

УДК 619:616.98:579.861.2

ГАРКАВЕНКО Т.О., канд. вет. наук, ст. наук. сп., e-mail: bac@vetlabresearch.gov.ua

Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи

КОЗИЦЬКА Т.Г., e-mail: bakteriologiazrdlvm@mail.ru

Запорізька регіональна державна лабораторія ветеринарної медицини

МЕХАНІЗМ РЕЗИСТЕНТНОСТІ ТА МЕТОДИ ВИЯВЛЕННЯ МЕТИЦИЛІНРЕЗИСТЕНТНОГО СТАФІЛОКОКА (MRSA) (ОГЛЯДОВА СТАТТЯ)

В сучасний період MRSA розглядають як один із провідних нозокоміальних патогенів. В статті наведені основні механізми розвитку резистентності метицилінрезистентних стафілококів, а також проведено порівняльний аналіз лабораторних методів виявлення MRSA. Підведений підсумок про переваги та недоліки методів.

Визначено місце мікробіологічних методів виявлення MRSA, так як вони є простими у виконанні, високочутливими, масовими у використанні, дешевими і такими, що не потребують для проведення контролювання використання дорогих приладів та тест-систем.

***Ключові слова:** антибіотики, метицилін, оксацилін, резистентність, стафілокок, лабораторні дослідження, механізм резистентності.*

Вступ. Антибіотикорезистентність основних збудників інфекційних захворювань є однією з найбільших проблем сучасної медицини. Швидкість, з якою формується і розповсюджується стійкість мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів, вражає. Препарати, які ще декілька років тому були ефективними, сьогодні втрачають свої позиції, а їх використання вимушено обмежується. Згідно даних ВООЗ, швидке підвищення стійкості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів загрожує підірвати основи охорони здоров'я, зроблені медичною наукою протягом останніх 50 років [7].

Staphylococcus aureus (золотистий стафілокок) – перший з мікроорганізмів, у якого була виявлена стійкість до раніше безвідмовно діючих антибактеріальних препаратів (АБП). З нього почалась історія вивчення пеніцилінази – першої в ряді β-лактамаз.

Стійкість до метициліну (оксациліну), пов'язана зі стійкістю до інших β-лактамних антибіотиків, дала назву мультирезистентним стафілококам. Вперше про метицилінрезистентний стафілокок (*MRSA*) заговорили більш, ніж 50 років тому під час клінічних випробувань метициліну в Англії. Відтоді в світовій науковій літературі, присвяченій антибіотикам, найбільш вживаною аббревіатурою являється *MRSA – Methicillinresistant Staphylococcus aureus*. Золотистий стафілокок і на теперішній час продовжує очолювати список проблемних мікроорганізмів [1]. Набувши стійкості до синтетичних пеніцилінів, *MRSA* стали швидко поширюватися. Уже в 1967 році вони були зареєстровані в Швейцарії, Франції, Данії, Австралії, Індії та інших країнах.

Зокрема, у Данії розповсюдженість *MRSA* серед стафілококів у період з 1967 до 1971 року склала близько 15% [2]. Сьогодні розповсюдженість інфекцій серед людей, викликаних *MRSA*, має такі географічні особливості – в скандинавських країнах та Нідерландах – 5%, Німеччині – 7%, Греції, Італії, Португалії, Франції – 36–57%, Китаї та Японії – 60%, Російській Федерації – 27–73%, в Україні ця цифра складає 31,4% [3].

Явище метицилінрезистентності стафілококів з часу відкриття цього феномену представляє значний науково-практичний інтерес та занепокоєння як у клініцистів, так і у мікробіологів.

Стафілококи відіграють значну роль при появі різних захворювань як людей, так і тварин. Більшість інфекцій, викликаних *MRSA*, проявляється як ускладнення основного захворювання або в результаті проведення медичних маніпуляцій. Внутрішньолікарняні інфекції, викликані *MRSA*, підвищують захворюваність та ризик смертності, а також вартість лікування пацієнтів [4].

Вивчення чутливості стафілококів до метициліну як маркеру полірезистентності включає визначення мінімальних інгібуючих концентрацій антибіотика (МІК) – це найменша концентрація антибіотика, яка *in vitro* повністю пригнічує видимий ріст мікроорганізмів та виражається в абсолютних одиницях дії (мг/л або мкг/см³) [5].

Метою роботи було проаналізувати механізм резистентності метицилінрезистентних стафілококів, зробити порівняльний аналіз наявних методів їх виявлення та обґрунтувати найбільш оптимальний метод для використання в мікробіологічних лабораторіях України.

Матеріали та методи досліджень. Матеріалом для дослідження були літературні дані, дані референс-лабораторій, звіти науково-практичних конференцій Міністерства охорони здоров'я України, Державної санітарно-епідеміологічної служби України, Національної академії медичних наук України, дані Всесвітньої Організації Охорони здоров'я (ВООЗ).

