

УДК: 616.24-002

DOI: 10.12737/5902

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ МОЛЕКУЛЯРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА ШТАММОВ STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE, ВЫДЕЛЕННЫХ У ПАЦИЕНТОВ ПОЖИЛОГО ВОЗРАСТА С ВНЕБОЛЬНИЧНЫМИ ПНЕВМОНИЯМИ

А.В. МАРТЫНОВА*, Л.А. БАЛАБАНОВА**, О.А. ЧУЛАКОВА*, А.А. ШЕПАРЕВ*

*Тихоокеанский государственный медицинский университет, пр-т Острякова, д.2, Владивосток, Россия, 690002

**Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова, пр-т 100 лет Владивостоку, 159, Квладивосток, Россия, 690022

Аннотация. Внебольничные пневмонии у лиц пожилого возраста являются значимой эпидемиологической проблемой для здравоохранения практически всех стран. Особенно актуальна проблема микробиологического мониторинга и эпидемиологического надзора за штаммами *S.pneumoniae*, как одного из убиквитарных возбудителей, вызывающих внебольничные пневмонии и другие инфекции дыхательных путей различной степени тяжести, что определяется их различной эпидемиологической значимостью.

Мультилокусное сиквенстипирование является перспективным методом молекулярно-эпидемиологического мониторинга, позволяющего идентифицировать эпидемически опасные клоны такого убиквитарного возбудителя как *S.pneumoniae*. Целью исследования являлось проведение мультилокусного сиквенстипирования штаммов пневмококка, выделенных у пациентов с внебольничными пневмониями, бронхитами и у носителей пожилого возраста. Материалы и методы: в исследование были взяты 14 штаммов, выделенных у пациентов с внебольничными пневмониями (из них – 7 полирезистентных), 8 штаммов – от пациентов с хронической обструктивной болезнью легких, 4 штаммов – от носителей. Мультилокусное сиквенстипирование было проведено согласно методике М.С. Enright and В. G. Spratt (1998). Результаты: все штаммы, выделенные во всех трех популяциях, представляют собой родственные изоляты вида *Streptococcus pneumoniae*, большинство из которых (18 из 26) обладают уникальным генотипом, определяющим наличие одного сиквенс-типа для каждого штамма. Из 14 штаммов, выделенных у лиц пожилого возраста с внебольничной пневмонией, 6 относились к профилю Taiwan 19F-14. Среди штаммов, выделенных от носителей, превалировала штамм, идентичный штамму R6. Среди штаммов, выделенных от пациентов с хронической обструктивной болезнью, превалирования какого-либо генотипа выявлено не было. Заключение: мультилокусное сиквенстипирование позволяет идентифицировать новые генотипы и дать прогноз относительно появления эпидемически опасных штаммов с новыми свойствами.

Ключевые слова: мультилокусное сиквенстипирование, пневмококковые пневмонии, внебольничные пневмонии, *S.pneumoniae*.

MOLECULAR-EPIDEMIOLOGICAL MONITORING OF STRAINS OF STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE ISOLATED FROM ELDERLY PATIENTS WITH COMMUNITY-ACQUIRED PNEUMONIA

A.V. MARTYNOVA, L.A. BALABANOVA, O.A. CHULAKOVA, A.A. SHEPARYOV

*Pacific state medical University, avenue Ostryakova, 2, Vladivostok, Russia, 690002

**Pacific G.B. Elyakova Institute of bioorganic chemistry, Ave 100 years, Vladivostok, 159, Kvladivostok, Russia, 690022

Abstract. Community-acquired pneumonias in the elderly patients are the significant epidemiological problem for the public health of almost all countries. Especially urgent is the problem of microbiological and epidemiological monitoring for the *S.pneumoniae* strains as one of the ubiquitous pathogens, causing the community-acquired pneumonias and the other respiratory tract infections of various severities, what is determined by their different epidemiological significance.

Multiloci sequesterant is a promising method of molecular-epidemiological monitoring, identifying epidemically dangerous clones such ubiquitaria of the pathogen as *S.pneumoniae*.

