

ВИЗНАЧЕННЯ МЕТИЦИЛІНРЕЗИСТЕНТНИХ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* (MRSA) НА ОСНОВІ КІЛЬКІСНОГО ВИМІРЮВАННЯ РАДІУСА БАКТЕРІАЛЬНИХ КЛІТИН ЗА ДОПОМОГОЮ РАСТРОВОЇ ЕЛЕКТРОННОЇ МІКРОСКОПІЇ

Конєва А.О., Чернецький І.В.
Сумський державний університет

Науковий керівник – Бергілевич О.М., кандидат ветеринарних наук,
професор кафедри громадського здоров'я Сумського державного університету

Дані епідагляду ВООЗ свідчать про високий рівень резистентності до антибіотиків збудників бактеріальних інфекцій у країнах як з високим, так і низьким рівнем економіки [6]. Найчастіше причиною таких бактеріальних інфекцій є метицилінрезистентний *Staphylococcus aureus* (MRSA), резистентність якого виникла в результаті довготривалого використання антибіотиків β-лактамної групи. Стійкість до антибіотичних препаратів цієї групи у *Staphylococcus aureus* обумовлена наявністю гену *mecA*, який відповідає за продукцію білка РВР2а. Останній дозволяє будувати клітинну стінку в присутності антибіотиків [2-3]. Тривалий час вважалося, що MRSA спричиняє виключно внутрішньо лікарняні інфекції, проте згодом цей мікроорганізм став причиною і позалікарняних інфекцій. Виходячи з цього, створення та вдосконалення методів виявлення стійких до антибіотиків мікроорганізмів є однією із головних задач стратегії для запобігання поширеності антибіотикорезистентних бактерій та важливою умовою для призначення ефективного лікування [4].

Відомі загальноприйняті лабораторні методи для визначення антибіотикорезистентності мікроорганізмів: диско-дифузійний метод та метод серійних розведень. Крім того, до сучасних методів належить полімеразно-ланцюгова реакція (ПЛР). На жаль, для даних методів характерний ряд недоліків. Так, їм властиві значна тривалість, трудомісткість, потреба у спеціальних умовах для виконання. До того ж, метод ПЛР є дуже вартісним [1].

Метою даного дослідження стала розробка методу визначення MRSA за допомогою растрового мікроскопу шляхом вимірювання радіусу досліджуваних бактеріальних клітин.

Відповідно до поставленої мети були визначені наступні завдання:

1. Виділення ізолятів *Staphylococcus aureus* з клінічного матеріалу та визначення серед них метицилінрезистентних штамів *Staphylococcus aureus* (MRSA) диско-дифузійним методом.
2. Підготовка штамів мікроорганізму для растрової електронної мікроскопії згідно до методики, описаної у *Electron Microscopy: Methods and Protocols* [5].
3. Дослідження зразків методом растрової електронної мікроскопії.

4. Кількісні вимірювання радіусу бактеріальних клітин метицилін-резистентних штамів *Staphylococcus aureus*.

5. Аналіз отриманих результатів дослідження та статистична обробка.

Об'єкт дослідження – виявлення метицилінрезистентного *Staphylococcus aureus* (MRSA) шляхом вимірювання середнього значення радіуса бактеріальних клітин з використанням растрової електронної мікроскопії.

Предмет дослідження – метицилінрезистентні штами *Staphylococcus aureus*.

Для проведення дослідження було використано ізоляти із проб матеріалу, що був відібраний із гнійних уражень людей, тварин та з об'єктів навколишнього середовища (грунт, вода, сире молоко). Виділення чистих культур здійснювали на агарі Байрд-Паркера. Проведені тести із отриманими культурами на коагулазну та каталазну активність мали позитивні результати. Усі виділені чисті культури *Staphylococcus aureus* були досліджені на антибіотикорезистентність загальноприйнятим диско-дифузійним методом; а для підтвердження їх антибіотикорезистентності та віднесення до MRSA було визначено наявність гену *mecA* – методом ПЛР (Державний науково-контрольний інституті біотехнології і штамів мікроорганізмів у м. Києві).

Дослідження зразків методом растрової електронної мікроскопії здійснювались за допомогою скануючого мікроскопу фірми «SELMi» – РЭМ106И, Україна на базі науково-навчальної лабораторії електронної мікроскопії СНАУ. Для кількісної характеристики радіусу *Staphylococcus aureus* отримані зображення клітин бактерій були оброблені за допомогою програми Djmaizer v.5.1.10. У даній програмі були зроблені вимірювання та отримані первинні дані для подальшої обробки, що дозволило чітко та швидко встановити кількісні показники бактеріальних клітин, такі як радіус, площа, довжина окружності. Статистична обробка отриманих вимірів була здійснена із застосуванням t-критерія Стюдента за допомогою програмного забезпечення Statistica v.12.