Результати досліджень та їх обговорення. Рівні резистентності різних мікроорганізмів до різних антибіотиків мають відмінності в залежності від регіону. Тому, насамперед, вкрай важливою є адекватна оцінка стану антибіотикорезистентності основних збудників до широко використовуваних антибактеріальних препаратів. На жаль, в Україні сьогодні не існує актуальних, об'єктивних, систематизованих даних щодо стану антибіотикорезистентності мікроорганізмів [10–13].

Під резистентністю мікроорганізмів до антибактеріальних засобів розуміють збереження їх здатності до розмноження в присутності таких концентрацій цих речовин, які створюються при введенні терапевтичних доз.

Існує декілька типів стійкості бактерій до антибіотиків:

– природна стійкість, яка визначається властивостями даного виду або роду мікроорганізмів, наприклад, стійкість грамнегативних бактерій до бензилпеніциліну, бактерій – до протигрибкових, а грибів до антибактеріальних препаратів;

– набута стійкість, яка в свою чергу може бути первинною та вторинною.

Термін «набута стійкість» застосовують у випадках, коли в чутливій до даного препарату популяції мікроорганізмів знаходять резистентні варіанти. Вона виникає в основному внаслідок мутацій, що відбуваються в геномі клітини.

Первинна стійкість (як результат мутації) виявляється в окремих клітинах популяції через її гетерогенність до початку лікування антибіотиками.

Вторинна стійкість формується також за рахунок мутацій. Може зростати при контакті бактерій з антибіотиками. Мутації не направлені та не пов'язані із дією антибіотиків. Вони елімінують чутливі особини популяції, і відповідно починають переважати резистентні клітини [14].

До недавнього часу штами *MRSA* були найбільш чутливими до β -лактамних антибіотиків. Однак з часом резистентність багатьох штамів стафілококів до цих антибіотиків почала збільшуватися.

MRSA часто являється збудником, причиною внутрішньолікарняних інфекцій (*HA-MRSA* – *health care associated MRSA*), які стали стійкими до найбільш поширених антибіотиків, що значно ускладнює лікування. Все частіше сукупність асоційованих штамів *MRSA* зустрічається у людей, які не були госпіталізовані, та навіть у здорових дітей (*CA-MRSA* – *community associated MRSA*).

Штами метицилінрезистентного стафілококу при тісному контакті можуть передаватися тваринам, які, в свою чергу, можуть виступати в ролі носіїв та в подальшому передавати цих збудників людям.

Адаптовані до тварин штами *MRSA* (*LA-MRSA* – *livestock associated MRSA*) опинилися в центрі уваги всього декілька років тому. Наприклад, клональний комплекс *MRSA* CC398, який найчастіше зустрічається у свиней, викликає особливе занепокоєння, так як його безсимптомне носійство поширене також серед людей, які працюють з інфікованими тваринами. Зустрічалися випадки колонізації CC398 також у інших видів тварин.

Відомі спалахи інфікування у коней, собак та котів, в основному *CA-MRSA*, що може сприяти зараженню людей, свійських тварин та об'єктів навколишнього середовища [1, 6].

Харчові продукти тваринного походження нерідко можуть бути контаміновані *MRSA*, в результаті чого формується основний шлях передачі інфекції від сільськогосподарських тварин до людей. Факторами передачі можуть також стати фрукти та овочі, контаміновані випорожненнями інфікованих тварин або брудною водою.

Метицилін практично повністю витіснив з клінічної практики оксацилін, відповідно з'явився термін «оксацилінорезистентність», що є повним синонімом терміну «метицилінорезистентність».

На генетичному рівні резистентність стафілокока пов'язана з наявністю так званого *mec*-комплексу в складі стафілококової хромосомної касети *mec* (*staphylococcal cassette chromosome mec* – *SCCmec*). Основними компонентами

мес-комплексу являються: структурний ген *mes A*, який кодує синтез додаткового пеніцилінзв'язуючого білку – ПЗБ2а, що володіє низькою афінністю до β-лактамних антибіотиків (пеніциліну, цефалоспорину, монобактамів, карбапенів); *mesI* та *mes R1* регулярні елементи, які контролюють транскрипцію *mes A*, а також *mes*-асоційовані ДНК. За розвиток метицилінрезистентності безпосередньо відповідає *mes A*.

Пеніцилінзв'язуючі білки (ПЗБ) представляють собою пептидази, які беруть участь у синтезі пептидоглікану клітинної стінки бактерій. Дія β-лактамів обумовлена сполученням їх структурних компонентів – білків та блокуванням, таким чином синтезу клітинної стінки бактерій (рис.1). Наявність ПЗБ2а вказує на низьку чутливість до всіх β-лактамних антибіотиків.

З клінічної точки зору важливо диференціювати штами з класичною («*mesA*»- обумовленою) резистентністю від штамів з парою інших механізмів резистентності, що рідко зустрічаються та обумовлюють низький або граничний рівень стійкості. Це пов'язано з тим, що при інфекціях, які викликані штамми з *mesA*-обумовленою резистентністю, терапія β-лактамними антибіотиками буде неефективною. Фенотипові характеристики, які можуть допомогти диференціювати перерахованих вище механізми резистентності, вказані в табл. 1.

