

ФЕНОТИПИ MLS-РЕЗИСТЕНТНОСТІ ШКІРНИХ ІЗОЛЯТІВ СТАФІЛОКОКІВ – ЗБУДНИКІВ ПІОДЕРМІЙ

О. І. Юрчишин

Івано-Франківський національний медичний університет;
76018, Івано-Франківськ, вул. Галицька, 2; e-mail: goral.oksana@mail.ru

Представлені результати дослідження фенотипових проявів MLS-резистентності у шкірних ізолятах стафілококів – збудників піодермій. Протестовано 50 штамів *S. aureus* та 51 штамі CNS. У дво- та три-дисковому тестах досліджено феномен індукції 14-членними макролідами резистентності до лінкозамідів та 16-членних макролідів. У 29,7% шкірних ізолятів стафілококів виявлено 2 індуктивні фенотипи резистентності до макролідів (D і D^+), які пов'язані з рибосомальним типом резистентності. У 15,8% стафілококів спостерігався неіндуктивний фенотип (Neg), в основі якого лежить ефлюксний механізм *mrsA*. Повну резистентність до макролідів і лінкозамідів проявили 20,8% штамів стафілококів. Чутливими до антибіотиків вказаних груп 33,7% стафілококів проявило фенотип *S*. Значення МБсК та МБцК ЕРІ для фенотипів D , D^+ та R становили >4000 мкг/мл, для фенотипу Neg - 32-500 мкг/мл, для фенотипу *S* 2-4 мкг/мл.

Ключові слова: стафілококи, антибіотикорезистентність, макроліди, піодермії.

Незважаючи на широке використання антибактеріальних препаратів у клінічній практиці, піодермії залишаються проблемою сучасної медицини [27]. Основними збудниками піодермій є *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* та коагулазо-негативні стафілококи (CNS) [11]. Препаратами вибору при лікуванні піодермій залишаються антибіотики, зокрема групи макролідів [2, 10, 18]. Їх протимікробна дія реалізується через пригнічення синтезу білків у бактеріальній клітині внаслідок блокування 50S-субодиниці рибосом [11, 14, 28]. Бактеріостатичний характер дії макролідів обумовлює швидкий темп формування резистентності до них у представників патогенної мікрофлори [8, 15, 25]. Ця резистентність часто поширюється на споріднені з макролідами лінкозаміди та стрептограміни (так звана MLS-група) [6, 16, 21].

Найбільше клінічне значення мають два механізми набування бактеріями MLS-резистентності: модифікація мішені (резистентність рибосомального типу) і активне виведення (ефлюкс) препаратів з клітини. Модифікація рибосомальної 23S-rPHK за рахунок дії ферменту метилази (що є продуктом генів родини *erm*) зумовлює високий рівень резистентності до макролідів. У стафілококів вона проявляється фенотипічно

здатністю макролідів індукувати резистентність до кліндаміцину [15, 16, 21, 26]. В основі ефлюксного механізму резистентності лежить активне виведення препаратів з мікробної клітини, яке забезпечується функціонуванням спеціальних мембранних pomp: MefA у стрептококів і MsrA у стафілококів [5, 11, 15]. Мембранна помпа MsrA, яка належить до суперродини АТФ-залежних мембранних АВС-транспортерів, виявляється у *S. aureus* і CNS. Вона забезпечує низький рівень MLS-резистентності, який поширюється лише на 14- та 15-членні макроліди [3, 9]. Лінкозаміди і 16-членні макроліди до числа можливих субстратів помпи MsrA не входять [17, 22]. Разом з тим, активний ефлюкс розглядається як перший етап формування мікробними клітинами резистентності високого рівня і не тільки до макролідів, а й до інших протимікробних препаратів: фторхінолонів, тетрациклінів, акридинів, катіонних сполук різної структури [4, 9, 25]. Тому встановлення механізмів MLS-резистентності клінічних ізолятів має важливе значення для забезпечення раціональної антибіотикотерапії пацієнтів.

Існують виразні паралелі між генетичними детермінантами MLS-резистентності стафілококів та її фенотипічним проявом [7]. Дослідження феномену індукції еритроміцином резистентності до кліндаміцину дозволило розділити штами стафілококів на 6 фенотипів [1, 18] з встановленими закономірностями генотипу резистентності.

У зв'язку з цим метою дослідження є з'ясування закономірностей поширення основних фенотипічних проявів MLS-резистентності серед шкірних ізолятів стафілококів – збудників піодермій.

Матеріали і методи.

