

*В.В. Маркевич¹, Л.П. Титов² проф., д.м.н.
V.V. Markevich, L.P. Titov*

Фенотипическая и генотипическая резистентность культур *S. pyogenes*, выделенных от больных в ЛПО г. Минска, к макролидам, тетрациклинам и линкозамидам

*1 – Белорусский государственный медицинский университет;
2 – РНПЦ микробиологии и эпидемиологии*

Научный руководитель: Л.П. Титов

Была исследована фенотипическая и генотипическая антибиотикорезистентность клинических штаммов *S. pyogenes* выделенных от больных в ЛПО г. Минска. Фенотипическая резистентность к макролидам составила 20%, к тетрациклинам – 18%, штаммов чувствительных к линкозамидам выявлено не было. При помощи мультиплексной ПЦР у 12% штаммов был выявлен *mef*-ген, отвечающий за резистентность к макролидам, а у 26% изолятов были обнаружены *tet*-гены, отвечающие за устойчивость к тетрациклинам. Ключевые слова: *S. pyogenes*, антибиотикорезистентность, мультиплексная ПЦР, гены антибиотикорезистентности.

Has been investigated phenotypic and genotypic antibiotic resistance clinical isolates *S. pyogenes* allocated from patients in hospitals Minsk. Phenotypic resistance to macrolides has made 20 %, to tetracyclines – 18 %, isolates sensitive to lincosamides has not been revealed. By means of multiplex PCR at 12 % stains the *mef*-gen which is responsible for resistance to macrolides has been revealed, and the *tet*-genes which are responsible for stability to tetracyclines have been found out in 26 % isolates.

Key words: *S. pyogenes*, antibiotic resistance, multiplex PCR, *mef*- and *tet*-genes.

Стрептококк группы А (СГА) или *Streptococcus pyogenes* – грамположительный кокк, относящийся к семейству *Streptococcaceae*, роду *Streptococcus*, является антропонозом, вызывающим разнообразные инфекции от доброкачественных поражений типа ангин или импетиго до чрезвычайно тяжелых, как синдром токсического шока или септицемии [1, 2].

Стрептококк группы А может вызывать огромный спектр заболеваний, а также поражать практически все ткани организма, за счет того, что он содержит много факторов патогенности: микрокапсула и М-белок, обладающие антифагоцитарным действием; нетипоспецифические белки; белки-рецепторы; Т- и F-белки; групповой полисахарид; липотейхоевую кислоту, пептидогликан и др. [3, 4]. Кроме этого, *S. pyogenes* способен продуцировать биологически активные экстрацеллюлярные вещества: стрептолизины О и S, стрептокиназу, ДНКазу В, гиалуронидазу, С5а-пептидазу, стрептодорназу, липопротенизу и др. Все известные на сегодня 9 суперантигенов СГА могут взаимодействовать с переменными участками β-цепи Т-лимфоцитов и антигенами главного комплекса гистосовместимости второго класса, приводят тем самым к мощному выбросу таких цитокинов, как фактор некроза опухоли и γ-интерферон [1]. В последние годы отмечается распространение штаммов СГА, резистентных к применяемым для противомикробной терапии препаратам – макролидам, линкозамидам, тетрациклинам, хлорамфениколу и фторхинолонам [5].

Считается, что *Streptococcus pyogenes* по-прежнему сохраняет чувствительность к β -лактамным антибиотикам (пенициллинам, цефалоспорином, карбапенемам), которые до сих пор остаются эффективными [3].

Известно 2 вида генов, отвечающих за устойчивость *S. pyogenes* к макролидам, линкозамидам и стрептограмину В: *erm*-гены (около 20 генов, кодируют фермент метилазу, который отвечает за модификацию мишени действия антимикробных препаратов) и *mef*-ген (кодирует транспортную систему, которая осуществляет активное выведение антибиотика из бактериальной клетки) [1, 4, 5, 6, 7, 8].

