

Антибиотикорезистентность и клональная эволюция *Streptococcus pneumoniae* серотипа 19А в России, 2002-2013 гг.

Маянский Н.А.¹, Савинова Т.А.¹, Алябьева Н.М.¹, Пономаренко О.А.¹, Бржозовская Е.А.¹, Лазарева А.В.¹, Катосова Л.К.¹, Козлов Р.С.²

¹ ФГАУ «Национальный научно-практический центр здоровья детей» Минздрава России, Москва, Россия

² НИИ антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава России, Смоленск, Россия

Контактный адрес:

Николай Андреевич Маянский
Эл. почта: mayansky@nczd.ru

Ключевые слова: *Streptococcus pneumoniae*, МЛСТ, антибиотикорезистентность, пили.

После введения вакцинации семивалентной пневмококковой конъюгированной вакциной (ПКВ7) частота заболеваний, связанных с невакцинными серотипами пневмококка, в первую очередь с серотипом 19А, возросла, что объясняли феноменом замещения серотипов. Однако в некоторых странах похожая ситуация складывалась и в период, предшествовавший введению вакцины. В настоящем исследовании мы ретроспективно изучили коллекцию неинвазивных 19А-пневмококков (n=49), собранных в России в 2002-2013 гг., и описали изменения их клонального состава в сочетании с чувствительностью к антимикробным препаратам и носительством генов пилей. Большинство (80%) изолятов относилось к четырем глобально распространенным клональным комплексам, СС156, СС230, СС320 и СС663. Пневмококки серотипа 19А в 2010-2013 гг. преимущественно относились к СС230 и СС320 (70%), заместив распространенные ранее СС156 и СС663. Все изоляты СС156, СС320 и СС663 имели значения минимальной подавляющей концентрации (МПК) пенициллина ≥ 1 мг/л, в то время как изоляты СС230 характеризовались умеренными и низкими значениями МПК пенициллина и были полностью чувствительны к амоксициллину и цефтриаксону. Это свидетельствовало о том, что чувствительность к β -лактамам антибиотикам исследованных 19А-пневмококков имела клональный характер. Очевидно, что изменение эпидемиологии пневмококковых серотипов, в том числе серотипа 19А, это многофакторное явление, отражающее влияние вакцинации, практики использования антибиотиков, а также естественные колебания.

Antimicrobial resistance and clonal evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A in Russia during 2002-2013

Mayansky N.A.¹, Savinova T.A.¹, Alyabyeva N.M.¹, Ponomarenko O.A.¹, Brzhozovskaya E.A.¹, Lazareva A.V.¹, Katosova L.K.¹, Kozlov R.S.²

¹ National Scientific and Practical Center of Children's Health of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

² Institute of Antimicrobial Chemotherapy, Smolensk State Medical University, Smolensk, Russia

Contacts:

Nikolay A. Mayansky
E-mail: mayansky@nczd.ru

Key words: *Streptococcus pneumoniae*, MLST, antimicrobial resistance, pili.

After the introduction of the conjugated 7-valent pneumococcal vaccine (PCV7) the incidence of infections, caused by non-vaccine serotypes of *S. pneumoniae*, especially by 19A serotype, significantly increased. But in few countries similar phenomenon was observed before the vaccine introduction. In the present study we evaluated retrospective collection of non-invasive *S. pneumoniae* strains of 19A-serotypes (n=49), isolated in Russia during 2002-2013. Majority (80%) of isolates were represented by four global clonal complexes: CC156, CC230, CC320, and CC663. During 2010-2013 isolates of 19A serotype were mainly represented by CC230 and CC320 (70%), replacing previously predominant CC156 and CC663. All CC156, CC320 and CC663 isolates demonstrated penicillin MIC of ≥ 1 mg/l, at the same time CC230 isolates had lower penicillin MICs and were fully susceptible to amoxicillin and ceftriaxone. This finding suggests that susceptibility to beta-lactams in pneumococci of 19A serotype is clone-associated.

Введение

Streptococcus pneumoniae (пневмококк) является важным патогеном человека, вызывающим широкий спектр инфекций, в том числе тяжелые инвазивные заболевания, включая бактериемию и менингит. Внедрение в практику семивалентной пневмококковой конъюгированной вакцины (ПКВ7) привело к резкому снижению частоты инвазивных пневмококковых инфекций (ИПИ), вызываемых ПКВ7-серотипами [1-3]. Вместе с тем, в пост-ПКВ7 периоде был зарегистрирован подъем

заболеваемости ИПИ, связанный с серотипами пневмококка, не входящими в состав ПКВ7, в первую очередь с серотипом 19А [4, 5]. Так, в США в период с 1999 по 2008 год частота 19А-ИПИ увеличилась с 0,7 до 2,5-2,6 случаев на 100000 населения [6]. Согласно данным, полученным в Германии, доля изолятов серотипа 19А среди ИПИ-пневмококков возросла до 15% в 2010-2011 гг. по сравнению с исходным уровнем 1,7-4,2% в 1997-2006 гг. [7]. После введения универсальной

вакцинации ПКВ7 аналогичная тенденция наблюдалась и в других европейских странах [8-10]. Сложившуюся ситуацию объясняли ПКВ-опосредованным феноменом замещения серотипов, то есть экспансией ранее существовавших минорных популяций пневмококка с не-ПКВ7 серотипами под давлением вакцины [11]. Однако в ряде стран, например, в Израиле и Южной Корее, сообщалось об увеличении частоты серотипа 19А в период, предшествующий введению ПКВ7 [12-14]. Это позволило предположить значение и других бактериальных факторов, помимо серотипа, для распространения 19А-пневмококков.

