

Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии

Научно-исследовательский институт антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава России

Учредитель

Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии

Издатель

Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии

www.iacmac.ru

Журнал зарегистрирован Комитетом РФ по печати 30.09.1999 г. (№019273) Тираж 3000 экз.

Подписка на сайте издателя
<https://service.iacmac.ru>

Адрес для корреспонденции
214019, г. Смоленск, а/я 5.
Тел./факс: (4812)45 06 02

Электронная почта:
info@cmac-journal.ru

Электронная версия журнала:
<https://cmac-journal.ru>

Журнал входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук

Присланные в редакцию статьи проходят рецензирование. Мнение редакции может не совпадать с точкой зрения авторов публикуемых материалов

Ответственность за достоверность рекламных публикаций несут рекламодатели

При перепечатке ссылка на журнал обязательна

Журнал является научным изданием для врачей, в связи с чем на него не распространяются требования Федерального закона от 29.12.2010 436-ФЗ «О защите детей от информации, причиняющей вред их здоровью и развитию»

© Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия, 2023.

Содержание

Болезни и возбудители

- 4 Носова А.О., Богословская Е.В., Шипулин Г.А.
Современные подходы и перспективы развития лабораторной диагностики кори
- 13 Каюмов К.А., Лямин А.В., Жестков А.В., Бажутова И.В.
Fusobacterium nucleatum: от классического пародонтопатогена до полноценного участника канцерогенеза

Антимикробные препараты

- 19 Попов Д.А., Зубарева Н.А., Паршаков А.А.
Азтреонам: клинико-фармакологическая характеристика на современном этапе
- 26 Мишинова С.А., Сыраева Г.И., Колбин А.С., Полушин Ю.С., Вербицкая Е.В.
Отчет данных российской базы по нежелательным явлениям лекарственных средств, применяемых при новой коронавирусной инфекции (COVID-19), с акцентом на фавипиравир
- 34 Скрябина А.А., Никифоров В.В., Шахмарданов М.З., Застрожин М.С., Скрябин В.Ю., Сычев Д.А.
Нежелательные реакции, возникающие на фоне терапии макролидами: анализ спонтанных сообщений по данным подсистемы «Фармаконадзор»
- 41 Стецюк О.У., Коваленко Т.Н., Андреева И.В., Белькова Ю.А.
Неизвестное об известном: комбинации цефалоспоринов III–IV поколения с сульбактамом
- 56 Мустафин Р.Н.
Перспективы применения статинов в противовирусной терапии

Антибиотикорезистентность

- 68 Виноградова А.Г., Кузьменков А.Ю., Трушин И.В., Эйдельштейн М.В., Сухорукова М.В., Старостенков А.А.
AMRexpert – онлайн-платформа для интерпретации, верификации и валидации результатов определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам

Опыт работы

- 77 Гордина Е.М., Божкова С.А., Лабутин Д.В., Гончарук Д.А., Ткач Е.Н.
Антистафилококковая активность и цитосовместимость лизостафина
- 84 Куркова А.А., Рачина С.А., Козлов Р.С., Портнягина У.С., Палютин Ш.Х., Решетько О.В., Журавлева М.В., Карпова О.Ю., Мягкова О.Г., Кузнецова Е.В., Каменева Т.Р.
Исследование отпуска антимикробных препаратов аптечными организациями Российской Федерации во время пандемии COVID-19
- 93 Сафонова К.А., Дехнич Н.Н., Елистратов Н.Д., Ржевцева Е.Д., Филина П.Г., Кузьменков А.Ю., Трушин И.В., Пунин А.А.
Факторы риска летального исхода COVID-19 у госпитализированных пациентов: результаты ретроспективного исследования
- 100 Жилинский М.Ю., Мухина Н.В., Комарова И.С., Рачина С.А., Черкасова Н.А., Борисов А.Б., Федина Л.В., Насрулова С.М.
Клинический случай инфекционного эндокардита, вызванного *Klebsiella pneumoniae*, у пациента с острым инфарктом миокарда без подъема сегмента ST
- 106 Овсянников Н.В., Билевич О.А., Бережной В.Г., Романовская Е.В., Зятьков И.Н., Минькович О.П., Ештокин Д.И.
Аспергиллома легкого после перенесенного COVID-19: клинический случай и обзор литературы

Антистафилококковая активность и цитосовместимость лизостафина

Гордина Е.М.¹, Божкова С.А.¹, Лабутин Д.В.¹, Гончарук Д.А.², Ткач Е.Н.²

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии им. Р.Р. Вредена» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

² ООО «Научно-технологический центр «БиоИнвест», Москва, Россия

Контактный адрес:

Екатерина Михайловна Гордина
Эл. почта: emgordina@win.rniito.ru

Ключевые слова: лизостафин, стафилококки, антибиотикорезистентность, Vero.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Внешнее финансирование: исследование проведено без внешнего финансирования.

Цель. Оценить антибактериальную активность лизостафина в отношении различных видов стафилококков, выделенных от пациентов с ортопедической инфекцией, а также его влияние на жизнеспособность клеток линии Vero.

