

II. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА БІОЛОГІЯ

УДК:579.61:615.015.8

Я.М. Данько¹, О.Л. Кузнєцова², І.С. Мануйлова¹

ЧУТЛИВІСТЬ ДО АНТИБІОТИКІВ ШТАМІВ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, ЩО ВИДІЛЕНІ ВІД БЕЗСИМПТОМНИХ НОСІЇВ

Сумський державний педагогічний університет ім. А.С. Макаренка¹
Сумська міська СЕС²

565 штамів *Staphylococcus aureus* було виділено від безсимптомних носіїв у 2008-2011 рр. та протестовано на чутливість до 20 антибіотиків диско-дифузійним методом в баклабораторії Сумської міської СЕС. Аналіз цих даних дозволяє стверджувати, що: 1) в популяції найбільшою є частка чутливих штамів; 2) спостерігається чітка тенденція до зниження резистентності (виключення – пеніцилін та амікацин); 3) структура мультирезистентності є загалом аморфною, впевнено можна говорити лише про досить цільний зв'язок резистентності до еритроміцину з стійкістю до канаміцину; 4) розподіл штамів за частотою мультирезистентності відповідає від'ємному біноміальному розподілові, що, на нашу думку, свідчить про відсутність істотного тиску добору на множинну стійкість до антибіотиків.

Ключові слова: *Staphylococcus aureus*, диско-дифузійний метод, чутливість до антибіотиків, добір на мультирезистентність.

Вступ. Стафілококи є представниками резидентної мікрофлори людини. Приблизно 20% здорових осіб є постійними, а 60% – періодичними носіями *Staphylococcus aureus*. Очевидно, що ці бактерії передаються від людини до людини, і при послабленні імунної системи можуть викликати інфекційні ураження. Тому важливими є дослідження резистентності до антибактеріальних препаратів (АБП) штамів *S. aureus*, що безсимптомно існують в складі мікрофлори людини. У 2008-2011 рр. в баклабораторії Сумської міської СЕС від здорових носіїв було виділено і досліджено на чутливість до АБП 565 штамів *S. aureus*. Для тестування використовували загалом 29 антибіотиків, ми відібрали з них 20, що застосовували найчастіше. Кожен з цих 20 АБП використовували різну кількість разів (від 48 до 494, середня – 227, медіана – 206). Усі 565 штамів тестувалися на чутливість до певного набору антибіотиків. Для кожного з антибіотиків фіксувався діаметр зони пригнічення росту. Чим більшим є цей діаметр, тим більшою є чутливість штаму до АБП. Діаметр зони пригнічення дає підстави для віднесення штаму до однієї з трьох категорій: резистентний (Р), помірно стійкий (П), чутливий (Ч).

Мета статті. Вищезгадана інформація дає нам змогу відповісти на наступні питання:

- 1) Яким є співвідношення R, П і Ч штамів для АБП, що використовувалися?
- 2) Чи змінюється це співвідношення з часом?
- 3) Якою є структура мультирезистентності досліджених штамів?
- 4) Чи відчувала останніми роками популяція *S. aureus*, що колонізує здорових носіїв, помітний тиск добору на мультирезистентність?

Матеріали та методи досліджень. Штами *Staphylococcus aureus* були виділені в баклабораторії Сумської міської СЕС від працівників організацій, що підлягали плановим обстеженням впродовж 2008-2011 років. Чутливість до антибіотиків визначали диско-дифузійним методом [1]. Статистичну обробку даних проводили за допомогою R [4], а також пакетів до нього, на які ми посилаємося окремо.

Результати та їх обговорення.

1. Співвідношення R, П і Ч штамів S. aureus.

Щоб дослідити співвідношення часток резистентних, помірно стійких і чутливих штамів, ми побудували графіки щільності розподілу штамів стафілокока за діаметром зон пригнічення росту для 20 АБП (рис. 1). Між вертикальними лініями на ньому знаходяться помірно стійкі штами; ліворуч – резистентні, праворуч – чутливі. Видно, що для більшості антибіотиків переважають чутливі штами. Виключеннями є пеніцилін, ванкоміцин і амікацин: частка R штамів тут є помітно віщою, а до пеніциліну взагалі чутливість не спостерігалася.

