

## Чувствительность к антибиотикам пневмококков, выделенных у детей города Красноярска

И. Н. Протасова<sup>1, 3</sup>, О. В. Перьянова<sup>1, 3</sup>, Н. В. Бахарева<sup>2</sup>,  
А. Б. Салмина<sup>1</sup>, И. В. Рева<sup>4, 5</sup>, Т. Такано<sup>4</sup>, Я. Ивао<sup>4</sup>, Т. Ямамото<sup>4</sup>,  
С. В. Сидоренко<sup>6</sup>, В. Г. Мельников<sup>7</sup>

<sup>1</sup> Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого, Красноярск, Россия

<sup>2</sup> Главное управление здравоохранения администрации города Красноярска, Красноярск, Россия

<sup>3</sup> Российско-Японский центр микробиологии, эпидемиологии и инфекционных заболеваний, Красноярск, Россия

<sup>4</sup> Международный медицинский научно-исследовательский центр, Ниигата, Япония

<sup>5</sup> Школа биомедицины Дальневосточного федерального университета, Владивосток, Россия

<sup>6</sup> НИИ детских инфекций, Санкт-Петербург, Россия

<sup>7</sup> Международный научно-технический центр, Москва, Россия

Проведено исследование резистентности к антибактериальным препаратам и серотиповой принадлежности 30 штаммов *Streptococcus pneumoniae*, выделенных от детей г. Красноярска. Полирезистентные штаммы составили 16,7% и характеризовались резистентностью к эритромицину, клиндамицину и тетрациклину с высокими значениями МПК.

Большинство штаммов, в том числе полирезистентных, относится к серотипам, входящим в состав пневмококковых вакцин, из них 60% принадлежат к серотипам 23F и 19F.

**Ключевые слова:** *Streptococcus pneumoniae*, серотипирование, антибиотикорезистентность, вакцинация.

### Antimicrobial Susceptibility of Pediatric *Streptococcus pneumoniae* Isolates in Krasnoyarsk

I. N. Protasova<sup>1, 3</sup>, O. V. Peryanova<sup>1, 3</sup>, N. V. Bakhareva<sup>2</sup>, A. B. Salmina<sup>1, 3</sup>, I. V. Reva<sup>4, 5</sup>,  
T. Takano<sup>4</sup>, Y. Iwao<sup>4</sup>, T. Yamamoto<sup>4</sup>, S. V. Sidorenko<sup>6</sup>, V. G. Melnikov<sup>7</sup>

<sup>1</sup> Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V. F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russia

<sup>2</sup> Central Administration of Public Health of Krasnoyarsk City, Krasnoyarsk, Russia

<sup>3</sup> Russian-Japanese Centre on Microbiology, Epidemiology and Infectious Diseases, Krasnoyarsk, Russia

<sup>4</sup> International Medical Science and Research Center, Niigata, Japan

<sup>5</sup> Biomedical School, Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia

<sup>6</sup> Research Institute of Pediatric Infectious Diseases, Saint Petersburg, Russia

<sup>7</sup> International Science and Technology Center, Moscow, Russia

*Streptococcus pneumoniae* strains isolated from children of Krasnoyarsk (Siberia, Russian Federation) were examined. Authors determined *Streptococcus pneumoniae* serotypes and antimicrobial resistance. 16.7%

of strains were multiple resistant with high MIC values for erythromycin, clindamycin and tetracycline (256, 128 and 32 mg/l, respectively). Prevalent serotypes were 23F and 19F. Most of serotypes (90%) belonged to those included in pneumococcal vaccines.

**Key words:** *Streptococcus pneumoniae*, serotyping, antimicrobial resistance, vaccination.

Контактный адрес:

Ирина Николаевна Протасова

Эл. почта: ovsyanka802@gmail.com

## Введение

*Streptococcus pneumoniae* в настоящее время является одним из основных бактериальных патогенов человека. По оценке ВОЗ пневмококковые заболевания являются причиной ежегодной гибели 1,6 млн человек [1]. Среди детей в возрасте до 5 лет ежегодно регистрируется около 14,5 млн случаев тяжелых пневмококковых заболеваний (включая пневмонию, менингит и сепсис), приводящих к летальному исходу приблизительно в 500 тыс. случаев [2, 3].

