

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СОСТАВА ГЕНОВ АНТИМИКРОБНОЙ УСТОЙЧИВОСТИ В ГЕНОМАХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *CORYNEBACTERIUM*

Т. А. Кульшань [✉], И. О. Бугаева, Е. Ф. Соболева, М. С. Аллянова, Д. А. Попов, И. Г. Швиденко

Саратовский государственный медицинский университет имени В. И. Разумовского Министерства здравоохранения Российской Федерации, Саратов, Россия

В настоящее время множественная антимикробная резистентность бактериальных инфекционных агентов представляет серьезную угрозу для мирового здравоохранения. Особое значение в развитии инфекций, в том числе госпитальных, играют следующие виды коринебактерий: *C. amycolatum*, *C. urealyticum*, *C. striatum*, *C. jeikeium*, *C. aurimucosum*, *C. genitalium*, которые устойчивы к большому арсеналу антимикробных препаратов. Целью исследования было проведение биоинформатического анализа спектра генов устойчивости к антимикробным препаратам в опубликованных геномах некоторых представителей рода *Corynebacterium*. Исследованы данные о нуклеотидных последовательностях полных геномов 22 штаммов коринебактерий, представленных в свободном доступе в NCBI GenBank. Биоинформатический анализ полногеномных последовательностей с целью поиска генов антимикробной устойчивости в указанных геномах осуществляли с помощью онлайн-ресурса PATRIC. Установлено, что представленные геномы в различных комбинациях содержали 25 генов устойчивости к антимикробным препаратам. У некоторых штаммов коринебактерий выявлены аминокислотные замены в *GyrA* (позиции 87, 88 и 91), с которыми может быть связана реализация устойчивости к хинолонам/фторхинолонам.

Ключевые слова: *C. amycolatum*, *C. jeikeium*, *C. striatum*, *C. urealyticum*, *C. aurimucosum*, геномы, гены антимикробной устойчивости, *gyrA*, антимикробные (противомикробные) препараты

Вклад авторов: Т. А. Кульшань — планирование исследования, анализ литературы, работа с молекулярно-генетическими данными (подбор геномов, аннотация генома, сравнительный анализ аминокислотной последовательности гена *gyrA*), аналитическая работа с полученными данными, написание публикации; И. О. Бугаева — планирование исследования, аналитическая работа с полученными данными, интерпретирование результатов, участие в написании публикации; Е. Ф. Соболева — анализ литературы, аналитическая работа с полученными данными, написание публикации; М. С. Аллянова — анализ литературы, анализ состава генов антимикробной устойчивости в геномах штаммов коринебактерий, работа с онлайн-сервисом PATRIC; Д. А. Попов — анализ литературы, поиск аминокислотных последовательностей гена *gyrA* в геномах коринебактерий, сравнительный анализ аминокислотных последовательностей; И. Г. Швиденко — консультирование в ходе написания статьи, аналитическая работа с полученными данными.

✉ **Для корреспонденции:** Татьяна Алексеевна Кульшань
ул. Б. Казачья, д. 112, г. Саратов, 410012, Россия; tatjana.kulshan@yandex.ru

Статья получена: 20.10.2023 **Статья принята к печати:** 03.12.2023 **Опубликована онлайн:** 19.12.2023

DOI: 10.24075/vrgmu.2023.047

COMPARATIVE BIOINFORMATICS ANALYSIS OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE GENE POOL IN THE GENOMES OF REPRESENTATIVES OF GENUS *CORYNEBACTERIUM*

Kulshan TA [✉], Bugaeva IO, Soboleva EF, Allyanova MS, Popov DA, Shvidenko IG

Razumovsky Saratov State Medical University, Saratov, Russia

Currently, multidrug resistance of bacterial infectious agents poses a serious threat to the global public health. The following *Corynebacterium* strains are of special importance for infections, including hospital-acquired ones: *C. amycolatum*, *C. urealyticum*, *C. striatum*, *C. jeikeium*, *C. aurimucosum*, *C. genitalium* that are resistant to the broad spectrum of antimicrobial drugs. The study was aimed to conduct bioinformatics analysis of the pool of antimicrobial resistance genes in the published genomes of some members of the genus *Corynebacterium*. The data on the whole genome nucleotide sequences of 22 *Corynebacterium* isolates readily available from NCBI GenBank were assessed. Bioinformatics analysis of the whole genome sequences conducted in order to search for antimicrobial resistance genes in the specified genomes was performed using the PATRIC online resource. It was found that the genomes provided comprised various combinations of 25 antimicrobial drug resistance genes. Amino acid substitutions in *GyrA* (positions 87, 88 and 91) were revealed in some *Corynebacterium* strains, through which quinolone/fluoroquinolone resistance could be realized.

Keywords: *C. amycolatum*, *C. jeikeium*, *C. striatum*, *C. urealyticum*, *C. aurimucosum*, genomes, antimicrobial resistance genes, *gyrA*, antimicrobial drugs

Author contribution: Kulshan TA — study planning, literature review, dealing with molecular genetic data (selection of genomes, genome annotation, comparative analysis of *gyrA* amino acid sequences), data analysis, manuscript writing; Bugaeva IO — study planning, data analysis, interpretation of findings, manuscript writing; Soboleva EF — literature review, data analysis, manuscript writing; Allyanova MS — literature review, analysis of the antimicrobial resistance gene pool in the genomes of corynebacterial strains, dealing with the PATRIC online service; Popov DA — literature review, search for *gyrA* amino acid sequences in the genomes of corynebacterial strains, comparative analysis of amino acid sequences; Shvidenko IG — advising during manuscript writing, data analysis.

