

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук,
профессор РАН

Маянский Николай Андреевич

Официальные оппоненты:

Грубер Ирина Мироновна - доктор медицинских наук, профессор, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», лаборатория экспериментальной микробиологии отдела микробиологии, заведующая лабораторией

Попов Дмитрий Александрович - доктор медицинских наук, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева» Минздрава России, лаборатория клинической микробиологии и антимикробной терапии, заведующий лабораторией

Ведущая организация: ФБУН «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Защита диссертации состоится «19» января 2021 г. в 14:00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.08 ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119992, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д.37/1 и на сайте организации: www.sechenov.ru

Автореферат разослан «___» _____ 20___ г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор



Калужин Олег Витальевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы диссертационного исследования

Пневмококки (*Streptococcus pneumoniae*) сохраняют лидирующие позиции в числе наиболее важных причин инфекционной заболеваемости и смертности (Баранов А.А., 2013; Seyhan M., 2016; O'Brien K.L., 2009). Спектр пневмококковых инфекций варьирует от местных мукозальных процессов (синуситы, острый средний отит, пневмония) до системных, нередко жизнеугрожающих поражений (Kadioglu A., 2008). 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 (Баранов А.А., 2013; O'Brien K.L., 2009).

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 (Torumkuneu D., 2018). При этом исследованная популяция характеризовалась высокими значениями минимальной подавляющей концентрации пенициллина (МПК₉₀=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 (Tomic V., 2014). 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 МПК пенициллина варьировала в пределах 0,06-0,125 мг/л (Козлов Р.С., 2010). 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 (Adam H.J., 2018). 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, уменьшила частоту тяжелых ИПИ (Balsells E., 2017; Richter S.S., 2014; van der Linden M., 2016). Вместе с тем, отмечено появление и распространение в структуре носоглоточных и

ИПИ-изолятов пневмококковых клонов, обладающих невакцинными серотипами (Black S., 2010; Dagan R., 2009; Eun H.C., 2008). Серьезную обеспокоенность вызывает клональная эволюция серотипов 19А и 35В, обеспечившая экспансию пневмококков сиквенс-типов ST320 и ST156 соответственно, которые характеризуют МЛТУ (Olarde L., 2018; van der Linden M., 2013).

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* (Makarewicz O., 2017; Metcalf B., 2016; Nakano S., 2019; van der Linden M., 2015). 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 (Golden A., 2018).

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 интенсивно, что связано с актуальностью данного направления исследований на современном этапе. Проблема резистентности пневмококков стоит остро, что находит отражение в научных публикациях, в том числе и в РФ. В ряде исследований описана распространенность антибиотикорезистентности пневмококков, а также проведено изучение механизмов устойчивости к макролидам и β -лактамам (Иванчик Н.В., 2019; Козлов Р.С., 2010; Протасова

И.Н., 2014; Савинова Т.А., 2011; Cornick J.E., 2012; Torumkunev D.2018).

Пневмококковые исследования получили дополнительный импульс в связи с разработкой и внедрением в широкую практику ПКВ. В нашей стране изучение структуры пневмококковых серотипов проводилось, начиная с 1980-х гг. (Катосова Л.К., 1990), и было развито в последующих работах (Алябьева Н.М., 2014; Калиногорская О.С., 2015; Козлов Р.С., 2011; Лобзин Ю.В., 2013; Протасова И.Н., 2014; Холодок Г.Н., 2011, 2016). После включения пневмококковой вакцинации в Национальный календарь профилактических прививок РФ в 2014 г. стали появляться работы, отслеживающие динамику серотипов на фоне вакцинации (Лазарева А.В., 2019; Муравьев А.А., 2017; Sidorenko S., 2020).

С развитием молекулярных технологий возросло число исследований, связанных с генетикой и эволюцией пневмококков. Был описан феномен замещения серотипов пневмококков и экспансии успешных невакцинных клонов (Kim L., 2016; Olarte L., 2018; Richter S.S., 2014; Straume D., 2015). 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 (Алябьева Н.М., 2014; Лазарева А.В., 2019; Kim L., 2016).

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 антибиотиков, 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. 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.

