

РЕЗИСТЕНТНОСТЬ К АНТИМИКРОБНЫМ ПРЕПАРАТАМ ШТАММОВ *ESCHERICHIA COLI*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА ДЕТЕЙ

ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера Роспотребнадзора, 197101, Санкт-Петербург, Россия

Исследования последних лет свидетельствуют, что резистентность бактерий существовала задолго до того, как антимикробные препараты (АМП) стали применять в клинической практике, устойчивостью к АМП обладают не только патогенные микроорганизмы. Изучены 511 штаммов *E. coli*, выделенные из микробиоты кишечника детей в возрасте от 1 мес до 17 лет, проживающих в Санкт-Петербурге: определена чувствительность штаммов к 15 АМП диско-диффузионным методом, чувствительность к 6 коммерческим бактериофагам производства НПО «Микроген». Методом мультиплексной ПЦР проведён поиск генов, кодирующих *b*-лактамазы молекулярных классов TEM, SHV, OXA, CTX-M. 39,3% штаммов характеризовались устойчивостью к 1 и более классам АМП. Доля полирезистентных (устойчивых к 3 и более классам АМП) составляла 16,6%. Полирезистентны к клинически значимым группам АМП (цефалоспорины расширенного спектра (ЦРС) + фторхинолоны + аминогликозиды) 0,8% штаммов. Устойчивость к аминопенициллинам выявлена у 29,5% штаммов, ЦРС – 11,2%, фторхинолонам – 13,3%, тетрациклину – 20%, хлорамфениколу – 9,8%, аминогликозидам – 2,5%. Резистентность к *b*-лактамам обусловлена продукцией *b*-лактамаз: к ампициллину – молекулярного семейства TEM (81,9%), ЦРС – молекулярного семейства CTX-M (87,7%) групп CTX-M1 (66%) и CTX-M9 (34%). 43,5% полирезистентных штаммов *E. coli* чувствительны как минимум к одному из 6 коммерческих бактериофагов. Исследование показало, что микробиота кишечника детей является важным резервуаром штаммов *E. coli*, обладающих резистентностью (в т. ч. множественной) к АМП различных классов. Терапия бактериофагами является альтернативным методом эрадикации устойчивых к антибиотикам штаммов *E. coli*.

Ключевые слова: микробиота кишечника; *E. coli*; антибиотикорезистентность; *b*-лактамазы; бактериофаги; TEM; SHV; OXA; CTX-M.

Для цитирования: Сужаева Л. В., Егорова С. А. Резистентность к антимикробным препаратам штаммов *Escherichia coli*, выделенных из микробиоты кишечника детей. Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65 (10): 638-644. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-10-638-644>

Suzhaeva L. V., Egorova S. A.

ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF *ESCHERICHIA COLI*, ISOLATED FROM CHILDREN'S INTESTINAL MICROBIOTA

Saint-Petersburg Pasteur Institute, 197101, Saint-Petersburg, Russia

Recent studies have shown that bacterial resistance existed long before antimicrobials were used in medicine, and not only pathogens are resistant to antibiotics. 511 strains of *E. coli* isolated from the intestinal microbiota of children aged 1 month to 17 years living in St. Petersburg were studied: the susceptibility to 15 antibiotics was determined by the disk diffusion method, as well as the susceptibility to 6 commercial bacteriophages produced by «Microgen» (Russia). The *b*-lactamase genes of molecular families TEM, SHV, OXA, and CTX-M were detected by multiplex PCR. 39,3% *E. coli* isolates were resistant to one or more antimicrobial classes. The proportion of multidrug resistant isolates (resistant to 3 or more classes) was 16,6%. Multidrug resistance to clinically significant antimicrobial classes (extended-spectrum cephalosporins (ESC) + fluoroquinolones + aminoglycosides) was detected in 0,8% isolates. Resistance to aminopenicillins was detected in 29,5%, ESC – 11,2%, fluoroquinolones – 13,3%, tetracycline – 20,0%, chloramphenicol – 9,8%, aminoglycosides – 2,5% isolates. *b*-lactam resistance was due to the beta-lactamase production: to ampicillin – the molecular family TEM (81,9%), ESC – the CTX-M molecular family (87,7%) CTX-M1 – (66%) and CTX-M9 groups (34%). 43,5% multidrug resistant *E. coli* isolates were susceptible to at least one of the six commercial bacteriophages produced by «Microgen». The study showed that the intestinal microbiota of children is an important reservoir of *E. coli* resistant (including multidrug resistance) to various classes of antibiotics, and bacteriophage therapy is an alternative method for eradication of antibiotic-resistant *E. coli*.

Key words: intestinal microbiota; *E. coli*; antibiotic resistance; beta-lactamases; bacteriophages; TEM; SHV; OXA; CTX-M.

For citation: Suzhaeva L. V., Egorova S. A. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli*, isolated from children's intestinal microbiota. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2020; 65 (10): 638-644 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-10-638-644>

For correspondence: Suzhaeva L. V., junior researcher of laboratory of enteric infections; e-mail: slv2211@yandex.ru

Information about authors:

Suzhaeva Ludmila V., <https://orcid.org/0000-0001-7292-9933>;

Egorova Svetlana A., <https://orcid.org/0000-0002-7589-0234>.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Received 19.06.2020
Accepted 22.06.2020

Резистентность к антимикробным препаратам (АМП) у возбудителей инфекционных болезней – растущая угроза здравоохранению, представляющая проблему для многих стран и сфер деятельности [1]. Одной из стратегических целей Глобального плана действий по борьбе с устойчивостью к АМП, принятого Всемирной ассамблеей здравоохранения, является совершенствование глобального мониторинга резистентности. В различных географических районах действуют региональные программы мониторинга резистентности возбудителей, вызывающих инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи (EARS-Net, CAESAR, ReLAVRA), а также заболеваний, передающихся с пищевыми продуктами (NARMS, CIPARS, EFSA/ECDC) [1 – 4]. В руководстве ВОЗ по осуществлению глобального мониторинга перечислены виды биологического материала, возбудители, АМП, приоритетные для мониторинга резистентности в повседневной практике. *Escherichia coli*, выделенная из образцов крови, спинно-мозговой жидкости, мочи, отнесена к приоритетным возбудителям [5].

