

УДК 579.842.15.04

**БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ШИГЕЛЛ, ИЗОЛИРОВАННЫХ
В СЕВЕРО-ВОСТОЧНОМ РЕГИОНЕ УКРАИНЫ В 1996-2003 гг.**

Дьяченко А.Г., Руденко С.С., Галушко Н.А., Божко М.Г., Дьяченко П.А., Пасечник Т.О.

Сумской Государственный университет МНО Украина
Институт микробиологии и иммунологии им. И.И. Мечникова АМН Украины

Резюме. Цель исследования – определить чувствительность шигелл к антибактериальным препаратам и клиническую эффективность последних для корректировки рекомендаций по эмпирической терапии острых шигеллезов (ОШ). Определяли чувствительность 164 штаммов *S.flexneri* и 80 штаммов *S.sonnei*, выделенных в Сумской области Украины в 1996-2003 гг., к 19 антибактериальным препаратам: ампициллину (Am), тетрациклину (Te), рифампицину (Ri), левомицетину (Ca), стрептомицину (St), фузидину (Fu), канамицину (Kn), эритромицину (Er), карбенициллину (Cb), доксициклину (Do), гентамицину (Ge), офлоксацину (Of), цефазолину (Cf), ципрофлоксацину (Cp). Установлена высокая устойчивость *S.flexneri* и *S.sonnei* к: Am (100%), Te (100%), Cb (90 и 50% соответственно), Do (90 и 35% соответственно), Fu (100%), Er (100%), Ri (100%), Ca (71,8 и 45% соответственно), St (81 и 40% соответственно). Некоторые изоляты были устойчивы к фторхинолонам.

Ключевые слова: шигеллы, резистентность к антибиотикам, терморезистентность

Вступление. Вопросы этиотропной терапии шигеллезов остаются на повестке дня врачей-инфекционистов: с одной стороны, использование этиотропных препаратов при заболеваниях легкой и средней тяжести считают нецелесообразным, с другой, отмечают, что назначение препаратов, к которым чувствительны шигеллы, значительно уменьшает интоксикацию, выраженность диарейного синдрома, ускоряет процессы репарации в толстой кишке [3]. Это можно объяснить патогенезом острого шигеллеза (ОШ), ведущую роль в котором играет инвазия возбудителя с дальнейшим развитием воспалительного процесса [9]. Широкое применение антибактериальных средств позволило за последние десятилетия существенно снизить заболеваемость шигеллезами, резко уменьшить смертность, которая наблюдается в единичных случаях среди детей грудного возраста, у пожилых и ослабленных людей. Уменьшились сроки пребывания больного в стационаре, длительность и степень выраженности клинических манифестаций, период бактериовыделения, формирование бактерионосительства [1]. Однако шигеллы в процессе взаимодействия с макроорганизмом активно приспосабливаются к новым для них условиям, приобретая устойчивость к антибактериальным препаратам. Уже в 40-е годы XX века появились штаммы, устойчивые к сульфаниламидам, в 50-е — к пенициллину и стрептомицину, в 60-е — к тетрациклину и левомицетину, в 70-е — к ампициллину, в 80-е — к триметаприму [12]. Этот естественный процесс ускоряется неоправданным, нерациональным и бесконтрольным применением антибактериальных средств, включая самолечение, что приводит к накоплению в бактериальной популяции устойчивых штаммов шигелл. Приобретение и утрата резистентности к тем или иным антибактериальным препаратам процесс динамический, нуждающийся в постоянном мониторинге, что позволяет корректировать рекомендации по применению антибактериальных препаратов в клинике.

Цель исследования: оценить распространенность в бактериальной популяции резистентных штаммов шигелл.

Материалы и методы. Работа выполнена на 124 штаммах (не более одного штамма от одного больного) *Shigella* spp., изолированных в Сумской и Харьковской областях, и реидентифицированных в бактериологических лабораториях Сумской областной СЭС и Института микробиологии и иммунологии АМН Украины в 2002-2003 гг. В работе использованы также результаты, полученные нами ранее при изучении устойчивости к антибактериальным препаратам 120 штаммов *S.flexneri*, выделенных от больных людей в 1996-2000 гг. [8].

