

Молекулярно-генетическое типирование энтеробактерий с продукцией БЛРС, выделенных от больных гемобластозами

А. Г. КОРОБОВА*, С. А. ХРУЛЬНОВА, В. А. ОХМАТ, Г. А. КЛЯСОВА

Гематологический научный центр Минздрава России, Москва

Molecular-Genetic Typing of Enterobacteriaceae Producing an Extended Spectrum Beta-Lactamase in Patients with Hemoblastoses

A. G. KOROBOVA, S. A. KHRULNOVA, V. A. OKHMAT, G. A. KLYASOVA

Hematology Research Center, Moscow

Цель исследования — определить основные механизмы инфицирования энтеробактериями с продукцией бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС) у гематологических больных. **Материал и методы.** В проспективное исследование (2013–2015 гг.) были включены случаи бактериемии, вызванные энтеробактериями. Мазки со слизистой оболочки прямой кишки брали в течение первых трёх суток после получения гемокультуры. Для детекции БЛРС были использованы фенотипические методы. Гены резистентности групп *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} и *bla*_{CTX-M} определяли методом ПЦР. Генотипирование проводили методом ERIC-ПЦР. **Результаты.** В 89 случаях бактериемии был выделен 91 изолят энтеробактерий (56% — *E. coli*, 26% — *K. pneumoniae*, 18% — другие) у 82 больных (медиана возраста 50 лет). Продукция БЛРС была у 19 (21%) изолятов (*E. coli* — *n*=11, *K. pneumoniae* — *n*=8). Бета-лактамазы CTX-M типа были определены у 95% изолятов. Колонизация слизистой оболочки прямой кишки, идентичными по виду энтеробактериями с продукцией БЛРС, была во всех 19 случаях бактериемии, вызванной БЛРС положительными энтеробактериями, и только в 8 (11%) из 72 при выделении из гемокультуры энтеробактерий без продукции БЛРС (*P*<0,0001). Генотипирование 19 продуцентов БЛРС из гемокультуры выявило генетическую идентичность только у двух изолятов *E. coli*, выделенных от одного пациента с интервалом в два месяца. При попарном генотипировании продуцентов БЛРС, выделенных из гемокультуры и со слизистой прямой кишки, генетически родственными были 26% пар изолятов. **Заключение.** У больных с опухолями системы крови и бактериемией, вызванной энтеробактериями с продукцией БЛРС, преобладает эндогенный путь инфицирования.

Ключевые слова: Enterobacteriaceae, БЛРС; CTX-M, бактериемия, колонизация, генотипирование.

The aim of this study was to determine the prevalent path of extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing Enterobacteriaceae transmission in hematological patients. **Methods.** Prospective study was performed from 2013 to 2015 and included cases of bacteremia caused by Enterobacteriaceae. Rectal swabs were taken within the first three days after positive blood culture. ESBL-production was confirmed by phenotypic tests. The genes of *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} and *bla*_{CTX-M} were determined by PCR. Genotyping was performed by ERIC-PCR. **Results.** A total of 91 enterobacteria isolates (56% — *E. coli*, 26% — *K. pneumoniae*, 18% — other) derived from blood were obtained in 89 cases of bacteremia in 82 patients (median age — 50 years). Production of ESBL was found in 19 (21%) isolates (*E. coli* — *n*=11, *K. pneumoniae* *n*=8). Beta-lactamase CTX-M type was identified in 95% of isolates. Colonization of gut with the same species was detected in all 19 episodes of bacteremia caused by ESBL positive isolates and only in 8 (11%) of 72 episodes of bacteremia caused ESBL-negative isolates (*P*<0.0001). Genotyping of 19 ESBL producers from blood culture revealed a genetic identity of only two isolates of *E. coli*, taken from the same patient within two months. Genetically related isolates from blood and gut in the same patients were identified in 26% of the pairs. **Conclusion.** The endogenous path of infection caused by ESBL producing Enterobacteriaceae prevailed in patients with hematological malignancies.

Keywords: Enterobacteriaceae; ESBL; CTX-M; bacteremia; colonization; genotyping.

Введение

В последние годы в этиологии инфекционных осложнений у больных опухолями системы крови отмечается увеличение доли полирезистентных бактерий, среди которых ведущую позицию занимают энтеробактерии с продукцией бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС) [1]. В России доля БЛРС-положительных энтеробактерий из гемо-

культуры у больных гемобластозами составляет 43% [2]. Распространение энтеробактерий с продукцией БЛРС представляет серьёзную проблему, так как в отношении их активность проявляют ограниченное число антимикробных препаратов.

Развитие тяжёлых инфекционных осложнений у иммунокомпрометированных больных происходит как при эндогенном, так и при экзогенном варианте инфицирования микроорганизмами. Эндогенная транслокация бактерий возникает, как правило, через слизистую оболочку желудочно-кишечного тракта, повреждаемую

© Коллектив авторов, 2017

*Адрес для корреспонденции: E-mail: amalofeeva@yandex.ru

цитостатическими препаратами или опухолью. Экзогенная передача внутрибольничных возбудителей происходит из окружающей среды или от пациента к пациенту. Этому способствует длительное, иногда 6—10 мес, пребывание больного в стационаре, тяжёлое течение опухоли, для адекватной терапии которой необходимо проведение инвазивных исследований, наличие сосудистых доступов. Рассматривают и смешанный механизм инфицирования, когда под воздействием антимикробных препаратов ранее чувствительные к антибиотикам эндогенные штаммы бактерий приобретают детерминанты устойчивости, и, попадая в окружающую среду, они способны сохраняться в условиях стационара и распространяться от пациента к пациенту.