E. coli – широко распространённый микроорганизм, обитающий в кишечнике человека и животных [6], поверхностных водоёмах [7], почве [8]. Некоторые представители вида являются возбудителями диарей и заболеваний внекишечной локализации [9]. Антимикробная терапия является основой этиотропного лечения эшерихиозов (тяжёлых форм диареи, циститов, пиелонефритов, сепсиса, менингита), мониторинг резистентности *E. coli* к АМП вызван необходимостью эффективного лечения этих заболеваний [10].

Больничная среда традиционно рассматривается как источник антибиотикорезистентных микроорганизмов. Исследования последних лет свидетельствуют, что резистентность существовала задолго до того, как АМП стали применять в клинической практике, устойчивостью к АМП обладают не только патогенные микроорганизмы. В микробиоме слюны и фекалий здоровых добровольцев обнаружены гены резистентности к 13 АМП [11]. Микробиом кишечника является резервуаром детерминант резистентности и имеет благоприятные условия для их передачи путём горизонтального переноса, в том числе и патогенным микроорганизмам [12]. Приобретают актуальность исследования резистентности к АМП бактерий микробиоты кишечника, расширяющие представления о механизмах её формирования и способах распространения.

Важной проблемой в лечении бактериальных инфекций является появление бактерий с множественной лекарственной устойчивостью. Ввиду высокой скорости её формирования снизился коммерческий интерес к разработке и производству новых АМП. В 2017 г. ВОЗ опубликовала перечень приоритетных патогенных микроорганизмов, для борьбы с лекарственной устойчивостью которых необходима разработка новых фармакологических препаратов. Одну из первых позиций в этом перечне занимают *E. coli*, устойчивые к цефалоспорианам расширенного спектра (ЦРС) и карбапенемам. Из 32 новых АМП, находящихся в стадии разработки, только два активны против этих граммотрицательных бактерий [13]. В поисках альтернативных стратегий борьбы с лекарственной устойчивостью бактерий возобновился интерес к терапии бактериофагами. Отсутствие достаточного количества правильно спланированных рандомизированных исследований, свидетельствующих об их эффективности и безопасности, ограничивают их широкое использование [14].

Цель – определить чувствительность к АМП штаммов *E. coli*, выделенных из микробиоты кишечника детей, проживающих в Санкт-Петербурге.

Материал и методы. Исследовано 511 штаммов *E. coli*, выделенных из микробиоты кишечника детей в возрасте от 1 мес до 17 лет, проживающих в Санкт-Петербурге. Диско-диффузионным методом (ДДМ) с использованием среды Мюллера-Хинтона и дисков производства Oxoid (Великобритания) согласно Клиническим рекомендациям «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам», версии 2014, 2015 гг. определена чувствительность к 15 АМП (ампициллин, цефтазидим, цефотаксим, цефепим, меропенем, налидиксовая кислота, ципрофлоксацин, гентамицин, тобрамицин, амикацин, нитрофурантоин, тетрациклин, хлорамфеникол, фосфомицин, триметоприм/сульфаметоксазол), относящихся к семи классам АМП. Согласно Федеральным клиническим рекомендациям «Рациональное применение бактериофагов в лечебной и противэпидемической практике» оценена чувствительность к 6 коммерческим бактериофагам производства АО НПО «Микроген»: бактериофаг коли (Пермь), колипротейный бактериофаг (Нижний Новгород), пиобактериофаг поливалентный (Уфа), секстафаг® пиобактериофаг поливалентный (Пермь), пиобактериофаг комплексный (Нижний Новгород), интести-бактериофаг (Нижний Новгород).

Фенотипическая детекция б-лактамаз расширенного спектра (БЛРС) и цефалоспориноаз молекулярного класса C (AmpC) проведена путём выявления синергизма с ингибиторами б-лактамаз (клавулановая кислота, клаксациллин) в формате теста с двумя дисками и с использованием набора «ESBL+AmpC screen disc kit» (Liofilchem, Италия). Методом мультиплексной ПЦР с электрофоретической детекцией со специфическими праймерами проведён поиск генов, кодирующих б-лактамазы молекулярных классов TEM, SHV, OXA, CTX-M согласно ранее опубликованным протоколам [15].

Достигнутый уровень значимости различий определён с использованием критерия сопряженности χ^2 Пирсона. 95% доверительные интервалы долей и частот рассчитаны методом Уилсона.

Результаты. Анализ результатов определения чувствительности штаммов *E. coli* к АМП показал, что 60,7% (95%ДИ:56,4-64,8) изолятов чувствительны ко всем исследованным АМП, 39,3% (95%ДИ:35,2-43,6) – характеризовались устойчивостью к 1 и более классам АМП. Доля штаммов, резистентных к 1 или 2 классам составила 22,7% (95%ДИ:19,3-26,5), полирезистентных (устойчивых к 3 и более классам АМП) – 16,6% (95%ДИ:13,7-20,1) (рис. 1.) Доля устойчивых штаммов, выделенных из фекалий детей разных возрастных групп, значимо не отличалась ($\chi^2=5,967$; $df=3$; $p=0,113$) и находилась в пределах от 31,3 до 46,0%. Доля полирезистентных изолятов находилась в пределах от 12 до 23% и не имела значимых отличий ($\chi^2=5,223$; $df=3$; $p=0,156$).

