

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр гематологии»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Коробова Анна Геннадьевна

**МОНИТОРИНГ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ С ПРОДУКЦИЕЙ БЕТА-ЛАКТАМАЗ
РАСШИРЕННОГО СПЕКТРА, ВЫДЕЛЕННЫХ У БОЛЬНЫХ ГЕМОБЛАСТОЗАМИ
ПРИ ХИМИОТЕРАПИИ**

14.01.21 - гематология и переливание крови

03.02.03 - микробиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
д.м.н., профессор Клясова Г.А.

Москва - 2018

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	4
Глава 1. Обзор литературы	10
1.1 Устойчивость бактерий к β -лактамам антибиотикам. Классификация β -лактамаз.....	10
1.2 Основные типы β -лактамаз.....	13
1.3 Распространение β -лактамаз расширенного спектра среди клинически значимых энтеробактерий ...	16
1.4 Источники инфицирования энтеробактериями в стационаре	22
1.5 Значение колонизации слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией β -лактамаз расширенного спектра	27
1.7 Методы детекции β -лактамаз у энтеробактерий.....	33
1.8 Заключение по обзору литературы	38
Глава 2. Материалы и методы.....	40
2.1 Общая характеристика и дизайн исследования, характеристика больных	40
2.2 Выделение и идентификация бактериальных изолятов	43
2.3 Фенотипическая детекция β -лактамаз	44
2.4 Детекция генов β -лактамаз	45
2.5 Генотипирование энтеробактерий с продукцией β -лактамаз расширенного спектра.....	46
2.6 Статистическая обработка результатов	47
Глава 3. Результаты исследования и обсуждение.....	49
3.1 Детекция энтеробактерий с продукцией β-лактамаз расширенного спектра у больных ОМЛ и лимфомами при поступлении в стационар и в процессе программной химиотерапии.....	49
3.1.1 Частота выявления и факторы риска колонизации слизистых оболочек ротовой полости и кишечника энтеробактериями с продукцией β -лактамаз расширенного спектра у больных ОМЛ и лимфомами при поступлении.....	49
3.1.2 Мониторинг энтеробактерий с продукцией β -лактамаз расширенного спектра в процессе программной полихимиотерапии у больных ОМЛ и лимфомами	54
3.2 Использование селективной хромогенной среды для детекции энтеробактерий с продукцией β-лактамаз	65
3.3 Характеристика энтеробактерий с продукцией β-лактамаз расширенного спектра, выделенных при мониторинге у больных ОМЛ и лимфомами.....	69

3.4 Генотипирование энтеробактерий с продукцией β-лактамаз расширенного спектра, выделенных из гемокультуры и со слизистой оболочки прямой кишки, у больных заболеваниями системы крови	78
Заключение.....	84
Выводы.....	91
Практические рекомендации.....	92
Список используемых сокращений	93
Список литературы.....	95

Введение

Актуальность проблемы

Современные программы химиотерапии (ХТ) позволяют достичь высокой общей выживаемости у больных гемобластозами, но наряду с успехами в лечении больных увеличивается риск возникновения тяжелых инфекционных осложнений. Бактериемия является одним из частых и тяжелых осложнений у иммунокомпрометированных больных. В настоящее время в структуре возбудителей бактериемии отмечена тенденция к увеличению доли грамотрицательных микроорганизмов, включая энтеробактерии (33,4%), из которых основную часть составляют *Escherichia coli* (18,6%) и *Klebsiella pneumoniae* (7,3%) [4]. Среди энтеробактерий регистрируется высокая частота детекции продуцентов β -лактамаз расширенного спектра (БЛРС) и составляет 43%.

Продукция БЛРС является одним из наиболее распространенных механизмов резистентности у энтеробактерий. Ферменты БЛРС отвечают за гидролиз таких β -лактамных антибиотиков, как цефалоспорины III–IV поколений, которые длительное время составляли основу лечения инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями. В отношении продуцентов БЛРС активность проявляют ограниченное число антибиотиков. Инфекционные осложнения, вызываемые энтеробактериями с продукцией БЛРС, характеризуются тяжелым течением, удлинением периода госпитализации, высокой летальностью и увеличением финансовых затрат на лечение. Одна из ведущих причин высокой летальности – это неадекватная стартовая терапия противомикробными препаратами. В этой связи крайне важным является определение продукции БЛРС у энтеробактерий и предоставление результатов в клинические отделения в максимально короткие сроки.

У больных гемобластозами преобладает эндогенный путь в развитии инфекционных осложнений, при котором происходит транслокация бактерий со слизистой оболочки кишечника в кровотоки [40]. К факторам риска, индуцирующим колонизацию слизистой оболочки энтеробактериями с продукцией БЛРС, относят применение антибиотиков, особенно цефалоспоринов III поколения, неадекватную антимикробную терапию, длительную госпитализацию, пребывание в отделении реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ), использование инвазивных методов исследования [104]. Как правило, у больных гемобластозами в период проведения курсов ХТ присутствует сразу несколько факторов риска: длительное пребывание больного в стационаре (иногда 6–10 месяцев), тяжелое течение заболевания, для адекватной терапии которого необходимо проведение инвазивных исследований, а также наличие сосудистых доступов.

Существует ограниченное число публикаций по анализу временных параметров детекции БЛРС-положительных энтеробактерий и частоте колонизации ими слизистой оболочки кишечника у гематологических больных во время реализации программной ХТ. Недостаточно изучено значение колонизации слизистой оболочки кишечника продуцентами БЛРС в развитии инфекций кровотока. Исследование частоты и времени детекции энтеробактерий с продукцией БЛРС со слизистой оболочки кишечника и определение факторов риска колонизации этими микроорганизмами, несомненно, важно для проведения профилактики инфекционных осложнений у больных гемобластозами и для правильного выбора антимикробной терапии при возникновении инфекций.

Цель исследования

Изучить частоту детекции энтеробактерий, продуцирующих БЛРС, со слизистой оболочки кишечника при программной химиотерапии и их значение в развитии инфекций кровотока у больных острыми миелоидными лейкозами (ОМЛ) и лимфомами.

Задачи исследования

1. Определить частоту детекции энтеробактерий с продукцией БЛРС со слизистой оболочки кишечника у больных ОМЛ и лимфомами при поступлении в стационар и в процессе ХТ.
2. Изучить временной интервал и факторы, влияющие на колонизацию слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС при проведении ХТ.
3. Оценить возможность использования селективной хромогенной среды для детекции энтеробактерий с продукцией БЛРС.
4. Исследовать молекулярные типы БЛРС и провести сравнительную характеристику БЛРС у разных групп больных и на разных этапах лечения.
5. Провести генотипирование изолятов энтеробактерий с продукцией БЛРС, выделенных со слизистой оболочки кишечника и из гемокультуры.

Научная новизна исследования

Проведено первое в России длительное мониторинговое исследование (в течение 6 месяцев) по детекции колонизации слизистой оболочки кишечника БЛРС-положительными энтеробактериями у больных ОМЛ и лимфомами. Доказано, что выделение продуцентов БЛРС со слизистой оболочки кишечника у больных с впервые диагностированными ОМЛ и лимфомами

до проведения цитостатической терапии определяется у 24% и 28% больных, соответственно. Вероятность колонизации слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС за 6 месяцев наблюдения достигает 91% у больных лимфомами и 84% у больных ОМЛ. Колонизация слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС не относится к постоянному признаку. Вероятность сохранения колонизации в течение 6 месяцев наблюдения составляет 30,3% (53,4% у больных лимфомами и 15,7% у больных ОМЛ). Вероятность ре-колонизации продуцентами БЛРС у больных, имевших их эрадикацию, наблюдается у 49,4% больных (у 57,2% больных лимфомами и у 36,5% больных ОМЛ).

Изучены факторы риска колонизации слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС при первом поступлении в стационар и в процессе ХТ в общей группе больных и отдельно у больных ОМЛ и лимфомами. Доказано, что при первом поступлении в Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации («НМИЦ гематологии») продуценты БЛРС значимо чаще определяются со слизистой оболочки кишечника у больных, переведенных из других стационаров (38% против 20%, $p = 0,01$) и пациентов в возрасте от 50 лет и старше в сравнении с больными моложе 50 лет (38% против 20%, $p = 0,05$, соответственно). Эти факторы были значимыми и у больных лимфомами. У больных ОМЛ значимым фактором колонизации продуцентами БЛРС было проживание вне Москвы (37% против 7%, $p = 0,04$). В процессе ХТ значимыми факторами, ассоциированными с колонизацией энтеробактериями с продукцией БЛРС, были парентеральное питание перед вторым курсом ХТ (100% против 25%, $p = 0,05$) и непрерывное пребывание больного в стационаре перед четвертым курсом ХТ (100% против 51%, $p = 0,002$).

Определено, что среди продуцентов БЛРС ведущими являются *E. coli* и *K. pneumoniae* как в общей группе больных, так и среди больных ОМЛ и лимфомами. Отмечено преобладание СТХ-М типа β -лактамаз (73%), ТЕМ β -лактамазы определялись реже (38%).

Доказано наличие как моноклонального, так и поликлонального распространения продуцентов БЛРС, выделенных со слизистой оболочки кишечника. В результате генотипирования было выявлено генетическое разнообразие изолятов *E. coli* с продукцией БЛРС, выделенных со слизистой оболочки кишечника при первом поступлении в стационар, и определено генетическое родство у 59% продуцентов БЛРС, выделенных в процессе ХТ.

Выявлено преобладание эндогенного пути инфицирования у больных опухолями системы крови при бактериемии, вызванной энтеробактериями с продукцией БЛРС. Не было определено генетического родства между энтеробактериями с продукцией БЛРС, выделенными из гемокультуры от разных больных. Доказано, что бактериемия, вызванная продуцентами БЛРС, была только у пациентов с колонизацией слизистой оболочки кишечника идентичными по виду

БЛРС-положительными энтеробактериями, а в 26% случаев было подтверждение генетического родства идентичных по виду изолятов, выделенных из гемокультуры и со слизистой оболочки прямой кишки.

Научно-практическая ценность работы

Проведенное исследование показало высокую чувствительность (98%) и специфичность (97%) хромогенной селективной среды CHROMagarTMESBL для детекции энтеробактерий с продукцией БЛРС. На основании полученных результатов хромогенные селективные среды можно рекомендовать для использования в рутинной практике лабораторий микробиологии с целью сокращения времени представления результата по детекции продуцентов БЛРС.

Доказано, что энтеробактерии с продукцией БЛРС значимо чаще и раньше по времени выделяются со слизистой оболочки прямой кишки, чем ротоглотки (36% против 17%, $p < 0,01$; 34 дня против 56 дней), причем, колонизация слизистой оболочки ротоглотки наблюдается только у больных с предшествующей колонизацией прямой кишки. Следовательно, для детекции колонизации энтеробактериями с продукцией БЛРС достаточно исследовать мазки со слизистой оболочки прямой кишки.

Статистический анализ позволил выявить группы больных с наибольшим риском колонизации слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС при поступлении в стационар и в процессе реализации ХТ. Необходимо, прежде всего, исследовать колонизацию БЛРС-положительными бактериями у больных от 50 лет и старше, поступивших из других стационаров, получавших парентеральное питание и длительно пребывающих в стационаре. Профилактика инфекционных осложнений фторхинолонами у больных с колонизацией продуцентами БЛРС не показана ввиду их неэффективности.

Доказано, что колонизация слизистой оболочки кишечника продуцентами БЛРС является предиктором бактериемии, вызванной этими бактериями. В этой связи необходимо проводить мониторинг колонизации слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС в процессе лечения у больных с высоким риском возникновения инфекционных осложнений. Детекция полирезистентных бактерий со слизистой оболочки кишечника косвенно позволяет предположить возможного возбудителя инфекции у больных с персистирующей лихорадкой неясной этиологии и гранулоцитопенией.

В результате исследования получены данные, подтверждающие экзогенную передачу продуцентов БЛРС от одного пациента к другому. В этой связи необходимо соблюдать стандарты инфекционного контроля в целях предотвращения распространения полирезистентных бактерий в стационаре.

Методология и методы исследования

Перед началом исследования было проведено планирование работы, разработан дизайн исследования и создана электронная база данных для сбора информации о включенных больных. По теме исследования был собран и проанализирован большой объем научной литературы, включающий в себя отечественные и иностранные источники. При выполнении данной работы были использованы микробиологические и молекулярно-генетические методы исследования. Анализ полученных данных был осуществлен с использованием статистических методов обработки результатов.

Положения, выносимые на защиту

1. Колонизация слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС у больных с впервые диагностированными ОМЛ и лимфомами определяется у части больных при поступлении и возрастает при программной ХТ, возможна их эрадикация и возобновление колонизации в процессе лечения.
2. Значимыми факторами, ассоциированными с колонизацией слизистой оболочки кишечника продуцентами БЛРС, при первом поступлении в стационар являются возраст больных от 50 лет и старше и перевод больного из другого стационара, в процессе ХТ – необходимость проведения парентерального питания и непрерывная госпитализация.
3. Среди БЛРС-положительных энтеробактерий преобладают *E. coli* (58,7%) и *K. pneumoniae* (25,3%), содержащие в основном СТХ-М тип БЛРС (73%). Доказано наличие как моноклонального, так и поликлонального распространения продуцентов БЛРС, выделенных со слизистой оболочки кишечника, у госпитализированных больных.
4. Колонизация слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС является предиктором бактериемии, вызванной идентичными по виду продуцентами БЛРС.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

О достоверности результатов работы свидетельствует использование стандартных микробиологических методов в соответствии с российскими и международными рекомендациями. Для внутреннего контроля качества использовали контрольные штаммы из Американской коллекции типовых культур (АТСС). В исследование включено достаточное количество больных и проведен значительный объем исследований, что позволило корректно осуществить статистическую обработку полученных данных.

Апробация работы состоялась 18 декабря 2017 года на заседании объединенной проблемной комиссии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России «Клинические исследования в гематологии (гемобласты, депрессии кроветворения; ТКМ; миело- и лимфопролиферативные заболевания; опухоли лимфатической системы; патология красной крови; ИТП; порфирии)» и «Фундаментальные исследования в гематологии, трансплантологии, трансфузиологии: Гемопоз, молекулярная биология, биотехнология, иммуногематология; биохимия; биофизика» (протокол № 14). Основные положения диссертационной работы доложены на II и III Конгрессах гематологов России (Москва, 2014 г., 2016 г.), Всероссийской научно-практической конференции специалистов по контролю инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (Москва, 2014 г.), производственном совещании «Лейкозы. Лимфомы. Терапия и фундаментальные исследования» (Москва, 2015 г.), Европейском конгрессе по клинической микробиологии и инфекционным заболеваниям (Копенгаген, 2015 г.; Амстердам, 2016 г.; Вена, 2017 г.), XXI Всероссийской научно-практической конференции «Качество лабораторных исследований – условие безопасности пациентов» (Москва, 2016 г.), II Российском конгрессе лабораторной медицины (Москва, 2016 г.).

Глава 1. Обзор литературы

1.1 Устойчивость бактерий к β -лактамам. Классификация β -лактамаз

β -Лактамные антибиотики составляют основу современной антибактериальной терапии, занимая важное место в лечении большинства инфекционных осложнений. В то же время, стремительное распространение бактерий с продукцией β -лактамаз, приводит к существенному ограничению выбора антибактериальных препаратов.

Устойчивость к β -лактамам антибиотикам у бактерий обусловлена несколькими механизмами. В их число входят снижение проницаемости внешней мембраны, активный транспорт антибиотиков из клетки, изменение структуры пенициллин-связывающих белков (ПСБ) и инактивация антибиотиков ферментами [17].

Основным механизмом, обеспечивающим устойчивость клинически важных изолятов энтеробактерий к β -лактамам антибиотикам, является гидролиз с помощью β -лактамаз. Ферменты β -лактамазы способны инактивировать β -лактамы за счет гидролиза или модификации структуры антимикробного препарата. Гены, кодирующие β -лактамазы, могут располагаться как на хромосомах, так и на плазидах. Плазмидная локализация генов обеспечивает возможность их горизонтального переноса и быстрого распространения детерминант устойчивости среди бактерий, что хорошо видно на примере значительного распространения энтеробактерий, продуцирующих β -лактамазы, среди госпитальных штаммов [15].

β -Лактамазы у бактерий появились задолго до начала применения β -лактамов антибиотиков в лечении инфекционных заболеваний. Поскольку пенициллин является продуктом жизнедеятельности мицелиальных грибов, то многие бактерии выработали механизм устойчивости к этому антибиотику. Основой бактерицидного действия β -лактамов является подавление формирования клеточной стенки за счет ингибирования ПСБ. В ходе эволюции произошло накопление точечных мутаций в геноме бактерий и некоторые белки приобрели способность разрушать соединения β -лактамов с ПСБ, что и привело к появлению β -лактамаз. Впоследствии хромосомные β -лактамазы оказались мобилизованными в состав подвижных генетических элементов, что стало одной из причин их быстрого распространения среди микроорганизмов.

Резистентность энтеробактерий к пенициллинам, связанная с разрушением этих антибиотиков ферментами β -лактамазами, была обнаружена в 40-х гг. XX века. Впервые процесс гидролиза пенициллина под действием биологически активных веществ, содержащихся в бесклеточном экстракте культуры *E. coli*, был описан Е.Р. Abraham и Е. Chain в 1940 г. [25].

В настоящее время известно более 500 различных β -лактамаз, которые встречаются практически у всех видов бактерий, вызывающих инфекции, и число этих ферментов постоянно растет (<http://www.lahey.org/studies>). Все β -лактамазы делят на четыре молекулярных класса (А, В, С и D) в зависимости от химического строения их молекул (Рисунок 1). Эта классификация β -лактамаз впервые была предложена R. Ambler в 1980 г. [28]. β -Лактамазы классов А, С и D относят к ферментам «серинового» типа, так как в активном центре этих ферментов находится аминокислота – серин. У ферментов класса В в качестве ко-фермента присутствует атом цинка (Zn^{2+}), поэтому их относят к металло- β -лактамазам.



Рисунок 1. Классификация β -лактамаз по молекулярным классам и функциональным группам [28, 45, 47]. Примечание: ферменты группы 2be и 2de относятся к БЛРС.

В 1989 г. К. Bush [44] впервые была предложена классификация β -лактамаз с использованием не только молекулярной структуры этих ферментов, но и их функциональных особенностей. Функциональная классификация β -лактамаз основана на их различной способности разрушать те или иные β -лактамные антибиотики. Эта система была уточнена и дополнена в 1995 г. коллективом авторов – К. Bush, G. Jacoby и A. Medeiros [46] с учетом новых ферментов, описанных у энтеробактерий. Последнее обновление функциональной классификации β -лактамаз было опубликовано К. Bush в 2010 г. [47], и в настоящее время эта классификация используется большинством исследователей. Согласно данной современной классификации все β -лактамазы разделены на 3 основные группы с учетом таких

функциональных особенностей, как преимущественный гидролиз определенных групп β -лактамных антибиотиков, чувствительность к действию ингибиторов β -лактамаз и расположение генов, кодирующих эти ферменты [8, 18, 22, 104].

В первую группу в соответствии с функциональной классификацией К. Bush входят ферменты, относящиеся к молекулярному классу С, среди них β -лактамазы AmpC. β -Лактамазы этой группы гидролизуют все цефалоспорины за исключением цефалоспоринов IV поколения. Ферменты AmpC устойчивы к действию ингибиторов β -лактамаз, таких как клавуланат, тазобактам и сульбактам. Гены, кодирующие AmpC β -лактамазы, располагаются на хромосомах у большинства представителей семейства Enterobacteriaceae [125], только у *Klebsiella* spp. и *Salmonella* spp. эти гены в составе хромосомы не найдены. Таким образом, представители родов *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Morganella*, *Providencia*, *Hafnia* и некоторые другие энтеробактерии способны проявлять природную устойчивость к цефалоспорином I-III поколений за счет гиперпродукции хромосомных AmpC β -лактамаз. У изолятов *E. coli* и *Klebsiella* spp. гены, кодирующие AmpC β -лактамазы, были обнаружены на плаزمидах, чаще других встречаются CMY, MIR, FOX, АСТ-типы плазмидных AmpC β -лактамаз [89].

К ферментам второй функциональной группы по классификации К. Bush относятся молекулярные классы А и D. На основании различий в преимущественном гидролизе разных β -лактамных антибиотиков ферменты этой группы разделены на ряд функциональных категорий – 2a, 2b, 2be, 2br, 2ber, 2c, 2ce, 2d, 2de, 2df, 2e, 2f. Особое значение в клинической практике имеют ферменты группы 2be и 2de, которые включают в себя ферменты, способные расщеплять не только пенициллины и цефалоспорины I поколения, но и цефалоспорины II, III, IV поколений и монобактамы. В группу 2be входят ферменты, чувствительные к действию ингибиторов β -лактамаз, таких как клавуланат, тазобактам и сульбактам, в то время как представители группы 2de малочувствительны к действию ингибиторов. Ферменты групп 2be и 2de были названы β -лактамазами расширенного спектра – БЛРС. Гены, кодирующие эти ферменты, расположены на конъюгативных плазмидах, благодаря такому расположению имеется возможность быстрого распространения генов, ответственных за продукцию БЛРС, среди бактерий. Появление плазмиды с генами резистентности у ранее чувствительного к цефалоспорином изолята приводит к развитию устойчивости к соответствующим антибиотикам. Чаще всего БЛРС встречаются у *E. coli* и *K. pneumoniae*, но могут быть обнаружены и у других видов семейства Enterobacteriaceae, а также представителей *Pseudomonas* spp. и *Acinetobacter* spp. [19, 109]. Среди нозокомиальных и внебольничных изолятов энтеробактерий наибольшее распространение получили такие ферменты из группы 2be, как TEM, SHV и CTX-M, а из группы 2de – OXA β -лактамазы (OXA-10, -11, -15 и другие).

К третьей функциональной группе, согласно классификации К. Bush [47], относятся цинкосодержащие β -лактамазы молекулярного класса В. Эти ферменты способны разрушать большинство β -лактамных антибиотиков, включая карбапенемы, и их действие не блокируется обычными ингибиторами β -лактамаз (клавуланат, тазобактам и сульбактам). Для ряда грамотрицательных бактерий, таких как *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia*, *Aeromonas* spp., *Bacteroides fragilis*, характерна продукция видоспецифических хромосомных металло- β -лактамаз. У представителей семейства Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* spp. и *Acinetobacter* spp. выявлены металло- β -лактамазы, гены которых имеют плазмидную локализацию [22]. К наиболее распространенным типам этой группы относятся VIM, IMP, NDM. В настоящее время продукция плазмидных металло- β -лактамаз у бактерий стала новой серьезной проблемой в лечении инфекционных осложнений.

Таким образом, β -лактамазы представляют обширную группу генетически и функционально разнородных ферментов. Продукция β -лактамаз является природным свойством для многих видов микроорганизмов, но наибольшее клиническое значение имеет приобретенная устойчивость к цефалоспорином, связанная с наличием у бактерий плазмидно-кодируемых ферментов. Особое значение БЛРС в клинической практике связано с их широким распространением среди энтеробактерий и с тем, что в отношении продуцентов БЛРС не активны такие антимикробные препараты, как цефалоспорины III-IV поколения. Часто энтеробактерии с продукцией БЛРС проявляют резистентность и к другим группам антибиотиков (фторхинолоны, аминогликозиды, триметоприм-сульфаметоксазол). При лечении инфекций, вызванных продуцентами БЛРС, препаратами выбора являются карбапенемы.

1.2 Основные типы β -лактамаз

Среди нозокомиальных и внебольничных возбудителей инфекций наибольшее распространение получили штаммы энтеробактерий с продукцией β -лактамаз TEM, SHV и CTX-M типов.

β -Лактамазы типа TEM

Тип TEM включает в себя ферменты широкого, расширенного спектра действия и ингибитор-устойчивые β -лактамазы. Гены, кодирующие ферменты этого типа могут находиться как на плазмидах, так и на хромосомах энтеробактерий. Впервые пенициллиназы TEM-1 типа были описаны N. Datta в 1965 г. [55]. Эти ферменты были обнаружены у изолята *E. coli*, выделенного из гемокультуры больного по фамилии Temoniера, откуда и получили свое название. Позднее был описан еще один фермент TEM-2, который отличается от TEM-1 заменой единственного аминокислотного остатка глицина в положении 39 на лизин, такая замена не изменила спектр гидролитической активности фермента. Ферменты TEM-1 и TEM-2

представлены β -лактамазами широкого спектра и относятся к функциональной группе 2b по классификации К. Вуш [47]. Особенностью этих ферментов является способность разрушать природные и полусинтетические пенициллины, цефалоспорины I поколения и частично цефоперазон. Благодаря плазмидной локализации эти ферменты быстро распространились среди энтеробактерий и в настоящее время по данным различных исследователей, фермент TEM-1 встречается у 73–94% устойчивых к ампициллину изолятов *E. coli* и составляет около 80% всех плазмидных β -лактамаз энтеробактерий [122]. Плазмиды, несущие гены *bla*_{TEM} находят у всех видов семейства Enterobacteriaceae [104]. Широкое внедрение в клиническую практику с начала 80-х годов цефалоспоринов привело к появлению штаммов с плазмидной локализацией детерминант устойчивости к этим антибиотикам [83]. Впоследствии было установлено, что эта устойчивость связана с продукцией микроорганизмами ферментов, генетически связанных с β -лактамазами широкого спектра (TEM-1). Новые ферменты с широкой субстратной специфичностью были названы БЛРС и отнесены к функциональной группе 2be. Известно, что первыми БЛРС типа TEM, представленными в литературе в 1982 г., были ферменты TEM-12 [106, 73]. Эти β -лактамазы определили у изолята *Klebsiella oxytoca*, выделенного из крови и спинномозговой жидкости у ребенка, находившегося в отделении реанимации для новорожденных в госпитале города Ливерпуль. В настоящее время известны также ферменты TEM типа, не чувствительные к действию ингибиторов β -лактамаз, таких как клавуланат и сульбактам. Их гидролитическая активность в отношении β -лактамных антибиотиков ниже, чем у TEM-1. Эти β -лактамазы получили название ингибитор-устойчивые TEM и были включены в функциональные группы 2bg и 2ber. Все описанные в настоящее время β -лактамазы TEM типа являются производными TEM-1 и отличаются от исходного фермента одиночными аминокислотными заменами. Всего известно более 220 представителей TEM β -лактамаз (<http://www.lahey.org/studies>), среди них около 90 ферментов относятся к БЛРС, включая такие как TEM-3, TEM-4, TEM-5, TEM-12 и другие производные TEM.

β -Лактамазы типа SHV

Тип SHV включает в себя ферменты широкого, расширенного спектра и ингибитор-устойчивые β -лактамазы. Гены, кодирующие SHV β -лактамазы, располагаются как на плазмидах, так и на хромосомах энтеробактерий. Особенностью локализации β -лактамаз SHV-1 является их расположение в составе хромосомы у большинства изолятов *K. pneumoniae* [89]. Впервые фермент SHV-1 был описан в 1972 г. J.S. Pitton [110]. Ферменты SHV-1 относятся к β -лактамазам широкого спектра, все остальные ферменты типа SHV являются производными SHV-1, их гены отличаются наличием точечных мутаций, делеций или вставок [12]. Мутации в гене *bla*_{shv} привели к появлению ферментов с различными профилями гидролитической активности по отношению к цефалоспорином, в том числе к появлению БЛРС (функциональная группа 2be).

Первые β -лактамазы SHV-2, обладающие расширенным спектром действия, были выделены в Германии в университетской клинике во Франкфурте в 1983 г. у трех изолятов *K. pneumoniae* и одного – *Serratia marcescens* с продукцией БЛРС [83]. Как и для ферментов типа TEM описаны мутации, приводящие к появлению устойчивости к ингибиторам β -лактамаз, и их относят к функциональным группам 2bg и 2ber. В настоящее время в базе данных <http://www.lahey.org/studies>, содержащей информацию о классификации и аминокислотных последовательностях описанных β -лактамаз, зарегистрировано более 190 вариантов генов *bla_{SHV}* и около 50 из них кодируют ферменты расширенного спектра действия, включая такие как SHV-2, SHV-3, SHV-4 и другие производные SHV [86].

β -Лактамазы типа CTX-M

Все β -лактамазы типа CTX-M относятся к БЛРС. Гены, кодирующие ферменты этого типа, имеют плазмидную локализацию и относятся к функциональной группе 2be [22]. β -Лактамазы CTX-M типа получили такое название вследствие того, что они эффективнее гидролизуют цефотаксим (сокращенно CTX) по сравнению с цефтазидимом. Впервые фермент этого типа был описан в 1989 г. А. Bauernfeind и соавт. [35] у изолята *E. coli*, выделенного из экссудата слухового прохода у новорождённого с отитом. В настоящее время известно 5 генетических кластеров ферментов CTX-M типа β -лактамаз - CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 и CTX-M-25 [41]. Каждый кластер состоит из основного фермента и его производных – ферментов, которые отличаются от исходного одной или несколькими мутациями. Генетическое сходство β -лактамаз CTX-M типа с другими ферментами класса A, такими как TEM и SHV, выражено слабо и составляет менее 40% [41]. Гораздо более высокая гомология (более 70%) наблюдается с хромосомно-кодируемыми ферментами таких видов энтеробактерий, как *K. oxytoca*, *Citrobacter diversus*, *Proteus vulgaris* и *Serratia fonticola* [104, 103]. Наибольшее сходство (99%) наблюдается с хромосомными цефалоспоринозазами таких представителей рода *Kluyvera*, как *Kluyvera georgiana*, *Kluyvera ascorbata* и *Kluyvera cryocrescens*. Это позволило предположить, что плазмидно-кодируемые ферменты CTX-M произошли от ферментов, входящих в состав хромосом представителей рода *Kluyvera*. В настоящее время известно более 170 ферментов типа CTX-M (<http://www.lahey.org/studies>).

Другие типы β -лактамаз

Другие типы БЛРС встречаются гораздо реже. К БЛРС относятся отдельные представители типа OXA, среди них OXA-10, -11, -14, -16, -17, -19, -15, -18, -28, -31, -32, -35, -45. Эти ферменты описаны в основном у изолятов *Pseudomonas aeruginosa* [60]. Такие БЛРС как SFO, BES-1, BEL-1, TLA-1 и TLA-2 не получили широкого распространения среди грамотрицательных бактерий, большинство из них были обнаружены у единичных клинических изолятов энтеробактерий [98, 104]. β -Лактамазы типа VEB достаточно часто встречаются у

возбудителей нозокомиальных инфекций в Восточной Азии. По данным исследований, проведенных в Тайланде и Вьетнаме, доля VEB-1 достигает 40% у энтеробактерий и 80% у *P. aeruginosa*. Ферменты GES выделены у отдельных изолятов энтеробактерий в разных странах и на разных континентах. Вспышки инфекций, вызванных *K. pneumoniae* с продукцией БЛРС типа GES были зарегистрированы в Корее, Португалии и Греции. По данным исследований ферменты типа PER распространены в основном среди неферментирующих грамотрицательных бактерий и их доля составляет от 30% до 55% у нозокомиальных изолятов, выделенных в отделениях интенсивной терапии в стационарах Турции. Также описаны единичные случаи выявления PER β -лактамаз у изолятов *Salmonella* spp., *Providencia* spp., *Proteus mirabilis* и других энтеробактерий.

Таким образом, несмотря на более раннее по времени выделение TEM и SHV типов β -лактамаз у клинически значимых изолятов энтеробактерий, наибольшее распространение получил CTX-M тип β -лактамаз. Другие типы БЛРС (OXA, SFO, BES, BEL, TLA, VEB, GES, PER) встречаются только у единичных изолятов энтеробактерий либо распространены локально в отдельных регионах.

1.3 Распространение β -лактамаз расширенного спектра среди клинически значимых энтеробактерий

С каждым годом растет число публикаций, в которых представлены результаты изучения энтеробактерий с продукцией БЛРС, включающие частоту встречаемости этих ферментов среди энтеробактерий, а также молекулярные характеристики БЛРС-продуцентов, выделенных в стационарах разных стран и среди разных групп населения. В 2004 г. было проведено многоцентровое исследование SMART (Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends), в котором участвовал 81 медицинский центр из 28 стран мира, расположенных на 5 континентах [52, 120]. По данным этого исследования наибольшая частота детекции БЛРС-положительных бактерий среди нозокомиальных штаммов *E. coli* и *Klebsiella* spp. была в Латинской Америке (12% и 27,6%, соответственно) и Азии (19,6% и 22,9%), реже в Европе (6,4% и 8,8%) и в Северной Америке (2,8% и 5,3%). Отчет Всемирной организации здравоохранения о состоянии устойчивости госпитальных и внебольничных штаммов бактерий к антибиотикам, опубликованный в 2014 г., включал результаты исследований из 129 стран мира [29]. Во многих странах частота обнаружения энтеробактерий, устойчивых к цефалоспорином III поколения, превысила 50%, причем, в Латинской Америке этот показатель составил 71%, а в странах Юго-Восточной Азии достиг 95%. Продукция БЛРС у энтеробактерий была минимальной в Канаде (до 9%) и в США (до 23%).

