



А.М. Насирова, Е.А. Колоскова, Б.А.Рамазанова, К.К. Мустафина
Казахский национальный медицинский университет имени С.Д.Асфендиярова
Алматы, Казахстан

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МЕТИЦИЛЛИНОРЕЗИСТЕНТНЫХ СТАФИЛОКОККОВ, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В УСЛОВИЯХ МНОГОПРОФИЛЬНОГО СТАЦИОНАРА Г.АЛМАТЫ, КАЗАХСТАН

Резюме: В статье приводятся результаты исследования биологических свойств стафилококков, имеющих фенотипический паттерн метициллинорезистентности. Изучены количественные характеристики гемолитической и лецитиназной активности, антибиотикорезистентность, установлена способность штаммов синтезировать биопленку и проведен тест модификации патогенных свойств при сокультивировании.

Ключевые слова: стафилококки, метициллинорезистентность, MRSA, MRCoNS

А.М. Насирова, Е.А. Колоскова, Б.А.Рамазанова, К.К. Мустафина
С.Ж. Асфендияров атындағы Қазақ ұлттық медицина университеті
Алматы, Қазақстан

АЛМАТЫ ҚАЛАСЫНЫҢ (ҚАЗАҚСТАН) КӨПСАЛАЛЫ СТАЦИОНАРЫНДА КЕЗДЕСЕТІН МЕТИЦИЛЛИНТҰРАҚТЫ СТАФИЛОКОКТАРДЫҢ БИОЛОГИЯЛЫҚ ҚАСИЕТТЕРІ

Түйін: Баяндамада метициллинтұрақтылықтың фенотиптік көріністері бар стафилококктардың биологиялық қасиеттерінің нәтижелері келтірілген. Гемолитикалық және лецитиназалық белсенділіктерінің сандық сипаты, антибиотиктерге тұрақтылығы, штамдардың биоүлбір түзу қабілеттіліктері анықталды, бірге дақылдандыру кезіндегі патогенділік қасиеттердің модификациясын тесттілеу жүргізілді.

Түйінді сөздер: стафилококктар, метициллинтұрақтылық, MRSA, MRCoNS

А.М. Nasirova, E.A. Koloskova, B.A.Ramazanova, K.K. Mustafina
Asfendiyarov Kazakh national medical university
Almaty, Kazakhstan

BIOLOGICAL PROPERTIES OF METHICILLIN-RESISTANT STAPHYLOCOCCI, CIRCULATING IN A MULTIDISCIPLINARY HOSPITAL IN ALMATY, KAZAKHSTAN

Resume: The article presents the results of a study of the biological properties of staphylococci with a phenotypic pattern of methicillin resistance. We were studied the quantitative characteristics of hemolytic and lecithinase activity, antibiotic resistance, the ability of strains to synthesize a biofilm was established, and a test for the modification of pathogenic properties during co-cultivation was carried out.

Key words: staphylococcus, methicillin, MRSA, MRCoNS

Введение.

Открытие пеницилина Александром Флеммингом дало начало новой эры в медицине. Успешная антибактериальная терапия инфекционных болезней, постоперационных осложнений и контроль за ними существенно увеличила выживаемость пациентов и качество их жизни [1,2]. Однако эволюционный механизм выживания микроорганизмов позволил сформировать новое свойство микробов – резистентность к антибиотикам. Среди возбудителей внебольничных и внутрибольничных инфекций человека важную роль играют грамположительные кокки рода *Staphylococcus*, которые в свою очередь способны колонизировать различные биотопы человека [3]. Данный факт существенно затрудняет оценку риска развития стафилококковых инфекций. Быстрая эволюция штаммов в ответ на применяемые антибактериальные препараты, в том числе на метициллин в 1962 году, привела к формированию

особого вида – метициллинорезистентного стафилококка [4]

Метициллинорезистентность кодируется геном *mecA*. Данный ген широко распространен среди видов стафилококков. Данное свойство существенно утяжеляет течение заболеваний и увеличивает риск летальных исходов.

Частота выделяемости метициллинорезистентных *Staphylococcus* в структуре стафилококковых инфекций имеют существенные территориальные отличия. В Тихоокеанском регионе частота встречаемости метициллинорезистентных стафилококков варьируется от 2,3 до 69,1% [5]. В странах Европейского союза регистрация метициллинорезистентных стафилококков разная – от 0,9% в Нидерландах и до 56% в Румынии [6]. Среди стран СНГ наиболее изучена проблема метициллинорезистентных стафилококков в Российской Федерации с установлением частоты выделения при различных нозологиях, с объектов



больничной среды, профиля антибиотикорезистентности и генетических паттернов [7].

