

DOI 10.29254/2077-4214-2021-2-160-177-180

UDC 579.864:616.1

Vashchenko A. O., Valchuk S. I., Voronkova Yu. S., Shevchenko T. M., Voronkova O. S.

**SUSCEPTIBILITY TO ANTIBIOTICS OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS STRAINS, ISOLATED FROM UPPER RESPIRATORY TRACT OF HUMAN**

Oles Honchar Dnipro National University (Dnipro)

voronkova.olga.04@gmail.com

**The connection of the publication with planned research works.** The research was performed within the scientific theme 0119U101044 "Monitoring the health of the population of Dnipropetrovsk region with the analysis of clinical and laboratory indicators".

**Introduction.** Indigenous microbiota of the human body includes all types of microorganisms that colonize various biotopes. It is represented by a large variety of species, among which there are opportunistic pathogens. Bacteria of the genus *Staphylococcus* are present in almost all people, representing facultative microorganisms that are found in various biotopes. Usually these microorganisms are representatives of transient microorganisms and their number does not exceed 3-4% of the total. However, with reduced immune reactivity, their number may increase and they cause various pathological manifestations [1, 2]. The trigger for the development of the inflammatory process can be: diseases of any localization, in the development of which staphylococcal infection may act as a secondary. Also, these are long-term drug therapy, exacerbation of chronic processes associated with carriers of staphylococci, mucosal injuries, disorders of the hormonal system, etc. [3].

Bacteria of the genus *Staphylococcus* can be part of the microbiota of any biotopes. In human pathology, three species have the greatest importance: *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* and *S. saprophyticus*. However, it is indicated that other species of staphylococci are able to mediate pathological processes in humans, especially in immunocompromised individuals [2].

The microbiota of the upper respiratory tract is mainly concentrated in the nasopharynx and oropharynx. It most often contains bacteria of the genera *Streptococcus* (groupe *viridans* – up to 95% of all microorganisms), *Staphylococcus*, and a number of opportunistic pathogens. Bacteria of the genus *Staphylococcus* are one of the most important in the structure of human respiratory diseases. These microorganisms are mainly isolated from both sick and almost healthy people [4]. In the nasal cavity and oropharynx, they are most often present as transient species (not more than 1-3% of the total number of microorganisms).

Carriers of opportunistic bacteria, in particular staphylococci, may be permanent or temporary depending on the characteristics of the strain, the state of the macroorganism and the competitive relationship between the representatives of the microbiota. The nasal carrier is the main in the spread of staphylococci among humans [5].

Nasal carriers pose a special risk in the structure of nosocomial infections, which is associated with the spread of determinants of antibiotic resistance among clinical strains [5, 6, 7]. Such strains mostly show polyresistance to antibacterial drugs, and sometimes to a number of disinfectants [6, 7].

**The aim of the research.** To investigate the frequency of detection of staphylococci of different species in the microbiota of the human upper respiratory tract and to study the resistance to antibiotics of isolated strains.

**Object and methods of research.** The research was performed on the basis of the Department of Bacteriology of the Educational and Scientific Laboratory of the Faculty of Medical Technologies of Diagnosis and Rehabilitation of Oles Honchar Dnipro National University (Dnipro).

The object of the study was the frequency of detection and biological properties of staphylococci isolated from nose of women and men with non-allergic rhinitis (age – 18 to 56 years, n=59).

Isolation, identification and study of biological properties of bacteria were carried out in accordance with the order «About the unification of microbiological (bacteriological) research methods» [8].

The disk-diffusion method was used to determine the sensitivity of microorganisms to antibacterial drugs. Next antibiotics were studied: ofloxacin, doxycycline, gentamicin, amoxicillin/clavulanic acid, oxacillin and azithromycin (HiMedia, India). The Muller-Hinton media was used. The research was conducted in accordance with the recommendation of CLSI [9].

Identification of biofilm forming staphylococci was done by a method of visually determining of the ability to biofilm formation. 200 µl of meat-peptone broth (MPB) and 50 µl of cell culture suspension of studies staphylococcal isolates containing  $1 \times 10^4$  cells / ml were added to the well of a 96-well sterile immunological plate (Sarstedt, Germany). Biofilm formation was observed for 72 hours. At the end of the incubation, the remnants of the nutrient medium were carefully removed with a syringe. If a biofilm remained on the walls and bottom of the wells of the tablet, the isolate was considered biofilm-forming [10].

