УСКОРЕННЫЙ МЕТОД ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИЙ И МИКРОМИЦЕТОВ В ГЕМОКУЛЬТУРАХ У ДЕТЕЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

В.Н. Чеботкевич¹, Э.А. Мартенс², С.В. Сидоренко², Е.Е. Киселева¹, С.С. Бессмельцев¹

¹Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии, Санкт-Петербург, Россия

²Детский научно-клинический центр инфекционных болезней, Санкт-Петербург, Россия

Accelerated method of identification of bacteria and micromycetes in hemocultures in children using multiplex PCR in real time

V.N. Chebotkevich¹, E.A. Martens², S.V. Sidorenko², E.E. Kiseleva¹, S.S. Bessmeltsev¹

¹Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, Saint-Petersburg, Russia

²Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, Saint-Petersburg, Russia

Резюме

Цель: оценить эффективность и клиническую значимость ускоренного метода идентификации микроорганизмов в гемокультурах у детей с использованием мультиплексной ПЦР в режиме реального времени.

Материалы и методы: всего было исследовано 72 образца крови, полученных от 62 детей в возрасте от 3 месяцев до 16 лет. Идентификацию выделенных культур проводили с помощью ПЦР в реальном времени, а также с использованием классических культуральных микробиологических методов.

Результаты: исходя из частоты выявления и клинической значимости патогенов, выделяемых от больных, была сформирована панель тест-систем для их идентификации с помощью ПЦР в реальном времени. Показано, что эффективность метода идентификации бактерий и микромицетов с помощью ПЦР в реальном времени по сравнению с микробиологическим методом составила 86,7%. Установлено значительное сокращение времени идентификации возбудителей (с 48 ч до 5–7 ч). Кроме того, использование данного метода позволяет в эти же сроки выявлять ряд генов антибиотикорезистентности (в частности, гены приобретенных карбапенемаз и метициллин-резистентности стафилококков).

Заключение: разработанный метод идентификации микроорганизмов в крови с использованием ПЦР в реальном времени показал свою эффективность, клиническую значимость и возможность использования при оказании медицинской помощи педиатрическим пациентам. Его применение значительно сокращает сроки получения результатов и, таким образом, позволяет начать своевременную этиотропную терапию.

Ключевые слова: инфекции кровотока, ПЦР, ПЦР-РВ, педиатрические пациенты, дети.

Abstract

Objective: To evaluate the effectiveness and clinical significance of an accelerated method for the identification of microorganisms in blood cultures in children using real-time multiplex PCR.

Materials and methods: A total of 72 blood samples were obtained from 62 children aged 3 months to 16 years. The identification of the isolated cultures, according to the proposed method, was carried out in real-time PCR and also using classical culture microbiological methods.

Results: Based on the frequency of detection and the clinical significance of pathogens isolated from children, a panel of test systems was formed to identify them by means of real-time PCR. It was shown that the effectiveness of the developed method for identification of bacteria and micromycetes by real-time PCR was 86,7% as compared with the microbiological method. A significant reduction in the time of identification of pathogens (from 48 hours to 5–7 hours) was demonstrated. In addition, the use of this method allows, at the same time, to identify a number of antibiotic resistance genes (in particular, the genes of acquired carbapenemases and methicillin-resistant staphylococci).

Conclusion: The developed method with real-time PCR for detecting and identifying microorganisms in the blood has shown its effectiveness, clinical significance and the possibility of using it for pediatric patients. Its use significantly shortens the time frame for obtaining results and, thus, allows timely initiation of etiotropic therapy.

Key words: blood flow infections, PCR, PCR-RT, children

Введение

Инфекции кровотока являются тяжелыми и опасными осложнениями у взрослых пациентов и детей. Так, смертность пациентов с сепсисом в педиатрических отделениях интенсивной терапии США составляет 26,4% [1]. Особое значение в современных условиях имеет проблема менингитов у детей. Так, частота гнойного менингита (ГМ) в Санкт-Петербурге составляет в среднем 5,9 на 100 тыс. детского населения в год. Общая летальность от ГМ при тяжелом течении у детей раннего возраста может достигать 45% [2]. Основными возбудителями ГМ у детей в возрасте от 1 – 3 месяцев до 5 лет являются *Escherichia coli*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, а также *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae*. У детей старше 5 лет и взрослых подавляющее число менингитов обусловлено *Neisseria meningitidis* и *Streptococcus pneumoniae* [2].