Чувствительность шигелл к антибиотикам изучали на агаре Мюллера-Хинтона дискодиффузионным методом с использованием коммерческих дисков производства НИЦФ (С.-Пб., РФ) [7]. Диски содержали следующие антибиотики: ампициллин/Am, тетрациклин/Te, рифампицин/Ri, хлорамфеникол (левомицетин)/Ca, стрептомицин/St, фузидин/Fu, канамицин/Kn, эритромицин/Er, карбенициллин/Cb, доксициклин/Do, гентамицин/Ge, офлоксацин/Of, цефазолин/Cf, ципрофлоксацин/Cp. При оценке активности антибиотиков результаты интерпретировали в соответствии с критериями изготовителя дисков и стандартами NCCL [14]. Качество дисков с антибиотиками контролировали по диаметру зон задержки роста эталонного штамма *Escherichia coli* ATCC 25922.

Минимальную подавляющую концентрацию (МПК) определяли методом серийных разведений [7] с использованием в качестве контроля того же референтного штамма *E.coli* ATCC 25922.

Терморезистентность шигелл определяли по [5]. Степень терморезистенции оценивали по длительности выживания культуры. К высокочувствительным относили штаммы, которые погибали после 3 мин прогревания при 70°C. Среднечувствительными считали штаммы, выдерживавшие прогревание в течение 5-15 мин. Штаммы, погибавшие после 30-45 мин прогревания, относили к терморезистентным. Изучали также выживание шигелл при температуре 92°C. Время прогревания при этой температуре составляло 5, 10, 20 сек.

Результаты исследования. Из 124 тестированных штаммов 44 (35,5%) были *S.flexneri* и 80 (64,5%) — *S.sonnei*. Подавляющее большинство штаммов *S.flexneri* относились к серологическому варианту 2a. Анализ антибиотикорезистентности, проведенный дискодиффузионным методом, показал, что все изоляты шигелл в той ли иной степени устойчивы к действию ампициллина, тетрациклина, карбенициллина, доксициклина, эритромицина, рифампицина, фузидина (табл.1). Максимально высокая резистентность отмечена к тетрациклину, рифампицину, эритромицину, фузидину. Кроме того, все изоляты *S.flexneri* устойчивы к стрептомицину и тетрациклину. Выявлены и другие достоверные видовые различия в уровнях резистентности *S.flexneri* и *S.sonnei*. Так, чувствительными к действию хлорамфеникола оказались 55% штаммов *S.sonnei* и лишь 18% штаммов *S.flexneri* ($P<0,05$). Высоко устойчивыми к действию карбенициллина были 90% и 50% ($P<0,05$), к действию доксициклина — 90% и 35% ($P<0,05$), стрептомицина — 81% и 40% ($P<0,05$) изолятов *S.flexneri* и *S.sonnei* соответственно.

Обращает на себя внимание быстрота приобретения микроорганизмами резистентности к действию антибактериальных препаратов. Так, 25% всех изолятов *S.flexneri*, выделенных в 1996-2000 гг., были чувствительны к гентамицину, в 2002-2003 гг. их количество уменьшилось вдвое. До 68% штаммов *S.flexneri*, выделенных 4-5 лет назад, обладали выраженной чувствительностью к хлорамфениколу, в настоящее время чувствительность к этому препарату отмечается лишь у 18% изолятов этого вида шигелл. Разительный результат получен в отношении рифампицина. Если в 1996-2000 гг. все штаммы *S.flexneri* были чувствительны к рифампицину, то выделенные в последние годы изоляты оказались резистентными к этому антибиотику. Все изоляты 1996-2000 гг. были чувствительны к фторхинолонам (абакталу/пемфлорксацину, ципрофлоксацину, норфлоксацину), в 2002-2003гг. доля чувствительных к ФХ (ципробай/ципрофлоксацин, офлоксацин) штаммов упала до 70-80%. Неожиданно высокой оказалась чувствительность шигелл к канамицину (97%).

