

IgA-ПРОТЕАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОЧНЫХ ФЕРМЕНТОВ РАЗЛИЧНЫХ СЕРОТИПОВ *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*, ВЫДЕЛЕННЫХ У ДЕТЕЙ-БАКТЕРИОНОСИТЕЛЕЙ

А.З. Зарипова¹, Ю.А. Тюрин^{1,2}, Л.Т. Баязитова^{1,2}, О.Ф. Тюпкина², Г.Ш. Исаева^{1,2}

¹ ФГБОУ ВО Казанский государственный медицинский университет, г. Казань, Россия

² ФБУН Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Казань, Россия

Резюме. Пневмококки (*Streptococcus pneumoniae*) — значимые возбудители тяжелых и опасных для жизни острых пневмоний, менингитов, а также отитов и синуситов у детей и лиц пожилого возраста. Ежегодно в мире регистрируется до 1,2 млн летальных исходов у детей из-за пневмонии и инфекции центральной нервной системы (менингита), этиологическим агентом которых является *S. pneumoniae*, большая доля летальных исходов от пневмококковой инфекции приходится на развивающиеся страны. Металлозависимые IgA1-протеазы патогенных бактерий относятся к важной группе бактериальных ферментов, расщепляющих человеческий иммуноглобулин A1 (IgA1) в области шарнира, тем самым препятствуя полноценной реализации антибактериального иммунитета организма хозяина. Цель исследования — изучение активности IgA1-протеиназ и их классового профиля (Na₂-ЭДТА и PMSF-ингибируемых) у различных серотипов пневмококков, выделенных от детей, являющихся носоглоточными носителями этих штаммов. **Материалы и методы.** Обследовано 585 детей, посещающих детские дошкольные учреждения, и проживающих г. Казани (n = 331) и в сельской местности (n = 254). Применены микробиологические, молекулярно-генетические, иммунохимические и биохимические методы для идентификации, определения серотипового состава и активности протеаз изолятов *Streptococcus pneumoniae*. Статистическая обработка результатов осуществлена с помощью программного пакета Graph Pad Prism, версия 5.0. **Результаты.** Частота распространенности *S. pneumoniae* среди детей-носителей в возрастной категории от 1,5 до 3 лет составила 35,1%; в возрасте 3–5 лет — 23,4%; среди детей 5–7 лет — 19,6% и среди детей старше 7 лет — 21,9%. Выявлено доминирование вакцинных серотипов 14, 19F, 23F, входящих в состав современных пневмококковых вакцин («Превенар», «Пневмовакс-23»), — 55,8%. В 19% случаев выявлена циркуляция среди детской популяции носительства невакцинных штаммов, не входящих в состав вышеуказанных вакцин. Среди выделенных изолятов выявлено 5,8% нетипируемых штаммов. IgA-протеиназная активность была выявлена в клеточных лизатах 45 (86,5%) штаммов *S. pneumoniae*, выделенных у бактерионосителей. Клеточные лизаты штаммов *S. pneumoniae*, которые не показали протеолитических свойств, были отнесены к серотипам 12F, Sg18. Таким образом, перспективны исследования по разработке альтернативных вакцин, содержащих иммуногенные протеины, адгезины или другие факторы вирулентности, общие для капсулированных и нетипируемых (инкапсулированных) штаммов пневмококков. Все вышеизложенное диктует необходимость микробиологического мониторинга бактерионосительства *S. pneumoniae* и поиска новых диагностических подходов для этиологической расшифровки *S. pneumoniae*-ассоциированных заболеваний.

Ключевые слова: *Streptococcus pneumoniae*, серотипы, IgA-протеазная активность, носительство, дети.

Адрес для переписки:

Тюрин Юрий Александрович
420015, Россия, г. Казань, ул. Большая Красная, 67,
Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии.
Тел.: 8 (843) 238-89-79 (служебн.).
E-mail: tyurin.yurii@yandex.ru

Contacts:

Yury A. Tyurin
420015, Russian Federation, Kazan, Bol'shaya Krasnaya str., 67,
Kazan Research Institute of Epidemiology and Microbiology.
Phone: +7 (843) 238-89-79 (office).
E-mail: tyurin.yurii@yandex.ru

Библиографическое описание:

Зарипова А.З., Тюрин Ю.А., Баязитова Л.Т., Тюпкина О.Ф., Исаева Г.Ш.
IgA-протеазная активность клеточных ферментов различных серотипов
Streptococcus pneumoniae, выделенных у детей-бактерионосителей //
Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 5–6. С. 680–686.
doi: 10.15789/2220-7619-2019-5-6-680-686

Citation:

Zaripova A.Z., Tyurin Yu.A., Bayazitova L.T., Tyupkina O.F., Isaeva G.Sh.
IgA-protease activity coupled to cellular enzymes of different *Streptococcus pneumoniae* serotypes isolated in pediatric bacteria carriers // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 5–6, pp. 680–686. doi: 10.15789/2220-7619-2019-5-6-680-686

