

УДК 579.882.//.044+615.33.015.8

Устойчивость *Chlamydia trachomatis* к антибиотикам *in vitro*: методологические аспекты и клиническое значение

Е.В. Шипицина¹, А.М. Савичева¹, Т.А. Хуснутдинова¹, К.В. Шалепо¹, О.Ю. Мисюрина², В.М. Говорун², М. Домейка³

¹НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О.Отта РАМН, Санкт-Петербург, Россия

²НИИ физико-химической медицины Минздрава России, Москва, Россия

³Институт клинической бактериологии Уппсальского университета, Уппсала, Швеция

Охарактеризована чувствительность 25 клинических штаммов *Chlamydia trachomatis* к антибиотикам, наиболее широко применяемым для лечения хламидийной инфекции. Из 25 штаммов 10 были определены как устойчивые *in vitro* к доксициклину, 10 – к азитромицину, 11 – к джозамицину, 11 – к спирамицину и 11 – к офлоксацину. Множественную резистентность проявили 12 изолятов, причем 6 из них оказались устойчивыми ко всем протестированным антибиотикам. Показан гетеротипический характер резистентности: только небольшая часть популяции хламидий (<1%) выживала в присутствии высоких концентраций антибиотика. Сопоставлены результаты контрольных исследований с данными тестирования чувствительности хламидий к антибиотикам *in vitro* и показано отсутствие связи между эффективностью антихламидийной тера-

пии и гетеротипической резистентностью хламидий. Так, 9 человек из 25 принимали препарат, к которому хламидии, выделенные до лечения, были устойчивы *in vitro*. Ни у одного из этих пациентов хламидии после лечения в культуре клеток не выделялись. Напротив, в единственном случае выделения хламидий в культуре клеток после лечения клинический изолят, полученный до лечения, был чувствительным к препарату, который использовался для антихламидийной терапии. Таким образом, тестирование чувствительности хламидий к антибиотикам при выборе препарата для лечения хламидийной инфекции представляется нецелесообразным.

Ключевые слова: *Chlamydia trachomatis*, определение чувствительности, гетеротипическая резистентность, антихламидийная терапия

Контактный адрес:

Елена Васильевна Шипицина

НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта РАМН,

Менделеевская линия, 3,

199034, Санкт-Петербург, Россия

Факс 7 – 812 – 323-75-44

Эл. почта: savitcheva@mail.ru

In vitro Antimicrobial Resistance of *Chlamydia trachomatis*: Methodological Aspects and Clinical Significance

E.V. Shipitsina¹, A.M. Savicheva¹, T.A. Khusnutdinova¹, K.V. Shalepo¹, O.Y. Misyurina², V.M. Govorun², M. Domeika³

¹ *Off Institute of Obstetrics and Gynecology, Russian Academy of Medical Sciences, Saint-Petersburg, Russia*

² *Research Institute of Physicochemical Medicine of the Ministry of Health of Russian Federation, Moscow, Russia*

³ *Institute of Clinical Bacteriology, Uppsala University, Uppsala, Sweden*

Susceptibility of 25 clinical isolates of *Chlamydia trachomatis* to the most commonly used antimicrobials for the treatment of chlamydial infections was studied. Of 25 isolates, 10 were determined as *in vitro* resistant to doxycycline, 10 – to azithromycin, 11 – to josamycin, 11 – spiramycin, and 11 – to ofloxacin. Multiple drug resistance was observed in 12 isolates; 6 of them were resistant to all tested antimicrobials. *Chlamydia* tested were found to express heterotypic resistance – only a small proportion of cells (<1%) demonstrated survival after exposure to high levels of antimicrobials. A comparison of the results of follow-up microbiological tests with the *in vitro* antimicrobial susceptibility of the isolated strains of *C. trachomatis* was made. No

correlation between clinical efficacy and heterotypic resistance of isolated strains was found. Of 25 included patients, 9 received antimicrobials, to which *chlamydia* isolated before treatment were *in vitro* resistant, but no *chlamydia* were isolated from these patients after treatment. Conversely, the only strain that was isolated from the patient after treatment was susceptible to antichlamydial agent used. Therefore, antimicrobial susceptibility testing of *chlamydia* is an unreasonable method to guide the choice of appropriate agents for the treatment of chlamydial infection.

Key words: *Chlamydia trachomatis*, susceptibility testing, heterotypic resistance, therapy of chlamydial infections.

Введение

Облигатные внутриклеточные бактерии *Chlamydia trachomatis* относятся к числу самых распространенных инфекционных агентов, передающихся половым путем. Неспецифичность симптомов и частое бессимптомное течение заболевания способствуют быстрому распространению *C. trachomatis* в популяции, так как инфицированные хламидиями мужчины и женщины не обращаются за медицинской помощью. Кроме того, отсутствие своевременной диагностики и лечения может способствовать переходу возбудителя в верхние отделы урогенитального тракта и инициации патологических процессов, влекущих за собой тяжелые последствия: воспалительные заболевания органов малого таза [1], внематочную беременность [2], невынашивание беременности и трубное бесплодие [3]. Существуют также данные, хотя и весьма ограниченные, свидетельствующие о возможной связи хламидийной инфекции и мужского бесплодия [3, 4].

Для лечения хламидийной инфекции широко используются тетрациклины, макролиды и фторхинолоны [5]. Сообщения последних лет свидетельствуют о возникновении проблемы резистентности хламидий к антибиотикам, проявляющейся как в неэффективности антихламидийной терапии, так и в выделении клинических изолятов *C. trachomatis*, устой-

чивых к антибиотикам *in vitro* [6–8]. Оценка масштаба и клинической актуальности этой проблемы представляет собой нелегкую задачу в силу нескольких причин. Во-первых, микробиологический контроль излеченности далеко не везде является общепринятой практикой. Во-вторых, реинфекция занимает значительное место среди случаев выявления хламидий после лечения [9]. В-третьих, определение чувствительности хламидий к антибиотикам лабораторными методами сопряжено с серьезными трудностями стандартизации процедуры тестирования и интерпретации его результатов [10]. Наконец, сведения о клинической значимости антибиотикоустойчивости хламидий *in vitro* весьма противоречивы [8, 11].