Встановлено профілі та фенотипічні детермінанти MLS-резистентності 101 клінічного штаму стафілококів, які виділені від пацієнтів з різними формами піодермій: 51 штаму *S. aureus* і 50 штамів коагулазо-негативних стафілококів (CNS). Серед CNS переважали *S. epidermidis*, поодинокі штами належали до видів *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. warneri*. Ідентифікацію культур здійснювали за морфологічними, культуральними та біохімічними властивостями (набір «STAPHYtest 16», Lachema, Чехія) відповідно до рекомендацій «Визначника бактерій Берджі» [29].

Чутливість штамів до антибіотиків визначали дискодифузійним методом на середовищі Мюллера-Хінтона відповідно до рекомендацій NCCLS (Національного комітету клініко-лабораторних стандартів США) [20]. MLS-резистентні штами стафілококів ідентифікували на основі результатів тестування відносно шести антибіотиків: еритроміцину (ЕРІ, 15 мкг/диск), кларитроміцину (КТМ, 15 мкг/диск), рокситроміцину (РКМ, 30 мкг/диск), спіраміцину (SR, 30 мкг/диск), лінкоміцину (ЛН, 15 мкг/диск) та кліндаміцину (СЛІ, 2 мкг/диск). Для диференціації конститутивного та індукцйбельного типів MLS-резистентності використано дводисковий (еритроміцин – кліндаміцин) [1, 18] та модифікований

тридисковий (еритроміцин – кліндаміцин – джозаміцин) [4] методи. При застосуванні тридискового методу 16-членний макролід джозаміцин нами було замінено на спіраміцин. Крім описаних класичних варіантів дво- і тридискового методів феномен індукції MLS-резистентності нами досліджено також на парі антибіотиків кларитроміцин – лінкоміцин. При постановці дво- і тридискового тестів диски з антибіотиками розташовували на відстані 12 мм від краю до краю диска (відповідно до стандарту NCCLS) для оптимальної оцінки результатів індукції резистентності. Результати враховували через 16-18 та 24 години у відбитому та прохідному світлі.

Мінімальні бактеріостатичні (МБсК) та мінімальні бактерицидні (МБцК) концентрації ЕРІ вивчали методом двократних серійних розведень в сольовому агарі Мюллера-Хінтона. Реєстрацію росту культур здійснювали через 24 та 36 годин.

Для статистичної обробки результатів використовували комп'ютерні програми WHONET 5.1 [24] та UTHSCSA ImageTool 2.0 [20].

Результати та їх обговорення

На основі аналізу результатів дво- і тридискових тестів із застосуванням різних комбінацій 14-членних (ЕРІ, КТМ, РКМ) і 16-членних (SR) макролідів та лінкозамідів (ЛН, CLI) усі досліджені шкірні ізоляти стафілококів вдалося класифікувати на 5 із 6 описаних раніше [1, 18] фенотипів.

Із 101 вивчених нами штамів стафілококів у 30 штамів встановлено індукцйбельні фенотипи резистентності. Усі ці штами характеризувалися резистентністю до ЕРІ та чутливістю до CLI і SR. Але при постановці дво- і тридискових тестів спостерігалася виразна здатність ЕРІ індукувати резистентність до CLI, і в дещо меншій мірі – до SR. ЕРІ-резистентні ізоляти характеризувалися також резистентністю або істотно зниженою чутливістю до напівсинтетичних 14-членних макролідів КТМ і РКМ. В усіх штамів цієї групи встановлено також аналогічну індукцію резистентності КТМ на ЛН та резистентності РКМ на ЛН.

Таблиця 1. Розподіл шкірних ізолятів *S.aureus* і CNS за фенотипами MLS-резистентності

	n	Фенотипи MLS-резистентності				
		Neg	D	D ⁺	R	S
<i>S.aureus</i>	51	5*/10 [†]	2*/4 [†]	-	16*/31 [†]	28*/55 [†]
МБсК ЕРІ, мкг/мл		125	4000	-	4000	2
МБцК ЕРІ, мкг/мл		250	8000	-	8000	4
CNS	50	11*/22 [†]	8*/16 [†]	20*/40 [†]	5*/10 [†]	6*/12 [†]
МБсК ЕРІ, мкг/мл		32	4000	4000	8000	2
МБцК ЕРІ, мкг/мл		250	8000	8000	8000	4

Примітка: * – абсолютне число штамів, [†] – відсоток штамів

Фенотип D (рис. 1,Б) спостерігався у 10 шкірних штамів стафілококів. Він характеризується виразною деформацією зони затримки росту (ЗЗР) навколо CLI з боку ЕРИ та малими розмірами ЗЗР навколо диску з ЕРИ (6-7 мм) після 16-18 годин інкубації.

