



<https://doi.org/10.34883/PL.2022.11.3.007>
УДК 616.15+616-006]:[579.842.1/2-093/.098]-053.2



Гурбо Т.О.✉, Кондаурова С.Л.

Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии, Минск, Беларусь

Микробиологический скрининг штаммов Enterobacterales, продуцирующих карбапенемазы, у детей с онкогематологическими заболеваниями

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: концепция и дизайн исследования, сбор материала, написание текста – Гурбо Т.О.; концепция и дизайн исследования, редактирование – Кондаурова С.Л.

Подана: 03.06.2022

Принята: 05.09.2022

Контакты: tantannat@yandex.by

Резюме

Введение. Распространение штаммов микроорганизмов, обладающих устойчивостью к антибактериальным лекарственным средствам, является серьезной проблемой в лечении детей с онкогематологическими заболеваниями.

Цель. Анализ распространенности в стационаре энтеробактерий, продуцирующих карбапенемазы, у детей с онкогематологическими заболеваниями.

Материалы и методы. Микробиологический скрининг содержимого желудочно-кишечного тракта детей проводился с целью выявления носительства мультирезистентной микрофлоры. Микробиологическая идентификация энтеробактерий проводилась на основе технологии матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации с регистрацией времени пролета (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight / MALDI-TOF), а также на автоматическом анализаторе Vitek 2. Для определения типа карбапенемаз методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени использовался анализатор GeneXpert.

Результаты. Проведен анализ распространенности энтеробактерий, продуцирующих карбапенемазы, в желудочно-кишечном тракте у пациентов Республиканского научно-практического центра детской онкологии, гематологии и иммунологии за период с января 2021 г. по апрель 2022 г. Выявлено, что среди штаммов энтеробактерий, продуцирующих карбапенемазы (n=24), наибольший удельный вес имела *K. pneumoniae* (87,6%), реже встречались штаммы видов *K. oxytoca* (8,3%) и *E. cloacae* (4,1%). Изучение спектра продуцируемых карбапенемаз энтеробактерий показало, что наибольшим удельным весом обладал тип OXA-48 (50%) (класс D).

Заключение. Для назначения адекватной антибактериальной терапии инфекций, вызванных карбапенем-резистентными штаммами энтеробактерий, требуется установление механизмов формирования устойчивости как с использованием фенотипических, так и молекулярно-генетических методов исследования.

Ключевые слова: дети, скрининг, энтеробактерии, карбапенемазы, антибиотикорезистентность

Hurbo T.✉, Kondaurava S.

Republican Scientific and Practical Center of Children's Oncology, Hematology
and Immunology, Minsk, Belarus

Microbiological Screening of Carbapenemase-Producing Enterobacterales Strains in Children with Oncohematological Diseases

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: conception and design of the study, material collection, text writing – Hurbo T.; conception and design of the study, editing – Kondaurava S.

Submitted: 03.06.2022

Accepted: 05.09.2022

Contacts: tantannat@yandex.by

Abstract

Introduction. The proliferation of strains of microorganisms resistant to antibacterial drugs is a serious problem in the treatment of children with oncohematological diseases.

Purpose. The aim of our study was to analyze the prevalence of in-hospital carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in children with oncohematologic diseases.

Materials and methods. Microbiological screening of the gastrointestinal contents of children was performed to detect the carrier of multidrug-resistant microflora. Microbiological identification of Enterobacteriaceae was performed using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight / MALDI-TOF technology and a Vitek 2 automated analyzer. A GeneXpert real-time polymerase chain reaction (PCR) analyzer was used to determine the type of carbapenemases.

Results. An analysis of the prevalence of Enterobacteriaceae producing carbapenemases in the gastrointestinal tract in patients of the Republican Scientific and Practical Center of Pediatric Oncology, Hematology and Immunology for the period from January 2021 was performed. It was found that among the Enterobacteriaceae producing carbapenemases ($n = 24$), the largest proportion had *K. pneumoniae* (87.6%), less frequent were strains of *K. oxytoca* species (8.3%) and *E. cloacae* (4.1%). The study of the spectrum of Enterobacteriaceae carbapenemases produced showed that the specific gravity of OXA-48 type (50%) (class D) had the greatest share.

