

**БЕЛАНОВ СЕРГЕЙ СЕРГЕЕВИЧ**

**ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ И ГЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ  
*STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ**

03.02.03 – микробиология

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание ученой степени**

**кандидата биологических наук**

**Оболенск – 2018 г.**

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней» Федерального медико-биологического агентства России

**Научный руководитель**

доктор медицинских наук, профессор **Сидоренко Сергей Владимирович**

**Официальные оппоненты:**

**Афанасьев Станислав Степанович**, доктор медицинских наук, профессор, Заслуженный деятель науки РФ, Федеральное бюджетное учреждение науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, главный научный сотрудник

**Краева Людмила Александровна**, доктор медицинский наук, Федеральное бюджетное учреждение науки «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, заведующая лабораторией медицинской бактериологии

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины» Федерального агентства научных организаций

Защита состоится «26» октября 2018 г. на заседании диссертационного совета Д 350.002.01 на базе Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 142279, Московская область, Серпуховский район, пос. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2018 г.

Ученый секретарь  
диссертационного  
совета Д 350.002.01,  
кандидат биологических наук

Фурсова Надежда Константиновна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

*Streptococcus pneumoniae* - грамположительная бактерия, в норме - обычный компонент микробиоты верхних дыхательных путей человека, который является практически единственным хозяином пневмококков. Основным резервуаром пневмококков в человеческой популяции являются дети до 5 лет (Jose R., Periseneris J., 2015).

В подавляющем большинстве случаев, пребывание пневмококков в носоглотке ребенка не сопровождается болезненными проявлениями и характеризуется как бессимптомное носительство. Длительность носительства колеблется от нескольких недель до 3 – 4 месяцев. Элиминация бактерий происходит в результате формирования специфического иммунного ответа на капсульные полисахариды бактерий, а также на некоторые поверхностные белки (Харит С.М., Сидоренко С.В., 2011).

Клинически выраженные инфекции на фоне носительства развиваются лишь в незначительной части случаев, их принято делить на поверхностные (мукозальные) и инвазивные. Критерием инвазивной инфекции является выявление пневмококков из первично стерильного локуса организма человека – крови или спинномозговой жидкости. К первым относят острый средний отит (ОСО) и синусит, ко вторым – менингит и бактериемию без явного очага инфекции. Одна из наиболее частых пневмококковых инфекций – пневмония может протекать и как поверхностная, и как инвазивная. Причины развития у части пациентов клинически выраженных инфекций и значительных различий в тяжести их течения не ясны, возможны как вариабельность факторов вирулентности у отдельных штаммов пневмококков, так и различная генетическая предрасположенность человека к инфекции (Маянский А.Н., 2015, Dagan R., 2016).

Чаще всего пневмококковые инфекции развиваются у детей и лиц пожилого возраста, у больных хроническими заболеваниями и иммунокомпрометированных пациентов. По некоторым оценкам, ежегодно только среди детей до 5 лет регистрируется более 14 миллионов случаев тяжелых пневмококковых инфекций, из них около 800 тысяч заканчиваются летальными исходами (O'Brien K.L., 2009).

Для обоснования эффективных направлений профилактики и лечения пневмококковых инфекций необходимы данные о структуре популяций бактерий, циркулирующих в различных географических регионах. Указанные факты определяют актуальность исследования.

### Степень разработанности темы исследования

Борьба с пневмококковыми инфекциями на сегодняшний день основана на двух стратегиях: предотвращении развития пневмококковых инфекций путем массовой вакцинации населения и этиотропной терапии инфекций, развившихся у отдельных пациентов. Реализация обеих стратегий может быть успешной лишь при наличии ряда исходных данных.

Доступные в медицинской практике антипневмококковые вакцины основаны на использовании в качестве протективных антигенов полисахаридов капсулы, которая рассматривается как один из основных факторов вирулентности пневмококков. Разработка пневмококковых вакцин осложняется двумя моментами: низкой иммуногенностью полисахаридов (Т-независимые антигены) у наиболее уязвимой категории населения - детей до 2-х лет и значительным антигенным разнообразием возбудителя (известно 93 серотипа). Первую проблему в значительной мере удалось разрешить в результате создания полисахаридных вакцин, конъюгированных с белками-носителями (пневмококковые конъюгированные вакцины - ПКВ). Решение второй проблемы возможно при выборе для включения в состав вакцины разумного количества полисахаридов наиболее распространенных серотипов. В настоящее время в медицинской практике доступны конъюгированные вакцины, включающие 7, 10 и 13 полисахаридов различных серотипов, соответственно ПКВ7, ПКВ10 и ПКВ13. Доступна также неконъюгированная полисахаридная вакцина, включающая 23 серотипа.

В период с 1980 по 2007 наиболее частыми возбудителями инвазивных инфекций во всем мире были семь серотипов: 1, 5, 6А, 6В, 14, 19F и 23F, а среди них самым распространенным -

серотип 14. При этом, между географическими регионами наблюдали значительные различия в распространенности отдельных серотипов (Johnson H.L., Deloria-Knoll L., 2010). Фундаментальные изменения в серотиповом составе пневмококков были выявлены в регионах, охваченных массовой вакцинацией. Так, в США через 10 лет после начала массовой иммунизации 7-валентной конъюгированной вакциной (ПКВ-7) доля «вакцинных» серотипов при инвазивных инфекциях снизилась с 64% до 3,8%, но возросла этиологическая роль других серотипов. В последующем, после внедрения в 2010 г 13-валентной вакцины (ПКВ-13) была отмечена тенденция к снижению частоты серотипов, входящих в эту вакцину (Richter K.P., Neilmann C.L., 2013). Накопленный опыт применения конъюгированных вакцин позволяет с высокой степенью вероятности прогнозировать, что в обозримом будущем для эффективной профилактики пневмококковых инфекций понадобятся вакцины, включающие большее количество серотипов (Таточенко В.К., 2014, Alicino C., 2017).

Основу этиотропной терапии пневмококковых инфекций составляют бета-лактамы, макролиды и фторхинолоны. Первые сообщения о выделении пневмококков со сниженной чувствительностью к пенициллину появились в 60-х годах прошлого века (Jacobs M.R., Koornhof H.J., 1978). С тех пор формирование и распространение устойчивости среди *S. pneumoniae* приняло угрожающий характер, частота устойчивости к бета-лактамам и макролидам в ряде регионов превышает 50%, а в некоторых - приближается к 90% (Kim S., 2012). В эпидемиологии антибиотикоустойчивых пневмококков значительные изменения произошли после начала массового применения пневмококковых конъюгированных вакцин. На фоне применения ПКВ-7 вначале наблюдали снижение частоты устойчивости, а затем ее рост, во многом за счет серотипа 19А. После внедрения ПКВ-13 роль серотипа 19А снижается, однако, появляются новые резистентные к антибиотикам серотипы (Hampton L.M., 2012, Richter K.P., 2013, Torne A.N., 2014). В целом, следует признать, что, по опыту США, современные антипневмококковые вакцины могут приводить к временному снижению частоты распространения устойчивых к антибиотикам штаммов, но не обеспечивают длительного и стабильного снижения уровня антибиотикорезистентности пневмококков (Mera R.M., Miller L.A., 2009, Jones R.N., Sader H.S., 2013).

Вполне очевидно, что для обоснования оптимального состава пневмококковых конъюгированных вакцин и рациональной эмпирической этиотропной терапии пневмококковых инфекций в Российской Федерации необходимо постоянное наблюдение за серотиповым составом и уровнем антибиотикорезистентности *S. pneumoniae*, циркулирующих в отдельных регионах. Более того, становится очевидным, что в ответ на массовую иммунизацию и антибиотикотерапию в популяции пневмококков как в отдельных географических регионах, так и, вероятно, на глобальном уровне происходят сложные генетические процессы, направленные на адаптацию бактерий к меняющимся условиям. Понимание содержания этих процессов принципиально необходимо для эффективной борьбы с пневмококковыми инфекциями (Брико Н.И., 2010). К сожалению, традиционные микробиологические методы недостаточно эффективны для решения указанных задач. Перечисленные факты послужили основой для определения цели и задач исследования.

### **Цель исследования**

Фенотипическая и генотипическая характеристика линий *Streptococcus pneumoniae*, выделенных у здоровых носителей и больных острым отитом и внебольничной пневмонией в Санкт-Петербурге в 2010 – 2015 гг.

### **Задачи исследования**

1. Охарактеризовать с помощью молекулярных методов серотиповый состав *S. pneumoniae*, выделенных у различных категорий детей в Санкт-Петербурге (больных острым средним отитом, внебольничной пневмонией и здоровых носителей), оценить потенциальный охват циркулирующих серотипов антипневмококковыми вакцинами.

2. Изучить распространение среди *S. pneumoniae* резистентности к антибактериальным препаратам, используемым для лечения пневмококковых инфекций (бета-лактамам, макролидам, фторхинолонам и др.).

3. Изучить связь пневмококков, вызывающих острый отит и внебольничную пневмонию, а также выделенных от здоровых носителей в Санкт-Петербурге с глобально распространенными генетическими линиями.

4. Охарактеризовать с помощью полногеномного секвенирования геномы представителей наиболее распространенных серотипов пневмококков, циркулирующих в Санкт-Петербурге.

5. Предоставить микробиологическое обоснование для выбора оптимальной конъюгированной вакцины для профилактики пневмококковых инфекций, а также антибактериальных препаратов для их лечения.

### **Научная новизна**

На основании результатов молекулярного типирования капсульных полисахаридов жизнеспособных культур *S. pneumoniae*, а также ДНК этих бактерий, выделенных у пациентов с острым средним отитом, внебольничной пневмонией, а также у здоровых носителей охарактеризован серотиповый состав пневмококков, циркулирующих в Санкт-Петербурге, оценен вероятный охват пневмококковой популяции 7-ми, 10-ти в 13-ти валентными конъюгированными вакцинами.

Установлено, что распространение среди *S.pneumoniae* устойчивости к макролидным и бета-лактамам антибиотикам в Санкт-Петербурге связано с циркуляцией глобальных генетических линий CC320/271, CC315/9 и CC423.

Дополнено представление о механизмах формирования устойчивости к антибиотикам в локальной популяции с использованием технологий ПЦР и полногеномного секвенирования. Впервые произведена оценка глобального резистоста наиболее распространённых штаммов.