В Европе и США *S. pneumoniae* является причиной 30–50% внебольничных пневмоний у взрослых, требующих госпитализации [4]. У детей частота обнаружения *S. pneumoniae* составляет 78% при долевой пневмонии и 13% при бронхопневмонии [5].

Спектр серотипов, вызывающих неинвазивные пневмококковые заболевания (средний отит и синусит) у детей до 5 лет, характеризуется значительным разнообразием. Инвазивные инфекции в основном обусловлены серотипами 1, 5, 6А, 6В, 14, 19F и 23F [6]. Некоторые серотипы (6В, 9V, 14, 19А, 19F и 23F) чаще других ассоциированы с лекарственной устойчивостью [7].

За последние 30 лет устойчивость пневмококков к антибактериальным препаратам существенно возросла. Впервые пенициллинорезистентные пневмококки были выделены в Австралии в 1967 г., позже — в Новой Гвинее (1974 г.), Южной Африке (1976 г.) и Испании (1979 г.). В настоящее время большинство пенициллино- и эритромицинорезистентных штаммов во всем мире относится к серотипам 6В, 6А, 9V, 14, 15А, 19F, 19А и 23F. После начала применения 7-валентной пневмококковой вакцины в 2000-х годах стали регистрироваться другие (невакцинные) серотипы, среди которых большое значение приобрел полирезистентный серотип 19А [8]. В РФ, по данным многоцентрового исследования ПеГАС, в 1999–2009 гг. полирезистентные штаммы *S. pneumoniae* составляли от 11,8 до 14,5% [9]; при этом все они сохраняли чувствительность к левофлоксацину, моксифлоксацину, ванкомицину, линезолиду и эртапенему.

Резистентность *S. pneumoniae* к антибактериальным препаратам обусловлена несколькими механизмами: изменением структуры пенициллинсвязывающих белков за счет модификации генов *pbp2x*, *pbp1a* и *pbp2b* (устойчивость к бета-лактамам), метилированием рибосом при наличии генов *erm* (устойчивость к макролидам, а также линкозамидам и стрептограмину), эффлюксом макролидов (гены *mef*) [8], защитой рибосом с помощью белка *tetM*, способствующего отщеплению тетрациклина от 30S субъединицы рибосом по ГТФ-зависимому пути

(ген *tetM*) [10]. По данным многих авторов, частота встречаемости различных серотипов, механизмы и уровень резистентности *S. pneumoniae* к антибактериальным препаратам могут существенно различаться в зависимости от региона [6, 8, 11, 12].

В г. Красноярске и Красноярском крае проблема антибиотикорезистентности пневмококков до настоящего времени остается неизученной, в связи с чем целью нашего исследования явилось определение чувствительности к антибиотикам и серотиповой принадлежности штаммов *S. pneumoniae*, выделенных от детей в возрасте до 5 лет.

## Материал и методы

В исследование включено 30 штаммов *S. pneumoniae*, полученных от детей г. Красноярска в возрасте до 5 лет.

Для выделения пневмококков использовали кровяной агар на основе Columbia Agar (BioRad, Франция) с добавлением 5% эритроцитарной массы [13], а также Chocolate Agar Base без селективной добавки (HiMedia, Индия). Инкубацию проводили в эксикаторе при температуре 35°C в течение 24 ч. Идентифицировали пневмококки на основании морфотинкториальных, культуральных и антигенных свойств (Slidex pneumo-Kit, bioMerieux, Франция). Для хранения штаммов при –80°C использовали триптиказо-соевый бульон (CONDA Pronadisa, Испания) с добавлением 30% глицерина.

