

ПОДОЛАННЯ АНТИБІОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТІ ДО ТЕТРАЦИКЛІНУ БАКТЕРІЙ РОДУ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ЗА ДОПОМОГОЮ НАНОЧАСТИНОК ЗОЛОТА ТА СРІБЛА

С.М. ДИБКОВА ^{1*}, О.Б. ЛЮТКО ², М.В. ДИБКОВ ³, К.В. ВІТРАК ²,
Л.С. РЕЗНІЧЕНКО ¹, Т.Г. ГРУЗИНА ¹, Г.Д. ТЕЛЕГЄЄВ ³

¹ Інститут біологічної хімії ім. Ф.Д. Овчаренка НАН України, бульв. Академіка Вернадського, 42, Київ, 03142, Україна

² ДУ «Інститут травматології та ортопедії НАМН України», вул. Бульварно-Кудрявська, 27, Київ, 01054, Україна

³ Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, вул. Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

E-mail: sdybkova@gmail.com, o.liutko@gmail.com, mdybkov@edu.imbg.org.ua, k.vitrak1122@gmail.com,
lrieznichenko@gmail.com, gruzinatamara@gmail.com, g.d.telegeev@imbg.org.ua

Автор для кореспонденції – Дибкова С.М., e-mail: sdybkova@gmail.com

Широке використання тетрациклінів у медицині, ветеринарії та тваринництві призвело до розповсюдження резистентності бактерій до тетрацикліну, зокрема у небезпечних представників золотистого стафілококу. Тому аналіз резистентності до тетрацикліну та створення підходів до її подолання є вкрай актуальним. Дослідження 64 клінічних ізолятів *S. aureus*, які характеризувались помірним біоплівкоутворенням показали, що 33 з них містили плазмідну ДНК. Показано значне розповсюдження (у 96 % вивчених ізолятів) відомих трансмісильних генів резистентності до тетрацикліну *tet(K)* і *tet(M)* у досліджених плазмідовмісних доксициклінрезистентних клінічних ізолятах *S. aureus*. Плазмідовмісні доксициклінрезистентні клінічні ізоляти із генами *tet(K)* і *tet(M)* втрачали резистентність до тетрациклінового антибіотику доксицикліну після обробки їх клітин наночастинками золота 30 нм в концентрації 3,2–9,6 мкг/мл чи срібла середнього розміру 30 нм у концентрації 20–40 мкг/мл. Елімінацію генів *tet*, відповідальних за набуту резистентність, підтвердили за допомогою ПЛР.

Ключові слова: антибіотикорезистентність, гени *tet(K)* *tet(M)*, *Staphylococcus aureus*, наночастинки золота чи срібла, тетрациклін, біоплівка, R-плазмід.

Вступ. Стафілококи — небезпечні для людини патогени, які відносяться до мікроорганізмів, пов'язаних з поширеними інфекціями із високою летальністю, здатністю до виживання та антибіотикорезистентністю. Критична ситуація з поширенням антибіотикорезистентності вимагає нових підходів як до розробки антибіотиків, так і до моніторингу резистентнос-

ті бактерій. Бути на крок попереду бактерій в «перегонах антибіотиків» допоможе всебічне вивчення резистентності бактерій (Crofts et al, 2017). Стійкість до антибіотиків найчастіше асоціюється із екстрахромосомними елементами, такими як плазмідні, транспозони та інтегри. Опосередкована плазмідними генами антибіотикорезистентність вже давно є основним напрямком вивчення епідеміологічно важливих механізмів антибіотикорезистентності (Alekshun et al, 2007).

Наразі визнано, що антибіотикорезистентність бактерій швидко формується в медичній практиці, у ветеринарії і сільськогосподарському виробництві (тваринництві). Тому подолання цього небезпечного явища є актуальним для всіх перелічених галузей (Zaheer et al, 2019). Резистентність до тетрацикліну є проблемою в системі виробництва яловичини, свинини, курятини в Україні і взагалі в Європі (Græsbøll et al, 2019). Тетрациклін є одним антибіотиків, який широко застосовується проти різних бактеріальних інфекцій людини та тварин. Наразі показано значне поширення в Україні генів стійкості до тетрацикліну *tet(M)* у бактерій, що може бути наслідком широкого використання антибіотика у сільськогосподарському виробництві (Shevchenko et al, 2019). Відомо, що гени резистентності до тетрацикліну *tet(M)* та *tet(K)* найчастіше локалізуються на плазмідах. Так, до 95 % випадків виявлення таких генів у клітинах бактерій *S. aureus* демонструють саме плазмідну асоційованість. Для виявлення генів антибіотикорезистентності до тетрациклінів використовують ПЛР (Khoshbakht et al, 2018).

