

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].

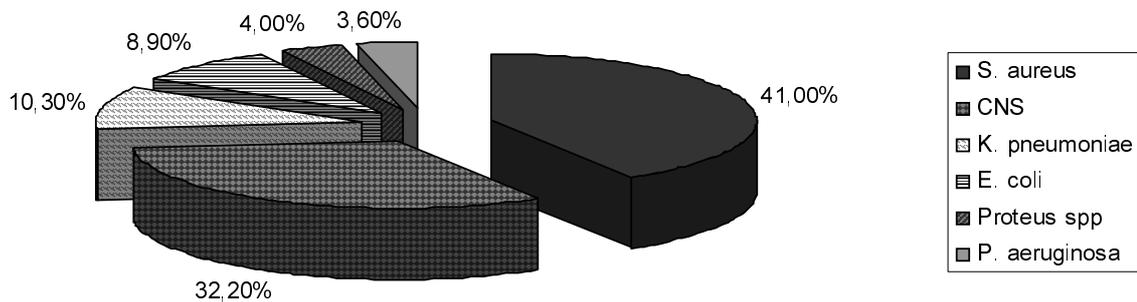
Отримані результати досліджень оброблено методом варіаційної статистики за допомогою програми MS Excel 2000, Biostat з використанням критерію χ^2 [10, 11].

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 грам-позитивні бактерії (41,0 % – *S. aureus*, 32,2 % – CNS). Грамнегативні бактерії зустрічалися в 26,8 % випадків. Найбільшу частку серед грамнегативної мікрофлори склали *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 |
| Стаціонарні | 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 %.

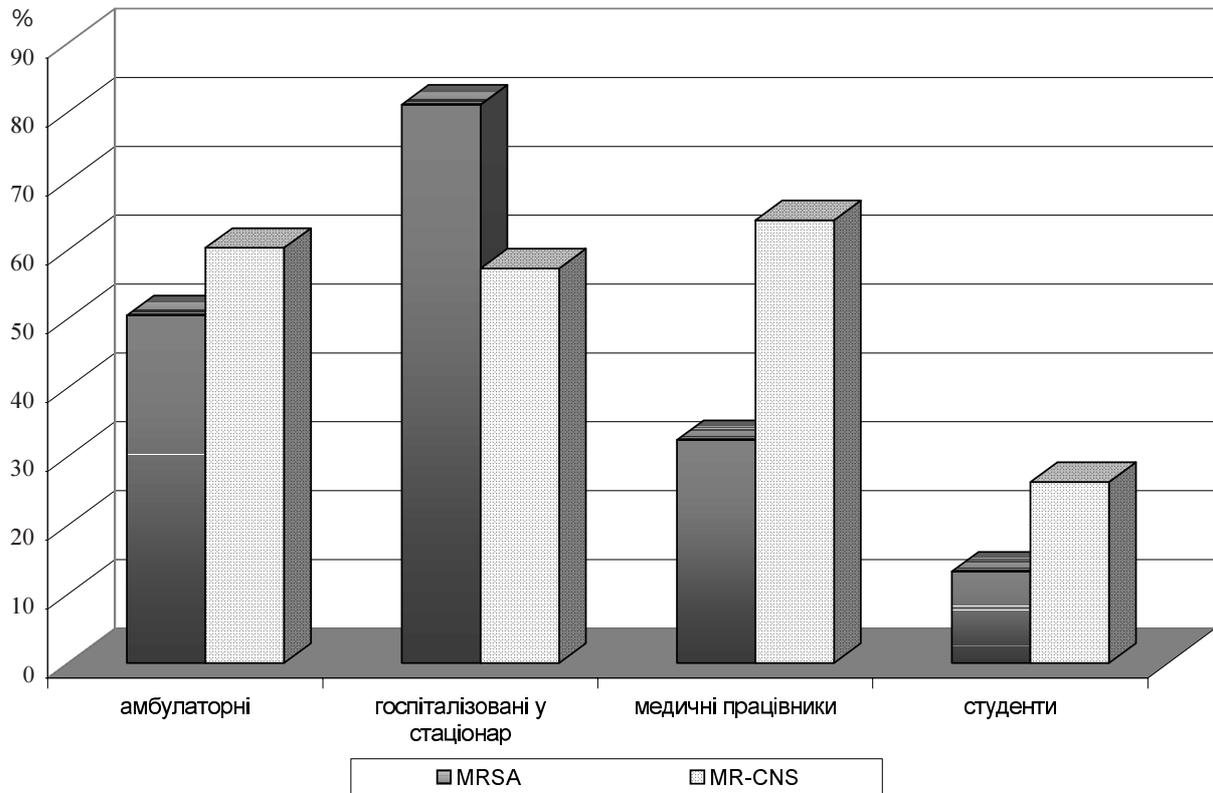
Серед штамів CNS кількість MR-CNS складала 56,2 %. Достовірна різниця у порівнянні з MRSA-штамами була відсутня ($\chi^2 > 0,05$).

