

16. EUCAST Clinical Breakpoint Table v. 5.0 (2015). Available at: [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/v\\_5.0\\_Breakpoint\\_Table\\_01.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_5.0_Breakpoint_Table_01.pdf)

Поступила 20.04.15

## REFERENCES

- Bozhkova S.A., Razorenov V.L., Petrova T.M. Mikrobiologicheskii monitoring – osnova ratsional'noy strategii i taktiki antibakterial'noy terapii infektsii kostey i protezirovannykh sustavov. *Tol'yatinskii meditsinskiy konsilium*. 2011; (3-4): 33–42. (in Russian)
- Rozova L.V., Godovykh N.V. Sravnitel'naya kharakteristika vidovogo sostava mikroorganizmov pri khronicheskom posttraumaticheskom i gematogenom osteomyelite. *Geniy Ortopedii*. 2014; (2): 56–9. (in Russian)
- Shapoval S.D., Savon I.L., Yakunich A.N., Maksimova O.O. Rezistentnye i polirezistentnye vozbuditeli gnoyno-nekroticheskikh oslozhneniy sindroma diabeticheskoy stopy. *Novosti khirurgii*. 2015; 23 (1): 70–6. (in Russian)
- Bozhkova S.A., Tikhilov R.M., Krasnova M.V., Rukina A.N., Tishina V.V., Polyakova E.M. i dr. Profil' rezistentnosti vozbuditeley kak osnova vybora effektivnogo antibiotika pri stafilokokkovykh infektsiyakh protezirovannykh sustavov. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2013; 15 (2): 115–23. (in Russian)
- Schmitz F.J., Fluit A.C., Gondolf M., Beyrau R, Lindenlauf E., Verhoef J. et al. The prevalence of aminoglycoside resistance and corresponding resistance genes in clinical isolates of staphylococci from 19 European hospitals. *J. Antimicrob. Chemother.* 1999; 43(2): 253–9.
- Privol'nev V.V., Rodin A.V., Karakulina E.V. Mestnoe primeneniye antibiotikov v lechenii infektsiy kostnoy tkani. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2012; 14 (2): 118–31. (in Russian)
- Duffy R.K., Shafritz A.B. Bone cement. *J. Hand. Surg. Am.* 2011; 36(6): 1086–8.
- Jiranek W.A., Hanssen A.D., Greenwald A.S. Antibiotic-loaded bone cement for infection prophylaxis in total joint replacement. *J. Bone Joint. Surg. Am.* 2006; 88(11): 2487–500.
- Strachunskiy L.S., Belousov Yu.B., Kozlov S.N. *Prakticheskoe rukovodstvo po antiinfektsionnoy khimioterapii*. Moscow: Borges; 2002. (in Russian)
- Fomina I.P. Sovremennyye aminoglikozidy. Znachenie v infektsionnoy patologii, osobennosti deystviya. *Rossiyskiy Meditsinskiy Zhurnal*. 1997; 5 (21): 1382–91. (in Russian)
- Yıldız Ö., Çoban A., Şener A., Coşkuner S., Bayramoğlu G., Güdücüoğlu H. et al. Antimicrobial susceptibility and resistance mechanisms of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from 12 Hospitals in Turkey. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2014; 13 (1): 44.
- Polyzou A., Slavakis A., Pourmaras S., Maniatis A.N., Sofianou D., Tsakris A. Predominance of methicillin-resistant staphylococcus aureus clone susceptible to erythromycin and several other non-β-lactam antibiotics in a Greek hospital. *J. Antimicrob. Chemother.* 2001; 48 (2): 231–4.
- Ida T., Okamoto R., Shimauchi C., Okubo T., Kuga A., Inoue M. Identification of Aminoglycoside-Modifying Enzymes by Susceptibility Testing: Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39 (9): 3115–21.
- Hauschild T., Sacha P., Wiczorek P., Zalewska M., Kaczyńska K., Tryniszewska E. Aminoglycosides resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from a University Hospital in Bialystok, Poland. *Folia Histochem. Cytobiol.* 2008; 46 (2): 225–8.
- Metodicheskie ukazaniya po opredeleniyu chuvstvitel'nosti mikroorganizmov k antibakterial'nym preparatam, MUK 4.2.1980-04 Minzdrava Rossii, 2004. (in Russian)
- EUCAST Clinical Breakpoint Table v. 5.0 (2015). Available at: [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/v\\_5.0\\_Breakpoint\\_Table\\_01.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_5.0_Breakpoint_Table_01.pdf)

Received 20.04.15

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 616.155.392:579.842.11.083

Коробова А.Г., Фролова И.Н., Клясова Г.А.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СЕЛЕКТИВНОЙ ХРОМОГЕННОЙ СРЕДЫ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ С ПРОДУКЦИЕЙ БЕТА-ЛАКТАМАЗ

ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава Российской Федерации, 125167, г. Москва

Изучали детекцию энтеробактерий с продукцией бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС) на селективной хромогенной среде и сравнивали результаты детекции БЛРС с методом «двойных дисков». Мазки со слизистой ротоглотки и прямой кишки от больных исследовали параллельно на плотных питательных средах (Эндо или Мак-Конки) и на селективной среде CHROMagar™ESBL (CHROMagar, Франция). Продукцию БЛРС среди энтеробактерий подтверждали методом «двойных дисков». Для исключения гиперпродукции *atpC* бета-лактамаз использовали E-тест, содержащий цефотетан и цефотетан с клоксациллином. При исследовании 1552 образцов от больных было выделено 1243 штамма энтеробактерий на агаре Эндо или Мак-Конки и 409 штаммов энтеробактерий на селективной среде CHROMagar™ESBL (*Escherichia coli* n=226, *Klebsiella pneumoniae* n = 105, *Enterobacter spp.* n = 35, *Citrobacter spp.* n=21, другие n= 22). Методом «двойных дисков» была подтверждена продукция БЛРС у 386 (94%) из 409 штаммов, выделенных на среде CHROMagar™ESBL. У 23 (6%) штаммов подтверждения не было, из них у 15 была выявлена гиперпродукция *atpC* бета-лактамаз, а 8 были чувствительны к цефалоспорином III поколения. Все энтеробактерии, выделенные на агаре Эндо или Мак-Конки, также тестировали методом «двойных дисков». Всего было получено 394 штамма энтеробактерий с продукцией БЛРС, из них на обеих средах (агар Эндо/Мак-Конки и CHROMagar™ESBL) – 263 (67%) штамма, только на среде CHROMagar™ESBL – 123 (31%), только на среде Эндо/Мак-Конки – 8 (2%); p < 0,0001. Чувствительность селективной среды CHROMagar™ESBL составила 98%, специфичность – 97%. Заключение об обнаружении энтеробактерий, продуцирующих БЛРС, представляли в клинику через 18–24 ч после поступления образцов от больных в лабораторию. CHROMagar™ESBL имеет высокую чувствительность и специфичность для выявления энтеробактерий с продукцией БЛРС и может быть использован в рутинной лабораторной практике.

Ключевые слова: хромогенные селективные среды; бета-лактамазы расширенного спектра; БЛРС; энтеробактерии; антибиотикорезистентность.

Для цитирования: Клиническая лабораторная диагностика. 2015; 60(11): 53–57.

Для корреспонденции: Коробова Анна Геннадьевна, amalofeeva@yandex.ru

For correspondence: Korobova A.G., amalofeeva@yandex.ru

Korobova A.G., Frolova I.N., Kliasova G.A.

THE APPLICATION OF SELECTIVE CHROMOGENIC AGAR FOR DETECTING ENTEROBACTERIA WITH PRODUCTION OF BETA-LACTAMASES

The hematological research center of Minzdrav of Russia, 125167 Moscow, Russia

The detection of enterobacteria with production of beta-lactamases of extended spectrum in selective chromogenic agar was analyzed. The results of detection of beta-lactamases of extended spectrum was compared with "double disc" technique. The smears from mucous membrane of guttur and rectum from patients were analyzed in parallel on solid growth agar (Endo or Mac Conkey) and on selective agar CHROMagar™ ESBL (CHROMagar, France). The production of beta-lactamases of extended spectrum was confirmed using "double discs" technique. To exclude hyper-production of ampC beta-lactamases E-test was applied containing cefotetan and cefotetan with cloxacillin. The sampling consisted of 1552 samples from patients. The study permitted to isolate 1243 strains of enterobacteria on agar Endo or Mac Conkey and 409 strains of enterobacteria on selective agar CHROMagar™ ESBL (*Escherichia coli* n=226, *Klebsiella pneumoniae* n=105, *enterobacter spp.* n=35, *Citrobacter spp.* n=21, others n=22). The application of "double discs" technique confirmed production of beta-lactamases of extended spectrum in 386 (94%) out of 409 strains isolated on agar CHROMagar™ ESBL. In 23 (6%) of strains no confirmation was established and hyper-production of ampC of beta-lactamases was established 15 out of total. Additionally, 8 were sensitive to cephalosporin of third generation. All enterobacteria isolated on agar Endo or Mac Conkey also were tested by "double discs" technique. Overall, 394 strains of enterobacteria with production of beta-lactamases of extended spectrum were obtained. On all agars (agar Endo or Mac Conkey and CHROMagar™ ESBL) - 263 (67%) strains; only on CHROMagar™ ESBL - 123 (31%) and only on agar Endo or Mac Conkey - 8 (2%) ( $p < 0.0001$ ). The sensitivity of selective agar CHROMagar™ ESBL made up to 98% and specificity - 97%. The resolution about detection of enterobacteria producing beta-lactamases of extended spectrum were submitted to clinic in 18-24 hours after arrival of samples from patients in laboratory. The CHROMagar™ ESBL has higher sensitivity and specificity to detect enterobacteria with production of beta-lactamases of extended spectrum and can be applied in common laboratory practice.