### **Практическая значимость и внедрение результатов работы в практику.**

Полученные в ходе работы данные использованы для обоснования включения пневмококковых конъюгированных вакцин в Национальный календарь прививок Российской Федерации. На основании полученных данных в 2013 г. в Санкт-Петербурге при поддержке Благотворительного фонда Ростроповича-Вишневецкой для массовой иммунизации детей в возрасте до 2-х лет была отобрана 13-валентная конъюгированная вакцина. . – Федеральный уровень внедрения.

Результаты оценки распространения среди пневмококков резистентности к антибактериальным препаратам используются для оптимизации эмпирической этиотропной терапии респираторных инфекций в ФГБУ ДНК ЦИБ. – Федеральный уровень внедрения.

В коллекцию чистых культур ФГБУ ДНК ЦИБ ФМБА России было добавлено 250 изолятов чистых культур *S. pneumoniae*, была создана электронная база данных клинического материала и чистых культур собранных и обработанных в 2010-2015 гг. – Федеральный уровень внедрения.

В отделе медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии (Акт внедрения ФГБУ ДНК ЦИБ ФМБА России «Механизмы антибактериальной резистентности у пневмококков» от 01.12.2014 г.) и в отделении специфической профилактики инфекционных болезней и иммунодефицитных состояний (Акт внедрения ФГБУ ДНК ЦИБ ФМБА России «Оптимизированная методика по ПЦР-типированию серотипового состава *S. pneumoniae*, вызывающих респираторные и инвазивные инфекции в Санкт-Петербурге от 01.12.2018 г.) ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России используются данные по уровню устойчивости к антибактериальным препаратам, а также оптимизированные методики по ПЦР-детекции возбудителя в клиническом материале, для повышения эффективности терапии и профилактики пневмококковых инфекций. - Учрежденческий уровень внедрения.

В базу данных GenBank были добавлены риды и драфт-последовательности 13 изолятов пневмококка секвенированных в ходе исследования. – Международный уровень внедрения.

В базу данных MLST, поддерживающуюся на базе Оксфордского университета, Оксфорд, Великобритания ( <https://pubmlst.org/spneumoniae/> ), была добавлена информация о 84 *S. pneumoniae*, выделенных на территории Российской Федерации и относящихся к 56 сиквенс-типам. – Международный уровень внедрения.

Материалы диссертации использованы в составлении учебной программы для курсов повышения квалификации практикующих клинических специалистов «Молекулярные методы идентификации и типирования *S. pneumoniae* в клиническом материале» проводившихся на базе ФГБУ ДНК ЦИБ. В результате выполнения работы заложены основы для формирования в Санкт-Петербурге системы наблюдения за серотиповым составом и антибиотикорезистентностью *S. pneumoniae*, вызывающих различные нозологические формы пневмококковых инфекций.

#### **Методология и методы работы**

Методология диссертационной работы состояла в организации комплексного, фундаментального исследования по характеристике фенотипической и генотипической структуры популяции *S. pneumoniae*, вызывающей основные формы пневмококковых заболеваний и бессимптомное носительство в Санкт-Петербурге. Анализ научной литературы, посвященной тематике исследования, проведен формально-логическими методами. Исследования, направленные на решение поставленных задач, осуществляли общенаучными и специфическими методами. В работе использованы микробиологические, молекулярно-генетические, эпидемиологические, биоинформационные и статистические методы исследований.

#### **Связь работы с научными программами**

Данное исследование проведено в рамках выполнения Государственного задания по прикладной научно-исследовательской работе: «Применение молекулярных методов для диагностики пневмококковых инфекций и типирования *Streptococcus pneumoniae*» (2012-2015 гг).

#### **Основные положения, выносимы на защиту**

1. Сопоставление серотипового состава конъюгированных пневмококковых вакцин и популяции *Streptococcus pneumoniae*, циркулирующих на территории Санкт-Петербурга, позволяет предположить, что массовая вакцинация 13-валентной вакциной обеспечит максимальную иммунологическую защиту населения от пневмококковых инфекций и предотвратит распространение потенциально опасного множественно устойчивого серотипа 19A.

2. Высокая частота устойчивости к макролидным антибиотикам в популяции *Streptococcus pneumoniae*, циркулирующих в Санкт-Петербурге (более 30%), обосновывает целесообразность сокращения объема потребления этих антибиотиков.

3. Распространение среди *S. pneumoniae*, циркулирующих в Санкт-Петербурге, антибактериальной резистентности преимущественно связано с импортом глобально распространенных линий клональных комплексов КК320, КК271, КК315 и КК423.

#### **Личное участие автора в получении результатов**

Автор лично разработал методологию исследования, подготовил план и программу работы, сформулировал цель и задачи, разработал схему отбора клинического материала для экспериментальной части. Лично проводил все эксперименты по обработке клинического материала, детекции ДНК возбудителя в клиническом материале, капсальному ПЦР-серотипированию и MLST-типированию, а также по полногеномному секвенированию. Автором самостоятельно написан текст диссертации и автореферата, подготовлены слайды для презентации. Все этапы экспериментальной части выполнены самостоятельно на базе отдела медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России. Эксперименты по полногеномному секвенированию частично были выполнены при содействии Центра Геномной Биоинформатики СПбГУ им. Добрянского, заведующий профессор Стефан О'Брайен.

### **Апробация работы**

Исследования по данной работе были проведены в рамках Государственного задания по прикладной научно-исследовательской работе: «Применение молекулярных методов для диагностики пневмококковых инфекций и типирования *Streptococcus pneumoniae*» (2012-2015 гг). Результаты исследований были представлены на следующих конференциях и научных форумах: European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases «ECCMID» (31 March-03 April 2012, London, United Kingdom), The 5<sup>th</sup> Pneumo surveillance workshop (3-5 June 2012, Warsaw, Poland), на Всероссийской научно-практической конференции по медицинской микробиологии и клинической микологии «XVI Кашкинские чтения» (19 - 21 июня 2013, Санкт-Петербург), The 6<sup>th</sup> Pneumo surveillance workshop (10-12 June 2013, Krakow, Poland), European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases «ECCMID» (10-13 May 2014, Barcelona, Spain), на Всероссийской научно-практической конференции по медицинской микробиологии и клинической микологии «XVII Кашкинские чтения» (9 - 11 июня 2014, Санкт-Петербург), European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases «ECCMID» (25-28 April 2015, Copenhagen, Denmark).

### **Публикация результатов исследования**

Всего по теме работы было опубликовано 14 работ из них 5 в рецензируемых научных журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации для опубликования основных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, 7 в виде тезисов конференций и 2 работы в виде прочих публикаций.

### **Структура и объем работы**

Диссертация изложена на 102 страницах машинописного текста и состоит из общей характеристики работы, 8 глав, выводов, списка сокращений, списка литературы и приложений. Библиографический список включает в себя 210 источников литературы. Диссертация иллюстрирована 17 таблицами и 15 рисунками.

### **Материалы и методы исследования**

В исследование были включены клинический материал и изоляты *S. pneumoniae*, выделенные в период с 2010 по 2015 г. в отделе медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России от детей в возрасте до 18 лет и взрослых. Для выделения и идентификации *S. pneumoniae* использовали стандартные микробиологические методы. Определение минимальных подавляющих концентраций (МПК) антибиотиков и интерпретацию результатов проводили в соответствии с рекомендациями CLSI и EUCAST ([www.eucast.org](http://www.eucast.org)).

Геномную ДНК выделяли из цельной крови и суспензии транспортной среды ESwab с помощью набора ДНК-Сорб (производство Интерлабсервис). Образцы ДНК хранили при -80°C. Для ПЦР-идентификации пневмококка в клиническом материале в качестве мишени использовали ген *lytA*, последовательность праймеров и условия амплификации описаны на сайте Центров по контролю и профилактике заболеваний (Centers for Disease Control and Prevention – CDC, США). (<http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/pcr.htm>). ПЦР-типирование ДНК с электрофоретической детекцией из культур пневмококков, а также ДНК пневмококков, обнаруженной в крови или жидкости среднего уха, проводили методом, описанным в работе (Pai R., 2006), с учетом модификаций условий амплификации и последовательностей праймеров, приведенных на сайте Центров по контролю и профилактике заболеваний (Centers for Disease Control and prevention – CDC, США). (<http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/pcr.htm>). Схемы ПЦР-типирования пневмококка в реальном времени была разработана с учетом специфики российской популяции и, конкретно, популяции г. Санкт-Петербург. Подбор оптимальных условий и праймеров осуществляли с помощью программного обеспечения Oligo 7.0, Geneious 8.0, NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). То же самое было проделано для экспериментов по детекции генов устойчивости к макролидам и генов, кодирующих ворсинки.

MLST-типирование осуществляли по стандартной схеме. Анализ проводился с использованием базы данных MLST (<http://spneumoniae.mlst.net>). Для установления связей

анализируемых изолятов друг с другом и с охарактеризованными изолятами из базы данных (определение принадлежности к клональным комплексам) и построения диаграмм использовался алгоритм eBURSTv3, интегрированный в MLST-вебсайт (<http://eburst.mlst.net>), а также программа Phyloviz 2.0 (<http://www.phyloviz.net/>).

Полногеномное секвенирование проводилось на платформах Ion Torrent PGM2 и Illumina MiSeq. Подготовка библиотек осуществлялась согласно рекомендациям производителей секвенаторов. Оценка качества ридов проводилась с помощью программы FastQC. Сборка геномов *de-novo* осуществлялась с помощью ассемблера Spades 3.0. Для аннотации геномов были использованы публичные серверы RAST и Artemis. Первичные данные по патогенности, резистентности и MLST были получены с помощью онлайн-сервисов центра Геномной Эпидемиологии (<http://cge.cbs.dtu.dk>), расширенные данные по резистентности - с помощью онлайн ресурса (<http://arpcard.mcmaster.ca/>). Профаговые элементы определяли с помощью ресурса PhAge Search Tool (<http://phast.wishartlab.com/>). Дальнейшая работа с данными проводилась с использованием программного обеспечения Ugene Unipro и Geneious 8.0.

