

А. В. Давыдов<sup>1</sup>, Л. П. Титов<sup>2</sup>, А. Н. Хархаль<sup>2</sup>, В. Г. Барауля<sup>3</sup>, Ю. В. Гусакова<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup>Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии,  
Минск, Республика Беларусь

<sup>3</sup>Минский городской центр гигиены и эпидемиологии, Минск, Республика Беларусь

### СВЯЗЬ МЕХАНИЗМОВ ГЕНОТИПИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* К АНТИБИОТИКАМ С ФЕНОТИПИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТЬЮ И СЕРОТИПАМИ

**Аннотация.** Изучение резистомы пневмококка и получение данных о молекулярно-генетических механизмах резистентности и их распространении имеют важное значение при проведении сравнительных исследований и осуществлении эпидемиологического надзора за резистентностью.

Цель исследования – изучение генотипической резистентности к антибиотикам штаммов пневмококка, выделенных от пациентов с различными формами пневмококковой инфекции и бактерионосителей, а также ее взаимосвязи с фенотипической резистентностью к антибиотикам и клинико-эпидемиологическими характеристиками штаммов (серотип, форма вызываемой инфекции).

Материалом исследования являлись 546 штаммов пневмококка и 5 образцов биологического материала, выделенных/полученных от пациентов разного возраста (5 дней – 81 год) с различными формами пневмококковой инфекции (менингит и другие инвазивные формы – 28 пациентов; пневмония – 27; острый синусит – 18; острый средний отит – 118; конъюнктивит – 26) и бактерионосителей (331 пациент).

Генотипическая резистентность пневмококка к антибиотикам исследовалась посредством мультиплексной ПЦР с детекцией генов *mefA*, *ermB* и мутаций в генах пенициллин-связывающих белков: *pbp1a* (574T→N, 575S→T, 576Q→G и 577F→Y); *pbp2b* (431T→K, 432Q→L) и *pbp2x* (338T→A).

В ходе исследования 551 изолята *S. pneumoniae* установлено, что у 60 % из них имеется как минимум один механизм резистентности к макролидам/линкозамидам, а распространенность гетерорезистентности (*mefA* + *ermB*) составила 22 %. Среди исследованных штаммов как минимум одну модификацию *pbp* имели 65 %, две модификации – 26, все три исследованные модификации *pbp* – 24 %. Доминирующим механизмом резистентности к макролидам является метилирование 23S РНК (ген *ermB*), который был обнаружен у 43 % генетически резистентных изолятов. Среди генетически резистентных к пенициллину изолятов пневмококка чаще всего встречались комбинации модификаций генов *pbp 1a* + 2*x* + 2*b* или *pbp 1a* + 2*x* (по 39–40 %) и отсутствовал генотип резистентности, обусловленный модификацией только *pbp2b*.

**Ключевые слова:** пневмококк, пневмококковая инфекция, *Streptococcus pneumoniae*, молекулярно-генетические механизмы резистентности к антибиотикам, *mefA*, *ermB*, *pbp*

**Для цитирования:** Связь механизмов генотипической резистентности *Streptococcus pneumoniae* к антибиотикам с фенотипической резистентностью и серотипами / А. В. Давыдов [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. мед. наук. – 2019. – Т. 16, № 4. – С. 454–467. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2019-16-4-454-467>

A. V. Davydov<sup>1</sup>, L. P. Titov<sup>2</sup>, A. N. Kharkhal<sup>2</sup>, V. G. Baraulya<sup>3</sup>, Y. V. Guskova<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

<sup>2</sup>Republic Research Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Republic of Belarus

<sup>3</sup>Minsk City Center for Hygiene and Epidemiology, Minsk, Republic of Belarus

### ASSOCIATION BETWEEN MOLECULAR MECHANISMS OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE, PHENOTYPES AND SEROTYPES IN *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

**Abstract.** Studies on pneumococcal resistome and molecular antimicrobial resistance mechanisms are relevant and may be used in large-scale epidemiological researches and surveillance of antimicrobial resistance.

A study of antimicrobial molecular resistance in the pneumococcal strains, that were isolated from the patients having the different forms of the pneumococcal infection or carriage, and association of it with phenotypes, clinical and epidemiological features of the strains (serotype, form of the infection).

We studied 546 pneumococcal strains and 5 specimens, that were isolated/obtained from the patients of various age (5 days – 81 years) having the different forms of the pneumococcal infection (meningitis and other invasive forms – 28, pneumonia – 27, acute rhinosinusitis – 18, acute otitis media – 118, conjunctivitis – 26) or carriage (331).

We used multiplex PCR to detect the following molecular pneumococcal antimicrobial resistance determinants – genes *mefA*, *ermB* and mutations in the penicillin-binding proteins: *pbp1a* (574T→N, 575S→T, 576Q→G and 577F→Y); *pbp2b* (431T→K, 432Q→L) and *pbp2x* (338T→A).

Among studied strains 60 % of 551 possess at least one resistance mechanism to macrolides/lincosamides, while 22 % were heteroresistant (*mefA* + *ermB*). About 65 % of the strains carry at least one *pbp* modification, 26 % – two modifications and 24 % – three *pbp* modifications. 23S RNA methylase (*ermB* gene) were discovered as a dominating mechanism and was detected in 43 % of genetically resistant strains. *Pbp 1a* + *2x* + *2b* and *pbp 1a* + *2x* were more frequent modifications among penicillin genetically resistant pneumococci, while *pbp2b* genotype was not detected.

**Keywords:** pneumococcus, pneumococcal infection, *Streptococcus pneumoniae*, molecular resistance mechanisms to antimicrobials, *mefA*, *ermB*, *pbp*

**For citation:** Davydov A. V., Titov L. P., Kharkhal A. N., Baraulya V. G., Gusakova Y. V. Association between molecular mechanisms of antimicrobial resistance, phenotypes and serotypes in *Streptococcus pneumoniae*. *Vesti Natsyyanal'nai akademii nauk Belarusi. Seriya meditsinskikh nauk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2019, vol. 16, no. 4, pp. 454–467 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2019-16-4-454-467>

**Введение.** Роль *Streptococcus pneumoniae* в патологии человека весьма высока, поскольку пневмококк является этиологическим агентом таких заболеваний, как внебольничная пневмония, бронхит, фарингит, синусит, острый средний отит, конъюнктивит, сепсис, менингит, эндокардит, артрит. Частота заболеваний, обусловленных *S. pneumoniae*, постоянно растет, они протекают тяжело и характеризуются высокой летальностью. Так, у пациентов с иммунодефицитами показатель летальности от пневмококковой инфекции достигает 50 %, а группами риска по развитию инвазивных форм пневмококковой инфекции и летальных исходов являются дети с иммунодефицитными состояниями, особенно недоношенные или ВИЧ-инфицированные, а также лица старше 65 лет [1].

Макролиды в терапевтических концентрациях являются бактериостатическими антибиотиками, которые ингибируют синтез белка посредством связывания компонента 50S субъединицы рибосомы – 23S рРНК, что приводит к преждевременной диссоциации комплекса пептидил-ТРНК с рибосомы. Основными механизмами резистентности пневмококка к ним является модификация мишени действия и активный эффлюкс препарата из клетки [2]. Наиболее часто модификация мишени обусловлена геном *ermB*, который кодирует РНК-метилазу, способную выполнять метилирование аденина в позиции 2058 23S рРНК, что приводит к появлению штаммов, высокоустойчивых к 14-, 15- и 16-членным макролидам, линкозамидам и стрептограминам В. Вторым механизмом является выведение антибиотика за пределы клетки посредством эффлюкс-помпы, которую кодирует класс генов *mef*, включающий варианты *mefA*, *mefE* и *mefI* [2]. В последние годы в странах Европы, Америки, Азии, Африки наблюдается увеличение количества публикаций, описывающих штаммы, обладающие комбинацией механизмов резистентности к макролидам (*ermB* и *mefA*) [2–4].

Формирование устойчивости к бета-лактамам антибиотикам *S. pneumoniae* происходит путем приобретения мутаций генами, кодирующими пенициллин-связывающие белки (ПСБ, *pbp*), которые являются важными компонентами клеточной стенки бактерий и основной мишенью действия бета-лактамов антибиотиков. Последовательное приобретение множественных мутаций в генах, кодирующих различные ПСБ, приводит к повышению значений минимальных подавляющих концентраций (МПК) пенициллина и других бета-лактамов антибиотиков [5]. Поскольку изменения в строении ПСБ, проявляющиеся в виде мозаичной структуры, снижают сродство β-лактамов к бактериальной клетке, установление изменений в генах, детерминирующих ПСБ, является основой изучения генотипической резистентности пневмококка к β-лактамам [2, 6]. Основное различие в формировании резистентности к β-лактамам и макролидам заключается в том, что гены, кодирующие ПСБ, стабильно расположены в хромосоме *S. pneumoniae*, в то время как детерминанты резистентности к макролидам и линкозамидам легко переносятся транспозонами [7].