Исследование чувствительности к антимикробным препаратам проводили согласно рекомендациям CLSI (2012) методом разведений в агаре Мюллера–Хинтона с добавлением 5% крови барана [14]. Для приготовления инокулюма использовали суточную чистую культуру *S. pneumoniae*, которую суспендировали в 0,9% стерильном растворе хлорида натрия до мутности, эквивалентной 0,5 по стандарту McFarland. Полученную взвесь наносили на поверхность приготовленного агара с антибиотиком и инкубировали при температуре 35°C в условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора в течение суток. Интерпретацию результатов проводили согласно критериям CLSI (2012) и EUCAST (для доксициклина и миноциклина) [15]; оценку уровня чувствительности к цефдиторену проводили в соответствии с данными M. Soriano [16], к панипенему — в соответствии с данными M. L. Grayson et al. [17].

В качестве контроля использовался штамм *S. pneumoniae* ATCC 49619.

Серотипирование *S. pneumoniae* проводили методом ПЦР, используя 40 пар праймеров, рекомендованных CDC [18].

Фрагменты *cps*-генов, имеющихся у всех капсульных штаммов *S. pneumoniae*, амплифициро-

вали по следующему температурному профилю: при 94°C – 2 мин.; 94°C – 15 с, 56°C – 10 с, при 72°C – 15 с, 35 циклов; 72°C – 10 мин.; 4°C – хранение [19]. Данное исследование использовалось в качестве теста, подтверждающего принадлежность к пневмококкам.

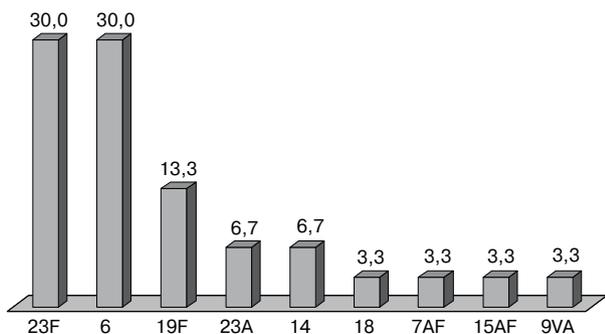
39 пар праймеров, используемых для амплификации фрагментов *cps*-генов, кодирующих серогруппы/серотипы 1, 2, 3, 4, 5, 6А/6В/6С, 7F/7А, 7С/ (7В/40), 8, 9L/9N, 9V/9А, 10А, 10F/ (10С/33С), 11А/11D, 12F/ (12А/44/46), 13, 14, 15А/15F, 15В/15С, 16F, 17F, 18А/18В/18С/18F, 19А, 19F, 20, 21, 22А/22F, 23А, 23В, 23F, 24А/24В/24F, 31, 33F/ (33А/37), 34, 35А/ (35С/42), 35В, 35F/47F, 38F/25F, 39F, были сгруппированы в 10 мультиплексных реакций, проводимых последовательно [19]. Амплификация проводилась на приборе Applied Biosystems по следующему температурному профилю: при 94°C – 2 мин.; 94°C – 10 с, 54°C – 15 с, при 72°C – 10 с, 39 циклов; 72°C – 2 мин.; 4°C – хранение.

Продукты амплификации детектировали в 1,5% агарозном геле (Sigma, США) с последующей визуализацией этидием бромида (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора) при УФ-излучении ( $\lambda$  310 нм) в трансиллюминаторе Molecular Imager® Gel Doc XR System (Bio-Rad, США). Размеры ПЦР-продуктов определяли сравнением с маркером молекулярных масс (100 bp DNA Ladder; Евроген, Россия).

Статистическая обработка и анализ полученных результатов осуществлялись с использованием компьютерных программ Microsoft Office Excel 2007 и Microsoft Office Access 2007.

**Результаты**

Исследовано 30 штаммов *S. pneumoniae*, полученных от детей из Красноярского краевого дома ребёнка, детских образовательных коллективов г. Красноярска (МБДОУ № 64, МБДОУ № 222), неорганизованных детей, прикрепленных к город-



Распределение серотипов исследуемых штаммов (в %).

ской детской поликлинике № 1, а также от детей, госпитализированных по поводу острого среднего отита и менингита.

