

Микробиологическое обоснование выбора антимикробных препаратов для терапии сальмонеллёза у детей

Л. П. ЖАРКОВА*, Н. Н. СМОЛЯНКИН, А. И. ГРЕКОВА, С. Н. КОЗЛОВ

Смоленский государственный медицинский университет, Смоленск

Microbiological Justification of the Germicide Selection for the Treatment of Salmonellosis in Children

L. P. ZHARKOVA, N. N. SMOLYANKIN, A. I. GREKOVA, S. N. KOZLOV

Smolensk State Medical University, Smolensk

Проведено определение чувствительности штаммов сальмонелл *in vitro* методом последовательных разведений в бульоне с определением МПК к антимикробным препаратам в соответствии с критериями EUCAST 2015 и Российскими клиническими рекомендациями. Установлена высокая активность цефалоспоринов III поколения (цефотаксим, цефепим), азитромицина, ко-тримоксазола при наличии резистентности сальмонелл к ципрофлоксацину (24,3%).

Ключевые слова: штаммы сальмонелл, МПК антибиотиков, цефалоспорины III поколения, азитромицин, ципрофлоксацин, ко-тримоксазол, дети.

The article presents the data on determination of sensitivity of *Salmonella* strains *in vitro* by the method of serial dilutions in broth with the determination of the minimum inhibitory concentrations (MIC) to antimicrobial agents in accordance with the 2015 EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing European Committee for determination of sensitivity to antimicrobial agents) criteria and national clinical guidelines. The study demonstrated a high pharmacodynamic activity of the III generation cephalosporins (Cefotaxime, cefepime), azithromycin, co-trimoxazole and the presence of *Salmonella* with resistance to ciprofloxacin (24.3%).

Key words: *Salmonella* strains, MIC of antibiotics (III generation cephalosporins, azithromycin, ciprofloxacin, co-trimoxazole), children.

Среди бактериальных инфекций, протекающих с синдромом колита, сальмонеллёз занимает лидирующие позиции у детей раннего и дошкольного возраста [1]. В Смоленской области на протяжении последних 10 лет заболеваемость сальмонеллёзом среди детского населения превышает таковую у взрослых в 2,5 раза [2].

В качестве АМП для эмпирической терапии сальмонеллёзов современными рекомендациями предлагаются препараты группы фторхинолонов (ФХ), цефалоспорины (ЦС) III поколения и триметоприм/сульфаметоксазол (ко-тримоксазол). В педиатрической практике препаратами выбора признаны ЦС III поколения как АМП с природной активностью в отношении сальмонелл, благоприятными фармакокинетическими свойствами, высокой активностью и хорошей переносимостью. Рядом зарубежных исследователей показана высокая клиническая эффективность лечения сальмонеллёза препаратом из группы макролидов — азитромицином [3].

Были получены штаммы сальмонелл от пациентов, участвующих в многоцентровом проспективном сравнительном исследовании по изучению клинической и микробиологической эффективности антимикробных препаратов (АМП) цефиксима и азитромицина при лечении острых кишечных инфекций (ОКИ) с синдромом колита у детей. В большинстве случаев (85,4%) был диагностирован сальмонеллёз, протекающий с высокой лихорадкой и наличием примеси крови в кале. Оба исследуемых АМП продемонстрировали высокую клиническую эффективность: азитромицин (Сумамед®) — 96,6%, цефиксим (Супракс®) — 92,9% и сходную динамику основных клинических симптомов заболевания [4]. При этом микробиологическая эффективность азитромицина (Сумамед®) оказалась выше, чем цефиксима (Супракс®) (81,8 и 52,6%), что послужило основанием для изучения фармакодинамических параметров ряда антибиотиков *in vitro* в целях прогнозирования их клинической эффективности.

