DOI: 10.32364/2618-8430-2021-4-1-90-97

Колонизация слизистой оболочки прямой кишки микроорганизмами с маркерами резистентности у детей с онкогематологическими заболеваниями

Л.Г. Боронина[1,2], Е.В. Саматова[2], М.П. Кукушкина[2], С.А. Панова[2], С.С. Устюгова[2], А.Г. Асновская[2]

[1]ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России, Екатеринбург, Россия
[2]ГАУЗ СО «ОДК», Екатеринбург, Россия

РЕЗЮМЕ

Введение: *одной из важных проблем современной медицины являются неуклонный рост числа инфекционных заболеваний, вызванных резистентными штаммами микроорганизмов, и снижение эффективности антимикробных препаратов, используемых для их лечения.*

Цель исследования: *изучить колонизацию слизистой оболочки кишечника представителями порядка Enterobacterales с продукцией β-лактамаз расширенного спектра (ESBL), устойчивыми к карбапенемам, Pseudomonas aeruginosa, устойчивыми к карбапенемам, и ванкомицин-резистентными Enterococcus фенотипическими и молекулярно-генетическими методами.*

Материал и методы: *исследование проведено в период с 10 декабря 2019 г. по 30 марта 2020 г. Проанализировано 150 проб (131 проба с фекалиями на условно-патогенную микрофлору, 19 — мазки со слизистой оболочки прямой кишки) от 66 пациентов, находившихся на лечении в онкогематологическом центре. Все образцы засевали на хромогенные селективные среды.*

Результаты исследования: *всего выделено 67 штаммов представителей порядка Enterobacterales, 71 изолят энтерококков и 7 изолятов P. aeruginosa. Колонизация кишечного тракта энтеробактериями с продукцией ESBL выявлена у 17 (25,8%) пациентов. Доминирующими представителями были E. coli (44,8% — 13 штаммов) и K. pneumoniae (34,5% — 10 штаммов). У 5 (7,6%) детей выделены одновременно два и более штаммов, продуцирующих ESBL: E. coli + K. pneumoniae (n=2); E. coli + E. cloacae (n=2); E. coli + K. pneumoniae + E. cloacae (n=1). Колонизация кишечного тракта ванкомицин-резистентными энтерококками выявлена у 18 (27,3%) пациентов, преимущественно выделялся E. faecium. У 9 (13,6%) пациентов обнаруживались ванкомицин-резистентный энтерококк и энтеробактерия с продукцией ESBL. Штаммы с фенотипом множественной резистентности к антимикробным препаратам выделены среди E. coli (n=1), K. pneumoniae (n=3), P. aeruginosa (n=1).*

Заключение: *по результатам проведенного исследования колонизация одним микроорганизмом с маркерами резистентности определялась у каждого 4-го (25,8–27,3%) пациента, двумя микроорганизмами — почти у каждого 7-го (13,6%). Среди энтеробактерий преобладали E. coli и K. pneumoniae, среди энтерококков — E. faecium. Хромогенные агары предназначены для исследования образцов от больных, и при их использовании заключение о наличии микроорганизмов с соответствующим маркером резистентности может быть выдано уже через 24 ч от момента поступления образцов в лабораторию.*

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: *мониторинг, колонизация, маркер резистентности, микроорганизмы, дети, онкогематологические заболевания.*

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ: *Боронина Л.Г., Саматова Е.В., Кукушкина М.П. и др. Колонизация слизистой оболочки прямой кишки микроорганизмами с маркерами резистентности у детей с онкогематологическими заболеваниями. РМЖ. Мать и дитя. 2021;4(1):90–97. DOI: 10.32364/2618-8430-2021-4-1-90-97.*

Colonization of rectal mucosa by microbes with antibiotic resistance markers in children with hematological malignancies

L.G. Boronina[1,2], E.V. Samatova[2], M.P. Kukushkina[2], S.A. Panova[2], S.S. Ustyugova[2], A.G. Asnovskaya[2]

[1]Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russian Federation
[2]Regional Children's Clinical Hospital, Yekaterinburg, Russian Federation

ABSTRACT

Background: *the steadily increasing occurrence of the infections caused by antibiotic-resistant germs and the reduction in the efficacy of antimicrobials is one of the important issues of modern medicine.*

Aim: *to study the colonization of rectal mucosa by extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) — producing carbapenem-resistant Enterobacterales, carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa, and vancomycin-resistant Enterococci using phenotypic methods and gene tests.*

Patients and Methods: *this study was performed from December 10, 2019, to March 30, 2020. 150 samples (131 fecal specimens and 19 rectal swabs) collected from 66 patients who were admitted to the Hematological Center were examined. All samples were inoculated into selective chromogenic media.*

Results: *67 strains of Enterobacterales, 71 Enterococci, and 7 P. aeruginosa were isolated. Rectal colonization by ESBL-producing Enterobacterales was identified in 17 patients (25.8%). E. coli (13 strains, 44,8%) and K. pneumoniae (10 strains, 34,5%) prevailed.*

In 5 children, two or more ESBL-producing strains were isolated, i.e., E. coli plus K. pneumoniae (n=2), E. coli plus E. cloacae (n=2), and E. coli plus K. pneumoniae plus E. cloacae (n=1). The colonization by vancomycin-resistant Enterococci (predominantly E. faecium) was identified in 18 patients (27.3%). Vancomycin-resistant Enterococci plus ESBL-producing Enterobacterales were isolated in 9 patients (13.6%). Multidrug-resistant strains were isolated among E. coli (n=1), K. pneumoniae (n=3), and P. aeruginosa (n=1).

