

Видовая идентификация и анализ генетических маркеров лекарственной устойчивости стрептококков с помощью количественной мультиплексной полимеразной цепной реакции у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких

Л.Н.Икряникова¹, М.Е.Сенина², Е.С.Лисицина², Л.М.Огородова³, С.В.Федосенко², М.А.Карнаушкина⁴, Е.Н.Ильина¹

1 – НИИ физико-химической медицины ФМБА России: 119435, Москва, ул. Малая Пироговская, 1а;

2 – ООО НПФ "Литех": 107023, Москва, ул. Малая Семеновская, 3а, стр. 2;

3 – ГБОУ ВПО "Сибирский государственный медицинский университет" Минздрава России: 634050, Томск, Московский тракт, 2;

4 – ГБОУ ВПО "Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова" Минздрава России: 127473, Москва, ул. Десятская, 20 / 1

Резюме

На лабораторной коллекции клинических штаммов стрептококков апробирована и использована для тестирования клинических образцов ДНК, изолированных из орофарингеальных мазков от пациентов со стабильной хронической обструктивной болезнью легких, экспериментальная диагностическая панель "Стрептопол+" (ООО НПФ "Литех"). В исследование включены пациенты ($n = 89$) с анамнезом заболевания ≥ 12 мес., индексом курения ≥ 10 пачко-лет, отсутствием обострений на протяжении предшествующих 4 нед. и терапии антибактериальными препаратами в течение 12 нед. до взятия клинического материала. При использовании экспериментального набора "Стрептопол+" обнаружены генетические маркеры лекарственной устойчивости и проведена видовая идентификация стрептококков по принципу мультиплексной полимеразной цепной реакции в реальном времени. Достоверно стрептококки определены в 83 (93,3 %) образцах, в 1 образце стрептококков не обнаружено, 5 образцов были отнесены в "серую" зону, характерную для низких титров ДНК (преимущественно зеленящие стрептококки группы *mitis*). Выявлено, что все они являются резервуаром генетических детерминант резистентности к макролидам, что повышает риск микробиологической резистентности и терапевтической неэффективности препаратов данной группы. Присутствие генов *mef* было зафиксировано в 89 (100 %) образцах; ген *ermB* обнаружен в 81 (91,0 %) образце.

Ключевые слова: макролиды, устойчивость, пневмококки, стрептококки, хроническая обструктивная болезнь легких.

Multiplex quantitative PCR for Streptococci species identification and detection of genetic drug resistance markers in COPD patients

L.N.Ikryannikova¹, M.E.Senina², E.S.Lisitsina², L.M.Ogorodova³, S.V.Fedosenko³, M.A.Karnaushkina⁴, E.N.Ilina¹

1 – Federal Institution "Scientific Research Institute of Physico-Chemical Medicine", Federal Medical and Biological Agency of Russia; 1A, Malaya Pirogovskaya ul., Moscow, 119435, Russia;

2 – LTD Scientific and Industrial Company "Litech": 3A, build. 2, Malaya Semenovskaya ul., Moscow, 107023, Russia;

3 – State Institution "Siberian State Medical University", Healthcare Ministry of Russia; 2, Moskovskiy trakt, Tomsk, 634050, Russia;

4 – State Institution "A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry", Healthcare Ministry of Russia; 20 / 1, Delegatskaya ul., Moscow, 127473, Russia

Summary

The aim of this study was to develop a new diagnostic tool for Streptococcus identification and simultaneous macrolide resistance genetic marker detection in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients. *Methods.* The "Streptopol +" experimental diagnostic panel (Lytech Ltd) was used to test laboratory collection of Streptococcus strains and DNA samples isolated from oropharyngeal swabs of 89 patients with stable COPD with length of disease ≥ 12 months, smoking history ≥ 10 pack / years, no exacerbations during the previous 4 weeks and no antibiotic therapy during the previous 12 weeks prior to study entry. *Results.* The "Streptopol +" experimental set allowed detection of drug resistance genetic markers and Streptococcus species identification based on a multiplex real-time PCR. Streptococcus was determined reliably in 83 (83 / 89; 93.3 %) samples obtained from COPD patients; Streptococcus was not found in one sample; 5 samples were in a "gray" zone with low DNA titers. Mainly, Streptococcus was identified as *S. viridans*, *mitis* group which was revealed to be as a reservoir for macrolide resistance genetic determinants. This increases a risk of macrolide resistance and therapeutic failure of these drugs. The *mef* genes were detected in all samples (89 / 89; 100 %), *ermB* gene was less frequent (81 / 89; 91.0 %). *Conclusion.* The "Streptopol +" experimental diagnostic panel has shown a high specificity and sensitivity to diagnose Streptococcus infection in COPD patients.

Key words: macrolides, drug resistance, pneumococcus, Streptococcus, chronic obstructive pulmonary disease.

Стрептококки – одни из основных контаминантов верхних дыхательных путей (ДП). Традиционно *Streptococcus pneumoniae* преобладает среди возбудителей внебольничных бактериальных пневмоний ($\approx 50\text{--}90\%$ в разных возрастных группах) и выявляется у $10\text{--}20\%$ больных с госпитальными пневмониями [1].

Известно, что ДП у больных хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ), особенно тяжелого и очень тяжелого течения, часто колонизированы бактериями, в т. ч. *S. pneumoniae*, которые идентифицируются культуральными и молекулярно-генетическими методами [2]. При этом более выраженная контаминация ДП *S. pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* в стабильный период ассоциирована с более тяжелым ограничением скорости воздушного потока – более значимым снижением объема форсированного выдоха за 1-ю секунду (ОФВ₁) (коэффициент корреляции (r) = $-0,299$; значение достоверности (p) = $0,033$) [3]. Трансформация бактериальной контаминации в инфекционный процесс является наиболее частой причиной развития обострений ХОБЛ, при этом усугубляется бронхиальная обструкция, нарастают все признаки болезни и ее дальнейшему прогрессированию [4, 5]. В то же время имеются данные, что появление в ДП больного ХОБЛ новых бактериальных штаммов *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *S. pneumoniae* или *Pseudomonas aeruginosa* является более вероятным фактором провоцирования обострения болезни, нежели постоянно присутствующие, привычные для пациента штаммы этих видов [6].

