

## Чувствительность к антибиотикам, клональное и серотиповое разнообразие пневмококков у детей с острым средним отитом в г. Москве

Н.А. Маянский<sup>1, 2</sup>, Н.М. Алябьева<sup>1</sup>, М.А. Лазарева<sup>1</sup>, А.М. Иваненко<sup>3</sup>,  
О.А. Пономаренко<sup>1</sup>, А.В. Лазарева<sup>1</sup>, Л.К. Катосова<sup>1</sup>, Т.В. Куличенко<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>Научный центр здоровья детей, Москва, Россия

<sup>2</sup>Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

<sup>3</sup>Морозовская детская городская клиническая больница, Москва, Россия

**Цель.** Анализ штаммов *Streptococcus pneumoniae* — ведущего возбудителя острого среднего отита (ОСО) у детей. Изучение чувствительности к антибиотикам, клональной и серотиповой структуры пневмококков, выделенных из жидкости среднего уха (ЖСУ) у детей с ОСО.

**Материал и методы.** Образцы ЖСУ у детей ≤5 лет с ОСО собирали в четырех детских клиниках г. Москвы в 2011–2013 гг. Выделение и идентификацию пневмококка проводили стандартными микробиологическими методами; чувствительность к антибиотикам определяли с помощью диско-диффузионного метода, минимальную подавляющую концентрацию (МПК) пенициллина и амоксициллина оценивали Е-тестом. Серотипирование осуществляли с помощью пневмококковых антисывороток Staten Serum Institut (Дания). Мультилокусное сиквенс-типирование проводили согласно общепринятому протоколу.

**Результаты.** Всего было проанализировано 107 штаммов пневмококка. Нечувствительными к пенициллину (МПК >0,06 мкг/мл) были 45% (48/107) изолятов, резистентными к макролидам — 34% (36/107) штаммов, причем 92% (33/36) макролидорезистентных пневмококков были носителями гена *ermB*, что наделяло их кон-

ститутивным MLS<sub>B</sub>-фенотипом, т.е. одновременной устойчивостью ко всем макролидам, линкозамидам, стрептограмину В. Множественной устойчивостью к антибиотикам обладали 30% (32/107) изолятов, однако все исследованные штаммы были чувствительны к амоксициллину (МПК ≤2 мкг/мл). Десять из 32 (31%) штаммов с множественной лекарственной устойчивостью относились к клональному комплексу (СС) 320, остальные принадлежали к 7 различным СС. В общей выборке из 107 штаммов доминировали серотипы 19F (27%), 3 (12%), 6В (11%), 14 (11%), 19А (9%) и 23F (8%). Доступные пневмококковые конъюгированные вакцины (ПКВ) охватывают от 93% (ПКВ-13) до 66 и 67% (ПКВ-7 и ПКВ-10 соответственно) этиологически значимых серотипов пневмококка при ОСО.

**Выводы.** Популяция пневмококков, ассоциированных с ОСО, характеризуется выраженным снижением чувствительности к антибиотикам и высокой клональностью. Серотиповой состав циркулирующих пневмококков предполагает преимущество ПКВ с расширенным спектром серотипов.

**Ключевые слова:** пневмококк, чувствительность к антибиотикам, сиквенс-тип, серотип, острый средний отит, дети.

## Antimicrobial Susceptibility, Clonal and Serotype Diversity of *Streptococcus pneumoniae* Isolated from Children with Acute Otitis Media in Moscow

N.A. Mayanskiy<sup>1, 2</sup>, N.M. Alyabieva<sup>1</sup>, M.A. Lazareva<sup>1</sup>, A.M. Ivanenko<sup>3</sup>, O.A. Ponomarenko<sup>1</sup>, A.V. Lazareva<sup>1</sup>, L.K. Katosova<sup>1</sup>, T.V. Kulichenko<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>Scientific Center for Children's Health, Moscow, Russia

<sup>2</sup>I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

<sup>3</sup>Morozovskaya Children's Hospital, Moscow, Russia

**Objective.** *Streptococcus pneumoniae* (pneumococcus) is the leading cause of acute otitis media (AOM) in children. Hereby, we describe antibiotic susceptibility, clonality, and serotype distribution of pneumococci isolated from the middle ear fluid (MEF) in children with AOM.

**Material and methods.** MEF specimens from children ≤5 years of age with AOM were collected in 4 pediatric hospitals in Moscow in 2011–2013. Isolation and identification of pneumococcus was performed using standard microbiological procedures. Antibiotic susceptibility was tested by means of the disk diffusion method, minimal inhibitory concentration (MIC) for penicillin and amoxicillin was determined by the E-test. Serotyping was performed using pneumococcal antisera from the Staten Serum Institut (Denmark). For the multilocus sequence typing, a conventional protocol was used.

**Results.** A total of 107 pneumococcal isolates were analyzed. Penicillin nonsusceptibility (MIC >0.06 µg/L) was found in 45% (48/107) isolates, macrolide resistance had 34% (36/107) pneumococci. The vast majority of macrolide-resistant isolates (92%, 33/36) carried the

*ermB* gene conferring a constitutive MLS<sub>B</sub>-phenotype, i.e. simultaneous resistance to all macrolides, lincosamides, streptogramin B. A multidrug resistant (MDR) phenotype displayed 30% (32/107) pneumococci, however all isolates were susceptible to amoxicillin (MIC ≤2 µg/mL). Ten of 32 (31%) MDR isolates belonged to clonal complex (CC) 320, the rest were distributed among 7 different CC. In the serotype distribution, isolates with serotype 19F (27%), 3 (12%), 6B (11%), 14 (11%), 19A (9%), and 23F (8%) predominated. Available polysaccharide pneumococcal conjugated vaccines (PCV) cover the majority of AOM serotypes (PCV7, 66%; PCV10, 67%; PCV13, 93%).

