

DOI: 10.31393/reports-vnmedical-2018-22(2)-29

УДК: 576.852.23+579.871.1.:615.334.:615.015.8

НОВИЙ ПІДХІД ДО ВИЗНАЧЕННЯ БАКТЕРИЦИДНОЇ АКТИВНОСТІ БЕНЗИЛПЕНІЦИЛІНУ ЩОДО *CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE*

Мотика О.І.¹, Слесарчук О.М.¹, Павлій Р.Б.¹, Капустяк К.Є.²¹Науково-дослідний інститут епідеміології та гігієни ЛНМУ ім. Данила Галицького (вул. Зелена, 12, м. Львів, Україна, 79005),²Інститут біології клітини НАН України (вул. Драгоманова, м. Львів, Україна, 879005)Відповідальний за листування:
e-mail: pavliy.rostislav@gmail.com

Статтю отримано 26 березня 2018 р.; прийнято до друку 30 квітня 2018 р.

Анотація. Відомості щодо бактерицидної активності бензилпеніциліну важливі при плануванні антибіотикотерапії ряду захворювань, спричинених *Corynebacterium diphtheriae* (ендокардити, бактеріємії, септицемії та ін.). Однак, методики визначення мінімальної бактерицидної концентрації (МБК) антибіотиків є складними. Метою дослідження була розробка методики оцінки рівня чутливості збудника дифтерії до бактерицидної дії пеніциліну, яка не потребує визначення МБК. Було визначено мінімальну інгібуючу концентрацію (МІК) та МБК пеніциліну у 80 штамів *C. diphtheriae* за допомогою стандартного методу серійних розведень у бульйоні (макрометод). МІК реєстрували через 24 та 48 год. росту. На першу добу росту МІК пеніциліну знаходились у межах від 0,017 до 0,5 мг/л, на другу - у межах від 0,035 до 0,5 мг/л. Зростання МІК на другу добу інкубації реєстрували у 47, 5±5,6% штамів. МІК50 та МІК90 як після 24 год, так і після 48 год росту становили 0,13 та 0,25 мг/л, відповідно. МБК пеніциліну знаходились в діапазоні від 0,5 до 32,0 мг/л, МБК50 становила 4,0 мг/л, МБК90 - 8,0 мг/л. У 35,0±5,3% досліджуваних штамів виявлено високі МБК (8,0 мг/л або вище). Встановлено, що у *C. diphtheriae* взаємозв'язок між МІК та МБК пеніциліну чітко виражений, якщо брати до уваги два значення МІК - на першу та на другу добу росту. Досліджувані штами розділись на умовні групи: 1) з МІК < 0,13 мг/л та переважно з низькими МБК; 2) з МІК 0,25 мг/л, у більшості не чутливі до бактерицидної дії та 3) штами з МІК 0,5 мг/л та високими МБК. Найсильніше вираженими були відмінності у поширеності коринебактерій з високими МБК при зіставленні штамів, МІК яких після 24 та 48 год. не перевищували 0,13 мг/л та тих, у яких МІК вже на першу добу інкубації були > 0,25 мг/л (коефіцієнт Стьюдента $t=4,13$, $p<0,001$). Одержані результати можуть бути використані для удосконалення методик визначення антибіотикочутливості коринебактерій.

Ключові слова: антибіотики, бактерицидна активність, пеніцилін, *Corynebacterium diphtheriae*.

Вступ

Захворювання, викликані *Corynebacterium diphtheriae*, часто перебігають у формі ендокардитів, бактеріємії, септицемії [3-5, 7, 9, 10]. У цих випадках для планування антибіотикотерапії важливими можуть бути дані щодо бактерицидної активності антибіотиків (зокрема, бензилпеніциліну) [2, 3, 8]. Однак, дослідження антибіотикочутливості патогенних бактерій в більшості випадків обмежується визначенням бактеріостатичної дії антибактеріальних препаратів. Мінімальна бактерицидна концентрація (МБК) рідко визначається в практичних лабораторіях через складність методик. Проблема ускладнюється тим, що для більшості мікроорганізмів не виявлено відповідності між значеннями МБК та мінімальної інгібуючої концентрації (МІК). У ході попередніх досліджень нами було виявлено, що у *C. diphtheriae* існує певний кореляційний зв'язок між значеннями МІК та МБК пеніциліну [1].

Метою роботи була розробка методики оцінки рівня чутливості *C. diphtheriae* до бактерицидної дії пеніциліну, яка не потребує визначення МБК.

