

## Клинико-микробиологическая характеристика сальмонеллеза и шигеллеза в Санкт-Петербурге

Егорова С.А., Кожухова Е.А., Кафтырева Л.А., Макарова М.А.

Санкт-Петербургский Государственный Медицинский Университет им. акад. И.П.Павлова (СПбГМУ им. акад. И.П.Павлова),

НИИЭМ им. Пастера

### ВВЕДЕНИЕ

Инвазивные диареи и, прежде всего такие, как бактериальная дизентерия и сальмонеллез в настоящее время в Санкт-Петербурге занимают лидирующие позиции в структуре этиологически расшифрованных острых кишечных инфекций (ОКИ) [4, 11, 17]. Значительные трудности в терапии бактериальных ОКИ создает повсеместное появление и распространение полирезистентных к антибиотикам штаммов [14, 15, 21, 29, 30], в связи с чем согласно Отечественным и Европейским рекомендациям [8, 42] энтеропатогены (шигеллы, сальмонеллы, эшерихии и др.) входят в группу микроорганизмов, требующих постоянного мониторинга за их чувствительностью к антимикробным препаратам.

### ЦЕЛЬ

Определить профиль резистентности к антимикробным препаратам штаммов *Salmonella enterica* и *Shigella flexneri*, выделенных в Санкт-Петербурге от госпитализированных взрослых больных сальмонеллезом и шигеллезом, с общей характеристикой контингента заболевших и применяемой этиотропной терапии.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

С целью определения чувствительности к антимикробным препаратам (АМП) 929 штаммов выделенных сальмонелл, относящихся к 32 сероварам, и 834 штамма шигелл Флекснера были протестированы диско - диффузионным методом на агаре Мюллера-Хинтон в соответствии со стандартами NCCLS [31] и МУК 4.12.1890-04 [8]. Чувствительность определялась к ампициллину, цефтазидиму, цефотаксиму, меропенему, хлорамфениколу, ципрофлоксацину, гентамицину, амикацину, канамицину, стрептомицину, тобрамицину, тетрациклину. Продукцию  $\beta$  – лактамаз расширенного спектра действия (БЛРС) подтверждали в тесте синергизма с двумя дисками (цефтазидим и амоксициллин\клавулановая кислота; цефотаксим и амоксициллин\клавулановая кислота).

У штаммов сальмонелл, резистентных к цефалоспорином III была изучена чувствительность к дополнительным АМП: тикарциллин, пиперациллин, цефалотин,

Дата поступления: 8.12.2006.