The purpose of this research was to carry out the multilocus sequence typing of strains of pneumococcus isolated in the elderly patients with community-acquired pneumonias, bronchitis. Materials and methods were 14 strains of *S.pneumoniae*, isolated in patients with community-acquired pneumonias (7 of them – multiresistant), 8 strains were isolated from the patients with the chronic pulmonary obstructive diseases and 4 strains – from carriers of activators. Multilocus sequence typing was carried out according to method of М.С. Enright and В. G. Spratt (1998). Results: all strains, isolated in all populations were the related isolates of the species *Streptococcus pneumoniae*, the most of them (18 of 26) have a unique genotype, determining the presence of one sequence-type for each strain. From 14 strains, isolated from the elderly with community-acquired pneumonia, 6 were related to the profile Taiwan 19F-14. Among strains isolated from the patients with COPD, the prevalence of any genotype wasn't identified. Conclusion: multilocus sequence typing allows to identify the new genotypes and to predict the appearing of epidemiologically dangerous strains with new proprieties.

Key words: multilocus sequence typing, pneumococcal pneumonia, community-acquired pneumonia, *S.pneumoniae*.

Внебольничные пневмонии являются актуальнейшей проблемой современной медицины. Особенно важна эта проблема среди лиц пожилого возраста [1-3]. Распространенность внебольничных пневмоний среди лиц пожилого и старческого возраста в Москве составляет 17,4%/00, а в США – 20-40%/00. По данным американских и европейских врачей, у пожилых людей заболеваемость внебольничной пневмонией

в 2 раза выше, чем у лиц молодого возраста; частота госпитализаций при этом заболевании с возрастом увеличивается более чем в 10 раз. Летальность при пневмонии среди больных старше 60 лет в 10 раз выше, чем в других возрастных группах, и достигает 10-15% при пневмококковых пневмониях [4]. Учитывая тот факт, что *S.pneumoniae* является одним из основных возбудителей внебольничных пневмоний в дру-

гих возрастных группах, а носительство этого возбудителя чрезвычайно распространено, значимость эпидемиологических исследований в отношении именно пневмококковых пневмоний у лиц пожилого возраста представляется более, чем актуальной [5-7].

Основными проблемами, наиболее значимыми в практическом здравоохранении и требующими практической доработки, в отношении пневмококковых пневмоний у пожилых лиц являются организация контроля за распространением антибиотикорезистентных изолятов, а также молекулярно-эпидемиологический мониторинг выделяемых изолятов, основанный на генотипировании, так как именно он позволит получить стандартизованную информацию о распространении того или иного изолята, что позволит сравнивать полученную информацию о характере выявляемых штаммов *S.pneumoniae*, и соответственно, планировать профилактические мероприятия в отношении пневмококковой инфекции.

Одним из методов, предназначенных для молекулярно-эпидемиологического мониторинга, является мультилокусное сиквенстипирование, которое будучи более дискриминирующим методом по сути (так как основано на исследовании варибельности фрагментов (по 500 кб) 7 пар аллельных генов пневмококка), позволяет создать фактически индивидуальный аллельный профиль каждого штамма, и в том числе охарактеризовать эпидемическую значимость штаммов пневмококка, значимых в развитии внебольничной пневмонии [8].

Цель исследования – оценить при помощи метода мультилокусного сиквенстипирования распространение эпидемически значимых штаммов *Streptococcus pneumoniae* у пациентов пожилого возраста с внебольничной пневмонией и определить доминирующий генотип.

Материалы и методы исследования. Учитывая тот факт, что одной из наиболее значимых эпидемических характеристик является устойчивость к антибактериальным химиопрепаратам, и, в том числе, полирезистентность, то в исследование нами были взяты полирезистентные и в равном им количестве взятые штаммы пневмококка, выделенные от пациентов пожилого возраста с внебольничными пневмониями (1 группа, n=14, из которых 7 штаммов были полирезистентными и 7 штаммов чувствительными к антибиотикам). В качестве контроля мы взяли полирезистентные штаммы, выделенные от пациентов с хронической обструктивной болезнью легких (n=8, поровну чувствительных и полирезистентных) и от носителей (n=4). Под полирезистентностью понимали устойчивость штаммов пневмококка к пенициллину и эритромицину.