Материалы и методы. Лизостафин получали генно-инженерным способом. Очистку проводили на SP-сефарозе, чистоту определяли методом электрофореза в ПААГ по Лэмбли. Изучена чувствительность к лизостафину 175 штаммов стафилококков 9-ти видов. Идентификацию выполняли методом MALDI-TOF MS, антибиотикочувствительность – в соответствии с EUCAST (версия 11.0). МИК лизостафина изучали путем последовательных разведений с концентрациями от 0,015 до 512 мг/л. В течение 72 ч. определяли жизнеспособность клеток Vero с лизостафином в концентрациях 0,5–32,0 мг/л методом МТТ с подсчетом живых клеток по их кривой роста. Результаты анализировали методом ANOVA с последующим тестом Даннетта.

Результаты. Динамическое исследование выявило ингибирующий эффект лизостафина (МИК 0,06 мг/л). МИК лизостафина в отношении клинических MSSA варьировала от 0,03 до 0,5 мг/л, МИК_{50/90} 0,125/0,5 мг/л. Для MRSA МИК_{50/90} 0,25/0,5 мг/л. МИК₅₀ лизостафина MRSE регистрировали в 2 раза выше, чем для MSSE – 1 мг/л. Максимальное значение МИК среди CoNS определяли против изолятов *S. warneri* и *S. hominis* – 64 мг/л, наименьшее для *S. saprophyticus* – 0,5 мг/л. МИК₅₀ лизостафина против MRSA была ниже, чем у ванкомицина в 4 раза, МИК₉₀ – в 3 раза. В ходе исследования цитосовместимости не установлено различий в количестве жизнеспособных клеток вне зависимости от концентрации лизостафина.

Выводы. Выявлена значительная активность лизостафина в отношении стафилококков, в разы превышающая ванкомицин в отношении MRSA. Изученный фермент был эффективен против резистентных к метициллину *S. aureus*. Выраженная антистафилококковая активность лизостафина, отсутствие влияния на жизнеспособность клеток Vero позволяют считать перспективным его дальнейшее изучение для профилактики и лечения стафилококковой ортопедической инфекции.

Original Article

Anti-staphylococcal activity and cytocompatibility of lysostaphin

Gordina E.M.¹, Bozhkova S.A.¹, Labutin D.V.¹, Goncharuk D.A.², Tkach E.N.²

¹ Vreden National Medical Research Center of Traumatology and Orthopedics, Saint-Petersburg, Russia

² LLC "Scientific technological center "BioInvest", Moscow, Russia

Contacts:

Ekaterina M. Gordina
E-mail: emgordina@win.rniito.ru

Key words: lysostaphin, staphylococcus, resistance, Vero.

Conflicts of interest: all authors report no conflicts of interest relevant to this article.

External funding source: no external funding received.

Objective. To study the antibacterial activity of lysostaphin against staphylococci various species, as well as its effect on the viability of Vero cells.

Materials and methods. Lysostaphin was obtained by genetic engineering. Purification of the protein was carried out on SP-sepharose, the purity was determined by electrophoresis in PAGE by Lamley. The susceptibility to lysostaphin of 9 species 175 strains of staphylococci was studied. Identification was performed by MALDI-TOF MS, antibiotic susceptibility by EUCAST (v. 11.0). The MIC of lysostaphin was studied by the method of serial dilutions with concentrations between 0.015 and 512 mg/l. For 72 hours, the viability of Vero cells with lysostaphin at concentrations of 0.5–32.0 mg/l was determined by the MTT method with counting of living cells according to their growth curve. The results were analyzed by ANOVA followed by Dunnett's test.

Results. A kinetic study of *S. aureus* growth in the presence of revealed an inhibitory effect of endopeptidase (MIC 0.06 mg/l). Lysostaphin was characterized by pronounced activity against clinical methicillin-sensitive *S. aureus*. The MIC ranged between 0.03 and 0.5 mg/l and the MIC_{50/90} was 0.125/0.5 mg/l. For methicillin-resistant *S. aureus* MIC_{50/90} 0.25/0.5 mg/l. The MIC₅₀ for MRSE was 2 times higher than for MSSE – 1 mg/l. The maximum MIC value was determined against isolates of *S. warneri* and *S. hominis* – 64 mg/l, the lowest for *S. saprophyticus* – 0.5 mg/l. MIC₅₀ of lysostaphin against MRSA was 4 times lower than that of vancomycin, MIC₉₀ was 3 times lower. Differences in viable cells depending on the concentration of lysostaphin were not found.

Conclusions. Significant activity of lysostaphin against staphylococci was revealed, which is several times higher than vancomycin against MRSA. Lysostaphin was also effective against methicillin-resistant *S. aureus*. The high anti-staphylococcal activity and cytocompatibility of lysostaphin are promising for its further study in the prevention and treatment of staphylococcal orthopedic infections.

