



УДК 340.6

Оценка серологического разнообразия штаммов *Streptococcus pneumoniae* среди детей из организованных коллективов города Иркутска

Л. А. Степаненко¹, С. В. Ильина¹, О. И. Боброва¹,
Ю. П. Джиоев^{1,2}, О. В. Колбасеева¹, В. И. Злобин¹

¹Иркутский государственный медицинский университет, Иркутск

²Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, Иркутск

E-mail: stepia@mail.ru

Анотация. Приведены результаты обследования детей в возрасте от 2 до 5 лет из организованных коллективов г. Иркутска на носительство *Streptococcus pneumoniae*, которое составило 17,1 %. Среди носителей было выявлено девять различных серотипов, из которых преобладали 6А/В/С (40,0 %) и 19 F (12,0 %). «Невакцинные» штаммы составили 20 %. Показано, что пневмококковые конъюгированные вакцины -7/13 (ПКВ-7/13) охватывают от 76,0 % до 80,0 % всех выявленных серотипов. Доля резистентных штаммов преобладала среди капсульных форм, входящих в состав ПКВ.

Ключевые слова: *Streptococcus pneumoniae*, ПЦР, серотипы, вакцинация, пневмококковая конъюгированная вакцина.

Введение

Streptococcus pneumoniae – один из наиболее часто обнаруживаемых возбудителей респираторных бактериальных инфекций, менингитов и бактериемии у детей [1; 5]. Пневмококк является частью комменсальной флоры верхних дыхательных путей. Наряду с *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Staphylococcus aureus* и различными гемолитическими стрептококками пневмококки колонизируют носоглотку [9]. Чаще всего колонизация протекает бессимптомно, однако в ряде случаев может развиваться местная или системная инфекция. Кроме того, носительство пневмококка служит важным источником распространения патогена в популяции. С учётом того, что в детских сообществах наблюдается наиболее высокая частота носительства, именно эта возрастная группа является основным резервуаром и источником диссеминации пневмококков. В связи с этим часть стратегии предотвращения пневмококковых инфекций нацелена на профилактику носительства, особенно у детей [2; 3]. В настоящее время известно более 90 серотипов *Streptococcus pneumoniae*. Широкое использование пневмококковых конъюгированных вакцин (ПКВ) для профилактики пневмококковых инфекций оказало существенное влияние на сероэпиде-

миологию пневмококка в тех странах, где они включены в национальные календари иммунизации, в том числе и в Российской Федерации [4]. Эти вакцины содержат капсульные полисахариды (от 7 до 13), в ответ на которые вырабатываются серотипоспецифические антитела. ПКВ показали свою высокую эффективность, резко снизив циркуляцию вакцинных пневмококков как среди пациентов с инвазивными инфекциями, так и у носителей [7; 8]. Поэтому изучение серотипового пейзажа и влияния вакцинации, а также других факторов (антибиотикотерапии) на эволюцию пневмококков приобретает на современном этапе особую актуальность.

Целью настоящего исследования явилась оценка серотипового спектра *S. pneumoniae*, определение их антибиотикорезистентности и перекрытия ПКВ-7/13 у детей из организованных коллективов города Иркутска.

Материалы и методы

Всего обследовано 280 детей в возрасте от 2 до 5 лет, посещающих детские учреждения (сады) г. Иркутска. Все дети относились ко второй и третьей группам здоровья и не были привиты ПКВ. Материал забирали тампоном СОРАН 482СЕ (Германия) с задней стенки носоглотки, транспортировали в среде обогащения и засеивали на чашки Петри с 5–10 %-ным кровяно-сывороточным агаром. Посевы инкубировали при 37 °С в течении 24 ч. Идентификацию пневмококка проводили на основании морфологических, тинкториальных и культуральных свойств, а также с помощью теста с оптохином и по литическому действию желчи. Чувствительность к антибиотикам оценивали традиционным диско-диффузионным методом, при котором по значению зон ингибции роста исследуемые культуры были отнесены к трём категориям: «чувствительный», «промежуточный» и «устойчивый».

Молекулярно-генетическое типирование осуществляли после получения чистой культуры возбудителя с помощью метода мультиплексной ПЦР с определением 39 серотипов, включая праймеры для локуса *cpsA*. Данный locus содержит серотип-специфические последовательности ДНК, на амплификации которых основана дифференцировка серотипов, способных формировать полисахаридную бактериальную капсулу [6].