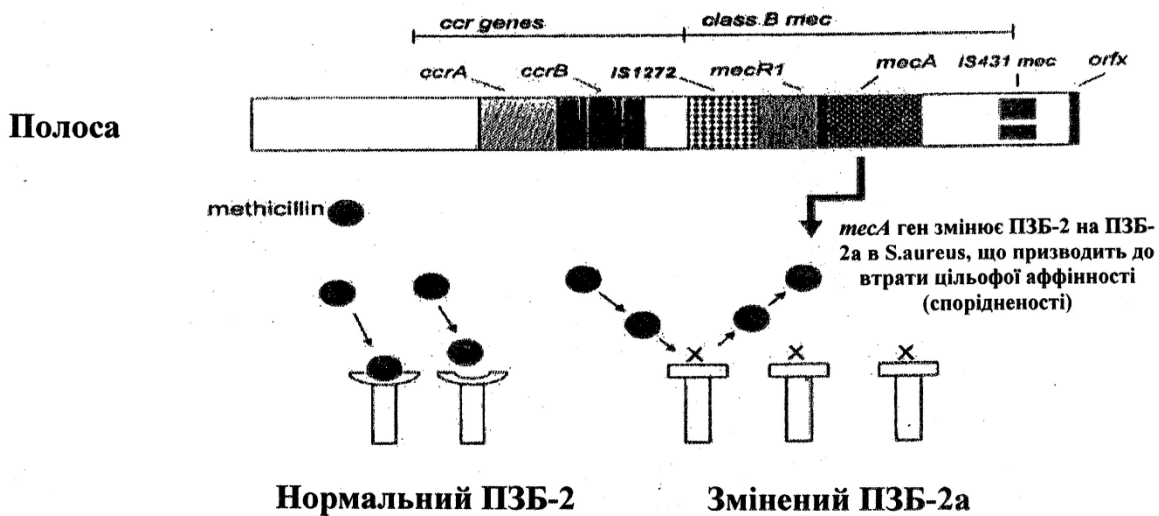


Рис. 1. Структура хромосомної *mes* стафілококової касети з комплексом рекомбінантних генів (Малайзія, Університет Селангора, факультет біомедицини та охорони здоров'я).

Примітки:

- *mes* - комплекс, який містить *mes A* ген, що відповідає за стійкість *S. aureus* до β-лактамів;
- *IS1272* – вставка послідовності, як елемент;
- *ccrA* та *ccrB* – хромосомна касета рекомбінантних генів А та В, що мобілізують *mes*-елемент;
- *mes R1* - *mes*-датчик, перетворювач та репресор генів, які регулюють продукування ПЗБ-2аБ, відповідального за стійкість β-лактамів;
- *IS431* – інтегрована плазмідна, яка кодує стійкість до тетрациклінів;
- *orfx* – відкрита рамка зчитування, в якій розташовані елементи (хромосомні стафілококові касети) [15].

Штами з класичним типом резистентності можуть, в свою чергу, бути гомо- або гетерогенними за типом експресії резистентності. При гомогенному типі експресії практично всі мікробні клітини проявляють резистентність в *in vitro*-тестах, в той час, як при гетерогенному типі тільки невелика частина клітин проявляє резистентність фенотипово. Нерідко тільки 1 з 10-100 млн. клітин в популяції з наявним геном *tes A* експресує резистентність, що веде до отримання граничних результатів при визначенні чутливості до оксациліну (МІК 2-8 мг/л). Резистентність, обумовлена гіперпродукцією β-лактамаз та мутацією нормальних ПЗБ, також призводить до отримання граничних значень МІК. Хоча резистентність до оксациліну, обумовлену гіперпродукцією β-лактамаз, можна легко відрізнити від класичної резистентності за зворотністю резистентності при використанні інгібіторів β-лактамаз [16].

Проведення лабораторних досліджень з метою визначення чутливості мікроорганізмів-збудників інфекційних хвороб людини та тварин до антибактеріальних препаратів набуває все більш важливого значення.

Таблиця 1

Типи резистентності до метициліну (оксациліну) у стафілококів

Тип резистентності	Наявність гену «tes A»	Механізм	Гранична резистентність	Ефективність інгібіторів β-лактамаз	Перехрестна резистентність до всіх β-актамів	Полірезистентність до інших класів антибіотиків
Класична - гомогенна - гетерогенна	+ +	Додатковий ПЗБ (ПЗБ-2a)	- +/-	- -	+ +	+ +
Інактивація β-лактамазами	-	Гіперпродукція β-лактамаз	+	+	-	-
Модифіковані ПЗБ (1,2,4)	-	Мутації звичайних ПЗБ (1,2,4)	+	-	-	-

Вивчення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів здійснюється для вирішення низки завдань:

- обґрунтування цілеспрямованої індивідуальної антибактеріальної терапії для лікування конкретної інфекційної хвороби;
- обґрунтування емпіричної терапії окремих нозологічних форм інфекційних хвороб у межах лікувальних установ/господарств або регіонів;
- спостереження за розповсюдженням антибіотикорезистентності мікроорганізмів;
- дослідження нових хімічних сполук на наявність антибактеріальної активності.

