

Чувствительность клинических штаммов *Streptococcus pyogenes* к антисептическому препарату гексэтидину и антимикробным препаратам для системного применения

И. А. Эйдельштейн, Р. С. Козлов, А. Н. Чагарян

НИИ антимикробной химиотерапии ГБОУ ВПО «Смоленская государственная медицинская академия»
Минздрава России, Смоленск, Россия

Охарактеризована активность 8 антибиотиков и антисептика гексэтидина в отношении клинических штаммов *Streptococcus pyogenes*, выделенных у пациентов с инфекциями различной локализации. Все исследованные препараты сохраняют высокую активность в отношении стрептококков группы А, за исключением тетрациклина и хлорамфеникола. Анализ вре-

менных кривых роста–отмирания для штаммов *Streptococcus pyogenes* свидетельствует о стабильном бактерицидном эффекте гексэтидина в отношении исследованных штаммов с высоким (16 мг/л) и низким уровнем МПК (4 мг/л).

Ключевые слова: *Streptococcus pyogenes*, гексэтидин, антибиотики, антимикробная активность.

Susceptibility of *Streptococcus pyogenes* Clinical Strains to Hexetidine and to Systemic Antimicrobials

I. A. Edelstein, R. S. Kozlov, A. N. Tchagaryan

Institute of Antimicrobial Chemotherapy, Smolensk, Russia

Minimal inhibitory concentrations (MIC) was used to describe the activity of 8 systemic antimicrobials and antiseptic hexetidine against clinical strains of *Streptococcus pyogenes*. All tested agents showed high activity against Group A streptococci, except tetracycline and chloram-

phenicol. Time-killing curves showed stable bactericidal effect of hexetidine against strains with both low (4 mg /l) and high (16 mg /l) MICs.

Key words: *Streptococcus pyogenes*, hexetidine, antibiotic, antimicrobial activity.

Контактный адрес:
Инна Александровна Эйдельштейн
Эл. почта: ie@antibiotic.ru

Введение

Streptococcus pyogenes (бета-гемолитический стрептококк группы А, БГСА) является наиболее распространенным возбудителем бактериального фарингита. Пенициллин считается препаратом выбора для лечения фарингита и других неинвазивных стрептококковых инфекций, а препараты группы макролидов рекомендуются в качестве альтернативных средств при наличии аллергических реакций у пациента на бета-лактамы антибиотики. Также при фарингитах могут местно использоваться антисептики, в частности гексэтидин (hexetidine), противомикробное действие которого обусловлено подавлением окислительных реакций метаболизма микроорганизмов [1, 2]. Гексэтидин обладает широким спектром активности в отношении бактерий и ряда грибов, а также оказывает слабое анестезирующее действие на слизистую оболочку.

Для оценки активности антимикробных препаратов, в соответствии с рекомендациями Комитета по клиническим лабораторным стандартам США (CLSI), применяется два методологических подхода: определение минимальных подавляющих концентраций (МПК) препаратов и анализ временной кривой гибели бактерий [3]. Показатели МПК используются в качестве опорных значений для характеристики активности антибактериальных препаратов в отношении определенного вида микроорганизма *in vitro*. Однако метод построения и оценки временной кривой гибели микроорганизмов *in vitro* позволяет более точно проанализировать количество активно размножающихся бактерий в определенные промежутки воздействия ингибирующего вещества. Данный подход также используется для выявления антагонизма или синергизма между двумя (и более) антимикробными препаратами и для определения толерантности.

Целью настоящего исследования было изучение активности антимикробных препаратов в отношении штаммов *S. pyogenes*, выделенных у пациентов с инфекциями различной локализации, а также характеристика антимикробного действия гексэтидина на основе анализа временных кривых гибели микроорганизмов.

