

УДК 615.28-016.8

Антибиотикорезистентность штаммов *H. influenzae*, выделенных в Екатеринбурге в 2000–2005 гг. у детей с инфекцией различной локализации

Боронина Л.Г.¹, Блинова С.М.²

¹ ГОУ ВПО «Уральская государственная медицинская академия» Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию Росздрава, Екатеринбург, Россия

² Областная детская клиническая больница №1, Екатеринбург, Россия

Проведено исследование резистентности к антибиотикам 268 клинических штаммов *H. influenzae* выделенных от детей в возрасте от 3 месяцев до 14 лет в Екатеринбурге и Свердловской области в период 2000–2005 гг. К ампициллину устойчивость составила 13%, к цефалоспорином II поколения – 3%. Впервые в Екатеринбурге были выявлены штаммы β -лактамазонегативных ампициллинорезистентных

H. influenzae (BLNAR), частота встречаемости которых составила 2,5%. Нечувствительными к тетрациклином были 37,3% штаммов. К хлорамфениколу сохраняли чувствительность 78,5% штаммов, к триметоприму/сульфаметоксазолу – 89,1%, к рифампицину – 96,9%. Был выделен 1 штамм, резистентных к фторхинолонам.

Ключевые слова: *H. influenzae*, антибиотикорезистентность, педиатрия.

Antimicrobial Resistance of Clinical Strains of *H. influenzae* Isolated from Children in Yekaterinburg During 2000–2005

Boronina L.G.¹, Blinova S.M.²

¹ Ural State Medical Academy, Ekaterinburg, Russia

² Regional Children Hospital, Ekaterinburg, Russia

Susceptibility testing of 268 clinical strains of *H. influenzae* isolated from children in Yekaterinburg during 2000–2005 was performed by disc diffusion method. Resistance to ampicillin was 13%, to II generation cephalosporins – 3%. There was the first report in Yekaterinburg on isolation of BLNAR strains with the rate of 2.5%. Non-

susceptible to tetracycline were 37.3% of strains. To chloramphenicol 78.5% of strains remain susceptible, to co-trimoxazole – 89.1%, to rifampicin – 96.9%. There was one strain resistant to fluoroquinolones.

Key words: *H. influenzae*, antimicrobial resistance, children.

Контактный адрес:
Боронина Любовь Григорьевна
620149, Екатеринбург
ул. С. Дерябиной, 32
ОДКБ №1

H. influenzae является одним из основных возбудителей бактериального менингита, отита, синусита, пневмонии и сепсиса у детей [1].

H. influenzae характеризуется природной чувствительностью ко многим применяемым в настоящее время антимикробным препаратам: β -лактамам (аминопенициллины, ингибиторозащищенные пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы), азилидам, тетрациклам, фторхинолонам, хлорамфениколу, триметоприму/сульфаметоксазолу, рифампицину. В то же время, как и для большинства других микроорганизмов появление и распространение антибиотикорезистентности является важной проблемой терапии инфекций, вызванных *H. influenzae*, причем частота устойчивости имеет значительные колебания в разных странах и регионах. Так, например, устойчивость к ампициллину в Испании составляет 30,6%, а в Германии – только 0,6%. А для тетрациклина уровень колебался от 1,5% в Великобритании до 17,8% в Бельгии и 25,4% в Испании [2].

Целью исследования явилось изучение частоты распространения разных фенотипов антибиотикорезистентности, а так же динамики развития резистентности к β -лактамам и к антибиотикам других групп у штаммов *H. influenzae*, выделенных на территории Свердловской области и Екатеринбурга в периоды 2000-2005 гг. от детей с инфекциями разных локализаций.

Материалы и методы

Проведено изучение чувствительности к антибиотикам 279 штаммов *H. influenzae*, полученных из клинического материала в период с 2000 г. по 2005 г. Из них 230 штаммов выделено из жидкости, полученной при *бронхоальвеолярном лаваже* (БАЛ) от детей с инфекциями нижних дыхательных путей, 28 – при инфекциях верхних дыхательных путей, 21 – от детей с другими диагнозами.

