

Савинова Татьяна Александровна

**Генетическое разнообразие и молекулярные основы
резистентности *Streptococcus pneumoniae* к β -лактамным
антибиотикам**

03.02.03 – Микробиология,
03.01.03 – Молекулярная биология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2011

Работа выполнена в государственном образовательном учреждении дополнительного профессионального образования «Российская Медицинская Академия Последипломного Образования» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации

Научные руководители: доктор медицинских наук, профессор
Сидоренко Сергей Владимирович

доктор биологических наук, доцент
Ильина Елена Николаевна

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, профессор
Бондаренко Виктор Михайлович

доктор медицинских наук, профессор
Митрохин Сергей Дмитриевич

Ведущая организация: Государственное Образовательное Учреждение Высшего профессионального образования «Санкт-петербургская государственная педиатрическая медицинская академия Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию Российской Федерации» (ГОУ ВПО СПб ГПМА Росздрава)

Защита диссертации состоится « 25 » марта 2011 г. в 11 часов на заседании совета Д 208.130.01 при ФГБУ «НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздравсоцразвития России (**123098 г. Москва, ул. Гамалеи, д.18**)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздравсоцразвития России.

Автореферат разослан « 25 » февраля 2011 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор

Русакова Е.В.

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Streptococcus pneumoniae - возбудитель менингита, пневмонии, обострений хронического бронхита, отита и синусита, относится к клинически и социально наиболее значимым микроорганизмам. Формирование пневмококками, как и другими микроорганизмами, устойчивости к антибактериальным препаратам является основной причиной снижения эффективности этиотропной терапии инфекционных болезней, удлинения сроков госпитализации пациентов и увеличения летальности. Применительно к пневмококкам наиболее актуальной представляется проблема их устойчивости к β -лактамным антибиотикам (БЛА) (Hansman D.V., 1967) поскольку именно эти препараты составляют основу этиотропной терапии пневмококковых инфекций.

Устойчивость пневмококков к БЛА опосредуется достаточно сложными и не до конца понятными механизмами. К настоящему времени в развитии резистентности однозначно установлена роль модификации генов трех пенициллинсвязывающих белков (ПСБ) – ПСБ1а, ПСБ2б и ПСБ2х (Stanhope M.J., 2008; Tait-Kamradt A.G., 2009). Продуктами модифицированных генов являются ПСБ со сниженной аффинностью к БЛА. В формировании устойчивости обсуждается также возможная роль некоторых других механизмов (Hakenbeck R., 1999; Filipe S.R., 2000; Smith A.M., 2001; Dias R., 2009).

Закономерности распространения антибактериальной резистентности среди пневмококков во многом определяются особенностями структуры популяции этих бактерий. Согласно современным представлениям в глобальной популяции пневмококков одновременно происходят процессы формирования, распространения и эволюции отдельных генетических линий (клонов или клональных комплексов), а также горизонтальный обмен генов (вирулентности, резистентности, капсульных полисахаридов) между ними. Происходит также горизонтальный обмен генами с родственными микроорганизмами (*Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* и др.). Однако многие детали этих процессов на глобальном и локальном (Российская Федерация) уровнях остаются неизученными.

Кроме того в настоящее время актуальна проблема точной идентификации пневмококков. Наиболее часто сложности в идентификации встречаются при исследовании образцов из респираторного тракта. Населяющие одни и те же экологические ниши *S. mitis* и *S. oralis* настолько близки к *S. pneumoniae*, что их дифференциальная идентификация сильно затруднена. Ошибочная идентификация *S. mitis* и *S. oralis* как *S. pneumoniae* может приводить к искажению данных об этиологии респираторных инфекций и распространении антибиотикорезистентности.

Таким образом, разработка и адаптация методов микробиологического и молекулярного контроля над распространением резистентности к БЛА среди пневмококков представляется актуальной проблемой, решение которой подразумевает фундаментальные и медицинские аспекты исследования.

Цель исследования

Изучить динамику распространения изолятов *S. pneumoniae*, устойчивых к БЛА, и оценить их разнообразие на территории Российской Федерации (РФ) методами бактериологии и молекулярно-генетического анализа.

Задачи исследования

1. Определить чувствительность клинических изолятов *S. pneumoniae* к БЛА и охарактеризовать динамику распространения резистентности;
2. Разработать высокопроизводительный метод выявления в генах ПСБ *S. pneumoniae* мутаций, приводящих к формированию резистентного к БЛА фенотипа;
3. Оценить возможность прогнозирования устойчивости *S. pneumoniae* к БЛА на основании анализа генов ПСБ (*pbpA*, *pbp2b*, *pbpX*);
4. Оптимизировать протокол ПЦР-типирования капсульных антигенов, пригодный для установления серотипа *S. pneumoniae*, применительно к микробной популяции, циркулирующей на территории РФ;
5. Охарактеризовать с помощью метода ПЦР-типирования капсульных антигенов и с помощью мультилокусного сиквенс-типирования популяционную структуру *S. pneumoniae* с повышенной устойчивостью к БЛА.

Научная новизна

Проведена фенотипическая, а также генетическая характеристика клинических изолятов *S. pneumoniae*, резистентных к БЛА, в том числе разработан высокопроизводительный метод, основанный на реакции минисеквенирования с последующим масс-спектрометрическим анализом, позволяющий быстро и эффективно выявлять мутации, приводящие к формированию резистентного фенотипа. С помощью разработанного метода проведена оценка распространенности значимых мутаций среди клинических изолятов *S. pneumoniae*.

Впервые охарактеризована популяционная структура изолятов *S. pneumoniae* с повышенной устойчивостью к пенициллину, циркулирующих на территории РФ с помощью перспективного метода мультилокусного сиквенс-типирования (Multi Locus Sequence Typing, MLST), часть изолятов охарактеризована методом ПЦР-типирования капсульных антигенов, позволяющим установить принадлежность *S. pneumoniae* к определенному серотипу. Установлено, что среди изолятов с повышенной устойчивостью к пенициллину 39,7 % относятся к трем глобально распространенным клональным комплексам (СС81, СС271 и СС315). Данные об изолятах, выделенных на территории РФ, внесены в международную базу данных MLST (<http://spneumoniae.mlst.net>).

Практическая значимость

Полученные данные о динамике распространения изолятов *S. pneumoniae*, резистентных к БЛА в различных регионах РФ могут быть использованы для оптимизации антибактериальной терапии респираторных инфекций. Так, данные полученные в ходе исследования, позволяют прогнозировать высокую эффективность бензилпенициллина, амоксициллина и цефотаксима при респираторных пневмококковых инфекциях.

Разработанный метод выявления мутаций в генах ПСБ может быть положен в основу создания диагностических тест-систем, направленных на обнаружение устойчивости *S. pneumoniae* к БЛА, в том числе непосредственно в клиническом материале больного.

Результаты исследования также имеют значение для понимания механизмов распространения, циркуляции и эволюции изолятов *S. pneumoniae*. Так, установлено, что устойчивость к пенициллину клинических изолятов *S. pneumoniae*, циркулирующих на территории РФ, связана, преимущественно, с распространением глобальных, множественно-устойчивых клональных комплексов этих бактерий; также установлено, что большинство таких изолятов относятся к «вакцинным», что говорит о перспективности антипневмококковой вакцинации как пути сдерживания распространения антибактериальной резистентности среди этих бактерий.

Результаты диссертационной работы были систематизированы и внедрены в педагогическую практику кафедры микробиологии ГОУ ДПО РМАПО Минздравсоцразвития России. В приложении представлены копии документов, подтверждающих практическую значимость работы («Акт внедрения результатов диссертационной работы в практику кафедры микробиологии РМАПО»).

Основные положения, выносимые на защиту

1. На территории РФ наблюдается тенденция к росту устойчивости пневмококков к БЛА на фоне выраженных колебаний этого показателя в отдельных регионах;
2. Отобраны специфичные мутации в генах ПСБ (*pbpA*, *pbp2b*, *pbpX*), обнаружение которых позволяет прогнозировать устойчивость *S. pneumoniae* к БЛА;
3. Популяция *S. pneumoniae* с повышенной устойчивостью к БЛА, циркулирующая на территории РФ, характеризуется выраженной клональностью и представлена в основном серотипами пневмококка, входящими в состав 13-валентной пневмококковой вакцины.