Для амплификации фрагментов генов использовались праймеры для локуса *cpsA-f* (gca-gta-cag-cag-ttt-gtt-gga-ctg-acc) и *cpsA-r* (gaa-tat-ttt-cat-tat-cag-tcc-cag-tc) производства НПФ «Синтол» (Россия). Идентификацию продуктов ПЦР проводили в 2 %-ном агарозном геле с добавлением GelRed (Biotium).

Для молекулярного типирования были отобраны изоляты пневмококка, положительные по *cpsA*, с которыми была проведена серия мультиплексных ПЦР, состоявшая из десяти последовательных реакций (табл. 1).

Амплификацию фрагментов генома *S. pneumoniae* проводили в реакционной смеси, содержащей готовую смесь для амплификации 5*ScreenMix-HS и по 10 нмоль каждого праймера в объёме 25 мкл. Реакцию проводили в многоканальном амплификаторе «Терцик» (ДНК-Технология, Россия) по универсальному профилю амплификации, адаптированному для максимального выхода ПЦР-продукта всех исследуемых

локусов генома: 94 °С – 3 мин, 35 циклов: 94 °С – 15 с, 56 °С – 10 с, 72 °С – 15 с, 72 °С – 10 мин, 22 °С – хранение.

Таблица 1

Серотипы *S. pneumoniae*, определяемые в ходе мультиплексных ПЦР

№ реакции	Определяемые серотипы
1	23F, 6A/B/C, 19A
2	14, 19F, 15A/F, 23A
3	3, 9V/A, 18 A/B/C/F, 35A/C/42
4	1,4, 9L/N, 10A
5	5, 7F/A/, 11 A/D, 13
6	2, 12F/A/44/46, 17F, 20
7	8, 15B/C, 22A/F, 33 F/A/37
8	16F, 21, 35B, 38/25F/A
9	7C/B/40, 24A/B/F, 31, 34
10	10F/C/33C, 23B, 35F/47F, 39F

Результаты и обсуждение

Из 280 обследованных детей 37,5 % составили девочки и 62,5 % мальчики. На основании микробиологических исследований был установлен уровень носительства *S. pneumoniae* среди детей, который составил 17,1 % (48 детей). Среди носителей *S. pneumoniae* в результате проведённых молекулярно-генетических исследований в 52,1 % случаев были выделены и взяты на серотипирование штаммы, положительные по *cpsA*-локусу.

В общей сложности среди носителей было выявлено девять различных серотипов, из которых преобладали 6A/B/C (40,0 %) и 19F (12,0 %). «Невакцинные» штаммы составили 20 %, среди которых изоляты серогруппы 15B/C составили 12,0 % и 10A – 8,0 % от общего числа штаммов. Остальные серотипы (14; 18A/B/C/F3; 23F; 9V/A) встречались редко, доля каждого составляла от 4,0 % до 8,0 % от общего числа. Среди всех выявленных нами серотипов 76,0 % вошли в состав 7-валентной и 80,0 % в состав 13-валентной пневмококковой конъюгированной вакцины.

Анализ возрастных особенностей серотипового спектра показал, что распространённость невакцинных штаммов была выше среди детей в возрасте 4 лет по сравнению с группой 2–3 лет (40,0 % против 14,3 %, $t = -118,7$; $p < 0,05$). Штаммы пневмококка с редкими серотипами, входящими в состав вакцин ПКВ 7/13, доля которых составляла $< 8,0$ % в общем распределении, суммарно чаще встречались у детей в возрасте 2–3 лет (48,9 % против 22,2 %, $t = 136,9$; $p < 0,05$).

В группе носителей значительную часть составили штаммы *S. pneumoniae*, нечувствительные к ко-триметоприму (41,7±1,2 %) и пенициллину (35,4±1,17 %). Необходимо отметить снижение чувствительности штаммов пневмококка к эритромицину (14,6±1,2 %), цефатоксиму и тетрациклину (12,5±1,8 %).

Среди выделенных штаммов, отрицательных по *CpsA*-локусу, доля резистентных к одному и более антибиотикам составила 39,1 %, тогда как среди *CpsA*-положительных штаммов данный показатель был выше и составил 65,2 % ($t = -2,47$; $p = 0,022$).

