

Оценка чувствительности MRSA к оксациллину, цефокситину, ванкомицину и даптомицину

В. В. ГОСТЕВ¹, Л. Н. ПОПЕНКО², Т. В. ЧЕРНЕНЬКАЯ³, З. С. НАУМЕНКО⁴, Т. М. ВОРОШИЛОВА⁵,
Ю. А. ЗАХАРОВА⁶, О. Е. ХОХЛОВА⁷, А. Н. КРУГЛОВ⁸, М. Г. ЕРШОВА⁹, С. Н. АНГЕЛОВА⁹,
Е. Д. ПОЛЕТАЕВА⁹, И. В. МОЛЧАНОВА¹⁰, С. В. СИДОРЕНКО¹

¹ ФГБУ «НИИ детских инфекций ФМБА России», Санкт-Петербург

² НИИ скорой помощи им. И. И. Джанелидзе, Санкт-Петербург

³ НИИ скорой помощи им. Н. В. Склифосовского, Москва

⁴ ФГБУ «Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» им. акад. Г. А. Илизарова» Минздрава России, Курган

⁵ ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А. М. Никифорова» МЧС России, Санкт-Петербург

⁶ ФГБУЗ «Пермский клинический центр» ФМБА России, Пермь

⁷ ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России, Красноярск

⁸ ООО «Национальное агентство по клинической фармакологии и фармации», Москва

⁹ ГУЗ ЯО Инфекционная клиническая больница №1, Ярославль

¹⁰ ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница», Челябинск

Estimation of MRSA Susceptibility to Oxacillin, Cefoxitine, Vancomycin and Daptomycin

V. V. GOSTEV, L. N. POPENKO, T. V. CHERNENKAYA, Z. S. NAUMENKO, T. M. VOROSHILOVA, YU. A. ZAKHAROVA,
O. E. KHOKHLOVA, A. N. KRUGLOV, M. G. ERSHOVA, S. N. ANGELOVA, E. D. POLETAEVA,
I. V. MOLCHANOVA, S. V. SIDORENKO

Research Institute of Children's Infections, St. Petersburg

I. I. Dzhanelidze Research Institute of Emergency Service, St. Petersburg

N. V. Sklifosovsky Research Institute of Emergency Service, Moscow

G. A. Ilizarov Russian Research Centre of Restorative Traumatology and Orthopedics, Kurgan

A. M. Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine, St. Petersburg

Perm Clinical Centre, Perm

V. F. Voino-Yasenevskiy Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk

National Agency of Clinical Pharmacology and Pharmacy, Moscow

Infectious Clinical Hospital No. 1, Yaroslavl

Chelyabinsk Regional Clinical Hospital, Chelyabinsk

Распространение и терапия инфекций, вызываемых метициллинорезистентными золотистыми стафилококками (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* — MRSA), остается одной из серьезнейших проблем в мире. В связи с этим очень важным является правильная лабораторная идентификация фенотипа MRSA, основанная на использовании маркерного антибиотика — цефокситина, чувствительность которого выше, чем оксациллина. Тенденцией последних лет является появление штаммов со сниженной чувствительностью к препаратам «последней линии защиты» от MRSA: ванкомицину и даптомицину. В России не изучена чувствительность MRSA к этим препаратам, и отсутствуют данные о распространении VISA (vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*) и hVISA (hetero-VISA) фенотипов. В настоящей работе представлены результаты оценки чувствительности 316 изолятов MRSA, собранных в нескольких регионах страны к оксациллину, цефокситину, ванкомицину и даптомицину. Так, установлено, что диапазон минимальной подавляющей концентрации (МПК) оксациллина лежит в очень широких пределах: 0,5–512 мкг/мл, при этом 2,2±1% штаммов фенотипически проявляют чувствительность к оксациллину, несмотря на наличие гена *mecA*. Напротив, к цефокситину эти изоляты MRSA проявляли выраженный уровень устойчивости, МПК>16 мкг/мл. По результатам серийных микроразведений выявлено, что 30,7±7% штаммов имеют критический уровень чувствительности с МПК 2 мкг/мл к ванкомицину, а при использовании Е-тестов выявлено 1,3±1% штаммов с МПК, равным 2–4 мкг/мл. MRSA проявляли высокую степень чувствительности к даптомицину, однако 2,8±1% штаммов характеризовались высокими значениями МПК (2 мкг/мл). Более того, в работе отмечено перекрестное снижение чувствительности к ванкомицину и даптомицину.

Ключевые слова: метициллинорезистентные стафилококки (MRSA), оксациллин, цефокситин, ванкомицин, даптомицин.

Prevalence and therapy of infections due to MRSA remain one of the most serious problems in the world. Therefore, correct laboratory identification of the MRSA phenotype based on the use of the marker antibiotic cefoxitine, as a more susceptible one vs. oxacillin, is of great importance. There is lately being observed a tendency towards emergence of strains with lower susceptibility

to the last reserve drugs protecting from MRSA, i. e. vancomycin and daptomycin. Susceptibility of MRSA to these drugs was not investigated in Russia and there are no data on the prevalence of the VISA and hVISA phenotypes. The results of our study on estimation of susceptibility of 316

© Коллектив авторов, 2013

Адрес для корреспонденции: 197022, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 9. НИИ детских инфекций

MRSA isolates from several regions of Russia to oxacillin, ceftazidime, vancomycin and daptomycin are presented herein. It was shown that the ranges of the oxacillin MIC were extremely wide, i. e. 0.5 to 512 mcg/ml, while $2.2 \pm 1\%$ of the isolates was susceptible by the phenotype to oxacillin, in spite of the *mecA* gene presence. As for ceftazidime, the MRSA isolates were rather resistant to it at the MIC > 16 mcg/ml. The tests with serial microdilutions revealed that $30.7 \pm 7\%$ of the isolates had a critical level of susceptibility to vancomycin at the MIC 2 mcg/ml. The E-tests revealed $1.3 \pm 1\%$ of the isolates which were susceptible at the MIC 2–4 mcg/ml. The MRSA isolates were highly susceptible to daptomycin, while high levels of the MIC (2 mcg/ml) were characteristic of $2.8 \pm 1\%$ of the isolates. Cross reduction of the susceptibility to vancomycin and daptomycin was observed.