**Conclusion.** AOM pneumococci circulating in Moscow are characterized by a substantial reduction in antimicrobial susceptibility and pronounced clonality. Pneumococcal serotype distribution suggests advantage of a PCV with the extended coverage.

**Key words:** pneumococcus, acute otitis media, serotype, sequence type, antimicrobial susceptibility, children.

## Введение

*Streptococcus pneumoniae* (пневмококк) является широко распространенным условно патогенным микроорганизмом, который может вызывать разнообразный спектр инфекционных болезней, начиная от мукозальных инфекций, пневмонии и заканчивая тяжелыми, нередко жизнеугрожающими заболеваниями (бактериемия, менингит) [1]. Пневмококк является ведущим этиологическим агентом одной из наиболее распространенных инфекций детского возраста — острого среднего отита (ОСО), составляя в структуре бактериальных отопатогенов 30–80% [2–4]. Более 80% детей переносят по меньшей мере один эпизод ОСО в течение первых трех лет жизни, а у 40% к 7-летнему возрасту ОСО возникает шесть и более раз [5]. Ведущая роль пневмококка в этиологии ОСО сочетается с глобальным ростом его устойчивости к антибиотикам. Так, во многих странах Европы распространенность штаммов со сниженной чувствительностью к пенициллину достигает 25–50%, а глобальная доля нечувствительных к пенициллину пневмококков оценивается

в 33% [6–8]. Более 20% пневмококков обладают резистентностью к макролидам, а в отдельных регионах, например в странах Азии и особенно в Китае, макролидорезистентные пневмококки встречаются с частотой 50–100% [6–9]. Кроме того, получили распространение штаммы с множественной устойчивостью к антибиотикам, доля которых в общей популяции пневмококков может достигать 40% и более.

Несмотря на разнообразие капсульных типов пневмококка (их описано более 90), антибиотикорезистентность не распределяется равномерно среди всех серотипов. Резистентные пневмококки принадлежат к ограниченному числу клонов (или клональных линий), которые включают лишь несколько серотипов. С другой стороны, отдельный серотип может быть представлен в составе разных клонов, не являющихся родственными и отличающихся по степени резистентности [7, 10, 11]. Семивалентная пневмококковая конъюгированная вакцина (ПКВ-7) оказала выраженный эффект на сероэпидемиологию пневмококка, практически прекратив циркуляцию вакцинных серотипов и существенно снизив забо-

леваемость пневмококковыми инфекциями, в том числе ОСО, в тех странах, где она применяется [10, 12–14].

Вместе с тем, в последние годы стали появляться сообщения о распространении в поствакцинальный период резистентных не-ПКВ-7 серотипов, в первую очередь серотипа 19А, принадлежащего к *клональному комплексу (clonal complex – CC) 320* [13, 15, 16]. Этот феномен замещения серотипов может реализовываться через механизм переключения капсулы и экспансии резистентных генотипов, существовавших до внедрения ПКВ [10, 11, 15, 17, 18]. В связи с этим выявление и молекулярная характеристика клонального разнообразия устойчивых к антибиотикам пневмококков представляется более перспективным подходом для прогнозирования эволюции и распространения резистентности, чем простое серотипирование отдельных штаммов.

**Цель работы.** В настоящей работе мы описываем чувствительность к антибиотикам, серотиповой состав, а также клональную структуру изолятов пневмококка, полученных из *жидкости среднего уха (ЖСУ)* пациентов с ОСО. Эти данные могут быть полезными для мониторинга изменений сероэпидемиологии и резистентности пневмококка после начала массовой вакцинации ПКВ, включенной в российский Национальный календарь профилактических прививок в 2014 г. [19].

## Материал и методы

Изоляты пневмококка, включенные в исследование, были получены в период с августа 2011 г. по апрель 2013 г. из четырех педиатрических стационаров г. Москвы в ходе проспективного исследования [20]. Все штаммы выделены из образцов ЖСУ, собранной путем тимпаноцентеза или через отверстие в барабанной перепонке при спонтанной оторее у пациентов с ОСО в возрасте  $\leq 5$  лет.

Пневмококк идентифицировали с помощью оптохинового теста и латекс-агглютинации (набор Slidex Pneumo-kit, bioMerieux, Франция). Серотипирование проводили с использованием пуловых латексных антисывороток и факторных/типовых антисывороток в реакции набухания капсулы по Нейфельду (Staten Serum Institut, Дания).

*Минимальные подавляющие концентрации (МПК)* пенициллина и амоксициллина определяли с помощью Е-тестов (bioMerieux), другие антибиотики тестировали диско-диффузионным методом (Bio-Rad, США).

Результаты интерпретировали согласно обновленным рекомендациям EUCAST (2013 г.) [21]. Изоляты с МПК пенициллина

$>0,06$  мкг/мл считали нечувствительными к пенициллину. Чувствительными считали штаммы с диаметром зоны подавления роста  $\geq 20$  мм для диска с оксациллином,  $\geq 21$  мм для эритромицина,  $\geq 19$  для клиндамицина и триметоприма/сульфаметоксазола.

Для определения генов *ermB* и *mef* у макролидорезистентных пневмококков использовали ПЦР, как было описано ранее [22].

*Мультилокусное сиквенс-типирование (МЛСТ)* пневмококков с множественной устойчивостью к антибиотикам (т.е. устойчивостью к 3 или 4 исследованным группам антибиотиков) проводили согласно протоколу [23]. Внутренние фрагменты генов *aroE*, *gdh*, *gki*, *recP*, *spi*, *xpt* и *ddl* амплифицировали путем ПЦР с помощью описанных праймеров, а затем полученные ампликоны секвенировали. Аллели и *сиквенс-типы (ST)* определяли с помощью программного обеспечения на web-странице пневмококка [24]. Сиквенс-типы анализировали и относили к клональным комплексам после их сравнения со всеми сиквенс-типами, имеющимися в онлайн-базе данных, используя программу eBURST [24]. Сиквенс-типы, имеющие 6 одинаковых аллельных вариантов из 7 исследованных локусов, относили к одному клональному комплексу.