Conclusions: *our findings demonstrate that the colonization by one and two antibiotic-resistant microbe was seen in every forth patient (25.8–27.3%) and every seventh patient (13.6%), respectively. E. coli and K. pneumoniae prevailed among Enterobacterales and E. faecium prevailed among Enterococci. Chromogenic agars are designed to examine the specimens collected from patients. Antibiotic-resistant microbes may be identified 24 hours after receiving specimen at a laboratory when using these media.*

KEYWORDS: *monitoring, colonization, resistance marker, microorganisms, children, hematological malignancies.*

FOR CITATION: *Boronina L.G., Samatova E.V., Kukushkina M.P. et al. Colonization of rectal mucosa by microbes with antibiotic resistance markers in children with hematological malignancies. Russian Journal of Woman and Child Health. 2021;4(1):90–97. DOI: 10.32364/2618-8430-2021-4-1-90-97.*

Введение

Одной из важных проблем современной медицины являются неуклонный рост числа инфекционных заболеваний, вызванных резистентными штаммами микроорганизмов, и снижение эффективности антимикробных препаратов, используемых для их лечения. Развитие резистентности к антимикробным препаратам у возбудителей заболеваний требует использования альтернативных, нередко менее безопасных и эффективных антимикробных препаратов, что снижает качество оказания медицинской помощи. Мониторинг чувствительности/устойчивости штаммов в популяции бактерий, определенной одним из регламентированных методов (диско-диффузионным методом, определением минимальной подавляющей концентрации в различных вариантах), является важнейшим элементом медицинской практики. Инфекции, вызываемые полирезистентными бактериями и связанные с оказанием медицинской помощи, признаны глобальной проблемой. Результаты исследований, проведенных в Российской Федерации в последние годы, показали, что в этиологической структуре инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, к ведущим возбудителям относятся *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumanii*, а также *Enterococcus faecalis* и *Enterococcus faecium* [1]. Перечисленные микроорганизмы находятся под пристальным вниманием Европейской системы надзора за антибиотикорезистентностью (EARS-Net). К наиболее проблемным возбудителям с позиций выбора адекватной терапии относят: метициллинорезистентные штаммы *S. aureus*; устойчивые к цефалоспоринам расширенного спектра и карбапенемам штаммы *K. pneumoniae* и *E. coli*; резистентные к карбапенемам штаммы *P. aeruginosa* и *A. baumannii*; устойчивые к ванкомицину штаммы *E. faecalis* и *E. faecium*.

Изучение механизмов резистентности микроорганизмов к антимикробным препаратам может проводиться с использованием как фенотипических (хромогенные среды, определение чувствительности к конкретным антимикробным препаратам диско-диффузионным методом или определение минимальной подавляющей концентрации в различных вариантах), так и молекулярно-генетических (детекция генов, ответственных за конкретные механизмы резистентности) методов [2].

С одной стороны, энтеробактерии являются представителями нормальной микрофлоры кишечника человека, с другой — могут быть возбудителями тяжелых как внебольничных, так и внутрибольничных инфекций. Бактерии, входящие в порядок *Enterobacterales*, колонизирующие кишечник, являются носителями генов как природной, так и приобретенной антибиотикорезистентности, которые могут передаваться от резистентных штаммов к чувствительным [3]. Частота обнаружения энтеробактерий с продукцией β-лактамаз расширенного спектра (Extended-spectrum beta-lactamase, ESBL) превышает 50% в большинстве стран мира [4]. Другими представителями нормальной микрофлоры кишечника являются энтерококки, которые становятся опасными при приобретении генов, ответственных за резистентность к ванкомицину. Колонизация слизистой оболочки кишечника ванкомицин-резистентными энтерококками (VRE) может сохраняться длительное время, от нескольких месяцев до нескольких лет [5].

Современные программы химиотерапии позволяют достичь высокой общей выживаемости у онкогематологических больных, но при этом увеличивается риск тяжелых инфекционных осложнений, частота которых достигает 80–90%. К данным осложнениям относится бактериемия, зачастую вызванная бактериями, обладающими каким-либо механизмом (маркером) резистентности: у энтеробактерий с высокой частотой встречаются изоляты, продуценты ESBL (43%), а у энтерококков — ванкомицин-резистентные штаммы (9%) [5–7].

В развитии инфекционных осложнений у больных, в первую очередь онкогематологических, преобладает эндогенный путь инфицирования, при котором бактерии со слизистой оболочки кишечника проникают в кровоток. В связи с этим микробиологический мониторинг слизистой оболочки кишечника у онкогематологических больных является неотъемлемой частью системы инфекционного контроля, позволяющей следить за циркуляцией возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, изменениями в их структуре, тенденциями развития устойчивости к антимикробным препаратам.

Цель исследования: изучить колонизацию слизистой оболочки кишечника представителями порядка *Enterobacterales* с продукцией ESBL, устойчивыми к карбапенемам, *Pseudomonas aeruginosa*, устойчивыми к карбапенемам, и ванкомицин-резистентными *Enterococcus* фенотипическими и молекулярно-генетическими методами.

Материал и методы

Исследование проведено в период с 10 декабря 2019 г. по 30 марта 2020 г. Проанализировано 150 проб (131 проба с фекалиями на условно-патогенную микрофлору, 19 — мазки со слизистой оболочки прямой кишки) от 66 паци-

ентов, находившихся на лечении в онкогематологическом центре ГАУЗ СО «ОДКБ». В исследование были включены дети в возрасте от 3 мес. до 16 лет (до года — 7 детей, от года до 7 лет — 26, от 7 лет до 10 лет — 14, от 11 лет до 16 лет — 19) с диагнозами: острый лимфобластный лейкоз (n=17), нейробластома (n=6), острый миелоидный лейкоз (n=4), апластическая анемия (n=5), острый лейкоз (n=4), остеосаркома Юинга (n=3), гистиоцитоз (n=3), прочие (n=24). Соотношение мальчиков (n=27) и девочек (n=39) 1:1,4. Пациенты находились в отделении анестезиологии, реанимации и трансплантологии костного мозга (n=18), отделениях детской онкологии № 1 (n=8) и № 2 (n=18), детской онкологии и гематологии (n=13), и 9 пациентов переходили в реанимацию или, наоборот, из реанимации с учетом их состояния. Кратность обследования пациентов следующая: 1 проба — 35 пациентов; 2 пробы — 14; 3 пробы — 4; 4 пробы — 5; 5 проб — 5; 6, 7 и 15 проб — по одному пациенту.