Апробация работы

Результаты исследований по теме диссертации доложены, обсуждены, опубликованы в материалах Международной конференции по антимикробным препаратам и химиотерапии (США, 2006), Европейского конгресса по клинической микробиологии и инфекционным болезням (Германия, 2007; Финляндия, 2009), II Ежегодного Всероссийского конгресса по инфекционным болезням (Россия, 2010), одобрены на заседаниях кафедры микробиологии ГОУ ДПО РМАПО Минздравсоцразвития России в 2007 - 2010 гг.

Апробация диссертации состоялась на заседании кафедры микробиологии ГОУ ДПО РМАПО Минздравсоцразвития России 24 мая 2010 года.

Личный вклад соискателя. Диссертационная работа выполнена самостоятельно. Отдельные этапы работы были выполнены совместно с соискателем Боровской А.Д.

Публикация научных исследований. По теме диссертации опубликовано 12 научных работ, в том числе 3 работы опубликованы в изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 143 листах и включает разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты», «Обсуждение», «Заключение», «Выводы» и «Список литературы», который включает 317 источников, из них 15 - отечественных авторов, 302 - зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 17 таблицами и 27 рисунками.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Микробиологические исследования. В исследование были включены клинические изоляты *S. pneumoniae*, выделенные в течение 1998-2007 гг. в лабораториях лечебных учреждений Москвы, Санкт-Петербурга, Ярославля, Томска, Иркутска и Владивостока от пациентов с респираторными инфекциями различной локализации (острые синуситы, острые средние отиты, обострение хронических бронхитов, пневмонии, пневмонии с бактериемией, менингиты, конъюнктивиты). Источниками выделения бактерий были: мокрота, аспираты из синуса и среднего уха, мазки из зева, кровь, спинномозговая и плевральная жидкости и др.

Идентификацию *S. pneumoniae* осуществляли на основании культуральных, морфологических свойств, отрицательных результатов каталазного теста, чувствительности к оптохину, а также с помощью коммерческих тест-систем Slidex pneumo-Kit (BioMerieux, Франция) и BBL Crystal Gram-Positive (BD, США). В качестве контроля использован референтный штамм *S. pneumoniae* ATCC 49619.

Чувствительность изолятов к бензилпенициллину, ампициллину, амоксициллину, цефуроксиму, цефотаксиму, а также эритромицину, кларитромицину, клиндамицину, левофлоксацину, тетрациклину, хлорамфениколу и котримоксазолу (все препараты производства Sigma, США) определяли методом серийных микроразведений в бульоне Мюллера-Хинтона (BBL, США) согласно рекомендациям Института клинических и лабораторных стандартов (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI, 2009) и Методическим указаниям по определению чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам (Методические указания, утвержденные Г.Г. Онищенко, 2004) в 96-луночных планшетах для иммунологических исследований.

Определение серотипов пневмококков проводили в реакции набухания со специфическими антисыворотками.

Выделение ДНК. ДНК из суточной культуры, выращенной на твердом колумбийском агаре (BioMerieux, Франция), выделяли с помощью набора «ДНК-экспресс» (ООО НПФ «Литех», г. Москва), согласно инструкции.

Полимеразная цепная реакция. Для амплификации фрагментов генов *S. pneumoniae*, связанных с механизмами формирования резистентности к БЛА (*pbpX*, *pbp2b*, *pbpA*), использовали оригинальные праймеры, представленные в табл. 1.

Для амплификации фрагментов генов «домашнего хозяйства» с целью последующего мультилокусного сиквенс-типирования использовали ранее рекомендованные праймеры (Enright M.C., 1998).

Для ПЦР-типирования капсульных антигенов использовали предложенные ранее праймеры, специфичные к вариабельным участкам генов *cps*, кодирующих капсульные полисахариды следующих серотипов/серогрупп: 1, 2, 3, 4, 5, 6A/6B/6C, 7F/7A, 7C/(7B/40), 8, 9L/9N, 9V/9A, 10A, 10F/(10C/33C), 11A/11D, 12F/(12A/44/46), 13, 14, 15A/15F, 15B/15C, 16F, 17F, 18A/18B/18C/18F, 19A, 19F, 20, 21, 22A/22F, 23A, 23B, 23F, 24A/24B/24F, 31, 33F/(33A/37), 34, 35A/(35C/42), 35B, 35F/47F, 38F/25F, 39F (Pai R., 2006, Dias C.A., 2007, Pimenta F.C., 2009).

Таблица 1.

Праймеры, используемые для амплификации генов, кодирующих детерминанты резистентности к β -лактамам антибиотикам

Ген	Название праймера	Последовательность 5' → 3'	Размер продукта (п.о.)
<i>pbpX</i>	Pbp2x-F	GAGGACTTTGTTTGGCGTGAT	987
	Pbp2x-R	TCACCAGGTGAAATATCCTTGA	
<i>pbp2b</i>	Pbp2b-F	CATCTGGATAAATATGGCAATATG	921
	Pbp2b-R	GGCAACCTGATAAAAACCTTG	
<i>pbpA</i>	Pbp1a-F	CCAGACGATGAATTGCAAGTCG	826
	Pbp1a-R	CTGTCCATACAGCCATTGAATAT	

ПЦР проводили в амплификаторе PTC-240 DNA Engine Tetrad2 (MJ Research Bio-Rad, США) с последующим анализом продуктов амплификации в 2%-ном агарозном геле.

Минисеквенирование проводили с праймерами, подобранными к точкам полиморфизмов: T338A/P, I371T, R384G, M400T, Q552E, N605T (ген *pbpX*), T445A, E475G, T488A/S (ген *pbp2b*), T371A/S, P432T, L539W, TSQF574-577NTGY (ген *pbpA*). Масс-спектрометрический анализ продуктов реакции минисеквенирования проводили с использованием MALDI-времяпролетного масс-спектрометра Microflex (Bruker Daltonics, Германия). Для записи и обработки масс-спектров использовали программное обеспечение фирмы Bruker Daltonics (Германия): flexControl 2.4 и flexAnalysis 2.4.

Определение нуклеотидной последовательности генов проводили модифицированным методом Сенгера с использованием прибора ABI Prism® 3100 Genetic Analyzer (“Applied Biosystems”, США; “Hitachi” Япония). Полноразмерную последовательность генов получали путем склеивания нуклеотидных фрагментов с использованием программного продукта «Vector NTI® Suite v. 9» (Informax Inc, США).

Анализ последовательностей генов «домашнего хозяйства» с определением сиквенс-типов (Sequence Type, ST) проводили с использованием базы данных MLST (<http://spneumoniae.mlst.net>). Для определения клональности изолятов использовали алгоритм eBURSTv3, интегрированный в MLST-вебсайт (<http://eburst.mlst.net>).

Для поиска гомологичных нуклеотидных или аминокислотных последовательностей в международной базе данных GenBank использовали программу BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

2.2 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

2.2.1 Характеристика антибактериальной активности БЛА в отношении *S. pneumoniae* и динамика распространения устойчивости

Распределение МПК БЛА в отношении *S. pneumoniae*.

На коллекции из 2760 клинических изолятов *S. pneumoniae*, собранных в течение 1998-2007 гг. в разных регионах РФ, проанализировано распределение МПК бензилпенициллина, амоксициллина, цефотаксима и цефуроксима в отношении *S. pneumoniae* в сравнении с распределением МПК этих антибиотиков из базы Европейского комитета по оценке антибиотикочувствительности (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST, <http://www.eucast.org>) (рис. 1).

