

Филимонова Ольга Юрьевна

Распространение и молекулярные механизмы резистентности к макролидным
антибактериальным препаратам микроорганизмов рода *Streptococcus* в
Российской Федерации

03.02.03 – Микробиология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва 2010 год

Работа выполнена в государственном образовательном учреждении дополнительного профессионального образования «Российская Медицинская Академия Последипломного Образования»

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор
Сидоренко Сергей Владимирович

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, профессор
Белокрысенко Сергей Сергеевич

доктор медицинских наук, профессор
Мазурова Изабелла Константиновна

Ведущая организация: **Военно-медицинская Академия
им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург**

Защита диссертации состоится " _ " _____ г.
в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.04.01 при
Федеральном Государственном учреждении науки «Московский научно-
исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им.
Г.Н.Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г.Москва,
ул.Адмирала Макарова, 10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУН «Московский
научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им.
Г.Н.Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека.

Автореферат разослан " _ " _____ 2010г.

Ученый секретарь диссертационного совета
Доктор медицинских наук

О.Ю.Борисова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы.

Респираторные инфекции занимают важное место среди инфекционных заболеваний человека.

Наиболее частыми возбудителями респираторных инфекций в амбулаторной практике являются *Streptococcus pneumoniae* и *Streptococcus pyogenes* (β -гемолитический стрептококк группы А) (Белошицкий Г.В., 2005; Белов Б.С., 2003; Зубков М.Н., 2005; Катосова Л.К., 2005; Королева И.С., 2003; Ноников В.Е., 2001; Манеров Ф.К., 1990; Сидоренко С.В., 2004; Черняев А.Л., 2002).

Макролиды, а также сходные с ними по механизму действия линкозамиды и стрептограмин, давно и с успехом применяются в амбулаторной практике при различных бактериальных инфекциях респираторного тракта. Данные препараты объединены в MLS антимикробную группу (М-макролид, L-линкозамид, S-стрептограмин). При этом появление в 80-е – 90-е годы прошлого века новых препаратов этой группы существенно расширило возможности их практического применения (Дворецкий Л.И., 2005; Заплатников А.Л., 2002; Козлов Р.С., 2001; Bergman M., 2006).

Однако, широкое, а в ряде случаев бесконтрольное и неоправданное использование макролидных антибиотиков при респираторных инфекциях, привело к появлению среди пневмотропных возбудителей устойчивых штаммов. Так, наиболее высокий удельный вес резистентных штаммов *S.pneumoniae* и *S.pyogenes* отмечен в тех странах, где макролидные антибиотики традиционно широко используются в клинической практике (Bergman M., 2004; Critchley I.A., 2007; Doern G.V., 2005; Fujita K., 1994; Gherardi G., 2007; Gracia, M., 2009; Guchev A., 2006; Kresken M, 2004).

К наиболее распространенным механизмам устойчивости стрептококков к макролидным антибиотикам относятся модификация мишени действия этих препаратов (метилирование участка связывания

антибиотиков, расположенного в V домене рРНК) и активное выведение лекарственного вещества из внутренней среды бактериальной клетки (эффлюкс). К редким механизмам устойчивости относятся мутации в генах рРНК и генах рибосомальных белков. Ферменты, осуществляющие метилирование рРНК, кодируются группой родственных генов (*erm*). У стрептококков чаще всего встречаются *erm(A)* и *erm(B)* гены, локализованные на хромосомах в составе транспозонов. Активное выведение макролидов осуществляется транспортными системами, представляющими собой крупные белки с 12-ю трансмембранными доменами. Указанные белки кодируются группой близкородственных генов (*mef*), которые локализуются на различных генетических элементах и опосредуют несколько различные уровни резистентности. В последние годы замечено возрастание количества вариантов *mef* генов (Betschel S.D., 1998; Blackman Northwood J., 2009; Cochetti I., 2005; Corne H.W. Klaassen, 2005; Del Grosso M., 2004; Farrell DJ, 2005).

В связи с вышеизложенным, наблюдение за динамикой распространения устойчивости к макролидам среди стрептококков и расшифровка ее механизмов является необходимым условием обоснования рационального применения этих антибиотиков. Учитывая особенности быстрого распространения резистентности среди стрептококков посредством эффлюкса, представляется актуальным более углубленное исследование *mef*-генов.

Цель исследования.

Оценить, с помощью современных фенотипических и молекулярно-генетических методов, динамику распространения штаммов *S.pneumoniae* и *S.pyogenes* резистентных к макролидным антибиотикам, выделенных от больных с внебольничными респираторными инфекциями, и расшифровать молекулярные механизмы устойчивости.

Задачи исследования.

1. Оценить динамику распространения штаммов *S. pneumoniae* и *S. pyogenes* устойчивых к макролидным антибиотикам, выделенных от больных с

внебольничными респираторными инфекциями в различных регионах Российской Федерации.

2. Расшифровать механизмы резистентности у штаммов, проявляющих фенотипическую устойчивость к макролидным антибиотикам, и выявить ведущие механизмы устойчивости.
3. Разработать высокопроизводительный метод дифференцировки *mef*-генов на подклассы, основанный на определении нуклеотидных полиморфизмов в реакции минисеквенирования с последующим масс-спектрометрическим анализом.
4. Оценить клональное родство антибиотикоустойчивых штаммов *S.pneumoniae*.

Научная новизна работы.

В ходе настоящего исследования выявлены значительные различия в динамике распространения и уровне резистентности к макролидным антибиотикам среди *S.pneumoniae* и *S.pyogenes* в различных регионах Российской Федерации. Указанные различия обосновывают необходимость разработки региональных рекомендаций по применению макролидов для эмпирической терапии инфекций дыхательных путей.

Проведенный мониторинг чувствительности к антибактериальным препаратам у 2944 клинических штаммов *S.pneumoniae* и *S.pyogenes*, выделенных от больных с респираторными инфекциями показал, что характер динамики распространения изолятов, устойчивых к макролидным антибактериальным препаратам, а также абсолютные показатели уровня резистентности в отдельных регионах РФ существенно различаются.

С помощью ПЦР проведена детекция генов резистентности у штаммов стрептококков, проявляющих фенотипическую устойчивость к макролидным антибиотикам. Выявлено, что ведущими механизмами устойчивости у штаммов *S.pneumoniae* были: рибосомальное метилирование, кодируемое *erm(B)*-геном и сочетание метилирования (присутствие *erm(B)* гена) с активным выведением лекарственного вещества, связанное с наличием *mef*

гена. В последние годы отмечено нарастание частоты выделения штаммов *S.pneumoniae*, несущих одновременно два гена, что увеличивает уровень резистентности микроорганизмов. Ведущим механизмом устойчивости к макролидам у штаммов *S.pyogenes* был эффлюкс, опосредованный *mef*-геном.

Разработан высокопроизводительный метод дифференцировки *mef*-гена на подклассы, основанный на MALDI-TOF масс-спектрометрии продуктов амплификации, полученных с помощью термоциклического достраивания праймеров с участием дезокси- и дидезоксинуклеотид-трифосфатов.

Впервые, с помощью разработанного метода, была проведена дифференцировка *mef*-генов на подклассы *mef(A)*, *mef(E)* и *mef(I)* у штаммов *S.pneumoniae* и *S.pyogenes*.