В соответствии с современными подходами к эмпирической терапии пациентов с пневмококковой инфекцией при выборе антибиотика и его дозы должны учитываться локальные сведения об антибиотикорезистентности *S. pneumoniae*. Назначение правильной стартовой антимикробной терапии при различных формах пневмококковой инфекции, особенно инвазивных, снижает вероятность неблагоприятного исхода, в том числе смерти и инвалидизации [8].

Важность изучения резистоста определяется тем, что он является основой фенотипической резистентности. Данные о ее молекулярных механизмах и их распространении имеют важное эпидемиологическое значение и используются при проведении сравнительных исследований и надзора за распространением резистентности. Существует ряд публикаций, описывающих методы ПЦР для детекции генетических детерминант резистентности пневмококка к макролидам и β-лактамам, однако они недостаточно валидированы на больших коллекциях штаммов в плане прогнозирования фенотипической резистентности [9–11].

Цель исследования – изучение генотипической резистентности к антибиотикам штаммов пневмококка, выделенных от пациентов с различными формами пневмококковой инфекции и бактерионосителей, а также ее взаимосвязи с фенотипической резистентностью к антибиотикам и клинико-эпидемиологическими характеристиками штаммов (серотип, форма вызываемой инфекции).

**Объекты и методы исследования.** Объектами исследования являлись 546 штаммов пневмококка и 5 образцов биологического материала, выделенных/полученных в период с февраля 2013 г. по декабрь 2016 г. от пациентов и переданных микробиологическими лабораториями лечебно-профилактических учреждений страны в Республиканскую референс-лабораторию по диагностике инвазивных бактериальных заболеваний (Лаборатория клинической и экспериментальной микробиологии РНПЦ эпидемиологии и микробиологии). Исследованные штаммы были получены от 551 пациента (59 % мужчин и 41 % женщин) с различными формами внебольничной пневмококковой инфекции (220/551; 39,9 %) и носительством (331/551; 60,1 %) (табл. 1). Возраст пациентов составлял 5 дней – 81 год (средний – 7,9 года, медиана – 3 года, межквартильный размах – 2–6 лет).

Штаммы были выделены в следующих регионах Беларуси: г. Минск (382; 69,3 %), Гомельская обл. (105; 19,1 %), Могилевская обл. (51; 9,3 %), Витебская обл. (13; 2,4 %).

Исследуемые штаммы были выделены из отделяемого носоглотки (50,3 %), жидкости среднего уха (21,4 %), отделяемого зева (9,8 %), отделяемого глаз (4,7 %), цереброспинальной жидкости (4,2 %), крови (3,3 %), отделяемого околоносовых пазух (3,3 %), мокроты (1,3 %), плевральной жидкости (0,9 %), кожи (0,5 %) и тканей легкого (0,4 %). Жидкость среднего уха получали при выполнении парацентеза или после перфорации барабанной перепонки, а содержимое околоносовых пазух (преимущественно верхнечелюстных) – при выполнении пункции; мокроту – при бронхоскопии или эндотрахеальной аспирации.

Т а б л и ц а 1. Характеристика исследованных штаммов в зависимости от диагноза пациентов

Table 1. Characteristic of the studied strains depending on the diagnosis of patients

Диагноз	К-во штаммов	Соотношение мужчин и женщин, %	Возраст (средний, минимальный–максимальный)	Возраст (медиана [25 %–75 %])	Источник выделения
Менингит и другие инвазивные формы	28	67/33	37,8 года (14 мес. – 78 лет)	41,5 [6,5–58] года	ЦСЖ – 82,1 %, кровь – 17,9 %
Пневмония	27	52/48	27,9 года (11 мес. – 70 лет)	25 [6–48,5] лет	Кровь – 48,1 %, мокрота – 25,9 %, ПЖ – 18,5 %, ткани легкого – 7,4 %
Острый синусит	18	50/50	11,6 года (3 года – 17 лет)	12,5 [8,75–14,5] года	Отделяемое пазух – 100 %
Острый средний отит	118	59/41	3,1 года (2 мес. – 48 лет; у 96 % пациентов: 2 мес. – 8 лет)	2,1 [9,5–36 мес.] года	ЖСУ – 100 %
Конъюнктивит	26	54/46	2,7 года (2 мес. – 13 лет)	2 [1–3] года	Отделяемое глаза – 100 %
Носительство с инфекцией верхних дыхательных путей	233	59/41	5,6 года (1 мес. – 81 год)	3,5 [2–6] года	Отделяемое носоглотки – 85,4 %, отделяемое зева – 14,6 %
Носительство здоровое	98	63/37	4,7 года (5 дней – 60 лет)	3,3 [2,4–5] года	Отделяемое носоглотки – 79,6 %, отделяемое зева – 20,4 %

П р и м е ч а н и е. ЦСЖ – цереброспинальная жидкость, ПЖ – плевральная жидкость, ЖСУ – жидкость среднего уха.

Для изучения фенотипической резистентности к антибиотикам и последующего сравнения ее с генотипической из общего числа было отобрано 214 штаммов. Из них 181 (84,6 %) штамм являлся клинически значимым (выделен от пациентов с различными формами пневмококковой инфекции) и 33 (15,4 %) штамма были выделены от бактерионосителей.

Реидентификацию изолятов проводили в соответствии с лабораторным руководством ВОЗ и CDC (Центры по контролю и профилактике заболеваний, США) [12] на основании микроскопии с окрашиванием по Граму, оценки морфологии колоний и гемолитической активности, отрицательной пробы на каталазу, чувствительности к оптохину, растворимости солями желчных кислот, а также молекулярно-генетического обнаружения гена аутолизина (*lytA*), гена регуляции синтеза капсулы (*cpsA*) и специфичных отдельным серотипам фрагментов генов капсульного локуса с целью серогенотипирования по описанной ранее методике [13, 14].

Генотипическую резистентность пневмококка к антибиотикам исследовали посредством мультиплексной ПЦР (две реакционные смеси). Исследуемыми генами резистентности к макролидам и линкозамидам (реакция 1) являлись *mefA* (кодирует трансмембранный переносчик – эффлюкс-помпу, активно выводящую антибиотик за пределы клетки) и *ermB* (РНК-метиلاза, способная выполнять метилирование аденина в позиции 2058 23S рРНК – мишени действия макролидов и линкозамидов). Исследуемыми детерминантами резистентности к β-лактамам (реакция 2) являлись следующие модификации в структуре ПСБ: *pbp1a* (четыре последовательные замены 574Т→N, 575S→T, 576Q→G и 577F→Y); *pbp2b* (замены 431Т→K, 432Q→L вблизи консервативного мотива 448SSN) и *pbp2x* (мутация 338Т→А в 337STMK мотиве), для детекции которых использовали праймеры с соответствующими нуклеотидными заменами неизмененных генов [15, 16]. В каждой реакции в качестве положительного контроля осуществлялось обнаружение гена регуляции синтеза капсулы пневмококка *cpsA*. Для экстракции ДНК из культур микроорганизмов применяли метод кипячения, из образцов биологического материала – сорбционный метод с использованием центрифужных силика-колонок NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel, Германия) с предшествующим ферментативным лизисом мутанолизинном и лизоцимом.

Т а б л и ц а 2. Праймеры, используемые для детекции детерминант резистентности пневмококка к антибиотикам

Table 2. Primers used to detect the determinants of pneumococcal resistance to antibiotics

Праймер	Последовательность праймера (5'-3')	Концентрация в реакционной смеси, μM	Размер продукта реакции, п. н.
<i>mefA</i> -F	AGTATCATTAATCACTAGTGC	0,3	346
<i>mefA</i> -R	TTCTTCTGGTACTAAAAGTGG	0,3	
<i>ermB</i> -F	GAAAAGGTACTCAACCAATA	0,5	639
<i>ermB</i> -R	AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC	0,5	
<i>pbp1a</i> -F	AGTATATCAAGAACACTGGCTACG	0,5	353
<i>pbp1a</i> -R	GCTTGGAGTGGTTGAGCTA	0,5	
<i>pbp2b</i> -F	AAATTGGCATAATGGATCTTTC	0,5	442
<i>pbp2b</i> -R	TATTCATCTCTGTCGGTTGC	0,5	
<i>pbp2x</i> -F	AAGTAACTATGAACCAGGATCAG	0,5	399
<i>pbp2x</i> -R	CGAAGCATTTGTGTTTGTGT	0,5	
<i>cpsA</i> -F	GCAGTACAGCAGTTTGTGGACTGACC	0,1	160
<i>cpsA</i> -R	GAATATTTTCATTATCAGTCCCAGTC	0,1	

Аmplификацию проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 1 ЕД Diamant Fast ДНК-полимеразы (Институт микробиологии НАН Беларуси, Беларусь) и 2,5 мкл 10x-буфера, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, праймеры (табл. 2), 2 мкл исследуемой ДНК и необходимый объем воды для ПЦР. Температурно-временной режим включал: 1 цикл при 95 °С в течение 3 мин, 35 циклов при 94 °С по 30 с, при 48 °С (53 °С для второй смеси) по 45 с и при 72 °С по 60 с, 1 цикл при 72 °С в течение 10 мин и последующее хранение при 4 °С. Электрофоретическую детекцию продуктов ПЦР-реакции осуществляли в 2 %-ном агарозном геле после проведения электрофореза в течение 80 мин при напряжении 7 В/см (рис. 1).

