



МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА МИКРОБИОЛОГИЯ

АЛЕКСАНДРА САШОВА АЛЕКСАНДРОВА

**МИКРОБИОЛОГИЧНИ, МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИ И
ЕПИДЕМИОЛОГИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ КЛИНИЧНИ
ЩАМОВЕ *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*
ИЗОЛИРАНИ ЗА ПЕРИОДА 2006 – 2013г.**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане на
образователна и научна степен „Доктор”
Научна специалност: 01.06.12. Микробиология

Научен ръководител: Проф. д-р Лена Петрова Сечанова, д.м.

Научно жури:

Проф. д-р Ива Стефанова Христова, д.м.

Проф. д-р Людмила Боянова Георгиева, д.м.н.

Проф. д-р Лена Петрова Сечанова, д.м.

Проф. д-р Тодор Веселов Кантарджиев, д.м.н.

Проф. д-р Енчо Запрянов Савов, д.м.н.

София

Използвани съкращения

АБ	антибиотик
АБР	антибиотична резистентност
АМЛС	антимикробни лекарствени средства
ГДП	горни дихателни пътища
ДДП	долни дихателни пътища
ДНК	дезоксирибонуклеинова киселина
ИПЗ	инвазивни пневмококови заболявания
МИК	минимална инхибираща концентрация
ПГ	пептидогликан
ПМН	Полиморфнонуклеарни левкоцити
ПП	Пневмококова пневмония
ПСП (PBP)	Penicillin-свързващи протеини
AFLP	Amplified Restriction Fragment Polymorphism
<i>aroE</i>	ген за шикимат дехидрогеназа
BOX-PCR	BOX-Polymerase Chain Reaction
BURST	Based upon related sequence types - алгоритъм за клъстерен анализ, използващ данни от MLST
CC	Clonal complex (Клонален комплекс)
CDC	Centers for disease control and prevention
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute, (Институт за клинични лабораторни стандарти)
CPS	генетичен локус, кодиращ пневмококовата капсула
ddl	ген за D-аланин- D-аланин лигаза
ECDC	European center for disease control and prevention
<i>erm(B)</i>	ген, кодиращ метилаза, отговорен за резистентността към MLS
ERSP	Erythromycin-резистентни <i>S.pneumoniae</i>
<i>gdh</i>	ген за глюкозо-6-фосфат дехидрогеназа
<i>gki</i>	ген за глюкозо-киназа
IS	инсерционни елементи
<i>lytA</i>	ген за пневмококов повърхностен антиген A
<i>mef(E)</i>	ген, отговорен за ефлукс механизма при макролидна резистентност
mega	Macrolide Efflux Genetic Assembly
MLEE	Multilocus Enzyme Electrophoresis, (Мультилокусна ензимна електрофореза)
MLS	M -макролиди, L-линкозамиди, S-стрептограмини
MLST	Multi locus sequence typing, (Мультилокусно секвениране)
PCR	Polymerase chain reaction, (Полимеразна верижна реакция)
PCV	Пневмококова конюгирана ваксина
PFGE	Pulsed-field gel electrophoresis, (Пулсова електрофореза)
<i>ply</i>	ген за пневмолизин
PPV	Пневмококова полизахаридна ваксина
PRSP	Penicillin – нечувствителни <i>S.pneumoniae</i>
RAPD	Randomly Amplified Polymorphic DNA, (Случайна амплификация на полиморфна ДНК)
<i>recP</i>	ген за транскетолаза
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
<i>spi</i>	ген за сигнална пептидаза I
ST	sequence type, (секвенционен тип)
WGS	Whole genome sequencing
WHO	World Health Organization, (Световна Здравна Организация)
<i>xpt</i>	ген за ксантин фосфорибозилтрансфераза

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Streptococcus pneumoniae е основен причинител на обществено-придобита пневмония, менингит и бактериемия сред пациенти от всички възрастови групи и най-честият причинител на остро възпаление на средното ухо (отитис медиа) при децата. Пневмококите са чест бактериален причинител и на други локални и системни инфекции, като придобити в обществото респираторни инфекции (емпиеми, синусити, бронхити).

Терапията на тежките инфекции причинени от *S. pneumoniae* се затруднява поради нарастващата резистентност към различни АМЛС. Значителен клиничен проблем създават макролид- и Penicillin-резистентните пневмококи у нас. Молекулярно-генетични проучвания са показали, че за развитието на резистентност към Penicillin и множествена резистентност при *S. pneumoniae* са допринесли динамични процеси, които се обуславят от вертикално разпространение на резистентни клонове, придобиване на резистентни гени в рамките на една клонална група и предаване на резистентни гени към нови клонални групи.

С въвеждането на конюгирани ваксини се постигна снижаване на процента на разпространение на антибиотико-резистентните щамове *S. pneumoniae*, но се наблюдават и динамични промени, както по отношение на нови серотипове (серотипова замяна) свързани с пневмококовите инфекции, така също и по отношение на разпространението на нови антибиотико-резистентни щамове и резистентни клонове *S. pneumoniae* в обществото.

Поради тази причина, едновременното проучване на молекулярните механизми на антибиотична резистентност, серотиповото разпределение на щамовете *S. pneumoniae*, клоналния им произход и трансгранично разпространение и епидемиологичната им обвързаност от периода преди и след включването на ваксината в нашата страна ще осигурят детайлна информация за циркулиращите пневмококови щамове в болниците и обществото и адекватната им терапия.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел на настоящата дисертация е:

Да се изследва разпространението на резистентни клинични изолати *S.pneumoniae* сред пациенти с инвазивни и респираторни пневмококови инфекции за периода 2006-2013г., да се проучи серотиповото разпределение и да се анализират молекулярните механизми свързани с макролидната резистентност и генетичната структура и клонално сходство на изследваните резистентни щамове.

За постигането на тази цел си поставихме **следните задачи**:

1. Да се определи *in vitro* чувствителността на инвазивни и неинвазивни клинични изолати *S.pneumoniae* към АМЛС, използвани за лечение на пневмококовите инфекции чрез метода определяне на минималните подтискащи концентрации.
2. Да се определи честотата в разпространението на Penicillin-нечувствителните, макролид-резистентните и множествено-резистентните щамове, да се актуализират данните и да се анализират тенденциите в развитието на антимикробната резистентност при щамове *S.pneumoniae*.
3. Да се определи фенотипа на Erythromycin-резистентните пневмококи.
4. Да се направи серотипова характеристика на изследваните щамове *S.pneumoniae* и да се изчисли процента участие на ваксиналните серотипове от пневмококовите конюгирани ваксини (потенциалната ефикасност на PCV).
5. Да се определят генетичните детерминанти отговорни за макролидна резистентност при *S.pneumoniae* с PCR и да се диференцират подкласовете резистентни гени с RFLP и директно автоматично секвениране.
6. Да се проучи клоналният произход сред представителна сбирка от пневмококови щамове с еднакъв резистотип и серотип чрез молекулярно-генетичните методи за епидемиологично типизиране PFGE и MLST.

7. Да се направи анализ на клоналните и филогенетични връзки между проучваните щамове за последните осем години с данните публикувани от други страни.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Раздел I. Микробиологични изследвания

1. Изследвани щамове *S. pneumoniae*

В изследването са включени 591 щама *S.pneumoniae*, събрани за периода от 2006 г. до 2013 г. от централните микробиологични лаборатории на четири университетски болници в страната, НЦЗПБ, както и от микробиологични лаборатории в София. Разпределението на клиничните материали по градове е както следва: София – (n=318), Пловдив – (n=107), Плевен – (n=129), Варна - (n=37) клинични материали.

2. Микробиологични методи за идентификация на *S. pneumoniae*

2.1.Тест с оптохин

2.2.Тест за разтворимост в жлъчни соли

3. Изпитване на чувствителност към антибиотици и определяне на МИК

3.1. Дисково-дифузионен метод (ДДМ) според инструкциите на CLSI (M100-S23, 2013)

3.2. Определяне на МИК с микробульонен метод

3.3.Определяне на МИК с метод на серийните разреждания на антибиотиците в агар

3.4.Определяне на МИК с градиентен тест за антибиотична чувствителност (Е тест)

4. Фенотипни методи за проучване на механизмите на резистентност към макролидни антибиотици

4.1. Фенотип на макролидна резистентност по троен дисков метод (Montanari et all., 2001г.)

5. Серотипиране

5.1. Метод на Нойфелд за набъбване на капсулата

5.2. Латекс-аглутинация

Раздел II. Молекулярно – биологични изследвания

1. Изолитране на тотална бактериална ДНК

2.Полимеразо-верижна реакция (PCR) за откриване на гените на макролидна резистентност при *S. pneumoniae*

3. Методи за диференциране на подкласове *mef(E)* и *mef(A)* гени

3.1. RFLP (restriction fragment length polymorphism) - метод с BamHI ендонуклеаза на всички 114 щамове с доказан *mef* ген след PCR-амплификация.

3.2. Директно автоматично секвениране на *mef* ген от 19 произволно избрани щамове *S.pneumoniae* с доказан *mef* ген в секвенатор модел ABI3130XL (Applied Biosystems, САЩ). Сравнителен анализ на получените секвенционни последователности и откриване на нуклеотидните несъответствия, отговорни за разграничаването на *mef(E)* и *mef(A)* с помощта на софтуерна програма FinchTV v 1.4.0, Geospiza Research Team.

4. Молекулярно типичане с pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

За представителна сбирка резистентни щамове *S. pneumoniae* от еднакъв серотип е извършено молекулярно типичане с PFGE на Gene-navigator апарат (Amersham Biosciences, Швеция) чрез макрорестрикционен анализ на геномната им ДНК с ендонуклеаза SmaI (20,000 units/ml, NEB, USA). Генерираните рестрикционни профили са класифицирани по Tenover (Tenover F.,1995).

5. Мултилокусно секвениране, MLST (multilocus sequence typing) на 7 “housekeeping”, консервативни гени *aroE*, *gdh*, *gki*, *recP*, *spi*, *xpt*, *ddl* при щамове *S. pneumoniae* от еднакъв серотип. Определяне на алелните профили и принадлежността към съответен секвенционен тип в базата данни на www.mlst.net. Праймерите двойки използвани за PCR амплификация на тези гени са публикуваните от M.Enright и B.Spratt (Enright M.,1998).

6. Анализ с e-BURST алгоритъм

Определяне на клоалния произход на щамове *S. pneumoniae* и доказване на родствени генотипове в пневмококовата популация. <http://eburst.mlst.net/>

7. Свързване на MLST клоален комплекс със съответстващ международен клон от Pneumococcal Molecular Epidemiology Network (PMEN)
<http://web1.sph.emory.edu/PMEN/index.html>.

8. Статистическа и софтуерна обработка на данните

Клъстерният анализ на щамове типирани с PFGE е извършен чрез построяване на дендрограма по алгоритъм посочен в <http://genomes.urv.cat/UPGMA/>.

За построяване на клонални комплекси въз основа на получените резултати от MLST е използвана софтуерна програма eBurst V.3.

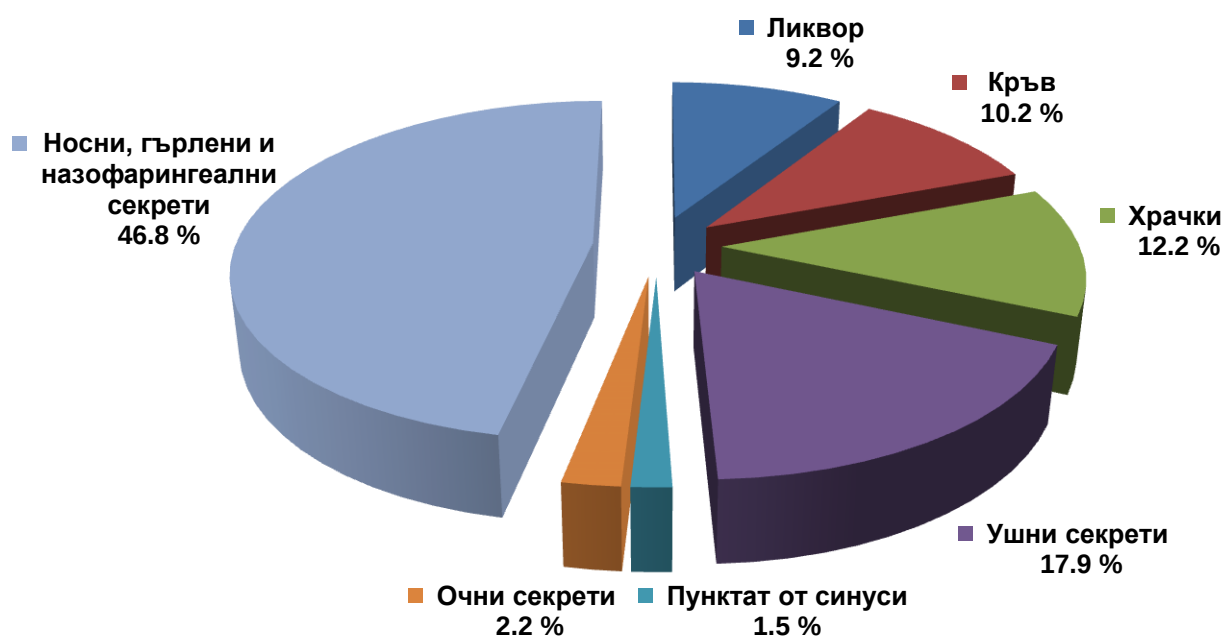
За изчисляване на статистическа значимост (Р-стойност): <http://www.socscistatistics.com/pvalues>. При стойност на $P < 0.05$ разликата е считана за сигнификантна.

Намиране на статистическа корелация между използваните методи за молекулярно типирание с коефициент на Wallace. <http://biomath.itqb.unl.pt/ClusterComp>.

ГЛАВА IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

I. Демографски и клинични данни за изследваните щамове *S.pneumoniae* от пациенти с пневмококови инфекции

Графика 1. Разпределение на щамовете *S.pneumoniae* според източника на izolата (вида на материала) за изследвания период 2006г. - 2013г.



