

## МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023

Мангутов Э.О.<sup>1</sup>, Харсеева Г.Г.<sup>1</sup>, Подойницына О.А.<sup>2</sup>, Носков А.К.<sup>2</sup>, Кругликов В.Д.<sup>2</sup>, Алутина Э.Л.<sup>1</sup>, Горох А.М.<sup>2</sup>, Воронина Н.А.<sup>1</sup>, Ивлиева О.Н.<sup>2</sup>.

### **CORYNEBACTERIUM SPP.: АНАЛИЗ ПРОФИЛЕЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К АНТИМИКРОБНЫМ ПРЕПАРАТАМ У ИЗОЛЯТОВ ОТ БОЛЬНЫХ С ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ РЕСПИРАТОРНОГО ТРАКТА И ПРАКТИЧЕСКИ ЗДОРОВЫХ ЛИЦ**

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 344022, Ростов-на-Дону, Россия;  
<sup>2</sup>ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, 344002, Ростов-на-Дону, Россия

*Цель исследования - провести сравнительный анализ фено- и генотипических маркёров резистентности к АМП изолятов Corynebacterium spp. от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта и практически здоровых лиц. Штаммы Corynebacterium spp. выделены от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта (99 шт.) и практически здоровых лиц (33 шт.), идентифицированы масс-спектрометрическим методом. Фенотипическая резистентность изолятов к АМП определена диско-диффузионным методом и с помощью автоматизированного баканализатора VITEK 2 Compact (BioMerieux), генотипическая - с помощью полногеномного секвенирования. Фено- и генотипической резистентностью к АМП чаще обладали изоляты от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта, чем от практически здоровых лиц. У всех штаммов недифтерийных коринебактерий вне зависимости от источника выделения превалировала резистентность к клиндамицину (74,2±1,1%), связанная с наличием гена erm(X), локализованного в хромосоме и имеющего вертикальный путь распространения. Расположение других генов резистентности к АМП (aph(3'')-Ia, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, tetAB(A), tet(W), ctx, sul1) в составе мобильных генетических элементов свидетельствует о возможности их горизонтального переноса. Наличие фено- и генотипической резистентности к АМП у изолятов недифтерийных коринебактерий от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта указывает на возможную взаимосвязь патогенных свойств и резистентности к АМП.*

*Ключевые слова:* Corynebacterium spp.; фено- и генотипические маркёры резистентности к АМП; воспалительные заболевания респираторного тракта; полногеномное секвенирование.

**Для цитирования:** Мангутов Э.О., Харсеева Г.Г., Подойницына О.А., Носков А.К., Кругликов В.Д., Алутина Э.Л., Горох А.М., Воронина Н.А., Ивлиева О.Н. Corynebacterium spp.: анализ профилей резистентности к антимикробным препаратам у изолятов от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта и практически здоровых лиц. Клиническая лабораторная диагностика. 2023; 68 (6): 356-364. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-6-356-364>

**Для корреспонденции:** Харсеева Галина Георгиевна, д-р мед. наук, проф., зав. кафедрой микробиологии и вирусологии № 2; e-mail: galinagh@bk.ru

**Финансирование.** Исследование проведено за счёт средств Федерального бюджета в рамках государственного задания «Маркёры патогенности и антибиотикорезистентности условно-патогенных микроорганизмов, связанных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта» и Отраслевой программы Роспотребнадзора.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 17.04.2023

Принята к печати 20.04.2023

Опубликовано 05.06.2023

Mangutov E.O.<sup>1</sup>, Kharseeva G.G.<sup>1</sup>, Podoynitsyna O.A.<sup>2</sup>, Noskov A.K.<sup>2</sup>, Kruglikov V.D.<sup>2</sup>, Alutina E.L.<sup>1</sup>, Gorokh A.M.<sup>2</sup>, Voronina N.A.<sup>1</sup>, Ivlieva O.N.<sup>2</sup>

### **CORYNEBACTERIUM SPP.: ANALYSIS OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE PROFILES IN ISOLATES FROM PATIENTS WITH INFLAMMATORY DISEASES OF THE RESPIRATORY TRACT AND PRACTICALLY HEALTHY INDIVIDUALS**

<sup>1</sup>Federal State Educational Institution of Higher Education «Rostov State Medical University» Ministry of Health of Russia, 344022, Rostov-on-Don, Russian Federation;

<sup>2</sup>Federal public health institution Rostov-on-Don Plague Control Research Institute of Rosпотребнадзор; 344002, Rostov-on-Don, Russian Federation

*The aim of the study was to conduct a comparative analysis of phenotypic and genotypic markers of resistance to AMPs in isolates of Corynebacterium spp. from patients with inflammatory diseases of the respiratory tract and practically healthy individuals. Strains of Corynebacterium spp., isolated from patients with inflammatory diseases of the respiratory tract (99 pcs.) and practically healthy individuals (33 pcs.), were identified by mass spectrometric method. The phenotypic resistance of isolates to AMPs was determined by the disk diffusion method and using the VITEK 2 Compact automated bacterial analyzer (BioMerieux), genotypic resistance was determined using whole genome sequencing. Isolates from patients with inflammatory diseases of the respiratory tract more often had phenotypic and genotypic resistance to AMPs than from practically healthy individuals. In all strains of non-diphtheria corynebacteria, regardless of the source of isolation, resistance to clindamycin prevailed (74.2±1.1%), associated with*

the presence of the *erm(X)* gene localized in the chromosome and having a vertical distribution pathway. The location of other AMP resistance genes (*aph(3'')-Ia*, *aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id*, *tetAB(A)*, *tetW*, *cmx*, *sul1*) in mobile genetic elements indicated the possibility their horizontal transfer. The presence of pheno- and genotypic resistance to AMP in isolates of non-diphtheria corynebacteria from patients with inflammatory diseases of the respiratory tract indicates a possible relationship between pathogenic properties and resistance to AMP.

**Key words:** *Corynebacterium* spp.; phenotypic and genotypic markers of resistance to AMPs; inflammatory diseases of the respiratory tract; whole genome sequencing.