IgA-PROTEASE ACTIVITY COUPLED TO CELLULAR ENZYMES OF DIFFERENT *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* SEROTYPES ISOLATED IN PEDIATRIC BACTERIA CARRIERS

Zaripova A.Z.^a, Tyurin Yu.A.^{a,b}, Bayazitova L.T.^{a,b}, Tyupkina O.F.^b, Isaeva G.Sh.^{a,b}

^a Kazan State Medical University, Kazan, Russian Federation

^b Kazan Scientific-Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Kazan, Russian Federation

Abstract. *Streptococcus pneumoniae* are significant causative agents of severe and life-threatening acute pneumonia, meningitis, as well as otitis and sinusitis both in children and elderly. As many as 1.2 million pediatric lethal outcomes due to pneumonia and infections of the central nervous system (meningitis) caused by *S. pneumoniae*, are recorded worldwide annually, a large proportion of which occur in developing countries. Metal-dependent IgA1 proteases derived from pathogenic bacteria comprise an important group of bacterial enzymes cleaving human immunoglobulin A1 (IgA1) at the hinge region, thereby interfering with fully-executed host antibacterial immunity. **Objective.** To study activity of IgA1-proteinases and their class profile (Na₂-EDTA and PMSF-inhibited) in various pneumococcal serotypes isolated from nasopharyngeal carrier children. **Materials and methods.** There were examined 585 children attending preschool facilities residing in Kazan (n = 331) and rural areas (n = 254). Microbiological, molecular genetics and immunochemical methods were used to identify, serotyping composition and protease activity of *Streptococcus pneumoniae* isolates. Data statistical processing was carried out by using software Graph Pad Prism version 5.0. **Results.** Prevalence of *S. pneumoniae* in pediatric carriers aged 1.5–3 years was 35.1%, 3–5 years — 23.4%, 5–7 years — 19.6%, and over 7 years — 21.9%. Vaccine serotypes 14, 19F, 23F as a part of current pneumococcal vaccines (Prevenar, Pneumavax-23) comprised as high as 55.8%. However, in 19% of cases were positive for non-vaccine *S. pneumoniae* strains. Non-typeable strains were detected in 5.8% isolates. IgA-proteinase activity was detected in cell lysates of 45 (86.5%) *S. pneumoniae* strains isolated from pediatric carriers. Cell lysates of *S. pneumoniae* strains showing no proteolytic properties, were assigned to serotypes 12F, Sg18. Thus, studies on development of alternative vaccines containing immunogenic proteins, adhesins or other virulence factors common to capsulated and non-typeable (encapsulated) pneumococcal strains hold promise. All the aforementioned accounts for a need for microbiological monitoring of *S. pneumoniae* carriage and search for new diagnostic approaches for etiological interpretation of *S. pneumoniae*-associated diseases.

Key words: *Streptococcus pneumoniae*, serotypes, IgA protease activity, carrier, children.

Введение

Пневмококки (*Streptococcus pneumoniae* или *S. pneumoniae*) значимые возбудители тяжелых и опасных для жизни острых пневмоний, менингитов, а также отитов и синуситов у детей и лиц пожилого возраста [3]. Ежегодно в мире регистрируется до 1,2 млн летальных исходов у детей из-за пневмонии и инфекции центральной нервной системы (менингита), этиологическим агентом которых является *S. pneumoniae*, большая доля летальных исходов от пневмококковой инфекции приходится на развивающиеся страны [1, 15]. По данным центра по контролю за заболеваемостью, только в США в 2000 г. *S. pneumoniae* вызвал около 17 тыс. случаев инвазивных инфекций у детей младшего возраста (до 5 лет), в том числе 700 случаев менингита [20].

Применение антибиотиков и вакцин привело к снижению бремени заболеваний, связанных с пневмококковыми инфекциями, но, несмотря на достигнутые успехи, в мировой медицинской практике по-прежнему ежегодно регистрируется более 2 млн летальных исходов, а повышенная устойчивость пневмококков к антибиотикам, а также смена вакцинных серотипов пневмококков, может привести в будущем к еще более серьезной угрозе здоровью детского населения и лиц пожилого возраста [21, 23]. В настоящее время идентифицировано 97 различных серотипов пневмококков, при

этом состав современных вакцин ограничивается теми серотипами, которые наиболее часто ассоциируются с инвазивными формами пневмококковой инфекции [12, 13]. Согласно последним данным эпидемиологических исследований, после включения пневмококковых вакцин в национальные программы иммунизации детей развитых и развивающихся стран отмечается увеличение иммунной прослойки и формирования коллективного иммунитета среди детского населения, а также дополнительной защиты от пневмококковой инфекции среди взрослых [2, 6, 12, 18]. Но, несмотря на несомненное влияние вакцинации на снижение инвазивных форм пневмококковой инфекции во всех возрастных группах вакцинированных и невакцинированных, имеются данные об увеличении частоты колонизации носоглотки невакцинированными и нетипируемыми, в том числе и инкапсулированными, штаммами пневмококков приблизительно до 3–19% случаев бессимптомного носительства [17].

