

Г.Н. Холодок^{1,4}, А.П. Бондаренко², Н.М. Ивахнишина¹, Т.А. Зайцева³, В.К. Козлов^{1,4}

ПОСТВАКЦИНАЛЬНАЯ ДИНАМИКА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ ИЗОЛЯТОВ *S. PNEUMONIAE* У ДЕТЕЙ ПРИАМУРЬЯ В ПЕРИОД 2013–2015 ГГ.

¹Хабаровский филиал ФГБНУ ДНЦ ФПД – НИИ охраны материнства и детства, 680022, ул. Воронежская, 49, тел. 8-(422)-98-05-91, e-mail: iomid@yandex.ru;

²Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, 680610, ул. Шевченко, 2, тел. 8-(4212)-32-54-63, e-mail: adm@hniet.ru;

³Управление Роспотребнадзора по Хабаровскому краю, 680009, ул. Карла Маркса, 109б, тел. 8-(4212)-27-47-44, e-mail: root@sanepid.khv.ru;

⁴Дальневосточный государственный медицинский университет, 680000, ул. Муравьева-Амурского, 35, тел. 8-(4212)-76-13-96, e-mail: nauka@mail.fesmu.ru, г. Хабаровск

Резюме

Изучена поствакцинальная циркуляция серовариантов носоглоточных изолятов *Streptococcus pneumoniae* в 2014–2015 гг. у детей, посещающих детские дошкольные учреждения, находившиеся в зоне подтопления в период катастрофического паводка на Амуре летом 2013 года. Молекулярно-генетическими методами обследовано 60 детей до и 51 ребенок – через 14 месяцев после вакцинации. Установлен общий спектр серовариантов пневмококка (12 вариантов) и преобладающий, включающий 19F, 14, 4 и 6AB варианты. Выявлены различия частоты и спектра серовариантов циркулирующих изолятов пневмококка в поствакцинальном периоде и у не вакцинированных детей, элиминация ряда серотипов и появление циркуляции невакцинных штаммов. Основной циркулирующий спектр пневмококка через год сохраняется, но у вакцинированных детей в 2 раза снизилось носительство серотипа 19F, а в 32 % случаев установлена элиминация пневмококка из носоглотки. Для оценки эффективности вакцинации против пневмококковой инфекции требуется постоянное мониторирование этого процесса.

Ключевые слова: пневмококк, вакцинация, серотипы, дети.

G.N. Kholodok^{1,4}, A.P. Bondarenko², N.M. Ivakhnishina¹, T.A. Zaitceva³, V.K. Kozlov^{1,4}

POST-VACCINATION DYNAMICS OF MOLECULAR-GENETIC VARIANTS OF *S.PNEUMONIAE* ISOLATES IN AMUR BASIN CHILDREN THROUGHOUT 2013–2015

¹Research Institute of Mother and Child Health Care;

²Research Institute for Epidemiology and Microbiology;

³Rosпотребнадзор State of Khabarovsk Kray;

⁴Far Eastern State Medical University, Khabarovsk

Summary

Post-vaccination circulation of nasopharyngeal *Streptococcus pneumoniae* isolate serotypes in kindergarten children who had been in the area of catastrophic flood of the Amur River in summer 2013 was studied in 2014–2015. Molecular genetic methods were used to examine 60 children prior to and 51 children, 14 months after the vaccination. A general spectrum of pneumococcal serotypes (12 variants) and a predominant spectrum of 19F, 14, 4 and 6AB variants were identified. A difference in the rate and spectrum of circulating pneumococcal isolate serotypes in the post-vaccination period and in unvaccinated children, elimination of some serotypes, and circulation of non-vaccine type strains were revealed. The main spectrum of circulating pneumococcal serotypes was found out to remain a year after the vaccination; however, vaccinated children demonstrated a two-fold decrease in 19F serotype carriage, and elimination of pneumococcus from the nasopharynx in 32 % of cases. To assess pneumococcal vaccination efficiency, constant monitoring of the process is required.

Key words: pneumococcal vaccination, serotype, children.