Найважливішою ознакою хронічної стафілококової інфекції є здатність росту бактерій у вигляді біоплівки — іммобілізованої на поверхні спільноти бактеріальних клітин, які вбудовані у позаклітинну полімерну матрицю. Сформовані стафілококові біоплівки надають таким збудникам унікальні властивості в сенсі стійкості до загальноприйнятих терапевтичних доз антимікробних засобів. Біоплівка значно підвищує можливість передачі генів антибіотикорезистентності у мікробних популяціях. Утворення біоплівки та стійкість до антибіотиків взаємопов'язані, тому виявлення ступеню біоплівкоутворення у клінічних ізолятах є сучасним рішенням в терапії стафілококових інфекцій (Manandhar et al, 2018). Оцінка потенціалу біоплівкоутворення штамми може допомогти протидіяти механізмам, які беруть участь у формуванні біоплівки, визначити раціональні стратегії контролю за *S. aureus* та протидіяти транспорту генів антибіотикорезистентності і передачі генів антибіотикорезистентності (Rodríguez-Lázaro et al, 2018).

Водночас із актуальністю досліджень епідеміологічно важливих механізмів антибіотикорезистентності до найрозповсюдженіших антимікробних препаратів, постає питання подолання такої антибіотикорезистентності. Перспективним напрямком в розробці способів подолання антибіотикорезистентності патогенних бактерій є елімінація R-плазмід з бактеріальних клітин за допомогою хімічних речовин. Так, бромистий етидій призводить до втрати бактеріями *Staphylococcus* плазмідасоціованого гену резистентності до тетрацикліну. R-плазмідні бактерії *Escherichia*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Staphylococcus* та *Yersinia* елімінуються при дії на клітину деяких гетероциклічних речовин, які здатні зв'язуватися з ДНК (Spengler et al, 2006). Водночас такі речовини є токсичними для людини і тварин, тому не можуть бути використані для подолання антибіотикорезистентності.

Дослідження взаємодії наночастинок золота та срібла з плазмідною ДНК бактерій штамму *E.coli* показали, що вказані наночастинок ефективно елімінують R-плазмідні (Dybko et al, 2014).

Метою роботи було виявлення епідеміологічно важливих трансмісильних генів резис-

тентності до тетрацикліну у клінічних ізолятах *S. aureus*, виділених із зразків ускладнених ран пацієнтів, що проходили діагностику у лабораторії мікробіології та хіміотерапії ДУ «Інституту травматології та ортопедії НАМН України», дослідження у них потенціалу до біоплівкоутворення та можливості подолання антибіотикорезистентності у таких ізолятах за використання біобезпечних наночастинок золота і срібла розміром 30 нм.

Матеріали і методи. У роботі використали 64 клінічних ізоляти *S. aureus*, виділених у лабораторії мікробіології та хіміотерапії ДУ «Інституту травматології та ортопедії НАМН України» від пацієнтів (за інформованої згоди) з гнійно-запальними та перипротезними інфекціями суглобів та контрольний штам *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Для скринінгу плазмідної ДНК в бактеріальних клітинах виділяли плазмідну ДНК методом лужного лізису (Vimboim et al, 1979).

У досліджуваних штамів визначали резистентність диско-дифузійним методом (Balouiri et al, 2016) до антибіотиків: доксицикліну, тігацилу, амоксилаву, рифампіцину, еритроміцину, ципрофлоксацину, цефокситіну, кліндаміцину, амікацину.

Виявлення генів *tet* за допомогою ПЛР. Дослідження трансмісильних генів резистентності до тетрацикліну *tet(K)*, *tet(M)* у клінічних ізолятах *S. aureus* були проведені за допомогою полімеразної ланцюгової реакції тотальної ДНК відповідних клінічних ізолятів. У дослідженні було використано специфічні олігонуклеотидні праймери (Strommenger et al, 2003):

tet (K)-F 5' GTAGCGACAATAGGTAATAGT

tet (K)-R 5' GTAGTGACAATAAACCTCCTA

tet (M)-F 5' AGTGGAGCGATTACAGAA

tet (M)-R 5' CATATGTCCTGGCGTGTCTA

(специфічні праймери для виявлення генів *tet(K)* та *tet(M)*).