Материал и методы

Чувствительность сальмонелл к антибиотикам определяли методом последовательных разведений в бульоне с определением минимальных подавляющих концентраций (МПК)

© Коллектив авторов, 2017

*Адрес для корреспонденции: 214025 Смоленск, ул. Нахимова, 23—37. СГМУ

АМП, рекомендованных для терапии сальмонеллёза. Результаты интерпретировались в соответствии с критериями EUCAST 2015 (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing — Европейский комитет по определению чувствительности к антимикробным препаратам) и отечественными клиническими рекомендациями [5].

Результаты исследования

Проведенное микробиологическое исследование установило высокую чувствительность выделенных штаммов сальмонелл к ЦС III поколения — цефотаксиму, цефиксиму (рис. 1, 2).

В ходе исследования были выявлены по 1 штамму сальмонелл с МПК, далеко выходящими за пределы диапазона чувствительности к ЦС III (МПК цефотаксима = 256 мг/л и МПК цефиксима — 512 мг/л).

Все выделенные штаммы сальмонелл по распределению МПК были чувствительны к азитромицину — антибиотику из группы 15-членных макролидов (рис. 3). Пограничное значение МПК азитромицина, по данным EUCAST, установленное только для «диких» штаммов *Salmonella* spp., не превышает 16 мг/л. Исходя из этого штаммы, у которых МПК не превышало 16 мг/л позволило ориентировочно считать их чувствительными к этому препарату [6].

Распределение штаммов сальмонелл по МПК фторхинолонов (рис. 4) показало группирование большинства из них в области низких значений. В группу тестируемых АМП была включена налидиксовая кислота как маркер эпидемиологического мониторинга антибиотикорезистентности сальмонелл. Распределение МПК налидиксовой кислоты для сальмонелл (рис. 5) показало наличие штаммов сальмонелл с МПК, равной 126 и 256 мг/л (по 2,7%), что указывает на снижение чувствительности не только к налидиксовой кислоте, но и возрастанию риска мутаций, обуславливающих устойчивость к ФХ.

В соответствии с международными рекомендациями по определению чувствительности (EUCAST, 2015) и Российскими клиническими рекомендациями выделение сальмонелл с МПК ципрофлоксацина в диапазоне >0,06 мг/л указывает на наличие у них мутаций генов (*gyrA* и *gyrB*), обуславливающих синтез бактериальных ферментов (ДНК-гиразы и топоизомеразы IV) и формирование резистентности тестируемых штаммов сальмонелл к препарату [7].

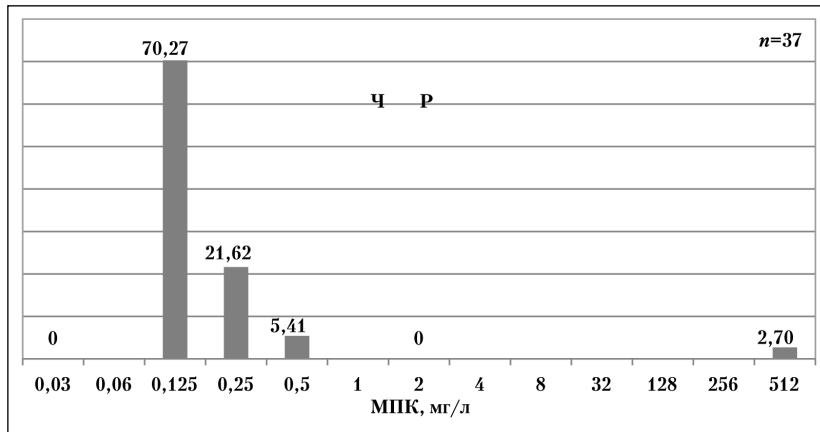


Рис. 1. Распределение штаммов *Salmonella* spp. по чувствительности к цефиксиму, %.