Якою мірою різниці у співвідношенні R, П і Ч штамів для різних АБП є невинновими? Ми дослідили це за допомогою методу залишків Пірсона [8].

Виявилось, що частка резистентних штамів є непропорційно високою для пеніциліну, ванкоміцину та амікацину. Висока стійкість до пеніциліну особливого здивування не викликає: він використовується вже занадто давно і став фактично неефективним. Ванкоміцин почав широко використовуватися починаючи з 1980 р. в якості ефективного альтернативного засобу проти золотистого стафілококу. Серед досліджених штамів майже 40% вже є нечутливими до ванкоміцину. Амікацин є найбільш ефективним проти грам-негативних бактерій, але він є активним також і проти стафілококу, стійкого до пеніциліну та цефалоспоринів. В нашій вибірці 35% штамів є резистентними до цього АБП.

До п'яти антибіотиків: олеандоміцину, поліміксину, ципрофлоксацину, стрептоміцину та рифампіцину резистентність є нижчою від очікуваної. Олеандоміцин було виділено у 1954 р., і він є ефективним проти стафілокока, низьку стійкість *S. aureus* можна пояснити тим, що сьогодні його вже практично не використовують. Поліміксини є активними проти грамнегативної

мікрофлори, тому стафілококи з ним фактично не стикаються. Щодо ципрофлоксацину, то в світі до нього стафілококи вже є стійкими. Низька стійкість досліджених штамів може бути пов'язаною з тим, що у нас він почав використовуватися дещо пізніше. Стрептоміцин – один з перших антибіотиків; тому досить дивно, що він і сьогодні пригнічує ріст стафілококів. Рифампіцин застосовують головним чином проти мікобактерії туберкульозу, тому для стафілокока резистентність проти цього препарату не є дуже актуальною.

Щодо помірної стійкості, то її частка є непропорційно високою для ванкоміцину, еритроміцину, карбеніциліну та цефотаксиму. Варто зазначити, що частка чутливих штамів для ванкоміцину і еритроміцину є нижчою за очікувану. Цей факт ми розглянемо пізніше.