## Результаты

Всего в исследование включено 107 штаммов пневмококка, выделенных из ЖСУ у пациентов с ОСО.

**Определение чувствительности к антибиотикам.** Чувствительность к антибиотикам определили у всех полученных изолятов. Результаты представлены в табл. 1. Для всех тестируемых антибиотиков доля нечувствительных штаммов превышала 30%. Наиболее высокой была резистентность к триметоприму/сульфаметоксазолу (59%, 63/107).

Чувствительность к пенициллину и амоксициллину оценивали путем скринингового тестирования чувствительности к оксациллину (1 мкг) с помощью диско-диффузионного метода. Резистентностью к оксациллину обладали 46% (49/107) изолятов пневмококка. Последующий анализ с использованием Е-теста показал, что все оксациллино-резистентные пневмококки, кроме одного (45%, 48/107), были нечувствительны к пенициллину (МПК  $>0,06$  мкг/мл) (см. табл. 1). МПК пенициллина  $\geq 2$  мкг/мл наблюдалась у 5% (5/107) штаммов. Распространенность нечувствительных к пенициллину изолятов была особенно высока среди главных серотипов, включая серотипы 14 (10/12, 83%), 19А (8/10, 80%), 19F (19/29, 66%) и 23F (5/9, 56%) (см. табл. 1).

Таблица 1. Распределение серотипов по отношению к их охвату ПКВ-13 и устойчивость к антибиотикам штаммов *S. pneumoniae*, выделенных из ЖСУ

Серотипы	n (%)	Нечувствительные штаммы, n				
		PEN	ERY	CLI	TMP/SMX	МУ <sup>A)</sup>
19F	29 (27)	19	15	14	23	14
3	13 (12)	0	0	0	0	0
6B	12 (11)	3	9	8	6	6
14	12 (11)	10	6	5 <sup>B)</sup>	8	6
19A	10 (9)	8	5	4 <sup>B)</sup>	9	5
23F	9 (8)	5	1	1	5	1
6A	5 (5)	2	0	0	5	0
18C	5 (5)	0	0	0	0	0
9V	3 (3)	1	0	0	3	0
4	1 (1)	0	0	0	0	0
7F	1 (1)	0	0	0	0	0
Не-ПКВ-13 <sup>B)</sup>	7 (7)	0	0	0	4	0
Все серотипы, n (%)	<b>107 (100%)</b>	<b>48 (45%)<sup>Г)</sup></b>	<b>36 (34%)</b>	<b>32 (30%)</b>	<b>63 (59%)</b>	<b>32 (30%)</b>

**Примечание.** Здесь и в табл. 2: PEN – пенициллин; ERY – эритромицин; CLI – клиндамицин; TMP/SMX – триметоприм/сульфаметоксазол.

<sup>A)</sup> Множественная устойчивость (устойчивость к 3 или 4 исследованным группам антибиотиков).

<sup>B)</sup> Индуцибельная резистентность (i-MLS<sub>B</sub> фенотип) у 1 штамма.

<sup>B)</sup> Не-ПКВ-13 серотипы (n=7): 15C – n=2; 8, 12B, 13, 15B, 39 – n=1 каждый.

<sup>Г)</sup> Пенициллин: МПК<sub>50</sub>=0,023 мкг/мл, МПК<sub>90</sub>=1,5 мкг/мл.

МПК амоксициллина была определена для всех 49 оксациллинорезистентных изолятов. Для большинства исследованных штаммов (80%, 39/49) МПК амоксициллина составила  $\leq 0,5$  мкг/мл, у 9 штаммов МПК была 1 мкг/мл и у 1 изолята МПК равнялась 2 мкг/мл. Ни одного амоксициллинорезистентного штамма пневмококка (МПК  $> 2$  мкг/мл) обнаружено не было.

Уровни резистентности к эритромицину и клиндамицину были близки (34%, 36/107 и 30%, 32/107 соответственно). Основным молекулярным механизмом резистентности к макролидам была модификация мишени за счет наличия гена *ermB*. Этот ген присутствовал более чем у 90% (33/36) эритромицинорезистентных штаммов как единственная детерминанта резистентности (у 16/36 изолятов) или в сочетании с геном эфлюкса *mef* (у 17/36 изолятов). Лишь 2 из 36 эритромицинорезистентных пневмококков имели только ген *mef*. Большинство макролидорезистентных штаммов обладали также устойчивостью к клиндамицину (89%, 32/36). Из 32 клиндамицинорезистентных изолятов 2 штамма обладали наведенной резистентностью (устойчивость к клиндамицину в присутствии эритромицина), т.е. индуцибельным MLS<sub>B</sub>-фенотипом (одновременная устойчивость ко всем макролидам, линкозамидам, стрептограмину В) [21]. Большая часть изолятов серотипа 6B была резистентной как к эритромицину, так и к клиндамицину (см. табл. 1).

Множественная устойчивость к антибиотикам, т.е. нечувствительность к 3 или 4 исследованным классам антибиотиков, наблюдалась у 30% (32/107) исследованных штаммов пневмококка (см. табл. 1). К числу серотипов с множественной устойчивостью относились серотипы 6B, 14, 19A и 19F, при этом доминировали представители серогруппы 19 (59%, 19/32). Примечательно, что именно к этой серогруппе принадлежали изоляты с высокой МПК пенициллина ( $\geq 2$  мкг/мл) и амоксициллина ( $\geq 1$  мкг/мл) (табл. 2). Пневмококки серотипов 3 и 18C были чувствительны ко всем тестированным антибиотикам. Ни один из не-ПКВ-13 серотипов не обладал множественной устойчивостью к антибиотикам.