Существенный рост доли энтеробактерий устойчивых к цефалоспорином III поколения среди возбудителей нозокомиальных инфекций за последние 10 лет можно проследить по данным европейского отчета о резистентности, представленным в системе мониторинга антибиотикорезистентности EARS-Net (Antimicrobial resistance surveillance in Europe, <http://ecdc.europa.eu/>). Уже в 2004 г. часть изолятов *E. coli* продуцировали БЛРС, наибольшая доля устойчивых изолятов наблюдалась в Румынии – 25-50%, к 2014 г. возросло число стран, где процент нечувствительных к цефалоспорином изолятов достигал 50% (Рисунок 2). Данные об устойчивости изолятов *K. pneumoniae* к антибиотикам в 2004 г. были представлены ограниченным числом государств, но к 2014 г. отмечено угрожающее распространение продуцентов БЛРС во многих странах. Так частота детекции БЛРС у *K. pneumoniae* была 50% и выше в таких странах Европы, как Италия, Греция, Болгария, Литва, Латвия и другие, минимальная доля продуцентов БЛРС была в Исландии – < 1% [59].

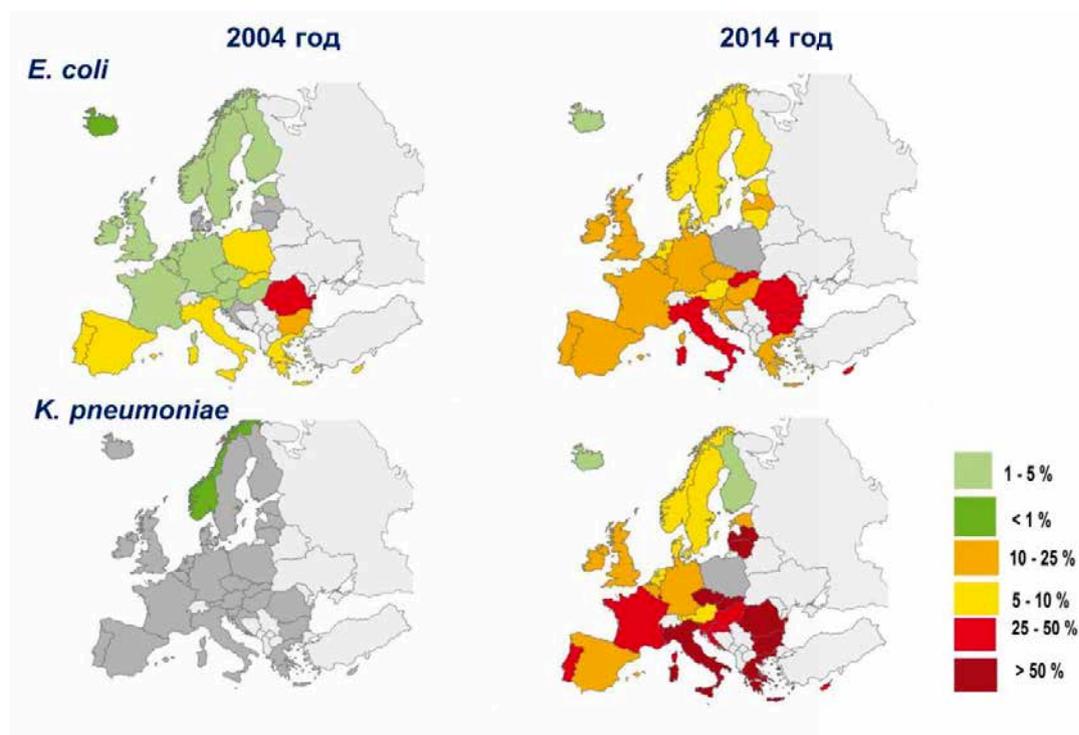


Рисунок 2. Динамика распространения энтеробактерий, устойчивых к цефалоспорином III поколения в Европе (Antimicrobial resistance surveillance in Europe, <http://ecdc.europa.eu/>).

В России первые сообщения о выделении энтеробактерий с продукцией БЛРС были опубликованы в 90-е годы XX века. В Санкт-Петербурге в 1996 г. были выделены изоляты *Salmonella typhimurium* с продукцией БЛРС, относящиеся к СТХ-М типу, из образцов кала у четырех членов одной семьи при гастроэнтерите [65]. В тот же период (1997–1998 гг.) в первых многоцентровых исследованиях (программа “Micromax”), посвященных этой проблеме, было показано, что в ОРИТ некоторых учреждений распространение БЛРС среди *E. coli* достигало 50%, а среди *Klebsiella* spp. превышало 90% [16]. Многоцентровое исследование ROSNET,

проведенное в 36 различных стационарах России, показало увеличение доли продуцентов БЛРС среди нозокомиальных изолятов энтеробактерий с 52,3% в 2002–2004 гг. до 69,3% в 2006–2007 гг. [127]. Причем, у *E. coli* этот показатель увеличился с 49,2% до 67,4%, а у *Klebsiella* spp. – с 81,2% до 90%. В 2007 г. были опубликованы результаты многоцентрового исследования 640 возбудителей бактериемии, выделенных из гемокультуры у 478 больных гемобластозами, находившихся на стационарном лечении в гематологических отделениях 7 лечебных учреждений 5 городов России с 2003 по 2005 гг. [6]. Среди грамотрицательных бактерий чаще выделяли микроорганизмы, относящиеся к семейству Enterobacteriaceae (32,4%), из них с продукцией БЛРС было 36%. Продукция БЛРС определялась у 36% – *E. coli* и у 62% изолятов *K. pneumoniae*.

В 90-е годы XX века среди возбудителей нозокомиальных инфекций чаще встречались энтеробактерии, продуцирующие БЛРС типов TEM и SHV. За последнее время произошло быстрое распространение СТХ-М типа БЛРС, эти β -лактамазы были выявлены в различных регионах мира и во многих странах стали доминирующими среди БЛРС [41, 50, 119, 121, 138]. По данным М.В. Эйдельштейна и соавт. [56] в 1997–1998 гг. продукция СТХ-М β -лактамаз была определена у 35,3% изолятов энтеробактерий с продукцией БЛРС, выделенных в ОРИТ различных регионов России, а к 2003 г. доля СТХ-М составляла уже 80,4% [23]. Похожие тенденции были отмечены в европейских странах: в Австрии частота детекции ферментов СТХ-М типа у продуцентов БЛРС возросла с 0% в 1998 г. до 85% в 2004 г, в Италии – с 12,5% до 38,2%, соответственно [121]. В Таиланде первые сообщения о детекции СТХ-М β -лактамаз у продуцентов БЛРС были опубликованы в 2001 г. [80], а в 2007 г. эти ферменты определяли уже у 90–100% энтеробактерий с продукцией БЛРС [30].

По мнению некоторых исследователей, высокая частота детекции БЛРС, в том числе СТХ-М типа, среди клинических штаммов энтеробактерий в развивающихся странах, является следствием недостаточно эффективной системы инфекционного контроля и отсутствия разумной политики применения антибиотиков [121]. Так сравнительное исследование, проведенное в Таиланде, выявило значительное преобладание колонизации слизистой оболочки кишечника продуцентами БЛРС среди населения в тех областях, где антибиотики продаются без рецепта и чаще используются без назначения врача [91]. Следует отметить, что увеличение частоты инфекций, вызванных продуцентами СТХ-М β -лактамаз, наблюдается и в экономически развитых странах, таких как США, Канада, Великобритания, Франция, Германия, Япония. Полагают, что важную роль в повсеместном распространении генов СТХ-М играют такие биологические факторы, как локализация генов на конъюгативных плазмидах и наличие эффективных мобильных генетических элементов. Плазмиды, содержащие гены СТХ-М, часто связаны с такими мобильными генетическими элементами, как интегроны [112]. Интегроны способствуют быстрой передаче генетической информации от одного микроорганизма к

другому, что приводит к широкому распространению СТХ-М β -лактамаз во всем мире [41]. В настоящее время не выявлено генов, кодирующих TEM и SHV типы БЛРС, в составе интегронов [112].

Выбор антибиотиков для лечения инфекций, вызванных энтеробактериями, продуцирующими БЛРС ограничен. Энтеробактерии, продуцирующие разные типы БЛРС, *in vitro* могут быть чувствительны к одним цефалоспорином и устойчивы к другим, но в очаге инфекции в концентрациях более 10^5 – 10^7 КОЕ/мл микроорганизмы проявляют эффект инокулюма и становятся устойчивыми к действию любых цефалоспоринов [77]. В исследованиях *in vitro* была отмечена активность цефокситина в отношении продуцентов БЛРС, но при лечении этим препаратом у бактерий появлялись мутации в генах, кодирующих порины клеточной стенки, что приводило к устойчивости микроорганизмов к этому антибиотику [104]. Энтеробактерии с продукцией БЛРС часто проявляют устойчивость к аминогликозидам, фторхинолонам и триметоприму сульфаметоксазолу. Это связано с тем, что на плазидах могут находиться гены, кодирующие β -лактамазы, и одновременно гены, отвечающие за резистентность к другим группам антибиотиков [79, 104]. По результатам определения чувствительности энтеробактерий с продукцией БЛРС, выделенных из крови у гематологических больных, резистентными к триметоприму сульфаметоксазолу были 82% из 147 изолятов, к гентамицину – 67%, а к амикацину – 21% [4], к левофлоксацину – 54% из 275 продуцентов БЛРС [3]. Аналогичные данные были получены в многоцентровом эпидемиологическом российском исследовании «МАРАФОН», проведенном в 2013-2014 гг. [21]. Более 90% изолятов *K. pneumoniae* ($n = 813$), включенных в это исследование, были нечувствительными к цефалоспорином III-IV поколения, резистентными к триметоприму сульфаметоксазолу были 74%, к гентамицину – 58%, к амикацину – 16% и к ципрофлоксацину – 81%.

Препараты группы карбапенемов проявляют активность в отношении микроорганизмов, продуцирующих БЛРС, как в исследованиях *in vitro*, так и в клинической практике [104]. По данным исследований, проведенных в «НМИЦ гематологии», чувствительными к имипенему и меропенему были все изоляты энтеробактерий ($n = 147$), выделенные из гемокультуры у гематологических больных с 2003 по 2007 гг. [4]. Этот результат подтверждается и в других исследованиях. Высокая активность карбапенемов была отмечена в работе, проведенной в 2011-2012 гг. При изучении антибиотикочувствительности 573 нозокомиальных изолятов семейства Enterobacteriaceae, устойчивыми к имипенему были только 2,8% изолятов, а к меропенему – 1,6% [20].

Из-за высокой стоимости карбапенемов и появления штаммов микроорганизмов, продуцирующих карбапенемазы, необходимо искать альтернативные антибиотики для лечения инфекционных осложнений, вызванных энтеробактериями с продукцией БЛРС. Потенциальную

альтернативу карбапенемам в лечении инфекций, вызванных БЛРС-продуцирующими энтеробактериями могут составлять ингибитор-защищенные β -лактамы – пиперациллин/тазобактам и цефоперазон/сульбактам. В российском многоцентровом исследовании при анализе чувствительности возбудителей бактериемии к антибиотикам у больных опухолями системы крови была показана активность *in vitro* пиперациллина/тазобактама и цефоперазона/сульбактама в отношении энтеробактерий с продукцией БЛРС [3]. Чувствительными к пиперациллину/тазобактаму оказались 88% из 275 изолятов энтеробактерий с продукцией БЛРС, включенных в исследование, к цефоперазону/сульбактаму – 76% изолятов. Основываясь на данных этого исследования, больным с фебрильной нейтропенией можно реализовать «классическую» эскалационную стратегию применения антибиотиков, с последующей заменой, при необходимости, на карбапенем, в зависимости от клинических проявлений инфекции.

В мировой литературе существует ограниченное число исследований по лечению инфекций, вызванных энтеробактериями с продукцией БЛРС, без использования карбапенемов. В большинстве случаев, такие альтернативные режимы включают ингибитор-защищенные β -лактамы антибиотики (например, пиперациллин/тазобактам, цефоперазон/сульбактам). Эффективность этих препаратов зависит от локализации первичного очага инфекции и чувствительности возбудителя *in vitro*. На практике эти препараты могут быть не активны из-за резистентности бактерий, по причине гиперпродукции БЛРС, продукции нескольких β -лактамаз одним микроорганизмом или наличия эффекта инокулюма [23]. Эти механизмы приводят к тому, что антибиотики группы цефалоспоринов в сочетании с ингибитором оказываются неэффективными в случае тяжелой инфекции, вызванной продуцентами БЛРС, при высокой микробной нагрузке.

Анализ эффективности применения пиперациллина/тазобактам был проведен в ретроспективном исследовании P.J. Gavin и соавт. [63], в исследование были включены 23 случая назначения пиперациллина/тазобактама у больных с инфекциями, вызванными энтеробактериями с продукцией БЛРС. При лечении инфекций мочеполовой системы ($n = 6$) эффективность пиперациллина/тазобактама была максимальной и составила 100%, не было выявлено влияния значения минимальной подавляющей концентрации (МПК) антибиотика на результаты лечения. При другой локализации очага инфекции было отмечено сокращение эффективности пиперациллина/тазобактама до 91% при значениях МПК пиперациллина/тазобактама $\leq 16,4$ мкг/мл, до 20% при значениях МПК пиперациллина/тазобактама $> 16,4$ мкг/мл. Похожие результаты были получены в другом ретроспективном исследовании, проведенном M. Trivedi и соавт. [132], в которое были включены 522 эпизода инфекций, среди них инфекции мочевыводящих путей ($n = 287$) и кожи ($n = 60$),

бактериемия ($n = 60$), пневмония ($n = 55$), перитонит ($n = 31$) и другие инфекции ($n = 29$). Большинству больных были назначены цефоперазон/сульбактам (около 60%) и пиперациллин/тазобактам (около 20%) в качестве альтернативы карбапенемам, реже использовали фторхинолоны, аминогликозиды, хлорамфеникол и ко-тримоксазол. Эффективность лечения карбапенемом и альтернативными антибиотиками была сопоставимой и составила 85,71% и 79,64% соответственно ($p = 0,152$). Высокая эффективность ингибитор-защищенных β -лактамов антибиотиков у больных с инфекцией мочевыводящих путей может быть объяснена высокой концентрацией препарата в очаге инфекции, которая превышает значения МПК антибиотика для патогена. Таким образом, эффективность этих препаратов напрямую зависит от локализации первичного очага инфекции и параметров чувствительности возбудителя *in vitro*.

Повсеместное распространение устойчивости к антимикробным препаратам среди возбудителей инфекционных осложнений у больных опухолями системы крови способствовало пересмотру «классической» стратегии назначения антимикробных препаратов в гематологии. В 2013 г. были выпущены международные рекомендации ESCM-4 (European Conference on Infections in Leukaemia) [33], в которых впервые помимо эскалационного подхода была предложена стратегия деэскалации антимикробной терапии в период гранулоцитопении у больных гемобластозами, которая раньше использовалась только у тяжелых больных в ОРИТ. В качестве препаратов для 1-го этапа при деэскалационном подходе рекомендовано применять антибиотики с более широким спектром действия, включая активность против энтеробактерий с продукцией БЛРС и/или полирезистентных изолятов *P. aeruginosa*, такие как карбапенем с антипсевдомонадной активностью или сочетание β -лактамов антибиотиков с колистином. В дальнейшем можно провести деэскалацию антимикробной терапии в соответствии с результатами микробиологических исследований. Причем, показаниями к использованию деэскалационного подхода у больных с фебрильной нейтропенией являются не только септический шок или тяжелая 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 преобладанием энтеробактерий с продукцией БЛРС среди возбудителей инфекций (уровень доказательности ВП), или у больных, колонизированных такими микроорганизмами (уровень доказательности ВП). Но такой подход в лечении не лишен негативных последствий, так как широкое применение карбапенемов и колистина может привести к развитию устойчивости у бактерий и к этим антибиотикам.

Суммируя приведенные результаты исследований можно отметить, что в настоящее время основной проблемой в лечении инфекционных осложнений у больных гемобластозами является

распространение устойчивости к антибиотикам среди возбудителей инфекций. Ведущими возбудителями являются энтеробактерии, среди которых отмечается высокая доля продуцентов БЛРС. Число препаратов, активных *in vitro* в отношении энтеробактерий с продукцией БЛРС, крайне ограничено, к таким препаратам относятся карбапенемы, ингибитор-защищенные β -лактамы и тигецилин. Однако для лечения инфекций, вызванных продуцентами БЛРС, препаратами выбора являются карбапенемы.

1.4 Источники инфицирования энтеробактериями в стационаре

У иммунокомпрометированных больных развитие тяжелых инфекционных осложнений происходит как при эндогенном, так и при экзогенном пути инфицирования микроорганизмами. Эндогенная транслокация бактерий, зачастую, происходит через слизистую оболочку желудочно-кишечного тракта, которая повреждается опухолью или в процессе реализации цитостатической терапии. Экзогенная передача внутрибольничных возбудителей может осуществляться из окружающей среды, от одного пациента к другому или через руки медицинского персонала. Этому способствует длительное пребывание больного в лечебном учреждении, которое достигает 6–10 месяцев, а также тяжелое течение заболевания, для адекватной терапии которого необходимо проведение инвазивных процедур и наличие сосудистых доступов. Возможен и смешанный механизм инфицирования, когда ранее чувствительные к антибиотикам эндогенные изоляты бактерий под воздействием антимикробных препаратов приобретают детерминанты устойчивости, а далее, попадая в окружающую среду, они длительно сохраняются в условиях стационара и распространяются от одного больного к другому.

Для определения источника инфекции и своевременного предотвращения дальнейшего ее распространения важно проводить молекулярные исследования возбудителей инфекционных осложнений в стационаре. Большинство вспышек внутрибольничных инфекций характеризуются наличием ограниченного числа эпидемических клонов, что подтверждает экзогенную передачу эпидемических штаммов. Распространение генетически родственных изолятов характерно, прежде всего, для отделений реанимации и неонатологии [68]. Так, по результатам О. Paniara и соавт. [101] при генотипировании семи неповторяющихся изолятов *K. pneumoniae*, выделенных от больных в отделении реанимации в течение одного месяца, была подтверждена циркуляция единственного эпидемического клона.

Молекулярные исследования позволяют выявить источник возникновения вспышки инфекции. Так в работе R. Ganeswari и соавт. [62] были описаны 11 случаев выявления *E. gergoviae* из гемокультуры у новорожденных, произошедшие в течение 12 дней. Авторы провели генотипирование изолятов *E. gergoviae*, выделенных из крови, а также полученных при

исследовании смывов с рук медицинского персонала и из окружающей среды. Резервуаром инфекции оказался физиологический раствор, контаминированный *E. gergoviae*, а передача патогенов происходила через руки медицинского персонала. Интересные результаты были получены А. Adler и соавт. [27] при анализе изолятов энтеробактерий с продукцией БЛРС, полученных из мазков со слизистой оболочки кишечника больных, находящихся на лечении в стационаре ($n = 194$), родственников ($n = 26$), ухаживающих за ними, и медицинского персонала ($n = 35$). Генетическое сходство с изолятами, полученными от больного, наблюдалось у 23 (88%) из 26 изолятов, выявленных у родственников, и только 6 (19%) из 32 изолятов *E. coli*, выделенных от медицинского персонала. Таким образом, квалифицированный уход за больными и соблюдение профилактических мер сокращает возможность передачи возбудителей внутри стационара от одного больного другому. Источником инфицирования в стационаре могут быть также продукты питания. В Испании была зарегистрирована инфекционная вспышка, вызванная клоном *K. pneumoniae*, продуцирующим β -лактамазы SHV-1 и СТХ-М-15 [49]. Источником инфекции оказались сотрудники пищеблока больницы, колонизация продуцентами БЛРС была у 6 (14%) из 44. Проведенные исследования показывают, что частота передачи резистентных штаммов гораздо выше при уходе за больными на дому, чем в стационаре [74], при соблюдении норм гигиены значительно снижается вероятность передачи устойчивых к антибиотикам бактерий через руки медицинского персонала [133]. Резервуарами инфекции могут быть разные источники, включая физиологические растворы, дистиллированную воду, щетки для обработки рук, контейнеры для мыла. Соблюдение профилактических мер, таких как дезинфекция рук, предметов ухода за больным, медицинского оборудования, раковин играет важную роль в предотвращении передачи возбудителей инфекции.

При анализе генетического родства клинически значимых энтеробактерий с продукцией БЛРС, полученных в процессе длительных наблюдений, часто обнаруживают поликлональность изолятов [67, 92]. В университетском госпитале Мадрида было проведено молекулярно-генетическое исследование клинически значимых изолятов *E. coli* и *K. pneumoniae* с продукцией БЛРС, полученных в течение 12 лет [34]. 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.

Поликлональность изолятов, выделенных из гемокультуры больных с гематологическими заболеваниями, была подтверждена в исследовании, проведенном в «НМИЦ гематологии» в более ранний период (2003–2006 гг.) [5]. 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%, $p < 0,001$).

Анализ генетического родства идентичных по виду энтеробактерий с продукцией БЛРС, выделенных у одного и того же больного из гемокультуры и со слизистой оболочки прямой кишки, позволяет подтвердить или опровергнуть эндогенный путь инфицирования. Число публикаций, в которых описаны такие молекулярные исследования, ограничено. По данным С. Cuartero и соавт. [54] у одного из 12 больных с колонизацией *E. coli*, продуцирующими БЛРС, развилась бактериемия, вызванная идентичными по виду бактериями. Методом пульс-гель электрофореза исследователи подтвердили генетическое родство изолятов, полученных из гемокультуры и со слизистой оболочки прямой кишки у этого больного. Аналогичное исследование проводили в университетском медицинском центре в Мичигане [93], в процессе этого исследования изучали колонизацию слизистой оболочки кишечника и инфицирование, вызванное изолятами *K. pneumoniae*, у онкогематологических больных и больных из отделения реанимации. Колонизация *K. pneumoniae* была выявлена у 406 (23%) из 1765 больных, а последующее инфицирование идентичными по виду изолятами было у 21 (5,2%) из 406 больных. Авторами было проведено попарное генотипирование изолятов *K. pneumoniae*, полученных из жидкости бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) ($n = 7$), из мочи ($n = 4$), из гемокультуры ($n = 5$) и со слизистой оболочки прямой кишки у тех же больных ($n = 16$). Всего было проанализировано 32 генетических профиля. Генетически родственными по результатам мультилокусного секвенирования-типирования (MLST) и полногеномного секвенирования были изоляты, выявленные из мочи больных и парные им изоляты, полученные со слизистой оболочки прямой кишки, а также изоляты, полученные из жидкости БАЛ и со слизистой оболочки прямой кишки. Изоляты из гемокультуры только в 2 из 5 случаев бактериемии были генетически родственными изолятам, выделенным со слизистой оболочки кишечника. Авторы объясняют низкий процент сходства парных изолятов при бактериемии тем, что в отделении реанимации происходит экзогенное инфицирование катетеров изолятами *K. pneumoniae* или инфицирование через руки медицинского персонала. Можно полагать, что для отделений реанимации более характерно экзогенное инфицирование полирезистентными бактериями.

В исследовании А. Samet и соавт. [123] были проанализированы повторные случаи бактериемии у больных лейкозами. 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*, то есть в половине случаев повторные эпизоды бактериемии были вызваны новыми возбудителями. В этой работе также было проведено генотипирование изолятов *E. coli*, выделенных в повторных исследованиях из образцов кала, которое показало, что у больных 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, и приводящей к селекции резистентных изолятов. Следовательно, в кишечнике может находиться одновременно несколько разных штаммов энтеробактерий одного вида. Это заключение было подтверждено в исследовании, проведенном В. Krawczyk и соавт. [84] и включавшем 115 больных гемобластозами и сепсисом. У каждого больного был выделен один изолят *E. coli* из гемокультуры и от трех 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*, включенных в исследование, изучали гены вирулентности, кодирующие такие факторы как Dr-адгезин, F1C-фимбрии и другие. Генетически родственные изоляты из крови и со слизистой оболочки кишечника имели идентичные наборы генов вирулентности. Следует отметить, что изоляты из гемокультуры достоверно чаще имели гены вирулентности, кодирующие Dr-адгезин, в отличие от изолятов *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 изолятов *E. coli*, колонизирующих слизистую оболочку кишечника, может быть дополнительным фактором, предрасполагающим к транслокации энтеробактерий в кровоток.

В связи с быстрым распространением полирезистентных бактерий и важностью выявления источника инфицирования в настоящее время широко используются молекулярно-генетические методы исследования для типирования микроорганизмов, к ним относят гель-электрофорез в пульсирующем поле [129], Саузерн-блот-типирование с использованием ген-специфических зондов, риботипирование, мультилокусный анализ числа tandemных повторов

(MLVA-типирование), MLST-типирование, а также ряд методов ПЦР, основанных на амплификации повторяющихся последовательностей (RAPD-ПЦР, Rep-ПЦР). Для проведения RAPD-ПЦР используют короткие неспецифические произвольные праймеры, которые гибридизируются с ДНК-мишенью при низкой температуре отжига [76]. В зависимости от участка-мишени ДНК, который используется при Rep-ПЦР, выделяют две ее разновидности: Rep-ПЦР (амплификация повторяющихся экстрагенных палиндромных элементов) и ERIC-ПЦР (амплификация повторяющихся внутригенных последовательностей, впервые описанных у представителей семейства Enterobacteriaceae) [136].

Важным моментом проведения генотипирования является стандартизация методов внутривидового типирования изолятов. Хотя наиболее точным и воспроизводимым методом остается пульс-электрофорез, его трудоемкость и достаточно высокая стоимость не позволяют использовать эту технологию в лабораторной практике. Тогда как с использованием RAPD-ПЦР и Rep-ПЦР можно достаточно быстро и просто оценить генетическое родство изолятов [7]. Ограничением методов ПЦР для типирования микроорганизмов, является чувствительность к изменениям условий проведения реакции. В результате RAPD-ПЦР и Rep-ПЦР можно выявить индивидуальные особенности каждого отдельного изолята. Отсутствие стандартизации этих методик ограничивает возможность сравнения результатов типирования, полученных в разных лабораториях, с использованием разных реактивов и разных условий проведения ПЦР. Однако определение генетического родства методом ПЦР позволяет провести генотипирование, выявить возможные источники инфицирования и проследить распространение полирезистентных изолятов внутри одного стационара.

Представленные выше данные демонстрируют, что для отделений реанимации и неонатологии наиболее характерным является экзогенное инфицирование полирезистентными бактериями и распространение генетически родственных изолятов. Резервуарами инфекции могут быть разные источники, включая физиологические растворы, дистиллированную воду, щетки для мытья рук, контейнеры с мылом, а также продукты питания. Инфицирование происходит при медицинских манипуляциях, через руки медицинского персонала или при контакте больного с предметами ухода. У больных гемобластозами возможен как эндогенный, так и экзогенный путь инфицирования при бактериемии, с преобладанием эндогенного пути развития инфекции, когда происходит транслокация микроорганизмов со слизистой оболочки кишечника в кровоток. Молекулярно-генетические исследования позволяют выявить источник инфицирования энтеробактериями с продукцией БЛРС в стационаре.

1.5 Значение колонизации слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией β -лактамаз расширенного спектра

Как уже говорилось, в случае эндогенного инфицирования происходит транслокация бактерий со слизистой оболочки кишечника в кровоток. В связи с этим у больных гемобластозами с персистирующей фебрильной нейтропенией и отсутствием микробиологического подтверждения инфекции из значимых локусов следует принимать во внимание колонизацию слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС при модификации противомикробной терапии.

Частота детекции колонизации слизистой оболочки прямой кишки энтеробактериями с продукцией БЛРС у больных при поступлении в стационар может варьировать в разных центрах. В литературе представлены результаты исследований, проведенных, как правило, у больных в многопрофильных стационарах, а не у отдельных категорий больных. В Нидерландах этот показатель составил 8,2%, причем отличия были незначительными среди больных, госпитализированных из дома (7,9%) и длительно получавших медицинскую помощь в реабилитационных центрах или на дому (8,6%) [111]. В другом исследовании выделение БЛРС-положительных изолятов со слизистой оболочки кишечника было у 10,6–10,8% госпитализированных больных, а по результатам многоцентрового исследования, проведенного в пяти реабилитационных центрах Израиля, Франции, Испании и включающего данные о 2873 больных – 26% [126, 36, 38]. В странах Юго-Восточной Азии этот показатель был существенно выше. В работе А. Mushtaq и соавт. [97] было отмечено, что при поступлении в госпиталь Карачи (Пакистан) колонизация энтеробактериями с продукцией СТХ-М-15 β -лактамаз (генетический кластер СТХ-М-1) выявлялась у 88% больных (155 из 176).

По результатам исследования, включавшего гематологических и онкологических больных из университетского медицинского центра в Германии, колонизация слизистой оболочки прямой кишки энтеробактериями с продукцией БЛРС при поступлении в стационар определялась у 17,5% (90 из 513) больных [88]. Аналогичные результаты были получены М. Arpan и соавт. [32] в Испании при исследовании мазков со слизистой оболочки кишечника у больных острыми лейкозами, при поступлении в стационар детекция продуцентов БЛРС была у 17,9% (29 из 162) больных. Дальнейшее исследование показало увеличение частоты колонизации во время лечения. При исследовании 217 эпизодов нейтропении, колонизация БЛРС-положительными бактериями была выявлена в 29% (63 из 217) случаях. По данным еще одного исследования [53], появление колонизации слизистой оболочки кишечника продуцентами БЛРС в процессе проведения ХТ было отмечено у 27% (17 из 63) больных гемобластозами. Сопоставимые результаты были получены и в другой работе [48], в которой зарегистрировали увеличение

случаев детекции продуцентов БЛРС у 154 больных гемобластозами с 14,3% при поступлении до 31,8% на момент завершения лечения. Таким образом, колонизация слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС отмечается у части больных перед началом курсов ХТ и возрастает в процессе лечения.

Исследования, проведенные в многопрофильном стационаре Тель-Авива (Израиль), показали, что колонизация слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС была у 10,8% (26 из 241) больных при госпитализации в стационар [36]. Впоследствии у 15,4% (4 из 26) больных с колонизацией продуцентами БЛРС развилась бактериемия, вызванная таким же видом бактерий, и только у 0,5% (1 из 215) больных без колонизации продуцентами БЛРС. Колонизация энтеробактериями с продукцией БЛРС явилась предиктором бактериемии, вызванной этими микроорганизмами (ОШ 38,9, $p < 0,001$). У гематологических больных были получены аналогичные результаты. В исследование В. J. Liss и соавт. [88], опубликованное в 2012 г., было включено 513 больных гемобластозами и солидными опухолями. Бактериологическое исследование образцов кала проводили в течение 72 часов после госпитализации в стационар, и колонизация энтеробактериями с продукцией БЛРС была определена у 17,5% (90 из 513) больных. В последующем бактериемия, вызванная энтеробактериями с продукцией БЛРС, развилась у 6,6% (6 из 90) больных с колонизацией и только у 0,5% (2 из 423) больных без колонизации (ОШ=4,5). Похожие результаты были получены в проспективном исследовании, проведенном в «НМИЦ гематологии» в 2013-2015 гг. 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, $p = 0,009$) [10].

Как было отмечено ранее, в развитии инфекционных осложнений у больных гемобластозами основным является эндогенный путь инфицирования, при котором происходит транслокация микроорганизмов со слизистой оболочки кишечника в кровоток. В этой связи больным проводится селективная деконтаминация кишечника, препаратом выбора является фторхинолон. Согласно рекомендациям первой Европейской конференции по инфекциям при лейкемии (ЕСIL-1) профилактика фторхинолоном может быть проведена больным группы высокого риска (больные острым лейкозом, реципиенты гемопоэтических стволовых клеток) в тех случаях, если у них ожидается гранулоцитопения длительностью от 7 дней и более после цитостатического воздействия [43]. Для профилактики фторхинолоном рекомендуется применять с первого дня ХТ до завершения гранулоцитопении (нейтрофилов более $0,5 \times 10^9/л$) или до назначения других антибиотиков. Эффективность применения фторхинолонов для профилактики подтверждена в ряде исследований, однако зарегистрированы случаи

суперинфекции, возникающие на фоне профилактики фторхинолоном, обусловленные устойчивыми к фторхинолонам изолятами *E. coli*, *P. aeruginosa*, метициллин-резистентным *Staphylococcus aureus* [42]. Неэффективность фторхинолонов в лечении инфекционных осложнений, вызванных БЛРС-положительными энтеробактериями, отмечена в клинических исследованиях. Так, в исследовании М. Tumbarello и соавт. [134] были проанализированы факторы, оказывающие влияние на летальность в 186 случаях бактериемии, обусловленной энтеробактериями с продукцией БЛРС (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*). Статистически значимыми предикторами летального исхода явились такие факторы как неадекватная стартовая антимикробная терапия (ОШ 6,28; $p < 0,001$) и не выявленный первичный очаг инфекции (ОШ 2,69; $p = 0,004$). Неадекватная антимикробная терапия была проведена 89 (47,8%) из 186 больных, летальность в этой группе больных была статистически выше в сравнении с больными, кому исходно проводилась адекватная терапия (59,5% против 18,5%, ОШ 2,38; $p < 0,001$). Назначение ципрофлоксацина, исходно проявляющего активность *in vitro* против выделенных бактерий, было отнесено к неадекватной антимикробной терапии, приводящей к увеличению летальности (ОШ 4,05; $p < 0,001$). Вероятно, неудачи в применении ципрофлоксацина могут быть связаны с особенностями фармакокинетики препарата, которая заключается в небольшой разнице между концентрацией ципрофлоксацина в крови и в тканях, при использовании в стандартных дозах. Концентрация препарата в тканях не всегда достигает значений МПК ципрофлоксацина для конкретного микроорганизма [105]. Так для лечения инфекционных осложнений рекомендуются терапевтические дозы ципрофлоксацина по 400 мг два раза в сутки, такая дозировка будет эффективной лишь в отношении бактерий, имеющих значения МПК ципрофлоксацина менее 0,03 мкг/мл [107]. Все вышесказанное ставит под сомнение использование фторхинолона (ципрофлоксацина, левофлоксацина, моксифлоксацина) для профилактики бактериальных инфекций у больных с колонизацией слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС.

