

МИКРОБИОЛОГИЯ

УДК 576.851.252:615.33.015.4].001.6(045)

ОЦЕНКА РЕЗИСТЕНТНОСТИ К МЕТИЦИЛЛИНУ КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ СТАФИЛОКОККОВ

Н.Г. Ходакова – ГОУ ВПО Саратовский ГМУ Росздрава, аспирант кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии; **Г.М. Шуб** – ГОУ ВПО Саратовский ГМУ Росздрава, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии, доктор медицинских наук, профессор; **И.Г. Швиденко** – ГОУ ВПО Саратовский ГМУ Росздрава, доктор медицинских наук, профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии. E-mail: meduniv@sgmu.ru

Стафилококки играют значительную роль в возникновении различных заболеваний человека. Среди них наиболее актуальны инфекции, вызванные метициллинорезистентными штаммами.

Изучение чувствительности стафилококков к метициллину, как маркеру полирезистентности, включает определение минимальных подавляющих концентраций антибиотика (МПК). Это наименьшая концентрация антибиотика, которая *in vitro* полностью подавляет видимый рост микроорганизмов при стандартных условиях постановки опыта и выражается в абсолютных единицах действия (мг/л или мкг/мл).

Целью исследования явилась оценка МПК метициллина (оксациллина) для клинических штаммов стафилококков, выделенных из различного клинического материала, сравнительная характеристика значений МПК антибиотика для *Staphylococcus aureus* и коагулазонегативных стафилококков (CNS).

Для этого нами определены концентрации оксациллина, задерживающие рост метициллинорезистентных клинических штаммов *S. aureus* и CNS, полученных в некоторых лечебных стационарах города Саратова, – многопрофильная клиническая больница №2, родильный дом №6, областная детская больница, ожоговый центр.

В регионе г.Саратова изучение метициллинорезистентности клинических штаммов стафилококков ранее не проводилось.

Ключевые слова: метициллин, оксациллин, полирезистентность, штамм, стафилококки.

THE METHICILLIN-RESISTANCE MEASURE OF STAPHYLOCOCCI CLINICAL STRAINS

N.G. Khodakova – Saratov State Medical University, Department of Microbiology, Virology and Immunology, Post-graduate, **G.M. Shub** – Saratov State Medical University, Head of Department of Microbiology, Virology and Immunology, Doctor of Medical Science, Professor, **I.G. Shvidenko** – Saratov State Medical University, Department of Microbiology, Virology and Immunology, Doctor of Medical Science, Professor. E-mail: meduniv@sgmu.ru

Staphylococci play a great role in the emergence of various human illnesses. The most actual are infections caused by methicillin-resistant staphylococci.

The study of methicillin susceptibility as a polyresistance marker includes the definition of the minimum inhibitory concentration (MIC) of antibiotic which in vitro fully suppresses the visible growth of microorganisms in the standard experiment conditions and is expressed in absolute figures (mg/l or mkg/ml).

*The aim of the research is the measure of MIC methicillin (oxacillin) for the clinical strains of staphylococci isolated from different clinical specimens and comparative analysis antibiotic's MIC for *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci (CNS).*

*The result of the research is the determination of the oxacillin concentration preventing growth of the methicillin-resistant clinical strains of *S. aureus* and CNS which were detected from different profile hospitals of Saratov – general hospital №2, maternity hospital №6, children's regional hospital and centre of combustiology.*

The methicillin-resistant of the staphylococci clinical strains in the Saratov region has not been investigated before.

Key words: methicillin, oxacillin, polyresistance, strains, staphylococci.

В последнее время распространение метициллинорезистентных штаммов стафилококков (MRS) представляет серьезную проблему в стационарах различного профиля. Так в ожоговых отделениях на долю устойчивых к метициллину штаммов *S.aureus* (MRSA) приходится от 25 до 77%. Распространенность MRSA в травматологических стационарах составляет 45 – 67% от общего числа выделенных стафилококков [8,9].

Не менее тревожные данные касаются обнаружения метициллиноустойчивых штаммов коагулазонегативных стафилококков (CNS). Есть данные [11] о том, что более 50% штаммов CNS являются резистентными к метициллину, причем в основном они представлены *S.epidermidis* (MRSE) [2]. Так, в отделении торакальной хирургии по данным Азизова И.С. [1] наряду с MRSA, на долю которых приходилось до 25,6%, частота выделения MRSE составила 51,3%. В ожоговых и травматологических отделениях аналогичные штаммы *S.epidermidis* обнаружены в 45% случаев [4]. По данным других авторов [7] эта цифра значительно выше и составляет 57,5%.