4. Охарактеризовать геномы отдельных изолятов пневмококков с множественной лекарственной устойчивостью с использованием секвенирования нового поколения.

Научная новизна

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).

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, обеспечивающее 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 ST14599, 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; 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. Научная литература, посвящённая вопросам распространения резистентности, серотипового разнообразия, молекулярно-генетическим особенностям *S. pneumoniae*, была проанализирована формально-логическими методами исследования.

Основные 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 ST14599 с множественной лекарственной устойчивостью возник в результате переключения локуса полисахаридной капсулы *cps* у пневмококка серотипа 19A.

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 ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России (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 по 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 (Москва, 2017, 2019).

Личный вклад автора в получение результатов

Личное участие соискателя в получении результатов диссертационной работы заключалось в выполнении бактериологических исследований коллекции педиатрических изолятов *S. pneumoniae*, включая идентификацию, серотипирование, тестирование чувствительности. Также автор участвовал в выполнении молекулярно-генетических методов с использованием ПЦР и секвенирования (молекулярное серотипирование, определение генов устойчивости к антибиотикам, мультилокусное сиквенс-типирование (МЛСТ)). Все перечисленные исследования выполнены в лаборатории микробиологии и лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России. Полногеномное секвенирование выполнено 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. 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 диссертации в практику

Результаты исследований в качестве диагностических технологий внедрены в практическую работу подразделений ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России и лаборатории клинической бактериологии РДКБ 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.

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 статьи опубликованы в журналах, входящих в первый квартиль (Q1) и одна статья - 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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Материалы и методы исследования

В исследование вошли изоляты пневмококков, выделенные в лаборатории микробиологии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России в период с 2010 по 2017 гг. Из имевшейся коллекции были отобраны изоляты, показавшие резистентность к трем и более антибиотикам, т.е. МЛУ-фенотип, при использовании диско-диффузионного метода и метода E-тестов (тестировали оксациллин (Окс), эритромицин (Эри), клиндамицин (Кли), триметоприм/сульфаметоксазол (ТМП) и тетрациклин (Тет)) для последующего определения МПК при помощи метода микроразведений (ММР) антибиотиков в бульоне. МПК определяли для 16 антибиотиков, относящихся к 10 группам, в планшетах Sensititre (Thermo Fisher Scientific) (см. Таблицу 1).

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. Результаты определения чувствительности к антибиотикам интерпретировали согласно рекомендациям EUCAST-2019.

Серотипирование проводили двумя методами, осуществляя молекулярное типирование всех пневмококков с помощью мультиплексной ПЦР (Pai R., 2006),

позволяющее 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). 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), но являлись носителями генов *ply* и *psaA*, считали нетипируемыми.

Для всех Эри-резистентных изолятов МЛУ-пневмококков определяли гены устойчивости к макролидам/линкозамидам - *ermB* и *mef* (Reinert, R. 2008). У изолятов МЛУ-пневмококков, устойчивых к Тет, исследовали гены *tetM* и *tetO* (Olsvik B., 1995), а у пневмококков, устойчивых к хлорамфениколу (Хло), определяли ген *catpQ194* (Marchese A., 1998). Определение генов резистентности к вышеуказанным антибиотикам проводили с применением ПЦР и детекцией продуктов амплификации в 2% агарозном геле.

Определение сиквенс-типа проводили с помощью метода МЛСТ. Полногеномное секвенирование проводили на платформе Illumina HiSeq 2500. 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.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программ SPSS 20.0 (SPSS Statistics, США) и Microsoft Excel.

2. Распространенность, спектр антибиотикорезистентности и серотиповое разнообразие пневмококков с МЛУ

Всего за период 2010-2017 гг. было выделено 2174 изолятов пневмококка. Ретроспективно из их числа было отобрано 507 (23,3%) изолятов, устойчивых к трем и более группам антибиотиков (Окс, Эри, Кли, ТМП и Тет). Для сформированной выборки изолятов были определены МПК к 10 группам антимикробных препаратов при помощи ММР в бульоне. У 29 (5,1%) Окс-Р изолятов МПК Пен оказалась в чувствительном диапазоне ($\leq 0,06$ мг/л), в связи с чем их исключили из выборки. Таким образом, в дальнейший анализ вошло 478 изолятов, имевших МЛУ-фенотип. Подавляющее большинство МЛУ-пневмококков (478 (100%) и 433 (90,6%)) обладали устойчивостью к Эри и Кли соответственно (МПК₅₀ ≥ 256 мг/л). Резистентностью к Пен и Амп (МПК > 2 мг/л)

