

9. Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных / Под ред. Д.К. Львова. – М.: МИА, 2013. – 1200 с.

Handbook of Virology. Viruses and viral infections of humans and animals / Ed. D.K. Lvov. – M.: Med. Inf. Agency, 2013. – 1200 p.

10. Чучалин А.Г. Тяжелый острый респираторный синдром / А.Г. Чучалин // Архив патологии. – 2004. – Т. 76. – № 3. – С. 5–11.

Chuchalin A.G. Severe acute respiratory syndrome / A.G. Chuchalin // Ter. Arch. – 2004. – V. 76. – № 3. – P. 5–11.

11. Щелканов М.Ю. Ближневосточный респираторный синдром: когда вспыхнет тлеющий очаг? / М.Ю. Щелканов, В.Ю. Ананьев, В.В. Кузнецов, В.Б. Шуматов // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2015. – № 2. – С. 94–98.

Shchelkanov M.Yu. Middle East respiratory syndrome: when will smoldering focus outbreak? / M.Yu. Shchelkanov, V.Yu. Ananiev, V.V. Kuznetsov, V.B. Shumatov // Pacific Medical Journal. – 2015. – № 2. – P. 94–98.

12. Щелканов М.Ю. Грипп: история, клиника, патогенез / М.Ю. Щелканов, Л.В. Колобухина, Д.К. Львов // Лечащий врач. – 2011. – № 10. – С. 33–38.

Shchelkanov M.Yu. Influenza: history, clinics, pathogenesis / M.Yu. Shchelkanov, L.V. Kolobukhina, D.K. Lvov // The Practitioner. – 2011. – № 10. – P. 33–38. URL: <https://www.lvrach.ru/2011/10/15435275/>

13. Щелканов М.Ю. Коронавирусы человека (Nidovirales, Coronaviridae): возросший уровень эпидемической опасности / М.Ю. Щелканов, Л.В. Колобухина, Д.К. Львов // Там же. – 2013. – № 10. – С. 49–54.

Shchelkanov M.Yu. Human coronaviruses (Nidovirales, Coronaviridae): increased level of epidemic threat / M.Yu. Shchelkanov, L.V. Kolobukhina, D.K. Lvov // The Practitioner. – 2013. – № 10. – P. 49–54. URL: <http://www.lvrach.ru/2013/10/15435832/>

14. Щелканов М.Ю. Эпидемическая вспышка Ближневосточного респираторного синдрома в Республике Корея (май-июль 2015 г.): причины, динамика, выводы / М.Ю. Щелканов, В.Ю. Ананьев, В.В. Кузнецов, В.Б. Шуматов // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2015. – № 3. – С. 25–29.

Shchelkanov M.Yu. Epidemic outbreak of Middle East respiratory syndrome in the Republic of Korea (May–July, 2015): reasons, dynamics, conclusions / M.Yu. Shchelkanov, V.Yu. Ananiev, V.V. Kuznetsov, V.B. Shumatov // Pacific Medical Journal. – 2015. – V. 3. – P. 25–29.

15. Chinese National Committee on Public Health and Traditional Chinese Medicine. Program for the diagnosis and treatment of pneumonia associated with a new coronavirus infection. 4-th edition. – Beijing, 2020. – 74 p. (In Chinese)

16. Genomic characterization and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding / R. Lu, X. Zhao, J. Li [et al.] // The Lancet. – 2020. 395(10224). P. 565–574. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30251-8.

17. Liu P. Viral Metagenomics Revealed Sendai Virus and Coronavirus Infection of Malayan Pangolins (Manis javanica) / P. Liu, W. Chen, J.P. Chen // Viruses. 2019. – V. 11. – № 11. – P. E979. DOI: 10.3390/v11110979.

18. World Health Organization. Coronavirus disease 2019 (COVID-19). Situation Report-40 (29 February 2020). URL: [https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200229-sitrep-40-covid-19.pdf?sfvrsn=849d0665\\_2](https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200229-sitrep-40-covid-19.pdf?sfvrsn=849d0665_2) (accessed 06.03.2020).