Большинство вспышек внутрибольничных инфекций характеризуются распространением ограниченного числа эпидемических клонов, что подтверждает экзогенную передачу эпидемических штаммов. Распространение генетически родственных изолятов характерно, прежде всего, для отделений реанимации и неонатологии [3]. Так, по результатам О. Paniaga и соавт. [4] при генотипировании семи неповторяющихся изолятов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных от больных в отделении реанимации в течение одного месяца, была подтверждена циркуляция единственного эпидемического клона. В то же время при анализе генетического родства энтеробактерий с продукцией БЛРС, полученных в процессе более длительного наблюдения, чаще обнаруживали поликлональность изолятов [5, 6]. В университетском госпитале в Мадриде было проведено молекулярно-генетическое исследование клинически значимых изолятов *Escherichia coli* и *K. pneumoniae* с продукцией БЛРС, полученных в течение 12 лет [7]. Авторы отметили генетическое разнообразие энтеробактерий с продукцией БЛРС, что подтверждает наличие нескольких источников, формирующих пул резистентных микроорганизмов в стационаре. Такими источниками могут быть как эпидемические клоны, так и ранее чувствительные эндогенные штаммы бактерий с приобретенными детерминантами устойчивости, которые впоследствии могут передаваться от одного микроорганизма другому с помощью мобильных генетических элементов.

Можно полагать, что преобладание эндогенного или экзогенного варианта инфицирования определяется не только спецификой стационара, но и видом микроорганизмов. Задачей настоящей работы было проведение генотипирования энтеробактерий с продукцией БЛРС, выделенных от больных опухолями системы крови, с целью определения какой из механизмов инфицирования (эндогенный или экзогенный) этими микроорганизмами преобладает в гематологии.

Материал и методы

Проспективное исследование было проведено в ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России в 2013—2015 гг. За период исследования у всех пациентов с бактериемией, вызванной энтеробактериями, брали мазок со слизистой оболочки прямой кишки в течение 1—3 сут после получения положительной гемокультуры с целью определения колонизации слизистой продуцентами БЛРС.

Детекцию БЛРС у всех энтеробактерий, выделенных из гемокультуры и со слизистой оболочки прямой кишки, проводили на хромогенной селективной среде CHROMagar™ESBL и далее подтверждали методом «двойных дисков» согласно методическим рекомендациям МУК 4.21890-04 [8]. Для исследования использовали диски с цефалоспорином III поколения — цефтазидимом (30 мкг), цефтриаксоном (30 мкг) (Oxoid, Великобритания) и амоксициллином с клавулановой кислотой (20/10 мкг) (Vecton, Dickinson, США). Согласно рекомендациям, продукцию БЛРС выявляли по наличию расширенной зоны подавления роста вокруг диска с цефалоспорином III поколения напротив диска, содержащего клавулановую кислоту. Для внутреннего контроля качества использовали референтные штаммы *E. coli* ATCC®25922 и *K. pneumoniae* ATCC®700603.

Для выделения ДНК использовали суточную культуру исследуемого микроорганизма. Несколько колоний суспендировали в 0,5 мл воды Milli Q, далее суспензию клеток нагревали в течение 5 мин при 95°C, затем центрифугировали 1 мин при 13000 об/мин и отбирали супернатант.

Наличие генов резистентности групп *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} и *bla*_{CTX-M}, кодирующих наиболее распространённые бета-лактамазы, определяли методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Для детекции групп *bla*_{TEM} и *bla*_{CTX-M} использовали наборы реагентов для выявления генов, кодирующих TEM и CTX-M бета-лактамазы («Литех», Россия). Для выявления генов, кодирующих SHV бета-лактамазы, использовали ПЦР-РВ со специфичными праймерами (179-s-F 5'-CGATGAACGCTTTCCCATGA-3'; 280-s-R 5'-AGATCCTGCTGGCGATAGT-3').

Принадлежность CTX-M бета-лактамаз к одному из 5 известных генетических кластеров (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25-родственные ферменты) определяли с помощью специфичных праймеров (табл. 1). Для детекции генов CTX-M бета-лактамаз у каждого изолята было проведено две мультиплексные ПЦР: в первой использовали специфичные праймеры для определения генов групп *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-8} и *bla*_{CTX-M-9}, во второй — *bla*_{CTX-M-2} и *bla*_{CTX-M-25}. ПЦР проводили в конечном объёме 20 мкл, содержащем 6 мкл экстрагированной ДНК, 8 мкл ПЦР-смеси-2-Blue (ИнтерЛабСервис, Россия), 0,2 мМ дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (dNTP), специфичные праймеры в концентрации 0,1 мкМ (каждый).

Программа амплификации с использованием термоциклера CFX96 Touch (BioRad, США) включала следующие этапы: предварительная денатурация (95°C в течение 3 мин), затем следовали 33 цикла денатурации (95°C в течение 20 с), отжига (58°C в течение 30 с), элонгации (72°C в течение 50 с), затем один цикл при 72°C в течение 4 мин. Полученные продукты ПЦР разделяли в 1% агарозном геле (Helicon, Россия) с добавлением этидия бромид (BioRad, США) при 200В в 1хТАЕ буфере (Литех, Россия). Визуализацию полос проводили при облучении УФ-светом с λ 260 нм при помощи трансиллюминатора (Vilber Lourmat, Франция). В качестве маркера молекулярной массы использовали ДНК-маркер GeneRuler™, 100 п.н. (Thermo Fisher Scientific, США).

Для определения генетического родства изолятов энтеробактерий с продукцией БЛРС был использован один из вариантов ПЦР с произвольными праймерами — ERIC-ПЦР. В работе использовали праймер ERIC1 [9]. В результате разделения в 1% агарозном геле получали набор ПЦР-фрагментов (профиль), характерный для каждого изолята. Сравне-

Таблица 1. Праймеры, используемые для проведения ПЦР

Ген	Название праймера	Последовательность олигонуклеотидов (5'–3')	Размер ПЦР-продукта (пар нуклеотидов)
<i>bla</i> _{CTX-M-1}	CTX-M-1-For	TGCCGAATTAGAGCGGCAGTC	504
	CTX-M-1-Rev	GCTGTACCCCAATGCTTTACC	
<i>bla</i> _{CTX-M-2}	CTX-M-2-For	GAAGCACCTGCTAAATCAGCG	470
	CTX-M-2-Rev	GGTTGGTGGTGCCATAATCTC	
<i>bla</i> _{CTX-M-8}	CTX-M-8-For	TCGCGTTAAGCGGATGATGC	857
	CTX-M-8-Rev	CCGTCCGGTGACGATTTTCGC	
<i>bla</i> _{CTX-M-9}	CTX-M-9-For	GGAACGCAAAAGCAGCTGCTT	352
	CTX-M-9-Rev	AGTTTCGCCAGCGCATGAC	
<i>bla</i> _{CTX-M-25}	CTX-M-25-For	GTGCCAGGCGAACGATGTT	743
	CTX-M-25-Rev	TCTCTGCCTTCGGCTCCGA	

Таблица 2. Колонизация слизистой оболочки прямой кишки при бактериемии, вызванной энтеробактериями с продукцией БЛРС

Гемокультура		Колонизация слизистой оболочки прямой кишки энтеробактериями с продукцией БЛРС
Энтеробактерии	<i>n</i>	
Всего	91	27 (30%)
Из них,		
с продукцией БЛРС	19	19 (100%)*
без продукции БЛРС	72	8 (11%)*

Примечание. * – $p < 0,0001$.