Фенотип D⁺ (рис. 1,В) спостерігався у 20 шкірних штамів стафілококів. Він характеризується деформацією ЗЗР навколо CLI з боку ЕРИ та одночасною появою невеликої кількості колоній між дисками з антибіотиками через 24 години інкубації, які краще візуалізуються в прохідному світлі. Для даного фенотипу властива також абсолютна відсутність ЗЗР навколо диску з ЕРИ. У стафілококів з фенотипом D⁺ інші 14-членні макроліди (КТМ, РКМ) також володіють здатністю індукувати резистентність до ЛН. Феномен індукції резистентності до 16-членного макроліда SR у них зберігається.

За даними генетичного аналізу (ПЛР) стафілококів з аналогічними індуктивними фенотипами продемонстровано наявність генів MLS-резистентності *ermA* у фенотипу D та *ermC* (у поєднанні з геном *ermA*, або без нього) у фенотипу D⁺ [1,18].

Фенотип R (рис. 1,Г) виявлено у 21 штаму із 102 досліджених. Він характеризується відсутністю ЗЗР навколо всіх дисків з макролідами і лінкозамидами через 16-18 годин інкубації. Результати генетичного аналізу свідчать, що стафілококи з таким фенотипом MLS-резистентності володіють повними наборами генів рибосомального типу резистентності *ermA*, *ermB* та *ermC* у поєднанні з геном плазмідного походження *mrsA*, що кодує мембранну АТФ-залежну помпу MsrA [1, 18].

Для стафілококів з описаними трьома фенотипами MLS-резистентності (D, D⁺ та R) властиві дуже високі значення МБсК та МБцК ЕРИ (>4000 мкг/мл).

Фенотип Neg (рис. 1,А) спостерігався у 16 штамів стафілококів, виділених від пацієнтів з піодерміями. Він характеризується малою ЗЗР навколо диску з ЕРИ та інших 14-членних макролідів, чутливістю до CLI, SR, ЛН, із діаметром ЗЗР більше 20-ти мм та відсутністю індукції резистентності. Даний фенотип властивий для штамів з класичним конститутивним типом резистентності тільки до 14-членних макролідів. На основі генетичного аналізу встановлено, що він забезпечується виключно ефлюксомним механізмом плазмідного походження (геном *mrsA*) [1,18].

Слід зауважити, що важливе практичне значення має саме диференціація між індуктивними фенотипами (D і D⁺) та фенотипом Neg, що дає можливість коректно застосовувати антибіотикотерапію лінкозамидами та 15,16-членними макролідами в останньому випадку.

Останній з вивчених нами фенотипів – фенотип S (рис. 1,Д) спостерігався у 34 шкірних ізолятів стафілококів. Він проявляється доброю чутливістю культур до всіх макролідів і лінкозамідів з великими значеннями ЗЗР.

Значення МБсК та МБцК ЕРІ для фенотипу Neg становить 32-500 мкг/мл, для фенотипу S – 2-4 мкг/мл.

В літературі описано ще один фенотип MLS-резистентності – HD (від англ. *hazy* – невиразний). Він характеризується невираженим, рівномірним ростом мікроорганізмів на дні чашки Петрі по всьому діаметру ЗЗР. Даний фенотип не є індуктивним, так як ріст мікроорганізмів навколо CLI за інтенсивністю відповідає росту навколо диску з ЕРІ. Генетичний аналіз підтверджує конститутивний механізм MLS-резистентності, що відповідає фенотипу R [1, 18].

