

МІКРОБІОЛОГІЧНИЙ МОНІТОРИНГ АНТИБІОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТІ МІКРООРГАНІЗМІВ РОДУ ENTEROCOCCUS

ДУ «Інститут мікробіології та імунології імені І.І. Мечникова АМН України» (м. Харків)

Роботу виконано в рамках планової НДР лабораторії медичної мікробіології з Музеем мікроорганізмів ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова АМН України» **НН/1 – 2010** «Підтримка та розвиток Музею-Депозитарію патогенних для людини мікроорганізмів».

Вступ. Сучасний період характеризується розповсюдженням нозокоміальних інфекцій викликаних грампозитивною мікрофлорою. Особливо небезпечними є метіцилінрезистентні стафілококи, ванкомицинрезистентні та мультирезистентні ентерококи. Патогенний потенціал мікроорганізмів обумовлюють фактори їх персистенції, а також резистентність до протимікробних препаратів. Ентерококи характеризуються як природною так і набутою резистентністю та швидким її розповсюдженням. Тому перелік антибіотиків для лікування ентерококових інфекцій обмежено групою β-лактамів, за винятком цефалоспоринів, до яких ентерококи характеризуються природною резистентністю; аміноглікозидів, деяких фторхінолонів, препаратів нітрофуранового ряду. Препаратами резерву є глікопептиди та лінезолід [1-4].

Особливості механізму дії β-лактамічних антибіотиків на ентерококи визначаються наявністю у мікроорганізмів пеніцилінзв'язуючого білку – ПЗБ-5, який відрізняється зниженою афінністю до β-лактамів. На фоні пригнічування інших ПЗБ, цей білок продовжує функціонувати і здійснювати синтез основного компоненту мікробної стінки – пептидоглікана. Природна резистентність ентерококів до цефалоспоринів і невисока чутливість до карбопенемів пов'язана саме з наявністю цього білку. Найбільшою афінністю до ПЗБ-5 володіють бензилпеніцилін, ампіцилін, та уреїдопеніциліни, однак навіть ці антибіотики не проявляють бактерицидної дії. В порівнянні з *E. faecalis* штами *E. faecium* продукують ПЗБ-5 в значно більшій кількості, що обумовлює меншу чутливість останніх до ампіциліну [8, 13]. В Північній та Південній Америці, а також в Лівані описані поодинокі штами ентерококів, які продукують β-лактамази [8, 10].

Для ентерококів характерна природна резистентність до низьких концентрацій аміноглікозидів, так званий «низький рівень резистентності», що обумовлено факультативно анаеробним характером метаболізму і недостатньою проникливістю клітинної оболонки мікробів. В наслідок цього антибіотик не потрапляє до чутливих мішеней. При

порушенні цілісності зовнішніх структур клітини під дією β-лактамічних антибіотиків, пасивна дифузія аміноглікозидів усередину мікробної клітини ентерококів стає ефективною. Тому в терапії ентерококових інфекцій використовується стандартна схема лікування – поєднання амінопеніцилінів з аміноглікозидами (гентаміцином або стрептоміцином), і в такій комбінації в результаті синергізма дії досягається виражений бактерицидний ефект. Вказане потребує проведення скринінгу на наявність у ентерококів високого рівня резистентності до цих препаратів.

Високий рівень резистентності до аміноглікозидів (HLAR) пов'язано зі змінами в структурі рибосом та утворенням аміноглікозидомодифікуючих ферментів [6, 11]. Також слід пам'ятати, що у ентерококів відсутня перехресна резистентність до стрептоміцину і гентаміцину, тому необхідно визначати чутливість до обох антибіотиків [6]. На фоні високого рівня резистентності до аміноглікозидів або резистентності до β-лактамів синергізм та бактерицидний ефект цих антибіотиків на ентерококи не проявляється.