✉ **Correspondence should be addressed:** Tatiana A. Kulshan
B. Kazachya, 112, Saratov, 410012, Russia; tatjana.kulshan@yandex.ru

Received: 20.10.2023 **Accepted:** 03.12.2023 **Published online:** 19.12.2023

DOI: 10.24075/brsmu.2023.047

В настоящее время множественная антимикробная резистентность бактериальных инфекционных агентов представляет серьезную угрозу для мирового здравоохранения. Нерациональное применение антимикробных препаратов для лечения людей, использование их в животноводстве и сельском хозяйстве —

определяющие факторы широкого распространения лекарственной устойчивости у бактерий [1–3].

Селективное давление антимикробных препаратов на бактериальную популяцию способствует реализации различных механизмов резистентности, которые возникают в результате приобретения генетических

Таблица 1. Штаммы представителей рода *Corynebacterium*, полногеномные нуклеотидные последовательности которых использованы в работе

№	Штамм	Год, место, источник выделения	Код доступа GenBank:
1	<i>Corynebacterium amycolatum</i> BER245	2011, Бразилия, человек (материал из уха)	CP102778.1
2	<i>Corynebacterium amycolatum</i> ICIS 53	2016, Россия, человек (вагинальное содержимое)	MIFV00000000
3	<i>Corynebacterium amycolatum</i> VH6958	2016, Испания, человек	JAFJMB000000000.1
4	<i>Corynebacterium amycolatum</i> ICIS 9	2017, Россия, человек (вагинальное содержимое)	MTPT00000000.1
5	<i>Corynebacterium amycolatum</i> SB-1	2019, Южная Корея, человек (кожа)	CP120206.1
6	<i>Corynebacterium amycolatum</i> ICIS 99	2020, Россия, человек (вагинальное содержимое)	JAIUSU000000000
7	<i>Corynebacterium amycolatum</i> 1189	н/и, Германия, н/и	CP069513.1
8	<i>Corynebacterium urealyticum</i> DSM 7109	1985, Германия, человек (моча)	AM942444
9	<i>Corynebacterium urealyticum</i> VH3073	2017, Испания, человек (моча)	VTFJ00000000
10	<i>Corynebacterium urealyticum</i> 996	н/и, Германия, н/и	CP065982.1
11	<i>Corynebacterium urealyticum</i> 994	н/и, Германия, н/и	CP066064.1
12	<i>Corynebacterium striatum</i> 2308	2011, Бразилия, человек (кровь)	NRIO00000000.1
13	<i>Corynebacterium striatum</i> 708C	2021, Великобритания, (суставная жидкость)	JASNMG000000000
14	<i>Corynebacterium striatum</i> 824M	2022, Великобритания, кровь	JASNMH000000000
15	<i>Corynebacterium striatum</i> 1197	н/и, Германия, н/и	CP069514.1
16	<i>Corynebacterium striatum</i> 1115	н/и, Германия, н/и	CP068158.1
17	<i>Corynebacterium striatum</i> ATCC 6940	н/и, человек (урогенитальный тракт)	ACGE00000000
18	<i>Corynebacterium jeikeium</i> K411	2004, Германия, человек (подмышечная впадина)	CR931997.1
19	<i>Corynebacterium jeikeium</i> 574	2016, США, человек	CP033784.1
20	<i>Corynebacterium jeikeium</i> ATCC 43734	н/и, человек (урогенитальный тракт)	ACYW00000000
21	<i>Corynebacterium aurimucosum</i> UMB7769	2013, США, человек (моча)	JASOLN000000000
22	<i>Corynebacterium genitalium</i> ATCC 33030	н/и, США, человек (урогенитальный тракт)	ACLJ00000000

детерминант устойчивости или спонтанных мутаций [1, 4–6]. Изучение эволюционных преобразований в бактериальных геномах, связанных с антибиотикорезистентностью, способствует оптимизации терапевтических стратегий и профилактических мер.

На сегодняшний день увеличение роли представителей нормальной микрофлоры, в частности представителей рода *Corynebacterium*, в инфекционной патологии также может быть связано с распространением в геномах бактерий генов антимикробной устойчивости. Все более частое выделение коринебактерий в качестве патогенов, особенно у людей с ослабленным иммунитетом, свидетельствует о повышении их роли в развитии инфекционных осложнений у пациентов [2].

Особое значение в развитии инфекций имеют следующие виды коринебактерий: *C. amycolatum* (инфекции кожи и мягких тканей, бактериемия, эндокардит, инфекции половой системы), *C. urealyticum* (острые и хронические инфекции мочевыводящих путей, мочекаменная болезнь), *C. striatum* (истинная бактериемия, колонизация протезов, катетеров, дыхательных трубок и т. д.), *C. jeikeium* (бактериемия, эндокардиты, пневмонии, инфекции кожи и мягких тканей), *C. aurimucosum* (острые или хронические инфекции суставов, инфицирование ран диабетической стопы), *C. genitalium* (инфекции мочеполовых путей) [2, 3, 5, 7–14]. Стоит отметить множественную лекарственную устойчивость некоторых видов коринебактерий к β -лактамам, макролидам, аминогликозидам, хинолонам, тетрациклинам и рифампицинам, линкозамидам и др. [1, 4, 12–14].