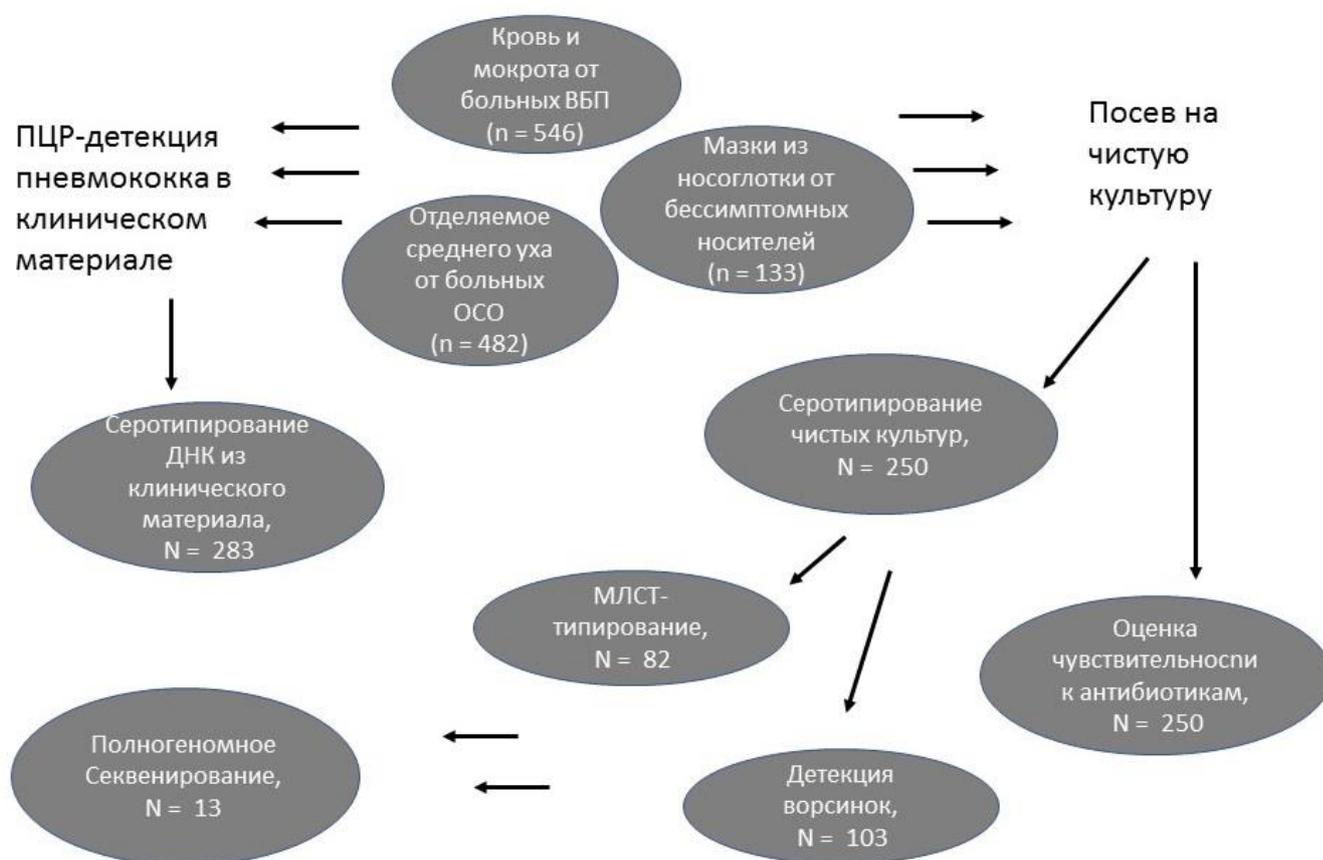


Рис 1. Схема и дизайн исследования

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Серотиповый состав *S. pneumoniae*, циркулирующих в Санкт-Петербурге

### Серотиповый состав *S. pneumoniae*, вызывающих острый отит у детей.

В ходе исследования методом парацентеза биологический материал из полости среднего уха был получен у 482 детей с острым средним отитом. Результаты детекции *S. pneumoniae* и/или ДНК бактерий классическими микробиологическими методами и/или ПЦР представлены в Таблице 1. Положительными на пневмококк были 192 образца (41,8%), в 62 случаях (12,8%) удалось получить жизнеспособную культуру. Во всех остальных положительных случаях было

обнаружено только присутствие пневмококковой ДНК. Как следует из материалов таблицы, этиологическая роль пневмококков была наибольшей у детей младшей возрастной группы (0 - 2 года), возбудитель был найден в 41,8% случаев. У детей в возрасте от 5 до 18 лет частота выделения пневмококков была почти в 2 раза ниже и равнялась 23%. При этом во всех возрастных группах пневмококковая ДНК с помощью ПЦР детектировалась существенно чаще, чем жизнеспособная бактериальная культура. Результаты серотипирования для чистых культур и клинического материала, полученных из одних и тех же образцов, полностью совпали. Если рассматривать распределение частоты случаев ОСО пневмококковой этиологии по возрастным группам, то наблюдается преобладание частоты заболевания пневмококковым отитом у детей младшей группы (0 < 2 года), которая составляет 62,6%; по сравнению с 41% - у детей от 2 до 5 лет и с 26,4% у детей старшей возрастной группы (5 < 18 лет) (Таблица 1).

Таблица 1. Эффективность различных методов детекции *S. pneumoniae* в жидкости среднего уха при остром среднем отите у детей

Возраст, лет	Количество образцов	Метод детекции <i>S. pneumoniae</i>	Количество (%) положительных образцов
0 - < 2	91	Культура + ПЦР	14 (15.4%)
		Только ПЦР	24 (26.4%)
		Всего	38 (41.8%)
2 - < 5	217	Культура + ПЦР	30 (13.8%)
		Только ПЦР	50 (23.1%)
		Всего	80 (36.9%)
5 - < 18	174	Культура + ПЦР	18 (10.4%)
		Только ПЦР	22 (12.6%)
		Всего	40 (23.0%)
Всего	482	Культура + ПЦР	62 (12.9%)
		Только ПЦР	96 (19.9%)
		Всего	158 (32.8%)

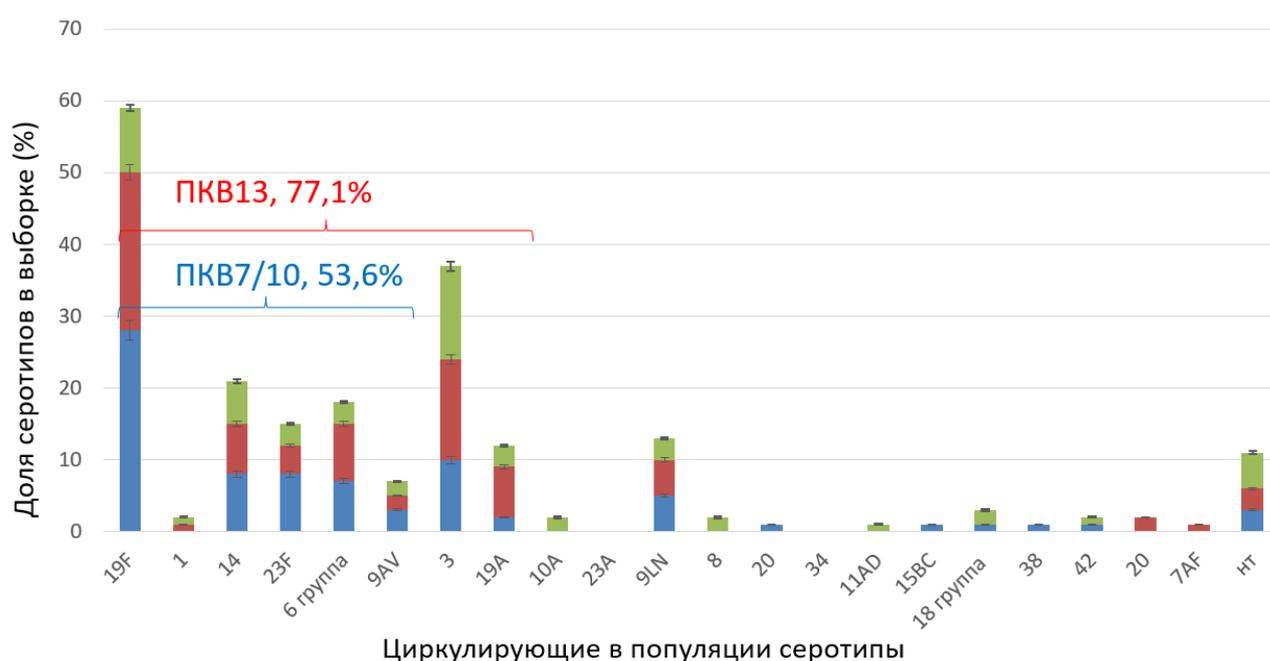


Рис 2. Распределение серотипов у больных ОСО различных возрастных групп

Исследование выявило в общей сложности 18 серотипов и серогрупп, встречающихся у детей больных ОСО (Рис 2). Преобладающими серотипами оказались 19F (28,1%), 3 (19,3%), 14 (8,3%). В то же время, для старшей возрастной группы характерно более равномерное распределение серотипов, доля редких и нетипируемых возрастает до 44,2%, но при этом сохраняется высокая доля встречаемости 3 серотипа (21,7%). Количество серотипов, входящих в состав конъюгированной вакцины ПКВ7, составило 53,6%, при этом, процент покрытия пневмококковой популяции вакциной уменьшался от младшей группы к старшей (64,9%, 57,3% и 32,6% соответственно). Серотипы, добавленные в 10-валентную вакцину ПКВ10, в популяции пневмококков, вызывающих ОСО у детей в Санкт-Петербурге, практически не встречаются. При этом 13-валентная вакцина ПКВ13, в частности, за счет добавления серотипов 3 и 19А, обеспечивает покрытие 77,1% штаммов *S.pneumoniae*, вызывающих ОСО. При этом, наблюдается следующее распределение покрытия вакцинами по возрастным группам: 87,8% - для детей младшего возраста, 80,1% - для детей от 2 до 5 лет и 56,5% - для детей старшей группы. Особого внимания заслуживает высокий процент встречаемости 3 серотипа, равномерно распределенного по всем возрастным группам.