Проведено мультилокусное сиквенс-типирование макролид-резистентных штаммов *S.pneumoniae*, обладающих ассоциированной устойчивостью к бета-лактамам антибиотикам. Установлено, что они принадлежат к международно-распространенным клональным комплексам CC81, CC271 и CC315.

Практическая значимость работы.

Собрана уникальная коллекция клинических штаммов *S.pneumoniae* и *S.pyogenes*, выделенных от больных с внебольничными респираторными инфекциями в различных регионах РФ, позволяющая проводить многоплановые исследования с целью оценки динамики изменения антибиотикочувствительности и перспективности использования новых групп антибактериальных препаратов.

Полученные данные о динамике распространения штаммов *S.pneumoniae* и *S.pyogenes* резистентных к макролидным антибиотикам в различных регионах России могут быть использованы для оптимизации антибактериальной терапии респираторных инфекций.

Создан банк ДНК клинических изолятов *S.pneumoniae* и *S.pyogenes*, устойчивых к макролидным антибактериальным препаратам, который можно использовать в дальнейших работах по прогнозированию распространения

резистентных штаммов и в исследованиях, направленных на изучение молекулярно-генетических механизмов их передачи.

Разработанный высокопроизводительный метод выявления нуклеотидных полиморфизмов для дифференцировки *mef* генов расширяет возможности лабораторий лечебно-профилактических учреждений по наблюдению за динамикой распространения детерминант устойчивости к макролидным антибиотикам и повышает эффективность методов идентификации, генотипирования и определения генетических маркеров лекарственной устойчивости микроорганизмов.

Нуклеотидные последовательности различных подклассов *mef* генов, обнаруженных у штаммов *S.pneumoniae*, внесены в международную базу GenBank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/> (EU486997, EU486999, EU486995, EU487001).

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Динамика распространения штаммов *S.pneumoniae* и *S.pyogenes* резистентных к макролидным антибиотикам в различных регионах Российской Федерации носит разнонаправленный характер, а ее уровень варьирует в широких пределах.
2. Ведущие механизмы устойчивости к макролидным антибиотикам у штаммов *S.pneumoniae* и *S.pyogenes* различаются. У штаммов *S.pneumoniae* устойчивость связана либо с генами *erm(B)*, либо с наличием генов *erm(B)* и *mef* одновременно. У штаммов *S.pyogenes* устойчивость связана, в основном с *mef* генами.
3. Распространенные среди *Streptococcus spp.* *mef* гены отличаются значительным разнообразием. Среди *S.pneumoniae* преобладают гены *mef(E)* подкласса, среди *S.pyogenes* – *mef(I)* подкласса.

Апробация работы.

Диссертация апробирована на заседании кафедры микробиологии Российской медицинской академии последипломного образования, протокол №6 от 14 октября 2009 г.

Основные результаты исследований представлены и доложены на VII-й Российской научно-практической конференции «Современные проблемы антимикробной химиотерапии» (Москва, 2006), Европейском конгрессе по клинической микробиологии и инфекционным болезням (Копенгаген, 2005), Международной конференции по антимикробным препаратам и химиотерапии (Сан-Франциско, 2006), конференции Европейского общества химиотерапии (Ахен, 2006), Европейском конгрессе по клинической микробиологии и инфекционным болезням (Мюнхен, 2007), II-м Ежегодном Всероссийском конгрессе по инфекционным болезням (Москва, 2010).

Публикации.

По теме диссертации опубликовано 16 научных работ, в том числе 5 статей, опубликованны в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, 2 статьи в периодической печати, 9 – в материалах конференций.

Структура и объем диссертации.

Материалы диссертация изложена на 117 страницах машинописного текста и включает следующие разделы: введение, обзор литературы, заключение по обзору литературы, 5 глав собственных исследований, заключение, выводы, приложение. Работа иллюстрирована 19 таблицами и 27 рисунками. Список использованной литературы включает 156 источников, в том числе отечественных – 44 и зарубежных – 112 авторов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы.

Материалы.

В работу включены 2944 клинических изолята бактерий рода *Streptococcus* (*S.pneumoniae* и *S.pyogenes*), полученных в ходе многоцентрового исследования в период с 2002 по 2007 гг от больных с респираторными инфекциями различной локализации (острые синуситы, острые средние отиты, обострение хронических бронхитов, пневмонии, пневмонии с бактериемией, менингиты, конъюнктивиты) из десяти ЛПУ

г.Москвы и из областных клинических больниц г.Санкт-Петербурга, г.Ярославля, г.Томска, г.Иркутска, г.Владивостока. Источниками выделения бактерий были: мокрота, бронхо-альвеолярный аспират, аспират из придаточных пазух носа, мазки из зева. Коллекция образцов клинических штаммов по годам и Федеральным округам представлена в таблице 1.

Таблица 1.

Коллекция образцов клинических штаммов

Год	Микро-организм	Общее кол-во	Федеральные округа			
			Центральный	Северо-Западный	Сибирский	Дальнево-сточный
2002	<i>S. pn</i>	0	0	0	0	0
	<i>S. пуо</i>	195	186	0	9	0
2003	<i>S. pn</i>	237	237	0	0	0
	<i>S. пуо</i>	218	173	0	45	0
2004	<i>S. pn</i>	581	300	31	250	0
	<i>S. пуо</i>	196	158	0	38	0
2005	<i>S. pn</i>	585	242	101	242	0
	<i>S. пуо</i>	171	117	0	54	0
2006	<i>S. pn</i>	457	253	47	157	0
	<i>S. пуо</i>	61	34	0	27	0
2007	<i>S. pn</i>	243	82	6	18	137
	<i>S. пуо</i>	0				
Итого	<i>S. pn</i>	2103	1114	185	667	137
	<i>S. пуо</i>	841	668	0	173	0

Методы.

Микробиологические исследования.

Идентификацию бактерий в бактериологических лабораториях ЛПУ проводили микроскопическим и культуральным методами, а также коммерческими тест-системами Crystal (BD, США). В качестве контроля использован референтный штамм ATCC 49619 *S.pneumoniae*.

Определение чувствительности к антимикробным препаратам проводилось методом микроразведений в бульоне Мюллера-Хинтон (BBL, США) согласно рекомендациям и критериям Методических указаний по определению чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам 2004г, а также CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institution, 2007г.) в 96-луночных планшетах для иммунологических исследований.

В панель тестируемых антибиотиков для штаммов *S.pneumoniae* были включены: эритромицин, кларитромицин, азитромицин, спирамицин, мидекамицин ацетат, джозамицин, телитромицин, клиндамицин; для штаммов *S.pyogenes* – пенициллин, эритромицин, телитромицин, клиндамицин, тетрациклин, хлорамфеникол, офлоксацин, левофлоксацин (Sigma).

Молекулярные методы исследования.

Выделение ДНК. ДНК из суточной культуры *S. pneumoniae* или *S.pyogenes*, выращенной на твердом Колумбийском агаре (bioMerieux, Франция) с добавлением 5% дефибринированной бараньей крови, была выделена с помощью набора «ДНК-экспресс» (ООО НПФ «Литех», г.Москва), согласно инструкции.

Таблица 2.