Key words: chromogenic selective agar; beta-lactamases of extended spectrum; enterobacteria; antibiotics resistance

Citation: *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2015; 60 (11): 53–57. (in Russ.)

**Введение.** Впервые продукция бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС) у энтеробактерий была обнаружена в начале 80-х годов XX века в Европе. Первый клинический штамм, продуцирующий БЛРС, был выделен в 1982 г. в Англии [1]. Этот штамм *Klebsiella oxytoca* выделили из крови и спинномозговой жидкости у ребенка, находившегося в отделении реанимации для новорожденных в госпитале г. Ливерпуля. В 1983 г. в университетской клинике во Франкфурте были выделены еще три штамма *Klebsiella pneumoniae* и один – *Serratia marcescens* с продукцией БЛРС [2].

Сообщения о выделении первых штаммов энтеробактерий с продукцией БЛРС в России относятся к 90-м годам XX века. В 1996 г. в Санкт-Петербурге были выделены штаммы *Salmonella typhimorium* с продукцией БЛРС, относящиеся к типу СТХ-М, из образцов кала у четырех членов одной семьи при гастроэнтерите [3]. В тот же период (1997–1998) в первых многоцентровых исследованиях (программа "Micromax"), посвященных этой проблеме, было показано, что в отделениях реанимации и интенсивной терапии ряда учреждений распространение БЛРС среди *Escherichia coli* приближалось к 50%, а среди *Klebsiella spp.* превышало 90% [4]. По результатам другого многоцентрового исследования ROSNET, в котором провели сравнение двух периодов с 2002 по 2004 г. и с 2006 по 2007 г. по детекции БЛРС у нозокомиальных штаммов энтеробактерий, полученных из 36 различных стационаров России, было отмечено увеличение их продукции для всех штаммов энтеробактерий с 52,3 до 69,3% [5]. При этом у штаммов *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 сепсиса, выделенных из гемокультуры у 478 больных с опухолями системы крови, находившихся на стационарном лечении в гематологических отделениях семи лечебных учреждений пяти городов России с 2003 по 2005 г. [6]. Среди грамотрицательных бактерий чаще выделяли микроорганизмы, относящиеся к семейству *Enterobacteriaceae* (32,4%), из них с продукцией БЛРС было 36%. Продукция БЛРС определялась у 62% штаммов *K. pneumoniae* и у 36% – *E. coli*.

В настоящее время энтеробактерии с продукцией БЛРС широко распространены во всем мире. В 2014 г. был опубликован отчет Всемирной организации здравоохранения о состоянии устойчивости госпитальных и внебольничных штаммов бактерий к антибиотикам, включающий результаты исследований из 129 стран мира [7]. Во многих странах частота об-

наружения 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 США (до 23%).

Чаще всего продукция БЛРС наблюдается у штаммов *K. pneumoniae* и *E. coli*, реже – у других видов семейства *Enterobacteriaceae* и неферментирующих грамотрицательных бактерий [8–10]. Продукция БЛРС является основной причиной резистентности энтеробактерий ко многим антимикробным препаратам, включая цефалоспорины III–IV поколения. В отношении этих возбудителей активность проявляет ограниченное число антибиотиков – это препараты из группы карбапенемов и тигециклин. Инфекционные осложнения, вызванные энтеробактериями с продукцией БЛРС, характеризуются тяжелым течением, высокой летальностью и увеличением финансовых затрат на лечение. Одна из причин высокой летальности – неадекватная противомикробная терапия. В этой связи крайне важным является определение продукции БЛРС у энтеробактерий и предоставление результатов в клинические отделения в максимально короткие сроки.