Я.А. Ахременко, А.Е. Гончаров, В.В. Колоджиева, Е.Ю. Белоногова, Д.С. Колесник, А.С. Мохов, В.И. Иларова, Л.А. Тарасова

## МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*, ВЫДЕЛЕННЫХ В Г. ЯКУТСКЕ

DOI 10.25789/YMJ.2020.70.14

УДК 616-022.7+616-093/-098

Определены микробиологические и молекулярно-генетические характеристики штаммов *S. pneumoniae*, выявленных при назофарингеальном носительстве в г. Якутске у пациентов в возрасте от 6 мес. до 85 лет.

Полученные данные свидетельствуют о распространенности вирулентных антибиотикорезистентных штаммов *S. pneumoniae* среди населения г. Якутска и диктуют необходимость проведения дальнейших эпидемиологических и микробиологических исследований этой проблемы.

**Ключевые слова:** пневмококк, назофарингеальное носительство, вирулентность, резистентность.

**АХРЕМЕНКО Яна Александровна** – к.м.н., доцент МИ СВФУ им. М.К. Аммосова, [yanalex2007@yandex.ru](mailto:yanalex2007@yandex.ru); **ГОНЧАРОВ Артемий Евгеньевич** – д.м.н., зав. лаб. Ин-та экспериментальной медицины, проф. Северо-Западного ГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава РФ, г. Санкт-Петербург, [phage1@yandex.ru](mailto:phage1@yandex.ru); **КОЛОДЖИЕВА Виктория Васильевна** – к.м.н., доцент СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава РФ, [vika-el@yandex.ru](mailto:vika-el@yandex.ru); **БЕЛОНОГОВА Екатерина Юрьевна** – аспирант Ин-та экспериментальной медицины, [katyushka1204@mail.ru](mailto:katyushka1204@mail.ru); **КОЛЕСНИК Дмитрий Сергеевич** – аспирант СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава РФ, [dmitry\\_kolesnik@mail.ru](mailto:dmitry_kolesnik@mail.ru); **МОХОВ Алексей Сергеевич** – аспирант СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава РФ, [docalexserg@gmail.com](mailto:docalexserg@gmail.com); **ИЛАРОВА Вера Иннокентьевна** – зав. учебно-научной микробиологической лабораторией Клиники СВФУ им. М.К. Аммосова, [bio53@mail.ru](mailto:bio53@mail.ru); **ТАРАСОВА Лидия Андреевна** – к.м.н., доцент МИ СВФУ им. М.К. Аммосова, [degtyarevalida@yandex.ru](mailto:degtyarevalida@yandex.ru).

The microbiological and molecular genetic characteristics of *S. pneumoniae* strains, identified during nasopharyngeal carriage, were determined in patients from the age of 6 months up to 85 years old, living in Yakutsk.

The obtained data indicate the prevalence of virulent antibiotic-resistant *S. pneumoniae* strains among the population of Yakutsk and dictate the need for further epidemiological and microbiological studies of this problem.

**Keywords:** pneumococcus, nasopharyngeal carriage, virulence, resistance.

**Введение.** Несмотря на введение массовой вакцинации, пневмококк (*Streptococcus pneumoniae*) входит в число главных возбудителей острых бактериальных инфекций у детей, особенно в возрасте до 5 лет [2–4].

Высокая заболеваемость пневмококковыми инфекциями сочетается с неуклонным ростом резистентности пневмококка к антибактериальным препаратам, наиболее широко используемым в клинической практике. β-лактамы и макролиды являются препаратами выбора при лечении пневмококковых инфекций, поэтому рост

резистентности *S. pneumoniae* к этим антибиотикам становится существенной клинической проблемой [4].

Резистентность *S. pneumoniae* к пенициллину и другим β-лактамам обусловлена изменением пенициллинсвязывающих белков (penicillin binding proteins, PBPs) — ферментов, которые участвуют в заключительных этапах синтеза клеточной стенки [13].

Резистентность к макролидам опосредуется двумя главными механизмами, к которым относятся изменения мишени связывания и эффлюкс анти-

биотика из бактериальной клетки. Первый механизм обусловлен модификацией сайта связывания макролидов с 23S-pPHK вследствие ее метилирования, которое нарушает взаимодействие антибиотика с мишенью. Метилирование осуществляется ферментом метилазой, который кодируется геном *erm* (англ. erythromycin ribosome methylation) и обуславливает высокий уровень устойчивости к макролидам. Описано около 20 разновидностей *erm*, однако наибольшее значение для формирования резистентности у пневмококка играет вариант *ermB*. Большинство пневмококков, имеющих *ermB*, демонстрируют перекрестную резистентность ко всем макролидам, а также к линкозамидам и стрептограмину В, поскольку их мишени частично перекрываются. Этот фенотип получил название MLSB [1,7].

