

© Колектив авторів, 2010
УДК 576.851.252:615.33

**Р.Г. Шикуча, В.В. Данилейченко, О.П. Корнійчук, Й.М. Федечко,
О.Р. Кулачковський**

ДОСЛІДЖЕННЯ ОКСАЦИЛІНО- І ВАНКОМІЦИНОРЕЗИСТЕНТНИХ ПОЗАГОСПІТАЛЬНИХ ІЗОЛЯТІВ СТАФІЛОКОКІВ

Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького, Львівський національний університет ім. Івана Франка

*Проаналізовано механізм стійкості до оксациліну позагоспітальних ізолятів стафілококів. Показано, що стійкість до оксациліну більшості ізолятів *S. aureus* можна пов'язати з гіперпродукцією *b*-лактамаз, а більшості коагулазонегативних стафілококів – з продукцією пеніцилінозв'язуючого білка (ПЗБ-2а). Показано вищий рівень стійкості коагулазонегативних стафілококів до переважної більшості антибіотиків. Виявлено особливості ультраструктури ванкоміцино-резистентних штамів стафілококів.*

Ключові слова: стафілококи, оксацилінорезистентні ізоляти, ванкоміцинорезистентні ізоляти, чутливість до антибіотиків, механізм стійкості

На сьогодні бактерії роду *Staphylococcus* є одними з найбільш актуальних збудників нозокоміальних інфекцій. Невпинне зростання резистентності стафілококів до антимікробних препаратів необхідно враховувати при виборі антибіотика для кожного конкретного пацієнта, а також при розробці програм емпіричної антибактерійної терапії як у стаціонарах, так і в позалікарняних умовах. Проблема стафілококових інфекцій у сучасному світі стоїть дуже гостро, перш за все за рахунок значного зростання резистентності збудників до метициліну. Велику стурбованість медиків викликає швидке поширення саме метицилінорезистентних штамів *S. aureus* (MRSA – *methicillin-resistant S. aureus*). Так, у реанімаційних відділеннях Москви частота виділення цих мікробів зросла з 0,8-40 % в 1996 р. до 54,8 % у 2000-2001 рр. [1]. У США частота виявлення MRSA у 2000 р. зросла порівняно з 1995-99 рр. на 29 % і склала 53 % [2]. В останні роки MRSA виділяють і при позалікарняних інфекціях [3].

Відомо, що набуття стафілококами резистентності до метициліну (оксациліну) обумовлюється

такими механізмами: 1) наявністю гена *tes A* у складі рухомого генетичного елемента «стафілокової хромосомної касети *tes*», що кодує продукцію додаткового пеніцилінозв'язуючого білка – ПЗБ-2а [4]; 2) гіперпродукцією *b*-лактамаз; 3) наявністю модифікованих пеніцилінозв'язуючих білків (ПЗБ) [5].

Істинною, або класичною, метицилінорезистентністю вважають ту, яка пов'язана з наявністю гена *tes A*. Штамам стафілококів саме з таким механізмом резистентності властива також множинна резистентність до антибіотиків майже всіх інших класів, крім глікопептидів. На відміну від них, штамми з модифікованими ПЗБ та штамми з гіперпродукцією *b*-лактамаз, звичайно, є чутливими до антибіотиків інших класів. Тому важливо диференціювати штамми з істинною (класичною) резистентністю від штамів з двома іншими механізмами резистентності. Резистентність до метициліну, зумовлену гіперпродукцією *b*-лактамаз, можливо відрізнити від істинної резистентності при застосуванні інгібіторів *b*-лактамаз [6].

Донедавна препаратом вибору при лікуванні MRSA-інфекцій був антибіотик-глікопептид – ванкоміцин. Однак в 1996 р. у Японії було виявлені штамми *S. aureus* з помірною резистентністю до цього препарату, а у 2002 р. у США було виділено штамми *S. aureus* із високим рівнем стійкості до ванкоміцину (VISA-штами) [7]. У цих штамів було виявлено ген, що кодує стійкість до ванкоміцину – *van A* [8].