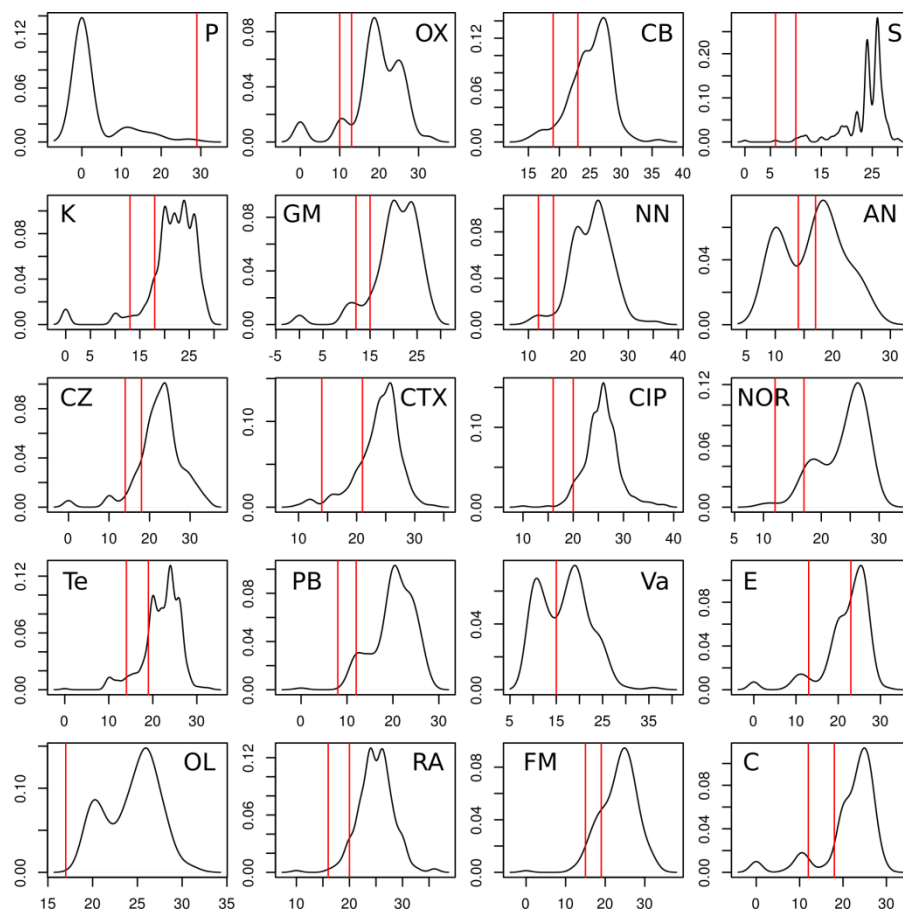


Рис. 1. Щільність розподілу штамів *S. aureus* за діаметром зон пригнічення росту (мм): P – пеніцилін; OX – оксацилін; CB – карбеніцилін; S – стрептоміцин; K – канаміцин; GM – гентаміцин; NN – тобраміцин; AN – амікацин; CZ – цефазолін; CTX – цефотаксим; CIP – ципрофлоксацин; NOR – норфлоксацин; Te – тетрациклін; PB – поліміксин; Va – ванкоміцин; E – еритроміцин; OL – олеандоміцин; RA – рифампіцин; FM – фурамаг; C – левоміцетин. Лінії позначають границі зон між P, II і Ч штамми. Для P і Va лінія одна, бо штами ділять лише на дві категорії: P і Ч. Для OL усі штами є чутливими, тому друга лінія не потрапила до області графіку.

2. Зміни чутливості *S. aureus* у часі.

Зміни чутливості штамів *S. aureus* до АБП впродовж чотирьох років можна побачити на рис. 2. На ньому представлена залежність діаметрів зон пригнічення росту від часу. Для встановлення тенденцій були побудовані лінії регресії і розраховані значення p для кожної. Усі вони виявилися надійними, за виключенням цефазоліну і олеандоміцину ($p = 0,2$). Причину цієї ненадійності легко зрозуміти. Олеандоміцин почав регулярно використовуватися для тестування лише у 2011 році, тому говорити про тенденції зарано. Щодо цефазоліну, то кутовий коефіцієнт ліній регресії є надто близьким до нуля, що робить висновки про якісь тенденції сумнівними. Ясно, що фактично чутливість до цефазоліну не змінювалася.

Як можна бачити, для більшості АБП спостерігалася чітка тенденція до підвищення чутливості. Аргументованих пояснень цього ми не маємо, здається, що тенденція мала б бути протилежною. Все ж таки варто взяти до уваги, що йдеться про штами стафілокока, що є виділеними від здорових носіїв.