Мультилокусное сиквенстипирование было проведено согласно методике М.С. Enright and В. G. Spratt (1998). Праймеры, использованные в исследовании, могут быть представлены следующим образом:

ddl-up, 5' TGCC/TCAAGTTCCTTATGTGG, и *ddl-dn*, 5' CACTGGGTG/AAAACCA/TGGCAT;
gdh-up, 5' ATGGACAAACCAGCNAGC/ TTT, и *gdh-dn*, 5' GCTTGAGGTCCCATG/ACTNCC;
gki-up, 5' GGCATTGGAATGGGATCACC, и *gki-dn*, 5' TCTCCCGCAGCTGACAC;
recP-up, 5' GCCAACTCAGGTCATCCAGG, и *recP-dn*, 5' TGCAACCGTAGCATTTGTAAC;
spi-up, 5' TTATTCCTCCTGATTCTGTC, и *spi-dn*, 5' GTGATTGGCCAGAAGCGGAA;
xpt-up, 5' TTATTAGAAGAGCGCATCCT, и *xpt-dn*, 5' AGATCTGCCTCCTTAAATAC.

Результаты и их обсуждение. Для изучения возможности формирования госпитального полирезистентного штамма *S.pneumoniae*, имеющего происхождением единый клон, мы провели мультилокусное сиквенстипирование популяций штаммов пневмококка, выделенных в различных биотопах и обладающих различной антибактериальной резистентностью, мы сравнили популяции полирезистентных и в равном количестве взятых изолятов, выделенных при внебольничных пневмониях (всего 14 штаммов: 7 штаммов, устойчивых к пенициллину и эритромицину, а также 7 штаммов, чувствительных к антибактериальным химиопрепаратам), штаммов, выделенных у пациентов с хроническим обструктивным бронхитом (всего 8 штаммов: 4 штамма, устойчивых к пенициллину и эритромицину и 4 штамма, чувствительных к антибактериальным химиопрепаратам), штаммов, выделенных у носителей (2 штамма, чувствительных к антибактериальным химиопрепаратам и 2 штамма, нечувствительных к антибактериальным химиопрепаратам). Всего в исследование нами было взято 26 штаммов.

Таким образом, при анализе изучаемой нами популяции микроорганизмов, возбудителей пневмококковых инфекций, выделенных от больных 1-й группы (штаммы, выделенные от пациентов с внебольничными пневмониями), 2-й группы (штаммы, выделенные от пациентов с хроническим обструктивным бронхитом) и 3-й группы (штаммы, выделенные от носителей) – методом мультилокусного сиквенс-типирования было выявлено, что все штаммы, выделенные во всех трех популяциях, представляют собой родственные изоляты вида *Streptococcus pneumoniae*, большинство из которых (18 из 26) обладают уникальным генотипом, определяющим наличие одного сиквенс-типа для каждого штамма.

При этом, можно выделить 6 кластерных групп, которые содержат штаммы, выделенные от разных больных, обладающие различными молекулярно-эпидемиологическими характеристиками (серотип, устойчивость к антибактериальным химиопрепаратам), и, которые являлись генетически близкородственными.

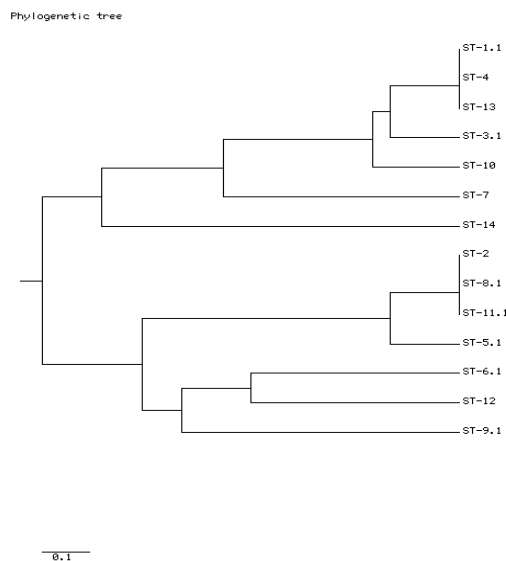


Рис. 1. Результаты мультилокусного сиквенстипирования (MLST) штаммов *S.pneumoniae*, выделенных у пациентов с внебольничной пневмонией (нумерация штаммов «.1» – полирезистентные штаммы, без расширения «.1» – чувствительные к антибиотикам штаммы), всего 14 штаммов

Исходя из результатов, представленных на рис. 1,

можно сделать вывод, что полирезистентные штаммы формируются при внебольничных пневмониях путем горизонтального переноса генетического материала: это подтверждается наличием двух клональных комплексов, в одном из которых присутствует один полирезистентный штамм (клональный комплекс, содержащий ST-1.1, ST-4, ST-13), а в другом – два (ST-2, ST-8.1, ST-11.1). Все это показывает возможность формирования полирезистентности у штаммов пневмококка, выделенных у пациентов с внебольничной пневмонией.

