

ОЦЕНКА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К АНТИБИОТИКАМ АНАЭРОБНЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ *BACTEROIDES*, *PREVOTELLA* И *FUSOBACTERIUM*, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

И.И. Шильникова, Н.В. Дмитриева

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва
115478, г. Москва, Каширское шоссе, 24, e-mail: iish54@mail.ru

Аннотация

В исследовании было проанализировано 122 штамма строго анаэробных грамотрицательных палочек рода *Bacteroides*, *Prevotella* и *Fusobacterium*, выделенных от онкологических больных в 2004–2014 гг. Большинство штаммов принадлежало к группе *Bacteroides fragilis* (55 %), затем по частоте выделения следовали штаммы *Prevotella* (34,4 %) и *Fusobacterium* (10,6 %). Видовую идентификацию штаммов проводили с помощью времяпролетной матрично-ассоциированной лазерной десорбционно-ионизационной масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS). Из группы *B. fragilis* наиболее часто выделялись *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. ovatus* и *B. vulgatus*. Среди *Prevotella* наиболее часто выделялись *P. buccae*, *P. buccalis*, *P. oris*, *P. denticola* и *P. nigrescens*, а среди *Fusobacterium* 77 % составляли штаммы *F. nucleatum*. Чувствительность выделенных штаммов к антимикробным препаратам определяли методом E-теста. Процент чувствительности изолятов группы *B. fragilis* составлял для метронидазола 97 %; имипенема – 95,5 %; амоксициллин / клавуланата – 95,5 % и клиндамицина – 77,6 %. Три штамма *B. fragilis* имели множественную резистентность (одновременно к имипенему, амоксициллин / клавуланату и метронидазолу либо клиндамицину). Все выделенные штаммы *Prevotella* были чувствительны к имипенему и амоксициллин / клавуланату, в то время как 78,6 % пигментных видов *Prevotella* и 46,4 % непигментированных видов были устойчивы к пенициллину. Количество штаммов, чувствительных к метронидазолу и клиндамицину, составляло 93 и 88 % соответственно. Все штаммы *Fusobacterium* были чувствительны ко всем тестируемым антибиотикам, включая пенициллин.

Ключевые слова: чувствительность анаэробных грамотрицательных палочек, резистентность, *Bacteroides*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, онкологические больные.

Bacteroides, *Prevotella* и *Fusobacterium* являются строго анаэробными грамотрицательными палочками, которые колонизируют ротовую полость, верхние дыхательные пути, желудочно-кишечный тракт и женские половые пути. Они относятся к условно-патогенным микроорганизмам, которые обычно вовлекаются в полимикробные аэробно-анаэробные инфекции, в основном у пациентов с иммунодефицитом. Иногда эти организмы выделяются в чистой культуре. До 1990 г. виды *Prevotella* принадлежали к роду *Bacteroides*, который в настоящее время ограничивается видами группы *B. fragilis* – основными представителями микрофлоры кишечника. Среди всех анаэробных бактерий члены группы *B. fragilis* наиболее часто выделяются из клинических образцов у больных с внутрибрюшными инфекциями, абсцессами, инфекциями малого таза, послеоперационными раневыми инфекциями и инфекциями мягких тканей. *B. fragilis* составляет менее 2 % кишечной флоры, но чаще других видов *Bacteroides* выделяется из

клинических образцов, в том числе крови, и является наиболее вирулентным видом [14].

Отличие от *Bacteroides* виды *Prevotella* являются желчечувствительными организмами и ассоциируются с инфекциями головы и шеи (около 70 %) и инфекциями легких (инфекции выше диафрагмы). Виды *Fusobacterium* вызывают различные инфекции, но выделяются из клинического материала реже, чем *Bacteroides* и *Prevotella* [5]. *F. nucleatum* чаще остальных видов фузобактерий выделяется из клинических образцов.

Для лечения инфекций, вызванных грамотрицательными анаэробными бактериями, такими как *Bacteroides*, *Prevotella* и *Fusobacterium*, используют метронидазол, карбапенемы, комбинации β-лактамов с ингибиторами β-лактамаз, клиндамицин и моксифлоксацин. Чувствительность к этим антианаэробным препаратам зависит от вида микроорганизма, географического расположения и специфики медицинского учреждения. В последние годы во всем мире возросла устойчивость этих

бактерий к различным антимикробным препаратам, а среди членов группы *B. fragilis* наблюдается устойчивость сразу к нескольким антибиотикам (так называемая мультирезистентность) [2, 6, 10]. Наибольший рост резистентности наблюдался в случае клиндамицина и моксифлоксацина; самый низкий уровень резистентности сохраняется в отношении метронидазола, имипенема и тагетциклина. *B. fragilis* является наиболее чувствительным к антибиотикам видом, однако он может демонстрировать множественную устойчивость к лекарственным препаратам.

