

**М.С. СЫЗДЫКОВ, А.Н. КУЗНЕЦОВ,
А.К. ДУЙСЕНОВА, А.Б. ШЕВЦОВ**
РГП ПХВ «Казахский научный центр карантинных и
зоонозных инфекций имени Масгута Айкимбаева»
Казахский Национальный медицинский университет
имени С. Д. Асфендиярова
РГП «Национальный центр биотехнологии»

ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ БРУЦЕЛЛ, ВЫДЕЛЕННЫХ В КАЗАХСТАНЕ

УДК 616.98(075.8):615.33

Введение: Бруцеллез является значительной проблемой общественного здравоохранения в странах Средней Азии, включая Казахстан. Лечение данной инфекции зачастую проводится эмпирически из-за ограниченной информации о профилях антибиотикочувствительности бруцелл.

Целью настоящего исследования явилось определение профилей антибиотикочувствительности клинических изолятов бруцелл в Казахстане, стране, эндемичной по бруцеллёзу.

Методы: Изоляты *Brucella* spp. были идентифицированы из гемокультур, полученных от пациентов с симптомами, не исключаящими бруцеллёз, в период с 2010 по 2014 г. Минимальные ингибирующие концентрации были определены для гентамицина, доксициклина и рифампицина с использованием E-теста. Интерпретация результатов была выполнена согласно критериям Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

Результаты: Всего было проанализировано 177 изолятов бруцелл. Все штаммы были чувствительны к доксициклину и гентамицину; возможная резистентность к рифампицину наблюдалась у 83 (47%) изолятов.

Выводы: Несмотря на высокий уровень бруцеллёза в Казахстане и частое назначение эмпирического лечения, изоляты остаются чувствительными к протестированным антибиотикам. Однако, это первое сообщение о вероятной резистентности к рифампицину среди бруцелл, выделенных в Казахстане.

Ключевые слова: *Brucella*, бруцеллёз, МИК, рифампицин, E-тест, Казахстан

Бруцеллез – это убиквитарная зоонозная инфекция, которая обуславливает по приблизительным оценкам 500000 новых случаев заболеваний людей ежегодно [1]. Эпидемическое значение имеют 4 вида рода *Brucella*: *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* и *B. canis* [2].

Бруцеллез – это системное заболевание, обуславливающее поражение многих органов и систем и обладающее клиническим полиморфизмом. Основными симптомами бруцеллёза являются лихорадка, симптомы интоксикации, потливость, поражение локомоторной системы и гепатоспленомегалия [3]. Заболевание характеризуется длительным рецидивирующим течением, склонностью к хронизации, медленным выздоровлением и возможными серьезными осложнениями со стороны опорно-двигательной и нервной систем, что требует длительного лечения [4].

Лечение бруцеллеза проводится эмпирически согласно стандартным схемам ВОЗ; антибиотикочувствительность бруцелл обычно не учитывается в связи с высоким риском заражения персонала [2] и необходимостью лаборного оборудования 3 уровня безопасности [5].

Целью настоящего исследования явилось определение антибиотикочувствительности клинических изолятов *B. melitensis* в различных регионах Казахстана.

Материалы и методы

Изоляты бруцелл (все – *Brucella melitensis*) были выделены из крови людей с симптомами, не исключаящими бруцеллёз, в период с 2010 по 2014 годы.

Кровь, полученная от людей, засеивалась на бактериологическую транспортную среду производства Казахского научного центра карантинных и зоонозных инфекций у постели больного с последующим пересевом по Кастанеда в условиях лаборатории.

Все штаммы бруцелл были идентифицированы до вида и биовара с использованием конвенциональных тестов: окраска по Граму, потребность в углекислом газе, положительные реакции на каталазу и оксидазу, продукция сероводорода и индола, редукция анилиновых красителей. Подтверждающим идентификацию вида бруцелл тестом служила ПЦР.

Нами была сформирована выборка из 177 клинических изолятов *B. melitensis*, выделенных в разных регионах Казахстана (Алматинская, Атырауская, Жамбылская, Западно-Казахстанская, Карагандинская, Кызылординская и Южно-Казахстанская области).