Key words: methicillin resistant staphylococci (MRSA), oxacillin, ceftazidime, vancomycin, daptomycin.

Введение

Дифференцировка метициллиночувствительных и метициллинорезистентных золотистых стафилококков (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* — MRSA) имеет принципиальное значение для терапии, так как последние проявляют клиническую устойчивость к бета-лактамам антибиотикам, за счёт наличия дополнительного пенициллинсвязывающего белка PBP2a, кодируемого геном *mecA*, и отличающегося сниженной аффинностью ко всем антибиотикам этой группы. При этом считается, что MRSA проявляют устойчивость ко всем бета-лактамам, несмотря на существенные различия в аффинности PBP2a к отдельным бета-лактамам [1, 2]. Гетерорезистентность популяции некоторых изолятов MRSA по чувствительности к оксациллину значительно осложняет лабораторную детекцию метициллинорезистентности [2]. Последний факт послужил основанием для замены оксациллина на цефокситин в качестве препарата для скрининга клинических изолятов *S. aureus* на метициллинорезистентность и признанию молекулярных методов детекции *mecA* гена в качестве золотого стандарта. Большинство изолятов MRSA также демонстрируют ассоциированную устойчивость к другим классам антибиотиков, именно поэтому препаратом выбора для лечения соответствующих инфекций долгое время оставался ванкомицин.

Однако с середины 1990 годов, сначала в Японии и США, а затем и по всему миру, стали появляться сообщения о штаммах со сниженной чувствительностью к ванкомицину. В настоящее время выделяют VISA (vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*), hVISA (hetero VISA) и VRSA (vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*) изоляты. VRSA отличаются высоким уровнем устойчивости (МПК ванкомицина более 64 мкг/мл), такие варианты формируются крайне редко (в мире описано менее 20 изолятов) в результате приобретения стафилококками детерминант резистентности от энтерококков [3]. VISA и hVISA изоляты отличаются невысокими уровнями МПК (4–8 и 2–4 мкг/мл соответственно) [4] и общим механизмом формирования устойчивости — усилением синтеза пептидогликана. При этом для hVISA характерна гетерогенность устойчивости к ванко-

мицину — повышенные значения МПК проявляет лишь незначительная часть популяции (около 1% клеток). Выявить VISA и hVISA изоляты с помощью диско-диффузионного метода невозможно. «Золотой стандарт» детекции VISA и hVISA изолятов — популяционный анализ, который весьма трудоёмок и требует специального оборудования [5]. При инфекциях, вызываемых как VISA, так и hVISA изолятами, отмечают значительное снижение эффективности ванкомицина. Более того, риск неудачи лечения возрастает уже при МПК ванкомицина более 1 мкг/мл, хотя по критериям как EUCAST, так и CLSI такие изоляты ещё рассматривают как чувствительные [6, 7].

Возрастание этиологической значимости инфекций, вызванных грамположительными бактериями, а также недостатки ванкомицина стимулировали разработку и внедрение в медицинскую практику во второй половине XX века новых препаратов соответствующей направленности. К таким препаратам относится даптомицин, разработанный ещё в 1980 годах, но одобренный FDA для использования только в 2003 году [8]. Даптомицин — антибиотик из класса липопептидов, обладающий новым механизмом действия, однако уже через несколько лет после его внедрения в клиническую практику были описаны первые клинические изоляты со сниженной чувствительностью с МПК ≥ 2 мкг/мл. Одним из крайне неблагоприятных факторов также является возможное перекрёстное снижение чувствительности к ванкомицину и даптомицину [9].

Целью настоящей работы были оценка распространённости среди MRSA изолятов типа VISA/hVISA, а также сравнительная оценка активности ванкомицина и даптомицина.

Материал и методы

Бактериальные изоляты. В работу включены 316 изолятов MRSA, выделенных от больных с разными формами внутрибольничных и внебольничных инфекций. Штаммы были собраны в 2011–2012 гг. из стационаров Санкт — Петербурга, Москвы, Ярославля, Перми, Челябинска, Кургана, Красноярска.

Идентификация культур, оценка антибиотикочувствительности. Идентификацию культур *Staphylococcus aureus* проводили на MALDI-TOF масс-спектрометре Microflex LT (Bruker Daltonics, Германия). Антибиотикочувствительность оценивали методом серийных микроразведений с определением МПК в бульоне Cation-Adjusted Mueller Hinton II Broth (BD,

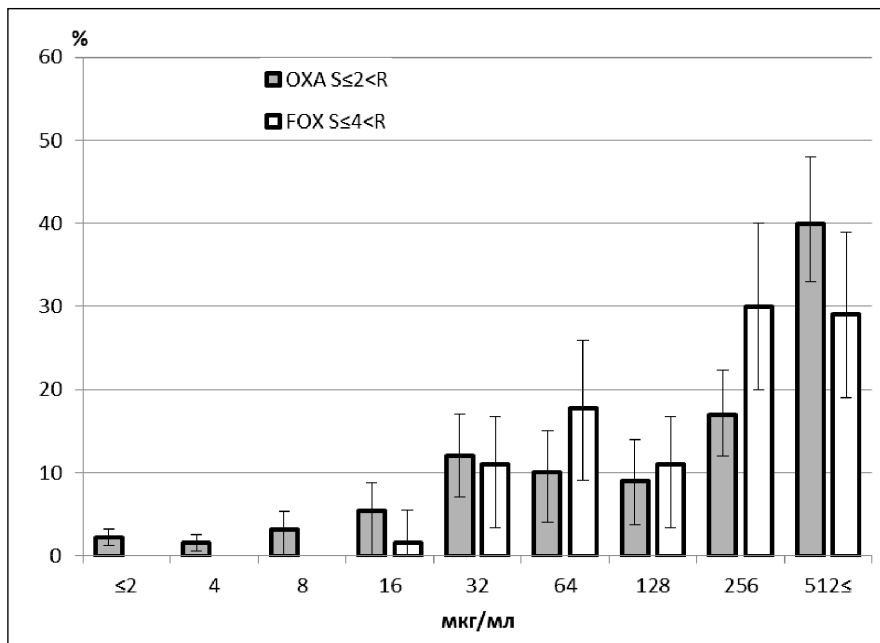


Рис. 1. Распределение МПК к оксациллину и цефокситину у изученных штаммов MRSA.