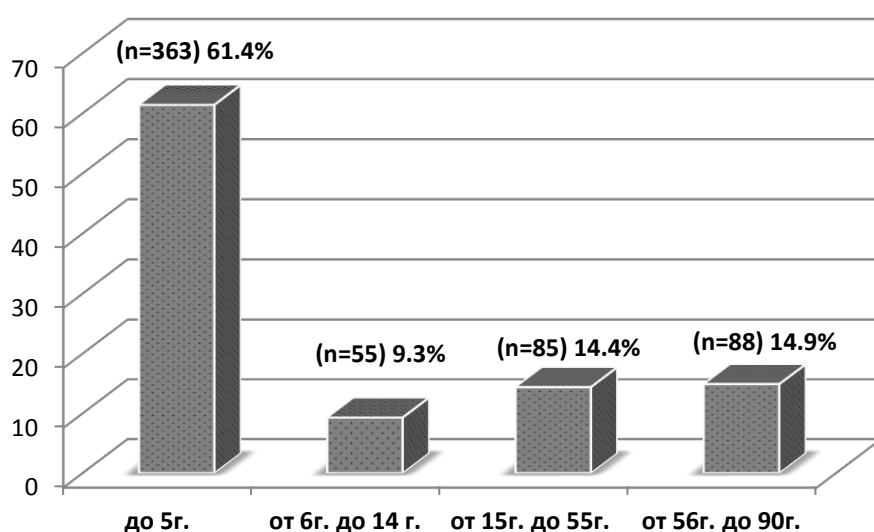
Най-честите прояви на инвазивни обществено-придобити пневмококови заболявания бяха менингитите (47.4%), пневмонии с плеврален излив (24.5%) и бактериемия (18.5%), а 9.6% от инвазивните щамове бяха получени от материали на пациенти с друга клинична форма на пневмококова инфекция - ендокардит, емпием, абсцес, перитонит.

Сред неинвазивните пневмококови заболявания беше голям дялът на пациентите с остър среден отит (n=106, 17.9%). Респираторните изолати (62.7%) бяха най-често

изолирани от пациенти с инфекции на горни дихателни пътища (фарингити и синусити) и на долни дихателни пътища (пневмонии и ХОББ).

Пневмококови щамове бяха изолирани от всички възрастови групи – пациенти на възраст от 1 месец до 90 години.

Графика 2. Възрастово разпределение на пациентите, от които са изолирани 591 клинични щама *S.pneumoniae*



При пациентите до 5г. възраст най-чести прояви на пневмококови заболявания бяха респираторните инфекции – 59.3%, отит на средното ухо - 26.2% и ИПЗ – 11.2%. При възрастните пациенти над 65г. най-чести бяха ИДДП – 46.9% и ИПЗ – 26.5%.

II. Микробиологични изследвания

1.Чувствителност към антимикробни лекарствени средства

Направен е анализ на активността на 15 вида АМЛС за 591 щама *S. pneumoniae* изследвани за периода: 2006-2013г.според критериите на CLSI документите (M100-S23, 2013). Клиничните материали бяха разделени на инвазивни, от ушни ексудати и респираторни. (Таблицы 1,2,3).

Общият брой на чувствителните инвазивни щамове към всички тествани антибиотици беше 50 (43.8%) (Таблица 1).

Penicillin - нечувствителните менингитни щамове бяха 15(27.8%), другите Penicillin - нечувствителни инвазивни щамове бяха 21 (18.4%).

Висока беше нечувствителността към Ceftriaxone: 13.0% при щамове изолирани от пациенти с менингит и 11.7% при пневмококите изолирани от други стерилни области. Щамове с намалена чувствителност към парентерален Cefuroxime бяха 17.6%.

Табл.1. Антимикробна чувствителност на 114 инвазивни щамове *S. pneumoniae*.

Антибиотик (Брой тестувани щамове)	МИК (µg/mL)			Чувствителност		
	МИК50	МИК90	МИК диапазон	S n (%)	I n (%)	R n (%)
Penicillin G						
Менингитни (54)	0.06	2	≤ 0.01 - 8	39 (72.2)	-	15 (27.8)
Други инвазивни (60)	0.03	2	≤ 0.01 - 8	54 (90.0)	3 (5.0)	3 (5.0)
Ceftriaxone						
Менингитни (54)	0.03	0.5	≤ 0.01 - 2	47 (87.0)	6 (11.1)	1 (1.9)
Други инвазивни (60)	0.03	1	≤ 0.01 - 4	53 (88.3)	3 (5.0)	4 (6.7)
Cefuroxime sodium (114)	0.12	4	≤ 0.01 - 16	94 (82.5)	1 (0.9)	19 (16.6)
Ampicillin						
Други инвазивни (60)	0.12	2	≤ 0.12 - ≥ 8.0	54 (90.0)	1 (1.7)	5 (8.3)
Amoxicillin-clavulanic acid						
Други инвазивни (60)	0.06	2	≤ 0.03 - ≥ 8	54 (90.0)	4 (6.7)	2 (3.3)
Erythromycin (114)	0.25	64	≤ 0.03 - ≥ 64	89 (78.0)	-	25 (22.0)
Clarithromycin (114)	0.25	64	≤ 0.03 - ≥ 64	89 (78.0)	-	25 (22.0)
Clindamycin (114)	0.03	64	≤ 0.03 - ≥ 64	90 (78.9)	-	24 (21.1)
Levofloxacin (114)	0.25	2	≤ 0.25 - 2	114 (100.0)	-	-
Meropenem (50)	0.06	1	≤ 0.06 - 2	40 (80.0)	3 (6.0)	7 (14.0)
Tetracycline (114)	0.5	4	≤ 0.25 - 64	81 (71.0)	1 (0.9)	32 (28.1)
Chloramphenicol (114)	2	4	≤ 0.5 - ≥ 16	106 (93.0)	-	8 (7.0)
Rifampin (114)	0.03	0.06	≤ 0.03 - 0.12	114 (100.0)	-	-
Trimeth-sulfameth (114)	0.25	32	≤ 0.25 - 32	59 (51.8)	9 (7.9)	46 (40.3)
Vancomycin (114)	0.03		≤ 0.12	114 (100.0)	-	-

Забележка: *R: резистентни; I: интермедиерни; S: чувствителни. Интерпретацията на резултатите е направена спрямо CLSI / M100-S23, 2013г.

Amoxicillin/clavulanic acid (2 : 1 разреждане). МИК стойностите се отнасят и за Amoxicillin.

Trimethoprim/sulphamethoxazole (1 : 19 разреждане). МИК стойностите се отнасят и за Trimethoprim.

Високо ниво на резистентност беше отбелязано към Tetracycline (29.0%), което потвърждава проучванията за свързани генетични елементи, кодиращи тетрациклинова и еритромицинова резистентност (Mingoia M.,2007). По отношение на активността на Trimethoprim-sulfamethoxazole почти половината щамове показаха нечувствителност (48.2%). Активността към Meropenem е изпитвана към общо 50 на брой щамове и нечувствителност беше открита при 10 щамове (20.0%).

Резултатите потвърдиха, че Amoxicillin-clavulanic acid и флуорохинолоните са активни АБП с високи нива на чувствителност, съответно (90.0%) и (100.0%) за лечение на не-менингитни ИПЗ.

Най-висока антибиотична активност за лечение на инвазивните пневмококови заболявания показаха Vancomycin, Levofloxacin и Rifampin (100%), следвана от (93.0%) за Chloramphenicol и (87.0%) за Ceftriaxone.

Табл.2. Антимикробна чувствителност на 106 щамове *Streptococcus pneumoniae* изолирани от ексудат от средното ухо при пациенти с остър среден отит.

Антибиотици	МИК (µg/mL)			Чувствителност		
	МИК50	МИК90	МИК диапазон	S n (%)	I n (%)	R n (%)
Penicillin V ^a	0.12	2	0.01 - 8	36 (34.0)	39 (36.8)	31 (29.2)
Amoxicillin	0.25	4	0.03 - 8	94 (88.6)	6 (5.7)	6 (5.7)
Amoxicillin-clavulanic acid	2	2	0.03 - 8	96 (90.6)	3 (2.8)	7 (6.6)
Cefuroxime sodium	0.5	8	0.03 - ≥16	76 (71.7)	4 (3.8)	26 (24.5)
Ceftriaxone	0.03	1	0.01 - 8	99 (93.4)	5 (4.7)	2 (1.9)
Erythromycin	2	64	0.03 - ≥ 64	49 (46.2)	-	57 (53.8)
Clarithromycin	2	64	0.03 - ≥ 64	49 (46.2)	-	57 (53.8)
Clindamycin	0.25	64	0.03 - ≥ 64	62 (58.5)	-	44 (41.5)
Levofloxacin	0.5	1	0.5 - 4	104 (98.1)	2 (1.9)	-
Tetracycline	8	64	0.12 - 64	49 (46.2)	1 (0.9)	56 (52.9)
Chloramphenicol	4	8	0.5 - 16	95 (89.6)	-	11 (10.4)
Trimeth-sulfameth	4	32	0.12 - 32	28 (26.4)	8 (7.6)	70 (66.0)

Забележка ^a Стойностите се отнасят за “орален” penicillin (penicillin V)

Най-висока антимикробна активност сред пневмоковите щамове от ушни ексудати беше открита за Amoxicillin-clavulanic acid, Ceftriaxone и Levofloxacin, съответно 90.6% , 93.4% и 98.1% чувствителни пневмококи.

Намалена чувствителност към Penicillin (орален Penicillin V) беше наблюдавана при 66.0% от щамове, като от тях пневмококите с висока степен на резистентност към Penicillin (MIC ≥ 2 µg /mL) бяха 29.2%.

Високи нива на нечувствителност бяха регистрирани към цефалоспорини от втора генерация – Cefuroxime (28.3%). Повече от половината щамове (53.8%) показаха нечувствителност към макролиди. Както и при инвазивните щамове *S. pneumoniae*, и тук нивата на резистентност към Tetracycline и Trimethoprim-sulfamethoxazole бяха много високи, съответно: 53.8% и 73.6%.

Щамове *S.pneumoniae* изолирани от пациенти с остър среден отит бяха сигнификантно по-често резистентни към Penicillin и Erythromycin (вкл. и другите макролиди) в сравнение с инвазивните щамове - 66.0% срещу 18.4% съответно за Penicillin (P-стойност < 0.00001) и 53.8% срещу 22.0% за Erythromycin (P-стойност < 0.00001).

Табл.3. Антимикробна чувствителност на 371 щамове *Streptococcus pneumoniae* изолирани от храчка, синус, горни респираторни материали (назофаринкс, гърлени, носни секрети) и очни секрети

Антибиотици	МИК (µg/mL)			Чувствителност		
	МИК50	МИК90	МИК диапазон	S n (%)	I n (%)	R n (%)
Penicillin V ^a	0.12	2	0.01 - 4	149 (40.2)	128 (34.5)	94 (25.3)
Amoxicillin	0.25	2	0.01 - 8	348 (93.8)	12 (3.2)	11(3.0)
Ampicillin	0.25	2	0.01 - 8	348 (93.8)	12 (3.2)	11(3.0)
Amoxicillin-clavulanic acid	0.25	2	0.01 - 8	348 (93.8)	12 (3.2)	11(3.0)
Cefuroxime sodium	0.25	4	0.01 - ≥ 8	257 (69.3)	24 (6.5)	90 (24.2)
Ceftriaxone	0.06	0.5	0.01 - 8	357 (96.2)	12 (3.2)	2 (0.6)
Erythromycin	0.12	64	0.03 - ≥ 64	214 (57.7)	1 (0.3)	156 (42.0)
Clarithromycin	0.12	64	0.03 - ≥ 64	216(58.2)	1 (0.3)	154 (41.5)
Clindamycin	0.06	64	0.03 - ≥ 64	269 (72.5)	-	102 (27.5)
Levofloxacin	0.5	2	0.5 - 16	359 (96.7)	10 (2.7)	2 (0.6)
Rifampin	0.03	0.03	0.03 - 0.06	371 (100.0)	-	-
Tetracycline	1	64	0.12 - 64	197 (53.1)	10(2.7)	164 (44.2)
Chloramphenicol	2	16	0.5 - 64	308 (83.0)	-	63 (17.0)
Trimeth-sulfamethoxazole	4	16	0.25 - 32	129 (34.8)	28 (7.5)	214 (57.7)

Забележка^a Стойностите се отнасят за “орален” penicillin (penicillin V)

Penicillin - нечувствителните щамове *S.pneumoniae* изолирани от пациенти с ИГДП бяха (59.8%). Резултатите за чувствителността към Ampicillin, Amoxicillin и Amoxicillin-clavulanic acid показаха висока антибактериална активност на тези препарати.

Нивото на резистентност към цефалоспорини от втора генерация беше доста по-високо от това при третогенерационните цефалоспорини, съответно: Cefuroxime (30.7%) и Ceftriaxone (3.8%).

Еритромицинова резистентност беше открита при 42.0% от пневмококовите щамове от респираторни материали. Clindamycin - резистентните щамове бяха 27.5%. Най-високи нива на резистентност бяха регистрирани към Tetracycline - 46.9% и Trimethoprim-sulfamethoxazole - 65.2%.

Малък процент от респираторните щамове показаха нечувствителност към флуорохинолони (Levofloxacin) – 3.3%. Нечувствителни щамове към Rifampin не бяха открити.

Резултатите от изпитването на антибиотичната чувствителност за щамове от пневмококовата колекция за 2006г. - 2013г. показаха, че най-висока резистентност към Penicillin имаха пневмококите от екссудати от средно ухо – 66.0%.

Най – високо ниво на нечувствителност към цефалоспоринови от трета генерация беше отбелязано при менингитните щамове – 13.0%, поради по-ниските МИК гранични стойности за интерпретация на чувствителност при тях.

Нивото на резистентност към макролидни антибиотици (Erythromycin) беше високо при всички пневмококови щамове, като отбеляза най-висок ръст при пневмококите изолирани от пациенти с остър среден отит (53.8%) и тези от пациенти с инфекции на горни и долни дихателни пътища (35.6%).