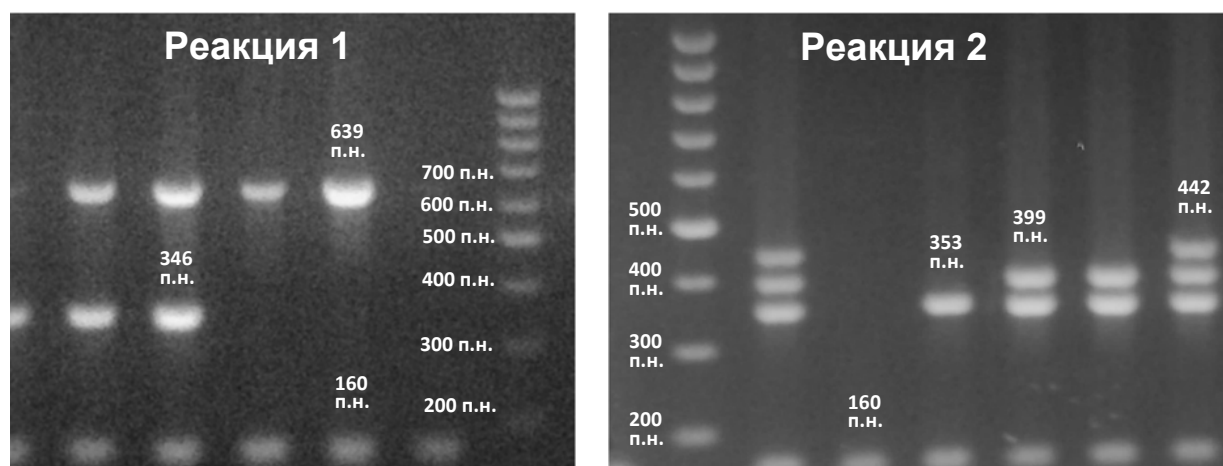


Рис. 1. Электрофореграммы продуктов реакций мультиплексной ПЦР для детекции детерминант резистентности пневмококка к макролидам/линкозамидам и бета-лактамам. Реакция 1: 160 п. н. – *cpsA*, внутренний положительный контроль; 346 п. н. – *mefA*; 639 п. н. – *ermB*; реакция 2: 160 п. н. – *cpsA*, внутренний положительный контроль; 353 п. н. – *pbplA*; 399 п. н. – *pbp2x*; 442 п. н. – *pbp2b*

Fig. 1. Electrophoregrams of the reaction products of multiplex PCR for detection of determinants of resistance of pneumococcus to macrolides/lincosamides and beta-lactams. Reaction 1: 160 bp – *cpsA*, internal positive control; 346 bp – *mefA*; 639 bp – *ermB*; reaction 2: 160 bp – *cpsA*, internal positive control; 353 bp – *pbplA*; 399 bp – *pbp2x*; 442 bp – *pbp2b*

Фенотипическую чувствительность к антибиотикам определяли методом микроразведений в бульоне в соответствии со стандартом CLSI (Институт клинических и лабораторных стандартов, США) M07-A10:2015 и международным стандартом ISO 20776-1:2006, рекомендованным EUCAST (Европейский комитет по определению чувствительности к противомикробным препаратам) [15]. Для определения клинической чувствительности штаммов полученные значения МПК интерпретировали с использованием критериев и пороговых значений CLSI 2017 [17].

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica v.10 (StatSoft Inc., США). Для анализа достоверности различий долей качественных признаков в группах выполняли проверку статистических гипотез о равенстве относительных частот бинарных признаков. Для оценки влияния факторов на вероятность инфицирования штаммами пневмококка с различными профилями устойчивости к антибиотикам рассчитывали показатели отношения шансов (ОШ) с 95 %-ным доверительным интервалом. Статистическую значимость различий шансов наступления исхода в группах оценивали с помощью точного критерия Фишера. Результаты тестов считали статистически значимым при  $p < 0,05$ .

**Результаты исследования.** Зависимость между наличием детерминант резистентности к макролидам/линкозамидам и МПК эритромицина/клиндамицина 214 штаммов пневмококка представлена на рис. 2, 3. Генотипически чувствительные пневмококки (без исследованных детерминант резистентности) демонстрируют преимущественно показатели МПК штаммов «дикого» типа – 0,008–0,064 мг/л для эритромицина (86/88; 97,7 %) и 0,016–0,064 мг/л для клиндамицина (87/88; 98,9 %) и, соответственно, клиническую чувствительность к данным антибиотикам. Штаммы с наличием только гена *mefA* (эффлюкс протонный насос) характеризуются преимущественно (16/19; 84,2 %) резистентностью низкого уровня к эритромицину (МПК = 1–8 мг/л), но отсутствием резистентности к клиндамицину (МПК = 0,016–0,064 мг/л). Штаммы, несущие ген *ermB* (23S РНК-метилаза), демонстрируют резистентность высокого уровня к эритромицину (МПК  $\geq$  512 мг/л; 54/55 штаммов, или 98,2 %) и клиндамицину (МПК = 16–256 мг/л; 53/55 штаммов, или 96,4 %). Наличие гетерорезистентности (*mefA* + *ermB*) не влияет качественно на фенотипическую резистентность к данным антибиотикам (по сравнению с *ermB*-генотипом), но может повышать показатели МПК клиндамицина до 128–256 мг/л. Таким образом, четко прослеживается взаимосвязь между наличием детерминант резистентности, МПК эритромицина/клиндамицина и формированием клинической резистентности к ним. Наличие редких исключений из описанных тенденций – резистентность к эритромицину/клиндамицину среди штаммов без

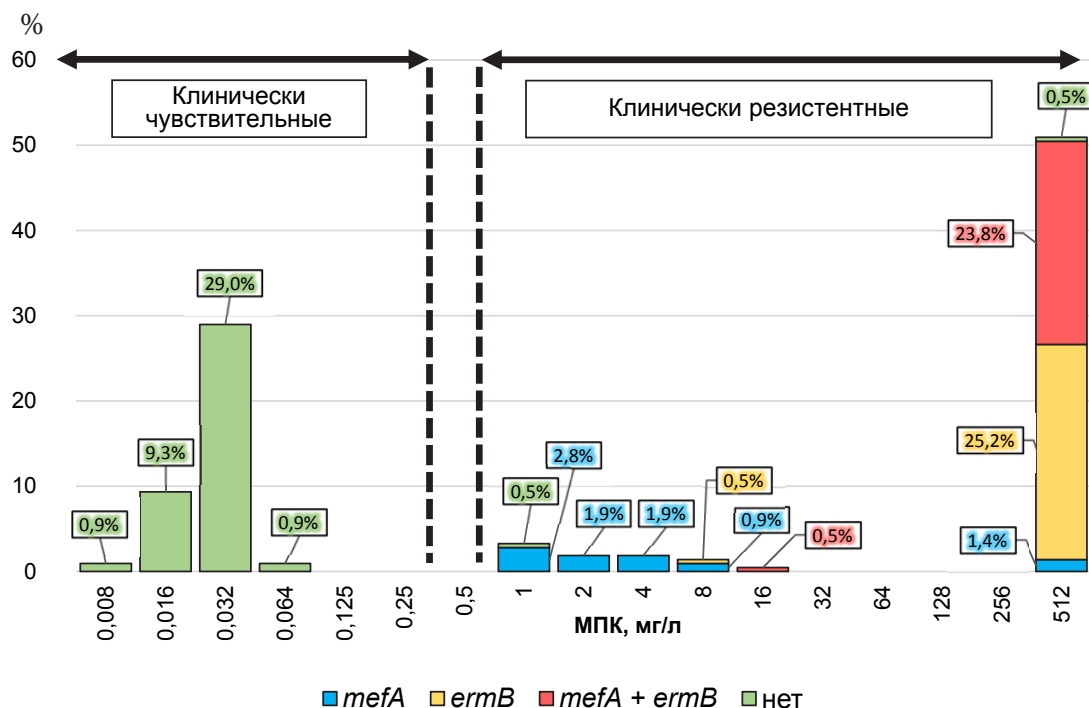


Рис. 2. Наличие детерминант резистентности к макролидам/линкозамидам у 214 штаммов пневмококка с различными показателями МПК эритромицина, %

Fig. 2. Presence of determinants of resistance to macrolides/lincosamides in 214 strains of pneumococcus with different indicators of minimum inhibitory concentrations of erythromycin, %