Тестирование чувствительности к антибиотикам проводилось *диско-диффузионным методом* (ДДМ). Для тестирования ДДМ использовали НТМ-агар; диски с антибиотиками (bioMerieux, Франция) с нагрузкой, соответственно: ампициллин, 10 мкг; амоксициллин/клавуланат, 20/10 мкг; цефазолин, 30 мкг; цефуросим, 30 мкг; цефотаксим, 30 мкг; хлорамфеникол, 30 мкг; тетрациклин, 30 мкг; азитромицин, 15 мкг; ципрофлоксацин, 5 мкг; офлоксацин, 5 мкг; триметоприм/сульфаметоксазол, 1,25/23,75 мкг; рифампицин, 5 мкг; для определения продукции β -лактамаз – диск с нитроцефином. Оценка результатов осуществлялась в соответствии со стандартами МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов

к антибактериальным препаратам» [3]. Контроль качества ДДМ проводили штаммами *H. influenzae* ATCC 49247, ATCC 49766 [3].

Панели тестируемых антибиотиков несколько различались и течение описываемого временного промежутка в связи с изменением политики применения антибиотиков в регионе и рутинной практики лаборатории.

Кроме фенотипических методов определения резистентности к β -лактамам антибиотикам для 12 штаммов использовали молекулярно-генетические методы определения ТЕМ-1 β -лактамаз с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Результаты и обсуждение

К ампициллину в 2000–2005 гг. чувствительность была определена для 187 штаммов, чувствительными из которых оказались 148 штаммов (79,1%), умеренно-резистентными 15 (8,1%), резистентными – 24 (12,8%). Результаты тестирования штаммов *H. influenzae* к ампициллину показаны на рис. 1. В разные годы чувствительность штаммов несколько отличалась. Так, чувствительность к ампициллину составила: 2000 г. – 71,4%, 2001 г. – 60%, 2002 г. – 76,4%, 2003 г. – 96,8%, 2004 г. – 70,4%, 2005 г. – 96,6%; резистентность: 0%, 22,9%, 18,1%, 3,3%, 14,8%, 3,5%, соответственно. Обращает на себя внимание отсутствие резистентных штаммов в 2000 г., в отличие от 2001 г., когда было зарегистрировано наибольшее значение резистентности (22,9%). В последующие годы (2003–2005) подобного количества устойчивых штаммов также не наблюдалось. Таким образом, можно заключить, что в целом, устойчивого роста резистентности штаммов к ампициллину не обнаружено, хотя в отдельные годы частота выделения резистентных штаммов (2002 г.) различалась. Однако данные различия нельзя рассматривать как статистически достоверные в связи с недостаточно большим числом штаммов в отдельные годы.

В соответствии с современными представлениями об определении чувствительности *H. influenzae* к β -лактамам антибиотикам препаратами выбора для тестирования являются ампициллин и тест с нитроцефином для выявления продукции β -лактамаз [3]. Исследование в нитроцефиновом тесте и определение резистентности к ампициллину позволяет различить β -лактамазопродуцирующие ампициллино-резистентные и β -лактамазонегативные ампициллинрезистентные (BLNAR) штаммы. Тест с нитроцефином был введен в практику нашей лаборатории с 2004 г., всего на продукцию β -лактамаз было протестировано 33 штамма *H. influenzae*. При этом 31 (93,9%) штамм не продуцировали дан-

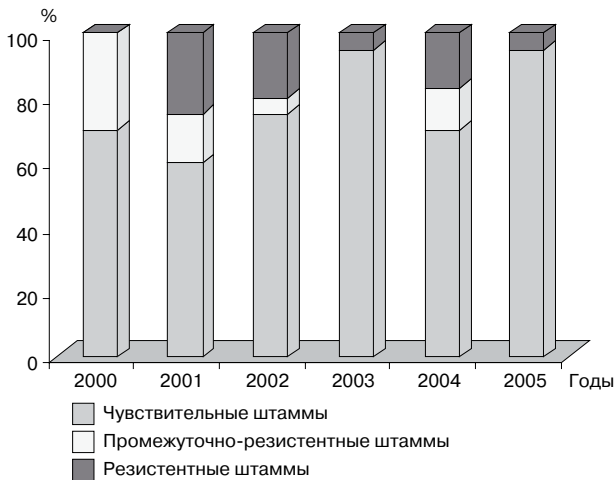


Рис. 1. Чувствительность штаммов *H. influenzae* к ампициллину в период 2000–2005 гг., %.

ный фермент, только 2 (6,1%) штамма дали положительный результат в тесте с нитроцефином.