Экспансия пневмококков серотипа 19А демонстрирует клональный характер. Клоны пневмококка, или клональные комплексы (СС, clonal complex), дифференцируют с помощью метода мультилокусного сиквенс-типирования (МЛСТ) [15-16]. Они могут отличаться по вирулентным свойствам, уровню устойчивости к антимикробным препаратам и приспособленности в целом (фитнесс), а также региональным и временным распределением [17]. Имеющиеся данные указывают на то, что распространение 19А-пневмококков связано с ограниченным набором клонов, который включает СС199, СС230, СС320, СС695, СС994 [6-8, 10, 18-23]. У большинства из этих клонов снижена чувствительность к антибиотикам и регистрируется множественная лекарственная устойчивость (МЛУ; нечувствительность к 3 и более классам антибиотиков). Она обычно сочетается с высоким уровнем нечувствительности к пенициллину, что связано с нарушением структуры пенициллинсвязывающих белков (penicillin binding proteins, PBPs) [24]. Кроме того, пневмококки СС320 – доминирующего и глобально распространенного клона серотипа 19А – и СС199 с сиквенс-типом (sequence type, ST) ST416 несут пили (фимбри), которые могут обеспечивать им дополнительные конкурентные преимущества [10, 23, 25].

Данные о молекулярной эпидемиологии пневмококков в России ограничены [26, 27]. Ранее мы сообщали о выявлении пневмококков СС320 серотипа 19А у нас в стране еще до введения вакцинации ПКВ в Национальный календарь профилактических прививок в 2014 году [28]. В настоящем исследовании мы ретроспективно изучили коллекцию неинвазивных 19А-пневмококков, собранных в России в 2002-2013 гг., и описали изменения их клонального состава в течение этого периода времени в сочетании с чувствительностью к антимикробным препаратам и носительством генов, кодирующих пили.

Материалы и методы

Коллекция изолятов

Данное ретроспективное исследование включило изоляты пневмококков серотипа 19А, полученные от детей из разных регионов России в 2002-2013 гг. Одна часть этой коллекции содержала изоляты, выделенные в НИИ антимикробной химиотерапии (Смоленск) в 2002-2008 гг. [29, 30]. Другая часть коллекции была получена в ходе многоцентрового исследования, проведенного в Москве в 2010-2013 гг. в Научном центре здоровья детей [31]. Изоляты были выделены из респираторных образцов, в том числе из носоглоточных мазков, жидкости среднего уха, мокроты и бронхоальвеолярного лаважа, т.е. были неинвазивными.

Серотипирование и определение чувствительности к антибиотикам

Лабораторные исследования проводили в Научном цен-

тре здоровья детей. Все изоляты повторно серотипировали в реакции набухания капсулы с использованием специфических антисывороток (Staten Serum Institut, Дания). Чувствительность к пенициллину, амоксициллину, цефтриаксону и эритромицину определяли методом Е-тестов (BioMérieux, Франция); чувствительность к клиндамицину, ко-тримоксазолу, тетрациклину и хлорамфениколу тестировали диско-диффузионным методом с использованием дисков Bio-Rad (США). Результаты интерпретировали согласно обновленным стандартам EUCAST-2015. Изоляты с минимальной подавляющей концентрацией (МПК) пенициллина >0,06 мг/л и >2 мг/л рассматривали как нечувствительные к пенициллину и резистентные к пенициллину соответственно. Детекцию детерминант резистентности *erm(B)* и *mef* у эритромицинорезистентных пневмококков проводили методом ПЦР, как описано ранее [31].

МЛСТ

МЛСТ выполняли в соответствии со стандартным протоколом [15, 16]. Анализ последовательностей генов «домашнего хозяйства» с определением сиквенс-типов проводили с использованием базы данных МЛСТ пневмококка [16]. Для определения клональной принадлежности изолятов использовали программу eBURST. Изоляты, у которых совпадали как минимум 5 из 7 аллелей, относили к одному клональному комплексу. Восемь изолятов с новыми аллельными профилями (т.е. новыми комбинациями аллелей) и шесть изолятов с новыми последовательностями аллелей (*recP*, n=2; *dll*, n=4) были внесены в базу данных МЛСТ для присвоения номеров новым сиквенс-типам.

Выявление генов, кодирующих пили типа 1 и 2 (P11 и P12)

Присутствие островков, кодирующих пили (pilus islet, PI), типа 1 (P11) определяли с помощью амплификации внутреннего фрагмента геномного региона P11 (также называемого островком патогенности *rlrA*) с использованием ранее описанных праймеров *RLRA-F* (5'-TCTGATAGATGAGACGCTGTTG-3') и *RLRA-R* (5'-CTCCGCTCTTCTACTACAAG-3') [32]. Для детекции P12 модифицировали праймеры, описанные Bagnoli [33] (*P12-F*: 5'-CGTGGGTATCAGGTGTCSTATG-3' и *P12-R*: 5'-TGACGTGAATAGCTTTTAAAGAA-3').

Статистический анализ

Для статистического анализа использовали программное обеспечение IBM SPSS Statistics, версия 20.0 (IBM Corp, США). Анализ таблиц сопряженности для сравнения пропорций проводили с использованием критерия согласия χ^2 или критерия z. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Описание коллекции пневмококков серотипа 19А

В исследование были включены 49 неинвазивных изолятов пневмококков серотипа 19А, выделенных у детей (медиана возраста 2,8 года, межквартильный размах 2,6 года). Восемнадцать изолятов были выделены в 2003 году в городах европейской части России (Москва, Санкт-Петербург и Смоленск); девять изолятов были выделены в городах азиатской части России в 2002-2008 гг. (Анадырь, Екатеринбург, Иркутск и Новокузнецк); 22 изолята были получены в Москве в 2010-2013 гг. Бактерии выделяли из носоглоточных мазков (67%), жидкости среднего уха (18%), а также образцов из нижних дыхательных путей (мокроты и бронхоальвеолярного лаважа; 15%).