Тем не менее, данные о резистентности коринебактерий к лекарственным средствам разноречивы, в этой связи целью исследования стало проведение биоинформатического анализа спектра генов устойчивости

к антимикробным препаратам в опубликованных геномах некоторых представителей рода *Corynebacterium*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали данные о нуклеотидных последовательностях полных геномов 22 штаммов 6 видов коринебактерий (*C. amycolatum*, *C. urealyticum*, *C. striatum*, *C. jeikeium*, *C. aurimucosum*, *C. genitalium*), представленных в свободном доступе в NCBI GenBank, выделенных на территории различных стран и в разные годы (табл. 1).

Биоинформатический анализ полногеномных последовательностей с целью поиска генов антимикробной устойчивости в указанных геномах осуществляли с помощью онлайн-ресурса PATRIC (Pathosystems Resource Integration Center) с использованием комплексной базы данных по исследованиям антибиотиков (Comprehensive Antibiotic Resistance Database, CARD) и базы данных устойчивых к антибиотикам организмов (Database of Antibiotic-Resistant Organisms, NDARO) [15].

Аминокислотные последовательности гена *gyrA* были взяты из репозитория Genbank. Для анализа аминокислотных последовательностей гена *gyrA* использовали программное обеспечение UGENE (Unipro UGENE) 48.1 [16]. Выравнивание аминокислотных последовательностей проводили с помощью программы MUSCLE, интегрированной в UGENE.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ходе проведенного биоинформатического анализа было установлено, что представленные геномы в различных комбинациях содержали гены устойчивости к антимикробным препаратам. Всего было определено

Таблица 2. Перечень генов устойчивости к антимикробным препаратам, обнаруженных в геномах изучаемых штаммов рода *Corynebacterium* с помощью онлайн-ресурса PATRIC

Антимикробные препараты	Гены, кодирующие антимикробную устойчивость
Липопептиды	<i>pgsA, gdpD (ugpQ, glpQ)</i>
Макролиды, пенициллины	<i>mtrA, mtrB</i>
Макролиды, линкозамиды, стрептограммы	<i>ermX</i>
Диаминопиримидины	<i>folA (dfr)</i>
Тетрациклины, глицилциклины	<i>s10p (rpsJ)</i>
Тетрациклины	<i>tetO (tetW)</i>
Сульфаниламиды	<i>folP</i>
Аминогликозиды	<i>s12p (rpsL, rpsJ), gibB, aph(3')-I, aph(6)-Ic</i>
Фузидиевая кислота	<i>ef-G (fusA), Isu (rplF)</i>
Циклосерин	<i>alc, dlr</i>
Изониазид	<i>oxyR</i>
Фосфомицины	<i>murA, ispC (dxx)</i>
Хлорамфеникол	<i>cmx</i>
Муропироцин	<i>ileS</i>
Триклозан	<i>fabG</i>
Бицикломицин	<i>rho</i>
Эльфамицины	<i>ef-Tu(tufA)</i>

25 разных генов, кодирующих устойчивость к лекарственным средствам антимикробной направленности (табл. 2).

Стоит отметить, что значительно реже в геномах изучаемых изолятов встречались гены (табл. 3):

1) *tetO (tetW)* (кодирует устойчивость к тетрациклину) — отсутствовал в геноме 19 штаммов (86,4%);

2) *aph (3')-I, aph (6)-Ic* (кодируют устойчивость к аминогликозидам) — отсутствовали в геноме 14 штаммов (63,6%);

3) *ermX* (кодирует устойчивость к макролидам, линкозамидам, стрептограммам) — отсутствовал в геноме 13 штаммов (59%);

4) *Isu (rplF)* (кодирует устойчивость к фузидиевой кислоте) — отсутствовал в геноме 12 штаммов (54,5%);

5) *cmx* (кодирует устойчивость к хлорамфениколу) — отсутствовал в геноме 8 штаммов (36,4,3%);

6) *ispC (dxx)* (кодирует устойчивость к фосфомицину) — отсутствовал в геноме 7 штаммов (32%);

7) *gibB* (кодирует устойчивость к аминогликозидам), *oxyR* (кодирует устойчивость к изониазиду), *fabG* (кодирует устойчивость к триклозану) — отсутствовали в геномах 1 штамма (4,5%) (*Corynebacterium striatum* 824M, *Corynebacterium striatum* 1197, *Corynebacterium striatum* 708C соответственно).

Вместе с тем, устойчивость к аминогликозидам, фузидиевой кислоте, фосфомицинам кодировалась несколькими генами, в этой связи отсутствие в геноме одного из генов не может быть свидетельством чувствительности изолята к данным антимикробным веществам.

Все остальные гены, представленные в табл. 2, встречались в геномах 22 штаммов коринебактерий в 100% случаев.

