

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616-006.04-06:616.9-022:579.852.13]-078

Шильникова И.И., Дьякова С.А., Кулага Е.В., Соколова Е.Н., Терещенко И.В., Дмитриева Н.В.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ КЛОСТРИДИЙ, ВКЛЮЧАЯ *CLOSTRIDIUM DIFFICILE*, ВЫДЕЛЕННЫХ ПРИ ИНФЕКЦИОННЫХ ОСЛОЖНЕНИЯХ У ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава Российской Федерации, 115478, г. Москва

Из 74 образцов биологического материала, взятых у онкологических больных, выделено 76 штаммов *Clostridium*, относящихся к 14 видам, в том числе 28 штаммов *C. difficile*. Видовая идентификация штаммов проводилась с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии методом прямого нанесения без экстракции. 74 (97,4%) штамма идентифицированы до вида с оценкой достоверности 2–2,5. Среди *C. non-difficile* наиболее часто выделялись *C. perfringens* (42%), группа *C. clostridioforme* (24%). Чувствительность выделенных штаммов к антимикробным препаратам определяли методом E-тестов. Разные виды клостридий имели различную чувствительность к антибиотикам. Штаммы *C. perfringens* чувствительны ко всем тестируемым антибиотикам, тогда как виды, относящиеся к группе *C. clostridioforme*, устойчивы к фторхинолонам (100%), пенициллину (67%). Резистентность к фторхинолонам наблюдалась у *C. scindens*, *C. ramosum*, *C. symbiosum*. Штаммы *C. scindens*, *C. tertium* устойчивы к пенициллину. Среди *C. difficile* 93% штаммов имели устойчивость к пенициллину, 57% — к имипенему и 100% — к фторхинолонам.

Ключевые слова: идентификация клостридий; *Clostridium difficile*; чувствительность к антибиотикам; резистентные штаммы; онкологические больные.

Для цитирования: Шильникова И.И., Дьякова С.А., Кулага Е.В., Соколова Е.Н., Терещенко И.В., Дмитриева Н.В. Идентификация и чувствительность к антибиотикам клостридий, включая *Clostridium difficile*, выделенных при инфекционных осложнениях у онкологических больных. Клиническая лабораторная диагностика. 2016; 61 (7): 439-444. DOI 10.18821/0869-2084-2016-61-7-439-444

Shilnikova I.I., Dyakova S.A., Kulaga E.V., Sokolova E.N., Tereschenko I.V., Dmitrieva N.V.

THE IDENTIFICATION AND SENSITIVITY TO ANTIBIOTICS OF CLOSTRIDIA, INCLUDING CLOSTRIDIA DIFFICILE ISOLATED UNDER INFECTIOUS COMPLICATIONS IN ONCOLOGIC PATIENTS

The N.N. Blokhin Russian oncologic research center of Minzdrav of Russia, 115478 Moscow, Russia

The 76 strains of *Clostridium* related to 14 species including 28 strains of *C. difficile*, were isolated from 74 samples of biological material taken out of oncologic patients. The species identification of strains was implemented by MALDI-TOF mass spectrometry using technique of direct application without extraction. The 74 strains (97.4%) were identified up to specie with reliability evaluation 2.0-2.5. Among *C. non-difficile* the most frequently were separated *C. perfringens* (42%), group of *C. clostridioforme* (24%). The sensitivity of separated strains to anti-microbial preparations was established with E-tests technique. The different species of *Clostridia* had different sensitivity to antibiotics. The strains *C. perfringens* are sensitive to all testing antibiotics whereas species related to group *C. clostridioforme* are resistant to fluoroquinolones (100%) & penicillin (67%). The resistance to fluoroquinolones was observed in *C. scindens*, *C. ramosum*, *C. symbiosum*. The strains *C. scindens*, *C. tertium* are resistant to penicillin. Among *C. difficile*, 93% of strains were resistant to penicillin, 57% - to imipenem and 100% - to fluoroquinolones.

Key words: identification of *Clostridia*; *Clostridium difficile*; sensitivity of antibiotics; resistant strain; oncological patient

For citation: Shilnikova I.I., Dyakova S.A., Kulaga E.V., Sokolova E.N., Tereschenko I.V., Dmitrieva N.V. The identification and sensitivity to antibiotics of clostridia, including *Clostridia difficile* isolated under infectious complications in oncologic patients. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostic)* 2016; 61 (7): 439-444 (in Russ.)

DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-7-439-444

For correspondence: Shilnikova I.I., candidate of biological sciences, senior researcher of laboratory of microbiological diagnostic and treatment of infections in oncology. e-mail: iish54@mail.ru

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Financing. The study had no sponsor support.

