

УДК [616.831.9:579.852]-07:[579.852:579.25].08

## Фенотипическая и генотипическая характеристика штаммов пневмококков, выделенных от больных пневмококковым менингитом

Г.В. Белошицкий, И.С. Королева, К.О. Миронов

Центральный НИИ эпидемиологии, Москва, Россия

Изучена устойчивость к антибактериальным препаратам 84 музейных штамма инвазивных пневмококков, выделенных от больных гнойным менингитом в Москве за период 1980–2010 гг., определена их серотиповая принадлежность и генетический аллельный профиль. Установлено, что на территории Москвы в течение 2008–2010 гг. отмечается рост устойчивости инвазивных пневмококков к антибактериальным препаратам, в том числе за счет штаммов с полирезистентными свойствами, доля которых составила 13% от числа исследованных культур. Все штаммы со сниженной чув-

ствительностью к пенициллину принадлежали к серотипам 23F, 19F, 19A, 6A, 6B, 14, которые ассоциированы с антибиотикоустойчивостью. Среди инвазивных пневмококков обнаружены штаммы с сиквенс-типами ST-663 и ST-675, относящиеся к международным эпидемическим клонам (Spain<sup>23F</sup>-1 и Taiwan<sup>19F</sup>-14) и характеризующиеся значительной устойчивостью к антибактериальным препаратам.

**Ключевые слова:** пневмококк, антибиотикоустойчивость, полирезистентность, серотип, мультилокусное секвенирование-типирование.

## Phenotypic and Genotypic Characteristics of Pneumococci Isolated from Patients with Pneumococcal Meningitis

G.V. Beloshitskiy, I.S. Korolyova, K.O. Mironov

Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

Antimicrobial susceptibility, serotype distribution, and multilocus sequence types of *Streptococcus pneumoniae* isolated from the patients with meningitis were determined. We tested a total of 84 isolates which have been obtained in Moscow during 1980–2010, of them 20 isolates were non-susceptible to penicillin. Serotypes 19F, 19A, 23F, 6A, 6B and 14 were the leading serotypes among the resistance strains. Eight of the 11 strains

non-susceptible to penicillin, which were isolated from 2008 to 2010, belonged to new sequence types not hitherto described in the MLST database. The two isolates appeared to be clonally related to the Spain<sup>23F</sup>-1 and Taiwan<sup>19F</sup>-14 clones by MLST.

**Key words:** *Streptococcus pneumoniae*, antimicrobial resistance, multidrug resistance serotype, multilocus sequence-typing.

Контактный адрес:

Григорий Владимирович Белошицкий

Эл. почта: rocmi@pcr.ru

## Введение

*Streptococcus pneumoniae* – один из наиболее частых этиологических микробных агентов, вызывающих тяжелейшие инвазивные инфекции (менингит, септицемия, пневмония) с высоким уровнем заболеваемости, смертности и инвалидизации среди детей и взрослого населения [1]. Длительное время этот возбудитель характеризовался высокой природной чувствительностью к пенициллинам и другим бета-лактамам антибиотикам, макролидам, линкозамидам, тетрациклинам, хлорамфениколу, умеренной устойчивостью к гликопептидам и ранним фторхинолонам, а также природной устойчивостью к аминогликозидам. Однако начиная с конца 70-х и начала 80-х годов XX века, ситуация начала стремительно меняться, принимая в некоторых странах драматический характер. Феномен нарастания устойчивости пневмококков к антибактериальным препаратам в разных регионах мира значительно отличался, в зависимости от частоты и обоснованности применения антибиотиков при лечении и профилактике инфекционных заболеваний. Особое беспокойство вызвали случаи клинической неэффективности пенициллина при лечении менингита, вызванного резистентными штаммами *S. pneumoniae* [2]. Было показано, что если инфекция у детей вызвана штаммами *S. pneumoniae* с промежуточной устойчивостью к бензилпенициллину, то медленнее нормализуется температура тела и требуется более длительный срок госпитализации [3].

