

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

Г.Г.Харсеева, Н.А.Воронина, Т.Д.Гасретова, О.И.Сылка С.Ю.Тюкавкина

**АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНЫЕ ШТАММЫ НЕДИФТЕРИЙНЫХ КОРИНЕБАКТЕРИЙ**

Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону

**Цель.** Исследование частоты встречаемости антибиотикорезистентных штаммов различных видов недифтерийных коринебактерий. **Материалы и методы.** Использованы штаммы *C.pseudodiphtheriticum*, *C.pseudotuberculosis*, *C.xerosis*, *C.amycolatum*, *C.striatum*, *C.ulcerans*, выделенные от больных с патологией респираторного и урогенитального тракта, а также от лиц, проходивших профилактическое обследование. Чувствительность к антибактериальным препаратам определяли методом серийных разведений. **Результаты.** Наибольшее количество штаммов недифтерийных коринебактерий проявляло резистентность к бензилпенициллину (54,8%) и линкомицину (50,7%), а наименьшее — к цефотаксиму, цефазолину (6,8%) и ванкомицину (13,7%). Наибольшее количество антибиотикорезистентных штаммов обнаружено среди представителей видов *C.pseudotuberculosis* (100%), *C.xerosis* (96,0%) и *C.pseudodiphtheriticum* (81,0%). Полирезистентные штаммы чаще выявляли среди видов *C.xerosis*, *C.amycolatum* и *C.striatum*. Штаммы недифтерийных коринебактерий чаще проявляли резистентность к одному и двум антибактериальным препаратам (24,7%), реже — к трем (20,5%), четырем (13,7%), пяти (4,1%) и шести (1,4%) препаратам. **Заключение.** Количество антибиотикорезистентных штаммов недифтерийных коринебактерий велико (89,0%) и неодинаково у разных видов.

Журн. микробиол., 2017, № 2, С. 3—8

**Ключевые слова:** недифтерийные коринебактерии, антибиотикорезистентность, полирезистентные штаммы, антибактериальные препараты

G.G.Kharseeva, N.A.Voronina, T.D.Gasretova, O.I.Sylka, S.Yu.Tyukavkina

**ANTIBIOTICS RESISTANCE OF CORYNEBACTERIUM NON DIPHTHERIAE STRAINS**

Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russia

**Aim.** Study the frequency of occurrence of antibiotics resistant strains of various species of *Corynebacterium non diphtheriae*. **Materials and methods.** *C.pseudodiphtheriticum*, *C.pseudotuberculosis*, *C.xerosis*, *C.amycolatum*, *C.striatum*, *C.ulcerans* strains isolated from patients with pathologies of respiratory and urogenital tract, as well as individuals taking prophylaxis examination were used. Sensitivity to antibacterial preparations was determined by the serial dilution method. **Results.** The highest number of *Corynebacterium non diphtheriae* strains displayed resistance to benzylpenicillin (54.8%) and lincomycin (50.7%), and lowest — to cefotaxime, cefazolin (6.8%) and vancomycin (13.7%). The highest number of antibiotics resistant strains were detected among members of *C.pseudotuberculosis* (100%), *C.xerosis* (96.0%) and *C.pseudodiphtheriticum* (81.0%) species. Polyresistant strains were detected most frequently among *C.xerosis*, *C.amycolatum* and *C.striatum* species. Strains of *Corynebacterium*

*non diphtheriae* most frequently displayed resistance to 1 or 2 antibacterial preparations (24.7%), less frequently — to 3 (20.5%), 4 (13.7%), 5 (4.1%) and 6 (1.4%) preparations. *Conclusion.* The amount of antibiotics resistant strains of *Corynebacterium non diphtheriae* is large (89.0%) and non-similar in various species.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 2, P. 3—8

Key words: *Corynebacterium non diphtheriae*, antibiotics resistance, polyresistant strains, antibacterial preparations

