

УДК 615.33.015.8.07

## Выявление резистентности к метициллину и другим $\beta$ -лактамам антибиотикам методом скрининга

### Введение

С момента появления в 70-х годах метициллинорезистентные стафилококки и прежде всего *метициллинорезистентные штаммы Staphylococcus aureus* (MRSA) являются одними из ведущих возбудителей нозокомиальных инфекций. Частота MRSA в структуре стафилококковых инфекций в последние годы резко возросла во всем мире, например, в США с 2% в 1975 г. до 35% в 1996 г.

Резистентность стафилококков к оксациллину (метициллину) может быть обусловлена тремя основными механизмами:

- продукцией дополнительного *пенициллинсвязывающего белка* (ПСБ) – ПСБ-2а (фермента, участвующего в синтезе клеточной стенки), кодируемого хромосомальным геном *tesA* – классическая, или истинная резистентность к метициллину (оксациллину);

- инактивацию вследствие гиперпродукции бета-лактамаз;

- модификацию нормальных ПСБ.

С клинической точки зрения, важно дифференцировать штаммы с классической (*tesA*-обусловленной) резистентностью от

штаммов с двумя другими редко встречающимися механизмами резистентности, обуславливающими низкий или пограничный уровень устойчивости. Это связано с тем, что при инфекциях, вызванных штаммами с *tesA*-обусловленной резистентностью, терапия бета-лактамами антибиотиками (пенициллинами, цефалоспоридами, карбапенемами) будет неэффективна.

Кроме того, эти штаммы часто бывают резистентны практически ко всем другим классам антибиотиков за исключением гликопептидов (ванкомицин, тейкопланин). Фенотипические характеристики, которые могут помочь дифференцировать три перечисленных механизма резистентности, изложены в таблице.

Штаммы с классическим типом резистентности могут в свою очередь быть гомо- или гетерогенными по типу экспрессии устойчивости. При гомогенном типе экспрессии практически все микробные клетки проявляют резистентность в стандартных *in vitro* тестах, в то время как при гетерогенном типе только небольшая часть клеток проявляет резистентность фенотипически. Нередко только 1 из 10 – 100 млн клеток в популяции с наличием гена *tesA* экспрессирует резистентность, что обуславливает получение пограничных результатов при определении чувстви-

тельности к оксациллину (МПК – 2–8 мг/л). Резистентность, обусловленная гиперпродукцией  $\beta$ -лактамаз и мутацией нормальных ПСБ, также приводит к получению пограничных значений МПК. Однако резистентность к оксациллину, обусловленная гиперпродукцией  $\beta$ -лактамаз, легко отличается от классической резистентности по ее обратимости при использовании ингибиторов  $\beta$ -лактамаз.

В отличие от штаммов с классической резистентностью гиперпродуценты  $\beta$ -лактамаз и штаммы с мутациями нормальных ПСБ обычно не имеют множественной резистентности к другим антибиотикам.

Наличие классической резистентности наиболее легко определить методом скрининга, так как рост микробных клеток с неклассическими типами резистентности обычно ингибируются.

Для определения чувствительности используется оксациллин ввиду его более высокой стабильности при хранении по сравнению с метициллином.

### Принцип

Для идентификации резистентности к оксациллину (метициллину) у стафилококков необходимо соблюдение следующих условий:

- 1) добавление 4% NaCl в агар с оксациллином (рН 7,2–7,4, так

Контактный адрес:  
Дехнич Андрей Владимирович  
214019, Смоленск, а/я 5  
Факс: (0812) 55-0624  
Эл. почта: andrei@cliph.keytown.com

Методические рекомендации подготовил А.В. Дехнич (Кафедра клинической фармакологии и антимикробной химиотерапии Смоленской государственной медицинской академии)

## Типы резистентности к метициллину (оксациллину) у стафилококков

Тип резистентности	Наличие гена <i>mecA</i>	Механизм	Пограничная резистентность	Эффективность ингибиторов $\beta$ -лактамаз	Резистентность	
					перекрестная	множественная к другим классам антибиотиков
Классическая:						
гомогенная	+	Дополнительный	-	-	+	+
гетерогенная	+	ПСБ (ПСБ-2а)	+/-	-	+	+
Инактивация $\beta$ -лактамазами	-	Гиперпродукция $\beta$ -лактамаз	+	+	-	-
Модифицированные ПСБ (1, 2, 4)	-	Мутации обычных ПСБ (1, 2, 4)	+	-	-	-

как при более низком рН увеличивается число ложноотрицательных результатов);

2) температура инкубации 35 °С;

3) длительность инкубации 24 ч для *S. aureus* и 48 ч – для коагулазоотрицательных стафилококков;

4) стандартизированное число микроорганизмов.