Клональная эволюция и устойчивость к антимикробным препаратам

Разнообразии клональных линий и сиквенс-типов 19А-пнев-

мококков в зависимости от времени выделения и его географии представлено в Таблице 1 и на Рисунке 1. Всего было выявлено 25 сиквенс-типов (14 из них были описаны впервые), принадлежавших к шести основным клонам; три сиквенс-типа не имели определенной клональной принадлежности, т.е. были синглтонами. Распределение клональных комплексов в течение периода исследования существенно различалось ($\chi^2=29,60$, $p<0,001$). Европейские изоляты 2003 г. были представлены двумя клонами, СС663 ($n=12$) и СС156 ($n=6$). В период 2010-2013 гг. распространенность этих клонов снизилась, и они были в значительной степени замещены клонами СС230 и СС320, которые составили 73% (16/22) от всех изолятов, выделенных в 2010-2013 гг. Пять из девяти изолятов из азиатской части России были представлены синглтонами; три изолята принадлежали к СС230.

Наиболее распространенный клон СС663 ($n=14$, 28% от

всей коллекции) был представлен четырьмя родственными сиквенс-типами (табл. 1). СС663 преобладал в европейской части России в 2003 году (67%); в 2010-2013 гг. были выделены только два изолята СС663. Большинство изолятов СС663 (79%) имели МЛУ-фенотип с высокими значениями МПК β -лактамов (табл. 2, 3). Все резистентные к цефтриаксону изоляты ($n=4$; МПК >2 мг/л) принадлежали к этому клональному комплексу (табл. 3). Более того, изоляты ST10434 ($n=5$), входящего в СС663, обладали экстремальной резистентностью, т.к. были нечувствительны к пяти из шести тестированных группам антибиотиков, включая пенициллин, эритромицин, клиндамицин, тетрациклин и хлорамфеникол; они сохраняли чувствительность только к ко-тримоксазолу.

Вторым по распространенности клоном был СС230 ($n=12$, 25% от всей коллекции), который включал восемь сиквенс-типов (табл. 1). Большинство изолятов СС230 было выделено

Таблица 1. Клональные комплексы (СС) и сиквенс-типы (ST) пневмококков серотипа 19А, выделенных в России в 2002-2013 гг.

СС	ST	n (% от всех изолятов)	n (% от изолятов в соответствующей колонке)			Комментарий*
			Европейская часть		Азиатская часть	
			2003	2010-2013	2002-2008	
663		14 (28%)	12 (67%)	2 (9%)**	0	Colombia ^{23F} -26 (ST338)
	663		5	1		
	10434		4	1		
	10435		2	0		
	10515		1	0		
230		12 (25%)	0	9 (41%)**	3 (33%)	Denmark ¹⁴ -32 (ST230)
	230			2	1	
	276			1	0	
	1611			1	0	
	2013			1	0	
	5369			0	1	
	5539			1	0	
	10431			2	1	
	10432			1	0	
					SLV ST10432	
156		7 (14%)	6 (33%)	1 (5%)**	0	Spain ^{9V} -3 (ST156)
	143		0	1		
	10437		4	0		
	10438		1	0		
	10514		1	0		
320		7 (14%)	0	7 (32%)**	0	Taiwan ^{19F} -14 (ST236)
	320			3		
	9656			4		
Синглтоны		5 (10%)	0	0	5 (56%)***	
	10433			0	1	
	10436			0	1	
	10512			0	3	
Разные		4 (10%)	0	3 (13%)	1 (11%)	
	63			1	0	
	5954			0	1	
	10430			1	0	
	10511			1	0	
Итого		49 (100%)	18 (100%)	22 (100%)	9 (100%)	

Примечание.

* РМЭН-клоны и их сиквенс-типы-родоначальники (в скобках), относящиеся к соответствующему клональному комплексу, обозначены жирным шрифтом.

Для впервые описанных сиквенс-типов показано родство с соответствующим сиквенс-типом-родоначальником клона. SLV и DLV (single- и double-locus variant) – аллельные профили, отличающиеся по одному и двум локусам, соответственно, от указанного сиквенс-типа.