Согласно российским и международным рекомендациям, детекция БЛРС в лабораторной практике может быть проведена стандартными фенотипическими методами, которые основаны на эффекте подавления активности этих ферментов в присутствии клавулановой кислоты и включают метод комбинированных дисков, «двойных дисков», серийных разведений в бульоне [10–13]. Метод «двойных дисков» используют в лабораторной практике чаще других методов, поскольку он прост в исполнении и характеризуется высокой чувствительностью и специфичностью [11]. 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 клинику только через 48–72 ч после доставки клинического образца от больного в лабораторию. В последнее время созданы коммерческие селективные среды для детекции БЛРС, которые содержат специальные добавки, подавляющие рост дрожжевых грибов, грамположительных микроорганизмов и энтеробактерий без продукции БЛРС. Перечень таких селективных сред достаточно широк – это CHROMagar™ ESBL (CHROMagar, Франция), ChromID ESBL (BioMérieux, Франция), Brilliance ESBL (Oxoid, Великобритания), BLSE agar (AES Chemunex, Фран-

Таблица 1

## Спектр микроорганизмов, выделенных на селективной среде CHROMagar™ESBL

| Микроорганизм                     | Количество |
|-----------------------------------|------------|
| <i>E. coli</i>                    | 226 (55)   |
| <i>K. pneumoniae</i>              | 105 (26)   |
| <i>Enterobacter spp.</i>          | 35 (8,5)   |
| <i>Citrobacter spp.</i>           | 21 (5)     |
| <i>K. oxytoca</i>                 | 12 (3)     |
| <i>P. mirabilis</i>               | 4 (1)      |
| <i>Raoultella ornithinolytica</i> | 3 (0,7)    |
| <i>P. vulgaris</i>                | 2 (0,5)    |
| <i>Morganella morganii</i>        | 1 (0,3)    |
| В с е г о...                      | 409        |

Примечание. Здесь и в табл. 2 в скобках процент.

ция) и др. Необходимо отметить, что такие среды предназначены для исследования первичного клинического материала от пациентов и при их использовании заключение о продукции БЛРС энтеробактериями может быть выдано уже через 18–24 ч с момента поступления образцов в лабораторию.

Цель нашего исследования – изучить выявление энтеробактерий с продукцией БЛРС на селективной среде CHROMagar™ESBL и сравнить полученные результаты по детекции БЛРС с методом «двойных дисков».

**Материалы и методы.** Исследование было проведено в ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России с апреля по декабрь 2013 г. и включало изучение 1552 образцов, взятых со слизистой ротоглотки и прямой кишки у больных с первичными острыми миелоидными лейкозами и лимфомами, находившихся на лечении в клинических отделениях центра. Образцы, полученные от больных, исследовали одновременно на плотных питательных средах для выявления грамотрицательных бактерий (МакКонки или Эндо) и на хромогенной селективной среде CHROMagar™ESBL (CHROMagar, Франция), предназначенной для прямого выделения энтеробактерий с продукцией БЛРС. Образцы от больных помещали на агары (МакКонки или Эндо и CHROMagar™ESBL) и инкубировали в термостате при температуре 36°C в течение 18–24 ч. При получении культуры микроорганизмов проводили их идентификацию методом времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF-MS) на анализаторе Microflex (Bruker Daltonics, Германия). Для этого

Таблица 2

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

| Микроорганизм             | CHROMagar™ESBL | Метод «двойных дисков» |
|---------------------------|----------------|------------------------|
| <i>E. coli</i>            | 226            | 222 (98)               |
| <i>K. pneumoniae</i>      | 105            | 105 (100)              |
| <i>Enterobacter spp.</i>  | 35             | 24 (69)                |
| <i>Citrobacter spp.</i>   | 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. morganii</i>        | 1              | 0                      |
| В с е г о...              | 409            | 386 (94)               |

использовали изолированные колонии, полученные на плотных питательных средах. Ионизацию бактериальных белков осуществляли с помощью матрицы  $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричной кислоты и раствора, содержащего 50% ацетонитрила и 2,5% трифторуксусной кислоты. Идентификацию проводили в автоматическом режиме с использованием программы MALDI Biotyper RTC версии 3.0 (Bruker Daltonics, Германия). Результат учитывали по коэффициенту видовой идентификации. Достоверными считали результаты, если коэффициент совпадения (score) имел значение от 2 и выше.

Параллельно у всех энтеробактерий детекцию БЛРС проводили методом «двойных дисков» согласно методическим рекомендациям МУК 4.21890–04 [11]. Для исследования использовали диски с цефалоспорином III поколения – цефотаксимом (30 мкг), цефтазидимом (30 мкг), цефтриаксоном (30 мкг) (Oxoid, Великобритания) и амоксициллином с клавулановой кислотой (20/10 мкг) (Becton, Dickinson, США). Продукция БЛРС выявляется по наличию расширенной зоны подавления роста вокруг диска с каким-либо цефалоспорином III поколения напротив диска, содержащего клавулановую кислоту.