Доли штаммов, устойчивых к различным классам АМП, не одинаковы. Наибольшие доли резистентных штаммов выявлены по отношению к аминопенициллинам и тетрациклинам (29,5% и 20% соответственно), наименьшие – к аминогликозидам и нитрофуранам (2,5% и 0,8%, соответственно). Доля изолятов, устойчивых к ЦРС, составила 11,2%, хинолонам – 13,3%, триметоприм/сульфаметоксазолу – 12,1%, хлорамфениколу

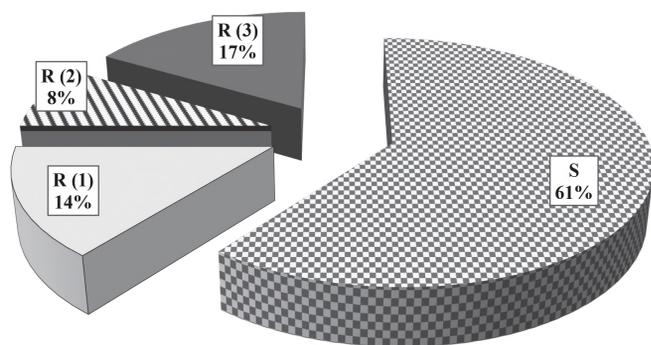


Рис. 1. Доля штаммов *Escherichia coli*, чувствительных и резистентных к различному количеству классов АМП (%). S – чувствительные ко всем исследуемым классам АМП; R(1) – резистентные к одному классу АМП; R(2) – резистентные к двум классам АМП; R(3) – резистентные к трём и более классам АМП.

– 9,8%. Не выявлены штаммы, нечувствительные к карбапенемам и фосфомицину,

Резистентность к АМП различных классов отличалась у штаммов, устойчивых и чувствительных к ампициллину. Доля штаммов, резистентных к ЦРС, хинолонам, аминогликозидам, триметоприм/сульфаметоксазолу, хлорамфениколу, тетрациклину, значительно выше у резистентных к ампициллину штаммов (рис. 2). Частота выявления полирезистентных штаммов среди ампициллинустойчивых изолятов составила 55% (95%ДИ:47,0-62,7), что значительно отличается от такого показателя среди чувствительных штаммов – 0,6% (95%ДИ: 0,2-2,0).

Подобные отличия отмечены у штаммов, кластеризованных по принципу чувствительности и нечувствительности ко всем остальным исследуемым классам АМП. Впечатляет доля полирезистентных изолятов среди штаммов, резистентных к аминогликозидам, ЦРС, хлорамфениколу, триметоприм/сульфаметоксазолу (100%, 86%, 82%, 87%, соответственно) в отличие от долей среди штаммов, чувствительных к каждому из этих АМП (14,5%, 7,9%, 9,5%, 6,9% соответственно).

У штаммов, устойчивых к исследуемым АМП, выявлено 44 фенотипа резистентности: к одному классу АМП – 6 фенотипов; двум классам – 8 фенотипов; трём классам – 11 фенотипов; четырём классам – 8 фенотипов; пяти классам – 6 фенотипов; шести классам – 3 фенотипа; семи классам – 2 фенотипа. Часто встречался фенотип устойчивости к одному классу АМП – к ампициллину (7,8%). Доля остальных фенотипов варьировала от 0,2 до 2,5%. Фенотипы множественной резистентности чаще всего содержали ампициллин (97,6%), тетрациклин (70,6%), триметоприм/сульфаметоксазол (63,5%).

При изучении 94 штаммов *E. coli*, устойчивых к ампициллину (чувствительных к ЦРС), выявлены гены *b-lactamase* (*bla*) различных молекулярных классов. У 81,9% устойчивых штаммов выявлены *bla*-гены, кодирующие *b-lactamase* молекулярного семейства TEM, у 7,4% штаммов – OXA, у 1,1% штаммов – SHV. У 3,2% штаммов одновременно выявлены гены TEM и OXA. У 12,8% штаммов гены известных *b-lactamase* выявить не удалось. Наиболее распространённым механизмом резистентности к аминопенициллинам у штаммов *E. coli* является продукция БЛРС молекулярного семейства TEM, что совпадает с данными литературы.

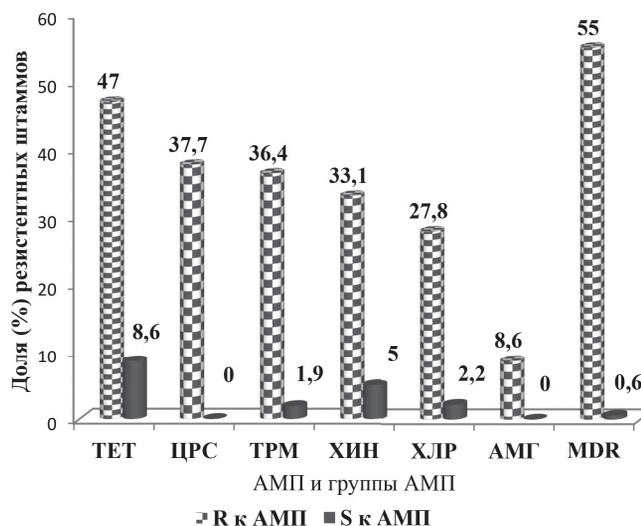


Рис. 2. Резистентность к различным АМП штаммов *Escherichia coli*, чувствительных и резистентных к ампициллину. R к АМП – резистентные к ампициллину; S – чувствительные к ампициллину; TET – тетрациклин; ЦРС – цефалоспорины расширенного спектра; ТРМ – триметоприм/сульфаметоксазол; ХИН – хинолоны; ХЛР – хлорамфеникол; АМГ – аминогликозиды; MDR – полирезистентные штаммы.

