

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ЦЕНТР ЗДОРОВЬЯ ДЕТЕЙ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Бржозовская Екатерина Анатольевна

**Фенотипические и молекулярно-генетические характеристики
носоглоточных *Streptococcus pneumoniae* с множественной лекарственной
устойчивостью, выделенных у детей в 2010-2017 гг.**

03.02.03 – Микробиология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
профессор РАН
доктор медицинских наук,
Маянский Н.А.

Москва – 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ:

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	19
Глава 1. Обзор литературы.....	19
1.1. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	19
1.1.1. Общая характеристика.....	19
1.1.2. Идентификация и типирование пневмококков.....	20
1.1.3. Внутривидовая трансформация <i>S. pneumoniae</i>	22
1.1.4. Респираторные пневмококковые инфекции.....	23
1.1.5. Инвазивные пневмококковые инфекции.....	24
1.2. Устойчивость пневмококков к противомикробным препаратам....	25
1.2.1. β -лактамы антибиотики	26
1.2.2. Макролиды, линкозамиды, тетрациклины и амфениколы.....	28
1.2.3. Ингибиторы путей фолиевой кислоты.....	30
1.2.4. Фторхинолоны.....	31
1.2.5. Ванкомицин, рифампицин, линезолид	32
1.3. Пневмококковые вакцины.....	34
1.3.1. Капсула пневмококков.....	34
1.3.2. Пневмококковые полисахаридные вакцины.....	35
1.3.3. Пневмококковые конъюгированные вакцины	35
1.3.4. Феномен переключения капсулы и замещения серотипов.....	36
1.3.5. Перспективы разработки новых пневмококковых вакцин.....	38
Глава 2. Материалы и методы исследования.....	39
2.1. Выделение и идентификация пневмококков.....	39
2.2. Определение чувствительности к антибиотикам.....	39
2.3. Серотипирование.....	40
2.4. Молекулярные исследования.....	41
2.4.1. Выделение ДНК.....	41
2.4.2. Анализ молекулярных механизмов устойчивости к макролидам,	

тетрациклинам и амфениколам.....	42
2.4.3. Мультилокусное сиквенс-типирование (МЛСТ).....	44
2.5. Полногеномное секвенирование.....	46
2.5.1. Приготовление библиотек для полногеномного секвенирования на платформе Illumina HiSeq 2500.....	46
2.5.2. Секвенирование и анализ данных полногеномного секвенирования.....	46
2.6. Статистический анализ.....	48
Глава 3. Распространенность, спектр антибиотикорезистентности и серотиповое разнообразие пневмококков с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ).....	50
3.1. Общая характеристика коллекции пневмококков с МЛУ.....	50
3.2. Профиль чувствительности к антибиотикам пневмококков с МЛУ.....	51
3.3. Серотиповое разнообразие пневмококков с МЛУ.....	56
3.4. Динамика распространенности и серотипового состава МЛУ-пневмококков.....	56
3.5. Особенности спектра множественной лекарственной устойчивости пневмококков в зависимости от серотипа.....	59
3.6. Молекулярные механизмы устойчивости к антибиотикам у МЛУ-пневмококков.....	63
Глава 4. Генотипы не-ПКВ13 серотипов пневмококков с МЛУ и характеристика появившегося клона ST2754 редкого серотипа 13.....	67
4.1. Ассоциации генотипов и серотипов не-ПКВ13-пневмококков с МЛУ.....	67
4.2. Характеристика ST2754, наиболее распространенного клона МЛУ-не-ПКВ13-пневмококков.....	70
Глава 5. Пневмококк серотипа 15А с множественной лекарственной устойчивостью, возникший в результате переключения локуса	76

полисахаридной капсулы <i>cps</i> у пневмококка серотипа 19А.....	
5.1. Характеристика изолята пневмококка Sp1994.....	76
5.2. Полногеномный SNP-анализ.....	77
5.3. Сравнение геномов Sp1994 и геномов потенциального реципиента и донора <i>cps</i> -локуса.....	77
5.4. Сравнение <i>cps</i> -локусов и их фланкирующих областей геномов Sp1994 и геномов потенциального реципиента и донора и определение точек рекомбинации	80
5.5. Особенности геномов Sp1994 и потенциального реципиента вне <i>cps</i> -локуса.....	82
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	83
ВЫВОДЫ.....	89
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	91
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....	92
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	93
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	95

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы диссертационного исследования

Пневмококки (*Streptococcus pneumoniae*) по-прежнему сохраняют свои лидирующие позиции в числе наиболее важных причин инфекционной заболеваемости и смертности, особенно в педиатрической популяции и у пожилых людей [2, 49, 126]. Спектр пневмококковых инфекций варьирует от местных мукозальных процессов (синуситы, острый средний отит, пневмония) до системных, нередко жизнеугрожающих состояний, включая менингит, бактериемию и сепсис [86]. По данным ВОЗ, в мире ежегодно регистрируется более 14 миллионов случаев тяжелых инвазивных пневмококковых инфекций (ИПИ) у детей в возрасте до пяти лет, из них около 800 тысяч случаев заканчиваются летальным исходом [2, 18, 126].

Одной из серьезных проблем здравоохранения является нарастающая устойчивость пневмококков к антимикробным препаратам, используемым для эмпирической терапии пневмококковых инфекций. Так, недавнее исследование, проведенное в трех регионах РФ (Москва, Санкт-Петербург и Смоленск) показало наличие резистентности к пенициллину у 33% пневмококков, а 31,2% пневмококков были устойчивы к макролидам, включая эритромицин, азитромицин и кларитромицин [163]. При этом исследованная популяция характеризовалась высокими значениями минимальной подавляющей концентрации пенициллина ($MPK_{90}=2$ мг/л). Эти данные примерно соответствовали оценкам пневмококковой резистентности в ряде европейских стран, которая в 2009-2012 гг. составляла 28,9% для пенициллина и 28,5% для эритромицина [162]. В предыдущем крупном многоцентровом исследовании Пегас, проведенном в 1999-2009 гг., устойчивость пневмококков к пенициллину и макролидам была ниже и составляла 8,1-11,2% и 8,2%, соответственно, а MPK пенициллина варьировала в пределах 0,06-0,125 мг/л [8]. Многие резистентные пневмококки демонстрируют фенотип множественной лекарственной

устойчивости (МЛУ, т.е. резистентность к трем и более группам антибиотиков). По разным данным, доля МЛУ-пневмококков может составлять от 5,6% до 30% популяции [28, 111]. Таким образом, мониторинг распространения резистентности и расшифровка ее механизмов являются актуальной задачей для выработки мер по нейтрализации угрозы дальнейшего роста устойчивости пневмококков.

Профилактика ИПИ при помощи пневмококковых конъюгированных вакцин (ПКВ), которые включают от 7 до 13 серовариантов полисахаридной капсулы пневмококков, существенно уменьшила частоту тяжелых ИПИ в тех странах, где она внедрена [35, 140, 166]. Вместе с тем, наряду со снижением ИПИ, ассоциированных с пневмококками вакцинных серотипов, было отмечено появление и распространение в структуре носоглоточных и ИПИ-изолятов ряда пневмококковых клонов, обладающих невакцинными серотипами, которые ранее встречались относительно редко. Эти связанные с вакцинацией изменения эпидемиологии серотипов хорошо документированы в научной литературе, хотя были описаны и ПКВ-независимые флуктуации серотипового состава пневмококков [43, 58, 65].

Увеличение частоты встречаемости конкретного серотипа может сопровождаться изменениями его клональной композиции, что было продемонстрировано на примере серотипов 19А и 35В [81, 127, 140, 165]. Серьезную обеспокоенность вызывает тот факт, что клональная эволюция указанных серотипов привела к экспансии пневмококков сиквенс-типов ST320 и ST156 соответственно, которые характеризовались МЛУ [127, 165].

Феномен замещения серотипов может быть обусловлен как распространением предсуществующих успешных клонов, так и возникновением новых «ускользающих» (англ. *escape*) клонов, приобретающих новый серотип при рекомбинации локуса полисахаридной капсулы *cps* [105, 114, 122, 167]. Переключение капсулы является одной из стратегий пневмококков «ускользнуть»

из-под давления вакцин-индуцированного иммунитета за счет захвата генов *cps*-локуса невакцинных серотипов. Предполагается, что у пневмококков, принадлежащих к одному клону (сиквенс-типу), но экспрессирующих разные серотипы, происходит трансформация капсулы. Такие рекомбинанты вместе с донорским *cps*-локусом могут приобретать дополнительный генетический материал, который способствует лучшей адаптации к изменениям окружающей среды.

Глубокий анализ пневмококковых популяций стал возможен благодаря быстрому развитию молекулярно-генетических технологий в последние годы. Метод полногеномного секвенирования сделал доступным исследование генетического содержания бактериального штамма на уровне отдельных нуклеотидов, а генетический анализ успешных клонов приобретает ключевое значение для понимания эволюции и распространения резистентности в пневмококковой популяции [70].

Таким образом, изучение антибиотикорезистентности пневмококков и эпидемиологии серотипов, прояснение закономерностей формирования устойчивости и ее распространения в динамично меняющейся пневмококковой популяции, испытывающей постоянное давление различных факторов отбора, является актуальным направлением современной микробиологии.

Степень разработанности темы диссертационного исследования

Разработка тематики антибиотикорезистентности ведется достаточно интенсивно, что связано с актуальностью данного направления исследований на современном этапе, когда устойчивость инфекционных возбудителей приобрела широкое распространение и является одним из наиболее серьезных вызовов системе здравоохранения. Проблема резистентности пневмококков также стоит остро, что находит отражение в научных публикациях, в том числе и в РФ. В ряде

исследований была описана распространенность антибиотикорезистентности пневмококков, а также проведено изучение механизмов устойчивости к макролидам и β -лактамам [4, 5, 7, 15, 19–21, 55, 163].

Пневмококковые исследования получили дополнительный импульс в связи с разработкой и внедрением в широкую практику пневмококковых конъюгированных вакцин, включающих наиболее распространенные и клинически значимые серотипы. В нашей стране изучение структуры пневмококковых серотипов проводилось, начиная с 1980-х гг. [6], и было развито в последующих работах [1, 3, 5, 9, 12, 16, 23, 24]. После включения пневмококковой вакцинации в Национальный календарь профилактических прививок РФ в 2014 г. стали появляться работы, отслеживающие динамику серотипов на фоне вакцинации [11, 14, 150].

В последние годы с развитием молекулярных технологий значительно возросло число исследований, связанных с генетикой и эволюцией пневмококков. Было показано влияние клинических вмешательств на эволюцию пневмококковых популяций [56]. Был описан феномен замещения серотипов пневмококков и экспансии успешных невакцинных клонов [91, 107, 112, 127, 140, 154, 173]. Постоянно пополняются международные базы данных, содержащие сведения о фенотипах и генотипах пневмококков, которые предоставляют удобные инструменты для анализа локальных данных и их сравнения с мировыми трендами [1, 11, 91, 135].

Цель исследования

Охарактеризовать профиль антибиотикорезистентности и ее механизмы у пневмококков с множественной лекарственной устойчивостью, описать их

серотиповой состав и генотипы для мониторинга появления и распространения новых резистентных клонов.

Задачи исследования

1. У пневмококков с множественной лекарственной устойчивостью определить минимальные подавляющие концентрации для десяти групп antimicrobных препаратов, рассчитать доли резистентных изолятов и оценить динамику их распространения.
2. Провести серотипирование пневмококков с множественной лекарственной устойчивостью и оценить вклад отдельных серотипов в формирование резистентной популяции.
3. При помощи молекулярно-генетических методов исследования охарактеризовать механизмы резистентности к антибиотикам у пневмококков с множественной лекарственной устойчивостью.
4. Осуществить мультилокусное сиквенс-типирование пневмококков с множественной лекарственной устойчивостью, обладающих серотипом, не входящим в состав 13-валентной пневмококковой конъюгированной вакцины, и описать полученные ассоциации генотип/серотип.
5. Охарактеризовать геномы отдельных изолятов пневмококков с множественной лекарственной устойчивостью с использованием секвенирования нового поколения.

Научная новизна работы

Впервые охарактеризован серотиповой состав циркулирующих изолятов пневмококков с множественной лекарственной устойчивостью и

идентифицированы преобладающие серотипы 19F, 6B, 14, 19A, 23F. Установлено, что из числа серотипов, не входящих в 13-валентную пневмококковую конъюгированную вакцину, множественной лекарственной устойчивостью в первую очередь обладали пневмококки серотипов 23A, 13, 28F и 11A.

Впервые проведено исследование профиля антибиотикорезистентности пневмококков с множественной лекарственной устойчивостью с определением минимальной подавляющей концентрации для десяти групп антимикробных препаратов и описаны преобладающие фенотипы устойчивости. Показано, что в этой популяции пневмококков была распространена резистентность к β -лактамам и преобладало сочетание устойчивости к эритромицину, клиндамицину, тетрациклину и триметоприму/сульфаметоксазолу.

Получены новые данные о распространенности основных молекулярных механизмов резистентности пневмококков, включая носительство генов *ermB* (макролиды/линкозамиды), *tetM* (тетрациклин), *catpQ194* (хлорамфеникол), мутации генов *folA* и *folP* (триметоприм/сульфаметоксазол), а также *parC/parE* и *gyrA/gyrB* (фторхинолоны).

Впервые осуществлено сопоставление серотипов и генотипов пневмококков с множественной лекарственной устойчивостью, которое позволило охарактеризовать новый клон пневмококков ST2754 серотипа 13, распространенный в РФ.

Впервые обнаружен пневмококк серотипа 15A ST14599 с множественной лекарственной устойчивостью, который возник в результате переключения локуса полисахаридной капсулы *cps* у пневмококка серотипа 19A. Проведена характеристика его генома с использованием секвенирования нового поколения, последовательность была аннотирована и депонирована в международную базу данных GenBank (регистрационный номер WMIJ01000000).

С помощью метода мультилокусного сиквенс-типирования выявлено 12 новых сиквенс-типов и 7 новых аллелей генов домашнего хозяйства пневмококков, информация о которых была экспортирована в международную базу данных PubMLST (Таблица 1). Всего в эту базу данных была депонирована информация о 21 изоляте пневмококков.

Таблица 1

Новые сиквенс-типы и аллели генов домашнего хозяйства пневмококков

ST	Ген (аллель)	№ новой аллели	ID PubMLST
13843 (n=1)	<i>ddl</i>	886	41767
13844 (n=1)	<i>xpt</i>	836	41768
14416 (n=1)	<i>aro</i>	482	42579
14417 (n=1)	<i>gdh</i>	637	42580
14694 (n=3)	<i>gdh</i>	647	49293
			49294
			49295
14696 (n=1)	<i>spi</i>	630	49297
15221 (n=6)	<i>recP</i>	373	50897
			50898
			50899
			50900
			50901
			50902
14599 (n=1)	Новые комбинации известных аллелей		49219
14692 (n=1)			49291
14693 (n=1)			49292
15091 (n=2)			50503
			50504
15093 (n=2)			50505
	50506		

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные данные о серотиповом разнообразии пневмококков с множественной лекарственной устойчивостью и преобладании среди них серотипов, входящих в состав 13-валентной пневмококковой конъюгированной вакцины, позволяют прогнозировать положительный вклад вакцинации в преодоление резистентности пневмококков.

Определены антибиотики, к которым большинство пневмококков с множественной лекарственной устойчивостью сохраняют чувствительность. К их числу относятся цефтриаксон, цефтаролин, фторхинолоны, ванкомицин, что следует учитывать при выборе терапии инфекций, ассоциированных с резистентными пневмококками. Напротив, выявленное преобладание носительства гена *ermB* в популяции пневмококков с множественной лекарственной устойчивостью, который обеспечивает перекрестную резистентность ко всем макролидам, свидетельствует против применения этой группы препаратов для лечения пневмококковых инфекций.

Появление и распространение в РФ невакцинного клона ST2754 с множественной лекарственной устойчивостью может свидетельствовать о динамизме и пластичности пневмококковой популяции под воздействием неблагоприятных факторов отбора (антибиотики, вакцинация), что расширяет представления об эволюционном потенциале пневмококков и предполагает необходимость дальнейшего мониторинга с использованием молекулярных методов.

Описание рекомбинантного изолята серотипа 15А нового сиквенс-типа ST14999, появившегося в результате геномной перестройки локуса полисахаридной капсулы *cps* пневмококка серотипа 19А распространенного клона

ST276, вносит фундаментальный вклад в понимание закономерностей эволюции пневмококков.

Пополнение международных баз данных новыми генотипами пневмококков будет способствовать дальнейшим исследованиям молекулярной эпидемиологии пневмококков.

Результаты исследований и разработок были внедрены в научно-исследовательскую работу лаборатории молекулярной микробиологии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России, а также в обучающие материалы по рациональной антибиотикотерапии кафедры общей патологии медико-биологического факультета ФГАУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России.

Методология и методы исследования

Методология исследования спланирована в соответствии с поставленной целью диссертационной работы. Предмет исследования – выявление и описание фенотипических особенностей выделенных педиатрических изолятов *S. pneumoniae*, устойчивых к 3 и более группам антибиотиков, циркулирующих в г. Москва и Московской области, а также в некоторых регионах России, в период с 2010 по 2017 годы; минимальные подавляющие концентрации (МПК) исследуемых антибиотиков определяли при помощи метода серийных микроразведений антибиотика в бульоне. Исследование молекулярно-генетических особенностей, обуславливающих формирование множественной лекарственной устойчивости, проводили с применением современных молекулярно-генетических методов, а также программ и ресурсов для обработки полученного массива данных. Научная литература, посвящённая проблеме исследования, а именно вопросам распространения резистентности, серотипового

разнообразия, молекулярно-генетическим особенностям *S. pneumoniae*, была проанализирована формально-логическими методами исследования. При выполнении настоящей работы были использованы бактериологические, биохимические, молекулярно-генетические, эпидемиологические и статистические методы исследования. Планирование и проведение исследований, направленных на реализацию поставленных задач, осуществлялось на основе общенаучных и специфических методов.

Положения, выносимые на защиту

1. Большинство серотипов пневмококков с множественной лекарственной устойчивостью принадлежит к числу серотипов, включенных в 13-валентную пневмококковую конъюгированную вакцину, и характеризуются устойчивостью к 4-5 антибиотикам (β -лактамы, эритромицин, клиндамицин, тетрациклин, триметоприм/сульфаметоксазол).
2. В популяции невакцированных серотипов пневмококков с множественной лекарственной устойчивостью преобладали пневмококки серотипов 23A, 13, 28F и 11A с резистентностью к эритромицину, клиндамицину, тетрациклину и/или триметоприму/сульфаметоксазолу.
3. Пневмококк серотипа 15A ST14999 с множественной лекарственной устойчивостью возник в результате переключения локуса полисахаридной капсулы *cps* у пневмококка серотипа 19A.

Личное участие автора в получении результатов

Личное участие соискателя в получении результатов диссертационной работы заключалось в выполнении бактериологических исследований коллекции

педиатрических изолятов *S. pneumoniae*, обладающих устойчивостью к трем и более группам антибиотиков, с использованием таких методов исследования, как культуральный посев, реидентификация культуры пневмококков, определение МПК к 16 тестируемым антибиотикам при помощи метода микроразведений антибиотика в бульоне и серотипирование при помощи реакции набухания капсулы с использованием специфических антисывороток. Также автор участвовал в выполнении молекулярно-генетических методов, таких как серотипирование большей части коллекции методом мультиплексной ПЦР, выделение ДНК, а также определение генов устойчивости к макролидам/линкозамидам, тетрациклину и хлорамфениколу, используя ПЦР с детекцией продуктов амплификации в агарозном геле; проведение мультилокусного сиквенс-типирования, анализ полученных данных и селекция ПКВ13- и невакцинных МЛУ-изолятов пневмококков для проведения полногеномного секвенирования. Все перечисленные исследования выполнены в лаборатории микробиологии и лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России, за исключением проведения полногеномного секвенирования, выполненного в отделе молекулярной диагностики и эпидемиологии (ФБУН «Центральный НИИ Эпидемиологии» Роспотребнадзора) совместно с н.с. лаборатории к.б.н. Михайловой Ю.В. и заведующим отделом молекулярной диагностики и эпидемиологии к.б.н. Шагиным Д.А. (нынешняя должность – директор Российской детской клинической больницы ФГАУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России). Анализ и биоинформатическую обработку экспериментальных результатов полногеномного секвенирования проводили совместно со с.н.с. лаборатории молекулярной микробиологии к.б.н. Савиновой Т.А. (ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России).

Внедрение результатов в практику

Результаты исследований в качестве диагностических технологий внедрены в практическую работу подразделений ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России и лаборатории клинической бактериологии Российской детской клинической больницы ФГАУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России. Полученные данные используются в учебной программе кафедры общей патологии медико-биологического факультета ФГАУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Достоверность изложенной работы подтверждают результаты применения сертифицированных микробиологических методов, характеризующихся высокой специфичностью и чувствительностью. Проведено исследование большого объема изолятов пневмококков, что позволяет корректно осуществить статистическую обработку, интерпретацию и анализ полученных результатов. Определение детерминант резистентности пневмококков позволило сопоставить полученные результаты с данными исследований с использованием традиционных микробиологических методов по оценке чувствительности пневмококков к антибактериальным препаратам, что свидетельствует о достоверности полученных результатов.

Диссертация апробирована на заседании лабораторного отдела (протокол № 1 от 13.03.2020г.).

Материалы диссертации были представлены и обсуждены на 27-м (Вена, 2017), 29-м (Амстердам, 2019), 30-м (Париж, 2020) Европейском конгрессе по

клинической микробиологии и инфекционным заболеваниям (ECCMID); XXI Международном конгрессе по антимикробной терапии МАКМАХ/ESCMID (Москва, 2019); на 14-й Европейской конференции молекулярной биологии пневмококков (Euro pneumo) (Грайфсвальд, 2019); на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием "Осенние Филатовские чтения - важные вопросы детского здоровья" (Пенза, 2019); на заседаниях Московского отделения Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов (ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, 2017; Российская детская клиническая больница ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, 2019).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 03.02.03 – «микробиология», области исследований «Морфология, физиология, биохимия и генетика микроорганизмов».

Публикации

Материалы результатов проведенного диссертационного исследования опубликованы в 7 оригинальных статьях в журналах из перечня рецензируемых научных изданий ВАК, 4 из них - реферируемые базой данных Scopus и Web of Science. Две из статей опубликованы в журналах, входящих в первый квартиль (Q1) и одна статья, в издании, входящем во второй квартиль (Q2) по импакт-фактору SJR.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 120 страницах текста и состоит из введения, основной части (обзора литературы, описания материалов и методов исследования и трех глав, отражающих результаты собственных исследований), заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений и условных обозначений, списка использованной литературы. Диссертация иллюстрирована 12 таблицами и 9 рисунками. Библиографический указатель включает 184 источника литературы, в том числе 25 ссылок на отечественные работы и публикации в российских журналах и 159 ссылок на зарубежные источники и публикации.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Глава 1. Обзор литературы

1.1. *Streptococcus pneumoniae*

1.1.1. Общая характеристика

S. pneumoniae – грамположительные, каталазо- и оксидазонегативные факультативно-анаэробные бактерии, в норме являются компонентом микробиоты верхних дыхательных путей человека. Пневмококки относятся к бактериям группы *Firmicutes*, классу *Bacilli*, порядку *Lactobacillales*, семейству *Streptococcaceae*, роду *Streptococcus* [2]. Впервые, ланцетоподобные кокковидные пары бактерий независимо друг от друга были открыты и описаны в 1881 году Луи Пастером (Франция) и Джорджем Стернбергом (США), впоследствии получившими чистую культуру *S. pneumoniae* из крови кролика, которому предварительно была введена слюна инфицированного человека [72].

Одним из основных отличительных признаков пневмококков в пределах рода *Streptococcus* является характер гемолиза на питательных средах, содержащих эритроциты [10]. Так, *S. pyogenes*, *S. agalactiae* и другие, объединяемые в группу пиогенных стрептококков, характеризуются β -гемолизом, а именно полным гемолизом эритроцитов с бесцветной прозрачной зоной, окружающей колонии.

S. pneumoniae относится к зеленым стрептококкам (*viridans streptococci*), которые при культивировании в аэробных условиях характеризуются α -гемолизом, а именно серовато-зеленым окрашиванием питательной среды,

окружающей колонии, обусловленным не полным разрушением эритроцитов, а лишь фрагментов клеточной стенки в результате воздействия пневмолизина (*ply*), демонстрирующего гемолитическую активность благодаря своей способности образовывать поры в богатых холестерином мембранах клеток человека [100].

К зеленым стрептококкам в настоящее время относятся группы *mutans*, *salivarius*, *anginosus*, *sanguinus*, и группа *mitis*. Фенотипически и филогенетически *S. pneumoniae* относят к кластеру *mitis* [66]. Примечательно, что *S. mitis*, *S. oralis* и *S. pneumoniae* генетически наиболее близки между собой и их дифференцировка на основании нуклеотидных последовательностей 16S рРНК затруднительна (идентичность достигает более 99%) [88]. Также недавно выявлен новый представитель вида стрептококков группы *viridans*, демонстрирующий максимальную идентичность с *S. pneumoniae*, а именно *Streptococcus pseudopneumoniae*. Фенотипически этот вид отличается от пневмококков устойчивостью к оптохину при инкубации в условиях 5% CO₂, а также отсутствием полисахаридной капсулы [76].

1.1.2. Идентификация и типирование пневмококков

Пневмококки относятся к категории прихотливых микроорганизмов, поэтому их идентификацию и культивирование необходимо осуществлять, используя питательные среды с добавлением 5-7% крови животного происхождения (дефибринированная баранья кровь) и лошадиной сыворотки для реализации потребности в нативном белке животного происхождения [10], фолиевой кислоте и аминном азоте. Изоляты *S. pneumoniae* характеризуются чувствительностью к оптохину (этилгидрокупреин) и растворяются солями желчных кислот (дезоксихолат) [100].

При культивировании на кровяном агаре изоляты *S. pneumoniae* демонстрируют такие морфологические особенности роста, как блюдцеобразное вдавление по центру колоний, α -гемолиз, обусловленный действием аутолизина (*lyt*) [100]. При стереомикроскопии бактериальная культура пневмококков характеризуется мягкой «творожистой» консистенцией, колонии имеют сероватый оттенок [10].

Для достижения высокой специфичности при идентификации пневмококков необходимы также среды, содержащие в своем составе или колистин и налидиксовую кислоту, или 5% гентамицин для подавления роста сапрофитной флоры [10].

Одним из основных отличительных признаков *S. pneumoniae* являются особенности антигенной структуры полисахаридной капсулы и с учетом этих особенностей для серотиповой идентификации микроорганизма используют золотой стандарт - реакцию набухания капсулы [151], впервые описанную Нейфельдом в 1902 году, реализуемую посредством последовательного тестирования изолятов с пуловыми, групповыми и факторными антисыворотками (против более 90 серотипов) [73, 153] и/или реакцию латексной агглютинации. Реакция набухания капсулы является трудоемкой, требует дорогих реагентов и может быть трудной для интерпретации [139], в связи с этим альтернативным вариантом является определение серотипа с использованием метода ПЦР, позволяющим детектировать гены синтеза полисахаридной капсулы (*cps*-локус) [46, 130]. Точное серотипирование патогена предоставляет важную эпидемиологическую информацию, поэтому серотипирование посредством последовательного алгоритма при помощи методов ПЦР и реакции набухания капсулы является наиболее надежным, с первоначальным обнаружением распространенных серотипов с использованием мультиплексной ПЦР, и с последующим применением реакции Нейфельда для определения оставшихся серотипов.

1.1.3. Внутривидовая трансформация *S. pneumoniae*

Впервые, явление трансформации было описано в 1928 году, когда Ф. Гриффит продемонстрировал возможность переноса факторов патогенности. Горизонтальный перенос генетических элементов в пределах вида и между близкородственными стрептококками (группы *viridans*) обеспечивает высокую гетерогенность популяции пневмококков, определяет пластичность генома, а также играет большую роль в процессах приобретения детерминант антибиотикорезистентности.

