

Сумський державний педагогічний університет ім. А. С. Макаренка
Природничо-географічний факультет
Кафедра загальної біології та екології

Тименко Альона Сергіївна

**СТІЙКІСТЬ ДО АНТИБІОТИКІВ ШТАМІВ ЗОЛОТИСТОГО
СТАФІЛОКОКУ У НЕДРИГАЙЛІВСЬКОМУ РАЙОНІ СУМСЬКОЇ
ОБЛАСТІ**

Спеціальність: 014 Середня освіта (Біологія та здоров'я людини)

Галузь знань: 01 Освіта

Кваліфікаційна робота

На здобуття освітнього ступеня магістра

Науковий керівник

_____ Я. М. Данько
кандидат біологічних наук, доцент
кафедри загальної біології та екології
«01» грудня 2020 року

Виконавець

_____ А. С. Тименко
«01» грудня 2020 року

Суми – 2020

ЗМІСТ

СПИСОК СКОРОЧЕНЬ.....	4
ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	7
1.1. <i>Staphylococcus aureus</i> як важливий патоген людини.....	7
1.2. Біологія <i>Staphylococcus aureus</i>	11
1.3. Патогенність <i>Staphylococcus aureus</i>	14
1.4. Хронічний тонзиліт і <i>Staphylococcus aureus</i>	17
1.5. Антибіотикорезистентність <i>Staphylococcus aureus</i>	21
1.6. Механізми антибіотикорезистентності.....	30
Механізми стійкості до β -лактамних антибіотиків.....	31
Макроліди і лінкосаміди.....	32
Аміноглікозиди.....	34
Хінолони / Фторхінолони.....	35
Глікопептиди.....	36
Тетрацикліни.....	37
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	39
2.1. Методи дослідження на чутливість до АБП.....	39
2.2. Методи статистичної обробки даних.....	42
РОЗДІЛ 3. РОЗПОДІЛ ШТАМІВ <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> ЗА ДІАМЕТРОМ ЗОН ПРИГНІЧЕННЯ І ГРУПОЮ ЧУТЛИВОСТІ.....	43
РОЗДІЛ 4. СТРУКТУРА СТІЙКОСТІ ШТАМІВ <i>STAPHYLOCOCCUS</i> <i>AUREUS</i> І ТЕНДЕЦІЇ У ЇЇ РОЗВИТКУ.....	47
4.1. Структура резистентності.....	47
4.2. Мультирезистентність.....	50
ВИСНОВКИ.....	54
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	55

СПИСОК СКОРОЧЕНЬ

Р – резистентний штам.	Va – ванкоміцин
П – помірно стійкий штам.	Е – еритроміцин
Ч – чутливий штам.	FM – фуромаг
АБП – антибактеріальний препарат.	CHL – левоміцетин (хлорамфенікол)
МПБ – м'ясо- пептонний бульйон.	ХТ – хронічний тонзиліт
МПА – м'ясо- пептонний агар.	MRSA – метицилін- резистентний <i>Staphylococcus aureus</i>
ЖСА – жовтково-сольовий агар.	МПК – мінімальна пригнічуюча концентрація
ДДМ – диско-дифузійний метод.	VRSA – ванкоміцин- резистентний <i>Staphylococcus aureus</i>
ЗПР – зона пригнічення росту.	VISA – <i>Staphylococcus aureus</i> зі зниженою чутливістю до ванкоміцину
КУО – колонієутворюючі одиниці.	
МК – мінімальна інгібуюча концентрація препарату.	
ПС – поживне середовище.	
ПА – поживний агар.	
ОХ – оксацилін .	
АХ – амоксицилін.	
GM – гентаміцин.	
MER – меропенем.	
OFX – офлоксацин.	
РТХ – потентокс.	
DX – доксициклін.	
CZ – цефазолін.	
СТХ – цефотаксим.	
CIP – ципрофлоксацин.	

ВСТУП

Відомо, що представники роду *Staphylococcus* від природи мають досить високий рівень чутливості до антибактеріальних препаратів (наприклад, бета-лактамів, аміноглікозидів, фторхінолонів, макролідів, лінкозамідів, глікопептидів, рифампіцину). Проте у багатьох випадках лікування стафілококової інфекції перетворюється на серйозну проблему, яка виникає через утворення антибіотикорезистентності. Таким чином, в сучасних умовах боротьба зі стафілококовою інфекцією і проблема резистентності до антибактеріальних препаратів постають досить гостро. Значення *S. aureus* зросло за останні роки не стільки внаслідок їхньої широкої розповсюдженості, а внаслідок поширення у них рівня стійкості до антибіотиків. Літературні дані свідчать про збільшення поширення у хворих різних категорій стафілококових штамів, які набули резистентності до антибактеріальних препаратів пеніцилінового ряду, макролідів, аміноглікозидів, цефалоспоринів тощо. Метицилінрезистентні штами *S. aureus*, що все частіше провокують виникнення гнійно-запальних захворювань в таких умовах найбільше турбують лікарів-клініцистів.

Матеріалом даної роботи були результати досліджень штамів *S. aureus*, що були виділені від дорослих, віком 18-55 років з попереднім діагнозом «хронічний тонзиліт у стадії загострення», на чутливість до 16 антибіотиків за допомогою диско-дифузного методу впродовж 2016-2019 років. Для кожного з антибіотиків фіксувався діаметр зони пригнічення росту. Чим більшим є цей діаметр, тим більшою є чутливість штаму до АБП і навпаки. Діаметр зони пригнічення дає підстави для віднесення штаму до однієї з трьох категорій: резистентний (Р), помірно стійкий (П), чутливий (Ч).

Об'єкт: 27 штамів *Staphylococcus aureus*, виділених від дорослих, віком 18-55 років з попереднім діагнозом «хронічний тонзиліт у стадії загострення».

Предмет: чутливість зазначених штамів до антибіотиків.

Мета: дослідити різниці у чутливості до антибіотиків та змін чутливості в часі між штамами *S. aureus* виділеними впродовж 2016-2019 рр.

Завдання:

Порівняти зазначені групи штамів за:

- 1) діаметром зон пригнічень до 16 поширених антибіотиків;
- 2) співвідношенням Р, П і Ч штамів;
- 3) резистентністю до антибіотиків;
- 4) тенденціями змін у чутливості.
- 5) Встановити кластери множинної стійкості.

Робота складається зі списку скорочень, вступу, чотирьох розділів, висновків, списку використаних джерел, містить чотири таблиці, шість рисунків, обсяг – 60 сторінок.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. *Staphylococcus aureus* як важливий патоген людини

Рід *Staphylococcus* належить до родини *Micrococcaceae* і охоплює кулясті нерухомі аспорогенні грампозитивні факультативно-анаеробні бактерії. У визначнику бактерій Д. Берджі [11] наведені дані про диференціальні ознаки 29 видів стафілококів. Ці види утворюють дві групи: коагулазопозитивні й коагулазонегативні. До першої групи належать такі види як *S. aureus*, *S. intermedius* і *S. hyicus*. Вони мають різне значення для інфекційної патології. Найбільш часто різноманітні захворювання у людей спричиняє *S. aureus*, набагато рідше – *S. hyicus*.

Коагулазонегативні стафілококи впродовж багатьох років вважалися за непатогенними, але сьогодні ця точка зору змінилася. Через погіршення в більшості країн екологічної ситуації та пов'язаним з нею зниженням природного імунітету почастишали випадки гнійно-септичних уражень тканин і органів, що викликані коагулазонегативними видами: *S. epidermidis*, *S. auricularis*, *S. capitis*, *S. cohnii*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. lentus*, *S. saprophyticus*, *S. schleiferi*, *S. simulans*, *S. warneri*, *S. xylosus* та ін., які зустрічаються на шкірі та слизових оболонках людини [43].

Стафілококи невибагливі до живильних середовищ і добре ростуть на звичайних, так званих “універсальних” середовищах. На м'ясо-пептонному агарі (МПА) вони формують колонії правильної круглої форми. Колонії опуклі, непрозорі, мають гладеньку, блискучу, начебто поліровану поверхню, забарвлені в залежності від кольору пігменту у золотистий, лимонно-жовтий, палевий, або білий кольори. На кров'яному агарі довкола колоній спостерігається зона гемолізу. При культивуванні у м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ) вони викликають помутніння й утворення осаду на дні. Стафілококи

гарно переносять підвищені концентрації кухарської солі. Тому у бактеріологічних лабораторіях їх часто вирощують на середовищах із вмістом NaCl 7-10 %. Таку високу концентрацію солі більшість бактерій, що утворюють мікробіом людини, не витримують. Таким чином, сольовий агар є селективним середовищем для стафілококів.

Стафілококи, особливо *Staphylococcus aureus*, виділяють багато екзотоксинів і агресинів (ферментів), які мають важливе значення для розвитку стафілококових інфекцій. Ці токсини є досить складними. Описано багато гемотоксинів, лейкоцидинів, некротоксинів, летальних токсинів. Наприклад, альфа-, бета-, гама- і дельта-гемолізени спричиняють гемоліз еритроцитів людини і багатьох видів тварин. Лейкоцидини у значних концентраціях руйнують лейкоцити, макрофаги та інші клітини імунної системи, а в менших концентраціях пригнічують їх фагоцитарну функцію. Некротоксин спричиняє некроз шкіри, а летальний токсин при парентеральному введенні — майже миттєву загибель. Також золотисті стафілококи виділяють ексфоліатини, які зумовлюють пухирчатку новонароджених і імпетиго у дітей. Окремі види здатні виділяти ентеротоксини, які через специфічний вплив на ентероцити кишковика призводять до виникнення харчових токсикоінфекцій та ентероколітів. Ентеротоксини є порівняно простими білками, на сьогодні описано шість їх різновидів (A, B, C, D, E, F).

Останніми роками дискутується питання про класифікацію категорії патогенності стафілококів. Деякі вчені вважають їх за умовно-патогенних бактерій, інші — досить переконливо аргументують, що вони є просто патогенними, бо непатогенних стафілококів не існує. Серед епідеміологів, мікробіологів і клініцистів досить поширене переконання, що сьогодні непатогенних стафілококів не існує. З цим переконанням узгоджується той факт, що частішають випадки виділення із крові, та інших тканин і органів

людини штамів стафілококів позбавлених будь-яких відомих маркерів патогенності, тим не менш, при елімінації їх з організму зникають також симптоми захворювання.

Усю цю інформацію необхідно враховувати при проведенні лабораторної діагностики стафілококових інфекцій. На жаль, у звичайних бактеріологічних лабораторіях нашої країни поки що можлива ідентифікація лише таких видів стафілококів як *S. aureus*, *S. epidermidis* і *S. saprophyticus*.

Стафілококи найчастіше уражають шкіру, її придатки та підшкірну клітковину. Вони викликають фурункули, карбункули, панариції, пароніхії, абсцеси, флегмони, мастити, лімфаденіти, нагноєння ран, в тому числі й операційних. У дітей стафілококи викликають стафілодермії, епідемічні пухирчатки, імпетиго. Їх виділяють при плевритах, бронхітах, пневмоніях, перитонітах. Також вони можуть спричинити ангіни, тонзиліти, гайморити, отити, кон'юнктивіти, дещо рідше – менінгіти, абсцеси мозку, міокардити, ендокардити, артрити, інфекції судинних протезів. Дуже небезпечні харчові токсикоінфекції, ентероколіти, холецистити, цистити, пієліти, пієлонефрити. При проникненні стафілококів у кров або кістковий мозок вони викликають сепсис, остеомієліт, синдром токсичного шоку. Проте всі захворювання зі стафілококовою етіологією не розглядаються як гострозаразні [40].

Staphylococcus aureus може безсимптомно розмножуватися на шкірі, слизових оболонках, у пазухах носа, на волоссі та нігтях якщо імунна система хазяїна є досить сильною. Якщо ж імунна система послаблюється, рівновага порушується і стафілококи перетворюються на небезпечних представників нашої мікрофлори. Стафілокок відповідальний за безліч хвороб; важко назвати орган чи тканину, яку б цей мікроб “обділив увагою”. На шкірі і в м'яких тканинах він викликає так званий синдром лущення шкіри і целюліт, які є найчастішими інфекційними хворобами шкіри. Салони краси чомусь намагаються лікувати целюліт масажами та іншими приємними процедурами,

що не мають відношення до терапії інфекційних хвороб [38]. Дихальним шляхам загрожує некротизуюча пневмонія, очам – кон'юктивіти і енд офтальміти, серцю – ендокардит і перикардит, опорно-руховому апарату – остеомієліт та інфекційний артрит. Стафілококи, розмножуючись у харчових продуктах, у тому числі в тих, що «не псуються», таких як твердий сир і сальмі, можуть викликати харчові отруєння. *S. aureus* виділяє токсини, які є найчастішою причиною серйозних харчових отруєнь, також і через той факт, що при термічній обробці стафілокок гине, але його токсини не руйнуються.

За даними ВООЗ, стафілокок золотистий є першим у списку бактерій, що є причиною зараження в медичних установах (є й така статистика: не завжди в лікарнях все стерильно). Більш того, це стосується і розвинених країн, а не тільки відсталих. У лікарнях країни найліпшого у світі медичного обслуговування – у США – відстежується більше ста тисяч випадків інфікування стафілококом на рік, багато з яких закінчуються летально. У медичних установах Франції не вдається стовідсотково контролювати поширення інфекцій, викликаних стійкими до антибіотиків штамми, більшість з яких – штамми золотистого стафілокока. Найчастіше стафілокок золотистий вражає пацієнтів, що мають ослаблений імунітет (наприклад, хворих на СНІД), а також тих, у кого імунітет штучно пригнічений для виконання трансплантацій або для встановлення імплантатів (такі люди не можуть уникнути перебування у лікарнях) [41]. Фактором ризику також є і штучна вентиляція легенів.

Інфікування стафілококом може так само відбуватися при порушенні звичайних правил гігієни в лікарнях. Високий ризик інфікування стафілококом при використанні внутрішньовенних катетерів та інших медичних приладів, що контактують з внутрішнім середовищем організму, наприклад, при внутрішньовенному харчуванні недоношених дітей або при гемодіалізі (штучному очищенні крові спеціальним апаратом, який заміщує роботу нирок) Всього на стафілокок золотистий припадає 31% усіх випадків інфекцій,

надбаних у госпіталях. Але, якщо випадки інфікування в лікарнях хоча б реєструються, то залишається тільки здогадуватися, яка кількість людей заражаються при проведенні хірургічних маніпуляцій у немедичних закладах, наприклад, у татуажних і косметологічних салонах, під час проколювання вух, пірсингу, нанесення тату... Ін'єкційні наркомани, безперечно, також відносяться до групи ризику щодо інфікування золотистим стафілококом [1].