Наблюдается нарастание удельного веса метициллинорезистентных стафилококков, как MRSA, так и коагулазонегативных (MRCNS), в основном эпидермальных, среди всей популяции стафилококков и у онкологических больных до 50% [13].

Устойчивые штаммы микроорганизмов могут возникать различными путями, однако в любом случае развитие резистентности микроорганизмов связано с изменением генома бактериальной клетки. Формирование резистентности связано с дозировкой, длительностью применения антибиотика, частотой его использования в конкретном лечебном учреждении, в частности, и в других сферах деятельности, способностью микроорганизма мутировать, поддерживать функциональные способности, возможность экспрессии микроорганизмами факторов устойчивости, а также наличием факторов, способствующих передаче их другим особям [14,15,16]. Антибактериальные препараты играют роль лишь селективных агентов.

Распространение устойчивых вариантов штаммов бактерий – комплекс сложных биологических процессов, зависящих от свойств микроорганизма, его генетической структуры, особенностей используемых препаратов и т.д., а также таких антропогенных факторов, как практика применения антибиотиков, ее длительность, социальные и экономические условия, интенсивность миграции населения. К другим факторам, способствующим распространению резистентности, относятся: нарастание иммунодефицита и увеличение тяжести инфекций, назначение комбинаций антибиотиков при их лечении, использование антибиотиков и отходов антибиотической промышленности для вскармливания животных, в сельском хозяйстве [3].

Не менее важной проблемой, наряду с формированием и распространением антибиотикорезистентности в экосистемах микроорганизмов и человеческой популяции, является селекция резистентных штаммов [6].

Опасность приобретения стафилококками резистентности к метициллину вызвана не столько поте-

рей активности у относительно мало применяемого в настоящее время метициллина, сколько тем, что у метициллинорезистентных штаммов наблюдается перекрестная устойчивость к β -лактамам, относящимся, в первую очередь, к изоксазолиновой группе (оксациллин, клоксациллин и др), цефалоспорином широкого спектра действия [5,10]. Эпидемические штаммы MRS проявляют множественную резистентность к антибиотикам, в том числе аминогликозидам, макролидам, линкозамидам. Так, частота ассоциированной устойчивости MRS к макролидам, линкозамидам, тетрациклинам, гентамицину (как маркеру устойчивости ко всем аминогликозидам), хлорамфениколу превышает 40–80%, что делает применение перечисленных препаратов в клинической практике проблематичным [12].

Материалы и методы. 97 клинических штаммов стафилококков были получены из различного патологического материала (материал от новорожденных, гной, раневое отделяемое, мази из зева и носа взрослых пациентов, с поверхности ожоговых ран) в лечебных учреждениях г.Саратова. Культуры стафилококков выделяли на желточно-солевом агаре (1,8% питательный агар, 7,5г NaCl на 100 мл среды, 1% яичного желтка).

Так как метициллин в настоящее время в медицинской практике не используется и отличается неустойчивостью при хранении, для определения чувствительности стафилококков к метициллину использовали оксациллин.

Для детекции метициллинорезистентности применяли метод скрининга на плотной питательной среде Muller-Hinton (HISPAN LAP, Pronadisa (Madrid)) с добавлением 4% NaCl и 6,0 мкг оксациллина (ОАО «Боисинтез»).

Величину минимальной подавляющей концентрации (МПК) оксациллина определяли методом серийных разведений согласно МУК 4.2.1890-04. Для приготовления основного раствора антибиотика использовали субстанцию оксациллина с известной активностью. Рабочий раствор антибиотика готовили из основного с использованием жидкой питательной среды, таким образом, чтобы получить двукратные разведения от 1000 до 0,5 мкг/мл.

Для инокуляции стандартную микробную взвесь, эквивалентную 0,5 по стандарту McFarland ($1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл), разводили питательным бульоном до концентрации 106 КОЕ/мл. После внесения инокулята в пробирки с раствором антибиотика конечная концентрация микроорганизмов достигала 5×10^5 КОЕ/мл. Одновременно ставили «отрицательный» контроль с питательным бульоном без антибиотика.

Параллельно проводили тестирование контрольных (референсных) штаммов (*S.aureus* ATCC 38591 – резистентный, *S.aureus* ATCC 29213 – чувствительный), при этом серия разведений включала пограничные концентрации и допустимые диапазоны МПК для чувствительных и резистентных штаммов.

Пробирки инкубировали при температуре 35°С в течение 24 часов. Учет результатов проводили визуально. За МПК принимали минимальную концентра-

цию оксациллина, при которой подавлялся видимый рост исследуемого штамма.

