

## 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.

## 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  $\beta$ -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  $\text{CO}_2$  (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  $5 \times 10^5$  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 CO<sub>2</sub> (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 (НИИАХ, 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-

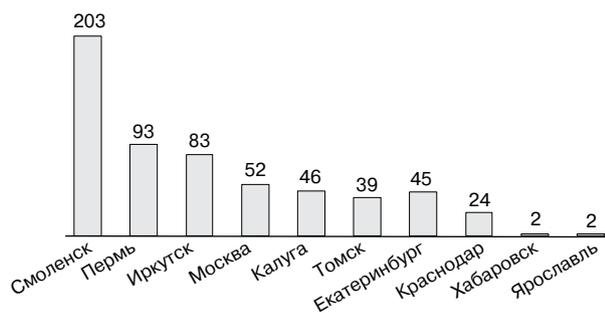


Рис. 1. Распределение штаммов *S. pyogenes* по центрам.

*in vitro* активностью: общая частота нечувствительных штаммов не превышает 5%. Для 3% штаммов МПК<sub>90</sub> эритромицина составляла 0,06 мг/л.

Количество нечувствительных к клиндамицину штаммов составило 0,7%, а его МПК<sub>90</sub> — 0,03 мг/л. Учитывая незначительный уровень резистентности к клиндамицину, можно предположить, что это обусловлено циркуляцией штаммов, имеющих ген *mefA* (М-фенотип), который отвечает за активный выброс из микробной клетки 14-членных макролидов (эритромицин и кларитромицин), но не обеспе-

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

Антимикробный препарат	Ч, %	УР, %	Р, %	МПК <sub>50</sub> , мг/л	МПК <sub>90</sub> , 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

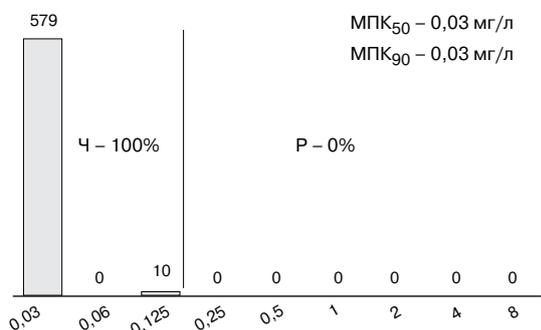


Рис. 2. Распределение МПК пеницилина для штаммов *S. pyogenes*.

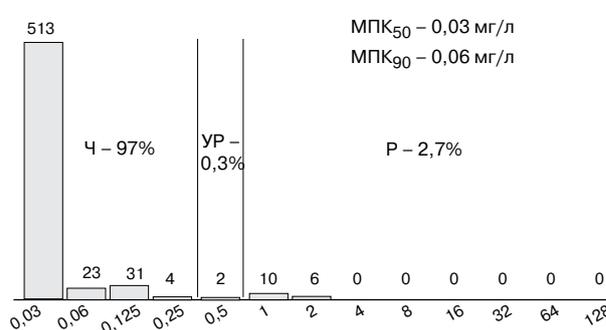


Рис. 3. Распределение МПК эритромицина для штаммов *S. pyogenes*.

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 МПК<sub>50</sub> и МПК<sub>90</sub> 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 МПК<sub>90</sub> 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-

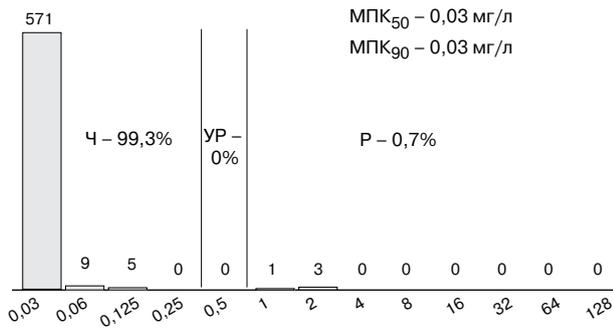


Рис. 4. Распределение МПК клиндамицина для штаммов *S. pyogenes*.

