

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«ДЕТСКИЙ НАУЧНО-КЛИНИЧЕСКИЙ ЦЕНТР ИНФЕКЦИОННЫХ  
БОЛЕЗНЕЙ ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО  
АГЕНТСТВА»  
ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА РОССИИ**

*На правах рукописи*

**БЕЛАНОВ СЕРГЕЙ СЕРГЕЕВИЧ**

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

03.02.03 – микробиология

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, профессор  
Сидоренко Сергей Владимирович

**Санкт-Петербург – 2018 г.**

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	15
1.1. Общая характеристика <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	15
1.2. Факторы вирулентности <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	17
1.2.1. Капсула .....	17
1.2.2. Прочие факторы вирулентности .....	18
1.3 Клиническое значение и эпидемиология <i>S. pneumoniae</i> .....	21
1.4. Генетическое разнообразие <i>S. pneumoniae</i> .....	23
1.5. Основные механизмы устойчивости к антибиотикам .....	23
1.5.1. Снижение проницаемости мембраны .....	24
1.5.2. Эффлюкс антибиотика .....	24
1.5.3. Инактивация антибактериальных агентов .....	24
1.5.4. Специфические механизмы устойчивости <i>S. pneumoniae</i> .....	25
1.5.5. Устойчивость к макролидам .....	25
1.5.6. Устойчивость к фторхинолонам .....	27
1.5.7 Устойчивость к бета-лактамам .....	27
1.6. Распространение глобальных клональных комплексов .....	32
1.7. Методы идентификации и типирования <i>S. Pneumoniae</i> .....	33
1.7.1 Методы, основанные на морфологических особенностях .....	33
1.7.2 Фенотипические методы .....	33
1.7.3 Серологический метод .....	34
1.8. Профилактика и лечение пневмококковых инфекций .....	35
1.8.1 Антибиотикотерапия .....	36
1.8.2 Вакцинопрофилактика пневмококковых инфекций .....	37
1.9. Распределение серотипов в популяции <i>S. pneumoniae</i> в России. ....	43
1.10. Заключение по обзору литературы .....	45
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	47
2.1. Общий дизайн исследования .....	47

2.2. Микробиологические методы.....	49
2.3. Молекулярные методы.....	51
2.4. Детекция генов ворсинок.....	56
2.5. Мультилокусное сиквенс-типирование.....	59
2.6. Полногеномное секвенирование.....	61
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	64
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ОЦЕНКИ СЕРОТИПИЧНОГО СОСТАВА <i>S.PNEUMONIAE</i> , ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ.....	64
3.1. Серотиповый состав <i>S. pneumoniae</i> вызывающих острый отит у детей	64
3.2. Серотиповый состав <i>S. pneumoniae</i> , вызывающих внебольничную пневмонию.....	66
3.3. Серотиповый состав <i>S. pneumoniae</i> , выделенный у здоровых детей при носителстве.....	68
3.4. Заключение по главе 3.....	68
ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ ОЦЕНКИ УРОВНЯ УСТОЙЧИВОСТИ <i>S.PNEUMONIAE</i> К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ.....	72
4.1. Резистентность <i>S. pneumoniae</i> к бета-лактамам антибиотикам.....	72
4.2. Резистентность к макролидам и линкозамидам.....	73
4.3. Антибиотикорезистентность среди изолятов <i>S. pneumoniae</i> , принадлежащих к различным серотипам.....	77
4.4. Заключение по главе 4.....	79
ГЛАВА 5. РЕЗУЛЬТАТЫ ОЦЕНКИ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ВОРСИНОК В ПОПУЛЯЦИИ <i>S.PNEUMONIAE</i> .....	86
5.1. Распространение ворсинок в популяции <i>S. Pneumoniae</i> .....	86
5.2. Заключение по главе 5.....	87
ГЛАВА 6. РЕЗУЛЬТАТЫ МУЛЬТИЛОКУСНОГО СИКВЕНСТИПИРОВАНИЯ ПОПУЛЯЦИИ <i>S.PNEUMONIAE</i> .....	88
6.1. Мультилокусное сиквенстипирование популяции <i>S. pneumoniae</i> .....	88
6.2. Заключение по главе 6.....	92

ГЛАВА 7. РЕЗУЛЬТАТЫ ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ <i>S.PNEUMONIAE</i> .....	94
7.1. Полногеномное секвенирование популяции <i>S. pneumoniae</i> .....	94
7.2. Заключение по главе 7 .....	98
ГЛАВА 8. ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	98
ВЫВОДЫ.....	101
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	103
СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ .....	131
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ .....	134

## ВВЕДЕНИЕ

### **Актуальность**

*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 [47]. В подавляющем большинстве случаев, пребывание пневмококков в носоглотке ребенка не сопровождается болезненными проявлениями и характеризуется как бессимптомное носительство. Длительность носительства колеблется от 2 – 3 недель до 3 – 4 месяцев. Элиминация бактерий происходит в результате формирования специфического иммунного ответа на капсульные полисахариды бактерий, а также на некоторые поверхностные белки [18].

Клинически выраженные инфекции на фоне носительства развиваются лишь в незначительной (менее 5%) части случаев, их принято делить на поверхностные (мукозальные) и инвазивные. К первым относят острый отит и синусит, ко вторым – менингит и бактериемию без явного очага инфекции. Критерием инвазивной инфекции является выявление пневмококков из первично стерильного локуса организма человека – из крови или спинномозговой жидкости. Одна из наиболее частых пневмококковых инфекций – пневмония, может протекать и как поверхностная, и как инвазивная [52]. 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 различия в генетической предрасположенности человека к инфекции [35].

Чаще всего пневмококковые инфекции развиваются у детей и лиц пожилого возраста, у больных хроническими заболеваниями и

иммунокомпрометированных пациентов. Согласно последним оценкам, ежегодно только среди детей до 5 лет регистрируется более 14 миллионов случаев тяжелых пневмококковых инфекций, из них около 800 тысяч заканчиваются летальными исходами [1, 16, 41, 56, 61, 163].

Для обоснования эффективных методов 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 наблюдали значительные различия в распространенности отдельных серотипов между географическими регионами [129]. 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 38%, но возросла этиологическая роль других серотипов, в дальнейшем, после внедрения в 2010 г 13-валентной вакцины (ПКВ-13) была отмечена тенденция к снижению частоты серотипов, входящих в эту вакцину [178]. 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 [24].

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 [124]. 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%. В эпидемиологии антибиотикоустойчивых пневмококков значительные изменения произошли после начала массового применения пневмококковых конъюгированных вакцин. На фоне применения ПКВ-7 вначале наблюдают снижение частоты устойчивости, а затем ее рост, во многом за счет серотипа 19А. После внедрения ПКВ-13 роль серотипа 19А снижается, однако, появляются новые антибиотикоустойчивые серотипы [197]. В целом следует признать, что, по опыту США, современные антипневмококковые вакцины могут приводить к временному снижению

частоты распространения антибиотикоустойчивых штаммов, но не обеспечивают длительного и стабильного снижения уровня антибиотикорезистентности пневмококков [130][154].

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 явным, что в ответ на массовую иммунизацию и широкое использование антибиотикотерапии 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 [4]. 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 детей с острым средним отитом, внебольничной пневмонией, здоровым носительством, а также взрослых с внебольничной пневмонией, охарактеризован серотиповый состав пневмококков, циркулирующих в Санкт-Петербурге, оценен вероятный охват пневмококковой популяции 7-ми, 10-ти и 13-ти валентными конъюгированными вакцинами.

Установлено, что распространение среди *S. pneumoniae* устойчивости к макролидным и бета-лактамным антибиотикам в Санкт-Петербурге связано с циркуляцией глобальных генетических линий СС320/271, СС315/9 и СС423/15.

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

### **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).

### **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.

#### **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 19А.

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, капсульному ПЦР-серотипированию и МЛСТ-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 101 странице 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.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Общая характеристика *Streptococcus pneumoniae*

В 1881 году Луи Пастер во Франции и Джордж М. Стернберг в США независимо друг от друга описали ланцетовидные пары коккоподобных бактерий и получили чистую культуру пневмококка из крови кролика, которому была введена слюна инфицированного человека [169, 192]. В восьмидесятих годах XIX века микроорганизм впервые назван «*pneumococcus*», так как было продемонстрировано, что он является возбудителем пневмонии [108], а также менингита и среднего отита [46]. В 1902 году Neufeld демонстрирует способность капсулы набухать под действием гомологических антисывороток (Quellung reaction), что явилось открытием, позволившим серотипировать штаммы пневмококков. В 1926 году пневмококк получил название "*Diplococcus pneumoniae*" [206], а свое современное название "*Streptococcus pneumoniae*" микроорганизм получил в 1974 году из-за способности образовывать длинные цепочки в жидкой среде [101].

Согласно современным таксономическим представлениям *Streptococcus pneumoniae* относится к *Filum Firmicutes* классу *Bacilli*, порядку *Lactobacillales*, семейству *Streptococcaceae*, роду *Streptococcus*. Одним из важнейших признаков дифференцировки бактерий в пределах рода *Streptococcus* является характер гемолиза на средах, содержащих эритроциты. Полный гемолиз эритроцитов и просветление среды (бета-гемолиз) вызывают *S. pyogenes*, *S. agalactiae* и ряд других стрептококков. *S. pneumoniae* относится к стрептококкам, вызывающим при культивировании в аэробных условиях зеленоватое прокрашивание вокруг колоний – альфа-гемолиз. Для обозначения этой группы используют различные термины – «не-бета-гемолитические», «альфа-гемолитические», «зеленящие» стрептококки (*viridans streptococci*) [38]. До настоящего времени у этих бактерий не выявлено ферментов или токсинов, вызывающих разрушение эритроцитов.

Наблюдаемый эффект связывают с продукцией бактериями перекиси водорода, вызывающей частичное разрушение эритроцитов. В анаэробных условиях перекись водорода не образуется, и гемолиз не происходит [134].

Пневмококки являются грамположительными диплококками (размером 0,5 - 1,5 мкм), имеют несколько удлиненную форму, причем стороны, обращенные друг к другу, плоские, а концы заостренные. В жидкой среде *Streptococcus pneumoniae* образует цепочки, а на твердой среде формирует колонии с углублением в центре, которое образуется в результате действия пневмококковых аутолизинов [134].

Пневмококки относятся к оксидаза- и каталаза-негативным факультативно анаэробным бактериям, рост которых усиливается при повышении содержания углекислого газа в атмосфере инкубации до 5-7% [181]. Пневмококк является "привередливым" микроорганизмом, требующим для роста на искусственных питательных средах высокого содержания аминного азота и нативного белка животного происхождения, поэтому в состав питательных сред должны входить аминокислоты (лизин, аргинин, метионин, треонин, гистидин, глицин, цистеин, аспарагин, изолейцин, валин и глютаминовая кислота), а также витамины группы В [5, 6].

Строение клеточной стенки пневмококков типично для грамположительных бактерий. Ее основой является пептидогликан со встроенными углеводами, тейхоевыми кислотами, липопротеинами и поверхностными белками. Пептидогликан - макромолекулярная структура, расположенная на внешней стороне цитоплазматической мембраны бактерий. Его основные функции – осмотическая защита клетки, поддержание ее формы. Кроме того, пептидогликан вовлечен в процесс деления и выполняет антигенные функции. Прикрепление пневмококков к эпителиальной клетке опосредовано наличием поверхностных белков-адгезинов, наиболее значимые из которых: пневмококковый поверхностный антиген А (PsaA), пневмококковый поверхностный протеин А (PspA), холин-связывающие белки (CbpA), гиалуронат лиаза (Hyl) [49].

Генетические характеристики пневмококков по-своему уникальны, в частности у них довольно легко происходит внутривидовая трансформация. Трансформирующая ДНК высвобождается в результате спонтанного лизиса части клеток популяции и становится доступной для эффективного связывания, транспортировки и встраивания в хромосому реципиента благодаря природной компетентности пневмококков. Трансформация была открыта в 1928 году, когда британский учёный Ф. Гриффит показал возможность переноса фактора вирулентности и превращения непатогенных штаммов *Streptococcus pneumoniae* в патогенные [44]. Горизонтальный обмен генетическими элементами в пределах вида и с близкородственными стрептококками (группы *viridans*) обеспечивает высокую гетерогенность популяции пневмококков, определяет пластичность генома, а также играет большую роль в приобретении антибиотикорезистентности [28, 46, 98].

Геном *S. pneumoniae* представлен хромосомной кольцевой ДНК, размер которой составляет 2038615 п.н., и плазмидами. Для референтного авирулентного штамма R6 (№ AE007317 в GeneBank) в 2001 году была прочитана последовательность генома [121]. В последующие годы геномы были расшифрованы еще для ряда пневмококковых штаммов, причем в последние годы количество секвенированных штаммов стало увеличиваться логарифмически [50, 51, 58]. Плазмидная ДНК пневмококков может содержать подвижные генетические элементы транспозоны, в состав которых входят гены, кодирующие резистентность к макролидам и линкозамидам [21, 77].

## **1.2. Факторы вирулентности *Streptococcus pneumoniae***

### **1.2.1. Капсула**

Патогенность *S. pneumoniae* в основном связана с поверхностными белками. Главным фактором вирулентности у пневмококков является полисахаридная капсула, выполняющая защитную функцию, препятствующая

фагоцитозу клетками иммунной системы хозяина. Было доказано, что некапсулированные штаммы в  $10^5$  раз менее вирулентны, чем штаммы, обладающие капсулой [145]. Вирулентность пневмококка определяется химическим составом капсулы. Большую часть пула антипневмококковых антител составляют антитела к антигенам капсулы. Капсула состоит из множества моносахаридов, объединенных в полисахариды, а также ряда несахаридных компонентов [41]. В настоящее время на основании различий в последовательности соединения капсульных олигосахаридов пневмококков, с одной стороны, и способности иммунной системы распознавать эти различия путем выработки специфических антител, с другой, выделяют более 90 (94 на сегодняшний день) серотипов пневмококков, включающих 22 отдельных серотипов и 72 серотипов, объединенных в 21 группу [41, 72].

Большинство (>90%) инвазивных заболеваний вызывается 23 серотипами, которые входят в широко используемую в настоящее время полисахаридную вакцину. Каждый серотип имеет характерные капсульные структуры, специфичность которых определяется различной последовательностью одинаковых для серогруппы полисахаридных комплексов [26, 140, 142].

### 1.2.2. Прочие факторы вирулентности

Некоторые пневмококковые белки, в том числе гиалуронат лиаза (*Hyl*) [141], пневмолизин (*Ply*) [105], нейроаминидазы (*NanA*, *NanB*), аутолизин (*LytA*) [141], холин-связывающий белок А (*CbpA*) [180], пневмококковый поверхностный антиген (*PsaA*) [184], адгезины PhtD и PhtE [49] и пневмококковый поверхностный протеин (*PspA*) [150] также могут быть использованы в качестве потенциальных вакцинных кандидатов. В основном, они участвуют в воспалительном процессе, вызванном инфекцией [116, 125, 187].

### 1.2.2. 1. Поверхностные белки.

Можно выделить четыре группы пневмококковых поверхностных белков, относящихся к факторам вирулентности: белки с LPxTG мотивом (13 у R6 и 19 у TIGR4), липопротеины (42 у R6 и 47 у TIGR4), семейство холин-связывающих белков (10 у R6 и 15 у TIGR4), а также группа не классических поверхностных белков, дополняющих белки мембранного якорного мотива [172].

#### Белки с LPxTG мотивом

Ковалентно связываются с пептидогликаном, после расщепления их LPxTG мотива сортазой [171]. Нейроаминидаза, содержащая LPxTG связывающий мотив, кодируются двумя генами: *nanA* и *nanB*. Основной функцией является отщепление сиаловой кислоты от гликопротеинов, гликопептидов и полисахаридов, расположенных на поверхности клеточной стенки хозяина. Наиболее ярким примером могут служить две цинк-металлопротеазы: *IgA*-протеаза и *Zmp-C*, отвечающие за отщепление антитела *IgA1* и внеклеточного матрикса [171].

#### Липопротеины

К пневмококковым липопротеинам относят *PspA* (пневмококковый поверхностный протеин), белки, отвечающие за ABC-транспорт марганца, а также олигопептидную пермеазу *Ami/AliAB*, необходимый компонент субстратного транспорта и процессов вирулентности. *PspA* находится на клеточной стенке и характерен для большинства штаммов пневмококка [93]. Основная функция заключается в обеспечении эффективной колонизации слизистых оболочек и последующей защите пневмококков от системы комплемента хозяина [179]. Несмотря на то, что антигенный состав *PspA* в значительной степени вариабельный, образование антител у экспериментальных животных в большей или меньшей степени обеспечивает защиту при введении различных штаммов пневмококков, что делает возможным создание в будущем вакцин на основе данного протеина [81, 82, 123].

### Холин-связывающие белки

*S. pneumoniae* может продуцировать от 13 до 16 СВР-белков, наиболее интересными из которых, как факторы вирулентности, являются аутолизины LytA, LytB и LytC [170]. Кроме этого данные белки являются частью таких важнейших биологических процессов, как синтез клеточной стенки, отделение дочерних клеток после деления, естественная генетическая трансформация. Действие этих ферментов в конечном итоге приводит к лизису клетки. Мутации гена *lytA* пневмококков приводят к значительному снижению вирулентности микроорганизма по сравнению со штаммами дикого типа [113, 143, 157].

### Неклассические поверхностные белки (NCSPs)

Данную группу представляют такие белки, как глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа и альфа-энолаза, необходимые составляющие углеводного метаболизма [79]. Другой представитель данной группы – белок RavA, отвечающий за адгезию к фибронектину. RavA является важным фактором вирулентности, участвующим в инвазии и регуляции воспалительного процесса при менингитах [90, 134].

#### **1.2.2.2. Пневмолизин (Ply)**

Белок с массой 53 kDa, относится к классу холестерол-зависимых цитолизинов, продуцируется всеми клиническими изолятами *S. pneumoniae* [191]. В отличие от большинства прочих пневмококковых факторов вирулентности, локализован в цитоплазме. Пневмолизин участник целого спектра биологических процессов, особенно важна его роль в раннем патогенезе пневмококковой инфекции. Фермент цитотоксичен по отношению к клеткам реснитчатого эпителия бронхов, кроме того, взаимодействие Ply с альвеолярными эпителиальными клетками и эндотелиальными клетками легких приводит к альвеолярному отеку и кровоизлиянию при пневмококковой пневмонии. Цитотоксическое действие пневмолизина может непосредственно ингибировать функцию фагоцитов и клеток иммунитета.

Низкие концентрации Ply могут ингибировать хемотаксис, бактерицидное действие, производство лимфокинов и иммуноглобулинов [80, 156]. Вирулентность и многочисленные функции пневмолизина, особенно на ранних стадиях пневмококковой инфекции, имеют решающее значение для пневмококковой колонизации хозяина. В настоящее время показано, что пневмолизин токсичен для всех клеток, имеющих в составе мембран холестерин [19, 126, 157].

### 1.3 Клиническое значение и эпидемиология *S. pneumoniae*

Пневмококки различных серотипов могут бессимптомно персистировать на слизистых оболочках полости рта и верхних дыхательных путей. Показано, что процент назофарингеального носительства пневмококка выше у детей до пяти лет (Driver, 2012; Маянский Н. А., Алябьева Н.М., Иваненко А.М., Пономаренко О.А., Катосова Л.К., Лазарева А.В., Куличенко Т.В., 2013). При этом, *S.pneumoniae* на протяжении многих лет остается одной из ведущих причин детской смертности. Противовирусную защиту нижних отделов дыхательных путей осуществляют механические факторы (аэродинамическая фильтрация, разветвление бронхов, надгортанник, кашель и чихание, колебательные движения ресничек мерцательного эпителия), а также механизмы неспецифического и специфического иммунитета. При нарушении равновесного состояния под действием различных эндогенных и экзогенных факторов (снижение эффективности защитных механизмов макроорганизма, массивность дозы микроорганизмов и/или их повышенная вирулентность) микроорганизмы могут проникать в близлежащие органы и ткани и/или кровеносное русло, вызывая различные заболевания [125, 134, 167, 203].

*Streptococcus pneumoniae* – наиболее частая причина внебольничной пневмонии у взрослых, требующая госпитализации в 30 - 70% случаев [166]. *S. pneumoniae* также является ведущей причиной бактериемий [146], менингитов [2], болезней верхних дыхательных путей и среднего отита [137]в

мире. Бактериemia присутствует примерно в 20 % случаев пневмококковой пневмонии у взрослых с летальностью от 10 до 30 % [160]. Смертность намного ниже у детей (<3 %) [204]. Инвазивным пневмококковым инфекциям, диагностируемым в случае выделения *S. pneumoniae* из обычно стерильных сайтов (кровь, цереброспинальная жидкость, хирургический аспират; плевральная, перикардальная, перитонеальная [186], наиболее часто подвержены маленькие дети (возраст 6 – 24 месяца), пожилые люди (старше 65 лет) и люди с нарушениями иммунного статуса [166]. По оценке Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) каждый год более 10 миллионов детей до 5 лет болеют пневмококковыми инфекциями с более чем 1.4 миллиона летальных исходов [194]. В Северной Америке и Европе ежегодно регистрируется от 15 до 40 случаев пневмококковой бактериемии на 100000 населения [83, 205]. В США в 2003 году 5600 случаев инвазивных пневмококковых инфекций из 35000 привели к летальному исходу у взрослых старше 18 лет; 44 % случаев инвазивных пневмококковых инфекций и 60 % смертности зарегистрировано у взрослых старше 65 лет. Следует сказать о значительной географической вариабельности инвазивных инфекций [109, 166, 188]. Так, в Европе ежегодная заболеваемость инвазивными инфекциями у детей до 2 лет намного ниже, чем в США, и составляет 16 – 35 случаев на 100000 и 160 – 180 случаев на 100000 соответственно [27, 127]. В середине 90-х годов отмечался рост частоты пневмококковой бактериемии в некоторых странах, в том числе в США [159], Бельгии [107], Швеции [119]. В Российской Федерации заболеваемость детей пневмонией составляет 10-30 случаев на 1000 (0,5-0,6 %)[7][9], при этом, в структуре смертности детей первого года жизни от болезней органов дыхания в 2003 г. доля пневмоний составила 68%. Наибольший уровень (27 на 100 тыс. детей) приходится на возраст 0-4 года [17, 18].

После введения гептавалентной пневмококковой конъюгированной вакцины (PCV7) в США в феврале 2000 года, частота возникновения инвазивных пневмококковых инфекций существенно понизилась и у детей, и

у невакцинированных взрослых [68, 188]. К сожалению, частота возникновения инвазивных пневмококковых инфекций, вызванных серотипами, не входящими в PCV7-вакцину, глобально растет [78]. Колебания уровня частоты инвазивных пневмококковых инфекций внутри стран могут быть связаны с клональным распространением или другими факторами [29, 152].

#### **1.4. Генетическое разнообразие *S. pneumoniae***

*S. pneumoniae* – бактерия, отличающаяся невероятно высоким генетическим и популяционным разнообразием, а также скоростью адаптации к изменяющимся условиям окружающей среды. В результате анализа первых полногеномных сиквенсов штаммов R6 и TIGR4 было показано насколько же сильно могут различаться изоляты внутри этого вида [121, 195]. Два генома отличались размером (2,6 Mb у R6, 2,16 Mb у TIGR4), более чем на 10% отличался состав присутствующих генов. В работе Hiller et al. в 2007 году было выявлено только 46% процентов консервативных генов для 17 линии пневмококка, при этом каждый изолят содержал от 21% до 32 % генов уникальных штамм-специфичных генов [120]. Подобные результаты подтолкнули авторов к выдвижению гипотезы о наличии у патогенных бактерий «пан-генома» или пула генов, который сам по себе намного больше, чем геном отдельно взятого изолята. Данная адаптация позволяет бактерии поддерживать генетическое разнообразие путем рекомбинации огромного количества генов «периферийной» части пула [120, 133].

#### **1.5. Основные механизмы устойчивости к антибиотикам**

В ходе эволюции у бактерий выработались разнообразные механизмы устойчивости к антибиотикам. На сегодняшний день выделяют три основных типа устойчивости, каждый из которых по сути является специфической адаптацией к одному из основных классов антибактериальных препаратов.

### **1.5.1. Снижение проницаемости мембраны**

Для того чтобы антибиотик эффективно выполнял свою роль, ему прежде всего нужно достичь мишени в достаточной концентрации. Поэтому очевидным ответом бактерии стала выработка механизмов по снижению проницаемости мембраны. Данный механизм контролируется генами, регулирующими экспрессию поринов и, в сочетании с работой трансмембранных помп, может приводить к достаточно впечатляющим результатам. В основном характерен для ряда неферментативных грамотрицательных бактерий, в частности *Pseudomonas aeruginosa* [99].

### **1.5.2. Эффлюкс антибиотика**

Принцип метода заключается в том, что скорость вывода антибиотика из клетки быстрее скорости его диффузии в нее. Это обеспечивается за счет работы трансмембранных помп, транспортных протеинов, обычно отвечающих за вывод из клетки во внешнюю среду токсичных продуктов метаболизма и субстратов. Данные белки найдены как у грамотрицательных, так и у грамположительных бактерий. Обычно, это не специфичный к субстрату механизм, способный к транспорту из клетки очень широкого спектра веществ, включая антибиотики самых разных классов. У пневмококка активный эффлюкс ассоциирован с резистентностью к макролидам, фторхинолонам [32, 62, 148].

### **1.5.3. Инактивация антибактериальных агентов**

Принцип механизма заключается в изменении или разрушении химической структуры антибиотика. Самый известный и актуальный на сегодняшний день пример - это гидролиз специфическими белками бета-лактамазами бета-лактамного кольца пенициллинов и цефалоспоринов [162, 174]. Также можно выделить, в зависимости от типа химической модификаций мишени, три основных класса энзимов, отвечающих за устойчивость к

аминогликозидам: 1) Аденилилтрансферазы, 2) Фосфорилтрансферазы, 3) Ацетилтрансферазы [71, 149].

Устойчивость к пенициллину может быть вызвана не только за счет действия бета-лактамаз, но также за счет мутаций в генах, детерминирующих пеницеллин-связывающие белки, за счет чего экспрессируется продукт с низкой аффинностью к лекарству. Устойчивость к эритромицину может быть вызвана модификацией 23S рибосомальной субъединицы, за счет экспрессии гена метилтрансферазы. В результате этой мутации уменьшается аффинность эритромицина к РНК [87, 88, 95].

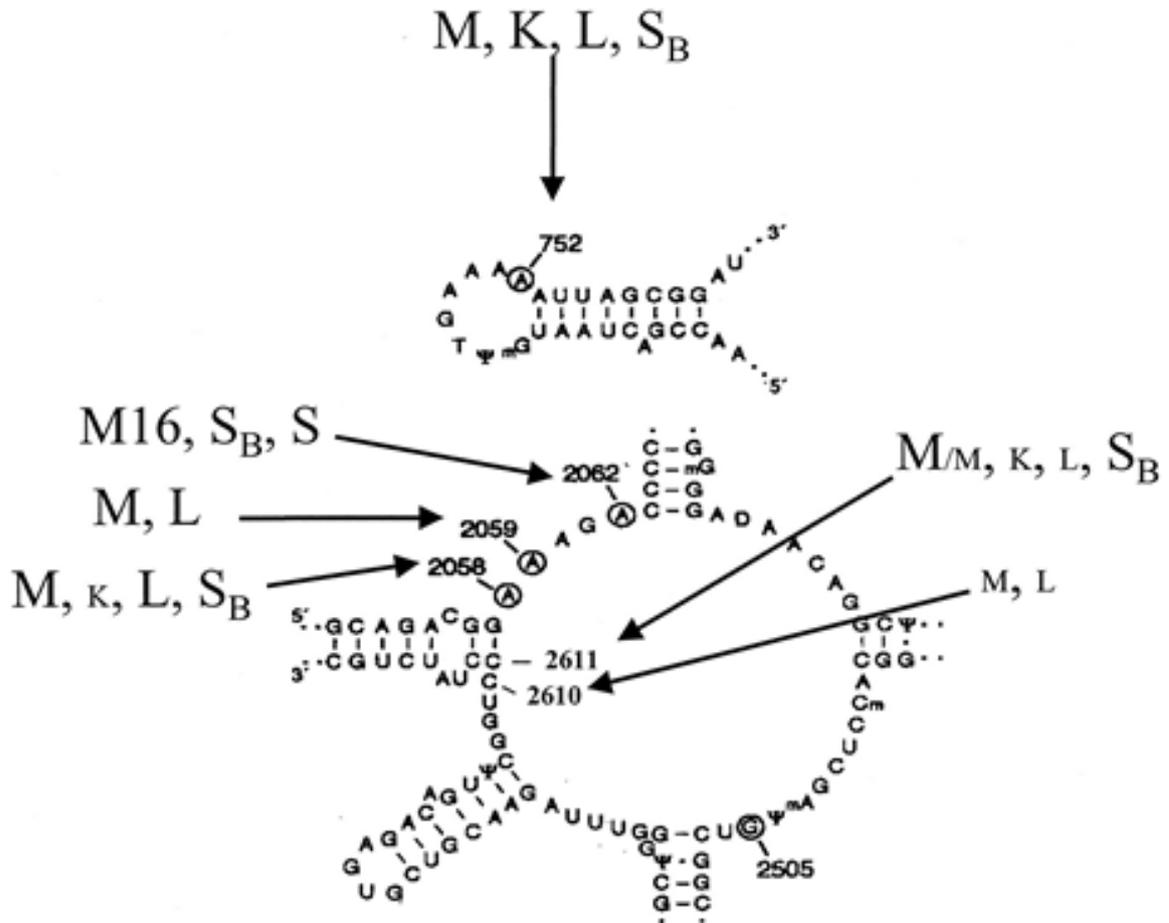
#### **1.5.4. Специфические механизмы устойчивости *S. pneumoniae***

В результате невозможности осуществлять необходимую антимикробную терапию пневмококковые инфекции каждый год уносят жизни более 1,5 миллионов людей, из которых более миллиона – это дети до пяти лет в развивающихся странах [164]. Три основных класса антибиотиков, используемых для борьбы с *S. pneumoniae* это бета-лактамы, макролиды и фторхинолоны. Стоит отметить, что на сегодняшний день произошло резкое увеличение количества резистентных штаммов пневмококка, как в общей популяции, так и среди госпитальных штаммов [32].