При исследовании культуральными методами образцов из респираторного тракта по морфологическим признакам *S. pneumoniae* с трудом отличается от других α -гемолитических (или зеленящих) стрептококков [7]. Населяющие одни и те же экологические ниши, комменсалы *S. mitis* и *S. oralis* настолько близки к потенциальному патогену *S. pneumoniae*, что их дифференциальная идентификация остается проблематичной. Видовая идентификация *S. pneumoniae* базируется на фенотипических тестах, основными из которых являются чувствительность к оптохину и лизис в присутствии солей желчи [7, 8]. Однако $\approx 4\text{--}5\%$ пневмококков устойчивы к оптохину, а рост некоторых других зеленящих стрептококков, наоборот, подавляется оптохином [9]. Также описаны пневмококки, устойчивые к солям желчи [10].

В последние годы разработаны генетические тесты для достижения корректной видовой идентификации *S. pneumoniae*, в т. ч. непосредственно в клиническом материале. Среди них преобладают тест-системы для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР), базирующиеся на выявлении генов, при помощи которых кодируются факторы вирулентности пневмококка – пневмолизин (*ply*) [11] и аутолизин (*lytA*) [12].

Учитывая роль пневмококковой инфекции в развитии обострения ХОБЛ, в схемах эмпирической терапии рекомендуются антибактериальные препараты (АБП), обладающие в т. ч. антипневмококковой активностью – β -лактамы АБП, макролиды и рес-

пираторные фторхинолоны. Увеличение частоты применения последних у пациентов с осложненным обострением ХОБЛ обусловлено наличием т. н. модифицирующих факторов риска формирования резистентности микроорганизмов. Для пневмококков такими факторами являются возраст пациента старше 65 лет, терапия β -лактамами в течение последних 3 мес., алкоголизм, иммуносупрессия (включая терапию глюкокортикостероидами – ГКС), наличие нескольких сопутствующих заболеваний [13]. Так, устойчивые к макролидам и пенициллинам стрептококки встречаются в Европе с частотой $\approx 30\%$ [14], в России – $5,6\%$ [15].

В настоящее время описаны 2 основных механизма формирования устойчивости стрептококков к макролидам – модификация мишени действия АБП и активный направленный эффлюкс. Первый вариант реализуется, как правило, за счет метилирования молекул 23S рРНК продуктом гена *ermB* (*erythromycin-resistance methylase*), что обуславливает устойчивость высокого уровня и обеспечивает перекрестную устойчивость к клиндамицину [16]. Другой путь связан с приобретением аленозин-5'-трифосфат-зависимых эффлюксных белков – продуктов генов *mef*. Наличием генов *mef* обусловлена устойчивость низкого уровня, и организм остается чувствительным к клиндамицину, однако при этом формируется перекрестная устойчивость к эритромицину, кларитромицину и азитромицину [14]. При этом резервуаром генетических детерминант устойчивости считаются непатогенные *S. mitis* и *S. oralis*.

В сложившейся ситуации очевидно применение диагностических панелей, при помощи которых реализуются принципы генетического тестирования для корректной видовой идентификации стрептококков с одновременной детекцией генетических маркеров лекарственной устойчивости к макролидам при обследовании и мониторинге пациентов с ХОБЛ различной степени тяжести.

В работе представлены результаты апробации экспериментальной диагностической панели "Стрептопол+" (ООО НПФ "Литех") на лабораторной коллекции клинических штаммов стрептококков, а также клинических образцов ДНК, выделенных от пациентов со стабильной ХОБЛ средней (II), тяжелой и очень тяжелой (III–IV) степени (GOLD, 2010).

Материалы и методы

Бактериальные штаммы. Для исследования было отобрано 139 образцов геномной ДНК, выделенных из чистых культур клинических штаммов стрептококков, охарактеризованных в работах [17, 18]. Данная выборка, в которую были включены 68 (49 %) образцов геномной ДНК *S. pneumoniae*, 4 (3 %) – *S. pseudopneumoniae*, 62 (44,5 %) – *S. mitis*, 5 (3,5 %) – *S. oralis*, являлась эпидемиологически несвязанной. Все штаммы были охарактеризованы по чувствительности к оптохину, для 75 из них имелась информация по устойчивости к макролидам (эритромицину, азитромицину) (табл. 1).

Таблица 1
Лабораторные штаммы зеленящих стрептококков, включенные в исследование
Table 1
Laboratory strains of *Streptococcus viridans* in the study

Вид стрептококков	Всего, n (%)	Охарактеризованные по чувствительности к макролидам			
		всего	S	I	R
<i>S. pneumoniae</i>	68 (48,9)	42	18	0	24
<i>S. pseudopneumoniae</i>	4 (2,9)	2	2	0	0
<i>S. mitis</i>	62 (44,6)	28	16	6	6
<i>S. oralis</i>	5 (3,6)	3	2	0	1
Итого, n (%)	139 (100)	75 (100)	37 (49,3)	6 (8,0)	32 (42,7)

Примечание: S – чувствительные, I – слабоустойчивые, R – устойчивые.
Notes: S, sensitive; I, slightly resistant; R, resistant.

Для 23 штаммов (*S. mitis* – 7, *S. pneumoniae* – 12, *S. pseudopneumoniae* – 4) в рамках выполнения работ по гранту РФФИ № НК 13-04-01854 было проведено полногеномное секвенирование. Номера аннотированных последовательностей в международной базе данных *GenBank* Национального центра биотехнологической информации США (NCBI) следующие:

S. pneumoniae:

- 357 (PRJNA201317);
- 2009 (PRJNA201318);
- 801 (PRJNA201319);
- 845 (PRJNA201320);
- 1488 (PRJNA201321);
- 1542 (PRJNA201322);
- 3051 (PRJNA201323);
- 1779 (PRJNA206047);
- NT13856 (PRJNA225874);
- NT1719 (PRJNA225875);
- NT27 (PRJNA225877);
- NT2298 (PRJNA242496);

S. mitis:

- 11 / 5 (PRJNA201324);
- 13 / 39 (PRJNA201325);
- 17 / 34 (PRJNA206048);
- 18 / 56 (PRJNA206049);
- 29 / 42 (PRJNA206050);
- 21 / 39 (PRJNA225878);
- 27 / 7 (PRJNA225879);

S. pseudopneumoniae:

- G42 (PRJNA225866);
- 22725 (PRJNA225867);
- 1321 (PRJNA225870);
- 5247 (PRJNA225872).