Під час вимірювання радіусу окремих бактерій *Staphylococcus aureus* було встановлено, що метицилінрезистентний *Staphylococcus aureus* (MRSA) з наявним геном *mecA*, мали менші розміри порівняно з метицилінчутливим *Staphylococcus aureus* (MSSA) із відсутнім геном *mecA* (табл. 1). Ці розміри для *Staphylococcus aureus* (MRSA) становлять $0,397 \pm 0,0677 \mu\text{m}$, а для *Staphylococcus aureus* (MSSA) $0,431 \pm 0,0578 \mu\text{m}$. Аналіз та статистична обробка отриманих даних показали, що середні кількісні показники радіусу обох груп клітин *Staphylococcus aureus* (MRSA та MSSA) істотно різняться між. Середні значення розмірів радіусів бактеріальних клітин *Staphylococcus aureus* з наявним геном *mecA* ($0,397 \mu\text{m}$) менші порівняно зі *Staphylococcus aureus* з відсутнім геном *mecA* ($0,431 \mu\text{m}$). Статистичний аналіз кількісних даних показав, що похибка вимірювань становить для mecA^+ $0,0677 \mu\text{m}$, для mecA^- – $0,0578 \mu\text{m}$. Було встановлено, що мінімальна кількість значень для отримання достовірних

результатів складає 5 промірів радіусів бактеріальної клітини *Staphylococcus aureus*. Згідно статистичних показників достовірність отриманих результатів є високою ($p=0,001$). Отже, результати дослідження вважаються достовірними.

Таблиця 1 – Результати вимірювання радіусу бактеріальних клітин різних груп *Staphylococcus aureus* із застосуванням растрового мікроскопу

Статистичні показники	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) із наявним геном <i>mecA</i> , μm	<i>Staphylococcus aureus</i> (MSSA) із відсутнім геном <i>mecA</i> , μm
Кількість промірів	125	125
Максимальне значення радіусу клітин	0,591	0,613
Мінімальне значення радіусу клітин	0,291	0,306
Середнє значення радіусу клітин	0,397	0,431
Похибка середнього	0,068	0,058

У ході виконання роботи було встановлено, що отриманий спосіб визначення метицилінрезистентного *Staphylococcus aureus* (MRSA) за допомогою растрового мікроскопу шляхом вимірювання радіусу досліджуваних клітин є точним і має переваги порівняно з аналогічними методиками за рахунок швидкості виконання.

Таким чином, розроблений спосіб має перспективу практичного застосування медичними лабораторіями, як альтернативний метод при необхідності визначення антибіотикорезистентних *Staphylococcus aureus* (MRSA) та визначення механізму його резистентності, що є головною умовою для призначення подальшого ефективного лікування пацієнтів. Окрім того, даний спосіб може стати ефективним інструментом для попередження розповсюдження стійких до антибіотиків штамів. Отриманий метод також може використовуватися для проведення досліджень науковими лабораторіями, що вивчають стійкість до антибіотиків *Staphylococcus aureus*, організаціями, що займаються контролем безпеки продовольчої сировини та харчових продуктів.

Список використаних джерел:

1. Люта В. А. Мікробіологія з технікою мікробіологічних досліджень, вірусологія та імунологія : підручник / В. А. Люта, О. В. Кононов. – К.: ВСВ «Медицина», 2017. – 576 с.
2. Супотницький М. В. Механізми розвитку резистентності к антибиотикам у бактерий // Биопрепараты. – 2011. – № 2. – С. 4–11.
3. Jessica M. A. Blair, Mark A. Webber, Alison J. Baylay, David O. Ogboluand Laura J. V. Piddock. Molecular mechanisms of antibioticresistance // Nature Reviews – Microbiology – 2015 – №13 – p. 42–51.

4. Berhilevych O. M., Kasianchuk V. V., Kukhtyn M. D., Lotskin I. M., Garkavenko T. O., Shubin P. A. Characteristics of antibiotic sensitivity of *Staphylococcus aureus* isolated from dairy farms in Ukraine // *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. – 2017. i – № 4. – p. 559–563.
5. *Electron Microscopy: Methods and Protocols Second Edition*, edited by John Kuo, 2007 – Humana Press Inc. Totowa, New Jersey. p. 11–18.
6. News release «High levels of antibiotic resistance found worldwide, new data shows» 29 January 2018: <https://www.who.int/>