**The results of the study and their discussion.** From the 59 studied samples of biological material were isolated 48 isolates (81.4%) that have typical to staphylococci morphology and tinctorial features. It is estimated that the frequency of nasal carriers of staphylococci ranges from 20 to 40%, and sometimes up to 80%. Epidemiological studies show that 20% of the population are resident carriers of staphylococci, 70% of them – transient, and only 10% have no permanently detected staphylococci. In our previous studies, the frequency of detection of staphylococci among the population of Dnipro showed that on average, these microorganisms are found in about 70% of people [3].

Identification of these microorganisms allowed to confirm their belonging to the genus *Staphylococcus* (Figure 1).

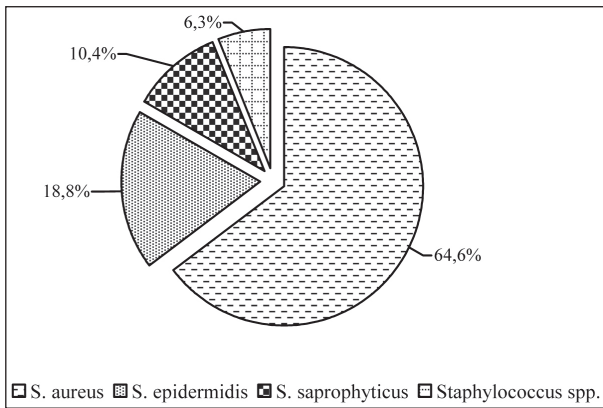


Figure 1 – Frequency of detection of staphylococci of different species.

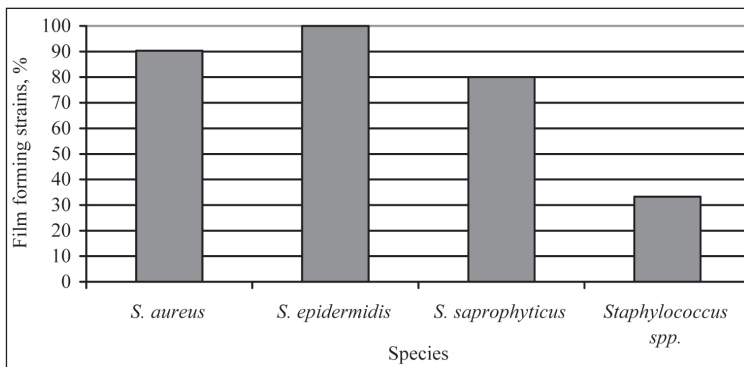


Figure 2 – Frequency of detection of film forming strains of staphylococci of different species.

The most common during the manifestations of non-allergic rhinitis in the microbiota were: *S. aureus* – 64.4% (31), *S. epidermidis* – 18.8% (9), *S. saprophyticus* – 10.4% (5) and *Staphylococcus spp.* – 6.3% (3).

The detection of *S. aureus* as a dominant representative of staphylococci in the microbiota of the nasal cavity is confirmed in many sources [5, 11, 12, 13], and it also indicates a role of other species of staphylococci in the development of diseases [11, 13].

In most cases, staphylococcal carriers are associated with the detection of strains that are prone to the formation of biofilms and show significant resistance to antibiotics of different groups [12], so these characteristics must be studied, especially in the case of chronic pathological processes.

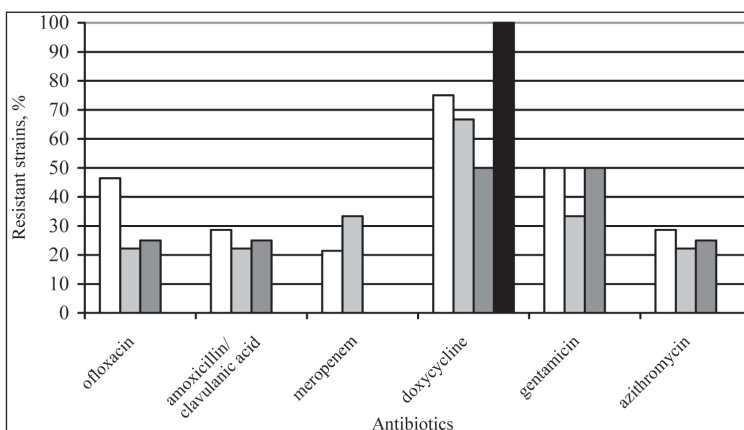


Figure 3 – Resistance to antibiotics of biofilm forming strains of staphylococci.