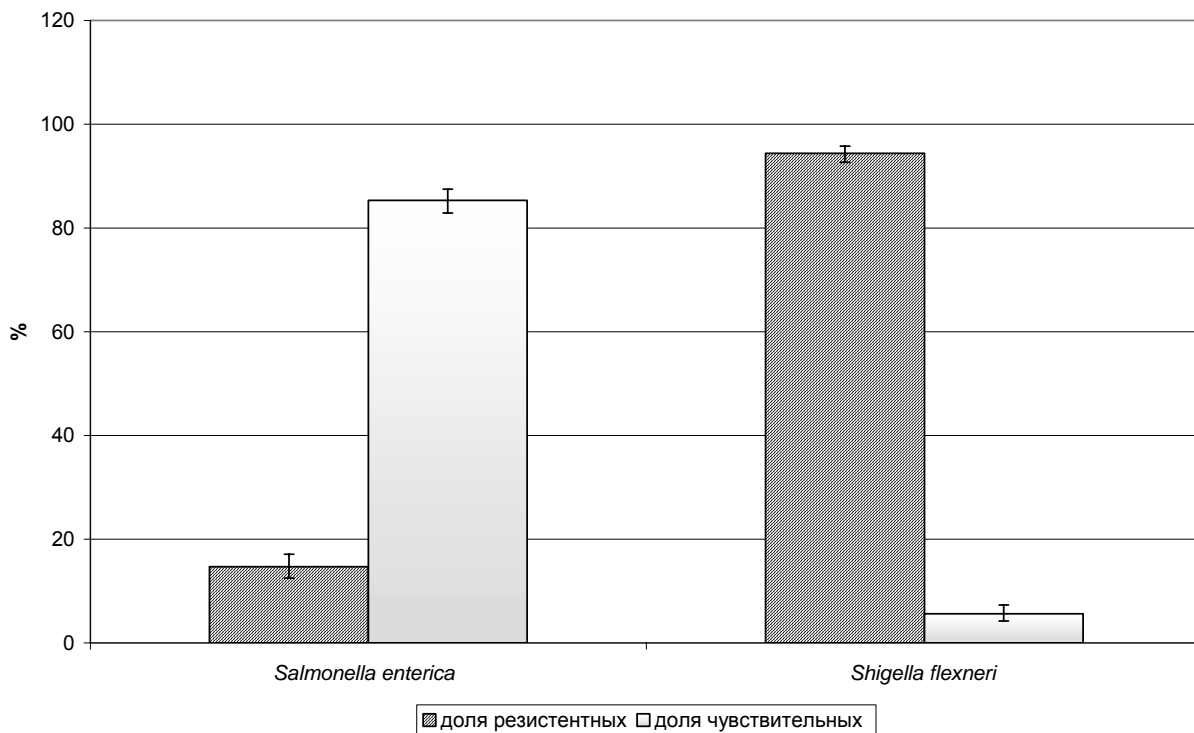
цефамандол, цефоперазон, цефокситин, цефтриаксон, цефепим, налидиксовая кислота, сульфаниламиды, триметоприм, спектиномицин, азтреонам, латамоксеф. Наличие генов  $\beta$  – лактамаз ( $bla_{TEM}$ ,  $bla_{CTX-M}$ ,  $bla_{CMY}$ ) и мобильных генетических элементов - интегрона I класса и ISEcp1 подтверждали методом ПЦР со специфическими праймерами. Выделение плазмид проводили по методу Takahashi и Nagano с последующей оценкой размера плазмидной ДНК путем сравнения с плазмидами известных размеров из коллекции парижского Института Пастера pIP173 (125.8 kb), RP4 (56 kb), Tr116 (210 kb). Трансформацию плазмидной ДНК осуществляли путем электропорации (БиоРад) с использованием в качестве реципиентных клеток *E.coli* DH10 В. Общую характеристику больных, клинические изоляты которых исследовались на чувствительность к АМП, изучали на основании ретроспективного анализа 415 историй болезни: 292 больных моно и микст шигеллезом Флекснера и 123 больных моно и микст сальмонеллезом, госпитализированных в 2002-2005 гг. в инфекционную больницу им. С.П. Боткина в Санкт - Петербурге. Для статистической обработки результатов использовали пакет программ SPSS 12.0 версия и STATISTICA 6.0. Статистически значимым считали различие при величине  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В популяции изученных сальмонелл с абсолютным преобладанием *S.D enteritidis* ( $59 \pm 8,5$  %) резистентными оказались  $14 \pm 2,4$  % штаммов. Доля резистентных штаммов среди изученных шигелл Флекснера с абсолютным преобладанием *S.flexneri 2a* ( $56 \pm 5,7$  %) и *S.flexneri 3a* ( $38 \pm 5,6$  %) значительно превышала таковую среди сальмонелл ( $p < 0,001$ ), составив  $94 \pm 1,7$  % (рис.1).

Рис.1.