США). Были использованы субстанции оксациллина и цефокситина (Sigma, США). Для оценки чувствительности к ванкомицину и даптомицину использовали готовые планшеты Sensititre в бульоне CAMH — TES buffer (TREK Diagnostic Systems, США). Дополнительно у 73 штаммов определяли МПК к ванкомицину с использованием эпсилометрических тестов двух производителей (M.I.C.Evaluator strips™ — M.I.C.E.™, Oxoid, Ltd и Etest®, BioMérieux, Франция) на агаре Мюллера-Хинтона (BioMérieux, Франция). Постановку эпсилометрических тестов осуществляли в двух вариантах: с бактериальной взвесью 0,5 и 2 по стандарту мутности Мак-Фарланд (McF), результаты учитывали через 24 и 48 ч. Определение МПК и интерпретацию результатов проводили в соответствии с CLSI 2011-2012. В качестве контрольных штаммов были использованы *S.aureus* ATCC 29213, *S.aureus* Mu50 (МПК ванкомицина 4—8 мкг/мл), клинический изолят hVISA 2533/00 (МПК 2—4 мкг/мл).

Выявление гена *tesA* в ПЦР. Выделение тотальной бактериальной ДНК проводили с помощью наборов «ДНК-сорб Б» («АмплиСенс», Россия). Для ПЦР детекции гена *tesA* были выбраны олигонуклеотиды F: 5'-AAGTTTGCCATAAGATCTATAA-3', R: 5'-ATTTATGTATGGCATGAGTAA-3', размер ампликона 672 п.н. (праймеры синтезированы в ЗАО «Евроген», Россия). ПЦР проводили с реакционными смесями HS-ScreenMix («Евроген», Россия) в 25 мкл. Амплификацию проводили в термоциклере «Терцик» (Россия) по следующему протоколу: предварительная денатурация: 95°C — 5 мин, далее 32 цикла: 95°C — 10 с, 50°C — 10 с, 72°C — 20 с., финальная элонгация при 72°C — 5 мин.

Анализ и статистическая обработка данных. Описательная статистика — результаты представлены в виде долей с 99% доверительным интервалом, для сравнения методов определения МПК в серийных микроразведениях и эпсилометрических тестах использована модель Блэнда-Алмана [10]. Расчёт МПК и других показателей, проводили на платформе WHONET ver. 5.6.

Результаты и обсуждение

Все изоляты ($n=316$), включённые в исследование, были идентифицированы как *S.aureus* со

средним коэффициентом идентификации (MALDI Biotyper score) $2,2 \pm 1,5$ и давали положительный результат в ПЦР на наличие гена *tesA*.

Оксациллин и цефокситин.

Результаты оценки чувствительности изолятов MRSA к оксациллину и цефокситину приведены на рис. 1. Диапазон МПК к оксациллину оказался очень широким и составил 0,5—512 мкг/мл, МПК₉₀ 512, средняя геометрическая (СГ) — 130 мкг/мл. Как можно заметить (см. рис.1), несмотря на наличие *tesA*, некоторые штаммы ($2,2 \pm 1\%$) проявляли фенотипическую чувствительность с МПК ≤ 2 мкг/мл. Помимо этого, можно также выделить ещё два кластера изолятов: это MRSA с высокими значениями

МПК (256—512 мкг/мл) и большая группа с разбросом от 4 до 128 мкг/мл. Из многих исследований известно, что MRSA характеризуются вариабельностью в отношении чувствительности к оксациллину, а МПК может колебаться от 2 до 1000 мкг/мл [11]. Такой разброс является следствием наличия гетерорезистентных популяций, где частота появления клеток с высокими МПК составляет всего 10^{-7} и ниже [2, 12]. Ещё один фактор, это различное строение стафилококковых *tes*-кассет (SCC_{tes}). В работе [13] мы уже отмечали связь между типом SCC_{tes} и уровнем устойчивости к оксациллину. Более того, в последнее время увеличивается число сообщений о фенотипически чувствительных к оксациллину MRSA, несущих ген *tesA* [14]. В нашем исследовании при использовании цефокситина все MRSA имели МПК ≥ 16 мкг/мл и среднегеометрическая МПК составила 170 мкг/мл, а МПК₉₀ — 512 мкг/мл, также не было обнаружено изолятов с МПК, близкой к пограничной зоне (4 мкг/мл). Тем не менее картина неравномерной чувствительности к цефокситину также сохраняется. Несмотря на то что $2,2 \pm 1\%$ MRSA оказались «чувствительными» к оксациллину, клинически беталактамы антибиотики будут неэффективны, поскольку в опытах *in vitro* установлено, что при культивировании таких клеток в присутствии оксациллина уже через несколько часов МПК возрастает в несколько раз [15].