Несмотря на распространение и значимость метициллинорезистентных стафилококков в здравоохранении, имеется недостаточная изученность их биологических свойств. В настоящее время имеются неоднозначные данные по способности образовывать биопленку, отсутствуют региональные данные по резистентности данных штаммов к антибактериальным препаратам, не проводились исследования по их симбиотическому взаимодействию [8-10].

В данной связи целью нашего исследования явилось изучить.

изучить факторы патогенности и персистенции штаммов *Staphylococcus*, имеющих фенотипический паттерн метициллинорезистентности.

Материалы и методы

Для исследования использовали штаммы *Staphylococcus*, выделенные из ран пациентов хирургического профиля и из носоглотки медицинских работников в количестве 26 шт.

Сохраненные в полужидком агаре штаммы восстанавливали однократным пассажем на желточно-солевым агаре и использовали в опытных исследованиях.

Определение антибиотикорезистентности *Staphylococcus spp.*

Тестирование чувствительности к антибактериальным препаратам проводили диско-диффузным методом Кирби Бауэра в соответствии с рекомендациями Института клинических и лабораторных стандартов (CLSI) [11]. Для исследования использовали диски с антибиотиками бензилпенициллин 10 ЕД, эритромицин 15 мкг, ципрофлоксацин 5 мкг, левофлоксацин 5 мкг, гентамицин 10 мкг, триметоприм/сульфаметоксазол 1,25/23,75 мкг, доксициклин 30 мкг, рифампицин 5 мкг, хлорамфеникол 30 мкг. Готовили бактериальную взвесь, соответствующую 0,5 стандарту мутности по МакФарланду из нескольких единичных суточных колоний, выросшем на питательном агаре. Затем культуру засеивали стерильным ватным тампоном штриховыми движениями с поворотом чашки Петри на 60° на поверхность питательного агара Мюллера-Хинтона. Затем диски с антибиотиками накладывали на поверхность засеянного агара и пластину инкубировали аэробно при 37 °С в течение 18 часов. Оценивали результат зоны ингибирования и интерпретировали в соответствии с руководящими принципами CLSI. Штаммы, демонстрирующие устойчивость к трем или более чем трем различным классам антибиотиков, считались мультирезистентными [27].

Определение продукции биопленки метициллинорезистентными штаммами *Staphylococcus spp.*

Исследование биопленкообразования проводили по методике Романовой Ю.М. и соавт., 2006. В опыте использовали стерильные пластиковые чашки Петри размером 35x10, на дно которых помещали предметное стекло. Культуры разводили свежим сывороточным бульоном 1:200. Полученные суспензии стерильно вносили по 150 мкл в стерильные пластиковые чашки Петри. В целях контроля в одну чашку Петри вносили только сывороточный бульон. Пластиковые чашки каждой

культуры инкубировали в термостате при температуре 33°C в течение 24 часов. Затем после завершения времени инкубирования содержимое лунок осторожно отсасывали и заполняли их 150 мкл дистиллированной воды и 15 мкл 1% спиртового раствора кристаллического фиолета. Пластиковые чашки оставляли на 45 минут при комнатной температуре на столе, затем краситель аккуратно отсасывали, затем дважды промывали дистиллированной водой.

Макроскопически оценивали наличие или отсутствие биопленок на предметном стекле в чашке Петри [12].

Определение модификации факторов патогенности при взаимоотношениях видов *Staphylococcus spp.*

Проводили определение факторов патогенности (гемолитической и лецитиназной активности) путем засева культуры методом «бляшек» на поверхность кровяного агара с добавлением 5% бараньей крови и на поверхность желточно-солевого агара. После 24 часовой инкубации проводили измерение диаметра колонии и зоны продукции ферментов. Индексы лецитиназной и гемолитической активности определяли как отношение диаметра колонии к диаметру зоны продукции фермента. Наличие гемолитической и лецитиназной активности определяли при результате менее 1 [13].