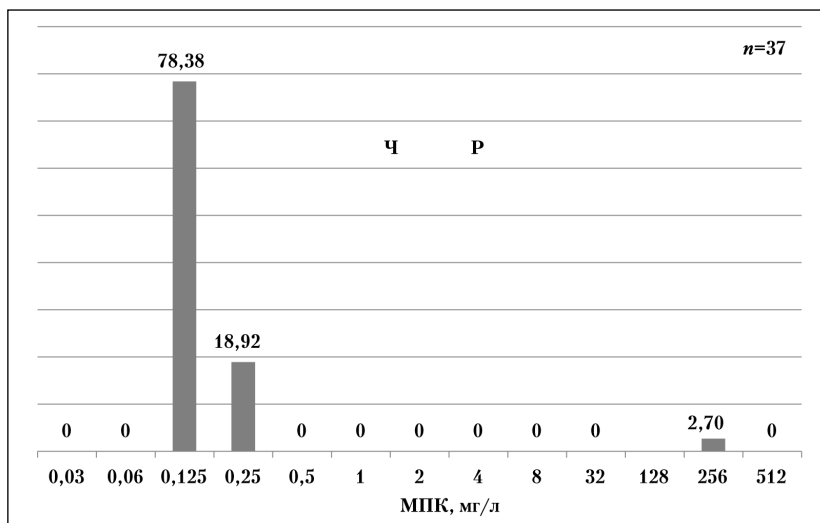


Рис. 2. Распределение штаммов *Salmonella* spp. по чувствительности к цефотаксиму, %.

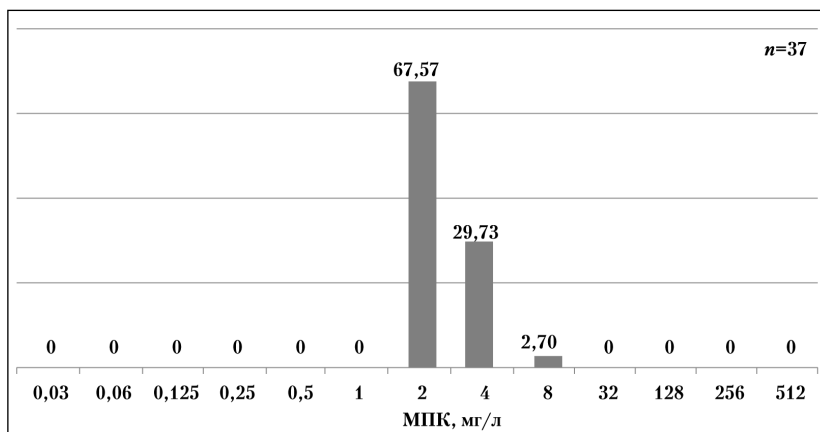


Рис. 3. Распределение штаммов *Salmonella* spp. по чувствительности к азитромицину, %.

Появление таких штаммов сальмонелл может быть связано с высоким риском клинической неэффективности при эмпирическом подходе выбора АМП.

Появление штаммов сальмонелл с МПК ципрофлоксацина более 0,06 мг/л не позволяет рассматривать его как препарат для эмпирической терапии ОКИ с синдромом колита без определения чувствительности к нему выделенных штаммов.

Тестирование выделенных штаммов сальмонелл по чувствительности к ко-тримоксазолу показало группирование штаммов бактерий в области низких значений МПК, с единичными штаммами в диапазоне значений МПК — 128 мг/л и 256 мг/л (рис. 6).

Полученные результаты тестирования свидетельствуют о чувствительности выделенных штаммов сальмонелл к ко-тримоксазолу и возможность его рекомендации к применению в терапии сальмонеллёзов.

Обсуждение результатов

В современных условиях эффективная антимикробная терапия зависит от точности исследования по определению чувствительности патогенных бактерий в лаборатории. Референтный метод последовательных микроразведений в повседневной практике микробиологических лабораторий не применяется из-за значительной трудоёмкости. Однако именно этот метод используется как «калибрующий» для наиболее распространённого в рутинной практике диско-диффузионного метода. Результаты оценки антибиотикочувствительности бактерий, полученные с помощью референтного метода, используют для обоснования микробиологических и клинических критериев чувствительности [6].