Следовательно, существенное значение приобретают дополнительные знания об биологических свойствах пневмококков и факторах их вирулентности.

В 90-х гг. прошлого столетия Courtney H.S. описал роль сериновых протеаз как факторов вирулентности для *S. pneumoniae* [10]. Ортологи сериновых протеаз как значимые факторы вирулентности были обнаружены у большин-

ства грамположительных бактерий [8]. Так, у *S. pneumoniae* идентифицирована термостабильная сериновая протеаза HtrA, связанная с мембраной клетки. Протеазы HtrA (High temperature requirement A) — индуцируемые тепловым шоком сериновые протеиназы, осуществляющие качественный белковый контроль путем гидролиза денатурированных белков, тем самым предохраняющие клетки от последствий стрессовых факторов. У многих микроорганизмов они являются фактором патогенности. Для стрептококков показано участие фермента в кворум-зависимых процессах и образовании биопленки. HtrA у пневмококков участвует во многих клеточных процессах в микробной клетке (деление клетки, активность бактериоцинов, и т.д.) [9, 11, 16]. Штаммы *S. pneumoniae*, дефицитные по HtrA, характеризуются меньшей вирулентностью (способность вызывать пневмонию и бактериемию) в эксперименте на животных моделях [18].

Металлзависимые IgA1-протеазы патогенных бактерий относятся к важной группе бактериальных ферментов, расщепляющих человеческий иммуноглобулин A1 (IgA1) в области шарнира, тем самым препятствуя полноценной реализации антибактериального иммунитета организма хозяина [24]. У *S. pneumoniae* металлзависимые IgA1-протеазы содержат консервативный Zn-связывающий HEXXH мотив, выявленный только в металлопротеазах. Особенностью этих ферментов является, то что их активность ингибируется за счет конкурентного связывания катионов с комплексом III (Na₂-ЭДТА).

Цель исследования — изучение активности IgA1-протеиназ и их классового профиля (Na₂-ЭДТА и PMSF-ингибируемых) у различных серотипов пневмококков, выделенных от детей, являющихся носоглоточными носителями этих штаммов.

Материалы и методы

Всего обследовано 585 детей, посещающих детские дошкольные учреждения, и проживающих в г. Казани (n = 331) и в сельской местности (n = 254).

Микробиологическое обследование. Биоматериал из носовых ходов, задней стенки глотки забирали тампон-зондами с транспортной средой Амиеса. С целью повышения результативности бактериологического исследования строго соблюдались следующие принципы: дети не получали антимикробные препараты 14 дней до момента обследования; с момента забора биоматериала до посева на питательные среды прошло не более 3 ч. Материал высевали на плотные питательные среды «Columbia agar Base» (Conda, Испания) с добавлением 5% бараньей крови.

Посевы инкубировали в CO₂-инкубаторе 24 ч. Фенотипическую идентификацию *S. pneumoniae* проводили на основании морфологических, культуральных данных. Для дифференциальной диагностики использовали оптохиновый тест, лизис в присутствии солей желчи.

Определение серотиповой принадлежности методом М-ПЦР. ПЦР реакцию проводили по схеме, представленной в работе Pai R. (2006) [20]. ПЦР проводили в объеме реакционной смеси 25 мкл, причем каждая реакционная смесь содержала: 1 × ПЦР-буфер (20 мМТрис-НСl, pH 8,0; 100 мМКCl; 0,1 мМ ЭДТА; 1 М дитиотреитол; 0,5% Твин 20), 200 мкМ каждого дезоксирибонуклеозидтрифосфата (SibEnzyme); 2,5 мМ MgCl₂; 2,0 ед. TaqF ДНК-полимеразы (Promega) и праймеров с концентрациями, как указано в таблице работы [19]. В качестве матрицы использовали образцы выделенной ДНК штаммов (2,5 мкл) протокол амплификацию проводили при условиях: начальный этап — 94°C в течение 4 мин с последующим 30 циклами амплификации 94°C в течение 45 с, 54°C в течение 45 с и 65°C в течение 2 мин 30 с. Продукты амплификации определяли методом электрофореза в 2% агарозных гелях в 1 × ТАЕ-буфере (40 мМТрис, 20 мМ ледяной уксусной кислоты, 1 мМ EDTA, pH 8,0) при 120 В при 45 мин. Гели окрашивали бромидом этидия (0,5 мкг/мл) и регистрировали изображения. Размеры ампликонов определяли по сравнению с молекулярным стандартом ДНК маркеров (SibEnzyme).