По методике Хуснутдиновой Л.М.(2006) определяли изменение гемолитической и лецитиназной активностей при сокультивировании симбионтов на плотной питательной среде. Для этого готовили 1 миллиардную взвесь культуры микроорганизмов в физиологическом растворе. В чашке Петри проводили посевы контрольных культур: штамм 1 – горизонтально, штамм 2 и штамм 3 – вертикально на противоположной стороне. В середине чашки проводили посевы этих же штаммов с пересечением в центре под прямым углом, что позволяло штаммам взаимодействовать между собой. Учет результатов проводили макроскопически при наличии изучаемого фактора патогенности и измерение его в контрольном штамме и в опытном образце [14].

Результаты

В нашем исследовании использовали 26 бактериальных культур метициллинорезистентных *Staphylococcus spp.* Видовая характеристика метициллинорезистентных стафилококков представлена следующими микроорганизмами: *S. aureus* – 73,1% (n=19), *S.epidermidis* – 15,4% (n=4), *S.saprophyticus* – 11,5% (n=3), из которых 80,8% (n=21) были выделены от пациентов, а 19,2% (n=5) были выделены от медицинских работников.

Гемолитическая активность определена у 53,8% (n=14) изученных метициллинорезистентных штаммов, из которых *S. aureus* продемонстрировали продукцию гемолизина у 70,6% (n=12) штаммов, а *S. saprophyticus* – в 66,7% (n=2). Данные штаммы имели высокую гемолитическую активность. Минимальный диаметр гемолиза отмечен у *S.saprophyticus* – 6 мм, максимальный – у *S. aureus* на уровне 23мм. Штаммы *S. epidermidis* не имели гемолитической активности. Среди 26 штаммов метициллинорезистентных стафилококков 42,3% (n=11) продуцировали лецитиназу. Из них *S.aureus* – 38,5% (n=10), *S.saprophyticus* – 3,9% (n=1). Индексы гемолитической и лецитиназной активности представлены в таблице 1.

**Таблица 1** – Уровни гемолитической и лецитиназной активности метициллинорезистентных *Staphylococcus spp.*

№	Вид микроорганизма	Уровень гемолитической активности N±σ мм	Гемолитический индекс N±σ	Уровень лецитиназной активности N±σ мм	Лецитиназный индекс N±σ
	<i>S. aureus</i>	16±5,5	0,6±0,16	5,3±0,9	0,55±0,17
	<i>S. saprophyticus</i>	11±7,1	0,68±0,01	5,0	0,6
	<i>S. epidermidis</i>	0	0	0	0

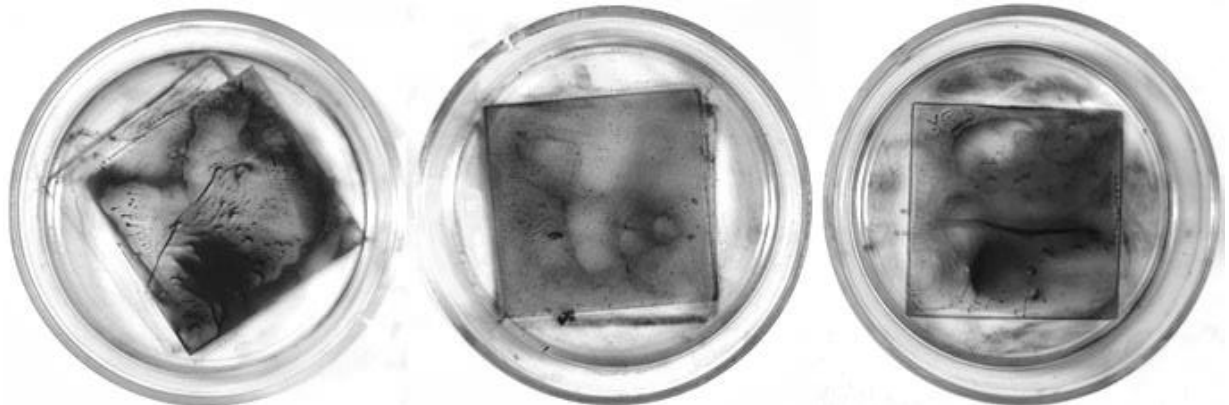
Проведение опыта модификации факторов патогенности при сокультивировании видов выявил, что штаммы могут усиливать синтез лецитиназы

симбионта, при этом при модификации гемолитической активности результаты показали индифферентные значения (рисунок 1).

