

MECHANIZMY OPORNOŚCI NA ANTYBIOTYKI WYKRYWANE U BAKTERII Z RODZAJU *CORYNEBACTERIUM*

Alina M. Olender*

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Wpłynęło w grudniu 2009 r.

1. Wstęp. 2. Problemy oznaczania oporności na antybiotyki i sposoby interpretacji. 3. Mechanizmy oporności na antybiotyki i chemioterapeutyki wykrywane u *Corynebacterium* spp. 3.1. Oporność na antybiotyki beta-laktamowe. 3.2. Oporność na makrolidy, linkozamidy i streptograminy B. 3.3. Oporność na fluorochinolony. 3.4. Oporność na tetracykliny. 3.5. Oporność na glikopeptydy. 3.6. Oporność na chloramfenikol. 3.7. Oporność na aminoglikozydy. 4. Wrażliwość na antybiotyki gatunków z rodzaju *Corynebacterium* najczęściej izolowanych z zakażeń. 5. Podsumowanie

Mechanisms of resistance to antibiotics in the species of the genus *Corynebacterium*

Abstract: In recent years, opportunistic species of the genus *Corynebacterium*, such as *C. jeikeium*, *C. urealyticum*, *C. amycolatum*, *C. striatum* and others, are becoming increasingly important to humans. The difficulties in the diagnosis of infections caused by these microorganisms are due to their presence on the skin and mucous membranes, which raises the possibility of contamination of the taken material, so that the real participation of these species in infections is underestimated. An additional problem in the application of effective antibiotic therapy is the lack of uniform rules for the assessment of antibiotic resistance. The possibility of determining the MIC by means of Etests, giving high correlation results with the dilution method and establishing the criteria for the interpretation of *Corynebacterium* sp., made it possible to standardize the methods for assessment of antibiotics resistance which are used in the treatment of infections produced by coryneform. The description of multidrug-resistant isolates of opportunistic strains of the genus *Corynebacterium* and genetic studies have highlighted the different mechanisms of resistance and confirmed the presence of responsible genes. Among detected mechanisms, the most significant is MLSB resistance to makrolides and linkozamides, streptogramins B (genes *ermX*, *ermA*, *ermB*, *msrA*, *mef*), quinolones (gene *gyrA* mutation), tetracyclines (*tetA*, *tetB*) and chloramphenicol (*cmx*). Moreover, the reports of glycopeptides resistance (van A) detection are extremely worrying. Based on the analysis of the sensitivity of resistant strains to antibiotics, it can be concluded that the most effective in the treatment of infections caused by *Corynebacterium* sp. are: vancomycin, teicoplanin, linezolid, daptomycin, quinupristin/dalfopristin, since they show the highest performance.

1. Introduction. 2. Problems in the determination of resistance to antibiotics and the way of their interpretation. 3. Mechanisms of resistance to antibiotics found in *Corynebacterium*. 3.1. Resistance to beta-lactam antibiotics. 3.2. Resistance to macrolides, linkozamides, streptogramins B. 3.3. Resistance to quinolones. 3.4. Resistance to tetracyclines. 3.5. Resistance to glycopeptides. 3.6. Resistance to chloramphenicol. 3.7. Resistance to aminoglycosides. 4. Sensitivity to antibiotics in the species of the genus *Corynebacterium* most frequently isolated from infections. 5. Summary

Słowa kluczowe: *Corynebacterium*, coryneform, mechanizmy oporności na antybiotyki, geny

Key words: *Corynebacterium*, coryneform, mechanisms of antibiotics resistance, genes

1. Wstęp

Rodzaj *Corynebacterium* obejmuje gatunki o różnicowanym znaczeniu chorobotwórczym. Od typowo patogenego dla ludzi *C. diphtheriae* [61], którego lizogenne szczepy wytwarzające toksynę są czynnikiem etiologicznym błonicy, czy patogenych dla zwierząt *C. pseudotuberculosis* [4, 13], *C. kutscheri* [2], *C. auriscanis* [9] oraz powodujących zakażenia oportunistyczne u ludzi i wchodzących w skład flory fizjologicznej *C. jeikeium* [37, 42], *C. urealyticum* [20, 21], *C. amycolatum* [1, 11, 20], *C. striatum* [7, 20, 32, 35, 40], *C. pseudodiphtheriticum* [8, 16], do nie wywołujących zakażeń takich jak *C. pseudogenitalium* [20] – również składnika mikroflory.

Do rodzaju *Corynebacterium* należą również gatunki niezwiązane z człowiekiem np.: wytwarzający kwas L-glutaminowy i lizynę *C. glutamicum*, wykorzystywany w procesach biotechnologicznych na skalę przemysłową i badaniach genetycznych [27, 46, 55, 59, 63, 66, 68].

W ostatnich latach pojawiły się liczne publikacje, których autorzy opisują przypadki zakażeń wywołanych przez oportunistyczne *Corynebacterium* spp. Przeprowadzone badania genetyczne izolowanych szczepów doprowadziły do wykrycia nowych gatunków takich jak: *C. singulare* [39], *C. auriscanis* [9], *C. resistens* [34], *C. imitans* [18], *C. sputi* [67] oraz reklasyfikację identyfikowanych wcześniej np.: *C. cystidis*, *C. pilosum* [49].

* Autor korespondencyjny: Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, ul. Chodźki 1, 20-093 Lublin; tel.: 081 742 37 84; e-mail: a.olender@umlub.pl

Stwierdzana coraz większa liczba zakażeń i duże różnicowanie gatunków w obrębie *Corynebacterium* spp. oraz pokrewnych rodzajów np.: *Turicella*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium* o podobnych cechach morfologicznych, spowodowało pilną potrzebę prowadzenia szczegółowych badań w zakresie ich identyfikacji i taksonomii. W związku z tym, tradycyjnie używana nazwa, także w języku polskim „dyfteroidy”, która sugeruje bezpośredni związek z *C. diphtheriae*, coraz częściej jest zastępowana przez systematyków bardziej uniwersalną nazwą „coryneform” [1, 5, 19, 20, 22, 29, 34], co wydaje się w pełni uzasadnione.

Gatunki oportunistyczne zaliczane do rodzaju *Corynebacterium* należą do drobnoustrojów, które w ostatnich latach nabierają coraz większego znaczenia w zakażeniach u ludzi [1, 7, 11, 17, 18, 34, 35]. Wiele szczepów izolowanych z materiałów klinicznych, należy do grup taksonomicznych, których cechy patogene nie zostało jeszcze dokładnie scharakteryzowane a ocena ich roli jako drobnoustrojów chorobotwórczych jest trudna. Dodatkowym utrudnieniem jest panująca niekiedy opinia o traktowaniu oportunistycznych coryneform jako zanieczyszczeń hodowli, co jest związane z ich bardzo częstym występowaniem na skórze i błonach śluzowych.