### Микроорганизм

Чистая культура *Staphylococcus* spp., инкубированная в течение 18–24 ч на кровяном агаре.

### Материалы

1. Агар Мюллера–Хинтон с добавлением 4% NaCl (4 г на 100 мл среды) и 6 мг/л оксациллина (0,6 мг на 100 мл среды). Агар Мюллера–Хинтон хранится при температуре 2–8 °С, готовится согласно прописи на этикетке, 4% NaCl добавляется до автоклавирования.

2. Субстанция оксациллина с известной активностью предварительно растворяется в стерильной дистиллированной воде (расчет концентрации оксациллина проводят с учетом его активности) и добавляется в охлажденный на водяной бане до 48–50 °С агар Мюллера–Хинтон. Приготовленный агар разливают по чашкам с толщиной слоя 3–4 мм (на чашку диаметром 100 мм – 25 мл). Готовые чашки со средой хранятся в пластиковых

пакетах при температуре 4–8 °С не более 5 сут.

3. Для контроля роста необходимо также приготовить чашки с агаром, содержащим 4% NaCl, но без антибиотика.

4. Кровяной агар с чистой культурой стафилококка, инкубированной в течение 18–24 ч.

5. Стерильный физиологический раствор.

6. Стандарт мутности 0,5 по Мак-Фарланду.

7. Стерильные тампоны или микропипетка (10 мкл).

8. Термостат с температурой инкубирования 35 °С.

### Контроль качества

1. Исследование проводят при обязательном контроле роста испытуемых культур на агаре Мюллера–Хинтон с 4% NaCl без оксациллина (культуру наносят так же, как на агар с оксациллином).

2. Контрольные штаммы:  
– *S. aureus* ATCC 38591 – резистентный;  
– *S. aureus* ATCC 29213 – чувствительный.

### Постановка теста

**Приготовление инокулюма.** Бактериальную взвесь стафилококка готовят из нескольких колоний с одинаковой морфологией на стерильном физиологическом растворе (3 мл) и доводят до мутности 0,5 по Мак-Фарланду ( $1,5 \cdot 10^8$  КОЕ/мл).

**Инокуляция. Метод I (микропипеткой):**

а) приготовить разведение 1:100 стандартного инокулюма 0,5 по Мак-Фарланду для получения бактериальной взвеси, содержащей  $1,5 \cdot 10^6$  КОЕ/мл (например, добавить 0,1 мл стандартной суспензии к 9,9 мл стерильного физиологического раствора);

б) с помощью микропипетки нанести каплю (10 мкл) разведенной стандартной суспензии на поверхность агара с оксациллином.

2. **Метод II (с помощью тампона):**

а) погрузить стерильный ватный тампон в пробирку со стандартизированной суспензией (0,5 по Мак-Фарланду), затем отжать избыток влаги о стенку пробирки;

б) коснуться тампоном поверхности агара с оксациллином.

**Инокуляция. Штаммы *S. aureus*** инкубируются при температуре 35 °С в течение полных 24 ч, а коагулаза(–) стафилококков – в течение 48 ч.

**Примечание.** *Среда АГВ не может быть рекомендована для постановки теста в связи с высокой частотой ложноположительных результатов.*

### Учет результата

**Интерпретация:**

1) появление видимого роста более 1 колонии на месте нанесения культуры означает устойчи-

вость данного штамма к оксациллину (метициллину);

2) при отсутствии роста на месте нанесения культуры исследуемый штамм учитывается как чувствительный к метициллину (оксациллину).