Пневмококки обладают ковалентно замкнутой ДНК по типу «кольца», состоящей приблизительно из 2,1 млн. пар нуклеотидов (п.н.), характеризующейся низким содержанием пар оснований гуанин-цитозин в своем составе (34-46%) [152, 168]; также геном *S. pneumoniae* дополнительно характеризуется наличием плазмид. Плазмидная ДНК пневмококков характеризуется содержанием и подвижных генетических элементов с высоким уровнем пластичности, причем состав генома может варьировать до 10%. Некоторые изоляты могут обладать и внехромосомными элементами наследственности, обуславливающими устойчивость к антимикробным препаратам таких классов, как макролиды, тетрациклины, линкозамиды и амфениколы. Также в составе генома *S. pneumoniae* может присутствовать большое количество последовательностей вставочных элементов, составляющих до 5% генома [154, 168]. Кроме того, геном *S. pneumoniae* содержит и многочисленные копии элементов ДНК с прямым повторением, обеспечивающих присутствие точек рекомбинации [168].

Процесс трансформации *S. pneumoniae* разделяют на несколько этапов [154]. Во-первых, должны быть получены соответствующие внутренние и внешние сигналы: так, в ответ на воздействие антибиотикотерапии или вакцинации происходит накопление стимулятора компетентности, внеклеточного

компетент-стимулирующего пептида [154], после этого, «*quorum-sensing*»-подобная система, регулирующая выработку бактериоцинов и являющаяся биологическим переключателем, активирует процесс трансформации пневмококков и последующее восстановление поврежденной ДНК [53, 154].

Во-вторых, естественная трансформация *S. pneumoniae* включает в себя этап реализации экспрессии около 20 генов ранней и поздней компетенции [148, 154]. После активации генов поздней компетенции, происходит процесс трансформации, а именно поглощение и рекомбинация экзогенной ДНК.

Примечательно, что *S. pneumoniae* обладают механизмами, обеспечивающими доступ к экзогенной ДНК, и одним из таких механизмов является «братоубийство», когда компетентные клетки *S. pneumoniae* лизируют некомпетентные «родственные» клетки пневмококков, для обеспечения доступа к гомологичной донорской ДНК [148, 154].

1.1.4. Респираторные пневмококковые инфекции

Пневмококки наиболее часто являются этиологической причиной острых средних отитов, синуситов, особенно среди детей младшего возраста. Основной экологической нишей при колонизации пневмококками организма человека является поверхность верхних дыхательных путей, а именно слизистая оболочка носоглотки [77, 104, 112], колонизация которой наиболее часто протекает бессимптомно [44, 104], сопровождаясь более длительной продолжительностью у детей младшего возраста (~43 дня), по сравнению с детьми старшего возраста (~25 дней) [78]. Частота и уровень носительства *S. pneumoniae* в популяции имеет самый высокий уровень (30-60%) среди детей младшего возраста [78, 124, 125], достигая максимальных показателей приблизительно к двум-трем годам жизни ребенка и снижается до <10% у взрослых [77]. Инфицирование пневмококком

обычно происходит как воздушно-капельным путем и колонизация носоглотки способствует развитию пневмококковых инфекций [77], так и при непосредственном контакте с мокротой, отделяемой от больного [77, 112, 168]. Поскольку пневмококки колонизируют в основном верхние дыхательные пути, носительство является важным фактором при горизонтальной передаче патогена другим лицам [44]; так как дети имеют самые высокие показатели передачи пневмококков от одного лица другому, они являются важным резервуаром при непрерывном распространении инфекционных заболеваний верхних дыхательных путей и основным источником передачи пневмококков взрослым [104, 112]. Элиминация микроорганизма происходит в ответ на сформированный серотип-специфический иммунный ответ на капсульные антигены микроорганизма, а также и на некоторые поверхностные белки [22].

Помимо колонизации носоглотки, пневмококки могут быть причиной и смежного распространения в пазухах (синусит) или среднего уха (острый средний отит) [179]; аспирация микроорганизма в легкие, вызывает развитие пневмококковой пневмонии [77, 104]. По данным ВОЗ, пневмококки являются этиологической причиной заболеваемости до 36% внебольничных пневмоний среди взрослых, а заболеваемость пневмококковой пневмонией среди детей варьирует в зависимости от региона, однако по оценкам ВОЗ, 8,7-52% случаев пневмококковой пневмонии встречается среди детей в возрасте до шести месяцев жизни [176].

1.1.5. Инвазивные пневмококковые инфекции

Лица, являющиеся носителями *S. pneumoniae*, подвержены риску развития ИПИ [112], возникающих при проникновении пневмококков в стерильные в норме локусы (кровеное русло, лимфу) [176]; при адгезии и успешной инвазии слизистой оболочки нижних дыхательных путей [77]. Заболеваемость ИПИ

существенно варьирует в зависимости от региона; по данным Центра по профилактике и контролю заболеваний США 2014 года, около 90% случаев ИПИ наблюдалось среди взрослых, в то время как по оценкам ВОЗ, в среднем 75% случаев ИПИ в мире приходилось на долю детей младше двух лет [176].

Пневмококковая бактериемия является одним из осложнений пневмококковых пневмоний, которое возникает примерно в 12-16% случаев пневмоний у детей и в 25-30% случаев ИПИ среди взрослых. Другой формой ИПИ является пневмококковый менингит [3], являющийся наиболее распространенной формой менингита у детей, так как вакцинация против *Haemophilus influenzae*, тип *b* привела к снижению гемофильной инфекции типа *b*. В целом, на долю пневмококкового менингита приходится 8% летальных случаев среди детей и 22% летальных случаев среди взрослых, по данным ВОЗ [176].

1.2. Устойчивость пневмококков к противомикробным препаратам

В 1928 году Александр Флеминг открыл пенициллин, после этого Эрнесту Чейну и Говарду Вальтер Флори удалось получить стабильную форму пенициллина в лаборатории университета Оксфорда; и уже в 1943 г. в США Г. Флори и компания «Мерк» запустили массовое производство пенициллина, заменившего сульфаниламиды при лечении пневмококковых пневмоний [119]. Снижение чувствительности к пенициллину было выявлено у клинических изолятов *S. pneumoniae* в 1965 году [92], а в 1967 году была описана панрезистентность у выделенного изолята *S. pneumoniae* [75]. С этого времени наблюдался неуклонный рост устойчивости циркулирующих изолятов *S. pneumoniae* ко многим антимикробным препаратам. Селективное давление применения антибиотиков стимулировало адаптацию микроорганизма в условиях колонизации носоглотки, где присутствует разнообразный генофонд зеленающих

стрептококков, и как следствие, детерминанты устойчивости могут передаваться от одного вида микроорганизма к другому [91, 154].

В 2017 году ВОЗ опубликовала список приоритетных микроорганизмов, представляющих угрозу для здоровья и жизни человека и являющихся этиологическими факторами инфекций с высоким уровнем устойчивости к антибиотикам по всему миру. *S. pneumoniae*, обладающие МЛУ-фенотипом и устойчивые к антибиотикам из группы β -лактамов, были включены в этот перечень [175].

1.2.1. β -лактамные антибиотики

Группа β -лактамных противомикробных препаратов нарушает синтез пептидогликана клеточной стенки путем необратимого связывания с доменом транспептидазы пенициллинсвязывающих белков (ПСБ, *pbp*, *penicillin-binding protein*), предотвращающих сшивание пептидогликана [91]. Снижение чувствительности и возрастание количества выделения устойчивых изолятов пневмококков к этому классу антибиотиков происходит поэтапно, начиная с приобретения ими мутаций, происходящих в трех из шести разных генов, кодирующих соответствующие ПСБ - *pbp1a*, *pbp2b* и *pbp2x* [38, 74].

При исследовании и анализе уровня чувствительности коллекции, циркулирующих изолятов *S. pneumoniae* из девяти европейских стран, наиболее устойчивыми к пенициллину были пневмококки серотипов 14 и 19А, при этом пневмококки серотипа 19А, наиболее часто обладали МЛУ-фенотипом [178].

Согласно данным программы мониторинга за уровнем резистентности *S. pneumoniae* - EARSS (European Antimicrobial Resistance Surveillance System) с 2015 по 2018 гг. в 32 странах Европейского союза, уровень устойчивости к пенициллину достигал 22,9-29,1% во Франции, 18,5-25% в Испании, 15,8-20,7% в

Ирландии и 18,1-22,5% в Хорватии [159]. По результатам исследования Alexander project [67], проведенного в более ранние годы, во Франции показатели резистентности к пенициллину составили 7,7 и 35,8%, в США 5,6 и 20,4%, в Испании 24,9 и 30,2%, в Великобритании 0,6 и 1,1%, в 1992 и 2001 гг., соответственно. Также исследователи приводят данные о драматичном возрастании доли устойчивых к пенициллину/эритромицину штаммах пневмококка во Франции – 32,7%, Испании – 17%, США – 15,3% [67].

При исследовании уровня резистентности *S. pneumoniae* к пенициллину по результатам исследования в странах Северной и Латинской Америки, Европе и Азиатско-Тихоокеанском регионе с 1997 по 2016 гг. [143] показано, что показатель чувствительности к пенициллину ($\leq 0,06$ мг/л) варьировал от 70,7% в европейском регионе до 52,4% в Азиатско-Тихоокеанском регионе за все годы исследования. В Северной Америке отмечено незначительное возрастание чувствительности в течение первых нескольких лет программы наблюдения, с 66,5% в 1997–1998 годах до 69,4% в 1999–2000 годах, с последующим снижением выделения доли чувствительных изолятов к β -лактамным антибиотикам до 57% в 2011–2012 гг. Подобное возрастание уровня резистентности к пенициллину наблюдалось во всех регионах исследования, причем самые высокие показатели - 32,7% в Европе (2011–2012 годы), 58,4% в Азиатско-Тихоокеанском регионе (2007–2008 годы) и 51,8% в Латинской Америке (2013–2014 годы) [143]. Доля МЛУ и ЭЛУ изолятов пневмококка достигала самых высоких показателей в Азиатско-Тихоокеанском регионе - 49,8% и 17,3%, соответственно. Наиболее активными антибактериальными препаратами в отношении МЛУ/ЭЛУ-изолятов пневмококка были цефтаролин (чувствительность 99,7 и 99,1%), линезолид и ванкомицин (чувствительность 100,0%) [143].

В обновленных рекомендациях по оценке чувствительности к антибиотикам Европейского комитета по тестированию антимикробной чувствительности 2019 года [160] в отношении неменингитных *S. pneumoniae* произошел ряд изменений в связи с эволюцией понятий клинических категорий чувствительности.

К категории «чувствительные» (Ч) относятся микроорганизмы, эффект проводимой терапии против которых с высокой вероятностью будет положительным. К чувствительным при увеличенной экспозиции антибиотика (П) относятся пневмококки с уровнем МПК, характеризующимся неясной эффективностью терапии, обладающие пограничными показателями МПК, но характеризующиеся высокой вероятностью эффективности проводимой антибиотикотерапии, при использовании более высоких доз антибиотика (EUCAST-2019). К категории резистентные (Р) относятся изоляты *S. pneumoniae*, действие антимикробного препарата при терапии которых, характеризуется высокой вероятностью терапевтической неудачи.

В соответствии с критериями EUCAST-2019, резистентными к пенициллину считаются изоляты пневмококков, обладающие показателями МПК > 2 мг/л; к категории «чувствительные при увеличенной экспозиции антибиотика» (П), относятся пневмококки, характеризующиеся значениями МПК в диапазоне от > 0,06 до 2,0 мг/л включительно,

1.2.2. Макролиды, линкозамиды, тетрациклины и амфениколы

Частота выделения устойчивых к макролидам изолятов *S. pneumoniae* в некоторых регионах мира превышает уровень выявляемых устойчивых изолятов пневмококков к пенициллину [91, 109, 111, 140]. При исследовании механизмов устойчивости к эритромицину и хлорамфениколу [45] среди 263 изолятов зеленящих стрептококков, было детектировано 56,3% изолятов устойчивых к эритромицину; 14% и 42% характеризовались сMLS_B-фенотипом и М-фенотипом, соответственно; при этом, 27% были устойчивы к тетрациклину и 3% изолятов резистентны к хлорамфениколу. Также был описан ряд генетических элементов, несущих детерминанты устойчивости к вышеуказанным

антибиотикам, а именно транспозоны *Tn2009*, *Tn2010*, вставочные элементы, *Tn917*, *Tn3872*, *Tn6002*, *Tn916*, *Tn5801*, а также и мобильные генетические элементы, обуславливающие невосприимчивость к тетрациклину [45].

Анализ данных распределения механизмов устойчивости к эритромицину, тетрациклину и хлорамфениколу среди стрептококков группы *viridans*, подтверждает тот факт, что зеленеющие стрептококки являются важным резервуаром генов устойчивости и способны обеспечивать их передачу более патогенным представителям среди своей группы, таким как *S. pneumoniae*.

При изучении МЛУ-изолятов *S. pneumoniae* [93] устойчивость к эритромицину в основном была обусловлена горизонтальным распространением конъюгативного транспозона *Tn916*, несущего гены резистентности *ermB* и *tetM*. Большинство транспозон-несущих изолятов относились к ПКВ13 и ППВ23-серотипам, но как сообщают авторы, необходимо дальнейшее продолжение проведения мониторинга серотипов и определения чувствительности к антибиотикам с течением времени. В исследовании, проведенном в Канаде, было продемонстрировано, что почти 13% изолятов, выделенных из образцов крови, и почти 25% изолятов, выделенных из образцов верхних дыхательных путей, характеризовались резистентностью к антибиотикам из группы макролидов [27]. Устойчивость к этому классу антибиотиков в большинстве случаев была опосредована двумя механизмами – эффлюксом (активным выведением антибиотика из бактериальной клетки) и рибосомальной модификацией мишени. Активное выведение антибиотика из бактериальной клетки обусловлено наличием генов класса *mef*, в частности, *mefA* и *mefE*, и ассоциируется с показателями невосприимчивости к макролидам, обладающими невысокими МПК.

Метилирование 23S рРНК опосредовано присутствием гена *ermB*, что в свою очередь приводит к детекции изолятов пневмококков, обладающих МПК более высокого уровня к макролидам, а также такие изоляты обычно устойчивы к

линкозамидам и стрептограмину В; такой фенотип носит название MLSB-фенотипа [91]. Большое количество изолятов, обладающих сочетанным генотипом *ermB/mefA*, были выделены в Азии, Канаде, Африке и России [69, 111, 145, 174]; этот двойной генотип хорошо исследован и показано, что наличие вышеуказанных генов, связано с присутствием такого мобильного генетического элемента, как транспозон *Tn2010* [145]. *Tn2010* является производным транспозона *Tn916*, одного из носителей гена *tetM*. Именно по этой причине *ermB*-опосредованная устойчивость к макролидам и устойчивость к тетрациклину часто выявляются в сочетании среди одних и тех же изолятов *S. pneumoniae*. Ген *tetM* функционирует, защищая рибосому 30S от связывания с антибиотиком; *tetO* ген функционирует аналогично, однако об этом гене не так часто сообщается в литературе в связи с его невысокой выявляемостью [91].

Формирование устойчивости к хлорамфениколу среди пневмококков происходит путем ферментативной инактивации антибиотика при производстве хлорамфениколацетилтрансферазы. Этот фермент кодируется геном *cat* и переносится конъюгативными транспозонами, а иногда и единым транспозоном, обуславливающим в том числе и сочетанную устойчивость к макролидам и тетрациклинам. Хлорамфеникол редко используется при лечении пневмококковых инфекций вследствие побочных эффектов [69], особенно при проведении терапии среди детей младшего возраста.

1.2.3. Ингибиторы путей фолиевой кислоты

Комбинация триметоприм/сульфаметоксазол подавляет синтез фолата бактериальной клеткой. Пневмококки характеризуются резистентностью к каждому из компонентов этого антимикробного препарата, обусловленной хромосомными мутациями. Так, устойчивость к триметоприму обеспечивается

благодаря наличию единственной аминокислотной замены (Ile100Leu) в гене дигидрофолатредуктазы А (*folA*) [91]. Устойчивость же к сульфаметоксазолу обусловлена присутствием локализованных вставок одного или двух кодонов между аминокислотами *Arg58* и *Ile66* гена дигидрофолатсинтазы Р (*folP*) [114]. Присутствие одной из этих двух аминокислотных замен в отдельности описано ранее при изучении изолятов *S. pneumoniae*, обладающих промежуточной устойчивостью (при увеличенной экспозиции антибиотика) к триметоприм/сульфаметоксазолу, в то время как сочетание этих замен обуславливало высокий уровень резистентности к триметоприм/сульфаметоксазолу [91].

1.2.4. Фторхинолоны

Устойчивость *S. pneumoniae* к хинолонам обусловлена точечными мутациями или комбинацией мутаций в генах, кодирующих топоизомеразу тип II, в частности ДНК топоизомеразу IV (*parC*) и ДНК-гиразу (*gyrA*). Изменения в областях этих генов, определяющих устойчивость к хинолонам (QRDR, *quinolone resistance-determining regions*), обуславливают предотвращение связывания фторхинолонов, что позволяет продолжаться процессам репликации бактериальной ДНК [91, 164]. Примечательно, что ЛФЛ предпочтительно связывается с мишенью, кодируемой топоизомеразой IV и этот процесс регулируется геном *parC*, тогда как МФЛ имеет сродство с гиразой, кодируемой геном *gyrA* [91, 164].

Формирование устойчивости пневмококков к хинолонам является многофакторным и сложным процессом и может быть связано с тремя типами механизмов. Во-первых, с хромосомными мутациями, приводящим к изменениям целевых ферментов и их степени связывания с антибиотиком; во-вторых, с

хромосомными мутациями, обуславливающими снижение накопления антибиотика или уменьшение поглощения, или увеличенный отток антимикробного препарата из бактериальной клетки; и в-третьих, с присутствием плазмидных генов устойчивости, продуцирующих либо целевые защитные белки, модифицирующие антибиотик, или обеспечивающие эффективную работу эффлюксной системы [79].

При исследовании чувствительности большой коллекции инвазивных изолятов *S. pneumoniae* к респираторным фторхинолонам в Германии, собранных в эпидемиологические сезоны, в период с 2004/2005 гг. по 2014/2015 гг., уровень устойчивости к ЛФЛ не превышал 0,5% [144]. В Китае, при анализе чувствительности к фторхинолонам 97,8% всех исследуемых изолятов, сохраняли чувствительность к этой группе антибиотиков; в США, с 1995 по 2000 годы, было зарегистрировано 95,5-99,7% восприимчивых к респираторным фторхинолонам изолятов *S. pneumoniae* [47].

Мутации в QRDR у пневмококков обычно возникают спонтанно, но был описан горизонтальный перенос мутированных генов от других видов зеленящих стрептококков [34, 68].

Эффлюкс антибиотиков является причиной формирования невысокого уровня устойчивости к фторхинолонам и придает только умеренное увеличение показателей МПК, и этот механизм в настоящее время еще не изучен детально [37, 85, 91].

1.2.5. Ванкомицин, рифампицин, линезолид

Ванкомицин относится к антибиотикам резерва и является важнейшим компонентом эмпирической терапии бактериального менингита. Описаны единичные клинические изоляты *S. pneumoniae*, устойчивые к ванкомицину [123,

141] и резистентность может быть обусловлена комбинацией изменений дефектного синтеза аутолизинас изменениями в генах, ассоциированных с клеточной гибелью (*vncS*, *vex2* и *rep27*) [31, 123, 141, 155].

Линезолид-резистентные пневмококки встречаются редко и на их долю приходилось менее 1% выборки среди тестируемых изолятов по данным наблюдения в Соединенных Штатах в течение 12-летнего периода времени [62]. Снижение восприимчивости к линезолиду, обусловлено модификацией рибосомального белка, включающего *cfr*-опосредованное метилирование 23S рРНК, и мутациями в 23S рРНК, а также изменениями или делециями в гене *rplD* [62, 91].

Рифампицин рекомендован для проведения комбинированной терапии менингитов, вызванных устойчивыми к β -лактамным антибиотикам *S. pneumoniae*. Высокий уровень резистентности к рифампицину (МПК>4 мг/л) ассоциирован с точечными мутациями кластеров I и III β -субъединицы РНК-полимеразы, кодируемой геном *rpoB* [113, 129]. Анализ последовательностей гена *rpoB* показал, что 8 устойчивых изолятов, 3 спонтанно-резистентных к рифампицину мутанта *S. pneumoniae*, а также два изолята *S. mitis* демонстрировали устойчивость к рифампицину, обусловленную в первую очередь точечными мутациями этого гена [64]. Невысокий уровень резистентности может быть связан с мутациями в кластере II гена *rpoB* (I545N, I545L). Во время внутрибольничной вспышки в Нидерландах были идентифицированы МЛУ-изоляты *S. pneumoniae*, выделенные от 36 пациентов, и при тестировании чувствительности к антибиотикам, были выявлены устойчивые к рифампицину изоляты пневмококков среди них [169].

1.3. Пневмококковые вакцины

1.3.1. Капсула пневмококков

В настоящее время на основании различий в последовательности капсульных олигосахаридов *S. pneumoniae* и способности иммунной системы распознавать эти различия путем выработки специфических антител выделяют 97 серотипов пневмококков.

Генетический локус, содержащий гены продукции капсулы, называется капсульным локусом (*cps*-локус). Эта единичная транскрипционная область, имеющая длину в среднем около 20,7 кб, располагающаяся между генами *dexB* и *aliA*, не участвующими в синтезе капсулы [41]. Первые четыре гена *cps*-локуса представляют собой консервативные последовательности почти для всех *S. pneumoniae* [86]. Четыре регуляторных белка, кодируемые этими генами, контролируют уровень экспрессии капсулы и адгезию микроорганизма [26, 41]. Большинство из потенциально кодирующих последовательностей центральной части *cps*-локуса кодируют функциональные трансферазы [41, 86, 180]. Функциональный промотор *cps*-локуса располагается непосредственно перед *cpsA* [180].

Существует два пути синтеза капсульных полисахаридов. Первый, *wzy*-зависимый путь [86], используется всеми серотипами пневмококков, за исключением двух (3 и 37), и приводит к синтезу полимеров, содержащих несколько типов полисахаридных звеньев, гликозидных связей и разветвлений [180]. Капсула серотипов 3 и 37 кодируется при помощи синтазного пути, более простого, чем *wzy*-зависимый путь, поскольку повторяющиеся единицы представляют собой отдельные сахара [26, 180].

Многочисленные работы подтверждают, что событие переключения капсулы внутри популяции пневмококков не является редким явлением, за счет

него невакцинные серотипы могут приобретать капсулы успешных ПКВ-клонов пневмококков [105, 114, 122, 172]. После внедрения ПКВ7 и до введения ПКВ13 наблюдался рост частоты выделения не-ПКВ13 серотипа 19А, связанного с успешной экспансией ST199 и ST320 [32, 105].

1.3.2. Пневмококковые полисахаридные вакцины

23-валентная пневмококковая полисахаридная вакцина (ППВ23) лицензирована в 1983 году и все еще используется сегодня во многих странах мира [63]. В состав этой вакцины вошли такие варианты серотипов, как 1, 2, 3, 4, 5, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15В, 17F, 18С, 19F, 19А, 20, 22F, 23F и 33F. Серотиповой охват ППВ23 шире, чем у любой лицензированной в настоящее время конъюгированной вакцины (ПКВ7, ПКВ10, ПКВ13). Однако в отличие от конъюгированных вакцин, ППВ23 не подходит для использования у детей в возрасте до 2 лет в связи с тем, что способность к адекватному иммунному ответу на Т-независимые антигены, которыми являются бактериальные полисахариды, формируется позже. Иммунитет после применения такой вакцины у взрослых сохраняется в течение 4-5 лет [63].

1.3.3. Пневмококковые конъюгированные вакцины

В состав ПКВ7 входит семь серотипов, наиболее часто ассоциируемых с возникновением ИПИ, а именно серотипы 4, 6В, 9V, 14, 18С, 19F и 23F, ответственные за возникновение более чем 80% инвазивных инфекций среди детей в довакцинальный период [42, 63]. Повсеместная ПКВ7-вакцинация привела к значительному общему снижению заболеваемости ИПИ среди детей

[60], особенно в отношении серотипов пневмококков, входящих в ее состав [42, 138]. При этом отмечались и косвенные эффекты вакцинации, особенно выявленные при носоглоточном носительстве пневмококков; ПКВ7 снижала носительство вакцинных серотипов на слизистой носоглотки, и снижала их передачу от детей другим непривитым ПКВ7-лицам.

С учетом изменения серотипового пейзажа пневмококков в пост-ПКВ7 была разработана и внедрена в практику 13-валентная ПКВ, которая содержит дополнительно полисахариды 6 сертипов, включая 1, 3, 4 5, 6А, 6В, 7F, 9V, 14, 18С, 19А, 19F и 23F. ПКВ-13 была введена для массового применения в США, Европе, Канаде в 2010 году; в России внедрена в национальный календарь прививок в 2014 году (приказ МЗ №125Н от 21.03.2014 г.). Также применение ПКВ13 было рекомендовано для профилактики ИПИ у взрослых в возрасте старше 65 лет.

1.3.4. Феномен переключения капсулы и замещения серотипов

Внедрение ПКВ в национальные программы иммунизации во многих странах мира значительно снизило заболеваемость ИПИ [173] и способствовало снижению общей доли заболеваемости пневмококковыми инфекциями, не поддающимся антибактериальной терапии, поскольку пневмококки вакцинных серотипов более устойчивы к антибиотикам по сравнению с невакцинными изолятами [95]. После введения ПКВ13-вакцинации, при исследовании изолятов из США, Китая, Израиля, показано, что частота выделения не-ПКВ13 серовариантов пневмококка (5, 12F, 15В/С, 33F, 35В/Д) при ИПИ имела тенденцию к возрастанию, и их доля в пре- и пост-ПКВ13-период оказала влияние на рост уровня резистентности к пенициллину (21 и 29%) и эритромицину (1 и 11%) [103]. Уровень потребления антибиотиков, несомненно оказывает

избирательное давление на возрастающую частоту выделения невакцированных носоглоточных пневмококков и преобладающими невакцированными носоглоточными серотипами в Европе являются сероварианты 15В/С, 11А, 23В, 15А, 35В, 10А, 21 и 23А [101]. Селективное давление, вызванное вакцинацией и антибиотикотерапией способствует изменению эпидемиологии серотипового состава, но при этом происходит и естественное колебание в распространенности серотипов.

Изменения серотиповой структуры популяции пневмококка являются результатом таких процессов, как феномен «замещения серотипов» («serotype replacement»), экспансия ранее существующих в популяции успешных клонов невакцированных серотипов, так и событий «переключения серотипа» («capsular switching»), т.е. приобретения локуса капсульных полисахаридов [177] в ходе гомологичной рекомбинации. Этот процесс затрагивает ДНК (> 30 т.п.н.) - *cps*-локуса и зачастую фланкирующие его гены, кодирующие пенициллин-связывающие белки, и вероятно, является неотъемлемой чертой эволюции *S. pneumoniae*. Замещение серотипов и капсульное переключение могут быть исследованы путем сравнения анализа ассоциаций генотип/серотип у резистентных клональных линий, распространенных до и после введения массовой вакцинации, с последующим анализом и исследованием нетипичных комбинаций, представляющих собой вариант переключения, возникающего в следствие рекомбинации в локусе *cps* (размер фрагментов от 21,9 до 56,5 кб) [48, 71, 108, 134], в некоторых случаях и в генах, кодирующих *pbp2x* и *pbp1a*, расположенных приблизительно в 7-8 кб от *cps*-локуса. Так, изоляты принадлежащие к одной и той же клональной линии, но экспрессирующие разные серотипы, обычно интерпретируются как пневмококки, претерпевшие событие капсульного переключения. Такие рекомбинантные изоляты одновременно с донорским *cps* локусом могут приобретать дополнительный генетический материал, способствующий лучшей адаптации к изменениям окружающей среды. Появление

новых МЛУ-клонов посредством капсульного переключения является серьезной проблемой для общественного здравоохранения.

1.3.5. Перспективы разработки новых пневмококковых вакцин

В связи с тенденцией к увеличению валентности ПКВ с каждым новым периодом времени, 15-валентная конъюгированная вакцина (ПКВ15, серотипы ПКВ13 + серотипы 22F и 33F) в настоящее время входит во II клиническую фазу испытаний в США. Несколько испытаний, как среди детей, так и среди взрослых показали, что ПКВ15 демонстрирует приемлемый профиль безопасности и вызывает серотип-специфический иммунный ответ, в отношении входящих в ее состав серотипов [116].