Материал и методы

Выделение, идентификация, транспортировка и хранение штаммов. В исследование включены клинические штаммы *S. pyogenes*, выделенные в 12 центрах Центрального (Москва, Смоленск, Ярославль, Калуга), Южного (Краснодар), Приволжского (Пермь), Уральского (Екате-

ринбург 3 центра), Сибирского (Иркутск, Томск) и Дальневосточного (Хабаровск) федеральных округов России. Идентификацию *S. pyogenes* в локальных лабораториях проводили с помощью рутинных методов, принятых в каждой лаборатории. В центральной лаборатории (НИИ антимикробной химиотерапии, Смоленск) проводилась реидентификация 100% штаммов на основе изучения морфологии колоний на кровяном агаре, наличия β -гемолиза, отрицательной каталазной реакции, чувствительности к бацитрацину и положительных результатов латекс-агглютинации с использованием набора «Slidex Strepto-Kit» (bioMerieux, Франция). Для субкультивирования микроорганизмов использовали колумбийский агар (bioMerieux, Франция) с добавлением 5% дефибринированной лошадиной крови. Инкубация проводилась в атмосфере с повышенным содержанием CO_2 (5%) при температуре 35 °С в течение 24 ч. До тестирования штаммы хранили в криобирках, содержащих триптиказо-соевый бульон (bioMerieux, Франция) с добавлением 30% стерильного глицерина (Sigma, США) при температуре -70 °С.

Определение чувствительности. В соответствии с рекомендациями CLSI/NCCLS [4] исследование чувствительности *S. pyogenes* с определением МПК проводили методом микроразведения в катион-сбалансированном бульоне Мюллера-Хинтона (BBL, США) с добавлением лизированной лошадиной крови (итоговая концентрация 5%).

Для приготовления бактериальной суспензии чистую суточную культуру микроорганизмов разводили в стерильном 0,9% растворе хлорида натрия до мутности, эквивалентной 0,5 по стандарту МакФарланда (DEN-1 McFarland Densitometr, BIOSAN, Латвия). Полученную взвесь *S. pyogenes* в стандартной концентрации 10^5 КОЕ/мл с помощью многоканальной пипетки вносили в лунки микротитровальных планшетов, которые инкубировали при температуре 35 °С в течение 20–24 ч в обычной атмосфере.

При тестировании использовали двойные серийные разведения химически чистых субстанций следующих антибиотиков: пенициллина (Sigma, Германия), эритромицина (Polfa, Польша), клиндамицина (Pfizer, США), левофлоксацина (Fluka, Германия), тетрациклина (Sigma, Германия), хлорамфеникола (Fluka, Германия), ко-тримоксазола (Sigma, Германия), ванкомицина (Eli Lilly, США), а также раствора антисептического препарата гексэтидина (SIGMA-ALDRICH, Германия).

Для тестирования гексэтидина из общей выборки *S. pyogenes* были отобраны штаммы, изолирован-

Таблица 1. Критерии интерпретации результатов определения чувствительности штаммов *S. pyogenes* к антибиотикам (МПК, мг/л) и допустимые диапазоны МПК (в мг/л) для контрольного штамма *S. pneumoniae* ATCC® 49619

Антибиотик	<i>S. pyogenes</i>			<i>S. pneumoniae</i> ATCC® 49619
	Ч	УР	Р	
Пенициллин	≤0,12	–	–	0,25–1
Эритромицин	≤0,25	0,5	≥1	0,03–0,12
Клиндамицин	≤0,25	0,5	≥1	0,03–0,12
Тетрациклин	≤2	4	≥8	0,12–0,5
Левифлоксацин	≤2	4	≥8	0,5–2
Хлорамфеникол	≤4	8	≥16	2–8
Триметоприм/сульфаметоксазол	≤2	4–8	>8	0,12/2,4–1/19
Ванкомицин	≤1	–	–	0,12–0,5

Примечание. Ч – чувствительные, УР – умеренно резистентные, Р – резистентные штаммы.

ные из назофарингеального материала пациентов, что составило 274 культуры.

Контроль качества тестирования с использованием референтных штаммов *S. pneumoniae* ATCC®49619 и *S. pyogenes* ATCC®19615 при каждой постановке чувствительности проводили в соответствии с рекомендациями CLSI. Допустимые значения МПК для *S. pneumoniae* представлены в табл. 1.