В науковій літературі є повідомлення про зростання ампіцилінрезистентних (ARE) ентерококів та штамів з високим рівнем резистентності до гентаміцину (HLG-R) і стрептоміцину (HLS-R). За результатами міжнародного моніторингу чутливості збудників нозокоміальних інфекцій, встановлено, що в США рівень розповсюженості ARE *E. faecium* досягав 89,8 %, при відсутності стійких штамів *E. faecalis* [12]. В Європі за даними EARSS-Net у 2009 році кількість ARE виду *faecium* досягала 92,9 %, у 2010 цей показник дорівнював 95,4%, на відміну від *E. faecalis*, аналогічні показники якого склали 2,1 % та 2,0 % відповідно. За результатами європейського моніторингу рівень розповсюженості *E. faecium* з HLG-R у 2009 р. був 39,1 %, у 2010 р. – 39,5 %, *E. faecalis* – 36,7 % та 29,5 %. Найбільший рівень ентерококів з HLG-R відмічено: в Греції, Італії, Нідерландах, Угорщині, Чехії [9]. Деякі вчені вважають, що розповсюдженість резистентності до аміноглікозидів досягла такого рівня, при якому доцільність використання їх без попередньої оцінки чутливості досить сумнівна.

Мета дослідження. Враховуючи все вищезазначене метою нашої роботи було вивчення резистентності до ампіциліну та високих доз аміноглікозидів у ентерококів, вилучених з різних екоотопів.

Об'єкт і методи дослідження. У роботі було використано 106 штамів мікроорганізмів роду

Enterococcus, які мали таке походження: 30 – вилучено з кишечника дітей, хворих на гостру кишкову інфекцію (ГКІ), 25 – з кишечника здорових дітей, 51 штамп від хворих на цукровий діабет (28 штамів з виділень трофічних виразок і 23 штами з кишечника цих же хворих). Для виділення ентерококів використовували ентерококагар (Оболенськ), ідентифікували вилучені культури за допомогою EN-COCCUStest (PLIVA-Lachema Diagnostika, Чехія). Приготування суспензій мікроорганізмів із визначеною концентрацією мікробних клітин проводили за шкалою McFarland з використанням електронного приладу Densi-La-Meter (PLIVA-Lachema Diagnostika, Чехія) згідно з інформаційним листом [7]. Чутливість штамів ентерококів до ампіциліну визначали диско-дифузійним методом на середовищі Мюллера-Хінтона (bioMerieux, Франція) з використанням стандартних комерційних дисків (НІЦФ, Санкт-Петербург, Росія) [5]. Скринінг чутливості ентерококів до високих доз аміноглікозидів проводили на серцево-мозковому агарі з використанням набору № 27 (ФГУН НИИЕМ ім. Пастера, Санкт-Петербург).

Статистичну обробку результатів здійснювали за допомогою комп'ютерних програм Microsoft Excel 2007.

Результати досліджень та їх обговорення.

Аналіз отриманих в ході нашого дослідження даних показав, що відсоток ARE складав в середньому $(31,1 \pm 4,4) \%$. Встановлено, що по частоті розповсюдження цих штамів між аналізованими групами (рис. 1) достовірних відмінностей не виявлено ($p > 0,05$). Так, серед ентерококів, які вилучено з фекалій дітей, хворих на ГКІ та здорових дітей, резистентних до дії цього антибіотику було $(29,3 \pm 7,1) \%$. При цьому у штамів, вилучених від хворих на ГКІ, цей показник складав $(25,0 \pm 8,8) \%$, від здорових – $(35,3 \pm 9,7) \%$. Серед штамів, ізольованих від хворих на цукровий діабет кількість ARE дорівнювала

