

## Профиль антибиотикорезистентности изолятов золотистого стафилококка, выделенных от больных и бактерионосителей Астраханского региона, как основа выбора штаммов-продуцентов бактериофагов для дальнейшей комбинированной фаготерапии

Р.О. Абдрахманова, Э.Г. Тазова, Г.Н. Генатуллина, Г.Р. Баева, А.Д. Даудова,  
Ю.З. Демина, А.Л. Ясенявская, О.В. Рубальский

Астраханский государственный медицинский университет Минздрава России  
414000, г. Астрахань, ул. Бакинская, 121

### Резюме

Золотистый стафилококк имеет высокий уровень устойчивости к антибиотикам и является распространенной причиной внутрибольничных инфекций, что первостепенно требует разработки новых терапевтических стратегий. Цель работы – анализ уровня и спектра антибиотикорезистентности изолятов *Staphylococcus aureus* для дальнейшего выделения вирулентных бактериофагов. **Материал и методы.** В исследовании использованы пробы клинического материала, полученные на базе Городской клинической больницы № 3 им. С.М. Кирова (г. Астрахань). Выделенные от больных бактериальные штаммы идентифицировали на основании морфологических, культуральных, биохимических и молекулярно-генетических признаков, их резистентность определяли диско-диффузионным методом с использованием стандартизированных коммерческих дисков с антибиотиками, в соответствии с методическими указаниями. **Результаты.** Оценка антибиотикорезистентности золотистого стафилококка, выделенного при исследовании клинического материала от больных, и анализ уровня чувствительности изолированных штаммов *S. aureus* позволяют сделать вывод, что все выделенные от пациентов изоляты *S. aureus* резистентны по крайней мере к одному антибиотику, а большинство штаммов характеризуется множественной лекарственной устойчивостью к антибиотикам. **Заключение.** Наличие мультирезистентных штаммов свидетельствует о необходимости поиска новых подходов при лечении стафилококковой инфекции и разработке эффективных средств для комбинированной терапии на основе вирулентных стафилококковых бактериофагов.

**Ключевые слова:** антибиотикорезистентность, бактериофаги, антибиотики, метициллин-резистентный золотистый стафилококк.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование:** Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации в части проведения НИР по теме «Разработка композиций для персонализированной антибактериальной терапии на основе вирулентных стафилококковых бактериофагов с контролируемой литической активностью» № 122022200191-4.

**Автор для переписки:** Абдрахманова Р.О., e-mail: radmilaazo@mail.ru

**Для цитирования:** Абдрахманова Р.О., Тазова Э.Г., Генатуллина Г.Н., Баева Г.Р., Даудова А.Д., Демина Ю.З., Ясенявская А.Л., Рубальский О.В. Профиль антибиотикорезистентности изолятов золотистого стафилококка, выделенных от больных и бактерионосителей Астраханского региона, как основа выбора штаммов-продуцентов бактериофагов для дальнейшей комбинированной фаготерапии. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2023;43(6):125–129. doi: 10.18699/SSMJ20230615

## Profile of antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from patients and bacterial carriers of the Astrakhan region as the basis for the selection of bacteriophage producing strains for further combined phage therapy

R.O. Abdrakhmanova, E.G. Tazova, G.N. Genatullina, G.R. Baeva, A.D. Daudova,  
Yu.Z. Demina, A.L. Yaseniyavskaya, O.V. Rubalsky

Astrakhan State Medical University of Minzdrav of Russia  
41400, Astrakhan, Bakinskaya st., 121

## Abstract

*Staphylococcus aureus* has a high level of antibiotic resistance and is a common cause of nosocomial infections, which primarily requires development of new therapeutic strategies. Aim of the study was to investigate the level and spectrum of antibiotic resistance of *S. aureus* isolates for further isolation of virulent bacteriophages. **Material and methods.** The study used samples of clinical material obtained on the basis of the City Clinical Hospital No. 3 named after S.M. Kirov (Astrakhan). Bacterial strains isolated from patients were identified on the basis of morphological, cultural, biochemical and molecular genetic characteristics. The determination of the resistance of the isolated cultures was carried out by the disco-diffusion method using standardized commercial discs with antibiotics, in accordance with the guidelines. **Results.** Evaluation of antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated during the study of clinical material from patients and analysis of sensitivity level of isolated strains of *S. aureus* allow us to conclude that all *S. aureus* isolated from patients are resistant to at least one antibiotic, and most strains are characterized by multidrug resistance to antibiotics. **Conclusions.** The presence of multi-resistant strains indicates the need to search for new approaches in the treatment of staphylococcal infection and to develop effective means for combination therapy based on virulent staphylococcal bacteriophages.