Особое значение имеет ранняя этиологическая диагностика генерализованных инфекций, поскольку отсроченное начало этиотропного лечения ассоциируется с повышенной смертностью и неблагоприятными исходами, в частности при ГМ [3]. Поэтому крайне актуальной является разработка ускоренных методов диагностики инфекций. Внедрение автоматических анализаторов позволило сократить время появления роста гемокультуры. Однако длительность процедуры идентификации выделенных гемокультур и определения чувствительности к антибиотикам существенно ограничивает ценность микробиологического культурального метода.

В последние годы активно идет поиск молекулярных методов, позволяющих осуществлять прямую детекцию и идентификацию возбудителей в клиническом материале, а также молекулярных методов ускоренного анализа гемокультур. Разрабатываются методики и наборы реагентов для выявления ряда возбудителей инфекций кровеносного русла, а также выявления генетических маркеров антибиотикорезистентности.

Цель исследования – оценить эффективность и клиническую значимость ускоренного метода идентификации микроорганизмов в гемокультурах у детей с использованием мультиплексной ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ).

Материалы и методы

Всего было исследовано 72 положительных образца крови, полученных от 62 детей в возрасте от 3 месяцев до 16 лет. Образцы отбирались в отделении реанимации на первые сутки, при поступлении в отделение, во флаконы VacT/ALERT в соответствии

с инструкцией производителя. Основную группу обследованных больных составляли пациенты с инфекциями центральной нервной системы (энцефалит, менингоэнцефалит), инфекциями дыхательных путей (бронхиты, бронхиолиты, обструктивный бронхит, пневмония) и кишечными инфекциями (гастроэнтерит, энтероколит, энтерит).

Культивирование посевов крови осуществляли в автоматическом анализаторе «VacT/ALERT®3D» (BioMerieux, Франция). Фенотипическую идентификацию выделенных микроорганизмов проводили стандартными методами в соответствии с действующей документацией [4]. Параллельно с фенотипической идентификацией проводили идентификацию положительных гемокультур с помощью метода мультиплексной ПЦР в реальном времени. Была проанализирована частота выявления и клиническая значимость микробов и микромицетов, выделяемых от детей. На основании этих данных для их идентификации была сформирована панель из тест-систем отечественного производителя (ООО «ИнтерЛабСервис»). Панель включает наборы для выявления следующих микроорганизмов: бактерии семейства Enterobacteriaceae, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Enterococcus spp.* (выявление до уровня рода); *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*; а также грибы рода *Candida* (*C.albicans*, *C.glabrata*, *C.krusei*, *C.parapsilosis*, *C.tropicalis*). Также в панель включены наборы для выявления генов антибиотикорезистентности: выявление ДНК метициллин-чувствительного и метициллин-резистентного *Staphylococcus aureus*, а также метициллин-резистентных коагулазонегативных *Staphylococcus spp.*, выявление генов приобретенных карбапенемаз класса металло-β-лактамаз (групп VIM, IMP, NDM), выявление генов приобретенных карбапенемаз групп KPC и OXA-48-подобных. Часть наборов сертифицирована и коммерчески доступна, а часть находится на стадии сертификации.

Выделение бактериальной ДНК из гемокультуры проводили набором для экстракции нуклеиновых кислот «ДНК-сорб-АМ» (ООО «ИнтерЛабСервис», ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Россия) в модификации (добавлено предварительное центрифугирование образца для получения рабочего осадка; лизис клеток проводится без присутствия сорбента; увеличен до 200 мкл объем ТЕ-буфера, добавляемого при растворении ДНК) [5].