Чувствительность к ингибиторозащищенному пенициллину – амоксициллину/клавуланату была определена для 99 штаммов, из них чувствительными оказались 94 (94,9%), резистентными – 5 (5,1%).

Исследование 12 штаммов *H. influenzae*, у которых β -лактамазы определялись путем амплификации гена TEM-1, проводили в 1999 г. методом ПЦР; тестирование в хромогенном тесте с нитроцефином, проведенном в 2004 г. с этими же штаммами, показало идентичные результаты. У трёх нетипируемых штаммов выявлены β -лактамазы TEM-1 методом ПЦР, и эти же штаммы показали положительную реакцию в тесте с нитроцефином.

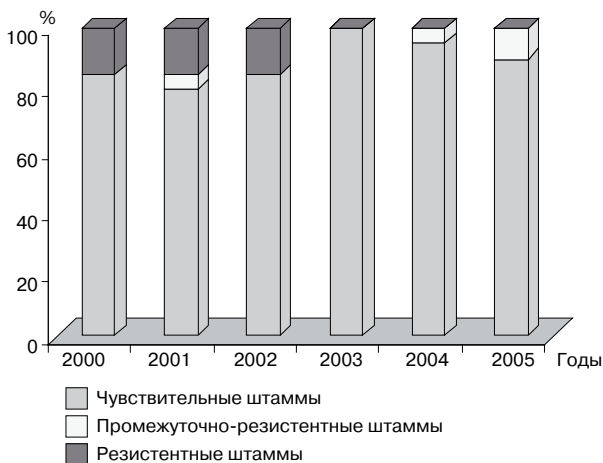


Рис. 2. Частота встречаемости резистентных к цефуроксиму штаммов *H. influenzae* в течение 2000–2005 гг., %

Тестирование к ампициллину и нитроцефину дает возможность подразделить штаммы на 3 группы: 1) β -лактамазоотрицательные ампициллиночувствительные; 2) β -лактамазопродуцирующие ампициллино-резистентные; 3) БЛНАР (β -лактамазонегативные ампициллино-резистентные).

Среди 33 штаммов, к которым был поставлен тест с нитроцефином и параллельно проведено тестирование к ампициллину, было выявлено 30 ампициллиночувствительных (I группа), 2- β -лактамазопродуцирующих ампициллинорезистентных (II группа); 1 штамм, вероятнее всего, можно отнести к группе БЛНАР, поскольку он оказался резистентным к ампициллину, давал отрицательный результат в нитроцефиновом тесте, проявлял умеренную резистентность к цефуроксиму.

Результаты и частота выявления фенотипов антибиотикорезистентности к β -лактамам антибиотикам у нетипируемых штаммов *H. influenzae* показаны в таблице 1.

Результаты применения ПЦР метода для обнаружения продукции β -лактамазы TEM-1 у *H. influenzae* в наших исследованиях полностью совпадает с результатами тестирования штаммов в хромогенном тесте с нитроцефином. Исследование продукции β -лактамазы у 13 штаммов этими двумя методами показало, что применение ПЦР метода не приводит к увеличению специфичности и чувствительности, а так же требует специального оборудования, поэтому использование хромогенного теста определения β -лактамаз у *H. influenzae* наиболее рационально для рутинной диагностики.

Результаты определения чувствительности *H. influenzae* к цефалоспорино II поколения – цефуроксиму показаны на рисунке 2. Чувствительность к данному препарату была определена для 150 штаммов, из них чувствительными оказались 140 (93,3%), умеренно-резистентными – 4 (2,7%), резистентными – 6 (4%) штаммов.

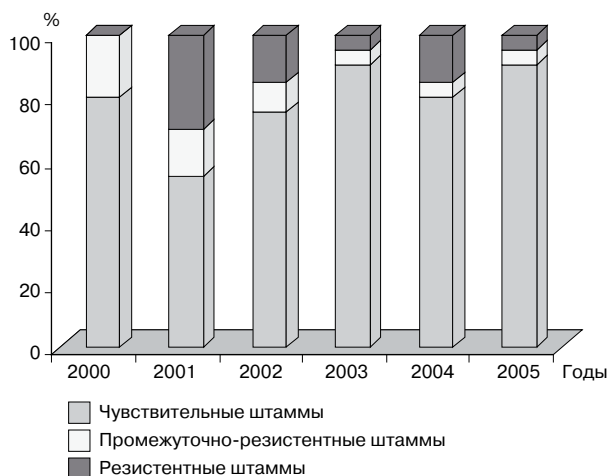
Исследование резистентности к цефалоспорино III поколения продемонстрировало их высокую активность в отношении *H. influenzae*. Все 154 протестированных штамма были чувствительны к цефотаксиму и цефтриаксону.

