

УДК: 582.282.23:57.085:615.28

ВИВЧЕННЯ РЕЗИСТЕНТНОСТІ ШТАМІВ ЗОЛОТИСТОГО СТАФІЛОКОКУ ДО ПРОТИМІКРОБНИХ ЗАСОБІВ

Назарчук О.А., Палій Д.В., Назарчук Г.Г.

Вінницький національний медичний університет
ім. М.І. Пирогова
(вул. Пирогова 56, м. Вінниця, 21018),
nazarchukoa@gmail.com

Провідне місце в профілактиці та лікуванні гнійно-запальних захворювань належить антимікробним препаратам системної і місцевої дії. Широке застосування протимікробних засобів в лікарській практиці для боротьби із патогенними мікроорганізмами, спричинило появу та розвиток у них захисних механізмів, як засобів виживання. Такі механізми збереження життєдіяльності в умовах впливу антибіотиків і антисептиків, що реалізуються за рахунок зміни генома мікробної клітини в процесі його мутації характеризують як резистентність мікроорганізмів до протимікробних препаратів. Все частіше у науковій літературі з'являються дані про зростання рівня резистентності у мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів [1–2].

Стійкість до протимікробних засобів становить серйозну проблему, оскільки стоїть на заваді оптимізації та вдосконаленню методів профілактики і лікування гнійно-запальних захворювань за допомогою антибактеріальних препаратів. Виникнення стійкості є природною реакцією мікроорганізмів. Накопичення світового досвіду щодо резистентності мікроорганізмів до протимікробних препаратів зумовлює поліпшення розуміння шляхів передачі та ефективних заходів профілактики нозокоміальних інфекцій. Боротьба з даним явищем передбачає обґрунтоване застосування протимікробних засобів, детальне вивчення механізмів формування резистентності та систематичне визначення рівня резистентності патогенних мікроорганізмів [1–2].

Відомо, що в механізмі формування і розвитку локальних та генералізованих гнійно-запальних ускладнень різної локалізації лежить інфікування умовнопатогенними мікроорганізмами із переважанням стафілококів. Лікування гнійно-запальних захворювань передбачає не лише системне введення антибіотиків, але і місцеве застосування антисептичних препаратів [2–4].

Незважаючи на високу зацікавленість розповсюдженням антибіотикорезистентності, даних про резистентність до антисептиків основних груп мікро-

організмів, які вегетують в гнійно-запальних ранах, на сьогодні недостатньо. В даній ситуації особливого значення набуває необхідність визначення формування резистентності у патогенних штамів *S. aureus* до антибіотиків, антисептиків, композицій на основі антисептиків. Результати дослідження швидкості формування резистентності до антибіотиків, антисептиків та композицій на основі антисептичних препаратів є науковим підґрунтям стосовно визначення практичної цінності застосування протимікробних препаратів як з профілактичною так і з лікувальною метою в повсякденній лікарській практиці [2, 3].

Мета. Дослідити формування резистентності штамів *S. aureus* до антибіотиків, антисептиків і композицій декаметоксину із модифікованими полісахаридами.

Матеріали та методи

Дослідження проводили на чотирьох клінічних штаммах *S. aureus*, виділених від хворих гнійно-запальними захворюваннями і музейному штамі *S. aureus* ATCC 25923. Досліджуваним штамам *S. aureus* притаманними були типові морфологічні, тинкторіальні, культуральні, біохімічні властивості.

Швидкість формування резистентності у *S. aureus* вивчали до композиції декаметоксину (0,1 мас.%) з карбоксиметилкрохмалом (КМК) (0,8 мас.%) і оксиетилцелюлозою (ОЕЦ) (0,4 мас.%), антисептиків (декасан 0,02%, дезмістин 0,1%, хлоргексидину біглюконат 0,05%) та антибіотиків (бензилпеніцилін, цефазолін, цефуроксім, цефтріаксон, азитроміцин, ванкомицин) методом послідовних пасажів із визначенням суббактеріостатичних концентрацій препаратів [5, 6].