#### **1.5.5. Устойчивость к макролидам**

Устойчивость к макролидам у пневмококка осуществляется за счет двух основных механизмов, включающих в себя модификацию молекулы антибиотика и активный эффлюкс молекулы лекарства из клетки. Данные механизмы детерминируются группами генов *mef* и *erm*, соответственно. Экспрессия гена приводит к пост-трансляционной модификации 23S РНК и, соответственно, снижает ее аффинность к макролидам (Рис 1). Штаммы с подобным генотипом показывают очень высокий уровень устойчивости (более 64 мкг/мл) [91]. Гены *mefA* и *i* детерминируют синтез белков,

участвующих в эффлюксе антибиотика из клетки. Изоляты, имеющие одновременно оба гена, почти всегда показывают очень высокий уровень устойчивости к макролидам и в настоящее время очень широко распространились по всему миру [60, 62].



**Рис 1** Мутации отвечающие за устойчивость к макролидам и их локализация на вторичной структуре 23S РНК у *E. coli* [136]

Вторичная структура «шпильки» 35 во 2 домене (верх) и 5 домене (низ) 23S рРНК *E. coli*. Нуклеотиды, защищенные эритромицином обведены кружками. Стрелками отмечены мутации, приводящие к устойчивости к макролидным антибиотикам у *S. pneumoniae*. Буквами закодированы соответствующие фенотипы: К, кетолиды; L, линкозамиды; М, макролиды; М16, 16-членные макролиды; SB, стрептограмин В; S, стрептограмин А и стрептограмин В. Размер шрифта обозначает уровень устойчивости

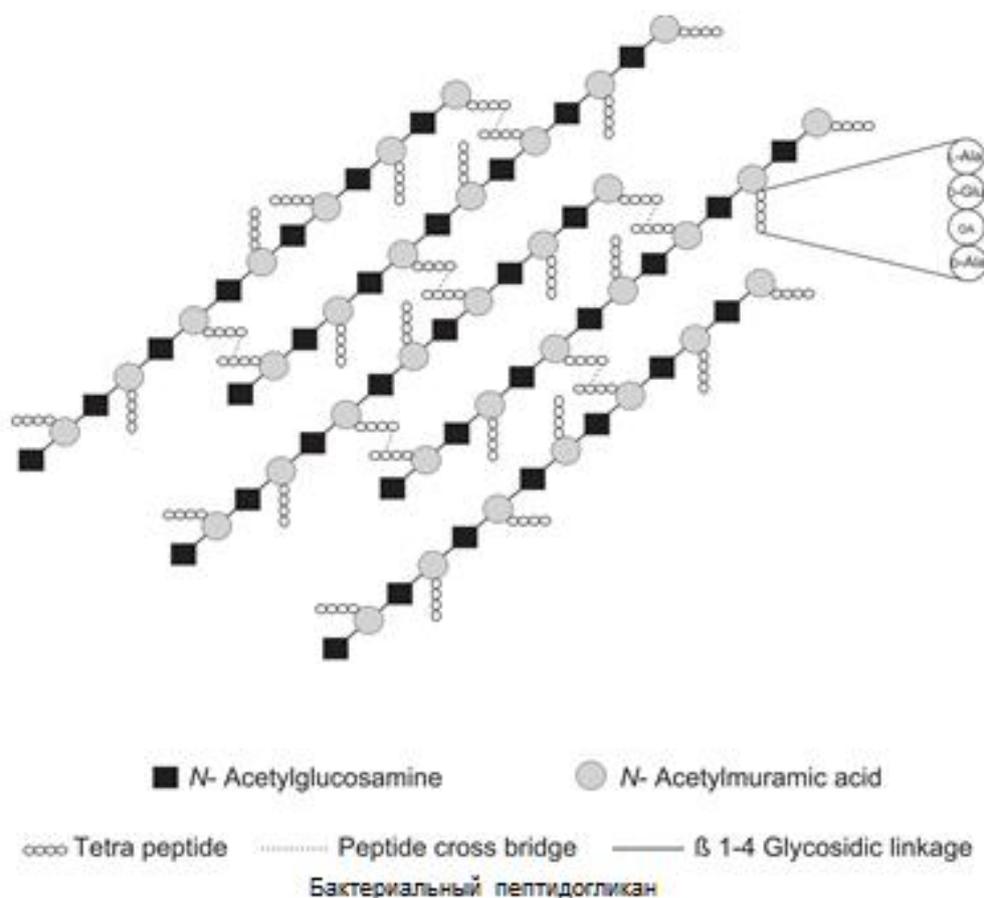
### 1.5.6. Устойчивость к фторхинолонам

Использование фторхинолонов началось с 1980-х годов, и поначалу они позиционировались как эффективное средство против грамотрицательных бактерий. Однако, рост устойчивости к макролидам и бета-лактамам среди пневмококков привел к их использованию и против грамположительных патогенов [91]. Как результат, стали поступать данные о резком увеличении количества штаммов *S.pneumoniae* устойчивых к ципрофлоксацину [67]. Резистентность к фторхинолонам напрямую связана с аккумуляцией спонтанных мутаций в генах, кодирующих ДНК-гиразы *gyrA* и *gyrB*, а также ДНК-топоизомеразы [67, 201]. Большинство фенотипов с устойчивостью к ципрофлоксацину более 16 µg/ml детерминированы одновременными мутациями в генах *parC* и *gyrA*, что подтверждается их устойчивостью и к фторхинолонам следующих поколений [84]. В сочетании с действием системы эффлюксных помп это может приводить к возникновению изолятов с очень высокими показателями устойчивости [63, 132, 185].

### 1.5.7 Устойчивость к бета-лактамам

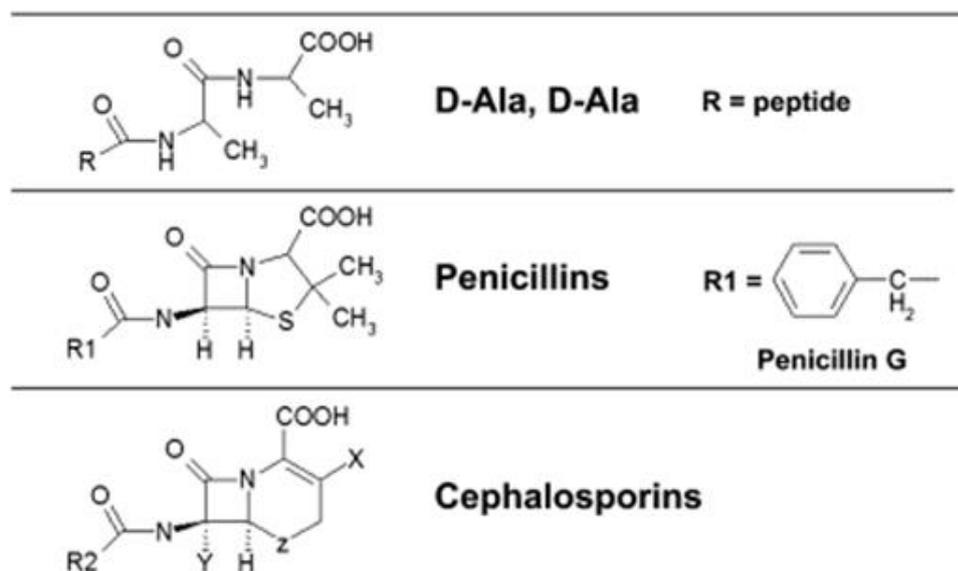
С момента открытия пенициллина Александром Флемингом и до недавнего времени, бета-лактамные антибиотики (содержащие бета-лактамное кольцо) были важнейшим средством борьбы с пневмококковыми инфекциями [210]. Принцип действия бета-лактамных антибиотиков основан на ингибировании синтеза клеточной стенки посредством связывания со специфичными белками РВРs, вовлеченными в синтез и сборку бактериального пептидогликана (Рис 2) – важнейшего компонента клеточной стенки. Если говорить подробнее о РВРs, то их главная роль в синтезе пептидогликанов заключается в транспептидазной и гликозилтрансферазной активности [189,210]. На протяжении долгого времени транспептидазы были основной мишенью для бета-лактамных антибиотиков (в частности пенициллина и цефалоспоринов). Это связано с химическим и структурным

сродством с D-Ala-D-Ala участком пептидогликана. За счет связывания с активным основанием серина в ТП-домеи данный класс антибиотиков способен формировать стабильный ковалентный комплекс, практически не подверженный гидролизу (Рис 3) [147]. Устойчивость к бета-лактамам детерминирована накоплением в пуле мозаичных генов, кодирующих измененные пенициллин-связывающие белки. Продукт экспрессии данных генов обладает пониженной аффинностью к бета-лактамам. Скорее всего, это произошло вследствие меж- и внутривидового переноса генов, в том числе, от других представителей рода *Streptococcus* [69, 102, 128, 210].

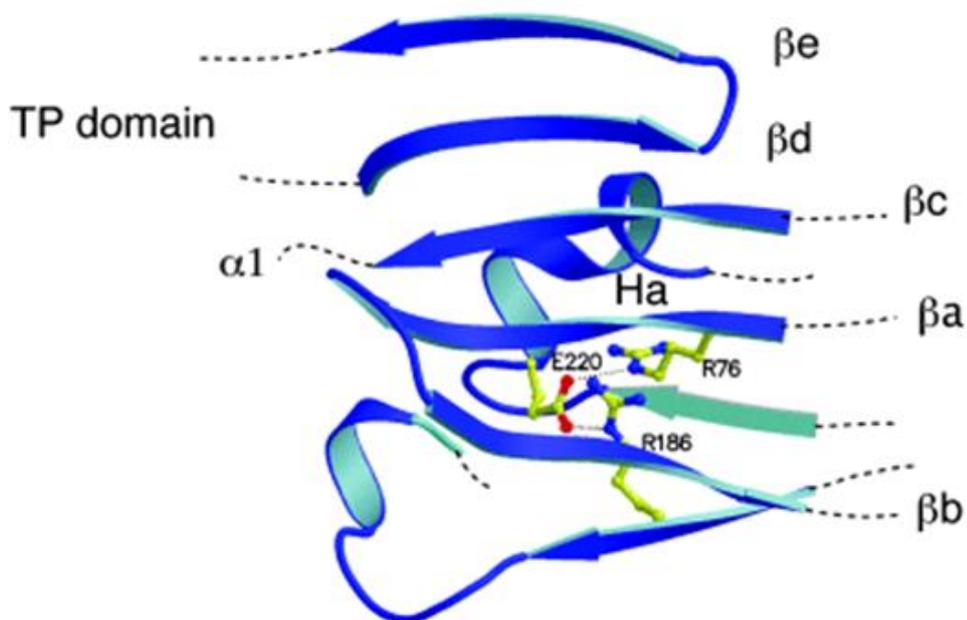


**Рис 2** Химическая архитектура бактериального пептидогликана [147]

Сравнительный анализ результатов секвенирования генов PBP<sub>s</sub>, устойчивых и чувствительных штаммов, показал, что они отличаются более, чем на 20% процентов на уровне ДНК и на 10% - на аминокислотном уровне [114].

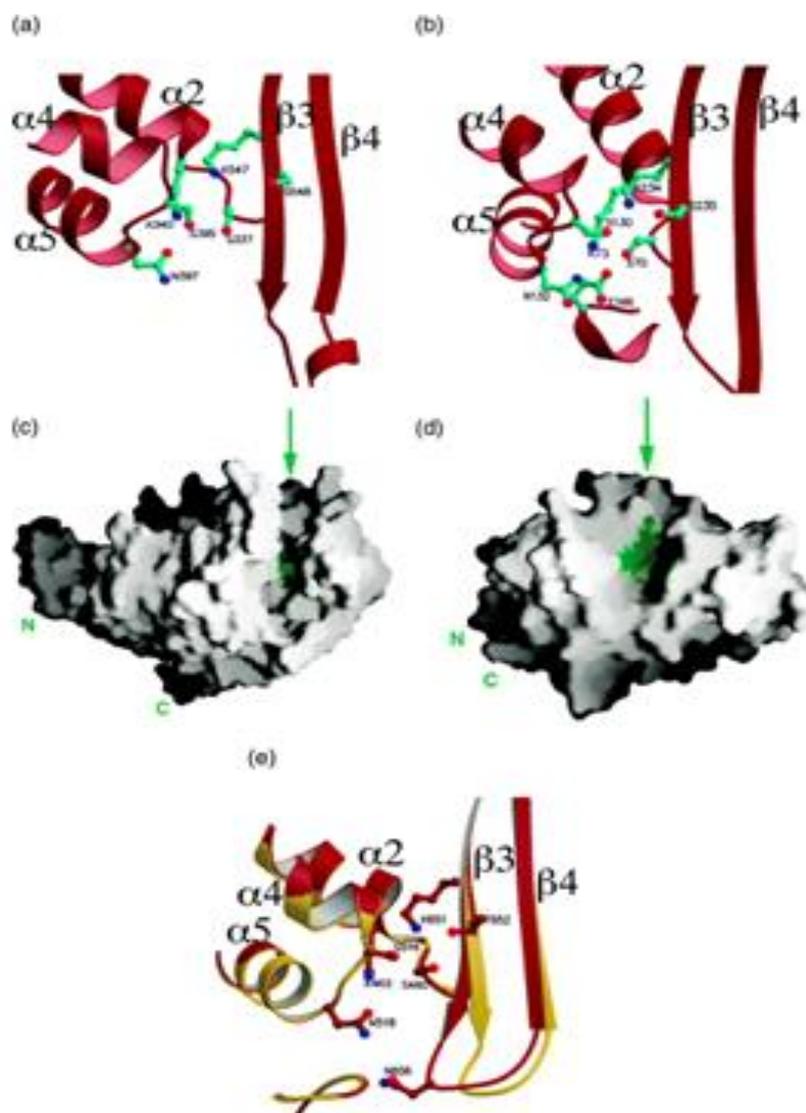


*Рис 3* Химические формулы молекул вовлеченных во взаимодействие с транс-пептидазным доменом пенициллин-связывающих белков [147]



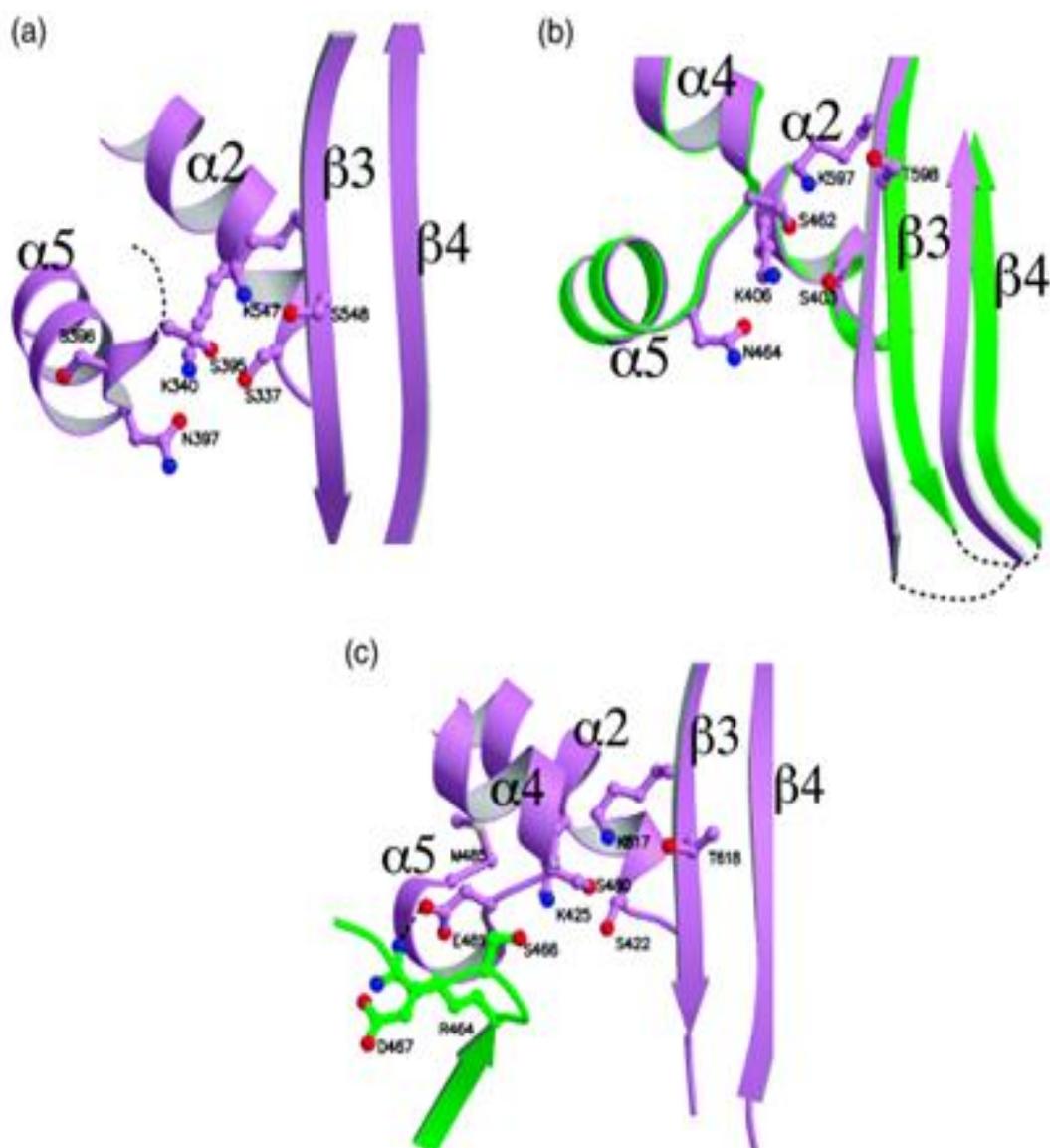
*Рис 4* Химическая структура транс-пептидазного домена пневмококкового PBP2x [147]

Характеризуется наличием трех классических мотивов, локализованных в основном на бета-цепи. Отдельно выделены три аминокислотных остатка (по одному от каждого мотива), которые отвечают за формирование стабильного участка, способного выполнять функцию «якоря» и точки связывания.



**Рис 5** Активные сайты пенициллин-связывающих белков и бета-лактамаз [147]

(a) Активный сайт RBP2x и (b) Активный сайт TEM-1 бета-лактамазы имеют очень схожую трехмерную структуру (c), поверхностная структура RBP2x показывает, что активный сайт (отмечен зеленым) образует вытянутую «трещину» (d), тогда как аналогичный сайт образованный TEM-1 бета-лактамазой формирует «карман» на поверхности молекулы (e). Суперпозиция «открытой» (желтая) и «закрытой» (коричневая) форм отображает близкое расположение C-конца и N-конца  $\beta 4$ . Это означает, что, только когда «трещина» открыта (при присоединении лиганда), обе  $\beta$ -цепи могут восстановить свое пространственное положение.



**Рис 6** Устойчивость к бета-лактамам антибиотикам может возникать как результат целого ряда событий [147]

**(а)** Кристаллическая структура пневмококкового PBP2x выделенная от резистентного штамма Sp328, четко видна «вариабельная» левая сторона. **(b)** Кристаллическая структура активного сайта of PBP2a у *S. aureus*. Пример случая резистентности, вызванного «искривлением» и смещением доменов. Фиолетовым отмечены не комплексные, зеленым – комплексные формы. **(с)** Кристаллическая структура активного сайта PBP5fm у *Enterococcus faecium* с инсерцией между аминокислотами номер 466 и 467 (зеленый цвет). Данные аминокислоты критически важны для структурной стабилизации левой стороны активного сайта.

Эффективность бета-лактамовых антибиотиков обусловлена структурным родством с D-Ala, D-Ala участком клеточных PBP's (первые два примера). R1, R2, X, Z – различные участки цефалоспоринов и пенициллинов, взаимодействие с которыми, по аналогии с первыми примерами, обуславливает эффективность антибиотиков следующих поколений [32].

### **1.6. Распространение глобальных клональных комплексов**

Во многом экстремальный всплеск устойчивости к антибиотикам по всему миру связан с распространением нескольких успешных клональных комплексов. Для контроля пневмококковой инфекции крайне важен мониторинг и изучение подобных клонов [135]. В 1997 году была основана международная организация PMEN (Pneumococcal Molecular Epidemiology Network), ее основной целью ставилась характеристика и классификация клональных линий с помощью целого ряда методов молекулярного типирования и определение путей их потенциального распространения [151]. Были установлены критерии системы номенклатуры и классификации, в которые входили страна происхождения, первоначально определенный серотип и номер в номенклатурной системе. Данные критерии должны были использоваться во всех последующих эпидемиологических исследованиях, что могло помочь скорейшей детекции распространения клональных линий в каждой новой стране и изучению состава глобальной мировой популяции *S.pneumoniae* [118].

На данный момент в базу данных PMEN входит 43 клон и клональных комплексов. Достаточно очевидно было, что подавляющее большинство этих клонов оказалось представителями серогрупп 6, 9, 19, 23, проявляющих устойчивость к одному или нескольким антибиотикам [70, 85, 207]. Можно выделить ряд наиболее изученных и широко распространенных клонов [135, 183, 207]. Одним из первых привлек к себе внимание клон *Spain23F-1* или клон «*Spain/USA*», впервые отмеченный в начале 80-х годов в Испании с серотипом 23F. С тех пор он был обнаружен практически по всей Европе, в США, Южной

Африке, на Дальнем Востоке. Данный клон резистентен к пенициллину, хлорамфениколу, тетрациклину, а часть изолятов - к эритромицину. Наиболее распространенными серотипами для него по-прежнему остается 23F и 19F. К началу 20 века более 40% резистентных штаммов в США относилось к представителям данного клонального комплекса [34, 92, 104].

## **1.7. Методы идентификации и типирования *S. pneumoniae***

### **1.7.1 Методы, основанные на морфологических особенностях**

Гемолитическая реакция стрептококков на кровяном агаре является отправной точкой в идентификации пневмококков, для которых характерно наличие  $\alpha$ -гемолиза [115]. Пневмококки при росте на кровяном агаре могут давать несколько типов колоний, что зависит от степени выраженности капсулы. Колонии с сильно развитой капсулой могут иметь несколько миллиметров в диаметре и быть настолько слизистыми, что напоминают каплю масла на агаровой поверхности. Колонии штаммов с менее выраженной капсулой имеют небольшие размеры, а их выделение сопряжено с определенными трудностями. При длительной инкубации (48 ч) колонии приобретают полую сферическую форму с уплощенным центром, который образуется в результате аутолиза [10, 11]. При микроскопии окрашенных по Граму мазков можно наблюдать грамположительные кокки (часто ланцетовидные диплококки) [176].

### **1.7.2 Фенотипические методы**

Дальнейшая идентификация *S. pneumoniae* проводится стандартными фенотипическими методами [11, 181].

- чувствительность к оптохину (метод основан на способности оптохина (этилгидрокупреина гидрохлорида) селективно подавлять рост пневмококка в отличие от других зеленеющих стрептококков);

- лизис в присутствии солей желчи (дезоксихолат натрия и таурохолат натрия), которые обладают способностью избирательно лизировать колонии *S. pneumoniae* на агаре или в бульоне. Метод основан на активации пневмококковых аутолизинов солями желчных кислот, что приводит к визуальному лизису пневмококков в течение 0,5-2 ч.

К сожалению, эти методы имеют ограничения. Так, примерно 4-5% пневмококков устойчивы к оптохину [175], а рост некоторых других «зеленящих» стрептококков, наоборот, подавляется оптохином [9, 106]. Молекулярно-генетический анализ таких штаммов показал, что чувствительность к оптохину «зеленящих» стрептококков обусловлена горизонтальным переносом *atpC*, *atpA* и фрагмента *atpB* генов от *S. pneumoniae* [74]. Также описаны пневмококки, устойчивые к солям желчи [165].

Наибольшие сложности в идентификации пневмококка встречаются при исследовании образцов из респираторного тракта. Населяющие одни и те же экологические ниши *S. mitis* и *S. oralis* настолько близки к *S. pneumoniae*, что их дифференциальная идентификация сильно затруднена [173]. Даже отличающиеся высокой степенью консервативности последовательности генов 16S рРНК *S. mitis*, *S. oralis* и *S. pneumoniae* идентичны на 99% [97]. В результате сложности дифференцировки морфологическими и культуральными методами от группы «зеленящих» стрептококков возникает проблема значительной гипердиагностики пневмококков [15].

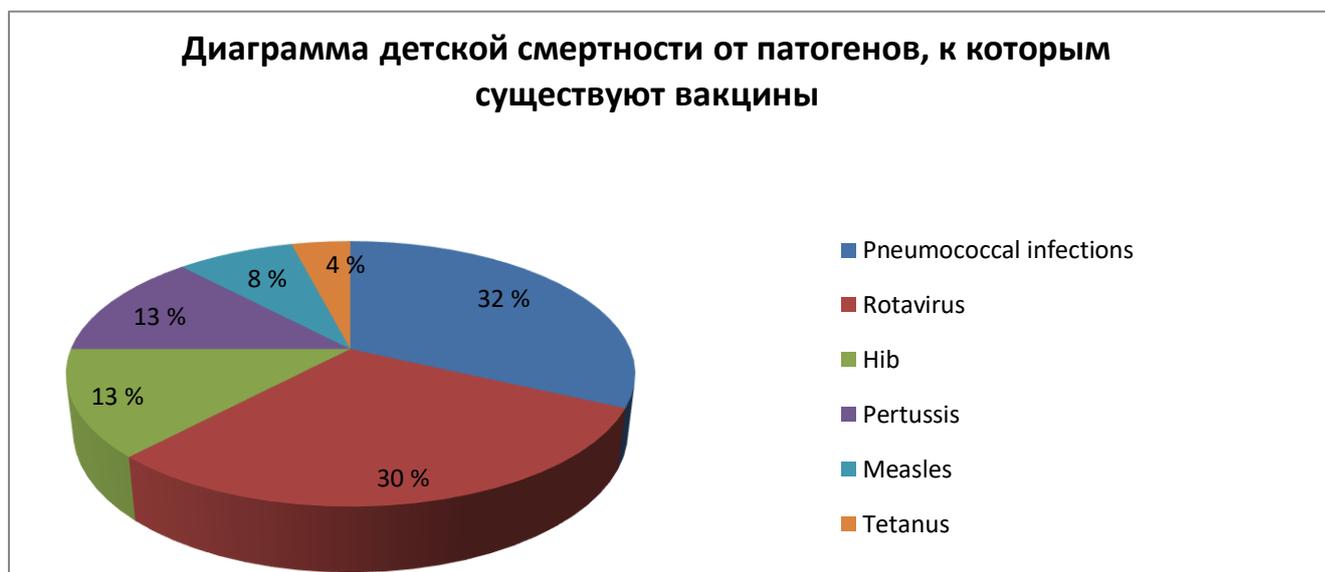
### 1.7.3 Серологический метод

Наряду с фенотипическими, существуют альтернативные методы идентификации *S. pneumoniae*, самым распространенным из которых является серологический [200]. Тест основан на выявлении пневмококковых капсульных полисахаридных антигенов с использованием поливалентной специфической пневмококковой сыворотки. Имеются также коммерческие диагностические наборы для выполнения латекс-агглютинационного теста,

например, "Slidex Pneumo-kit" (BioMerieux, Франция). К преимуществам этого метода относят скорость и простоту использования, а к недостаткам – стоимость, сравнительно низкую специфичность вследствие возможных перекрестных реакций с другими стрептококками [8].

