

Ордынская Алина Игоревна, ординатор,
ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии
в Белгородской области», Белгород

Бочарова Ксения Александровна,
кандидат медицинских наук, доцент,
заведующая кафедрой микробиологии и вирусологии
с курсом клинической иммунологии,
Белгородский Государственный Национальный
исследовательский университет, Белгород

ЭРИТРОМИЦИНРЕЗИСТЕНТНЫЙ ПНЕВМОКОКК. РАЗЛИЧНЫЕ ФЕНОТИПЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ

Аннотация: Лабораторная дифференциация фенотипов резистентности к эритромицину для пневмококков плохо стандартизирована. В этой статье представлены исследования 25 клинических изолятов устойчивых к эритромицину ($MIC \geq 1$ мкг/мл) *Streptococcus pneumoniae* были протестированы на фенотип устойчивости с помощью двухдискового теста эритромицин-клиндамицин (ранее использовавшегося для определения фенотипа устойчивости к макролидам у штаммов *Streptococcus pyogenes*) и индукционных тестов MIC, т.е. путем определения MIC макролидных антибиотиков без предварительного воздействия и с предварительным воздействием до 0,05 мкг эритромицина на мл.

Ключевые слова: *Streptococcus pneumoniae*, антибиотик, MIC, ген, фенотип, резистентность

Модификация сайта-мишени рибосомы под действием метилаз, кодируемых генами класса *erm*, является наиболее распространенным и широко исследованным механизмом резистентности стрептококков к эритромицину. Давно известно, что метилирование рибосом вызывает снижение связывания и основной устойчивости к макролидным, линкозамидным и стрептограминовым В (MLS) антибиотикам и что у стрептококков устойчивость к MLS может быть выражена либо конститутивно (*cMLS* фенотип), либо индуцируемо (*iMLS* фенотип). Только недавно был описан механизм утечки макролидов для стрептококков, в котором он связан с новым паттерном резистентности (фенотипом M), характеризующимся устойчивостью к 14- и 15-членным макролидам и чувствительностью к 16-членным макролидам, линкозамидам и стрептограмину В.

Хотя M – резистентность сходна у *Streptococcus pyogenes* и *Streptococcus pneumoniae*, будучи опосредованной у обоих видов сходными детерминантами – *mef* (A) и *mef* (E) соответственно, недавно было рекомендовано рассматривать единый ген, *mef* (A), кодирующий сходные мембранные белки, ответственные за отток макролидов, устойчивость к MLS. представляется более разнообразным. С генотипической точки зрения, у *S. pyogenes* устойчивость к MLS опосредована двумя классами генов метилазы, т.е. обычной детерминантой *erm* (AM), принадлежащей к классу генов *erm* (B), и недавно описанной детерминантой *erm* (TR), принадлежащей к классу генов *erm* (A). У *S. pneumoniae* широко документирован только первый ген метилазы, хотя присутствие *erm* (TR) было недавно продемонстрировано в конкретных изолятах устойчивых к эритромицину пневмококков. С фенотипической точки зрения устойчивые к эритромицину штаммы *S. pyogenes* можно разделить на три фенотипа (*cMLS*, *iMLS* и M) с помощью простого двухдискового теста (эритромицин плюс клиндамицин) или – так же просто, но более точно – на пять фенотипов с



помощью трехдискового теста (эритромицин плюс клиндамицин и джозамицин), который позволяет дополнительно дифференцировать индуцируемо устойчивые штаммы на три отдельных типа (iMLS-A, iMLS-B и iMLS-C). Кроме того, у *S. pneumoniae* детерминанта erm (AM) может быть связана как с конститутивной (фенотип cMLS), так и с индуцируемой (фенотип iMLS-A) резистентностью, тогда как детерминанта erm (TR) обычно связана с индуцируемой резистентностью (фенотипы iMLS-B и iMLS-C). Напротив, различие между конститутивной и индуцируемой устойчивостью к MLS у штаммов *S. pneumoniae* является неопределенным, а лабораторная дифференциация фенотипов устойчивости к макролидам плохо стандартизирована.

Штаммы бактерий. В общей сложности 25 клинических изолятов эритромицинорезистентных *S. pneumoniae* были собраны в бактериологической лаборатории ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в Белгородской области в период с сентября 2021 по июнь 2022 года. Идентификация штамма была подтверждена на MALDI-TOF масс-спектрометре и обычными лабораторными тестами, такими как чувствительность к оптохину.