Макролиды – один из наиболее часто применяемых классов антибиотиков. Поскольку наиболее активным в отношении *H. influenzae* и, следовательно, имеющим наибольшее клиническое значение при инфекциях, вызванных этим микроорганизмом, является азитромицин, определение чувствительности проводилось только к этому препарату. В течение пяти лет к азитромицину было протестировано всего 67 штаммов, из них 55 (82,1%) оказались чувствительны, 5 (7,5%) – умеренно-

Таблица 1. Частота выявления фенотипов *H. influenzae* к β -лактамам антибиотикам, выделенных в 2000–2005 гг.

Фенотип	Количество штаммов	Частота выявления фенотипа от исследованных штаммов в %
1) β -лактамазонегативные (BLNAS), чувствительные к ампициллину	178	91,3
2) β -лактамазопродуцирующие ампициллинорезистентные, (BLPAR)	10	5,1
3) β -лактамазонегативные ампициллинорезистентные, (БЛНАР, BLNAR)	5	2,56
4) β -лактамазонегативные, умеренно резистентные к ампициллину, (BLNAI)	2	1,02
Всего штаммов	195	100

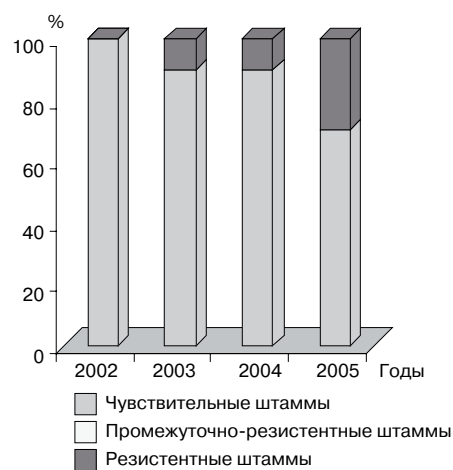
резистентны, 7 (10,5%) – резистентны. В соответствии с современными представлениями определение чувствительности к макролидам представляет нерешенную проблему во всем мире; не существует достоверных критериев чувствительности, и тестирование, как таковое, носит субъективный характер. Поэтому представляемые данные имеют спорное значение и толкование. Даже при самом строгом соблюдении рекомендаций CLSI/NCCLS при тестировании *H. influenzae* к макролидам ДДМ выявляется более 50% ошибок в интерпретации результатов. Поэтому наиболее информативным в этом случае является метод E-тестов [2]. Кроме того, макролиды имеют низкую природную активность в отношении *H. influenzae*, которая уменьшается при снижении pH среды, наблюдаемой в дыхательных путях при инфекции. Так как макролиды накапливаются внутри клеток, у многих из них создается низкая концентрация в интерстициальной жидкости, где локализуется *H. influenzae* [4, 5].

Рис. 3. Частота выделения резистентных штаммов *H. influenzae* к хлорамфениколу в 2000–2005 гг., %

К представителю фторхинолонов – ципрофлоксацину было протестировано 74 штамма, из них 73 (98,7%) оказались чувствительны, 1 (1,4%) – резистентный. По данным литературы, так же как и в нашем исследовании, резистентность *H. influenzae* к фторхинолонам встречается крайне редко.

Резистентность к хлорамфениколу определялась у 210 штаммов, из них 165 (78,5%) оказались чувствительны, 19 (9,0%) – умеренно-резистентны, 26 (12,5%) – резистентны (рис. 3). Наибольшее количество резистентных к хлорамфениколу штаммов выделено в 2001 г. – 25,5%, в последующие годы резистентных штаммов выявлено значительно меньше: в 2002 г. – 13,2%, в 2003 г. – 3,7%, в 2004 г. – 15,2%, в 2005 г. – 3,6%. По доступным данным, резистентных *H. influenzae* к хлорамфениколу штаммов в разных странах встречается от 0,5% до 24,9% [2, 6–8].