## ВВЕДЕНИЕ

Роль патогенного потенциала недифтерийных коринебактерий длительное время была недооценена. Ранее считалось, что недифтерийные коринебактерии, за исключением *C. ulcerans* и *C. pseudotuberculosis*, не патогенны для человека, а обнаружение коринебактерий в клиническом материале объяснялось его контаминацией. Однако в настоящее время известно, что штаммы *C. non diphtheriae* следует рассматривать как клинически значимые либо при повторном выделении, либо при обнаружении их в чистой культуре в материале из стерильных биотопов [1, 5, 8, 10, 11]. Особое значение имеет правильная их идентификация и определение чувствительности к антибактериальным препаратам. Это связано с появлением данных о повышении антибиотикоустойчивости различных видов коринебактерий. Важным является определение антибиотикограммы таких видов, как *Corynebacterium jeikeium*, *Corynebacterium urealyticum*, *Corynebacterium amycolatum*, обладающих устойчивостью ко многим из наиболее часто применяемых в клинической практике антибиотикам. Для большинства видов коринебактерий, характеризующихся лекарственной устойчивостью, эффективны гликопептидные антибактериальные препараты, которые часто используют в качестве первой линии эмпирического лечения.

Формирование полиантибиотикорезистентности недифтерийных коринебактерий, особенно ассоциированных с другими микроорганизмами, обуславливает более тяжелое и длительное течение болезни [1, 4]. Большинство исследователей признают, что резистентность и, особенно, полирезистентность бактерий к антибиотикам достигла уже критического уровня и имеет тенденцию к дальнейшему распространению, в том числе и на новые антибактериальные препараты. Множественной лекарственной устойчивостью обладают такие наиболее часто выделяемые из клинического материала виды *C. non diphtheriae*, как *C. pseudodiphtheriticum*, *C. amycolatum*, *C. striatum*, *C. urealyticum*, *C. minutissimum* и др. [5, 10]. В то же время, множественная лекарственная устойчивость среди нечасто выделяемых видов коринебактерий наблюдается редко. В связи с этим, актуальным является мониторинг антибиотикочувствительности и выявление штаммов недифтерийных коринебактерий, обладающих множественной резистентностью к антибактериальным препаратам.

Цель работы — исследование частоты встречаемости антибиотикорезистентных штаммов различных видов недифтерийных коринебактерий.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследованы 73 штамма недифтерийных коринебактерий (*C. pseudodiphtheriticum*, *C. pseudotuberculosis*, *C. xerosis*, *C. amycolatum*, *C. striatum*, *C. ulcerans*), выделенные за период с 2009 по 2011 гг. из верхних дыхательных путей (зев,

нос) больных с острым и хроническим тонзиллитом, ангинами, из урогенитального тракта (влагалище, цервикальный канал, моча) от пациентов с острым кольпитом, острым и хроническим пиелонефритом, а также лиц, проходивших профилактическое обследование. Штаммы *S. non diphtheriae* получены из лабораторий бактериологических методов исследования Горбольницы № 1 г. Гуково Ростовской области; Областной детской больницы, ЦГБ № 1 им. Н.А.Семашко и Консультативно-диагностического центра Ростова-на-Дону. Идентифицированы бактериологическим методом в соответствии с Методическими рекомендациями [2] и секвенированием генов 16S рРНК с помощью праймеров для коринебактерий (ЗАО «Синтол», Москва).

Определение чувствительности штаммов недифтерийных коринебактерий к антибактериальным препаратам (бензилпеницилину, цефотаксиму, цефазолину, эритромицину, гентамицину, рифампицину, линкомицину, ванкомицину) проводили методом серийных разведений (микрометодом) в жидкой питательной среде [3]. Результаты метода серийных разведений оценивали по значениям МПК (минимальной подавляющей концентрации) в мг/л. Для контроля метода использовали чувствительные к антибиотикам эталонные штаммы *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922 и *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, полученные из ГИСК им. Л.А. Тарасевича. Для характеристики степени чувствительности коринебактерий к антибактериальным препаратам вычисляли МПК для 50% и 90% исследованных штаммов, а также определяли количество чувствительных и резистентных штаммов *S. non diphtheriae*.