**Key words:** antibiotic resistance, bacteriophage, antibiotics, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Financing:** The work was carried out within the framework of the state task of the Ministry of Health of the Russian Federation regarding research on the topic “Development of compositions for personalized antibacterial therapy based on virulent staphylococcal bacteriophages with controlled lytic activity” No. 122022200191-4.

**Citation:** Abdrakhmanova R.O., Tazova E.G., Genatullina G.N., Baeva G.R., Daudova A.D., Demina Yu.Z., Yasyenyavskaya A.L., Rubalsky O.V. Profile of antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from patients and bacterial carriers of the Astrakhan region as the basis for the selection of bacteriophage producing strains for further combined phage therapy. *Sibirskiy nauchnyy medicinskij zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2023;43(6):125–129. [In Russian]. doi: 10.18699/SSMJ20230615

## Введение

*Staphylococcus aureus* является значимым патогеном в современном мире в связи с его способностью вызывать широкий спектр инфекционных заболеваний, от незначительных кожных до тяжелых тканевых инфекций, а также сепсиса. Данный патоген имеет высокий уровень устойчивости к антибиотикам и служит распространенной причиной внутрибольничных инфекций, что первостепенно требует разработки новых терапевтических стратегий [1, 2]. В XIX в. британский бактериолог Флеминг открыл пенициллин, используя его в клинике для борьбы с инфекцией, вызванной, в том числе, *S. aureus*. Позже на фоне данного глобального для медицины открытия и появления в последующем различных антибактериальных препаратов формировалась скрытая опасность для человечества, приведшая к широкому, иногда неконтролируемому и необоснованному, использованию антибиотиков и развитию бактериальной резистентности, способствуя появлению полирезистентных штаммов *S. aureus* [3–5]. По чувствительности к антибактериальным препаратам *S. aureus* можно разделить на метициллин-чувствительный (MSSA) и метициллин-резистентный золотистый стафилококк (MRSA) [6]. В последние десятилетия в связи с эволюцией

бактерий и необоснованно избыточной терапией антибиотиками лекарственная устойчивость *S. aureus* и уровень инфицирования MRSA постепенно растут, требуя изменений терапевтических стратегий по применению антибактериальных препаратов, основными аспектами которых является исключение необоснованного назначения антибиотиков и применение принципа минимальной достаточности в отношении выбора препаратов, определения приоритета их назначения на основе идентификации бактериального агента и его чувствительности с учетом данных по региональной антибиотикорезистентности [7, 8].

Одним из вариантов совершенствования схем лечения и разработки новых противомикробных препаратов, который снова набирает популярность, является фаготерапия [9, 10]. Однако известно, что штаммы золотистого стафилококка, резистентные к метициллину (MRSA) и к производным ванкомицина, могут быть устойчивы и к действию одиночных фагов, а при обработке биопленок тех же штаммов комбинациями фага с антибиотиком повторный рост бактерий предотвращается [11]. Следовательно, создание коллекции фагов с бактерицидной активностью и восприимчивостью к патогенам открывает новые вопросы, касающиеся эффективности комбинированной фаготерапии, и требует комплексного подхода в

разработке системы, повышающей чувствительность бактериальных клеток к антибиотикам.

Цель исследования – изучить резистентность изолятов *S. aureus*, выделенных из клинического материала больных и бактерионосителей, к антибактериальным препаратам различных химических групп.

## Материал и методы

Материалом для исследования служили штаммы *S. aureus*, выделенные из гнойных ран, от больных хирургического отделения и со слизистой оболочки носоглотки лиц, проходивших медицинский осмотр в Городской клинической больницы № 3 им. С.М. Кирова (г. Астрахань). Изолятов выделяли путем посева клинического материала на желточно-солевой агар с маннитом, приготовленный на основе сухой коммерческой среды bioMerieux (Франция). Микроорганизмы вида *S. aureus* идентифицировали на основе положительных результатов тестов на коагулазную и лецитоветиллазную активность, ферментации маннита и способности продуцировать каротиноидный пигмент при культивировании на молочно-солевом агаре. Генетическая принадлежность к виду *S. aureus* определена при помощи набора «ДНК-Экспресс» (НПФ «Литех», Россия) с последующей постановкой ПЦР в реальном времени с использованием набора «СТАФИПОЛ» (НПФ «Литех», Россия) согласно протоколу производителя.