Введение

Стафилококки – широко распространенная группа бактерий, относящихся к нормальной микрофлоре человека и животных. Род *Staphylococcus* включает две основные группы: коагулазоотрицательные (CoNS) и коагулазоположительные (CoPS). *Staphylococcus aureus* является наиболее распространенным возбудителем инфекций человека различных локализаций и обладает высоким патогенным потенциалом [1]. В отличие от многих других бактериальных патогенов, которые экспрессируют один или несколько токсинов для развития инфекционного процесса, *S. aureus* производят значительный набор факторов вирулентности. К ним относятся множество белков и факторов уклонения от иммунитета, а также широкий спектр небелковых веществ, которые обеспечивают колонизацию клеток хозяина [2–5]. Защиту от фагоцитоза обеспечивают коагулаза, липаза, гиалуронидаза, стафилокиназа, с помощью которых *S. aureus* ускользают от врожденного и адаптивного иммунного ответа хозяина, способствуя инвазии бактерий в эукариотические клетки [2, 6].

На сегодняшний день описано более 50 видов CoNS [7]. Одни виды, такие как *Staphylococcus carnosus*, не вызывают заболевания человека, другие – демонстрируют средний патогенный потенциал (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*), в то время как *Staphylococcus lugdunensis* характеризуется высокой вирулентностью [7]. Известно, что CoNS способны быть причиной широкого перечня заболеваний, включая менингит, эндофтальмит, перитонит, инфекции кожи, мягких тканей, костей, суставов, особенно у пациентов с ослабленным иммунитетом и именно по этой причине приобретают все большее значение в области здравоохранения [8–10].

Стафилококки играют ведущую роль в возникновении различных осложнений после хирургических операций, связанных с установкой ортопедических имплантатов. В исследовании Цискарашвили А. и соавт. наиболее частыми возбудителями перипротезной инфекции (ППИ) крупных суставов были *S. aureus* (31,9%) и *S. epidermidis* (20,2%) [11], а в исследовании Winkler T. и соавт. лидирующими возбудителями при ППИ были коагулазо-негативные стафилококки (30–43%), затем *S. aureus* (12–23%) [12]. Кроме того, значимой проблемой является распространенная среди стафилококков приобретенная устойчивость к антибактериальным препаратам нескольких классов [2, 7]. Известно, что инфекции, вызванные метициллинорезистентными *S. aureus*, связаны с более высоким уровнем смертности, чем инфекции, вызванные метициллиночувствительными штаммами [2]. Некоторые из наиболее распространенных видов CoNS также демонстрируют устойчивость к метициллину, например, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* и *Staphylococcus sciuri* [7].

В настоящее время регистрируют штаммы *S. aureus* устойчивые практически ко всем доступным антибиотикам. Несмотря на то, что ванкомицин остается антибиотиком выбора при инфекциях, вызванных метициллинорезистентным *S. aureus* (MRSA), описаны изоляты

чувствительные к ванкомицину только при увеличенной экспозиции препарата (VISA) [2]. Помимо генетических механизмов устойчивость стафилококков к антибактериальным препаратам обеспечивается образованием биопленок, играющих первостепенную роль в развитии инфекций, связанных с медицинскими устройствами: имплантат-ассоциированный остеомиелит, эндокардит протезированных клапанов, катетер-ассоциированные инфекции кровотока и другие [13]. Инфекционный контроль и адекватная этиотропная терапия особенно важны в ортопедической хирургии из-за обширных операций, связанных с установкой имплантатов, тяжелых последствий для пациента и системы здравоохранения в случае развития имплантат-ассоциированной инфекции, которая в подавляющем большинстве случаев требует замены инфицированного имплантата.

В эру растущей антибиотикорезистентности исследователи все больше внимания уделяют поиску альтернативных соединений, обладающих биоцидными свойствами. Лизостафин является ферментом, секретруемым *Staphylococcus simulans* biovar *staphylolyticus* с высокой специфической антибактериальной активностью *in vitro* и *in vivo* в отношении *S. aureus* [14, 15]. Это цинк-металло-эндопептидаза, расщепляющая пентаглициновый мостик в пептидогликановом слое клеточной стенки, что приводит к нарушению ее целостности. В своем исследовании Wu J. и соавт. показали, что использование лизостафина более выгодно, чем антибиотиков, благодаря его специфичности в отношении стафилококков и чрезвычайно высокой кинетики антибактериального действия [16]. Кроме того, установлено, что лизостафин высокоэффективен в отношении *S. aureus*, включая штаммы MRSA, VISA и VRSA (ванкомицинорезистентный *S. aureus*) [17].

Цель исследования – оценить антибактериальную активность лизостафина в отношении различных видов стафилококков, выделенных от пациентов с ортопедической инфекцией, а также его влияние на жизнеспособность эукариотических клеток линии Vero.

Материалы и методы

Лизостафин получали генно-инженерным способом в ООО «Научно-технологический центр «БиоИнвест» (Москва). На первом этапе была создана плазмидная ДНК на основе вектора pET39b, содержащего ген лизостафина (GenBank AAB53783.1). Последовательность гена оптимизировали для экспрессии в клетках *Escherichia coli* с учетом частоты встречаемости кодонов. Полученной плазмидной ДНК pET39b/lss трансформировали клетки *E. coli* BL21(DE3) и из полученных трансформантов готовили главный и рабочий банки клеток.