В соответствии с зарубежными и отечественными рекомендациями препаратами выбора для эмпирической терапии сальмонеллёзов у взрослых пациентов являются фторхинолоны, цефалоспорины III поколения, ко-тримоксазол и

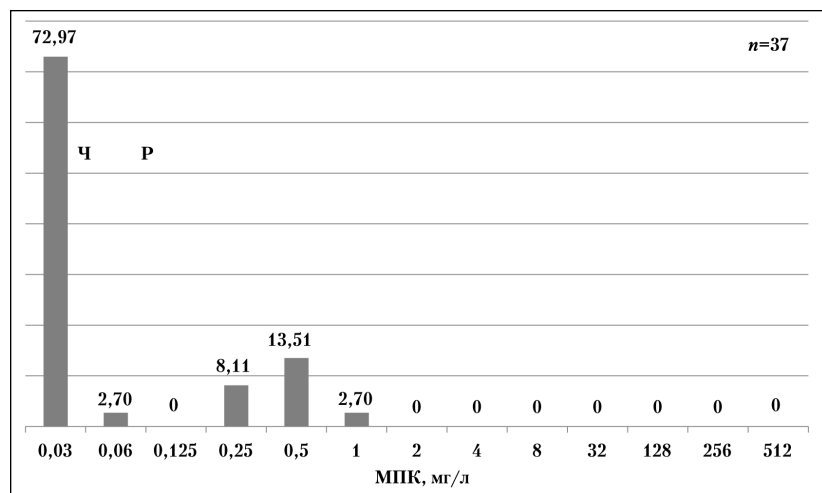


Рис. 4. Распределение штаммов *Salmonella* spp. по чувствительности к ципрофлоксацину, %.

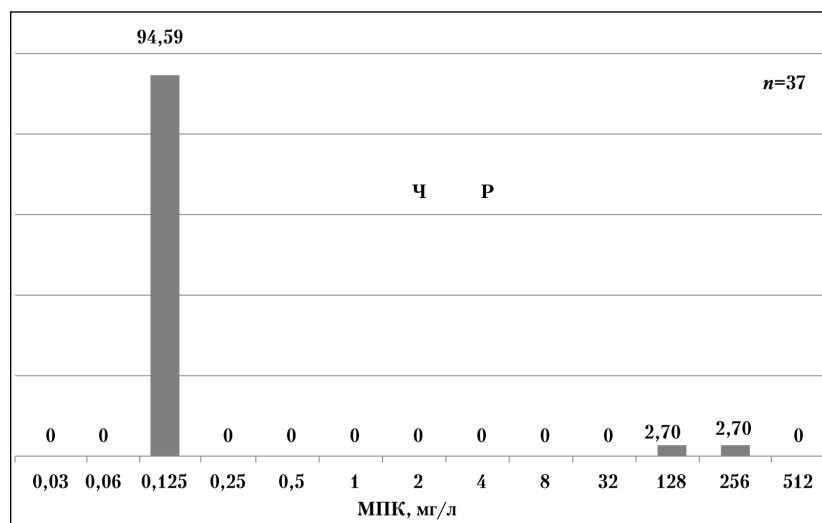


Рис. 5. Распределение штаммов *Salmonella* spp. по чувствительности к налидиксовой кислоте, %.

