



Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии

Научно-исследовательский институт антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава России

**Учредитель**

Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии

**Издатель**

Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии

[www.iascmac.ru](http://www.iascmac.ru)

Журнал зарегистрирован Комитетом РФ по печати 30.09.1999 г. (№019273) Тираж 3000 экз.

**Подписные индексы**

По каталогу «Журналы России» на 2020 г. агентства «Роспечать»:

**82125** – единый подписной индекс;

**T6708** – для юридических лиц.

**Подписка на сайте издателя**

<https://service.iascmac.ru>

**Адрес для корреспонденции**

214019, г. Смоленск, а/я 5.  
Тел./факс: (4812)45 06 02

Электронная почта:  
[cmac@antibiotic.ru](mailto:cmac@antibiotic.ru)

Электронная версия журнала:  
[www.cmac-journal.ru](http://www.cmac-journal.ru)

Журнал входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук. Присланные в редакцию статьи проходят рецензирование

Мнение редакции может не совпадать с точкой зрения авторов публикуемых материалов

Ответственность за достоверность рекламных публикаций несут рекламодатели

При перепечатке ссылка на журнал обязательна

© Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия, 2020.

## Содержание

252 От редакции

### Болезни и возбудители

- Козлов Р.С., Андреева И.В., Стецюк О.У., Муравьев А.А.  
**254** Вакцинация против пневмококковой инфекции взрослых пациентов с сопутствующими заболеваниями: взгляд через призму клинических рекомендаций  
 Кожушная О.С., Солопова Г.Г., Воропаев А.Д., Маркова Ж.В., Сацук А.В., Баламожнова А.О., Новичкова Г.А.  
**266** Эпидемиологическое расследование вспышки кандидемий, вызванной *S. parapsilosis*, в центре детской гематологии/онкологии

### Антибиотикорезистентность

- Гординская Н.А., Беляева Е.В., Борискина Е.В., Кряжев Д.В.  
**272** Проблема антибиотикорезистентности стафилококков в педиатрических стационарах  
 Карпов О.Э., Гусаров В.Г., Замятин М.Н., Орлова О.А., Петрова Л.В., Камышова Д.А., Деметриенко М.В., Габоян Я.С., Пивкина А.И., Гриценко Е.А.  
**277** Управление антибиотикорезистентностью в стационаре: современные реалии и перспективы  
 Шедько Е.Д., Тимошина О.Ю., Азизов И.С.  
**287** Молекулярная эпидемиология генов группы *trg*

### Опыт работы

- Гороховский В.С., Слободенюк Е.В., Бобровникова М.Ю., Дьяченко С.В.  
**302** Влияние сотовых телефонов медицинского персонала на распространение проблемных резистентных микроорганизмов  
 Иванова О.В., Эйдельштейн И.А., Ромашов О.И., Козлов Р.С.  
**306** Оценка влияния мутаций в гене 23S рРНК *Mycoplasma pneumoniae*, обуславливающих устойчивость к макролидам, на тяжесть течения внебольничной пневмонии у лиц молодого возраста, находившихся на лечении в Смоленском военном госпитале  
 Егорова С.А., Кафтырева Л.А.  
**314** Методологические подходы к определению чувствительности штаммов *Salmonella* к фторхинолонам

## Методологические подходы к определению чувствительности штаммов *Salmonella* к фторхинолонам

Егорова С.А.<sup>1</sup>, Кафтырева Л.А.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Роспотребнадзора, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Контактный адрес:

Светлана Александровна Егорова  
Эл. почта: egorova72@mail.ru

Ключевые слова: *Salmonella*, фторхинолоны, определение чувствительности, скрининг, зона технической неопределенности.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Внешнее финансирование: исследование проведено без внешнего финансирования.

**Цель.** Оценить эффективность различных подходов к определению чувствительности штаммов *Salmonella*, включая *S. typhi*, к фторхинолонам, учитывая молекулярные механизмы резистентности.

**Материалы и методы.** Сравнили значения МПК ципрофлоксацина с диаметрами зон подавления роста вокруг диска с пefлоксацином, 5 мкг (310 штаммов) и налидиксовой кислотой, 30 мкг (420 штаммов). МПК ципрофлоксацина определяли методами градиентной диффузии и последовательных разведений в бульоне. Использовали агар и бульон Мюллера – Хинтона, диски и полоски с антибиотиками производства Oxoid (Великобритания). Изучили молекулярные механизмы резистентности к хинолонам у 19 штаммов. Характер мутаций в QRDR-регионе генов *gyrA*, *gyrB*, *parC* и *parE* и наличие генов, ассоциированных с плазмидами (*qnr*, *aac(6)-1b* и др.), оценили путем анализа последовательностей, полученных методом полногеномного секвенирования с использованием сервиса ResFinder биоинформационной платформы Center of Genomic Epidemiology. Геномные ДНК-библиотеки готовили с использованием набора реагентов MiSeq Nextera XT Library Preparation Kit (Illumina, США). Секвенирование проводили на приборе MiSeq (Illumina, США) с набором реагентов MiSeq Reagent Kit v3 600 cycles (Illumina, США). Сборку и анализ геномов проводили с помощью CLC Genomics Workbench 8.0 (QIAGEN, США).