Пасажування досліджуваних мікроорганізмів проводили на м'ясопептонному бульйоні із збільшенням концентрацій досліджуваних препаратів. У якості матеріалу для кожного наступного пасажу брали культури, які давали ріст в присутності найбільшої концентрації досліджуваного антимікробного препарату. Культури мікроорганізмів пересівали на поживні середовища із вищою у 2–4 рази концентрацією протимікробних засобів. Інтервали між пасажами визначали відповідно до швидкості росту культури. Тест-штами, які проростали швидко, пересівали через 2–3 доби. Проведено 30 пасажів [6]. Статистичну обробку отриманих даних проводили з використанням програм Microsoft Excel 2007 та «Med Stat», згідно рекомендаціям зі статистичної обробки даних [7].

Результати та обговорення

В результаті проведених досліджень встановлено поступове формування резистентності *S. aureus* до декасану.

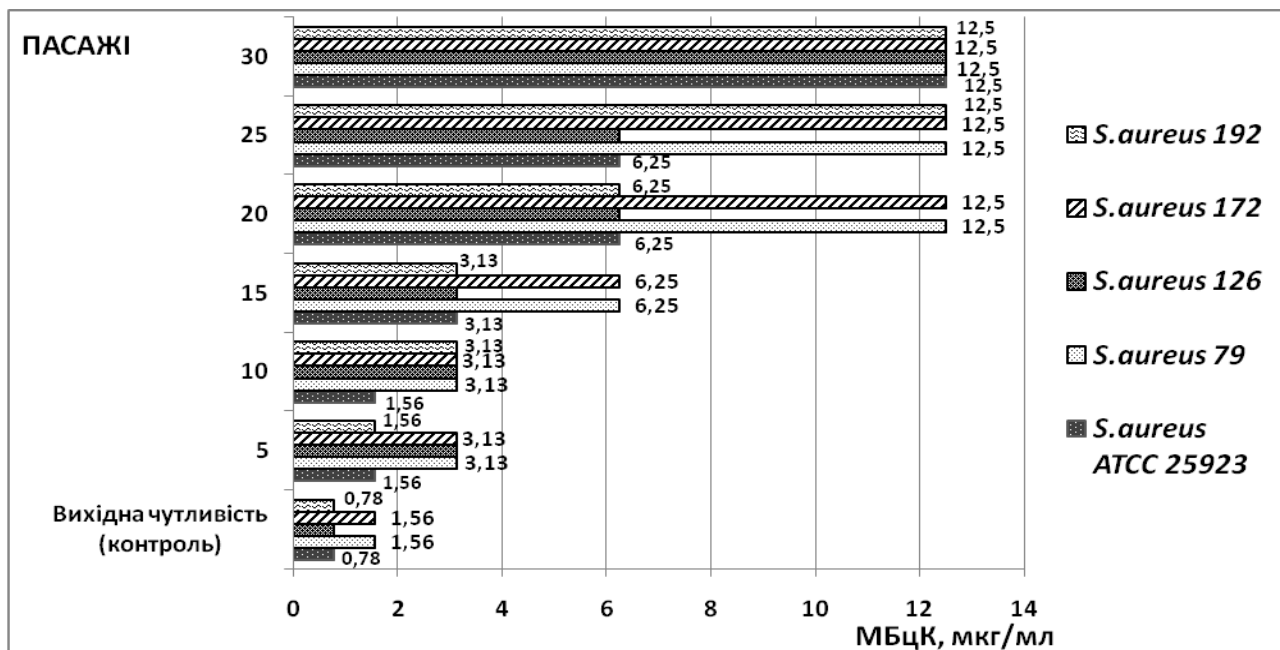


Рис.1. Характеристика формування резистентності до декасану *S. aureus*

В процесі пасажування мікроорганізмів на 5 пасажі резистентність у *S. aureus* ATCC 25923 збільшилась у 2 рази, а у клінічних штамів в 2-4 рази, дана тенденція зберігалась до 10 пасажу. Після 15 пасажу резистентність у всіх 5 досліджуваних штамів *S. aureus* збільшилась в порівнянні із контролем у 4 рази,

після 20 – у 8 разів, після 25 в 4 штамів – у 8 разів і лише у *S. aureus* 192 зростання резистентності досягло 16 разів. На 30 пасажі стійкість штамів *S. aureus* зростає у 8 – 16 разів, $P < 0,001$ (рис.1).