Принято считать, что к метициллинорезистентным относятся штаммы *S.aureus*, для которых МПК оксациллина равен 4 мкг/мл и более, в то время как для CNS эта величина должна быть не менее 0,5 мкг/мл. В связи с этим определение чувствительности штаммов *S.aureus* к оксациллину (метициллину) проводили в диапазоне концентраций препарата от 4 до 1000 мкг/мл, а коагулазонегативных (CNS) – от 0,5 до 1000 мкг/мл. Однако следует отметить, что CNS штаммов, для которых МПК составляла 0,5; 1,0; 2,0 мкг/мл, обнаружено не было. Поэтому если концентрация оксациллина 4 мкг/мл не задерживала рост микроорганизмов, такие стафилококки расценивались как чувствительные к оксациллину, в то время как штаммы, для которых МПК была 4 мкг/мл и более, идентифицировались как метициллинорезистентные.

Результаты и обсуждение. В табл. 1 и 2 представлены данные о частоте (в абсолютных числах и в %), с которой встречаются отдельные значения МПК в диапазоне от 4 до 1000 мкг/мл. Данные приведены в отношении всех стафилококков и отдельно для *S.aureus* и CNS.

Из табл. 1, видно, что концентрация оксациллина менее 4 мкг/мл не подавляла рост ни одного из изученных штаммов *S.aureus* и CNS. В связи с этим все выделенные культуры можно считать метициллинорезистентными.

Лишь для 5,1% штаммов МПК оксациллина равнялась 4 мкг/мл. Концентрации антибиотика в пределах от 8 до 250 мкг/мл подавляли рост от 6,2 до 10,3% штаммов, в то время как МПК 500 и 1000 мкг/мл – 17,5 и 28,9% соответственно, что демонстрирует высокую резистентность данных штаммов к антибиотику. Рост 50% стафилококков подавлялся концентрацией оксациллина 167 мкг/мл (МПК50).

Условно мы разделили метициллинорезистентные стафилококки на штаммы с низким (МПК 4–16 мкг/мл), средним (МПК 31,25 – 250 мкг/мл) и высоким (МПК 500 мкг/мл и выше) уровнем устойчивости. Как видно из табл. 1, почти половина изученных культур обладали высоким уровнем устойчивости к оксациллину, в то время как штаммов с низким уровнем устойчивости было менее трети. По нашему мнению, это может служить подтверждением того, что формирование устойчивости штаммов стафилококков к метициллину в стационарах г.Саратова происходило достаточно длительное время, что и привело к циркуляции штаммов с высоким уровнем устойчивости.

При сравнении уровней устойчивости *S.aureus* и коагулазонегативных стафилококков (табл.2) можно отметить, что имеются существенные различия в величинах МПК оксациллина для *S.aureus* и CNS. Так, лишь 12,5 и 6,3% штаммов *S.aureus* устойчивы к высоким концентрациям оксациллина (500 и 1000 мкг/мл), тогда как среди CNS этот показатель составил 20 и 40%. В то же время соотношение аналогичных штаммов, рост которых ингибирован 4 мкг/мл антибиотика, равно 1:1 (6,3% и 6,2% соответственно). Число штаммов, обладающих средним уровнем

устойчивости, среди *S.aureus* составило от 6,3 до 18,7%, а среди CNS – от 4,6 до 6,2%. Это свидетельствует, о том, что среди CNS существенно преобладают штаммы, устойчивые к высоким концентрациям оксациллина, в то время как в популяции *S.aureus* в основном циркулируют штаммы со средним уровнем устойчивости к данному антибиотику, а также отражают высокую адаптационную способность и пластичность штаммов CNS.

В табл. 3 представлены МПК оксациллина для штаммов стафилококков, выделенных из различного патологического материала. Из таблицы видно, что наибольшее количество метициллинорезистентных стафилококков составили штаммы, выделенные от новорожденных (46), из раневого отделяемого (32) и материала из зева и носа (15 штаммов). Оставшееся число штаммов выделено из мочи (1) и гноя (1).

Применив принцип, использованный ранее, можно разделить штаммы на группы по уровню резистентности к данному антибиотику. При этом из материала, выделенного от новорожденных, количество штаммов с низким уровнем резистентности составило 26,1%, со средним – 21,7%, с высоким – 52,2%. В мазках из зева, носа штаммы распределились соответственно уровням – 0%, 20%, 80%, в раневом отделяемом – 28,1%, 53,1%, 18,8%. Таким образом, подавляющее большинство штаммов из материала от новорожденных, в мазках из зева и носа относится к группе с высокой степенью резистентности к оксациллину (МПК 500 мкг/мл и более). Однако и в раневом отделяемом такие штаммы составили около 20%, что, безусловно, следует учитывать в клинической практике. Таким образом, большинство выделенных штаммов имеют высокий и средний уровни резистентности, что указывает на преобладание таких штаммов в популяции метициллинорезистентных стафилококков.

