

МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ И ТЕХНОЛОГИИ

УДК 615.33.015.8:579.862.1

***STREPTOCOCCUS MUTANS* – ВОЗМОЖНЫЙ ФАКТОР РИСКА РАСПРОСТРАНЕНИЯ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ**

***Т.В. Бродина*^{1*}, *А.В. Любимова*¹, *А.Е. Фетинг*¹, *А.В. Силин*¹, *Р.Ф. Юсупова*¹,
*А.В. Киселев*¹, *Е.А. Климова*²**

¹*Северо-Западный государственный медицинский университет
имени И.И. Мечникова, г. Санкт-Петербург,*

²*Санкт-Петербургский государственный университет, Россия*

STREPTOCOCCUS MUTANS – POSSIBLE RISK FACTOR FOR ANTIBIOTIC RESISTANCE PREVALENCE

***T.V. Brodina*^{1*}, *A.V. Lyubimova*¹, *A.E. Feting*¹, *A.V. Silin*¹, *R.F. Yusupova*¹,
*A.V. Kiselev*¹, *E.A. Klimova*²**

¹*North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg,*

²*St. Petersburg State University, Russian Federation*

Цель. Оценить распространенность эритромицин- и тетрациклинрезистентных штаммов *S. mutans*, изолированных из зубного налета детей. Определить ведущий механизм их устойчивости к макролидам.

Материалы и методы. Исследовано 86 штаммов *S. mutans*, изолированных из зубного налета детей в возрасте 6–17 лет. Скрининг на резистентность к эритромицину осуществлялся двумя методами – фенотипическим и генотипическим, к тетрациклину – только фенотипическим.

Результаты. Доля изолятов *S. mutans*, фенотипически резистентных к эритромицину, составила более 16,0 %, к тетрациклину – 26,7 %. Преобладающий молекулярно-генетический механизм резистентности к эритромицину – наличие *mef A*-гена (78,6 % всех эритромицинрезистентных штаммов); 10,5 % всех исследованных штаммов *S. mutans* являются потенциальным резервуаром генов антибиотикорезистентности (*erm B* и *mef A*) в горизонтальной передаче.

Ключевые слова. *S. mutans*, *Viridans Streptococci*, гены антибиотикорезистентности, *erm B*, *mef A*.

© Бродина Т.В., Любимова А.В., Фетинг А.Е., Силин А.В., Юсупова Р.Ф., Киселев А.В., Климова Е.А., 2017

тел. +7 (812) 303 50 00

e-mail: brodina23@gmail.com

[Бродина Т.В. (*контактное лицо) – аспирант кафедры эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии; Любимова А.В. – доктор медицинских наук, профессор кафедры эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии; Фетинг А.Е. – студентка VI курса; Силин А.В. – доктор медицинских наук, профессор кафедры стоматологии общей практики; Юсупова Р.Ф. – студентка VI курса; Киселев А.В. – доктор медицинских наук, профессор кафедры профилактической медицины и охраны здоровья; Климова Е.А. – аспирант кафедры детской стоматологии].

Aim. To assess the prevalence of erythromycin and tetracycline-resistant *S. mutans* strains, isolated from child dental deposit; to determine the leading mechanism of their resistance to macrolides.

Materials and methods. Eighty six *S. mutans* strains, isolated from the dental deposits of children aged 6–17 years were studied. Screening of erythromycin resistance was fulfilled with two methods – phenotypical and genotypical, tetracycline – with phenotypical alone.

Results. The share of *S. mutans* isolates, phenotypically resistant to erythromycin, was 16 %, to tetracycline – 26,7 %. The prevailing molecular-genetic mechanism of erythromycin resistance – presence of *mef A*-gene (78,6 % of all erythromycin-resistant strains); 10,5 % of all the studied *S. mutans* strains is a potential reservoir of antibiotic resistance genes (*erm B* and *mef A*) in the horizontal transmission.

Key words. *S. mutans*, *Viridans Streptococci*, antibiotic resistance genes, *erm B* and *mef A*.

ВВЕДЕНИЕ

S. mutans из группы *Viridans Streptococci* (*VGS*) являются частью нормальной микрофлоры ротовой полости, которая играет важнейшую роль в подавлении колонизации полости рта другими патогенами. Однако вирулентные штаммы *S. mutans* способны инициировать развитие кариеса зубов. У пациентов со снижением иммунитета (нейтропения, иммунокомпромисс) их наличие считается фактором риска аутоиммунного нефрита, неалкогольного стеатогепатита, атеросклероза, они также способны вызывать серьезные инфекции – эндокардит, сепсис и менингит [1–4, 6, 7]. Кроме того, эти бактерии могут обмениваться генетическим материалом с другими микроорганизмами, разделяющими их среду обитания. Известно, что у *S. mutans* и других *VGS* растет устойчивость ко многим антибиотикам, включая макролиды и тетрациклины [4, 9].