**For citation:** Mangutov E.O., Kharseeva G.G., Podoyntsina O.A., Noskov A.K., Kruglikov V.D., Alutina E.L., Gorokh A.M., Voronina N.A., Ivlieva O.N. *Corynebacterium* spp.: analysis of antimicrobial resistance profiles in isolates from patients with inflammatory diseases of the respiratory tract and practically healthy individuals. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2023; (6): 356-364 (in Russ.) DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-6-356-364>

**For correspondence:** Kharseeva Galina Georgievna, MD, Professor, Head of the Department of Microbiology and Virology № 2; e-mail: [galinagh@bk.ru](mailto:galinagh@bk.ru)

**Information about authors:**

Mangutov E.O., <https://orcid.org/0000-0001-6959-2540>;  
Kharseeva G.G., <https://orcid.org/0000-0002-6226-2183>;  
Podoyntsina O.A., <https://orcid.org/0000-0002-9996-4189>;  
Noskov A.K., <https://orcid.org/0000-0003-0550-2221>;  
Kruglikov V.D., <https://orcid.org/0000-0002-6540-2778>;  
Alutina E.L., <https://orcid.org/0000-0001-6968-0583>;  
Gorokh A.M., <https://orcid.org/0000-0002-2017-7992>;  
Voronina N.A., <https://orcid.org/0000-0002-9655-6876>;  
Ivlieva O.N., <https://orcid.org/0009-0009-5877-9823>.

**Financing.** The study was carried out at the expense of the federal budget within the framework of the state task "Pathogenicity and antibiotic resistance markers of opportunistic microorganisms associated with inflammatory diseases of the respiratory tract" and the Rosptrebnadzor Industry Program.

**Conflict of interests.** The authors declare absence of conflict of interests.

Received 17.04.2023

Accepted 20.04.2023

Published 05.06.2023

**Введение.** *Corynebacterium* spp., входящие в состав микробиома человека, могут способствовать развитию воспалительных заболеваний респираторного и урогенитального тракта, кожи [1-3], явиться возбудителями бактериальной коинфекции и выделяться при бактериемии из крови больных с COVID-19 [4]. Наибольшую настороженность вызывает обнаружение в биоматериале от больных таких видов недифтерийных коринебактерий как *C. striatum*, *C. amycolatum*, *C. riegelii*, которые многие исследователи в последнее время расценивают как патогенные [5-7]. *C. striatum* описан как часто встречаемый патоген с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), вызывающий инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи (ИСМП), особенно у лиц с иммунодефицитными состояниями [5, 8, 9]. В промышленно развитых и развивающихся странах мира участились случаи ИСМП, этиологическим агентом развития которых являются штаммы *C. striatum* с МЛУ [9, 10]. Многие штаммы *Corynebacterium* spp. обладают генами лекарственной устойчивости, что является серьезной причиной для беспокойства. Они часто проявляют резистентность к ампициллину, ципрофлоксацину, гентамицину, эритромицину, пенициллину, тетрациклину, но сохраняют чувствительность к ванкомицину, линезолиду, хлорамфениколу [11, 12]. Известно, что изоляты *C. striatum* с МЛУ обладают повышенной способностью к биоплёнокообразованию [13, 14], что позволяет рассматривать этот вид коринебактерий как новый патоген, требующий повышенного внимания [13].

До недавнего времени для *Corynebacterium* spp.

отсутствовала ясность в понимании вопроса о критериях оценки их резистентности к антимикробным препаратам (АМП). Полагали, что следует сравнивать результаты определения их чувствительности к АМП с аналогичными данными при грамположительных бактериях (стафилококки, стрептококки) или принимать во внимание только случаи полной резистентности, выявляемые диско-диффузионным методом. В настоящее время для *Corynebacterium* spp. определены критерии оценки резистентности к АМП [15], однако молекулярные механизмы перехода от колонизации к способности вызывать развитие инфекционного процесса у этих микроорганизмов, особенно с МЛУ, исследованы пока недостаточно. У штаммов *Corynebacterium* spp. обнаружены гены, кодирующие резистентность к различным АМП. Известно, что некоторые механизмы устойчивости к фторхинолонам (ципрофлоксацину и моксифлоксацину) у недифтерийных коринебактерий связаны со спонтанными мутациями в *gyrA*-гене [11, 13]. У изолятов *C. striatum*, характеризующихся МЛУ, выявлены гены резистентности к эритромицину и клиндамицину (*erm(X)*), тетрациклину (*tetAB(A)* и *tetAB(B)*), аминогликозидам (*aac*, *ant*, *aph*), хлорамфениколу (*cmx*) [13, 16, 17]. Описаны генетически разнообразные изоляты недифтерийных коринебактерий, с различной представленностью генетических детерминант, обуславливающих резистентность к АМП, что подтверждает роль горизонтального переноса генов в быстром формировании фенотипа МЛУ у *Corynebacterium* spp. [13, 18, 19]. Повышение клинической значимости недиф-

терийных коринебактерий, увеличение количества штаммов с МЛУ, недостаточное понимание механизмов формирования потенциальной устойчивости к АМП указывает на необходимость проведения дальнейших исследований в этом направлении.

Цель исследования - провести сравнительный анализ фено- и генотипических маркеров резистентности к АМП изолятов *Corynebacterium* spp. от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта и практически здоровых лиц.