Таблица 1. Чувствительность к антибиотикам бактерий рода *Shigella* spp., изолированных в 1996 – 2003 гг.,%

№ п/п	Препарат	<i>S.flexneri</i>		<i>S.sonnei</i> 2002-2003 гг. N=80
		1996-2000 гг. N=44	2002-2003 гг. N=120	
1	Ампициллин		0	0
2	Карбенициллин		0	0
3	Цефазолин		45,5	15,0
4	Тетрациклин		0	0
5	Доксициклин		0	0
6	Рифампицин	100,0	0	0
7	Левомецетин	68,0	18,2	55,0
8	Стрептомицин		0	45,0
9	Канамицин		100	95,0
10	Гентамицин	25,0	18,2	10,0
11	Фузидин		0	0
12	Эритромицин		0	0
13	Ровамицин	100,0		
14	Ципрофлоксацин	100,0	72,7	90,0
15	Офлоксацин		70,0	72,7
16	Абактал	100,0		
17	Норфлоксацин	100,0		
18	Фурадонин	82,0		
19	Фуразолидон	80,0		

Для всех штаммов шигелл была определена МПК офлоксацина, гентамицина, макропена, хлорамфеникола (табл.2).

Таблица 2. Минимальные подавляющие концентрации антибактериальных препаратов в отношении бактерий рода *Shigella* spp., мг/л

Препарат	МПК ₅₀	МПК ₉₀	Диапазон МПК
Макропен	0,015	0,03	0,015-0,03
Офлоксацин	0,035	0,07	0,005-0,07
Гентамицин	0,03	0,06	0,03-0,07
Хлорамфеникол	60,0	250,0	5,0-250,0

Как и следовало ожидать, большинство штаммов оказались чувствительными к низким концентрациям офлоксацина и макропена (МПК₅₀ соответственно 0,035 и 0,015 мг/л). В то же время гораздо большие концентрации препаратов не подавляли рост некоторых штаммов, а 4 изолята *S.flexneri* оказались устойчивыми к действию офлоксацина во всем диапазоне использованных концентраций и макропена при концентрациях до 0,1 мг/л. Подавляли рост чувствительных штаммов шигелл и невысокие концентрации гентамицина (МПК₅₀ 0,03 мг/л). Диапазон подавляющих рост концентраций макропена, офлоксацина и гентамицина колебался в очень небольших пределах. Напротив, диапазон ингибирующих концентраций хлорамфеникола составлял почти два порядка (5-250 мг/л).

По результатам исследования установлены фенотипы резистентности штаммов *Shigella* spp., изолированных в 2002-2003 гг. (табл.3). Проведенный анализ выявил 17 спектров антибиотикорезистентности, включающих от 8 до 12 детерминант устойчивости. Фенотип резистентности Am/Te/Ri/Ca/St/Fu/Er/Cr/Do/Ge/Cf доминировал как среди штаммов *S.flexneri* (27%), так и *S.sonnei* (16%). Среди последних почти столь же часто встречались фенотипы Am/Te/Ri/Fu/Er/Cb/Do/Cf и Am/Te/Ri/St/Fu/Er/Cb/Do/Ge/Cf/Of. Не обнаружены штаммы, чувствительные ко всем использованным антибиотикам.

Исследование терморезистентности шигелл показало что 79% всех изолятов сохраняли способность к росту и размножению даже после 45 мин прогревания при 70°C. 9% штаммов *S.flexneri* показали среднюю чувствительность к температурному фактору (погибли после 15-мин прогревания). 27% штаммов *S.flexneri* и 5% штаммов *S.sonnei* погибли после длительного прогревания. В соответствии с санитарными правилами (ДСП 4.4.4011-98) пастеризация молока на перерабатывающих предприятиях осуществляется при температуре 92°C без экспозиции. Проведенный анализ устойчивости шигелл к этой температуре показал, что все штаммы сохраняли жизнеспособность при экспозиции 5 и 10 сек. По 45% обоих видов шигелл оказались резистентными к прогреванию в течение 20 сек. Эта экспозиция оказалась губительной и для контрольного штамма *E.coli* ATCC 25922.