Тесты на чувствительность и ECDD. MIC определяли методом микроразведения бульона в соответствии с процедурой, рекомендованной Национальным комитетом по клиническим лабораторным стандартам (NCCLS). В качестве тест-среды использовали бульон Мюллера-Хинтона (BIO-RAD) с добавлением 5% бараньей крови. Антибиотики тестировали в конечных концентрациях (полученных из двукратных разведений), которые варьировали от 0,015 до 128 мкг/мл. *S. pneumoniae* Для контроля качества использовали ATCC 49619. Контрольные точки MIC, предложенные NCCLS, использовались для эритромицина, клиндамицина и кларитромицина (чувствительный, $\leq 0,25$ мкг/мл; промежуточный, 0,5 мкг/мл; устойчивый, ≥ 1 мкг/мл) и для азитромицина (чувствительный, $\leq 0,5$ мкг/мл; промежуточный, 1 мкг/мл; устойчивый, ≥ 2 мкг/мл), для 16-членных макролидов использовали джозамицин и рокситамидин (чувствительные, ≤ 1 мкг/мл; промежуточные, 2 мкг/мл; устойчивые, ≥ 4 мкг/мл).

Диски с эритромицином (15 мкг) и клиндамицином (2 мкг) помещали на расстоянии 15-20 мм друг от друга на агар Мюллера-Хинтона (BIO-RAD) с добавлением 5% бараньей крови, которую инокулировали тампоном, смоченным в бактериальной суспензии с мутностью, эквивалентной мутности 0,5 мкфарландского стандарта. После 18 ч инкубации при 37°C отсутствие зоны ингибирования вокруг двух дисков указывало на конститутивную резистентность (фенотип cMLS): притупление зоны ингибирования клиндамицином проксимальнее эритромицинового диска указывало на индуцируемую резистентность (фенотип iMLS); а чувствительность к клиндамицину при отсутствии притупления зоны ингибирования вокруг клиндамицинового диска указывала на фенотип M.

Индукция резистентности к MLS (тесты индукции MIC). Индукцию резистентности к MLS оценивали по предварительному росту (3 часа при 37°C) в эритромицине в субингибирующей концентрации (0,05 мкг/мл). Как описано ранее, затем культуру промывали, и клетки использовали для приготовления инокулята для МИК-тестирования обычным методом микроразведения бульона.

Все 25 исследованных эритромицинорезистентных штаммов *S. pneumoniae* были протестированы с использованием анализа ECDD; 17 (70,5%) были отнесены к фенотипу cMLS и 8 (29,5%) – к фенотипу M. Индуцируемо резистентные изоляты (фенотип iMLS) этим методом обнаружены не были.

Макролидные MICs и MIC-индукционные тесты. Были определены и сравнены MIC двух 14-членных (эритромицин и кларитромицин), одного 15-членного (азитромицин) и двух 16-членных (джозамицин и рокситамидин) макролидов. Однородные паттерны чувствительности наблюдались у 20 штаммов, отнесенных к фенотипу M с помощью теста ECDD; все эти изоляты были устойчивы к 14- и 15-членным макролидам (с MIC, не