ние и интерпретацию результатов исследования проводили с использованием программы компьютерного анализа (GelJ v.1.3). Анализ ПЦР-профилей с построением дендрограмм был выполнен с использованием коэффициента Dice и алгоритма сравнения невзвешенных попарных средних (UPGMA). Изоляты считали генетически родственными, если коэффициент сходства (КС) был 80% и более.

Результаты исследования

Характеристика микроорганизмов, выделенных из гемокультуры. В исследование были включены 89 случаев бактериемии, вызванной энтеробактериями, у 82 больных в возрасте от 18 до 77 лет (медиана 50 лет). Основную долю составили больные острыми лейкозами (46%, $n=38$) и лимфомами (33%, $n=7$). У 5 пациентов были зарегистрированы неоднократные выделения энтеробактерий из крови с интервалом более одного месяца: три повторных эпизода бактериемии были у двоих больных и два — у троих.

В 89 случаях бактериемии был выделен 91 изолят энтеробактерий, поскольку в двух случаях было сочетание микроорганизмов. В структуре возбудителей доминировали *E.coli* (56%, $n=51$), далее следовали *K.pneumoniae* (26%, $n=23$) и *Enterobacter* spp. (9%, $n=8$). Доля других видов энтеробактерий составила 9%, включая *Klebsiella oxytoca* ($n=2$), *Citrobacter* spp. ($n=2$), *Serratia* spp. ($n=2$), *Morganella morganii* ($n=1$), *Raoultella* spp. ($n=1$), *Salmonella* spp. ($n=1$).

Продукция БЛРС была выявлена у 19 (21%) из 91 энтеробактерий, в их число вошли 11 (22%) изолятов *E.coli* и 8 (35%) *K.pneumoniae*. У других видов энтеробактерий продукция БЛРС не была подтверждена. У каждого из 19 БЛРС-положительных изолятов был определен хотя бы один ген из исследуемых групп генов бета-лактамаз

(*bla*_{TEM} или *bla*_{SHV} или *bla*_{CTX-M}). Одновременно наличие двух генов было у 11 (58%) продуцентов БЛРС и трех генов — у 8 (42%). Бета-лактамазы CTX-M типа преобладали и были определены у 18 (95%) изолятов, TEM — у 17 (89%) и SHV — у 11 (58%). Принадлежность CTX-M бета-лактамаз к генетическому кластеру CTX-M-1 была выявлена у 15 (83%) из 18 изолятов, один изолят (5,5%) принадлежал к кластеру CTX-M-9. В нашем исследовании был получен высокий процент детекции групп генов *bla*_{TEM} и *bla*_{SHV}, однако, метод ПЦР не позволяет дифференцировать бета-лактамазы TEM и SHV типа на ферменты широкого и расширенного спектра.

У всех больных при выделении энтеробактерий из гемокультуры брали мазки со слизистой оболочки прямой кишки. Колонизация слизистой оболочки прямой кишки идентичными по виду энтеробактериями с продукцией БЛРС была во всех 19 случаях бактериемии, вызванной БЛРС положительными энтеробактериями, и только в 8 (11%) из 72 при выделении из гемокультуры энтеробактерий без продукции БЛРС ($p < 0,0001$) (табл. 2). Не наблюдалось выделения продуцентов БЛРС из гемокультуры, если при исследовании мазков со слизистой оболочки прямой кишки не выявляли подобные бактерии.

Генотипирование энтеробактерий с продукцией БЛРС, выделенных из гемокультуры. Генотипирование методом ERIC-ПЦР было проведено у 19 энтеробактерий с продукцией БЛРС, в число которых вошли *E.coli* ($n=11$) и *K.pneumoniae* ($n=8$). По результатам генотипирования изоляты *E.coli* были объединены в 5 генетических групп (E1–E5) (рис. 1). Группа E1 включала 6 изолятов, E2 — 2 изолята, а E3, E4 и E5 — по одному

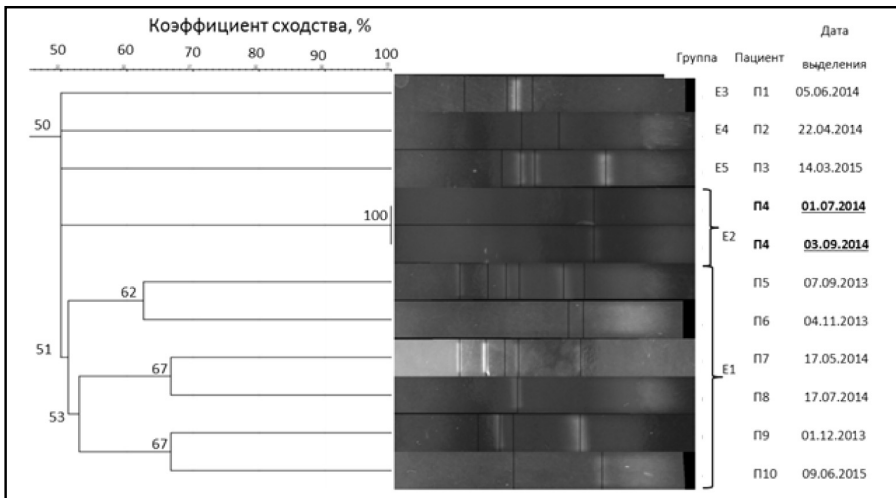


Рис. 1. Дендрограмма генетических профилей *E.coli* с продукцией БЛРС, выделенных из гемокультуры ($n=11$).