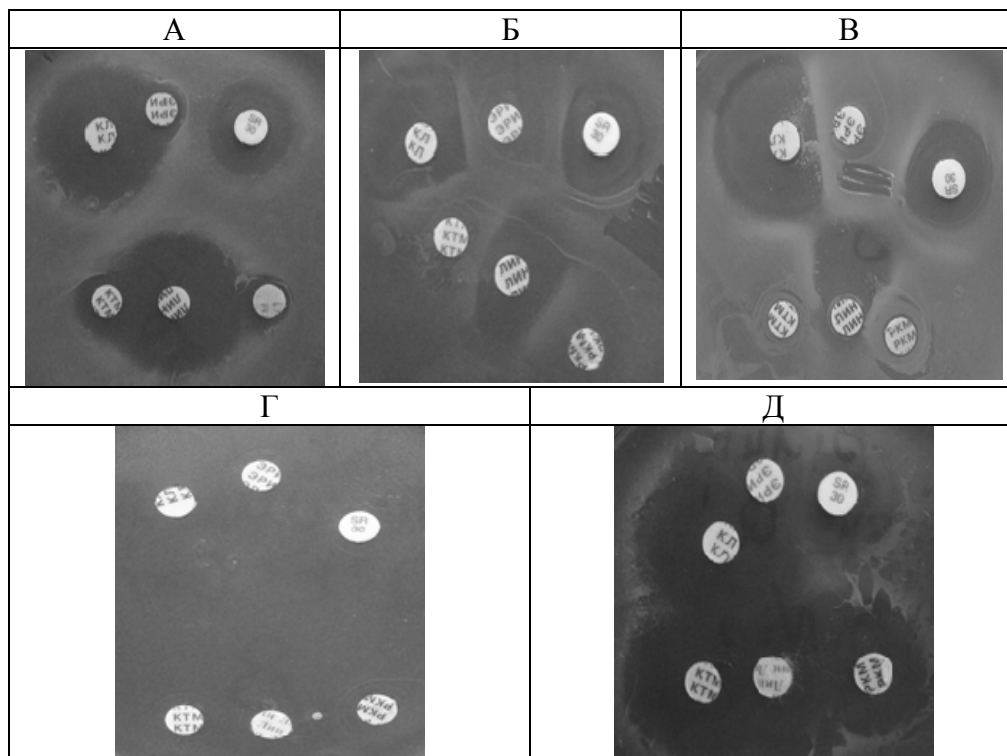


Рис. 1. Фенотипи MLS-резистентності стафілококів: фенотип Neg (А), фенотип D (Б), фенотип D⁺(В), фенотип R (Г), фенотип S (Д)

Верхній ряд антибіотиків (зліва-направо): CLI – кліндаміцин, ЕРІ – еритроміцин, SR – спіраміцин. Нижній ряд антибіотиків (зліва – направо): КТМ – кларитроміцин, ЛН – лінкоміцин, РКМ – рокситроміцин

У ході дослідження ми виявили досить цікаву особливість фенотипів MLS-резистентності у золотистого стафілокока. Більшість з виділених від пацієнтів з піодерміями штамів *S.aureus* (66%) проявили 1 фенотип MLS-резистентності – R, деякі з асоційованою MRSA резистентністю, що ставить під сумнів терапевтичну ефективність антибіотиків цих груп при лікуванні піодермій. Решта штамів *S.aureus* проявили фенотип S.

Висновки.

1. Прості і дешеві дво-і тридискові тести дозволяють здійснити фенотипічну диференціацію механізмів MLS-резистентності клінічних ізолятів стафілококів.

2. Визначення індуктивного та не індуктивного фенотипів резистентності у збудників піодермій дозволяє оцінити терапевтичну ефективність антибіотиків MLS-групи.

3. 66% штамів *S.aureus*, основного збудника піодермій, проявили фенотип R, деякі з штамів з асоційованою MRSA резистентністю, що ставить під сумнів терапевтичну ефективність антибіотиків цих груп при лікуванні піодермій.

Література

1. Christine D.S., Patti M.R., Morrell A.K. // J. Clin. Microbiol. – 2005. – Vol.43, №4. – P. 1716-1721.
2. Dreno B., Foulc P., Reynaud A. et al. // Eur. J. Dermatol. – 2005. – Vol.15, №3. – P. 152-155.
3. Fiebelkorn K.R., Crawford S. A., McElmel M.L. // J. Clin. Microbiol. – 2003. – Vol.41, №10. – P. 4740-4744.
4. Giovanetti E., Montanari M.P., Mingoia M. et al. // Antimicrob. Agents Chemother. – 1999. – Vol.43, №8. – P. 1935-1940.
5. Huda N., Lee E.W., Chen J. et al. // Antimicrob. Agents Chemother. – 2003. – Vol.47, №8. – P. 2413-2417.
6. Korczynska M., Mukhtar T.A., Wright G.D. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. – 2007. – Vol. 104, №25. – P.10388-10393.
7. Leclercq R., Brisson A., Duval J. et al. // Antimicrob. Agents Chemother. – 1987. – Vol.31, №12. – P. 1887-1891.
8. Leclercq R., Courvalin P. // Antimicrob. Agents Chemother. – 1991. – Vol.35, №7. – P. 1267-1272.
9. Lina G., Quaglia A., Leclercq R. // Antimicrob. Agents Chemother. – 1987. – Vol.43, №5. – P. 1062-1066.
10. Mills O., Thornsberry C., Cardin C.W. et al. // ActaDerm Venerool. – 2002. – Vol. 82. №1. – P. 260-265.
11. Mulazimogly L., Tulkens P., Francoise Van Bambeke // Antimicrob. Therapy and Vaccines. – 2004. – Vol.2. – P. 243-262.
12. Paul.C.S., Ilendo E., Ristow K.L. // J. Clin. Microbiol. – 2004. – Vol.42, №6. – P. 2777-2779.
13. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Ninth Informational Supplement // NCCLS M 100-S8; M100-S9. – January, 1999. – 84 p.
14. Prunier A.L., Malbruny B., Tande D. et al. // Antimicrob. Agents Chemother. – 2002. – Vol.46, №9. – P. 3054-3056.
15. Roberts M.C., Sutcliffe J., Courvalin P. et al. // Antimicrob. Agents Chemother. – 1999. – Vol.43, №12. – P. 2823-2830.