**МЛСТ штаммов пневмококка с множественной устойчивостью к антибиотикам.** Выявленные штаммы пневмококка с множественной устойчивостью к антибиотикам (n=32) генотипировали с помощью МЛСТ. Клональная структура этих штаммов с указанием серотипа и профиля резистентности представлена в табл. 2. Всего было обнаружено 13 известных сиквенс-типов, принадлежащих к 8 клональным комплексам, а также 3 новых сиквенс-типа, имеющих связь с СС320, и 1 синглетон (генотип-«одиночка», не принадлежащий ни к одному из известных клональных комплексов).

В нашей выборке преобладали представители СС320 (31%, 10/32). Они включали 3 изолята с ST320, 6 однолокусных вариантов (*single locus*

Таблица 2. Клональная структура штаммов *S. pneumoniae* с множественной устойчивостью к антибиотикам, выделенных из ЖСУ, их серотиповая принадлежность и чувствительность к антимикробным препаратам

№	Клональный комплекс (глобальный клон – родоначальник комплекса)	ST	Серотип	МПК, мкг/мл				TMP/ SMX	<i>erm/mef</i>
				PEN	AMX	ERY	CLI		
1	CC320 (Taiwan <sup>19F</sup> -14)	320	19A	1,5	2	Н/ч	Н/ч	Н/ч	<i>erm</i> +/ <i>mef</i> +
2		320	19F	4	1	Н/ч	Н/ч	Н/ч	<i>erm</i> +/ <i>mef</i> +
3		320	19F	1	1	Н/ч	Н/ч	Н/ч	<i>erm</i> +/ <i>mef</i> +
4		320 SLV <sup>A)</sup>	19F	2	1	Н/ч	Н/ч	Н/ч	<i>erm</i> +/ <i>mef</i> +
5		320 SLV <sup>A)</sup>	19F	1	1	Н/ч	Н/ч	Н/ч	<i>erm</i> +/ <i>mef</i> +
6		320 SLV <sup>A)</sup>	19F	1,5	1	Н/ч	Н/ч	Н/ч	<i>erm</i> +/ <i>mef</i> +
7		320 SLV <sup>A)</sup>	19F	1,5	1	Н/ч	Н/ч	Н/ч	<i>erm</i> +/ <i>mef</i> +
8		320 SLV <sup>A)</sup>	19F	1,5	1	Н/ч	Н/ч	Н/ч	<i>erm</i> +/ <i>mef</i> +
9		320 SLV <sup>B)</sup>	19A	2	1	Н/ч	Н/ч	Н/ч	<i>erm</i> +/ <i>mef</i> +
10		320 DLV <sup>B)</sup>	19F	4	1	Н/ч	Ч	Н/ч	<i>mef</i> +
11	Синглетон	Новый <sup>D)</sup>	19F	4	1	Н/ч	Н/ч	Н/ч	<i>erm</i> +/ <i>mef</i> +
12	CC236 (Taiwan <sup>19F</sup> -14)	236	19F	0,19	0,25	Н/ч	Н/ч	Н/ч	<i>erm</i> +/ <i>mef</i> +
13		236	19F	0,19	0,12	Н/ч	Н/ч	Н/ч	<i>erm</i> +/ <i>mef</i> +
14		236	19F	0,38	0,12	Н/ч	Н/ч	Н/ч	<i>erm</i> +/ <i>mef</i> +
15	CC193 (Greece <sup>21</sup> -30)	179	19F	0,5	0,25	Н/ч	Н/ч	Ч	<i>erm</i> +
16		177	19F	0,012	S <sup>D)</sup>	Н/ч	Н/ч	Н/ч	<i>erm</i> +
17	CC230 (Denmark <sup>14</sup> -32)	276	19A	0,25	0,25	Н/ч	Н/ч <sup>E)</sup>	Н/ч	<i>erm</i> +/ <i>mef</i> +
18		5539	19A	0,5	0,03	Н/ч	Ч	Н/ч	<i>mef</i> +
19	CC156 (Spain <sup>9V</sup> -3)	790	19A	1	0,25	Н/ч	Н/ч	Н/ч	<i>erm</i> +/ <i>mef</i> +
20		790	14	1,5	0,25	Н/ч	Н/ч	Н/ч	<i>erm</i> +
21		790	14	1	0,5	Н/ч	Н/ч <sup>E)</sup>	Н/ч	<i>erm</i> +
22		865	14	1	0,5	Н/ч	Н/ч	Ч	<i>erm</i> +
23		865	14	1,5	0,25	Н/ч	Н/ч	Ч	<i>erm</i> +
24		865	14	1	0,5	Н/ч	Н/ч	Ч	<i>erm</i> +
25	CC15 (England <sup>14</sup> -9)	15	14	0,75	0,12	Н/ч	Н/ч	Н/ч	<i>erm</i> +
26	CC315 (Poland <sup>6B</sup> -20)	315	6B	0,12	0,03	Н/ч	Н/ч	Ч	<i>erm</i> +
27		315	6B	0,023	S <sup>D)</sup>	Н/ч	Н/ч	Н/ч	<i>erm</i> +
28		315	6B	0,032	S <sup>D)</sup>	Н/ч	Н/ч	Н/ч	<i>erm</i> +
29		315	6B	0,125	0,03	Н/ч	Н/ч	Н/ч	<i>erm</i> +
30		1032	6B	0,016	S <sup>D)</sup>	Н/ч	Н/ч	Н/ч	<i>erm</i> +
31		386	6B	1	0,5	Н/ч	Н/ч	Ч	<i>erm</i> +
32	CC81 (Spain <sup>23F</sup> -1)	81	23F	1	0,25	Н/ч	Н/ч	Н/ч	<i>erm</i> +/ <i>mef</i> +

**Примечание.** ST – сиквенс-тип; AMX – амоксициллин; ERY – эритромицин. Ч – чувствительный; Н/ч – нечувствительный. SLV – однолокусный вариант, DLV – двулокусный вариант. *erm/mef* – наличие соответствующей детерминанты резистентности к макролидам обозначено знаком «+».