Представленные выше данные подтверждают важность исследования колонизации слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС и необходимость выявления групп больных с наибольшим риском колонизации этими микроорганизмами. В настоящее время опубликовано большое количество исследований по изучению факторов риска колонизации слизистой оболочки кишечника и развития инфекций, вызванных БЛРС-положительными бактериями [37, 104, 138]. Эти исследования существенно отличаются друг от друга выбором когорты больных, объемом выборки, контрольной группой больных. Достоверными факторами риска колонизации энтеробактериями с продукцией БЛРС являются длительное пребывание в стационаре и в отделении реанимации, проведение инвазивных медицинских манипуляций, таких как установка назогастральной трубки, гастро- или илеостома,

выполнение хирургических операций, парентеральное питание, такие факторы как дистрофия, преклонный возраст, наличие пролежней и иммунодефицит также увеличивают риск колонизации слизистой кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС [26, 39, 71, 108, 115, 137, 139]. По результатам исследований риск колонизации значительно выше у больных с онкологическими заболеваниями, диабетом, тяжелыми травмами головного мозга, неврологическими нарушениями [26, 39, 115, 118]. Еще одним важным фактором риска является применение антибиотиков. Риск колонизации слизистой оболочки кишечника продуцентами БЛРС у больных возрастает при назначении как β -лактамов [26, 39, 118], так и не β -лактамов антибиотиков – фторхинолонов, триметоприма сульфаметоксазола, ванкомицина [26, 71, 118, 137].

В работе М. Tumbarello и соавт. [135] были изучены возможные факторы риска колонизации слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС у 849 больных при поступлении в три крупных стационара в Италии. Задачей исследования было выявление факторов, которые позволили бы уже при поступлении в стационар определять больных с наибольшим риском колонизации продуцентами БЛРС. При многофакторном анализе было отмечено, что независимыми факторами риска колонизации являлись предшествующая госпитализация (ОШ 5,69, $p < 0,001$), поступление из других стационаров (ОШ 5,61, $p = 0,006$), тяжелое состояние при поступлении (ОШ 3,8, $p < 0,001$), предшествующая терапия β -лактамами антибиотиками или фторхинолонами (ОШ 3,68, $p < 0,001$) и возраст больного 70 лет и более (ОШ 3,2, $p < 0,001$).

По результатам многих исследований доказано, что предшествующие госпитализации и длительное пребывание в стационаре влияют на риск колонизации слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС. В литературе представлено ограниченное число длительных мониторинговых исследований по временным характеристикам детекции и доли больных с колонизацией слизистой оболочки кишечника БЛРС-положительными микроорганизмами во время госпитализации. По данным разных авторов, среднее время пребывания больных в стационаре до момента детекции колонизации этими бактериями составляло от 11 до 67 дней [104]. В исследовании G. Bisson и соавт. [39] длительность госпитализации была значимо больше у больных с колонизацией, чем у больных без колонизации продуцентами БЛРС (23 дня против 8 дней, соответственно, $p = 0,01$). В другой работе значимым фактором риска колонизации слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС была длительность пребывания в стационаре более 21 дня ($p < 0,001$) [102].

В последнее время отмечается увеличение частоты регистрации случаев колонизации слизистой оболочки прямой кишки энтеробактериями с продукцией БЛРС среди людей, не применявших антибиотики и не имевших госпитализацию в стационар [138]. В 2008 г. при

анализе образцов кала, полученных у 322 здоровых волонтеров, проживающих в Париже, энтеробактерии с продукцией БЛРС не были обнаружены [52], а по результатам исследования, проведенного в 2011 г. у 345 добровольцев, колонизация продуцентами БЛРС была зарегистрирована у 21 (6%) жителей Парижа [99]. Исследования, проведенные в Испании, показали, что частота колонизации такими микроорганизмами составила 6,6% при анализе 948 образцов кала амбулаторных больных медицинского центра в Барселоне, во время вспышек кишечных инфекций обнаружение этих микроорганизмов возрастало до 31% (19 из 61 образца) [94]. Похожие результаты получены в Нидерландах при изучении колонизации слизистой оболочки кишечника у пациентов, обратившихся к терапевту. Колонизация БЛРС-положительными бактериями была выявлена у 10% пациентов, и в этой группе преобладали больные с симптомами дискомфорта в кишечнике [117].

Полагают, что среди здорового населения колонизация слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС происходит при употреблении в пищу продуктов питания, содержащих подобные микроорганизмы, либо при контакте с носителями этих бактерий. В ряде исследований энтеробактерии с продукцией БЛРС были выявлены в образцах мяса домашних животных, птицы, образцах сырого молока, зеленых салатов и томатов [61, 66, 87, 95, 125]. Молекулярные исследования, проведенные в Нидерландах, подтвердили генетическое родство БЛРС продуцирующих энтеробактерий, выделенных из образцов мяса птицы и со слизистой оболочки кишечника добровольцев [82]. В другом исследовании, проведенном в Дании, также была доказана возможность передачи БЛРС-штаммов человеку от домашних животных, с колонизацией этими бактериями [69]. Так в четырех из 39 обследованных фермерских хозяйств были выявлены генетически родственные энтеробактерии с продукцией БЛРС у домашних животных и у фермеров, ухаживающих за ними. Жители сельской местности чаще оказываются носителями продуцентов БЛРС [90]. Таким образом, род занятий и место жительства являются факторами риска колонизации слизистой оболочки кишечника БЛРС-положительными бактериями.

Многие исследователи отмечают значение путешествий в страны Азиатско-тихоокеанского региона в приобретении колонизации слизистой оболочки кишечника продуцентами БЛРС у туристов. В исследование, проведенное в Швеции, были включены 100 добровольцев, у которых мазки со слизистой оболочки прямой кишки брали до начала путешествия и после него [128]. Колонизация энтеробактериями с продукцией БЛРС была определена у 24 (24%) из 100 участников и преобладала у туристов, посетивших Индию (88%, $p < 0,001$), реже определялась после поездок в другие страны Азии – 32%, в Южную Европу – 13%, и не было отмечено колонизации после путешествий в Северную, Южную или центральную

Америку. Достоверным фактором риска колонизации было развитие гастроэнтерита во время поездки ($p = 0,003$).

Еще одной важной характеристикой колонизации слизистой оболочки кишечника продуцентами БЛРС является длительность колонизации. В работе А. Apisarnthanarak и соавт. [31] исследовали длительность колонизации БЛРС-штаммами в течение 6 месяцев после выписки больного из стационара. Медиана продолжительности колонизации составила 98 дней (разброс от 14 до 182 дней), причем значительно более длительный период колонизация сохранялась у больных, которые продолжали принимать антибиотики после окончания госпитализации (154 против 56 дней, $p = 0,04$). В исследовании Е. Titelman и соавт. [131] изучали продолжительность колонизации слизистой оболочки кишечника продуцентами БЛРС после регистрации инфекционного эпизода. Колонизация сохранялась у 51 (84%) из 61 больного в течение одного месяца, у 36 (66%) - в течение трех месяцев, у 31 (55%) - в течение 6 месяцев и у 26 (43%) – в течение 12 месяцев. Интересным был тот факт, что во время наблюдения у 17 (28%) из 61 больного были выявлены новые штаммы, генетически неродственные первичным штаммам, а также другие виды БЛРС-положительных бактерий, не сходные с выявленными вначале. Появление генетически неродственных штаммов было отмечено и у здоровых волонтеров, колонизация слизистой оболочки кишечника у которых была впервые зарегистрирована после путешествия в страны азиатского региона [130]. Детекция БЛРС-штаммов отмечалась не во всех последовательно взятых образцах, поэтому авторы сделали вывод, что по отсутствию искомым микроорганизмов в одном образце нельзя делать заключение об отсутствии колонизации слизистой оболочки кишечника, необходимо проводить повторные исследования.

Суммируя литературные данные, следует отметить важное значение исследования колонизации слизистых оболочек кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС у больных опухолями системы крови в период гранулоцитопении. Основным фактором риска развития инфекций, вызванных продуцентами БЛРС, является предшествующая колонизация слизистой оболочки прямой кишки соответствующими по виду микроорганизмами. Частота выделения микроорганизмов из гемокультуры невелика, но летальность остается высокой при несвоевременной и неадекватной антимикробной терапии, особенно это касается случаев инфекции, вызванных полирезистентными бактериями. У значительного числа больных гемобластозами колонизация слизистой оболочки кишечника БЛРС-положительными бактериями регистрируется при поступлении в стационар, и доля таких больных возрастает во время лечения. Наиболее важными факторами риска колонизации слизистой оболочки кишечника продуцентами БЛРС являются длительное пребывание в стационаре и применение антибиотиков. Следует отметить, что в последнее время нередкими стали случаи детекции колонизации слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС у людей, не

применявших антибиотики и не имевших госпитализацию в стационар. Среди причин колонизации продуцентами БЛРС вне стационара выделяют употребление в пищу продуктов питания, контаминированных БЛРС-положительными энтеробактериями, или контакт с носителями этих бактерий, еще одной группой риска являются туристы, путешествующие в страны Азиатско-Тихоокеанского региона. Важным моментом является длительность сохранения колонизации слизистой оболочки кишечника, в ряде случаев энтеробактерии с продукцией БЛРС продолжают выделяться в течение 12 месяцев, в этот период возрастает вероятность развития инфекций, вызванных продуцентами БЛРС.

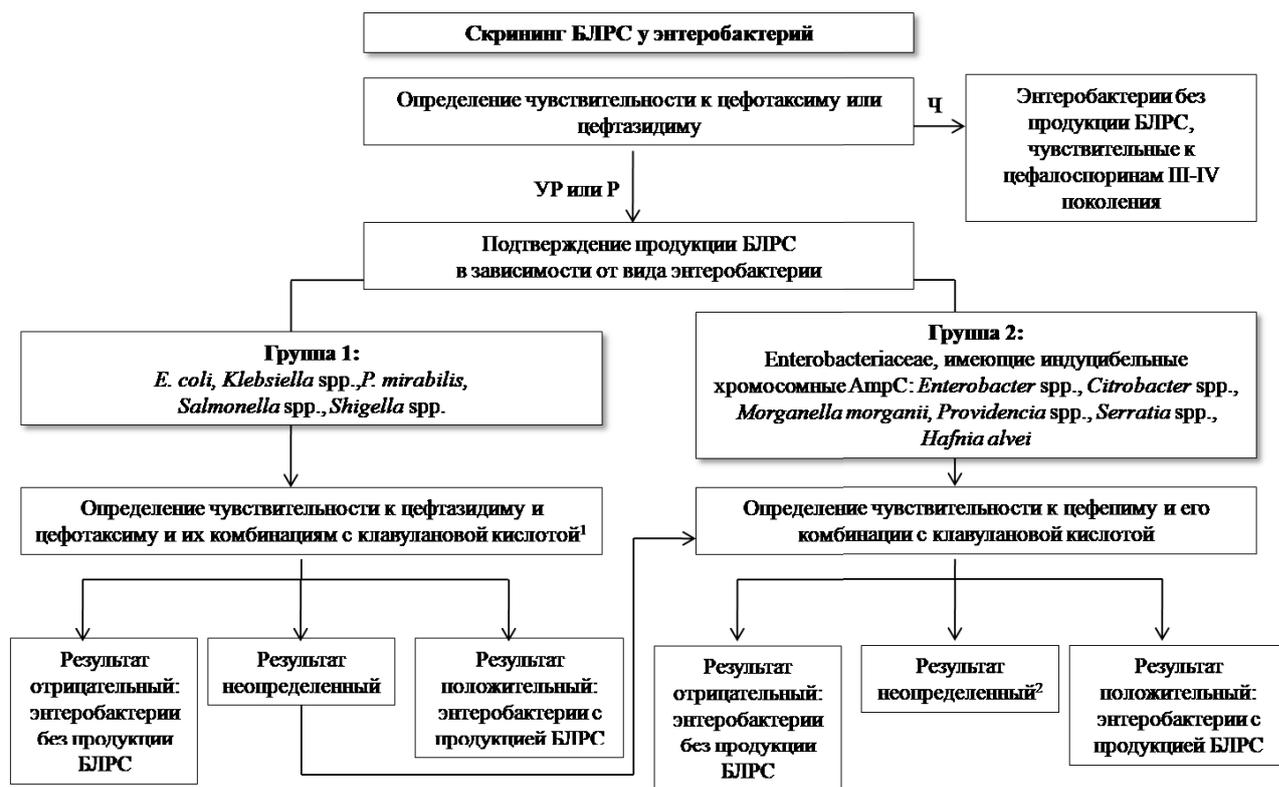
1.7 Методы детекции β -лактамаз у энтеробактерий

В соответствии с рекомендациями EUCAST и российскими методическими указаниями необходимо проводить скрининг всех клинически значимых энтеробактерий для выявления продукции БЛРС [9, 57]. Признаком вероятной продукции БЛРС является повышение МПК хотя бы к одному из цефалоспоринов (цефотаксим, цефтриаксон, цефтазидим, цефподоксим) до 2 мкг/мл либо снижение зоны задержки роста до 20 мм для цефотаксима и цефподоксима, 22 мм для цефтриаксона, 21 мм для цефтазидима [57]. После выявления изолята с предполагаемой продукцией БЛРС рекомендуется провести подтверждающий тест с использованием одного из фенотипических либо молекулярных методов детекции БЛРС (Рисунок 3). Различия в уровне экспрессии генов и в свойствах ферментов у отдельных бактерий, а также наличие других механизмов резистентности (например, других β -лактамаз, выведения молекул антибиотика из клетки, нарушения проницаемости клеточной стенки) приводит к большому разнообразию фенотипов резистентности среди БЛРС-продуцирующих изолятов. В ряде случаев результаты фенотипических методов не могут быть учтены ни как положительные, ни как отрицательные, поэтому требуется проведение дополнительных молекулярных исследований. Молекулярные методы (ПЦР и секвенирование) позволяют выявить не только наличие генов, кодирующих β -лактамазы, но определить тип фермента [8, 12, 18, 22].

Фенотипические методы детекции β -лактамаз

Стандартные фенотипические методы детекции БЛРС основаны на эффекте подавления активности ферментов β -лактамаз в присутствии клавулановой кислоты (Рисунок 3). В их число входят метод «двойных дисков», метод комбинированных дисков, градиентный тест для выявления БЛРС (E-тест), метод серийных микроразведений в бульоне [51, 57, 24, 9]. Подтверждение продукции БЛРС необходимо проводить для исключения ложноположительных результатов скрининга, поскольку увеличение МПК цефалоспоринов у энтеробактерий может

быть обусловлено как продукцией БЛРС, так и повышением уровня продукции хромосомных β -лактамаз класса С или снижением проницаемости пориновых каналов.



УР – умеренно-резистентный, Р – резистентный.

¹ Если проводилось определение чувствительности к цефокситину и МПК цефокситина превышает 8 мкг/мл, то рекомендуется выполнить исследование, подтверждающее продукцию БЛРС с использованием цефепима и цефепима с клавулановой кислотой.

² Результаты теста не могут быть учтены ни как положительные, ни как отрицательные (например, если результаты градиентного метода невозможно учесть из-за выхода границы зоны подавления роста за пределы МПК на полоске или из-за отсутствия четкого синергизма при выполнении методов комбинированных дисков и «двойных дисков»). Если использование цефепима и цефепима с клавулановой кислотой не позволяет подтвердить продукцию БЛРС, то требуется проведение генотипического исследования.

Рисунок 3. Алгоритм фенотипического выявления продукции БЛРС у энтеробактерий [EUCAST 2013, 57].

Метод «двойных дисков» используют в лабораторной практике чаще других, поскольку он прост в выполнении и имеет высокую чувствительность и специфичность [9]. Данный метод является вариантом классического диско-диффузионного метода (ДДМ) определения чувствительности и позволяет обнаружить продукцию БЛРС по наличию расширенной зоны подавления роста вокруг диска с цефалоспорином напротив диска с клавулановой кислотой (Рисунок 4). Для повышения чувствительности этого метода следует использовать несколько дисков с разными цефалоспоридами (например, цефтриаксон и цефтазидим), так как разные типы БЛРС могут проявлять различную субстратную специфичность. При выполнении метода «двойных дисков» расстояние между центрами дисков должно быть 20-25 мм, но оно может быть уменьшено до 15 мм или увеличено до 35 мм для изолятов с высоким или низким уровнем резистентности соответственно [57, 24]. Для выявления продукции БЛРС у энтеробактерий, которые содержат хромосомные AmpC β -лактамазы, таких как *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp.,

Morganella morganii, *Providencia stuartii*, *Serratia* spp., *Hafnia alvei*, рекомендуется использовать дополнительно диски с цефалоспоридами IV поколения (цефепим) [57].

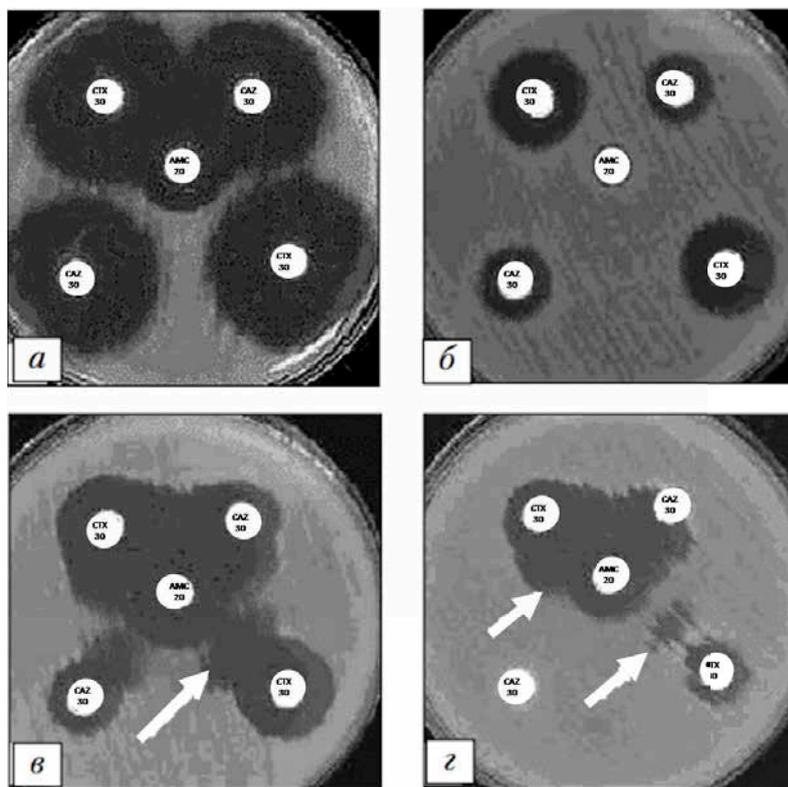


Рисунок 4. Выявление продукции БЛРС с помощью метода «двойных дисков». Отрицательные результаты: а) *E. coli* (БЛРС-); б) *Enterobacter cloacae* (гиперпродукция AmpC). Положительные результаты: в) и г) – *K. pneumoniae* (БЛРС+). Обозначения дисков: АМС – амоксициллин с клавулановой кислотой (20/10 мкг), CAZ – цефтазидим (30мкг), СТХ – цефотаксим (30 мкг) [9].

Для выполнения метода комбинированных дисков используют диски с цефалоспоридами (цефотаксим и цефтазидим) и диски, содержащие комбинации цефалоспоринов с клавулановой кислотой (цефотаксим + клавуланат, цефтазидим + клавуланат) [10, 51, 57]. Различие в диаметрах зон подавления роста для цефалоспоринов с клавулановой кислотой и без нее на 5 мм и более свидетельствует о продукции штаммом БЛРС. Для энтеробактерий, которые содержат хромосомные AmpC β -лактамазы, в соответствии с рекомендациями EUCAST необходимо использовать дополнительно диски с цефалоспоридами IV поколения (цефепим) и их комбинацию с клавулановой кислотой [57].

Для выполнения метода серийных микроразведений в бульоне используют двойные серийные разведения antimicrobных препаратов в следующем диапазоне концентраций: цефтазидима – от 0,25 до 128,0 мг/л, цефтазидима/клавуланата – от 0,25/4,0 до 128,0/4,0 мг/л; цефотаксима – от 0,25 до 64,0 мг/л; цефотаксима/клавуланата – от 0,25/4,0 до 64,0/4,0 мг/л. Снижение МПК цефтазидима или цефотаксима не менее чем в 8 раз (на 3 последовательных

двукратных разведения) в присутствии клавуланата, в сравнении со значениями МПК соответствующих цефалоспоринов без ингибиторов, свидетельствует о продукции изолятом БЛРС [9]. В соответствии с рекомендациями EUCAST для энтеробактерий, которые содержат хромосомные AmpC β -лактамазы, необходимо проводить дополнительно исследование МПК цефалоспорина IV поколения (цефепима) и его комбинации с клавулановой кислотой. Двойные серийные разведения антибиотика выполняют в следующем диапазоне концентраций: цефепима – от 0,25 до 512,0 мг/л, цефтазидима/клавуланата – от 0,25/4,0 до 512,0/4,0 мг/л [57]. Результаты исследования учитывают аналогично.

В последнее время созданы коммерческие селективные хромогенные среды для скрининга энтеробактерий с продукцией БЛРС, которые содержат специальные добавки, подавляющие рост дрожжевых грибов, грамположительных микроорганизмов и энтеробактерий без продукции БЛРС. Перечень таких селективных сред достаточно широк – это CHROMagarTMESBL (CHROMagar, Франция), ChromID ESBL (BioMérieux, Франция), Brilliance ESBL (Oxoid, Великобритания), BLSE agar (AES Chemunex, Франция) и другие.

По результатам многочисленных исследований селективные хромогенные среды для детекции БЛРС имеют высокую чувствительность и специфичность для детекции продуцентов БЛРС. Так при исследовании 230 изолятов *E. coli* с известным генотипом резистентности на среде CHROMagarTMESBL чувствительность составила 99,2%, а специфичность – 89% [85]. В другом исследовании при тестировании другой хромогенной среды – ChromID ESBL чувствительность и специфичность для *E. coli*, *K. pneumoniae* и *P. mirabilis* ($n = 505$) составила 96,6% и 93,9% соответственно, а для *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Morganella* spp., *Serratia* spp. ($n = 137$) – 96,9% и 78,6% [100]. При исследовании клинических образцов на разных селективных хромогенных средах чувствительность и специфичность составляла для ChromID ESBL - 88-100% и 90-96%, для CHROMagarTMESBL – 100% и 93%, для Brilliance ESBL – 94,9% и 95,7% [64]. Таким образом, по результатам ряда исследований была отмечена высокая чувствительность и специфичность хромогенных сред по детекции БЛРС для изолятов *E. coli* и *K. pneumoniae*, и несколько ниже для изолятов *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Morganella* spp., *Serratia* spp.

Гиперпродукция хромосомных AmpC β -лактамаз является еще одним механизмом устойчивости микроорганизмов к цефалоспорином III поколения и чаще обнаруживается у *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Morganella* spp. и *Serratia* spp. Выделение энтеробактерий с гиперпродукцией AmpC на селективных средах, предназначенных для скрининга БЛРС, было подтверждено во многих исследованиях. В работе P. Lagace-Weins и соавт. [85] проверяли детекцию БЛРС на селективной среде у изолятов *E. coli* ($n = 213$) и *K. pneumoniae* ($n = 17$) с генетическими подтвержденными механизмами резистентности. Среди исследуемых микроорганизмов у 91 изолята *E. coli* была экспрессия AmpC, а у 8 – ко-экспрессия AmpC и

БЛРС. На селективной среде, предназначенной для детекции БЛРС, была получена культура 11% (10 из 91) изолятов *E. coli* с экспрессией AmpC и 88% (7 из 8) – с ко-экспрессией AmpC и БЛРС. В другом исследовании минимальное количество ложноположительных результатов, связанных с выявлением энтеробактерий с гиперпродукцией AmpC β -лактамаз, отмечалось на селективной среде CHROMagarCTX, предназначенной для выявления энтеробактерий с продукцией β -лактамаз CTX-М типа и подавления роста микроорганизмов с гиперпродукцией хромосомных AmpC β -лактамаз. Однако на этой среде зачастую не удавалось определить энтеробактерии, продуцирующие БЛРС других типов, таких как TEM, SHV и другие [114].

При проведении исследований с использованием селективных хромогенных сред необходимо принимать во внимание возможность получения ложноотрицательных результатов, связанных с недостаточной микробной нагрузкой в исследуемом образце. В исследовании M. Hornsey и соавт. [75] было продемонстрировано влияние инокулюма энтеробактерий, продуцирующих БЛРС, на обнаружение их на селективной среде CHROMagarTMESBL. Только 4 из 9 исследованных изолятов были выделены на селективной среде при микробной нагрузке менее 100 КОЕ/мл. При прямом исследовании клинических образцов от больных на селективной среде исходная микробная нагрузка неизвестна, поэтому можно получить ложноотрицательный результат по определению продуцентов БЛРС в связи с низким содержанием микроорганизмов в исследуемом материале.

Следует отметить, что для детекции БЛРС любым из фенотипических методов необходимо предварительно получить чистую культуру исследуемого микроорганизма. Следовательно, заключение о продукции БЛРС может быть выдано в клинические отделения только через 48-72 часа после доставки образца от больного в лабораторию, тогда как при прямом нанесении биологического материала на хромогенные селективные среды для детекции продуцентов БЛРС предварительное заключение об обнаружении БЛРС-положительных бактерий может быть предоставлено в клинические отделения уже через 18–24 часа после поступления образцов в лабораторию. Необходимо помнить, что все положительные результаты, полученные с использованием селективных хромогенных сред, должны быть подтверждены с помощью стандартных фенотипических методов детекции БЛРС.

Таким образом, фенотипические методы детекции БЛРС у энтеробактерий включают метод «двойных дисков», метод комбинированных дисков, градиентный тест для выявления БЛРС (E-тест), метод серийных микроразведений в бульоне. Для сокращения времени до получения предварительной информации о наличии БЛРС-положительных бактерий в исследуемом материале могут быть использованы селективные хромогенные среды для выявления продуцентов БЛРС.

1.8 Заключение по обзору литературы

Резюмируя данные обзора литературы, следует отметить, что 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 БЛРС. Одной из наиболее значимых проблем в лечении инфекционных осложнений, вызванных этими бактериями, является их устойчивость ко многим антимикробным препаратам, в то время как выбор альтернативных антибиотиков является ограниченным.

У больных гемобластозами возможен как эндогенный, так и экзогенный путь инфицирования при бактериемии, с преобладанием эндогенного пути развития инфекции, при котором происходит транслокация микроорганизмов со слизистой оболочки кишечника в кровотоки. Следовательно, одним из основных факторов риска возникновения инфекций в период гранулоцитопении является предшествующая колонизация слизистой оболочки кишечника соответствующими по виду микроорганизмами. У значительного числа больных гемобластозами колонизация энтеробактериями с продукцией БЛРС регистрируется уже при поступлении в стационар, и доля таких больных возрастает в процессе ХТ. Таким образом, детекция полирезистентных бактерий на слизистой оболочке кишечника позволяет косвенно предположить возможного возбудителя инфекции, что в свою очередь может помочь в своевременном выборе адекватной эмпирической терапии.

Факторами риска колонизации слизистой оболочки кишечника продуцентами БЛРС являются длительное пребывание в стационаре и в отделении реанимации, выполнение инвазивных медицинских манипуляций, применение антибиотиков, преклонный возраст. Как правило, у больных гемобластозами в период ХТ присутствует сразу несколько факторов риска колонизации слизистой оболочки кишечника БЛРС-положительными бактериями, поэтому у этой категории больных особенно велика вероятность детекции энтеробактерий с продукцией БЛРС со слизистой оболочки кишечника.

В настоящее время в литературе существуют описания ограниченного числа длительных мониторинговых исследований по выявлению колонизации слизистой оболочки кишечника продуцентами БЛРС у больных продолжительное время находящихся в стационаре. В большинстве опубликованных работ проводился анализ колонизации больных с различными нозологиями либо исследуется колонизация в процессе коротких эпизодов лечения больных гемобластозами. Помимо этого, для каждого стационара и для каждой когорты пациентов имеются особенности распространения полирезистентных бактерий, поэтому изучение частоты детекции энтеробактерий с продукцией БЛРС, выделенных у больных гемобластозами при

программной ХТ имеет большое значение при принятии мер по оптимизации антимикробной терапии и ограничению распространения полирезистентных микроорганизмов.

Глава 2. Материалы и методы

Научная работа представляет проспективное исследование и состоит из двух частей. Первая часть посвящена мониторингу энтеробактерий с продукцией БЛРС, выделенных со слизистой оболочки ротоглотки и прямой кишки у больных ОМЛ и лимфомами. Во второй части проводится молекулярное исследование БЛРС-положительных изолятов, выделенных из гемокультуры и со слизистой оболочки кишечника у гематологических больных.

2.1 Общая характеристика и дизайн исследования, характеристика больных

Исследование проводилось в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России (генеральный директор – академик РАН В.Г. Савченко). В исследование были включены больные гемобластозами, находившиеся на лечении в следующих отделениях:

- отдел интенсивной химиотерапии гемобластозов, депрессий кроветворения и трансплантации костного мозга (руководитель – д.м.н. Е.Н. Паровичникова) включающий:
 - отделение интенсивной химиотерапии гемобластозов и депрессий кроветворения (заведующая отделением – к.м.н. В.В. Троицкая);
 - отделение интенсивной химиотерапии гемобластозов и трансплантации костного мозга (заведующая отделением к.м.н. – Л.А. Кузьмина);
- отделение химиотерапии гематологических заболеваний (заведующая отделением – к.м.н. Е.О. Грибанова);
- отделение химиотерапии и интенсивной терапии гематологических заболеваний (заведующий отделением к.м.н. – С.К. Кравченко);
- отделение анестезиологии и реаниматологии (заведующий отделением – д.м.н. Г.М. Галстян).

Бактериологические исследования были выполнены в лаборатории клинической бактериологии, микологии и антибиотической терапии (заведующая лабораторией – д.м.н., профессор Г.А. Клясова). Молекулярные исследования проводили в лаборатории молекулярной гематологии (заведующий лабораторией – д.м.н. А.Б. Судариков) и в лаборатории клинической бактериологии, микологии и антибиотической терапии (заведующая лабораторией – д.м.н., профессор Г.А. Клясова).

Мониторинг детекции энтеробактерий с продукцией БЛРС со слизистой оболочки ротовой полости и прямой кишки был проведен у больных ОМЛ и лимфомами с апреля 2013 по ноябрь 2014 года. В исследование были включены все больные, поступившие в «НМИЦ гематологии» во время проведения исследования, с впервые установленным диагнозом или с рецидивом. Наблюдение за больными проводили в течение 6 месяцев.

В исследование включили 98 больных, из них больные ОМЛ – 34% и больные лимфомами – 66%. Гемобластоз был впервые диагностирован у 94 (96%) больных, а 4 (4%) больных (1 ОМЛ и 3 лимфомами) были госпитализированы с ранним или поздним рецидивом заболевания, возникшим через 1 год и позже после констатации ремиссии. Характеристика больных в течение 6 месяцев наблюдения представлена в таблице 1. Медиана возраста больных была 43 года (разброс от 17 до 83 лет). Больные лимфомами были статистически значимо старшего возраста, чем больные ОМЛ (47 против 35 лет, $p = 0,01$). Среди больных ОМЛ было в два раза больше женщин, чем мужчин (21 женщина и 12 мужчин), а в группе больных лимфомами количество мужчин и женщин было сопоставимым (30 мужчин и 35 женщин).

Химиотерапия была проведена 91 (93%) из 98 больных. Курсы ХТ не проводили 7 больным, из них у 4-х по причине отказа от лечения, а у троих в связи с летальным исходом. За 6 месяцев наблюдения 74% больных ОМЛ было выполнено 3 курса ХТ, а 87% больных лимфомами – от 4 до 8 курсов ХТ. У больных ОМЛ основными были курсы ХТ по программе «7+3» (94%), у больных лимфомами – «блоковая терапия» по протоколу NHL-BFM-90 или mNHL-BFM-90 (48%) и EPOCH (37%) [11].

Таблица 1. Характеристика больных ОМЛ и лимфомами, включенных в исследование, в течение 6 месяцев наблюдения

Параметры	ОМЛ	Лимфома	Всего
Число больных при поступлении	33	65	98
Пол (мужчины/ женщины)	12 /21	30 /35	42/56
Возраст, медиана, годы	35 (17–83)	47 (18–76)	43 (17–83)
Число больных, получивших 1-й курс ХТ	31	60	91
Число больных, выбывших из исследования до 1-го курса ХТ	2	5	7
Причины выбывания из исследования			
- Отказ от лечения	1	3	4
- Летальный исход	1	2	3
Схемы ХТ			
- «7+3»	29 (94%)	-	-
- Блоковая терапия (NHL-BFM-90, mNHL-BFM-90)	-	29 (48 %)	-
- EPOCH, R-EPOCH, R-Da-EPOCH	-	22 (37%)	-
- СНОР и R-СНОР	-	8 (13%)	-
- Другие курсы ХТ	2 (6%)	1 (2%)	-
Число больных, получивших 2-й курс ХТ	25	55	80
Число больных, выбывших из исследования до 2-го курса ХТ	6	5	11
Причины выбывания из исследования			
Отказ от лечения	1	2	3
Летальный исход	5	3	8

Продолжение таблицы 1.