Ванкомицин и даптомицин. По результатам серийных разведений диапазон значений МПК ванкомицина был в пределах 0,06—2 мкг/мл, СГ составила 1,2 мкг/мл и МПК₉₀ 2 мкг/мл. Распределение МПК было следующим: $0,3 \pm 0,3\%$ изоля-

тов с МПК 0,06 мкг/мл; $2,2 \pm 1\%$ с МПК 0,5 мкг/мл; $66,7 \pm 9\%$ с МПК 1 мкг/мл. Однако обращает на себя внимание, что $30,7 \pm 7\%$ изолятов имеют пограничное значение — 2 мкг/мл, что по современным критериям CLSI, EUCAST расценивается как чувствительность. Несмотря на это, как указывалось ранее, при МПК > 1 мкг/мл вероятность неудачной терапии ванкомицином возрастает. Следовательно, изоляты, имеющие МПК 2 мкг/мл, следует рассматривать как штаммы «группы риска». Для выявления и подтверждения hVISA/VISA фенотипов рекомендуется использовать одновременно несколько методик. В серийных разведениях МПК может быть занижена (в среднем на одно разведение), а также этот метод не позволяет выявлять фенотипическую гетерогенность. С другой стороны, использование эсипометрических тестов решает эту проблему, но наоборот, может приводить к завышенным результатам [16, 17].

В данной работе параллельно для оценки чувствительности были использованы эсипометрические тесты с обычной и высокой бактериальной нагрузкой. Так, МПК₉₀ и среднегеометрическая МПК соответственно составили: в эсипометрических тестах с 0,5 McF — 2 и 1,19 мкг/мл (диапазон 0,25—3,5 мкг/мл); эсипометрических тестах с 2 McF — 3 и 1,7 мкг/мл (диапазон 0,5—4 мкг/мл).

Для более детальной оценки трёх методов измерений была использована модель Блэнда — Алтмана, основанная на отношении средней (μ) данных, полученных в сравниваемых методах, и разницы в измерениях в рамках двух стандартных отклонений ($\pm 2\sigma$). На рисунке 2, а представлена модель сравнения серийных разведений и эсипометрического теста с 0,5 McF. Следует обратить внимание, что 90% всех точек лежат в пределах допустимых границ $\mu \pm 2\sigma$, то есть в рамках $(-0,1) \pm 1,6$ мкг/мл, средняя разность между измерениями составила всего -0,1 мкг/мл со стандартным отклонением 0,8, что говорит о небольших различиях в измерениях. Напротив,

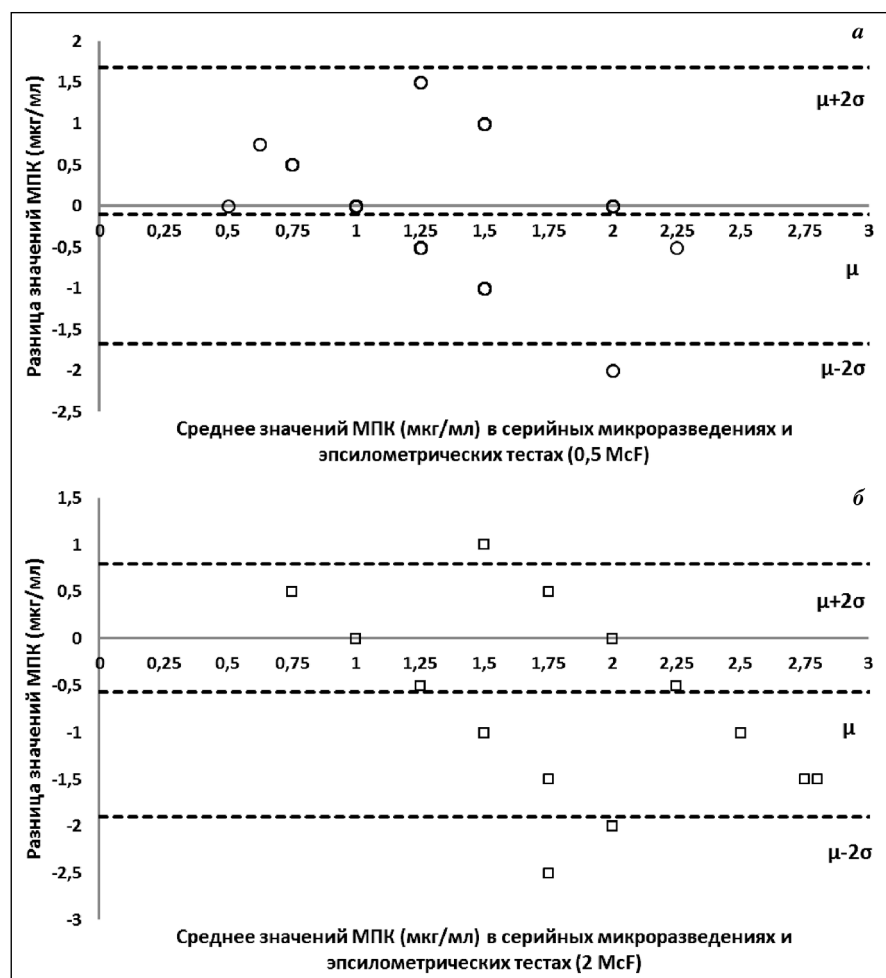


Рис. 2. Модель Блэнда — Алтмана для сравнения двух методик.

а — серийные микроразведения и Е-тесты с 0,5 McF; б — серийные микроразведения и эсипометрические тесты с 2 McF. По вертикали — разброс значений разности МПК в сравниваемых методах; по горизонтали — разброс значений средней в двух методах измерений. Пунктирные линии: (μ) — средняя разностей всех измерений; ($\mu \pm 2\sigma$) — допустимые границы в разнице измерений.

сравнивая результаты серийных разведений и Е-тестов с 2 McF (рис. 2, б), мы получаем видимую высокую среднюю разность, которая составляет -0,6 мкг/мл при небольших диапазонах измерений МПК: 0,5—3,5 мкг/мл. Большое количество точек ложится в зоне высоких значений МПК — до 2,5 мкг/мл, хотя 80% результатов находятся в рамках допустимых границ $(-0,6) \pm 1,36$ мкг/мл. 20% точек, выходящих за пределы $\mu \pm 2\sigma$, можно расценивать как ошибку измерений с учётом высокой бактериальной нагрузки.