Эффект лицензированных в настоящее время пневмококковых вакцин основан на выработке антител против капсульных полисахаридов, входящих в состав вакцины, то есть базируется на формировании серотип-специфического иммунного ответа. Ограниченное количество входящих в состав вакцин серотипов, вариации циркулирующих серотипов по всему миру и феномен замещения серотипов стимулируют разработку новых подходов к созданию пневмококковых вакцин, в частности, на основе специфических белков. Многие белки на поверхности клеточной мембраны пневмококков универсально экспрессируются на постоянно высоком уровне, тем самым делая их идеальными мишенями и возможными кандидатами при разработке вакцин нового типа. Некоторые пневмококковые белки, такие как *ply*, *psaA*, *pspA*, *hyl* и семейства белков *pht* [132], могут быть использованы в качестве потенциальных вакцинных кандидатов [83, 181, 182]. Дополнительные белки, которые продемонстрировали схожую степень иммуногенности, такие как *pspC*, *nanA*, *piaA* и *lytA*, также активно исследуются [117, 132].

Глава 2. Материалы и методы исследования

2.1. Выделение и идентификация пневмококков

В исследование вошли изоляты пневмококков, выделенные в лаборатории микробиологии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России в период с 2010 по 2017 гг. Культивирование изолятов пневмококков проводили на колумбийском агаре (BioMerieux, Франция) с содержанием в питательной среде 5% дефибринированной бараньей крови и 3% лошадиной сыворотки. Инкубацию проводили в атмосфере с повышенным содержанием CO₂ (5%) при температуре +37°C в течение 18-24 ч. Идентификацию *S. pneumoniae* проводили путем оценки морфологии колоний (α -гемолиз, блюдцеобразное вдавление по центру колоний), исследования фенотипических характеристик (чувствительность к оптохину), проведения серологических тестов *S. pneumoniae* (положительный результат агглютинации с использованием набора Slidex pneumo-Kit (BioMerieux) или Wellcogen *S. pneumoniae* (Oxoid, Великобритания). Выделенные изоляты после идентификации хранили в криопробирках с триптиказосоевым бульоном (BioMerieux) с добавлением 17% стерильного глицерина (Sigma, США) при температуре -70°C.

2.2. Определение чувствительности к антибиотикам

Тестирование чувствительности пневмококков к антибиотикам проводили несколькими методами. На первом этапе исследования из имевшейся коллекции были отобраны изоляты, показавшие резистентность к трем и более антибиотикам, т.е. МЛУ-фенотип, при использовании диско-диффузионного

метода (тестировали оксациллин (Окс), эритромицин (Эри), клиндамицин (Кли), триметоприм/сульфаметоксазол (ТМП) и тетрациклин (Тет)). Затем отобранные изоляты для определения МПК тестировали при помощи метода микроразведений (ММР) антибиотиков в бульоне в планшетах Sensititre (Thermo Fisher Scientific, США), как указано в инструкции. Данные планшеты включали 16 антибиотиков, относящихся к 10 группам. Перечень антибиотиков и МПК для категоризации изолятов в зависимости от чувствительности приведены в Таблице 3.1. В ряде случаев дополнительно использовали эпсилOMETрические тесты (Е-тесты; BioMerieux) согласно инструкции производителя. Изоляты с МПК пенициллина (Пен) и цефтриаксона (Цеф) ≥ 8 мг/л дополнительно исследовали при помощи ММР в бульоне с использованием субстанций антибиотиков (Sigma в концентрации 0-128 мг/л. При анализе распределений МПК Пен и Цеф результаты объединяли с данными Sensititre.

Результаты определения чувствительности к антибиотикам интерпретировали согласно рекомендациям EUCAST-2019 [98, 160] и в соответствии с методическими указаниями по определению чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам [13]. Для осуществления контроля качества тестирования чувствительности использовали контрольный изолят *S. pneumoniae* ATCC 49619.

2.3. Серотипирование

Серотипирование проводили двумя методами. Сначала осуществляли молекулярное типирование всех пневмококков с помощью мультиплексной ПЦР [130], которое позволяло определить 28 наиболее часто встречающихся серотипов. Те изоляты, серотип которых не удалось определить, серотипировали при помощи реакции набухания капсулы по Нейфельду со специфическими

антисыворотками производства Statens Serum Institute (Копенгаген, Дания) в соответствии с инструкцией производителя. Серотипы всех не-ПКВ-пневмококков были подтверждены серологическим методом.

Изоляты, которые не агглютинировали ни один из пулов антисыворотки (пулы от А до I и от Р до Т) считали нетипируемыми. Для доказательства принадлежности таких изолятов к виду *Streptococcus pneumoniae* у них тестировали при помощи ПЦР гены *ply* и *psaA*, которые считают достаточно надежными пневмококковыми маркерами [170].

2.4. Молекулярные исследования

2.4.1. Выделение ДНК

Для экстракции ДНК использовали колонки QIAamp DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Испания) в соответствии с инструкцией, предоставленной производителем. Для получения стандартизированного количества бактериальных клеток культуры микроорганизма инкубировали в течение 18-24 часов при 37°C в присутствии 5% CO₂ и готовили бактериальную взвесь с мутностью 0,5 McF в TE-буфере (состав: 10 mM Tris-HCl, 1 mM ЭДТА, pH 8,0). После стадии элюции, выделенную ДНК проверяли с использованием электрофореза в 2% агарозном геле в присутствии маркера молекулярных масс 500–10000 п.н. (Ахургер, США) для оценки качества и концентрации экстрагированной ДНК, далее выделенные образцы ДНК хранили при температуре -20°C.

2.4.2. Анализ молекулярных механизмов устойчивости к макролидам, тетрациклинам и амфениколам

Для всех Эри-резистентных изолятов МЛУ-пневмококков определяли гены, обуславливающие устойчивость к антибиотикам группы макролидов и линкозамидов *ermB* и *mef*, с использованием праймеров, описанных ранее [137]. У изолятов МЛУ-пневмококков, устойчивых к Тет, исследовали гены *tetM* и *tetO* с применением праймеров, предложенных [128], с модификациями, а у пневмококков, устойчивых к хлорамфениколу (Хло), определяли ген *catpQ194* [106]. Последовательности праймеров приведены в Таблице 2.1.

Определение соответствующих генов, обуславливающих устойчивость к вышеуказанным антибиотикам, проводили с применением ПЦР и детекцией продуктов амплификации в 2% агарозном геле. Общий объем реакционной смеси для детекции генов, обуславливающих резистентность к макролидам, составлял 25 мкл, и содержал по 5 пМ каждого из праймеров и по 10-20 нг ДНК. Реакцию амплификации проводили в соответствии со следующей схемой:

1. Начальная денатурация - 94°C – 5'
2. Денатурация 94°C – 30"
- Отжиг праймеров 60°C – 45"
- Элонгация 72°C – 1'
- Количество температурных циклов 35
3. Пост ПЦР 72°C – 10'

Для исследования наличия генов, обуславливающих устойчивость к Тет и Хло, готовили реакционную смесь, общий объем которой составлял 20 мкл, и состоящую из: 3 мкл геномной ДНК, 2 мкл каждого из праймеров, 10 мкл iQSupermix (Bio-Rad, США) и 3 мкл DI H₂O. Реакцию амплификации для идентификации генов *tetM* и *tetO* проводили следующим образом:

1. Начальная денатурация - 95°C – 5'

2. Денатурация 94°C – 2'

Отжиг праймеров 60°C – 1'

Элонгация 72°C – 2'

Количество температурных циклов 30

3. Пост ПЦР 72°C – 10'

Присутствие гена *catpQ194* у Хло-Р изолятов МЛУ-*S. pneumoniae* детектировали при следующем алгоритме амплификации:

1. Начальная денатурация - 95°C – 5'

2. Денатурация 94°C – 2'

Отжиг праймеров 47°C – 1"

Элонгация 72°C – 1'

Количество температурных циклов 30

3. Пост ПЦР 72°C – 10'

Таблица 2.1

Праймеры для детекции детерминант резистентности

Ген	Праймер	Последовательность (5'-3')	Размер продукта (п.н.)
<i>erm(B)</i>	ЕСР-F ЕСР-R	GAAAAGGТАСТСААССААТА AGТААСGGТАСТТАААТТGТТТАС	639
<i>mef</i>	МСР-L-F МСР-L-R	АТGGАААААТАСААСААТТGGААА ТТАТТТТАААТСТААТТТТСТААССТС	1218
<i>tet(M)</i>	tet(M2) tet(M3)	GAACTCGAACAAGAGGAAAGC АТGGАAGCCCAGAAAGGAT	740
<i>tet(O)</i>	tet(O1) tet(O2)	ААСТТАGGCАТТСТGGCTCAC ТССCACTGTTCCАТАТСТGТСА	519
<i>catpQ194</i>	CATd CATr	ТТАGGYTАТТGGGATAAGTTA CATGRТААССАТСАСАWACAG	338

2.4.3. Мультилокусное сиквенс-типирование (МЛСТ)

Метод основан на детекции семи генов «домашнего хозяйства» (housekeeping genes), не претерпевающих значительных изменений под действием селективного давления факторов внешней среды, например, в отличие от генов, кодирующих капсулу пневмококков. Для секвенирования проводили амплификацию внутренних фрагментов генов *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). Праймеры и условия амплификации представлены в Таблице 2.2. Анализ полученных нуклеотидных последовательностей проводили с использованием международной базы данных PubMLST (<http://spneumoniae.mlst.net>). Для установления связей тестируемых изолятов друг с другом и с представленными и охарактеризованными в базе данных изолятами *S. pneumoniae* (в том числе, определение принадлежности к клональным комплексам), и построение филогенетических деревьев, использовали базу eBURST, интегрированную на сайте PubMLST (<http://eburst.mlst.net>).

МЛСТ проводили, используя реагенты и оборудование фирмы Applied Biosystem (США), по методике, описанной в инструкции производителя. Полученные после секвенирования нуклеотидные последовательности анализировали с помощью программы SeqMan, а затем сравнивали с базой аллелей. Сиквенс-тип определяли на основании комбинации аллелей. Изоляты, находящиеся в базе данных, сгруппированы в клональные комплексы на основании кластеризации методом eBURST (<http://eburst.mlst.net/>) для микроорганизма вида *S. pneumoniae*.

Праймеры, используемые для амплификации семи генов домашнего хозяйства пневмококков

Ген	Праймер	Последовательность 5' → 3'	Исходные последовательности для подтверждения в PubMLST	Размер продукта (п.н.)
<i>aroE</i>	aroE-F	GCCTTTGAGGCGACAGC	GAAGCGAGT	479
	aroE-R	TGCAGTTCA(G/A)AAACAT(A/T)TTCTAA		
<i>gdh</i>	gdh-F	ATGGACAAACCAGC(G/A/T/C)AG(C/T)TT	AGAACAT	659
	gdh-R	GCTTGAGGTCCCAT(G/A)CT(G/A/T/C)CC		
<i>gki</i>	gki-F	GGCATTGGAATGGGATCACC	ACCCTTCAA	626
	gki-R	TCTCCCGCAGCTGACAC		
<i>recP</i>	recA-F	GCCAACTCAGGTCATCCAGG	CTCAACCAAA	572
	recA-R	TGCAACCGTAGCATTGTAAC		
<i>spi</i>	spi-F	TTATTCCTCCTGATTCTGTC	GTATCTTTT	560
	spi-R	GTGATTGGCCAGAAGCGGAA		
<i>xpt</i>	xpt-F	TTATTAGAAGAGCGCATCCT	GGTGATAA	572
	xpt-R	AGATCTGCCTCCTTAAATAC		
<i>ddl</i>	ddl-F	TGC(C/T)CAAGTTCCTTATGTGG	GCTAAAAT	513
<i>ddl</i>	ddl-R	CACTGGGT(G/A)AAACC(A/T)GGCAT	GCTAAAAT	513

2.5. Полногеномное секвенирование

2.5.1. Приготовление библиотек для полногеномного секвенирования на платформе Illumina HiSeq 2500

Полногеномное секвенирование отобранных изолятов осуществляли на платформе Illumina MiSeq&HiSeq 2500. Выделение геномной ДНК проводили на колонках QIAamp DNeasy Blood and Tissue Kit. Концентрацию выделенной ДНК в элюате измеряли на флуориметре Qubit 2.0 с помощью Qubit dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, США). Далее производили фрагментацию ДНК с параллельным включением адапторных последовательностей, необходимых для секвенирования, с помощью методики на основе фермента транспозазы (Nextera DNA Kit, Illumina). На старт реакции брали 40 нг геномной ДНК. При недостаточной концентрации образца ДНК производили пропорциональное снижение транспозазы в реакционной смеси. Индексирование полученных библиотек проводили путем амплификации с индексными праймерами. Индексированные полногеномные библиотеки пулировали в эквимольном (по возможности, с учетом концентраций и длин полученных библиотек) соотношении. Получившиеся пулы очищали с параллельным селективированием по длине с помощью SpeedBead Magnetic Carboxylate Modified Particles (GE Healthcare).

2.5.2. Секвенирование и анализ данных полногеномного секвенирования

Высокопроизводительное секвенирование проводили на секвенаторе Illumina HiSeq 2500 с использованием наборов Illumina HiSeq PE Rapid Cluster Kit v2 и Illumina HiSeq Rapid SBS Kit v2. Первичную обработку прочтений с целью их

фильтрации по качеству и удалению адаптеров секвенирования выполняли с использованием программного обеспечения bcl2fastq 2.20 (Illumina), flexbar 2.5 и специально разработанного программного обеспечения (скриптов) [61]. Сборку контигов осуществляли с использованием программного обеспечения SPAdes, версия 3.10 [36].

Используя программу ResFinder 2.1, анализировали детерминанты резистентности к антибиотикам. Определение сиквенс-типа на основе полногеномных данных проводили с помощью программного обеспечения MLST 1.8 [84, 96, 115]. Для каждой программы были использованы текущие версии баз данных по генам.

Для сбора статистики по прочтениям и контигам, а также для анализа выходных файлов программ и представления результатов в табличном виде, удобном для восприятия, применяли пакет программ samtools и специально разработанное программное обеспечение (скрипты). Филогенетический сравнительный анализ геномов проводили с использованием эталонного генома *S. pneumoniae* R6 (NCBI: NC_003098). Гены с хромосомными мутациями, обуславливающими резистентность, были извлечены с использованием инструментов NCBI BLAST, их также сравнивали с эталонным изолятом *S. pneumoniae* R6. Выделенные гены были выровнены при сравнении с эталонной последовательностью R6 с использованием программы множественной последовательности ClustalW2. Нуклеотидные последовательности *parC*, *parE*, *gyrA*, *gyrB* и *folA/folP* были исследованы для ранее описанных мутаций, характеризующих устойчивость к фторхинолонам и ТМП соответственно. Последовательности ДНК были переведены в аминокислотные последовательности и исследованы на мутации.

Собранные контиги после проведения полногеномного секвенирования были аннотированы с использованием RAST (быстрые аннотации с

использованием Subsystems Technology, США) [33] и NCBI PGAP (NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline, США) [158] серверов аннотаций.

При проведении сравнительного геномного анализа использовали полные геномы из открытого доступа базы данных PubMLST. Собранные контиги исследуемых геномов были упорядочены и ориентированы относительно эталонного генома изолята R6 (инвентарный номер GenBank NC_003098.1). Резистомы и вируломы анализировали с помощью алгоритма BLAST. Служба CSI Phylogeny 1.4 была использована для сравнения SNP и формирования логических выводов на основании объединенного выравнивания высококачественных SNP [57]. Результаты визуализировали с помощью MEGA [157].

Филогенетические деревья были построены с помощью сервиса CSI Phylogeny 1.4, и результаты были визуализированы с использованием MEGA. Многократное выравнивание последовательностей и сравнительный анализ исследуемых геномов проводили с использованием Mauve [59] с последующей визуализацией гомологии генома с помощью программного обеспечения BLAST Ring Image Generator (BRIG) [30]. Во время процесса выравнивания Mauve идентифицировал консервативные области (называемые локально коллинеарными блоками, LCB), которые, по-видимому, внутренне свободны от перегруппировок генома; также были извлечены выровненные *core*-последовательности исследуемых геномов, как минимум, разделяющие каждый LCB.

2.6. Статистический анализ

Ведение базы данных изолятов и статистический анализ проводили с помощью программ SPSS 25.0 (SPSS Statistics, США) и Excel. Сравнение различий частоты встречаемости МЛУ-пневмококков по годам наблюдения осуществляли с использованием таблиц сопряженности χ^2 . Для сравнения долей

использовали z-критерий. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Глава 3. Распространенность, спектр антибиотикорезистентности и серотиповое разнообразие пневмококков с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ)

3.1. Общая характеристика коллекции пневмококков с МЛУ

Всего за период 2010-2017 гг. в лаборатории микробиологии ФГАУ "НМИЦ здоровья детей" Минздрава России было выделено 2174 изолятов пневмококка. Ретроспективно, опираясь на данные тестирования чувствительности диско-диффузионным методом, из их числа было отобрано 507 (23,3%) изолятов, устойчивых к трем и более группам антибиотиков. Сюда входили Окс, Эри, Кли, ТМП и Тет, которые рутинно используются для оценки профиля антибиотикорезистентности пневмококка. Далее, для сформированной выборки изолятов были определены МПК к 10 группам антимикробных препаратов при помощи метода микроразведений в бульоне. У 29 (5,1%) Окс-Р изолятов МПК Пен оказалась в чувствительном диапазоне ($\leq 0,06$ мг/л), т.е. они были резистентны к двум группам антибиотиков, в связи с чем их исключили из выборки. Таким образом, в дальнейший анализ вошло 478 изолятов, имевших МЛУ-фенотип.

Большинство МЛУ-пневмококков были выделены из носоглотки (385; 80,5%). Другими источниками стали образцы нижних дыхательных путей (52; 10,9%) и жидкость среднего уха (39; 8,2%); еще два (0,4%) изолята были получены из стерильных локусов (кровь и спинномозговая жидкость). В возрастной структуре носителей МЛУ-пневмококков преобладали дети в возрасте ≤ 5 лет (324; 67,8%).

3.2. Профиль чувствительности к антибиотикам пневмококков с МЛУ

У подавляющего большинства МЛУ-пневмококков ожидаемо наблюдалась резистентность к Эри, Кли и Тет, входившим в число антибиотиков для формирования выборки (Таблица 3.1). Анализ при помощи E-тестов, обладающих более широким диапазоном МПК, показал для 481 (22,1%) Эри-Р и 442 (20,3%) Кли-Р изолятов МПК антибиотика ≥ 256 мг/л. Резистентностью к Пен и Амп (МПК > 2 мг/л) обладали 148 (31%) и 224 (46,9%) изолятов соответственно. Примечательно, что у 271 (56,7%) МЛУ-пневмококков значения МПК Пен находились в диапазоне от 0,12 до 2 мг/л, т.е. согласно новым критериям EUCAST-2019 [160] они относились к категории чувствительных при увеличенной экспозиции антибиотика. При этом большинство ($> 90\%$) МЛУ-пневмококков сохраняли чувствительность к Цеф, цефтаролину и Хло (Таблица 3.1). Кроме того, были обнаружены лишь единичные изоляты, резистентные к фторхинолонам, линезолиду и рифампицину, а к ванкомицину были чувствительным все МЛУ-пневмококки (Таблица 3.1).

Для получения более широкого спектра МПК мы дополнительно проанализировали пневмококки, имевшие МПК Пен и Цеф ≥ 8 мг/л ($n=19$ и $n=17$ соответственно), с использованием ММР в бульоне в диапазоне концентраций этих антибиотиков 0-128 мг/л. Были получены следующие показатели МПК: Пен – 8 мг/л ($n=11$) и 16 мг/л ($n=8$); Цеф – 8 мг/л ($n=11$), 16 мг/л ($n=3$) и 32 мг/л ($n=3$). Распределение МПК Пен и Цеф, полученное при объединении результатов на всем диапазоне концентраций, представлено на Рисунках 3.1 и 3.2.

Значения минимальной подавляющей концентрации десяти групп антибиотиков у пневмококков с МЛУ

Антибиотик	Группа	Ч (чувствительный)		П (промежуточный; чувствительный при повышенной экспозиции антибиотика)		Р (резистентный)		МП ₅₀ (мг/л)	МПК ₉₀ (мг/л)
		МПК	n (%)	МПК	n (%)	МПК	n (%)		
Пенициллин	β-лактамы	≤0,06	59 (12%)	0,12–2	271 (56,7%)	>2	148 (31%)	2	4
Ампициллин		≤0,5	142 (29,7%)	1-2	112 (23,4%)	>2	224 (46,9%)	2	8
Цефтриаксон		≤0,5	164 (34,3%)	1-2	279 (58,4%)	>2	35 (7%)	1	2
Эртапенем		≤0,5	334 (69,9%)	Нет	-	>0,5	144 (30,1%)	0,5	1
Цефтаролин		≤0,25	446 (93,3%)	Нет	-	>0,25	32 (7%)	<0,12	0,25
Эритромицин	Макролиды	≤0,25	0	0,5	0	>0,5	478 (100%)	256	256
Клиндамицин	Линкозамиды	≤0,5	45 (9%)	Нет	-	>0,5	433 (90,6%)	256	256
Хлорамфеникол	Амфениколы	≤8	433 (90,6%)	Нет	-	>8	45 (9%)	4	8
Триметоприм/ сульфаметоксазол	Сульфаниламиды	≤1	90 (19%)	2	34 (7%)	>2	354 (74,1%)	4	>4
Тетрациклин	Тетрациклины	≤1	22 (5%)	2	4 (1%)	>2	452 (94,6%)	>8	>8

Антибиотик	Группа	Ч (чувствительный)		П (промежуточный; чувствительный при повышенной экспозиции антибиотика)		Р (резистентный)		МП ₅₀ (мг/л)	МП ₉₀ (мг/л)
		МПК	n (%)	МПК	n (%)	МПК	n (%)		
Левифлоксацин	Респираторные фторхинолоны	≤2	473 (99%)	Нет	-	>2	5 (1%)	1	1
Моксифлоксацин		≤0,5	474 (99,2%)	Нет	-	>0,5	4 (1%)	<0,12	0,25
Линезолид	Оксазалидиноны	≤2	477 (99,7%)	4	-	>4	1 (1%)	1	1
Рифампицин	Рифампицины	≤0,06	454 (95%)	0,12-0,5	18 (4%)	>0,5	6 (1%)	<0,06	<0,06
Ванкомицин	Гликопептиды	≤2	478 (100%)	Нет	-	>2	0	0,5	0,5

Примечание:

^a – МЛУ – множественная лекарственная устойчивость; МПК – минимальная подавляющая концентрация.

^б – Пограничные значения МПК анализируемых антибиотиков указаны согласно критериям EUCAST-2019.

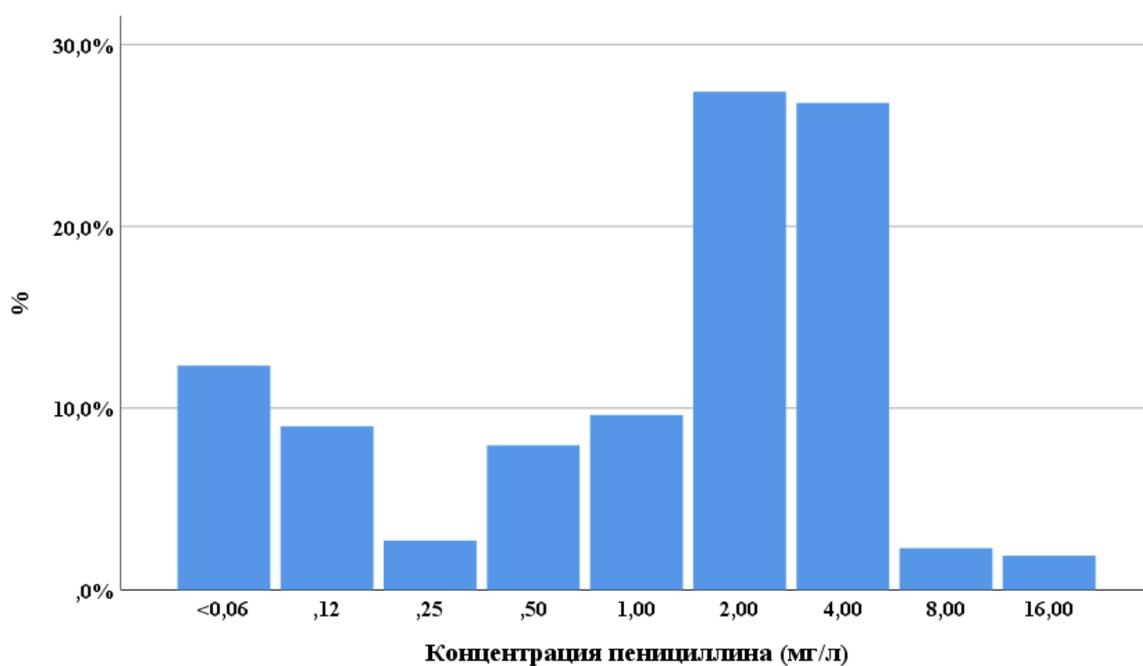


Рисунок 3.1. Распределение МПК пеницилина у пневмококков с МЛУ

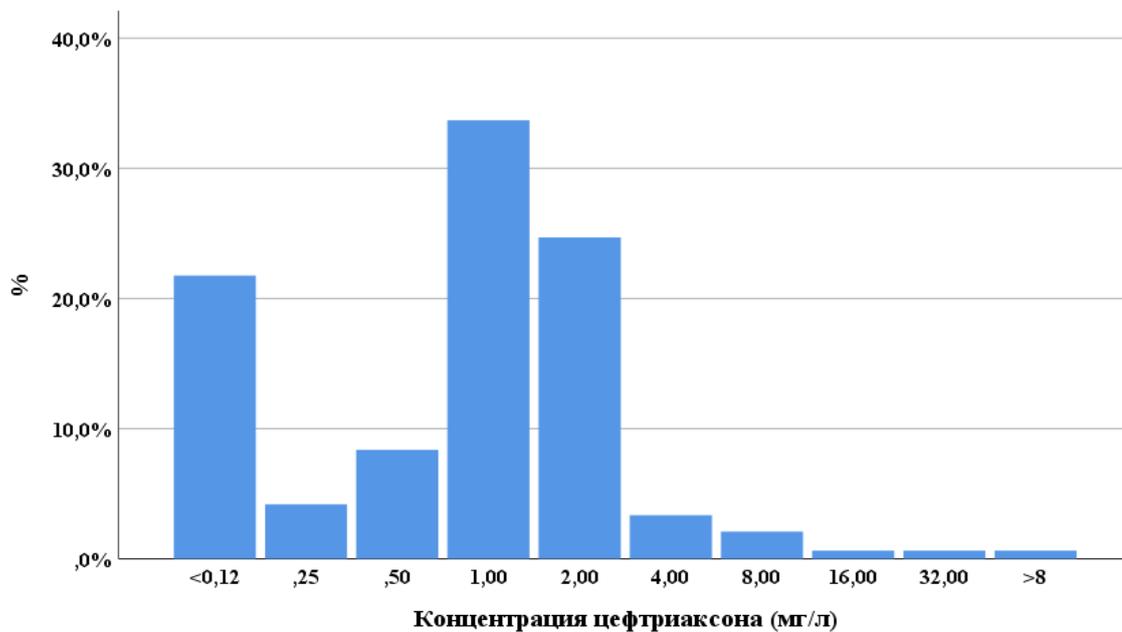


Рисунок 3.2. Распределение МПК цефтриаксона у пневмококков с МЛУ

Наиболее распространенным фенотипом МЛУ-пневмококков была комбинация устойчивости Эри/Кли/ТМП/Тет в сочетании с резистентностью к Пен (32,4%) или без нее (23,4%) (Таблица 3.2). Значительная часть МЛУ-пневмококков (200; 41,8%) обладала резистентностью к 5 и более группам антибиотиков, т.е. имела фенотип экстремальной лекарственной устойчивости (ЭЛУ) (Таблица 3.2). Типичный профиль ЭЛУ-пневмококков был представлен в виде резистентности к Пен/Эри/Кли/ТМП/Тет. Кроме того, некоторые пневмококки с ЭЛУ были дополнительно устойчивы и к Хло. Дополнительная информация о сочетанной устойчивости на уровне серотипов представлена ниже (см. раздел 3.5).