Второй механизм резистентности к макролидам связан с их активным выведением (эффлюксом) из бактериальной клетки с помощью особой

на наличие обобщающих данных крупных многоцентровых исследований [2], региональные данные крайне важны для понимания тенденций молекулярной эпидемиологии и резистентности пневмококков как на конкретной территории, так и в целом по стране, при этом имеет место дефицит информации о ситуации на Северо-Востоке РФ.

**Цель:** определить микробиологические и молекулярно-генетические характеристики штаммов *S. pneumoniae*, выявленных при назофарингеальном носительстве в г. Якутске.

**Материалы и методы исследования.** Изучены изоляты *S. pneumoniae*, полученные из отделяемого носоглотки у 69 пациентов в возрасте от 6 мес. до 85 лет, проживающих в г. Якутске и проходящих обследование по поводу острых и хронических заболеваний ЛОР-органов (ринит, синусит, отит), повторных ОРВИ и назофарингитов. Из них 58 детей (84%), 11 взрослых (16%), стационарных пациентов – 25 (36,2%), амбулаторных – 44 (63,8%).

татах использовали тест-системы для выявления ДНК *S. pneumoniae* (ВекторБЕСТ) на ПЦР-ПВ. Определение чувствительности к антимикробным препаратам осуществляли диско-диффузионным методом с интерпретацией согласно рекомендациям EUCAST и Клиническим рекомендациям по определению чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам (версия 2018-03), для уточнения фенотипа чувствительности/резистентности использовали микробиологический анализатор Vitek II Compact.

Подтверждение видовой идентификации проводилось путем амплификации гена аутолизина (*lytA*) [12]. Определение серологических типов выделенных штаммов *S. pneumoniae* выполнялось с помощью мультиплексной ПЦР [9]. Для идентификации генов вирулентности и генетических детерминант устойчивости к макролидным антибиотикам в полимеразной цепной реакции использованы следующие праймеры (табл. 1, 2).

Таблица 1

Праймеры, использованные в исследовании для идентификации генов вирулентности

Ген	Последовательность праймеров (5'→3')	Референсный геном (GenBank Acc. №)	Локализация в референсном геноме		Источник
<i>ftsW</i>	ATGGCTTCCCCGTGCTTTTA	AE005672.3	1001727	1001746	Настоящее исследование
	AGATACGAGCGCCAGAATGG		1001901	1001882	
<i>pezT</i>	CGCGCAACTCCAAAAGAACA		989035	989054	
	CCCACCTGCAACATCTCCTT		989255	989236	
<i>nplT</i>	GGAGACCTTTCGGGAAGTGG		985812	985831	
	TGGTCCTCCAGTCAAGGCTA		986562	986543	

Таблица 2

Праймеры, использованные для детекции генетических детерминант устойчивости к антибиотикам группы макролидов

Праймеры	Последовательность 5' → 3'	Ген	Размер продукта (пары нуклеотидов)	Ссылка на источник
<i>ermB-f</i>	ATTGGAACAGGTAAAGGCG	<i>Erm B</i>	442	[8]
<i>ermB-r</i>	GAACATCTGTGGTATGGCG			
MEF 57-f	AGTATCATTAATCACTAGTGC	<i>MEF(A)</i>	346	[7]

помпы, встроенной в клеточную стенку. Эффлюксная помпа кодируется несколькими вариантами гена *mef* (англ. macrolide efflux). Mef-позитивные пневмококки имеют M-фенотип, который характеризуется резистентностью к четырнадцати- и пятнадцатичленным макролидам, но сохранением чувствительности к шестнадцатичленным макролидам, линкозамидам и стрептограмину В [1,3,10].

Еще одной актуальной проблемой в связи с проводимой в РФ вакцинацией конъюгированными пневмококковыми вакцинами является возможность генетических изменений в популяции возбудителя под воздействием применяемых вакцин. В этой связи важны данные, характеризующие наличие в геномах *S. pneumoniae* мобильных генетических элементов, ассоциируемых с инвазивным потенциалом, к числу которых относится остров патогенности PPI1 [5].