ST-F 5' CAGCTCGTGTCTGAGATGT

ST-R 5' AATCATTTGTCCACCTTCG

(праймери, специфічні для *S. aureus*, позитивний контроль). ПЛР проводили в реакційній суміші об'ємом 25 мкл, яка включала: 0,5 мкл ДНК та 10 пмоль відповідних праймерів. Реакцію ампліфікації проводили 1 цикл 93,5 °C 8 хв та 40 циклів 93,5 °C 35 с; 55 °C 35 с; 72 °C

40 с. Продукти ПЛР розділяли у 1,8%-вому агарозному гелі з подальшою візуалізацією ПЛР-продуктів розчином бромистого етидію. Розмір фрагмента, який відповідає гену *tet(K)* складає 360 п.н., *tet(M)* – 158 п.н. Позитивний контроль на *S. aureus* – 420 п.н.

Аналіз біоплівкоутворення. Здатність бактерій клінічних ізолятів *S. aureus* до біоплівкоутворення досліджували згідно (Piechota et al, 2018). Кожен штам вирощували впродовж 18 год на м'ясо-пептонному агарі (МПА). Далі в стерильних пробірках розводили суспензію бактерій 10^8 КУО/мл у м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ) (загальний об'єм 1 мл) і культивували 48 год при 37 °С. Після культивування культуральну рідину зливали, а сформовані на стінках пробірок біоплівки промивали стерильним фосфатним буфером (рН 7,4). Після промивання біоплівки фіксували метанолом впродовж 15 хв, обробляли 1%-вим розчином кристалічного фіолетового впродовж 5 хв, промивали дистильованою водою і висушували на повітрі. Далі вносили у пробірки 0,5 мл 96 % етанолу, знімали з стінок біоплівку та аналізували оптичну густину за допомогою фотокolorиметра КФК-2 при довжині хвилі 492 нм. Показник $\geq 0,12$ свідчив про біоплівкоутворення, $< 0,2$ – слабе біоплівкоутворення, $0,2-0,4$ – помірне, а $> 0,4$ – сильне (Piechota et al, 2018).

Елімінація плазмідної ДНК за допомогою наночастинок. Для елімінації плазмідної ДНК застосовували колоїдний розчин золота зі сферичними наночастинами золота середнього розміру 30 нм (38,6 мкг/мл за металом) та колоїдний розчин срібла зі сферичними частинками середнього розміру 30 нм (80 мкг/мл за металом). Нічну культуру бактерій клінічних ізолятів *S. aureus* розводили МПБ у співвідношенні 1 : 50, інкубували на качалці 2 год до титру клітин $1-2 \cdot 10^9$. $1 \cdot 10^4-1 \cdot 10^5$ клітин вносили в пробірки з 2 мл МПБ, куди попередньо додавали вихідний препарат наночастинок золота або срібла у кількості, що забезпечувала вміст золота 3,2 або 9,6 мкг/мл, а срібла 20 або 40 мкг/мл за металом. Культури вирощували при 37 °С впродовж 20–24 год. В подальшому бактеріальні культури висівали по 0,1 мл на чашки з МПА та визначали чутливість до антибіотиків диско-дифузійним ме-

тодом. Паралельно в усіх оброблених наночастинами металів клітин всіх досліджуваних клінічних ізолятів візуалізували наявність плазмід за допомогою електрофорезу в 1%-вому агарозному гелі та виділяли тотальну ДНК для виявлення генів стійкості до тетрацикліну.

Результати та обговорення. *S. aureus* зазвичай є представником нормальної мікрофлори здорових людей, але здатний викликати небезпечні для життя стани, переважно у ослаблених осіб або пацієнтів, які перенесли хірургічні втручання. Вони є одною з основних причин внутрішньолікарняних інфекцій і відомі своєю схильністю до розвитку стійкості до багатьох антимікробних агентів. Особливе занепокоєння викликає постійне збільшення кількості мультирезистентних штамів *S. aureus*. У стафілококів гени резистентності до антибіотиків в основному пов'язані з мобільними генетичними елементами, такими як плазмиди та транспозони (Kwong et al, 2017).