Таблица 3. Частота фенотипов резистентности *Shigella* spp., %

Фенотип	<i>S,sonnei</i> N = 80	<i>S,flexneri</i> N = 44
Am/Te/Ri/Ca/Fu/Er/Cb/Do/Ge	10,1	0
Am/Te/Ri/Ca/Fu/Er/Cb/Do/Ge/Cf	3,7	0
Am/Te/Ri/Ca/Fu/Er/Cb/Do	0	9,0
Am/Te/Ri/St/Fu/Er/Cb/Do/Ge/Cf	5,0	11,1
Am/Te/Ri/St/Fu/Er/Cb/Do/Ge/Cf/Cp	5,0	0
Am/Te/Ri/St/Fu/Er/Cb/Do/Ge/Cp	0	6,8
Am/Te/Ri/St/Fu/Er/Cb/Do/Ge/Of/Cf	13,7	0
Am/Te/Ri/St/Fu/Cn/Er/Cb/Do	6,2	0
Am/Te/Ri/Fu/Er/Cb/Do/Ge	5,0	0
Am/Te/Ri/Fu/Er/Cb/Do/Of/Cf	3,7	0
Am/Te/Ri/Fu/Er/Cb/Do/Cf	15,0	0
Am/Te/Ri/Ca/St/Fu/Er/Cb/Do/Ge/Cf	16,2	27,3
Am/Te/Ri/Ca/St/Fu/Er/Cb/Do/Ge/Cf/Cp	5,0	11,1
Am/Te/Ri/Ca/St/Fu/Er/Cb/Do/Ge/Cp	0	9,0
Am/Te/Ri/Ca/St/Fu/Er/Cb/Do	0	6,8
Am/Te/Ri/Ca/St/Fu/Er/Cb/Do/Ge/Of	5,0	0
Am/Te/Ri/Ca/St/Fu/Er/Cb/Do/Ge/Of/Cf	6,2	18,0

Обсуждение результатов. Основной проблемой терапии острых бактериальных диарей является высокий уровень резистентности шигелл к антибактериальным препаратам, причем ведущие позиции в формировании

антибиотикорезистентности занимает *S.flexneri*. В наших исследованиях этот вид шигелл оказался устойчивым к 8 из 14 использованных препаратов (Am, Te, Ri, St, Fu, Eg, Cb, Do). Менее 20% всех изолятов *S.flexneri* были чувствительны к хлорамфениколу и гентамицину. *S.sonnei* были устойчивы к 7 из 14 препаратов (Am, Te, Ri, Fu, Eg, Cb, Do). Полирезистентность шигелл обусловлена широким применением этих антимикробных препаратов в терапии острых кишечных инфекций в 70-е-80-е годы. Множественная лекарственная устойчивость кодируется R плазмидами, которые свободно циркулируют в бактериальной популяции и обеспечивают штаммам шигелл-носителей плазмид селективные преимущества. Антибиотикорезистентность кодируется, в основном, гетерогенными по размеру плазмидами, содержащими от 2,7 до 180 т.п.о. [6], и, частично, хромосомными генами. Скорость распространения плазмид полирезистентности особенно велика у донорских штаммов, несущих конъюгативные F плазмиды [8]. В результате в микробной популяции начинают преобладать селекционированные полирезистентные изоляты шигелл. В связи с этим следует считать неоправданным применение указанных препаратов для эмпирической терапии шигеллезов, хотя подобные рекомендации еще встречаются в литературе [11,13]. Аналогичные рекомендации относятся и к канамицину. Хотя почти все штаммы были чувствительными к этому препарату, подавляющие рост концентрации оказались неприемлемо высокими (результаты не представлены).

Аминогликозид 2 поколения гентамицин широко использовался для этиотропной терапии шигеллезов в период эпидемического подъема заболеваемости дизентерией Флекснера в середине 90-х годов. Это привело к появлению штаммов, устойчивых к этому препарату. В наших исследованиях доля чувствительных штаммов шигелл обоих видов к гентамицину была одинаково низкой. Хотя ингибирующие *in vitro* рост этих штаммов концентрации антибиотика достаточно низкие, вряд ли следует считать целесообразным применение гентамицина для лечения шигеллезов.

Чувствительность к хлорамфениколу у половины штаммов *S.sonnei* и 18% штаммов *S.flexneri* сохранена. Однако диапазон МПК для разных штаммов составляет почти два порядка, причем большинство чувствительных штаммов отвечает на концентрации Ca 100 мг/л и выше, что также делает бесперспективным использование этого препарата для терапии шигеллезов. Отмечена умеренная чувствительность (около 30% всех штаммов) шигелл к цефазолину. Известно, что этот антибиотик ингибирует транспептидазу бактериальной клетки, приводя к деградации бактериальной стенки и гибели бактерий.