**Материал и методы.** Исследованы штаммы *Corynebacterium* spp., выделенные в 2017-2021 гг. из верхних дыхательных путей (нос, зев) от больных с тонзиллитом, ангиной, ринофарингитом, бронхитом, пневмонией (99 штаммов) и практически здоровых лиц (33 штамма) в бактериологической лаборатории МБУЗ «Детская городская больница № 1 города Ростова-на-Дону», МБУЗ «Городская больница № 20 города Ростова-на-Дону», ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России. Штаммы *Corynebacterium* spp. выделены от больных в количестве  $10^5$  КОЕ/мл и более, практически здоровых лиц -  $10^4$  КОЕ/мл и менее, их идентификация проведена масс-спектрометрическим методом (MALDI-ToF MS) на приборе Bruker Daltonics Biotyper (Германия) и баканализаторе VITEK 2 Compact (BioMerieux, Франция). Изоляты *Corynebacterium* spp. от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта (*C. pseudodiphtheriticum* R7, R9, R11, *C. amycolatum* R2, R3, *C. afermentans* R12, *C. falsenii* R132, *C. striatum* R546) и практически здоровых лиц (*C. pseudodiphtheriticum* Дон2, Дон4, Дон5, Дон6) депонированы в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКМП-Оболенск». Аннотированные последовательности генома депонированы в базе данных GenBank как проект секвенирования PRJNA339674 с регистрационными номерами: SAMN31031755, SAMN31031754, SAMN31031753, SAMN31031752, SAMN31031751, SAMN31031750, SAMN31031749, SAMN31031748, SAMN31031747, SAMN31031746, SAMN31031745, SAMN31031744.

**Определение чувствительности к АМП** проводили диско-диффузионным методом и с помощью автоматизированного баканализатора VITEK 2 Compact (BioMerieux) к бензилпенициллину, ципрофлоксацину, моксифлоксацину, гентамицину, ванкомицину, эритромицину, клиндамицину, тетрациклину, линезолиду, рифампицину в соответствии с Клиническими рекомендациями [15], а также к левомицетину и триметоприму-сульфаметоксазолу.

**Полногеномное секвенирование и биоинформационный анализ.** Тотальную ДНК штаммов недифтерийных коринебактерий выделяли с помощью набора PureLink™ Mini (Thermo Fisher Scientific, США). Полногеномное секвенирование осуществляли на платформе MGI (MGI Tech Co., Ltd, США) с использованием наборов MGIEasy FS DNA Library Prep Kit и MGI-Seq 2000RS High-throughput sequencing kit PE200 (MGI Tech Co., Ltd, США) согласно рекомендациям производителя. Единичные прочтения собира-

ли в контиги с помощью программного обеспечения SPAdes 3.9.0 [20].

Анализ качества сборки проведён с использованием пакета Quast 5.0.2 [21]. Поиск генов резистентности к АМП проведён с использованием программы Abricate 1.0.1 [22]. Сравнение нуклеотидных нуклеотидных и аминокислотных последовательностей выполнено посредством Mega 6 [23].

Статистическую обработку данных проведена с помощью программы STATISTICA 12.0 (StatSoftInc, США) и MedCalc (версия 9.3.5.0).

**Результаты.** Рассматривая показатели резистентности к АМП штаммов недифтерийных коринебактерий (табл. 1), выделенных на территории г. Ростова-на-Дону от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта, установлено, что большинство ( $77,8 \pm 4,2\%$ ) клинических изолятов обладали резистентностью к клиндамицину. Резистентность штаммов *Corynebacterium* spp. к другим АМП выявляли значительно реже: к ципрофлоксацину - у  $22,2 \pm 4,2\%$  штаммов, бензилпенициллину и эритромицину -  $14,1 \pm 3,5\%$ , тетрациклину -  $8,1 \pm 2,7\%$ , гентамицину и моксифлоксацину -  $4,0 \pm 2,0\%$ , линезолиду -  $2,0 \pm 1,4\%$ . Среди штаммов *Corynebacterium* spp., выделенных от практически здоровых лиц, количество изолятов, резистентных к АМП, меньше по сравнению с аналогичными результатами у больных. Большинство из них также проявляли резистентность к клиндамицину ( $63,6 \pm 8,5\%$ ). Из 99 изолятов *Corynebacterium* spp. от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта обнаружено 6 ( $6,1 \pm 2,4\%$ ) штаммов с МЛУ и 2 ( $2,0 \pm 1,4\%$ ) экстремально резистентных штамма (ЭР). Среди изолятов *Corynebacterium* spp. от практически здоровых лиц обнаружен только один штамм с МЛУ.

Представляли интерес выяснить, каковы механизмы формирующейся у *Corynebacterium* spp. резистентности к АМП и насколько они отличны у обследованных с патологией респираторного тракта и практически здоровых лиц. Для этого проведено полногеномное секвенирование 12 штаммов недифтерийных коринебактерий. Чувствительность и резистентность к АМП этих изолятов определяли с помощью модифицированного метода серийных разведений с использованием двух пограничных значений МПК (табл. 2).

Для детекции генов резистентности к АМП с помощью полногеномного секвенирования исследованы 8 штаммов, выделенных от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта, и 4 изолята от практически здоровых лиц. С помощью программного обеспечения Abricate 1.0.1 проведён поиск генов резистентности к АМП. Обнаруженные детерминанты представлены в табл. 3.

При исследовании штаммов *Corynebacterium* spp., выделенных от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта (табл. 3), установлено, что у большинства (7 из 8 исследованных изолятов) выявлен ген *erm(X)*, детерминирующий резистентность к линкозамидам (клиндамицин, линкомицин), макролидам (эритромицин) и стрептограминам (вир-

Таблица 1

Резистентные к АМП штаммы *Corynebacterium* spp. (абс. / %±m)

АМП	Источник выделения штаммов <i>Corynebacterium</i> spp.				Всего штаммов <i>Corynebacterium</i> spp. (132 шт./100%)	
	Больные с воспалительными заболеваниями респираторного тракта (99 шт./100%)		Практически здоровые лица (33 шт./100%)			
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Бензилпенициллин	14	14,1±3,5	1	3,0±3,0*	15	11,4±2,7
Ципрофлоксацин	22	22,2±4,2	1	3,0±3,0*	23	17,4±3,2
Моксифлоксацин	4	4,0±2,0	-		4	3,0±1,5
Гентамицин	4	4,0±2,0	-		4	3,0±1,5
Ванкомицин	-		-		-	
Эритромицин	14	14,1±3,5	3	9,1±5,2	17	12,9±2,8
Клиндамицин	77	77,8±4,3	21	63,6±12,3	98	74,2±1,1
Тетрациклин	8	8,1±2,7	3	9,1±5,2	11	8,3±2,4
Линезолид	2	2,0±1,4	-		2	1,5±1,1
Рифампицин	-		1	3,0±3,0	1	0,8±0,8

Примечание. \* - Достоверность различий ( $p \leq 0,05$ ) между показателями у больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта и практически здоровых лиц.