Выделение бактериальной ДНК. ДНК выделяли из бактериальной массы чистой культуры с использованием набора «GeneFlute™ Bacterial Genomic DNA kits» (Sigma, США). Средняя концентрация геномной ДНК составила ~10 нг/мкл. Концентрацию выделенной геномной ДНК определяли на спектрофотометре «NanoDrop 2000» (Thermo Scientific).

Получение бактериальных лизатов. Пневмококковые изоляты культивировали на 5% кровяном агаре в течение 12 ч при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Бактериальные клетки суспендировали в 250 мкл ТЕ-буфера (10 мМ Трис-НСl, pH 8,0) и доводили мутность до 1,0 по стандарту Макфарланда. Полученную суспензию немедленно замораживали при –20°C в течение 5 мин. Полученные лизаты сохраняли при –20°C до дальнейшего использования.

Определение протеолитической активности пневмококковых лизатов в отношении IgA человека [7]. Определение IgA-протеиназной активности лизатов *S. pneumoniae* проводили иммуноферментным методом. В реакции определяли способность лизатов расщеплять субстрат (Human IgA, Sigma) на фрагменты при pH 7,4 и 25°C. IgA-протеиназную активность рассчитывали на количество белка в лизате. Для ин-

гибирования металлзависимых протеиназ применяли 0,5 мМ раствор Na_2 -ЭДТА натрия, а для ингибирования сериновых протеиназ 0,5 мМ фенилметилсульфонил фторид (PMSF). Активность выражали в условных единицах (усл. ед.), где 1 усл. ед. соответствовала расщеплению 1 мкмоль субстрата за 1 мин при 25°C на 1 мг белка лизата.

Статистическая обработка результатов осуществлена с помощью программного пакета Graph Pad Prism, версия 5.0.

Результаты

Частота распространенности *S. pneumoniae* среди детей-носителей в возрастной категории от 1,5 до 3 лет составила 35,1%; в возрасте 3–5 лет — 23,4%; среди детей 5–7 лет — 19,6% и среди детей старше 7 лет — 21,9%. Анализ медицинских карт обследованных детей показал, что вакцинированы от пневмококковой инфекции были 144 (24,6 %) ребенка из всех обследованных. Для вакцинации были использованы различные типы вакцин: у 123 (85,7%) детей применялась конъюгированная вакцина «Превенар», остальные дети привиты полисахаридной вакциной «Пневмо-23». Возрастная категория привитых от пневмококковой инфекции составила: дети в возрасте от 1 года до 3 лет — 44 (7,5%) ребенка; дети от 3–5 лет — 70 (11,9%) детей; дети 5–7 лет — 29 (4,95%), дети в возрастной группе 7 лет и старше — 7 детей (1,2%).

Проведение микробиологического обследования детей сопровождалось анкетированием родителей. По данным анкет и медицинских карт 156 (26,7%) детей отнесены к категории часто и длительно болеющих (ЧДБ), из них от пневмококковой инфекции было вакцинировано 29 детей. При формировании группы ЧДБ использовали критерии, предложенные А.А. Барановым и В.Ю. Альбицким, включающие число заболеваний острыми респираторными инфекциями вирусного и/или бактериального происхождения в течение года и возраст ребенка [4]: на 1 году жизни это 4 и более ОРЗ в год, на 2–3 годах жизни — 6 и более, на 4 году — 5 и более, на 5–6 годах — 4 и более, на 7 году жизни и старше — 3 и более ОРЗ в течение года. Распределение по возрастам среди ЧДБ детей было следующим:

- 1–3 года — 11 детей (14,9%), в том числе 6 вакцинированных детей;
- 3–5 лет — 64 ребенка (27,4%), в том числе 14 вакцинированных детей;
- 5–7 лет — 73 ребенка (29,8%), в том числе 9 вакцинированных детей;
- 7 лет и старше — 8 детей (25%), все не вакцинированы.

В 143 (24,4%) случаях были диагностированы бронхиты, бронхопневмонии, пневмонии, а в 122 (20,8%) случаях отмечены эпизоды острого среднего отита (один и более) и у 25 (4,3%) детей были выявлены тонзиллофарингиты и риносинуситы.

При изучении вирулентных свойств штаммов *S. pneumoniae* были отобраны методом случайной выборки 52 штамма от детей в возрасте от 1–3 лет (12 изолятов), от 5 до 7 лет (30 изолятов) и от 7 лет и старше (10 изолятов). Распределение выбранных штаммов по серотипам/серогруппам по данным молекулярно-генетического типирования представлено в таблице 1.

Выявлено доминирование вакцинных серотипов 14, 19F, 23F, входящих в состав современных пневмококковых вакцин («Превенар», «Пневмовакс-23») — 55,8%. В 19% случаев выявлена циркуляция среди детской популяции носительства невакцинных штаммов, не входящих в состав вышеуказанных вакцин. Среди выделенных изолятов выявлено 5,8% нетипируемых штаммов.