Набор олигонуклеотидных праймеров, использованных для амплификации различных фрагментов генома

N	Локус	Праймер	5'-3' последовательность	Размер продукта, п.н.
1	<i>mef</i>	mef_F mef_R	5' ATG GAA AAA TAC AAC AAT TGG AAA 3' 5' TTA TTT TAA ATC TAA TTT TCT AAC CTC 3'	1100
2	<i>mef_1</i>	mef_F_1 mef_R_1	5' ATG GAA AAA TAC AAC AAT TGG AAA 3' 5' CC AGC TGC TGC GAT AAT TAA ATC 3'	263
3	<i>mef_mel</i>	mef_mel_F mef_mel_R	5' GCC TGA ATA TTT AGG ACG TGT 3' 5' CTT CAC GGT CTA AAT GGC TCG 3'	718
4	<i>ermB</i>	ermB_F ermB_R	5' GAA AAG GTA CTC AAC CAA ATA 3' 5' AGT AAC GGT ACT TAA ATT GTT TAC 3'	640
5	<i>ermA</i>	ermA_F ermA_R	5' TCT AAA AAG CAT GTA AAA GAA 3' 5' CTT CGA TAG TTT ATT AAT ATT AGT 3'	600

Штаммы, нечувствительные к макролидным антибактериальным препаратам, исследованы методом полимеразной цепной реакции для детекции *erm*-генов и *mef*-генов. В исследовании использованы праймеры, представленные в таблице 2 (Okitsu N. et al. J Clin Microbiol. 2005; Klaassen,

CHW, Mouton JW, Antimicrob Agents Chemother. 2005, Филимонова О.Ю. 2007). Из-за того что, не всегда воспроизводился результат с праймерами для *mef*-гена, взятыми из других источников, нами разработаны праймеры *mef_1* и *mef_mel* и подобраны условия ПЦР, которые использовались параллельно.

Полимеразная цепная реакция проведена в амплификаторе PTC-240 DNA Engine Tetrad2 (MJ Research Bio-Rad, США) с последующим анализом продуктов амплификации в 2%-ном агарозном геле.

Определение нуклеотидной последовательности генов проводили модифицированным методом Сенгера с использованием прибора ABI Prism® 3100 Genetic Analyzer (“Applied Biosystems”, США; “Hitachi” Япония). Полноразмерную последовательность генов получали путем склеивания нуклеотидных фрагментов с использованием программного продукта «Vector NTI® Suite v. 9» (Informax Inc, США). Для поиска гомологичных нуклеотидных или аминокислотных последовательностей в международных базах данных GenBank и EMBL была использована программа BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Статистическую обработку и анализ данных производили с помощью компьютерных программ Microsoft® Office Excel 2003, Whonet-5.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Динамика распространения штаммов *S. pneumoniae* и *S.pyogenes* резистентных к макролидам и оценка антибактериальной активности препаратов MLS-группы

Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам является неотъемлемой частью в работе клинических лабораторий в ЛПУ при диагностике возбудителей респираторных инфекций.

Проведен анализ статистических параметров макролидов и линкозамидов за пять лет (характер распределения МПК, диапазон МПК, значения МПК₅₀, МПК₉₀, средняя геометрическая МПК) у 2103 штаммов *S.pneumoniae* и 841 штамма *S.pyogenes*.

Выявлено, что наибольший уровень антибактериальной активности к изученным штаммам *S.pneumoniae* и *S.pyogenes* наблюдался у телитромицина (полусинтетическое производное эритромицина, выделенное в подгруппу кетолидов).

Препараты эритромицин (14-членный природный макролид), кларитромицин (14-членный полусинтетический макролид) и клиндамицин (линкозамид) практически не различались по уровню активности и уступали телитромицину у обоих представителей рода *Streptococcus*. Уровень активности азитромицина (15-членный полусинтетический макролид) был несколько ниже, чем у трех выше приведенных антибиотиков.

Следует также отметить, что соотношение чувствительных, промежуточных и устойчивых штаммов для 14-ти и 15-ти членных макролидов было практически одинаковым.

Уровень чувствительности к телитромицину составил 99% у всех изученных штаммов. Только один штамм *S.pneumoniae* и пять штаммов *S.pyogenes* показали промежуточную устойчивость к этому препарату.

Учитывая приведенные данные, для анализа динамики распространения резистентных штаммов использовали эритромицин, как маркер устойчивости ко всем 14-ти и 15-ти членным макролидам, а также клиндамицин, как представитель линкозамидов.

На рисунке 1 представлен сводный график динамики распространения штаммов *S.pneumoniae* и *S.pyogenes* резистентных к эритромицину и клиндамицину (в %) по годам.

Выявлено, что уровень устойчивости *S.pyogenes* к эритромицину на территории Российской Федерации выше, чем у штаммов *S. pneumoniae* и варьирует в диапазоне 7-15.8%.

А уровень резистентности к клиндамицину, напротив, выше у штаммов *S. pneumoniae*, чем у пиогенных стрептококков, и практически полностью повторяет динамику устойчивости пневмококков к эритромицину, разница в частоте устойчивости к сравниваемым препаратам не превышает 1% - 2%.

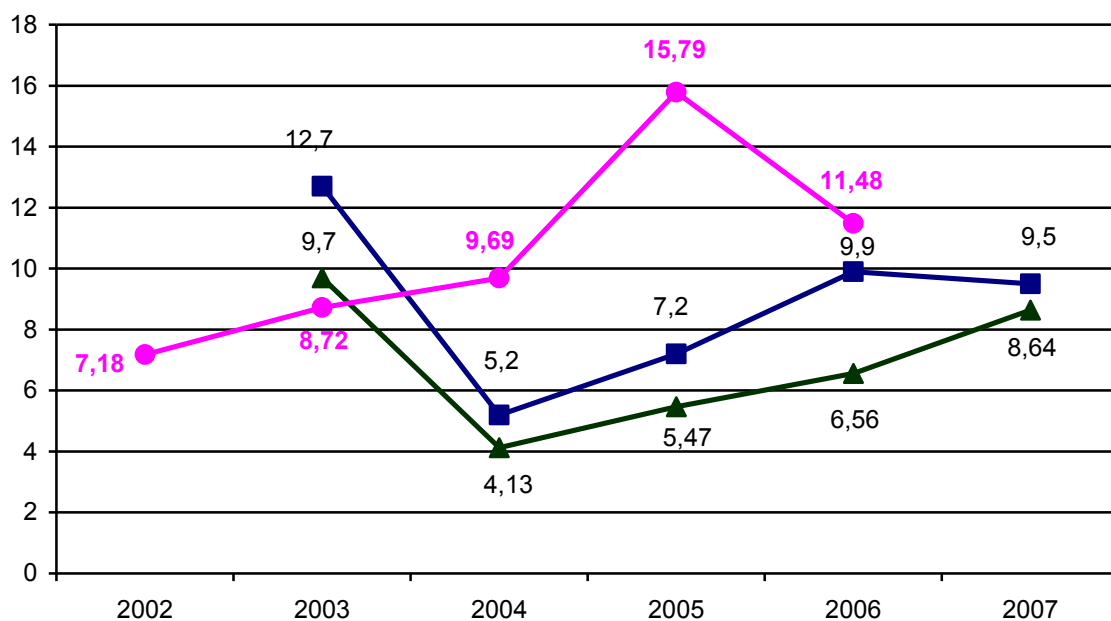


Рисунок 1. Динамика распространения штаммов *S.pneumoniae* и *S.pyogenes* резистентных к эритромицину и клиндамицину (в %).

