

УДК 615.33:615.015.8:575.85
DOI 10.54229/2226-2008-2023-2-2

О. Г. Перетятко, Ю. А. Ягнюк, Н. І. Скляр, С. Л. Крестецька, Г. М. Большакова, Т. В. Холодна

ДИНАМІКА ФОРМУВАННЯ РЕЗИСТЕНТНОСТІ ДО БЕНЗИЛПЕНІЦИЛІНУ У ШТАМІВ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, ВИЛУЧЕНИХ У РІЗНІ ІСТОРИЧНІ ПЕРІОДИ

Державна установа «Інститут мікробіології та імунології імені І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України», Харків, Україна

УДК 615.33:615.015.8:575.85

О. Г. Перетятко, Ю. А. Ягнюк, Н. І. Скляр, С. Л. Крестецька, Г. М. Большакова, Т. В. Холодна
ДИНАМІКА ФОРМУВАННЯ РЕЗИСТЕНТНОСТІ ДО БЕНЗИЛПЕНІЦИЛІНУ У ШТАМІВ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, ВИЛУЧЕНИХ У РІЗНІ ІСТОРИЧНІ ПЕРІОДИ

Державна установа «Інститут мікробіології та імунології імені І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України», Харків, Україна

У статті наведено результати вивчення динаміки формування *in vitro* резистентності стафілококів, вилучених у різні історичні періоди (преантибіотичний, метаантибіотичний та сучасний), до бензилпеніциліну. Адаптацію стафілококів до бензилпеніциліну проводили шляхом пасажування на агарі Мюллера-Хінтона зі зростаючими концентраціями антибіотика, починаючи із суббактерицидної, всього проведено 30 пасажів. Встановлено, що всі досліджені штами *S. aureus*, незалежно від періоду їх виділення, були здатними адаптуватися до зростаючих концентрацій бензилпеніциліну. Проте штами *S. aureus*, вилучені у сучасний період, характеризувались більш швидкими темпами адаптації та адаптувались до більш високих концентрацій бензилпеніциліну, ніж стафілококи, вилучені у пре- та метаантибіотичний періоди.

Ключові слова: штами *S. aureus*, вилучені у різні історичні періоди, бензилпеніцилін, моделювання резистентності.

UDC 615.33:615.015.8:575.85

О. Г. Peretyatko, Yu. A. Yagnyuk, N. I. Sklyar, S. L. Krestetska, G. M. Bolshakova, T. V. Kholodna
DYNAMICS OF THE FORMATION OF RESISTANCE TO BENZYL PENICILLIN IN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* STRAINS ISOLATED IN DIFFERENT HISTORICAL PERIODS

State Institution "Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kharkiv, Ukraine

Introduction. To establish antibiotic resistance evolution regularities, it is necessary to study the peculiarities of its formation. One of the ways to reproduce the natural evolution of antibiotic resistance is to model it in *in vitro* studies.

The aim of the research – to study the speed of resistance formation to benzylpenicillin in *S. aureus* strains of different isolation periods in *in vitro* experiments.

Research materials and methods. The subjects of the study included 12 *S. aureus* strains sensitive to beta-lactam antibiotics, isolated in different historical periods: 4 – in the pre-antibiotic period (from 1930 to 1943), 4 – in the meta-antibiotic period (from 1962 to 1969), 4 – in the modern period (2020). Adaptation of staphylococci to benzylpenicillin was carried out by passage on Mueller-Hinton agar with increasing concentrations of benzylpenicillin, starting with subbactericidal, a total of 30 passages were carried out. Statistical processing of the obtained data was conducted using methods of non-parametric statistics by means of the licensed statistical software package "Statistica 6.1" (serial number – AGAR909E415822FA).

Research results and discussion. It was established that after the cycle of resistance adaptive selection, the Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of benzylpenicillin for all strains of the pre-antibiotic period was 2.0 µg/ml and exceeded the initial values by 125–250 times. In strains of staphylococci isolated during the meta-antibiotic period, the average value of the minimum bactericidal concentration of the antibiotic was 3.63 µg/ml, the multiplicity of increase – from 31.3 to 250 times. The MBC of benzylpenicillin for modern strains has increased 125–500 times relative to the initial values, with an average value of 16 µg/ml.