Результаты и обсуждение

Использование автоматических гемокультураторов позволило значительно сократить время проведения микробиологического анализа и устанавливать бактериемию даже на фоне интенсивной антибактериальной терапии (за счет сорбента антибиотиков в питательной среде). Уже на первые

сутки удавалось выделять этиологически значимые микроорганизмы, а также грибы рода *Candida*. Появление роста спустя 2 суток и позднее, как правило, указывало на контаминацию, что соответствует мнению других исследователей по этому вопросу [6]. Учитывая, что клинически значимые изоляты давали рост в автоматическом анализаторе в течение первых суток, а идентификация микроорганизмов с помощью ПЦР – РВ занимает 5 – 7 ч, результат анализа может быть получен в течение 24 – 36 ч, в то время как использование классического микробиологического метода (фенотипическая диагностика) занимает около 48 ч и результат анализа может быть получен не ранее чем через 72 ч. Кроме того, использование ПЦР-РВ позволяет в эти же сроки выявлять ряд генов антибиотикорезистентности (в частности, гены приобретенных карбапенемаз и метициллин-резистентности стафилококков).

Результаты параллельного исследования гемокультур микробиологическим и методом ПЦР-РВ представлены в таблице 1.

Таблица 1

Результаты параллельного исследования проб, полученных от пациентов Детского научно-клинического центра инфекционных болезней микробиологическим и молекулярным методами

Микробиологический метод (n = 72)	ПЦР-РВ (n = 72)
<i>S.epidermidis</i> – 33	MRCoNS – 26 MSCoNS – 7
<i>S.hominis</i> – 8	MRCoNS – 6 MSCoNS – 2
<i>S.hominis</i> + <i>C.albicans</i> – 1	MSCoNS + <i>C. albicans</i> – 1
<i>S.haemolyticus</i> – 2	MRSA – 1 MRCoNS – 1
<i>S.aureus</i> + <i>C.consensus</i> – 2	MRSA – 2, а <i>C.consensus</i> – Не определен
<i>S.parasanguinis</i> – 1	<i>Streptococcus</i> spp. – 1
<i>S.salivarius</i> – 1	<i>Streptococcus</i> spp – 1
<i>S.pneumoniae</i> – 1	<i>S.pneumoniae</i> – 1
<i>N.meningitidis</i> – 3	<i>N.meningitidis</i> – 3
<i>Haemophilus influenzae</i> – 1	<i>Haemophilus influenzae</i> – 1
<i>E.coli</i> – 2	<i>E.coli</i> – 2
<i>K.pneumoniae</i> – 5	<i>K.pneumoniae</i> – 5
<i>E.faecium</i> – 1	<i>Enterococcus</i> spp. – 1
<i>E.faecalis</i> – 3	<i>Enterococcus</i> spp. – 3
<i>Trucella otitidis</i> – 1	Не определен
<i>M.luteus</i> – 1	Не определен
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> – 2	Не определен
<i>A.baumannii</i> – 1	<i>A.baumannii</i> – 1
<i>A.nosocomialis</i> – 2	Не определен
<i>Candida (Clavyspora) lusitaniae</i> – 1	Не определен

Чаще всего микробиологическим методом были выявлены коагулазонегативные стафилококки (КНС): *Staphylococcus epidermidis* – 33, *Staphylococcus hominis* – 9, *Staphylococcus haemolyticus* – 2. В двух посевах выявлен *Staphylococcus aureus*. Методом ПЦР-РВ было выявлено 34 метициллин-резистентных КНС (MRCoNS), 10 метициллин-чувствительных КНС (MSCoNS) и в 3 случаях – метициллин-резистентный *Staphylococcus aureus* (MRSA).

Несовпадение микробиологического и ПЦР-РВ результатов отмечено только в одном случае (*Staphylococcus haemolyticus* и MRSA соответственно). Надо отметить, что ранее мы также встречались с подобным результатом [7]. В указанном исследовании бактериологическим методом был определен *Staphylococcus epidermidis*, а методом ПЦР-РВ – MSSA (метициллин-чувствительный *Staphylococcus aureus*), данный образец был секвенирован по гену 16S рРНК и идентифицирован как *Staphylococcus aureus*.