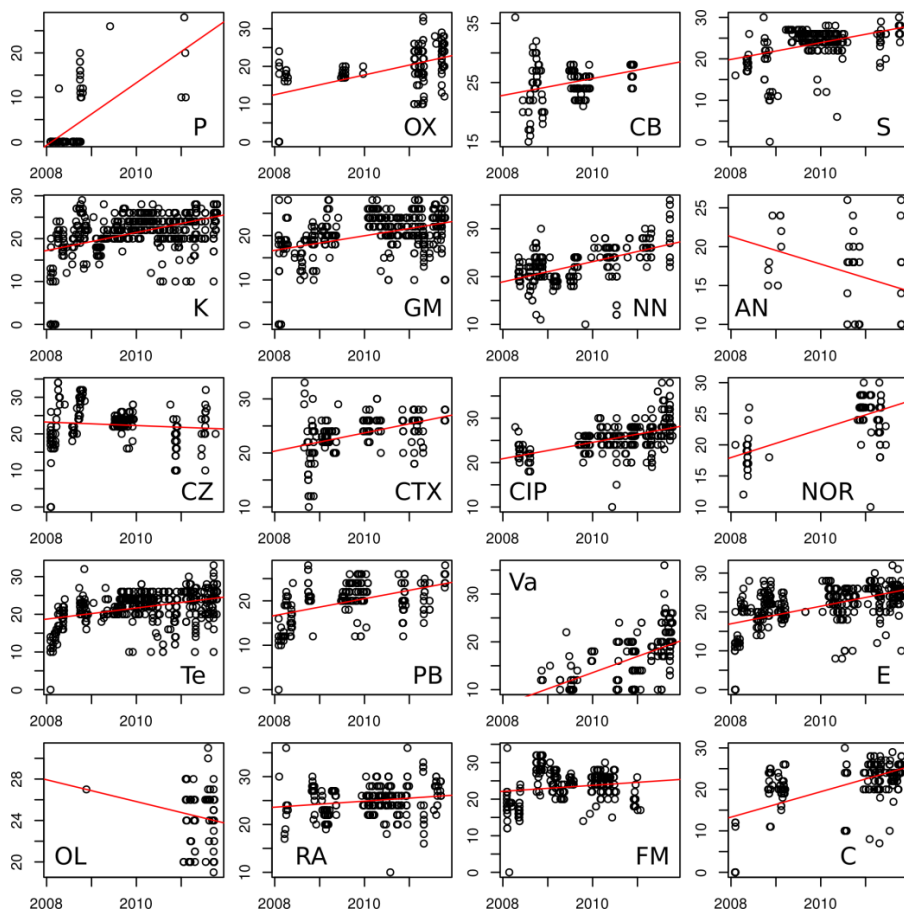


Рис. 2. Зміни діаметрів зон пригнічення росту *S. aureus* у часі. Вісь ординат: діаметр (мм); абсцисс: час (роки). Позначення АБП ті ж самі, що й на рис. 1.

Тенденція до зростання резистентності зафіксована нами лише для амікацину. Ця тенденція є досить надійно підтвердженою значеннями p , хоча ж ці значення ($p = 0,025$) все ж таки наближаються до критичної п'ятивідсоткової межі. Але в будь якому разі, про відсутність тенденції до зменшення резистентності до амікацину можна говорити абсолютно впевнено.

Раніше ми згадували про надмірно високу частку помірно стійких до ванкоміцину і еритроміцину штамів. Враховуючи встановлену нами тенденцію до зростання частки чутливих до АБП штамів, можна припустити, що останніми роками спостерігається досить швидка зміна структури резистентності власне для ванкоміцину і еритроміцину. Зміни ж в структурі резистентності для решти препаратів є менш стрімкими.

Ми дослідили не тільки загальні тенденції, але також і зміни у співвідношенні Р, П і Ч штамів впродовж 2008-2011 років. Ці зміни представлені на рис. 3. На них відсутні пеніцилін (чутливі штами не траплялися) і норфлоксацин (дані занадто фрагментарні, щоб перетворити їх на графік цього типу). Загальна тенденція до зростання частки чутливих штамів на них також є очевидною.