Сьогодні для визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів існує 5 методів дослідження:

- метод серійних розведень у бульйоні та агарі;

- диско-дифузійний метод;
- Е-тест;
- автоматизовані (рідше роботизовані) автоматичні системи (комплекси) детекції мікроорганізмів і їх чутливості до антимікробних препаратів;
- молекулярно-генетичний метод [8].

Стандартні методи визначення чутливості мікроорганізмів до антибіотиків були розроблені у другій половині ХХ століття і з тих пір принципово не змінилися.

Серед стандартизованих методів визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів розрізняють методи серійних розведень та дифузійні. Крім того, в даний час все більш широкого розповсюдження набувають автоматичні методи.

Для визначення величини МІК певні концентрації антибіотику вносять у поживне середовище, яке потім засівають культурою досліджуваного мікроорганізму, і після інкубації оцінюють наявність або відсутність видимого росту.

Розрізняють методи серійних розведень в агарі або в бульйоні. Залежно від об'єму використаного бульйону, розрізняють методи серійних макро- та мікророзведень.

В основу дифузійних методів визначення чутливості покладена дифузія антибактеріальних препаратів (АБП) у щільне поживне середовище та пригнічення росту досліджуваної культури в цій зоні. Існують дві основні модифікації дифузійного методу: диско-дифузійний та Е-тест.

В диско-дифузійному методі в якості носія антибактеріальних препаратів використовують паперовий диск із визначеною концентрацією антибіотика. Утворення зони пригнічення росту відбувається в результаті дифузії АБП з носія в поживне середовище. Диско-дифузійний метод дозволяє лише опосередковано зробити висновок про величину МІК, а результатом дослідження є віднесення мікроорганізму до однієї з категорій чутливості (чутливий, помірно-чутливий або резистентний).

Е-тест – це вузька полімерна смужка (0,5×6,0 см), на яку нанесений градієнт концентрацій АБП (від мінімальних до максимальних). Пригнічення росту мікроорганізму навкруги смужки Е-тесту відбувається тільки в тій зоні, де концентрація антибіотика, що дифундує з носія, вище МІК, при цьому утворюється краплеподібна зона інгібіції. Значення концентрацій АБП на кожній ділянці носія нанесені на зовнішній (зверненій до дослідника) поверхні Е-тесту. Величину МІК враховують в тому місці, де межа зони пригнічення росту впритул підходить до носія.

Для вивчення антибіотикочутливості мікроорганізму мікробіологічним методом, незалежно від виду методу, необхідно послідовно виконати такі етапи:

- приготувати поживні середовища (ПС);
- приготувати суспензії досліджуваних мікроорганізмів (інокулюми);
- внести інокулюм у поживне середовище;

- інкубувати посіви визначений проміжок часу за відповідних температурних параметрів;

- провести облік результатів та їх інтерпретацію, формулювання рекомендацій щодо лікування.

Дифузійні методи, крім вище наведених дій, включають також етап накладення дисків або смужок Е-тесту на щільне ПС.

При визначенні чутливості штамів стафілококів до оксациліну необхідно враховувати деякі особливості:

- для приготування інокулюму використовують тільки прямий метод суспендування колоній;

- тривалість інкубації до обліку результатів визначення чутливості до оксациліну повинна становити не менше 24 год.

Особливості тестування диско-дифузним методом: використовують диски, що містять 1 мкг оксациліну; при обліку результатів звертають увагу навіть на одиничні дрібні колонії стафілококів, знайдені в межах зони пригнічення росту.

Особливість тестування методами серійних розведень: у поживне середовище доцільно додавати натрію хлорид (NaCl).

В автоматизованих же системах для визначення чутливості мікроорганізмів використовується метод, заснований на використанні тільки двох концентрацій антибіотиків, які відповідають граничним значенням МІК (автоматичні мікробіологічні аналізатори VITEK2, MA120 Reader, Autobac MS-2, Cobas Micro, Quantum 2, Sceptor та ін.). При їх використанні результати отримують вже через 3-10 годин. Одна з їх переваг полягає в тому, що вони дозволяють отримувати результати одночасно до 18-20 антибіотиків. Ці методи широко використовуються у мікробіологічних лабораторіях, вони добре корелюють з іншими методами.

Випускають комерційні набори тривалого зберігання, які складаються з планшетів з ліофільно висушеними розведеннями антибіотика, куди вносять по 0,1 см³ суспензії чистої культури мікроорганізмів. Результати визначення антибіотикорезистентності можна оцінювати візуально (за наявності у середовищі індикатора) або за допомогою спектрофотометрів, коли реєструється зміна оптичної густини середовища [3].

Однак такі автоматизовані системи несуть великі фінансові затрати та при користуванні ними частота виявлення резистентних штамів може бути знижена внаслідок повільного росту стійких варіантів. У більшості подібних систем результати враховують шляхом порівняння росту (або загибелі) бактеріальних клітин у присутності антибіотиків з контролем, де є тільки мікроби. За цих умов досить важко диференціювати клітини, які гинуть, від тих, що повільно розмножуються.