Совпадение результатов фенотипической и молекулярной видовой идентификации установлено в отношении основных инфекционных агентов: *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* и *Candida albicans*. Касательно *Enterococcus* spp. ПЦР-РВ позволяет проводить идентификацию только до уровня рода. Из трех штаммов бактерий рода *Acinetobacter* идентифицировали один – *Acinetobacter baumannii*, поскольку только он входит в предлагаемую панель. Отрицательный результат для всех использованных наборов получен для посевов, идентифицированных фенотипически как *Micrococcus luteus*, *Trucella otitidis*, *Candida lusitaniae*. *Micrococcus* spp. не входит в панель ПЦР-РВ, так как микрококки – представители нормальной микрофлоры кожи и часто являются контаминантами образцов крови [8]. В то же время надо отметить, что КНС также часто являются контаминантами, однако могут вызывать тяжелые случаи сепсиса у иммуносупрессированных онкогематологических больных [9]. Метициллин-резистентные КНС широко распространены в ОРИТ и поэтому представляют опасность в первую очередь для иммунокомпрометированных пациентов [10]. *Trucella otitidis* и *Candida lusitaniae* циркулируют в крови крайне редко и не входят ни в одну из коммерчески доступных тест-систем.

Сравнение результатов, полученных с помощью молекулярного и микробиологического методов, представлено в таблице 2.

Таблица 2

**Микроорганизмы, выявленные
микробиологическим и молекулярным методами
в 72 пробах, полученных от пациентов Детского
научно-клинического центра инфекционных
болезней**

Микроорганизм	Микробиологический метод	Молекулярный метод
KNC	44	43
Staphylococcus aureus	2	2
Campylobacter consicus	2	0
Candida albicans	1	1
Candida (Clavyspora) lusitanae	1	0
Streptococcus spp.	3	3
Neisseria meningitidis	3	3
Haemophilus influenzae	1	1
Escherichia coli	2	2
Klebsiella pneumoniae	5	5
Enterococcus spp.	4	4
Trucella otitidis	1	0
M.luteus	1	0
Stenotrophomonas maltophilia	2	0
Acinetobacter spp.	3	1
Итого	75	65

Показано, что результаты выявления микроорганизмов молекулярно-биологическим и микробиологическим методами статистически не отличаются. Сравнение методов было проведено с использованием точного критерия Фишера в программе R (p -value = 0.9855; двусторонний тест).

Ограничением используемой панели является отсутствие тест-системы для выявления с помощью ПЦР-РВ *Stenotrophomonas maltophilia*. Данный микроорганизм рассматривается сейчас как возбудитель нозокомиальных инфекций, как у взрослых, так и у детей [11], и должен быть включен в панель используемых тест-систем.

В двух случаях микробиологическими методами были выделены смешанные культуры — *Staphylococcus hominis* + *Candida albicans* и *Staphylococcus aureus* + *Campylobacter consicus*. В первом случае результаты микробиологического и ПЦР-РВ методов совпадали, а во втором — совпадение в идентификации только *Staphylococcus aureus*. *Campylobacter consicus* был выявлен в нашем исследовании дважды у одного и того же пациента, в обоих эпизодах в ассоциации со *Staphylococcus aureus*. Показано, что микроорганизмы рода *Campylobacter* играют важную роль в этиологии бактериальных кишечных инфекций у детей. Для выявления возбудителя в фекалиях в

качестве экспресс-метода рекомендуется использовать метод ПЦР, позволяющий своевременно проводить адекватную этиотропную терапию [12].

Таким образом, удалось установить коррдантность результатов микробиологического и молекулярно-биологического методов для 65 из 75 выделенных патогенов. Принимая эффективность культурального метода за 100%, эффективность разработанного метода составила 86,7%.