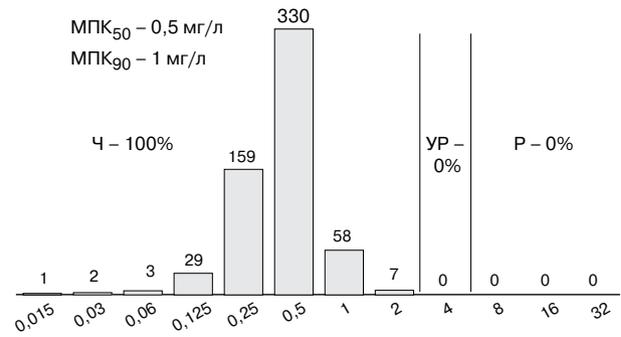


Рис. 5. Распределение МПК левофлоксацина для штаммов *S. pyogenes*.

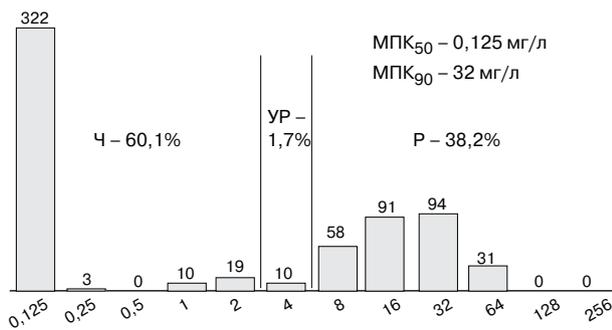


Рис. 6. Распределение МПК тетрациклина для штаммов *S. pyogenes*.

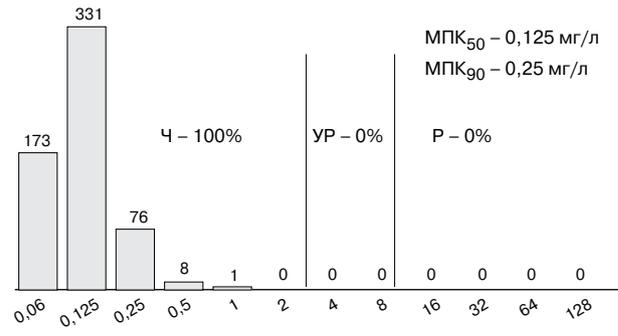


Рис. 7. Распределение МПК триметоприма/сульфаметоксазола для штаммов *S. pyogenes*.

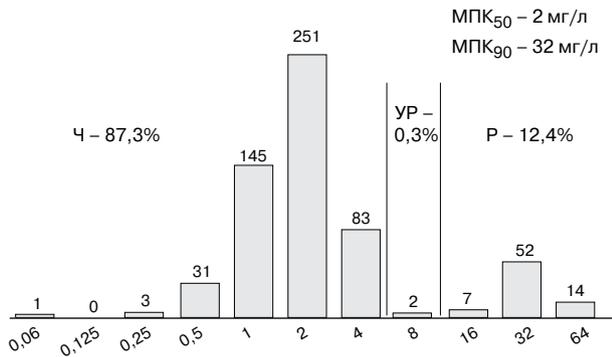


Рис. 8. Распределение МПК хлорамфеникола для штаммов *S. pyogenes*.

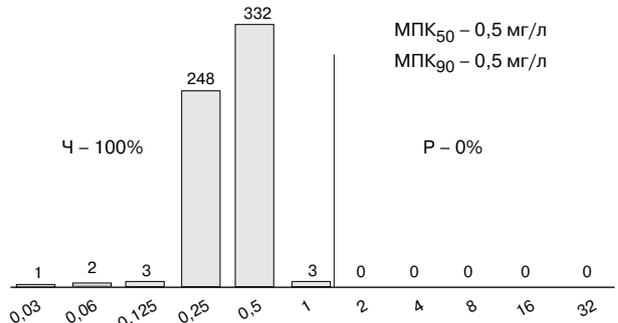


Рис. 9. Распределение МПК ванкомицина для штаммов *S. pyogenes*.

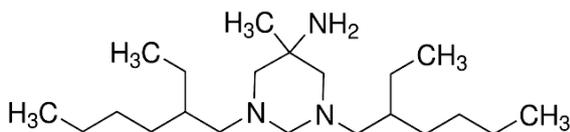


Рис. 10. Гексэтидин — 1,3-бис (2-этилгексил) гексагидро-5-метил-5-пиримидинамин.