Таблица 3.2

Фенотипы резистентности пневмококков с МЛУ

Фенотип резистентности	N	%	Накопленный %
β/Эри/Кли/ТМП/Тет	155	32,4	32,4
Эри/Кли/ТМП/Тет	112	23,4	55,9
Эри/Кли/Тет	79	16,5	72,2
β/Эри/Кли/Тет	19	4,0	76,2
Эри/ТМП/Тет	19	4,0	80,1
β/Эри/ТМП/Тет	13	2,7	82,7
Эри/Кли/ТМП/Тет/Хло	13	2,7	85,6
Эри/Кли/ТМП	12	2,5	88,1
β/Эри/Кли/Тет/Хло	11	2,3	90,4
β/Эри/Кли/ТМП/Тет/Хло	9	1,9	92,3
β/Эри/Кли	6	1,3	93,5
β/Эри/Тет	5	1,0	94,6
Другой	25	5,2	100
Всего:	478	100	

Примечание:

^a – β – группа β-лактамовых антибиотиков; Эри – эритромицин; Кли – клиндамицин; ТМП – триметоприм/сульфаметоксазол; Тет – тетрациклин; Хло – хлорамфеникол.

3.3. Серотиповое разнообразие пневмококков с МЛУ

Вся коллекция из 2174 собранных пневмококков распределилась между 53 серотипами, при этом 478 МЛУ-пневмококков были носителями 24 серотипов (Таблица 3.3). В структуре МЛУ-пневмококков преобладали ПКВ13-серотипы, доля которых составила 89,3%. Среди них выделялись серотипы 19F, 6B, 14, 19A и 23F, имевшие частоту $\geq 5\%$. Однако пневмококки не всех ПКВ13-серотипов характеризовались МЛУ. Так, не было выявлено ни одного МЛУ-пневмококка серотипов 1, 3, 4 и 7F (Таблица 3.3). Из числа не-ПКВ13-серотипов с частотой $\geq 1\%$ в структуре МЛУ-изолятов встречались пневмококки с серотипами 23A, 13, 28F, 11A и серогруппы 35, а также нетипируемые изоляты (Таблица 3.3).

Высокая частота ($\geq 25\%$) МЛУ-изолятов в структуре отдельных серотипов была выявлена как среди пневмококков ПКВ13-серотипов, включая 19F (49,9%), 19A (49%), 14 (41%) и 6B (36%), так и невакцинных серотипов, в частности, 28F (50%), 35A (38%), 13 (33%) и 20 (25%) (Таблица 3.3).

3.4. Динамика распространенности и серотипового состава МЛУ-пневмококков

Для характеристики временной динамики частоты встречаемости пневмококков с МЛУ было отобрано 633 изолята пневмококков, выделенных из носоглотки детей в возрасте ≤ 5 лет в ходе рутинной диагностики пациентов с симптомами острой респираторной инфекции, посещавших амбулаторные отделения ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России. Эта относительно однородная когорта изолятов, выделенных в одном центре, была пригодна для динамического анализа. Результаты представлены в Таблице 3.4. Всего из 633 изолятов 175 (27,6%) пневмококков обладали МЛУ-фенотипом.

Распределение серотипов МЛЮ-пневмококков и их место в общей структуре серотипов

Серотип^а	Всего изолятов	Доля (%) по выборке в целом	Из них МЛЮ-изолятов	Доля (%) в выборке МЛЮ-изолятов	Доля (%) МЛЮ-изолятов в структуре серотипа
ПКВ13					
19F	409	18,8%	204	42,7%	49,9%
6B	213	9,8%	76	16%	36%
14	183	8,4%	75	16%	41%
23F	216	9,9%	22	5%	10%
19A	49	2,3%	24	5%	49%
6A	127	5,8%	17	4%	14%
9V	44	2%	8	2%	18%
18C	49	2,3%	1	0,2%	2%
3	113	5,2%	0	0	0
7F	9	0,4%	0	0	0
4	6	0,3%	0	0	0
1	3	0,1%	0	0	0
Всего ПКВ13	1421	65,4%	427	89,3%	30%
Не-ПКВ13					
23A	48	2,2%	8	2%	17%
13	21	1%	7	2%	33%
28F	12	0,6%	6	1%	50%
11A	120	5,5%	5	1%	4%
35C	30	1,4%	4	0,8%	13%
35A	8	0,4%	3	0,6%	38%
35F	34	1,6%	2	0,4%	6%
35B	8	0,4%	1	0,2%	13%
15A	37	1,7%	1	0,2%	3%
10A	52	2,4%	1	0,2%	2%

Серотип ^а	Всего изолят ов	Доля (%) по выборке в целом	Из них МЛУ- изолятов	Доля (%) в выборке МЛУ- изолятов	Доля (%) МЛУ- изолятов в структуре серотипа
Не-ПКВ13					
9N	23	1,1%	1	0,2%	4%
34	34	1,6%	1	0,2%	3%
20	4	0,2%	1	0,2%	25%
6C	46	2,1%	1	0,2%	2%
24F	1	0,04%	1	0,2%	100%
29	1	0,04%	1	0,2%	100%
Другие^б	221	10,2%	0	0	0
Нетипиру- емые	53	2,4%	7	2%	13%
Всего не- ПКВ13	753	34,6%	51	10,3%	7%
Итого	2174	100%	478	100%	

Примечание:

МЛУ – множественная лекарственная устойчивость.

^а – Серотипы указаны в порядке убывания частоты МЛУ-изолятов.

^б – Всего 25 серотипов (серотип (n)): 15B/C (106), 31 (22), 37 (18), 16F (14), 33F (9), 6D (7), 8 (7), 22F (6), 23B (5), 7C (3), 17F (3), 28A (3), 42 (3), 24A (2), 38 (2), 39 (2), 7A (1), 9A (1), 10B (1), 11D (1), 12F (1), 15F (1), 18A (1), 21 (1), 33B (1).

В течение периода наблюдения частота встречаемости МЛУ-пневмококков значительно варьировала от 18-24,4% в 2010-2012 гг. до 36,7% в 2016 г. (p=0,011). В 2017 г. было зафиксировано значимое снижение доли пневмококков с МЛУ до 27,1% по сравнению с 2016 г. (p=0,022) (Таблица 3.4). Подавляющее большинство МЛУ-пневмококков в данной когорте было представлено ПКВ13-серотипами (n=161, 92%). В 2010-2016 гг. их доля колебалась в пределах 91-95%, а в 2017 г. была зарегистрирована тенденция к снижению доли ПКВ13-серотипов до 86% (p=0,322).

Динамика частоты встречаемости множественной лекарственной устойчивости в когорте пневмококков, выделенных у детей возрасте ≤5 лет в 2010-2017 гг.

Изоляты	2010/11	2012	2013/14	2015	2016	2017	Итого	Значение <i>p</i>
Всего изолятов	90 (100%)	139 (100%)	115 (100%)	62 (100%)	120 (100%)	107 (100%)	633 ^a (100%)	НП
Из них МЛУ-изолятов	22 (24%)	25 (18%)	34 (29,6%)	21 (33,9%)	44 (36,7%)	29 ^b (27,1%)	175 (27,6%)	0,011
Всего МЛУ-изолятов	22 (100%)	25 (100%)	34 (100%)	21 (100%)	44 (100%)	29 (100%)	175 (100%)	НП
В том числе:								
ПКВ13-серотипы	21 (95%)	23 (92%)	31 (91%)	20 (95%)	41 (93%)	25 ^b (86%)	161 (92%)	0,314
не-ПКВ13-серотипы	1 (5%)	2 (8%)	3 (9%)	1 (5%)	3 (7%)	4 (14%)	14 (8%)	

Примечание:

НП – не применимо.

^a – В динамическую когорту были включены только пневмококки, выделенные из носоглотки у амбулаторных пациентов ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России в возрасте ≤5 лет в течение 2010-2017 гг.

^b – $p=0,022$ при сравнении долей МЛУ-пневмококков в 2016 г. и 2017 г.

^b – $p=0,322$ при сравнении долей ПКВ13-серотипов в 2017 г. и в остальные годы.

3.5. Особенности спектра множественной лекарственной устойчивости пневмококков в зависимости от серотипа

Фенотип антибиотикорезистентности МЛУ-пневмококков имел серотиповые особенности (Рисунок 3.3, Таблица 3.5). Так, устойчивость к β-лактамам была наиболее характерна для ПКВ13-серотипов 19F, 19A, 23F, 14 и 9V, в то время как два других распространенных ПКВ13-серотипа 6B и 6A были более чувствительны к этой группе антибиотиков. Несколько

изолятов серотипа 19F с ЭЛУ-фенотипом были резистентны к фторхинолонам, рифампицину и линезолиду (Таблица 3.5). Устойчивостью к Хло чаще других обладали пневмококки серотипов 6А и 23F.

Не-ПКВ13-серотипы МЛУ-пневмококков преимущественно характеризовались резистентностью к 3-4 группам антибиотиков из числа Эри, Кли, ТМП и Тет (Таблица 3.5). Единичные изоляты серотипа 23А и 28F были дополнительно устойчивы к β -лактамам. Резистентность к Хло была выявлена у МЛУ-пневмококков серотипов 6С, 28F, 35В и 35С.

В целом, в структуре серотипов 14, 19А, 19F и 23F более 45% изолятов характеризовались ЭЛУ (Рисунок 3.3). Наиболее экстремальной резистентностью отличались три 23F-изолята, которые были устойчивы сразу к семи группам антибиотиков, включая β -лактамы, Эри, Кли, ТМП, Тет, Хло и фторхинолоны.

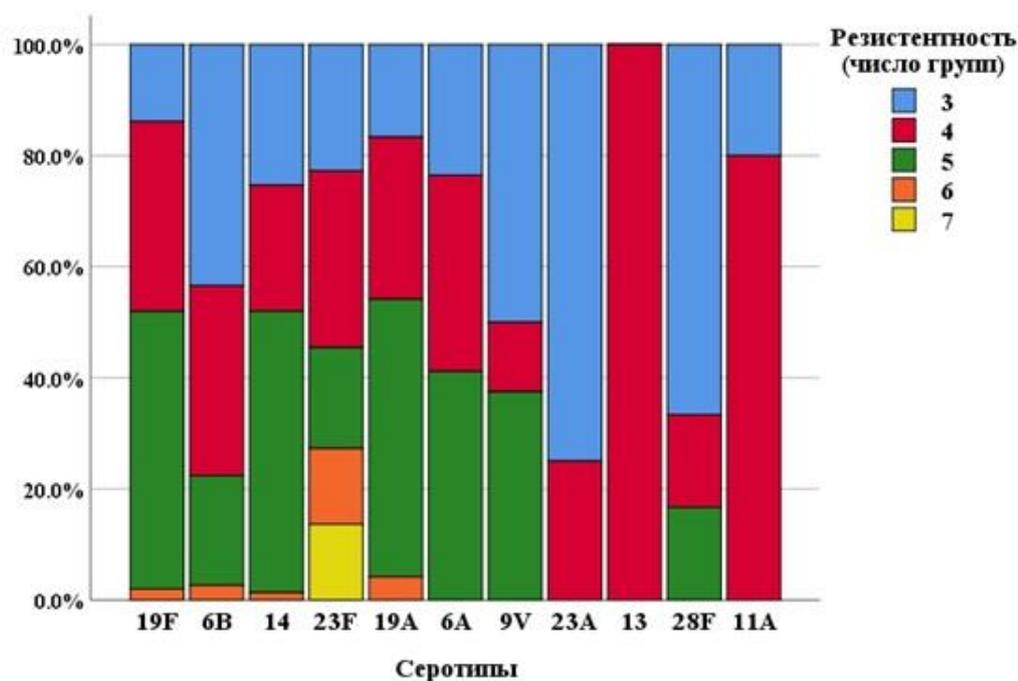


Рисунок 3.3. Число групп антибиотиков, к которым резистентны МЛУ-пневмококки, в зависимости от серотипа

Примечание: Представлены серотипы с распространенностью $\geq 1\%$.

Распространенность резистентности к различным антибиотикам среди пневмококков с множественной лекарственной устойчивостью в зависимости от серотипа

Серотип (n)	Пен	Ампициллин	Цефтриаксон	Эртапенем	Цефтаролин	Эри	Кли	ТМП	Тет	Хло	ЛФЛ	МФЛ	Рифамицин	Линезолид
19F (204)	85 (42%)	120 (58,8%)	21 (10%)	94 (47%)	19 (9%)	204 (100%)	190 (93,1%)	167 (81,9%)	202 (99%)	7 (4%)	2 (1%)	1 (0,5%)	2 (1%)	1 (0,5%)
6B (76)	6 (8%)	9 (12%)	0	5 (7%)	0	76 (100%)	70 (92%)	46 (61%)	75 (99%)	8 (11%)	0	0	4 (5%)	0
14 (75)	27 (36%)	50 (67%)	6 (8%)	15 (20%)	5 (7%)	75 (100%)	72 (96%)	60 (80%)	59 (79%)	2 (3%)	0	0	0	0
19A (24)	14 (58%)	15 (63%)	4 (17%)	15 (62,5%)	4 (17%)	24 (100%)	21 (88%)	19 (79%)	22 (92%)	4 (17%)	0	0	0	0
23F (22)	11 (50%)	18 (82%)	3 (14%)	7 (32%)	3 (14%)	22 (100%)	13 (59%)	15 (68%)	19 (86%)	10 (46%)	3 (14%)	3 (14%)	0	0
6A (17)	3 (18%)	6 (35%)	1 (6%)	2 (12%)	1 (6%)	17 (100%)	17 (100%)	6 (35%)	17 (100%)	7 (41%)	0	0	0	0
9V (8)	2 (25%)	4 (50%)	0	2 (25%)	0	8 (100%)	5 (63%)	7 (88%)	7 (88%)	0	0	0	0	0

Серотип (n)	Пен	Ампициллин	Цефтриаксон	Эртапенем	Цефтаролин	Эри	Кли	ТМП	Тет	Хло	ЛФЛ	МФЛ	Рифампицин	Линезолид
23A (8)	0	1 (13%)	0	1 (13%)	0	8 (100%)	8 (100%)	1 (13%)	8 (100%)	0	0	0	0	0
13 (7)	0	0	0	0	0	7 (100%)	7 (100%)	7 (100%)	7 (100%)	0	0	0	0	0
28F (6)	0	0	0	2 (33%)	0	6 (100%)	6 (100%)	2 (33%)	6 (100%)	1 (17%)	0	0	0	0
11A (5)	0	0	0	0	0	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	4 (80%)	0	0	0	0	0
Нетипируемые (7)	0	0	0	0	0	7 (100%)	4 (57%)	5 (71%)	7 (100%)	0	0	0	0	0
Другие (27)	0	1 (4%)	0	1 (4%)	0	19 (70,4%)	15 (55,6%)	14 (51,9%)	19 (70,4%)	6 (22,2%)	0	0	0	0

Примечание:

^a – Пен – пенициллин; Эри – эритромицин; Кли – клиндамицин; Хло – хлорамфеникол; ТМП – триметоприм/сульфаметоксазол; Тет – тетрациклин; ЛФЛ – левофлоксацин; МФЛ – моксифлоксацин; МЛУ – множественная лекарственная устойчивость.

^b – Представлены серотипы с распространенностью $\geq 1\%$ в порядке уменьшения частоты выделения. Данные представляют число и пропорцию (%) изолятов, резистентных к соответствующему антибиотику среди МЛУ-изолятов указанных серотипов. Все тестируемые МЛУ-изоляты пневмококков были чувствительны к ванкомицину.

Отметим, что большинство (>80%) МЛУ-пневмококков, включая изоляты с экстремальной резистентностью, сохраняли чувствительность к таким антибиотикам, как цефтриаксон, цефтаролин и фторхинолоны, а к рифампицину, линезолиду и ванкомицину были чувствительны практически все изоляты (Таблица 3.5).

3.6. Молекулярные механизмы устойчивости к антибиотикам у МЛУ-пневмококков

Все 478 Эри-Р изолятов были протестированы на присутствие основных детерминант резистентности к макролидам *ermB* и *mef* (Таблица 3.6). Подавляющее большинство (94,6%) было носителем гена *ermB* в сочетании с *mef* или без него. Лишь у 16 (3,3%) Эри-Р МЛУ-пневмококков был обнаружен только *mef*, еще 9 (1,9%) изолятов были *ermB/mef*-негативными. Таким образом, доминирующим механизмом резистентности к макролидам стало метилирование мишени, опосредуемое присутствием гена *ermB*, что обуславливало формирование у МЛУ-пневмококков MLS_B-фенотипа (конститутивного или индуцибельного), т.е. перекрестной устойчивости к антимикробным препаратам из группы макролидов, линкозамидов и стрептограмину В [97, 98, 136, 142].

Для определения механизмов устойчивости к Тет была исследована случайная выборка 260 из 452 (57,5%) Тет-Р изолятов; ген *tetM* присутствовал у 240 из них (92,3%) (Таблица 3.6). Восемнадцать *tetM*-негативных изолятов были дополнительно протестированы на носительство гена *tetO*, который был обнаружен лишь в одном случае.

При анализе 45 Хло-Р МЛУ-изолятов было показано, что 27 (60%) из них были носителями гена *catpQ194*, ассоциированного с резистентностью к амфениколам (Таблица 3.6).

Молекулярные механизмы устойчивости к Эри, Тет и Хло

Фенотип (n)	Генотип	n (%)
Эри-Р (478)	<i>erm(B)</i> +	194 (40,6%)
	<i>erm(B)</i> +/ <i>mef</i> +	259 (54,2%)
	<i>mef</i> +	16 (3,3%)
	<i>erm(B)</i> -/ <i>mef</i> -	9 (1,9%)
Тет-Р (260)	<i>tet(M)</i> +	240 (92,3%)
	<i>tet(M)</i> -	20 (8%) ^a
Хло-Р (45)	<i>catpQ194</i> +	27 (60%)
	<i>catpQ194</i> -	18 (40%)

Примечание:

Эри-Р – эритромицинрезистентные; Тет-Р – тетрациклинрезистентные; Хло-Р – хлорамфениколрезистентные.

^a – Один из 18 протестированных *tet(M)*-негативных изолятов (6%) был носителем гена *tet(O)*.

Механизмы резистентности к фторхинолонам были изучены путем анализа нуклеотидных последовательностей генов *parC/parE* и *gyrA/gyrB*, кодирующих ключевые белки-мишени этих антибиотиков ДНК топоизомеразу IV и ДНК-гиразу соответственно, при сравнении с эталонным геномом R6 и геномами чувствительных к фторхинолонам МЛУ-изолятов. Исследовали все пять МЛУ-пневмококков с резистентностью к ЛФЛ (n=5) и ЛФЛ/МФЛ (n=4), для которых дополнительно определили сиквенс-тип; результаты представлены в Таблице 3.7. При сравнении с R6 у 3 из 5 ЛФЛ-Р изолятов были выявлены функционально значимые замены аминокислот в обеих субъединицах ДНК топоизомеразы IV ParC (D83Y или D83N) и ParE (I460V), имевшие типичную локализацию в регионах, определяющих резистентность к фторхинолонам (quinolone resistance-determining region; QRDR) [31, 47, 50, 68, 144, 156]. В двух ЛФЛ-Р/МФЛ-Р 23F-изолятах в субъединице GyrA ДНК-гиразы была обнаружена QRDR-мутация S81F, а ParC несла дополнительную мутацию K137N (Таблица 3.7). При сравнении аминокислотных последовательностей QRDR с соответствующими

последовательностями из R6 и чувствительных к фторхинолонам МЛУ-пневмококков у двух ЛФЛ-Р/МФЛ-Р изолятов (19F/ST162 и 23F/ST102) не было найдено ранее описанных значимых функциональных мутаций. Единственными выявленными уникальными аминокислотными заменами были T493I в *ParC* и H553Y в *GyrA* у 23F/ST102-изолята и D822Y в *ParC* у 19F/ST162-изолята *S. pneumoniae*.

Мутации в QRDR были обнаружены в различных положениях и сочетаниях в *parC/parE* и *gyrA/gyrB*, что не свидетельствует в пользу клонального характера распространения устойчивости к фторхинолонам. Влияние рекомбинации на возникновение устойчивости и приобретение мутаций, опосредующих резистентность к ЛФЛ и МФЛ у *S. pneumoniae* при совместном носоглоточном носительстве с зелеными стрептококками, остается минимальным [50].

Последовательность генов дигидрофолатредуктазы (*folA*) и дигидроптероатсинтазы (*folP*), ассоциированных с устойчивостью к ТМП, была проанализирована у 26 МЛУ-пневмококков. У 23 (89%) были обнаружены мутации в обоих генах, ведущие к значимым аминокислотным заменам, еще два и один изолят характеризовались изолированным повреждением *folA* и *folP* соответственно. В 24 (92%) изолятов *folA* нес типичную мутацию I100L. Повреждение *folP* во всех случаях было связано с наличием вставок, вызывающих 1-2 аминокислотных замены между кодонами 59 и 69. Один ТМП-Р МЛУ-изолят пневмококка серотипа 28F (ST546, МПК ТМП=4 мг/л) имел нехарактерные изменения в *folP* (Q28K, P122A, N247I).

**Аминокислотные замены в субъединицах ДНК топоизомеразы IV
(ParC/ParE) и ДНК-гиразы (GyrA/GyrB) МЛУ-пневмококков, резистентных
к фторхинолонам**

Серотип/ST	МПК (мг/л)		ParC	ParE	GyrA	GyrB
	ЛФЛ	МФЛ				
19F/ST162 (n=1)	8 (P)	2 (P)	R373H, N473K, A589E, A608V, <i>D822Y</i>	L166P	V489I	I163V, K169R, T177I, I188T
19F/ST8099 (n=1)	4 (P)	0,25 (Ч)	D83Y , R373H, N473K, A589E, A608V	I460V , L166P	V486I	I163V, K169R, T177I, I188T, A297S
23F/ST81 (n=2)	8 (P)	2 (P)	D83N , K137N , R373H, N473K, A589E, A608V	I460V , S132N, L166P, L290F, A326V	S81F , V489I, A653T	I163V, K169R, K181E
23F/ST102 (n=1)	8 (P)	1 (P)	A189V, R373H, N473K, <i>T493I</i> , A589E	L166P	V486I, <i>H553Y</i>	H140Y, I163V, K169R, K181E, I188T

Примечание:

Жирным шрифтом выделены функционально значимые мутации. Курсивом выделены не описанные ранее мутации у ЛФЛ-Р/МФЛ-Р изолятов *S. pneumoniae* в QRDR по сравнению с R6 и чувствительными к фторхинолонам МЛУ-изолятами *S. pneumoniae*.

ST – сиквенс-тип; МПК – минимальная подавляющая концентрация; ЛФЛ – левофлоксацин; МФЛ – моксифлоксацин; P – резистентный; Ч – чувствительный.

Глава 4. Генотипы не-ПКВ13 серотипов пневмококков с МЛУ и характеристика появившегося клона ST2754 редкого серотипа 13

4.1. Ассоциации генотипов и серотипов не-ПКВ13-пневмококков с МЛУ

Как было указано в разделе 3.3, 478 МЛУ-пневмококков были представлены 24 серотипами, из которых 44 изолята были носителями 16 различных не-ПКВ13-серотипов (см. Таблицу 3.3). С целью определения их генотипа и выявления возможной взаимосвязи с резистентными клонами вакцинных серотипов мы провели процедуру МЛСТ для данных изолятов. Результаты представлены в Таблице 4.1. Всего было выявлено 23 сиквенс-типа, пять из которых (14416, 14599, 14692, 14693 и 14694) были описаны впервые. В большинстве случаев мы получили известные ассоциации генотип-серотип, которые имелись в базе данных PubMLST и/или были описаны в литературе. Так, МЛУ-пневмококки серотипа 23А были представлены ST338 (n=5), ST42 (n=1), ST166 (n=1) и ST4726 (n=1), типичными для этого серотипа, а 5 из 6 28F-пневмококков были ассоциированы с характерным ST546. Изоляты серогруппы 35 преимущественно были связаны с ST5972 (n=2) и его новым SLV ST14694 (n=4). Изоляты серотипа 11А были распределены между сиквенс-типами ST8605 (n=2), его SLV ST14416 (n=1), ST62 и ST4661 (n=1 каждый). Большинство генотипов МЛУ-не-ПКВ13-пневмококков характеризовалось устойчивостью к Эри, Кли, Тет и/или ТМП. Резистентность к β -лактамам антибиотикам наблюдалась лишь у двух сиквенс-типов ST81 (серотип 6С) и ST166 (серотип 23А), связанных с глобальными Пен-Р клонами Spain^{23F}-1 и Spain^{9V}-3 соответственно (Таблица 4.1).

Характеристика генотипов не-ПКВ13 пневмококков с МЛЮ и их связь с глобальными клонами

ST	Серотип (n)	Пен (мг/л)	Фенотип резистентности ^а	Серотип PubMLST ₆	Связь с глобальными клонами ^б	Ссылка/Примечание
42	23A (1)	≤0,06	Эри/Кли/Тет	23A/23F	DLV Tennessee ^{23F} -4	[131]
62	11A (1)	≤0,06	Ери/Кли/ТМП	11A		[29]
81	6C (1)	Пен = 2 мг/л; Амп = 4 мг/л	β/Эри/Кли/Тет/Хло	6A/19A/19F/ 23F	Spain ^{23F} -1	
123	28F (1)	≤0,06	Эри/Кли/Тет	9V/ 17F /23F		[25]
166	23A (1)	1	β/Эри/Кли/Тет	9V/11A/ 23A	SLV Spain ^{9V} -3	[51, 94]
230	24F (1)	1	Эри/Кли/Тет	14 /19F/19A/24F	Denmark ¹⁴ -32	[118]
338	23A (5)	0,25 (1); 0,5 (4)	Эри/Кли/Тет	6C/19A/ 23A /23F	Colombia ^{23F} -26	[118, 131]
546	28F (5)	≤0,06 (2); 0,12 (1); 0,5 (2)	Эри/Кли/Тет (3); Эри/Кли/ТМП/Тет (1); Эри/Кли/ТМП/Тет/Хло (1)	28F		[40]
558	35B (1)	2	Эри/Кли/Хло/Тет	35B/NT	SLV Utah ^{35B} -24	[87]
2754	13 (7) 9N (1)	≤0,06	Эри/Кли/ТМП/Тет	6AB/19F/33B		[149, 184]
2991	35F (2)	0,12 (1); ≤0,06 (1)	Эри/Кли/ТМП/Тет	6ABC/19F/33A/ 35F		[183]

ST	Серотип	Пен (мг/л)	Фенотип резистентности ^a	Серотип PubMLST	СС/синглетон	Ссылка/Примечание
3135	10A (1)	0,5	Эри/ТМП/Тет	10A		
3214	35A (1)	≤0,06	Эри/ТМП/Тет	9V/13/ 35A /NT		[183]
4661	11A (1)	≤0,06	Эри/Кли/ТМП/Тет	11A /20		[183]
4726	23A (1)	0,25	Эри/Кли/ТМП/Тет	6B/23A	SLV ST42	
4745	20 (1)	≤0,06	Эри/Кли/ТМП/Тет	20		
5972	35A (2)	≤0,06	Эри/Кли/ТМП/Тет (1); Эри/ТМП/Тет (1)	35A/ 35C /42		
8605	11A (2)	0,5	Эри/Кли/ТМП/Тет (2)	11A		
14416	11A (1)	0,5	Эри/Кли/ТМП/Тет	Новый ST (11A)	SLV ST8605	
14599	15A (1)	2	Эри/Кли/Тет	Новый ST (19A/19F)	DLV ST276	
14692	34 (1)	≤0,06	Эри/Кли/ТМП/Тет	Новый ST (34)	SLV ST6823	
14693	29 (1)	≤0,06	Эри/Кли/Тет	Новый ST (29)	SLV ST5893	
14694	35C (4)	≤0,06 (3); 0,12 (1)	Эри/Кли/ТМП/Тет/Хло	Новый ST (35C)	SLV ST5972	

Примечание:

^a – Пен-пенициллин; Эри – эритромицин; Кли – клиндамицин; ТМП – триметоприм/сульфаметоксазол; Тет – тетрациклин; Хло – хлорамфеникол; ЛФЛ – левофлоксацин; МФЛ – моксифлоксацин; β – группа β-лактамовых антибиотиков; Пен-П – промежуточная чувствительность к пенициллину, чувствительный при повышенной экспозиции антибиотика; МПК – минимальная подавляющая концентрация; SLV – замена в одном локусе аллельного профиля; DLV – замена в двух локусах аллельного профиля; ST – сиквенс-тип

^b – Жирным шрифтом выделены серотипы, чаще всего ассоциирующиеся с соответствующим генотипом

^B – Для новых сиквенс-типов указаны известные 1-2-локусные варианты

Отсутствием типичной связи генотип-серотип выделялись МЛУ-пневмококки наиболее распространенного в нашей выборке ST2754 (n=8; 18%), а также пневмококк Sp1880 серотипа 15A с новым сиквенс-типом ST14599. Этот сиквенс-тип являлся DLV ST276, который ассоциируется с серотипами 19A/19F, но не с 15A, и последующий анализ доказал, что Sp1880 15A/ST14599 появился благодаря переключению капсулы у пневмококка 19A/ST276 (см. главу 5).