Штамм-продуцент выращивали глубинным способом в биореакторе общим объемом 5 л (BTC, Латвия) на полусинтетической питательной среде. Индукция синтеза целевого белка осуществлялась путем добавления в среду лактозы. Культивирование продолжали до достижения

стационарной фазы роста. Бактерии отделяли от культуральной жидкости центрифугированием на большегрузной центрифуге Sorvall Evolution RC (Thermo Scientific) в течение 10 мин. при 15000 g и температуре 4°C.

Биомассу суспендировали в буфере, содержащем 50 mM Tris-HCl и 100 mM NaCl в соотношении 1:7, при pH 8,0 и температуре 4°C. Затем суспензию бактериальных клеток дважды пропускали через проточный гомогенизатор высокого давления APV1000 (SPX, Дания) при 750 бар. Дебрис удаляли центрифугированием на большегрузной центрифуге Sorvall Evolution RC (Thermo Scientific) в течение 30 мин. при 15000 g и температуре 4°C. Полученный супернатант передавали на этап выделения и очистки.

Очистку белка проводили на SP-сефарозе (GE, Швеция) в ацетатном буфере в градиенте NaCl 0-1 M на хроматографе AKTA Purifier 100 FPLC System (GE, Швеция). Целевые фракции осаждали сульфатом аммония до насыщения 40%. Суспензию центрифугировали при 9000 g и температуре 4°C в течение 10 мин. на центрифуге Eppendorf 5810R. Полученный осадок растворяли в буфере, содержащем 20 mM NaOAc и 100 mM NaCl (pH 5,0), и наносили на колонку с Superdex 75 (GE, Швеция), уравновешенную тем же буфером. Целевые фракции фильтровали через стерилизующие фильтры Millex-GV 0,22 мкм (Millipore), фасовали по 1 мл во флаконы типа 2R и лиофилизировали в сушке AdVantage (VirTis, США).

В готовом продукте определяли чистоту методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) по Лэмли, содержание бактериальных эндотоксинов методом ЛАЛ-теста (реакция лизата амебоцитов с эндотоксином) и содержание иммунореактивных белков штамма-производителя при помощи набора F410 (Cugnus, США).

Микробиологическое исследование носило проспективный характер, в него включали клинические штаммы, выделенные подряд из биоматериала пациентов с перипротезной инфекцией и/или остеомиелитом в 2021 г. Изучена чувствительность к лизостафину 175 штаммов стафилококков девяти видов: *S. aureus* – 92 (метициллиночувствительные *S. aureus* (MSSA) – 46, MRSA – 46), *S. epidermidis* – 60 (метициллиночувствительные *S. epidermidis* (MSSE) – 30, метициллинорезистентные *S. epidermidis* (MRSE) – 30), *Staphylococcus saprophyticus* – 4, *Staphylococcus capitis* – 4, *S. haemolyticus* – 3, *Staphylococcus warneri* – 3, *Staphylococcus hominis* – 3, *S. simulans* – 3, *S. lugdunensis* – 3. Выделение культур проводили в соответствии со стандартными культуральными методиками, принятыми в лаборатории. Материалом для исследования служили тканевые биоптаты, раневое отделяемое, синовиальная жидкость и удаленные металлоконструкции, полученные от пациентов, находящихся на стационарном лечении. Видовую идентификацию выполняли методом матрично-активированной лазерной десорбционно/ионизационной времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS) с использованием системы FlexControl и программного обеспечения MBT Compass 4.1. (Bruker Daltonics, Германия), Score $\geq 2,0$. Антибиотикочувствительность стафилококков изучали в соответствии с требованиями EUCAST (версия 11.0) [18].

Наличие антибактериального действия лизостафина в отношении эталонных штаммов *S. aureus* ATCC 29213 (MSSA) и ATCC 43300 (MRSA) оценивали путем построения кинетических кривых роста. В 4 лунки 96-луночного планшета вносили 150 мкл бульона Мюллера-Хинтона (МХБ), 50 мкл взвеси *S. aureus* (0,5 по стандарту мутности МакФарланда) и добавляли 40 мкл лизостафина, растворенного в МХБ в определенной концентрации (от 0,06 до 4 мг/л). В контрольные лунки вместо лизостафина добавляли 40 мкл МХБ. Планшеты инкубировали при 37°C 18 ч. в спектрофотометре SPECTROstar NANO (BMG, Германия). Исследование состояло из 20 циклов по 3000 секунд, измерение оптической плотности бактериальной взвеси проводили при длине волны 600 нм. Анализ полученных кривых проводили в программе SPECTROstar NANO MARS.

Минимальные ингибирующие концентрации (МИК) лизостафина в отношении стафилококков изучали путем последовательных разведений в МХБ с диапазоном концентраций от 0,015 до 512 мг/л. В качестве положительного контроля использовали ванкомицин в концентрациях 0,016–256 мг/л. Рассчитывали МИК₅₀ и МИК₉₀ – минимальные концентрации, ингибирующие рост 50% и 90% бактериальных штаммов соответственно.