**Результаты.** Несмотря на высокую конкордантность МПК ципрофлоксацина и результатов скрининговых тестов с дисками пefлоксацина (совпадение категории чувствительности для 96,5% штаммов) и налидиксовой кислотой (совпадение для 98,1% штаммов), результаты, полученные для некоторых устойчивых штаммов, противоречили друг другу, что создало вероятность ошибочной категоризации штамма при тестировании одним методом. Расхождение результатов было получено в 19 случаях сравнения, причем в 3 случаях оно имело объективную причину, а именно наличие у штаммов «парадоксального» фенотипа устойчивости, обусловленного плазмидным механизмом (ген *qnrS*). Остальные расхождения наблюдались в том случае, если полученные значения являлись пограничными: МПК ципрофлоксацина – 0,06 мг/л, диаметр зоны подавления роста для пefлоксацина – 24 мм. Повторное тестирование штаммов выявило колебания значений вокруг пограничного: МПК – 0,06–0,12 мг/л, диаметр – 23–25 мм.

**Выводы.** При определении чувствительности штаммов *Salmonella* к фторхинолонам целесообразно ввести категорию «Зона технической неопределенности»: МПК ципрофлоксацина – 0,06 мг/л, диапазон диаметра зоны подавления роста для пefлоксацина – 23–25 мм. При проведении скрининга диско-диффузионным методом необходимо использовать пefлоксацин и налидиксовую кислоту.

Original Article

## Methodological approaches to fluoroquinolone susceptibility testing of *Salmonella*

Egorova S.A.<sup>1</sup>, Kaftyreva L.A.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Saint-Petersburg Pasteur Institute, Saint-Petersburg, Russia

<sup>2</sup> North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint-Petersburg, Russia

Contacts:

Svetlana A. Egorova  
E-mail: egorova72@mail.ru

Key words: *Salmonella*, fluoroquinolones, susceptibility testing, screening, area of technical uncertainty.

**Objective.** To evaluate effectiveness of the various approaches to fluoroquinolone susceptibility testing of *Salmonella*, including *S. typhi*, taking into account molecular resistance mechanisms.

**Materials and methods.** The MIC values of ciprofloxacin were compared with the inhibition zone for pefloxacin disc, 5 mg (310 isolates) and nalidixic acid, 30 mg (420 isolates). MIC of ciprofloxacin was determined by gradient diffusion test and broth microdilution method. Muller – Hinton agar and Muller – Hinton broth, antibiotic discs and MICE-tests (Oxoid, UK) were used. Chromosomal mutations in QRDR of *gyrA*, *gyrB*, *parC*, and *parE* genes and plasmid-mediated quinolone resistance genes (*qnr*, *aac(6)-1b* etc.) were detected in 19 *Salmonella* isolates by analysis using ResFinder service (Center of Genomic

Conflicts of interest: all authors report no conflicts of interest relevant to this article.

External funding source: no external funding received.

Epidemiology). Genomic DNA libraries were prepared using the MiSeq Nextera XT Library Preparation Kit (Illumina, USA). WGS was performed on MiSeq (Illumina, USA) with MiSeq Reagent Kit v3 600 cycles (Illumina, USA). Genome assembly and analysis were performed using CLC Genomics Workbench 8.0 (Qiagen, USA).

**Results.** Despite the high concordance of ciprofloxacin MIC values and the results of disc diffusion screening with pefloxacin (96.5% of isolates) and nalidixic acid (98.1% of isolates), the results obtained for some resistant isolates were inconsistent. When those isolates were tested by a single method, there was a possibility of incorrect susceptibility categorization. Discordant results were obtained for 19 isolates and had the objective reason (paradoxical resistance phenotype due to the plasmid-mediated resistance, *qnrS*) in 3 cases. Other discrepancies were noted when the values were equal to the clinical breakpoints: ciprofloxacin MIC – 0.06 mg/l, inhibition zone for pefloxacin – 24 mm. Repeated testing revealed the variations around the clinical breakpoints: the MIC values of 0.06–0.12 mg/l, and inhibition zone of 23 to 25 mm.

**Conclusions.** When performing fluoroquinolone susceptibility testing of *Salmonella*, it is reasonable to add the category “Area of Technical Uncertainty”: ciprofloxacin MIC value of 0.06 mg/l, and inhibition zone for pefloxacin of 23 to 25 mm. Two discs (pefloxacin and nalidixic acid) should be used for fluoroquinolone resistance screening by disk diffusion method.

## Введение

Фторхинолоны являются препаратами выбора при лечении тяжелых форм сальмонеллезных инфекций, включая брюшной тиф. В то же время, по данным различных авторов, в Российской Федерации доля штаммов *Salmonella*, устойчивых к этому классу антимикробных препаратов (АМП) достигает 50–70% [1–4]. У штаммов *Salmonella* описаны хромосомные и плазмидоопосредованные механизмы устойчивости к хинолонам. Основным механизмом является модификация мишени вследствие мутаций (однонуклеотидных замен) в хромосомных генах, кодирующих субъединицы ДНК-гиразы (*gyrA*, *gyrB*) и топоизомеразы (*parC*, *parE*). У штаммов *Salmonella* наиболее часто обнаруживают однонуклеотидные замены в QRDR-регионе (quinolone resistance-determining region) гена *gyrA* в кодонах 83 (серин) и 87 (аспарагиновая кислота). Мутации в генах *gyrB*, *parC*, *parE*, а также в других хромосомных генах, приводящие к снижению экспрессии поринов или повышению экспрессии систем эффлюкса, описаны значительно реже, не имеют самостоятельного значения в формировании резистентности и действуют как дополнительные факторы, повышая уровень устойчивости у штаммов с уже имеющимися мутациями в гене *gyrA*. Плазмидоопосредованные механизмы (защита мишени белками семейства Qng; системы эффлюкса QerA и OqxAB; модификация хинолонов ферментом ацетилтрансферазой AAC(6′)-Ib-cr) обнаруживают намного реже, чем хромосомные: по данным литературы, доля таких штаммов *Salmonella* составляла от 0,5% до 10,0% для генов семейства *qnr*, менее 1,0% – для гена *aac(6′)-Ib-cr* [5–14].