Значения минимальной подавляющей концентрации десяти групп антибиотиков у пневмококков с МЛУ

Антибиотик	Группа	Ч (чувствительный)		П (промежуточный; чувствительный при повышенной экспозиции антибиотика)		Р (резистентный)		МПК ₅₀ (мг/л)	МПК ₉₀ (мг/л)
		МПК ^а	n (%)	МПК ^а	n (%)	МПК ^а	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
Левофлоксацин	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:

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

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

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

Серотип	Всего изолятов	Доля (%) по выборке в целом	Из них МЛУ-изолятов	Доля (%) в выборке МЛУ-изолятов	Доля (%) МЛУ-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%
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 ^a	221	10,2%	0	0	0
Нетипируемые	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. Серотипы указаны в порядке убывания частоты МЛУ-изолятов.

^a – 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).

обладали 148 (31%) и 224 (46,9%) изолятов соответственно. Примечательно, что у 271 (56,7%) МЛУ-пневмококка значения МПК Пен находились в диапазоне от 0,12 до 2 мг/л, т.е. согласно новым критериям EUCAST-2019 они относились к категории чувствительных при увеличенной экспозиции антибиотика. Большинство (>90%) МЛУ-пневмококков сохраняли чувствительность к Цеф, цефтаролину и Хло (Таблица 1). Были обнаружены лишь единичные изоляты, резистентные к фторхинолонам, линезолиду и рифампицину; к ванкомицину были чувствительным все МЛУ-пневмококки (Таблица 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).

Вся коллекция из 2174 собранных пневмококков распределилась между 53 серотипами, при этом 478 МЛУ-пневмококков были носителями 24 серотипов (Таблица 2). В структуре МЛУ-пневмококков преобладали ПКВ13-серотипы (n=427, 89,3%) (Таблица 2). Из числа не-ПКВ13-серотипов с частотой $\geq 1\%$ в структуре МЛУ-изолятов встречались пневмококки с серотипами 23А, 13, 28F, 11А и серогруппы 35, также нетипируемые изоляты.

В структуре серотипов 14, 19А, 19F и 23F более 45% изолятов характеризовались экстремальной лекарственной устойчивостью (резистентность к 5 и более группам антибиотиков) (Рисунок 1). 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.

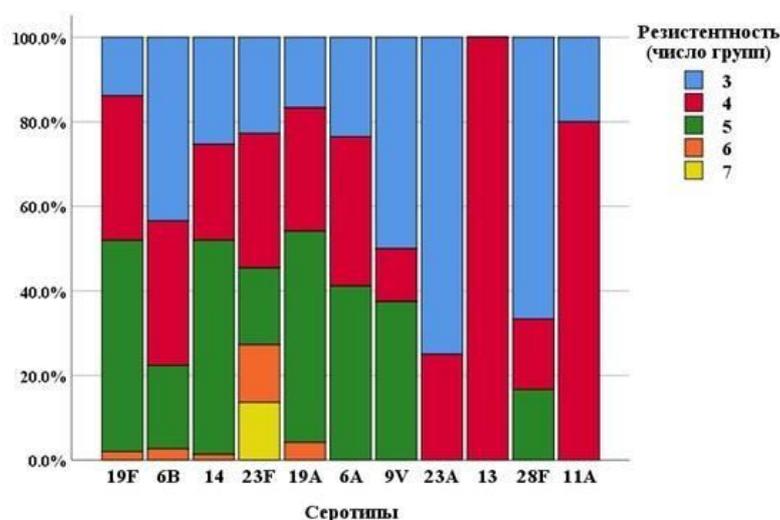


Рисунок 1. Число групп антибиотиков, к которым резистентны МЛУ-пневмококки, в зависимости от серотипа

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

Из 478 Эри-Р изолятов 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. При исследовании механизмов устойчивости к Тет на случайной выборке из 260 Тет-Р изолятов ген *tetM* был обнаружен у 240 из них (92,3%). 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*.