1.2. Біологія *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus, виявлений Р. Кохом, виділений з гною фурункула Л. Пастером у 1880 році, детально описав властивості Ф. Розенбах.

Стафілокок золотистий (*Staphylococcus aureus*) – грампозитивна бактерія роду *Staphylococcus*, сферичної форми, діаметром 0,5-0,3 мкм. Стафілококи діляться безладно в кількох площинах, утворюючи скупчення у вигляді виноградного грона. Нерухомі, не утворюють спор та капсул, іноді трансформуються в L-форми [38].

Стафілококи грампозитивні, нерухливі, не утворюють спор, окремі види в організмі мають ніжку капсулу. До складу клітинної стінки входять пептидоглікан (муреїн) і тейхоеві кислоти. Стафілококи мають типову правильну круглу форму, розмір 0,5 - 1,5 мкм. У мазках мають вигляд неправильних скупчень, які нагадують грона винограду. При виготовленні мазків з гною не завжди спостерігається типове розташування клітин. Стафілококи є факультативними анаеробами але краще ростуть за аеробних умов. Вони є не дуже вибагливими до поживних середовищ, добре культивуються на простих середовищах. На м'ясо-пептонному агарі їхні колонії мають правильну, круглу форму, є опуклими і непрозорими, мають гладеньку, блискучу, ніби поліровану поверхню. У залежності від кольору пігменту, мають золотистий, палевий, білий, лимонно-жовтий колір. На кров'яному агарі колонії оточені зоною гемолізу. У МПБ викликають

помутніння й осад на дні.

Стафілококи продукують протеолітичні й сахаролітичні ферменти. Вони розріджують желатин, ферментують деякі вуглеводи із виділенням кислот, викликають зсідання молока, [39].

Як вже зазначалося, за типом дихання золотистий стафілокок належить до факультативних анаеробів; при вирощуванні в аеробних умовах має потребу в амінокислотах і вітамінах, а в анаеробних – в урацилі та вуглеводах. Стафілококи здатні до росту на простих живильних середовищах (при температурі від 15 до 40° С) і утворюють великі непрозорі білі, кремові або масляно-жовті колонії при 25°С, 1-3 мм в діаметрі протягом 24 годин і діаметром 3-8 мм при культивуванні протягом 3 днів в аеробних умовах. Це значно спрощує мікробіологічну діагностику і інші процедури, пов'язані із культивуванням бактерій. Вони достатньо просто вирощуються на МПБ і МПА при рН 7,0-7,2. Як вже зазначалося, добре, на відміну від багатьох інших бактерій, ростуть на живильних середовищах, в яких міститься 15%-вий розчин NaCl, тобто є представниками галофільних (солестійких) бактерій, тому елективними для стафілококів є поживні середовища з підвищеним вмістом NaCl: жовтково-сольовий агар ((ЖСА), молочно-сольовий агар (МЖСА), молочно-жовтково-сольовий агар (МЖСА). На жовтково-сольовому агарі патогенні стафілококи формують колонії, оточені райдужним віночком через розкладання лецитину яєчного жовтка з допомогою ферменту лецитинази. При культивуванні у МПБ золотисті стафілококи викликають дифузійне помутніння [10].

Стафілококи мають високу біохімічну активність: вони ферментують в аеробних умовах багато вуглеводів до оцтової кислоти без газу. На кров'яному агарі золотистий стафілокок формує колонії, що оточені вираженою зоною гемолізу, епідермальний стафілокок зон гемолізу не утворює.

Зокрема, *S. aureus* розкладає до кислоти глюкозу, сахарозу, лактозу, маніт

і не ферментує мальтозу.

Різні види стафілококів ферментують різний спектр вуглеводів.

Диференціально-діагностичним є тест на зброджування глюкози в анаеробних умовах. Ферментація глюкози в анаеробних умовах з утворенням молочної кислоти характерна для стафілококів і відрізняє їх від стрептококів. Для проведення цього тесту використовують готове середовище з індикатором ВР (водорозчинним блакитним) або середовище Х'ю-Лейфсона з індикатором бромтимоловим синім. Вихідне середовище має ліловий (середовище з індикатором ВР) або зелений (середовище Х'ю-Лейфсона) колір. Аеробні бактерії окислюють глюкозу, тобто утворюють кислоту тільки в середовищі без вазелінового масла.

Анаеробні бактерії ферментують глюкозу, тобто утворюють кислоту тільки в середовищі з вазеліновим маслом. Факультативні анаероби, до яких відноситься золотистий стафілокок, утилізують глюкозу в аеробних і анаеробних умовах.

Посів здійснюють уколом в стовпчик живильного середовища в дві пробірки. Після посіву для створення анаеробних умов середовища в одній з пробірок заливають шаром стерильного вазелінового масла. Культивування проводять протягом 3-4 діб.

Утворення кислоти призводить до жовтого фарбування стовпчика середовища.

Стафілококи розріджують желатин у вигляді воронки, білки розщеплюють до аміаку і сірководню, не утворюють індолу.

Патогенні види стафілококів (зокрема, *S. aureus*) продукують плазмокоагулазу (коагулазопозитивні) і фібринолізин. *S. epidermidis* і *S. saprophyticus* не продукують плазмокоагулазу (коагулазонегативні).

Щоб виявити плазмокоагулазу і фібринолізин, до пробірки з плазмою крові кролика вносять досліджувану культуру і інкубують протягом доби за

температурою 360 С. За позитивної реакції утворюється щільний згусток.

Для виявлення фібринолітичної активності пробірку зі згустком залишають в термостаті ще на добу. За наявності фібринолізину згусток розріджується. Останніми роками в матеріалі від хворих все частіше виявляються коагулазонегативні стафілококи, що вважалися раніше непатогенними бактеріями [49].

1.3. Патогенність *Staphylococcus aureus*

Патогенний потенціал багатьох збудників залежить як від властивостей, притаманних конкретному мікроорганізму, так і від стану факторів захисту організму-господаря. В залежності від характеру даних взаємовідносин всі мікроорганізми поділяють на патогенні, умовно-патогенні і не патогенні (за класифікацією Х. Гроса). Патогенні стафілококи мають високий ступінь летальності (загибелі) для клітин крові; умовно-патогенні стафілококи здатні викликати незначний запальний процес у вигляді гіперемії (почервоніння) і інфільтрації (ущільнення); непатогенні, або сапрофіти (мешканці поверхні шкіри і зовнішнього середовища), практично не викликають захворювань. Дана класифікація є умовною, бо патогенні прояви стафілококів залежать не тільки від їх біологічних властивостей, але і від стану організму людини, його стійкості і реактивності. *S. aureus* грає ключову роль в інфекційній патології тварин і людини. Збудниками стафілококових інфекцій можуть бути також *S. epidermidis* і *S. saprophyticus*. Пігментоутворення і розщеплення вуглеводів не є критеріями патогенності стафілококів. Найголовнішими факторами, що визначають патогенність збудника є мікрокапсула, компоненти клітинної стінки, ферменти і токсичні субстанції.

Мікрокапсула захищає бактерії від комплемент-опосередкованого поглинання поліморфноядерними фагоцитами, сприяє адгезії мікроорганізмів і їх розповсюдженню в тканинах. При вирощуванні *in vitro* вона зазвичай не

утворюється.

Компоненти клітинної стінки стимулюють розвиток запальних реакцій: підсилюють синтез ІЛ-1 макрофагами, активують систему комплементу і є потужними хемоатрактантами для нейтрофілів [42].

Одним з найбільш патогенних екзотоксинів, що викликає некроз і навіть апоптоз клітин макроорганізму, є альфа-токсин, який продукується у вигляді мономера, а потім накопичується на клітинних поверхнях з формуванням гептамерної пористої структури (мембранного каналу), що сприяє лізису клітин [19].

До інших властивостей, що часто пов'язані з патогенністю золотистого стафілокока (але не обов'язково є її причиною), є здатність ферментувати манітол, наявність кислої фосфатази, бета-лактамази (пеніцилінази), протеази, гіалуронідази, лізоциму, каталази і ДНКаз, а також наявність білка А (в клітинній стінці), який з'єднується з Fc-фрагментом IgG і перешкоджає фагоцитозу і руйнує комплемент. Наявні у золотистих стафілококів ферменти ліпази, що гідролізують жири, дозволяють їм проникати в шкіру та підшкірні тканини шляхом розщеплення присутніх в шкірі жирів. Гіалуронідаза є ферментом, що розщеплює муцин і гідролізує гіалуронову кислоту, яка є у сполучній тканині і, таким чином, сприяє розширенню зони дії стафілококів. Стафілокіназу (фібринолізин) можуть продукувати кілька штамів золотистого стафілокока, цей фермент розщеплює фібрин і сприяє поширенню бактерій з локального вогнища [43].

Стафілококові токсини за їхньою біологічною активністю поділяють на 3 групи: цитолітичні токсини (які включають гемолізін і лейкоцідін); ентеротоксин (що викликає гострий гастроентерит) та ексфоліативний токсин (епідермолітичний екзотоксин, що дає так званий синдром «ошпареної шкіри»).

Стафілококами продукуються 4 гемолізину (альфа-, бета-, гамма- і дельтатоксини). Найбільш патогенним з екзотоксинів, що викликає некроз і

навіть апоптоз клітин макроорганізму, є альфа-токсин, який продукується у вигляді мономера, він формує на клітинних поверхнях гептамерну пористу структуру (мембранний канал), що сприяє лізису клітин [44].

Рибіт-тейхоєва кислота (полісахарид А) є компонентом клітинної стінки стафілококів, ковалентно зв'язаним з муреїном, який пригнічує фагоцитоз. Полісахарид В був виявлений у невірулентних непатогенних штамів. Інтегрований білок А є компонентом клітинної стінки, також ковалентно з'єднаним із пептидогліканом. Він побудований з одного поліпептидного ланцюга, і є унікальним для золотистого стафілокока, його особливістю є здатність зв'язуватися з Fc-фрагментом IgG і позаклітинним матричним глікопротеїном. Білок А бере участь у адгезії бактерій і пригнічує фагоцитоз. Зв'язана коагулаза є ферментом клітинної стінки з антигенними властивостями, хоча ж зв'язок її з вірулентністю стафілококів не виявлено. Цей фермент каталізує перетворення фібриногену плазми у фібрин за присутності кофактора (протромбіну або його похідних), внаслідок чого в крові утворюються згустки. Вільний білок А виробляється і секретується золотистими стафілококами під час їх росту і розмноження. Подібно зв'язаному білку А, він сприяє адгезії мікроорганізмів до поверхонь і пригнічує фагоцитоз [45].

Фактори патогенності золотистого стафілокока детермінуються не тільки хромосомними генами, а й генами профагів, геном яких інтегрується із хромосомою хазяїна (9NM1, 9NM2, 9NM3, 9NM4) і генами автономних плазмід. Гени, що визначають патогенність стафілококів, згруповані в “острови патогенності”. Найбільш повний набір цих факторів патогенності є у штамів золотистого стафілококу. Штами інших видів стафілококів можуть мати лише деякі з цих факторів патогенності. Фактори патогенності стафілококів за функцією можна поділити на наступні групи:

1. Фактори, що забезпечують адгезію стафілококів (клампінг-фактор тейхоєві кислоти, капсула та ін.).

2. Фактори, що сприяють розповсюдженню стафілококів по тканинах організму (гіалуронідаза, стійкість до жирних кислот).
3. Фактори з токсичною функцією (токсини).
4. Фактори, що перешкоджають фагоцитозу (полісахаридна капсула, білок А).
5. Фактори, що інактивують захисні системи організму (фактори з антилізоцимною, антиінтерференовою, антикомплементарною, антикарнозиною, антилактоферриною, антигемоглобиною активностями) [49].

Лейкоцидин є екзотоксином, що сприяє виживанню стафілококів в макроорганізмі (руйнує поліморфноядерні лейкоцити). Він складається з двох фракцій: S і F, токсичних тільки разом, а не поодиночі.

Існує 6 антигенних типів стафілококового ентеротоксину (А, В, С1, С2, D і Е). Молекули ентеротоксинів А, В і D, які продукує більшість золотистих стафілококів, є термостабільними білками, здатними витримувати кип'ятіння протягом 30 хвилин. Синтез ентеротоксинів зумовлений генами плазмід або хромосомними генами. Ентеротоксини А і D викликають харчові отруєння через пригнічення функції всмоктування води товстим кишковиком з наступним розвитком діареї та подразненням рецепторів, що спричиняє блювоту. Пірогенний екзотоксин С (синонім – ентеротоксин F) є білком, який продукується не тільки штамами золотистого стафілокока і викликає розвиток синдрому токсичного шоку [2].

1.4. Хронічний тонзиліт і *Staphylococcus aureus*

Хронічний тонзиліт – це хронічне захворювання. Воно перебігає з загостреннями, запаленням піднебінних мигдалин (гланд) в результаті частих ангін. Хворі скаржаться на біль при ковтанні, першіння в горлі, неприємний запах з рота, збільшення і болючість підщелепних лімфовузлів. Хронічним

тонзилітам (ХТ) належить одне з провідних місць в структурі загальної ЛОР-захворюваності. За літературними даними, від 2 до 15 відсотків усього населення хворіє на хронічний тонзиліт [1-5]. Хронічний тонзиліт небезпечний метатонзиллярними ускладненнями з боку різних органів і систем, які в умовах збільшення захворюваності призводять до ранньої інвалідизації працездатного населення. Таким чином, тонзиллярна проблема набула велику актуальність і соціальну значущість і привертає увагу не тільки отоларингологів, а й інших медиків: інфекціоністів, педіатрів, терапевтів, ревматологів, імунологів і мікробіологів. Труднощі в лікуванні ХТ обумовлені різноманіттям етіопатогенетичних механізмів його розвитку, тому одним з актуальних питань практичної медицини є оптимізація лікування ХТ у стадії загострення. В Україні показник захворюваності на ХТ сягає 1260 осіб на 10 тис. населення. Згідно зі статистичними даними впродовж останніх 8-10 років кількість хворих на ХТ збільшується, також через той факт, що приблизно 75% дітей, що страждали на ХТ, продовжують хворіти й у дорослому віці. Домінуючим бактеріальним чинником хронічного тонзиліту найчастіше є золотистий стафілокок [36].