Според критериите на CLSI/M100-S23,2013г. за менингитни изолати: МИК стойности за парентерален Penicillin и за всички останали щамове МИК стойности за орален Penicillin (≥ 0.12 mg/mL), 313 (53.0%) от изследваните щамове показаха нечувствителност към Penicillin, от които 170 щамове (28.8%) бяха с интермедиерна чувствителност към Penicillin, а 143 щамове (24.2%) бяха с висока резистентност към Penicillin (МИК ≥ 2 mg/mL).

За сравнение с периода 2001-2005г. сред изследвани 328 пневмококови щамове пеницилинова резистентност с ниски нива (МИК, 0.125 до 1 mg/mL) е била отчетена при 25.6% от щамове, а с високи нива (МИК, ≥ 2 mg/mL) – при 13.7% (Setchanova L.,2007).

За периода 1991-1993г. нечувствителност към Penicillin са показали 24.3% от 296 изследвани пневмококови щамове. (Setchanova L.,1995).

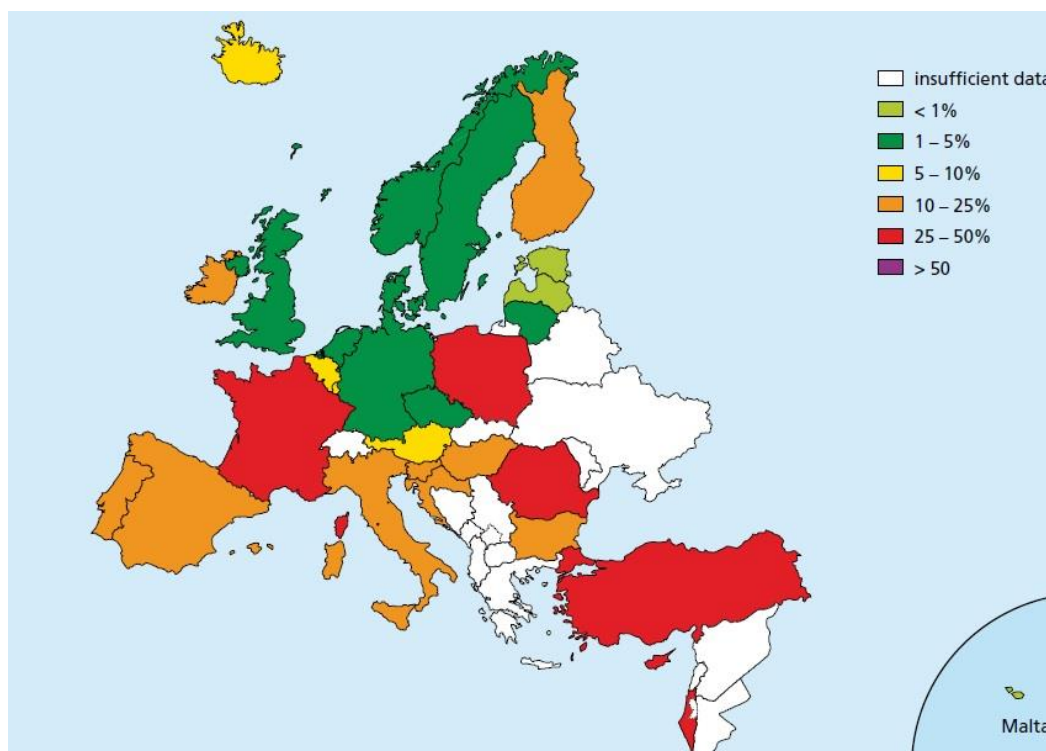
Нивата на интермедиерно - резистентните и високо - резистентните пневмококови щамове към Ceftriaxone за същият период (2001-2005г.) са били (2.7%) и (1.2%) (Setchanova L.,2007). Тези стойности са значително по-ниски от стойностите за интермедиерно - резистентните и високо - резистентните щамове към Ceftriaxone – (24.0%) и (11.1%), намерени съответно за периода 2006г. - 2013г.

Основният проблем с антимикробната резистентност при *S. pneumoniae* в световен мащаб е нечувствителност към Penicillin и макролиди, и България не прави изключение. Многобройни проучвания потвърждават, че увеличената консумация на антибиотици е свързана с появата на АБР в световен мащаб (ESAC,2011). В доклад на ESAC – European Surveillance of Antimicrobial Consumption от 2011г. за антибиотична консумация, данните за България показват най-честа употреба на Penicillin и други β -лактамни антибиотици – (56.4%), а на второ място са макролидите – (16.9%). Нивата на антибиотичната

консумация на хинолони и тетрациклини са съответно: (11.8%) и (9.2%). ESAC докладва, че най-висока антибиотична консумация сред 29-те европейски държави е регистрирана в Гърция – 35.1%, следвана от Кипър – 32.0%, Франция – 28.7% и Италия – 27.6%. България заема средни позиции от 19.5% (средна дневна доза на 1000 жители дневно) консумация на АБ, подобни са данните за АБ консумация в Полша и Испания.

За нашата страна, данните за Penicillin - нечувствителните инвазивни щамове *S. pneumoniae* за 2006-2013г. бяха подобни на докладваните в Испания, Португалия, Италия, Унгария, Хърватска и Словения.

Фиг.1. Данни за честотата на инвазивните Penicillin - нечувствителни щамове *S.pneumoniae* в европейските страни (%), 2007г.

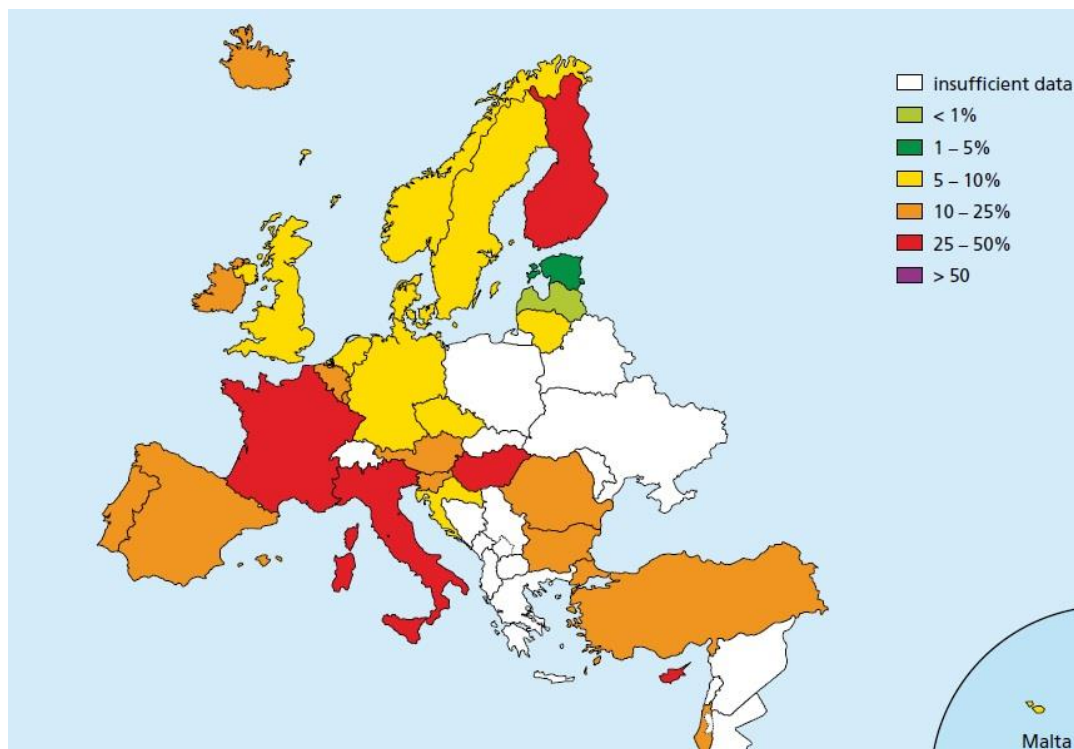


The European Observatory on Health Systems

По отношение на макролидната резистентност в България за периода от 2001г. до 2005г. е отчетено ниво на ERSP от (24.7%), а Clindamycin – резистентни са били (10.7%) от пневмококите (Setchanova L.,2007). За периода 2006г. - 2013г. резултатите показват почти двойно нарастване на ERSP за изследваните 591 щам (40.4%), а Clindamycin-резистентните щамове са (28.8%). (Стойността на P е < 0.00001 . Резултатът е сигнификантен при $p < 0.05$ при сравнение на процентите за двата периода).

Обобщени данни за нивата на инвазивните Erythromycin-резистентни щамове *S.pneumoniae* в Европейските страни са показани на Фиг.2.

Фиг.2. Данни за честотата на инвазивните Erythromycin – резистентни щамове *S.pneumoniae* в европейските страни (%), 2007г.



The European Observatory on Health Systems

За проучвания период инвазивните Erythromycin-резистентни щамове *S.pneumoniae* бяха 22.0%. Резултатите за макролидната резистентност сред инвазивните пневмококови щамове в България са подобни на докладваните в Румъния, Турция, Словакия, Словения, Испания и Португалия, където честотата на тези щамове варира между (10.0% и 25.0%).

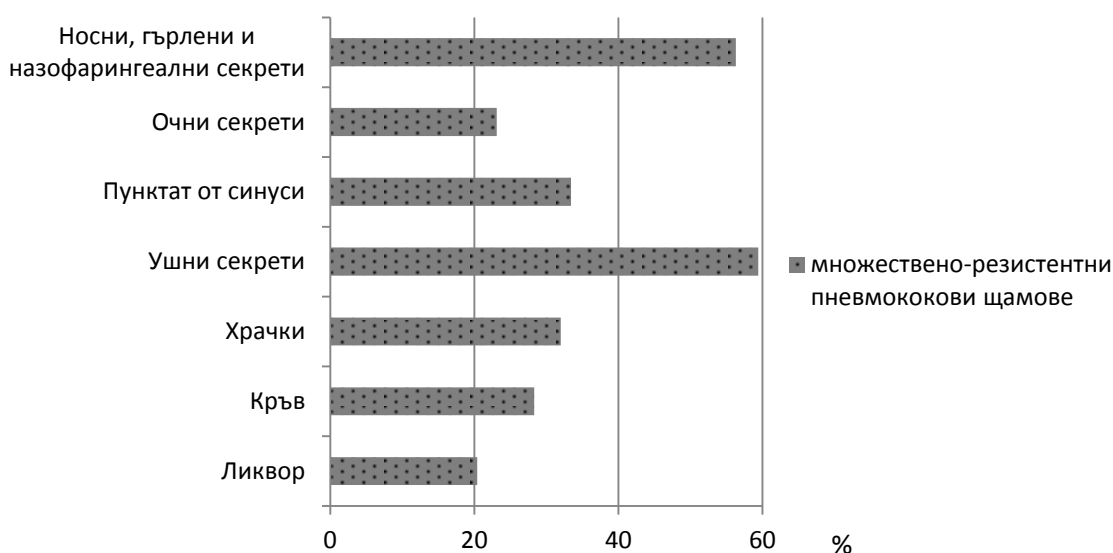
Успоредно с увеличаване на делът на Penicillin – нечувствителните и Erythromycin – резистентните пневмококови щамове, нараства и процентът на множествено - резистентните изолати.

Резултатите сред изследваните 591 клинични щама *S.pneumoniae*, показаха, че множествено – резистентни са приблизително половината щамове (n=276, 46.7%). За множествено - резистентни щамове приехме тези, които показаха резистентност към повече от три различни класа АМЛС. Сред Penicillin-нечувствителните щамове (n=311), едновременно резистентни и към Erythromycin бяха (n=194, 62.3%), а множествено-резистентни бяха 252 щама (81.0%).

Разпределението на множествено-резистентните щамове сред изследваните клинични материали *S.pneumoniae* е показано на Графика 3.

Най - честият резистотип сред множествено - резистентните изолати *S.pneumoniae* беше към Penicillin, Erythromycin, Tetracycline, Chloramphenicol и Trimethoprim-sulfamethoxazole. Преобладаваше в 76 (27.5%) от множествено - резистентните щамове. Други по - разпространени резистотипове сред пневмококовите изолати показаха резистентност към Penicillin, Erythromycin, Tetracycline и Trimethoprim-sulfamethoxazole – 27 щам (9.8%) и към Penicillin, Erythromycin, Chloramphenicol и Trimethoprim-sulfamethoxazole - 23 щам (8.4%).

Графика 3. Разпределение на множествено-резистентните щамове според вида на материала за 591 щам *S.pneumoniae*.



Най - висок брой множествено-резистентните щамове *S.pneumoniae* се откриха при изолатите от средно ухо (59.4%), следвани от щамове изолирани от носни, гърлени и назофарингеални секрети (56.3%). Най-ниско ниво на множествено-резистентни пневмококи беше отчетено при щамове изолирани от ликвор (20.4%).

Т.като детерминантите на резистентност са локализирани на мобилни генетични елементи, се разпространяват бързо чрез хоризонтален трансфер между членове на популацията. Придобитата резистентност е често множествена, като тенденцията води до появата на множествено - резистентни щамове. Последните проучвания сочат, че честата асоциация на устойчивост към Erythromycin и Tetracycline при *S.pneumoniae* е свързана с инсерция на *erm*(B) в конюгативен транспозон от семейство Tn916. Този транспозон има

два структурни елемента: Tn2009, съдържащ *tet*(M) ген плюс *mega* елемент с включен *mef*(E) ген и Tn2010, носещ *tet*(M) и *erm*(B) гени плюс *mega* елемент. (Mingoia M.,2007).

Друго доказателство за свързаната корезистентност и пренос на подвижни генетични елементи, водещ до появата на множествоно-резистентни щамове е Tn5253. Той представлява съставна структура от Tn5251, който е почти идентичен с Tn916, включващ гени за резистентност *erm*(B), *mef*(E), *tet*(M) и Tn5252 носещ детерминантата за хлорамфениколова резистентност *cat* ген. Тези нови доказателства подкрепят хипотезата за връзка между *cat*(Q) и *mef*(E) гени в *S.pneumoniae* (Mingoia M.,2007).

