

© Гладка О.А., Мотика О.І., 2005
УДК 576.852.23+579.871.1:615.334:615.015.8

О.А. Гладка, О.І. Мотика

ТОЛЕРАНТНІСТЬ ДО БЕНЗИЛПЕНІЦИЛІНУ *С. KYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE*

Львівський НДІ епідеміології та гігієни

Досліджено чутливість до бензилпеніциліну 47 штамів *S. diphtheriae*, виділених у Львівській області у 1986-2004 рр., за допомогою методу розведень у живильному бульйоні з визначенням мінімальної пригнічуючої та мінімальної бактерицидної концентрацій (МПК і МБК) і методу паперових дисків. Всі штами були чутливі до пеніциліну за результатами традиційних для практики методів: зони затримки росту становили 20-30 мм, МПК – 0,035-0,5 мкг/мл. МБК пеніциліну перебувала в межах 0,07-16,0 мкг/мл. У 20 – (42,6±7,3) % – штамів співвідношення МБК/МПК складало ≥ 32 , що дозволило вважати їх толерантними до пеніциліну. Достовірної різниці в кількості пеніцилін-толерантних культур серед штамів різних біоварів і серед токсигенних й нетоксигенних штамів не виявлено. Близько половини – (46,8±7,3) % – штамів *S. diphtheriae* характеризувались високими МБК пеніциліну (≥ 4 мкг/мл). Отримані в ході роботи результати свідчать про необхідність зваженого ставлення до пеніциліну як препарату вибору при дифтерійній інфекції.

Впродовж десятиліть використанню антибіотиків при дифтерії не приділялось належної уваги, оскільки основним засобом лікування була антитоксична протидифтерійна сироватка. Показаннями до застосування антибіотиків вважались лише тяжкі форми хвороби, ускладнені вторинною бактерійною інфекцією [1], навіть була поставлена під сумнів сама доцільність їх використання в схемі лікування дифтерії [2]. При носійстві *S. diphtheriae* антибіотикотерапія рекомендувалась тільки після повторного висіву токсигенної форми збудника, а при нетоксигенному носійстві – лише у випадку супутніх захворювань [1].

Нині ставлення до ролі антибіотиків у лікуванні дифтерійної інфекції суттєво змінилось. Показана висока ефективність цих препаратів при лікуванні хворих, необхідність застосування антибіотиків при всіх клінічних формах дифтерії чітко визна-

чена і більше не викликає сумніву [3-6]. З 1995 р. такі антибіотики, як еритроміцин та бензатинпеніцилін, рекомендовано ВООЗ для застосування з превентивною метою щодо контактних осіб в осередках дифтерії в якості препаратів вибору [7]. При цьому підкреслювалось, що пеніциліну слід віддавати перевагу, оскільки введення цього препарату можна обмежити одноразовою ін'єкцією, а також через його високу активність до *S. diphtheriae in vitro*.

Однак широке використання антибіотиків у медичній практиці має зворотний бік – появу та розповсюдження антибіотикорезистентності. На даний час стійкі до пеніциліну штами поширились у популяціях багатьох видів патогенних бактерій – стафілококів, стрептококів, гонококів, окремих видів недифтерійних коринебактерій. Багаторічні дослідження антибіотикочутливості *S. diphtheriae*, проведені у різних регіонах світу, демонстрували відсутність резистентних до пеніциліну штамів. Водночас повідомлено про значний відсоток випадків неуспішного застосування цього антибіотика при носійстві збудника дифтерії (за даними різних авторів – до 16,0-31,3 % [8, 9]) та неефективного лікування хворих [5, 10].

Однією з причин невідповідності між активністю пеніциліну до коринебактерій дифтерії *in vivo* та *in vitro* може бути наявність у популяції толерантних до цього антибіотика штамів, відносно яких пеніцилін не має бактерицидного ефекту. Толерантні штами характеризуються великою різницею у величинах МПК і МБК. Звичайно вважається, що бактерії толерантні до β -лактамних антибіотиків, якщо співвідношення МБК/МПК становить >32 [11-16]. При цьому толерантні штами переважно залишаються чутливими до пеніциліну при тестуванні за допомогою методів, які традиційно використовуються на практиці для визначення антибіотикочутливості, а саме, при вивченні антибіотикограм методом паперових дисків і методом розведень у бульйоні чи агарі з визначенням МПК.