Штаммом, содержащим 24 из 25 обнаруженных генов антимикробной резистентности, был *C. striatum* 2308. В его геноме отсутствовал только ген *tetO (tetW)*. По литературным данным известно, что штамм был выделен в 2011 г. из гемокультуры мужчины, который находился на

лечении в больнице Рио-де-Жанейро. По фенотипической характеристике был чувствителен только к тетрациклину (МПК 1 мг/л), линезолиду (МИК 0,25 мг/л) и ванкомицину (МИК 0,5 мг/л) [12]. Данные биоинформатического анализа, полученные нами, подтверждают результаты фенотипического исследования [12]: отсутствие гена *tetO (tetW)* (устойчивость к тетрациклину), отсутствие генов устойчивости к оксазолидонам (линезолид) и гликопептидам (ванкомицин). Стоит отметить, что генов резистентности к линезолиду и ванкомицину не было обнаружено ни у одного исследуемого штамма. Однако авторы указывают, что фенотипически данный штамм был устойчив к эритромицину (МИК > 256 мг/л) и клиндамицину (МПК > 256 мг/л), гентамицину (аминогликозид) (МИК 256 мг/л) [12]. Такие фенотипические проявления могут быть обусловлены присутствием генов *ermX* и *aph (3')-I, aph (6)-Ic*.

Еще одним штаммом, в геноме которого отсутствовал лишь ген *ispC (dxx)* (устойчивость к фосфомицину), стал *Corynebacterium amycolatum* ICIS 9, выделенный из влагалища здоровой женщины в 2017 г. в России. Вместе с тем, устойчивость к фосфомицинам кодируется еще и геном *murA*, который присутствовал в геноме. *Corynebacterium amycolatum* ICIS 9 авторы публикации рассматривали в качестве возможного пробиотического препарата при лечении дисбиоза влагалища [9–11]. Была установлена фенотипическая устойчивость *Corynebacterium amycolatum* ICIS 9 к антимикробным препаратам (амикацину, гентамицину (аминогликозиды), амоксициллину (бета-лактамы), кларитромицину (макролид), хлорамфениколу, ципрофлоксацину (фторхинолон) и тетрациклину) [9–11]. Действительно, в ходе проведенного нами биоинформатического исследования в геноме данного изолята содержались гены, кодирующие устойчивость к пенициллинам, аминогликозидам, макролидам, хлорамфениколам, фторхинолонам и тетрациклину (табл. 2).

Что касается штаммов, в геноме которых отсутствует значительное количество генов антимикробной резистентности (от 6 до 10 генов), то к ним относились:

Таблица 3. Перечень генов устойчивости к антимикробным препаратам, отсутствующих в геномах изучаемых штаммов рода *Corynebacterium*

№	Штамм	Отсутствующие в геноме гены антимикробной резистентности
1	<i>Corynebacterium amycolatum</i> BER245	<i>ermX, tetO (tetW), ispC (dxr)</i>
2	<i>Corynebacterium amycolatum</i> ICIS 53	<i>ermX, tetO (tetW), aph(3')-I, aph(6)-I, lsu (rplF), ispC (dxr), cmx</i>
3	<i>Corynebacterium amycolatum</i> VH6958	<i>tetO (tetW), lsu (rplF), ispC (dxr)</i>
4	<i>Corynebacterium amycolatum</i> ICIS 9	<i>ispC (dxr)</i>
5	<i>Corynebacterium amycolatum</i> SB-1	<i>ermX, tetO (tetW), aph(3')-I, aph(6)-I, lsu (rplF), ispC (dxr), cmx</i>
6	<i>Corynebacterium amycolatum</i> ICIS 99	<i>ermX, tetO (tetW), aph(3')-I, aph(6)-I, lsu (rplF), ispC (dxr)</i>
7	<i>Corynebacterium amycolatum</i> 1189	<i>ermX, tetO (tetW), aph(3')-I, aph(6)-I, lsu (rplF), ispC (dxr), cmx</i>
8	<i>Corynebacterium urealyticum</i> DSM 7109	<i>ermX, tetO (tetW), aph(3')-I, aph(6)-I</i>
9	<i>Corynebacterium urealyticum</i> VH3073	<i>tetO (tetW), lsu (rplF)</i>
10	<i>Corynebacterium urealyticum</i> 996	<i>ermX, tetO (tetW), lsu (rplF)</i>
11	<i>Corynebacterium urealyticum</i> 994	<i>tetO (tetW), lsu (rplF)</i>
12	<i>Corynebacterium striatum</i> 2308	<i>tetO (tetW)</i>
13	<i>Corynebacterium striatum</i> 708C	<i>mtrA, mtrB, ermX, tetO (tetW), gibB, aph(3')-I, aph(6)-I, lsu (rplF), fabG, cmx</i>
14	<i>Corynebacterium striatum</i> 824M	<i>ermX, tetO (tetW), aph(3')-I, aph(6)-I, lsu (rplF), gibB</i>
15	<i>Corynebacterium striatum</i> 1197	<i>oxyR</i>
16	<i>Corynebacterium striatum</i> 1115	<i>tetO (tetW), aph(3')-I, aph(6)-I, lsu (rplF), cmx</i>
17	<i>Corynebacterium striatum</i> ATCC 6940	<i>ermX, tetO (tetW), aph(3')-I, aph(6)-I</i>
18	<i>Corynebacterium jeikeium</i> K411	<i>ermX, tetO (tetW), aph(3')-I, aph(6)-I</i>
19	<i>Corynebacterium jeikeium</i> 574	<i>tetO (tetW), aph(3')-I, aph(6)-I, lsu (rplF), cmx</i>
20	<i>Corynebacterium jeikeium</i> ATCC 43734	<i>ermX, tetO (tetW), aph(3')-I, aph(6)-I</i>
21	<i>Corynebacterium aurimucosum</i> UMB776	<i>aph(3')-I, aph(6)-I, lsu (rplF), cmx</i>
22	<i>Corynebacterium genitalium</i> ATCC 33030	<i>ermX, tetO (tetW), aph(3')-I, aph(6)-I, cmx</i>

C. amycolatum ICIS 99, *C. amycolatum* ICIS 53, *C. amycolatum* SB-1, *C. amycolatum* 1189, *C. striatum* 824M, *C. striatum* 708 (табл. 3).