Клинические образцы. Методом случайной выборки в исследование включены мужчины и женщины, страдающие ХОБЛ ($n = 89$; средний возраст – $58,23 \pm 9,6$ года) стабильного течения с анамнезом заболевания ≥ 12 мес. и индексом курения (ИК) ≥ 10 пачколет. В исследовании приняли участие пациенты ($n = 64$) со стабильной ХОБЛ II (средней) степени, а также больные ($n = 33$) стабильной ХОБЛ III–IV (тяжелой и очень тяжелой) степени (GOLD, 2010). У всех пациентов на протяжении предшествующих 4 нед. отсутствовали обострения и в течение 12 нед. до забора клинического материала не проводилась терапия АБП.

У всех пациентов, участвующих в исследовании, производился забор орофарингеальных мазков в пробирку с помощью стерильной палочки с ватным тампоном. Экстракция ДНК выполнялась с использованием набора *FastDNA® SPIN KitforSoil* (МРБИО, США) согласно протоколу, оптимизированному сотрудниками *National Heart and Lung Institute* (Великобритания) для повышения выхода ДНК. Процедура выделения ДНК проводилась на базе Центральной научно-исследовательской лаборатории ГБОУ ВПО "Сибирский государственный медицинский университет" Минздрава России. До проведения ПЦР выделенная ДНК помещалась в морозильную камеру с температурой -20°C .

Генотипирование. Обнаружение генетических маркеров лекарственной устойчивости и видовая идентификация стрептококков проводилась с использованием экспериментального набора "Стрептопол+" производства ООО НПФ "Литех" согласно протоколу производителя. В данном наборе реализуется принцип мультиплексной ПЦР в реальном времени. Одновременно проводятся 4 измерения в 1 пробирке, регистрируется флуоресцентный сигнал от разных флуорофоров – FAM, HEX, ROX и Cy5 (рис. 1А)

Диагностическая тест-система "Стрептопол+" включает 2 триплексных набора:

- *Streptococcus spp.* (FAM) / (*S. pyogenes* (HEX) / *S. agalactiae* (ROX));
- *S. pneumoniae* (FAM) / *Mef* (HEX) / *ErmB* (ROX).

В каждом тестируемом образце амплифицируется внутренний контроль (детектируемый по каналу Cy5), что свидетельствует об адекватности проведенных процедур пробоподготовки и отсутствии ингибирования ПЦР.

Проведение ПЦР и интерпретация полученных данных осуществлялись с помощью прибора CFX-96 (*BioRad*, США) по следующей программе: $94^\circ\text{C} - 1,5$ мин, затем 40 циклов: $95^\circ\text{C} - 10$ с (денатурация), $64^\circ\text{C} - 11$ с (отжиг праймеров), $72^\circ\text{C} - 20$ с (элонгация). На стадии элонгации происходит отжиг зонда и высвобождение метки с последующей ее регистрацией на флуоресцентном детекторе. Детекция продуктов прибором осуществляется автоматически в каждом цикле амплификации. На основе этих данных при помощи управляющей программы строятся

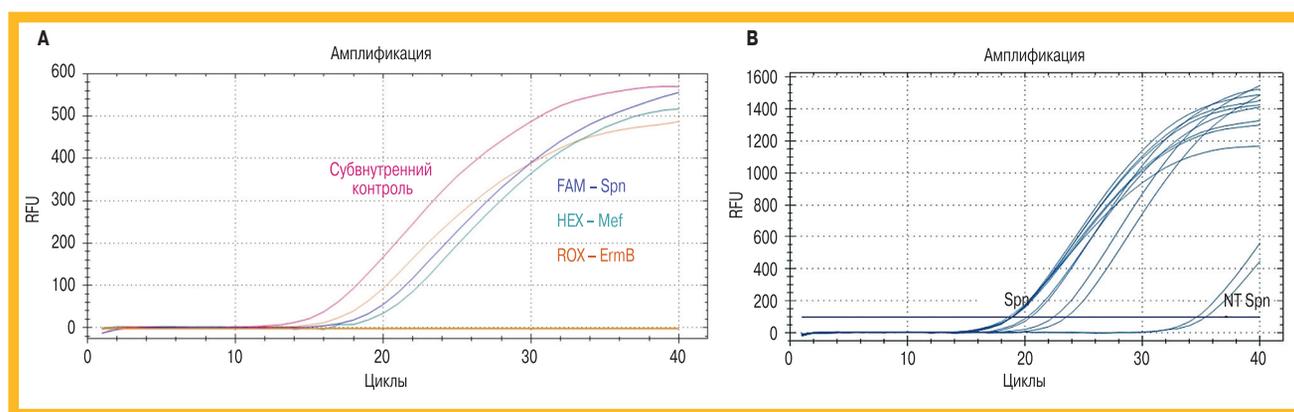


Рис. 1. Примеры регистрации флуоресцентного сигнала при анализе с помощью набора "Стрептопол+": А – образец ДНК, загрязненный *S. pneumoniae* (Spn), несущий детерминанты резистентности *mef* и *ermB*; В – выровненные по концентрации образцы ДНК инкапсулированного *S. pneumoniae* (Spn) и его бескапсульный вариант (NT Spn)
Примечание: разноцветные кривые соответствуют *Streptococcus spp.*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, диагностированным с помощью флюорофоров FAM, HEX, ROX соответственно.

Fig. 1. Examples of fluorescent signal registration (inner control)

кривые накопления флуоресцентного сигнала по каждому из заданных для образцов каналу.