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).

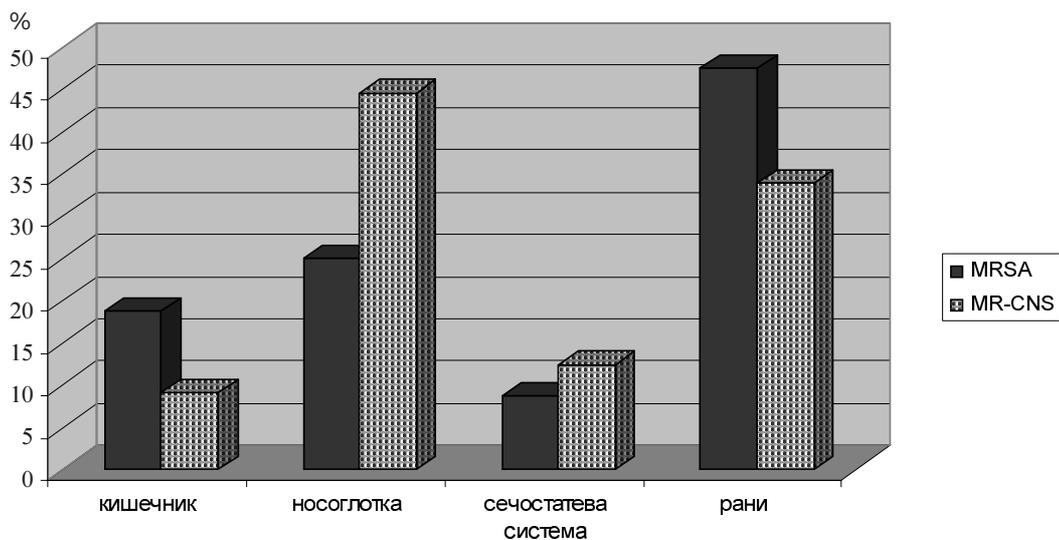
ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ



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 | %±s _p | | n | %±s _p |
| Амбулаторні | 101 | 51 | 50,5±5,0 | 63 | 38 | 60,3±6,2 |
| Стационарні | 74 | 60 | 81,1±4,5 | 68 | 39 | 57,3±7,9 |
| Медичні працівники | 37 | 12 | 32,4±7,8 | 28 | 18 | 64,3±11,3 |
| Студенти | 15 | 2 | 13,3±8,8 | 19 | 5 | 26,3±19,7 |
| Всього | 227 | 125 | 55,1±3,3 | 178 | 100 | 56,1±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 | %±s _p |
| Амбулаторні | 101 | 24 | 23,8±4,2 |
| Стационарні | 74 | 22 | 29,7±5,3 |
| Медичні працівники | 37 | 4 | 10,8±5,1 |
| Студенти | 15 | 0 | - |
| Всього | 227 | 50 | 22,0±2,7 |

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

цей показник складав (55,1±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 визначати 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* склала 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

напряму 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. Бабич. – 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.