Планируя данное исследование, мы ставили перед собой задачу определить чувствительность клинических изолятов хламидий к антибиотикам, наиболее часто используемым для лечения хламидийной инфекции, и сопоставить результаты тестирования с результатами антихламидийной терапии.

Материал и методы исследования

Штаммы *Chlamydia trachomatis*

Референс-штамм D/UW-3/Cx (ATCC VR-885) был любезно предоставлен доктором Eva Hjelm из Упсальского университета (Швеция). Клиничес-

кие изоляты были получены от пациентов НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта РАМН, обратившихся в научно-поликлиническое отделение в 2002–2003 гг.

При выделении хламидий в культуре клеток пациента приглашали на повторное исследование с рекомендацией провести его не ранее, чем через 3–4 недели после окончания лечения. Антибактериальную терапию назначали врачи – акушеры-гинекологи и урологи. При взятии материала (соскобов эпителия цервикального канала у женщин и уретры у мужчин) и направлении его на контрольное исследование врач указывал препараты, которые использовались для антихламидийной терапии, а также последний день приема антибиотиков. Затем клинический материал исследовали с использованием методов полимеразной цепной реакции (ПЦР) и культуры клеток (КК). Изоляты хламидий, выделенные до лечения, хранили при -70°C . После получения материала для контрольного исследования эти изоляты размораживали, культивировали и определяли их чувствительность к антибиотикам.

Антибактериальные препараты

В работе были использованы следующие антибиотики: доксициклин (Sigma Chemical Co., США), азитромицин (Pfizer/МАСК, Германия), джозамицин (Pfizer/МАСК, Германия), кларитромицин (Abbot Laboratories Ltd., Англия), спирамицин (3900 МЕ/мл, Sigma Chemical Co., США) и офлоксацин (ICN Pharmaceuticals Inc., США). Растворы антибиотиков готовили в соответствии с инструкциями производителей. В экспериментах по определению МПК и МБК использовали двукратные разведения антибиотиков в диапазоне: 0,01–5,12 мкг/мл (для доксициклина, азитромицина, джозамицина); 0,0025–1,28 мкг/мл (для кларитромицина); 0,5–32 МЕ/мл (для спирамицина); 0,5–32 мкг/мл (для офлоксацина). Разведения антибиотиков готовили непосредственно перед каждым экспериментом.

Культивирование клеток McCoу

Клетки линии McCoу выращивали в пластиковых матрасах на 75 см^2 (Sarstedt Inc., США) при 36°C в среде RPMI 1640 (ICN Pharmaceuticals Inc., США) с добавлением 10% сыворотки эмбрионов коровы (ICN Pharmaceuticals Inc., США), 20 мМ НЕРЕС (ICN Pharmaceuticals Inc., США) и 2 мМ глутамина (ICN Pharmaceuticals Inc., США).

Культивирование *Chlamydia trachomatis*

Цервикальные и уретральные образцы собирали в пластиковые пробирки вместимостью 5 мл

(ELKAY, США), содержащие 1 мл транспортной среды (сахарозо-фосфатный буфер) и хранили при 4°C в течение 24 часов; в случае необходимости более длительного хранения пробы замораживали до -70°C . Клетки McCoу вносили в 24-луночные пластиковые планшеты (Sarstedt Inc., США) в количестве $\sim 10^5$ на лунку и инкубировали в течение 24 часов при 36°C в 5% CO_2 в CO_2 -инкубаторе HERA cell (Heraeus, Германия). Затем среду удаляли и вносили по 0,5 мл клинического образца в лунку, добавляли 0,5 мл инкубационной среды (среда RPMI 1640, содержащая 0,5% глюкозы, 10% сыворотки эмбрионов коровы, 25 мкг/мл ванкомицина (ICN Pharmaceuticals Inc., Irvine, США), 25 мкг/мл гентамицина (ICN Pharmaceuticals Inc., США), 2,5 мкг/мл амфотерицина В (ICN Pharmaceuticals Inc., США)) и центрифугировали при 1700 g в течение 1 часа в центрифуге BR 3.11 (Joan, Франция). После этого планшеты инкубировали при 36°C в 5% CO_2 в течение 2 часов, затем среду удаляли, добавляли в каждую лунку 1 мл инкубационной среды, содержащей циклогексимид (ICN Pharmaceuticals Inc., США) в концентрации 1 мкг/мл, и инкубировали пробы при 36°C в 5% CO_2 в течение 72 часов.

Визуализацию и подсчет хламидийных включений производили с помощью микроскопа Zeiss Axiolab (Германия) при 200-кратном увеличении, используя меченные флюоресцеином видоспецифические моноклональные антитела (Chlamyset antigen FA, Orion Diagnostica, Финляндия).

С целью получения большого количества хламидий, необходимого для тестирования чувствительности к антибиотикам, производили от 5 до 10 пассажей клинических изолятов. Как минимум два последних пассажа проводили без добавления антибиотиков.