Тестирование антибиотикочувствительности

Уровни минимальных ингибирующих концентраций (МИК) определялись для конвенциональных противобруцеллезных препаратов: рифампицин, доксициклин, гентамицин, а также к эритромицину в E-тесте (Biomerieux, Швеция) на чашках Петри с бруцелл-агаром (Himedia, Индия) с добавлением 5% овечьей сыворотки после 48 часов инкубации при 35°C в атмосферном воздухе.

Производился посев исследуемого штамма газонем на чашки Петри. Полоски E-теста помещались на агар с посевом, который инкубировался при вышеописанных условиях, после чего осуществлялось чтение результатов.

МИК определялась по пересечению зоны подавления роста со шкалой E-теста.

Контрольные точки МИК для определения чувствительности к тому или иному препарату определялись в

соответствии с рекомендациями The Clinical Laboratory Standards Institute. Эти значения были оценены в соответствии с критериями CLSI для медленно растущих бактерий (таблица 1).

Таблица 1 – Пределы колебаний МИК для медленно растущих бактерий

| Антибиотик | Колебания МИК (мг / мл) | Контрольная точка (мг/мл) |
|-------------|-------------------------|---------------------------|
| Гентамицин | 0,064-2,0 | 4,0 |
| Доксициклин | 0,032-1,0 | 1,0 |
| Рифампицин | 0,008-4,0 | 1,0 |

В соответствии с этими критериями исследуемые штаммы были разбиты на группы:

- S - чувствительные к изучаемому антибиотику;
- I - изоляты с промежуточной чувствительностью;
- R - устойчивые.

В качестве контроля идентификации, биотипирования и определения антибиотикочувствительности использовался референтный штамм *Brucella melitensis* 16М. Кроме того, в качестве контроля качества определения антибиотикочувствительности использовался штамм *Esherichia coli* ATCC 25922.

Результаты и их обсуждение

Результаты изучения фенотипических свойств штаммов бруцелл показали, что лиофилизация культур и длительное хранение их при температуре +4°C не оказывало существенного влияния на культурально-морфологические свойства микробов. Однако они претерпевали некоторые изменения фенотипических свойств, которые выражались в изменении фагочувствительности, метаболизма тионина, акрифлавина, фуксина, антибиотикочувствительности, агглютинабельности, термоагглютинации. При пассаже через специфические среды происходило восстановление фенотипических свойств штаммов, хотя в ряде случаев отмечалась реверсия из S-формы в SR- и R-формы.

Среди штаммов бруцелл, отобранных для определения чувствительности к антибиотикам, типировано было 138 из 177 (77,97%).

Распределение по биоварам изучаемых изолятов *B. melitensis* представлено в таблице 2 и на рисунке 1.

Таблица 2 – Распределение по биоварам изучаемых изолятов *B. Melitensis*

| Биовар | Число штаммов |
|----------|---------------|
| R-форма | 1 |
| Биовар 1 | 47 |
| Биовар 2 | 6 |
| Биовар 3 | 84 |

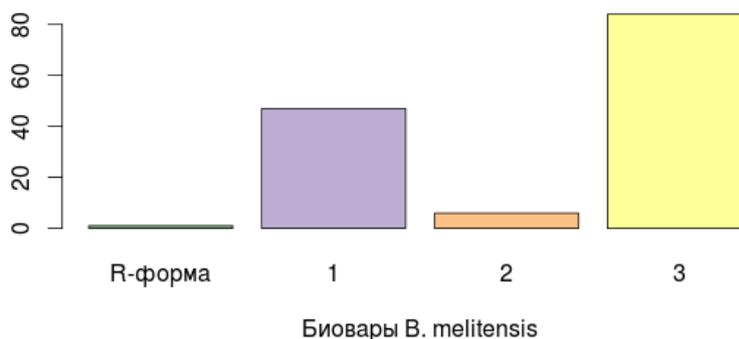


Рисунок 1 – Распределение по биоварам изучаемых изолятов *B. melitensis*

Биотипирование показало, что среди изучаемых культур преобладали 1 и 3 биовары *B. melitensis* (рисунок 1).

Ряд культур, включая две, находившиеся на криохраниении, при применении общепринятых методов идентификации, вследствие изменения фенотипических свойств, имели отклонения от видовых признаков, что представляло определённые трудности при их идентификации.