Инфекции кровотока являются тяжелыми осложнениями многих заболеваний, как у взрослых, так и у детей, и требуют быстрой диагностики и безотлагательного этиотропного лечения. У детей наибольшую опасность представляют генерализованные формы менингококковой инфекции, которые наблюдаются у детей до 14 лет в 10 раз чаще, а у детей до 4 лет — в 22 раза чаще, чем у взрослых [13]. По результатам многолетнего микробиологического мониторинга этиологии бактериальных гнойных менингитов у детей в Санкт-Петербурге установлено, что *Neisseria meningitidis* обнаруживается в 50–70% случаев, *Haemophilus influenzae* в 17,1–37,2% и *Streptococcus pneumoniae* в 7,1–22,9% [14]. Дифференцировка этих возбудителей может быть осуществлена с помощью предлагаемого метода ПЦР-РВ.

Грозным осложнением инфекции кровеносного русла является развитие сепсиса. Летальность от сепсиса высока. Kumar A. et al. [15] показали, что каждый час задержки адекватной терапии при тяжелом сепсисе и септическом шоке приводит к повышению летальности на 7,6%. Аналогичные результаты были получены и при сепсисе у детей [16]. Молекулярная идентификация возбудителей сепсиса в гемокультурах позволяет существенно сократить время получения результата за счет детекции микроорганизмов на ранней стадии культивирования при низкой концентрации возбудителей, а также за счет одновременной детекции филогенетических маркеров и генов антибиотикорезистентности.

Был разработан алгоритм диагностики сепсиса у иммуносупрессированных онкогематологических больных. Апробация методики показала ее эффективность для расшифровки этиологии сепсиса у пациентов крупного многопрофильного стационара [5]. При этом, наряду с диагностикой инфекций кровеносного русла, проводилось выявление вирусов группы герпеса (вируса простого герпеса 1,2 типов, цитомегаловируса, вируса герпеса человека 6 типа и вируса Эпштейна — Барр) в крови. Это позволило выявить клинически важные факты о развитии бактериемии и сепсиса у онкогематологических больных на фоне активации герпес-вирусной инфекции [9]. Велика роль вирусной инфекции и при тяжелом сепсисе у детей. По данным эпидемиологического исследования по

программе SPROUT (Sepsis Prevalence, Outcomes, and Therapies), охватывающей 128 педиатрических отделений интенсивной терапии в 26 странах мира, у 19% детей с тяжелым сепсисом, наряду с антибактериальной терапией, потребовалось противовирусное лечение [16]. Разработанная панель для выявления и идентификации микроорганизмов в крови показала свою эффективность и возможность использования для педиатрических пациентов.

Заключение

Разработанный метод позволяет идентифицировать бактерии и микромицеты в гемокультурах. Возможно расширение и быстрая корректировка панели детектируемых возбудителей и маркеров антибиотикорезистентности. Применение разработанного метода значительно сокращает сроки получения результатов и, таким образом, позволяет начать своевременную этиотропную терапию.