** Значимые различия между долями в 2003 и 2010-2013 гг. ($p<0,05$).

*** Значимые различия между долями в 2002-2008 и 2003, 2010-2013 гг. ($p<0,05$).

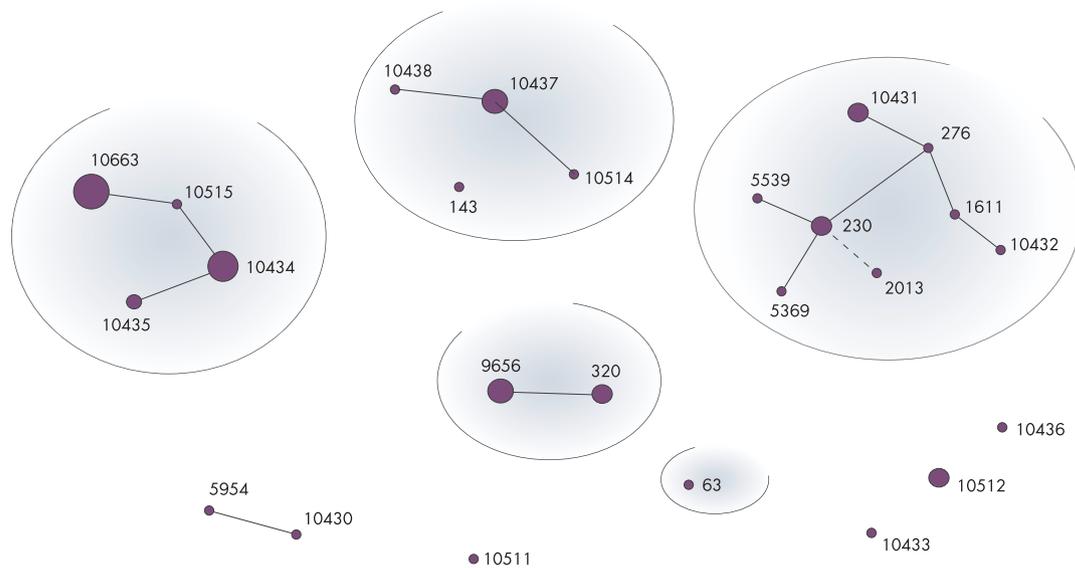


Рисунок 1. Популяционная структура пневмококков серотипа 19А, выделенных в России в 2002-2013 гг., eBURST-анализ.

Примечание. Однолокусные варианты (SLV) обозначены сплошными линиями, двухлокусные варианты (DLV) – пунктирными линиями. Размер круга пропорционален числу изолятов.

в Москве в 2010-2013 гг., составляя 41% от этой части коллекции; три изолята было получено в азиатской части России. СС230 характеризовался умеренными и низкими значениями МПК β-лактамов, в большинстве случаев сохранял чувствительность к клиндамицину, тетрациклину и хлорамфениколу, но обладал резистентностью к ко-тримоксазолу (табл. 2, 3). МЛУ обладали пять (42%) изолятов СС230, которые были резистентны к эритромицину.

СС156 был представлен семью 19А-пневмококками (14% от всей коллекции), относившимися к четырем сиквенс-типам. Шесть из семи изолятов были выделены в городах европейской части России в 2003 году, сформировав субклон в составе трех новых близкородственных сиквенс-типов: ST10437, ST10438 и ST10514 (табл. 1). Эти пневмококки обладали примечательным фенотипом, будучи полностью резистентными к амоксициллину с МПК 4-8 мг/л, которые превышали МПК пенициллина (табл. 3). Кроме того, эти изоляты были устойчивы к ко-тримоксазолу, но сохраняли чувствительность к эритромицину, клиндамицину, тетрациклину и хлорамфениколу.

СС320-пневмококки (n=7, 14% от всей коллекции) были выделены исключительно в 2010-2013 гг., их доля в этот период составила 32% (табл. 1). СС320 был представлен двумя сиквенс-типами: ST320 (n=3) и ST9656 (n=4; новый однолокусный вариант ST320 по аллели *recP*). Все изоляты СС320 имели МЛУ с высокими МПК пенициллина и амоксициллина (диапазон 1-4 мг/л) и резистентностью к эритромицину и ко-тримоксазолу (табл. 2, 3). Все изоляты, кроме одного, имели более высокие значения МПК амоксициллина, чем МПК пенициллина; все СС320-пневмококки были чувствительны к хлорамфениколу.

Девять изолятов представляли различные клональные линии или несвязанные сиквенс-типы. Все шесть пенициллиночувствительных 19А-пневмококков принадлежали к этой группе изолятов и не имели МЛУ (табл. 2, 3). Один синглетон (ST10436) демонстрировал высокие значения МПК пенициллина и амоксициллина (2 мг/л) (табл. 3).

В целом, чувствительность 19А-пневмококков к β-лакта-

ным антибиотикам была сходной в 2003 и 2010-2013 гг. В течение этого периода доля пенициллинорезистентных изолятов (МПК >2 мг/л) снизилась с 28% (5/18) до 5% (1/22) (p=0,041).

Несмотря на то, что доля эритромицинорезистентных 19А-пневмококков осталась неизменной (67-68%), доля изолятов, несущих две детерминанты резистентности к эритромицину *erm(B)* и *mef*, увеличилась с 17% (2/12) в 2003 году до 60% (9/15) в 2010-2013 гг. (p=0,023). Частота хлорамфеникол-резистентных изолятов значительно снизилась с 33% (6/18) до 5% (1/22) (p=0,017). Наоборот, доля резистентных к ко-тримоксазолу изолятов в течение периода исследования увеличилась с 44% (8/18) до 82% (18/22) (p=0,014).

Носительство генов, кодирующих пили, в зависимости от клональной принадлежности и антибиотикорезистентности

У 29 изолятов (59%) было показано наличие P11, из которых у семи изолятов дополнительно присутствовали P12; у 20 изолятов (41%) островков, кодирующих пили, обнаружено не было (табл. 2). Носительство P11 и P12 отличалось явной клональностью. Пневмококки СС663 и СС156 несли P11, но не обладали P12, в то время как в СС320-изолятах были выявлены оба вида PI (табл. 2). Среди остальных пневмококков не было выявлено изолятов, несущих PI, за исключением ST10436, который был P11-положительным. Частота МЛУ была значительно выше среди PI-положительных изолятов (табл. 4). Подавляющее большинство пилированных пневмококков были нечувствительны к β-лактамам антибиотикам, однако все изоляты без PI оставались чувствительны к амоксициллину и цефтриаксону, имея низкие и умеренные значения МПК пенициллина (табл. 4). Кроме того, распространенность эритромицин- и клиндамицин-резистентных пневмококков была выше среди пилированных изолятов (табл. 4).