Все образцы, цикл выхода которых был < 35, считались отрицательными. По завершении всех действий при помощи программы автоматически рассчитываются точки пересечения кривых накопления флуоресцентного сигнала каждого образца с пороговой линией, что дает представление о наличии или отсутствии ДНК в исследуемых образцах.

Параметры диагностической специфичности (Sp) и чувствительности (Sn) рассчитывались по формулам:

$$Sp = (Tn / (Tn + Fp)) \times 100 \%, \\ Sn = (Tp / (Tp + Fn)) \times 100 \%,$$

где Тр – истинноположительный результат, Тп – истинноотрицательный результат, Фр – ложноположительный результат, Fn – ложноотрицательный результат.

Результаты и обсуждение

Лабораторная коллекция из 139 образцов геномной ДНК стрептококков, 75 из которых – штаммы с данными по чувствительности к эритромицину и азитромицину (см. табл. 1), была протестирована с целью установления эффективности работы экспериментального набора "Стрептопол+" производства ООО НПФ "Литех".

В анализируемую выборку вошли штаммы зеленящих (*viridans*) стрептококков, чья видовая принадлежность была подтверждена бактериологическими и молекулярно-генетическими методами [17, 18]. Представителями зеленящих стрептококков, среди которых встречаются патогенные *S. pneumoniae*, сопутствующая флора, представленная преимущественно видами *S. mitis* и *S. oralis*, и вид *S. pseudopneumoniae*, патогенный потенциал которого пока не определен, колонизируется слизистая ДП. Исходя из этих предпосылок, была сформирована экспериментальная группа образцов, включающая приблизительно равное число штаммов *S. pneumoniae*

и *S. mitis*; группы чувствительных и устойчивых к макролидам стрептококков также были сопоставимы по своему объему.

По данным ПЦР-тестирования, присутствие *Streptococcus spp.* было подтверждено в 139 (100 %) анализируемых образцах. Для 67 штаммов *S. pneumoniae*, в т. ч. 4 бескапсульных пневмококков, также была показана 100%-ная выявляемость. *S. pyogenes* и *S. agalactiae* в анализируемой выборке не обнаружены, что совпадает с результатами бактериологической идентификации.

Пороговые значения появления сигнала для патогенного пневмококка на 10–15 циклов отличались от таковых, регистрируемых для его клинически менее значимого бескапсульного варианта (NT *S. pneumoniae*), обладающего, как предполагается, пониженной вирулентностью [19] (см. рис. 1В).

При анализе нуклеотидного состава гена пневмолизина у бескапсульных *S. pneumoniae* обнаружено филогенетическое родство этого гена как с пневмококками, имеющими капсулу, так и с псевдопневмококками, чем объясняется наблюдаемое снижение эффективности работы праймеров и зондов, специфичных для инкапсулированных *S. pneumoniae*. В геномах 2 штаммов NT *S. pneumoniae* было обнаружено 2 варианта гена *ply*, расположенных в различных местах генома, что требует дальнейшего изучения с привлечением дополнительных физиологических и молекулярно-биологических подходов.

Генетические детерминанты устойчивости к макролидам (гены *mef* и *ermB*) были выявлены в 50 (36,0 %) из 139 образцов. Ген *mef* обнаруживался в 38 штаммах, ген *ermB* – в 30. Из них в 18 штаммах имелись оба гена одновременно. Среди стрептококков, чувствительных к эритромицину и азитромицину, генетические детерминанты резистентности были обнаружены в 12 (32,4 %) из 37 образцов. При этом в 6 образцах выявлялся ген *mef*, в 4 – *ermB*, в 2 – оба гена. В группе слабоустойчивых и устойчивых штаммов стрептококков генетические детерминанты устойчивости обнаруживались в 100 % случаев.

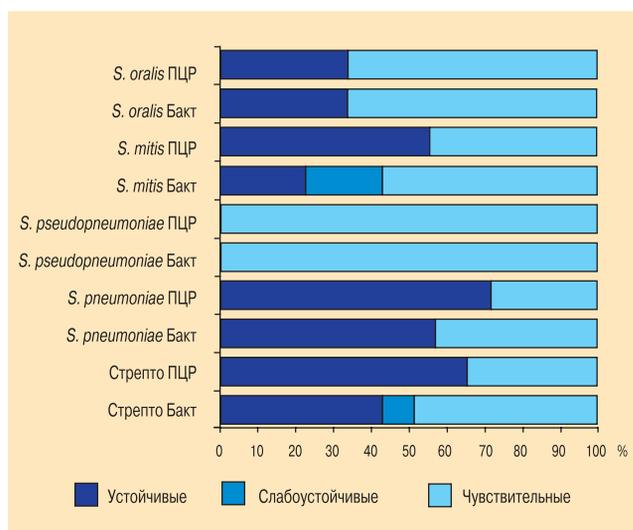


Рис. 2. Сопоставление результатов бактериологического (Бакт) и генетического (ПЦР) методов выявления устойчивых к макролидам штаммов стрептококков

Fig. 2. Comparison of bacteriological (BACT) and genetic (PCR) methods for identification of macrolide-resistant *Streptococcus* strains

Результаты генетического тестирования устойчивости к макролидам хорошо согласуются с данными бактериологического анализа для всех исследованных видов стрептококков (рис. 2).

Исходя из результатов лабораторной апробации, для мультиплексного набора *Streptococcus spp.* / *S. pyogenes* / *S. agalactiae* и для видоспецифичного набора на *S. pneumoniae* диагностическая чувствительность и специфичность составили 100 %.

Генетическими тестами, направленными на предсказание устойчивости стрептококков к макролидам, продемонстрирована 100%-ная чувствительность при диагностической специфичности 79 %. Наблюдаемое обнаружение генетических детерминант резистентности среди чувствительных образцов может быть вызвано молекулярными особенностями конкретного штамма, например сниженным уровнем экспрессии генов, ответственных за формирование лекарственной устойчивости. С другой стороны, не отрицается вероятность ошибки в фенотипических тестах, проверить которые в рамках настоящего исследования не представляется возможным.

