

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

© Колектив авторів, 2013
УДК 579.861.2: 615.015.8:616-036.2

**С.А. Деркач, О.В. Коцар, І.А. Воронкіна, І.А. Крилова, Л.С. Габишева,
Т.І. Тонкошкур, Т.В. Хірна**

ПОШИРЕНІСТЬ МЕТИЦИЛІНОСТІЙКИХ ШТАМІВ СТАФІЛОКОКІВ СЕРЕД ПОЗАСТАЦІОНАРНИХ ХВОРИХ З ГНІЙНО-ЗАПАЛЬНИМИ ЗАХВОРЮВАННЯМИ

ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова НАМН України», Харківський національний медичний університет, Головне Управління Держсанепідслужби України в Харківській області, КП «Санепідсервіс»

Наведено результати визначення метицилінорезистентності стафілококів різними методами. Підтверджена поширеність циркуляції в регіоні позалікарняних метицилінорезистентних штамів стафілококів серед хворих з гнійно-запальними процесами та серед клінічно здорових людей групи ризику (медичних працівників стаціонарів).

Ключові слова: розповсюдженість, стафілокок, метицилінорезистентність.

Зростання етіологічної ролі умовно патогенної мікрофлори є глобальною проблемою у всьому світі. Особливе значення має тенденція до набуття такими збудниками множинної антибіотикорезистентності. Особливою проблемою стало широке розповсюдження метицилінорезистентних штамів стафілококу (MRS) [1-3].

В теперішній час у медичній практиці метицилін не застосовується через те, що характеризується нестабільністю при зберіганні. Тому чутливість штамів до β -лактамінів визначається за допомогою оксациліну, при цьому використовують терміни «метициліночутливість» та «метицилінорезистентність».

Епідеміологію внутрішньолікарняного поширення MRS вивчено більш детально, у той час як масштаби розповсюдження таких штамів у позалікарняних умовах залишаються майже невідомими.

В останні десятиріччя все частіше вилучають MRS-штами, які здатні викликати інфекцію в позастанціонарних умовах у хворих, які раніше не зверталися за медичною допомогою. Ці штами отримали назву «позалікарняні MRSA» (*community-acquired MRSA, CA-MRSA*) [4]. *CA-MRSA* – це штами, виділені від амбулаторних хворих або протягом перших 48 годин з моменту госпіталізації в стаціонар, що виключає їх приналежність до нозокоміальних штамів, циркулюючих у даному лікувальному закладі.

Метою нашого дослідження було вивчення розповсюдження резистентних до метициліну регіональних штамів стафілококів (а саме *CA-MRSA*), вилучених із різного клінічного матеріалу.

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження були 553 особи: клінічно здорові – 204 та хворі – 349 осіб. Із них 129 – з гнійно-запальними захворюваннями шкіри та підшкірної клітковини (фурункульоз, карбункульоз, гідраденіт, абсцес, флегмона шкіри), 95 – з проявами синдрому дисбактеріозу кишечника, 80 – з ЛОР-патологією (отит, гайморит, фронтит, тонзиліт, фарингіт) та 45 осіб з гнійно-запальними процесами нижніх відділів сечостатевого тракту (цистит, уретрит, простатит). Всі хворі знаходились на амбулаторному або стаціонарному лікуванні і були обстежені в перші 2 доби після госпіталізації.

Відбір матеріалу для досліджень проводили згідно з діючими нормативними документами МОЗ України [5, 6].

Ідентифікацію мікроорганізмів проводили за культурально-морфологічними та біохімічними властивостями на класичних диференціально-діагностичних середовищах за стандартними методиками [7, 8].

Для зручності аналізу та статистичної обробки результатів до груп коагулазопозитивних стафілококів (CPS) включено *S. aureus* та *S. intermedius*. До групи коагулазонегативних стафілококів (CNS) – *S. haemolyticus* (93 % від усіх виділених коагулазонегативних ізолятів) та *S. cohnii*, *S. warneri* і *S. epidermidis*.

Визначення метицилінорезистентності стафілококів проводили диско-дифузійним методом (ДДМ) та методом скринінгу на агарі з оксациліном [9].

