

УДК 615.015.8:579.861.2:575.174.015.3(045)

ГЕТЕРОГЕННІСТЬ ПОПУЛЯЦІЇ СТАФІЛОКОКІВ ЗА ОЗНАКОЮ МЕТИЦИЛІНРЕЗИСТЕНТНОСТІ

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

Державна установа «Інститут мікробіології та
імунології ім. І.І. Мечникова Національної
академії медичних наук України»

*Харківський Національний медичний
університет

Одним з головних факторів, що знижує ефективність лікування антибіотиками, є постійно прогресуюча резистентність мікроорганізмів до лікарських засобів. Більшість вчених схилиються до думки, що антимікробна резистентність - це глобальна пандемія, яка загрожує життю кожного пацієнта [1, 2].

Особливого значення набуває формування полірезистентності у штамів стафілококів, які є збудниками цілого ряду як нозокоміальних, так і позалікарняних захворювань.

Не дивлячись на досягнення мікробіології та практичної медицини, проблеми стафілокової інфекції в клінічній практиці стоять досить гостро.

Боротьба зі стафілоковою інфекцією ускладнюється також тим, що даний мікроорганізм надзвичайно поширений у природі і його часто знаходять як у кишечнику, так і на поверхні шкіри клінічно здорових людей. Він здатний вегетувати і накопичуватись у різноманітних об'єктах навколишнього середовища. Останнім часом, внаслідок неконтрольованого та незавжди раціонального використання антибіотиків, антисептиків і дезінфектантів формуються та широко поширюються мультирезистентні стафілококи [3]. При цьому потенційно найнебезпечнішими є оксациліностійкі штами стафілококів (метицилінрезистентні стафілококи – MRS).

Препаратами вибору для лікування стафілокової інфекції є бета-лактамі антибіотики. При виявленні у штамів метицилінрезистентності вони вважаються стійкими до всіх бета-лактамічних антибіотиків. Більш того, такі штами, як правило, володіють полірезистентністю відносно інших класів антибактеріальних препаратів [4, 5].

Отже, визначення чутливості до метициліну (оксациліну) кожного вилученого штаму є обов'язковою умовою для призначення адекватної антибіотикотерапії стафілокової інфекції.

Основним методом для визначення метицилінорезистентності в лабораторній практиці

залишається диско-дифузійний (ДДМ). При використанні дисків з антибіотиками нерідко отримуються сумнівні результати. Однією із причин такого явища є наявність у досліджуваних штамів гетерогенності популяції.

Гетерогенність - це розщеплювання однорідної популяції на варіанти, які відрізняються від початкової форми за морфологічними, культуральними, фізіологічними, біохімічними та іншими ознаками [1]. Зміни при дисоціаціях носять постійний та зворотній характер і відбуваються з частотою 10^{-2} – 10^{-4} на одне клітинне ділення. Інтерес до процесу дисоціації значно виріс у зв'язку з розвитком антибіотикорезистентності.

Популяції стафілококу, як і інші види бактерій, гетерогенні за ознакою чутливості до антибіотиків. Феномен гетерогенності популяції за ознакою антибіотикостійкості визначається наявністю у популяції резистентного штаму субпопуляції з різними рівнями стійкості антибіотику [6].

Штами навіть з класичним типом резистентності можуть бути як гомо- так і гетерогенними за типом експресії резистентності. При гомогенному типі практично всі мікробні клітини проявляють резистентність у стандартних *in vitro* тестах, в той час як при гетерогенному типі невелика кількість клітин проявляє фенотипову резистентність.

У зв'язку з цим метою даного дослідження було визначення гетерогенності популяції стафілококів за ознакою метицилінорезистентності.

Матеріали та методи

Для вирішення даної мети нами досліджено 57 позалікарняних штамів стафілококу, виділених від хворих із різними проявами гнійно-запальних процесів.

Попередньо визначена їх чутливість до метициліну (оксациліну) диско-дифузійним методом (ДДМ). Слід звернути увагу на те, що згідно методичним рекомендаціям метицилінрезистентним вважається штам, якщо діаметр затримки росту навколо диску з оксациліном не перевищує 13 мм або відмічається ріст більше двох колоній стафілококу навіть у зоні затримки росту.

Для визначення мінімальної інгібуючої концентрації (МІК) метициліну (оксациліну) використовували метод послідових серійних розведень в поживному бульйоні з додаванням 4 % NaCl [5, 7]. Метод заснований на послідовних двократних розведеннях антибіотику. Для приготування основного розчину антибіотику використовували оксацилін (РФ ОАО «Органика»).