Для исключения продукции *ampC* бета-лактамаз проводили дополнительные исследования. Определяли чувствительность к цефепиму (цефалоспорины IV поколения). Если продукция БЛРС у энтеробактерий не определена методом «двойных дисков», а выделенный изолят имел устойчивость хотя бы к одному из цефалоспоринов III поколения и был чувствителен к цефепиму, то дополнительно исследовали чувствительность к цефокситину. Энтеробактерии, устойчивые к цефокситину и чувствительные к цефепиму, рассценивали как возможно имеющие гиперпродукцию *ampC* бета-лактамаз и проводили с ними дополнительное исследование с использованием E-тестов для детекции *ampC*, содержащих цефотетан и цефотетан с клоксациллином (CN/CNI, BioMerieux, Франция) [12].

**Результаты и обсуждение.** При исследовании 1552 образцов от больных было выделено 1243 штамма энтеробактерий на агаре Эндо или Мак-Конки и 409 штаммов энтеробактерий на селективной хромогенной среде для детекции БЛРС. В табл. 1 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 других видов энтеробактерий составила 5,5%.

Методом «двойных дисков» была подтверждена продукция БЛРС у 386 (94%) из 409 энтеробактерий, полученных на селективной хромогенной среде (табл. 2). Полное совпадение результатов детекции энтеробактерий с продукцией БЛРС на среде CHROMagar™ESBL и методом «двойных дисков» было получено для штаммов *K. pneumoniae* ( $n = 105$ ), *P. mirabilis* ( $n = 4$ ) и *R. ornithinolytica* ( $n = 3$ ), для штаммов *E. coli* этот показатель составил 98%. Для таких энтеробактерий, как *Enterobacter spp.*, *Citrobacter spp.*, *K. oxytoca*, *P. vulgaris*, *M. morganii*, процент совпадений был ниже (от 69 до 86).

Продукция БЛРС не подтверждена у 23 (6%) из 409 штаммов 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 штаммов 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* бета-лактамаз была выявлена у 15 (65%) из 23 исследованных штаммов, в число которых вошли все штаммы *Enterobacter spp.* ( $n = 11$ ), один *E. coli*, два *Citrobacter spp.* и один *M. morganii*.

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

Таблица 3

**Чувствительность и специфичность среды CHROMagar™ESBL по детекции энтеробактерий с продукцией БЛРС**

| Микроорганизм  |       | Чувствительность, % | Специфичность, % | Ложноположительные штаммы | Ложноотрицательные штаммы |
|--|-------|---------------------|------------------|---------------------------|---------------------------|
| вид  | число |                     |                  |                           |                           |
| <i>E. coli</i>   | 222   | 99                  | 99               | 4                         | 3                         |
| <i>K. pneumoniae</i>   | 105   | 96                  | 100              | 0                         | 4                         |
| <i>Enterobacter</i> spp.,<br><i>Citrobacter</i> spp.,<br><i>M. morgani</i> ,<br><i>S. marcescens</i> | 42    | 96                  | 93               | 15                        | 1                         |
| Всего...   | 386   | 98                  | 97               | 25                        | 8                         |

Таким образом, совпадение результатов детекции энтеробактерий с продукцией БЛРС на селективной хромогенной среде и полученных методом «двойных дисков» было достигнуто для 386 (94%) изученных штаммов. При дополнительном исследовании 23 (6%) штаммов, выделенных на селективной среде и не подтвержденных методом «двойных дисков», оказалось, что у 15 (4%) из них была продукция ampC бета-лактамаз, а 8 (2%) изолятов были чувствительны к цефалоспорином III и IV поколения.

Гиперпродукция хромосомных ampC бета-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 другими исследователями. В исследовании P. Lagace-Weins и соавт. [15] проверяли детекцию БЛРС на селективной среде у изолятов *E. coli* ( $n = 213$ ) и *K. pneumoniae* ( $n = 17$ ) с генетическими подтвержденными механизмами резистентности. Среди исследуемых изолятов у 91 штамма *E. coli* была экспрессия AmpC, а у 8 штаммов *E. coli* – коэкспрессия AmpC и БЛРС. На селективной среде, предназначенной для детекции БЛРС, был получен рост 10 (11%) из 91 штамма *E. coli* с экспрессией AmpC и 7 (88%) из 8 штаммов *E. coli* с коэкспрессией AmpC и БЛРС. В другом исследовании минимальное количество ложноположительных результатов, связанных с выявлением энтеробактерий с гиперпродукцией ampC бета-лактамаз, отмечалось на селективной среде CHROMagarCTX, предназначенной для выявления энтеробактерий с продукцией CTX-M и подавления роста микроорганизмов с гиперпродукцией хромосомных ampC бета-лактамаз. Однако на этой среде зачастую не удавалось определить энтеробактерии, продуцирующие БЛРС других генетических типов (TEM, SHV и др.) [16].