Примечание:

- Эритромицин *S.pneumoniae*
- ▲ Клиндамицин *S.pneumoniae*
- Эритромицин *S.pyogenes*

Анализируя эти данные, можно предположить, что ведущие механизмы резистентности у штаммов *S.pneumoniae* и *S.pyogenes* различны.

По длительности наблюдения и количеству изученных изолятов наиболее полные данные получены для Центрального Федерального округа. Как видно из таблицы 1, за пять лет в Центральном Федеральном округе собрано и исследовано 1114 штаммов *S.pneumoniae* и 668 штаммов *S.pyogenes*. В 2003 году нечувствительными к эритромицину были 30 (12.7%) штаммов *S.pneumoniae* из изученных изолятов, в 2004 году - 21 штамм (7%). В последующие годы отмечали постепенный рост частоты выделения изолятов нечувствительных к эритромицину, в 2007 году этот показатель составил 14.6%. Частота распространения нечувствительных к эритромицину штаммов *S.pyogenes* в период с 2002 по 2004 гг. оставалась практически

постоянной 14 (7.5%), 13 (6.9%) и 11 (6.9%) штаммов соответственно. В 2005 году наблюдали некоторое повышение показателя устойчивости до 11.1%.

В других регионах Российской Федерации длительность периода наблюдения за распространением резистентных штаммов стрептококков была меньше, меньшим было и количество изученных изолятов.

Наименьшее число нечувствительных к эритромицину штаммов *S.pneumoniae* было выделено в г.Томске. Однако, если в 2004 году не выявлено из всех изучаемых изолятов ни одного штамма *S.pneumoniae*, резистентного к эритромицину, то в 2006 году устойчивые штаммы составили 3%. В г.Иркутске также наблюдалась тенденция к росту показателя устойчивости с 3.1% в 2004 году до 12.22% в 2006 году. В г.Санкт-Петербурге, напротив, прослеживалось снижение частоты выделения резистентных пневмококков к эритромицину с 13% до 6.4% за тот же период наблюдения.

Более 80% штаммов *S.pneumoniae* устойчивых к эритромицину показали резистентность и к клиндамицину. В полной мере сказанное относится к г.Москве, г.Томску и г.Санкт-Петербургу. Существенные различия выявлены лишь в г.Иркутске, где устойчивость к клиндамицину росла значительно медленнее, чем к эритромицину (50% штаммов).

И другая картина наблюдалась в отношении штаммов *S.pyogenes* устойчивых к эритромицину. Только четыре штамма *S.pyogenes* устойчивые к эритромицину (г.Москва) были резистентны к клиндамицину. В остальных регионах все штаммы *S.pyogenes* были чувствительны к этому препарату.

В целом, частота распространения устойчивых штаммов *S.pneumoniae* и *S.pyogenes* к макролидным антибиотикам в различных регионах в отдельные периоды существенно варьировала. Характер динамики и абсолютные показатели уровня резистентности в отдельных регионах различались.

Следует отметить, что невозможно использование усредненных данных по распространению штаммов *S.pneumoniae* и *S.pyogenes*,

резистентных к макролидам, в отдельных регионах Российской Федерации для оптимизации терапии.

Разработка метода дифференцировки *mef*-гена на подклассы

В связи с высокой гомологией *mef*-генов их дифференцировка с помощью ПЦР практически невозможна. Метод PCR-RFLP достаточно трудоемок, плохо поддается стандартизации и не позволяет детектировать все подклассы *mef*-гена.

Задача дифференцировки *mef* генов по существу сводится к детекции нуклеотидных полиморфизмов, характерных для их отдельных подклассов. Анализ представленных в GenBank последовательностей подклассов *mef* генов выявил три точки полиморфизма (положения: 264-267 пн., 587-588 пн., 745-746 пн), в каждой из которых последовательности нуклеотидов оказались уникальными для отдельных подгрупп генов.

Для выявления нуклеотидных последовательностей в указанных точках полиморфизма нами был разработан метод, основанный на реакции ферментативного дестраивания олигонуклеотидных праймеров с последующим определением молекулярной массы продуктов реакции с помощью времяпролётной масс-спектрометрии с лазерной десорбционной ионизацией в присутствии вспомогательного вещества – матрицы (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation, MALDI).

Идентификацию *mef*-генов проводили путем сравнения молекулярных масс предсказанных продуктов реакции термоциклического дестраивания и реально полученных (таблица 3, рисунок 2 (А и Б), рисунок 3 (А и Б), рисунок 4 (А и Б)). На этих рисунках представлены масс-спектры, полученные при проведении реакции термоциклического дестраивания праймеров F-264 (рисунок 2 А и Б), R-587 (рисунок 3 А и Б), R-745 (рисунок 4 А и Б).

Результат типирования рассматривался как однозначный, если во всех трех точках полиморфизма размер продуктов дестройки соответствовал расчетному. В ряде случаев по результатам минисеквенирования сделать

однозначное заключение о типе *mef*-гена было невозможно. В рамках группы *mef*-гена выделены подклассы *mef*(E) и *mef*(I).

Метод, основанный на селективном ферментативном достраивании олигонуклеотидных праймеров, по точности идентификации однонуклеотидного полиморфизма сопоставим с прямым определением нуклеотидной последовательности интересующих локусов, при этом является значительно более простым и дешевым в исполнении (стоимость расходных материалов сопоставима со стоимостью стандартной ПЦР).

Для валидации разработанной системы дифференцировки было проведено определение нуклеотидных последовательностей *mef*-генов у 52-х изолятов *S. pneumoniae* и 33-х изолятов *S. pyogenes*.

Однозначные результаты дифференцировки *mef*-генов с помощью минисеквенирования полностью совпадали с результатами, полученными при классическом секвенировании по Сэнгеру. В тех случаях, когда результаты дифференцировки с помощью минисеквенирования оказались неопределенными, при классическом секвенировании были выявлены *mef*-гены, демонстрировавшие наибольшую степень гомологии с *mef*-геном недавно описанным у *Bacteroides ovatus* и не получившим до настоящего времени отдельного обозначения.

Генетические детерминанты резистентности *Streptococcus spp.* к макролидным антибиотикам

Из изолятов со сниженной чувствительностью к эритромицину (МПК \geq 1.0 мкг/мл), обнаруженных в ходе настоящей работы, изучены на наличие основных детерминант устойчивости к макролидам с помощью ПЦР и разработанной системы дифференцировки *mef*-гена 164 штамма *S.pneumoniae* и 70 штаммов *S.pyogenes*.

Названия и состав праймеров, состав реакционных смесей и возможные продукты реакции для отдельных *mef* genes.