Зниження чутливості до ванкоміцину пов'язано з посиленням синтезу пептидоглікану і зменшенням утворення поперечних зшивок; клітинна стінка у штамів VISA має більшу товщину, ніж у чутливих до ванкоміцину. У результаті цього значна частина ванкоміцину зв'язується у верхніх шарах клітинної стінки і не досягає мішені впливу [9].

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Поява MRSA зі зниженою чутливістю до ванкомицину обмежила можливості терапевтичного вибору антибіотиків і зумовила зростання числа невдалих результатів лікування. Виникла потреба пошуку нових ефективних препаратів. Одним із них став лінезолід, представник нового класу антибіотиків – оксазолідинонів, механізм дії яких ґрунтується на зв'язуванні зі специфічною ділянкою на рибосомі бактерій та пригніченні синтезу мікробного білка. На сьогодні немає даних про резистентність метицилінорезистентних стафілококів до лінезоліду [10].

Матеріали і методи

Об'єктом досліджень були 248 ізолятів бактерій роду *Staphylococcus*, виділених від амбулаторних хворих із різноманітного матеріалу – мазків із носа та зіву, кон'юнктиви, харкотиння, грудного молока, сечі, випорожнень, гною із фурункулів, постін'єкційних абсцесів, вмісту ран.

Виділення стафілококів проводили загальноприйнятими методами. Для посіву матеріалу та виділення чистих культур застосовували стандартні середовища для бактерій кокової групи (цукровий бульйон, жовтково-сольовий агар, глюкозо-кров'яний агар).

Оксацилінорезистентні штами виявляли методом скринінгу при посіві на агар Мюллера-Хілтона, до якого додавали 4 % NaCl (4 г на 100 мл середовища) і 6 мг/л оксациліну (0,6 мг на 100 мл середовища) при рН 7,2-7,4 і температурі інкубації 35 °С. Бактерійний завис стафілококів доводили до мутності 0,5 по Мак Фарланду ($1,5 \times 10^8$ КУО/мл). Тривалість інкубації: 24 год. для *S. aureus* і 48 год. для коагулазонегативних стафілококів [6].

Диференціацію стафілококів – продуцентів β -лактамаз від стафілококів з іншими механізмами резистентності здійснювали за визначенням чутливості до ампіциліну/сульбактаму та амоксиклаву [3].

Визначення чутливості до антибіотиків проводили методом Кірбі-Бауера за стандартом *National Comitete of Clinical Laboratory Standart (NCCLS)*, а також за стандартом виробника.

З метою контролю методик досліджень використовували стандартні штами стафілококів із музею кафедри мікробіології ЛНМУ ім. Данила Галицького.

Електронно-мікроскопічні дослідження виконували в міжфакультетській лабораторії електронної мікроскопії Львівського національного університету ім. Івана Франка. Фіксацію здійснювали уранілацетатом і за Рейнолдсом [11].

Результати досліджень обробляли загальноприйнятими методами варіаційної статистики із розрахунком середнього арифметичного (M), середньоквадратичного відхилення, похибки середнього арифметичного (m);

оцінювали достовірність розбіжностей за критерієм Ст'юдента (t).

Результати досліджень та їх обговорення

Встановлено, що кількість оксацилінорезистентних стафілококів склала 37,5 %, причому з них 58,1 % були ідентифіковані як *S. aureus*, решта – коагулазонегативні стафілококи.