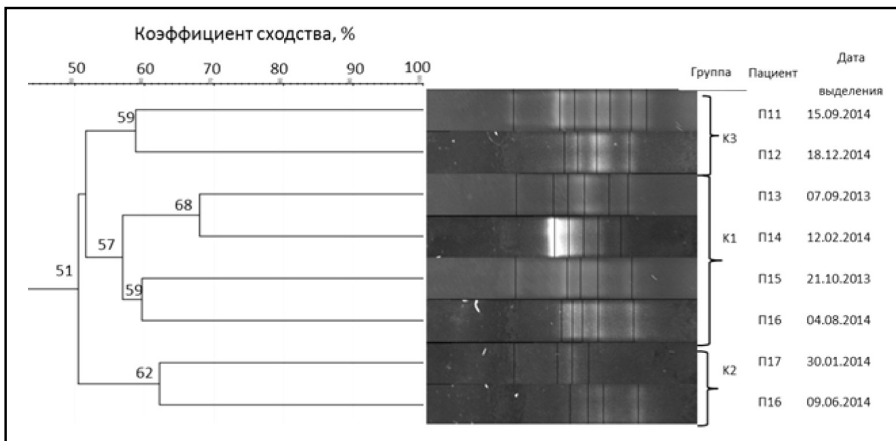


Рис. 2. Дендрограмма генетических профилей *K.pneumoniae* с продукцией БЛРС, выделенных из гемокультуры ($n=8$).

изоляту (табл. 3). Генетически идентичными (КС=100%) были только два изолята (группа E2), однако оба изолята *E.coli* были выделены из гемокультуры одного пациента (П4) с интервалом в два месяца. В группе E1 КС варьировал от 51 до 67%, и период между выделением изолятов составлял от 2 мес до 1,5 лет. Представители групп E3, E4 и E5 обладали уникальными генетическими профилями с интервалом выделения из гемокультуры больных от 44 дней до 11 мес.

ки больных. Методом ERIC-ПЦР было проведено попарное генотипирование изолятов энтеробактерий с продукцией БЛРС, выделенных из гемокультуры и со слизистой прямой кишки, у одного и того же больного. Всего было проанализировано 22 генетических профиля *E.coli* (11 пар) и 16 генетических профилей *K.pneumoniae* (8 пар) (рис. 3).

Генетически идентичными были три пары изолятов *E.coli* (6 изолятов), среди них две пары *E.coli*

Результаты генотипирования восьми *K.pneumoniae* представлены на рис. 2. При анализе дендрограммы было выявлено, что изоляты принадлежали к трём разным генетическим группам (K1—K3). Группа K1 включала 4 изолята, а K2 и K3 — по два. КС в группах варьировал от 57 до 68% (табл. 2). Наиболее высокий КС (68%) был у двух изолятов с интервалом выделения в 5 мес. Как и при анализе изолятов *E.coli*, у одного больного с интервалом в два месяца из гемокультуры дважды выделяли идентичные по виду *K.pneumoniae* с продукцией БЛРС, но генетического родства между ними не было выявлено (КС=51%). Таким образом, при анализе генетических профилей *K.pneumoniae* с продукцией БЛРС из гемокультуры было выявлено генетическое разнообразие всех микроорганизмов, включая изоляты от одного больного.

Попарное генотипирование энтеробактерий с продукцией БЛРС, выделенных из гемокультуры и со слизистой оболочки прямой кишки

Таблица 3. Результаты генотипирования энтеробактерий с продукцией БЛРС, выделенных из гемокультуры

Энтеробактерии с продукцией БЛРС		Генотипирование		
Вид	N	Группа	Количество изолятов, n	КС между изолятами, %
<i>E.coli</i>	11	E1	6	51—7
		E2	2	100
		E3	1	—
		E4	1	—
		E5	1	—
<i>K.pneumoniae</i>	8	K1	4	57—68
		K2	2	62
		K3	2	59

имели полное совпадение (КС=100%), и для одной пары КС составил 92% (рис. 3, а). Среди *K.pneumoniae* было выявлено две пары генетически родственных изолятов с КС 83 и 92%, соответственно (рис. 3, б). Таким образом, в 5 (26%) из 19 случаев бактериемии изоляты из гемокультуры были генетически родственными изолятам, выделенным со слизистой оболочки кишечника, включая 3 (28%) пары *E.coli* и 2 (25%) — *K.pneumoniae* (табл. 4).

Как было представлено ранее, у одного больного дважды с интервалом в два месяца из гемокультуры были выделены генетически идентичные (КС=100%) изоляты *E.coli*. Изоляты, полученные со слизистой прямой кишки (от 01.07.2014 и от 03.09.2014) у этого больного, также оказались генетически родственными (КС=87%) между собой, но не было выявлено генетического родства между изолятами, выделенными из гемокультуры и со слизистой оболочки прямой кишки.

Также хотелось бы отметить, что генетически родственными (КС=82%) оказались два изолята *K.pneumoniae* с продукцией БЛРС, выделенные из гемокультуры и со слизистой оболочки прямой кишки, от разных пациентов (П15, П12) (рис. 3, б). Из этих изолятов первым был выделен изолят со слизистой оболочки прямой кишки у одного больного, и лишь через год и два месяца был получен генетически родственный изолят из гемокультуры другого больного.

Обсуждение результатов

Одним из основных факторов развития инфекций, вызванных энтеробактериями с продук-

цией БЛРС, является предшествующая колонизация слизистой оболочки кишечника этими бактериями. Риск возникновения инфекции, вызванной продуцентами БЛРС, возрастает в 5—18 раз, если определяется детекция БЛРС-положи-