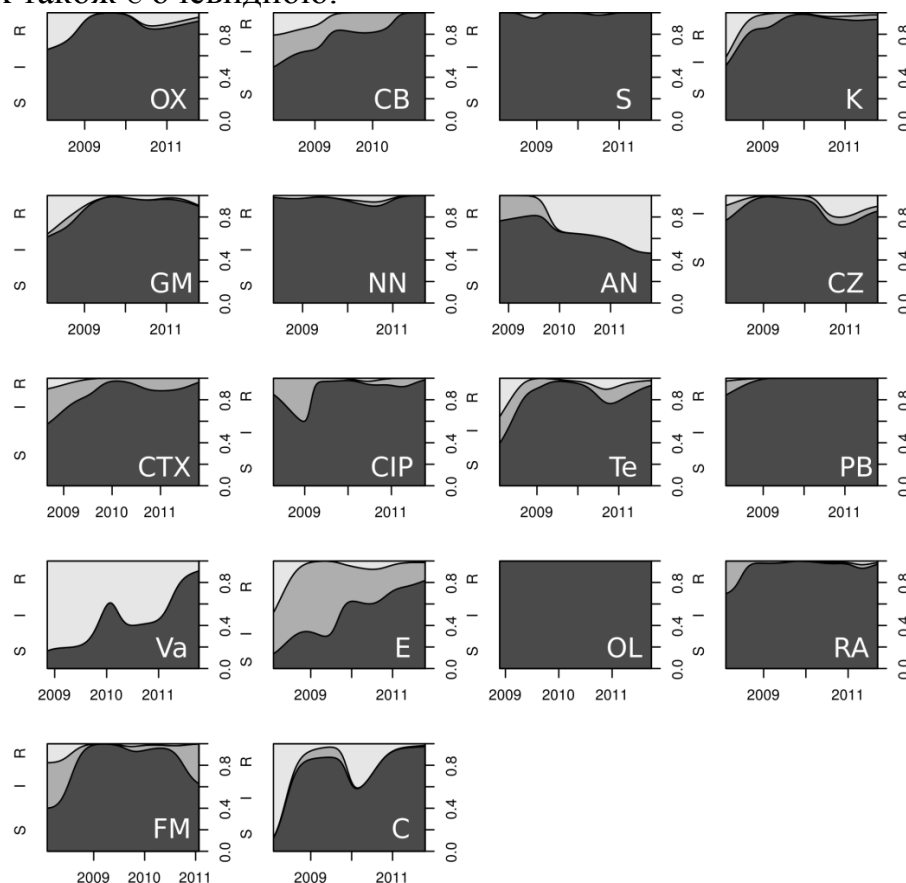


Рис. 3. Зміни у співвідношенні резистентних, помірно стійких і чутливих штамів. S – чутливі, I – помірно стійкі, R – резистентні. На вісі абсцис – час (роки), на другій вісі ординат – частки. Позначення АБП ті ж самі, що й на рис. 1.

3. Структура мультирезистентності *S. aureus*.

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. Відповідь на це питання суттєво утруднює той факт, що впродовж періоду дослідження використовували не один набір антибіотиків, а цілих 146. Причому, навіть той набір з семи АБП, що застосовували найбільш часто, використовували лише 36 разів, що явно замало для надійних висновків. Таким чином, відповідь можна було отримати виключно за допомогою статистичних методів.

З огляду на таку природу даних, бажано було б, щоб на процес тестування можна було дивитися як на випадкову вибірку певної кількості антибіотиків з вихідного набору у 20 штук. В такому разі змінна, значеннями якої є кількість разів, котру використовували кожний з антибіотиків, має бути розподіленою нормально. Ми перевірили це припущення за допомогою тестів Шапіро-Уїлка, Колмогорова-Смірнова та Андерсона-Дарлінга. Усі вони підтвердили, що наш розподіл наближається до нормального. До того ж ми побудували графіки [3], що дозволяють візуально порівняти розподіл частот, з якими застосовували антибіотики, з нормальним (рис. 4).

Очевидно, що розподіл нашої змінної дійсно наближається до нормального, хоча ж спостерігається певна позитивна асиметрія, а кількість разів, з якою використовували канаміцин, є викидом, що можна побачити, побудувавши класичну шухлядкову діаграму Тьюкі.

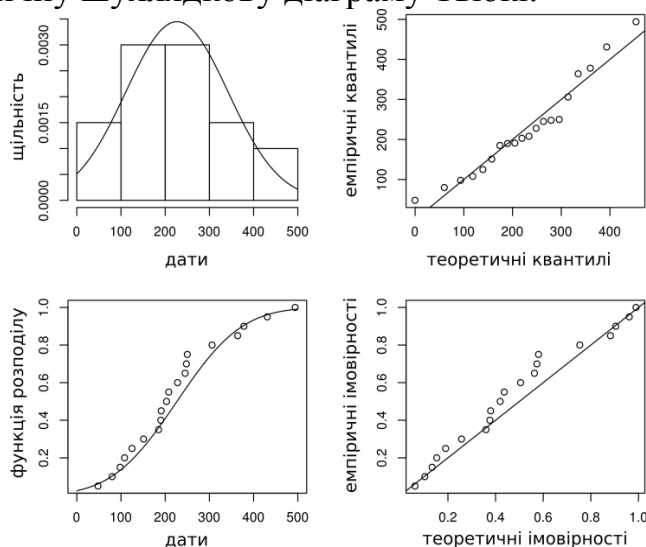


Рис. 4. Графічна перевірка на нормальність розподілу змінної, значеннями якої є кількість разів використання кожного з 20 АБП. Зліва направо, згори вниз: Гістограма для наших даних і ідеальна нормальна крива. Графік квантиль-квантиль (QQ-plot). Графік кумулятивної функції розподілу імовірностей. Графік імовірність-імовірність (PP-plot). Емпіричні дані – кружальця, теоретичні – лінії.

