

УДК 616.24-002-036.2

Мартынова А.В.<sup>1,2</sup>, Чулакова О.А.<sup>1</sup>, Балабанова Л.А.<sup>3</sup>**МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ПАЦИЕНТОВ ПОЖИЛОГО ВОЗРАСТА**

*ГБОУ ВПО Тихоокеанский государственный медицинский университет<sup>1</sup>;  
Дальневосточный Федеральный Университет<sup>2</sup>;  
Лаборатория морской биохимии,  
Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова,  
Дальневосточное отделение Российской Академии наук<sup>3</sup>;*

**Резюме.** Микробиологический мониторинг является одним из действенных инструментов эпидемиологического надзора за пневмококковыми инфекциями, в том числе и у лиц пожилого возраста. Цель: выявить особенности микробиологических свойств штаммов пневмококка у лиц пожилого возраста с внебольничными пневмониями, бронхитами и при носительстве для рационализации микробиологического мониторинга и планирования мер профилактики пневмококковых инфекций. Материалы и методы: В исследование нами были взяты штаммы *Streptococcus pneumoniae*, выделенные от пациентов пожилого возраста, определена распространенность различных аллелей генетических детерминант различных факторов патогенности. Результаты: Полученные результаты позволяют утверждать, что существуют различия в штаммах, выделенных у пациентов пожилого возраста, выделенных при внебольничной пневмонии, хроническом обструктивном бронхите и при обследовании на носительство. Заключение: что штаммы, выделенные у пациентов пожилого возраста при внебольничной пневмонии пневмококковой этиологии обладают определенными особенностями в характере распространения генетических детерминант, определяющих патогенность циркулирующих изолятов.

**Ключевые слова.** *Streptococcus pneumoniae*, пневмококки, пневмококковые инфекции микробиологический мониторинг

*Martynova, A.V., Kulakova O.A., Balabanova L.A.*

**MICROBIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF STRAINS OF *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* ISOLATED FROM ELDERLY PATIENTS**

**Summary.** Microbiology monitoring is still remaining the active instrument of epidemiologic surveillance for pneumococcal infection also in aged patients. The aim of our research was to define the peculiarities of microbiological characteristics of pneumococci isolated in aged patients with community-acquired pneumonias, bronchitis and in carriage for rationalization of microbiological monitoring and planning of preventive measures of pneumococcal infections. Material and methods: there were taken strains of *Streptococcus pneumoniae*, isolated in aged patients, also there were determined the variability in strains of different alleles of genetic determinants of pathogenic factors, Results: the gained results allow us to state that there are differences in strains isolated in aged patients isolated in community-acquired pneumonias, bronchitis, in carriage. Conclusions: there are differences in way of spread of genetic determinants of pathogenicity.

**Key words.** *Streptococcus pneumoniae*, pneumococci, microbiological monitoring

**Введение.** Еще в начале становления микробиологической науки пневмококк привлек внимание ученых вариативностью своих патогенных свойств, что позволяет этому возбудителю существовать практически во всех микроэко-логических условиях. Такой убикивитарности возбудителя будут способствовать пластичность генома *S.pneumoniae*, которая позволяет данному микробу в различной степени экспрессировать факторы патогенности в ответ на изменения микробиоценоза, в том числе и респираторного тракта, что проявляется на практике появлением высокопатогенных штаммов. Кроме того, пластичностью генома объясняется и появлением устойчивых к антибактериальным химиопрепаратам штаммов пневмококка, что так же подтверждает высокие адаптивные способности *S.pneumoniae* к воздействию селективного прессинга на микробную популяцию антибиотиков [1, 2-4].

Основным методом, позволяющим обеспечить решение задач эпидемиологического надзора за пневмококковыми инфекциями, является, прежде всего, микробиологический мониторинг за формированием устойчивости к антибактериальным химиопрепаратам и динамики выработки основных факторов вирулентности выделенных штаммов [5-7]. Это в полной мере, по нашему мнению, позволяет не только изучить внутривидовые процессы данного вида микроорганизмов, но и оценить возможность появления эпидемического варианта, что особенно важно при увеличении в структуре заболеваемости инвазивных форм пневмококковых инфекций [8,9]. В качестве генетических маркеров, часто применяемых в микробиологическом мониторинге, используются такие гены как пневмолизин (*ply*), аутолизин (*lytA*, *lytC*, *lytB*), поверхностный протеин (*pspA*, *pspC*).