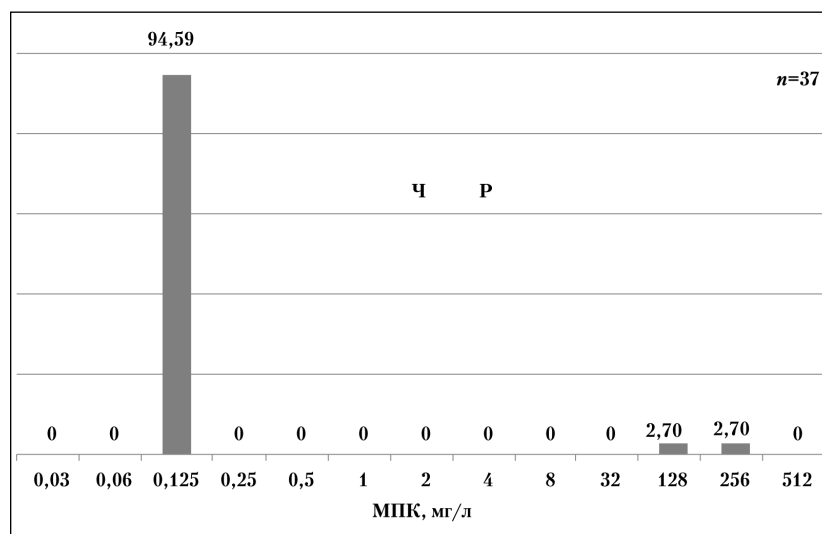


Рис. 6. Распределение штаммов *Salmonella* spp. по чувствительности к ко-тримоксазолу, %.

азитромицин. В то же время в педиатрической практике таковыми признаны ЦС III поколения, как АМП с природной активностью в отношении сальмонелл, благоприятными фармакокинетическими свойствами, доказанной высокой эффективностью и хорошей переносимостью [8]. Однако имеются публикации о появлении устойчивых к ЦС штаммов *Salmonella*, продуцирующих бета-лактамазы расширенного спектра (БЛРС), что может повлиять на эмпирическое назначение данных препаратов. В России частота выделения таких штаммов среди сероваров *S.virchow*, *S.enteritidis*, *S.typhimurium*, *S.newport*, по данным различных исследователей, составляет 0,2–10,0% [7–10]. Кроме того, обнаружена продукция БЛРС генетической группы СТХ-М и цефалоспориноаз AmpC [7, 11, 12]. Выявление таких штаммов не вызывает затруднений в практике бактериологической лаборатории при условии включения в рутинное тестирование штаммов *Salmonella* как минимум двух ЦС (цефтазидима и цефотаксима) и выполнения подтверждающих тестов (в различных модификациях).

Исследованиями последних лет показано, что в настоящее время в популяции *Salmonella* высока доля штаммов, резистентных к хинолонам [7–9]. Назначение препаратов из группы ФХ возможно в педиатрической практике только при доказанной резистентности к ЦС. Определяющим критерием для назначения препаратов этой группы при лечении сальмонеллёзов являются значения МПК ципрофлоксацина. В ведущих зарубежных рекомендациях по определению чувствительности к АМП (EUCAST — Европейского комитета по определению чувствительности микроорганизмов к АМП; CLSI — Института клинических лабораторных стандартов США), а также в отечественных клинических рекомендациях «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» [4, 5] предложен особый подход при тестировании чувствительности к ФХ штаммов *Salmonella*. Критерии интерпретации результатов тестирования отличаются от критериев, применяемых для других энтеробактерий.

Рядом авторов опубликованы клинические данные, свидетельствующие о низкой эффективности ципрофлоксацина при лечении системных инфекций, вызванных штаммами *Salmonella* с МПК ципрофлоксацина $>0,06$ мг/л [10–12]. Вследствие этого в лаборатории, определяя чувствительность к АМП, к категории «чувствительный» следует относить только те штаммы *Salmonella*, для которых МПК ципрофлоксацина не превышает 0,06 мг/л [9]. Определение чувствительности диско-диффузионным методом (ДДМ) с использованием диска с ципрофлоксацином (5 мкг) не позволяет достоверно выявить такие штаммы сальмонелл. Около 20% штаммов, резистентных к фторхинолонам при МПК ципрофлоксацина 0,19–0,125 мг/л, по результатам тестирования ДДМ попадают в категорию «чувствительный» (диаметр зоны задержки роста вокруг диска с ципрофлоксацином больше 30 мм) [6].