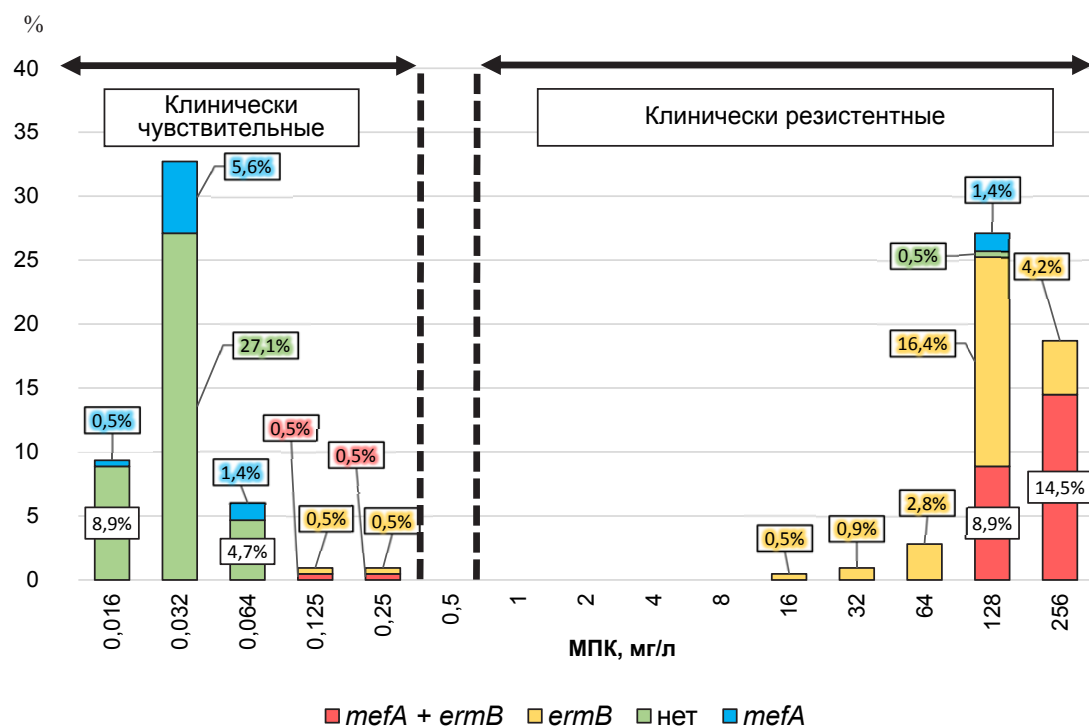


Рис. 3. Наличие детерминант резистентности к макролидам/линкозамидам у 214 штаммов пневмококка с различными показателями МПК клиндамицина, %

Fig. 3. Presence of determinants of resistance to macrolides/lincosamides in 214 strains of pneumococcus with various indicators of minimum inhibitory concentrations of clindamycin, %

детерминант резистентности (1–2 из 88 штаммов; 1,1–2,3 %), резистентность к клиндамицину и резистентность высокого уровня к эритромицину среди штаммов с *mefA*-генотипом (3/19; 15,8 %) – можно объяснить присутствием других механизмов резистентности, которые не изучались в данном исследовании. Так, в ряде работ описаны прочие механизмы резистентности пневмококка к макролидам/линкозамидам, но в целом они были охарактеризованы как крайне редкие (мутации в доменах II/V 23S рРНК [4, 18] или в рибосомальных белках L2, L4, L22 [2, 19]).

Однако генетический профиль детерминант резистентности указывает на предположительно крайне низкую роль других механизмов резистентности в формировании устойчивости к эритромицину и клиндамицину: 2/128 штаммов (1,6 %) и 4/107 штаммов (3,7 %) соответственно. Преобладающим же механизмом является посттранскрипционная модификация 23S рРНК, причем среди штаммов, резистентных как к клиндамицину (103/107, 96,3 %), так и к эритромицину (55/128, 43,0 %). Механизм эффлюкса за счет функционирования протонного насоса (ген *mefA*) обусловил 14,8 % (19/128) случаев резистентности к эритромицину, а гетерорезистентность (*mefA* + *ermB*) – 40,6 % (52/128). Наличие *ermB*-позитивных или гетерорезистентных штаммов (*mefA* + *ermB*) без клинической резистентности к клиндамицину можно объяснить отсутствием экспрессии данных генов в пределах небольшой группы штаммов (2 из 52–55 штаммов, 3,6–3,8 %).

Пневмококки, не несущие исследованные детерминанты резистентности к бета-лактамам, практически всегда демонстрируют показатели МПК штаммов «дикого» типа – 0,004–0,064 мг/л для пенициллина (73/74; 98,6 %) и 0,008–0,125 мг/л для цефотаксима (74/74; 100 %) и, соответственно, клиническую чувствительность к данным антибиотикам (табл. 3). Штаммы с модификацией только в одном ПСБ (*pbp1a* или *pbp2x*) характеризуются преимущественно (21/27; 77,8 %) резистентностью низкого уровня к пенициллину (МПК = 0,125–2 мг/л), но отсутствием резистентности к цефотаксиму (24/27; 88,9 %) на фоне повышения его МПК до 0,032–0,25 мг/л. Исключение составляют 3/16 (18,8 %) *pbp2x*-позитивных штаммов, которые демонстрируют резистентность к пенициллину (МПК = 1–2 мг/л) и промежуточную устойчивость к цефотаксиму (МПК = 1 мг/л), что можно объяснить наличием иных (не исследованных) механизмов резистентности. В ряде исследований приводятся прочие молекулярные механизмы, повышающие резистентность пневмококка к  $\beta$ -лактамам антибиотикам, такие как мутации в опероне *murMN*, кодирующем контролирующие биосинтез пептидогликана белки *MurM* и *MurN* [3, 20, 21]; мутации в гене *ciaH*, кодирующем гистидинкиназу, которая является частью двухкомпонентной регуляторной системы *ciaHR* [21].

Т а б л и ц а 3. Зависимость между наличием детерминант резистентности к бета-лактамам и МПК пенициллина/цефотаксима (мг/л) 214 штаммов пневмококка

Table 3. Dependence between the presence of determinants of resistance to beta-lactams and minimum inhibitory concentrations of penicillin/cefotaxime (mg/l) of 214 strains of pneumococcus

Детерминанты резистентности	К-во штаммов в зависимости от МПК пенициллина												К-во штаммов в зависимости от МПК цефотаксима								Всего штаммов, n (%)			
	чувствительных						резистентных*						чувствительных				нечувствительных*							
	≤0,004	0,008	0,016	0,032	0,064	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	0,008	0,016	0,032	0,064	0,125	0,25	0,5	1		2	4	8
Нет	11		25	34	3		1						9	14	46	4	1							74 (34,6)
Только <i>pbp1a</i>							7	4								1	3	7						11 (5,1)
Только <i>pbp2x</i>				2	4	6	1		2	1					1	7	4	1		3				16 (7,5)
<i>pbp1a</i> + 2x						1	4			1	40	8			3	2					32	12	5	54 (25,2)
<i>pbp1a</i> + 2b										1												1		1 (0,5)
<i>pbp2x</i> + 2b						1			2	2							1	2	1	1				5 (2,3)
<i>pbp1a</i> + 2x + 2b										37	14	2						2	6	42	1	2		53 (24,8)
Итого	11	–	25	36	7	8	13	4	4	42	54	10	9	14	47	15	10	9	4	10	75	14	7	214 (100)

\* Интерпретация выполнена с использованием пороговых значений для менингита.

Штаммы, несущие комбинацию двух (*pbp 1a + 2x* или *pbp 1a + 2b*, или *pbp 2x + 2b*) либо трех (*pbp 1a + 2x + 2b*) детерминант резистентности, всегда демонстрируют резистентность к пенициллину (МПК  $\geq 0,125$  мг/л) и в большинстве случаев (105/113; 92,9 %) характеризуются высокими показателями МПК (2–8 мг/л), а также нечувствительностью (103/113; 91,2 %) к цефотаксиму (МПК = 1–8 мг/л). Примечательно, что более высокие показатели МПК бета-лактамов обнаруживаются у штаммов с наличием двух модификаций (*pbp 1a + 2x*), чем у штаммов с профилем *pbp 1a + 2x + 2b*. С другой стороны, добавление модификаций *pbp2b* к генотипу *pbp2x* увеличивает МПК цефотаксима от 0,032–1 до 0,25–2 мг/л.

Описанные взаимосвязи между наличием генетических детерминант резистентности к бета-лактамам, макролидам/линкозамидам и формированием клинической резистентности к соответствующим антибиотикам создают предпосылки для использования молекулярного обнаружения данных механизмов устойчивости с целью прогнозирования фенотипической резистентности. Показатели информативности возможных диагностических тестов, рассчитанные на основе изучения выделенных в регионе пневмококков, представлены в табл. 4.