При изучении 57 штаммов *E. coli*, устойчивых к ампициллину и ЦРС, на первом этапе использованы фенотипические подтверждающие тесты, которые у 56 штаммов подтвердили продукцию БЛРС (синергизм с клавулановой кислотой) и у 1 штамма – продукцию *b-lactamase* молекулярного класса С (синергизм с клоксациллином). У 87,7% штаммов, устойчивых к ампициллину и ЦРС, обнаружены *bla*-гены, кодирующие продукцию БЛРС молекулярного семейства СТХ-М, из них 22,8% штаммов продуцировали только СТХ-М, остальные 64,9% штаммов сочетали продукцию СТХ-М с другими *b-lactamase* (TEM, SHV, OXA). У 5,3% штаммов выявлены гены только молекулярного класса TEM, у 3,5% – молекулярных классов TEM и SHV. У штамма с фенотипически подтверждённой продукцией *b-lactamase* молекулярного класса С выявлены гены, кодирующие продукцию AmpC-цефалоспорины SMY и TEM. У одного изолята гены известных *b-lactamase* выявить не удалось.

Гены БЛРС молекулярного семейства СТХ-М преимущественно представлены молекулярной группой СТХ-М1 (66%), СТХ-М9 (34%). Штаммы *E. coli*, обладающие генами цефотаксимаз, в большинстве случаев имели гены и других *b-lactamase*. В группе изолятов с генами молекулярной группы СТХ-М9 они обнаружены у 94,1% штаммов, с генами СТХ-М1 – у 63,6% штаммов ($\chi^2=5,967$; $df=3$; $p=0,113$). Штаммы, обладающие генами БЛРС молекулярных групп СТХ-М1 и СТХ-М9, имели различную устойчивость к хлорамфениколу, триметоприм/сульфаметоксазолу, хинолонам, аминогликозидам. Доля штаммов, резистентных к хлорамфениколу, триметоприм/сульфаметоксазолу, аминогликозидам, в группе с СТХ-М1 меньше, чем в группе СТХ-М9. Доля штаммов резистентных к хинолонам, в группе с СТХ-М1 выше, чем в группе СТХ-М9. Устойчивость к остальным исследуемым АМП в указанных группах не отличалась.

В исследуемой популяции *E. coli* частота встречаемости штаммов, содержащих *b-lactamase* различных

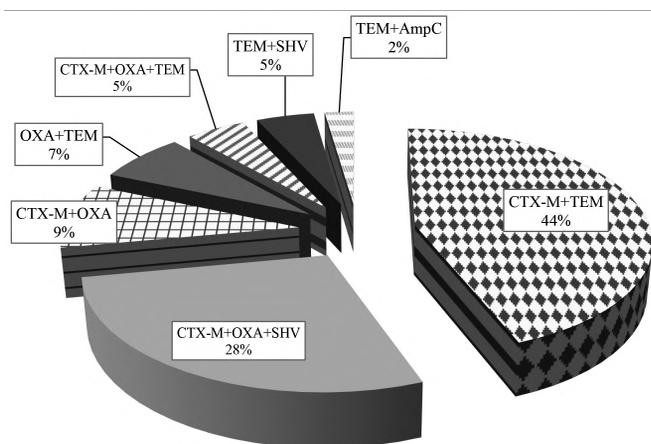


Рис. 3. Сочетания генов β -лактамаз различных молекулярных классов.

молекулярных семейств, составила 27%. β -лактамазы семейства TEM обнаружены у 22,7%, SHV – у 2,9%, OXA – у 2,5%, CTX-M – у 9,8%, AmpC – у 0,19% штаммов. Сочетанная продукция β -лактамаз выявлена у 8,4% штаммов. Сочетания этих ферментов представлены 7 фенотипами (рис. 3). Доли штаммов *E. coli*, содержащих гены β -лактамаз различных молекулярных семейств и их сочетания, статистически значимо не отличались в группах детей разного пола и возраста.

При оценке чувствительности 511 штаммов *E. coli* к шести коммерческим препаратам на основе бактериофагов выявлено, что к действию бактериофага коли чувствительны 33,7% штаммов, коли-протейного бактериофага – 11,2%, пиобактериофага поливалентного – 16,2%, секстафага – 10,6%, пиобактериофага комплексного – 6,8%, интести-бактериофага – 13,7%.

К одному из исследуемых бактериофагов чувствительны 17,2% штаммов, к двум – 11,4%, к трём – 6,7%, к четырём – 4,7%, к пяти – 1,8%, к шести – 0,8%. Минимум к одному из исследуемых бактериофагов чувствительны 42,5% штаммов *E. coli*.

Доля штаммов, чувствительных к бактериофагам, среди *E. coli*, чувствительных и резистентных к различным классам АМП, значимо не отличалась по отношению ко всем исследуемым бактериофагам, за исключением секстафага. Секстафаг чаще оказывал литическое действие на штаммы, чувствительные к ампициллину (13,1%), ЦРС (11,7%), хинолонам (11,7%), тетрациклину

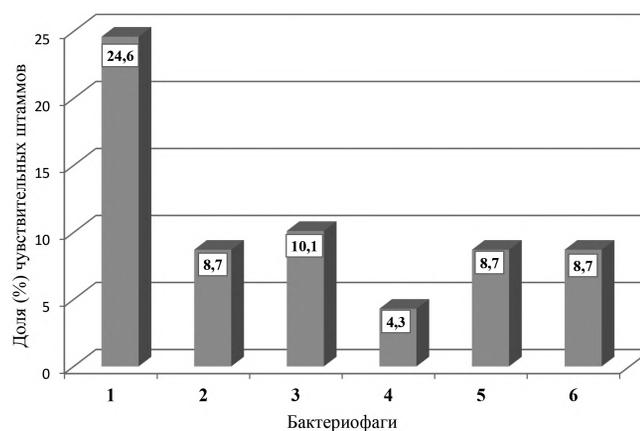


Рис. 4. Чувствительность полирезистентных штаммов *Escherichia coli* к коммерческим препаратам на основе бактериофагов. 1 – бактериофаг коли (Пермь), 2 – колипротейный бактериофаг (Нижний Новгород), 3 – пиобактериофаг поливалентный (Уфа), 4 – секстафаг® пиобактериофаг поливалентный (Пермь), 5 – пиобактериофаг комплексный (Нижний Новгород), 6 – интести-бактериофаг (Нижний Новгород).

