

## Чувствительность к антибиотикам стрептококков группы А различных *emm* генотипов, выделенных от больных инвазивными и неинвазивными инфекциями мягких тканей

Н. И. Брико, Н. Ф. Дмитриева, Д. А. Клейменов, К. В. Липатов,  
Е. В. Глушкова, В. В. Котин

Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова, Москва, Россия

**Цель.** Исследовать чувствительность к антибиотикам штаммов стрептококка группы А (СГА) различных *emm*-генотипов, выделенных от больных инвазивными и неинвазивными инфекциями мягких тканей.

**Материал и методы.** Исследовали 91 культуру СГА, выделенную от пациентов со стрептококковой инфекцией мягких тканей гнойно-хирургического отделения 23 ГКБ им. «Медсантруд» г. Москвы в 2008–2011 гг. Идентификацию стрептококков группы А проводили методом латекс-агглютинации, генотипирование — согласно протоколам CDC. Чувствительность к антибиотикам определяли методом серийных микроразведений в соответствии с рекомендациями EUCAST (v.4.1).

**Результаты.** Резистентность к тетрациклину выявлена у 46 (50,5%) культур, к азитромицину, кларитромицину и эритромицину — у 17,6, 15,4 и 15,4% штаммов соответственно. К хлорамфениколу, клиндамицину и левофлоксацину оказа-

лись не чувствительны 13,2, 5,5 и 1,1% культур соответственно. Из 91 культуры СГА 23,1% были устойчивы более чем к одному антибиотику. При этом среди 35 различных *emm* генотипов СГА, к которым были отнесены исследованные штаммы, полирезистентность обнаруживалась у штаммов шести *emm* генотипов: 44.0, 49.8, 65.0, 74.0, 88.2, st 1731.2.

**Заключение.** Наибольшей проблемой антибиотикорезистентности СГА является высокая частота резистентности к тетрациклину. Все культуры, независимо от источника выделения (ИСИ или неинвазивная форма), были чувствительны к низким концентрациям пенициллина. Культуры СГА, проявляющие полирезистентность, принадлежали к ограниченному набору *emm*-генотипов, как правило, широко распространенных в различных регионах мира.

**Ключевые слова:** *Streptococcus pyogenes*, антибиотикорезистентность, генотип.

## Antimicrobial Susceptibility of Group A Streptococci of Different *emm* Genotypes, Isolated from Patients with Invasive and Non-Invasive Skin and Soft Tissue Infections

N. I. Briko, N. F. Dmitrieva, D. A. Kleymenov, K. V. Lipatov, E. V. Glushkova, V. V. Kotin

I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

**Aim.** To evaluate the antimicrobial susceptibility of group A streptococci (GAS) of different *emm*-genotypes, isolated from patients with invasive and non-invasive skin and soft tissue infections.

**Material and Methods.** Overall 91 strains of GAS isolated during 2008–2011 from patients with invasive and non-invasive skin and soft tissue infections hospitalized in one Moscow's hospital were included in the study. Identification was done by latex agglutination, genotyping — by CDC protocol. Susceptibility to antimicrobials was evaluated by broth microdilution method in accordance with EUCAST v.4.1 recommendations.

**Results.** Resistance to tetracycline was noted in 50,5% of strains; to azithromycin, clarithromycin and erythromycin — in 17.6%, 15.4% and 15.4% of strains,

respectively; 13,2%, 5,5% and 1,1% of strains were non-susceptible to chloramphenicol, clindamycin and levofloxacin. Among tested strains 23.1% were resistant to more than one antimicrobial. Out of 35 different *emm* genotypes multiresistance was detected in the following *emm* genotypes: 44.0, 49.8, 65.0, 74.0, 88.2, st 1731.2.

**Conclusion.** The most prominent antimicrobial resistance problem in the tested strains was very high rate on non-susceptibility to tetracycline. All isolates tested, independently of type of infection (invasive and non-invasive) were highly susceptible to penicillin G. Multiresistant Gas isolates were belonging to few international *emm*-genotypes.