Conclusions. As a result of benzylpenicillin resistance adaptive selection, subpopulations of *S. aureus* strains were obtained, able to grow in the presence of the antibiotic with MBC that exceeded the initial values in the range from 31.3 to 500 times. It was established that *S. aureus* strains isolated in the modern period were characterized by faster rates of adaptation and adapted to higher concentrations of benzylpenicillin than staphylococci isolated in the pre- and meta-antibiotic periods.

Key words: *S. aureus* strains isolated in different historical periods, benzylpenicillin, resistance modeling.

Зв'язок з науковими роботами. Стаття є фрагментом планової фундаментальної науково-дослідної роботи лабораторії загальної мікробіології з Музеєм мікроорганізмів ДУ «ІМІ НАМН» «Дослідження механізмів формування резистентності до бета-лактамініх антибіотиків у мікроорганізмів різних таксономічних груп», номер державної реєстрації 0121U107613.

Вступ. Резистентність мікроорганізмів до антибіотиків і, як наслідок, різке зниження ефективності етіотропної терапії інфекційних захворювань є серйозною загрозою благополуччю і здоров'ю людства [1–3]. За деякими розрахунками, у разі відсутності прогресу у боротьбі з антибіотикорезистентністю мікроорганізмів втрати працездатного населення у світі до 2050 року будуть сягати 11–14 мільйонів осіб на рік, витрати у грошовому вимірі становитимуть 3 трлн на рік [4; 5].

© О. Г. Перетятко, Ю. А. Ягнюк та ін., 2023

Вважається, що головною причиною формування та швидкого поширення резистентності є селективний тиск на мікроорганізми через неналежне використання антибіотиків у клінічній медицині [6; 7] та активне застосування антимікробних препаратів у сільському господарстві [8]. Проте, незважаючи на беззаперечний вклад людства у стрімке поширення антибіотикорезистентності, все частіше з'являються повідомлення про виявлення резистентності до антибіотиків у мікроорганізмів, вилучених із зразків, що не піддавались антропогенному впливу [9].

Тому для успішного подолання проблеми антибіотикорезистентності мікроорганізмів вкрай важливим є проведення досліджень з вивчення закономірностей її еволюції. Одним зі шляхів відтворення природної еволюції антибіотикорезистентності є моделювання її у дослідженнях *in vitro*. Особливого наукового значення набуває використання як об'єкта для моделювання резистентності музейних штамів різних періодів виділення, оскільки ступінь селективного тиску на мікроорганізми у доантибіотичну еру та в епоху впровадження і широкого використання антибіотиків у клінічній практиці був різним [10].

Мета роботи – вивчення у дослідіах *in vitro* динаміки формування резистентності до бензилпеніциліну у штамів *S. aureus* різних періодів виділення.

Матеріали та методи дослідження. Об'єктами дослідження були 12 чутливих до бета-лактамних антибіотиків штамів *S. aureus*, вилучених у різні історичні періоди: 4 з них вилучено у так званий преантибіотичний [11] період (з 1930 по 1943 рр.), 4 – у метаантибіотичний період (з 1962 по 1969 рр.), 4 штами було вилучено у сучасний період (2020 р.) (таблиця 1). Штами пре- та метаантибіотичного періоду отримано з колекції музею мікроорганізмів ДУ «ІМІ НАМН». Циркулюючі штами, вилучені від хворих на гнійно-запальні інфекції, було отримано з бактеріологічної лабораторії ХКЛ на залізничному транспорті № 1 Філії «Центр охорони здоров'я» ПАТ «Укрзалізниця» згідно з договором про науково-практичне співробітництво.

Таблиця 1

Походження штамів, взятих для моделювання резистентності до бензилпеніциліну

№ п/п	Назва штаму	Інв. номер	Рік виділення
Музейні штами преантибіотичного періоду			
1	<i>S. aureus</i> 5/1	16552	1943 р.
2	<i>S. aureus</i> 1608	16557	1930 р.
3	<i>S. aureus</i> 1667	16559	1937 р.
4	<i>S. aureus</i> O-15	16569	1936 р.
Музейні штами метаантибіотичного періоду			
5	<i>S. aureus</i> Курочка	16567	1964 р.
6	<i>S. aureus</i> 353	16572	1962 р.
7	<i>S. aureus</i> 374	16573	1962 р.
8	<i>S. aureus</i> 906	16577	1969 р.
Циркулюючі штами, вилучені у сучасний період			
9	<i>S. aureus</i> 428	–	2020 р.
10	<i>S. aureus</i> 54	–	2020 р.
11	<i>S. aureus</i> 732	–	2020 р.
12	<i>S. aureus</i> 1959	–	2020 р.