До інших факторів, які впливають на результати, належить дія субінгібіторних концентрацій препаратів на ультраструктуру бактеріальних клітин. Вони призводять до зміни форми, набухання клітини, що може супроводжуватись зміною оптичної густини суспензії та спотворенням

результатів. В свою чергу, це дає неправильну інформацію про чутливість збудника [3].

Молекулярно-генетичний метод кардинально відрізняється від всіх інших. Він має вкрай високу точність, тому що за допомогою полімеразно ланцюгової реакції (ПЛР) дозволяє виявити наявність резистентності в певного виду і навіть штаму мікроорганізмів у його генетичному апараті (кільцевій ДНК або плазмідах). Даний метод можна віднести до експрес-методів. Так, при використанні Real-time ПЛР ампліфікаторів або термоциклерів результат одержують через кілька годин. Метод ПЛР не вимагає навіть виділення чистої культури збудника і дозволяє одночасно детектувати конкретні мікроорганізми в біологічних субстратах, взятих від хворого, і виявляти наявність у них генів стійкості до різних антимікробних препаратів (можливо одночасно до декількох). Єдиним, але істотним недоліком такого методу є його «якісний» результат. Він не може нам дати даних про МІК конкретного антимікробного препарату для конкретного збудника інфекції. Так, ми одержуємо результат швидко, маємо високий рівень вірогідності наявності у конкретного збудника резистентності і навіть виду до певного набору антибактеріальних препаратів, але не можемо визначити їх МІК. Однак найголовніший недолік методу полягає в тому, що за його допомогою ми не можемо визначати чутливість мікроорганізмів до антимікробних засобів, а тим більше кількісну характеристику у вигляді рівня МІК [9].

Штами стафілококів, резистентні до оксациліну, вважають стійкими до усіх β -лактамних АБП. Якщо результати дослідження суперечливі, вирішальними є результати визначення чутливості до оксациліну. Визначати чутливість стафілококів до β -лактамних АБП, окрім бензилпеніциліну та оксациліну, недоцільно.

При виявленні у стафілококів множинної резистентності при чутливості до оксациліну дослідження повторюють. Критерії оцінки резистентності до метициліну для *S. aureus* і коагулазанегативних стафілококів відрізняються.

При отриманні сумнівних результатів необхідно використовувати додаткові методи, такі як молекулярно-генетичні, прямого виявлення гена *tesA* або білка ПЗБ2а.

Висновки та перспективи подальших досліджень:

1. В сучасний період *MRSA* розглядають як один із провідних нозокоміальних патогенів.

2. Резистентність стафілококів до оксациліну (метициліну) обумовлена трьома основними механізмами:

- продукцією додаткового пеніцилінзв'язуючого білку (ПЗБ) – ПЗБ2а – класична або істинна резистентність до метициліну (оксациліну);
- інактивацією внаслідок гіперпродукції β -лактамаз;
- модифікацією нормальних ПЗБ.

3. Виявити штами *MRSA* можна як класичними мікробіологічними методами, так і за допомогою сучасних методів досліджень: ПЦР,

автоматизованих систем VITEK2, MA120 Render, Autobac MS-2, Cobas Micro, Quantum 2, Sceptor та ін.

4. Мікробіологічні методи відіграють важливу роль, так як є простими у виконанні, високочутливими, масовими у використанні, дешевими і такими, що не потребують для проведення контролювання використання дорогих приладів та тест-систем. В роботі використовують легкодоступні розхідні матеріали, обладнання, наявні у звичайній мікробіологічній лабораторії.

5. Найбільш простим методом дослідження залишається мікробіологічний диско-дифузійний метод, який можна використовувати у якості скринінгового методу, так як є достатньо об'єктивним, ґрунтується на використанні дисків з антибіотиками відомої концентрації.

6. При виділенні пенициліно- і метициліно-чутливих штамів стафілококів мікроорганізм вважається чутливим до всіх бета-лактамних АБП, а препаратами вибору будуть природні пенициліни та амінопенициліни.

7. При виявленні продукції β-лактамаз і чутливості до оксациліну – мікроорганізм резистентний до природних пеницилінів, аміно-, карбокси- і уреїдопеницилінів, але чутливий до оксациліну, інгібіторозахищених пеницилінів і цефалоспоринів I-II поколінь, які є препаратами вибору в даному випадку. Відносно даних штамів будуть також активні цефалоспорини IV покоління і карбапенеми, проте переваг порівняно з препаратами вибору вони не мають.

