

Д.В. Тапальский, В.А. Осипов, С.В. Жаворонок

Устойчивость низкого уровня к фторхинолонам у полирезистентных штаммов сальмонелл

Low level resistance to fluoroquinolones in polyresistant *Salmonella*

D.V. Tapal'sky, V.A. Osipov, S.V. Zhavoronok

Гомельский государственный медицинский университет,
Гомельский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья

Антибиотикотерапия не является основным методом лечения сальмонеллезных гастроэнтеритов, но она важна при инвазивных формах инфекции и у пациентов с риском возникновения экстраинтестинальных осложнений. Длительное время препаратами выбора являлись хлорамфеникол, ампициллин и ко-тримоксазол, однако развитие устойчивости сальмонелл к этим препаратам во многих регионах мира представляет существенную проблему. В настоящее время для лечения сальмонеллезов с успехом используются фторхинолоны даже при инфекциях, вызванных полирезистентными штаммами [6, 7].

Ведущим механизмом устойчивости к хинолонам/фторхинолонам является модификация мишеней — двух бактериальных ферментов ДНК-гиразы и топоизомеразы IV, опосредующих конформационные изменения в молекуле бактериальной ДНК, необходимые для ее нормальной репликации. У сальмонелл наибольшее сродство хинолоны проявляют к ДНК-гиразе, благодаря чему именно этот фермент является первичной мишенью их действия. Основным механизмом устойчивости к хинолонам — изменение структуры топоизомераз в результате мутаций в соответствующих генах и аминокислотных замен в молекулах ферментов. В свою очередь аминокислотные замены способствуют снижению сродства хинолонов к ферментам и повышению МПК препаратов [8, 9].

Единичные точечные мутации гена *gugA* приводят к устойчивости к налидиксовой кислоте и устойчивости низкого уровня к фторированным хинолонам. При этом минимальная ингибирующая концентрация для цiproфлоксацина повышается с 0,03 мг/л и ниже у чувствительных штаммов до 0,125—1,0 мг/л [3, 8]. Хотя эти значения дают возможность отнести штаммы к категории «чувствительные» при определении антибиотикорезистентности согласно рекомендованным кон-

трольным точкам для фторхинолонов (NCCLS M2-A7), наблюдаемое десятикратное и более увеличение минимальных ингибирующих концентраций по сравнению с полностью чувствительными штаммами позволяет прогнозировать недостаточный клинический эффект антибиотикотерапии [1]. В доступной литературе имеется ряд сообщений о неудачах этиотропной терапии фторхинолонами экстраинтестинальных сальмонеллезов, вызванных штаммами с устойчивостью низкого уровня (МПК 0,125—1,0 мг/л) к цiproфлоксацину [4, 5].

Вероятно, контрольные точки чувствительности/устойчивости сальмонелл к фторхинолонам будут пересмотрены в ближайшем будущем. На практике присутствие устойчивости к налидиксовой кислоте — надежный маркер устойчивости низкого уровня к фторхинолонам [2].

В европейском многоцентровом исследовании (2000 г.) устойчивость низкого уровня к цiproфлоксацину была выявлена у 13% штаммов *S. typhimurium*, 8% *S. enteritidis*, 53% *S. virchow* и 57% *S. hadar* [10].

В последнее десятилетие накапливаются данные о случаях сальмонеллезов, вызванных полирезистентными штаммами с полной устойчивостью к цiproфлоксацину [8]. Такие штаммы обычно имеют две или больше точечных мутаций в гене *gugA* и дополнительно мутации в *gugB* и *parC*. Суммарное количество таких штаммов в многоцентровых международных исследованиях не превышало 0,2—0,4%.

Цель исследования — оценить состояние резистентности к налидиксовой кислоте и фторхинолонам штаммов сальмонелл в Гомельской области.

Исследования проводились в 2004 г. в рамках программы микробиологического мониторинга патогенных энтеробактерий в Гомельской области.

В бактериологической лаборатории Гомельского областного центра гигиены и эпидемиологии проведе-

на реидентификация и определение антибиотикорезистентности 1076 изолятов сальмонелл 9 различных серотипов, выделенных бактериологическими лабораториями Гомеля и районов Гомельской области от больных-носителей и из объектов внешней среды. Определение чувствительности к 8 антибактериальным препаратам — ампициллину (А), хлорамфениколу (С), налидиксовой кислоте (N), ципрофлоксацину (P), тетрациклину (Т), гентамицину (G), ко-тримоксазолу (R), цефотаксиму (F) — проводилось диско-диффузионным методом на среде Мюллера–Хинтона в соответствии со стандартом NCCLS M2-A7. Качество исследованной контролировалось штаммом *E. coli* ATCC 25922. Внешний контроль качества лабораторных исследований осуществлялся Координирующим центром ВОЗ по антибиотикорезистентности энтеропатогенов (Копенгаген, Дания) в рамках программы EQAS-2004. Для хранения и анализа микробиологической информации, изучения профилей антибиотикорезистентности использовали пакет программного обеспечения микробиологической лаборатории WHONET 5 (ВОЗ, Женева).