Obserwowany wzrost przypadków zakażeń wywołanych przez oportunistyczne *Corynebacterium* spp. wynika zapewne z wyższego poziomu diagnostyki mikrobiologicznej – opracowania komercyjnych zestawów do ich identyfikacji oraz stosowania metod biologii molekularnej do identyfikacji trudnych i badania nowo poznawanych gatunków.

Do grupy chorych szczególnego ryzyka, u których coryneform mogą powodować zakażenia, należą przede wszystkim osoby z obniżoną odpornością z powodu toczącego się procesu nowotworowego, zaburzeniami czynności szpiku kostnego, po zabiegach chirurgicznych, urologicznych, inwazyjnych badaniach diagnostycznych oraz chorzy na AIDS. Dodatkowym ryzykiem jest długotrwała hospitalizacja, antybiotykoterapia, radioterapia, leczenie cytotatykami i sterydami. Niepokojącym faktem jest obserwowany wzrost tego typu zakażeń u pacjentów, tzw. „immunokompetentnych”, u których nie stwierdzano wcześniej objawów obniżenia odporności [8, 16].

Utrudnieniem w diagnostyce mikrobiologicznej zakażeń wywołanych przez *Corynebacterium* spp. jest brak jednolitych zasad wykonywania oznaczeń oporności na antybiotyki, co jest podstawą efektywnej antybiotykoterapii. Przedstawiane przez wielu autorów wyniki badań charakteryzujące oporność na antybiotyki różnych gatunków izolowanych z materiałów klinicznych oparte były przede wszystkim na badaniach fenotypowych. Były one prowadzone w różnych

ośrodkach za pomocą różnych metod i różnych interpretacji. Z tego powodu wyniki te nie zawsze mogą być porównywalne, niemniej jednak stały się podstawą do informacji o występowaniu wśród *Corynebacterium* spp. szczepów wykazujących wysoką oporność na antybiotyki, dla których antybiotykiem z wyboru skutecznie działającym jest wankomycyna.

Prowadzone od lat 80. XX wieku badania genów oporności występujących u *Corynebacterium* spp. zwróciły uwagę na możliwe mechanizmy ich przeniesienia oraz podobieństwo do genów występujących u innych drobnoustrojów np.: pałeczek *E. coli* [12, 45, 46], *Staphylococcus* spp. [41], *Enterococcus* spp. [38]. Są to nieliczne doniesienia, które nie podają obszernych informacji na temat genów oporności występujących u *Corynebacterium* spp.

2. Problemy oznaczania oporności na antybiotyki i sposobie interpretacji

Gatunki z rodzaju *Corynebacterium* wykazują różne zapotrzebowanie na składniki niezbędne do wzrostu (lipidy). Powszechnie stosowanym podłożem jest Columbia Agar z 5% krwią owczą oraz agar tryptozowo-sojowym z dodatkiem 5% krwi owczej i jej lizatu [34], lub lizatu 3,0; 4,5; 5,0% krwi końskiej [18, 34, 35, 42]. Gatunki lipofilne np.: *C. jeikeium* czy *C. urealyticum*, wykazują szybszy wzrost na podłożu z dodatkiem Tween 80, który używany jest w różnych stężeniach od 0,2 do 1,0% [21], lub zamiennie z 6,6% surowicą króliczą [58]. Prowadzone są również hodowle *Corynebacterium* spp. w płynnych podłożach – bulionie mózgowo-sercowy z 0,2% Tween 80 i ekstraktem drożdżowym (0,4%) [42]. Ze względu na stymulację wzrostu coryneform przez Tween 80, krytykowane jest jego dodawanie do podłoża służących do oznaczania lekooporności [29]. Natomiast znacznie ułatwia izolację coryneform dodanie do podłoża fosfomycyny, która hamuje wzrost innych bakterii [21].

W związku z brakiem zaleceń do wykonania badań i interpretacji oporności na antybiotyki dla *Corynebacterium* spp. używane były różne metody a sposoby ich interpretacji stosowano takie jak dla innych grup bakterii Gram-dodatnich: *Staphylococcus* spp. [26], *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp. [21], paciorkowców zieleniejących [7]. Dla penicyliny i ampicyliny stosowano interpretację, jak dla *Listeria monocytogenes*, a dla wankomycyny taką jak dla grupy innych Gram-dodatnich, ale nie enterokoków [32]. Do wykrywania aktywności beta-laktamaz wykorzystywano metodę acydometryczną [35] opisywaną przez Tu i wsp. [57]. Przy oznaczaniu oporności na antybiotyki beta-laktamowe coryneform – *Brevibacterium casei*, *Der-*

mabacter hominis i *Turacella otidis* zastosowano kryteria takie jak dla *Enterobacteriaceae* [56].

Metoda dyfuzyjno-krażkowa jest często stosowana do oznaczania wrażliwości na antybiotyki wielu rodzajów bakterii. W przypadku coryneform jest często wykorzystywana do badania oporności różnych gatunków, ale brak zasad interpretacji dla *Corynebacterium* spp. podważa jej wiarygodność. Kryteria interpretacji stref zahamowania wzrostu przyjmowane są takie jak dla różnych Gram-dodatnich bakterii.

Do oznaczania lekooporności najczęściej używany jest Mueller-Hinton Agar lub Columbia Agar z dodatkiem 5% krwi owczej i inokulum w 0,85% NaCl o gęstości 0,5 lub 1,0 wg skali McFarlanda. Inkubacja przeprowadzana jest w temperaturze 35°C przez 18–24 godz., w atmosferze CO₂ lub bez niego [21, 32].

Metoda mikrorozcieńczeń w bulionie lub Mueller-Hinton Agar, z dodatkiem 3,0; 4,5 lub 5% lizatu krwi końskiej [22, 34, 35] i zawiesiny bakterii o gęstości 0,5 w skali McFarlanda [18, 32] jest najczęściej wykorzystywana w pracach, w których oznaczano wartości MIC (Minimal Inhibitory Concentration) *Corynebacterium* spp. Inkubacja przeprowadzana jest w warunkach tlenowych w temperaturze 35°C przez 20–24, lub 48 godzin [18, 34, 35, 42].

W badaniach lekooporności coryneform wykorzystywano również metodę mikrorozcieńczeń stosowaną dla *Staphylococcus* – ATB Staph5 (bioMérieux) [65].