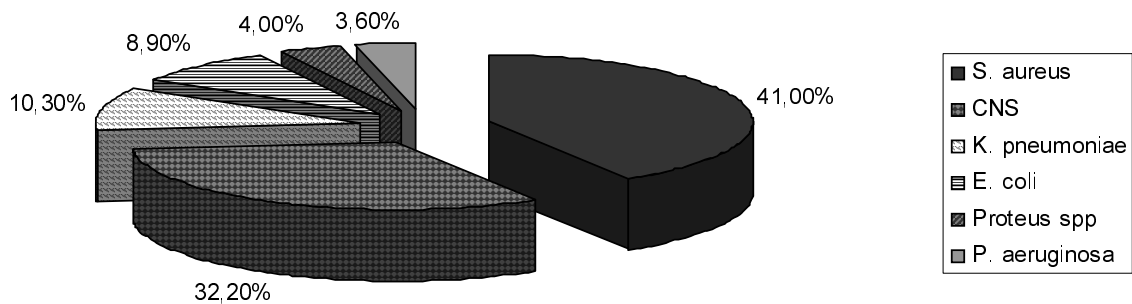
Отримані результати досліджень оброблено методом варіаційної статистики за допомогою програми MS Excel 2000, Biostat з використанням критерію χ^2 [10, 11].

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Всі виділені штами стафілококів були розподілені за плазмокоагулюючою активністю та чутливістю до оксациліну на MSSA (метициліночутливі коагулазопозитивні стафілококи), MRSA (метицилінорезистентні коагулазопозитивні стафілококи), MS-CNS (метициліночутливі коагулазонегативні стафілококи) та MR-CNS (метицилінорезистентні коагулазонегативні стафілококи).

Результати досліджень та їх обговорення

У результаті дослідження клінічного матеріалу встановлено, що в 73,2 % випадків етіологічним фактором гнійно-запальних захворювань були грампозитивні бактерії (41,0 % – *S. aureus*, 32,2 % – CNS). Грамнегативні бактерії зустрічалися в 26,8 % випадків. Найбільшу частку серед грамнегативної мікрофлори складали *K. pneumoniae* (10,3 %), *E. coli* (8,9 %), *Proteus spp.* (4,0 %) та *Pseudomonas aeruginosa* (3,6 %) (мал. 1).



Мал. 1. Частка штамів УПМ, виділених з різних біотопів від обстежених хворих.

Отже, провідними збудниками гнійно-запальних інфекцій є стафілококи. Результати мікробіологічних

досліджень по частоті виділення стафілококів у різних категорій обстежених наведені в таблиці 1.

Таблиця 1

Частота вилучення стафілококів у різних категорій обстежених

Профіль пацієнтів	Кількість обстежених	<i>S. aureus</i>		CNS	
		n	%±s _p	n	%±s _p
Амбулаторні	217	101	46,5±3,4	63	29,0±3,4
Стационарні	132	74	56,1±4,3	68	51,5±3,7
Медичні працівники	115	37	32,2±4,4	28	24,3±3,2
Студенти	89	15	16,9±4,0	19	21,3±3,2
Всього	553	227	41,0±2,1	178	32,2±2,0

Встановлено, що найбільша частка штамів *S. aureus* та CNS із аналізованої вибірки припадає на стаціонарних пацієнтів, обстежених в перші дві доби (56,1 та 51,5 % відповідно). Серед амбулаторних хворих кількість *S. aureus* переважала над кількістю CNS, відповідно (46,5±3,4) та (29,0±3,4) %. Серед медичних працівників, як і студентів, кількість вилучених *S. aureus* та CNS була майже на одному рівні (32,2±4,4) і (24,3±3,2) %; (16,9±4,0) і (21,3±3,2) % відповідно. Серед студентів частота виділення *S. aureus* була достовірно меншою, ніж серед медичних працівників ($\chi^2 < 0,05$).

У подальших дослідженнях ми визначали кількість MRSA серед циркулюючих на даній території стафілококів.

Отримані результати експериментальних досліджень дозволили встановити, що кількість MRSA, визначена диско-дифузійним методом (ДДМ), склала 55,1 %.