### 1.8. Профилактика и лечение пневмококковых инфекций

На сегодняшний день можно выделить два основных подхода для борьбы с пневмококковыми инфекциями: антибиотикотерапия и вакцинация. До 1970-х годов большинство пневмококковых изолятов были чувствительны к основным антибиотикам, таким как пенициллин, клиндамицин, цефалоспорин, ванкомицин и макролидам. Однако, с начала 1990-х годов резко стало возрастать количество штаммов, устойчивых к пенициллину и прочим популярным антибиотикам. Вакцинация также не может считаться панацеей в борьбе с пневмококковыми инфекциями. Пневмококк до сих пор занимает первое место среди причин смерти от заболеваний, которые можно предотвратить с помощью вакцинации [56, 208].



*Рис 7 Статистика детской смертности от патогенов, поддающихся вакцинопрофилактике*

### 1.8.1 Антибиотикотерапия

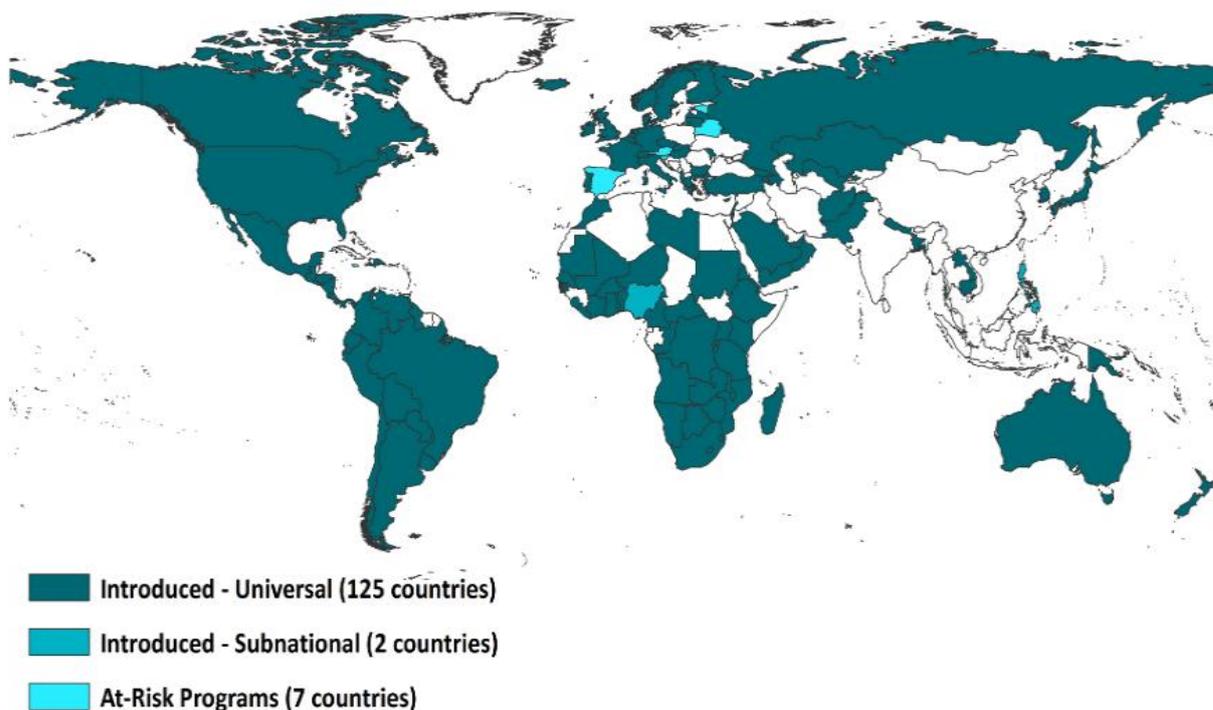
В связи с растущей распространенностью мультирезистентных штаммов, лечение пневмококковых инфекций становится все более сложным и дорогим процессом, зачастую приводящим к длительной госпитализации больного. Поэтому очевидна необходимость международного сотрудничества в рамках исследования заболевания и распространения резистентности. В связи с распространенной практикой эмпирического назначения антибиотиков, когда целью терапевта является борьба со всем спектром возможных патогенов у больного, обычно назначаются препараты широкого спектра действия. Однако очевидно, что терапевт при выборе стратегии лечения (против конкретного патогена или широкого их спектра) должен учитывать дополнительно все возможные аспекты течения инфекции, локализации очага заражения, возраста и физического состояния пациента, также должен оценивать вероятность и степень вовлечения *S.pneumoniae* в инфекционный процесс и его потенциальный уровень устойчивости к антибактериальным препаратам. На основании этих данных обычно выбирают линию использования бета-лактамов, макролидов, фторохинолонов или их комбинации [111, 194, 196]. Соответствующий выбор из бета-лактамов: пенициллин G, цефотаксим, цефтриаксон, имипенем, меропенем, амоксициллин перорально и некоторые другие. Макролиды (эритромицин и азитромицин) крайне популярны вследствие их широкого спектра действия и долгого использования в клинической практике, однако, следует учитывать, что высокий уровень резистентности к ним может сказаться на эффективности лечения. Фторхинолоны, такие как левофлоксацин, моксифлоксацин, гемифлоксацин, были разработаны в основном как средство борьбы против грамположительных бактерий, но опять же следует учитывать быстро растущий уровень резистентности к ним. Популярны ванкомицин и линезолид, показывающие очень хорошие результаты [3, 53, 111, 196].

## 1.8.2 Вакцинопрофилактика пневмококковых инфекций

Потребность в антипневмококковых вакцинах стала особенно заметной на фоне быстрого распространения в последние десятилетия антибактериальной резистентности среди пневмококков. Главной движущей силой в распространении резистентности является массовое применение антибиотиков, прежде всего по таким показаниям, как респираторные инфекции у детей. На 2015 год пневмококковые вакцины интродуцированы в систему здравоохранения 134 стран и, по глобальной оценке, покрывают 69% от общей популяции (Global Vaccine Introduction Report 2015, Рис. 8)[54].

Капсульные полисахариды являются основными протективными антигенами пневмококков, однако, их разнообразие существенно затрудняет разработку эффективной вакцины. Создание вакцины, содержащей все 94 варианта пневмококковых полисахаридов представляется мало реальным. Более перспективным направлением оказалось создание вакцины, содержащей ограниченное количество полисахаридных антигенов. Результаты многочисленных исследований свидетельствуют, что на глобальном уровне более 80% наиболее тяжелых инвазивных заболеваний вызываются 20 серотипами, а 13 серотипов вызывают 70% – 75% заболеваний [54, 56, 194].

Первой антипневмококковой вакциной была 14-валентная полисахаридная, вошедшая в медицинскую практику в 1977 г. В 1983 г. в практику была внедрена 23-валентная полисахаридная вакцина (PPV23). В состав PPV23 входят очищенные капсульные полисахариды наиболее распространенных серотипов (1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F и 33F). К основным недостаткам этой вакцины относятся низкая иммуногенность у детей до 2-х лет, которые являются одним из наиболее уязвимых контингентов, а также неспособность индуцировать иммунологическую память, поскольку полисахариды относятся к Т-независимым антигенам. [28, 177, 209].



*Рис 8 Карта стран, участвующих в программе вакцинации PCV-вакцинами*

Указанных недостатков удалось избежать при создании вакцины PCV7. В состав этой вакцины входят капсульные полисахариды серотипов 4, 6В, 9V, 14, 19F и 23F, а также олигосахарид серотипа 18С, конъюгированные с белком CRM 197 нетоксигенных коринебактерий дифтерии [194]. Благодаря конъюгированию полисахаридов с белком вакцина индуцирует Т-зависимый иммунный ответ, иммунологическую память и протективный иммунитет даже у новорожденных. По данным ВОЗ на август 2008 PCV7 была зарегистрирована более чем в 90 странах, в 26-ти включена в национальные схемы иммунизации. На май 2009 г. PCV7 включена в национальные программы иммунизации 38 стран. В настоящее время осуществляется внедрение 13-ти валентной конъюгированной пневмококковой вакцины (PCV13), в состав которой дополнительно включены полисахариды серотипов 1, 3, 5, 6А, 7F и 19А [27, 35, 56].

Наиболее полно эффективность PCV7 задокументирована в США, где эта вакцина доступна с 2000 г. К 2006 г 77,4% детей в возрасте от 19 до 35 месяцев получили 4 и более доз вакцины PCV7, а 91,4% - три и более дозы [61]

*(Immunization coverage in the United States: Coverage with individual vaccines by state and local area, 2008. National Center for Immunization and Respiratory Disease, 2009).*

Опыт применения PCV7 показал, что эффективность вакцины превзошла самые смелые ожидания. Наиболее важным результатом массовой вакцинации оказалось снижение частоты самых тяжелых пневмококковых инфекций – менингитов и инвазивных инфекций в целом. Так, в США в период с 1998-1999 по 2004 – 2005гг общая частота пневмококковых менингитов снизилась с 1,13 до 0,79 случаев на 100 000 населения, при этом заболеваемость среди детей до 2-х лет снизилась на 64% (с 10,16 до 3,66 случаев на 100 000) [122]. Вполне естественно, что снижение заболеваемости происходило, в основном, за счет инфекций, вызываемых серотипами пневмококков, включенными в состав PCV7 («вакцинные серотипы»), при этом наблюдали некоторый подъем заболеваемости за счет так называемых «невакцинных» серотипов[152].

Снижение заболеваемости касалось и всей группы инвазивных пневмококковых инфекций. В довакцинальный период, у детей до 5-ти лет заболеваемость ОСО была на уровне около 100 случаев на 100 000, после внедрения вакцины, этот показатель снизился до 22 – 23 случаев [194]. Как и при менингитах, снижение произошло, в основном, за счет «вакцинных» серотипов и сопровождалось некоторым увеличением заболеваемости, вызываемой «невакцинными» серотипами (в основном серотипом 19А). Заболеваемость пневмонией после внедрения вакцинации также снизилась [112]. Так показано, что частота госпитализаций по поводу пневмонии у детей до 2-х лет снизилась с 12,5 случаев на 1 000 (довакцинальный период) до 8,1 [89, 100, 139, 202].

Применение PCV7 привело к снижению приблизительно на 7% заболеваемости самой распространенной инфекцией – острым средним отитом. Снижение заболеваемости ОСО оказалось не столь выраженным как другими нозологическими формами, что объясняется полиэтиологичностью

заболевания. Имеются также достаточно интересные косвенные данные о влиянии PCV7 на заболеваемость острым отитом [211]. Ретроспективный анализ баз данных частных страховых компаний выявил снижение частоты обращений к врачу и назначений антибиотиков по поводу ОСО у вакцинированных детей младше 2-х лет. Расчеты показали, что вакцинация обеспечила снижение общих прямых расходов, связанных с лечением отита, на 32,3% (с 1,41 млрд. USD в 1997-1999 гг. до 0,95 млрд. USD в 2004 г) [30, 138].

Несмотря на то, что PCV7 применялась в США только у детей, оказалось, что массовая вакцинация обеспечивает и, так называемый, «популяционный» эффект. Снижение заболеваемости инвазивными пневмококковыми инфекциями было выявлено и в других возрастных группах, прежде всего, среди лиц пожилого возраста. После начала массовой вакцинации общая частота инвазивных пневмококковых инфекций среди лиц старше 65 лет снизилась на 37%, при этом частота заболеваний, вызываемых «вакцинными» серотипами, снизилась на 92% при некотором повышении частоты заболеваний, вызываемых «невакцинными» серотипами. Снижение заболеваемости в старших возрастных группах населения, скорее всего, связано со снижением частоты носительства пневмококков у детей, которые являются источником инфекции для своих пожилых родственников [25, 31, 68, 144].

Не менее важным непрямым эффектом массовой вакцинации детей оказалось снижение частоты антибактериальной резистентности пневмококков, выявленное в Канаде и в некоторых других регионах. Частота устойчивости к пенициллину после начала кампании по вакцинации детей снизилась с 14% до 4,6%, а к макролидам – с 8,8% до 5,8% [35, 198].

В тоже время необходимо отметить, что в практике применения PCV7 существуют несколько спорных моментов. Прежде всего, обсуждается вопрос о том, насколько полно вакцина покрывает серотипы, циркулирующие в каждом конкретном географическом регионе (стране), и как это может

отразиться на эффективности вакцинации. Изначально вакцина конструировалась на основании данных о распространении отдельных серотипов на территории США и перекрывала более 80% серотипов, циркулирующих в этой стране. В Европе процент перекрытия оказывается несколько ниже (более 70%), а в странах Азии и Африки колеблется от 40% до 60% (Таблица 1)[152, 193]. Вторым сложным моментом является изменение серотипового состава пневмококков, наблюдаемое после начала массовой иммунизации. Как уже отмечалось выше, на фоне снижения заболеваемости инфекциями, вызываемыми «вакцинными» серотипами, возрастает роль «невакцинных» серотипов (эффект замещения). На сегодняшний день этот прирост мало влияет на общее снижение заболеваемости, однако, определенное беспокойство вызывает распространение отдельных серотипов, характеризующихся множественной антибактериальной резистентностью.

**Таблица 1** Частота распространения в различных регионах серотипов пневмококков, «перекрываемых» вакциной PCV7 [117]

Регионы	PCV7 серогруппы (14, 6, 19, 18, 23, 9, 4)
США/Канада	88.7%
Океания	77.6%
Европа	74.4%
Африка	67.3%
Латинская Америка	63.4%
Азия	43.1%

-\* Ограниченные данные свидетельствуют, что в РФ PCV7 может перекрывать 32% - 66% и более серотипов [194, 199].

Наибольшее беспокойство вызывает распространение серотипа 19А [59, 138, 182]. В США, где накоплен наибольший опыт применения PCV7, наблюдают распространение устойчивых пневмококков, относящихся и к

другим серотипам (15А, 23А, 35В, 6А и 6С) [110]. С биологической точки зрения эффект замещения следует рассматривать как признак эффективности вакцины, однако, существуют риск, что в будущем заболеваемость за счет «невакцинных» серотипов поднимется до исходного уровня.

Наиболее логичным решением этой проблемы является изменение состава вакцины в зависимости от меняющегося серотипового состава. Так, в 10-валентную конъюгированную вакцину дополнительно включены полисахариды серотипов 1, 5 и 7F. А новая 13-валентная вакцина содержит в дополнение к перечисленным полисахаридам еще трех серотипов - 3, 6А и 19А. Включение в состав 13-валентной вакцины серотипа 19А представляется особенно важным [64].

Оценивая более отдаленные перспективы развития вакцинопрофилактики пневмококковых инфекций, прежде всего, следует подчеркнуть необходимость налаживания системы наблюдения за распространенностью пневмококковых инфекций и динамикой серотипового состава пневмококков. Данные о динамике серотипового состава пневмококков позволят своевременно менять состав вакцины. Существуют также определенные перспективы разработки вакцин, основанных на использовании белковых видоспецифичных антигенов [187].

С использованием вакцин связаны два явления, которые в последнее время приобрели важное значение: замена серотипов и переключение серотипов. Замена серотипов связана со снижением уровня распространенности пневмококков вакцинных серотипов в носоглотке, что сопровождается соответствующим увеличением невакцинных серотипов, заполняющих вакантные экологические ниши. Замена серотипов, вызывающих инвазивные заболевания детей и взрослых, значительно возросла в США после вакцинации [155, 190]; Количество штаммов невакцинных серотипов группы 19 (в частности серотипа 19А) возросло с 3% до вакцинации до 20% после введения вакцины. Стоит отметить, что значительное количество изолятов серотипа 19А были нечувствительными к

амоксициллину, цефтриаксону или трем и более классам антибиотиков [118, 153]. Множественно резистентный серотип 19А начал появляться в США в 2003 году и стал наиболее частой причиной инвазивных пневмококковых заболеваний у детей [86, 94]. Процент серотипов, не входящих в PCV7, особенно 19А, 6А, 6С, 22F и 35В, значительно возрос в США в последнее время; пенициллин-нечувствительные изоляты серотипов 15А, 23А, 35В и 6С также становятся все более распространенными [110]. Так, распространенность серотипа 6С возросла с 1% (до 2001 года) до 8,7% (в 2007 году)[161].

С введением в практику вакцин связано также капсульное переключение: гены, кодирующие один тип капсулы, путем трансформации и рекомбинации меняются на гены, кодирующие другой серотип. Переключение с одного вакцинного серотипа на другой было впервые описано в конце 90х годов [86], но большее значение имеет переключение с вакцинного серотипа на невакцинный. Приобретение невакцинной капсулы штаммом пневмококка, вызывающим инвазивные болезни, вызывает серьезную озабоченность в связи с использованием серотип-специфичных вакцин. Кроме того, у невакцинных серотипов больше шансов приобрести множественную резистентность с течением времени в результате переключения серотипов [109]. Дальнейшее снижение распространения инвазивных пневмококковых болезней связано с разработкой новых вакцин (недавно разработанная 13-валентная вакцина содержит 6 дополнительных серотипов - 1, 3, 5, 6А, 7F и 19А), а также с разработкой серотип-неспецифичных вакцин [35, 96, 131].

### **1.9. Распределение серотипов в популяции *S. pneumoniae* в России.**

Данные о серотипах пневмококков, циркулирующих на территории России, достаточно ограничены.

В работе [60] приводятся результаты серотипирования эритромицин-резистентных пневмококков, выделенных при инфекциях дыхательных путей

у пациентов различных возрастных групп в центральном регионе России. Из включенных в исследование штаммов 66,3% перекрывались вакциной PCV7.

В работе [193] приведены результаты серотипирования эритромицин-устойчивых и хинолон-устойчивых пневмококков, выделенных у детей, посещающих детские сады, или находящихся в домах ребенка. В данном исследовании охвачены практически все регионы России от Дальнего Востока до Северо-Запада. Спектр серотипов пневмококков, выявляемых при носительстве, является суррогатным маркером, в определенной степени отражающим спектр серотипов, вызывающих у детей инфекции различной степени тяжести. Вакцина PCV7 покрывает 32% серотипов, включенных в исследование. Несколько больший процент покрытия 7-валентной вакциной был выявлен при изучении носительства пневмококков у детей, посещающих детские сады в Архангельской области (41.0%) [199].

В работе [2] приведены данные о серотиповом составе пневмококков, вызывающих наиболее тяжелую патологию – менингиты. Процент перекрытия колебался в различные временные периоды и составил в 2003 – 2006 гг. 40%. К сожалению, авторы приводят данные только о серогрупповом составе, дифференцировка серотипов в пределах таких важных групп как 6, 9, 19 и 23 не проводилась.

Анализ имеющихся данных показывает, что в зависимости от региона степень покрытия PCV7 может колебаться от 49% до 82%, с наиболее высокими показателями в Северной Америке и Европе. Одновременно наблюдается увеличение доли серотипов 1, 3, 5, 6A, 7F, 19A. В основном в развитых странах на серотипы входящие в состав PCV10 и PCV13 соответственно приходится 65-75% и 80-90% серотипов [64][155].

На конец 2013 года можно выделить 8 наиболее интересных работ в области распределения серотипов у пневмококка и эффективности существующих вакцин [64]. Во всех исследованиях было отмечено преобладание в популяции серотипова 6B, 14, 19F и 23F, а также высокая частота встречаемости 3 серотипа. Серотип 19A превалировал среди

резистентных штаммов, вызывающих ОСО, ВБП и носительство у всех возрастных групп. Разница между охватом пневмококковой популяции ПКВ10 и ПКВ13 доходила до 26% [9, 11].

### 1.10. Заключение по обзору литературы

*S. pneumoniae* продолжает оставаться одним из ведущих патогенов и эпидемически значимых патогенов и одной из основных причин, вызывающей целый спектр заболеваний: пневмонию, менингит, бактеримию, острый отит. За последние десятилетия наблюдается критический рост уровня устойчивости к антибиотикам среди пневмококков, вызванный преимущественно нерациональным использованием антибактериальных препаратов и распространением нескольких глобальных мультирезистентных клональных линий. Пневмококки являются генетически крайне разнообразным и пластичным видом, способным быстро адаптироваться к изменяющимся факторам окружающей среды.

На сегодняшний день существуют только два эффективных подхода по профилактике и лечению пневмококковых инфекций – это вакцинация и антибиотикотерапия. Оба имеют свои недостатки и преимущества. Долгое время основным оружием по борьбе с пневмококковыми заболеваниями было использование антибактериальных препаратов. Однако, из-за повсеместного распространения глобальных мультирезистентных клональных линий, эффективность лечения существенно снизилась. Данный факт заставляет нас обратить внимание на необходимость вакцинации основных групп риска. К подводным камням этого подхода можно отнести то, что все существующие вакцины серотипспецифичны, то есть необходимо тщательное исследование серотипового состава популяции каждого отдельно взятого региона перед принятием решения о включении той или иной вакцины в календарь прививок. Особо следует упомянуть изменчивость *S.pneumoniae* и способность очень быстро адаптироваться к изменяющимся условиям внешней среды, в том числе к воздействию таких селективных факторов, как вакцинация и

антибиотикотерапия. Так, исходя из последних исследований, в регионах, где вакцинация проводилась на протяжении периода от 5 лет и более наблюдается значительное снижение доли вакцинных серотипов и, соответственно, увеличение доли серотипов ранее крайне редко встречавшихся в популяции. Все вышеперечисленные факты говорят о необходимости постоянного мониторинга изменений в составе популяции, а также о регулярной коррекции состава пневмококковых вакцин и рекомендаций к применению антибактериальных препаратов.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Общий дизайн исследования

Получение клинического материала у больных пневмококковыми заболеваниями производился непосредственно в учреждении, занимающемся лечением больного. Далее параллельно проводили выделение чистой культуры и детекцию ДНК. У всех положительных проб определялся серотип с помощью ПЦР-серотипирования. Для чистых культур проводили оценку антибиотикочувствительности. В случае чистых культур, для 82 штаммов выборочно осуществлялось определение сиквенстипа с помощью МЛСТ. Для штаммов, представляющих наиболее характерные клональные комплексы и серотипы, циркулирующие в Санкт-Петербургской популяции, было произведено полногеномное секвенирование.

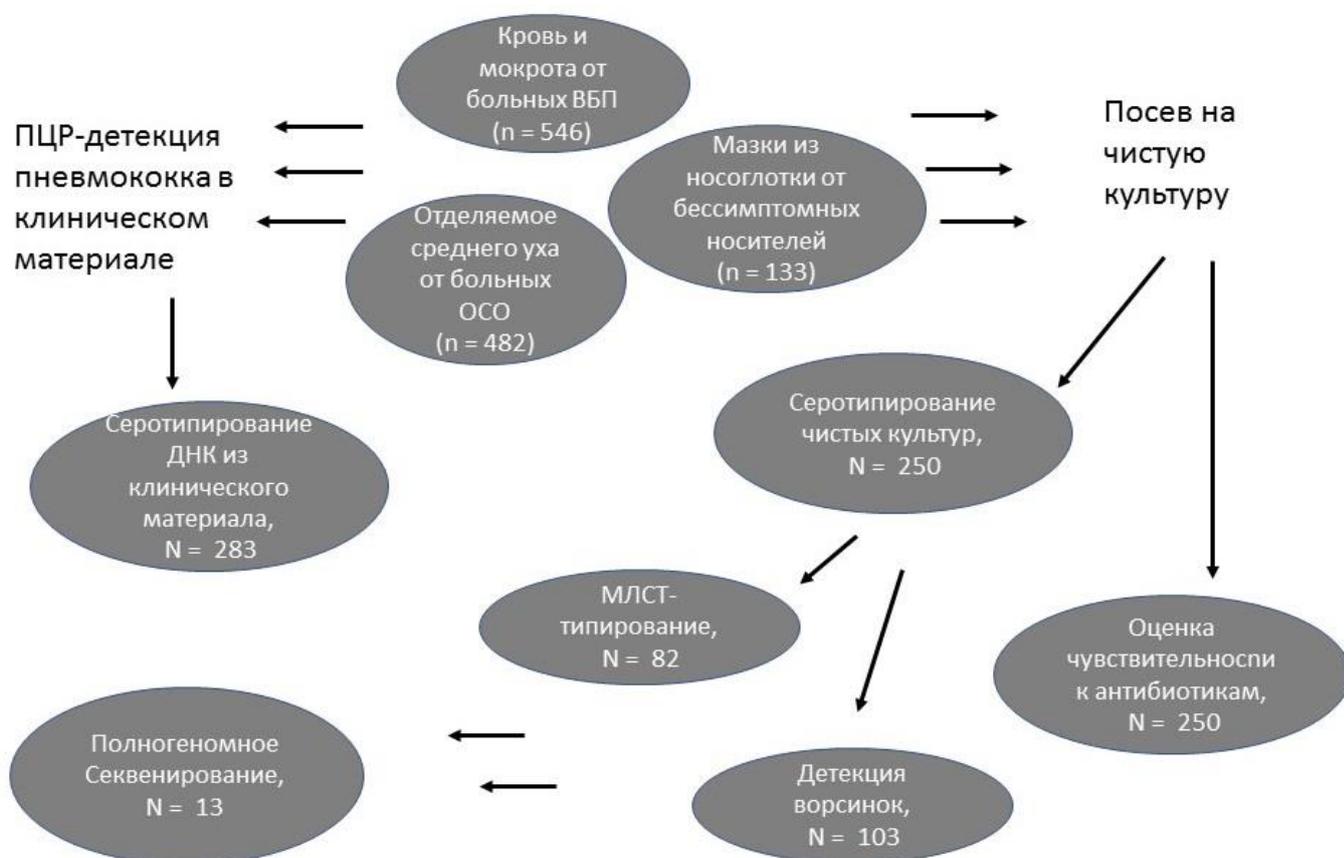


Рис 9 Схема дизайна исследования

## **Пациенты и изоляты**

В исследование было включено 1024 образца клинического материала, полученного от больных пневмококковыми заболеваниями и бессимптомных носителей, а также 250 чистых культур пневмококка, выделенных в период с 2010 по 2013 г. в лаборатории молекулярной микробиологии и эпидемиологии ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России (Санкт-Петербург). Образцы клинического материала состояли из 482 образцов отделяемого среднего уха от детей, больных ОСО, 452 образцов крови от детей, больных ВБП, и 94 образца крови от взрослых с ВБП (всего 546 образцов). Источниками выделения чистых культур *S. pneumoniae* при менингите была спинномозговая жидкость; при пневмонии - мокрота и материал бронхоальвеолярного лаважа; при остром отите - жидкость среднего уха, полученная при парацентезе; при носительстве - мазки из носоглотки. Всего было получено 133 чистых культуры от бессимптомных носителей, 62 культуры от больных ОСО и 55 культур от больных ВБП.

## **Получение биологического материала**

**Материал из полости среднего уха.** Всего было обработано 482 образца отделяемого среднего уха. Детей, поступавших в приемное отделение медицинского учреждения с диагнозом «острый средний отит», осматривал дежурный врач-оториноларинголог и, в соответствии со стандартами лечебного учреждения, принимал решение о необходимости проведения парацентеза. После обработки 70% раствором этанола в наружный слуховой проход вводилась стерильная воронка. Через воронку осуществлялся надрез барабанной перепонки. Свободно вытекающее отделяемое немедленно собиралось тампоном транспортной системы *ESwab* (Coran). Полученный в результате парацентеза биологический материал хранился до транспортировки в холодильнике при температуре +4<sup>0</sup>С - +8<sup>0</sup>С не более 24 ч.

**Кровь.** Всего было обработано 546 образцов крови. У детей и взрослых с диагнозом «внебольничная пневмония» при наличии рентгенологического

подтверждения в течение первых суток после поступления с помощью вакуумной системы BD Vacutainer®, содержащей ЭДТА, в соответствии с инструкцией изготовителя, получали образцы венозной крови в объеме 3,0 – 10,0 мл. Заполненные пробирки хранили при +2°C - + 8°C до прибытия курьера, но не более 48 ч.

## **2.2. Микробиологические методы.**

### **Выделение и идентификация *S. pneumoniae***

Для культивирования *S. pneumoniae* использовали Колумбийский агар (bioMérieux, Франция) с добавлением 5% донорской эритроцитарной массы и 10% лошадиной сыворотки. Инкубация проводилась в атмосфере с повышенным содержанием CO<sub>2</sub> (3–7 %) при температуре 35°C в течение 24 ч. Идентификация пневмококков осуществлялась за счет характерной морфологии колоний на кровяном агаре, наличия α-гемолиза, чувствительности к оптохину, лизиса в присутствии солей желчных кислот с 10% раствором дезоксихолата натрия (Sigma, США) и/или положительных результатов латекс-агглютинации с использованием набора Slidex Pneumo-Kit (bioMérieux, Франция). Для идентификации чистых культур, полученных при посеве клинического материала, использовалась MALDI-TOF масс-спектрометрия, для окончательной валидации культур, детектированных на масс-спектрометре, использовалась ПЦР-детекция генов *lytA* и *cpsA*. После идентификации штаммы хранили в микробанках (DELTA LAB, Spain) при температуре –70°C.