(12%) по сравнению с резистентными к этим препаратам штаммами (4,6%, 1,8%, 2,9%, 4,9% соответственно).

Доля штаммов, чувствительных к каждому из исследуемых бактериофагов, значимо не отличалась у штаммов, резистентных к разному количеству классов АМП (см. таблицу). Доля штаммов, чувствительных как минимум к одному из исследуемых бактериофагов, среди полирезистентных штаммов составила 43,5%, среди БЛРС-продуцирующих штаммов – 44,0%. Полирезистентные штаммы чаще чувствительны к бактериофагу коли (24,6%). Чувствительность к поливалентным препаратам на основе бактериофагов варьировала от 4,3 до 10,1% (рис. 4).

Обсуждение. Сравнение показателей устойчивости штаммов *E. coli* к 15 АМП показало, что исследуемые штаммы наиболее часто резистентны к ампициллину и тетрациклину.

По данным литературы устойчивость к аминопенициллинам по сравнению с другими классами АМП имеет самые высокие показатели среди госпитальных штаммов *E. coli*, выделенных из крови и спинномозговой жидкости, среди изолятов, выделенных из мочи при инфекциях мочевыводящих путей (ИМП) [1, 16]. Резистентность к ампициллину у таких штаммов значи-

Доля (%) штаммов *E. coli*, чувствительных к действию коммерческих бактериофагов

Наименование бактериофагов	Количество классов антибиотиков, к которым резистентны <i>E. coli</i>								Всего $n=511$	χ^2 (df=7)	p
	0 ($n=310$)	1 ($n=73$)	2 ($n=43$)	3 ($n=35$)	4 ($n=22$)	5 ($n=14$)	6 ($n=12$)	7 ($n=2$)			
Бактериофаг коли	36,8	35,6	30,2	28,6	27,3	7,1	16,7	0	33,7	9,481	0,220
Колипротейный бактериофаг	11,3	9,6	7,0	11,4	13,6	21,4	16,7	0	11,2	3,193	0,867
Пиобактериофаг поливалентный	18,1	11,0	14,0	17,1	13,6	14,3	8,3	50,0	16,2	4,817	0,682
Секстафаг	13,5	11,0	2,3	5,7	4,5	0	0	0	10,6	11,042	0,137
Пиобактериофаг комплексный	6,1	6,8	9,3	8,6	13,6	7,1	0	0	6,8	3,44	0,842
Интести-бактериофаг	17,4	11,0	2,3	11,4	9,1	0	8,3	0	13,7	12,178	0,095

тельно выше, чем у исследованных нами изолятов, выделенных из микробиоты кишечника (93% и 68% против 29%, соответственно). Данная ситуация выглядит вполне закономерной, так как препаратами стартовой терапии заболеваний этой локализации у пациентов детского возраста являются именно б-лактамы АМП, что способствует увеличению селективного давления и росту резистентности возбудителя к данной группе АМП.

Сравнение полученных результатов с данными литературы показало, что устойчивость к ампициллину диареогенных штаммов *E. coli* некоторых патотипов (энтеропатогенные, ЕРЕС; энтеротоксигенные, ЕТЕС) не отличается от таковой у штаммов, выделенных из микробиоты кишечника, у энтероинвазивных *E. coli* (ЕИ-ЕС) значительно превышает таковую [17]. Вероятно, это связано с тем, что ЕТЕС вызывает более тяжёлое клиническое течение болезни по сравнению с ЕРЕС и ЕТЕС и для лечения таких диарей чаще используются АМП.

Сравнение резистентности к ампициллину штаммов, выделенных из микробиоты кишечника здоровых детей в различных географических регионах, показало, что доля устойчивых штаммов в Санкт-Петербурге (29,5%) значительно ниже, чем в странах Африки и Азии (Ливия – 73% [18], Тайвань – 70,1% [19], Вьетнам – 65% [20], Индия – 63,7% [21]), но выше, чем в европейских странах (Германия – 16,5%) [22]. Анализ данных литературы показывает, что в странах Азиатско-Тихоокеанского региона количество потребляемых АМП значительно выше, чем в странах Европы [23-25].

Исследование показало, что устойчивые к аминопенициллину штаммы значительно чаще резистентны к другим классам АМП в отличие от чувствительных изолятов. Аналогичная картина характерна и для штаммов, устойчивых к ЦРС, что согласуется с общемировыми тенденциями [19, 21, 22].

Основным механизмом резистентности штаммов *E. coli* к аминопенициллинам является выработка БЛРС [26]. Наиболее распространёнными б-лактамазами, выявленными в данной работе, являются б-лактамазы молекулярного семейства TEM (81,9%).

Доля штаммов, устойчивых к ЦРС, составила 11,2%, что значительно ниже, чем среди госпитальных штаммов *E. coli* (72,6%) [27] и штаммов, выделенных при внебольничных ИМП (20%) [16]. Вероятно, это связано с частым использованием этих АМП в качестве препаратов стартовой терапии различных инфекционных заболеваний у детей. Доля штаммов *E. coli*, устойчивых к ЦРС, в нашем исследовании сопоставима с показателями для штаммов, выделенных из микробиоты кишечника здоровых жителей стран Европы (Германии, Франции, Испании, Швеции, Венгрии, Австралии, Португалии), США, Аргентины, где она составляет 5-10%. Указанная доля значительно выше у жителей стран Азии (Тайланда, Вьетнама, Китая, Индии) и Мексики – 40-60%. Появление таких штаммов в микробиоте кишечника здоровых людей связано с предшествующим приёмом АМП данной группы, эпизодами пребывания в стационаре, употреблением пищевых продуктов и воды, контаминированных устойчивыми микроорганизмами, путешествием в страны с высокой распространённостью БЛРС-продуцирующих бактерий, профессиональной деятельностью в животноводстве (особенно в птицеводстве и свиноводстве), контактом с домашними животными [28].