S. aureus, створюючи хронічне вогнище інфекції в організмі, знижує імунітет і може викликати розвиток різних хвороб: пієлонефриту, інфекційного ендокардиту, ревматизму, поліартриту, аднекситу, простатиту, безпліддя та ін. Піднебінні мигдалики, а також інші лімфоїдні утворення глоткового кільця, захищають організм від хвороботворних мікробів, що проникають разом з повітрям, водою та їжею. За певних обставин бактерії викликають в мигдаликах гостре запалення, ангіну. В результаті ангін, що повторюються, може розвинути хронічний тонзиліт. В окремих випадках (близько 3% від усієї кількості хворих) хронічний тонзиліт є первинно-хронічним захворюванням, тобто виникає без попередніх ангін [37]. Специфічний хронічний тонзиліт являє собою ураження мигдалин з утворенням інфекційних гранульом при

туберкульозі, сифілісі, склеромі й належить до цих нозологій. Хронічний неспецифічний тонзиліт – інфекційно-алергійне захворювання з місцевими проявами у вигляді стійкої запальної реакції піднебінних мигдаликів. Ця реакція морфологічно виражається альтерацією, ексудацією та проліферацією.

Проблема хронічного тонзиліту продовжує залишатися актуальною і в наш час. Вона перетворилася із суто оториноларингологічної на клініко-імунологічну, навіть загальнобіологічну проблему. Це пов'язано не тільки із широким розповсюдженням цього захворювання. Важливим моментом є набуття нових знань про функції, що виконують піднебінні мигдалики в організмі, а також формуванням нових уявлень про патогенез хвороби [12].

Розрізняють специфічний та неспецифічний хронічний тонзиліт. Хронічний неспецифічний тонзиліт є мультидисциплінарною проблемою клінічної медицини й має важливе значення в клініці внутрішніх та дитячих хвороб. Актуальність цієї проблеми зумовлена передусім високою частотою захворюваності. Із хронічним тонзилітом пов'язане також виникнення і погіршення перебігу багатьох захворювань, насамперед серцево-судинної системи, нирок, суглобів і інших.

Розглядаючи патогенез хронічного тонзиліту, необхідно зупинитися на деяких аспектах анатомії та фізіології лімфаденоїдного глоткового кільця. До лімфаденоїдного глоткового кільця належать піднебінні мигдалики, тканини яких є субстратом для хронічного тонзиліту. Лімфаденоїдне глоткове кільце представлене: 1) значними скупченнями лімфаденоїдної тканини (мигдаликами), 2) її невеликими острівцями та тяжами, розташованими в глотці, гортані, порожнині носа. Піднебінні, глотковий, язиковий та трубні мигдалики – є найбільш значними та постійними компонентами лімфаденоїдного глоткового кільця. Всі скупчення лімфаденоїдної тканини в глотці щільно пов'язані між собою. Для лімфоепітеліальних утворень є характерним розташування на межі зовнішнього та внутрішнього середовищ.

Всі ці утворення складають так званий “лімфоепітеліальний комплекс” або MALT (mucosal associated lymphoid tissue), це лімфоїдна тканина, асоційована зі слизовою оболонкою. До лімфоепітеліальних утворень відносять також пейєрові бляшки, солітарні фолікули та апендикс.

Мигдалики є вхідними воротами для мікробних агентів і забезпечують первинний контакт антигену з лімфоцитами, через них імунокомпетентні органи отримують інформацію щодо антигенів, що потрапляють до організму при диханні та харчуванні.

У мигдалику розрізняють верхній та нижній полюси, зовнішню та внутрішню поверхні. Внутрішня поверхня мигдалика повернена до ротової порожнини, тут є отвори, що ведуть у сліпі канали – лакуни або крипти, яких зазвичай 12-20, це вузькі, довгі, звивисті щілини, напрямок і величина яких дуже мінливі. Вміст лакун в нормі довго не затримується й постійно поновлюється, він є джерелом антигенної інформації. Через велику глибину та звивистість крипт їхній вміст може гнити та затримуватися, що може бути причиною утворення ретенційних кіст, вони стають вогнищем латентної інфекції. За хронічного запалення мигдаликів устя крипт, що мають різну форму і розмір, часто розширюються [48].

Хронічний тонзиліт буває простим (компенсованим) і токсико-алергічним (декомпенсованим). Для простої форми хронічного тонзиліту характерні місцеві ознаки запалення (краї дужок набряклі і потовщені, в лакунах спостерігається рідкий гній або гнійні пробки). Може бути збільшення регіонарних лімфовузлів. При токсико-алергічній формі окрім місцевих ознак запалення є загальні токсико-алергічні прояви: швидка стомлюваність, періодичні нездужання і незначні підвищення температури, час від часу болі в суглобах, при загостренні хронічного тонзиліту – болі в області серця при нормальній ЕКГ. Періоди відновлення респіраторних захворювань тривалі і затяжні. Можуть виникати функціональні порушення діяльності серця

(порушення серцевого ритму, тривалий субфебрилітет) відповідно зі зміною картини ЕКГ. Також спостерігаються функціональні порушення в суглобах, судинній системі, печінці і нирках. Приєднуються тонзилогенний сепсис, загальні вади серця, інфекційні артрити, ревматизм, ряд хвороб щитовидної та передміхурової залози, сечової системи, а також супутні місцеві захворювання: паратонзиллярні абсцеси, парафарингіт, фарингіт.

Підставою для виставлення діагнозу хронічного тонзиліту є повторюваність ангін, дані огляду отоларинголога, а також додаткові дослідження: фарингоскопія та бактеріологічний посів матеріалу із зіву [15].

1.5. Антибіотикорезистентність *Staphylococcus aureus*

Відкриття пеніциліну стало початком ери антибіотиків, яка добігла у теперішні дні критичного стану. Основною причиною є вражаюча швидкість виникнення і поширення резистентності мікроорганізмів до АБП. У 2011 році ВООЗ визнала, що таке небачене підвищення стійкості мікроорганізмів до АБП загрожує основам охорони здоров'я в усьому світі і визначила боротьбу з антибіотикорезистентністю мікроорганізмів як своє головне завдання [12].

Причин швидкого поширення резистентності мікроорганізмів є кілька, вони як медичні, так і соціально-економічні. Це необгрунтоване й нераціональне застосування сильнодіючих антибіотиків, у тому числі і широкого спектру, їх доступність у продажу, часте використання в сільському господарстві й ветеринарії, низький, а в деяких місцях відсутній інфекційний контроль, недооцінка ситуації медичними працівниками їхня недостатня поінформованість. Медики у всьому світі часто прописували їх без належних підстав, наприклад, при звичайному підвищенні температури, або при вірусних інфекціях, на які антибактеріальні препарати не діють. В результаті, зі 115 основних антибіотиків 68 вже втратили свою ефективність. Особливо загрозовою є ситуація з лікуванням дітей, для лікування котрих загалом можна

застосовувати тільки 10% від наявного арсеналу антибіотиків.

Сучасна ситуація є результатом того, що на початку 1970-х років у лікарів виникла впевненість, що за допомогою ефективних антимікробних препаратів можна перемогти практично всі бактеріальні інфекції. Проте їхній оптимізм поступово згасав, коли виявилось, що у багатьох бактерій, зокрема у *Staphylococcus aureus*, росте резистентність до цілого спектру антибіотиків. Мультирезистентність золотистого стафілокока становить тепер серйозну проблему для практичних лікарів [39]. Це пов'язано із тим, що *Staphylococcus aureus* через сильну спроможність викликати різноманітні, загрозливі життю інфекції, високу вірулентність, та унікальну здатність адаптуватися є одним із найскладніших патогенів сучасності. Золотистий стафілокок нерідко присутній на шкірі та в носі, не викликаючи при цьому жодних захворювань. Однак нерідко він стає причиною серйозних інфекцій і навіть смерті пацієнта.

Резистентність стафілококів до АБП сприяє їх персистенції в умовах лікарні. Більше ніж 90% госпітальних і побутових штамів золотистого стафілокока, що викликають інфекцію, мають резистентність до пеніциліну. Вона обумовлена β -лактамазами, які звичайно продукуються за допомогою генів плазмід. Незабаром після впровадження в практику АБП, стійких до пеніциліназ, спочатку в Європі й Скандинавії були виділені так звані метицилін-резистентні золотисті стафілококи. Вони резистентні до усіх β -лактамних антибактеріальних препаратів а також і до цефалоспоринів. Причому результати стандартного тесту за допомогою диско-дифузного метода можуть вказувати на чутливість до останнього [46].

Стафілококи є лише відносно стійкими мікроорганізмами. Прямі сонячні промені вбивають їх протягом декількох годин. У пилу стафілококи зберігаються 50-100 днів і добре переносять висушування. У гною можуть виживати до 200 днів. У рідких середовищах при нагріванні до 70-80 °C гинуть через 20-30 хв., при 100 °C – за кілька секунд, сухий жар вбиває їх протягом 2

годин. Формалін, 1-2% розчин гідроксиду натрію інактивують стафілококів протягом однієї години, 1% розчин хлораміна – за 2-5 хв. Абсолютний алкоголь не діє на стафілококів, проте 50% його розчин знищує їх за 10 хв. Стафілококи чутливі до ряду фарбників, зокрема кристалічного фіолетового, малахітового зеленого та інших [50].

Більше 90% госпітальних і побутових штамів золотистого стафілокока, що викликають інфекцію, мають резистентність до пеніциліну. Резистентність стафілококів до АБП сприяє їх персистенції в умовах лікарні. Стійкість до пеніциліну обумовлена β -лактамазами, які звичайно продукуються за допомогою плазмід. Стійкість до метициліну (оксациліну) є більш новою ознакою. Вона утворилася через набуття додаткового пеніцилінзв'язуючого білка 2А (ПЗБ2А), який має знижену афінність до бета-лактамних антибіотиків. Білок ПЗБ2А кодується геном *mecA*, що входить до складу мобільного генетичного елемента, так званої “стафілококової хромосомної касети *mec*”, походження якої ще не з'ясовано. Це значною мірою звужує коло антибактеріальних препаратів для лікування інфекцій, викликаних метицилін-резистентними штамми, для яких характерною є висока частота асоційованої стійкості не лише до бета-лактамних антибіотиків, але і до макролідів, тетрациклінів, аміноглікозидів, фторхінолонів, хлорамфеніколу [31].

Резистентність стафілококів до оксациліну (метициліну) може бути зумовлена трьома основними механізмами:

1. наявністю додаткового пеніцилін-стійкого білка ПДБ-2А. ПДБ-2А — фермент, що бере участь у синтезі клітинної стінки, його кодує хромосомний ген *mecA*. Це класична, або істинна резистентність до метициліну (оксациліну);
2. інактивацією метициліну внаслідок гіперпродукції β -лактамаз;
3. модифікацію нормальних ПДБ.

З клінічної точки зору, важливо розрізняти штами з класичною,

обумовленою *tesA* резистентністю, від штамів з двома іншими механізмами резистентності, зустрічність яких є незначною і які зумовлюють низький або граничний рівень стійкості. При інфекціях, викликаних штамми з *tesA*-обумовленою резистентністю, терапія β -лактамами антибіотиками такими як пеніцилінами, цефалоспоринами, карбапенемами, буде неефективною. Крім того, ці штамми часто бувають резистентні практично до усіх інших класів антибіотиків за винятком глікопептидів (ванкоміцин, тейкопланін) [11]. В цьому дослідженні серед штамів *S. aureus* було 57,14% штамів, резистентних до оксациліну, 58,93% — до ванкоміцину. Це підтверджує існування серед госпітальної групи штамів стафілококів метицилін- та ванкоміцинрезистентних штамів. Це може досить сильно впливати на вибір антибіотикотерапії для досягнення максимального антимікробного терапевтичного ефекту.

Дослідження клінічних штамів *S. aureus* показало, що застосування ампіциліну, захищеного сульбактамом, не зможе забезпечити достатнього терапевтичного ефекту, стійкість до цього препарату виявляли у 25% штамів, 64% показали помірну резистентність. Визначення чутливості *S. aureus* до уреїдопеніцилінів, комбінованих із азобактамом, продемонструвало помірний антимікробний ефект: чутливими виявилися 75% досліджуваних штамів, 19% — проявляли помірну резистентність.

Якщо йдеться про стафілококів, достатніми антибактеріальними властивостями володіють препарати цефалоспоринового ряду I (цефазолін), II (цефуроксим) і III поколінь (цефтріаксон, цефтазидим), що свідчить про можливість застосування цефалоспоринів у клінічній практиці як одного із засобів подолання антибіотикорезистентності *S. aureus*, зумовленої продукцією β -лактамаз. Активність цефалоспорину IV покоління, цефепіму виявилася недостатньою. Збереження чутливості *s. aureus* до карбапенемів (наприклад 88% є чутливими до меропенему) та рифампіцину дещо полегшує завдання вибору антибіотикотерапії.

Антибіотики, що належать до групи тетрациклінів і аміноглікозидів характеризуються низькою ефективністю щодо досліджених штамів *S. aureus* — приблизно 40% штамів є резистентними. Серед цієї групи антибактеріальних препаратів найвища чутливість спостерігається до аміноглікозидів II покоління, таких як гентаміцин (89). Стосовно макролідів спостерігається наступний рівень чутливості штамів *S. aureus*: кларитротроміцин і азитроміцин продемонстрували антимікробну активність у 71–79% випадків, а еритроміцин — лише у 32%.

Низький рівень резистентності серед досліджених клінічних штамів *S. aureus* виявлено до антибіотиків фторхінолонового ряду. Серед фторхінолонів найвищу протимікробну активність мають препарати IV покоління. Серед них до гатифлоксацину встановлено абсолютну чутливість у 92% досліджуваних штамів, помірну резистентність проявляли лише 7% штамів.

Фторхінолони IV покоління (моксифлоксацин), III покоління (левофлоксацин) та II покоління (ципрофлоксацин) також виявилися активними проти *S. aureus*. Резистентність до цих препаратів серед досліджуваних штамів не перевищувала 9%. Менш чутливими виявилися штами *S. aureus* до офлоксацину та ломефлоксацину [31].