При определении чувствительности к бета-лактамам (пенициллину) среди капсульных форм пневмококка было выявлено 47,8 % резистентных штаммов. Полирезистентностью, т. е. устойчивостью к трём и более классам антибиотиков, в данной группе обладали 34,8 % штаммов. Полирезистентность была свойственна определённому числу пневмококковых серотипов. Так, наиболее устойчивые к антибиотикам пневмококки выявлялись среди штаммов 19F (66,7 %) и 6A/B/C (37,5 %). Также к группе высокой резистентности относились серотипы 14 и 9V/A. Нужно отметить, что все они относятся к вакцинным штаммам и поэтому широкое применение ПКВ приведёт к резкому снижению их циркуляции среди носителей. Чувствительностью ко всем исследуемым антибиотикам обладали штаммы серотипа 18A/B/C/F (вакцинные) и 10A (не вакцинные).

Полученные данные о циркулирующих среди детей из организованных коллективов города Иркутска серотипов пневмококка имеют огромное значение в связи с начавшейся после включения в 2014 г. ПКВ в календарь профилактических прививок вакцинацией, так как позволяют оценить спектр циркулирующих на данной территории серотипов и их перекрытие существующими вакцинами. Однако нельзя не учитывать избирательное действие вакцин, которое даёт преимущество тем капсульным формам, которые не входят в её состав. В этих условиях количество данных штаммов может увеличиваться и играть важную роль в структуре серотипов.

Учитывая полученные нами данные, можно говорить о распространении в Иркутске *S. pneumoniae* среди практически здоровых детей в возрасте до 5 лет. Особую тревогу вызывает повышение частоты встречаемости капсульных серотипов, отличающихся устойчивостью к антибиотикам, а именно к пенициллину и ко-триметоприму, которые используются в педиатрической практике. Однако нужно отметить преобладание резистентных штаммов среди капсульных форм, входящих в состав ПКВ.

Таким образом, полученные нами данные демонстрируют необходимость проведения постоянного мониторинга за спектром и распространённостью штаммов пневмококков и определения генетической принадлежности возбудителя с целью совершенствования эпидемиологического надзора за данной инфекцией на исследуемой территории.

Список литературы

1. Баранов А. А. Пневмококковая инфекция и связанные с ней заболевания – серьезная проблема современного здравоохранения / А. А. Баранов, Л. С. Намазова, В. К. Таточенко // Педиатр. фармакология. – 2008. – Т. 5, № 1. – С. 7–12.
2. Пневмококковая инфекция и современные возможности ее профилактики - эпидемиологический обзор ситуации в мире и в России / С. В. Сидоренко [и др.] // Вопр. современной педиатрии. – 2010. – Т. 9, №1. – С. 62–69.

3. Райнерт Р. Р. Новые данные по эффективности 13-валентной пневмококковой конъюгированной вакцины в отношении инвазивных пневмококковых инфекций, пневмоний, острого среднего отита и назофарингеального носительства / Р. Р. Райнерт, Б. Тайши // Педиатр. фармакология. – 2012. – Т 9. № 3. – С. 12–18.
4. Результаты оценки эффективности и безопасности применения конъюгированных пневмококковых вакцин в Российской Федерации / С. В. Ильина [и др.] // Эпидемиология и инфекц. болезни. Актуальные вопросы. – 2013. – № 6. – С. 55–59.
5. Global burden of childhood pneumonia and diarrhea / C. L. Walker [et al.] // The Lancet. – 2013. – Vol. 381, N 9875. – P. 1405–1416.
6. Pai R. Sequential multiplex PCR approach for determining capsular serotypes of streptococcus pneumoniae isolates / R. Pai, R. E. Gertz, B. Beall // J. of Clinical Microbiology. – 2006. – Vol. 44 (1). – P. 124–131.
7. Pneumococcal Serotypes before and after Introduction of Conjugate Vaccines, United States, 1999–2011 / S. S. Richter [et al.] // Emerg Infect Dis. – 2013. – Vol. 19, N 7. – P. 1074–1083.
8. Serotype prevalence and antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates among global populations / M. Hackel [et al.] // Vaccine. – 2013. – Vol. 31, N 42. – P. 4881–4887.
9. The fundamental link between pneumococcal carriage and disease / B. Simell [et al.] // Expert Review of Vaccines. – 2012. – Vol. 11, N 7. – P. 841–855.