Анализ временной кривой гибели микроорганизмов. Антимикробная активность гексэтидина была исследована с помощью анализа временной кривой гибели микроорганизмов с использованием метода разведений в бульоне в соответствии с рекомендациями CLSI/NCCLS [4]. В исследовании были включены штаммы *S. pyogenes* с МПК гексэтидина, равной 4 и 16 мг/л как наибольшее и наименьшее значение, полученное в результате анализа. Для выполнения процедуры были выбраны конечные концентрации гексэтидина, соответствующие одно-, двух- и четырехкратному увеличению МПК для каждого исследуемого штамма *S. pyogenes*. В каждый флакон, содержащий 5 мл бульона Мюллера–Хинтон (BBL, США), 5% дефибрированной лошадиной крови от общего объема и гексэтидин в необходимой концентрации, вносился тестируемый микроорганизм, находящийся в логарифмической фазе роста. Итоговая концентрация микробных клеток во флаконе составляла 5×10^5 КОЕ/мл. Флаконы инкубировали при 35 °С в обычной атмосфере. Отобранные аликвоты суспензии (50 мкл) инокулировали на чашки, содержащие колумбийский агар (bioMerieux, Франция) с добавлением 5% дефибрированной лошадиной крови, с использованием Automated Spiral Plater (Spiral Biotech) через 0, 2, 4, 6, 8, 10 и 24 часа. Все исследования проводили в повторях, а в качестве

отрицательного контроля использовали флаконы без гексэтидина. Инкубирование чашек проводилось в атмосфере с повышенным содержанием CO₂ (5%) при температуре 35 °С. Подсчет растущих колоний осуществляли с использованием формул и таблиц расчета пакета SpiralBiotech QCount™ в соответствующих разведениях. Антимикробная активность препарата была интерпретирована как бактерицидная, если погибало 99,9% (≥3 lg) микроорганизмов от общего количества КОЕ/мл, содержащихся во внесенном инокулюме в нулевой точке. Бактериостатическая активность определялась как гибель менее чем 99,9% (<3 lg) микроорганизмов от общего количества КОЕ/мл, внесенных во флакон для культивирования.

Методы обработки данных и статистического анализа. Ввод данных, статистическая обработка и анализ полученных результатов проводился с использованием программного обеспечения компьютерных программ Microsoft® Office Excel 2010, SAS версия 6.12 (SAS Institute, США) и M-Lab (НИИИХ, Смоленск).

Результаты исследования

Распределение штаммов по центрам. В исследование включено 589 клинических штаммов *S. pyogenes*. Количество штаммов *S. pyogenes*, полученных в каждом из 12 центров исследования, представлено на рис. 1.

Резистентность штаммов *S. pyogenes*. Обобщенные результаты и критерии интерпретации определения чувствительности *S. pyogenes* представлены в табл. 2. Категория «нечувствительный» объединяла штаммы, обладавшие умеренным и высоким уровнем резистентности.

Кроме необходимости учета данных по чувствительности, важная роль в прогнозировании ситуа-

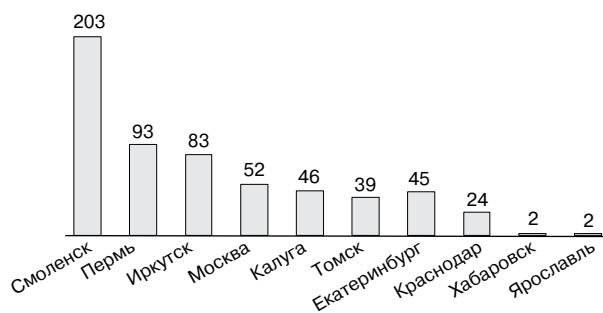


Рис. 1. Распределение штаммов *S. pyogenes* по центрам.