Обсуждение

В настоящем исследовании мы проанализировали выборку пневмококков серотипа 19А, собранных в период с

Таблица 2. Устойчивость к антимикробным препаратам, генотип резистентности к макролидам и наличие генов, кодирующих пили, в клональных группах пневмококков серотипа 19А

СС (n изолятов)	n (%) изолятов									МЛУ	Генотип резистентности к макролидам**	PI1***	PI2
	Нечувствительные к соответствующему препарату*												
	PEN	AMX	CTX	ERY	CLI	SXT	CHL	TET					
СС663 (14)	14 (100%)	13 (93%)	11 (79%)	14 (100%)	9 (64%)	3 (21%)	7 (50%)	6 (43%)	11 (79%)	<i>erm(B)/mef</i> , 3 (21%); <i>erm(B)</i> , 6 (43%); <i>mef</i> , 3 (21%); нет <i>erm(B)/mef</i> , 2 (14%)	14 (100%)	0	
СС230 (12)	12 (100%)	0	0	5 (42%)	2 (17%)	12 (100%)	1 (8%)	2 (17%)	5 (42%)	<i>erm(B)/mef</i> , 2 (40%); <i>mef</i> , 3 (60%)	0	0	
СС320 (7)	7 (100%)	7 (100%)	7 (100%)	7 (100%)	6 (86%)	7 (100%)	0	4 (57%)	7 (100%)	<i>erm(B)/mef</i> , 6 (86%); <i>mef</i> , 1 (14%)	7 (100%)	7 (100%)	
СС156 (7)	7 (100%)	7 (100%)	4 (57%)	1 (14%)	1 (14%)	6 (86%)	0	1 (14%)	1 (14%)	<i>erm(B)</i> , 1/1	7 (100%)	0	
СС63 (1)	0	0	0	1	1	0	0	1	1	<i>erm(B)</i> , 1/1	0	0	
Синглетон, ST10433 (1)	1	0	0	1	1	0	0	0	1	<i>erm(B)</i> , 1/1	0	0	
Синглетон, ST10436 (1)	1	1	1	0	0	1	0	0	0	Нет ERY-резистентных	1	0	
PEN-S**** (6): СС180, ST10511 (1); Синглетон, ST10512 (3); Группа двух сиквенс-типов, ST5954 (1), ST10430 (1)	0	0	0	0	0	4 (67%)	0	1 (17%)	0	Нет ERY-резистентных	0	0	
Итого (49)	43 (88%)	28 (57%)	23 (47%)	29 (59%)	20 (41%)	33 (67%)	8 (16%)	13 (27%)	25 (51%)	<i>erm(B)/mef</i> , 11 (38%); <i>erm(B)</i> , 9 (31%); <i>mef</i> , 7 (24%); нет <i>erm(B)/mef</i> , 2 (7%)	29 (59%)	7 (14%)	

Примечание.

* AMX – амоксициллин; CHL – хлорамфеникол; CLI – клиндамицин; CTX – цефтриаксон; ERY – эритромицин; PEN – пенициллин; SXT – ко-тримоксазол; TET – тетрациклин; МЛУ – множественная лекарственная устойчивость.

** Процент показывает долю среди эритромицинорезистентных изолятов, несущих соответствующую детерминанту резистентности.

*** PI (*pilus islet*) – островок, кодирующий пили.

**** PEN-S (*penicillin-susceptible*) – группа из шести пенициллиночувствительных изолятов.

Таблица 3. Чувствительность к β-лактамам у пневмококков серотипа 19А

СС	n (%) изолятов; диапазон МПК (мг/л)*								
	PEN			AMX			CTX		
	S (≤0,06)	I (>0,06; ≤2)	R (>2)	S (≤0,5)	I (>0,5; ≤2)	R (>2)	S (≤0,5)	I (>0,5; ≤2)	R (>2)
Всего, n (%)	6 (12%)	32 (65%)	11 (23%)	21 (43%)	14 (29%)	14 (29%)	26 (53%)	19 (39%)	4 (8%)
СС663 (n=14)	0	5 (36%)	9 (64%)	1 (7%)	11 (79%)	2 (14%)	3 (21%)	7 (50%)	4 (29%)
		1,0-16			0,5-12			0,250-32	
СС230 (n=12)	0	12 (100%)	0	12 (100%)	0	0	12 (100%)	0	0
		0,094-0,5			0,047-0,5			0,06-0,5	
СС320 (n=7)	0	7 (100%)	0	0	1 (14%)	6 (86%)	0	7 (100%)	0
		1,0-2,0			1,0-4,0**			1-1,5	
СС156 (n=7)	0	5 (71%)	2 (29%)	0	1 (14%)	6 (86%)	3 (43%)	4 (57%)	0
		1,0-4,0			1,5-8,0**			0,5-1,0	
СС63, ST63 (n=1)	0	1	0	1	0	0	1	0	0
		0,125			0,047			0,250	
Синглетон, ST10433 (n=1)	0	1	0	1	0	0	1	0	0
		0,5			0,5			0,25	
Синглетон, ST10436 (n=1)	0	1	0	0	1	0	0	1	0
		2			2			1,5	
PEN-S*** (n=6)	6 (100%)	0	0	6 (100%)	0	0	6 (100%)	0	0
		0,003-0,016			0,01-0,032			0,016-0,08	

Примечание.

* PEN – пенициллин; AMX – амоксициллин; CTX – цефтриаксон. S – чувствительные; I – умеренно резистентные; R – резистентные.