Стрептококки приобретают устойчивость к макролидам тремя механизмами: 1) посттранскрипционной модификацией 23S субъединицы рРНК аденин-N6-метилтрансферазами (кодируемые *erm*-геном); 2) действием эффлюксного насоса, опосредованным геном *mef A*, что помогает создать

низкую концентрацию внутриклеточного лекарственного средства; 3) рибосомными мутациями в ключевом сайте при связывании с антибиотиками. Наиболее распространенный способ обмена детерминантами резистентности среди близкородственных бактерий происходит через генетический перенос *in vivo*. В одном из исследований была показана сильная корреляционная связь между концентрацией антибиотиков в слюне и ростом уровня колонизации резистентных штаммов *S. mutans* [12]. И, как следствие, *S. pneumoniae* или *S. pyogenes* и многие другие патогенные стрептококки становятся все более устойчивыми к макролидам.

Наконец, индукция устойчивости к макролидам также может непреднамеренно способствовать устойчивости к тетрациклину, так как их основные детерминанты резистентности – гены *erm B* и *tet M* – часто располагаются на одном и том же мобильном элементе. Таким образом, потенциальную роль *S. mutans* в качестве резервуара устойчивости к макролидам нельзя игнорировать.

Цель исследования – определение распространенности эритромицин- и тетрациклинрезистентных штаммов *S. mutans*, установление основного механизма приобретения резистентности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Микробиологическому исследованию был подвергнут зубной налет 80 детей в возрасте 6–17 лет, полученный при профилактическом осмотре в 2016–2017 гг.

Пробы зубного налета отбирались стерильными деревянными зубочистками, образцы сразу помещались в пробирки Eppendorf. Содержимым пробирки являлась транспортная среда – триптозно-соевый бульон объемом 200 мкл с содержанием 20%-ной сахарозы и 10 %-ной глюкозы (либо ТНВ, ВНИ), в который предварительно опускали диск с антибиотиком бацитрацином концентрацией 0,04 ед. в качестве селективного фактора. Пробы хранились при температуре 4 °С и доставлялись в лабораторию в первые сутки после отбора.

Культивирование *S. mutans* осуществлялось при $t = 37$ °С на дифференциально-диагностических плотных питательных средах *Mitis Salivarius agar* в микроаэрофильных условиях в течение 24 часов.

Чувствительность к эритромицину, клиндамицину и тетрациклину определялась диско-диффузионным методом коммерческими дисками, минимальные ингибирующие концентрации интерпретировались в соответствии с критериями NCCLS (США) [9].

Изоляты *S. mutans* изучены на устойчивость к макролидам, был определен их фенотип методом «двойных дисков» на чашках Петри с Muller – Hinton агаром. Для этого диски с эритромицином (15 мкг) и клиндамицином (2 мкг) были размещены на расстоянии 16 мм друг от друга. После инкубации отмечались два различных вида устойчивых

фенотипов [10]. Устойчивость к клиндамицину и эритромицину интерпретировалась как конститутивный тип макролида – линкозамидстрептомицина (сMLS_B). Восприимчивость к клиндамицину и резистентность к эритромицину без D-зоны дифференцировалась как фенотип М. Чувствительность к тетрациклинам также определялась диско-диффузионным методом с концентрацией диска 30 мкг.

Геномная ДНК выделялась с помощью набора химических реагентов для получения ДНК из проб («ДНК-экспресс», производство НПФ «Литех», г. Москва) в соответствии с инструкциями производителя.

Наличие генов *erm* В и *mef* А определяли методом ПЦР-амплификации, используя ранее описанные специфичные праймеры 10-превалентен.

Амплификация выполнялась в термоциклере CFX-96 (BIO-RAD, США) с последующей электрофоретической оценкой результатов реакции. Каждый раз при постановке реакции совместно с образцами ставились положительный и отрицательный контроль для предотвращения получения ложных результатов.

Анализ ПЦР-продуктов осуществлялся методом гель-электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле с окраской ДНК этидиумом бромидом (10 MG/ML) производства «Helixon», г. Москва, и визуализацией в УФ-лучах на трансиллюминаторе «UVT1» производства «Biokom». В качестве стандарта для оценки длины полученных ампликонов использовали маркер длин фрагментов с шагом в 100 пар нуклеотидов производства НПО «Сибэнзим» (8 мкл маркера на дорожку). Электрофорез осуществлялся при помощи источни-

ка питания для электрофореза нуклеиновых кислот в агарозных и акриламидных гелях «Эльф-4» и «Эльф-8». Параметры электрофореза: 180 В, 19,0 Вт, 180 мА в течение 25 минут.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

За время обследования были выделены 86 штаммов *S. mutans* от 80 детей. Из 86 тестируемых изолятов *S. mutans* у 11 (12,8 %) обнаружен М-фенотип резистентности к макролидам, у 3 (3,5 %) – сMLSВ-фенотип. Индуцибельный тип iMLSВ выявлен не был. Остальные 72 (83,7 %) штамма были восприимчивы к антибиотикам.