3) при сомнительных результатах, а также для штаммов, выделенных у больных с клинически неэффективной терапией и у больных с серьезными инфекциями, необходимо провести развернутое исследование с определением МПК к оксациллину и гену *tesA*.

#### Представление результата:

1) *S. aureus* или коагулаза(-) стафилококк (*S. epidermidis*), чувствительный к метициллину (оксациллину);

2) *S. aureus* или коагулаза(-) стафилококк (*S. epidermidis*), резистентный к метициллину (MRSA или MRSE).

Метициллино (оксациллино) резистентные стафилококки должны расцениваться как резистентные ко всем  $\beta$ -лактамам – пенициллинам, цефалоспорином, карбапенемам, комбинациям пенициллинов с ингибиторами  $\beta$ -лактамаз. Кроме того, среди метициллинорезистентных стафилококков очень часто наблюдается ассоциированная резистентность к другим антибиотикам – аминогликозидам, макролидам, хинолонам, тетрациклинам.

#### Ограничения метода

1. Скрининг на агаре с оксациллином предназначен для фенотипического определения штаммов, имеющих ген *tesA*. Однако штаммы с другими типами резистентности иногда могут давать ложноположительный результат.

2. Метод скрининга для выявления резистентности к оксацил-

лину (метициллину) менее надежен у коагулаза(-) стафилококков, чем у *S. aureus*.

**Примечание.** *Оксациллин в сравнении с метициллином менее стабилен к действию стафилококковых  $\beta$ -лактамаз, что может привести к получению большего числа ложноположительных результатов, чем при использовании метициллина. В то же время метициллин в сравнении с оксациллином значительно менее стабилен при хранении, что и ограничивает его применение.*

#### Ванкомицинорезистентный *Staphylococcus aureus*

О возможности появления ванкомицинорезистентных штаммов *S. aureus* стали задумываться около 10 лет назад после сообщений о появлении резистентности к ванкомицину у энтерококков.

Первое сообщение о выделении метициллинорезистентного *S. aureus* со сниженной чувствительностью к ванкомицину (МПК 8 мг/л) из клинического материала появилось в 1996 г.

Несмотря на значение МПК к ванкомицину, соответствующее диапазону умеренной резистентности, данный штамм был зарегистрирован как VRSA (ванкомицинорезистентный *S. aureus*) ввиду клинической неэффективности ванкомицина. У этого штамма не было найдено ни одного из ранее известных механизмов резистентности к ванкомицину; отмечено только увеличение толщины клеточной стенки и концентрации пенициллин-связывающих белков 2 и 2a.

Далее одно за другим последовали сообщения о выделении из клинического материала штаммов *S. aureus* с МПК к ванкомицину 8 мг/л, обозначенных как VISA (*S. aureus* со сниженной чувствительностью к ванкомицину).

В результате углубленного исследования ванкомицинорезистентности у MRSA при скрининге более чем 2000 штаммов из различных стационаров было выявлено от 1 до 25% (!) штаммов с гетерогенной (индуцибельной) резистентностью к ванкомицину, экспрессирующих ее с частотой около 1 клетки на 1 млн. Такие штаммы могут являться предшественниками VRSA.

Специалисты пока не пришли к согласию, какой термин использовать: VRSA или VISA. Это связано с тем, что, несмотря на значения МПК, соответствующие диапазону умеренной резистентности, налицо клиническая неэффективность ванкомицина при терапии VRSA- и VISA-инфекций.

Многие специалисты предлагают свои методы скрининга ванкомицинорезистентности у стафилококков. Однако общепринятые стандарты еще не разработаны.

Таким образом, чрезвычайно важна разработка методов лабораторной диагностики и мониторинга ванкомицинорезистентности, особенно у пациентов, получающих или получавших ванкомицин/тейкоплагин, и при неэффективности этой терапии.

Следует разработать методики контроля за VRSA-инфекциями. Для предупреждения распространения VRSA необходимо изолировать больных и носителей *S. aureus*. Кроме того, применение антибиотиков должно предусматривать снижение числа необоснованных назначений ванкомицина.

В России пока не описано ни одного штамма *S. aureus* со сниженной чувствительностью к ванкомицину. Вероятнее всего это связано с редким использованием ванкомицина в клинической практике.