Определение чувствительности клинических изолятов хламидий к антибиотикам

Для тестирования чувствительности к антибиотикам использовали 96-луночные планшеты (Sarstedt Inc., США); клетки McCoу вносили в планшеты в количестве $\sim 10^4$ на лунку и инкубировали в течение 24 часов при 36°C в 5% CO_2 . Клетки заражали хламидиями в разведении, при котором образовывалось приблизительно 10^3 включений на монослой (20–40 включений в поле при 200-кратном увеличении). Планшеты центрифугировали при 1700 g в течение 1 часа и инкубировали при 36°C в 5% CO_2 в течение 2 часов. Затем содержимое лунок удаляли и вносили в лунки инкубационную среду, содержащую соответствующие концентрации антибиотиков; каждую концентрацию тести-

вали в двух лунках. В качестве контроля использовали две лунки, в которые добавляли инкубационную среду без антибиотиков. После этого планшеты инкубировали при 36° С в 5% CO₂ в течение 72 часов, затем клетки фиксировали 96% этанолом в течение 10 мин, отмывали фосфатно-солевым буфером и окрашивали флюоресцирующими антителами. *Минимальную подавляющую концентрацию* (МПК) определяли как наименьшую концентрацию антибиотика, при которой не наблюдалось ни одного типичного включения, МПК₉₀ – как наименьшую концентрацию антибиотика, при которой наблюдалось уменьшение количества включений на 90% и более по сравнению с контролем. *Минимальную бактерицидную концентрацию* (МБК) определяли как наименьшую концентрацию антибиотика, при которой не наблюдалось ни одного типичного включения после пассажей без антибиотиков.

Полимеразная цепная реакция

Выделение ДНК из клинических проб проводили с использованием тест-систем ДНК-экспресс (НПФ «Литех», Москва), амплификацию – ПОЛИМИК-Хл (НПФ «Литех», Москва) в соответствии с инструкциями производителя.

Типирование хламидий

Серотипы хламидий определяли секвенированием фрагмента гена, кодирующего главный белок наружной мембраны хламидий – МОМР (*Major Outer Membrane Protein*). Для этого использовали праймеры, комплементарные одной из переменных областей гена (Se-прямой: 5'ССААТАТГСТ-СААТСТААССЗ', Se-обратный: 5'ААТТГСААГ-

GAGACGATATTTG3'). ПЦР проводили в 50 мкл реакционной смеси, содержащей 10 мМ трис HCl (pH 8,3), 50 мМ KCl, 2 мМ MgCl₂, 0,2 мМ каждого дНТФ (Promega Corporation, США), 10 пмоль каждого праймера (НПФ «Литех», Москва), 1 единицу *Taq*-полимеразы (Promega Corporation, США), 50 нг ДНК *C. trachomatis*. Реакцию проводили в программируемом термостате Gene Amp 2400 (Perkin Elmer, США) при следующем режиме: 93° С – 40 сек, 55° С – 30 сек, 72° С – 1 мин, количество циклов – 40.

Продукты амплификации разделяли электрофорезом в 3% агарозном геле. Ампликоны вырезали из геля и очищали, используя Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega Corporation, США). Нуклеотидную последовательность ампликонов определяли, используя *fmol* DNA Cycle Sequencing System (Promega Corporation, Madison, WI, США), согласно инструкциям производителя.

Методы статистической обработки результатов

Для представления данных тестирования чувствительности клинических изолятов хламидий к антибиотикам использовали средства описательной статистики пакета Excel 2000.

Результаты исследования

Из 150 пациентов, приглашенных нами на контрольное исследование, явились только 25: 20 женщин и 5 мужчин. Результаты тестирования антибиотикочувствительности клинических изолятов хламидий, выделенных от этих пациентов до лечения, суммированы в табл. 1. Из табл. 1 видно, что значе-

Таблица 1. Чувствительность к антибиотикам клинических изолятов *C. trachomatis* (n=25), выделенных до лечения

| Показатель | Доксициклин | Азитромицин | Джозамицин | Спирамицин | Офлоксацин |
|------------------------------|-------------|-------------|------------|------------|------------|
| МПК | | | | | |
| диапазон | 0,08–>5,12 | 0,02–>5,12 | 0,02–>5,12 | 1–>32 | 0,5–>32 |
| медiana | 0,64 | 0,16 | 0,04 | 2 | 1 |
| для референс-штамма | 0,08 | 0,02 | 0,04 | 1 | 1 |
| МПК₉₀ | | | | | |
| диапазон | 0,08–0,16 | 0,01–0,02 | 0,02–0,04 | 0,5–1 | 0,5–1 |
| значение для референс-штамма | 0,08 | 0,01 | 0,04 | 1 | 0,5 |
| МБК | | | | | |
| диапазон | 0,08–>5,12 | 0,02–>5,12 | 0,02–>5,12 | 1–>32 | 0,5–>32 |
| медiana | 0,64 | 0,32 | 0,16 | 2 | 2 |
| значение для референс-штамма | 0,16 | 0,02 | 0,08 | 2 | 2 |

Примечание. Концентрации антибиотиков приводятся в мкг/мл (спирамицин – в МЕ/мл).

ния МПК и МБК варьируют в очень широких пределах для всех антибиотиков. Напротив, значения МПК₉₀ всех антибиотиков находятся в очень узком диапазоне – это значит, что резкое уменьшение количества включений (на 90% и более) происходит при близких концентрациях антибиотика. Значения МБК незначительно превышают значения МПК: наибольшее отличие в медианах значений МБК и МПК зафиксировано для джозамицина – в 4 раза. В табл. 1 также представлены значения МПК и МБК антибиотиков для контрольного чувствительного штамма VR-885. Их сравнение с медианами значений МПК и МБК антибиотиков для клинических изолятов показывает, что значения МПК и МБК доксициклина, азитромицина и джозамицина, полученные при исследовании клинических изолятов, превышают значения МПК и МБК этих антибиотиков, полученные для референс-штамма: для доксициклина МПК – в 8 раз, МБК – в 4 раза; для азитромицина МПК – в 8 раз, МБК – в 16 раз; для джозамицина МБК – в 4 раза. Кроме того охарактеризована чувствительность к кларитромицину двух изолятов (18362Сх и 906Сх), выделенных от пациентов, которым было назначено комбинированное лечение: оба изолята были определены как чувствительные к данному антибиотику, так как для них значения МПК и МБК (0,005 мкг/мл) не превышали МПК и МБК для референс-штамма (0,01 мкг/мл).