Съществена причина за глобалното нарастване на Penicillin - устойчивите и множествоно - резистентните пневмококи е появата и разпространението на антибиотико - резистентни пневмококови клонове. Такива множествоно - резистентни клонове *S.pneumoniae* са със световно разпространение и се докладват в различни региони по света. С най-голямо световно разпространение са клонове от серотипове 23F, 19F, 6B, 9V, 19A, които са често срещани и в нашата страна. В Европа най-често циркулиращите PMEN – клонове, допринасящи за високата резистентност в пневмококовата популация са Spain9V-3, Spain6B-2, Denmark 14-32, Sweden15A – 25, Taiwan19F-14, Spain23F-1, Poland6B -20 (Aguiar S.,2010, Ardanuy C.,2009, Bowers J.,2012, Shin J.,2011).

2. Серотипова характеристика на инвазивни и неинвазивни щамове *S.pneumoniae* и потенциално ваксинално покритие на пневмококовите конюгирани ваксини

С цел да бъдат анализирани всички серотипове с течение на времето, всички пневмококови щамове бяха разделени в два периода в зависимост от годината, когато щамът е изолиран: пред-ваксинален (2006г. – 2010г.) и пост-ваксинален (2011г.-2013г.). Три PCV в момента са лицензирани за употреба при деца. PCV 7 - валентната е широко използвана в целия свят през последните 10 години. През 2010г. са въведени две нови PCV - PCV10 (Synflorix; GSK, UK) и PCV13 (Prevenar 13; Pfizer, USA). В българският имунизационен календар от 1.04.2010г. е въведена изборно, след търг 10-валентната конюгирана ваксина PCV10. PCV7 почти не е използвана в България преди въвеждането на PCV10.

Серотипово разпределение на щамове *S.pneumoniae* от пациенти с инвазивни пневмококови заболявания.

Всички инвазивни щамове, общо 114 на брой, бяха серотипирани. Предваксиналният период (2006–2010г.) обхващаше 84 инвазивни щама, а следваксиналният (2011-2013г.) - 30 инвазивни щама.

Най - разпространените серотипове през предвакциналния период сред 114 инвазивни щамове бяха ваксинални серотипове 19F (14.3%), 6B (12.0%), 3 (12.0%), 1 (8.3%), 7F (7.1%). Неваксиналните серотипове бяха n=13, 15.5%. Щамовете с PCV7-серотипове бяха 46.4%, щамовете с PCV10-серотипове бяха 67.8%, а тези с PCV13 – 84.5%, което потвърди нуждата от въвеждането на по-широкоспектърна конюгирана ваксина в България.

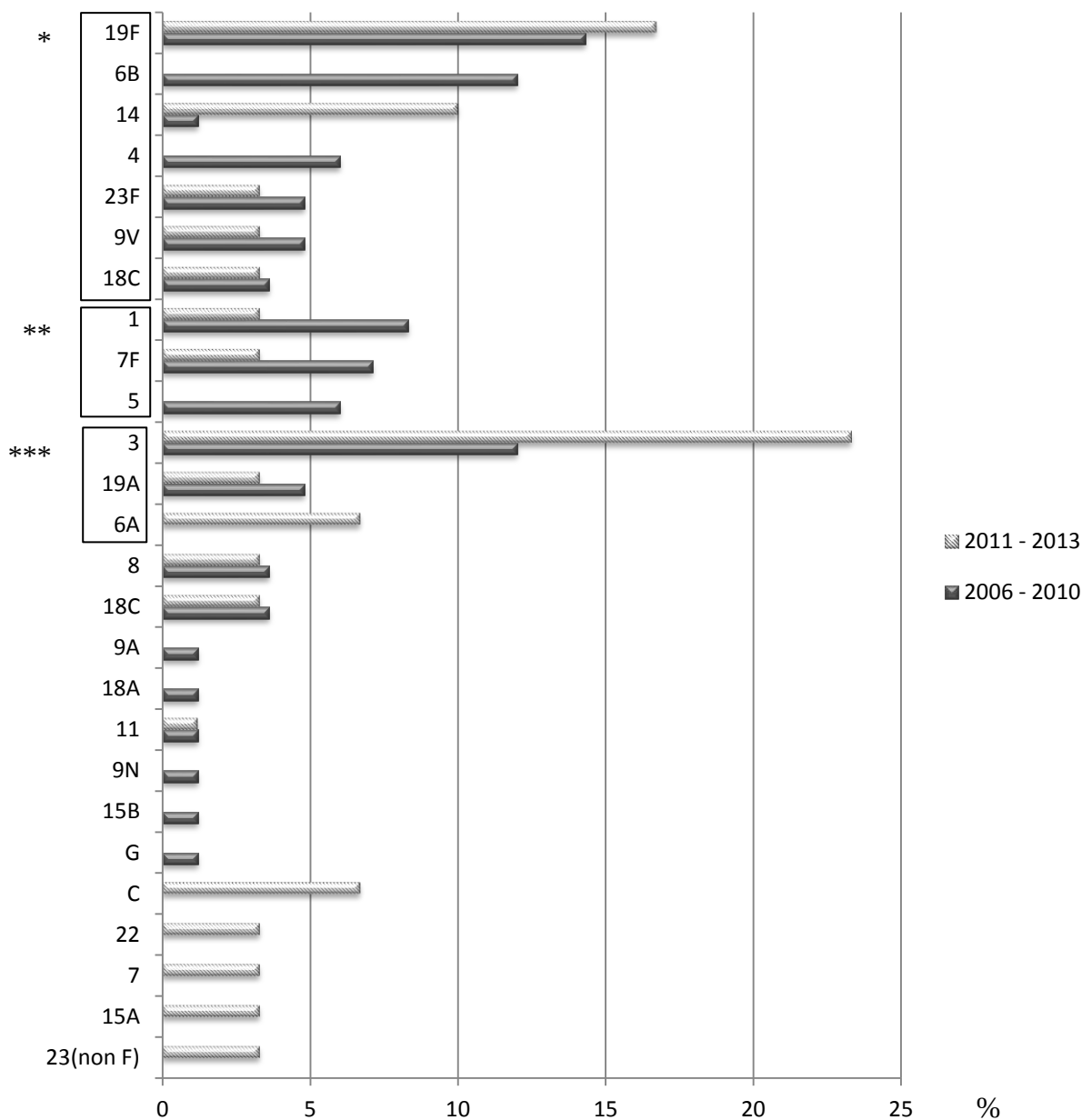
На Графика 4 е представено серотиповото разпределение в предвакцинален и следвакцинален период на инвазивни клинични щамове *S.pneumoniae*.

Сравнението с по-ранни периоди показва, че най – широко застъпеният серотип 19F се открива по-често за периода 2006г.-2010г., в сравнение с 1995г.-2005г. (7,1%). Серотип 6B също се среща по-често в периода 2006г.-2010г. в сравнение с 1995г.-2005г. (5.5%) (Setchanova L.,2012). Вероятна причина за това е клоналното разпространение на серотипове 19F и 6B в обществото между 2006г. и 2010г. За серотип 14 се наблюдаваше обратната тенденция - намалява в периода 2011г.-2013г. в сравнение с предвакциналния период от 9.4% на 1.2%. Забелязва се тенденция за серотиповата подмяна след националната PCV10 ваксинация, като най-разпространени серотипове в следвакциналния период бяха серотипове 3 (не-вакцинален) и 19F (вакцинален тип).

След въвеждането на PCV10 в имунизационния календар, броят на изолираните инвазивни щамове намалява и за периода 2011г.-2013г. те бяха (n= 30), (10 щамове средно годишно) спрямо щамовете от периода 2006г. - 2010г. (n= 84), (17 щамове средно годишно). Серотиповете, които се срещаха най-често в следвакциналния период сред инвазивните клинични щамове бяха серотипове 3 (23.3%), 19F (16.7%), 14 (10.0 %) и 6A (6.7%). Ваксиналните серотипове при всички инвазивни щамове за следвакциналния период от PCV7 бяха 36.6%, от PCV10 бяха 43.3%, а тези от PCV13 бяха 76.6%

Наблюдава се увеличаване на процентът на неваксиналните серотипове, които съставят (23.3%) от всички серотипове, доказани за периода 2011г.-2013г. в сравнение с (15.5%) за периода – 2006г.-2010г.

Графика 4. Серотипово разпределение на 114 инвазивни щама *S.pneumoniae* в пред-ваксинален (2006 – 2010г.) и след-ваксинален (2011 – 2013г.) период.



Забележка: G и C могат да принадлежат към следните серотипове/серогрупи :

G – 29, 34, 35 (35F, 35A, 35B, 35C), 42, 47 (47F, 47A)

C – 24 (24F, 24A, 24B), 31, 40

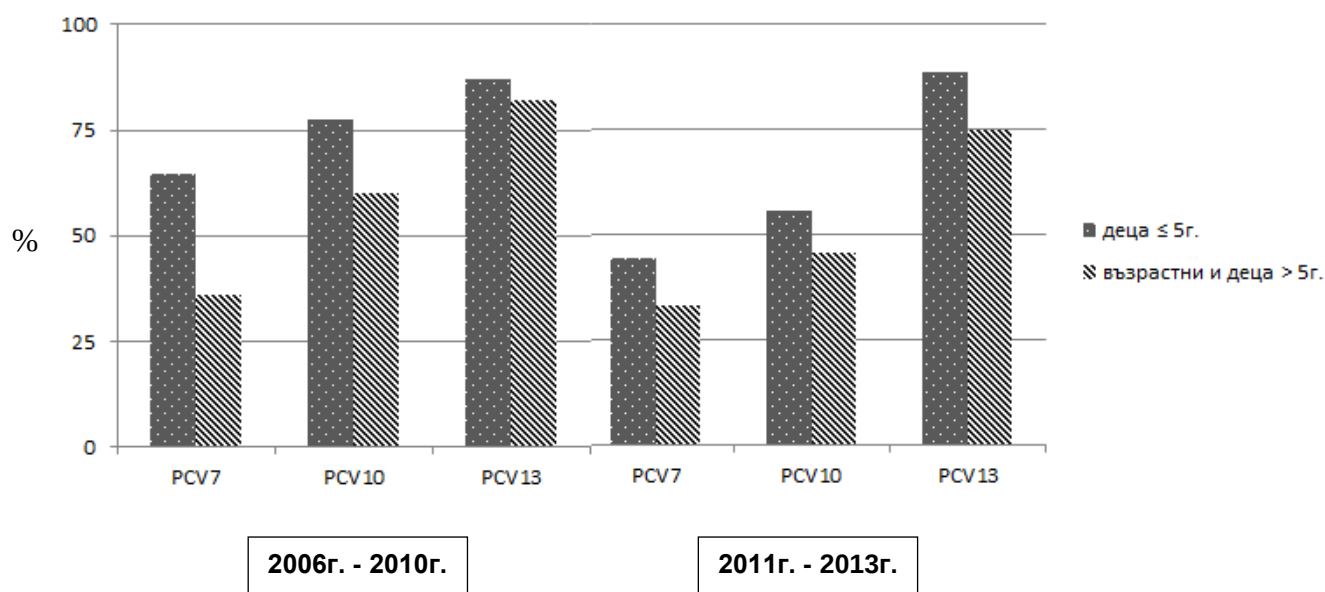
Оградените и маркирани серотипове с една звезда влизат в състава на PCV7

Оградените и маркирани серотипове с две звезди влизат в състава на PCV10

Оградените и маркирани серотипове с три звезди влизат в състава на PCV13

Съществено практическо значение има наблюдаването на ефективността на пневмококовите конюгирани ваксини (PCV) включени в националната имунизационна програма чрез мониториране на серотиповото разпределение за пневмококовите щамове.

Графика 5. Потенциално серотипово покритие според възрастовите групи на PCV за щамове *S.pneumoniae* от пациенти с инвазивни пневмококови заболявания за предвакциналния (2006 - 2010г.) и следвакциналния (2011 - 2013г.) период.



През първите 5 години от възрастта (целевата група за PCV имунизация), най-често срещаните серотипове преди въвеждането на масовата имунизация бяха 19F (n=5, 16.1%), 6B (n=5, 16.1%), 4 (n=3, 9.6%) 9V (n=3, 9.6%) и 23F (n=3, 9.6%). Потенциалното покритие от ваксините PCV7, PCV10 и PCV13 при деца под 5 г. в предвакциналния период беше съответно (64.5%), (77.4%) и (87.1%).

Най-разпространените серотипове при по-големи деца над 5г. възраст и възрастни пациенти в предвакциналния период бяха 3 (n=9, 17.0%), 1 (n=7, 13.2%), 19F (n=7, 13.2%), 6B (n=5, 9.4%) и 7F (n=4, 7.5%).

Размерът на покритие от страна на PCV7, PCV10 и PCV13 за по-големи деца над 5г. възраст и възрастни пациенти за периода 2006г. - 2010г. беше съответно (36.0%), (60.0%) и (82.0%).

В следвакиналният период се отбеляза значителен спад при броя изолирани щамове (n=30, 26.3%). Серотиповете, доказани за този период бяха предимно от 19F, 19A, 3, 23F, 14. В този период покритието от ваксиналните серотипове за PCV7, PCV10 и PCV13 при децата до 5г. възраст беше (44.4%), (55.6%) и (88.9%). При групата на деца над 5г. и възрастни потенциалното покритие беше съответно (33.3%), (45.8%) и (75.0%) за ваксините PCV7, PCV10 и PCV13. Серотиповете, които се срещаха по-често в тази възрастова група бяха 3, 19F, 7F, 14, 6A, като във възрастта от 55г. до 85г. – рискова група за по-висока честота на ПИ, преобладаваха серотипове 3 и 19F.

След въвеждането на първата PCV – (PCV7) в САЩ през 2000 г., и широката и употреба по света, се отчита драстично намаляване на честотата на ПЗ при деца (CDC, 2010). Серотиповото покритие на PCV7 в нашата страна при деца под 5 години е подобно на това в много европейски страни, преди въвеждането на масова имунизация (Liu Z.,2012, Maraki S.,2010, Mott M.,2013, O'Brien K.,2003). Въпреки това, честотата на ИПЗ и резистентността отново нарастват поради появата на множество резистентни, не-ваксинални "заменени" серотипове (Croucher N.,2011).