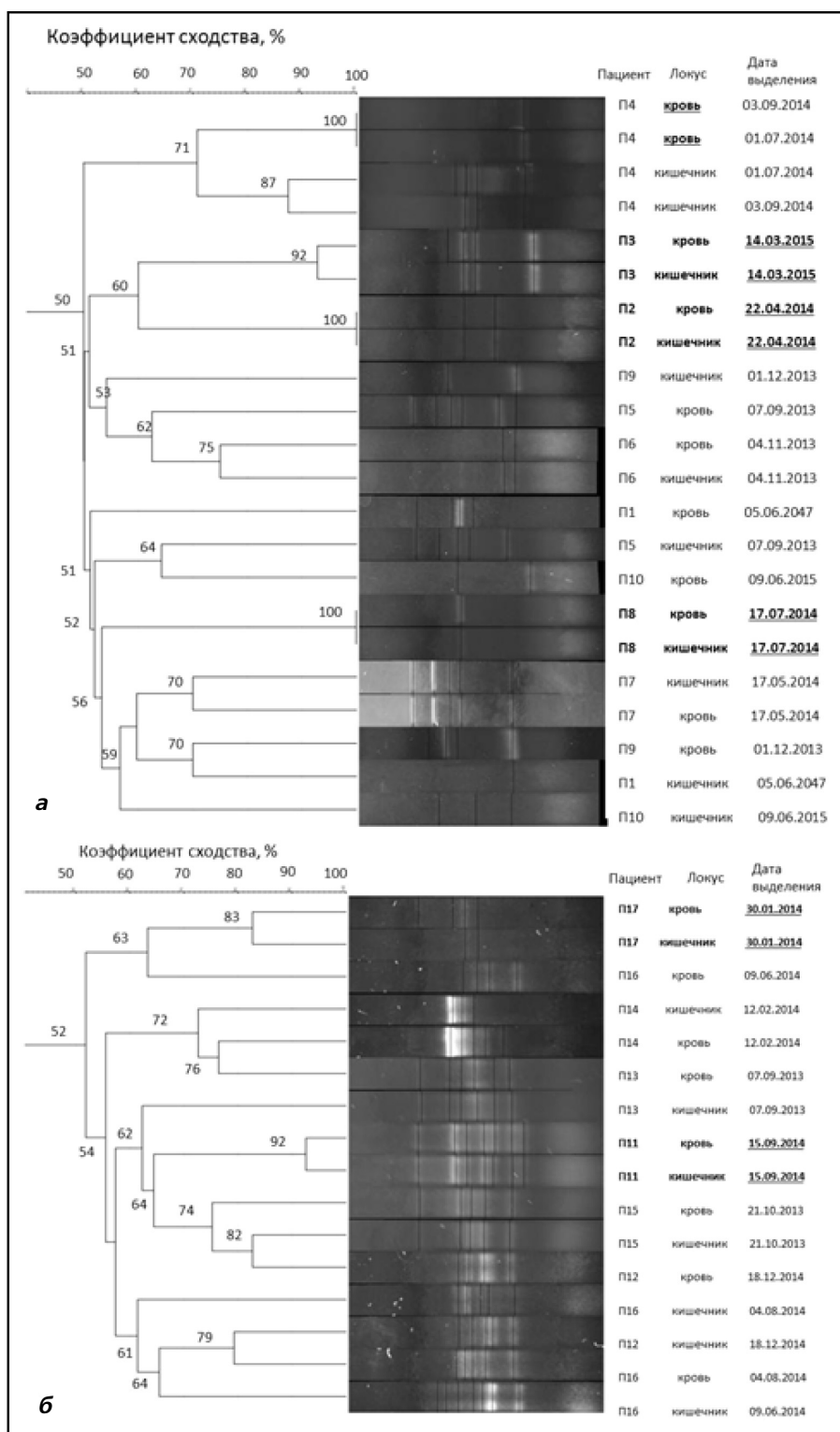


Рис. 3. Дендрограммы генетических профилей *E.coli* ($n=22$, а) и *K.pneumoniae* ($n=16$, б) с продукцией БЛРС из гемокультуры и со слизистой прямой кишки.

Таблица 4. Результаты попарного генотипирования энтеробактерий с продукцией БЛРС, выделенных из гемокультуры и со слизистой прямой кишки

Вид	Энтеробактерии Число пар	КС энтеробактерий с продукцией БЛРС, выделенных со слизистой прямой кишки и из гемокультуры, n (%)		
		≥80%	60–79%	<60%
<i>E.coli</i>	11	3 (28)	4 (36)	4 (36)
<i>K.pneumoniae</i>	8	2 (25)	3 (37,5)	3 (37,5)
Всего	19	5 (26)	7 (37)	7 (37)

тельных бактерий со слизистой оболочки прямой кишки [10]. По результатам исследования, проведенного в многопрофильном стационаре Тель-Авива (Израиль), колонизация кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС была выявлена у 26 (10,8%) из 241 больного при госпитализации в стационар [11]. Впоследствии бактериемия развилась у 4 (15,4%) из 26 больных, имевших колонизацию энтеробактериями с продукцией БЛРС, и была вызвана тем же видом бактерий, и лишь у 1 (0,5%) из 215 больных без колонизации продуцентами БЛРС. Колонизация слизистой оболочки энтеробактериями с продукцией БЛРС явилась предиктором бактериемии, вызванной этими микроорганизмами (ОШ 38,9; $p < 0,001$). Аналогичные результаты были получены в исследованиях у гематологических больных. В работе В. J. Liss и соавт. [12], опубликованной в 2012 г., приведены данные о 513 больных гемобластозами и солидными опухолями. Микробиологическое исследование образцов кала проводили в течение 72 ч после госпитализации в стационар, и колонизация энтеробактериями с продукцией БЛРС была выявлена у 90 (17,5%) больных. В дальнейшем бактериемия, вызванная энтеробактериями с продукцией БЛРС, развилась у 6 (6,6%) из 90 больных с колонизацией слизистой оболочки кишечника БЛРС-продуцирующими бактериями и только у 2 (0,5%) из 423 больных без колонизации (ОШ 4,5). В нашем исследовании были получены аналогичные результаты. Частота бактериемии, вызванной энтеробактериями с продукцией БЛРС, у больных с колонизацией этими микроорганизмами составила 7,5% (5 из 68 случаев), и не было случаев бактериемии, вызванной продуцентами БЛРС, у больных без колонизации этими бактериями (0 из 105 случаев; $p = 0,009$) [13]. Информация о наличии колонизации устойчивыми бактериями позволяет косвенно предположить вероятного возбудителя у больных с персистирующей фебрильной нейтропенией.