Serological Variety of *Streptococcus pneumoniae* Strains among Children in the Organized Groups in the City of Irkutsk

L. A. Stepanenko¹, S. V. Ilyina¹, O. I. Bobrova¹, Yu. P. Dzhioev^{1,2},
O. V. Kolbaseeva¹, V. I. Zlobin¹

¹Irkutsk State Medical University, Irkutsk

²Scientific Centre of the Family Health and Human Reproduction Problems SB RAMS, Irkutsk

Abstract. The article presents the results of a survey of children aged 2 to 5 years in the day nurseries of the city of Irkutsk. The *Streptococcus pneumoniae* carrier rate among them was 17,1 %. Nine different serotypes were detected among these carriers with prevailed serotypes 6 A/B/C (40,0 %) and 19 F (12,0 %). The strains not included in the vaccine used were 20 %. It is shown that the pneumococcal conjugate vaccine PCV-7/13 covers from 76 % to 80,0 % of all identified serotypes. The proportion of resistant strains prevailed among the capsule forms which forms a part of PCV.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*, PCR, serotyping, vaccination, pneumococcal conjugate vaccine (PCV).

Степаненко Лилия Александровна
кандидат медицинских наук
старший научный сотрудник
Иркутский государственный

Stepanenko Lilia Aleksandrovna
Candidate of Sciences (Medicine)
Senior Research Scientist
Irkutsk State Medical University

медицинский университет
664003, г. Иркутск, ул. Красного
восстания, 1
тел.: (3952) 24–29–86
e-mail: steplia@mail.ru

1, Krasnogo Vosstania st., Irkutsk, 664003
tel.: (3952) 24–29–86
e-mail: steplia@mail.ru

Ильина Светлана Владимировна
доктор медицинских наук
заведующий кафедрой
Иркутский государственный
медицинский университет
664003, г. Иркутск, ул. Красного
восстания, 1
тел.: 8 (3952) 24–36–09
e-mail: dr_ilina@yahoo.com

Ilyina Svetlana Vladimirovna
Doctor of Sciences (Medicine)
Head of Chair
Irkutsk State Medical University
1, Krasnogo Vosstania st., Irkutsk, 664003
tel.: (3952) 24–36–09
e-mail: dr_ilina@yahoo.com

Боброва Олеся Ивановна
аспирант
Иркутский государственный
медицинский университет
664003, г. Иркутск, ул. Красного
восстания, 1
тел.: (3952) 24–12–94

Bobrova Olesya Ivanovna
Post graduate
Irkutsk State Medical University
1, Krasnogo Vosstania st., Irkutsk, 664003
tel.: (3952) 24–12–94

Джиоев Юрий Павлович
кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник
Научный центр проблем здоровья семьи
и репродукции человека СО РАМН
664025, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 3
ведущий научный сотрудник,
НИИ биомедицинских технологий
Иркутский государственный
медицинский университет
664003, г. Иркутск, ул. Красного
восстания, 1
тел.: (3952) 33–39–52
e-mail: alanir07@mail.ru

Dzhioev Yuri Pavlovich
Candidate of Sciences (Biology)
Senior Research Scientist
Scientific Centre of the Family Health and
Human Reproduction Problems SB RAMS
3, K. Marx st., Irkutsk, 664025
Leading Research Scientist,
Institute of Biomedical Technology
Irkutsk State Medical University
1, Krasnogo Vosstania st., Irkutsk, 664003
tel.: (3952) 33–39–51,
e-mail: alanir07@mail.ru

Колбасеева Ольга Владимировна
кандидат биологических наук
старший научный сотрудник
Иркутский государственный
медицинский университет
664003, г. Иркутск, ул. Красного
восстания, 1
тел.: 8 (3952) 24–29–86

Kolbaseeva Ol'ga Vladimirovna
Candidate of Sciences (Biology)
Senior Research Scientist
Irkutsk State Medical University
1, Krasnogo Vosstania st., Irkutsk, 664003
tel.: 8 (3952) 24–29–86

Злобин Владимир Игоревич
доктор медицинских наук, профессор,
академик РАН
директор НИИ Биомедицинских
технологий
Иркутский государственный медицин-
ский университет
664003, г. Иркутск, ул. Красного
восстания, 1
тел.: 8 (3952) 24–30–16
e-mail: vizlobin@mail.ru

Zlobin Vladimir Igorevich
Doctor of Sciences (Medicine)
Professor, Academician of RAS,
Director of Institute
Irkutsk State Medical University
1, Krasnogo Vosstania st., Irkutsk, 664003
tel.: (3952) 24–30–16,
e-mail: vizlobin@mail.ru