Дослідження 64 клінічних ізолятів *S. aureus*, виділених від пацієнтів з гнійно-запальними та перипротезними інфекціями суглобів у лабораторії мікробіології та хіміотерапії ДУ «Інституту травматології та ортопедії НАМН України» показали, що 33 клінічних ізоляти *S. aureus* містили плазмідну ДНК, а з огляду на значний потенціал антибіотикорезистентності серед плазмід бактерій клінічних ізолятів *S. aureus* (Mores et al, 2021), зроблено припущення про наявність генів антибіотикорезистентності на таких візуалізованих екстрахромосомних елементах у досліджуваних ізолятах.

Усі ці 33 клінічних плазмідовмісних ізоляти *S. aureus* виявилися метицилінрезистентними (MRSA). Відомо, що MRSA є причиною тяжких стафілококових інфекцій, які важко лікувати через їх стійкість до деяких антибіотиків (Liu et al, 2011). Важливою характеристикою *S. aureus* (MRSA) є їх здатність викликати внутрішньолікарняні (нозокоміальні) інфекції.

Дослідження профілей антибіотикорезистентності показало, що 24 з 33 клінічних плазмідовмісних ізолятів *S. aureus* проявляли резистентність до антибіотика тетрациклінового ряду – доксицикліну. Стійкість до тетрацикліну *S. aureus* зумовлена механізмом модифікації рибосоми, що кодується широко розповсюдженим геном *tet(M)*, або механізмом

опосередкованого ефлюксу, кодованим геном *tet(K)*. З різних генів *tet*, що кодують механізми ефлюксу, *tet(K)* найчастіше зустрічається в *S. aureus* (Schmitz et al, 2001). Відомо, що у Європі та Азії дуже поширеними є гени резистентності до тетрацикліну *tet(K)*, *tet(M)*, які мають плазмідну локалізацію (Khoshbakht et al, 2018). Тому було проведено виявлення генів *tet(K)*, *tet(M)* у плазмідовмісних клінічних ізолятах *S. aureus* за допомогою ПЛР. На рис. 1. наведено одну з електрофореграм розділення продуктів ПЛР, які отримано при дослідженні ДНК бактерій клінічних ізолятів №№ 110, 126, 418 та контрольного штаму *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Було показано наявність епідеміологічно важливих трансмісильних генів резистентності до тетрацикліну у бактеріях 23 клінічних ізолятів *S. aureus*. Загалом показано, що з 24 доксициклінрезистентних клінічних плазмідовмісних ізолятів *S. aureus* 11 ізолятів мали ген *tet(M)*, 4 ізоляти містили ген *tet(K)*, 8 – і *tet(M)* і *tet(K)*, бактерії одного клінічного ізоляту не містили а ні *tet(M)*, а ні *tet(K)* генів.

Також було досліджено дев'ять доксициклінчутливих плазмідовмісних клінічних ізолятів на наявність генів *tet(K)* і *tet(M)*. Показано, що жоден доксициклінчутливий клінічний ізолят не мав генів *tet(K)* і *tet(M)*.

Отже, представлені дані дозволяють зробити висновок про значне розповсюдження трансмісильних генів резистентності до тетрацикліну *tet(K)* і *tet(M)* у досліджених плазмідовмісних доксициклінрезистентних клінічних ізолятах *S. aureus*, 96 % таких ізолятів мали як мінімум один з цих генів.

Оскільки виявлення патогенних штамів, що утворюють біоплівки, має надзвичайно важливе значення в діагностичних лабораторіях і з огляду на підвищену небезпеку передачі генів антибіотикорезистентності у біоплівках нами було досліджено потенціал до біоплівкоутворення в усіх представлених 64 клінічних ізолятах *S. aureus*. Такі ізоляти були представлені трьома групами: 31 ізолят, бактерії яких не мають плазмід; 24 плазмідовмісних доксициклінрезистентних ізоляти; 9 плазмідовмісних доксициклінчутливих ізоляти. Варто відмітити, що в групі 24 плазмідовмісних доксициклінрезистентних ізолятів ми відслідковували і