Received 02.04.2016
Accepted 15.04.2016

Для корреспонденции: Шильникова Ирина Ивановна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. микробиологической диагностики и лечения инфекций в онкологии ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; e-mail: iish54@mail.ru

Введение. К роду *Clostridium* относятся анаэробные грамположительные палочки, образующие споры. Род является одним из самых многочисленных и гетерогенных среди бактерий и подвергается постоянному таксономическому переосмотру, так как его представители имеют различную природу и сгруппированы в полигенетические кластеры [1]. Род *Clostridium* включает более 200 строго анаэробных и аэротолерантных видов, широко распространенных в природе в основном в качестве почвенных сапрофитов, участвующих в процессах гниения и брожения. Многие виды клостридий входят в состав резидентной кишечной и вагинальной микрофлоры человека и животных. В первой половине XX столетия клостридиальные инфекции, как полагали, в основном вызываемые *C. perfringens*, ассоциировались с жизнеугрожающими инфекциями мягких тканей, раневыми инфекциями, интраабдоминальным сепсисом, септическим абортom. За последние 50 лет с развитием и усовершенствованием технологий анаэробной бактериологии стало очевидным, что многочисленные виды *Clostridium* вызывают широкий спектр заболеваний человека — от столбняка и ботулизма до пищевых отравлений, некротизирующего энтерита и псевдомембранозного колита [2]. Основным фактором вирулентности клостридий — токсины.

Около 30 видов клостридий являются возбудителями инфекций человека. За последние годы этот список пополнился в результате выделения из клинического материала видов, ранее не ассоциированных с инфекциями человека, например *C. amygdalinum*, *C. aldenense*, *C. chauvoei*, *C. citroniae*, *C. celerecrescens*, *C. fallax*, *C. glycolicum*, *C. hominis*, *C. intestinale*. Тяжелые инфекции, часто заканчивающиеся смертельным исходом, вызывают около 10 видов клостридий, продуцирующих летальные токсины [3]. *C. sordellii* способен продуцировать до семи видов экзотоксинов, из которых летальный и геморрагический токсины являются наиболее ядовитыми из семейства клостридиальных цитотоксинов.

Большинство инфекций, вызываемых клостридиями, носит эндогенный характер, некоторые являются экзогенными, такими как пищевые отравления (*C. perfringens*), ботулизм (*C. botulinum*, *C. baratii*), столбняк (*C. tetani*), инфекции мягких тканей и токсический шок в результате инъекций (*C. novyi* тип А). В большинстве случаев клостридии выделяются при полимикробных инфекциях в ассоциации с аэробными и/или анаэробными микроорганизмами. Часто *Clostridium spp.* ассоциируются с внутрибрюшными и плевропюльмональными инфекциями, инфекциями женской репродуктивной системы, мягких тканей, бактериемией (0,5—2% от всех положительных культур крови).

Среди возбудителей анаэробной бактериемии клостридии занимают второе место после грамотрицательных палочек группы *Bacteroides fragilis* [4]. *C. perfringens* чаще других видов клостридий выделяется из крови. Разные виды *Clostridium*, вызывающие инфекции кровотока, ассоциируются с определенными клиническими синдромами, например *C. perfringens* — со скоротечным внутрисосудистым гемолизом [5], *C. septicum*, *C. tertium* — с лейкоемией и злокачественными новообразованиями, *C. sordellii* — с послеродовыми инфекциями, *C. novyi* — с употреблением инъекционных наркотиков [6].

Мионекрозы и гангрену вызывают не только *C. perfringens*, но и *C. novyi*, *C. septicum*, *C. ramosum*. Клостридиальные мионекрозы возникают в контаминированных ранах после травм или операций. Спонтанные, не травматические мионекрозы случаются редко и чаще ассоциируются с желудочно-кишечными и гематологическими новообразованиями, диабетом и заболеваниями периферических сосудов. *C. sordellii* может вызвать некротизирующие инфекции мягких тканей в результате инъекций и гангрену матки [7]. Акушерско-

гинекологические инфекции, возникшие в результате родов, медицинского или спонтанного аборта и ассоциированные с *C. sordellii*, могут привести к 100% летальному исходу, который наступает через 2—6 дней от начала инфекции.