Наименьшее количество генов резистентности к антимикробным препаратам (19 генов) содержал штамм *C. striatum* 708, выделенный из суставной жидкости пациента в Великобритании (BioSample: SAMN34403526).

В настоящее время выделяют множество причин антимикробной устойчивости микроорганизмов. Это явление обусловлено не только присутствием генетических детерминант, ассоциированных с антимикробной устойчивостью, но и различными мутациями в данных генах. Обнаружено, что мутации в коротких областях генов *gyrA* и *gyrB* (регионы, определяющие устойчивость к хинолонам (QRDR)), кодирующих А и В субъединицы ДНК-гиразы, приводят к формированию устойчивости к хинолонам/фторхинолонам [9].

У коринебактерий устойчивость к хинолонам/фторхинолонам обусловлена спонтанными мутациями в гене, кодирующем субъединицу фермента гиразы А [12, 13]. Установлено, что мутации, связанные с изменением аминокислот в положениях 87, 88 и 91, повышают минимальные ингибирующие концентрации (МИК) хинолонов/фторхинолонов. Так, замены в 87 позиции Ser (S) на Arg (R), Phe (F), Val (V), в 88 позиции — Ala (A) на Pro (P), в 91 позиции — Asp (D) на Tyr (Y), Gly (G), Ala (A) повышали МИК ципрофлоксацина, левофлоксацина и моксифлоксацина [12, 13]. В этой связи мы посчитали необходимым провести молекулярно-генетический анализ аминокислотной последовательности данного гена у 22 изучаемых штаммов. Для проведения сравнительного анализа и определения номера аминокислотной позиции в качестве референса был использован *GyrA* *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 (код доступа GenBank: NP599264) [13].

Согласно литературным данным, изоляты *C. striatum* ATCC 6940, *C. jeikeium* ATCC 43734 и *C. urealyticum* DSM 7109 обладали чувствительностью к хинолонам/фторхинолонам [13]. Аминокислотные последовательности гена *gyrA* данных штаммов использовали в качестве контроля.

В ходе анализа установлено, что штаммы *C. striatum* ATCC 6940, *C. jeikeium* ATCC 43734, *C. amycolatum* 1189, *C. aurimucosum* UMB7769, *C. striatum* 1115, *C. urealyticum* 994, *C. urealyticum* 996, *C. urealyticum* DSM 7109, *C. jeikeium* K411, *C. amycolatum* SB-1, *C. genitalium* ATCC 33030 имели в позиции 87 аминокислоту Ser (S), в 91 позиции — Asp (D). По литературным данным, такая структура гена позволяла им быть чувствительными к хинолонам/фторхинолонам, несмотря на наличие генов резистентности [12, 13].

В 87 позиции замену Ser (S) на Arg (R) отмечали у *C. amycolatum* ICIS 53, *C. amycolatum* ICIS 99. У штамма *C. amycolatum* VH6958 кроме замены Ser (S) на Arg (R) в позиции 87 наблюдали также замену в 88 позиции Ala (A) на Pro (P). Стоит обратить внимание на штамм *C. amycolatum* BER245, у которого кроме замены Ser (S) на Arg (R) в позиции 87 наблюдали замену Asp (D) на Tyr (Y) в 91 позиции. Такие мутации резко повышали МИК к хинолонам/фторхинолонам [12, 13].

C. urealyticum VH3073 имел две уникальные замены: 87 — Ser (S)/ Val (V) и 91 — Asp (D)/ Tyr (Y). *C. striatum* 2308, *C. striatum* 708C, *C. striatum* 824M имели лишь одну аминокислотную замену 87 — Ser (S)/ Val (V). Вместе с тем обнаружены штаммы, несущие уникальные замены: 87 — Ser (S)/ Ile (I), 91 — Asp (D)/ Ala (A) — *C. amycolatum* ICIS 9; 87 — Ser (S)/ Ile (I), 91 — Asp (D)/ Gly (G) — *C. jeikeium* 574; 87 — Ser (S)/ Phe (F), 91 — Asp (D)/ Gly (G) — *C. striatum* 1197 (рис.). Эволюционное значение данных замен предстоит определить в дальнейших исследованиях.

Таким образом, в 87 позиции 11 изолятов имеют аминокислоту Ser (S), 4 штамма — Val (V), 4 штамма — Arg

Консенсусная последовательность:

*C. glutamicum*_ATCC_13032
*C. striatum*_ATCC_6940
*C. jeikeium*_ATCC_43734
*C. amycolatum*_FDAARGOS_1189
*C. aurimucosum*_UMB7769
*C. striatum*_FDAARGOS_1115
*C. urealyticum*_FDAARGOS_994
*C. urealyticum*_FDAARGOS_996
*C. jeikeium*_K411
*C. urealyticum*_DSM_7109
*C. amycolatum*_SB-1
*C. genitalium*_ATCC_33030
*C. amycolatum*_ICIS_53
*C. amycolatum*_ICIS_99
*C. amycolatum*_VH6958
*C. amycolatum*_BER245
*C. urealyticum*_VH3073
*C. striatum*_2308
*C. striatum*_708C
*C. striatum*_824M
*C. amycolatum*_ICIS_9
*C. jeikeium*_FDAARGOS_574
*C. striatum*_FDAARGOS_1197