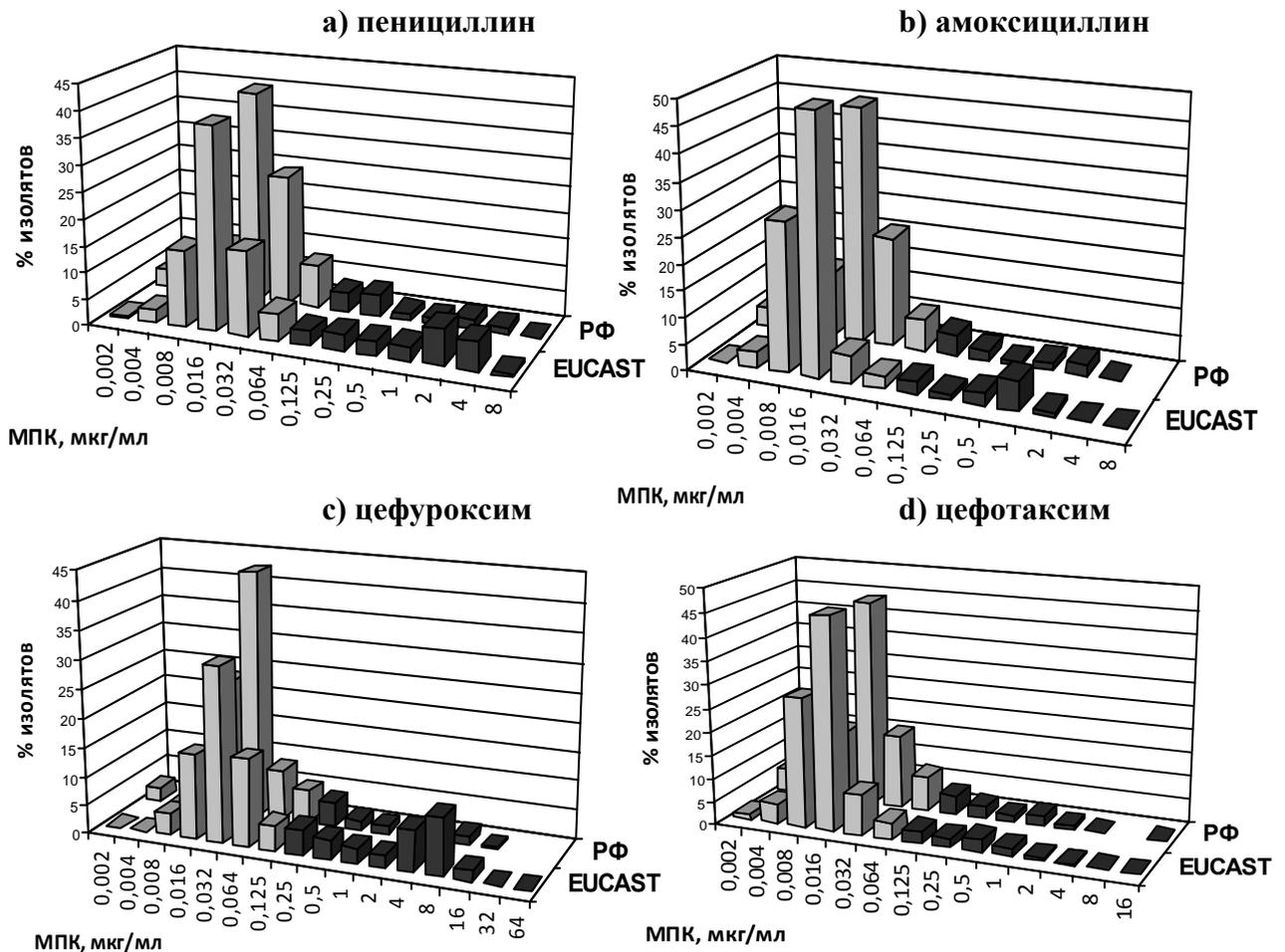


Рисунок 1. Сопоставление распределений МПК БЛА клинических изолятов *S. pneumoniae*, выделенных в данном исследовании, с данными для изолятов, представленными в базе EUCAST. Изоляты, относящиеся по определению EUCAST к «дикой» популяции, выделены светло-серым цветом.

EUCAST вводит понятие микробиологической «точки отсечения» - величины МПК антибактериального препарата, отделяющей популяцию микроорганизмов, лишенную каких-либо механизмов устойчивости («дикий» тип), от популяции, обладающей какими-либо механизмами устойчивости к конкретному антибактериальному препарату («не дикий» тип). «Точки отсечения» для конкретных препаратов являются постоянными видовыми признаками микроорганизмов.

Следует отметить, что характеры распределения МПК пенициллина, амоксициллина, цефуроксима и цефотаксима очень близки. Для перечисленных антибиотиков EUCAST предлагает фактически одинаковые «точки отсечения» (0,06 мкг/мл для бензилпенициллина, амоксициллина, цефотаксима, 0,12 мкг/мл для цефуроксима), что отражает практически одинаковый уровень их природной антипневмококковой активности. Из рис. 1 следует, что изученные клинические изоляты представлены «дикой» и «не дикой» популяциями (по определению EUCAST). На основании визуальной оценки можно заключить, что характер распределения МПК антибиотиков в отношении «дикой» популяции изученных изолятов принципиально сходен с распределением их МПК в отношении «дикой» популяции представленной в базе EUCAST. Полученные результаты, прежде всего, характеризуют адекватность и стандартность использованных методов оценки антибиотикочувствительности. Данные по распределению МПК БЛА, полученные в ходе настоящего исследования были проанализированы экспертами EUCAST и включены в общую базу данных.

Резистентность *S. pneumoniae* к пенициллину, амоксициллину, цефуроксиму и цефотаксиму.

Следует отметить, что в настоящее время единой точки зрения о критериях чувствительности к антибактериальным препаратам не сложилось. Так, CLSI предлагает только клинические критерии чувствительности, предназначенные для прогнозирования эффективности лечения. EUCAST предлагает микробиологические («точки отсечения») и клинически ориентированные критерии чувствительности. При этом как CLSI, так и EUCAST рекомендуют различные критерии чувствительности в зависимости от источника выделения микроорганизма, а также различные схемы лечения в зависимости от уровня чувствительности бактерий.

В настоящей работе для оценки антибиотикочувствительности были использованы микробиологические критерии EUCAST. На рис. 2 приведены данные о динамике распространения устойчивых к БЛА изолятов *S. pneumoniae* в Москве и других регионах. Следует отметить, что за период наблюдения с 1998 по 2007 г. в Москве происходили значительные колебания в частоте распространения устойчивости к пенициллину: от 10,8 % в 2004 году до 23,8 % в 2002. В период с 2005 по 2007 г. частота устойчивости нарастала и достигла уровня 23,4 %. В других регионах также отмечалась тенденция к росту резистентности: в Иркутске, Санкт-Петербурге и Томске частота выделения изолятов с повышенной устойчивостью достигла максимума в 2006 году и составила 17,8 %, 14,5 % и 6,3 % соответственно.

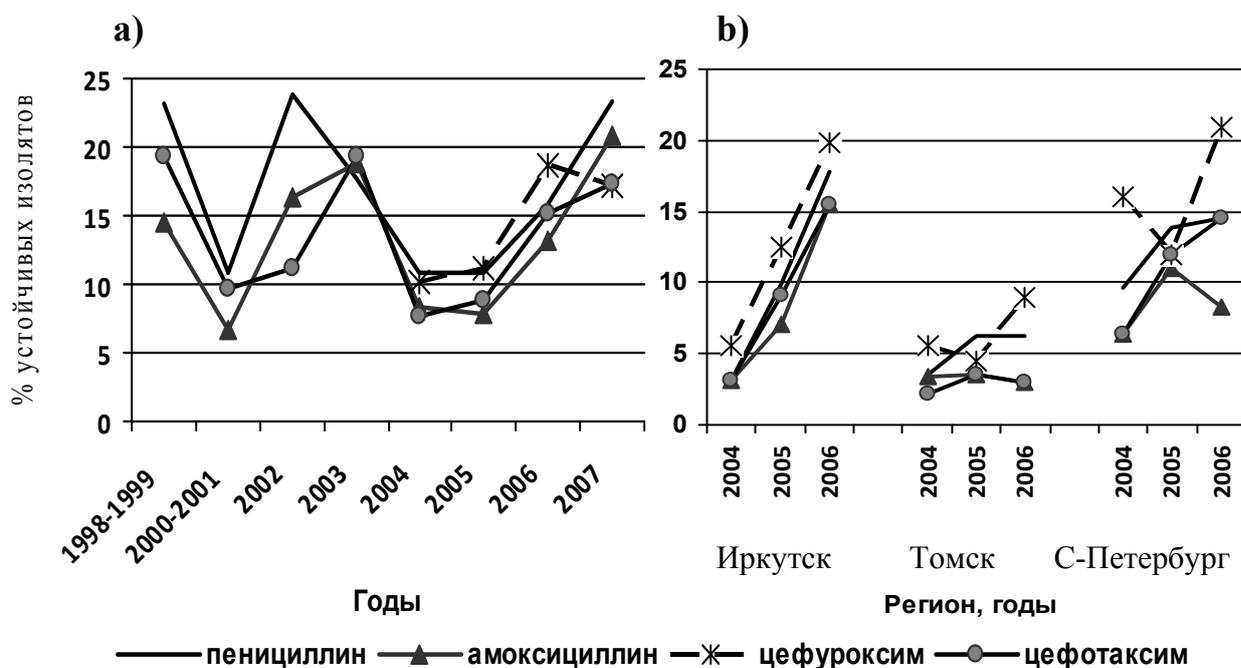


Рисунок 2. Динамика распространения клинических изолятов *S. pneumoniae*, резистентных к БЛА в Москве (а) и других регионах (б).