Повсеместное распространение резистентности к антимикробным препаратам среди возбудителей инфекционных осложнений у больных гемобластозами способствовало пересмотру «классической» стратегии назначения антимикробных препаратов в гематологии. В международных рекомендациях экспертов ECIL-4 (European Conference on Infections in Leukaemia)

[14], выпущенных в 2013 г., впервые помимо эскалационного подхода была предложена стратегия деэскалации антимикробной терапии в период гранулоцитопении у больных гемобластозами, которая раньше использовалась лишь у тяжёлых больных в ОРИТ. При деэскалационном подходе в качестве препаратов для 1-го этапа рекомендовано применять антибиотики с более широким спектром, включая активность против энтеробактерий с продукцией БЛРС и/или полирезистентных штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, такие как карбапенем с антипсевдомонадной активностью или сочетание бета-лактамов антибиотиков с колистином. В дальнейшем можно провести деэскалацию антимикробной терапии в соответствии с результатами микробиологических исследований. Причём, показанием к использованию деэскалационного подхода у больных с фебрильной нейтропенией являются не только септический шок или тяжёлая пневмония, но и колонизация или предшествующая инфекция полирезистентными микроорганизмами. Впервые в гематологии в качестве препаратов для 1-го этапа при деэскалационном подходе было рекомендовано применение карбапенемов в центрах с высокой долей инфекций, вызванных энтеробактериями с продукцией БЛРС (уровень доказательности ВП), или у больных, колонизированных такими микроорганизмами (уровень доказательности ВП). Акцент в рекомендациях на колонизацию слизистой оболочки полирезистентными грамотрицательными бактериями в выборе антибиотика также является доказательством того, что у больных с персистирующей фебрильной нейтропенией преобладает эндогенный вариант инфицирования.

Основными типами БЛРС до конца 1990 годов были TEM и SHV [15, 16]. В настоящее время во всех странах мира, включая Россию, получили широкое распространение энтеробактерии с продукцией СТХ-М-типа БЛРС, наибольшее эпидемиологическое значение имеют гены группы СТХ-М-1, и основным представителем этой группы является СТХ-М-15 [15, 17]. По нашим данным, большинство энтеробактерий с продукцией БЛРС (83%), выделенных из гемокультуры, были продуцентами СТХ-М-1-типа бета-лактамаз.

Исследователи отмечают значительное генетическое разнообразие энтеробактерий, проду-

цирующих бета-лактамазы СТХ-М-типа [15, 18]. Так, исследователями из Франции были проанализированы 74 штамма энтеробактерий с продукцией БЛРС, из которых у 71,5% были выявлены гены бета-лактамаз СТХ-М-типа [6]. В это исследование были включены изоляты клинически значимые и со слизистой оболочки прямой кишки. Генотипирование методом ERIC-ПЦР показало, что 40 (54%) изолятов энтеробактерий с продукцией БЛРС обладало уникальными профилями, а 34 (46%) были объединены в шесть генетически родственных кластеров. Было выявлено, что в течение трёх лет в этом стационаре наблюдалось как экзогенное распространение эпидемических клонов энтеробактерий, так и эндогенное инфицирование у больных с колонизацией слизистой оболочки кишечника.

Поликлональность изолятов, выделенных из гемокультуры больных с гематологическими заболеваниями, была подтверждена в исследовании, проведённом в нашем центре в более ранний период (2003—2006 гг.) [19]. Среди изученных грамотрицательных бактерий ($n=152$) доминирующий клон отсутствовал, идентичные бактерии в одном клоне были представлены ограниченным числом изолятов, и было сделано заключение о наличии двух вариантов инфицирования в стационаре — эндогенном и экзогенном, с преобладанием эндогенного. Однако для штаммов *E.coli* наиболее характерным было эндогенное инфицирование, а экзогенный путь передачи инфекции чаще определялся у *P.aeruginosa*, поскольку генетически родственные изоляты определяли достоверно чаще среди изолятов *P.aeruginosa*, чем среди изолятов *E.coli* (35% против 3%, $p<0,001$).

В представленной работе мы проводили генотипирование только энтеробактерий с продукцией БЛРС, и выявили разнообразие генетических профилей изолятов. Подобные результаты были получены другими исследователями при генотипировании энтеробактерий. Так, в исследовании, проведённом в университетском онкологическом центре в Барселоне, при генотипировании *E.coli* с продукцией БЛРС ($n=17$) из гемокультуры также была определена поликлональность, все изучаемые изоляты не были генетически родственными [20].

Число публикаций, в которых оценивается генетическое родство идентичных по виду энтеробактерий с продукцией БЛРС, выделенных у одного и того же пациента из гемокультуры и со слизистой оболочки прямой кишки, ограничено. По данным С. Cuartero и соавт. [21], у одного из 12 пациентов с колонизацией *E.coli*, продуцирующими БЛРС, развилась бактериемия, вызванная идентичными по виду бактериями. Исследователями было подтверждено генетическое родство изолятов, полученных из гемокультуры и со слизистой оболочки прямой кишки у этого пациента. Анало-

гичное исследование проводили в университетском медицинском центре в Мериленде [22], в процессе которого были изучены изоляты *Acinetobacter baumannii*, полученные у шести больных из гемокультуры и со слизистой оболочки прямой кишки. По результатам пульс-электрофореза у всех пациентов было подтверждено генетическое родство исследуемых изолятов, полученных из разных локусов.