** У шести из семи изолятов значения МПК амоксициллина были выше, чем МПК пенициллина.

*** PEN-S (*penicillin-susceptible*) – группа из шести пенициллиночувствительных изолятов; описана в Таблице 2.

Таблица 4. Устойчивость к антимикробным препаратам и носительство генов, кодирующих пилы, у пневмококков серотипа 19А

Препарат*	PI-отрицательные** (n=20)	PI-положительные** (n=29)	p***
	n (%) нечувствительных изолятов		
PEN	14 (70%)	29 (100%)	<0,001
AMX	0	28 (97%)	<0,001
CTX	0	23 (79%)	<0,001
ERY	7 (35%)	22 (76%)	0,004
CLI	4 (20%)	16 (55%)	0,003
SXT	16 (80%)	17 (59%)	0,117
CHL	1 (5%)	7 (24%)	0,075
TET	16 (80%)	20 (69%)	0,390
МЛУ (есть)	6 (30%)	19 (66%)	0,015

Примечание.

* AMX – амоксициллин; CHL – хлорамфеникол; CLI – клиндамицин; CTX – цефтриаксон; ERY – эритромицин; PEN – пенициллин; SXT – ко-тримоксазол; TET – тетрациклин; МЛУ – множественная лекарственная устойчивость.

** PI (pilus islet) – островок, кодирующий пилы. PI-отрицательные – изоляты, не несущие PI; PI-положительные – изоляты, несущие PI1 или PI2 вместе с PI2.

*** Статистически значимые различия в доле нечувствительных изолятов между PI-отрицательными и PI-положительными пневмококками показаны жирным шрифтом.

2002 по 2013 гг. в нескольких регионах России. В ней доминировали четыре клональных комплекса, включая СС156, СС230, СС320 и СС663, которые составили 80% всей коллекции. Перечисленные клональные линии связаны с главными международными клонами, циркулирующими по всему миру. СС156 наименее представлен среди пневмококков серотипа 19А, и его распространенность существенно не изменилась под влиянием ПКВ [6, 7, 13, 18, 21]. Похожая картина сложилась с клоном PMEN Colombia^{23F}-26, к которому по результатам eBURST-анализа была отнесена наша клональная группа ST663 [6, 18]. Литературные сообщения о пневмококках ST663 единичны, однако свидетельствуют об их высокой устойчивости к β-лактамам антибиотикам и связи с тяжелыми ИПИ [34, 35]. ST663 19А-пневмококки имели заметную распространенность (9,6%) в период до введения ПКВ7 в Болгарии [21]. В настоящем исследовании СС663 доминировал в европейской части России в 2003 году. Интересно, что самый первый изолят 19А-пневмококка с ST663, зарегистрированный в базе данных pubmlst.org/spneumoniae, был выделен в России в 1987 году [16]. Таким образом, возможно, что ST663 и родственные сиквенс-типы были локально распространены в Восточной Европе в 1990-х и начале 2000-х годов. Следует отметить, что в течение периода исследования мы не обнаружили ни одного изолята, принадлежащего к СС199, который был широко распространен в пре-ПКВ7 период в США и Европе [7, 18].

В отличие от клонов, описанных выше, в пост-ПКВ7 периоде существенно возросла доля СС230 и СС320. В то время как экспансия СС230 была отмечена лишь в нескольких странах, таких как Германия и Португалия [7, 8], СС320 в настоящее время является одним из наиболее распространенных клонов 19А-пневмококков на многих территориях, включая США, Канаду, Италию, Испанию [6, 18, 20, 22]. Наши результаты показали, что в 2010-2013 гг. СС230 и СС320, которые в основном вытеснили СС156 и СС663, составляли более 70% пневмококков серотипа 19А, циркулирующих в европейской

части России. 19А-пневмококки СС320 описывались в России, начиная с 2010 года [28]. Мы обнаружили только два сиквенс-типа, связанных с СС320, включая идентификационный для этого клона ST320 и новый ST9656, впервые выявленный в России. Тот факт, что исследованная нами коллекция изолятов была собрана до включения ПКВ в Национальный календарь профилактических прививок в 2014 году, допускает предположение о ПКВ-независимой эволюции клональной структуры пневмококков серотипа 19А в России, как это случилось и в некоторых других регионах [12-14].

Экспансия лишь небольшого числа клонов серотипа 19А предполагает наличие у них конкурентных преимуществ на уровне генотипа. Помимо ПКВ7-опосредованного отбора, клональный успех СС320 и других клонов 19А-пневмококков может быть связан с селективным давлением антибиотиков [17, 36]. Действительно, все исследованные нами изоляты СС320 имели МЛУ с высокими значениями МПК β-лактамов, что согласуется с данными других авторов [6, 13, 22]. Вместе с тем, в европейской части России СС320 заменил другой резистентный клон, СС663, что предполагало участие дополнительных бактериальных факторов в обеспечении конкурентоспособности. В частности, в модельных исследованиях на мышах 19А-пневмококки, относящиеся к ST320, отличались более высокой колонизационной активностью по сравнению с бактериями ST236, предшественника ST320 [14]. Повышенная способность к колонизации клона СС320 может быть связана с наличием пилей PI1 и PI2 [10, 23, 25, 40-42], которые способствуют адгезии пневмококков на эукариотических клетках [33]. В настоящем исследовании СС320 был единственной клональной линией, обладающей пиллями двух типов, а изоляты СС663 имели только PI1. Наличие пилей является клональным признаком [25, 32], и большинство нечувствительных к антибиотикам клонов обладают этими структурами [40]. Таким образом, сочетание наличия пилей и устойчивости к антимикробным препаратам может обеспечивать конкурентные преимущества подобным клональным линиям.

Все изоляты СС156, СС320 и СС663 имели значения МПК пенициллина ≥ 1 мг/л, в то время как представители СС230 обладали умеренными и низкими значениями МПК пенициллина и были полностью чувствительны к амоксициллину и цефтриаксону. Это свидетельствовало о том, что чувствительность к β-лактамам антибиотикам исследованных 19А-пневмококков имела клональный характер.