**Рисунок 1** – Модификация факторов патогенности при сокультивировании видов.

Изучение способности штаммов образовывать биопленку выявило, что все штаммы способны синтезировать биопленку различной степени

интенсивности (рисунок 2) как значимый фактор персистенции микроорганизма в окружающей среде и фактор риска развития внутрибольничных инфекций.

**Рисунок 2** – биопленкообразование штаммов метициллинорезистентных *Staphylococcus spp*

Определение чувствительности к антибактериальным препаратам проводили по стандартам CLSI (2018). Изучили резистентность к

антибактериальным препаратам в зависимости от вида *Staphylococcus spp.* (рисунок 3).

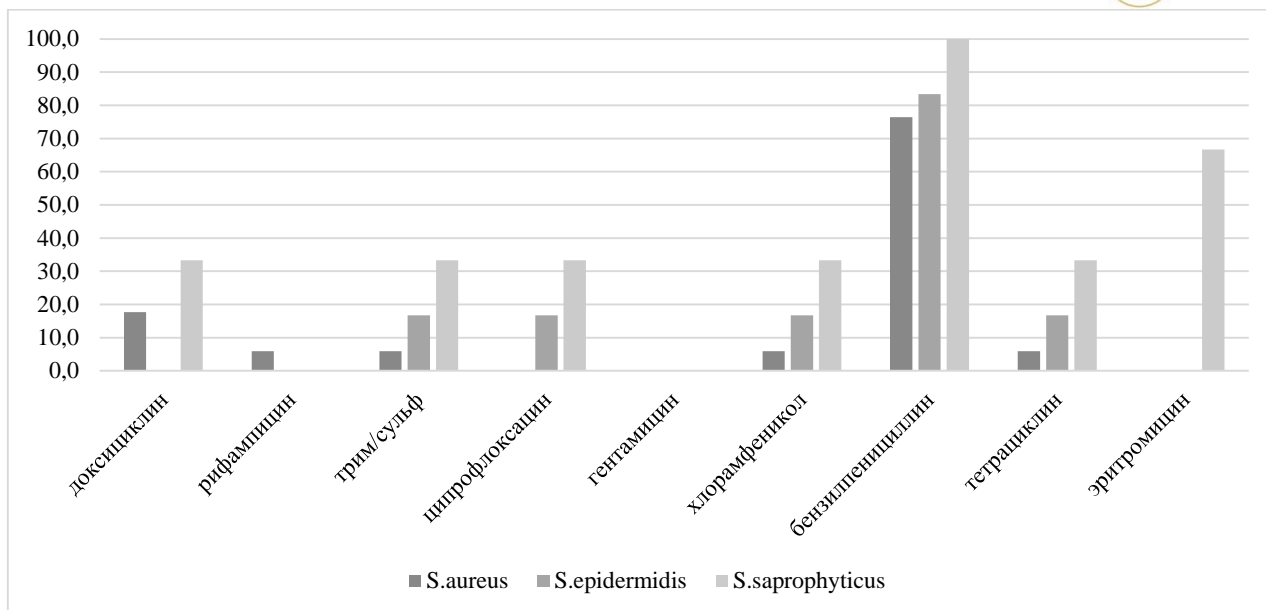


Рисунок 3 – Резистентность к антимикробным препаратам различных видов метициллинорезистентных стафилококков

Изученные штаммы *Staphylococcus spp.* демонстрируют сохранение чувствительности к гентамицину. Все штаммы видов *Staphylococcus spp.* устойчивы к бензилпенициллину в высокой степени от 76,5% у *S.aureus* до 100% у *S.saprophyticus*. Отмечается, что штаммы *S.saprophyticus* наиболее часто демонстрируют резистентность к изучаемым препаратам. Сохранение чувствительности данного вида сохраняется к рифампицину и гентамицину.

Обсуждение

Данное исследование по изучению биологических свойств *Staphylococcus spp.*, имеющих фенотипический паттерн метициллинорезистентности, как эпидемиологически значимых потенциальных возбудителей внебольничных и внутрибольничных инфекций проведено впервые на территории Республики Казахстан.

Факторы патогенности стафилококков и их роль в патогенезе инфекционных заболеваний широко изучены, однако эти факторы также способствуют выживаемости вида при взаимодействии с неспецифической защитой организма [53]. Разный уровень гемолитической активности продемонстрирован штаммами в нашем исследовании. При этом мы не отмечали продукцию гемолизина штаммами *S. epidermidis* в отличие от российских исследователей [8, 15].