Устойчивость к тетрациклинам обуславливают *tet*-гены. Часть из них (*tet*(M) и *tet*(O)) встречаются весьма часто и за счет того, что локализованы на плазмидах, обуславливают быстрое внутри- и межвидовое распространение. Другие же, такие как *tet*(K) и *tet*(L), кодируют насосы для тетрациклина, обеспечивая тем самым активное выведение антибиотика из бактериальной клетки, встречаются относительно редко [1, 4, 8,].

Целью нашего исследования было изучить фенотипическую антибиотикорезистентность клинических штаммов *S. pyogenes* и выявить гены, отвечающие за антибиотикорезистентность к макролидам, линкозамидам и тетрациклинам.

Материалы и методы. Нами было изучено 50 штаммов *S. pyogenes*, выделенных от больных с гнойно-воспалительными заболеваниями в г. Минске. Из них 8 штаммов были выделены от детей. 39 штаммов (78%) было выделено от амбулаторных больных, а 11 (22%) – от стационарных больных. Средний возраст больных составил $28,2 \pm 2,2$ года. Возраст детей колебался от 3 до 15 лет. Все штаммы, принявшие участие в исследовании, были выделены от больных с заболеваниями верхних-дыхательных путей (ВДП). 27 штаммов (54%) были выделены от больных с различными формами ангин (катаральная, лакунарная, фолликулярная), причем из них 18 штаммов (66,7%) были выявлены при лакунарной форме ангины. 6 штаммов (12%) были выделены от больных с острым тонзиллитом. Остальные штаммы были выделены при таких патологиях как: хронический тонзиллит, паротанзилярный абсцесс, скарлатина и от больных с рецидивирующими инфекциями ВДП.

Для забора материала использовались стерильные ватные тампоны, которые затем помещались в пробирки с транспортной средой Стюарта для доставки материала в лабораторию, где проводилось выявление и культивирование *S. pyogenes*.

Посев материала с тампонов проводился на чашки с кровяным агаром с соблюдением всех правил посева на чашку Петри первичной культуры β -гемолитического стрептококка. Для идентификации стрептококка группы А на чашку после посева помещали 2 диска: с бацитрацином и с триметоприм/сульфаметоксазолом. Чашки инкубировали при 36 $^{\circ}$ C в течение ночи в аэробных условиях. Чашки, на которых, после первичной инкубации в течение ночи отсутствовали признаки роста β -гемолитического стрептококка, оставляли еще на 24 часа для инкубации (изредка инкубация составляла 72 часа) [2].

У полученных изолятов определяли фенотипическую антибиотикорезистентность с помощью диско-диффузионного метода к тетрациклину, эритромицину и клиндамицину.

Для выявления генов резистентности мы применили мультиплексную процедуру ПЦР, которая позволяет одновременно обнаружить три макролидных (*erm(A)*, *erm(B)*, и *mef(A/E)*) и четыре тетрациклиновых (*tet(M)*, *tet(O)*, *tet(K)*, и *tet(L)*) факторов определяющих устойчивость стрептококков к антимикробным препаратам. Внутренним контролем для ПЦР было выявление видоспецифического 16S rRNA гена. [8, 10].

ДНК из культуры выделяли при помощи коммерческого набора Genomic DNA Purification Kit в соответствии с инструкцией производителя.

ПЦР проводили в объеме 50 мкл, из которых 10 мкл приходилось на ДНК исследуемого штамма. Каждый праймер брали с таким расчетом, чтобы его конечная концентрация в смеси была 10 пмоль (таб. 1). На одну реакцию ПЦР брали: 2 мкл 2mM MgCl₂; 2,5 мкл 10x сульфатного буфера (NH₄(SO₄)₂); 0,25 мкл Taq-полимеразы; 2,5 мкл dNTP. ПЦР осуществляли на термоциклере Терцик, в соответствии со следующим температурным режимом: 1 цикл 94оС – 6 минут; 38 циклов: 94оС – 40 секунд, 56оС – 50 секунд, 72оС – 1 минута 20 секунд; 1 цикл 72оС – 7 минут. Для хранения проб использовали 4оС.