Большинство штаммов (90%) было выделено из носоглотки бактерионосителей, 6,7% (2 штамма) – из отделяемого среднего уха, 3,3% (1 штамм) – из крови.

Большинство штаммов (73,3%) принадлежали к серотипам 23F, 19F и серогруппе 6 (6ABC). В целом, до 90% относились к серотипам, входящим в состав пневмококковых вакцин, разрешенных к применению в РФ (рисунок).

Чувствительность *S. pneumoniae* определяли к 15 антимикробным препаратам: пенициллину, цефалоспорином (цефаклор, цефдиторен, цефтриаксон), карбапенемам (имипенем, панипенем), макролидам (эритромицин), линкозамидам (клиндамицин), тетрациклином (тетрациклин, доксициклин, миноциклин), фторхинолоном (левофлоксацин), гликопептидам (ванкомицин), оксазолидиноном (линезолид), ансамицином (рифампицин) (табл. 1).

Исследуемые штаммы демонстрировали высокую чувствительность к пенициллину, доля умеренно резистентных составила 6,7%. Это коррелирует с данными исследования ПЕГАС [9], согласно которым доля нечувствительных к данному препарату штаммов в Российской Федерации составляет 8,1–11,2%. В то же время, доля штаммов, нечувствительных к пероральному цефалоспорино II поколения цефаклору, составила 20%; к пероральному цефалоспорино III поколения цефдиторену – 10%; к парентеральному цефалоспорино III поколения цефтриаксону – 10%. При этом значения МПК<sub>90</sub> составили 16, 0,5 и 1 мг/л соответственно, т. е. для цефаклора они находятся в диапазоне резистентности.

Карбапенемы обладали практически 100% активностью в отношении *S. pneumoniae* (за исключением одного штамма, умеренно резистентного к имипенему) при значениях МПК<sub>90</sub> 0,063 (имипенем) и 0,031 мг/л (панипенем). Необходимо отметить, что панипенем, широко применяемый в Японии, в настоящее время в клинической практике в Российской Федерации не используется.

Штаммы, нечувствительные к эритромицину (УР + Р), составили 16,6% от общего числа, что в 3 раза выше аналогичного показателя в 2006–2009 гг. по данным исследования ПЕГАС (4,6%). Штаммы, устойчивые к клиндамицину, составили 10%, что также превышает общероссийские показатели (от 2,9 до 4,5% за период 1999–2009 гг.).

Препараты группы тетрациклинов (тетрациклин, доксициклин, миноциклин) в 86,7% случаев обладали активностью в отношении исследуемых штаммов, при этом значения МПК<sub>90</sub> находились в диапазоне резистентности. Согласно общероссий-

Таблица 1. Результаты определения чувствительности к антимикробным препаратам выделенных штаммов *S. pneumoniae*

Препарат	МПК <sub>50</sub> , мг/л	МПК <sub>90</sub> , мг/л	Диапазон МПК, мг/л	Ч, %	УР, %	Р, %
Пенициллин	0,125	2	0,016–4	93,3	6,7	0
Цефаклор	0,5	16	0,25–64	80	3,3	16,7
Цефдиторен	0,031	0,5	0,008–1	90	0	10
Цефтриаксон	0,063	1,0	0,008–2,0	90	10	0
Имипенем	0,016	0,063	0,004–0,25	96,7	3,3	0
Панипенем	0,008	0,031	0,002–0,63	100	0	0
Эритромицин	0,063	4,0	0,031–256	83,4	3,3	13,3
Клиндамицин	0,063	0,063	0,016–256	90	0	10
Тетрациклин	0,125	32	0,125–32	86,7	0	13,3
Доксициклин	0,063	4	0,063–8	86,7	0	13,3
Миноциклин	0,031	4	0,031–4	86,7	0	13,3
Левифлоксацин	1	1	0,5–1	100	0	0
Ванкомицин	0,25	0,5	0,25–0,5	100	0	0
Линезолид	0,5	1	0,5–1	100	0	0
Рифампицин	0,063	0,063	0,015–512	96,7	0	3,3

Примечание. Ч – чувствительные, УР – умеренно резистентные, Р – резистентные штаммы.