Таблица 2

Чувствительность штаммов *Corynebacterium* spp. к антимикробным препаратам

Вид	МПК антимикробных препаратов, мг/л						
	Бензилпенициллин	Ципрофлоксацин	Моксифлоксацин	Ванкомицин	Тетрациклин	Линезолид	Рифампицин
Изоляты от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта							
<i>C. amycolatum</i> R2	>0,125	>1,0	>0,5	≤2,0	>2,0	≤2,0	≤0,06
<i>C. amycolatum</i> R3	≤0,125	>1,0	≤0,5	≤2,0	≤2,0	≤2,0	≤0,06
<i>C. pseudodiphtheriticum</i> R7	≤0,125	≤0,001	≤0,5	≤2,0	≤2,0	≤2,0	≤0,06
<i>C. pseudodiphtheriticum</i> R9	≤0,125	≤0,001	≤0,5	≤2,0	≤2,0	>2,0	≤0,06
<i>C. pseudodiphtheriticum</i> R11	≤0,125	≤0,001	≤0,5	≤2,0	≤2,0	≤2,0	≤0,06
<i>C. afermentans</i> R12	>0,125	≤0,001	≤0,5	≤2,0	>2,0	≤2,0	≤0,06
<i>C. falsenii</i> R132	>0,125	≤0,001	≤0,5	≤2,0	≤2,0	≤2,0	≤0,06
<i>C. striatum</i> R546	>0,125	>1,0	>0,5	≤2,0	>2,0	>2,0	≤0,06
Изоляты от практически здоровых лиц							
<i>C. pseudodiphtheriticum</i> Дон2	≤0,125	≤0,001	≤0,5	≤2,0	≤2,0	≤2,0	≤0,06
<i>C. pseudodiphtheriticum</i> Дон4	>0,125	≤0,001	≤0,5	>2,0	≤2,0	≤2,0	>0,5
<i>C. pseudodiphtheriticum</i> Дон5	≤0,125	≤0,001	≤0,5	≤2,0	≤2,0	≤2,0	≤0,06
<i>C. pseudodiphtheriticum</i> Дон6	≤0,125	≤0,001	≤0,5	≤2,0	≤2,0	≤2,0	≤0,06

Примечание. Резистентность штаммов к АМП выделена темным фоном.

гинамицин, хинупристин, пристидамицин). Фено-тип гена *erm(X)* проявлялся у 4 штаммов наличием резистентности к клиндамицину и эритромицину, у 2 - только к клиндамицину, у одного штамма - отсутствовал.

При исследовании четырёх изолятов недифтерийных коринебактерий от практически здоровых лиц

выявлен только ген *erm(X)*, фенотипически проявляющийся резистентностью к клиндамицину. При этом у единственного штамма *C. pseudodiphtheriticum* Дон4, относящегося к категории МЛУ, генов резистентности к АМП не обнаружено (табл. 4).

Участок нуклеотидной последовательности с геном

**Фено- и генотипические маркёры резистентности к АМП изолятов *Corynebacterium* spp. от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта**

Вид <i>Corynebacterium</i> spp.	Фенотип резистентности к АМП в соответствии с [15]	Категория	Гены	Фенотип генов резистентности к АМП
<i>C. amycolatum</i> R2	Бензилпенициллин Ципрофлоксацин Моксифлоксацин Гентамицин Эритромицин Клиндамицин Тетрациклин	ЭР	<i>erm(X)</i>	Клиндамицин Эритромицин
			<i>aph(3')-Ia</i> , <i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aph(6)-Id</i> , <i>aac(3)-XI</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i>	Гентамицин
			<i>tetAB(A)</i>	Тетрациклин
			<i>cmx</i>	Левомецетин
<i>C. amycolatum</i> R3	Ципрофлоксацин	-	<i>cmx</i>	-
<i>C. pseudodiphtheriticum</i> R7	Эритромицин Клиндамицин	-	<i>erm(X)</i>	Клиндамицин, Эритромицин
			<i>sulI</i>	Триметоприм-сульфаметоксазол
<i>C. pseudodiphtheriticum</i> R9	Линкомицин	-	<i>erm(X)</i>	-
			<i>cmx</i>	Левомецетин
<i>C. pseudodiphtheriticum</i> R11	Эритромицин Клиндамицин	-	<i>erm(X)</i>	Клиндамицин, Эритромицин
			<i>sulI</i>	Триметоприм-сульфаметоксазол
<i>C. afermentans</i> R12	Пенициллин Клиндамицин Тетрациклин	МЛУ	<i>erm(X)</i>	Клиндамицин
			<i>aph(3')-Ia</i> , <i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aph(6)-Id</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i>	Гентамицин
			<i>tetAB(A)</i>	Тетрациклин
			<i>cmx</i>	Левомецетин
<i>C. falsenii</i> R132	Бензилпенициллин Клиндамицин	-	<i>erm(X)</i>	Клиндамицин
<i>C. striatum</i> R546	Бензилпенициллин Ципрофлоксацин Моксифлоксацин Гентамицин Эритромицин Клиндамицин Тетрациклин Линкомицин	ЭР	<i>erm(X)</i>	Клиндамицин, Эритромицин
			<i>aph(3')-Ia</i> , <i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aph(6)-Id</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i>	Гентамицин
			<i>tetAB(A)</i> , <i>tet(W)</i>	Тетрациклин
			<i>cmx</i>	Левомецетин

**Фено- и генотипические маркёры резистентности к АМП изолятов *Corynebacterium* spp. от практически здоровых лиц**

Вид	Фенотип резистентности к АМП в соответствии с [15]	Категория	Гены	Фенотип резистентности к АМП
<i>C. pseudodiphtheriticum</i> Дон 2	Клиндамицин	-	<i>erm(X)</i>	Клиндамицин
<i>C. pseudodiphtheriticum</i> Дон 4	Бензилпенициллин Клиндамицин Рифампицин	МЛУ	-	-
<i>C. pseudodiphtheriticum</i> Дон 5	Клиндамицин	-	<i>erm(X)</i>	Клиндамицин
<i>C. pseudodiphtheriticum</i> Дон 6	Клиндамицин	-	<i>erm(X)</i>	Клиндамицин