IgA-протеиназная активность была выявлена в клеточных лизатах 45 (86,5%) штаммов *S. pneumoniae*, выделенных у бактерионосителей. Клеточные лизаты штаммов *S. pneumoniae*, которые не показали протеолитических свойств, были отнесены к серотипам 12F, Sg18. По величине протеолитической активности изолированные штаммы *S. pneumoniae* были подразделены на группы (табл. 2).

Доминирование штамма с серотипом 16F (11,5% DI 4,9–24,6) среди циркулирующих невакцинных штаммов коррелировало с его высокой способностью расщеплять иммуноглобулины А (высокая протеазная активность), сопоставимой с инвазивными серотипами 14, 19F, 23F, что указывает на возможное участие этого серотипа в развитии инвазивных форм пневмококковой инфекции и поддержании эпидемиологического процесса.

Выявление протеазной активности у нетипируемых штаммов (табл. 2), ранее считавшихся невирулентными, также может свидетельствовать о возможном участии нетипируемых штаммов в развитии инфекционного процесса.

Установлено, что протеолитическая активность лизатов штаммов серотипов 14, 19F, 7F, 23F, 16F при введении в реакционную среду PMSF была ингибирована на $66,5 \pm 2,3\%$, а при введении ЭДТА-Na — на $33,5 \pm 2,3\%$. Протеолитическая активность лизатов штаммов серотипов 22F, 33F, 35B при введении в реакционную среду PMSF была ингибирована на $11,1 \pm 1,23\%$, а при введении Na_2 -ЭДТА — на $88,9 \pm 1,23\%$. Таким образом, установлено, что штаммы *S. pneumoniae* различных серотипов/серогрупп характеризуются разным

Таблица 1. Распределение штаммов пневмококков по серотипам и связь с применяемыми вакцинами

Table 1. Distribution of strains of pneumococci by serotypes and association with vaccines used

Серотип/ серогруппа Serotype/ serogroup	абс.; % (95% ДИ) abs.; % (95% DI)	Входит в состав вакцин Included in vaccines
14	12; 23,07% (13,2–37,8)	ПКВ-7, ПКВ-10, ПКВ-13, Пневмо-23/PCV-7, PCV-10, PCV-13, PPV-23 (Pneumovax)
19F	12; 23,07% (13,2–37,8)	ПКВ-7, ПКВ-10, ПКВ-13, Пневмо-23/PCV-7, PCV-10, PCV-13, PPV-23 (Pneumovax)
23F	5; 9,6% (3,6–22,2)	ПКВ-7, ПКВ-10, ПКВ-13, Пневмо-23/PCV-7, PCV-10, PCV-13, PPV-23 (Pneumovax)
7F	2; 3,8% (0,7–14,6)	ПКВ-10, ПКВ-13, Пневмо-23/PCV-10, PCV-13, PPV-23 (Pneumovax)
33F	3; 5,8% (1,5–17,2)	Пневмо-23/PPV-23 (Pneumovax)
35B	3; 5,8% (1,5–17,2)	Не входит в состав вакцин/Not included in vaccines
12F	3; 5,8% (1,5–17,2)	Пневмо-23/PPV-23 (Pneumovax)
16F	6; 11,5% (4,9–24,6)	Не входит в состав вакцин/Not included in vaccines
22F	2; 3,8% (0,7–14,6)	Пневмо-23/PPV-23 (Pneumovax)
Sg 18	1; 1,9% (0,1–11,8)	ПКВ-7, ПКВ-10, ПКВ-13, Пневмо-23/PCV-7, PCV-10, PCV-13, PPV-23 (Pneumovax)
Нетипируемые Untyped	3; 5,8% (1,5–17,2)	Не входит в состав вакцин/Not included in vaccines
Всего Total	52 (100%)	

уровнем IgA-протеолитической активности. Протеолитическая способность лизатов этих штаммов обусловлена активностью сериновых и металл-зависимых ферментов, белковая природа которых может быть в последующем идентифицирована с применением энзимографических и молекулярно-генетических методов исследования.

Заключение

Пневмококки — комменсальные условно-патогенные бактерии, являющиеся компонентом микробиоценоза носоглотки. Колонизация носоглотки является начальным этапом генерализации инфекции. Исход взаимоотношений между *S. pneumoniae* и макроорганизмом зависит от реактивности иммунной системы организма [22]. При этом важная роль отводит-