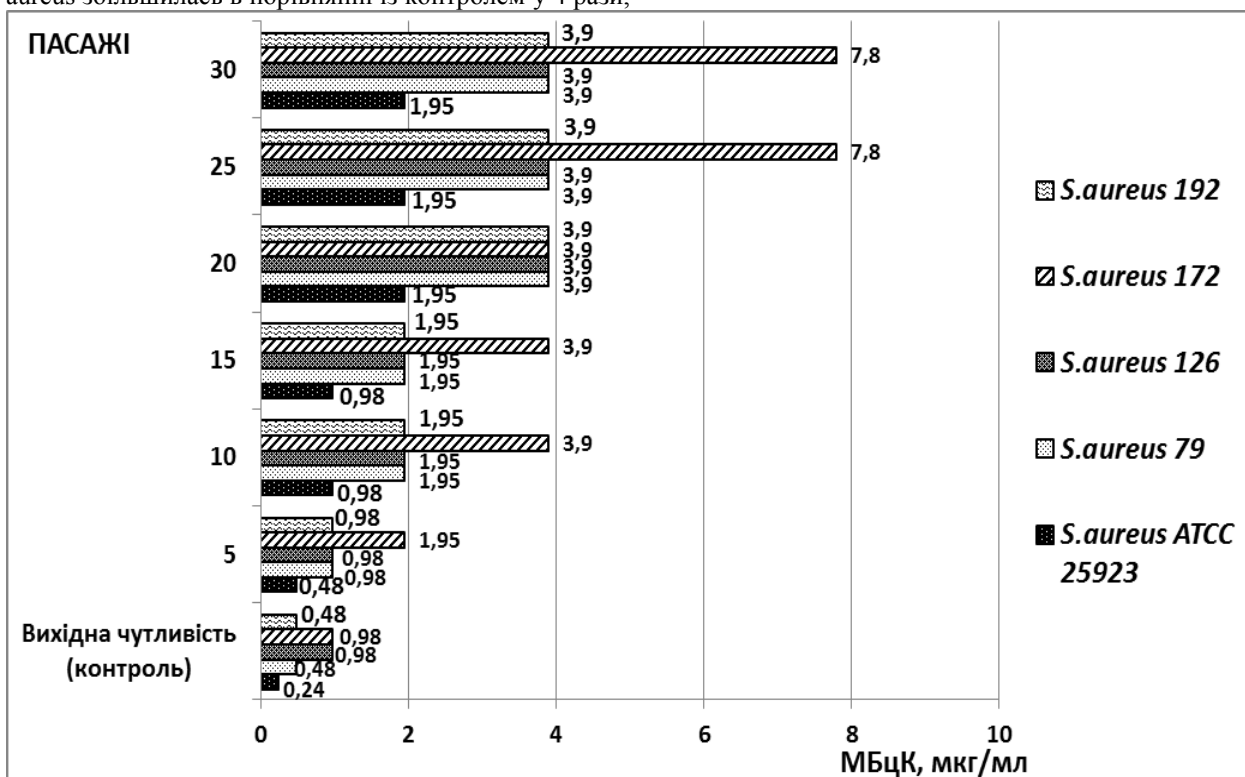


Рис. 2. Характеристика формування резистентності до композиції на основі декаметоксину з КМК і ОЕЦ *S. aureus*

Із результатів дослідження швидкості формування резистентності *S. aureus* до композиції на основі

декаметоксину з КМК і ОЕЦ видно, що стійкість штамів *S. aureus* розвивалася досить повільно. Вихідні

значення мінімальної бактерицидної концентрації (МБцК) становили 0,24 – 0,98 мкг/мл. При подальшому культивуванні штамів стафілококу в середовищі в присутності композиції декаметоксину з КМК і ОЕЦ резистентність *S. aureus* зростає в 2 рази на 5 пасажі. Після 10-15 пасажів спостерігали зниження чутливості *S. aureus* в 4 рази, МБцК композиції при цьому становила 7,8 мкг/мл. 20 – 30 кратне культивування стафілококів в середовищі із зростаючими концентраціями композиції декаметоксину з КМК і ОЕЦ знизило їх чутливість до композиції у 8 разів, $P < 0,001$ (рис.2).