Механизм устойчивости к ЦРС обусловлен в 87,7% случаев выработкой БЛРС молекулярного семей-

ства СТХ-М, групп СТХ-М1 (66%) и СТХ-М9 (34%). б-лактамазы молекулярных групп СТХ-М2, СТХ-М8, СТХ-М25 не выявлены. Полученные результаты отражают мировые тенденции распространения энтеробактерий, продуцирующих б-лактамазы молекулярной группы СТХ-М1, которые доминируют практически во всех регионах мира за исключением Китая, Юго-Восточной Азии, Южной Кореи, Японии, Испании, где преобладает группа СТХ-М9, Южной Америки, где преобладает группа СТХ-М2 [29].

Среди штаммов, устойчивых к ЦРС, доля полирезистентных значительно выше (86,0%) по сравнению с аналогичной долей у чувствительных к этим АМП штаммов (7,9%). Вероятно, плазмиды, несущие гены цефотаксимаз, содержат гены, определяющие резистентность к другим классам препаратов (хинолонам, аминогликозидам, тетрациклину, хлорамфениколу, триметоприм/сульфаметоксазолу) [30].

Вызывает интерес устойчивость штаммов *E. coli*, выделенных из микробиоты кишечника детей, к тетрациклину – препарату, в настоящее время не используемому в педиатрической практике и редко применяемому у взрослых. Устойчивость к нему одинаково часто встречалась у штаммов, выделенных от детей в возрасте 1 мес и от детей дошкольного и школьного возраста. Вероятно, младенец приобретает такие штаммы от матери, так как кишечник новорожденного при естественных родах заселяется преимущественно «материнскими» микроорганизмами. В организме матери штаммы *E. coli* могли приобрести устойчивость к тетрациклину, остаточные количества которого содержатся в пищевых продуктах вследствие его использования в ветеринарии и животноводстве [31]. Аналогичный механизм формирования резистентности у штаммов *E. coli* в микробиоте кишечника нельзя исключить и у детей более старшего возраста.

В нашем исследовании резистентные к ципрофлоксацину штаммы *E. coli* выявлены лишь в 2,9% случаев, что значительно отличается от показателей резистентности штаммов, вызывающих ИСМП (65,6%) и ИМП (17,6%) [27, 16]. Возможно, резистентные штаммы приобретены детьми от матери в момент рождения, поскольку детский и подростковый возраст является противопоказанием для приёма препаратов из группы хинолонов из-за риска нарушения формирования костно-мышечной системы [32].

Оценка чувствительности выделенных штаммов *E. coli* к коммерческим бактериофагам не выявило значимых отличий у штаммов в зависимости от чувствительности к различным классам АМП и их количеству. 43,5% полирезистентных штаммов чувствительны, как минимум к одному из шести исследуемых бактериофагов, что позволяет считать, что терапия бактериофагами является альтернативным методом эрадикации устойчивых к АМП штаммов *E. coli*.

Литическим действием на полирезистентные штаммы чаще обладал бактериофаг коли (24,6%), в отличие от остальных фагов, чувствительность к которым не превышала 10,1%. Можно предположить, что титр колифага в моновалентном препарате бактериофага выше, чем в поливалентном в пересчёте на единицу объёма. Различия в чувствительности могут быть обусловлены различиями самих фаговых коктейлей у разных завод-производителей ввиду использования ими в процессе изготовления отличающихся коллекций штаммов «хозяев». Коллекции состоят из клинических штаммов,

выделенных при различных заболеваниях, вызванных *E. coli*, а исследуемые нами штаммы таковыми не являются. Нельзя не упомянуть о региональной специфичности фагов в отношении вида *E. coli*, отличающегося широким внутривидовым разнообразием [33]. Несмотря на объективно существующие ограничения, фаготерапия представляется перспективным методом борьбы с устойчивыми к АМП штаммами *E. coli*, учитывая растущий опыт создания препаратов бактериофагов с наибольшей литической активностью по отношению к целевому патогену и возможность локальной адаптации этих препаратов [34].

Выводы. При изучении чувствительности к АМП штаммов *E. coli*, выделенных из микробиоты кишечника детей, установлено, что 39,3% штаммов резистентны к АМП, причём 16,6% имеют множественную устойчивость к 3 и более классам. Одновременно устойчивы к клинически значимым группам АМП (ЦРС + фторхинолоны + аминогликозиды) 0,8% штаммов. Устойчивость к б-лактамам (АМП часто используемым в педиатрической практике) выявлена у 29,5% штаммов, включая 11,2% устойчивых к ЦРС. Резистентность к б-лактамам обусловлена продукцией б-лактамаз: к ампициллину – молекулярного семейства TEM (81,9%), ЦРС – молекулярного семейства СТХ-М (87,7%) групп СТХ-М1 (66%) и СТХ-М9 (34%).

При изучении чувствительности полирезистентных штаммов *E. coli* к коммерческим бактериофагам производства НПО «Микроген» выявлено, что 43,5% этих штаммов чувствительны как минимум к одному из тестируемых бактериофагов. Литической активностью чаще обладал бактериофаг коли, в сравнении с другими препаратами бактериофагов, содержащих в своем составе фаги против *E. coli*.