В настоящее время известно, что в большинстве случаев устойчивость к ФХ у штаммов сальмонелл, вызванная мутациями в генах *gyrA* и *gyrB*, определяющих синтез бактериальных ферментов (ДНК-гиразы и топоизомеразы IV), развивается ступенчато. Поэтому можно повысить чувствительность ДДМ, включив в тестирование диск с налидиксовой кислотой — наиболее чувствительным АМП, который первым из группы хинолонов реагирует на появление резистентности, обусловленной единичными мутациями. Кроме того, в отечественных клинических рекомендациях [5] и рекомендациях EUCAST при определении чувствительности штаммов *Salmonella* к фторхинолонам ДДМ рекомендовано использовать диск с пefлоксацином (5 мкг) в качестве индикаторного диска. В случае если зона задержки роста менее 24 мм, то штамм следует считать «устойчивым» ко всем ФХ [6]. Опыт микробиологов отдельных лабораторий свидетельствует, что достоверность исследования в значительной степени зависит от качества диска с пefлоксацином. Тестирование дисков с пefлоксацином (5 мкг) различных производителей показало, что не все диски обеспечивали точное соответствие зоны задержки роста (менее 24 мм) наличию механизмов резистентности [8,11].

В последние годы для лечения ОКИ с синдромом колита, включая сальмонеллёзы, стал применяться азитромицин. В то же время определение чувствительности штаммов *Salmonella* к этому препарату затрудняет отсутствие критериев интерпретации результатов, полученных как при постановке ДДМ, так и методов разведения [6,7]. В связи с этим в литературе отсутствуют данные о чувствительности штаммов *Salmonella* к азитромицину и частоте выделения устойчивых штаммов. Тем не менее чувствительность штаммов *Salmonella* к азитромицину можно оценить ориентировочно по так называемым «эпидемиологическим точкам отсечения» (ECOFF — Epidemiological cut-off values), сравнивая МПК для изучаемого штамма со значениями МПК, полученными для «дикой» популяции (штаммы, не имеющие мутационных или других приобретённых механизмов устойчивости к конкретному АМП). По данным EUCAST, большая часть популяции сальмонелл имеет диапазон МПК азитромицина 4–16 мг/л. Штаммы, у которых МПК не превышает 16 мг/л, не имеют приобретённых механизмов резистентности к азитромицину, что позволяет ориентировочно считать их чувствительными к этому препарату. Поскольку ДДМ

или метод пограничных концентраций не позволяют получить точное значение МПК, для определения чувствительности к азитромицину следует использовать Е-тест или метод последовательных разведений.

Заключение

Проведённое *in vitro* микробиологическое исследование антибиотикочувствительности ограниченного количества штаммов сальмонелл в педиатрической популяции выявило их высокую чувствительность к ЦС III поколения — цефотаксиму и цефиксиму. В то же время, исследования, проводимые на различных территориях РФ, выявили устойчивость *Salmonella* к препаратам, рекомендованным для лечения сальмонеллёзов — ФХ и ЦС. Несмотря на то что ФХ редко применяются для терапии сальмонеллёзов в педиатрии, современная интерпретация результатов определения МПК в отношении сальмонелл для цiproфлоксацина в нашем исследовании позволяет констатировать появление резистентных сальмонелл к препарату в г. Смоленске, которые составляют 24,3%. Данное обстоятельство указывает на необходимость ограничения ФХ для эмпирической терапии сальмонеллёзов при доказанной их резистентности к ЦС.

Формирование резистентности у штаммов *Salmonella* связано, в первую очередь, с использованием АМП в ветеринарии и сельском хозяйстве. Данные о резистентности штаммов, выделенных от людей, коррелируют с данными, получен-

ными для штаммов, выделенных из пищевых продуктов и от сельскохозяйственных животных [12]. Резистентность штаммов *Salmonella* к АМП, используемым для эмпирического лечения сальмонеллёзной инфекции в качестве препаратов выбора, представляет большую проблему для здравоохранения. Устойчивость к фторхинолонам и ЦС, развивающаяся на фоне утраты чувствительности сальмонелл к «старым» АМП (ампициллин, хлорамфеникол), значительно ограничивает возможности терапии сальмонеллёзов. Полученные нами результаты определения МПК ко-тримоксазола в отношении сальмонелл позволяют рассматривать этот АМП как резервный препарат для эмпирической терапии сальмонеллёза в педиатрической практике.