<sup>A)</sup> Новый сиквенс-тип ST9659. Все 5 штаммов являются однолокусным вариантом ST320, обладая идентичной новой последовательностью локуса *ddl* (№ 610).

<sup>B)</sup> Новый сиквенс-тип ST9656. Однолокусный вариант ST320 по локусу *rec* (новая последовательность *rec* № 257).

<sup>C)</sup> Новый сиквенс-тип ST9657. Двулокусный вариант ST320 по локусам *aro* (последовательность № 7) и *ddl* (новая последовательность *ddl* № 608).

<sup>D)</sup> Новый сиквенс-тип ST9658 с профилем МЛСТ: *aro* 7, *gdh* 13, *gki* 8, *rec* 15, *spi* 6, *xpt* 6, *ddl* – новая последовательность № 609.

<sup>E)</sup> МПК амоксициллина тестировали только у пенициллинонечувствительных штаммов (МПК пенициллина > 0,06 мкг/мл).

<sup>F)</sup> Индуцибельная резистентность (i-MLS<sub>B</sub> фенотип).

*variant*, SLV) и 1 двулокусный вариант (*double locus variant*, DLV) этого сиквенс-типа. Примечательно, что 5 из 6 SLV обладали идентичным вариантом последовательности локуса *ddl* и принадлежали

к единственному новому сиквенс-типу, который ранее не был описан в базе данных PMEN (см. табл. 2). Большинство изолятов CC320 имели серотип 19F (8/10), а 2 из 10 изолятов – серо-

тип 19А. Все СС320-пневмококки характеризовались высокими МПК пенициллина и амоксициллина ( $\geq 1$  мкг/мл). Кроме того, 9 из 10 этих штаммов являлись носителями комбинации детерминант устойчивости к макролидам *ermB* и *mef*, что обуславливало их MLS<sub>B</sub>-фенотип. Один штамм (DLV ST320) был носителем гена *mef* и сохранял чувствительность к клиндамицину (см. табл. 2). Изолят-синглетон с серотипом 19F демонстрировал высокую МПК пенициллина (4 мкг/мл) и имел обе детерминанты резистентности к макролидам.

Оставшиеся изоляты серогруппы 19 ( $n=8$ ) принадлежали к 4 различным клональным комплексам, включая СС236 ( $n=3$ ), СС193 ( $n=2$ ), СС230 ( $n=2$ ) и СС156 ( $n=1$ ). В этой группе пневмококков МПК пенициллина была сравнительно низкой МПК  $\leq 0,5$  мкг/мл, за исключением 1 штамма из СС156 с МПК пенициллина 1 мкг/мл, а 3 из 8 изолятов обладали единственной детерминантой резистентности к макролидам (у 2 был ген *ermB*, у 1 — ген *mef*).

Клональный комплекс СС156 (клон Spain<sup>9V-3</sup>) был представлен пневмококками ST790 и ST865 ( $n=3$  каждый). Большинство (5 из 6) этих изолятов относилось к серотипу 14 и было носителем *ermB* как единственной детерминанты резистентности к макролидам, а один изолят обладал индуцибельным MLS<sub>B</sub>-фенотипом. Оставшийся СС156-изолят с ST790 обладал капсулой 19А и двойным механизмом резистентности к макролидам. Все пневмококки СС156 демонстрировали высокую МПК пенициллина ( $\geq 1$  мкг/мл). Один штамм с серотипом 14 имел ST15 и относился к СС15 (см. табл. 2).

Клональный комплекс СС315 был представлен 6 изолятами (все с серотипом 6В) и 3 сиквенс-типами, которые включали ST315 ( $n=4$ ), ST1032 и ST386 ( $n=1$  каждый). Лишь один штамм имел высокую МПК пенициллина (1 мкг/мл), но был чувствителен к триметоприму/сульфаметоксазолу. Остальные были чувствительны к пенициллину или имели невысокий уровень МПК.

Один изолят с множественной устойчивостью с серотипом 23F имел ST81 и представлял СС81 (см. табл. 2).

**Распределение серотипов пневмококка.** Среди 107 типированных штаммов пневмококка было выявлено 17 различных серотипов, однако доминировали всего 6 серотипов с распространенностью  $>5\%$ , которые суммарно составили почти 80% распределения (см. табл. 1). В число ведущих серотипов вошли серотипы 19F (27%), 3 (12%), 6В (11%), 14 (11%), 19А (9%) и 23F (8%). Не было получено ни одного изолята с серотипом 1 или 5. Охват серотипов имеющимися ПКВ составил: ПКВ-7 — 66%

(включает серотипы 4, 6В, 9V, 14, 18С, 19F и 23F), ПКВ-10 — 67% (дополнительно к ПКВ-7 включает серотипы 1, 5, 7F), ПКВ-13 — 93% (дополнительно к ПКВ-10 включает серотипы 3, 6А, 19А).