Metoda zużyciem Etest (AB BIODISK) jest bardzo dokładną i wygodną w oznaczaniu wrażliwości na antybiotyki u *Corynebacterium* spp., tym bardziej, że istnieją ustalone kryteria interpretacji wartości MIC dla tej grupy bakterii [62]. Do wykonania oznaczenia powinien być zastosowany Mueller-Hinton Agar z dodatkiem 5% krwi owczej, inokulum 1 wg skali McFarlanda w bulionie i prowadzona inkubacja w 35°C w atmosferze tlenowej lub z 5% CO₂ (jeśli jest to wymagane do lepszego wzrostu badanego szczepu, ale nie w przypadku erytromycyny i klindamycyny) przez 24–48 godz. lub dłużej – jeżeli szczep jest wolnorosnący. Odczytana wartości MIC na pasku Etest powinna odpowiadać całkowitemu zahamowaniu wzrostu, obejmującemu również mikrokolonie i wzrost mgławicowy. Dla antybiotyków bakteriostatycznych przy widocznym wzroście mgławicowym należy odczytać MIC w punkcie 80% jego zahamowania. Jako szczep kontrolny powinien być użyty *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619.

W wielu pracach autorzy wykonali oznaczenie wrażliwości na antybiotyki *Corynebacterium* spp. za pomocą metody z użyciem Etest [15, 17, 48, 65], co dawało bardzo dobrą porównywalność wyników i wysoką ich korelację z uzyskanymi metodą mikrorozcieńczeń w bulionie.

3. Mechanizmy oporności na antybiotyki i chemioterapeutyki wykrywane u *Corynebacterium* spp.

Problemem w leczeniu zakażeń wywołanych przez gatunki z rodzaju *Corynebacterium* jest izolacja szczepów o wysokiej oporności na antybiotyki. Informacje te oparte są przede wszystkim na badaniach fenotypowych, w których dokładnie scharakteryzowano izolaty pochodzące z różnych materiałów klinicznych [1, 17, 19–22, 32, 35, 40].

Od lat 70. do wczesnych lat 80. XX wieku prowadzone były badania nad pozachromosomalnymi elementami genetycznymi zarówno u patogennych, jak i niepatogennych szczepów *Corynebacterium* spp. [23, 28, 64]. Od tego czasu została wykryta duża liczba plazmidów, z pośród których duże plazmidy pochodziły głównie z gatunków potencjalnie chorobotwórczych dla człowieka, małe natomiast z *Corynebacterium* spp. występujących w glebie. Geny oporności na antybiotyki najczęściej zlokalizowane są na dużych plazmidach np.: oporność na tetracyklinę, chloramfenikol, erytromycynę, streptomycynę na plazmidzie pTP10 u *C. xerosis* [12, 25].

Opisywane wielolekooporne szczepy *C. jeikeium* [42, 66] *C. amycolatum* [66], *C. striatum* [7, 32, 35, 40] i *C. resistens* [34] potwierdzają występowanie u *Corynebacterium* spp. różnych mechanizmów oporności i genów o różnej lokalizacji.

3.1. Oporność na antybiotyki beta-laktamowe

Penicylina jest jednym z zalecanych antybiotyków w leczeniu błonicy, co wynika z powszechnej wrażliwości toksycznych i nietoksycznych szczepów *C. diphtheriae* na ten antybiotyk [61]. Jednak opisywane były przypadki jej nieskuteczności. Wykonane przez von Hunolstein i wsp. [65] badania wrażliwości na penicylinę 24 nietoksycznych szczepów *C. diphtheriae* biotyp *gravis* metodą mikrorozcieńczeń w bulionie i za pomocą Etest (wyniki obu metod były zgodne w 98%), wykazały MIC dla penicyliny w zakresie 0,064–0,250 mg/l i bardzo niski dla erytromycyny (MIC ≤ 0,016 mg/l). MBC (Minimal Bactericidal Concentration) minimalne stężenie bakteriobójcze MBC₅₀ i MBC₉₀ dla penicyliny było 2 i 8 mg/l oraz 17 i 24. 71% badanych szczepów miało stosunek MBC/MIC ≥ 32. Wyniki badań sugerowały tolerancję (niewrażliwość) na penicylinę, co potwierdzał brak pozytywnego efektu leczenia przy wartościach MIC wskazujących na wrażliwość badanych szczepów na ten antybiotyk. Tolerancję na amoksyliny stwierdzono również u szczepu *C. diphtheriae* izolowanego z przypadku *endocarditis* [14].

Wykryta oporności na oksacylinę u szczepu *Corynebacterium* spp. była związana z wysoką aktywnością obecnych na Tn3598 – transpozonie klasy II – 12 kpz, pary genów *tetA* i *tetB* determinujących oporność na tetracykliny. Aktywność tych genów, polegająca na potężnym czynnym wypompowywaniu, powodowała usuwanie również innego strukturalnie antybiotyku, jakim była oksacylina [53].

Na podstawie analizy wyników badań fenotypowych i genotypowych różnych gatunków rodzaju *Corynebacterium* wykazujących oporność na antybiotyki beta-laktamowe, można sądzić, że występują u tych drobnoustrojów oba mechanizmów oporności tj. wytwarzanie beta-laktamaz i modyfikacja białek wiążących penicylinę. Potwierdza to np.: oporność na penicylinę (MIC₉₀ >4 µg/ml) u szczepów *C. jeikeium* i *C. urealyticum*, ampicylinę (MIC₉₀ >8 µg/ml) [22], u *C. resistens* na penicylinę, cefazolinę, cefotiam, cefmetazol, cefepim (MIC >64 µg/ml) i imipenem (MIC >32 µg/ml) [34], u szczepów *C. striatum* na penicylinę, ampicylinę (MIC₉₀ = 16 µg/ml), cefazolinę, cefotiam, cefotaksim, imipenem (MIC₉₀ >32 µg/ml) [35]. U szczepów szpitalnych *C. urealyticum* oporność na penicylinę i cefotaksim była szczególnie wysoka (MIC₉₀ >512 µg/ml) [21].

Analiza sekwencji genomu *C. glutamicum* wykazała obecność czterech genów kodujących białka PBP (Penicillin Binding Proteins) HMW (high-molecular-weight), tj. PBP1a, PBP1b, PBP2a, PBP2b, dwóch genów kodujących PBP4, PBP4b (low-molecular-weight) oraz dwóch kodujących prawdopodobnie beta-laktamazy [63].

