

## Молекулярная характеристика изолятов Enterobacterales с продукцией бета-лактамаз расширенного спектра, выделенных из гемокультуры больных опухолями системы крови

Хрульнова С.А., Коробова А.Г., Фёдорова А.В., Фролова И.Н., Клясова Г.А.

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России, Москва, Россия

**Контактный адрес:**

Светлана Алексеевна Хрульнова  
Эл. почта: khrulnovas@mail.ru

**Ключевые слова:** Enterobacterales, БЛРС, гемокультура, гены бета-лактамаз, опухоли системы крови.

**Цель.** Изучить распределение генов *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> и *bla*<sub>SHV</sub> у изолятов Enterobacterales с продукцией бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС), выделенных из гемокультуры больных опухолями системы крови.

**Материалы и методы.** Материалом исследования были изоляты Enterobacterales, выделенные из гемокультуры больных, находившихся на стационарном лечении в 10 лечебных учреждениях России (2003-2015 гг.). Продукция БЛРС у Enterobacterales была определена фенотипическими методами (CLSI 2017). Наличие генов, кодирующих ферменты TEM, SHV и CTX-M, определяли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием специфических праймеров.

**Результаты.** Всего было исследовано 499 изолятов Enterobacterales с продукцией БЛРС. В структуре микроорганизмов преобладали *Klebsiella pneumoniae* (43,9%) и *Escherichia coli* (43,3%). Исследуемые гены были представлены у Enterobacterales как в сочетании (79%), так и изолированно (19,6%). Гены *bla*<sub>CTX-M</sub> были наиболее распространенными (82,6%), далее следовали гены *bla*<sub>TEM</sub> (73,7%) и *bla*<sub>SHV</sub> (53,7%). У 1,4% (n=7) изолятов Enterobacterales с продукцией БЛРС исследуемые гены *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> выявлены не были. Гены *bla*<sub>CTX-M</sub> были обнаружены у 84,9% *K. pneumoniae*, 89,8% *E. coli* и 42,6% *Enterobacter cloacae*. Гены *bla*<sub>CTX-M</sub> принадлежали к кластерам *bla*<sub>CTX-M-1</sub> (88,8%), *bla*<sub>CTX-M-9</sub> (14,8%) и *bla*<sub>CTX-M-2</sub> (0,2%). Доля изолятов, имеющих сочетание генов двух разных кластеров *bla*<sub>CTX-M</sub>, составила 4,1%.

**Выводы.** Среди Enterobacterales с продукцией БЛРС наиболее распространенными были гены *bla*<sub>CTX-M</sub> (82,6%), основная доля которых принадлежала к кластеру *bla*<sub>CTX-M-1</sub> (88,8%). У большинства исследуемых изолятов (79%) было выявлено сочетание генов разных типов бета-лактамаз, а у 4,1% CTX-M-продуцирующих Enterobacterales – сочетание генов двух разных кластеров.

## Molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacterales isolates collected from blood culture in patients with hematological malignancies

Khurulnova S.A., Korobova A.G., Fyodorova A.V., Frolova I.N., Klyasova G.A.

National Medical Research Center of Hematology, Moscow, Russia

**Contacts:**

Svetlana A. Khurulnova  
E-mail: khurulnovas@mail.ru

**Key words:** Enterobacterales, ESBL, blood culture, beta-lactamase genes, hematological malignancies.

**Objective.** The objective of the study was to evaluate the prevalence of genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> and *bla*<sub>CTX-M</sub> among extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Enterobacterales isolates collected from blood culture in patients with hematological malignancies.

**Materials and Methods.** The prospective multicenter study included Enterobacterales isolates collected from blood culture in hematological patients from 10 Russian hospitals (2003-2015). The isolates were screened for ESBLs by the phenotypic methods (CLSI 2017). Genes encoding TEM, SHV and CTX-M were detected using polymerase chain reaction (PCR) by specific primers.

**Results.** A total of 499 ESBL-producing Enterobacterales were evaluated. Among them *Klebsiella pneumoniae* (43.9%) and *Escherichia coli* (43.3%) predominated. The tested genes were present in combination (79%) and alone (19.6%). Genes of *bla*<sub>CTX-M</sub> were most common (82.6%), followed by *bla*<sub>TEM</sub> (73.7%) and *bla*<sub>SHV</sub> (53.7%). The genes (*bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> and *bla*<sub>CTX-M</sub>) were not detected in 1.4% (n=7) ESBL-producing Enterobacterales. Genes *bla*<sub>CTX-M</sub> were in 84.9% *K. pneumoniae*, 89.8% *E. coli* and 42.6% *Enterobacter cloacae*. The *bla*<sub>CTX-M</sub> genes belonged to the subtypes *bla*<sub>CTX-M-1</sub> (88.8%), *bla*<sub>CTX-M-9</sub> (14.8%) and *bla*<sub>CTX-M-2</sub> (0.2%). Two different subtypes of *bla*<sub>CTX-M</sub> were in 4.1% Enterobacterales isolates.

**Conclusions.** Among the ESBL-producing Enterobacterales isolates *bla*<sub>CTX-M</sub> genes were most common (82.6%), the majority of them belonged to the *bla*<sub>CTX-M-1</sub> subtypes (88.8%). Most of Enterobacterales isolates (79%) harbored several types of beta-lactamases genes and 4.1% isolates carried two subtypes of *bla*<sub>CTX-M</sub>.