Для 4 из 73 изолятов ($5 \pm 4\%$ и $1,3 \pm 1\%$ от всей выборки), имеющих МПК 2 мкг/мл в серийных разведениях, были характерны высокие значения МПК при использовании эсипометрических тестов, которые составили 3 мкг/мл в 0,5 McF (рис. 3, а) и 4 мкг/мл в 2 McF (рис. 3, б). Таким образом, такие изоляты можно рассматривать как hVISA варианты. Контрольные штаммы Mu50 (рис. 4, а) и hVISA 2533/00 (рис. 4, б),

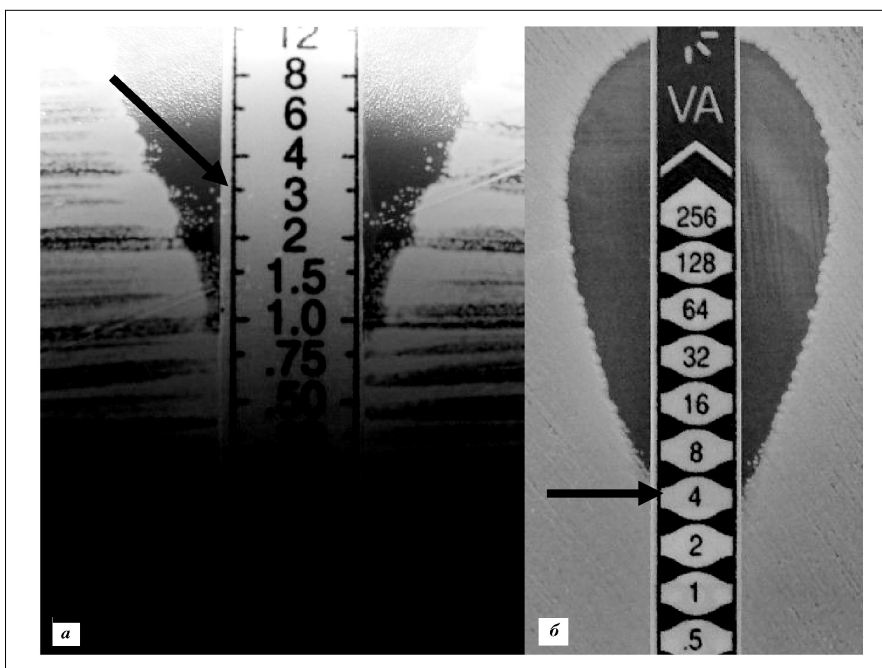


Рис. 3. Эпсилومترические тесты с клиническими изолятами hVISA. Значения МПК отмечены черными стрелками.

a — изолят SA0085, (Etest®, BioMérieux, Франция) МПК 3 мкг/мл (0,5 McF); *б* — изолят SA0080, (M.I.C.Evaluator strips™ — M.I.C.E.™, Oxoid, Ltd) МПК 4 мкг/мл (2 McF).

соответственно имели МПК 4–8 мкг/мл и 2–4 мкг/мл. К сожалению, использование эпсилومترических тестов с 2 McF не позволяет достоверно выявлять hVISA фенотип, поскольку само увеличение бактериальной нагрузки ведет за собой и увеличение МПК. При использовании эпсилومترических тестов раз-

диапазоне 0,38–0,75 мкг/мл [19]. Противоположные результаты представлены в исследовании А. С. Musta с соавт. [6], где среди 489 MRSA, выделенных от больных с бактериемией в разные периоды с 1996 по 2006 гг., выявлено 10% изолятов с МПК 2 мкг/мл, из которых порядка 30% характеризовались как hVISA фенотипы. В многоцентро-

личных производителей были получены сходные результаты. Необходимо отметить, что при оценке результатов следует учитывать рост единичных колоний в пределах зон ингибции роста.

Данные о частоте распространения hVISA и VISA вариантов в мире противоречивы. Так, в исследовании А. М. Pitz с соавт. [18], проведенном в одном стационаре за девятилетний период (2000–2008 гг.), было выявлено всего 17% MRSA с МПК ≥ 2 мкг/мл к ванкомицину и только 2 изолята обладали hVISA фенотипом. Другие авторы отмечают крайне низкую частоту встречаемости hVISA/VISA. Например, в работе R. L. Holmes, J. H. Jorgensen было исследовано 240 изолятов MRSA, выделенных от больных с сепсисом за период 1999–2006 гг., МПК ванкомицина была в

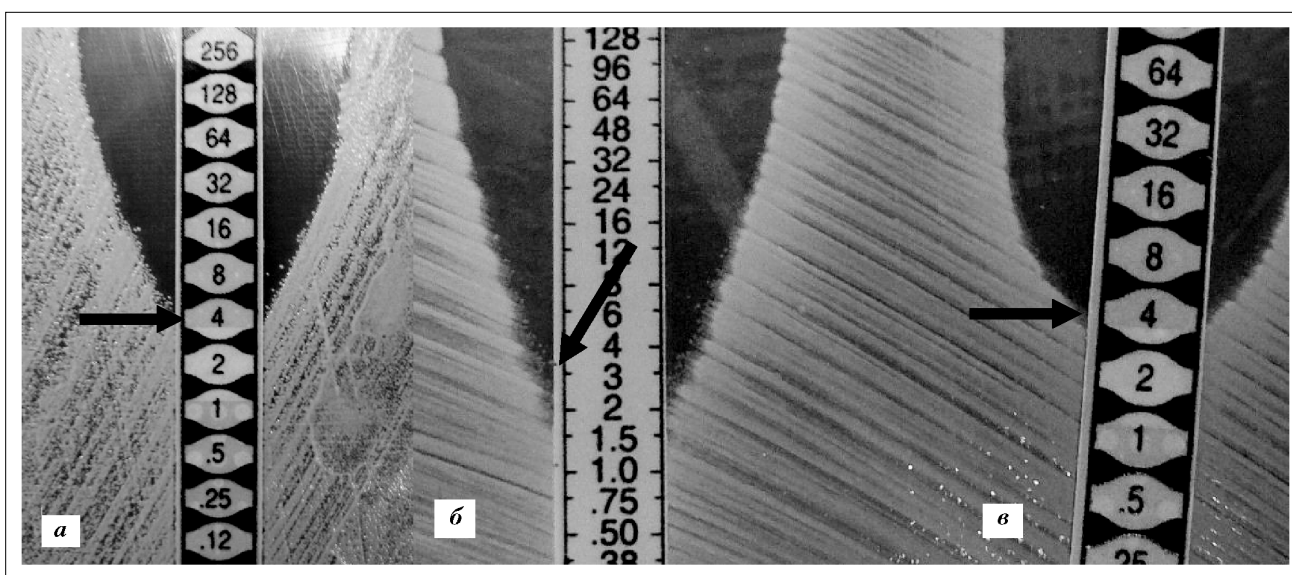


Рис. 4. Эпсилومترические тесты с контрольными штаммами. Значения МПК отмечены черными стрелками.