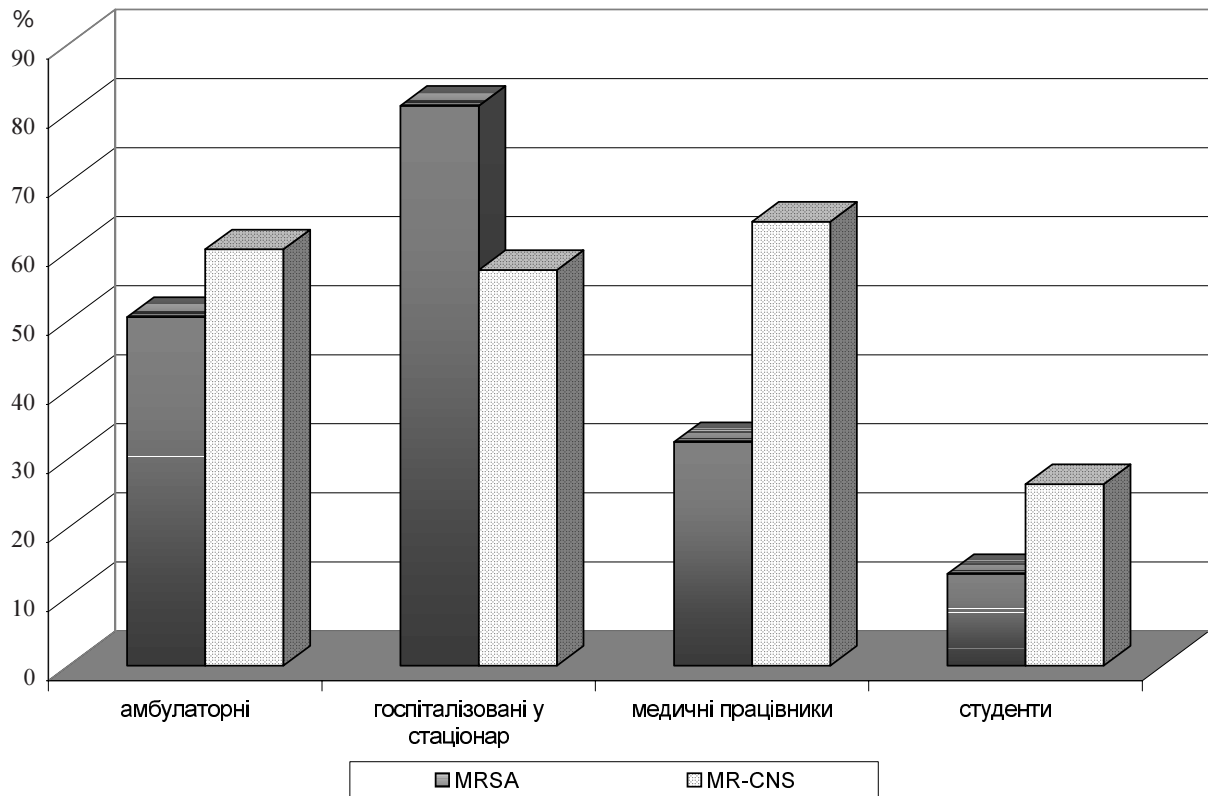
Серед штамів CNS кількість MR-CNS складала 56,2 %. Достовірна різниця у порівнянні з MRSA-штамами була відсутня ($\chi^2 > 0,05$).

Встановлено, що серед різних категорій обстежених кількість MRSA вище у хворих, госпіталізованих до стаціонару (81,1 %) (мал. 2).

Серед студентів частота виділення MRS була достовірно меншою, ніж серед медичних працівників ($\chi^2 < 0,05$).

Кількість MR-CNS серед амбулаторних та госпіталізованих до стаціонару обстежених осіб достовірно не відрізнялась ($\chi^2 > 0,05$) (мал. 2).