Для оценки цитотоксичности лизостафина использовали клетки линии Vero. Культуру клеток выращивали в модифицированной среде Dulbecco (DMEM) с высоким содержанием глюкозы, L-глутамина, пирувата натрия, эмбриональной бычьей сыворотки (10%), пенициллина 100 Ед/мл и стрептомицина 100 мг/мл (Corning, США). Клетки разделяли каждые 3 дня в соотношении 1:3 и заменяли среду на свежую.

Жизнеспособность клеток в присутствии лизостафина оценивали путем засева 96-луночных культуральных планшетов клетками Vero (2000 и 1000 в лунке) и инкубацией в течение 24 ч. до полного прикрепления. Затем в лунки добавляли культуральную среду с лизостафином в концентрации 0,5, 1, 2, 4, 8, 32 мг/л. Через 72 ч. инкубации, в лунки добавляли раствор 3-(4,5 диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид (МТТ) (Merck, Германия) в конечной концентрации 1 мг/л. Планшеты инкубировали в течение 3 ч. Раствор в лунках заменяли на 100 мкл диметилсульфоксида (ДМСО). После этого планшеты инкубировали и перемешивали еще 5 мин. в шейкере со скоростью 200 об/мин. Оптическую плотность (ОП) измеряли при 570 и 640 нм на спектрофотометре SPECTROstar Nano (BMG, Германия). Определяли разницу ОП при длине волны 570 и 640 нм с вычитанием среднего значения сигнала пустых лунок. Далее определяли число жизнеспособных клеток с учетом данных соответствующих кривых клеточного роста. Кривую роста клеток строили для каждого повторения эксперимента. Для этого параллельно засевали планшет с двукратным разведением клеток в количестве 16000, 8000, 4000 и 2000 в лунке. Определение ОП после инкубации проводили методом МТТ через 24 ч. после засева планшета как описано выше.

Результаты анализировали с помощью программы GraphPad Prism 9.0 (США). Данные представлены в

виде средних значений количества жизнеспособных клеток с соответствующими стандартными отклонениями. Определение (интерполирование) количества клеток проводили методом логистической регрессии. Результаты оценивали методом одностороннего дисперсионного анализа ANOVA с последующим тестом Даннетта (Dunnett's post-hoc test). Значения $p < 0,05$ считали статистически значимыми.

Результаты

Динамическое исследование роста эталонных культур *S. aureus* ATCC 29213 (MSSA) и ATCC 43300 (MRSA) в присутствии различных концентраций лизостафина (0,06–4 мг/л) выявило ингибирующий эффект эндопептидазы в сравнении с контролем (Рисунки 1 и 2). Лизостафин значительно ингибировал рост эталонных штаммов стафилококков даже в наименьших тестируемых концентрациях – 0,06 мг/л ($p < 0,01$).

Наибольшей активностью лизостафин характеризовался в отношении метициллиночувствительных штаммов *S. aureus* (Таблица 1). Для эталонного штамма *S. aureus* ATCC 29213 МИК составила 0,06 мг/л. Для клинических изолятов МИК варьировала от 0,03 до 0,5 мг/л, МИК_{50/90} 0,125/0,5 мг/л. МИК лизостафина *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA) – 0,06 мг/л. Показатель

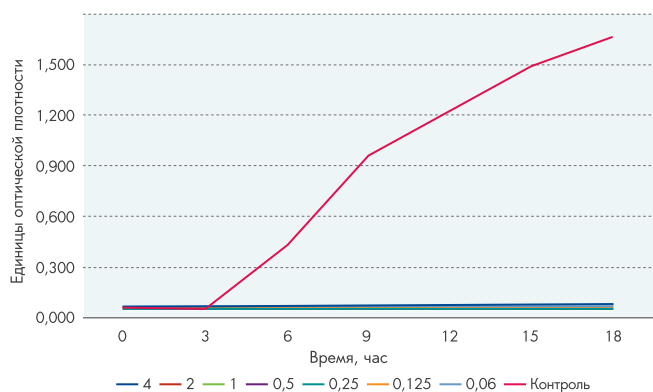


Рисунок 1. Динамика роста *S. aureus* ATCC 29213 (MSSA) в присутствии различных концентраций лизостафина (мг/л)

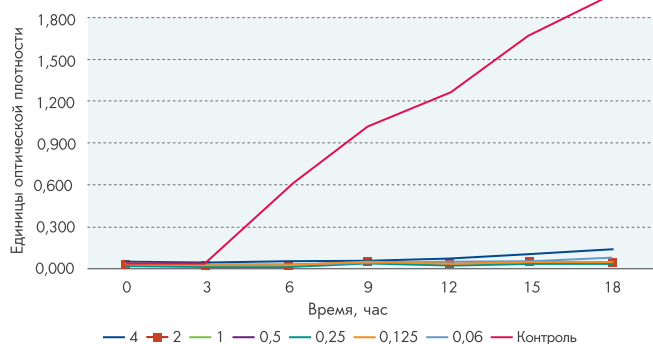


Рисунок 2. Динамика роста *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA) в присутствии различных концентраций лизостафина (мг/л)

