

**ВИДОВОЙ СОСТАВ БАКТЕРИЙ РОДА *STREPTOCOCCUS*,
ИДЕНТИФИЦИРОВАННЫХ ИЗ БИОМАТЕРИАЛА ПАЦИЕНТОВ С
ДИАГНОЗОМ ВНЕБОЛЬНИЧНАЯ ПНЕВМОНИЯ В ПЕРИОД ПАНДЕМИИ
НОВОЙ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ**

О. Н. Колотова, Л. В. Катаева, И. В. Бакштановская, Т. Ф. Степанова,
К. Б. Степанова

Федеральное бюджетное учреждение науки «Тюменский научно-
исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Федеральной
службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
г. Тюмень

Резюме

Цель - изучение видового состава бактерий рода *Streptococcus*, выделенных из мокроты и промывных вод бронхов у пациентов с диагнозом внебольничная пневмония, в том числе ассоциированной с COVID-19, и определение их спектра резистентности к антимикробным препаратам.

Материалы и методы. Проанализирован видовой состав бактерий рода *Streptococcus*, изолированных из отделяемого нижних дыхательных путей от 308 пациентов с диагнозом внебольничная пневмония.

Результаты. В структуре видов *Streptococcus spp.* преобладает *S. mitis* в 46,1% случаев у ковидпозитивных пациентов и 33,3% у ковиднегативных. Бактерии рода *S. pneumoniae* бактериологическим методом изолированы в 3,8±2,0% проб, методом ПЦР в 33±5,3% у ковидпозитивных пациентов. У пациентов с неподтвержденным SARS-CoV-2 *S. pneumoniae* выделен в 6,1±4,2% случаев бактериологическим методом и ПЦР методом в 31,9±8,1% проб биологического материала. Более 65% штаммов бактерий рода *Streptococcus* проявляли резистентность к ампициллину, вне зависимости от статуса ковидпринадлежности.

Ключевые слова: внебольничная пневмония, SARS-CoV-2, бактерии рода *Streptococcus*, мокрота, промывные воды бронхов, антибиотикорезистентность.

Введение. Пандемия новой коронавирусной инфекции сопровождается высоким уровнем заболеваемости органов дыхания, в частности внебольничной пневмонией (ВП), с высокой долей осложненных и затяжных случаев [1, 2, 3, 4]. Пневмония, вызванная вирусом SARS-CoV-2 влечет за собой острый респираторный дистресс-синдром или дыхательную недостаточность с риском летального исхода (40%) [5, 6]. Наиболее тяжелое течение заболевания наблюдается у пациентов пожилого возраста, особенно при наличии сопутствующих заболеваний (хроническая обструктивная болезнь легких, сердечно-сосудистые заболевания, сахарный диабет, заболевания почек и печени, алкоголизм) [7]. Этиология ВП связана с микрофлорой, колонизирующей верхние отделы дыхательных путей. Из многочисленных микроорганизмов, только обладающие повышенной вирулентностью, при попадании в нижние отделы дыхательных путей способны вызывать клинические проявления инфекции. К числу таких возбудителей в первую очередь относится *S. pneumoniae* [8, 9, 10]. Согласно опубликованным данным, частота обнаружения *S. pneumoniae* при ВП варьирует в пределах от 5 до 35% от выявленных случаев. Такой разброс в показателях объясняется трудностями в получении качественных образцов мокроты из нижних отделов дыхательных путей, различиями в чувствительности применяемых диагностических сред и тестов, использованием антимикробных препаратов для лечения заболевания до проведения этиологической диагностики [13]. Как известно, вирусные инфекции наносят серьезный удар по иммунной системе человека, что предрасполагает к развитию бактериальной инфекции [8, 11, 12]. Поэтому условно-патогенные бактерии – представители резидентной микрофлоры носоглотки человека, такие как *Streptococcus spp.* могут иметь этиологическое значение [14].

Материалы и методы. В исследование включены 308 образцов мокроты и промывных вод бронхов от пациентов, находящихся на стационарном лечении в моногоспиталях Тюмени и Тюменской области с подтвержденным диагнозом внебольничная пневмония различной степени тяжести. Средний возраст

пациентов составил 57 лет, сроки пребывания в стационаре от 2 суток до 4 месяцев. Клинический материал получен в период с мая по ноябрь 2020 года.