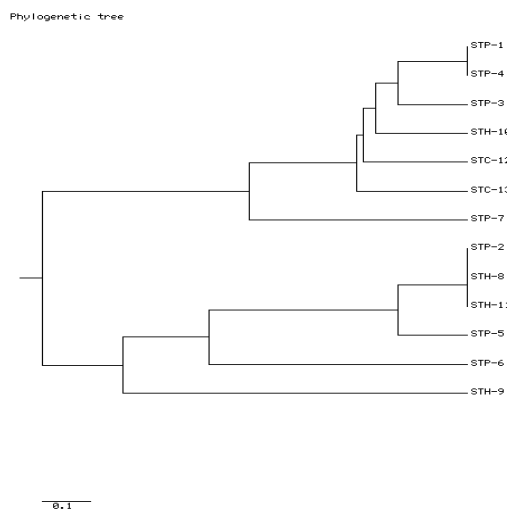


Рис. 2. Результаты мультилокусного секвенирования полирезистентных штаммов пневмококка, выделенных в 1, 2 и 3 группах (всего 13 штаммов)

Таблица

Молекулярно-эпидемиологическая характеристика полирезистентных к антибиотикам штаммов *S.pneumoniae*

Серотип	Результаты MLST								Резистентность	
	aroE	gdh	gki	recP	spi	xpt	ddl	MLST тип	пен	эрит
Штаммы, выделенные в 1 группе (n=14, внебольничная пневмония)										
19F	7	11	10	1	6	8	14	162	ч	у
19F	1	5	4	12	5	3	8	423	ч	у
	7	11	10	1	6	8	14	158	уу	у
19F	4	4	2	4	4	1	1	81	ч	у
23F	7	5	1	1	13	31	14	440	ч	у
14	1	5	4	5	5	1	8	9	ч	уу
н/г	1	5	4	5	5	1	8	9	у	уу
14	7	5	1	8	14	11	14	124	у	уу
18C	7	2	1	1	10	1	21	113	у	уу
6A	2	7	4	10	10	1	27	176	у	уу
15B	8	13	14	4	17	4	14	95	уу	уу
15C	8	13	14	4	17	4	14	201	у	уу
9V	7	11	10	1	6	8	14	158	уу	у
Штаммы, выделенные в 2 группе (n=8, ХОБЛ)										
9V	7	11	10	1	6	8	14	162	уу	уу
3	7	15	2	10	6	1	22	180	уу	уу
19F	1	8	9	1	6	4	6	311	уу	у
6A	2	7	4	10	10	1	27	65	у	у
19F	1	8	4	1	1	4	6	36	у	уу
23F	1	8	9	1	6	4	6	311	уу	уу
18C	7	2	1	1	10	1	21	113	у	у
23F	7	13	8	1	10	6	37	272	уу	уу
Штаммы от носителей (n=4)ч										
19F	1	8	10	4	9	1	3	341	ч	уу
19A	2	14	11	2	6	17	22	785	ч	уу
6B	8	37	9	29	2	12	53	344	уу	уу
6A	2	13	9	1	6	19	14	490	уу	уу

Примечание: уу – умеренно-устойчивые штаммы, у – устойчивые штаммы, ч – чувствительные штаммы

Анализ распространения близкородственных в генетическом отношении штаммов показывает, что из 4-х по-

лирезистентных выделенных нами изолятов пневмококка у носителей, 2 являются представителями единого клонального комплекса, что позволяет говорить о том, что и у носителей, в обычных условиях протекают процессы внутривидовой перестройки штаммов, что может привести к формированию госпитального изолята, и, что, соответственно, требует профилактических мероприятий.