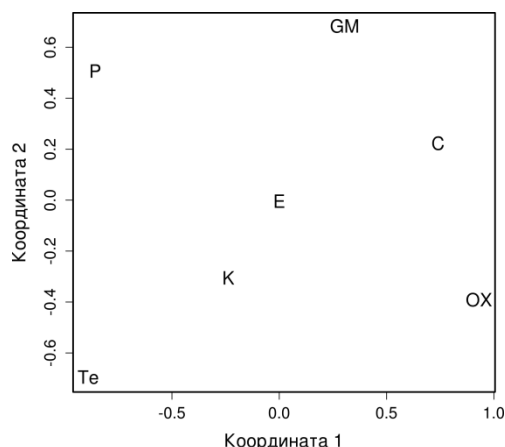


Рис. 5. Відстані між сімома антибіотиками в абстрактному двовимірному просторі що є пропорційними частоті, з якою спостерігається резистентність до обох препаратів. Позначення антибіотиків див. рис. 1.

Ми обчислили попарні коефіцієнти кореляції Спірмена [5] для усіх можливих сполучень стійкості до 19 антибіотиків (олеандоміцин було вилучено, оскільки стійкість до нього не спостерігалася). З'ясувалося, що кореляційні зв'язки сильніші за слабкі ($r > 0,3$) об'єднують групу з семи АБП, причому значення p свідчать про їх надійність. Кластерний аналіз начебто вказав, що серед цих семи існує дві групи: оксацилін, гентаміцин, левоміцетин та пеніцилін, тетрациклін, канаміцин, еритроміцин. Але бутстрап-тест [6] показав, що ці кластери надійними не є. Структура зв'язків цих антибіотиків виявилася іншою. Багатовимірне шкалювання [7] дало наступну картину (рис. 5): найміцніше пов'язаними між собою є еритроміцин і канаміцин ($r = 0,66$), а решта утворює начебто периферію. Таким чином, досить щільно пов'язаними між собою є лише стійкість до еритроміцину і канаміцину.

4. Добір на мультирезистентність у *S. aureus*.

Основним шляхом набуття резистентності до антибіотиків у *S. aureus* є горизонтальний перенос генів. В такий спосіб штам може стати резистентним до одного чи декількох антибіотиків одразу. Якщо бактерії стикаються з різними антибіотиками, то мультирезистентність є селективно вигідною. За таких умов, добір на множинну стійкість збільшуватиме частку мультирезистентних штамів.

Кількість штамів *S. aureus*, що є одночасно стійкими до певної кількості антибіотиків, наведена на рис. 6.

Видно, що найбільшою є частка чутливих штамів («резистентною» до 0 антибіотиків), найменшою – стійких одночасно до 8 АБП. За допомогою R-пакету `fitdistrplus` [3] ми спробували встановити тип розподілу, що найбільше відповідає нашим емпіричним даним. Графік Кулена і Фрея представлений на рис. 7.

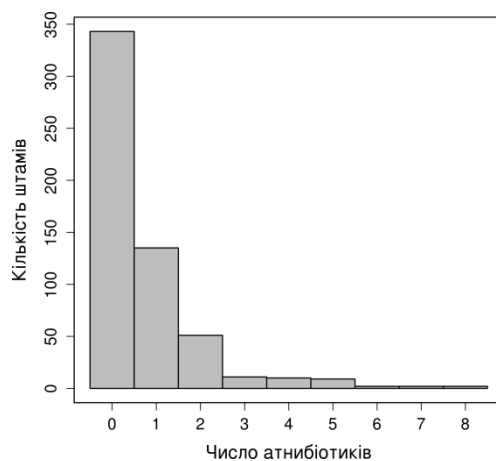


Рис. 6. Розподіл штамів *S. aureus* за частотою множинної стійкості до АБП.