В США в 1998 году доля штаммов пневмококков, устойчивых к пенициллину, в среднем по стране составила 24%, половина из исследованных культур были резистентны к высоким концентрациям препарата (МПК >2 мг/л), а к 2001 году этот показатель в некоторых штатах уже достигал уровня 56% [4]. В Испании в 2003 году устойчивыми к пенициллину были 61,9% штаммов, к цефотаксиму – 11%, макролидам – 43,6%, хлорамфениколу – 25,8%; во Франции – соответственно 47,6, 11, 46,1 и 14,7% штаммов [5]. В Китае в 2004–2005 гг. среди штаммов, выделенных у детей при респираторных заболеваниях, доля культур, нечувствительных к пенициллину, составляла 63%, а к макролидам – до 94% [6]. Пневмококки не только приобрели устойчивость к пенициллину и другим бета-лактамам, но и к целому ряду других классов антибактериальных препаратов. Например, перекрестная устойчивость к пенициллину и ко-тримоксазолу в Европе, по данным исследования Alexandr Project за 2000 год, определялась у 90% исследованных пенициллинорезистентных культур [7]. Выявлена

перекрестная устойчивость к пенициллину и макролидам [4].

В России распространенность резистентных штаммов пневмококков в популяции менее критична. Доля пневмококков, устойчивых к антибиотикам, в разных регионах России, в рамках работы по программе ПеГАС-III, составила: от 9 до 25% – устойчивых к пенициллину, от 0 до 4% – к цефотаксиму, от 4,5 до 19% – к кларитромицину, от 17 до 31% – к тетрациклину и от 3 до 11% – к хлорамфениколу. Полирезистентными свойствами обладали 14,5% исследованных культур [8].

Целью настоящего исследования ставилась оценка уровня устойчивости к антибактериальным препаратам пневмококков, выделенных от больных пневмококковыми менингитами за период 1980–2010 гг., характеристика их серотипового пейзажа и генетическое типирование устойчивых штаммов методом *мультилокусного секвенирования-типирования* (МЛСТ).

## Материал и методы

Исследованы 84 музейных штаммов пневмококков, выделенных от больных гнойным менингитом за период 1980–2010 гг. Высев штаммов, хранящихся в условиях глубокой заморозки (–70°C) или в лиофилизированном состоянии, выполнялся на кровяной и «шоколадный» агар с последующим определением морфологических, культуральных и биохимических свойств.

Принадлежность культур к виду *S. pneumoniae* подтверждалась микроскопией, положительным тестом с оптохином, чувствительностью к желчным кислотам, положительным тестом с оппигиновороткой.

Исследование антибиотикоустойчивости проводилось с помощью тест-системы «ATB STREP 5 ref 14 355» (BioMerieux, Франция) согласно инструкции производителя. Система позволяла тестировать штаммы пневмококка на чувствительность к антибактериальным препаратам, представленным в пограничных концентрациях: к пенициллину – в диапазоне от 0,031 до 4 мг/л, амоксициллину – от 2 до 4 мг/л, цефотаксиму – от 0,5 до 4 мг/л, эритромицину – 0,25 мг/л, клиндамицину – 0,25 мг/л, тетрациклину – 2 мг/л, левофлоксацину – от 2 до 4 мг/л, хлорамфениколу – 4 мг/л, ванкомицину – 1 мг/л и ко-тримоксазолу – от 0,5/9,5 до 2/38 мг/л. Результаты исследования оценивали согласно требованиям Европейского Комитета по определению антибиотикочувствительности (EUCAST) [9]. Исключение составили хлорамфеникол и клиндамицин, устойчивость к которым согласно регламенту EUCAST валифицируется при МПК

$\geq 8$  и  $\geq 0,5$  мг/л соответственно, однако в тест-системе концентрации этих препаратов составляли 4 и 0,25 мг/л. В этом случае устойчивость штамма оценивалась по пограничной концентрации антибиотика, представленной в тест-системе.