Все энтеробактерии, выделенные на агаре Эндо или Мак-Конки, нами были протестированы также методом «двойных дисков». У 271 (22%) из 1243 штаммов энтеробактерий, полученных на этих плотных средах, была подтверждена продукция БЛРС. При этом на агаре Эндо или Мак-Конки было выделено 8 штаммов, которые не 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 штаммов была подтверждена методом «двойных дисков» и при повторной инкубации чистой культуры микроорганизмов на селективной хромогенной среде. Таким образом, всего было получено 394 штамма энтеробактерий с продукцией БЛРС, из них на обеих плотных средах (агар Эндо /Мак-Конки и селективный CHROMagar™ESBL) – 263 (67%) штамма, только на селективной среде CHROMagar™ESBL – 123 (31%), только на среде Эндо/МакКонки – 8 (2%), OR = 21,9;  $p < 0,0001$ .

Всего 8 (2%) из 394 штаммов энтеробактерий, продуцирующих БЛРС, не обнаружены на селективной среде при выделе-

нии их на агаре Эндо или Мак-Конки. Такой результат можно объяснить недостаточной микробной нагрузкой в исследуемом образце. В исследовании M. Hornsey и соавт. [17] продемонстрировано влияние инокулюма энтеробактерий, продуцирующих БЛРС, на способность обнаружения их на селективной среде CHROMagar™ESBL. Только 4 из 9 исследованных штаммов были выделены на селективной среде при микробной нагрузке менее 100 КОЕ/мл. При исследовании клинических образцов от больных на селективной среде исходная микробная нагрузка неизвестна и можно предположить, что ложноотрицательные результаты являются отражением низкого содержания микроорганизмов в исследуемом образце.

По результатам нашего исследования чувствительность селективной хромогенной среды для детекции БЛРС у всех видов энтеробактерий составила 98%, специфичность – 97% (табл. 3). Высокая чувствительность и специфичность отмечена для штаммов *E. coli* (99%), несколько ниже была чувствительность для *K. pneumoniae* (96%). Для штаммов *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *M. morgani* и *Serratia marcescens* чувствительность составила 98%, специфичность – 93%.

Другими исследователями были получены аналогичные результаты. Так, при детекции 230 штаммов *E. coli* с известным генотипом резистентности на среде CHROMagar™ESBL чувствительность составила 99,2%, специфичность – 89% [15]. В исследовании [18] 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%. При исследовании клинических образцов на разных селективных хромогенных средах чувствительность и специфичность составляла для ChromID ESBL 88–100 и 90–96%, для CHROMagar™ESBL 100 и 93%, для Brilliance ESBL 94,9 и 95,7% [19]. Таким образом, по результатам ряда исследований была отмечена высокая чувствительность и специфичность хромогенных сред по детекции БЛРС для штаммов *E. coli* и *K. pneumoniae* и несколько ниже для штаммов *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Morganella* spp., *Serratia* spp.

**Заключение.** В проведенном исследовании показана высокая чувствительность (98%) и специфичность (97%) селективной среды CHROMagar™ESBL для детекции БЛРС у энтеробактерий, что доказывает возможность использования этого агара для скрининга БЛРС у энтеробактерий в рутинной лабораторной практике. Максимальные чувствительность и специфичность были определены для штаммов *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 Мак-Конки (98% против 69%;  $p < 0,0001$ ). Другой положительный момент – сокращение времени исследования на сутки, следовательно результаты в клинику передавались существенно раньше. Установлено, что на селективной среде могут быть выделены энтеробактерии с гиперпродукцией ampC бета-лактамаз (4%), которые также обладают устойчивостью к цефалоспорином III поколения. Только 2% штаммов, выделенных на селективной среде CHROMagar™ESBL, были чувствительны к цефалоспорином III поколения.

## ЛИТЕРАТУРА

- Payne D.J., Marriott M.S., Amyes S.G. Characterisation of a unique ceftazidime-hydrolysing beta-lactamase, TEM-E2. *J. Med. Microbiol.* 1990; 32(2): 131–4.
- Knothe H., Shah P., Krcmery V., Antal M., Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection.* 1983; 11(6): 315–7.
- Gazouli M., Sidorenko S.V., Tzelepi E., Kozlova N.S., Gladin D.P., Tzouveleki L.S. A plasmid-mediated beta-lactamase conferring resistance to cefotaxime in a *Salmonella typhimurium* clone found in St Petersburg, Russia. *J. Antimicrob. Chemother.* 1998; 41(1): 119–21.
- Сидоренко С.В., Страчунский Л.С., Ахмедова Л.И. Результаты