Отбор и транспортировка биологического материала для лабораторного исследования проводилась в соответствии с требованиями законодательства РФ в отношении возбудителей инфекционных заболеваний человека I-II групп патогенности [6, 15].

Проведено микроскопическое исследование мокроты, окрашенной по Граму (308 образцов). Для культивирования бактерий рода *Streptococcus* осуществлен посев клинических образцов в объеме 0,1 мл из третьего разведения (для промывных вод бронхов) или из пятого разведения (для мокроты) на агар с дефибрированной кровью барана (5%), обогащённый лошадиной сывороткой (3,5%) и шоколадный агар. Посевы инкубировали при температуре 37 °С в течении 24 - 48 часов в CO₂-инкубаторе.

Выросшие на плотных питательных средах колонии идентифицировали с помощью времяпролетной масс-спектрометрии на приборе microflex MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Германия) с программным обеспечением BioTyper 3,0. Для определения групповой принадлежности *Streptococcus spp.* применяли набор реагентов «Стрепто-латекс-тест» («ЭКОлатекс», Россия). Подтверждение видовой принадлежности бактерий осуществляли дисками с оптохином 6 мкг («НИЦФ», Россия) и набором латексной агглютинации Dry Spot Pneumo («ОХОИД», Великобритания).

Параллельно с бактериологическим методом, для обнаружения ДНК *S. pneumoniae* биологический материал исследовали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени. Для этого использовали «Набор для выявления ДНК *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* и *S. pneumoniae* «АмплиСенс»» (ФБУН «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора, Россия).

Для выявления РНК вируса SARS-CoV-2 пробы исследовали методом ПЦР наборами: тест-система Вектор-ПЦРrv-2019-nCoV-RG (ГНЦ «Вектор», Россия), SARS-CoV-2/SARS-CoV («ДНК-технология», Россия).

Резистентность к антимикробным препаратам определяли диско-диффузионным методом на среде Мюллер-Хинтон (HiMedia, Индия), результаты анализировали в соответствии с действующими нормативными документами (Клинические рекомендации «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» Версия – 2018 – 03 и МУК 4.2.1890–04). Чувствительность штаммов *Streptococcus spp.* оценивали к ампициллину, амоксициллин/клавулановой кислоте, клиндамицину, цефотаксиму.

Результаты и обсуждение. Положительный результат ПЦР исследования SARS-CoV-2 из 308 проб биоматериала подтвержден в 192 случаях, отрицательный результат получен в 116 пробах. В ходе бактериологического исследования в 47 образцах отделяемого нижних дыхательных путей роста микроорганизмов на всех дифференциально-диагностических средах не обнаружено. Бактерии рода *Streptococcus* идентифицированы в 111 пробах, в том числе у ковидпозитивных пациентов в - 78 случаях, у ковиднегативных - в 33 (рисунок 1).

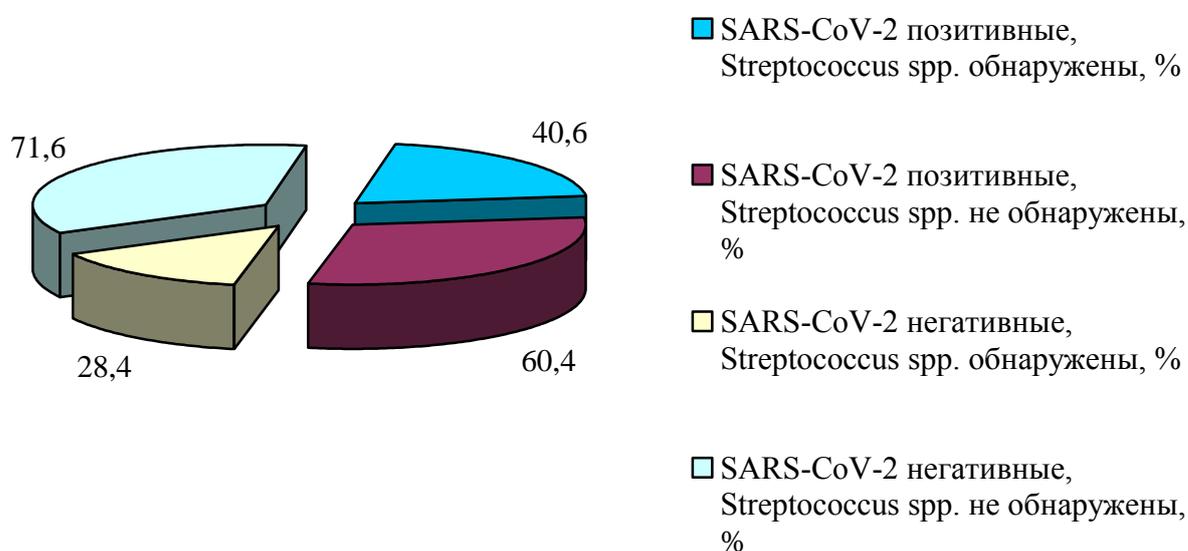


Рисунок 1. Частота обнаружения бактерий рода *Streptococcus* в исследуемых пробах.