Целью исследования явилось определение этиологической структуры видов *Bacteroides*, *Prevotella* и *Fusobacterium*, выделяемых от онкологических больных; анализ чувствительности этих анаэробов к антимикробным препаратам и выявление резистентных штаммов в нашей клинике.

Материал и методы

Сбор образцов и условия роста микроорганизмов

Все образцы клинического материала были собраны в период с августа 2004 г. по март 2014 г. от пациентов с различными злокачественными новообразованиями. Образцы биоматериала доставлялись в лабораторию в течение 2 ч после сбора без использования специальных анаэробных транспортных систем и высевались на Schaedler Agar (bioMérieux, Франция) с добавлением гемина, менадиона и 5 % крови, а также на обогащенный тиогликолевый бульон (bioMérieux, Франция). Чашки и пробирки с бульоном инкубировали в анаэробной атмосфере с использованием герметичных банок или пакетов и Genbox системы (bioMérieux, Франция) при 37°C в течение 48 ч. Каждый морфологический тип выросших колоний вновь пересевали на чашки с Schaedler агаром и одновременно на чашки с кровяным агаром. Чашки с Schaedler агаром снова инкубировали в анаэробных условиях, а чашки с кровяным агаром инкубировали в аэробных условиях с целью выявления строго анаэробных бактерий. Предварительную идентификацию проводили с использованием анализаторов Rapid ID 32A, Vitek-2 (bioMérieux, Франция) и MicroScan WalkAway (Siemens, Великобритания). Выделенные штаммы хранили в сливках молока при -70°C.

Идентификация выделенных штаммов

Для идентификации выделенных штаммов до вида использовали самый современный, достоверный и простой метод – времяпролетную матрично-ассоциированную лазерную десорбционно-ионизационную масс-спектрометрию (matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS), – который успешно применяется для идентификации

анаэробных бактерий в последние годы [9, 15]. Чистую культуру каждого штамма размораживали, дважды пересевали на кровяной агар и инкубировали в анаэробных условиях. Идентификацию проводили методом прямого нанесения. Одну или несколько колоний наносили непосредственно на металлическую мишень в виде тонкой пленки с помощью пластиковой петли в три точки и покрывали 1 мкл матрицы (α -циано-4-гидрокси-коричной кислоты), растворенной в органическом растворителе (50 % ацетонитрил и 2,5 % трифторуксусной кислоты). Мишень оставляли при комнатной температуре, пока матричный раствор не высохнет на воздухе. В качестве положительного контроля и калибровочного стандарта использовали *E. coli* (бактериальный стандарт, Bruker Daltonik, Бремен, Германия). Масс-спектры получали с использованием масс-спектрометра MicroFlex LT (Bruker Daltonik GmbH) и анализировали с помощью программного обеспечения Biotyper 3,0 в программе FlexControl. Для идентификации бактерий спектр определяемого штамма сравнивался со спектрами штаммов базы данных. Использовали базу данных 4 613 стандартных спектров (версия 3.3.1.0). Оценка достоверности совпадения спектра анализируемого штамма со спектром штамма базы данных рассчитывается в диапазоне от 0 до 3,0. В соответствии с критериями, предложенными производителем, оценка от 1,7 до 1,99 указывает на идентификацию до рода, а оценка ≥ 2 указывает на идентификацию до вида. Оценка $\leq 1,7$ рассматривается как недостоверная идентификация.

Чувствительность

к антимикробным препаратам

Минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) антибиотиков определяли с помощью стрипов-полосок M.I.C.Evaluator (Oxoid, Англия), на которые нанесены градиенты концентраций антибиотика. Полоски M.I.C.E. действуют по принципу оригинального устройства – E-теста [11]. Было протестировано пять антимикробных агентов: метронидазол, клиндамицин, пенициллин, имипенем и амоксициллин/клавуланат. Для каждого штамма готовили инокулят с концентрацией, эквивалентной 1,0 стандарта McFarland. Чашки с кровяным агаром засеивали инокулятом, соблюдая равномерность; после полного высыхания накладывали полоски M.I.C.E. в соответствии с инструкциями производителя и инкубировали в течение 48 ч при 37°C в анаэробной атмосфере. После истечения времени инкубирования вокруг полоски образуется зона ингибирования. МИК определяется в точке, где зона роста микроорганизма пересекается с полоской. Значения МИК интерпретировались в соответствии со стандартами EUCAST.

Результаты и обсуждение*Таксономическая структура грамотрицательных анаэробных палочек*

За 10-летний период было выделено 122 штамма грамотрицательных анаэробных палочек из 110 образцов клинического материала, полученных от онкологических больных с инфекциями легких, головы и шеи, брюшной полости, желчевыводящих путей, малого таза и мягких тканей (табл. 1).