Визначення МІК проводили мікрометодом на 96-лункових планшетах (Sarstedt, Германія). У

кожну лунку вносили культуру з кінцевою концентрацією досліджуваного мікроорганізму, яка відповідає стандарту каламутності 0,5 за McFarland, в об'ємі 0,1 мкл, додавали антибіотик зазначеної концентрації. Залишали в термостаті на 18-20 годин. Облік результатів проводили візуально, порівнюючи ріст мікроорганізму у присутності АБП із ростом культури у лунці без АБП. За МІК приймали мінімальну концентрацію, що забезпечує повне пригнічення видимого росту досліджуваного штаму [5].

Вивчення гетерогенності популяції стафілококів за ознакою резистентності до метициліну проводили за допомогою методу відбитків [8].

Колонію досліджуваної культури стафілококу, з відомою МІК оксациліну, розсівали за Голдом на жовтково-сольовий агар. Повторно відбирали ізолювані колонії та повторювали цей цикл 5 разів. Матеріал однієї колонії із останнього пасажу пересівали на скошений м'ясо-пептонний агар. З добової культури готували завис мікроорганізмів $1,5 \times 10^8$ КУО/мл.

На чашку-матрицю з середовищем Мюлера-Хінтона (МХ) методом «газону» наносили 0,2 мл інокулюму. Після добового інкубування в термостаті за допомогою штамп-реплікатора робили відбитки з підрослими колоніями на чашки-реплики, які містили зазначені концентрації оксациліну: 0,25 мкг/мл, 0,5 мкг/мл, 1 мкг/мл, 2 мкг/мл, 4 мкг/мл, 8 мкг/мл, 16 мкг/мл, 32 мкг/мл, 64 мкг/мл, 128 мкг/мл. В якості контролю робили висів досліджуваної культури на МХ без оксациліну. Після інкубації при $T 35^\circ\text{C}$ протягом 24 годин проводили облік результатів дослідження. Кількість колоній, що виростили на щільних середовищах з різною концентрацією оксациліну, відповідало кількості колоній, стійких до цієї концентрації оксациліну, і визначалась у відсотках від кількості колоній, які виростили на середовищі без антибіотику. Таким чином, визначалась питома вага штамів з різним значенням МІК до оксациліну.

Отримані результати досліджень оброблено методом варіаційної статистики за

допомогою програми MS Excel 2000, Biostat з використанням стандартної похибки долі критерію χ^2 [9, 10].

Результати та обговорення

У залежності від значення рівня чутливості стафілококів до оксациліну (при використанні методу послідових серійних розведень в бульйоні) штами розподілили на MRSA, MSSA та з пограничною резистентністю – BSSA (*borderline-susceptible S. aureus*). До MSSA відносили штами, значення МІК яких складає від 0,5 до 2 мкг/мл, до групи BSSA – від 2 до 4 мкг/мл, до MRSA - 4 мкг/мл і більше (табл. 1). Із таблиці 1 видно, що серед ізолятів *S. aureus* було виявлено 47,4 % MSSA штамів, 35,1 % - MRSA-штамів та 17,5 % - BSSA. Останніх було достовірно менше ($\chi^2 < 0,05$).

При дослідженні ступеня антимікробної активності оксациліну виявлено принципові відмінності характеристик розподілу штамів MRSA. В 50,0 % випадках штами *S. aureus* мали МІК оксациліну 4,0 мкг/мл. Концентрація оксациліну 8 мкг/мл затримувала ріст 20,0 % досліджених культур. Для 15,0 % штамів МІК складала 16 мкг/мл, для 5,0 % - від 32 до 128 мкг/мл. Характер розподілу метицилінорезистентних клінічних ізолятів *S. aureus* за рівнем резистентності до оксациліну зображено на рисунку 1.

Таблиця 1. Результати визначення рівня МІК клінічних штамів *S. aureus* (n=57) методом серійних розведень

Значення МІК, мкг/мл	Абс.ч	$M \pm m$
від 0,5 до 2 (MSSA)	27	47,4±6,6
від 2 до 4 (BSSA)	10	17,5±5,0
від 4 і > (MRSA)	20	35,1±6,3