Стафілококи є чутливими до більшості дезінфектантів. Вони також чутливі до анілінових барвників (фуксину, кристалічного фіолетовому, діамантовому зеленому) і йоду, що дозволяє використовувати ці препарати місцево для лікування стафілококових піодермій. Фуксин і діамантовий зелений входять також до складу селективних середовищ для виділення ентеробактерій (середовища Ендо, Плоскирева) в якості факторів, що пригнічують розвиток грампозитивних бактерій, у тому числі стафілококів.

На сьогодні відомі такі механізми стійкості стафілококів до оксациліну: а) класична оксацилінрезистентність пов'язана із продукцією ПЗБ2А, в межах цього типу виділяють гомогенний та гетерогенний типи прояву резистентності

клітин у популяції. Для госпітальних штамів, стійких за рахунок продукції ПЗБ2А, характерна стійкість як до бета-лактамів, так і до інших класів антибіотиків, а застосування інгібіторів бета-лактамаз не усуває стійкість штамів до бета-лактамів; б) оксацилінрезистентність обумовлена гіперпродукцією бета-лактамаз. Такі штами характеризуються відсутністю множинної резистентності до інших класів антибіотиків, застосування інгібіторів беталактамаз, наприклад, клавуланату, сульбактаму, має наслідком втрату стійкості до бета-лактамів; в) стійкість до оксациліну за рахунок продукції інших модифікованих пеніцилінзв'язуючих білків — вони не мають множинної стійкості до інших класів антибіотиків та перехресної стійкості до всіх бета-лактамів, проте інгібітори бета-лактамаз в даному випадку є неефективними [34].

Стафілококи не володіють від природи стійкістю до антибіотиків. Однак в наш час широкого поширення набули штами стафілококів, що володіють множинною стійкістю до антибіотиків (β -лактамів, еритроміцину, тетрациклінів, хлорамфеніколу та ін.). Стійкість до антибіотиків звичайно визначається генами, розташованими у бактеріальній хромосомі, що виникли у результаті мутацій, або у R-плазмідах, набутих у результаті генетичного перенесення. Особливої уваги потребують метицилін-резистентні штами стафілококів (MRS-штами), що реєструються як при внутрішньолікарняних випадках, так і при позалікарняних інфекціях. Серед метицилін-резистентних стафілококів найбільш поширені штами золотистого (MRSA) і епідермального (MRSE) стафілококів. Резистентність стафілококів до β -лактамних антибіотиків обумовлена присутністю гена *mecA*, який кодує пеніцилін-зв'язуючий білок. Ген *mecA* локалізований на мобільному генетичному елементі, стафілококової хромосомної касеті – *scsmec* [49].

Штами з класичним типом резистентності можуть у свою чергу бути гомогенними або гетерогенними за проявами стійкості. За гомогенним типом

експресії практично всі мікробні клітини виявляють резистентність в стандартних тестах *in vitro*, в той час як при гетерогенному типі лише незначна частина клітин володіє резистентністю. Звичайно лише 1 клітина на 10-100 млн. клітин в популяції, що несуть ген *mecA* демонструють резистентність, що обумовлює одержання граничних результатів при визначенні чутливості до оксациліну (МПК – 2-8 мг/л). Резистентність, обумовлена гіперпродукцією β -лактамаз і мутацією нормальних ПДБ, також приводить до отримання граничних значень МПК. Проте резистентність до оксациліну, обумовлена гіперпродукцією β -лактамаз, легко відрізняється від класичної резистентності за її оборотності при використанні інгібіторів β -лактамаз. На відміну від штамів з класичною резистентністю гіперпродуценти β -лактамаз і штами з мутаціями нормальних ПДБ зазвичай не мають множинної резистентності до інших антибіотиків [5].

Резистентність золотистого стафілокока до метициліну визначається генетично, а не зміною препарату під впливом ферментів. Це, можливо, обумовлено змінами білків стафілококів, чутливих до пеніциліну. Досить часто метицилін-резистентні золотисті стафілококи набувають плазмід резистентності R, що несуть комбіновану резистентність до еритроміцину, тетрацикліну, левоміцетину, ліндаміцину, аміноглікозидних антибіотиків.

Наявність класичної резистентності найбільш легко визначити методом скринінгу, так як зростання мікробних клітин з некласичними типами резистентності зазвичай пригнічується. Для визначення чутливості використовується оксацилін зважаючи на його більш високу стабільність при зберіганні в порівнянні з метициліном.

MRSA стафілококи усе ширше розповсюджуються у світі, особливо в консультативних клініках третього рівня. У США приблизно 5% золотистих стафілококів у лікарнях стійкі до метициліну. В третині з обстежених лікарень були зареєстровані випадки бактеріємії, викликані цими штамми

стафілокока. Інфекції, спричинені метицилін-резистентними штамми *Staphylococcus aureus* набагато складніші, бо такі штами бактерій резистентні також і до багатьох інших антибіотиків. Нині *Staphylococcus aureus* – провідна причина внутрішньолікарняних інфекцій і їх частота зростає, серед цих штамів домінує MRSA. Ці інфекції частіше траплялися у чоловіків та осіб віком більше 65 років. Таким чином, значення MRSA як причини позалікарняних інфекцій починає зростати.

Кожна третя особа є носієм *Staphylococcus aureus*, але тільки кожна сота особа є носієм резистентних штамів. MRSA є причиною 10% внутрішньолікарняних інфекцій. Нещодавно виявили, що MRSA трапляється удвічі частіше, ніж вважали. Вибір оптимального лікування проти *S. aureus* наштовхується на дві проблеми: 1) зростаюча резистентність до багатьох антибіотиків; 2) складність усунення внутрішньоклітинно-локалізованого золотистого стафілококу.

У США смертність від MRSA-інфекцій становила 6,3 на 100 тисяч осіб у 2005 році. Щороку приблизно 19 тисяч осіб у США помирають через інфікування MRSA. Смертність яка викликана золотистим стафілококом, утримується на дуже високому рівні, 20-40%, незважаючи на доступність ефективних антибіотиків.

Наявні дані свідчать, що зараження епідермальним стафілококом найчастіше відбувається внутрішньолікарняно, причому випадки зараження відрізняються більше вираженою варіабельністю й ступенем стійкості збудників до антибактеріальних препаратів у порівнянні з інфекціями, викликаними золотистим стафілококом. Фактично всі виділені мікроорганізми містять R-плазмід, що продукують β -лактамазу, і резистентні до пеніциліну. Приблизно третина має резистентність до аміноглікозидів і дві третини – до тетрацикліну, еритроміцину, кліндаміцину й левоміцетину. Виділені від госпіталізованих хворих епідермальні стафілококи, що містять плазмід із

множинною стійкістю до антибактеріальних препаратів, можуть служити важливим джерелом для набуття стійкості золотистим стафілококом; передача R-плазмід від епідермального стафілокока до золотистого стафілокока у результаті кон'югації підтверджена як *in vitro*, так і *in situ* на шкірі.

Стійкість до метициліну широко поширена серед штамів експериментального стафілокока. За даними одного з досліджень, більше 80% мікроорганізмів, виділених від хворих ендокардитом із протезами клапанів серця, були резистентні до метициліну. Температурні умови, рН, осмотичний тиск й наявність хелатів і важких металів можуть впливати на ступінь стійкості. Метицилін-резистентні мікроорганізми можуть виявитися чутливими при визначенні за допомогою звичайних методів [21].

Раніше вважалося, що штами епідермального стафілококу як, і штами золотистого стафілококу, залишаються чутливими до ванкоміцину і, звичайно, до рифампіцину, хоча стійкість до останнього може виникнути швидко, якщо використовується тільки цей препарат. Тим не менш, вже 15 років тому науковці почали замислюватися про можливість появи ванкоміцінорезистентних штамів *S. aureus* після свідчень про появу резистентності до ванкоміцину у ентерококів.

Перше повідомлення про виділення метицилін-резистентних *S. aureus* зі зниженою чутливістю до ванкоміцину з клінічного матеріалу з'явилося в 1996 р. Незважаючи на значення МПК до ванкоміцину, відповідно діапазону помірної резистентності, даний штам був зареєстрований як VRSA (ванкоміцин-резистентний *S. aureus*) через клінічну неефективність ванкоміцину. У цього штаму не було знайдено жодного з раніше відомих механізмів резистентності до ванкоміцину; відзначено тільки збільшення товщини клітинної стінки і концентрації пеніцилін-зв'язуючих білків 2 і 2a. Далі одне за одним пішли повідомлення про виділення з клінічного матеріалу штамів *S. aureus* з МПК до ванкоміцину, позначених як VISA (*S. aureus* зі зниженою чутливістю до

ванкоміцину).

У результаті поглибленого дослідження ванкоміцінорезистентності у MRSA при скринінгу більш ніж 2000 штамів з різних стаціонарів було виявлено від 1 до 25% штамів з гетерогенною (індуцибельною) резистентністю до ванкоміцину, експресують її з частотою близько 1 клітини на 1 млн. Такі штами можуть бути попередниками VRSA. Багато фахівців пропонують свої методи скринінгу ванкоміцінорезистентності у стафілококів. Однак загальноприйняті стандарти ще не розроблені. Фахівці поки не прийшли до згоди, який термін використовувати: VRSA або VISA. Це пов'язано з тим, що, незважаючи на значення МПК, відповідні діапазони помірної резистентності є в наявності клінічної неефективності ванкоміцину при терапії VRSA- і VISA-інфекцій.

Таким чином, надзвичайно важливою є розробка методів лабораторної діагностики та моніторингу ванкоміцінорезистентності, особливо у пацієнтів, які отримують або отримували ванкоміцин/тейкопланін, і при неефективності цієї терапії. Є безумовна необхідність розробки методики контролю за VRSA-інфекціями. Для попередження розповсюдження VRSA необхідно ізолювати хворих і носіїв *S. aureus*. Крім того, застосування антибіотиків має передбачати зниження числа необґрунтованих призначень ванкоміцину [20].

1.6. Механізми антибіотикорезистентності

Основою терапевтичної дії антибактеріальних препаратів є гальмування життєдіяльності збудника інфекційної хвороби в результаті пригнічення специфічного метаболізму мікроорганізмів. Це досягається шляхом зв'язування антибіотика з мішенню, у якості якої може виступати або фермент, або структурна молекула мікроорганізму [22].

Резистентність мікроорганізмів до антибіотиків може бути як природною, так і набутою. Справжня природна стійкість характеризується відсутністю у мікроорганізмів мішені для дії антибіотика або недоступності мішені через

первинно низьку проникність або через наявність ферментативної інактивації. За наявності у бактерій природної стійкості антибіотики не матимуть клінічної ефективності. Природна резистентність є постійною видовою ознакою мікроорганізмів і її легко зпрогнозувати.

Під набутою стійкістю розуміють властивість окремих штамів бактерій зберігати життєздатність при концентраціях антибіотиків, які є згубними для основної частини мікробної популяції, тобто для більшості інших мікроорганізмів. Виникають ситуації, коли більша частина мікробної популяції виявляє набуту стійкість. Наявність у бактерій набутої резистентності завжди супроводжується зниженням клінічної ефективності антибіотика. Формування резистентності у всіх випадках однаково обумовлено генетично: це набуття нової генетичної інформації або зміна рівня експресії власних генів [17].

Механізми стійкості до b-лактамних антибіотиків

Найпоширенішим механізмом стійкості мікроорганізмів до b-лактамів є їх ферментативна інактивація, що є результатом гідролізу одного з зв'язків b-лактамного кільця ферментами b-лактамазами. До теперішнього часу описано більше 200 ферментів, які можна розрізнити за наступними практично важливими властивостями:

1. Субстратний профіль (здатність до переважного гідролізу тих чи інших b-лактамів, наприклад пеніцилінів або цефалоспоринів, або обох у рівній мірі).
2. Локалізація кодуючих генів (плазмідна або хромосомна). Ця властивість визначає епідеміологію резистентності. За наявності плазмідної локалізації генів відбувається швидке внутрішньо- і міжвидове поширення резистентності, при хромосомній спостерігається поширення резистентного клону.
3. Чутливість до тих інгібіторів, що застосовуються зазвичай у медичній практиці: клавуланової кислоти, сульбактаму і тазобактаму.

Широке поширення β -лактамаз широкого спектра серед грамнегативних бактерій не призводить до серйозних проблем в лікуванні, оскільки є достатня кількість високоактивних β -лактамних антибіотиків, таких як цефалоспорини другого-четвертого поколінь, інгібіторозахищені пеніциліни тощо. Аналогічна складається ситуація і з більш широким розповсюдженням стафілококових β -лактамаз. У даний час найбільше значення у клінічній практиці мають плазмідні β -лактамази грамнегативних бактерій розширеного спектру, оскільки вони мають здатність руйнувати цефалоспорини третього і, меншою мірою, четвертого покоління. Звичайні методи оцінки антибіотикочутливості дуже часто не виявляють цей механізм стійкості.

Ферменти - ПСБ, - що беруть участь у синтезі клітинної стінки бактерій, стають мішенями дії β -лактамів. Внаслідок модифікації у деяких ПСБ зменшується спорідненість до β -лактамів, що проявляється в підвищенні МПК цих препаратів і зниженні клінічної ефективності. Гени модифікованих ПСБ локалізовані на хромосомах. Стійкість стафілококів (*S.aureus* і коагулазонегативних стафілококів) зумовлена появою у мікроорганізмів додаткового ПСБ (ПСБ2а). [3]. Стійкість до метициліну або оксациліну є маркером наявності ПСБ2а.

Усі β -лактами не слід використовувати в терапії при інфекціях, що викликаються метицилінорезистентними стафілококами, незалежно від результатів оцінки *in vitro*, вони є клінічно неефективними. Те, що частота поширення метицилінорезистентних стафілококів у деяких відділеннях реанімації, онкології та гематології в Україні перевищує 50-60%, створює вкрай серйозні проблеми для лікування. Стійкість стафілококів і пневмококів має реальне значення у клінічній практиці.

Макроліди і лінкосаміди

Основною мішенню для дії макролідних і лінкозамідних антибіотиків є 50S субодиниця бактеріальної рибосоми. Незважаючи на відмінності в

структурі, ділянка зв'язування з рибосомою є загальною для всіх цих антибіотиків. У більшості бактерій стійкість є наслідком метилювання 23S-субодиниці рРНК. Метилази є широко поширеними серед багатьох аеробних та анаеробних бактерій, як грампозитивних, так і грамнегативних. З'ясовано близько 20 генів (*erm-erythromycin ribosome methylation*), що кодують фермент метилаз, вони асоційовані з транспозонами і можуть локалізуватися і у плазмідах, і на хромосомах.