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Феномен толерантності до пеніцилінів вивчається протягом приблизно 30 років у різних груп патогенних бактерій, в основному грампозитивних коків (стафілококів, стрептококів) [11, 13, 14]. Стосовно коринебактерій ця проблема практично не висвітлена. Лише в останні роки в літературі з'явилися повідомлення про виявлення значної кількості (понад 60 %) толерантних до пеніциліну штамів серед нетоксигенних *C. diphtheriae*, виділених в Італії та Великобританії в 1994-2001 рр. [12, 16].

Метою роботи було визначення толерантності до пеніциліну *C. diphtheriae*, виділених у Львівській області на різних етапах епідемічного процесу дифтерії.

Матеріали і методи

Досліджено чутливість до пеніциліну 47 токсигенних і нетоксигенних штамів *C. diphtheriae* (з них 20 біовару *gravis*, 26 біовару *mitis*, 1 біовару *belfanti*), виділених у Львівській області в 1986-2004 рр.

Перед постановкою дослідів *C. diphtheriae* культивували на живильному агарі з 5 % крові (КА) протягом 18 год. Оптичну густину бактерійних суспензій вимірювали на ФЕК-М (зелений світлофільтр, кювета 3 мм) і за стандартом мутності на 5 од.

МПК бензилпеніциліну визначали методом серійних дворазових макророзведень [17] у живильному бульйоні (ПБ) з 20 % сироватки великої рогатої худоби. Пробірки засівали суспензією коринебактерій з розрахунку 10^6 клітин/мл середовища та інкубували при 37 °С у статичних умовах. МПК визначали після 48 год інкубації. Для визначення МБК матеріал висівали на щільне середовище (КА) по 0,05 мл зразка з кожної пробірки, в яких через 24 год не було видимого росту коринебактерій, з подальшим підрахунком колоній через 48-72 год. За МБК вважали найнижчу концентрацію, яка викликала загибель не менше 99,9 % бактерій. Толерантними до пеніциліну вважали культури, в яких співвідношення МБК/МПК було ≥ 32 [12, 16].

Паралельно з методом розведень для визначення чутливості *C. diphtheriae* до пеніциліну застосовували метод дифузії в агарі на середовищі АГВ з використанням стандартних паперових дисків згідно із загальноприйнятою методикою [18].

Результати досліджень та їх обговорення

Дослідження чутливості *C. diphtheriae* до бензилпеніциліну за допомогою методу паперових дисків показало, що зони затримки росту перебували в межах 20-30 мм. У більшості штамів (72,3 %) зони затримки росту становили 20-25 мм. Межі значень МПК пеніциліну дорівнювали 0,035-

0,5 мкг/мл. Обчислено МПК пеніциліну для 50 та 90 % досліджених штамів; МПК₅₀ дорівнювала 0,13, МПК₉₀ – 0,25 мкг/мл. Таким чином, всі досліджені штами *C. diphtheriae* були чутливими до пеніциліну за результатами традиційних для практики методів згідно з чинними в Україні критеріями оцінки.

При дослідженні бактерицидної активності пеніциліну щодо *C. diphtheriae* (за допомогою дозованого висіву на кров'яний агар) встановлено, що МБК коливались у досить широких межах – від 0,07 до 16 мкг/мл; МБК₅₀ складала 2,0 мкг/мл, МБК₉₀ – 4,0 мкг/мл. Виявлено, що у 20 штамів (42,6±7,3 %) співвідношення МБК/МПК було >32 , що дозволило вважати ці штами толерантними до пеніциліну.