В наше исследование было включено двое больных с двукратным выделением идентичных по виду продуцентов БЛРС из гемокультуры. У одного больного изоляты *E.coli*, выделенные из гемокультуры с интервалом в два месяца, были генетически родственными, в то время как у другого больного изоляты *K.pneumoniae* имели разные ПЦР-профили (КС=51%). Аналогичные результаты были получены в исследовании А. Samet и соавт. [23]. Неоднократное выделение *E.coli* из гемокультуры было у шести больных гематологическими заболеваниями и только у троих повторные эпизоды бактериемии были вызваны генетически родственными изолятами *E.coli*. В этой работе также было проведено генотипирование изолятов *E.coli*, выделенных в повторных исследованиях из образцов кала, которое показало, что у больных с гемобластозами в течение нескольких недель происходит смена одного генотипа *E.coli* на другой. Авторы исследования объясняют полученные результаты изменчивостью кишечной микрофлоры у больных гемобластозами, возникающей под воздействием ряда факторов, наиболее значимыми из которых являются антибиотики и цитостатические препараты, приводящие к селекции наиболее резистентных изолятов. Следовательно, в кишечнике может находиться одновременно несколько разных штаммов энтеробактерий одного вида. Так, в исследовании, проведённое В. Krawczyk и соавт. [24], было включено 115 больных гемобластозами, у каждого пациента был выделен один изолят *E.coli* из гемокультуры и от трёх до десяти фенотипически разных изолятов *E.coli* со слизистой оболочки кишечника. Молекулярно-генетическое исследование доказало, что 77% (89 из 115) изолятов *E.coli* из гемокультуры были генетически родственными изолятам *E.coli*, полученными со слизистой оболочки прямой кишки. Также у всех *E.coli*, включённых в исследование изучали гены вирулентности, кодирующие такие факторы, как Dг-адгезин, F1С-фимбрии и другие. Генетически родственные изоляты из крови и со слизистой оболочки кишечника имели идентичные наборы генов вирулентности. Интересно отметить, что изоляты из гемокультуры достоверно чаще имели гены вирулентности, кодирующие Dг-адгезин, в отличие от штаммов *E.coli*, выделенных со слизистой оболочки кишечника у того же больного, но

не являющихся генетически родственными (16% против 5%, $p=0,009$). И наоборот, гены, кодирующие F1C-фимбрии, значимо чаще определяли у изолятов *E.coli*, которые были получены со слизистой оболочки кишечника, и не являлись генетически родственными изоляту из гемокультуры (36% против 17%, $p=0,001$). Это исследование продемонстрировало, что в кишечнике у больного может постоянно находиться несколько разных штаммов энтеробактерий одного вида, а наличие генов вирулентности у штаммов *E.coli*, колонизирующих слизистую кишечника, может быть дополнительным фактором, предрасполагающим к транслокации энтеробактерий со слизистой оболочки кишечника в кровоток.

По результатам нашей работы, 26% бактериемий были обусловлены изолятами генетически родственными изолятам энтеробактерий с продукцией БЛРС, выделенным со слизистой прямой кишки. Такое родство является подтверждением эндогенного инфицирования при бактериемии у больных с гемобластомами. В остальных случаях (74%) колонизация и бактериемия у одного и того же пациента были вызваны разными штаммами одного вида. Невысокий процент совпадений (26%) можно объяснить ограничениями нашего исследования, поскольку при генотипировании мы анализировали только один изолят, выделенный со слизистой оболочки кишечника, в то время как на слизистой оболочке кишечника могут находиться одновременно несколько БЛРС-положительных штаммов энтеробактерий одного вида.

При анализе результатов парного генотипирования оказалось, что генетически родствен-

ными были два изолята *K.pneumoniae* с продукцией БЛРС, выделенные из гемокультуры и со слизистой оболочки прямой кишки, но от разных больных. Интервал между выделениями изолятов составил один год и два месяца. Можно предположить, что была длительная циркуляция изолята *K.pneumoniae* с продукцией БЛРС в окружающей среде стационара с последующей экзогенной передачей пациенту. Такое генетическое родство изолятов возможно при смешанном варианте инфицирования, когда ранее чувствительные к антимикробным препаратам эндогенные микроорганизмы приобретают детерминанты устойчивости под воздействием антибиотиков, и, попадая в окружающую среду стационара, вызывают экзогенное инфицирование других больных.

Заключение

На основании полученных результатов можно сделать заключение, что у больных опухолями системы крови при бактериемии, вызванной энтеробактериями с продукцией БЛРС, преобладает эндогенный путь инфицирования. Не было выявлено генетического родства между энтеробактериями с продукцией БЛРС, выделенными от разных больных. Доказано, что бактериемия, вызванная БЛРС-положительными бактериями, была только у пациентов с колонизацией слизистой оболочки кишечника идентичными по виду продуцентами БЛРС, а в 26% случаев было подтверждение генетического родства идентичных по виду изолятов, выделенными из гемокультуры и со слизистой оболочки прямой кишки.

ЛИТЕРАТУРА

- Mikulska M., Viscoli C., Orasch C., Livermore D.M., Averbuch D., Cordonnier C. et al. Aetiology and resistance in bacteraemias among adult and paediatric haematology and cancer patients. *J Infect* 2014; 68 (4): 321–331.
- Клясова Г.А. Инфекции при гемобластозах и депрессиях кроветворения: клиника, диагностика и лечение: Автореф. дисс. ... д-ра мед. наук. М.: 2009. / *Klyasova G.A. Infekcii pri gemoblastozah i depressijah krovetvorenija: klinika, diagnostika i lechenie: Avtoref. diss. ... d-ra med. nauk. M.: 2009. [in Russian]*
- Guyot K., Biran V., Doit C., Moissenet D., Guillard T., Brasme L. et al. Raman spectroscopic analysis of the clonal and horizontal spread of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; 31: 2827–2834.
- Paniara O., Platsouka E., Dimopoulou H., Tzelepi E., Miriagou V., Tzouveleki L.S. Diversity of beta-lactam resistance levels among related *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in an intensive care unit. *J Chemother* 2000; 12 (3): 204–207.
- Giraud-Morin C., Fosse T. A seven-year survey of *Klebsiella pneumoniae* producing TEM-24 extended-spectrum beta-lactamase in Nice University Hospital (1994–2000). *J Hosp Infect* 2003; 54 (1): 25–31.
- Marcade G., Brisse S., Bialek S., Marcon E., Leflon-Guibout V., Passet V. et al. The emergence of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* of international clones ST13, ST16, ST35, ST48 and ST101 in a teaching hospital in the Paris region. *Epidemiol Infect* 2013; 141 (8): 1705–1712.
- Baquero F., Coque T.M., Cantón R. Allodemics. *Lancet Infect Dis* 2002; 2 (10): 591–592.
- Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам (Методические указания МУК 4.21890-04). *Клин микробиол антимикроб химиотер* 2004; 6: 306–359.
- Versalovic J., Koeuth T., Lupski J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* 1991; 19 (24): 6823–6831.
- Biehl L.M., Schmidt-Hieber M., Liss B., Cornely O.A., Vehreschild M.J. Colonization and infection with extended spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae in high-risk patients - Review of the literature from a clinical perspective. *Crit Rev Microbiol* 2016; 42 (1): 1–16.
- Ben-Ami R., Schwaber M.J., Navon-Venezia S., Schwartz D., Giladi M., Chmelnitsky I. et al. Influx of extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae into the hospital. *Clin Infect Dis* 2006; 42 (7): 925–934.
- Liss B.J., Vehreschild J.J., Cornely O.A., Hallek M., Fätkenheuer G., Wisplinghoff H. et al. Intestinal colonisation and blood stream infections due to vancomycin-resistant enterococci (VRE) and extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae (ESBLE) in patients with haematological and oncological malignancies. *Infection* 2012; 40 (6): 613–619.
- Охмат В.А., Клясова Г.А., Коробова А.Г., Паровичникова Е.Н., Федорова А.В., Троицкая В.В. и соавт. Следует ли назначать карбапенемы всем больным с фебрильной нейтропенией и колонизацией энтеробактериями с продукцией β -лактамаз расширенного спектра? *Онкогематология* 2016;11(3): 49–57. / *Okhmat V.A., Klyasova G.A., Korobova A.G., Parovichnikova E.N., Fedorova A.V., Troickaja V.V. i soavt. Sleduet li naznachat' karbapenemy vsem bol'nym s febril'noj neutropenij i kolonizacij jenterobakterijami s produkciej β -laktamaz rasshirennoogo spektra? Onkogematologija* 2016;11(3): 49–57. [in Russian]
- Averbuch D., Orasch C., Cordonnier C., Livermore D.M., Mikulska M., Viscoli C. et al. European guidelines for empirical antibacterial therapy for febrile neutropenic patients in the era of growing resistance: summary of the 2011 4th European Conference on Infections in Leukemia. *Haematologica* 2013; 98 (12): 1826–1835.