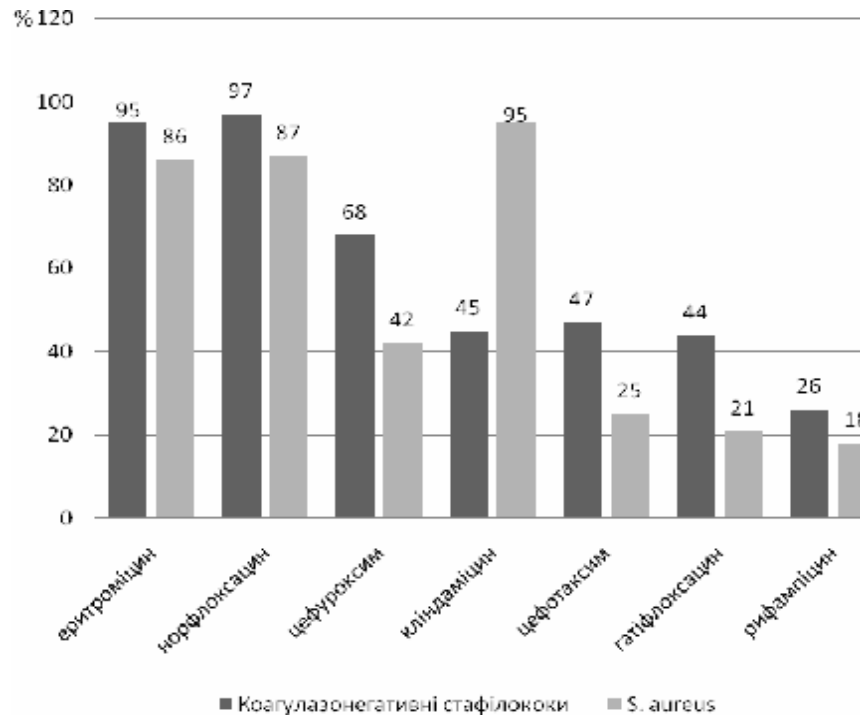
Щоб з'ясувати механізм резистентності до оксациліну, ми визначали чутливість до ампіциліну/сульбактаму та амоксиклаву, що дає можливість віддиференціювати ізоляти з резистентністю, спричиненою гіперпродукцією *b*-лактамаз, від резистентності, обумовленої продукцією ПЗБ-2а і мутантних форм ПЗБ.

Встановлено, що 66,7 % оксацилінорезистентних *S. aureus* були чутливими до ампіциліну/сульбактаму і амоксиклаву, що, очевидно, свідчить про стійкість до оксациліну, обумовлену гіперпродукцією *b*-лактамаз. Відповідно, 33,3 % склали ті штами, у яких можна передбачити генетично детерміновану резистентність до цього антибіотика або резистентність, обумовлену модифікованими ПЗБ.

Серед коагулазонегативних оксацилінорезистентних стафілококів 64,1 % штамів виявилися стійкими до ампіциліну/сульбактаму і амоксиклаву, що дає можливість передбачити у них стійкість до оксациліну за рахунок гіперпродукції білка ПЗБ-2а; у решти (35,9 %) коагулазонегативних оксацилінорезистентних стафілококів стійкість до оксациліну, очевидно, обумовлена гіперпродукцією *b*-лактамаз.

Порівняльне дослідження резистентності до антибіотиків коагулазопозитивних і коагулазонегативних стафілококів показало, що 100 % ізолятів були стійкими до пеніциліну, ампіциліну, амоксициліну, 86 % *S. aureus* і 95 % коагулазонегативних стафілококів – до еритроміцину; 87 % *S. aureus* і 97 % коагулазонегативних – до норфлоксацину. 100 % виділених ізолятів були чутливими до фузидинової кислоти. Щодо стійкості до кліндаміцину, то кількість штамів *S. aureus* мала значну перевагу над коагулазонегативними штамами. Серед коагулазонегативних стафілококів кількість штамів, стійких до цефуроксиму, була значно більшою, ніж серед *S. aureus*. Така ж закономірність виявлена і щодо стійкості до гатифлоксацину і цефотаксиму. Стійкість стафілококів обох груп до рифампіцину була майже однаковою (мал. 1).

Загалом, виявилось, що резистентність коагулазонегативних стафілококів була вищою порівняно з резистентністю *S. aureus*.



Мал. 1. Порівняльне дослідження рівнів стійкості до антибіотиків (у %) *S. aureus* та коагулазонегативних стафілококів.