The study of the ability to form biofilm strains showed that 87.5% (42) of them were able to form a biofilm after 72 h of cultivation (Figure 2).

It was found that all strains of *S. epidermidis* (9) were able to form biofilm. Also, this property is typical for *S. aureus* – 90.3% (28) and *S. saprophyticus* – 80% (4). Among the strains identified as *Staphylococcus spp.* only 1 showed a weak ability to form a biofilm. These indicators coincide with the known data that the vast majority of staphylococcal strains, which are clinical, are prone to biofilm formation [7, 14].

The greatest threat in the biofilm state is staphylococci due to increased resistance to antibiotics [15, 16], which requires more detailed studies of their resistance and, if necessary, correction of antimicrobial therapy [1, 2, 15, 16, 17]. We have studied the spread the resistance to antibiotics of the isolated strains of staphylococci, which are able to form biofilm (Figure 3).

It was found that more than 50% of strains were resistant to doxycycline – a drug from the group of tetracyclines. There are a number of clinical studies, which indicate that doxycycline is less effective than drugs from other groups [18], but remains better than some, for example, vancomycin [19].

More than 30-70% of strains were susceptible to other antibiotics. The best effect was found for meropenem, to which only 21.4% (6) and 33.3% (3) of *S. aureus* and *S. epidermidis* strains were resistant, respectively. This pattern is typical of methicillin-resistant *S. aureus* and, as is known, *S. epidermidis* to be rapidly resistant to this antibiotic.

**Conclusions.** The dominance of *S. aureus* strains among other staphylococci in the microbiota of the nasal cavity in persons with rhinitis was shown: 64.6% (31) cases. It was determined that most strains of staphylococci of different species have a tendency to form a biofilm: 87.5% (42) of cases, which may indicate the likelihood of complications of therapy due to increased resistance of bacteria to antibiotics in the biofilm state. It has been determined that azithromycin, amoxicillin / clavulanic acid and ofloxacin may be recommended as drugs of choice for the treatment of rhinitis in subjects. The reserve drug is meropenem, and doxycycline can be used only in determining the susceptibility to it in a particular strain.

**Prospects for further research.** The study of the prevalence of staphylococcal carriers among the population is of great interest, because these bacteria create major problems in medical practice, in particular, they play a major role in the spread of antibiotic resistance and cause a number of nosological forms that are difficult to treat. A feature of staphylococci is also the ability of most clinical strains to form a biofilm, in which they show even greater resistance to antibiotics.

Studying the prevalence of staphylococci among the population and determining their biological properties is an extremely important and urgent task for the development of schemes of rational antimicrobial therapy, which can increase the effectiveness of treatment and prevent the spread of antibiotic resistance among microorganisms.