Точки полиморфизма, названия праймеров	Состав праймеров	Состав реакционной смеси (dNTP и ddNTP)	Ген	Возможные продукты реакции	М.м.	δ^a
264 – 267 по F-264	5'-ТТААТТАТСГСАГСАГСТГГ-3'	dT, dC, ddG	Нет	Праймер (F-264)	6132	-
			<i>Mef</i> (A)	Праймер + dT + dT + dC + ddG	7343	1211
			<i>Mef</i> (E)	Праймер + dT + ddG	6750	618
			<i>Mef</i> (I)	Праймер + ddG	6445	313
587 – 588 по R-587	3'-САСГТТТСАААССТТГГТТ-5'	dT, ddG, ddC	Нет	Праймер (R-587)	5754	-
			<i>Mef</i> (A)	Праймер + ddG	6067	313
			<i>Mef</i> (E)	Праймер + dT + dT + ddG	6675	921
			<i>Mef</i> (I)	Праймер + dT + ddC	6331	264
745-746 по R-745	3'-TGAAATTACCTTGTGGACACG-5'	dA, ddG, ddT	Нет	Праймер (R-745)	6446	-
			<i>Mef</i> (A)	Праймер + dA + dA + ddT	7360	914
			<i>Mef</i> (E)	Праймер + ddG	6759	313
			<i>Mef</i> (I)	Праймер + dA + ddT	7047	601

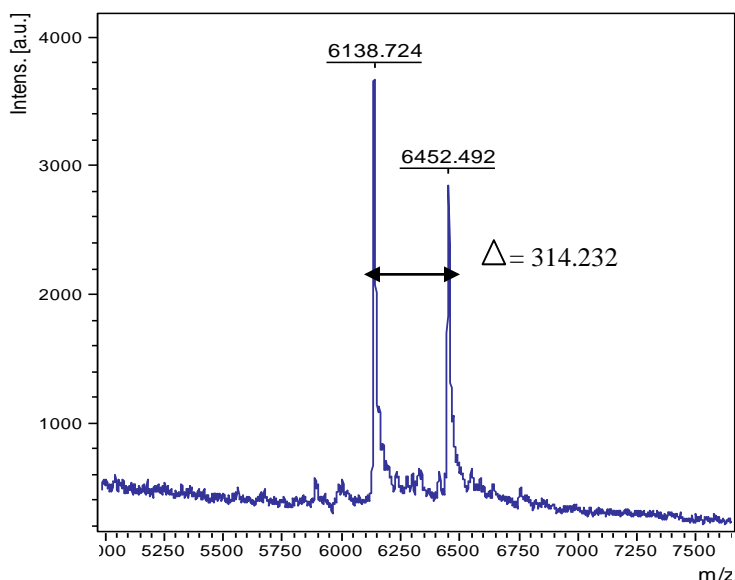


Рисунок 2-А. Результаты дифференцировки *mef* генов по точке полиморфизма 264 -267 (праймер F-264). Продукт достраивания *mef(I)*-ген.

Примечание: первый пик соответствует массе исходного праймера F-264 (расчетная мол. масса = 6132 d, экспериментальная = 6138.742 d). Второй пик соответствует продукту достраивания, характерному для *mef(I)*-гена (расчетная мол. масса = 6445 d, экспериментальная = 6452.492 d). Расчетная разница мол. масс исходного праймера и продукта достраивания составляет 313 d, экспериментальная – 314.232 d.

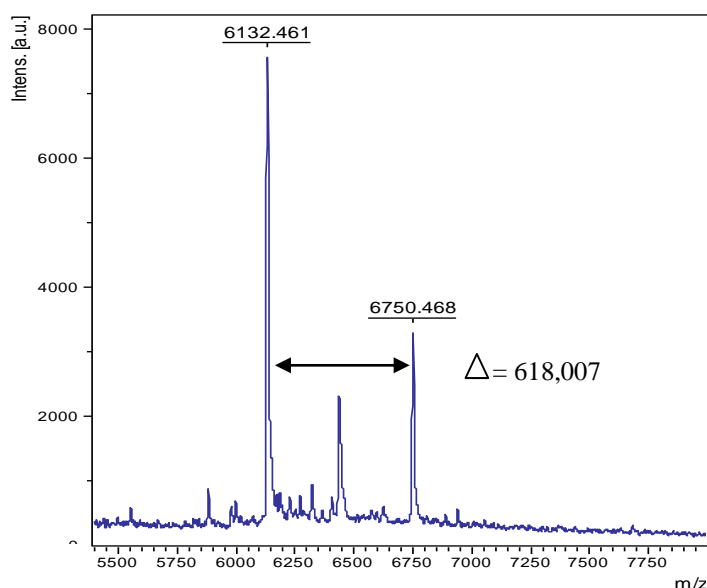


Рисунок 2-Б. Результаты дифференцировки *mef* генов по точке полиморфизма 264 -267 (праймер F-264). Продукт достраивания *mef(E)*-ген.

Примечание: первый пик соответствует массе исходного праймера F-264 (расчетная мол. масса = 6132 d, экспериментальная = 6132.461 d). Второй пик соответствует продукту достраивания, характерному для *mef(E)* гена (расчетная мол. масса = 6750 d, экспериментальная = 6750.468 d). Расчетная разница мол. масс исходного праймера и продукта достраивания составляет 618 d, экспериментальная – 618.007 d.

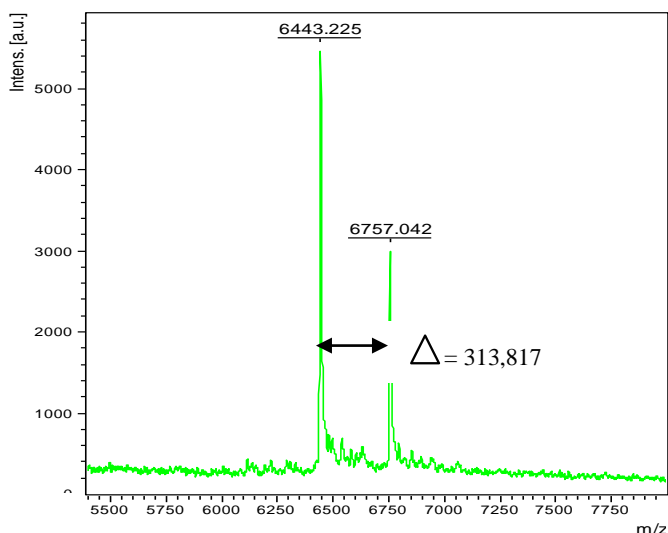


Рисунок 3-А. Результаты дифференцировки *mef*-генов по точке полиморфизма 587-588 (праймер R-587). Продукт достраивания *mef*(E)-ген.
 Примечание: первый пик соответствует массе исходного праймера R-587 (расчетная мол. масса = 6446 d, экспериментальная = 6443.225 d). Второй пик соответствует продукту достраивания, характерному для *mef*(E) гена (расчетная мол. масса = 6759.2 d, экспериментальная = 6757.042 d). Расчетная разница мол. масс исходного праймера и продукта достраивания составляет 313.2 d, экспериментальная – 313.817 d.