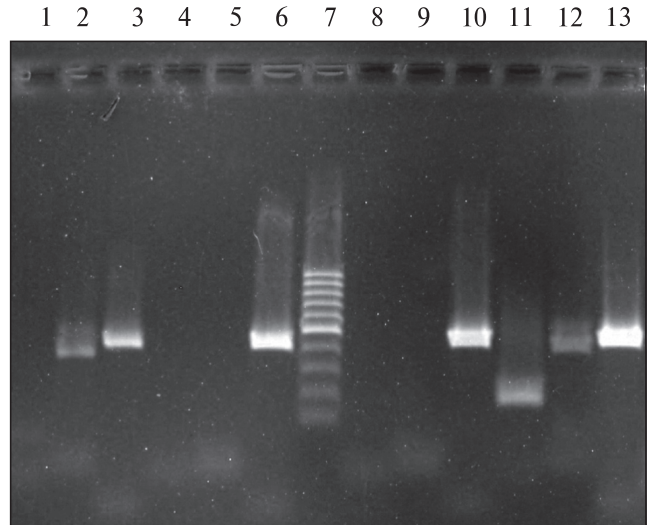


Рис. 1. Електрофореграма ПЛР-продуктів виявлення генів *tet(K)*, *tet(M)*: 1–3 – резистентний до доксицикліну клінічний ізолят № 110 (1 – *tet(M)*; 2 – *tet(K)*; 3 – ST); 4–6 – контрольний штам *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (4 – *tet(M)*; 5 – *tet(K)*; 6 – ST); 8–10 – чутливий до доксицикліну клінічний ізолят № 126 (8 – *tet(M)*; 9 – *tet(K)*; 10 – ST); 11–13 – резистентний до доксицикліну клінічний ізолят № 418 (11 – *tet(M)*; 12 – *tet(K)*; 13 – ST); 7 – маркер молекулярної маси Generunner 100 bp

систематизували дані щодо здатності до біоплівкоутворення у бактерій, які мали гени стійкості до тетрацикліну – *tet(K)* і *tet(M)*.

Результати оцінки потенціалу до біоплівкоутворення представлені у таблиці.

Оцінка потенціалу до біоплівкоутворення в клінічних ізолятах *S. aureus*

Група клінічних ізолятів	Показник оптичної густини при 492 нм	Ступінь біоплівкоутворення
31 ізолят, бактерії яких не мають плазмід	0,21–0,24	Помірна
9 плазмідовмісних доксициклінчутливих ізолятів	0,20–0,25	Помірна
24 плазмідовмісних доксициклінрезистентних ізолятів	0,21–0,30	Помірна
Носії гену <i>tet (K)</i>	0,22–0,24	Помірна
Носії гену <i>tet (M)</i>	0,21–0,27	Помірна
Носії генів <i>tet (K)</i> і <i>tet (M)</i>	0,21–0,30	Помірна
Ізоляти, що не мають генів <i>tet (K)</i> і <i>tet (M)</i>	0,21–0,26	Помірна