8. При виявленні метицилінорезистентності штам вважається стійким до всіх β-лактамних антибіотиків, для лікування необхідно використовувати препарати інших груп, препаратами вибору в цьому випадку є глікопептиди.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Сайт журналу «Болезни и антибиотики» [Електронний ресурс]. – Режим доступу до ресурсу: <http://www.mif-ua.com/archive/article/34693>.
2. Barton M. Guidelines for the prevention and management of community – associated methicillin – resistant Staphylococcus aureus: A perspective for Canadian health care practitioners / M. Barton, M. Hawkes // The Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology. – 2006. – Vol. 17 – № 8. – P. 43–46.
3. 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.
4. Макушенко С.Н. Сучасний стан проблем оксацилінрезистентності стафілококів / О.С. Макушенко // профілактична медицина. – 2011. – № 2. – С. 13–23.
5. Афанасьєва Т.І. Метицилінрезистентные стафиллококки / Т.І. Афанасьєва // Антибиотики и химиотерапия. – 1998. – №6. – С. 29–31.
6. Vanderhaeghen W. Methicillin – Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in Food Production Animals / W. Vanderhaeghen, K. Hermans, F. Haesebrouck. – Ukkel, Belgium, 2014. – P. 55.
7. Фещенко Ю.І. Антибіотикорезистентність мікроорганізмів. Стан проблеми та шляхи вирішення / Ю.І. Фещенко, М.І. Гуменюк, О.С. Денисов // Український хіміотерапевтичний журнал. – 2010. – № 1-2 (23). – С. 4–10.

8. Карпов І.А. Внебольничные инфекции, обусловленные метициллинрезистентным стафилококком (MRSA): подходы к антибактериальной терапии / І.А. Карпов, С.Ф. Качанко // Медицинские новости. – 2006. – № 10. – 20–30.
9. Бондаренко А.М. Визначення чутливості криптококів до антимікотиків – основа ефективності лікування криптококового менінгіту / А.М. Бондаренко // Іноваційні хвороби. – 2015. - № 4. – С. 6–19
10. Bhavnani S.M. Outcomes evaluation of patients with ESBL – and non – ESBL – producing Escherichia coli and Klebsiella species as defined by CLSI reference methods / Bhavnani S.M., Ambrose P.G., Craig W.A., et al. // Diagn. Microbiol. Infect. Dis. – 2006 – V. 54 (3) – P.231–236.
11. Brown S.D. Antimicrobial susceptibility of Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes and Haemophilus influenzae collected from patients across the USA, in 2001 – 2002, as part of the PROTEKT US study / Brown S.D., Rybak M.J. // J. Antimicrob. Chemother. – 2004 – V. 54 – Suppl. 1 – P. 7–15.
12. Doern G. V. Antimicrobial susceptibility among community – acquired respiratory tract pathogens in the USA: data from PROTEKT US 2000 – 01 / Doern G.V., Brown S.D. // Infection. – 2004 – V. 48 (1) – P.56–65.
13. Меенкер Д. О риске передачи человеку стафилококковой инфекции от свиней [Электронный ресурс] / Д. Меенкер, Т. Блаха // Сайт журнала “Perfect agriculture”. – 2010. – Режим доступа до ресурсу: <http://www.perfectagro.ru>.
14. Хіміотерапевтичні препарати. Антибіотики. Методи визначення антибіотикочутливості бактерій. – [Електронний ресурс]. – Режим доступа: http://www.medcollege.te.ua/sayt1/Lecturs/Mikrobiologia_virysologia_ta_imynologia/antubiotuku_himioterparatu.htm.
15. Selvaraj S. Antimicrobial activity of the plant extractions against Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) / S. Selvaraj, R. Valiappan // Microbiology world. – 2015. – № 12. – P. 17–25.
16. Дехнич А.В. Методическое пособие по выявлению резистентности к метициллину и другим бета-лактамам антибиотикам методом скрининга / А.В. Дехнич, А.Н. Маянский, В.В. Тец – Смоленск. – 2004. – С. 1–9.

МЕХАНИЗМ РЕЗЕСТЕНТНОСТИ И МЕТОДЫ МЕТИЦИЛЛИНРЕЗЕСТЕНТНОГО СТАФИЛОКОККА (MRSA) (ОБЗОРНАЯ СТАТЬЯ) / Т.А. Гаркавенко, Т.Г. Козицкая

В статье представлены основные механизмы развития резистентности метициллинустойчивых стафилококков, проведён сравнительный анализ лабораторных методов выявления MRSA. Подведены итоги о преимуществах и недостатках методов.

Определено место микробиологических методов выявления MRSA, так как они просты в использовании, высокочувствительные, массовые в применении, дешёвые и такие, которые не требуют для проведения контроля использования дорогостоящих приборов и тест-систем.

Ключевые слова: *антибиотики, метициллин, оксациллин, резистентность, стафилококк, лабораторные исследования, механизм резистентности*

MECHANISM OF RESISTANCE METHODS OF DETECTION METHICILLIN-RESISTANT STAPHYLOCOCCUS (MRSA) (REVIEW) / Garkavenko T., Kozitskaya T.

Introduction. Staphylococcus aureus is the first among microorganisms which resistance to earlier smoothly acting antibacterials has been discovered. Since that time, the history of penicillinase research as the first among β-lactamases has begun.

The goal of the work was to study the mechanism of resistance for methicillin-resistant staphylococci, to make a comparative analysis for existing methods of their detection, and to prove the optimal method for usage in microbiological laboratories of Ukraine.