### **Оценка антибиотикочувствительности**

Антибиотикочувствительность определяли методом серийных микроразведений с определением минимальной подавляющей концентрации (МПК) в бульоне Mueller Hinton (СМН) II Broth (Becton Dickinson, США). В бульон добавляли лизированную лошадиную кровь до конечной

концентрации 5%. Для оценки антибиотикочувствительности использовали суточную культуру пневмококка, выращенную на кровяном агаре. Из культуры пневмококка готовили бактериальную суспензию в стерильном физиологическом растворе мутностью 0,5 McFarland. Далее полученную микробную взвесь разводили в 10 раз бульоном, содержащим 5% лизированной лошадиной крови, и использовали для инокуляции с тестируемыми антибиотиками. Определялась чувствительность микроорганизмов к 14 антимикробным препаратам: пенициллин (PEN, Sigma, Германия), амоксициллин (AMX, Sigma, Германия), цефтаролин (СНТ, «AstraZeneca, Англия), цефотаксим (Aventis Pharma, Франция), эритромицин (ERY, «Molekula», Англия), клиндамицин (CLY, «Molekula», Англия), левофлоксацин (LVX, «Molekula», Англия), моксифлоксацин (MFX, «Molekula», Англия), тетрациклин (ТСУ, «Molekula», Англия), хлорамфеникол (СНЛ, «Molekula», Англия), ко-тримоксазол (SXT, «Molekula», Англия), имипенем (ИМР, «Molekula», Англия), меропенем (МЕМ, «Molekula», Англия), эртапенем (ЕТР, «Molekula», Англия). При тестировании использовали двойные серийные разведения химически чистых субстанций антибиотиков в микротитровальных планшетах (НПО «Медполимер», Санкт-Петербург). Суспензию вносили в лунки микротитровальных планшетов с помощью многоканальных пипеток (Dynatech, Германия). После этого планшеты инкубировали при температуре 35°C в течение 20–24 ч в обычных атмосферных условиях.

Интерпретацию результатов проводили в соответствии с рекомендациями CLSI и EUCAST ([www.eucast.org](http://www.eucast.org)). При каждом определении чувствительности для контроля качества использовали штамм, рекомендованный CLSI - *S.pneumoniae* ATCC 49 619. Все эксперименты проводились на базе лаборатории молекулярной микробиологии и эпидемиологии ФГБУ ДНКЦИБФМБА России.

## 2.3. Молекулярные методы

### Выделение ДНК

Геномную ДНК выделяли из цельной крови и суспензии транспортной среды *ESwab* с помощью набора ДНК-Сорб (производство Интерлабсервис) в соответствии с инструкциями изготовителей. Образцы ДНК хранили при 80°С. При постановке ПЦР 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>). Биологические образцы, содержащие ДНК пневмококков, использовали для ПЦР-типирования.

### Детекция *S. pneumoniae* в клиническом материале

*ПЦР-типирование S. pneumoniae с электрофоретической детекцией.* ПЦР-типирование ДНК из культур пневмококков, а также ДНК пневмококков, обнаруженной в крови или жидкости среднего уха, проводили методом, описанным в работе [168], 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>).

Праймеры и зонды, используемые для детекции ДНК пневмококков и типирования капсульных полисахаридов методом ПЦР в реальном времени приведены в Таблицах 2 и 3, соответственно.

**Таблица 2** Праймеры, используемые в ПЦР в реальном времени для детекции ДНК пневмококков и типирования капсульных полисахаридов

Мишень	Нуклеотидная последовательность 5' - 3'
lytA1rt-f	tcgtgcgttttaattccagct
lytA1rt-r	acgcaatctagcagatgaagca
15A/15Frt-f	aattgcctataaactcattgagatag
15A/15Frt-r	ccataggaaggaaatagtattgttc

18C/18A/18B/18Frt-f	tcgatggctagaacagatttatgg
18C/18A/18B/18Frt-r	ccattgtccctgtaagaccattg
16Frt-f	taatggtatgaccttggaatcttccc
16Frt-r	tcccaaaggataatcaataacttttagaag
19art-f	cgcctagtctaaatacca
19Art-r	gaggtcaactataatagtaagag
19Frt-f	tgaggttaagattgctgatcg
19Frt-r	cacgaatgagaactcgaataaaag
22f/22art-f	tctattaataaaccattggaattgaaacg
22F/22Art-r	tcgcaattgaagaccacataaaactg
23Art-f	ctcccctccattaccatttgg
23Art-r	tgaagaaagtgctgtttgtgaacc
23firt-f	gacagcaacgacaatagtcatctc
23Frt-r	tccatccaacctaacacacttc
> 3333F/33A/37rt-f	ggaactggttcagcaactatacg
1) 33F/33A/37rt-r	ggttctaagaccgtctgaaatacc
1rt-f	tttcatccctatgtgtggtatag
1rt-r	gctttagaaggtagagttaacaac
2rt-f	tgttatcccatataagaaccgagtgt
2rt-r	aaaattacccaaaagctatccaa
3rt-f	ccactaaagctttggcaaaagaaa
3rt-r	cccgaacgtaaagcttcttca
4rt-f	gcttctgctgtaactgttgtgc
4rt-r	caccaccatagtaaccaaagtcc
5rt-F	catgatttatgcctcttgcaa
5rt-R	gacagtataagaaaagcaagggctaa
6a/6b/6c/6drt-f	gtttgactagagtatgggaagg
6A/6B/6C/6Drt-r	tagcctttctgaaaacatttagcg
6C/6Drt-f	ttgggatgattggcgtattag
6C/6Drt-r	ctcttcaattagttcttcagttcg
7f/7art-f	atgaaggctttggttgacagg
7F/7Art-r	attctcgccatcaattgcatattc
9v/9art-f	aggtatcctatatactgctttagg
9v/9art-r	cgaatctgccaatatctgaaag

11a/11drt-f	Aaatggtttggatattggtttggttgg
11a/11drt-r	Agtgctaactgtaaaacttgattatgag
12f/12a/12b/44/46rt-f	gcacccacgggtaaatattctac
12f/12a/12b/44/46rt-r	caactaagaaccaaggatccacag
14rt-f	agagtgtatgaggaatcc
14rt-r	atatatctactgtagaggaat

**Таблица 3** Зонды, используемые для детекции ДНК пневмококков и ее типирования методом ПЦР в реальном времени

Мишень	Нуклеотидная последовательность
lytA probe	(FAM)tg-ccg-aaa-acg-c(T-RTQ1)t-gat-aca-ggg-ag(P)
15A/15F- Probe	(FAM)cc-c(G-LNA)c-a(A-LNA)a-c(T-LNA)c-t(G-LNA)t-cct-(RTQ1)
18C/18A/18B/18F-Probe	(R6G)ag-gga-gtt-gaa-tca-acc-tat-aat-ttc-gcc-cc(BHQ2)
16F-Probe	(R6G)ag-cca-taa-gtc-t(T-BHQ1)c-caa-atg-ctt-aac-cgc-t(P)
19A-Probe	(FAM)ta-tca-atg-agc-cga-tcc-gtc-act-t(RTQ1)
19F-Probe	(ROX)cg-c(A-LNA)c-t(G-LNA)t-c(A-LNA)a-t(T-LNA)c-acc-ttc-(BHQ2)
22F/22A- Probe	(R6G)tc-cgt-aat-(T-BHQ1)cg-ctt-atg-ggc-aca-ttc-tcc-a(P)
23A-Probe	(ROX)ag-cta-gaa-c(T-BHQ2)c-cca-cac-tcc-cta-ctc-cca-(P)
23F-Probe	(Cy5)at-tgt-gtc-ca(T-BHQ2)-aac-cct-tcg-tcg-tat-ttc-caa-ag(P)
33F/33A/37- Probe	(R6G)cc-cca-aat-agg-ac(T-BHQ1)-ttt-ctg-cca-tgc-caa-a(P)
1-Probe	(FAM)tg-c(C-LNA)a-a(A-LNA)g-c(C-LNA)a-g(C-LNA)c-at(RTQ1)
2-Probe	(FAM)tt-gca-att-(T-BHQ1)ca-att-ttt-ttg-ccc-cao-tct-c(P)
3-Probe	(R6G)tt-gta-gac-cgc-ccc-aca-a(T-BHQ1)t-cat-ttt-gt(P)
4-Probe	(Cy5)tt-cca-caa-aag-aag-agc-cta-cag-gta-acc-cca-(BHQ2)
5-Probe	(FAM)tc-ttc-ttc-tca-(T-BHQ1)cg-ttt-ccg-cat-gct-ttt-(P)
6A/6B/6C/6D-Probe	(FAM)tg-ttc-tgc-cc(T-BHQ1)-gag-cao-ctg-gtc-ttg-tat-c(P)
6C/6D-Probe	(FAM)cc-a(C-LNA)g-c(A-LNA)a-t(T-LNA)c-g(C-LNA)c-atc-(RTQ1)
7F/7A-Probe	(ROX)ac-acc-act-ata-ggc-tgt-tga-gac-taa-cgc-aca-(BHQ2)
9V/9A-Probe	(R6G)ac-a(C-LNA)a-t(T-LNA)g-a(C-LNA)a-a(C-LNA)c-gct-(BHQ2)
11A/11D-Probe	(Cy5)at-tcc-aac-ttc-tcc-cao-ttt-ctg-cca-cgg-(BHQ2)
12F/12A/12B/ 44/46-Probe	(Cy5)tg-ccc-acc-aac-acc-agg-tcc-agg-t(BHQ2)
14-Probe	(FAM )cg-cca-agt-aac-a(T-BHQ1)t-tcc-att-cca-tt(P)

## **Оптимизация ПЦР в реальном времени для детекции ДНК пневмококков в биологическом материале и типирования капсульных полисахаридов.**

Ниже приведены условия проведения ПЦР в реальном времени для детекции в биологическом материале ДНК пневмококков. В качестве мишени использовали ген пневмококкового аутолизина – *lytA* (реакция I).

Образцы биологического материала, в которых была обнаружена ДНК пневмококков (276 изолятов), использовали для типирования капсульных полисахаридов (реакции I – V). Перечисленные реакции проводили последовательно до получения положительного результата.

### **Реакция I.**

➤ *lytA*: для ДНК, выделенной из культур и смыва из уха:

Праймеры – по 10 пМ на одну реакцию (конечная концентрация в реакционной смеси 0,4 пМ/мкл)

Зонд – 2,5 пМ на одну реакцию (конечная концентрация в реакционной смеси 0,1 пМ/мкл)

Условия: 95С – 5 мин, 39 циклов (95С – 10 сек, 58С – 25 сек, 72С – 10 сек)

Использовали qPCRmix-HS (Евроген)

➤ *lytA* + НВВ: для ДНК, выделенной из крови:

Праймеры *LytA* – по 10 пМ на одну реакцию (конечная концентрация в реакционной смеси 0,4 пМ/мкл)

Праймеры НВВ – по 30 пМ на одну реакцию (конечная концентрация в реакционной смеси 1,2 пМ/мкл)

Зонд *LytA* - 2,5 пМ на одну реакцию (конечная концентрация в реакционной смеси 0,1 пМ/мкл)

Зонд НВВ - по 10 пМ на одну реакцию (конечная концентрация в реакционной смеси 0,4 пМ/мкл)

Mg<sup>2+</sup> - 2 мМ

*TaqF*-полимераза – 2,5 ед/ реакция

Условия: 95С – 15 мин, 39 циклов (95С – 10 сек, 56С – 25 сек, 72С – 10 сек)

### **Реакция II.**

6A/B/C/D + 9A/V + 23F

Праймеры – по 10 пМ на одну реакцию (конечная концентрация в реакционной смеси 0,4 пМ/мкл)

Зонды 6a/b/c/d и 9a/v – по 5 пМ на одну реакцию (конечная концентрация в реакционной смеси 0,2 пМ/мкл)

Зонд 23f – по 15 пМ на одну реакцию (конечная концентрация в реакционной смеси 1,2 пМ/мкл)

Условия: 95С – 5 мин, 39 циклов (95С – 10 сек, 54С – 25 сек, 72С – 10 сек)

Использовали qPCRmix-HS (Евроген)

### **Реакция III.**

19F + 18A/B/C/F + 15A/F

Праймеры – по 10 пМ на одну реакцию (конечная концентрация в реакционной смеси 0,4 пМ/мкл)

Зонды 18A/B/C/F + 15A/F – по 5 пМ на одну реакцию (конечная концентрация в реакционной смеси 0,2 пМ/мкл)

Зонд 19F – по 10 пМ на одну реакцию (конечная концентрация в реакционной смеси 1 пМ/мкл)

Условия: 95С – 5 мин, 39 циклов (95С – 10 сек, 58С – 25 сек, 72С – 10 сек)

Использовали qPCRmix-HS (Евроген)

### **Реакция IV.**

19A + 3 + 12A/B/F/44/46

Праймеры – по 10 пМ на одну реакцию (конечная концентрация в реакционной смеси 0,4 пМ/мкл)

Зонды 3 и 12A/B/F/44/46 – по 5 пМ на одну реакцию (конечная концентрация в реакционной смеси 0,2 пМ/мкл)

Зонд 19A – по 5 пМ на одну реакцию (конечная концентрация в реакционной смеси 0,4 пМ/мкл)

Условия: 95С – 5 мин, 39 циклов (95С – 10 сек, 50С – 25 сек, 72С – 10 сек)

Использовали qPCRmix-HS (Евроген)

#### **Реакция V.**

7A/F + 4 + 5

Праймеры – по 10 пМ на одну реакцию (конечная концентрация в реакционной смеси 0,4 пМ/мкл)

Зонд 7A/F – по 2,5 пМ на одну реакцию (конечная концентрация в реакционной смеси 0,1 пМ/мкл)

Зонд 5 – по 5 пМ на одну реакцию (конечная концентрация в реакционной смеси 0,2 пМ/мкл)

Зонд 4 – по 10 пМ на одну реакцию (конечная концентрация в реакционной смеси 0,4 пМ/мкл)

Условия: 95С – 5 мин, 39 циклов (95С – 10 сек, 56С – 25 сек, 72С – 10 сек)

Использовали qPCRmix-HS (Евроген)

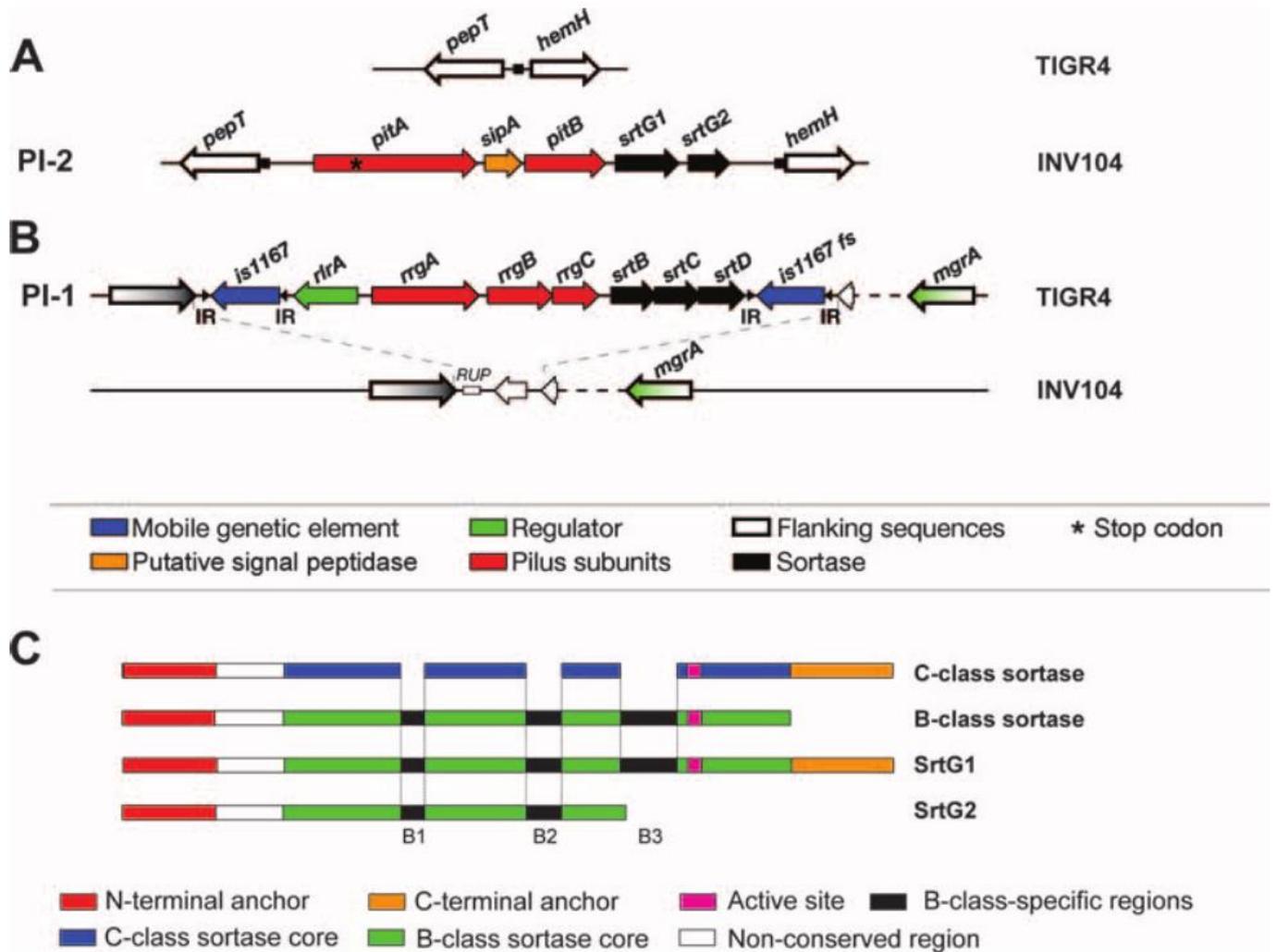
### **2.4. Детекция генов ворсинок**

Для исследования брали суточную культуру пневмококка, всего в исследование было включено 103 штамма *S. pneumoniae*. Выделение ДНК производилось с помощью набора ДНК-Сорб Б (Интерлабсервис, Россия), по стандартному протоколу. Для всех культур предварительно был определен серотип. Наличие генов ворсинок обоих типов определялось с помощью ПЦР. Праймеры для исследования были взяты из статей [73, 75, 158], условия амплификации проверялись с помощью программы Oligo 7 (DBA Oligo, Inc.,

США). В итоге был подобран следующий температурный профиль для ПЦР реакции: 94°C 2 мин.; 94°C 30 сек., 55°C 30 сек., 72°C 45 сек., 30 циклов; 5 мин 72°C, 4°C хранение. В качестве мишеней были выбраны: *Rlra* locus, консервативные гены, фланкирующие пили-оперон, а также ряд генов, кодирующих различные белки, участвующие в синтезе ворсинок (Таблица 4).

**Таблица 4** Праймеры для детекции ворсинок

Мишень	Праймер	5'-3' последовательность
Пили II детекция	1008for	GCTGGATCGAGTTTGAAACCAGAA
Пили II детекция	1009rev	TAAGGATCACCAAAGTCCAAGGCA
Пили II детекция	INTf	ATGGCTTCAGGGGCTATGTTTCGGTG
Пили II детекция	INTrev	TTTCAGTGTATGTTTTAGTGCTTCA
Пили I детекция	459 for	AACTGAATTGACACAACGTGTCTT
Пили I детекция	470 rev	GCCACACAAGATGTTGATGCTTTT
Пили I детекция	P01 rev	AGCGACAAGCCACTGTATCATATT
Пили I детекция	<i>Rlr_srtC_F</i>	GGGGAAGATTATGCGACCTT
Пили I детекция	<i>Rlr_srtD_R</i>	GCTTGGCTCTGCACGGTGCC



**Рис 10** Схема генетической организации регионов кодирующих ворсинки [73]

Согласно литературным данным [73, 76] у ворсинок второго типа отсутствует регуляторный элемент *rlrA*, а также в биосинтезе самих субъединиц ворсинок участвуют совершенно другие белки. (Рис.10).

#### Схема детекции ворсинок I типа:

1. ПЦР с праймерами (459 for, 470 rev), фланкирующими оперон, при отсутствии *rrgA*-островка ПЦР-продукт меньшего размера.
2. ПЦР с праймерами (459 for, P01 rev), амплифицирующими регион внутри *rrgA*-островка.
3. ПЦР с праймерами (Rlr\_srtC\_F, Rlr\_srtD\_R), контрольный ПЦР, на наличие генов, кодирующих сортазу.

### Схема детекции ворсинок II типа:

1. ПЦР с праймерами (1008for ,1009rev) фланкирующими пили-II регион, при отсутствии такового детектировался ампликон меньшего размера. 1008for-INTrev.
2. ПЦР с праймерами (1008for-INTrev) для детекции участка внутри пили-II региона, продукт получался только при наличии пили-II региона.
3. ПЦР с праймерами (INTfor-1009rev) для детекции участка внутри пили-II региона, продукт получался только при наличии пили-II региона.

### 2.5. Мультилокусное сиквенс-типирование

Оценка клональности была проведена для 82 изолятов *S.pneumoniae*.

Мультилокусное сиквенс-типирование основано на анализе внутренних фрагментов следующих генов «домашнего хозяйства»:

- *aroE* (shikimate dehydrogenase)
- *gdh* (glucose-6-phosphate dehydrogenase)
- *gki* (glucose kinase)
- *recP* (transketolase)
- *spi* (signal peptidase I)
- *xpt* (xanthine phosphoribosyltransferase)
- *ddl* (D-alanine-D-alanine ligase)

Для амплификации фрагментов генов «домашнего хозяйства», используемых для последующего мультилокусного сиквенс-типирования (MLST), использовали ранее рекомендованные праймеры и следующий температурный профиль: 94°C — 2 мин; 94°C — 15 сек., 56°C — 30 сек., 72°C — 30 сек., 35 циклов; 72°C — 10 мин; 4°C — хранение (<http://spneumoniae.mlst.net>).

Определение нуклеотидных последовательностей фрагментов семи генов «домашнего хозяйства» и *cps*-генов проводили модифицированным методом Сенгера с использованием

набора ABI Prism® BigDTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit на генетическом анализаторе ABI 3730 согласно рекомендациям производителя. В реакции секвенирования генов «домашнего хозяйства» и генов капсульных полисахаридов использовали те же праймеры, что и в реакции амплификации (Таблица 5).

**Таблица 5** Праймеры, используемые для амплификации генов «домашнего хозяйства»

Ген	Обозначение праймеров	Последовательность 5' → 3'	Размер амплифицируемого фрагмента (п.н)
aroE	aroE-F	GCCTTTGAGGCGACAGC	479
	aroE-R	TGCAGTTCA(G/A)AAACAT(A/T)TTCTAA	
gdh	gdh-F	ATGGACAAACCAGC(G/A/T/C)AG(C/T)TT	659
	gdh-R	GCTTGAGGTCCCAT(G/A)CT(G/A/T/C)CC	
gki	gki-F	GGCATTGGAATGGGATCACC	626
	gki-R	TCTCCCGCAGCTGACAC	
recP	recP-F	GCCAАCTCAGGTCATCCAGG	572
	recP-R	TGCAACCGTAGCATTTGTAAC	
spi	spi-F	TTATTCCTCCTGATTCTGTC	560
	spi-R	GTGATTGGCCAGAAGCGGAA	
xpt	xpt-F	TTATTAGAAGAGCGCATCCT	572
	xpt-R	AGATCTGCCTCCTTAAATAC	
ddl	ddl-F	TGC(C/T)CAAGTTCCTTATGTGG	513
	ddl-R	CACTGGGT(G/A)AAACC(A/T)GGCAT	

Анализ последовательностей генов «домашнего хозяйства» с определением сиквенс-типов (ST) 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>), позднее для этих целей использовалась программа Phyloviz 2.0 [55].

## 2.6. Полногеномное секвенирование

Для полногеномного секвенирования были выбраны 13 штаммов, представляющих наиболее распространенные и интересующие нас группы в пневмококковой популяции Санкт-Петербурга (Таблица 6).

**Таблица 6** Изоляты отобранные для полногеномного секвенирования

Изолят	Этиология	Пенициллин	Эритромицин	Серотип	Сиквенстип
spn78	ОСО	+/-	+	19А	9587
spn133	ОСО	+	+	19А	663
spn148	ОСО	+	+	19F	320
spn154	ОСО	-	-	3	новый
spn158	носитель	-	-	3	505
spn198	носитель	+	+	9VA	236
spn252	ОСО	-	-	23F	новый
spn322	носитель	-	-	3	13161
spn349	ВБП	+	+	19А	320
spn375	ОСО	-	-	3	новый
spn438	ОСО	+	+	19F	236
spn558	носитель	+/-	-	19F	2296
spn3733	носитель	+	+	19А	271

Штаммы 78, 133, 148, 349, 438 характеризовались множественной устойчивостью к антибактериальным препаратам, были выделены от больных острыми формами ОСО и ВБП 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 не характерного 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.

### **2.6.1. Выделение геномной ДНК и приготовление библиотек**

Выделение геномной ДНК осуществлялось на колонках с помощью набора QIAamp DNA Mini Kit. Из суточной культуры *S. pneumoniae* готовили взвесь мутностью приблизительно 3 единицы по стандарту McFarland, после чего ее переносили в 1.5 мл Eppendorf с лизирующим буфером. Дальнейший процесс выделения и очистки геномной ДНК соответствовал стандартному протоколу набора. После элюции полученную ДНК разгоняли в 1% агарозном геле в присутствии ДНК маркера 500 – 10000 п.н. 1 kb DNA Ladder («Ахургер», США), для оценки качества и концентрации получившейся ДНК. Для получения более точных данных по концентрации нуклеиновых кислот в элюате использовался флюориметр Qubit 2.0 («Invitrogen», США). Для окончательной очистки от примеси остатков РНК и белков проба при 37°C полчаса инкубировалась с РНКазой А и Протеиназой К. Подготовка библиотек ДНК и проведение эмульсионной ПЦР и сиквенса осуществлялось согласно стандартному протоколу Ion Torrent.

### **2.6.2 Анализ и обработка данных секвенирования**

Оценка качества полученных ридов производилась с помощью программного обеспечения Ion Torrent, а также с помощью программы FastQC [23], после чего производилась сборка генома deNovo. В ходе работы были опробованы различные ассемблеры: Mira [33], Spades [22], CLCbio (QIAGEN), Velvet [66]. Лучше всего себя зарекомендовали ассемблер Spades - качеством сборки, а также ассемблер CLCbio - удобством интерфейса. После deNovo

сборки, полученные контиги картировали на референс, в качестве референтных были выбраны штаммы *Streptococcus pneumoniae* ST556, OX141, INV200, Taiwan19F-14. Для выравнивания и ориентации контигов, анализа и сравнения геномов использовалась программа Mauve [36]. Для завершения сборки драфт-геномов и ориентации контигов относительно референса использовался онлайн-сервер Contiguator 2.0 [40]. Основная работа по анализу и интерпретации результатов выполнялась в программах Unipro Ugene [43], Geneious 11 [48]. Для аннотации использовались онлайн сервер RAST [57] и программа Glimmer3 [37]. Первичные данные по патогенности, резистентности 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/>). МЛСТ типирование осуществлялось с помощью онлайн базы данных PubMLST (<http://pubmlst.org>). Профаговые элементы определяли с помощью ресурса PHAge Search Tool (<http://phast.wishartlab.com/>) онлайн-сервера PHASTER [20]. Визуализация результатов осуществлялась во встроенном в Geneious 11 браузере, а так же в геном-браузерах IGV [65] и IGB [39]. Расчет ряда статистических показателей, а также частично обработка результатов секвенирования осуществлялась с помощью языка программирования R и набора пакетов для него BioConductor [42].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ОЦЕНКИ СЕРОТИПИОГО СОСТАВА *S.PNEUMONIAE*, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ

Согласно дизайну исследования, было решено проанализировать отдельно выборки клинического материала от больных ОСО и ВБП, а также в качестве контрольной группы взять выборку культур пневмококка, выделенных от здоровых носителей.

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

В ходе исследования методом парацентеза был получен биологический материал из полости среднего уха у 482 детей с острым средним отитом. Результаты детекции *S. pneumoniae* и/или ДНК бактерий классическими микробиологическими методами и/или ПЦР представлены в Таблице 7.

**Таблица 7** 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 (n, %) 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%)

Положительными на пневмококк были 192 образца (41,8%), в 62 случаях (12,9%) удалось получить жизнеспособную культуру. Во всех остальных случаях была обнаружена только пневмококковая ДНК. Как следует из материалов таблицы, этиологическая роль пневмококков была наибольшей у детей младшей возрастной группы (0 - < 2 лет), возбудитель был выделен в 41,8% случаев. У детей в возрасте от 5 до 18 лет частота выделения пневмококков была почти в 2 раза ниже (23%). При этом, во всех возрастных группах ДНК пневмококков с помощью ПЦР выявляли существенно чаще, чем жизнеспособные бактерии.

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 лет) – 62,6%; 41% - у детей от 2 до 5 лет; у детей старшей возрастной группы (5<18 лет) доля пневмококковых отитов снижается до 26,4% (Таблица 9).