## Введение

Грамотрицательные бактерии занимают одну из лидирующих позиций среди возбудителей бактериемии у иммунокомпрометированных больных. В России по результатам многоцентрового исследования доля Enterobacterales в этиологии 640 случаев бактериемии у 478 больных, находившихся на стационарном лечении в гематологических отделениях, составила 32,4%. Ведущими представителями из них были *E. coli* (18,5%) и *K. pneumoniae* (7,8%) [1].

За последние десятилетия отмечено увеличение резистентности микроорганизмов к антимикробным препаратам, используемым в клинике. Серьезную проблему представляет распространение Enterobacterales с продукцией бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС). Особое значение БЛРС определяется, прежде всего, их способностью обуславливать устойчивость к цефалоспорином 3-4 поколения, которые широко используют для лечения нозокомиальных инфекций. Сепсис, вызванный энтеробактериями с продукцией БЛРС, характеризуется тяжелым течением, удлинением периода госпитализации, высокой летальностью и увеличением финансовых затрат на лечение.

Сообщения о выделении первых штаммов энтеробактерий с продукцией БЛРС в России относятся к 90-м годам XX века. В многоцентровом исследовании «Micromax», проведенном в 1997-1998 гг., было показано, что в отделениях реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) ряда учреждений распространение БЛРС среди *E. coli* приближалось к 40%, а среди *Klebsiella* spp. превышало 90% [2]. В другом российском многоцентровом исследовании, проведенном в тот же период (1997-1998 гг.), доля БЛРС-продуцентов составляла в среднем 15,8% среди *E. coli* и 60,8% среди *K. pneumoniae*, сильно варьируя в разных стационарах [3]. За короткий промежуток времени распространение БЛРС среди нозокомиальных штаммов Enterobacterales, выделенных в ОРИТ, значительно увеличилось. Так, уже в 2003 г. доля БЛРС-продуцирующих *K. pneumoniae* достигла 84,3%, *E. coli* – 54,7% [4]. Частота детекции БЛРС у энтеробактерий, выделенных из гемокультуры больных опухолями системы крови (2000-2015 гг.), составила 40% (у 483 из 1203 изолятов), из них у *Klebsiella* spp. – 58%, у *E. coli* – 40% [5].

Первый клинический изолят, продуцирующий БЛРС, был выделен в 1982 г. в Ливерпуле (Англия) [6]. Это был изолят *Klebsiella oxytoca*, выделенный из крови и спинномозговой жидкости новорожденного, находившегося в отделении реанимации. Устойчивость к цефтазидиму у *K. oxytoca* была обусловлена продукцией ранее неизвестного фермента TEM-E2. Позднее было проведено секвенирование, и этот фермент был отнесен к TEM-12 типу БЛРС [7]. Далее в 1983 г. во Франкфурте (Германия) были выделены изоляты *K. pneumoniae* и один изолят *Serratia marcescens*, устойчивые к цефалоспорином 3 поколения, которые продуцировали новый фермент БЛРС – SHV-2 [8, 9]. Среди ферментов TEM и SHV типов могут быть бета-лактамазы как широкого спектра, так и расширенного спектра, представителями последних являются TEM-12 и SHV-2. Различие в нуклеотидной последовательности генов, кодирующих бета-лактамазы широкого спектра и БЛРС, составляет всего несколько

нуклеотидов, и их разделение возможно только при проведении секвенирования.

БЛРС, относящиеся к СТХ-М типу, были описаны в 1990 г. [10]. Эти ферменты были обнаружены у *E. coli*, выделенной от ребенка с отитом. Все ферменты СТХ-М типа относятся к БЛРС, в отличие от ферментов TEM и SHV типов. Несмотря на более позднее появление, ферменты СТХ-М в настоящее время стали доминирующими у энтеробактерий с продукцией БЛРС. Бета-лактамазы СТХ-М типа подразделяются на пять основных филогенетических кластеров на основании анализа нуклеотидной последовательности кодирующих их генов, такие как СТХ-М-1, СТХ-М-2, СТХ-М-8, СТХ-М-9, СТХ-М-25. Ключевую роль в распространении генов *bla*<sub>СТХ-М</sub> играют мобильные генетические элементы – инсерционные последовательности, интегроны, транспозоны и плазмиды. В настоящее время известно более 170 вариантов ферментов СТХ-М типа ([www.lahey.org/Studies/](http://www.lahey.org/Studies/)).

Основная часть исследований, как в иностранной литературе, так и в российской, касается изучения БЛРС у клинически значимых изолятов Enterobacterales, выделенных из разных локусов от разных категорий больных, находящихся на лечении в многопрофильных стационарах. Целью настоящего исследования являлось изучение распределения генов *bla*<sub>СТХ-М</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> и *bla*<sub>SHV</sub> среди БЛРС-продуцирующих Enterobacterales, выделенных только из гемокультуры больных опухолями системы крови.