Пневмококк относится к условно-патогенным микроорганизмам и до настоящего времени признан основным возбудителем острого среднего отита, синусита и пневмонии у детей во всем мире [4, 5]. Актуальность пневмококковой инфекции сохраняется в связи с высоким уровнем носоглоточного носительства в детской популяции до 5-летнего возраста. Вакцинация против данной инфекции с января 2014 года вошла в национальный календарь прививок Российской Федерации, но основная популяция детей в возрасте 3-5 лет оставалась незащищенной. В июле августе 2013 года на Дальнем Востоке произошло катастрофическое на-

воднение на р. Амур и в зоне подтопления оказались ряд детских дошкольных учреждений г. Хабаровска.

Характерной особенностью наводнения оказалось длительное стояние высокого уровня воды на Амуре и медленное его снижение. По данным СМИ только к 17 ноября 2013 г. В Хабаровском крае не осталось подтопленных участков [2]. Неблагополучное состояние экологии и биогеохимических показателей, характерное для Дальневосточного региона, еще более усугублялось вследствие экстремальной катастрофы и становилось дополнительным фактором риска формирования респираторной патологии.

В послепаводковом периоде в крае проведены масштабные мероприятия по профилактике заболеваний пострадавшего населения, в том числе от пневмоний. Дети и взрослые, проживающие в зоне подтопления, были вакцинированы конъюгированной противопневмококковой вакциной PCV13, предоставленной правительством РФ. Согласно утвержденной МЗ ХК и Управлением Роспотребнадзора по Хабаровскому краю программе «Оценка эффективности вакцинации против пневмококковой инфекции», разработанной в декабре 2013 года с участием Хабаровского филиала ДНЦ ФПД-НИИ охраны материнства и детства с февраля 2014 года начаты мониторинговые исследования по оценке циркуляции серологических вариантов *S. pneumoniae* в послепаводковом периоде. В рамках утвержденной программы было проведено исследование носоглоточного носительства *Streptococcus pneumoniae* у детей, ведущего возбудителя внебольничной пневмонии, острого среднего отита, синуситов.

Целью исследования являлись выявление частоты носоглоточного носительства *Streptococcus pneumoniae* у детей-носителей г. Хабаровска до и после вакцинации конъюгированной противопневмококковой вакциной PCV13 и оценка его молекулярно-генетических характеристик.

Материалы и методы

Забор биологического материала на исследование носительства пневмококка у детей проводили сотрудники НИИ охраны материнства и детства совместно с ХНИИЭМ Роспотребнадзора с 05 февраля 2014 года по разработанному протоколу. Настоящий протокол разработан в соответствии с Национальным стандартом РФ ГОСТ Р 52379-2005 «Надлежащая клиническая практика», утвержденным приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 27 сентября 2005 г. № 232-ст. и утвержден в Министерстве здравоохранения Хабаровского края в декабре 2013 г.

Обследованы здоровые дети в возрасте до 5 лет, посещающие детские дошкольные учреждения, которые находились в зоне подтопления. Все исследования одобрены Этическим комитетом НИИ охраны материнства и детства и проводились после получения информированного согласия родителей.

Материал из носоглотки на бактериологические и ПЦР исследования забирали стерильными тампонами одновременно у каждого ребенка. Начало обследования – февраль 2014 г. до вакцинации. Повторные заборы биоматериала после вакцинации проводили через 14 месяцев. Бактериологические исследования (64 пробы) и идентификацию выделенных микроорганизмов выполняли в ХНИИЭМ стандартными методами согласно Приказу МЗ СССР №535 от 22.04.1985. Использовали сертифицированные питательные среды (Основа питательного агара, агар Мюллера Хинтона, «БиоМерье») и реактивы («БиоМерье», «БиоРад», «Ляхема»).