Наличие полногеномных последовательностей отдельных штаммов *S. pneumoniae* и *S. mitis* позволило определить местонахождение детерминант резистентности в геномах этих штаммов. Из результатов более ранних исследований известно, что обычно детерминанты устойчивости к макролидам у стрептококков локализованы на мобильных генетических элементах — конъюгативных транспозонах семейств Tn916 и Tn1545, важнейших медиаторах переноса генов резистентности внутри рода. У пневмококков Tn916-подобный транспозон, как правило, имеет в своем составе ген устойчивости к тетрациклину *tet(M)*, а также гены резистентности к макролидам — *ermB* и *mefA* / *mefE* [20], причем последний является частью так называемого *mega*-элемента

(*macrolide efflux genetic assembly*) — консервативного фрагмента размером $\approx 5\ 000$ п. н. [21]. В данном исследовании имелась информация о полногеномных нуклеотидных последовательностях 8 штаммов *S. pneumoniae*, 3 из которых были определены как чувствительные к макролидам, а у 5 обнаружен высокий уровень устойчивости к эритромицину / азитромицину (klarитромицину). При анализе полногеномных данных установлено присутствие обоих детерминант резистентности (генов *ermB* и *mefE*, входящих в *mega*-элемент) в составе Tn2010, относящегося к Tn916-семейству у 3 из 5 устойчивых штаммов, тогда как у 2 других штаммов обнаружен одиночный ген *ermB* в составе другого транспозона из Tn916-семейств, имеющего частичную гомологию с Tn2010 и Tn6003. В геномах 3 чувствительных *S. pneumoniae* никаких детерминант резистентности не обнаружено. Результаты ПЦР в реальном времени полностью совпали с данными полногеномного секвенирования.

Среди 5 штаммов *S. mitis*, для которых имелись данные полногеномного секвенирования, у 1 проявлялась высокая устойчивость к макролидам, у другого — слабая. В геноме устойчивого штамма были обнаружены гены *ermB* и *mefE*, причем *ermB* входил в состав интегративного конъюгативного элемента семейства Tn916, в то время как *mefE* находился вне транспозона, внутри *mega*-элемента на одном из участков хромосомной ДНК. В слабоустойчивом к макролидам штамме *S. mitis* у одиночного гена *mefE* отмечена аналогичная локализация. Многообразие мест внедрения стрептококкового *mega*-элемента было показано ранее [21], что свидетельствует о более сложной природе распространения детерминант резистентности к макролидам внутри рода стрептококков, чем до сих пор считалось.

В ходе клинической апробации экспериментальная диагностическая панель "Стрептопол+" применялась для анализа 89 образцов ДНК, выделенных из орофарингальных мазков, полученных у пациентов с ХОБЛ. Достоверно стрептококки определялись в 83 (93,3 %) из 89 образцов, в 1 образце стрептококков не обнаружено, 1 образец попал в "серую" зону, характерную для низких титров ДНК.

В зависимости от тяжести заболевания все пациенты с ХОБЛ были разделены по степени тяжести на 2 группы, различавшиеся по анамнестическим и клинико-функциональным показателям: средней, тяжелой и очень тяжелой степени. Так, у больных ХОБЛ средней степени тяжести отмечены меньшая частота обострений и госпитализаций за предшествующий год, более редкие эпизоды приема системных ГКС, менее выраженные потребность в короткодействующих β_2 -агонистах (КДБА) и тяжесть одышки по модифицированной шкале одышки mMRC (*Modified Medical Research Council*), более высокая толерантность к физической нагрузке по результатам 6-минутного шагового теста (6-МШТ) и значения сатурации кислородом (SatO) до и после нагрузки, а также лучшие показатели ОФВ₁ до и после бронходилатации (БД) в стандартной пробе с сальбутамолом (табл. 2).

Таблица 2
Анамнестические и клинико-функциональные характеристики групп больных ХОБЛ
Table 2
Clinical and functional parameters of COPD patients involved in the study ($M \pm m$)

Показатель	ХОБЛ II степени тяжести	ХОБЛ III–IV степени тяжести	<i>p</i>
Частота обострений за 12 мес.	1,81 ± 1,2	2,61 ± 1,7	0,017
Частота госпитализаций за 12 мес.	0,12 ± 0,3	0,54 ± 0,7	0,0002
Курсы системных ГКС за 12 мес.	0,12 ± 0,45	0,45 ± 0,7	0,008
Потребность в КДБА, дозы в сутки	1,1 ± 1,3	3,64 ± 0,6	0,000001
mMRC, баллы	0,97 ± 0,44	2,48 ± 0,8	1,28E-11
Пройденное расстояние 6-МШТ, м	477,5 ± 178	303,6 ± 139	0,000004
SatO ₂ , %:			
до теста	97,5 ± 1,23	95,82 ± 1,16	2,93E-09
после теста	96,97 ± 1,65	94,24 ± 1,6	8,72E-12
ОФВ ₁ :			
до БД, л	1,9 ± 0,57	1,08 ± 0,36	0,00007
до БД, %	64 ± 9,7	41,57 ± 8,6	1,14E-18
после БД, л	2,14 ± 0,59	1,31 ± 0,55	0,0003
после БД, %	71,34 ± 9,97	48,14 ± 11,5	6,54E-17

Примечание: результат представлен в виде $M \pm m$, где M – среднее, m – стандартное отклонение.

С целью анализа ассоциации выявляемости стрептококков с клиническими признаками рассчитана безразмерная величина (ΔSt) как разность между пороговыми значениями накопления сигнала от ДНК человека и от ДНК стрептококков. Опосредованно эта величина отражает степень бактериального обсеменения стрептококками. Для данной выборки полученные значения варьировали от $-6,97$ до $10,81$. При анализе частоты распределения 15 (16,9 %) из 89 образцов отнесены в группу с низким обсеменением, 68 (76,4 %) – с высоким бактериальным обсеменением, 6 образцов были отнесены к "серой" зоне. При проведении корреляционного анализа выявлено, что большее значение ΔSt соотносится с более высокой представленностью гена *mef* ($r = 0,45$; $p = 0,000009$), что указывает на встречаемость гена *mef* преимущественно среди стрептококков.