## Материалы и методы

### Источники бактериальных изолятов

Материалом исследования были изоляты Enterobacterales с продукцией БЛРС (n=499), выделенные из гемокультуры больных, находившихся на стационарном лечении в гематологических отделениях 10 лечебных учреждений 8 городов России (Москва, Иркутск, Новосибирск, Барнаул, Челябинск, Сургут, Самара, Ростов-на-Дону) с 2003 по 2015 гг. В исследование включали первый изолят, выделенный из гемокультуры. Все изоляты были доставлены в лабораторию ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, где были проведены окончательная идентификация микроорганизмов, определение чувствительности к антимикробным препаратам методом серийных микро-разведений в бульоне и детекция генов резистентности к бета-лактамам антибиотикам.

### Видовая идентификация и хранение

Идентификацию полученных изолятов до вида проводили в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России до 2012 г. с помощью тест-систем API 20E (BioMerieux, Франция), с 2012 г. – методом матричной лазерной десорбционной ионизационной времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS) на анализаторе Microflex LT (Bruker Daltonics, Германия). Для идентификации полученных изолятов до вида брали изолированные колонии бактерий. Ионизацию бактериальных белков осуществляли с помощью специального реагента – матрицы ( $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричная кислота и раствор, содержащий 50% ацетонитрила и 2,5% трифторуксусной кислоты). Идентификацию проводили в автоматическом режиме с использованием программы MALDI Biotyper Real Time Classification, версия

3.1 (Bruker Daltonics, Германия). В качестве критерия надежной видовой идентификации использовали рекомендуемые значения коэффициента совпадения («Score») от 2,0 и выше. До проведения исследований изоляты хранили при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$  в триптиказо-соевом бульоне с добавлением 20% глицерина.

#### Фенотипическая детекция бета-лактамаз

Для выявления продукции БЛРС у изолятов Enterobacteriales проводили параллельное определение минимальных подавляющих концентраций (МПК) цефтазидима и цефотаксима и их комбинаций с клавулановой кислотой [11]. Снижение МПК цефтазидима или цефотаксима не менее чем в 8 раз (на 3 последовательных двукратных разведения) в присутствии ингибитора, в сравнении со значениями МПК соответствующих цефалоспоринов без ингибиторов, свидетельствовало о продукции БЛРС. Для внутреннего контроля качества использовали референтные штаммы *E. coli* ATCC<sup>®</sup>25922 и *K. pneumoniae* ATCC<sup>®</sup>700603 (SHV-12).

#### Определение генов бета-лактамаз

Наличие генов резистентности *bla*<sub>ТЕМ</sub> и *bla*<sub>СТХ-М</sub> определяли методом ПЦР с использованием наборов реагентов для выявления генов бета-лактамаз ТЕМ и СТХ-М типов («Литех», Россия), генов *bla*<sub>SHV</sub> – методом ПЦР в режиме реального времени с использованием специфических праймеров (179-s-F 5'-CGATGAACGCTTTCCCATGA-3';

**Таблица 1.** Видовой состав изолятов Enterobacteriales с продукцией БЛРС, выделенных из гемокультуры больных опухолями системы крови

Вид микроорганизмов	Количество изолятов, n (%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	219 (43,9)
<i>Escherichia coli</i>	216 (43,3)
<i>Enterobacter cloacae</i>	45 (9)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	6 (1,2)
<i>Proteus mirabilis</i>	5 (1)
<i>Serratia marcescens</i>	4 (0,8)
<i>Citrobacter freundii</i>	2 (0,4)
<i>Pluralibacter gergoviae</i>	2 (0,4)

**Таблица 2.** Гены бета-лактамаз у изолятов Enterobacteriales с продукцией БЛРС

Гены бета-лактамаз	Изоляты, n (%)				
	<i>K. pneumoniae</i> , n=219	<i>E. coli</i> , n=216	<i>E. cloacae</i> , n=45	Другие*, n=19	Всего n=499
<i>bla</i> <sub>СТХ-М</sub> + <i>bla</i> <sub>ТЕМ</sub> + <i>bla</i> <sub>SHV</sub>	145 (66,2)	14 (6,5)	3 (6,7)	0	162 (32,5)
<i>bla</i> <sub>СТХ-М</sub> + <i>bla</i> <sub>ТЕМ</sub>	4 (1,8)	111 (51,4)	15 (33,3)	11 (57,9)	141 (28,3)
<i>bla</i> <sub>ТЕМ</sub> + <i>bla</i> <sub>SHV</sub>	20 (9,1)	8 (3,7)	16 (35,6)	3 (15,8)	47 (9,4)
<i>bla</i> <sub>СТХ-М</sub> + <i>bla</i> <sub>SHV</sub>	37 (16,9)	7 (3,2)	0	0	44 (8,8)
<i>bla</i> <sub>СТХ-М</sub>	0	62 (28,7)	2 (4,4)	1 (5,3)	65 (13,0)
<i>bla</i> <sub>ТЕМ</sub>	1 (0,5)	10 (4,6)	3 (6,7)	4 (21,1)	18 (3,6)
<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	11 (5,0)	1 (0,5)	3 (6,7)	0	15 (3,0)
Не определены	1 (0,5)	3 (1,4)	3 (6,7)	0	7 (1,4)
Всего <i>bla</i> <sub>СТХ-М</sub>	186 (84,9)	194 (89,8)	20 (42,6)	12 (63,2)	412 (82,6)
Всего <i>bla</i> <sub>ТЕМ</sub>	170 (77,6)	143 (66,2)	37 (82,2)	18 (94,7)	368 (73,7)
Всего <i>bla</i> <sub>SHV</sub>	213 (97,3)	30 (13,9)	22 (48,9)	3 (15,8)	268 (53,7)

\* *K. oxytoca* (n=6), *P. mirabilis* (n=5), *S. marcescens* (n=4), *C. freundii* (n=2), *P. gergoviae* (n=2).