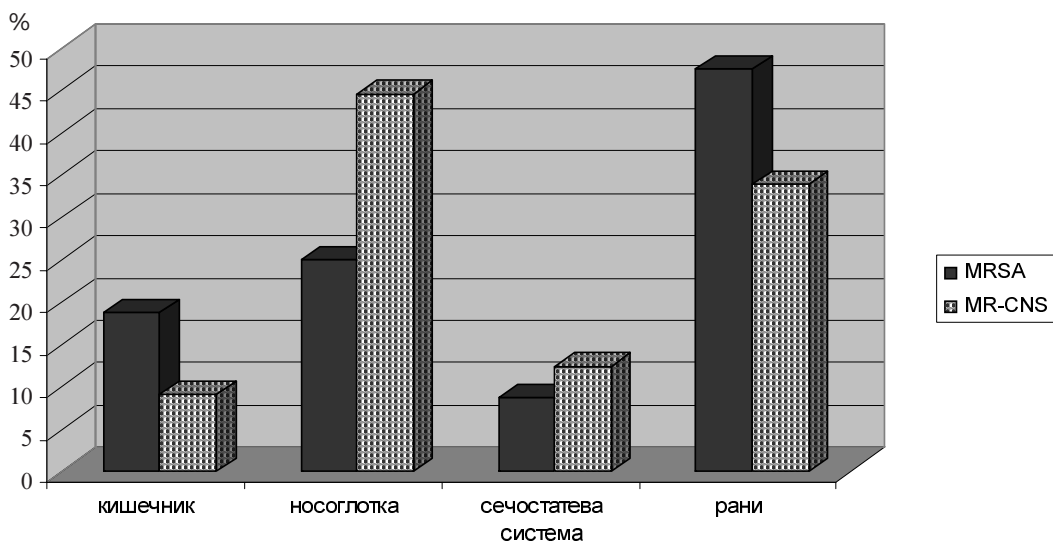
ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ



Мал. 2. Частка MRSA та MR-CNS у різних категорій обстежених осіб.

Також проведений аналіз частоти вилучення MRS-штамів залежно від біотопу вилучення. Основними видами клінічного матеріалу, з якого були виділені MRSA штами, є рановий ексудат (47,5 %) та мазки з

носоглотки (25,0 %). У хворих з синдромом дисбактеріозу кишечника MRSA штами були вилучені у 18,75 % випадків (мал. 3).



Мал. 3. Частка штамів MRSA, виділених із різних біотопів.

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Як видно з малюнка 3, більшість штамів MR-CNS були виділені з носоглотки та ран – відповідно 44,6 та 33,9 %. Достовірна відмінність спостерігалась при визначенні кількості штамів MR-CNS, які були виділені з кишечника та сечостатевої системи, кількість яких була значно менша, відповідно 9,1 та 12,4 %. З носоглотки кількість виділених MR-CNS була достовірно більшою, ніж MRSA.

Відомо, що резистентність стафілококів до оксациліну (метициліну) обумовлена трьома основними механізмами:

а) продукцією додаткового пеніцилінзв'язуючого білка – ПЗБ-2а (фермент, який приймає участь у синтезі клітинної стінки), що кодується хромосомним геном *tesA* – класична, або істинна, резистентність до метициліну (оксациліну);

б) інактивацією внаслідок гіперпродукції β -лактамаз;

в) модифікацією нормальних ПЗБ [12-14].

Згідно Наказу МОЗ України №167, запропоновані такі методи визначення метицилінорезистентності: ДДМ, скринінг на агарі з оксациліном, визначення мінімальної інгібуючої концентрації оксациліну (MIK), виявлення гену *tesA* у полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР). Основним із них, що найчастіше застосовується в роботі бактеріологічних лабораторій, залишається ДДМ. В основі даного методу лежить здатність антибактерійних препаратів дифундувати у поживне середовище, пригнічуючи ріст мікроорганізмів, нанесених на поверхню агару газонним методом.

Цей метод дозволяє виявити сам факт фенотипового прояву метицилінорезистентності у досліджених культур без визначення її природи, тобто механізму формування резистентності. У таблиці 2 наведена кількість MRSA штамів у різних категоріях обстежених методом диско-дифузії.