Путем сравнения МПК и/или МБК в отношении клинического изолята с МПК и/или МБК для

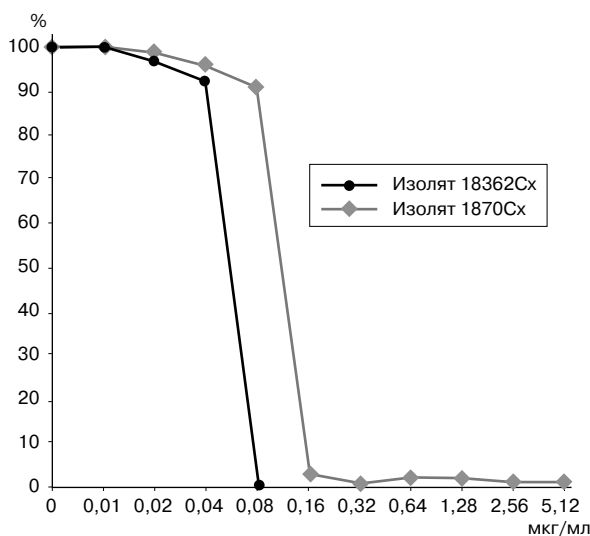


Рис. 1. Кривые роста клинических изолятов 18362Сх (чувствительный) и 1870Сх (устойчивый) в присутствии доксициклина. По оси абсцисс – концентрация доксициклина, по оси ординат – количество включений (в % по отношению к контролю).

чувствительного референс-штамма каждый изолят был определен как чувствительный или устойчивый к антибиотику. Изолят считали устойчивым, если значения МПК и/или МБК для него превышали значения МПК и/или МБК, определенные для референс-штамма, в 10 и более раз. Из 25 изолятов 10 продемонстрировали высокий уровень резистентности к доксициклину и азитромицину; и по 11 изолятов оказались устойчивыми к джозамицину, спирамицину или офлоксацину. Множественную резистентность (устойчивость к двум и более антибиотикам) проявили 12 изолятов, причем 6 из них оказались устойчивыми ко всем протестированным антибиотикам.

Особого внимания заслуживает вопрос о характере резистентности: значения МПК и МБК, определенные для устойчивых изолятов хламидий, выходили за пределы исследованного диапазона концентраций антибиотиков, тогда как значения МПК₉₀ для них не превышали значения МПК₉₀, определенного для контрольного чувствительного штамма. Механизмы такого типа резистентности, когда при высоких концентрациях антибиотика выживает лишь около 1% микроорганизмов, не известны. Ранее показано, что селекции антибиотикоустойчивых бактерий при этом не происходит, так как с каждым пассажем в присутствии антибиотика выживает только небольшая часть популяции [12]. Для иллюстрации этого явления представлены кривые роста 2 изолятов, один из которых мы определили как чувствительный (18362Сх), другой – как резистентный (1870Сх) к доксициклину в присутствии возрастающих (от 0,01 до 5,12 мкг/мл) концентраций этого антибиотика (рис. 1). Из графика видно, что ингибирование всей популяции изолята 18362Сх произошло в очень узком диапазоне концентраций доксициклина – от 0,04 до 0,08 мкг/мл. Кривая роста изолята 1870Сх показывает, что в диапазоне концентраций доксициклина от 0,08 до 0,16 мкг/мл происходит ингибирование приблизительно 99% популяции хламидий, а далее – с возрастанием концентрации антибиотика количество включений практически не изменяется. С этой же целью представлены микрофотографии, изображающие рост изолятов 18362Сх и 1870Сх на разных концентрациях доксициклина (рис. 2).

Для выявления ассоциации между генотипической резистентностью хламидий и эффективностью антихламидийной терапии мы провели сравнительный анализ результатов антибактериальной терапии пациентов и чувствительности хламидий к антибиотикам *in vitro*. В табл. 2 представлены данные о проведенной терапии и результаты контрольного исследования для всех 25 пациентов. Для ле-