Литература

1. Ruth A. McCracken C.E., Fortenberry J.D. et al. Pediatric severe sepsis: current trends and outcomes from the Pediatric Health Information Systems database. *Pediatr. Crit. Care Med.* 2014 Nov; 15 (9): 828-838.
2. Скрипченко, Н.В. Нейроинфекции у детей в современных условиях / Н.В. Скрипченко [и др.] // Практическая медицина. — 2017. — №111 ('10). — С. 7—15.
3. Скрипченко, Н.В. Гнойные менингиты у детей : руководство для врачей / Н.В. Скрипченко, Ю.В. Лобзин, А.А. Вильниц. — СПб: СИНЭЛ, 2017. — 404 с.
4. Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений: приказ МЗ СССР № 535 от 22 апреля 1985 г. Ссылка активна на 31.08.2018 г. — <http://www.alppp.ru/law/zdravoohranenie--fizicheskaja-kultura-i-sport--turizm/zdravoohranenie/64/prikaz-minzdrava-sssr-ot-22-04-1985--535.html>
5. Киселева, Е.Е. Алгоритм выявления и видовой идентификации бактерий в крови с использованием ПЦР / Е.Е. Киселева // Вестник гематологии. — 2017. — Т. XIII, №1. — С. 19—24.
6. Багирова, Н.С. Бактериemia истинная и ложная: значение критериев оценки клинической значимости положительной гемокультуры / Н.С. Багирова // Клиническая Лабораторная Диагностика. — 2015. — Т. 60, № 8. — С. 55—61.
7. Матосова, С.В. Апробация методики на основе ПЦР в режиме реального времени для расшифровки этиологии септических состояний / С.В. Матосова [и др.] // Вестник гематологии. — 2014. — Т. X, № 4. — С. 39.
8. Hall K.K., Lyman J.A. Updated review of blood culture contamination. *Clin. Microbiol. Rev.* 2006; 19 (4): 788-802.
9. Chebotkevich, V.N., Bessmeltsev S.S., Kiseleva E.E. et al. Bloodstream infections and herpesvirus activation following intensive chemotherapy of adult oncohematological patients. *Cellular Therapy and Transplantation.* 2016; 5 (4(17)): 21-31.
10. Widerström M., Wiström J., Edebro H. et al. Colonization of patients, healthcare workers, and the environment with healthcare-associated *Staphylococcus epidermidis* genotypes in an intensive care unit: a prospective observational cohort study. *BMC Infect. Dis.* 2016; 16: 743.

11. Nayyar C., Thakur P., Tak V., Saigal K. *Stenotrophomonas maltophilia*: An Emerging Pathogen in Paediatric Population. *Journal of Clinical and Diagnostic Research.* 2017; 11 (1): 8-11.
12. Лачкова, Л.В. Клинико-патогенетические особенности и тактика терапии кампилобактериоза у детей : автореф. дис. ... канд. мед. наук (14.00.10) / Л.В. Лачкова; НИИ-ДИ. — СПб, 2006. — 24 с
13. Менингококковая инфекция и гнойные бактериальные менингиты в Российской Федерации. Информационно-аналитический обзор. Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора РФ 2016.
14. Кветная, А.С. Стратегия микробиологической диагностики бактериальных гнойных менингитов / А.С. Кветная, Л.И. Железова // Материалы 7-й Российско-итальянской конф. «Актуальные вопросы социально значимых вирусных инфекций». — Великий Новгород, 2009. — С. 68—72.
15. Kumar A., Roberts D., Wood E.K. et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit. Care Med.* 2006; 34 (6): 1589-1596.
16. Weiss S.L., Fitzgerald J.C., Pappachan J. et al. Global Epidemiology of Pediatric Severe Sepsis: The Sepsis Prevalence, Outcomes, and Therapies Study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2015; 191 (10): 1147—1157.

References

1. Ruth A. McCracken C.E., Fortenberry J.D. et al. Pediatric severe sepsis: current trends and outcomes from the Pediatric Health Information Systems database. *Pediatr. Crit. Care Med.* 2014 Nov; 15 (9): 828-838.
2. Skripchenko N.V., Vil'nic A.A., Skripchenko E.Ju. [et al.] *Nejroinfekcii u detej v sovremennyh uslovijah. Prakticheskaja medicina.* 2017; ('10 (111): 7-15 (In Russian).
3. Skripchenko N.V., Lobzin Ju.V., Vil'nic A.A. *Gnojnye meningity u detej. Rukovodstvo dlja vrachej.* SPb: SINJeL, 2017: 404 p. (In Russian).
4. Ob unifikacii mikrobiologicheskikh (bakteriologicheskikh) metodov issledovaniya, primenyaemyh v kliniko-diagnosticheskikh laboratoriyah lechebno-profilakticheskikh uchrezhdenij: prikaz MZ SSSR № 535 ot 22 aprelya 1985 g. — <http://www.alppp.ru/law/zdravoohranenie--fizicheskaja-kultura-i-sport--turizm/zdravoohranenie/64/prikaz-minzdrava-sssr-ot-22-04-1985--535.html> (In Russian).
5. Kiseleva E.E. Algoritm vyyavleniya i vidovoj identifikacii bakterij v krovi s ispol'zovaniem PCR. *Vestnik gematologii.* 2017; XIII (1): 19-24 (In Russian).
6. Bagirova N.S. *Bakteriemiya istinnaya i lozhnaya: znachenie kriteriev ocenki klinicheskoy znachimosti polozhitel'noj gemokul'tury.* *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika.* 2015; 60 (8): 55-61 (In Russian).
7. Matosova S.V., Savochkina Y.A., Gavrillov S.N. et al. *Aprobaciya metodiki na osnove PCR v rezhime real'nogo vremeni dlya rasshifrovki ehtiologii septicheskikh sostoyanij.* *Vestnik gematologii.* 2014; X (4): 39 (In Russian).
8. Hall K.K., Lyman J.A. Updated review of blood culture contamination. *Clin. Microbiol. Rev.* 2006; 19 (4): 788-802.
9. Chebotkevich, V.N., Bessmeltsev S.S., Kiseleva E.E. et al. *Bloodstream infections and herpesvirus activation following intensive chemotherapy of adult oncohematological patients.* *Cellular Therapy and Transplantation.* 2016; 5 (4(17)): 21-31.
10. Widerström M., Wiström J., Edebro H. et al. Colonization of patients, healthcare workers, and the environment with healthcare-associated *Staphylococcus epidermidis* genotypes in an intensive care unit: a prospective observational cohort study. *BMC Infect. Dis.* 2016; 16: 743.