Начиная с 2010 года, расширенная 13-валентная ПКВ, включающая в свой состав серотип 19А, приходит на замену ПКВ7. ПКВ13 продемонстрировала высокую эффективность в снижении частоты ИПИ, связанных с 19А-пневмококками [41, 42]. Эффективно вытесняя вакцинные серотипы из циркуляции, вакцины ПКВ оказывают гораздо более широкое воздействие на микробное сообщество, чем предполагалось ранее [43, 44]. В недавней работе Galanis и соавторы показали, что вакцинация ПКВ способствовала распространению новых или минорных пневмококковых клонов и увеличивала клональное разнообразие пневмококков не только у вакцинированных, но и у невакцинированных лиц [44]. Эти данные свидетельствуют о возможности экспансии отдельных серотипов, в том числе и в ПКВ-невакцинированной популяции. Очевидно, что изменение эпидемиологии пневмококковых серотипов, включая серотип 19А, это многофакторное явление, отражающее влияние вакцинации, практики использования антибиотиков, а также естественные колебания.

Литература

- Pilishvili T., Lexau C., Farley M., et al. Sustained reductions in invasive pneumococcal disease in the era 283 of conjugate vaccine. *J Infect Dis.* 2010;201:32-41.
- Tan T. Pediatric invasive pneumococcal disease in the United States in the era of pneumococcal conjugate vaccines. *Clin Microbiol Rev.* 2012;25:409-419.
- van der Linden M., Falkenhörst G., Perniciaro S., et al. Effects of infant pneumococcal conjugate vaccination on serotype distribution in invasive pneumococcal disease among children and adults in Germany. *PLoS One.* 2015;10:e0131494.
- Richter S., Heilmann K., Dohrn C., et al. Pneumococcal serotypes before and after introduction of conjugate vaccines, United States, 1999-2011. *Emerg Infect Dis.* 2013;19:1074-1083.
- Hackel M., Lascols C., Bouchillon S., et al. Serotype prevalence and antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates among global populations. *Vaccine.* 2013;31:4881-4887.
- Beall B., Gertz R., Hulkower R., et al. Shifting genetic structure of invasive serotype 19A pneumococci in the United States. *J Infect Dis.* 2011;203:1360-1368.
- van der Linden M., Reinert R., Kern W., et al. Epidemiology of serotype 19A isolates from invasive pneumococcal disease in German children. *BMC Infect Dis.* 2013;13:70.
- Aguiar S., Pinto F., Nunes S., et al. Denmark14-230 clone as an increasing cause of pneumococcal infection in Portugal within a background of diverse serotype 19A lineages. *J Clin Microbiol.* 2010;48:2 101-108.
- Reinert R., Jacobs M., Kaplan S. Pneumococcal disease caused by serotype 19A: review of the literature and implications for future vaccine development. *Vaccine.* 2010;28:4249-4259.
- Del Grosso M., Camilli R., D'Ambrosio F., et al. Increase of pneumococcal serotype 19A in Italy is due to expansion of the pilated clone ST416/CC199. *J Med Microbiol.* 2013;62:1220-1225.
- Weinberger D., Malley R., Lipsitch M. Serotype replacement in disease after pneumococcal vaccination. *Lancet.* 2011;378:1962-1973.
- Choi E., Kim S., Eun B., et al. *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A in children, South Korea. *Emerg Infect Dis.* 2008;14:275-281.
- Dagan R., Givon-Lavi N., Leibovitz E., et al. Introduction and proliferation of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A clones that cause acute otitis media in an unvaccinated population. *J Infect Dis.* 2009;199:776-785.
- Hsieh Y., Lin T., Chang K., et al. Expansion and evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A ST320 clone as compared to its ancestral clone, Taiwan19F-14 (ST236). *J Infect Dis.* 2013;208:203-210.
- Enright M., Spratt B. A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. *Microbiology.* 1998;144:3049-3060.
- Multilocus sequence typing: *Streptococcus pneumoniae* [database online]. Available at: <http://pubmlst.org/spneumoniae>.
- Henriques-Normark B., Blomberg C., Dagerhamn J., et al. The rise and fall of bacterial clones: *Streptococcus pneumoniae*. *Nat Rev Microbiol.* 2008;6:827-837.
- Moore M., Gertz R. Jr., Woodbury R., et al. Population snapshot of emergent *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A in the United States, 2005. *J Infect Dis.* 2008;197:1016-1027.
- Hulten K., Kaplan S., Lamberth L., et al. Changes in *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A 322 invasive infections in children from 1993 to 2011. *J Clin Microbiol.* 2013;51:1294-1297.
- Gene A., del Amo E., Inigo M., et al. Pneumococcal serotypes causing acute otitis media among children in Barcelona (1992-2011): emergence of the multiresistant clone ST320 of serotype 19A. *Pediatr Infect Dis J.* 2013;32:e128-133.
- Setchanova L., Alexandrova A., Dacheva D., et al. Dominance of multidrug-resistant Denmark14-32 (ST230) clone among *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A isolates causing pneumococcal disease in Bulgaria from 1992 to 2013. *Microb Drug Resist.* 2015;21:35-42.
- Golden A., Rosenthal M., Fultz B., et al. Characterization of MDR and XDR *Streptococcus pneumoniae* in Canada, 2007-13. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70:2199-2202.
- Metcalf B., Gertz R. Jr., Gladstone R., et al. Strain features and distributions in pneumococci from children with invasive disease before and after 13-valent conjugate vaccine implementation in the USA. *Clin Microbiol Infect.* 2016;22(1):60.e9-60.e29.
- Hakenbeck R., Brückner R., Denapate D., et al. Molecular mechanisms of β -lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Future Microbiol.* 2012;7:395-410.