16. Schmitz F.J., Sadurski R., Kray A. et al. // J. Antimicrob. Chemother. – 2000. – Vol.45, №6. – P. 891-894.
17. Smita T. V., Warren D.J., McDermott L.M. et al. // Antimicrob. Agents Chemother. – 1987. – Vol.31, №5. – P. 735-743.
18. Steward C.D., Raney P.M., Morrell A.K. et al. // J. Clin. Microbiol. – 2005. – Vol.43, №4. – P. 1716-1721.
19. Sultana N., Arayne M.S., Sabri R. // Pakistan j. Pharm. Sci. – 2005. – Vol.18, №2. – P. 35-39.
20. UTHSCSA ImageTool 2.0, The University of Texas Health Science Center in San Antonio, ©1995-1996. – Режим доступу: <http://ddsdx.uthscsa.edu/>. – Заголовок з екрану.
21. Warren D. J., Smita T.V., Donald T. D. // Antimicrob. Agents Chemother. – 1987. – Vol. 31, №6. – P. 883-888.
22. Weaver J.R., Pattee P.A. // J. Bacteriol. – 1964. – Vol.88, №3. – P. 574-580.
23. Westh H., Hougaard D.M., Vuust.J. et al. // Antimicrob. Agents Chemother. – 1995. – Vol.39, №2. – P. 369-373.
24. WHONET 5.1, WHO Collaborating Centre for the Surveillance of Antibiotic Resistance, ©1989-2001. – Режим доступу: <http://www.who.int/drugresistance/whonetsoftware/>. – Заголовок з екрану.
25. Wondrack L., Massa M., Yang B.V. et al. Antimicrob. Agents Chemother. – 1996. – Vol.40, №4. – P. 992-998.
26. Wozniak M., Tiuryn J., Wong L. // BMC Genomics. – 2012. – Vol.13, №7. – P. 1-17.
27. Белькова Ю.А. Пиодермии в амбулаторной практике / Ю.А. Белькова // Болезни и возбудители. – 2005. – Т.7, №3. – С. 255-267.
28. Майданник В.Г. Азитромицин: антибактериальные и неантибактериальные эффекты / В.Г. Майданник, В.Д. Срибная // Международный журнал педиатрии, акушерства и гинекологии. – 2013. – Т.3, №1.
29. Определитель бактерий Берджи. 9-е изд. В 2-х т. Пер. с англ. / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уильямса. – М.: Мир, 1997. – С. 553-559.

*Стаття надійшла до редакційної колегії 23.11.2014 р.
Рекомендовано до друку д.м.н., професором **Зайцем Л.М.**,
д.м.н., професором **Кондратюком В.А.** (м. Тернопіль)*

MLS-RESISTANCE PHENOTYPES OF STAPHYLOCOCCI SKIN ISOLATES – PATHOGENS OF PYODERMA

O. I. Yurchyshyn

*Ivano-Frankivs'k National Medical University;
76018, Ivano-Frankivs'k, Galytska str., 2; e-mail: goral.oksana@mail.ru*

Article deals with MLS-resistance phenotypes of staphylococci skin isolates mpathogens of pyoderma. 50 isolates of S. aureus and 51 isolate of CNS were used to perform resistance induction testing of 14-macrolides to lincosamides and 16-macrolides. 29,7% of isolates showed two distinct induction phenotypes (labeled D and D⁺) linked with ribosomal resistance. 15,8% of isolates showed noninduction phenotype (Neg), contained mrsA. 20,8% of isolates demonstrated complete resistance to macrolides and lincosamides. Finally 33,7% of isolates were susceptible by disk testing to all antibiotics (S phenotype). D, D⁺ and R phenotype isolates showed ERY MICs >4000 µg/ml, Neg phenotype – 32-500 µg/ml, S phenotype – 2-4 µg/ml.

Key words: staphylococci, antibiotic resistance, macrolides, pyoderma.