Хрульнова С.А. и соавт.

Молекулярная характеристика Enterobacteriales с продукцией БЛРС

280-s-R 5'-AGATCCTGCTGGCGATAGT-3'). Амплификацию проводили в термоциклере CFX96 Touch (BioRad, США).

Определение генов кластеров *bla*<sub>СТХ-М-1</sub>, *bla*<sub>СТХ-М-2</sub>, *bla*<sub>СТХ-М-8</sub>, *bla*<sub>СТХ-М-9</sub> и *bla*<sub>СТХ-М-25</sub> проводили методом ПЦР с использованием специфических праймеров, представленных в статье Wooaford N. и соавт. [12].

## Результаты

Всего было исследовано 499 изолятов Enterobacteriales с продукцией БЛРС, выделенных из гемокультуры больных опухолями системы крови, которые были представлены 8 видами бактерий с преобладанием *K. pneumoniae* (43,9%) и *E. coli* (43,3%), Таблица 1. В этой когорте микроорганизмов *E. cloacae* составили 9%, остальные виды суммарно – 3,8%.

В Таблице 2 представлено распределение изучаемых генов бета-лактамаз. В геномах БЛРС-положительных Enterobacteriales преобладали гены *bla*<sub>СТХ-М</sub> (82,6%), далее следовали гены *bla*<sub>ТЕМ</sub> (73,7%) и *bla*<sub>SHV</sub> (53,7%). Ферменты СТХ-М типа были представлены в сопоставимых долях у изолятов *E. coli* (89,8%) и *K. pneumoniae* (84,9%), только у 42,6% *E. cloacae*. ТЕМ тип бета-лактамаз преобладал у *E. cloacae* (82,2%) и у Enterobacteriales, объединенных в группу «другие» (94,7%). Гены *bla*<sub>SHV</sub> были обнаружены почти у половины изолятов *E. cloacae* (48,9%) и лишь у 13,9% *E. coli*. У 1,4% (n=7) изолятов Enterobacteriales с продукцией БЛРС исследуемые гены *bla*<sub>СТХ-М</sub>, *bla*<sub>ТЕМ</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> выявлены не были.

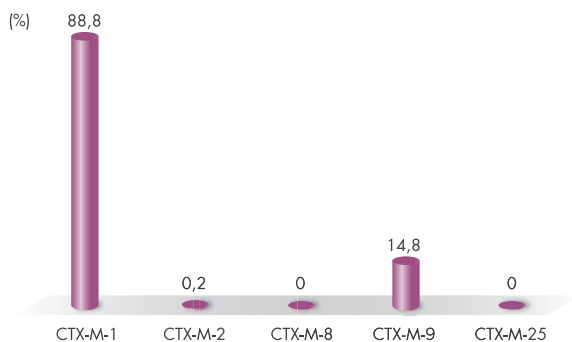
Гены исследуемых типов бета-лактамаз были представлены у Enterobacteriales в сочетаниях и изолированно. У большинства изолятов Enterobacteriales с продукцией БЛРС (79%) было выявлено сочетание генов разных типов бета-лактамаз (СТХ-М, ТЕМ и SHV), изолированно – только у 19,6% изолятов (Таблица 2). Максимальная доля изолятов, имеющих комбинации генов бета-лактамаз разных типов, была определена у *K. pneumoniae* (94%), и среди них преобладало присутствие одновременно всех трех исследуемых генов (66,2%). Сочетание исследуемых генов резистентности определялось реже у *E. coli* (64,8%) и *E. cloacae* (75,6%). В геномах *E. cloacae* с продукцией

БЛРС в равных долях присутствовали комбинации генов *bla*<sub>СТХ-М</sub> + *bla*<sub>ТЕМ</sub> (33,3%) и *bla*<sub>ТЕМ</sub> + *bla*<sub>SHV</sub> (35,6%), а у *E. coli* преобладали гены *bla*<sub>СТХ-М</sub> + *bla*<sub>ТЕМ</sub> (51,4%). Наличие генов бета-лактамаз только одного типа чаще выявлялось у *E. coli* (33,8%) и было представлено генами *bla*<sub>СТХ-М</sub> (28,7%), Таблица 2.

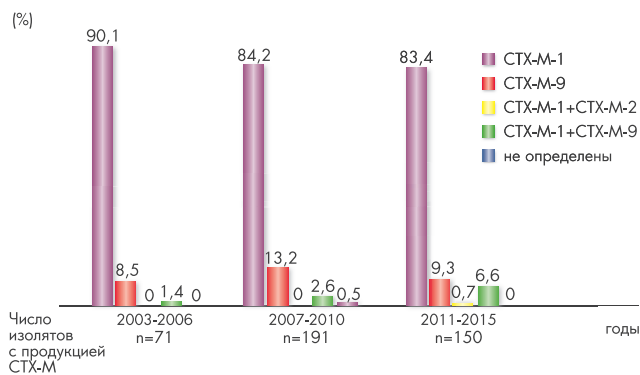
Гены *bla*<sub>СТХ-М</sub>, обнаруженные у изолятов Enterobacterales с продукцией БЛРС, принадлежали к трем кластерам. Наиболее распространенными были гены кластера *bla*<sub>СТХ-М-1</sub> (88,8%), реже выявляли *bla*<sub>СТХ-М-9</sub> (14,8%) и *bla*<sub>СТХ-М-2</sub> (0,2%), Рисунок 1. Гены кластеров *bla*<sub>СТХ-М-8</sub> и *bla*<sub>СТХ-М-25</sub> обнаружены не были.