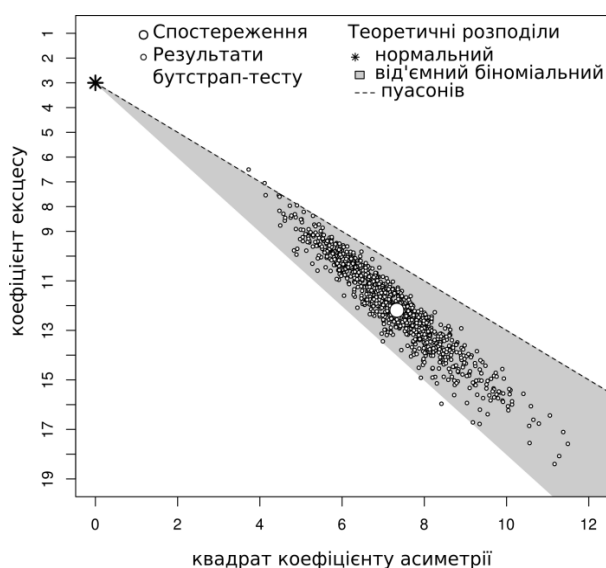


Рис. 7. Графік Кулена-Фрея з результатами бутстрап-тесту ($n = 1000$) на відповідність від'ємному біноміальному розподілу частот зустрічності мультирезистентних штамів *S. aureus*.

Виявилося, що наші дані не відповідають нормальному та Пуасоновому розподілові, натомість, чудово відповідають від'ємному біноміальному. Для підтвердження цього ми провели бутстрап-тест ($n = 1000$). Фактично, усі результати тесту знаходяться в межах від'ємного біноміального розподілу.

На наш погляд, такий характер розподілу мультирезистентності погоджується з переважно випадковим характером набуття множинної стійкості і не погоджується з припущенням про існування помітного тиску добору на мультирезистентність.

Цей висновок також узгоджується з вже зазначеною тенденцією до зниження рівня резистентності взагалі, а також відсутністю чітких кластерів в структурі мультирезистентності. Таким чином, наші дані дозволяють стверджувати, що останніми роками суттєвого тиску добору на мультирезистентність популяція *S. aureus* м. Суми не відчувала.

Висновки. 1) Серед штамів *S. aureus*, що були виділені у баклабораторії СЕС м. Суми впродовж 2008-2011 років від здорових носіїв найбільшою є частка чутливих до АБП штамів.

2) Спостерігається чітка тенденція до зниження резистентності *S. aureus* (виключення – пеніцилін та амікацин).

3) Структура мультирезистентності *S. aureus* є загалом аморфною, впевнено можна говорити лише про досить щільний зв'язок резистентності до еритромицину з стійкістю до ванкомицину.

4) Розподіл штамів *S. aureus* за частотою мультирезистентності відповідає від'ємному біноміальному розподілові, що, на нашу думку, свідчить про відсутність істотного тиску добору на множинну стійкість до антибіотиків.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Наказ МОЗ України від 05.04.2007 № 167 про затвердження методичних вказівок «Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів».
2. Chongsuvivatwong V. – epicalc: Epidemiological calculator [Електронний ресурс]: R package version 2.13.2.1 / Chongsuvivatwong V., 2011. – Режим доступу : <http://CRAN.R-project.org/package=epicalc>.
2. Delignette-Muller M. L. – fitdistrplus: help to fit of a parametric distribution to non-censored or censored data [Електронний ресурс] : R package version 0.1-3 / Delignette-Muller M. L., Pouillot R., Denis J.-B., Dutang C., 2010. – Режим доступу : <http://www.r-project.org/conferences/useR-2009/slides/Delignette-Muller+Pouillot+Denis.pdf>.
3. R: A Language and Environment for Statistical Computing [Електронний ресурс] / R Development Core Team. – R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2012. – Режим доступу : <http://www.R-project.org/>.
4. Revelle W. psych: Procedures for Psychological, Psychometric, and Personality Research [Електронний ресурс] : R package version 1.1.12 / Revelle W. – Northwestern University, Evanston, Illinois, 2011. – Режим доступу : <http://personalityproject.org/r/psych.manual.pdf>.
5. Suzuki R. pvclust: Hierarchical Clustering with PValues via Multiscale Bootstrap Resampling [Електронний ресурс] : R package version 1.2-2 / Suzuki R., Shimodaira H., 2011. – Режим доступу : <http://CRAN.R-project.org/package=pvclust>.
6. Venables W. N. Modern Applied Statistics with S / Venables W. N., Ripley B. D. – Fourth edition. – New York: Springer, 2002. – 495 p.
7. Zeileis A. Residual-based shadings for visualizing (conditional) independence / Zeileis A., Meyer D., Hornik K. // Journal of Computational and Graphical Statistics. – 2007. – Vol. 16, № 3. – Pp. 507–525.