Механизмы резистентности к фторхинолонам были изучены путем анализа нуклеотидных последовательностей генов *parC/parE* и *gyrA/gyrB*, а также их сравнения с эталонным геномом R6 и геномами чувствительных к фторхинолонам МЛУ-изолятов. При сравнении с R6 у 3 из 5 ЛФЛ-Р изолятов были выявлены функционально значимые замены аминокислот в 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). В двух ЛФЛ-Р/МФЛ-Р 23F-изолятах в субъединице GyrA ДНК-гиразы была обнаружена QRDR-мутация S81F, а ParC несла дополнительную мутацию K137N.

Последовательность генов дигидрофолатредуктазы (*folA*) и дигидроптероатсинтазы (*folP*), ассоциированных с устойчивостью к ТМП, была проанализирована у 26 МЛУ-пневмококков. 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.

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

478 МЛУ-пневмококков были представлены 24 серотипами, из которых 44 изолята были носителями 16 различных не-ПКВ13-серотипов (см. Таблицу 2). С целью определения их генотипа и выявления возможной взаимосвязи с резистентными клонами вакцинных серотипов мы провели МЛСТ для данных изолятов. 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 однолокусным вариантом (SLV) ST14694 (n=4). Изоляты серотипа 11A были распределены между сиквенс-типами ST8605 (n=2), его SLV ST14416 (n=1), ST62 и ST4661 (n=1 каждый). Большинство генотипов МЛЮ-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 6C) и ST166 (серотип 23A), связанных с глобальными Пен-Р клонами Spain^{23F}-1 и Spain^{9V}-3 соответственно.

Отсутствием типичной связи генотип-серотип выделялись МЛЮ-пневмококки наиболее распространенного в нашей выборке ST2754 (n=8; 18%), а также пневмококк Sp1880 серотипа 15A с новым сиквенс-типом ST14599, двулокусным вариантом (DLV) ST276, который ассоциируется с серотипами 19A/19F.

Далее мы подробно охарактеризовали МЛЮ-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. Все изоляты ST2754 сохраняли чувствительность к антибиотикам из группы β -лактамов (МПК Пен $\leq 0,06$ мг/л), но 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 *ermB* и *tetM*, 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 и GenBank была получена информация о 20 изолятах пневмококков, принадлежавших к ST2754; большинство изолятов относилось к серогруппе 33. Все изоляты ST2754, кроме одного, были выделены в странах Азии 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, мы осуществили филогенетический анализ на основе данных SNP, проведя полногеномное секвенирование наших изолятов. В качестве эталонного изолята был использован пневмококк Sp1883 серотипа 13 (Sp1883-ST2754/13) (Рисунок 2А). При построении филогенетического дерева ST2754-изоляты образовывали два 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 2А).