3.2. Oporność na makrolidy, linkozamidy i streptograminy B

Mechanizm oporności na makrolidy, linkozamidy i streptograminy B (MLS_B) najczęściej występuje u gronkowców. Związany jest z obecnością genów z grupy *erm* (erythromycin ribosome methylation) kodujących enzym metylazę rRNA, która powoduje dimetylację adeniny obecnej w 23S rRNA [3]. Roberts i wsp. [41] zakwalifikowali geny *erm* występujące u *Corynebacterium* spp. do klasy X. Mimo wysokiego stopnia homologii między genami *ermX* izolowanymi z różnych gatunków *Corynebacterium* (*C. diphtheriae*, *C. jeikeium*, *C. xerosis*) wykazują one inną lokalizację. Gen *ermX* (tj. *ermCd*) *C. diphtheriae* znajduje się w obrębie 14,5-kpz plazmidu pNG2 [10], natomiast gen *ermX* (tj. *ermCX*) *C. xerosis* jest zlokalizowany w obrębie transpozonu Tn5432, którego nośnikiem jest 50-kpz R plazmid pTP10 [11]. U szczepu *C. jeikeium* [37] i *C. striatum* [40] *ermX* występuje na chromosomie co zostało potwierdzone (gen *ermXcj*) również

u innych badanych szczepów *C. jeikeium* [42]. Mimo różnic w wynikach badań u szczepów *C. jeikeium* i *C. xerosis*, gen *ermX* jest głównie łączony z lokalizacją na transpozonie Tn5432. U innych badanych szczepów, u których mechanizm MLS_B nie jest związany z lokalizacją genów *ermX* na transpozonie Tn5432, stwierdzono, że posiadają one również wszystkie jego części składowe (tj. Tn5432), co wskazuje na późniejszą jego reorganizację [24]. Jest możliwe, że ruchome elementy transpozycyjne IS1249 zawierające *ermX* mogą tworzyć nowe złożone transpozony zawierające inne geny wielolekooporne. Jest to szczególnie niepokojące, ponieważ transpozycja sekwencji insercyjnej IS1249 jest znana z możliwości wstawienia i przeniesienia Tn5432 z genomów bakterii niespokrewnionych [42]. Prace, w których opisywano różną lokalizację wykrytych genów *ermX* dotyczyły gatunków *Corynebacterium*, które izolowane były z różnych rejonów geograficznych. Szczep *C. diphtheriae* zawierający pNG2 i *C. striatum* pochodzący od pacjentów z północno-zachodniej części USA [10, 25, 40], *C. xerosis* z pTP10 z Japonii [51], *C. jeikeium* z Francji [42] i *C. jeikeium* i *C. amycolatum* z Hiszpanii [66].

Rozmieszczenie genów *ermX* sugeruje, że lekooporne szczepy *Corynebacterium* spp. nabywają geny od drobnoustrojów kolonizujących skórę lub błony śluzowe. *ErmCd* jest zawarty w plazmidzie pNG2 podobnym do plazmidów izolowanych od *Corynebacterium* spp. występujących na skórze [44]. Replikon 2.6-kpz EcoRI-ClaI fragment (*oriR*) może posiadać dużo mikroorganizmów, w tym *E. coli* [12, 45, 46].

Plazmid pNG2 wydaje się mało prawdopodobnym miejscem, z którego pochodzą geny *erm* *Corynebacterium* spp. Bardziej prawdopodobnym jest związany z chromosomem transpozon Tn5432, który może być ruchomy [51]. Tn5432 został również wykryty u występujących na skórze szczepów *Propionibacterium acnes*, *P. avidum* i *P. granulosum*, co sugeruje, że wielolekooporne szczepy z rodzaju *Corynebacterium* mogą być ważnym źródłem w horyzontalnym transferze genów oporności do innych drobnoustrojów patogennych dla człowieka [43].

Możliwość przenoszenia genu *ermX* „do” lub „z” gatunków występujących u zwierząt potwierdza fakt, że został on wykryty u szczepu *Corynebacterium* spp. izolowanego z mleka pasteryzowanego. Wykazywał on oporność na erytromycynę i/lub spiromycynę [36].

U szczepów *Corynebacterium* grupy A posiadających mechanizm oporności MLS_B został wykryty również gen *ermB* [30].

Oporność na makrolidy i streptograminy B u szczepów *Corynebacterium* spp. jest związana również z obecnością genu *msrA* [33] i wytwarzaniem układu aktywnego transportu wypompowywania antybiotyku z komórki (macrolide efflux proteins). Gen *msrA* był

wcześniej wykrywany tylko u *Staphylococcus* spp. [41]. Koduje on przekaźnik ATP potrzebny komórce do uzyskania energii z hydrolizy ATP do aktywnego transportu erytromycyny i streptograminy B i umożliwia syntezę rodziny transporterów ABC, tj. wielobiałkowych systemów do aktywnego wypompowywania antybiotyku z komórki [31].

Gen *mef* powodujący aktywne usuwanie makrolidów z komórki bakteryjnej został wykryty u *S. pneumoniae* i *S. pyogenes* oraz jak wykazał L u n a i wsp. [30] również u *Corynebacterium* grupy A, *C. jeikeium* i innych szczepów *Corynebacterium* spp.

3.3. Oporność na fluorochinolony

Oporność na fluorochinolony (norfloksacyne, ciprofloksacyne, lewofloksacyne) została wykryta u szczepów *C. macginleyi* przez E g u c h i i wsp. [15] i jest związana z mutacjami w obrębie obszaru genu strukturalnego podjednostki A gyrazy, który określany jest jako obszar warunkujący oporność na chinolony (QRDR – quinolone resistance determining region) [15, 31]. Poprzez analizę genu *gyrA* kodującego podjednostkę A gyrazy ujawniono zmianę w rejonie QRDR aminokwasu w pozycji 83 (Ser na Arg), co spowodowało wytworzenie u *C. macginleyi* oporności na norfloksacyne. Wykryto także podwójną mutację prowadzącą do zmiany aminokwasów w pozycjach 83 i 87 (Asp na Ala) warunkującą oporność na wszystkie fluorochinolony. U wszystkich szczepów *C. macginleyi* o wysokim poziomie oporności występowały podwójne mutacje w Ser-83 i Asp-87 [15].

Badania sekwencji genu *gyrA* przeprowadzono również u szczepów *C. striatum* i *C. amycolatum* [48]. Wysoka oporność na chinolony u *C. amycolatum* była wynikiem podwójnej mutacji i zmiany aminokwasów w pozycji 87 i 97 lub 87 i 88 (niezwykła lokalizacja w *gyrA*). W *gyrA* *C. striatum* występowały mutacje aminokwasów w pozycji 87 i 91, co odpowiadało oporności (bardzo duże wartości MIC) na ciprofloksacyne i lewofloksacyne, ale jedynie umiarkowanie zwiększonej wartości MIC moxifloksacyny. Badania te wykazały różne zawiłe mechanizmy oporności na chinolony u badanych gatunków *Corynebacterium* spp. [48].

3.4. Oporność na tetracykliny

Oporność na tetracykliny u *C. striatum* (97% badanych szczepów) opisywana była przez M a r t i n e z - M a r t i n e z i wsp. [32] w oparciu o przeprowadzone badania fenotypowe. Potwierdziło to wykrycie obecności genu *tetM*, który determinuje oporność na wszystkie tetracykliny i jest związany z ochronnym działaniem na rybosom przez białko o masie około 72–72,5 kDa [40].