Materials and methods. *The material for the study was published data, reference laboratories data, research conferences reports of Health Ministry of Ukraine, the State Sanitary and Epidemiological Service of Ukraine, National Academy of Medical Sciences of Ukraine, as well as the World Health Organization (WHO) data.*

Results of research and discussion. *Antibiotic resistance of major infectious diseases' pathogens is one of the most serious problems of modern medicine. The speed for emerging and spreading of microorganisms' resistance to antibiotics is impressive.*

MRSA often is a causative agent for nosocomial infections (HA-MRSA- health care associated MRSA), which have become resistant to the most common antibiotics, and this seriously complicates treatment.

More often a set of associated MRSA strains are found in people who haven't been hospitalized and even in healthy children (CA-MRSA-community associated MRSA).

A few years ago strains of MRSA (LA-MRSA-live stock associated MRSA) appeared in the center of attention.

For instance, MRSA SS398 clonal complex, most common in pigs, is of particular concern, as its asymptomatic carrier is also common among people who work with infected animals. There have been outbreaks in horses, dogs and cats, mostly CA-MRSA, which may contribute to people, domestic animals and the environment contamination.

Food of animal origin can often be contaminated by MRSA, resulting in creating the main way of transmission from farm animals to humans. Fruits and vegetables contaminated with feces of infected animals or polluted water can also be transfer factors.

Today there are five research methods to determine microorganisms sensitivity to antibiotics. They are:

- serial dilutions in broth and agar method;
- disc diffusion method;
- E-test;
- automatic systems (complexes) for detection microorganisms and their sensitivity to antimicrobial agents;
- molecular genetic method.

Among the standardized methods for determining the microorganisms sensitivity to antibiotics there are serial dilutions and diffusion methods.

In addition, automatic methods are becoming widespread.

Diffusion methods, other than the above mentioned, also include the imposing of discs or E-test strips on solid growth medium.

Also automated microbiological analyzers are used (VITEK2, MA120 Reader, Autobac MS-2, Cobas Micro, Quantum 2, Sceptor, etc.) to determine the microorganisms sensitivity.

When these automated systems are used the results are obtained within 3–10 hours. One of the advantages of these automated systems is that they allow to get results simultaneously for about 18–20 antibiotics. These methods are widely used in microbiology laboratories, they correlate well with other methods.

Molecular genetic method differs from all the others. It has very high precision because the polymerase chain reaction (PCR) can detect the presence of resistance in certain species and even strains in its genetic apparatus (circular DNA or plasmids).

The strains of staphylococci resistant to oxacillin are considered to be resistant to all β -lactam antibacterials.

If you receive questionable results, you should use additional methods such as molecular genetic one.

Conclusions and recommendations for further research:

1. At present MRSA is considered to be one of the leading nosocomial pathogens;

2. MRSA strains can be identified both by classic microbiological methods and modern research methods: PCR, automated systems VITEK2, MA120 Reader, Autobac MS-2, Cobas Micro, Quantum 2, Sceptor, etc.

3. Microbiological methods play an important role, as they are simple to apply, highly sensitive, widespread in use, affordable and do not require monitoring for the use of expensive instrumentation and test systems. Readily available consumables, equipment common for any microbiological laboratory are used for work.

4. The easiest method of microbiological research remains disc diffusion method that can be used as a screening method, since it is sufficiently objective, based on the use of discs with antibiotics with known concentration.

5. When identified as methicillin resistant, the strain is considered to be resistant to all β -lactam antibiotics. It is necessary to use drugs of other groups for treatment, in this case the choice is glycopeptides.

REFERENCES

1. Sait zhurnalu «Bolezni I antibiotiki» [Site of journal «Disease and antibiotics»]. www.mif-ua.com/archive. Retrieved from www.mif-ua.com/archive/article/34693 [in Russian].
2. Barton, M., & Hawkes, M. (2006). Guidelines for the prevention and management of community – associated methicillin – resistant *Staphylococcus aureus*: A perspective for Canadian health care practitioners. *The Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 17, 8, 43-46.
3. Makushenko, O.S., Avdeeva, L.V., & Polishchuk O.I. (2008). Vydovyi sklad ta mechanism stiiikosti do oksacylinu gospitalnyh shtamiv stafilokokiv [Species composition and mechanisms of resistance to oxacillin hospital strains of staphylococci]. *Materialy naukovopraktychnoi konferentsii "Shpytalni infektsii: suchasnyi stan problem" – Materials of scientific-practical conference "Hospital infections: current state of problems"*, 132-134 [in Ukraine].
4. Makushenko, O.S. (2011). Suchasnyi stan problem oksatsylinrezystentnosti stafilikokiv [The current state of problems oxacillin resistance staphylococcus]. *Profilaktychna medetsyna – Preventive medicine*. 2, 13-23 [in Ukraine].
5. Afanaseva, T.I. (1998). Metetsylinrezistentnye stafilokoki [Methicillin – Resistant staphylococcus]. *Antibiotiki i himioterapiia - Antibiotics and Chemotherapy*, 6, 29–31 [in Ukraine].
6. Vanderhaeghen, W., Hermans, K., & Haesebrouck, F. (2014). *Methicillin – Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in Food Production Animals*. Ukkel, Belgium.
7. Feshchenko, U.I., Gumenyuk, M.I., & Denisov, O.S. (2010). Antybiotykozystentnist mikroorganizmiv. Stan problemy ta shliahy vyrishennia [Antibiotic resistance of microorganisms. State problems and ways of solution]. *Ukrainskyi khimioterapeutychnyi Zhurnal – Ukrainian chemotherapeutic Journal*, 1-2 (23), 4-10 [in Ukraine].
8. Karpov, I.A., & Kachanko, E.F. (2006). Vnebolnichnye infektsii, obuslovlennye meticylinrezestentnym stahilokokom (MRSA): podkhody k antibakterialnoi terapii [Community-acquired infections due to methicillin-resistant staphylococcus (MRSA): approaches to antibiotic therapy]. *Meditsinskie novosti – Medical news*, 10, 20-30 [in Russian].
9. Bondarenko, A.M. (2015). Vznachenia chutlyvosti kryptokokiv do antymicyotyktiv – osnova efektyvnosti likuvania kryptokokovogo meningitu [Determination of sensitivity to antimycotics kryptokokiv – the basis of the effectiveness of treatment of cryptococcal meningitis]. *Inovaciini hvoroby – Innovative disease*, 4, 6-19 [in Ukraine].
10. Bhavnani, S.M., Ambrose P.G., & Craig W.A. (2006). Outcomes evaluation of patients with ESBL – and non – ESBL – producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species as defined by CLSI reference methods. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*, 54 (3), 231-236.
11. Brown, S. D., & Rybak M.J. (2004). Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* and *Haemophilus influenzae* collected from patients across the USA, in 2001 – 2002, as part of the PROTEKT US study. *Antimicrob. Chemother*, 54, 1, 7-15.