Развитие устойчивости к фторхинолонам происходит поэтапно. Эпидемиологическая точка отсечения (ECOFF), разделяющая штаммы порядка Enterobacterales на «дикий» и «не дикий» типы по чувствительности к цiproфлоксацину, составляет 0,06 мг/л для штаммов *Salmonella* и *E. coli*; 0,12 мг/л – для *Klebsiella* spp. и других представителей. Если у штамма вследствие единичной однонуклеотидной замены в хромосомном гене произошла модификация только одного фермента (как правило, ДНК-гиразы) или штамм приобрел плазмидный ген резистентности, то возникает «устойчивость низкого уровня» к фторхинолонам: МПК цiproфлоксацина по-

вышается в 2–4 раза и достигает 0,12–0,5 мг/л. Если штамм уже имеет устойчивость низкого уровня, то в случае возникновения дополнительных хромосомных мутаций или приобретения плазмидных генов, он становится высоко устойчивым к фторхинолонам: МПК цiproфлоксацина достигает 1,0 мг/л и выше.

Штаммы порядка Enterobacterales расцениваются как чувствительные (S) к цiproфлоксацину при МПК ≤ 0,25 мг/л, резистентные (R) при МПК > 0,5 мг/л. В категорию S могут попасть штаммы «не-дикого» типа с устойчивостью низкого уровня, т.е. наличие механизма резистентности не влияет на клиническую категоризацию штамма [15, 16]. В отличие от других энтеробактерий, для штаммов *Salmonella* устойчивость низкого уровня (МПК цiproфлоксацина = 0,12–0,5 мг/л) признана клинически значимой. Клиническая неэффективность фторхинолонов, используемых в стандартной дозе, при лечении брюшного тифа, вызванного такими штаммами *S. typhi*, подтверждена рандомизированными клиническими исследованиями (категория доказательств A). Аналогичные данные имеются и в отношении других сероваров *Salmonella*, вызывающих инвазивные (генерализованные) инфекции (категория доказательств C) [17–21]. Некоторые исследователи указывают на эффективность использования максимально высоких доз гатифлоксацина длительным курсом в отношении штаммов *S. typhi* с устойчивостью низкого уровня [22, 23].

Подходы к определению чувствительности штаммов *Salmonella* к фторхинолонам и критерии интерпретации в последние годы неоднократно менялись. До 2011 г. был рекомендован скрининговый тест с диском налидиксовой кислоты, при этом устойчивые штаммы *Salmonella* следовало расценивать как устойчивые ко всем хинолонам. Этот препарат является высокочувствительным индикатором для хромосомного механизма резистентности: штаммы с некоторыми мутациями могут сохранять чувствительность к цiproфлоксацину (МПК = 0,06 мг/л), но быть устойчивыми к налидиксовой кислоте (d = 6–9 мм) [24]. В то же время налидиксовая кислота не всегда позволяет выявить плазмидоопосредованные механизмы устойчивости. У штаммов,

которые приобрели гены *qnr* или *aac(6′)-Ib-cr*, может возникнуть «парадоксальный» фенотип устойчивости: несмотря на то что МПК цiproфлoксацина повышается до 0,12–0,5 мг/л (устойчивость низкого уровня), сохраняется чувствительность к налидиксовой кислоте [14]. С 2011 г. EUCAST исключил из рекомендаций скрининговый тест с диском налидиксовой кислоты, а также критерии интерпретации для диска с цiproфлoксацином. Единственным критерием оценки чувствительности штаммов *Salmonella* к фторхинолонам осталось значение МПК цiproфлoксацина.

В 2013 г. EUCAST установил особые критерии интерпретации для цiproфлoксацина и штаммов *Salmonella*, отличающиеся от других представителей порядка Enterobacterales. Для штаммов *Salmonella*, вызывающих инвазивные инфекции (брюшной тиф, паратифы, генерализованные и внекишечные формы сальмонеллезной инфекции), клиническое пограничное значение МПК цiproфлoксацина совпадает с ECOFF:  $S \leq 0,06$  мг/л;  $R > 0,06$  мг/л. Таким образом, в настоящее время к категории S относят только штаммы «дикого» типа, которые не имеют фенотипически выявляемых механизмов резистентности к хинолонам. Экспертные правила EUCAST рекомендуют расценивать штаммы с МПК цiproфлoксацина без уточнения типа инфекции (системная или локализованная) [15, 21]. С 2014 г. EUCAST ввел скрининговый тест с диском пefлoксацина (5 мкг) для выявления резистентности к фторхинолонам у штаммов *Salmonella*. Штаммы с диаметром зоны подавления роста  $< 24$  мм рекомендовано расценивать как устойчивые ко всем фторхинолонам. Целесообразность использования такого подхода подтверждена многими исследованиями [25–28].