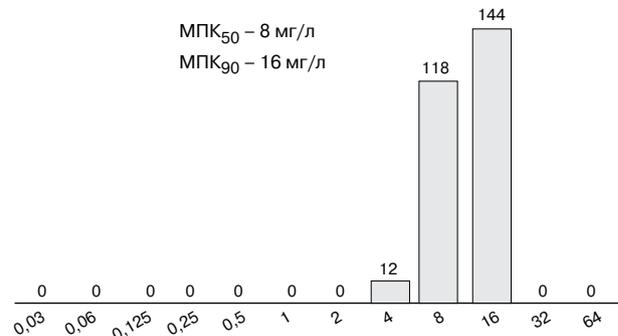


Рис. 11. Распределение МПК гексэтидина для штаммов *S. pyogenes*.

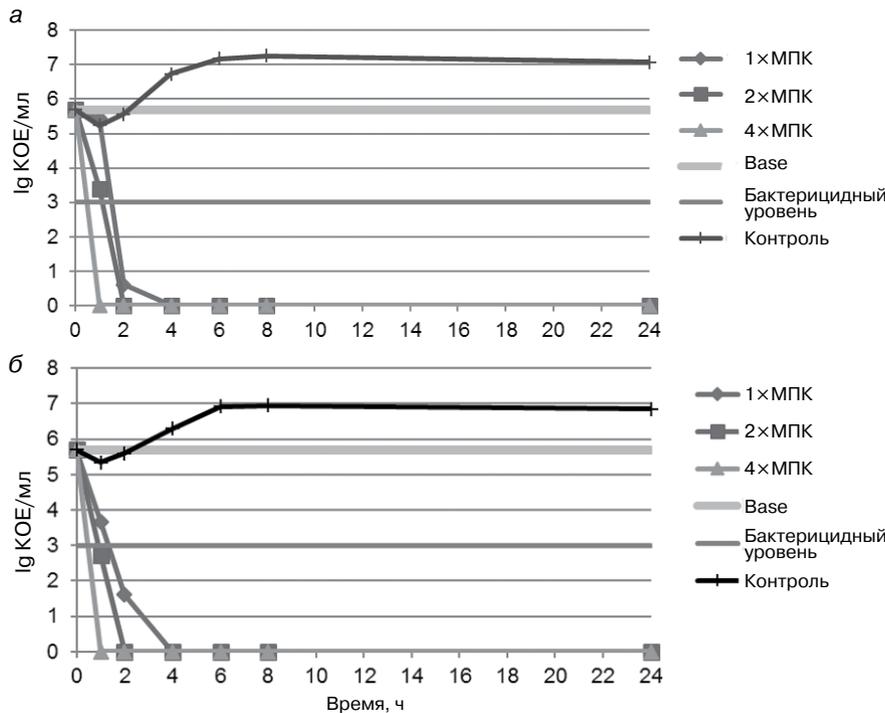


Рис. 12. Кривые роста–отмирания штаммов *S. pyogenes* с МПК 4 мг/л (а) и МПК 16 мг/л (б) гексэтидина.

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  $\geq 8$  мг/л. Преобладание чувствительных штаммов подтверждается значением МПК<sub>50</sub> (0,125 мг/л). В то же время, МПК<sub>90</sub> (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). МПК<sub>50</sub> и МПК<sub>90</sub> 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 МПК<sub>50</sub> составила 2 мг/л и находится в диапазоне чувствительности. В то же время, МПК<sub>90</sub> (32 мг/л) находится в диапазоне резистентности.

**Гликопептиды.** Ванкомицин проявлял активность в отношении всех исследованных штаммов. Его МПК<sub>50</sub> и МПК<sub>90</sub> 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, выделенные из других источников или видов клинического материала, в исследование не включались. Поскольку на настоящий момент не существует критериев интерпретации для препарата, оценивались показатели МПК<sub>50</sub> и МПК<sub>90</sub>, 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 концентра-

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 (6<sup>th</sup> 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.