Визначення чутливості мікробних культур до бета-лактамних антибіотиків проводили диско-дифузійним методом Keurbu-Bauer [12]. Мінімальну бактеріцидну концентрацію (МБЦК) бензилпеніциліну (ПАТ «Київ-медпрепарат», Україна) визначали методом серійних розведень у агаризованому середовищі Мюллера-Хінтона (Himedia, Індія) [13]. Адаптацію стафілококів до бензилпеніциліну проводили шляхом пасажування на агарі Мюллера-Хінтона зі зростаючими концентраціями бензилпеніциліну, починаючи із суббактерицидної. Всі досліди проводили у двох паралелях за однакових умов культивування. Для інокуляції використовували мікробну суспензію щільністю 0,5 за стандартом Мак-Фарланда, розведена в 10 разів, посівна доза становила 5×10^7 КУО/мл. Приготування суспензій мікроорганізмів із визначеною концентрацією мікробних клітин проводили за шкалою McFarland з використанням електронного приладу Densi-La-Meter (PLIVA-Lachema Diagnostika, Чеська Республіка). Для контролю життєздатності мікроорганізмів використовували агар Мюллера-Хінтона без додавання антибіотика. Чашки з посівами інкубували за температури 35°C 16–20 годин. Для подальших пасажів використовували культури, які давали ріст у присутності найбільшої концентрації досліджуваного антибіотика. Культури пересівали на поживні середовища із вищою у 2–4 рази концентрацією бензилпеніциліну. Загалом проведено 30 пасажів.

Статистична обробка отриманих даних проведена за допомогою методів непараметричної статистики [14] з використанням пакета ліцензійного статистичного програмного забезпечення «Statistica 6.1» (серійний номер – AGAR909E415822FA).

Результати дослідження та їх обговорення. Перед проведенням циклу селективної адаптації стафілококів до бензилпеніциліну визначали мінімальні бактерицидні концентрації зазначеного антибіотика для кожного дослідного штаму. Аналіз показників МБЦК бензилпеніциліну щодо досліджених штамів *S. aureus* показав, що середнє її значення для штамів, вилучених у преантибіотичний період, становило $(0,012 \pm 0,004)$ мкг/мл, для штамів метаантибіотичного періоду – $(0,028 \pm 0,020)$ мкг/мл, для сучасних штамів – $(0,044 \pm 0,022)$ мкг/мл. У разі порівняння середніх показників МБЦК бензилпеніциліну у штамів, вилучених у різні періоди, виявлено достовірні відмінності між показниками штамів преантибіотичного та сучасного періоду ($p < 0,05$) (рис. 1).

У разі проведення адаптивної селекції пеніцилінрезистентності у штамів преантибіотичного періоду встановлено, що перша зміна МБЦК пеніциліну у *S. aureus* (16557) відбулась на 3-му пасажі, в інших штамів зазначеної групи – на 5-му пасажі (рис. 2).

Показники МБЦК 0,250 мкг/мл, що свідчить про формування стійкості до пеніциліну, зафіксовано у *S. aureus* (16559) та *S. aureus* (16569) на 10-му та 12-му пасажах відповідно. У зазначених штамів подальше двократне збільшення МБЦК відбувалося вже на 21-му та 22-му пасажах. Водночас у решти штамів аналізованої групи – *S. aureus* (16552) та *S. aureus* (16557) резистентність сформувалась лише на 19-му та 20-му пасажах відповідно, а подальше подвоєння МБЦК – на