### Обсуждение результатов

В настоящей работе представлены результаты разностороннего анализа пневмококков, полученных из ЖСУ у детей с ОСО. Существенная доля изученных штаммов характеризовалась нечувствительностью к антибиотикам. Снижение чувствительности к пенициллину было отмечено у 45% изолятов, 34% были резистентными к эритромицину и 30% пневмококков обладали множественной устойчивостью к антибиотикам. В исследовании Л.К. Катосовой и соавт., опубликованном в 2006 г. [25], в коллекции из 37 ЖСУ-пневмококков был выявлен лишь 1 пенициллиночувствительный изолят и ни одного резистентного к макролидам. Кроме того, работы, проведенные в конце 1990-х и на протяжении 2000-х годов в Смоленском НИИ антимикробной химиотерапии, показали чувствительность к пенициллину и эритромицину примерно у 90% носоглоточных изолятов пневмококка [26, 27]. Очевидно, что распространенность нечувствительных к антибиотикам пневмококков заметно возросла в последние годы. Тревожно и то, что за это время популяция пневмококков накопила множественные детерминанты резистентности, например двойственную устойчивость к макролидам за счет комбинации генов *ermB* и *mef*, о чем свидетельствуют настоящие данные и результаты наших предыдущих исследований [28].

Анализ клональной структуры пневмококков с множественной устойчивостью к антибиотикам показал преобладание изолятов, относящихся к СС320. Этому клональному комплексу принадлежало большинство пневмококков с высокими МПК пенициллина и амоксициллина. Данные о генотипах пневмококка, присутствующих на территории России, ограничены, о чем можно судить по международной базе данных PMEN. Из 162 изолятов, депонированных в ней, большинство датировано 1990-ми — началом 2000-х годов [24]. В одной работе было описано 58 пенициллиночувствительных штаммов пневмококка, собранных в России в 2003–2007 гг., среди которых преобладали представители СС81 (ST81 с серотипом 23F), СС156 и СС236 [29]. Последние составляли большинство изолятов с множественной устойчивостью серотипа 19F (ST236, ST271 и ST651). Серотип 19А был представлен 2 штаммами с ST236 и ST608 [29]. В нашей выборке генотипированных пневмококков мы также наблюдали перечисленные клональные комплексы,

однако они встречались гораздо реже. Десять из 32 пневмококков с множественной устойчивостью принадлежали к СС320, из них 3 изолята имели ST320, а у 7 изолятов были обнаружены новые сиквенс-варианты ST320. Отметим, что 6 из 7 этих пневмококков отличались от ST320 по последовательности локуса *ddl*, причем 5 из них обладали идентичной новой последовательностью *ddl* аллеля. Дивергентные последовательности по локусу *ddl* ассоциируются со структурными вариантами пенициллинсвязывающего белка 2b, обеспечивающими резистентность к пенициллину [15]. До настоящего времени в РМЭН не было депонировано ни одного изолята из России с сиквенс-типом ST320 [24], т.е. штамм пневмококка серотипа 19А с ST320, обнаруженный в ходе настоящей работы, является первым пневмококком такого рода, выявленным в нашей стране. Эти данные указывают на то, что, несмотря на ранее наблюдавшуюся ограниченную распространенность СС320 на территории России, в настоящее время этот клональный комплекс выходит на лидирующие позиции среди пневмококков с множественной устойчивостью к антибиотикам.

Пневмококковый клон с сиквенс-типом ST320 и капсулой серотипа 19А, являющийся родоначальником клонального комплекса СС320, получил широкое распространение в США, Канаде, Италии и Испании [15, 16, 30]. В Германии и Португалии увеличение доли серотипа 19А было связано с другим клональным комплексом — СС230 [31, 32]. В обоих случаях наблюдавшаяся экспансия объяснялась за счет феномена замещения серотипов, имеющего отношение к внедрению в широкую практику ПКВ-7 [15, 18]. В то же время в Южной Корее и Израиле об экспансии серотипа 19А с множественной устойчивостью к антибиотикам сообщалось еще до начала использования ПКВ [33, 34]. В частности, в Южной Корее распространился существовавший клон ST320, тогда как в Израиле пролиферировали другие клональные комплексы, в основном СС230 [33, 34].

В отличие от процитированных работ, полученные нами данные говорят о появлении в рамках СС320 нескольких клональных линий пневмококка с множественной устойчивостью к антибиотикам, экспрессирующих преимущественно капсулу 19F (8 из 10 представителей СС320 имели серотип 19F и только 2 имели серотип 19А). Экспансия серотипа 19А ST320 и других клональных вариантов этого серотипа до начала использования ПКВ может быть обусловлена его конкурентными преимуществами по сравнению со штаммами-предшественниками, включая лучшую способность к колонизации, повышенную вирулентность и высокую антибиотикоре-

зистентность [15, 33, 34]. В этом контексте можно предположить, что в отсутствие давления ПКВ (как это до сих пор было в России) капсульный тип не играет ведущей роли в эволюции пневмококка. По мнению ряда авторов, одним из ведущих факторов, способствующих возникновению и распространению таких успешных пневмококковых клонов, как СС320, служит резистентность к антибиотикам [31, 34, 35]. Наши результаты поддерживают это положение, демонстрируя накопление в пневмококковой популяции России многих резистентных клонов на фоне роста ее устойчивости к антибиотикам за последние годы.

Резистентность к антибиотикам тесно связана с практикой назначения и применения этих препаратов. Обычно уровень резистентности имеет прямую зависимость от уровня потребления антибиотиков [36]. Тем не менее, в России сложилась парадоксальная ситуация, когда широкая распространенность устойчивых пневмококков сочетается со сравнительно низким потреблением антибиотиков, которое сопоставимо с Нидерландами, где уровень резистентности самый низкий в Европе [36].