Лецитиназная активность считается дополнительным маркером идентификации золотистого стафилококка. Однако в исследовании Ons Haddad et al(2018) наблюдали лецитиназу у 79,1% штаммов *S.aureus* [16]. Аналогичные данные приведены в работе белорусских исследователей, где 77,7% *S.aureus* имели лецитиназную активность [17]. В нашем исследовании этот показатель установлен в 38,5% штаммов золотистого стафилококка. Немногочисленные исследования указывают на связь продукции лецитиназы с местом выделения, сокультивирования и выделения штамма из очага инфекции [9, 15, 17].

Результаты изучения антибиотикочувствительности метициллинорезистентных штаммов показывают резистентность к препаратам пенициллинового ряда,

эритромицину, ципрофлоксацину – антибиотикам, широко применяемым на амбулаторном этапе. Эти данные отличаются от результатов исследований в Пакистане, Эфиопии, Бангладеше и Китае. Имеются различия в частоте циркуляции резистентных штаммов на территории Российской Федерации, что демонстрирует важность мониторинга антибиотикорезистентности на региональном уровне [7, 18-21].

Нами впервые была применена методика сокультивирования штаммов, где обнаружена способность одного штамма усиливать синтез лецитиназы другим штаммом. Данный результат чрезвычайно важен для понимания хронизации воспалительного процесса, перехода нормальных симбионтов в возбудителей инфекции и способность к длительной персистенции в организме человека [14].

Проведенное нами исследование показывает необходимость продолжения изучения проблемы циркуляции и биологических свойств метициллинорезистентных стафилококков на территории Алматы с целью постоянного мониторинга за изменениями эпидемиологически значимых показателей биологических свойств.

Вклад авторов. Все авторы принимали равносильное участие при написании данной статьи.

Конфликт интересов – не заявлен.

Данный материал не был заявлен ранее, для публикации в других изданиях и не находится на рассмотрении другими издательствами.

При проведении данной работы не было финансирования сторонними организациями и медицинскими представительствами.

Финансирование – не проводилось.

Авторлардың үлесі. Барлық авторлар осы мақаланы жазуға тең дәрежеде қатысты.

Мүдделер қақтығысы – мәлімделген жоқ.

Бұл материал басқа басылымдарда жариялау үшін бұрын мәлімделмеген және басқа басылымдардың қарауына ұсынылмаған.



Осы жұмысты жүргізу кезінде сыртқы ұйымдар мен медициналық өкілдіктердің қаржыландыруы жасалған жоқ.

Қаржыландыру жүргізілмеді.

Authors' Contributions. All authors participated equally in the writing of this article.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 WHO publishes list of bacteria that urgently require the development of new antibiotics [press release]. 18.04.2022.
- 2 Sengupta S, Chattopadhyay MK, Grossart H-P. The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Front Microbiol.* 2013;4:47-.
- 3 Ustoichivost' k antibiotikam [press release]. Tsentr SMI2020
- 4 CDC. Antibiotic resistance threats in the United States, 2013 Апрель 2013 г. .
- 5 Nickerson EK, West TE, Day NP, Peacock SJ. Staphylococcus aureus disease and drug resistance in resource-limited countries in south and east Asia. *The Lancet Infectious diseases.* 2009;9(2):130-5.
- 6 Johnson AP. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: the European landscape. *The Journal of antimicrobial chemotherapy.* 2011;66(4):43-8.
- 7 Gostev V, Sidorenko S. Metitsillinrezistentnye zolotistye stafilokokki: problema rasprostraneniya v mire i Rossii. *Farmateka.* 2015;299(6):30.
- 8 Belyaeva EV, Ermolina GB, Boriskina EV, Kryazhev DV, Shkurkina IS. Monitoring bioplenkoobrazuyushchei sposobnosti u tsirkuliruyushchikh v detskom statsionare koagulazonegativnykh stafilokokkov. *Meditinskii al'manakh.* 2018;4(55).
- 9 Alieva L, Shchukina V, Gordina E, Selin A. Vidovoe raznoobrazie i faktory patogennosti stafilokokkov, izolirovannykh ot detei, infitsirovannykh mikobakteriyami tuberkuleza. *Teoreticheskie i prikladnye aspekty sovremennoi nauki.* 2014;5(2):7-9.
- 10 Gordinskaya NA, Boriskina EV, Kryazhev DV. Antibiotikorezistentnost' kak faktor virulentnosti uslovno-patogennykh mikroorganizmov. *Zdorov'e naseleniya i sreda obitaniya.* 2021;4:50-6.
- 11 Institute. CaLS. Twenty-Third Informational Supplement. M100-S23. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing 2018.
- 12 Romanova Yu, Alekseeva N, Smirnova T, Andreev A, Didenko L, Gintsburg A. Sposobnost' k formirovaniyu bioplenok v iskusstvennykh sistemakh u razlichnykh shtammov Salmonella typhimurium. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2006;4:38-42.