Матеріали та методи

Об'єктами дослідження були 80 штамів *C. diphtheriae* (біоварів *gravis*, *mitis* та *belfanti*, токсигенних та нетоксигенних); 3 з них - еталонні (NCTC10648, NCTC03984, NCTC10356), 67 виділені від хворих на дифтерію та носіїв

за період з 1986 до 2004 р. (культури з колекції, яка зберігається в НДІЕГ ЛНМУ ім. Данила Галицького). Для контролю активності бензилпеніциліну використовували *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Культивування коринебактерій проводили на поживному агарі з додаванням 5% донорської крові (кров'яний агар, КА), у поживному бульйоні з 20% кінської сироватки (сироватковий бульйон, СБ), виготовлених із сухих основ виробництва МЕРСК (Німеччина) або HIMEDIA (Індія). Використовували натрієву сіль бензилпеніциліну виробництва ВАР "Київмедпрепарат" (м. Київ, Україна).

Чутливість *C. diphtheriae* до пеніциліну визначали за допомогою стандартного методу двократних серійних розведень у СБ [7] (мікрометод) з дотриманням наступних умов: ряд розведень пеніциліну в СБ - від 128,0 до 0,0035 мг/л; загальний об'єм середовища 4 мл, посівна доза приблизно 10⁶ бактеріальних клітин/мл; інкубацію посівів проводили при 37 С без перемішування. МІК реєстрували через 24 та 48 год. Для визначення МБК пеніциліну проводили дозовані висіви на КА культуральної рідини з усіх пробірок, у яких не спостерігали росту через 24 год., з наступним підрахунком колоній після 24, 48 та 72 год. культивування. За МБК вважали найнижчу концентрацію антибіотика, яка протягом 24 год. викликала загибель не менше 99,9% коринебактерій.

Величину біомаси коринебактерій в СБ визначали колориметрично (при довжині хвилі 360 нм).

Статистичну обробку одержаних результатів проводили за загальноприйнятими методиками. Нормальність розподілів даних перевіряли методом "χ-квадрат"; МІК₅₀, МІК₉₀, МБК₅₀ та МБК₉₀ визначали методом кумуляції та інтерполяції.

Результати. Обговорення

Значення показника бактериостатичної активності пеніциліну (МІК) на першу добу інкубації знаходились в межах від 0,017 до 0,5 мг/л. У версії документів Європейського комітету клінічних лабораторних стандартів (European Committee of antimicrobial susceptibility testing, EUCAST), прийнятій у 2018 р., на відміну від попередніх версій, при тестуванні антибіотикочутливості коринебактерій рекомендується в окремих випадках реєструвати МІК антибіотиків двічі [7]. Перший раз - після 16-24 год. інкубації, а у випадку "недостатнього росту" - після 40-44 год.; при цьому не уточнено, який саме ріст коринебактерій слід вважати "недостатнім". Усі штами збудника дифтерії, використані в даному дослідженні, на першу добу інкубації характеризувались помірним або досить інтенсивним ростом в СБ (від 0,3 до 7,0 одиниць оптичної густини). Однак, у 47,5±5,6% культур після 48 год інкубації спостерігали зростання МІК у два-чотири рази. Межі значень МІК на другу добу становили 0,035-0,5 мг/л. Більш ніж вдвічі (з 23,8 до 48,8%) зростає кількість штамів, МІК пеніциліну яких перевищили 0,13 мг/л. Згідно чинних оціночних таблиць EUCAST, дане значення МІК розглядається як критична точка чутливості коринебактерій до пеніциліну [7]. При цьому, на другу добу інкубації незмінними залишились значення МІК₅₀ та МІК₉₀, які становили 0,13 та 0,25 мг/л, відповідно.

МБК пеніциліну знаходились в діапазоні від 0,5 до 32,0 мг/л, МБК₅₀ становила 4,0 мг/л, МБК₉₀ - 8,0 мг/л. У 35,0±5,3% досліджуваних штамів МБК становили 8,0 мг/л або вище, що в декілька разів перевищує граничні значення терапевтичних концентрацій пеніциліну в сироватці крові людини при застосуванні стандартних схем антибіотикотерапії.

Встановлено, що взаємозв'язок між величинами МІК та МБК пеніциліну був досить чітко виражений, якщо брати до уваги два значення МІК - зареєстровані на першу та на другу доби інкубації антибіотикограм (табл. 1).

Таблиця 1. Взаємозв'язок між величинами МІК та МБК пеніциліну у *C. diphtheriae* при визначенні МІК через 24 та 48 год. інкубації.