В 2019 г. EUCAST ввел понятие «зона технической неопределенности» (ЗНТ) в отношении некоторых комбинаций микроорганизм/антибиотик и отметил, что при попадании результата тестирования в эту зону существует высокая вероятность ошибочной категоризации штамма [29]. ЗНТ учитывает возможность колебания результатов вследствие технических факторов, биологической вариабельности, присущей многим видам микроорганизмов, а также объективные трудности интерпретации некоторых комбинаций микроорганизм/антибиотик [30, 31]. При попадании результата в ЗНТ рекомендовано повторное тестирование и/или использование альтернативных методов. ЗНТ для штаммов Enterobacterales и цiproфлoксацина включает значение МПК 0,5 мг/л, конкретные рекомендации в отношении штаммов *Salmonella* отсутствуют. Учитывая тот факт, что в рутинной практике прогнозирование исхода антибиотикотерапии основывается на результатах однократного тестирования штамма, существует вероятность ошибочной категоризации штамма, особенно в том случае, если полученный результат находится близко к клиническому пограничному значению или совпадает с ECOFF, как у *Salmonella* и цiproфлoксацина.

Таким образом, методы оценки чувствительности штаммов *Salmonella* к фторхинолонам должны включать тестирование чувствительных индикаторных препаратов, учитывать возможность попадания результата

в ЗНТ и исключать вероятность ошибочной категоризации штамма.

**Цель** исследования – оценить эффективность различных подходов к определению чувствительности к фторхинолонам штаммов *Salmonella*, включая возбудителя брюшного тифа, учитывая молекулярные механизмы резистентности.

## Материалы и методы

В ходе работы сопоставили результаты определения чувствительности штаммов *Salmonella* к фторхинолонам, полученные различными методами. Сравнили значения МПК цiproфлoксацина (как наиболее объективный критерий чувствительности) с диаметрами зон подавления роста вокруг диска с пefлoксацином, 5 мкг (для 310 штаммов) и налидиксовой кислотой, 30 мкг (для 420 штаммов). МПК цiproфлoксацина определяли методом градиентной диффузии, при получении расхождения результатов подтверждали методом последовательных разведений в бульоне. Использовали агар и бульон Мюллера – Хинтона, диски и полоски с антибиотиками производства Oxoid (Великобритания).

Молекулярные механизмы резистентности к хинолонам (характер мутаций в QRDR-регионе генов *gyrA*, *gyrB*, *parC* и *parE* и наличие генов, ассоциированных с плазмидами – *qnr*, *aac(6′)-Ib* и др.) оценили у 19 штаммов *Salmonella* путем анализа последовательностей, полученных методом полногеномного секвенирования с использованием сервиса ResFinder биоинформационной платформы Center of Genomic Epidemiology (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>). Геномную ДНК выделяли из бульонных культур, содержащих  $10^9$  КОЕ, с использованием набора DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, США) согласно инструкции производителя. Геномные ДНК-библиотеки готовили из 70 нг ДНК с использованием набора реагентов MiSeq Nextera XT Library Preparation Kit (Illumina, США) согласно протоколу производителя. Секвенирование проводили на приборе MiSeq (Illumina, США) с набором реагентов MiSeq Reagent Kit v3 600 cycles (Illumina, США). Сборку и анализ геномов проводили с помощью CLC Genomics Workbench 8.0 (Qiagen, США).

## Результаты

При сравнении значения МПК цiproфлoксацина и результата скринингового теста с диском пefлoксацина совпадение клинической категории чувствительности было получено для 299 из 310 тестируемых штаммов *Salmonella* (96,5%). Для 231 штамма с МПК цiproфлoксацина  $\leq 0,06$  мг/л (категория S) диаметр зоны подавления роста (d) вокруг диска с пefлoксацином составлял  $\geq 24$  мм (категория S). Для 68 штаммов с МПК цiproфлoксацина  $> 0,06$  мг/л (категория R) d пefлoксацина составлял  $< 24$  мм (категория R), что подтвердило целесообразность использования пefлoксацина как индикатора устойчивости при тестировании штаммов *Salmonella* (Таблица 1).

Расхождения в результатах тестирования наблюдались для 11 штаммов (3,5%). Для 6 штаммов с МПК цiproфлoксацина 0,12–0,25 мг/л (категория R) d пefлoк-

**Таблица 1.** Распределение значений диаметра зоны подавления роста для диска с пefлоксацином и МПК цiproфлoксацина

МПК цiproфлoксацина, мг/л	Диаметр зоны подавления роста для диска с пefлоксацином (5 мкг), мм																				Всего штаммов						
	6	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29		30	31	32	33	36	40
> 32,0	8																										8
8,0	5																										5
4,0	3																										3
0,5		1	1			1		4	2	2																	11
0,25			1	3	5	4	7	11	23	17	6	4	1	3*													85
0,12					1	4	3	15	25	37	20	11	6	3*													125
0,06								1**	2**	1**			1**		1	1	1	1	1	1							10
0,032																3		4			4		1	1			9
0,016																2	6	3	1	6	7	3			1		29
0,008																1	3	1	6	2	3	1	3				20
0,004																1				1	1	1					5
Всего штаммов	16	1	1	1	3	6	9	10	31	52	57	26	16	7	7	5	13	4	8	14	11	5	4	1	1	1	310

\* При многократном повторном тестировании штаммов значения диаметра зоны подавления роста колебались от 22 до 24 мм.