У клінічній практиці можуть зустрічатися стафілококи, що мають стійкість як до всіх макролідів і лінкозамідів, так і тільки до 14- і 15-членних макролідів. Описано два варіанти синтезу метилази: конститутивний і індукцибельний. При першому типі синтез ферменту є незалежним від зовнішніх умов. Відповідно, бактерії мають стійкість до всіх макролідів і лінкозамідів. При другому, індукцибельному типі синтезу ферменту індукція є необхідною для його початку. Синтез стрептококових метилаз індукований усіма макролідами і лінкозамидами, відповідно тому мікроорганізми проявляють стійкість до всіх перерахованих антибіотиків. Синтез стафілококових метилаз, на відміну від цього, здатний індукуватися тільки 14- і 15-членними макролідами, отже мікроорганізми проявляють стійкість до перерахованих антибіотиків, але в той же час зберігають чутливість до 16-членних макролідів і лінкозамідів.

Активне виведення макролідів і лінкозамідів здійснюється кількома транспортними системами. Основне клінічне значення має поширена серед *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* і багатьох інших грампозитивних бактерій система виведення, що кодується *mef*-геном. Відповідний білок-транспортер виводить 14- і 15-членні макроліди та забезпечує не такий високий рівень резистентності. Значення цього механізму резистентності не достатньо вивчений. Лінкозаміди і 16-членні макроліди зберігають активність. Гени *mef* локалізовані на хромосомах у складі кон'югативних елементів, що обумовлює досить ефективні внутрішньо- і міжвидові поширення.

В Україні серед метицилінорезистентних стафілококів досить поширена стійкість до макролідів і лінкозамідів. Для метициліночутливих стафілококів частота стійкості, як правило, не перевищує 10% [7].

Ферменти, що інактивують макроліди та лінкозаміди, описані серед грампозитивних і грамнегативних мікроорганізмів. У деяких з них досить широкий субстратний профіль, інші інактивуються тільки окремими антибіотиками (еритроміцинестерази, поширені серед сімейства *Enterobacteriaceae*, лінкоміцинацетилтрансферази стафілококів і ентерококів).

Аміноглікозиди

Основним механізмом стійкості до аміноглікозидів є їхня ферментативна інактивація шляхом модифікації. Молекули аміноглікозидів при модифікації втрачають здатність зв'язуватися з рибосомами і пригнічувати біосинтез білка. Описано три групи АМФ, здійснюють інактивацію аміноглікозидів, шляхом їх зв'язування з різними молекулами: ААС - приєднують молекулу оцтової кислоти, Арн - приєднують молекулу фосфорної кислоти, нуклеотидил- або АНТ- приєднують молекулу нуклеотиду аденіну.

Для України характерна висока частота розповсюдження стійкості серед грамнегативних бактерій до гентаміцину та тобраміцину, що, ймовірно, пов'язане з необгрунтовано широким застосуванням гентаміцину. Частота стійкості до нетилміцину, як правило, трохи нижча. Стійкість до амікацину зустрічається досить рідко. Число АМФ, що зустрічаються у грампозитивних бактерій, не настільки велике.

У грампозитивних і грамнегативних бактерій використовуються різні ферменти. Загальне число описаних АМФ перевищує 50 з більш-менш унікальним субстратним профілем. Гени ферментів локалізуються, як правило, у плазмідах, що є причиною швидкого внутрішньо- і міжвидового поширення стійкості. На практиці серед грамнегативних бактерій зустрічаються практично всі комбінації стійкості до окремих аміноглікозидів. Це пов'язане з тим, що

субстратні профілі окремих ферментів є досить різноманітними і у бактерій можуть бути одночасно декілька генів АМФ.

Зниження проникності зовнішніх структур. Процес проникнення аміноглікозидів через зовнішню і цитоплазматичну мембрани бактерій є досить складним. Низька природна чутливість до аміноглікозидів деяких мікроорганізмів (наприклад, *B. cereus*) пояснюється саме недостатньою проникністю для антибіотиків зовнішньої мембрани цих мікроорганізмів. Природна стійкість анаеробів до аміноглікозидів зумовлена тим, що транспорт цих антибіотиків через цитоплазматичну мембрану йде за рахунок перенесення електронів, які у анаеробів відсутні. Це також причина того, що факультативні анаероби в умовах анаеробіозу можуть бути значно більш стійкими до аміноглікозидів, ніж в аеробних умовах. Є дані про те, що аміноглікозиди можуть активно виводитися з мікробної клітини.

У деяких випадках стійкість може бути пов'язана з модифікацією 30S субодиниці бактеріальної рибосоми, яка є основною мішенню дії аміноглікозидних антибіотиків. Поширення та клінічне значення стійкості, пов'язаної з модифікацією мішені не є значним [14].

Хінолони / Фторхінолони

Провідним механізмом стійкості до хінолонів / фторхінолонів є модифікація двох бактеріальних ферментів. Мутації в генах *gyrA* і *parC* є основою формування резистентності до хінолонів. Принциповим є те, що мутації в одному або двох генах можуть накопичуватися, що веде до поступового зниження спорідненості ферментів до хінолонів і підвищенням мінімальної пригнічуючої концентрації (МПК). Поодинокі мутації призводять до розвитку стійкості тільки по відношенню до нефторованих хінолонів і супроводжуються незначним, з клінічної точки зору підвищенням МПК (в 2-4 рази) по відношенню до фторхінолонів. Якщо є одна і більше мутацій в одному або більше чутливих ферментах, спостерігається високий рівень стійкості

грамнегативних мікроорганізмів до фторхінолонів (МПК > 64,0 мг/л).

ДНК-гірази і топоізомерази IV, беруть участь у конформаційних змінах бактеріальної ДНК, і є необхідними для її нормальної реплікації. Кожен з ферментів має чотири субодиниці: ДНК-гіраза складається з двох *gyrA* і двох *gyrB* субодиниць (відповідні гени *gyrA* і *gyrB*); топоізомераза IV - з субодиниць *parC* і *parE* (відповідні гени *parC* і *parE*). Гени обох ферментів локалізуються на бактеріальній хромосомі.

Активне виведення. Останніми роками накопичується все більше даних про широке поширення серед грампозитивних і грамнегативних мікроорганізмів стійкості, пов'язаної з активним виведенням хінолонів. Цей механізм часто поєднується з модифікацією мішеней серед штамів з високим рівнем стійкості до фторхінолонів.

Стійкість до фторхінолонів (ципрофлоксацину і офлоксацину) є реальною проблемою в лікуванні нозокоміальних інфекцій в Україні. Швидше за все резистентність формується у штамів *P. aeruginosa*. З'являються також дані про зростання стійкості до фторхінолонів серед пневмококів [13].

Глікопептиди

Механізм стійкості до глікопептидів найдетальніше вивчений у ентерококів, він пов'язаний з синтезом модифікованої бічний поліпептидного ланцюга у бактерій. Механізм дії глікопептидів полягає у блокуванні синтезу пептидоглікану на завершальній стадії, тоді молекули антибіотика зв'язуються з кінцевими амінокислотами у пептидному ланцюжку (D-аланін-D-аланін). Останніми роками в Японії і США з'явилися повідомлення про виділення одиничних штамів метицилінорезистентних і метициліночутливих *S. aureus* зі зниженою чутливістю до ванкоміцину (visa). Для штамів зі зниженою чутливістю характерно потовщення клітинної стінки, а також зменшення аутолітичної активності. Зниження чутливості до глікопептидів було описано

раніше для коагулазонегативних стафілококів.

При виділенні ванкоміцинорезистентності ентерококів і стафілококів необхідно дотримуватися надзвичайної обережності, ретельно забезпечувати чистоту досліджуваної культури і слідкувати за точністю її ідентифікації [14].

Тетрацикліни

Серед грамнегативних і грампозитивних мікроорганізмів найбільш поширеним є механізм активного виведення. Детермінанти резистентності зазвичай мають плазмідну локалізацію, що забезпечує їхнє швидке поширення, як внутрішньо-, так і міжвидове. Частина генів і відповідні білки (TetA, TetE) поширені серед грамнегативних бактерій, інші (TetK, TetL) серед грампозитивних.

Захисні білки дозволяють бактерії синтезувати протеїни, незважаючи на зв'язування з рибосомою молекули тетрацикліну. Механізм такого захисту наразі невідомий. Описано 5 генів, що кодують ці захисні білки, вони поширені серед грамнегативних і грампозитивних бактерій і обумовлюють стійкість до всіх тетрациклінів. Стійкість до тетрацикліну серед клінічно найбільш впливових мікроорганізмів досить висока, що не дозволяє вважати їх ефективним засобом для лікування більшості інфекцій [13].

Хлорамфенікол

Ацетилювання є основним механізмом стійкості до хлорамфеніколу. Гени ферментів як правило, локалізуються у плазмідах і входять до складу транспозонів разом із генами стійкості до інших антибіотиків.

Множинна стійкість, пов'язана зі зниженням проникності. Зниження проникності зовнішніх структур бактеріальної клітини призводить до формування стійкості одночасно до декількох груп антибіотиків і є найменш специфічним механізмом стійкості. Найчастішою причиною цього стає повна або часткова втрата поринових білків. Система mar (multiple antibiotic resistance

- множинна стійкість до антибіотиків) відносно добре вивчена. Застосування тетрацикліну або хлорамфеніколу формує стійкість не тільки до цих антибіотиків, але і до β -лактамів і хінолонів. Активація MAR-системи одночасно призводить до зниження кількості одного з поринових білків (OmpF) і підвищення активності однієї із систем активного виведення.

Зниження проникності з причини втрати або зниження кількості поринових білків зустрічається в асоціації з продукцією β -лактамаз більш широкого спектру. Втрата одного з поринових білків (D2) у *P. aeruginosa* призводить до вибіркового зниження чутливості мікроорганізма до такого АБП як імпіпенем [13].

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Робота виконана на базі Недригайлівського лабораторного відділення Роменського міськрайонного відділу Державного управління «Сумський обласний лабораторний центр охорони здоров'я України».

Матеріалом даної роботи були результати досліджень 27 штамів *S. aureus*, що були виділені від дорослих, віком 18-55 роки з попереднім діагнозом «хронічний тонзиліт у стадії загострення», на чутливість до 16 антибіотиків за допомогою диско-дифузного методу впродовж 2016-2019 років.

2.1. Методи дослідження на чутливість до АБП

Для встановлення чутливості штамів стафілококу до АБП відповідно до наказу Міністерства охорони здоров'я України від 05.04.2007 року № 167 Про затвердження методичних вказівок «Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів» був використаний диско-дифузійний метод.

Цей метод ґрунтується на здатності антибіотиків дифундувати з просякнутих ними паперових дисків у поживне середовище. Це пригнічує ріст бактерій, що потрапили на поверхню агару.

Для визначення чутливості мікроорганізмів використовувалися стандартні поживні середовища. Щільне поживне середовище підготовлювалося відповідно до інструкції виробника. Далі воно розливалось на горизонтальній поверхні по чашках Петрі шаром товщиною 4-5 мм. Цей параметр є дуже важливим, оскільки діаметр і форма зони пригнічення росту залежать від якості агарового шару, його глибини і рівномірності. Чашки залишалися при кімнатній температурі до застигання. Зберігалися чашки запаяними в поліетиленові пакети при температурі 4-8 °С протягом 5 діб. Перед інокуляцією чашки підсушували у термостаті при 35 °С з прочиненою кришкою

протягом 10-20 хв. На внутрішній поверхні кришок не має бути конденсату.

Для визначення чутливості ДДМ використовували тільки стандартизовані якісні диски з антибіотиками. Під час дослідження диски зберігалися з АБП тривалий термін в герметичній упаковці в морозильній камері при температурі -18 °С. Невеликі партії дисків, що використовувалися в повсякденній роботі, зберігалися в холодильнику при температурі 4-8 °С, щільно закупореними, щоб запобігти попаданню вологи, крім того, для додаткового захисту від вологи у флаконах з дисками комерційного виготовлення вкладений спеціальний вологопоглинач.

Флакони з дисками витримувалися перед використанням герметично закритими до досягнення ними кімнатної температури протягом 1 години, що не дозволило утворюватися конденсату на дисках після відкривання флаконів.

Для стандартності проведення досліджень у кожному досліді використовувалися тест-культури з відомою чутливістю до антибіотиків.

ВООЗ рекомендовано три штами типових культур: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*. Якість та точність результатів дослідження залежить також від умов зберігання готових комерційних дисків, оскільки вміст в них антибіотиків може знизитися нижче доступного рівня до закінчення терміну придатності. Під час визначення антибіотикочутливості виділених штамів отримані дані співставлялися з розмірами зон пригнічення росту навколо дисків з антибіотиками для контрольних культур та були порівняні з допустимими контрольними значеннями. Якщо діаметри зон пригнічення росту контрольних штамів є у певних межах, це свідчить про достатню стандартизацію і точність проведених експериментів.

Розміщувати у чашці Петрі понад 6 дисків недоцільно, при великих діаметрах зон затримки росту більше число дисків може бути джерелом помилок і впливати на кількісну інтерпретацію результатів. Правильний підбір набору дисків є фактором, що визначає коректність досліджень і, без сумніву,

інтерпретацію результатів.

Оцінку результатів проводять за таблицею, яка містить граничні значення діаметрів зон затримки росту для резистентних, помірно резистентних та чутливих штамів, а також значення мінімальної пригнічуючої (інгібуючої) концентрації (МПК, МІК) антибіотиків для стійких і чутливих штамів.

Отримані значення діаметрів зон затримки росту порівнюють з контрольними значеннями таблиці і визначають до якої з трьох категорій чутливості належать досліджувані штами.

Метод дифузії за допомогою дисків є якісним методом. Він дозволяє встановити лише факт чутливості або резистентності збудників інфекції. Однак встановлений корелятивний зв'язок розмірів зон пригнічення росту досліджуваних штамів і значень МІК (мінімальна концентрація препарату, яка інгібує ріст досліджуваного штаму) антибіотиків, дозволяє оцінити ступінь чутливості і кількісно, використовуючи дані, наведені у спеціальних таблицях.