Таблиця 2

Питома частка MRS, вилучених від хворих з гнійно-запальними захворюваннями та здорових ДДМ

Профіль пацієнтів	Загальна кількість <i>S. aureus</i>	Із них MRSA		Загальна кількість CNS	Із них MR-CNS	
		n	% \pm s _p		n	% \pm s _p
Амбулаторні	101	51	50,5 \pm 5,0	63	38	60,3 \pm 6,2
Стаціонарні	74	60	81,1 \pm 4,5	68	39	57,3 \pm 7,9
Медичні працівники	37	12	32,4 \pm 7,8	28	18	64,3 \pm 11,3
Студенти	15	2	13,3 \pm 8,8	19	5	26,3 \pm 19,7
Всього	227	125	55,1 \pm 3,3	178	100	56,1 \pm 3,7

Іншим методом, рекомендованим МОЗ України для виявлення метицилінорезистентності, є скринінг на агарі з оксациліном. Цей метод високочутливий і специфічний, він дозволяє підтвердити класичну резистентність у штамів *S. aureus*.

У подальших дослідженнях усі ідентифіковані за результатами ДДМ MRSA штами були вивчені з застосуванням методу скринінгу в агарі з оксациліном (табл. 3).

Таблиця 3

Питома частка MRS, вилучених від хворих з гнійно-запальними захворюваннями та здорових носіїв, методом скринінгу на агарі з оксациліном, %

Профіль пацієнтів	Загальна кількість штамів <i>S. aureus</i>	Із них MRSA	
		n	% \pm s _p
Амбулаторні	101	24	23,8 \pm 4,2
Стаціонарні	74	22	29,7 \pm 5,3
Медичні працівники	37	4	10,8 \pm 5,1
Студенти	15	0	-
Всього	227	50	22,0 \pm 2,7

Як видно із таблиці 3, (22,0 \pm 2,7) % вилучених штамів *S. aureus* мали підтверджену істинну метицилінорезистентність, у той час як при визначенні ДДМ

цей показник складав (55,1 \pm 3,3) % (табл. 2). Тобто, близько 33,1 % штамів MRSA володіли фенотипною резистентністю.

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Отримані дані свідчать, що кількість MRSA штамів у хворих, госпіталізованих до стаціонару, порівняно з кількістю MRSA, вилучених від амбулаторних хворих, була практично однаковою ($\chi^2 > 0,05$).

Аналіз циркуляції MRSA штамів серед клінічно здорових носіїв груп ризику показав наявність більш широкого розповсюдження таких штамів серед медичних працівників. Це може бути пояснено тим, що у стаціонарі наявні більш сприятливі умови для циркуляції MRS-штамів, що забезпечує ширше носійство серед медичного персоналу.

Слід зазначити, що фенотипова оксацилінорезистентність (виявлена методом диско-дифузії), пов'язана з гіперпродукцією β -лактамаз, швидко зникає при 2-3-кратному пересіві культури на живильному середовищі без оксациліну. Штами з підтвердженою істинною, генетично зумовленою, метицилінорезистентністю зберігають стійкість протягом чисельних пересівів.

Знання механізму резистентності штаму стафілокока у кожному випадку має велике значення для вибору антибіотикотерапії. Препаратами вибору для лікування стафілококових інфекцій є β -лактамні антибіотики [8]. При виділенні пеніциліно- і метициліночутливих штамів стафілококів вважається чутливим до всіх β -лактамних антибіотиків. При виявленні продукції пеніцилінази і чутливості до оксациліну антибіотиками вибору залишаються інгібіторозахищені пеніциліни, цефалоспорини I-II та IV поколінь, карбапенеми. Резистентний до оксациліну штам (метицилінорезистентний) вважається стійким до всіх β -лактамних антибіотиків, а для лікування необхідно використовувати препарати інших груп і перш за все глікопептиди чи оксазолідони [8].

Згідно з даними цілого ряду досліджень, MRS-штами володіють не лише перехресною стійкістю до усіх β -лактамних антибіотиків, а й асоційованою резистентністю до препаратів інших класів, включаючи аміноглікозиди, макроліди, лінкозаміди, тетрацикліни, фторхінолони [15, 16]. Водночас, серед позалікарняних стафілококів, за нашими даними і результатами інших дослідників, поширені переважно штамми MRS, для яких не властива виражена асоційована резистентність до антибіотиків інших груп [17, 18].