Определение МПК ципрофлоксацина для 28 штаммов сальмонелл с различными профилями резистентности проводили методом серийных разведений в бульоне с использованием 96-луночных планшетов для иммунологических исследований (микрометод). Применяли конечные концентрации ципрофлоксацина от 0,008 до 4 мг/л. Для контроля качества параллельно определяли МПК ципрофлоксацина референсных штаммов: *E. coli* ATCC 25922 (МПК 0,004–0,016 мг/л) и *S. aureus* ATCC 29213 (МПК 0,12–0,5 мг/л).

После инокуляции планшеты инкубировали 20–24 ч при температуре 37°C. В качестве отрицательного контроля использовали отдельный планшет, в ячейки которого вносили бульон без антибактериального препарата и бактериальную суспензию. До учета результатов планшет хранили в холодильнике при температуре 4°C. Результаты учитывали визуально, сравнивая рост микроорганизмов в ячейках, содержащих ципрофлоксацин, с ячейками контрольного планшета. Результаты интерпретировали в соответствии с критериями NCCLS (R — МПК ≤4 мг/л, I — МПК = 2 мг/л, S — МПК ≥1 мг/л). Устойчивостью к ципрофлоксацину низкого уровня считали МПК 0,25–1,0 мг/л.

Доминирующими серотипами сальмонелл в Гомельской области традиционно являются *S. enteritidis* и *S.*

Таблица 1

Антибиотикорезистентность доминирующих серотипов сальмонелл (Гомельская обл., 2004 г.)

Препарат	<i>Salmonella enteritidis</i> , n=587			<i>Salmonella typhimurium</i> , n=457		
	%R	%I	%S	%R	%I	%S
Ампициллин	3,6	0,4	96	96,4	0,2	3,4
Хлорамфеникол	4,5	0,5	95	82,3	3,4	14,3
Налидиксовая кислота	10,3	12,9	76,8	4,9	8,0	87,1
Ципрофлоксацин	0	3,6	96,4	0	0,4	99,6
Тетрациклин	19,2	49,1	31,7	87,8	10,8	1,4
Гентамицин	3,2	1,6	95,1	39,6	37,6	22,7
Ко-тримоксазол	4,2	0,2	95,7	74,8	2,5	22,7
Цефотаксим	3,4	3,6	93	90,8	1,4	7,9

Таблица 2

Антибиотикорезистентность доминирующих серотипов сальмонелл: чувствительные и полирезистентные штаммы

Штаммы	<i>S. enteritidis</i>		<i>S. typhimurium</i>	
	абс.	%	абс.	%
Чувствительные штаммы	182	31,0	3	0,7
Устойчивые (R+) к ≥4 АБП / в т. ч. устойчивые к НК	20/7	3,4/1,2	415/57	90,8/12,5
Устойчивые (R+) к ≥6 АБП / в т. ч. устойчивые к НК	5/1	0,9/0,2	266/54	58,2/11,8
Устойчивых (R+) к 7 АБП / в т. ч. устойчивых к НК	0/0	0,0/0,0	45/45	9,8/9,8

typhimurium. Наибольшие уровни антибиотикорезистентности выявлены у штаммов *S. typhimurium* (табл. 1). Особого внимания заслуживает устойчивость к цефотаксиму (90,8% резистентных штаммов) — цефалоспорины III поколения, в настоящее время являющегося одним из препаратов выбора для лечения инвазивных сальмонеллезов.

Среди штаммов *S. enteritidis* преобладали чувствительные штаммы либо устойчивые к 1–2 препаратам. Устойчивость к налидиксовой кислоте встречалась чаще у штаммов этого серотипа (R+ = 23,2%). В европейском многоцентровом исследовании 2000 г. устойчивость *S. enteritidis* к налидиксовой кислоте превышала таковую к другим препаратам и составила 13% [10]. Тем не менее, только у 1,2% штаммов *S. enteritidis* устойчивость к налидиксовой кислоте сочеталась с множественной лекарственной устойчивостью к 4 и более препаратам (табл. 2). У штаммов *S. typhimurium* устойчивость к налидиксовой кислоте отмечалась несколько реже (R+ = 12,3%), однако у 11,8% штаммов она сочеталась с устойчивостью к 6 или 7 препаратам (профили резистентности ACNGRF, ACNTRF, ACNTGR, ACNTGRF), у 9,8% штаммов сохранялась чувствительность только к ципрофлоксацину (профиль резистентности ACNTGRF).