Вероятно, что одним из главных двигателей растущей устойчивости является сомнительная практика назначения антибиотиков. Так, недавнее многоцентровое исследование показало, что необоснованное назначение антибиотиков детям в амбулаторной сети составляет 40%, а правильное использование было зарегистрировано в 45% случаев [37]. В перечне назначаемых антибиотиков 22% приходилось на макролиды и 14% — на цефалоспорины. Ряд авторов относят оба эти класса антибиотиков к числу препаратов, стимулирующих появление резистентности [34]. Например, введение единственной дозы цефтриаксона может привести к серьезным сдвигам в носоглоточной микрофлоре, повышая долю штаммов пневмококка со сниженной чувствительностью к пенициллину [38]. В нашем исследовании более 90% пациентов с ОСО, которых лечили антибиотиками, получали цефалоспорины (данные не представлены). Выбор этого класса антибиотиков в качестве препаратов первой линии при лечении ОСО следует признать неадекватным. Международные рекомендации однозначно указывают на амоксициллин (в сочетании с клавуланатом или без него) в качестве первоначального выбора антибиотика при ОСО в подавляющем большинстве случаев [4]. Представленные в настоящей работе результаты поддерживают данную рекомендацию, поскольку все исследованные изоляты пневмококка из ЖСУ были чувствительны к амоксициллину.

Анализ распределения серотипов пневмококка при ОСО показал преобладание типичных

«педиатрических» серотипов, которые были распространены во многих странах до введения ПКВ [12]. Наиболее часто встречались изоляты серогруппы 19, составив 36% спектра серотипов. В отличие от других стран, мы наблюдали сравнительно высокую долю пневмококков серотипа 3 (12%). Большинство пневмококков со сниженной чувствительностью к антибиотикам принадлежали к серогруппам 19 и 6 и к серотипу 14. Таким образом, композиция серотипов прогнозирует хороший охват циркулирующих пневмококков имеющимися ПКВ, включая нечувствительные штаммы.

ПКВ зарекомендовали себя как важный инструмент для снижения бремени пневмококковых инфекций, связанных с вакцинными серотипами, включая ОСО [12, 14, 16]. В 2014 году иммунизация ПКВ была введена и в российский календарь прививок [19]. Отметим, что современная сероэпидемиология и молекулярно-генетические характеристики пневмококков в России обосновывают использование ПКВ с расширенным охватом серотипов, включая серотип 19А, даже несмотря на относительно небольшую долю этого серотипа среди циркулирующих штаммов [28, 39]. Эта мера будет способство-

вать ограничению возможной экспансии предшествующих клонов СС320 с множественной устойчивостью к антибиотикам через механизм «переключения» капсулы под давлением вакцинации.

Таким образом, наше исследование показало широкую распространенность устойчивости к антибиотикам среди штаммов пневмококка, вызывающих ОСО, которая возросла в последние годы. Это требует срочных мер по изменению сложившейся практики назначения и использования антибиотиков. Описанные изоляты пневмококка с множественной устойчивостью принадлежали к ограниченному числу клональных линий, которые не были описаны в России ранее. В связи с этим необходимость тщательного наблюдения за распространением и эволюцией резистентных пневмококков после начала широкой вакцинации ПКВ в нашей стране не вызывает сомнений.

### Выражение признательности

Исследование было выполнено при частичной поддержке гранта на проведение независимого исследования от компании Pfizer.

### Литература

1. Баранов А.А., Намазова Л.С., Таточенко В.К. Пневмококковая инфекция и связанные с ней заболевания — серьезная проблема современного здравоохранения. Педиатрическая фармакология 2008; 5, 2:7-12.
2. Маянский Н.А., Алябьева Н.М., Иваненко А.М., Пономаренко О.А., Катосова Л.К., Лазарева А.В., Куличенко Т.В., Намазова-Баранова Л.С. Бактериальная этиология острого среднего отита у детей до 5 лет: роль *Streptococcus pneumoniae*. Вопросы диагностики в педиатрии 2013; 5, 3:5-13.
3. Vergison A. Microbiology of otitis media: a moving target. Vaccine 2008; 26S: G5-G10.
4. Lieberthal A.S., Carroll A.E., Joffe M.D., et al. The diagnosis and management of acute otitis media (clinical practice guideline). Pediatrics 2013; 131: e964.
5. Monasta L., Ronfani L., Marchetti F., et al. Burden of disease caused by otitis media: systematic review and global estimates. PLoS One 2012; 7(4): e36226.
6. Reinert R.R. The antimicrobial resistance profile of *Streptococcus pneumoniae*. Clin Microbiol Infect 2009; 15 (Suppl. 3):7-11.
7. Linares J., Ardanuy C., Pallares R., Fenoll A. Changes in antimicrobial resistance, serotypes and genotypes in *Streptococcus pneumoniae* over a 30-year period. Clin Microbiol Infect 2010; 16:402-10.
8. Hackel M., Lascols C., Bouchillon S., et al. Serotype prevalence and antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates among global populations. Vaccine 2013; 31:4881-7.
9. Geng Q., Zhang T., Ding Y., et al. Molecular characterization and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* isolated from children hospitalized with respiratory infections in Suzhou, China. PLoS One 2014; 9: e93752.
10. Маянский Н.А., Алябьева Н.М., Лазарева А.В., Катосова Л.К. Серотиповое разнообразие и резистентность пневмококков. Вестник РАМН 2014; 7-8:38-45.
11. Wyres K.L., Lambertsen L.M., Croucher N.J., et al. Pneumococcal capsular switching: a historical perspective. J Infect Dis 2013; 207:439-49.
12. Rodgers G.L., Arguedas A., Cohen R., Dagan R. Global serotype distribution among *S. pneumoniae* isolates causing otitis media in children: potential implications for pneumococcal conjugate vaccines. Vaccine 2009; 27:3802-10.
13. Richter S.S., Heilmann K.P., Dohrn C.L., et al. Pneumococcal serotypes before and after introduction of conjugate Vaccines, United States, 1999-2011. Emerg Infect Dis 2013; 19:1074-83.
14. Azzari C., Martín-Torres F., Schmitt H.J., Dagan R. Evolving role of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in clinical practice. Pediatr Infect Dis J 2014; 33:858-64.
15. Moore M.R., Gertz R.E. Jr, Woodbury R.L., et al. Population snapshot of emergent *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A in the United States, 2005. J Infect Dis 2008; 197:1016-27.