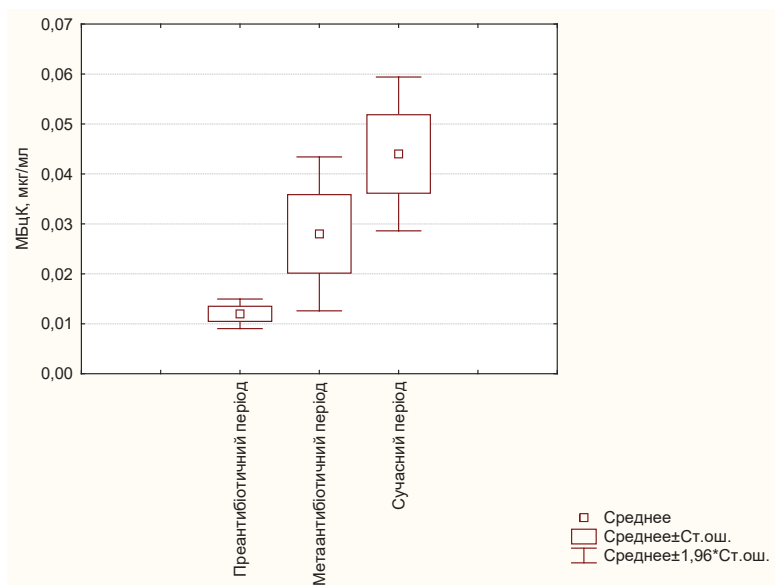


Рис. 1. Середнє значення МБцК бензилпеніциліну щодо штамів *S. aureus*, вилучених у різні періоди

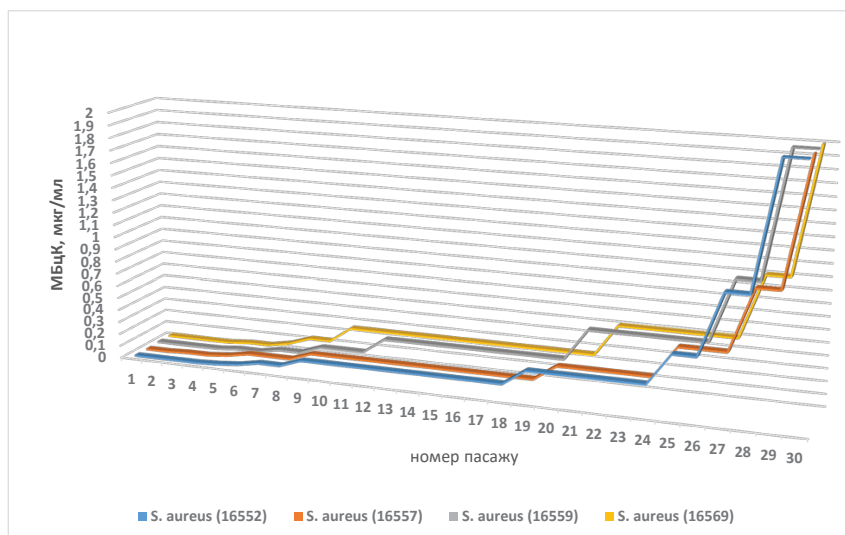


Рис. 2. Характеристика швидкості зростання МБцК бензилпеніциліну у штамів *S. aureus*, вилучених у преантибіотичний період

25-му пасажі. Проте після 30-го пасажу МБцК бензилпеніциліну щодо всіх штамів преантибіотичного періоду становила 2,0 мкг/мл. Таким чином, у процесі селективної адаптації до бензилпеніциліну у досліджених штамів преантибіотичного періоду вдалось отримати мутантні клони *S. aureus* з МБцК антибіотика, що перевищувала вихідні значення у 125–250 разів.

Під час вивчення динаміки адаптації до бензилпеніциліну у штамів стафілококів, вилучених у метаантибіотичний період, встановлено, що перша зміна МБцК у двох штамів зазначеної групи відбулась на 4-му пасажі, у двох інших на 3-му і 5-му пасажах відповідно. При цьому резистентність до бензилпеніциліну (МБцК 0,250 мкг/мл) у трьох штамів проаналізованої групи зафіксована на 9-му, 10-му та на 12-му пасажах. А в одного штаму (*S. aureus* (16567)), у якого зафіксовано найвищий

вихідний рівень МБцК (0,064 мкг/мл), резистентність сформувалась уже на 6-му пасажі (рис. 3).