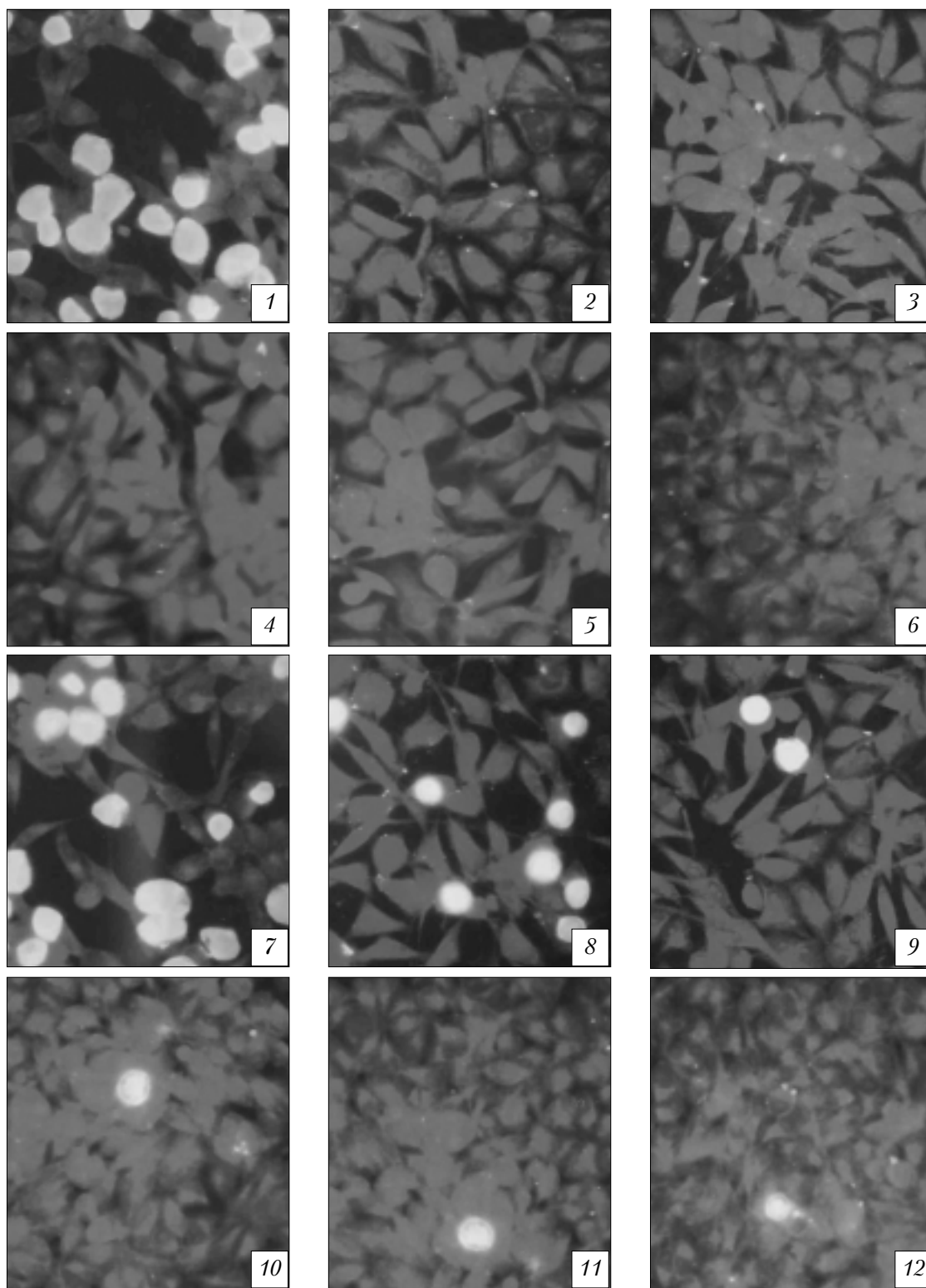


Рис. 2. Ингибирование культуры хламидий доксициклином.

Окраска с помощью моноклональных антителами, меченых флюоресцеином (Chlamyset antigen FA, Orion diagnostica, Espoo, Финляндия). Ув. $\times 400$. 1–6 – изолят 18362Cх (чувствительный к доксициклину); 7–8 – изолят 1870Cх (устойчивый к доксициклину); 1, 7 – концентрация доксициклина 0,04 мкг/мл; 4, 10 – концентрация доксициклина 0,32 мкг/мл; 2, 8 – концентрация доксициклина 0,08 мкг/мл; 5, 11 – концентрация доксициклина 0,64 мкг/мл; 3, 9 – концентрация доксициклина 0,16 мкг/мл; 6, 12 – концентрация доксициклина 1,28 мкг/мл.

Таблица 2. Сопоставление результатов антихламидийной терапии с результатами определения антибиотикочувствительности *C. trachomatis*

| Пациент | Изолят* | Терапия** | Срок контрольного исследования*** | Результат контрольного исследования ПЦР/КК | Результат тестирования**** |
|---------|---------|-----------|-----------------------------------|--|----------------------------|
| 1 | 4873Сх^ | Dx | 2,5 мес. | отр./отр. | Dx – уст. |
| 2 | 17228Сх | Dx, Jm | 1,5 мес. | отр./отр. | Dx – чув., Jm – чув. |
| 3 | 5736Сх | Jm | 1 мес. | пол./пол. | Jm – чув. |
| 4 | 20885Сх | Dx | 6 мес. | отр./отр. | Dx – уст. |
| 5 | 2308U^^ | Dx, Sp | 2 мес. | отр./отр. | Dx – чув., Sp – уст. |
| 6 | 17130Сх | Dx | 2 мес. | отр./отр. | Dx – чув. |
| 7 | 10545Сх | Dx | 2 нед. | отр./отр. | Dx – чув. |
| 8 | 18362Сх | Ox, Kl | 2 нед. | отр./отр. | Ox – чув., Kl – чув. |
| 9 | 1870Сх | Az | 1 мес. | отр./отр. | Az – уст. |
| 10 | 4985Сх | Sp | 2 нед. | отр./отр. | Sp – чув. |
| 11 | 5734U | Dx, Ox | 1 мес. | отр./отр. | Dx – уст., Ox – уст. |
| 12 | 5565U | Dx, Sp | 1,5 мес. | отр./отр. | Dx – уст., Sp – уст. |
| 13 | 11Сх | Dx | 4 мес. | отр./отр. | Dx – уст. |
| 14 | 38Сх | Jm | 2 мес. | отр./отр. | Jm – чув. |
| 15 | 729Сх | Dx | 2 нед. | пол./отр. | Dx – уст. |
| 16 | 2481Сх | Dx | 3 мес. | отр./отр. | Dx – уст. |
| 17 | 3735Сх | Sp | 3,5 мес. | отр./отр. | Sp – чув. |
| 18 | 1490Сх | Ox | 4,5 мес. | отр./отр. | Ox – уст. |
| 19 | 22Сх | Dx | 5 мес. | отр./отр. | Dx – чув. |
| 20 | 906Сх | Jm, Kl | 2,5 мес. | отр./отр. | Jm – чув., Kl – чув. |
| 21 | 44Сх | Az | 5 нед. | отр./отр. | Az – чув. |
| 22 | 212U | Dx, Sp | 11 нед. | отр./отр. | Dx – чув., Sp – уст. |
| 23 | 5029U | Dx, Sp | 5 нед. | отр./отр. | Dx – чув., Sp – чув. |
| 24 | 10003Сх | Dx, Jm | 3 мес. | отр./отр. | Dx – чув., Jm – чув. |
| 25 | 5817Сх | Jm | 5 мес. | отр./отр. | Jm – чув. |

Примечание.