Клостридиальные инфекции ассоциируются с такими основными заболеваниями, как злокачественные опухоли, лейкозы, желудочно-кишечные расстройства, диабет. Положительная гемокультура *C. septicum* строго ассоциируется с карциномой кишечника и энтероколитом при нейтропении [8]. Инфекции, вызванные *C. septicum*, скоротечны и сопровождаются высокой смертностью. Описан случай бактериемии, ассоциированной с *C. symbiosum*, у большого метастатическим раком кишки [9]. *C. tertium* выделяется из крови иммунокомпрометированных больных, при абсцессах мозга, менингитах, инфекциях мягких тканей [10]. *C. tertium* является малопатогенным и нетоксигенным видом. К предрасполагающим факторам развития *C. tertium*-ассоциированной бактериемии относятся: поражение слизистой кишечника, нейтропения, резистентность ко многим β-лактамам антибиотикам, клиндамицину, метронидазолу. Малопатогенный и нетоксигенный вид *C. cadaveris* в редких случаях вызывает инфекции, которые всегда возникали у онкологических больных [11].

C. ramosum, *C. innocuum*, *C. clostridioforme* составляют так называемую RIC-группу, которая отличается повышенной резистентностью ко многим антибактериальным препаратам. *C. ramosum* выделяется при абсцессах желудочно-кишечного тракта, газовой гангрене, инфекциях уха, абсцессе мозга, пиелонефрите, спондилезе. *C. ramosum* редко ассоциируется с тяжелыми инфекциями или бактериемией и в основном выделяется от больных с иммунодефицитом [12]. *C. innocuum* может вызывать внутрибрюшную сепсис, бактериемию, эндокардиты. *C. clostridioforme* стоит на третьем месте по частоте выделения из крови после *C. perfringens* и *C. septicum*. Использование молекулярно-генетических методов идентификации микроорганизмов позволило определить близкородственные виды — *C. bolteae* и *C. hathewayi*, которые составляют группу *C. clostridioforme*. Недавно в эту группу добавлены *C. aldenense* и *C. citroniae* [13]. Виды группы *C. clostridioforme* часто выделяются при перитонитах, остеомиелитах, абсцессах печени, диабетической стопе из крови.

Особое место среди клостридиальных инфекций занимают инфекции, ассоциированные с *Clostridium difficile*. Этот микроорганизм является ведущим возбудителем внутрибольничной антибиотикоассоциированной диареи и псевдомембранозного колита у 10—25% госпитализированных и 2—15% не госпитализированных больных. Он чаще выделяется от больных раком, нейтропенией, перенесших трансплантацию костного мозга, ВИЧ-инфицированных [14, 15]. Токсигенные штаммы *C. difficile* выделяются в 20—25% случаев при антибиотикоассоциированной диарее и почти всегда при псевдомембранозных колитах. Предрасполагающими условиями для развития инфекций, вызванных *C. difficile*, являются предшествующая терапия антибиотиками или противоопухолевыми препаратами, процедуры или операции на желудочно-кишечном тракте (ЖКТ), длительная госпитализация, пожилой возраст. Иногда *C. difficile* может вызывать внекишечные инфекции, например эмпиему мозга, эмпиему плевры и чаще остальных видов клостридий — инфекции костей. Описано выделение *C. difficile* из перикардиальной жидкости пациента с медиастинитом и перикардитом, имевшего в анамнезе *C. difficile*-ассоциированную диарею. Внекишечные штаммы *C. difficile* выделяются редко, и данных об их чувствительности к антибиотикам недостаточно [16]. Опубликовано 15 клинических случаев бактериемии, вызванной *C. difficile* [17]. Смертность при *C. difficile*-ассоциированной

бактериемии составляла 50%. Эпидемиологическое значение внекишечных штаммов *C. difficile* пока неизвестно.

Цель исследования — определение источника и частоты выделения различных видов *Clostridium*; изучение видового спектра и чувствительности к антимикробным препаратам клостридий, выделенных от онкологических больных с инфекционными осложнениями; выявление резистентных штаммов.

Материал и методы. Сбор биоматериала и условия культивирования. 74 образца биологического материала собраны у 68 онкологических больных с различными инфекционными осложнениями. У двух больных клостридии выделялись из разных образцов биоматериала и у четырех — при повторных заборах биоматериала. Еще у двух больных из одного биоматериала выделено два разных вида клостридий. Биоматериал доставляли в лабораторию в течение не более 2 ч после его забора без использования специальных транспортных систем и высевали на анаэробный агар (Oxoid, Англия) с добавлением 5% крови и на обогащенный тиогликолевый бульон (bioMérieux, Франция). Чашки и пробирки с бульоном инкубировали в анаэробной атмосфере с использованием герметичных банок и газогенерирующих пакетов AnaeroGen (Oxoid, Англия) при 37 °С в течение 48 ч. Из фекалий больных с диареей и с положительным тестом на токсины А и В выделены 26 штаммов *C. Difficile*. Для получения чистой культуры *C. difficile* проводили алкогольный шок. С этой целью к 1 мл фекалий добавляли 1 мл этанола, перемешивали и оставляли на 60 мин при комнатной температуре. Затем высевали на анаэробный агар и культивировали в анаэробных условиях в течение 48 ч при 37 °С. В результате обработки этанолом вегетативные клетки сопутствующих бактерий погибали, а споры сохраняли жизнеспособность. Выделенные штаммы клостридий хранили в сливках при -70 °С для дальнейшего исследования.