4.2. Характеристика ST2754, наиболее распространенного клона МЛУ-не-ПКВ13-пневмококков

Далее мы подробно охарактеризовали МЛУ-пневмококки ST2754, носителями которого были изоляты серотипов 13 (n=7) и 9N (n=1). Первый ST2754-изолят (серотип 9N) был выделен в 2012 г., а остальные изоляты появились в 2016 (n=1) и 2017 (n=6) гг. ST2754-пневмококки были выделены в образцах, полученных из трех разных географических областей России, включая европейскую (Казань, Москва, Смоленск) и азиатскую части (Томск), а также кавказский регион. Все изоляты ST2754 сохраняли чувствительность к антибиотикам из группы β -лактамов (МПК Пен $\leq 0,06$ мг/л), но при этом были устойчивы к Эри и Кли (МПК ≥ 256 мг/л), к Тет (МПК ≥ 8 мг/л) и ТМП (≥ 4 мг/л). Все изоляты ST2754 характеризовались наличием генов *erm(B)* и *tet(M)*, встроенных в *Tn6002*-подобный транспозон. Устойчивость к ТМП у всех ST2754-изолятов серотипа 13 была связана с наличием как аминокислотной замены I100L в *folA*, так и с присутствием локализованных вставок в гене *folP*; у 9N-изолята наблюдалась только мутация *folA*.

При анализе баз данных PubMLST [121] и GenBank (Таблица 4.2) была получена информация о 20 изолятах пневмококков, принадлежавших к ST2754.

Таблица 4.2

Номера данных полногеномного секвенирования (WGS) в GenBank для изолятов, использованных в работе (филогенетический анализ, сравнение геномов ST2754-пневмококков)

WGS номер (GenBank)	Обозначение в тексте (рис. 4.1)
CAAQVT01	ST2754/33B-ERS653787_Nepal 2014
CAAOXJ01	ST2754/6C-ERS653789_Nepal 2014
CAALRC01	ST2754/33B-ERS653616_Nepal 2012
CAAVJE01	ST2754/33B-ERS740832_China 2000
CAALXT01	ST2754/33B-ERS653936_Nepal 2009
CAAVJA01	ST2754/33B-ERS740834_China 2000
CABBPI01	ST2754/6B-ERS1021242_China 2009
CABBOB01	ST2754/33B-ERS1021236_China 2009
CAAXKN01	ST2754/13-ERS725980_Malawi 2013

Большинство изолятов относилось к серогруппе 33 (преимущественно серотип 33В) (Таблица 4.2) [121]. Все изоляты ST2754, кроме одного, были выделены в странах Азии (Китай, Непал, Южная Корея, Индия и Пакистан) в период с 2004 по 2014 гг. Единственный ST2754-изолят серотипа 13 был выделен в юго-восточной Африке (Малави) в 2013 году. Для того, чтобы оценить взаимосвязь между изолятами ST2754, полученными в ходе настоящего исследования, и ST2754-изолятами, представленными в базах данных PubMLST и GenBank, мы осуществили филогенетический анализ на

основе данных SNP, проведя полногеномное секвенирование наших изолятов. В качестве эталонного изолята был использован пневмококк Sp1883 серотипа 13 (Sp1883-CT2754/13) (Рисунок 4.1).

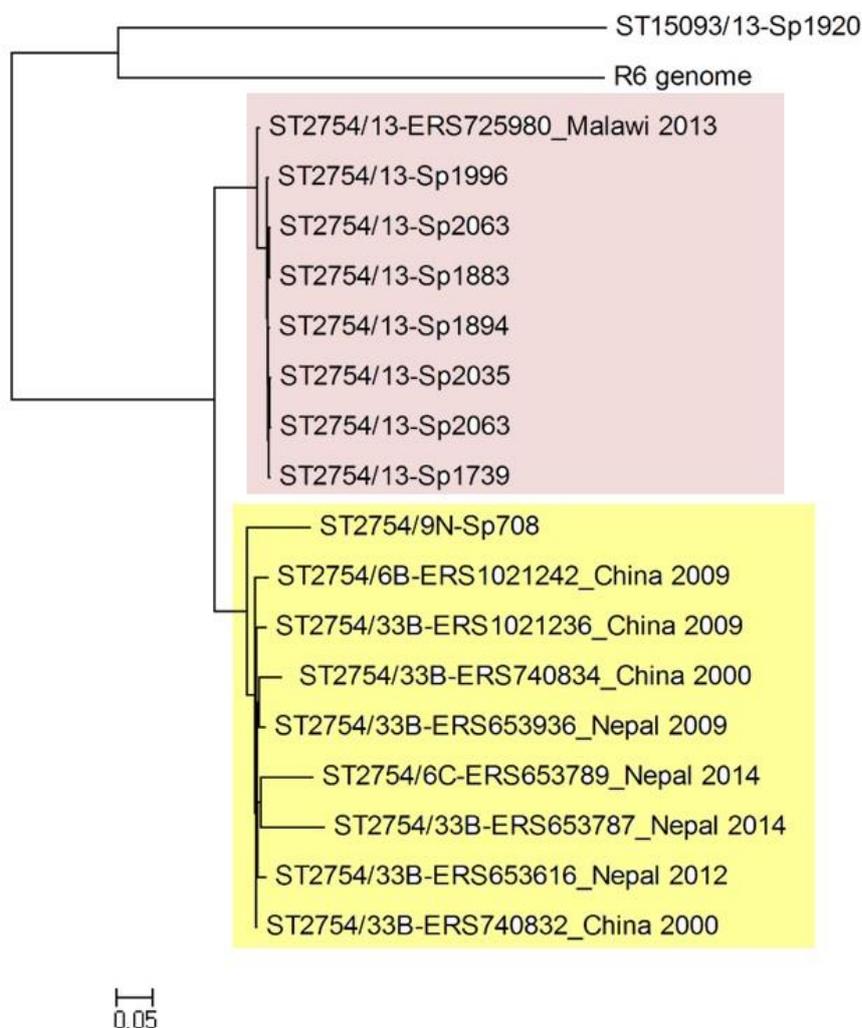


Рисунок 4.1. Филогенетика ST2754-пневмококков по данным полногеномного SNP-анализа

Примечание:

В анализ были включены: ST2754-изоляты, полученные в ходе настоящего исследования (n=8; их обозначение включает «Sp» и 3-4 цифры); репрезентативные ST2754-изоляты из баз данных PubMLST и GenBank, выделенные в разных странах. Пневмококк R6 и чувствительный пневмококк ST15093 серотипа 13 были использованы для сравнения. Проанализированные ST2754-пневмококки образуют два кластера: кластер I (сиреневый) включает все изоляты ST2754 серотипа 13 из России и один из Малави, а кластер II (желтый) объединяет изоляты ST2754 других серотипов.

При построении филогенетического дерева ST2754-изоляты образовывали два отдельных кластера. Так, изоляты ST2754/13 из России демонстрировали большую степень идентичности с изолятом ST2754/13 из Малави и кластеризовались отдельно от изолята ST2754/9N, который группировался с азиатскими изолятами ST2754/6BC/33B (Рисунок 4.1).

Далее было проведено сравнение геномов ST2754/13, ST2754/9N, ST2754/33B, ST2754/6B и ST2754/6C с использованием многократного выравнивания последовательностей при помощи прогрессивного алгоритма Mauve (Рисунок 4.2). Последовательности всех *core*-геномов ST2754-пневмококков были идентичны, за исключением двух областей: капсульного локуса *cps* (т.к. анализировали пневмококки разных серотипов) и гена, кодирующего бактериоцины, в непосредственной близости от которого располагался локус генов, кодирующий синтез аргинина. Этот локус включал гены аргининсукцинат-синтетазы ArgG и аргининсукциназы ArgH, катализирующих превращение цитруллина в аргинин, и присутствовал у изолятов серотипа 13, выделенных в России и Малави, но отсутствовал у других изолятов (рисунок 4.2). Кроме того, ST2754/9N-изолят обладал опероном утилизации фукозы I типа (*fsc*-оперон) в отличие от изолятов ST2754/13 и ST2754/33B, имевших *fsc*-оперон 2 типа (Рисунок 4.2).

Затем мы сравнили последовательности геномов между *mraW* и *recU* генами (область *cps*-локуса и его фланкирующих областей) у Sp1883-ST2754/13, ST2754/9N-изолята, изолята ST2754/13-Малави и репрезентативного ST2754/33B-генома (Рисунок 4.2). *cps*-локусы и фланкирующие регионы (в том числе гены *pbp1a* и *pbp2x*) Sp1883-ST2754/13 и ST2754/13-Малави были идентичны, за исключением двух нуклеотидных замен в гене *wzd* африканского изолята. Фланкирующие 3' и 5' регионы *cps*-локуса ST2754/9N-изолята характеризовались большей идентичностью с таковыми у ST2754/33B-изолята, оба изолята (серотипа 9N и 33B) обладали полностью идентичными последовательностями генов *pbp1a* и *pbp2x*, что

свидетельствовало о возможном приобретении изолятом с генотипом ST2754/33В капсулы 9N, то есть переключении серотипа. .

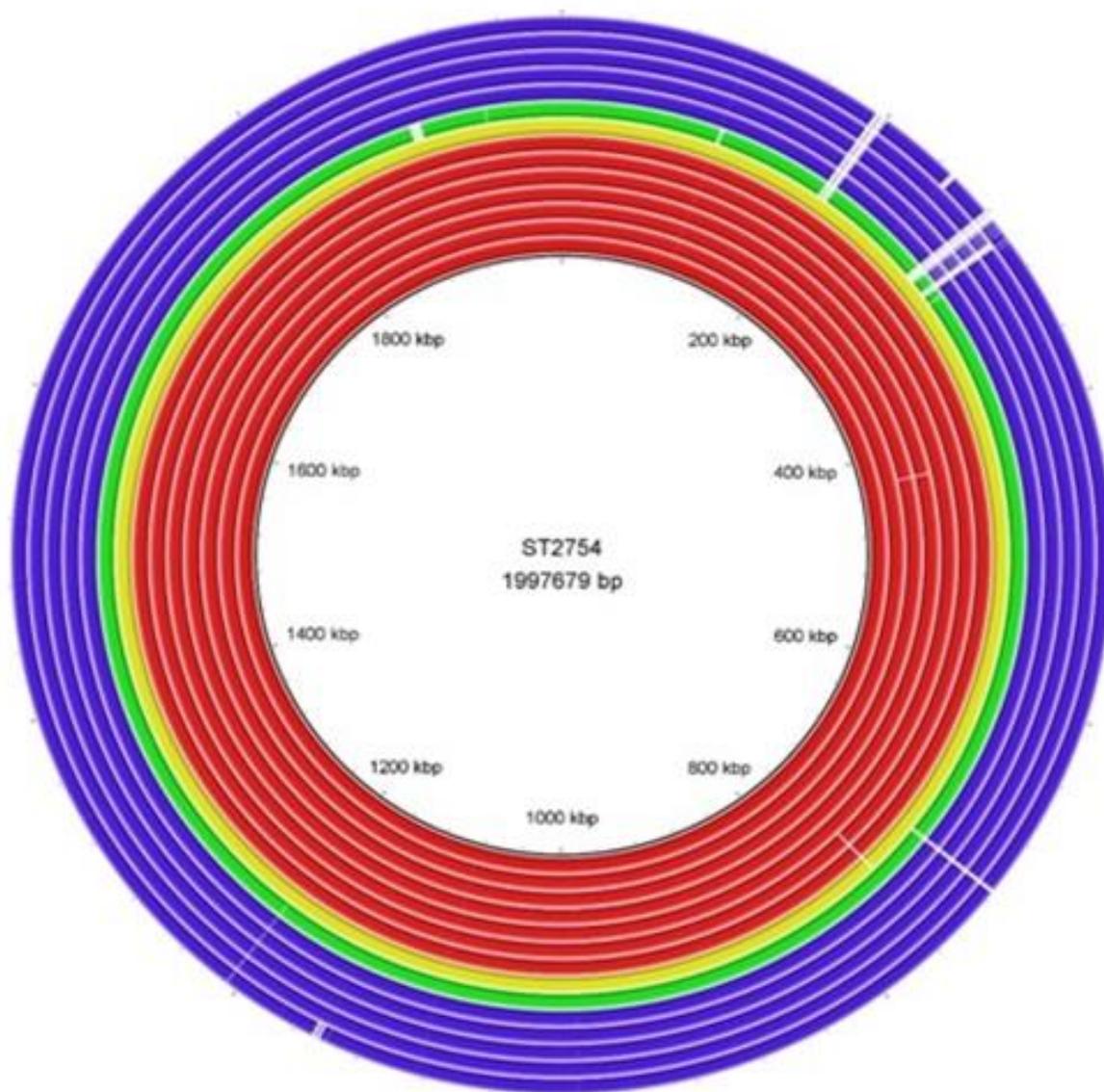


Рисунок 4.2. Сравнение геномов ST2754-пневмококков

Примечание:

Геномы ST2754/13 (n=7) и ST2754/9N (n=1) изолятов, полученных в ходе настоящего исследования, выделены красным и зеленым цветом соответственно; PubMLST-геномы ST2754/13-Малави и ST2754/33В выделены желтым и синим цветом соответственно.

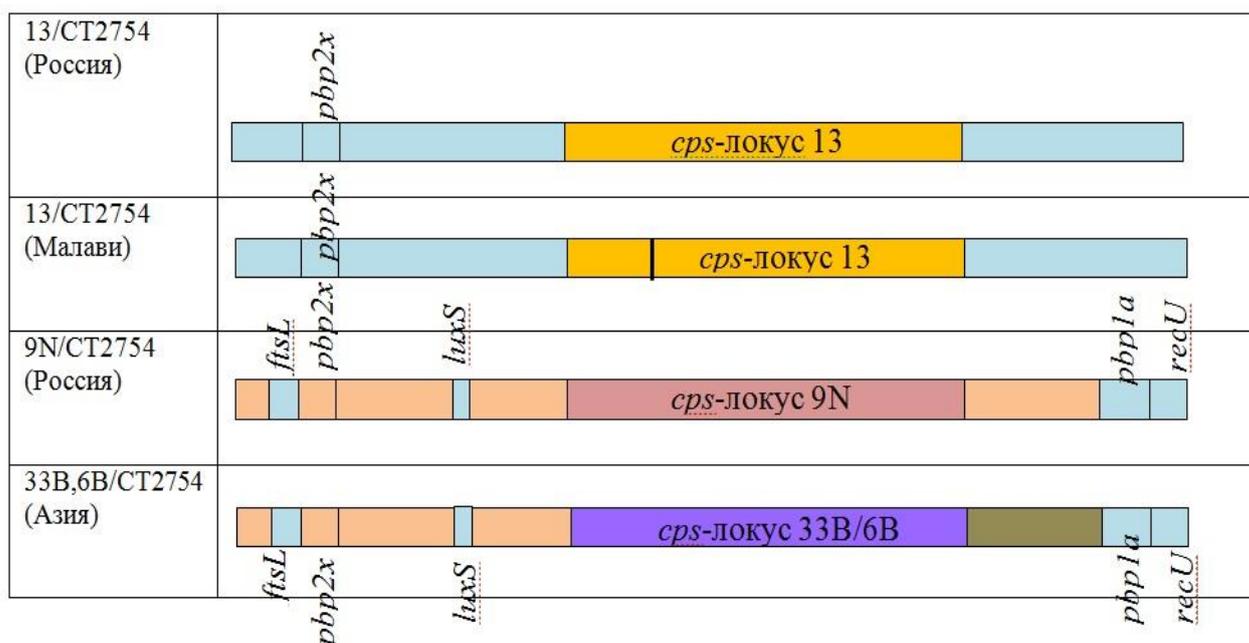


Рисунок 4.3. Сравнение *cps*-локуса и фланкирующих регионов ST2754-пневмококков.

Примечание:

Блоки одного цвета представляют области, характеризующиеся 100% идентичностью. Сплошная черная линия указывает на наличие двух нуклеотидных замен в гене *wzd* *cps*-локуса изолята ST2754/13-Малави по сравнению с Sp1883-ST2754/13.

Глава 5. Пневмококк серотипа 15А с множественной лекарственной устойчивостью, возникший в результате переключения локуса полисахаридной капсулы *cps* у пневмококка серотипа 19А

5.1. Характеристика изолята пневмококка Sp1994

МЛУ-изолят пневмококка Sp1994 был выделен от 11-летнего ребенка из г. Смоленск в 2017 году. Он имел серотип 15А, был устойчив к Эри и Кли (МПК ≥ 256 мг/л), а также Тет (МПК ≥ 8 мг/л). В соответствии с критериями EUCAST-2019 [160], Sp1994 относился к категории чувствительного при повышенной экспозиции антибиотика к β -лактамам (МПК Пен=2 мг/л, Цеф=1 мг/л). МЛСТ показало принадлежность Sp1994 к новому сиквенс-типу ST14599, являвшемуся SLV ST3772. Для сравнения с Sp1994 мы выбрали изолят пневмококка Sp880 серотипа 15А, выделенный в Москве в 2012 году. Этот изолят был чувствителен ко всем тестируемым антибиотикам, за исключением Эри и Кли (МПК ≥ 256 мг/л), и принадлежал к ST861, связанному с ST63-клоном.

База данных PubMLST содержит более 290 изолятов *S. pneumoniae*, имеющих 5 (DLV) или 6 (SLV) из 7 аллелей генов домашнего хозяйства, идентичных ST14599 [120]. Генотип ST276, преимущественно связанный с серотипом 19А, был наиболее часто встречающимся DLV ST14599. Отметим, что мы не обнаружили в PubMLST ни одного пневмококка, сочетавшего серотип 15А и ST276. Среди приблизительно 1200 изолятов серотипа 15А, зарегистрированных в этой базе данных, 46% пневмококков относились к ST63; ST4965 и его SLV составляли еще 7% изолятов серотипа 15А [120]. Эти данные могли указывать на близкие филогенетические отношения Sp1994 15А/ST14599 с генетической линией не-15А-пневмококков.

5.2. Полногеномный SNP-анализ

Для проверки этой возможности мы провели полногеномный SNP-анализ, используя геном Sp1994 как референсный и сравнив его с несколькими геномами пневмококков серотипов 15A (n=6) и 19A (n=6) различных сиквенс-типов, доступных в GenBank и PubMLST (Рисунок 5.1). Sp1994 продемонстрировал большее сходство и идентичность по SNP с изученными геномами 19A/ST276 по сравнению с геномами 15A/ST63, 15A/ST861 и 15A/ST4965 (Рисунок 5.1). Следовательно, Sp1994 15A/ST14599 мог представлять собой вариант пневмококка серотипа 19A, возникший за счет переключения локуса полисахаридной капсулы *cps* (свитч-вариант).

5.3. Сравнение геномов Sp1994 и геномов потенциального реципиента и донора *cps*-локуса

Для того чтобы подтвердить эту гипотезу, нами было выполнено многократное выравнивание последовательностей геномов с помощью прогрессивного алгоритма Mauve для трех изолятов: (1) Sp1994 (именуемого в дальнейшем рекомбинант-15A/ST14599), (2) пневмококка 19A/ST276 PHESPV0568 из PubMLST (id 46314) как кандидата-реципиента *cps*-локуса (реципиент-19A/ST276) и (3) пневмококка из нашей коллекции Sp880 в качестве кандидата-донора *cps*-локуса (донор-15A/ST861). Результаты анализа приведены на Рисунке 5.2. Последовательности геномов рекомбинанта-15A/ST14599 и реципиента-19A/ST276 продемонстрировали 99,99% идентичность, за исключением двух больших областей. Одной из них был *cps*-локус, а другой – локус вспомогательной секреторной системы (*aSec*).

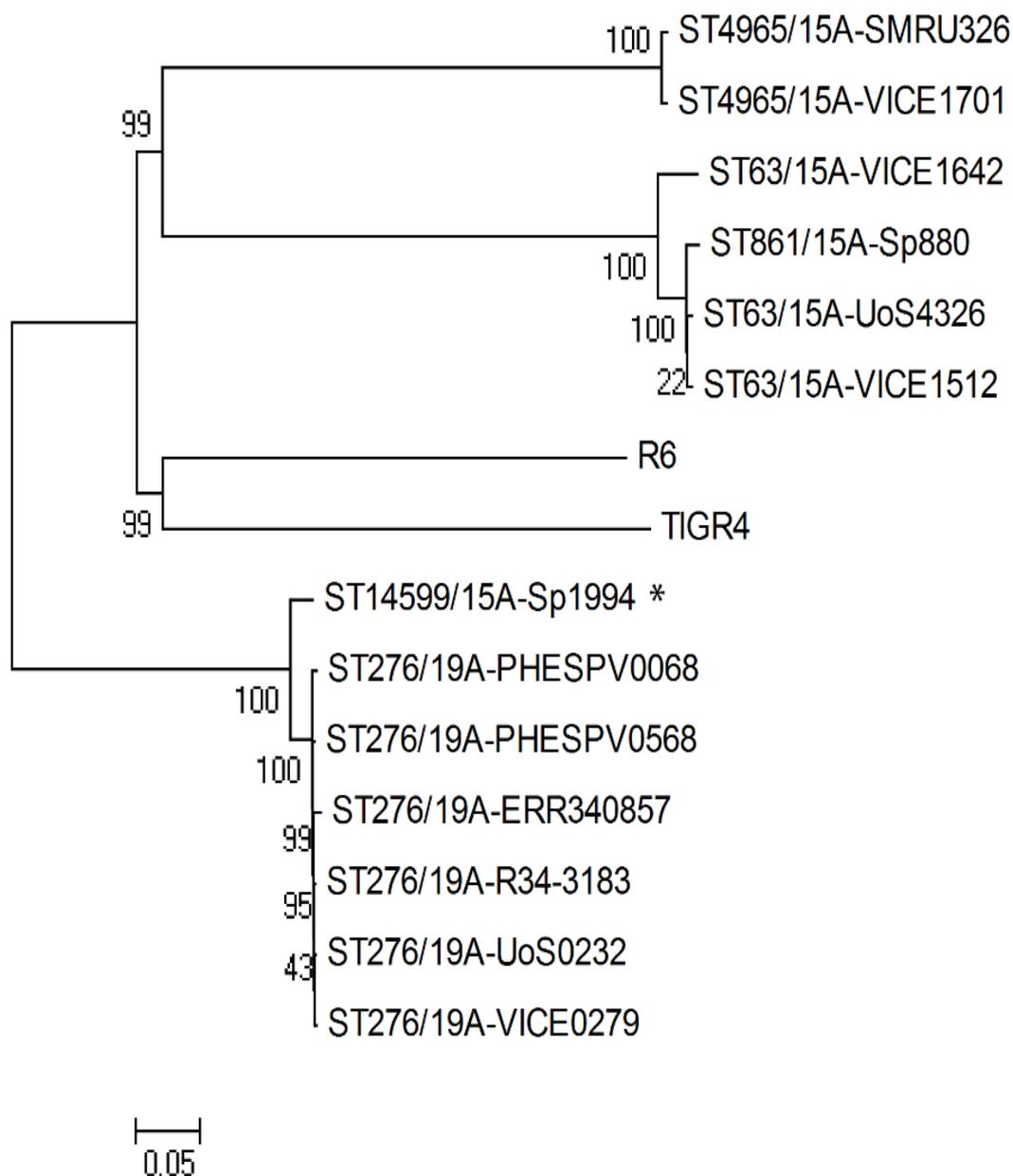


Рисунок 5.1. Филогенетический анализ на основе полногеномного SNP-анализа репрезентативных изолятов пневмококка, потенциальных реципиентов и доноров *cps*-локуса.

Примечание:

Sp1994 отмечен звездочкой; геномы пневмококков R6 и TIGR4 были использованы в качестве внешней группы сравнения.

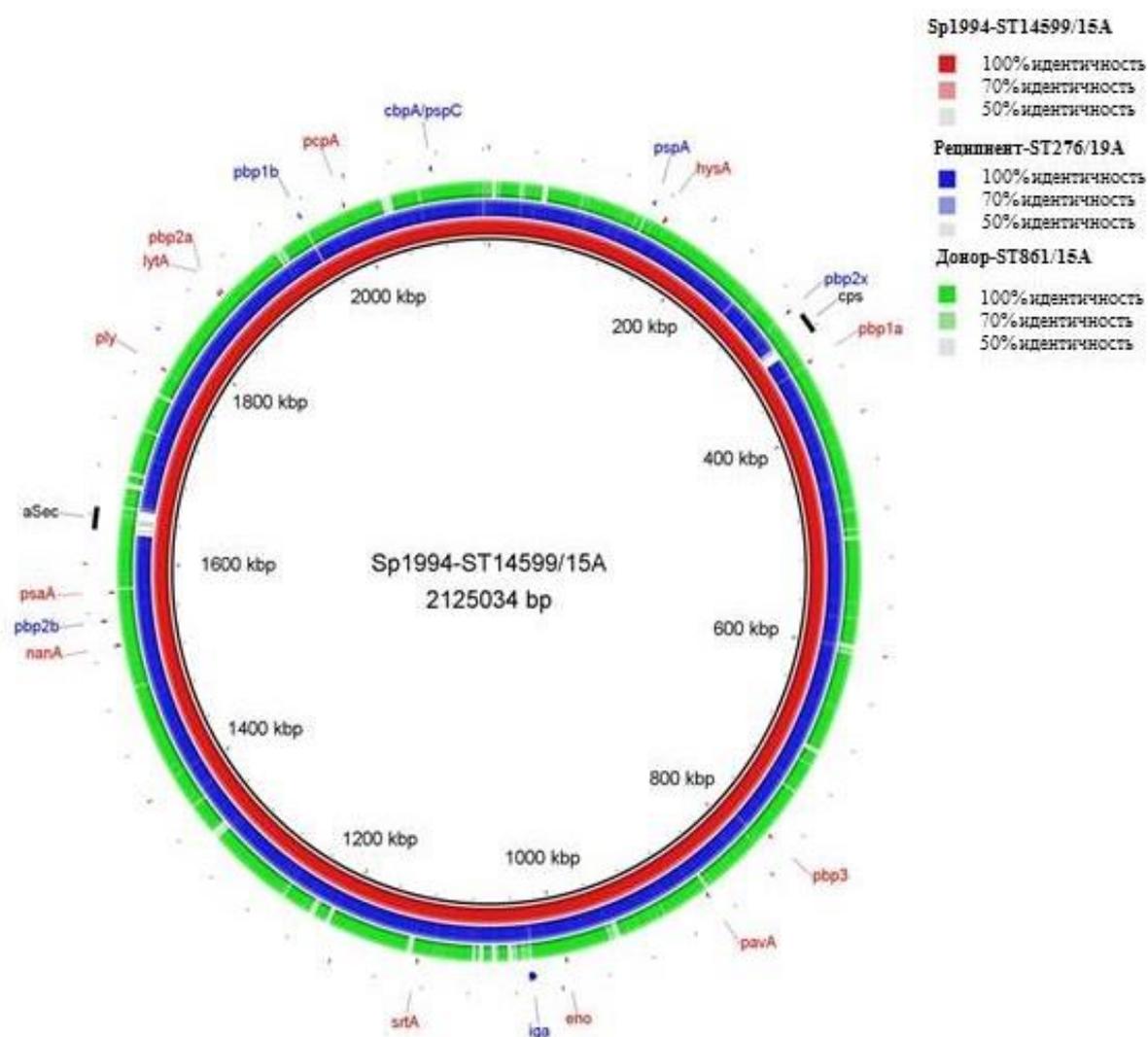


Рисунок 5.2. Геном рекомбинанта-15A/ST14599 (Sp1994) по сравнению с геномами реципиента-19A/ST276 и донора-15A/ST861.