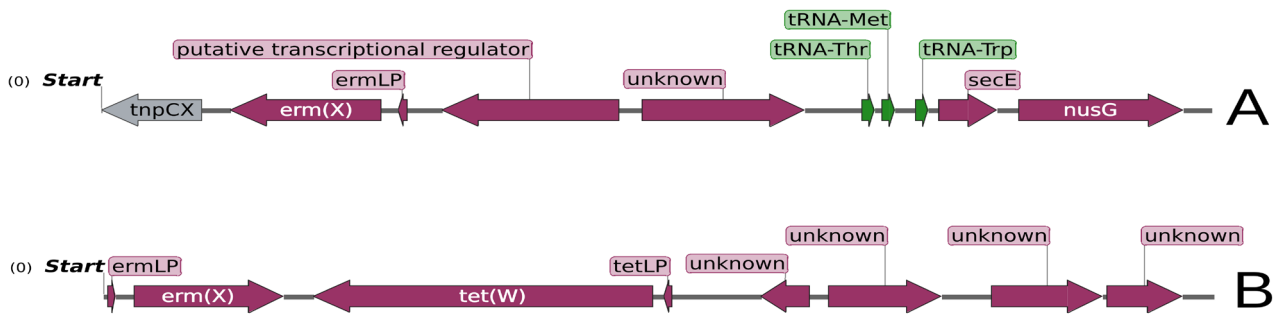


Рис.1. Участок нуклеотидной последовательности. А - с геном *erm(X)* у изолятов от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта (*C. amycolatum* R2, *C. pseudodiphtheriticum* R7, R9, R11, *C. afermentans* R12, *C. falsenii* R132) и практически здоровых лиц (*C. pseudodiphtheriticum* Дон2, Дон5, Дон6); В - с генами *erm(X)* и *tet(W)* у *C. striatum* R546.

DNA Sequences	Translated Protein Sequences
Species/Abbrv	* *
1. <i>C. amycolatum</i> R3	a g c g c t c t c g c a a a c a c a g g a t t c c t c g c c
2. <i>C. striatum</i> 9438	a g c g c t c t c g c a a a c g c a g g a t t c c t c g c c
3. <i>C. afermentans</i> R12	a g c g c t c t c g c a a a c g c a g g a t t c c t c g c c
4. <i>C. pseudodiphtheriticum</i> R9	a g c g c t c t c g c a a a c g c a g g a t t c c t c g c c
5. <i>C. amycolatum</i> R2	a g c g c t c t c g c a a a c g c a g g a t t c c t c g c c
DNA Sequences	Translated Protein Sequences
Species/Abbrv	* *
1. <i>C. amycolatum</i> R3	T P V F S L L L I T R V L S A L A N T G F L A V A L S T A T T L V
2. <i>C. striatum</i> 9438	T P V F S L L L I T R V L S A L A N A G F L A V A L S T A T T L V
3. <i>C. afermentans</i> R12	T P V F S L L L I T R V L S A L A N A G F L A V A L S T A T T L V
4. <i>C. pseudodiphtheriticum</i> R9	T P V F S L L L I T R V L S A L A N A G F L A V A L S T A T T L V
5. <i>C. amycolatum</i> R2	T P V F S L L L I T R V L S A L A N A G F L A V A L S T A T T L V

Рис. 2. Фрагменты нуклеотидных и аминокислотных последовательностей у недифтерийных коринебактерий. А - фрагмент нуклеотидной последовательности гена *stmX* у штамма *C. amycolatum* R3 с мутацией G316A; В - фрагмент аминокислотной последовательности штамма *C. amycolatum* R3 с заменой A106T.

*erm(X)* у изолятов от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта (*C. amycolatum* R2, *C. pseudodiphtheriticum* R7, R9, R11, *C. afermentans* R12, *C. falsenii* R132) и практически здоровых лиц (*C. pseudodiphtheriticum* Дон2, Дон5, Дон6) одинаков и представлен транспозазой (*tnpCX*), собственно геном *erm(X)*, а также *ermLP*, кодирующим лидирующий пептид, участвующий, как предполагают, в регуляции экспрессии гена *erm(X)* (рис. 1). По-видимому, у этих штаммов область с геном *erm(X)* локализована в составе хромосомы, о чём можно косвенно судить, ориентируясь на соседние гены, кодирующие белки структурных единиц рибосом, субъединицы РНК-полимеразы, различные тРНК. У *C. striatum* R546 локализация генов *ermLP/erm(X)* отличалась от остальных исследованных штаммов. Детерминанты устойчивости к макролидам и линкозамидам у этого штамма располагались рядом с геном *tet(W)*, которому предшествует ген *tetLP*, кодирующий предполага-

емый лидерный пептид. Расположение и ориентация этих четырёх генов соответствуют их локализации в плазмиде *pJA144188* [24], однако всей плазмиды в геноме этого изолята не обнаружено. Возможно, эти гены у *C. striatum* R546 интегрированы в хромосому в составе общего мобильного генетического элемента.

Другими относительно часто встречаемыми являлись гены *aph(3')-Ia*, *aph(3')-Ib*, *aph(6)-Id*, *tetAB(A)*, обнаруженные одновременно у трёх исследованных штаммов недифтерийных коринебактерий, которые проявили фенотипическую резистентность к гентамицину и тетрациклину (табл. 3). У исследованных изолятов *Corynebacterium* spp. выявлены гены резистентности к АМП, определение чувствительности к которым не регламентировано Клиническими рекомендациями [15]. У 5 клинических изолятов обнаружен ген *stmX*, фенотипически проявлявшийся у 4 из них резистентностью к левомицетину, у двух штаммов - ген *sull*, обусловивший резистентность к триметоприму-суль-

фаметоксазолу. Отсутствие фенотипической резистентности к левомицетину у штамма *C. amycolatum* R3 может быть связано с единичной нуклеотидной заменой G316A (рис. 2), приводящей к смене аминокислоты аланина на треонин (A106T). Вероятно, такая замена ведёт к утрате способности белка выполнять свою функцию, в результате чего штамм *C. amycolatum* R3 утратил резистентность к левомицетину.