U szczepów *C. striatum* M82B oporność na tetracyklinę jest związana z regionem 50-kpz R-plazmidu pTP10. Analiza sekwencji nukleotydów ujawniła dwie ramki odczytu nazwane *tetA* i *tetB*. Do analizy funkcji *tetAB* genów wykorzystano ich ekspresję w *C. glutamicum* i stwierdzono, że są one odpowiedzialne za oporność na tetracyklinę, oksytetracyklinę oraz na niskim poziomie (mniejsze wartości MIC) na inne pochodne: chlorotetracyklinę, minocyklinę, doksycyklinę. Jednocześnie stwierdzono zwiększoną u tego szczepu wartość MIC dla oksacyliny, co może wynikać z działania genów *tetAB*, tj. wytworzenia potężnego mechanizmu czynnego transportu wypompowywania leków z komórki [54].

R plazmid pTP10 obecny u *C. xerosis* zawiera również determinanty oporności na tetracyklinę oraz inne antybiotyki: chloramfenikol, kanamycynę, erytromycynę [28, 52].

U szczepów *C. melassecola*, gatunku używanego do produkcji glutaminianu, gen oporności na tetracyklinę, został wykryty na plazmidzie pAG1 [12, 50].

3.5. Oporność na glikopeptydy

Zalecanym przez wielu autorów antybiotykiem w empirycznym leczeniu zakażeń o charakterze inwazyjnym wywołanych przez coryneform jest wankomycyna. Wiąże się to z powszechną wrażliwością na ten antybiotyków nawet wielolekoopornych gatunków takich jak *C. jeikeium*, *C. resistant*, *C. amycolatum*, *C. striatum*. Są jednak doniesienia o izolacji szczepów *Corynebacterium* – *C. aquaticum* i *C. grupy B1* opornych na wankomycynę [60].

B e r n a s i wsp. [6] opisali przypadek izolacji szczepu *Corynebacterium* spp. opornego na wankomycynę oraz penicylinę G, erytromycynę, gentamycynę i rifampicyne izolowanego od 44-letniego chorego z *endocarditis* 4 miesiące po wymianie protezy zastawki mitralnej. Zastosowanie imipenemu i ciprofloksacyny spowodowało wyleczenie zakażenia.

U pokrewnych gatunków coryneform *Oerskovia turbata* 892 i *Arcanobacterium (Corynebacterium) haemolyticum* 872 stwierdzono oporność na wankomycynę i teikoplaninę o charakterze konstytuowanym. Wykryto obecność genów *van A*, występujących na plazmidach 15 i 20 kpz. U szczepów *A. haemolyticum* 872 sekwencja genu *van A* okazała się taka sama jak u opornego na wankomycynę *Enterococcus faecium* BM4147. W przypadku *O. turbata* 892 występowała w trzech miejscach zmiana sekwencji. *A. haemolyticum* i *O. turbata* wykazują naturalną wrażliwość na wankomycynę i teikoplaninę, stwierdzona oporność u badanych szczepów wynikała z obecności genu *van A* [38].

3.6. Oporność na chloramfenikol

Geny oporności na chloramfenikol zostały wykryte na plazmidach – u szczepu *Corynebacterium* spp. na plazmidzie pXZ10145 – 5,3 kpz [68], oraz u *C. xerosis* na pTP10 – 45,0 kpz [12].

Ya u c h i wsp. [55] wykryli u szczepu *C. striatum* M82B (dawniej *C. xerosis* M82B) gen oporności na chloramfenikol *cmx* (chloramphenicol export) jako integralną część transpozonu Tn5564, zawierającego kompletną kopię sekwencji inercyjnej IS1513. Gen *cmx* koduje specyficzne białko (transmembrane chloramfenikol efflux protein) hamujące przechodzenie antybiotyku do cytoplazmy.

3.7. Oporność na aminoglikozydy

W 1984 roku Katsumata i wsp. [27] wykryli u szczepu *Corynebacterium* spp. geny oporności na streptomycynę i spektinomycynę zlokalizowane na plazmidzie pCG4. Natomiast gen oporności na kanamycynę u *C. xerosis* M82B stwierdzono na plazmidzie pTP10 [55].

4. Wrażliwość na antybiotyki gatunków z rodzaju *Corynebacterium* najczęściej izolowanych z zakażeń

Ze względu na występowanie wielolekoopornych szczepów różnych gatunków z rodzaju *Corynebacterium*, bardzo cenne są wyniki badań charakteryzujące wrażliwość na antybiotyki, które potencjalnie mogą mieć zastosowanie w leczeniu zakażeń.

Fernandez-Roblas i wsp. [17] przeprowadzili ocenę wrażliwości na antybiotyki za pomocą Etest dużej liczby szczepów: *C. urealyticum*, *C. amycolatum*, *C. jeikeium*, *C. coyleae*, *C. striatum*, *C. aurimucosum* i *C. afermentans*. Autorzy stwierdzili, że szczepy wszystkich badanych gatunków były wrażliwe na glikopeptydy, linezolid, chinupristynę/dalfopristynę i daptomycynę, co potwierdzili Funke i wsp. [19, 20].

Przeprowadzone we Włoszech badania genetyczne szczepów *C. striatum* MDR (multidrug-resistant), ujawniły występowanie lekoopornego klonu, którego szczep izolowano z przypadków zapalenia płuc, odcewnikowej bakteriemii i zakażeń ran. Wykazywały one wrażliwość na glikopeptydy, tigeocyklinę, chinupristynę/dalfopristynę, daptomycynę i linezolid, przy oporności na inne grupy antybiotyków [7].

Jednym z najbardziej opornych gatunków izolowanych ze środowiska szpitalnego jest *C. jeikeium*. Przeprowadzone badania przez Johnson i wsp. [26] 66 szczepów *C. jeikeium* wykazały u wszystkich oporność na penicylinę, u 94% oporność na erytromycynę,

74% na tetracyklinę. 22 szczepy innych badanych gatunków z rodzaju *Corynebacterium* miały zdecydowanie niższy odsetek opornych. Natomiast wszystkie objęte badaniem szczepy wrażliwe były na wankomycynę (MIC = 0,5–4,0 mg/l), linezolid (MIC = 0,5–2,0 mg/l) i daptomycynę (MIC ≤ 1 mg/l) z wyjątkiem dwóch izolatów *C. aquaticum*, których MIC dla daptomycyny wynosił 8 mg/l. Daptomycyna była zastosowana z powodzeniem w leczeniu skojarzonym z rifampicyną w przypadku *endocarditis* wywołanym przez *C. amycolatum* [11] i *C. striatum* [47]. Wysoka aktywność linezolidu wykazana w badaniach nad 190 szczepami coryneform przez Gomez-Garcés i wsp. [22] wskazuje na bardzo wysoką skuteczność tego antybiotyku, który może być zastosowany w leczeniu zakażeń wywołanych przez coryneform.