Примечание:

Названия идентичных локусов рекомбинантного и реципиентного геномов отмечены красным цветом, названия локусов с 92-99% идентичностью отмечены синим цветом. Локусы больших перестановок генома отмечены черными дугами (визуализация программного обеспечения BRIG).

5.4. Сравнение *cps*-локусов и их фланкирующих областей геномов Sp1994 и геномов потенциального реципиента и донора и определение точек рекомбинации

Затем было проведено сравнение последовательностей *cps*-локуса и его фланкирующих областей (от 5' *mraW* до 3' *recU*) в трех рассматриваемых геномах (Рисунок 5.3). *cps*-локус рекомбинанта-15A/ST14599 размером около 18,3 kb имел характерную для серотипа 15A структуру из 17 генов. Первые пять консервативных генов, а именно *wzg*, *wzh*, *wzd*, *wze* и *wchA*, были обнаружены во всех трех геномах. Последовательность гена *wzg* у рекомбинанта-15A/ST14599 была на 100% и 95,6% идентична последовательности *wzg* у реципиента-19A/ST276 и донора-15A/ST861 соответственно. Большинство генов, расположенных ниже *wzg*, у рекомбинанта-15A/ST14599 и донора-15A/ST861 были идентичны, за исключением *wzh*, *wchA* и *wzu*, имевших 9, 3 и 3 мутации соответственно, и псевдогена *wciZ* со вставкой размером 12 п.н. в *cps*-локусе у рекомбинанта-15A/ST14599.

Для определения предполагаемых точек рекомбинации в исследуемых геномах были дополнительно проанализированы области, фланкирующие *cps*-кластер. Рекомбинант-15A/ST14599 и донор-15A/ST861 содержали один и тот же паттерн 3'-транспозазного гена (*tnp*) с двумя противоположно направленными элементами вставочной последовательности (IS), IS1381 и IS1671, между генами *gtp3* и *aliA*. В отличие от донора-15A/ST861, рекомбинант-15A/ST14599 обладал двумя небольшими делециями после IS-элементов, что указывало на событие рекомбинации. Между позицией 219 *wzh*-локуса и генами транспозаз ниже *gtp3* последовательности геномов рекомбинанта-15A/ST14599 и донора-15A/ST861 демонстрировали максимальную идентичность (99,8%). Кроме того, последовательности генов

ниже *aliA*, включая *pbp1a*, были 100% идентичны у рекомбинанта-15A/ST14599 и реципиента-19A/ST276, а регион от *clpL* до *wzg* в 5'-области показал 99-100% идентичность в этих двух геномах (Рисунок 5.3). Таким образом, вероятно, что переключение *cps*-локуса произошло посредством гомологичной рекомбинации фрагмента *cps*-локуса размером 15 kb от *wzh* до *aliA* между пневмококком серотипа 15A в качестве донора и пневмококком 19A/ST276 в качестве реципиента.

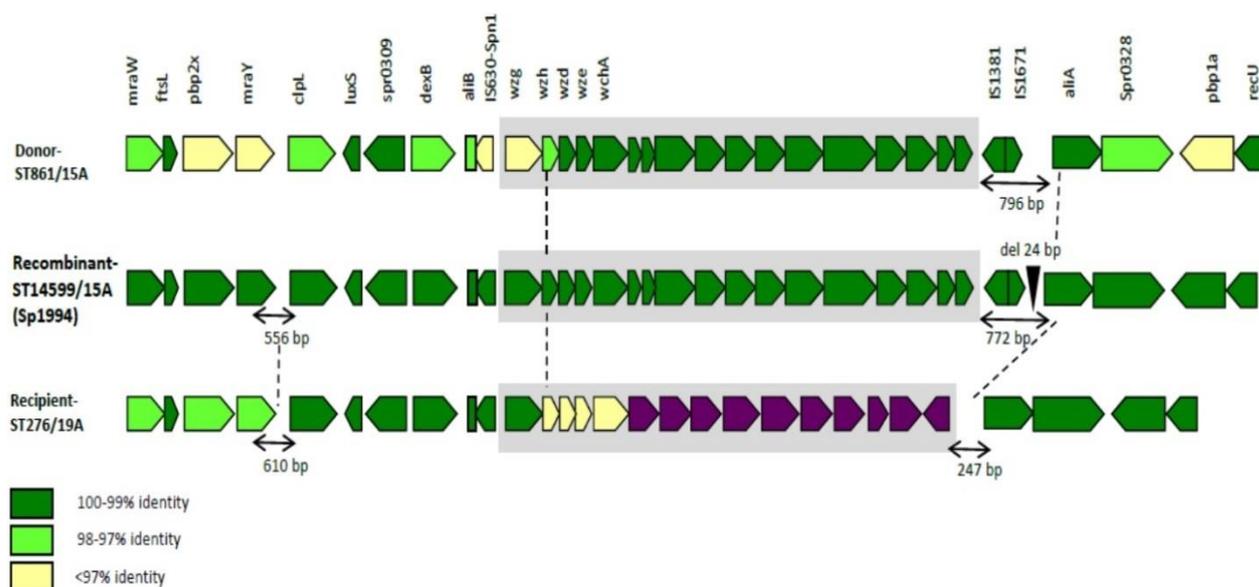


Рисунок 5.3. Сравнение *cps*-локусов и фланкирующих областей в геноме рекомбинанта-15A/ST14599 (Sp1994), потенциального донора и потенциального реципиента

Примечание:

cps-локусы отмечены серым цветом; вертикальные пунктирные линии указывают на вероятные сайты рекомбинации; черный треугольник отображает делецию 24 п.н. Гены *cps*-локуса, специфичные для серотипа 19A, отмечены фиолетовым цветом.

5.5. Особенности геномов Sp1994 и потенциального реципиента вне *cps*-локуса

5'-область рекомбинанта-15A/ST14599, непосредственно фланкирующая предполагаемую последовательность импорта, не была

идентична таковой у реципиента-19A/ST276. В частности, паттерны нуклеотидного замещения в *pbp2x*, *mraY* и межгенной последовательности между *mraY* и *clpL* были различными. Однако нуклеотидная последовательность области *pbp2x-mraY* рекомбинанта-15A/ST14599 демонстрировала большую идентичность (97,7-98,5%) с аналогичной последовательностью у реципиента-19A/ST276 по сравнению с донором-15A/ST861 (89,5-95,7%).

5.5. Особенности геномов Sp1994 и потенциального реципиента вне *cps*-локуса

Рекомбинант-15A/ST14599 и реципиент-19A/ST276 имели общие нуклеотидные вариации в генах, связанных с устойчивостью к β -лактамам (*pbp1a*, *pbp2a*) и вирулентностью (*lytA*, *ply*, *pcpA*, *pavA*, *hysA*, *nanA*, *eno*, *srtA* и *psaA*). Нуклеотидные последовательности генов *pspA* и *cbpA/pspC*, кодирующих холинсвязывающие белки, и *iga*, кодирующего протеазу IgA1, различались на 1-8% между двумя геномами (Рисунок 5.3).

Рекомбинант-15A/ST14599 и донор-15A/ST861 несли большой участок ДНК, содержащий гены дополнительной секреторной системы, встроенной в островок патогенности *psrP-secY2A2*. Этот локус отсутствовал в геноме реципиента-19A/ST276. BLAST-анализ общедоступных геномов PubMLST показал, что система *aSec* отсутствовала у ST276 и других DLV ST14599, тогда как большинство изолятов 15A/ST63 обладали этим локусом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В своей работе мы охарактеризовали профиль резистентности и серотиповой пейзаж пневмококков, обладающих МЛУ, из обширной коллекции носоглоточных изолятов, полученных у детей в 2010-2017 гг. в разных регионах РФ. Доля пневмококков с МЛУ-фенотипом в целом по выборке составила 22%. В азиатских странах, особенно в Южной Корее и Китае, распространенность МЛУ-пневмококков значительно выше и составляет у взрослых пациентов 50,8% [90]. Уровень МЛУ пневмококков у детей в возрасте до 5 лет с ИПИ может достигать 46,1% [171]. Наши данные были ближе к результатам, полученным в странах Северной Америки и Европы (6,2-21%) [80].

Структура МЛУ-пневмококков имела выраженные серотиповые особенности. Большинство (более 80%) из них относились к ограниченному спектру серотипов, в первую очередь это были ПКВ13-серотипы 6A/B, 14, 19A/F и 23F. Из числа МЛУ-пневмококков невакцинных серотипов преобладали серотипы 23A, 13, 28F и 11A. По данным литературы, особенно высока доля МЛУ-пневмококков в структуре серотипов 19F и 19A и не-ПКВ13 серотипов 11A, 15A, 35B и 23A [54].

Пневмококки ПКВ13-серотипов преимущественно характеризовались резистентностью к 4-5 антибиотикам, включая β -лактамы, Эри, Кли, Тет и ТМП, а пневмококки невакцинных серотипов чаще сочетали устойчивость к Эри, Кли и Тет. Устойчивость к макролидам у МЛУ-пневмококков была связана с носительством гена *ermB*, который обеспечивал высокий уровень резистентности (МПК ≥ 256 мг/л). Обращала на себя внимание высокая доля изолятов-носителей двух генов макролидрезистентности *ermB* и *mef* (54,2%). Появление *ermB/mef*-несущих пневмококков в популяции невакцинных серотипов, таких как 11A, 15A, 22F, 23A, 33F и 35B, было отмечено в США и

странах Азии [90, 145]. По данным ряда исследований, наличие обоих генов *ermB* и *mef* может свидетельствовать о высокой рекомбинационной активности пневмококков, ассоциированной с формированием МЛУ-фенотипа [99]. Доминирование механизмов устойчивости, характеризующих перекрестную резистентность пневмококков ко всем макролидным антибиотикам, включая 15- и 16-членные, ставит под вопрос эффективность этой группы препаратов для эмпирической терапии пневмококковых инфекций.

Как было отмечено в работе Лазаревой А.В. [11], нарастание устойчивости пневмококков к ряду антибиотиков, в частности, Пен, Эри и Кли, наблюдавшееся в РФ в 2010-2017 гг., могло быть связано с экспансией предсуществовавших клонов, в частности, серотипа 14. Устойчивость к макролидам может являться одним из преимуществ клона, способствующих его распространению. Об этом свидетельствуют результаты исследования популяции носоглоточных пневмококков, проведенного на африканских территориях, где население массово получало азитромицин для лечения и профилактики трахомы [89]. Они показали, что частота макролидрезистентных клонов, циркулировавших до начала использования антибиотика, значительно увеличилась после лечения. Это наблюдение показывает, что селективное давление антибиотиков может стимулировать экспансию существующих резистентных генотипов. Более того, фармакодинамические характеристики азитромицина могут способствовать отбору резистентных пневмококков с МЛУ-фенотипом [39]. Таким образом, нерациональное использование антибиотиков, особенно в педиатрии, на которое указывает ряд отечественных исследований [17], может быть одним из факторов, поддерживающих распространение пневмококковой резистентности. Интересно, что цитируемая работа выявила необоснованность до 40% назначений антибиотиков при острых респираторных инфекциях у детей, причем именно макролиды

(азитромицин) оказались наиболее часто назначаемыми препаратами (22%) [17].

Наше восьмилетнее наблюдение включило как период времени до введения ПКВ13 в Национальный календарь профилактических прививок в 2014 г., так и пост-ПКВ13 период. Данные о вакцинации в нашей когорте детей не были доступны, однако официальные сообщения говорят о том, что охват ПКВ13, в частности, в г. Москве, составлял 20,9%, 52,3% и 52% детей, родившихся в 2015, 2016 и 2017 гг. соответственно [161]. Как показал анализ динамики серотипов в целом [111], в течение 2010-2015 гг. частота ПКВ13-серотипов сохранялась на уровне 75% и выше с небольшими ежегодными колебаниями. Однако, в 2017 г. было зафиксировано значимое снижение доли ПКВ13-серотипов до 58,5%, связанное с увеличением пропорции пневмококков невакцинных серотипов, в первую очередь серотипа 15В/С. Исследование структуры МЛУ-серотипов за тот же период, проведенное в настоящей диссертационной работе, также показало снижение доли ПКВ-13-серотипов с 36,7% в 2016 г. до 27,1% в 2017 г. в когорте изолятов, отобранных для динамического анализа. Описанное снижение в 2017 г. доли носоглоточных пневмококков ПКВ13-серотипов, в том числе с МЛУ-фенотипом, может быть свидетельством влияния вакцинации на колонизацию вакцинными серотипами. Вакцин-зависимое ограничение циркуляции резистентных ПКВ13-серотипов пневмококков рассматривают как один из важных факторов снижения пневмококковой резистентности в пост-ПКВ13 периоде в ряде стран [82, 140]. Следовательно, программы по рациональному использованию антибиотиков должны быть нацелены в том числе и на снижение распространения резистентных клонов пневмококка невакцинных серотипов.

В ходе анализа молекулярной эпидемиологии пневмококков невакцинных серотипов мы обнаружили и охарактеризовали новый МЛУ-клон ST2754, большинство изолятов которого имели серотип 13. Клон

ST2754 был устойчив к Эри, Кли, Тет и ТМП, но сохранял чувствительность к Пен. Устойчивость к Эри и Тет была обусловлена носительством *Tn6002*-подобного транспозона, в составе которого имелись гены *erm(B)* и *tet(M)*. Интересно, что большинство изолятов ST2754, представленных в базе данных PubMLST, относились к серотипу 33В и имели происхождение из стран Азии, а единственный пневмококк ST2754 серотипа 13 был выделен в юго-восточной Африке. Наш ST2754-клон филогенетически был наиболее близок именно с этим изолятом. Вообще, серотип 13 относится к числу редких и практически не встречается в европейских странах [121]. Наличие дополнительных детерминант вирулентности, в частности системы метаболизма аргинина ArgG/ArgH, которая повышает способность к адгезии и инвазии [133, 146], а также локуса бактериоцинов свидетельствует о том, что МЛУ-ST2754 клон обладает благоприятным генетическим фоном и определенным потенциалом для закрепления в циркуляции. Дальнейшее отслеживание генетической композиции пневмококковой популяции позволит оценить справедливость этой гипотезы.

В ходе настоящего исследования был описан пневмококк Sp1994 серотипа 15А, обладавший новым ST14599 – генотипом, связанным с клональной линией ST276. Действительно, сравнительный геномный анализ показал, что данный пневмококк возник благодаря трансформации локуса полисахаридной капсулы *cps* у МЛУ-пневмококка серотипа 19А ST276, и появившийся невакцинный рекомбинант Sp1994-ST14599/15А сохранил МЛУ-фенотип. Частота выделения пневмококков клона ST276 существенно возросла в пост-ПКВ период [105, 110, 147], и хотя большинство из них экспрессирует серотип 19А, есть сообщения о том, что МЛУ-пневмококки ST276 могут иметь капсулу серотипа 20 [102, 127]. Все это не исключает, что ST276 принадлежит к числу успешных генотипов. В то же время, наличие неидентичных участков вне *cps*-локуса в геномах вероятного реципиента и

рекомбинанта может указывать на то, что переключение капсулы произошло сравнительно давно и не под давлением вакцинации.

Переключение капсулы не является редким событием для пневмококков. Сообщалось о приобретении капсулы невакцинного серотипа различными успешными ПКВ-клонами [105, 114, 122, 172]. В частности, после внедрения ПКВ7 и до появления ПКВ13 произошло распространение не-ПКВ7 серотипа 19A ST320 [32, 105], в пост-ПКВ13 периоде появился не-ПКВ13 серотип 35B, возникший как свитч-вариант ПКВ13-серотипов с МЛУ, имевших отношение к клону ST156 [127].

В отличие от пневмококков 19A/ST276, изолят Sp1994-15A/ST14599 обладал локусом системы *aSec*. Этот локус состоял из гена *psrP* и 16 генов вспомогательных белков, участвующих в транспорте важного фактора вирулентности *PsrP*, который представляет собой закрепленный на клеточной стенке адгезин, обогащенный сериновыми повторами. Приобретенная посредством горизонтального переноса генов система *aSec*, являясь частью острова патогенности *psrP-secY2A2*, облегчает пневмококковую колонизацию носоглотки и развитие инфекций нижних дыхательных путей и часто встречается у пневмококков, вызывающих пневмонию [102]. Наряду с оперонами, кодирующими капсулу и пили, гены *psrP-secY2A2* определяют разнообразие пневмококковой популяции [102]. Описанный локус *psrP-secY2A2* обладал высокой степенью гомологии с подобными локусами у штаммов оральных стрептококков и *Staphylococcus aureus*, которые характеризовались повышенной способностью к формированию биопленок и колонизации поверхности зубов и ассоциировались с инфекционным эндокардитом [114]. Таким образом, вторичные рекомбинации, не связанные с *cps*-локусом и произошедшие в результате случайного обмена генами, могут обеспечивать определенные преимущества рекомбинантным генетическим линиям пневмококков и играть важную роль в адаптации и эволюции этого патогена.

В последние годы серогруппа 15 стала одной из наиболее распространенных невакцинных серогрупп среди пневмококков, вызывающих ИПИ, а также выделенных от носителей [105, 111, 122, 167]. Большинство изолятов серотипа 15А относится к ST63, который является идентификационным сиквенс-типом глобального клона PMEN Sweden^{15A}-25 и его родственных генотипов [122]. Большинство ST63-пневмококков чувствительны к β -лактамам антибиотикам с низкими значениями МПК, но устойчивы к макролидам за счет наличия гена *ermB*. Однако в недавнем сообщении из Японии был описан 15А/ST63-ассоциированный пневмококковый клон с МЛУ-фенотипом и наличием рекомбинаций в регионе гена *pbp2x*, произошедших до введения ПКВ [122]. Кроме того, несколько генетических линий МЛУ-пневмококков невакцинных серотипов, связанных с 15А/ST63-клоном, были описаны в США в пост-ПКВ периоде [52, 115]. Таким образом, появление рекомбинантных генетических линий невакцинных серотипов пневмококков с удачным генетическим фоном, обладающих МЛУ-фенотипом, вызывает беспокойство. Очевидно, что пневмококковая популяция динамически изменяется под влиянием различных клинических и естественных вызовов, что предполагает проведение постоянного эпидемиологического мониторинга с целью выработки стратегии своевременного ответа на эти изменения.

ВЫВОДЫ

1. Основную долю (89,1%) в популяции пневмококков с множественной лекарственной устойчивостью занимали серотипы 19F, 6B, 14, 19A, 23F, 6A и 9V, входящие в состав 13-валентной пневмококковой конъюгированной вакцины, которые преимущественно характеризовались резистентностью к 4-5 антибиотикам, включая β -лактамы, эритромицин, клиндамицин, тетрациклин и триметоприм/сульфаметоксазол.
2. В популяции пневмококков с множественной лекарственной устойчивостью были выявлены изоляты 16 невакцинных серотипов, среди которых преобладали пневмококки серотипов 23A, 13, 28F и 11A с резистентностью к эритромицину, клиндамицину, тетрациклину и/или триметоприму/сульфаметоксазолу.
3. У пневмококков с множественной лекарственной устойчивостью преобладали следующие механизмы резистентности: эритромицин/клиндамицин – *ermB* (94,8%), тетрациклин – *tetM* (92,3%), хлорамфеникол – *catpQ194* (60%), триметоприм/сульфаметоксазол – сочетание мутаций *folA* (I100L) и *folP* (89%). Устойчивость к фторхинолонам у 3 из 5 фторхинолонрезистентных изолятов была опосредована значимыми мутациями в ParC (D83N, K137N), ParE (I460V) и GyrA (S81F).
4. В 2016-2017 гг. среди пневмококков с множественной лекарственной устойчивостью в РФ получил распространение клон ST2754 редкого серотипа 13, характеризовавшийся резистентностью к эритромицину, клиндамицину, тетрациклину и триметоприму/сульфаметоксазолу.
5. При проведении полногеномного секвенирования выявлен и охарактеризован изолят пневмококка серотипа 15A ST1499 с множественной лекарственной устойчивостью, возникший в результате

переключения локуса полисахаридной капсулы *cps* у пневмококка серотипа 19А.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Динамичная серотиповая структура циркулирующей популяции пневмококков в условиях массового применения ПКВ13 требует проведения регулярного мониторинга.
2. С целью своевременного выявления изменения генетической композиции пневмококковой популяции целесообразно проводить ее оценку с использованием метода МЛСТ.
3. Для лечения инфекций, связанных с МЛУ-пневмококками, целесообразно использовать препараты, сохраняющие активность в отношении большинства бактерий с таким фенотипом. К ним относятся, в частности, цефтриаксон, фторхинолоны, ванкомицин. С учетом высокой частоты встречаемости носительства гена *ermB* можно ожидать низкую эффективность назначения препаратов из группы макролидов для эмпирической терапии пневмококковых инфекций.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

1. Продолжение наблюдения за циркулирующими серотипами пневмококков в педиатрической популяции для отслеживания появления новых актуальных серотипов, которые могут стать кандидатами для включения в состав новых пневмококковых вакцин.
2. Внедрение молекулярно-генетических методов для прогнозирования фенотипа устойчивости к антибиотикам по бактериальному резистому.
3. Разработка алгоритмов для одновременного серотипирования и генотипирования пневмококков с использованием технологий секвенирования нового поколения.
4. Изучение влияния мероприятий по оптимизации практики применения антибиотиков на уровень резистентности в пневмококковой популяции.
5. Исследование вирулентности пневмококков, ассоциированных с ИПИ, в сравнении с носоглоточными изолятами для расширения представлений о патогенезе пневмококковых инфекций.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

DLV	Double-locus variant (замена в двух локусах аллельного профиля)
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (Европейский комитет по оценке антибиотикочувствительности)
MLST	Multilocus sequence typing (мультилокусное сиквенс-типирование)
PMEN	Pneumococcal Molecular Epidemiology Network (Пневмококковая молекулярно-эпидемиологическая сеть)
SLV	Single-locus variant
ST	Sequence Type (сиквенс-тип)
QRDR	Quinolone-resistance determining region (область, определяющая устойчивость к хинолонам)
ИПИ	инвазивные пневмококковые инфекции
Кли	Клиндамицин
ЛФЛ	Левифлоксацин
МЛУ	множественная лекарственная устойчивость
МПК	минимальная подавляющая концентрация
МФЛ	Моксифлоксацин
П	категория «промежуточный; чувствительный при повышенной экспозиции антибиотика»
Пен	Пенициллин
ПКВ13	13-валентная пневмококковая конъюгированная вакцина
п.н.	пар нуклеотидов
ППВ23	23-валентная пневмококковая полисахаридная вакцина

Р	категория «резистентный»
Тет	Тетрациклин
ТМП	триметоприм/сульфаметоксазол
Хло	Хлорамфеникол
Ч	категория «чувствительный»
ЭЛУ	экстремальная лекарственная устойчивость
Эри	Эритромицин

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Алябьева, Н.М. Серотипы и устойчивость к антибиотикам штаммов *Streptococcus pneumoniae*, выделенных у детей при респираторных инфекциях // Дис...канд. мед. наук: 03.02.03 / Алябьева Наталья Михайловна. – М., 2014. – 101 с.
2. Баранов, А.А. Стрептококки и пневмококки: Руководство для врачей / А.А. Баранов, Н.И. Брико, Л.С. Намазова-Баранова, Л.А. Ряпис // Феникс. 2013. - 302 с.
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. – Т.13, № 3. – С. 261-266.
4. Иванчик, Н.В. Антибиотикорезистентность клинических штаммов *Streptococcus pneumoniae* в России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «ПеГАС 2014–2017» / Н.В. Иванчик, А.Н. Чагарян, М.В. Сухорукова, Р.С. Козлов, А.В. Дехнич, О.И. Кречикова и соавт. // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2019. Т. 3, № 21. - С. 230–237.
5. Калиногорская, О.С. Антибиотикорезистентность и серотипы *Streptococcus pneumoniae* выделенных от детей в Санкт-Петербурге, 2010-2013 гг. / О.С. Калиногорская, С.С. Беланов, М.О. Волкова, В.В. Гостев, С.В. Сидоренко // Антибиотики и Химиотерапия.- 2015. - Т. 1–2. № 60. - С. 10–18.
6. Катосова, Л.К. Серотипы *S. pneumoniae* у детей, больных острой пневмонией и плевритом / Л.К. Катосова, В.К. Таточенко, А.А. Арова, А.А. Кешикбаева, А.П. Батуро, Т.А. Кузнецова, А.Б. Левин // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 1990. - Т. 5. - С. 23–28.
7. Козлов, Р.С. Антибиотикорезистентность *Streptococcus pyogenes* в России: результаты многоцентрового проспективного исследования Пе-ГАС-1 / Р.С.

Козлов, О.И. Сивая, К.В. Шпынев, Е.Д. Агапова, С.М. Розанова, Е.Н. Гугуцидзе и др. // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2005. – Т.7, № 2. – С. 154-166.

8. Козлов, Р.С. Динамика резистентности *Streptococcus pneumoniae* к антибиотикам в России за период 1999–2009 гг. (результаты многоцентрового проспективного исследования ПЕГАС) / Р.С. Козлов, О.В. Сивая, О.И. Кречикова // Клиническая Микробиология и Антимикробная Химиотерапия. - 2010. - №Т. 4. №12. - С. 329–341.

9. Козлов, Р.С. Серологическая характеристика и чувствительность к антибиотикам пневмококков, выделенных у детей в возрасте до 5 лет в отдельных регионах Российской Федерации / Р.С. Козлов, А.Н. Чагарян, Л.В. Козлова, А.А. Муравьев А.А. // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2011. – Т.13, № 2. – С. 177–187.

10. Кречикова, О.И. Выделение, идентификация и определение чувствительности к антибиотикам *Streptococcus pneumoniae* * Isolation, Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of *Streptococcus pneumoniae* / О.И. Кречикова, Р.С. Козлов, Т.М., Богданович, О.У. Стецюк, М.М. Суворов, Л.К. Катосова, Л.А. Вишнякова // Клиническая Микробиология и Антимикробная Химиотерапия. - 2000. Vol. 2. № 1. - P. 88–98.

11. Лазарева А.В. Микробиологическая характеристика, механизмы устойчивости к антибиотикам и молекулярная эпидемиология резистентных форм респираторных патогенов и госпитальных грамотрицательных бактерий // Дис...докт. мед. наук: 03.02.03 / Лазарева Анна Валерьевна. – М., 2019. – 233 с.

12. Лобзин, Ю.В. Серотипы *Streptococcus pneumoniae*, вызывающие ведущие нозологические формы пневмококковых инфекций / Ю.В. Лобзин, С.В. Сидоренко, С.М. Харит, С.С. Беланов и др. // Журнал инфектологии. – 2013. – Т.5. – № 4. – С. 35-40.

13. Методические указания по определению чувствительности

микроорганизмов к антибактериальным препаратам. МУК 4.2. 1890-04.

14. Муравьев, А.А. Эпидемиология серотипов *S. pneumoniae* на территории Российской Федерации // А.А. Муравьев, Р.С. Козлов, Н.Н. Лебедева // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2017. - Т. 19. - № 3. - С. 200–206.

15. Протасова, И.Н. Чувствительность к антибиотикам пневмококков, выделенных у детей города Красноярска / И.Н. Протасова, О.В. Перьянова, Н.В. Бахарева, А.Б. Салмина, и соавт. // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2014. –Т. 16. –№ 2. – С. 144-148.

16. Протасова, И.Н. Смена серотипов *Streptococcus pneumoniae* у детей, вакцинированных 7-валентной конъюгированной вакциной / И.Н. Протасова, Н.В. Бахарева, О.В. Перьянова, Т.А. Елистратова, М.В. Коваль // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2014. – Т. 5. –№ 78. – С. 67-71.