Различни изследвания документират, че "бягство" от PCV7 на резистентни пневмококови клонове, документирани в PMEN, става чрез няколко независими хоризонтални трансфера, които водят до серотипово превключване на PMEN - щамове от ваксинален серотип до неваксинален такъв (Pandya G.,2011).

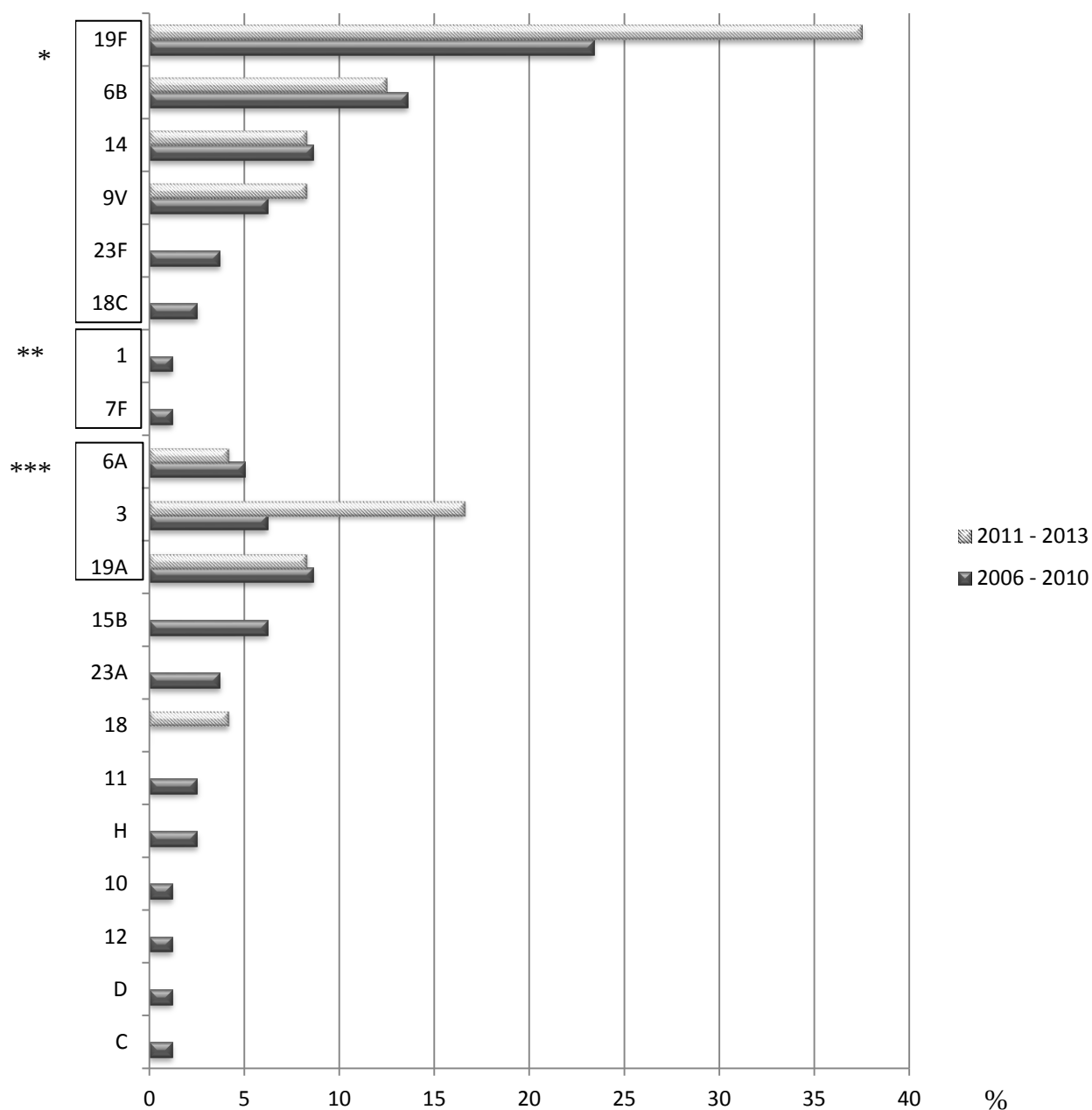
Новите ваксини (PCV10 и PCV13) имат много по-добро серотипово покритие, като 13 - валентната ваксина е с най-високо серотипово покритие за изследваните клинични изолати. Предполага се, че серотиповата замяна е в следствие на силен селективен натиск за превключване на капсулни варианти не само при PCV7, но и при PCV10 – имунизираните. Трябва да се очаква, че пневмококите ще се адаптират бързо към постоянния антибиотичен натиск и ваксини като PCV10 и PCV13.

Серотипово разпределение на щамове *S.pneumoniae* от пациенти с остър среден отит

Резултатите показаха, че сред пневмококовите щамове, изолирани от ушни ексудати както в пред-ваксиналния, така и в след-ваксиналния период се открояват предимно множество - резистентни серотипове, което затруднява ефикасното лечение на възпаления на средното ухо.

За първият период 2006г. - 2010г. бяха изолирани 81 пневмококови щам, а през вторият броят им значително намаля (n=24), след въвеждането на PCV10.

Графика 6. Серотипово разпределение на 105 щаме *S.pneumoniae* от пациенти с остър среден отит за предвакцинален (2006 – 2010г.) и следвакцинален (2011 – 2013г.) период.



Забележка: C, D и H пневмококи могат да принадлежат към следните серотипове/серогрупи :

C – 24 (24F, 24A, 24B), 31, 40

D – 16 (16F, 16A), 36, 37

H – 13, 28 (28F, 28A)

Оградените и маркирани серотипове с една звезда влизат в състава на PCV7

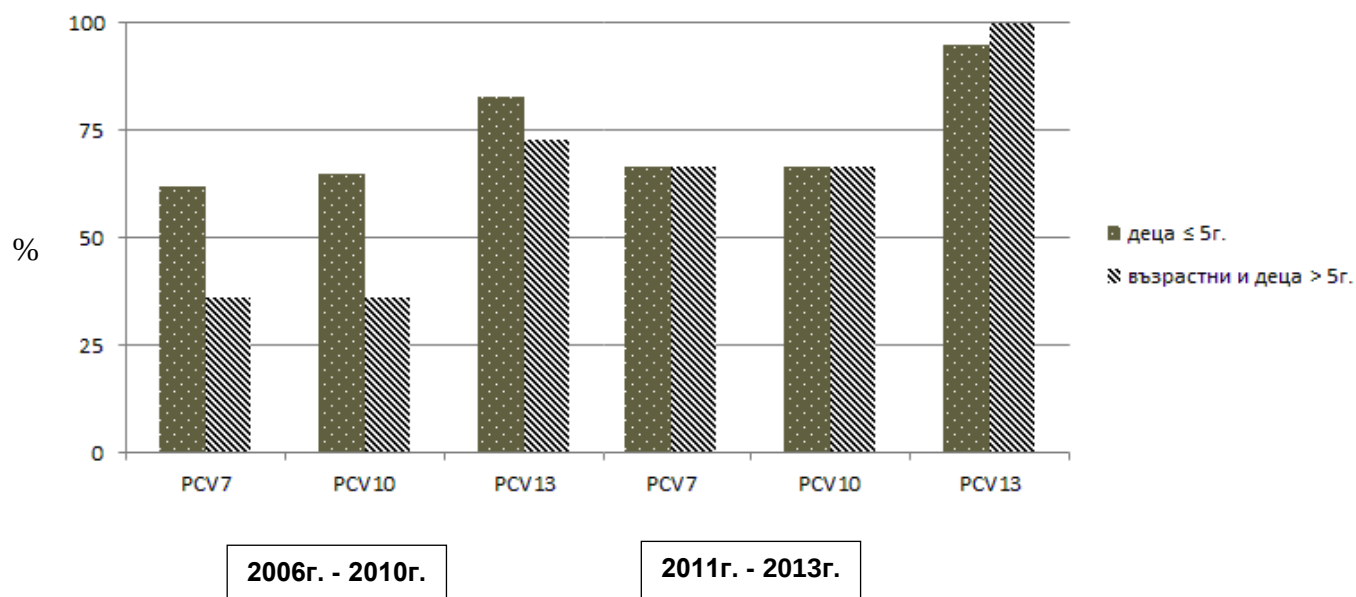
Оградените и маркирани серотипове с две звезди влизат в състава на PCV10

Оградените и маркирани серотипове с три звезди влизат в състава на PCV13

В предвакциналния период най-голям брой изолати от средно ухо бяха от серотипове 19F (23.5%), 6B (13.6%), 19A (8.6%), 14 (8.6%), 3 (6.2%), 9V (6.2%), 15B (6.2%) и 6A (5.0%). Потенциалното серотипово покритие за PCV7, PCV10 и PCV13 за предвакциналния период за шамовете от ушни ексудати беше съответно: 59.3%, 61.8% и 82.8%. Разпространението на невакциналните серотипове беше 17.2%.

В следвакциналния период вакциналният серотип 19F продължава да бъде най-често доказваният серотип – (n=9, 37.5%). PCV13-вакцинален серотип 3 (n=4, 16.7%) се среща по-често в следвакциналния период. В по-малък процент, за сравнение с предвакциналния период, се наблюдават серотипове 6B (n=3, 12.5%) и 14 (n=2, 8.3%). Потенциалното серотипово покритие за PCV7 и PCV10 за следвакциналния период за шамовете от ушни ексудати беше еднакво: 66.7%, а за PCV13 беше 95.8%. Невакциналните серотипове за този период (2011-2013г.) бяха 4.2%.

Графика 7. Потенциално серотипово покритие на пневмококовите конюгирани ваксини за шамове *S.pneumoniae* от пациенти с остър среден отит за предвакцинален (2006 - 2010г.) и следвакцинален (2011 - 2013г.) период.



Във възрастовата група до 5г. най-чести изолирани серотипове в предвакциналния период бяха 19F (n=18, 22.2%), 6B (n=11, 13.6%) и 19A (n=7, 8.6%) подредени в низходящ ред. Потенциалното серотипово покритие за този период на PCV7, PCV10 и PCV13 беше съответно – (62.0%), (64.8%) и (83.1%). При по-големите от 5г. деца и възрастните

потенциалното серотипово покритие за периода 2006г. – 2010г. за PCV7 и PCV10 беше еднакво – (36.4%), а за PCV13 - (72.7%), т.като покриваше серотипове 19А и 6А.

След въвеждането на PCV10 в България броят на щамове, изолирани от ексудати от средно ухо намалява значително както при децата до 5г. възраст, така и в групата на по-големите деца и възрастни пациенти. Въпреки това, водещи серотипове в целевата група за ваксинация за този период остават 19F, 6В, 3 и 19А. Аналогична е ситуацията и в други европейски страни, където се откриват същите серотипове отговорни за остър среден отит (Cohen R.,2010). Потенциалното серотипово покритие за PCV7, PCV10 и PCV13 за следваксиналния период беше съответно 66.7%, 66.7% и 100.0% за по-големите деца и възрастни пациенти. При децата до 5г. възраст потенциалното серотипово покритие за PCV7 и PCV10 беше еднакво и за двете ваксини – 66.7%, а за PCV13 беше 95.2%, т.като покриваше серотипове 19А и 3.

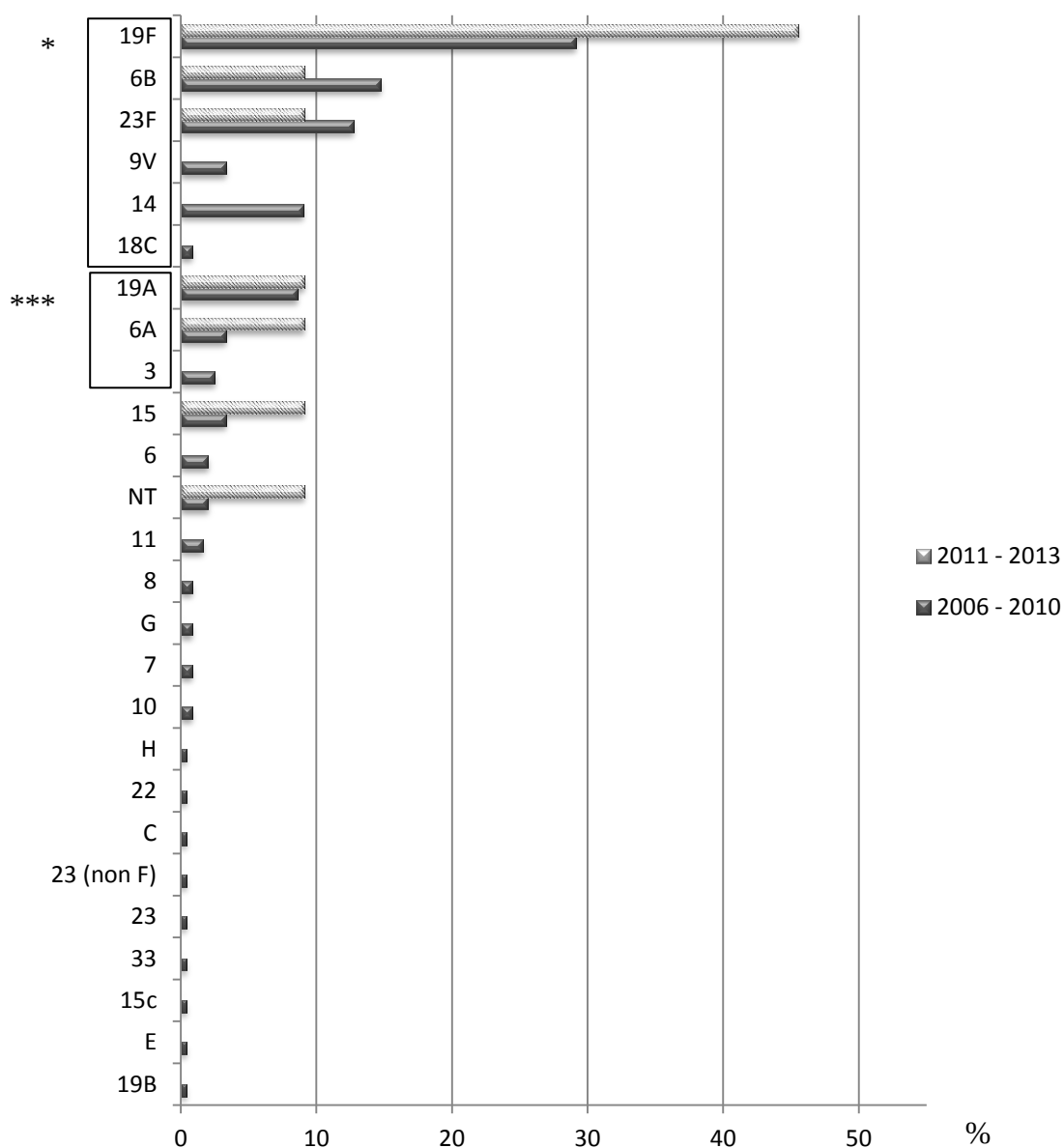
Серотипово разпределение на 254 щамове *S.pneumoniae* от пациенти с инфекции на горни и долни дихателни пътища.

