

УДК 579.842.14:615.015.8:615.33

А. М. Седракян, А. А. Мнацаканян, З. У. Геворкян, К. А. Аракелова

**Мониторинг антибиотикорезистентности штаммов *Salmonella*,
циркулирующих в Армении**

(Представлено академиком К.Г. Карагезяном 30/X 2006)

Ключевые слова: *сальмонеллез, антибиотикорезистентность, серотип, ПЦР-анализ*

Сальмонеллезные инфекции остаются серьезной угрозой для здоровья населения во всем мире. В большинстве случаев возбудители заболеваний принадлежат к 10 серотипам (*S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. heidelberg*, *S. newport* и др.) [1]. Эффективность мероприятий по профилактике и контролю сальмонеллезов зависит от раннего распознавания вспышек через соответствующую систему надзора, основанную на субтипировании выделенных бактерий. Во многих странах при исследовании вспышек, когда необходимо быстрое и более точное определение штамма, используется ДНК-типирование.

Сальмонеллезные инфекции поддаются антимикробной терапии, однако в последние десятилетия наблюдается резкое увеличение множественной устойчивости патогенов к антимикробным препаратам. Общеизвестно, что серотипы возбудителя и уровни антибиотикорезистентности различаются в зависимости от географического района их выделения и меняются с течением времени [2-4]. Ясна необходимость постоянного мониторинга антибиотикорезистентности для успешного маневрирования средствами терапии.

Работы по мониторингу антибиотикорезистентности сальмонелл проводились нами на протяжении ряда лет совместно с Инфекционной клинической больницей "Норк" [5-7]. Данная статья является продолжением работ по мониторингу антибиотикорезистентности за период с 2005 по 2006 г. и включает в себя анализ данных по серотипам возбудителей; приводятся также результаты по ПЦР-типированию выборки штаммов сальмонелл, выделенных от больных сальмонеллезом.

Штаммы *Salmonella*, использованные в работе, выделены от больных в Инфекционной клинической больнице "Норк" за период с 2005 по 2006 г. Диагноз сальмонеллеза подтверждался клинически и лабораторными методами исследования [8-10]. Штаммы *Salmonella* были использованы для: 1) мониторинга антибиотикорезистентности (n = 56); 2) ПЦР-анализа (n = 28).

Мониторинг антибиотикорезистентности проводился с использованием панели из 18 антибиотиков различных групп и поколений (табл. 1).

Использованные антибиотики

Антибиотики			Поколение	Доза, мкг/мл
β-лактамы	Пенициллиновые	Пенициллин		10
		Ампициллин		10
		Аугментин [*]		20/10
	Цефалоспориновые	Цефазолин	1-е	30
		Цефуроксим	2-е	30
		Цефтазидим	3-е	30
		Цефтриаксон	3-е	30
		Цефепим	4-е	30
	Карбапенемы	Имипенем		10
Хинолоны/ фторхинолоны	Хинолоны	Невиграмон	1-е	20
	Фторхинолоны	Ципрофлоксацин	2-е	30
		Офлоксацин	2-е	5
Моксифлоксацим		4-е	5	
Аминогликозиды		Стрептомицин		20
		Гентамицин		30
		Нетилин		30
Тетрациклин				30
Хлорамфеникол				30

^{*} Ампициллин/клавуланат

Чувствительность штаммов *Salmonella* к антибиотикам определяли диско-диффузионным методом [11].

ПЦР-анализ штаммов *Salmonella*. Бактериальную ДНК выделяли двумя методами: 1) с использованием FastDNA[®] Kit (Cat# 6540-400) согласно инструкциям производителя; 2) методом кипячения [12]. Использованы пара специфичных для сальмонелл праймеров: invAF и invAR (размер конечного продукта - 284 п.о.), а также внутренний контроль амплификации IAC (размер конечного продукта - 157 п.о.) [12]. В качестве положительного контроля использовали ДНК штамма *Salmonella enterica* серотипа *Typhimurium* 104 (DT104). ПЦР-амплификацию проводили на Thermal Cycler (BIO-RAD) в режиме [12]. 10 мкл ПЦР-продукта подвергали электрофорезу в 2%-ном агарозном геле. В качестве стандарта использовали HyperLadder 1[™] (5 мкл). Окрашенные этидиум бромидом ампликоны визуализировали при 302 нм.