References

1. Agarwal A, Singh KP, Jain A. Medical significance and management of staphylococcal biofilm. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2010;58(2):147-160. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2009.00601.x.
2. Al-Mutairi D, Kilty SJ. Bacterial biofilms and the pathophysiology of chronic rhinosinusitis. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. 2011;11(1):18-23. DOI: 10.1097/ACI.0b013e3283423376.
3. Andersson DI, Hughes D. Selection and transmission of antibiotic-resistant bacteria. *Microbiol Spectr*. 2017;5(4):337-340. DOI: 10.1128/microbiolspec.MTBP-0013-2016.
4. Archer NK, Mazaitis MJ, Costerton JW, Leid JG, Powers ME, Shirtliff ME. *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation and roles in human disease. *Virulence*. 2011;2(5):445-459. DOI: 10.4161/viru.2.5.17724.
5. Chen BJ, Xie XY, Ni LJ, Dai XL, Lu Y, Wu XQ, et al. Factors associated with *Staphylococcus aureus* nasal carriage and molecular characteristics among the general population at a Medical College Campus in Guangzhou, South China. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2017;16(1):28. DOI: 10.1186/s12941-017-0206-0.
6. Cole AL, Sundar M, Lopez A, Forsman A, Yooseph S, Cole AM. Identification of Nasal Gammaproteobacteria with Potent Activity against *Staphylococcus aureus*: Novel Insights into the «Noncarrier» State. *mSphere*. 2021;6(1):e01015-20. DOI: 10.1128/mSphere.01015-20.
7. Ghellai L, Hassaine H, Klouche N, Abdelmounaim K. Detection of biofilm formation of a collection of fifty strains of *Staphylococcus aureus* isolated in Algeria at the University Hospital of Tlemcen. *Journal of Bacteriology Research*. 2014;6(1):1-6. DOI: 10.5897/JBR2013.0122.
8. Haaber J, Penades JR, Ingmer H. Transfer of Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol*. 2017;25(11):893-905. DOI: 10.1016/j.tim.2017.05.011.
9. Hiltunen AK, Savijoki K, Nyman TA, Miettinen I, Ihalainen P, Peltonen J, et al. Structural and Functional Dynamics of *Staphylococcus aureus* Biofilms and Biofilm Matrix Proteins on Different Clinical Materials. *Microorganisms*. 2019;7(12):584. DOI: 10.3390/microorganisms7120584.
10. Manner S, Goeres DM, Skogman M, Vuorela P, Fallarero A. Prevention of *Staphylococcus aureus* biofilm formation by antibiotics in 96-Microtiter Well Plates and Drip Flow Reactors: critical factors influencing outcomes. *Sci Rep*. 2017;7:43854. DOI: 10.1038/srep43854.
11. Ogonowska P, Gilaberte Y, Barańska-Rybak W, Nakonieczna J. Colonization With *Staphylococcus aureus* in Atopic Dermatitis Patients: Attempts to Reveal the Unknown. *Front Microbiol*. 2021;11:567090. DOI: 10.3389/fmicb.2020.567090.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 11th ed. Wayne: CLSI; 2018. 13 p. Available from: [https://clsi.org/media/1928/m07ed11\\_sample.pdf](https://clsi.org/media/1928/m07ed11_sample.pdf).
13. Министерство здравоохранения СССР. Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений [Internet]. Москва: МЗ СССР; 1985. Доступно: <https://docs.cntd.ru/document/420245293>. [in Russian].
14. Singh R, Ray P, Das A, Sharma M. Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrob Chemother*. 2010;65(9):1955-1958. DOI: 10.1093/jac/ckq257.
15. Wolcott R, Costerton JW, Raoult D, Cutler SJ. The polymicrobial nature of biofilm infection. *Clinical Microbiology and Infection*. 2013;19(2):107-112. DOI: doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.04001.x.
16. Harifulina MA, Voronkova OS, Shevchenko TM, Vinnikov AI. Kharakterystyka stafilokokiv ta yikh rol' u patolohiyi ditey. *Visn. Dnipropetr. Univ. Ser. Biol. Med*. 2014;5(2):115-120. DOI: 10.15421/021422. [in Ukrainian].
17. Kunelskaya NL, Turovskiy AB, Kolbanova IG, Popova IA. Antibakterialnaya terapiya hronicheskogo sinusita. *RMZh*. 2016;21:1411-1416. [in Russian].
18. Belkaid Y, Hand TW. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell*. 2014;157(1):121-141. DOI: 10.1016/j.cell.2014.03.011.
19. Yang D, Xing Y, Song X, Qian Y. The impact of lung microbiota dysbiosis on inflammation. *Immunology*. 2020;159(2):156-166. DOI: 10.1111/imm.13139.

**ЧУТЛИВІСТЬ ДО АНТИБІОТИКІВ ШТАМІВ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, ІЗОЛЬОВАНИХ З ВЕРХНІХ ДИХАЛЬНИХ ШЛЯХІВ ЛЮДИНИ**

**Ващенко А. О., Вальчук С. І., Воронкова Ю. С., Шевченко Т. М., Воронкова О. С.**

**Резюме.** *Мета.* Дослідити частоту виявлення стафілококів різних видів у складі мікробіоти верхніх дихальних шляхів людини та вивчити стійкість до антибіотиків виділених штамів.