Параметры	ОМЛ	Лимфома	Всего
Медиана наблюдения за больными, дни	37 (23–69)	21 (19–29)	-
Число больных, получивших 3-й курс ХТ	23	54	77
Число больных, выбывших из исследования до 3-го курса ХТ	2	1	3
Причины выбывания из исследования			
- Летальный исход	1	1	2
- Завершено наблюдение	1		1
Медиана наблюдения за больными, дни	76 (61–126)	45 (38–62)	-
Число больных, получивших 4-й курс ХТ	16	52	68
Число больных, выбывших из исследования до 4-го курса ХТ	7	2	9
Причины выбывания из исследования			
- Отказ от лечения	1	1	2
- Летальный исход	1	1	2
- Завершены курсы ХТ	5*		5
Медиана наблюдения за больными, дни	123 (104–184)	68 (59–118)	-
Число больных, получивших 5-ый курс ХТ	1	46	47
Число больных, выбывших из исследования до 5-го курса ХТ	15	6	21
Причины выбывания из исследования			
- Завершено наблюдение	15		21
- Завершены курсы ХТ		6	
Медиана наблюдения за больными, дни	175	87 (76–175)	-
Число больных, получивших 6-й курс ХТ	0	41	41
Число больных, выбывших из исследования до 6-го курса ХТ	1	5	6
Причины выбывания из исследования			
- Завершено наблюдение	1		6
- Завершены курсы ХТ		5	
Медиана наблюдения за больными, дни	-	109 (100–164)	-
Число больных, получивших 7-й курс ХТ	0	13	13
Число больных, выбывших из исследования до 7-го курса ХТ	-	28	28
Причины выбывания из исследования			
- Завершены курсы ХТ	-	28	28
Медиана наблюдения за больными, дни	-	138 (124–166)	-
Число больных, получивших 8-й курс ХТ	0	9	9
Число больных, выбывших из исследования до 8-го курса ХТ	-	4	4
Причины выбывания из исследования			
- Завершены курсы ХТ	-	4	4
Медиана наблюдения за больными, дни	-	161 (146–186)	-

Примечание: * проведена трансплантация стволовых гемопоэтических клеток

Дизайн исследования представлен на рисунке 5. У всех больных брали мазки со слизистой оболочки ротовой полости и прямой кишки в течение первых двух дней госпитализации в

«НМИЦ гематологии», исследование повторяли каждые 7 ± 2 дней во время пребывания больного в стационаре и при очередной госпитализации. Колонизацией энтеробактериями с продукцией БЛРС считали хотя бы однократное выделение продуцентов БЛРС в мазках со слизистой оболочки ротовой полости или кишечника. Полагали, что произошла элиминация БЛРС-положительных бактерий со слизистой оболочки кишечника, если данные микроорганизмы не определяли в трех последовательно взятых мазках.



Рисунок 5. Дизайн исследования по детекции колонизации слизистой оболочки ротоглотки и прямой кишки энтеробактериями с продукцией БЛРС

2.2 Выделение и идентификация бактериальных изолятов

Мазки со слизистой оболочки ротоглотки и прямой кишки для бактериологического исследования брали стерильным зонд-тампоном и помещали в транспортную среду. В лаборатории исследование мазков проводили на стандартных агаризованных средах Эндо или МакКонки и параллельно на хромогенной селективной среде CHROMagarTMESBL (CHROMagar, Франция), предназначенной для прямого выявления энтеробактерий с продукцией БЛРС. Чашки Петри с образцами инкубировали в термостате при температуре 36°C в течение 18-24 часов. Идентификацию выделенных бактерий проводили методом матричной лазерной десорбционной ионизационной времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS) на анализаторе Microflex (Bruker Daltonik, Германия) в автоматическом режиме с использованием программы Biotyper RTC версии 3.0 (Bruker Daltonik, Германия). Для идентификации полученных изолятов до вида изолированные колонии микроорганизма, полученные на агаризованных средах, в двух повторах наносили на ячейки слайда (мишени), после чего немедленно покрывали 1 мкл специального реагента – матрицы (α -циано-4-гидроксикоричная кислота и раствор, содержащий 50% ацетонитрила и 2,5% трифторуксусной кислоты), поглощающего энергию лазерного излучения. В качестве критерия надежной видовой идентификации использовали рекомендуемые значения коэффициента совпадения (score) от 2,0 и выше.

2.3 Фенотипическая детекция β-лактамаз

У всех выделенных энтеробактерий проводили подтверждение продукции БЛРС методом «двойных дисков» в соответствии с МУК 4.21890-04 [9] и согласно алгоритму, представленному в EUCAST 2013 [57]. Для детекции БЛРС этим методом использовали следующие диски с цефалоспоридами III-IV поколения: цефотаксим (30 мкг), цефтазидим (30 мкг), цефепим (30 мкг) (Oxoid, Великобритания) и диск с амоксициллином и клавулановой кислотой (20/10 мкг) (Becton, Dickinson, США). Для приготовления инокулюма использовали чистую суточную культуру бактерий. Стерильным тампоном переносили несколько колоний исследуемого микроорганизма в пробирку со стерильным физиологическим раствором. Взвесь бактериальных клеток доводили до мутности 0,5 по стандарту МакФарланда (10^8 КОЕ/мл) и наносили на поверхность агара Мюллер-Хинтона в трех различных направлениях. Через 5–10 минут после инокулирования на подсохшую поверхность агара накладывали диски с антибиотиками. В центре располагали диск, содержащий клавулановую кислоту, по бокам от него на расстоянии 20–30 мм между центрами дисков – диски с цефалоспоридами. Чашки с агаром инкубировали в термостате в течение 18–20 часов. Наличие продукции БЛРС определяли по расширению зоны подавления роста между одним или несколькими дисками с цефалоспоридами и диском, содержащим клавулановую кислоту (рисунок 4 в, з).

Продукцию БЛРС у энтеробактерий дополнительно подтверждали методом последовательных серийных микроразведений в бульоне с использованием 96-луночных планшетов в соответствии с методикой, рекомендованной Институтом по клиническим и лабораторным стандартам (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI 2015) [51]. Для определения МПК использовали следующий диапазон конечных концентраций антибиотиков в лунках: цефтазидим – от 0,25 до 128 мкг/мл, цефтазидим/ клавулановая кислота – от 0,25/4 до 128/4 мкг/мл, цефотаксим – от 0,25 до 64 мкг/мл, цефотаксим/ клавулановая кислота – от 0,25/4 до 64/4 мкг/мл. Для исследования изолятов *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *M. morgani* и *Raoultella ornithinolytica* применяли методику, рекомендованную для *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *P. mirabilis*. В работе были использованы чистые субстанции антибиотиков: цефтазидим (Ceftazidime hydrate, SIGMA), цефотаксим (Cefataxime sodium salt, SIGMA), клавуланат (Potassium clavulanate, Fluka).

Согласно рекомендациям CLSI исследование МПК цефалоспоринов проводили следующим образом. В лунки планшета вносили по 50 мкл растворов антибиотиков в бульоне Мюллера-Хинтон с таким расчетом, чтобы при 2-кратном разведении в лунках создавались концентрации, соответствующие заданному диапазону концентраций. Из отдельных колоний бактерий готовили суспензию, соответствующую стандарту мутности 0,5 по МакФарланду.

Приготовленную суспензию разводили в 100 раз в бульоне Мюллера-Хинтон и далее вносили по 50 мкл в лунки планшета. Инокулированные планшеты инкубировали в течение 18–20 часов при температуре 35–37°C. Во внимание принимали значения наименьшей концентрации антибиотика, подавляющей видимый рост микроорганизма – МПК. 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, считали свидетельством продукции изолятом БЛРС [9].

Для исключения продукции AmpC β-лактамаз проводили дополнительные исследования. Если продукция БЛРС не была подтверждена методом «двойных дисков» и методом серийных микроразведений в бульоне, а выделенный изолят имел устойчивость хотя бы к одному из тестируемых цефалоспоринов III поколения и был чувствителен к цефепиму, то дополнительно исследовали чувствительность к цефокситину с помощью ДДМ. Энтеробактерии, устойчивые к цефокситину и чувствительные к цефепиму, расценивали как возможно имеющие гиперпродукцию AmpC β-лактамаз, которую подтверждали с помощью градиентного теста (CN/CNI, BioMérieux, Франция), содержащего цефотетан и цефотетан с клоксациллином и предназначенного для детекции AmpC, согласно рекомендациям EUCAST 2013 [57].

Для внутреннего контроля качества использовали следующие контрольные штаммы: *E. coli* ATCC®25299, *K. pneumoniae* ATCC®700603.

2.4 Детекция генов β-лактамаз

Изоляты энтеробактерий с продукцией БЛРС, включенные в исследование, хранили в криопробирках в 15% растворе глицерина в триптиказо-соевом бульоне при температуре -70°C до проведения дополнительных исследований. Для выделения хромосомной ДНК использовали суточную культуру исследуемых микроорганизмов. Из суточной культуры бактерий готовили суспензию в 200 мкл деионизированной стерильной воды. Полученную суспензию инкубировали при температуре 95°C в течение 5 минут и центрифугировали при 13000 оборотах в минуту в течение 2 минут. ДНК, находящуюся в надосадочной жидкости, хранили в микроцентрифужных пробирках при температуре -20°C и использовали для последующих ПЦР-исследований.

Детекцию наиболее распространенных генов β-лактамаз *bla*_{TEM} и *bla*_{CTX-M} проводили у всех изолятов с продукцией БЛРС. Для определения наличия генов *bla*_{TEM} и *bla*_{CTX-M} использовали коммерческие наборы реагентов для ПЦР-диагностики в реальном времени (Литех, Россия). Реакцию амплификации проводили в ПЦР-пробирках на 0,1 мл (MicroAmp®Fast 96-Well Reaction Plate, Applied Biosystems, Китай) в объеме 25 мкл. В состав ПЦР смеси для каждой пробы

входили: 17 мкл разбавителя, 5 мкл реакционной смеси, 0,2 мкл ДНК-полимеразы и 2,8 мкл образца. Амплификацию и детекцию продуктов реакции проводили с помощью амплификатора StepOne и программного обеспечения StepOne™ Software v2.1 (Life Technologies Applied Biosystems) по следующему протоколу: денатурация в течение 1 минуты 30 секунд при температуре 95°C, далее 40 циклов амплификации (10 секунд денатурация при 94°C, 30 секунд отжиг праймеров при 60°C, 20 секунд элонгация при 72°C). Для регистрации специфического сигнала в данных наборах реагентов был использован канал FAM. Детекция продуктов амплификации осуществлялась прибором автоматически в каждом цикле амплификации.

2.5 Генотипирование энтеробактерий с продукцией β-лактамаз расширенного спектра

Во второй части работы у больных с бактериемией, вызванной энтеробактериями, была исследована колонизация слизистой оболочки прямой кишки энтеробактериями с продукцией БЛРС. Исследование было проведено с 2013 по 2015 г. В течение первых трех дней после получения гемокультуры брали мазок со слизистой оболочки прямой кишки. Далее проводили молекулярно-генетический анализ БЛРС-положительных бактерий, выделенных из гемокультуры и со слизистой прямой кишки, для определения генетического родства.

Для определения генетического родства продуцентов БЛРС был использован один из вариантов ПЦР с произвольными праймерами – ERIC-ПЦР (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus). ERIC-ПЦР включает в себя амплификацию с праймерами, частично комплементарными повторяющимся межгенным последовательностям энтеробактерий.

ПЦР проводили в конечном объеме 20 мкл, содержащем 6 мкл исследуемой ДНК, 0,2 мМ дидоксирибонуклеозидтрифосфатов (dNTP), 2 мкл буфера (Beagle, Россия), 0,2 мкл Taq-полимеразы (Beagle, Россия), 9,6 мкл стерильной деионизированной воды и праймер ERIC1 (3'-САСТТАGGGGTCCTCGAATGTA-5') [136] в конечной концентрации 25 пМоль. Амплификацию проводили с использованием термоциклера CFX96 Touch (BioRad, США) согласно следующему протоколу: начальный этап денатурации – 3 минуты при 94°C, затем 34 цикла: денатурация – 1 минута при 94°C, отжиг – 1 минута при 54°C и элонгация 1 – минута при 72°C. Завершающий этап элонгации продлевали до 4 минут.

Полученные продукты ПЦР разделяли в 1% агарозном геле (Helicon, Россия, biotechnology grade) с добавлением этидия бромида (BioRad, США) при 200В в 1хТАЕ буфере (Литех, Россия). Визуализацию полос проводили при облучении геля УФ-светом с длиной волны 260 нм при помощи трансиллюминатора (Vilber Lourmat, Франция). В качестве маркера молекулярной массы использовали ДНК маркер GeneRuler™, 100 пар нуклеотидов (Thermo Fisher Scientific, США). В

результате разделения в агарозном геле получали набор ПЦР-фрагментов (профиль), характерный для каждого изолята. Генетическое сходство исследуемых изолятов оценивали по количеству и расположению полос на электрофореграмме. Сравнение 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 от 80% и более. Присутствие генетически родственных изолятов считали признаком моноклонального распространения энтеробактерий с продукцией БЛРС. Поликлональное распространение определялось в том случае, если КС между штаммами был менее 80%.

Генотипирование проводили в лаборатории клинической бактериологии, микологии и антибиотической терапии совместно со старшим научным сотрудником к.б.н. С.А. Хрульновой (заведующая лабораторией – профессор, д.м.н. Г.А. Клясова).

2.6 Статистическая обработка результатов

Для сбора данных о больных на этапе планирования исследования был составлен протокол, который состоял из двух частей. В первой части фиксировали основные данные о больном (Ф.И.О., возраст, пол, место жительства, диагноз) и анамнез до поступления в стационар (сопутствующие заболевания, предшествующие госпитализации, абдоминальные операции, применение антибиотиков, пребывание в реанимации). Во второй части протокола регистрировали возможные факторы риска, ассоциированные с колонизацией слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС в процессе пребывания больного в стационаре. В эту часть протокола включали данные о курсах ХТ, инвазивных вмешательствах, применении антибиотиков, наличии центрального венозного катетера (ЦВК), гранулоцитопении и ее длительности, хирургических вмешательствах, пребывании в реанимации, парентеральном питании, диарее. На основе заполненных протоколов и шаблонов, разработанных ранее для мониторинговых исследований в информационно-аналитическом отделе «НМИЦ гематологии» [1], была создана электронная база данных (Access 2003).

Обработку и анализ данных осуществляли с помощью процедур статистического пакета SAS v9.13 [124] и SPSS. Качественные признаки сравнивали с помощью критерия χ^2 . Для оценки влияния факторов риска на вероятность развития события при однофакторном анализе применяли метод отношения шансов (Odds Ratio, ОШ). Для определения наиболее значимых факторов риска был проведен пошаговый многофакторный анализ. Для сравнения

количественных показателей, таких как длительность воздействия факторов риска, ассоциированных с колонизацией БЛРС-положительными бактериями, использовали непараметрический статистический критерий Манна-Уитни. Анализ факторов риска, ассоциированных с колонизацией слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС, проводили как для общей группы больных, включающей больных ОМЛ и лимфомами, так и отдельно для каждой нозологической категории. Анализ влияния возможных факторов риска на вероятность колонизации слизистой оболочки кишечника продуцентами БЛРС был проведен до начала ХТ, перед вторым и четвертым курсом ХТ.

Для оценки распределения времени появления колонизации слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС в процессе ХТ использовали статистические методы событийного анализа. Построение кривых выживаемости выполняли по методу Каплана-Майера, для оценки достоверности различий использовали тест Log-rank. Результаты мониторинга факторов риска каждого больного были представлены в виде временных рядов, которые впоследствии анализировали с помощью методов событийного анализа ("land-mark" анализ). Для оценки сравнительной значимости анализируемых факторов риска были проведены расчеты вероятности детекции продуцентов БЛРС по модели Кокса. Различия считались статистически значимыми, если степень вероятности безошибочного прогноза была 95% ($p \leq 0,05$).

Событийный анализ для выявления вероятности колонизации слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС за весь период наблюдения был проведен у всех пациентов, включенных в исследование; вероятность элиминации БЛРС-положительных бактерий была оценена у больных с колонизацией слизистой оболочки прямой кишки этими микроорганизмами от момента детекции колонизации до элиминации, а вероятность реколонизации - только у больных с предшествующей элиминацией продуцентов БЛРС со слизистой оболочки кишечника.

Статистический анализ проведен совместно с руководителем информационно-аналитического отдела к.т.н. С.М. Куликовым и научным сотрудником к.т.н. Ю.А. Чабаевой.

Глава 3. Результаты исследования и обсуждение

3.1 Детекция энтеробактерий с продукцией β -лактамаз расширенного спектра у больных ОМЛ и лимфомами при поступлении в стационар и в процессе программной химиотерапии

3.1.1 Частота выявления и факторы риска колонизации слизистых оболочек ротовой полости и кишечника энтеробактериями с продукцией β -лактамаз расширенного спектра у больных ОМЛ и лимфомами при поступлении

В исследование были включены 98 больных с диагнозами ОМЛ (34%) и лимфомы (66%). Характеристика больных, включенных в исследование, отражена в таблице 2. Больные лимфомами были статистически значимо старшего возраста, чем больные ОМЛ (47 лет против 35 лет, $p = 0,01$). Колонизацию слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС выявили у 26 (27%) из 98 больных в течение первых дней госпитализации в «НМИЦ гематологии». У всех больных с колонизацией БЛРС-положительными бактериями гемобластоз был диагностирован впервые. Доля больных с колонизацией была сопоставимой у двух групп больных и составила 28% (18 из 65) у больных лимфомами и 24% (8 из 33) – ОМЛ. Колонизация слизистой оболочки ротоглотки продуцентами БЛРС была только у 4 (4%) из 98 больных и наблюдалась статистически значимо реже, чем со слизистой оболочки кишечника (27%, $p < 0,01$).

Таблица 2. Характеристика больных, включенных в исследование

Параметры	Всего	ОМЛ	Лимфома	<i>p</i>
Число больных	98	33 (34 %)	65(66 %)	-
Пол (мужчины/ женщины)	42/56	12 /21	30 /35	-
Возраст, медиана, годы	43 (17–83)	35 (17–83)	47 (18–76)	0,01
Число больных, имевших колонизацию продуцентами БЛРС при первой госпитализации в «НМИЦ гематологии»	26 (27%)	8 (24%)	18 (28%)	>0,05

Мы изучили факторы риска, ассоциированные с колонизацией слизистой оболочки кишечника БЛРС-положительными энтеробактериями, у всех больных и в зависимости от нозологической группы (Таблица 3). Среди анализируемых факторов преобладали применение антибиотиков в последний месяц (80%) и пребывание в другом стационаре в течение последних 6 месяцев до госпитализации в «НМИЦ гематологии» (77%). Значительное количество больных имели сопутствующие заболевания (41%) и были переведены в «НМИЦ гематологии» из других

лечебных учреждений (38%). В группе больных ОМЛ в сравнении с лимфомами было достоверно больше больных, имевших госпитализацию в последние 6 месяцев (94% против 68%, $p = 0,004$) и в два раза больше больных, переведенных из других стационаров (58% против 28%, $p = 0,004$). Среди больных лимфомами в сравнении с больными ОМЛ было значительно больше пациентов 50 лет и старше (42% против 21%, $p = 0,05$) и имевших сопутствующие заболевания (48% против 27%, $p = 0,05$).

Таблица 3. Факторы риска, ассоциированные с колонизацией слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС, у больных ОМЛ и лимфомами при поступлении в «НМИЦ гематологии»

Показатель	Всего <i>n</i> (%)	ОМЛ <i>n</i> (%)	Лимфома <i>n</i> (%)	<i>p</i>
Общее число больных	98	33	65	-
Применение антибиотиков в последний месяц до госпитализации в «НМИЦ гематологии»	78 (80)	27 (82)	51 (78)	0,7
Пребывание в другом стационаре в последние 6 месяцев до госпитализации в «НМИЦ гематологии»	75 (77)	31 (94)	44 (68)	0,004
Пол (мужчины)	56 (58)	12 (36)	29 (45)	0,4
Место жительства в других регионах, исключая Москву	48 (49)	19 (58)	29 (45)	0,2
Сопутствующие заболевания	40 (41)	9 (27)	31 (47)	0,05
Перевод из другого стационара в «НМИЦ гематологии»	37 (38)	19 (58)	18 (28)	0,004
Возраст 50 лет и старше	34 (35)	7 (21)	27 (42)	0,05
Проживание в сельской местности	13 (13)	5 (15)	8 (12)	0,69
Пребывание в реанимации до госпитализации в «НМИЦ гематологии»	9 (9)	2 (6)	7 (11)	0,44
Абдоминальные операции в последний месяц до госпитализации в «НМИЦ гематологии»	5 (5)	1 (3)	4 (6)	0,5

Далее был проведен однофакторный анализ факторов риска колонизации слизистой оболочки кишечника продуцентами БЛРС (Таблица 4). Такие факторы как перевод больного из другого стационара и возраст 50 лет и старше явились статистически значимыми для риска колонизации продуцентами БЛРС. Так у больных, поступивших из других стационаров в «НМИЦ гематологии», колонизация составляла 38% против 20% в случаях госпитализации больных в «НМИЦ гематологии» из дома (ОШ 3,1; $p = 0,01$). Вероятность колонизации была значительно выше среди больных в возрасте 50 лет и старше в сравнении с больными моложе 50 лет (38% против 20%; ОШ 2,4, $p = 0,05$). Детекция БЛРС-положительных бактерий со слизистой

оболочки кишечника наблюдалось чаще у больных, которые находились на лечении в другом стационаре в течение последних 6 месяцев до госпитализации в «НМИЦ гематологии» (31% против 13%) и постоянно проживали в сельской местности (46% против 24%).

Таблица 4. Факторы риска колонизации слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС при поступлении в «НМИЦ гематологии»

Фактор	Колонизация энтеробактериями с продукцией БЛРС в зависимости от анализируемого фактора		ОШ (95% ДИ)	<i>p</i>
	Есть фактор	Нет фактора		
Перевод из другого стационара	14 (38%) из 37	12 (20%) из 61	3,1 (1,23–7,82)	0,01
Возраст 50 лет и старше	13 (38%) из 34	13 (20%) из 64	2,4 (0,97–6,10)	0,05
Пребывание в другом стационаре в последние 6 месяцев до госпитализации в «НМИЦ гематологии»	23 (31%) из 75	3 (13%) из 23	2,9 (0,79–10,92)	0,09
Проживание в сельской местности	6 (46%) из 13	20 (24%) из 85	2,8 (0,84–9,25)	0,09
Абдоминальные операции в последний месяц до госпитализации в «НМИЦ гематологии»	2 (40%) из 5	24 (26%) из 93	1,917 (0,37–4,33)	0,71
Место жительства в других регионах, исключая Москву	15 (31%) из 48	11 (22%) из 50	1,6 (0,65–3,98)	0,29
Сопутствующие заболевания	15 (30%) из 50	11 (23%) из 48	1,4 (0,58–3,56)	0,43
Пребывание в реанимации до госпитализации в «НМИЦ гематологии»	3 (33%) из 9	23 (26%) из 89	1,4 (0,33–6,21)	0,24
Наличие лимфомы	18 (28%) из 65	8 (24%) из 33	1,2 (0,46–3,14)	0,71
Применение антибиотиков в последний месяц до госпитализации в «НМИЦ гематологии»	21 (27%) из 78	5 (25%) из 20	1,1 (0,36–3,41)	0,86

Факторы риска колонизации слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС у больных лимфомами представлены в таблице 5. Статистически значимыми факторами, ассоциированными с колонизацией продуцентами БЛРС у больных лимфомами, были те же показатели, как и в общей группе больных – это перевод в «НМИЦ гематологии» из другого стационара (50% против 19%, ОШ 4,2, $p = 0,01$) и возраст 50 лет и старше (40% против 18%, ОШ 3,0, $p = 0,05$). Другие показатели не были статистически значимыми. Следует отметить, что детекция продуцентов БЛРС чаще наблюдалось при наличии у больных таких факторов как

проживание в сельской местности, а не в городе (50% против 25%), пребывание в другом стационаре в течение последних 6 месяцев (34% против 14%), применение антибиотиков и проведение абдоминальных операций в течение последнего месяца до госпитализации в «НМИЦ гематологии» (31% против 14%; 50% против 26%, соответственно).

Таблица 5. Факторы риска колонизации слизистой оболочки прямой кишки энтеробактериями с продукцией БЛРС у 65 больных лимфомами при поступлении в «НМИЦ гематологии»

Фактор	Колонизация энтеробактериями с продукцией БЛРС в зависимости от анализируемого фактора		ОШ (95% ДИ)	<i>p</i>
	Есть фактор	Нет фактора		
Перевод из другого стационара	9 (50%) из 18	9 (19%) из 47	4,2 (1,30–14,68)	0,01
Возраст 50 лет и старше	11 (40%) из 27	7 (18%) из 38	3,0 (0,99–9,36)	0,05
Пребывание в другом стационаре в последние 6 месяцев до госпитализации в «НМИЦ гематологии»	15 (34%) из 44	3 (14%) из 21	3,1 (0,79–12,24)	0,09
Проживание в сельской местности	4 (50%) из 8	14 (25%) из 57	3,1 (0,68–13,92)	0,13
Применение антибиотиков в последний месяц до госпитализации в «НМИЦ гематологии»	16 (31%) из 51	2 (14%) из 12	2,7 (0,55–13,72)	0,21
Абдоминальные операции в последний месяц до госпитализации в «НМИЦ гематологии»	4 (50%) из 8	15 (26%) из 57	2,6 (0,63–7,71)	0,20
Пребывание в реанимации до госпитализации в «НМИЦ гематологии»	3 (43%) из 7	16 (28%) из 58	1,969 (0,39–9,79)	0,21
Сопутствующие заболевания	12 (29%) из 31	6 (25%) из 24	1,2 (0,39–,89)	0,71
Место жительства в других регионах, исключая Москву	8 (28%) из 29	10 (28%) из 36	0,99 (0,33–2,96)	0,98

Факторы риска колонизации слизистой оболочки кишечника БЛРС-продуцирующими энтеробактериями у больных ОМЛ представлены в таблице 6. Единственным статистически значимым фактором, ассоциированным с колонизацией слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС у 33 больных ОМЛ, было место жительства. Так риск колонизации продуцентами БЛРС у больных, проживающих в других регионах, включая Московскую область, был в 7,6 раза выше по сравнению с жителями Москвы (37% против 7%, ОШ 7,6, $p = 0,04$). По другим анализируемым факторам не было получено статистически

значимых различий. Однако детекция энтеробактерий с продукцией БЛРС была в два раза чаще у больных, проживающих в сельской местности (40% против 21%) и поступивших из других стационаров (32% против 14%).

Таблица 6. Факторы риска колонизации слизистой оболочки прямой кишки энтеробактериями с продукцией БЛРС у 33 больных ОМЛ при поступлении в «НМИЦ гематологии»

Фактор	Колонизация энтеробактериями с продукцией БЛРС в зависимости от анализируемого фактора		ОШ (95% ДИ)	p
	Есть фактор	Нет фактора		
Место жительства в других регионах, исключая Москву	7 (37%) из 19	1 (7%) из 14	7,6 (0,81–71,04)	0,04
Перевод из другого стационара	6 (32%) из 19	2 (14%) из 14	2,8 (0,47–16,46)	0,25
Проживание в сельской местности	2 (40%) из 5	6 (21%) из 28	2,4 (0,33–18,13)	0,37
Сопутствующие заболевания	3 (33%) из 9	5 (21%) из 24	1,9 (0,35–10,40)	0,45
Возраст 50 лет и старше	2 (29%) из 7	6 (23%) из 26	1,3 (0,20–8,71)	0,76
Применение антибиотиков в последний месяц до госпитализации в «НМИЦ гематологии»	5 (19%) из 27	3 (50%) из 6	0,23 (0,04–1,48)	0,10
Пребывание в другом стационаре в последние 6 месяцев до госпитализации в «НМИЦ гематологии»	8 (26%) из 31	0 из 2	-	0,41
Абдоминальные операции в последний месяц до госпитализации в «НМИЦ гематологии»	0 из 1	7 (22%) из 22	-	0,50
Пребывание в реанимации до госпитализации в «НМИЦ гематологии»	0 из 2	7 (23%) из 31	-	0,48

Проведен многофакторный анализ факторов, ассоциированных с колонизацией слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС, в число которых вошли возраст больных 50 лет и старше, поступление из другого стационара и проживание вне Москвы. Независимыми факторами риска колонизации слизистой оболочки кишечника БЛРС-положительными изолятами явились возраст от 50 лет и старше и перевод из другого стационара в общей группе больных и у больных лимфомами, а проживание вне Москвы – у больных ОМЛ (Таблица 7).

Таблица 7. Факторы, ассоциированные с риском колонизации слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС при поступлении в «НМИЦ гематологии» (многофакторный анализ)

Диагноз	Число больных	Фактор	<i>p</i>	ОШ (95% ДИ)
Лимфомы и ОМЛ	98	Возраст 50 лет и старше	0,01	2,9 (1,1–7,39)
		Перевод из другого стационара	0,03	3,6 (1,3–9,6)
Лимфомы	65	Возраст 50 лет и старше	0,01	3,7 (1,1–12,8)
		Перевод из другого стационара	0,03	5,1 (1,4–18,1)
ОМЛ	33	Место жительства в других регионах, исключая Москву	0,049	1,02 (0,99–1,04)

Таким образом, наше исследование продемонстрировало, что практически у каждого третьего больного (27%) с впервые диагностированными ОМЛ и лимфомами была колонизация слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС при поступлении в «НМИЦ гематологии». Детекция продуцентов БЛРС была статистически значимо чаще со слизистой оболочки прямой кишки, чем ротоглотки. При многофакторном анализе независимыми факторами, при наличии которых вероятность колонизации БЛРС-положительными бактериями возрастает, у больных лимфомами явились перевод в «НМИЦ гематологии» из другого стационара и возраст от 50 лет и старше, у больных ОМЛ – проживание больных вне Москвы.

3.1.2 Мониторинг энтеробактерий с продукцией β-лактамаз расширенного спектра в процессе программной полихимиотерапии у больных ОМЛ и лимфомами

За 6 месяцев наблюдения энтеробактерии-продуценты БЛРС были выявлены у 75 (76,5%) из 98 больных. Вероятность колонизации слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС у больных ОМЛ и лимфомами в процессе реализации ХТ за период наблюдения представлена на рисунке 6. За анализируемый период вероятность колонизации в группе больных лимфомами составила 91%, а в группе больных ОМЛ – 84%. Медиана времени детекции колонизации продуцентами БЛРС у больных лимфомами от начала ХТ была 25 дней (разброс от 7 до 175 дней), а ОМЛ – 68 дней (разброс от 5 до 163 дней) ($p = 0,23$). Основная часть выявления «новых» случаев колонизации БЛРС-положительными бактериями ($n = 70$) была до 96 дня наблюдения, и только у 5 больных в более поздний период.

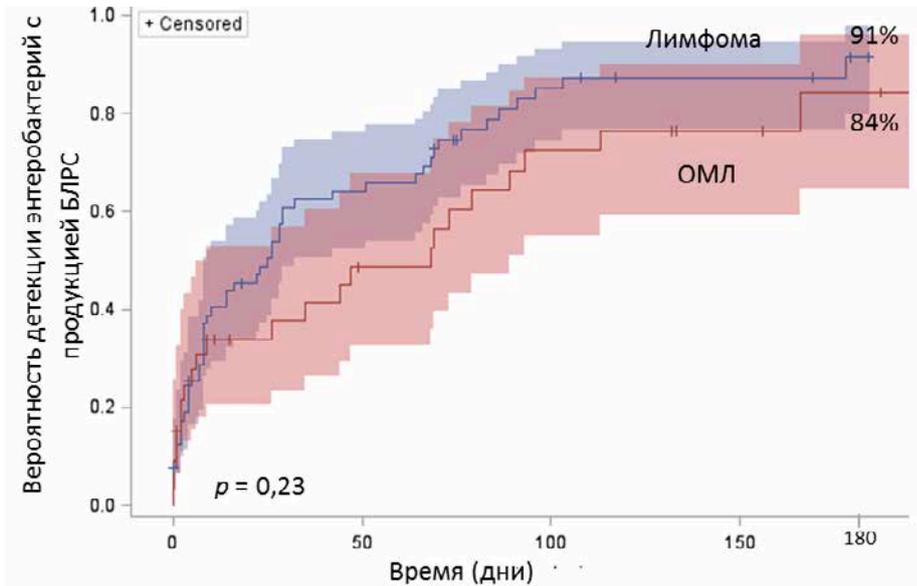


Рисунок 6. Вероятность детекции энтеробактерий с продукцией БЛРС в процессе мониторинга у больных ОМЛ ($n = 33$) и лимфомами ($n = 65$) в течение 6 месяцев наблюдения

Оценка вероятности детекции энтеробактерий с продукцией БЛРС в зависимости от возраста больного представлена на рисунке 7. Детекция БЛРС-положительных бактерий за период 6 месяцев была сопоставимой у больных в возрасте 50 лет и старше и у более молодых пациентов (84% и 80%, соответственно). У больных 50 лет и старше в сравнении с более молодыми пациентами время детекции продуцентов БЛРС было почти в 2 раза меньше (медиана 22 дня против 43 дней), но выявленные различия не были статистически значимыми.