Серологическое типирование штаммов выполнялось с помощью специфических антипневмококковых сывороток производства Statens Serum Institut (Дания) по стандартной схеме определения реакции набухания капсулы (quellung reaction).

Генетическое типирование проводилось методом МЛСТ. Для этого амплифицировались и определялись нуклеотидные последовательности 7 фрагментов генов (aroE, gdh, gki, recP, spi, xpt, ddl) согласно принятым требованиям [10]. Обозначение номеров аллелей и сиквенс-типов (ST) проводилось в соответствии с международной номенклатурой при помощи Интернет-ресурса <http://spneumoniae.mlst.net>. Впервые обнаруженные сиквенс-типы, которые на момент окончания исследования не присутствовали в базе данных, обозначены буквами латинского алфавита; для новых сиквенс-типов указан аллельный профиль. Метод МЛСТ был применен

только к штаммам, устойчивым к антибиотикам: всего было протипировано 20 штаммов.

### Результаты исследований

Среди 84 изученных культур выявлено 20 штаммов с устойчивостью к пенициллину в диапазоне значений МПК  $>0,06 - <2$  мг/л, резистентных культур (МПК  $>2$  мг/л) обнаружено не было. Доля устойчивых штаммов в первой группе (выделенных в 1980–2000 гг.) составила 21% (8 штаммов), во второй (2008–2010 гг.) – 26% (12 штаммов). При этом, если среди культур, выделенных в 1980–2000 гг., преобладали штаммы с МПК  $<0,5$  мг/л (7 из 8 штаммов), то среди пневмококков периода 2008–2010 гг. культуры с МПК  $<0,5$  мг/л составляли только 50% всех штаммов (6 из 12). Результаты серологического типирования устойчивых штаммов пневмококков (МПК  $\geq 0,06$  мг/л) и их генетическая характеристика представлены в табл. 1.

Ведущее место в серотиповом пейзаже занимала серогруппа 19 (серотипы 19A – 3 шт., 19F – 2 шт., 19C – 1 шт.), далее следовала серогруппа 6 (серотип 6B – 2 шт., 6A – 1 шт.), серотип 23F – 2 шт., серотип

Таблица 1. Характеристика штаммов пневмококков, устойчивых к пенициллину

Диапазон МПК, мг/л	Серогруппа/серотип	Сиквенс-тип	Год выделения
$>1<2$	19A	ST-663	1987
	23F	ST-81	2008
	6B	ST-a (2, 6, 1, 2, 6, 1, 28)	2009
	14	ST-b (7, 5, 10, 18, 6, 1, 1)	2009
	19F	ST-c (15, 16, 26, 15, 6, 20, 19)	2010
$>0,5<1$	6A	ST-675	2008
	19F	ST-236	2010
$>0,25<0,5$	19A	ST-d (8, 10, 8, 8, 6, 26, 1)	1981
	19C	ST-925	1988
	14	ST-63	1988
	9V	ST-e (7, 8, 8, 4, 6, 28, 14)	2009
	4	ST-800	2009
	19A	ST-f (46, 8, 22, 1, 6, 1, 2)	2010
$>0,13<0,25$	23F	ST-g (7, 13, 2, 6, 10, 6, 14)	1981
	4	ST-h (1, 8, 4, 1, 6, 116, 31)	2008
$>0,06<0,13$	34	ST-i (1, 9, 53, 10, 10, 28, 18)	1981
	35	ST-1475	1986
	6B	ST-193	1987
	22F	ST-j (1, 2, 19, 66, 15, 1, 18)	2009
	34	ST-k (1, 9, 18, 10, 10, 28, 4)	2010

Примечание.\* – для впервые обнаруженных сиквенс-типов в скобках указан аллельный профиль.