Отже, при виявленні стійкості до оксациліну ДДМ, потрібно визначити природу такої резистентності, а наявність чутливості до антибіотиків інших класів може мати важливе значення для вибору антибіотикотерапії конкретного хворого.

Висновки

1. Підтверджена поширеність циркуляції в регіоні позалікарняних метицилінорезистентних штамів

стафілококу серед хворих з гнійно-запальними процесами та серед клінічно здорових людей групи ризику (медичних працівників стаціонарів).

2. Більшість штамів, віднесених до метицилінорезистентних за результатами ДДМ, мали фенотипову резистентність, зумовлену гіперпродукцією β -лактамаз. Частота виділення MRS-штамів з підтвердженою істинною резистентністю відносно усіх вилучених від хворих позалікарняних штамів *S. aureus* складала 14,9 %.

3. Проаналізована нами вибірка не є репрезентативною, оскільки широкий моніторинг за всіма регіональними штамми-збудниками гнійно-запальних захворювань на всіх рівнях клінічного і доклінічного обстеження відсутній. До того ж, суттєво більша кількість хворих або взагалі не звертається за медичною допомогою, або лікується емпірично, без визначення антибіотикочутливості збудника, отже, і без підтвердження його метицилінорезистентності.

4. Проведені скринінгові обстеження дозволяють лише впевнено констатувати факт циркуляції MRSA та MR-CNS у позалікарняних умовах, що вказує на загальну тенденцію розповсюдження таких штамів і подальше загострення проблеми антибіотикотерапії стафілококової інфекції не лише внутрішньолікарняного генезу, а і в амбулаторній практиці та при самолікуванні хворих.

5. Показана значна етіологічна роль у виникненні гнійно-запальних захворювань різної локалізації коагулазо-негативних штамів стафілококів, серед яких майже половина була метицилінорезистентною (при визначенні ДДМ). Такі високі показники можуть бути пов'язані з тим, що дані штамми здатні викликати більш тяжкі захворювання, які не могли бути виліковані антибіотиками у домашніх умовах (або селективно сформували стійкість до β -лактамів у процесі такого самолікування) і тому потрапили до наших досліджень після звернення хворих до лікарів. Тим не менше, це вказує на нагальну необхідність визначення метицилінорезистентності штамів-збудників як у коагулазопозитивних, так і в коагулазонегативних стафілококів, що забезпечить більш раціональні підходи до лікування хворих.

6. Поширеність циркуляції MRS-штамів (не лише нозокоміальних, а й позалікарняних) не тільки серед *S. aureus*, а й серед CNS, свідчить про необхідність з'ясування реальних масштабів поширення таких штамів у кожному регіоні країни. Для цього необхідне створення умов для лабораторного підтвердження метицилінорезистентності штамів-збудників з оцінкою природи останньої та впровадження в практику різних методів дослідження. Перспективними у цьому

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

напрямку є молекулярно-генетичні та інші експрес-методи визначення метицилінорезистентності вилучених від хворих штамів, що забезпечить правильність вибору стартової терапії, а визначення антибіотикотипів штамів, циркулюючих у кожному регіоні, дозволить оперативно змінювати схеми лікування.