a — VISA Mu50, M.I.C.Evaluator strips™ — M.I.C.E.™, Oxoid, Ltd (МПК 4 мкг/мл); *б* — hVISA 2533/00 Etest®, BioMérieux, Франция (МПК 3 мкг/мл), 0,5 McF; *в* — hVISA 2533/00 M.I.C.Evaluator strips™ — M.I.C.E.™, Oxoid, Ltd (МПК 4 мкг/мл), 0,5 McF.

вом исследовании, проведённом в Канаде, из 6414 изолятов MRSA, собранных с 1995—2006 гг., только 4% имели МПК 2 мкг/мл, а общее количество hVISA составило 5,3% [20]. На протяжении последнего десятилетия всё больше появлялось сообщений о hVISA изолятах. По данным некоторых авторов, частота выявления таких стафилококков в конкретных медицинских учреждениях очень высокая [4, 21, 22]. Такой разброс данных является следствием отсутствия унифицированного метода определения hVISA, а также нестабильности фенотипов.

Чувствительность MRSA к даптомицину. Диапазон МПК даптомицина в отношении исследуемых изолятов составил 0,03—2 мкг/мл, среднегеометрическая МПК 0,8 мкг/мл. Распределение МПК носило следующий характер: 0,3±0,3% изолятов с МПК 0,03 мкг/мл; 0,6±1% с МПК 0,25 мкг/мл; 39,5±8% с МПК 0,5 мкг/мл и 56,6±9% с МПК 1 мкг/мл. В нашей работе выявлено 9 штаммов (2,8±1%), не чувствительных к даптомицину и имеющих МПК 2 мкг/мл. Если проанализировать проведённые исследования по изучению чувствительности стафилококков к даптомицину, то можно сделать вывод, что частота встречаемости изолятов с МПК ≥ 2 мкг/мл крайне не велика. Так, в работе [23], где тестировались изоляты, собранные ещё в 2001 году, до внедрения в практику антибиотика в Европе, среди 334 MRSA диапазон МПК составил 0,12—1 мкг/мл, МПК₉₀ 0,5 мкг/мл, нечувствительных стафилококков описано не было. В другом исследовании, проведённом в США, из 1800 изолятов MRSA, выделенных от больных с сепсисом в 2001—2006 годах, только 0,1% имели МПК 1,5 мкг/мл [24, 25]. Из анализа более чем 3000 штаммов стафилококков, собранных в начале 2000 годов в Европе, Северной и Южной Америки, только 0,06% изолятов имели МПК ≥ 2 мкг/мл [26]. Хотя, в последнее время всё чаще появляются единичные сообщения об изолятах со сниженной чувствительностью к даптомицину. Полученные в нашем исследовании данные, говорят о достаточно высокой доле MRSA (2,8±1%), имеющих МПК 2 мкг/мл, такие штаммы требуют генетической расшифровки механизмов, обуславливающих повышение МПК.

Другая немаловажная проблема — это перекрёстное снижение чувствительности MRSA к

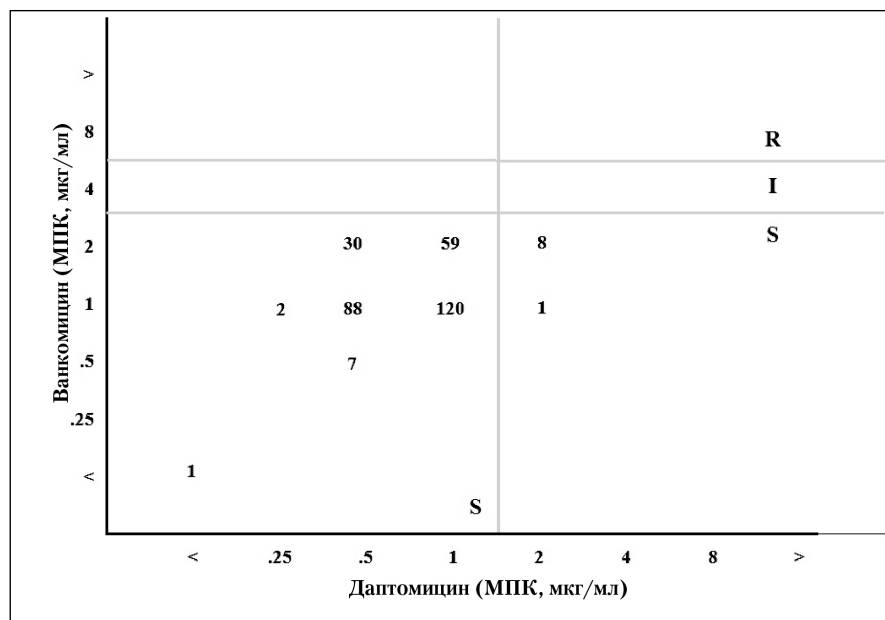


Рис. 5. Распределение МПК к ванкомицину и даптомицину (скаттерграмма) у MRSA, представлены абсолютные данные (n=316).