**Key words:** *Streptococcus pyogenes*, antimicrobial resistance, genotype.

### Введение

В этиологической структуре воспалительных заболеваний мягких тканей значительное место принадлежит стрептококкам группы А (*Streptococcus pyogenes*). Часть из этих инфекций протекает в виде тяжелых генерализованных форм — *инвазивных стрептококковых инфекций* (ИСИ). Типовой состав культур *стрептококков группы А* (СГА), выделяемых при данной локализации возбудителя, характеризуется значительным разнообразием [1]. Для различных регионов земного шара отмечается свой набор наиболее часто встречающихся генотипов. Исследование антибиотикочувствительности штаммов также демонстрирует неодинаковый уровень устойчивости выделяемых культур в разных странах [2–4]. В некоторых работах сделана попытка провести параллель между чувствительностью к антибиотикам штаммов СГА, вызвавших ИСИ, с их *emm*-типом [5–7]. Цель данной работы — определить особенности антибиотикочувствительности различных *emm* генотипов СГА, выделенных при инвазивных и неинвазивных инфекциях мягких тканей в одном из хирургических стационаров г. Москвы.

### Материал и методы

Обследование пациентов и выделение биологического материала проводили с мая 2008 г. по март 2011 г. в гнойно-хирургическом отделении 23 ГКБ им. «Медсантруд» г. Москвы. СГА выделяли из крови или материала, полученного во время

операции при первичном нарушении целостности кожного покрова. Посев пробы осуществляли на кровяной агар с добавлением 5% бараньей крови. После учета результатов первичного посева на агар выделяли чистую культуру и культивировали ее в бульоне Todd-Hewitt в течение 18 часов при 37 °С. Идентификацию стрептококков группы А проводили методом латекс-агглютинации с использованием набора реагентов для групповой идентификации Slidex Strepto-Kit (bioMerieux, Франция).

Большинство молекулярно-генетических процедур (выделение геномной ДНК, электрофорез ДНК и др.) осуществляли в соответствии с руководством [8]. Наличие генов бактериофаговых токсинов *speA*, *speB* и *speC* определяли методом ПЦР при условиях, описанных ранее [9].

*Emm*-типирование культур СГА проводили в соответствии с протоколом, рекомендованным *Центрами по контролю и профилактике заболеваний США* (CDC) [10]. Фрагменты ДНК выделяли из агарозного геля посредством набора «Bacterial Genomic DNA Miniprep kit» («Ахуген», США).

Секвенирование ДНК проводили с использованием набора BigDye v.3.1 (Applied Biosystems) на генетическом анализаторе ABI 3130x1 согласно инструкции производителя. С целью установления *emm*-типа и *emm*-подтипа штаммов полученные последовательности сравнивали с данными, опубликованными в *Streptococcus pyogenes emm* sequence database [11] с помощью программы BLAST2.

Таблица 1. Распределение культур *S. pyogenes* ( $n=91$ ) по степени чувствительности к антимикробным препаратам (в %)

Антибиотики	Ч	УР	Р
Азитромицин	82,4	4,4	13,2
Хлорамфеникол	86,8	0	13,2
Кларитромицин	84,6	2,2	13,2
Клиндамицин	94,5	0	5,5
Эритромицин	84,6	5,5	9,9
Левифлоксацин	98,9	1,1	0
Линезолид	100	0	0
Моксифлоксацин	—	—	—
Пенициллин	100,0	0	0
Тетрациклин	49,5	0	50,5
Триметоприм/сульфаметоксазол	—	—	—
Ванкомицин	100	0	0

Примечание. Ч — чувствительные, УР — умеренно резистентные, Р — резистентные.