Таб. 1. Праймеры, использованные для постановки мультиплексной ПЦР

Гены	Последовательность праймеров (5' – 3')	Размер ампликона (bp)
<i>erm(A)</i>	CCCGAAAAATACGCAAAATTTTCAT	590
	CCCTGTTTACCCATTTATAAACG	
<i>erm(B)</i>	TGGTATTCCAAATGCGTAATG	745
	CTGTGGTATGGCGGGTAAGT	
<i>mef(A/E)</i>	CAATATGGGCAGGGCAAG	317
	AAGCTGTTCCAATGCTACGG	
<i>tet(M)</i>	GTGGACAAAGGTACAACGAG	406
	CGGTAAAGTTCGTCACACAC	
<i>tet(O)</i>	AACTTAGGCATTCTGGCTCAC	515
	TCCCACTGTTCCATATCGTCA	
<i>tet(K)</i>	GATCAATTGTAGCTTTAGGTGAAGG	155
	TTTTGTTGATTTACCAGGTACCATT	
<i>tet(L)</i>	TGGTGGAATGATAGCCCATT	229

	CAGGAATGACAGCACGCTAA	
16S rRNA	GAGTACGACCGCAAGGTTGA	100
	CTGGTAAGGTTCTTCGCGTTG	

Результаты ПЦР определяли при помощи горизонтального электрофореза в 1,5% агарозном геле, содержащем этидиум бромид. Электрофорез проводили в 1х ТВЕ (45-миллиметровые Тримараны-НС1, 45-миллиметровая борная кислота, 1-миллиметровый EDTA) при следующих условиях: 200V, 100mA, 100W. Продолжительность электрофореза составляла 40мин. По величине образовавшегося продукта (таб.1, рис. 1) определяли генотип данного штамма [8].

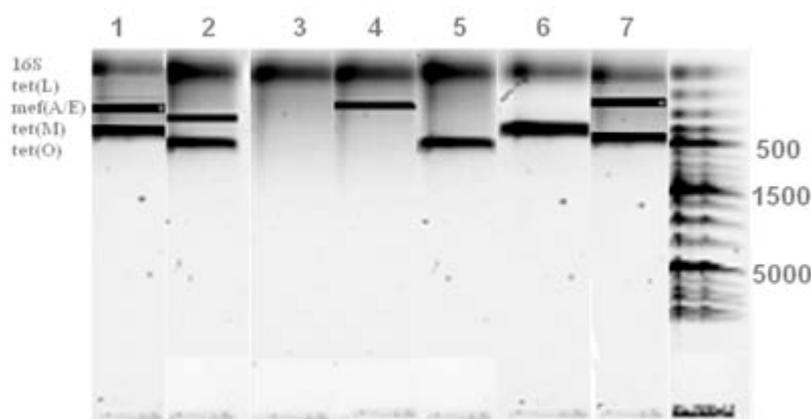


Рис. 1. Электрофореграмма мультиплексной ПЦР для выявления генов резистентности штаммов *S. pyogenes* где: 1 – штамм, содержащий 2 гена резистентности: tet(L) (229bp) и tet(M) (406bp); 2 – штамм с mef(A/E) (317bp) и tet(O) (515bp) генами, отвечающими за резистентность; 3 – штамм, имеющий только 16S rRNA (100bp)ген; 4, 5, 6 – штаммы, имеющие по одному гену резистентности: tet(L) (229bp), tet(O) (515bp), tet(M) (406bp) соответственно; 7 – штамм, содержащий tet(L) (229bp) и tet(M) (406bp) гены резистентности. Ввод, статистическую обработку и анализ данных производили с помощью компьютерных программ Microsoft Excel версия 7.0 и Статистика версия 6.0. Результаты и их обсуждение.

1.Фенотическая резистентность изолятов стрептококков, выделенных из разных источников. При изучении антибиотикограммы, полученной диско-диффузионным методом, было выявлено, что все 50 изученных изолятов (100%) чувствительны к клиндамицину. К эритромицину было чувствительно только 40 штаммов из 50 исследованных (80%), 6 изолятов (12%) имели промежуточную устойчивость, а 4 (8%) обладали устойчивостью к данному препарату. Чувствительность к тетрациклину была выявлена у 41 штамма (82%), промежуточной устойчивостью обладало 4 штамма (8%), а 5 изолятов (10%) были устойчивы к тетрациклину. Следует отметить, что 4 изолята из изученных (8%) обладали устойчивостью и/или промежуточной устойчивостью к 2 и более противомикробным препаратам (таб. 1).