Проведенный нами анализ выявил фенотипическую неоднородность природных популяций шигелл. Всего отмечено 17 фенотипов резистентности. Очевидно, основу фенотипического разнообразия шигелл составляет геномный (включая внехромосомные гены) полиморфизм данных бактерий, позволяющий отбирать из гетерогенных бактериальных популяций клоны с определенными гено- и фенотипами, адекватными специфическим условиям среды обитания микроорганизмов. Это подтверждается тем обстоятельством, что штаммы, выделенные из одного экотопа, имели однотипный фенотип резистентности. С этих позиций фенотип шигелл следует рассматривать как итог не только генетической, но и экологической детерминации.

Высокая чувствительность бактерий обнаружена к тем антимикробным препаратам (фторхинолонам, макролидам 2-го поколения), которые в предшествующие годы мало использовались для лечения шигеллезов или не использовались вовсе. Подтверждена высокая чувствительность шигелл к фторированным хинолонам (МПК₅₀ примерно 0,03 мг/л), что совпадает с имеющимися в литературе данными [10]. Однако, если 5-6 лет назад все 100% изолятов шигелл были чувствительны к препаратам этого ряда, то в данном исследовании чувствительными к ципрофлоксацину и офлоксацину оказались 84% и 71% штаммов. В настоящее время фторхинолоны по частоте использования в инфекционной патологии стоят на втором месте после β-лактамовых антибиотиков. В отличие от других антибактериальных препаратов факторы резистентности к ФХ не переносятся при помощи плазмид. Резистентность к ним формируется вследствие хромосомных мутаций двух типов: мутация ДНК-гиразы (мишени фторхинолонов) и мутации клеточных мембран, препятствующей проникновению препарата в бактериальную клетку. Тем не менее, наши исследования свидетельствуют о появлении устойчивых к ФХ штаммов шигелл. Тревожным обстоятельством является факт появления изолятов, резистентных к офлоксацину во всем диапазоне использованных в опыте концентраций препарата. Данный факт еще не нашел отражения в литературе.

Установлено, что наиболее высокой ингибирующей активностью обладает макропен — препарат из группы макролидов 2-го поколения. Его эффективность обусловлена тем, что препарат связывается с большой (50S) субъединицей бактериальных рибосом и блокирует тем самым синтез белка. МПК₅₀ макропена составляет 0,015 мг/л, а диапазон МПК 0,015-0,03 мг/л, что позволяет рекомендовать макропен как препарат выбора для лечения шигеллезов.

Анализ терморезистентности шигелл показал, что в бактериальной популяции быстро растет доля штаммов, обладающих высокой устойчивостью к температурному фактору. Если в 1996-2000 гг. среди *S.flexneri* преобладали (81,7%) среднечувствительные изоляты [8], то в данном исследовании лишь 9% шигелл этого вида были оценены как среднечувствительные. 79% всех изолятов сохраняли жизнеспособность после прогревания в

течение 45 мин. Даже 20 сек экспозиция при 92°C вызывала гибель чуть больше половины штаммов *S.flexneri* и *S.sonnei*.