**Цель исследования:** выявить особенности микробиологических свойств штаммов пневмококка у лиц пожилого возраста с внебольничными пневмониями, бронхитами и при носительстве для рационализации микробиологического мониторинга и планирования мер профилактики пневмококковых инфекций.

**Материалы и методы.** Нами были взяты штаммы *Streptococcus pneumoniae*, выделенные от пациентов пожилого возраста (69±6,7 лет) с внебольничной пневмонией (всего 118 штаммов), при бронхитах (всего 78 штаммов). Для исследования носительства возбудителя и для выявления его роли в формировании заболеваемости у лиц пожилого возраста инфекциями нижних дыхательных путей, мы провели обследование 100 пациентов, обратившихся за консультативной медицинской помощью в поликлинику ветеранов по поводу заболеваний желудочно-кишечного тракта, травм, и не имеющие в анамнезе хронических заболеваний дыхательных путей, ни острых заболеваний дыхательных путей на момент обследования. Средний возраст обследованной группы составил 72 ±5,6.

ПЦР идентификацию штаммов пневмококка проводили общепринятым способом, при этом готовили реакционную смесь, в которой содержалось из расчета на одну пробирку воды 40 мкл, буфера для ПЦР 5 мкл, смеси нуклеотидов 8 мкл, Таq полимеразы (производитель Sigma-Aldrich) 0,2 мкл, праймеров прямых и обратных по 0,5 мкл, затем разливали в реакционные пробирки по 45 мкл, и добавляли воду и ДНК из расчета на объем реакционной смеси по 5 мл. Условия амплификации (GeneAmpPCRSystem2400,Perkin-Elmer) были нижеследующие: первоначально денатурация шла в течение 3 мин при 94<sup>0</sup>С, последующие этапы денатурации (29 циклов) проводились по 1 мин – при 94<sup>0</sup>С; затем отжиг шел в течение 30 циклов по 1 минуте при температуре 45<sup>0</sup>С; воссоединение полученных цепей ДНК длилось в течение 30 циклов по 3 минуты при температуре 72<sup>0</sup>С, с конечным этапом синтеза по 10 минут при 72<sup>0</sup>С в течение 30 циклов, затем – инкубация при 10<sup>0</sup>С. Исследование проводилось согласно методике, включавшей такие этапы как выделение ДНК, ПЦР амплификация с праймерами к генам пневмолизина *ply*, аутолизина *lytA*, пневмококкового поверхностного протеина *ApspA*, пневмококкового поверхностного протеина *C pspC*; рестрикция – соответственно с энзимами *Hind3*, *Pvu2*, *EcoRI*, *Sma1*; секвенирование, идентификация и статистическая обработка полученных результатов. ПЦР производилось согласно общепринятой методике, с использованием гибридизации по Саузерну. Для этого для денатурации фрагментов ДНК гель вымачивали в буфере для денатурации при осторожном покачивании в течение 30 мин при комнатной температуре, затем выдерживали в буфере для нейтрализации в течение 30 мин. Одновременно вымачивали нейлоновый фильтр Genetrans 45 (Plasco, Massachusetts, USA) для переноса ДНК в 6 моль ЭДТА в течение 5 минут. Собирали систему для переноса ДНК и проводили перенос при комнатной температуре в течение ночи в 20 моль ЭДТА. По окончании переноса снимали фильтровальную бумажку и отмечали положение лунок на фильтре, затем после снятия фильтра промывали остатки агарозы буфером ЭДТА. Пришивали ДНК к фильтру, поместив последний на 5 минут под УФ-лампу (254 нм). Затем проводили гибридизацию с соответствующими праймерами к генетическим детерминантам основных факторов вирулентности при температуре 42 градуса в течение 60 минут. Затем промывали фильтр в двух сменах ЭДТА по 5 минут, и проводили идентификацию полученного результата.

Праймеры, использованные в исследовании:

*ply*\_F 5'-ATTTCTGTAACAGCTACCAACGA-3'

*ply*\_R 5'-GAATTCCTGTCTTTTCAAAGTC-3'

*lytA*\_F 5'-CAACCGTACAGAATGAAGCGG-3'

*lytA*\_R 5'-TTATTCGTGCAATACTCGTGCG-3'

*lytB*\_R 5'-GGAAGAAGGCATATGAAGAAAGTAAGATTTATTTTTTTAGC 3'

*lytB*\_R 5'-GGGTGCACATATGAGTGATGGTACTTGGCAAGGAAAACAG -3'

*lytC*\_R 5'-TTATTCGTGCAATACTCCACATATGAGTGATGGTGTGCG-3'