Молекулярно-генетические исследования *Streptococcus pneumoniae* (94 пробы) осуществляли методом ПЦР-РВ. Тампон инокулировали в 0,5 мл «Транспортной среды для хранения и транспортировки респираторных мазков» (ООО «ИнтерЛабСервис») ФБУН ЦНИ-

ИЭ Роспотребнадзора) в пробирке эппендорф и затем тестировали методом ПЦР-РВ с генами *lytA* и *psaA* в качестве мишеней. Для экстракции ДНК *S. pneumoniae* из носоглоточного смыва использовали «ДНК-сорб-АМ» («ИнтерЛабСервис»). ПЦР-РВ проводили на термоциклере CFX 96 в формате «мультипрайм» в объеме 25 мкл. Для серотипирования применяли праймеры фирмы «Синтол», рекомендованные Центром по контролю и профилактике заболеваний (CDC, США). Праймеры подобраны в соответствии с вакцинными и выявляемыми ранее серотипами пневмококка. Статистическая оценка проводилась с использованием критерия достоверности Стьюдента (t-критерий).

Результаты и обсуждение

Ранее (2012–2013 гг.) нами были проведены исследования циркуляции серологических вариантов пневмококка у больных пневмонией, синуситом и у носителей [1]. Было выявлено 8 серовариантов/групп, 87,5 % из которых принадлежит вакцинным штаммам и 73,7 % основным вариантам, имеющим клиническое значение в России – 19F, 6AB и 3. Один штамм сероварианта 11 AD, выделенный от носителя не принадлежал к вакцинным.

Выявленные сероварианты присутствовали во всех изученных группах: и у носителей и при респираторной патологии (рис. 1). Клинически значимый вакцинный серовариант 19F встречался в 2 раза чаще при респираторной патологии: в 53 % случаев при внебольничной пневмонии, в 50 % – при синуситах и в 22,7 % у носителей. Достоверного различия частоты его выявления при патологии и у носителей не установлено ($p=0,0606$), что обусловлено вероятно малой выборкой. В то же время штамм 19A, характеризующийся повышенной устойчивостью к пенициллину обнаруживали только у носителей в 9 % случаев. Серогруппу 6AB выявляли у носителей и при неинвазивной пневмококковой инфекции в 22,7 % случаев, в 1,9 раз чаще, чем при пневмонии. Напротив, серотип 3, вызывающий тяжелые, в том числе некротические пневмонии, с достаточно высокой частотой выявляли при пневмониях – в 20 % случаев и достаточно часто – в 13 % случаев у носителей. Таким образом, установленный спектр серологических вариантов *S. pneumoniae* у носителей и больных респираторной патологией в г. Хабаровске в 2013 году, характеризовался преобладанием 3 вариантов – 19F, 6AB и 3, в целом составляющих 73,7 % всех полученных штаммов. Принадлежность большинства выявленных изолятов *S. pneumoniae* к штаммам 19F серотипа, ассоциированного с устойчивостью к пенициллину, объясняла повышенный уровень резистентности пневмококка в г. Хабаровске, превышающий аналогичный показатель в западных регионах России [3].

Все изоляты принадлежали к вакцинным штаммам, входящим в состав пневмококковой конъюгированной вакцины Превенар 13, включенной с 2014 года в национальный календарь прививок России. Совпадение установленного спектра пневмококка с вакцинными штаммами позволяло предполагать эффективность плановой вакцинации, снижение носоглоточного носительства *S. pneumoniae* и, как следствие, заболеваемости детей пневмококковыми инфекциями.

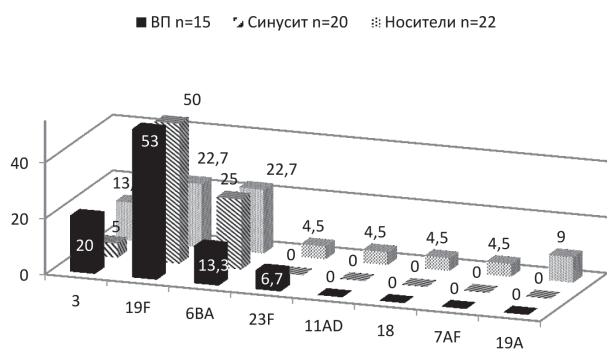


Рис. 1. Сероварианты *S. pneumoniae* циркулирующие у носителей и при респираторных заболеваниях у детей в г. Хабаровске (%)

В настоящем исследовании (2014–2015 гг.) из 60 обследованных детей из детского сада носоглоточное носительство пневмококка до проведения вакцинации PCV13 методом бактериологического исследования выявлено в 48,4 % случаев и методом ПЦР в 91,4 % случаев ($p < 0,01$) (рис. 2).