Динамика распространения устойчивых к амоксициллину изолятов как в Москве, так и в других регионах практически идентична динамике устойчивости к пенициллину. Незначительные различия касались лишь относительных значений, частота устойчивости к амоксициллину в каждый период времени была на 2,5 % - 8,7 % ниже, чем к пенициллину.

В течение периода наблюдения в Москве отмечали также рост частоты выделения устойчивых к цефуроксиму изолятов с максимумом в 2006 году (18,6 %). Одновременно возрастал и уровень устойчивости пневмококков, так в 2006 году 14 % изолятов демонстрировали МПК более 1,0 мкг/мл. В других регионах также отмечено распространение изолятов *S. pneumoniae* с повышенной устойчивостью к цефуроксиму. В Санкт-Петербурге и Иркутске частота встречаемости таких изолятов достигла в 2006 году 20 %, в Томске – 9 %. Однако, частота выделения изолятов с высоким уровнем устойчивости (МПК > 1,0 мкг/мл) не превышала 5 %.

В Москве динамика распространения устойчивых к цефотаксиму пневмококков была практически аналогична динамике распространения устойчивости к пенициллину – пики и падения отмечались в те же периоды времени, с колебаниями от 8 % до 20 %. В Санкт-Петербурге и Иркутске максимальная частота выделения устойчивых к цефотаксиму изолятов была отмечена в 2006 году (15 %), в Томске этот показатель не превышал 4 %.

В целом, частота распространения устойчивых изолятов *S. pneumoniae* к БЛА в различных регионах в отдельные периоды существенно варьировала. Не рекомендуется использование усредненных данных по распространению резистентных к БЛА изолятов *S. pneumoniae* в отдельных регионах РФ для оптимизации терапии.

Продемонстрирована достоверная ассоциация ($p < 0,001$) высокого уровня резистентности к пенициллину с ростом устойчивости к антибиотикам других групп: до 86 % пневмококков с МПК пенициллина ≥ 2 мкг/мл были также устойчивы к макролидным антибиотикам. Высокий уровень перекрестной устойчивости был также с линкозамидами (79,3 %), котримоксазолом (81,5 %) и тетрациклином (89,2 %).

2.2.2 Разработка метода детекции генетических маркеров резистентности *S. pneumoniae* к БЛА с использованием MALDI-ToF масс-спектрометрии

При выборе значимых маркеров формирования устойчивости пневмококка к БЛА были отобраны три гена – *pbpA*, *pbp2b* и *pbpX*, продукты которых рассматриваются как мишени действия данного класса антимикробных препаратов. Поскольку единого мнения о первичном сайте возникновения мутаций, обуславливающих устойчивость *S. pneumoniae* к БЛА не существует, мутации в этих генах рассматривались независимо, но с учетом возможного кумулятивного эффекта. Для каждого гена был произведен анализ участка, кодирующий транспептидазный домен фермента. В рассмотрение ассоциации генотип-фенотип включены только те мутации, вклад которых в снижение аффинности ПСБ к пенициллину экспериментально показан в ходе кинетических экспериментов по изменению константы диссоциации, а также с привлечением искусственного мутагенеза и трансформации. По этому принципу для исследования отобраны мутации: T338A/P, I371T, R384G, M400T, Q552E, N605T (ген *pbpX*), T445A, E475G, T488A/S (ген *pbp2b*), T371A/S, P432T, L539W, TSQF574-577NTGY (ген *pbpA*).

Для детекции известных мутаций в генах ПСБ *S. pneumoniae*, приводящих к соответствующим аминокислотным перестройкам, нами был разработан метод минисеквенирования с последующим определением молекулярной массы продуктов реакции с помощью времяпролётной масс-спектрометрии с лазерной десорбционной ионизацией в присутствии вспомогательного вещества – матрицы (MALDI-ToF масс-спектрометрии).

В основе предложенного подхода лежит реакция ферментативного достраивания олигонуклеотидного праймера с участием дезокси- и дидезоксинуклеотидтрифосфатов. Последние обеспечивают специфическую остановку синтеза (в зависимости от нуклеотидной последовательности матричной ДНК) и получение набора нуклеотидных цепочек, отличающихся друг от друга по длине на 1 - 4 нуклеотида.

Последующий анализ продуктов реакции с помощью MALDI-ToF масс-спектрометрии позволяет сравнить молекулярные массы теоретически предсказанных и экспериментально полученных продуктов, и сделать заключение о наличии или отсутствии мутаций в исследуемом локусе.

На основании сравнения нуклеотидных последовательностей генов ПСБ, представленных в GenBank, были проанализированы значимые полиморфизмы в выбранных локусах и осуществлен дизайн внутренних праймеров с учетом всех возможных вариантов нуклеотидных замен, таким образом,

чтобы осуществлялся отжиг одного из праймеров в непосредственной близости к интересующей нас точке полиморфизма. Работу данной системы можно проиллюстрировать на примере анализа мутаций гена *rbpX* в точке полиморфизма 338 (рис. 3).

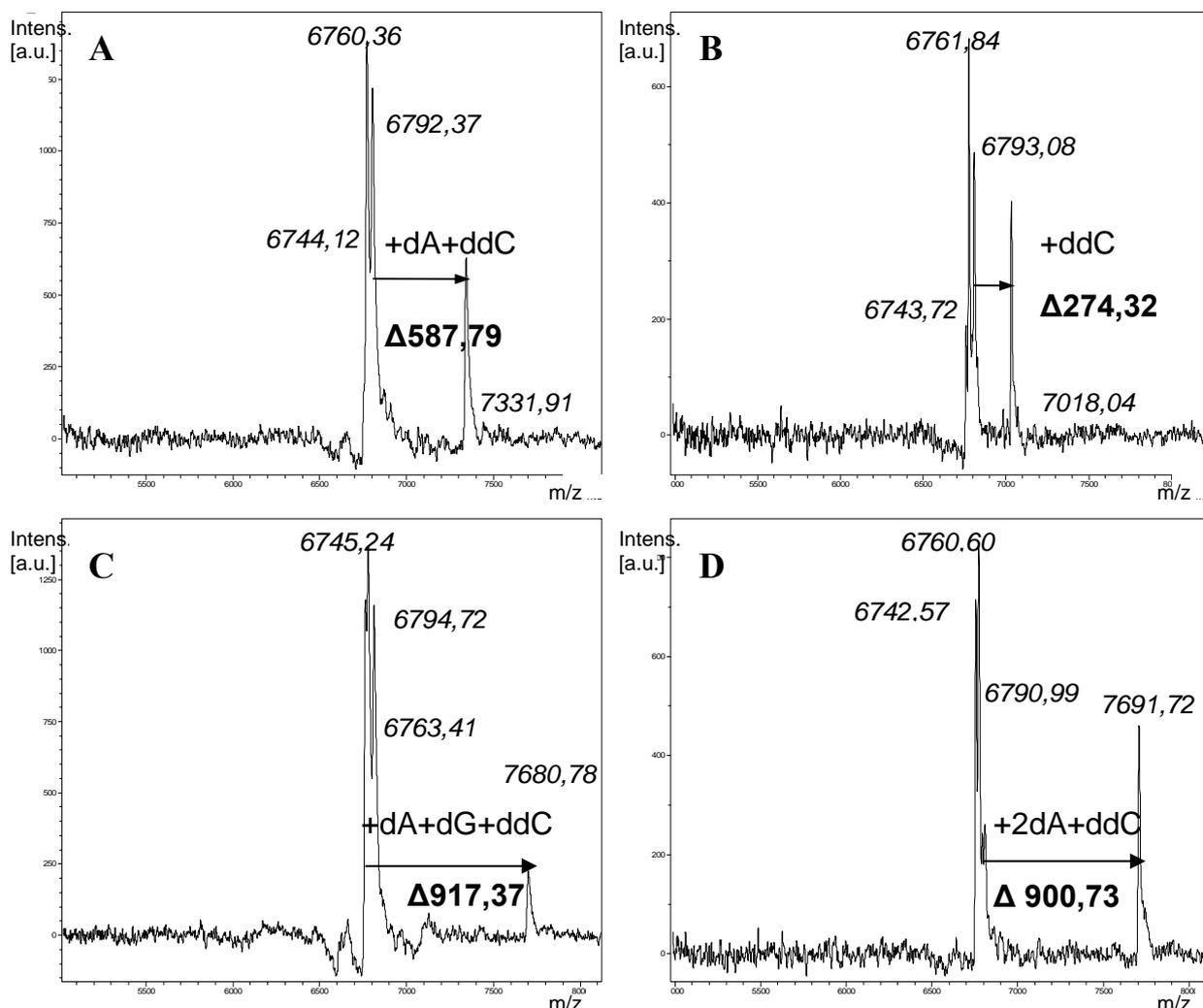


Рисунок 3. Масс-спектры продуктов реакции минисеквенирования гена *rbpX* (точка полиморфизма **T338**).