*lytC*\_R 5'-TTATTCGTGCAAGTGCACATATATACTCGTGCG-3'

*pspA*\_F5' ATCTTAGGGGCTGGTTTTGTTACG 3'

*pspA*\_R 5'CGGCGCTGGAGTTTCTTCTT 3'

*pspC*\_F 5' CGACGAATAGCTGAAGAGG 3'

*pspC*\_R 5'CATACCGTTTTCTTGTTCCTCCAGCC3'

*piuA*\_R 5' TGGTGCATGTAGTACAAACTCAAG 3'

*piuA*\_F 5' AGTCCGCCTCCGCTTAGAT 3'

Статистическая обработка проведена с использованием критерия хи-квадрат. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

### Результаты исследования и их обсуждение.

Важнейшими, с точки зрения медицинской микробиологии, являются такие факторы вирулентности как белки-адгезины, нейраминидаза, гиалуронидаза и пневмолизин. Очевиден тот факт, что существуют различия в выработке факторов вирулентности у различных штаммов пневмококка (что было доказано и при изучении референтных штаммов), что обуславливает различия в патогенезе инфекционного процесса, вызываемого пневмококком. Различия в выработке факторов вирулентности могут быть обусловлены действием различных индуцирующих факторов макроорганизма, но чаще всего, они связаны с существующими различиями в геноме, что и определяет внутривидовую вариабельность микроорганизма.

Для характеристики возможной вариабельности генома штаммов *S.pneumoniae*, выделенных у пациентов пожилого возраста, мы изучили распространенность таких генетических детерминант факторов вирулентности как *pspA* (пневмококковый поверхностный белок А), *psaA* (пневмококковый поверхностный адгезин А), *piuA* (ген, отвечающий за перенос ионов железа, необходимый для участия в дыхательной цепи), ген пневмолизина (*ply*). Изучая особенности распространенности основных генетических детерминант, определяющих адгезию в группах штаммов, выделенных от пациентов с пневмококковыми пневмониями (118 штаммов), составившими 1 группу штаммов, от носителей (29 штаммов), составивших 2 группу, и от пациентов с обострениями хронического бронхита (78 штаммов), составивших 3 группу, мы получили следующие данные ( таблица 1):

Таблица .1

Распространенность основных генетических детерминант в геноме штаммов *S.pneumoniae*, выделенных от пациентов с внебольничными пневмониями, носителей и от пациентов с хроническим обструктивным бронхитом

	1 группа (n=118)	2 группа (n=29)	3 группа (n=78)	P
<b>Поверхностные адгезины</b>				
<i>pspA</i>	100% (118)	100% (29)	100%(78)	P=0,03
<i>pspC</i>	88,1%(104)	77,13%(22)	61,2% (48)	
<i>psaA</i>	83,1% (98)	93,1%(27)	97,1%(76)	
<b>Другие гены факторов патогенности</b>				
<i>piuA</i>	94,1%( 112)	24,1%(7)	69,7% (54)	
<b>Гены гидролаз клеточной стенки</b>				
<i>ply</i>	100% (118)	100% (29)	100%(78)	P=0,04
<i>lytA</i>	92,3%(112)	62%(18)	82,05%(69)	
<i>lytB</i>	66,1%(78)	51,1%(15)	61,5% (48)	
<i>lytC</i>	96,01%(114)	31,03%(9)	47,4%(37)	

Полученные результаты позволяют утверждать, что существуют различия в штаммах, выделенных у пациентов пожилого возраста при внебольничной пневмонии, хроническом обструктивном бронхите и при обследовании на носительство. Действительно, определенный интерес представляет исследование распространенности гена *pspC*, являющегося паралогичным гену *pspA*, который присутствует в клеточной стенке всех пневмококков. Учитывая тот факт, что *pspC* является установленным паралогом со схожей к *pspA* функцией, а также принимая во внимание преобладание данного гена в геноме штаммов, выделенных у пациентов с внебольничной пневмонией (в 88,1%) по сравнению со штаммами от пациентов с хроническим обструктивным бронхитом (61,2%), можно предполагать, что этот ген увеличивает патогенность штаммов, и, соответственно, является маркером патогенных штаммов. Так как основной функцией белков *pspA*, *pspC* является обеспечение эффективной колонизации слизистых оболочек, защите пневмококков от фиксации комплемента, что способствует снижению опсонизации, штаммы, обладающие обоими вариантами генов, будут эффективнее избегать защитных механизмов иммунитета, что будет способствовать развитию патогенетического процесса у пациента.