Таблица 1

Таксономическая структура видов *Bacteroides*, *Prevotella* и *Fusobacterium*, выделенных от онкологических больных за период с 2004 по 2014 г.

Виды анаэробных грамотрицательных палочек	Количество штаммов
<i>Bacteroides</i>	67
<i>B. fragilis</i>	33
<i>B. thetaiotaomicron</i>	12
<i>B. ovatus</i>	8
<i>B. vulgatus</i>	6
<i>B. nordii</i>	2
<i>B. uniformis</i>	1
<i>B. pyogenes</i>	1
<i>Parabacteroides distasonis</i>	3
<i>Parabacteroides johnsonii</i>	1
<i>Prevotella</i>	42
Непигментированные	28
<i>P. buccae</i>	10
<i>P. buccalis</i>	6
<i>P. oris</i>	6
<i>P. salivae</i>	1
<i>P. baroniae</i>	1
<i>P. bergensis</i>	1
<i>P. bivia</i>	1
<i>P. disiens</i>	1
<i>P. oralis</i>	1
Пигментированные	14
<i>P. denticola</i>	6
<i>P. nigrescens</i>	5
<i>P. melaninogenica</i>	2
<i>P. intermedia</i>	1
<i>Fusobacterium</i>	13
<i>F. nucleatum</i>	10
<i>F. necrophorum</i>	1
<i>F. mortiferum</i>	1
<i>F. ulcerans</i>	1

Все выделенные штаммы были идентифицированы до вида на MALDI-TOF MS с оценкой ≥ 2 . В группе *B. fragilis* наиболее часто выделялись *B. fragilis* (почти половина всех видов *Bacteroides* и 26,8 % от общего числа выделенных штаммов). Второе место по частоте выделения занимал *B. thetaiotaomicron*, за которым следовали *B. ovatus* и *B. vulgatus*. Аналогичное распределение видов наблюдалось в группе *B. fragilis* в исследованиях, проведенных в США, но отличалось от ситуации в Канаде, где *B. ovatus* был вторым наиболее часто выделяемым видом после *B. fragilis*, за которыми следовали *B. thetaiotaomicron* и *B. stercoris* [6, 12].

В исследованиях, проведенных в Испании, после *B. fragilis* и *B. thetaiotaomicron* наиболее часто выделяемым видом был *B. uniformis* [3]. В нашем исследовании *Bacteroides spp.* выделялись из желчи (34,9 %), дренажного отделяемого (30,2 %), абсцессов (20,6 %) и операционных ран (14,3 %).

Количество непигментированных видов *Prevotella* было в два раза выше (28 штаммов из 42), чем количество пигментированных видов (14 из 42). Наиболее часто среди непигментированных видов выделялись *P. buccae*, *P. buccalis* и *P. oris*, а среди пигментных видов – *P. denticola* и *P. nigrescens* (табл. 1). В исследованиях, проведенных в Болгарии, пигментированные виды выделялись чаще, чем непигментированные [4]. Возможно, эти различия связаны с различной локализацией инфекции и разными образцами биоматериалов. В нашем исследовании *Prevotella spp.* чаще выделялись из плевральной и брюшной жидкостей (35,9 %), операционных ран (25,6 %), абсцессов (20,5 %), желчи (10,3 %) и операционного материала (7,7 %). Несмотря на то, что *Prevotella spp.* являются желчечувствительными организмами, они иногда выделялись из желчи холангиостом.

Штаммы *Fusobacterium* выделялись относительно редко, и большинство из них (77 %) относилось к *F. nucleatum*. *Fusobacterium spp.* примерно с одинаковой частотой выделялись из жидкостей, абсцессов, операционных ран и желчи. Ни один штамм из группы *B. fragilis*, *Prevotella* и *Fusobacterium* не был выделен из образцов крови в течение исследуемого периода.

*Чувствительность**к антибактериальным препаратам*

Распределение значений МИК четырех антимикробных агентов в отношении исследуемых штаммов *Bacteroides* представлено в табл. 2. В нашей клинике метронидазол является препаратом выбора для профилактики и лечения анаэробных инфекций. Этот препарат обладает более высокой эффективностью по сравнению с имипенемом и комбинацией β -лактамов с ингибиторами β -лактамаз, в частности амоксициллин / клавуланатом. Для большинства выделенных штаммов *Bacteroides* диапазоны МИК метронидазола, имипенема и амоксициллин / клавуланата составляли 1–4, 0,12–0,5 и 0,5–2 мкг/мл соответственно.