Таблица 2. Характеристика полирезистентных штаммов пневмококков

Год выделения	Сиквенс-тип (ST)	Серотип	МПК, мг/л					
			PEN	CTX	ERY	CLI	CMR	TET
1987	663	19A	>1<2	>0,5<1	>0,25	<0,25	<4	>2
2008	81	23F	>1<2	>1<2	>0,25	<0,25	>4	>2
2008	675	6A	>0,5<1	<0,5	>0,25	>0,25	<4	>2
2009	1NEW	6B	>1<2	>1<2	>0,25	>0,25	>4	>2
2009	2NEW	14	>1<2	>1<2	>0,25	<0,25	<4	>2
2010	3NEW	19F	>1<2	>0,5<1	>0,25	>0,25	<4	>2
2010	236	19F	>0,5<1	>0,5<1	>0,25	<0,25	<4	>2

**Примечание.** Здесь и в табл 3: PEN – пенициллин, CTX – цефотаксим, ERY – эритромицин, CLI – клиндамицин, CMR – хлорамфеникол, TET – тетрациклин

14 – 2 шт., серотип 4 – 2 шт., серотип 34 – 2 шт., и по одному штамму серотипов 9V, 35, 22F. Все штаммы с МПК  $\geq 0,5$  мг/л относились к серотипам, ассоциированным с антибиотикоустойчивостью: 19F, 19A, 23F, 6A, 6B, 14.

Проведенное генетическое типирование культур методом МЛСТ показало, что половина исследованных штаммов пневмококков со сниженной чувствительностью к пенициллину имели новый аллельный профиль (сиквенс-тип), который отсутствовал в базе данных <http://spneumoniae.mlst.net>. При этом 8 из 11 культур с новым аллельным профилем относились к штаммам, выделенным в период 2008–2010 гг. Данный факт свидетельствует в пользу того, что рост устойчивости к препарату в настоящее время преимущественно обусловлен эволюционными процессами среди штаммов пневмококков, циркулирующих на данной территории, а не за счет массивного распространения в Москве уже описанных международных антибиотикоустойчивых генетических клонов.

Среди культур со сниженной устойчивостью к пенициллину одновременной устойчивостью к цефотаксиму (МПК  $>0,5$  мг/л) обладали шесть штаммов. Доля таких пневмококков, выделенных за период 1980-2000 гг., составляла 2,5% (1 штамм) против 11% (5 штаммов), выделенных в 2008–2010 гг. Данные культуры были представлены серотипами 19A, 19F, 6A, 6B, 23F, 14.

Нечувствительны к макролидам (в частности к эритромицину) были 17 штаммов (МПК  $>0,25$  мг/л), из которых 7 (18%) относились к культурам, выделенным до 2000 г., и 10 (22%) – к периоду 2008–2010 гг. Из них доля штаммов с одновременной нечувствительностью к клиндамицину (т.е. к 16-членным макролидам, линкозамидам и стрептограминам) с МПК  $>0,25$  мг/л составила 5 и 9% соответственно. Серотиповой пейзаж пневмо-

кокков, устойчивых к макролидам и пенициллину, был практически одинаков.

Штаммы с одновременной нечувствительностью к эритромицину и клиндамицину относились к серотипам 6B (3 штамма), 6A и 19F, один штамм был нетипируемый. Генетическое типирование показало, что данные штаммы принадлежали как к известным сиквенс-типам ST-1816, ST-193 (клон Greece<sup>21-30</sup>), ST- 675, так и к новым сиквенс-типам ST-a (2, 6, 1, 2, 6, 1, 281), ST-c (15, 16, 26, 15, 6, 20, 19) и сиквенс-тип с аллельным профилем (20, 28, 14,1,15,14,1), впервые обнаруженным при проведении данного исследования.