Антибактеріальний препарат	Діаметр зон пригнічення росту, мм		
	Резистентні	Помірно стійкі	Чутливі
Оксацилін	≤ 10	11-12	≥ 13
Ампіцилін	≤ 11	12-14	≥ 15
Меронем	≤ 13	14-15	≥ 16
Цефтріаксон	≤ 13	15-17	≥ 21
Цефепім	≤ 14	15-17	≥ 18
Цефтазідім	≤ 14	15-17	≥ 18
Амікацин	≤ 14	13-14	≥ 17
Гентаміцин	≤ 12	13-14	≥ 15
Ванкоміцин	≤ 10	11-14	≥ 15
Ципрофлоксацин	≤ 15	16-20	≥ 21
Еритроміцин	≤ 13	14-22	≥ 23
Лінкоміцин	≤ 17	17-20	≥ 21

Ко-тримоксазол	≤ 10	11-15	≥ 16
Доксицилін	≤ 12	13-15	≥ 16
Стрептоміцин	≤ 6	7-9	≥ 10
Рифампіцин	≤ 16	17-19	≥ 20
Хлорафменікол	≤ 12	13-17	≥ 18

2.2. Методи статистичної обробки даних

Статистичну обробку даних проводили за допомогою R [5], а також пакетів до нього, на які ми посилаємося окремо. Усі ілюстрації також зроблені з використанням графічних можливостей R.

РОЗДІЛ 3. РОЗПОДІЛ ШТАМІВ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ЗА ДІАМЕТРОМ ЗОН ПРИГНІЧЕННЯ І ГРУПОЮ ЧУТЛИВОСТІ

Вихідними даними, з якими ми працювали були дані про діаметри зон пригнічення, отримані за допомогою диско-дифузійного метода. Найбільш адекватно їх можна представити у вигляді графіків щільності розподілу штамів стафілокока за діаметром зон пригнічення росту. Такі графіки для 16 АБП представлені на рис. 3.1. Графік щільності розподілу представляє всю наявну інформацію, а не спрощену досить штучним поділом на три групи (чутливі, помірно стійкі, стійкі). Це так само, як розподіл в популяції людини за ростом представити у вигляді класифікації на «високі», «середні», «низькі». На графіках щільності розподілу (рис. 3.1) між двома лініями знаходяться помірно стійкі штами; ліворуч – резистентні, праворуч – чутливі. Можна спрощено розглядати ці графіки як дзвоноподібні. Очевидно, що для більшості АБП максимуми щільності розподілу знаходяться в зонах для чутливих і помірно стійких штамів. Для деяких АБП можна спостерігати другий, менший пік щільності в інтервалі значень діаметрів для стійких штамів. Більш вираженими такі другі піки є для CRO, R, LM, E, AMP.

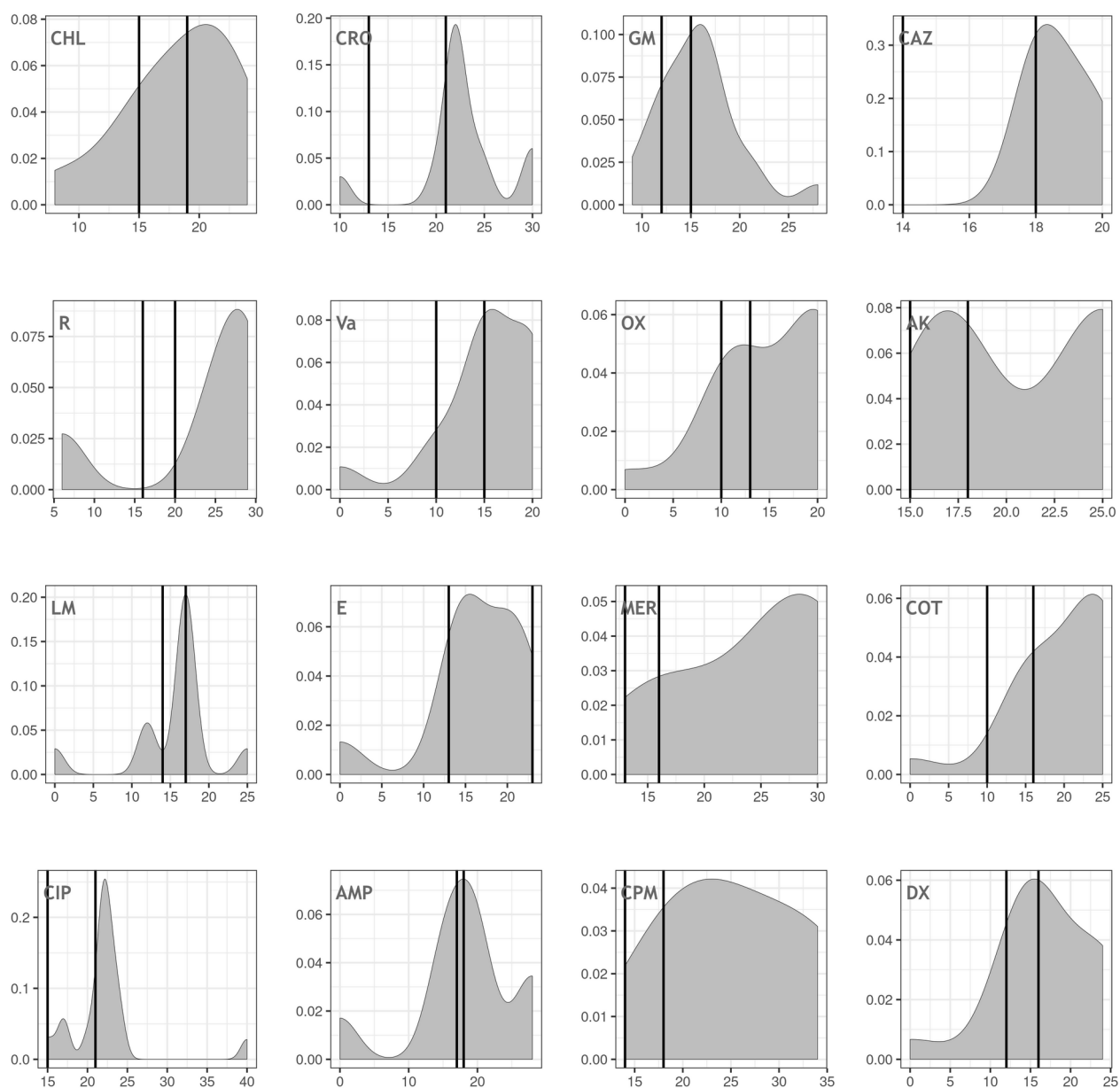


Рис. 3.1. Щільність розподілу штамів *S. aureus* за діаметром зон пригнічення росту (мм). Ділянка між вертикальними лініями — діапазон помірно чутливих штамів, зліва від неї — резистентні, праворуч — чутливі штами.

Також ми класифікували штами згідно загально прийнятої медичної класифікації на три групи, чутливі, помірно чутливі і стійкі штами. Результати представлені у таблиці 3.1.

Таблиця 3.1

Відсоток штамів по групах чутливості

АБП	Чутливі, %	Помірно чутливі, %	Стійкі, %
AMP	19	0	15
LM	30	0	11
R	15	0	4
Va	48	0	11
CHL	26	11	7
GM	44	15	11
E	4	33	4
CRO	37	4	4
DX	30	22	4
OX	33	26	4
CIP	52	11	4
COT	48	19	4
AK	33	33	0
MER	19	4	0
CPM	22	0	0
CAZ	15	0	0

Ці ж самі дані у графічному вигляді представлені на рис. 3.2.

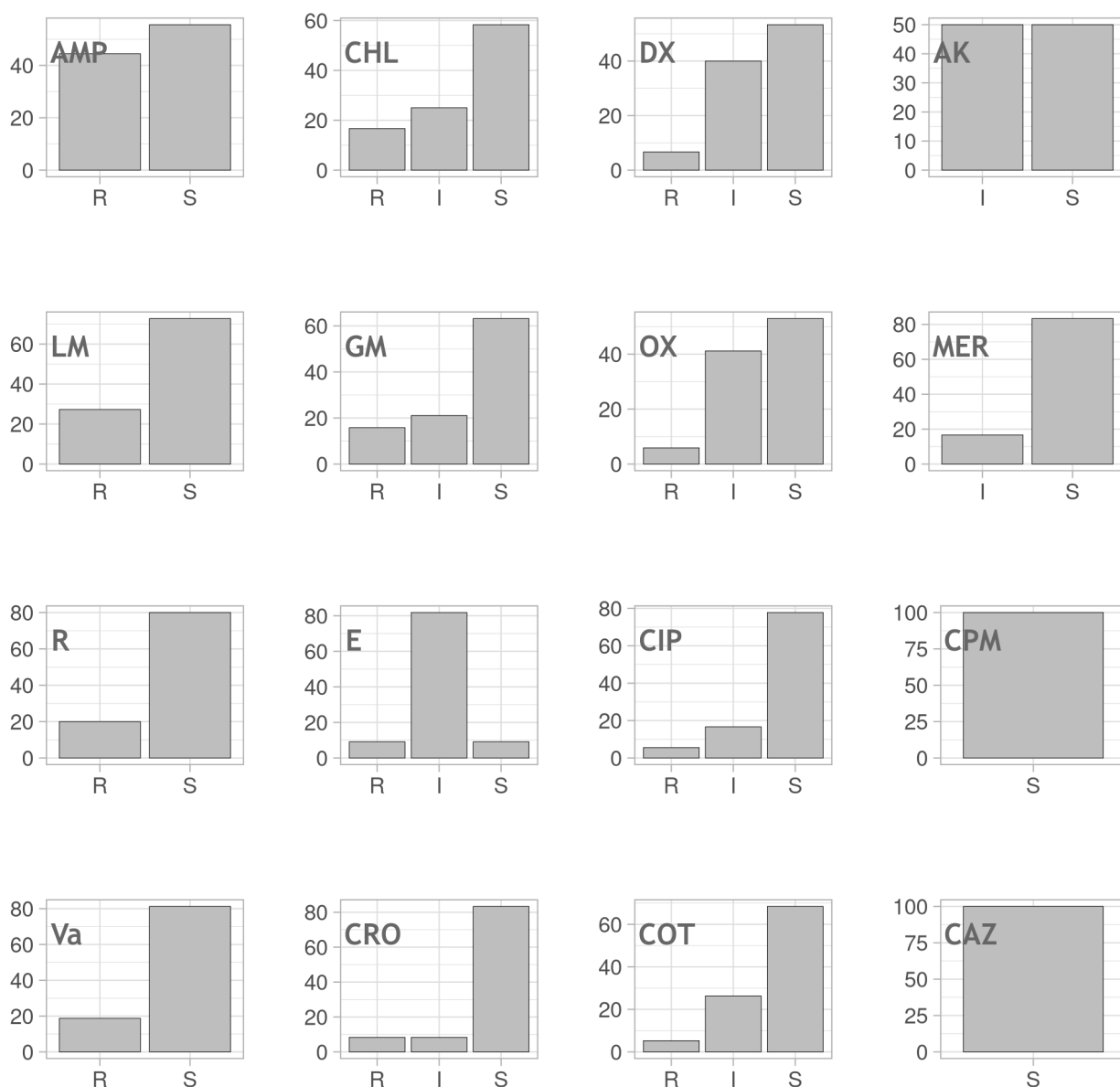


Рис. 3.2. Розподіл штамів *S. aureus* відповідно до рівня стійкості до АБП. R — стійкі, I — помірно стійкі, S — чутливі. АК — амікацин, AMP — ампіцилін, CAZ — цефтазидим, CHL — хлорамфенікол, CIP — ципрофлоксацин, COT — ко-тримоксазол, CPM — цефепім, CRO — цефтріаксон, DX — доксициклін, E — еритроміцин, GM — гентаміцин, LM — лінкоміцин, MER — меропенем, OX — оксацилін, R — рифампіцин, Va — ванкоміцин

Як бачимо (рис. 3.2, правий стовпчик), до чотирьох АБП — АК, MER,

CPM, CAZ — стійкі штами відсутні. До решти із протестованих антибіотиків спостерігається той чи інший рівень стійкості. Значення цього рівня суттєво залежить від конкретного АБП.

РОЗДІЛ 4. СТРУКТУРА СТІЙКОСТІ ШТАМІВ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* І ТЕНДЕЦІЇ У ЇЇ РОЗВИТКУ

4.1. Структура резистентності

Ми вирішили встановити, якою є частка штамів стійких до кожного з випробуваних 16 антибіотиків. Результати представлені на рис. 4.1