Розвиток резистентності у *S. aureus* до хлоргексидину біглюконату характеризувався різною швидкістю. Спостерігали зменшення чутливості штамів до антисептичного препарату у 2 рази на 5 пасажі, у 8 разів після 10 і 15 пасажів. Послідуюче культивування штамів *S. aureus* із збільшенням концентрацій хлоргексидину біглюконату, відображало зниження чутливості мікроорганізмів до антисептика у 16 разів починаючи з 20 пасажу і 64 рази після 30 пасажу, $P < 0,001$ (рис. 3).

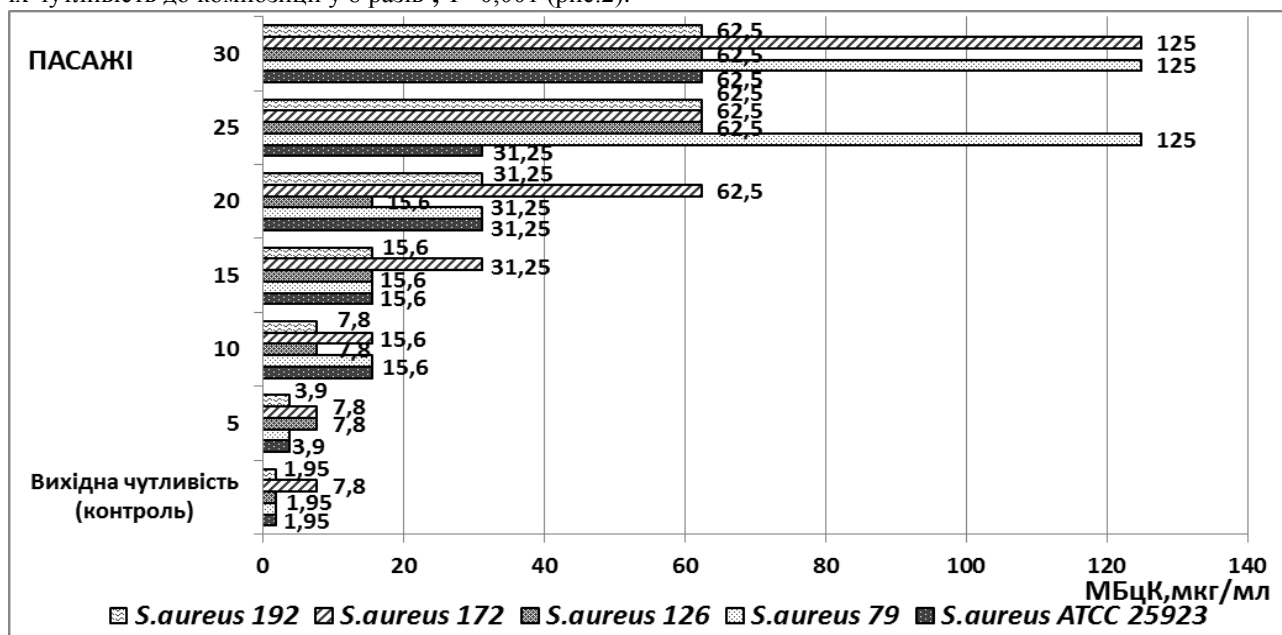


Рис. 3. Характеристика формування резистентності до хлоргексидину біглюконату *S. aureus*

Так, МБцК хлоргексидину біглюконату після 30 пасажів культивування мікроорганізмів досягали 62,5 – 125 мкг/мл, в той час як його вихідна МБцК до усіх досліджуваних штамів *S. aureus* становила 1,95 мкг/мл (рис. 3).

Аналіз отриманих в результаті дослідження даних показав швидке поступове формування стійкості штамів стафілокока до дезмістину, $P < 0,001$ (рис. 4).