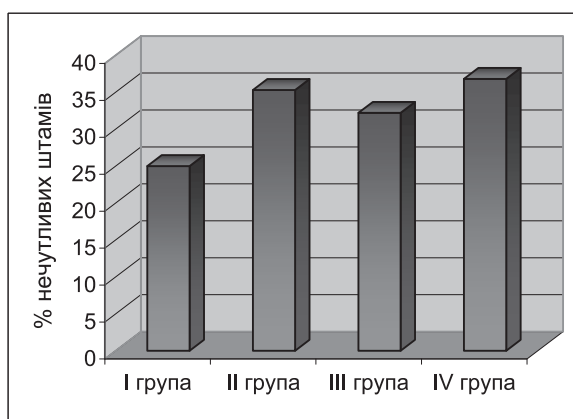


Рис 1. Питома вага мікроорганізмів роду *Enterococcus*, стійких до ампіциліну (ARE): 1 група –штами, вилучені з кишечника дітей, хворих на ГКІ, 2 група –штами, вилучені з кишечника здорових дітей, 3 група – штами, вилучені з трофічних виразок хворих на цукровий діабет, 4 група – штами, вилучені з кишечника хворих на цукровий діабет.

$(34,0 \pm 6,6) \%$. При цьому у штамів із трофічних виразок цей показник складав $(32,2 \pm 9,0) \%$, у кишкових штамів – $(36,8 \pm 10,0) \%$.

Аналіз розповсюженості ARE серед ентерококів різних видів показав, що відсоток ARE виду *faecium* був вищим у порівнянні з видом *faecalis* і досягав $(54,1 \pm 10,2) \%$ та $(25,0 \pm 5,4) \%$ відповідно.

Слід відмітити, що за літературними даними кількість ARE *faecalis* значно менше, ніж в нашому дослідженні і коливається у межах від 2 до 5 %. Але є поодинокі повідомлення про вищий рівень розповсюдження ARE серед *E. faecalis* у окремих станціях [2].

Наступним етапом нашої роботи було визначення резистентності мікроорганізмів роду *Enterococcus* до високих доз аміноглікозидів (гентаміцину та стрептоміцину). Аналіз отриманих в ході нашого дослідження даних показав, що частота розповсюдження ентерококів з HLAR до обох препаратів складала $(52,3 \pm 5,3) \%$. В цей же час $(6,8 \pm 2,7) \%$ штамів характеризувались резистентністю до гентаміцину при чутливості до стрептоміцину, а $(9,1 \pm 3,0) \%$ штамів були резистентними до стрептоміцину і чутливими до гентаміцину.

Аналізуючи отримані результати необхідно відзначити деякі відмінності в частоті розповсюдження ентерококів з HLAR, в залежності від екотопу виділення мікроорганізмів. Так, серед ентерококів, вилучених від дітей, хворих на ГКІ, питома вага ентерококів з HLAR дорівнювала $(65,1 \pm 9,9) \%$, у здорових дітей (група порівняння) цей показник достовірно не відрізнявся і складав $(60,0 \pm 9,8) \%$. Слід підкреслити, що резистентність до гентаміцину при чутливості до стрептоміцину спостерігалась у $(13,0 \pm 6,1) \%$ штамів першої групи і $(13,3 \pm 2,6) \%$ штамів другої групи ($p > 0,05$). Встановлено, що у першій дослідній групі кількість штамів, резистентних до стрептоміцину і чутливих до гентаміцину дорівнювала – $(4,3 \pm 3,7) \%$, у другій групі – таких штамів не виявлено.

В групі ентерококів, вилучених від хворих на цукровий діабет з синдромом «діабетична стопа», частота розповсюдження штамів з HLAR була в 1,2 рази вище, ніж в попередніх групах і дорівнювала $(72,0 \pm 6,3) \%$ ($p < 0,05$). Також, відмінністю цієї групи ентерококів є більш високий відсоток штамів стійких до стрептоміцину, ніж до гентаміцину. Так, серед ентерококів, вилучених із трофічних виразок, відсоток резистентних до стрептоміцину і чутливих до гентаміцину складав $(9,7 \pm 5,5) \%$, кількість резистентних до гентаміцину і чутливих до стрептоміцину була значно меншою і дорівнювала $(3,2 \pm 2,8) \%$ ($p < 0,05$); резистентними до обох аміноглікозидів виявились $(48,4 \pm 9,4) \%$ штамів.