Слід підкреслити, що у зазначеного штаму протягом усієї тривалості періоду селекції зберігалась найшвидша динаміка підвищення мінімальної бактерицидної концентрації і на 26-му пасажі її значення становило 8,0 мкг/мл, що у 125 разів перевищувало вихідний показник. Аналогічна кратність збільшення мінімальної бактерицидної концентрації бензилпеніциліну відзначена щодо штаму *S. aureus* (16577), стосовно якого МБцК зростає з 0,016 мкг/мл до 2,0 мкг/мл. Стосовно штаму *S. aureus* (16573), вилученого у 1962 році, МБцК дослідженого антибіотика зростає у 250 разів, причому її зростання набувало стрибкоподібного характеру – подвоєння МБцК спостерігалось з 27-го по 29-й пасажі. Водночас щодо штаму *S. aureus* (16572),

ТЕОРІЯ ТА ЕКСПЕРИМЕНТ

вилученого також у 1962 році, МБцК бензилпеніциліну за 30 пасажів зросла лише у 31,3 раза – з 0,016 мкг/мл до 0,5 мкг/мл та не змінювалась протягом десяти останніх пасажів.

У разі культивування на поживних середовищах з антибіотиком сучасних штамів спостерігалось швидке, вже на перших пасажах, подвоєння МБцК, а формування резистентності до бензилпеніциліну вже на 5-му (2 штамів) та 9-му (2 штамів) пасажах (рис. 4).

Слід зазначити, що штамів, вилучених у сучасний період, відрізнялись різними темпами зростання МБцК бензилпеніциліну. Наприклад, на 16-му пасажі було зафіксовано збільшення МБцК антибіотика щодо штамів *S. aureus* 732 та *S. aureus* 1959 – у 125 разів, а у штамів *S. aureus* 428 та *S. aureus* 54 – лише у 7,8 та 31,3 раза відповідно. Проте після 30-го пасажу всі сучасні штамів виявляли високий ступінь адаптації до антибіотика: МБцК бензилпеніциліну щодо трьох штамів *S. aureus*

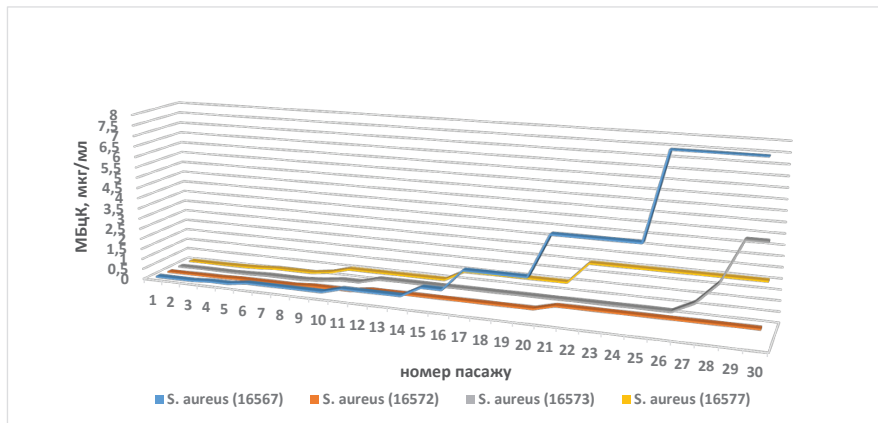


Рис. 3. Характеристика швидкості зростання МБцК бензилпеніциліну у штамів *S. aureus*, вилучених у метаантибіотичний період

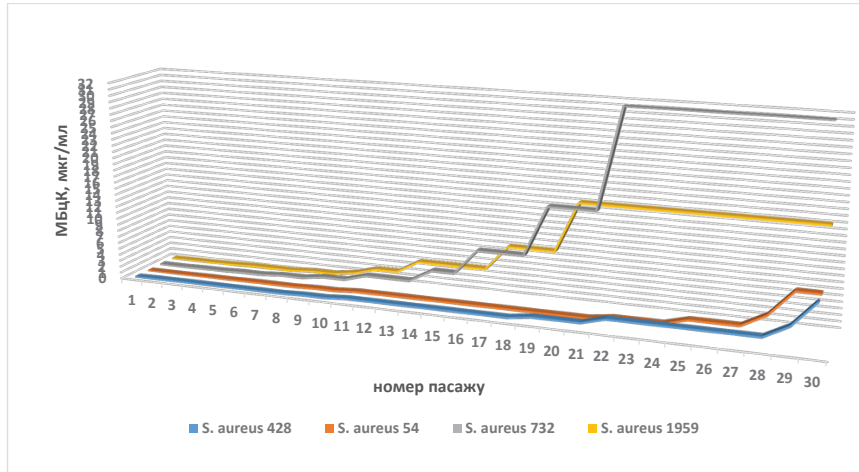


Рис. 4. Характеристика швидкості зростання МБцК бензилпеніциліну у штамів *S. aureus*, вилучених у сучасний період

аналізованої групи зросла п'ятсоткратно стосовно вихідних значень, щодо одного штамів – у 125 разів.