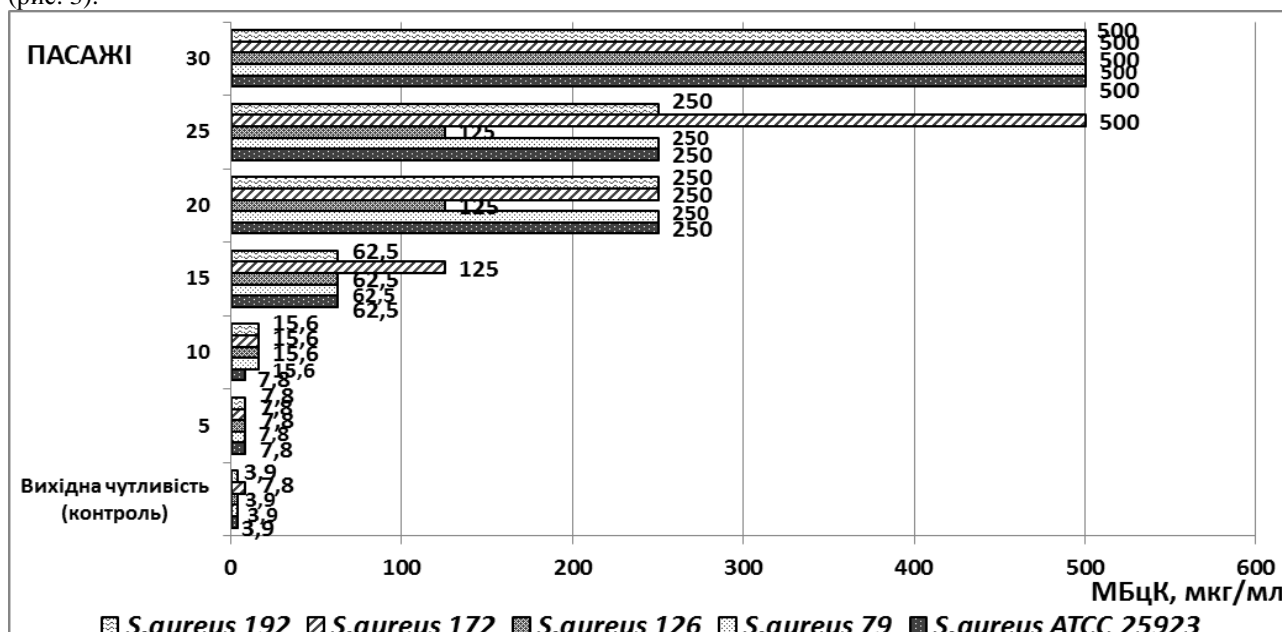


Рис. 4. Характеристика формування резистентності до дезмістину *S. aureus*

Доказом цього було зростання значень МБцК дезмістину до *S. aureus* від вихідних – 3,9–7,8 мкг/мл до 500 мкг/мл після 30 пасажу культивування мікроорганізмів. Після 5 пасажу чутливість трьох штамів *S. aureus* зменшилась в 2 рази, *S. aureus* 172 був чутливим до 7,8 мкг/мл дезмістину (рис. 4).

Після 10 пасажів стійкість 2 штамів була вищою у 2 рази, 3 штамів – у 4 рази в порівнянні із вихідним рівнем чутливості. На 15 пасажі у всіх досліджуваних штамів збільшилась стійкість до дезмістину у 16 разів. Починаючи із 20 пасажу резистентність *S. aureus* зростає в 32 – 64 рази і на 30 пасажі культивування мікроорганізмів була у 128 разів вищою, порівнюючи із вихідними значеннями чутливості мікроорганізмів. Лише *S. aureus* 172 зберігав чутливість до концентрацій дезмістину у 64 рази вищих від попередніх (рис. 4).

Встановлено, що резистентність бактерій формувалась шляхом багатоступеневих мутацій із повільною селекцією резистентних варіантів. В цьому відношенні антисептики, особливо декасан і композиція на основі декаметоксину з КМК і ОЕЦ мають переваги в порівнянні із антибіотиками, до яких високий

рівень резистентності у *S. aureus* виникає після перших 5–10 пасажів.

У дослідженні встановлено, що формування резистентності у штамів *S. aureus* до пеніцилінів, зокрема бензилпеніциліну, зростає більше ніж у 128 разів вже на 2 пасажі культивування мікроорганізмів, де МБцК бензилпеніциліну до *S. aureus* перевищує 500 мкг/мл, тоді як у контролі МБцК становить 62,5 мкг/мл (табл. 1).