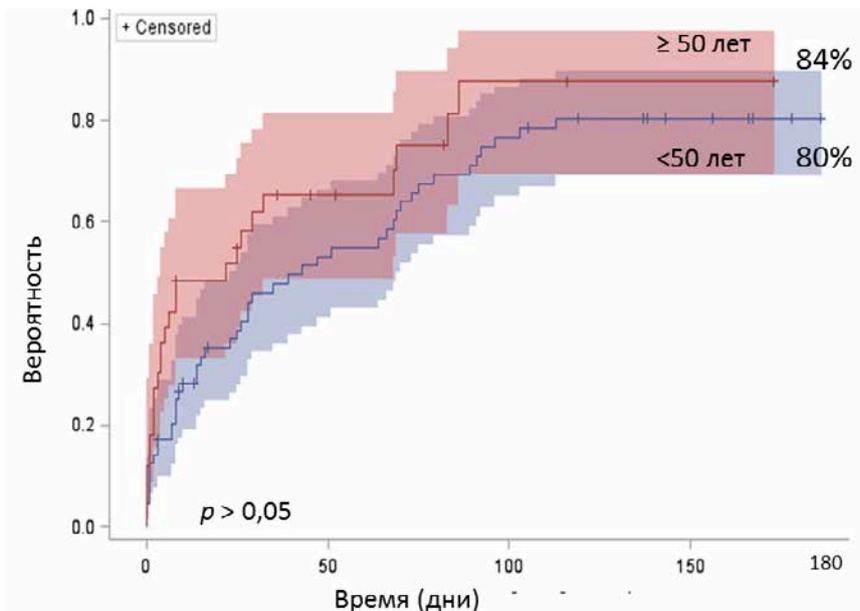


Рисунок 7. Вероятность детекции энтеробактерий с продукцией БЛРС в процессе мониторинга в общей группе больных моложе 50 лет ($n = 64$) и у больных 50 лет и старше ($n = 34$) в течение 6 месяцев наблюдения

При анализе вероятности детекции энтеробактерий с продукцией БЛРС в двух возрастных группах у больных ОМЛ и лимфомами было выявлено, что среди больных моложе 50 лет сохранялись те же тенденции, что и в смешанной возрастной группе (Рисунок 8, А) – вероятность колонизации за 6 месяцев наблюдения была несколько выше у больных лимфомами (86%) в сравнении с больными ОМЛ (71%), а медиана детекции составила 28 и 73 дня, соответственно. Среди больных от 50 лет и старше вероятность колонизации слизистой оболочки кишечника БЛРС-положительными энтеробактериями у больных ОМЛ и лимфомами была сопоставимой с «младшей» возрастной группой и достигала соответственно 70% и 83% за весь период наблюдения (Рисунок 8, Б). Тогда как медиана детекции была 6 дней у больных ОМЛ и 22 дня у больных лимфомами, но необходимо отметить, что выявленные различия были незначимыми, а в исследование было включено 34 больных 50 лет и старше и из них только 7 больных ОМЛ.

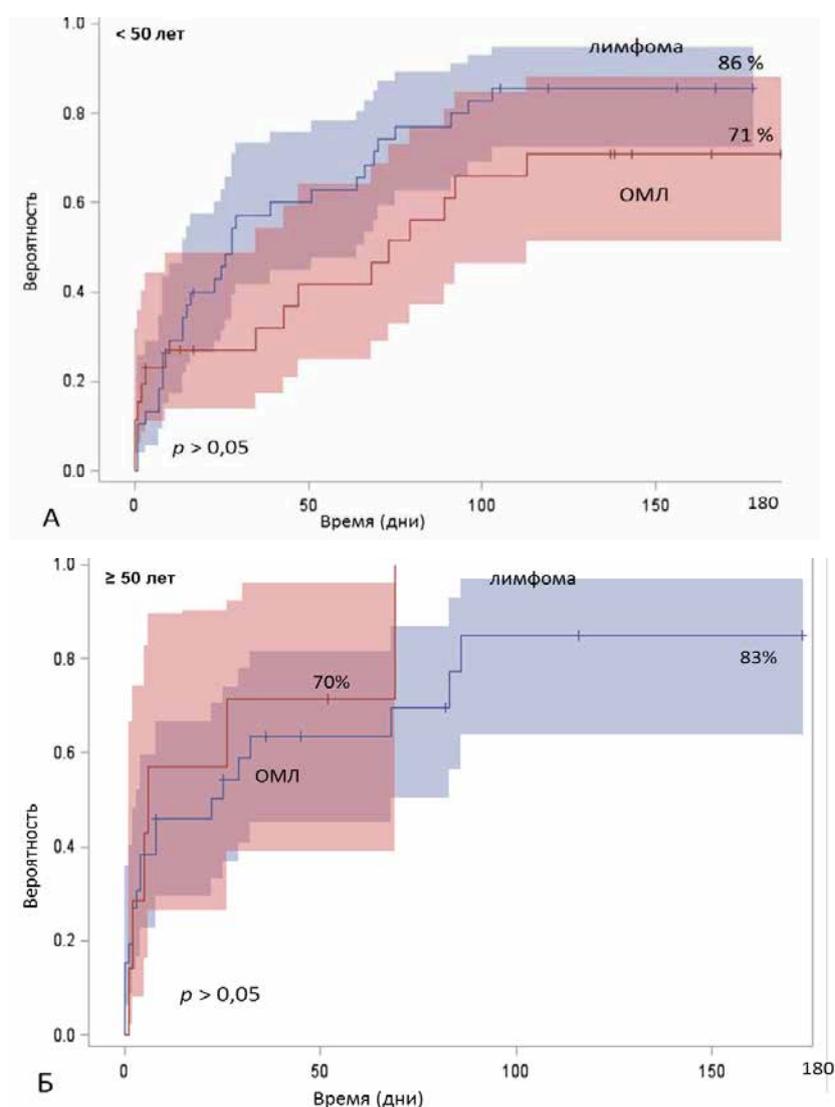


Рисунок 8. Вероятность детекции энтеробактерий с продукцией БЛРС в процессе мониторинга при ОМЛ и лимфоме в двух возрастных группах (А – возраст больного моложе 50 лет, $n = 64$; Б – возраст больного 50 лет и старше, $n = 34$) в течение 6 месяцев наблюдения

При проведении курсов ХТ было отмечено возрастание доли больных с колонизацией слизистой оболочки кишечника продуцентами БЛРС (Рисунок 9). Уже при первой госпитализации в наш центр БЛРС-положительные бактерии со слизистой оболочки кишечника были выявлены у 26 (27%) из 98 больных. Детекция продуцентов БЛРС возросла у больных ОМЛ с 24% при поступлении до 81% к 4-му курсу ХТ, а у больных лимфомами – с 28 до 69% соответственно. Значимый прирост колонизации энтеробактериями с продукцией БЛРС у больных лимфомами с 28 до 51% был отмечен к моменту проведения 2-го курса ХТ ($p = 0,009$), а у больных ОМЛ с 40 до 70% – к 3-му курсу ХТ ($p = 0,04$).

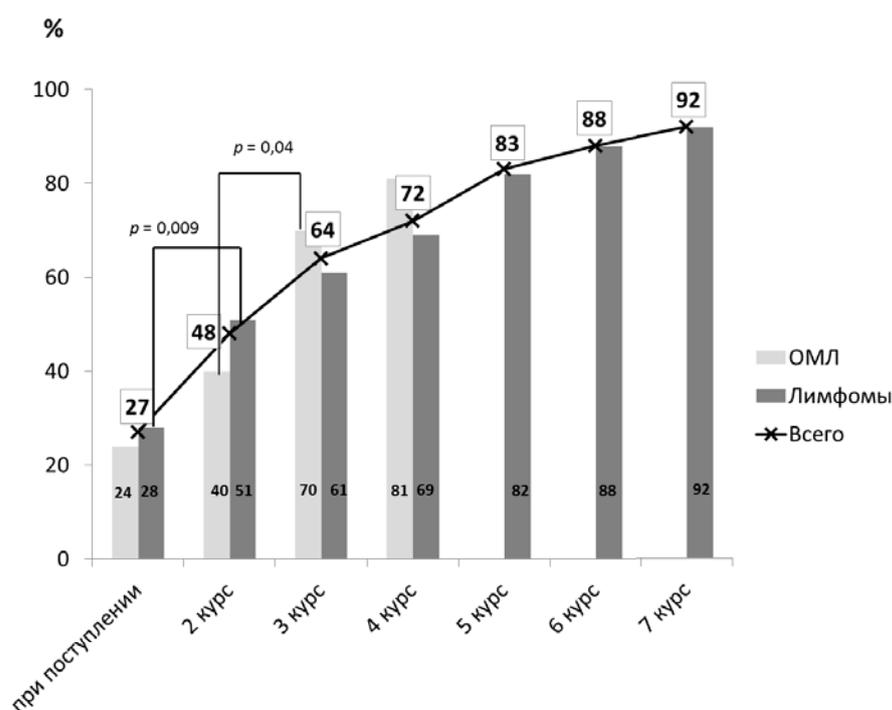


Рисунок 9. Динамика детекции энтеробактерий с продукцией БЛРС на курсах ХТ в течение 6 месяцев наблюдения

В течение 6 месяцев наблюдения у 33 (44%) из 75 больных, имевших колонизацию слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС, была отмечена элиминация продуцентов БЛРС с медианой 20 дней (разброс от 5 до 133 дней). Вероятность сохранения энтеробактерий с продукцией БЛРС на слизистой оболочке прямой кишки в течение 6 месяцев равнялась 30,3%, причем, у больных лимфомами этот показатель был выше (53,4%), чем у больных ОМЛ (15,7%) (Рисунок 10). Основная часть случаев элиминации энтеробактерий с продукцией БЛРС со слизистой оболочки кишечника у больных лимфомами наблюдалась в течение первых 2 месяцев после их детекции, а далее этот показатель выходил на плато, в то время как у больных ОМЛ отмечалось постепенное уменьшение колонизации продуцентами БЛРС в течение всего периода наблюдения 6 месяцев. У 13 (39%) из 33 больных была возобновлена детекция энтеробактерий с продукцией БЛРС со слизистой оболочки кишечника с

медианой в 37 дней (разброс от 14 до 90 дней). Вероятность реколонизации БЛРС-положительными бактериями составила 49,4%, и этот показатель был ниже у больных ОМЛ (36,5%) в сравнении с больными лимфомами (57,2%) (Рисунок 11), однако различия были статистически не значимыми.

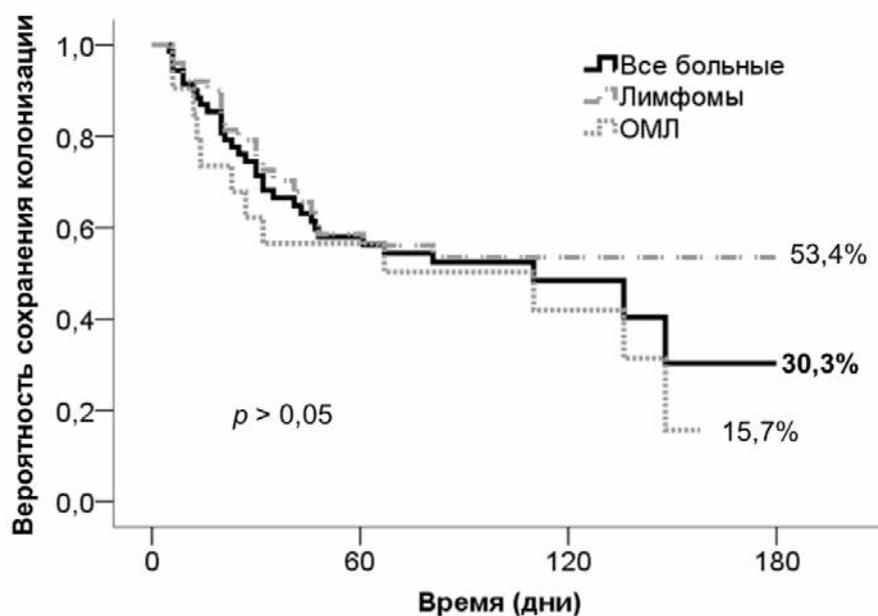


Рисунок 10. Вероятность сохранения колонизации слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС у больных ОМЛ и лимфомами в течение 6 месяцев наблюдения

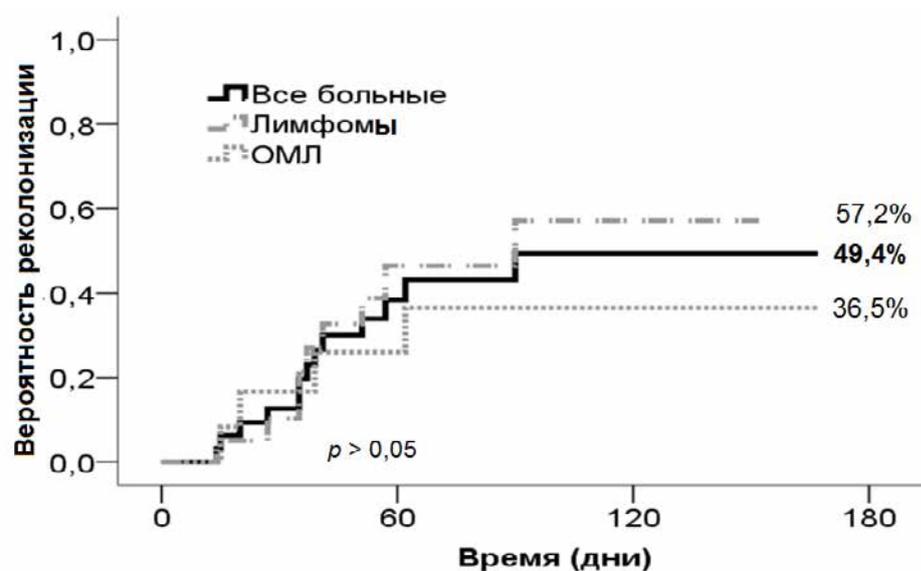


Рисунок 11. Вероятность реколонизации слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС у больных ОМЛ и лимфомами после их элиминации в течение 6 месяцев наблюдения

Далее было проведено изучение факторов риска колонизации слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС (таблица 8). У каждого больного в процессе проведения курсов ХТ был в наличии хотя бы один фактор. Частота регистрации более 50% была отмечена для таких факторов, как установка ЦВК (85%), применение антибиотиков (84%), гранулоцитопения (84%). У больных ОМЛ в сравнении с больными лимфомами значимо чаще регистрировали гранулоцитопению (97% против 75%, $p = 0,008$), преобладало применение антибиотиков (100% против 75%, $p = 0,002$) и пребывание в ОРИТ (55% против 28%, $p = 0,009$). При событийном анализе не было обнаружено факторов, статистически значимо влияющих на время детекции энтеробактерий с продукцией БЛРС у больных ОМЛ и лимфомами.

Таблица 8. Факторы риска, ассоциированные с колонизацией слизистой оболочки прямой кишки энтеробактериями с продукцией БЛРС, у больных ОМЛ и лимфомами в течение 6 месяцев наблюдения

Факторы риска	Всего, <i>n</i> (%) <i>n</i> = 98	ОМЛ, <i>n</i> (%) <i>n</i> = 33	Лимфома, <i>n</i> (%) <i>n</i> = 65	<i>p</i>
Возраст 50 лет и старше	34 (35)	7 (21)	27 (42)	0,05
Сопутствующие заболевания	40 (41)	9 (27)	31 (47)	0,05
Наличие ЦВК	83 (85)	31 (94)	52 (80)	0,07
Наличие гранулоцитопении	82 (84)	32 (97)	49 (75)	0,008
Применение антибиотиков	82 (84)	33 (100)	49 (75)	0,002
Диарея	39 (40)	9 (27)	30 (46)	0,07
Пребывание в ОРИТ	36 (37)	18 (55)	18 (28)	0,009
Абдоминальные операции	5 (5)	2 (6)	3 (5)	0,76
Парентеральное питание	5 (5)	1 (3)	4 (6)	0,51

У 14 (14%) из 98 больных за период наблюдения 6 месяцев развилась бактериемия, вызванная энтеробактериями. Частота бактериемии, обусловленной БЛРС-положительными бактериями, составила 7% (5 из 75) у больных с колонизацией слизистой оболочки кишечника этими микроорганизмами, при этом не было выявлено ни одного случая бактериемии у больных без колонизации этими бактериями (0 из 23, $p = 0,2$).

Таким образом, отмечается значимое увеличение доли больных с колонизацией во время реализации курсов ХТ у больных ОМЛ и лимфомами. Достоверное увеличение детекции энтеробактерий с продукцией БЛРС было перед вторым курсом ХТ у больных лимфомами и перед третьим курсом ХТ у больных ОМЛ. Вероятность колонизации слизистой оболочки

кишечника продуцентами БЛРС за 6 месяцев наблюдения составила 91% у больных лимфомами и 84% у больных ОМЛ. У всех больных, включенных в исследование, были в наличии факторы риска, способствующие колонизации слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС. Больные лимфомами были достоверно старше и чаще имели сопутствующие заболевания, а у больных ОМЛ значимо чаще регистрировали гранулоцитопению, было назначение антибиотиков и необходимость перевода в ОРИТ. Частота выявления БЛРС-положительных бактерий из гемокультуры была невелика (7%), но бактериемия, вызванная этими бактериями, возникала только у больных с колонизацией слизистой оболочки кишечника идентичными по виду продуцентами БЛРС.

Факторы риска колонизации слизистой оболочки прямой кишки энтеробактериями с продукцией БЛРС до проведения второго курса ХТ

Мы провели изучение факторов риска колонизации слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС перед вторым курсом ХТ у 80 больных. У 21 (26%) была детекция продуцентов БЛРС при первом поступлении в стационар. Эти больные были исключены из анализа. Частотный анализ факторов риска, зарегистрированных от дня первой госпитализации и до проведения 2-го курса ХТ, был выполнен у 59 пациентов (17 – ОМЛ и 42 – лимфомами), из них у 17 (29%) больных имелась колонизация слизистой оболочки кишечника продуцентами БЛРС (таблица 9). Перед 2-м курсом ХТ колонизация определялась чаще у больных лимфомами (26%), чем у больных ОМЛ (8%, $p = 0,066$). Энтеробактерии с продукцией БЛРС были обнаружены у всех больных, которым проводили парентеральное питание (100% против 25%, $p = 0,05$), хотя количество таких пациентов было невелико ($n = 3$). Перевод больного в ОРИТ не относился к значимым факторам риска, индуцирующим колонизацию слизистой оболочки кишечника продуцентами БЛРС, однако, медиана длительности пребывания в реанимации была продолжительнее у больных с колонизацией этими бактериями в сравнении с больными без колонизации (32 дня против 5 дней, $p = 0,07$) (Таблица 10). При анализе длительности воздействия других факторов риска также не было выявлено значимых отличий.

Таблица 9. Факторы риска колонизации слизистой оболочки прямой кишки энтеробактериями с продукцией БЛРС, регистрируемые от первой госпитализации в «НМИЦ гематологии» до проведения 2-го курса ХТ, у больных ОМЛ и лимфомами

Фактор риска	Колонизация энтеробактериями с продукцией БЛРС в зависимости от анализируемого фактора		ОШ (95% ДИ)	<i>p</i>
	Есть фактор	Нет фактора		
Диагноз лимфома	15 (36%) из 42	2 (12%) из 17	4,1 (0,84–20,74)	0,066
Возраст 50 лет и старше	3 (19%) из 16	14 (33%) из 43	0,48 (0,12–1,95)	0,3
Наличие ЦВК	9 (26%) из 35	8 (33%) из 24	0,69 (0,22–2,16)	0,52
Наличие гранулоцитопении	13 (28%) из 46	4 (31%) из 13	0,89 (0,23–3,39)	0,86
Применение антибиотиков	13 (30%) из 44	4 (27%) из 15	1,15 (0,31–4,29)	0,83
Диарея	6 (43%) из 14	11 (24%) из 45	2,3 (0,66–8,16)	0,18
Пребывание в ОРИТ	2 (20%) из 10	15 (31%) из 49	0,57 (0,11–2,99)	0,49
Парентеральное питание	3 (100%) из 3	14 (25%) из 56	-	0,05
Непрерывное пребывание в стационаре	5 (25%) из 20	12 (31%) из 39	0,75 (0,22–2,54)	0,64

Таблица 10. Длительность воздействия факторов риска колонизации слизистой оболочки прямой кишки энтеробактериями с продукцией БЛРС, регистрируемых от первой госпитализации в «НМИЦ гематологии» до проведения 2-го курса ХТ, у больных ОМЛ и лимфомами

Фактор риска	Колонизация энтеробактериями с продукцией БЛРС		<i>p</i>
	Есть	Нет	
Длительность пребывания в ОРИТ, медиана, дни	32 (6–58)	5 (3–25)	0,07
Длительность пребывания в стационаре, медиана, дни	17 (5–69)	21 (4–39)	0,19
Количество катетеро-дней	21 (7–65)	23 (5–37)	0,37
Длительность применения антибиотиков, медиана, дни	7 (2–52)	11 (4–50)	0,42
Длительность гранулоцитопении, медиана, дни	4 (1–23)	9 (1–35)	0,13

При частотном анализе факторов риска колонизации слизистой оболочки прямой кишки энтеробактериями с продукцией БЛРС и анализе длительности их воздействия до проведения 2-го курса ХТ у больных лимфомами значимых отличий у больных с колонизацией продуцентами БЛРС и без таковой не было выявлено (таблица 11, 12).

Таблица 11. Факторы риска колонизации слизистой оболочки прямой кишки энтеробактериями с продукцией БЛРС, регистрируемые от первой госпитализации в «НМИЦ гематологии» до проведения 2-го курса ХТ, у 42 больных лимфомами

Фактор риска	Колонизация энтеробактериями с продукцией БЛРС в зависимости от анализируемого фактора		ОШ (95% ДИ)	<i>p</i>
	Есть фактор	Нет фактора		
Возраст 50 лет и старше	3 (23%) из 13	12 (41%) из 29	0,43 (0,096–1,88)	0,25
Наличие ЦВК	5 (33%) из 15	10 (37%) из 27	0,85 (0,23–3,21)	0,81
Наличие гранулоцитопении	6 (30%) из 20	9 (41%) из 22	0,62 (0,17–2,23)	0,46
Применение антибиотиков	5 (31%) из 16	10 (38%) из 26	0,73 (0,19–2,72)	0,64
Диарея	6 (55%) из 11	9 (29%) из 31	2,9 (0,71–12,1)	0,13
Пребывание в ОРИТ	1 (33%) из 3	14 (36%) из 39	0,89 (0,07–10,75)	0,93
Парентеральное питание	2 (100%) из 2	13 (33%) из 40	-	0,52
Непрерывное пребывание в стационаре	3 (25%) из 12	12 (40%) из 30	0,5 (0,112–2,234)	0,34

Таблица 12. Длительность воздействия факторов риска колонизации слизистой оболочки прямой кишки энтеробактериями с продукцией БЛРС, регистрируемых от первой госпитализации в «НМИЦ гематологии» до проведения 2-го курса ХТ, у 42 больных лимфомами

Фактор риска	Колонизация энтеробактериями с продукцией БЛРС		<i>p</i>
	Есть	Нет	
Длительность пребывания в стационаре, медиана, дни	17 (5–23)	16 (4–29)	0,79
Количество катетеро-дней	21 (9–22)	21 (5–22)	0,91
Длительность применения антибиотиков, медиана, дни	6 (2–20)	8 (4–21)	0,16
Длительность гранулоцитопении, медиана, дни	4 (1–8)	5 (1–22)	0,49

Анализ частоты встречаемости факторов риска колонизации слизистой оболочки прямой кишки энтеробактериями с продукцией БЛРС у больных ОМЛ до проведения 2-го курса ХТ не проводили, по причине небольшого числа случаев детекции продуцентов БЛРС ($n = 2$).

Таким образом, значимым фактором риска колонизации слизистой оболочки кишечника была необходимость в проведении парентерального питания до проведения 2-го курса ХТ. У больных ОМЛ чаще регистрировали факторы риска, ассоциированные с колонизацией слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС, но детекция новых случаев колонизации этими микроорганизмами чаще отмечалась у больных лимфомами, чем ОМЛ. Детекция продуцентов БЛРС была чаще у больных, длительное время находящихся в ОРИТ.

Факторы риска колонизации слизистой оболочки прямой кишки энтеробактериями с продукцией БЛРС до проведения четвертого курса ХТ

Далее были изучены факторы риска колонизации слизистой оболочки прямой кишки энтеробактериями с продукцией БЛРС от дня первой госпитализации в стационар и до проведения 4-го курса ХТ. Колонизация продуцентами БЛРС была у 17 (25%) из 68 больных при первом поступлении в стационар. Эти больные были исключены из анализа. Частотный анализ факторов риска был проведен у 51 больного, из них у 32 (63%) имелась колонизация слизистой оболочки кишечника БЛРС-положительными бактериями (Таблица 13). Значимым фактором риска, оказавшим влияние на детекцию продуцентов БЛРС, было непрерывное пребывание больных в стационаре до 4-го курса ХТ. Детекция БЛРС-положительных бактерий со слизистой оболочки прямой кишки наблюдалась у всех больных, находившихся постоянно в стационаре к моменту проведения 4-го курса ХТ, и только у половины, наблюдавшихся амбулаторно в перерывах между курсами ХТ (100% против 51%, ОШ 2,85, $p = 0,002$). Медиана непрерывного пребывания в стационаре у этой когорты больных составила 70 дней (64–180 дней).

Результаты анализа факторов риска колонизации слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС перед началом 4 курса ХТ у 40 больных лимфомами и у 11 больных ОМЛ представлены в Таблицах 14 и 15. При анализе факторов риска колонизации продуцентами БЛРС по нозологическим формам было определено, что у больных лимфомами значимым был тот же показатель, что и в общей группе больных – это непрерывное пребывание в стационаре (100% против 48%, $p = 0,005$). Медиана непрерывного пребывания в стационаре у больных лимфомами составила 66 дней (64–81 дней). У больных ОМЛ не выявлено значимых факторов риска, влияющих на детекцию продуцентов БЛРС.

Таблица 13. Факторы риска колонизации слизистой оболочки прямой кишки энтеробактериями с продукцией БЛРС, регистрируемые от первой госпитализации в «НМИЦ гематологии» до проведения 4-го курса ХТ, у больных ОМЛ и лимфомами

Фактор риска	Колонизация энтеробактериями с продукцией БЛРС в зависимости от анализируемого фактора		ОШ (95% ДИ)	<i>p</i>
	Есть фактор	Нет фактора		
Диагноз лимфома	24 (60%) из 40	8 (73%) из 11	0,56 (0,13–2,45)	0,44
Возраст 50 лет и старше	7 (50%) из 14	25 (68%) из 37	0,48 (0,14–1,68)	0,25
Наличие ЦВК	25 (66%) из 38	7 (54%) из 13	1,65 (0,46–5,93)	0,44
Наличие гранулоцитопении	14 (%) из 37	5 (%) из 14	1,01 (0,31–3,94)	0,89
Применение антибиотиков	20 (59%) из 34	12 (71%) из 17	0,59 (0,17–2,07)	0,41
Диарея	7 (58%) из 12	25 (64%) из 39	0,78 (0,21–2,94)	0,72
Пребывание в ОРИТ	7 (38%) из 9	25 (59%) из 42	2,38 (0,44–12,87)	0,3
Парентеральное питание	1 из 1	31 (62%) из 50	-	0,43
Непрерывное пребывание в стационаре	12 (100%) из 12	20 (51%) из 39	2,85 (0,67–12,15)	0,002

Таблица 14. Факторы риска колонизации слизистой оболочки прямой кишки энтеробактериями с продукцией БЛРС, регистрируемые от первой госпитализации в «НМИЦ гематологии» до проведения 4-го курса ХТ, у 40 больных лимфомами

Фактор риска	Колонизация энтеробактериями с продукцией БЛРС в зависимости от анализируемого фактора		ОШ (95% ДИ)	<i>p</i>
	Есть фактор	Нет фактора		
Возраст 50 лет и старше	5 (42%) из 12	19 (68%) из 28	0,34 (0,08–1,37)	0,12
Наличие ЦВК	17 (%) из 27	7 (%) из 13	1,46 (0,38–5,57)	0,58
Наличие гранулоцитопении	15 (58%) из 26	9 (64%) из 14	0,76 (0,19–2,89)	0,68
Применение антибиотиков	12 (52%) из 23	12 (71%) из 17	0,46 (0,12–1,71)	0,24
Диарея	5 (56%) из 9	19 (61%) из 31	0,79 (0,18–3,54)	0,76
Пребывание в ОРИТ	1 (50%) из 2	23 (61%) из 38	0,65 (0,04–11,24)	0,77
Парентеральное питание	0	24 (60%) из 40	-	-
Непрерывное пребывание в стационаре	9 (100%) из 9	15 (48%) из 31	-	0,005

Таблица 15. Факторы риска колонизации слизистой оболочки прямой кишки энтеробактериями с продукцией БЛРС, регистрируемые от первой госпитализации в «НМИЦ гематологии» до проведения 4-го курса ХТ, у 11 больных ОМЛ

Фактор риска	Колонизация энтеробактериями с продукцией БЛРС в зависимости от анализируемого фактора		ОШ (95% ДИ)	p
	Есть фактор	Нет фактора		
Возраст 50 лет и старше	2 (100%) из 2	6 (67%) из 9	-	0,34
Наличие ЦВК	8 (73%) из 11	0	-	-
Наличие гранулоцитопении	8 (73%) из 11	0	-	-
Применение антибиотиков	8 (73%) из 11	0	-	-
Диарея	2 (67%) из 3	6 (50%) из 8	0,67 (0,04–11,94)	0,78
Пребывание в ОРИТ	6 (86%) из 7	2 (50%) из 4	6,00 (0,34–107,43)	0,20
Парентеральное питание	1 (100%) из 1	7 (70%) из 10	-	0,52
Непрерывное пребывание в стационаре	3 (100%) из 3	5 (%) из 8	-	0,21

Таким образом, перед четвертым курсом ХТ детекция новых случаев колонизации слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС отмечалась с сопоставимой частотой у больных лимфомами и ОМЛ. У больных непрерывно находившихся в стационаре до проведения 4-го курса ХТ колонизация слизистой оболочки прямой кишки продуцентами БЛРС была статистически значимо чаще, аналогичная тенденция была выявлена у больных лимфомами.

3.2 Использование селективной хромогенной среды для детекции энтеробактерий с продукцией β-лактамаз

Для изучения чувствительности и специфичности селективной хромогенной среды CHROMagar™ESBL для детекции энтеробактерий с продукцией БЛРС было исследовано 1552 мазка со слизистой оболочки ротовой полости и прямой кишки. За время исследования выделено 1243 изолята энтеробактерий на агаре Эндо (или МакКонки) и 409 изолятов энтеробактерий на селективной хромогенной среде для детекции БЛРС. В таблице 16 представлен спектр энтеробактерий, полученных на селективной хромогенной среде. Отмечалось преобладание *E. coli* (55%) и *K. pneumoniae* (26%), реже выявлялись *Enterobacter spp.* (8,5%) и *Citrobacter spp.* (5%). Доля выявления других видов энтеробактерий составила 5,5%.

Таблица 16. Спектр микроорганизмов, выделенных на селективной среде CHROMagar™ESBL

Микроорганизм	Количество, <i>n</i> (%)
<i>E. coli</i>	226 (55)
<i>K. pneumoniae</i>	105 (26)
<i>Enterobacter</i> spp.	35 (8,5)
<i>Citrobacter</i> spp.	21 (5)
<i>K. oxytoca</i>	12 (3)
<i>P. mirabilis</i>	4 (1)
<i>R. ornithinolytica</i>	3 (0,7)
<i>P. vulgaris</i>	2 (0,5)
<i>M. morgani</i>	1 (0,3)
Всего	409

Методом «двойных дисков» была подтверждена продукция БЛРС у 386 (94%) из 409 энтеробактерий, полученных на селективной хромогенной среде (Таблица 17). Полное совпадение результатов детекции энтеробактерий с продукцией БЛРС на среде CHROMagar™ESBL и методом «двойных дисков» было получено для изолятов *K. pneumoniae* ($n = 105$), *P. mirabilis* ($n = 4$) и *R. ornithinolytica* ($n = 3$), для изолятов *E. coli* этот показатель составил 98%. Для таких энтеробактерий как *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *K. oxytoca* процент совпадений был ниже (от 69% до 86%).

Таблица 17. Сравнение результатов детекции энтеробактерий с продукцией БЛРС на среде CHROMagar™ESBL и методом «двойных дисков»

Микроорганизм	Детекция энтеробактерий с продукцией БЛРС	
	CHROMagar™ESBL, <i>n</i>	Метод «двойных дисков», <i>n</i> (%)
<i>E. coli</i>	226	222 (98)
<i>K. pneumoniae</i>	105	105 (100)
<i>Enterobacter</i> spp.	35	24 (69)
<i>Citrobacter</i> spp.	21	18 (86)
<i>K. oxytoca</i>	12	10 (83)
<i>P. mirabilis</i>	4	4 (100)
<i>R. ornithinolytica</i>	3	3 (100)
<i>P. vulgaris</i>	2	0
<i>M. morgani</i>	1	0
Всего	409	386 (94)

Продукция БЛРС не была подтверждена у 23 (6%) из 409 изолятов энтеробактерий, выделенных на селективной среде CHROMagar™ESBL. В их число вошли *Enterobacter spp.* ($n = 11$), *E. coli* ($n = 4$), *Citrobacter spp.* ($n = 3$), *K. oxytoca* ($n = 2$), *P. vulgaris* ($n = 2$), *M. morganii* ($n = 1$). Для этих изолятов был проведен дополнительный анализ, включающий исследование чувствительности к цефокситину и постановку E-теста, содержащего цефотетан и цефотетан с клоксациллином, для подтверждения продукции AmpC. Гиперпродукция AmpC β-лактамаз была выявлена у 15 (65%) из 23 исследованных изолятов, в число которых вошли все изоляты *Enterobacter spp.* ($n = 11$), два – *Citrobacter spp.* и по одному изоляту *E. coli* и *M. morganii*.