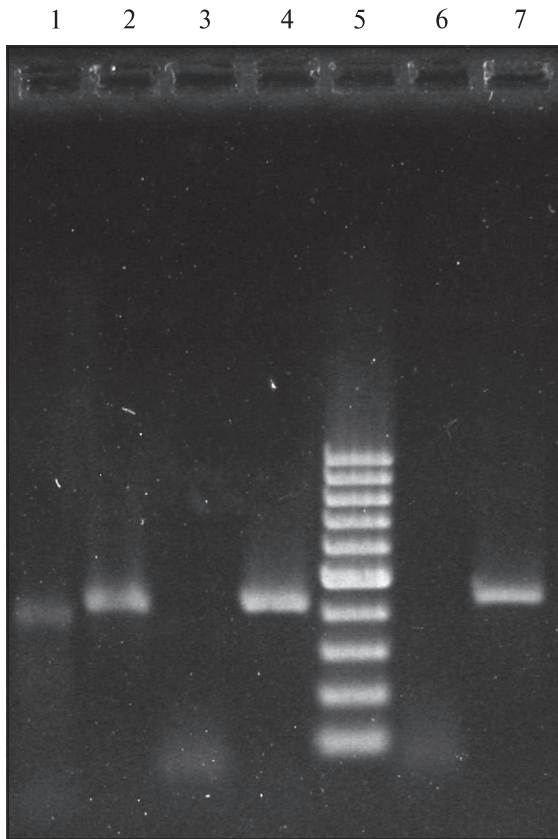


Рис. 2. Електрофореграма ПЛР-продуктів виявлення гену *tet(K)* в ДНК клінічного ізоляту *S. aureus* № 110 : 1, 2 – до обробки наночастинками, 3, 4 – після обробки наночастинками золота 30 нм (3,2 мкг/мл), 5 – маркер молекулярної маси GeneRunner 100bp, 6, 7 – після обробки наночастинками срібла 30 нм (20 мкг/мл) (1, 3, 6 – праймери *tet(K)-F* + *tet(K)-R*, 2, 4, 7 – праймери ST-F + ST-F, позитивний контроль *S. aureus*)

Таким чином, проведені дослідження щодо потенціалу до біоплівкоутворення в представлених 64 клінічних ізолятах *S. aureus* продемонстрували помірну здатність утворювати біоплівки стафілококами плазмидовмісних ізолятів, так і ізолятами, що не мали плазмід. Такий факт викликає занепокоєння, оскільки досліджувані бактерії були клінічними ізолятами, виділеними від хворих пацієнтів з гнійно-запальними та перипротезними інфекціями суглобів, а отже існує надзвичайно високий ризик розповсюдження плазмідних генів резистентності до тетрацикліну у внутрішньолікарняних популяціях біоплівкоутворюючих бактерій золотистого стафілококу.

Було проведено дослідження щодо елімінації плазмідасоційованих генів антибіотикорезистентності у клінічних ізолятів золотистого стафілокока за допомогою наночастинок золота і срібла. Використовували наночастинки золота середнього розміру 30 нм у вигляді колоїдного розчину, одержаного шляхом гідротермального синтезу: золотохлористоводневу кислоту ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) відновлювали цитратом натрію у присутності карбонату калію; а наночастинки срібла середнього розміру 30 нм – у вигляді колоїдного розчину, одержаного конденсаційним методом шляхом відновлення нітрату срібла таніном.

Обробку плазмидовмісних бактеріальних клітин клінічних ізолятів *S. aureus*, які продемонстрували наявність досліджуваних генів *tet(K)* та/або *tet(M)* наночастинок золота чи срібла здійснювали шляхом інкубування бактерій із наночастинок металів вводили в середовище культивування у вигляді стерильних водних розчинів у кількості, яка забезпечує вміст наночастинок золота в середовищі 3,2–9,6 мкг/мл, а срібла – 20–40 мкг/мл за металом. Так, до культури бактерій клінічних ізолятів у МПБ з титром клітин $1-2 \cdot 10^9$ додавали вихідний препарат наночастинок золота або срібла до вказаних вище концентрацій та здійснювали культивування при 37 °C впродовж 20–24 год.

За даними диско-дифузійного методу дослідження чутливості до тетрациклінового антибіотика доксицикліну, усі оброблені бактерії наночастинок срібла чи золота середнього розміру 30 нм втратили резистентність до даного антибіотика. Посів бактерій кожного обробленого штаму на середовище з доксицикліном показало відсутність росту на середовищі з даним антибіотиком.

Короткочасне культивування бактерій, що втратили резистентність до доксицикліну на МПА (близько 18 год) із наступним посівом на середовище з антибіотиком показало відсутність до реверсії антибіотикорезистентності до доксицикліну.

В усіх оброблених наночастинок металів клінічних ізолятах стафілокока проводили візуалізацію плазмід за допомогою електрофору в 1%-вому агарозному гелі. Показано відсутність плазмід в усіх клінічних ізолятах, що

піддавалися елімінації плазмід за використання наночастинок золота чи срібла середніх розмірів 30 нм.

Проведений ПЛР-аналіз таких елімінантів на наявність раніше визначених у них генів *tet(K)* і *tet(M)* показав відсутність таких генів після обробки бактеріальних клітин наночастинами (рис. 2).

Відмічено, що бактерії одного штаму, у яких не виявлено гени *tet(K)*, *tet(M)* теж втрачали резистентність до доксицикліну, а отже можна зробити припущення, що інші гени резистентності до вказаного антибіотика розміщені також на плазміді.