В нуклеотидных последовательностях *cmx* у всех пяти штаммов встречались и другие единичные замены, однако они являлись синонимичными и не вели к замене аминокислот. Гены *aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id*, *cmx* расположены у штаммов *C. amycolatum* R2, *C. afermentas* R12, *C. striatum* R546 рядом, в одинаковой очередности и ориентации друг относительно друга. Здесь же расположен ген *tnpR*, кодирующий резолвазу - фермент, проводящий сайт-специфическую рекомбинацию и обеспечивающий перемещение ряда транспозонов, в частности, нечётного транспозона Tn3 [25]. Ген *aac(3)-XI* обнаружен только у штамма *C. amycolatum* R2. Ген *aph(3')-Ia* выявлен у изолятов *C. amycolatum* R2, *C. afermentas* R12, *C. striatum* R546. Судя по поиску в Blast, этот ген часто представлен в составе плазмид у микроорганизмов многих видов, родов и семейств. Ген *cmx* у штамма *C. amycolatum* R3 находится в составе транспозона на хромосоме, а у штамма *C. pseudodiphtheriticum* R9 может быть как на хромосоме, так и на плазмиде. Ген *tetAB(A)* обнаружен у трёх штаммов недифтерийных коринебактерий: *C. amycolatum* R2, *C. striatum* R546, *C. afermentas* R12. Этот ген может быть локализован у штаммов *C. amycolatum* R2 и *C. striatum* R546 как в составе плазмиды, так и хромосомы, тогда как у *C. afermentas* R12, по всей видимости, - в составе хромосомы. Рядом с геном *tetAB(A)* у этих трёх штаммов располагался парный ему ген, кодирующий АТФ-связывающую пермеазу *YheH*. Помимо этого, в данной области присутствуют ещё 7 генов. Весь указанный участок генома (около 9000 п.н.) аналогичен фрагменту плазмиды pTP10. Ген *sull* у штаммов *C. pseudodiphtheriticum* R7 и *C. pseudodiphtheriticum* R11 находится на хромосоме в окружении генов трансферазы и транспозазы.

**Обсуждение.** Большинство исследованных штаммов *Corynebacterium* spp. вне зависимости от источника выделения обладали фенотипической резистентностью к клиндамицину (74,2±1,1%). Резистентность к клиндамицину, относящемуся к линкозамидам, связывают с наличием гена *erm(X)*, который обнаружен у 10 из 12 штаммов недифтерийных коринебактерий, исследованных с помощью полногеномного секвенирования. Ген *erm(X)* кодирует у коринебактерий выработку фермента 23S рРНК-аденин-N-6-метилтрансферазы *erm(X)*, модифицирующего мишень для связывания антибиотика - 23S РНК, являющуюся компонентом 50S субъединицы рибосом бактерий. Приобретение микроорганизмами этого гена ведёт к развитию высокого уровня устойчивости к макролидам, линкозамидам, стрептограминам [5]. По нашим данным, наряду с доминирующей резистентностью изолятов *Corynebacterium* spp. к клиндамицину, только 12,9±2,8% из 132 исследованных штаммов

проявили фенотипическую резистентность к эритромицину. Устойчивость микроорганизмов к эритромицину обусловлена защитным действием продукта гена *erm(X)* ферментом эритромицинометилазой, метилирующей остаток аденина в молекуле 23S рибосомной РНК и, соответственно, предотвращающей связывание эритромицина с бактериальной клеткой. Несмотря на достаточно высокий уровень гомологии между генами *erm(X)* у различных видов коринебактерий (*C. diphtheriae*, *C. jeikeium*, *C. xerosis* и др.), их нуклеотидные последовательности имеют отличия и могут являться составной частью плазмид или быть интегрированными в хромосому [5]. По нашим данным, участок нуклеотидной последовательности с геном *erm(X)* представлен транспозазой (*tnpCX*), генами *erm(X)* и *ermLP*, которые расположены в одинаковой ориентации в составе хромосомы у изолятов от больных и практически здоровых лиц. Исключение составил штамм *C. striatum* R546, у которого ген *erm(X)* расположен рядом с геном *tet(W)* и, по всей видимости, может находиться как на плазмиде, так и быть интегрирован в хромосому в составе общего мобильного генетического элемента. Это свидетельствует о том, что для гена *erm(X)* характерен у исследованных изолятов коринебактерий, в основном, вертикальный путь передачи, но не исключен и горизонтальный. Одновременное наличие резистентности к клиндамицину и чувствительности к эритромицину у штаммов *Corynebacterium* spp., содержащих ген *erm(X)*, может быть связано с рядом факторов: наличие гена *ermLP*, регулирующего экспрессию *erm(X)* и, соответственно, продукцию фермента эритромицинометилазы; локализация гена *erm(X)* в хромосоме; особенности структуры гена *erm(X)*, предполагающими отсутствие аллели *erm(X)cd*, кодирующей резистентности к эритромицину. Следует учитывать особенности строения и состава клеточной стенки коринебактерий, содержащей гликолипид корд-фактор, миколовые и миколоновые кислоты.

У трёх исследованных штаммов недифтерийных коринебактерий обнаружены одновременно гены *aph(3')-Ia*, *aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id*, кодирующие продукцию аминокликозидмодифицирующих ферментов, и гены *tetAB(A)* и *tet(W)*, обеспечивающие выработку транспортных белков семейства MFS, кодирующих эффлюксные помпы для тетрациклинов и позволяющие бактериям синтезировать белок даже при связывании тетрациклина с рибосомальной мишенью. Наличие этих генов проявилось фенотипической резистентностью исследованных изолятов к гентамицину и тетрациклину соответственно. Гены *aph(3')-Ia*, *aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id*, *tetAB(A)*, *tet(W)* локализованы у исследованных штаммов недифтерийных коринебактерий в составе мобильных генетических элементов - транспозонов и могли находиться как в составе плазмид, так и хромосом.