Таб. 1. Фенотипическая резистентность клинических штаммов *S. pyogenes*.

Кол-во штаммов	Устойчивость к исследованным антимикробным препаратам		
	Тетрациклин	Эритромицин	Клиндамицин
4 (8%)	R	S	S
31 (62%)	S	S	S
3 (6%)	S	R	S
3 (6%)	S	I	S
2 (4%)	S	I	S
1 (2%)	S	R	S
1 (2%)	R	I	S
1 (2%)	S	S	S
4 (8%)	I	S	S

Нами был отмечен тот факт, что резистентность штаммов *S. pyogenes* зависела от того, из какого ЛПО они были выделены. Так нами были установлены ЛПО, в которых не было выявлено ни одного штамма имеющего резистентность или промежуточную устойчивость хотя бы к одному антимикробному препарату: 32 взрослая поликлиника, 1 детская поликлиника, 11 детская поликлиника, 17 и 25 детские поликлиники. Были также выявлены ЛПО в которых уровень резистентных штаммов или имеющих промежуточную устойчивость достигал 100% (12 взрослая поликлиника, 16 взрослая поликлиника, 26 взрослая поликлиника, 6 поликлиника, 3 детская больница). Таким образом, мы видим, что уже на догоспитальном этапе формируется резистентность, которая, очевидно, зависит от того, какие антимикробные препараты применяют для лечения.

Также следует отметить, что высокий уровень резистентных штаммов или штаммов, имеющих промежуточную устойчивость, был выявлен при таких патологиях как хронический тонзиллит (100%) и фолликулярная ангина (71,4%). У пациентов с диагнозами лакунарная ангина и острый тонзиллит процент штаммов с выявленной устойчивостью/промежуточной устойчивостью был гораздо ниже и составил 44,4% и 33,3% соответственно. Все штаммы, выявленные при таких патологиях как катаральная ангина и паратонзиллит, были чувствительны ко всем антимикробным препаратам.

2. Генотипическая характеристика резистентности изолятов стрептококков из разных источников. Для выявления генов резистентности используется полимеразная цепная реакция (ПЦР). Ранее для обнаружения наличия генов устойчивости у *S. pyogenes* широко использовалась ПЦР, выявляющая только один из генов резистентности. Однако, из-за того, что штаммы стрептококков, несущие больше чем один макролид/тетрациклин определяющий фактор устойчивости все чаще и чаще встречаются, необходима постановка многих ПЦР для обнаружения их наличия. Хотя корреляция между наличием *erm(B)* и *tet(M)* хорошо установлена и есть также признак, предлагающий генетическую связь *tet(O)* с *erm(A)* или *mef*, пробы для одновременного обнаружения генов резистентности к макролидам и тетрациклинам в стрептококках более предпочтительны и экономичны [8].

У 8 штаммов (16%) был выявлен *tet(M)*-ген, отвечающий за устойчивость к тетрациклину, у 2 штаммов (4%) был выявлен другой ген, отвечающий за

приобретенную устойчивость к тетрациклину – tet(O)-ген; эти белки являются гомологичными к EF-G факторам удлинения и EF-Tu и обладают АТФазной активностью, что является весьма важным для смещения тетрациклина от рибосомы. Tet(L)-ген был обнаружен у 3 изолятов (6%), tet(K)-ген не был установлен ни у одного из исследованных изолятов. Следует также отметить, что 1 штамм содержал 2 гена отвечающих за антибиотикорезистентность к тетрациклину: tet(L) и tet(M) гены, однако фенотипически у данного штамма не было выявлено чувствительности к данному антибиотику (таб. 2). У одного штамма содержащего tet(M)-ген и одного с tet(O)-геном был также обнаружен mef(A/E)-ген, отвечающий за устойчивость к макролидам, которая осуществляется посредством активного выведения антиминокробного препарата из микробной клетки. В обоих этих случаях фенотипически резистентности к тетрациклину выявлено не было, а у штамма содержащего tet(M) и mef(A/E) гены вообще не было выявлено с помощью диско-диффузионного способа резистентности к антиминокробным препаратам. У 4 штаммов (8%) выявлялся только mef(A/E)-ген и у трех из них (75%) фенотипическим методом была выявлена устойчивость к эритромицину. Однако у одного штамма, имеющего mef(A/E)-ген, не было выявлено in vitro антибиотикорезистентности. Гены, отвечающие за устойчивость к макролидам и линкозамидам посредством модификации мишени действия (метирирование 23S-субъединицы рибосомальной РНК) – erm(A) и erm(B) – не были выявлены у исследуемых изолятов, что было достаточно предсказуемо, т.к. MLSB-фенотип резистентности не был выявлен ни у одного из исследуемых штаммов.