Исследование чувствительности *S. pyogenes* с определением минимальной подавляющей концентрации (МПК) антибиотиков проводили методом микроразведений в катион-сбалансированном бульоне Мюллера–Хинтон (BBL, США) с добавлением лизированной лошадиной крови (итоговая концентрация — 5%). Для приготовления бактериальной суспензии чистую суточную культуру микроорганизмов разводили в стерильном 0,9% растворе хлорида натрия до мутности, эквивалентной 0,5 по стандарту МакФарланда. Инкубация микротитровальных планшетов проводилась при температуре 35 °С в течение 18±2 ч в обычной атмосфере. Контроль качества с использованием контрольного штамма *S. pneumoniae* ATCC 49619 проводился при каждой постановке чувствительности. Интерпретация результатов определения чувствительности производилась согласно критериям Европейского комитета по определению чувствительности (EUCAST, v. 4.1.).

### Результаты исследования

К следующим антибиотикам не было выявлено резистентности у исследованных штаммов: пенициллину, ванкомицину, линезолиду, моксифлоксацину и левифлоксацину (к последнему один штамм был умеренно резистентен). Чуть менее половины штаммов ( $n=43$ , 47,3%) были чувствительны ко всем протестированным в данном исследовании антибиотикам. 27 штаммов (29,7%) были резистентны только к тетрациклину. Еще два штамма (2,2%) помимо резистентности к тетрациклину были умеренно устойчивы: один к левифлоксацину и еще один ко всем трем представителям макролидов — азитромицину, кларитромицину и эритромицину.

Из оставшихся 19 штаммов два (2,2%), сохраняя чувствительность к тетрациклину, были резистентны/умеренно резистентны к макролидам, 4 штамма (4,4%) были резистентны к тетрациклину и хлорамфениколу, и 13 (14,3%) штаммов обнаружили устойчивость к 3 и более представителям классов (групп) антимикробных препаратов, т. е. являлись полирезистентными (табл. 1).

В целом, резистентность к тетрациклину выявлена у 46 (50,5%) культур, к азитромицину, кларитромицину и эритромицину — у 16 (17,6%), 14 (15,4%) и 14 (15,4%) штаммов соответственно. К хлорамфениколу, клиндамицину и левифлоксацину оказались нечувствительными 12 (13,2%), 5 (5,5%) и 1 (1,1%) штаммов соответственно.

Среди 91 культуры СГА было определено 35 различных *emm* генотипов. При этом наиболее распространенными были *emm88* (14 штаммов — 13,5%), *st1731* — 12 штаммов и *emm66* — 10. Определено четыре штамма как *emm49*, по три штамма — с *emm*-типами 1, 28, 41, 73 и 84; по два штамма с *emm*-типами — 32, 53, 60, 64, 76, 80, 81, 117, 27G6, *st2940*. Остальные генотипы представлены по одному штамму: 12, 22, 25, 44, 59, 65, 74, 77, 83, 89, 94, 110, 115, 122, *st221*, *stG485* (табл. 2).

Среди чувствительных ко всем протестированным антибиотикам культур ( $n=43$ ), тринадцать (30,2%) были выделены от больных ИСИ и относились к 1, 28, 60, 66, 84, 88 *emm*-типам. Культуры, относящиеся к последним четырём *emm*-типам, были также выделены от больных неинвазивными формами инфекции (см. табл. 2).

11 штаммов десяти *emm*-типов (28, 41, 53, 66, 76, 77, 80, 117, *st221* и *st2940*), вызвавшие ИСИ, были устойчивы только к тетрациклину, что составило

Таблица. 2. Распределение культур по *emm*-генотипам и чувствительности к антибиотикам