Пояснити механізм елімінації R-плазмід із досліджених клінічних ізолятів можна виходячи із даних, що досліджені наночастинок золота чи срібла розміром 30 нм проникають до бактеріальної клітини шляхом електропорації, індукованої мембранним потенціалом (Ulberg et al, 2014). При цьому всередині клітини відбувається взаємодія заряджених наночастинок із зарядженою молекулою плазмідної ДНК, що призводить до зміни структури плазмід і елімінації такої плазмід з клітини.

Отже, усі представники 24 плазмідовмісних доксициклінрезистентних клінічних ізолятів втрачали резистентність до тетрациклінового антибіотика доксицикліну під впливом обробки їх клітин наночастинами золота 30 нм в концентрації 3,2–9,6 мкг/мл чи срібла середнього розміру 30 нм у концентрації 20–40 мкг/мл. ПЛР аналіз клінічних ізолятів, які до обробки наночастинами металів містили досліджені гени *tet(K)* і *tet(M)*, показав відсутність у елімінантів таких генів. Елімінація генів резистентності до тетрацикліну у плазмідовмісних ізолятів *S.aureus* із відомою плазмідною локалізацією досліджених генів *tet(K)* і *tet(M)* свідчить про ефективність продемонстрованого способу подолання антибіотикорезистентності збудників гнійно-запальних та перипротезних інфекцій суглобів людини за допомогою наночастинок металів. Нами вперше було показано можливість подолання антибіотикорезистентності збудників гнійно-запальних та перипротезних інфекцій суглобів людини до широко розповсюдженого антибіотика тетрацикліну, який застосовуються для лікування та профілактики цих захворювань, шляхом елімінації

плазмідної ДНК за допомогою наночастинок золота або срібла середніх розмірів 30 нм, отриманих методами хімічної конденсації.

Дотримання етичних стандартів. Стаття не містить жодних досліджень, які були виконані із використанням лабораторних препаратів, клітинних ліній або інтактних організмів тварин чи людини.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Фінансування. Роботу частково підтримано Simons Support Grant 1290589.

OVERCOMING ANTIBIOTIC RESISTANCE TO TETRACYCLINE IN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* BY GOLD AND SILVER NANOPARTICLES

S.M. Dybkova, O.B. Liutko, M.V. Dybkov, K.V. Vitrak, L.S. Rieznichenko, T.G. Gruzina, G.D. Telegeev

F.D. Ovcharenko Institute of Biocolloidal Chemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, 42 Acad. Vernadskoho Ave., Kyiv, 03142, Ukraine
State Institution «The Institute of Traumatology and Orthopedics by the National Academy of Medical Sciences of Ukraine»,
27 Bulvarno-Kudriavska St., Kyiv, 0105427, Ukraine
The Institute of Molecular Biology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine,
150 Zabolotnoho Str., Kyiv, 03143, Ukraine

E-mail: sdybkova@gmail.com, o.liutko@gmail.com, mdybkov@edu.imbg.org.ua, k.vitrak1122@gmail.com, lrieznichenko@gmail.com, gruzinatamara@gmail.com, g.d.telegeev@imbg.org.ua

Wide application of tetracyclines in medicine, veterinary medicine and stock raising has led to the spread of bacterial resistance to tetracycline, particularly among dangerous representatives of *Staphylococcus aureus*. Therefore, the analysis of resistance to tetracycline and the elaboration of approaches to overcoming it are extremely relevant. The study of 64 clinical isolates of *S. aureus*, characterized by moderate biofilm formation, showed that 33 of them contained plasmid DNA. A significant spread (in 96 % of studied isolates) of the known transmissible tetracycline resistance genes *tet(K)* and *tet(M)* was shown in the examined plasmid-containing doxycycline-resistant clinical isolates of *S. aureus*. Plasmid-containing doxycycline-resistant clinical isolates with *tet(K)* and *tet(M)* genes lost resistance to the tetracycline-based antibiotic doxycycline after treatment of their cells with gold nanoparticles of 30 nm in a concentration of 3.2–9.6 µg/ml or medium-sized silver