Определение резистентности выделенных культур к антибактериальным препаратам различных химических групп проводили диско-диффузионным методом с учетом фенотипических свойств [12] на плотной агаровой среде, представленной сухим питательным агаром Гивентала – Ведыминой (АГВ), с использованием стандартизированных коммерческих дисков с антибиотиками. Для приготовления бактериальной суспензии взвеси использовали предварительно выделенную чистую агаровую культуру каждого изолята *S. aureus* с концентрацией  $1,5 \times 10^8$  КОЕ/мл. Контроль точности концентраций приготовленных инокулятов проводили по стандарту мутности McFarland 0,5. В течение 15 минут после приготовления бактериальных суспензий 1 мл каждой из них наносили стерильной пипеткой на поверхность чашек Петри с питательной средой АГВ, равномерно распределяя по поверхности покачиванием. После подсушивания при комнатной температуре по истечении 15 минут стерильным пинцетом выполняли аппликацию дисков, оставляя стандартные интервалы 15–20 мм от края чашки до диска и между дисками. Посевы инкубировали в термостате при 37 °C в течение

24 часов. Результаты учитывали путем измерения зоны задержки роста микроорганизмов вокруг бумажных дисков с антибиотиками. Полученные результаты сравнивали по пограничным значениям этих параметров, отделяющих чувствительные изоляты от промежуточных и промежуточные – от устойчивых.

Нормально распределенные количественные показатели описывали средними значениями и стандартными отклонениями ( $M \pm SD$ ).

## Результаты и их обсуждение

В ходе выполнения работ выделено 167 изолятов стафилококков, имеющих лецитиназную активность, все они идентифицированы при помощи ПЦР как вид *S. aureus*, 21 изолят проявлял лизогенные свойства. Результаты определения резистентности выделенных культур *S. aureus* к антимикробным препаратам (фосфомицин, ванкомицин, гентамицин, клиндамицин, азитромицин, цефепим, ампициллин, норфлоксацин, оксациллин и ципрофлоксацин, цефоперазон, амоксициллин, линезолид, цефокситин, цефоперазона сульбактам и меропенем) представлены в таблице. Наличие метициллинрезистентных стафилококков наглядно демонстрирует их низкую чувствительность к оксациллину. Установлено, что штаммы золотистого стафилококка были наименее устойчивы к ципрофлоксацину. Их резистентность к гентамицину, ампициллину, ванкомицину, цефепиму, азитромицину, клиндамицину, норфлоксацину и оксациллину преобладала над чувствительностью к данной группе антимикробных препаратов. Высокая чувствительность культуры *S. aureus* отмечена к линезолиду, меропенему, амоксиклаву, цефоперазона сульбактаму, фосфомицину, амоксициллину (см. таблицу).

## Заключение

Оценка антибиотикорезистентности *S. aureus*, выделенного при исследовании клинического материала от больных, и анализ установленных уровней чувствительности изолированных штаммов *S. aureus* позволяют сделать вывод, что среди выделенных культур большинство являются метициллин-резистентными. Лечение инфекций, вызванных MRSA, проводят гликопептидами (ванкомицин, тейкопланин) или оксазолидинонами (линезолид, тедизолид). В результатах работы представлена резистентность и к ванкомицину, и к линезолиду. Кроме того, все выделенные от пациентов изоляты *S. aureus* резистентны по крайней мере к одному антибиотику, а большинство штаммов характеризуется множественной лекарственной устойчивостью к антибиотикам. Наличие мультирезистентных штаммов свидетель-

## Чувствительность выделенных культур золотистого стафилококка к отдельным антибиотикам различных групп

Susceptibility of isolated cultures of *S. aureus* to individual antibiotics of various groups