Идентификация выделенных штаммов. Для видовой идентификации выделенных штаммов использовали метод времяпролетной матрично-ассоциированной лазерной десорбционно-ионизационной масс-спектрометрии (matrix-assisted laser desorption ionization — time of flight mass spectrometry, MALDI-ToF MS) [17]. Чистую культуру каждого штамма размораживали, дважды пересеивали 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 3 точки и добавляли 1 мкл матрицы (α-циано-4-гидрокси-коричной кислоты), растворенной в органическом растворителе (50% ацетонитрил и 2,5% трифторуксусная кислота). 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, Германия). Масс-спектры получали с использованием масс-спектрометра MicroFlex LT (Bruker, Германия), анализировали с помощью программного обеспечения Biotope 3.0 в программе FlexControl. Для идентификации бактерий спектр определяемого штамма сравнивали со спектрами таксонов базы данных. Использовали базу данных, содержащую 5629 таксонов (версия 4.4.0.1). Оценка достоверности совпадения спектра анализируемого штамма со спектром штамма базы данных рассчитывается в диапазоне от 0 до 3. 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 ≤ 1,7 рассматривается как недостоверная идентификация.

Чувствительность к антимикробным препаратам. Минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) антибио-

тиков определяли с помощью полосок M.I.C.Evaluator (Oxoid, Англия), на которые нанесены градиенты концентраций антибиотика. Полоски M.I.C.E. действуют по принципу E-теста. Протестировано 7 антимикробных препаратов: метронидазол, ванкомицин, пенициллин, имипенем, амоксициллин/клавуланат, цiproфлоксацин, левофлоксацин. 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 °С в анаэробной атмосфере. После истечения времени инкубирования вокруг полоски образовывалась зона ингибирования. МИК определяется в точке пересечения зоны роста микроорганизма с полоской. Значения МИК интерпретировались в соответствии со стандартами EUCAST.

Результаты. Этиологическая структура *Clostridium spp.* Выделено 76 штаммов *Clostridium*, относящихся к 14 видам, в том числе 28 штаммов *C. difficile*. 74 (97,4%) штамма идентифицированы до вида с оценкой достоверности 2—2,5, два штамма идентифицированы до рода с оценкой достоверности < 2 (табл. 1).

По частоте выделения лидирующее место занимала *C. perfringens* (42%), за ней была группа *C. clostridioforme* (24%), которая помимо основного вида, давшего название группе, включает *C. hathewayi* и *C. bolteae*.

Часто клостридии выделялись при холангитах, перитонитах, абсцессах брюшной полости у больных раком печени и поджелудочной железы (38%) и у больных раком кишки (30%) (табл. 2). Реже клостридии выделялись при инфекциях мочеполовой системы (14%), желудка (8%), мягких тканей (8%). Более половины штаммов *C. perfringens* выделены при инфекциях печени и поджелудочной железы, тогда как источником выделения *C. clostridioforme* чаще являлась прямая или сигмовидная кишка. Среди больных с диареей спектр основного заболевания значительно шире: лейкоз, миелосаркома, рак молочной железы, мочевого пузыря, яичников, щитовидной железы, ротоглотки, саркома Юинга.

Всего исследован 41 образец биологического материала,

Таблица 1

Достоверность идентификации 76 штаммов *Clostridium spp.*

Вид (количество) штаммов	Достоверность идентификации		
	2,300—2,500	2,000—2,299	1,700—1,999
<i>Clostridium perfringens</i> (21)	11	10	
<i>Clostridium clostridioforme</i> (6)	5	1	
<i>Clostridium hathewayi</i> (5)	1	4	
<i>Clostridium bifermentans</i> (3)		3	
<i>Clostridium ramosum</i> (2)		2	
<i>Clostridium scindens</i> (2)		2	
<i>Clostridium septicum</i> (2)	2		
<i>Clostridium bolteae</i> (1)	1		
<i>Clostridium cadaveris</i> (1)		1	
<i>Clostridium sordelli</i> (1)		1	
<i>Clostridium symbiosum</i> (1)		1	
<i>Clostridium tertium</i> (1)	1		
<i>Clostridium spp.</i> (2)			2
<i>Clostridium difficile</i> (28)	13	15	