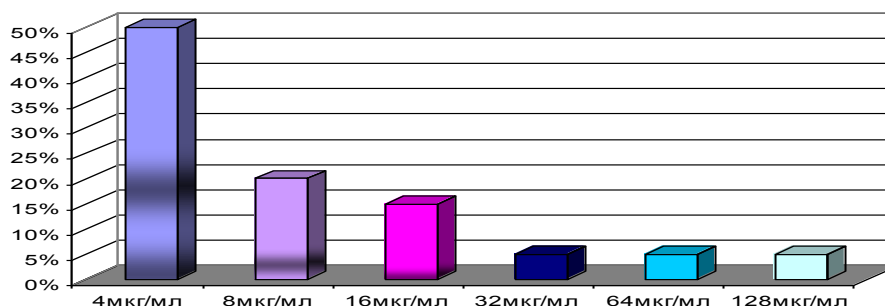


Рис. 1. Розподіл метицилінрезистентних клінічних ізолятів *S. aureus* за рівнем резистентності до оксациліну

Для визначення гетерогенності популяцій досліджено 10 клінічних ізолятів *S. aureus* з різними рівнями стійкості до оксациліну: №1 – МІК 0,5 мкг/мл, №2 – 1,0 мкг/мл, №3 – 2,0 мкг/мл, №4 – 4,0 мкг/мл, №5 – 4,0 мкг/мл, №6 – МІК 8 мкг/мл, №7 – МІК 16 мкг/мл, №8 – МІК 32 мкг/мл, №9 – МІК 64 мкг/мл, №10 – МІК 128 мкг/мл.

Висів культур проводили на чашки з середовищем МХ, які містили 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 16,0; 32,0; 64,0; 128,0 мкг/мл оксациліну. В якості контролю використовували на чашку з середовищем Мюллера-Хінтона без оксациліну.

Кількість колоній, що виростили на контрольних чашках складала 97-100% від розрахованого числа КУО, що свідчило про достатню кількість матеріалу на реплікаторі, необхідного для висіву на всі чашки репліки.

Отже, кількість колоній, які виростили на чашках-репліках з різною концентрацією антибіотика відповідало кількості клітин у популяції, стійких до цієї концентрації оксациліну, і визначалась у відсотках від числа колоній на чашці без препарату. Отримані дані приведені на рис. 2.

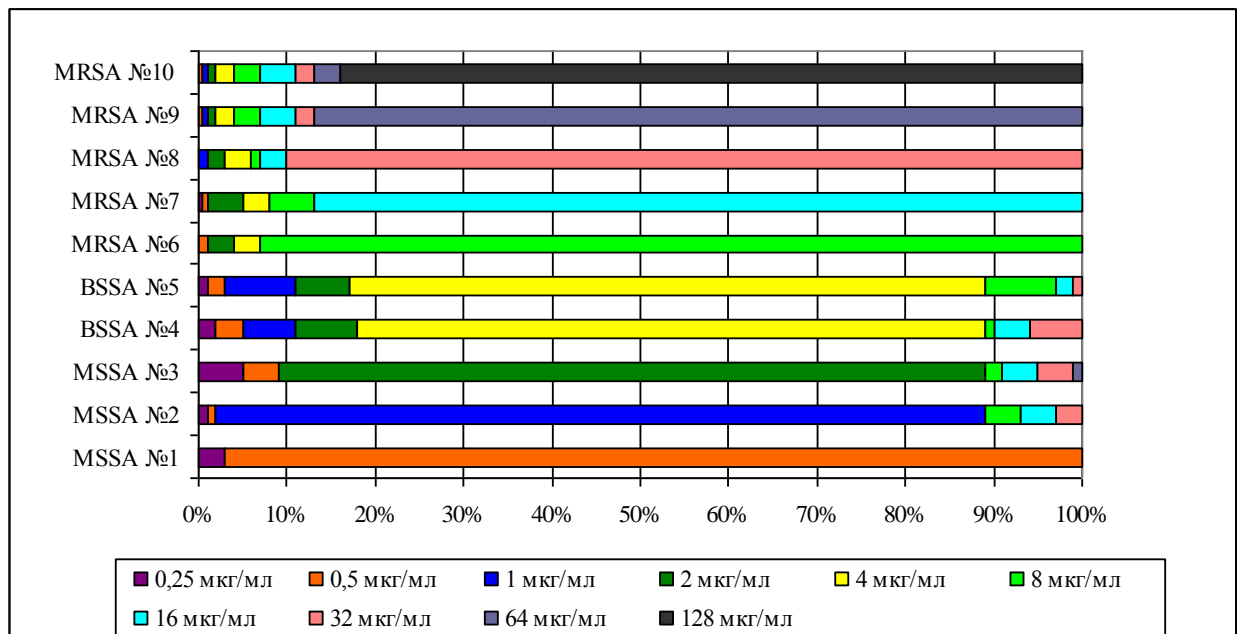


Рис. 2. Субпопуляції штамів *S. aureus* з різними рівнями МІК

Із отриманих даних видно, що популяції всіх досліджених штамів гетерогенні за ознакою метицилінорезистентності.