Исследование выявило в общей сложности 18 серотипов и серогрупп, встречающихся у детей больных ОСО. Преобладающими серотипами оказались 19F (28,1%), 3 (19,3%), 14 (8,3%), далее идут серотипы 14, 9LN и серогруппа 6ABC (все по 6,8%), 10% образцов оказались нетипируемыми. Примечательно, что у детей младшей возрастной группы (от 2 до 5 лет) преобладали наиболее распространенные серотипы, так, доля серотипа 19F составила 40,4%, 3 серотипа – 21,1%, а общее количество редких и нетипируемых штаммов составило всего лишь 12,8%. В то же время, для старшей возрастной группы характерно более равномерное распределение серотипов, возрастает доля редких и нетипируемых - 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 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.

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

Образцы крови получены у 452 детей с рентгенологически подтвержденной внебольничной пневмонией. ДНК *S. pneumoniae* обнаружена в 56 (12,4%) случаях. Результаты ПЦР-типирования представлены в Таблице 10. 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%, значительной была доля серотипа 14 – 8,8%. Особо следует отметить необычно 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 9).

Из 94 взрослых с рентгенологически подтвержденной внебольничной пневмонией ДНК пневмококков обнаружена у 35 (37,2%). Результаты ПЦР-типирования представлены в Таблице 10. 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%.

**Таблица 9.** Распределение пневмококковых серотипов у больных ОСО разных возрастных групп (процентное соотношение).

		Серотипы, % положительных проб																			
Пациенты (n) Возраст (лет)	Количество (%) положительных проб	ПКВ7/10 серотипы/серогруппы						Добавленные ПКВ13 серотипы			Не вакцинные серотипы/серогруппы										
		6A/B/C	9V/A	14	18A/B/C/F	19F	23F	Total ПКВ 7/10	3	19A	Total ПКВ 13	8	9L/N	10A	35AC/42	20	34	11AD	15BC	38/25F	H/тип
91 0 - < 2	57 (62.6%)	7.0	3.5	8.8	1.8	40.4	3.5	64.9	21.1	1.8	87.8	0	5.3	0	1.8	1.8	0	0	0	1.8	1.8
217 2 - < 5	89 (41.0%)	10.1	2.2	10.1	0	25.8	9.0	57.3	16.9	6.7	80.1	1.1	6.7	0	0	2.2	1.1	0	1.1	0	6.7
174 5 - < 18	46 (26.4%)	2.2	2.2	4.3	2.2	15.2	6.5	32.6	21.7	2.2	56.5	2.2	8.7	5.0	0	0	0	2.2	0	0	26.1
Всего, 482 0 - < 18	192 (39.8%)	6.8	2.6	8.3	1.0	28.1	6.8	53.6	19.3	4.2	77.1	1.0	6.8	1.0	0.5	1.6	0.5	0.5	10.5	0.5	10.0

Таким образом, охват ПКВ7 и ПКВ10 не отличался и составил 42,9%, в то время как ПКВ13 обеспечивает охват 68,2% серотипов, выделенных от пациентов с госпитализированной внебольничной пневмонией. Всего пневмококк удалось диагностировать в 16,8% образцов крови от больных ВБП. Эффективность диагностики у взрослых и детей отличалась почти в 3 раза, что, очевидно, связано с тем, что практически все образцы взрослых были от пациентов с тяжелыми формами заболевания. Следует также отметить различия в частоте встречаемости 19F (17,1% против 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%, для 13-валентной – 68,2%.

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

Всего было проанализировано 133 образца клинического материала и чистых культур, выделенных от бессимптомных носителей. 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%. (Таблица 11).

### **3.4. Заключение по главе 3**

Среди 482 исследованных образцов аспирата среднего уха 192 (41,8%) были положительными на предмет наличия пневмококковой ДНК, в 62 образцах (13,5%) удалось получить жизнеспособную культуру. Результаты серотипирования для чистых культур и клинического материала, полученных из одних и тех же образцов, полностью совпали. .

Таблица 10. 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 11. Серотиповый состав *S. pneumoniae*, выделенных от здоровых детей при носительстве.

Кол-во изолятов	Серотипы (%)															
	Входящие в ПКВ7							Плюс ПКВ13			Невакцинные					Прочие и НТ
	6A/B/C/D	9V/A	14	18	19F	23F	ПКВ7	3	19A	ПКВ13	10A	12F	15	17F	35F	
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

Если рассматривать распределение частоты случаев ОСО пневмококковой этиологии по возрастным группам, то наблюдается преобладание случаев заболевания у детей младшей группы (0<2 лет) – 62,6%; 41% - у детей от 2 до 5 лет; у детей старшей возрастной группы (5<18 лет) доля пневмококковых отитов снижается до 26,4%.

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 системы организма. Соответственно, наиболее оправданно вакцинировать именно эту возрастную группу.

Среди образцов крови от больных внебольничной пневмонией следы пневмококковой ДНК были обнаружены в 91 образце из 542 (16,7%). 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 у возрастной категории до 18 лет было определено только 56 положительных результатов из 452 (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 невакцинных 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

практически не отличалось и составило 57,1% и 71,4% для ПКВ7/10 и ПКВ13 у возрастной группы до 18 лет и 51,6% и 68,2% для ПКВ7/10 и ПКВ13 у группы старше 18 лет. Анализ распределения серотипов чистых культурах дал следующие результаты: всего ПКВ7/10 и ПКВ13 были представлены соответственно 60,8% и 73,6% 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 бессимптомных 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.

## ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ ОЦЕНКИ УРОВНЯ УСТОЙЧИВОСТИ *S.PNEUMONIAE* К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ

Характеристика антибиотикочувствительности *S. pneumoniae*, выделенных при здоровом носительстве и при пневмококковых инфекциях, приведена в Таблице 12.

### 4.1. Резистентность *S. pneumoniae* к бета-лактамным антибиотикам

**Пенициллин.** Для детального анализа устойчивости пневмококков к пенициллину на рисунке 7 приведено распределение МПК антибиотика в отношении всех включенных в исследование изолятов, а также значения критериев чувствительности, предлагаемые EUCAST и CLSI. Для пенициллина в отношении *S. pneumoniae* за «эпидемиологическую точку отсечения» принята МПК = 0.06 мкг/мл

К микробиологически устойчивой популяции относились 32,4% изученных изолятов. Критерии EUCAST и CLSI совпадают при оценке чувствительности при менингите и при инфекциях другой локализации. *S. pneumoniae*, выделенные при менингите, считаются устойчивыми к пенициллину при МПК > 0.06 мкг/мл, в исследованной выборке таких изолятов оказалось 32,4%. 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 остром отите, был существенно ниже и составил по критериям EUCAST и CLSI, соответственно, 7,5% и 2,5%.

**Амоксициллин.** Интерпретация результатов оценки чувствительности *S. pneumoniae* к аминопенициллинам также связана с определенными трудностями. CLSI предлагает одинаковые критерии чувствительности к амоксициллину и амоксициллину/клавуланату, согласно этим критериям 2,0 % изученных изолятов относились к категории устойчивых (МПК  $\geq$  8.0 мкг/мл), 2,8 % - к промежуточным (МПК=4.0 мкг/мл). Согласно критериям EUCAST пневмококки относят к чувствительным к ампициллину при МПК  $\leq$  0.5 мкг/мл, к промежуточным при МПК = 1,0 – 2,0 мкг/мл, к устойчивым при МПК  $>$  2,0 мкг/мл. В рамках данного исследования МПК ампициллина была определена в отношении 70 изолятов, полученных от пациентов с острым отитом, среди них 14,3 % относились к промежуточным и устойчивым.

**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 среди всех 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 пневмонии (77.8%), наибольший – среди выделенных при отите (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 бессимптомных носителей, в то время как у больных ВПБ и ОСО их доля составляла от 9,9% до 11,1% по EUCAST и 2,8%-3,8% - по CLSI.

## **4.2. Резистентность к макролидам и линкозамидам**

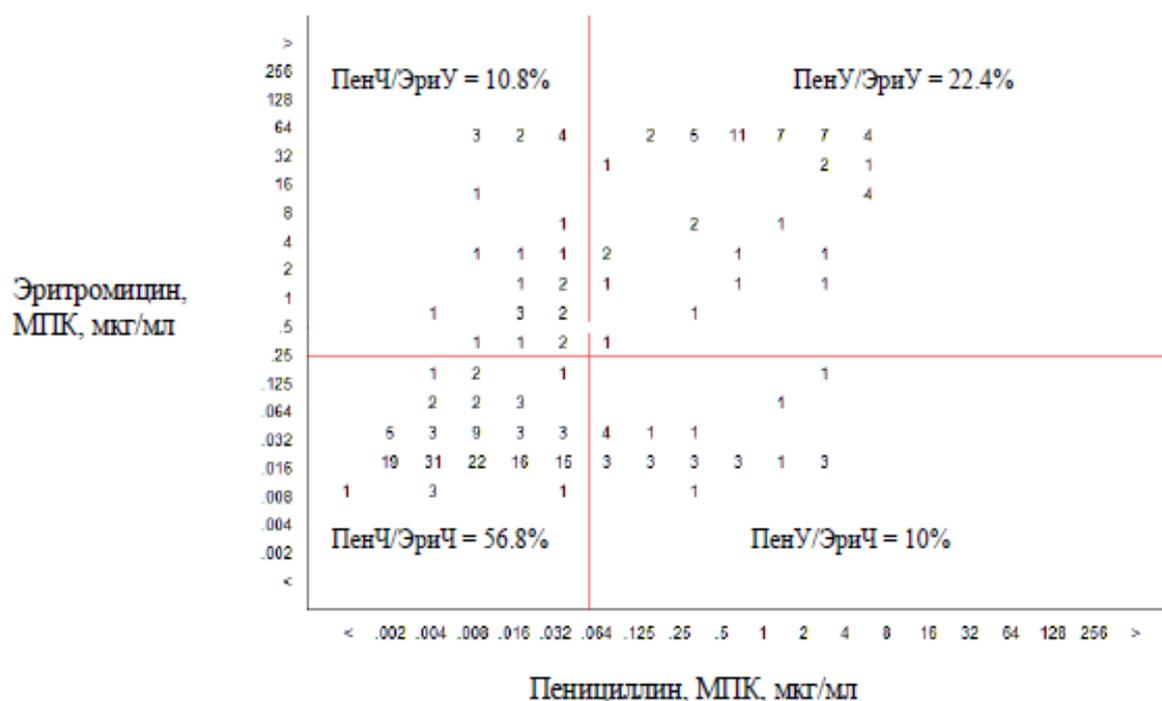
Критерии чувствительности пневмококков к эритромицину (индикаторному антибиотику для 14- и 15-членных макролидов) у EUCAST и

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 острым отитом (21,2%). К клиндамицину 14,8% штаммов проявляло устойчивость.

### **Моксифлоксацин**

К моксифлоксацину устойчивых штаммов найдено не было.

**Ассоциированная устойчивость *S. pneumoniae* к пенициллину и эритромицину.** На рисунке 11 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.



**Рис 11** Распределение МПК эритромицина и пенициллина в отношении *S. pneumoniae* (количество изолятов, подавляемых различными концентрациями антибиотиков)

**Таблица 12** 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

***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%), наименьший – от пациентов с отитом (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 пневмонией (37,5%) и от здоровых носителей (38,7%), наименьшая – среди изолятов от пациентов с отитом (28,8%).

***Резистентность к хлорамфениколу.***

Среди всех изученных изолятов устойчивыми оказались 46,2%, наибольшая частота устойчивости отмечена среди изолятов от пациентов с пневмонией (47,2%) и от здоровых носителей (50,7%), наименьшая – от пациентов с отитом (38,0%).

Резюмируя итоги оценки результатов тестирования резистентности к антибактериальным препаратам, необходимо отметить высокий уровень устойчивости к макролидным антибиотикам, в частности, уровень устойчивости к эритромицину составил 31,2%, причем к промежуточно устойчивым 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 почти в 2 раза ниже, чем к эритромицину, и составил 14,8%. Не было выявлено устойчивых изолятов к моксифлоксацину. Что касается данных по тетрациклину, ко-тримоксазолу и хлорамфениколу – полученные результаты демонстрируют достаточно удручающую картину: процент устойчивых штаммов составил 33,2, 34,8 и 46,2%, соответственно. Для 22,8% штаммов была выявлена множественная устойчивость одновременно к бета-лактамам и макролидным антибиотикам.

### **4.3. Антибиотикорезистентность среди изолятов *S. pneumoniae*, принадлежащих к различным серотипам**

Данные об антибиотикорезистентности пневмококков различных серотипов приведены в Таблице 13. Как следует из представленных материалов, наибольшая частота устойчивости была характерна для изолятов серотипа 19А. Все 11 изолятов этого серотипа проявляли выраженное в разной степени снижение чувствительности к пенициллину, а также отличались в сравнении с другими серотипами наиболее высокой частотой устойчивости амоксициллину, цефотаксиму, цефтаролину, эритромицину и тетрациклину. Серотип 19А уступал другим серотипам только по частоте устойчивости к хлорамфениколу и ко-тримоксазолу.

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 острого отита (21% случаев) проявилась в несколько меньшей частоте устойчивости среди пневмококков, выделенных от пациентов с ОСО в сравнении с другими группами.

**Таблица 13.** Распространение снижения чувствительности к пенициллинам (% нечувствительных изолятов) среди пневмококков различных серотипов, выделенных у 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/t	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>

#### 4.4. Заключение по главе 4

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, 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. Для каждого отдельного антибиотика можно было выделить свои нюансы при интерпретации результатов.

Так, пенициллин в клинической практике в России для лечения респираторных инфекций, прежде всего пневмонии, применяется неоправданно редко, антибиотик сохраняет свое значение как индикаторный препарат для выявления микробиологической устойчивости к бета-лактамам. Идеология EUCAST предполагает четкое разграничение микробиологической и клинической чувствительности/устойчивости. Основным параметром, отделяющим «дикую» (лишенную приобретенной устойчивости) популяцию от микробиологически устойчивой, является «эпидемиологическая точка отсечения». Для пенициллина в отношении *S. pneumoniae* за

«эпидемиологическую точку отсечения» принята МПК = 0.06 мкг/мл. К микробиологически устойчивой популяции относились 32,4% изученных изолятов.

И EUCAST и CLSI декларируют, что для обоснования критериев клинической чувствительности/устойчивости они используют данные об активности антибиотиков *in vitro*, результаты фармакодинамического моделирования и клинических наблюдений, однако, лишь EUCAST приводит конкретные данные. Так, клинические критерии чувствительности к пенициллину обоснованы в документе «European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Benzylpenicillin: Rationale for the EUCAST clinical breakpoints», version 1.0 <http://www.eucast.org>. Общим для EUCAST и CLSI является использование различных критериев для изолятов, полученных при менингите и при инфекциях другой локализации. *S. pneumoniae*, выделенные при менингите, считаются устойчивыми к пенициллину при МПК > 0.06 мкг/мл, в исследованной выборке таких изолятов оказалось 32,4 %.

К полученным результатам следует относиться с осторожностью, прогнозировать уровень резистентности к пенициллину пневмококков, вызывающих менингит, вряд ли возможно, поскольку практически все изученные изоляты были выделены при респираторных инфекциях. Учитывая широкие возможности по варьированию доз пенициллина в процессе лечения, EUCAST конкретизирует рекомендации по дозированию антибиотика при пневмонии в зависимости от чувствительности возбудителя. При лечении пневмонии, вызванной *S. pneumoniae* с МПК ≤ 0.5 мкг/мл, возможно использовать пенициллин в суточной 7,7 млн ЕД. При МПК возбудителя ≤ 1.0 мкг/мл рекомендуется суточная доза 11.4 – 15.4 млн ЕД, а при МПК ≤ 2.0 мкг/мл необходима доза до 24 млн ЕД. CLSI не выделяет отдельных категорий микробиологической и клинической устойчивости и относит все изоляты с МПК ≤ 2.0 мкг/мл к категории чувствительных, но в комментарии указывает, что для лечения пневмококковых инфекций с указанным уровнем чувствительности возбудителя необходимо использовать дозу пенициллина не

менее 12 млн ЕД в сутки. По критерия CLSI при МПК пенициллина 4,0 мкг/мл изоляты относят к промежуточным, для лечения вызванных ими инфекций необходимо использовать антибиотик в дозе 18 – 24 млн ЕД в сутки, указанный уровень устойчивости был выявлен у 6,0 % изолятов. В отношении 3,6 % изолятов МПК пенициллина составила 8,0 мкг/мл, по критериям CLSI они были отнесены к устойчивым. Очевидно, что критерии EUCAST по сравнению с критериями CLSI являются более жесткими, однако, скорее всего, они позволяют с большей достоверностью прогнозировать эффективность лечения, что имеет неоспоримое практическое значение. Так, 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 остром отите, был существенно ниже и составил по критериям EUCAST и CLSI соответственно 7,5 % и 2,5 %. При этом необходимо отметить, что парентеральное применение пенициллина для лечения пневмококковых инфекций верхних дыхательных путей и, в частности, острого отита нецелесообразно[4].

Интерпретация результатов оценки чувствительности *S. pneumoniae* к аминопенициллинам также связана с определенными трудностями. CLSI предлагает одинаковые критерии чувствительности к амоксициллину и амоксициллину/клавуланату, согласно этим критериям 2,0 % изученных изолятов относились к категории устойчивых (МПК  $\geq$  8,0 мкг/мл), 2,8 % - к промежуточным (МПК=4,0 мкг/мл). Существенных различий в частоте снижения чувствительности к амоксициллину среди *S. pneumoniae*, выделенных при различных инфекциях и у здоровых носителей не выявлено. Каких либо комментариев по использованию аминопенициллинов для лечения пневмококковых инфекций CLSI не приводит.

EUCAST до настоящего времени не разработал критерии чувствительности к амоксициллину, амоксициллину/клавуланату и ампициллину/сульбактаму. Для оценки чувствительности к перечисленным

антибиотикам предлагается использовать результаты определения МПК ампициллина.

В 2015 году к клиническим критериям чувствительности пневмококков к бета-лактамам EUCAST был добавлен комментарий, согласно которому при инфекциях, вызванных изолятами с промежуточной чувствительностью к ампициллину, следует избегать перорального назначения ампициллина, амоксициллина и амоксициллина/клавуланата (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 5.0, 2015. <http://www.eucast.org>). Каких либо обоснований данной рекомендации EUCAST не приводит. Согласно критериям EUCAST, пневмококки относят к чувствительным к ампициллину при МПК  $\leq 0,5$  мкг/мл, к промежуточным - при МПК = 1,0 – 2,0 мкг/мл, к устойчивым при МПК  $> 2,0$  мкг/мл. В рамках данного исследования МПК ампициллина была определена в отношении 70 изолятов, полученных от пациентов с острым отитом, среди них 14,3 % относились к промежуточным и устойчивым.

Вполне очевидно, что различия в уровне устойчивости к амоксициллину, получаемые при использовании различных критериев (5,8% устойчивости при использовании критериев CLSI против 14,3% при использовании критериев EUCAST), имеют существенное значение для планирования эмпирической терапии пневмококковых инфекций нижних и верхних дыхательных путей. К сожалению, ни EUCAST, ни CLSI не предоставляют обоснований предлагаемых критериев.

Различия в критериях чувствительности к цефотаксиму по EUCAST и CLSI незначительны. В обеих системах изоляты считаются устойчивыми при МПК  $> 2,0$  мкг/мл. К чувствительным по EUCAST относятся изоляты при МПК  $\leq 0,5$  мкг/мл, а по CLSI - при МПК  $\leq 1,0$  мкг/мл. Таким образом, частота устойчивых изолятов среди всех, 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 пневмонии (77,8%), наибольший – среди выделенных при отите (97,6%).

В отличие от других бета-лактамов цефтаролин обладает более высокой аффинностью в отношении белка ПСБ2х, который определяет устойчивость к пенициллину *S. pneumoniae*. Высокая аффинность цефтаролина ко всем шести ПСБ пневмококка делает его активным в отношении штаммов, устойчивых к пенициллину, амоксициллину, цефалоспорином, макролидам и фторхинолонам. Для активности цефтаролина в отношении *S. pneumoniae* характерны принципиально те же закономерности, что и для цефотаксима, но уровень чувствительности самый высокий среди бета-лактамов[9].

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 острым отитом (21,2%).

Несмотря на незначительные различия в критериях чувствительности к клиндамицину между EUCAST и CLSI, результаты интерпретации полностью совпали. Частота устойчивости к клиндамицину (маркер резистентности к 16-членным макролидам) была приблизительно в 2 раза ниже, чем к эритромицину, и в среднем составила 14,8%. Наибольший уровень устойчивости был отмечен среди изолятов, полученных от носителей, наименьший – среди изолятов от пациентов с отитом.

Критерии чувствительности к моксифлоксацину по EUCAST существенно жестче, чем по CLSI, однако, устойчивых изолятов выявлено не было.

Критерии чувствительности пневмококков к тетрациклину между EUCAST и CLSI совпадают. В среднем частота устойчивости к тетрациклину составила 33,2%. Наибольший уровень был отмечен среди изолятов,

полученных от пациентов с пневмонией (41,7%), наименьший – от пациентов с отитом (30,0%).

Несмотря на незначительные различия в критериях между EUCAST и CLSI, результаты оценки чувствительности к ко-тримоксазолу с использованием двух указанных систем совпали. В среднем, среди всех изученных изолятов к устойчивым относились 34,8%. Наибольшая частота устойчивости была выявлена среди изолятов, полученных от пациентов с пневмонией (37,5%) и от здоровых носителей (38,7%), наименьшая – среди изолятов от пациентов с отитом (28,8%)[9].

Результаты оценки чувствительности пневмококков к хлорамфениколу по CLSI и EUCAST полностью совпали, несмотря на незначительные различия в критериях. Среди всех изученных изолятов устойчивыми оказались 46,2%, наибольшая частота устойчивости отмечена среди изолятов от пациентов с пневмонией (47,2%) и от здоровых носителей (50,7%), наименьшая – от пациентов с отитом (38,0%)[9].

Исходя из полученных данных, очевидна необходимость снижения доли макролидных антибиотиков при терапии пневмококковых заболеваний, 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 наиболее высокой частотой устойчивости амоксициллину, цефотаксиму, цефтаролину, эритромицину и тетрациклину. Серотип 19А уступал другим серотипам только по частоте устойчивости к хлорамфениколу и ко-тримоксазолу. Для других распространенных серотипов (19F, 6A/B/C 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, 18A/B/C, 12F, 15, 35F, 10A, 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.

ГЛАВА 5. РЕЗУЛЬТАТЫ ОЦЕНКИ РАСПРОСТРАНЕНИЯ  
ВОРСИНОК В ПОПУЛЯЦИИ *S.PNEUMONIAE*

**5.1. Распространение ворсинок в популяции *S. pneumoniae***

Результаты детекции ворсинок у *S. pneumoniae*, выделенных у здоровых детей при носительстве, приведены в Таблице 14. Всего было проанализировано 133 штамма от больных ОСО и бессимптомных носителей.

**Таблица 14.** Частота продукции различных типов ворсинок у *S. pneumoniae*, выделенных у здоровых детей при носительстве и при ОСО

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), 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

## 5.2. Заключение по главе 5

Во многом 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, какой-то 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 результаты не дают сделать каких-либо четких выводов о роли пили в патогенезе пневмококка и позволяют лишь выдвинуть гипотезу о возможной роли ворсинок II типа в колонизации верхних дыхательных путей и отсутствия их роли в проникновении в полость среднего уха.

## ГЛАВА 6. РЕЗУЛЬТАТЫ МУЛЬТИЛОКУСНОГО СИКВЕНСТИПИРОВАНИЯ ПОПУЛЯЦИИ *S.PNEUMONIAE*

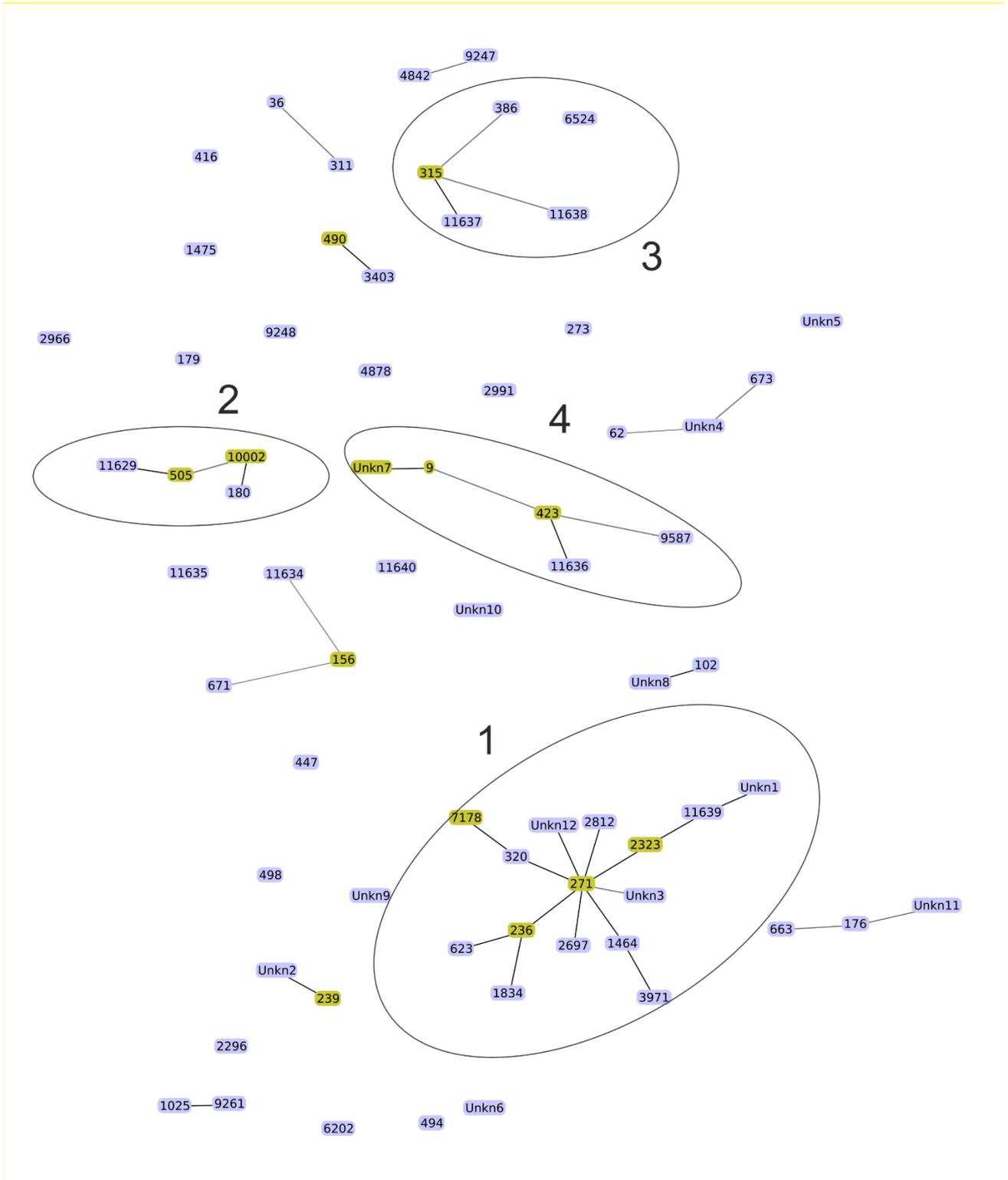
### 6.1. Мультилокусное сиквенстипирование популяции *S. pneumoniae*

Была проанализирована выборка из 82 изолятов (Рис. 12), 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). Данные по распределению устойчивости к антибактериальным препаратам среди циркулирующих в Санкт-Петербурге клональных линий представлены на Рисунке 12.

Было проведено типирование выборки 33 штаммов от больных инвазивными формами пневмококковых заболеваний (63 % из них устойчивые к макролидам, 48 % - со множественной устойчивостью) и 61 штамма от 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 – 39,4 %, серогруппа 6 – 19,2 %, серотип 19А составил 12,8% (80% клонов - устойчивые к макролидам, 60% мультирезистентные), 3 – 13,8%, 23F - 4,3 %, прочие серотипы и нетипируемые штаммы составили 10,5% (Рис 15).