За результатами проведення 30 пасажів адаптивної селекції було встановлено, що середні значення МБцК бензилпеніциліну щодо сучасних штамів достовірно перевищували аналогічні показники, встановлені щодо штамів пре- та метаантибіотичного періодів ($p < 0,05$) (рис. 5).

Таким чином, встановлено, що всі досліджені штамів *S. aureus*, незалежно від періоду їх виділення,

були здатними адаптуватися до зростаючих концентрацій бензилпеніциліну. Однак штамів, вилучених у сучасний період, характеризувались більш швидкими темпами адаптації. Так, уже на 11-му пасажі МБцК антибіотика щодо циркулюючих штамів зросла майже у 30 разів, тоді як щодо штамів пре- та метаантибіотичного періоду – у 13 та 12,3 раза відповідно ($p < 0,05$). На 25-му пасажі МБцК щодо сучасних штамів збільшилась у середньому майже у 300 разів, тоді як для штамів з груп порівняння –

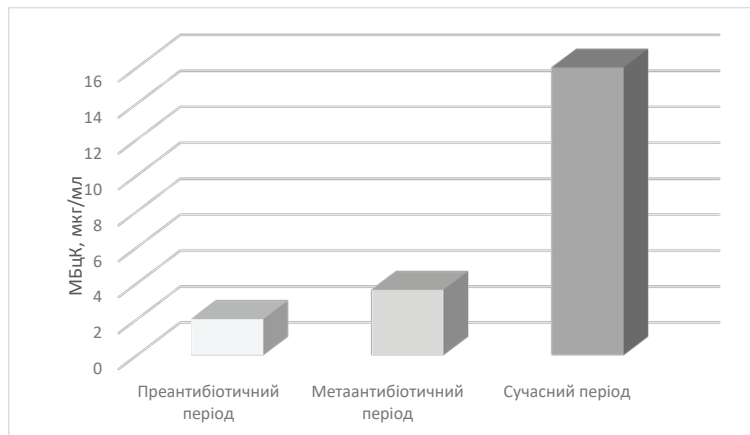


Рис. 5. Середнє значення МБцК бензилпеніциліну щодо штамів *S. aureus*, вилучених у різні періоди, після циклу адаптивної селекції

у 41,7 та 62,5 разів відповідно. На останньому етапі періоду адаптивної селекції МБцК бензилпеніциліну щодо музейних штамів пре- та метаантибіотичного періодів зростає у середньому у 166 та 130 разів, а щодо штамів сучасного періоду – у 363 рази.

Встановлено за результатами наших досліджень відмінність динаміки формування резистентності у стафілококів різних періодів виділення, на наш погляд, може бути пов'язана з неоднорідністю генетичного фону досліджуваних штамів різних експериментальних груп. Як відомо, широке використання антибіотиків у клінічній практиці чинить селективний тиск на мікробні популяції, підвищуючи при цьому рівень їх адаптації, у тому числі за рахунок змін на молекулярно-генетичному рівні [15: 16]. Тобто є закономірним припущення, що фенотипово чутливі до бензилпеніциліну штами, вилучені у сучасний період, можуть бути носіями неекспресуючих генів резистентності до пеніцилінів, оскільки бета-лактами є однією з найвживаніших груп антибіотиків в останні десятиріччя.

Висновки. Встановлено, що всі досліджені штами *S. aureus*, незалежно від періоду їх виділення, були здатними адаптуватися до зростаючих концентрацій бензилпеніциліну. За результатами адаптивної селекції резистентності до бензилпеніциліну отримано субпопуляції штамів *S. aureus*, здатні рости в присутності антибіотика з МБцК, що перевищувала вихідні значення у межах від 31,3 до 500 разів.