Можна зробити наступний висновок: серед популяції штамів *S. aureus*, які віднесені за результатами наших досліджень до метициліночутливих та до штамів з пограничною резистентністю, 11 % клітин популяції виявились стійкими до порогового значення оксациліну (МІК=4 і > мкг/мл). Така гетерогенність у популяції стафілококів здатна формувати метицилінорезистентність у циркулюючих штамів. Експресія гетерогенності більш характерна для штамів з низьким та середнім значенням МІК.

Наявністю гетерогенності можна пояснити низьку ефективність лікування хворих бета-лактамами цефалоспоринового ряду при незадовільній чутливості до них вилучених штамів стафілококу *in vitro*. Хіміотерапевтична резистентність в таких випадках формується уже під час лікування як реакція -відповідь мікроба на селективний тиск антибіотикотерапії.

Для стафілококів є характерною здатність швидко адаптуватись до дії антибактерійних препаратів, формуючи до них резистентність. Це досить наглядно було підтверджено експериментальним шляхом науковцями Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова [11].

Проводячи пасажування штамів *S. aureus* на МПБ із збільшенням концентрації досліджуваних антибіотиків, автори виявили зниження чутливості до пеніцилінів уже на п'ятому пасажі більше ніж у 128 разів, до цефалоспоринових I, III поколінь у 32-64 рази, починаючи з 10 пасажу, до глікопептидів – у 128 разів після 10 пасажів, до макролідів – у 16 разів з п'ятого пасажу, в порівнянні із вихідними значеннями чутливості.

Аналогічна ситуація може мати місце не тільки *in vitro*, але і *in vivo*: в процесі лікування антибіотиками за рахунок гетерогенності популяції відбувається селекція стійких субодиноць, які виживуть після лікування хворого та передаються іншому пацієнту. Внаслідок

лікування хворого, знову "виживають" штами з підвищеною стійкістю до антибіотиків, що в кінці кінців призводить до формування полірезистентних штамів та їх розповсюдження в позалікарняних умовах.

Метицилінорезистентність стафілококів має складні молекулярні основи. Крім гену *tes A* мають значення інші хромосомні фактори. Характерною рисою резистентності до метициліну є її гетерогенна експресія.

За даними різних авторів резистентність до оксациліну низького рівня виявляється у штамів, позбавленого гену *tes A*. Вона пов'язана з гіперпродукцією бета лактамаз і, можливо, метициліназ, а також з модифікаціями нормальних пеніцилін-зв'язуючих білків. На фенотип резистентності впливає багато факторів, в тому числі регуляторні елементи бета-лактамази і ще не ідентифіковані хромосомні локуси [12].

Висновки

1. Виявлена (методом ДДМ) та підтверджена шляхом визначення МІК оксациліну наявність у позалікарняних штамів *S. aureus* метицилінорезистентності різного ступеню (MSSA - 47,4 %, BSSA - 17,5 %, MRSA - 35,1 %).
2. Експериментально підтверджена наявність гетерогенності за ознакою та рівнем метицилінорезистентності практично у всіх досліджених штамів.
3. Найбільша експресія гетерогенності характерна для штамів з низьким та середнім значенням МІК ($\approx 11,0$ %).
4. Гетерогенна природа резистентності до метициліну є серйозною перешкодою при лабораторному тестуванні звичайними методами, що в свою чергу ускладнює вибір ефективної антибіотикотерапії хворих стафілококовою інфекцією.

References

1. Kuchma, I. U. Heterogeneity on the criteria of biological properties and sensitivity to antimicrobial agents bacteria of the genus *Streptococcus* vegetating in the respiratory system of patients with pneumonia [Text] / I. U. Kuchma // *Infectious diseases*. – 2013. – № 1. – P. 69-73.
2. Volianskiy, U. L. SOS literally and figuratively. New strategy to combat the development of resistance to antibiotics [Text] / U. L. Volianskiy, T. U. Kotlova, I. U. Kuchma // *Teoretichna medicine*. – 2013. – t. 19, No 2. – P. 162–170.
3. Microbiological study of the principle of creating complex of preventive antimicrobial properties on the formation of antibiotic resistance [Text] / N. Filimonov [et al.] // *Journal of Pharmacy*. – 2005. – № 1 (41). – P. 69-72.
4. Guidelines for the use of standardized microbiological (bacteriological) methods in clinical

diagnostic laboratories [Text] / Application number 1 to the order of the USSR Ministry of Health number 535 of 22 April 1985 - 45 c.