### Серотиповый состав *S. pneumoniae*, вызывающих внебольничную пневмонию.

Образцы крови получены от 452 детей с рентгенологически подтвержденной ВБП. ДНК *S. pneumoniae* обнаружена в 56 (12,4%) случаях. Результаты ПЦР-типирования представлены в Таблице 3. Чаще всего бактериемическую пневмонию вызвал серотип 3 (14,3%), лишь несколько реже возбудителями были представители серогруппы 6 (12,2%), серотипа 9V/A, 23F, 19F - все по 9,9%, существенной была доля серотипа 14 – 8,8%. Особо следует отметить нетипично высокую долю серотипа 10А (8,9%), который настолько широко был представлен только в выборке детей больных пневмонией и почти не встречался у прочих групп. Охват выделенных серотипов составил 55,4% для ПКВ7 и ПКВ10 и 67,9% - для ПКВ13 (Таблица 3).

Из 94 взрослых с рентгенологически подтвержденной ВБП ДНК пневмококков обнаружена у 35 (37,2%). Результаты ПЦР-типирования представлены в Таблице 3. Чаще всего у взрослых пневмонию вызывали серотипы 3 и 19F – по 17,1%, кроме того, были значительно представлены серотипы 23F, 19А и 6 серогруппа – по 8,6%. (Рис. 3). Таким образом, охват ПКВ7 и ПКВ10 был одинаков и составил 42,9%, в то время как ПКВ13 обеспечивает охват 68,2% серотипов, выделенных от пациентов с госпитализированной внебольничной пневмонией.

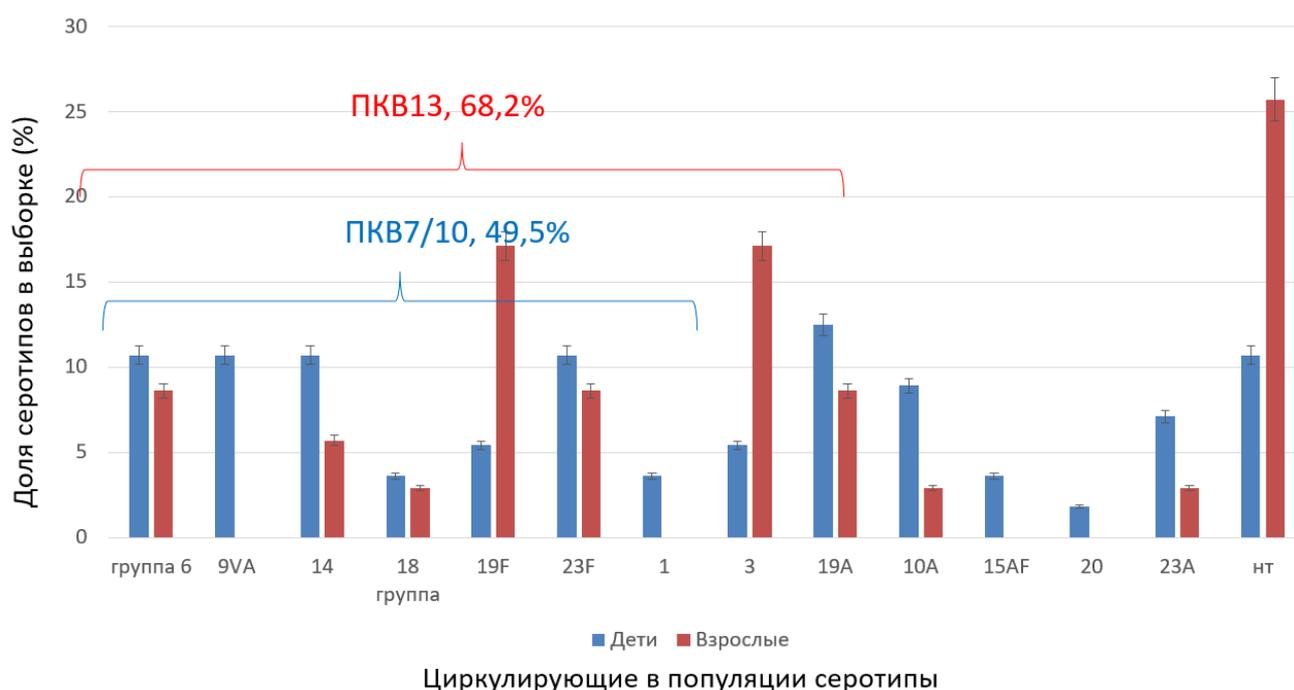
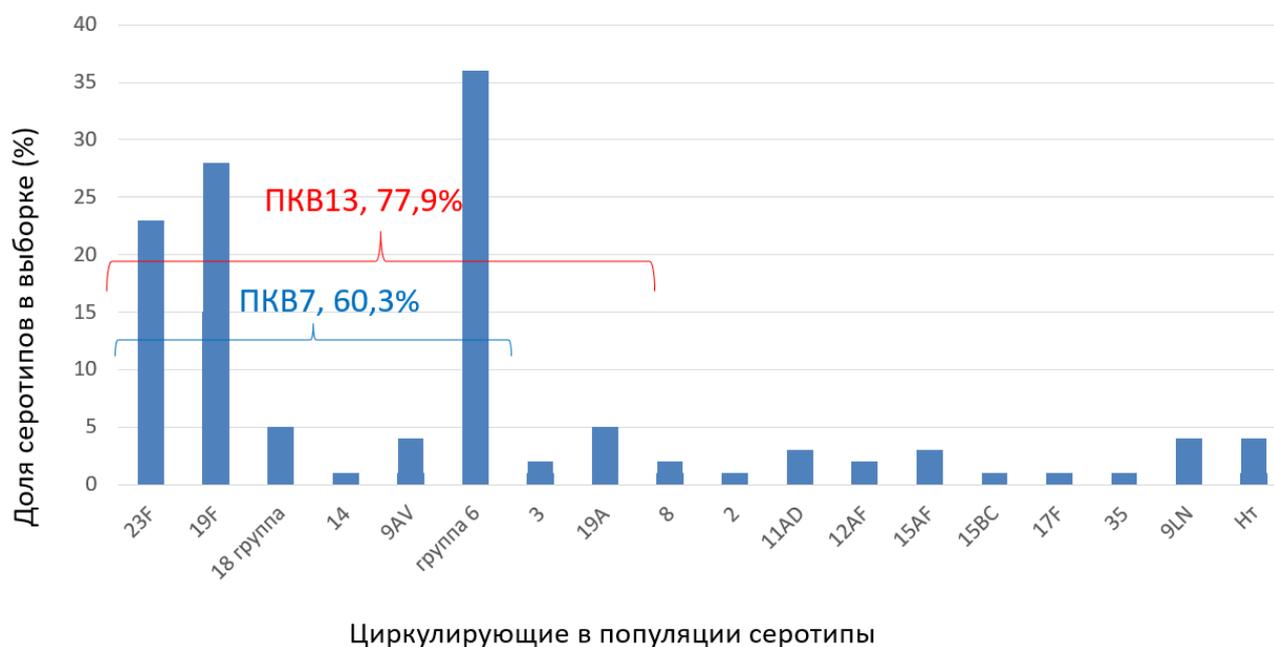


Рис 3. Распределение серотипов у больных ВБП различных возрастных групп

Всего пневмококк удалось диагностировать в 16,8% образцов крови от больных ВБП. Эффективность диагностики у взрослых и детей отличалась почти в 3 раза, что, по-видимому, связано с тем, что практически все образцы от взрослых больных были от пациентов с тяжелой формой заболевания. Следует также отметить различия в частоте встречаемости 19F (17,1% и 5,4%) и 19A (8,6% и 1,8%) серотипов у детей и взрослых, а также неожиданно высокую долю 10A серотипа у детей. Если брать совмещенную выборку образцов клинического материала от детей и взрослых, то процент покрытия 7/10-валентной вакцины составил 49,5%, 13-валентной – 68,2%.

#### **Серотиповый состав *S. pneumoniae*, выделенных у здоровых детей при носительстве.**

Всего было проанализировано 133 образца клинического материала и чистых культур, выделенных от бессимптомных носителей (Таблица 4). Преобладающими серотипами были серогруппа 6 (20,3%), 19F (18,8%), 23F (15,8%), 19A (13,8%), следует отметить низкую встречаемость, по сравнению с больными ОСО и ВБП, 3 серотипа (3,8%) и высокий процент мультирезистентных линий 19A серотипа. Общий процент покрытия 7/10-валентными вакцинами составил 60,3%, 13-валентной - 77,9% (Рис. 4).



**Рис 4.** Распределение серотипов у бессимптомных носителей

**Антибиотикочувствительность *S.pneumoniae*, циркулирующих в Санкт-Петербурге.** Характеристика антибиотикочувствительности *S. pneumoniae*, выделенных при здоровом носительстве и при пневмококковых инфекциях, приведена в Таблице 5.

#### **Резистентность *S. pneumoniae* к бета-лактамам антибиотикам.**

**Пенициллин.** Несмотря на то, что в клинической практике в России для лечения респираторных инфекций, прежде всего пневмонии, пенициллин применяется неоправданно редко, антибиотик сохраняет свое значение как индикаторный препарат для выявления микробиологической устойчивости к бета-лактамам. Согласно критериям EUCAST пневмококки, выделенные при инфекциях, отличных от менингита, относятся к промежуточным при значениях МПК от 0,06 до 2,0 мкг/мл включительно, а к устойчивым - при МПК > 2,0 мкг/мл. Изолятов с такими параметрами выявлено 22,8 % и 9,6 %, соответственно. Среди изолятов, выделенных от пациентов с пневмонией, по критериям EUCAST устойчивыми были 16,7 %, а по критериям CLSI - только 2,8%. Уровень устойчивости среди изолятов, выделенных при ОСО, был существенно ниже и составил по критериям EUCAST и CLSI, соответственно, 7,5 % и 2,5 %.

**Цефотаксим.** Различия в критериях чувствительности к цефотаксиму по EUCAST и CLSI незначительны. В обеих системах изоляты считаются устойчивыми при МПК > 2,0 мкг/мл. Таким образом, частота устойчивых изолятов, включенных в исследование, в обеих системах одинакова, а частота чувствительных по EUCAST несколько ниже, чем по CLSI – 86,0% и 96,8%, соответственно. Наименьший уровень чувствительности по EUCAST отмечен среди изолятов, выделенных при ВВП (77,8%), наибольший – среди выделенных при ОСО (97,6%). **Цефтаролин.** Уровень устойчивости по критериям EUCAST и CLSI отличался весьма значительно, так, в общей выборке было 1,6% устойчивых штаммов по CLSI и 6% - по EUCAST. Примечательно, что устойчивые штаммы фактически отсутствовали у здоровых носителей, в то время, как у больных ВВП и ОСО их доля составляла от 9,9% до 11,1% по EUCAST и 2,8%-3,8% по CLSI.