Материал забирали и транспортировали в соответствии с методическими указаниями МУ 4.2.2039–05 [8].

Все пробы засевали на хромогенные селективные среды: «CHROMagar™ ESBL», «CHROMagar™ KPC», «CHROMagar™ VRE» (CHROMagar, Франция), затем инкубировали в термостате при температуре 36 °С в течение 18–24 ч. Среда «CHROMagar™ ESBL» предназначена для прямого выделения энтеробактерий с продукцией ESBL, «CHROMagar™ KPC» — для прямого обнаружения резистентных к карбапенемам грамотрицательных бактерий, «CHROMagar™ VRE» — для выявления и идентификации ванкомицин-резистентных штаммов *Enterococcus* (*E. faecalis*, *E. faecium*). Посев фекалий на условно-патогенную микрофлору проводили на среды Плоскирева, Эндо, Сабуро, желточно-солевой агар, 5% кровяной агар, висмут-сульфит агар (после 24-часового накопления на магниевой среде). Мазки со слизистой оболочки прямой кишки исследовали на среде Эндо. Идентификацию микроорганизмов проводили классическим бактериологическим методом, а также на полуавтоматическом анализаторе «ATB Expression» (bioMerieux, Франция) и автоматическом анализаторе «Phoenix M50» (Becton Dickinson, США).

Продукцию ESBL у энтеробактерий, полученных на хромогенной селективной среде «CHROMagar™ ESBL», подтверждали методом «двойных дисков». Резистентность к карбапенемам у грамотрицательных бактерий, и в частности у *K. pneumoniae,* продуцирующей карбапенемазы (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase — KPC), полученных на хромогенной селективной среде «CHROMagar™ KPC», доказывали определением резистентности к соответствующим карбапенемам диско-диффузионным методом. Резистентность к ванкомицину у энтерококков, полученных на хромогенной селективной среде «CHROMagar™ VRE», подтверждали определением резистентности к ванкомицину диско-диффузионным методом.

Постановку и оценку антибиотикочувствительности диско-диффузионным методом проводили на агаре Мюллера — Хинтона (Sifin diagnostics with passion, Германия) в соответствии с действующей нормативной документацией [9, 10]. Для выявления штаммов с множественной лекарственной резистентностью все изоляты, дающие рост на хромогенных средах, тестировали также на чувствительность к другим классам антибиотиков (табл. 1). В связи с изменениями в интерпретации результатов определения зон задержки роста в клинических рекомендациях в версии 2018–03 [9] и рекомендациях EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) в версии 10.0, 2020 [10], которые внедрены с марта 2020 г., в таблице 1 указаны изменения в оценке результатов резистентности к антибиотикам.

Для выявления продукции карбапенемаз без их дифференциации у *P. aeruginosa* и представителей порядка *Enterobacterales* применяли фенотипический метод инактивации карбапенемов (Carbapenem Inactivation Method, CIM) [11].

Молекулярно-биологическая детекция генов, кодирующих карбапенемазы у штамма *Hafnia alvei*, осуществлялась методом мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени с использованием наборов реагентов «АмплиСенс® MDR MBL-FL» и «АмплиСенс® MDR KPC/OXA-48-FL» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия). Выявлялись гены, кодирующие приобретенные сериновые карбапенемазы групп KPC и OXA-48-подобных (OXA-48 и OXA-162) и металло-бета-лактамазы с карбапенемазной активностью групп VIM, IMP и NDM.

Результаты и обсуждение

Всего выделено 67 штаммов представителей порядка *Enterobacterales*, 71 изолят энтерококков и 7 изолятов *P. aeruginosa* (табл. 2).

За исследуемый период было обследовано 66 детей. У 17 пациентов роста энтеробактерий, энтерококков, *P. aeruginosa* не обнаружено. У 26 пациентов зарегистрирована колонизация кишечника одним или несколькими штаммами вышеперечисленных бактерий. У 9 пациентов при первых обследованиях роста не выявлено, затем имело место заселение кишечника: у 44,4% произошла колонизация нормофлорой, не обладающей изучаемыми механизмами резистентности (*E. faecalis*, *Enterococcus spp.*, *E. coli*), у 44,4% — резистентной флорой (*E. faecium*, *H. alvei*, *P. aeruginosa*), у 11,2% — при первоначальной колонизации нормофлорой из-за длительно проводимой терапии произошла смена на ванкомицин-резистентный *E. faecium*. У 6 пациентов при первичной колонизации кишечника преимущественно штаммами, не обладающими антибиотикорезистентностью, за исключением одного пациента с *E. coli* с продукцией ESBL, на фоне проводимой антибиотикотерапии рост данных микроорганизмов перестал обнаруживаться. У 6 пациентов произошла смена вида колонизирующего микроорганизма, на фоне постоянно выделяющегося ванкомицин-резистентного *E. faecium* или *E. coli* с продукцией ESBL менялись штаммы других видов энтеробактерий или энтерококков. У 2 пациентов внутри одного и того же чувствительного вида микроорганизма произошла селекция и колонизация резистентными штаммами: в первом случае место ванкомицин-чувствительного штамма *E. faecium* занял ванкомицин-резистентный, во втором — место карбапенем-чувствительного штамма *P. aeruginosa* занял резистентный штамм.