Авторы статьи выражают признательность сотрудникам бактериологической лаборатории Научно-исследовательского института антимикробной химиотерапии (НИИ АХ) ГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет» Минздрава РФ за проведение исследования по определению МПК микроорганизмов к тестируемым антимикробным препаратам: Кречиковой Ольге Ивановне, заслуженному врачу РФ, к.м.н., заведующей лабораторией клинической микробиологии; Сухоруковой Марине Витальевне, к.м.н., руководителю лаборатории антибиотикорезистентности; Иванчик Натали Владимировне, к.м.н., научному сотруднику лаборатории антибиотикорезистентности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Behtereva M.K., Kvetnaja A.S. Salmonellosis. Handbook of infectious diseases in children / ed. Y.Lobzin. St.Petersburg: SpetsLit, 2013 (in Russian).
2. Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2015 году» Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека [Электронный ресурс]. - Режим доступа: http://rospotrebnadzor.ru/upload/iblock/486/gd_2015_ds.pdf — (дата обращения: 11.12.16). / Gosudarstvennyj doklad «O sostojanii sanitarno-jepidemiologicheskogo blagopoluchija naselenija v Rossijskoj Federacii v 2015 godu» Federal'naja sluzhba po nadzoru v sfere zashhity prav potrebitelej i blagopoluchija cheloveka [Elektronnyj resurs]. - Rezhim dostupa: http://rospotrebnadzor.ru/upload/iblock/486/gd_2015_ds.pdf - (data obrashhenija: 11.12.16). [in Russian]
3. Лобзин Ю.В., Якушин С.Б., Захаренко С.М. Практические рекомендации по ведению пациентов с инфекционной диареей по материалам рекомендаций Американского общества инфекционных болезней. Методические рекомендации для клиницистов. Клин микробиол антимикроб химиотер 2001; 2: 163—182. / Lobzin Ju.V., Jakushin S.B., Zakharenko S.M. Prakticheskie rekomendacii po vedeniju pacientov s infekcionnoj diareej po materialam rekomendacij Amerikanskogo obshhestva infekcionnykh boleznej. Metodicheskie rekomendacii dlja klinicistov. Klin mikrobiol antimikrob khimioter 2001; 2: 163—182. [in Russian]
4. Смолянкин Н.Н., Грекова А.И., Жаркова Л.П. Эффективность азитромицина и цефиксима в терпии острых кишечных инфекций с инвазивным типом диареи у детей. Клин микробиол антимикроб химиотер 2014; 3: 202—211. / Smoljankin N.N., Grekova A.I., Zharkova L.P. Jeffektivnost' azitromicina i cefiksima v terpii ostrыkh kishhechnыkh infekcij s invazivnym tipom diarei u detej. Klin mikrobiol antimikrob khimioter 2014; 3: 202—211. [in Russian]
5. Отечественные клинические рекомендации «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам». Версия 2015-02. Доступно по URL: <http://www.antibiotic.ru/minzdrav/clinical-recommendations/clrec-dsma2015.pdf> / Otechestvennye klinicheskie rekomendacii «Opredelenie chuvstvitel'nosti mikroorganizmov k antimikrobnым preparatam». Versija 2015-02. Dostupno po URL: <http://www.antibiotic.ru/minzdrav/clinical-recommendations/clrec-dsma2015.pdf> [in Russian]
6. Кафтырева Л.А., Егорова С.А., Макарова М.А., Краева В.Н., Пахомова Г.С. Диагностика внекишечных сальмонеллёзов и особенности определения чувствительности сальмонелл к антибиотикам. Справочник КДЛ 2016; 12: 70—79. / Kaftyreva L.A., Egorova S.A., Makarova M.A., Kraeva V.N., Pakhomova G.S. Diagnostika vnekišhechnыkh sal'monellezov i osobennosti opredelenija chuvstvitel'nosti sal'monell k antibiotikam. Spravochnik KDL 2016; 12: 70—79. [in Russian]
7. Козырева В.К., Эйдельштейн М.В., Тапальский Д.В. и др. Независимое приобретение резистентности к хинолонам у клонально родственных нозокомиальных штаммов *Salmonella typhimurium* вследствие гипермутабельности. Клин микробиол антимикроб химиотер 2012; 2: 153—161. / Kozyreva V.K., Jejdel'shtejn M.V., Tapal'skij D.V. i dr. Nezavisimoe priobretenie rezistentnosti k khinolonom u klonal'no rodstvennykh nozokomial'nykh shtammov Salmonella typhimurium vsledstvie gipermutabel'nosti. Klin mikrobiol antimikrob khimioter 2012; 2: 153—161. [in Russian]
8. Елиусизова А.Б., Шубин Ф.Н., Кузнецова Н.А., Бахольдина С.И. Чувствительность к фторхинолонам сальмонелл в Сибири и на Дальнем Востоке. Тихоокеанский мед журн 2010; 4: 51—54. / Eliusizova A.B., Shubin F.N., Kuznecova N.A., Bakholdina S.I. Chuvstvitel'nost' k ftorkhinolonam sal'monell v Sibiri i na Dal'nem Vostoke. Tikhookeanskij med zhurn 2010; 4: 51—54. [in Russian]
9. Кафтырева Л.А., Егорова С.А., Кожухова Е.А., Макарова М.А. и др. Резистентность энтеробактерий к антимикробным препаратам выбора при лечении острых кишечных инфекций. Казанский мед журн 2009; 5: 699—704. / Kaftyreva L.A., Egorova S.A., Kozhukhova E.A., Makarova M.A. i dr. Rezistentnost' jenterobakterij k antimikrobnым preparatam vybora pri lechenii ostrыkh kishhechnыkh infekcij. Kazanskij med zhurn 2009; 5: 699—704. [in Russian]
10. Ахметова Л.И., Розанова С.М. Чувствительность к антимикробным препаратам штаммов шигелл и сальмонелл, выделенных в Екатеринбурге. Клин микробиол антимикроб химиотер 2000; 3: 58—62. / Akhmetova L.I., Rozanova S.M. Chuvstvitel'nost' k antimikrobnым