Примечание: Первые три пика соответствуют молекулярным массам внутренних праймеров, четвертый пик соответствует продукту достраивания одного из праймеров:

A – продукты достраивания праймера P-338-1 при выявлении «дикого» генотипа в положении T338 (Теоретическая разница молекулярных масс продукта достраивания и исходного праймера (T) = 586 Da, экспериментальная (Δ) = 587,79 Da); **B** – продукты достраивания праймера P-338-1 при выявлении мутантного генотипа **T338P** (T = 273 Da, Δ = 274,32 Da); **C** – продукты достраивания праймера P-338-2 при выявлении мутантного генотипа **T338A** (T = 916 Da, Δ = 917,37 Da); **D** – продукты достраивания праймера P-338-3 при выявлении «дикого» генотипа в положении **T338** (T = 899 Da, Δ = 900,73 Da).

Данный метод по точности идентификации однонуклеотидного полиморфизма сопоставим с прямым определением нуклеотидной последовательности интересующих локусов, при этом является значительно более простым и дешевым в исполнении (стоимость расходных материалов сопоставима со стоимостью стандартной ПЦР).

С целью валидации разработанной системы детекции генетических маркеров резистентности были секвенированы фрагменты генов *pbpX*, *pbp2b*, *pbpA*, кодирующих транспептидазные домены ПСБ, для 45, 22 и 62 изолятов, соответственно. Внутри рассмотренной выборки результаты, полученные методом минисеквенирования, полностью совпали с результатами классического секвенирования по Сэнгеру, что говорит о высокой точности разработанного метода.

2.2.3 Результаты детекции генетических маркеров резистентности методом минисеквенирования

Всего методом минисеквенирования было проанализировано 226 клинических изолятов с известной чувствительностью к пенициллину и цефотаксиму на наличие значимых мутаций в генах *pbpX*, *pbp2b* и *pbpA*.

Анализ отобранных точек полиморфизма в гене *pbpX* позволил выявить десять сочетаний мутаций, причем наиболее часто встречающейся была комбинация мутаций в локусах T338, I371, R384, N605 (33,6 %). Сочетание мутаций в R384, Q552 и в T338, R384 было обнаружено у 19,5 % и 7,1 % изолятов, соответственно. Остальные варианты комбинаций встречались у единичных изолятов, а изолированные мутации обнаружены только в кодоне Q552 (3,1 %).

Три комбинации мутаций было выявлено при анализе точек полиморфизма в гене *pbp2b*, причем изолированные мутации в кодонах E475 и T488 не встречались, а в T445 были обнаружены у 12 изолятов (5,3 %). Наиболее часто встречающимся было сочетание трех мутаций (62,8 %).

Среди проанализированной выборки отсутствовали изоляты с мутациями только в гене *pbpA*. Этот факт, в совокупности с более низкой частотой выявляемости таких мутаций, может косвенно указывать на роль ПСБ1а как вторичного, дополнительного звена в формировании устойчивости к пенициллину, что вполне согласуется с общепринятой точкой зрения (Zarun A., 2008). Всего было выявлено три варианта комбинаций мутаций, наиболее часто встречались изоляты с мутациями в трех локусах T371, P432, TSQF574-577 (38,5 %).

Поскольку достоверной информации о существовании кумулятивного эффекта мутаций в ПСБ1а нет, и оценить его наличие в рамках проведенного исследования не представляется возможным, мутации в гене *pbpA* не дискриминировали и рассматривали в совокупности как *pbpA_{mut}*, приравненные по частоте к аминокислотным заменам в TSQF574-577 кодонах. Исходя из аналогичных предпосылок, сформирован *pbp2b_{mut}* генотип, равный по частоте встречаемости заменам T445A. Полученное распределение изолятов с различными генотипами в зависимости от уровня чувствительности к пенициллину представлено в табл. 2.

По данным генетического тестирования, 65/226 (28,8 %) изолятов относились к «дикому» генотипу (не содержали мутаций в исследованных локусах). Среди оставшейся части выборки были выявлены 17 различных комбинаций генетических маркеров, потенциально вовлеченных в формирование резистентности пневмококков к пенициллину.

Все изоляты, чувствительные к пенициллину ($n = 52$, МПК $\leq 0,06$ мкг/мл) не имели мутаций ни в одном из проанализированных локусов, а наличие любой комбинации мутаций коррелировало с превышением значения МПК «точки отсечения» ($> 0,06$ мкг/мл). В целом, из 174 изолятов *S. pneumoniae* с повышенной устойчивостью к пенициллину мутации в рассмотренных ПСБ были обнаружены в 161 (92,5 %) случае (табл. 2), что реально свидетельствует о высокой диагностической чувствительности метода.

Таблица 2.

Распределение изолятов *S. pneumoniae* в зависимости от уровня чувствительности к пенициллину для каждого генетического варианта

Генотип изолята, согласно тестированию генов ПСБ	N (%)	Категория чувствительности ¹⁾ , N (%)		
		S	I	R
wt	65 (28,8)	52 (80)	13 (20)	
<i>pbpX</i> Q552E	1 (0,4)		1 (100)	
<i>pbp2b</i> _{mut} <i>pbpA</i> _{mut}	5 (2,2)		4 (80)	1 (20)
<i>pbpX</i> Q552E, <i>pbp2b</i> _{mut}	4 (1,8)		4 (100)	
<i>pbpX</i> Q552E, <i>pbp2b</i> _{mut} <i>pbpA</i> _{mut}	2 (0,9)		2 (100)	
<i>pbpX</i> R384G, Q552E, <i>pbp2b</i> _{mut}	11 (4,9)		11 (100)	
<i>pbpX</i> T338mut, R384G, <i>pbp2b</i> _{mut}	15 (6,7)		15 (100)	
<i>pbpX</i> I371T, N605T, <i>pbp2b</i> _{mut}	1 (0,4)		1 (100)	
<i>pbpX</i> R384G, Q552E, <i>pbp2b</i> _{mut} <i>pbpA</i> _{mut}	33 (14,7)		33 (100)	
<i>pbpX</i> T338mut, Q552E, <i>pbp2b</i> _{mut} <i>pbpA</i> _{mut}	1 (0,4)		1 (100)	
<i>pbpX</i> T338mut, R384G, <i>pbp2b</i> _{mut} <i>pbpA</i> _{mut}	1 (0,4)		1 (100)	
<i>pbpX</i> T338mut, I371T, R384G, <i>pbp2b</i> _{mut}	1 (0,4)		1 (100)	
<i>pbpX</i> T338mut, I371T, R384G, <i>pbp2b</i> _{mut} <i>pbpA</i> _{mut}	3 (1,3)		3 (100)	
<i>pbpX</i> T338mut, R384G, N605T, <i>pbp2b</i> _{mut} <i>pbpA</i> _{mut}	5 (2,2)		4 (80)	1 (20)
<i>pbpX</i> T338mut, I371T, R384G, N605T, <i>pbp2b</i> _{mut}	1 (0,4)			1 (100)
<i>pbpX</i> T338mut, I371T, R384G, Q552E, <i>pbp2b</i> _{mut} <i>pbpA</i> _{mut}	1 (0,4)			1 (100)
<i>pbpX</i> T338mut, I371T, R384G, N605T, <i>pbp2b</i> _{mut} <i>pbpA</i> _{mut}	75 (33,3)		17 (23)	58 (77)
<i>pbpX</i> T338mut, I371T, R384G, Q552E, N605T, <i>pbp2b</i> _{mut} <i>pbpA</i> _{mut}	1 (0,4)			1 (100)
Всего	226	52	111	63
	(100)	(23,0)	(49,1)	(27,9)

Примечание: ¹⁾ S – чувствительные (МПК $\leq 0,06$ мкг/мл), I – с промежуточной устойчивостью (МПК = 0,12-1 мкг/мл), R – устойчивые (МПК ≥ 2 мкг/мл) по критериям CLSI.