Най - разпространени серотипове в предваксиналния период при респираторните изолати бяха серотипове 19F (29.1%), 6В (14.7%), 23F (12.7%), 14 (9.0%) и серотип 19А (8.6%).

Потенциалното серотипово покритие за PCV7, PCV10 и PCV13 за респираторните щамове от предваксиналния период беше съответно: 70.0%, 70.0% и 84.3%. Разпространението на неваксиналните серотипове за периода (2006 -2010г.) беше 16.0%.

В следваксиналния период броят на изолираните пневмококови щамове значително намаля. Наблюдаваха се пневмококи основно от серотип 19F (45.5%). Бяха изолирани също щамове от ваксинални серотипове 6В, 23F, 19А, 6А, които имаха еднакво разпространение (9.1%). От неваксиналните серотипове беше изолиран серотип 15. Серотиповото покритие за следваксиналния период при респираторните щамове беше 70.0% за PCV7, а за PCV10 и PCV13 беше еднакво – 90.0%. Неваксиналните серотипове в следваксиналния период бяха 10.0%.

Графика 8. Серотипово разпределение в предвакцинален (2006 – 2010г.) и следвакцинален (2011 – 2013г.) период на 254 щама *S.pneumoniae* от пациенти с инфекции на горни и долни дихателни пътища.



Забележка: C,G и H пневмококи могат да принадлежат към следните серотипове/серогрупи :

C – 24 (24F,24A,24B), 31, 40

G – 29, 34, 35 (35F, 35A, 35B, 35C), 42, 47 (47F, 47A)

H – 13, 28 (28F, 28A)

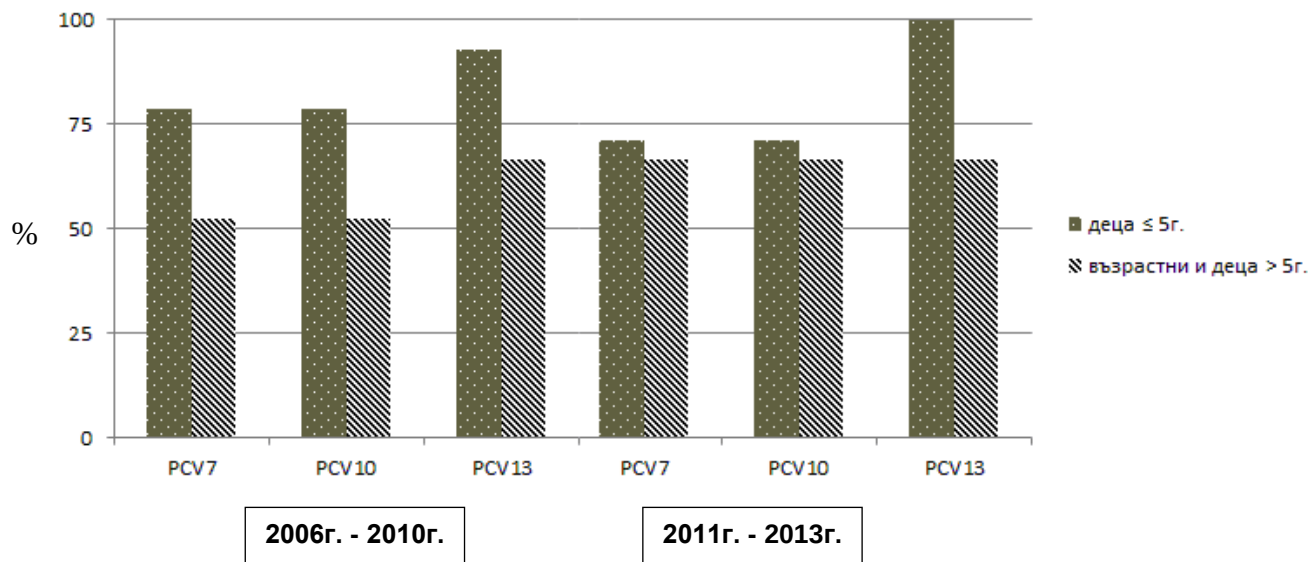
Оградените и маркирани серотипове с една звезда влизат в състава на PCV7.

Оградените и маркирани серотипове с три звезди влизат в състава на PCV13.

Липсваха серотипове участващи в състава на PCV10.

Потенциално серотипово покритие на PCV за щамове *S.pneumoniae* от пациенти с респираторни инфекции е изобразено на следващата графика.

Графика 9. Потенциално серотипово покритие на пневмококовите конюгирани ваксини за щамове *S.pneumoniae* от пациенти с инфекции на горни и долни дихателни пътища за предваксинален (2006 - 2010г.) и следваксинален (2011 - 2013г.) период



В предваксиналния период най-често изолирани серотипове при децата до 5г. възраст сред респираторните щамове бяха серотипове 19F (n=56, 35.0%), 6B (n=25, 15.6%), 23F (n=23, 14.4%), 14 (n=20, 12.5%) и 19A (n=17, 10.6%) в низходящ ред. Потенциалното серотипово покритие за PCV7 и PCV10 при тази възрастова група беше еднакво – (78.7%), а за PCV13 беше (93.1%). В групата на по - големите деца и възрастните серотиповото покритие за PCV7, PCV10 и PCV13 беше съответно (52.4%), (52.4%) и (66.7%), поради големият брой неваксинални серотипове (33.3%) за периода 2006г. – 2010г. Неваксиналните серотипове/сегроупи, които преобладаваха бяха 15 и 11. Ваксиналните серотипове, които бяха най-широко разпространени при тази възрастова група бяха 19F (n=15, 18.1%), 6B (n=11, 13.2%), 23F (n=8, 9.6%), 9V (n=7, 8.4%) и 3 (n=6, 7.2%) подредени по честота.

След 2011г. потенциалното серотипово покритие за пневмококовите щамове от деца до 5г. възраст с респираторни инфекции беше по - ниско за PCV7 и PCV10 - (71.4%) и 100.0% за PCV13, т.като обхващаше все по-често срещаните се 19A и 3, които имат покритие само от нея. При пациентите извън целевата група за ваксинация, потенциалното серотипово покритие и за трите ваксини беше 66.7%.

Обобщените резултати показаха, че най-често доказвани серотипове в пневмококовата колекция за предвакциналния период от 2006г. до 2010г. са от серотипове 19F (n=102, 25.1%), 6B (n=57, 14.0%), 23F (n=39, 9.6%), 19A (n=32, 7.9%) и 14 (n=30, 7.4%), а за следващия период - 19F (n=19, 28.8%), 3 (n=11, 16.7%), 14 (n=5, 7.6%), 6B (n=4, 6.1%) и 19A (n=4, 6.1%).

Налице е увеличение с течение на времето в разпространението на серотип 3, особено сред инвазивните щамове. Серотипове 19F и 19A продължиха да бъдат едни от най-често изолираните, както преди, така и след въвеждането на масовата имунизация в България и при инвазивни и при неинвазивни щамове *S. pneumoniae*. Подобно увеличаване при серотип 19A е настъпило в някои страни преди въвеждането на PCV7, а в други е възникнало след това. Най-вероятните причини за серотиповата замяна, се дължат главно на увеличено разпространение на щамове от не-вакцинални серотипове в обществото, поради селективния натиск на конюгираните ваксини ("бягство" от ваксината) и/или чрез капсулно превключване, при което щам от ваксинален серотип придобива чрез рекомбинация нов CPS locus на невакцинален серотип *S. pneumoniae* (Brueggemann A., 2012, Coffey TJ.,1998, Croucher N.,2011).

Освен факта, че серотип 19A може да запълни екологична ниша след редукция на серотиповете при прилагането на PCV7 и PCV10 (Brueggemann A., 2012) и други факти са били предложени като отговорни за увеличаване на разпространението на 19A :

(I) макролидната и пеницилинова нечувствителност преобладават в рамките на този серотип (полирезистентни серотип 19A щамове). Резистентният фенотип дава предимство на тези щамове за устойчивото им разпространение и колонизация в обществото въпреки антибиотичния натиск и имунопрофилактиката с ваксини.

(II) антибиотичен натиск заедно с капсулно превключване от резистентен клон (Jefferies J.,2004, Wyres K.,2013).

(III) появата в серотип 19A на минорен устойчив клон съществуващ преди въвеждането на PCV7 (Dagan R.,2009)

(IV) появата на нови устойчиви клонове (Aguiar S.,2010,Hausdorff W.,2010, Martínez G .,2013) или

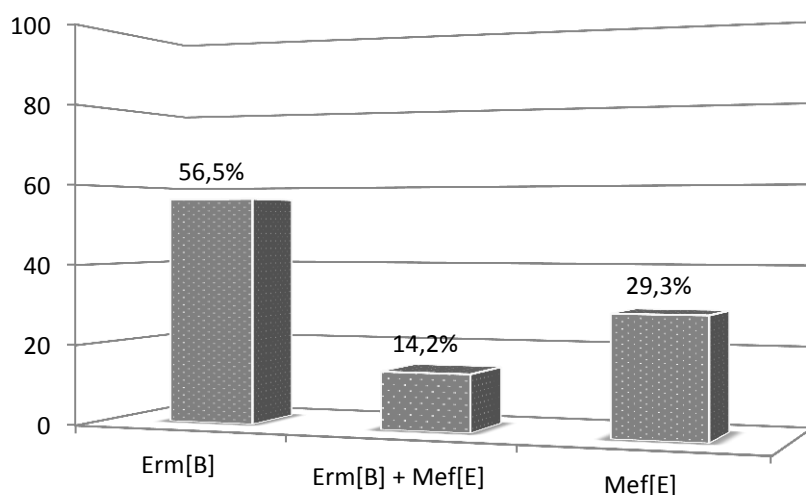
(V) всеки един от тях самостоятелно или в комбинация в пневмококовата популация, в която възникват глобални промени в серотиповата честота (Rudolph K.,2013, Salleras L.,2009, Wyres K.,2013). Поради всички тези причини, той е достоен за изследване на еволюцията му във времето и това може да има превантивни и терапевтични последици.

III. Молекулярно-биологични проучвания

1. Молекулярно-биологични механизми на резистентност към MLS група антибиотици при щамове *S.pneumoniae*: 2006-2013г.

Резултатите показаха, че сред 591 клинични щамове *S.pneumoniae*, макролид - резистентните щамове са 239 (40.4%).

Графика 10. Разпределение на генетичните детерминанти, отговорни за макролидната резистентност сред 239 клинични щама *S.pneumoniae*



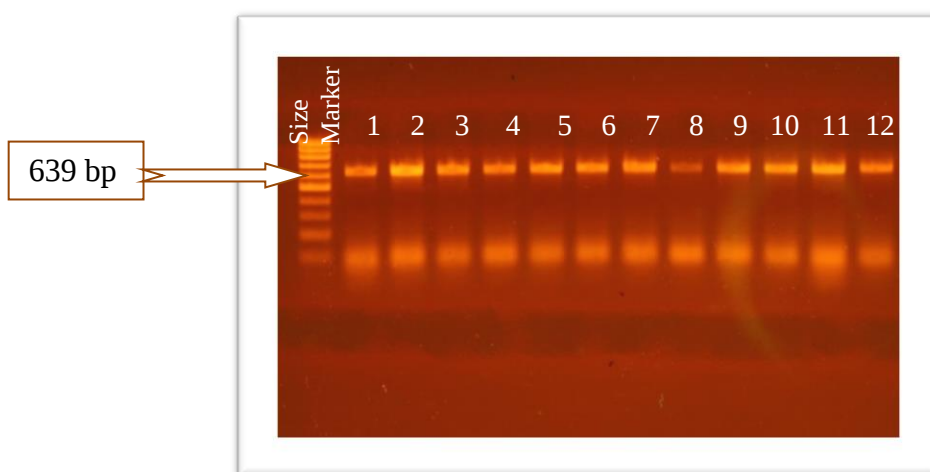
Молекулярният анализ на механизмите на макролидна резистентност при *S.pneumoniae* разкри разпространението на две генетични детерминанти сред всички ERSP в България за периода от 2006г. до 2013г. Преобладаващият брой е на щамове с *erm(B)* ген, кодиращ метилаза – 135 на брой, (56.5%), а *mef(E)* ген, който е отговорен за активната екскреция (ефлукс) от бактериалната клетка е представен в 70 щам (29.3%). Прави впечатление увеличаването на броя на пневмококови щамове, носещи и двата гена – (n=34, 14.2%). Резултати от PCR амплификацията на *erm(B)* и *mef(E)* гени са представени на Фиг.3 и 4.