Гены кластера *bla*<sub>СТХ-М-1</sub> преобладали у всех исследуемых видов Enterobacterales и были представлены как изолированно (78,9-100%), так и в сочетаниях (0,5-4,8%), Таблица 3. Гены бета-лактамаз двух разных кластеров СТХ-М были выявлены у 17 (4,1%) из 412 изолятов. Наиболее распространенным было сочетание генов кластеров *bla*<sub>СТХ-М-1</sub> + *bla*<sub>СТХ-М-9</sub> (3,9%) и определялось у *K. pneumoniae* (4,8%) и *E. coli* (3,6%). Гены кластера *bla*<sub>СТХ-М-9</sub> были обнаружены у 61 изолята Enterobacterales, преобладали у *E. coli* (у 41 из 61 изолята), были представлены в основном изолированно (в 45 из 61), сочетание определялось с генами кластера *bla*<sub>СТХ-М-1</sub> (у 16 из 61). Ген кластера *bla*<sub>СТХ-М-2</sub> был обнаружен только у одного изолята *K. pneumoniae* в комбинации с геном кластера *bla*<sub>СТХ-М-1</sub> (0,2%). У 1 (0,2%) из 412 СТХ-М-продуцирующих изолятов Enterobacterales не были установлены исследуемые кластеры ферментов.

На Рисунке 2 представлено распределение генов разных кластеров СТХ-М типа в исследуемые временные периоды. Гены кластера *bla*<sub>СТХ-М-1</sub>, определяемые изолированно, доминировали в течение всего исследования.

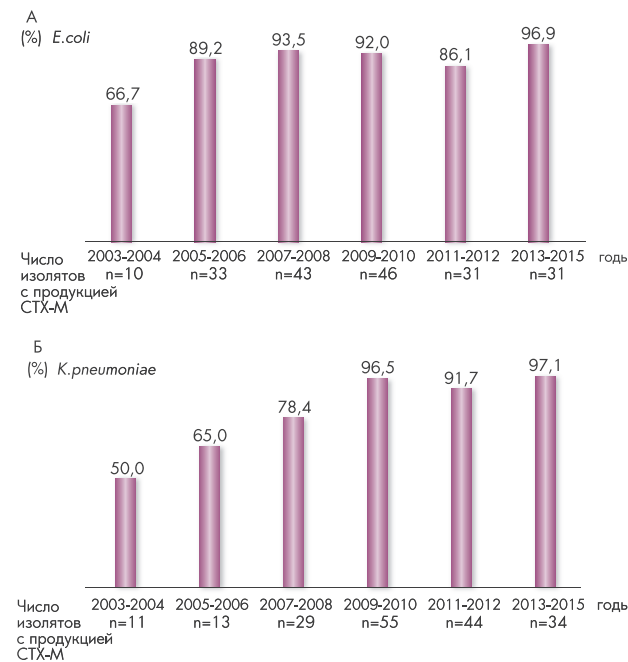


**Рисунок 1.** Распределение генов бета-лактамаз, относящихся к разным кластерам СТХ-М, у изолятов Enterobacterales с продукцией БЛРС



**Рисунок 2.** Распределение генов разных кластеров БЛРС СТХ-М типа в исследуемые временные периоды

Однако за анализируемый период произошло их снижение с 90,1% (2003-2006 гг.) до 83,4% (2011-2015 гг.) за счет увеличения сочетания с генами других кластеров *bla*<sub>СТХ-М</sub>. Следующими по распространенности были гены кластера *bla*<sub>СТХ-М-9</sub>, представленные изолированно в геномах Enterobacterales, и их доля варьировала от 8,5% до 13,2%. С течением времени наблюдалась отчетливая



**Рисунок 3.** Динамика распределения генов *bla*<sub>СТХ-М</sub> у *E. coli* (А) и *K. pneumoniae* (Б) с продукцией БЛРС

**Таблица 3.** Гены кластеров бета-лактамаз СТХ-М типа у изолятов Enterobacterales с продукцией БЛРС

Гены кластеров СТХ-М	Изоляты, n (%)				
	<i>K. pneumoniae</i> n=186	<i>E. coli</i> n=194	<i>E. cloacae</i> n=20	Другие* n=12	Всего n=412
<i>bla</i> <sub>СТХ-М-1</sub>	165 (88,7)	153 (78,9)	20 (100)	11 (91,7)	349 (84,7)
<i>bla</i> <sub>СТХ-М-9</sub>	10 (5,4)	34 (17,5)	0	1 (8,3)	45 (10,9)
<i>bla</i> <sub>СТХ-М-1</sub> + <i>bla</i> <sub>СТХ-М-9</sub>	9 (4,8)	7 (3,6)	0	0	16 (3,9)
<i>bla</i> <sub>СТХ-М-1</sub> + <i>bla</i> <sub>СТХ-М-2</sub>	1 (0,5)	0	0	0	1 (0,2)
Не определены	1 (0,5)	0	0	0	1 (0,2)

\* *K. oxytoca* (n=6), *P. mirabilis* (n=4), *S. marcescens* (n=1), *C. freundii* (n=1).