Исследование показало, что микробиота кишечника детей является важным резервуаром штаммов *E. coli*, обладающих резистентностью (в т. ч. множественной) к АМП различных классов. Появление таких штаммов в микробиоте кишечника может быть связано с их приобретением в момент рождения от матери, предшествующим приёмом АМП, эпизодами пребывания в стационаре, употреблением пищевых продуктов и воды, контаминированных устойчивыми микроорганизмами, путешествием в страны с высокой распространённостью резистентных к АМП штаммов. Устойчивые к АМП аутоштаммы *E. coli* могут быть причиной инфекции у ослабленных детей и пациентов отделений интенсивной терапии, могут передавать гены резистентности патогенным микроорганизмам. Дальнейшее изучение резистентности *E. coli*, присутствующих в микробиоте кишечника, будет способствовать расширению наших знаний о механизмах её формирования, путях распространения, способах её устранения.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (1-15, 18-25, 28-30, 33, 34 см. REFERENCES)

16. Палагин И.С., Сухорукова М.В., Дехнич А.В., Эйдельштейн М.В., Перепанова Т.С., Козлов Р.С. и др. Антибиотикорезистентность возбудителей внебольничных инфекций мочевых путей в России: результаты многоцентрового исследования «Дармис-2018». *Клиническая микробиология и антимикробная*

химиотерапия. 2019; 21(2):134-46. https://elibrary.ru/download/elibrary_41179883_46071908.pdf.

17. Гончар Н.В., Партина И.В., Ныркова О.И., Драп А.С. Антибиотико- и фагорезистентность клинических штаммов кишечной палочки у госпитализированных детей Санкт-Петербурга, больных эшерихиозами. *Антибиотики и химиотерапия*. 2014; 59 (9-10): 38-43.

26. Егоров А.М., Уляшова М.М., Рубцова М.Ю. Бактериальные ферменты и резистентность к антибиотикам. *Acta Naturae (русскоязычная версия)*. 2018; 10(4): 33-48. https://www.elibrary.ru/download/elibrary_36916320_74780557.pdf.

27. Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Иванчик Н.В., Склеенова Е.Ю., Шайдуллина Э. Р., Азизов И. С. и др. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Enterobacteriales* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования МАРАФОН 2015-2016. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2019; 21(2):147-59. https://elibrary.ru/download/elibrary_41179884_63500344.pdf.

31. Онищенко Г.Г., Шевелёва С.А., Хотимченко С.А. Гигиеническое обоснование допустимых уровней антибиотиков тетрациклиновой группы в пищевой продукции. *Гигиена и санитария*. 2012; 91 (6): 4-14. https://www.elibrary.ru/download/elibrary_18846289_70501382.pdf.

32. Поляк М.С. Антибиотикотерапия. Теория и практика. СПб.: ИнформМед; 2010.

REFERENCES

1. Central Asian and Eastern European surveillance of antimicrobial resistance. Annual report 2017. Copenhagen: World Health Organization Regional Office for Europe; 2017. Available at: https://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0005/354434/WHO_CAESAR_AnnualReport_2017.pdf.
2. Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance (CIPARS) Annual Report 2013. Ontario: Public Health Agency of Canada; 2015. Available at: <https://www.canada.ca/en/public-health/services/surveillance/canadian-integrated-program-antimicrobial-resistance-surveillance-cipars/cipars-reports.html>.
3. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017. *European Food Safety Authority Journal*. 2019; 17(2): 5598. Doi: 10.2903/j.efsa.2019.5598.
4. CDC. National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS) Now: Human Data. Atlanta: Department of Health and Human Services; 2019. Available at: <https://www.cdc.gov/narmsgnow>.
5. Global antimicrobial resistance surveillance system: manual for early implementation. Geneva: World Health Organization; 2017. Available at: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/188783/9789241549400_eng.pdf.
6. Escobar-Páramo P., Le Menac'h A., Le Gall T., Amorin C., Gouriou S., Picard B. et al. Identification of forces shaping the commensal *Escherichia coli* genetic structure by comparing animal and human isolates. *Environmental Microbiology*. 2006; 8:1975-84. Doi:10.1111/j.1462-2920.2006.01077.x.
7. Hansen S., Messer T., Mittelstet A., Berry E. D., Bartelt-Hunt S., Abimbola O. *Escherichia coli* concentrations in waters of a reservoir system impacted by cattle and migratory waterfowl. *Science of The Total Environment*. 2020; 705: 135607. Doi:10.1016/j.scitotenv.2019.135607.
8. Dusek N., Hewitt A. J., Schmidt K. N., Bergholz, P. W. Landscape-Scale Factors Affecting the Prevalence of *Escherichia coli* in Surface Soil Include Land Cover Type, Edge Interactions, and Soil pH. *Applied and environmental microbiology*. 2018; 84 (10): e02714-17. Doi:10.1128/AEM.02714-17.
9. Kaper J. B., Nataro J. P., Mobley H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*. 2004; 2: 123-40. Doi: 10.1038/nrmicro818.
10. Vila J., Sáez-López E., Johnson J. R., Römling U., Dobrindt U., Cantón R. et al. *Escherichia coli*: an old friend with new tidings. *FEMS microbiology reviews*. 2016; 40 (4): 437-63. Doi:10.1093/femsre/fuw005.
11. Sommer M., Dantas G., Church G. M. Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora.