Присутствие генов *mef* было зафиксировано у всех 89 (100 %) пациентов, включая 1, в чьем образце стрептококки не найдены и в ДНК которого также обнаружен ген *ermB*. Данный факт вполне объясним возможностью распространения этих генов среди отличных от стрептококков бактерий, например, микрококков.

В проанализированной группе больных ген *ermB* встречался реже, чем *mef* и был обнаружен в 81 (91,0 %) образце из 89, причем 28 (31,3 %) образцов прошли как слабopоложительные. При этом идентифицированный ген *ermB* всегда сочетался с геном *mef*. Таким образом, можно говорить о потенциальном риске развития резистентности к макролидам стрептококков практически у всех обследованных больных ХОБЛ. Вероятно, наличие генов устойчивости может быть связано с высокой частотой инфекционно-зависимых обострений, ассоциированных с применением АБП в группе обследованных больных.

Так, только 6 пациентов из всей группы обследованных с ХОБЛ характеризовались отсутствием обост-

рений на протяжении предшествующих 12 мес. Данные пациенты относились к группе больных ХОБЛ II (GOLD, 2010), средней степени тяжести, характеризовались слабовыраженными (< 2 баллов по шкале mMRC) или выраженными (≥ 2 балла по шкале mMRC) симптомами заболевания и низким риском развития обострений (типы А и В по GOLD, 2011). Интересно, что у 5 из них стрептококки орофарингеальных мазков также отличались отсутствием гена *ermB*. В целом в группе пациентов со средней степенью тяжести ХОБЛ частота обострений составила $1,81 \pm 1,20$ за 1 год, а у больных тяжелого и очень тяжелого течения – $2,6 \pm 1,6$ за 1 год. При этом данные группы больных характеризовались статистически значимыми различиями по частоте обострений ($p = 0,017$). За предшествующий год у 34 (38,2 %) обследованных с ХОБЛ зарегистрировано по 1 эпизоду обострения заболевания, у 19 (21,35 %) – по 2, у 14 (15,73 %) – по 3, у 16 (17,97 %) – ≥ 4 . Следует отметить, что частота курсовой терапии АБП по поводу респираторных инфекций в группе обследованных больных ХОБЛ существенно варьировала: от 0 эпизодов у пациентов с ХОБЛ средней степени тяжести до 5–6 эпизодов – у больных с тяжелым и очень тяжелым течением заболевания (средняя частота – $1,69 \pm 1,48$ эпизода в год).

В ходе обработки количественных данных по циклам выхода сигнала амплификации генов *mef* и *ermB* выполнен корреляционный анализ по Спирмену с рядом клинико-функциональных характеристик. Величина, обратная значению цикла выхода, косвенно отражает степень представленности анализируемых генетических детерминант устойчивости. В частности, высокая представленность гена *ermB* в образце соотносилась с более высоким значением ИК и статистически значимо коррелировала с более частыми обострениями ХОБЛ у пациентов, увеличением частоты приема АБП и более выраженной продукцией мокроты (табл. 3).

Таблица 3
Анализ корреляционных связей
между представленностью генов *mef* и *ermB*
клинико-anamnestическими характеристиками больных
Table 3
Relationships between *mef* and *ermB* genes and clinical features of the patients

Представленность гена в образце	Клинико-амнестический признак	n	r	p
<i>mef</i>	Частота обострений	88	0,25	0,018
<i>mef</i>	Частота курсов АБТ	88	0,27	0,010
<i>ermB</i>	Частота обострений	87	0,30	0,0045
<i>ermB</i>	Частота курсов АБТ	87	0,49	0,000002
<i>ermB</i>	Продукция мокроты	87	0,30	0,0045
<i>ermB</i>	ИК	87	0,32	0,0022

Схожие результаты получены при анализе представленности гена *mef* – более высокая представленность этого гена достоверно ассоциировалась с более частыми эпизодами обострения ХОБЛ, более высокой частотой назначения АБП за предшествующие 12 мес. (см. табл. 3).

Следует отметить, что представленность генов *mef* и *ermB* в образцах напрямую коррелировали друг с другом ($r = 0,55$; $p = 3,09E-08$).

По данным видовой идентификации *S. pneumoniae* достоверно определялся в 2 образцах, еще в 4 наблюдался слабоположительный сигнал. Во всех этих образцах присутствовали гены *mef*. Гены *ermB* обнаруживались в 5 (83,3 %) из 6 случаев. У 2 пациентов в данной группе заболевание характеризовалось тяжелым течением, высоким риском развития обострения (≥ 2 эпизода за 12 мес.) и потребностью в применении АБП (≥ 1 эпизода за 1 год). Так, у 1 из этих больных на протяжении 12 мес. зарегистрированы 6 эпизодов обострения ХОБЛ, ассоциированных с назначением АБТ. При этом в 2 случаях обострения у данного больного использовались макролидные АБП (азитромицин и кларитромицин). Еще у 2 пациентов из группы ХОБЛ с выявленным *S. pneumoniae* зарегистрированы средняя степень тяжести по спирометрической классификации (GOLD, 2010), высокий риск развития обострения (2 и 4 эпизода обострения соответственно) и 1 эпизод назначения АБТ за предшествующие 12 мес. У 2 пациентов со средней степенью тяжести ХОБЛ риск обострений определен как низкий и терапия АБТ за 12 мес. отсутствовала. Таким образом, по результатам исследования орофарингеальных мазков показатели у обследованных больных ХОБЛ II–IV степени тяжести (6,74 %) отличались низкой контаминацией *S. pneumoniae*. В то же время все образцы с выявленным *S. pneumoniae* характеризовались наличием генетических детерминант устойчивости к макролидным АБП. Присутствие низких титров (слабоположительный сигнал) *S. pyogenes* было зафиксировано в 41 (46,1 %) из 89 образцов, *S. agalactiae* не обнаружено, что закономерно при исследовании биологических проб со слизистых верхних ДП.