Чутливість тест-штамів *S. aureus* до цефазоліну в контролі визначали при значеннях МБцК 7,8 – 15,6 мкг/мл. В процесі культивування мікроорганізмів, чутливість останніх після 5 пасажів зменшилась у 8 разів, а на 8 пасажі культивування – більше ніж у 64 рази, при МБцК цефазоліну 500 мкг/мл відмічали ріст культур на поживому середовищі (табл. 1).

Швидкість формування резистентності *S. aureus* до цефтріаксону була подібною. Вже на 5 пасажі спостерігали зростання стійкості штамів *S. aureus* до цефтріаксону у 8 – 32 рази, а *S. aureus* 79 – у 128 разів. На 10 пасажі усі досліджувані штами *S. aureus* були не чутливими до МБцК 500 мкг/мл, що відповідає зростанню стійкості більше ніж у 32 (3 штами), 64 (1 штама), 128 (1 штама) разів (табл. 1).

Таблиця 1. Характеристика формування резистентності штамів *S. aureus* до β-лактамних антибіотиків

	Штами <i>S.aureus</i>	Концентрації, кратність до контролю	ПАСАЖІ				
			Вихідний рівень чутливості (контроль)	5	10	20	30
Бензилпеніцилін	<i>S.aureus</i> ATCC 25923	МБцК, мкг/мл	3,9	>500	>500	>500	>500
		Кратність до контролю	-	>128	>128	>128	>128
		p*	-	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
	<i>S.aureus</i> 79	МБцК, мкг/мл	15,6	>500	>500	>500	>500
		Кратність до контролю	-	> 32	>32	> 32	> 32
		p*	-	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
	<i>S.aureus</i> 126	МБцК, мкг/мл	31,25	>500	>500	>500	>500
		Кратність до контролю	-	> 16	> 16	> 16	> 16
		p*	-	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
	<i>S.aureus</i> 172	МБцК, мкг/мл	62,5	>500	>500	>500	>500
		Кратність до контролю	-	> 8	> 8	> 8	> 8
		p*	-	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
<i>S.aureus</i> 192	МБцК, мкг/мл	31,25	>500	>500	>500	>500	
	Кратність до контролю	-	> 16	> 16	> 16	> 16	
	p*	-	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	
Цефазолін	<i>S.aureus</i> ATCC 25923	МБцК, мкг/мл	7,8	31,25	>500	>500	>500
		Кратність до контролю	-	4	> 64	> 64	> 64
		p*	-	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
	<i>S.aureus</i> 79	МБцК, мкг/мл	7,8	62,5	>500	>500	>500
		Кратність до контролю	-	8	> 64	> 64	> 64
		p*	-	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
	<i>S.aureus</i> 126	МБцК, мкг/мл	15,6	62,5	>500	>500	>500
		Кратність до контролю	-	4	> 32	> 32	> 32

Цефтріаксон	S.aureus 172	P*	-	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	
		МБцК, мкг/мл	15,6	62,5	>500	>500	>500	
		Кратність до контролю	-	4	> 32	> 32	> 32	
	S.aureus 192	P*	-	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	
		МБцК, мкг/мл	7,8	62,5	>500	>500	>500	
		Кратність до контролю	-	8	> 64	> 64	> 64	
	Цефтріаксон	S.aureus ATCC 25923	P*	-	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
			МБцК, мкг/мл	3,9	125	>500	>500	>500
			Кратність до контролю	-	32	>32	>32	>32
		S.aureus 79	P*	-	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
			МБцК, мкг/мл	3,9	500	>500	>500	>500
			Кратність до контролю	-	128	>128	>128	>128
S.aureus 126		P*	-	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	
		МБцК, мкг/мл	7,8	62,5	>500	>500	>500	
		Кратність до контролю	-	8	>64	>64	>64	
S.aureus 172		P*	-	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	
		МБцК, мкг/мл	15,6	500	>500	>500	>32	
		Кратність до контролю	-	32	>32	>32	>500	
S.aureus 192	P*	-	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001		
	МБцК, мкг/мл	15,6	125	>500	>500	>500		
	Кратність до контролю	-	8	>32	>32	>32		

P* - в порівнянні із контролем

Ванкоміцин проявляв бактерицидну дію по відношенню штамів S. aureus при МБцК 3,9 – 7,8 мкг/мл. Після 5 пасажу стійкість мікроорганізмів до препарату зростала у 64 рази, S. aureus 192 – у 128

разів. Після 6 пасажу культивування досліджуваних штамів S. aureus, резистентність до ванкоміцину зростає більше ніж у 128 разів, мікроорганізми були нечутливими до МБцК 500 мкг/мл (табл. 2).