- Science (New York, N.Y.)*. 2009; 325(5944): 1128-31. Doi: 10.1126/science.1176950.
12. Lerner A., Matthias T., Aminov R. Potential effects of horizontal gene exchange in the human gut. *Frontiers in immunology*. 2017; 8: 1630. Doi: 10.3389/fimmu.2017.01630.
 13. Antibacterial agents in preclinical development: an open access database. Geneva: World Health Organization; 2019. Available at: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/330290/WHO-EMP-IAU-2019.12-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
 14. Sabino J., Hirten R. P., Colombel J. F. Review article: bacteriophages in gastroenterology – from biology to clinical applications. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2020; 51: 53-63. Doi: 10.1111/apt.15557.
 15. Dalenne C., Costa A.D., Decré D., Favier C., Arlet G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2010; 65 (3): 490-5. Doi: 10.1093/jac/dkp498.
 16. Palagin I. S., Sukhorukova M. V., Dekhnich A. V., Edelstein M. V., Perepanova T. S., Kozlov R. S. et al. Antimicrobial resistance of pathogens causing community-acquired urinary tract infections in Russia: results of multicenter study «DARMIS-2018». *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2019; 21(2):134-46. (in Russian)
 17. Gonchar N. V., Partina I. V., Nyrkova O. I., Drap A. C. Resistance of clinical strains of pathogenic *E.coli* to antibiotics and bacteriophage in hospitalized children with escherichiosis in St.Petersburg. *Antibiotiki i khimioterapiya*. 2014; 59 (9-10): 38-43. (in Russian)
 18. Ahmed S. F., Ali M. M., Mohamed Z. K., Moussa T. A., Klena J. D. Fecal carriage of extended-spectrum β -lactamases and AmpC-producing *Escherichia coli* in a Libyan community. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*. 2014; 13:22. Doi: 10.1186/1476-0711-13-22.
 19. Huang I. F., Lee W. Y., Wang J. L., Hung C. H., Hu H. H., Hung W. Y. et al. Fecal carriage of multidrug-resistant *Escherichia coli* by community children in southern Taiwan. *BMC gastroenterology*. 2018; 18(1): 86. Doi: 10.1186/s12876-018-0807-x.
 20. Dyar O. J., Hoa N. Q., Trung N. V., Phuc H. D., Larsson M., Chuc N. T. et al. High prevalence of antibiotic resistance in commensal *Escherichia coli* among children in rural Vietnam. *BMC infectious diseases*. 2012; 12: 92. Doi: 10.1186/1471-2334-12-92.
 21. Gupta M., Didwal G., Bansal S., Kaushal K., Batra N., Gautam V. et al. Antibiotic-resistant *Enterobacteriaceae* in healthy gut flora: A report from north Indian semiurban community. *The Indian journal of medical research*. 2019; 149 (2): 276-80. Doi: 10.4103/ijmr.IJMR_207_18.
 22. Valenza G., Nickel S., Pfeifer Y., Eller C., Krupa E., Lehner-Reindl V. et al. Extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* as intestinal colonizers in the German community. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014; 58 (2): 1228-30. Doi: 10.1128/AAC.01993-13.
 23. Holstiege J., Schink T., Molokhia M. Mazzaglia G., Innocenti F., Oteri A. et al. Systemic antibiotic prescribing to paediatric outpatients in 5 European countries: a population-based cohort study. *BMC Pediatrics*. 2014; 14: 174. Doi:10.1186/1471-2431-14-174.
 24. Boeckel T. V., Gandra S., Ashok A., Caudron Q., Grenfell B., Levin S. et al. Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. *The Lancet Infectious Diseases*. 2014; 14 (8): 742-50. Doi: 10.1016/S1473-3099(14)70780-7.
 25. Auta A., Hadi M. A., Oga E., Adewuyi E. O., Abdu-Aguye S. N., Adeloye D. et al. Global access to antibiotics without prescription in community pharmacies: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Infection*. 2019; 78 (1): 8-18. Doi: 10.1016/j.jinf.2018.07.001.
 26. Egorov A. M., Ulyashova M. M., Rubtsova M. Yu. Bacterial enzymes and antibiotic resistance. *Acta Naturae*. 2018; 10(4): 33-48. (in Russian)
 27. Sukhorukova M. V., Edelstein M. V., Ivanchik N. V., Skleenova E. Yu., Shajdullina E. R., Azyzov I. S. et al. Antimicrobial resistance of nosocomial *Enterobacterales* isolates in Russia: results of multicenter epidemiological study «MARATHON 2015-2016». *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2019; 21(2):147-59. (in Russian)
 28. Karanika S., Karantanos T., Arvanitis M., Grigoras C., Mylonakis E. Fecal colonization with extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* and risk factors among healthy individuals: a systematic review and metaanalysis. *Clinical Infectious Diseases*. 2016; 63(3): 310-8. Doi: 10.1093/cid/ciw283.
 29. Kawamura K., Nagano N., Suzuki M., Wachino J. I., Kimura K., Arakawa Y. ESBL-producing *Escherichia coli* and its rapid rise among healthy people. *Food safety (Tokyo, Japan)*. 2017; 5(4): 122-50. Doi:10.14252/foodsafetyfscj.2017011.
 30. Bartoloni A., Pallecchi L., Benedetti M., Fernandez C., Vallejos Y., Guzman E. et al. Multidrug-resistant commensal *Escherichia coli* in children, Peru and Bolivia. *Emerging infectious diseases*. 2006; 12 (6): 907-13. Doi: 10.3201/eid1206.051258.
 31. Onishchenko G. G., Sheveleva S. A., Khotimchenko S. A. Hygienic substantiation of the permissible levels for tetracycline-group antibiotics in food. *Gigiena i sanitariya*. 2012; 91 (6): 4-14. (in Russian)
 32. Polyak M. S. Antibioticotherapy. Theory and practice. [Antibiotikoterapiya. Teoriya i praktika]. St.Petersburg: InformMed; 2010. (in Russian)
 33. Bourdin G., Navarro A., Sarker S. A., Pittet A. C., Qadri F., Sultana S. et al. Coverage of diarrhoea-associated *Escherichia coli* isolates from different origins with two types of phage cocktails. *Microbial biotechnology*. 2014; 7(2): 165-76. Doi: 10.1111/1751-7915.12113.
 34. Ujmajuridze A., Chanishvili N., Goderdzishvili M., Leitner L., Mehnert U., Chkhotua A. et al. Adapted bacteriophages for treating urinary tract infections. *Frontiers in microbiology*. 2018; 9: 1832. Doi: 10.3389/fmicb.2018.01832.

Поступила 19.06.20

Принята к печати 22.06.20