15. Calbo E., Garau J. The changing epidemiology of hospital outbreaks due to ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae*: the CTX-M-15 type consolidation. *Future Microbiol* 2015; 10 (6): 1063–1075.
16. Сидоренко С.В., Тишков В.И. Молекулярные основы резистентности к антибиотикам. *Успехи биол хим* 2004; 44: 263–306. / Sidorenko S.V., Tishkov V.I. Molekuljarnye osnovy rezistentnosti k antibiotikam. *Uspekhi biol khim* 2004; 44: 263–306. [in Russian]
17. Эйдельштейн М.В., Страчунский Л.С. Динамика распространенности и чувствительности БЛРС-продуцирующих штаммов энтеробактерий к различным антимикробным препаратам в ОРИТ России. *Клин микробиол антимикроб химиотер* 2005; 7 (4): 323–336. / Jejdelshtejn M.V., Strachunskij L.S. Dinamika rasprostranennosti i chuvstvitel'nosti BLRS-producirujushhikh shtammov jenterobakterij k razlichnym antimikrobnym preparatam v ORIT Rosii. *Klin mikrobiol antimikrob khimioter* 2005; 7 (4): 323–336. [in Russian]
18. Livermore D.M., Canton R., Gniadkowski M., Nordmann P., Rossolini G.M., Arlet G. et al. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59 (2): 165–174.
19. Клясова Г.А., Бриллиантова А.Н., Миронова А.В. Генотипирование грамотрицательных бактерий, выделенных из крови при сепсисе у больных с гематологическими заболеваниями. *Тер архив* 2007; 79 (7): 74–80. / Klyasova G.A., Brilliantova A.N., Mironova A.V. Genotipirovanie gramotricatel'nykh bakterij, vydelennykh iz krovi pri sepsise u bol'nykh s gematologicheskimi zabojevanijami. *Ter arkhiv* 2007; 79 (7): 74–80. [in Russian]
20. Gudiol C., Calatayud L., Garcia-Vidal C., Lora-Tamayo J., Cisnal M., Duarte R. et al. Bacteraemia due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* (ESBL-EC) in cancer patients: clinical features, risk factors, molecular epidemiology and outcome. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65 (2): 333–341.
21. Cuartero C., Sánchez Diaz A.M., Ruiz-Garbajosa P., Valverde A., Alonso J.M., Rodríguez J.D. et al. Dynamics of intestinal colonization with extended-spectrum beta-lactamases (ESBL)-producing Enterobacteriaceae in neutropenic oncohaematological patients. P2132 In: *Bacterial infections in cancer patients. Proceeding of 23th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 2013 Apr 27–30; Berlin, Germany. Available from: https://www.escmid.org/escmid_publications/escmid_library/?q=Cuartero+C.&id=2173&L=0&x=27&y=18
22. Thom K.A., Hsiao W.W., Harris A.D., Stine O.C., Rasko D.A., Johnson J.K. Patients with *Acinetobacter baumannii* bloodstream infections are colonized in the gastrointestinal tract with identical strains. *Am J Infect Control* 2010; 38 (9): 751–753.
23. Samet A., Śledzińska A., Krawczyk B., Hellmann A., Nowicki S., Kur J. et al. Leukemia and risk of recurrent *Escherichia coli* bacteremia: genotyping implicates *E.coli* translocation from the colon to the bloodstream. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2013; 32 (11): 1393–1400.
24. Krawczyk B., Śledzińska A., Szemiako K., Samet A., Nowicki B., Kur J. Characterisation of *Escherichia coli* isolates from the blood of haematological adult patients with bacteraemia: translocation from gut to blood requires the cooperation of multiple virulence factors. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2015; 34 (6): 1135–1143.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Коробова Анна Геннадьевна — научный сотрудник научно-клинической лаборатории клинической бактериологии, микологии и антибиотической терапии ГНЦ МЗ РФ, Москва

Хрульнова Светлана Алексеевна — к. б. н., старший научный сотрудник научно-клинической лаборатории клинической бактериологии, микологии и антибиотической терапии ФГБУ ГНЦ МЗ РФ, Москва

Охмат Владимир Александрович — к. м. н., научный сотрудник научно-клинической лаборатории клинической бактериологии, микологии и антибиотической терапии ФГБУ ГНЦ МЗ РФ

Клясова Галина Александровна — д. м. н., профессор, заведующая научно-клинической лабораторией клинической бактериологии, микологии и антибиотической терапии ФГБУ ГНЦ МЗ РФ, Москва