Zróznicowanie oporności na antybiotyki u gatunków z rodzaju *Corynebacterium* ma duży związek z miejscem występowania badanych szczepów. Jak stwierdzili Garcia-Bravo i wsp. [21] szczepy *C. urealyticum* pochodzące od pacjentów hospitalizowanych wykazują zdecydowanie wyższą oporność (wyższe wartości MIC) na antybiotyki, niż od pacjentów ambulatoryjnych. Przeprowadzono analizę częstości i czasu stosowanej antybiotykoterapii u chorych, co potwierdziło, że środowisko szpitalne i częściej stosowana antybiotykoterapia u pacjentów hospitalizowanych sprzyja występowaniu szczepów wielolekoopornych, a środowisko szpitalne, w jakim przebywają pacjenci jest miejscem występowania szczepów *C. urealyticum* wywołujących u nich zakażenia. Natomiast zdecydowanie niższa oporność na antybiotyki (niższe wartości MIC) izolatów pochodzących od pacjentów ambulatoryjnych wskazuje, że szczepy *C. urealyticum* pochodzą z mikroflory kolonizującej skórę chorego.

Niepokojącym faktem jest opisanie w 2005 roku wielolekoopornego nowego gatunku *C. resistens*. Jest on lipofilny, o słabych właściwościach fermentacyjnych (fermentuje glukozę), nie redukuje azotanów, nie wytwarza ureazy i pyrazinamidazy. Charakteryzuje się opornością na penicylinę i cefalosporyny (MIC > 64 µg/ml), imipenem (MIC > 32 µg/ml), aminoglikozydy (MIC > 3 µg/ml), makrolidy (MIC > 16 µg/ml), chinoliny (MIC > 32 µg/ml) oraz wrażliwością na teikoplaninę (MIC ≤ 0,5 µg/ml) i wankomycynę (MIC = 2 µg/ml) [34].

5. Podsumowanie

Coraz częstsze izolowanie z materiałów klinicznych wielolekoopornych szczepów z rodzaju *Corynebacterium* zwraca uwagę na pojawiający się problem związany z leczeniem zakażeń wywołanych przez tą

grupę bakterii oportunistycznych, tym bardziej, że zakażenia dotyczą często diagnostycznie trudnych przypadków, chorych hospitalizowanych, często z towarzyszącą chorobą powodującą obniżenie odporności. Niedoceniany udział coryneform w zakażeniach może prowadzić do błędów terapeutycznych.

Dokładna diagnostyka mikrobiologiczna zakażeń wywołanych przez gatunki z rodzaju *Corynebacterium*, identyfikacja izolowanych szczepów do gatunku oraz określenie wrażliwości na antybiotyki metodami umożliwiającymi oznaczenie wartości MIC daje możliwość oceny występujących i pojawiających się mechanizmów lekooporności oraz umożliwia podejmowanie decyzji co do właściwej antybiotykoterapii. Zastosowanie metod biologii molekularnej i badanie genów oporności, ich lokalizacji oraz dróg przenoszenia, jest bardzo ważnym kierunkiem badań nad monitorowaniem mechanizmów oporności u coryneform i daje możliwość śledzenia i określenia ich udziału w transmisji genów między innymi gatunkami.

Badania nad wrażliwością na antybiotyki różnych gatunków wielolekoopornych z rodzaju *Corynebacterium* wskazują, że najwyższą skuteczność w leczeniu zakażeń wykazują: glikopeptydy, linezolid, daptomycyna, tigeicyklina, chinupristyna/dalfopristina.

Piśmiennictwo

- Adderson E.E., Boudreaux J.W., Hayden R.T.: Infections caused by coryneform bacteria in pediatric oncology patients, *Pediatr. Infect.* **2**, 136–141 (2008)
- Amao H., Moriguchi N., Komukai Y., Kawasami H., Takahashi S., Sawada T.: Detection of *Corynebacterium kutscheri* in the feces of subclinically infected mice. *Lab. Anim.* **3**, 376–382 (2008)
- Arthur M., Nolin C., Mabilat C., Courvalin P.: Detection of erythromycin resistance by the Polymerase Chain Reaction using primers in conserved region of *erm* rRNA methylase genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **10**, 2024–2026 (1990)
- Baird G.J., Fontanie M.C.: *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. *J. Comp. Pathol.* **4**, 179–210 (2007)
- Balci I., Esik F., Bayram A.: Coryneform bacteria isolated from blond cultures and their antibiotic susceptibilities, *J. Intern. Med. Res.* **30**, 422–427 (2002)
- Barnass S., Holland K., Tabaqchali S.: Vancomycin-resistant *Corynebacterium species* causing prosthetic valve endocarditis successfully treated with imipenem and ciprofloxacin. *J. Infect.* **2**, 161–169 (1991)
- Campanile F., Carretto E., Barbarini D., Grigis A., Falcone M., Goglio A., Venditti M., Stefani S.: Clonal multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* strains, Italy. *Emerg. Infect. Dis.* **15**, 75–78 (2009)
- Chiner E., Arriero J.M., Signes-Costa J., Marco J., Corral J., Gomez-Esparrago A., Ortiz de la Tabla V., Martin C.: *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* pneumonia in an immunocompetent patient. *Monaldi. Arch. Chest. Dis.* **54**, 325–327 (1999)
- Collins M.D., Hoyles L., Lawson P.A., Falsen E., Robson R.L., Foster G.: Phenotypic and phylogenetic characterization of a new *Corynebacterium* species from dogs: description of *Corynebacterium auriscanis* sp. nov. *J. Clin. Microbiol.* **11**, 3443–3447 (1999)
- Coyle M.B., Minshew B.H., Bland J.A., Hsu P.C.: Erythromycin and clindamycin resistance in *Corynebacterium diphtheriae* from skin lesion. *Antimicrob. Agents Chemother.* **16**, 525–527 (1979)
- Dalal A., Urban C., Segal-Maurer S.: Endocarditis due *Corynebacterium amycolatum*. *J. Med. Microbiol.* **10**, 1299–1302 (2008)
- Deb J.K., Nath N.: Plasmids of corynebacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **175**, 11–20 (1999)
- Dorella F.A., Pacheco L.G., Oliveira S.C., Miyoshi A., Azevedo V.: *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence, *Vet. Res.* **2**, 201–218 (2006)
- Dupon C., Turner L., Rouveix E., Nicolas M.H., Dorra M.: Endocardite à *Corynebacterium diphtheriae* tolerant à l'amoxicillin. *Presse Med.* **24**, 1135 (1995)
- Eguchi H., Kuwahara T., Miyamoto T., Nakayama-Imahiji H., Ichimura M., Hayashi T., Shiota H.: High-level fluoroquinolone resistance in ophthalmic clinical isolates belonging to the species *Corynebacterium macginleyi*. *J. Clin. Microbiol.* **2**, 527–532 (2008)
- Freeman J.D., Smith H.J., Haines H.G., Hellyar A.G.: Seven patients with respiratory infection due to *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*. *Pathology*, **26**, 311–314 (1994)
- Fernandez-Roblas R., Adames H., Martin-de-Hijas N.Z., Garcia Almeida D., Gadea I., Esteban J.: In vitro activity of tigeicycline and 10 other antimicrobials against clinical isolates of the genus *Corynebacterium*. *Int. J. Antimicrob. Agents*, doi:10.1016/j.ijantimicag. 2008.11.001 (2009)
- Funke G., Efstratiou A., Kiklinska D., Hutson R., De Zoysa A., Engler K.H., Collins M.D.: *Corynebacterium imitans* sp. nov. isolated from patients with suspected diphtheria. *J. Clin. Microbiol.* **8**, 1978–1983 (1997)
- Funke G., Punter V., von Graevenitz A.: Antimicrobial susceptibility patterns of some recently established coryneform bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**, 2874–2878 (1996)
- Funke G., von Graevenitz A., Clarridge III J.E., Bernard K.A.: Clinical Microbiology of coryneform bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* **1**, 125–159 (1997)
- Garcia-Bravo M., Aguado J.M., Morale J.M., Norwega A.R.: Influence of external factors in resistance of *Corynebacterium urealyticum* to antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**, 497–499 (1996)
- Gomez-Garces J-L., Alos J-I., Tamayo J.: In vitro activity of linezolid and 12 other antimicrobials against coryneform bacteria, *Int. J. Antimicrob. Agents.* **29**, 688–692 (2007)
- Gross D.C., Vidaver A.K., Keralis M.B.: Indigenous plasmids from phytopathogenic *Corynebacterium* sp. *J. Gen. Microbiol.* **115**, 479–489 (1979)
- Hall R.M., Collis C.M., Kim M.J., Partridge S.R., Recchia G.D. Stokes H.W.: Mobile gene cassettes and integrons in evolution. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **870**, 68–80 (1999)
- Hodgson A.L., Krywult J., Radford A.J.: Nucleotide sequence of the erythromycin resistance gene from the *Corynebacterium* plasmid pNG2. *Nucleic Acids Res.* **18**, 1891 (1990)
- Johnson A.P., Mushtaq S., Warner M., Livermore D.M.: Activity of daptomycin against multi-resistant Gram-positive