<i>Emm</i> -типы (число штаммов), вызвавшие ИСИ	<i>Emm</i> -типы (число штаммов), вызвавшие неинва- зивные формы СИ	Число штаммов			Антибиотики и оценка чувствительности к ним						
		всего	инвазивные формы СИ	неинвазивные формы СИ.	азитромицин	кларитромицин	эритромицин	хлорамфеникол	клиндамицин	тетрациклин	
1.0 (1)	1.0 (1)	80.0 (1)	43	13	30	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
1.47 (1)	12.4 (1)	81.1 (2)									
28.0 (2)	25.3 (1)	84.0 (1)									
60.1 (1)	27G.6 (1)	88.2 (4)									
66.1 (2)	32.2 (1)	88.4 (1)									
84.0 (2)	53.0 (1)	89.0 (1)									
88.2 (4)	59.0 (1)	94.0 (1)									
	60.1 (1)	117.0 (1)									
	66.1 (5)	st1731 (3)									
	73.0 (1)	stG485.0 (1)									
28.0 (1)	77.0 (1)	22.0 (1)	27	11	16	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Р
41.2 (1)	80.0 (1)	27G.6 (1)									
53.0 (1)	117.0 (1)	41.2 (2)									
66.0 (2)	st221 (1)	66.0 (1)									
76.0 (1)	st2940 (1)	73.0 (1)									
		32.2 (1)	1	—	1	Р	Ч	Р	Ч	Ч	Ч
		110.1 (1)	1	—	1	Р	Р	Ч	Ч	Ч	Ч
		st1731 (1)	1	—	1	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Р
64.0 (2)		122.2 (1)	4	2	2	Ч	Ч	Ч	Р	Ч	Р
		st1731 (1)									
73.0 (1)			1	1	—	Р	Р	Р	Ч	Ч	Р
44.0 (1)			1	1	—	Р	Ч	Ч	Р	Ч	Р
		88.2 (5)	5	—	5	Р	Р	Р	Ч	Р	Р
49.8 (1)	65.0 (1)	st1731 (1)	7	2	5	Р	Р	Р	Р	Ч	Р
74.0 (1)	49.8 (3)										

40,7% от общего числа штаммов ( $n=27$ ) с такими свойствами.

21 культура, проявившая устойчивость более чем к одному антибиотику, принадлежала к одиннадцати *emm* генотипам (32, 44, 49, 64, 65, 73, 74, 88, 110, 122, st1731). Из них 6 (28,6%) штаммов были связаны с ИСИ и представляли 44, 49, 64, 73 и 74 *emm*-типы.

Все эти штаммы демонстрировали чувствительность к клиндамицину и левофлоксацину и резистентность к тетрациклину, большинство были резистентны к хлорамфениколу (кроме *emm*73.0) и умеренно резистентны/резистентны к макролидам (кроме *emm*64.0).

Остальные 15 штаммов были выделены от больных неинвазивными формами стрептококковых инфекций мягких тканей и относились к следующим *emm*-типам: 32, 49, 65, 88, 110, 122 и st1731.

Культуры всех *emm*-типов, за исключением *emm*122.2, были резистентны/умеренно резистентны

к двум-трем макролидам. Пять культур, проявивших устойчивость к клиндамицину, принадлежали одному *emm*-типу — 88.2 (см. табл. 2). При этом МПК для всех пяти *emm*-типов составила 16 мг/л. Все штаммы были чувствительны к левофлоксацину, большинство резистентны к тетрациклину (кроме *emm*32.2 и *emm*110.1). В то же время *emm*-типы 49.8, 65.0, 122.2 и st1731.2 были устойчивы к хлорамфениколу.

В целом, 13 штаммов, обладавших полирезистентными свойствами, относились к шести *emm*-типам: 44.0, 49.0, 65.0, 74.0, 88.2, st1731.2 (табл. 3). Для них было определено наличие генов эритрогенных токсинов.

Штамм *emm*44.0, в котором выявлен *speB*, был умеренно резистентен к азитромицину, а также к хлорамфениколу и тетрациклину (4МПК<sub>R</sub>). У всех четырех культур *emm*49.8 выявлены гены эритрогенных токсинов А и В (*speA*, *speB*). Практически такими же свойствами обладал штамм *emm*65.0, но ген *speA* у него не определялся. Наиболее интерес-

Таблица. 3. Характеристика антибиотикочувствительности и наличие генов эритрогенных токсинов у полирезистентных штаммов