В течение всего периода к тетрациклину было протестировано 158 штаммов, из них 85 (53,7%)

Рис. 4. Частота выявления резистентных штаммов *H. influenzae* к триметоприму/сульфаметоксазолу в 2002–2005 гг., %

оказалось чувствительны, 14 (9,0%) – умеренно-резистентными, 59 (37,3%) – резистентными. Наибольшее количество резистентных штаммов было выделено в 2000 и 2002 г.г. По зарубежным данным резистентность *H. influenzae* к тетрациклину составляет от 1,5% до 25,4% [2, 6–8].

На рис. 4 показаны результаты исследования активности триметоприма/сульфаметоксазола в отношении 83 из выделенных штаммов. Резистентных штаммов к триметоприму/сульфаметоксазолу в 2002 г. не обнаружили, в 2003 г. выявлено 9,0% резистентных штаммов, в 2004 г. – 8,3%, в 2005 г. – 19,2%. В целом, из 83 протестированных штаммов 74 (89,1%) оказались чувствительными, 9 (10,9%) – резистентными.

К рифампицину была определена чувствительность 66 штаммов, из них чувствительных оказалось 64 (96,9%), умеренно-резистентных – 2 (3,1%).

Заключение

Таким образом, на основании проведенного нами мониторинга чувствительности *H. influenzae* в г. Екатеринбурге можно подчеркнуть следующие особенности.

Резистентность *H. influenzae* к ампициллину в 2002 г. возросла до 18,9% по сравнению с 2000 г. В последующие годы (2003–2005) подобного количества резистентных штаммов выявлено не было. Умеренно резистентные к ампициллину штаммы выделялись не каждый год, так, в 2005 и 2003 г. штаммы этого фенотипа не были обнаружены. β -лактамазы обнаружены у 5,1 % штаммов. Различий в частоте выявления β -лактамаз у штаммов *H. influenzae* фенотипическими и генотипическими методами не выявлено. Не продуцировали β -лактамазу и были чувствительны к ампициллину 91,3% штаммов. Среди протестированных штаммов 2,5% β -лактамазонегативных ампициллинорезистентных штаммов *H. influenzae* (BLNAR). Резистентность всех штаммов *H. influenzae* к цефалоспорином I поколения, полученная в период наших наблюдений, полностью согласуется с опубликованными результатами зарубежных и отечественных исследований [2, 6–8]. Полученные нами результаты подтверждают недостаточную активность цефалоспоринов I поколения в отношении *H. influenzae* и значительно более высокую активность цефалоспоринов II–III поколений. Так, для цефуроксима подавляющее большинство штаммов были чувствительны (95,6%), не было найдено штаммов, устойчивых к цефотаксиму и цефтриаксону. К ингибиторозащищенным пенициллинам (в частности, к амоксициллину/клавуланату) выявлено 5 резистентных штаммов, что составило 5,5%

среди всех выделенных в 2001–2005 г.г. штаммов. Не смотря на то, что мы обнаружили β -лактамазы у 5% штаммов, устойчивой тенденции к повышению роли этих фенотипов *H. influenzae* не обнаружено. В то же время по зарубежными данными отмечается повышается частота выделения таких штаммов: так, во Франции β -лактамазы выявлены у 29,1 % штаммов, на Ближнем Востоке – у 65,5% и в Японии – у 25%. В ряде европейских стран (Нидерланды, Бельгия) выявление штаммов, продуцирующих β -лактамазы составляет около 5%, что находится на уровне результатов нашего исследования в Свердловской области. В то же время β -лактамазонегативных ампициллинорезистентных штаммов *H. influenzae* (BLNAR) в Свердловской области выделялось 2,5%, так же как на Ближнем Востоке – 2,5% – и несколько больше, чем в Северной и Латинской Америке (0,1%). В данном исследовании обнаружены достаточно редко описываемые в зарубежной литературе и ранее не описанные в нашей стране два штамма *H. influenzae* (1,0%), не продуцирующие β -лактамазу и умеренно-резистентные к ампициллину (BLNAI). В то же время в Азии и прежде всего в Японии, в отличие от наших результатов, такие штаммы в 2004 г. выявлены в около 25% случаев.

Резистентность к фторхинолонам выявлялась крайне редко. Впервые выявленная на территории Свердловской области резистентность у нескольких штаммов *H. influenzae* к фторхинолонам требует дальнейшего мониторинга.