\*\* При повторном тестировании методом микроразведений в бульоне МПК колебалась от 0,06 до 0,12 мг/л.

Пограничные значения МПК цiproфлoксацина (EUCAST 2020): S ≤ 0,06 мг/л, R > 0,06 мг/л; диаметр зоны подавления роста для пefлоксацина (скрининг): S ≥ 24 мм, R < 24 мм.

■ – диапазоны значений, относящиеся к категории R; ■ – к категории S; ■ – штаммы, для которых двумя методами получены противоречивые результаты.

**Таблица 2.** Распределение значений диаметра зоны подавления роста для диска с налидиксовой кислотой и МПК цiproфлoксацина

МПК цiproфлoксацина, мг/л	Диаметр зоны подавления роста для диска с налидиксовой кислотой (30 мкг), мм																				Всего штаммов						
	6	8	9	10	11	12	13	14	15	16	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27		28	30	31	32	35	38
> 32,0	11			1																							12
16,0	1																										1
8,0	6		1																								7
4,0	1																										1
1,0	1																										1
0,5	11																										11
0,25	71	4	3	2	8	3	3	2		1*	1*																102
0,12	155	2	5	7	7	5	11	3	11																		206
0,06	5**									1						1		1	1	1							9
0,032															2		1	1	1	1	2						8
0,016												1	1	2	5	2	4	7	2	1	4			1			30
0,008													3	2	3		2	4	2	4	2	4	1	5	1		27
0,004															1		1	1	1	1	1						5
Всего штаммов	262	6	9	10	15	8	14	6	13	1	1	2	2	5	10	6	2	7	10	9	5	9	1	5	1	1	420

\* Штаммы *Salmonella*, у которых при дальнейшем исследовании выявлена плазмидопосредованная резистентность к хинолонам (qnrS).

\*\* При повторном тестировании методом микроразведений в бульоне МПК колебалась от 0,06 до 0,12 мг/л.

Пограничные значения МПК цiproфлoксацина (EUCAST 2020): S ≤ 0,06 мг/л, R > 0,06 мг/л.

ESOFF для налидиксовой кислоты: «хидкий» тип – ≥ 16 мм, «не-хидкий» тип – < 16 мм.

■ – диапазоны значений, относящиеся к категории R; ■ – к категории S; ■ – штаммы, для которых двумя методами получены противоречивые результаты.

сацина составил 24 мм (категория S). При повторном тестировании этих штаммов значения *d* пefлоксацина колебались в пределах 22–24 мм. Дополнительное тестирование штаммов с диском налидиксовой кислоты, в отличие от пefлоксацина, выявило устойчивость низкого уровня: *d* налидиксовой кислоты – 6–12 мм (категория R). Пять штаммов, чувствительных к ципрофлоксацину по значению МПК (0,06 мг/л), по результатам скрининга с пefлоксацином относились к категории R (*d* = 18–22 мм). Следует отметить, что полученное для этих штаммов значение МПК ципрофлоксацина, определенное методом градиентных концентраций, являлось клиническим пограничным (ЕСOFF). При неоднократном определении МПК ципрофлоксацина методом микроразведений в бульоне результаты колебались от 0,06 (категория S) до 0,12 мг/л (категория R). Изучение молекулярных механизмов резистентности показало, что все 11 штаммов, при тестировании которых наблюдалось расхождение результатов, относились к «не дикому» типу и имели хромосомный механизм резистентности – единичные олигонуклеотидные замены Ser83Phe и Asp87Asn в QRDR-регионе гена *gyrA*. Зарегистрированные несоответствия результатов были обусловлены, по-видимому, технической и/или биологической вариабельностью тестирования.

При сравнении МПК ципрофлоксацина и результатов скринингового теста с диском налидиксовой кислоты для подавляющего большинства штаммов (412 из 420, 98,1%) результаты тестирования совпали. Для 338 штаммов с МПК ципрофлоксацина > 0,06 мг/л (категория R) *d* налидиксовой кислоты не превышал 16 мм (категория R). Для 74 штаммов с МПК ципрофлоксацина ≤ 0,06 мг/л (категория S) *d* налидиксовой кислоты составлял > 16 мм (категория S) (Таблица 2).

У 8 штаммов (1,9%) результаты тестирования двумя методами не соответствовали друг другу. Для 3 штаммов (*S. typhi*, *S. typhimurium*, *S. corvallis*) был получен «парадоксальный» фенотип устойчивости: значение МПК (0,25 мг/л) соответствовало устойчивости низкого уровня к ципрофлоксацину, при этом штаммы сохраняли чувствительность к налидиксовой кислоте (*d* = 18–20 мм). Молекулярное исследование выявило у этих штаммов плазмидоопосредованный механизм устойчивости – защиту мишени, кодируемую геном *qnrS*.