Антибиотик	Резистентные	Слабочувствительные	Высокочувствительные
Ципрофлоксацин	44,00 ± 0,33	56,00 ± 0,83	0,25 ± 0,03
Оксациллин	75,25 ± 0,33	0,75 ± 0,11	4,75 ± 0,03
Норфлоксацин	62,75 ± 0,36	29,25 ± 0,20	8,00 ± 0,36
Ампицилин	64,48 ± 1,86	32,33 ± 1,14	4,50 ± 0,58
Цефепим	54,50 ± 0,40	40,00 ± 0,33	5,25 ± 0,21
Азитромицин	78,69 ± 2,04	17,42 ± 0,23	6,14 ± 0,86
Клиндамицин	70,00 ± 0,13	23,25 ± 0,36	7,00 ± 0,88
Гентамицин	63,00 ± 1,42	32,25 ± 0,36	4,50 ± 0,08
Ванкомицин	67,00 ± 0,08	0,75 ± 0,11	32,75 ± 0,38
Фосфомицин	56,00 ± 0,08	24,80 ± 5,42	19,30 ± 1,45
Меропенем	40,25 ± 1,08	31,00 ± 1,08	29,00 ± 3,11
Цефоперазон сульбактам	24,75 ± 0,36	50,25 ± 1,36	25,00 ± 0,58
Цефокситин	41,75 ± 1,86	40,25 ± 0,86	17,75 ± 0,36
Линезолид	0,25 ± 0,03	50,25 ± 2,36	50,25 ± 2,36
Амоксиклав	37,75 ± 1,36	37,75 ± 3,03	24,25 ± 2,53
Амоксициллин	42,00 ± 0,75	43,50 ± 2,13	14,00 ± 1,08
Цефоперазон	37,75 ± 0,20	42,25 ± 0,45	20,00 ± 0,58

ствуется о необходимости поиска новых подходов при лечении стафилококковой инфекции и разработке эффективных средств для комбинированной терапии на основе вирулентных стафилококковых бактериофагов с целью предупреждения возрастания уровня циркуляции антибиотикорезистентных штаммов *S. aureus*.

## Список литературы / References

1. Plumet L., Ahmad-Mansour N., Dunyach-Remy C., Kissa K., Sotto A., Lavigne J.P., Costechareyre D., Molle V. Bacteriophage therapy for *Staphylococcus aureus* infections: a review of animal models, treatments, and clinical trials. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2022;12:907314. doi: 10.3389/fcimb.2022.907314
2. Ahmad-Mansour N., Loubet P., Pouget C., Dunyach-Remy C., Sotto A., Lavigne J.P., Molle V. *Staphylococcus aureus* toxins: an update on their pathogenic properties and potential treatments. *Toxines (Basil)*. 2021;13(10):677. doi: 10.3390/toxins13100677
3. Токаева Б.Т., Кималыкова Х.Х., Угушева Д.Х., Шихова Т.С. Анализ чувствительности золотистого стафилококка к антибиотикам. *Наука и здравоохранение*. 2014;(2):92–94.
4. Tokaeva B.T., Kimalyakova Kh.Kh., Ugusheva D.Kh., Shikhova T.S. Analysis of sensitiveness of *Staphylococcus aureus* to the antibiotics. *Nauka i zdravookhraneniye = Science and Healthcare*. 2014;(2):92–94. [In Russian].
5. Roca I., Akova M., Baquero F., Carlet J., Cavaleri M., Coenen S., Cohen J., Findlay D., Gyssens I., Heuer O.E., ... Vila J. The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. *New Microbes New Infect.* 2015;6:22–29. doi: 10.1016/j.nmni.2015.02.007
6. Намазова-Баранова Л.С., Баранов А.А. Антибиотикорезистентность в современном мире. *Педиатр. фармакол.* 2017;14(5):341–354. doi: 10.15690/pf.v14i5.1782
7. Namazova-Baranova L.S., Baranov A.A. Antibiotic resistance in the modern world. *Pediatricheskaya farmakologiya = Pediatric Pharmacology*. 2017;14(5):341–354. [In Russian]. doi: 10.15690/pf.v14i5.1782
8. Kwiecinski J.M., Horswill A.R. *Staphylococcus aureus* bloodstream infections: pathogenesis and regulatory mechanisms. *Curr. Opin. Microbiol.* 2020;53:51–60. doi: 10.1016/j.mib.2020.02.005
9. King D.T., Sobhanifar S., Strynadka N.C.J. One ring to rule them all: Current trends in combating bacterial resistance to the beta-lactams. *Protein Science*. 2016;25(4):787–803. doi: 10.1002/pro.2889
10. Turner N.A., Sharma-Kuinkel B.K., Maskarinec S.A., Eichenberger E.M., Shah P.P., Carugati M., Holland T.L., Fowler V.G. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: overview of basic and clinical research. *Nat. Rev. Microbiol.* 2019;17(4):203–218. doi: 10.1038/s41579-018-0147-4
11. Kolenda C., Medina M., Bonhomme M., Laumay F., Roussel-Gaillard T., Martins-Simoes P., Tristan A.,