<i>Emm</i> -тип (число штаммов)	Гены стрептококковых токсинов			МПК, мг/л						
	<i>spe A</i>	<i>spe B</i>	<i>spe C</i>	азитро- мицин	кларитро- мицин	эритро- мицин	клинда- мицин	хлорам- феникол	лево- флокса- цин	тетра- циклин
44.0 (1)	—	+	—	1	0,25	0,125	0,125	64	1	32
49.8 (4)	+	+	—	4	4	1	0,0625	32	1	32
65.0 (1)	—	+	—	2	2	1	0,0625	32	2	32
74.0 (1)	+	+	+	16	16	2	0,25	64	2	16
88.2 (5)	—	+	—	16	16	16	16	2	1	32
st1731.2 (1)	+	+	—	2	2	0,5	0,0625	32	1	16
Пограничные кон- центрации МПК (Ч / Р)	—			≤0,5/≥2	≤0,25/≥1	≤0,25/≥1	≤0,25/≥1	≤4/≥16	≤2/≥8	≤2/≥8

ный по содержанию токсинов штамм *emm*-типа 74.0 (мы обнаружили в его геноме гены *speA*, *speB*, *speC*) был одним из наиболее чувствительных к антибиотикам. У всех пяти штаммов *emm88.2* определялся ген *speB*. И наконец, штамм st1731.2, имея в своем патогенетическом арсенале гены *speA* и *speB*, был устойчив к азитромицину, кларитромицину, хлорамфениколу и тетрациклину (см. табл. 3).

### Обсуждение результатов исследования

Наибольшее количество культур (50,5%) проявили резистентность к тетрациклину, что отражает общую тенденцию увеличения доли нечувствительных к тетрациклину штаммов СГА и превышает такие показатели при исследованиях, проводившихся как в России, так и в ряде зарубежных стран. В то же время доля штаммов, резистентных к эритромицину, оказалась выше, чем при анализе респираторных штаммов СГА в России [2], но ниже выявляемой в ряде стран Европы [6, 12].

Резистентность к 14- и 15-членным макролидам была сопоставима с таковой к хлорамфениколу. Среди исследованных нами штаммов устойчивость к хлорамфениколу ни в одном случае не сопровождалась одновременной устойчивостью к клиндамицину.

Все культуры, независимо от источника выделения (ИСИ или неивазивная форма), были чувствительны к низким концентрациям пенициллина (≤0,03 мг/л).

К полирезистентным были отнесены штаммы шести *emm* генотипов: 44.0, 49.8, 65.0, 74.0, 88.2, st1731.2. В настоящее время складывается представление, что динамика распространения резистентности к препаратам связана не только с количеством потребляемых антибиотиков, но

и с динамикой распространения отдельных клонов возбудителей, обусловленной совершенно другими причинами.

Широкое распространение штаммов генотипа *emm49* (M49) в различных географических регионах с 1950 года по настоящее время и большой круг заболеваний, им вызываемых, дало основание включать его при разработке вакцинных препаратов. К потенциально вакцинным относится также штамм *emm* генотипа 44.0 [13]. Штаммы *emm* генотипов 65, 74 и st 1731 не являются вакцинными, но при этом являются достаточно распространенными, в связи с чем данные по их чувствительности к антибиотикам также представляют интерес. Следует отметить, что штаммы с *emm* 88.2, по данным литературы, не входят как в число вакцинных, так и часто регистрируемых [14].

Важным также является то, что ряд культур с повышенной вирулентностью также являлись полирезистентными. Так, например, культура СГА, выделенная от больной ИСИ (*emm74*), проявляла устойчивость к пяти антибиотикам: тетрациклину, хлорамфениколу, азитромицину, эритромицину и кларитромицину. В исследовании, проведенном в Турции [6], штамм, типированный как *emm74*, изолированный из крови больного при ИСИ, также проявлял полирезистентность. У выделенного нами штамма данного типа были выявлены гены важных факторов вирулентности возбудителя — эритрогенных токсинов *speA*, *speB* и *speC*. У штаммов генотипа *emm49* и st1731 определены гены *speA* и *speB*, у штаммов с *emm* 88.2, 65 и 44 — ген *speB* (см. табл. 3).