Т а б л и ц а 4. Показатели информативности молекулярных методов определения клинической резистентности пневмококка к бета-лактамам, макролидам и линкозамидам ( $n = 214$ )

Table 4. Informational indicators of the molecular methods for determining the clinical resistance of pneumococcus to beta-lactams, macrolides and lincosamides ( $n = 214$ )

Детерминанты резистентности	Предсказанная фенотипическая устойчивость к антибиотику	Чувствительность	Специфичность
<i>mefA</i> или <i>ermB</i>	Эритромицин	126/128 (98,4 %)	86/86 (100 %)
<i>ermB</i>	Клиндамицин	103/107 (96,3 %)	103/107 (96,3 %)
Модификации в одном-трех <i>pbp</i>	Пенициллин (резистентность низкого уровня – МПК $\geq 0,125$ мг/л)	134/135 (99,3 %)	73/79 (92,4 %)
Модификации в двух-трех <i>pbp</i>	Цефотаксим (нечувствительность при менингите – МПК $\geq 1$ мг/л)	103/106 (97,2 %)	98/108 (90,7 %)

Для оценки общей и внутрисеротиповой распространенности детерминант резистентности к макролидам/линкозамидам и бета-лактамам в циркулирующей в регионе популяции пневмококка всего был проанализирован 551 штамм (табл. 5). Среди всех штаммов 60,1 % (331/551) характеризовались наличием как минимум одного механизма резистентности к макролидам/линкозамидам. Распространенность эффлюкса (*mefA*) составила 36,1 % (199/551), а метилирования 23S РНК (*ermB*) – 46,1 % (254/551), причем 22,1 % (122/551) среди данных штаммов обладали сразу двумя механизмами. Наиболее распространенными механизмами резистентности к бета-лактамам являлись модификации *pbp1a* и *pbp2x*, которые встречались с частотой 57,0 % (314/551) и 56,1 % (309/551) соответственно; изменения в *pbp2b* наблюдались реже – у 27,0 % (149/551) штаммов. Среди всех штаммов 65,3 % (360/551) имели как минимум одну модификацию *pbp*, 26,1 % (144/551) – две модификации и 24,3 % (134/551) – все три исследованные модификации *pbp*. Серотипы, наиболее ассоциированные с генотипической резистентностью к данным классам антибиотиков: 14 (90,1 % из 71 штамма были устойчивы к макролидам/линкозамидам, 98,6 % – к бета-лактамам), 19А (90,9 и 90,9 % из 33 штаммов), 19F (88,1 и 90,4 % из 135 штаммов) и 6В/6А (86,3 и 89,5 % из 95 штаммов), в меньшей мере – серотипы 35А/35С/42 (9 и 1 % из 9 штаммов), 23F (32,7 и 65,3 % из 49 штаммов), 7F/7А (0 и 4 % из 7 штаммов) и 9V/9А (6,7 и 46,7 % из 15 штаммов). Следует отметить, что все данные серотипы (кроме 35А/35С/42) являются «педиатрическими» и преимущественно входят в состав всех пневмококковых вакцин (ПКВ10, ПКВ13, ППСВ23), за исключением серотипов 19А, 6А (суммарно 33–128 из 551 штамма; 6,0–23,2 %), не включенных в состав ПКВ10 (но включенных в ПКВ13), и серотипов 35А/35С/42 (9/551; 1,6 %), являющихся невакцинными. Среди серотипов 5, 3, 11А/Д, 15В/15С, 6С/6Д, 15А/15F, 34 и 35В выявлялись лишь единичные штаммы с генотипической резистентностью, распространенность которой можно охарактеризовать как низкую (3-й серотип – 10,3 и 0 % из 29 штаммов; 15В/15С – 13,3 и 13,3 % из



15 штаммов) либо как не поддающуюся оценке ввиду общей низкой встречаемости данных серотипов. Среди серотипов 1, 18C/18F/18B/18A, 8, 9N/9L, 10A, 12F/12A/12B/44/46, 17F, 22F/22A, 33F/33A/37, 10B, 10F/10C/33C, 13, 16F, 23A, 28A, 31, 35F/47F, 39 не было выявлено генотипически резистентных штаммов.

Анализ распространенности отдельных механизмов устойчивости позволил установить особенности генотипической резистентности штаммов пневмококка у пациентов с разными формами инфекции и носительством (рис. 4). Так, доля генетически резистентных штаммов варьировалась в пределах 44,4–70,3 % для макролидов/линкозамидов и 50,0–77,1 % для бета-лактамов; была наибольшей при остром среднем отите (70,3 % к макролидам/линкозамидам и 77,1 % к бета-лактамам) и наименьшей при остром синусите (44,4 % к макролидам/линкозамидам и 50,0 % к бета-лактамам). В целом, распространенность генетически резистентных штаммов среди групп пациентов возрастала в следующем ряду: острый синусит, менингит и другие инвазивные формы, пневмония, здоровое носительство, носительство с инфекцией верхних дыхательных путей, конъюнктивит, острый средний отит. Распространенность эфлюкса (*mefA*) составила 8,2–18,0 %

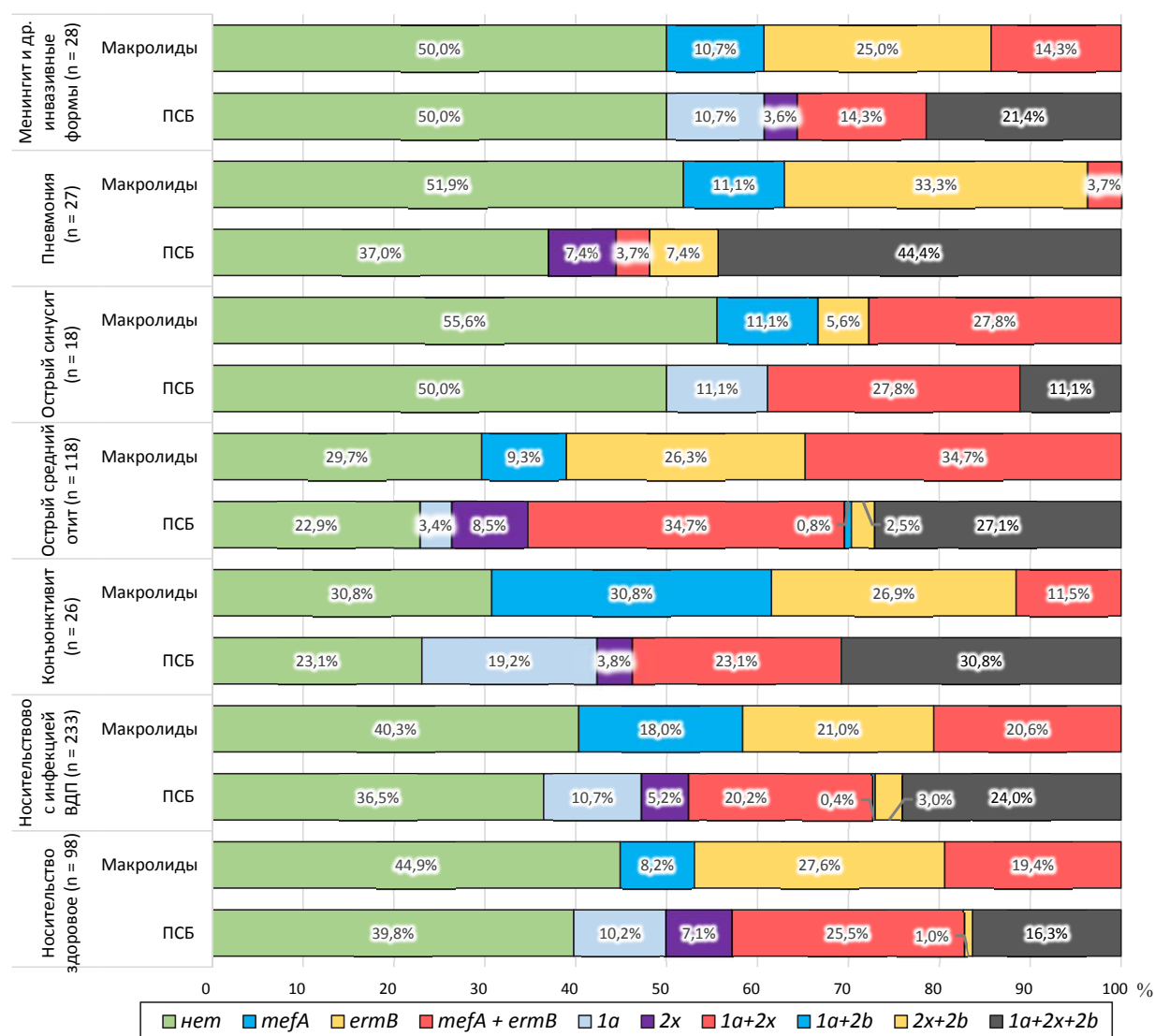


Рис. 4. Встречаемость детерминант резистентности к макролидам/линкозамидам и бета-лактамам среди 548 штаммов пневмококка, выделенных при различных формах инфекции

Fig. 4. Frequency of determinants of resistance to macrolides/lincosamides and beta-lactams in 548 strains of pneumococcus with different infection forms

и существенно не отличалась при разных формах инфекции, за исключением конъюнктивита (30,8 %). Метилирование 23S РНК (*ermB*) примерно равновероятно встречалось при всех формах (21,0–27,6 %), за исключением пневмонии (33,3 %) и острого синусита (5,6 %). Гетерорезистентность (*mefA* + *ermB*) к макролидам/линкозамидам характеризовалась как низкой встречаемостью (пневмония – 3,7 %), так и высокой (острый синусит – 27,8 %, острый средний отит – 34,7 %); при других формах она варьировалась в пределах 11,5–20,6 %.