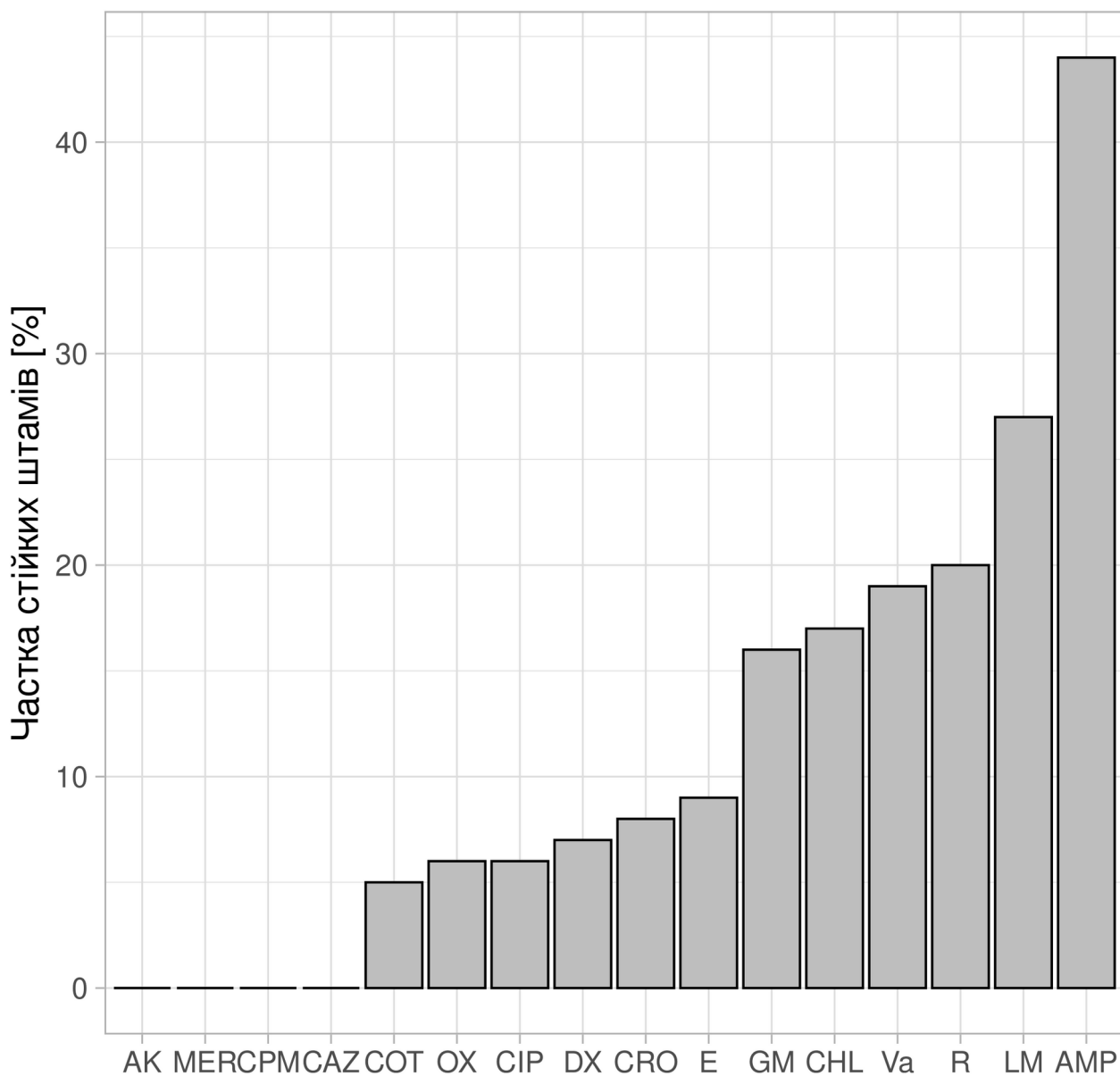


Рис. 4.1. Частка стійких до окремих АБП штамів

З рис. 4.1 можна бачити, що найбільш поширеною є стійкість до ампіциліну, вона сягає 44%. На другому місці за поширеністю стійкості йде LM (27%). До решти антибіотиків стійкими є менш ніж 20% штамів. До чотирьох АБП стійкість взагалі не спостерігалася: АК, MER, CPM, CAZ.

Виникає питання, чи можна прослідкувати на наших даних тенденції у змінах стійкості до окремих АБП. Математично лінію регресії можна побудувати завжди, головним питанням є, наскільки ця лінія є надійною. Показником, наскільки надійно кутових коефіцієнт лінії регресії відрізняється від 0 — тобто можна стверджувати, що рівень стійкості зростає чи зменшується на дослідженому інтервалі часу — є значення P . Чим вони менші, тим надійнішою є лінія регресії. У біології максимально припустиме значення P є 0,05 (іншими словами, ймовірність, що наші висновки є хибними становить 5%). Розраховані за допомогою функції *lm()* (мова R) значення P представлені у таблиці 4.1.

АБП	Значення P
E	0.05
CHL	0.26
MER	0.34
OX	0.47
CAZ	0.48
AMP	0.48
LM	0.49
CRO	0.5
R	0.52

Va	0.53
DX	0.53
CIP	0.56
GM	0.64
AK	0.64
CPM	0.67
COT	0.74

Як ми бачимо з таблиці 4.1 надійною можна вважати лише лінію регресії для лінкоміцину, для інших АБП наших даних не вистачає, щоб робити висновки про тенденції змін стійкості у часі.

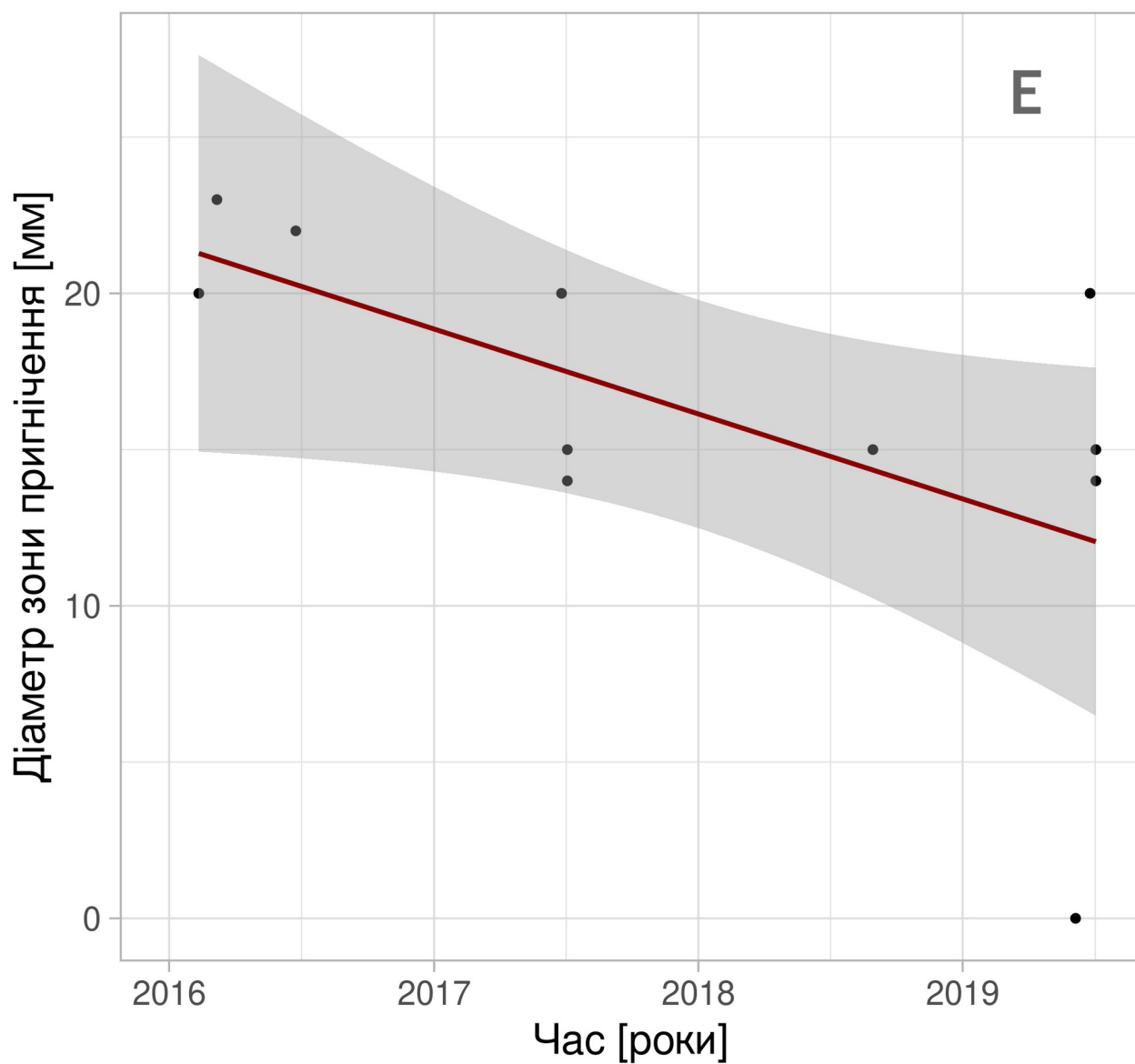


Рис. 4.2. Зміни стійкості до лінкоміцину у 2016-2019 роках

Таким чином, бачимо (рис. 4.2), що діаметр зони пригнічення для лінкоміцину зменшується, що свідчить про збільшення стійкості до цього АБП серед штамів золотистого стафілокока.

4.2. Мультирезистентність

Множинна стійкість до АБП є однією з найважливіших проблем в боротьбі з бактеріальними інфекціями. Ми вирішили дослідити, чи існує такий

комплекс або комплекси антибіотиків, до яких найчастіше спостерігається множинна стійкість. Серед стійких штамів, стійкість до більш ніж одного антибіотика спостерігалася у більш ніж половини штамів (55% від стійких штамів). Розподіл стійкості представлений у таблиці 4.1. Можна бачити, що серед стійких штамів один (9%) виявився стійким одразу до шести антибіотиків (OX, Va, COT, CHL, LM, E). Стійкими до трьох антибіотиків є також 9% від стійких штамів, 36% є стійкими до двох АБП. Таким чином, множинна стійкість є явищем поширеним, що не може не викликати стурбованості.

Таблиця 4.1

Штами, стійкі до одного чи більше антибактеріального препарату

	AMP	OX	Va	COT	CHL	R	LM	CIP	CRO	E	GM	^D X
1		+	+	+	+		+			+		
2							+		+		+	
3					+			+				
4	+											+
5	+		+									
6	+		+									
7							+					
8						+						
9	+											
10											+	
11											+	

Ми вирішили встановити застосувати кластерний аналіз для встановлення комбінацій АБП, стійкість до яких зустрічається частіше. Результати представлені на рис. 4._. Кластеризація відбувалася за методом Варда. Для оцінки надійності кластерів множинної стійкості був застосований бутстрап-тест (n=1000). Як можна бачити усі кластери є дуже надійними

(значення $p=100\%$). По-суті, як і слід очікувати, ця інформація співпадає з представленою у таблиці 4.1, але деякі зв'язки помітні краще.

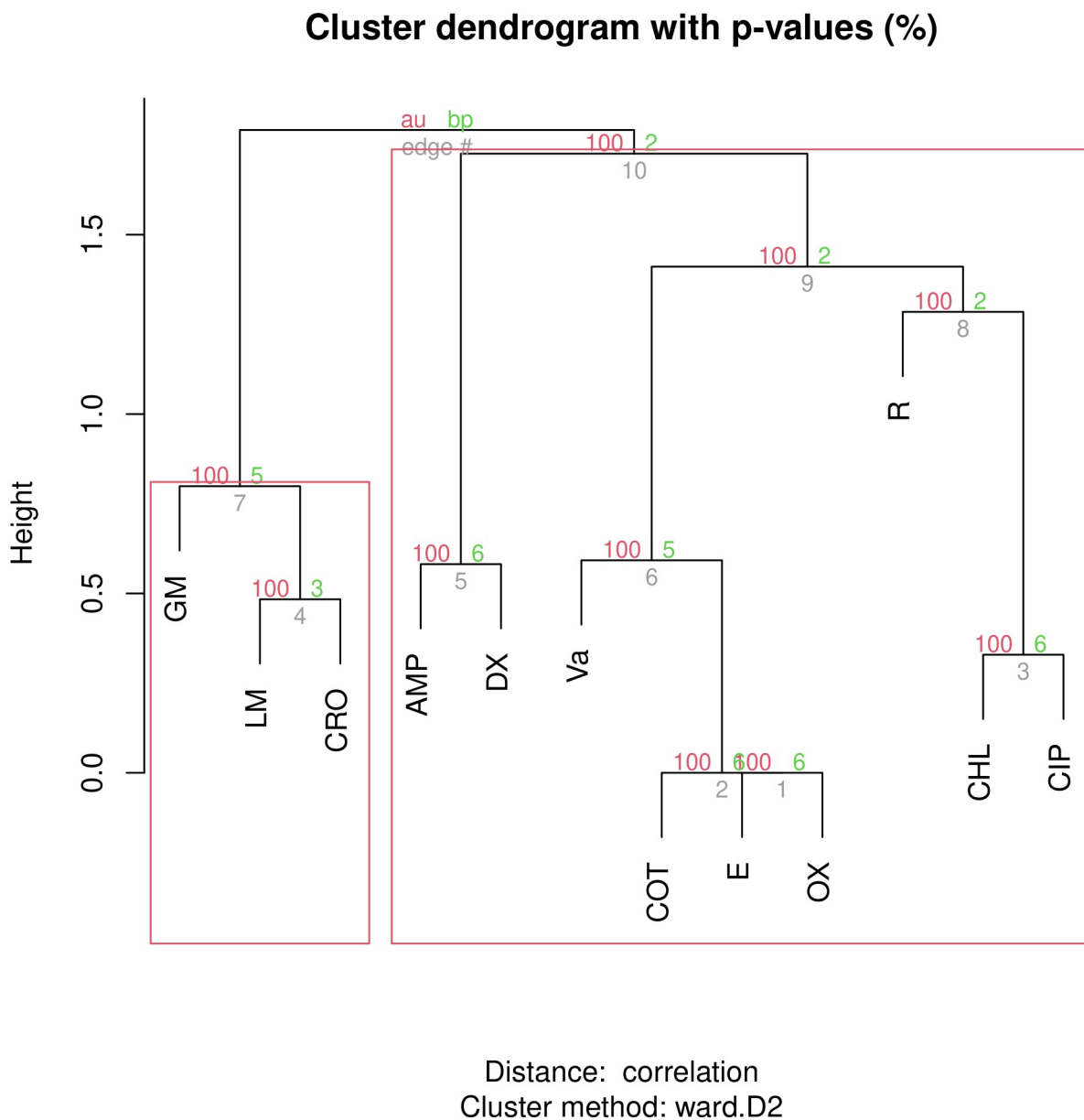


Рис. 4.3. Кластери множинної стійкості до АБП.

На рис. 4.3 ми бачимо два великих кластера стійкості. До меншого належить група з GM, LM, CRO. Таким чином використовувати будь яку пару цих АБП є недоцільним. Великий кластер (рис. 4. __, праворуч) у свою чергу розпадається на дрібніші, кожний з яких також є надійно виділеним.

Продовжуючи цю логіку ми вирішили задати протилежне питання: “стійкість до яких комбінацій АБП є найменш поширеною”. На наш погляд, відповідь на нього має очевидне практичне значення. Власне такі комбінації антибіотиків є найбільш перспективними для лікування сучасних штамів золотистого стафілокока у Недригайлівському районі. Результати кластеризації можна бачити на рис. 4.4.