- preparatam shtammov shigell i sal'monell, vydelennykh v Ekaterinburge. Klin mikrobiol antimikrob khimioter 2000; 3: 58—62. [in Russian]
11. Гончар Н.В., Лазарева И.В., Рычкова С.В. и др. Заболеваемость детей сальмонеллёзом и уровень резистентности клинических штаммов сальмонелл к антибактериальным препаратам в Санкт-Петербурге. Журн инфектол 2015; 1: 80—86. / Gonchar N.V., Lazareva I.V., Rychkova S.V. i dr. Zaboлеваemost' detej sal'monellezom i uroven' rezistentnosti klinicheskikh shtammov sal'monell k antibakterial'nyh preparatam v Sankt-Peterburge. Zhurn infektol 2015; 1: 80—86. [in Russian]
 12. Egorova S., Kaftyreva L., Grimont Patrick A.D., François-Xavier Weill. Prevalence and characterization of extended-spectrum cephalosporin resistant non-typhoidal Salmonella isolates in adults in St-Petersburg, Russia (2002—2005). Microb Drug Resist 2007; 13: 102—107.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Жаркова Людмила Павловна — д.м.н., доцент кафедры клинической фармакологии Смоленского государственного медицинского университета, Смоленск

Смолянкин Николай Николаевич — ассистент кафедры инфекционных болезней у детей Смоленского государственного медицинского университета, Смоленск

Грекова Антонина Ивановна — к.м.н., заведующая кафедрой инфекционных болезней у детей, Смоленского государственного медицинского университета, Смоленск

Козлов Сергей Николаевич — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой клинической фармакологии Смоленского государственного медицинского университета, Смоленск