Из полученных данных следует, что нет ни одного штамма *Salmonella*, чувствительного ко всем тестируемым антибиотикам, как и нет штамма, резистентного ко всем антибиотикам. Результаты мониторинга приведены в табл. 2 и на рис. 1.

Таблица 2

Характеристика исследованных штаммов *Salmonella* на множественную устойчивость к антибиотикам

Число антибиотиков	1	2	3	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Число резистентных штаммов														
<i>S. typhimurium</i>	0	1	0	2	2	4	3	5	8	6	7	4	3	1
<i>S. enteritidis</i>	7	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Все штаммы, наделенные множественной устойчивостью к антибиотикам (6 и более), принадлежали к серотипу *S. typhimurium*.

На рис. 1 представлены результаты тестирования резистентности исследованных штаммов *Salmonella* к панели антибиотиков.

Из исследованных β -лактамов наиболее эффективен имипенем, подавляющее большинство исследованных штаммов были к нему чувствительны (94%). Менее эффективен аугментин (32% резистентных штаммов).

Из цефалоспориновых антибиотиков наилучшие характеристики у антибиотика 4-го поколения - цефепима, 30% исследованных штаммов к нему чувствительны. Не выявлено ни одного штамма, чувствительного к цефазолину.

Умеренную чувствительность исследованные штаммы чаще всего проявляли по отношению к пенициллиновым антибиотикам (аугментин - 42%, пенициллин - 19%, ампициллин - 21%) и аминогликозидам (стрептомицин - 18%, гентамицин - 23%, нетилин - 27%). Отмеченные антибиотики подавляют рост умеренно чувствительных штаммов сальмонелл лишь частично, что может способствовать отбору устойчивых штаммов.

Следует отметить неэффективность невидграмона - 96% исследованных штаммов были к нему устойчивы.

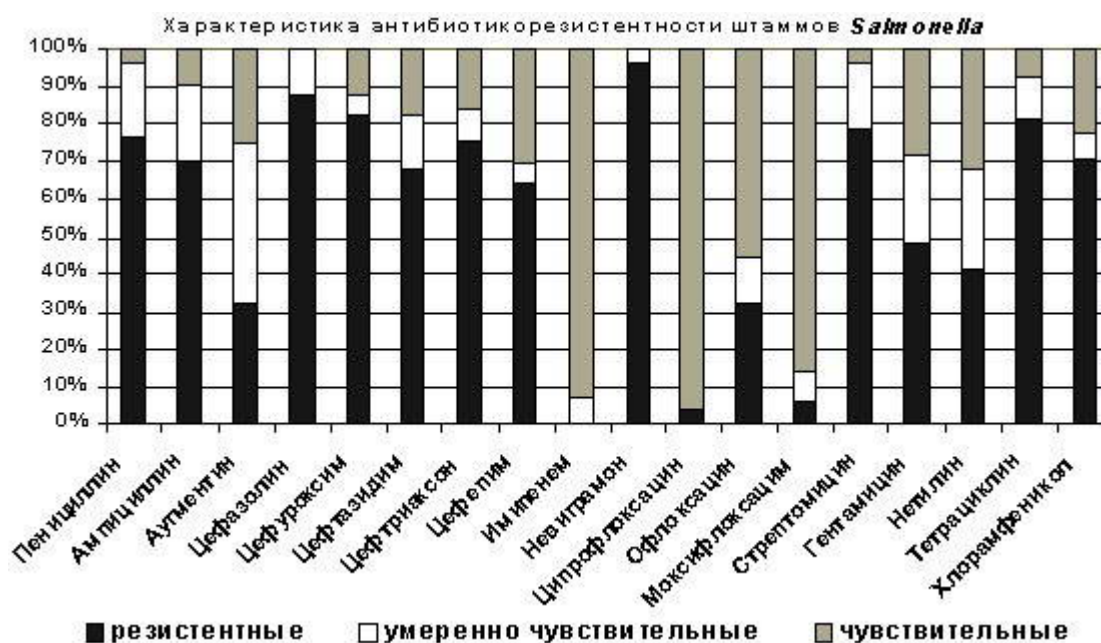


Рис. 1. Резистентность исследованных штаммов *Salmonella* к антибиотикам.