Conclusion. For prescription of adequate antibiotic therapy for infections caused by carbapenem-resistant strains of Enterobacteriaceae, it is necessary to determine the mechanisms of resistance formation by means of both phenotypic and molecular genetic methods.

Keywords: children, screening, enterobacteriaceae, carbapenemases, antibiotic resistance

■ ВВЕДЕНИЕ

Широкое распространение штаммов микроорганизмов, продуцирующих карбапенемазы, зачастую приводит к развитию тяжелых инфекционных заболеваний, вызванных данными микроорганизмами. Пациенты детского возраста с онкогематологической патологией наиболее подвержены развитию инфекционных осложнений



ввиду иммуносупрессивного статуса, вызванного основным заболеванием и проводимой химиотерапией. Носительство определенных штаммов энтеробактерий в желудочно-кишечном тракте таких пациентов может стать причиной транслокации данных микроорганизмов в системный кровоток, вызвав инфекцию, которая очень тяжело поддается терапии. В настоящее время диагностические подходы к возбудителям инфекционных болезней не ограничиваются только определением чувствительности выделенных штаммов энтеробактерий к карбапенемам. Для назначения эффективной этиотропной антибактериальной терапии при лечении тяжелых инфекций, вызванных полирезистентными микроорганизмами, необходимо иметь информацию о наличии и типах карбапенемаз, продуцируемых грамотрицательными микроорганизмами, в каждом конкретном случае [1]. Карбапенемазы – ферменты грамотрицательных микроорганизмов, которые гидролизуют бета-лактамы антибиотиков: пенициллины, цефалоспорины, монобактамы, карбапенемы. Продуценты карбапенемаз среди бактерий семейства Enterobacteriaceae отличаются от других бактерий с множественной лекарственной устойчивостью тем, что они чувствительны к небольшому количеству антибактериальных средств [2]. Наличие металлобета-лактамаз у микроорганизмов, вызвавших заболевание, обуславливает применение врачами определенных схем антибактериальной терапии, включая комбинированную, с целью эффективной терапии тяжелых инфекционных осложнений у пациентов.

Структурная классификация β -лактамаз учитывает первичную аминокислотную структуру ферментов и пространственную структуру активного центра. Функциональная классификация основана на субстратной специфичности ферментов (способности к преимущественному гидролизу β -лактамов определенных групп – пенициллинов, цефалоспоринов, монобактамов, карбапенемов). По структуре первичной аминокислотной последовательности β -лактамазы разделяют на четыре молекулярных класса – А, В, С и D [3]. Ферменты классов А, С и D являются гидролазами серинового типа, ферменты класса В – металлосодержащими гидролазами, в активном центре которых содержатся один или два атома цинка. Способностью гидролизовать карбапенемы обладают отдельные представители разных молекулярных классов β -лактамаз [4], однако наиболее распространенными и клинически важными в настоящее время являются сериновые карбапенемазы КРС (молекулярный класс А), металло- β -лактамазы – МБЛ (молекулярный класс В) и отдельные сериновые карбапенемазы ОХА (молекулярный класс D) подгруппы ОХА-23, ОХА-40, ОХА-51, ОХА-58 [5].

Микробиологический скрининг – это проведение исследований в группах пациентов с целью выборочного выделения целевых видов микробов из огромного сообщества микробов. Задачей скрининга является обнаружение возможного возбудителя до развития инфекционного осложнения.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ распространенности энтеробактерий, продуцирующих карбапенемазы, среди пребывающих на лечении в стационаре детей с онкогематологическими заболеваниями.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Микробиологический скрининг содержимого желудочно-кишечного тракта пациентов государственного учреждения «Республиканский научно-практический

центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» (далее – Центр) проводился путем исследования кала, взятого в контейнер для биологического материала (организация-производитель «Литопласт-МЕД», Республика Беларусь). Материал исследовался группой бактериологии отделения инфекционного контроля Центра. Скрининг АБ-резистентности проводился по двум методам: скринингового выделения энтеробактерий, устойчивых к цефепиму и меропенему. Микробиологический скрининг желудочно-кишечного тракта пациентов на предмет носительства ими мультирезистентной микрофлоры проводился по схеме: первичным пациентам – однократно в течение 72 часов после госпитализации; повторно поступающим пациентам – после межкурсовых промежутков длительностью более 3 месяцев – однократно в течение 72 часов после госпитализации; поступающим переводом из других стационаров – однократно в течение 72 часов после госпитализации; бессимптомным пациентам в период предполагаемой длительной нейтропении (более 7 сут.) – еженедельно в течение всего периода нейтропении; носителям карбапенем-резистентных штаммов энтеробактерий *P. aeruginosa*, *A. baumannii* – еженедельно до получения 2 отрицательных результатов; пациентам отделения анестезиологии и реанимации и отделения трансплантации (ОТ) – еженедельно при нахождении в отделении более 7 суток; лихорадящим пациентам с неустановленным очагом возможной инфекции – однократно в течение 48 часов после появления лихорадки.

Штаммы энтеробактерий, выделенные от пациентов, резистентные к меропенему, исследовались еще и на наличие карбапенемаз. При исследовании использовался тест Cepheid Xpert Carba-R, выполняемый на системе GeneXpert, который представляет собой качественный *in vitro* диагностический тест для быстрого обнаружения и дифференциации нуклеотидных последовательностей генов ^{bla}NDM, ^{bla}VIM, ^{bla}OXA-48, ^{bla}IPM-1, связанных с нечувствительностью к карбапенемам, у грамотрицательных бактерий в образцах, полученных путем ректального соскоба от пациентов, подверженных риску колонизации кишечника бактериями, нечувствительными к карбапенемам. Одновременно выполнялся посев биологического материала с целью выделения микроорганизмов для эпидемиологического типирования, определения чувствительности к антимикробным препаратам и дальнейшей подтверждающей идентификации бактерий, нечувствительных к карбапенемам. Затем культуру, нечувствительную к карбапенемам, инкубированную 24-часа в термостате, смешивали с реактивом и перемешивали содержимое флакона на вихревой мешалке в течение 10 секунд на высокой скорости, после чего переносили 1,7 мл полученного реактива в камеру для пробы картриджа Xpert Carba-R. Подготовленный картридж загружали в прибор GeneXpert не позднее 30 минут после внесения пробы. По окончании исследования в аппарате получали результаты теста Xpert Carba-R Assay и осуществляли интерпретацию результатов исследования.

Микробиологическая идентификация энтеробактерий проводилась на основе технологии матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации с регистрацией времени пролета (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight / MALDI-TOF), а также на автоматическом анализаторе Vitek 2 (BioMerieux, Франция). Оценка чувствительности анализируемых штаммов к антибактериальным лекарственным средствам производилась на автоматическом анализаторе Phoenix M50 (Becton Dickinson, США). Полученные цифры минимальных ингибирующих концентраций (МИК) оценивались с использованием системы экспертных правил



Европейского комитета по тестированию антимикробной чувствительности – EUCAST. Для определения типа карбапенемаз методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени использовался анализатор GeneXpert (Cepheid, США).

■ РЕЗУЛЬТАТЫ

За период с января 2021 г. по апрель 2022 г. из клинического материала (кал) пациентов Центра было выделено 24 штамма полирезистентных энтеробактерий – продуцентов карбапенемаз. Среди энтеробактерий, продуцирующих карбапенемазы, наибольший удельный вес имел вид *K. pneumoniae* (87,6% от общего количества), *K. oxytoca* (8,3%), *E. cloacae* (4,1%). Среди выявленных карбапенемаз наиболее часто встречался тип OXA-48 (класс D) – 50%, KPC (класс A) – 4,2%, NDM (класс D) – 33,2%, VIM (класс B) – 4,2%; сочетание NDM и OXA-48 встречалось в 4,2% случаев, сочетание VIM и KPS – в 4,2%. Штаммов, содержащих более 2 типов карбапенемаз, выявлено не было. Результаты исследования штаммов энтеробактерий, продуцирующих карбапенемазы, представлены в таблице.