Значения МИК для исследуемых антибиотиков распределились следующим образом (таблица 3):

Таблица 3 – Значения МИК (мг / мл) для изолятов *B. melitensis* (n = 177)

| Препарат | 0,023 | 0,032 | 0,047 | 0,064 | 0,094 | 0,125 | 0,19 | 0,25 | 0,38 | 0,5 | 0,75 | 1 | 1,5 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 |
|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|------|------|-----|------|----|-----|----|----|----|----|----|
| Гентамицин | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 28 | 25 | 22 | 26 | 33 | 34 | 3 | 6 |
| Доксици- клин | 13 | 30 | 63 | 46 | 17 | 5 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Рифампи- цин | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 25 | 28 | 40 | 1 | 3 | 0 | 7 | 3 | 27 | 43 |

Все изученные штаммы были чувствительны к доксициклину, 9 из 177 штаммов бруцелл обладали промежуточной чувствительностью к гентамицину (5,08%), а 83 из 177 (10,84%) – к рифампицину (таблица 4).

Таблица 4 – Распределение чувствительности к антибиоткам штаммов *B. melitensis*

| Антибиотик | S | I | R |
|-------------|-----|----|---|
| Гентамицин | 168 | 9 | 0 |
| Доксициклин | 177 | 0 | 0 |
| Рифампицин | 94 | 83 | 0 |

Таким образом, длительное хранение культур бруцелл, как в лиофилизированном состоянии, так и в условиях криохранения, приводит к реверсии фенотипических свойств штаммов, что затрудняет их идентификацию.

Изучение МИК клинических изолятов *Brucella melitensis* из различных регионов Казахстана показывает, что бруцеллы показывают достаточную чувствительность к основным антибактериальным препаратам, назначаемым для проведения эмпирического лечения. Устойчивых штаммов в нашем исследовании не было выявлено. Наиболее эффективным антибиотиком в отношении *B. melitensis* оказался доксициклин: все изученные штаммы были чувствительны к препарату. Наибольшее число штаммов показывали промежуточную чувствительность в отношении рифампицина (рисунок 2).

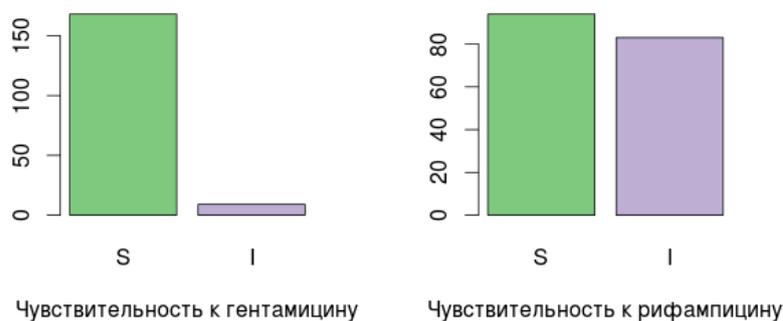


Рисунок 2 – Чувствительность к гентамицину и рифампицину *B. melitensis*

Выводы.

1. Несмотря на широкое распространение бруцеллеза в Республике Казахстан и активное применение эмпирической терапии данной инфекции, основной возбудитель, *B. melitensis*, сохраняет чувствительность к основным конвенциональным антибиотикам.
2. Однако мы впервые сообщаем о наметившейся тенденции формирования антибиотикорезистентности бруцелл, выделенных в Казахстане, к рифампицину.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 World Health Organization (WHO) // Fact sheet. - Geneva, Switzerland: 1997. - N173. - P. 45-49.
- 2 Corbel M.J. Brucellosis in humans and animals. - Geneva: World Health Organization, 2006. - 102 p.
- 3 Pappas G., Papadimitriou P., Akritidis N. et al. The new global map of human brucellosis // Lancet Infect. Dis. - 2006. - V. 6. - P. 91-99.
- 4 Lang R., Rubinstein E. Quinolones for the treatment of brucellosis // J. Antimicrob. Chemother. - 1992. - V. 29. - P. 357-363.
- 5 Robichaud S., Libman M., Behr M., Rubin E. Prevention of laboratory-acquired brucellosis // Clin Infect Dis. - 2004. - V. 38. - P. 119-122.