гликопептидам и даптомицину. В работах [9, 27, 28] продемонстрировано, что снижение чувствительности MRSA к ванкомицину может коррелировать с повышением МПК к даптомицину до 2 мкг/мл у hVISA, и до 4 мкг/мл у VISA. Также имеются данные о возможном параллельном снижении чувствительности к рассматриваемым антибиотикам у пациентов, находящихся на терапии этими препаратами [28, 29]. В нашем исследовании параллельный анализ чувствительности к ванкомицину и даптомицину (рис. 5) показал, что подавляющее большинство изолятов имеют фенотипы с МПК 1 мкг/мл к обоим антибиотикам. В отношении подавляющего большинства штаммов с МПК 2 мкг/мл к ванкомицину, МПК даптомицина колеблется в пределах 0,5—1 мкг/мл. Однако, 8 штаммов с «критическим» значением МПК ванкомицина были нечувствительны к даптомицину (МПК 2 мкг/мл). Среди них отдельного внимания заслуживает изолят SA0077, выделенный из мокроты от больного с пневмонией и абсцессом лёгкого, который находился на терапии ванкомицином. При постановке серийных разведений были получены следующие результаты: МПК даптомицина составила 4 мкг/мл, ванкомицина — 2 мкг/мл. Однако при повторном определении МПК к ванкомицину и даптомицину составила 2 мкг/мл.

Как уже отмечалось, проблема перекрёстного снижения чувствительности к ванкомицину и даптомицину описывается во многих работах [9, 27, 28], однако механизм такого явления до конца остается невыясненным. У не чувствительных к этим антибиотикам штаммов MRSA, описывают-

ся мутации в регулонах, участвующих в регуляции и биосинтезе клеточной стенки, что способствует увеличению её толщины и изменению химического состава [30, 31]. Кроме того, механизм резистентности к даптомицину связан, в первую очередь, с накоплением мутаций и изменением паттернов экспрессии генов, участвующих в биосинтезе мембранных фосфолипидов, результатом этого является изменение суммарного заряда цитоплазматической мембраны [31]. Эти изменения ведут к неспособности молекулы даптомицина электрохимически взаимодействовать с мембранной. Еще одной особенностью hVISA/VISA вариантов и не чувствительных к даптомицину изолятов, является крайне неустойчивый фенотип, который может реверсировать в чувствительные формы в лабораторных условиях.

Заключение

Таким образом, анализируя чувствительность изолятов MRSA к оксациллину, цефокситину, ванкомицину и даптомицину, можно отметить некоторые особенности. Уровень резистентности MRSA к оксациллину отличается широким диапазоном, при этом $2,2 \pm 1\%$ *mecA*-положительных MRSA оценены как чувствительные. В этой связи рекомендуемым маркерным антибиотиком для детекции фенотипа MRSA является цефокситин, все штаммы к этому антибиотику имели МПК ≥ 16 мкг/мл. Наиболее серьезная проблема обстоит с определением чувствительности к ванкомицину, поскольку диско-диффузионный метод не приемлем для выявления hVISA/VISA, а методов количественной оценки МПК существует множество вариантов, но к сожалению, ни один из них

не обладает высокой степенью эффективности и воспроизводимости. Использование эппиметрических тестов частично решает такую проблему за счёт выявления фенотипической гетерогенности, однако существует вероятность получения завышенных результатов МПК, и в частности с увеличением бактериальной нагрузки, что было продемонстрировано в настоящей работе. Усугубляет ситуацию также неустойчивость фенотипов со сниженной чувствительностью к ванкомицину в лабораторных условиях. Другая немаловажная проблема — это высокая доля MRSA ($30,7 \pm 7\%$) с «критическими» значениями МПК 2 мкг/мл. Фенотип hVISA был выявлен у четырёх изолятов, для которых было характерно появление зон роста на уровне МПК 2–4 мкг/мл в эппиметрических тестах. Конечно, выявленные в Российских регионах hVISA изоляты, требуют детального анализа механизмов резистентности. В исследовании также показано, что снижение чувствительности к ванкомицину влияет и на повышение МПК к даптомицину, количество штаммов с МПК 2 мкг/мл к ванкомицину и даптомицину составило $2,5 \pm 1\%$. Достаточно высокая доля изолятов MRSA с МПК 2 мкг/мл к даптомицину, требует детальной расшифровки механизмов, обуславливающих снижение чувствительности к этому препарату.

Выражаем благодарность члену-корреспонденту РАМН, д. б. н., профессору А. А. Фирсову (НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе РАМН, Москва), и профессору Гриневич (Варшава) за предоставленные штаммы *S.aureus* Mu50 и hVISA 2533/00.