- bacteria including enterococci and *Staphylococcus aureus* resistant to linezolid. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **24**, 315–319 (2004)
27. Katsumata R., Ozaki A., Oka T., Furuya A.: Protoplast transformation of glutamate-producing bacteria with plasmid DNA. *J. Bacteriol.* **159**, 306–311 (1984)
 28. Kono M., Sasatsu M., Aoki T.: R plasmids in *Corynebacterium xerosis* strains. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **23**, 506–508 (1983)
 29. Lagrou J., Verhaegen M., Janssens G., Wauters G., Verbist L.: Prospective study of catalase-positive coryneform organisms in clinical specimens: identification, clinical relevance, and antibiotic susceptibility. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **30**, 7–15 (1998)
 30. Luna V.A., Coates P., Eady A., Cove J.H., Nguyen T.T.H., Roberts M.C.: A variety of Gram-positive bacteria carry mobile *mef* genes. *J. Antimicrob. Chemother.* **44**, 19–25 (1999)
 31. Markiewicz Z., Kwiatkowski Z.A.: Bakterie, antybiotyki, lekooporność. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa, 2006
 32. Martinez-Martinez L., Suarez A.I., Winstanley J., Ortega M.C., Bernard K.: Phenotypic characteristics of 31 strains of *Corynebacterium striatum* isolated from clinical sample. *J. Clin. Microbiol.* **9**, 2458–2461 (1995)
 33. Ojo K.K., Striplin M.J., M., Ulep C.C., Close N.S., Zittle J., Luis H., Bernardo M., Leitao J., Roberts M.C.: *Staphylococcus* efflux *msr(A)* gene characterized in *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Corynebacterium*, and *Pseudomonas* isolates. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **3**, 1089–1091 (2006)
 34. Ostuka Y., Kawamura Y., Koyama T., Iihara H., Ohkusu K., Azeki T.: *Corynebacterium resistens* sp. nov., a new multi-resistant coryneform bacterium isolated from human infection. *J. Clin. Microbiol.* **8**, 3713–3717 (2005)
 35. Otsuka Y., Ohkusu K., Kawamura Y., Baba S., Azeki T., Kiura S.: Emergence of multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* as a nosocomial pathogen in long-term hospitalized patients with underlying diseases. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **54**, 109–114 (2006)
 36. Perrin-Guyomard A., Soumet C., Leclercq R., Doucet-Populaire R., Sanders P.: Antibiotic susceptibility of bacteria isolated from pasteurized milk and characterization of macrolide-lincosamide-streptogramin resistance genes. *J. Food. Prot.* **2**, 347–352 (2005)
 37. Pitcher D., Johnson A., Allerberger F., Woodford N., George R.: An investigation of nosocomial infection with *Corynebacterium jeikeium* in surgical patients using a ribosomal RNA gene probe. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **9**, 643–648 (1990)
 38. Power E.G., Abdullah Y.H., Talsania H.G., Spice W., Aathithan S., French G.L.: *vanA* genes in vancomycin-resistant clinical isolates of *Oerskovia turbata* and *Arcanobacterium* (*Corynebacterium*) *haemolyticum*. *J. Antimicrob. Chemother.* **4**, 595–606 (1995)
 39. Riegel P., Ruimy R., Renard F.N.R., Freney J., Prevost G., Jehl F., Christen R., Monteil H.: *Corynebacterium singulare* sp. nov., new species for urease-positive strains related to *Corynebacterium minutissimum*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **4**, 1092–1096 (1997)
 40. Roberts M.C., Leonard R.B., Briselden A., Schoenknecht F.D., Coyle M.B.: Characterization of antibiotic-resistant *Corynebacterium striatum* strains. *J. Antimicrob. Chemother.* **30**, 463–474 (1992)
 41. Roberts M.C., Sutcliffe J., Courvalin P., Jensen L.B., Rood J., Seppala H.: Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 2823–2830 (1999)
 42. Rosato A.E., Lee B.S., Nash K.A.: Inducible macrolide resistance in *Corunebacterium jeikeium*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **7**, 1982–1989 (2001)
 43. Ross J.I., Eady A.A., Carnegie E., Cove J.H.: Detection of transposon Tn5432 – mediated macrolide-lincosamide-streptogramin B (MLSB) resistance in cutaneous propionibacterie from six European cities. *J. Antimicrob. Chemother.* **49**, 165–168 (2002)
 44. Serwold-Davis T.M., Groman N.B.: Mapping and cloning of *Corynebacterium diphtheriae* plasmid pNG2 and characterization of ist relatedness to plasmids from skin coryneforms. *Antimicrob. Agents Chemother.* **30**, 69–72 (1986)
 45. Serwold-Davis T.M., Groman N.B., Kao C.C.: Localization of an origin of replication in *Corynebacterium diphtheriae* broad host range plasmid pNG2 that also functions in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **54**, 119–123 (1990)
 46. Serwold-Davis T.M., Groman N., Rabin M.: Transformation of *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium ulcerans*, *Corynebacterium glutamicum* and *Escherichia coli* with the *C. diphtheriae* plasmid pNG2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 4964–4968 (1987)
 47. Shah M., Murillo J.L.: Successful treatment of *Corynebacterium striatum* endocarditis with daptomycin plus rifampin. *Ann. Pharmacother.* **10**, 1741–1744 (2005)
 48. Sierra J.M., Martinez-Martinez L., Vazquez 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.* **5**, 1714–1719 (2005)
 49. Takahashi T., Tsuji M., Kikuchi N., Ishihara C., Osanai T., Kasai N., Yanagawa R., Hiramune T.: Assignment of the bacterial agent of urinary calculus in young rats by the comparative sequence analysis of the 16s rRNA genes corynebacteria. *J. Vet. Sci.* **3**, 515–517 (1995)
 50. Takeda Y., Fujii M., Nakajoh Y., Nishimura T., Isshiki S.: Isolation of tetracycline resistance plasmid from a glutamate-producing *Corynebacterium*, *Corynebacterium melassecola*. *J. Ferment. Bioeng.* **70**, 177–179 (1990)
 51. Tauch A., Kassing F., Kalinowski J., Pühler A.: The *Corynebacterium xerosis* composite transposon Tn5432 consists of two identical insertion sequences, designated IS1249, flanking the erythromycin resistance gene ermC. *Plasmid*, **34**, 119–131 (1995)
 52. Tauch A., Kassing F., Kalinowski J., Pühler A.: The erythromycin resistance gene of the *Corynebacterium xerosis* R-plasmid pTP10 also carrying chloramphenicol, kanamycin and tetracycline resistance is capable of transposition in *Corynebacterium glutamicum*. *Plasmid*, **33**, 168–179 (1995)
 53. Tauch A., Krieff S., Kalinowski J., Pühler A.: The 51,409-bp R-plasmid pTP10 from the multiresistant clinical isolate *Corynebacterium striatum* M82B is composed of DNA segments initially identified in soil bacteria and in plant, animal, and human pathogens. *Mol. Gen. Genet.* **263**, 1–11 (2000)
 54. Tauch A., Krieff S., Pühler A., Kalinowski J.: The *tetAB* of the *Corynebacterium striatum* R-lasmid pTP10 encode an ABC transporter and confer tetracycline, oxytetracycline and oxacillin resistance in *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **173**, 203–209 (1999)
 55. Tauch A., Zheng Z., Pühler A., Kalinowski J.: *Corynebacterium striatum* chloramphenicol resistance transposon