Заключение

Согласно совокупным результатам проведенного исследования, экспериментальный набор "Стрептопол+" обладает высокой диагностической чувствительностью и специфичностью и может быть применен для нужд фтизиопульмонологии. При использовании этого набора при тестировании 89 орофарингеальных мазков, полученных у больных ХОБЛ II–IV степени тяжести, почти во всех проанализированных образцах верифицированы стрептококки. Скорее всего, это зелениющие стрептококки группы *mitis*, и все они являются резервуаром генетических детерминант резистентности к макролидам, что повышает риск микробиологической резистентности и терапевтической неэффективности препаратов данной группы.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № НК 13-04-01854 и федеральной целевой программы "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы" (ГК № 14.604.21.0075, уникальный идентификатор RFMEFI60414X0075).

The study was granted by Russian Foundation for Basic Research (registration number NK13-4-01854) and Federal special programme "Priority Research and Development of Science and Technologies in Russia in 2014 – 2020" (GK 14.604.21.0075; unique identifier RFMEFI60414X0075).

Литература

1. Зубков М.Н., Гугуцидзе Е.Н. Микробиологические аспекты диагностики пневмоний. *Пульмонология*. 1997; 13: 41–45.
2. Cabrera-Rubio R., Garcia-Núñez M., Setó L. et al. Microbiome diversity in the bronchial tracts of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50: 3562–3568.
3. Garcha D.S., Thurston S.J., Patel A.R. et al. Changes in prevalence and load of air way bacteria using quantitative PCR in stable and exacerbated COPD. *Thorax*. 2012; 67: 1075–1080.
4. Monso E., Rosell A., Bonet G. Risk factors for lower air way colonization in chronic bronchitis. *Eur. Respir. J.* 1999; 13: 338–342.
5. Sethi S., Murphy T.F. Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease. *N. Engl. J. Med.* 2008; 359: 2355–2365.

6. Sehti S., Evans N., Grant B.J.B., Murphy T.F.N. New strains of bacteria and exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Engl. J. Med.* 2002; 347: 465–471.
7. Facklam R. What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002; 15: 613–630.
8. Facklam R., Pigott N. Description of phenotypic characteristics to aid in the identification of *Streptococcus pneumoniae*. In: Totollan A., ed. Pathogenic streptococci: present and future. St. Petersburg: *Lancet Publications*; 1994.
9. Pikiš A., Campos J.M., Rodriguez W.J., Keith J.M. Optochin resistance in *Streptococcus pneumoniae*: mechanism, significance and clinical implications. *J. Infect. Dis.* 2001; 184: 582–590.
10. Obregon V., Garcia P., Garcia E. et al. Molecular peculiarities of the *lytA* gene isolated from clinical pneumococcal strains that are bile insoluble. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40: 2545–2554.
11. Corless C.E., Guiver M., Borrow R. et al. Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39: 1553–1558.
12. McAvin J.C., Reilly P.A., Lohman K.L. Sensitive and specific method for rapid identification of *Streptococcus pneumoniae* using real-time fluorescence PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39: 3446–3451.
13. Чучалин А.Г., ред. Пульмонология. Национальное руководство. М.: *ГЭОТАР-Медиа*; 2013.
14. Reinert R.R., Ringelstein A., van der Linden M. et al. Molecular epidemiology of macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates in Europe. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43: 1294–1300.
15. Страчунский Л.С., Кречикова О.И., Решедько Г.К. и др. Чувствительность к антибиотикам пневмококков, выделенных от здоровых детей из организованных коллективов. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 1999; 1 (1): 31–39.
16. Farrell D.J., Morrissey I., Bakker S. et al. Molecular Epidemiology of multiresistant *Streptococcus pneumoniae* with both *erm(B)*- and *mef(A)*-mediated macrolide resistance. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42: 764–768.
17. Ikryannikova L.N., Filimonova A.V., Malakhova M.V. et al. Discrimination between *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus mitis* based on sorting of their MALDI mass spectra. *Clin. Microbiol. Infect.* 2013; 11: 1066–1071.
18. Ikryannikova L.N., Lapin K.N., Malakhova M.V. et al. Misidentification of alpha-hemolytic streptococci by routine tests in clinical practice. *Infect. Genet. Evol.* 2011; 11: 1709–1715.
19. Preston J.A., Dockrell D.H. Virulence factors in pneumococcal respiratory pathogenesis. *Future Microbiol.* 2008; 2: 205–221.
20. Roberts A.P., Mullany P. A modular master on the move: the Tn916 family of mobile genetic elements. *Trends Microbiol.* 2009; 17: 251–258.
21. Del Grosso M., Camilli R., Iannelli F. et al. The *mef(E)*-carrying genetic element (mega) of *Streptococcus pneumoniae*: Insertion sites and association with other genetic elements. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006; 50: 3361–3366.
2. Cabrera-Rubio R., Garcia-Núñez M., Setó L. et al. Microbiome diversity in the bronchial tracts of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50: 3562–3568.
3. Garcha D.S., Thurston S.J., Patel A.R. et al. Changes in prevalence and load of air way bacteria using quantitative PCR in stable and exacerbated COPD. *Thorax.* 2012; 67: 1075–1080.
4. Monso E., Rosell A., Bonet G. Risk factors for lower air way colonization in chronic bronchitis. *Eur. Respir. J.* 1999; 13: 338–342.
5. Sethi S., Murphy T.F. Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease. *N. Engl. J. Med.* 2008; 359: 2355–2365.
6. Sehti S., Evans N., Grant B.J.B., Murphy T.F.N. New strains of bacteria and exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Engl. J. Med.* 2002; 347: 465–471.
7. Facklam R. What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002; 15: 613–630.
8. Facklam R., Pigott N. Description of phenotypic characteristics to aid in the identification of *Streptococcus pneumoniae*. In: Totollan A., ed. Pathogenic streptococci: present and future. St. Petersburg: *Lancet Publications*; 1994.
9. Pikiš A., Campos J.M., Rodriguez W.J., Keith J.M. Optochin resistance in *Streptococcus pneumoniae*: mechanism, significance and clinical implications. *J. Infect. Dis.* 2001; 184: 582–590.
10. Obregon V., Garcia P., Garcia E. et al. Molecular peculiarities of the *lytA* gene isolated from clinical pneumococcal strains that are bile insoluble. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40: 2545–2554.
11. Corless C.E., Guiver M., Borrow R. et al. Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39: 1553–1558.
12. McAvin J.C., Reilly P.A., Lohman K.L. Sensitive and specific method for rapid identification of *Streptococcus pneumoniae* using real-time fluorescence PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39: 3446–3451.
13. Chuchalin A.G., ed. Pulmonology. National guidelines. Moscow: *GEOTAR-Media*; 2013 (in Russian).
14. Reinert R.R., Ringelstein A., van der Linden M. et al. Molecular epidemiology of macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates in Europe. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43: 1294–1300.
15. Strachunskiy L.S., Krechikova O.I., Reshed'ko G.K. et al. Antibacterial sensitivity of pneumococcus isolated from children of child institutions. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya.* 1999; 1 (1): 31–39 (in Russian).
16. Farrell D.J., Morrissey I., Bakker S. et al. Molecular Epidemiology of multiresistant *Streptococcus pneumoniae* with both *erm(B)*- and *mef(A)*-mediated macrolide resistance. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42: 764–768.
17. Ikryannikova L.N., Filimonova A.V., Malakhova M.V. et al. Discrimination between *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus mitis* based on sorting of their MALDI mass spectra. *Clin. Microbiol. Infect.* 2013; 11: 1066–1071.
18. Ikryannikova L.N., Lapin K.N., Malakhova M.V. et al. Misidentification of alpha-hemolytic streptococci by routine tests in clinical practice. *Infect. Genet. Evol.* 2011; 11: 1709–1715.