тенденция к увеличению доли изолятов Enterobacteriales, несущих комбинацию генов кластеров  $bla_{CTX-M-1}$  и  $bla_{CTX-M-9}$  с 1,4% (2003-2006 гг.) до 6,6% (2011-2015 гг.). Следует отметить, что более поздний анализируемый период (2011-2015 гг.) характеризовался наибольшим разнообразием вариантов присутствия генов  $bla_{CTX-M}$  в геномах изолятов Enterobacteriales, как изолировано, так и в сочетаниях (Рисунок 2).

Динамика распределения генов бета-лактамаз CTX-M типа среди *K. pneumoniae* и *E. coli*, ведущих представителей Enterobacteriales, в разные периоды исследования представлена на Рисунке 3. Существенное увеличение доли CTX-M-позитивных изолятов с последующим выходом на плато среди изолятов *E. coli* произошло в более ранний период в сравнении с изолятами *K. pneumoniae*. Так, доля изолятов *E. coli*, несущих гены  $bla_{CTX-M}$ , увеличилась с 66,7% до 89,2% при сравнении 2003-2004 гг. и 2005-2006 гг., достигла 93,5% в 2007-2008 гг., выйдя на плато в последующие годы исследования (Рисунок 3, А). У *K. pneumoniae* увеличение доли изолятов с продукцией ферментов CTX-M типа происходило более плавно в сравнении с изолятами *E. coli*, и в 2009-2010 гг. их доля составила 96,5% (Рисунок 3, Б).

## Обсуждение

Основными представителями Enterobacteriales с продукцией БЛРС, выделенными из гемокультуры больных опухолями системы крови, были *K. pneumoniae* (43,9%) и *E. coli* (43,3%), как и в ранее проведенном нами исследовании [1]. Однако в отличие от исследования 2003-2005 гг. [1], в котором продуценты БЛРС были представлены тремя видами Enterobacteriales (*K. pneumoniae*, *E. coli* и *P. mirabilis*), в данной работе спектр Enterobacteriales с продукцией БЛРС был шире и состоял из 8 видов, включая такие возбудители как *E. cloacae*, *K. oxytoca*, *S. marcescens*, *C. freundii*, *P. gergoviae*. Преобладание *K. pneumoniae* и *E. coli* среди продуцентов БЛРС и в то же время видовое расширение БЛРС-позитивных Enterobacteriales среди клинически значимых возбудителей инфекций в многопрофильных стационарах было отмечено и другими исследователями [4, 13, 14].

В России, как и во всем мире, отмечено увеличение доли БЛРС-продуцирующих изолятов, содержащих гены бета-лактамаз CTX-M типа. В представленном исследовании гены  $bla_{CTX-M}$  доминировали и были определены в геномах 82,6% БЛРС-позитивных изолятов Enterobacteriales, выделенных из гемокультуры, гены  $bla_{TEM}$  и  $bla_{SHV}$  – в 73,7% и 53,7% соответственно. У БЛРС-продуцирующих изолятов Enterobacteriales, выделенных от больных в многопрофильных стационарах (2002-2007 гг.), частота детекции генов  $bla_{SHV}$  была сопоставима с нашими результатами и составляла 45-55%, генов  $bla_{TEM}$  – 43-47%, причем в этих исследованиях видовой состав бактерий, включая *Klebsiella* spp. (39-47%), был сопоставимым с нашим исследованием [13, 15]. Как отмечалось ранее, метод ПЦР не позволяет дифференцировать бета-лактамазы типов TEM и SHV на ферменты широкого и расширенного спектра и вполне определенно, что изучаемые нами изоляты Enterobacteriales с продукцией БЛРС имели и гены бета-лактамаз широкого спектра.

Сочетание генов разных типов бета-лактамаз было обнаружено у 79% Enterobacteriales, выделенных из гемокультуры больных опухолями системы крови, и этот показатель был выше, чем в других российских исследованиях (40-68%) [13, 15]. В работах других исследователей при анализе продуцентов БЛРС, выделенных из гемокультуры больных в многопрофильных стационарах, частота детекции комбинации генов разных типов бета-лактамаз у изолятов *E. coli* была сопоставима с нашими данными, и были выявлены некоторые отличия по изолятам *K. pneumoniae*. В исследовании Wang S. и соавт. [16] комбинация генов двух типов бета-лактамаз преобладала у изолятов *E. coli*, выделенных из гемокультуры больных в многопрофильных стационарах (62,3%). Нами было выявлено сочетание двух типов бета-лактамаз у 58,5% *E. coli*. В работе Cubero M. и соавт. [17] детекция сочетания генов двух или трех типов бета-лактамаз у *K. pneumoniae* составила 96,7% и была сопоставима с нашими данными (94%). Отличия были выявлены по числу сочетаний. Так, в исследовании Cubero M. и соавт. [17] 80% сочетаний были представлены двумя генами, а по нашим данным, у 66,2% изолятов *K. pneumoniae* определялись гены трех ферментов. Вероятно, наблюдаемые различия в соотношении частоты детекции генов двух или трех типов ферментов связаны с категорией больных, от которых были получены исследуемые изоляты *K. pneumoniae*. Для больных опухолями системы крови характерным является длительное, неоднократное пребывание в стационаре, и вполне определенно, что у микроорганизмов, колонизирующих слизистую оболочку желудочно-кишечного тракта, создаются условия для обмена генетической информацией, а транслокация бактерий из кишечника относится к основному механизму развития инфекций кровотока в период нейтропении.