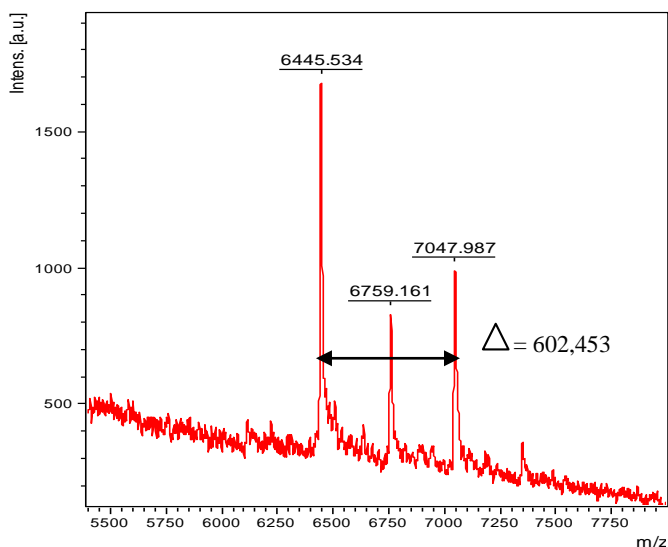


Рисунок 3-Б. Результаты дифференцировки *mef*-генов по точке полиморфизма 587-588 (праймер R-587). Продукт достраивания *mef*(I)-ген.
 Примечание: первый пик соответствует массе исходного праймера R-587 (расчетная мол. масса = 6446 d, экспериментальная = 6445.534 d). Второй пик соответствует продукту достраивания, характерному для *mef*(I) гена (расчетная мол. масса = 7047.2 d, экспериментальная = 7047.987 d). Расчетная разница мол. масс исходного праймера и продукта достраивания составляет 601.2 d, экспериментальная – 602.453 d.

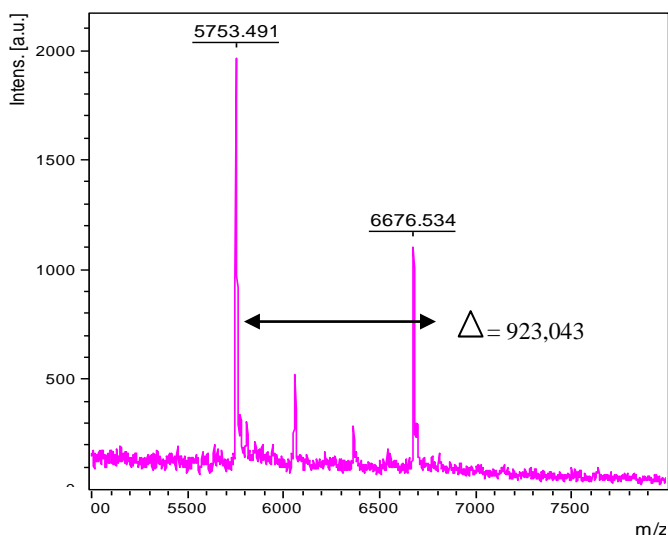


Рисунок 4-А. Результаты дифференцировки *mef*-генов по точке полиморфизма 745-746 (праймер R-745). Продукт достраивания *mef*(E)-ген.

Примечание: первый пик соответствует массе исходного праймера R-745 (расчетная мол. масса = 5754 d, экспериментальная = 5753.491 d). Второй пик соответствует продукту достраивания, характерному для *mef*(E) гена (расчетная мол. масса = 6675.2 d, экспериментальная = 6757.042 d). Расчетная разница мол. масс исходного праймера и продукта достраивания составляет 921.2 d, экспериментальная – 923.043 d.

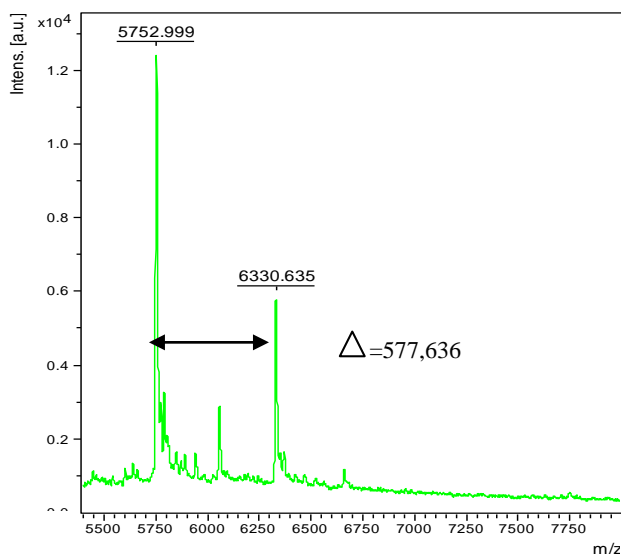


Рисунок 4-Б. Результаты дифференцировки *mef*-генов по точке полиморфизма 745-746 (праймер R-745). Продукт достраивания *mef*(I)-ген.

Примечание: первый пик соответствует массе исходного праймера R-745 (расчетная мол. масса = 5754 d, экспериментальная = 5752.999 d). Второй пик соответствует продукту достраивания, характерному для *mef*(I) гена (расчетная мол. масса = 6331.2 d, экспериментальная = 6330.635 d). Расчетная разница мол. масс исходного праймера и продукта достраивания составляет 577.2 d, экспериментальная – 577.636 d.

Гены, ответственные за резистентность к макролидным антибиотикам и их комбинации, которые встречались у изученных штаммов *S. pneumoniae* представлены в таблице 4.

Таблица 4.

Результаты детекции детерминант резистентности к макролидным антибиотикам у штаммов *S. pneumoniae*

Период выделения	Генотипы резистентности							
	<i>erm(B)+mef(E)</i>	<i>erm(B)+mef(I)</i>	<i>erm(B)+mef**</i>	<i>erm(B)</i>	<i>mef(I)</i>	<i>mef(E)</i>	<i>mef*</i>	<i>mef**</i>
2003(n=24)	9 / 38%	-	-	11/46%	1 / 4%	2 / 8%	1 / 4%	-
2004(n=29)	10 / 35%	-	-	14/48%	1 / 3%	3 / 10%	-	1 / 3%
2005(n=44)	7 / 16%	-	1 / 2%	26/59%	3 / 7%	6 / 14%	-	1 / 2%
2006(n=43)	15 / 35%	2 / 5%	6 / 14%	9/21%	3 / 7%	7 / 16%	1 / 2%	-
2007(n=24)	10 / 42%	-	8 / 33%	4/17%	-	2 / 8%	-	-
ИТОГО(n=164)	51 / 31%	2 / 1%	15 / 9%	64/39%	8 / 5%	20/12%	2 / 1%	2 / 1%

Примечание: * - *mef*-ген, сходный с *mef*-геном, *Bacteroides ovatus* (GeneBank AJ557257)

** - осуществить точную идентификацию *mef*-гена не удалось

Ведущим механизмом устойчивости у пневмококков было рибосомальное метилирование, опосредованное *erm(B)* геном. Поэтому преобладали штаммы *S. pneumoniae* с изолированным *erm(B)* геном и штаммы, содержащие одновременное *erm(B)* и *mef(E)* гены.

Так, в период с 2003 по 2005 гг. отмечено преобладание пневмококков с изолированными *erm(B)* генами, а в 2006 и 2007 гг. выявлена тенденция к увеличению частоты штаммов, обладающих одновременно двумя генами. Генов *erm(A)* у *S. pneumoniae* обнаружено не было.

Распространенность штаммов *S. pneumoniae* с изолированными *mef(E)* генами нарастала в период с 2003 по 2006 гг. (от 8% до 16%), а в 2007 было отмечено снижение частоты их выделения до 12.5%. Пневмококки с генами подкласса *mef(I)* встречались спорадически. Следует также отметить отсутствие среди изученных штаммов генов *mef(A)*.

В 2003 и 2006 гг. было обнаружено по одному штамму, обладающему *mef*-геном, сходным с *mef*-геном, ранее выявлявшимся только у *Bacteroides ovatus* в 2003 году. У двух штаммов провести точную идентификацию *mef*-генов не удалось.