Необходимо отметить, что несмотря

Материал был получен из носоглотки с помощью тампонов, которые помещались в транспортную среду Эймса с углем. Посевы на шоколадном агаре инкубировали в герметичных контейнерах с газогенераторами для создания микроаэрофильных условий (bioMerieux) в течение 24 ч. Идентификацию выделенных культур проводили методом времяпролетной масс-спектрометрии на анализаторе Vitek MS, при неопределенных резуль-

**Результаты и обсуждение.** По данным учебно-научной микробиологической лаборатории Клиники СВФУ, частота пневмококкового назофарингеального носительства в г. Якутске в 2010 г. составляла 14,1%, а в 2017 г. – всего лишь 2,7% в общей структуре назофарингеального бактерионосительства. Из 69 полученных образцов более половины подтвержденных изолятов *S. pneumoniae* было представлено серотипом 6A (53,8%), треть штаммов

(30,8%) - серотипом 19F, остальные 15,4% - серотипами 7F и 23F.

При определении чувствительности к антимикробным препаратам диско-диффузионным методом обращали внимание на наличие чувствительности/резистентности к  $\beta$ -лактамам антибиотикам по диску с 1 мкг оксациллина (OX) и чувствительности/резистентности к макролидам по диску с 15 мкг эритромицина (E). Так, 42% выделенных пневмококков были резистентны к  $\beta$ -лактамам, а 34,8% - резистентны к макролидам, при этом 26,1% штаммов были резистентны к обоим группам препаратов (табл. 3).

Таблица 3

**Выявленные фенотипы чувствительности/резистентности *S. pneumoniae* к  $\beta$ -лактамам и макролидам**

Фенотип	Абс. (%)	Абс. (%)
OX-R E-S	11 (15,9)	Ox – R 29 (42)
OX – R E - R	18 (26,1)	
OX-S E-R	6 (8,7)	E – R 24 (34,8)
OX – S E - S	34 (49,3)	

При генетическом исследовании показано, что резистентность к макролидам отмечена у всех изолятов серотипа 6А, причем у 80% представителей данного типа был выявлен ген резистентности *ermB* и у 50% этих пневмококков выявлялись все 3 гена, ассоциированные с островом патогенности PPI1. Эти же гены, а также все детерминанты устойчивости к макролидам выявлялись у *S. pneumoniae* серотипа 19F. В целом охарактеризовано 6 генотипов пневмококков, выделенных при назофарингеальном бактерионосительстве в г. Якутске (табл. 4).

Таким образом, более 80% изученных нами штаммов *S. pneumoniae* представлено серотипами 6А и 19F. У 50% пневмококков 6А и 100% серотипа 19F пневмококков выявлялись все 3 гена, ассоциированные с островом патогенности PPI1. Резистентность к макролидам отмечена у всех изолятов серотипа 6А, при этом у 80% представителей серотипа 6А и 100% представителей серотипа 19F был выявлен ген резистентности *ermB* (фенотип

**Разнообразие генотипов *S. pneumoniae*, выделенных в г. Якутске**

Гены устойчивости к макролидам			Гены, ассоциированные с островом патогенности PPI1			Серотип	Эритромицин
<i>MSR</i>	<i>MEF</i>	<i>ermB</i>	<i>pezT</i>	<i>nplT</i>	<i>FtsW</i>		
-	-	+	+	+	+	6А	R
+	+	-	+	+	+	6А	R
-	-	+	-	+	+	6А	R
-	-	+	-	-	+	6А	R
-	-	+	-	+	+	6А	R
+	+	+	+	+	+	19F	I

MLSB), а 20% пневмококков серотипа 6А имели ген *tef* (М-фенотип).

**Заключение.** Полученные данные свидетельствуют о распространенности вирулентных и антибиотикорезистентных штаммов *S. pneumoniae* среди населения г. Якутска и диктуют необходимость проведения дальнейших эпидемиологических и микробиологических исследований в этой области. Последующие мониторинговые исследования, очевидно, должны быть направлены на оценку влияния массовой вакцинации населения на генетическую структуру популяции пневмококков, включая оценку появления новых штаммов с высоким патогенным и эпидемиологическим потенциалом.