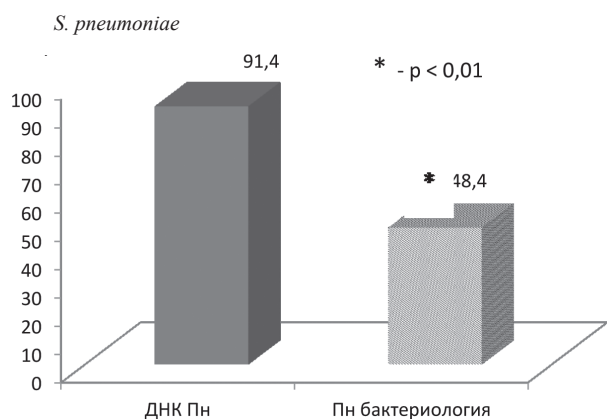


Рис. 2. Частота выявления ДНК *S. pneumoniae* методом ПЦР и изолятов при бактериологическом исследовании носоглоточного смыва (%)

Установлено, что у детей до вакцинации спектр серовариантов пневмококка включал все вакцинные штаммы, кроме 7F и 19A (рис. 3). Показано увеличение носоглоточного носительства *S. pneumoniae* серотипа 19F до 35 % случаев (22,7 % в 2013 году). При этом 64 % штаммов этого серотипа оказались устойчивы к β -лактамам антибиотикам. То есть, как и в прошлые годы, преобладает циркуляция серотипа 19F с тенденцией к росту. Далее по убыванию выявлены 14 серотип (18,3 %), 4 серотип (15,0 %) и 6A/B/C/D группа (11,7 %). Другие сероварианты установлены реже с частотой от 8,3 до 1,7 % (таблица).

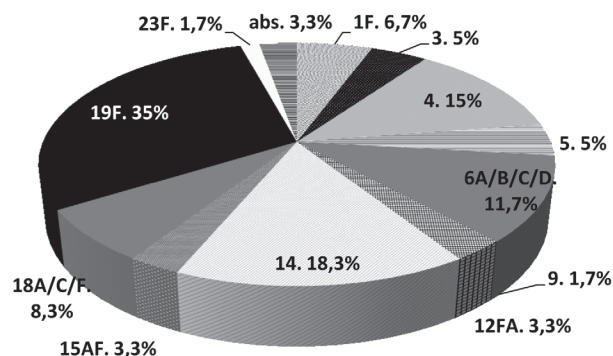


Рис. 3. Спектр серовариантов *S. pneumoniae* у носителей до вакцинации PCV 13 (февраль 2014 г.)

На индивидуальном уровне у части детей было выявлено носительство 2 или 3 серовариантов как до, так и после вакцинации. До вакцинации ассоциации серовариантов установлены в 15,1 %, после вакцинации в 22,2 % случаев (различие не достоверно). Наиболее часто выявляли ассоциации 19F, 6A/B/C/D, 4 и 5 серовариантов.

Через год и 2 месяца после вакцинации обследовано 28 детей из этой группы. Основной спектр серотипов остался прежним. Однако установлено снижение циркуляции 19F серотипа до 17,9 %. Элиминированы были 23 и 9V серотипы и невакцинные серотипы 11A/D, 12F/A и 15A/F (таблица).