Література

1. Шагинян И.А. Молекулярная эпидемиология инфекций, вызываемых метициллиноустойчивыми стафилококками / И.А. Шагинян, О.А. Дмитриенко // Журн. микробиол. – 2003. – № 3. – С. 99-107.
2. Hardy K.J. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in the critically ill / K.J. Hardy, P.M. Hawkey, F. Gao // Brit. J. Anaesthesia. – 2004. – Vol. 92, N 1. – P. 121-130.
3. DeLeo F.R. Reemergence of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* in the genomics era / Frank R. DeLeo, Henry F. Chambers // J. Clin. Invest. – 2009. – V. 119, Is. 9. – P. 2464-2474.
4. Salgado C.D. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A meta-analysis of prevalence and risk factors / C.D. Salgado, B.M. Farr, D.P. Calfee // Clin. Infect. Dis. – 2003. – N 36. – P. 131-139.
5. Методические указания по применению унифицированных микробиологических (бактериологических) методов исследования в клинико-диагностических лабораториях / Приложение № 1 к приказу МЗ СССР № 535 от 22 апреля 1985 г. – 45 с.
6. Методические указания по микробиологической диагностике заболеваний, вызываемых энтеробактериями / С.Д. Тетеренова, В.А. Кимссо, Ю.М. Крюков, М.С. Премухина. – Москва, 1984. – 142 с.
7. Сидоренко С.В. Механизмы резистентности микроорганизмов / С.В. Сидоренко // Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии. – 2007. – № 2. – С. 19-60.
8. Наказ МОЗ України № 167 Про затвердження методичних вказівок «Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів» [Електронний ресурс] / МОЗ України. – Режим доступу : <http://mozdocs.kiev.ua>.
9. Дехнич А.В. Выявление резистентности к метициллину и другим бета-лактамам антибиотикам методом скрининга / А.В. Дехнич // Клин. микробиол. и антимикроб. химиотер. – 1999. – Т. 1, № 1. – С. 89-91.
10. Лапач С.М. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С.М. Лапач, А.В. Чубенко, П.Н. Бабиц. – К.: «МОРИОН», 2001. – 408 с.
11. Гланц С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц; пер. с англ. – М.: Практика, 1998. – 459 с.
12. Страчунский Л.С. Внебольничные MRSA – новая проблема антибиотикорезистентности / Л.С. Страчунский, Ю.А. Белькова, А.В. Дехнич // Клин. микробиол. и антимикроб. химиотер. – 2005. – № 7 (1). – С. 32-44.
13. Метициллинрезистентные *Staphylococcus aureus* – возбудители внутрибольничных инфекций в стационарах России. Роль факторов патогенности / [О.А. Дмитренко и др.] // Узловые вопросы борьбы с инфекцией: Матер. конф. – СПб, 2004. – С. 76-77.
14. Куцук Р.В. Похідні тiazолідину – новий клас сполук, здатних відновлювати чутливість метицилінрезистентних стафілококів до β-лактамних антибіотиків / Р.В. Куцук, Р.Б. Лесик, Л.М. Куровець // Biomed. Biosoc. Anthropology. – 2008. – № 11. – С. 65-68.
15. Levy S.B. Active efflux, a common mechanism for biocide and antibiotic resistance / S.B. Levy // J. Appl. Microbiol. Symp. – 2002. – Vol. 92, Suppl. – R 65S-71S.
16. Skurray R.A. Molecular evolution of multiply-antibiotic-resistant staphylococci / R.A. Skurray, N. Firth // Ciba Found. Symp. – 1997. – Vol. 207. – P. 167-183.
17. Hoogkamp-Korstanje J.A. *In-vitro* activities of ciprofloxacin, levofloxacin, lomefloxacin, ofloxacin, pefloxacin, sparfloxacin and trovafloxacin against gram-positive and gram-negative pathogens from respiratory tract infections / J.A. Hoogkamp-Korstanje // J. Antimicrob. Chemother. – 1997. – Vol. 40. – P. 427-431.
18. *Staphylococcus aureus* nasal carriage as a marker for subsequent staphylococcal infections in intensive care unit patients / [X. Corbella, M.A. Dominguez, M. Pujol et al.] // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. – 1997. – Vol. 16. – P. 351-357.

METHICILLIN-RESISTANT CULTURES OF STAPHYLOCOCCUS PREVALENCE IN OUTPATIENTS WITH PURULENT-INFLAMMATORY DISEASES

S.A. Derkach, O.V. Kotsar, I.A. Voronkina, I.A. Krylova, L.S. Habysheva, T.I. Tonkoshkur, T.V. Khirna

SUMMARY. *The results of determination of staphylococci methicillin-resistant different methods. Confirmed prevalence of circulation in the region methicillin-resistant community-acquired strains of staphylococci among patients with inflammatory processes and among clinically healthy individuals at risk (medical staff of hospitals).*

Key words: *prevalence, staphylococcus, methicillin-resistant.*

Отримано 13.08.2013 р.