Количество фенотипически резистентных штаммов *S. mutans* к тетрациклину – 23 изолята (26,7 %).

Среди 14 резистентных к макролидам изолятов 11 (78,6%) имели *mef A*-ген. Один (33,3 %) штамм с сMLSВ-фенотипом был позитивен на ген *erm B*. М-фенотип был доминирующим (78,6 %) среди устойчивых к эритромицину штаммов. Другие исследования также показали, что М-фенотип преобладает среди VGS из ротоглотки [5]. В нашем исследовании ген *erm B* обнаруживался в изолятах с сMLSВ-фенотипом, об этом также сообщают и другие исследователи [5, 11]. Ген *mef A* был обнаружен исключительно у штаммов с фенотипом М.

Доля изолятов *S. mutans*, фенотипически резистентных к эритромицину, составила более 16,0 %, к тетрациклину – 26,7 %. Преобладающий молекулярно-генетический механизм резистентности к эритромицину – наличие *mef A*-гена (78,6 % всех эритромицинрезистентных штаммов). Из всех исследованных штаммов *S. mutans* 10,5 % являются

потенциальным резервуаром генов антибиотикорезистентности (*erm B* и *mef A*) в горизонтальной передаче.

ВЫВОДЫ

1. Обнаружена высокая частота резистентности штаммов *S. mutans* к макролидам и тетрациклинам у детей в Санкт-Петербурге.

2. Необходим мониторинг резистентности к антибиотикам как *S. mutans*, так и других видов стрептококков, в том числе и молекулярно-генетический. Это поможет координировать направления индивидуальной (ориентированной на пациента) и популяционной терапевтической стратегии.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Bruckner L., Gigliotti F. Viridans group streptococcal infections among children with cancer and the importance of emerging antibiotic resistance. *Semin Pediatr Infect Dis* 2006; 17: 153–160.

2. Balletto E., Mikulska M. Bacterial infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2015; 7: 101–109.

3. Douglas C. Identity of viridans streptococci isolated from cases of infective endocarditis. *J Med Microbiol* 1993; 39: 179–182.

4. Gordon, K.A., Beach M.L., Biedenbach D.J., Jones R.N., Rhomberg P.R., Mutnick A.H. Antimicrobial susceptibility patterns of hemolytic and viridans group streptococci: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–2000). *Diag Microbiol Infect Dis* 2002; 43: 157–162.

5. Ioannidou S., Papaparaskevas J., Tsios P.T., Foustoukou M., Legakis N.J., Vatopoulus A. Prevalence and characterization of the mechanisms of macrolide, lincosamide and streptogramin resistance in viridans group streptococci. *Int J Antimicrob Agents* 2003; 22: 626–629.
6. Kennedy H.F., Gemmell C.G., Bagg J., Gibson B.E.S., Michie J.R. Antimicrobial susceptibility of blood culture isolates of viridans group streptococci: relationship to a change in empirical antibiotic therapy in febrile neutropenia. *J Antimicrob Chemother* 2001; 47: 693–696.
7. Luna V.A., Coates P., Eady E.A., Cove J.H., Nguyen T.T., Roberts M.C. A variety of gram-positive bacteria carry mobile *mef* genes. *J Antimicrob Chemother* 1999; 44: 19–25.
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing – Thirteenth Informational Supplement M100-S13. NCCLS, Wayne, PA, USA 2003.
9. Seppala H., Haanpera M., Al-Jubaish M., Jarvinen H., Jalava J., Huovinen J. Antimicrobial susceptibility patterns and macrolide resistance genes of viridans group streptococci from normal flora. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52: 636–644.
10. Seppala H., Nissinen A., Yu Q., Huovinen P. Three different phenotypes of erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* in Finland. *J Antimicrob Chemother* 1993; 32: 885–891.
11. Seppala H., Skurnik M., Soini H., Roberts M.C., Huovinen P. A novel erythromycin resistance methylase gene (*ermTR*) in *Streptococcus pyogenes*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 257–262.
12. Soriano F., Rodriguez-Cerrato V. Pharmacodynamic and kinetic basis for the selection of pneumococcal resistance in the upper respiratory tract. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2002; 50: 51–58.

Материал поступил в редакцию 26.05.2017