Таблица 2. Характеристика 5 полирезистентных штаммов *S. pneumoniae*

Серотип/серогруппа	Пенициллин	Цефаклор	Цефдиторен	Цефтриаксон	Имипенем	Панипенем	Эритромицин	Клиндамицин	Ванкомицин	Линезолид	Тетрациклин	Доксициклин	Миноциклин	Левифлоксацин	Рифампицин
19F	УР	Р	Ч	Ч	УР	Ч	Р	Р	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
19F	УР	Р	Ч	Ч	Ч	Ч	УР	Ч	Ч	Ч	Р	Р	Р	Ч	Ч
6ABC	Ч	Р	Р	УР	Ч	Ч	Р	Р	Ч	Ч	Р	Р	Р	Ч	Ч
6ABC	Ч	Р	Р	УР	Ч	Ч	Р	Р	Ч	Ч	Р	Р	Р	Ч	Ч
9VA	Ч	Р	Р	УР	Ч	Ч	Р	Ч	Ч	Ч	Р	Р	Р	Ч	Р

ским показателям, от 25 до 27% штаммов пневмококков нечувствительны к тетрациклину.

Все штаммы *S. pneumoniae* характеризовались чувствительностью к левифлоксацину, ванкомицину и линезолиду.

К рифампицину устойчивость выявлена у одного штамма.

Из 30 исследованных штаммов 5 (16,7%) обладали полирезистентностью (табл. 2). Четыре из них были выделены из носоглотки детей-бактерионосителей (дом ребенка), один штамм – из отделяемого среднего уха.

Все полирезистентные штаммы демонстрировали устойчивость к цефаклору со значениями МПК от 16 до 64 мг/л (при этом МПК пенициллина составила от 2 до 4 мг/л), а также к эритромицину. У трех штаммов, резистентных к эритромицину, значения МПК находились на высоком уровне и составляли 256 мг/л; МПК клиндамицина у дан-

ных штаммов составила 128 мг/л, МПК тетрациклина – 32 мг/л.

Обращает на себя внимание штамм, резистентный к рифампицину (МПК составила 512 мг/л). Данный штамм получен от годовалого ребенка с острым отитом, принадлежал к серогруппе 9 (9V/A) и характеризовался устойчивостью к цефалоспорином, тетрациклином и эритромицину.

Необходимо отметить, что все полирезистентные штаммы сохраняли чувствительность к левифлоксацину, панипенему, ванкомицину и линезолиду.

### Заключение

Пневмококковая инфекция является актуальной проблемой в педиатрической практике. Основной группой риска являются дети первых 5 лет жизни, особенно маловесные, недоношенные, с хроническими заболеваниями, врожденными аномалиями развития и иммунодефицитными состояниями.

Болезни, вызываемые *S. pneumoniae*, наносят значительный ущерб демографической и экономической ситуации в Красноярском крае. Экономические потери региона при лечении острых отитов, менингитов, сепсиса пневмококковой этиологии у детей раннего возраста, с учетом прямых и непрямых экономических затрат, составляют порядка 350 млн руб.

Наши предыдущие исследования по изучению назофарингеального носительства пневмококков среди детей г. Красноярск показали высокий уровень бактерионосительства как среди организованных (49,6%), так и среди неорганизованных (53,4%) детей [20], что говорит о необходимости введения пневмококковых вакцин в региональные программы иммунизации.

В г. Красноярске и Красноярском крае впервые начато серотипирование пневмококков и исследование их антибиотикорезистентности.

Согласно полученным нами данным, большинство серотипов исследуемых штаммов *S. pneumoni-*

*ae* (90%) относились к вакцинальным, входящим в состав 13-валентной пневмококковой вакцины.

Количество полирезистентных штаммов составило 16,7%, что выше средних показателей по РФ. Обращает на себя внимание высокий уровень резистентности к эритромицину (16,6%) и цефалоспорином (10–20%). Серотипы всех полирезистентных штаммов также принадлежали к вакцинальным.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о целесообразности и перспективности вакцинации против пневмококковой инфекции как одного из путей сдерживания распространения резистентности *S. pneumoniae* к антибактериальным препаратам.