Таб. 2. Соответствие между частотой встречаемости генов антибиотикорезистентности штаммов *S. ruogenes* и фенотипической резистентностью.

Кол-во штаммов	Наличие генов резистентности					Фенотипическая резистентность	
	mef(A/E)	tet(O)	tet(L)	tet(M)	16S	Е*	Т
3 (6%)	0	0	0	+	+	S	R
29 (58%)	0	0	0	0	+	S	S
2 (4%)	0	0	0	+	+	S	I
1 (2%)	+	+	0	0	+	R	S
4 (8%)	0	0	0	0	+	I	S
1 (2%)	0	0	0	0	+	S	I
1 (2%)	0	0	+	0	+	I	S
1 (2%)	+	0	0	+	+	S	S
3 (6%)	+	0	0	0	+	R	S
1 (2%)	+	0	0	0	+	S	S
1 (2%)	0	+	0	0	+	S	R
1 (2%)	0	0	+	+	+	S	S
1 (2%)	0	0	0	+	+	I	R
1(2%)	0	0	+	0	+	S	I

* Примечание: Е – эритромицин; Т – тетрацилин.

Если обратиться к литературным данным, то мы увидим что фенотипическая резистентность *S. ruogenes* имеет отличия в разных уголках земного шара. Так,

по данным многоцентрового проспективного исследования ПеГАС-I, проведенного в России уровни резистентности к макролидам варьировали от 2 до 12% в 1999-2000 гг и от 0,15% до 8% в 2001–2003 гг., к клиндамицину – 3% и 1% соответственно. Наибольший уровень резистентности был выявлен к тетрациклину и составил 47% в 1999-2000 гг, а в 2001-2003 гг. снизился до 45%. В Бельгии уровень резистентности к макролидам в 1999-2003 гг. составил 13%; в Корее 23% из изученных изолятов имели резистентность к эритромицину; в Испании уровень резистентности к эритромицину составил 21,7%, к клиндамицину – 6,6%. Однако есть сообщения о том, что устойчивость к макролидам в некоторых регионах мира превышает 30% [3, 5, 6, 7, 9, 10]. Различия в уровнях антибиотикорезистентности микроорганизмов, в том числе и *S. pyogenes*, обусловлены тем, что главным фактором, влияющим на возникновение и дальнейшее распространение резистентности в популяции микроорганизмов, является широкое, за частую неоправданное, использование системных antimикробных препаратов. Так, многими авторами в фармакоэпидемиологических исследованиях показана прямая зависимость между частотой использования макролидов и носительством пневмококков, резистентных к макролидам и пенициллину. Также установлено, что стрептококки группы *Viridans* являются "резервуаром" резистентности к эритромицину и другим антибиотикам и способны передавать факторы резистентности другим микроорганизмам, в частности *S. pyogenes* [8]. В то же время ограничительная политика использования системных антибиотиков способствует уменьшению частоты антибиотико-резистентных штаммов респираторных патогенов. В Японии в 1970-80-х гг. наблюдали выраженное снижение частоты резистентных к эритромицину штаммов *S. pyogenes* с 61,8 до 1-3% после сокращения потребления макролидов со 170 до 65-85 т. ежегодно. В Финляндии снижение частоты использования макролидов на 50% привело к снижению резистентности *S. pyogenes* к эритромицину в 2 раза [1]. В результате проведенного нами исследования было установлено, что антибиотикорезистентность к макролидам обусловлена *mef(A/E)*-геном, который отвечает за модификацию (метилование) мишени действия (рибосомальной РНК), что соответствует литературным данным. Так ряд авторов отмечает, что почти в 90% случаев резистентность к макролидам обусловлена метилированием рибосом, в остальных случаях она связана с активным выведением (эффлюксом) антибиотика из клетки [5, 7, 8].