Figure 1. Frequency of detection of bacteria of the genus *Streptococcus* in the studied samples.

В монокультуре бактерии рода *Streptococcus* изолированы в 44% проб от ковидпозитивных и в 36% ковиднегативных пациентов. Ассоциации

представлены культурами: грибы рода *Candida*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*.

Сравнительная характеристика видов бактерий рода *Streptococcus*, изолированных бактериологическим методом из мокроты и промывных вод бронхов от пациентов с диагнозом внебольничная пневмония, в зависимости от лабораторного подтверждения SARS-CoV-2 представлена в таблице 1.

Результаты исследования показали, что среди бактерий рода *Streptococcus*, чаще встречается вид *S. mitis*, относящийся к сапрофитной микробиоте, причем в пробах от ковидпозитивных пациентов процент встречаемости выше, чем у ковиднегативных. Достоверных различий не обнаружено.

Таблица 1/Table 1

Видовая характеристика бактерий рода *Streptococcus*, выделенных из содержимого нижних дыхательных путей, в зависимости от лабораторного подтверждения SARS-CoV-2

Species characteristics of bacteria of the genus *Streptococcus* isolated from the contents of the lower respiratory tract, depending on laboratory confirmation of SARS-CoV-2

Виды <i>Streptococcus</i> <i>Species</i> <i>Streptococcus</i>	SARS-CoV-2			
	ПОЗИТИВНЫЕ (n = 78 культур) positive (n = 78 cultures)		НЕГАТИВНЫЕ (n = 33 культуры) negative (n = 33 cultures)	
	Абс. число abs. number	% ± m	Абс. число abs. number	% ± m
<i>S. mitis</i>	36	46,1±5,6	11	33,3±8,2
<i>S. parasanguinis</i>	16	20,5±4,6	7	21,2±7,1
<i>S. oralis</i>	7	8,9±3,2	7	21,2±7,1
<i>S. vestibularis</i>	8	10,5±3,5	0	0
<i>S. salivarius</i>	5	6,4±2,8	5	15,2±6,2
<i>S. pneumoniae</i>	3	3,8±2,2	2	6,1±4,2
<i>S. infantis</i>	2	2,6±1,8	0	0
<i>S. peroris</i>	1	1,3±1,3	0	0
Всего:	78	100	33	100

По данным литературы основным бактериальным возбудителем внебольничных пневмоний является *S. pneumoniae* [15]. Результаты нашего исследования показали низкую частоту выявляемости *S. pneumoniae* в содержимом нижних дыхательных путей. Так, у ковидпозитивных пациентов штаммы *S. pneumoniae* идентифицированы в $3,8 \pm 2,0\%$ случаев, у ковиднегативных пациентов - в $6,1 \pm 4,2\%$. Поэтому, параллельно для подтверждения полученных данных, пробы биоматериала исследованы методом ПЦР (рисунок 2). Положительные результаты на наличие ДНК бактерий *S. pneumoniae* выявлены в $33 \pm 5,3\%$ случаев у ковидпозитивных пациентов и в $31,9 \pm 8,1\%$ у ковиднегативных пациентов.