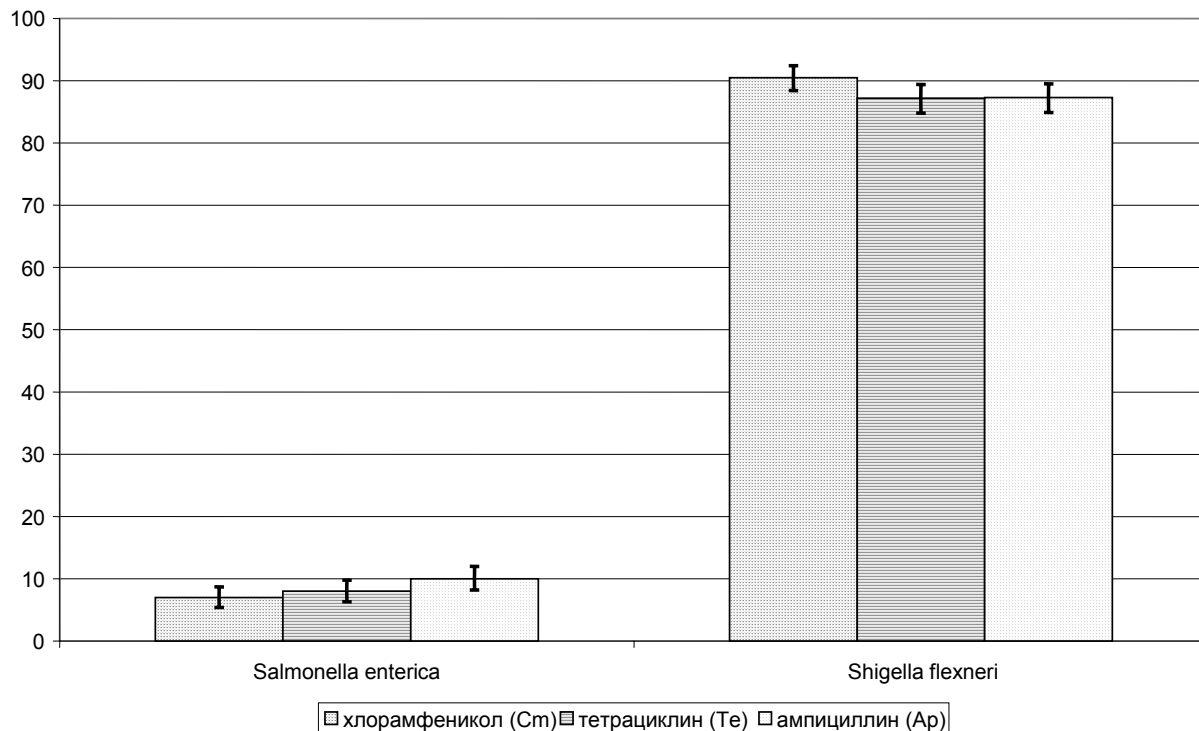
Соотношение доли резистентных и чувствительных к АМП штаммов в популяциях *Salmonella enterica* и *Shigella flexneri* (клинические изоляты, Санкт-Петербург, 2002-2005 гг.)



В популяции изученных энтеропатогенов наиболее часто отмечалась резистентность к ампициллину (Ар), тетрациклину (Те) и хлорамфениколу (См). Так, у сальмонелл резистентность к перечисленным АМП встречалась в  $10 \pm 2,0 \%$ ,  $8 \pm 1,8 \%$  и  $7 \pm 1,7\%$  случаев соответственно. В изученной популяции шигелл Флекснера доля резистентных к перечисленным АМП оказалась значительно выше:  $87 \pm 2,4 \%$ ,  $87 \pm 2,2 \%$  к Ар и Те соответственно и  $90,5 \pm 2,1\%$  к См (рис. 2).

Рис.2.