В ноябре 2010 г. из операционной раны больного раком желудка был выделен штамм *B. fragilis*, устойчивый к метронидазолу (МИК ≥ 256 мкг/мл). Этот штамм был также устойчив к амоксициллину/клавуланату (МИК ≥ 256 мкг/мл) и имипенему (МИК ≥ 32 мкг/мл), но чувствителен к клиндамицину (2 мкг/мл). В октябре 2011 г. от больного гепатоцеллюлярной карциномой и холангитом был выделен штамм *B. thetaiotaomicron* со сниженной чувствительностью к метронидазолу (МИК – 8 мкг/мл), но чувствительный к другим антибиотикам.

Таблица 2

Диапазоны МИК различных антимикробных агентов в отношении 67 штаммов *Bacteroides* spp.

Антимикробный агент	Количество штаммов, для которых МИК (мкг/мл) антимикробных агентов составлял:														
	≤0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	≥256
Амоксициллин/клавуланат	-	1	-	2	3	18	17	12	8	3	-	-	-	-	3
Имипенем	-	-	8	17	19	14	3	2	1	-	-	3	-	-	-
Клиндамицин	3	-	1	6	1	4	12	15	10	7	-	-	-	-	8
Метронидазол	-	-	-	-	1	7	19	28	10	1	-	-	-	-	1

Таблица 3

Сравнение *in vitro* активности различных антимикробных агентов в отношении штаммов *B. fragilis* и не-*B. fragilis*

Антимикробный агент	Виды	Диапазон МИК (мкг/мл)	Количество резистентных штаммов
Амоксициллин/клавуланат	<i>B. fragilis</i>	0,03–256	3
	не- <i>B. fragilis</i>	0,12–8	0
Имипенем	<i>B. fragilis</i>	0,06–32	3
	не- <i>B. fragilis</i>	0,06–2	0
Клиндамицин	<i>B. fragilis</i>	0,06–256	4
	не- <i>B. fragilis</i>	0,015–256	11
Метронидазол	<i>B. fragilis</i>	0,25–256	1
	не- <i>B. fragilis</i>	0,5–8	1

В сентябре 2009 г. от больного раком желудка из абсцесса в ложе желчного пузыря была выделена монокультура штамма *B. fragilis*, устойчивого к амоксициллин/клавуланату (МИК ≥ 256 мкг/мл), имипенему (МИК ≥ 32 мкг/мл) и клиндамицину (МИК ≥ 256 мкг/мл), но чувствительного к метронидазолу (2 мкг/мл). Через месяц от больного раком печени с холециститом из желчи был выделен второй мультирезистентный штамм *B. fragilis*, который демонстрировал устойчивость к амоксициллин/клавуланату (МИК ≥ 256 мкг/мл), имипенему (МИК ≥ 32 мкг/мл) и клиндамицину (МИК ≥ 256 мкг/мл), но был чувствителен к метронидазолу (4 мкг/мл). Этот штамм был выделен из полимикробной культуры в ассоциации с *Stenotrophomonas maltophilia* и *E. coli*. Инфекции, вызываемые *Bacteroides* spp. с множественной лекарственной устойчивостью, встречаются редко и возникают в основном у иммунокомпрометированных пациентов, в частности у онкологических больных [7]. В Канаде выделены *B. ovatus* и *B. thetaiotaomicron* с множественной лекарственной устойчивостью: к клиндамицину, моксифлоксацину и цефокситину [6]. Кроме того, во Франции были выделены штаммы *B. fragilis*, устойчивые одновременно к нескольким агентам, таким как метронидазол, имипенем и амоксициллин/клавуланат [13].

Активность клиндамицина в отношении *Bacteroides* spp. очень избирательна. Диапазон МИК для большинства штаммов *Bacteroides* составлял 1–4 мкг/мл. Клиндамицин не используется в нашей клинике, и, вероятно, поэтому наблюдается относительно низкий уровень рези-

стентности (22,4 %) к этому препарату. Всего 15 штаммов были устойчивы к клиндамицину, 8 из которых имели высокий уровень резистентности (МИК ≥ 256 мкг/мл), и для 7 штаммов МИК составил 8 мкг/мл.

Чувствительность к различным антибактериальным препаратам может существенно варьировать у разных штаммов (табл. 3). Различия в чувствительности *B. fragilis* и других видов не-*B. fragilis* необходимо учитывать при назначении эмпирической терапии анаэробных инфекций, так как они имеют важное эпидемиологическое значение. Имипенем и амоксициллин/клавуланат были активны в отношении всех штаммов не-*B. fragilis*, но среди штаммов *B. fragilis* три имели высокую резистентность к этим препаратам. Известно, что устойчивость к имипенему наблюдается только у штаммов *B. fragilis*, что согласуется с нашими результатами. Один штамм *B. fragilis* обладал высокой резистентностью к метронидазолу (МИК ≥ 256), и один штамм *B. thetaiotaomicron* был со сниженной чувствительностью к метронидазолу (8 мкг/мл). Уровень устойчивости к клиндамицину варьировал от 12 % (4 из 33 штаммов) у *B. fragilis* до 32 % (11 из 34 штаммов) среди не-*B. fragilis*.