Выводы

1. В популяции стафилококков заметно преобладание штаммов, для которых МПК оксациллина составили 250 мкг/мл и более (46,4% от общего числа стафилококков), в то время как штаммы с низким уровнем резистентности составили менее трети. Это является косвенным свидетельством длительной селекции высокорезистентных штаммов в условиях стационара.

2. Коагулазонегативные стафилококки составляют большинство среди штаммов, характеризующихся высокой степенью устойчивости к метициллину (оксациллину). Соотношение MRCNS и MRSA составляет более чем 2:1, что указывает на большую адаптационную способность таких культур и их несомненную эпидемиологическую опасность.

3. Устойчивые к метициллину стафилококки чаще выделялись из материала, полученного от новорожденных и раневого отделяемого (46 и 32 соответственно), при этом высокорезистентные штаммы составили от 20 до 50%. Независимо от вида патологического материала, в нем преобладали штаммы со средним и высоким уровнем устойчивости к метициллину, что является подтверждением распространности таких штаммов в стационарах г.Саратова.

Распределение штаммов стафилококков по величине МПК оксациллина

МПК мкг/мл	MRS		
	Абс	%	Σ %
1000	28	28,9	100
500	17	17,5	71,1
250	7	7,2	53,6
125	9	9,3	46,4
62,5	9	9,3	37,1
31,25	6	6,2	27,8
16	10	10,3	21,6
8	6	6,2	11,3
4	5	5,1	5,1
2	-	-	-
1	-	-	-
0,5	-	-	-
Итого	97	100	-
МПК50	167,91±17,8 мкг/мл		

Таблица 2

Распределение *S.aureus* и коагулазонегативных стафилококков по величине МПК оксациллина

МПК мкг/мл	<i>S.aureus</i>			CNS		
	абс	%	Σ %	Абс	%	Σ %
1000	2	6,3	100	26	40	100
500	4	12,5	93,7	13	20	60
250	3	9,3	81,2	4	6,2	40
125	5	15,6	71,9	3	4,6	33,8
62,5	6	18,7	56,3	3	4,6	29,2
31,25	2	6,3	37,6	4	6,2	24,6
16	4	12,5	31,3	6	9,2	18,4
8	4	12,5	18,8	2	3,0	9,2
4	2	6,3	6,3	4	6,2	6,2
2				-	-	-
1				-	-	--
0,5				-	-	-
Итого	32	100		65	100	
МПК50	45,02±4,4 мкг/мл			375±1,2		

Доверительный интервал для 95% штаммов – 0,05%

Таблица 3

Распределение штаммов метициллинорезистентных стафилококков, выделенных из различного патологического материала, по величине МПК оксациллина

Величина МПК (мкг/мл)	Всего	Низкий уровень				Средний уровень				Высокий уровень			
		Всего	в том числе МПК			Всего	в том числе МПК			Всего	в том числе МПК		
			4	8	16		31,25	62,5	125		250	500	1000
Материал от новорожденных	46 100%	12 26,1%	2 4,3%	3 6,5%	7 15,2%	10 21,7%	5 11%	2 4,3%	3 6,5%	-	24 52,2%	10 21,8%	14 30,4%
Мазки из зева, носа	15 100%	-	-	-	-	3 20%	-	1 6,7%	1 6,7%	1 6,6%	12 80%	3 20%	9 60%
Мокрота	2 100%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2 100%	1 50%	1 50%
Моча	1 100%	-	-	-	-	1 100%	-	-	-	1 100%	-	-	-
Гной	1 100%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 100%	1 100%	-
Раневое отделяемое	32 100%	9 28,1%	3 9,4%	3 9,4%	3 9,4%	17 53,1%	1 3%	6 18,8%	5 15,6%	5 15,6%	6 18,8%	2 6,3%	4 12,5%
Количество штаммов с данной МПК	97	21	5	6	10	31	6	9	9	7	45	17	28