Как следует из данных таблицы 5, гены резистентности пиогенных стрептококков к макролидам, также разнообразны и встречаются в различных комбинациях.

Таблица 5.

Результаты детекции детерминант резистентности к макролидным антибиотикам у штаммов *S. pyogenes*

	<i>erm(A)+ mef(I)</i>	<i>erm(A) + mef(E)</i>	<i>erm(A) + mef**</i>	<i>erm(B) + mef(I)</i>	<i>erm(A)</i>	<i>mef(I)</i>	<i>mef(E)</i>	<i>mef*</i>	<i>mef**</i>
2002(n=14)	-	-	-	-	1 /7%	8/57%	1 /7%	1/7%	3/21%
2003(n=16)	-	-	1 /6%	-	-	6/38%	-	-	9/56%
2004(n=15)	-	1 / 7%	1 /7%	1 /7%	-	8/53%	-	1/7%	3/20%
2005(n=18)	1 /6%	-	-	-	-	5/28%	2/11%	2/11	8/44%
2006(n=7)	-	-	-	-	-	-	-	-	7/100%
Итого (n=70)	1 /1%	1 / 1%	2 /3%	1 /1%	1 /1%	27/39 %	3 /4%	4/6%	30/43 %

Примечание: * - *mef*-ген, сходный с *mef*-геном, *Bacteroides ovatus* (GeneBank AJ557257)

** - осуществить точную идентификацию *mef*-гена не удалось

Ведущим механизмом устойчивости был эффлюкс, опосредованный *mef(I)*-геном. У единичных штаммов обнаружены *erm(A)*-гены либо в изолированном виде, либо в комбинации с различными *mef*-генами. Ген *erm(B)* удалось обнаружить только в одном штамме в комбинации с *mef(I)* геном. У значительной части штаммов *mef*-гены не были точно идентифицированы, так как с использованными в работе праймерами не удалось получить ампликоны достаточного размера.

У четырех штаммов обнаружены *mef*-гены, сходные с *mef*-генами *Bacteroides ovatus* (GeneBank AJ557257).

Валидация полученных результатов проведена с помощью прямого секвенирования при сопоставлении с международной базой данных генотипов (GeneBank).

Молекулярное типирование штаммов *S.pneumoniae*, устойчивых к макролидам.

Для мультилокусного сиквенс-типирования (MLST - Multilocus Sequences Typing) отобрано 29 штаммов пневмококков. Результаты приведены в таблице 6.

В результате MLST типирования *S. pneumoniae*, среди изученных штаммов преобладали пневмококки 81 СС^b клонального комплекса, распространенного в Южной Африке, Южной Корее и Японии. Эти штаммы содержали два механизма резистентности к макролидным антибиотикам и, кроме того, были устойчивы к пенициллину и тетрациклину.

Таблица 6.

Результаты MLST типирования штаммов *S. pneumoniae*, устойчивых к макролидным антибиотикам

Кол-во штаммов	Генотип	Серотип	Клональные комплексы СС ^b	ST ^a
15	<i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (E) – 14 шт <i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (?) – 1 шт	23 F (10 шт) Не определяли 5шт	81	81
4	<i>erm</i> (B)	6B	315	315
1	<i>erm</i> (B)	14	63	3816
1	<i>erm</i> (B)	-	156	790
1	<i>erm</i> (B)	-	-	143
1	<i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (E)	19F	-	236
1	<i>mef</i> (E)	19F	271	651
1	<i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (E)	-	-	271
1	-	-	1012	1012
1	<i>erm</i> (B)	6B	new	new
1	<i>erm</i> (B)	19A	new	new
1	<i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (?)	-	new	new

Четыре штамма определились как 315 СС^b клональный комплекс, который соответствовал Poland 6B-20 ATCC ВАА-612. Эти штаммы

содержали только *erm*(B)-ген. Три штамма принадлежали 271 СС^b клональному комплексу, соответствовавшему Taiwan 19F-14 ATCC 700905.

Метод молекулярного типирования позволяет оценить клональное родство микроорганизмов и решать задачи глобальной эпидемиологии, затрагивающие значительные ареалы распространения или всю популяцию в целом. Сравнение полученных данных между собой, выяснение эволюционных связей между штаммами, их генетического расстояния производится с использованием специализированного программного обеспечения и международной базы. Это необходимо для наблюдения за миграцией отдельных достаточно стабильных клонов, которые могут претерпевать на региональном уровне изменчивость, сопровождающуюся приобретением дополнительных маркеров устойчивости или/и утратой отдельных их детерминант.

Выводы

1. Наибольший уровень резистентности к макролидным антибиотикам среди *S. pneumoniae* на территории Российской Федерации был отмечен в Москве в 2007 г (14,6%), а среди *S. pyogenes* в 2005 г в Иркутске (41.2%). Разнонаправленный характер динамики и частоты распространения устойчивых штаммов в отдельных регионах не позволяет использовать усредненные данные для оптимизации терапии на этих территориях. Тенденция к увеличению распространения резистентных штаммов, требует постоянного мониторинга за чувствительностью микроорганизмов.
2. Разработан метод дифференцировки *mef*-генов на подклассы, основанный на детекции нуклеотидных последовательностей в трех точках полиморфизма в реакции термоциклического достраивания праймеров и последующей масс-спектрометрической детекцией продуктов амплификации.
3. Выявлено, что у штаммов *S. pneumoniae* ведущими механизмами устойчивости были: рибосомальное метилирование, опосредованное *erm*(B) геном и сочетание метилирования (присутствие *erm*(B) гена) с активным выведением лекарственного вещества, связанное с наличием *mef*(E) гена. Распространенность штаммов *S. pneumoniae* с изолированным *erm*(B) геном – 39% и штаммов, содержащих одновременно *erm*(B) и *mef*(E) гены – 31%. В последние годы отмечено нарастание частоты выделения штаммов *S. pneumoniae*, несущих одновременно два гена, что увеличивает уровень резистентности микроорганизмов.
4. Ведущим механизмом устойчивости к макролидам у штаммов *S. pyogenes* был эффлюкс, опосредованный *mef*(I)-геном. У единичных штаммов обнаружены *erm*(A) и *erm*(B) -гены либо в изолированном

виде, либо в комбинации с различными *mef*-генами. Поэтому 16-членные макролиды и линкозамиды имеют явное преимущество перед 14- и 15-членными макролидами в лечении инфекций, вызванных штаммами *S.pyogenes*.

5. Установлено, что макролид-резистентные штаммы *S. pneumoniae*, обладавшие ассоциированной устойчивостью к бета-лактамам антибиотикам, принадлежали к международно-распространенным клональным комплексам CC81, CC271 и CC315. Подобные штаммы пневмококков распространены в странах Юго-Восточной Азии и Европы.

Практические рекомендации

Результаты изучения генетических механизмов устойчивости стрептококков к макролидным антибиотикам существенно дополняют данные о распространении резистентных штаммов, выявленных фенотипическими методами, что позволило сделать ряд практически важных выводов.

Невысокий уровень резистентности *S.pneumoniae* к макролидным антибиотикам в регионах Российской Федерации (за исключением г.Москвы) позволяет рассматривать макролидные антибиотики как средства эмпирической терапии пневмококковых инфекций в тех случаях, когда по тем или иным причинам применение бета-лактамов является невозможным или нежелательным.