	87	88	90	91	92	94	96	98	100					
86	T	A	I	Y	D	T	L	V	R	M	A	Q	P	W
86	S	A	I	Y	D	T	L	V	R	L	A	Q	S	W
86	S	A	I	Y	D	T	L	V	R	L	A	Q	P	W
86	S	A	I	Y	D	T	M	V	R	M	A	Q	P	W
86	S	A	I	Y	D	T	L	V	R	L	A	Q	P	W
86	S	A	I	Y	D	T	L	V	R	L	A	Q	S	W
86	S	A	I	Y	D	T	L	V	R	M	A	Q	P	W
86	S	A	I	Y	D	T	L	V	R	M	A	Q	P	W
86	S	A	I	Y	D	T	L	V	R	L	A	Q	P	W
86	S	A	I	Y	D	T	L	V	R	M	A	Q	P	W
86	S	A	I	Y	D	T	M	V	R	M	A	Q	P	W
86	S	A	I	Y	D	T	L	V	R	L	A	Q	P	W
86	R	A	I	Y	D	T	M	V	R	M	A	Q	P	W
86	R	A	I	Y	D	T	M	V	R	M	A	Q	P	W
86	R	P	V	Y	D	T	M	V	R	M	A	Q	P	W
86	R	A	I	Y	Y	T	M	V	R	M	A	Q	P	W
86	V	A	I	Y	Y	T	L	V	R	M	A	Q	P	W
86	V	A	I	Y	D	T	L	V	R	L	A	Q	S	W
86	V	A	I	Y	D	T	L	V	R	L	A	Q	S	W
86	V	A	I	Y	D	T	L	V	R	L	A	Q	S	W
86	I	A	I	Y	A	T	M	V	R	M	A	Q	P	W
86	I	A	I	Y	G	T	M	V	R	M	A	Q	P	W
86	F	A	I	Y	G	T	L	V	R	L	A	Q	S	W

Рис. Аминокислотная последовательность гена *gyrA* штаммов рода *Corynebacterium*, взятых в качестве примера. Рамкой выделены позиции точечных мутаций в аминокислотной последовательности гена *gyrA*, влияющие по литературным данным на повышение минимальной подавляющей концентрации (МИК) к хинолонам/фторхинолонам

(R), 2 штамма — Ile (I), 1 штамм — Phe (F). В 88 позиции 21 штамм имеет Ala (A), 1 изолят — Pro (P). В 91 позиции 17 изолятов имеют аминокислоту Asp (D), 2 штамма — Tyr (Y), 2 штамма — Gly (G), 1 штамм — Ala (A).

Подводя итог, стоит отметить, что двойные мутации в гене *gyrA*, описанные в литературе как вызывающие резкое повышение МИК к хинолонам/фторхинолонам, были обнаружены у: *C. amycolatum* VH6958, выделенного в 2016 г. в Испании (BioSample: SAMN18038700) — замена в 87 позиции Ser (S) на Arg (R), замена в 88 позиции Ala (A) на Pro (P). *C. amycolatum* BER245, выделенный в 2011 г. в Бразилии от больного отитом — замена в позиции 87 Ser (S) на Arg (R), в 91 позиции замена Asp (D) на Tyr (Y). *C. urealyticum* VH3073, выделенный в 2017 г. в Испании из мочи пациента (BioSample: SAMN12621417), замена в 87 позиции Ser (S)/ Val (V) и 91 — Asp (D)/ Tyr (Y).

У двух штаммов (*C. amycolatum* ICIS 53, *C. amycolatum* ICIS 99) отмечали одну мутацию — Ser (S) на Arg (R).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Распространение генов устойчивости к антимикробным препаратам посредством горизонтального переноса вызывает увеличение количества устойчивых микроорганизмов, в том числе и среди представителей условно-патогенной флоры. Стоит отметить, что штаммы коринебактерий, например, штаммы *C. amycolatum* ICIS 53, *C. amycolatum* ICIS 9, *C. amycolatum* ICIS 99, выделенные из

вагинального содержимого здоровых женщин, обладали достаточно большим арсеналом генов антимикробной резистентности [9, 11]. В этой связи необходим постоянный мониторинг за антимикробной устойчивостью бактерий с целью разработки эффективных мер по борьбе с ростом их устойчивости к антимикробным препаратам. Базы данных, содержащие сведения об устойчивости бактерий к антибиотикам, позволяют сравнивать результаты, полученные с помощью различных методов, проводить оценку распространенности генов антимикробной устойчивости.

Полученные нами результаты позволили выделить основной набор генов антимикробной устойчивости, содержащийся в геномах коринебактерий. Эти данные могут быть использованы в качестве возможной оценки применения антимикробных препаратов для лечения пациентов. Тем не менее молекулярно-генетические исследования должны сочетаться с другими методами, основанными на фенотипической оценке чувствительности к лекарственным средствам, поскольку не всегда данные по фенотипической и генотипической резистентности коррелируют между собой.