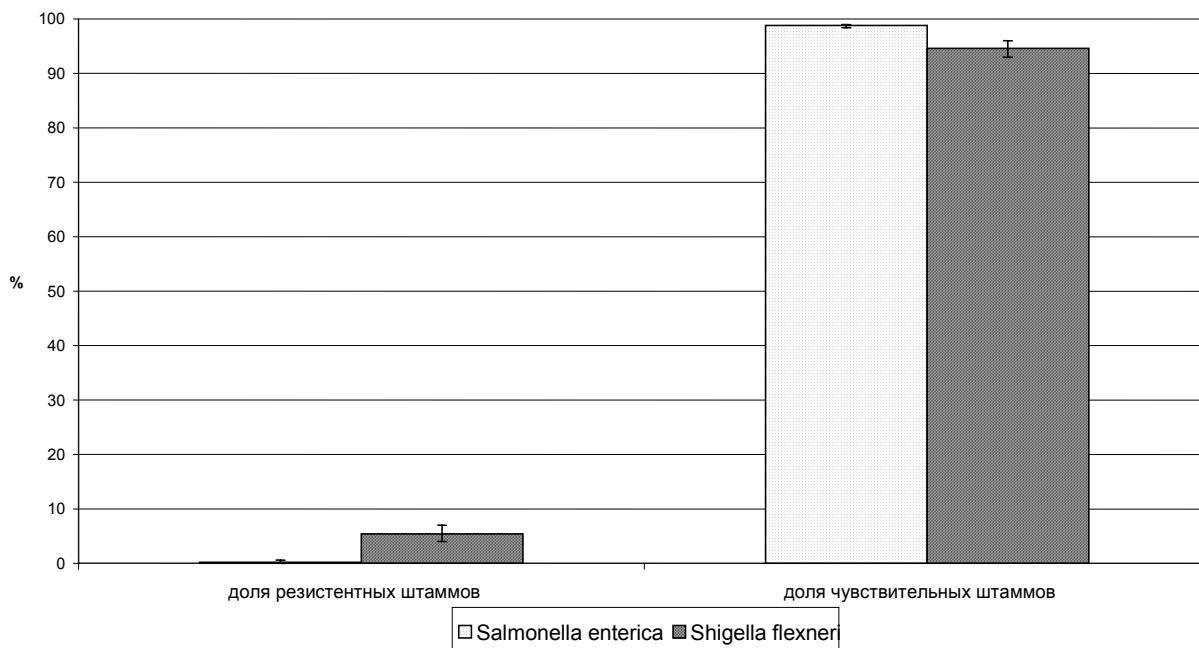
Доля резистентных к Cm, Te и Ap штаммов в популяции *Salmonella enterica* и *Shigella flexneri* (клинические изоляты, Санкт-Петербург, 2002-2005 гг).



Как видно из данных рисунка 3. суммарная за четыре года резистентность изученных штаммов к гентамицину как среди шигелл, так и сальмонелл оказалась невысокой, при этом разница в частоте обнаружения резистентных штаммов между популяцией шигелл и сальмонелл оказалась значимой ( $p < 0,001$ ).

Рис. 3.

Доля резистентных к гентамицину штаммов в популяции *Salmonella enterica* и *Shigella flexneri* (клинические изоляты, Санкт-Петербург, 2002-2005 гг).



Дата поступления: 8.12.2006.

При скрининговом исследовании два штамма сальмонелл : *Salmonella enterica* серовар Newport 9854 and *Salmonella enterica* серовар Virchow 4259 оказались резистентными к цефалоспорином III поколения. Среди шигелл один штамм шигелл Флекснера 2a (*Shigella flexneri 2a 861*) был, как и подавляющее большинство других шигелл резистентным к ампициллину, тетрациклину и хлорамфениколу, и в дополнение к этому оказался резистентным ко всем изученным аминогликозидам и цефтазидиму.