В г.Москве ситуация несколько сложнее в связи с наблюдающейся тенденцией к росту устойчивости штаммов *S.pneumoniae* к макролидным антибиотикам. Для принятия решения о возможности использования макролидов в качестве средств эмпирической терапии необходимо наблюдение за чувствительностью штаммов *S.pneumoniae* к данному классу антибактериальных препаратов. Следует также отметить, что поскольку основными механизмами резистентности к макролидам у *S.pneumoniae* является экспрессия *erm* генов либо в качестве единственной детерминанты, либо совместно *mef* генами, 16-членные макролиды и линкозамиды не будут иметь существенных преимуществ перед 14- и 15-членными макролидами.

Роль макролидов как средств эмпирической терапии инфекций, вызванных *S.pyogenes* более определена. Практически во всех регионах уровень устойчивости этих бактерий к макролидам колеблется в пределах 3% - 17%, однако поскольку ведущим механизмом резистентности является эффлюкс (в 90% случаев), 16-членные макролиды и линкозамиды обладают явным преимуществом в сравнении с 14- и 15-членными антибиотиками и могут рассматриваться как надежные средства эмпирической терапии.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Дворецкий Л.И. Левофлоксацин и макролиды при обострении хронического бронхита. Результаты длительного мониторинга больных / Л.И.Дворецкий, Н.В.Дубровская, С.А.Грудинина, **О.Ю.Филимонова**, С.В.Сидоренко, С.В.Яковлев // Инфекции и антимикробная терапия-2005.-Том 7- №1, С. 18-26
2. Дворецкий Л.И. Клинико-микробиологический мониторинг больных с обострением хронического бронхита, леченного антибактериальными препаратами / Л.И.Дворецкий, Н.В.Дубровская, С.А.Грудинина, **О.Ю.Филимонова**, С.В.Яковлев, Е.В.Сергеева, С.В.Сидоренко // Терапевтический архив-2006-Том 78-№3, С. 25-35
3. Дворецкий Л.И. Левофлоксацин и макролиды при обострении хронического бронхита: сравнительный анализ эффективности лечения и длительности безрецидивного периода / Л.И.Дворецкий, Н.В.Дубровская, С.А.Грудинина, **О.Ю.Филимонова**, С.В.Сидоренко, С.В.Яковлев // Антибиотики и химиотерапия-2007, 52; 7—8, С.21-31
4. Дубровская Н.В. Респираторные фторхинолоны, защищенные пенициллины и макролиды в лечении обострений хронического бронхита (ХБ) и хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) / Н.В.Дубровская, Л.И.Дворецкий, С.В.Яковлев, С.А.Грудинина, **О.Ю.Филимонова**, С.В.Сидоренко. // Сборник материалов VII Российской конференции «Современные проблемы антимикробной химиотерапии» - 2005- С. 22
5. Малахова М.В. Применение метода MALDI-ToF масс-спектрометрии для анализа генетически детерминированной устойчивости *Streptococcus pneumoniae* к фторхинолонам / М.В.Малахова, В.А.Верещагин, Е.Н.Ильина, В.М.Говорун, **О.Ю.Филимонова**, С.А.Грудинина, С.В.Сидоренко // Антибиотики и химиотерапия-2007, 52, 1—2, С.10-17
6. СавиноваТ.А. Генетическое разнообразие пенициллин-устойчивых *Streptococcus pneumoniae* / **О.Ю.Филимонова**, С.А.Грудинина, С.В.Сидоренко // Журнал инфектологии-2010, Т.1, № 4, С. 66-71.
7. **Филимонова О.Ю.** Антибиотикорезистентность *Haemophilus influenzae*, выделенных в 2002-2004гг. в г.Москва / Филимонова О.Ю., Грудинина С.А., Катосова Л.К., Столярова Л.Г., Фатова М.А., Дубровская Н.В. // Антибиотики и химиотерапия-2004.-№12, С. 14-20
8. **Филимонова О.Ю.** Метод MALDI-tof масс-спектро-метрической дифференцировки *mef* генов стрептококков / Филимонова О.Ю., Савинова Т.А., Солдатова С.И., Круглов А.Н., Ильина Е.Н., Сидоренко С.В. // Материалы II Ежегодного Всероссийского конгресса по инфекционным болезням –Москва-2010, С.340-341
9. Grudinina S.A. Surveillance of antibacterial resistance in major pathogens of community-acquired respiratory tract infections in Moscow, Russia, 2004 /

- S.A.Grudinina, **O.Y.Filimonova**, S.V.Sidorenko // 15 European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases –Copenhagen-April 2-5, 2005.-P1776- P. 585
10. Grudinina S.A. High prevalence of *erm(B)/mef(A)* positive isolates among macrolide resistant *Streptococcus pneumoniae* in Russia / S. Grudinina, E. Ilina, **O. Filimonova**, A. Al-Lahham, M. Malakhova, L. Stolyarova, S. Sidorenko, R. Reinert. // European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases -Germany, Aachen -2006.-P.1191
 11. Grudinina S.A. Characterization of macrolide resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates from Russia / S.A Grudinina, O.Y Filimonova, E.N.Ilina, A.Al-Lahham, M.V.Malachova, L.G.Stolyarova, S.V.Sidorenko, R.R.Reinert // Nice, ESCMID, European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases -Germany, Aachen -2006.-P.1190
 12. Grudinina S.A. Mass-spectrometric Discrimination of *mef(A)*, *mef(E)* and *mef(I)* Genes and their Prevalence among Macrolide-Resistant *Streptococcus pneumoniae* (Spn) Isolates from Russia / S.A Grudinina, **O.Y.Filimonova**, T.A. Savinova, L.G. Stolyarova, E.N.Ilina, L.M.Weigel, S.V.Sidorenko // ICAAC06 Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy -Atlanta, GA-2006.-A-2520-ASM
 13. Grudinina S.A. *Haemophilus influenzae* resistance patterns in Moscow / S.A.Grudinina, **O.Y.Filimonova**, S.V.Sidorenko. // 5th European Congress of Chemotherapy and Infection. -Rhodes, Greece, October 17-20, 2003. - Mon 135, - P.122
 14. Grudinina S.A. Prevalence and Mechanisms of *Streptococcus pyogenes* Resistance to Macrolides in Moscow, Russia / S.A.Grudinina, **O.Y.Filimonova**, E.N.Ilina, S.V.Sidorenko. // European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases –Germany, Munchen-2007-April -P.741
 15. Reinert R.R. Mechanisms of Macrolide Resistance among *Streptococcus pneumoniae* Isolates from Russia / R.R.Reinert, **O.Y.Filimonova**, A.Al-Lahham, S.A.Grudinina, E.N.Ilina, L.M. Weigel, S.V.Sidorenko// Antimicrobial Agents and Chemotherapy–June-2008.- N 6 - P. 2260–2262
 16. Rezvan S.P. Antibacterial resistance in respiratory pathogens in Northern Caucasia / S.P.Rezvan, S.A.Grudinina, V.S.Shoukhov, L.G.Stolyarova, **O.Y.Filimonova**, S.V.Sidorenko. // 5th European Congress of Chemotherapy and Infection. -Rhodes, Greece- October 17-20, 2003. -Mon 136, - P.122