**Резистентность к макролидам и линкозамидам.** Критерии чувствительности пневмококков к эритромицину (индикаторному антибиотику для 14- и 15-членных макролидов) у EUCAST и CLSI совпадают. Средний уровень устойчивости среди всех изолятов, включенных в исследование, составлял 31,2%, к промежуточным относились только 2% изолятов. Наибольшая частота устойчивости была отмечена среди изолятов, выделенных от носителей (37,3%), наименьшая – среди изолятов от пациентов с ОСО (21,2%). К клиндамицину проявляло устойчивость 14,8% штаммов.

**Моксифлоксацин.** К моксифлоксацину устойчивых штаммов найдено не было.

**Ассоциированная устойчивость *S. pneumoniae* к пенициллину и эритромицину.** На рисунке 5 приведено распределение изолятов, демонстрирующих различные значения МПК пенициллина и эритромицина. Как следует из рисунка, 22,8% изолятов демонстрировали одновременное снижение чувствительности к эритромицину и пенициллину.

**Резистентность к тетрациклину.** В среднем частота устойчивости к тетрациклину составила 33,2%. Наибольший уровень был отмечен среди изолятов, полученных от пациентов с пневмонией (41,7%), наименьшей – от пациентов с ОСО (30,0%).

**Резистентность к ко-тримоксазолу.** В среднем среди всех изученных изолятов к устойчивым относились 34,8%. Наибольшая частота устойчивости была выявлена среди изолятов, полученных от пациентов с ВВП (37,5%) и от здоровых носителей (38,7%), наименьшая – среди изолятов от пациентов с ОСО (28,8%). **Резистентность к хлорамфениколу.** Среди всех изученных изолятов устойчивыми оказались 46,2%, наибольшая частота устойчивости отмечена среди изолятов от пациентов с ВВП (47,2%) и от здоровых носителей (50,7%), наименьшая – от пациентов с ОСО (38,0%).

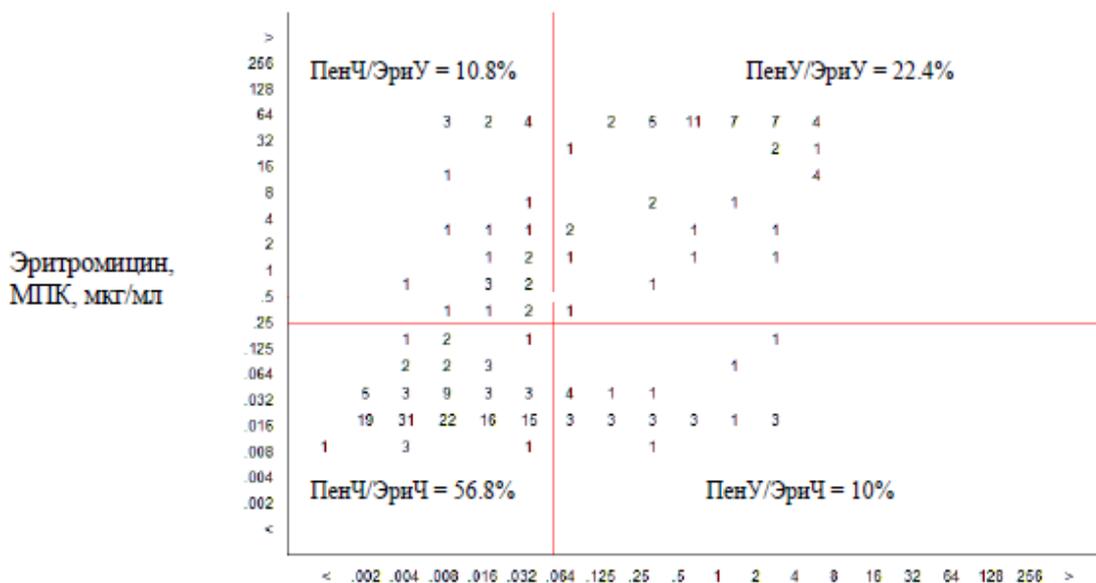


Рис 5. Распределение МПК эритромицина и пенициллина в отношении *S. pneumoniae* (количество изолятов, подавляемых различными концентрациями антибиотиков)



Таблица 3. Серотиповый состав *S. pneumoniae*, вызывающих внебольничную пневмонию

Пациенты, (n)	Положительных образцов (n)	Серотипы, % положительных проб															
		Входящие в ПКВ7							Всего ПКВ7/10			Всего ПКВ13		Невакцинные			
		6A/B/C/D	9V/A	14	18	19F	23F	1		3	19A		10A	15AF	20	23A	НТ
Дети (452)	56	10.7	10.7	10.7	3.6	5.4	10.7	3.6	55.4	12.5	1.8	67.9	8.9	3.6	1.8	7.1	10.7
Взрослые (94)	35	8.6	-	5.7	2.9	17.1	8.6	-	42.9	17.1	8.6	68.6	2.9	-	-	2.9	25.7
Всего (546)	91	9.9	6.6	8.8	3.3	9.9	9.9	1.1	49.5	14.3	4.4	68.2	6.6	2.2	1.1	5.5	16.5

Таблица 4. Серотиповый состав *S. pneumoniae*, выделенных от здоровых детей при носительстве

Кол-во изолятов	Серотипы (%)																
	Входящие в ПКВ7							Плюс ПКВ13			Невакцинные						
	6A/B/C/D	9V/A	14	18	19F	23F	ПКВ7	3	19A	ПКВ13	10A	12F	15	17F	35F	Прочие и НТ	
133	20.3	3.8	0.8	0.8	18.8	15.8	60.3	3.8	13.8	77.9	0.8	1.5	1.5	0.8	0.8	16.7	

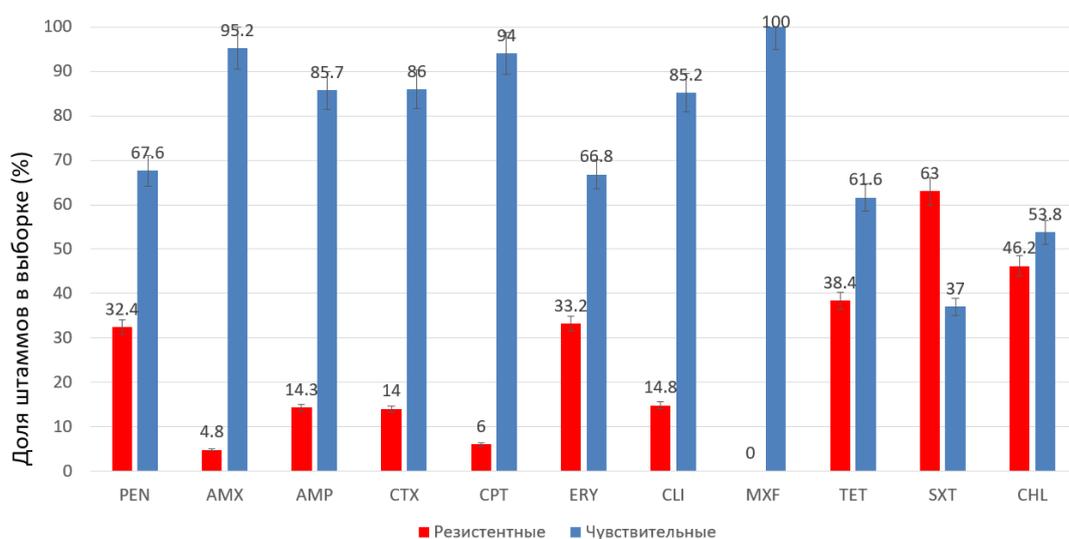
Таблица 5. Антибиотикочувствительность *S. pneumoniae*, выделенных при здоровом носительстве и пневмококковых инфекциях

Антибиотик	Критерии	У/Ч	Пневмонии (n=36)			Отиты (n=80)			Носительство (n=134)			Всего (n=250)		
			У	П	Ч	У	П	Ч	У	П	Ч	У	П	Ч
Пенициллин	EUCAST	$>2/\leq 0.06$	16.7	27.8	55.6	7.5	16.2	76.2	9.0	25.4	65.6	9.6	22.8	67.6
	CLSI	$\geq 8/\leq 2$	2.8	13.9	83.3	2.5	5.0	92.5	4.5	4.5	91.0	3.6	6.0	90.4
Амоксициллин	CLSI	$\geq 8/\leq 2$	2.8	2.8	94.4	2.5	1.3	96.2	1.5	3.7	96.8	2.0	2.8	95.2
Ампициллин	EUCAST	$>2/\leq 0.5$	-	-	-	4.3	10.0	85.7	-	-	-	4.3	10.0	85.7
Цефотаксим	EUCAST	$>2/\leq 0.5$	2.8	19.4	77.8	1.2	1.2	97.6	0.7	10.5	88.5	1.2	12.8	86.0
	CLSI	$\geq 4/\leq 1$	2.8	8.3	88.9	1.2	0	98.8	0.7	1.5	97.8	1.2	2.0	96.8
Цефтаролин	EUCAST	$>0.25/\leq 0.25$	11.1	0	88.9	9.9	0	90.1	2.3	0	97.7	6.0	0	94.0
	CLSI	$/\leq 0.5$	2.8	0	97.2	3.8	0	96.2	0	0	100.0	1.6	0	98.4
Эритромицин	EUCAST//CLSI	$>0.5/\leq 0.25//\geq 1/\leq 0.25$	30.6	2.8	66.7	21.2	1.2	77.5	37.3	2.2	60.5	31.2	2	66.8
Клиндамицин	EUCAST// CLSI	$>0.25/\leq 0.5//\geq 1/\leq 0.25$	13.9	0	86.1	8.8	0	91.2	18.7	0	81.3	14.8	0	85.2
Моксифлоксацин	EUCAST//CLSI	$>0.5/\leq 0.5//\geq 4/\leq 1$	0	0	100.0	0	0	100.0	0	0	100.0	0	0	100.0
Тетрациклин	EUCAST// CLSI	$>2/\leq 1//\geq 4/\leq 1$	41.7	2.8	55.5	30.0	10.0	60.0	32.8	3.0	64.2	33.2	5.2	61.6
Ко-тримоксазол	EUCAST//CLSI	$>2/\leq 1//\geq 4/\leq 0.5$	37.5	33.0	29.2	28.8	34.6	36.5	38.7	21.0	40.3	34.8	28.2	37.0
Хлорамфеникол	EUCAST//CLSI	$>8/\leq 8//\geq 8/\leq 4$	47.2	0	52.8	38.0	0	62.0	50.7	0	49.3	46.2	0	53.8