11. Nayyar C., Thakur P., Tak V., Saigal K. Stenotrophomonas maltophilia: An Emerging Pathogen in Paediatric Population. Journal of Clinical and Diagnostic Research. 2017; 11 (1): 8-11.
12. Lachkova L.V. Kliniko-patogeneticheskie osobennosti i taktika terapii kampilobakterioza u detej: avtoref.dis. ... kand. med. nauk (14.00.10). NIIDI.SPb, 2006: 24 p. (In Russian).
13. Meningokokkovaya infekciya i gnojnye bakterial'nye meningity v Rossijskoj Federacii. Informacionno-analiticheskij obzor. Central'nyj NII ehpidemiologii Rospotrebnadzora RF 2016.
14. Kvetnaya A.S., Zhelezova L.I. Strategiya mikrobiologicheskoy diagnostiki bakterial'nyh gnojnyh meningitov. Materialy 7-oj Rossijsko-ital'yanskoj konf. "Aktual'nye voprosy social'no znachimyh virusnyh infekcij". Velikij Novgorod, 2009: 68-72 (In Russian).
15. Kumar A., Roberts D., Wood E.K. et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. Crit. Care Med. 2006; 34 (6): 1589-1596.
16. Weiss S.L., Fitzgerald J.C., Pappachan J. et al. Global Epidemiology of Pediatric Severe Sepsis: The Sepsis Preva-

Авторский коллектив:

Чеботкевич Виталий Николаевич — руководитель лаборатории бактериологии Российского научно-исследовательского института гематологии и трансфузиологии, д.м.н., профессор; тел.: 8(812)717-29-58, e-mail: vitnikcheb@mail.ru

Мартенс Эльвира Акрамовна — заведующая лабораторией медицинской микробиологии Детского научно-клинического центра инфекционных болезней; тел.: 8(812)234-36-73, e-mail: eamartens@yandex.ru

Сигоренко Сергей Владимирович — руководитель отдела молекулярной микробиологии и эпидемиологии Детского научно-клинического центра инфекционных болезней, д.м.н., профессор; тел.: 8(812)347-49-13, e-mail: sidorserg@gmail.com

Киселева Екатерина Евгеньевна — младший научный сотрудник лаборатории бактериологии Российского научно-исследовательского института гематологии и трансфузиологии, к.б.н.; тел.: 8(812)717-29-58; e-mail: venefika989@gmail.com

Бессмельцев Станислав Семенович — заместитель директора по научной работе Российского научно-исследовательского института гематологии и трансфузиологии, д.м.н., профессор; тел.: 8(812)717-67-80; e-mail: bsshem@hotmail.com