Наиболее выраженная полирезистентность была выявлена у пяти штаммов с генотипом *emm* 88.2. Вполне вероятно, что такие штаммы широ-

ко распространены в России. По данным нашего исследования, количество штаммов данного генотипа было максимальным при мониторинге СГА

инфекций мягких тканей у больных отделения гнойной хирургии стационара за период с 2008 по 2011 гг. [1].

## Литература

1. Брико Н.И., Глушкова Е.В., Дмитриева Н.Ф., Клейменов Д.А., Липатов К.В., Ещина А.С., Тимофеев Ю.М., Мирская М.А., Введенская О.В. Инвазивная стрептококковая инфекция (группы А) мягких тканей в хирургическом стационаре г. Москвы. Вестник РАМН 2013; 6:15-20.
2. Азовскова О.В., Иванчик Н.В., Дехнич А.В., Кречикова О.И., Козлов Р.С., исследовательская группа «ПеГАС». Динамика антибиотикорезистентности респираторных штаммов *Streptococcus pyogenes* в России за период 1999–2009. Клин микробиол антимикроб химиотер 2012; 14(4):309-21.
3. Rubio-Lopez V., Valdezate S., Alvarez D., Villalon P., Medina M.J., Salcedo C. and Saez-Nieto J. Molecular epidemiology, antimicrobial susceptibilities and resistance mechanisms of *Streptococcus pyogenes* isolates resistant to erythromycin and tetracycline in Spain (1994-2006). BMC Microbiol 2012; 12:215.
4. Ardanuy C., Domenech A., Rolo D., Calatayud L., Tubau F., Ayats J., Martin R., Linares J. Molecular characterization of macrolide- and multidrug-resistant *Streptococcus pyogenes* isolated from adult patients in Barcelona, Spain (1993-2008). J Antimicrob Chemother 2010; 65:634-43.
5. Sakata H. Susceptibility and emm type of *Streptococcus pyogenes* isolated from children with severe infection. J Infect Chemother 2013; 19(6):1042-6.
6. Arslan U., Oryasin E., Eskin Z., Turk Dagi H., Findik D., Tuncer I., Bozdogan B. Distribution of emm genotypes and antibiotic susceptibility of *Streptococcus pyogenes* strains analogy with the vaccine in development. Mikrobiol Bul 2013; 47(2):318-23.
7. Wajima T., Murayama S.Y., Sunaoshi K., Nakayama E., Sunakawa K., Ubukata K. Distribution of emm type and antibiotic susceptibility of group A streptococci causing invasive and noninvasivedisease. J Med Microbiol 2008; 57(11):1383-8.
8. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М., Мир, 1984.
9. Дмитриева Н.Ф., Трофимов Д.Ю., Ещина А.С., Ряпис Л.А., Скоркина Ю.А., Герасимов А.Н., Журавлев М.В. Брико Н.И. Частота встречаемости генов spe ABC в штаммах *Streptococcus pyogenes* и идентификация возбудителя с помощью ПЦР. Журн микробиол 2002; 5:3-6.
10. Доступно по URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/strepblast.htm>
11. Доступно по URL: [http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/protocol\\_emm-type.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/protocol_emm-type.htm)
12. Van Heirstraeten L., Coenen S., Lammens C., Hens N., Goossens H., Malhotra-Kumar S. Antimicrobial drug use and macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes*, Belgium. Emerg Infect Dis 2012; 18(9):1515-8.
13. Dale J.B., Penfound T.A., Tamboura B., Sow S.O., Nataro J.P., Tapia M., Kotloff K.L. Potential coverage of a multivalent M protein-based group A streptococcal vaccine. Vaccine 2013; 31:1576-81.
14. Cole J.N., Barnett T.C., Nizet V., Walker M.J. Molecular insight into invasive group A streptococcal disease. Nature Rev Microbiol 2011; 9:724-36.