У 8 (2%) из 409 изолятов, полученных на селективной среде, продукция БЛРС и AmpC не была выявлена. Эти 8 изолятов были чувствительными к цефалоспорином III и IV поколения. В их число вошли *E. coli* ($n = 3$), *Citrobacter spp.* ($n = 1$), *K. oxytoca* ($n = 2$), *P. vulgaris* ($n = 2$).

Таким образом, совпадение результатов по детекции энтеробактерий с продукцией БЛРС на селективной хромогенной среде и методом “двойных дисков” было получено для 386 (94%) изученных изолятов. При дополнительном исследовании 23 (6%) изолята, выделенных на селективной среде и не подтвержденных методом “двойных дисков”, оказалось, что у 15 (4%) из них была гиперпродукция AmpC β-лактамаз, а 8 (2%) изолятов были чувствительными к цефалоспорином III и IV поколения.

Исследование методом «двойных дисков» также было проведено для всех энтеробактерий, выделенных на агаре Эндо или МакКонки. У 271 (22%) из 1243 изолятов энтеробактерий, полученных на этих плотных средах, была подтверждена продукция БЛРС. При этом на агаре Эндо или МакКонки было выделено 8 изолятов, которые не были обнаружены на селективной хромогенной среде. В их число вошли *K. pneumoniae* ($n = 4$), *E. coli* ($n = 3$) и *Enterobacter spp.* ($n = 1$). Продукция БЛРС у этих изолятов была подтверждена методом «двойных дисков» и при повторной инкубации чистой культуры микроорганизмов на селективной хромогенной среде. Таким образом, всего было получено 394 изолята энтеробактерий с продукцией БЛРС, из них на обеих плотных средах (агар Эндо /МакКонки и селективный CHROMagar™ESBL) – 263 (67%) изолята, только на селективной среде CHROMagar™ESBL – 123 (31%), только на среде Эндо/МакКонки – 8 (2%) (ОШ = 21,9, $p < 0,0001$).

По результатам нашего исследования чувствительность селективной хромогенной среды для детекции БЛРС у всех видов энтеробактерий составила 98%, а специфичность – 97% (Таблица 18). Высокая чувствительность и специфичность отмечена для *E. coli* (99%), несколько ниже была чувствительность для *K. pneumoniae* (96%). Для изолятов *Enterobacter spp.*, *Citrobacter spp.*, *M. morganii* и *S. marcescens* чувствительность составила 98%, а специфичность 93%.

Таблица 18. Чувствительность и специфичность среды CHROMagar™ESBL по детекции энтеробактерий с продукцией БЛРС

Микроорганизмы		Чувствительность, %	Специфичность, %	Ложноположительные изоляты, <i>n</i>	Ложноотрицательные изоляты, <i>n</i>
Вид	<i>n</i>				
<i>E. coli</i>	222	99	99	4	3
<i>K. pneumoniae</i>	105	96	100	0	4
<i>Enterobacter</i> spp., <i>Citrobacter</i> spp., <i>M.morganii</i> , <i>S. marcescens</i>	42	98	93	15	1
Всего	386	98	97	25	8

Проведенное исследование показало высокую чувствительность (98%) и специфичность (97%) селективной хромогенной среды CHROMagar™ESBL для детекции БЛРС у энтеробактерий, доказав тем самым возможность использования этого агара для скрининга БЛРС у энтеробактерий в рутинной лабораторной практике. Максимальные чувствительность и специфичность были определены для изолятов *E. coli* (99% и 99%, соответственно) и *K. pneumoniae* (96% и 100%, соответственно). Вероятность выделения энтеробактерий с продукцией БЛРС на селективной среде CHROMagar™ESBL была значимо выше, чем на агаре Эндо или МакКонки (98% против 69%, $p < 0,0001$). Другим положительным моментом было сокращение времени детекции БЛРС на сутки, и, следовательно, результаты в клинику передавались существенно раньше. Было выявлено, что на селективной среде могут быть выделены энтеробактерии с гиперпродукцией AmpC β-лактамаз (4%), которые также обладают устойчивостью к цефалоспорином III поколения. Только 2% изолятов, выделенных на селективной среде CHROMagar™ESBL были чувствительными к цефалоспорином III поколения.

3.3 Характеристика энтеробактерий с продукцией β -лактамаз расширенного спектра, выделенных при мониторинге у больных ОМЛ и лимфомами

За анализируемый период у 98 больных, включенных в исследование, провели анализ 1311 мазков со слизистой оболочки ротоглотки и 1311 мазков со слизистой оболочки прямой кишки. Всего было выявлено 1973 энтеробактерии, включая 335 (17%) со слизистой ротоглотки и 1638 (83%) со слизистой прямой кишки. Продукция БЛРС была подтверждена у 652 (33%) из 1973 энтеробактерий. Частота обнаружения продуцентов БЛРС среди энтеробактерий, выделенных со слизистой оболочки кишечника, была достоверно выше и составила 36% (596 из 1638), в то время как со слизистой ротоглотки – только 17% (56 из 335) ($p < 0,01$). Медиана детекции составила 34 дня (разброс 5–175 дней) при выявлении БЛРС-положительных бактерий со слизистой прямой кишки, а со слизистой ротоглотки – 56 дней (разброс 7–86 дней). Детекция БЛРС-положительных энтеробактерий со слизистой оболочки ротовой полости была только у больных, уже имевших ранее колонизацию слизистой оболочки прямой кишки, причем, выявляли идентичные по виду продуценты БЛРС.

Спектр энтеробактерий с продукцией БЛРС, выделенных со слизистой оболочки ротовой полости и прямой кишки за весь период исследования, представлен в таблице 19. Ведущими микроорганизмами были *E. coli* (56,4%), далее следовали *K. pneumoniae* (27,4%), реже выявляли *Enterobacter spp.* (7,2%) и *Citrobacter spp.* (4,9%), доля других энтеробактерий составила 4,1%. Видовой состав энтеробактерий с продукцией БЛРС, выделенных со слизистой оболочки прямой кишки, был шире и включал 10 видов микроорганизмов, тогда как в мазках со слизистой оболочки ротоглотки было выявлено 3 вида продуцентов БЛРС. Выделение *E. coli* с продукцией БЛРС было достоверно чаще со слизистой прямой кишки, чем со слизистой ротоглотки (58,7% против 32%, $p = 0,0001$), а *K. pneumoniae* и *Enterobacter spp.* с продукцией БЛРС преобладали в мазках со слизистой ротовой полости (50% против 25,3%, $p = 0,0001$; 18% против 6,2%, $p = 0,0013$, соответственно).

В таблице 20 представлен спектр БЛРС-положительных энтеробактерий, выделенных со слизистой оболочки прямой кишки у больных ОМЛ и лимфомами. Видовой состав микроорганизмов у больных лимфомами был шире и включал 9 видов энтеробактерий. Ведущими видами в обеих группах были изоляты *E. coli* (72,8% и 53,7%), далее следовали *K. pneumoniae* (17% и 28,3%), затем *Enterobacter spp.* (7% и 5,9%). Детекция *E. coli* с продукцией БЛРС была достоверно чаще у больных ОМЛ, чем у больных лимфомами (73% против 53,5%, $p < 0,0001$), в то время как изоляты *K. pneumoniae* и *Citrobacter spp.* выявляли значимо чаще у больных лимфомами (28,1% против 17,6%, $p = 0,009$; 6,9% против 1,2%, $p = 0,007$, соответственно).

Таблица 19. Видовой состав энтеробактерий с продукцией БЛРС, выделенных со слизистой оболочки ротовой полости и прямой кишки за весь период исследования у 98 больных

Микроорганизмы	Всего, <i>n</i> (%)	Слизистая оболочка прямой кишки, <i>n</i> (%)	Слизистая оболочка ротовой полости, <i>n</i> (%)	<i>p</i>
<i>E. coli</i>	368 (56,4)	350 (58,7)	18 (32)	0,0001
<i>K. pneumoniae</i>	179 (27,4)	151 (25,3)	28 (50)	0,0001
<i>Enterobacter</i> spp.	47 (7,2)	37 (6,2)	10 (18)	0,0013
<i>Citrobacter</i> spp.	32 (4,9)	32 (5,4)	0	-
<i>K. oxytoca</i>	13 (2)	13 (2,2)	0	-
<i>Proteus</i> spp.	7 (1,1)	7 (1,2)	0	-
<i>R. ornithinolitica</i>	2 (0,3)	2 (0,3)	0	-
<i>M. morganii</i>	2 (0,3)	2 (0,3)	0	-
<i>Kluyvera intermedia</i>	1 (0,2)	1 (0,2)	0	-
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	1 (0,2)	1 (0,2)	0	-
Всего	652	596	56	-

Таблица 20. Видовой состав микроорганизмов, выделенных со слизистой оболочки прямой кишки у больных ОМЛ и лимфомами

Микроорганизмы	ОМЛ, <i>n</i> (%)	Лимфома, <i>n</i> (%)	<i>p</i>
<i>E. coli</i>	115 (72,8)	235 (53,7)	<0,0001
<i>K. pneumoniae</i>	27 (17)	124 (28,3)	0,009
<i>Enterobacter</i> spp.	11 (7)	26 (5,9)	0,96
<i>Citrobacter</i> spp.	2 (1,3)	30 (6,8)	0,007
<i>K. oxytoca</i>	2 (1,3)	11 (2,5)	0,35
<i>Proteus</i> spp.	0	7 (1,6)	0,11
<i>R. ornithinolitica</i>	0	2 (0,5)	-
<i>M. morganii</i>	0	2 (0,5)	-
<i>K. intermedia</i>	1 (0,6)	0	-
<i>L. adecarboxylata</i>	0	1 (0,2)	-
Всего	158	438	-

Нами было проведено молекулярное исследование по выявлению генов, кодирующих два типа β-лактамаз – СТХ-М и ТЕМ – у продуцентов БЛРС, выделенных со слизистой оболочки прямой кишки (Таблица 21). У 86% (511 из 596) изолятов был определен хотя бы один из исследуемых генов (*bla*_{СТХ-М} или *bla*_{ТЕМ}), одновременная продукция двух типов – у 25% изолятов.

β -Лактамазы СТХ-М типа преобладали и были определены у 73% изолятов, наличие TEM было у 38%. Следует отметить, что β -лактамазы СТХ-М типа у больных лимфомами выявлялись значительно чаще, чем у больных ОМЛ (80% против 55%, $p < 0,0001$). Гены *bla*_{TEM} в изолированном виде были выявлены значимо чаще у больных ОМЛ (18% против 11%, $p = 0,01$). Исследуемые типы β -лактамаз не были выявлены у 14% (85 из 596) изолятов, значимо чаще не было их детекции у больных ОМЛ, чем лимфомами (27% против 9%, $p < 0,0001$).

Таблица 21. Типы β -лактамаз у энтеробактерий с продукцией БЛРС, выявленных у больных ОМЛ и лимфомами

Типы β -лактамаз	Всего, n (%) $n = 596$	ОМЛ, n (%) $n = 158$	Лимфома, n (%) $n = 437$	p
TEM	75 (13)	29 (18)	46 (11)	0,01
СТХ-М	285 (48)	48 (31)	237 (54)	<0,0001
СТХ-М+TEM	151 (25)	38 (24)	113 (26)	0,48
Всего TEM	226 (38)	67 (42)	159 (36)	0,18
Всего СТХ-М	436 (73)	86 (54)	350 (80)	<0,0001
Не выявлено СТХ-М и TEM	85 (14)	43 (27)	42 (9)	<0,0001

При анализе распространения типов β -лактамаз среди ведущих микроорганизмов-продуцентов БЛРС (*E. coli* и *K. pneumoniae*) оказалось, что гены *bla*_{СТХ-М} чаще обнаруживали в изолированном виде (48% и 50%, соответственно), чем в сочетании с генами *bla*_{TEM} (23% и 20%, соответственно) (Таблица 22). Исследуемые типы β -лактамаз не были выявлены у 15% изолятов *E. coli* и 17% *K. pneumoniae*. Достоверных различий в частотах определения исследуемых генов, кодирующих β -лактамазы, у *E. coli* и *K. pneumoniae* не было выявлено.

Таблица 22. Типы β -лактамаз у изолятов *E. coli* и *K. pneumoniae*, выявленных в процессе мониторинга

типы β -лактамаз	<i>E. coli</i> , n (%) $n = 350$	<i>K. pneumoniae</i> , n (%) $n = 151$
TEM	48 (13)	20 (13)
СТХ-М	168 (48)	76 (50)
СТХ-М+TEM	81 (23)	30 (20)
Всего TEM	129 (37)	50 (33)
Всего СТХ-М	249 (71)	106 (70)
Не выявлено СТХ-М и TEM	53 (15)	25 (17)

В таблице 23 представлена видовая принадлежность первых ($n = 88$) и последующих изолятов ($n = 508$), выявленных со слизистой оболочки прямой кишки. При сравнении частоты встречаемости микроорганизмов не обнаружено значимых различий, в обеих группах преобладали *E. coli* (59% и 58,6%, соответственно), далее следовали *K. pneumoniae* (23% и 25,6%).

Таблица 23. Видовой состав первых и последующих изолятов энтеробактерий с продукцией БЛРС

Микроорганизмы	Энтеробактерии с продукцией БЛРС	
	Первый изолят, n (%) N = 88	2-ой и последующие изоляты, n (%) N = 508
<i>E. coli</i>	52 (59)	298 (58,6)
<i>K. pneumoniae</i>	21 (23)	130 (25,6)
<i>Citrobacter</i> spp.	6 (7)	26 (5,1)
<i>Enterobacter</i> spp.	4 (5)	33 (6,5)
<i>K. oxytoca</i>	4 (5)	9 (1,8)
<i>R. ornithinolytica</i>	1 (1)	1 (0,2)
<i>Proteus</i> spp.	0	7 (1,4)
<i>M. morgani</i>	0	2 (0,4)
<i>L. adecarboxylata</i>	0	1 (0,2)
<i>K. intermedia</i>	0	1 (0,2)

При сравнении типов БЛРС у первых и последующих изолятов с продукцией БЛРС отмечено преобладание СТХ-М типа БЛРС (69% и 74%, соответственно) (Таблица 24). Среди повторных изолятов в сравнении с первыми изолятами значимо чаще определяли СТХ-М тип β -лактамаз отдельно (50% против 33%, $p = 0,0025$), и реже в сочетании с ТЕМ (23% против 36%, $p = 0,01$).

Среди 88 изолятов, выделенных впервые, было 34 изолята, полученных при первой госпитализации больного в «НМИЦ гематологии» и 54 – в процессе ХТ (Таблица 25). Видовой состав микроорганизмов, выявленных при реализации ХТ, был шире, но *E. coli* были ведущими в обеих анализируемых группах. Частота детекции *K. pneumoniae* с продукцией БЛРС была достоверно выше при первом поступлении в стационар, чем в период лечения (42% против 13%, $p = 0,0025$). Доля СТХ-М-положительных изолятов была сопоставимой в этих группах (76% и 65%, соответственно) (Таблица 26).

Таблица 24. Типы β-лактамаз у первого и последующих изолятов энтеробактерий с продукцией БЛРС

Типы β-лактамаз	Энтеробактерии с продукцией БЛРС		p
	Первый изолят, n (%) N = 88	2-ой и последующие изоляты, n (%) N = 508	
TEM	11(13)	64 (13)	> 0,05
CTX-M	29 (33)	256 (50)	0,0025
CTX-M+TEM	32 (36)	119 (23)	0,01
Всего TEM	43 (49)	183 (36)	0,02
Всего CTX-M	61 (69)	375 (74)	0,38
Не выявлено CTX-M и TEM	16 (18)	69 (14)	> 0,05

Таблица 25. Видовой состав первых изолятов с продукцией БЛРС, выделенных при первом поступлении и в процессе ХТ

Микроорганизмы	Число первых изолятов с продукцией БЛРС, n (%)		p
	выявлены при поступлении N = 34	выявлены при ХТ N = 54	
<i>E. coli</i>	18 (52)	34 (63)	0,35
<i>K. pneumoniae</i>	14 (42)	7 (13)	0,0025
<i>Citrobacter</i> spp.	2 (6)	4 (7,4)	0,78
<i>Enterobacter</i> spp.	0	4 (7,4)	-
<i>K. oxytoca</i>	0	4 (7,4)	-
<i>R. ornithinolytica</i>	0	1 (1,8)	-

Таблица 26. Типы β-лактамаз у первых изолятов с продукцией БЛРС, выделенных при первом поступлении и в процессе ХТ

Типы β-лактамаз	Число первых изолятов с продукцией БЛРС, n (%)		p
	выявлены при поступлении N = 34	выявлены при ХТ N = 54	
TEM	3 (9)	8 (15)	0,41
CTX-M	11 (32)	18 (33)	0,92
CTX-M+TEM	15 (44)	17 (32)	0,23
Всего TEM	18 (53)	25 (46)	0,54
Всего CTX-M	26 (76)	35 (65)	0,25
Не выявлено CTX-M и TEM	5 (15)	11 (20)	0,50

Резюмируя полученные в работе данные, следует отметить, что в мазках со слизистой оболочки прямой кишки энтеробактерии с продукцией БЛРС выделяли значительно чаще и в более ранние сроки, чем со слизистой оболочки ротоглотки (36% против 17%, $p < 0,01$; 34 дня против 56 дней). Среди энтеробактерий преобладали *E. coli* и *K. pneumoniae*, содержащие преимущественно β -лактамазы СТХ-М типа. У больных лимфомами изоляты, несущие гены *bla*_{СТХ-М}, выявлялись значительно чаще, чем у больных ОМЛ (80% против 55%, $p < 0,0001$), а изоляты, несущие гены *bla*_{ТЕМ} в изолированном виде, значительно чаще встречались у больных ОМЛ (18% против 11%, $p = 0,01$). У повторных изолятов значительно чаще определяли гены, кодирующие β -лактамазы СТХ-М типа, в изолированном виде, чем у впервые выявленных продуцентов БЛРС (33% против 50%, $p = 0,0025$).

Генотипирование E. coli с продукцией БЛРС, выделенных у больных, наблюдавшихся в течение 96 дней

Важным фактором, существенно влияющим на распространение продуцентов БЛРС в стационаре, является экзогенная передача изолятов от одного больного к другому. Для определения генетического разнообразия БЛРС-положительных бактерий, выделенных со слизистой оболочки кишечника, мы провели генотипирование изолятов *E. coli*, выделенных у больных, наблюдавшихся в течение 96 дней.

За 96 дней наблюдения детекция энтеробактерий с продукцией БЛРС со слизистой оболочки кишечника была у 57 (78%) из 73 больных. У 48 (84%) из 57 больных БЛРС-положительные бактерии были представлены одним видом, а у 9 (16%) – сочетанием двух видов продуцентов БЛРС. В таблице 27 отражена видовая принадлежность 66 изолятов энтеробактерий с продукцией БЛРС. Ведущими микроорганизмами были *E. coli* (59%), далее следовали *K. pneumoniae* (23%), реже выявляли *Citrobacter* spp. (6%) и *K. oxytoca* (6%).

Таблица 27. Видовой состав энтеробактерий с продукцией БЛРС, выделенных у 57 больных в течение 96 дней наблюдения

Микроорганизмы	Число изолятов, n (%)
	N = 66
<i>E. coli</i>	39 (59)
<i>K. pneumoniae</i>	15 (23)
<i>Enterobacter</i> spp.	3 (4,5)
<i>Citrobacter</i> spp.	4 (6)
<i>K. oxytoca</i>	4 (6)
<i>R. ornithinolytica</i>	1 (1,5)

При первом поступлении в «НМИЦ гематологии» детекция БЛРС-положительных бактерий была у 18 (25%) больных и у 39 (53%) – в период реализации ХТ. Генотипирование было проведено у 39 изолятов *E. coli* с продукцией БЛРС, выделенных со слизистой оболочки прямой кишки, из них 12 изолятов были получены при первом поступлении в «НМИЦ гематологии», а 27 – в период ХТ.

Результаты генотипирования 12 *E. coli* с продукцией БЛРС, выявленных при первом поступлении в «НМИЦ гематологии», КС между исследуемыми изолятами и даты их выделения представлены на рисунке 12. Горизонтальная ось отражает степень генетического сходства изолятов – КС. При анализе 12 генетических профилей было выявлено 12 генетически неродственных групп (E1–E12) с КС между изолятами не более 75%. Максимальный коэффициент сходства 75% был у трех пар изолятов, интервал между выделениями этих изолятов в мазках со слизистой оболочки кишечника составил 42, 48 и 54 дня. Таким образом, подтверждено генетическое разнообразие *E. coli* с продукцией БЛРС, выделенных у больных при первом поступлении в стационар.

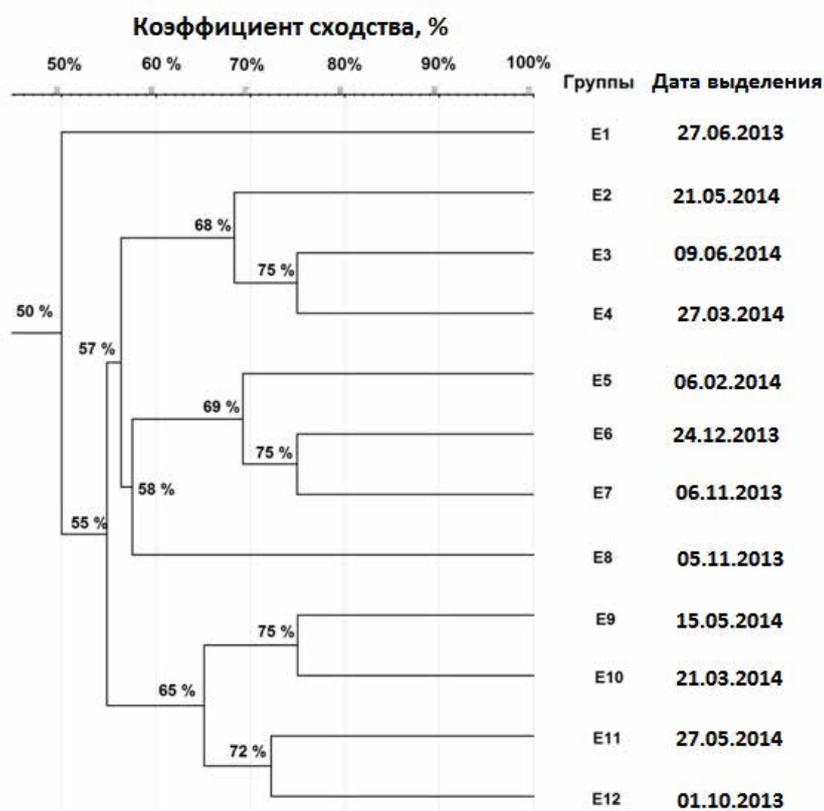


Рисунок 12. Результаты генотипирования *E. coli* с продукцией БЛРС, выявленных при первом поступлении в «НМИЦ гематологии» ($n = 12$)

Результаты генотипирования 27 изолятов *E. coli* с продукцией БЛРС, впервые выявленных у больных в период ХТ, представлены на рисунке 13. В результате анализа генетических

профилей исследуемые изоляты были отнесены к трем кластерам: два больших (кластер II и III) и один минорный, содержащий только один изолят (кластер I, E13). В кластер II вошли 4 генетически родственных изолята, они объединены в состав группы E14 с КС 81%. Изоляты из группы E14 были выделены у больных, госпитализированных на лечение в одно отделение. Кроме того, два изолята из этой группы имели КС равный 100% и обладали генами, кодирующими один тип β -лактамаз (СТХ-М), интервал между выделением этих микроорганизмов составил 6 месяцев. Вторая пара изолятов из группы E14 имела КС равный 93%. Оба изолята содержали одновременно гены *bla*_{СТХ-М} и *bla*_{ТЕМ}, интервал между выделениями был только 6 дней. В кластере III попарно генетически родственными были 12 изолятов, относившихся к 6 группам с КС более 80% (E19, E22, E23, E25, E30, E31). Полное совпадение генетических профилей (КС = 100%) было у двух изолятов из группы E22, выделенных у больных, госпитализированных в разные отделения, и интервал между детекцией составил 40 дней. Однако изоляты из группы E22 обладали генами, кодирующими разные типы β -лактамаз – у одного изолята присутствовали гены *bla*_{СТХ-М}, а у другого *bla*_{ТЕМ}.

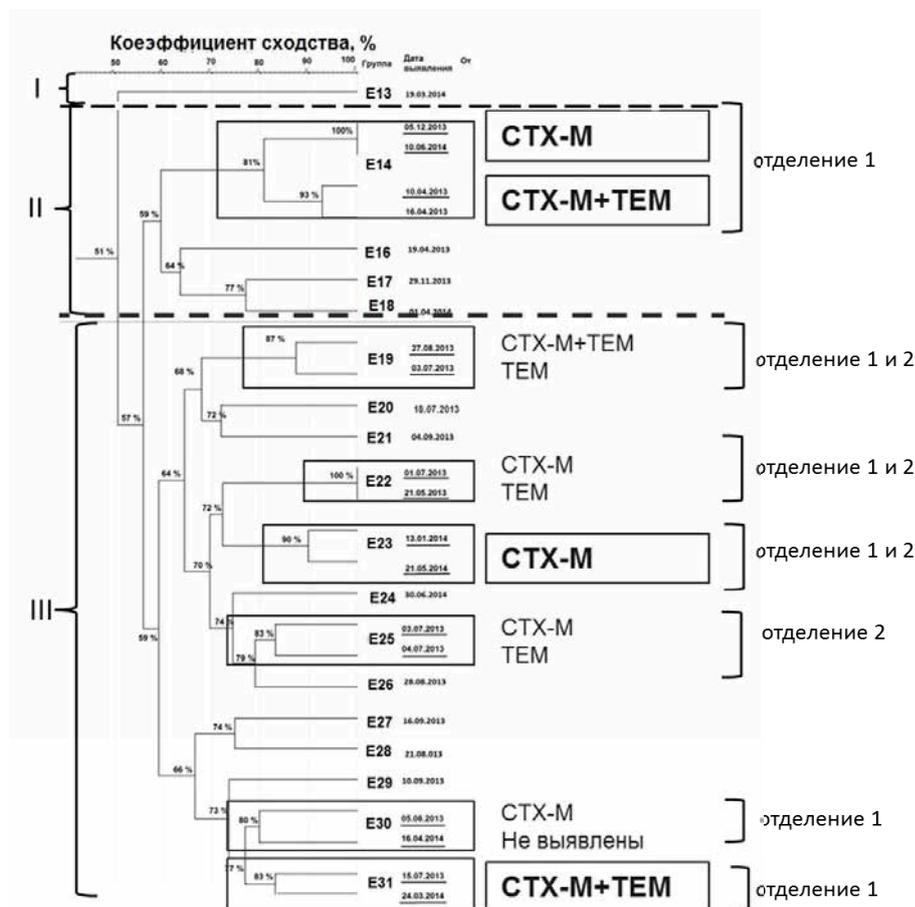


Рисунок 13. Результаты генотипирования *E. coli*, выявленных в процессе мониторинга при ХТ ($n = 27$). Примечание: цифрами I, II, III обозначены генетические кластеры, в рамки обведены изоляты с КС $\geq 80\%$, СТХ-М, ТЕМ – продукция ферментов СТХ-М и ТЕМ типов.

В результате исследования было выделено 59% (16 из 27) генетических родственных изолятов, которые были объединены в 7 групп с коэффициентом сходства более 80% (Таблица 28). По 2 родственных изолята вошли в 6 групп (E19, E22, E23, E25, E30, E31) и одна группа объединяла 4 изолята (E14), выделенных в одном отделении с интервалом от 6 дней до 1 года 2 месяцев. При генотипировании энтеробактерий с продукцией БЛРС, выделенных в процессе мониторинга, было выявлено генетическое разнообразие изолятов, только часть изолятов были сходными попарно.

Таблица 28. Генетически родственные изоляты *E. coli* с продукцией БЛРС, выделенных из мазков со слизистой кишечника в период ХТ

Группа	Количество изолятов, <i>n</i>	Коэффициент сходства, %
E14	4	81-100%
E22	2	100%
E23	2	93%
E19	2	87%
E25	2	83%
E31	2	83%
E30	2	80%

Таким образом, показано генетическое разнообразие *E. coli* с продукцией БЛРС, выделенных со слизистой оболочки кишечника от больных. Однако генетически родственные изоляты были выявлены как у больных из одного отделения, так и из разных, что подтверждает возможность распространения эпидемических штаммов внутри стационара. Наше исследование показало, что доля больных с колонизацией слизистой прямой кишки энтеробактериями с продукцией БЛРС возрастает во время проведения курсов ХТ, одним из значимых факторов риска является непрерывное пребывание больного в стационаре, что, возможно, увеличивает риск передачи изолятов от одного больного к другому.

3.4 Генотипирование энтеробактерий с продукцией β -лактамаз расширенного спектра, выделенных из гемокультуры и со слизистой оболочки прямой кишки, у больных заболеваниями системы крови

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%, $n = 27$). У 5 больных 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 *K. oxytoca* ($n = 2$), *Citrobacter* spp. ($n = 2$), *Serratia* spp. ($n = 2$), *M. morgani* ($n = 1$), *Raoultella* spp. ($n = 1$), *Salmonella* spp. ($n = 1$).

Продукция БЛРС была выявлена у 19 (21%) из 91 энтеробактерии, 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 генов β -лактамаз (*bla*_{TEM} или *bla*_{CTX-M}). β -Лактамазы CTX-M типа преобладали и были определены у 18 (95%) изолятов, TEM – у 17 (89%). Одновременно наличие двух генов было у 16 (84%) продуцентов БЛРС.

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 ($p < 0,0001$) (Таблица 29). Не наблюдалось выделения продуцентов БЛРС из гемокультуры, если при исследовании мазков со слизистой оболочки прямой кишки не выявляли подобные бактерии.

Таблица 29. Колонизация слизистой оболочки прямой кишки при бактериемии, вызванной энтеробактериями с продукцией БЛРС

Гемокультура		Колонизация слизистой оболочки прямой кишки энтеробактериями с продукцией БЛРС у больных с положительной гемокультурой
Энтеробактерии, всего	91	27 (30%)
Из них:		
с продукцией БЛРС	19	19 (100%)*
без продукции БЛРС	72	8 (11%)*

Примечание: * $p < 0,0001$

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 (Е1–Е5) (Рисунок 14). Группа Е1 включала 6 изолятов, Е2 – 2 изолята, а Е3, Е4 и Е5 – по одному изоляту (Таблица 30). Генетически родственными (КС = 100%) были только два изолята (группа Е2), однако, оба изолята *E. coli* были выделены из гемокультуры одного больного (П4) с интервалом в два месяца. В группе Е1 КС варьировал от 51 до 67%, и период между выделением изолятов составлял от 2 месяцев до 1,5 лет. Представители групп Е3, Е4 и Е5 обладали уникальными генетическими профилями с интервалом выделения из гемокультуры больных от 44 дней до 11 месяцев.

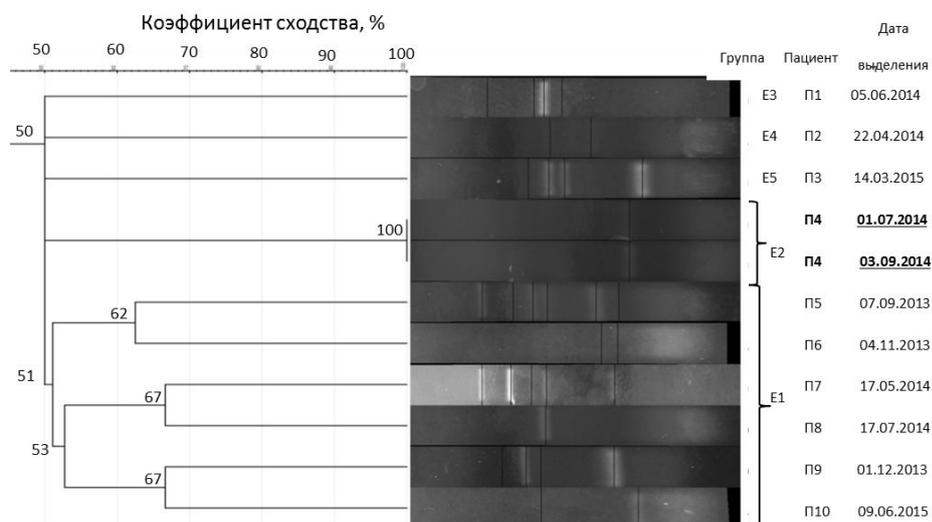


Рисунок 14. Дендрограмма генетических профилей *E. coli* с продукцией БЛРС, выделенных из гемокультуры ($n = 11$)

Таблица 30. 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	51-67
		E2	2	100
		E3	1	-
		E4	1	-
		E5	1	-
<i>K. pneumoniae</i>	8	K1	4	57-68
		K2	2	62
		K3	2	59

Результаты генотипирования восьми *K. pneumoniae* представлены на рисунке 15. При анализе дендрограммы было выявлено, что изоляты принадлежали к трем разным генетическим группам (K1–K3). Группа K1 включала 4 изолята, а K2 и K3 – по два. КС в группах варьировал от 57 до 68% (Таблица 30). Наиболее высокий КС (68%) был у двух изолятов с интервалом выделения в 5 месяцев. Как и при анализе изолятов *E. coli*, у одного больного с интервалом в два месяца из гемокультуры дважды выделяли *K. pneumoniae* с продукцией БЛРС, но генетического родства между изолятами 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.