Таблиця 2. Характеристика формування резистентності штамів S. aureus до глікопептидів і макролідів

	Штами S.aureus	Концентрації, кратність до контролю	ПАСАЖІ				
			Вихідний рівень чутливості (контроль)	5	10	20	30
Ванкоміцин	S.aureus ATCC 25923	МБцК, мкг/мл	3,9	250	>500	>500	>500
		Кратність до контролю	-	64	>128	>128	>128
		P*	-	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
	S.aureus 79	МБцК, мкг/мл	3,9	250	>500	>500	>500
		Кратність до контролю	-	64	>128	>128	>128
		P*	-	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
	S.aureus 126	МБцК, мкг/мл	3,9	250	>500	>500	>500
		Кратність до контролю	-	64	>128	>128	>128
		P*	-	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
	S.aureus 172	МБцК, мкг/мл	7,8	500	>500	>500	>500
		Кратність до контролю	-	64	>64	>64	>64
		P*	-	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
S.aureus 192	МБцК, мкг/мл	3,9	500	>500	>500	>500	
	Кратність до контролю	-	128	>128	>128	>128	
	P*	-	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	
Азитро-	S.aureus ATCC 25923	МБцК, мкг/мл	15,6	>500	>500	>500	>500
		Кратність до контролю	-	>32	>32	>32	>32
		P*	-	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
	S.aureus 79	МБцК, мкг/мл	3 1,25	>500	>500	>500	>500

		Кратність до контролю	-	>16	>16	>16	>16
		p*	-	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
S.aureus 126		МБцК, мкг/мл	31,25	>500	>500	>500	>500
		Кратність до контролю	-	>16	>16	>16	>16
		p*	-	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
S.aureus 172		МБцК, мкг/мл	31,25	>500	>500	>500	>500
		Кратність до контролю	-	>16	>16	>16	>16
		p*	-	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
S.aureus 192		МБцК, мкг/мл	31,25	>500	>500	>500	>500
		Кратність до контролю	-	>16	>16	>16	>16
		p*	-	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

*P**- в порівнянні із контролем

Визначили формування резистентності у штамів *S. aureus* до азитроміцину. Клінічні штами виявляли чутливість до азитроміцину при МБцК 31,25 мкг/мл, *S.aureus* ATCC 25923 був чутливим до 15,6 мкг/мл. Починаючи з 2-го пасажу у клінічних штамів резистентність збільшилась більше ніж у 16 разів, (МБцК > 500 мкг/мл), а у *S.aureus* ATCC 25923 в 32 рази після 3-го пасажу (табл. 2).

Одержані нами результати вивчення формування резистентності штамів стафілококу до антимікробних препаратів дозволяють характеризувати антисептики, зокрема декасан, композицію декаметоксину з КМК і ОЕЦ як засоби з високою протимікробною дією і невисокою швидкістю формування стійкості.

Висновки

У штамів *S. aureus* відбувається повільне формування резистентності до декасану, після 30 пасажів мінімальні суббактеріостатичні концентрації в порівнянні із їх вихідними значеннями зростають не більше ніж у 16 разів, $P < 0,001$.

В присутності композиції декаметоксину з карбоксиметилкрохмалом і оксиетилцелюлозою відбувається повільне формування резистентності штамів стафілококу. Так, після 30 пасажів штами *S. aureus* виявляють чутливість до концентрацій досліджуваної композиції, що у 8 разів перевищують вихідні значення, $P < 0,001$.

У порівнянні із антисептиками досліджувані штами *S.aureus* досить швидко формують резистентність до антибіотиків. До пеніцилінів чутливість *S. aureus* знижується на п'ятому пасажі більше ніж у 128 разів, $P < 0,001$; до цефалоспоринів I, III поколінь – у 32 – 64 рази, починаючи з 10 пасажу, $P < 0,001$; до глікопептидів – у 128 разів після 10 пасажів, $P < 0,001$; до макролідів – у 16 разів з п'ятого пасажу, зберігаючи стійкість на цьому ж рівні після 30 пасажів, $P < 0,001$, в порівнянні із вихідними значеннями чутливості.