Дальнейшее изучение двух штаммов сальмонелл с расширенным спектром АМП выявило устойчивость штамма *Salmonella enterica* серовар Virchow 4259 к ампициллину, тикарциллину, пиперациллину, цефалотину, цефамандолу, цефоперазону, цефтриаксону, цефепиму, тетрациклину, налидиксовой кислоте, сульфаниламидам, триметоприму и аминогликозидам (стрептомицину, гентамицину, канамицину, спектиномицину и тобрамицину), исключая амикацин. При этом штамм оставался чувствительным к цефтазидиму, цефокситину, азтреонаму, латамоксефу, имепенему, фторхинолонам и хлорамфениколу. Полученный фенотип резистентности позволил предположить продукцию штаммом БЛРС, что подтвердилось наличием синергизма между оксимино -  $\beta$ -лактамами и клавулановой кислотой. С помощью ПЦР было выявлено, что штамм обладает *bla*<sub>CTX-M</sub> геном субтипа *bla*<sub>CTX-M315</sub>, инсерционной последовательностью *ISEcp1*, расположенной в непосредственной близости перед *bla*<sub>CTX-M</sub> геном и интегроном I класса. Штаммы, обладающие  $\beta$ -лактамазами CTX-M типа, кодируемых трансферабельными плазмидами встречаются среди энтеробактерий по всему миру [18, 28, 35, 40], в том числе в России среди внутрибольничных штаммов *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* [22] и *Salmonella enterica* serotype Typhimurium [23, 26, 37].

Штамм *Salmonella enterica* серовар Newport 9854 был резистентен к ампициллину, тикарциллину, пиперациллину, цефалотину, цефамандолу, цефоперазону, цефтриаксону, цефтазидиму, цефокситину, тетрациклину, сульфаниламидам, хлорамфениколу и аминогликозидам (исключая амикацин). Чувствительность к  $\beta$ -лактамам не восстанавливалась клавулановой кислотой. Штамм сохранял чувствительность к цефепиму, имепенему, латамоксефу, триметоприму, налидиксовой кислоте и фторхинолонам. Резистентность штамма к цефокситину и отсутствие восстанавливающей активности цефалоспоринов действия со стороны клавулановой кислоты свидетельствовали о продукции  $\beta$ -лактамазы молекулярного класса C: AmpC  $\beta$ -лактамазы. Плазмидно-кодируемые AmpC  $\beta$ -лактамазы выявлены среди клинических штаммов *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* и *Enterobacter aerogenes* в Европе, США и других странах [33]. Они также описаны у штаммов *Salmonella enterica*, выделенных от людей и из пищевых продуктов во многих странах [19, 27]. Среди AmpC  $\beta$ -лактамаз

Дата поступления: 8.12.2006.

наиболее часто описаны цефалоспорины СМУ, кодируемые генами *bla*<sub>СМУ</sub> [20, 38]. ПЦР анализ штамма на наличие генов *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>СМУ</sub> и анализ аминокислотного сиквенса, выявил наличие гена *bla*<sub>СМУ-2</sub> и присутствие интегрона I класса. Плазмидный анализ обоих штаммов сальмонелл показал, что штаммы обладают плазмидой размером > 200 kb. Локализация *bla*- генов и детерминант резистентности к другим АМП в составе плазмид обоих штаммов была подтверждена опытами по трансформации плазмидных ДНК.

Продукцию БЛРС у штамма *S. flexneri* 2a 861 подтвердили в тесте синергизма с двумя дисками (цефтазидим и амоксициллин\клавулановая кислота; цефотаксим и амоксициллин\клавулановая кислота).

Анализ контингента больных шигеллезом Флекснера и гастроинтестинальной формой сальмонеллеза, показал, что среди пациентов преобладали мужчины (61,8%). Возраст больных варьировал от 15 до 93 лет с преобладанием больных в возрастной категории 31-60 лет (53,7%). Подавляющее большинство больных переносили среднетяжелую (74,3%), остальные – тяжелую форму заболевания. Сопутствующая патология выявлена у 73 % больных. Средняя продолжительность пребывания в стационаре составила  $10,5 \pm 0,32$  койко-дня, длительность лихорадки и патологического стула  $4,8 \pm 0,26$  и  $8,8 \pm 0,35$  соответственно.