Сочетания определенных мутаций коррелируют с уровнем резистентности пневмококков к пенициллину. Около 40 % изолятов с промежуточным уровнем резистентности (МПК = 0,12 - 1,0 мкг/мл) несли мутации R384G, Q552E в ПСБ2х и мутации в ПСБ2б (из них 75 % обладали также мутантным ПСБ1а). Промежуточный уровень устойчивости в 15 % случаев связан с мутациями в 4 локусах ПСБ2х (T338mut, I371T, R384G, N605T) совместно с мутациями в ПСБ2б и ПСБ1а, причем последним генотипом обладали 92 % высокорезистентных изолятов (МПК ≥ 2 мкг/мл). Полученные нами результаты хорошо соотносятся с литературными данными, говорящими о существовании двух семейств последовательностей ПСБ2х: первое семейство характеризуется наличием замены T338mut и связано с высокими уровнями резистентности, второе семейство с мутацией Q552E связано с промежуточными

уровнями устойчивости к пенициллину. Причем по литературным данным одновременное наличие мутаций в локусах T338 и Q552 является достаточно редким и коррелирует с высокими уровнями устойчивости к БЛА. Один высокорезистентный изолят (МПК = 4 мкг/мл) из проанализированной выборки обладал таким сочетанием мутаций.

В случае изучения феномена повышения устойчивости *S. pneumoniae* к цефотаксиму не наблюдалось четкого соответствия повышенного уровня резистентности с наличием мутаций в генах ПСБ, что может свидетельствовать о разных точках полиморфизмов, вовлеченных в формирование устойчивости к пенициллинам и цефалоспорином.

2.2.4 Разработка метода ПЦР-типирования капсульных антигенов, позволяющего установить серотип клинических изолятов *S. pneumoniae*

Праймеры, специфичные к варибельным участкам генов, кодирующих капсульные полисахариды, были протестированы на ограниченной группе изолятов с известными серотипами, что позволило оптимизировать условия мультипраймерной ПЦР по сравнению с вариантами, предложенными в статьях (Pai R., 2006; Saha S.K., 2008).

В результате внесенных изменений разработанная схема представляла собой каскад из 10 мультипраймерных реакций, проводимых последовательно. Праймерные системы оптимизированы таким образом, что в ходе первых четырех раундов амплификации удалось установить серотипы для большинства клинических изолятов *S. pneumoniae*.

Валидация была осуществлена на группе изолятов, серотип которых был определен классическим способом, а также было проведено секвенирование фрагментов *cps*-локусов.

2.2.5 Результаты определения серотипов клинических изолятов *S. pneumoniae* методом ПЦР-типирования капсульных антигенов

Молекулярный метод позволил определить серотипы 93,6 % (221/236) изолятов *S. pneumoniae* с повышенной устойчивостью к пенициллину и/или другим антибиотикам, выделенных в 2003-2007 гг. Невозможность серотипировать 6,4 % изолятов может быть связана с присутствием серотипов, не включенных в мультипраймерные реакции, или с бактериальной нагрузкой ниже предела чувствительности мультипраймерной ПЦР.

Из 39 пар праймеров системы ПЦР-типирования капсульных антигенов только 22 обладали полной специфичностью в отношении конкретных серотипов, а 17 пар праймеров были специфичны в отношении серогрупп (6, 1, 22, 24) или 2-4 серотипов, относящихся к одной серогруппе, или обладающих перекрестной реактивностью (например, 9V/9A, 11A/11D, 33F/33A/37, 35A/35C/42). В результате использования молекулярного метода, дополненного данными классического серотипирования, было дифференцировано 29 серотипов/серогрупп: 1, 3, 4, 6 (в том числе 6A и 6B), 9V/A (в том числе 9A), 9L, 9N, 10A, 11B, 11A/D, 13, 14, 15A/F (в том числе 15A), 16, 17A, 18A/B/C/F, 19A, 19F, 23A, 23F, 33F/A/37, 35A/C/42 (в том числе 35C), 35F, 39F.

Наиболее распространенными были серотипы 23F (35,2 %) и 19F (13,1 %). К серогруппе 6 относились 18,2 % изолятов. По 3,4 % изолятов относи-

лись к серотипу 3 и серогруппе 18, а 4,7 % изолятов - к серотипу 14. Семь (3,0 %) и пять (2,1 %) изолятов относились к серотипам 6А и 19А соответственно, все изоляты обладали множественной резистентностью. Следует отметить, что использование вакцин без таких серотипов может привести к распространению резистентных изолятов.

К сожалению, использование данного метода ограничивается специфичностью некоторых пар праймеров из-за высокой гомологии последовательности капсульных антигенов в серогруппах 6 и 18. Для дифференцирования таких изолятов необходимо использовать классическое серотипирование или секвенирование локусов, кодирующих капсульные антигены.

Тем не менее, полученные данные имеют определенное значение для оценки перспективности антипневмококковой вакцинации. Так, 63,1 % изолятов относились к серотипам, против которых направлена 7-валентная пневмококковая вакцина, рекомендованная к использованию в России с 2009 года, 63,6 % - к серотипам против которых направлена 10-валентная вакцина и 72,0 % - к серотипам против которых направлена 13-валентная вакцина, рекомендованная к использованию в США и странах Евросоюза с 2010 года.

2.2.6 Мультилокусное сиквенс-типирование

Метод мультилокусного сиквенс-типирования, подкрепленный данными серотипирования и детекции генетических маркеров резистентности, использован для анализа клонального родства изолятов *S. pneumoniae*, циркулирующих на территории РФ.

MLST в настоящее время также рассматривается как наиболее точный метод дифференцировки стрептококков и идентификации *S. pneumoniae* (Hanage W.P., 2005). Среди 73 изолятов, которые по классическим фенотипическим признакам следовало отнести к пневмококкам, 10 относились к группе «зеленящих» стрептококков. Ошибки в идентификации пневмококков могут привести к завышению данных о распространении устойчивости к БЛА среди этих микроорганизмов.

Среди 63 клинических изолятов, идентифицированных с помощью MLST как *S. pneumoniae*, было выявлено 33 различных сиквенс-типа (ST) и 22 клональных комплекса (Clonal Complex, CC). Девять CC были представлены более чем одним изолятом: CC81, CC315, CC271, CC414, CC156, CC280, CC1012, CC15 и CC176. Шесть изолятов относились к сиквенс-типам, не входящим ни в один клональный комплекс. Среди проанализированной выборки было обнаружено 8 изолятов с новыми комбинациями аллелей и пять - с новыми последовательностями одного из семи генов «домашнего хозяйства». Все изоляты с новыми комбинациями аллелей были внесены в международную базу данных MLST и новым аллельным профилям были присвоены следующие номера: 3403, 3816, 4841, 4842, 4843, 4844, 5180 и 5181.

Фенотипические и генотипические характеристики изолятов представлены в табл. 3. Самым распространенным был ST81, представленный 15 изолятами, выделенными преимущественно в Москве. Все изоляты ST81 относились к серотипу 23F, из них 12 обладали одинаковым профилем резистентности: были устойчивыми к пенициллину, цефотаксиму, эритромицину, тет-

рациклину и хлорамфениколу. Три изолята дополнительно имели устойчивость к левофлоксацину. Генотипические характеристики проанализированных изолятов также показали высокую степень однородности выборки: все изоляты имели детерминанты резистентности к макролидным антибиотикам – гены *mefE* и *ermB*. Комбинация мутаций в трех ПСБ была идентичной у подавляющего большинства изолятов, за исключением двух изолятов, обладающих промежуточным уровнем резистентности (МПК = 0,12-1 мкг/мл) к пенициллину.

Вторым по количеству изолятов был СС271, включающий в себя сиквенс-типы: ST236 (n=4), ST651 (n=1) и ST271 (n=1). Все серологически типированные изоляты СС271 относились к серотипу 19F, кроме одного (19A). Несмотря на небольшую выборку, СС271 оказался фенотипически неоднородным: три изолята обладали ассоциированной устойчивостью к пенициллину, эритромицину и тетрациклину, один был устойчив к пенициллину и тетрациклину, и один показал невысокий уровень резистентности к пенициллину. Интересно, что устойчивость к эритромицину у трех изолятов была обусловлена наличием обеих детерминант резистентности – генов *ermB* и *mefE*, а у четвертого – присутствием только *mefE*. Комбинации маркеров резистентности в ПСБ у четырех высокорезистентных к пенициллину клинических изолятов были идентичными, тогда как изолят с промежуточным уровнем резистентности (МПК = 0,25 мкг/мл) к пенициллину и чувствительный к цефотаксиму не имел значимых мутаций в ПСБ.