Таблица

Спектр серовариантов *S. pneumoniae* установленный у детей-носителей из детского сада до- и после вакцинации PCV13 (февраль 2014 – апрель 2015 гг.) (%)

Сероварианты <i>S. pneumoniae</i>	Частота выявления (%)		Примечания
	до вакцинации (n=60)	после вакцинации через 1 год 2 месяца (n=28)	
1F	6,7	10,7	
3	5,0	7,1	
4	15,0	7,1	
5	5,0	3,6	
6A/B/C/D	11,7	3,6	
7F	0	3,6	
9	1,7	0	
11A/D	0	0	не вакцинный
12F/A	3,3	0	не вакцинный
14	18,3	3,6	
15A/F	3,3	0	не вакцинный
18A/C/F	8,3	7,1	
19A	0	0	
19F	35,0	17,9	
23F	1,7	0	
Abs.	3,3	32,1*	

Примечание. * – различие достоверно, $p < 0,05$.

Выявлено снижение носительства серогрупп 14 с 18,3 % до 3,6 % и 4-й группы с 15,0 % до 7,0 % ($p > 0,05$, различие не достоверно). Всего сохранилось носительство прежнего (до вакцинального) сероварианта в 64,2 % случаев (у 18 из 28 детей). Полная замена одного вакцинного серотипа на другой установлена в 16,7 % случаев. Среди серовариантов, элиминированных после вакцинации на индивидуальном уровне, выявляли практически все циркулирующие в исследуемой популяции варианты. Достоверно определено, что только у вакцинированных детей через год в 32,1 % случаев отсутствовало носоглоточное носительство пневмококка ($p < 0,05$), что доказывает эффективность проведенной вакцинации.

Часть детей, обследованных в общей группе до вакцинации, не вакцинировалась по разным причинам, не связанным с заболеваниями. Они определены как группа сравнения ($n=23$). По результатам одномоментного обследования с вакцинированными детьми было установлено, что через год у не вакцинированных детей частота носительства сероварианта 19F выросла почти в 2 раза и составила 62,2 % ($p < 0,05$), вытеснив из популяции другие сероварианты (рис. 4). Таким образом, в отсутствие вакцинации рост популяции 19F серотипа пневмококка опасен с позиций распространения и увеличения резистентности пневмококка к антимикробным препаратам.

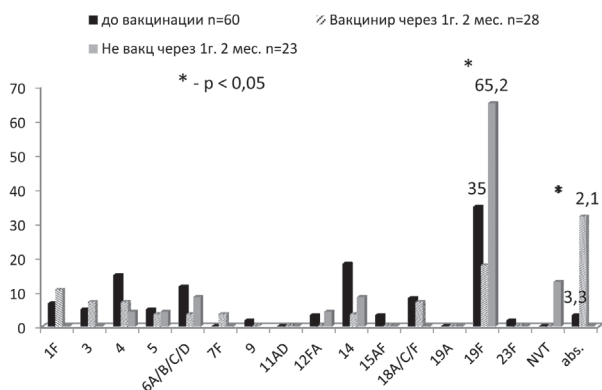


Рис. 4. Сравнительная динамика частоты носоглоточного носительства серовариантов *S. pneumoniae* у вакцинированных PCV13 и не вакцинированных детей детского сада (%)

Выводы

1. Штаммы *S. pneumoniae*, циркулирующие в исследованной детской популяции, в 93 % случаев принадлежат вакцинным серовариантам, с преобладанием 19

F серотипа (35 %), 14, 6 A/B/C/D, 4, 23F и 3 серотипов/групп, которые ассоциируют с резистентностью к АМП.

2. По результатам скрининга резистентности пневмококков, изолированных от детей из детского сада, с использованием диска с оксациллином 1 мкг/диск (с учетом стандартов EUCAST) установлено, что 64 % штаммов серотипа 19F оказались устойчивы к β-лактамам антибиотикам.

3. Проведение в г. Хабаровске в 2014 году экстренной вакцинации против пневмококковой инфекции привело к снижению частоты носоглоточного носительства у вакцинированных детей пневмококка 19F, 4, 6A/BC/D и 14-го серовариантов в 1,5-2 раза и полной элиминации пневмококка из носоглотки в 32,1 % случаев ($p < 0,05$).