12. Doern, G. V., & Brown, S.D. (2004). Antimicrobial susceptibility among community – acquired respiratory tract pathogens in the USA: data from PROTEKT US 2000 – 01. *Infection*, 48 (1), 56-65.

13. Meenkrn, D., & Blaha, T. (2010). O riske peredachi cheloveku stafilokokovoi infektsii ot svinei [About the risk of transmission the men of staphylococci infection from pigs]. *Journal "Perfect agriculture"*. Retrived from www.perfectagro.ru. [in Russian].

14. Himioterapevtychni preparaty. Antybiotyky. Metody vyznachenia antybiotikochutlyvosty bakteriy [Chemotherapy drugs. Antibiotics. Methods for determining the resistance of bacteria to antibiotics]. www.medcollege.te.ua. Retrieved from http://www.medcollege.te.ua/sayt1/Lecturs/Mikrobiologia_virysologia_ta_imynologia/antubiotuku_himioterapratu.htm.

15. Selvaraj, S., & Valiappan, R. (2015). Antimicrobial activity of the plant extractions against Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA). *Microbiology world*, 12, 17-25.

16. Dekhnich, A.V., Maianskii, A.N., & Tets, V.V. (2004). Metodicheskoe posobie po vyiavlniiu rezistentnosti k metitsyllinu i drugim beta-laktamnym antibiotikametodom skringinga [Manual identification of methicillin resistance and other beta-lactam antibiotics by screening]. Smolensk [in Russian].

УДК: 636.09–615.371. 55.49

ГОРБАТЮК О.І., канд. вет. наук, доцент, e-mail: goroliva@ukr.net

РИЖЕНКО Г.Ф., канд. біол. наук, доцент, e-mail: anaerob12@ukr.net

АНДРІЯЩУК В.О., ЖОВНІР О.М., канд. вет. наук, e-mail: Zhovnir73@ukr.net

УХОВСЬКА Т.М., ТЮТЮН С.М., e-mail: tanyavet@ukr.net

Інститут ветеринарної медицини НААН

РІВЕНЬ СПЕЦИФІЧНИХ АНТИТІЛ В ОРГАНІЗМІ КРОЛІВ У РАЗІ ЗАСТОСУВАННЯ АСОЦІЙОВАНОЇ (МУЛЬТИКОМПОНЕНТНОЇ) ВАКЦИНИ «МУЛЬТИСУІСАН» ТА МОНОВАКЦИН

*У статті представлені матеріали з вивчення показників специфічного гуморального імунітету в організмі тварин після застосування їм експериментального зразка асоційованої вакцини «Мультисуісан» проти найпоширеніших бактеріозів свиней. Стаття містить результати порівняльного аналізу рівня титрів антитіл, специфічних до *S. choleraesuis*, *Cl. perfringens* тип C і *E. coli*, визначених за постановки реакції аглютинації (РА) із сироватками крові тварин, щеплених дослідними зразками асоційованої і моновакцин, які підтверджують відсутність конкуренції між антигенами в організмі вакцинованих тварин.*

Ключові слова: бактеріози свиней, асоційована вакцина, моновакцина, реакція аглютинації (РА), конкуренція антигенів.

Вступ. Як доводять вчені, останнім часом у патогенезі бактеріозів тварин важливу роль відіграють асоційовані збудники, оскільки, за дослідження біоматеріалу від загиблих тварин, у мікробіоценозах переважно виділяють кілька патогенів [1–4].

Питаннями з вивчення впливу асоціацій патогенних бактерій на організм тварин займалося багато учених, проте за сучасних соціально-економічних