Устойчивость к тетрациклину (МПК $>2,0$  мг/л) выявлена у 31% (12 из 39) штаммов периода 1981–2000 гг. и у 27% (12 из 45) штаммов, выделенных в 2008–2010 гг.

Обнаружены два штамма, резистентные к хлорамфениколу (МПК $>4$ мг/л), выделенные в 2008 и 2009 гг., их доля составила 4% от числа штаммов этого периода. Все исследованные культуры были чувствительны к левофлоксацину (МПК  $\leq 2$  мг/л) и ванкомицину (МПК  $\leq 1$  мг/л).

Полирезистентные свойства, т.е. устойчивость к трем и более классам препаратов, выявлена у 7 штаммов (табл. 2).

Доля полирезистентных штаммов периода 1980–2000 гг. составила 2,6% (1 из 39), периода 2008–2010 гг. – 13% (6 из 45). Среди полирезистентных культур два штамма относились к международным эпидемическим клоном Spain<sup>23F-1</sup> (ST-81) и Taiwan<sup>19F-14</sup> (ST-236), два штамма – к известным своей антибиотикоустойчивостью сиквенс-типам ST-663 и ST-675, три штамма – к новым сиквенс-типам (ST-a, ST-b, ST-c), аллельный профиль которых отсутствовал в базе данных <http://spneumoniae.mlst.net>.

Наиболее опасным среди выявленных международных эпидемических клонов является клон

Таблица 3. Характеристика пневмококков, выделенных в Москве, принадлежащих к международным эпидемическим клонам, но не обладающих полирезистентными свойствами

Эпидемический клон	Год выделения	ST	Серотип	МПК, мг/л					
				PEN	CTX	ERY	CLI	CMR	TET
Sweden <sup>15A</sup> -25	1988	63	14	>0,25<0,5	<0,5	<0,25	<0,25	<4	>2
Greece <sup>21</sup> -30	1987	193	6B	>0,06<0,13	<0,5	<0,25	<0,25	<4	>2

Spain<sup>23F</sup>-1 (ST-81), который впервые был обнаружен в Испании в начале 80-х годов XX века. Впоследствии пневмококки этого клона различных серотипов (9V, 14, 19F, 6A) были изолированы в Германии, США, Южной Америке, Юго-Восточной Азии. Этому клону приписывают главную роль в подъеме резистентности к пенициллину и другим препаратам в Испании, Италии, Португалии, США. Так, в Португалии большинство штаммов пневмококков, выделенных в 1996–1998 гг. в центрах по уходу за детьми, с МПК пенициллина >1 мг/л принадлежали к клону Spain<sup>23F</sup>-1 (ST-81) [11]. По данным A. Corso et al. (1998), до 40% всех пенициллинорезистентных пневмококков в США, выделенных в 1996–1997 гг., относились к клону Spain<sup>23F</sup>-1 [12]. В России этот клон наиболее часто встречался среди штаммов с полирезистентными свойствами; они выделялись в Москве из нестерильных локусов, все относились к серотипу 23F и были устойчивы к пенициллину, цефотаксиму, эритромицину, тетрациклину и хлорамфениколу [13]. Выявление Spain<sup>23F</sup>-1 (ST-81) в Москве среди инвазивных пневмококков, выделенных от больных пневмококковыми менингитами, носит неблагоприятный прогностический характер.

Нами были обнаружены три новых сиквенс-типа пневмококков (ST-a, ST-b, ST-c), не входящих в базу данных <http://spneumoniae.mlst.net>, с характеристиками устойчивости к антибиотикам, не уступающими известным международным клонам. Кроме того, выявлены два штамма, принадлежащие к эпидемическим клонам Sweden<sup>5A</sup>-25

(ST-63) и Greece<sup>21</sup>-30 (ST-193), но не обладающие полирезистентными свойствами (табл. 3).