У 5 штаммов, устойчивых по результатам тестирования с налидиксовой кислотой (*d* = 6 мм), МПК ципрофлоксацина составляла 0,06 мг/л (категория S). При повторном определении МПК для этих штаммов методом микроразведений в бульоне значения колебались от 0,06 (категория S) до 0,12 мг/л (категория R). Эти штаммы имели хромосомный механизм устойчивости – единичную олигонуклеотидную замену Ser83Phe в гене *gyrA*. Полученные результаты подтвердили высокую чувствительность налидиксовой кислоты как индикатора хромосомного механизма устойчивости штаммов *Salmonella* к хинолонам.

## Обсуждение

Данное исследование показало, что любой из индикаторных хинолонов (ципрофлоксацин, пefлоксацин, налидиксовая кислота), тестируемый в качестве

единственного препарата, не способен достоверно выявить все механизмы резистентности, описанные у штаммов *Salmonella*. Результаты количественных методов подвержены колебаниям, вследствие чего однократное тестирование штамма может приводить к его неправильной категоризации. Наиболее клинически значимой ошибкой в этом случае является отнесение устойчивого штамма (R) к категории чувствительный (S). Несмотря на высокую конкордантность значений МПК ципрофлоксацина и результатов скрининговых тестов с дисками пefлоксацина (96,5%) и налидиксовой кислоты (98,1%), для некоторых штаммов «не дикого» типа получены противоречивые результаты. Это создает вероятность ошибочной категоризации штамма при однократном тестировании одним методом. Расхождение результатов было получено в 19 случаях сравнения, причем в 3 случаях оно имело объективную причину – наличие у штаммов «парадоксального» фенотипа устойчивости, обусловленного плазмидным механизмом (ген *qnrS*). Остальные расхождения наблюдались в том случае, если полученные значения являлись пограничными: МПК ципрофлоксацина = 0,06 мг/л, диаметр зоны подавления роста для пefлоксацина – 24 мм. Повторное тестирование штаммов выявило колебания значений вокруг пограничного: МПК – 0,06–0,12 мг/л, диаметр – 23–25 мм.

Пefлоксацин позволяет выявить штаммы, устойчивые к хинолонам посредством различных механизмов (хромосомных и плазмидных), однако колебания результатов могут привести к ошибочной интерпретации в том случае, если зона подавления роста находится в диапазоне 23–25 мм. Добавление при скрининге диско-диффузионным методом второго индикаторного хинолона – налидиксовой кислоты – является альтернативным методом выявления хромосомной устойчивости и повышает достоверность тестирования. Кроме того, использование двух препаратов позволяет выявить «парадоксальный» фенотип резистентности и плазмидный механизм.

Несмотря на то что методы оценки МПК ципрофлоксацина принято считать наиболее достоверными для оценки чувствительности штаммов *Salmonella* к хинолонам, при их постановке также возможна ошибочная категоризация, если получено значение МПК 0,06 мг/л, которое является пограничным. В этом случае следует подтвердить результат альтернативным методом – диско-диффузионным методом с пefлоксацином и налидиксовой кислотой.

Учитывая вышесказанное, при тестировании штаммов *Salmonella* представляется целесообразным ввести категорию «зона технической неопределенности». К ней следует отнести значение МПК ципрофлоксацина = 0,06 мг/л, а также диапазон диаметра зоны подавления роста для пefлоксацина – 23–25 мм.

## Заключение

При оценке чувствительности штаммов *Salmonella* к фторхинолонам получение достоверных результатов, пригодных для прогнозирования эффективности лечения и долговременного мониторинга резистентности на различных территориях, возможно только при использовании

актуальных версий рекомендаций EUCAST и российских клинических рекомендаций «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам».

При постановке скринингового диско-диффузионного теста целесообразно использовать 2 препарата

из группы хинолонов: пefлоксацин и налидиксовую кислоту. При определении МПК ципрофлоксацина, в том случае если получено значение 0,06 мг/л, следует подтвердить результат скрининговым диско-диффузионным тестом.