Сведения об авторах

Насирова Аделя Миршайровна/ Nassirova Adel Mirshairovna

Магистрант 2-го курса КазНМУ им. С.Д. Асфендиярова

Специальность: «Биомедицина»

Адрес: Казахстан, г. Алматы

e-mail: adel.stamkulova@gmail.com

ORCID 0000-0002-1386-2908

Колоскова Екатерина Александровна/Koloskova Yekaterina Aleksandrovna

-PhD

-доцент кафедры микробиологии, вирусологии КазНМУ им. С.Д. Асфендиярова

koloskova.e@kaznmu.kz

-г. Алматы, Казахстан,

ORCID 0000-0002-6329-5032

No conflicts of interest have been declared.

This material has not been previously submitted for publication in other publications and is not under consideration by other publishers.

There was no third-party funding or medical representation in the conduct of this work.

Funding - no funding was provided.

13 Luo G, Samaranyake LP, Yau JY. Candida species exhibit differential in vitro hemolytic activities. *J Clin Microbiol.* 2001;39(8):2971-4.

14 Khusnutdinova L. Modifikatsiya biologicheskikh svoistv bakterii v usloviyakh assotsiatsii indigennoi i patogennoi mikroflory. *Vestnik OGU.* 2006;12:6-9.

15 Boriskina EV, Belyaeva EV, Ermolina GB, Shkurkina IS, Kryazhev DV, editors. Sravnitel'naya kharakteristika biologicheskikh svoistv koagulazonegativnykh stafilokokkov, tsirkuliruyushchikh V statsionarakh razlichnogo profilya. *Nauchnoe obespechenie protivoepidemicheskoi zashchity naseleniya: aktual'nye problemy i resheniya.* 2019.

16 Haddad O, Merghni A, Elargoubi A, Rhim H, Kadri Y, Mastouri M. Comparative study of virulence factors among methicillin resistant Staphylococcus aureus clinical isolates. *BMC Infect Dis.* 2018;18(1):560-.

17 Kuftina E, Logovaya E, editors. Faktory patogennosti stafilokokkov, vydelennykh ot studentov BGMU. VII Masherovskie chteniya; 2013.

18 Bilal H, Khan MN, Rehman T, Hameed MF, Yang X. Antibiotic resistance in Pakistan: a systematic review of past decade. *BMC Infect Dis.* 2021;21(1):244-249.

19 Ahmed I, Rabbi MB, Sultana S. Antibiotic resistance in Bangladesh: A systematic review. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases.* 2019;80:54-61.

20 Shariati A, Dadashi M, Chegini Z, van Belkum A, Mirzaii M, Khoramrooz SS, et al. The global prevalence of Daptomycin, Tigecycline, Quinupristin/Dalfopristin, and Linezolid-resistant Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci strains: a systematic review and meta-analysis. *Antimicrobial resistance and infection control.* 2020;9(1):56-57.

21 Chernen'kaya T, Evdokimova N. Chuvstvitel'nost' k antibakterial'nym preparatam metitsillinrezistentnykh stafilokokkov, vydelennykh ot patsientov statsionara skoroi meditsinskoi pomoshchi. *Meditinskii alfavit.* 2017;1(7):32-5.

Рамазанова Бахыт Амануловна/Ramazanova Bakhyt Amanullova

-д.м.н., профессор,

-зав. кафедрой микробиологии, вирусологии КазНМУ им. С.Д. Асфендиярова

b.ramazanova@kaznmu.kz

-г. Алматы, Казахстан,

ORCID 0000-0002-4014-4215

Мустафина Камиля Камаловна/Mustafina Kamilya Kamalovna

-к.м.н., доцент,

-профессор кафедры микробиологии, вирусологии КазНМУ им. С.Д. Асфендиярова

mustafina.k@kaznmu.kz

-г. Алматы, Казахстан,

ORCID 0000-0001-8861-4047