Изменения биологических свойств шигелл продолжаются последние два десятилетия. При этом модулируются свойства, способствующие выживаемости шигелл в среде и *in vivo* (повышается резистентность бактерий к действию температурного фактора, дезинфицирующим средствам, противомикробным препаратам и т.д.). Такое повышение резистентности шигелл к различным факторам среды следует рассматривать как свидетельство перехода микробной популяции от фазы эпидемического распространения к фазе резервации, в том числе в форме резидентного бактерионосительства, что сопровождается также снижением патогенности и вирулентности шигелл. Это приводит к резкому падению числа тяжелых случаев инфекции, росту среднетяжелых и особенно легких случаев заболевания. В результате значительное количество заболевших не госпитализируется и не регистрируется, что искажает истинную картину протекающего эпидемического процесса. Лишь часть его остается доступной для наблюдения и анализа. Некоторые из наблюдаемых изменений биологических свойств шигелл детерминируются плазмидами, распространенность которых в бактериальной популяции обусловлена селективным давлением антибиотикотерапии. Другие, такие как терморезистентность, кодируются генами теплового шока и другими хромосомными генами. Сегодня отсутствует логическое объяснение причин такого резкого изменения фенотипа шигелл. Можно думать об изменениях уровня экспрессии ряда генов микроорганизмов, способствующих выживанию вида в изменившихся условиях среды обитания. Однако эти изменения биологических свойств шигелл необходимо учитывать при разработке противоэпидемических мероприятий и технических условий обработки пищевых продуктов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андрейчин М.А., Ивахив О.Л. Бактериальные диареи.-Київ:Здоров'я,1998.-411 с.
2. Васильев В.С., Комар В.И., Шейка М.И., Оценка тяжести интоксикации при острых инфекционных болезнях // Здоровоохранение Белорусии. – 1984. - №3. – С. 46-49.
3. Возианова Ж.И. Инфекционные и паразитарные болезни. – Київ: Здоров'я, 2000. – Т.1. – 904 с.
4. Кальф-Калиф Я.Я. О лейкоцитарном индексе интоксикации и его практическом значении. // Врачебное дело. - 1941. -№1. - С.31-35.
5. Круглов Ю.В. Определение терморезистентности культур энтеробактерий // Труды VII Украинского микробиол. о-ва. – Т.2. – Черновцы, 1983. – 15с.
6. Куракин Э.С. Межбольничное распространение *Shigella flexneri* 2a// Журн. микробиол.-1998.-№ 3.-С.31-35.
7. Лабораторные методы исследования в клинике. Под ред. В.В.Меньшикова. М.,Медицина, 1987, с.341.
8. Липовская В.В.,Савинова Е.М.,Дьяченко А.Г. Селективные свойства патогенных энтеробактерий и их значимость как эпидемиологических маркеров// Доповіді НАН України.-2000.-№6.-С.176-180.
9. Милютин Л.Н., Воротынцева Н.В. Стратегия и тактика этиотропной терапии острых кишечных инфекций у детей на современном этапе // Антибиотики и химиотерапия. - 1993.- Т38.- №1.-С.46-52.
10. Посохова К.А., Вікторов О.П., Мальцев В.І., Шараєва М.Л. Фторхінолони// Новості мед.и фармац.-2004.-№ 1(141).-С.22-24.
11. Flores A., Araque M., Vizcaya L. Multiresistant *Shigella* species isolated from pediatric patients with acute diarrhoeal disease// Am.J.Med.Sci.-1998.-V.316.- P.379-384.
12. Khalil K., Khan S., Mazhar K. et al. Occurrence and susceptibility to antibiotics of *Shigella* species in stools of hospitalized children with bloody diarrhoea in Pakistan// Am.J.Trop.Med.-1998.-V.58.-P.800-803.
13. Kotloff K.L. Shigellosis. In: F.D.Burg, E.R.Wald, J.R.Ingelfinger, R.A.Polin, eds. Current Pediatric Therapy. Phil., Saunders, 1999. P.49-51.
14. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacterial that grow aerobically; approved standard – 5th ed. NCCLS
15. Document M7-A4; 2000, p.20(2).

BIOLOGICAL PROPERTIES OF SHIGELLA SPP. ISOLATED IN SUMY REGION IN 1996-2003

Sumy state University, Sumy

The purpose of the study – to determine the sensitivity of *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri* to antimicrobial drugs and their clinical effectiveness for moderating recommendations for empiric therapy of shigellosis. A total of 164 strains of *S. flexneri* and 80 strains of *S. sonnei* isolated in Sumy region of Ukraine during 1996-2003 years were tested to 19 antimicrobials: ampicillin (Am), tetracyclin (Te), rifampicine (Ri), chloramphenicol (Ca), streptomycin (St), fusidin (Fu), kanamycin (Kn), erythromycin (Er), carbenicillin (Cb), doxycyclin (Do), gentamycine (Ge), ofloxacin (Of), cefazolin (Cf), ciprofloxacin (Cp). High rate of resistance were found in both *S. flexneri* and *S. sonnei* to: Am (100%), Te (100%), Cb (90 and 50% respectively), Do (90 and 35% respectively), Fu (100%), Er (100%), Ri (100%), Ca (71,8 and 45% respectively), St (81 and 40% respectively). Some isolates were resistant to florquinolones.

Key words: *Shigella* spp., sensitivity to antibiotics