Таблица 2

Источники выделения различных видов клостридий у онкологических больных

Вид (количество) штаммов	Биотоп					
	желудок	кишка	печень, поджелудочная железа	легкие	кожа и мягкие ткани	мочеполовая система
<i>C. perfringens</i> (21)	1	5	11	1	1	2
<i>C. clostridioforme</i> (6)		5				1
<i>C. hathewayi</i> (5)		1	2			2
<i>C. bifermentans</i> (3)	1		1		1	
<i>C. ramosum</i> (2)		1			1	
<i>C. scindens</i> (2)	1					1
<i>C. septicum</i> (2)		1			1	
<i>C. bolteae</i> (1)		1				
<i>C. cadaveris</i> (1)			1			
<i>C. sordelli</i> (1)			1			
<i>C. symbiosum</i> (1)		1				
<i>C. tertium</i> (1)			1			
<i>Clostridium</i> spp. (2)			2			
<i>C. difficile</i> (2)	1					1
Всего (50)	4	15	19	1	4	7

полученный из закрытых полостей и глубоких ран (отделяемое по дренажам, содержимое абсцессов, желчь), 7 образцов крови, 26 образцов фекалий от больных с диареей и положительным тестом на токсины А и В *C. difficile*. Из 48 образцов 38 (79,2%) получены от больных раком желудка, кишки, печени, поджелудочной железы. Наиболее часто клостридии выделялись из желчи (30%), абсцессов (20%), отделяемого брюшных дренажей (18%) (табл. 3). Из крови выделено 7 (14%) штаммов и столько же из операционных ран. Около половины штаммов *C. perfringens* выделялись из желчи, отделяемой из холангиостомы. *C. clostridioforme* чаще выделялись из содержимого абсцессов, *C. hathewayi* — из желчи и абсцессов. Из двух внекишечных штаммов *C. difficile* один выделен из плевральной жидкости у больного раком желудка, другой — из послеоперационной раны у больной саркомой матки.

Из 11 (23%) образцов биоматериала, включая 6 образцов крови, клостридии выделялись в чистой культуре, остальные образцы содержали ассоциацию *Clostridium* с другими микроорганизмами. Из четырех образцов, в том числе один образец крови, клостридии выделялись только в ассоциации с анаэробными микроорганизмами. В качестве ассоциантов аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов наиболее часто выделялись энтерококки, *E. coli*, неферментирующие грамотрицательные палочки.

Чувствительность клостридий к антимикробным препаратам. Чувствительность различных видов *Clostridium* к семи антимикробным препаратам показана в табл. 4. Все штаммы *C. perfringens*,

C. bifermentans, *C. cadaveris*, *C. sordelli* чувствительны ко всем исследуемым препаратам, включая фторхинолоны. Все виды клостридий, включая *C. difficile*, чувствительны к ванкомицину и метронидазолу, кроме одного штамма *C. ramosum*, выделенного из распадающейся опухоли прямой кишки, для которого МИК метронидазола превышала 256 мкг/мл. Амоксициллин/клавуланат эффективен в отношении всех выделенных штаммов, за исключением одного штамма *C. clostridioforme* (МИК > 256 мкг/мл). Этот мультирезистентный штамм обладал устойчивостью к пенициллину (МИК >32 мкг/мл) и фторхинолонам (МИК >32 мкг/мл), но чувствителен к имипенему. Из шести штаммов *C. clostridioforme* только один чувствителен к пенициллину (МИК 0,25 мкг/мл), два имели промежуточную чувствительность (МИК 0,5 мкг/мл), три штамма обладали устойчивостью к пенициллину (МИК 1—32 мкг/мл). Два штамма с промежуточной чувствительностью к пенициллину и два пенициллинрезистентных штамма (МИК 1 мкг/мл) имели устойчивость к имипенему (МИК >32 мкг/мл). Все пять штаммов другого представителя группы *C. clostridioforme* — *C. hathewayi* обладали устойчивостью к пенициллину (МИК 1—2 мкг/мл), но при этом были чувствительны к имипенему и амоксициллину/клавуланату. Все штаммы *C. clostridioforme*, *C. hathewayi*, *C. bolteae* устойчивы к ципрофлоксацину и левофлоксацину (МИК >32 мкг/мл), которые также оказались неэффективными в отношении *C. ramosum*, *C. scindens*, *C. symbiosum* и одного из двух штаммов *C. septicum*. Устойчивость к пенициллину (МИК 1 мкг/мл) наблюдалась у *C. tertium* и одного из двух штаммов *C. scindens*.