Слід відмітити, що з кишечника хворих на цукровий діабет питома вага ентерококів з HLAR дорівнювала $(68,4 \pm 9,7) \%$, що у 1,4 рази більше ніж аналогічний показник штамів, вилучених з трофічних виразок цих же хворих ($p < 0,05$). Резистентними до стрептоміцину і чутливими до гентаміцину було $(21,0 \pm 8,4) \%$ кишкових штамів, що у 2,2 рази перевищує аналогічний показник штамів, вилучених з трофічних виразок

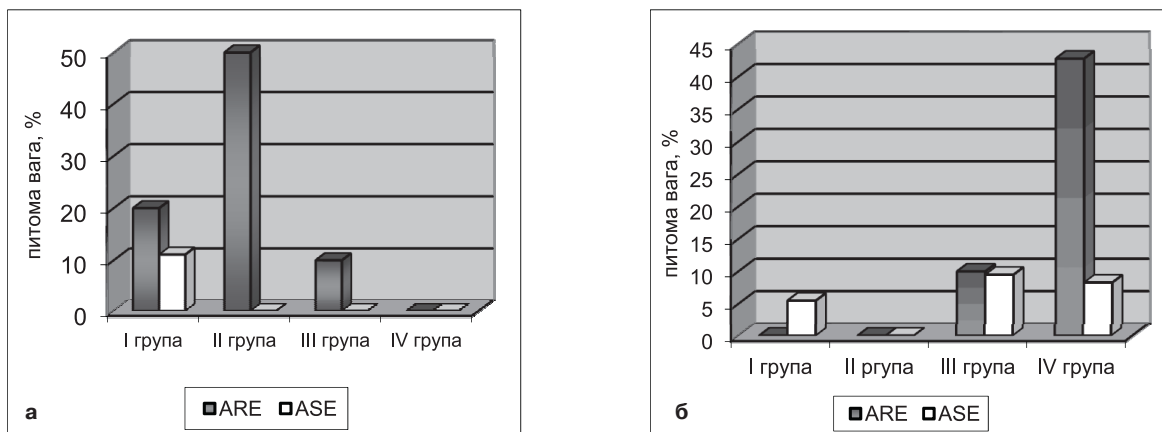


Рис 2. Питома вага ARE і ASE резистентних до гентаміцину (а) та стрептоміцину (в):
1 група –штами, вилучені з кишечника дітей, хворих на ГКІ, 2 група –штами, вилучені з кишечника здорових дітей, 3 група – штами, вилучені з трофічних виразок хворих на цукровий діабет, 4 група – штами, вилучені з кишечника хворих на цукровий діабет.

($p < 0,05$). Резистентних ентерококів до гентаміцину при чутливості їх до стрептоміцину серед кишкових штамів не виявлено, серед штамів, вилучених з трофічних виразок цих же хворих цей показник складає $(3,2 \pm 2,8) \%$.

Аналізуючи розповсюдженість ентерококів з HLAR в залежності від виду, встановлено, що серед *E. faecalis* штами, стійкі до гентаміцину і стрептоміцину були виявлені у $(58,2 \pm 6,0) \%$ випадків, що в 1,7 рази більше, ніж серед *E. faecium* ($p < 0,05$). Слід відмітити, що штамів *E. faecalis*, резистентних до гентаміцину і чутливих до стрептоміцину було $(4,5 \pm 2,5) \%$, що в 3,2 рази менше, ніж серед *E. faecium* і навпаки, резистентних до стрептоміцину при чутливості до гентаміцину було $(10,4 \pm 3,7) \%$, що у 2,2 рази більше, ніж серед *E. faecium* ($p < 0,05$).

Щоб довести наскільки ефективною буде стандартна схема лікування ентерококових інфекцій (ампіцилін + гентаміцин) та (ампіцилін + стрептоміцин) нами проаналізована чутливість ARE і ампіцилінчутливих (ASE) ентерококів до високих доз аміноглікозидів. Результати надані на **рис.2**.