Высокую чувствительность проявили тестируемые штаммы сальмонелл к фторхинолонам. Наиболее эффективным был антибиотик 2-го поколения ципрофлоксацин (96% штаммов к нему чувствительны), затем антибиотик 4-го поколения моксифлоксацим (86% чувствительны). Полученные нами результаты согласуются с литературными данными, согласно которым фторхинолоны в наименьшей степени способствуют селекции устойчивости.

Эффективность аминогликозидов к исследованным штаммам была невысока, устойчивость к ним в порядке возрастания составляла: 41% - нетилин, 48% - гентамицин и 79% - стрептомицин.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что в исследованной панели антибиотиков наиболее эффективны имипенем, ципрофлоксацин и моксифлоксацим, в меньшей степени - офлоксацин, затем аугментин.

Распределение по серотипам исследованных на антибиотикорезистентность штаммов *Salmonella*, а также штаммов, выделенных от больных сальмонеллезом в Инфекционной клинической больнице "Норк" за 2001 и 2002 гг., приведено на рис. 2.

Преобладающим серотипом сальмонелл в данной экологической нише остается *S. typhimurium*, на долю которого приходится свыше 80% случаев заболевания. Следует отметить увеличение случаев сальмонеллезом, вызванных *S. enteritidis*, почти в 4 раза.

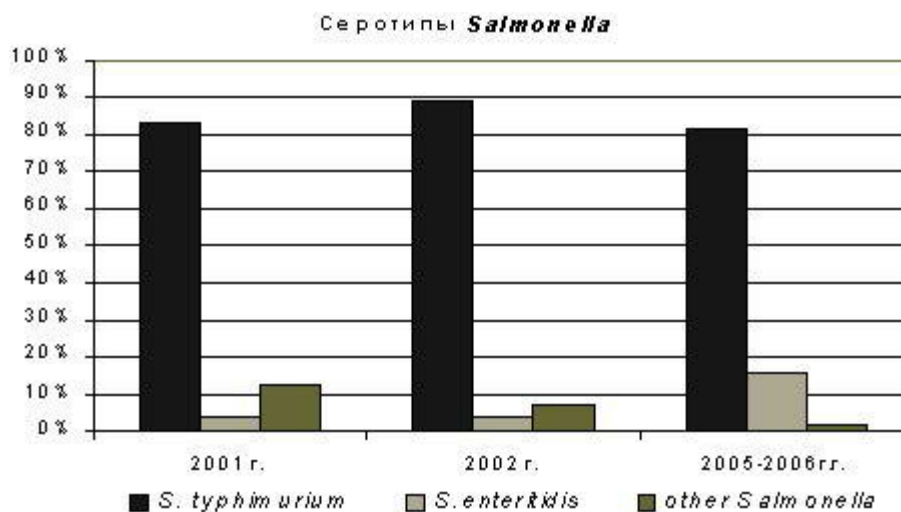


Рис. 2. Распределение штаммов *Salmonella* по серотипам.

Результаты по ПЦР-генотипированию выборки штаммов сальмонелл ($n = 28$) показали, что все эти штаммы являются сальмонеллами, так как на всех треках наблюдались полосы, расположение которых соответствовало фрагментам ожидаемого молекулярного веса (284 п.о. для *invA*F и *invA*R праймеров; 157 п.о. для IAC) на треках положительного контроля. Использование IAC позволило избежать ложно-негативного результата теста для 5-ти из исследованных штаммов и подтвердило, что эти штаммы являются сальмонеллами. Таким образом, ПЦР-анализ всех генотипированных штаммов сальмонелл подтвердил данные диагностики клиническими и лабораторными методами исследования.

Таким образом, на основе полученных данных можно заключить, что для начала

антибиотикотерапии, в ожидании результатов по антибиотикорезистентности конкретного штамма-возбудителя, наиболее эффективно использование имипенема и ципрофлоксацина, применение которых может быть ограничено в связи с противопоказаниями в конкретных случаях.