Характеристика чутливості до бактериостатичної дії пеніциліну	Межі значень МБК, мг/л	СГ-МБК, мг/л	Питома вага (%) штамів з МБК > 8,0 мг/л (M+m)
МІК через 48 год. <0,07 мг/л	0,5-8,0	1,32	6,7±6,7
МІК через 48 год. < 0,13 мг/л	0,5-16,0	1,97	17,2±5,8
МІК через 24 год. <0,13 мг/л через 48 год. >0,25 мг/л	2,0-16,0	5,76	47,4±11,8
МІК через 24 год. >0,25 мг/л	4,0-32,0	8,61	68,4±10,0
МІК через 24 год. 0,5 мг/л	8,0-32,0	18,0	100,0

При групуванні штамів за значеннями МІК відразу привертає увагу те, що у *C. diphtheriae* високі (8,0 мг/л або вище) МБК частіше асоціювались з МІК >0,25 та 0,5 мг/л, ніж з МІК <0,13 мг/л. Така особливість збудника дифтерії дуже чітко простежується при співставленні середньгеометричної МБК (СГ-МБК) для штамів з різним рівнем чутливості до бактериостатичної дії.

Очевидними були відмінності у поширеності коринебактерій з високими МБК в групах штамів, МІК яких на першу та другу добу не перевищували межу чутливості 0,13 мг/л, та тих, у яких МІК на першу добу інкубації були >0,25 мг/л (коефіцієнт Ст'юдента $t=4,13$, $p<0,001$).

Штами, у яких МІК на другу добу не перевищувала 0,13 мг/л, та штами, у яких МІК на першу добу були <0,13 мг/л, а на другу зросли до >0,25 мг/л, також помітно відрізнялись за чутливістю до бактерицидної активності пеніциліну ($t=2,31$, $p<0,05$).

Спостерігалась також певна різниця у поширеності коринебактерій з високими МБК між штамами, у яких МІК перевищила межу чутливості на другу добу, і штамами, МІК яких була >0,25 мг/л вже після 24 год. інкубації ($t=1,41$, $p=0,2$).

Штами *C. diphtheriae* з МІК пеніциліну 0,5 мг/л заслуговують окремого обговорення. Дана група, хоч і становила менше 10% вибірки, однак, характеризувалася високою стійкістю і до бактерицидної дії антибіотика. Серед них не виявлено культур з МБК менше 8,0 мг/л, натомість присутні культури з МБК 32,0 мг/л.

Отже, встановлено, що при продовженні терміну інкубації антибіотикограм *C. diphtheriae* до 48 год. збільшилась імовірність виявлення штамів, які поєднували знижену чутливість до бактериостатичної дії пеніциліну та високі МБК. Таким чином, при визначенні чутливості *C. diphtheriae* до пеніциліну методом розведення в бульйоні реєстрацію МІК доцільно проводити після 24 год інкубації для виявлення штамів зі зниженою чутливістю та, повторно, через 48 год. інкубації - для остаточної реєстрації результатів.

Висновки та перспективи подальших розробок

1. При тестуванні чутливості *C. diphtheriae* до пеніциліну методом розведення в бульйоні МІК доцільно реєструвати двічі - на першу та другу добу інкубації,

незалежно від інтенсивності росту досліджуваного ізоляту.

2. Значення МІК можна використати для приблизної оцінки чутливості *C. diphtheriae* до бактерицидної дії пеніциліну, розділивши штами на умовні групи: 1) з МІК <0,13 мг/л та в основному з низькими МБК; 2) з МІК 0,25 мг/л, у більшості не чутливі до бактерицидної дії

та 3) штами з МІК 0,5 мг/л та високими МБК.

У подальшому доцільно удосконалити техніку визначення чутливості збудника дифтерії до бактерицидної активності бензилпеніциліну, а також дослідити можливість тестування активності інших антибіотиків з бактерицидним типом дії, для можливого включення методик в рекомендації для практичних лабораторій.