При порівнянні основних показників чутливості до пеніциліну (зон затримки росту та МПК) толерантних і чутливих коринебактерій на перший погляд складалось враження, що ці показники нижчі у толерантних штамів. Зони затримки росту >28 мм реєстрували у толерантних культур частіше, ніж у чутливих (15,0 та 3,7 % штамів відповідно). Штамів з МПК $<0,13$ мкг/мл також було більше серед толерантних, ніж серед чутливих – 65,0 та 51,9 % відповідно. Однак така різниця виявилась статистично недостовірною. Таким чином, при визначенні чутливості *C. diphtheriae* до пеніциліну лише за традиційними для практики методами, без вимірювання МБК (яке звичайно не проводиться через досить складну техніку постановки тесту), виявлення толерантності неможливе.

Досліджено поширеність толерантних до пеніциліну культур серед *C. diphtheriae* різних біоварів, а також серед токсигенних і нетоксигенних штамів (табл. 1). Відсоток толерантних культур був дещо вищим серед токсигенних штамів, ніж серед нетоксигенних; толерантні штами частіше належали до біовару *gravis*, ніж *mitis*. Ці результати наводять на думку, що толерантність частіше притаманна дифтерійним коринебактеріям з більшими патогенними властивостями, однак достовірного підтвердження цього не було отримано. Слід відзначити, що раніше толерантність вивчалась лише у нетоксигенних *C. diphtheriae* [12, 16].

Порівняння чутливості до пеніциліну *C. diphtheriae*, виділених на різних етапах епідемічного процесу дифтерії, показало можливе зростання кількості толерантних штамів в останні роки (табл. 2). Водночас виявлення толерантності у штамів, виділених більше 15 років тому, вказує, що толерантність є не новим типом резистентності

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Таблиця 1
Поширеність толерантних до пеніциліну
C. diphtheriae серед штамів з різними
біологічними властивостями

Частка толерантних <i>C. diphtheriae</i> серед штамів, (M±m) %				
біовару <i>gravis</i> (n=20)	біовару <i>mitis</i> (n=26)	біовару <i>belfanti</i> (n=1)	токси- генних* (n=16)	нетокси- генних (n=31)
50,0±11,5	38,5±9,7	–	56,3±12,4	35,5±7,0

Примітка: * – токсигенність *C. diphtheriae* визначали в реакції дифузної преципітації в агарі на середовищі ВТДМ (Елек-тест).

C. diphtheriae. Отримані нами дані про наявність пеніцилінтолерантності у «старих» штамів схожі з результатами досліджень, виконаних з використанням колекцій *Staphylococcus aureus*, виділених у 50-х та 80-х роках минулого століття [13].

Таблиця 2
Кількість толерантних до пеніциліну
C. diphtheriae серед штамів, виділених на різних
етапах епідемічного процесу дифтерії

Роки виділення	Кількість досліджених штамів	Частка толерантних до пеніциліну штамів, (M±m) %
1986-1989	7	28,6±6,6
1992-1998	24	41,7±7,2
1999-2004	16	50,0±7,3
Всього	47	42,6±7,2

Щодо клінічного значення антибіотикотолерантності збудників інфекцій, поки що немає єдиної думки. Цей тип резистентності в 1977 р. був описаний у золотистих стафілококів, виділених від пацієнтів, які погано піддавались терапії антибіотиками [11]. З того часу опубліковано немало робіт, присвячених цій проблемі. Дослідники вважали толерантність причиною неуспішного лікування бактерійних інфекцій [14, 15], в інших взаємозв'язок між толерантністю та ефективністю антибіотикотерапії не доведений [13]. На сьогодні в

літературі описано спроби виявити подібний взаємозв'язок для *C. diphtheriae*, у тому числі дослідження, проведене на експериментальній моделі ендокардиту кроля [12, 19]. Чіткої залежності результату терапії пеніциліном від наявності толерантності у *C. diphtheriae* встановлено не було.