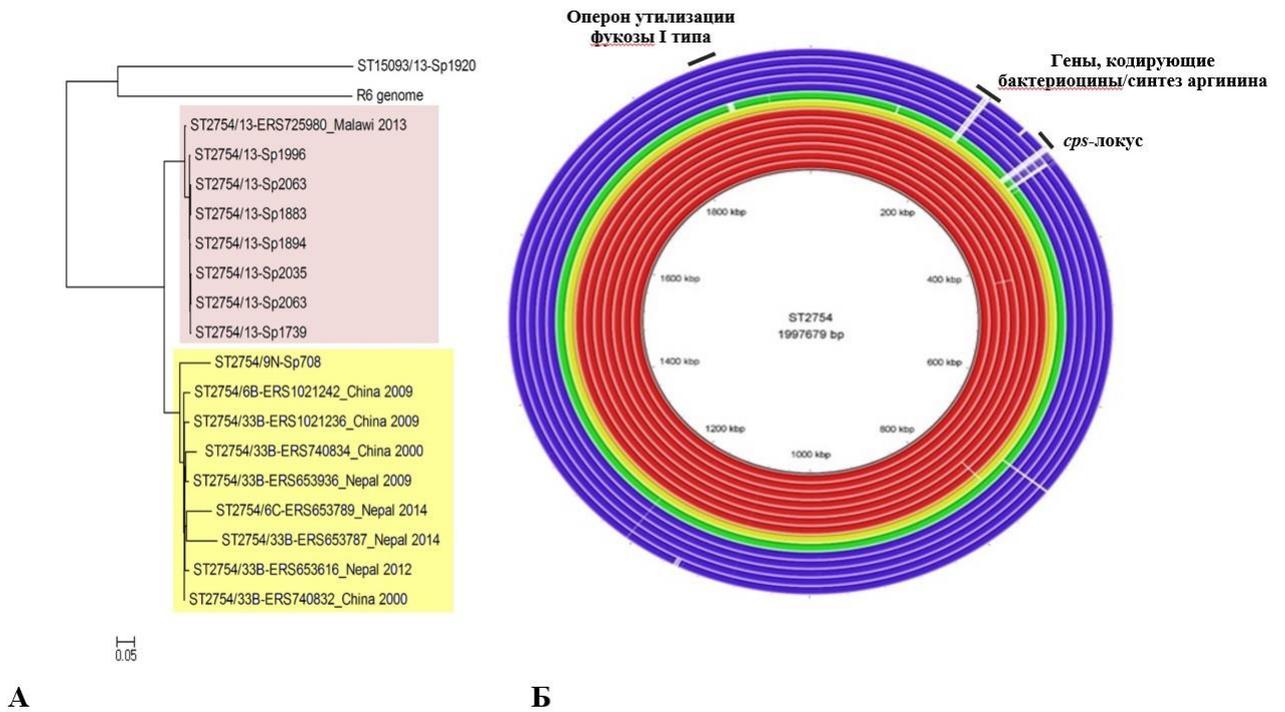


Рисунок 2. Филогенетика (А) и сравнение геномов (Б) ST2754-пневмококков по данным полногеномного SNP- анализа

Примечание: (А) 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. (Б) 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 ST2754/33B выделены желтым и синим цветом соответственно.

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 2Б). 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 (гены аргининсукцинат-синтетазы *ArgG* и аргининсукциназы *ArgH*); он присутствовал у изолятов серотипа 13, выделенных в России и Малави, но отсутствовал у других изолятов (Рисунок 2Б). Кроме того, ST2754/9N-изолят обладал опероном утилизации фукозы 1 типа (*fsc*-оперон) в отличие от изолятов ST2754/13 и ST2754/33B, имевших *fsc*-оперон 2 типа.

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. *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 ST2754/33B капсулы 9N, то есть переключении серотипа.

4. Пневмококк серотипа 15А с МЛУ, возникший в результате переключения локуса полисахаридной капсулы *cps* у пневмококка серотипа 19А

МЛУ-изолят пневмококка Sp1994, серотипа 15А, выделенный в г. Смоленск в 2017, году был устойчив к Эри и Кли (МПК ≥ 256 мг/л), а также Тет (МПК ≥ 8 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 тестированным 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. 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. Эти данные могли указывать на близкие филогенетические отношения Sp1994 15А/ST14599 с генетической линией не-15А-пневмококков.

Для проверки этой возможности мы провели полногеномный SNP-анализ, используя геном Sp1994 как референсный и сравнив его с несколькими геномами пневмококков серотипов 15А (n=6) и 19А (n=6) различных сиквенс-типов, доступных в GenBank и PubMLST (Рисунок 3А). Sp1994 продемонстрировал большее сходство и идентичность по SNP с изученными геномами 19А/ST276 по сравнению с геномами 15А/ST63, 15А/ST861 и 15А/ST4965 (Рисунок 3А). Следовательно, Sp1994 15А/ST14599 мог представлять собой вариант пневмококка серотипа 19А, возникший за счет переключения локуса полисахаридной капсулы *cps* (свитч-вариант).