Статистический анализ результатов проводили с помощью программы Statistica 7.0 и MedCalc (версия 9.3.5.0).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

При исследовании чувствительности штаммов недифтерийных коринебактерий к антибактериальным препаратам путем определения МПК<sub>50</sub>, МПК<sub>90</sub> (табл.) установлено, что наибольшую активность проявляли цефотаксим, ванкомицин и цефазолин, подавляющие рост 50% штаммов в концентрации  $\leq 0,019$  мг/л. При этом к цефотаксиму оказались чувствительными 90% штаммов, МПК<sub>90</sub> которого составила 0,625 мг/л. Наименьшей чувствительностью *S. non diphtheriae* обладали к гентамицину, линкомицину и эритромицину, подавляющим 90% штаммов в концентрации  $\geq 5,0$  мг/л.

На основании полученных величин МПК все штаммы недифтерийных коринебактерий подразделили на чувствительные и резистентные. Для разграничения категорий чувствительности (или рези-

Антибиотико-чувствительность штаммов недифтерийных коринебактерий (n=73)

Показатели Антибак- териальные препараты	МПК <sub>50</sub>	МПК <sub>90</sub>	Количество штаммов недифтерийных коринебактерий	
			Чувствительные	Резистентные
Ванкомицин	$\leq 0,019$	2,5	63 86,3±4,0%	10 13,7±4,0%
Линкомицин	0,312	$\geq 5,0$	36 49,3±5,9%	37 50,7±5,9%
Цефазолин	$\leq 0,019$	2,5	63 86,3±4,0%	5 6,8±2,9%
Цефотаксим	$\leq 0,019$	0,625	66 90,4±3,4%	5 6,8±2,9%
Бензилпенициллин	0,157	2,5	33 45,2±5,8%	40 54,8±5,8%
Гентамицин	0,390	$\geq 5,0$	59 80,8±4,6%	14 19,2±4,7%
Эритромицин	0,157	$\geq 5,0$	42 57,5±5,8%	21 28,8±5,2%
Рифампицин	0,078	2,5	33 45,2±5,8%	20 27,4±4,8%

стенности) между собой использовали пограничные концентрации МПК антибиотика, которые сравнивали с показателями NCCLS (Национальный комитет по клиническим лабораторным стандартам США), а также показателями EUCAST (Европейский комитет по тестированию антимикробной восприимчивости) для коринебактерий [7, 9].

При определении количества чувствительных к антибактериальным препаратам штаммов *S. non diphtheriae* из 73 исследованных установлено, что наиболее чувствительны (90,4±3,4% штаммов) они были к цефотаксиму, а также к ванкомицину и цефазолину (86,3±4,0%). Наименьшее количество штаммов *S. non diphtheriae* проявляли чувствительность к бензилпенициллину и рифампицину (45,2±5,8%), а также линкомицину (49,3±5,9%).

По результатам определения количества резистентных к указанным антибактериальным препаратам штаммов *S. non diphtheriae* выявили, что наиболее резистентны они были к бензилпенициллину и линкомицину (54,8±5,8% и 50,7±5,9% штаммов соответственно), а наименее — к цефотаксиму, цефазолину (6,8±2,9% штаммов) и ванкомицину (13,7±4,0% штаммов).

При исследовании расширенного спектра резистентности к антибактериальным препаратам различных видов *S. non diphtheriae* установили, что наибольшее количество резистентных штаммов обнаружено среди представителей вида *S. pseudotuberculosis* (100%), причем, среди них чаще штаммы *S. pseudotuberculosis* проявляли резистентность к двум (33,3±13,6%) антибиотикам. В то же время, среди штаммов *S. pseudotuberculosis* наблюдали резистентность к одному, трем (25,0±12,5%), реже — к четырем (16,7±10,8%) антибактериальным препаратам.

Среди других видов коринебактерий большое количество резистентных штаммов обнаружено у *S. xerosis* (96,0±3,9%), причем среди них была выявлена полиантибиотикорезистентность к трем (12,0±6,5%), четырем (28,0±9,0%) и пяти (12,0±6,5%) антибактериальным препаратам. Несколько меньшее количество резистентных штаммов было определено у *S. pseudodiphtheriticum* (81,0±8,6%), среди которых антибиотикорезистентность встречалась чаще к одному (38,1±10,6%), реже — к двум (24,0±9,3%) и трем (19,0±8,6%) антибактериальным препаратам. При исследовании 5 штаммов *S. amycolatum* была выявлена множественная антибиотикорезистентность к трем (1 штамм) и шести антибактериальным препаратам (1 штамм). Из 8 исследованных штаммов *S. striatum* полиантибиотикорезистентность к трем и четырем препаратам обнаружили у 4 и 1 штамма соответственно.