Пятнадцать пациентов на момент обследования не получали антибиотикотерапию, у них кишечник был колонизирован преимущественно штаммами без маркеров резистентности. Остальные пациенты получали минимум один антибиотик, схема применяемого лечения зависела от диагноза основного заболевания, тяжести и стадии болезни, а также наличия осложнений.

Таблица 1. Оценка пограничных зон подавления роста для интерпретации результатов определения чувствительности
Table 1. Assessment of growth inhibition zones to interpret the results of antibiotic susceptibility testing

Антибиотик Antibiotic	**Содержание антибиотика в диске, мкг** Concentration of antibiotic in the disc, μg	**Диаметр зоны, мм (согласно [9])** Diameter of zone, mm [9]		**Диаметр зоны, мм (согласно [10])** Diameter of zone, mm [10]	
		Ч≥ / S≥	***Р< / R<***	***Ч≥ / S≥***	***Р< / R<***
Представители порядка *Enterobacterales* / *Enterobacterales*					
Пенициллины с ингибиторами β-лактамаз: Penicillin plus β-lactamase inhibitors:					
амоксициллин-клавулановая кислота amoxicillin-clavulanic acid	20–10	19	19	19	19
пиперациллин-тазобактам piperacillin-tazobactam	30–6	20	17	20	17
Цефалоспорины: / Cephalosporins:					
цефотаксим / cefotaxime	5	20	17	20	17
цефтазидим / ceftazidime	10	22	19	22	19
Аминогликозиды: / Aminoglycosides:					
гентамицин / gentamycin	10	17	14	17	17
амикацин / amikacin	30	18	15	18	18
Карбапенемы: / Carbapenems:					
эртапенем / ertapenem	10	25	22	25	25
меропенем / meropenem	10	22	16	22	16
имипенем / imipenem	10	22	16	22	17
Фторхинолоны: / Fluoroquinolones:					
ципрофлоксацин / ciprofloxacin	5	26	24	25	22
P. aeruginosa					
Пенициллины с ингибиторами β-лактамаз: Penicillin plus β-lactamase inhibitors:					
пиперациллин-тазобактам Piperacillin-tazobactam	30–6	18	18	50	18
Цефалоспорины: / Cephalosporins:					
цефтазидим / Ceftazidime	10	17	17	50	17
Аминогликозиды: / Aminoglycosides:					
амикацин / amikacin	30	18	15	15	15
Карбапенемы: / Carbapenems:					
меропенем / meropenem	10	24	18	24	18
имипенем / imipenem	10	20	17	50	20
Фторхинолоны: / Fluoroquinolones:					
ципрофлоксацин / ciprofloxacin	5	26	26	50	26
Enterococcus spp.					
Пенициллины: / Penicillins:					
ампициллин / ampicillin	2	10	8	10	8
Аминогликозиды: / Aminoglycosides:					
гентамицин / gentamycin	30	8	8	8	8
стрептомицин / streptomycin	300	14	14	14	14
Фторхинолоны: / Fluoroquinolones:					
норфлоксацин / norfloxacin	10	12	12	12	12
Гликопептиды: / Glycopeptides:					
ванкомицин / vancomycin	5	12	12	12	12
Оксазолидиноны: / Oxazolidinones:					
линезолид / linezolid	10	19	19	20	20

Примечание. *Ч — чувствительные, Р — резистентные.* **Note.** *S, susceptible; R, resistant.*

Все штаммы порядка *Enterobacterales*, рода *Enterococcus* и *P. aeruginosa*, не дающие рост на соответствующих средах «CHROMagar™», не тестировались на чувствительность к антимикробным препаратам. При повторном выделении у пациентов изолятов микроорганизмов, дающих рост на средах «CHROMagar™», чувствительность к антибиотикам не определяли. Чувствительность энтеробактерий, энтерококков и синегнойной палочки к антимикробным препаратам представлена в таблицах 3–5.

E. coli типичная, с гемолитическими свойствами и лактозонегативная объединены в одну группу, так как интерпретация антибиотикочувствительности не зависит от морфологических и биохимических свойств кишечной палочки. У всех штаммов энтеробактерий, выросших

Таблица 2. Спектр видов энтеробактерий и энтерококков
Table 2. The spectrum of *Enterobacterales* and *Enterococcus spp.*

Вид микроорганизма Species	**Всего штаммов** Strains, in total	**Без механизмов резистентности / нормобиота / не давших рост на хромогенных средах** No mechanisms or resistance / normobiota / no growth onto chromogenic media	**Рост на средах «CHROMagar™»** Growth on CHROMagar™		
			ESBL	***KPC***	***VRE***
E. coli	25	16	9	0	–
***E. coli* гемолитическая** / Hemolytic *E. coli*	6	5	1	0	–
***E. coli* лактозонегативная** / Lactose-negative *E. coli*	7	3	4	0	–
K. pneumoniae	14	4	10	2	–
Klebsiella oxytoca	1	1	0	0	–
Morganella morganii	1	1	0	0	–
Enterobacter aerogenes	3	3	0	0	–
Enterobacter cloacae	7	3	4	0	–
Citrobacter koseri	1	0	1	0	–
Havnia alvei	2	–	2	0	–
Enterococcus spp.	30	26	–	–	4
E. faecalis	11	11	–	–	0
E. faecium	30	1	–	–	29
P. aeruginosa	7	4	–	3	–

Таблица 3. Распределение штаммов энтеробактерий по категории чувствительности
Table 3. Susceptibility of *Enterobacterales*