Таблица 2. Результаты определения чувствительности штаммов *S. pyogenes* (n=589)

Антимикробный препарат	Ч, %	УР, %	Р, %	МПК ₅₀ , мг/л	МПК ₉₀ , мг/л	Диапазон МПК, мг/л
Пенициллин	100	0	0	0,03	0,03	0,03–0,125
Эритромицин	97	0,3	2,7	0,03	0,06	0,03–2
Клиндамицин	99,3	0	0,7	0,03	0,03	0,03–2
Тетрациклин	60,1	1,7	38,2	0,125	32	0,125–64
Левифлоксацин	100	0	0	0,5	1	0,015–2
Хлорамфеникол	87,3	0,3	12,4	2	32	0,06–64
Триметоприм/ сульфаметоксазол	100	0	0	0,125	0,25	0,03–1
Ванкомицин	100	0	0	0,5	0,5	0,03–1
Гексэтидин	—	—	—	8	16	0,03–64

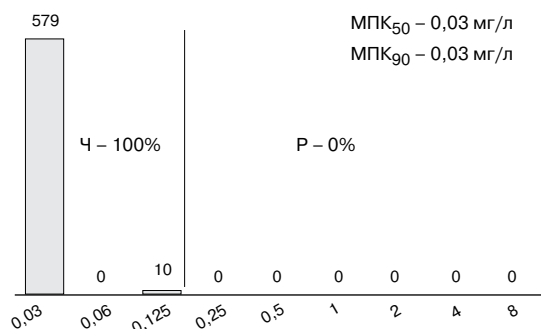


Рис. 2. Распределение МПК пеницилина для штаммов *S. pyogenes*.

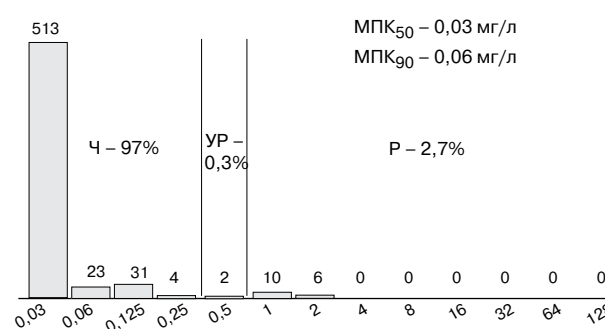


Рис. 3. Распределение МПК эритромицина для штаммов *S. pyogenes*.

ции с резистентностью принадлежит распределению штаммов по значениям МПК.

Бета-лактамы. *S. pyogenes* сохраняет высокую чувствительность к пенициллинам. Чувствительными к пенициллину были 100% штаммов БГСА. Значения МПК₅₀ и МПК₉₀ для штаммов *S. pyogenes* составляли 0,03 мг/л (рис. 2).

Макролиды и линкозамиды. Распределение штаммов *S. pyogenes* по значениям МПК эритромицина представлено на рис. 3.

Следует отметить, что в целом представители этой группы антибиотиков обладают высокой *in*

живает резистентность к 16-членным макролидам.

Распределение штаммов по значениям МПК клиндамицина представлено на рис. 4.

Фторхинолоны. Левифлоксацин характеризовался высоким уровнем активности в отношении исследованных штаммов *S. pyogenes*, его МПК₉₀ составляла 1 мг/л (рис. 5).

Тетрациклины. К тетрациклину нечувствительными были 39,9% исследованных изолятов *S. pyogenes* (рис. 6). В субпопуляции, представленной чувствительными микроорганизмами, 322 штамма имели МПК ≤ 0,125 мг/л, что соответствует зна-

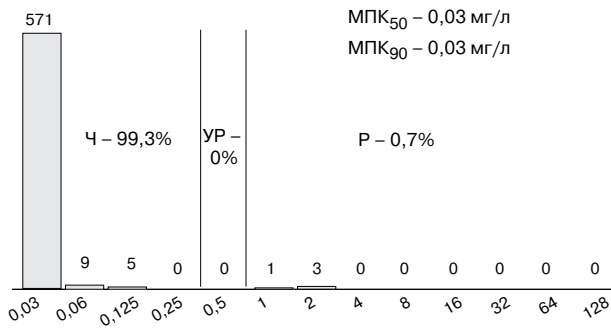


Рис. 4. Распределение МПК клиндамицина для штаммов *S. pyogenes*.