Недостатній прояв клінічної ефективності бензилпеніциліну щодо *C. diphtheriae* може залежати від величини МБК, особливо якщо вона перевищує рівень антибіотика в крові. Відомо, що терапевтичні концентрації пеніциліну в крові людини при застосуванні середніх доз становлять 0,5-2,0 ОД/мл (приблизно 0,2-1,2 мкг/мл) [17]. Серед досліджених нами штамів *C. diphtheriae* майже половина (46,8±7,3 %) характеризувалась МБК пеніциліну, які значно перевищували верхню межу його терапевтичної концентрації, дорівнюючи 4,0 мкг/мл і вище (табл. 3). Зрозуміло, що штами з високими МБК в більшості випадків були пеніцилінтолерантними, однак 27,3 % з них мали співвідношення МБК/МПК нижче 32, тобто вважались чутливими. Виникає питання, чи застосування звичайних доз антибіотика зможе забезпечити достатню бактерицидну активність щодо таких штамів – а отже, про те, чи дійсно вони чутливі до пеніциліну.

Слід відзначити високу частку (36,7 %) культур з МБК 8,0 та 16,0 мкг/мл серед коринебактерій, виділених у 1996-2004 рр., в той час як серед штамів, виділених до 1995 р. включно, їх було лише 5,9 %. МБК 16,0 мкг/мл були зареєстровані лише у штамів, виділених у 2000-2004 рр. Це може вказувати на загальне зниження рівня чутливості до пеніциліну популяції збудника дифтерії протягом останнього десятиліття.

На сьогодні досліджень, присвячених бактерицидній активності пеніциліну до *C. diphtheriae*, дуже мало. У доступній літературі ми виявили лише дві роботи, в яких наведені МБК пеніциліну коринебактерій дифтерії [9, 12]. У першій з них МБК пеніциліну було визначено у 121 штаму *C. diphtheriae*, виділених від бактеріоносіїв під час спалаху дифтерії в США в 1970-1971 рр. Ці значення були невисокі – від 0,01 до 1,0 мкг/мл; при цьому

Таблиця 3
Значення МБК пеніциліну у *C. diphtheriae*, чутливих і толерантних до цього антибіотика

Штами	Кількість штамів з МБК пеніциліну, мкг/мл											
	<1,0		1,0		2,0		4,0		8,0		16,0	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Чутливі (n=27)	13	48,2	4	14,8	4	14,8	5	18,5	1	3,7	-	-
Толерантні (n=20)	-	-	-	-	4	20,0	5	25,0	8	40,0	3	15,0
Всього (n=47)	13	27,7	4	8,5	8	17,0	10	21,3	9	19,1	3	6,4

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

повідомлено про неуспішність лікування носіїв бензилпеніциліном у 16 % випадків. У другій роботі представлені МБК пеніциліну 24 штамів, виділених у пізніші роки (1995-1996 рр.) у Великобританії від хворих на фарингіт. Культури характеризувались значно вищими МБК – від 0,125 до 16,0 мкг/мл; близько половини штамів мали МБК $\geq 4,0$ мкг/мл. Результати цієї роботи та нашого дослідження практично збігаються, за винятком того, що в названій роботі всі штами з високими МБК були віднесені авторами до толерантних.

Таким чином, отримані результати та дані літератури наводять на думку, що МБК є необхідним показником для характеристики чутливості коринебактерій дифтерії до пеніциліну, критерії оцінки якого ще належить встановити в ході розширеного клініко-лабораторного дослідження. Значна поширеність пеніцилінтолерантних штамів *C. diphtheriae*, тенденція до зниження рівня чутливості до пеніциліну свідчить про необхідність зваженого ставлення до цього антибіотика при використанні його в якості препарату вибору при дифтерійній інфекції.

Висновки

1. Встановлено, що серед штамів *C. diphtheriae*, які вважались чутливими до бензилпеніциліну за традиційними для практики методами (паперових дисків і розведень з визначенням МПК), $(42,6 \pm 7,3)$ % виявились толерантними до цього антибіотика.

2. Толерантність до пеніциліну була притаманна штамам, виділеним на різних етапах епідемічного процесу дифтерії, в тому числі більше 15 років тому.

3. Встановлено, що у $(46,8 \pm 7,3)$ % досліджених штамів МБК пеніциліну були $\geq 4,0$ мкг/мл, що значно перевищує терапевтичні концентрації цього антибіотика в крові. Високі МБК реєстрували не лише у толерантних, а й у чутливих до пеніциліну коринебактерій дифтерії.