ся антиинфекционной защите в месте входных ворот, поскольку пневмококковое носительство — процесс локальный. Однако современные представления о развитии, особенностях патогенетических механизмов бактерионосительства *S. pneumoniae* у детей дошкольного возраста не объясняют причины развития инвазивных форм пневмококковой инфекции, не позволяют прогнозировать исход персистенции пневмококка в организме. Полученные нами данные о том, что 86,5% клинических изолятов *S. pneumoniae*, выделенных от практически здоровых детей-носителей, обладают выраженной IgA-протеиназной активностью, свидетельствуют о характере вирулентности штаммов. Штаммы с высокой активностью протеаз были отнесены к серотипам 14, 19F, 7F, 23F, 16F. По данным исследователей из Великобритании и Японии, штаммы, принадлежащие к серотипам 14, 19A, 19F и 23F, чаще обладают устойчивостью к антимикробным препаратам [14, 25], выделяются у 10–12% больных с внебольничной пневмонией. По данным НИИ антимикробной химиотерапии [5], преобладающими серотипами, вызывающими инвазивные инфекции, были 19A (21,4%), 19F (21,4%), 23F (14,3%) и 1 (14,3%). Учитывая суммарный вирулентный потенциал и антибиотикорезистентность циркулирующих у детей-бактерионосителей штаммов пневмококков, нельзя недооценивать роль носительства *S. pneumoniae*.

Существование возможных угроз, связанных с колонизацией невакцированными и нетипируемыми (инкапсулированными) вариантами пневмококков биотопа верхних дыхательных путей, ассоциированными с развитием неинвазивных и инвазивных форм,

Таблица 2. Протеазная активность штаммов *S. pneumoniae*Table 2. Protease activity of strains of *S. pneumoniae*

Серотипы <i>S. pneumoniae</i> Serotypes <i>S. pneumoniae</i>	Активность (усл. ед.)* Activity (U)*
Серотипы 14, 19F, 7F, 23F, 16F Serotype 14, 19F, 7F, 23F, 16F	0,5±0,03
Серотипы 22F, 33F, 35B Serotype 22F, 33F, 35B	0,17±0,02
Серотипы 12F, Sg18 Serotype 12F, Sg18	0
Нетипируемые Untyped	0,1±0,01

Примечание. *1 усл. ед. активности составляет 1 мкмоль субстрата за 1 мин при T 25°C на 1 мг белка лизата.

Note. * (U) units activity is 1 μmol substrate per 1 min at T 25°C per 1 mg of the lysate protein.

хотя и на более низком уровне в сравнении с вакцинными штаммами, указывает на необходимость разработки вакцин нового поколения имеющих более широкий защитный спектр. Перспективны исследования по разработке альтернативных вакцин, содержащих иммуногенные протеины, адгезины или другие факторы вирулентности, общие для капсулированных и нетипируемых (инкапсулированных) штаммов пневмококков. Все вышеизложенное диктует необходимость микробиологического мониторинга за бактерионосительством *S. pneumoniae* и поиска новых диа-

гностических подходов для этиологической расшифровки *S. pneumoniae*-ассоциированных заболеваний.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Благодарности

Статья подготовлена при поддержке фармацевтической компании «Phizer».