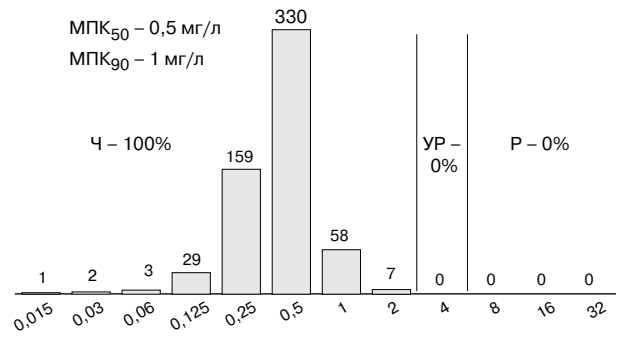


Рис. 5. Распределение МПК левофлоксацина для штаммов *S. pyogenes*.

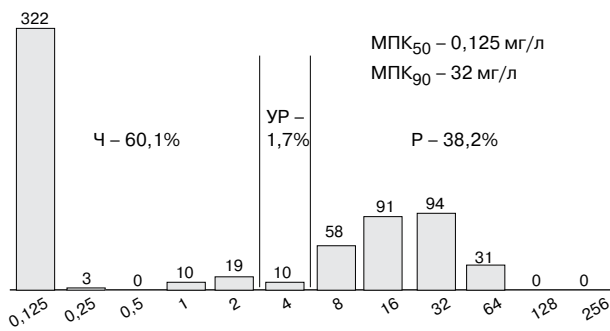


Рис. 6. Распределение МПК тетрациклина для штаммов *S. pyogenes*.

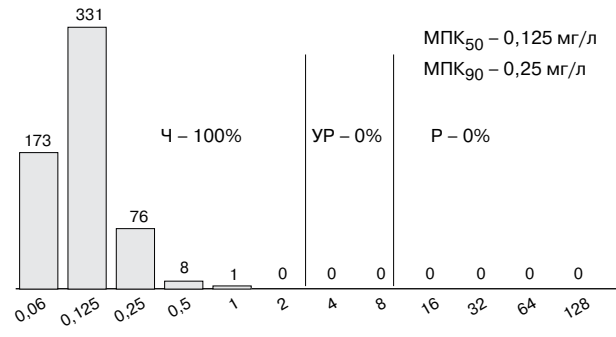


Рис. 7. Распределение МПК триметоприма/сульфаметоксазола для штаммов *S. pyogenes*.

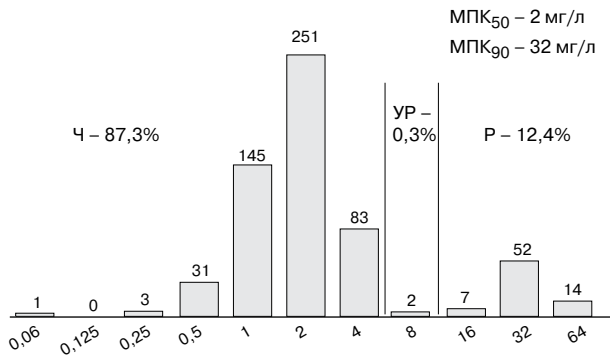


Рис. 8. Распределение МПК хлорамфеникола для штаммов *S. pyogenes*.

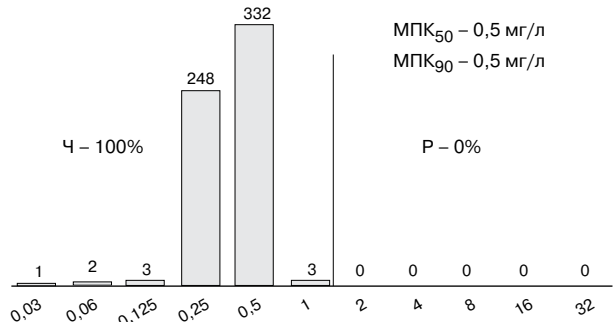


Рис. 9. Распределение МПК ванкомицина для штаммов *S. pyogenes*.