## Литература

1. Evmenenkova I.G., Murach L.V. Analysis of resistance of strains of *Salmonella* spp. to antibiotics in the Smolensk region for 2012-2017. Smolensk medical almanac. 2018;1:93-96. Russian. (Евмененкова И.Г., Мурач Л.В. Анализ резистентности штаммов *Salmonella* spp. к антибиотикам в Смоленском регионе за 2012-2017 гг. Смоленский медицинский альманах. 2018;1:93-96).
2. Zharkova L.P., Smolyankin N.N., Grekova A.I., Kozlov S.N. Microbiological justification of the germicide selection for the treatment of salmonellosis in children. Antibiotiki i himioterapija. 2017;62(7-8):30-35. Russian. (Жаркова Л.П., Смолянкин Н.Н., Грекова А.И., Козлов С.Н. Микробиологическое обоснование выбора антимикробных препаратов для терапии сальмонеллеза у детей. Антибиотики и химиотерапия. 2017;7-8(62):30-35).
3. Reshetneva I.T., Peryanova O.V., Dmitrieva G.M., Ostapova T.S. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated in the Krasnoyarsk Territory. Gigiena i sanitarija. 2015;94(2):35-38. Russian. (Решетнева И.Т., Перьянова О.В., Дмитриева Г.М., Остапова Т.С. Антибиотикорезистентность сальмонелл, выделенных на территории Красноярского края. Гигиена и санитария. 2015;94(2):35-38).
4. Egorova S.A., Kaftyreva L.A., Suzhaeva L.V., Zabrovskaia A.V., Voitenkova E.V., Matveeva Z.N., et al. Antimicrobial resistance and clinical significant resistance mechanisms of *Salmonella* isolated in 2014-2018 in Saint-Petersburg, Russia. Russian Klinicheskaja laboratornaja diagnostika. 2019;64(10):620-626. Russian. (Егорова С.А., Кафтырева Л.А., Сужаева Л.В., Забровская А.В., Войтенкова Е.В., Матвеева З.Н., и др. Устойчивость к антимикробным препаратам и клинически значимые механизмы резистентности штаммов *Salmonella*, выделенных в 2014-2018 гг. в Санкт-Петербурге, Россия. Клиническая лабораторная диагностика. 2019;64(10):620-626). DOI: 10.18821/0869-2084-2019-64-10-620-626
5. Cuypers W.L., Jacobs J., Wong V., Klemm E.J., Deborggraeve S., Van Puyvelde S. Fluoroquinolone resistance in *Salmonella*: insights by whole-genome sequencing. Microb Genom. 2018;4(7):e000195. DOI: 10.1099/mgen.0.000195
6. Abouzeed Y.M., Baucheron S., Cloeckert A. ramR mutations involved in efflux-mediated multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Antimicrob Agents Chemother. 2008;7(52):2428-2434. DOI: 10.1128/AAC.00084-08
7. Accou-Demartin M., Gaborieau V., Song Y., Roumagnac P., Marchou B., Achtman M., Weill F-X. *Salmonella enterica* serotype Typhi with nonclassical quinolone resistance phenotype. Emerg Infect Dis. 2011;6(17):1091-1094. DOI: 10.3201/eid1706.101242
8. CDC. National Antimicrobial Resistance Monitoring System for enteric bacteria (NARMS): Human isolates surveillance report for 2015 (Final Report). Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services. CDC, 2018. Available at: [www.cdc.gov/narms/pdf/2015-NARMS-Annual-Report-cleared\\_508.pdf](http://www.cdc.gov/narms/pdf/2015-NARMS-Annual-Report-cleared_508.pdf). Accessed August 20, 2020.
9. Du X.D., Li D.X., Hu G.Z., Wang Y., Shang Y.H., Wu C.M., et al. Tn1548-associated armA is co-located with qnrB2, aac(6)-Ib-cr and blaCTX-M-3 on an IncFII plasmid in a *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B strain isolated from chickens in China. J Antimicrob Chemother. 2012;67(1):246-248. DOI: 10.1093/jac/dkr407
10. McDermott P.F., Tyson G.H., Kabera C., Chen Y., Li C., Folster J.P., et al. Whole-genome sequencing for detecting antimicrobial resistance in nontyphoidal *Salmonella*. Antimicrob Agents Chemother. 2016;60(9):5515-5520. DOI: 10.1128/AAC.01030-16
11. Sjölund-Karlsson M., Folster J.P., Pecic G., Joyce K., Medalla F., Rickert R., Whichard J.M. Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance among non-Typhi *Salmonella enterica* isolates from humans in the United States. Antimicrob Agents Chemother. 2009;53(5):2142-2144. DOI: 10.1128/AAC.01288-08
12. Tadesse G., Tessema T.S., Beyene G., Aseffa A. Molecular epidemiology of fluoroquinolone resistant *Salmonella* in Africa: A systematic review and meta-analysis. PLoS One. 2018;13(2):e0192575. DOI: 10.1371/journal.pone.0192575
13. Wong M.H., Chan E.W., Liu L.Z., Chen S. PMQR genes *oqxAB* and *aac(6)Ib-cr* accelerate the development of fluoroquinolone resistance in *Salmonella typhimurium*. Front Microbiol. 2014;5:521. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00521
14. Rodriguez-Martinez J.M., Cano M.E., Velasco C., Martinez-Martinez L., Pascual A. Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. J Infect Chemother. 2011;17(2):149-182. DOI: 10.1007/s10156-010-0120-2
15. Clinical recommendations. Susceptibility testing of microorganisms to antimicrobial agents, 2018. Available at: [www.antibiotic.ru/minzdrav/files/docs/clrec-dsma2018.pdf](http://www.antibiotic.ru/minzdrav/files/docs/clrec-dsma2018.pdf). Accessed August 20, 2020. Russian. (Клинические рекомендации. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам, 2018. Доступно по адресу: [www.antibiotic.ru/minzdrav/files/docs/clrec-dsma2018.pdf](http://www.antibiotic.ru/minzdrav/files/docs/clrec-dsma2018.pdf). Ссылка активна на 20.08.2020 г.)

16. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. European Society of Clinical Microbiology and Infectious. 2020. Available at: [www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/). Accessed August 20, 2020.
17. Crump J.A., Kretsinger K., Gay K., Hoekstra R.M., Vugia D.J., Hurd S., et al. Clinical response and outcome of infection with *Salmonella enterica* serotype Typhi with decreased susceptibility to fluoroquinolones: a United States FoodNet multicentre retrospective study. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(4):1278-1284. DOI: 10.1128/AAC.01509-07
18. Dolecek C., Tran T.P., Nguyen N.R., Le T.P., Ha V., Phung Q.T., et al. A multi-center randomised controlled trial of gatifloxacin versus azithromycin for the treatment of uncomplicated typhoid fever in children and adults in Vietnam. *PLoS One.* 2008;3:e2188. DOI: 10.1371/journal.pone.0002188
19. Parry C.M., Ho V.A., Phuong L.T., Bay P.V., Lanh M.N., Tung le T., et al. Randomized controlled comparison of ofloxacin, azithromycin, and an ofloxacin-azithromycin combination for treatment of multidrug-resistant and nalidixic acid-resistant typhoid fever. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(3):819-825. DOI: 10.1128/AAC.00447-06
20. Thanh D.P., Karkey A., Dongol S., Thi N.H., Thompson C.N., Rabaa M.A., et al. A novel ciprofloxacin-resistant subclone of H58 *Salmonella* Typhi is associated with fluoroquinolone treatment failure. *Elife.* 2016; 5:e14003. DOI: 10.7554/eLife.14003
21. EUCAST Expert rules, intrinsic resistance and exceptional phenotypes v 3.1. 2016. Available at: [www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Expert\\_Rules/Expert\\_rules\\_intrinsic\\_exceptional\\_V3.1.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Expert_Rules/Expert_rules_intrinsic_exceptional_V3.1.pdf). Accessed August 20, 2020.
22. Koirala S., Basnyat B., Arjyal A., Shilpakar O., Shrestha K., Shrestha R., et al. Gatifloxacin versus ofloxacin for the treatment of uncomplicated enteric fever in Nepal: an open-label, randomized, controlled trial. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(10):e2523. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002523
23. Thompson C.N., Karkey A., Dongol S., Arjyal A., Wolbers M., Darton T., et al. Treatment response in enteric fever in an era of increasing antimicrobial resistance: an individual patient data analysis of 2092 participants enrolled into 4 randomized, controlled trials in Nepal. *Clin Infect Dis.* 2017;64(11):1522-1531. DOI: 10.1093/cid/cix185
24. Kozyreva V.K., Edelstein M.V., Tapalski D.V., Azizov I.S., Romanov A.V., Kozlov R.S. Clonal dissemination of CTX-M-5-producing nosocomial strains of *Salmonella* Typhimurium in Russia, Belarus, and Kazakhstan. *Klinicheskaja mikrobiologija i antimikrobnaja himioterapija.* 2012;14(1):38-50. Russian. (Козырева В.К., Эйдельштейн М.В., Тапальский Д.В., Азизов И.С., Романов А.В., Козлов Р.С. Клональное распространение CTX-M-5-продуцирующих нозокомиальных штаммов *Salmonella* Typhimurium в России, Беларуси и Казахстане. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2012;14(1):38-50).
25. Skov R., Matuschek E., Sjölund-Karlsson M., Ahman J., Petersen A., Stegger M., et al. Development of a pefloxacin disk diffusion method for detection of fluoroquinolone-resistant *Salmonella enterica*. *J Clin Microbiol.* 2015;53(11):3411-3417. DOI: 10.1128/JCM.01287-15
26. *Salmonella* spp. Pefloxacin 5 µg as screen for fluoroquinolone resistance. EUCAST. European Society of Clinical Microbiology and Infectious. 2020. Available at: [www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Disk\\_criteria/Validation\\_2020/Salmonella\\_and\\_pefloxacin\\_v\\_1.4\\_January\\_2020.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_criteria/Validation_2020/Salmonella_and_pefloxacin_v_1.4_January_2020.pdf). Accessed August 20, 2020.
27. Sharma P., Dahiya S., Kumari B., Balaji V., Sood S., Das B.K., Kapil A. Pefloxacin as a surrogate marker for quinolone susceptibility in *Salmonella enterica* serovars Typhi & Paratyphi A in India. *Indian J Med Research.* 2017;145(5):687-692. DOI: 10.4103/ijmr.IJMR\_494\_16
28. Veeraraghavan B., Anandan S., Sethuvel D.P., Ragupathi N.K. Pefloxacin as a surrogate marker for fluoroquinolone susceptibility for *Salmonella* Typhi: problems and prospects. *J Clin Diagn Res.* 2016;10(8):DL01-DL2. DOI: 10.7860/JCDR/2016/17022.8306
29. Area of Technical Uncertainty (ATU) in antimicrobial susceptibility testing. European Society of Clinical Microbiology and Infectious. 2018. Available at: [www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/Area\\_of\\_Technical\\_Uncertainty\\_guidance\\_2019-1.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/Area_of_Technical_Uncertainty_guidance_2019-1.pdf). Accessed August 20, 2020.
30. Hombach M., Ochoa C., Maurer F.P., Pfiffner T., Bottger E.C., Furrer R. Relative contribution of biological variation and technical variables to zone diameter variations of disc diffusion susceptibility testing. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(1):141-151. DOI: 10.1093/jac/dvk309
31. Maurer F.P., Courvalin P., Bottger E.C., Hombach M. Integrating forecast probabilities in antibiograms: a way to guide antimicrobial prescriptions more reliably? *J Clin Microbiol.* 2014;52(10):3674-3684. DOI: 10.1128/JCM.01645-14