Ген *cmx*, кодирующий хлорамфеникол-эффлюксный MFS транспортер *cmx*, и ген *sull*, ответственный за выработку невосприимчивой к сульфаниламидам дигидроптероат-синтазы, локализованы у изолятов *Corynebacterium* spp. в составе транспозона на хро-

мосоме. Клинические изоляты *Corynebacterium* spp. от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта чаще проявляли фено- и генотипическую резистентность к АМП, чем изоляты от практически здоровых лиц. Это может быть связано с использованием АМП, способствующих селекции антибиотикорезистентных штаммов у больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта. Известно, что под действием АМП метаболизм у бактерий приостанавливается, вследствие чего они выживают, но не размножаются, изменяя свое морфологическое строение, химический состав и, возможно, патогенные свойства [26]. Имеются данные о том, что лечение пациентов АМП, даже способствует колонизации их организма *C. pseudodiphtheriticum*, вследствие чего коринебактерии могут увеличивать свой патогенный потенциал, переходя от комменсализма к паразитизму [27]. Популяция *Corynebacterium* spp., являющихся условно-патогенными микроорганизмами, гетерогенна и такие изменения, по всей видимости, касаются лишь определённой части представителей микробиоты, наиболее подверженных действию АМП.

У исследованных изолятов *Corynebacterium* spp. в составе мобильных генетических элементов выявлены гены *ctx* и *sull*, кодирующие резистентность к хлорамфениколу (левомицетину) и триметоприму-сульфаметоксазолу соответственно, а также обнаружена фенотипическая резистентность к этим препаратам, определение чувствительности к которым не регламентировано Клиническими рекомендациями [15].

**Заключение.** Фено- и генотипической резистентностью к АМП чаще обладали штаммы *Corynebacterium* spp., выделенные от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта, чем от практически здоровых лиц. Среди изолированных на территории г. Ростова-на-Дону штаммов *Corynebacterium* spp. от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта и практически здоровых лиц превалирует резистентность к клиндамицину, связанная с наличием гена *erm(X)*, локализованного в хромосоме и имеющего вертикальный путь распространения. Расположение других выявленных у коринебактерий генов резистентности к АМП (*aph(3')-Ia*, *aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id*, *tetAB(A)*, *tet(W)*, *ctx*, *sull*) в составе мобильных генетических элементов свидетельствует об их горизонтальном переносе, что, по всей видимости, может приводить к их быстрому распространению в популяции. Наличие фено- и генотипической резистентности к АМП у изолятов недифтерийных коринебактерий от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта указывает на возможную взаимосвязь патогенных свойств и резистентности к АМП.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1-14, 16-18, 20-25 см.  
REFERENCES)

15. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам : клинические рекомендации (EUCAST, 2023). - <https://www.antibiotic.ru/library/eucast-eucast-clinical-breakpoints-bacteria-13-0-rus/>.

19. Миронов А.Ю., Зур Н.В. Молекулярные маркеры патогенов. М.: Тираж; 2013.  
20. Чеботарь И.В., Бочарова Ю.А., Гурьев А.С., Маянский Н.А. Стратегии выживания бактерий в условиях контакта с антибиотиками. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020; 65 (2): 116-21.  
21. Мангутов Э.О., Алиева А.А., Харсеева Г.Г., Воронина Н.А., Алексеева Л.П., Евдокимова В.В. и др. *Corynebacterium* spp.: взаимосвязь патогенных свойств и резистентности к антимикробным препаратам. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (9): 519-24.

REFERENCES

1. Valdoeiros S.R., Neves C.S., Carvalho J.A., Gonçalves C., Pereira P., Vasconcelos O. et al. Infection and colonization by *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*: a 9-year observational study in a university central hospital. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2020; 39(9): 1745-52. DOI: 10.1007/s10096-020-03891-y.
2. Chauvelot P., Ferry T., Tafani V., Diot A., Tasse J., Conrad A. et al. Bone and joint infection involving *Corynebacterium* spp.: from clinical features to pathophysiological pathways. *Front Med. (Lausanne)*. 2021; 7: 539501. DOI: 10.3389/fmed.2020.539501.
3. Clariot S., Constant O., Lepeule R., Fihman V., Razazi K., Cook F. et al. Clinical relevance and impact of *Corynebacterium* isolation in lower respiratory tract of critically ill patients requiring mechanical ventilation. *Infection*. 2020; 48(3): 413-20. DOI: 10.1007/s15010-020-01411-w.
4. Marino A., Campanella E., Stracquandano S., Ceccarelli M., Zagami A., Nunnari G. et al. *Corynebacterium striatum* bacteremia during SARS-CoV2 infection: case report, literature review, and clinical considerations. *Infectious Disease Reports*. 2022; 14(3): 383-90. DOI: 10.3390/idr14030042.
5. Leyton B., Ramos J.N., Baio P.V.P., Veras J.F.C., Souza C., Burkovski A. et al. Treat Me Well or Will Resist: uptake of mobile genetic elements determine the resistome of *Corynebacterium striatum*. *Int. J. Mol. Sci.* 2021; 22(14):7499. DOI: 10.3390/ijms22147499. PMID: 34299116; PMCID: PMC8304765.
6. Heggendorf L.H., Gomes S.W.C., Sant'Anna L.O., Longo L., Farsura A.F. et al. Virulence potential and characteristics of multidrug-resistant *Corynebacterium amycolatum* strains isolated from nosocomial infections. *Human Journals*. 2022; 22(4): 1-24. DOI: 10.25166/IJSRM/2022.22.4.2.
7. Aygün G., Midilli K., Çilingir H., Yılmaz M., Küçük A. ve Eker, E. A fatal case of urosepsis due to *Corynebacterium riegliei*. *Braz. J. Microbiol.* 2013; 44(2): 475-6. DOI: org/10.1590/S1517-83822013000200022.
8. Kang Y., Chen S., Zheng B., Du X., Li Z., Tan Z. et al. Epidemiological Investigation of Hospital Transmission of *Corynebacterium striatum* Infection by Core Genome Multilocus Sequence Typing Approach. *Microbiol. Spectr.* 2023; 11(1): e0149022. DOI:10.1128/spectrum.01490-22.
9. Wang X., Zhou H., Chen D., Du P., Lan R., Qiu X. et al. Whole-Genome Sequencing Reveals a Prolonged and Persistent Intra-hospital Transmission of *Corynebacterium striatum*, an Emerging Multidrug-Resistant Pathogen. *J. Clin. Microbiol.* 2019; 57(9): e00683-19. DOI: 10.1128/JCM.00683-19.
10. Wang X., Zhou H., Du P., Lan R., Chen D., Dong A. et al. Genomic epidemiology of *Corynebacterium striatum* from three regions of China: an emerging national nosocomial epidemic. *J. Hosp. Infect.* 2021; 110: 67-75. DOI: 10.1016/j.jhin.2020.10.005.
11. Yoon S., Kim H., Lee Y., Kim S. Bacteremia caused by *Corynebacterium amycolatum* with a novel mutation in *gyrA* gene that confers high-level quinolone resistance. *Korean J. Lab. Med.* 2011; 31(1): 47-8. DOI: 10.3343/kjlm.2011.31.1.47.
12. Reddy B.S., Chaudhury A., Kalawat U., Jayaprada R., Reddy G., Ramana B.V. Isolation, speciation, and antibiogram of clinically relevant non-diphtherial *Corynebacteria* (Diphtheroids). *Indian J. Med. Microbiol.* 2012; 30(1): 52-7. DOI: 10.4103/0255-0857.93033.