В течение всего периода исследований резистентных к хлорамфениколу штаммов выявлялось от 22% в 2001 г. и 17% в 2002 г. до 3% в 2005 г. За весь период исследований не наблюдалось увеличения частоты выявления резистентных к хлорамфениколу штаммов, тем не менее, каждый год обнаруживалось некоторое количество резистентных и умеренно резистентных штаммов. Полученные нами данные резистентности к хлорамфениколу не противоречат результатам, полученным в европейских странах.

Наибольшее число резистентных к тетрациклину штаммов было выявлено в 2000 и 2002 г. (частота встречаемости 70–75%) [6–8]. В то же время в 2004–2005 г. количество резистентных штаммов не превышало 15%. Наши данные по определению резистентности к тетрациклину частично согласуются с зарубежными данными (1,5–24% резистентных штаммов). В то же время не наблюдалась устойчивой тенденции к увеличению частоты выявления резистентных штаммов в 2000–2005 г.

При тестировании штаммов к триметоприму/сульфаметоксазолу выявлено увеличение частоты

резистентных штаммов от 10% в 2003 году до 21% в 2005 году. Данные, полученные в ходе нашего исследования, не противоречат литературным, так как в последнее время наблюдается существенная приобретенная резистентность к триметоприму/ сульфаметоксазолу, снижающая клиническую эффективность препарата [9].

К рифампицину были выявлены только умеренно резистентные (3,1%) и чувствительные штаммы. Резистентных штаммов не выявлено.

Полирезистентных штаммов *H. influenzae* (к ампицилину, гентамицину, к цефалоспорином), описанных в Санкт-Петербурге в 1997 г., нами обнаружено не было [10].

В заключении следует отметить, что несмотря на появление и распространение β -лактамазопродуцирующих штаммов и появление β -лактамазо-негативных ампициллинорезистентных штаммов, резистентность к которым связана с изменением пенициллинсвязывающих белков, сохраняется высокая активность ряда β -лактамных антибиотиков и прежде всего цефалоспоринов II–IV поколений и ингибиторозащищенных пенициллинов, что позволяет их рассматривать в качестве препаратов выбора при терапии инфекций, вызванных *H. influenzae* у детей.

Литература

1. Богданович Т.М., Стецюк О.У., Боронина Л.Г. Выделение, идентификация и определение чувствительности к антибиотикам *Haemophilus influenzae*. Клин микробиол антимикроб химиотер 2000; 2: 2:93-109.
2. Daoud Z., Hanna N., Cjcsaki A. Patterns of susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* at a university hospital. Abstract of the 15th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Disease, Geneva 2005. Available from: www.librainitiative.com/TCN
3. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: Методические указания. – М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. – 91 с.
4. Катосова Л.К. Сравнительная характеристика штаммов *H. influenzae*, выделенных от здоровых детей и больных острыми и хроническими бронхолегочными заболеваниями. Журнал микробиол эпидемиол и иммунобиол 1986; (1):14-18.
5. Страчунский Л.С., Козлов С.Н. Макролиды в современной клинической практике. Смоленск: Амипресс; 2000.
6. Л.С. Страчунский, О.И. Кречикова, Г.К. Решедько, и соавт. Чувствительность к антибиотикам *Haemophilus influenzae*, выделенных у здоровых детей из организованных коллективов. Клин Микробиол Антимикроб Химиотер 2002; 4(1):33-41.
7. de Almeida A.E., de Filippis I., Ferreira D.G., de Abreu A.O., Rebelo C., Gemal A.L., Marzochi KB. Antimicrobial susceptibility of *Haemophilus influenzae* isolates collected from 4 centers in Brazil (1990-2003). Diagn Microbiol Infect Dis 2006; 54:57-62.
8. Marchese A., Ardito F., Fadda G., Fontana R., Lo Cascio G., Nicoletti G., Speciale A.M., Schito G.C. The Sentinel Project: an update on the prevalence of antimicrobial resistance in community-acquired respiratory *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus* spp. in Italy. Int J Antimicrob Agents 2005; 26(1):8-12.
9. Чучалин А.Г., Синопальников А.И., Яковлев С.В. и др. Внебольничная пневмония у взрослых: практические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике. Клин Микробиол Антимикроб Химиотер 2006; 8(1):54-86.
10. Сорокина М.Н. Актуальные вопросы эпидемиологии, клиники, диагностики и профилактики инфекций, вызываемой *H. influenzae* типа b. Новости вакцинопрофилактики 1998; (4):14-20.