Устойчивость к антимикробным препаратам может быть связана с различными мутационными изменениями, в частности, устойчивость к хинолонам/фторхинолонам в основном реализуется за счет приобретения точечных мутаций в последовательности гена *gyrA*, кодирующего субъединицу А ДНК-гиразы, а сверхэкспрессия

эффлюксного насоса может играть дополнительную роль в приобретении устойчивости к хинолонам [12, 13]. У *C. amycolatum* изменение в положении 87 *GyrA* придавало устойчивость ко всем протестированным хинолонам/фторхинолонам [12, 13]. Данные замены мы увидели и в анализируемых нами геномах штаммов *C. amycolatum*. Вместе с тем, некоторые коринебактерии несли несколько мутаций в аминокислотной последовательности гена *gyrA*, повышающих МИК к хинолонам/фторхинолонам [12, 13]. Исследование мутационной изменчивости в генах играет важную роль в изучении эволюционных преобразований в геномах бактерий и может использоваться для разработки молекулярных экспресс-методов диагностики.

ВЫВОДЫ

Нарастающая этиологическая значимость коринебактерий в инфекционной патологии, особенно в качестве госпитальных патогенов среди пациентов с ослабленным иммунитетом, которые перенесли длительную госпитализацию, несколько курсов антибиотикотерапии и для лечения которых использовали инвазивные медицинские устройства, определяет необходимость регулярного мониторинга патогенов. Устойчивость бактерий к антимикробным препаратам вызывает серьезную озабоченность, в связи

с этим в настоящей работе: 1) установлено присутствие в геномах коринебактерий большого арсенала генов (25 генов) антимикробной устойчивости в различных комбинациях. Присутствие гена коррелирует со способностью изолята обладать устойчивостью к противомикробным препаратам. Это важное эволюционное последствие воздействия антибиотиков на популяционную структуру микроорганизмов. Стоит отметить, что резистентность к антимикробным препаратам чаще всего кодируется несколькими генами. Вариабельность детерминант противомикробной устойчивости подчеркивает необходимость постоянного наблюдения за профилями резистентности коринебактерий; 2) выявлены мутации в аминокислотных последовательностях гена *gyrA* изучаемых штаммов (в позициях 87, 88, 91), которые ассоциируют с устойчивостью к хинолонам/фторхинолонам.

Цель работы достигнута. Ограниченность данных по изучению коринебактерий, в том числе молекулярно-генетических, затрудняет проведение сравнительного анализа. Расширение спектра штаммов, в том числе представленных в различных базах данных, позволит иметь более полное представление о строении генома, фенотипических характеристиках, а выявление спектра генов антимикробной устойчивости позволит иметь более полное представление о направлениях антибактериальной терапии.

Литература

1. Харсеева Г. Г., Воронина Н. А., Гасретова Т. Д., Тюкавкина С. Ю., Сылка О. И., Миронов А. Ю. Чувствительность к антибиотикам штаммов *Corynebacterium non diphtheriae*, выделенных в стационарах Ростова-на-Дону и Ростовской области. Клиническая лабораторная диагностика. 2017; 62 (8): 502–6.
2. Fernandez LV, Fortuny AS, Rodriguez EF. *Corynebacterium ruviciproducens* and *Corynebacterium amycolatum* mastitis in immunocompetent no breastfeeding women. Revista Argentina de Microbiologia. 2021; 53 (11): 39–42.
3. Jesus HNR, Rocha DJPG, Ramos RTJ, Silva A, Brenig B, Góes-Neto A, et al. Pan-genomic analysis of *Corynebacterium amycolatum* gives insights into molecular mechanisms underpinning the transition to a pathogenic phenotype. Front Microbiol. 2022; 13: 1–11.
4. Харсеева Г. Г., Воронина Н. А., Миронов А. Ю., Харисова А. Р. Антибиотикочувствительность штаммов *Corynebacterium non diphtheriae*, циркулирующих в Ростове-на Дону и Ростовской области. Клиническая лабораторная диагностика. 2012; 10: 62–4.
5. Alibi S, Ferjani A, Boukadida J, Cano ME, Fernández-Martínez M, Martínez-Martínez L, et al. Occurrence of *Corynebacterium striatum* as an emerging antibiotic-resistant nosocomial pathogen in a Tunisian hospital. Sci Rep. 2017; 7: 1–8. PubMed PMID: 28848236.
6. Харсеева Г. Г., Мангутов Э. О. Бут О. М., Чепусова А. В., Алутина Э. Л. Анализ частоты выделения недифтерийных коринебактерий от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (7): 430–34.
7. Sahu V, Pathak MM, Das P, Ravi A. *Corynebacterium jeikeium* as an unusual cause of keratitis: a case report from a tertiary care hospital in Chhattisgarh, India. Cureus. 2021; 13 (12): 1–11.
8. Salem N, Salem L, Saber S, Ismail G, Bluth MH. *Corynebacterium urealyticum*: a comprehensive review of an understated organism. Infection and Drug Resistance. 2015; 8: 129–45.
9. Gladysheva IV, Chertkov KL, Cherkasov SV, Khlopko YA, Kataev VY, Valyshev AV. Probiotic potential, safety properties, and antifungal activities of *Corynebacterium amycolatum* ICIS 9 and *Corynebacterium amycolatum* ICIS 53 strains. Probiotics Antimicrob Proteins. 2023; 15 (3): 588–600. PubMed PMID: 34807410.
10. Gladysheva IV, Cherkasov SV, Khlopko YA, Plotnikov AO. Genome characterization and probiotic potential of *Corynebacterium amycolatum* human vaginal isolates. Microorganisms. 2022; 10 (2): 1–17. PubMed PMID: 35208706.
11. Gladysheva IV, Khlopko YA, Cherkasov SV. Draft genome sequence of the vaginal isolate *Corynebacterium amycolatum* ICIS 9. Genome Announc. 2017; 5 (37): 1–2. PubMed PMID: 28912325.
12. Ramos JN, Rodrigues IDS, Baio Pa VP, Veras JFC, Ramos RTJ, Pacheco LG, et al. Genome sequence of a multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* isolated from bloodstream infection from a nosocomial outbreak in Rio de Janeiro, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2018; 113 (9): 1–5.
13. Sierra JM, Martínez-Martínez L, Vázquez F, Giralt E, Vila J. Relationship between mutations in the *gyrA* gene and quinolone resistance in clinical isolates of *Corynebacterium striatum* and *Corynebacterium amycolatum*. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49 (5): 1714–19. PubMed PMID: 15855486.
14. Silva-Santana G, Silva CMF, Olivella JGB, Silva IF, Fernandes LMO, Sued-Karam BR. 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. PubMed PMID: 33625540.
15. PATRIC (Pathosystems Resource Integration Center). Available from: <https://www.patricbrc.org>.
16. UGENE (Unipro UGENE) 48.1. Available from: <https://ugene.net/ru/>.