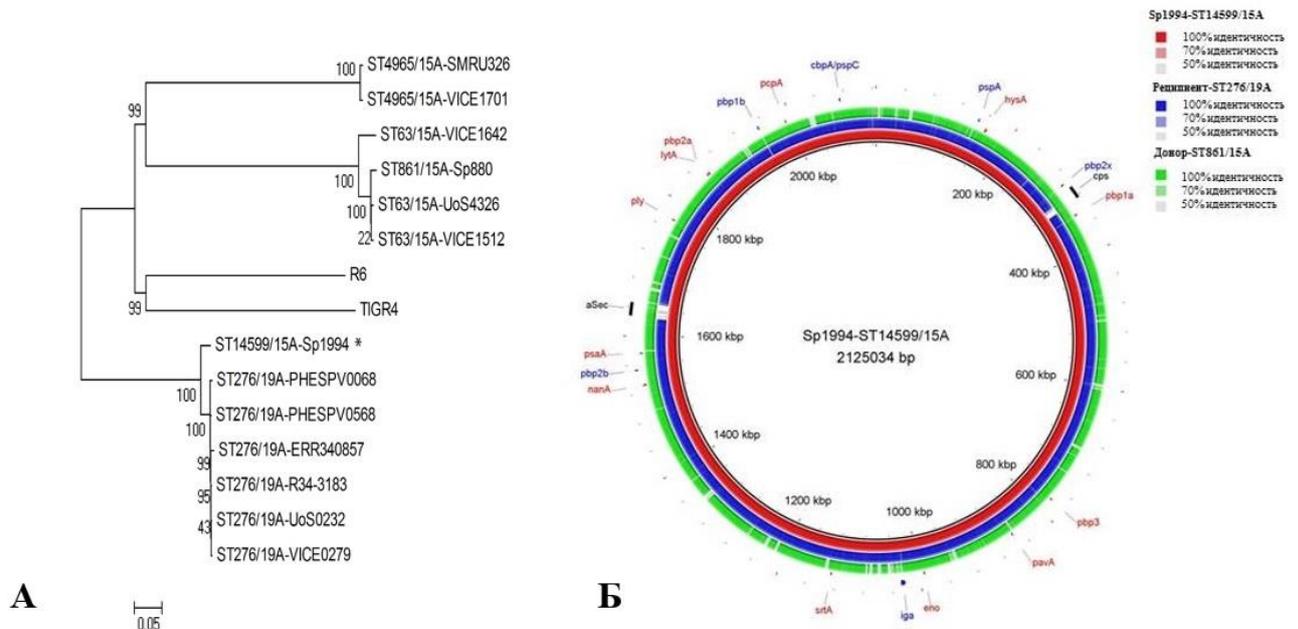


Рисунок 3. Филогенетический анализ (А) на основе полногеномного SNP-анализа репрезентативных изолятов пневмококка, потенциальных реципиентов и доноров *cps*-локуса и (Б) геном рекомбинанта-15А/ST14599 (Sp1994) по сравнению с геномами реципиента-19А/ST276 и донора-15А/ST861.

Примечание: (А) Sp1994 отмечен звездочкой; геномы пневмококков R6 и TIGR4 были использованы в качестве внешней группы сравнения. (Б) 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).

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

Затем было проведено сравнение последовательностей *cps*-локуса и его фланкирующих областей (от 5' *mraW* до 3' *recU*) в трех рассматриваемых геномах (Рисунок 4). *cps*-локус рекомбинанта-15А/ST14599 размером около 18,3 kb имел характерную для серотипа 15А 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 *wzy*, имевших 9, 3 и 3 мутации соответственно, и псевдогена *wciZ* со вставкой размером 12 п.н. в *cps*-локусе у рекомбинанта-15A/ST14599.