Из 26 штаммов *C. difficile*, выделенных из кала онкологических больных с диареей, только два имели промежуточную чувствительность к пенициллину (МИК 0,5 мкг/мл), остальные штаммы и два внекишечных штамма устойчивы к пенициллину (МИК 1 >32 мкг/мл). Все штаммы обладали пониженной чувствительностью или устойчивостью к имипенему. Для 12 (42,8%) штаммов МИК имипенема составляла 1—4 мкг/мл, что свидетельствует о чувствительности этих

Таблица 3

Частота выделения *Clostridium* spp. из биологического материала

<i>Clostridium</i> spp. (количество штаммов)	Биологический материал					
	кровь	желчь	брюшной дренаж	плевральный дренаж	раневое отделяемое	содержимое абсцесса
<i>C. perfringens</i> (21)	2	10	4	1	2	2
<i>C. clostridioforme</i> (6)	1		1		1	3
<i>C. hathewayi</i> (5)	1	2				2
<i>C. bifermentans</i> (3)		1	1		1	
<i>C. ramosum</i> (2)					2	
<i>C. scindens</i> (2)	1					1
<i>C. septicum</i> (2)	2					
<i>C. bolteae</i> (1)			1			
<i>C. cadaveris</i> (1)		1				
<i>C. sordelli</i> (1)		1				
<i>C. symbiosum</i> (1)			1			
<i>C. tertium</i> (1)			1			
<i>Clostridium</i> spp. (2)						2
<i>C. difficile</i> (2)				1	1	
Всего (50)	7	15	9	2	7	10

Примечание. * — отличие от значений в группе сравнения достоверно ($p < 0,01$).

Активность антимикробных препаратов в отношении видов *Clostridium*

Вид клостридий (количество штаммов)	Диапазон МИК, мкг/мл (% чувствительных штаммов)						
	Пенициллин *R > 0,5 мкг/мл	Амоксициллин R > 8 мкг/мл	Имипенем R > 8 мкг/мл	Метронидазол **R > 4 мкг/мл	Ципрофлоксацин	Левифлоксацин	Ванкомицин R > 2 мкг/мл
<i>C. perfringens</i> (21)	0,06—0,25 (100)	0,015—0,25 (100)	0,03—0,12 (100)	0,5—4,0 (100)	0,25—0,5 (100)	0,25—0,5 (100)	0,25—2,0 (100)
<i>C. clostridioforme</i> (6)	0,25—>32 (50)	0,12—>256 (83)	0,12—>32 (33)	0,015—0,06 (100)	> 32 (0)	> 32 (0)	0,5—1,0 (100)
<i>C. hathewayi</i> (5)	1—2 (0)	0,25—0,5 (100)	1—4 (100)	0,06—0,25 (100)	> 32 (0)	> 32 (0)	0,25—0,5 (100)
<i>C. bifermentans</i> (3)	0,12—0,25 (100)	0,06—0,5 (100)	0,03—0,06 (100)	0,5—1,0 (100)	2—4 (100)	2—4 (100)	0,25—1,0 (100)
<i>C. ramosum</i> (2)	0,06—0,12 (100)	0,03 (100)	0,12 (100)	1>256 (50)	> 32 (0)	> 32 (0)	2 (100)
<i>C. scindens</i> (2)	0,5—1,0 (50)	0,12—0,5 (100)	0,12 (100)	0,06—0,12 (100)	> 32 (0)	> 32 (0)	0,5 (100)
<i>C. septicum</i> (2)	0,06 (100)	0,03 (100)	0,004—0,015 (100)	0,5—1,0 (100)	0,12—32 (50)	Нет данных	0,25—0,5 (100)
<i>C. bolteae</i> (1)	0,25	0,12	0,12	0,015	> 32	> 32	0,5
<i>C. cadaveris</i> (1)	0,25	0,12	0,03	0,12	0,25	0,5	1
<i>C. sordelli</i> (1)	0,12	0,03	0,06	4	1	2	1
<i>C. symbiosum</i> (1)	0,25	0,5	0,25	0,03	>32	>32	0,25
<i>C. tertium</i> (1)	1	0,5	0,12	1	0,25	0,5	1
<i>Clostridium spp.</i> (2)	4	2	0,5	0,12	> 32	> 32	0,5
	0,06	0,03	0,25	0,12	0,25	0,25	0,5
<i>C. difficile</i> (28)	0,5 > 32 (7)	0,25—0,5 (100)	1 > 32 (43)	0,12—1 (100)	> 32 (0)	> 32 (0)	0,25—1,0 (100)

Примечание. * — резистентность (R) к антимикробным препаратам в соответствии со стандартами EUCAST; ** — для *C. difficile* резистентность к метронидазолу соответствует МИК >2 мкг/мл.