Четыре изолята ST315 относились к 6 серогруппе и обладали сходным профилем резистентности (были высоко устойчивы к эритромицину, тетрациклину и умеренно устойчивы к пенициллину). Резистентность к эритромицину обуславливалась наличием гена *ermB*. Мутации в ПСБ2х и ПСБ2б были идентичными в трех изолятах (ПСБ1а «дикого» типа), а в четвертом – были обнаружены дополнительные мутации в ПСБ1а. Таким образом, ST315 в целом был однороден как по фенотипическим признакам, так и по генотипу.

Изоляты, относящиеся к клональному комплексу СС414, были представлены одним сиквенс-типом (ST1500), и три из них обладали фенотипической и генотипической однородностью, а один отличался как серотипом (6А), так и генетическими характеристиками и фенотипическим профилем. Клональные комплексы, представленные 2-3 изолятами, имели различающиеся в пределах каждого сиквенс-типа профили резистентности, несмотря на небольшое количество представителей.

Остальные сиквенс-типы были представлены единственными изолятами, они отличались невысоким уровнем устойчивости к пенициллину и низкой частотой ассоциированной устойчивости к антибактериальным препаратам других групп (табл. 3).

Наиболее многочисленные клональные комплексы - СС81, СС271, СС315 относились к международным клонам Spain 23F-1 (ATCC 700669), Taiwan 19F-14 (ATCC 700905), Poland 6B-20 (ATCC BAA-612) соответственно.

Таблица 3.

Характеристика изолятов *S. pneumoniae*, относящихся к выявленным клональным комплексам.

СС (%)	ST	N	Серо-тип	МПК антибиотиков, мкг/мл					Генотип устойчивости к БЛА			Генотип устойчивости к макролидам
				Пенициллин	Цефотаксим	Эритромицин	Левифлоксацин	Котримоксазол	ПСБ2х (мутации в точках полиморфизма)	ПСБ2 б	ПСБ1а	
81 (23,8)	81	2	23F	0,125-0,25	0,125-0,25	>32	1	1-4	338, 384, 605	mut ¹⁾	mut	<i>ermB+mefE</i>
		10	23F	2-8	0,5->8	32->32	1-2	1->4	338, 371, 384, 605	mut	mut	
		2	23F	4	8->8	>32	4-8	>4	338, 371, 384, 552, 605	mut	mut	
		1	23F	2	1	>32	8	>4	338, 371, 384, 605	mut	mut	
271 (9,5)	236	1	19F	4	1	>32	0,5	>4	338, 371, 384, 605	mut	mut	<i>ermB+mefE</i>
		1	19F	2	0,5	0,25	1	>4	338, 371, 384, 605	mut	mut	-
		1	19F	0,25	0,06	<0,015	0,5	1	wt ²⁾	wt	wt	-
		1	19A	1	1	32	0,5	1	338, 371, 384, 605	mut	mut	<i>ermB+mefE</i>
		1	19F	1	1	>32	1	4	338, 371, 384, 605	mut	mut	<i>ermB+mefE</i>
	651	1	19F	2	1	2	1	>4	338, 371, 384, 605	mut	mut	<i>mefE</i>
315 (6,3)	315	3	6B	0,125-0,25	0,03-0,06	>32	0,5	1-4	338, 384	mut	wt	<i>ermB</i>
		1	6B	0,125	0,5	>32	1	4	338, 384	mut	mut	
414 (6,3)	1500	1	23F	0,125	0,06	<0,008	1	1	384, 552	mut	mut	-
		2	23F	0,125	0,008-0,03	0,03	1	0,5-2	384, 552	mut	mut	-
		1	6A	0,06	0,03	2	1	2	wt	wt	wt	<i>mefE</i>
156 (4,8)	790	1	14	2	1	>32	1	0,125	338, 371, 384, 605	mut	mut	<i>ermB</i>
	143	1	14	4	2	>32	1	>4	338, 371, 384, 605	mut	mut	
	608	1	19A	4	2	0,06	1	2	338, 371, 384, 605	mut	mut	
280 (3,2)	239	1	9V/A	1	0,5	0,125	1	1	wt	wt	wt	-
		1	<i>cpsA</i> ³⁾	0,25	0,015	0,03	2	0,125	wt	wt	wt	
1012 (3,2)	1012	1	33F/A	0,5	0,125	<0,008	0,5	1	wt	wt	wt	-
		1	11A/D	0,5	0,5	0,008	1	2	wt	wt	wt	
15 (3,2)	423	1	19F	0,25	0,25	0,03	1	4	wt	wt	wt	-
	4844	1	6B	1	0,5	0,5	1	4	384, 552	mut	wt	

176 (3,2)	93 4282	1 1	6A <i>cpsA</i> ⁴⁾	1 1	0,5 0,5	>32 0,5	1 1	2 4	338, 371, 384, 605 384, 552	mut mut	mut mut	<i>ermB</i>
2779 (1,6)	2779	1	6B	0,125	0,125	0,03	0,5	>4	338, 371, 384	mut	mut	-
490 (1,6)	3403	1	6A	0,015	0,015	>32	1	>4	wt	wt	wt	<i>ermB</i>
230 (1,6)	230	1	19F	0,5	0,125	<0,008	1	>4	384, 552	mut	mut	-
102 (1,6)	102	1	18	0,125	0,03	0,03	0,5	0,5	552	mut	wt	-
90 (1,6)	2009	1	6B	0,25	0,25	0,03	0,5	2	384, 552	mut	wt	-
439 (1,6)	42	1	23A	0,25	0,125	0,25	1	4	384, 552	mut	mut	-
63 (1,6)	3816	1	14	0,125	0,125	>32	1	0,5	552	mut	wt	<i>ermB</i>
123 (1,6)	123	1	23F	0,25	0,125	0,03	1	>4	wt	wt	wt	-
801 (1,6)	801	1	<i>cpsA</i> ⁺	0,008	0,008	0,03	1	0,125	wt	wt	wt	-
180 (1,6)	505	1	3	0,015	0,015	0,06	1	0,25	wt	wt	wt	-
2315 (1,6)	4843	1	<i>cpsA</i> ⁺	0,03	0,25	0,125	0,25	0,5	384, 552	mut	wt	-
346 (1,6)	1203	1	19F	0,5	0,06	0,06	1	0,5	338, 552	mut	mut	-
-(1,6)	323	1	23F	0,5	0,125	<0,015	0,5	1	384, 552	mut	wt	-
-(1,6)	2912	1	19A	0,03	0,03	1	0,5	>4	wt	wt	wt	<i>mefE</i>
-(1,6)	4841	1	23F	0,25	0,25	<0,008	1	2	552	mut	mut	-
-(1,6)	4842	1	6	0,5	0,5	<0,008	1	2	384, 552	mut	wt	-
-(1,6)	5180	1	6A	0,015	0,015	>32	1	4	wt	wt	wt	<i>ermB</i>
-(1,6)	5181	1	6A	0,03	0,015	2	1	2	wt	wt	wt	<i>ermB</i>
-(1,6)	new1 ⁵⁾	1	1	0,25	0,06	0,03	0,5	0,25	384, 552	mut	mut	-
-(1,6)	new2	1	6B	0,25	0,125	>32	1	>4	338, 384	mut	wt	<i>ermB</i>
-(1,6)	new3	1	19A	2	4	32	1	0,5	338, 371, 384, 552	mut	mut	<i>ermB</i>
-(1,6)	new4	1	14	0,25	0,125	<0,008	1	1	384, 552	mut	mut	-
-(1,6)	new5	1	<i>cpsA</i> ⁻	0,125	0,125	<0,008	0,25	0,25	384, 552	mut	mut	-

Примечания: ¹⁾ любые мутации;

²⁾ «дикий» тип (отсутствие мутаций);

³⁾ ген *cpsA* амплифицировался, но установить серотип методом ПЦР-типирования капсульных антигенов не удалось;

⁴⁾ ген *cpsA* не амплифицировался;

⁵⁾ сиквенс-типы с новыми последовательностями одного из семи генов «домашнего хозяйства».