ЛИТЕРАТУРА

- Chambers H.F. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. Clin Microbiol Rev 1997; 10: 4: 781–791.
- Ikonidis A., Michail G., Vasdeki A., Labrou M., Karavasilis V., Stathopoulos C., Maniatis A.N., Pournaras S. In vitro and in vivo evaluations of oxacillin efficiency against *mecA*-positive oxacillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 2008, 52: 11: 3905–3908.
- Perichon B., Courvalin P. VanA-type vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 2009, 53: 11: 4580–4587.
- Howden B.P., Davies J.K., Johnson P.D., Stinear T.P., Grayson M.L. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. Clin Microbiol Rev 2010; 23: 1: 99–139.
- Walsh T.R., Bolmstrom A., Qvarnstrom A., Ho P., Wootton M., Howe R.A., MacGowan A.P., Diekema D. Evaluation of current methods for detection of staphylococci with reduced susceptibility to glycopeptides. J Clin Microbiol 2001; 39: 7: 2439–2444.
- Musta A.C., Riederer K., Shemes S., Chase P., Jose J., Johnson L.B., Khatib R. Vancomycin MIC plus heteroresistance and outcome of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia: trends over 11 years. J Clin Microbiol 2009; 47: 6: 1640–1644.
- Wi Y.M., Kim J.M., Joo E.J., Ha Y.E., Kang C.I., Ko K.S., Chung D.R., Song J.H., Peck K.R. High vancomycin minimum inhibitory concentration is a predictor of mortality in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia. Int J Antimicrob Agents 2012; 40: 2: 108–113.
- Steenbergen J.N., Alder J., Thorne G.M., Tally F.P. Daptomycin: a lipopeptide antibiotic for the treatment of serious Gram-positive infections. J Antimicrob Chemother 2005; 55: 3: 283–288.
- Kelley P.G., Gao W., Ward P.B., Howden B.P. Daptomycin non-susceptibility in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) and heterogeneous-VISA (hVISA): implications for therapy after vancomycin treatment failure. J Antimicrob Chemother 2011; 66: 5: 1057–1060.
- Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: 1999.
- Figueiredo A.M., Ha E., Kreiswirth B.N., de Lencastre H., Noel G.J., Senterfit L., Tomasz A. In vivo stability of heterogeneous expression classes in clinical isolates of methicillin-resistant staphylococci. J Infect Dis 1991; 164: 5: 883–887.
- Tomasz A., Nachman S., Leaf H. Stable classes of phenotypic expression in methicillin-resistant clinical isolates of staphylococci. Antimicrob Agents Chemother 1991; 35: 1: 124–129.
- Гостев В.В., Сидоренко С.В. Тип стафилококковой хромосомной *mec*-кассеты (SCC*mec*) и уровень резистентности метициллин-резистентных *Staphylococcus aureus* к оксациллину. Проблем мед микол 2012; 14: 2: 77–78.
- Saeed K., Dryden M., Parnaby R. Oxacillin-susceptible MRSA, the emerging MRSA clone in the UK? J Hosp Infect 2010; 76: 3: 267–268.
- Sakoulas G., Gold H.S., Venkataraman L., DeGirolami P.C., Eliopoulos G.M., Qian Q. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: comparison of susceptibility testing methods and analysis of *mecA*-positive susceptible strains. J Clin Microbiol 2001; 39: 11: 3946–3951.

16. Nadarajah R., Post L.R., Liu C., Miller S.A., Sahm D.F., Brooks G.F. Detection of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* with the updated Trek-Sensititre System and the MicroScan System. Comparison with results from the conventional Etest and CLSI standardized MIC methods. *Am J Clin Pathol* 2010; 133: 6: 844–848.
17. Satola S.W., Farley M.M., Anderson K.F., Patel J.B. Comparison of detection methods for heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*, with the population analysis profile method as the reference method. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 1: 177–183.
18. Pitz A.M., Yu F., Hermesen E.D., Rupp M.E., Fey P.D., Olsen K.M. Vancomycin susceptibility trends and prevalence of heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in clinical methicillin-resistant *S.aureus* isolates. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 1: 269–274.
19. Holmes R.L., Jorgensen J.H. Inhibitory activities of 11 antimicrobial agents and bactericidal activities of vancomycin and daptomycin against invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates obtained from 1999 through 2006. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 2: 757–760.
20. Adam H.J., Louie L., Watt C., Gravel D., Bryce E., Loeb M., Matlow A., McGeer A., Mulvey M.R., Simor A.E. Detection and characterization of heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* isolates in Canada: results from the Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program, 1995–2006. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 2: 945–949.
21. Khosrovaneh A., Riederer K., Saeed S., Tabriz M.S., Shah A.R., Hanna M.M., Sharma M., Johnson L.B., Fakih M.G., Khatib R. Frequency of reduced vancomycin susceptibility and heterogeneous subpopulation in persistent or recurrent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Infect Dis* 2004; 38: 9: 1328–1330.
22. Wootton M., MacGowan A.P., Walsh T.R., Howe R.A. A multicenter study evaluating the current strategies for isolating *Staphylococcus aureus* strains with reduced susceptibility to glycopeptides. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 2: 329–332.
23. Critchley I.A., Draghi D.C., Sahm D.F., Thornsberry C., Jones M.E., Karlowsky J.A. Activity of daptomycin against susceptible and multidrug-resistant Gram-positive pathogens collected in the SECURE study (Europe) during 2000–2001. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 3: 639–649.
24. Sader H.S., Fey P.D., Limaye A.P., Madinger N., Pankey G., Rahal J., Rybak M.J., Snyderman D.R., Steed L.L., Waites K. et al. Evaluation of vancomycin and daptomycin potency trends (MIC creep) against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates collected in nine U.S. medical centers from 2002 to 2006. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 10: 4127–4132.
25. Sader H.S., Rhomberg P.R., Jones R.N. Nine-hospital study comparing broth microdilution and Etest method results for vancomycin and daptomycin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 7: 3162–3165.
26. Streit J.M., Jones R.N., Sader H.S. Daptomycin activity and spectrum: a worldwide sample of 6737 clinical Gram-positive organisms. *J Antimicrob Chemother* 2004; 53: 4: 669–674.
27. van Hal S.J., Paterson D.L., Gosbell I.B. Emergence of daptomycin resistance following vancomycin-unresponsive *Staphylococcus aureus* bacteraemia in a daptomycin-naïve patient — a review of the literature. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011; 30: 5: 603–610.
28. Kirby A., Edwards C., Broughton C.M., Williams N.J. Glycopeptide and daptomycin resistance in community-associated MRSA in the UK. *Infection* 2011; 39: 3: 277–279.
29. Skiest D.J. Treatment failure resulting from resistance of *Staphylococcus aureus* to daptomycin. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 2: 655–656.
30. Fischer A., Yang S.J., Bayer A.S., Vaezzadeh A.R., Herzig S., Stenz L., Girard M., Sakoulas G., Scherl A., Yeaman M.R. et al. Daptomycin resistance mechanisms in clinically derived *Staphylococcus aureus* strains assessed by a combined transcriptomics and proteomics approach. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66: 8: 1696–1711.
31. Peleg A.Y., Miyakis S., Ward D.V., Earl A.M., Rubio A., Cameron D.R., Pillai S., Moellering R.C., Eliopoulos G.M. Whole genome characterization of the mechanisms of daptomycin resistance in clinical and laboratory derived isolates of *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* 2012; 7: 1: e28316.