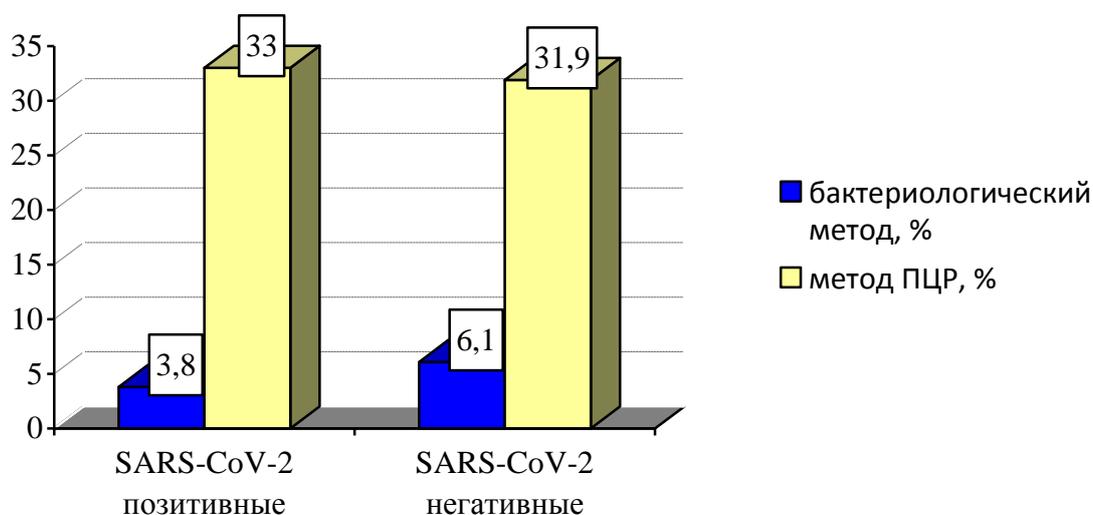


Рисунок 2. Частота обнаружения *S. pneumoniae* классическим бактериологическим методом и методом ПЦР.

Figure 2. Frequency of detection of *S. pneumoniae* by classical bacteriological method and PCR method.

Таким образом, выявленные различия в частоте обнаружения *S. pneumoniae* классическим бактериологическим и ПЦР методами могут быть объяснены несколькими причинами. Прежде всего, на исследование доставлялся биоматериал от пациентов, принимающих антимикробную терапию, что отражается на жизнеспособности бактерий. Кроме того, средний возраст пациентов, взятых нами в исследование, составлял 57 лет, в то время как, по данным литературы [8], *S. pneumoniae* выявляются преимущественно у молодых пациентов без сопутствующей патологии и при легком течении заболевания. Что касается ПЦР диагностики, аналитическая чувствительность набора составляла 1×10^3 ГЭ/мл. Поэтому пробы с положительными результатами обнаружения ДНК *S. pneumoniae* могли содержать бактерии в титре меньшем диагностического, учитываемого при классическом бактериологическом методе.

Исследование устойчивости к антимикробным препаратам штаммов *Streptococcus spp.*, изолированных из отделяемого нижних дыхательных путей, представлены в таблице 2. Показано, что более 65% штаммов проявляли резистентность к ампициллину, вне зависимости от статуса ковидпринадлежности. Штаммы бактерий, выделенные от ковиднегативных пациентов в 50±8,8% случаев были резистентны к амоксициллин/клавулановой кислоте, к цефотаксиму - 28,1±7,9%, к клиндамицину - 15,6±6,4%. У пациентов с подтвержденным SARS-CoV-2 — 40,3±5,6% штаммов *Streptococcus spp.* обладали резистентностью к амоксициллин/клавулановой кислоте, к цефотаксиму — 29,9±5,2% и 22,1±4,7% - к клиндамицину.

Таблица 2/ Table 2

Резистентность штаммов *Streptococcus spp.* к антимикробным препаратам
Resistance of *Streptococcus spp.* to antimicrobial drugs

Антибактериальный препарат Antibacterial drug	SARS-CoV-2 позитивные (n=77) positive		SARS-CoV-2 негативные (n=32) negative	
	Абс. число abs. number	% ±m	Абс. число abs. number	% ±m
Клиндамицин Clindamycin	17	22,1±4,7	5	15,6±6,4
Ампициллин Ampicillin	56	72,7±5,1	21	65,6±8,4
Амоксициллин/клавулановая кислота Amoxicillin / clavulanic acid	31	40,3±5,6	16	50,0±8,8
Цефотаксим Cefotaxime	23	29,9±5,2	9	28,1±7,9

На формировании резистентности сапрофитной микробиоты может оказывать влияние предшествующий прием антибиотиков, носительство антибиотикорезистентных штаммов, а также горизонтальный обмен генами резистентности [7].

Заключение. Таким образом, в структуре видов *Streptococcus spp.*, изолированных из нижних отделов дыхательных путей пациентов при внебольничной пневмонии, в том числе ассоциированной с SARS-CoV-2, преобладали штаммы комменсальной микробиоты *S. mitis*, *S. parasanguinis*, *S.*

oralis. Более 65% всех изученных штаммов обладали резистентностью к ампициллину.