particles of 30 nm in a concentration of 20–40 µg/ml. The elimination of *tet* genes responsible for acquired resistance was confirmed by PCR.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Alekshun MN, Levy SB (2007) Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. *Cell* 128:1037–1050 <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.004>
- Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK (2016) Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal* 6:71–79. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Bimboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl Acids Res* 7:1513–1523. <https://doi.org/10.1093/nar/7.6.1513>
- Crofts TS, Gasparrini AJ, Dantas G (2017) Next-generation approaches to understand and combat the antibiotic resistome. *Nat Rev Microbiol* 15:422–434. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.28>
- Dybkoiva SM, Gruzina TG, Rieznichenko LS, Ulberg ZR (2014) Interaction of gold and silver nanoparticles with plasmids DNA. *Faktori eksperimentalnoy evolucii organizmiv* 15:48–52. ISSN 2219-3782 (Print). ISSN 2415-3826 (Online). <http://www.utgis.org.ua/journals/index.php/Faktory/article/view/297> (Ukrainian)
- Græsbøll K, Larsen I, Clasen J et al (2019) Effect of tetracycline treatment regimens on antibiotic resistance gene selection over time in nursery pigs. *BMC Microbiol* 19:269. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1619-z>
- Khoshbakht R, Derakhshandeh A, Jelviz L, Azhdari F (2018) Tetracycline Resistance Genes in Salmonella enterica Serovars With Animal and Human Origin. *Int J Enteric Pathog* 6:60–64. <https://doi.org/10.15171/ijep.2018.17>
- Kwong SM, Ramsay JP, Jensen SO, Firth N (2017) Replication of staphylococcal resistance plasmids. *Front Microbiol* 8:2279. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02279>
- Liu C, Bayer A, Cosgrove SE et al (2011) Clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America for the treatment of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections in adults and children. *Clin Infect Dis* 52:e18–e55. <https://doi.org/10.1093/cid/ciq146>
- Manandhar S, Singh A, Varma A et al (2018) Biofilm producing clinical staphylococcus aureus isolates augmented prevalence of antibiotic resistant cases in tertiary care hospitals of Nepal. *Front Microbiol* 9:2749 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02749>

- Mores CR, Montelongo C, Putonti C et al (2021) Investigation of Plasmids Among Clinical Staphylococcus aureus and Staphylococcus haemolyticus Isolates From Egypt. *Front Microbiol* 12:659116. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.659116>
- Piechota M, Kot B, Frankowska-Maciejewska A et al (2018) Biofilm Formation by Methicillin-Resistant and Methicillin-Sensitive Staphylococcus aureus Strains from Hospitalized Patients in Poland. *Bio-med Res Int* 2018:4657396. <https://doi.org/10.1155/2018/4657396>
- Rodríguez-Lázaro D, Alonso-Calleja C, Oniciuc EA et al (2018) Characterization of biofilms formed by foodborne methicillin-resistant staphylococcus aureus. *Front Microbiol* 9:3004. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03004>
- Schmitz FJ, Krey A, Sadurski R et al (2001) Resistance to tetracycline and distribution of tetracycline resistance genes in European Staphylococcus aureus isolates. *J Antimicrob Chemother* 47:239–240. <https://doi.org/10.1093/jac/47.2.239>
- Shevchenko LV, Dobrozhan YV, Mykhalska VM et al (2019) Contamination of hen manure with nine antibiotics in poultry farms in Ukraine. *Regul Mech Biosyst* 10:532–537. <https://doi.org/10.15421/021978>
- Spengler G, Molnar A, Schelz Z et al (2006) The Mechanism of Plasmid Curing in Bacteria. *Curr Drug Targets* 7:823–841. <https://doi.org/10.2174/138945006777709601>
- Strommenger B, Kettlitz C, Werner G, Witte W (2003) Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in Staphylococcus aureus. *J Clin Microbiol* 41:4089–4094. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.9.4089-4094.2003>
- Ulberg ZR, Shilov VN (2014) Membrane-Potential-induced electroporation as a physical mechanism for metal nanoparticle penetration through a cell membrane. *Colloid J* 76:739–745. <https://doi.org/10.1134/S1061933X14050159>
- Zaheer R, Lakin SM, Polo RO et al (2019) Comparative diversity of microbiomes and Resistomes in beef feedlots, downstream environments and urban sewage influent. *BMC Microbiol* 19:197. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1548-x>

Надійшла в редакцію 27.06.2024
Після доопрацювання 10.07.2024
Прийнята до друку 18.11.2024