Среди профилей генотипической резистентности к бета-лактамам модификация одного *pbp* (*1a* или *2x*) наблюдалась с частотой 7,4–23,0 % при разных формах. Встречаемость двух модификаций *pbp* (*1a* + *2x* или *1a* + *2b*, или *2x* + *2b*) варьировалась в пределах 11,1–27,8 %, за исключением острого среднего отита (38,0 %). Три модификации *pbp* (*1a* + *2x* + *2b*) наблюдались с частотой 11,1–30,8 %, кроме пневмонии (44,4 %). Встречаемость отдельных механизмов резистентности распределилась следующим образом: мутации в *pbp1a* обнаруживались у 46,4–55,4 % штаммов, за исключением таких форм инфекции, как острый средний отит и конъюнктивит, где эти показатели составили 66,1 и 73,1 % соответственно. Модификации *pbp2x* были распространены с частотой 50,0–57,7 %, кроме форм инфекции с более высоким распространением (пневмония – 63,0 %, острый средний отит – 72,9 %) и более низким (острый синусит – 38,9 %, менингит – 39,3 %). Мутации в *pbp2b* обнаружены у 17,3–30,8 % штаммов, кроме острого синусита (11,1 %) и пневмонии (51,9 %).

Случаи носительства (как здорового, так и с инфекцией верхних дыхательных путей) демонстрируют сходные уровни распределения различных механизмов резистентности к макролидам и β-лактамам и штаммов «дикого» типа, что может свидетельствовать о том, что выделенные штаммы происходят из единой популяции пневмококка.

**Обсуждение.** Проблема резистентности *S. pneumoniae* к антимикробным лекарственным средствам не только не теряет актуальности во всем мире, но и выходит на передний план среди основных внебольничных возбудителей инфекционных заболеваний человека. Так, резистентность инвазивных изолятов пневмококка, выделенных в странах – участницах сети CAESAR (эпидемиологический надзор за резистентностью к антибиотикам в Центральной Азии и Восточной Европе), в 2016 г. колебалась в пределах 6–47 % к пенициллинам и 9–45 % к макролидам [22]. Возникновение штаммов с комбинацией различных механизмов резистентности вызывает особую тревогу, поскольку они связаны с мультирезистентными и чрезвычайно резистентными клонами, получившими доминирующее распространение в популяции [23]. Во многих регионах мира по результатам продолжительного мониторинга в довакцинальную эру наблюдался постоянный рост уровней резистентности пневмококка к β-лактамам, макролидам и линкозамидам, а в Беларуси, по данным наших предыдущих исследований, уровни резистентности весьма высоки. В данной публикации дается полная молекулярно-генетическая характеристика штаммов, описанных фенотипически ранее [24–26]. Так, в ходе исследования 551 изолята *S. pneumoniae*, выделенного на территории страны, было установлено, что 60 % из них характеризовались наличием как минимум одного механизма резистентности к макролидам/линкозамидам, а распространенность гетерорезистентности (*mefA* + *ermB*) составила 22 %. Среди данных штаммов 65 % имели как минимум одну модификацию *pbp*, 26 % – две модификации и 24 % – все три исследованные модификации *pbp*.

Доминирующим механизмом резистентности к макролидам является метилирование 23S РНК (ген *ermB*), который был обнаружен у 43 % генетически резистентных изолятов. В исследованиях зарубежных авторов показано, что доминирование механизма резистентности, обусловленного действием продукта гена *ermB*, характерно для пневмококков в России (54 %) [23], ряде стран Европы (более 75 %) [3, 4, 19] и в Африке (Тунис) [27]. Доминирующий в США [18, 27], Австралии [27], некоторых странах Западной Европы (Германия – 33 %, Греция – 100 %) [4] и Азии (Иран) [9, 20] механизм резистентности к макролидам, обусловленный эффлюксом (*mefA*), был обнаружен у 15 % генетически резистентных пневмококков. Комбинация двух механизмов (*mefA* + *ermB*) была отмечена у 41 % изолятов. Преобладание в популяции более эффективного механизма (*ermB*), а также высокая доля гетерорезистентных штаммов (*mefA* + *ermB*) по сравнению с дру-

гими регионами, вероятно, обуславливает наблюдаемые высокие уровни фенотипической резистентности пневмококков.

Кроме того, установлено, что среди генетически резистентных к пенициллину изолятов пневмококка чаще всего встречались комбинации модификаций генов *pbp 1a + 2x + 2b* или *pbp 1a + 2x* (по 39–40 %) и отсутствовал генотип резистентности, обусловленный модификацией только *pbp2b*. Роль модификаций *pbp1a*, *pbp2x* и *pbp2b* в увеличении резистентности к β-лактамам как отдельно, так и в различных комбинациях исследована учеными разных стран мира. Так, японскими учеными описана высокая частота встречаемости комбинации модификаций генов *pbp 1a + 2x + 2b* (более 30 %) и отсутствие изолятов с изменениями *pbp2b* [11], а иранские исследователи установили, что генетическая резистентность обусловлена действием *pbp1a* и *pbp1x* [20].

Пневмококки, обладающие молекулярными механизмами резистентности к макролидам/линкозамидам и β-лактамам, в абсолютном большинстве относились к «педиатрическим» серотипам, в той или иной мере включенным в состав антипневмококковых вакцин: 19A (91 % резистентных к макролидам, 91 % – к β-лактамам), 14 (90 %/99 %), 19F (88 %/90 %), 6A/B (86 %/90 %) и 23F (33 %/65 %), что соответствует данным, полученным в других странах. Так, в России доминирующими серотипами, резистентными к пенициллину, являются 19A (90 %), 14 (64 %), 19F (57 %) и 23F (32 %), а резистентные к эритромицину штаммы относятся к серотипам 19A (58 %), 19F (52 %) и 6B (46 %) [23]. В странах Западной Европы повышенной резистентностью к β-лактамам и макролидам обладали серотипы 23F (31 %/16 %), 14 (25 %/31 %) и 6B (16 %/15 %) [4, 28]. Однако следует отметить, что в нашем исследовании серотип 35A/35C/42 также демонстрирует высокий уровень генетической резистентности к макролидам (*ermB* – 100 % из 9 штаммов), а также к β-лактамам (*pbp 2x + 2b* – 11 % из 9 штаммов), что вызывает обеспокоенность, поскольку он не входит в состав существующих антипневмококковых вакцин. Также выявлены единичные штаммы, обладающие генетической резистентностью одновременно к β-лактамам и макролидам/линкозамидам серотипов 6C/D и 15A/15F, а также к β-лактамам – 35B. Штаммы «дикого» типа (генетически чувствительные к макролидам/линкозамидам и β-лактамам) относились как к вакцинным (1, 8, 9N/9L, 10A, 12F/12A/12B/44/46, 33F/33A/37), так и к невакцинным (10B, 10F/10C/33C, 13, 16F, 23A, 28A, 31, 35F/47F, 39) серотипам.

Для быстрого получения сведений о чувствительности изолятов пневмококков к β-лактамам, макролидам, линкозамидам, а также для скрининга резистентности напрямую в клинических образцах, предположительно содержащих ДНК *S. pneumoniae*, целесообразно продолжить разработку описанного молекулярно-генетического метода с целью его внедрения. Выполненное исследование на обширной коллекции штаммов, циркулирующих в регионе, демонстрирует высокие показатели чувствительности и специфичности данного метода в отношении прогнозирования фенотипической резистентности на основании генотипической к пенициллину и цефотаксиму (специфичность – не менее 91 %, чувствительность – не менее 97 %) и к эритромицину/клиндамицину (специфичность и чувствительность – не менее 96 %).