Антибиотик Antibiotic	***E. coli* (n=13)**			***K. pneumoniae* (n=6)**			***E. cloacae* (n=4)**		***C. koseri* (n=1)**		***H. alvei* (n=1)**	
	Ч / S	***У-Р/У / M/S-I***	***Р / R***	***Ч / S***	***У-Р/У / M/S-I***	***Р / R***	***Ч / S***	***Р / R***	***Ч / S***	***Р / R***	***Ч / S***	***Р / R***
Амоксициллин-клавулановая кислота Amoxicillin-clavulanic acid	7	1	5	0	0	6	0	4	0	1	0	1
Пиперациллин-тазобактам Piperacillin-tazobactam	3	0	1	2	0	2	1	0	1	0	0	1
Цефотаксим / Cefotaxime	0	0	13	0	0	6	0	4	0	1	0	1
Цефтазидим / Ceftazidime	0	0	13	0	0	6	0	4	0	1	0	1
Гентамицин / Gentamycin	6	0	7	1	0	5	2	2	0	1	1	0
Амикацин / Amikacin	12	0	1	1	2	3	2	2	0	1	1	0
Эртапенем / Ertapenem	9	0	4	2	0	4	3	1	0	1	0	1
Меропенем / Meropenem	4	0	0	4	1	1	1	0	1	0	0	1
Имипенем / Imipenem	4	0	0	4	1	1	1	0	1	0	0	1
Ципрофлоксацин / Ciprofloxacin	8	1	4	0	1	5	4	0	1	0	1	0

Примечание. *Здесь и в табл. 4, 5: Ч — чувствительные, У-Р — умеренно-резистентные, У — чувствительные при увеличенной экспозиции, Р — резистентные.*

Note. *Here and in table 4 and table 5: S, susceptible; M, moderately susceptible; S-I, susceptible, increased exposure strains; R, resistant.*

на хромогенной среде «CHROMagar™ ESBL», продукция ESBL подтверждена методом «двойных дисков»: у *E. coli*, *K. pneumoniae*, *C. koseri* путем использования дисков с цефтазидимом (10 мкг) и цефотаксимом (5 мкг) и диска, содержащего комбинацию амоксициллина с клавулановой кислотой (20–10 мкг), а у энтеробактерий с индуцибельными хромосомными AmpC: *E. cloacae*, *H. alvei* в дополнение к этому определялось наличие синергизма между диском цефепима (30 мкг) и диском, содержащим комбинацию амоксициллина с клавулановой кислотой (20–10 мкг) [12]. Два штамма *K. pneumoniae*, резистентных к карбапенемам и давших рост на среде «CHROMagar™ KPC», продуцировали ESBL и выросли на среде «CHROMagar™ ESBL». Резистентность к карбапенемам у продуцентов ESBL описана также рядом исследователей и может быть связана с комбинацией продукции ESBL и снижением проницаемости внешней мембраны [3].

При определении чувствительности к карбапенемам у представителей порядка *Enterobacterales* диско-диффузионным методом в первую очередь тестировали эртапенем как наиболее чувствительный к карбапенемазам антибиотик этой группы, но данный антимикробный препарат

Таблица 4. Распределение штаммов энтерококков по категории чувствительности

Table 4. Susceptibility of *Enterococci*

Антибиотик Antibiotic	*E. faecium* (n=16)		*Enterococcus spp.* (n=3)	
	Ч/S	*P/R*	*Ч/S*	*P/R*
Ампициллин / Ampicillin	0	16	0	3
Гентамицин / Gentamycin	0	16	0	3
Стрептомицин / Streptomycin	12	4	3	–
Норфлоксацин / Norfloxacin	1	15	0	3
Ванкомицин / Vancomycin	0	16	0	3
Линезолид / Linezolid	16	0	3	0

Таблица 5. Распределение штаммов *P. aeruginosa* по категории чувствительности (n=3)

Table 5. Susceptibility of *P. aeruginosa*

Антибиотик Antibiotic	*Ч/S*	*У-Р/У/M/S-I*	*P/R*
Пиперациллин-тазобактам Piperacillin-tazobactam	1	1	1
Цефтазидим / Ceftazidime	1	0	2
Амикацин / Amikacin	2	0	1
Меропенем / Meropenem	0	0	3
Имипенем / Imipenem	0	0	3
Ципрофлоксацин Ciprofloxacin	3	0	0

обладает меньшей специфичностью, поэтому изоляты, обладающие ESBL и AmpC, могут проявлять устойчивость к нему и в отсутствие карбапенемаз [12]. При выявлении умеренной резистентности или резистентности к эртапенему определялась чувствительность к меропенему и имипенему, для обнаружения карбапенемаз класса А ставили дополнительно диск с пиперациллином-тазобактамом, а также проводили CIM-тест. По результатам нашего исследования, если штамм энтеробактерий был только резистентен к эртапенему, он не давал роста на среде «CHROMagar™ KPC». Только у одного штамма *K. pneumoniae* CIM-тест был положительный, и он был резистентен к имипенему, меропенему, эртапенему, пиперациллину-тазобактаму, в данном случае, скорее всего, имела место продукция карбапенемаз класса А. У второго штамма *K. pneumoniae* CIM-тест был отрицательный, он резистентен к эртапенему, пиперациллину-тазобактаму и чувствителен при увеличенной экспозиции (ранее считался умеренно-резистентным) к имипенему и меропенему, скорее всего, в данном случае продукции карбапенемаз не было, а было снижение проницаемости внешней мембраны или имел место другой механизм [3]. Все остальные штаммы энтеробактерий, резистентные к эртапенему, были чувствительны к меропенему и имипенему, CIM-тест отрицателен.