РЕЗЮМЕ

Я.Н. Данько, О.Л. Кузнецова, И.С. Мануйлова. Чувствительность к антибиотикам штаммов *Staphylococcus aureus*, выделенный у бессимптомных носителей.

565 штаммов *Staphylococcus aureus* было выделено у здоровых носителей в 2008-2001 гг. и протестировано на чувствительность к 20 антибиотикам диск-диффузионным методом в баклаборатории СЭС г. Сумы. Анализ этих данных позволяет утверждать, что: 1) в популяции преобладают чувствительные штаммы; 2) наблюдается четкая тенденция к снижению резистентности (исключения – пенициллин и амикацин); 3) структура мультирезистентности достаточно аморфна, с уверенностью можно утверждать лишь наличие достаточно сильной связи устойчивости к эритромицину с резистентностью к канамицину; 4) распределение штаммов по частоте мультирезистентности соответствует отрицательному биномиальному распределению, что, на наш взгляд, свидетельствует об отсутствии существенного давления отбора на мультирезистентность.

Ключевые слова: *Staphylococcus aureus*, диско-диффузионный метод, чувствительность к антибиотикам, отбор на мультирезистентность.

SUMMARY

Ya.N. Danko, O.L. Kuznetsova, I.S. Manuilova. Antibiotic susceptibility of strains of *Staphylococcus aureus* isolated from asymptomatic carriers.

565 strains of Staphylococcus aureus were isolated from asymptomatic carriers in 2008-2011 and tested for susceptibility to 20 antibiotics by the CDS method in the bacteriological laboratory of the Sanitary-epidemiological station in Sumy, Ukraine. Analysis of these data suggests that: 1) population is dominated by susceptible strains; 2) there is a clear trend to decrease in resistance (except for penicillin and amikacin); 3) the structure of the multiresistance is rather amorphous, only relationship between resistance to erythromycin and kanamycin is quite strong; 4) the frequency distribution of multiresistant strains perfectly fits to the negative binomial distribution; we believe, this is due to the absence of the significant selection pressure for the multiresistance.

Key words: *Staphylococcus aureus*, CDS-method, antibiotic susceptibility, selection for the multiresistance.

УДК 577.125.8

С. М. Дмитрук¹, Л. Г. Спасьонова², С. А. Дмитрук²,
І. М. Супрун¹, І. М. Медведєва³

**ДИСЛІПІДЕМІЇ У ЖІНОК – МЕШКАНОК м. СУМИ З РІЗНИМ
РЕПРОДУКТИВНИМ СТАТУСОМ**

¹Сумський державний педагогічний університет ім. А. С. Макаренка

²Медичний центр “Флоріс”, м. Суми

³Сумська обласна клінічна лікарня

З метою вивчення розповсюдженості та структури дисліпідемій лабораторно обстежено 90 жінок репродуктивного віку, а також у періоді пери- та постменопаузи. Досліджувались показники ліпідного спектру сироватки крові. Найбільша частота та переважання атерогенних типів дисліпідемій, асоційованих з високим ризиком розвитку вільного атеросклерозу, встановлені для жінок, які перебували в періоді пери- та постменопаузи.

Ключові слова: дисліпідемія, репродуктивний статус, атерогенні порушення.

Вступ. Метаболічні порушення, пов'язані з дисбалансом співвідношення ліпідів та ліпопротеїнів крові (дисліпідемії) атерогенної спрямованості є визнаним фактором ризику розвитку серцево-судинної патології як у чоловіків, так і у жінок [1, 4, 5, 10, 11, 12, 14].

У порівнянні з чоловіками, крім аспектів, які стосуються у рівній мірі обох статей, розвиток дисліпідемій у жінок має наступні особливості: по-перше, за різними даними, прогностично значущі щодо ризику розвитку атеросклерозу, зміни у ліпідному спектрі сироватки крові жінок починаються