Исследования, направленные на совершенствование диагностики, терапии и профилактики пневмококковых инфекций, позволят снизить показатели заболеваемости и смертности среди детей и приведут к улучшению демографической и социально-экономической ситуации в Красноярском крае.

## Литература

- World Health Organization. Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization – WHO position paper. Wkly Epidemiol Rec 2007; 82:93-104.
- World Health Organization. Progress in introduction of pneumococcal conjugate vaccine worldwide, 2000-2012. Wkly Epidemiol Rec 2013; 88:173-80.
- O'Brien K.L., Wolfson L.J., Watt J.P., et al. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. Lancet 2009; 374:893-902.
- World Health Organization. Pneumococcal vaccines – WHO position paper. Wkly Epidemiol Rec 2012; 87:129-44.
- Vuori-Holopainen E., Peltola H. Reappraisal of lung tap: review of an old method for better etiologic diagnosis of childhood pneumonia. Clin Infect Dis 2001; 32:715-26.
- Johnson H.L., Deloria-Knoll M., Levine O.S., et al. Systematic evaluation of serotypes causing invasive pneumococcal disease among children under five: the pneumococcal global serotype project. PLoS Med 2010; 7:e1000348.
- Kyaw M.H., Lynfield R., Schaffner W., et al. Effect of introduction of the pneumococcal conjugate vaccine on drug-resistant *Streptococcus pneumoniae*. N Engl J Med 2006; 354:145-63.
- Reinert R.R. The antimicrobial resistance profile of *Streptococcus pneumoniae*. Clin Microbiol Infect 2009; 15 (Suppl 3):7-11.
- Козлов Р.С., Сивая О.В., Кречикова О.И., Иванчик Н.В. Динамика резистентности *Streptococcus pneumoniae* к антибиотикам в России за период 1999-2009 гг. (Результаты многоцентрового исследования «ПеГАС»). Клин микробиол антимикроб химиотер 2010; 12:329-41.
- Grohs P., Trieu-Cuot P., Podglajen I., et al. Molecular basis for different levels of *tet(M)* expression in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother 2012; 56:5040-5.
- Савинова Т.А., Филимонова О.Ю., Грудинина С.А., Сидоренко С.В. Генетическое разнообразие пенициллиноустойчивых *Streptococcus pneumoniae*. Журн инфектол 2009; 1:66-71.
- Reinert R.R., Filimonova O.Y., Al-Lahham A., et al. Mechanisms of macrolide resistance among *Streptococcus pneumoniae* isolates from Russia. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52:2260-2.
- Кречикова О.И., Козлов Р.С., Богданович Т.М., и др. Выделение, идентификация и определение чувствительности к антибиотикам *Streptococcus pneumoniae* (методические рекомендации). Клин микробиол антимикроб химиотер 2000; 2:88-98.
- CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-second informational supplement. CLSI document M100-S22. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST. Available from: URL: <http://www.eucast.org/>
- Soriano F., Gimenez M.J., Aguilar L. Cefditoren in upper and lower community-acquired respiratory tract infections. Drug Des Devel Ther 2011; 5:85-94.
- Grayson M.L., Crowe S.M., McCarty J.S., et al., editors. Kucers' the use of antibiotics: A clinical review of antibacterial, antifungal, antiparasitic, and antiviral drugs. 6th ed. CRC Press; 2010.
- Streptococcus* Laboratory. Available from: URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/protocols.htm>
- Савинова Т.А. Генетическое разнообразие и молекулярные основы резистентности *Streptococcus pneumoniae* к  $\beta$ -лактамам антибиотикам. Автореф. дисс... канд. биол. наук. М., 2011.
- Бахарева Н.В., Протасова И.Н., Перьянова О.В. и др. Бактерионосительство *Streptococcus pneumoniae* среди детей г. Красноярск. Эпидемиол и вакцинопроф 2012; 4:73-7.