Список литературы/References

1. Баязитова Л.Т., Тюпкина О.Ф., Чазова Т.А., Тюрин Ю.А., Исаева Г.Ш., Зарипова А.З., Пяташина М.А., Авдонина Л.Г., Юзлибаева Л.Р. Внебольничные пневмонии пневмококковой этиологии и микробиологические аспекты назофарингеального носительства *Streptococcus pneumoniae* у детей в Республике Татарстан // Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 3. С. 271–278. [Bayazitova L.T., Tyupkina O.F., Chazova T.A., Tyurin Yu.A., Isaeva G.Sh., Zaripova A.Z., Pityashina M.A., Avdonina L.G., Yuzlibaeva L.R. Non-hospital pneumonia of pneumococcal etiology and microbiological aspects of nasopharyngeal transport of *Streptococcus pneumoniae* in children in the Republic of Tatarstan. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2017, vol. 7, no. 3, pp. 271–278. doi: 10.15789/2220-7619-2017-3-271-278 (In Russ.)]
2. Белоцерковская Ю.Г., Романовская А.Г., Стырт Е.А. Пневмококковая вакцина у взрослых снижает риск инфекций, вызванных *Streptococcus pneumoniae* // Клиническая медицина. 2016, Т. 94, № 1. С. 61–66. [Belotserkovskaya Yu.G., Romanovskaya A.G., Styrty E.A. Pneumococcal vaccine in adults reduces the risk of infections caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Klinicheskaya meditsina = Clinical Medicine*, 2016, vol. 94, no. 1, pp. 61–66. doi: 10.18821/0023-2149-2016-94-1-61-66 (In Russ.)]
3. Боронина Л.Г., Саматова Е.В. Эпидемиологические особенности *Streptococcus pneumoniae*, выделенного у детей, при неинвазивных пневмококковых инфекциях и носоглоточном бактерионосительстве // Вопросы диагностики в педиатрии. 2013. Т. 5, № 3. С. 22–26. [Boronina L.G., Samatova E.V. Epidemiological features of *Streptococcus pneumoniae*, isolated in children, with noninvasive pneumococcal infections and nasopharyngeal bacteriocarriers. *Voprosy diagnostiki v pediatrii = The Diagnostics in Pediatrics*, 2013, vol. 5, no. 3, pp. 22–26. (In Russ.)]
4. Козлов Р.С., Кречикова О.И., Муравьев А.А., Миронов К.О., Платонов А.Е., Дунаева Е.А., Таточенко В.К., Щербаков М.Е., Родникова В.Ю., Романенко В.В., Сафьянов К.Н., группа исследователей PAPIRUS. Результаты исследования распространенности в России внебольничной пневмонии и острого среднего отита у детей в возрасте до 5 лет (PAPIRUS). Роль *S. pneumoniae* и *H. influenzae* в этиологии данных заболеваний // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2013. Т. 15, № 4. С. 246–260. [Kozlov R.S., Krechikova O.I., Murav'ev A.A., Mironov K.O., Platonov A.E., Dunaeva E.A., Tatochenko V.K., Shherbakov M.E., Rodnikova V.Ju., Romanenko V.V., Saf'janov K.N., research group PAPIRUS. Incidence of community acquired pneumonia and acute otitis media in children 0–5 years in Russia and role of *S. pneumoniae* or *H. influenzae* in the etiology of the diseases. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 2013, vol. 15, no. 4, pp. 246–260. (In Russ.)]
5. Костинов М.П. Иммунокоррекция вакцинального процесса у лиц с нарушенным состоянием здоровья. М.: Медицина для всех, 2006. 172 с. [Kostinov M.P. Immunocorrection of the vaccination process in persons with disabilities. Moscow: *Medicina dlya vseh*, 2006. 172 p. (In Russ.)]
6. Муравьев А.А., Козлов Р.С., Лебедева Н.Н. Эпидемиология серотипов *S. pneumoniae* на территории Российской Федерации // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2017. Т. 19, № 3. С. 200–206. [Muraviev A.A., Kozlov R.S., Lebedeva N.N. Epidemiology of *S. pneumoniae* serotypes in the territory of the Russian Federation. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 2017, vol. 19, no. 3, pp. 200–206. (In Russ.)]
7. Тюрин Ю.А., Шамсутдинов А.Ф., Фассахов Р.С. Изучение полиморфизма однонуклеотидных фрагментов аутогена металлозависимой протеазы штаммов *Staphylococcus aureus*, выделенных с кожи больных атопическим дерматитом // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2014. № 4. С. 5–7. [Tyurin Yu.A., Shamsutdinov A.F., Fassahov R.S. A study of the single nucleotide polymorphism fragments of the AUR gene metalloprotease strains of *Staphylococcus aureus* isolated from the skin of patients with atopic dermatitis. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya = Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, 2014, no. 1, pp. 5–7. (In Russ.)]
8. Bethe G., Nau R., Wellmer A., Hakenbeck R., Reinert R.R., Heinz H.P., Zysk G. The cell wall-associated serine protease PrtA: a highly conserved virulence factor of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett.*, 2001, vol. 205, no. 1, pp. 99–104. doi: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10931.x
9. Cassone M., Gagne A.L., Spruce L.A., Seeholzer S.H., Seberty M.E. The HtrA protease from *Streptococcus pneumoniae* digests both denatured proteins and the competence-stimulating peptide. *J. Biol. Chem.*, 2012, vol. 287, no. 46, pp. 38449–38459. doi: 10.1074/jbc.M112.391482
10. Courtney H.S. Degradation of connective tissue proteins by serine proteases from *Streptococcus pneumoniae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1991, vol. 175, no. 3, pp. 1023–1028. doi: 10.1016/0006-291X(91)91667-2