Интересным представляется изолят *H. alvei*, резистентный к имипенему, меропенему, эртапенему, пиперациллину-тазобактаму, при этом, скорее всего, имели место продуцируемые карбапенемазы класса А. Культура не дала роста на среде «CHROMagar™ KPC», но согласно инструкции к данной среде она рассчитана на карбапенем-резистентные штаммы *E. coli*, группу KEC (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*), *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*. У *H. alvei* CIM-тест отрицательный. Данный штамм был тестирован на гены резистентности методом ПЦР в реальном времени. Использованными нами ПЦР-наборами не определены гены резистентности: VIM, IMP, NDM, KPC, OXA-48, 162. Ни один фенотипический метод не обладает 100% чувствительностью. По данным литературы, чувствительность CIM-теста составляет 82% [13, 14]. Существует модификация CIM-теста, разработанная с целью повышения его чувствительности, когда при приготовлении суспензии тестируемого изолята стерильную дистиллированную воду или 0,9% физиологический раствор заменяют на триптиказо-соевый бульон, что, с одной стороны, повышает чувствительность до 93%, но, с другой стороны, удорожает методику, поэтому она не используется в рутинной практике [14]. Наличие умеренно активных ферментов (карбапенемаз), в частности типа OXA-48, снижает чувствительность их определения [14]. Кроме того, при постановке CIM-теста необходимо строгое соблюдение методики — 24-часовое тестирование культуры и контрольных штаммов. В настоящее время «золотым стандартом» обнаружения продуцентов карбапенемаз являются молекулярные методы [14]. Однако разрешенные к применению в нашей стране ПЦР-наборы не включают весь спектр генов, ответственных за выработку карбапенемаз различных классов, поэтому точный механизм резистентности к карбапенемам у *H. alvei* выяснить не удалось.

В нашем исследовании колонизация кишечного тракта энтеробактериями с продукцией ESBL выявлена у 17 (25,8%) пациентов. Доминирующими представителями были *E. coli* (44,8% — 13 штаммов) и *K. pneumoniae* (34,5% — 10 штаммов). У 5 (7,6%) детей выделены одновременно два и более штаммов, продуцирующих ESBL: *E. coli* + *K. pneumoniae* (n=2); *E. coli* + *E. cloacae* (n=2); *E. coli* + *K. pneumoniae* + *E. cloacae* (n=1).

Существует два типа ванкомицин-резистентности. Первый тип, когда бактерия несет гены резистентности (главным образом типа VanC, а также VanD, VanE, VanF и т. д.), характерен для *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus casseliflavus* и *Enterococcus flavescens*, уровень резистентности в этом случае низкий. При втором типе имеет место приобретенная резистентность (типы VanA и VanB), часто обнаруживаемая у *E. faecium* и *E. faecalis*. Поэтому, чтобы вовремя обнаружить резистентные штаммы и предотвратить распространение резистентности, крайне важно детектировать VRE и дифференцировать их от других энтерококков.

В нашем исследовании колонизация кишечного тракта ванкомицин-резистентными энтерококками, преимущественно *E. faecium*, выявлена у 18 (27,3%) пациентов. У 9 (13,6%) пациентов обнаруживался ванкомицин-резистентный энтерококк и энтеробактерия с продукцией ESBL.

У всех протестированных штаммов *P. aeruginosa* (n=3) продукция карбапенемазы фенотипическим методом (CIM) не выявлена, что, скорее, свидетельствует о других механизмах резистентности к карбапенемам.

Часто штаммы грамотрицательных бактерий имеют фенотип множественной резистентности к антимикробным препаратам (multiple drug resistanc, MDR), как минимум к трем препаратам, относящимся к различным категориям/классам антимикробных препаратов [15]. В нашем исследовании такие штаммы были среди *E. coli* (n=1), *K. pneumoniae* (n=3), *P. aeruginosa* (n=1).

Несмотря на значительные успехи, достигнутые в онкогематологии, инфекционные осложнения остаются одной из причин, ухудшающих прогноз при оказании высокотехнологичной помощи. В связи с этим необходима система надзора за ведущими возбудителями госпитальных инфекций и их резистентностью к антимикробным препаратам — микробиологический мониторинг, который позволит: 1) своевременно выявлять госпитальные штаммы микроорганизмов и разрабатывать стратегию и тактику борьбы с ними; 2) своевременно корректировать лекарственный формуляр на основе организации рационального взаимодействия клинических фармакологов, сотрудников лаборатории клинической микробиологии и госпитальных эпидемиологов; 3) активно выявлять пациентов с риском инфицирования, связанного с оказанием медицинской помощи.

Заключение

Таким образом, на основании фенотипических и молекулярно-генетических исследований штаммов со слизистой толстого кишечника от пациентов, находящихся на лечении в онкогематологическом центре, практически у каждого 4-го (25,8–27,3%) определялась колонизация слизистой оболочки кишечника микроорганизмом с маркером устойчивости, и почти у каждого 7-го (13,6%) больного обнаружено 2 микроорганизма с маркерами резистентности. Среди энтеробактерий преобладали *E. coli* и *K. pneumoniae*, среди энтерококков — *E. faecium*. Применение хромогенных сред для исследования образцов со слизистой кишечника позволило сделать заключение о наличии микроорганизмов с соответствующим маркером резистентности уже через 24 ч от момента поступления образцов в лабораторию. Информирование онкологов о колонизации резистентными бактериями слизистой кишечника позволяет корректировать назначение антибактериальной терапии на различных этапах лечения, в т. ч. у больных, перенесших трансплантацию костного мозга.