References

1. Feshchenko Yu.I. Antibiotic resistance of microorganisms. State of problem and way of decision [Text] / Yu.I. Feshchenko, M.I. Gumenuk, O.S. Denisov // Ukrainian Chemical Therapeutic Journal. – 2010. – N. 1-2 (23). – P. 4-10.

2. Antiseptics in prophylaxis and treatment of infections [Text] / edited by G.K. Paliy. – K.: Zdorovya, 1997. – 201 p.

3. Medical microbiology, virology and immunology: text-book for students of higher medical school [Text] / edited by V.P. Shyrobokov // 2nd edition. – Vinnitsa: Nova Knyga, 2011. – 952 p.

4. Sorokoumova L.K. Development of resistance in bacteria at presence of antiseptic medicines [Text] / L.K. Sorokoumova // Reports of Morphology. – 2008. – N. 14(2). – P. 344 – 346.

5. Volyanskiy Y.L. The study of specific activity antimicrobial therapeutic drugs [Text] / Y.L. Volyanskiy, V.P. Shyrobokov, S.V. Biryukova, V.G. Paliy // Methodical recommendations MN of Ukraine, Kyiv, 2004. – 38 p.

6. Determination of microorganisms' sensitivity to antibacterial drugs: methodical recommendations MV 9.9.5 – 143 [Text] // [Necrasova L.S., Svyta V. M., Gluskevych T.G., et al.]. – Kyiv, 2007. – 74 p.

УДК: 582.282.23:57.085:615.28

ВИВЧЕННЯ РЕЗИСТЕНТНОСТІ ШТАМІВ ЗОЛОТИСТОГО СТАФІЛОКОКУ ДО ПРОТИМІКРОБНИХ ЗАСОБІВ

Назарчук О.А., Палій Д.В., Назарчук Г.Г.

В роботі представлені результати вивчення формування резистентності штамів *S. aureus* до антибіотиків, антисептиків і композиції декаметоксину із модифікованими полісахаридами. Показано розвиток резистентності у *S.aureus* до пеніцилінів, цефалоспоринів, глікопептидів, макролідів. Встановлено повільне формування резистентності штамів стафілококу до декасану і композиції декаметоксину з карбоксиметилкрохмалом, оксиетилцелюлозою.

Ключові слова: антибіотики, антисептики, декаметоксин, карбоксиметилкрохмаль, оксиетилцелюлоза, резистентність.

УДК: 582.282.23:57.085:615.28

ИЗУЧЕНИЕ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ШТАММОВ ЗОЛОТИСТОГО СТАФИЛОКОККА К ПРОТИВОМИКРОБНЫМ СРЕДСТВАМ

Назарчук А.А., Палій Д.В., Назарчук Г.Г.

В работе представлены результаты изучения формирования резистентности штаммов *S.aureus* к антибио-

тикам, антисептикам и композиции декаметоксина с модифицированными полисахаридами. Показано развитие резистентности у *S.aureus* к пенициллинам, цефалоспорином, гликопептидам, макролидам. Установлено медленное формирование резистентности штаммов стафилококка к декасану и композиции декаметоксина с карбоксиметилкрахмалом, оксиэтилцеллюлозой.

Ключевые слова: антибиотики, антисептики, декаметоксин, карбоксиметилкрахмал, оксиэтилцеллюлоза, резистентность.

UDC: 582.282.23:57.085:615.28

THE STUDY OF RESISTENCE OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS STRAINS TO ANTIMICROBIALS

Nazarchuk O.A., Paliy D.V., Nazarchuk G.G.

In the research work the results of the study of resistance forming to antibiotics, antiseptics and decametoxine composition with modified polysaccharides in *S.aureus* strains are presented. The development of resistance to penicillins, cephalosporins, glycopeptides, macrolides is shown. Slow forming of resistance to decasan and decametoxine composition with carboxymethylamylum, oxyethylcellulose was determined.

Key words: antibiotics, antiseptics, decametoxine, carboxymethylamylum, oxyethylcellulose, resistance.