- * – Сх – соскоб эпителия цервикального канала; U – соскоб эпителия уретры;
- ** – Dx – доксицилин; Kl – кларитромицин; Ox – офлоксацин; Az – азитромицин; Sp – спирамицин; Jm – джозамицин;
- *** – рассчитывался от последнего дня приема препарата до проведения контрольного исследования;
- **** – изолят считали устойчивым к антибиотику, если значения МПК и/или МБК для него превышали МПК и/или МБК, определенные для референс-штамма, в 10 и более раз.

чения урогенитальной хламидийной инфекции 8 человек принимали доксицилин, 2 – азитромицин, 3 – джозамицин, 2 – спирамицин и 1 – офлоксацин. Нескольким пациентам было назначено комбинированное лечение: доксицилин в сочетании со спирамицином (4 пациента), доксицилин в сочетании с джозамицином (2 пациента), доксицилин в сочетании с офлоксацином (1 пациент), джозамицин в сочетании с кларитромицином (1 пациент), офлоксацин в сочетании с кларитромицином (1 пациент). Контрольные исследования соскобов эпителия цервикального канала (у женщин) и уретры (у мужчин), проведенные в разные сроки (от 2 недель до 5 месяцев) после окончания терапии, дали отрицательные результаты у 23 из 25 пациентов. В 2 случаях (пациентки 3 и 15) при контрольном исследовании хламидии были обнаружены вновь.

У пациентки 3 через 1 месяц после окончания лечения джозамицином были обнаружены хламидии как методом ПЦР, так и в КК. С помощью секвенирования фрагмента гена *omp1* было показано, что хламидии, выделенные от пациентки 3 до и после лечения, принадлежат серотипу В. Клинический изолят, полученный от этой пациентки до лечения, оказался чувствительным ко всем протестированным антибиотикам, в том числе к джозамицину, который пациентка принимала для лечения хламидийной инфекции.

Положительный результат ПЦР-анализа также был получен при исследовании материала от пациентки 15, взятого через 2 недели после окончания лечения доксициклином. Выделить хламидии в культуре клеток не удалось даже после трех пассажей. Учитывая этот факт, а также то, что со време-

ни окончания лечения до контрольного исследования прошло всего 2 недели, можно предположить с высокой степенью вероятности, что у этой пациентки после лечения были обнаружены нежизнеспособные хламидии.

Таким образом, из 25 пациентов 9 принимали для лечения урогенитальной хламидийной инфекции препарат, к которому хламидии, выделенные от этих пациентов до лечения, были устойчивы *in vitro*. Ни у одного из этих пациентов хламидии после лечения в культуре клеток не выделялись. Напротив, в единственном случае выделения хламидий в культуре клеток после лечения клинический изолят, полученный до лечения, оказался чувствительным к препарату (джозамицину), который использовался для антихламидийной терапии.

Обсуждение результатов исследования

Надежность результатов тестирования чувствительности микроорганизмов к антибиотикам в значительной мере определяется степенью стандартизации процедуры анализа. Воспроизводимость результатов тестирования зависит от концентрации инокулята, времени и температуры инкубации, рН среды, стабильности антимикробных агентов и многих других факторов.

C. trachomatis – внутриклеточный паразит, и необходимость использования культуры клеток существенно усложняет проблему стандартизации процедуры тестирования. Кроме того, до сих пор не разработано единого протокола исследования, и один из самых критических моментов анализа – время добавления антибиотиков (вместе с инокулятом, сразу после центрифугирования или через несколько часов после преинкубации без антибиотиков) – оставлен на усмотрение исследователей. R.J. Suchland с соавт. не наблюдали различий в значениях МПК антибиотиков при добавлении их вместе с инокулятом или через 1–8 часов после заражения клеток, в то время как значения МПК резко возрастали, если антибиотики добавляли через временной интервал, превышающий 8 часов [13]. T. Notomi и соавт. показали, что добавление в культуру хламидий офлоксацина и спарфлоксацина даже в очень высоких концентрациях (до 64 мкг/мл) не препятствовало формированию включений, если антибиотики добавляли через 20 часов и более после инфицирования клеток хламидиями [14]. Очевидно, что этот методологический аспект нуждается в дальнейшем изучении.

Исследование R.W. Peeling с соавт. [10] показало, что низкая воспроизводимость результатов тестирования, получаемых в разных лабораториях, не исключается использованием единого протокола

анализа. Для этого 5 изолятов *C. trachomatis* различных сероваров были размножены, закодированы и разосланы в 6 лабораторий. Анализ полученных данных выявил существенные различия в значениях МПК и МБК, определенных для одного и того же изолята в разных лабораториях, несмотря на то, что все 6 лабораторий использовали единый протокол анализа. Например, значения МПК азитромицина, полученные для изолята № 1 в лабораториях № 1 и № 2, равнялись 2,0 и 0,02 мкг/мл соответственно. Наблюдаемые различия в значениях МПК и МБК могли быть обусловлены такими компонентами анализа, как инфекционный титр инокулята (протоколом определялся достаточно широкий диапазон), площадь монослоя (часть лабораторий использовала пробирки, часть – культуральные планшеты), антибиотики (условия хранения и приготовления рабочих растворов) и моноклональные антитела разной специфичности. Однако основной причиной варьирования значений МПК и МБК авторы назвали субъективность определения «конечной точки» роста хламидий. Так как отличить аберрантные включения от нормальных порой представляется крайне затруднительным, то именно субъективизм в интерпретации морфологии и размера включений является основной причиной различий – в десятки, а порой и сотни раз – в значениях МПК, полученных разными исследователями.