Аналіз результатів показав, що серед усіх взятих до дослідження ARE, кількість ентерококів з HLAR складала $(69,3 \pm 9,0) \%$ штамів, при цьому резистентними до обох аналізованих препаратів були $(38,5 \pm 9,5) \%$, тоді як окремо до гентаміцину і стрептоміцину – по $(15,4 \pm 7,0) \%$ штамів відповідно. Дещо інша картина спостерігалась при аналізі ASE. Так резистентними

до дії гентаміцину і стрептоміцину було $(58,0 \pm 6,2) \%$ штамів, що в 1,5 рази перевищувало аналогічний показник ARE ($p < 0,05$). Кількість ASE резистентних до гентаміцину при чутливості до стрептоміцину дорівнювала $(3,3 \pm 2,2) \%$, а резистентних до стрептоміцину при чутливості до гентаміцину – $(6,4 \pm 3,1) \%$, що в 4,6 та 2,4 рази відповідно менше ніж аналогічний показник у ARE ($p < 0,05$).

Підсумовуючи отримані нами результати, слід відмітити, що лікування за стандартною схемою: ампіцилін + гентаміцин, ампіцилін + стрептоміцин в $(56,2 \pm 12,4) \%$ та в $(68,7 \pm 11,6) \%$ випадків відповідно буде неефективним.

Висновки. Таким чином, наші дослідження показали високий рівень розповсюдженості ампіцилінрезистентних ентерококів та штамів стійких до високих доз аміноглікозидів, що виключає можливість емпіричного застосування традиційної схеми лікування ентерококових інфекцій (ампіцилін+гентаміцин та ампіцилін+стрептоміцин).

Все вищезазначене диктує необхідність проведення мікробіологічного моніторингу антибіотикорезистентності збудників ентерококових інфекцій, як у окремих стаціонарах так і на регіональному рівні.

Перспективи подальших досліджень. Вважаємо за доцільне продовжувати роботу у даному напрямку та проводити цілеспрямований пошук нових ефективних схем лікування ентерококових інфекцій.

Список літератури

1. Белобородова Н.В. Место линезолида в лечении инфекционного эндокардита / Н.В. Белобородова, А.Р. Седракан // Инфекции и антимикробная терапия. – 2009. – № 1. – С. 6–10.
2. Буслаева Г.Н. Перспективы использования линезолида в педиатрической практике / Г.Н. Буслаева // Педиатрия. – 2005. – № 2. – С. 75–79.
3. Габриэлян Н.И. Энтерококки как возбудители послеоперационных инфекционных осложнений / Н.И. Габриэлян, Е.М. Горская, Т.С. Спирина // Журн. микробиол. – 2007. – № 4. – С. 50–53.
4. Мироненко Л.Г. Ванкомицинрезистентные энтерококки (обзор литературы) [Электронный ресурс] / Л.Г. Мироненко, Е.Г. Перетятко // Анналы Мечниковского института. – 2007. – № 2. – С. 6-10. – Режим доступа к журналу: <http://www.imiamn.org/journ/>.