*Salmonella enterica* серовар Virchow 4259 была выделена из стула пациента, уроженца Татарстана (мужчина 38 лет), прибывшего в Санкт-Петербург уже с симптомами ОКИ; *Salmonella enterica* серовар Newport 9854 - из стула пациента 23 лет, уроженца Армении, проживающего в Санкт-Петербурге, симптомы гастроэнтероколита у которого появились на фоне получения терапии в отделении хронического гемодиализа в одной из больниц города (с режимом 3 раза в неделю). Штамм *S. flexneri* 2a 861 был выделен у мужчины 30 лет; жителя Ленинградской области. Во всех трех случаях заболевание имело среднетяжелое течение.

Анализ этиотропной антибактериальной терапии показал, что практически все больные получали препараты фторхинолонового ряда (преимущественно ципрофлоксацин). При этом только перорально препарат получали 81,8% больных, только внутривенно - 6,7%, а 11,5% пациентов получали препарат *per os* в комбинации с внутривенным введением. В среднем курс перорального и парентерального введения препарата составил  $5 \pm 0,1$  и  $3 \pm 0,3$  дня соответственно. Подавляющее большинство больных (82%) за время заболевания наряду с фторхинолоновыми антибиотиками получали одновременно второй АМП. Чаще других в качестве второго антибиотика назначали гентамицин и ампициллин (83,4% и 7,4% больных соответственно). Почти четверть больных (24%) получали три АМП, 6% - четыре АМП.

## ВЫВОДЫ

1. Доля резистентных штаммов в популяции изученных сальмонелл, преимущественно представленных *S.D enteritidis*, оказалась значительно меньше, чем в популяции изученных шигелл Флекснера.
2. Самым распространенным профилем резистентности как среди сальмонелл, так и среди шигелл оказалась сочетанная резистентность к трем АМП - ампициллину, тетрациклину и хлорамфениколу.
3. Два штамма сальмонелл - *Salmonella enterica* серовар Virchow 4259 и *Salmonella enterica* серовар Newport 9854, и один штамм шигелл – *Shigella flexneri 2a* 861 продемонстрировали полирезистентность к АМП, включая гентамицин и цефалоспорины III поколения, и способность продуцировать БЛРС.
4. Все штаммы сохраняли чувствительность к цiproфлоксацину, основному препарату этиотропной терапии бактериальных ОКИ.
5. С достаточно высокой частотой за период заболевания больные получали одновременно два и три АМП. У большинства больных в качестве второго АМП назначался гентамицин. Выявленная резистентность к гентамицину, особенно выраженная у шигелл Флекснера 2а и 3а, требует дополнительного рассмотрения целесообразности использования этого антибиотика в терапии шигеллеза и сальмонеллеза.

## БЛАГОДАРНОСТЬ

Авторы выражают глубокую признательность сотрудникам бактериологической лаборатории больницы им. С.П. Боткина ( зав. лаб. Т.И.Шестакова) и лаборатории биоразнообразия бактерий Института Пастера Парижа ( зав. лаб. Patric Grimont) за помощь в осуществлении работы.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бондарснко В. М., Боев Б. В., Лыкова Е. А., Воробьев А. А. // Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии. - 1999.- № 1.- С. 66 -70.;
2. Бондарснко В. М., Лиходед В.Г., Воробьев А. А. // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2004. - №4. - С. 90 - 93.;
3. Воробьев А.А., Борисова Е.В., Моложавая О.С., Борисов В.А. // Вестн. Рос. АМН.- 2001.- №2.- С 21 – 25.).