**Заключение.** Таким образом, по результатам нашего исследования приведены данные о распространении отдельных генетических механизмов резистентности в циркулирующей в регионе популяции пневмококков, описаны формирующиеся и циркулирующие генотипы штаммов и определена их роль в общей структуре популяции, а также выявлена их взаимосвязь с фенотипическими характеристиками штаммов (серотип, клиническая резистентность) и клинико-эпидемиологическими свойствами (форма инфекции). Описанные взаимосвязи между наличием генетических детерминант резистентности к β-лактамам, макролидам/линкозамидам и формированием клинической резистентности к соответствующим антимикробным лекарственным средствам позволяют с достаточно высокими показателями чувствительности и специфичности прогнозировать резистентность изолятов *S. pneumoniae* в течение 2–4 ч с момента получения клинического образца, что позволит в ранние сроки назначать рациональную этиотропную антибиотикотерапию.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Белошицкий, Г. В. Пневмококковые менингиты в Российской Федерации / Г. В. Белошицкий, И. С. Королева, Н. И. Кошкина // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2009. – № 2. – С. 21–26.
2. Biological and epidemiological features of antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* in pre- and post-conjugate vaccine eras: a United States perspective / L. Kim [et al.] // Clin. Microbiol. Rev. – 2016. – Vol. 29, N 3. – P. 525–552. <https://doi.org/10.1128/cmr.00058-15>
3. Molecular mechanisms and epidemiology of resistance in *Streptococcus pneumoniae* in the Middle East region / G. El Moujaber [et al.] // J. Med. Microbiol. – 2017. – Vol. 66, N 7. – P. 847–858. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000503>
4. Molecular epidemiology of macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates in Europe / R. R. Reinert [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2005. – Vol. 43, N 3. – P. 1294–1300. <https://doi.org/10.1128/jcm.43.3.1294-1300.2005>
5. Central Asian and Eastern European surveillance of antimicrobial resistance. Annual report 2016 / World Health Organization. – Copenhagen : WHO, 2016. – 133 p.
6. Substitutions in PBP2b from  $\beta$ -lactam-resistant *Streptococcus pneumoniae* have different effects on enzymatic activity and drug reactivity / P. Calvez [et al.] // J. Biol. Chem. – 2017. – Vol. 292, N 7. – P. 2854–2865. <https://doi.org/10.1074/jbc.m116.764696>
7. Reinert, R. R. The antimicrobial resistance profile of *Streptococcus pneumoniae* / R. R. Reinert // Clin. Microbiol. Infect. – 2009. – Vol. 15, suppl. 3. – P. 7–11. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02724.x>
8. Внебольничная пневмония у взрослых: практические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике / А. Г. Чучалин [и др.] // Инфекц. болезни: новости, мнения, обучение. – 2013. – № 2 (3). – С. 91–123.
9. Antimicrobial susceptibility and analysis of macrolide resistance genes in *Streptococcus pneumoniae* isolated in Hamadan / M. N. Mosleh [et al.] // Iran. J. Basic Med. Sci. – 2014. – Vol. 17, N 8. – P. 595–599.
10. Quadriplex real-time polymerase chain reaction (lytA, mef, erm, pbp2bwt) for pneumococcal detection and assessment of antibiotic susceptibility / V. Srinivasan [et al.] // Diagn. Microbiol. Infect. Dis. – 2011. – Vol. 71, N 4. – P. 453–456. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2011.08.017>
11. Rapid identification of penicillin and macrolide resistance genes and simultaneous quantification of *Streptococcus pneumoniae* in purulent sputum samples by use of a novel real-time multiplex PCR assay / K. Y. Fukushima [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2008. – Vol. 46, N 7. – P. 2384–2388. <https://doi.org/10.1128/jcm.00051-08>
12. World Health Organization. Laboratory methods for the diagnosis of meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae* : WHO manual / World Health Organization, Centers for Disease Control and Prevention. – Pub. 2. – WHO/IVB.11.09, 2011. – 311 p.
13. Серотиповая характеристика штаммов *Streptococcus pneumoniae*, выделенных у детей с острыми средними отитами и синуситами / А. В. Давыдов [и др.] // Здоровоохранение. – 2016. – № 3. – С. 12–20.
14. Давыдов, А. В. Использование мультиплексной ПЦР для серотипирования штаммов *Streptococcus pneumoniae* в рамках осуществления мониторинга пневмококковой инфекции в Беларуси / А. В. Давыдов, Л. П. Титов, А. Н. Хархаль // Молекулярная диагностика 2017 : сб. тр. IX Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием (Москва, 18–20 апр. 2017 г.) : в 2 т. / Федер. служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека [и др.] ; под ред. В. И. Покровского. – М., 2017. – Т. 2. – С. 336–338.
15. Antimicrobial wild type distributions of microorganisms [Electronic resource] // EUCAST. – Mode of access : <https://mic.eucast.org/Eucast2/SearchController/search.jsp?action=performSearch&BeginIndex=0&Micdif=mic&NumberIndex=50&Antib=-1&Specium=12>. – Date of access : 02.12.2017.
16. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard. – 10th ed. CLSI document M07-A10. – Wayne, PA : Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015. – 94 p.
17. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI supplement M100 / CLSI. – Pub. 27th. – Wayne, PA : Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017. – 224 p.
18. Predominance of 23S rRNA mutants among non-erm, non-mef macrolide-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* collected in the United States in 1999–2000 / T. A. Davies [et al.] // Antimicrob. Agents Chemother. – 2005. – Vol. 49, N 7. – P. 3031–3033. <https://doi.org/10.1128/aac.49.7.3031-3033.2005>
19. Susceptibilities to telithromycin and six other agents and prevalence of macrolide resistance due to L4 ribosomal protein mutation among 992 Pneumococci from 10 central and Eastern European countries / K. Nagai [et al.] // Antimicrob. Agents Chemother. – 2002. – Vol. 46, N 2. – P. 371–377. <https://doi.org/10.1128/aac.46.2.371-377.2002>
20. Kargar, M. M. Multi-drug resistance and molecular pattern of erythromycin and penicillin resistance genes in *Streptococcus pneumoniae* / M. Kargar, M. Baghernejad, D. S. Ghorbani // Afr. J. Biotechnol. – 2012. – Vol. 11, N 4. – P. 968–973. <https://doi.org/10.5897/ajb11.2783>
21. New aspects of the interplay between penicillin binding proteins, murM, and the two-component system CiaRH of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A isolates from Hungary / I. Schweizer [et al.] // Antimicrob. Agents Chemother. – 2017. – Vol. 61, N 7. – P. e00414–e00417. <https://doi.org/10.1128/aac.00414-17>
22. Central Asian and Eastern European surveillance of antimicrobial resistance. Annual report 2017 / World Health Organization. – Copenhagen : WHO, 2018. – 135 p.
23. Serotypes and antibiotic resistance of non-invasive *Streptococcus pneumoniae* circulating in pediatric hospitals in Moscow, Russia / N. Mayanskiy [et al.] // Int. J. Infect. Dis. – 2014. – Vol. 20. – P. 58–62. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2013.11.005>

24. Чувствительность к антибиотикам штаммов *Streptococcus pneumoniae*, выделенных от пациентов с менингитом в Беларуси / А. В. Давыдов [и др.] // Здоровоохранение. – 2018. – № 1. – С. 22–32.
25. Чувствительность к антибиотикам штаммов *Streptococcus pneumoniae*, выделенных от пациентов с пневмонией в Беларуси / А. В. Давыдов [и др.] // Мед. новости. – 2017. – № 12. – С. 74–82.
26. Чувствительность к антибиотикам и связь с серотипами штаммов *Streptococcus pneumoniae* у детей с острым средним отитом и острым синуситом в Беларуси / А. В. Давыдов [и др.] // Клин. микробиол. и антимикроб. химиотер. – 2018. – Т. 20, № 3. – С. 206–215.
27. Phenotype, genotype, and serotype distribution of macrolide resistant invasive and non-invasive *Streptococcus pneumoniae* strains, in Sousse, Tunisia / M. Marzouk [et al.] // Med. Mal. Infect. – 2014. – Vol. 44, N 10. – P. 478–482. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2014.07.016>
28. Molecular epidemiology of penicillin-non-susceptible *Streptococcus pneumoniae* isolates from children with invasive pneumococcal disease in Germany / R. R. Reinert [et al.] // Clin. Microbiol. Infect. – 2007. – Vol. 13, N 4. – P. 363–368. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01676.x>