Список посилань

1. Гладка, О. А. & Мотика, О. І. (2011). Оцінка антибактеріальної активності бензилпеніциліну щодо *Corynebacterium diphtheriae*. *Вісник проблем біології та медицини*, 3(2), 167-172.
2. Brauner, A., Shores, N., Fridman, O. & Balaban, N. O. (2017). An experimental framework for quantifying bacterial tolerance. *Biophys. J.*, 112 (12), 2664-2671. doi: 10.1016/j.bpj.2017.05.014.
3. Patris, V., Argiriou, O., Konstantinou, C., Lama, N., Georgiou, H., Katsanevakis, E. & Charitos, C. (2014). *Corynebacterium diphtheriae* endocarditis with multifocal septic emboli: can prompt diagnosis help avoid surgery? *Am. J. Case Rep.*, 15, 352-254. doi: 10.12659/AJCR.890855.
4. Muttaiyah, S., Best, E. J., Freeman, J. T., Taylor, S. L., Morris, A. J. & Roberts, S. A. (2011). *Corynebacterium diphtheriae* endocarditis: a case series and review of the treatment approach. *Int. J. Infect. Dis.*, 15 (9), 584-588. doi: 10.1016/j.ijid.2011.04.003.
5. Wagner, K. S., White, J. M., Lucenko, I., Mercer, D., Crowcroft, N. S., Neal, Sh. & Efstratiou, A. (2012). Diphtheria in the postepidemic period, Europe, 2000-2009. *Emerg. Infect. Dis.*, 18 (2), 217-225. doi: 10.3201/eid1802.110987.
6. Romney, M. G., Roscoe, D. L., Bernard, K., Lai, S., Efstratiou, A. & Clarke, A. M. (2006). Emergence of a invasive clone of nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* in the urban poor population of Vancouver, Canada. *J. Clin. Microbiol.*, 44 (5), 1625-1629. DOI: 10.1128/JCM.44.5.1625-1629.2006.
7. EUCAST Breakpoints Tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 8.0, valid from 2018-01-01. Retrieved from http://www.eucast.org/clinical_breakpoints.
8. Grandiere-Perez, L., Jacqueline, C., Le Mabecque, V., Patey, O., Potel, G., Bugnon, D. & Caillon, J. (2002). In vitro activity of amoxycillin in non-toxicogenic *Corynebacterium diphtheriae* rabbit endocarditis experimental model. *Pathol. Biol.*, 50 (9), 513-515.
9. Zakikhany, K. & Efstratiou, A. (2012). Diphtheria in Europe: current problems and new challenges. *Future Microbiol.*, 7, 595-607. doi: 10.2217/fmb.12.24.
10. Zasada, A. A. (2015). *Corynebacterium diphtheriae* infections currently and in the past. *Przegl Epidemiol.*, 69 (3), 439-444. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26519837>.
11. Muttaiyah, S., Best, E. J., Freeman, J. T., Taylor, S. L., Morris, A. J. & Roberts, S. A. (2011). *Corynebacterium diphtheriae* endocarditis: a case series and review of the treatment approach. *Int. J. Infect. Dis.*, 15 (9), 584-588. doi: 10.1016/j.ijid.2011.04.003.
12. Wagner, K. S., White, J. M., Lucenko, I., Mercer, D., Crowcroft, N. S., Neal, Sh. & Efstratiou, A. (2012). Diphtheria in the postepidemic period, Europe, 2000-2009. *Emerg. Infect. Dis.*, 18 (2), 217-225. doi: 10.3201/eid1802.110987.
13. Romney, M. G., Roscoe, D. L., Bernard, K., Lai, S., Efstratiou, A. & Clarke, A. M. (2006). Emergence of a invasive clone of nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* in the urban poor population of Vancouver, Canada. *J. Clin. Microbiol.*, 44 (5), 1625-1629. DOI: 10.1128/JCM.44.5.1625-1629.2006.
14. EUCAST Breakpoints Tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 8.0, valid from 2018-01-01. Retrieved from http://www.eucast.org/clinical_breakpoints.
15. Grandiere-Perez, L., Jacqueline, C., Le Mabecque, V., Patey, O., Potel, G., Bugnon, D. & Caillon, J. (2002). In vitro activity of amoxycillin in non-toxicogenic *Corynebacterium diphtheriae* rabbit endocarditis experimental model. *Pathol. Biol.*, 50 (9), 513-515.
16. Zakikhany, K. & Efstratiou, A. (2012). Diphtheria in Europe: current problems and new challenges. *Future Microbiol.*, 7, 595-607. doi: 10.2217/fmb.12.24.
17. Zasada, A. A. (2015). *Corynebacterium diphtheriae* infections currently and in the past. *Przegl Epidemiol.*, 69 (3), 439-444. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26519837>.

Referenses

1. Hladka, O. A. & Motyka, O. I. (2011). Otsinka antybakterialnoi

Мотыка Е.И., Слесарчук О.Н., Павлий Р.Б., Капустяк К.Е.