штаммов, но при этом в зоне ингибирования наблюдался рост отдельных колоний. Этот факт свидетельствует о низкой эффективности имипенема в отношении *C. difficile*. Все выделенные штаммы чувствительны к метронидазолу, амоксициллину/клавуланату и ванкомицину (см. табл. 4).

Обсуждение. Как показывают полученные результаты, основным источником возникновения инфекционных осложнений, вызванных *Clostridium spp.*, является ЖКТ (79,2%). Хирургические вмешательства и химиолучевая терапия, проводимые онкологическим больным, провоцируют транслокацию бактерий из ЖКТ в органы и ткани, что ведет к возникновению эндогенных инфекций, включая инфекции кровотока. Клостридиальная бактериемия часто ассоциируется со злокачественными новообразованиями, в частности с колоректальным раком. В нашем исследовании клостридии выделялись из семи образцов крови, что составило 14,6% от всех образцов биоматериала, не считая образцов кала.

Чувствительность к антимикробным препаратам варьирует в зависимости от вида клостридий. Большинство клостридий чувствительно к β-лактамным антибиотикам, поэтому традиционно для лечения клостридиальных инфекций, кроме *C. difficile*-ассоциированной диареи, препаратом выбора является пенициллин [3, 19]. *C. clostridioforme*, *C. ramosum*, *C. butyricum* могут продуцировать β-лактамазы [20]. Альтернативными препаратами являются метронидазол, хлорамфеникол, имипенем, комбинация β-лактамных антибиотиков с ингибиторами β-лактамаз. Данные о чувствительности различных видов клостридий к антибиотикам в литературе край-

не ограничены. Полученные результаты показывают, что из 14 видов *Clostridium*, наиболее «проблемными» являются *C. clostridioforme* и *C. difficile*. Среди штаммов *C. clostridioforme* 100% чувствительность отмечалась только в отношении метронидазола и ванкомицина, к остальным тестируемым препаратам наблюдалась устойчивость или промежуточная чувствительность. Все штаммы *C. difficile* чувствительны к метронидазолу, ванкомицину, амоксициллину/клавуланату. Более 90% штаммов устойчивы к пенициллину, 57% штаммов — к имипенему. Основной причиной возникновения *C. difficile*-ассоциированной диареи является применение антибиотиков, особенно цефалоспоринов, пенициллинов, клиндамицина, реже — макролидов, аминогликозидов, фторхинолонов, хлорамфеникола, тетрациклинов и, по некоторым данным, пиперациллина/газобактама и меропенема [21]. Практически любой антибактериальный препарат может приводить к развитию *C. difficile*-ассоциированной инфекции, что объясняется высокой степенью развития приобретенной резистентности этого возбудителя [22]. Препаратами выбора при лечении *C. difficile*-ассоциированных инфекций являются ванкомицин и метронидазол.

Для того чтобы назначать адекватную и эффективную терапию клостридиальной инфекции, необходимо достоверно идентифицировать вид выделенного возбудителя и получить антибиотикограмму, поскольку разные виды *Clostridium* значительно различаются по своей чувствительности к антимикробным препаратам.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1—13, 15—22
см. REFERENCES)

14. Дмитриева Н.В., Ключникова И.А., Шильникова И.И. Clostridium difficile-ассоциированная диарея (обзор литературы). *Сибирский онкологический журнал*. 2014; (1): 46—53.