## References

- Beloshitskii G. V., Koroleva I. S., Koshkina N. I. Pneumococcal meningitis in Russian Federation. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika* [Epidemiology and vaccine prevention], 2009, no. 2, pp. 21–26 (in Russian).
- Kim L., McGee L., Tomczyk S., Beall B. Biological and epidemiological features of antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* in pre- and post-conjugate vaccine eras: a United States perspective. *Clinical Microbiology Reviews*, 2016, vol. 29, no. 3, pp. 525–552. <https://doi.org/10.1128/cmr.00058-15>
- El Moujaber G., Osman M., Rafei R., Dabboussi F., Hamze M. Molecular mechanisms and epidemiology of resistance in *Streptococcus pneumoniae* in the Middle East region. *Journal of Medical Microbiology*, 2017, vol. 66, no. 7, pp. 847–858. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000503>
- Reinert R. R., Ringelstein A., van der Linden M., Cil M. Y., Al-Lahham A., Schmitz F.-J. Molecular epidemiology of macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates in Europe. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, vol. 43, no. 3, pp. 1294–1300. <https://doi.org/10.1128/jcm.43.3.1294-1300.2005>
- Central Asian and Eastern European surveillance of antimicrobial resistance. Annual report 2016. Copenhagen, World Health Organization, 2016. 133 p.
- Calvez P., Breukink E., Roper D. I., Dib M., Contreras-Martel C., Zapun A. Substitutions in PBP2b from  $\beta$ -lactam-resistant *Streptococcus pneumoniae* have different effects on enzymatic activity and drug reactivity. *Journal of Biological Chemistry*, 2017, vol. 292, no. 7, pp. 2854–2865. <https://doi.org/10.1074/jbc.m116.764696>
- Reinert R. R. The antimicrobial resistance profile of *Streptococcus pneumoniae*. *Clinical Microbiology and Infection*, 2009, vol. 15, suppl. 3, pp. 7–11. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02724.x>
- Chuchalin A. G., Sinopal'nikov A. I., Kozlov R. S., Tyurin I. E., Rachina S. A. Community-acquired pneumonia in adults: practical recommendations on diagnosis, therapy and prophylaxis. *Infektsionnye Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie* [Infectious diseases: news, opinions, training], 2013, no. 2 (3), pp. 91–123 (in Russian).
- Mosleh M. N., Gharibi M., Alikhani M. Y., Saidijam M., Vakhshiteh F. Antimicrobial susceptibility and analysis of macrolide resistance genes in *Streptococcus pneumoniae* isolated in Hamadan. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 2014, vol. 17, no. 8, pp. 595–599.
- Srinivasan V., du Plessis M., Beall B. W., McGee L. Quadriplex real-time polymerase chain reaction (lytA, mef, erm, pbp2bwt) for pneumococcal detection and assessment of antibiotic susceptibility. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2011, vol. 71, no. 4, pp. 453–456. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2011.08.017>
- Fukushima K. Y., Yanagihara K., Hirakata Y., Sugahara K., Morinaga Y., Kohno S., Kamihira S. Rapid identification of penicillin and macrolide resistance genes and simultaneous quantification of *Streptococcus pneumoniae* in purulent sputum samples by use of a novel real-time multiplex PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 2008, vol. 46, no. 7, pp. 2384–2388. <https://doi.org/10.1128/jcm.00051-08>
- World Health Organization. *Laboratory methods for the diagnosis of meningitis caused by Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae, and Haemophilus influenzae: WHO manual*. World Health Organization, Centers for Disease Control and Prevention. Pub. 2. WHO/IVB.11.09, 2011. 311 p.
- Davydov A. V., Titov L. P., Klyuiko N. L., Gurinovich V. V. Serotype characteristic of *Streptococcus pneumoniae* strains isolated from children with acute otitis media and sinusitis. *Zdravookhranenie* [Healthcare], 2016, no. 3, pp. 12–20 (in Russian).
- Davydov A. V., Titov L. P., Kharkhal' A. N. The usage of multiplex PCR for serogenotyping the strains of *Streptococcus pneumoniae* as a part of the monitoring for pneumococcal infection in Belarus. *Molekulyarnaya diagnostika 2017: sbornik trudov IX Vserossiiskoi nauchno-prakticheskoi konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem (Moskva, 18–20 aprelya 2017 goda). Tom 2* [Molecular diagnostics 2017: proceedings of the IX All-Russian scientific and practical conference with international participation (Moscow, April 18–20, 2017). Vol. 2]. Moscow, 2017, pp. 336–338 (in Russian).
- Antimicrobial wild type distributions of microorganisms. EUCAST. Available at: <https://mic.eucast.org/Eucast2/SearchController/search.jsp?action=performSearch&BeginIndex=0&Micdif=mic&NumberIndex=50&Antib=-1&Specium=12> (accessed 02.12.2017).
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: Approved standard. 10th ed.* CLSI document M07-A10. Wayne, PA, Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015. 94 p.

17. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI supplement M100. CLSI. Pub. 27th. Wayne, PA, Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017. 224 p.
18. Davies T. A., Bush K., Sahm D., Evangelista A. Predominance of 23S rRNA mutants among non-erm, non-mef macrolide-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* collected in the United States in 1999–2000. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2005, vol. 49, no. 7, pp. 3031–3033. <https://doi.org/10.1128/aac.49.7.3031-3033.2005>
19. Nagai K., Appelbaum P. C., Davies T. A., Kelly L. M., Hoellman D. B., Andrasevic A. T. [et al.]. Susceptibilities to telithromycin and six other agents and prevalence of macrolide resistance due to L4 ribosomal protein mutation among 992 *Streptococcus pneumoniae* from 10 central and Eastern European countries. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2002, vol. 46, no. 2, pp. 371–377. <https://doi.org/10.1128/aac.46.2.371-377.2002>
20. Kargar M., Baghernejad M., Ghorbani D. S. Multi-drug resistance and molecular pattern of erythromycin and penicillin resistance genes in *Streptococcus pneumoniae*. *African Journal of Biotechnology*, 2012, vol. 11, no. 4, pp. 968–973. <https://doi.org/10.5897/ajb11.2783>
21. Schweizer I., Blättner S., Maurer P., Peters K., Vollmer D., Vollmer W., Hakenbeck R., Denapaite D. New aspects of the interplay between penicillin binding proteins, murM, and the two-component system CiaRH of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A isolates from Hungary. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2017, vol. 61, no. 7, pp. e00414–e00417. <https://doi.org/10.1128/aac.00414-17>
22. *Central Asian and Eastern European surveillance of antimicrobial resistance. Annual report 2017*. Copenhagen, World Health Organization, 2018. 135 p.
23. Mayanskiy N., Alyabieva N., Ponomarenko O., Lazareva A., Katosova L., Ivanenko A., Kulichenko T., Namazova-Baranova L., Baranov A. Serotypes and antibiotic resistance of non-invasive *Streptococcus pneumoniae* circulating in pediatric hospitals in Moscow, Russia. *International Journal of Infectious Diseases*, 2014, vol. 20, pp. 58–62. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2013.11.005>
24. Davydov A. V., Titov L. P., Kharkhal' A. N., Klyuiko N. L., Baraulya V. G., Rogacheva T. A. Antibiotic susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* strains isolated from patients with meningitis in Belarus. *Zdravookhraneniye* [Healthcare], 2018, no. 1, pp. 22–32 (in Russian).
25. Davydov A. V., Titov L. P., Klyuiko N. L., Levshina N. N., Kharkhal' A. N., Madzharova O. A., Belanovskaya L. I. Antibiotic susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* strains isolated from patients with pneumonia in Belarus. *Meditinskiiye novosti* [Medical news], 2017, no. 12, pp. 74–82 (in Russian).
26. Davydov A. V., Titov L. P., Klyuiko N. L., Gurinovich V. V., Lazarev A. V. Antimicrobial susceptibility and association with serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates in children with acute otitis media and acute sinusitis in Belarus. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya* [Clinical microbiology and antimicrobial chemotherapy], 2018, vol. 20, no. 3 (in Russian).
27. Marzouk M., Ferjani A., Amamou S., Alibi S., Haj Ali M., Boukadida J. Phenotype, genotype, and serotype distribution of macrolide resistant invasive and non-invasive *Streptococcus pneumoniae* strains, in Sousse, Tunisia. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 2014, vol. 44, no. 10, pp. 478–482. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2014.07.016>
28. Reinert R. R., van der Linden M., Seegmüller I., Al-Lahham A., Siedler A., Weißmann B., Toschke A. M., von Kries R. Molecular epidemiology of penicillin-non-susceptible *Streptococcus pneumoniae* isolates from children with invasive pneumococcal disease in Germany. *Clinical Microbiology and Infection*, 2007, vol. 13, no. 4, pp. 363–368. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01676.x>

## Информация об авторах

Давыдов Александр Владимирович – ассистент. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: alexander.davydovv@gmail.com

Титов Леонид Петрович – член-корреспондент, д-р мед. наук, профессор, заведующий лабораторией. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: leonidtitov@tut.by

Хархаль Анна Николаевна – мл. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: anna-madlen69@yandex.by

Барауля Валентина Геннадьевна – заведующий отделением. Минский городской центр гигиены и эпидемиологии (ул. П. Бровки, 13/1, 220013, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: aleftina90@mail.ru

Гусакова Юлия Владимировна – врач-бактериолог. Минский городской центр гигиены и эпидемиологии (ул. П. Бровки, 13/1, 220013, г. Минск, Республика Беларусь).

## Information about the authors

Alexander V. Davydov – Assistant. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: alexander.davydovv@gmail.com

Leonid P. Titov – Corresponding Member, D. Sc. (Med.), Professor, Head of the Laboratory. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: leonidtitov@tut.by

Anna N. Kharkhal – Junior researcher. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: anna-madlen69@yandex.by

Valentina G. Baraulya – Head of the Department. Minsk City Center for Hygiene and Epidemiology (13/1, Brovka Str., 220013, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: aleftina90@mail.ru

Yuliya V. Gusakova – Bacteriologist. Minsk City Center for Hygiene and Epidemiology (13/1, Brovka Str., 220013, Minsk, Republic of Belarus).