- многочетрового исследования сравнительной активности цефепима и других антибиотиков в отношении возбудителей тяжелых госпитальных инфекций (программа «Micromax<sup>TM</sup>). *Антибиотики и химиотерапия*. 1999; 44(11): 7–16.
5. 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. 20th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2010; Vienna. Available at: [http://registration.akm.ch/2010eccmid\\_einsicht.php?XNABSTRACT\\_ID=100676&XNSPRACHE\\_ID=2&XNKONGRESS\\_ID=114&XNMASKEN\\_ID=900](http://registration.akm.ch/2010eccmid_einsicht.php?XNABSTRACT_ID=100676&XNSPRACHE_ID=2&XNKONGRESS_ID=114&XNMASKEN_ID=900) (дата обращения 01.07.2015).
  6. Клясова Г.А., Сперанская Л.Л., Миронова А.В., Масчан М.А., Байдильдина Д.Д., Верещagina С.А. и др. Возбудители сепсиса у иммунокомпрометированных больных: структура и проблемы антибиотикорезистентности (результаты многоцентрового исследования). *Гематология и трансфузиология*. 2007; 1: 11–8.
  7. WHO. 2014. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. WHO, Geneva, Switzerland. Available at: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf) (дата обращения 30.05.2015).
  8. Bush K., Jacoby G. A., Medeiros A. A. A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 1995; 39(6): 1211–33.
  9. Эйдельштейн М.В.  $\beta$ -Лактамазы аэробных грамотрицательных бактерий: характеристика, основные принципы классификации, современные методы выявления и типирования. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2001; 3(3): 223–42.
  10. Эйдельштейн М.В. Выявление бета-лактамаз расширенного спектра у грамотрицательных бактерий с помощью фенотипических методов. Методические рекомендации. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2001; 2: 183–9.
  11. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам (Методические указания МУК 4.21890-04). *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2004; 6: 306–59.
  12. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Version 1.0, 2013. Available at: [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Resistance\\_mechanisms/EUCAST\\_detection\\_of\\_resistance\\_mechanisms\\_v1.0\\_20131211.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_v1.0_20131211.pdf) (дата обращения 30.06.2015).
  13. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-First Informational Supplement. CLSI document M100-S24. 2014. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
  14. Jones M., Sweeney A., Stoeppler E., Miller M., Gilligan P. Comparison of three selective media for the recovery of Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae. UNC Hospitals. 2011. Available at: [http://www.chromagar.com/fichiers/13087488252011\\_ESBL\\_GIL-LIGAN\\_poster.pdf?PHPSESSID=a66d3dca443d47b9ab9ee07a5dff76a7](http://www.chromagar.com/fichiers/13087488252011_ESBL_GIL-LIGAN_poster.pdf?PHPSESSID=a66d3dca443d47b9ab9ee07a5dff76a7) (дата обращения 01.07.2015).
  15. 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. 20th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2010, Vienna. Available at: [http://www.chromagar.com/fichiers/1271837960Lagace\\_COLOREX\\_ESBL\\_Poster\\_ECCMID\\_2010.pdf?PHPSESSID=a66d3dca443d47b9ab9ee07a5dff76a7](http://www.chromagar.com/fichiers/1271837960Lagace_COLOREX_ESBL_Poster_ECCMID_2010.pdf?PHPSESSID=a66d3dca443d47b9ab9ee07a5dff76a7) (дата обращения 01.07.2015).
  16. 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. *J. Antimicrob. Chemother.* 2009; 63(2): 302–8.
  17. Hornsey M., Phee L., Woodford N., Turton J., Meunier D., Thomas C. et al. Evaluation of three selective chromogenic media, CHROMagar ESBL, CHROMagar CTX-M and CHROMagar KPC, for the detection of *Klebsiella pneumoniae* producing OXA-48 carbapenemase. *J. Clin. Pathol.* 2013; 66(4): 348–50.
  18. Overdeest 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. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 49(2): 519–22.
  19. Gazin M., Paasch F., Goossens H., Malhotra-Kumar S. Current trends in culture-based and molecular detection of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-harboring and carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50(4): 1140–6.
  - resistance to cefotaxime, ceftazidime, ceftazidime and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection.* 1983; 11(6): 315–7.
  3. Gazouli M., Sidorenko S.V., Tzelepi E., Kozlova N.S., Gladin D.P., Tzouveleki L.S. A plasmid-mediated beta-lactamase conferring resistance to cefotaxime in a *Salmonella typhimurium* clone found in St Petersburg, Russia. *J. Antimicrob. Chemother.* 1998; 41(1): 119–21.