Особенностью изолятов ST81, распространенных в РФ, является наличие двух генов устойчивости к макролидным антибиотикам (*ermB* и *mefE*). Изоляты ST81 с таким генотипом ранее описывали в Юго-Восточной Азии и Южной Африке, для изолятов этого сиквенс-типа циркулирующих в Европе и Северной Америке характерно сохранение чувствительности к макролидным антибиотикам. Все изоляты, выделенные в РФ (по данным настоящего исследования), имели фенотип, характерный для изолятов из Азии, причем часть их обладала устойчивостью к левофлоксацину.

Клональный комплекс 271, представленный в РФ сиквенс-типами 236, 271 и 651, наиболее широко распространен в Юго-Восточной Азии (54,3 %), однако достаточно часто он встречается и в других географических регионах. Причем как в Европе, так и в Азии доминантным является мультирезистентный фенотип (пенициллин-, эритромицин-, тетрациклин-устойчивый). Четыре из шести обнаруженных в ходе данного исследования изолятов относились к этому фенотипу.

По данным базы MLST сиквенс-тип 315 наиболее часто встречается на территории Европы (89,1 %) с преобладающим пенициллин-, эритромицин-, тетрациклин-устойчивым фенотипом. Все изоляты ST315, проанализированные в ходе данной работы, обладали таким же фенотипом.

Таким образом, более 39 % клинических изолятов с повышенной устойчивостью к пенициллину, циркулирующих в России, относились к трем глобальным клональным комплексам (CC81, CC271 и CC315). Независимое формирование перечисленных клональных комплексов на территории РФ является маловероятным, скорее всего, произошел их импорт из других географических регионов.

Выводы

1. Частота распространения изолятов *S. pneumoniae*, устойчивых к β -лактамам антибиотикам, варьирует в пределах от 3,1 % до 23,8 % в зависимости от региона и периода выделения изолята, что позволяет прогнозировать высокую эффективность эмпирической терапии пневмококковых инфекций дыхательных путей β -лактамами антибиотиками;
2. Показана достоверная ассоциация высокой устойчивости клинических изолятов *S. pneumoniae* к пенициллину (МПК ≥ 2 мкг/мл) с устойчивостью к макролидным антибиотикам, линкозамидам, ко-тримоксазолу и тетрациклину;
3. Обнаружение мутаций в генах ПСБ (*pbpA*, *pbp2b*, *pbpX*) разработанным методом минисеквенирования с последующей масс-спектрометрической детекцией продуктов амплификации позволяет прогнозировать устойчивость клинических изолятов *S. pneumoniae* к β -лактамам антибиотикам;
4. Оптимизирован протокол мультипраймерной ПЦР, позволяющий установить серотип клинических изолятов *S. pneumoniae*, циркулирующих на территории РФ, на основании варибельности генов, кодирующих полисахаридную капсулу;

5. Около 72 % изолятов, устойчивых к β -лактамам антибиотикам, относятся к серотипам, против которых направлена 13-валентная пневмококковая вакцина, что позволяет рассматривать вакцинацию как действенное средство сдерживания распространения резистентных изолятов;
6. Циркулирующая на территории России популяция *S. pneumoniae* с повышенной устойчивостью к β -лактамам антибиотикам характеризуется выраженной клональностью; 39,7 % таких изолятов относятся к трем клональным комплексам (СС81, СС271 и СС315), имеющим мировое распространение.

Список опубликованных работ

1. Боровская, А.Д. Дифференцировка α -гемолитических стрептококков прямым масс-спектрометрическим профилированием / А.Д. Боровская, Е.Н. Ильина, Т.А. Савинова, С.В. Сидоренко, С.А. Грудинина, В.М. Говорун // Биоорганическая химия. – 2011. – Т. 37. – № 1. – С. 61-69.
2. Савинова, Т.А. Масс-спектрометрический анализ генетических маркеров резистентности *S. pneumoniae* к бета-лактамам антибиотикам / Т.А. Савинова, Е.Н. Ильина, С.В. Сидоренко // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2010. – № 3. – С. 16-25.
3. Савинова, Т.А. Динамика распространения резистентности к бета-лактамам антибиотикам среди *Streptococcus pneumoniae*, клиническая значимость результатов / Т.А. Савинова, С.В. Сидоренко, С.В. Буданов, С.А. Грудинина // Антибиотики и химиотерапия. – 2010. – Т. 55. – №1-2. – С. 12-20.
4. Савинова, Т.А. Генетическое разнообразие пенициллиноустойчивых *Streptococcus pneumoniae* / Т.А. Савинова, О.Ю. Филимонова, С.А. Грудинина, С.В. Сидоренко // Журнал инфектологии. – 2010. – Т.1. – № 4. – С. 66-71.
5. Borovskaya, A. The experience of a 2-year application of MALDI Biotyper technique in a routine setting / A. Borovskaya, E. Ilina, S. Sidorenko, A. Kruglov, D. Mudrak, T. Savinova, T. Maier, M. Kostrzewa, V. Govorun // Thesis from 20th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. – Vienna, 2010.
6. Савинова, Т.А. Клональная структура пневмококков, устойчивых к пенициллину / Т.А. Савинова, С.И. Солдатова, А.Н. Круглов, Е.Н. Ильина, С.В. Сидоренко // Материалы II Ежегодного Всероссийского конгресса по инфекционным болезням. – Москва, 2010.
7. Филимонова, О.Ю. Метод MALDI-tof масс-спектрометрической дифференцировки *tef* генов стрептококков / О.Ю. Филимонова, Т.А. Савинова, С.И. Солдатова, А.Н. Круглов, Е.Н. Ильина, С.В. Сидоренко // Материалы II Ежегодного Всероссийского конгресса по инфекционным болезням. – Москва, 2010.
8. Savinova, T.A. Clonal diversity of penicillin non-susceptible *Streptococcus pneumoniae* isolates in Moscow, Russia / T.A. Savinova, E.N. Ilina, A.D.

- Borovskaya, S.V. Sidorenko // Thesis from 19th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. – Helsinki, 2009.
9. Grudinina, S.A. Prevalence of mutations in PBP2x of *Streptococcus pneumoniae* / S.A. Grudinina, T.A. Savinova, E.N. Ilina, S.V. Sidorenko // Thesis from 17th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. – Munich, 2007.
 10. Grudinina, S.A. Analysis of *pbp2x* Genes in Clinical Isolates of *Streptococcus pneumoniae* (Spn) / S.A. Grudinina, T.A. Savinova, O.Y. Filimonova, N.V. Dubrovskaya, E.N. Ilina, L.M. Weigel, S.V. Sidorenko // Thesis from 46th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy – San Francisco, 2006.
 11. Guchev, I.A. Nasopharyngeal Carriage of Macrolide-Resistant *Streptococcus pneumoniae* (Spn) After Prophylactic Administration of Azithromycin (Az) / I.A. Guchev, S.A. Grudinina, O.Y. Filimonova, T.A. Savinova, M.V. Malakchova, E.N. Ilina, L.M. Weigel, S.V. Sidorenko // Thesis from 46th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy – San Francisco, 2006.
 12. Grudinina, S.A. Mass-spectrometric Discrimination of *mef(A)*, *mef(E)* and *mef(I)* Genes and their Prevalence among Macrolide-Resistant *Streptococcus pneumoniae* (Spn) Isolates from Russia / S.A. Grudinina, O.Y. Filimonova, T.A. Savinova, L.G. Stolyarova, E.N. Ilina, L.M. Weigel, S.V. Sidorenko // Thesis from 46th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy – San Francisco, 2006.

Список используемых сокращений

БЛА – β-лактамы антибиотики

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

МПК – минимальная подавляющая концентрация

п.о. – пар оснований

ПСБ – пенициллинсвязывающий белок

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РФ – Российская Федерация

MALDI-TOF масс-спектрометрия – времяпролётная масс-спектрометрия с лазерной десорбционной ионизацией в присутствии вспомогательного вещества - матрицы (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass-Spectrometry)

MLST – мультилокусное сиквенс-типирование (Multi Locus Sequence Typing)

СС – клональный комплекс (Clonal Complex)

ST – сиквенс-тип (Sequence Type)

CLSI – Институт клинических и лабораторных стандартов США (Clinical and Laboratory Standards Institute)

EUCAST – Европейский комитет по оценке антибиотикочувствительности (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)