References

1. Kharseeva GG, Voronina NA, Gasretova TD, Tyukavkina SYu, Sylka OI, Mironov AYu. The sensitivity to antibiotics of *Corynebacterium non diphtheriae* isolated in hospitals of Rostov-on-don and the Rostovskaya oblast. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 2017; 62 (8): 502–6. Russian.
2. Fernandez LV, Fortuny AS, Rodriguez EF. *Corynebacterium pyruviciproducens* and *Corynebacterium amycolatum* mastitis in immunocompetent no breastfeeding women. *Revista Argentina de Microbiologia*. 2021; 53 (11): 39–42.
3. Jesus HNR, Rocha DJPG, Ramos RTJ, Silva A, Brenig B, Góes-Neto A, et al. Pan-genomic analysis of *Corynebacterium amycolatum* gives insights into molecular mechanisms underpinning the transition to a pathogenic phenotype. *Front Microbiol*. 2022; 13: 1–11.
4. Kharseeva GG, Voronina NA, Mironov AYu, Kharysova AR. The antibiotics sensitivity of strains of *Corynebacterium non diphtheriae* circulating in Rostov-on-don and Rostov oblast. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 2012; 10: 62–4. Russian.
5. Alibi S, Ferjani A, Boukadida J, Cano ME, Fernández-Martínez M, Martínez-Martínez L, et al. Occurrence of *Corynebacterium striatum* as an emerging antibiotic-resistant nosocomial pathogen in a Tunisian hospital. *Sci Rep*. 2017; 7: 1–8. PubMed PMID: 28848236.
6. Kharseeva GG, Mangutov EO, But OM, Chepusova AV, Alutina EL. Analysis of the frequency of allocation of *Corynebacteria non diphtheria* from patients with inflammatory diseases of the respiratory tract. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 2019; 64 (7): 430–34. Russian.
7. Sahu V, Pathak MM, Das P, Ravi A. *Corynebacterium jeikeium* as an unusual cause of keratitis: a case report from a tertiary care hospital in Chhattisgarh, India. *Cureus*. 2021; 13 (12): 1–11.
8. Salem N, Salem L, Saber S, Ismail G, Bluth MH. *Corynebacterium urealyticum*: a comprehensive review of an understated organism. *Infection and Drug Resistance*. 2015; 8: 129–45.
9. Gladysheva IV, Chertkov KL, Cherkasov SV, Khlopko YA, Kataev VY, Valyshev AV. Probiotic potential, safety properties, and antifungal activities of *Corynebacterium amycolatum* ICIS 9 and *Corynebacterium amycolatum* ICIS 53 strains. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2023; 15 (3): 588–600. PubMed PMID: 34807410.
10. Gladysheva IV, Cherkasov SV, Khlopko YA, Plotnikov AO. Genome characterization and probiotic potential of *Corynebacterium amycolatum* human vaginal isolates. *Microorganisms*. 2022; 10 (2): 1–17. PubMed PMID: 35208706.
11. Gladysheva IV, Khlopko YA, Cherkasov SV. Draft genome sequence of the vaginal isolate *Corynebacterium amycolatum* ICIS 9. *Genome Announc*. 2017; 5 (37): 1–2. PubMed PMID: 28912325.
12. Ramos JN, Rodrigues IDS, Baio Pa VP, Veras JFC, Ramos RTJ, Pacheco LG, et al. Genome sequence of a multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* isolated from bloodstream infection from a nosocomial outbreak in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2018; 113 (9): 1–5.
13. Sierra JM, Martínez-Martínez L, Vázquez F, Giralt E, Vila J. Relationship between mutations in the *gyrA* gene and quinolone resistance in clinical isolates of *Corynebacterium striatum* and *Corynebacterium amycolatum*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49 (5): 1714–19. PubMed PMID: 15855486.
14. Silva-Santana G, Silva CMF, Olivella JGB, Silva IF, Fernandes LMO, Sued-Karam BR. 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. PubMed PMID: 33625540.
15. PATRIC (Pathosystems Resource Integration Center). Available from: <https://www.patricbrc.org>.
16. UGENE (Unipro UGENE) 48.1. Available from: <https://ugene.net/ru/>.