Література

1. Дифтерійная инфекция / Философова Т.Г., Мощич П.С., Мельник М.Н., Богатырева С.А. – К.: Здоров'я, 1984. – 112 с.
2. Дифтерия / Фаворова Л.А., Астафьева Н.В., Корженкова М.П. и др. – М.: Медицина, 1988. – 208 с.
3. Тактика ведения больных дифтерией, ангинами, носителей коринебактерий дифтерии в условиях эпидемического роста заболеваемости дифтерией: Метод. реком. / Возианова Ж.И., Ковалева Н.М., Печенка А.М. и др. – Киев, 1993. – 38 с.
4. Мостюк А.І., Прокопів О.В. Антибіотики в лікуванні дифтерії // Сучасні інфекції. – 1999. – № 2. – С. 99-102.

5. Вовк Л.М., Анастасій І.А. Ефективність антибактерійної терапії у хворих на дифтерію // Клінічні проблеми боротьби з інфекційними хворобами: Матер. VI з'їзду інфекціоністів України (25-27 вересня 2002 р., Одеса). – Тернопіль: Укрмедкнига, 2002. – С. 33-34.

6. Ляшенко Ю.И., Ходжаев Г.А., Краснов Ю.С., Макеев Л.А. Эффективность антибактериального лечения больных дифтерией зева // Актуальные проблемы химиотерапии бактериальных инфекций. – М., 1991. – С. 405-406.

7. The WHO/UNICEF strategy for diphtheriae control in the Newly Independent States. – Copenhagen, 4 April 1995.

8. Крамарев С.О., Трішкова Л.О., Богатирьова С.О. та ін. Носійство токсигенних коринебактерій дифтерії у дітей // Інфекційні хвороби. – 1995. – № 2. – С. 32-33.

9. McClockey R., Green M., Eller J., Smilack J. Treatment of diphtheria carriers: benzathine penicillin, erythromycin, and clindamycin // Ann. Intern. Med. – 1974. – V. 81. – P. 788-791.

10. Kneen R., Pham N.G., Solomon T. et al. Penicillin vs. erythromycin in the treatment of diphtheriae // Clin. Infect. Dis. – 1998. – V. 27, N 4. – P. 845-850.

11. Sabath L.D., Wheeler N., Laverdiere M. et al. A new type of penicillin resistance of *Staphylococcus aureus* // Lancet. – 1977. – V. 26, N 1. – P. 443-447.

12. Von Hunolstein C., Scopetti F., Efstratiou A., Engler K. Penicillin tolerance amongs non-toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans* isolated from cases of pharyngitis // J. Antimicrob. Chemother. – 2002. – N 50. – P. 125-128.

13. Goessens W.H., Fontijne P., Van Raffe M., Michel M.F. Tolerance percentage as a criterion for the detection of tolerance *Staphylococcus aureus* strains // Antimicrob. Ag. Chemother. – 1984. – V. 25, N 5. – P. 575-578.

14. Betriu C., Gomez M., Sanches A. et al. Antibiotic resistance and penicillin tolerance in clinical isolates of group B streptococci // Ibid. – 1994. – V. 38, N 9. – P. 2183-2186.

15. Dore M., Osato M.S., Realdi G. et al. Amoxycillin tolerance in *Helicobacter pylori* // J. Antimicrob. Chemother. – 1999. – V. 43. – P. 47-54.

16. Von Hunolstein C., Alfarone G., Scopetti F. et al. Molecular epidemiology and characteristics of *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans* strains isolated in Italy during the 1990 // J. Med. Microbiol. – 2003. – V. 52, N 2. – P. 181-188.

17. Навашин С.М., Фомина И.П. Рациональная антибиотикотерапия. – М.: Медицина, 1982. – 496 с.

18. Методические указания по определению чувствительности микроорганизмов к антибиотикам методом диффузии в агар с использованием дисков: Методические указания МЗ СССР № 2675-83 от 10.03.1983. – 28 с.

19. Grandiere-Perez L., Jacqueline C., Le Mebecque V. et al. In vitro activity of amoxycillin in non-toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* rabbit endocarditis experimental model // Pathol. Biol. – 2002. – V. 50, N 9. – P. 513-515.

**CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE
TOLERANCE TO BENZYL PENICILLIN**

O.A. Hladka, O.I. Motyka

SUMMARY. Sensitivity to benzylpenicillin of 47 strains of Corynebacterium diphtheriae isolated in Lviv region during 1986-2004 was tested by using a broth macrodilution method and disk diffusion method. All strains were susceptible to penicillin based on routine testing: the diameters of growth inhibition zones ranged from 20 to 30 mm, the values of minimal inhibiting concentrations (MIC) ranged from 0,035

to 0,5 mg/ml. Minimal bactericidal concentrations (MBC) ranged from 0,07 to 16,0 mg/ml. For twenty (42,6 + 7,3 %) from tested strains MBC/MIC ratio was > 32, indicating that these strains were tolerant to penicillin. Considerable difference in proportion of tolerant organisms within a biotype gravis and mitis or toxigenic and non-toxigenic isolates was not found. Approximately half (46,8 + 7,3 %) of C.diphtheriae strains have high values of MBC (> 4,0 mg/ml). The data of this study show that penicillin as an antibiotic of choice for treatment of C.diphtheriae infections must be use with caution.

© Малий В.П., Полукчи О.К., Волобуєва О.В., 2005
УДК 616.931-092.19-053.2-07:616.153

В.П. Малий, О.К. Полукчи, О.В. Волобуєва

**ДИНАМІКА ПОКАЗНИКІВ МІСЦЕВИХ ЗАХИСНИХ ФАКТОРІВ
У ХВОРИХ НА ДИФТЕРІЮ**

Харківський інститут удосконалення лікарів

Вивчено стан місцевого імунітету у 141 хворого на дифтерію. Зміни з боку місцевого імунітету встановлено при всіх формах хвороби, але найбільшими вони були у хворих з тяжким перебігом. Автори вважають, що високі титри секреторного IgA в ротоглотковому секреті є захисними і перешкоджають подальшому поширенню патологічного процесу.

Впродовж останніх років ситуація із захворюваністю на дифтерію залишається складною [1-3]. Тяжкий перебіг, часті ускладнення, які виникають протягом недуги, роблять проблему дифтерії вельми актуальною.

Відомо, що патологічний процес розпочинається з колонізації збудником дифтерії верхніх дихальних шляхів [2, 4-6]. Саме на цьому етапі значну роль відіграє стан місцевих факторів захисту, які викликають бактеріоліз, зв'язування токсину бактерій. За їх недостатності патологічний процес набирає маніфестної форми або формується бактеріоносійство [7, 8]. Система місцевого імунітету є складним захисним механізмом, який є першим імунним бар'єром, що забезпечує захист організму від антигенного впливу. Одним з найважливіших показників стану місцевого імунітету є рівні імуноглобулінів у біологічних рідинах організму і зокрема в

ротоглотковому секреті. Їм належить провідна роль у забезпеченні функціональної повноцінності слизової оболонки органів, зокрема ротоглотки [7, 8]. Тому при дифтерії стан місцевого імунітету є важливим чинником припинення подальшого поширення патологічного процесу. Але в літературі цьому важливому питанню приділяється недостатня увага, досліджень стану місцевих захисних факторів практично немає, не вивчено їх зв'язок з тяжкістю хвороби. Пошуки відповіді на деякі з цих питань і зумовили мету роботи – вивчення деяких показників місцевих захисних факторів у хворих з різними формами дифтерії.

Матеріали і методи

У ротоглотковому секреті вивчали показники секреторного імуноглобуліну А (sIgA), імуноглобулінів (Ig) класів А, М, G, комплементу, циркулюючих імунних комплексів (ЦІК). Дослідження виконували в динаміці, 1 раз на тиждень протягом всього терміну перебування в стаціонарі. Залежно від тяжкості дифтерії хворі (141 людина) були розподілені за наступними групами: 1-а – 64 з легкою, 2-а – 31 із середньотяжкою, 3-я – 46 з тяжкою формами; діагноз було підтверджено бактеріологічно. Групу порівняння (контрольну) склали 15 практично здорових осіб.