В целом, среди всех исследованных штаммов недифтерийных коринебактерий большинство оказались антибиотикорезистентными (89,0±3,7%), причем наиболее часто штаммы проявляли резистентность к одному и двум антибактериальным препаратам (24,7±5,0%), реже — к трем (20,5±4,7%), четырем (13,7±4,0%), пяти (4,1±2,3%) и шести (1,4±1,3%) препаратам. Подавляющее количество штаммов *S. non diphtheriae* (*S. pseudotuberculosis*, *S. xerosis*, *S. amycolatum* и *S. striatum*), у которых обнаружена полиантибиотикорезистентность, были выделены из урогенитального тракта.

Наибольшее количество штаммов недифтерийных коринебактерий были резистентны к бензилпенициллину, рифампицину и линкомицину. Интересным является тот факт, что при рассмотрении характера множественной резистентности штаммов *S. non diphtheriae* (к четырем, пяти и шести антибактериальным препаратам), обнаруживаемой в большинстве случаев к указанным антибактериальным препаратам, в единичных случаях встречали штаммы, резистентные не только к гентамицину и эритромицину, но и к цефотаксиму,

ванкомицину и цефазолину. Следует отметить, что из всех штаммов *S. pop diphtheriae* наибольшее количество полиантибиотикорезистентных штаммов определяли среди видов *S. xerosis*, *S. amycolatum* и *S. striatum*.

## ОБСУЖДЕНИЕ

На основании полученных данных (МПК<sub>50</sub>, МПК<sub>90</sub>, количество чувствительных и резистентных штаммов) было установлено, что наиболее эффективными антибактериальными препаратами в отношении штаммов недифтерийных коринебактерий явились цефотаксим, цефазолин и ванкомицин, наименее — бензилпенициллин и линкомицин.

Чувствительность к таким антибактериальным препаратам, как цефотаксим и цефазолин, у большинства штаммов коринебактерий можно объяснить, по-видимому, их повреждающим воздействием на клеточную мембрану и подавлением синтеза пептидогликанового слоя, сопровождающихся высвобождением аутолитических ферментов. Клеточная оболочка коринебактерий, имея сложное строение, включает в свой состав такие поверхностные белки, как PS-2, DIP1281, белок 67-72p (гемагглютинин), арабиногалактан, пептидогликан, корд-фактор, липоманнан и липоарабиноманнан, являющиеся факторами патогенности и обуславливающими процессы жизнедеятельности клетки [6]. Повреждающее воздействие цефотаксима и цефазолина на эти структуры влечет за собой их разрушение и лизис коринебактерий.

Наличие большого количества антибиотикорезистентных штаммов недифтерийных коринебактерий к таким препаратам как бензилпенициллин, рифампицин и линкомицин, вероятно, может быть обусловлено давностью и частотой их применения в медицинской практике, а также проведенной ранее антибиотикотерапией обследованных с различными заболеваниями, от которых эти штаммы выделяли. Поскольку антибактериальные препараты в проведенном исследовании были взяты из разных фармакологических групп, возможно наличие различной природы и механизмов резистентности к ним коринебактерий. По-видимому, к таким механизмам могут быть отнесены инактивация антибиотика за счет продукции бета-лактамаз и аминокликозидмодифицирующих ферментов; структурные изменения в молекулах, являющихся мишенями для антибиотика; активное выведение антибиотиков из микробной клетки (efflux pump — эффлюкс-эффект). При этом снижение проницаемости внешних структур бактериальной клетки является наименее специфичным механизмом устойчивости и обычно приводит к формированию устойчивости одновременно к нескольким разным группам антибиотиков.