*Об'єкт і методи дослідження.* Об'єктом дослідження була стійкість до антибіотиків біоплівкотвірних штамів стафілококів, що виділені з порожнини носу осіб з неалергічним ринітом. Для виділення та ідентифікації стафілококів використовували мікроскопічні та бактеріологічні методи. Вивчення здатності до утворення біоплівки здійснювали на 96-лункових пластикових планшетах. Чутливість до антибіотиків визначали відповідно до стандартів CLSI.

*Результати дослідження та їх обговорення.* Встановлено, що найбільш часто при проявах неалергічного риніту у складі мікробіоти носової порожнини присутні: *S. aureus* – 64,4% (31), *S. epidermidis* – 18,8% (9), *S. saprophyticus* – 10,4% (5) та *Staphylococcus spp.* – 6,3% (3). 87,5% (42) виділених штамів стафілококів були здатні до формування біоплівки через 72 години культивування. З них: всі штами *S. epidermidis* (9), 90,3% (28) – *S. aureus*, 80% (4) – *S. saprophyticus* та 1 – *Staphylococcus spp.*

Виявлено, що понад 50% були резистентні до доксицикліну. До інших антибіотиків найкращий ефект визначено до меропенему, до якого стійкими були тільки 21,4% (6) та 33,3% (3) штамів *S. aureus* та *S. epidermidis* відповідно.

*Висновки.* Показано переважання штамів *S. aureus* серед інших стафілококів у складі мікробіоти порожнини носу в осіб з ринітами: 64,6% (31) випадків. Визначено, що більшість штамів стафілококів різних видів має схильність до утворення біоплівки: 87,5% (42) випадків, що може вказувати на імовірність ускладнень терапії через підвищену стійкість бактерій до антибіотиків у біоплівковому стані. Визначено, що в якості препаратів вибору для лікування риніту в обстежених осіб можуть бути рекомендовані азитроміцин, амоксицилін/клавуланова кислота та офлоксацин. Препаратом резерву є меропенем, а доксициклін може бути використаний тільки при визначенні чутливості до нього у конкретного штаму.

**Ключові слова:** стафілококи, порожнина носа, неалергічний риніт, біоплівка, антибіотикорезистентність.

**SUSCEPTIBILITY TO ANTIBIOTICS OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS STRAINS, ISOLATED FROM UPPER RESPIRATORY TRACT OF HUMAN**

**Vashchenko A. O., Valchuk S. I., Voronkova Yu. S., Shevchenko T. M., Voronkova O. S.**

**Abstract.** *The aim of the research.* To investigate the frequency of detection of staphylococci of different species in the microbiota of the human upper respiratory tract and to study the resistance to antibiotics of isolated strains.

*Object and methods of the research.* The object of the research was antibiotic resistance of biofilm forming strains of staphylococci isolated from the nasal cavity of persons with non-allergic rhinitis. Microscopic and bacteriological methods were used to isolate and identify the staphylococci. The study of the ability to form a biofilm was performed on 96-well plastic plates. Antibiotic susceptibility was determined according to CLSI standards.

*The results of the study and their discussion.* It was found that the most common manifestations of non-allergic rhinitis in the microbiota of the nasal cavity are: *S. aureus* – 64.4% (31), *S. epidermidis* – 18.8% (9), *S. saprophyticus* – 10.4% (5) and *Staphylococcus* spp. – 6.3% (3). 87.5% (42) of the isolated strains of staphylococci were able to form a biofilm after 72 h of cultivation. Of these: all strains of *S. epidermidis* (9), 90.3% (28) – *S. aureus*, 80% (4) – *S. saprophyticus* and 1 – *Staphylococcus* spp.

It was found that more than 50% were resistant to doxycycline. For other antibiotics, the best effect was found for meropenem, to which only 21.4% (6) and 33.3% (3) of *S. aureus* and *S. epidermidis* strains were resistant, respectively.

*Conclusions.* The predominance of *S. aureus* strains among other staphylococci in the microbiota of the nasal cavity in persons with non-allergic rhinitis: 64.6% (31) cases. It was determined that most strains of staphylococci of different species have a tendency to form a biofilm: 87.5% (42) of cases. It has been determined that azithromycin, amoxicillin / clavulanic acid and ofloxacin may be recommended as drugs of choice for the treatment of rhinitis in surveyed contingent. The reserve drug is meropenem, and doxycycline can be used only in determining the sensitivity to it in a particular strain.