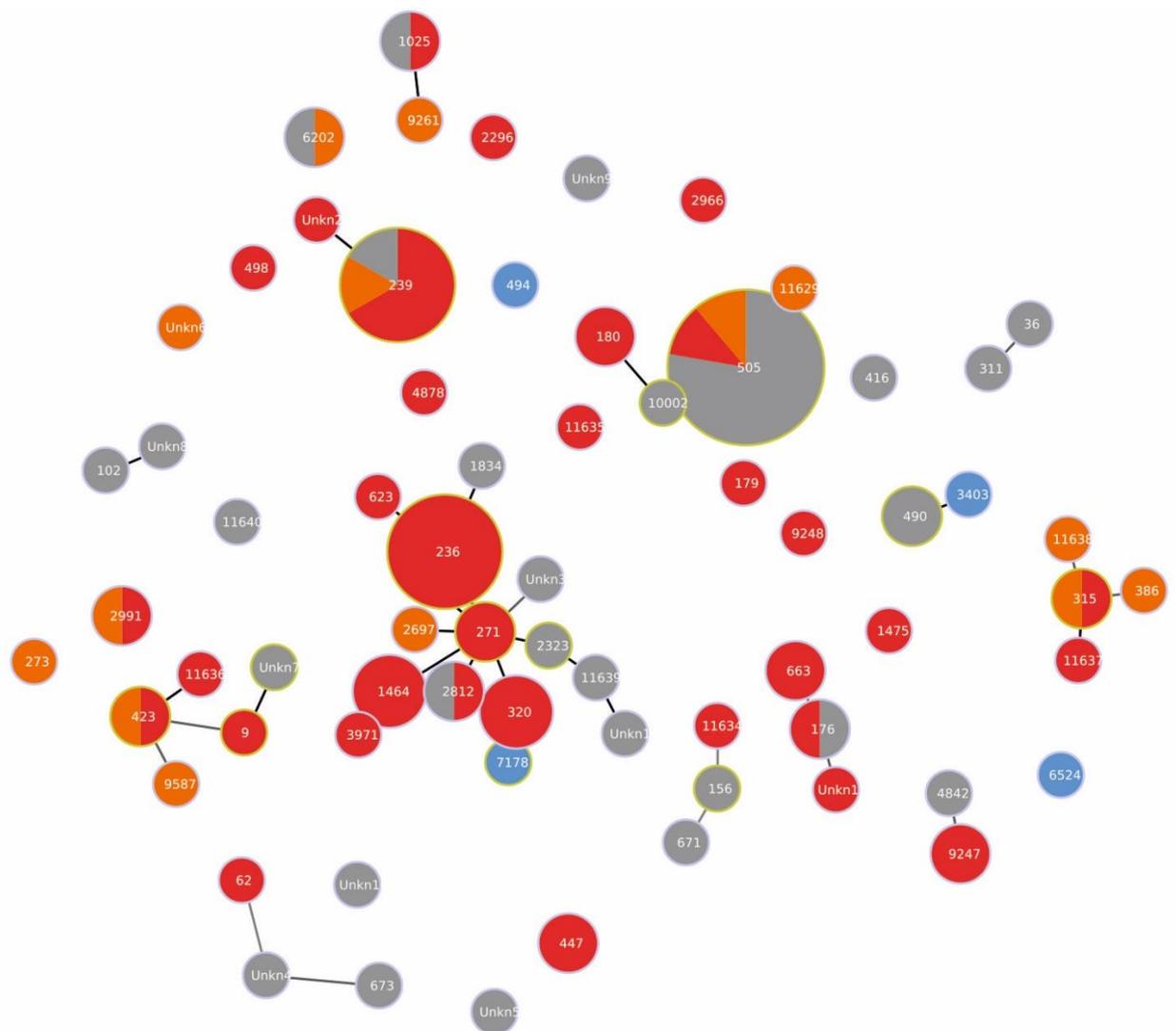
В процессе МЛСТ-типирования Санкт-Петербургской популяции *S.pneumoniae*, особый интерес вызвало выявление в ней глобальных клональных комплексов, в частности, ассоциированных с множественной резистентностью к антибактериальным препаратам. В этом плане, на локальном уровне мы видим соблюдение общемировых тенденций: среди исследованной выборки были обнаружены представители целого ряда глобальных клональных комплексов, из которых особо можно выделить 320 клональный комплекс, представленный 23 изолятами, преимущественно с

серотипами 19F и 19A, для 17 из которых характерна множественная устойчивость как к бета-лактамам, так и к макролидам.



**Рис 12** Клональные линии, встречающиеся в популяции г Санкт-Петербурга, изображение сделано при помощи Phyloviz 2.0

Цифрами обозначены наиболее значимые клональные комплексы, встречающиеся в популяции: 1 – КК320(КК271), 2 – КК505(КК180), 3 – КК315, 4 – КК423.

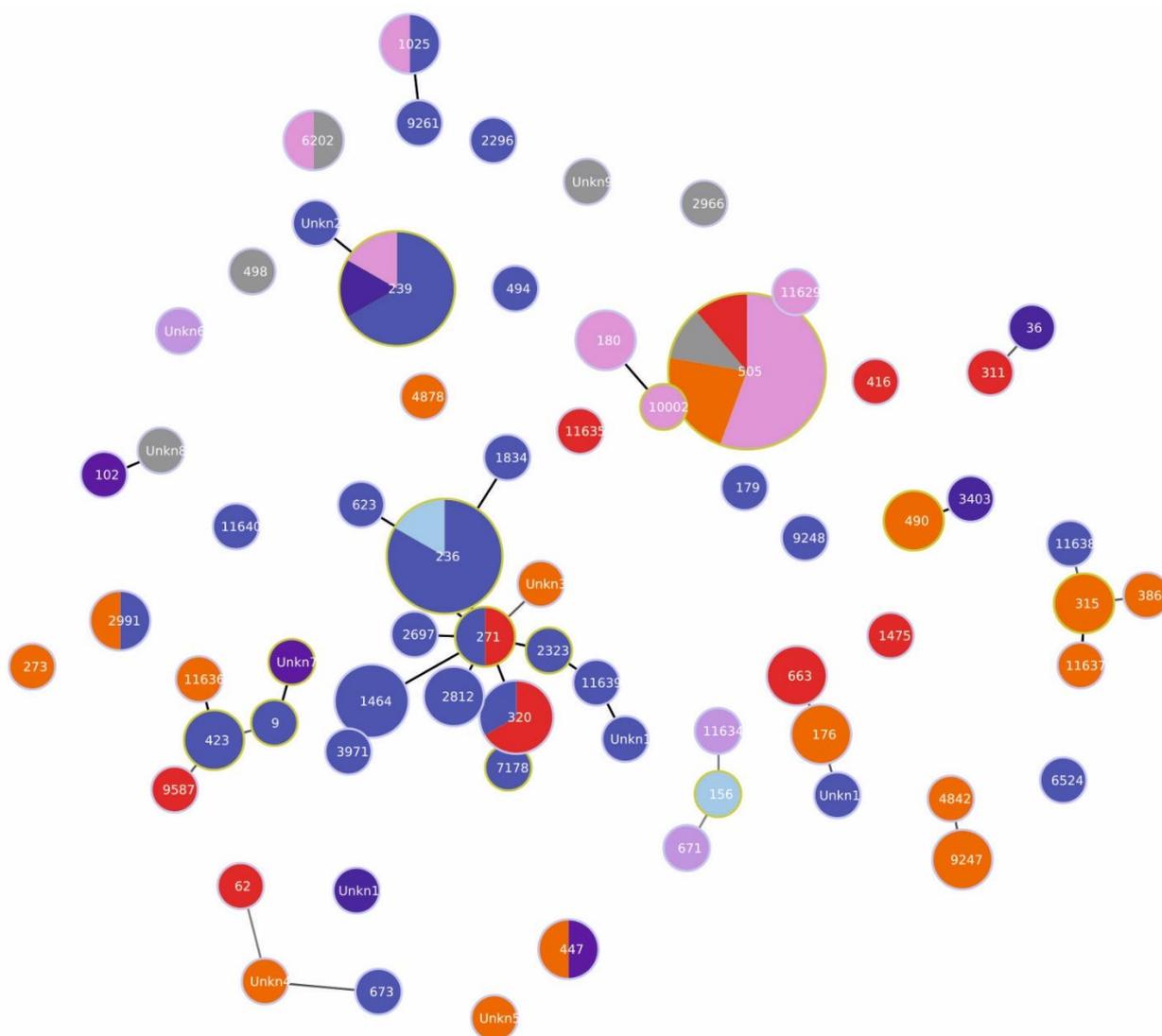


**Рис 13** Резистентность к пенициллину и эритромицину среди циркулирующих в г. Санкт-Петербурге клональных линий *S.pneumoniae*, изображение сделано при помощи *Phyloviz 2.0*

Красным выделены штаммы, устойчивые к обоим антибиотикам, оранжевым – только к эритромицину, голубым – к пенициллину, серым – чувствительные.

В Санкт-Петербурге 320КК был представлен следующими сиквенс-типами: СТ236 (6), СТ320 (3), СТ271 (2), СТ1464 (3), СТ2812 (2), СТ623, СТ1834, СТ2323, СТ2967, СТ3971, СТ7178 и СТ11639 встречались по одному разу. Для штаммов 320КК в исследованной выборке была характерна следующая этиология: 7(30,5%) штаммов были выделены от больных ВБП и менингитами, по 8(34,7%) – от бессимтомных больных и больных ОСО.





*Рис 15 Серотиповый состав циркулирующих в городе Санкт-Петербурге клональных линий*

*Наиболее распространенные серотипы, входящие в существующие вакцины, обозначены соответствующим цветом: 19F – синим, группа 6 – розовым, 23 – темно-синим, 18С –фиолетовым, 14 – светло- голубым, 3 – оранжевым, 19А– красным, невакцинные серотипы обозначены серым.*

## 6.2. Заключение по главе 6

Для 81 изолята было проведено МЛСТ-типирование. Данная выборка включала 33 штамма от больных ОСО и ВВП, а также 48 штаммов, выделенных от бессимптомных носителей. 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 8 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/Ф 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 сиквенстипы, 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 3 серотипа, циркулирующие в Санкт-Петербурге, относились к СТ505, 180, 239, 6202, 1025, 10002, наиболее представлен был СТ505 (4 штамма из 10) и СТ180(2 штамма из 10). Практически все вышеперечисленные сиквенстипы относятся к одному глобальному комплексу КК180 и достаточно близки друг к другу филогенетически. Что интересно все изоляты СТ505 проявляли чувствительность к антибактериальным препаратам и были выделены от бессимптомных носителей. Отдельно выделяется в этой группе 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.

## ГЛАВА 7. РЕЗУЛЬТАТЫ ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ *S.PNEUMONIAE*

### 7.1. Полногеномное секвенирование популяции *S. pneumoniae*

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 острыми формами ОСО и ВБП и принадлежали к серотипам 19А/Ф, 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. Характеристика качества сиквенсов и результатов сборки геномов представлена в таблице 15. Риды и собранные драфт-геномы были загружены в глобальную публичную базу данных Genebank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), в рамках проекта ID 422173. Результаты аннотации геномов, а также предсказания их потенциальных функций представлены в таблице 16. Результаты предварительного анализа резистоста и патогенности штаммов представлены в таблице 17.

Таблица 15 Характеристика результатов полногеномного секвенирования

Изолят	N ридов	N кнтигов	Ср.размер	Макс. конт	Мин. конт	Длина сиквенса	GC контент	N25	N50	N75
spn78	269325	44	4886	203307	506	2150231	39,49%	155648	107007	55341
spn133	316164	103	2172	141590	502	2237867	39,56%	102166	74215	54376
spn148	481607	62	3296	206124	505	2043842	39,69%	94692	68023	33858
spn154	573790	57	3712	199933	519	2115912	39,63%	170099	89248	58499
spn158	507876	57	3464	194144	505	1974892	39,72%	158618	75940	47512
spn198	480105	60	3491	336320	541	2095077	39,62%	122170	73066	48773
spn252	561462	87	2417	26971	504	2102833	39,58%	109923	62170	30675
spn322	569472	70	2974	161910	503	2082317	39,62%	92792	61559	43994
spn349	556659	119	2784	162143	504	2060298	39,79%	93361	66514	42982
spn375	534670	52	4064	228020	542	2113614	39,62%	179289	107583	57740
spn438	672627	69	2961	171956	505	2043629	39,70%	81216	59088	33884
spn558	882370	51	4048	186999	558	2064581	39,69%	115186	85122	53214
spn3733	984122	53	3891	219175	503	2062286	39,72%	174119	112040	56867

Таблица 16 Результаты аннотации геномов и распределения функций определенных генов

	78	133	148	154	158	198	252	322	349	375	438	558	3733
<b>Всего генов</b>	2256	2344	2112	2213	2154	2056	2166	2206	2257	2202	2110	2168	2173
<b>Кофакторы, витамины, пигменты</b>	147	166	136	164	157	157	153	156	163	162	149	158	152
<b>Клеточная стенка и капсула</b>	118	134	133	121	118	109	107	133	142	122	133	131	133
<b>Вирулентность, защита</b>	55	58	54	52	61	49	52	53	61	52	54	50	54
<b>Метаболизм калия</b>	15	15	15	15	18	15	14	15	15	15	15	15	15
<b>Различного назначения</b>	14	14	14	14	15	14	15	14	15	14	14	15	14
<b>Фаги, профаги, транспозоны, плазмиды</b>	14	21	2	9	2	2	2	3	3	9	2	12	2
<b>Мембранный транспорт</b>	86	98	72	106	85	92	96	98	94	104	85	104	87
<b>Метаболизм железа</b>	23	32	28	25	23	23	25	26	29	25	28	24	27
<b>РНК метаболизм</b>	105	103	106	106	110	105	106	108	115	106	106	106	107
<b>Нуклеозиды и нуклеотиды</b>	84	84	84	83	90	83	83	84	91	83	86	84	85
<b>Метаболизм белков</b>	186	189	189	184	202	185	186	188	201	184	189	185	189
<b>Клеточный цикл и деление</b>	36	38	36	37	41	36	37	57	38	36	36	36	36
<b>Хемотаксис и подвижность</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>Регуляция клеточного сигналинга</b>	41	34	38	34	36	32	35	31	36	33	34	532	33
<b>Вторичный метаболизм</b>	7	6	4	6	5	5	5	5	5	6	4	5	4
<b>Метаболизм ДНК</b>	112	126	117	135	134	116	126	121	139	127	117	117	121
<b>Жирные кислоты и липиды</b>	65	66	63	65	69	62	64	64	67	65	63	64	64
<b>Метаболизм азота</b>	6	6	7	7	7	7	8	7	7	7	7	6	7
<b>Дыхание</b>	22	13	13	13	14	13	13	13	13	13	1	13	13
<b>Устойчивость к стрессу</b>	43	44	44	44	47	43	44	45	44	44	13	43	45
<b>Метаболизм ароматических соединений</b>	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
<b>Аминокислоты и производные</b>	218	214	210	221	231	219	214	217	226	221	212	213	211
<b>Метаболизм серы</b>	14	13	10	11	12	11	11	9	11	11	10	12	10
<b>Метаболизм фосфора</b>	30	30	30	30	34	32	30	30	34	30	30	30	30
<b>Метаболизм углеводов</b>	291	304	299	299	326	303	299	303	313	300	288	289	290

Таблица 17. Результаты анализа резистома и патогенности штаммов

Ген, фенотип	78	133	148	154	158	198	252	322	349	375	438	558	3733
Серотип	19А	19А	19F	3	3	9VA	23F	3	19А	3	19F	19F	19А
Сиквенстип	9587	663	320	N	505	236	N	13161	320	N	236	2296	271
tet(M), устойчивость к тетрациклину	+	+	+						+		+		+
erm(B), устойчивость к макролидам	+	+	+						+		+		+
msr(D), устойчивость к макролидам, линкозамидам, стрептограммину Б			+								+		+
mef(A), устойчивость к макролидам			+						+		+		+
pat(B), компонент эффлюкс-насоса, общая устойчивость к антибиотикам	+	+							+				+
pmr(A), компонент эффлюкс-насоса, общая устойчивость к антибиотикам									+	+			+
gImA(II), компонент эффлюкс-насоса, общая устойчивость к антибиотикам	+	+							+				+
rbr1A, устойчивость к бета-лактамам	+	+							+				+
rbr2X, устойчивость к бета-лактамам	+	+							+				+

## 7.2. Заключение по главе 7

Отдельно надо отметить, что полногеномное секвенирование изолятов *S.pneumoniae* было проведено впервые в России и с его помощью были заложены предпосылки для будущих фундаментальных исследований биологии бактерии и механизмов, отвечающих за ее патогенез и вирулентность.

## ГЛАВА 8. 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 проб.

Всего было обработано и исследовано 1024 образца клинического материала (546 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 различных средах, 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 РФ. 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, детерминирующих устойчивость к макролидным антибиотикам. Для части штаммов выборочно определялся сиквенс-тип с помощью методики МЛСТ-типирования.

Данное исследование было начато до введения 13-валентной конъюгированной вакцины в календарь прививок. Стоит отметить, что данные, полученные в нашей лаборатории во многом совпали с данными других российских групп изучающих пневмококк [14, 53, 64]. Серотипы 19F, 23F, серогруппа 6 являлись преобладающими в локальной популяции, крайне интересен факт высокой доли серотипа 3. Также, как и в остальном мире, наблюдается тенденция пол увеличения доли 19A серотипа, который ассоциирован с мультирезистентными глобальными клональными комплексами КК320 и КК423. Полученные в ходе работы данные позволили во многом оценить ее потенциальную эффективность 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 во многом послужили обоснованием для принятия решения об интродукции 13-валентной вакцины в Национальный календарь прививок.

Результаты по тестам на антибиотикочувствительность и наличие *mef/erm* показали ожидаемо высокий процент резистентных и мультирезистентных изолятов. Так, процент штаммов, устойчивых к бета-лактамам, на примере пенициллина, составил 9,6% (22,8% умеренно-чувствительных), к макролидам, на примере эритромицина - 31,2% (2% умеренно-чувствительных), штаммов с устойчивостью к обоим антибиотикам - 21,2%.

*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 следует необходимость перманентного мониторинга как для отслеживания изменений генетической структуры популяции, в частности, серотипового состава, так и своевременной детекции новых клональных линий, устойчивых к антибактериальным препаратам. К сожалению, в Российской Федерации данной проблеме долгое время уделялось недостаточное внимание.

Результаты исследования во многом послужили обоснованием для принятия решения об интродукции 13-валентной вакцины в Национальный календарь прививок. На сегодняшний день вакцина Превенар ПКВ-13 введена в регулярный календарь прививок для детей младшего возраста во многих регионах РФ. На базе лаборатории молекулярной микробиологии и эпидемиологии ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России по всей стране создана сеть центров, 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 столь важном вопросе.

## ВЫВОДЫ

1. Среди штаммов *S.pneumoniae*, вызывающих острый средний отит, внебольничную пневмонию и здоровое носительство у детей, преобладали серотипы: 19F, 23F, 3, 6. Показано, что ПКВ 7/10 охватывают 53,6% при ОСО, 57,1% - при ВВП, 60,3% - при здоровом носительстве. Для ПКВ13 данные цифры составляют 77,1, 81,6%, 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, к наиболее представленным относились глобальные генетические линии относящиеся к клональным комплексам КК320, КК505, КК315 и КК423.
4. Полногеномное секвенирование изолятов *S. pneumoniae*, представляющих основные группы, встречающиеся в Санкт-Петербурге, дало целостную картину генетического окружения. Общее количество генов у секвенированных штаммов варьирует от 2056 до 2344. У резистентных штаммов обнаружено от 9 до 14 профагов и мобильных генетических элементов, что значительно больше 2-4 денных

у чувствительных изолятов. Наличие генов, отвечающих за устойчивость к антибиотикам, коррелирует с результатами оценки чувствительности методом МПК.

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 1 линии макролидные антибиотики, а в качестве стартовых, применять бетта-лактамы антибиотики, такие как пенициллин и амоксициллин.
3. С целью повышения эффективности оценки эпидемической ситуации рекомендуется применять адаптированные под конкретный серотиповый пейзаж конкретной локальной популяции схемы мультиплексных реакций ПЦР-типирования капсульных антигенов *S.pneumoniae*.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баранов А.А. Стрептококки и пневмококки: Руководство для врачей / А.А. Баранов, Н.И. Брико, Л.С. Намазова-Баранова, Л.А. Ряпис.- Ростов на Дону: «Феникс», 2013.- С. 302.
2. Белошицкий Г.В. Пневмококковые менингиты в Российской Федерации / Г.В. Белошицкий, И.С. Королева, Н.И. Кошкина // Эпидемиология и вакцинопрофилактика.- 2009.- №2.- С. 21–26.
3. Белошицкий Г.В. Фенотипическая и генотипическая характеристика штаммов пневмококков, выделенных от больных пневмококковым менингитом/ Г.В. Белошицкий, И.С. Королева, К.О. Миронов // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.- 2011.- №3.- С. 261–266.
4. Брико Н.И. Эпидемиологический надзор и тактика специфической профилактики инвазивных пневмококковых инфекций в России/ Н.И.Брико // Здоровоохранение.- 2010.- №8.- С.15-24.
5. Винник А. Л. Питательная среда для выделения и культивирования пневмококка / А. Л. Винник, А. К. Варгина, З. И. Ершова // Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунологии.- 1985.- № 8.- С. 19-22.
6. Грубер И.М. Физиологические особенности пневмококков/ И.М. Грубер, Л.Г.Жданова, Ю.В. Мохов// Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунологии.- 1981.- № 12.- С. 24–29.
7. Гучев О.И. Антибиотикопрофилактика вспышек внебольничной пневмонии в гомогенной популяции / О.И. Гучев, И.А. Клочков// Качественная клиническая практика.- 2003.- №1.- С. 24–29.
8. Зубков Е.Н. Микробиологические аспекты диагностики пневмоний/ Е.Н.Зубков, М.Н.Гугуцидзе // Пульмонология.- 1997.- №1.- С. 41–45.
9. 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, С.В.

- Сидоренко// Антибиотики и химиотерапия.- 2015.- № 1–2 (60).- С. 10–18.
10. Костюкова Н.Н. Биологические свойства и распространенность *Streptococcus pneumoniae* / Н.Н. Костюкова // Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунологии. -1981.- №12.- С. 9–16.
  11. Кречикова О.И. Выделение, идентификация и определение чувствительности к антибиотикам *Streptococcus pneumoniae* / О.И. Кречикова, Р.С. Козлов, Т.М. Богданович, О.У. Стецюк, М.М. Суворов, Л.К. Катосова, Л.А. Вишнякова, М.Е. Фаустова // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.- 2000.-Т.2, №1 .-С.88-98.
  12. Маянский Н.А. Бактериальная этиология острого среднего отита у детей до 5 лет: роль *Streptococcus Pneumoniae*/ Н.А.Маянский, Н.М. Алябьева, А.М. Иваненко, О.А. Пономаренко, Л.К. Катосова, А.В. Лазарева, Т.В. Куличенко, Л.С. Намазова-Баранова// Вопросы диагностики в педиатрии. 2013. № 3 (5). С. 5–13.
  13. Мизерский Е.В. Эпидемиология внебольничной пневмонии у детей/ Е.В. Мизерский, Ю.Л.Сорокина// Материалы совещания экспертов «Внебольничная пневмония», Москва, 24-27.03. 2005.- Москва, 2005.
  14. Миронов К.О. Идентификация и серотипирование российских штаммов *Streptococcus pneumoniae* с применением методик , основанных на ПЦР/ К.О. Миронов, А.Е. Платонов, Р.С. Козлов// Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.- 2011.- №4.- С. 304–313.
  15. Перова А.Л. Клинико-лабораторные критерии отбора детей для обследования на пневмококковую инфекцию/ А.Л. Перова, С.М. Харит, С.В. Сидоренко, С.С. Беланов// Современные подходы к диагностике, терапии и профилактике инфекционных заболеваний у детей: Научные труды.- СПб., 2014.- С. 424–436.
  16. Рудакова А.В. Фармакоэкономические аспекты вакцинации детей 13-

- валентной пневмококковой конъюгированной вакциной в Российской Федерации / А.В. Рудакова, А.А. Баранов, Ю.В. Лобзин, Н.И. Брико, Л.С. Намазова-Баранова, В.К. Таточенко, С.М. Харит, С.В. Сидоренко, И.С. Короленко, Р.С. Козлов, Н.А. Маянский, М.П. Костинов, Н.Ф. Снегова // Вопросы современной педиатрии.- 2014. - Т.13, №1.- С.51-59.
17. Сидоренко С.В. Пневмококковая инфекция и современные возможности ее профилактики - эпидемиологический обзор ситуации в мире и в России/ С.В. Сидоренко, Ю.В. Лобзин, С.М. Харит // Вопросы современной педиатрии.- 2010.- № 1 (9). -С. 62–69.
18. Харит С.М. Распространенность пневмококковых пневмоний и отитов у детей младшего возраста (Предварительные данные)/ С.М. Харит, С.В. Сидоренко, А.А. Рулева, А.Л. Перова, М.О. Волкова, В.В. Гостев, С.И. Алексеенко, А.В. Орлов// Вопросы современной педиатрии.- 2011.- № 6 (10).- С. 103–107.
19. Цыганкова О.И. Бактериальные гемолизины и связь с вирулентностью / О.И. Цыганкова.- Ставрополь: Медицина, 1988.- 50 с.
20. Arndt D. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool/ D. Arndt, J. R. Grant, A.Marcu et al.// Nucleic Acids Res.- 2016.- Volume 44, Issue W1.- P. 16-21.
21. Balsalobre L. Characterization of recombinant fluoroquinolone-resistant pneumococcus-like isolate/ L. Balsalobre, M. Ortega, A.G de la Campa// Antimicrob Agents Chemother.- 2013.- № 1 (57).- P. 254–260.
22. Bankevich A. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing / Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A.A., Dvorkin M., Kulikov A.S., Lesin V.M., Nikolenko S.I., Pham S., Prjibelski A.D., Pyshkin A. V, Sirotkin A. V, Vyahhi N., Tesler G., Alekseyev M.A., Pevzner P.A. // J Comput Biol.- 2012.- № 5 (19).- P. 455–477.
23. Brown J. FQC Dashboard: integrates FastQC results into a web-based, interactive, and extensible FASTQ quality control tool/ J. Brown, M. Pirrung, L.A. McCue // Bioinformatics.- 2017.- Volume 33, Issue 19.- P. 3137–3139.

24. Alicino C. The impact of 10-valent and 13-valent pneumococcal conjugate vaccines on hospitalization for pneumonia in children: A systematic review and meta-analysis/ Alicino C., Paganino C., Orsi A., Astengo M., Trucchi C., Icardi G., Ansaldi F. // *Vaccine*.- 2017.- № 43 (35).- P. 5776–5785.
25. CDC - Centers for Disease Control and Direct and indirect effects of routine vaccination of children with 7-valent pneumococcal conjugate vaccine on incidence of invasive pneumococcal disease--United States, 1998-2003// *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*.- 2005.- Volume 54, Issue 36.- P.893–897 .
26. Cornick J.E. *Streptococcus pneumoniae* / Cornick J.E., Everett D.B., Broughton C., Denis B.B., Banda D.L., Carrol E.D., Parry C.M., Stigg S.// *Emerging Infectious Diseases*. - 2011.- № 6 (17).- P. 2004–2006.
27. Ewald H. The Clinical Effectiveness of Pneumococcal Conjugate Vaccines: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials./ Ewald H., Briel M., Vuichard D., Kreutle V., Zhydkov A., Gloy V. // *Deutsches Arzteblatt international*.- 2016.- № 9 (113).- P. 139–46.
28. Henriques-Normark B. The pneumococcus: epidemiology, microbiology, and pathogenesis/ B. Henriques-Normark, E.I. Tuomanen// *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*.- 2013.- № 7 (3).- P. a010215
29. Moore M.R. Use of Pneumococcal Disease Epidemiology to Set Policy and Prevent Disease during 20 Years of the Emerging Infections Program/ M.R. Moore, C.G. Whitney// *Emerging Infectious Disease journal*.- 2015. -№ 9 (21).- P. 1551.
30. Porchia B.R. Evaluating the costs and benefits of pneumococcal vaccination in adults / Porchia B.R., Bonanni P., Bechini A., Bonaccorsi G., Boccalini S. // *Expert Review of Vaccines*.- 2017.- № 2 (16).- C. 93–107.
31. Song J.Y. Clinical Implications of Pneumococcal Serotypes: Invasive Disease Potential, Clinical Presentations, and Antibiotic Resistance/ J.Y. Song, M.H. Nahm, M.A. Moseley// *J Korean Med Sci*.- 2013.- № 1 (28).- P. 4–15.
32. Cherazard R. Antimicrobial Resistant *Streptococcus pneumoniae*: Prevalence, Mechanisms, and Clinical Implications./ Cherazard R., Epstein M., Doan

- T.L., Salim T., Bharti S., Smith M.A. // Am J Ther.- 2017.- № 3 (24).- P. e361–e369.
33. Chevreur B. Using the miraEST assembler for reliable and automated mRNA transcript assembly and SNP detection in sequenced ESTs / Chevreur B., Pfisterer T., Drescher B., Driesel A.J., Muller W.E., Wetter T., Suhai S. // Genome Res.- 2004.- № 6 (14).- P. 1147–1159.
34. Croucher N.J. Population genomic datasets describing the post-vaccine evolutionary epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*. / Croucher N.J., Finkelstein J.A., Pelton S.I., Parkhill J., Bentley S.D., Lipsitch M., Hanage W.P. // Sci Data. -2015.- №2.- P. 150058.
35. Dagan R. Prevention of early episodes of otitis media by pneumococcal vaccines might reduce progression to complex disease / Dagan R., Pelton S., Bakaletz L., Cohen R. // Lancet Infect Dis. -2016.- № 4 (16).- P. 480–492.
36. Darling A.E. ProgressiveMauve: multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement. / A.E. Darling, B. Mau, N.T. Perna// PLoS One.- 2010.- № 6 (5).- P. e11147.
37. Delcher A.L. Identifying bacterial genes and endosymbiont DNA with Glimmer / Delcher A.L., Bratke K.A., Powers E.C., Salzberg S.L.// Bioinformatics.- 2007.- № 6 (23).- P. 673–679.
38. Facklam R. What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes/ R. Facklam// Clin Microbiol Rev.- 2002.- № 4 (15).- P. 613–630.
39. Freese N.H. Integrated genome browser: visual analytics platform for genomics/ N.H. Freese, D.C. Norris, A.E. Loraine// Bioinformatics.- 2016.- № 14 (32).- P. 2089–2095.
40. Galardini M. CONTIGuator: a bacterial genomes finishing tool for structural insights on draft genomes / Galardini M., Biondi E.G., Bazzicalupo M., Mengoni A. // Source Code Biol Med.- 2011.- (6).-P. 11.
41. Geno K.A. Pneumococcal Capsules and Their Types: Past, Present, and Future / Geno K.A., Gilbert G.L., Song J.Y., Skovsted I.C., Klugman K.P., Jones C.,

- Konradsen H.B., Nahm M.H. // Clin Microbiol Rev.- 2015.- № 3 (28).- P. 871–899.
42. Gentleman R.C. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics / Gentleman R.C., Carey V.J., Bates D.M., Bolstad B., Dettling M., Dudoit S., Ellis B., Gautier L., Ge Y., Gentry J., Hornik K., Hothorn T., Huber W., Iacus S., Irizarry R., Leisch F., Li C., Maechler M., Rossini A.J., Sawitzki G., Smith C., Smyth G., Tierney L., Yang J.Y., Zhang J. // Genome Biol.- 2004.- № 10 (5).-P. R80.
43. Golosova O. Unipro UGENE NGS pipelines and components for variant calling, RNA-seq and ChIP-seq data analyses / Golosova O., Henderson R., Vaskin Y., Gabrielian A., Grekhov G., Nagarajan V., Oler A.J., Quinones M., Hurt D., Fursov M., Huyen Y. // PeerJ.- 2014.- №2.- P. e644.
44. Griffith F. The Significance of Pneumococcal Types/ F. Griffith // J Hyg (Lond).- 1928.- № 2 (27).- P. 113–159.
45. Henriques-Normark B., Tuomanen E.I. The pneumococcus: epidemiology, microbiology, and pathogenesis / Henriques-Normark B., Tuomanen E.I.// Cold Spring Harbor perspectives in medicine.- 2013.- № 7 (3).- P. a010215
46. Iovino F. How Does *Streptococcus pneumoniae* Invade the Brain? / Iovino F., Seinen J., Henriques-Normark B., van Dijl J.M. // Trends Microbiol.- 2016.- № 4 (24).- P. 307–315.
47. Jose R.J. Community-acquired pneumonia/ R.J. Jose, J.N. Periselneris, J.S. Brown// Curr Opin Pulm Med.- 2015.- № 3 (21).- P. 212–218.
48. Kearse M. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data / Kearse M., Moir R., Wilson A., Stones-Havas S., Cheung M., Sturrock S., Buxton S., Cooper A., Markowitz S., Duran C., Thierer T., Ashton B., Meintjes P., Drummond A. // Bioinformatics.- 2012.- № 12 (28).- P. 1647–1649.
49. Khan M.N. Vaccine candidates PhtD and PhtE of *Streptococcus pneumoniae* are adhesins that elicit functional antibodies in humans/ M.N. Khan, M.E. Pichichero// Vaccine.- 2012.- № 18 (30).- P. 2900–2907.