4. Журкин А.Т., Макарова Т.В., Ставитская Е.Л. // Клиническая медицина.- 1996.- Т.74, №9.-С. 32-33.
5. Красноголовец В. Н. Дисбактериоз кишечника. М.: Медицина, 1989.208 с.
6. Лобзин Ю.В.// Эпидемиология и инф.болезни.-1999.- №6.- С 50-54.
7. Маркова Ю.А., Мамонтова Л.М., Савилов Е.Д. // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.- 2002.- №2.- С. 6 – 8.;
8. Методические указания по определению чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам, МУК 4.12.1890-04, Минздрав России, Москва,2004
9. Милютин Л.Н., Рожнова С.Ш., Цешковский И.С. // Эпидемиология и инфекц. болезни.-1998.- №1.-С.33 - 37.
10. Покровский В. И, Ющук Н. Д. Бактериальная дизентерия. М.: Медицина, 1994.367 с.
11. Рахманова А.Г., Жолобов В.Е., Курчанов В.И., и соавт. Инфекционная заболеваемость в Санкт-Петербурге по материалам инфекционных стационаров и амбулаторно-поликлинических учреждений. Альманах «Инфекционные болезни – 2003» \Под общей ред. А.Г. Рахмановой, А.А. Яковлева, Е.Н. Виноградовой.- СПб.:Изд-во НИИХ СПбГУ, 2004,13-29;
12. Сборник официальной статистики Федерального центра государственного санитарно-эпидемиологического надзора Министерства здравоохранения Российской Федерации. Информационный сборник статистических и аналитических материалов (часть I):инфекционная заболеваемость в Российской Федерации в 2001-2003 г.;
13. Солодовников Ю.П., Тибекин А.Т.,Кобзева О.Б. и соавт. //Журн. микробиол.-1999.- №6.- С.121.;
14. Страчунский Л.С.// Клини Микробиол Антимикроб Химиотер .-2005.-Т.7, №1.-С.92-96
15. Страчунский Л..С., Кречикова О. И, Иванов А. С. и др. // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. .-2000. -Т. 2, № 2. -С. 65-69.
16. Таликова Е. В. Клинико-бактериологические аспекты дизентерии Флекснера у детей в период повышенной заболеваемости, принципы диагностики и терапии // Автореф. дис.... канд. мед. наук. СПб., 1998. 163 с.
17. Шестакова Т.И., Петрова Л.Ю., Абакумова Н.М. и соавт. Бактериальные инфекции по материалам клинико-диагностической лаборатории городской инфекционной больницы №30 им. С.П. Боткина с 1999 по 2002 годы. Инфекционные заболевания в



- Санкт-Петербурге на рубеже веков. Сб., посв.300-летию Санкт-Петербурга. СПб, 2003,146;
18. Batchelor M., K. Hopkins, E.J. Threlfall, F.A. Clifton-Hadley, A.D. Stallwood, R.H. Davies, and E. Liebana. //Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Apr. 2005, p. 1319-1322.
  19. Batchelor M., K.L.Hopkins, E.J.Threlfall, F.A.Clifton-Hadley, A.D.Stallwood, R.H.Davies, and E.Liebana. //Journal of Clinical Microbiology, May 2005, p.2261-2265.
  20. Betina E. Orman, Silvia A. Pineiro, Sonia Arduino, Marcelo Galas, Roberto Melano, Maria I. Caffer, Daniel O. Sordelli, and Daniela Centron. //Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Dec.2002, p.3963-3970.
  21. Binsztein N, Picandet A. M, Notario R. et al. //Rev. Latinoam Microbiol, 1999. Vol. 41, N 3,p. 121-126.
  22. Edelstein M., M.Pimkin, I.Palagin, I.Edelstein, and L.Stratchounski. // Antimicrob.Agents Chemother. Dec.2003, p.3724-3732
  23. Edelstein M., M.Pimkin, T.dmitrachenko, V.Semenov, N.Kozlova, D.Gladin, A.Baraniak, and L.Stratchounski. // Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Aug.2004, p.2808-2815.
  24. Edrington TS, Schultz CL, Bischoff KM, Callaway TR, Looper ML, Genovese KJ, Jung YS, McReynolds JL, Anderson RC, Nisbet DJ. // Microb. Drug. Resist. 2004 Spring; 10 (1): 51-6.
  25. Garattoli A., F. Tosini, W.P. Giles, M.E. Rupp, S.H. Hinrichs, F.J. Angulo, T.J. Barrett, and P.D. Fey. // Antimicrobial agents and chemotherapy, May 2000, p.1269-1272.
  26. Gazouli M., S.V.Sidorenko, E.Tzelepi, N.S.Kozlova, D.P.Gladin and L.S.Tzouveleki // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 1998, 41: 119-121.
  27. Gupta Amita, John Fontana, Colleen Crowe, Barbara Bolstroff, Alison Stout, Susan Van Duyn, Mike P. Hoekstra, Jean M. Whichard, Timothy J. Barrett, and Frederick J. Angulo. // Journal of Infectious Diseases, 2003,188:1707-16.
  28. Hasman Henrik, Dik Mevius, Kees Veldman, Inger Olesen and Frank M. Aarestrup //Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2005, 56: 115-121.
  29. Jos Bogaerts, Jan Verhaegen, Jean Paul Munyabikali, Bernadette Mukantabana, Paul Lemmens, Jos Vandeven and Jos Vandepitte' //Diagnostic Microbiology and Infectious Disease .1997, Volume 28, Issue 4 , p. 165-171
  30. Larry K. Pickering. // Seminars in Pediatric Infectious Diseases . 2004.Vol. 15, Is. 2 ,p.71-77
  31. NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, Approved standard 8th Edition. NCCLS document M2-A8. NCCLS, Wayne, PA, USA, 2003.