Поступила 02.04.16

REFERENCES

1. Finegold S.M., Song Y., Liu C. Taxonomy — General comments and update on taxonomy of Clostridia and Anaerobic cocci. *Anaerobe*. 2002; 8(5): 283—5.
2. Jousimies-Somer H., Summanen P., Citron D.M., Baron E.J., Wexler H.M., Finegold S.M. *Wadsworth-KTL Anaerobic Bacteriology Manual*. 6th ed. Star Publishing, Belmont, California; 2002.
3. Stevens D.L., Aldape M.J., Bryant A.E. Life-threatening clostridial infections. *Anaerobe*. 2012; 18(2): 254—69.
4. Rechner P.M., Agger W.A., Mruz K., Cogbill T.H. Clinical features of clostridial bacteremia: a review from a rural area. *Clin. Infect. Dis*. 2001; 33: 349—53.
5. Poulou A., Manolis E.N., Markou F., Ropotos A., Georgiadis M., Tsakris A. Fatal massive hemolysis as the first manifestation of Clostridium perfringens septicemia in a patient with non-systematic or local predisposing disorder. *Anaerobe*. 2007; 13: 40—2.
6. Leal J., Gregson D.B., Ross T., Church D.L., Laupland K.B. Epidemiology of Clostridium species bacteremia in Calgary, Canada, 2000—2006. *J. Infect*. 2008; 57(3): 198—203.
7. Aldape M.J., Bryant A.E., Stevens D.L. Clostridium sordellii infection: epidemiology, clinical findings and current perspectives on diagnosis and treatment. *Clin. Infect. Dis*. 2006; 43: 1436—46.
8. Khan A., Devenport K. A reminder of the association between Clostridium septicum and colonic adenocarcinoma. *Int. Sem. Surg. Oncol*. 2006; 3: 12—4.
9. Elsayed S., Zhang K. Bacteremia caused by Clostridium symbiosum. *J. Clin. Microbiol*. 2004; 42: 4390—2.
10. Miller D.L., Brazer S., Murdoch D., Reller L.B., Corey G.R. Significance of Clostridium tertium bacteremia in neutropenic and non-neutropenic patients: review of 32 cases. *Clin. Infect. Dis*. 2001; 32: 975—8.
11. Morshed S., Malek F., Silverstein R.M., O'Donnell R.J. Clostridium cadaveris septic arthritis after total hip arthroplasty in a metastatic breast cancer patient. *J. Arthroplasty*. 2007; 22: 289—92.
12. Van der Vorm E.R., von Rosenstiel I.A., Spanjaard L., Dankert J. Gas gangrene in an immunocompromised girl due to a Clostridium ramosum infection. *Clin. Infect. Dis*. 1999; 28: 923—4.
13. Finegold S.M., Song Y., Liu C., Hecht D.W., Summanen P., Könönen E. et al. Clostridium clostridioforme: a mixture of three clinically important species. *Eur. J. Microbiol. Infect. Dis*. 2005; 24(5): 319—24.
14. Dmitrieva N.V., Klyuchnikova I.A., Shil'nikova I.I. Clostridium difficile-associated diarrhea (literature review). *Sibirskiy onkologicheskiy zhurnal*. 2014; (1): 46—53. (in Russian)
15. Freeman J., Bauer M.P., Baines S.D., Corver J., Fawley W.N., Goorhuis B. et al. The changing epidemiology of Clostridium difficile infections. *Clin. Microbiol. Rev*. 2010; 23(3): 529—49.
16. Zheng L., Citron D.M., Genheimer C.W., Sigmon S.F., Carman R.J., Lyerly D.M. et al. Molecular characterization and antimicrobial susceptibilities of extraintestinal Clostridium difficile isolates. *J. Clin. Microbiol*. 2007; 13(3—4): 114—20.
17. Libby D.B., Bearman G. Bacteremia due to Clostridium difficile — review of the literature. *Int. J. Infect. Dis*. 2009; 13: e305—9.
18. Grosse-Herrenthey A., Maier T., Gessler F., Schaumann R., B@hnel H., Kostrzewa M. et al. Challenging the problem of clostridial identification with matrix-assisted laser desorption and ionization-time-of-flight mass spectrometry. *Anaerobe*. 2008; 14: 242—9.
19. Tyrrell K.L., Citron D.M., Warren Y.A., Fernandez H.T., Merriam C.V., Goldstein E.J. In vitro activities of daptomycin, vancomycin and penicillin against Clostridium difficile, C. perfringens, Finegoldia magna and Propionibacterium acnes. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2006; 50(8): 2728—31.
20. Appelbaum P.C., Spangler S.K., Pankuch G.A., Philippon A., Jacobs M.R., Shiman R. et al. Characterization of a beta-lactamase from Clostridium clostridioforme. *J. Antimicrob. Chemother*. 1994; 33(1): 33—40.
21. Garey K.W., Dao-Tran T.K., Jiang Z.D., Price M.P., Gentry L.O., Dupont H.L. A clinical risk index for Clostridium difficile infection in hospitalized patients receiving broadspectrum antibiotics. *J. Hosp. Infect*. 2008; 70(2): 142—7.
22. Huang H., Weintraub A., Fang H., Nord C.E. Antimicrobial resistance in Clostridium difficile. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2009; 34: 516—22.

Received 02.04.16