В геномах исследуемых нами изолятов Enterobacteriales были обнаружены гены трех кластеров  $bla_{CTX-M}$  ( $bla_{CTX-M-1}$ ,  $bla_{CTX-M-2}$  и  $bla_{CTX-M-9}$ ), из которых доминировали гены кластера  $bla_{CTX-M-1}$  (88,8%) аналогично другим российским исследованиям (94,1-93,8%) [4, 13]. Преобладание генов кластера  $bla_{CTX-M-1}$  было подтверждено и другими исследованиями. Так, во Франции гены кластера  $bla_{CTX-M-1}$  были обнаружены у 87% *E. coli*, выделенных из гемокультуры больных с онкогематологическими заболеваниями [18], в Китае этот показатель был несколько ниже и составил 63,2% у изолятов *E. coli*, выделенных из гемокультуры больных без опухолей системы крови [16]. В то же время следует отметить, что не во всех странах гены кластера  $bla_{CTX-M-1}$  являются доминирующими. В Юго-Восточной Азии, Южной Корее, Японии и Испании преобладали гены, относящиеся к кластеру  $bla_{CTX-M-9}$ , а в Южной Америке – к кластеру  $bla_{CTX-M-2}$  [19]. В Испании частота детекции генов кластера  $bla_{CTX-M-9}$  у *E. coli*, колонизирующих слизистую оболочку кишечника больных с гематологическими заболеваниями, составила 55% [20], в нашем исследовании – только у 14,8% Enterobacteriales. В Японии гены кластера  $bla_{CTX-M-9}$  преобладали у Enterobacteriales, выделенных из гемокультуры (43,2%) [21], и среди изолятов, вызвавших внебольничные инфекции (66,9%) [22]. Только один (0,2%) из исследуемых нами изолятов Enterobacteriales содержал в своем геноме ген кластера  $bla_{CTX-M-2}$ . В других исследованиях частота детекции генов

кластера *bla*<sub>CTX-M-2</sub> также была невысокой и варьировала от полного отсутствия до 7-13,4% [3, 20, 22].

Гены разных кластеров *bla*<sub>CTX-M</sub> были представлены в основном изолированно (95,6%), а у 4,1% изолятов в сочетании с преобладанием *bla*<sub>CTX-M-1</sub> + *bla*<sub>CTX-M-9</sub> (3,9%). В исследовании Прячук С.Д. и соавт. [13] сочетание генов кластеров *bla*<sub>CTX-M-1</sub> + *bla*<sub>CTX-M-9</sub> было выявлено только у 0,8% исследуемых изолятов. Более высокий процент обнаружения в сочетаниях генов разных кластеров *bla*<sub>CTX-M</sub> в нашем исследовании в сравнении с другими исследованиями в России, вероятно, также можно объяснить категорией больных, от которых они были выделены.

В нашем исследовании, как и в ранее опубликованной работе Эйдельштейн М.В. и соавт. [4], были показаны разные временные тенденции в распространении генов *bla*<sub>CTX-M</sub> у изолятов *E. coli* и *K. pneumoniae*. Увеличе-

ние почти в 1,5 раза доли CTX-M-продуцирующих *E. coli* произошло в более ранний период в сравнении с изолятами *K. pneumoniae*.

## Заключение

Данное исследование показало, что среди изолятов БЛРС-продуцирующих Enterobacterales, выделенных из гемокультуры больных опухолями системы крови, преобладали гены *bla*<sub>CTX-M</sub> (82,6%), из них основная доля принадлежала к кластеру *bla*<sub>CTX-M-1</sub> (88,8%). Особенностью микроорганизмов, выделенных из гемокультуры, было наличие сочетания генов двух или трех типов бета-лактамаз у большинства исследуемых изолятов (79%) и генов двух разных кластеров у CTX-M-продуцирующих Enterobacterales (4,1%).