- Zähler D., Gudlavalleti A., Stephens D. Increase in pilus islet 2-encoded pili among isolates, Atlanta, Georgia, USA. *Emerg Infect Dis.* 2010;16:955-962.
- Sidorenko S.V., Savinova T.A., Il'ina E.N., Syrochkina M.A. Population structure of pneumococci with reduced sensitivity to penicillin and prospects of antipneumococcal vaccination to contain the spread of antibacterial resistance. *Antibiotiki i himioterapija.* 2011;5:14-18. Russian. (Сидоренко С.В., Савинова Т.А., Ильина Е.Н., Сырочкина М.А. Популяционная структура пневмококков со сниженной чувствительностью к пенициллину и перспективы антипневмококковой вакцинации для сдерживания распространения антибактериальной резистентности. *Антибиотики и химиотерапия.* 2011;5:14-18.)
- Majanskij N.A., Aljab'eva N.M., Lazareva M.A., et al. Antimicrobial Susceptibility, Clonal and Serotype Diversity of *Streptococcus pneumoniae* Isolated from Children with Acute Otitis Media in Moscow. *Klinicheskaja mikrobiologija i antimikrobnaja himioterapija.* 2016;18(2):84-92. Russian. (Маянский Н.А., Алябьева Н.М., Лазарева М.А. и соавт. Чувствительность к антибиотикам, клональное и серотиповое разнообразие пневмококков у детей с острым средним отитом в г. Москве. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2016;18(2):84-92.)
- Mayanskiy N., Alyabieva N., Ponomarenko O., et al. Bacterial etiology of acute otitis media and characterization of pneumococcal serotypes and genotypes among children in Moscow, Russia. *Pediatr Infect Dis J.* 2015;34:255-260.
- Strachounski L., Kozlov R., Appelbaum P., et al. Antimicrobial resistance of nasopharyngeal pneumococci from children from day-care centers and orphanages in Russia: results of a unique prospective multicentre study. *Clin Microbiol Infect.* 2006;12:853-866.
- Kozlov R.S., Chagarjan A.N., Kozlova L.V., Murav'ev A.A. Serological Characteristics and Antimicrobial Susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* Isolated from Children 0-5 Years of Age in Different Regions of Russia. *Klinicheskaja mikrobiologija i antimikrobnaja himioterapija.* 2011;13(2):177-187. Russian. (Козлов Р.С., Чагарян А.Н., Козлова Л.В., Муравьев А.А. Серологическая характеристика и чувствительность к антибиотикам пневмококков, выделенных у детей в возрасте до 5 лет в отдельных регионах Российской Федерации. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2011;13(2):177-187.)
- Mayanskiy N., Alyabieva N., Ponomarenko O., et al. Serotypes and antibiotic resistance of non-invasive *Streptococcus pneumoniae* circulating in pediatric hospitals in Moscow, Russia. *Int J Infect Dis.* 2014;20:58-62.
- Aguiar S., Serrano I., Pinto F., et al. The presence of the pilus locus is a clonal property among pneumococcal invasive isolates. *BMC Microbiol.* 2008;8:41.
- Bagnoli F., Moschioni M., Donati C., et al. A second pilus type in *Streptococcus pneumoniae* is prevalent in emerging serotypes and mediates adhesion to host cells. *J Bacteriol.* 2008;190:5480-5492.
- Gertz R. Jr., McEllistrem M., Boxrud D., et al. Clonal distribution of invasive pneumococcal isolates from children and selected adults in the United States prior to 7-valent conjugate vaccine introduction. *J Clin Microbiol.* 2003;41:4194-4216.
- Shouval D., Porat N., Dagan R., et al. Bacteremia caused by a highly-resistant *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A circulating in a daycare center. *Int J Infect Dis.* 2010;14(Suppl 3):e253-255.
- Klugman K. The successful clone: the vector of dissemination of resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 2002;50(Suppl S2):1-5.
- Sjöström K., Blomberg C., Fernebro J., et al. Clonal success of pilated penicillin nonsusceptible pneumococci. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104:12907-12912.
- McElligott M., Vickers I., Meehan M., et al. Noninvasive pneumococcal clones associated with antimicrobial nonsusceptibility isolated from children in the era of conjugate vaccines. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59:5761-5767.
- Siira L., Jalava J., Kajjalainen T., et al. Antimicrobial resistance in relation to sero- and genotypes among invasive *Streptococcus pneumoniae* in Finland, 2007-2011. *Microb Drug Resist.* 2014;20:124-130.
- Hjálmarsson M., Pétursdóttir B., Erlendsdóttir H., et al. Prevalence of pilus genes in pneumococci isolated from healthy preschool children in Iceland: association with vaccine serotypes and antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70:2203-2208.
- Moore M., Link-Gelles R., Schaffner W., et al. Effectiveness of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine for prevention of invasive pneumococcal disease in children in the USA: a matched case-control study. *Lancet Respir Med.* 2016;4:399-406.
- van der Linden M., Falkenhörst G., Perniciaro S., et al. Effectiveness of pneumococcal conjugate vaccines (PCV7 and PCV13) against invasive pneumococcal disease among children under two years of age in Germany. *PLoS One.* 2016;11:e0161257.
- Biesbroek G., Wang X., Keijsers B., et al. Seven-valent pneumococcal conjugate vaccine and nasopharyngeal microbiota in healthy children. *Emerg Infect Dis.* 2014;20:201-210.
- Galanis I., Lindstrand A., Darenberg J., et al. Effects of PCV7 and PCV13 on invasive pneumococcal disease and carriage in Stockholm, Sweden. *Eur Respir J.* 2016;47:1208-1218.