Сопоставив результаты мультилокусного секвенирования всех полирезистентных штаммов (рис. 2), мы пришли к выводу, что наиболее высока вероятность к осуществлению событий горизонтального переноса в полирезистентных штаммах, выделяющихся у лиц пожилого возраста с хроническим обструктивным бронхитом, а также в штаммах, выделенных у пациентов с внебольничной пневмонией (табл.).

Таким образом, анализ генетического разнообразия штаммов *Streptococcus pneumoniae* показал, что среди изученных нами 26 чувствительных и нечувствительных (т.е. умеренно-устойчивых и устойчивых) к пенициллину и эритромицину штаммов было выделено 22 различных сиквенстипа и 4 клональных комплекса. При этом, 2 комплекса были представлены более, чем одним изолятом.

Необходимо отметить, что из 14 штаммов, выделенных у лиц пожилого возраста с внебольничной пневмонией, 6 относились к профилю *Taiwan 19F-14*, из них 4 обладали одинаковым профилем резистентности: были устойчивыми/промежуточными к пенициллину, эритромицину, тетрациклину и клиндамицину. Генотипические характеристики проанализированных штаммов также показали высокую степень однородности выборки: все изоляты имели детерминанты резистентности к макролидным антибиотикам – гены *mefE* и *ermB* (что согласуется с фенотипическими данными). Основной характеристикой штаммов *S.pneumoniae* генотипа *Taiwan 19F-14* является то, что независимо от географической области выделения, эти микроорганизмы являются полирезистентными прежде всего по отношению к бета-лактамам и макролидам. Данный сиквенстип распространен в основном в Южной Корее, Вьетнаме и Гонконге.

Среди штаммов, вызвавших у лиц пожилого возраста ХОБЛ, методом мультилокусного секвенирования было идентифицировано 2 различных сиквенс типа, при этом каждый из них был представлен 5 и 3 изолятами.

Несмотря на небольшую выборку, штаммы, выделенные от носителей, оказались фенотипически неоднородными: 2 штамма были умеренно-устойчивы к пенициллину и 2 штамма чувствительны. При этом, все 4 штамма были нечувствительными к эритромицину. Оба умеренно-устойчивых штамма принадлежали к сиквенстипу, идентичному штамму R6, который является авирулентным штаммом, и может рассматриваться как условно-патогенная микрофлора.

Выводы. Таким образом, MLST в настоящее время рассматривается как наиболее точный метод дифференцировки стрептококков и идентификации *S. pneumoniae* [8] и один из важнейших инструментов микробиологического мониторинга штаммов этого микроорганизма, что позволяет провести типирование и дать прогноз относительно появления штаммов с новыми свойствами, которые в перспективе могут стать госпитальными изолятами и потребовать совершенно новых мероприятий в отношении эпидемиологического надзора.

Литература

References

1. Бачинская Е.Н. Возбудители внебольничных пневмоний на пороге нового тысячелетия // Антибиотики и химиотерапия. 2000. 45. С. 21–28.
2. Богданов М.Б., Черненко Т.В. Микробиологическая оценка антибактериальных препаратов, используемых для эмпирической терапии внебольничных инфекций нижних дыхательных путей // Антибиотики и химиотерапия. 2000. 10. С. 15–19.
3. Жильцов И.В., Семёнов В.М. Бета-лактамазная активность мокроты и ее влияние на эффективность антибактериальной терапии // Туберкулез и болезни легких. 2012. №4. С. 18–26.
4. Новиков Ю.К. Диагностика и лечение внебольничных пневмоний // РМЖ. 2001. №1. С. 11–16.
5. Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений. Приказ МЗ СССР № 535 от 22 апреля 1985 г.
6. Семенов В.М., Дмитраченко Т.И., Жильцов И.В. Микробиологические аспекты резистентности к антимикробным препаратам // Туберкулез и болезни легких. 2012. №4. С. 18–26.
7. Синопальников А.И., Страчунский Л.С. Новые рекомендации по ведению взрослых пациентов с внебольничной пневмонией // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2001. №1. С. 18–21.
8. Enright M.C., Spratt B.G. A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae* identification of clones association with serious invasive disease // Microbiology. 1998. 144. P. 5049–5060.