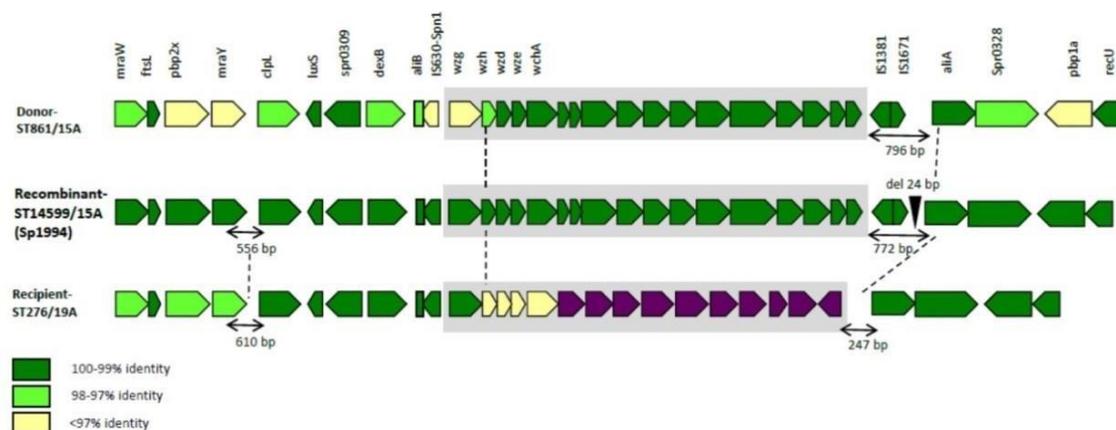


Рисунок 4. Сравнение *cps*-локусов и фланкирующих областей в геноме рекомбинанта-15A/ST14599 (Sp1994), потенциального донора и потенциального реципиента

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.

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 *IS1381* и *IS1671*. В отличие от донора-15A/ST861, рекомбинант-15A/ST14599 обладал двумя небольшими делециями после *IS*-элементов, что указывало на событие рекомбинации. 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 4). 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.

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.

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 ST14599 с множественной лекарственной устойчивостью, возникший в результате переключения локуса полисахаридной капсулы *cps* у пневмококка серотипа 19A.

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.

ПЕРЕЧЕНЬ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. 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**. - 2017. - Vol. 145. № 8. P. 1708–1719
2. Маянский, Н.А. Динамика распространенности серотипов и антибиотикорезистентности носоглоточных пневмококков, выделенных у детей в 2010–2016 гг.: результаты ретроспективного когортного исследования / Н.А. Маянский, Н.М. Алябьева, О.А. Пономаренко, Т.В. Куличенко, И.В. Артемова, А.В. Лазарева, **Е.А. Бржозовская**, О.В. Шамина, Л.К. Катосова // **Вопросы современной педиатрии**. – 2017.- Т. 16. – № 5. – С. 413-423.
3. Маянский, Н.А. Антибиотикорезистентность и клональная эволюция *Streptococcus pneumoniae* серотипа 19А в России, 2002-2013 гг. / Н.А. Маянский, Т.А. Савинова, Н.М. Алябьева, О.А. Пономаренко, **Е.А. Бржозовская**, А.В. Лазарева, Л.К. Катосова, Р.С.

- Козлов // **Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия**. - 2017. - 19. – № 2. – С. 145-151.
4. 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.
5. Мирзаева, А.Р. Назофарингеальное носительство *Streptococcus pneumoniae* у детей младше 5 лет на фоне массовой вакцинации от пневмококка в республике Хакасия / А.Р. Мирзаева, Т.В. Куличенко, О.И. Лебедева, З.А. Алачева, Т.Г. Кузнецова, Н.М. Алябьева, **Е.А. Бржозовская**, Н.А. Маянский // **Российский педиатрический журнал**. - 2019. - Т. 22. – № 4. – С. 196-204.
6. Savinova, T. A multiple drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* of serotype 15A occurring from serotype 19A by capsular switching / T. Savinova, **E. Brzhozovskaya**, D. Shagin, Y. Mikhaylova, A. Shelenkov, Y. Yanushevich, N. Mayanskiy // **Vaccine**. – 2020. – Vol. 38. P. 5114-5118.
7. Алябьева, Н.М. Серотиповой состав *Streptococcus pneumoniae*, выделенных от детей в Москве до и после внедрения 13-валентной пневмококковой конъюгированной вакцины / Н.М. Алябьева, **Е.А. Бржозовская**, О.А. Пономаренко, А.В. Лазарева // **Российский педиатрический журнал**. - 2020. - Т. 23. – № 3. – С. 160-164.

СПИСОК 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)
SLV	Single-locus variant (замена в одном локусе аллельного профиля)
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
Р	категория «резистентный»
Тет	Тетрациклин
ТМП	триметоприм/сульфаметоксазол
Хло	Хлорамфеникол
Цеф	Цефтриаксон
Ч	категория «чувствительный»
Эри	Эритромицин