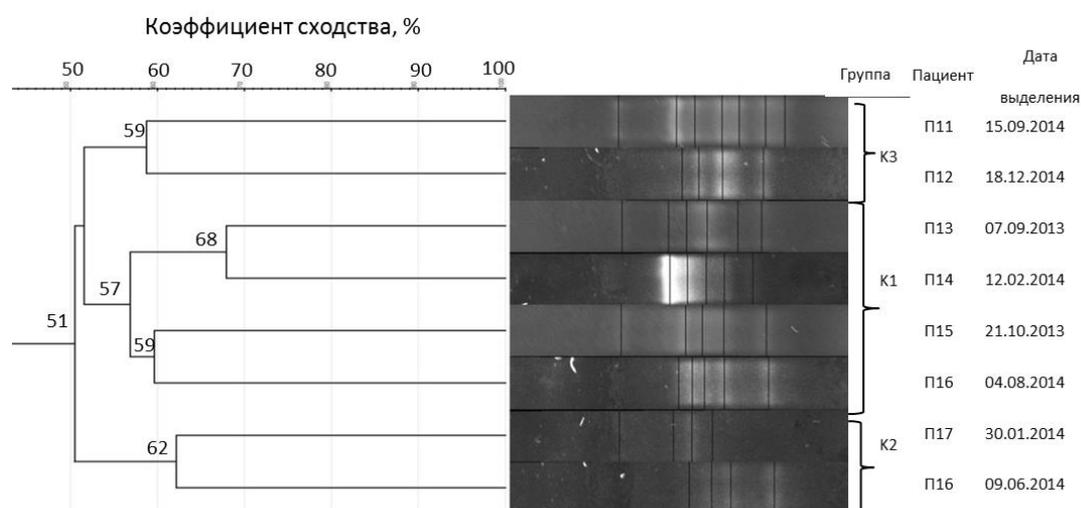


Рисунок 15. Дендрограмма генетических профилей *K. pneumoniae* с продукцией БЛРС, выделенных из гемокультуры (n = 8)

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

Методом ERIC-ПЦР было проведено попарное генотипирование изолятов энтеробактерий с продукцией БЛРС, выделенных из гемокультуры и со слизистой оболочки 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) (Рисунок 16).

Генетически родственными были три пары изолятов *E. coli* (6 изолятов), среди них две пары *E. coli* имели полное совпадение генетических профилей (КС = 100%), и для одной пары КС составил 92% (Рисунок 16, А). Среди *K. pneumoniae* было выявлено две пары генетически родственных изолятов с КС 83% и 92%, соответственно (Рисунок 16, 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* (Таблица 31).

Таблица 31. Результаты попарного генотипирования энтеробактерий с продукцией БЛРС, выделенных из гемокультуры и со слизистой прямой кишки

Энтеробактерии		КС энтеробактерий с продукцией БЛРС, выделенных со слизистой прямой кишки и из гемокультуры, n (%)		
вид	Число пар	≥ 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)

Как было представлено ранее, у одного больного дважды с интервалом в два месяца из гемокультуры были выделены генетически родственные (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 больных (П15, П12) (Рисунок 16, 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.

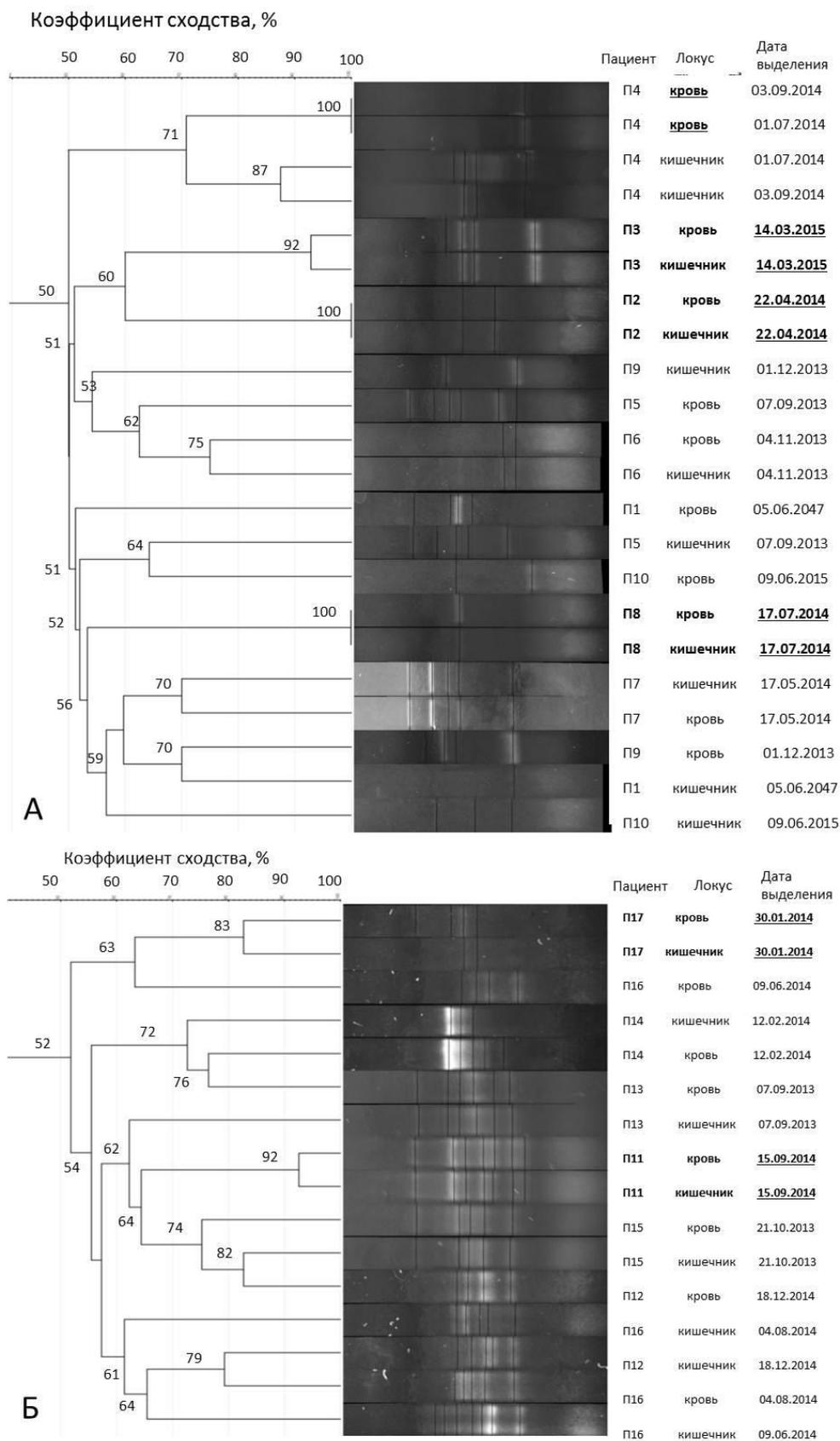


Рисунок 16. Дендрогаммы генетических профилей *E. coli* ($n = 22$, А) и *K. pneumoniae* ($n = 16$, Б) с продукцией БЛРС из гемокультуры и со слизистой оболочки прямой кишки

При анализе результатов парного генотипирования оказалось, что генетически родственными были два изолята *K. pneumoniae* с продукцией БЛРС, выделенные из гемокультуры и со слизистой оболочки прямой кишки, но от разных больных. Можно предположить, что была длительная циркуляция изолята *K. pneumoniae* с продукцией БЛРС в окружающей среде стационара с последующей экзогенной передачей больному. 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.

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 из гемокультуры от разных больных. Доказано, что бактериемия, вызванная БЛРС-положительными бактериями, была только у больных 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.

Заключение

В настоящее время инфекционные осложнения, обусловленные энтеробактериями с продукцией БЛРС, широко распространены во всем мире. Учитывая преобладание эндогенного пути инфицирования при бактериемии у больных опухолями системы крови, при котором происходит транслокация бактерий со слизистой оболочки кишечника в кровоток, необходимо проводить мониторинг колонизации слизистой оболочки кишечника продуцентами БЛРС у больных с высоким риском развития инфекционных осложнений.

Целью данной работы было изучить частоту детекции энтеробактерий с продукцией БЛРС, выделенных у больных гемобластозами, при программной ХТ и их значение в развитии инфекций кровотока у больных ОМЛ и лимфомами.

Мониторинг детекции энтеробактерий с продукцией БЛРС был проведен среди больных ОМЛ и лимфомами, поступивших на лечение в клинические отделения «НМИЦ гематологии» с 2013 по 2014 г. В исследование было включено 98 больных, из них 33 – ОМЛ и 65 – лимфомами. У 27% больных с впервые диагностированными ОМЛ и лимфомами была выявлена колонизация слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС при первом поступлении в стационар, с сопоставимой частотой обнаружения у больных ОМЛ (24%) и лимфомами (28%). Достоверно чаще определялась колонизация слизистой оболочки прямой кишки (27%) в сравнении с колонизацией слизистой оболочки ротовой полости (4%, $p < 0,01$).

Необходимо отметить, что в нашем исследовании была зарегистрирована высокая частота колонизации слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС при поступлении в стационар (27%), что вероятно связано с тем, что 77% больных, включенных в исследование, имели госпитализацию в другие стационары, а 80% – применяли антибиотики в последний месяц до госпитализации в «НМИЦ гематологии». По данным, опубликованным ранее, этот показатель был ниже, но в литературе, как правило, представлены результаты исследований, проведенных у больных в многопрофильных стационарах, а не у отдельной категории больных. Так, в исследовании немецких ученых выделение БЛРС-положительных бактерий со слизистой оболочки кишечника составило 9,5% (416 из 4376) у впервые госпитализированных больных [70], в крупном стационаре в Израиле – 10,6% (56 из 525) [126], аналогичные результаты получены при исследовании, проведенном в госпитале Сингапура – 12,4% (124 из 1006 больных) [141].

В исследовании продемонстрировано, что такие факторы как перевод больного из другого стационара и возраст 50 лет и старше явились статистически значимыми для риска колонизации продуцентами БЛРС. Так у больных, поступивших из других стационаров в «НМИЦ гематологии», колонизация составляла 38% против 20% в случаях госпитализации больных из

дома (ОШ = 3,1; $p = 0,01$). Вероятность колонизации была статистически значимо выше среди больных в возрасте 50 лет и старше, чем у более молодых больных (38% против 20%, ОШ = 2,4, $p = 0,05$). Возраст от 50 лет и старше и перевод из другого стационара при многофакторном анализе оказались независимыми факторами колонизации слизистой оболочки кишечника БЛРС-положительными изолятами. Влияние предыдущей госпитализации в появлении колонизации слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС было отмечено и в других исследованиях. По результатам анализа, включавшего 1351 больного из четырех стационаров в Нидерландах, было продемонстрировано, что стационарное лечение в течение последних 6 месяцев (ОШ = 2,13) и выявление продуцентов БЛРС в течение последнего года (ОШ = 11,35) были независимыми факторами в колонизации этими бактериями при поступлении в стационар [111]. Исследователи из Израиля при анализе данных о 525 больных выявили четыре независимых фактора риска, ассоциированных с колонизацией слизистой оболочки кишечника продуцентами БЛРС – это госпитализация в течение последнего года (69,6% против 51,4%; $p = 0,02$), пребывание в доме престарелых (32,1% против 10,9%; ОШ = 2,80; $p < 0,01$), прием антибиотиков в течение последних 6 месяцев (72,5% против 44%; $p < 0,001$), предшествующая колонизация БЛРС-положительными изолятами (21,4% против 4,7%; $p < 0,001$) [126].

У больных лимфомами статистически значимыми факторами риска для колонизации энтеробактериями с продукцией БЛРС были те же показатели, как и в общей группе больных – это перевод в «НМИЦ гематологии» из другого стационара (50% против 19%, ОШ = 4,2, $p = 0,01$) и возраст 50 лет и старше (40% против 18%, ОШ = 3,0, $p = 0,05$). У больных ОМЛ был выявлен дополнительный фактор риска – проживание вне Москвы ($p = 0,04$). Возможно, жителей Москвы раньше госпитализируют в стационар для реализации специализированной помощи. Среди больных ОМЛ, впервые поступивших в «НМИЦ гематологии», была большая доля больных, переведенных из других стационаров (58%), и тех, кто имел госпитализацию в течение последних 6 месяцев (94%).

В исследовании была отмечена высокая вероятность колонизации слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС у больных гемобластомами в период реализации ХТ в течение 6 месяцев наблюдения, которая составила 91% у больных лимфомами и 84% у больных ОМЛ, причем у 27% больных колонизацию регистрировали уже при первом поступлении в стационар. Детекция БЛРС-положительных энтеробактерий со слизистой оболочки ротовой полости во время мониторинга наблюдалась у 14 (14%) из 98 больных, причем у всех была предшествующая колонизация слизистой оболочки прямой кишки идентичными по виду продуцентами БЛРС. Раньше по времени определяли колонизацию слизистой оболочки прямой кишки (медиана 34 дня) в сравнении с колонизацией слизистой оболочки ротовой полости (медиана 56 дней).

По нашим данным, основная часть случаев колонизации слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС была зарегистрирована до 96-го дня наблюдения, при этом медиана обнаружения продуцентов БЛРС у больных лимфомами составила 25 дней, в то время как у больных ОМЛ – 68 дней. Однако отличия были статистически не значимыми. Необходимо отметить, что детекция энтеробактерий с продукцией БЛРС была в более ранний период у больных 50 лет и старше, чем у более молодых больных (22 дня против 43 дней).

За анализируемый период 6 месяцев колонизация слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС была выявлена у 75 больных ОМЛ и лимфомами, однако у 33 (44%) из них в дальнейшем была элиминация этих микроорганизмов на период две недели и более. Вероятность сохранения колонизации в течение всего периода наблюдения была только 30,3%. Интересным является тот факт, что у 13 (39%) из 33 больных в нашем исследовании была реколонизация энтеробактериями с продукцией БЛРС. Возобновление детекции БЛРС-положительных бактерий со слизистой оболочки кишечника можно объяснить продолжением воздействия факторов риска, влияющих на колонизацию слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС, поскольку больным продолжали проводить курсы ХТ.

При событийном анализе не было выявлено факторов риска, достоверно влиявших на время детекции энтеробактерий с продукцией БЛРС во время госпитализации. Можно предположить, что значимые факторы риска не были выявлены в данной группе больных, вследствие того, что у всех больных, включенных в исследование, были в наличии факторы риска, способствующие колонизации слизистой оболочки кишечника продуцентами БЛРС. Опубликовано сравнительно мало результатов длительных мониторинговых исследований по детекции колонизации энтеробактериями с продукцией БЛРС в процессе пребывания больных в стационаре. По данным С. Cuartero и соавт. [54] колонизация БЛРС-положительными энтеробактериями до начала профилактики фторхинолонами была у 5,7% (3 из 53) онкогематологических больных, а после реализации профилактики этот показатель увеличился до 13,2% (7 из 53), но длительность наблюдения за больными в исследовании не указана. В другой работе было подтверждено, что частота колонизации возрастала с 14,3% до 31,8 % после периода нейтропении у онкологических и гематологических больных [48].

Отмечается существенное увеличение числа больных с колонизацией слизистой оболочки прямой кишки энтеробактериями с продукцией БЛРС при реализации курсов ХТ в течение 6 месяцев наблюдения. Так при первом поступлении в «НМИЦ гематологии» частота колонизации была у 27% больных, а перед вторым курсом ХТ она достигала 48% ($p = 0,006$). Значимый прирост колонизации энтеробактериями с продукцией БЛРС у больных лимфомами с 28% до 51% был отмечен к моменту проведения второго курса ХТ ($p = 0,009$), а у больных ОМЛ с 40% до 70% к третьему курсу ХТ ($p = 0,04$).

Анализ встречаемости возможных факторов риска показал, что у всех больных были факторы, способствующие колонизации слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС. Следует отметить, что больные лимфомами в сравнении с больными ОМЛ были достоверно старше (42% против 21%, $p = 0,05$) и чаще имели сопутствующие заболевания (48% против 27%, $p = 0,05$), а у больных ОМЛ значимо чаще была гранулоцитопения (97% против 75%, $p = 0,008$), необходимость перевода в ОРИТ (55% против 28%, $p = 0,009$), им чаще назначали антибиотики (100% против 75%, $p = 0,002$).

Факторы риска, ассоциированные с колонизацией слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС, были изучены перед 2-м и 4-м курсами ХТ. При частотном анализе факторов риска колонизации слизистой оболочки кишечника продуцентами БЛРС, проведенном перед 2-м курсом ХТ, значимой была необходимость парентерального питания. Отсутствие влияния этого фактора перед 4-м курсом ХТ можно объяснить малым количеством больных, получавших парентеральное питание на этом этапе анализа ($n = 1$). Другим значимым фактором риска было непрерывное пребывание больных в стационаре до момента проведения 4-го курса ХТ. Медиана непрерывного пребывания в стационаре составила 70 дней (64–180 дней). Детекция продуцентов БЛРС со слизистой оболочки прямой кишки наблюдалась у всех больных, находившихся постоянно в стационаре к моменту проведения 4-го курса ХТ, и только у половины, наблюдавшихся амбулаторно в перерывах между курсами ХТ (100% против 51%, ОШ 2,85, $p = 0,002$). Многие исследователи отмечают лечение β -лактамами антибиотиками и фторхинолонами как значимый фактор риска, ассоциированный с колонизацией продуцентами БЛРС [135]. Мы не выявили существенного значения антибиотиков в колонизации слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС. Объяснением этому может быть особенность выбранной когорты пациентов, поскольку данный фактор был доминирующим у всех больных (более 80%).

Для прямой детекции энтеробактерий с продукцией БЛРС из клинического материала использовали селективную хромогенную среду. В нашем исследовании продемонстрирована высокая чувствительность (98%) и специфичность (97%) селективной хромогенной среды CHROMagarTMESBL для детекции БЛРС у энтеробактерий. Максимальная чувствительность и специфичность была определена для изолятов *E. coli* (99% и 99%, соответственно) и *K. pneumoniae* (96% и 100%, соответственно). Вероятность выделения энтеробактерий с продукцией БЛРС на селективной среде CHROMagarTMESBL была значимо выше, чем на агаре Эндо или МакКонки (98% против 69%, $p < 0,0001$). Было показано, что на селективной среде могут быть получены энтеробактерии с гиперпродукцией AmpC β -лактамаз (4%), которые также обладают устойчивостью к цефалоспорином III поколения. Только 2% изолятов, полученных на этой среде, были чувствительными к цефалоспорином III поколения. Аналогичные данные

представлены в исследовании M. Gazin и соавт. [64], так при исследовании клинических образцов на среде CHROMagarTMESBL чувствительность и специфичность составили – 100% и 93%, соответственно. Также необходимо отметить сокращение времени исследования. Уже через 18–24 часа после поступления образцов для исследования в лабораторию в клинические отделения выдавали предварительное заключение о наличии продуцентов БЛРС.

За анализируемый период у 98 больных было выявлено 1973 энтеробактерии. Продукция БЛРС была подтверждена у 652 (33%) из 1973 энтеробактерий. В спектре энтеробактерий с продукцией БЛРС, выделенных со слизистой оболочки ротоглотки и прямой кишки, преобладали *E. coli* (56,4%), далее следовали *K. pneumoniae* (27,4%). В структуре микроорганизмов, выделенных со слизистой прямой кишки, преобладали *E. coli* (58,7%), а со слизистой ротоглотки – *K. pneumoniae* (50%). Отмечены достоверные различия в доле выделения *K. pneumoniae* среди продуцентов БЛРС, полученных при первом поступлении в «НМИЦ гематологии» и среди изолятов впервые появившихся у больных во время ХТ (42% против 13%, $p = 0,0025$). Проведенное молекулярное исследование показало, что у 86% изолятов был определен хотя бы один из исследуемых генов (*bla*_{СТХ-М} или *bla*_{ТЕМ}), одновременное наличие двух генов – у 25% изолятов. β -Лактамазы СТХ-М типа преобладали и были определены у 73% изолятов, ТЕМ – у 38% изолятов. β -Лактамазы типа СТХ-М у больных лимфомами выявлялись значимо чаще, чем у больных ОМЛ (80% против 55%, $p < 0,0001$), а ТЕМ – в изолированном виде значимо чаще встречались у больных ОМЛ (18% против 11%, $p = 0,01$). Среди повторных изолятов значимо чаще определяли гены *bla*_{СТХ-М} в изолированном виде, чем у первых изолятов (50% против 33%, $p = 0,0025$). Необходимо отметить, что ферменты СТХ-М типа обладают расширенным спектром действия, тогда как среди ферментов ТЕМ есть как β -лактамазы широкого, так и расширенного спектра. Используемый в исследовании метод ПЦР не позволяет дифференцировать друг от друга гены *bla*_{ТЕМ} и *bla*_{SHV}, кодирующие ферменты широкого и расширенного спектра [8].

В рамках исследования было проведено изучение генетического разнообразия 39 изолятов *E. coli* с продукцией БЛРС, полученных при первом выявлении у больного. Генотипирование изолятов, полученных при поступлении в стационар, показало их генетическое разнообразие, что свидетельствует о различных источниках колонизации слизистой оболочки кишечника у больных, впервые поступивших в «НМИЦ гематологии». Анализ генетических профилей первых изолятов, выявленных в процессе реализации ХТ, показал наличие 7 групп, включающих от 2 до 4 генетически родственных изолятов. Присутствие нескольких генетически родственных групп подтверждает возможность экзогенной передачи продуцентов БЛРС внутри стационара. Таким образом, в нашем исследовании доказано предположение о том, что для энтеробактерий с продукцией БЛРС характерно как моноклональное, так и поликлональное распространение [72].

Во второй части исследования была проанализирована взаимосвязь колонизации слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС с развитием бактериемии, вызванной этими микроорганизмами. 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 ($p < 0,0001$). Не наблюдалось выделения продуцентов БЛРС из гемокультуры, если при исследовании мазков со слизистой оболочки прямой кишки не выявляли подобные бактерии.

Попарное генотипирование было проведено для изолятов энтеробактерий с продукцией БЛРС, выделенных из гемокультуры и со слизистой прямой кишки, у одного и того же больного. При анализе генетических профилей продуцентов БЛРС из гемокультуры было выявлено генетическое разнообразие изолятов. В нашей работе продемонстрировано, что 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 больного 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 попарного генотипирования оказалось, что генетически родственными были два изолята *K. pneumoniae* с продукцией БЛРС, выделенные из гемокультуры и со слизистой оболочки прямой кишки, но от разных больных. Можно предположить, что была длительная циркуляция изолята *K. pneumoniae* с продукцией БЛРС в окружающей среде стационара с последующей экзогенной передачей больному. 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. На основании результатов исследования было сделано заключение о наличии двух механизмов инфицирования энтеробактериями с продукцией БЛРС в стационаре – эндогенного и экзогенного, с преобладанием эндогенного.

В заключении можно отметить, что мониторинг колонизации слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС и максимально быстрая их детекция являются

крайне важными для назначения своевременной и адекватной терапии инфекционных осложнений и предотвращения эпидемического распространения устойчивых к антибиотикам бактерий.

Выводы

1. Доказано, что выделение БЛРС-положительных бактерий со слизистой оболочки кишечника у больных с впервые диагностированными ОМЛ и лимфомами до проведения цитостатической терапии определяется у 27% больных и возрастает до 84–91% в процессе ХТ в течение 6 месяцев наблюдения.
2. Вероятность сохранения колонизации продуцентами БЛРС в течение 6 месяцев наблюдения составляет 30,3% (53,4% у больных лимфомами и 15,7% у больных ОМЛ), ре-колонизация возникает у 49,4% больных (57,2% у больных лимфомами 36,5% у больных ОМЛ), имевших эрадикацию БЛРС-положительных энтеробактерий.
3. Факторами, ассоциированными с колонизацией продуцентами БЛРС, до проведения ХТ являются перевод больных из другого стационара (38% против 20%, $p = 0,01$) и возраст от 50 лет и старше (38% против 20%, $p = 0,05$); у больных ОМЛ – проживание вне Москвы (37% против 7%, $p = 0,04$); в процессе ХТ – парентеральное питание (100% против 25%, $p = 0,05$) и непрерывное пребывание больного в стационаре (100% против 51%, $p = 0,002$).
4. Установлена высокая чувствительность (98%) и специфичность (97%) селективной хромогенной среды для детекции энтеробактерий с продукцией БЛРС.
5. Среди продуцентов БЛРС, выделенных со слизистой оболочки кишечника больных, преобладают *E. coli* (58,7%) и *K. pneumoniae* (25,3%), содержащие в основном СТХ-М тип БЛРС (73%); определено генетическое разнообразие БЛРС-положительных бактерий при первом поступлении и генетическое сходство 59% изолятов в период пребывания больных в стационаре.
6. Определено, что бактериемия, вызванная БЛРС-положительными бактериями, возникает только у пациентов с колонизацией слизистой оболочки кишечника идентичными по виду продуцентами БЛРС, а в 26% случаев отмечается генетическое родство идентичных по виду изолятов, выделенных из гемокультуры и со слизистой оболочки прямой кишки.

Практические рекомендации

1. Хромогенные селективные среды для выявления энтеробактерий с продукцией БЛРС имеют высокую чувствительность и специфичность, и могут быть использованы в практической бактериологии для детекции продуцентов БЛРС.
2. Для детекции колонизации слизистых оболочек энтеробактериями с продукцией БЛРС достаточно проводить исследование только со слизистой оболочки кишечника.
3. Мониторинг колонизации слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС следует проводить у больных ОМЛ и лимфомами при поступлении в стационар, перед началом курса ХТ, при развитии инфекционных осложнений.
4. Профилактика фторхинолонами не показана больным с колонизацией слизистой оболочки кишечника продуцентами БЛРС.
5. Ввиду преобладания эндогенного пути инфицирования у больных ОМЛ и лимфомами, определение колонизации слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС косвенно позволяет предположить возможного возбудителя инфекции у больных с лихорадкой неясной этиологии и гранулоцитопенией.
6. Отсутствие колонизации слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС имеет высокое отрицательное предсказательное значение для развития бактериемии, вызванной продуцентами БЛРС.

Список используемых сокращений

БАЛ – бронхо-альвеолярный лаваж

БЛРС - β-лактамазы расширенного спектра

НМИЦ гематологии – Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

КС - коэффициент сходства

КОЕ/мл - колониеобразующие единицы в миллилитре

МПК – минимальная подавляющая концентрация

ОМЛ – острый миелоидный лейкоз

ОРИТ – отделение реанимации и интенсивной терапии

ОШ – отношение шансов

ПСБ – пенициллин-связывающий белок

ХТ – химиотерапия

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ЦВК – центральный венозный катетер

*bla*_{TEM} – гены, кодирующие β-лактамазы типа TEM

*bla*_{CTX-M} – гены, кодирующие β-лактамазы типа CTX-M

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute (Национальный комитет по клиническим и лабораторным стандартам)

ЕСИЛ — European Conference on Infections in Leukaemia (Европейская конференция по инфекциям при лейкемии)

ERIC-ПЦР - Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (метод ПЦР, основанный на амплификации повторяющихся внутригенных последовательностей энтеробактерий)

EUCAST - European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (Европейский комитет по определению чувствительности к антибиотикам)

MLST - Multilocus Sequence Typing (мультилокусное секвенирование-типирование)

Микроорганизмы

<i>B. cepacia</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
<i>C. diversus</i>	<i>Citrobacter diversus</i>
<i>E. cloacae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>H. alvei</i>	<i>Hafnia alvei</i>
<i>K. intermedia</i>	<i>Kluyvera intermedia</i>
<i>K. oxytoca</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>L. adecarboxylata</i>	<i>Leclercia adecarboxylata</i>
<i>M. morgani</i>	<i>Morganella morgani</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>P. mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>P. stuartii</i>	<i>Providencia stuartii</i>
<i>P. vulgaris</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
<i>R. ornithinolytica</i>	<i>Raoultella ornithinolytica</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. fonticola</i>	<i>Serratia fonticola</i>
<i>S. maltophilia</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>S. marcescens</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>S. typhimurium</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>

Список литературы

1. Гармаева Т. Ц. Вирусные гепатиты В и С у больных заболеваниями системы крови: автореф. дис. ... док. мед. наук: Гармаева Татьяна Цыреновна. – Москва, 2012. – 46 с.
2. Клинические рекомендации. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. (Версия 2.0 2015) [Электронный ресурс] Режим доступа: <http://www.antibiotic.ru/minzdrav/clinical-recommendations/>_(дата обращения 25.01.2018)
3. Клясова Г.А. Глава «Антимикробная терапия». Программное лечение заболеваний системы крови: Сборник алгоритмов диагностики и протоколов лечения заболеваний системы крови /Под ред. В.Г. Савченко. – М.: Практика, 2012.
4. Клясова Г.А. Инфекции при гемобластозах и депрессиях кроветворения: клиника, диагностика и лечение: автореф. дис. ... док. мед. наук: Клясова Галина Александровна – Москва, 2009. – 47 с.
5. Клясова Г.А., Бриллиантова А.Н., Миронова А.В. Генотипирование грамотрицательных бактерий, выделенных из крови при сепсисе у больных с гематологическими заболеваниями //Терапевтический архив. – 2007. – Т. 79. – №7. – С. 74-80.
6. Клясова Г.А., Сперанская Л.Л., Миронова А.В., Масчан М.А., Байдильдина Д.Д., Верещагина С.А., Капорская Т.С., Юрицина Н.Ю., Поспелова Т.И., Крайнова Л.Е., Маркина О.А., Трушина Е.Е., Бриллиантова А.Н., Фролова И.Н. Возбудители сепсиса у иммунокомпрометированных больных: структура и проблемы антибиотикорезистентности (результаты многоцентрового исследования) //Гематология и трансфузиология. – 2007. – Т. 52. – № 1. – С. 11-18.
7. Кузнецова М.В., Максимова А.В., Карпунина Т.И. Опыт использования гер- и gapD-полимеразной цепной реакции для эпидемиологической характеристики нозокомиальных изолятов *Pseudomonas aeruginosa* //Клиническая лабораторная диагностика. – 2015. – Т. 60. – № 3. – С. 44-50.
8. Мудрак Д.Е. Молекулярно-генетические особенности устойчивости к β -лактамам антибиотикам грамотрицательных микроорганизмов – возбудителей нозокомиальных инфекций: автореф. дис. ... канд. биол. наук: Мудрак Дарья Евгеньевна. – Москва, 2010. – 21 с.
9. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические указания МУК 4.21890-04 //Клиническая Микробиология и Антимикробная Химиотерапия. – 2004. – Т. 6. – С. 306-59.
10. Охмат В.А. Инфекционные осложнения в период индукции и консолидации ремиссии у больных острыми лейкозами: автореф. дис. ... канд. мед. наук: Охмат Владимир Александрович. – Москва, 2016. – 25 с.

11. Программное лечение заболеваний системы крови: Сборник алгоритмов диагностики и протоколов лечения заболеваний системы крови / под ред. Савченко В.Г. – М.: Практика; 2012. – 1056 с.
12. Рубцова М.Ю., Уляшева М.М., Бахманн Т.Т., Шмидт Р.Д., Егоров А.М. Мультипараметрическое определение генов и точечных мутаций в них для идентификации β -лактамаз //Успехи биологической химии. – 2010. – Т.50. – С.303-348.
13. Савченко В.Г., Паровичникова Е.Н., Афанасьев Б.В., Грицаев С.В., Семочкин С.В., Бондаренко С.Н., Троицкая В.В., Соколов А.Н., Кузьмина Л.А., Клясова Г.А., Гапонова Т.В., Баранова О.Ю., Лапин В.А., Константинова Т.С., Самойлова О.С., Капорская Т.С., Шатохин С.В. Национальные клинические рекомендации по диагностике и лечению острых миелоидных лейкозов взрослых //Гематология и трансфузиология. – 2014. – Т. 59. – № S2. – С. 2-29.
14. Сидоренко С.В. Бета-лактамазы расширенного спектра и место современных β -лактаманых антибиотиков в терапии тяжелых нозокомиальных инфекций //Гематология и трансфузиология. – 2007. – Т. 52. – №4. – С. 39-42.
15. Сидоренко С.В. Бета-лактамазы расширенного спектра: клиническое значение и методы детекции //Инфекции и антимикробная терапия. – 2002. – Т. 4. – № 6. – С. 1-12.
16. Сидоренко С.В., Страчунский Л.С., Ахмедова Л.И., Белобородов В.Б., Богомолова Н.С., Большаков Л.В., Дехнич А.В., Карабак В.И., Маликов В.Е., Павлова М.В., Поликарпова С.В., Руднов В.А., Яковлев В.П. Результаты многоцентрового исследования сравнительной активности цефепима и других антибиотиков в отношении возбудителей тяжелых госпитальных инфекций (программа “Micromax”) //Антибиотики и химиотерапия. – 1999. – Т. 44. – №11. – С. 7-16.
17. Сидоренко С.В., Тишков В.И. Молекулярные основы резистентности к антибиотикам //Успехи биологической химии. – 2004. – Т. 44. – №. 2. – С. 263-306.
18. Степанова М. Н. Мутационная изменчивость СТХ-М β -лактамаз и формирование устойчивости к цефтазидиму у клинических и лабораторных штаммов *Escherichia coli*: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.02.03/ Степанова Марина Николаевна. – Казань, 2011. – 27 с.
19. Страчунский Л.С. Бета-лактамазы расширенного спектра – быстро растущая и плохо осознаваемая угроза //Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2005. – Т. 7. – № 1. – С. 92-96.
20. Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Склеенова Е.Ю., Иванчик Н.В., Тимохова А.В., Дехнич А.В., Козлов Р.С., исследовательская группа «МАРАФОН» Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов Enterobacteriaceae в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования МАРАФОН в 2011–2012 гг //Клиническая Микробиология и Антимикробная Химиотерапия. – 2014. – Т. 16. – № 4. – С. 254-265.

21. Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Склеенова Е.Ю., Иванчик Н.В., Микотина А.В., Дехнич А.В., Козлов Р.С. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов Enterobacteriaceae в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования МАРАФОН 2013–2014 //Клиническая Микробиология и Антимикробная Химиотерапия. – 2017. – Т. 19. – № 1. – С. 49-56.
22. Эйдельштейн М.В. Бета-лактамазы аэробных грамотрицательных бактерий: характеристика, основные принципы классификации, современные методы выявления и типирования //Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2001. – Т. 3 – №3. – С. 223-242.
23. Эйдельштейн М.В., Страчунский Л.С. Динамика распространенности и чувствительности БЛРС-продуцирующих штаммов энтеробактерий к различным антимикробным препаратам в ОРИТ России //Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2005. – Т. 7. – № 4. – С. 323-336.
24. Эйдельштейн М.В. Выявление β -лактамаз расширенного спектра у грамотрицательных бактерий с помощью фенотипических методов. Пособие для врачей //Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2001. – Т. 3. – № 2. – С. 183-189.
25. Abraham E.P., Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin //Nature. – 1940. – № 146. – С. 837.
26. Adler A., Baraniak A., Izdebski R., Fiett J., Gniadkowski M., Hryniewicz W., Salvia A., Rossini A., Goossen H., Malhotra S., Lerman Y., Elenbogen M., Carmeli Y. A binational cohort study of intestinal colonization with extended-spectrum β -lactamase-producing *Proteus mirabilis* in patients admitted to rehabilitation centres //Clinical Microbiology and Infection. – 2013. – Т. 19. – № 2. – С. E51–E58.
27. Adler A., Baraniak A., Izdebski R., Fiett J., Salvia A., Samsó J.V., Lawrence C., Solomon J., Paul M., Lerman Y., Schwartzberg Y., Mordechai E., Rossini A., Fierro J., Lammens C., Malhotra-Kumar S., Goossens H., Hryniewicz W., Brun-Buisson C., Gniadkowski M., Carmeli Y.; MOSAR team. A multinational study of colonization with extended spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in healthcare personnel and family members of carrier patients hospitalized in rehabilitation centres //Clinical Microbiology and Infection. – 2014. – Т. 20. – № 8. – С. O516-523.
28. Ambler R.P. The structure of β -lactamases. //Philosophical transactions of the Royal Society of London (Biol.) – 1980. – Т. 289. – №. 1036. – С. 321-331.
29. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. World Health Organization. Geneva, Switzerland: WHO; 2014. [Электронный ресурс] Режим доступа: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf (дата обращения 25.01.2018).

30. Apisarnthanarak A., Kiratisin P., Mundy L.M. Clinical and molecular epidemiology of healthcare-associated infections due to extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* that harbor multiple ESBL genes //Infection Control and Hospital Epidemiology. – 2008. – T. 29. – № 11. – C. 1026-1034.
31. Apisarnthanarak A., Bailey T.C., Fraser V.J. Duration of stool colonization in patients infected with extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. //Clinical Infectious Diseases. – 2008. – T. 46. – № 8. – C. 1322-1323.
32. Arnan M., Gudiol C., Calatayud L., Liñares J., Dominguez M. Á., Batlle M., Ribera J.M., Carratalà J., Gudiol F. Risk factors for, and clinical relevance of, faecal extended-spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* (ESBL-EC) carriage in neutropenic patients with haematological malignancies //European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases – 2011. – T. 30. – №. 3. – C. 355-360.
33. Averbuch D., Orasch C., Cordonnier C., Livermore D.M., Mikulska M., Viscoli C., Gyssens I.C., Kern W.V., Klyasova G., Marchetti O., Engelhard D., Akova M. 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. – T. 98. – № 12. – C. 1826-1835.
34. Baquero F., Coque T.M., Cantón R. Allodemics //The Lancet Infectious Diseases. – 2002. – T. 2. – № 10. – C. 591-592.
35. Bauernfeind A., Grimm H., Schweighart S. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli* //Infection. – 1990. – T.18. – №5. – C.294-298.
36. Ben-Ami R., Schwaber M.J., Navon-Venezia S., Schwartz D., Giladi M., Chmelnitsky I., Leavitt A., Carmeli Y. Influx of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae into the Hospital //Clinical Infectious Diseases. – 2006. – T. 42. – №. 7. – C. 925-934.
37. Biehl L.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 //Critical Reviews in Microbiology. – 2016. – T. 42. – № 1. – C. 1-16.
38. Bilavsky E., Temkin E., Lerman Y., Rabinovich A., Salomon J., Lawrence C., Rossini A., Salvia A., Samso J.V., Fierro J., Paul M., Hart J., Gniadkowski M., Hochman M., Kazma M., Klein A., Adler A., Schwaber M.J., Carmeli Y. Risk factors for colonization with extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae on admission to rehabilitation centres //Clinical Microbiology and Infection. – 2014. – T. 20. – № 11. – C. O804-810.
39. Bisson G., Fishman N.O., Patel J.B., Edelstein P.H., Lautenbach E. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *klebsiella* species: risk factors for colonization and impact of

antimicrobial formulary interventions on colonization prevalence //Infection Control and Hospital Epidemiology. –2002. – T. 23. – № 5. – C. 254-260.

40. Blijlevens N.M., Donnelly J.P., De Pauw B.E. Mucosal barrier injury: biology, pathology, clinical counterparts and consequences of intensive treatment for haematological malignancy: an overview //Bone Marrow Transplantation. – 2000. – T. 25. – № 12. – C. 1269-1278.

41. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes //Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2004. – T. 48. – № 1. – C. 1-14.

42. Bow E.J. Fluoroquinolones, antimicrobial resistance and neutropenic cancer patients //Current Opinion In Infectious Diseases. – 2011. – T. 24. – № 6. – C. 545-553.

43. Bucaneveva G., Castagnola E., Viscoli C., Leibovici L., Menichetti F. Quinolone prophylaxis for bacterial infections in afebrile high risk neutropenic patients //European Journal of Cancer Supplements. – 2007. – T. 5. – № 2. – C. 5–12.

44. Bush K. Characterization of beta-lactamases //Antimicrobial agents and chemotherapy. – 1989. – T. 33. – № 3. – C. 259-263.

45. Bush K. The impact of beta-lactamases on the development of novel antimicrobial agents //Current Opinion in Investigational Drugs. – 2002. – T. 3. – № 9. – C. 1284-1290.

46. Bush K., Jacoby G.A., Medeiros A.A. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure //Antimicrobial agents and chemotherapy. – 1995. – T. 39. № 6. – C. 1211-1233.

47. Bush K., Jacoby G.A. Minireview. Updated Functional Classification of beta-Lactamases //Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2010. – T. 54. – № 3. – C. 969–976.

48. Calatayud L., Arnan M., Liñares J., Dominguez M.A., Gudiol C., Carratalà J., Batlle M., Ribera J.M., Gudiol F. Prospective study of fecal colonization by extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in neutropenic patients with cancer //Antimicrob Agents Chemother. – 2008. – T. 52. – № 11. – C. 4187-4190.

49. Calbo E., Freixas N., Xercavins M., Riera M., Nicolás C., Monistrol O., Solé Mdel M., Sala M.R., Vila J., Garau J. Foodborne Nosocomial Outbreak of SHV1 and CTX-M-15–producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology and Control //Clinical Infectious Diseases. – 2011. – T. 52. – № 6. – C. 743–749.

50. Carrer A., Nordmann P. CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae*: a change in the epidemiology of ESBL //Pathologie Biologie (Paris). 2011. – T. 59. – № 6. – C. e133-135.

51. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement //CLSI Document M100-S25, Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne P. A. – 2015.

52. Coque T.M., Baquero F., Canton R. Increasing prevalence of ESBL - producing *Enterobacteriaceae* in Europe //Eurosurveillance. – 2008. – Т. 13. – №. 47. – С. 19044.
53. Cornejo-Juárez P., Suárez-Cuenca J.A., Volkow-Fernández P., Silva-Sánchez J., Barrios-Camacho H., Nájera-León E., Velázquez-Acosta C., Vilar-Compte D. Fecal ESBL *Escherichia coli* carriage as a risk factor for bacteremia in patients with hematological malignancies //Support Care Cancer. – 2016. – Т. 24. – № 1. – С. 253-259.
54. Cuartero C., Sánchez Díaz A.M., Ruiz-Garrajosa P., Valverde A., Alonso J.M., Rodríguez J.D., Lozano S., Lopez J., Canton R. Dynamics of intestinal colonization with extended-spectrum beta-lactamases (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* in neutropenic oncohaematological patients. P2132 [электронный ресурс] In: Bacterial infections in cancer patients. Proceeding of 23th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2013 Apr 27–30; Berlin, Germany. Режим доступа:
https://www.escmid.org/escmid_publications/escmid_elibrary/?q=Cuartero+C.&id=2173&L=0&x=27&y=18 (дата обращения 25.01.2018).
55. Datta N., Kontomichalou P. Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in *Enterobacteriaceae* //Nature. – 1965. – Т. 208. – С. 239-241.
56. Edelstein M., Pimkin M., Palagin I., Edelstein I., Stratchounski L. Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals //Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2003. – Т. 47. – № 12. – С. 3724-3732.
57. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Version 1.0, 2013. [Электронный ресурс] Режим доступа:
http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_v1.0_20131211.pdf (дата обращения 25.01.2018)
58. EUCAST. Breakpoint table v 5.0 2015 [Электронный ресурс] Режим доступа:
(http://www.eucast.org/eucast_news/news_singleview/?no_cache=1&tx_ttnews%5Btt_news%5D=133 b (дата обращения 25.01.2018).
59. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2014. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC; 2015.
60. Evans B.A., Amyes S.G. OXA β -lactamases //Clinical Microbiology Reviews. - 2014. – Т. 27. – № 2. – С. 241-263.
61. Ewers C., Bethe A., Semmler T., Guenther S., Wieler L.H. Extended-spectrum β -lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their

- putative impact on public health: a global perspective. //Clinical Microbiology and Infection. – 2012. – T. 18. – №7. – C. 646-655.
62. Ganeswire R., Thong K.L., Puthuchery S.D. Nosocomial outbreak of *Enterobacter gergoviae* bacteraemia in a neonatal intensive care unit //Journal of Hospital Infection. – 2003. – T. 53. – T. 4. – C. 292-296.
63. Gavin P.J., Suseno M.T., Thomson R.B.Jr., Gaydos J.M., Pierson C.L., Halstead D.C., Aslanzadeh J., Brecher S., Rotstein C., Brossette S.E., Peterson L.R. Clinical correlation of the CLSI susceptibility breakpoint for piperacillin-tazobactam against extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species //Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2006. – T. 50. – №. 6. – C. 2244-2247.
64. Gazin M., Paasch F., Goossens H., Malhotra-Kumar S. Current trends in culture-based and molecular detection of extended-spectrum- β -lactamase-harboring and carbapenem-resistant Enterobacteriaceae //Journal of Clinical Microbiology. – 2012. – T. 50. – № 4. – C.1140-1146.
65. Gazouli M., Sidorenko S.V., Tzelepi E., Kozlova N.S., Gladin D.P., Tzouvelekis L.S. A plasmid-mediated beta-lactamase conferring resistance to cefotaxime in a *Salmonella typhimurium* clone found in St Petersburg, Russia //Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 1998. – T. 41. – № 1. – C. 119-121.
66. Geser N, Stephan R, Hächler H. Occurrence and characteristics of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) producing Enterobacteriaceae in food producing animals, minced meat and raw milk //BMC Veterinary Research. – 2012. – T. 8. – №. 1. – C. 21.
67. 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) //Journal of Hospital Infection. – 2003. – T. 54. – № 1. – C. 25-31.
68. Guyot K., Biran V., Doit C., Moissenet D., Guillard T., Brasme L., Courroux C., Maquelin K., van Leeuwen W., Vuthien H., Aujard Y., De Champs C., Bingen E. Raman spectroscopic analysis of the clonal and horizontal spread of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit //European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. – 2012. – T. 31. – C. 2827–2834.
69. Hammerum A.M., Larsen J., Andersen V.D., Lester C.H., Skovgaard Skytte T.S., Hansen F., Olsen S.S., Mordhorst H., Skov R.L., Aarestrup F.M., Agersø Y. Characterization of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* obtained from Danish pigs, pig farmers and their families from farms with high or no consumption of third- or fourth-generation cephalosporins //Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2014. – T. 69. – № 10. – C. 2650-2657.
70. Hamprecht A., Rohde A.M., Behnke M., Feihl S., Gastmeier P., Gebhardt F., Kern W.V., Knobloch J.K., Mischnik A., Obermann B., Querbach C., Peter S., Schneider C., Schröder W., Schwab

- F., Tacconelli E., Wiese-Posselt M., Wille T., Willmann M., Seifert H., Zweigner J. Colonization with third-generation cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae on hospital admission: prevalence and risk factors //Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2016. – T. 71. – № 10. – C. 2957-2963.
71. Harris A. D., McGregor J. C., Johnson J. A., Strauss S. M., Moore A. C., Standiford H. C., Hebden J. N., Morris J. G. Risk Factors for Colonization with Extended-Spectrum β -Lactamase-producing Bacteria and Intensive Care Unit Admission //Emerging Infectious Diseases. – 2007. – T. 13. – № 8. – C. 1144-1149.
72. Hendrik T.C., Voor In 't Holt A.F., Vos M.C. Clinical and Molecular Epidemiology of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella* spp.: A Systematic Review and Meta-Analyses //PLoS One. – 2015. – T. 10. – № 10. – C. e0140754.
73. 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. – T. 36. – № 9. – C. 1981-1986.
74. Hilty M., Betsch B.Y., Bögli-Stuber K., Heiniger N., Stadler M., Küffer M., Kronenberg A., Rohrer C., Aebi S., Endimiani A., Droz S., Mühlemann K. Transmission Dynamics of Extended-Spectrum β -lactamase-Producing Enterobacteriaceae in the Tertiary Care Hospital and the Household Setting //Clinical Infectious Diseases. – 2012. – T. 55. – № 7. – C. 967-975.
75. Hornsey M., Phee L., Woodford N., Turton J., Meunier D., Thomas C., Wareham D.W. Evaluation of three selective chromogenic media, CHROMagar ESBL, CHROMagar CTX-M and CHROMagar KPC, for the detection of *Klebsiella pneumoniae* producing OXA-48 carbapenemase //Journal of Clinical Pathology. – 2013. – T. 66. – № 4. – C.348-350.
76. Huey B., Hall J. Hypervariable DNA fingerprinting in *Escherichia coli*: minisatellite probe from bacteriophage M13 //Journal of Bacteriology. – 1989. – T. 171. – № 5. – C. 2528-2532.
77. Jacoby G. A., Munoz-Price L. S. The New β -Lactamases //The New England Journal of Medicine. – 2005. – T.352. – C. 380-391.
78. Jacoby G.A. AmpC beta-lactamases //Clinical Microbiology Reviews. – 2009. – T. 22. – № 1. – C. 161-182.
79. Johnson J. R., Johnston B., Clabots C., Kuskowski M. A., Castanheira M. *Escherichia coli* Sequence Type ST131 as the Major Cause of Serious Multidrug-Resistant *E. coli* Infections in the United States //Clinical Infectious Diseases. – 2010. – T. 51. – № 3. – C. 286-294.
80. Kiratisin P., Apisarnthanarak A., Saifon P., Laesripa C., Kitphati R., Mundy L.M. The emergence of a novel ceftazidime-resistant CTX-M extendedspectrum β -lactamase, CTX-M-55, in both community-onset and hospital-acquired infections in Thailand //Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. –2007. – T. 58. – C. 349-355.

81. 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. – Т. 28. – №. 2. – С. 302-307.
82. Kluytmans J.A., Overdeest I.T., Willemsen I., Kluytmans-van den Bergh M.F., van der Zwaluw K., Heck M., Rijnsburger M., Vandenbroucke-Grauls C.M., Savelkoul P.H., Johnston BD, Gordon D, Johnson JR. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* from retail chicken meat and humans: comparison of strains, plasmids, resistance genes, and virulence factors //Clinical Infectious Diseases. – 2013. – Т. 56. – №4. – С. 478-487.
83. 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. – Т. 11. – № 6. – С. 315-317.
84. 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 //European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. – 2015. – Т. 34. – № 6. – С. 1135-1143.
85. Lagace-Weins P., Tailor F., Baudry-Simner P., Zhanel G.G., Hoban D.J. Evaluation of a chromogenic medium for extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae. P. 351. [электронный ресурс]. / Lagace-Weins P.// 20th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. - 2010. - Vienna. Режим доступа: http://www.chromagar.com/fichiers/1271837960Lagace_COLOREX_ESBL_Poster_ECCMID_2010.pdf?PHPSESSID=a66d3dca443d47b9ab9ee07a5dff76a7 (дата обращения 25.01.2018)
86. Liakopoulos A., Mevius D., Ceccarelli D. A Review of SHV Extended-Spectrum β -Lactamases: Neglected Yet Ubiquitous //Frontiers in Microbiology. – 2016. – Т. 7. – С. 1374.
87. Liebana E., Carattoli A., Coque T. M., Hasman H., Magiorakos A.-P., Mevius D., Peixe L., Poirel L., Schuepbach-Regula G., Torneke K., Torren-Edo J., Torres C., Threlfall J. Public Health Risks of Enterobacterial Isolates Producing Extended-Spectrum β -Lactamases or AmpC β -Lactamases in Food and Food-Producing Animals: An EU Perspective of Epidemiology, Analytical Methods, Risk Factors, and Control Options. //Clinical Infectious Diseases. – 2013. – Т. 56. – №7. – С. 1030-1037.
88. Liss B.J., Vehreschild J.J., Cornely O.A., Hallek M., Fätkenheuer G., Wisplinghoff H., Seifert H., Vehreschild M.J. 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. – Т. 40. – № 6. – С. 613-619.
89. Livermore D.M. Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance //Clinical Microbiology Reviews. – 1995. – Т. 8. – № 4. – С. 557-584.

90. Lo W.U., Ho P.L., Chow K.H., Lai E.L., Yeung F., Chiu S.S. Fecal carriage of CTXM type extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms by children and their household contacts //Journal of Infection. – 2010. – T. 60. – № 4. – С. 286-292.
91. Luvsansharav U.O., Hirai I., Niki M., Sasaki T., Makimoto K., Komalamisra C., Maipanich W., Kusolsuk T., Sa-Nguankiat S., Pubampen S., Yamamoto Y. Analysis of risk factors for a high prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in asymptomatic individuals in rural Thailand //Journal of Medical Microbiology. – 2011. – T. 60. – № 5. – С. 619-624.
92. Marcade G., Brisse S., Bialek S., Marcon E., Leflon-Guibout V., Passet V., Moreau R., Nicolas-Chanoine M.H. The emergence of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* of international clones ST13, ST16, ST35, ST48 and ST101 in a teaching hospital in the Paris region //Epidemiology and Infection. – 2013. – T. 141. – № 8. – С.1705-1712.
93. Martin R.M., Cao J., Brisse S., Passet V., Wu W., Zhao L., Malani P.N., Rao K., Bachman M.A. Molecular Epidemiology of Colonizing and Infecting Isolates of *Klebsiella pneumoniae* //mSphere. – 2016. – T. 1. – № 5. – С. e00261-16.
94. Mesa R. J., Blanc V., Blanch A. R., Cortés P., González J. J., Lavilla S., Miró E., Muniesa M., Saco M., Tórtola M.T., Mirelis B., Coll P., Llagostera M., Prats G., Navarro F. Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in different environments (humans, food, animal farms and sewage) //Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2006. – T. 58. – С. 211–215.
95. Mesa R.J., Blanc V., Blanch A.R., Cortés P., González J.J., Lavilla S., Miró E., Muniesa M., Saco M., Tórtola M.T., Mirelis B., Coll P., Llagostera M., Prats G., Navarro F. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in different environments (humans, food, animal farms and sewage) //Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2006. – T. 58. – №1. – С. 211-215.
96. Monstein H.J., Ostholm-Balkhed A., Nilsson M.V., Nilsson M., Dornbusch K., Nilsson L.E. Multiplex PCR amplification assay for the detection of *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} and *bla*_{CTX-M} genes in Enterobacteriaceae //Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica. 2007. – T. 115. – № 12. – С. 1400-1408.
97. Mushtaq A., Carvalho M., Chishti N., Khatoon S., Weeks J., Jehan F., Khanani R., Khan F., Farooqi M., Walsh T. Frequency of carriage of New Delhi metallo beta-lactamase-1 (NDM-1) and CTX-M-15 among patients from hospitals in Karachi: preliminary data assessing risk factors for carriage and infection. P. 1299. [электронный ресурс]. / Mushtaq A. // 23th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. – 2013. – Berlin. Режим доступа: https://www.escmid.org/escmid_library/online_lecture_library/material/?mid=6957 (дата обращения 25.01.2018).
98. Naas T., Poirel L., Nordmann P. Minor extended-spectrum beta-lactamases //Clinical microbiology and infection. – 2008. – T. 14. – №. s1. – С. 42-52.

99. Nicolas-Chanoine M.H., Gruson C., Bialek-Davenet S., Bertrand X., Thomas-Jean F., Bert F., Moyat M., Meiller E., Marcon E., Danchin N., Noussair L., Moreau R., Leflon-Guibout V. 10-Fold increase (2006-11) in the rate of healthy subjects with extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* faecal carriage in a Parisian check-up centre //Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2013. – T. 68. – № 3. – C. 562-568.
100. Overdevest I.T., Willemsen I., Elberts S., Verhulst C., Kluytmans J.A. Laboratory detection of extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: evaluation of two screening agar plates and two confirmation techniques //Journal of Clinical Microbiology. – 2011. – T. 49. – № 2. – C. 519-522.
101. 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 //Journal of Chemotherapy. – 2000. – T. 12. – № 3. – C. 204-207.
102. Pasricha J., Koessler T., Harbarth S., Schrenzel J., Camus V., Cohen G., Perrier A., Pittet D., Iten A. Carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae among internal medicine patients in Switzerland //Antimicrobial Resistance and Infection Control. – 2013. – T. 2. – № 1. – C. 20.
103. Paterson D. L., Hujer K.M., Hujer A.M., Yeiser B., Bonomo M.D., Rice L.B., Bonomo R.A. Extended-Spectrum β -Lactamases in *Klebsiella pneumoniae* Bloodstream Isolates from Seven Countries: Dominance and Widespread Prevalence of SHV- and CTX-M-Type β -Lactamases //Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2003. – T. 47. – № 11. – C. 3554–3560.
104. Paterson D. L., Bonomo R. A. Extended-Spectrum Beta-Lactamases: a Clinical Update //Clinical microbiology reviews. – 2005. – T. 18 – № 4. – C. 657–686.
105. Paterson D.L., Ko W.C., Von Gottberg A., Mohapatra S., Casellas J.M., Goossens H., Mulazimoglu L., Trenholme G., Klugman K.P., Bonomo R.A., Rice L.B., Wagener M.M., McCormack J.G., Yu V.L. Antibiotic therapy for *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: implications of production of extended-spectrum beta-lactamases //Clinical Infectious Diseases. – 2004. – T. 39. – № 1. – C. 31-37.
106. Payne D.J., Marriott M.S., Amyes S.G. Characterisation of a unique ceftazidime-hydrolysing beta-lactamase, TEM-E2 // Journal of Medical Microbiology. – 1990. – T.32. – № 2. – C.131-134.
107. Pea F., Poz D., Viale P., Pavan F., Furlanut M. Which reliable pharmacodynamics breakpoint should be advised for ciprofloxacin monotherapy in the hospital setting? A TDM-based retrospective perspective // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2006. – T. 58. – № 2. – C. 380-386.
108. Peña C., Gudiol C., Tubau F., Saballs M., Pujol M., Dominguez M.A., Calatayud L., Ariza J., Gudiol F. Risk-factors for acquisition of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* among hospitalised patients //Clinical Microbiology and Infection. – 2006. – T. 12. – № 3. – C. 279-284.

109. Pfaller M. A., Segreti J. Overview of the epidemiological profile and laboratory detection of extended-spectrum β -lactamases //Clinical Infectious Diseases. – 2006. – T. 42 (Suppl 4). – S. 153-163.
110. Pitton J.S. Mechanism of bacterial resistance to antibiotics //Ergebnisse der Physiologie, biologischen Chemie und experimentellen Pharmakologie. – 1972. – T. 65. – C. 629-638.
111. Platteel T.N., Leverstein-van Hall M.A., Cohen Stuart J.W., Thijsen S.F., Mascini E.M., van Hees B.C., Scharringa J., Fluit A.C., Bonten M.J. Predicting carriage with extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria at hospital admission: a cross-sectional study //Clinical Microbiology and Infection. – 2015. – T. 21. № 2. – C. 141-146.
112. Poirel L., Naas T., Nordmann P. Genetic support of extended-spectrum beta-lactamases //Clinical Microbiology and Infection. – 2008. – T. 14. – №. s1. – C. 75-81.
113. Polsfuss S., Bloemberg G.V., Giger J., Meyer V., Hombach M. Comparison of European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) and CLSI screening parameters for the detection of extended-spectrum b-lactamase production in clinical Enterobacteriaceae isolates //Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2012. – T. 67. – № 1. – C.159–166.
114. Randall L.P., Kirchner M., Teale C.J., Coldham N.G., Liebana E., Clifton-Hadley F. Evaluation of CHROMagar CTX, a novel medium for isolating CTX-M-ESBL-positive Enterobacteriaceae while inhibiting AmpC-producing strains //Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2009. – T. 63. – № 2. – C. 302-308.
115. Razazi K., Derde L.P., Verachten M., Legrand P., Lesprit P., Brun-Buisson C. Clinical impact and risk factors for colonization with extended-spectrum β -lactamase-producing bacteria in the intensive care unit //Intensive Care Medicine. – 2012. – T. 38. – № 11. – C. 1769-1778.
116. Reinert R.R., Low D.E., F.´via Rossi, Zhang X., Wattal C., Dowzicky M.J. Antimicrobial susceptibility among organisms from the Asia/Pacific Rim, Europe and Latin and North America collected as part of TEST and the in vitro activity of tigecycline //Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2007. – T. 60. – № 5. – C. 1018–1029.
117. Reuland E.A., Overdeest I.T., Al Naiemi N., Kalpoe J.S., Rijnsburger M.C., Raadsen S.A., Ligtenberg-Burgman I., van der Zwaluw K.W., Heck M., Savelkoul P.H., Kluytmans J.A., Vandenbroucke-Grauls C.M. High prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae carriage in Dutch community patients with gastrointestinal complaints //Clinical Microbiology and Infection. – 2013. – T. 19. – № 6. – C. 542-549.
118. Rodríguez-Baño J., Navarro M.D., Romero L., Muniain M.A., Perea E.J., Pérez-Cano R., Hernández J.R., Pascual A. Clinical and Molecular Epidemiology of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* as a Cause of Nosocomial Infection or Colonization: Implications for Control //Clinical Infectious Diseases. – 2006. – T. 42. – № 1. – C. 37–45.

119. Rodríguez-Baño J., Navarro M.D., Romero L., Muniain M.A., de Cueto M., Ríos M.J., Hernández J.R., Pascual A. Bacteremia due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in the CTX-M era: a new clinical challenge // *Clinical Infectious Diseases*. – 2006. – Т. 43. – № 11. – С. 1407-1414.
120. Rossi F., Baquero F., Hsueh P.R., Paterson D.L., Bochicchio G.V., Snyder T.A., Satishchandran V., McCarroll K., DiNubile M.J., Chow J.W. In vitro susceptibilities of aerobic and facultatively anaerobic Gram-negative bacilli isolated from patients with intra-abdominal infections worldwide: 2004 results from SMART (Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends) // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2006. – Т. 58. – № 1. – С. 205-210.
121. Rossolini G.M., D'Andrea M.M., Mugnaioli C. The spread of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases // *Clinical Microbiology and Infection*. – 2008. – Т. 14. – №. s1. – С. 33-41.
122. Roy C., Segura C., Tirado M., Reig R., Hermida M., Tervel D., Foz A. Frequency of plasmid determined beta-lactamases in 680 consecutively isolated strains of Enterobacteriaceae // *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. – 1986. – Т. 4. – №2. – С. 146-147.
123. Samet A., Sledzińska A., Krawczyk B., Hellmann A., Nowicki S., Kur J., Nowicki B. Leukemia and risk of recurrent *Escherichia coli* bacteremia: genotyping implicates *E. coli* translocation from the colon to the bloodstream // *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. – 2013. – Т. 32. – № 11. – С. 1393-400.
124. SAS Institute Inc. SAS® 9.1.3, Cary, NC: SAS Institute Inc; 2004.
125. Scientific Opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended-spectrum β -lactamases and/or AmpC β -lactamases in food and food-producing animals // *EFSA Journal*. – 2011. – Т. 9. – № 8. – С. 2322.
126. Shitrit P., Reifeld S., Paitan Y., Gottesman B.S., Katzir M., Paul M., Chowers M. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae carriage upon hospital admission: prevalence and risk factors // *Journal of Hospital Infection*. – 2013. – Т.85. – №3. – С. 230-2322.
127. Sukhorukova M., Kozyreva V., Ivanchik N., Edelstein M., Kozlov R. Five-year trends in the prevalence and types of ESBLs and antimicrobial susceptibility of ESBL-producing nosocomial strains of Enterobacteriaceae in Russia. P. 716 [Электронный ресурс] / Sukhorukova M. // 20th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. – 2010. - Vienna. Режим доступа: http://registration.akm.ch/2010eccmid_einsicht.php?XNABSTRACT_ID=100676&XNSPRACHE_ID=2&XNKONGRESS_ID=114&XNMASKEN_ID=900 (дата обращения 25.01.2018).
128. Tängdén T., Cars O., Melhus Å., Löwdin E. Foreign Travel Is a Major Risk Factor for Colonization with *Escherichia coli* Producing CTX-M-Type Extended-Spectrum β -Lactamases: a Prospective Study with Swedish Volunteers // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2010. – Т.54. – № 9. – С. 3564-3568.

129. Tenover F.C., Arbeit R.D., Goering R.V., Mickelsen P.A., Murray B.E., Persing D.H., Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing //Journal of Clinical Microbiology. – 1995. – T. 33. – № 9. – C. 2233-2239.
130. Tham J., Walder M., Melander E., Odenholt I. Duration of colonization with extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in patients with travellers' diarrhea //Scandinavian Journal of Infectious Diseases. – 2012. – T. 44. – № 8. – C. 573-577.
131. Titelman E., Hasan C.M., Iversen A., Naucler P., Kais M., Kalin M., Giske C.G. Faecal carriage of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae is common 12 months after infection and is related to strain factors //Clinical Microbiology and Infection. – 2014. – T. 20. – № 8. – C. O508-515.
132. Trivedi M., Patel V., Soman R., Rodriguez C., Singhal T. The outcome of treating ESBL infections with carbapenems vs. non carbapenem antimicrobials //Journal of the Association of Physicians of India. – 2012. – T. 60. – C. 28-30.
133. Tschudin-Sutter S., Frei R., Dangel M., Stranden A., Widmer A.F. Rate of Transmission of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae Without Contact Isolation //Clinical Infectious Diseases. – 2012. – T. 55. – № 11. – C. 1505-1511.
134. Tumbarello M., Sanguinetti M., Montuori E., Trecarichi E.M., Posteraro B., Fiori B., Citton R., D'Inzeo T., Fadda G., Cauda R., Spanu T. Predictors of Mortality in Patients with Bloodstream Infections Caused by Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae: Importance of Inadequate Initial Antimicrobial Treatment //Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2007. – T. 51. – №6. – C. 1987–1994.
135. Tumbarello M., Trecarichi E.M., Bassetti M., De Rosa F.G., Spanu T., Di Meco E., Losito A.R., Parisini A., Pagani N., Cauda R. Identifying patients harboring extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae on hospital admission: derivation and validation of a scoring system //Antimicrob Agents Chemother. – 2011. – T. 55. – № 7. – C. 3485-3490.
136. Versalovic J., Koeuth T., Lupski J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes //Nucleic Acids Research. – 1991. – T. 19. – № 24. – C. 6823-6831.
137. Wiener J., Quinn J.P., Bradfordn P.A., Goering R.V., Nathan C., Bush K., Weinstein R. Multiple Antibiotic-Resistant *Klebsiella* and *Escherichia coli* in Nursing Homes //Journal of the American Medical Association. – 1999. – T. 281. – № 6. – C. 517-523.
138. Woerther P.L., Burdet C., Chachaty E., Andremont A. Trends in human fecal carriage of extended-spectrum β -lactamases in the community: toward the globalization of CTX-M //Clinical Microbiology Reviews. – 2013. – T. 26. – №4. – C. 744-758.

139. Woerther P.L., Angebault C., Jacquier H., Hugede H.C., Janssens A.C., Sayadi S., El Mniai A., Armand-Lefèvre L., Ruppé E., Barbier F., Raskine L., Page A.L., de Rekeneire N., Andremont A. Massive Increase, Spread, and Exchange of Extended Spectrum b-Lactamase–Encoding Genes Among Intestinal Enterobacteriaceae in Hospitalized Children With Severe Acute Malnutrition in Niger //Clinical Infectious Diseases. – 2011. – T. 53. – № 7. – C. 677–685.
140. Woodford N., Fagan E.J., Ellington M.J. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum (beta)-lactamases //Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2006. – T. 57. – № 1. – C. 154-155.
141. Young B.E., Lye D.C., Krishnan P., Chan S.P., Leo Y.S. A prospective observational study of the prevalence and risk factors for colonization by antibiotic resistant bacteria in patients at admission to hospital in Singapore //BMC Infectious Diseases. – 2014. – T. 14. – №. 1. – C. 298.