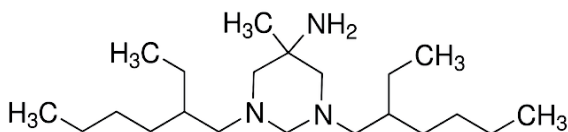


Рис. 10. Гексэтидин – 1,3-бис(2-этилгексил) гексагидро-5-метил-5-пиримидинамин.

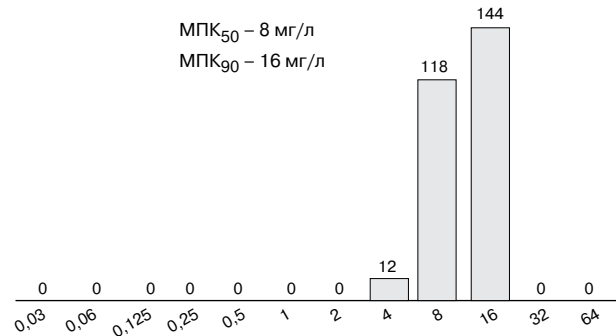


Рис. 11. Распределение МПК гексэтидина для штаммов *S. pyogenes*.

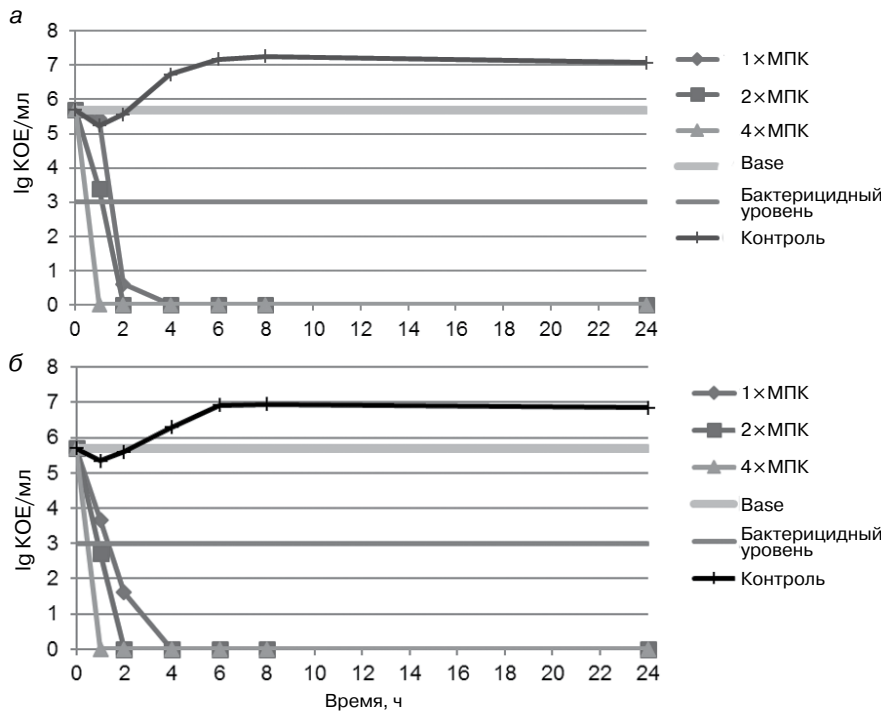


Рис. 12. Кривые роста–отмирания штаммов *S. pyogenes* с МПК 4 мг/л (а) и МПК 16 мг/л (б) гексэтидина.