Поскольку виды *Prevotella* имеют более низкий уровень устойчивости к пенициллину, по сравнению с видами *Bacteroides*, нам казалось интересным оценить их чувствительность (табл. 4). Были выявлены существенные различия в резистентности к пенициллину между пигментными и непигментированными видами (78,6 %, 11/14 штаммов по сравнению с 46,4 %, 13/28). Среди

Таблица 4

Диапазоны МИК различных антимикробных агентов в отношении 42 штаммов *Prevotella* spp.

Антимикробный агент	Количество штаммов, для которых МИК (мкг/мл) антимикробных агентов составлял:														
	≤0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	≥256
Пенициллин	3	5	5	4	1	-	-	-	2	-	-	22	-	-	-
Амоксициллин/ клавуланат	3	2	5	13	5	8	3	-	2	3	-	-	-	-	-
Имипенем	13	8	10	8	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Клиндамицин	17	16	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
Метронидазол	-	1	-	-	3	10	9	8	8	2	1	-	-	-	-

Таблица 5

Диапазоны МИК различных антимикробных агентов в отношении 13 штаммов *Fusobacterium* spp.

Антимикробный агент	Количество штаммов, для которых МИК (мкг/мл) антимикробных агентов составлял:										
	0,002	0,004	0,008	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1,0	
Пенициллин	1	3	3	2	2	-	1	1	-	-	
Амоксициллин/ клавуланат	-	-	-	7	2	1	1	-	1	1	
Имипенем	1	-	6	1	2	1	1	1	-	-	
Клиндамицин	-	-	-	3	5	4	-	-	1	-	
Метронидазол	-	-	-	5	2	1	2	1	1	1	

Prevotella spp. не было обнаружено штаммов, устойчивых к имипенему и амоксициллину/клавуланату. Устойчивость к клиндамицину (МИК ≥ 256 мкг/мл) наблюдалась у 5 штаммов, которые также были резистентны к пенициллину, и два из этих штаммов показали сниженную чувствительность к метронидазолу (МИК 8 мкг/мл). Множественной лекарственной устойчивостью обладал штамм *P. buccalis*, выделенный в 2006 г., и штамм *P. buccae*, выделенный в 2012 г., оба из операционной раны после мастэктомии. В 2012 г. из операционной раны больного раком слепой кишки был выделен штамм *P. bivia*, который не был чувствителен к метронидазолу (МИК – 16 мкг/мл), но чувствителен к другим тестируемым антибиотикам, в том числе пенициллину. В исследовании, проведенном во Франции, также были обнаружены штаммы *P. bivia*, устойчивые к метронидазолу [1, 8]. Авторы сообщали, что устойчивость этих штаммов можно было обнаружить только после длительного инкубационного периода (72–96 ч). В нашем исследовании устойчивость к метронидазолу наблюдалась после 48 ч инкубирования. Мы также наблюдали рост отдельных колоний в зоне просветления. Для этой субпопуляции МИК метронидазола варьировала от 16 до 256 мкг/мл. Для большинства штаммов *Prevotella* МИК метронидазола имела такой же диапазон (0,5–4 мкг/мл), как и для *Bacteroides* spp. Но *Prevotella* spp. были чувствительны к более низким концентрациям клиндамицина (≤0,015–0,03 мкг/мл), амоксициллин / клавуланата (0,12–0,5 мкг/мл) и имипенема (≤0,015–0,12 мкг/мл), чем виды *Bacteroides*.

Все штаммы *Fusobacterium* были чувствительны ко всем тестируемым антибиотикам, включая пенициллин (табл. 5). *Fusobacterium* spp. были чувствительны к еще более низким концентрациям антибиотиков, чем *Prevotella* spp. В США были выделены штаммы *Fusobacterium*, устойчивые к клиндамицину, что, вероятно, связано с частым использованием этого препарата в клинической практике [2].

Выводы

Проведенное исследование показало, что в отношении анаэробных грамотрицательных палочек рода *Bacteroides*, *Prevotella* и *Fusobacterium* наиболее активными антибактериальными агентами являются метронидазол, имипенем и амоксициллин/клавуланат. Тем не менее были выделены три штамма *B. fragilis*, устойчивых одновременно к трем препаратам (имипенему, амоксициллину/клавуланату и метронидазолу или клиндамицину), а также три штамма *Prevotella* со сниженной чувствительностью к метронидазолу (МИК 8–16 мкг/мл). Широкое использование этих препаратов может привести к появлению и селекции резистентных штаммов у онкологических больных с тяжелыми инфекционными осложнениями. Резистентные штаммы были выделены в нашей клинике в период с 2009 по 2012 г. Мониторинг чувствительности анаэробных возбудителей инфекции к антимикробным препаратам необходим для проведения адекватной эмпирической терапии в будущем.