5. Про затвердження методичних вказівок: Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів: [Чинний від 05.04.2007]. – К.: МОЗ України, 2007. – 51 с. (Нормативний документ МОЗ України. Наказ).
6. Сидоренко С.В. Молекулярные основы резистентности к антибиотикам / С.В. Сидоренко, В.И. Тишков // Успехи биологической химии. – 2004. – Т. 44. – С. 263–306.
7. Стандартизація приготування мікробних суспензій: Інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я № 163-2006 К.: (Укрмедпатентінформ), 2006. – 10 с. – (Нормативний документ МОЗ України; Український центр наукової медичної інформації та патентно-ліцензійної роботи. Інформаційний лист).
8. Arbeloa A. Role of Class A Penicillin-Binding Proteins in PBP5-Mediated β -Lactam Resistance in *Enterococcus faecalis* / A. Arbeloa, H. Segal, J. Hugonet // Journal of Bacteriology. – 2004. – Vol. 186, № 5. – P. 122–1228.
9. Antimicrobial resistance in Europe [Електронний ресурс]. – Режим доступу : [//www.rivm.nl/earss](http://www.rivm.nl/earss).
10. Arias C. A. Time-Kill and Synergism Studies of Ceftobiprole against *Enterococcus faecalis*, Including β -Lactamase-Producing and Vancomycin-Resistant Isolates / C.A. Arias, K.V. Singh, D. Panesso // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2007. – Vol. 51, № 6. – P. 2043–2047.
11. Galindo J.A. High-Level Aminoglycoside Resistance *Enterococcus* spp. in a tertiary care hospital in Mexico / J.A. Galindo, Y.G. Tejada, S.G. Cerezo // Electron Journal Biomed. – 2005. – Vol. 1. – P. 40–45.
12. National Nosocomial Infectious Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 to June 2002, issued August 2002. Am J. Infect. Control. – 2002. – Vol. 30, № 8. – P. 458 – 475.
13. Ono S. Mechanisms of Resistance to Imipenem and Ampicillin in *Enterococcus faecalis* / S. Ono, T. Muratani, T. Matsumoto // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2005. – Vol. 49, № 7. – P. 2954–2958.

УДК 616.935 : 615.28

МІКРОБІОЛОГІЧНИЙ МОНІТОРИНГ АНТИБІОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТІ МІКРООРГАНІЗМІВ РОДА ENTEROCOCCUS

Перетятко О.Г.

Резюме. Приведені результати мікробіологічного моніторингу резистентності 106 ентерококів, виділених з кишечника здорових дітей і дітей з ОКИ, кишечника і трофічних виразок хворих цукровим діабетом. Встановлено, що рівень поширеності ARE складав 31,1%, достовірної різниці між ARE, виділеними з різних екоотопів не виявлено. Частота поширення ентерококів з HLAR досягла 52,3 %, найвищий рівень її був визначений у ентерококів, виділених з кишечника хворих цукровим діабетом. Отримані результати свідчать про необхідність проведення мікробіологічного моніторингу резистентності ентерококів.

Ключові слова: резистентність до антибіотиків, ампицилинрезистентные ентерококи (ARE), резистентність до високих рівнів аміноглікозидів (HLAR).

УДК 616.935:615.28

Микробиологический мониторинг антибиотикорезистентности микроорганизмов рода *Enterococcus*

Перетятко Е.Г.

Резюме. Приведены результаты микробиологического мониторинга резистентности 106 энтерококков, выделенных из кишечника здоровых детей и детей с ОКИ, кишечника и трофических язв больных сахарным диабетом. Установлено, что уровень распространенности ARE составлял 31,1%, достоверной разницы между ARE, выделенными из разных экоотопов не выявлено. Частота распространения энтерококков с HLAR достигала 52,3 %, наивысший уровень ее был определен у энтерококков, выделенных из кишечника больных сахарным диабетом. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости проведения микробиологического мониторинга резистентности энтерококков.

Ключевые слова: резистентность к антибиотикам, ампицилинрезистентные энтерококки (ARE), резистентность к высоким уровням аминогликозидов (HLAR).

UDC 616.935:615.28

Microbiological Monitoring Of *Enterococcus* Species Antibiotic Resistance

Peretyatko E.G.

Summary. The results of microbiological monitoring of antibiotic resistance of 106 enterococcus strains, isolated from the intestine of healthy children and children with AEI, intestine and trophic ulcers of patients with diabetes are presented in the article. It was determined that the prevalence of ARE was 31,1 % and there was no reliable difference between ARE, isolated from different ecotopes. The rate of HLAR in enterococci was 52,3 %, the greatest level of resistance was detected in enterococcus strains, isolated from the intestine of patients with diabetes. Obtained results testify to the necessity of the microbiological monitoring of enterococci antibiotic resistance.

Key words: antibiotic resistance, ampicillin resistant enterococci (ARE), high level aminoglycoside resistance (HLAR).

Стаття надійшла 28.03.2012 р.

Рецензент – проф. Лобань Г.А.