## Литература

1. Klyasova G.A., Speranskaya L.L., Mironova A.V., et al. The pathogens causing sepsis in immunocompromized patients: structure and problems of antibiotic resistance. Results of a multi-center cooperative study. *Gematologiya i transfuziologiya*. 2007;52(1):13-18. Russian. (Клясова Г.А., Сперанская Л.Л., Миронова А.В. и соавт. Возбудители сепсиса у иммунокомпрометированных больных: структура и проблемы антибиотикорезистентности (результаты многоцентрового исследования). *Гематология и трансфузиология*. 2007;52(1):13-18.)
2. Sidorenko S.V., Strachounski L.S., Ahmedova L.I., et al. The results of the multicenter study of the comparative activity of cefepime and other antibiotics against pathogens of severe nosocomial infection (the program "Micromax"). *Antibiotiki i khimioterapiya*. 1999;44(11):7-16. Russian. (Сидоренко С.В., Страчунский Л.С., Ахмедова Л.И. и соавт. Результаты многоцентрового исследования сравнительной активности цефепима и других антибиотиков в отношении возбудителей тяжелых госпитальных инфекций (программа «Micromax»). *Антибиотики и химиотерапия*. 1999;44(11):7-16.)
3. Eidelstein M., Pimkin M., Palagin I., Eidelstein I., Strachounski L. Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47:3724-3732.
4. Eidelstein M.V., Strachounski L.S. Trends in the prevalence and susceptibility of ESBL-producing Enterobacteriaceae to various antimicrobial agents in Russian ICUs. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2005;7(4):323-336. Russian. (Эйдельштейн М.В., Страчунский Л.С. Динамика распространенности и чувствительности БЛРС-продуцирующих штаммов энтеробактерий к различным антимикробным препаратам в ОРИТ России. *Клиническая микробиология антимикробная химиотерапия*. 2005;7(4):323-336.)
5. Klyasova G.A., Okhmat V.A. Antimicrobial therapy. In: Savchenko V.G., ed. Algorithms of diagnosing and protocols of treatment of blood system diseases. Moscow: Praktika; 2018. P.1069-1113. Russian. (Клясова Г.А. Охмат В.А. Антимикробная терапия. Под редакцией Савченко В.Г. Алгоритмы диагностики и протоколы лечения заболеваний системы крови. Москва: Практика; 2018. с.1067-1113.)
6. Payne D.J., Marriott M.S., Amyes S.G. Characterization of a unique ceftazidime-hydrolyzing beta-lactamase, TEM-E2. *J Med Microbiol*. 1990;32(2):131-134.
7. Heritage J., Hawkey P.M., Todd N., Lewis I.J. Transposition of the gene encoding a TEM-12 extended-spectrum beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*. 1992;36(9):1981-1986.
8. Knothe H., Shah P., Krcmery V., Antal M., Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection*. 1983;11(6):315-317.
9. Kliebe C., Nies B.A., Meyer J.F., Tolxdorff-Neutzling R.M., Wiedemann B. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother*. 1985;28(2):302-307.
10. Bauernfeind A., Schweighart S., Grimm H. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection*. 1990;18(5):294-298.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Seventh Informational Supplement. CLSI document M100-S27. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.
12. Woodford N., Fagan E.J., Ellington M.J. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum (beta)-lactamases. *J Antimicrob Chemother*. 2006;57(1):154-155.
13. Pryamchuk S.D., Fursova N.K., Abaev I.V., et al. Genetic determinants of antibacterial resistance among nosocomial *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., and *Enterobacter* spp. isolates collected in Russia within 2003-2007. *Antibiotiki i khimioterapiya*. 2010;55(9-10):3-10. Russian. (Прямчук С.Д., Фурсова Н.К., Абаев И.В. и соавт. Генетические детерминанты устойчивости к антибактериальным средствам в нозокомиальных штаммах *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. и *Enterobacter* spp., выделенных в России в 2003-2007 гг. *Антибиотики и химиотерапия*. 2010;55(9-10):3-10.)
14. Robin F., Beyrouthy R., Bonacorsi S., et al. Inventory of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae in France as assessed by a multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(3):e01911-16.
15. Sidorenko S.V., Berezin A.G., Ivanov D.V. Molecular mechanisms of cephalosporins resistance in gramnegative bacteria of the Enterobacteriaceae family. *Antibiotiki i khimioterapiya*. 2004;49(3):6-16. Russian. (Сидоренко С.В., Березин А.Г., Иванов Д.В. Молекулярные механизмы устойчивости грамотрицательных бактерий семейства Enterobacteriaceae к цефалоспориновым антибиотикам. *Антибиотики и химиотерапия*. 2004;49(3):6-16.)
16. Wang S., Zhao S.Y., Xiao S.Z., et al. Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of *Escherichia coli* causing bloodstream infections in three hospitals in Shanghai, China. *PLoS One*. 2016;11(1):e0147740.
17. Cubero M., Grau I., Tubau F., et al. Molecular Epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* strains causing bloodstream infections in adults. *Microb Drug Resist*. 2018;24(7):949-957.
18. Denis B., Lafaurie M., Donay J.L., et al. Prevalence, risk factors, and impact on clinical outcome of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* bacteraemia: a five-year study. *Int J Infect Dis*. 2015;39:1-6.
19. Bevan E.R., Jones A.M., Hawkey P.M. Global epidemiology of CTX-M  $\beta$ -lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. *J Antimicrob Chemother*. 2017;72:2145-2155.
20. Arnan M., Gudiol C., Calatayud L., et al. Risk factors for, and clinical relevance of, faecal extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Escherichia coli* (ESBL-EC) carriage in neutropenic patients with haematological malignancies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011;30(3):355-360.
21. Noguchi T., Matsumura Y., Yamamoto M., et al. Clinical and microbiologic characteristics of cefotaxime-non-susceptible Enterobacteriaceae bacteremia: a case control study. *BMC Infect Dis*. 2017;17(1):44.
22. Shibasaki M., Komatsu M., Sueyoshi N., et al. Community spread of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing bacteria detected in social insurance hospitals throughout Japan. *J Infect Chemother*. 2016;22(6):395-399.

Хрульнова С.А. и соавт.