Подводя итоги оценки результатов тестирования резистентности к антибактериальным препаратам, можно особо отметить высокий уровень устойчивости к макролидным антибиотикам, в частности, уровень устойчивости к эритромицину составил 31,2%, причем, к промежуточным относилось только 2% изолятов. Интересно, что наибольшая частота устойчивости была обнаружена от изолятов, полученных при носительстве, наименьшая – при ОСО. Схожая картина наблюдалась и при детекции устойчивости к клиндамицину, в целом, ее уровень был почти в 2 раза ниже, чем к эритромицину, и составил 14,8%. Не было выявлено устойчивых изолятов к моксифлоксацину. Что касается данных по тетрациклину, котримоксазолу и хлорамфениколу – полученные результаты демонстрируют достаточно удручающую картину: процент устойчивых штаммов составляет 33,2, 34,8 и 46,2%, соответственно. Наибольшую важность представляют данные о частоте случаев множественной устойчивости одновременно к бета-лактамам и макролидным антибиотикам, которая составила 22,8%.

#### **Антибиотикорезистентность среди штаммов *S. pneumoniae*, относящихся к различным серотипам.**

Данные об антибиотикорезистентности пневмококков различных серотипов приведены в Таблице 6. Как следует из представленных материалов, наибольшая частота устойчивости была характерна для изолятов серотипа 19А. Все 11 изолятов этого серотипа проявляли в разной степени выраженное снижение чувствительности к пенициллину, а также отличались в сравнении с другими серотипами наиболее высокой частотой устойчивости к амоксициллину, цефотаксиму, цефтаролину, эритромицину и тетрациклину. Серотип 19А уступал другим серотипам только по частоте устойчивости к хлорамфениколу и котримоксазолу. Для других распространенных серотипов (19F, 6А/В/С и 14) также была характерна высокая частота устойчивости к пенициллину, варьирующая приблизительно от 30% до 60%, и к эритромицину - от 29% до 46%. Далее, в порядке снижения частоты устойчивости, следовали серотипы 9V/L и 23F. Серотипы 1, 18А/В/С, 12F, 15, 35F, 10А, 17F и 34 были представлены единичными изолятами и в большинстве случаев сохраняли чувствительность к антибиотикам (Рис.6). Следует отметить относительно высокую частоту устойчивости к антибиотикам среди нетипируемых изолятов, которые были выделены в основном от здоровых носителей. Важной особенностью была низкая частота устойчивости среди достаточно распространенного серотипа 3. Из 24 изолятов этого серотипа лишь единичные проявляли снижение чувствительности к пенициллину, эритромицину и другим антибиотикам.



**Рис 6.** Распределение устойчивости к основным антибактериальным препаратам среди чистых культур пневмококка (N=250)

Таблица 6. Распространение снижения чувствительности к бета-лактамам (% нечувствительных изолятов) относительно серотипового состава у различных возрастных категорий детей

Серотипы	Пневмония				Отиты, синуситы				Носители				Всего			
	N	PEN		AMX	N	PEN		AMX	N	PEN		AMX	N	PEN		AMX
		EUCAST	CLSI	CLSI		EUCAST	CLSI	CLSI		EUCAST	CLSI	CLSI		EUCAST	CLSI	CLSI
6A/B/C	6	33,3	16,7	0	12	8,3	0	0	27	46,2	22,3	3,8	45	33,3	15,6	2,2
9V/L	1	100	100	0	3	33,3	0	0	5	40	0	0	9	44,4	11,1	0
14	4	75	25	0	1	0	0	0	1	100	0	0	6	66,7	16,7	0
18A/B/C	0				1	0	0	0	1	0	0	0	2	0	0	0
19F	4	75	75	25	22	36,4	22,7	0	25	40	14,8	8	51	41,2	23,5	5,9
23F	10	30	0	0	7	42,9	14,3	14,3	21	9,5	0	0	38	21,1	2,6	2,6
<b>Всего ПКВ7</b>	<b>25</b>	<b>48,0</b>	<b>24,0</b>	<b>4,0</b>	<b>46</b>	<b>28,3</b>	<b>13,0</b>	<b>2,2</b>	<b>80</b>	<b>33,75</b>	<b>12,5</b>	<b>3,75</b>	<b>151</b>	<b>34,4</b>	<b>14,6</b>	<b>0,6</b>
1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0
<b>Всего ПКВ10</b>	<b>27</b>	<b>44,4</b>	<b>22,2</b>	<b>3,7</b>	<b>46</b>	<b>28,3</b>	<b>13,0</b>	<b>2,2</b>	<b>80</b>	<b>33,75</b>	<b>12,5</b>	<b>3,75</b>	<b>153</b>	<b>34,0</b>	<b>14,4</b>	<b>2,6</b>
3	2	0	0	0	17	5,9	0	0	5	20	0	0	24	8,3	0	0
19A	2	100	50	0	7	100	57,1	28,6	2	100	50	50	11	100	54,5	27,3
<b>Всего ПКВ13</b>	<b>31</b>	<b>45,2</b>	<b>22,6</b>	<b>3,2</b>	<b>70</b>	<b>30,0</b>	<b>14,3</b>	<b>4,2</b>	<b>87</b>	<b>33,3</b>	<b>12,6</b>	<b>4,6</b>	<b>188</b>	<b>34,6</b>	<b>14,9</b>	<b>3,7</b>
8	0	0	0	0	2	50	0	0	1	100	0	0	3	33,3	0	0
10A	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
12F	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	2	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0	2	100	0	0	2	100	0	0
17F	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
34	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
35F	1	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	1	0	0	0
n\т	4	25	0	0	8	12,5	0	0	39	95,9	17,9	7,7	51	76,5	13,7	7,8
<b>Всего</b>	<b>36</b>	<b>47.2</b>	<b>19,4</b>	<b>2.8</b>	<b>81</b>	<b>34.6</b>	<b>12,5</b>	<b>3.9</b>	<b>133</b>	<b>33.1</b>	<b>13,5</b>	<b>5.3</b>	<b>250</b>	<b>32.5</b>	<b>9,6</b>	<b>4.8</b>

Значительная роль *S.pneumoniae* серотипа 3 в этиологии ОСО (21% случаев) проявилась в несколько меньшей частоте устойчивости среди пневмококков, выделенных от пациентов с отитами в сравнении с другими группами.

### Распространение генов ворсинок

Результаты детекции ворсинок у *S. pneumoniae*, выделенных у здоровых детей при носительстве, приведены в Таблице 7. Всего было проанализировано 133 штамма от больных ОСО и бессимптомных носителей.

Таблица 7. Частота продукции различных типов ворсинок у *S. pneumoniae*, выделенных у здоровых детей при носительстве и при остром среднем отите

Пациенты	Тип ворсинок			
	PI-1		PI-2	
	n (%)	Серотипы (n)	n (%)	Серотипы (n)
Носительство, n=51	10 (19.6%)	6ABC(3), 14(2), 23F(2), 19A(1), 19F(1), 18ABCF(1)	7 (13,7%)	23F(2), 19A(2), 19F(2), 8 (1)
Острый отит, n=52	14 (25%)	6ABC(5), 23F(2), 19A(2), 19F(2), 9VA(2), 0 18ABCF(1)	0	-
Всего, n=103	24 (23,3%)	14(2), 6ABC(8), 23F(4), 19A(3), 19F(3), 9VA(2), 18ABCF(2)	7 (6,8)	23F(2), 19A(2), 19F(2), 8 (1)

Как следует из материалов таблицы, существенных различий в частоте выявления ворсинок I типа между изолятами, выделенными при остром отите и при носительстве, выявить не удалось. В то же время ворсинки II типа выявляли только среди изолятов, выделенных при носительстве. Возможно, что ворсинки II типа играют более важную роль в колонизации слизистой оболочки верхних дыхательных путей и не участвуют в процессе проникновения в полость среднего уха.

### Мультилокусное сиквенс-типирование

Была проанализирована выборка из 82 изолятов (Рис. 7), из которых 33 штамма от больных инвазивными формами пневмококковых заболеваний (63 % из них устойчивые к макролидам, 48 % - со множественной устойчивостью) и 48 штаммов от бессимптомных носителей (50% - устойчивые к макролидам, 25 % - мультирезистентные). В общей выборке 69,5 % всех изолятов проявляли устойчивость к макролидам и 37,8 % - множественную устойчивость к антибиотикам. Что касается распределения по серотипам, то самым распространенным оказался серотип 19F – 23,2 %, серогруппа 6 – 17,1%, серотип 19A составил 14,6% (80% штаммов, устойчивых к макролидам, 60% -мультирезистентных), 3 – 12,2 %, 23F - 4,9 %, прочие серотипы и нетипируемые штаммы составили 10,5%.



менингитами, по 8(34,7%) – от бессимптомных больных и больных ОСО. Следует отметить, что 320КК преобладает в исследованной выборке (более 30% всех штаммов), помимо него в значительной мере были представлены 505КК, 490КК, 315КК и 423КК. Принципиально важным моментом является обнаружение множественно устойчивых изолятов серотипов 19А и 19F, относящихся к клональному комплексу КК320. Известно, что на фоне массовой иммунизации 7-ми и 10-ти валентными конъюгированными вакцинами происходит быстрое распространение именно этой генетической линии.