MICROBIOLOGY

13. Silva-Santana G., Silva C.M.F., Olivella J.G.B., Silva I.F., Fernandes L.M.O., Sued-Karam B.R. et al. Worldwide survey of *Corynebacterium striatum* increasingly associated with human invasive infections, nosocomial outbreak, and antimicrobial multidrug-resistance, 1976-2020. *Arch. Microbiol.* 2021; 203(5):1863-80. DOI: 10.1007/s00203-021-02246-1.
14. Alibi S., Ramos-Vivas J., Ben Selma W., Ben Mansour H., Boukadda J., Navas J. Virulence of clinically relevant multidrug resistant *Corynebacterium striatum* strains and their ability to adhere to human epithelial cells and inert surfaces. *Microb. Pathog.* 2021; 155: 104887. DOI: 10.1016/j.micpath.2021.104887.
15. Antimicrobial susceptibility testing: clinical guidelines (EUCAST, 2023). <https://www.antibiotic.ru/library/eucast-eucast-clinical-breakpoints-bacteria-13-0-rus/>.
16. Campanile F., Carretto E., Barbarini D., Grigis A., Falcone M., Goglio A. et al. Clonal multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* strains, Italy. *Emerg. Infect. Dis.* 2009; 15(1): 75-8. DOI: 10.3201/eid1501.080804.
17. Ramos J.N., Souza C., Faria Y.V., da Silva E.C., Veras J.F.C., Baio P.V.P. et al. Bloodstream and catheter-related infections due to different clones of multidrug-resistant and biofilm producer *Corynebacterium striatum*. *BMC Infect. Dis.* 2019; 19(1): 672. DOI: 10.1186/s12879-019-4294-7.
18. Suh J.W., Ju Y., Lee C.K., Sohn J.W., Kim M.J., Yoon Y.K. Molecular epidemiology and clinical significance of *Corynebacterium striatum* isolated from clinical specimens. *Infect. Drug. Resist.* 2019; 12:161-71. DOI: 10.2147/IDR.S184518.
19. Mironov A.Yu., Zur N.V. Molecular markers of pathogens. Moscow: Tirazh; 2013. (in Russian)
20. Prjibelski A., Antipov D., Meleshko D., Lapidus A., Korobeynikov A. Using SPAdes De Novo Assembler. *Curr. Protoc. Bioinformatics.* 2020; 70(1): e102. DOI: 10.1002/cpbi.102.
21. Gurevich A., Saveliev V., Vyahhi N., Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics.* 2013; 29(8): 1072-5. DOI: 10.1093/bioinformatics/btt086.
22. Feldgarden M., Brover V., Haft D.H., Prasad A.B., Slotta D.J., Tolstoy I. et al. Validating the AMRFinder tool and resistance gene database by using antimicrobial resistance genotype-phenotype correlations in a collection of isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2019; 63(11): e00483-19. DOI: 10.1128/AAC.00483-19.
23. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018; 35(6):1547-9. DOI: 10.1093/molbev/msy096.
24. Schroder J., Maus I., Meyer K., Wördemann S., Blom J., Jaenicke S. et al. Complete genome sequence, lifestyle, and multi-drug resistance of the human pathogen *Corynebacterium resistens* DSM 45100 isolated from blood samples of a leukemia patient. *BMC Genomics.* 2012; 13: 141. DOI: 10.1186/1471-2164-13-141.
25. Montañó S.P., Rowland S.J., Fuller J.R., Burke M.E., MacDonald A.I., Boocock M.R. et al. Structural basis for topological regulation of Tn3 resolvase. *Nucleic. Acids Res.* 2023; 51(3): 1001-18. DOI: 10.1093/nar/gkac733.
26. Chebotar' I.V., Bocharova Y.A., Gur'ev A.S., Mayansky N.A. Bacteria survival strategies in contact with antibiotics. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika.* 2020; 65(2): 116-21. DOI: 10.18821/0869-2084-2020-65-2-116-121. (in Russian)
27. Mangutov E.O., Alieva A.A., Kharseeva G.G., Voronina N.A., Alekseeva L.P., Evdokimova V.V. et al. *Corynebacterium* spp.: relationship of pathogenic properties and antimicrobial resistance. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika.* 2022; 67(9): 519-24. DOI: 10.51620/0869-2084-2022-67-9-519-524. (in Russian)