5. Order № 167 On approval of guidance "given the sensitivity of microorganisms to antibiotics" MOH (Ministry of Health) of Ukraine of 05.04.2007 : [Text] / . – access mode: <http://mozdocs.kiev.ua>.

6. Moellennig, R. C. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: no longer confined to the inpatient arena [Text] / R. C. Moellennig // *Infect. Dis. Special Edition*. – 2003. – №6. – P. 63–67.

7. Overview of the British guidelines on the management of CA-MRSA infections. [Text] / A.A. Nikulin, A.V. Dekhich. // *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. – 2010. – V.12 - № 1. – P. 4–22.

8. Lederberg, J. 50 éves. Orvosi Hetilap [Text] / J. Lederberg. – 1975. – № 116(36). – P. 2135–2136.

9. Lapach, SM Statistical methods in biomedical studies using Excel [Text] / SM Lapach, AV Tschubenko, P. Babich. - K.: "MORION", 2001 - 408 p.

10. Glantz, S. Biomedical Statistics [Text] / Per. from English. - M.: Practice, 1998. - 459 p.

11. Paliy, V. G. Research of antimicrobial properties based on composition of detametaksin. / V. G. Paliy [et al.] // *Naukoviy visnik Uggorodckogo university serious «Medicine»*. – 2012. – vol. 1 (43) – P. 48-52.

12. Kutcyk, R. V. Microbiological study new approaches to the treatment and prevention of staphylococcal infection based on a study of antimicrobial properties of thiazole derivatives, furan, acridine and biologically actives substances of natural origin: Avtoref.dys ... Dr. of Medical Science: 03.00.07 / state enterprise "Inst. microbial. and immunol. im. I.I. Mechniykova Science of Ukraine." – Kharkov, 2008. – P 40.

УДК 615.015.8:579.861.2:575.174.015.3(045) ГЕТЕРОГЕННІСТЬ ПОПУЛЯЦІЇ СТАФІЛОКОКІВ ЗА ОЗНАКОЮ МЕТИЦИЛІНРЕЗИСТЕНТНОСТІ

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

Ідентифіковано 57 штамів стафілококу, вилучених від позалікарняних хворих стафілококовою інфекцією. Визначена їх метицилінорезистентність диско-дифузійним методом та методом серійних розведень з визначенням МІК оксациліну. В дослідженнях *in vitro* виявлена наявність гетерогенності культур з ознакою метицилінорезистентності. Показано, що експресія гетерогенності більш характерна для штамів з низьким та середнім значенням МІК оксациліну.
Ключові слова: стафілококова інфекція, метицилінорезистентність, гетерогенність.

УДК 615.015.8:579.861.2:575.174.015.3(045)

**ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ПОПУЛЯЦИИ
СТАФИЛОКОККОВ ПО ПРИЗНАКУ
МЕТИЦИЛЛИНОРЕЗИСТЕНТНОСТИ**

**Коцарь О. В., Воронкина И.А., Деркач С. А.,
Крылова И. А., Габисева Л.С.***

Идентифицировано 57 штаммов стафилококка, выделенных от амбулаторных больных со стафилококковой инфекцией. Определена их метициллинорезистентность диско-диффузионным методом и методом серийных разведений с определением МИК оксациллина. В исследованиях *in vitro* определено наличие гетерогенности культур по признаку метициллинорезистентности. Показано, что экспрессия гетерогенности в большей степени характерна для штаммов с низким и средним значением МИК оксациллина.

Ключевые слова: стафилококковая инфекция, метициллинорезистентность, гетерогенность.

UDK 615.015.8:579.861.2:575.174.015.3(045)
HETEROGENEITY OF *STAPHYLOCOCCUS*
POPULATION ON THE BASIS OF
METYTSYLIN RESISTANCE

**Kotsar O.V., Voronkina I.A., Derkach S.A.,
Krylova I.A., Gabisheva L.S.**

57 *Staphylococcus* strains were identified and excluded from patients. Metytsylin resistance of these strains was determined using disc-diffusion method and method of serial dilutions with oxacillin MIC determination. In *in vitro* studies of heterogeneity for the cultures with metytsylin resistance was revealed. Expression of heterogeneity was shown to be more typical for strains with low and average levels of oxacillin MICs.

Keywords: staphylococcal infection, metytsylin resistance, heterogeneity.