При анализе распространенности генов *psaA* (поверхностного пневмококкового адгезина) нами не было выявлено значимых различий в варибельности, тем не менее, можно отметить, что в штаммах, выделенных от пациентов с внебольничными пневмониями, этот ген представлен несколько реже, что может быть связано с мутацией соответствующего участка в силу воздействия селективных факторов макроорганизма.

Значимыми представляются различия в наличии такого гена, как *piuA*, отвечающего за перенос ионов железа: в штаммах 1 группы (выделенных от пациентов с пневмонией) он представлен в 94,1%, в штаммах 2 группы (при обследовании на носительство) – в 24,1%, в штаммах 3 группы (выделенных у пациентов с хроническим обструктивным бронхитом) – в 69,7%. Вышеуказанные данные подтверждают предположение, что увеличение экспрессии данного гена ведет к увеличению патогенного потенциала пневмококка.

Ген *ply*, отвечающий за выработку токсина белковой природы, поражающего клетки бронхиального эпителия, присутствует во всех штаммах пневмококка, и соответственно является конститутивным геном данного микроорганизма. При анализе группы генов, отвечающих за выработку гидролаз клеточной стенки, можно отметить, что имеется варибельность среди семейства генов кластера *lyt*, что так же связано с изменениями патогенности изучаемых штаммов. Так, ген *lytA*, являющийся одним из маркеров для идентификации пневмококка, представлен во всех трех группах штаммов, и, вероятно, именно он несет основную функциональную нагрузку с целью экспрессии белка *LytA*, определяющего лизис клеточной стенки, что необходимо в физиологических условиях для роста микроорганизма при делении клетки. Ген *lytB* является паралогом гена *lytA*, и в наших исследованиях мы не обнаружили значимых различий в распространенности данного гена и изменениях в вирулентных свойствах штаммов пневмококка, выделенных от пациентов с различными формами пневмококковой инфекции. Наличие, и соответственно, экспрессия гена *lytC*, наоборот является маркерным событием для повышения патогенности штаммов *S.pneumoniae*, и соответственно, для развития инфекционного процесса в респираторном тракте.

**Выводы (заключение).** Таким образом, при анализе распространенности генетических детерминант различных факторов вирулентности штаммов пневмококка, нам удалось выявить различия в их распространенности, что может быть использовано в качестве маркера патогенности штаммов. Исходя из представленных результатов, мы можем сделать вывод, что штаммы, выделенные у пациентов пожилого возраста при внебольничной пневмонии пневмококковой этиологии обладают определенными особенностями в характере распространения генетических детерминант, определяющих патогенность циркулирующих изолятов, что позволяет рационализировать идентификацию, так и определить генетические детерминанты госпитальных изолятов, идентификация которых прежде всего актуальна в целях организации микробиологического мониторинга для эпидемиологического надзора.

**Литература:**

1. Бачинская Е.Н. Возбудители внебольничных пневмоний на пороге нового тысячелетия.// Антибиотики и химиотерапия. – 2000. – Т.45. – С.21-28.
2. Богданов М.Б. Микробиологическая оценка антибактериальных препаратов, используемых для эмпирической терапии внебольничных инфекций нижних дыхательных путей / М.Б. Богданов, Т.В. Черненко // Антибиотики и химиотерапия. – 2000. – №.10. – С.15-19.
3. Жильцов И.В. Бета-лактамазная активность мокроты и ее влияние на эффективность антибактериальной терапии / И.В. Жильцов, В.М. Семёнов // 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 клинко-диагностических лабораториях лечебно- профилактических учреждений // Приказ МЗ СССР № 535 от 22 апреля 1985 г.
6. Семенов В.М. Микробиологические аспекты резистентности к антимикробным препаратам / В.М. Семенов, Т.И. Дмитраченко, И.В. Жильцов // Туберкулез и болезни легких. – 2012. – №.4. – С.18-26.
7. Синопальников А.И. Новые рекомендации по ведению взрослых пациентов с внебольничной пневмонией / А.И. Синопальников, Л.С. Страчунский // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. –2001. – №1. – С.18-21.
8. Токмакова С.И. Влияние табакокурения на слизистую оболочку полости рта / С.И Токмакова, Ю.В. Луницына // Забайкальский медицинский вестник. – 2012. – №1. – С.124-130.
9. Streptococcus pneumoniae. Textbook in Serotyping, VirulenceFactors and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for Measuring Pneumococcal Antibodies.-Statens Serum Institute, Copenhagen, Denmark. – 2013. – P 34.