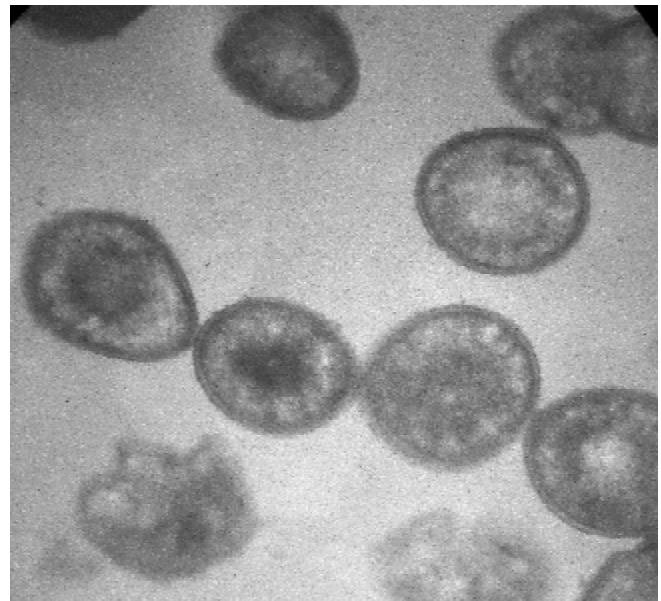
Нами було виділено 12 ванкоміцинорезистентних штамів *S. aureus*. 100 % цих штамів були стійкими до всіх досліджуваних антибіотиків, за винятком лінезоліду – антибіотика із групи оксазолідонів (резистентності не виявлено зовсім), а також рифампіцину та левоміцетину (16,7 % штамів виявилися чутливими).

Проведено порівняльне дослідження електронограм 2 штамів *S. aureus*, чутливих до пеніциліну та інших антибіотиків, та 3 штамів *S. aureus*, резистентних до ванкоміцину.

На електронограмі (мал. 2) штаму стафілокока, чутливого до всіх досліджуваних антибіотиків, виявляються характерні для прокаріотичних клітин структурні елементи клітинної стінки, негомогенної цитоплазми, нуклеоїду.

На електронограмі (мал. 3) клітини стафілокока, резистентного до ванкоміцину, виявлено значні відмінності структури порівняно з чутливим штамом стафілокока. Внаслідок значної щільності клітинної стінки контраст слабо проникає в клітину й зосереджується на поверхні клітинної стінки. Внутрішня структура клітини не виявляється. На зрізах клітин видно значно потовщену клітинну стінку та повністю неконтрастований внутрішньоклітинний простір. Відомо, що у таких варіантів ста-

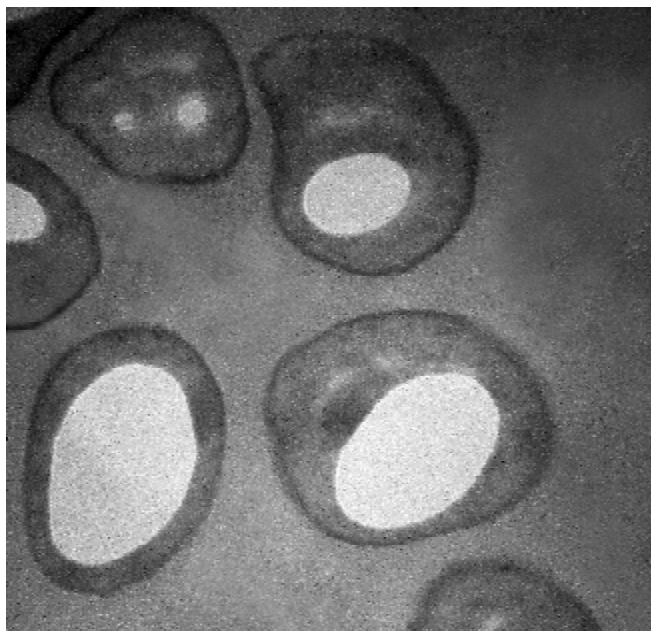
філококів клітинна стінка містить значно більше шарів пептидоглікану, ніж у інших.



Мал. 2. Електронограма *S. aureus*, чутливого до антибіотиків ($\times 15\,000$).