чению, наблюдаемому у изолятов «дикого» фенотипа. Нечувствительные к тетрациклину штаммы были представлены двумя субпопуляциями: с низким (1,7% штаммов) и высоким (38,2% штаммов) уровнями резистентности с МПК тетрациклина соответственно 4 и ≥ 8 мг/л. Преобладание чувствительных штаммов подтверждается значением МПК₅₀ (0,125 мг/л). В то же время, МПК₉₀ (32 мг/л) находится в диапазоне значений, характерных для высоких показателей резистентности. Резистентность к тетрациклину в выборке эритромицинорезистентных штаммов БГСА была значительно выше (94,4% — 17 из 18 штаммов), чем среди эритромициночувствительных штаммов (36,4% — 208 из 571 штамма).

Триметоприм/сульфаметоксазол. Триметоприм/сульфаметоксазол характеризовался высокой активностью в отношении тестируемых штаммов БГСА (100% чувствительных). МПК₅₀ и МПК₉₀ составили соответственно 0,125 и 0,25 мг/л и нахо-

дятся в диапазоне чувствительности (рис. 7).

Хлорамфеникол. К хлорамфениколу нечувствительными были 12,7% изолятов (рис. 8). Его МПК₅₀ составила 2 мг/л и находится в диапазоне чувствительности. В то же время, МПК₉₀ (32 мг/л) находится в диапазоне резистентности.

Гликопептиды. Ванкомицин проявлял активность в отношении всех исследованных штаммов. Его МПК₅₀ и МПК₉₀ составляли 0,5 мг/л (рис. 9).

Гексэтидин. Химическая структура гексэтидина представлена на рис. 10.

Для исследования антибактериальных свойств гексэтидина было проанализировано 274 штамма *S. pyogenes*, выделенных из ротоглотки. Штаммы, выде-

ленные из других источников или видов клинического материала, в исследование не включались. Поскольку на настоящий момент не существует критериев интерпретации для препарата, оценивались показатели МПК₅₀ и МПК₉₀, которые составили 8 и 16 мг/л соответственно (рис. 11).

Анализ временных кривых роста–отмирания *S. pyogenes*. Для оценки активности гексэтидина в отношении штаммов *S. pyogenes* с МПК 4 мг/л и *S. pyogenes* с МПК 16 мг/л были построены временные кривые роста–отмирания (рис. 12).

Гексэтидин демонстрирует бактерицидную активность как в отношении *S. pyogenes* с низким уровнем МПК (4 мг/л), так и с высоким уровнем МПК (16 мг/л) через 24 часа инкубирования. Снижение более чем на 3 lg видимого роста микроорганизмов наблюдается через 4 часа культивирования для всех выбранных концентраций гексэтидина.

Время гибели штаммов *S. pyogenes* дополнительно оценивалось при нескольких concentra-

Таблица 3. Время гибели штаммов *S. pyogenes* при различных концентрациях гексэтидина, входящих в состав лекарственных форм

Показатель	Концентрация гексэтидина, %		
	0,2	0,1	МПК гексэтидина, мг/л
Время гибели, ч	2	2	4
Время гибели, ч	4	–	16

циях гексэтидина, входящих в состав различных лекарственных форм: 0,1% раствора для наружного применения и 0,2% раствора для наружного применения в виде аэрозоля. При использовании 0,1% и 0,2% растворов препарата через 2 часа отсутству-

ет рост *S. pyogenes* с МПК, равной 4 мг/л, а через 4 часа наблюдается угнетение роста *S. pyogenes* с МПК 16 мг/л. Данные анализа для двух штаммов *S. pyogenes* представлены в табл. 3.

Литература

1. Karić E., Becić F. Hexetidine - an oral antiseptic. *Med Arh* 2002; 56(1):43-8.
2. Piloni A.P., Buttini G., Giannarelli D., et al. Antimicrobial action of Nitens mouthwash (cetyltrimethylammonium naproxenate) on multiple isolates of pharyngeal microbes: a controlled study against chlorhexidine, benzydamine, hexetidine, amoxicillin, amoxicillin-clavulanate, clarithromycin, and cefaclor. *Chemotherapy* 2002; 48(4):168-73.
3. NCCLS. (1999). National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing (6th ed.). Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents. Approved Standards. M26-A.
4. National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2000). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically. – Fifth Edition Approved Standard M7-A5 NCCLS, Wayne, PA.