Таблица 1. Показатели МИК лизостафина в отношении стафилококков (n = 175)

Стафилококки	МИК ₅₀ (мг/л)	МИК ₉₀ (мг/л)
MSSA (n = 46)	0,125	0,5
MRSA (n = 46)	0,25	0,5
MSSE (n = 30)	0,5	2
MRSE (n = 30)	1	2
Другие CoNS (n = 23)	4	32

MSSA – метициллиночувствительные *S. aureus*; MRSA – метициллинорезистентные *S. aureus*; MSSE – метициллиночувствительные *S. epidermidis*; MRSE – метициллинорезистентные *S. epidermidis*; CoNS – коагулазоотрицательные стафилококки.

Таблица 2. Сравнение МИК лизостафина и ванкомицина в отношении MRSA (n = 46)

Показатель	Лизостафин	Ванкомицин
МИК ₅₀ (мг/л)	0,25	1
МИК ₉₀ (мг/л)	0,5	1,5

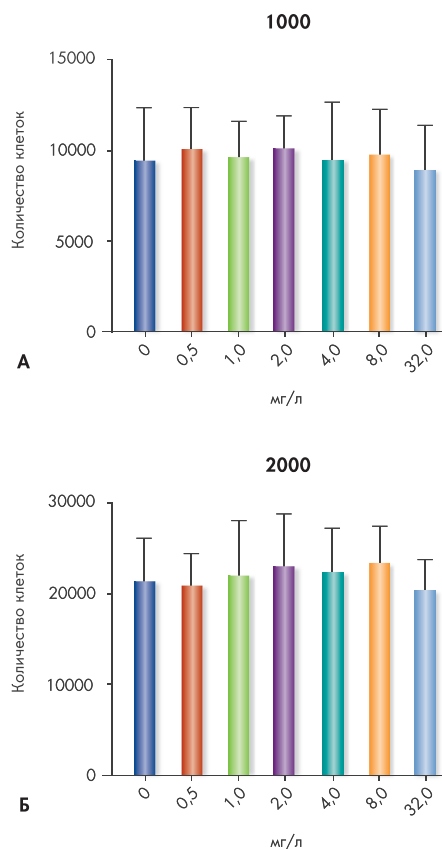


Рисунок 3. Количество жизнеспособных клеток Vero. Стартовое количество клеток Vero в лунке: «А» – 1000, «Б» – 2000 клеток; $p > 0,05$ при сравнении среднего количества клеток в каждой концентрации с контролем (0 мг/л)

МИК₅₀ для клинических штаммов устойчивых к метициллину превышал в 2 раза данный показатель для чувствительных культур. Аналогичная закономерность выявлена при расчете МИК₅₀ *S. epidermidis*. Так, МИК₅₀ клинических культур MRSE выше в 2 раза, чем для MSSE. Однако более 90% исследуемых изолятов данного вида были чувствительны к 2 мг/л лизостафина, вне зависимости от их антибиотикопротипа. В отношении других изученных видов CoNS регистрировали меньшую активность тестируемого фермента. Максимальное значение МИК определяли в отношении *S. warneri* 2559 и *S. hominis* 6654 – 64 мг/л, наименьшее значение для *S. saprophyticus* – 0,5 мг/л, к данной концентрации лизостафина были чувствительны 3 из 4 протестированных штаммов данного вида.

Сравнение с ванкомицином показало большую активность лизостафина в отношении изученных штаммов MRSA (Таблица 2): МИК₅₀ фермента ниже, чем у антибиотика в 4 раза, а МИК₉₀ – в 3 раза.

В ходе исследования не установлено различий в количестве жизнеспособных эукариотических клеток при совместной инкубации с лизостафином в течение 72 ч. вне зависимости от его концентрации в сравнении с контролем (Рисунок 3). Полученные результаты указывают на отсутствие прямого цитотоксического воздействия лизостафина на клетки линии Vero.

Обсуждение

Угроза, создаваемая устойчивыми к антибиотикам бактериями, в том числе стафилококками, продолжает расти, и прогнозы относительно их воздействия на будущее глобального здравоохранения неблагоприятны [15, 19]. Во второй половине XX-го в. непрерывная разработка новых антибактериальных химиотерапевтических средств позволяла в значительной степени контролировать распространение и течение MRSA-инфекций, но зачастую патогены развивали механизмы резистентности вскоре после введения в клиническую практику нового препарата [3]. В настоящее время ванкомицин, даптомицин и линезолид представляют собой препараты выбора для лечения инфекций, вызванных MRSA, но даже они теряют свою эффективность из-за приобретаемой резистентности у штаммов *S. aureus* [20]. Кроме того, необходимо помнить, что указанные антибиотики характеризуются большим перечнем нежелательных лекарственных реакций, что зачастую существенно ограничивает возможность их применения. В результате возникает острая необходимость в разработке альтернативных подходов к лечению инфекций, вызванных резистентными стафилококками [21], и одним из перспективных антистафилококковых средств является лизостафин.