В исследованной экологической нише особую опасность представляют случаи сальмонеллеза, вызванные возбудителями с серотипом *S. typhimurium*, так как к этому серотипу относятся все штаммы, наделенные множественной устойчивостью к антибиотикам. Применение ДНК-анализа сальмонелл приобретает особую важность в связи с возможностью ускоренной диагностики сальмонеллеза и перспективой определения ПЦР-анализом серотипа возбудителя, что позволит быстро выявить наличие *S. typhimurium*.

Выражаем благодарность главному врачу Инфекционной клинической больницы "Норк" А.В. Асоян за предоставление возможности использования клинического материала, а также Ж.А. Кцоян за помощь в обсуждении полученных результатов.

Институт молекулярной биологии НАН РА

Инфекционная клиническая больница "Норк" МЗ РА

Литература

1. *Darwin K. H., Miller V. L.* - Clin. Microbiol. Rev. 1999. V. 12. P. 405-28.
2. *Козлова Н.С., Иванов В.П. и др.* - Антибиотики и химиотерапия. 1995. Т. 40(3). С. 35-42.
3. *Slutsker L., Altekruze S.F., Swerdlow D.L.* - Infectious Disease Clinics of North America. 1998. 12. P. 199-216.
4. *Glynn M.K., Bopp C., Dewitt W., Dabney P., Molktar M., Angulo F.L.* - New England Journal of Medicine. 1998. 338. P. 1333-8.
5. *Gevorgyan Z.U., Ktsoyan L.A., Sarkisyan N.N., Sedrakian A.M., Arakelova K.A., Ktsoyan Zh.A., Asoyan A.V., Kazaryan K.A., Karageuzyan K.G., Aminov R.* - National Academy of sciences of RA, Electronic journal of natural sciences. 2004. N 1(2). P. 46-50.
6. *Вартересян И.В., Геворкян З.У., Саркисян Н.Н., Седракян А.М., Аракелова К.А., Кцоян Ж.А.* - ЖМЭИ. 2002. № 1. С. 78-79.
7. *Геворкян З.У., Вартересян И.В., Седракян А.М., Аракелова К.А., Саркисян Н.Н., Асоян А.В., Кцоян Ж.А., Карагезян К.Г.* - Сб. статей по материалам научной сессии "Фундаментальные и прикладные аспекты медицинской диагностики". Ереван. 1-2 ноября 2001. С. 81-85.
8. Методические рекомендации по клинике, терапии и диагностике сальмонеллез. МЗ СССР. М. 1978.
9. *Учайкин В.Ф.* Руководство по инфекционным заболеваниям детей. Москва. 1998. 422 с.
10. *Митрохин С.Д., Никушкин Е.В.* - Практикующий врач. 1998. Т. 13. С. 42-43.
11. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2001. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard M2-A7. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
12. *Malorny B., Tassios P.T., Radstrom P., Cook N., Wagner M., Hoorfar J.* - Int. J. Food Microbiol. 2003. V. 83. P. 39-48.

Ա. Մ. Սեդրակյան, Ա. Ա. Մնացականյան, Զ. Հ. Գևորգյան, Կ. Ա. Առաքելովա

Հայաստանում շրջանառվող *Salmonella* շտամերի հակաբիոտիկակայունության
մոնիտորինգ

Աշխատանքում ներկայացված են 2005-2006թթ. «Նորք» ինֆեկցիոն կլինիկական հիվանդանոցում սալմոնելոզով հիվանդներից անջատված *Salmonella* շտամերի հակաբիոտիկակայունության մոնիտորինգի և սերոտիպերի անալիզի տվյալները: Բերված են նաև *Salmonella* շտամերի PCR-անալիզի արդյունքները:

A. M. Sedrakyan, A. A. Mnatsakanyan, Z. U. Gevorgyan, K. A. Arakelova

Monitoring of Antibiotic Resistance of *Salmonella* Strains Circulating in Armenia

The data on monitoring of antibiotic resistance of *Salmonella* strains, isolated from patients with salmonellosis in "Nork" Clinical Hospital of Infectious Diseases over a period from 2005 to 2006, are presented, as well as the analysis of data on these strains' serotypes. The results on PCR-analysis of *Salmonella* strains are also presented.