ЛИТЕРАТУРА

1. Alauzet C., Mory F., Teyssier C., Hallage H., Carlier J.P., Grolhier G., Lozniewski A. Metronidazole resistance in *Prevotella* spp. and description of a new *nim* gene in *Prevotella baroniae* // Antimicrob. Agents Chem. 2010. Vol. 54 (1). P. 60–64. doi: 10.1128/AAC.01003-09.
2. Aldridge K.E., Ashcraft D., Cambre K., Pierson C.L., Jenkins S.G., Rosenblatt J.E. Multicenter survey of the changing in vitro antimicrobial susceptibilities of clinical isolates of *Bacteroides fragilis* group, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas* and *Peptostreptococcus* species // Antimicrob. Agents Chemother. 2001. Vol. 45 (4). P. 1238–1243.
3. Betriu C., Culebras E., Gomez M., Lopez F., Rodriguez-Avial I., Picazo J.J. Resistance trends of the *Bacteroides fragilis* group over a 10-year period, 1997 to 2006, in Madrid, Spain // Antimicrob. Agents Chemother. 2008. Vol. 52 (7). P. 2686–2690. doi: 10.1128/AAC.00081-08.
4. Boyanova L., Kolarov R., Gergova G., Dimitrova L., Mitov I. Trends in antibiotic resistance in *Prevotella* species from patients of the University Hospital of Maxillofacial Surgery, Sofia, Bulgaria, in 2003–2009 // Anaerobe. 2010. Vol. 16 (5). P. 489–492. doi: 10.1016/j.anaerobe.2010.07.004.
5. Huggan P.J., Murdoch D.R. Fusobacterial infections: clinical spectrum and incidence of invasive disease // J. Infect. 2008. Vol. 57 (4). P. 283–289. doi: 10.1016/j.jinf.2008.07.016.
6. Karlowsky J.A., Walky A.J., Adam H.J., Baxter M.R., Hoban D.J., Zhanel G.G. Prevalence of antimicrobial resistance among clinical isolates of *Bacteroides fragilis* group in Canada in 2010–2011: CANWARD surveillance study // Antimicrob. Agents Chemother. 2012. Vol. 56 (3). P. 1247–1252. doi: 10.1128/AAC.05823-11.
7. Katsandri A., Papapaskevas J., Pantazatou A., Petrikos G.L., Thomopoulos G., Houhoula D.P., Avlami A. Two cases of infections due to multidrug-resistant *Bacteroides fragilis* group strains // J. Clin. Microbiol. 2006. Vol. 44 (9). P. 3465–3467.
8. Mory F., Carlier J.P., Alauzet C., Thouvenin M., Schuhmacher H., Lozniewski A. Bacteremia caused by a metronidazole-resistant *Prevotella* sp. Strain // J. Clin. Microbiol. 2005. Vol. 43 (10). P. 5380–5383.
9. Nagy E., Maier T., Urban E., Terhes G., Kostrzewa M., ESCMID Study Group on Antimicrobial Resistance in Anaerobic Bacteria. Species identification of clinical isolates of *Bacteroides* by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry // Clin. Microbiol. Infect. 2009. Vol. 15 (8). P. 796–802. doi: 10.1111/j.1469-0691.2009.02788.x.
10. Nagy E., Urban E., Nord C.E.; ESCMID Study Group on Antimicrobial Resistance in Anaerobic Bacteria. Antimicrobial susceptibility of *Bacteroides fragilis* group isolates in Europe: 20 years of experience // Clin. Microbiol. Infect. 2011. Vol. 17(3). P. 371–379. doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03256.x.
11. Rennie R.P., Turnbull L., Brosnikoff C., Cloke J. First comprehensive evaluation of the M.I.C. evaluator device compared to Etest and CLSI reference dilution methods for antimicrobial susceptibility testing of clinical strains of anaerobes and other fastidious bacterial species // J. Clin. Microbiol. 2012. Vol. 50 (4). P. 1153–1157. doi: 10.1128/JCM.05397-11.
12. Snyderman D.R., Jacobus N.V., McDermott L.A., Golan Y., Hecht D.W., Golgstein E.J., Harrell L., Jenkins S., Newton D., Pierson C., Rihs J.D., Yu V.L., Venezia R., Finegold S.M., Rosenblatt J.E., Gorbach S.L. Lessons learned from the anaerobe survey: historical perspective and review of the most recent data (2005–2007) // Clin. Infect. Dis. 2010. Vol. 50. Suppl 1. P. 26–33. doi: 10.1086/647940.
13. Turner P., Edwards R., Weston V., Gazis A., Ispahani P., Greenwood D. Simultaneous resistance to metronidazole, co-amoxiclav and imipenem in clinical isolate of *Bacteroides fragilis* // Lancet. 1995. Vol. 345 (8960). P. 1275–1277.
14. Wexler H.M. *Bacteroides*: the good, the bad and the nitty-gritty // Clin. Microbiol. Rev. 2007. Vol. 20 (4). P. 593–621.
15. Wybo I., Soetens O., De Bel A., Echahidi F., Vancutsem E., Vandorslaer K., Pierard D. Species identification of clinical *Prevotella* isolates by matrix-assisted laser-desorption ionization-time of flight mass spectrometry // J. Clin. Microbiol. 2012. Vol. 50 (4). P. 1415–1418. doi: 10.1128/JCM.06326-11.