Литература.

1. Du Toit A. Measles increases the risk of other infections. *Nat. Rev. Microbiol.* 2019. № 18 (2) DOI: 10.1038/s41579-019-0301-7.
2. Pan Y., Zhang D., Yang P. Viral load of SARS-CoV-2 in clinical samples // *Lancet Infectious Diseases*. 2020. № 4 (20). P. 411-412.
3. Reusken C. B. E. M., Broberg E. K., Haagmans B. et al. Laboratory readiness and response for novel coronavirus (2019-nCoV) in expert laboratories in 30 EU/EEA countries // *EuroSurveill*. 2020. № 25(6):pii=2000082. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.6.2000082>.
4. Zhou P., Yang X. Lou, Wang X. G. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin // *Nature*. 2020. № 7798 (579). P. 270-273.
5. Веселова Е. И., Русских А. Е., Каминский Г. Д., Ловачева О. В., Самойлова А. Г., Васильева И. А. Новая коронавирусная инфекция // *Туб. и болезни легких*. - 2020. - Т. 98, № 4. С. 6-14. <http://doi.org/10.21292/2075-1230-2020-98-4-6-14>.
6. СП 3.1.3597-20. Профилактика новой коронавирусной инфекции (COVID-19).
7. Зарипова А. З., Валиева Р. И., Баязитова Л. Т., Целищева М. В. Диагностика пневмококковых инфекций респираторного тракта. *Практическая пульмонология*. 2018. № 4. С. 74-80.
8. Захаренков И. А., Рачина С. А., Дехнич Н. Н., Козлов Р. С., Синопальников А. И., Иванчик Н. В., Яцышина С. Б., Елькина М. А., Архипенко М. В., Гордеева С. А., Лебедева М. С., Портнягина У. С. Этиология тяжелой внебольничной пневмонии у взрослых: результаты первого российского многоцентрового исследования. *Терепевтический архив* 1. 2020. С. 36-42.
9. Баязитова Л. Т., Тюпкина О. Ф., Чазова Т. А., Тюрин Ю. А., Исаева Г. Ш., Зарипова А. З., Патяшина М. А., Авдонина Л. Г., Юзлибаева Л. Р. Внебольничные пневмонии пневмококковой этиологии и микробиологические аспекты назофарингеального носительства *Streptococcus pneumoniae* в республике Татарстан. *Инфекции и иммунитет*. 2017. 7(3):271-278.
10. Голубкова А. А., Сомова А. В. Роль *Streptococcus pneumoniae* в этиологии внебольничных пневмоний в крупном промышленном регионе Российской Федерации. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2018. № 3 (73). С. 29-33.
11. Baig A. M. Neurological manifestations in COVID-19 caused by SARS-CoV-2 // *CNS Neuroscience and Therapeutics*. 2020. № 5 (26). P. 499-501.
12. Zheng Y. Y., Ma Y. T., Zhang J. Y. COVID-19 and the cardiovascular system // *Nature Reviews Cardiology*. 2020. № 5 (17). P. 259-260.

13. Бондаренко А. П., Шмыленко В. А., Троценко О. Е., Котова В.О., Бутакова Л. В., Базыкина Е. А. Характеристика бактериальной микрофлоры, выделенной из проб мокроты больных пневмонией в Хабаровске и Хабаровском крае в начальный период пандемии COVID-19 (май–июнь 2020 г.). Проблемы особо опасных инфекций. 2020; 3. 2020. № 3. С. 43-49.
14. Попова А. Ю., Ежлова Е. Б., Демина Ю. В., Носков А. К., Ковалев Е. В., Чемисова О. С., Твердохлебова Т. И., Павлович Н. В., Водопьянов С. О., Цимбалистова М. В., Гаевская Н. Е., Воловикова С. В., Стенина С. И., Гудуева Е. Н., Сагакянц М. М., Алешукина А. В., Слись С. С. 2020. Особенности этиологии внебольничных пневмоний, ассоциированных с covid-19. COVID19-PREPRINTS.MICROBE.RU. <https://doi.org/10.21055/preprints-3111913>.
15. МР 4.2.0114-16. Лабораторная диагностика внебольничной пневмонии пневмококковой этиологии.