Результаты исследования штаммов энтеробактерий, продуцирующих карбапенемазы, n=24
Results of the study of strains of Enterobacteriaceae producing carbapenemases, n=24

Штамм	Пациент	Тип карбапенемазы	МИК МЕМ*	Чувствительность к CEF/AVI**	Год
<i>K. pneumoniae</i>	1	KPS	>8	–	2021
<i>K. pneumoniae</i>	2	NDM	≥16	–	2021
<i>K. pneumoniae</i>	3	OXA-48	≥16	–	2021
<i>K. pneumoniae</i>	4	OXA-48	>8	S***	2021
<i>K. pneumoniae</i>	5	OXA-48	>8	S	2021
<i>K. pneumoniae</i>	6	OXA-48	–	S	2021
<i>K. pneumoniae</i>	7	OXA-48	>8	S	2021
<i>K. pneumoniae</i>	8	NDM, OXA-48	>8	R***	2021
<i>K. pneumoniae</i>	9	OXA-48	>8	S	2021
<i>K. pneumoniae</i>	10	OXA-48	>8	S	2021
<i>K. pneumoniae</i>	11	NDM	≥16	R	2021
<i>K. pneumoniae</i>	12	OXA-48	≥16	S	2022
<i>K. pneumoniae</i>	13	NDM	>8	R	2022
<i>K. pneumoniae</i>	14	NDM	>8	R	2022
<i>K. pneumoniae</i>	15	OXA-48	>8	S	2022
<i>K. pneumoniae</i>	16	NDM	>8	R	2022
<i>K. pneumoniae</i>	17	NDM	>8	R	2022
<i>K. pneumoniae</i>	18	OXA-48	>8	S	2022
<i>K. pneumoniae</i>	19	OXA-48	>8	S	2022
<i>K. pneumoniae</i>	20	NDM	>8	R	2022
<i>K. pneumoniae</i>	21	NDM	>8	R	2022
<i>K. oxytoca</i>	22	VIM, KPS	>8	R	2021
<i>K. oxytoca</i>	23	VIM	8	R	2021
<i>E. cloacae</i>	24	OXA-48	>8	S	2022

Примечания: * МЕМ – меропенем; ** CEF/AVI – цефтазидим/авибактам; *** S/R – чувствительность/резистентность.

Штаммы, продуцирующие металlobеталактамазы, демонстрировали устойчивость к цефтазидиму/авибактаму и высокие значения минимальных ингибирующих концентраций меропенема.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ распространенности энтеробактерий, продуцирующих карбапенемазы, у детей с онкогематологическими заболеваниями в Республиканском научно-практическом центре детской онкологии, гематологии и иммунологии показал, что среди энтеробактерий, продуцирующих карбапенемазы (n=24), наибольший удельный вес имеет *K. pneumoniae* (87,6%), реже встречаются штаммы видов *K. oxytoca* (8,3%) и *E. cloacae* (4,1%). Среди карбапенемаз разных типов преобладает OXA-48 (50%), которая согласно современной молекулярной классификации относится к классу D.

Для разработки алгоритмов назначения эмпирической антибактериальной терапии инфекций, вызванных карбапенем-резистентными штаммами энтеробактерий, необходимо располагать сведениями о механизмах формирования устойчивости основных нозокомиальных патогенов к карбапенемам и другим антибактериальным лекарственным средствам как с помощью фенотипических, так и молекулярно-генетических методов.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Timofeeva O.G., Polikarpova S.V. Local microbiological monitoring of carbapenemases-producing Enterobacterales. *Laboratory Service*. 2019;8(3):14-19. (in Russian)
2. Falagas M.E., Karageorgopoulos D.E., Nordmann P. Therapeutic options with Enterobacteriaceae producing carbapenem-hydrolyzing enzymes. *Future Microbiol.* 2011; 6:653–6. 10.2217/fmb.11.49.
3. Bush K., Jacoby G.A., Medeiros A.A. A functional classification scheme for betalactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1995;39:1211–1233b.
4. Queenan A.M., Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 2007;20:440–458.
5. Tapalski D.V., Osipov V.A., Zhavoronok S.V. Carbapenemases of gramnegative pathogens: spread and methods of detection. *Medicinskij zhurnal*. 2012;2:10–15. (in Russian)