За сравнение с периода от 2001г. до 2005г. е бил доказан само един изолат, носещ и двете генетични детерминанти *erm(B)* и *mef(E)*. В същият петгодишен период са открити 4 щам *S.pneumoniae* с мутации в L4 рибозомалния протеин, които в следващите години не бяха доказани при нито един изолат (Setchanova L.,2007). Разпределението на генотиповете на макролидна резистентност в различните периоди от време претърпява

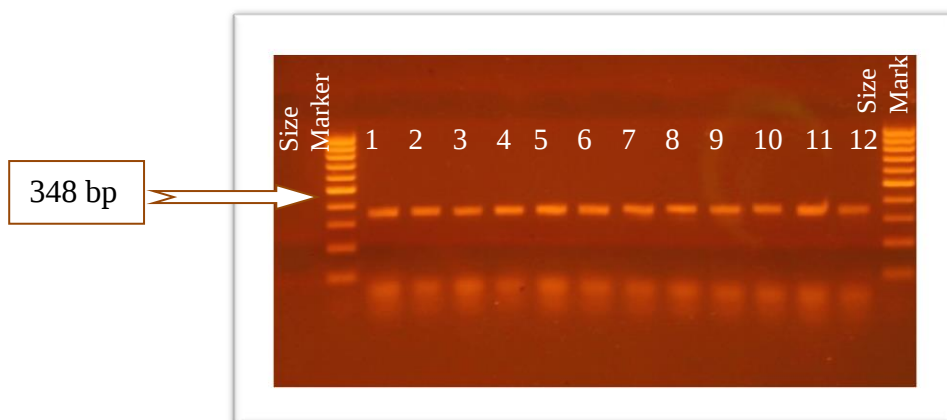
промени. През периода (1995г. – 2005г.) най-разпространеният ген е *mef(E)* (75.0%), следван от *erm(B)* ген (25.0%) (Setchanova L.,2007).

От еволюционна гледна точка е най-вероятно образуването на щамове с две резистентни детерминанти, чрез придобиване от щамове с *mef(E)* гени и на допълнителен *erm(B)* ген. Придобиването на *erm(B)* ген, кодиращ по - високи нива на макролидна резистентност, в съчетание с *mef(E)* ген осигурява на тези пневмококови щамове по – голямо генетично селективно предимство и стабилност.

Фиг. 3. Агарозна гел-електрофореза на PCR амплификационни продукти на *erm(B)* гени в клинични щамове *S.pneumoniae*



Фиг. 4. Агарозна гел-електрофореза на PCR амплификационни продукти на *mef(E)* гени в клинични щамове *S.pneumoniae*



Доказването на генетичните механизми на макролидна резистентност при *S.pneumoniae* има голяма практическа стойност, тъй като позволява определянето на активността на различните антибиотици от MLS_B групата.

Табл.4. Разпределение на МИК стойностите за макролиди и Clindamycin на 239 щама *S. pneumoniae* според генотипа.

Генотип (%)	No	АБП	МИК (mg/L)			
			диапазон	% S	% I	% R
<i>mef</i> (E) (29.3)	70	Erythromycin	0.5->64	-	8.5	91.5
		Clarithromycin	0.03-32	2.4	7.1	90.5
		Azithromycin	0.06-> 64	2.4	4.8	92.9
		Clindamycin	0.01-0.12	100	-	-
<i>erm</i> (B) (56.5)	135	Erythromycin	16->64	-	-	100
		Clarithromycin	2->64	-	-	100
		Azithromycin	>64	-	-	100
		Clindamycin	0.5->64	-	3.7	96.3
<i>erm</i> (B) + <i>mef</i> (E) (14.2)	34	Erythromycin	>64	-	-	100
		Clarithromycin	>64	-	-	100
		Azithromycin	>64	-	-	100
		Clindamycin	>64	-	-	100

Забележка - S-чувствителен; I-интермедиерен; R-резистентен.

Присъствието на *mef* ген се асоциира с по-ниски нива на еритромицинова резистентност. Сред *mef* - положителните щамове бяха наблюдавани по-ниски МИК стойности за макролидните антибиотици, при (n=6, 8.5%) пневмококи бяха отчетени междинни нива на резистентност за Erythromycin и 100% чувствителност към Clindamycin като представител на линкозамидните антибиотици при всички щамове с доказан ефлукс механизъм. При щамове с *erm*(B) ген, както и при тези, които притежават и двете генетични детерминанти бяха отчетени само високи нива на резистентност както сред 14-членните макролиди, така и сред линкозамидите.

2. Анализиране на връзката между фенотипиране и генотипиране на Erythromycin-резистентни пневмококи

Определянето на фенотипа на макролидна резистентност по тройния дисков метод с Erythromycin, Clindamycin и Rokitamycin позволява откриването не само на най-честите фенотипове, каквито са MLS и M фенотип при пневмококите, но и откриването на по-редки генетично - обусловени механизми.

Табл. 5. Фенотипове на макролидна резистентност и връзката им с Erythromycin – резистентните гени сред 136 щама *S.pneumoniae* тествани по троен дисков метод (Montanari, 2001г.)

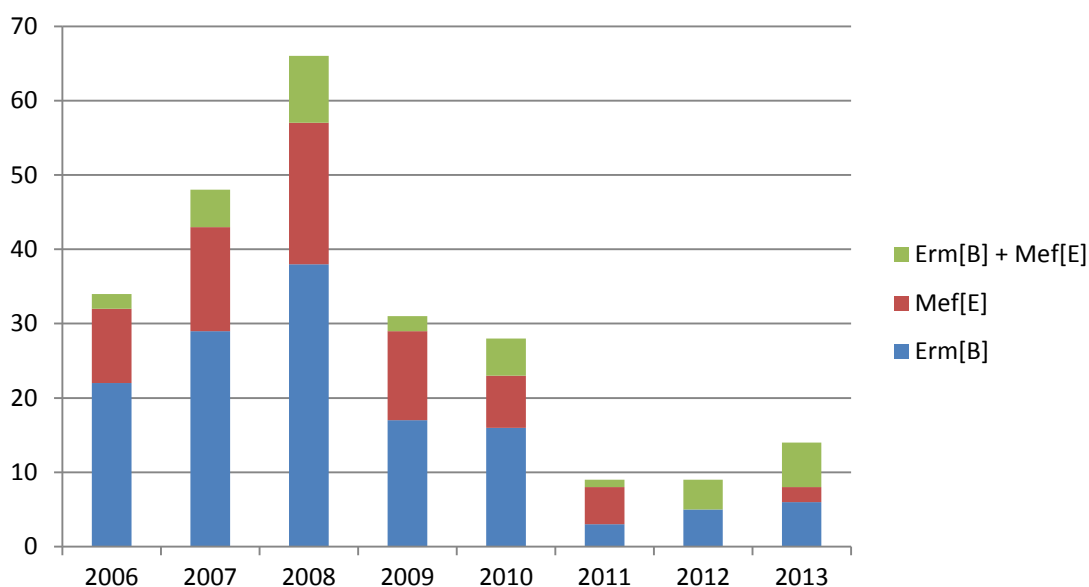
Фенотип на макролидна резистентност	No. (%) щамове	Брой щамове с доказан генотип		
		<i>erm</i> (B) /88	<i>mef</i> (E) /43	<i>erm</i> (B) + <i>mef</i> (E) /5
M	43 (31.6)	-	43	-
iMcLS	77 (56.7)	77	-	-
cMLS	13 (9.5)	8		5
iMLS	3 (2.2)	3	-	-

При представителите с М-фенотип (31.6%) във всички случаи беше доказван *mef*(E) ген. По-голям брой от щамовете се характеризираха с MLS_B фенотип – 93 (68.4%), при които беше доказан *erm*(B) ген или комбинация от двата гена. Най-голям беше броят на пневмококите, които проявяваха iMcLS фенотип, който се откри при 77 щама (56.7%).

3. Разпределение на макролид – резистентните генетични детерминанти през периода на проучване 2006г.-2013г.

Разпределението на генетичните детерминанти, обусловени от *erm*(B) и *mef*(E) гени, за проучвания период позволи да бъде проследено преобладаването на едни генетични механизми над други, свързани с макролидната резистентност. (Графика 11)

Графика 11. Разпределение на гените, отговорни за макролидна резистентност при 239 щама *S.pneumoniae* за периода от 2006г. до 2013г.



През целия период на изследване най - честият доказван генотип беше обусловен от *erm*(B) ген. В последните години, в нашата страна се увеличиха значително щамове, които притежават и двата вида гени, като тенденцията е щамове само с *mef*(E) ген да отстъпват по брой на тези с *erm*(B) ген или *erm*(B) + *mef*(E) гени. Причини за това могат да бъдат търсени в силния антибиотичен натиск и увеличаването на резистентността, както и в еволюцията на пневмококите към по - приспособим геном. Ситуацията е сходна и за съседните на нас страни, както и в глобален план. С най-широко разпространение сред макролид-резистентните пневмококи са щамове, носещи в генома си *erm*(B) ген, кодиращ по-високи нива на резистентност (Farell D.,2005, McGee L.,2001, Gomez E.,2008).

4. Разпределение на генетичните детерминанти отговорни за еритромициновата резистентност сред пациенти от различни възрастови групи с пневмококови заболявания

В помощ на епидемиологичните и генетични проучвания за установяване на най-значимите механизми, обуславящи макролидната резистентност сред пациенти с ПЗ от различни възрастови групи, беше разгледано разпределението на гените за тази резистентност при пациенти - от 0 до 14г. и от 15г. до 90г. за всички години от периода на проучване.

Табл.6. Разпределение на 239 Erythromycin – резистентни щамове и генетичните механизми, отговорни за еритромициновата резистентност сред изолатите *S. pneumoniae* от деца и възрастни, 2006–2013г.

Година	Деца			Възрастни		
	Общ но.	E-R N (%)	<i>erm</i> (B)/ <i>mef</i> (E)/ <i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (E) n	Общ но.	E-R n %	<i>erm</i> (B)/ <i>mef</i> (E)/ <i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (E) n
2006	67	21 (31.3)	14/4/3	54	8 (14.8)	5/ 3/ 0
2007	100	43 (43.0)	25/14/4	27	4 (14.8)	4/ 0/ 0
2008	122	64 (52.4)	35/20/9	32	9 (28.1)	6/ 3/ 0
2009	28	23 (82.1)	13/8/2	20	7 (35.0)	3/ 4/ 0
2010	63	25 (39.7)	13/ 7/5	12	4 (33.3)	4/ 0/ 0
2011	13	7 (53.8)	2/ 4/1	8	2 (25.0)	1/ 1/ 0
2012	9	6 (66.6)	2/ 0/4	8	3 (37.5)	3/ 0/ 0
2013	19	9 (47.4)	4/ 1/4	9	4 (44.4)	2/ 1/ 1
Общ брой (n=591)	421	198 (47.0)	108/58/32	170	41 (24.2)	28/12/1

Забележка : E-R – Erythromycin – резистентни щамове

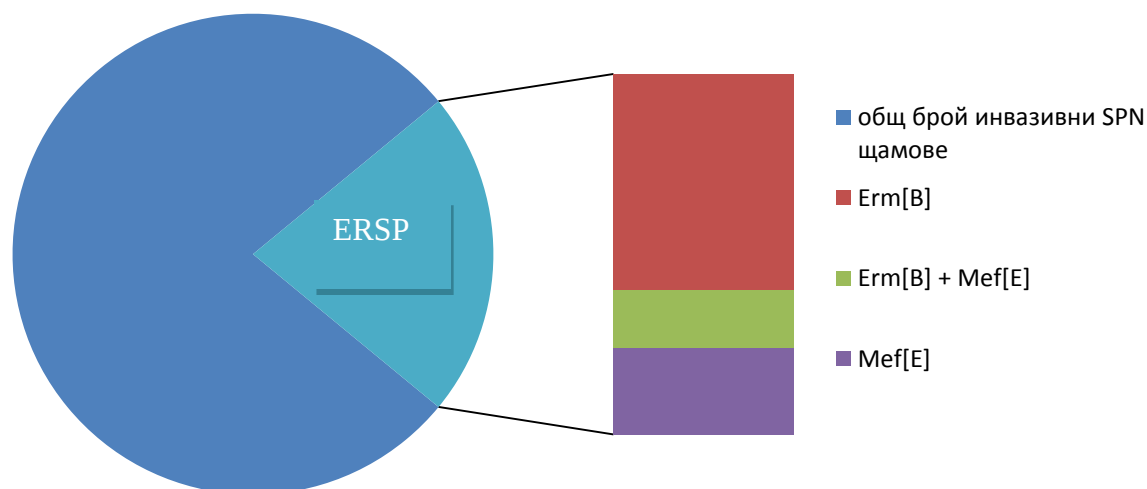
По-голям дял имаха клиничните щамове, изолирани от пациенти в детска възраст от 0 до 14г. (n=421, 71.2%), като 198 (47.0%) от тях бяха ERSP. Делът на пневмококовите изолати от възрастни пациенти беше представен от 170 щамове (28.8%), като ERSP бяха (n=41, 24.1%).

През всички години на проучването, както при децата, така и при възрастните, най-голямо разпространение имаха пневмококовите щамове с доказан *erm*(B) ген, съответно 108 щамове (54.5%) при деца и 28 щамове (68.3%) при възрастни. Активен ефлукс, кодиран от *mef*(E) ген беше доказан за 58 (29.3%) клинични щамове от деца и 12 щамове (29.3%) от възрастни пациенти. Прави впечатление лошата тенденция на изолиране на пневмококови щамове от деца, носещи и двата гена. Такива бяха 32 щамове (16.2%) от деца и само един щам (2.4%) носещ *erm*(B) + *mef*(E) гени от възрастен пациент.

5. Генотипово разпределение на Erythromycin – резистентните щамове *S.pneumoniae* сред различните клинични материали.

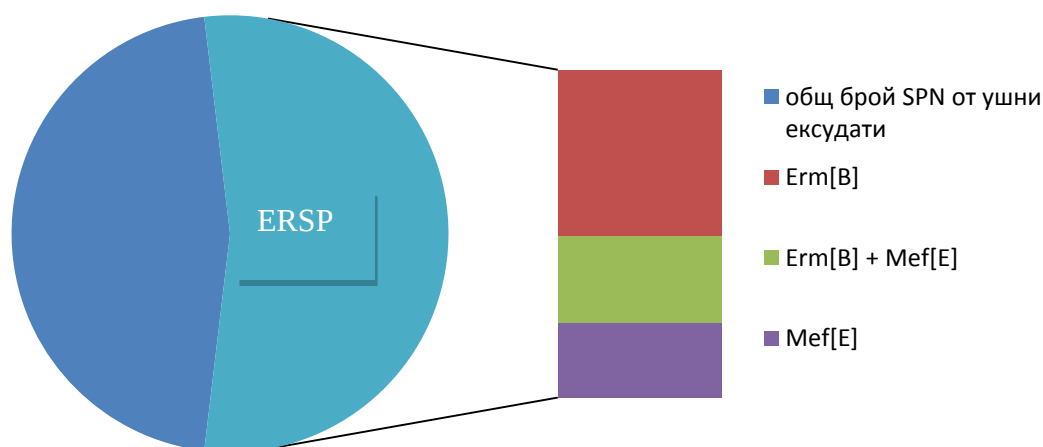
Генотиповото разпределение беше разгледано за всички ERSP разделени в следните три групи: щамове от инвазивни клинични материали, от ексудати от средно ухо и от респираторни материали. (Графики 12,13,14)

Графика 12. Генотипово разпределение на 25 Erythromycin-резистентни щамове *S.pneumoniae* изолирани от 114 инвазивни клинични материали.