17. Рачина, С.А. Анализ подходов к применению антибиотиков при инфекциях верхних дыхательных путей и ЛОР-органов у детей : результаты опроса участковых педиатров / С.А. Рачина, Р.С. Козлов, В.К. Таточенко, исследовательская группа ПАТРИОТ: Л.П. Жаркова, Э.В. Дудникова, И.Б. Сакулина, С.В. Мальцев, Т.В. Спичак, В.Н. Сероклинов, О.И. Чиркова, Н.В. Климова, Т.А. Шуматова, Г.А. Батищева, С.П. Хохлова, Л.А. Крюкова, Ф.К. Манеров, Т.И. Каганова, Е.Б. Павлинова, И.М. Косенко, Е.Г. Кондюрин , И.А. Захаренков // Болезни и возбудители. - 2016. - Т. 18. - № 1. - С. 20–32.

18. Рудакова, А.В. Фармако-экономические аспекты вакцинации детей 13-валентной пневмококковой конъюгированной вакциной в Российской Федерации / А.В. Рудакова, А.А. Баранов, Ю.В. Лобзин Ю.В., Н.И. Брико // Вопросы современной педиатрии. – 2014. – Т. 13. – № 1. – С. 51-59.

19. Савинова, Т.А. Генетическое разнообразие пенициллинустойчивых *Streptococcus pneumoniae* / Т.А. Савинова, О.Ю. Филимонова, С.А. Грудинина С.А, С.В. Сидоренко // Журнал инфектологии. – 2010. – Т.1. – № 4. – С. 66-71.

20. Савинова, Т.А. Генетическое разнообразие и молекулярные основы

резистентности *Streptococcus pneumoniae* к β -лактамным антибиотикам: авторефю дис. ... канд. мед. наук: 03.02.03, 03.01.03 / Савинова Татьяна Александровна. М., 2011. - 22с.

21. Сидоренко, С.В. Резистентность к макролидам и линкозамидам среди *Streptococcus pneumoniae* и *Streptococcus pyogenes* в Российской Федерации / С.В. Сидоренко, С.А. Грудинина, О.Ю. Филимонова, Л.Г. Столярова, Т.А. Савинова // Клиническая фармакология и терапия. – 2008. – Т. 17. – № 2. – С. 1-5.

22. Харит, С.М. Распространенность пневмококковых пневмоний и отитов у детей младшего возраста (предварительные данные) / С.М. Харит, С.В. Сидоренко, А.А. Рулева и соавт. // Вопросы современной педиатрии. – 2011. – №6. – С. 103-107.

23. Холодок, Г.Н. . Поствакцинальная динамика молекулярно - генетических вариантов изолятов *S. pneumoniae* у детей Приамурья в период 2013 / Г.Н. Холодок, А.П. Бондаренко, Н.М. Ивахнишина, Т.А. Зайцева, В.К. Козлов // Педитрия. - 2016. - Т. 2. – С. 103-107.

24. Холодок, Г.Н. Фенотипы *Streptococcus pneumoniae*, циркулирующие в популяции детей Хабаровского края / Г.Н. Холодок, В.К. Козлов // Бюллетень Хабаровский филиал Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания Сибирского отделения РАМН – НИИ охраны материнства и детства. - 2011. - Т. 40. - С. 29–33.

25. Цветкова, И.А. Клональная структура популяции изолятов *Streptococcus pneumoniae*, циркулирующих в России с 1980 по 2017 гг. / И.А. Цветкова, С.С. Беланов, В.В. Гостев, О.С. Калиногорская, М.О. Волкова, А.С. Мохов, Е.В. Никитина, Е.Л. Калисникова, К.А. Иванова, А.А. Володина, С.В. Сидоренко // Антибиотики и химиотерапия. - 2019. - Т. 5–6. №64. - С. 22–31.

26. Aanensen, D.M. Predicted functions and linkage specificities of the products of the *Streptococcus pneumoniae* capsular biosynthetic loci / D.M. Aanensen, A. Mavroidi, S.D. Bentley, P.R. Reeves, B.G. Spratt // Journal of Bacteriology. - 2007. - Vol. 189. № 21. - P. 7856–7876.

27. Adam, H.J. Baseline epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* serotypes in Canada prior to the introduction of the 13-valent pneumococcal vaccine / H.J. Adam, J.A. Karlowsky, K.A. Nichol, M.W. Gilmour, D.J. Hoban, J. Embree, G.G. Zhane // *Microbial Drug Resistance*. - 2012. - Vol. 18. № 2. - P. 176–182.
28. Adam, H.J. Analysis of multidrug resistance in the predominant *Streptococcus pneumoniae* serotypes in Canada: The SAVE study, 2011-15 / H.J. Adam, A.R. Golden, J.A. Karlowsky, M.R. Baxter, K.A. Nichol, I. Martin, W. Demczuk, M.R. Mulvey, M.W. Gilmour, D.J. Hoban, G.G. Zhanel // *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. - 2018. - Vol. 73. July. P. vii12–vii19.
29. Aguinagalde, L. Emergence of amoxicillin-resistant variants of Spain9V-ST156 pneumococci expressing serotype 11A correlates with their ability to evade the host immune response / L. Aguinagalde, B. Corsini, A. Domenech, M. Domenech, J. Cámara, C. Ardanuy, E. García, J. Liñares, A. Fenoll, J. Yuste // *PLoS ONE*. - 2015. - Vol. 9. № 10. - P. 1–12.
30. Alikhan, N.F. BLAST Ring Image Generator (BRIG): Simple prokaryote genome comparisons / N.F. Alikhan, N.K. Petty, N.L. Ben Zakour, S.A. Beatson // *BMC Genomics*. - 2011. - Vol. 1. № 12. - P. 402.
31. Alonso, R. An extended PCR-RFLP assay for detection of *parC*, *parE* and *gyrA* mutations in fluoroquinolone-resistant *Streptococcus pneumoniae* / R. Alonso, M. Galimand, P. Courvalin // *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. - 2004. Vol. 53. № 4. - P. 682–683.
32. Ardanuy, C. Emergence of a multidrug-resistant clone (ST320) among invasive serotype 19A pneumococci in Spain / C. Ardanuy, D. Rolo, A. Fenoll, D. Tarrago, L. Calatayud, J. Linares // *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. - 2009. Vol. 64. № 3. - P. 507–510.
33. Aziz, R.K. The RAST Server: Rapid annotations using subsystems technology / R.K. Aziz, D. Bartels, A.A. Best, M. DeJongh, T. Disz, R.A. Edwards, K. Formsma, S. Gerdes, E.M. Glass, M. Kubal, F. Meyer, G.J. Olsen, R. Olson, A.L. Osterman, R.A. Overbeek, L.K. McNeil, D. Paarmann, T. Paczian, B. Parrello, G.D. Pusch, C. Reich, R. Stevens, O. Vassieva, V. Vonstein, A. Wilke, O.

Zagnitko // BMC Genomics. - 2008. Vol. 9. - P. 1–15.

34. Balsalobre, L. Viridans group streptococci are donors in horizontal transfer of topoisomerase IV genes to *Streptococcus pneumoniae* / L. Balsalobre, M.J. Ferrandiz, J. Linares, F. Tubau, A.G. de la Campa // Antimicrobial Agents Chemotherapy. - 2003. Vol. 47. № 7. - P. 2072–2081.

35. Balsells, E. Serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* causing invasive disease in children in the post-PCV era: A systematic review and meta-analysis / E. Balsells, L. Guillot, H. Nair, M.H. Kyaw // PLoS One. - 2017. Vol. 12. № 5. - P. 1–20.

36. Bankevich, A. SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing / A. Bankevich, S. Nurk, P.A. Pevzner // Journal of Computational Biology. - 2012. Vol. 19. №5. - P. 455-477.

37. Baranova, N.N. Apparent involvement of a multidrug transporter in the fluoroquinolone resistance of *Streptococcus pneumoniae* / N.N. Baranova, A.A. Neyfakh // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. - 1997. Vol. 41. № 6. - P. 1396–1398.

38. Barcus, V.A. Genetics of high level penicillin resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* / V.A. Barcus, K. Ghanekar, M. Yeo, T.J. Coffey, C.G. Dowson // FEMS Microbiology Letter. - 1995. Vol. 126. № 3. - P. 299–303.

39. Barkai, G. Community prescribing and resistant *Streptococcus pneumoniae* / G. Barkai, D. Greenberg, N. Givon-Lavi, E. Dreifuss, D. Vardy, R. Dagan // Emerging Infectious Diseases. - 2005. Vol. 11. № 6. - P. 829–837.

40. Beall, B. Pre- and postvaccination clonal compositions of invasive pneumococcal serotypes for isolates collected in the United States in 1999, 2001, and 2002 / B. Beall, M.C. McEllistrem, R.E. Gertz, S. Wedel, D.J. Boxrud, A.L. Gonzalez, M. Medina, R. Pai, T.A. Thompson, L.H. Harrison, L. McGee, C.G. Whitney and the Active Bacterial Core Surveillance Team // Journal of Clinical Microbiology. - 2006. Vol. 44. - P. 999–1017.

41. Bentley, S.D. Genetic analysis of the capsular biosynthetic locus from all 90 pneumococcal serotypes / S.D. Bentley, D.M. Aanensen, A. Mavroidi, D.

- Saunders, E. Rabinowitsch, M. Collins, K. Donohoe, D. Harris, L. Murphy, M.A. Quail, G. Samuel, I.C. Skovsted, M.S. Kalsoft, B. Barrell, P.R. Reeves, J. Parkhill, B.G. Spratt // *PLoS Genetics*. - 2006. Vol. 2. № 3. - P. 0262–0269.
42. Bettinger, J.A. The effect of routine vaccination on invasive pneumococcal infections in Canadian children, Immunization Monitoring Program, Active 2000-2007 / J.A. Bettinger, D.W. Scheifele, J.D. Kellner, S.A. Halperin, W. Vaudryd, B. Lawe, G. Tyrrell, for Members of the Canadian Immunization Monitoring Program, Active (IMPACT) // *Vaccine*. - 2010. Vol. 28. № 9. - P. 2130–2136.
43. Black, S. The volatile nature of pneumococcal serotype epidemiology: Potential for misinterpretation / S. Black // *The Pediatric Infectious Disease Journal*. - 2010. Vol. 29. № 4. - P. 301–303.
44. Bogaert, D. Streptococcus pneumoniae colonisation: The key to pneumococcal disease / D. Bogaert, R. de Groot, P.W.M. Hermans // *Review Streptococcus pneumoniae colonisation. Lancet Infectious Diseases*. - 2004. Vol. 4. № 3. - P. 144–154.
45. Brenciani, A. Genetic determinants and elements associated with antibiotic resistance in viridans group streptococci / A. Brenciani, E. Tiberi, E. Tili, M. Mingoia, C. Palmieri, P.E. Varaldo, E. Giovanetti // *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. - 2014. Vol. 69. № 5. - P. 1197–1204.
46. Brito, D.A. Serotyping Streptococcus pneumoniae by multiplex PCR / D.A. Brito, M. Ramirez, H. de Lencastre // *Journal of Clinical Microbiology*. - 2003. Vol. 6. № 41. - P. 2378–2384.
47. Brueggemann, A.B. Fluoroquinolone resistance in Streptococcus pneumoniae in United States since 1994-1995 / A.B. Brueggemann, S.L. Coffman, P. Rhomberg, H. Huynh, L. Almer, A. Nilius, R. Flamm, G.V. Doern // *Antimicrobial Agents and chemotherapy*. - 2002. Vol. 46. № 3. - P. 680–688.
48. Brueggemann, A.B. Vaccine escape recombinants emerge after pneumococcal vaccination in the United States / A.B. Brueggemann, R. Pai, D.W. Crook, B. Beall // *PLoS Pathogens*. - 2007. Vol. 3. № 11. - P. 1628–1636.
49. Ceyhan, M. Serotype distribution of Streptococcus pneumoniae in children

with invasive diseases in Turkey: 2008–2014 / M. Ceyhan, Y. Ozsurekci, N. Gürler, L. Öksüz, S. Aydemir, S. Ozkan, S. Yuksekkaya, M.K. Emiroglu, M. Gültekin, A. Yaman, A. Kiremitci, K. Yanık, A. Karli, H. Ozcinar, F. Aydin, G. Bayramoglu, Y. Zer, Z. Gulay, E.D. Gayyurhan, M. Gül, C. Özakın, H. Güdücüoğlu, D. Perçin, N. Akpolat, C. Ozturk, Y. Camcıoğlu, E.K Öncel, M. Çelik, L. Şanal & Hakan Uslu// *Human Vaccines Immunotherapeutics*. - 2016. Vol. 12. № 2. - P. 308–313.

50. Ceysens, P.J. Molecular analysis of rising fluoroquinolone resistance in Belgian non-invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates (1995-2014) / P. Ceysens, F. V. Bambeke, W. Mattheus, S. Bertrand, F. Fux, E.V. Bossuyt, S. Damée, H. Nyssen, S. De Craeye, J. Verhaegen, The Belgian *Streptococcus pneumoniae* Study Group¶, P.M. Tulkens, R.Vanhoof1// *PLoS ONE*. - 2016. № 5 (11). - P. 1–17.

51. Chen, C. Evaluation of the impact of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine immunization in children by surveillance of culture-confirmed pneumococcal disease: A prospective clinical microbiological study / C. Chen, L. Su, H. Li, M. Hsu, T. Wu, C. Chen, K. Kuo, C. Hsiao, C. Chiu // *Vaccine*. - 2019. Vol. 36. № 37. - P. 5147–5152.

52. Chochua, S. Invasive serotype 35B pneumococci including an expanding serotype switch lineage, United States, 2015–2016 / S. Chochua, B.J. Metcalf, Z. Li, H. Walker, T. Tran, L. McGee, B. Beall // *Emerging Infectious Diseases*. - 2017. Vol. 6. № 23. - P. 922–930.

53. Claverys, J.P. Induction of Competence Regulons as a General Response to Stress in Gram-Positive Bacteria / J.P. Claverys, M. Prudhomme, B. Martin // *Annual Review of Microbiology*. - 2006. Vol. 60. № 1. - P. 451–475.

54. Corcoran, M. The epidemiology of invasive pneumococcal disease in older adults in the post-PCV era . Has there been a herd effect? / M. Corcoran, I. Vickers, J. Mereckiene, S. Murchan, S. Cotter, M. Fitzgerald, M. Mcelligott, M. Cafferkey, D. O’Flanagan, R.Cunney, H. Humphreys // *Epidemiology & Infection*. Cambridge University Press. - 2017 . C. 1–10.

55. Cornick, J.E. Streptococcus pneumoniae: the evolution of antimicrobial resistance to beta-lactams, fluoroquinolones and macrolides / J.E. Cornick, S.D. Bentley // *Emerging Microbes and Infections*. – 2012. – Vol. 14. – P.573-83.
56. Croucher, N.J. Rapid pneumococcal evolution in response to clinical interventions / N.J. Croucher, S.R. Harris, C. Fraser, M.A. Quail, et al. // *Science*. – 2011. – Vol. 331. – P. 430-4.
57. CSI Phylogeny service, <https://cge.cbs.dtu.dk/services/CSIPhylogeny>; 2019 [accessed 26 April 2019]
58. Dagan, R. Introduction and Proliferation of Multidrug-Resistant Streptococcus pneumoniae Serotype 19A Clones That Cause Acute Otitis Media in an Unvaccinated Population / R. Dagan, N. Givon-Lavi, E. Leibovitz, D. Greenberg, N. Porat // *Journal Infectious Disease*. - 2009. - Vol. 199. № 6. - P. 776–785.
59. Darling, A.C.E. Mauve: Multiple Alignment of Conserved Genomic Sequence With Rearrangements / A.C.E. Darling, B. Mau, F.R. Blattner, N.T. Perna // *Genome Research*. - 2004. - Vol. 14. P. 1394–1403.
60. Dinleyici E.C. Pneumococcal conjugated vaccines: Impact of PCV-7 and new achievements in the postvaccine era / E.C. Dinleyici, Z.A. Yargic // *Expert Reviews. Vaccines*. - 2008. - Vol. 7. № 9. - P. 1367–1394.
61. Dodt, M. FLEXBAR-flexible barcode and adapter processing for next-generation sequencing platforms / M. Dodt, J.T. Roehr, R. Ahmed, C. Dieterich // *Biology (Basel)*. - 2012. - Vol. 1. № 3. - P. 895–905.
62. Dong, W. Mutations within the rplD Gene of Linezolid-Nonsusceptible Streptococcus pneumoniae Strains Isolated in the United States / W. Dong, S. Chochua, L. McGee, D. Jackson, K.P. Klugman, J.E. Vidal // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. - 2014. - Vol. 58. № 4. - P. 2459–2462.
63. Durando, P. Experience with pneumococcal polysaccharide conjugate vaccine (conjugated to CRM197 carrier protein) in children and adults / P. Durando, S.N. Faust, M. Fletcher, P. Krizova, A. Torres, T. Welte // *Clinical Microbiology and Infection*. - 2013. - Vol. 19. № SUPPL. 1. - P. 1–9.

64. Enright, M. Molecular Evolution of Rifampicin Resistance in *Streptococcus pneumoniae* / M. Enright, P. Zawadski, P. Pickerill, C.G. Dowson // *Microbial Drug Resistance*. - 1998. - Vol. 4. № 1. - P. 65–70.
65. Eun, H.C. *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A in children, South Korea / E.H. Choi, S.H. Kim, B.W. Eun, S.J. Kim, N.H. Kim, J.Lee, H.J. Lee // *Emerging Infectious Diseases*. - 2008. - Vol. 14. № 2. - P. 275–281.
66. Facklam, R. What Happened to the Streptococci: Overview of Taxonomic and Nomenclature Changes Richard / R. Facklam // *Clinical Microbiology Reviews*. - 2002. - Vol. 15. № 4. - P. 613–630.
67. Felmingham, D. The Alexander Project: The benefits from a decade of surveillance / D. Felmingham, A.R. White, M.R. Jacobs, P.C. Appelbaum, J. Poupard, L.A. Miller, R.N. Grüneberg // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. - 2005. - Vol. 2. № 56. - P. 3–21.
68. Ferrándiz, M.J. Horizontal transfer of *parC* and *gyrA* in fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* / M.A J. Ferrandiz, A. Fenoll, J. Linares, A.G.D.L. Campa // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. - 2000. - Vol 4. №44. - P. 840–847.
69. Golden, A.R. Characterization of MDR and XDR *Streptococcus pneumoniae* in Canada, 2007-13 // A.R. Golden, M. Rosenthal, B. Fultz et al. // *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2015. – Vol.70. – P. 2199-202.
70. Golden, A.R. Molecular characterization of predominant *Streptococcus pneumoniae* serotypes causing invasive infections in Canada: The SAVE study, 2011-15 / A.R. Golden, H.J. Adam, J.A. Karlowsky, M. Baxter, K.A. Nichol, I. Martin, W. Demczuk, P.V. Caesele, J.B. Gubbay, B. Lefebvre, P.N. Levett, G. Zahariadis, D. Haldane, R. Gad, G. German, M.W. Gilmour, M.R. Mulvey, D.J. Hoban, G.G. Zhanel on behalf of the Canadian Antimicrobial Resistance Alliance (CARA) // *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2018. - Vol. 73. Suppl. №7. - P. vii20–vii31.
71. Golubchik, T. Pneumococcal genome sequencing tracks a vaccine escape variant formed through a multi-fragment recombination event / T. Golubchik, A.B.

- Brueggemann, T. Street, R.E. Gertz, C.C.A. Spencer, T. Ho, E. Giannoulatou, R. Link-Gelles, R.M. Harding, B. Beall, T.E.A. Peto, M.R. Moore, P. Donnelly, D.W. Crook, R. Bowden // *Nature Genetics*. - 2012. - Vol. 3. № 44. - P. 352–355.
72. Gray, B.M. Clinical and epidemiologic studies of pneumococcal infection in children / B.M. Gray, H.C. Dillon // *Pediatric Infectious Disease*. - 1986. - Vol.5. №2. - P. 201–207.
73. Habib M. Capsular Serotyping of *Streptococcus pneumoniae* Using the Quellung Reaction / M. Habib, B.D. Porter, C. Satzke // *Journal of Visualized Experiments*. – 2014. – Vol. 84. № 51208. P. 1-4.
74. Hakenbeck, R. Multiple changes of penicillin-binding proteins in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* / R. Hakenbeck, M. Tarpay, A. Tomasz // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. - 1980. - Vol. 17. № 3. - P. 364–371.
75. Hansman, D. A Resistant pneumococcus / D. Hansman, M.M. Bullen // *Letters to the editor. The Lancet*. - 1967. - Vol. 2. - P. 264–265.
76. Harf-Monteil, C. Incidence and pathogenic effect of *Streptococcus pseudopneumoniae* / C. Harf-Monteil, C. Granello, C.L. Brun, H. Monteil, P. Riegel // *Journal of Clinical Microbiology*. - 2006. - Vol. 44. № 6. - P. 2240–2241.
77. Henriques-Normark, B. The pneumococcus: Epidemiology, microbiology, and pathogenesis / B. Henriques-Normark, E.I. Tuomanen // *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. - 2013. - Vol. 3. № 7. - P. 1-17.
78. Högberg L. Age- and Serogroup-Related Differences in Observed Durations of Nasopharyngeal Carriage of Penicillin-Resist / L. Högberg, P. Geli, H. Ringberg, E. Melander, M. Lipsitch, K. Ekdahl // *Journal of Clinical Microbiology*. –2007. – Vol. 45. № 3. P. 948-952.
79. Hooper, D.C. Mechanisms of Action and Resistance / D.C. Hooper, G.A. Jacoby // *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. - 2016. №6. - P. 1–21.
80. Hsu, H. Effect of Pneumococcal Conjugate Vaccine on Pneumococcal Meningitis / H.E. Hsu, K.A. Shutt, M.R. Moore, B.W. Beall, N.M. Bennett, A.S. Craig, M.M. Farley, J.H. Jorgensen, C.A. Lexau, S. Petit, A. Reingold, W.

- Schaffner, A. Thomas, C.G. Whitney, L.H. Harrison // *The New England Journal of Medicine: Research & Review*. - 2009. - Vol. 360. № 3. - P. 244–256.
81. Hulten, K.G. Changes in *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A invasive infections in children from 1993 to 2011 / K.G. Hulten, S.L. Kaplan, L.B. Lamberth et al. // *The Journal of Clinical Microbiology*. – 2013. – Vol. 51. – P. 1294-7.
82. Janoir, C. Insight into resistance phenotypes of emergent non 13-valent pneumococcal conjugate vaccine type pneumococci isolated from invasive disease after 13-valent pneumococcal conjugate vaccine implementation in France / C. Janoir, A. Lepoutre, L. Gutmann, E. Varon // *Open Forum Infectious Diseases*. – 2016. – Vol. 3. – P. 020.
83. Jedrzejak, M.J. Pneumococcal Virulence Factors: Structure and Function / M.G. Jedrzejak // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. - 2001. - Vol. 65. № 2. - P. 187–207.
84. Joensen, K.G. Real-time whole-genome sequencing for routine typing, surveillance, and outbreak detection of verotoxigenic *Escherichia coli* / K.G. Joensen, F. Scheutz, O. Lund, H. Hasman, R.S. Kaas, E.M. Nielsen, F.M. Aarestrup // *Journal of Clinical Microbiology*. - 2014. - Vol. 52. № 5. - P. 1501–1510.
85. Jumbe, N.L. Quinolone efflux pumps play a central role in emergence of fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae* / N.L. Jumbe, A. Louie, M.H. Miller, W. Liu, M.R. Deziel, V.H. Tam, R. Bachhawat, G.L. Drusano // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. - 2006. - Vol. 50. № 1. - P. 310–317.
86. Kadioglu, A. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease / A. Kadioglu, J.N. Weiser, J.C. Paton, P.W. Andrew // *Nature Reviews Microbiology*. - 2008. - Vol. 6. № 4. - P. 288–301.
87. Kasahara, K. Serotype 35B *Streptococcus pneumoniae*, Japan, 2002-2012 / K. Kasahara, Y. Komatsu, A. Koizumi, B. Chang, M. Ohnishi, T. Muratani, K. Mikasa // *Journal of Infection and Chemotherapy*. - 2014. - Vol. 3. № 20. - P. 228–230.

88. Kawamura, Y. Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus* / Y. Kawamura, X.G. Hou, F. Sultana, H. Miura, T. Ezaki // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. - 1995. - Vol. 45. № 2. - P. 406–408.
89. Keenan, J.D. Evidence for Clonal Expansion After Antibiotic Selection Pressure: Pneumococcal Multilocus Sequence Types Before and After Mass Azithromycin Treatments / J.D. Keenan, K.P. Klugman, L. McGee, J.E. Vidal, S. Chochua, P. Hawkins, V. Cevallos, T. Gebre, Z. Tadesse, P.M. Emerson, J.H. Jorgensen, B.D. Gaynor, T.M. Lietman // *The Journal of Infectious Disease*. - 2015. - P. 988–994.
90. Kim, H.S. Changes in serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolates from adult patients in Asia: Emergence of drug-resistant non-vaccine serotypes / S.H. Kim, D.R. Chung, Jae-Hoon Song, J. Y. Baek, V. Thamlikitkul, H. Wang, C. Carlos, N. Ahmad, R. Arushothy, S.H. Tan, D. Lye, Cheol-In Kang, K.S. Ko, K.R. Peck, on behalf of the Asian Network for Surveillance of Resistant Pathogens (ANSORP) // *Vaccine*. - 2019. - P. 1–9.
91. Kim, L. Biological and epidemiological features of antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* in pre- and post-conjugate vaccine eras: A United States perspective / L. Kim, L. McGee, S. Tomczyk, B. Beall // *Clinical Microbiology Reviews*. - 2016. - Vol. 29. № 3. - P. 525–552.
92. Kislak, J.W. Susceptibility of pneumococci to nine antibiotics / J.W. Kislak, L.M.B. Razavi, A.K. Daly, M. Finland // *The American Journal of the Medical Sciences*. - 1965. - P. 53–60.
93. Kittana, F.N.A. Erythromycin - resistant *Streptococcus pneumoniae*: phenotypes, genotypes, transposons and pneumococcal vaccine coverage rates / F.N.A. Kittana, I.B. Mustak, G. Hascelik, S. Saricam, N. Gurler, K.S. Diker // *Journal of Medical Microbiology*. - 2019. - Vol. 68. № 6. - P. 874-881.
94. Ko, K.S. Evolution of Erythromycin-Resistant *Streptococcus pneumoniae* from Asian Countries That Contains *erm* (B) and *mef* (A) Genes / K.S. Ko, J. Song //

The Journal of Infectious Diseases. - 2004. - Vol. 4. № 190. - P. 739–747.

95. Kyaw, M.H. Effect of Introduction of the Pneumococcal Conjugate Vaccine on Drug-Resistant *Streptococcus pneumoniae* / M.H. Kyaw, R. Lynfield, W. Schaffner, A.S. Craig, J. Hadler, A. Reingold, A.R. Thomas, L.H. Harrison, N.M. Bennett, M.M. Farley, R.R. Facklam, J.H. Jorgensen, J. Besser, E.R. Zell, A. Schuchat, C.G. Whitney, for Active Bacterial Core Surveillance of the Emerging Infections Program Network. Abstract // The New England Journal of Medicine. - 2006. - Vol. 354. P. 1455–1463.

96. Larsen, M.V. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria / M.V. Larsen, S. Cosentino, S. Rasmussen, C. Friis, H. Hasman, R.L. Marvig, L. Jelsbak, T. Sicheritz-Pontřn, D.W. Ussery, F.M. Aarestrup, O. Lund // Journal of Clinical Microbiology. - 2012. - Vol. 50. № 4. - P. 1355–1361.

97. Leclercq, R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications / R. Leclercq // Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. – 2002. – Vol. 34. – P. 482-492.

98. Leclercq, R. EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing / R. Leclercq, R. Cantón, D.F. Brown, C.G. Giske, et al. // Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. – 2013. – Vol. 19. – P. 141-160.

99. Lee, J. Recombination rates of *Streptococcus pneumoniae* isolates with both *erm(B)* and *mef(A)* genes / J. Lee, J. Song, K.S. Ko // FEMS Microbiology Letters. - 2010. - Vol. 309. - P. 163–169.

100. Levinson, W. Review of Medical Microbiology and Immunology / W. Levinson // Review of Medical Microbiology and Immunology, 11th edition. - 2010.