  4. Sidorenko S.V., Stratchounski L.S., Ahmedova L.I. The results of a multicenter study of comparative activity of cefepime and other antibiotics against etiologic agent of severe nosocomial infection (the program «Micromax»). *Antibiotiki i himioterapiya*. 1999; 44(11): 7–16. (in Russian)
  5. 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. 20th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2010, Vienna. Available at: [http://registration.akm.ch/2010eccmid\\_einsicht.php?XNABSTRACT\\_ID=100676&XNSPRACHE\\_ID=2&XNKONGRESS\\_ID=114&XNMASKEN\\_ID=900](http://registration.akm.ch/2010eccmid_einsicht.php?XNABSTRACT_ID=100676&XNSPRACHE_ID=2&XNKONGRESS_ID=114&XNMASKEN_ID=900) (Accessed 01.07.2015).
  6. Klyasova G. A., Speranskaya L. L., Mironova A. V., Maschan M. A., Baidildina D. D., Vereshchagina S. A. et al. The pathogens causing sepsis in immunocompromised patients: structure and problems of antibiotic resistance. Results of a multi-center cooperative study. *Gematologiya i Transfusiologiya*. 2007. 52 (1): 11–8. (in Russian)
  7. WHO. 2014. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. WHO, Geneva, Switzerland. Available at: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf) (Accessed 30.05.2015).
  8. Bush K., Jacoby G. A., Medeiros A. A. A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 1995; 39(6): 1211–33.
  9. Edelstein M. Beta-Lactamases of Aerobic Gram-Negative Bacteria: Description, Principles of Classification, Methods of Detection and Typing. *Klinicheskaya Mikrobiologiya i Antimikrobnaya Himioterapiya*. 2001; 3(3): 223–42. (in Russian)
  10. Edelstein M. Detection of Extended Spectrum  $\beta$ -lactamases by Phenotypic Methods in Gram-negative Bacteria. *Klinicheskaya Mikrobiologiya i Antimikrobnaya Himioterapiya*. 2001; 2: 183–9. (in Russian)
  11. Guidelines for Susceptibility testing of microorganisms to antibacterial agents. *Klinicheskaya Mikrobiologiya i Antimikrobnaya Himioterapiya*. 2004; 6: 306–59. (in Russian)
  12. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Version 1.0, 2013. Available at: [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Resistance\\_mechanisms/EUCAST\\_detection\\_of\\_resistance\\_mechanisms\\_v1.0\\_20131211.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_v1.0_20131211.pdf) (Accessed 30.06.2015).
  13. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-First Informational Supplement. CLSI document M100-S24. 2014. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
  14. Jones M., Sweeney A., Stoeppler E., Miller M., Gilligan P. Comparison of three selective media for the recovery of Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae. UNC Hospitals. 2011. Available at: [http://www.chromagar.com/fichiers/13087488252011\\_ESBL\\_GIL-LIGAN\\_poster.pdf?PHPSESSID=a66d3dca443d47b9ab9ee07a5dff76a7](http://www.chromagar.com/fichiers/13087488252011_ESBL_GIL-LIGAN_poster.pdf?PHPSESSID=a66d3dca443d47b9ab9ee07a5dff76a7) (Accessed 01.07.2015).
  15. 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. 20th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2010, Vienna. Available at: [http://www.chromagar.com/fichiers/1271837960Lagace\\_COLOREX\\_ESBL\\_Poster\\_ECCMID\\_2010.pdf?PHPSESSID=a66d3dca443d47b9ab9ee07a5dff76a7](http://www.chromagar.com/fichiers/1271837960Lagace_COLOREX_ESBL_Poster_ECCMID_2010.pdf?PHPSESSID=a66d3dca443d47b9ab9ee07a5dff76a7) (Accessed 01.07.2015).
  16. 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. *J. Antimicrob. Chemother.* 2009; 63(2): 302–8.
  17. Hornsey M., Phee L., Woodford N., Turton J., Meunier D., Thomas C. et al. Evaluation of three selective chromogenic media, CHROMagar ESBL, CHROMagar CTX-M and CHROMagar KPC, for the detection of *Klebsiella pneumoniae* producing OXA-48 carbapenemase. *J. Clin. Pathol.* 2013; 66(4): 348–50.
  18. Overdeest 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. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 49(2): 519–22.
  19. Gazin M., Paasch F., Goossens H., Malhotra-Kumar S. Current trends in culture-based and molecular detection of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-harboring and carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50(4): 1140–6.

Поступила 01.08.15

## REFERENCES

1. Payne D.J., Marriott M.S., Amyes S.G. Characterisation of a unique ceftazidime-hydrolysing beta-lactamase, TEM-E2. *J. Med. Microbiol.* 1990; 32(2): 131–4.
2. Knothe H., Shah P., Krcmery V., Antal M., Mitsuhashi S. Transferable

Received 01.08.15