1. Bachinskaya EN. Vozbuditeli vnebol'nichnykh pnevmoniy na poroge novogo tysyacheletiya. Antibiotiki i khimioterapiya.2000;45:21-8. Russian.
2. Bogdanov MB, Chernen'kaya TV. Mikrobiologicheskaya otsenka antibakterial'nykh preparatov, ispol'zuemykh dlya empiricheskoy terapii vnebol'nichnykh infektsiy nizhnikh dykhatel'nykh putey Antibiotiki i khimioterapiya.2000;10:15-9. Russian.
3. Zhil'tsov IV, Semenov VM. Beta-laktamaznaya aktivnost' mokroty i ee vliyanie na effektivnost' antibakterial'noy terapii. Tuberkulez i bolezni legkikh. 2012;4:18-26. Russian.
4. Novikov YuK. Diagnostika i lechenie vnebol'nichnykh pnevmoniy. RMZh.2001;1:11-6. Russian.
5. Ob unifikatsii mikrobiologicheskikh (bakteriologicheskikh) metodov issledovaniya, primenyaemykh v kliniko-diagnosticheskikh laboratoriyakh lechenno-profilakticheskikh uchrezhdeniy. Prikaz MZ SSSR № 535 ot 22 aprelya 1985 g. Russian.
6. Semenov VM, Dmitrachenko TI, Zhil'tsov IV. Mikrobiologicheskie aspekty rezistentnosti k antimikrobnym preparatam. Tuberkulez i bolezni legkikh. 2012;4:18-26. Russian.
7. Sinopal'nikov AI, Strachunskiy LS. Novye rekomendatsii po vedeniyu vzroslykh patsientov s vnebol'nichnoy pnevmoniey. Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya. 2001;1:18-21. Russian.
8. Enright MC, Spratt BG. A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae* identification of clones association with serious invasive disease. Microbiology. 1998;144:5049-60. Russian.

УДК: 617.559-053

DOI: 10.12737/5903

СПОНДИЛОЛИЗ И СПОНДИЛОЛИЗНЫЙ СПОНДИЛОЛИТЕЗ LV ПОЗВОНКА У ДЕТЕЙ ДОШКОЛЬНОГО И МЛАДШЕГО ШКОЛЬНОГО ВОЗРАСТА

Е.Г. СКРЯБИН

ГБОУ ВПО «Тюменская государственная медицинская академия» Минздрава РФ, ул. Одесская, 54, г. Тюмень, Россия, 625023, тел.: (3452) 20-21-97; e-mail: tigma@tymsma.ru

Аннотация. Изучены характер и частота основных клинических симптомов спондилолиза и спондилолизного спондилолистеза LV позвонка у 8 детей дошкольного и младшего школьного возраста. Показано, что в этом возрасте у детей отсутствуют общеизвестные симптомы спондилолиза и спондилолистеза. Установлено, что в 83,3% случаев спондилолистез у детей формируется на фоне двустороннего спондилолиза межсуставной части дуги LV позвонка. Патология, как правило, носит первую степень тяжести. Во всех клинических наблюдениях спондилолистез у детей формировался на фоне spina bifida posterior LV и SI позвонков. Основными симптомами спондилолиза и спондилолистеза LV позвонка исследуемых детей были: болезненность позвоночника при пальпации – 100,0% случаев; разнонаправленные функциональные блоки в межпозвонковых и реберно-поперечных суставах – 100,0%; асимметрия парных мягкотканых и костных образований передней и задней поверхностей туловища – 85,7%; отстояние нижних углов лопаток от задней поверхности грудной клетки – 85,7%; постуральный дисбаланс мышц передней и задней поверхностей туловища – 71,4%; напряжение мышц разгибателей поясничного отдела позвоночника – 71,4%; ограничение функции позвоночника в направлении активного сгибания – 57,1%; рекурвации в локтевых и коленных суставах – 57,1%; плоско-вальгусные стопы – 57,1%; слаженность поясничного лордоза – 42,8%; установочная кривошея – 42,8%; асимметричное выстояние правой половины грудной клетки при наклоне корпуса вперед – 28,6%; укорочение левой нижней конечности – 28,6% клинических наблюдений.

Ключевые слова: дети младшего возраста, спондилолиз, спондилолистез, LV позвонок.