Поступила 16.12.14

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Шильникова Ирина Ивановна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории микробиологической диагностики и лечения инфекций в онкологии, НИИ клинической онкологии, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Москва), Российская Федерация. Тел.: +7 (967) 084-76-70. E-mail: iish54@mail.ru. SPIN-код: 9400-6222

Дмитриева Наталья Владимировна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая лабораторией микробиологической диагностики и лечения инфекций в онкологии, НИИ клинической онкологии, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Москва), Российская Федерация. Тел.: +7 (499) 324-18-40. E-mail: prof.ndmitrieva@mail.ru

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие финансовой поддержки / конфликта интересов, о котором необходимо сообщить

EVALUATION OF ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY OF ANAEROBIC PATHOGENS *BACTEROIDES*, *PREVOTELLA* AND *FUSOBACTERIUM* ISOLATED FROM CANCER PATIENTS

I.I. Shilnikova, N.V. Dmitrieva

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Russian Academy of Medical Sciences, Moscow 24, Kashirskoye Shosse, 115448-Moscow, Russia, e-mail: iish54@mail.ru

Abstract

In this study 122 strains of strictly anaerobic gram-negative rods *Bacteroides*, *Prevotella* and *Fusobacterium*, isolated from cancer patients between 2004 and 2014 were analyzed. The most common strains were *B. fragilis* (55 %) followed by *Prevotella* (34.4 %) and *Fusobacterium* spp (10.6 %). The species identification was carried out by matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). Among the *B. fragilis* group strains, *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. ovatus* and *B. vulgatus* were isolated most frequently. Among *Prevotella* species, the most frequently isolated species were *P. buccae*, *P. buccalis*, *P. oris*, *P. denticola* and *P. nigrescens*, and 77 % of the *Fusobacterium* spp. were *F. nucleatum*. Susceptibilities of the isolates to antimicrobial agents were determined by the E-test methodology. The percentage of the

susceptibility of *B. fragilis* group isolates were: metronidazole, 97 %; imipenem, 95.5 %; amoxicillin/clavulanate, 95.5 % and clindamycin, 77.6 %. Three *B. fragilis* isolates proved to be multidrug-resistant (simultaneously to imipenem, amoxicillin/ clavulanate and metronidazole or clindamycin). All *Prevotella* isolates were susceptible to imipenem and amoxicillin/clavulanate, whereas 78.6 % of the pigmented *Prevotella* species and 46.4 % of the non-pigmented species were resistant to penicillin. The number of strains susceptibility to metronidazole and clindamycin were 93 % and 88 %, respectively. All *Fusobacterium* strains were sensitive to all tested antibiotics, including penicillin.

Key words: Antimicrobial susceptibility, resistance, *Bacteroides*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, cancer patients.