**Key words:** staphylococci, nasal cavity, non-allergic rhinitis, biofilm, antibiotic resistance.

Рецензент – проф. Білаш С. М.  
Стаття надійшла 23.12.2020 року

DOI 10.29254/2077-4214-2021-2-160-180-183

УДК 617.3+597.6

<sup>1</sup>Кривцова М. В., <sup>1</sup>Костенко Є. Я., <sup>1</sup>Скляр І. І., <sup>1</sup>Костенко С. Б., <sup>2</sup>Саламон І.

## ПЕРСИСТЕНЦІЯ УМОВНО-ПАТОГЕННОЇ МІКРОБІОТИ У РОТОВІЙ ПОРОЖНИНІ ХВОРИХ ІЗ ЗАПАЛЬНИМИ ЗАХВОРЮВАННЯМИ ПАРОДОНТУ

<sup>1</sup>ДВНЗ «Ужгородський національний університет» (м. Ужгород)

<sup>2</sup>Прешовський університет в Прешові (м. Прешов, Словаччина)

maryna.krivcova@uzhnu.edu.ua

**Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.** Дана робота є фрагментом НДР «Клініко-лабораторне дослідження сучасних стоматологічних технологій та експертна оцінка якості методик лікування», номер державної реєстрації 0118U004526 та «Мікробіологічні, біохімічні та біотехнологічні аспекти використання лікарських рослин та продуктів на їх основі щодо антибіотикорезистентних штамів мікроорганізмів в умовах різних біологічних систем», номер державної реєстрації 0120U100516.

**Вступ.** Однією з основних ценотичних груп мікроорганізмів ротової порожнини є факультативна мікробіота, етіологічна значущість та роль якої на сучасному етапі у розвитку запальних захворювань та післяопераційних ускладнень значно підвищується [1]. Перебуваючи у ротовій порожнині та інших органах, як представники нормальної мікробіоти, за певних умов (зниження імунного статусу організму, оперативні втручання, соматичні захворювання і т. д.), умовно-патогенні мікроорганізми викликають запальні процеси різної локалізації [2].

Важливим аспектом вивчення даної групи мікроорганізмів в мікробіоті ротової порожнини є стрімке зростання полімедикаментозної резистентності (стійкості) до антибіотичних препаратів. Основними причинами втрати активності антибіотиків є їх нераціональне та нецільове використання (особливо при самолікуванні) та застосування у різних галузях сільськогосподарства. Внаслідок цього лікування багатьох інфекційних захворювань, стає важчим: подовжується період перебування хворих у стаціонарі, зростають витрати на лікування та збільшуються показники смертності. Полімедикаментозну стійкість на сьогодні,

виявляють як у патогенних бактерій, так і коменсальних мікроорганізмів. Формування антибіотикорезистентності генетично зумовлено, внаслідок мутацій, набуття нової генетичної інформації або завдяки зміні рівня експресії власних генів бактерійної клітини [3]. Важливим напрямком досліджень є вивчення резистентності не тільки патогенних бактерій, але й мікроорганізмів, що живуть у навколишньому середовищі. Із цим певною мірою пов'язане поняття глобальної резистоми, як сукупності всіх генів резистентності до АБ у геномах усіх мікроорганізмів – патогенних і непатогенних, що живуть у природних умовах і різних біологічних середовищах. До складу резистоми входять потенційні гени резистентності, які кодують білки, що визначають помірну антибіотикорезистентність (забезпечують афінність до АБ) [4-6].

У зв'язку із стрімкою зміною вірулентності та патогенності представників факультативної мікробіоти, актуальності набувають роботи з вивчення складу, рівня персистенції та біологічних властивостей умовно-патогенних мікроорганізмів при запальних процесах різної етіології, в тому числі ротової порожнини та з'ясування їх ролі в ускладненнях запальних захворювань пародонту [5, 6].

**Метою даної роботи** було дослідити спектр, рівень персистенції та чутливість до антибіотиків умовно-патогенних мікроорганізмів пародонтальних тканин в умовах запальних захворювань пародонту.

**Об'єкт і методи дослідження.** Клінічною базою для виділення ізолятів, що персистували на фоні запальних процесів тканин пародонту була «Університетська стоматологічна поліклініка» ДВНЗ «УжНУ»; мікробіологічні дослідження проводили у мікробіоло-