101. Levy, C. Diversity of Serotype Replacement After Pneumococcal Conjugate Vaccine Implementation in Europe / C. Levy, N. Ouldali, L. Caeymaex, F. Angoulvant, E. Varon, R. Cohen // Journal of Pediatrics. - 2019. - Vol. 213. - P. 252-253.e3.

102. Lizcano, A. Transcriptional organization of pneumococcal *psrP-secY2A2* and impact of *GtfA* and *GtfB* deletion on *PsrP*-associated virulence properties / A.

Lizcano, R.A.S. Babua, A.T. Shenoya, A.M. Savillec, N. Kumard, A. D'Mellod, C.A. Hinojosaa, R.P. Gilleya, J. Segoviaa, T.J. Mitchellc, H. Tettelind, C.J. Orihuela // *Microbes and Infection*. - 2018. - Vol. 19. № 6. - P. 323–333.

103. Lo, S.W. Pneumococcal lineages associated with serotype replacement and antibiotic resistance in childhood invasive pneumococcal disease in the post-PCV13 era: an international whole-genome sequencing study / S.W Lo, R.A Gladstone, A.J. van Tonder, J.A. Lees, M. Plessis, R. Benisty, N. Givon-Lavi, P.A. Hawkins, J.E. Cornick, B. Kwambana-Adams, P.Y. Law, P.L. Ho, M. Antonio, D.B. Everett, R. Dagan, A. Gottberg, K.P. Klugman, L. McGee, R.F. Breiman, S.D. Bentley, The Global Pneumococcal Sequencing Consortium // *The Lancet Infectious Diseases*. - 2019. - Vol. 7. № 19. - P. 759–769.

104. Lynch, J.P. *Streptococcus pneumoniae*: Epidemiology, risk factors, and strategies for prevention / J.P. Lynch, G.G. Zhanel // *Current Opinion in Pulmonary Medicine*. - 2009. - Vol. 30. № 2. - P. 189–209.

105. Makarewicz, O. Whole genome sequencing of 39 invasive *Streptococcus pneumoniae* sequence type 199 isolates revealed switches from serotype 19A to 15B / O. Makarewicz, M. Lucas, C. Brandt, L. Herrmann, A. Albersmeier, C. Ruckert, J. Blom, A. Goesmann, M. van der Linden, J. Kalinowski, M.W. Pletz // *PLoS One*. - 2017. - Vol. 12. № 1. - P. 1–18.

106. Marchese, A. Molecular epidemiology of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates recovered in Italy from 1993 to 1996 / A. Marchese, M. Amirez, G.C. Schito, A. Tomasz // *Journal of Clinical Microbiology*. - 1998. - Vol. 36. № 10. - P. 2944–2949.

107. Martin, J.M. Emergence of *streptococcus pneumoniae* serogroups 15 and 35 in nasopharyngeal cultures from young children with acute otitis media / J.M. Martin, A. Hoberman, J.L. Paradise, K.A. Barbadora, N. Shaikh, S. Bhatnagar, T. Shope, S.L. Block, M.A. Haralam, M. Kurs-Lasky, D.K. Colborn, M. Green // *The Pediatric Infectious Disease Journal*. - 2014. - Vol. 33. № 11. - P. e286–e290.

108. Marttinen, P. Detection of recombination events in bacterial genomes from large population samples / P. Marttinen, W.P. Hanage, N.J. Croucher, T.R.

- Connor, S.R. Harris, S.D. Bentley, J. Corander // *Nucleic Acids Research*. - 2012. - Vol. 1. № 40. - P. 1–12.
109. Mayanskiy, N. Serotypes and antibiotic resistance of non-invasive *Streptococcus pneumoniae* circulating in pediatric hospitals in Moscow, Russia / N. Mayanskiy, N. Alyabieva, O. Ponomarenko, A. Lazareva, L. Katosova, A. Ivanenko, T. Kulichenko, L. Namazova-Baranova, A. Baranov // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2014. – Vol. 20. – P. 58-62.
110. Mayanskiy, 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 / N. Mayanskiy, T. Savinova, N. Alyabieva, O.Ponomarenko, E. Brzhozovskaya, A. Lazareva, L. Katosova, R. Kozlov // *Epidemiology and Infection*. Cambridge Press. - 2017. - Vol. 145. № 8. P. 1708–1719.
111. Mayanskiy, N. Changing serotype distribution and resistance patterns among pediatric nasopharyngeal pneumococci collected in Moscow, 2010–2017 / N. Mayanskiy, T. Kulichenko, N. Alyabieva, E. Brzhozovskaya, O. Ponomarenko, T. Savinova, A. Lazareva // *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. - 2019. - Vol. 94. № 4. P. 385–390.
112. Mehr, S. *Streptococcus pneumoniae* - a review of carriage, infection, serotype replacement and vaccination / S. Mehr, N. Wood // *Paediatric Respiratory Reviews*. - 2012. - Vol. 13. № 4. P. 258–264.
113. Meier, P.S. Low-level resistance to rifampin in *Streptococcus pneumoniae* / P.S. Meier, S. Utz, S. Aebi, K. Muhlemann // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. - 2003. - Vol. 47. № 3. - P. 863–868.
114. Metcalf, B.J. Strain features and distributions in pneumococci from children with invasive disease before and after 13-valent conjugate vaccine implementation in the USA / B.J. Metcalf¹, R.E. Gertz, R.A. Gladstone, H. Walker, L.K. Sherwood, D. Jackson, Z. Li¹, C. Law, P.A. Hawkins, S. Chochua, M. Sheth, N. Rayamajhi, S.D. Bentley, L. Kim, C.G. Whitney, L. McGee and B. Beall¹, on behalf of the Active Bacterial Core surveillance team// *Clinical Microbiology and*

Infection. 2016. № 1 (22). C. 60.e9-60.e29.

115. Metcalf, B. J. Using whole genome sequencing to identify resistance determinants and predict antimicrobial resistance phenotypes for year 2015 invasive pneumococcal disease isolates recovered in the United States / B.J. Metcalf, S. Chochua, R.E. Gertz, Z. Li, H. Walker, T. Tran, P.A. Hawkins, A. Glennen, R. Lynfield, Y. Li, L. McGee, B. Beal // *Clinical Microbiology and Infection*. - 2016. - Vol. 12. № 22. - P. 1002.e1-1002.e8.

116. Meulen, S.A. Safety, tolerability and immunogenicity of 15-valent pneumococcal conjugate vaccine in toddlers previously vaccinated with 7-valent pneumococcal conjugate vaccine / A.S. Meulen, T. Vesikari, E.A. Malacaman, S.A. Shapiro, Mi.J. Dallas, P.A. Hoover, R. McFetridge, J.E. Stek, R.D. Marchese, J. Hartzel, W.J. Watson, L.K. Musey // *The Pediatric Infectious Disease Journal*. - 2015. - Vol. 34. № 2. - P. 186–194.

117. Moffitt, K.L. Next Generation Pneumococcal Vaccines / K.L. Moffitt, R. Malley // *Current Opinion in Immunology*. - 2011. - Vol. 23. № 1. - P. 407–413.

123. Morton N. Swartz M.D. Attacking the Pneumococcus — A Hundred Years' War // *N Engl J Med*. 2002. № 10 (346). C. 722.

118. Moore, M.R. Population Snapshot of Emergent *Streptococcus pneumoniae* Serotype 19A in the United States, 2005 / M.R. Moore, R.E. Gertz, R.L. Woodbury, G.A. Barkocy-Gallagher, W. Schaffner, C. Lexau, K. Gershman, A. Reingold, M. Farley, L.H. Harrison, J.L. Hadler, N.M. Bennett, A.R. Thomas, L. McGee, T. Pilishvili, A.B. Brueggemann, C.G. Whitney, J.H. Jorgensen, B. Beall // *The Journal of Infectious Diseases*. - 2008. - Vol. 7. № 197. - P. 1016–1027.

119. Morton N. Swartz M.D. Attacking the Pneumococcus — A Hundred Years' War // *N Engl J Med*. 2002. № 10 (346). C. 722.

120. Multilocus sequence typing: *Streptococcus pneumoniae* [database online]. Available at: <http://pubmlst.org/spneumoniae>. 2019.

121. Multilocus sequence typing: *Streptococcus pneumoniae* [database online]. Available at: <http://pubmlst.org/spneumoniae> [accessed January, 2020].

122. Nakano, S. Nationwide surveillance of paediatric invasive and non-invasive

- pneumococcal disease in Japan after the introduction of the 13-valent conjugated vaccine, 2015–2017 / S. Nakano, T. Fujisawa, Y. Ito, B. Chang, Y. Matsumura, M. Yamamoto, S. Suga, M. Ohnishi, M. Nagao // *Vaccine*. - 2019. - P. 2015–2017.
123. Normark, B.H. Clinical Isolates of *Streptococcus pneumoniae* That Exhibit Tolerance of Vancomycin / B. Henriques Normark, R. Novak, Å. Örtqvist, G. Källenius, E. Tuomanen, S. Normark // *Clinical Infectious Diseases*. - 2001. - Vol. 32. № 4. - P. 552–558.
124. Normark, B.H. Clonal Analysis of *Streptococcus pneumoniae* Nonsusceptible to Penicillin at Day-Care Centers with Index Cases, in a Region with Low Incidence of Resistance: Emergence of an Invasive Type 35B Clone among Carriers / B. Henriques Normark, B. Christensson, A. Sandgren, B. Noreen, S. Sylvan, L.G. Burman, B. Olsson-Liljequist // *Microbial Drug Resistance*. - 2003. - Vol. 4. № 9. - P. 337–344.
125. Nunes, S. Trends in Drug Resistance, Serotypes, and Molecular Types of *Streptococcus pneumoniae* Colonizing Preschool-Age Children Attending Day Care Centers in Lisbon, Portugal: a Summary of 4 Years of Annual Surveillance / S. Nunes, R. Sá-Leão, J. Carriço, C.R. Alves, R. Mato, A.B. Avô, J. Saldanha, J.S. Almeida, I.S. Sanches, H. de Lencastre // *Journal of Clinical Microbiology*. –2005. – Vol. 43. № 3. P. 1285-1293.
126. O’Brien, K.L. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates / K.L O’Brien, L.J Wolfson, J.P. Watt, E. Henkle, M. Deloria-Knoll, N. McCall, E. Lee, K. Mulholland, O.S. Levine, T. Cherian, for the Hib and Pneumococcal Global Burden of Disease Study Team // *The Lancet*. - 2009. - Vol. 374. № 9693. - P. 893–902.
127. Olarte, L. Invasive serotype 35B pneumococci including an expanding serotype switch lineage / L. Olarte, S.L. Kaplan, W.J. Barson, J.R. Romero, P.L. Lin, T.Q. Tan, J.A. Hoffman, J.S. Bradley, L.B. Givner, E.O. Mason, K.G. Hultén // *Emerging Infectious Diseases*. - 2018. - Vol. 24. № 2. - P. 405.
128. Olsvik, B. Detection of tet(M) and tet(Q) using the polymerase chain reaction in bacteria isolated from patients with periodontal disease / B. Olsvik, I. Olsen,

F.C. Tenover // *Oral Microbiology and Immunology*. - 1995. - Vol. 10. № 2. - P. 87–92.

129. Padayachee, T. Molecular basis of rifampin resistance in *Streptococcus pneumoniae* / T. Padayachee, K.P. Klugman // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. - 1999. - Vol. 10. № 43. - P. 2361–2365.

130. Pai, R. Sequential multiplex PCR approach for determining capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates // R. Pai, R.E. Gertz, B.J. Beall // *The Journal of Clinical Microbiology*. – 2006. – Vol. 44. – P.124 –13.

131. Palacios, P.A. Molecular characterization of non-vaccine *Streptococcus pneumoniae* serotypes 11A, 15 B/C and 23A recovered from invasive isolates in Colombia / P.A. Palacios, C. Duarte, O. Sanabria, J. Moreno // *Biomedica*. - 2017. - Vol. 3. № 37. - P. 390–396.

132. Pichichero, M.E. Next generation protein based *Streptococcus pneumoniae* vaccines / M.E. Pichichero, M.N. Khan, Q. Xu // *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. - 2016. - Vol. 12. № 1. - P. 194–205.

133. Piet, J.R. *Streptococcus pneumoniae* Arginine Synthesis Genes Promote Growth and Virulence in Pneumococcal Meningitis / J.R. Piet, M. Geldhoff, B.D. C. van Schaik, M.C. Brouwer, M.V. Seron, M.E. Jakobs, K. Schipper, Y. Pannekoek, A.H. Zwinderman, T. van der Poll, A.H.C. van Kampen, F. Baas, A. van der Ende, D. van de Beek // *The Journal of Infectious Diseases*. - 2014. - Vol. 209. - P. 1781–1791.

134. Pillai, D.R. Genome-wide dissection of globally emergent multi-drug resistant serotype 19A *Streptococcus pneumoniae* / D.R. Pillai, D. Shahinas, A. Buzina, R.A Pollock, R. Lau, K. Khairnar, A. Wong, D.J. Farrell, K. Green, A. McGeer, D.E. Low // *BMC Genomics*. - 2009. - Vol.10. - P. 1–13.

135. Protasova, I.N. Molecular characterization of *Streptococcus pneumoniae*, particularly serotype 19A/ST320, which emerged in Krasnoyarsk, Russia / I.N. Protasova, T. Wan, N.V. Bakhareva, W. Hung, W. Higuchi, Y. Iwao, T.A. Yelistratova, N.A. Ilyenkova, Y.S. Sokolovskaya, G.P. Martynova, I.V. Reva, G.V. Reva, S.V. Sidorenko, L. Teng, O.V. Peryanova, A.B. Salmina, T.

- Yamamoto // *Microbiology and Immunology*. - 2017. - Vol. 61. № 9. P. 359–370.
136. Raddaoui, A. High prevalence of multidrug-resistant international clones among macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates in immunocompromised patients in Tunisia / A. Raddaoui, F.B. Tanfous, Y. Chebbi, W. Achour, R. Baaboura, A. Benhassen // *International Journal of Antimicrobial Agents*. - 2018. - Vol. 52. № 6. - P. 893–897.
137. Reinert, R.R. Mechanisms of macrolide resistance among *Streptococcus pneumoniae* isolates from Russia / R.R. Reinert, O.Y. Filimonova, A. Al-Lahham, S.A. Grudinina, et al. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2008. – Vol. 52. – P. 2260-2.
138. Reingold, A. 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 / A. Reingold, J. Hadler, M. Farley // *Journal of the American Medical Association*. - 2005. - Vol. 54. № 36. - P. 2022–2024.
139. Richter, S. Evaluation of Pneumococcal Serotyping by Multiplex PCR and Quellung Reactions / S.S. Richter, K.P. Heilmann, C.L. Dohrn, F. Riahi, D.J. Diekema, G.V. Doernb // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2013. – Vol. 51. № 12. P. 4193-4195.
140. Richter, S.S. Changes in pneumococcal serotypes and antimicrobial resistance after introduction of the 13-valent conjugate vaccine in the United States / S.S. Richter, D.J. Diekema, K.P. Heilmann, C.L. Dohrn, et al. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2014. – Vol. 58. – P. 6484-6489.
141. Rodriguez, C.A. Tolerance to Vancomycin in Pneumococci: Detection with a Molecular Marker and Assessment of Clinical Impact / A.C. Rodriguez, R. Atkinson, W. Bitar, C.G. Whitney, K.M. Edwards, L. Mitchell, J. Li, J. Sublett, C. Li, T. Liu, P.J. Chesney, E.I. Tuomanen // *The Journal of Infectious Diseases*. - 2004. - Vol. 190. № 8. - P. 1481–1487.
142. Rückinger, S. Reduction in the incidence of invasive pneumococcal disease after general vaccination with 7-valent pneumococcal conjugate vaccine in

- Germany / S. Rückinger, M. van der Linden, R.R. Reinert, R. von Kries, F. Burckhardt, A. Siedler // *Vaccine*. - 2009. - Vol. 27. № 31. - P. 4136–4141.
143. Sader, H.S. Antimicrobial susceptibility of streptococcus pneumoniae from North America, Europe, Latin America, and the Asia-Pacific Region: Results from 20 years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2016) / H.S. Sader, R.E. Mendes, J. Le, G. Denys, R.K. Flamm, R.N. Jones // *Open Forum Infectious Diseases*. -2019. Vol. 1. № 6. - P. S14–S22.
144. Schmitz, J. Fluoroquinolone resistance in Streptococcus pneumoniae isolates in Germany from 2004–2005 to 2014–2015 / J. Schmitz, M. van der Linden, A. Al-Lahham, N. Levina, M.W. Pletz, M. Imohl // *International Journal of Medical Microbiology*. - 2017. - Vol. 307. № 4–5. - P. 216–222.
145. Schroeder, M.R. Macrolide resistance in Streptococcus pneumoniae / M.R. Schroeder, D.S. Stephens // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. - 2016. - Vol. 6. P. 1–9.
146. Schulz, C. Regulation of the Arginine Deiminase System by ArgR2 Interferes with Arginine Metabolism and Fitness of Streptococcus pneumoniae / C. Schulz, P. Gierok, L. Petruschka, M. Lalk, U. Mäder, S. Hammerschmidt // *mbio.asm.org*. - 2014. - Vol. 5. № 6. - P. 1–15.
147. Setchanova, L. Dominance of multidrug-resistant Denmark14-32(ST230) clone among Streptococcus pneumoniae serotype 19A isolates causing pneumococcal disease in Bulgaria from 1992 to 2013 / L. Setchanova, A. Alexandrova, D. Dacheva et al. // *Microbial Drug Resistance*. – 2015. – Vol. 21. – P. 35-42.
148. Shanker, E. Quorum sensing regulation of competence and bacteriocins in Streptococcus pneumoniae and mutans / E. Shanker, M.J. Federle // *Genes (Basel)*. MDPI. - 2017. - Vol. 8. № 1. - P. 1-17.
149. Shi, W. Population biology of 225 serogroup 6 Streptococcus pneumoniae isolates collected in China / W. Shi, K. Yao, M. He, S. Yu, Y. Yang // *BMC Infectious Diseases*. - 2014. - Vol. 1. № 14. - P. 1–7.
150. Sidorenko, S. Multicenter study of serotype distribution of Streptococcus

pneumoniae nasopharyngeal isolates from healthy children in the Russian Federation after introduction of PCV13 into the National Vaccination Calendar / S. Sidorenko, W. Rennert, Y. Lobzin, N. Briko, R. Kozlov et al. // *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. - 2020. - Vol. 96. № 1. - P. 114914.

151. Siira, L. From Quellung to Multiplex PCR, and Back When Needed, in *Pneumococcal Serotyping* / L. Siira, T. Kaijalainen, L. Lambertsen, M.H. Nahm, M. Toropainen, A. Virolainen // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2012. – Vol. 5. № 8. P. 2727-2731.

152. Spellerberg, B. *Streptococcus* / B. Spellerberg, C. Brandt et al. // *Manual of Clinical Microbiology*. ASM Press. Washington, D.C. - 2015. - Vol. 11. P. 383–402.

153. SSI Diagnostica Neufeld antisera. 2020. Available from: <https://www.ssidiagnostica.com/neufeld-antisera/?cid=36>. /. - 2020 [accessed January, 2020]. 2020.

154. Straume, D. Natural transformation and genome evolution in *Streptococcus pneumoniae* / D. Straume, G.A. Stamsås, L.S. Håvarstein. // *Infection, Genetics and Evolution*. - 2015. - Vol. 33. № 1432. - P. 371–380.

155. Sung, H. Vancomycin-tolerant *Streptococcus pneumoniae* in Korea / H. Sung, H. B. Shin, M. Kim, K. Lee, E. Kim, W. Song, S.H. Jeong, W. Lee, Y. Park, G.M. Eliopoulos // *Journal of Clinical Microbiology*. - 2006. - Vol. 44. № 10. - P. 3524–3528.

156. Takeuchi N. Emergence of quinolone-resistant strains in *Streptococcus pneumoniae* isolated from paediatric patients since the approval of oral fluoroquinolones in Japan / N. Takeuchi, Mi. Ohkusu, T. Hoshino, S. Naito, A. Takaya, T. Yamamoto, N. Ishiwada // *Journal of Infection and Chemotherapy*. - 2017. - Vol.4. № 23. - P. 218–223.

157. Tamura, K. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 / K. Tamura, J. Dudley, M. Nei, S. Kumar // *Molecular Biology and Evolution*. - 2007. - Vol. 24. № 8. - P. 1596–1599.

158. Tatusova, T. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline / T. Tatusova, M.

- DiCuccio, A. Badretdin, V. Chetvernin, E.P. Nawrocki, L. Zaslavsky, A. Lomsadze, K.D. Pruitt, M. Borodovsky, J. Ostell // *Nucleic Acids Research*. - 2016. - Vol. 44. № 14. - P. 6614–6624.
159. The European Centre for Disease Prevention and Control. The European Centre for Disease Prevention and Control Surveillance of antimicrobial resistance . - 2018. - P. 49–56 .
160. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility. Testing (EUCAST), Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 9.0. http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/; 2019 [accessed 8 January 2019]. - P. 1–11.
161. The official site of the Ministry of Health of the Russian Federation. Available at: <https://www.rosminzdrav.ru/news/2018/06/01/8132> (In Russian). [Accessed January 2019].
162. Tomic, V. Regional and global antimicrobial susceptibility among isolates of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* collected as part of the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial (T.E.S.T.) from 2009 to 2012 and comparison with previous years of T.E.S.T. (2004-2008) / V. Tomic, M.J. Dowzicky // *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. – 2014. – Vol. 13. – P. 52.
163. Torumkuney, D. Results from the Survey of Antibiotic Resistance (SOAR) 2014-16 in Russia / D. Torumkuney, N. Mayanskiy, M. Edelstein, S. Sidorenko, R. Kozhevin, I. Morrissey // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. - 2018. - Vol. 73. № May. - P. v14–v21.
164. van Bambeke, F. Quinolones in 2005: An update / F. van Bambeke, J.M. Michot, J.V. Eldere, P.M. Tulkens // *Review Article. Clinical Microbiology and Infection* - 2005. Vol. 11. № 4. - P. 256–280.
165. van der Linden, M. Epidemiology of serotype 19A isolates from invasive pneumococcal disease in German children / M. van der Linden, R.R. Reinert, W.V. Kern et al. // *BMC Infectious Diseases*. – 2013. – Vol. 13. – P. 70.
166. van der Linden, M. Effectiveness of Pneumococcal Conjugate Vaccines

- (PCV7 and PCV13) against Invasive Pneumococcal Disease among Children under Two Years of Age in Germany / M. van der Linden, G. Falkenhorst, S. Perniciaro, C. Fitzner, M. Imöhl // *PLoS One*. – 2016. – Vol. 11. – e0161257.
167. van der Linden, M. Increase of serotypes 15A and 23B in IPD in Germany in the PCV13 vaccination era / M. van der Linden, S. Perniciaro, M. Imöhl. // *BMC Infectious Diseases*. - 2015. - Vol. 15. № 1. - P. 1-12.
168. van der Poll, T. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia / T. van der Poll, S.M. Opal // *The Lancet*. - 2009. - Vol. 374. № 9700. P. 1543–1556.
169. van Tilburg, P.M.B. Emergence of Rifampin-Resistant *Streptococcus pneumoniae* as a Result of Antimicrobial Therapy for Penicillin-Resistant Strains / P.M.B. van Tilburg, D. Bogaert, M. Sluijter, A.R. Jansz, R. de Groot, P.W.M. Hermans // *Clinical Infectious Diseases*. - 2001. - Vol. 33. № 8. - P. e93–e96.
170. Verhelst, R. Comparison of five genotypic techniques for identification of optochin-resistant pneumococcus-like isolates / R. Verhelst, T. Kaijalainen, T.D. Baere, G. Verschraegen, G. Claeys, L.V. Simaey, C.D. Ganck, M. Vaneechoutte // *Journal of Clinical Microbiology*. - 2003. - Vol. 41. № 8. - P. 3521–3525.
171. Wang, C.Y. Antibiotic resistance profiles and multidrug resistance patterns of *Streptococcus pneumoniae* in pediatrics: A multicenter retrospective study in mainland China / C. Wang, Y. Chen, C. Fang, et al. // *Medicine (United States)*. - 2019. - Vol. 98. № 24. - P. 1–7.
172. Weinberger, R. Incidence of invasive pneumococcal disease in 5-15 year old children with and without comorbidities in Germany after the introduction of PCV13: Implications for vaccinating children with comorbidities / R. Weinberger, G. Falkenhorst, C. Bogdanc, M. van der Linden, M. Imöhl, R. von Kries // *Vaccine*. - 2015. - Vol. 33. № 48. - P. 6617–6621.
173. Weinberger, D. M. Serotype replacement in disease after pneumococcal vaccination / D. M. Weinberger, R. Malley, M. Lipsitch // *Lancet*. – 2011. – Vol. 378. – P. 1962-73.
174. Wierzbowski, A.K. Evolution and molecular characterization of macrolide-

- resistant *Streptococcus pneumoniae* in Canada between 1998 and 2008 / A.K. Wierzbowski, J.A. Karlowsky, H.J. Adam, K.A. Nichol, D.J. Hoban, G.G. Zhanel, on behalf of the Canadian Antimicrobial Resistance Alliance (CARA // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. - 2014. - Vol. 69. № 1. - P. 59–66.
175. World Health Organization Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>
176. World Health Organization. WHO position paper on pneumococcal vaccines // *Weekly Epidemiological Record*. - 2012. - Vol. 14. № 87. - P. 129–144.
177. Wyres, K.L. Pneumococcal capsular switching: a historical perspective / K.L. Wyres, L.M. Lambertsen, N.J. Croucher, L. McGee, et al. // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2013. – Vol. 207. – P. 439-49.
178. Yahiaoui, R.Y. Distribution of serotypes and patterns of antimicrobial resistance among commensal *Streptococcus pneumoniae* in nine European countries / R.Y. Yahiaoui, H.J. Bootsma, C.D.J. den Heijer, G.N. Pluister, W. J. Paget, P. Spreuwenberg, K. Trzcinski, E. E. Stobberingh // *BMC Infectious Diseases*. - 2018. - Vol. 18. № 1. - P. 1–10.
179. Yatsyshina, S. Detection of respiratory pathogens in pediatric acute otitis media by PCR and comparison of findings in the middle ear and nasopharynx / S. Yatsyshina, N. Mayanskiy, O. Shipulina, T. Kulichenko, N. Alyabieva, L. Katosova, A. Lazareva, T. Skachkova, M. Elkina, S. Matosova, G. Shipulin // *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. - 2016. - Vol. 85. № 1. - P. 125–130.
180. Yother, J. Capsules of *Streptococcus pneumoniae* and Other Bacteria: Paradigms for Polysaccharide Biosynthesis and Regulation / J. Yother // *Annual Review of Microbiology*. - 2011. - Vol. 65. № 1. - P. 563–581.
181. Yother, J. Structural properties and evolutionary relationships of PspA, a surface protein of *Streptococcus pneumoniae*, as revealed by sequence analysis / J.

Yother, D.E. Briles // *Journal of Bacteriology*. - 1992. - Vol. 174. № 2. - P. 601–609.

182. Yother, J. Novel surface attachment mechanism of the *Streptococcus pneumoniae* protein PspA / J. Yother, J.M. White // *Journal of Bacteriology*. - 1994. - Vol. 176. № 10. - P. 2976–2985.

183. Zhang, B. Characterization of highly antimicrobial-resistant clinical pneumococcal isolates recovered in a Chinese hospital during 2009-2010 / B. Zhang, R.E. Gertz, Z. Liu, Z. Li, W. Fu, B. Beal // *Journal of Medical Microbiology*. - 2012. Vol. 1. № 61. - P. 42–48.

184. Zhao, C. Phenotypic and genotypic characteristic of invasive pneumococcal isolates from both children and adult patients from a multicenter surveillance in China 2005-2011 / C. Zhao, F. Zhang, Y. Chu, Y. Liu, B. Cao, M. Chen, Y. Yu, K. Liao, L. Zhang, Z. Sun, B. Hu, J. Lei, Z. Hu, X. Zhang, H. Wang // *PLoS ONE*. - 2013. - Vol. 12. № 8. - P. 1–9.