Wu J. и соавт. изучали эффект лизостафина на штаммы *S. aureus* и *S. epidermidis*, а также на сформированные ими биопленки. Установлено, что *S. aureus* были чувствительны даже к крайне низким концентрациям лизостафина. Так, МИК₉₀ лизостафина *S. aureus* составила 0,064 мг/л, однако для *S. epidermidis* данный показатель был 64 мг/л. Кроме того, авторы показали,

что лизостафин в концентрации 1 мг/л не только уничтожал *S. aureus* в биопленках, но и оказывал деструктивное действие на внеклеточный матрикс сформированных биопленок *in vitro* на пластиковых и стеклянных поверхностях. Более высокие концентрации лизостафина разрушали и биопленки *S. epidermidis*. При этом высокие концентрации оксациллина (400 мг/л), ванкомицина (800 мг/л) и клиндамицина (800 мг/л) не влияли на сформированные биопленки *S. aureus* [16].

Аналогичная закономерность выявлена и в нашем исследовании, так штаммы *S. aureus* характеризовались большей чувствительностью к лизостафину, в сравнении с *S. epidermidis* (МИК₉₀ 0,5 мг/л против 2 мг/л). Определено, что МИК_{50/90} лизостафина в отношении клинических штаммов MRSA была в несколько раз ниже, чем ванкомицина, что указывает на выраженную активность фермента против резистентных к антибиотикам штаммов и необходимость дальнейшего изучения возможности применения лизостафина *in vivo* и в клинических условиях.

Johnson C. и соавт. разработали инъекционный гидрогель с лизостафином для лечения ортопедических инфекций, вызванных *S. aureus*. Было показано, что данный гидрогель обеспечивал полную эрадикацию возбудителя в очаге инфекции и был более активен в сравнении с растворимым лизостафином в модели стафилококковой инфекции на мышах. Инфицированные *S. aureus* переломы, обработанные гидрогелем с лизостафином, полностью зажили через 5 недель. Авторы рекомендуют использовать полученные гидрогели с лизостафином в качестве альтернативы антибиотикам при лечении ортопедических MRSA-инфекций [22].

Следует отметить, что ряд штаммов *S. aureus* характеризуются устойчивостью к лизостафину. По данным Wu J. и соавт. *S. aureus* считают устойчивым к лизостафину при МИК более 32 мг/л [16], однако в нашем исследовании таких культур не регистрировали. В своей работе Batool N. и соавт. секвенировали геном 72 устойчивых к лизостафину штаммов *S. aureus* и определили, что серингидроксиметилтрансфераза (*glyA* или *shmT*), отвечающая за метаболизм серина/глицина и фолиевой кислоты, играет ключевую роль в развитии резистентности к лизостафину [14].

Антимикробные свойства казались многообещающими, однако от разработки лизостафина в качестве терапевтического средства отказались. Некоторые из причин отказа от дальнейшего клинического использования лизостафина включали доступность антистафилококковых антибиотиков, опасения относительно потенциальной иммуногенности парентерально вводимого белка и «загрязнения» препаратов лизостафина. По результатам выполненного нами исследования *ex vivo* с использованием культуры клеток Vero установлено, что тестируемый нами лизостафин был безопасен и не оказывал прямого цитотоксического действия в широком диапазоне концентраций от 0,05 до 32 мг/л. При этом концентрация лизостафина 32 мг/л была эффективна в отношении 100% изученных штаммов *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. simulans*, *S. saprophyticus*, *S. capitis*, *S. lugdunensis*.

Заключение

Результаты проведенного исследования продемонстрировали высокую активность лизостафина в отношении клинических штаммов стафилококков, выделенных от пациентов с ортопедической инфекцией, в разы превышающую ванкомицин в отношении культур MRSA. Отмечено, что изученный эндопептид (в тестируемой концентрации 0,06 мг/л) был эффективен

в отношении не только чувствительных, но и резистентных к метициллину штаммов *S. aureus*. Высокая антистафилококковая активность и отсутствие цитотоксичности лизостафина позволяют считать перспективным его дальнейшее изучение не только с целью профилактики развития инфекции, но и в составе комплексного лечения ортопедической инфекции, основными возбудителями которой являются именно стафилококки.