Таким чином, виявлено значні відмінності ультраструктури чутливих до більшості антибіотиків і ванкоміцинорезистентних штамів стафілококів.

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ



Мал. 3. Електроннограма штаму стафілокока, резистентного до ванкоміцину ($\times 15\ 000$).

Загалом, дослідження механізму резистентності оксацилінорезистентних стафілококів повинно сприяти уникненню помилок при призначенні антибактерійної терапії. Актуальним завданням є пошук нових етіотропних засобів для лікування інфекцій, викликаних цими збудниками.

Висновки

1. Встановлено, що 66,7 % виділених штамів *S. aureus* і 35,9 % виділених штамів коагулазонегативних стафілококів мають стійкість до оксациліну, яку можна пов'язати з гіперпродукцією *b*-лактамаз.
2. Встановлено вищі рівні стійкості до антибіотиків коагулазонегативних стафілококів у порівнянні із *S. aureus*.
3. Показано значні відмінності ультраструктури чутливих до більшості антибіотиків і ванкоміцинорезистентних штамів стафілококів.

Література

1. Эпидемиология антибиотикорезистентности нозокомиальных штаммов *Staphylococcus aureus* в России: результаты многоцентрового исследования / Дехнич А.В., Эдельштейн И.А., Нарезкина А.Д. и др. // *Клин. микробиол., антимикробная химиотерапия*. – 2002. – № 4. – С. 325-336.

2. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, Data Summary from January 1992-June 2001, Issued August 2001 // *Am. J. Infect. Control*. – 2001. – N 29. – P. 404-421.

3. Макушенко О.С., Авдеева Л.В., Мачерет Я.Ю. Видовий склад та чутливість до антибіотиків оксацилінрезистентних штамів стафілококів // *AML*. – 2008. – Vol. XIV. – С. 50-54.

4. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / Hiramatsu K., Cui L., Kuroda M., Ito T. // *Trends Microbiol.* – 2001. – N 9. – P. 486-493.

5. Courvalin P. Evolutionary strategy of antibiotic resistance // *Bull. Acad. R. Med. Belg.* – 2002. – Vol. 157. – P. 308-317.

6. Дехнич А.В. Выявление резистентности к метициллину и другим бета-лактамам антибиотикам методом скрининга // *Современные методы клинической микробиологии*. – 2003. – № 1. – С. 63-68.

7. Hiramatsu K. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility // *J. Antimicrob. Chemotherapy*. – 1997. – N 40. – P. 135-136.

8. Cosgrove S.E., Carroll K.C., Perl T.M. *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin // *Clin. Infect. Dis.* – 2004. – Vol. 39. – P. 539-545.

9. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the absence of vancomycin exposure / Whitener C.J., Park S.Y., Browne F.A. et al. // *Clin. Infect. Dis.* – 2004. – Vol. 38. – P. 1049-1055.

10. Applebaum P.C. The emergence of vancomycin-intermediate vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2006. – Vol. 12, Suppl. 1. – P. 16-23.

11. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy // *Cell Biology*. – 1963. – Vol. 17. – P. 208-212.

INVESTIGATION OF OXACILLIN- AND VANCOMYCINRESISTANCE UNHOSPITAL ISOLATES OF STAPHYLOCOCCUS

R.H. Shykula, V.V. Danyleychenko, O.P. Korniyuchuk, Y.M. Fedechko, O.R. Kulachkovsky

SUMMARY. *The mechanism of resistance to oxacillinum of unhospital isolates of staphylococcus have been studied. It was showed that resistance to oxacillinum of majority of isolates of S. aureus can linke with hyperproduction of b-lactamase, majority of coagulazonegative staphylococcus – with production penicillin-relating squirrel. It was showed that coagulazonegative staphylococcus demonstrated the higher level of resistance to swingeing majority of antibiotics. of vancomycinresistance strains of staphylococcus.*

Key words: *staphylococci, oxacillinresistance isolates, vancomycinresistance isolates, mechanism of sensitiveness to the antibiotics*

Отримано 22.02.2010 р.