В нашем исследовании среди генов, отвечающих за резистентность к тетрациклину, превалировал *tet(M)*-ген (55,6%). Следует отметить, что большинство авторов также указывают на это, а часть из них даже говорит о том, что частота встречаемости *tet(M)*-гена может достигать 73% и более [5, 7, 8].

Выводы.

1. При исследовании фенотипической антибиотикорезистентности диско-диффузионным методом, который является самым распространенным, на данном этапе, методом в лабораториях ЛПО, не было выявлено штаммов устойчивых к клиндамицину. Также не было выявлено *erm*-генов, которые обуславливают устойчивость к линкозамидам.

2. У 13 штаммов (26%) были выявлены гены, отвечающие за устойчивость к тетрациклинам. Тогда как фенотипически только у 5 (10%) штаммов была выявлена устойчивость к тетрациклину, еще у 4 (8%) изолятов была отмечена промежуточная устойчивость.
3. *Mef(A/E)*-ген, отвечающий за устойчивость к макролидам, был найден у 6 (12%) из исследованных штаммов, а при помощи диско-диффузионного метода устойчивость к эритромицину была установлена только у 4 (8%) штаммов, у 6 (12%) изолятов была выявлена промежуточная устойчивость штаммов.
4. 5 штаммов (10%) имели так называемые «молчащие гены»: фенотипически у них не было выявлено устойчивости или промежуточной устойчивости, а гены, отвечающие за устойчивость, присутствовали.

Литература

1. Брико, Н. И. Стрептококки и стрептококкозы / Н. И. Брико, В. И. Покровский, Л. А. Ряпис. М., 2006. С. 544.
2. Дуайт, Р. Дж. Лабораторная диагностика инфекций, вызванных стрептококком группы А / Р. Джонсон Дуайт [и др.]. Женева, 1998. С. 117.
3. Козлов, Р. С. Антибиотикорезистентность *Streptococcus pyogenes* в России: результаты многоцентрового проспективного исследования ПеГАС-I / Р. С. Козлов [и др.] // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2005. Т. 7. № 2. С. 154–166.
4. Шпынев, К. В. *Streptococcus pyogenes*: характеристика микроорганизма, выделение, идентификация и определение чувствительности к антибактериальным препаратам / К. В. Шпынев [и др.] // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2007. Т. 9. № 2. С. 104–120.
5. Betriu, C. Prevalence of macrolide and tetracycline resistance mechanisms in *Streptococcus pyogenes* isolates and in vitro susceptibility to telithromycin / C. Betriu [et al.] // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2002. Vol. 50. P. 433–442.
6. Littauer, P. Macrolide-Resistant *Streptococcus pyogenes* in Norway: Population Structure and Resistance Determinants / P. Littauer [et al.] // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2006. Vol. 50, № 5. P. 1896–1899.
7. Sook, Y. B. Phenotypes and genotypes of macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes* isolated in Seoul, Korea / Y. B. Sook // *Journal of Medical Microbiology*. 2007. Vol. 56. P. 229–235.
8. Surbhi, M.-K. Multiplex PCR for simultaneous detection of macrolide and tetracycline resistance determinants in *Streptococci* / M.-K. Surbhi [et al.] // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. November 2005. Vol. 49, № 11. P. 4798–4800.
9. Surbhi, M.-K. Macrolide- and Telithromycin-resistant *Streptococcus pyogenes*, Belgium, 1999–2003 / M.-K. Surbhi [et al.] // *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 11, № 6, June 2005. P. 939–942.
10. Tamayo, J. Resistance to macrolides, clindamycin and telithromycin in *Streptococcus pyogenes* isolated in Spain during 2004 / J. Tamayo [et al.] // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2005. Vol. 56. P. 780–782.