16. Gene A., del Amo E., Inigo M., et al. Pneumococcal serotypes causing acute otitis media among children in Barcelona (1992-2011): emergence of the multiresistant clone S.T320 of serotype 19A. *Pediatr Infect Dis J* 2013; 32: e128-33.
17. Croucher N.J., Harris S.R., Fraser C., et al. Rapid pneumococcal evolution in response to clinical interventions. *Science* 2011; 331:430-4.
18. Weinberger D.M., Malley R., Lipsitch M. Serotype replacement in disease after pneumococcal vaccination. *Lancet* 2011; 378:1962-73.
19. Приказ Министра здравоохранения Российской Федерации от 21 марта 2014 г. N125н г. Москва «Об утверждении национального календаря профилактических прививок и календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям».
20. Баранов А.А., Намазова-Баранова Л.С., Маянский Н.А., Куличенко Т.В., Полунина Т.А., Лазарева А.В. и соавт. Роль *Streptococcus pneumoniae* в структуре бактериальных инфекций у детей, госпитализированных в стационары г. Москвы в 2011-2012 гг. *Педиатрическая фармакология* 2013; 10(5):6-12.
21. Leclercq R., Cantón R., Brown D.F., et al. E.T expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Infect* 2013; 19:141-60.
22. Алябьева Н.М. Серотипы и устойчивость к антибиотикам штаммов *Streptococcus pneumoniae*, выделенных у детей при респираторных инфекциях: Дисс... канд. мед. наук. Москва, 2014, 98 с.
23. Enright M.C., Spratt B.G. A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. *Microbiology* 1998; 144:3049-60.
24. Multi Locus Sequence Typing: *Streptococcus pneumoniae* [database online]. Режим доступа: <http://pubmlst.org/srpneumoniae>.
25. Катосова Л.К., Очкасов А.В., Богомильский М.Р. Этиология и рациональная терапия тяжелых форм острых средних гнойных отитов у детей. *Антибиот химиотер* 2006; 2:23-9.
26. Козлов Р.С., Сивая О.В., Кречикова О.И., Иванчик Н.В., группа исследователей проекта «ПеГАС». Динамика резистентности *Streptococcus pneumoniae* к антибиотикам в России за период 1999-2009 гг. *Клин микробиол антимикроб химиотер* 2010; 12(4):269-368.
27. Козлов Р.С., Чагарян А.Н., Козлова Л.В., Муравьев А.А. Серологическая характеристика и чувствительность к антибиотикам пневмококков, выделенных у детей в возрасте до 5 лет в отдельных регионах Российской Федерации. *Клин микробиол антимикроб химиотер* 2011; 13:177-87.
28. Mayanskiy N., Alyabieva N., Ponomarenko O., et al. Serotypes and antibiotic resistance of non-invasive *Streptococcus pneumoniae* circulating in pediatric hospitals in Moscow, Russia. *Int J Infect Dis* 2014; 20:58-62.
29. Сидоренко С.В., Савинова Т.А., Ильина Е.Н., Сырочкина М.А. Популяционная структура пневмококков со сниженной чувствительностью к пенициллину и перспективы антипневмококковой вакцинации для сдерживания распространения антибактериальной резистентности. *Антибиот химиотер* 2011; 56(5-6):11-8.
30. Pillai D.R., Shahinas D., Buzina A., et al. Genome-wide dissection of globally emergent multi-drug resistant serotype 19A *Streptococcus pneumoniae*. *BMC Genomics* 2009; 10:642.
31. van der Linden M., Winkel N., Küntzel S., et al. Epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* serogroup 6 isolates from IPD in children and adults in Germany. *PLoS One* 2013; 8: e60848.
32. Aguiar S.I., Pinto F.R., Nunes S., et al. Denmark14-230 clone as an increasing cause of pneumococcal infection in Portugal within a background of diverse serotype 19A lineages. *J Clin Microbiol*. 2010; 48:101-8.
33. Hsieh Y.-C., Lin T.L., Chang K.Y., et al. Expansion and evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A ST320 clone as compared to its ancestral clone, Taiwan19F-14 (ST236). *J Infect Dis* 2013; 208:203-10.
34. Dagan R., Givon-Lavi N., Leibovitz E., et al. Introduction and proliferation of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A clones that cause acute otitis media in an unvaccinated population. *J Infect Dis* 2009; 199:776-85.
35. Moore M.R. Rethinking replacement and resistance. *J Infect Dis* 2009; 199:771-3.
36. Goossens H., Ferech M., Vander Stichele R., Elseviers M.; ESAC Project Group. Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study. *Lancet* 2005; 365:579-87.
37. Rachina S., Kozlov R., Jarkova L., Belkova Y., Tatchenko, V., and PATRIOT study group. Prescribing of systemic antimicrobials for respiratory infections in children in primary care in Russia [Abstract P0370]. Proceedings of the 24th ECCMID 2014 Barcelona, Spain.
38. Heikkinen T., Saeed K.A., McCormick D.P., et al. A single intramuscular dose of ceftriaxone changes nasopharyngeal bacterial flora in children with acute otitis media. *Acta Paediatr* 2000; 89:1316-21.
39. Tatchenko V., Sidorenko S., Namazova-Baranova L., et al. *Streptococcus pneumoniae* serotype distribution in children in the Russian Federation before the introduction of pneumococcal conjugate vaccines into the National Immunization Program. *Expert Rev Vaccines* 2014; 13:257-64.