НОВЫЙ ПОДХОД К ОПРЕДЕЛЕНИЮ БАКТЕРИЦИДНОЙ АКТИВНОСТИ БЕНЗИЛПЕНИЦИЛЛИНА ОТНОСИТЕЛЬНО *CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE*

Аннотация. Данные о бактерицидной активности бензилпенициллина важны при планировании антибиотикотерапии ряда заболеваний, вызванных *Corynebacterium diphtheriae* (эндокардиты, бактериемии, септицемии и др.). Однако, методики определения минимальной бактерицидной концентрации (МБК) антибиотиков сложны. Целью исследования была разработка методики оценки уровня чувствительности возбудителя дифтерии к бактерицидному действию пенициллина, которая не требует определения МБК. Были определены минимальная ингибирующая концентрация (МИК) и МБК пенициллина у 80 штаммов *C. diphtheriae* с помощью стандартного метода серийных разведений в бульоне (макрометод). МИК регистрировали через 24 та 48 часов роста. В первые сутки роста МИК пенициллина находились в границах от 0,017 до 0,5 мг/л, во вторые - в границах от 0,035 до 0,5 мг/л. Возрастание МИК на вторые сутки инкубации зарегистрировано у 47,5±5,6% штаммов. МИК50 и МИК90 как после 24 часов, так и после 48 часов роста составляли 0,13 та 0,25 мг/л, соответственно.

МБК пенициллина находились в диапазоне от 0,5 до 32,0 мг/л, МБК50 составляла 4,0 мг/л, МБК90 - 8,0 мг/л. У 35,0±5,3% исследованных штаммов выявлено высокие МБК (8,0 мг/л или выше). Установлено, что у *C. diphtheriae* взаимосвязь между МИК и МБК пенициллина четко выражена, если принимать во внимание два значения МИК - в первые и во вторые сутки роста. Исследованные штаммы разделились на три условные группы: 1) с МИК < 0,13 мг/л и преимущественно с низкими МБК; 2) с МИК 0,25 мг/л, в большинстве не чувствительные к бактерицидному действию антибиотика и 3) штаммы с МИК 0,5 мг/л и высокими МБК. Наиболее сильно выраженными были различия в распространенности коринебактерий с высокими МБК при сравнении штаммов, МИК которых после 24 и 48 часов не превышали 0,13 мг/л, и тех, у которых МИК уже в первые сутки инкубации были >0,25 мг/л (коэффициент Стьюдента $t=4,13$, $p<0,001$). Полученные результаты могут быть использованы для усовершенствования методик определения антибиотикочувствительности коринебактерий.

Ключевые слова: антибиотики, бактерицидная активность, пенициллин, *Corynebacterium diphtheriae*.

Motyka O.I., Slesarchuk O.M., Pavlii R.B., Kapustiak K.E.

A NEW APPROACH TO DETERMINATION OF BACTERICIDAL ACTIVITY OF BENZYL PENICILLIN ON CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE

Annotation. Information on the bactericidal activity of benzylpenicillin is important when planning antibiotic therapy for a number of diseases caused by *Corynebacterium diphtheriae* (endocarditis, bacteremia, septicemia, etc.). However, methods for determining the minimum bactericidal concentration (MBC) of antibiotics are complicated. The aim of the study was to develop a method for testing of diphtheria causative agent susceptibility to the bactericidal action of penicillin without MBC determination. The minimum inhibitory concentrations (MICs) and MBCs in 80 strains of *C. diphtheriae* were determined using the standard broth dilution method (macromethod). The MICs were registered after 24 and 48 years of growth. After the first day of growth the MIC of penicillin was in the range of 0.017 to 0.5 mg / L, after second day - in the range of 0.035 to 0.5 mg / liter. The increase of the MICs for the second day of growth was observed in 47.5±5.6% of strains. MIC50 and MIC90 both after 24 hours and after 48 hours of growth were 0.13 and 0.25 mg/L, respectively. MBCs of penicillin was in the range of 0.5 to 32.0 mg/L, MBC50 was 4.0 mg/l, MBC90 - 8.0 mg/l. In 35,0±5,3% of the studied strains, high MBCs (8.0 mg / l or higher) was detected. It has been established that in *C. diphtheriae* the relationship between the MIC and the MBC of penicillin is clearly expressed, taking into account the two values of the MIC - for the first and second day of growth. Investigated strains are divided into three conditional groups: 1) with MIC 0.13 mg/L and basically with low MBCs; 2) with MIC 0.25 mg/L, in most cases are not susceptible to bactericidal action, and 3) strains with MIC 0.5 mg/L and high MBCs. The most pronounced were differences in the prevalence of corynebacteria with high MBCs in two groups of strains: MICs which did not exceed 0.13 mg/L after 24 and 48 hours, and those in whom the MIC was 0.25 mg/L or higher already on the first day of incubation (Student's coefficient $t=4.13$, $p<0.001$). The obtained results can be used to improve the methods for determining of corynebacteria susceptibility to antimicrobials.

Key words: antimicrobials, bactericidal action, penicillin, *Corynebacterium diphtheriae*.