REFERENCES

1. Alauzet C., Mory F., Teyssier C., Hallage H., Carlier J.P., Grolhier G., Lozniewski A. Metronidazole resistance in *Prevotella* spp. and description of a new *nim* gene in *Prevotella baroniae* // Antimicrob. Agents Chem. 2010. Vol. 54 (1). P. 60–64. doi: 10.1128/AAC.01003-09.
2. Aldridge K.E., Ashcraft D., Cambre K., Pierson C.L., Jenkins S.G., Rosenblatt J.E. Multicenter survey of the changing in vitro antimicrobial susceptibilities of clinical isolates of *Bacteroides fragilis* group, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas* and *Peptostreptococcus* species // Antimicrob. Agents Chemother. 2001. Vol. 45 (4). P. 1238–1243.
3. Betriu C., Culebras E., Gomez M., Lopez F., Rodriguez-Avial I., Picazo J.J. Resistance trends of the *Bacteroides fragilis* group over a 10-year period, 1997 to 2006, in Madrid, Spain // Antimicrob. Agents Chemother. 2008. Vol. 52 (7). P. 2686–2690. doi: 10.1128/AAC.00081-08.
4. Boyanova L., Kolarov R., Gergova G., Dimitrova L., Mitov I. Trends in antibiotic resistance in *Prevotella* species from patients of the University Hospital of Maxillofacial Surgery, Sofia, Bulgaria, in 2003–2009 // Anaerobe. 2010. Vol. 16 (5). P. 489–492. doi: 10.1016/j.anaerobe.2010.07.004.
5. Huggan P.J., Murdoch D.R. Fusobacterial infections: clinical spectrum and incidence of invasive disease // J. Infect. 2008. Vol. 57 (4). P. 283–289. doi: 10.1016/j.jinf.2008.07.016.
6. Karlowsky J.A., Walkty A.J., Adam H.J., Baxter M.R., Hoban D.J., Zhanel G.G. Prevalence of antimicrobial resistance among clinical isolates of *Bacteroides fragilis* group in Canada in 2010–2011: CANWARD surveillance study // Antimicrob. Agents Chemother. 2012. Vol. 56 (3). P. 1247–1252. doi: 10.1128/AAC.05823-11.
7. Katsandri A., Papaparaskevas J., Pantazatou A., Petrikos G.L., Thomopoulos G., Houhoula D.P., Avlami A. Two cases of infections due to multidrug-resistant *Bacteroides fragilis* group strains // J. Clin. Microbiol. 2006. Vol. 44 (9). P. 3465–3467.
8. Mory F., Carlier J.P., Alauzet C., Thouvenin M., Schuhmacher H., Lozniewski A. Bacteremia caused by a metronidazole-resistant *Prevotella* sp. Strain // J. Clin. Microbiol. 2005. Vol. 43 (10). P. 5380–5383.
9. Nagy E., Maier T., Urban E., Terhes G., Kostrzewa M., ESCMID Study Group on Antimicrobial Resistance in Anaerobic Bacteria. Species identification of clinical isolates of *Bacteroides* by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry // Clin. Microbiol. Infect. 2009. Vol. 15 (8). P. 796–802. doi: 10.1111/j.1469-0691.2009.02788.x.
10. Nagy E., Urban E., Nord C.E.; ESCMID Study Group on Antimicrobial Resistance in Anaerobic Bacteria. Antimicrobial susceptibility of *Bacteroides fragilis* group isolates in Europe: 20 years of experience // Clin. Microbiol. Infect. 2011. Vol. 17(3). P. 371–379. doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03256.x.
11. Rennie R.P., Turnbull L., Brosnikoff C., Cloke J. First comprehensive evaluation of the M.I.C. evaluator device compared to Etest and CLSI reference dilution methods for antimicrobial susceptibility testing of clinical strains of anaerobes and other fastidious bacterial species // J. Clin. Microbiol. 2012. Vol. 50 (4). P. 1153–1157. doi: 10.1128/JCM.05397-11.
12. Snyderman D.R., Jacobus N.V., McDermott L.A., Golan Y., Hecht D.W., Gogstein E.J., Harrell L., Jenkins S., Newton D., Pierson C., Rihs J.D., Yu V.L., Venezia R., Finegold S.M., Rosenblatt J.E., Gorbach S.L. Lessons learned from the anaerobe survey: historical perspective and review of the most recent data (2005–2007) // Clin. Infect. Dis. 2010. Vol. 50. Suppl 1. P. 26–33. doi: 10.1086/647940.
13. Turner P., Edwards R., Weston V., Gazis A., Ispahani P., Greenwood D. Simultaneous resistance to metronidazole, co-amoxiclav and imipenem in clinical isolate of *Bacteroides fragilis* // Lancet. 1995. Vol. 345 (8960). P. 1275–1277.
14. Wexler H.M. *Bacteroides*: the good, the bad and the nitty-gritty // Clin. Microbiol. Rev. 2007. Vol. 20 (4). P. 593–621.
15. Wybo I., Soetens O., De Bel A., Echahidi F., Vancutsem E., Vandoorslaer K., Pierard D. Species identification of clinical *Prevotella* isolates by matrix-assisted laser-desorption ionization-time of flight mass spectrometry // J. Clin. Microbiol. 2012. Vol. 50 (4). P. 1415–1418. doi: 10.1128/JCM.06326-11.

ABOUT THE AUTHORS

Shilnikova Irina Ivanovna, PhD, Senior Researcher of Laboratory for Microbiologic Diagnosis and Treatment of Infection in Oncology, N.N. Blokhin Cancer Research Center of Russia (Moscow), Russian Federation. Phone: +7 (967) 084-76-70. E-mail: iish54@mail.ru. SPIN-code: 9400-6222

Dmitrieva Natalia Vladimirovna, MD, DSc, Professor, Head of Laboratory for Microbiologic Diagnosis and Treatment of Infection in Oncology, N.N. Blokhin Cancer Research Center of Russia (Moscow), Russian Federation. Phone: +7 (499) 324-18-40. E-mail: prof.dmitrieva@mail.ru