**Литература**

1. Козлов Р.С. Пневмококки: прошлое, настоящее и будущее / Р.С. Козлов. - Смоленск: Смоленская государственная медицинская академия, 2005. - 128 с.
2. Kozlov R.S. Pneumococci: past, present and future / R.S. Kozlov. - Smolensk: Smolensk state medical Academy, 2005. - 128 p.
3. Пневмококковая инфекция и современные возможности ее профилактики — эпидемиологический обзор ситуации в мире и в России / С.В. Сидоренко, Ю.В. Лобзин, С.М. Харит [и др.] // Вопросы современной педиатрии. - 2010. - Т. 9, №1. - С. 62–69.
4. Pneumococcal infection and modern possibilities of its prevention — an epidemiological review of the situation in the world and in Russia / S.V. Sidorenko, Yu.V. Lobzin, S.M. Harit [et al.] // Issues of modern Pediatrics. - 2010. - V. 9, №1. - P. 62-69.
5. Райнерт Р.Р. Новые данные по эффективности 13-валентной пневмококковой конъюгированной вакцины в отношении инвазивных пневмококковых инфекций, пневмоний, острого среднего отита и назофарингеального носительства / Р.Р. Райнерт, Б. Тайши // Педиатрическая фармакология. - 2012. - № 3. - С. 8-11.
6. Rainert R.R. New data on the effectiveness of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine

against invasive pneumococcal infections, pneumonia, acute otitis media and nasopharyngeal carrier / R.R. Rainert, B. Tajshi // Pediatric pharmacology. - 2012. - №3. - P. 8-11.

4. Серотиповое разнообразие и резистентность пневмококков / Н.А. Маянский, Н.М. Алябьева, А.В. Лазарева, Л.К. Катосова // Вестник РАМН. - 2014. - № 7–8. - С. 38–45.

Serotype diversity and resistance of pneumococci / N.A. Mayansky, N.M. Alyabyeva, A.V. Lazareva, L.K. Katosova // Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2014. - № 7–8: 38–45.

5. A variable region within the genome of *Streptococcus pneumoniae* contributes to strain-strain variation in virulence / R.M. Harvey, U.H. Stroehrer, A.D. Ogunniyi [et al.] // PLoS One. 2011. 6(5). DOI: 10.1371/journal.pone.0019650

6. Cornick J.E. *Streptococcus pneumoniae*: the evolution of antimicrobial resistance to beta-lactams, fluoroquinolones and macrolides / J.E. Cornick, S.D. Bentley // Microb. Infect. 2012; 14: 573–583. DOI: 10.1016/j.micinf.2012.01.012.

7. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR / J. Sutcliffe, T. Grebe, A. Tait-Kamradt, L. Wondrack // Antimicrob Agents Chemother 1996;40:2562-6.

8. Molecular epidemiology of erythromycin resistance in *Streptococcus pneumoniae* isolates from blood and noninvasive sites / M.R. Amezaga, P.E. Carter, P. Cash, H. McKenzie // J. Clin. Microbiol. 2002. 40:3313-3318. DOI: 10.1128/JCM.40.9.3313-3318.2002

9. Rarely occurring 19A-like cps locus from a serotype 19F pneumococcal isolate indicates continued need of serology-based quality control for PCR-based serotype determinations / F.C. Pimenta, REJr Gertz, A. Yu J. Roundtree // J. Clin Microbiol. 2009 Jul;47(7):2353-4. DOI: 10.1128/JCM.00704-09.

10. Reinert R.R. The antimicrobial resistance profile of *Streptococcus pneumoniae* / R.R. Reinert // Clin. Microbiol. Infect. 2009; 15 (Suppl. 3): 7–11. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2009.02724.x.

11. Retsema J. Macrolides: structures and microbial targets / J. Retsema, W. Fu // Int. J. of Antimicrob. Agents. 2001; 3–10.

12. Clinical validation of multiplex real-time PCR assays for detection of bacterial meningitis pathogens / X. Wang [et al.] // J. Clin. Microbiol. 50, 702–708 (2012)

13. Zapun C. Penicillin-binding proteins and beta-lactam resistance / C. Zapun, T.V. Contreras-Martel // FEMS Microbiol. Rev. 2008; 32: 361–385. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2007.00095.x.