- Tn5564: genetic organization and transposition in *Corynebacterium glutamicum*. *Plasmid*, **40**, 126–139 (1998)
56. Troxler R., Funke G., von Graevenitz A., Stock I.: Natural antibiotic susceptibility of recently established coryneform bacteria, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **20**, 315–323 (2001)
57. Tu K.K., Jorgensen J.H., Stratton C.W.: A Rapid paper-disc test for penicillinase. *Am. J. Clin. Pathol.* **75**, 557–559 (1981)
58. Weiss K., Laverdiere M., Rivest R.: Comparison of antimicrobial susceptibilities of *Corynebacterium* species by broth microdilution and disc diffusion methods, *Antimicrob. Agents. Chemother.* **4**, 930–933 (1996)
59. Wendisch V.F., Bott M., Kalinowski J., Oldiges M., Wiechert W.: Emerging *Corynebacterium glutamicum* systems biology, *J. Biotechnol.* **1**, 74–92 (2006)
60. Williams D.Y., Selepak S.T., Gill V.J.: Identification of clinical isolates of nondiphtherial *Corynebacterium* species and their antibiotic susceptibility patterns. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **17**, 23–28 (1993)
61. Wilson A.P.R.: Treatment of infections caused by toxigenic and non-toxigenic strains of *Corynebacterium diphtheriae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **35**, 717–720 (1995)
62. www.abbiotest.com/Etest Application Sheet/Fastidious Gram Positive Bacilli EAS 021
63. Valbuena N., Letek M., Ordonez E., Atala J., Daniel R.A., Gil J.A., Mateos L.M.: Characterization of HMW-PBPs from the rod-shaped actinomycete *Corynebacterium glutamicum*: peptidoglycan synthesis in cells lacking actin-like cytoskeletal structures. *Mol. Microbiology*, **66**, 643–657 (2007)
64. Vertes A.A., Inui M., Yukawa H.: Manipulating *Corynebacteria*, from individual genes to chromosomes. *Appl. Environ. Microbiol.* **12**, 7633–7642 (2005)
65. Von Hunolstein C., Scopetti F., Efstratiou A., Engler K.: Penicillin tolerance amongst non-toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* isolated from cases of pharyngitis. *J. Antimicrob. Chemother.* **50**, 125–128 (2002)
66. Yague Guirao G., Mora Peris B., Martinez-Toldos M.C., Rodriguez Gonzalez T., Valero Guillen P.L., Segovia Hernandez M.: Implication of *ermX* genes in macrolide- and telithromycin-resistance in *Corynebacterium jeikeium* and *Corynebacterium amycolatum*. *Rev. Esp. Quimioterap.* **3**, 136–242 (2005)
67. Yassin A.F., Siering C.: *Corynebacterium sputi* sp. nov., isolated from the sputum of the a patient with pneumonia, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **12**, 2876–2879 (2008)
68. Zhen Z.H., Ma C.P., Yan W.Y., He P.F., Mao Y.X., Sun W., Lei Z.Z., Zhu P., Wu J.F.: Restriction map of plasmid pXZ10145 of *Corynebacterium glutamicum* and construction of an integrated plasmid. *Chin. J. Biotechnol.* **3**, 183–188 (1987)