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Азизов, И.С. Антибиотикорезистентность метициллинорезистентных штаммов *Staphylococcus spp.*, выделенных у пациентов с эмпиемой плевры / И.С. Азизов // КМАХ. – 2001. – №3. – Прилож.1. – С.5.
2. Афанасьева, Т.И. Метициллинорезистентные стафилококки / Т.И. Афанасьева // Антибиотики и химиотерапия. – 1998. – №6. С.29-31
3. Буданов, С.В. Линезолид – новый антибактериальный препарат группы оксазолидинонов: значение в контроле распространения и при лечении множественной грамположительной инфекции / С.В. Буданов, Л.Б. Смирнова // Антибиотики и химиотерапия. – 2002. – Т.47. – №7. С.38-41.
4. Галеева, Е.В. Фармакоэпидемиологический анализ антибиотикотерапии у детей с ожоговой травмой в отделениях хирургического профиля / Е.В. Галеева, Н.В. Кондратенко, И.В. Крапивина // Современные проблемы антимикробной химиотерапии: Тезисы V Российской конференции. – М., 2003. – С.45.
5. Зайцев, А.А. Стафилококки и ванкомицин: тенденции и противостояние. / А.А. Зайцев, О.И. Карпов, С.В. Сидоренко // Антибиотики и химиотерапия. – 2003. – Т.48. – №6. – С.20-23.
6. Зуева, В.С. Метициллинорезистентные стафилококки / В.С. Зуева, О.А. Дмитриенко, А.К. Акатов и др. // ЖМЭИ. – 1988. – №4. – С.100-109.
7. Кочетков, Г.А. Оценка антибиотикорезистентности устойчивых к метициллину штаммов золотистого стафилококка в отделениях термической травмы НИИИТО / Г.А. Кочетков, С.И. Пылаева, Т.М. Конышкина // КМАХ. – 2000. – №2. – Прилож.1. – С.25.
8. Краснова, М.В. Профили резистентности метициллинорезистентных и метициллиночувствительных *Staphylococcus aureus* в травматологическом стационаре в 1999 г. / М.В. Краснова, Г.Е. Афиногенов, О.М. Яковлева и др. // КМАХ. – 2000. – №2 – Прилож.1. – С.25.
9. Пылаева, С.И. Развитие проблемы метициллинорезистентности госпитальных стафилококков в травматологической клинике / С.И. Пылаева, Н.А. Гординская, Н.А. Кувакина и др. // КМАХ. – 2001. – №3. – Прилож.1. – С.32.
10. Сазыкин, Ю.О. Новые цефалоспорины, эффективные при метициллинорезистентности / Ю.О. Сазыкин // Антибиотики и химиотерапия. – 1997. – Т.42. – №7. – С.24.
11. Сидоренко, С.В. Результат многоцентрового исследования чувствительности стафилококков к антибиотикам в Москве и Санкт-Петербурге / С.В. Сидоренко, С.П. Резван, С.А. Грудинина и др. // Антибиотики и химиотерапия. – 1998. – Т.43 – №7. – С.15-25.
12. Сидоренко, С.В. Клиническое значение антибиотикорезистентности грамположительных микроорганизмов / С.В. Сидоренко // Инфекции и антимикробная терапия. – 2003. – Т.5. – №2. – С.48-54.
13. Страчунский Ю.Л.С., Белоусов Ю.Б., Козлов С.Н. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии / под ред. Л.С. Страчунского, Ю.Б. Белоусова, С.Н. Козлова. – М. 2000. – С. 35.
14. John, JF Jr. The microbial genetics of antibiotic cycling / JF Jr John, L.B Rice. // Infect Control Hosp Epidemiol. – 2000. – №21(1 suppl). – P.22-S31.
15. Shlaes, D.M. Society for Healthcare Epidemiology of America and Infectious Diseases Society of America Joint Committee on the Prevention of Antimicrobial Resistance: guidelines for the prevention of antimicrobial resistance in hospitals / D.M. Shlaes, D.N. Gerding, J.F. John, et al. // Clin Infect Dis. – 1997. – №25. – P.584-599.
16. Warren, D.K. Infection control measures to limit antimicrobial resistance / D.K. Warren, V.J. Fraser // Crit Care Med. – 2001. – №29 (4 suppl). – P.128-134.



на заметку

Сотрудниками Саратовского государственного медицинского университета получены патенты:

1. № 2319520 Способ повышения чувствительности золотистого стафилококка к химиотерапевтическим препаратам / О.П. Семенова, П.В. Решетов, С.Ф. Шимчук, А.В. Сумбаев.
2. № 2315580 Способ оптимизации репаративного остеогенеза / О.В. Бейдик, В.В. Анников, П.В. Глыбочко, В.Н. Николенко, А.В. Зарецков, К.К. Левченко, Ван Кай, Д.А. Марков.
3. № 2315543 Способ прогнозирования возможности рецидива кровотечения. / Ю.Г. Шапкин, Д.А. Усанов, Р.Ю. Иванов, А.В. Скрипаль, А.В. Абрамов, С.В. Капралов.