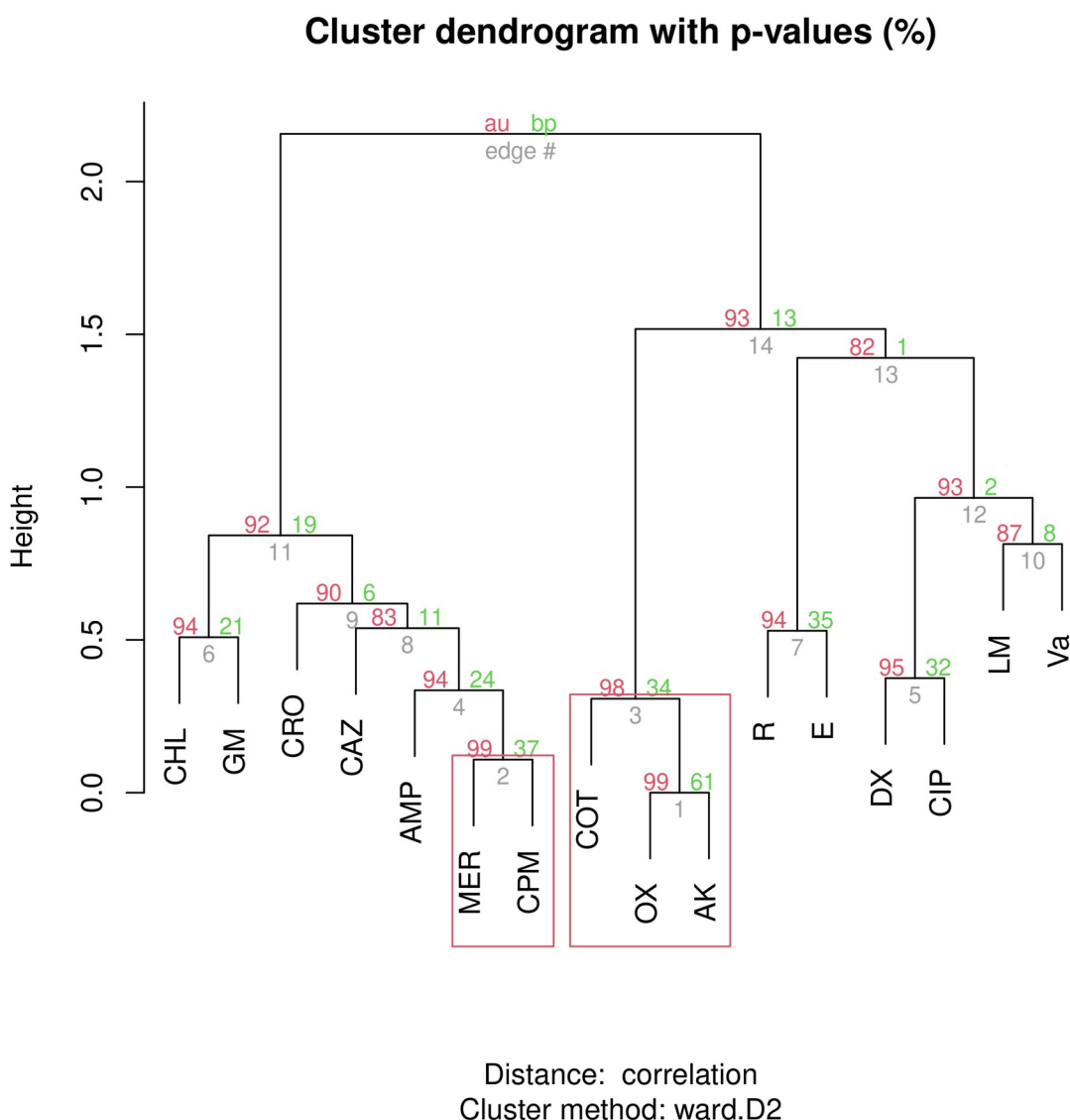


Рис. 4.4. Кластери чутливості до АБП.

Бачимо, що існує два дуже надійних кластера АБП до яких є чутливими більшість штамів. Це MER+CPM і OX+AK+COT. Власне ці комбінації варто застосовувати в важких випадках стафілококової інфекції, особливо, якщо ще

немає результатів тестування на стійкість. Тим більше, що фактично стійкість до AC, CPM, CAZ, MER серед досліджених штамів не спостерігалася.

ВИСНОВКИ

1. Досліджувалася стійкість до 16 антибіотиків 27 штамів *Staphylococcus aureus*: амікацин, гентаміцин, хлорамфенікол, ванкоміцин, меропенем, ко-тримоксазол, лінкоміцин, еритроміцин, ампіцилін, оксацилін, рифампіцин, доксициклін, ципрофлоксацин, цефепім, цефтазидим, цефтріаксон.
2. Найбільш поширеною є стійкість до ампіциліну (44% штамів, досліджених на чутливість ампіциліну) і лінкоміцину (27% штамів). Стійкість до рифампіцину, ванкоміцину, хлорамфеніколу і гентаміцину знаходиться у межах 15-20%. Стійкість до еритроміцину, цефтріаксону, доксицикліну, оксациліну, ципрофлоксацину, ко-тримоксазолу знаходиться у межах 5-10%.
3. До меропенему, цефепіму, цефтазидиму, амікацину стійкі штамів відсутні.
4. 11 штамів (40%) стійкі хоча ж б до 1 антибіотика.
5. 6 штамів (22%) є стійкими до 2 і більше антибіотиків. Один зі штамів є стійким до 6 антибіотиків, один до 3, 4 до 2 антибіотиків.
6. Достовірно збільшилася за період досліджень стійкість до еритроміцину.
7. Кластери множинної стійкості дозволяють оптимізувати антибіотикотерапію, власне не використовувати комбінації антибіотиків, стійкість до яких спостерігається частіше.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Актуальные проблемы диагностики и лечения БГМ / Ю.Я. Венгеров, М.В. Нагибина, В.Б. Ченцов и др. // Лечащий врач. – 2008. – №9. – С. 31–36.
2. Лобзин Ю.В. Бактериальные менингиты и герпетическая инфекция / Ю.В. Лобзин, В.В. Пилипенко, В.Е. Карев // Инфекционные болезни. – 2010. – Т. 8. – №4. – С. 5–9.
3. Конли Дж. Резистентность к противомикробным препаратам: повторение «трагедии общего достояния» / Дж. Конли // Бюллетень Всемирной организации здравоохранения. – 2010. – Вып. 88. – №11. – С. 797–876.
4. Бліндер О.О. Проблема стафілококового носійства та порівняльна характеристика засобів санації різного механізму дії: Дис... канд. мед. наук. – Харків, Інститут мікробіології та імунології ім. І.І.Мечникова АМН України, 2005. – 130с.
5. Дмитриева Н.В., Солодовник Ф.И., Петухова И.Н. Опыт применения мупироцина при назальном носительстве золотистого стафилококка у медицинского персонала // Антибиотики и химиотерапия.- 2000.-№.3.С. 35-38.
6. Шарун А.В. Влияние активных форм кислорода разного происхождения на представителей микробиоценоза ротовой полости : Дис... канд. мед. наук.- Днепрпетровськ, Днепрпетровская гос. медицинская академия, 2005. – 223с.
7. Піддубна О.М. Обґрунтування мікробіологічних критеріїв важкості перебігу поєднаної травми опорнорухової системи і головного мозку: Дис... канд. мед. наук. - Харків, Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова АМН України, 2004. – 181с.

8. Тимченко О.М. Удосконалення молекулярногенетичних методів внутрішньовидового епідеміологічного типування клінічно-значущих мікроорганізмів різних таксономічних груп: Дис... канд. мед. наук. - Харків, Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова АМН України, 2004. – 183с.
9. Приказ МЗ СССР №535 "Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования в клинко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений" Утв. зам. Министра здравоохран. СССР Ю.Ф. Исаковым и нач. Гл. упр. лечебнопрофилактич. помощи А.М. Москвичёвым 22.04.85. / МЗ СССР - М., 1985.-123 с.
10. Митрохин С.Д. Гнойные экссудаты, раны и абсцессы. Современный алгоритм микробиологического исследования // Инфекции и антимикробная терапия. - 2002. – Том 4, №3. - С.15-18.
11. Определитель бактерий Берджи: В 2-х т. Том 1 / Под ред. Хоулта Дж., Крига Н., Снита П., Стейли Дж., Уильямса С. / Пер. с англ. Под ред. Заварзина Г.А. – Девятое изд., М.: Мир, 1997. - 432 с.
12. Определитель бактерий Берджи: В 2-х т. Пер. с англ./ Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уильямса. - М.:Мир, 1997. Т.2.- 368 с.
13. Саттон Д., Фотергилл А., Ринальди М. Определитель патогенных и условно-патогенных грибов. Пер. с англ. – М.: Мир, 2001. – 486 с.
14. Веант Р., Мосс У., Уивер Р., Холлис Д., Джордан Дж., Кук Э., Дейншвар М. Определитель нетривиальных патогенных грамотрицательных бактерий. – М.: Мир, 1999. – 792 с.
15. Козуля С. В. Изучение влияния композиции эфирных масел на состояние внутрибольничной среды / С. В. Козуля // Таврический медико-биологический вестник. – 2009. – Т. 12, № 4 (48). – С. 78–80.

16. Бабушкина И. В. Изучение антибактериального действия наночастиц меди и железа на клинические штаммы *S. aureus* / И. В. Бабушкина, В. В. Бородулин, Г. В. Коршунов, Д. М. Пучиньян // Саратовский медицинский журнал. – 2010. – Т. 6. – № 1. – С. 9–14.
17. Стукова Е. И. Патогенетическое значение золотистого стафилококка при атопическом дерматите / Е. И. Стукова, Ю. В. Кенисфект // Fundamental research. – 2013. – № 7. – С. 680–685.
18. Замазій Т. М. Персистенція *Staphylococcus aureus* серед учнів медичного коледжу [Електронний ресурс] / Т. М. Замазій, О. М. Маланова, М. В. Кучма, Л. М. Руденко, Г. М. Большакова // Annals of Mechnikov Institute. – 2010. – № 1. – С. 30–33. Режим доступу до журналу: www.imiamn.org.ua/journal.htm
19. Современные методы диагностики вирусных респираторных инфекций и их терапии с использованием препаратов интерферона: [метод. рек.] / под ред. Модзольского А. Ф., Дяченко Н. С., Спивака Н. Я. – Киев, 1994. – 18 с.
20. Апоптозіндукуюча активність пептидогліканів та тейхоевих кислот грампозитивних збудників гнійно-запальних захворювань у хірургічних хворих / І. С. Гайдаш, В. В. Флегонтова, Є. В. Суглобов, О. М. Салманова, Є. І. Потьомкін // Вестник гигиены и эпидемиологии – 2001. – № 1. – С. 70–72.
21. Спивак Н. Я. Антибактериальная эффективность препаратов интерферона и его индукторов в различных биологических системах: Автореф. дис.... д-ра биол. наук: Інститут мікробіології та вірусології. – Київ, 1987. – 48 с.
22. Никулин А. А. Обзор Британского общества по антимикробной химиотерапии (BSAC) по диагностике и лечению инфекций, вызванных метициллинорезистентными штаммами *Staphylococcus aureus* (MRSA) во

- внебольничных условиях / А. А. Никулин, А. В. Дехничч // Клиническая микробиологическая антимикробная химиотерапия. – 2010. – Т. 12, № 1. – С. 4–22.
23. Вихоть Н. Е. Влияние стафилококка и его антигенных субстанций на интерфероногенез и корректирующее действие интерферона при стафилококковой инфекции / Вихоть Н. Е., Спивак Н. Я., Черная Л. Н. – Киев: Наукова думка, 1988. – С. 138–147.
24. Воробьев А. А. Дисбактериозы у детей / А. А. Воробьев, В. М. Бондаренко, Е. А. Лыкова // Вестник РАМН. – 2004. – № 2. – С. 13–17.
25. Саркулова М. Н. Микробиологическая характеристика возбудителей внутрибольничной инфекции у урологических больных / М. Н. Саркулова // Журнал микробиологии. – 2005. – № 5. – С. 101–103.
26. Локальний моніторинг антибіотикочувствительності / О. І. Мангуренко, Е. А. Федчун, П. В. Левчук, В. Ф. Грицай // Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. – 2011. – Вип. XXIV, № 1. – С. 126–128.
27. Гучев И. А. Рациональная антимикробная химиотерапия инфекций кожи и мягких тканей / И. А. Гучев, С. В. Сидоренко, В. Н. Французов // Антибиотики и химиотерапия. – 2003. – Т. 48, № 10. – С. 25–31.
28. Лапач С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич. – К.: МОРИОН, 2000. – 320 с.
29. Резистентность микроорганизмов и антибактериальная терапия / И. Б. Ершова, А. А. Высоцкий, Т. В. Ширина, В. И. Ткаченко, А. А. Мочалова // Український журнал екстремальної медицини імені Г. О. Можаєва. – 2008. – Т. 9, № 1. – С. 28–32.

30. Стецюк О. У. Новый карбапенемный антибиотик дорипенем: перспективы применения в клинической практике / О. У. Стецюк // Клиническая микробиология. – 2008. – № 3. – С. 245–259.
31. Назарчук О.А. Чутливість клінічних штамів *Staphylococcus aureus* до антибактеріальних препаратів / О.А. Назарчук, Г.Г. Назарчук, Д.В. Палій, В.В. Сухляк. // Укр. мед. часопис. – 2012. – Т. 3, № 89. – С. 107-109.
32. Наказ МОЗ України від 05.04.2007 № 167 про затвердження методичних вказівок «Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів».
33. Макушенко О.С. Видовий склад та механізми стійкості до оксациліну госпітальних штамів стафілококів / О.С. Макушенко, Л.В. Авдєєва, О.І. Поліщук // Матеріали науково – практичної конференції «Шпитальні інфекції: сучасний стан проблем». – 2008, Харків. – С. 132–134.
34. Макушенко С.Н. Сучасний стан проблем оксацилінрезистентності стафілококів / О.С. Макушенко // профілактична медицина. – 2011. – № 2. – С. 13–23.
35. Афанасьєва Т.І. Метициллинрезистентные стафиллококки / Т.І. Афанасьєва // Антибиотики и химиотерапия. – 1998. – №6. – С. 29–31.
36. І.О. Ситник., С.І.Климнюк, М.С. Творко Мікробіологія, вірусологія, імунологія, Тернопіль, 1998.-С.148-172, 2224-237.
37. Пяткін К.Л., Кривошеш Ю.С. Мікробіологія.-К., 1992.-С 115-138, 187-196.
38. С.І.Климнюк І.О.Ситник, М.С.Творко Практична мікробіологія Тернопіль, “Укрмедкнига”, 2004.-С.100-125.
39. Наказ МОЗ України від 5 квітня 2007 р. №167 Про затвердження методичних вказівок «Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів».

40. R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.