Встановлено, що динаміка формування резистентності до бензилпеніциліну відрізнялась у штамів, вилучених у різні історичні періоди. Штами *S. aureus*, вилучені у сучасний період, характеризувались більш швидкими темпами адаптації та адаптувались до більш високих концентрацій бензилпеніциліну ніж стафілококи, вилучені у пре- та метаантибіотичний періоди.

Перспективи подальших досліджень. Для подальшого вивчення закономірностей формування резистентності до стафілококів, вилучених у різні періоди використання антибіотиків у клінічній практиці, нами планується виконання молекулярно-генетичних досліджень на етапах проведення адаптивної селекції антибіотикорезистентності.

ЛІТЕРАТУРА

1. Shirobokov VP, Voytsekhovskiy VG, Yakymenko AI. Antibiotics in medicine: yesterday, today and tomorrow. *Materials of International science and practice conf. "Modern problems of antibiotic therapy and the formation of antibiotic resistance"*. 2018 Jan 29; Chernivtsi; 2018. P. 102–3 (in Ukrainian).
2. Dyachenko PA. Antibiotics. End of an era? *Bulletin of Sumy State University, "Medicine" Series*. 2012; (2): 5–19 (in Russian).
3. Salmanov AG. Resistance to antibiotics and biocides. *Int J Antibiotics and Probiotics*. 2017; 1(2): 92–125 (in Ukrainian).
4. Taylor J, Hafner M, Yerushalmi E. Estimating the economic costs of antimicrobial resistance: *Model and Results*. Cambridge: RAND Corporation; 2014. 87 p.
5. Fitchett JR. Antimicrobial resistance: opportunity for Europe to establish global leadership. *Lancet Infect Dis*. 2016; 16 (4): 388–9.
6. Zelenaya KV, Smirnova SN, Lyashchenko OI, Zhukova AA. Antibiotic resistance as a global problem of society of the 21st century. *Concept*. 2017; (42): 38–41 (in Russian).
7. The antibiotic alarm. *Nature*. 2013 Mar 14 [cited 2023 Feb 17]; 495(7440): 1412013. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/495141a>.
8. Spellberg B, Gilbert DN. The future of antibiotics and resistance: a tribute to a career of leadership by John Bartlett. *Clin Infect Dis*. 2014; 59(2): 71–5.
9. Santiago-Rodriguez T, Fornaciari G, Luciani S, et al. Gut microbiome and putative resistome of inca and italian nobility mummies. *Genes*. 2017 Nov 7 [cited 2022 Oct 19]; 8(11): 310. Available from: .
10. François Blanquart F. Evolutionary epidemiology models to predict the dynamics of antibiotic resistance. *Evol Appl*. 2019; 12(3): 365–383.

ТЕОРІЯ ТА ЕКСПЕРИМЕНТ

11. Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2010; 74(3): 417–33.
12. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility. Routine and extended internal quality control for MIC determination and disk diffusion as recommended by EUCAST. Version 10.0. 2020 Jan 1 [cited 2022 Feb 13]. Available from: <http://www.eucast.org>.
13. Labinskaya AS, Blinkova AP, Eshchina AS. General and sanitary microbiology with the technique of microbiological research. Moscow: Medicine; 2004. 576 p. (in Russian).
14. Antonomonov MYu. Mathematical processing and analysis of biomedical data. Kyiv: Medinform. 2017. 578 p. (in Russian).
15. Wistrand-Yuen E, Knopp M, Hjort K, Koskiniemi S, Berg OG, Andersson DI. Evolution of high-level resistance during low-level antibiotic exposure. *Nat Commun.* 2018 Apr 23 [cited 2022 Feb 13]; 9(1): 1599. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04059-1>.
16. Santos-Lopez A, Marshall ChW, Haas AL, Turner C, Rasero J, Cooper VS. The roles of history, chance, and natural selection in the evolution of antibiotic resistance *Elife.* 2021 Aug 25 [cited 2022 Feb 20]; 10:e70676. Available from: <https://10.7554/eLife.70676>.

Надійшла до редакції 15.05.2023 р.

Прийнята до друку 07.06.2023 р.

Електронна адреса для листування lazatimus@ukr.net