Поступила 11.11.14

УДК 616.24-036.12-085.281.015.8

References

1. Zubkov M. N., Gugutsidze E. N. Microbiological aspects of pneumonia diagnosis. *Pul'monologiya.* 1997; 1: 41–45 (in Russian).

19. Preston J.A., Dockrell D.H. Virulence factors in pneumococcal respiratory pathogenesis. *Future Microbiol.* 2008; 2: 205–221.
20. Roberts A.P., Mullany P. A modular master on the move: the Tn916 family of mobile genetic elements. *Trends Microbiol.* 2009; 17: 251–258.
21. Del Grosso M., Camilli R., Iannelli F. et al. The *mef(E)*-carrying genetic element (mega) of *Streptococcus pneumoniae*: Insertion sites and association with other genetic elements. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006; 50: 3361–3366.

Received November 11, 2014

UDC 616.24-036.12-085.281.015.8

Информация об авторах

Икрянникова Лариса Николаевна – к. х. н., старший научный сотрудник НИИ физико-химической медицины ФМБА России; тел.: (499) 246-45-70; e-mail: Larisa.Ikryannikova@gmail.com

Сенина Мария Евгеньевна – научный сотрудник ООО НПФ "Литех"; тел.: (495) 258-39-47; e-mail: senina_maria@mail.ru

Лисицына Евгения Сергеевна – научный сотрудник ООО НПФ "Литех"; тел.: (495) 258-39-47; e-mail: lisitsinaes@gmail.com

Огородова Людмила Михайловна – д. м. н., профессор, член-корр. РАН, зав. кафедрой факультетской педиатрии с курсом детских болезней лечебного факультета ГБОУ ВПО "Сибирский государственный медицинский университет" Минздрава России, зам. министра науки и образования России; тел.: (3822) 51-49-67, e-mail: lm-ogorodova@gmail.com

Федосенко Сергей Вячеславович – к. м. н., докторант кафедры госпитальной терапии с курсом физической реабилитации и спортивной медицины ГБОУ ВПО "Сибирский государственный медицинский университет" Минздрава России; тел.: (3822) 51-49-67; e-mail: s-fedosenko@mail.ru

Карнаушкина Мария Александровна – к. м. н., ассистент кафедры пульмонологии ФПДО ГБОУ ВПО "МГМСУ им. А.И.Евдокимова" Минздрава России; тел.: (3822) 51-49-67; e-mail: kar3745@yandex.ru

Ильина Елена Николаевна – д. б. н., заведующий лабораторией НИИ физико-химической медицины ФМБА России; тел.: (499) 245-04-71; e-mail: ilinaen@gmail.com

Author information

Ikryannikova Larisa Nikolaevna, PhD in Chemistry, Senior Researcher, Federal State Budget Scientific institution "Scientific Research Institute of Physico-Chemical Medicine", Federal Medical and Biological Agency of Russia; tel.: (499) 246-45-70; e-mail: Larisa.Ikryannikova@gmail.com

Senina Mariya Evgen'evna, Researcher, LTD Scientific and Industrial Company "Litech", tel.: (495) 258-39-47; e-mail: senina_maria@mail.ru

Lisitsyna Evgeniya Sergeevna, Researcher, LTD Scientific and Industrial Company "Litech", tel.: (495) 258-39-47; e-mail: lisitsinaes@gmail.com

Ogorodova Lyudmila Mikhailovna, MD, Professor, Associate Member of Russian Academy of Medical Science, Head of Chair of Pediatrics, Therapeutic Faculty, State Budget High-Level Educational Institution "Siberian State Medical University", Healthcare Ministry of Russia; Deputy Minister of Science and Education of Russian Federation; tel.: (3822) 51-49-67, e-mail: lm-ogorodova@gmail.com

Fedosenko Sergey Vyacheslavovich, PhD, Doctoral candidate, Chair of Hospital Therapy, Physical Rehabilitation and Sport Medicine, State Budget High-Level Educational Institution "Siberian State Medical University", Healthcare Ministry of Russia; tel.: (3822) 51-49-67; e-mail: s-fedosenko@mail.ru

Karnaushkina Mariya Aleksandrovna, PhD, Assistant Lecturer, Chair of Pulmonology, Postgraduate Education Faculty, State Budget High-Level Educational Institution "A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry", Healthcare Ministry of Russia; tel.: (3822) 51-49-67; e-mail: kar3745@yandex.ru

Il'ina Elena Nikolaevna, MD in Biology, Scientific Research Institute of Physico-Chemical Medicine, Federal Medical and Biological Agency of Russia; tel.: (499) 245-04-71; e-mail: ilinaen@gmail.com