Pirot F., Ferry T., Laurent F., PHAGEinLYON Study Group. Phage therapy against *Staphylococcus aureus*: selection and optimization of production protocols of novel broad-spectrum silviavirus phages. *Pharmaceutics*. 2022;14(9):1885. doi: 10.3390/pharmaceutics14091885

10. Atshan S.S., Hamat R.A., Aljaberi M.A., Chen J.S., Huang S.W., Lin C.Y., Mullins B.J., Kicic A. Phage therapy as an alternative treatment modality for resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Antibiotics (Basel)*. 2023;12(2):286. doi: 10.3390/antibiotics12020286

11. Kebriaei R., Lehman S.M., Shah R.M., Stampfer K.C., Kunz Coyne A.J., Holger D., El Ghali A.,

Rybak M.J. Optimization of phage-antibiotic combinations against *Staphylococcus aureus* biofilms. *Microbiol. Spectr.* 2023;11(3): e0491822. doi: 10.1128/spectrum.04918-22

12. Шепелин А.П., Домотенко Л.В. Диск-диффузионный метод для определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. *Поликлиника*. 2019;4(1):2–5.

Shepelin A.P., Domotenko L.V. Disk diffusion method for determining the sensitivity of microorganisms to antibacterial drugs. *Poliklinika = Polyclinic*. 2019;4(1):2–5 [In Russian].

#### Сведения об авторах:

Абдрахманова Радмила Охасовна, ORCID: 0000-0003-0536-8149, e-mail: radmilaazo@mail.ru  
Тазова Эльмира Галиевна, ORCID: 0009-0006-7011-4267, e-mail: ametist07@mail.ru  
Генатуллина Гузель Наилевна, к.б.н., ORCID: 0000-0001-5417-4477, e-mail: genatullina@mail.ru  
Баева Гузель Ренатовна, ORCID: 0009-0008-8578-7303, e-mail: guzel.baeva@mail.ru  
Даудова Адилья Джигангировна, к.м.н., ORCID: 0000-0001-8607-2395, e-mail: адаудова@mail.ru  
Демина Юлия Заурбековна, ORCID: 0000-0003-0428-2570, e-mail: j\_d\_79@mail.ru  
Ясенявская Анна Леонидовна, к.м.н., ORCID ID: 0000-0003-2998-2864, e-mail: yasen\_9@mail.ru  
Рубальский Олег Васильевич, д.м.н., проф., академик РАН, ORCID: 0000-0002-2904-9276, e-mail: rubalsky6@mail.ru

#### Information about the authors:

Radmila O. Abdrakhmanova, ORCID: 0000-0003-0536-8149, e-mail: radmilaazo@mail.ru  
Elmira G. Tazova, ORCID: 0009-0006-7011-4267, e-mail: ametist07@mail.ru  
Guzel N. Genatullina, candidate of biological sciences, ORCID: 0000-0001-5417-4477, e-mail: genatullina@mail.ru  
Gyuzel R. Baeva, ORCID: 0009-0008-8578-7303, e-mail: guzel.baeva@mail.ru  
Adilya D. Daudova, candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0001-8607-2395, e-mail: адаудова@mail.ru  
Yulia Z. Demina, ORCID: 0000-0003-0428-2570, e-mail: j\_d\_79@mail.ru  
Anna L. Yasyenyavskaya, candidate of medical sciences, ORCID ID: 0000-0003-2998-2864, e-mail: yasen\_9@mail.ru  
Oleg V. Rubalsky, doctor of medical sciences, professor, academician of the RAS, ORCID: 0000-0002-2904-9276, e-mail: rubalsky6@mail.ru

Поступила в редакцию 16.06.2023

После доработки 04.07. 2023

После повторной доработки 15.09.2023

Принята к публикации 18.09.2023

Received 16.06.2023

Revision received 04.07. 2023

Second revision received 15.09.2023

Accepted 18.09.2023