### **Полногеномное секвенирование**

Всего было секвенировано в рамках конкретного исследования 13 изолятов *S.pneumoniae*, представляющих наиболее интересные группы, циркулирующие в Санкт-Петербурге. Штаммы 78, 133, 148, 349, 438 характеризовались множественной устойчивостью к антибактериальным препаратам, были выделены от больных с острыми формами ОСО и ВВП и принадлежали к серотипам 19А/F, а также к общему клональному комплексу КК320. Штамм 198 также обладающий множественной устойчивостью к антибактериальным препаратам и относящийся к КК320 представлял отдельный интерес, так как являлся носителем нехарактерного для данного клонального комплекса серотипа 9VA. Изолят 3733 был выделен от бессимптомного носителя и относился к отличному от КК320 глобальному клональному комплексу, который интересен увеличением в нем доли множественно устойчивых линий серотипа 19А. Штаммы 154, 158 и 322 проявляли чувствительность к большинству антибиотиков, относились к 3 серотипу, доля которого в российской популяции выше среднемирового уровня. Риды и собранные драфт-геномы были загружены в глобальную публичную базу данных Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), в рамках проекта ID 422173. Был осуществлен первичный биоинформатический анализ секвенированных штаммов, проведена оценка распределения детерминант резистентности к основным антибактериальным препаратам. В целом можно сказать, что впервые в России было проведено полногеномное секвенирование изолятов *S.pneumoniae*, и с его помощью были заложены предпосылки для будущих фундаментальных исследований биологии бактерии, в том числе факторов отвечающих за патогенез и вирулентность.

### **ОБСУЖДЕНИЕ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Пневмококковые инфекции по-прежнему остаются одной из главных причин детской смертности. Долгое время основным способом детекции возбудителя оставались микробиологические методы. Однако, стоит заметить, что они во многом лимитированы по времени, и зачастую их эффективность крайне мала, в частности, при детекции патогена в крови и ряде других типов клинического материала.

Всего было обработано и исследовано 1024 образца клинического материала (542 образца крови и 482 образца аспирата среднего уха) и 250 изолятов чистых культур *S.pneumoniae*. В ходе исследования был усовершенствован его дизайн, что позволило максимально быстро и эффективно проводить анализ популяции. При получении образца клинического материала производился его посев на различные питательные среды, и ставилась ПЦР реакция на наличие пневмококковой ДНК в пробе, в качестве мишени для идентификации возбудителя было решено остановиться на гене *LytA*. Такие традиционные мишени, как например, ген 16s РНК субъединицы в случае *S.pneumoniae*, не позволяют с достаточной точностью отделить пневмококк от родственных видов, что чревато высоким процентом ложноположительных результатов. При положительном результате ставилась ПЦР реакция на наличие гена капсульной оболочки *cpsA*, и далее проводилось серотипирование с использованием схемы мультиплексной реакции, адаптированной под серотиповый состав пневмококковой популяции Санкт-Петербурга. В случае роста чистой культуры проводилось определение устойчивости штамма к антибактериальным препаратам методом серийных разведений, и параллельно ставилась ПЦР реакция на наличие *mef/erm* генов,

детерминирующей устойчивостью к макролидным антибиотикам. Для части штаммов выборочно определялся сиквенс-тип с помощью методики МЛСТ-типирования.

Среди 482 исследованных образцов аспирата среднего уха 192 (41,8%) были положительными на предмет наличия пневмококковой ДНК, в 62 (12,8%) удалось получить жизнеспособную культуру. Результаты серотипирования для чистых культур и клинического материала, полученных из одних и тех же образцов, полностью совпали. Если рассматривать распределение частоты случаев ОСО пневмококковой этиологии по возрастным группам, то наблюдается преобладание случаев заболевания у детей младшей группы (0-2 года) – 62,6%; у прочих возрастных групп доля пневмококковых отитов снижается: до 41% - у детей среднего возраста (2 - 5 лет) и до 26,4% - у детей старшей возрастной группы (5-18 лет). Из чего можно сделать вывод о том, что группой риска, наиболее подверженной пневмококковым отитам, являются именно дети младшего возраста (до 5 лет). По всей видимости, это обусловлено еще не до конца сформировавшейся микрофлорой и иммунной системой организма.

Среди образцов крови от больных ВБП следы пневмококковой ДНК были обнаружены в 94 образцах из 542 (16, 8%). Чистую культуру удалось получить лишь в единичных случаях. Стоит отметить, что процент положительных проб был выше у взрослых пациентов (старше 18 лет), пневмококковая ДНК была найдена в 35 образцах из 94 (37,2%). В это же время в возрастной категории до 18 лет было определено только 56 положительных результатов из 379 (12,4%).

Исследование распределения серотипов в популяции дало следующие результаты. У детей, больных ОСО серотипы, входящие в ПКВ7/10, составили 53,6% от общего количества, при этом вместе с серотипами ПКВ13 эта цифра уже составляла 77,1% популяции, доля невакцированных серотипов составила 12,9%, 10% представляли нетипируемые штаммы. Интересно, что процент встречаемости серотипов отличался в зависимости от возрастной группы, так, для детей младшей группы (0<2 лет) процент серотипов, входящих в ПКВ7/10 и ПКВ13, составлял, соответственно, 64,9% и 87,8%, для категории среднего возраста от 2 до 5 лет – 57,3% и 80,1%, у детей старшей группы (5<18 лет) процент вакцинных серотипов падал до 32% и 56,5%, соответственно. У больных внебольничной пневмонией распределение серотипов по возрастным группам отличалось и составило 55,4% и 67,9% для ПКВ7/10 и ПКВ13 у возрастной группы до 18 лет и 42,9% и 68,6%, соответственно, для ПКВ7/10 и ПКВ13 у группы старше 18 лет. Анализ распределения серотипов в чистых культурах дал следующие результаты: всего в ПКВ7/10 и ПКВ13 были представлены, соответственно, 60,3% и 77,9% серотипов. В том числе, для культур, выделенных от больных ОСО, эти показатели составляли 56,8% и 83,9%, для культур, полученных от больных пневмонией - 75% и 86,1%, для культур, выделенных от здоровых носителей – 59,4% и 63,9% соответственно. Исходя из результатов, показывающих значительно больший процент отитов пневмококковой этиологии у детей младшего возраста, а также, соображений, что именно у этой категории течение болезни сопряжено с максимальными рисками, напрашивается вывод об актуальности вакцинирования именно детей младшего возраста.

Для всех случаев, когда удалось выделить чистую культуру, была проведена оценка чувствительности к антибиотикам. Были получены следующие результаты: к пенициллину было устойчиво 9,6% всех изолятов, к амоксициллину - 2%, к цефотаксиму и цефтаролину - по 1,2%, к клиндамицину - 14%, к эритромицину – 31,2%, к тетрациклину – 33,2%, к хлорамфениколу – 46,2%. Значительный процент популяции показывал промежуточные значения устойчивости, так, в случае пенициллина, 22,8% штаммов показывали значения МПК от 0,06 до 2,0 мкг/мл включительно, следовательно, при лечении заболеваний, вызванных подобными штаммами, должны использоваться более высокие дозировки антибиотика. Так, EUCAST рекомендует при лечении пневмонии, вызванной *S. pneumoniae* с МПК  $\leq 0.5$  мкг/мл, использовать пенициллин в суточной дозировке 7,7 млн ЕД. При МПК возбудителя  $\leq 1.0$  мкг/мл рекомендуется суточная доза 11,4 – 15,4 млн ЕД, а при МПК  $\leq 2.0$  мкг/мл необходима доза до 24 млн. ЕД. В целом, можно сделать вывод, что амоксициллин, цефотаксим и цефтаролин по-прежнему показывают высокую эффективность, интерпретация

результатов чувствительности к пенициллину и амоксициллину вызывает определенные трудности в связи с различными критериями EUCAST и CLSI. Исходя из полученных данных, очевидна необходимость снижения доли макролидных антибиотиков при терапии пневмококковых инфекций, вследствие их малой эффективности и общего роста количества резистентных к ним изолятов. Истоки данного процесса лежат, как в повсеместном распространении глобальных клональных комплексов, так и в некорректном использовании антибиотиков терапевтами и населением.

По итогам исследования подтвердилась традиционно высокая устойчивость к антибактериальным препаратам штаммов 19А серотипа. Все 11 изолятов этого серотипа проявляли выраженное в разной степени снижение чувствительности к пенициллину, а также отличались в сравнении с другими серотипами с наиболее высокой частотой устойчивости амоксициллину, цефотаксиму, цефтаролину, эритромицину и тетрациклину. Серотип 19А уступал другим серотипам только по частоте устойчивости к хлорамфениколу и котримоксазолу. Для других распространенных серотипов (19F, 6А/В/С и 14), также была характерна высокая частота устойчивости к пенициллину, варьирующая приблизительно от 30% до 60% и к эритромицину от 29% до 46%. Далее в порядке снижения частоты устойчивости следовали серотипы 9V/L и 23F. Серотипы 1, 18А/В/С, 12F, 15, 35F, 10А, 17F и 34 были представлены единичными изолятами и, в большинстве случаев сохраняли чувствительность к антибиотикам. Следует отметить относительно высокую частоту устойчивости к антибиотикам среди нетипируемых изолятов, которые были выделены в основном от здоровых носителей. Важной особенностью была низкая частота устойчивости среди достаточно распространенного серотипа 3. Из 24 изолятов этого серотипа лишь единичные проявляли снижение чувствительности к пенициллину, эритромицину и другим антибиотикам. Значительная роль *S. pneumoniae* серотипа 3 в этиологии ОСО (21% случаев) проявилась в несколько меньшей частоте устойчивости среди пневмококков, выделенных от пациентов с отитами в сравнении с другими группами.

Механизмы, отвечающие за вирулентность *S.pneumoniae*, до конца не раскрыты. Считается, что основным фактором вирулентности пневмококка является капсула. Однако, серьезный интерес представляет еще целый ряд факторов, потенциально имеющих значение в регуляции механизмов адгезии к клеткам эпителия хозяина. В первую очередь речь идет о ворсинках-пили. У пневмококка было найдено 2 типа пили и до сих пор их роль в биологии бактерии остается до конца не ясной. Было проанализировано 133 изолята *S.pneumoniae*, выделенных от больных ОСО и бессимптомных носителей. К сожалению, корреляции в частоте выявления ворсинок I типа между штаммами разной этиологии выявить не удалось, при этом ворсинки II типа были найдены только у штаммов, полученных при носительстве. Подобные неопределенные результаты не дают право сделать какие-либо четкие выводы о роли пили в патогенезе пневмококка и позволяют лишь выдвинуть гипотезу о возможной роли ворсинок II типа в колонизации верхних дыхательных путей и отсутствии их роли в проникновении бактерий в полость среднего уха.