50. Li G. Complete genome sequence of *Streptococcus pneumoniae* strain ST556, a multidrug-resistant isolate from an otitis media patient / Li G., Hu F.Z., Yang X., Cui Y., Yang J., Qu F., Gao G.F., Zhang J.R. // J Bacteriol.- 2012.- № 12 (194).- P. 3294–3295.
51. Makarewicz O. Whole Genome Sequencing of 39 Invasive *Streptococcus pneumoniae* Sequence Type 199 Isolates Revealed Switches from Serotype 19A to 15B / Makarewicz O., Lucas M., Brandt C., Herrmann L., Albersmeier A., Ruckert C., Blom J., Goesmann A., Linden M. van der, Kalinowski J., Pletz M.W.// PLoS One.- 2017.- № 1 (12).- P. e0169370.
52. Mayanskiy A.N. Biofilm Formation by *Streptococcus pneumoniae* / Mayanskiy A.N., Chebotar I. V, Lazareva A. V, Mayanskiy N.A.// Mol Gen Mikrobiol Virusol.- 2015.- № 3 (33). P. 16–22.
53. Mayanskiy A.N. Antimicrobial resistance, penicillin-binding protein sequences, and pilus islet carriage in relation to clonal evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A in Russia, 2002-2013 / Mayanskiy N., Savinova T., Alyabieva N., Ponomarenko O., Brzhozovskaya E., Lazareva A., Katosova L., Kozlov R. // Epidemiol Infect.- 2017.- № 8 (145).- P. 1708–1719.
54. McIntosh E.D. Global prevailing and emerging pediatric pneumococcal serotypes/ E.D. McIntosh, R.R. Reinert // Expert Rev Vaccines.- 2011.- № 1 (10).- P. 109–129.
55. Nascimento M. PHYLOViZ 2.0: providing scalable data integration and visualization for multiple phylogenetic inference methods / Nascimento M., Sousa A., Ramirez M., Francisco A.P., Carrico J.A., Vaz C. // Bioinformatics.- 2017.- № 1 (33).- P. 128–129.
56. Nuorti J.P. Prevention of pneumococcal disease among infants and children - use of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine and 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine - recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) / Nuorti J.P., Whitney C.G. // MMWR Recomm Rep.- 2010. -№ RR-11 (59).- P. 1–18.
57. Overbeek R. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using

- Subsystems Technology (RAST) / Overbeek R., Olson R., Pusch G.D., Olsen G.J., Davis J.J., Disz T., Edwards R.A., Gerdes S., Parrello B., Shukla M., Vonstein V., Wattam A.R., Xia F., Stevens R. // *Nucleic Acids Res.*-2014.- 42 (D1).- P. D206-D214.
58. Perez-Maya A.A. Complete Genome Sequence of *Streptococcus pneumoniae* Serotype 19A, a Blood Clinical Isolate from Northeast Mexico / Perez-Maya A.A., Hinojosa-Robles R.M., Barcenas-Walls J.R., Vignau-Cantu A., Barrera-Saldaña H.A., Ortiz-Lopez R.// *Genome Announc.*- 2016.- Volume 4, Issue 2.- P. e00195-16.
59. Pillai D.R. Genome-wide dissection of globally emergent multi-drug resistant serotype 19A *Streptococcus pneumoniae* // *BMC Genomics.*- 2009.- (10).- P. 642.
60. Reinert R.R. Mechanisms of macrolide resistance among *Streptococcus pneumoniae* isolates from Russia / Reinert R.R., Filimonova O.Y., Al-Lahham A., Grudinina S.A., Ilina E.N., Weigel L.M., Sidorenko S. V // *Antimicrob Agents Chemother.*- 2008.- № 6 (52).- P. 2260–2262.
61. Saokaew S. Cost Effectiveness of Pneumococcal Vaccination in Children in Low- and Middle-Income Countries: A Systematic Review / Saokaew S., Rayanakorn A., Wu D.B., Chaiyakunapruk N. // *Pharmacoeconomics.*- 2016.- № 12 (34).- P. 1211–1225.
62. Schroeder M.R. Macrolide Resistance in *Streptococcus pneumoniae*/ M.R. Schroeder, D.S. Stephens// *Front Cell Infect Microbiol.*- 2016. - №6.- P. 98
63. Takeuchi N. Emergence of quinolone-resistant strains in *Streptococcus pneumoniae* isolated from paediatric patients since the approval of oral fluoroquinolones in Japan / Takeuchi N., Ohkusu M., Hoshino T., Naito S., Takaya A., Yamamoto T., Ishiwada N. // *J Infect Chemother.* 2017. № 4 (23). P. 218–223.
64. Tatochenko V. *Streptococcus pneumoniae* serotype distribution in children in the Russian Federation before the introduction of pneumococcal conjugate vaccines into the National Immunization Program / Tatochenko V., Sidorenko

- S., Namazova-Baranova L., Mayanskiy N., Kulichenko T., Baranov A., Lobzin Y., Kharit S., Kozlov R., Andreeva I., Muravjev A., Chagaryan A., Koroleva I., Beloshitskiy G., Mironov K., Degtyareva E., Reinert R.R.// *Expert Rev Vaccines*.- 2014.- № 2 (13).- P. 257–264.
65. Thorvaldsdottir H. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration/ H. Thorvaldsdottir, J.T. Robinson, J.P. Mesirov / *Brief Bioinform.*- 2013.- № 2 (14).- P. 178–192.
66. Zerbino D.R. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs/ D.R. Zerbino, E. Birney // *Genome Res.*- 2008.- № 5 (18).- P. 821–829.
67. Adam H.J. Association between fluoroquinolone usage and a dramatic rise in ciprofloxacin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Canada, 1997-2006 / Adam H.J., Hoban D.J., Gin A.S., Zhanel G.G. // *Int J Antimicrob Agents*.- 2009.- № 1 (34).- P. 82–85.
68. Alane S.R. Association of serotypes of *Streptococcus pneumoniae* with disease severity and outcome in adults: an international study / Alane S.R., McGee L., Jackson D., Chiou C.C., Feldman C., Morris A.J., Ortqvist A., Rello J., Luna C.M., Baddour L.M., Ip M., Yu V.L., Klugman K.P. // *Clin Infect Dis*.- 2007.- № 1 (45).- P. 46–51.
69. Albarracín Orió A.G. Compensatory evolution of pbp mutations restores the fitness cost imposed by  $\beta$ -lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae*. / Albarracín Orió A.G., Piñas G.E., Cortes P.R., Cian M.B., Echenique J. // *PLoS pathogens*.- 2011.- № 2 (7).- P. e1002000.
70. Amo E. D. Serotypes and Clonal Diversity of *Streptococcus pneumoniae* Causing Invasive Disease in the Era of PCV13 in Catalonia, Spain / Amo E. D., Esteva C., Hernandez-Bou S., Galles C., Navarro M., Sauca G., Diaz A., Gassiot P., Marti C., Larrosa N., Ciruela P., Jane M., Sa-Leao R., Munoz-Almagro C.// *PLoS One*.- 2016. -№ 3 (11).- P. e0151125.
71. Andersson D.I. Persistence of antibiotic resistance in bacterial populations/ D.I. Andersson, D. Hughes// *FEMS Microbiology Reviews*.- 2011. -№ 5 (35).- P.

901–911

72. Baek J.Y. Prevalence of antimicrobial resistant *Streptococcus pneumoniae* serotype 11A isolates in Korea, during 2004-2013, due to the increase of multidrug-resistant clone, CC166 / Baek J.Y., Kim S.H., Kang C.I., Chung D.R., Peck K.R., Ko K.S., Song J.H. // *Infection, Genetics and Evolution*.- 2016.- №38.- P. 122–125.
73. Bagnoli F. A second pilus type in *Streptococcus pneumoniae* is prevalent in emerging serotypes and mediates adhesion to host cells / Bagnoli F., Moschioni M., Donati C., Dimitrovska V., Ferlenghi I., Facciotti C., Muzzi A., Giusti F., Emolo C., Sinisi A., Hilleringmann M., Pansegrau W., Censini S., Rappuoli R., Covacci A., Massignani V., Barocchi M.A. // *J Bacteriol.*- 2008.- № 15 (190).- P. 5480–5492.
74. Balsalobre L. Molecular characterization of disease-associated streptococci of the mitis group that are optochin susceptible / Balsalobre L., Hernandez-Madrid A., Llull D., Martin-Galiano A.J., Garcia E., Fenoll A., de la Campa A.G. // *J Clin Microbiol.*- 2006.- № 11 (44).- P. 4163–4171.
75. Basset A. Expression of the type 1 pneumococcal pilus is bistable and negatively regulated by the structural component RrgA. / Basset A., Turner K.H., Boush E., Sayeed S., Dove S.L., Malley R. // *Infection and immunity*.- 2011.- № 8 (79).- P. 2974–83.
76. Basset A. An epigenetic switch mediates bistable expression of the type 1 pilus genes in *Streptococcus pneumoniae*. / Basset A., Turner K.H., Boush E., Sayeed S., Dove S.L., Malley R. // *Journal of bacteriology*.- 2012.- № 5 (194).- P. 1088–91.
77. Bellanger X. Conjugative and mobilizable genomic islands in bacteria: evolution and diversity / Bellanger X., Payot S., Leblond-Bourget N., Guédon G. // *FEMS Microbiology Reviews*.- 2014.- № 4 (38).- P. 720–760.
78. Bender J.M. Pneumococcal necrotizing pneumonia in Utah: does serotype matter? / Bender J.M., Ampofo K., Korgenski K., Daly J., Pavia A.T., Mason E.O., Byington C.L. // *Clin Infect Dis*.- 2008.- № 9 (46).- P. 1346–1352.

79. Bergmann S. Versatility of pneumococcal surface proteins / Bergmann S. // *Microbiology*.- 2006.- № 152(Pt 2).- P. 295–303.
80. Berry A.M. Additive attenuation of virulence of *Streptococcus pneumoniae* by mutation of the genes encoding pneumolysin and other putative pneumococcal virulence proteins / Berry A.M., Paton J.C. // *Infect Immun*.- 2000.- № 1 (68).- P. 133–140.
81. Briles D.E. Immunization of humans with recombinant pneumococcal surface protein A (rPspA) elicits antibodies that passively protect mice from fatal infection with *Streptococcus pneumoniae* bearing heterologous PspA / Briles D.E., Hollingshead S.K., King J., Swift A., Braun P.A., Park M.K., Ferguson L.M., Nahm M.H., Nabors G.S. // *The Journal of Infectious Diseases*.- 2000.- № 6 (182).- P. 1694–1701.
82. Browall S. Intraclonal variations among *Streptococcus Pneumoniae* isolates influence the likelihood of invasive disease in children // *Journal of Infectious Diseases*.- 2014.- № 3 (209).- P. 377–388.
83. Browall S. Clinical manifestations of invasive pneumococcal disease by vaccine and non-vaccine types. / Browall S., Norman M., Tångrot J., Galanis I., Sjöström K., Dagerhamn J., Hellberg C., Pathak A., Spadafina T., Sandgren A., Bättig P., Franzén O., Andersson B., Örtqvist Å., Normark S., Henriques-Normark B., Spada T., Sandgren A., Bättig P., Franzén O., Andersson B., Örtqvist Å., Normark S., Henriques-Normark B. // *The European respiratory journal*.- 2014.- № 6 (44).- P. 1646–57.
84. Brueggemann A.B. Fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae* in United States since 1994-1995. / Brueggemann A.B., Coffman S.L., Rhomberg P., Huynh H., Almer L., Nilius A., Flamm R., Doern G. V. // *Antimicrob Agents Chemother*.- 2002.- № 3 (46).- P. 680–688.
85. Brueggemann A.B. Clonal relationships between invasive and carriage *Streptococcus pneumoniae* and serotype- and clone-specific differences in invasive disease potential. / Brueggemann A.B., Griffiths D.T., Meats E., Peto T., Crook D.W., Spratt B.G. // *The Journal of Infectious Diseases*.- 2003.- №

- 9 (187).- P. 1424–1432.
86. Brueggemann A.B. Vaccine escape recombinants emerge after pneumococcal vaccination in the United States / Brueggemann A.B., Pai R., Crook D.W., Beall B. // PLoS Pathog. -2007.- № 11 (3).- P. e168.
87. Bush K.  $\beta$ -Lactams and  $\beta$ -Lactamase Inhibitors: An Overview / Bush K., Bradford P.A. // Cold Spring Harb Perspect Med.- 2016.- Volume 6, Issue 8.- P. a025247.
88. Bussiere D.E. Crystal structure of ErmC', an rRNA methyltransferase which mediates antibiotic resistance in bacteria / Bussiere D.E., Muchmore S.W., Dealwis C.G., Schluckebier G., Nienaber V.L., Edalji R.P., Walter K.A., Lador U.S., Holzman T.F., Abad-Zapatero C. // Biochemistry.- 1998.- № 20 (37).- P. 7103–7112.
89. Chang Q. Stability of the pneumococcal population structure in Massachusetts as PCV13 was introduced / Chang Q., Stevenson A.E., Croucher N.J., Lee G.M., Pelton S.I., Lipsitch M., Finkelstein J.A., Hanage W.P. // BMC Infectious Diseases. 2015. № 1 (15). P. 68.
90. Chao Y. *Streptococcus pneumoniae* biofilm formation and dispersion during colonization and disease / Chao Y., Marks L.R., Pettigrew M.M., Hakansson A.P. // Front. Cell. Infect. Microbiol.- 2015.- № 4.- P. 1–16.
91. Cornick J.E. *Streptococcus pneumoniae*: the evolution of antimicrobial resistance to beta-lactams, fluoroquinolones and macrolides / Cornick J.E., Bentley S.D. // Microbes Infect.- 2012.- № 7–8 (14).- P. 573–583.
92. Corso A. Molecular characterization of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates causing respiratory disease in the United States / Corso A., Severina E.P., Petruk V.F., Mauriz Y.R., Tomasz A. // Microb Drug Resist.- 1998.- № 4 (4).- P. 325–337.
93. Crain M.J. Pneumococcal surface protein A (PspA) is serologically highly variable and is expressed by all clinically important capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* / Crain M.J., Waltman 2nd W.D., Turner J.S., Yother J., Talkington D.F., McDaniel L.S., Gray B.M., Briles D.E. // Infect

- Immun.- 1990.- № 10 (58).- P. 3293–3299.
94. Critchley I.A. Prevalence of serotype 19A *Streptococcus pneumoniae* among isolates from U.S. children in 2005-2006 and activity of faropenem / Critchley I.A., Jacobs M.R., Brown S.D., Traczewski M.M., Tillotson G.S., Janjic N. // *Antimicrob Agents Chemother.*- 2008.- № 7 (52).- P. 2639–2643.
95. Croucher N.J. Rapid pneumococcal evolution in response to clinical interventions. / Croucher N.J., Harris S.R., Fraser C., Quail M. a, Burton J., Linden M. van der, McGee L., Gottberg A. von, Song J.H., Ko K.S., Pichon B., Baker S., Parry C.M., Lambertsen L.M., Shahinas D., Pillai D.R., Mitchell T.J., Dougan G., Tomasz A., Klugman K.P., Parkhill J., Hanage W.P., Bentley S.D. // *Science (New York).*- 2011.- № 6016 (331).- P. 430–434.
96. Croucher N.J. Diversification of bacterial genome content through distinct mechanisms over different timescales / Croucher N.J., Coupland P.G., Stevenson A.E., Callendrello A., Bentley S.D., Hanage W.P. // *Nature Communications.*- 2014.- № 5.- P. 1–12.
97. Croxatto A. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology/ A. Croxatto, G. Prod'hom, G. Greub// *FEMS Microbiology Reviews.*- 2012. № 2 (36).- P. 380–407.
98. Cvitkovitch D.G. Genetic competence and transformation in oral streptococci / Cvitkovitch D.G. // *Crit Rev Oral Biol Med.*- 2001.- № 3 (12).- P. 217–243.
99. Delcour A.H. Outer membrane permeability and antibiotic resistance / Delcour A.H. // *Biochim Biophys Acta.* -2009.- № 5 (1794).- P. 808–816.
100. Deng X. Genetic analysis of invasive pneumococcal isolates from children in Ontario, Canada, 2007-2012./ Deng X., Arya G., Memari N., Mackenzie R., MacMullin G., Low D.E., Pillai D.R., Gubbay J.B. // *The Pediatric infectious disease journal.*- 2015.- № 6 (34).- P. 594–8.
101. Diebel R.H. Family II. Streptococcaceae/ R.H. Diebel, H.W. Seeley Jr. // Buchanan R.E., Gibbons N.E., editors. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.* Baltimore: The Williams & Wilkins Co, 1974.. P. 490–515
102. Dowson C.G. Penicillin-resistant viridans streptococci have obtained altered

- penicillin-binding protein genes from penicillin-resistant strains of *Streptococcus pneumoniae*. / Dowson C.G., Hutchison a, Woodford N., Johnson a P., George R.C., Spratt B.G. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.- 1990.- № 15 (87).- P. 5858–62.
103. Driver C. Pneumonia part 2: signs, symptoms and vaccinations / Driver C. // Br J Nurs.- 2012.- № 4 (21).- P. 245–249.
104. Eutsey R. Genetic Stabilization of the Drug-Resistant PMEN1 Pneumococcus Lineage by Its Distinctive DpnIII Restriction-Modification System / Eutsey R., Powell E., Dordel J., Salter S.J., Clark T., Korlach J., Ehrlich G.D., Hiller N.L. // mBio journal.- 2015.- № 6 (3).- P.00173-15
105. Feldman C. Pneumolysin induces the salient histologic features of pneumococcal infection in the rat lung in vivo / Feldman C., Munro N.C., Jeffery P.K., Mitchell T.J., Andrew P.W., Boulnois G.J., Guerreiro D., Rohde J.A., Todd H.C., Cole P.J. et al. // Am J Respir Cell Mol Biol.- 1991.- № 5 (5).- P. 416–423.
106. Fenoll A. Molecular basis of the optochin-sensitive phenotype of pneumococcus: characterization of the genes encoding the F0 complex of the *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus oralis* H(+)-ATPases / Fenoll A., Munoz R., Garcia E., de la Campa A.G. // Mol Microbiol.- 1994.- № 4 (12).- P. 587–598.
107. Flamaing J. *Streptococcus pneumoniae* bacteraemia in Belgium: differential characteristics in children and the elderly population and implications for vaccine use/ J. Flamaing, J. Verhaegen, W.E. Peetermans // J Antimicrob Chemother.- 2002.- № 1 (50).- P. 43–50.
108. Friedlander C. Die Mikrokokken der *Pneumoniae* / Friedlander C. // Fortschr. Medicin.- 1883.-№ 1.- P. 715–733.
109. Gandon S. Forecasting Epidemiological and Evolutionary Dynamics of Infectious Diseases / Gandon S., Day T., Metcalf C.J.E., Grenfell B.T. // Trends in Ecology & Evolution.- 2016.- Volume 31, Issue 10.- P.776–788.

110. Gertz Jr. R.E. Increased penicillin nonsusceptibility of nonvaccine-serotype invasive pneumococci other than serotypes 19A and 6A in post-7-valent conjugate vaccine era / Gertz Jr. R.E., Li Z., Pimenta F.C., Jackson D., Juni B.A., Lynfield R., Jorgensen J.H., Carvalho Mda G., Beall B.W. // *The Journal of Infectious Diseases*.- 2010.- № 5 (201).- P. 770–775.
111. Gilbert D.N. *The Sanford Guide to Antimicrobial Therapy 2010* / D.N. Gilbert // *Antimicrobial Therapy*, 2010. - P.220.
112. Grijalva C.G. Decline in pneumonia admissions after routine childhood immunisation with pneumococcal conjugate vaccine in the USA: a time-series analysis / Grijalva C.G., Nuorti J.P., Arbogast P.G., Martin S.W., Edwards K.M., Griffin M.R. // *Lancet*.- 2007.- № 9568 (369).- P. 1179–1186.
113. Hakenbeck R. Versatility of choline metabolism and choline-binding proteins in *Streptococcus pneumoniae* and commensal streptococci / Hakenbeck R., Madhour A., Denapaite D., Brückner R. // *FEMS Microbiology Reviews*.- 2009.- № 3 (33).- P. 572–586.
114. Hakenbeck R. Molecular mechanisms of beta-lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae* / Hakenbeck R., Bruckner R., Denapaite D., Maurer P. // *Future Microbiol*.- 2012.- № 3 (7).- P. 395–410.
115. Harrison O.B. Molecular typing methods for outbreak detection and surveillance of invasive disease caused by *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae*, a review. / Harrison O.B., Brueggemann A.B., Caugant D. a, Ende A. van der, Frosch M., Gray S., Heuberger S., Krizova P., Olcen P., Slack M., Taha M.-K., Maiden M.C.J. // *Microbiology*.- 2011.- № 157 (8).- P. 2181–95.
116. Harvey C. A variable region within the genome of *Streptococcus pneumoniae* contributes to strain-strain variation in virulence / C. Harvey, Stroehler, U. H // *PLoS One*.- 2011.- V. 5 I.- P. e19650.
117. Hausdorff W.P. Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: implications for conjugate vaccine formulation and use, part I / Hausdorff W.P., Bryant J., Paradiso P.R., Siber G.R. // *Clin Infect Dis*.- 2000.-

№ 1 (30).- P. 100–121.