11. Dawid S., Sebert M.E., Weiser J.N. Bacteriocin activity of *Streptococcus pneumoniae* is controlled by the serine protease HtrA via posttranscriptional regulation. *J. Bacteriol.*, 2009, vol. 191, no. 5, pp. 1509–1518. doi: 10.1128/JB.01213-08
12. Feldman C., Anderson R. Review: current and new generation pneumococcal vaccines. *J. Infect.*, 2014, vol. 69, no. 4, pp. 309–325. doi: 10.1016/j.jinf.2014.06.006
13. Geno K.A., Gilbert G.L., Song J.Y., Skovsted I.C., Klugman K.P., Jones C., Konradsen H.B., Nahm M.H. Pneumococcal capsules and their types: past, present, and future. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2015, vol. 28, no. 3, pp. 871–899. doi: 10.1128/CMR.00024-15
14. Gupta A., Khaw F.M., Stokle E.L., George R.C., Pebody R., Stansfield R.E., Sheppard C.L., Slack M., Gorton R., Spencer D.A. Outbreak of *Streptococcus pneumoniae* serotype 1 pneumonia in a United Kingdom school. *BMJ*, 2008, vol. 337: a2964. doi: 10.1136/bmj.a2964
15. Hausdorff W.P., Bryant J., Paradiso P.R., Siber G.R. Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: implications for conjugate vaccine formulation and use, part I. *Clin. Infect. Dis.*, 2000, vol. 30, pp. 100–121. doi: 10.1086/313608
16. Ibrahim Y.M., Kerr A.R., McCluskey J., Mitchell T.J. Role of HtrA in the virulence and competence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.*, 2004, vol. 72, no. 6, pp. 3584–3591. doi: 10.1128/IAI.72.6.3584-3591.2004
17. Keller L.E., Robinson D.A., McDaniel L.S. Non encapsulated *Streptococcus pneumoniae*: emergence and pathogenesis. *MBio*, 2016, vol. 7, no. 2: e01792. doi: 10.1128/mBio.01792-15
18. Kriger O., Regev-Yochay G. The effect of pneumococcal conjugate vaccine on pneumococcal carriage and invasive disease. *Harefuah.*, 2019, vol. 158, no. 5, pp. 316–320.
19. Pai R., Gertz R.E., Beall B. Sequential multiplex PCR approach for determining capsular serotypes of streptococcus pneumoniae isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 2006, vol. 44, no. 1, pp. 124–131. doi: 10.1128/JCM.44.1.124-131.2006
20. Prevention of pneumococcal disease: recommendations of the (ACIP). *MMWR Recomm. Rep.*, 1997, no. 4, vol. 46 (RR-8), pp. 1–24.
21. Reshetnikova I.D., Bayazitova L.T., Tupkina O.F., Tyurin Y.A., Shamsutdinov A.F., Kadkina V., Rizvanov A.A. Characteristics of antibiotic resistance nasopharyngeal strains of *Streptococcus pneumoniae* in children suffering from respiratory pathologies. *BioNanoScience*, 2017, vol. 7, no. 1, pp. 182–185. doi: 10.1007/s12668-016-0324-8
22. Simell B., Auranen K., Käyhty H., Goldblatt D., Dagan R., O'Brien K. L. The fundamental link between pneumococcal carriage and disease. *Expert. Rev. Vaccines*, 2012, vol. 11, no. 7, pp. 841–855. doi: 10.1586/erv.12.53
23. Van der Poll T., Opal S.M. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet*, 2009, vol. 374, pp. 1543–1556. doi: 10.1016/S0140-6736(09)61114-4
24. Wani J.H., Gilbert J.V., Plaut A.G., Weiser J.N. Identification, cloning and sequencing of the immunoglobulin A1 protease gene of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.*, 1996, vol. 64, pp. 3967–3974.
25. Yoshioka C.R., Martinez M.B., Brandileone M.C., Ragazzi S.B., Guerra M.L., Santos S.R., Shieh H.H., Gilio A.E. Analysis of invasive pneumonia-causing strains of *Streptococcus pneumoniae*: serotypes and antimicrobial susceptibility. *J. Pediatr. (Rio J.)*, 2011, vol. 87, no. 1, pp. 70–75. doi: 10.2223/JPED.2063

Авторы:

Зарипова А.З., ассистент кафедры микробиологии ФГБОУ ВО Казанский государственный медицинский университет, г. Казань, Россия;

Тюрин Ю.А., к.м.н., зав. научно-исследовательской лабораторией иммунологии и разработки аллергенов ФБУН Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Казань, Россия; ассистент кафедры биохимии и клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО Казанский государственный медицинский университет, г. Казань, Россия;

Баязитова Л.Т., к.м.н., зав. научно-исследовательской лабораторией микробиологии ФБУН Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Казань, Россия; доцент кафедры микробиологии ФГБОУ ВО Казанский государственный медицинский университет, г. Казань, Россия;

Тюпкина О.Ф., старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории микробиологии ФБУН Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Казань, Россия;

Исаева Г.Ш., д.м.н., директор ФБУН Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Казань, Россия; зав. кафедрой микробиологии ФГБОУ ВО Казанский государственный медицинский университет, г. Казань, Россия.

Authors:

Zaripova A.Z., Assistant Professor, Department of Microbiology, Kazan State Medical University, Kazan, Russian Federation;

Tyurin Yu.A., PhD (Medicine), Head of Scientific Research Laboratory of Immunology and Allergens Development, Kazan Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Kazan, Russian Federation; Assistant Professor, Department of Biochemistry and Clinical Laboratory Diagnostics, Kazan State Medical University, Kazan, Russian Federation;

Bayazitova L.T., PhD (Medicine), Head of Scientific Research Department of Microbiology, Kazan Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Kazan, Russian Federation; Associate Professor, Department of Microbiology, Kazan State Medical University, Kazan, Russian Federation;

Tyupkina O.F., Senior Researcher, Scientific Research Department of Microbiology, Kazan Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Kazan, Russian Federation;

Isaeva G.Sh., PhD, MD (Medicine), Director, Kazan Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Kazan, Russian Federation; Head of Microbiology Department, Kazan State Medical University, Kazan, Russian Federation.