Таким образом, полученные результаты по изучению антибиотикорезистентности у штаммов недифтерийных коринебактерий показали, что количество резистентных штаммов к одному и нескольким антибактериальным препаратам велико ( $89,0 \pm 3,7\%$ ) и неодинаково у разных видов. Наиболее часто резистентность к антибиотикам проявляли штаммы *S. pseudotuberculosis*, реже *S. xerosis*, *S. amycolatum* (5 из 5 штаммов) и *S. striatum* (7 из 8 штаммов), причем, все они были выделены из урогенитального тракта. В то же время, множественная резистентность штаммов разных видов также отличалась между собой. Так, из всех исследуемых видов коринебактерий наиболее полиантибиотикорезистентными оказались *S. xerosis* и *S. amycolatum*, у которых наблюдалась резистентность к пяти и шести антибиотикам. При этом чаще резистентность формировалась к бензилпенициллину, линкомицину и рифампицину, реже — к эритромицину и гентамицину. Большинство штаммов не-

дифтерийных коринебактерий были чувствительны и не проявляли резистентность к цефотаксиму, цефазолину и ванкомицину.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Краева Л.А., Манина Ж.Н., Ценева Г.Я. и др. Этиологическое значение *Corynebacterium non diphtheriae* у больных с различной патологией. Журн. микробиол. 2007, 5: 3-7.
2. Методические рекомендации 4.2.00.20-11 «Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Фенотипическая идентификация бактерий рода *Corynebacterium*». М., 2011.
3. Методические указания 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам». М., 2004.
4. Харсеева Г.Г., Воронина Н.А., Миронов А.Ю. и др. Антибиотикочувствительность штаммов *Corynebacterium non diphtheriae*, циркулирующих в г.Ростове-на-Дону и Ростовской области. Клиническая лабораторная диагностика. 2012, 10: 62-64.
5. Bernard K.A. The genus *Corynebacterium* and other medically relevant coryneform-like bacteria. J. Clin. Microbiol. 2012, 50 (10): 3152-3158.
6. Burkovski A. Cell envelope of *Corynebacteria*: structure and influence on pathogenicity. ISRN Microbiol. 2013, P. 1-11. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/935736>.
7. EUCAST Definitive document. Methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. Clin. Microbiol. Infect. 1998, 4: 291-296.
8. Funke, G., von Graevenitz A., Clarridge J.E. et al. Clinical microbiology of coryneform bacteria. Clin. Microbiol. Rev. 1997, 10 (1): 125-159.
9. NCCLS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; ninth informational supplement M100-S9. 1999, 19 (1).
10. Ortiz-Pérez A., de Hijas N.Z.M., Esteban J. et al. High frequency of macrolide resistance mechanisms in clinical isolates of *Corynebacterium* species. Microb. Drug. Resist. 2010, 16 (4): 273-277.
11. Reddy B.S., Chaudhury A., Kalawat U. et al. Isolation, speciation, and antibiogram of clinically relevant non-diphtherial *Corynebacteria* (Diphtheroids). Indian J. Med. Microbiol. 2012, 30 (1): 52-57.

Поступила 15.07.16

Контактная информация: Харсеева Галина Георгиевна, д.м.н., проф., 344022, Ростов-на-Дону, Нахичеванский пер., 29, р.т. (863)250-41-09

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

*Н.А.Селянская, С.В.Титова, С.Н.Головин, Л.А.Егуазарян, Л.М.Веркина, А.В.Тришина*

## ДЕЙСТВИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА БИОПЛЕНКИ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ ЭЛЬ ТОР

Ростовский-на-Дону противочумный институт

*Цель.* Изучение действия антибактериальных препаратов на биопленки холерных вибрионов Эль Тор. *Материалы и методы.* Определяли чувствительность *Vibrio cholerae* El Tor (6 штаммов) к различным концентрациям антибактериальных препаратов (доксисицилин, тетрацилин, левомицетин, рифампицин, гентамицин, цефтазидим) (МУК 4.2.2495-09). Для визуализации действия препаратов на биопленки использовали трансмиссионную электронную микроскопию. *Результаты.* Значения минимальных подавляющих концентраций антибактериальных препаратов в отношении биопленок увеличались в 5 — 100 раз по сравнению с планктонными культурами. При электронно-микроскопическом исследовании при действии антибактериальных препаратов на биопленки наблюдали некоторое сглаживание тяжелой между