118. Henriques-Normark B. The rise and fall of bacterial clones: *Streptococcus pneumoniae*. / Henriques-Normark B., Blomberg C., Dagerhamn J., Bättig P., Normark S. // Nature reviews. Microbiology.- 2008.- № 11 (6).- P. 827–37.
119. Henriques Normark B. Dynamics of penicillin-susceptible clones in invasive pneumococcal disease / Henriques Normark B., Kalin M., Ortqvist A., Akerlund T., Liljequist B.O., Hedlund J., Svenson S.B., Zhou J., Spratt B.G., Normark S., Kallenius G. // The Journal of Infectious Diseases.- 2001.- № 7 (184).- P. 861–869.
120. Hiller N.L. Comparative genomic analyses of seventeen *Streptococcus pneumoniae* strains: insights into the pneumococcal supragenome / Hiller N.L., Janto B., Hogg J.S., Boissy R., Yu S., Powell E., Keefe R., Ehrlich N.E., Shen K., Hayes J., Barbadora K., Klimke W., Dernovoy D., Tatusova T., Parkhill J., Bentley S.D., Post J.C., Ehrlich G.D., Hu F.Z. // J Bacteriol.- 2007.- № 22 (189).- P. 8186–8195.
121. Hoskins J. Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6 / Hoskins J., Alborn Jr. W.E., Arnold J., Blaszczyk L.C., Burgett S., DeHoff B.S., Estrem S.T., Fritz L., Fu D.J., Fuller W., Geringer C., Gilmour R., Glass J.S., Khoja H., Kraft A.R., Lagace R.E., LeBlanc D.J., Lee L.N., Lefkowitz E.J., Lu J., Matsushima P., McAhren S.M., McHenney M., McLeaster K., Mundy C.W., Nicas T.I., Norris F.H., O’Gara M., Peery R.B., Robertson G.T., Rockey P., Sun P.M., Winkler M.E., Yang Y., Young-Bellido M., Zhao G., Zook C.A., Baltz R.H., Jaskunas S.R., Rosteck Jr. P.R., Skatrud P.L., Glass J.I. // J Bacteriol.- 2001.- № 19 (183). -P. 5709–5717.
122. Hsu H.E. Effect of pneumococcal conjugate vaccine on pneumococcal meningitis / Hsu H.E., Shutt K.A., Moore M.R., Beall B.W., Bennett N.M., Craig A.S., Farley M.M., Jorgensen J.H., Lexau C.A., Petit S., Reingold A., Schaffner W., Thomas A., Whitney C.G., Harrison L.H.// N Engl J Med.- 2009.- № 3 (360).- P. 244–256.
123. Hu D. Roles of virulence genes (PsaA and CpsA) on the invasion of

- Streptococcus pneumoniae* into blood system. / Hu D., Wang D., Liu Y., Liu C., Yu L., Qu Y., Luo X., Yang J., Yu J., Zhang J., Li X. // European journal of medical research.- 2013. -№ 1 (18).- P. 14.
124. Jacobs M.R. Emergence of multiply resistant pneumococci / Jacobs M.R., Koornhof H.J., Robins-Browne R.M., Stevenson C.M., Vermaak Z.A., Freiman I., Miller G.B., Witcomb M.A., Isaacson M., Ward J.I., Austrian R. // N Engl J Med.- 1978.- № 14 (299).- P. 735–740.
125. Jedrzejak M.J. Pneumococcal Virulence Factors : Structure and Function. / Jedrzejak M.J.// Microbiol Mol Biol Rev.- 2001.- № 2 (65).- P. 187–207.
126. Jefferies J.M.C. Presence of nonhemolytic pneumolysin in serotypes of *Streptococcus pneumoniae* associated with disease outbreaks. / Jefferies J.M.C., Johnston C.H.G., Kirkham L.-A.S., Cowan G.J.M., Ross K.S., Smith A., Clarke S.C., Brueggemann A.B., George R.C., Pichon B., Pluschke G., Pfluger V., Mitchell T.J. // The Journal of infectious diseases.- 2007.- № 6 (196).- P. 936–44.
127. Jefferson T. *Streptococcus pneumoniae* in western Europe: serotype distribution and incidence in children less than 2 years old. / Jefferson T., Ferroni E., Curtale F., Giorgi Rossi P., Borgia P. // Lancet Infect Dis.- 2006.- № 7 (6).- P. 405–410.
128. Johnsborg O. Regulation of natural genetic transformation and acquisition of transforming DNA in *Streptococcus pneumoniae*/ O. Johnsborg, L.S. Håvarstein // FEMS Microbiology Reviews.- 2009.- № 3 (33).- P. 627–642
129. Johnson H.L. Systematic evaluation of serotypes causing invasive pneumococcal disease among children under five: the pneumococcal global serotype project / Johnson H.L., Deloria-Knoll M., Levine O.S., Stoszek S.K., Freimanis Hance L., Reithinger R., Muenz L.R., O'Brien K.L // PLoS Med.- 2010.- № 10 (7).- P. e1000348.
130. Jones R.N. Update on antimicrobial susceptibility trends among *Streptococcus pneumoniae* in the United States: report of ceftaroline activity from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998-2011) / Jones R.N.,

- Sader H.S., Mendes R.E., Flamm R.K. // *Diagn Microbiol Infect Dis.*- 2013.- № 1 (75).- P. 107–109.
131. Jones R.N. Evolving trends in *Streptococcus pneumoniae* resistance: implications for therapy of community-acquired bacterial pneumonia/ R.N. Jones, M.R. Jacobs, H.S. Sader // *Int J Antimicrob Agents.*- 2010.- № 3 (36).- P. 197–204.
132. Jumbe N.L. Quinolone efflux pumps play a central role in emergence of fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae* / Jumbe N.L., Louie A., Miller M.H., Liu W., Deziel M.R., Tam V.H., Bachhawat R., Drusano G.L. // *Antimicrob Agents Chemother.*- 2006.- № 1 (50).- P. 310–317.
133. Kadam A. *Streptococcus pneumoniae* Supragenome Hybridization Arrays for Profiling of Genetic Content and Gene Expression / Kadam A., Janto B., Eutsey R., Earl J.P., Powell E., Dahlgren M.E., Hu F.Z., Ehrlich G.D., Hiller N.L. // *Curr Protoc Microbiol.*- 2015.- №36.- P. 9D.4.1-20.
134. Kadioglu A. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. / Kadioglu A., Weiser J.N., Paton J.C., Andrew P.W. // *Nature reviews. Microbiology.*- 2008. -№ 4 (6).- P. 288–301.
135. Klugman K.P. The successful clone: the vector of dissemination of resistance in *Streptococcus pneumoniae*. / Klugman K.P. // *Antimicrob Agents Chemother.*- 2002.- №50(S2).- P. 1-5.
136. Leclercq R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications / Leclercq R. // *Clin Infect Dis.*- 2002.- № 4 (34).- P. 482–492.
137. Lieberthal A.S. The Diagnosis and Management of Acute Otitis Media / Lieberthal A.S., Carroll A.E., Chonmaitree T., Ganiats T.G., Hoberman A., Jackson M.A., Joffe M.D., Miller D.T., Rosenfeld R.M., Sevilla X.D., Schwartz R.H., Thomas P.A., Tunkel D.E. // *Pediatrics.*- 2013.- № 3 (131).- P. e964–e999.
138. Liñares J. Changes in antimicrobial resistance, serotypes and genotypes in *Streptococcus pneumoniae* over a 30-year period / Liñares J., Ardanuy C.,

- Pallares R., Fenoll A. // *Clinical Microbiology and Infection*.- 2010.- № 5 (16).- P. 402–410.
139. Linden M. van der Epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* serogroup 6 isolates from IPD in children and adults in Germany. / Linden M. van der, Winkel N., Küntzel S., Farkas A., Perniciaro S.R., Reinert R.R., Imöhl M. // *PloS one*.- 2013.- № 4 (8).- P. e60848.
140. Llull D. Genetic bases and medical relevance of capsular polysaccharide biosynthesis in pathogenic streptococci/ D. Llull, R. Lopez, E. Garcia// *Curr Mol Med*.-2001.- № 4 (1).- P. 475–491.
141. Lock R.A. Purification and immunological characterization of neuraminidase produced by *Streptococcus pneumoniae*/ R.A. Lock, J.C. Paton, D.Hansman // *Microb Pathog*.- 1988.- № 1 (4).- P. 33–43.
142. Lopez R. Pneumococcus: the sugar-coated bacteria / Lopez R. // *Int Microbiol*.-2006.- № 3 (9).- P. 179–190.
143. López R. Recent trends on the molecular biology of pneumococcal capsules, lytic enzymes, and bacteriophage/ R. López, E. García // *FEMS Microbiology Reviews*.- 2004.- (28).- P. 553–580.
144. Lozano R. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010 / Lozano R., Naghavi M., Foreman K., Murray C.J.L. // *The Lancet*.- 2012.- № 9859 (380).- P. 2095–2128.
145. Lu Q. Homeostatic Control of Innate Lung Inflammation by Vici Syndrome Gene *Epg5* and Additional Autophagy Genes Promotes Influenza Pathogenesis / Lu Q., Yokoyama C.C., Williams J.W., Baldrige M.T., Jin X., Desrochers B., Bricker T., Wilen C.B., Bagaitkar J., Loginicheva E., Sergushichev A., Kreamalmeyer D., Keller B.C., Zhao Y., Kambal A., Green D.R., Martinez J., Dinauer M.C., Holtzman M.J., Crouch E.C., Beatty W., Boon A.C.M., Zhang H., Randolph G.J., Artyomov M.N., Virgin H.W. // *Cell Host and Microbe*.- 2016.- № 1 (19).- P. 102–113.
146. Luján M. Influence of pneumococcal serotype group on outcome in adults with

- bacteraemic pneumonia. / Luján M., Gallego M., Belmonte Y., Fontanals D., Vallès J., Lisboa T., Rello J. // *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology.*- 2010.- № 5 (36).- P. 1073–9.
147. Macheboeuf P. Penicillin binding proteins: key players in bacterial cell cycle and drug resistance processes / Macheboeuf P., Contreras-Martel C., Job V., Dideberg O., Dessen A. // *FEMS Microbiol Rev.*- 2006.- № 5 (30).- P. 673–691.
148. Marrer E. Involvement of the putative ATP-dependent efflux proteins PatA and PatB in fluoroquinolone resistance of a multidrug-resistant mutant of *Streptococcus pneumoniae*. / Marrer E., Schad K., Satoh A.T., Page M.G., Johnson M.M., Piddock L.J. // *Antimicrob Agents Chemother.*- 2006. -№ 2 (50).- P. 685–693.
149. Martinez J.L. A global view of antibiotic resistance. / Martinez J.L., Fajardo A., Garmendia L., Hernandez A., Linares J.F., Martínez-Solano L., Sánchez M.B. // *FEMS microbiology reviews.*- 2009.- № 1 (33). -P. 44–65.
150. McDaniel L.S. PspA, a surface protein of *Streptococcus pneumoniae*, is capable of eliciting protection against pneumococci of more than one capsular type / McDaniel L.S., Sheffield J.S., Delucchi P., Briles D.E. // *Infect Immun.*- 1991.- № 1 (59).- P 222–228.
151. McGee L. Nomenclature of major antimicrobial-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae* defined by the pneumococcal molecular epidemiology network / McGee L., McDougal L., Zhou J., Spratt B.G., Tenover F.C., George R., Hakenbeck R., Hryniewicz W., Lefevre J.C., Tomasz A., Klugman K.P. // *J Clin Microbiol.*- 2001.- № 7 (39).- P. 2565–2571.
152. Mehr S. *Streptococcus pneumoniae* - a review of carriage, infection, serotype replacement and vaccination/ S. Mehr, N. Wood // *Paediatric Respiratory Reviews.*- 2012.- № 4 (13).- P. 258–264.
153. Mera R. Serotype replacement and multiple resistance in *Streptococcus*

- pneumoniae* after the introduction of the conjugate pneumococcal vaccine / Mera R., Miller L.A., Fritsche T.R., Jones R.N. // *Microb Drug Resist.*- 2008.- № 2 (14).- P. 101–107.
154. Mera R.M. The impact of the pneumococcal conjugate vaccine on antimicrobial resistance in the United States since 1996: evidence for a significant rebound by 2007 in many classes of antibiotics / Mera R.M., Miller L.A., Amrine-Madsen H., Sahm D.F.// *Microb Drug Resist.*- 2009.- № 4 (15).- P. 261–268.
155. Metcalf B.J. Strain features and distributions in pneumococci from children with invasive disease before and after 13 valent conjugate vaccine implementation in the United States. / Metcalf B.J., Gertz R.E., Gladstone R.A., Walker H., Sherwood L.K., Jackson D., Li Z., Law C., Hawkins P.A., Chochua S., Sheth M., Rayamajhi N., Bentley S.D., Kim L., Whitney C.G., McGee L., Beall B. // *Clinical microbiology and infection.*- 2015.-Vol.22, Issue 1.- P. 60.e9-60.e29.
156. Mitchell A. M. *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors and variation / A. M. Mitchell, T.J. Mitchell// *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.*- 2010.- № 5 (16).- P. 411–8.
157. Morales M. Insights into the Evolutionary Relationships of LytA Autolysin and Ply Pneumolysin-Like Genes in *Streptococcus pneumoniae* and Related Streptococci / Morales M., Martín-Galiano A.J., Domenech M., García E. // *Genome Biology and Evolution.*- 2015.- № 9 (7).- P. 2747–2761.
158. Moschioni M. *Streptococcus pneumoniae* contains 3 rlrA pilus variants that are clonally related. / Moschioni M., Donati C., Muzzi A., Masignani V., Censini S., Hanage W.P., Bishop C.J., Reis J.N., Normark S., Henriques-Normark B., Covacci A., Rappuoli R., Barocchi M. // *The Journal of infectious diseases.*- 2008.- № 6 (197).- P. 888–96.
159. Mufson M.A. Bacteremic pneumococcal pneumonia in one American City: a 20-year longitudinal study, 1978-1997/ M.A. Mufson, R.J.Stanek // *Am J Med.*- 1999.- № 1A (107).- P. 34S–43S.

160. Musher D.M. Bacteremic and nonbacteremic pneumococcal pneumonia. A prospective study / Musher D.M., Alexandraki I., Graviss E.A., Yanbeiy N., Eid A., Inderias L.A., Phan H.M., Solomon E. // *Medicine (Baltimore)*.- 2000.- № 4 (79).- P. 210–221.
161. Nahm M.H. Increase in the prevalence of the newly discovered pneumococcal serotype 6C in the nasopharynx after introduction of pneumococcal conjugate vaccine / Nahm M.H., Lin J., Finkelstein J.A., Pelton S.I. // *The Journal of Infectious Diseases*.- 2009.- № 3 (199).- P. 320–325.
162. Nikolaidis I. Resistance to antibiotics targeted to the bacterial cell wall/ I.Nikolaidis, S. Favini-Stabile, A. Dessen // *Protein Science*.- 2014.- № 3 (23).- P. 243–259.
163. O'Brien K.L. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates / O'Brien K.L., Wolfson L.J., Watt J.P., Henkle E., Deloria-Knoll M., McCall N., Lee E., Mulholland K., Levine O.S., Cherian T.// *Lancet*. - 2009. - № 9693 (374). - P. 893–902.
164. O'Brien K.L. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates / O'Brien K.L., Wolfson L.J., Watt J.P., Henkle E., Deloria-Knoll M., McCall N., Lee E., Mulholland K., Levine O.S., Cherian T.// *Lancet*. 2009. - № 9693 (374). P. 893–902.
165. Obregon V. Molecular peculiarities of the *lytA* gene isolated from clinical pneumococcal strains that are bile insoluble / Obregon V., Garcia P., Garcia E., Fenoll A., Lopez R., Garcia J.L. // *J Clin Microbiol*.- 2002. -№ 7 (40).- P. 2545–2554.
166. Ortqvist A. *Streptococcus pneumoniae*: epidemiology, risk factors, and clinical features/ A. Ortqvist, J. Hedlund, M. Kalin// *Semin Respir Crit Care Med*.- 2005. -№ 6 (26).- P. 563–574.
167. Otto M. Physical stress and bacterial colonization. / Otto M. // *FEMS microbiology reviews*.- 2014.- № 6 (38).- P. 1250–70.
168. Pai R. Sequential multiplex PCR approach for determining capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates/ R. Pai, R.E. Gertz, B. Beall// *J Clin*

Microbiol.- 2006.- № 1 (44).- P. 124–131

169. Paster Chamberland M.M. Sur une maladie nouvelle, provoquee par la salive d'enfant mort de la rage/ M.M. Paster Chamberland, L. Roux // Compt. Rend. Acad. d sci.- 1881.- № 92.- P. 59–65.
170. Paterson G.K. Role of two-component systems in the virulence of *Streptococcus pneumoniae*/ G.K.Paterson, C.E.Blue, T.J.Mitchell// Journal of medical microbiology.- 2006.- № Pt 4 (55).- P. 355–63.
171. Paterson G.K. The role of *Streptococcus pneumoniae* sortase A in colonisation and pathogenesis / G.K.Paterson, T.J.Mitchell// Microbes Infect.- 2006.- № 1 (8).- P. 145–153.
172. Perez-Dorado I. Pneumococcal surface proteins: when the whole is greater than the sum of its parts / I.Perez-Dorado, S.Galan-Bartual, J.A.Hermoso // Mol Oral Microbiol.- 2012.- № 4 (27).- P. 221–245.
173. Perez V.P. Pleural effusion with negative culture: a challenge for pneumococcal diagnosis in children / Perez V.P., Caierão J., Fischer G.B., Dias C.A.G., d'Azevedo P.A. // Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. - 2016. - № 86(2). - P.200-4.
174. Philippon A. Extended-spectrum beta-lactamases / A.Philippon, R.Labia, G.Jacoby // Antimicrob Agents Chemother.- 1989.- № 8 (33).- P. 1131–1136.
175. Pikis A. Optochin resistance in *Streptococcus pneumoniae*: mechanism, significance, and clinical implications / Pikis A., Campos J.M., Rodriguez W.J., Keith J.M. // The Journal of Infectious Diseases.- 2001.- № 5 (184).- P. 582–590.
176. Poll van der T. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia / T. van der Poll, S.M.Opal // Lancet.- 2009.- № 9700 (374).- P. 1543–56.
177. Richter S.S. Changing epidemiology of antimicrobial-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States, 2004-2005 / Richter S.S., Heilmann K.P., Dohrn C.L., Riahi F., Beekmann S.E., Doern G. V // Clin Infect Dis.- 2009. - № 3 (48).- P. e23-33.

178. Richter S.S. Pneumococcal Serotypes before and after Introduction of Conjugate Vaccines, United States, 1999-2011(1.) / Richter S.S., Heilmann K.P., Dohrn C.L., Riahi F., Diekema D.J., Doern G. V. // *Emerg Infect Dis.*- 2013. -№ 7 (19).- P. 1074–1083.
179. Roche H. Regions of PspA/EF3296 best able to elicit protection against *Streptococcus pneumoniae* in a murine infection model / Roche H., Hakansson A., Hollingshead S.K., Briles D.E. // *Infect Immun.*- 2003.- № 3 (71).- P. 1033–1041.
180. Rosenow C. Contribution of novel choline-binding proteins to adherence, colonization and immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae* / Rosenow C., Ryan P., Weiser J.N., Johnson S., Fontan P., Ortqvist A., Masure H.R. // *Mol Microbiol.*- 1997. -№ 5 (25).- P. 819–829.
181. Ruoff R.A. *Streptococcus.* / R.A.Ruoff, D. Whiley, K.L. Beighton // Murray P.R., ed. *Manual of Clinical Microbiology.* 7th ed. Washington, DC: ASM Press. 1999. P. 283–296.
182. Sá-Leão R. Changes in pneumococcal serotypes and antibiotypes carried by vaccinated and unvaccinated day-care centre attendees in Portugal, a country with widespread use of the seven-valent pneumococcal conjugate vaccine / Sá-Leão R., Nunes S., Brito-Avô A., Frazão N., Simões A.S., Crisóstomo M.I., Paulo A.C.S., Saldanha J., Santos-Sanches I., Lencastre H. de // *Clinical Microbiology and Infection.* - 2009. - № 11 (15). - P.1002-07.
183. Sadowy E. Expansion and evolution of the *Streptococcus pneumoniae* Spain9V-ST156 clonal complex in Poland. / Sadowy E., Kuch A., Gniadkowski M., Hryniewicz W. // *Antimicrobial agents and chemotherapy.*- 2010. -№ 5 (54).- P. 1720–7.
184. Sampson J.S. Cloning and nucleotide sequence analysis of *psaA*, the *Streptococcus pneumoniae* gene encoding a 37-kilodalton protein homologous to previously reported *Streptococcus* sp. adhesins / Sampson J.S., O'Connor S.P., Stinson A.R., Tharpe J.A., Russell H. // *Infect Immun.*- 1994.- № 1 (62).- P. 319–324.

185. Schmitz J. Fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae* isolates in Germany from 2004–2005 to 2014–2015 / Schmitz J., Linden M. van der, Al-Lahham A., Levina N., Pletz M.W., Imöhl M. // International Journal of Medical Microbiology.- 2017.- №. 307(4-5).- P. 216-222.
186. Schuchat A. Use of surveillance for invasive pneumococcal disease to estimate the size of the immunosuppressed HIV-infected population / Schuchat A., Broome C. V, Hightower A., Costa S.J., Parkin W. // JAMA. - 1991. - № 24 (265). - P. 3275–3279.
187. Serruto D. Genome-based approaches to develop vaccines against bacterial pathogens / Serruto D., Serino L., Masignani V., Pizza M. // Vaccine.- 2009.- № 27 (25-26). - P. 3245–3250.
188. Shah S.S. Trends in invasive pneumococcal disease-associated hospitalizations/ S.S.Shah, A.J.Ratner // Clin Infect Dis.- 2006.- № 1 (42).- P. e1-5.
189. Shahid M. Beta-lactams and beta-lactamase-inhibitors in current- or potential-clinical practice: a comprehensive update. / Shahid M., Sobia F., Singh a, Malik a, Khan H.M., Jonas D., Hawkey P.M. // Critical reviews in microbiology.- 2009.- № 2 (35).- P. 81–108.
190. Singleton R.J. Invasive pneumococcal disease caused by nonvaccine serotypes among alaska native children with high levels of 7-valent pneumococcal conjugate vaccine coverage / Singleton R.J., Hennessy T.W., Bulkow L.R., Hammitt L.L., Zulz T., Hurlburt D.A., Butler J.C., Rudolph K., Parkinson A.// JAMA.- 2007.- № 16 (297). -P. 1784–1792.
191. Solovyova A.S. The solution structure and oligomerization behavior of two bacterial toxins: pneumolysin and perfringolysin O. / Solovyova A.S., Nöllmann M., Mitchell T.J., Byron O. // Biophysical journal.- 2004. -№ 1 (87).- P. 540–52.
192. Sternberg G.M. A fatal form of septicaemia in the rabbit, produced by the subcutaneous injection of human saliva / Sternberg G.M. // Annual Reports of the National Board of Health.- 1881.- №3.- P. 87–108.
193. Strachounski L.S. Antimicrobial resistance of nasopharyngeal pneumococci

- from children from day-care centres and orphanages in Russia: results of a unique prospective multicentre study / Stratchounski L.S., Kozlov R.S., Appelbaum P.C., Kretchikova O.I., Kosowska-Shick K. // *Clin Microbiol Infect.*- 2006. -№ 9 (12).- P. 853–866.
194. Tatochenko V. *Streptococcus pneumoniae* serotype distribution in children in the Russian Federation before the introduction of pneumococcal conjugate vaccines into the National Immunization Program. / Tatochenko V., Sidorenko S., Namazova-Baranova L., Mayanskiy N., Kulichenko T., Baranov A., Lobzin Y., Kharit S., Kozlov R., Andreeva I., Muravjev A., Chagaryan A., Koroleva I., Beloshitskiy G., Mironov K., Degtyareva E., Reinert R.R. // *Expert review of vaccines.*- 2014.- № 2 (13).- P. 257–64.
195. Tettelin H. Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae* / Tettelin H., Nelson K.E., Paulsen I.T., Eisen J.A., Read T.D., Peterson S., Heidelberg J., DeBoy R.T., Haft D.H., Dodson R.J., Durkin A.S., Gwinn M., Kolonay J.F., Nelson W.C., Peterson J.D., Umayam L.A., White O., Salzberg S.L., Lewis M.R., Radune D., Holtzapple E., Khouri H., Wolf A.M., Utterback T.R., Hansen C.L., McDonald L.A., Feldblyum T. V., Angiuoli S., Dickinson T., Hickey E.K., Holt I.E., Loftus B.J., Yang F., Smith H.O., Venter J.C., Dougherty B.A., Morrison D.A., Hollingshead S.K., Fraser C.M. // *Science.*- 2001.- № 5529 (293).- C. 498–506.
196. Thompson M. Duration of symptoms of respiratory tract infections in children: systematic review / Thompson M., Vodicka T.A., Blair P.S., Buckley D.I., Heneghan C., Hay A.D., Team T.P. // *BMJ.*- 2013.-№ 347.- P. f7027.
197. Torne A.N. European enhanced surveillance of invasive pneumococcal disease in 2010: Data from 26 European countries in the post-heptavalent conjugate vaccine era / Torne A.N., Dias J.G., Quinten C., Hrubá F., Busana M.C., Lopalco P.L., Gauci A.J., Pastore-Celentano L. // *Vaccine.*- 2014.- № 29 (32).- P. 3644–3650.
198. Tyrrell G.J. Serotypes and antimicrobial susceptibilities of invasive *Streptococcus pneumoniae* pre- and post-seven valent pneumococcal

- conjugate vaccine introduction in Alberta, Canada, 2000-2006 / Tyrrell G.J., Lovgren M., Chui N., Minion J., Garg S., Kellner J.D., Marrie T.J. // *Vaccine*.- 2009.- № 27 (27).- P. 3553–3560.
199. Vorobieva V. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* among children in the Arkhangelsk region, Russia: prevalence, population structure and antibiotic resistance / Vorobieva V. // 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Barcelona, Spain - 2008.- P.1711.
200. Weber D. *Streptococcus pneumoniae* Infections: Microbiology, Epidemiology, Treatment, and Prevention. / D. Weber, W. Rutala// Medscape Education.- 2011. Available from: <http://www.medscape.org/viewarticle/451448>.
201. Wecke T. Antibiotic research in the age of omics: from expression profiles to interspecies communication / T. Wecke, T.Mascher // *The Journal of antimicrobial chemotherapy*.- 2011.- № 12 (66).- P. 2689–704.
202. Weiser J.N. The pneumococcus: why a commensal misbehaves. / Kadioglu A., Weiser J.N., Paton J.C., Andrew P.W. // *J Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*.- 2010.- № 2 (88).- P. 97–102.
203. Willems R.J. Population biology of Gram-positive pathogens: high-risk clones for dissemination of antibiotic resistance / Willems R.J., Hanage W.P., Bessen D.E., Feil E.J. // *FEMS Microbiology Reviews*.- 2011.- № 5 (35).- P. 872–900.
204. Wilson L.K. Surveillance of invasive infection in children and adults admitted to QECH, Blantyre, 1996-2002. / Wilson L.K., Phiri A., Soko D., Mbwwinji M., Walsh A.L., Molyneux M.E. // *Malawi medical journal*.- 2003.- № 2 (5).- P. 52–55.
205. Winslow C.E. The Families and Genera of the Bacteria: Final Report of the Committee of the Society of American Bacteriologists on Characterization and Classification of Bacterial Types. / Winslow C.E., Broadhurst J., Buchanan R.E., Krumwiede C., Rogers L.A., Smith G.H. // *J. Bacteriol.*- 1920.- № 5.- P. 191–229.
206. Wyres K.L. The multidrug-resistant PMEN1 pneumococcus is a paradigm for

- genetic success. / Wyres K.L., Lambertsen L.M., Croucher N.J., McGee L., Gottberg A. von, Liñares J., Jacobs M.R., Kristinsson K.G., Beall B.W., Klugman K.P., Parkhill J., Hakenbeck R., Bentley S.D., Brueggemann A.B. // *Genome biology*.- 2012.- № 11 (13).- P. R103.
207. Xu Q. Nasopharyngeal bacterial interactions in children / Xu Q., Almodovar A., Casey J.R., Pichichero M.E. // *Emerg Infect Dis*.- 2012.- № 11 (18).- P. 1738–1745.
208. Yu J. Development of an automated and multiplexed serotyping assay for *Streptococcus pneumoniae*. / Yu J., Lin J., Kim K.-H., Benjamin W.H., Nahm M.H. // *Clinical and vaccine immunology : CVI*.- 2011.- № 11 (18).- P. 1900–7.
209. Zapun A. Penicillin-binding proteins and  $\beta$ -lactam resistance / A.Zapun, C.Contreras-Martel, T.Vernet // *FEMS Microbiology Reviews*.- 2008.- № 2 (32).- P. 361–385.
210. Zhou F. Trends in acute otitis media-related health care utilization by privately insured young children in the United States, 1997-2004 / Zhou F., Shefer A., Kong Y., Nuorti J.P. // *Pediatrics*.- 2008.- № 2 (121).- P. 253–260.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. 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. 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. 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. SNP-Полиморфизм в геномах изолятов *Streptococcus pneumoniae* СС320, 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 прочих опубликованных работ по теме диссертации**

1. Антибиотикорезистентность *Streptococcus pneumoniae*: клиническое значение и тенденция распространения/ С.В. Сидоренко, М.О. Волкова, О.С. Калиногорская, **С.С. Беланов**, В.В. Гостев// Вестник практического врача.- 2014.- № 2.- С. 9. Цит. eLibrary = 3.
2. Клинико-лабораторные критерии отбора детей для обследования на пневмококковую инфекцию/ А.Л. Перова, С.М. Харит, С.В. Сидоренко, **С.С. Беланов**// Современные подходы к диагностике, терапии и профилактике инфекционных заболеваний у детей: Научные труды.- Санкт-Петербург, 2014.- С. 424-436.

### **Тезисы конференций по теме диссертации**

1. **Беланов С.С.** Молекулярные методы детекции и типирования *Streptococcus pneumoniae* при острых отитах у детей. / **Беланов С.С.**, Волкова М.О., Гостев В.В., Сидоренко С.В. // Материалы V Российского форума "Здоровье детей: профилактика социально-значимых заболеваний. 12-13 Мая 2011 г. – Санкт-Петербург, 2011. – С. 53
2. **Беланов С.С.** Распространение антибактериальной резистентности среди *Streptococcus pneumoniae*, вызывающих острый отит у детей в Санкт-Петербурге. / **Беланов С.С.**, Волкова М.О., Калиногорская О.С., Сидоренко С.В. // Тезисы Всероссийской научно-практической конференции по медицинской микробиологии и клинической микологии (XV Кашкинские чтения) с международным участием, 27 – 28 Июня 2012 г., Санкт-Петербург, 2012. – С. 75
3. Sidorenko S. Pneumococcal serotypes causing bacteraemic community-acquired pneumonia in children and adults in Saint Petersburg, Russia. / **Belanov S.S.**, Sergeeva E.V., Belokurov M., Volkova M.O., Sidorenko S.V. // ECCMID-XXIII, Berlin, Germany, 28 April 2013. – eP743.

4. **Беланов С.С.** Серотиповый состав и антибиотикорезистентность пневмококков, циркулирующих в Российской Федерации/ Тезисы Всероссийского Конгресса по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии (XVI Кашкинские чтения), 19-21 Июня 2013 г., Санкт-Петербург, 2013. – С. 75
5. Sidorenko, S. Prevalence of PI-1 and PI-2 among *Streptococcus pneumoniae* isolated from healthy nasopharyngeal carriers and children with acute otitis media/ **Belanov S.**, Tsvetkova I., Sidorenko S.// ECCMID-XXIV, Barcelona, Spain, 12 May 2014. – P1446
6. Sidorenko S. Evaluation of the capsular genes locus of *Streptococcus pneumoniae* serotypes 19A/F, isolated from children with pneumococcal infections: bioinformatics assay. / **Belanov S.**, Tsvetkova I., Gostev V., Sidorenko S. // ECCMID-XXV, Copenhagen, Danmark, May 2015. – P0178
7. Цветкова И.А. Клональная структура популяции *Streptococcus pneumoniae*, циркулирующих в Санкт-Петербурге и распространение резистентности к антибактериальным препаратам. / Цветкова И.А., **Беланов С.С.**, Гостев В.В., Мохов А.С., Волкова М.О., Калиногорская О.С., Иванова К.А., Калисникова Е.Л., Никитина Е.В., Володина А.А., Сидоренко С.В. // Всероссийский Конгресс по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии (XXI Кашкинские чтения), 6-8 Июня 2018 г. – Санкт-Петербург, 2018 – в печат

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ 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
СВР	Cell Binding Proteins, Клеточно-связывающие белки
CSP	Competent stimulating protein, Компетент-стимулирующие белки
ТП	Транспептидазный домен
PMEN	Pneumococcal Molecular Epidemiology Network
MLST(МЛСТ)	Multi Locus Sequence Typing, Мультилокусное Сиквенс
Типирование	
СС(КК)	Clonal Complex, Клональный Комплекс
ST(СТ)	Sequence-type, Сиквенс-тип