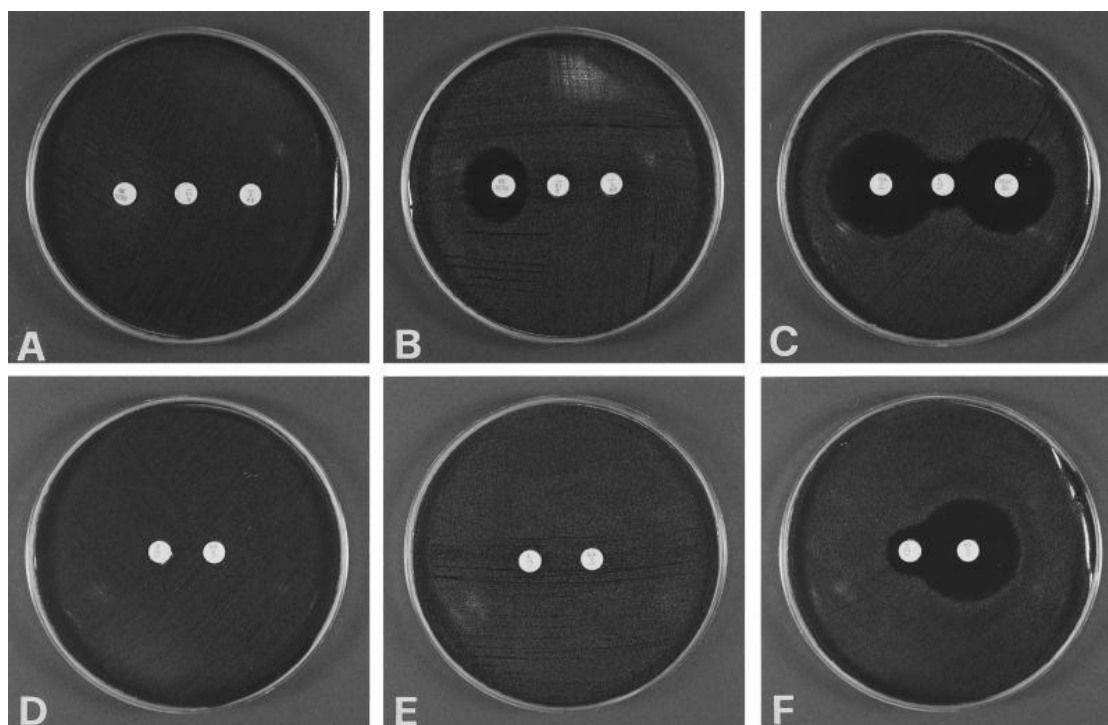


превышающими 16 мкг/мл для эритромицина и кларитромицина и 32 мкг/мл для азитромицина) и чувствительны к 16-членным макролидам. Напротив, среди 17 штаммов, отнесенных к фенотипу sMLS с помощью теста ECDD, наблюдались неоднородные паттерны чувствительности; все эти изоляты были устойчивы (с широко варьирующимися уровнями MIC) к 14- и 15-членным макролидам, тогда как MIC джозамицина и рокитрамицина варьировали от чувствительности (0,5 и 0,06 мкг/мл соответственно) до высокого уровня резистентности (>128 мкг/мл).

Трехдисковый тест. Чтобы легко дифференцировать внутри эритромицинорезистентных пневмококков не только изоляты M фенотипа от пневмококков с устойчивостью к MLS, но также, среди последних, sMLS от изолятов iMcLS, был разработан тест с тремя дисками путем добавления диска с рокитрамицином (30 мкг; баррель) к дискам с эритромицином и клиндамицином обычного теста ECDD. Эритромициновый диск помещали в центр агаровой чашки, а клиндамициновый и рокитрамициновый диски располагали на расстоянии 15-20 мм друг от друга с обеих сторон.

Все штаммы были протестированы с помощью этого трехдискового анализа (ECRTD).

Штаммы iMcLS (рис. (Рис.1 В) характеризовались отсутствием значительной зоны ингибирования ни вокруг эритромицинового, ни вокруг клиндамицинового диска, что соответствует их устойчивости к обоим препаратам, но представляли собой зону ингибирования вокруг рокитрамицина, которая была притуплена на стороне, проксимальной к эритромициновому диску, что соответствует индуцируемости их устойчивости к рокитрамицину. С помощью теста ECDD (рис. (Рис.1 Е) эти штаммы будут идентифицированы как sMLS, зона ингибирования клиндамицином не будет заметна. Истинный фенотип sMLS (рис. (Рис.1 А и D), характеризующийся отсутствием значительной зоны ингибирования вокруг трех дисков, и фенотип M (рис. (Рис.1 С и F), характеризующийся чувствительностью к клиндамицину и рокитрамицину без притупления соответствующих зон ингибирования, были идентифицированы с помощью теста ECRTD так же легко, как и с помощью теста ECDD.



Тот факт, что индуцируемая резистентность к клиндамицину у пневмококков обычно не встречается, вряд ли означает, что резистентность к MLS выражена только конститутивно у этих организмов. Действительно, 16-членные макролиды, которые особенно эффективны *in vitro* против стрептококков, включая некоторые устойчивые к эритромицину изоляты, по-видимому, лучше подходят для выявления индуцируемой MLS резистентности пневмококков, чем линкозамиды. Это особенно относится к рокитамцину, который обладает более мощной антипневмококковой активностью *in vitro*, чем другие 16-членные макролиды и фактически использовался в прошлом для предварительного отличия индуцируемой от конститутивной резистентности пневмококков к MLS.

Среди изолятов *S. pneumoniae* с устойчивостью к MLS [генотипически характеризующихся геном *erm* (AM) и обычно отнесенных к фенотипу *sMLS* на основе теста ECDD] те, которые также устойчивы к рокитамцину без индукции, вероятно, представляют настоящий фенотип *sMLS*, тогда как те, которые становятся устойчивыми к рокитамцину только после индукции, на самом деле, вероятно, представляют фенотип *iMLS*. Мы обозначили последний тип как *iMcLS*, чтобы подчеркнуть, что индуцируемость касается макролидов (особенно 16-членных, с акцентом на рокитамцин), но не линкозамидов, к которым эти штаммы устойчивы и без индукции (у нас пока нет данных о стрептограминах группы В). Тест ECRTD с тремя дисками, разработанный путем добавления диска с рокитамцином к дискам с эритромицином и клиндамицином теста ECDD, позволил легко отличить не только пневмококки с фенотипом М от пневмококков с устойчивостью к MLS, но также, среди последних, пневмококки с более узким, но, вероятно, более истинным фенотипом *sMLS* от пневмококков с фенотипом *iMcLS*.

Список литературы:

1. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) «Who fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action»