М.С. СЫЗДЫҚОВ, А.Н. КУЗНЕЦОВ, А.Қ. ДҮЙСЕНОВА, А.Б. ШЕВЦОВ

«Масғұт Айқымбаев атындағы Қазақ карантиндік және зооноздық инфекциялар ғылыми орталығы» ШЖҚ РМК
С. Ж. Асфендияров атындағы Қазақ ұлттық медицина университеті
«Ұлттық биотехнология орталығы» РМК

ҚАЗАҚСТАНДА БӨЛІНГЕН БРУЦЕЛЛДЕРДІҢ КЛИНИКАЛЫҚ ИЗОЛЯТТАРЫНЫҢ ФЕНОТИПТІК ҚАСИЕТТЕРІ ЖӘНЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬДЫ ПРЕПАРАТТАРҒА СЕЗІМТАЛДЫҒЫ

Түйін: Кіріспе: Бруцеллез Орта Азия мемлекеттерінде, соның ішінде Қазақстандағы қоғамдық денсаулық сақтаудың күрделі мәселесі болып табылады. Бруцеллдің антибиотикалық сезімталдығы профилі туралы ақпараттың шектеулілігінен берілген жұқпаны емдеу көптеген жағдайда эиприкалық тұрғыда жүргізіледі.

Берілген зерттеудің мақсаты Қазақстандағы, бруцеллез бойынша эндемиялы елдегі бруцелл изоляттарының антибиотикалық сезімталдығы профилін анықтау болып табылады.

Әдістері: 2010 жылдан бастап және 2014 жылға дейінгі кезеңде бруцеллезді жоққа шығармайтын симптомдары бар пациенттерден алынған, *Brucella* spp изоляттары гемоөскінділерден идентификацияланды. Ең аз көлемдегі ингибирлеуші концентрациялар E-тестті пайдалану арқылы гентамицин, доксициклин және рифампицин үшін анықталынды. Нәтижелерді интерпретациялау Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) критерийлеріне сәйкес орындалды.

Нәтижелері. Барлығы 177 бруцелл изоляты талданды. Барлық штамдар доксициклин мен гентамицинге сезімтал болды; рифампицинге ықтимал сезімталдық 83 (47%) изолятта анықталды.

Қорытындылар: Қазақстандағы бруцеллездің жоғары деңгейіне және эиприкалық емдеудің тағайындалуына қарамастан, изоляттар тестіден өткізілетін антибиотиктерге сезімтал болып қала береді. Дегенмен, бұл Қазақстанда бөлінген бруцеллдердің ішіндегі рифампицинге ықтимал резистенттік туралы бірінші хабар.

Түйінді сөздер: *Brucella*, бруцеллез, МИК, рифампицин, E-тест, Қазақстан

M.S. SYZDYKOV, A.N. KUZNETSOV, A.K. DUYSENOVA, A.B. SHEVTSOV

RSE REM «Kazakh Scientific Center of Quarantine and Zoonotic Diseases named by Masgut Aykimbayev»
Kazakh National Medical University named by S. D. Asfendiyarov
RSE «National Biotechnology Centre»

PHENOTYPIC CHARACTERISTICS AND SENSITIVITY TO ANTIBIOTICS OF THE BRUCELLA CLINICAL STRAINS ISOLATED IN KAZAKHSTAN

Resume:

Background: Brucellosis poses a significant public health problem in Central Asian countries, including Kazakhstan. Treatment of this disease is often empirical due to limited information on the antibiotic susceptibility profiles of *Brucella* spp. *The aim of this study* was to determine the antibiotic susceptibility profiles of *Brucella* blood isolates in Kazakhstan, a country endemic for brucellosis.

Methods: *Brucella* spp. isolates were identified from the blood cultures of patients with symptoms not excluding brucellosis from 2010 to 2014. Minimum inhibitory concentrations were determined for gentamicin, doxycycline, and rifampicin using the E-test. Interpretations were made according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines.

Results: A total of 177 *Brucella* spp. isolates were analyzed. All were susceptible to doxycycline and gentamicin; probable resistance to rifampicin was observed among 83 (47%) of the isolates.

Conclusions: Despite the high burden of brucellosis in Kazakhstan and frequent empirical treatment, isolates have remained susceptible to the tested antibiotics. However, this is the first report of probable resistance to rifampicin among *Brucella* isolates from Kazakhstan.

Keywords: *Brucella*, Brucellosis, MIC, Rifampicin, E-test, Kazakhstan