Таким образом, важнейшим методологическим аспектом тестирования чувствительности хламидий к антибиотикам является определение МПК. R.J. Suchland с соавт. [13] предложили следующую методику определения МПК. Минимальную концентрацию антибиотика, при которой происходит редукция большей части включений и/или изменение их морфологии, они назвали МПК_{ТП} (ТП – точка перехода). По сути, МПК_{ТП} является эквивалентом МПК₉₀ и представляет собой надежное количественное выражение точки, при которой подавляется рост почти всех включений. Концентрацию антибиотика, превышающую МПК_{ТП} в два раза, они предложили принимать за МПК. Такой подход к определению МПК представляется авторам оправданным, и, что самое главное, позволяет всем исследователям, выполняющим тестирование чувствительности *C. trachomatis* к антибиотикам, получать воспроизводимые и сопоставимые результаты.

Трудности характеристики чувствительности хламидий к антибиотикам не исчерпываются трудностями стандартизации самой процедуры тестирования. К ним следует добавить трудности интерпретации результатов, так как строгих критериев определения штамма как чувствительного или устойчивого к данному антибиотику для хламидий не

разработано. Чаще всего руководствуются значениями МПК (МБК) или МПК₉₀, сравнивая их со значениями МПК (МБК) или МПК₉₀ для чувствительного контрольного штамма.

Мы оценивали чувствительность клинического изолята хламидий по минимальной концентрации антибиотика, полностью подавляющей его рост: изолят считали устойчивым, если значения МПК и/или МБК превышали значения МПК и/или МБК, определенные для референс-штамма, в 10 и более раз. В результате реализации такого подхода 10 клинических изолятов хламидий из 25 были определены как резистентные к доксициклину, 10 – к азитромицину и по 11 – к джозамицину, спирамицину или офлоксацину. Если бы в качестве критерия оценки чувствительности изолята к антибиотику мы взяли его минимальную концентрацию, подавляющую формирование внутриклеточных колоний на 90% и более (МПК₉₀), то все клинические изоляты хламидий были бы определены как чувствительные ко всем пяти антибиотикам.

Такой тип резистентности, при котором концентрация антибиотика, необходимая для подавления роста всех микроорганизмов, существенно превышает концентрацию антибиотика, подавляющую рост 90% популяции, R.V. Jones и соавт. назвали **гетеротипической резистентностью** [12]. При определении антибиотикочувствительности хламидий, выделенных от пациентов с повторной хламидийной инфекцией после лечения тетрациклином, была продемонстрирована их устойчивость к этому препарату (значение МПК превышало 8 мкг/мл), причем резистентность проявляла только небольшая часть популяции хламидий. Полностью резистентный фенотип, выведенный культивированием в присутствии тетрациклина (8 мкг/мл), либо погибал, либо терял резистентность при выращивании в среде без антибиотика. Кроме резистентности к тетрациклину эти изоляты проявили также резистентность к доксициклину, эритромицину и клиндамицину, но оказались чувствительными к рифампицину, ципрофлоксацину и офлоксацину. J. Somani и соавт. [8] описали 3 случая множественной резистентности к доксициклину, азитромицину и офлоксацину клинических изолятов хламидий, выделенных от пациентов после неудач антихламидийной терапии азитромицином, при этом резистентность также носила гетеротипический характер. Выявление хламидий после лечения авторы связывали с антибиотикоустойчивостью хламидий *in vitro*, которая проявлялась в выживании очень небольшой части популяции хламидий в присутствии высоких концентраций антибиотика.

В противоположность этому, R.J. Suchland с соавт. [13] пришли к выводу, что гетеротипическая резистентность хламидий не связана с клиническим исходом хламидийной инфекции – успехом или неуспехом антихламидийной терапии. Они охарактеризовали антибиотикочувствительность 42 клинических изолятов хламидий, 30 из которых были выделены от пациентов с единственным эпизодом хламидийной инфекции. Еще у 6 пациентов хламидии одного серотипа выявлялись более трех раз в течение длительного времени (2 года и более), и 6 пациентов обратились к врачу после курса антихламидийной терапии – у них хламидии были обнаружены вновь. Для всех 42 изолятов было показано, что небольшая часть хламидий выживала в присутствии высоких концентраций доксициклина, азитромицина и офлоксацина. Обращает на себя внимание тот факт, что гетеротипическая резистентность – это, как правило, множественная резистентность. Из 25 клинических изолятов хламидий, охарактеризованных в нашем исследовании, множественную резистентность проявили 12 изолятов, причем 6 изолятов оказались устойчивыми ко всем протестированным антибиотикам – доксициклину, азитромицину, джозамицину, спирамицину и офлоксацину.

В нашей работе показано, что, несмотря на высокую частоту встречаемости хламидий, проявляющих гетеротипическую антибиотикорезистентность *in vitro*, в подавляющем большинстве случаев антихламидийная терапия приводит к элиминации возбудителя. Только у одного человека из 25 хламидии были выделены в культуре клеток после лечения; изолят, выделенный от этой пациентки до лечения, мы определили как чувствительный к препарату, который использовался для лечения (джозамицин). Учитывая, что хламидии, выделенные от этой пациентки до и после лечения, принадлежат трахомному серовару В, который крайне редко обнаруживают в урогенитальных соскобах, можно предположить, что выявление хламидий после лечения было обусловлено не реинфекцией, а несоблюдением предписанной схемы лечения либо самой пациенткой, либо ее партнером. Возможно также, что в данном случае имела место персистенция хламидийной инфекции, опосредованная не антибиотикорезистентностью хламидий, а иными факторами. Далее, 9 пациентов из 25 принимали для лечения урогенитальной хламидийной инфекции препарат, к которому хламидии, выделенные от этих пациентов до лечения, проявили резистентность *in vitro*. Только у одного из этих 9 пациентов хламидии были обнаружены после лечения методом ПЦР; выделить микроорганизм в культуре клеток не удалось даже после трех пассажей. Прини-

мая во внимание этот факт, а также то, что со времени окончания лечения до контрольного исследования прошло всего 2 недели, мы склонны считать, что у этого пациента после лечения были обнаружены нежизнеспособные хламидии. Таким образом, полученные нами данные позволяют сделать вывод, что гетеротипическая резистентность *in vitro* не влияет на эффективность терапии. На наш взгляд, до тех пор, пока не будет определено клиническое значение *in vitro* резистентности хламидий, а также пока не будут разработаны стандартный протокол тестирования и четкие критерии определения штамма хламидий как чувствительного или устойчивого, диагностическая эффективность теста антибиотикочувствительности хламидий не может считаться бесспорной.