4. У детей, не получивших вакцинацию PCV13, выявлено увеличение частоты носительства пневмококка серотипа 19F до 65,2 %, за счет элиминации других серовариантов, появление невакцинных штаммов и отсутствие полной элиминации пневмококка из носоглотки.

Литература

1. Актуальность вакцинопрофилактики пневмококковой инфекции в г. Хабаровске / Г.Н. Холодок, Г.П. Евсеева, Н.М. Ивахнишина и соавт. // Дальневосточный медицинский журнал. – 2014. – № 3. – С. 29-33.

2. Махинов А.М. Историческое наводнение в бассейне Амура в 2013 году: причины и последствия // Рыбак Хабаровского края. – № 475, 30.12.2013 г. – Режим доступа: <http://amureco.ru/ekoknigi/nauchnye-raboty/istoricheskoe-navodnenie-v-basseine-amura-v-2013-godu-prichiny-i-posledstvi> (дата обращения 18.03.2016).

3. Молекулярно-генетическая характеристика и резистентность к антимикробным препаратам *Streptococcus pneumoniae* в Хабаровском крае / Г.Н. Холодок, Н.В. Морозова, Л.А. Балабанова и соавт. // КМАХ. – 2015. – Т. 17, № 2. – Прил. 1. – С. 48.

4. Федосеев М.В. Перспектива вакцинопрофилактики пневмококковой инфекции: современный взгляд на проблему // Росс. мед. журнал. – 2009. – Т. 1. – С. 36-41.

5. European enhanced surveillance of invasive pneumococcal disease in 2010: data from 26 European countries in the post-heptavalent conjugate vaccine era / Torné A. Navarro, J.G. Dias, C. Quinten, et al. // Vaccine. – 2014. – Vol. 32, № 29. – P. 3644-3650.

Literature

1. Relevance of pneumococcal vaccination in Khabarovsk // Far Eastern medical Journal. – 2014. – № 3. – P. 29-33.

2. Makhinov A.M. Historic flooding in the Amur River basin in 2013: causes and consequences // Newspaper «Rybak of Khabarovsk region» № 475, 30.12.2013. – Access: <http://amureco.ru/ekoknigi/nauchnye-raboty/istoricheskoe-navodnenie-v-basseine-amura-v-2013-godu-prichiny-i-posledstvi> (reference date 18/03/2016).

3. Molecular-genetic characteristics and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* in the Khabarovsk Territory // Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy. – 2015. – Vol. 17, № 2. – P. 48.

4. Fedosenko M.V. Perspectives of vaccine prevention of pneumococcal disease: modern view on the problem // Russ. med. jor. – 2009. – Vol. 1. – P. 36-41.

5. European enhanced surveillance of invasive pneumococcal disease in 2010: data from 26 European countries in the post-heptavalent conjugate vaccine era // Vaccine. – 2014. – Vol. 32 (29). – P. 3644-3650.

Координаты для связи с авторами: Холодок Галина Николаевна – д-р мед., наук, ведущий научный сотрудник ХФ ДНЦ ФПД-НИИОМид, тел. +7-914-548-78-55, e-mail: hgn49@mail.ru; Бондаренко Алла Павловна – канд. мед. наук, зав. лабораторией бактериальных инфекций ХНИИЭМ Роспотребнадзора, тел. +7-909-804-33-08, e-mail: adm@hniiem.ru; Ивахнишина Наталья Михайловна – канд. биол. наук, старший научный сотрудник ХФ ДНЦ ФПД-НИИОМид, тел. 8-(4212)-98-05-91, e-mail: iomid@yandex.ru; Зайцева Татьяна Анатольевна – руководитель Управления Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Хабаровскому краю, тел. 8-(4212)-27-47-44, e-mail: root@sanepid.khv.ru; Козлов Владимир Кириллович – д-р мед. наук, член корр. РАН, проф., научный руководитель лаборатории КМИ бронхолегочной и перинатальной патологии ХФ ДНЦ ФПД-НИИ ОМид, тел. 8-(4212)-98-05-91, e-mail: iomid@yandex.ru.