МПК ципрофлоксацина 28 протестированных штаммов составила 0,016—0,5 мг/мл. Наиболее высокие значения МПК (0,5 мг/л) отмечены у 4 штаммов *S. typhimurium* (профиль ACNTGRF, диаметр зоны подавления роста для налидиксовой кислоты 6—8 мм) и 1 штамма *S. enteritidis* (профиль резистентности NT). Из 18 штаммов, устойчивых (R+) к налидиксовой кислоте, только 11 имели устойчивость низкого уровня к ципрофлоксацину (МПК 0,25—0,5 мг/л), МПК остальных устойчивых к налидиксовой кислоте штаммов составила 0,06—0,125 мг/л. Устойчивость низкого уровня к ципрофлоксацину выявлялась преимущественно у штаммов с диаметром зоны подавления роста для налидиксовой кислоты 6—13 мм (категория R — резистентные). Только 1 штамм (9,1%) со сниженной чувствительностью к ципрофлоксацину по чувствительности к налидиксовой кислоте относился к категории I — умеренно устойчивые. Не выявлено штаммов со сниженной устойчивостью к ципрофлоксацину среди 10 штаммов, чувствительных к налидиксовой кислоте (МПК ципрофлоксацина 0,016—0,06 мг/мл). Значения МПК контрольных штаммов соответствовали референсным.

Таким образом, около 10% штаммов *S. typhimurium* с множественной лекарственной устойчивостью (устойчивость к 7 из 8 препаратов основных групп, профиль ACNTGRF) сохраняют чувствительность только к фторхинолонам. Для большинства этих штаммов методом серийных разведений определяется устойчивость низкого уровня к ципрофлоксацину. Несмотря на то что уровень устойчивости к ципрофлоксацину (МПК 0,25—1,0 мг/л) ниже клинически значимого, отмечается увеличение количества неудач при лечении

[5]. В связи с этим следует отметить, что недавно поступил запрос на переоценку минимальных концентраций для фторхинолонов при лечении сальмонеллеза [1]. Возможной альтернативой для лечения могли быть цефалоспорины IV поколения, однако в наших предыдущих исследованиях до 80% полирезистентных штаммов *S. Typhimurium* с профилями ACNGRF, ACNTRF, ACNTGRF были устойчивы (R) к цефепиму.

Накопление в бактериальной популяции полирезистентных штаммов сальмонелл с устойчивостью низкого уровня к ципрофлоксацину может послужить причиной неэффективности этиотропной антибактериальной терапии. Эффективным способом скрининга штаммов со сниженной чувствительностью к ципрофлоксацину является определение резистентности к налидиксовой кислоте диско-диффузионным методом, проводимое в рамках программ мониторинга антибиотикорезистентности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Aarestrup F.M., Wiuff C., Molbak K., Threlfall E.J. // Antimicrob. Agents Chemother. — 2003. — V. 47. — P. 827—829.
2. Albayrak F., Cokca F., Erdem B., Aysev A.D. // Intern. J. of Antimicrob. Agents. — 2004. — V. 23. — P. 332—336.
3. Allen K.J., Poppe C. // Microb. Drug Resist. — 2002. — N 8. — P. 375—383.
4. Davis M.A., Hancock D.D., Besser T.E. // J. Labor. Clin. Med. — 2002. — V. 140. — P. 135—141.
5. Helms M., Vastrup P., Gerner-Smidt P., Molbak K. // Emerg. Infect. Dis. — 2002. — N 8. — P. 490—495.
6. Lawson A.J., Dassama M.U., Ward L.R., Threlfall E.J. // Emerg. Infect. Dis. — 2002. — N 8. — P. 434—436.
7. Lindsay E.A., Lawson A.J., Walker R.A. et al. // Emerg. Infect. Dis. — 2002. — N 8. — P. 732—734.
8. Nakaya H., Yasuhara A., Yoshimura K. et al. // Emerg. Infect. Dis. — 2003. — N 9. — P. 255—257.
9. Parry C.M. // Current Opinion in Infect. Dis. — 2003. — V. 16. — P. 467—472.
10. Threlfall E.J., Fisher I.S.T., Berghold C. et al. // Eurosurveillance. — 2003. — N 8. — P. 41—45.