Все системы *in vitro*, используемые для тестирования чувствительности микроорганизмов к антибиотикам, имеют ряд недостатков и ограничений, например, они не учитывают роли иммунных факторов хозяина в элиминации патогена. Важность иммунного ответа хозяина была показана в исследовании K.S. Parks и соавт. [15]: у части пациентов элиминация хламидий происходила спонтанно, без антибиотикотерапии. Таким образом, гетеротипическая резистентность – выживаемость небольшого количества инфекционных элементарных телец – может иметь место *in vitro*, однако, в ситуации *in vivo* иммунные механизмы макроорганизма, возможно, уничтожают микроорганизмы, выжившие после антибиотикотерапии.

Молекулярные механизмы гетеротипической резистентности не изучены. Если учесть, что тетра-

циклины, макролиды и фторхинолоны имеют разные молекулярные мишени, то маловероятно, что она является прямым следствием молекулярных изменений в генах мишеней антибиотиков. Возможно, гетеротипическая резистентность обусловлена еще не изученными изменениями в биохимических свойствах хламидий, индуцированными реакцией на стресс, каким является воздействие антибиотиками. Возможно, в условиях стресса изменяется продолжительность некоторых фаз жизненного цикла хламидий, во время которых они невосприимчивы к антибиотикам, и, по причине асинхронности хламидийной культуры, выживает только небольшая часть популяции. Возможно также, что механизмом гетеротипической резистентности является активный эффлюкс – «выброс» (выкачивание) антибиотика из хламидийной клетки или внутриклеточной колонии хламидий. По-видимому, гетеротипическая резистентность хламидий – явление довольно распространенное, и необходимы дальнейшие исследования, чтобы в полной мере оценить его биологическую роль и клиническое значение.

Учитывая высокий показатель распространенности хламидийной инфекции и ее роль в нарушении репродуктивной функции человека, трудно переоценить важность изучения феномена устойчивости *C. trachomatis* к антибиотикам. Теоретические и эпидемиологические исследования в этой области должны создать прочную основу как для рациональной терапии хламидийной инфекции, так и для создания новых антихламидийных препаратов.

Литература

1. Cohen C.R., Brunham R.C. Pathogenesis of Chlamydia induced pelvic inflammatory disease. *Sex Transm Inf* 1999; 75:21-4.
2. Sziller I., Witkin S.S., Ziegert M., et al. Serological responses of patients with ectopic pregnancy of the *Chlamydia trachomatis* 60 kDa heat shock protein. *Hum Reprod* 1998; 13:1088-93.
3. Paavonen J., Eggert-Kruse W. *Chlamydia trachomatis*: impact on human reproduction. *Human Reprod Update* 1999; 5:433-47.
4. Munoz M.G., Witkin S.S. Autoimmunity to spermatozoa, asymptomatic *Chlamydia trachomatis* genital tract infection and $\gamma\delta$ T lymphocytes in seminal fluid from the male partners of couples with unexplained infertility. *Hum Reprod* 1995; 10:1070-5.
5. Ridgway G.L. Treatment of chlamydial genital infection. *J Antimicrob Chemother* 1997; 40:311-4.
6. Allaire A.D., Huddlestone J.F., Graves W.L. Initial and repeat screening for *Chlamydia trachomatis* during pregnancy. *Infect Dis Obstet Gynecol* 1998; 6:116-22.
7. Miller J.M. Recurrent chlamydial colonization during pregnancy. *Am J Perinatol* 1998; 15:307-9.
8. Somani J., Bhullar V.B., Workowski K.A., et al. Multiple drug-resistant *Chlamydia trachomatis* associated with clinical treatment failure. *J Infect Dis* 2000; 181:1421-7.
9. Kjar H.O., Dimcevski G., Hoff G., Olesen F., Ostergaard L. Recurrence of urogenital *Chlamydia trachomatis* infection evaluated by mailed samples obtained at home: 24 weeks' prospective follow up study. *Sex Transm Inf* 2000; 76:169-72.
10. Peeling R.W., Bowie W.R., Dillon J.R., et al. Standardization of antimicrobial susceptibility testing for *Chlamydia trachomatis*. In: Orfila J., Byrne G.I., Chernesky M.A., et al, editors. Chlamydial infections. Proceedings of the 8th International Symposium on Human Chlamydial infections; 1994; Societa Editrice Esculapio, Chantilly, France; 1994. p.346-9.

11. Dean D., Suchland R.J., Stamm W.E. Evidence for long-term cervical persistence of *Chlamydia trachomatis* by omp1 genotyping. J Infect Dis 2000; 182:909-16.
12. Jones R.B., Van der Pol B., Martin D.H., Shepard M.K. Partial characterization of *Chlamydia trachomatis* isolates resistant to multiple antibiotics. J Infect Dis 1990; 162:1309-15.
13. Suchland R.J., Geisler W.M., Stamm W.E. Methodologies and cell lines used for antimicrobial susceptibility testing of *Chlamydia* spp. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47:636-42.
14. Notomi T., Ikeda Y., Nagayama A. Minimal inhibitory and minimal lethal concentration against *Chlamydia trachomatis* dependent on the time of addition and duration of the presence of antibiotics. Chemotherapy 1999; 45:242-8.
15. Parks K.S., Dixon P.B., Richey C.M., Hook E.W. Spontaneous clearance of *Chlamydia trachomatis* infection in untreated patients. Sex Transm Dis 1997; 24:229-35.