По итогам МЛСТ-типирования была проведена оценка связи циркулирующих в популяции штаммов с глобальными клональными комплексами. В общей выборке 69,5 % всех изолятов проявляли устойчивость к макролидам и 37,8 % - множественную устойчивость к антибиотикам. По результатам анализа было выявлено, что циркулирующие в популяции штаммы представлены восьмью клональными комплексами, из которых наибольшее представительство имеют КК320 и КК505. Клональный комплекс 320 известен благодаря тому, что в основном он представлен глобально распространенными линиями 19А/Г серотипов, для которых характерна множественная устойчивость к целому ряду антибактериальных препаратов. В проанализированной выборке КК320 представлен 23 изолятами (24,6%) и является самой большой группой из всех представленных в локальной популяции. Были определены следующие сиквенс-типы, входящие в него: СТ236 (6 штаммов), СТ271 (2), СТ320 (3), СТ1464 (3), СТ1834(1), СТ2323(1), СТ2697 (1), СТ2812 (2), СТ3971 (1). Серотип 19F абсолютно преобладал и был представлен 15 штаммами из 20, серотип 19А был

представлен 4 изолятами, 1 штамм относился к серотипу 9VA. Штаммы серотипа 3, циркулирующие в Санкт-Петербурге, относились к СТ505, 180, 239, 6202, 1025, 10002, наиболее широко был представлен СТ505 (4 штамма из 10) и СТ180 (2 штамма из 10). Практически все вышеперечисленные сиквенс-типы относятся к одному глобальному комплексу КК505/180 и достаточно близки друг к другу филогенетически. Что интересно, все изоляты СТ505 проявляли чувствительность к антибактериальным препаратам и были выделены от бессимптомных носителей. Особняком в этой группе стоит изолят СТ239, выделенный из аспирата среднего уха больного ОСО ребенка и проявляющий устойчивость (или промежуточную устойчивость) к целому ряду антибактериальных препаратов. Следует заметить, что данный штамм выделяется из общей группы и филогенетически.

Впервые в России было осуществлено масштабное полногеномное секвенирование основных клональных линий *S. pneumoniae*. Была проделана первичная биоинформатическая обработка полученных данных. Все изоляты были добавлены в глобальную базу данных Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Были заложены предпосылки для дальнейшего детального изучения механизмов распространения резистентности к антибактериальным препаратам, вирулентности бактерии, фундаментальных основ ее биологии.

Стоит отметить, что данные, полученные в нашей лаборатории, во многом совпали с данными других российских групп, изучающих пневмококк (Таточенко, 2014; Маянский, 2017). Серотипы 19F, 23F, серогруппа 6 являлись преобладающими в локальной популяции, крайне интересен факт высокой доли серотипа 3. Так же, как и в остальном мире, наблюдается тенденция по увеличению доли 19A серотипа, который ассоциирован с мультирезистентными глобальными клональными комплексами КК320 и КК423. Полученные в ходе работы данные позволили во многом оценить потенциальную эффективность конъюгированных пневмококковых вакцин относительно структуры популяции *S. pneumoniae* в России. Разница в охвате серотипов между ПКВ7/10 и ПКВ13 колебалась в диапазоне 20-25% для разных этиологических и возрастных групп. Результаты исследования повлияли на принятие решения об интродукции 13-валентной вакцины в Национальный календарь прививок.

*S. pneumoniae* является крайне изменчивым организмом, способным эффективно адаптироваться под воздействием окружающей среды. Вакцинопрофилактика и антибиотикотерапия являются в данных условиях мощнейшими факторами селективного отбора, направляющими вектор эволюции популяции в сторону превалирования мультирезистентных штаммов с ранее редко встречающимися серотипами. Очевидным выводом из констатации этого факта является необходимость перманентного мониторинга изменений генетической структуры популяции, в частности, серотипового состава, и своевременной детекции новых клональных линий, устойчивых к антибактериальным препаратам. К сожалению, в Российской Федерации данной проблеме долгое время уделялось недостаточное внимание. На базе лаборатории молекулярной микробиологии и эпидемиологии ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России создана сеть центров, охватывающих всю страну, занимающихся сбором клинического материала и изучением динамики генетических изменений в популяции пневмококка. Для анализа и предсказания возможных изменений в работе активно начали использоваться самые современные биоинформатические и молекулярные методы, что в целом говорит о положительной динамике в решении столь важного вопроса.

## ВЫВОДЫ

1. Среди штаммов *S. pneumoniae*, вызывающих ОСО, ВВП и здоровое носительство у детей, преобладали серотипы: 19F, 23F, 3, 6. Показано, что ПКВ 7/10 охватывают 53,6% при остром среднем отите, 49,5% - при внебольничной пневмонии, 60,3% - при здоровом носительстве. Для ПКВ13 данные цифры составляют 77,1, 68,2%, 66,4%, соответственно. Степень покрытия циркулирующих в популяции серотипов значительно выше для вакцины ПКВ13.
2. Для изолятов *S. pneumoniae* циркулирующих в Санкт-Петербурге характерны следующие показатели устойчивости к антибактериальным препаратам: к пенициллину устойчиво 9,6% всех изолятов, к амоксициллину - 2%, к цефотаксиму и цефтаролину - по 1,2%, к клиндамицину - 14%, к эритромицину - 31,2%, к тетрациклину - 33,2%, к хлорамфениколу - 46,2%.
3. В популяции пневмококков Санкт-Петербурга, вызывающих острый средний отит и внебольничную пневмонию, а также выделенных от здоровых носителей, наиболее широко представлены глобальные генетические линии, относящиеся к клональным комплексам КК320, КК505, КК315 и КК423.
4. Впервые в России было осуществлено полногеномное секвенирование представителей основных линий *S. pneumoniae*, циркулирующих в Санкт-Петербурге. Были заложены предпосылки для дальнейшего детального изучения механизмов распространения резистентности к антибактериальным препаратам, вирулентности бактерии, фундаментальных основ ее биологии.
5. Представлено научное обоснование включения в Национальный календарь прививок конъюгированной 13-валентной вакцины, для профилактики пневмококковых инфекций у детей младшего возраста. По итогам оценки уровня устойчивости к антибактериальным препаратам рекомендовано отказаться от использования макролидных антибиотиков для лечения пневмококковых заболеваний.

## Практические рекомендации

1. Для своевременной коррекции состава антипневмококковых вакцин рекомендуется мониторинг серотипового состава циркулирующих в популяции штаммов *S. pneumoniae*.
2. При формировании региональных протоколов антибактериальной терапии инвазивных инфекций, вызванных *S. pneumoniae*, наряду с обязательным мониторингом показателей чувствительности к основным антибактериальным препаратам, следует исключить из препаратов первой линии макролидные антибиотики, а в качестве стартовых - применять бета-лактамы антибиотики, такие как пенициллин и амоксициллин.
3. С целью повышения эффективности оценки эпидемической ситуации рекомендуется применять адаптированные под серотиповый пейзаж конкретной локальной популяции схемы мультиплексных реакций ПЦР-типирования капсульных антигенов *S. pneumoniae*.

## Список опубликованных работ по теме диссертации

1. Перова А.Л. Клинические и бактериологические особенности острых средних отитов у детей в возрасте до 5 лет: предварительные данные/ А.Л. Перова, А.А. Рулева, С.С. Беланов, С.М. Харит, С.В. Сидоренко// Педиатрическая фармакология.- 2012.- Т. 9, № 5.- С. 22-26. Цит. РИНЦ = 8. Цит. Google Scholar = 8.

2. **Belanov S.** Etiology of acute otitis media and pneumococcal serotypes in children from Saint-Petersburg/ **S. Belanov**, V. Gostev, M. Volkova// *Clinical Microbiology & Infection*.-2012.- Т. 18, Suppl.№ 3.- С. 314. Цит. РИНЦ = 1. Цит. Google Scholar = 2. IF = 5.292.
3. Лобзин Ю.В. Серотипы *Streptococcus pneumoniae*, вызывающих ведущие нозологические формы пневмококковых инфекций/ Ю.В. Лобзин, С.В. Сидоренко, С.М. Харит, **С.С. Беланов**, М.О. Волкова, В.В. Гостев, С.И. Алексеенко, С.И. Петрова, Е.В. Сергеева, И.С. Королева, А.В. Орлов, Е.Я. Фролова// *Журнал инфектологии*.- 2013.- Т. 5, № 4.- С. 36-42. Цит. РИНЦ = 29. Цит. Google Scholar = 37.
4. Калиногорская О.С. Антибиотикорезистентность и серотиповый состав *Streptococcus pneumoniae*, выделенных у детей в Санкт-Петербурге в 2010-2013 гг./ О.С. Калиногорская, **С.С. Беланов**, М.О. Волкова, В.В. Гостев, С.В. Сидоренко// *Антибиотики и химиотерапия*.- 2015. - Т. 60, № 1-2.- С. 10-18. Цит. РИНЦ = 17. Цит. Google Scholar = 19.
5. Цветкова И.А. SNP-Полиморфизм в геномах изолятов *Streptococcus pneumoniae* CC320, устойчивых к бета-лактамам антибиотикам/ И.А. Цветкова, М.О. Волкова, О.С. Калиногорская, **С.С. Беланов**, В.В. Гостев, С.В. Сидоренко// *Антибиотики и химиотерапия*.- 2016.- № 11-12.- С. 21-27.

#### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БАЛ	Бронхоальвеолярный лаваж
ВИЧ	Вирус иммунодефицита человека
ВОЗ	Всемирная Организация Здравоохранения
ВБП	Внебольничная пневмония
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
ЖКТ	Желудочно-кишечный тракт
МПК	Минимальная подавляющая концентрация
ОСО	Острый средний отит
ПКВ(PCV)	Пневмококковая конъюгированная вакцина
ППВ	Пневмококковая полисахаридная вакцина
ПСБ	Пенициллинсвязывающий белок
ПЦР	Полимеразная цепная реакция
CLSA	Комитет по клиническим и лабораторным исследованиям США
ЦНС	Центральная нервная система
PMEN	Pneumococcal Molecular Epidemiology Network,
MLST(МЛСТ)	Multy locus sequence typing, Мультилокусное сиквенс типирование
СС(КК)	Clonal Complex, Клональный Комплекс
ST(СТ)	Sequence-type, Сиквенс-тип