Литература

- Lakhundi S., Zhang K. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: molecular characterization, evolution, and epidemiology. *Clin Microbiol Rev.* 2018;31(4):e00020-18. DOI: 10.1128/CMR.00020-18
- Cheung G., Bae J.S., Otto M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence.* 2021;12(1):547-569. DOI: 10.1080/21505594.2021.1878688
- Foster T.J. Surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Spectr.* 2019;7(4). DOI: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0046-2018
- Leonard A.C., Petrie L.E., Cox G. Bacterial anti-adhesives: inhibition of *Staphylococcus aureus* nasal colonization. *ACS Infect Dis.* 2019;5(10):1668-1681. DOI: 10.1021/acsinfecdis.9b00193
- Visansirikul S., Kolodziej S.A., Demchenko A.V. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides: A structural and synthetic perspective. *Org Biomol Chem.* 2020;18:783-798. DOI: 10.1039/C9OB02546D
- Genovese C., D'Angeli F., Bellia F., Distefano A., Spampinato M., Attanasio F., et al. *In vitro* antibacterial, anti-adhesive and anti-biofilm activities of *Krameria lappacea* (Dombey) Burdet & B.B. Simpson root extract against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antibiotics (Basel).* 2021;10(4):428. DOI: 10.3390/antibiotics10040428
- França A., Gaio V., Lopes N., Melo L.D.R. Virulence factors in coagulase-negative staphylococci. *Pathogens.* 2021;10(2):170. DOI: 10.3390/pathogens10020170
- Natsis N.E., Cohen P.R. Coagulase-negative staphylococci skin and soft tissue infections. *Am J Clin Dermatol.* 2018;19(5):671-677. DOI: 10.1007/s40257-018-0362-9
- Heilmann C., Ziebuhr W., Becker K. Are coagulase-negative staphylococci virulent? *Clin Microbiol Infect.* 2019;25(9):1071-1080. DOI: 10.1016/j.cmi.2018.11.012
- Becker K., Both A., Weißelberg S., Heilmann C., Rohde H. Emergence of coagulase-negative staphylococci. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2020;18(4):349-366. DOI: 10.1080/14787210.2020.1730813
- Tsiskarashvili A.V., Melikova R.E., Novozhilova E.A. Analysis of six-year monitoring of common pathogens causing periprosthetic joint infection of major joints and the tendency to resistance. *Genij ortopedii.* 2022;28(2):179-188. Russian. (Цискарашвили А.В., Меликова Р.Э., Новожилова Е.А. Анализ шестилетнего мониторинга основных возбудителей перипротезной инфекции крупных суставов и их тенденция к резистентности. *Гений ортопедии.* 2022;28(2):179-188.) DOI: 10.18019/1028-4427-2022-28-2-179-188
- Winkler T., Trampuz A., Renz N., Perka C., Bozhkova S.A. Classification and algorithm for diagnosis and treatment of hip periprosthetic infection. *Travmatologiya i ortopediya Rossii.* 2016;1:33-45. Russian. (Винклер Т., Трампуш А., Ренц Н., Перка К., Божкова С.А. Классификация и алгоритм диагностики и лечения перипротезной инфекции тазобедренного сустава. *Травматология и ортопедия России.* 2016;1:33-45.)
- Gordina E.M., Bozhkova S.A. Bacterial biofilms in orthopedics: the problem and possible prospects for prevention. *RMJ.* 2021;8:29-32. Russian. (Гордина Е.М., Божкова С.А. Бактериальные биопленки в ортопедии: проблема и возможные перспективы профилактики. *РМЖ.* 2021;8:29-32.)
- Batool N., Ko K.S., Chaurasia A.K., Kim K.K. Functional identification of serine hydroxymethyltransferase as a key gene involved in lysostaphin resistance and virulence potential of *Staphylococcus aureus* strains. *Int J Mol Sci.* 2020;21(23):9135. DOI: 10.3390/ijms21239135
- Fang Y., Kirsch J.R., Li L., Brooks S.A., Heim S., Tan C., et al. Deimmunized lysostaphin synergizes with small-molecule chemotherapies and resensitizes methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to β -lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* 2021;65(3):e01707-20. DOI: 10.1128/AAC.01707-20
- Wu J.A., Kusuma C., Mond J.J., Kokai-Kun J.F. Lysostaphin disrupts *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms on artificial surfaces. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:3407-3414. DOI: 10.1128/AAC.47.11.3407-3414.2003
- Mohamed M.F., Hamed M.I., Panitch A., Seleem M.N. Targeting methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with short salt-resistant synthetic peptides. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(7):4113-4122. DOI: 10.1128/AAC.02578-14
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 11.0, 2021. Available at: www.eucast.org. Accessed October 2022.
- Willyard C. The drug-resistant bacteria that pose the greatest health threats. *Nature.* 2017;543(7643):15. DOI: 10.1038/nature.2017.21550
- Choo E.J., Chambers H.F. Treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Infect Chemother.* 2016;48:267-273. DOI: 10.3947/ic.2016.48.4.267
- Azhar A., Rasool S., Haque A., Shan S., Saeed M., Ehsan B., Haque A. Detection of high levels of resistance to linezolid and vancomycin in *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol.* 2017;66:1328-1331. DOI: 1099/jmm.0.000566
- Johnson C.T., Wroe J.A., Agarwal R., Martin K.E., Gulberg R.E., Donlan R.M., et al. Hydrogel delivery of lysostaphin eliminates orthopedic implant infection by *Staphylococcus aureus* and supports fracture healing. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2018;115(22):E4960-E4969. DOI: 10.1073/pnas.1801013115