Клоны Sweden<sup>5A</sup>-25 и Greece<sup>21</sup>-30 наиболее часто характеризуются высокой устойчивостью к тетрациклину и макролидам при сравнительно редкой умеренной устойчивости к пенициллину и другим бета-лактамам. Среди исследованных московских штаммов отмечалось только небольшое снижение чувствительности к пенициллину (МПК<0,5 мг/л) и резистентность (МПК >2 мг/л) к тетрациклину.

### Выводы

1. На территории Москвы в течение 2008-2010 гг. отмечается рост устойчивости инвазивных пневмококков к антибактериальным препаратам, в том числе за счет штаммов с полирезистентными свойствами, доля которых составила 13% от числа исследованных культур.
2. Все штаммы со сниженной чувствительностью к пенициллину (МПК >0,5 мг/л) принадлежали к серотипам 23F, 19F, 19A, 6A, 6B, 14, которые ассоциированы с антибиотикоустойчивостью.
3. Среди инвазивных пневмококков обнаружены штаммы с сиквенс-типами ST-663 и ST-675, относящиеся к международным эпидемическим клонам (Spain<sup>23F</sup>-1 и Taiwan<sup>19F</sup>-14) и характеризующиеся значительной устойчивостью к антибактериальным препаратам.
4. Устойчивость штаммов пневмококков периода 2008–2010 гг. обусловлена преимущественно культурами, которые отнесены к новым, не описанным ранее сиквенс-типам.

### Литература

1. Musher D. M., Breiman R.F., Tomasz A. *Streptococcus pneumoniae*: at the threshold of the 21 st century. In: A. Tomasz, ed. *Streptococcus pneumoniae*: molecular biology and mechanisms of disease. Mary Ann Liebert, Inc., New York; 2000. p. 485-91.
2. Gartner J.C., Michaels R.H. Meningitis from a pneumococcus moderately resistant to penicillin. *JAMA* 1979; 241:1707.
3. Rowland K.E., Turnidge J.D. The impact of penicillin resistance on the outcome of invasive *Streptococcus pneumoniae* infection in children. *Austr N Z J Med* 2000; 30:441-9.
4. Jones M.E., Karlowsky J.A., Kelly L.J., et al. Current antimicrobial susceptibilities of pneumococci and other *Streptococcus* spp. from France, Germany, Italy and USE using TSN data. 12<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases; 2002, abstr. P1108.
5. Reinert R.R., Reinert S., Linden M., et al. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* in eight European countries from 2001 to 2003. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49:2903-13.
6. Yang F., Xu X.G., Yang M.J., et al. Antimicrobial susceptibility and molecular epidemiology of *Streptococcus pneu-*

- moniae* isolated from Shanghai, China. Int J Antimicrob Agents 2008; 32:386-91.
7. Schito G.C., Debbia E.A., Marchese A. The evolving threat of antibiotic resistance in Europe: new data from the Alexandr Project. JAC 2000; 46:3.
  8. Козлов Р.С. Пневмококки: уроки прошлого – взгляд в будущее. Смоленск: МАКМАХ, 2010. – с. 55-70.
  9. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters (EUCAST, v.1.3.2011-01-05). www.eucast.org.
  10. Enright M., Spratt B.G. A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. Microbiology 1998; 144:3049-60.
  11. Sa-Leao, R., Tomasz A., I.Sanches S., et al. Genetic diversity and clonal patterns among antibiotic-susceptible and resistant *Streptococcus pneumoniae* colonizing children: day care centres as autonomous epidemiological units. J Clin Microbiol 2000; 30:4137-44.
  12. Corso, A., E. P. Severina, V.F. Petruk, Y.R. Mauriz, Tomasz A. Molecular characterization of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates causing disease in the United States. Microb Drug Resist 1998; 4:325-37.
  13. Савинова Т.А. Генетическое разнообразие и молекулярные основы резистентности *Streptococcus pneumoniae* к  $\beta$ -лактамным антибиотикам. Дисс. канд.наук, Москва, 2011.