Литература

1. Кафтырева Л.А., Зуева Л.П., Колосовская Е.Н. и др. Принципы организации мониторирования устойчивости ведущих возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, к антимикробным препаратам в лечебно-профилактических медицинских организациях здравоохранения. Федеральные клинические рекомендации. М.; 2014.
2. Гончаров А.Е., Зуева Л.П., Колоджиева В.В. и др. Молекулярно-генетический мониторинг в системе эпидемиологического надзора за инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи. Федеральные клинические рекомендации. М.; 2014.
3. Шилова А.Н., Ильина В.Н., Субботовская А.И. и др. Характеристика энтеробактерий с множественной резистентностью, колонизирующих кишечный тракт у детей раннего возраста с врожденными пороками сердца при поступлении в кардиохирургический стационар. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2016;18(1):68–74.
4. Клясова Г.А., Коробова А.Г., Фролова И.Н. и др. Детекция энтеробактерий с продукцией бета-лактамаз расширенного спектра у больных острыми миелоидными лейкозами и лимфомами при поступлении в стационар. Гематология и трансфузиология. 2016;61(1):25–32.
5. Федорова А.В., Клясова Г.А. Использование селективной хромогенной среды для детекции ванкомицинрезистентных энтерококков. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2018;20(1):55–61. DOI: 10.36488/cmac.2018.1.55-61.
6. Коробова А.Г., Клясова Г.А. Энтеробактерии с продукцией β-лактамаз расширенного спектра: источники инфицирования и значение колонизации слизистой оболочки кишечника у больных гемобластозами. Гематология и трансфузиология. 2018 63 (2):174–183.
7. Коробова А.Г. Мониторинг энтеробактерий с продукцией бета-лактамаз расширенного спектра, выделенных у больных с гемобластозами при химиотерапии: дис. … канд. мед. наук. М.; 2018.
8. Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории. Методические указания 4.2.2039–05. М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России; 2005.
9. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии. Клинические рекомендации. М.; 2018.
10. Европейский комитет по определению чувствительности к антимикробным препаратам. Таблицы пограничных значений для интерпретации значений МПК и диаметров зон подавления роста. Версия 10.0, 2020. (Электронный ресурс.) URL: http://www.eucast.org. (дата обращения: 21.05.2020).
11. Zwaluw K., Haan A., Pluister G.N. et al. The Carbapenem Inactivation Method (CIM), a Simple and Low-Cost alternative for Carba NP Test to Assess Phenotypic Carbapenemase Activity in Gram Negative Rjds. PLos One. 2015;10(3):e0123690. DOI: 10.1371/journal.pone.0123690.
12. Руководство EUCAST по выявлению механизмов резистентности и резистентности, имеющей особое клиническое и/или эпидемиологическое значение. Версия 2.0, 2017. [EUCAST Guidelines for the identification of resistance and resistance mechanisms of particular clinical and / or epidemiological significance. Version 2.0, 2017 (in Russ.)].
13. Гаязова Д. Выявление микроорганизмов, продуцирующих карбапенемазы. (Электронный ресурс.) URL: https://fedlab.ru/upload/medialibrary/000/prezentatsii-/prezentatsii-samara/%D0%93%D0%B0%D1%8F%D0%B7%D0%BE%D0%B2%D0%B0.pdf (дата обращения: 21.05.2020).
14. Попов Д.А. Сравнительная характеристика современных методов определения продукции карбапенемаз. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия; 2019;21(2):125–133. DOI: 10.36488/cmac.2019.2.125-133.
15. Полищук А.Г., Якубович Е.И., Полухина О.В. и др. Карбапенемазопродуцирующие грамотрицательные бактерии в специализированном стационаре ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий Санкт-Петербурга». Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2017;19(3):235–242.

References

1. Kaftyreva L.A., Zueva L.P., Kolosovskaya E.N. et al. The principles of monitoring the resistance of leading pathogens of infections associated with the provision of medical care to antimicrobial agents in medical and preventive health care organizations. Federal clinical guidelines. M.; 2014 (in Russ.).
2. Goncharov A.E., Zueva L.P., Kolodzhieva V.V. et al. Molecular genetics monitoring in the system of epidemiological surveillance of infections associated with the provision of medical care. Federal clinical guidelines. M.; 2014 (in Russ.).
3. Shilova A.N., Ilyina V.N., Subbotovskaya A.I. et al. Characterization of enterobacteria with multiple resistance colonizing the intestinal tract in young children with congenital heart defects upon admission to a cardiosurgical hospital. Clinical microbiology and antimicrobial chemotherapy. 2016;18(1):68–74 (in Russ.).
4. Klyasova G.A., Korobova A.G., Frolova I.N. et al. Detection of enterobacteria with the production of extended-spectrum beta-lactamases in patients with acute myeloid leukemia and lymphomas upon admission to the hospital. Hematology and transfusiology. 2016;61(1):25–32 (in Russ.).