32. Notification of Communicable Diseases in the Baltic Sea and Barents Regions, 2002. *EpiNorth* 2003;3\4:46-48;
33. Philippon Alain, Guillaume Arlet, and George A. Jacoby. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Jan.2002, p.1-11.
34. Poirel Laurent, Jean-Winoc Decousser, and Patrice Nordmann. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Sep. 2003, p.2938-2945.
35. Politi L, Tassios PT, Lambiri M, Kansouzidou A, Pasiotou M, Vatopoulos AC, Mellou K, Legakis NJ, Tzouvelekis LS. // *J. Clin. Microbiol.* 2005 Jul; 43 (7): 3453-6.
36. Poppe C., L.C.Martin, C.L.Gyles, R.Reid-Smith, P.Boerlin, S.A.McEwen, J.F.Prescott, and K.R.Forward. // *Applied and Environmental Microbiology*, Mar.2005, p. 1184-1192
37. Tassois P.T., M.Gazouli, E.Tzelepi, H.Milch, N.Kozlova, S.Sidorenko, N.J.Legakis, and L.S.Tzouvelekis. // *Journal of Clinical Microbiology*, Nov.1999, p.3774-3777.
38. Yan Jing-Jou, Wen-Chien Ko, Cheng-Hsun Chiun, Shu-Huei Tsai, Hsiu-Mei Wu, and Jiunn-Jong Wu.. // *Emerging Infectious Diseases*. 2003, **9(3)**: 323-328
39. Zhao S., S. Qaiyumi, S. Friedman, R. Singh, S.L. Foley, D.G. White, P.F. McDermott, T. Doncar, C. Bolin, S. Munro, E. J. Baron, and R.D. Walker. // *Journal of Clinical Microbiology*, Dec.2003, p.5366-5371.
40. Weill François-Xavier, Renaud Lailier, Karine Praud, Annaëlle Kérouanton, Laëtitia Fabre, Anne Brisabois, Patrick A.D. Grimont, and Axel Cloeckeaert. // *Journal of Clinical Microbiology*, Dec.2004, p.5767-5773
41. Winokur P.L., A. Brueggemann, D.L. DeSalvo, L. Hoffman, M.D. Apley, E.K. Uhlenhopp, M.A. Pfaller, and G.V. Doern. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Oct.2000, p.2777-2783.
42. European Committee for Clinical Laboratory Standards. Standards for quality assurance. Part I: Terminology and general principles. ECCLS Document.1985;2(1).