5. Fedorova A.V., Klyasova G.A. The use of selective chromogenic medium for the detection of vancomycin-resistant enterococci. Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy. 2018;20(1):55–61 (in Russ.). DOI: 10.36488/cmac.2018.1.55-61.
6. Korobova A.G., Klyasova G.A. Enterobacteria with the production of extended-spectrum β-lactamases: sources of infection and the importance of colonization of the intestinal mucosa in patients with hemoblastoses. Hematology and transfusiology. 2018;63(2):174–183 (in Russ.).
7. Korobova A.G. Monitoring of enterobacteria with the production of extended-spectrum beta-lactamases isolated in patients with hemoblastoses during chemotherapy: Thesis. M.; 2018 (in Russ.).
8. The technique of collecting and transporting biomaterials in microbiological laboratories. Guidelines 4.2.2039–05. M.: Federal Center for Sanitary Inspection of the Ministry of Health of Russia; 2005 (in Russ.).
9. Determination of the sensitivity of microorganisms to antibacterial drugs. Interregional Association of Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy. Clinical recommendations. M.; 2018 (in Russ.).
10. European Committee for the Determination of Antimicrobial Susceptibility. Tables of boundary values for the interpretation of IPC values and diameters of zones of growth suppression. Version 10.0, 2020. (Electronic resource.) URL: http://www.eucast.org (access date: 05.21.2020 (in Russ.).
11. Zwaluw K., Haan A., Pluister G.N. et al. The Carbapenem Inactivation Method (CIM), a Simple and Low-Cost alternative for Carba NP Test to Assess Phenotypic Carbapenemase Activity in Gram Negative Rjds. PLos One. 2015;10(3):e0123690. DOI: 10.1371/journal.pone.0123690.
12. EUCAST Guidelines for the identification of resistance and resistance mechanisms of particular clinical and / or epidemiological significance. Version 2.0, 2017 (in Russ.).
13. Gayazova D. Identification of microorganisms producing carbapenemase. (Electronic resource.) URL: https://fedlab.ru/upload/medialibrary/000/prezentatsii-/prezentatsii-samara/%D0%93%D0%B0%D1%8F%D0%B7%D0%BE%D0%B2%D0% B0.pdf (access date: 05.21.2020) (in Russ.).
14. Popov D.A. Comparative characteristics of modern methods for determining the production of carbapenemases. Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy. 2019;21(2):125–133 (in Russ.). DOI: 10.36488/cmac.2019.2.125-133.
15. Polishchuk A.G., Yakubovich E.I., Polukhina O.V. et al. Carbapenemase-producing gram-negative bacteria in a specialized hospital of St. Petersburg Russian Scientific Center for Radiology and Surgical Technologies. Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy. 2017;19(3):235–242 (in Russ.).

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:
Боронина Любовь Григорьевна — *д.м.н., профессор кафедры клинической лабораторной диагностики и бактериологии ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава; 620028, Россия, г. Екатеринбург, ул. Репина, д. 3; секретарь научного отдела ГАУЗ СО «ОДКБ»; 620149, Россия, г. Екатеринбург, ул. С. Дерябиной, д. 32. ORCID iD 0000-0003-0152-962X.*
Саматова Елена Валерьевна — *к.м.н., врач-бактериолог лаборатории клинической микробиологии ГАУЗ СО «ОДКБ»; 620149, Россия, г. Екатеринбург, ул. С. Дерябиной, д. 32. ORCID iD 0000-0003-3154-6201.*
Кукушкина Марина Павловна — *заведующая лабораторией клинической микробиологии ГАУЗ СО «ОДКБ»; 620149, Россия, г. Екатеринбург, ул. С. Дерябиной, д. 32; ORCID iD 0000-0003-1980-9099.*
Панова Светлана Анатольевна — *врач-бактериолог лаборатории клинической микробиологии ГАУЗ СО «ОДКБ»; 620149, Россия, г. Екатеринбург, ул. С. Дерябиной, д. 32; ORCID iD 0000-0003-4347-0929.*
Устюгова Светлана Сергеевна — *врач-бактериолог лаборатории клинической микробиологии ГАУЗ СО «ОДКБ»; 620149, Россия, г. Екатеринбург, ул. С. Дерябиной, д. 32; ORCID iD 0000-0002-0053-4884.*
Асновская Анна Геннадьевна — *врач-бактериолог лаборатории клинической микробиологии ГАУЗ СО «ОДКБ»; 620149, Россия, г. Екатеринбург, ул. С. Дерябиной, д. 32. ORCID iD 0000-0003-1649-1310.*
Контактная информация: *Саматова Елена Валерьевна, e-mail: lavrinenko@eka-net.ru.* **Прозрачность финансовой деятельности:** *никто из авторов не имеет финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.* **Конфликт интересов** *отсутствует.* **Статья поступила** *02.07.2020, поступила* **после рецензирования** *27.07.2020,* **принята в печать** *19.08.2020.*

ABOUT THE AUTHORS:
Lyubov' G. Boronina — *Doct. of Sci. (Med.), professor of the Department of Clinical Laboratory Diagnostics & Bacteriology, Ural State Medical University; 3, Repin str., Yekaterinburg, 620028, Russian Federation; secretary of the Scientific Division, Regional Children's Clinical Hospital; 32, S. Deryabina str., Yekaterinburg, 620149, Russian Federation; ORCID iD 0000-0003-0152-962X.*
Elena V. Samatova — *Cand. of Sci. (Med.), bacteriologist of the Laboratory of Clinical Microbiology, Regional Children's Clinical Hospital; 32, S. Deryabina str., Yekaterinburg, 620149, Russian Federation; ORCID iD 0000-0003-3154-6201.*
Marina P. Kukushkina — *Head of the Laboratory of Clinical Microbiology, Regional Children's Clinical Hospital; 32, S. Deryabina str., Yekaterinburg, 620149, Russian Federation; ORCID iD 0000-0003-1980-9099.*
Svetlana A. Panova — *bacteriologist of the Laboratory of Clinical Microbiology, Regional Children's Clinical Hospital; 32, S. Deryabina str., Yekaterinburg, 620149, Russian Federation; ORCID iD 0000-0003-4347-0929.*
Svetlana S. Ustyugova — *bacteriologist of the Laboratory of Clinical Microbiology, Regional Children's Clinical Hospital; 32, S. Deryabina str., Yekaterinburg, 620149, Russian Federation; ORCID iD 0000-0002-0053-4884.*
Anna G. Asnovskaya — *bacteriologist of the Laboratory of Clinical Microbiology, Regional Children's Clinical Hospital; 32, S. Deryabina str., Yekaterinburg, 620149, Russian Federation; ORCID iD 0000-0003-1649-1310.*

Contact information: *Elena V. Samatova, e-mail: lavrinenko@eka-net.ru.* **Financial Disclosure:** *no authors have a financial or property interest in any material or method mentioned. There is no* **conflict of interests**. **Received** *02.07.2020,* **revised** *27.07.2020,* **accepted** *19.08.2020.*