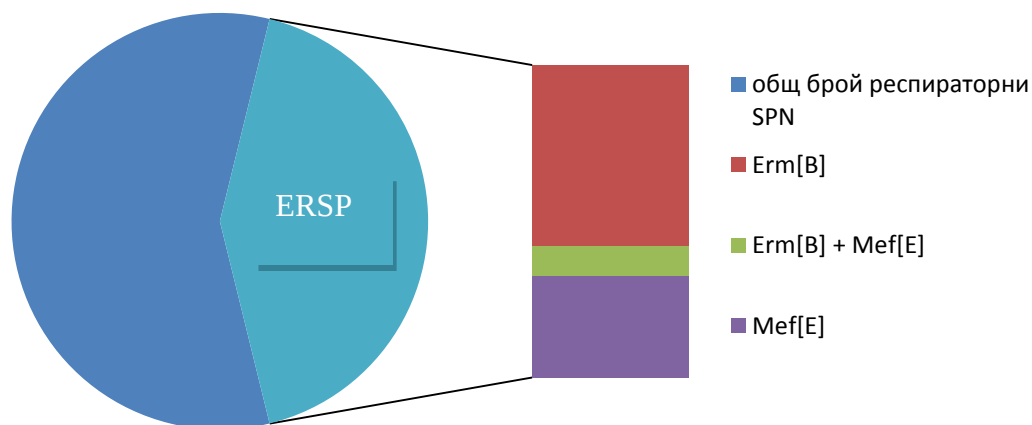
Сред 114 инвазивни пневмококови щамове, 25 (21.9 %) бяха ERSP. През 2006г. - 2013г., *erm*(B) ген бе открит при 15 щамове (13.1%) и съответно беше най-разпространеният генотип за макролидна резистентност сред инвазивните пневмококови щамове. *Mef*(E) ген беше доказан при 6 щамове (5.3%), а двойният механизъм на резистентност беше представен в (n=4, 3.5%) пневмококи. Всички инвазивни ERSP бяха и множествено – резистентни, като 18 (72.0%) от тях бяха и Penicillin – нечувствителни.

Графика 13. Генотипово разпределение на 57 Erythromycin-резистентни щамове *S.pneumoniae* изолирани от 106 ушни екsudати на пациенти с остър среден отит (АОМ)



От общо 106 щамове от ушни екsudати, 57 на брой (53.8%) бяха ERSP. Генът *erm*(B) беше открит в 29 щамове (27.3%). За разлика от инвазивните и респираторни пневмококи, при щамове от ушни екsudати направи впечатление повишеният брой щамове с двоен механизъм на макролидна резистентност. Такъв механизъм беше доказан в 15 щамове (14.1%) и измести по брой щамове, които носят само *mef*(E) ген, каквито бяха 13 щамове (12.3%). Този модел на макролидна резистентност сред щамове *S.pneumoniae* от пациенти с остър среден отит в последните години заменя ефлукс механизма (*mef* генотип), който е бил преобладаващ сред макролид – резистентните пневмококи в нашата страна преди 2005 г. (Setchanova L., 2007).

Графика 14. Генотипово разпределение на 157 Erythromycin – резистентни щамове *S.pneumoniae* изолирани от 371 респираторни клинични материали (храчки, пунктати от синуси, носни, гърлени, назофарингеални секрети) и очни секрети.



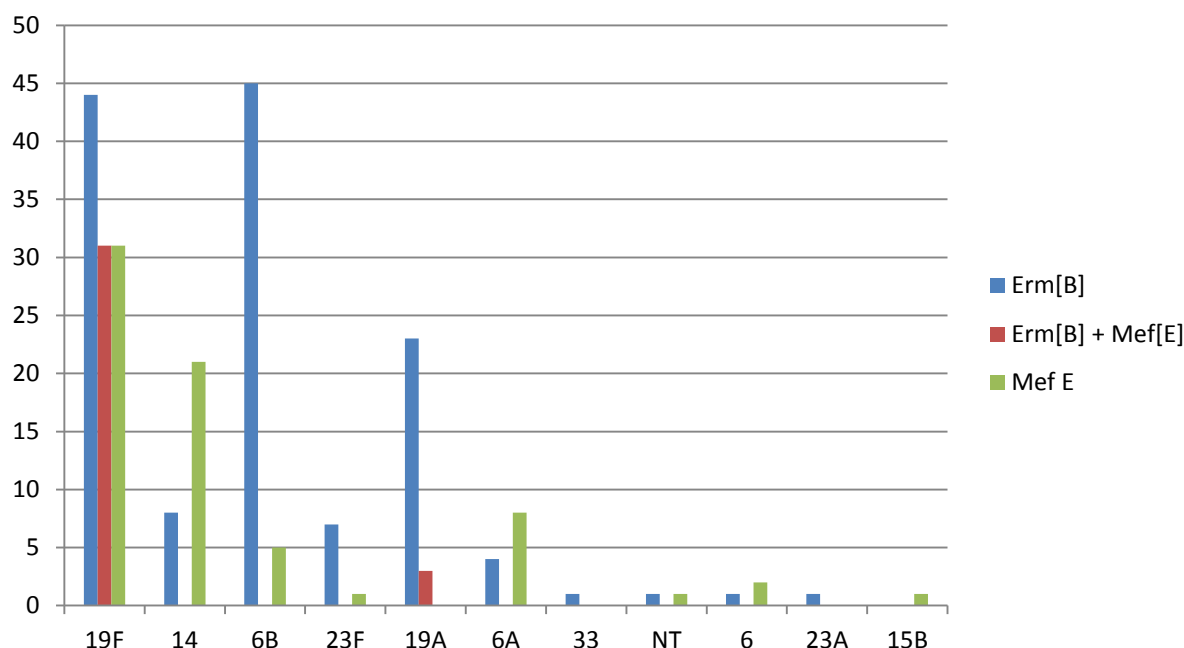
От общо 371 щамове изолирани от респираторен тракт, 157 на брой (42.3%) бяха ERSP. Сред пневмококовите щамове, изолирани от пациенти с инфекции на горни и долни дихателни пътища, най - често доказваната генетична детерминанта беше *erm(B)* ген, открита при 91 щамове (58.0%), следвана от *mef(E)* ген, при 51 щамове (32.5%). Комбинация от двете генетични детерминанти беше открита в 15 (9.5%) пневмококи.

6. Генотипово разпределение на Erythromycin – резистентните щамове *S.pneumoniae* изолирани за периода 2006 - 2013г. в зависимост от установеният серотип

Съществуват значителни различия в честотата на отделните серотипове установявани при ERSP. Въпреки голямата серотипова хетерогенност, която се откри при щамовете от пневмококовата колекция, няколко основни серотипа преобладаваха сред ERSP.

Анализът на серотиповото разпределение сред всички 239 макролид-резистентни пневмококи показва присъствие на 10 серотипа и само два щамове бяха нетипируеми (NT = nontypeable) (Графика 15).

Графика 15. Генотипово разпределение на 239 Erythromycin – резистентни щамове *S.pneumoniae* спрямо установеният серотип за периода 2006г. - 2013г.



Най-честите серотипове сред ERSP бяха: 19F (n=106, 44.3%), 6B (n=50, 21.0%), 14 (n=29, 12.1%), 19A (n=26, 10.9%), 6A (n=12, 5.0%) и 23F (n=8, 3.3%), които заедно представляваха 96.6 % от всички ERSP. Неваксиналните серотипове при ERSP бяха 2.5%.

Сред Penicillin-нечувствителните щамове (МИК $\geq$ 0.1 μ g/mL) от пневмококовата колекция, които бяха 311 на брой (52.9%), най-разпространени серотипове бяха: 19F (n=105, 33.8%), 6B (n=41, 13.2%), 23F (n=41, 13.2%), 9V (n=33, 10.6%), 19A (n=32, 10.3%) и 14 (n=30, 9.6%).

Всички серотипове, доказани при макролид-резистентните щамове, бяха открити и при Penicillin-нечувствителните щамове, с изключение на серотип 9V, който се откриваше само при пневмококи без резистентност към Erythromycin.

Резултатите показаха, че генотипът *erm*(B) се открива почти във всички серотипове, но в най-голям брой от случаите е сред серотипове 6B, 19F и 19A. Щамове, при които се доказва *mef*(E) ген са главно от серотипове 19F, 14 и 6A. Механизмът на двойна резистентност *erm*(B) + *mef*(E) беше доказан само в изолати от серотипове 19F и 19A.

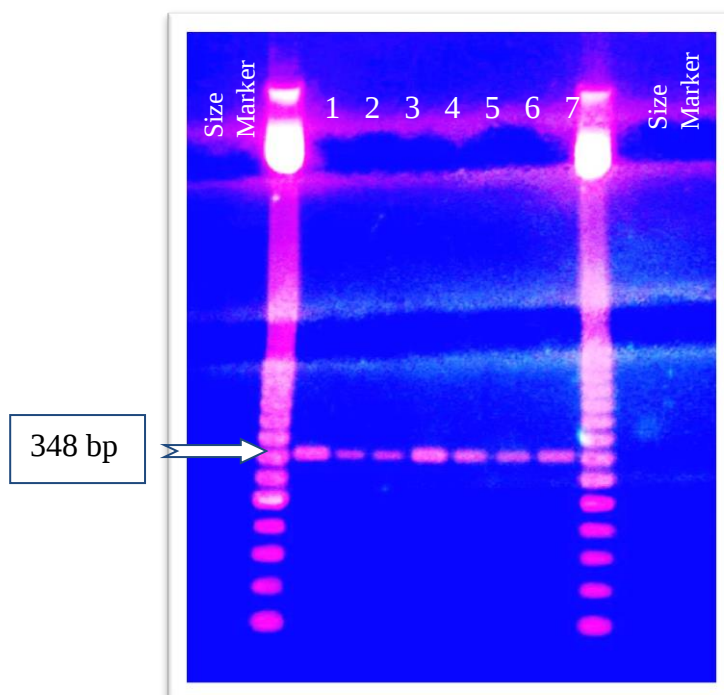
7. Диференциране на подкласовете на *mef* ген с RFLP

Ефлуks-медираната еритромицинова резистентност при *S.pneumoniae* е свързана с *mef* ген, който е представен от различни подкласове *mef* гени. Диференцирането им се

свежда до откриване на единични нуклеотидни полиморфизми, специфични за отделните подкласове гени. Беше извършен RFLP анализ на *mef*-PCR продуктите със специфична *Bam*HI ендонуклеаза за получаване на различни размери на ампликоните.

Резултатите от рестрикцията показаха, че всички изследвани щамове нямат рестрикционен сайт, в който ензимът да е активен и да продуцира два фрагмента. След хоризонтална гел - електрофореза бяха отчетени единични фрагменти от 348 bp, което доказва, че при тях се открива *mef*(E) ген. Ако имаха рестрикционен сайт, биха се генерирали два фрагмента от 284 bp и 64 bp, което е индикация за наличието на *mef*(A) ген.

Фигура 5. Агарозна гел-електрофореза на *mef* – положителни PCR амплификационни продукти от щамове *S.pneumoniae* след рестрикционна реакция с ендонуклеаза *Bam*HI.



8. Автоматично директно секвениране на *mef* ген

За потвърждаване на резултатите от рестрикционният анализ беше избран методът на Автоматично директно секвениране като най-точна техника за определяне на нуклеотидна последователност на даден ДНК фрагмент. Автоматично директно секвениране беше проведено за произволно избрани 19 на брой от общо 104 (18.3%) *mef*-положителни *S.pneumoniae* щамове.

Анализът включваше сравняване на получените секвенции с оригиналните последователности на *mef*(A) и *mef*(E) гени, депозирани в GenBank с регистрационни

номера: U70055.1 и U83667.1 (Del Grosso M.,2006). Бяха отбелязани специфични точки на полиморфизъм в положения: 264bp и 267bp за отделните подгрупи гени и базовата замяна, която не позволява рестрикция и генириране на два фрагмента, което е характерно само за представители с *mef(A)* ген.

Резултатите от RFLP бяха в пълно съответствие с резултатите от Директното автоматично секвениране. Всички секвенирани проби притежаваха *mef(E)* - ген.

9. Макрорестрикционен анализ на тотална геномна ДНК на *S. pneumoniae* с PFGE

Генотипиращата техника PFGE беше използвана за определяне на генетичните връзки и епидемиологично маркиране на пневмококовите изолати.

Вниманието бе фокусирано върху пневмококови щамове от серотип 19А, защото той преобладаваше над всички останали серотипове, които не влизат в състава на PCV10. Освен това представителите от серотип 19А се срещаха при всички възрастови групи и бяха високо резистентни. Всички пневмококови щамове с доказан серотип 19А, общо 52 на брой, от различни клинични източници, бяха изследвани с PFGE.

Значително увеличаване на заболяванията, причинени от серотип 19А се докладват в САЩ, Франция, Испания, Италия след въвеждането на PCV7. В Израел и Финландия преди широкомащабното използване на конюгирани ваксини също се изолират голям брой пневмококи от серотип 19А (Aguilar S., 2010, Dagan R.,2009, Tyrrell G.,2011, Van der Linden M. 2013).

Резултатите за 19А – клиничните изолати *S.pneumoniae*, тяхното разпространение през годините, резистентен профил, генетични фактори за макролидна резистентност, рестрикционни PFGE - профили и секвенционни типове са обобщени на Табл. 7.

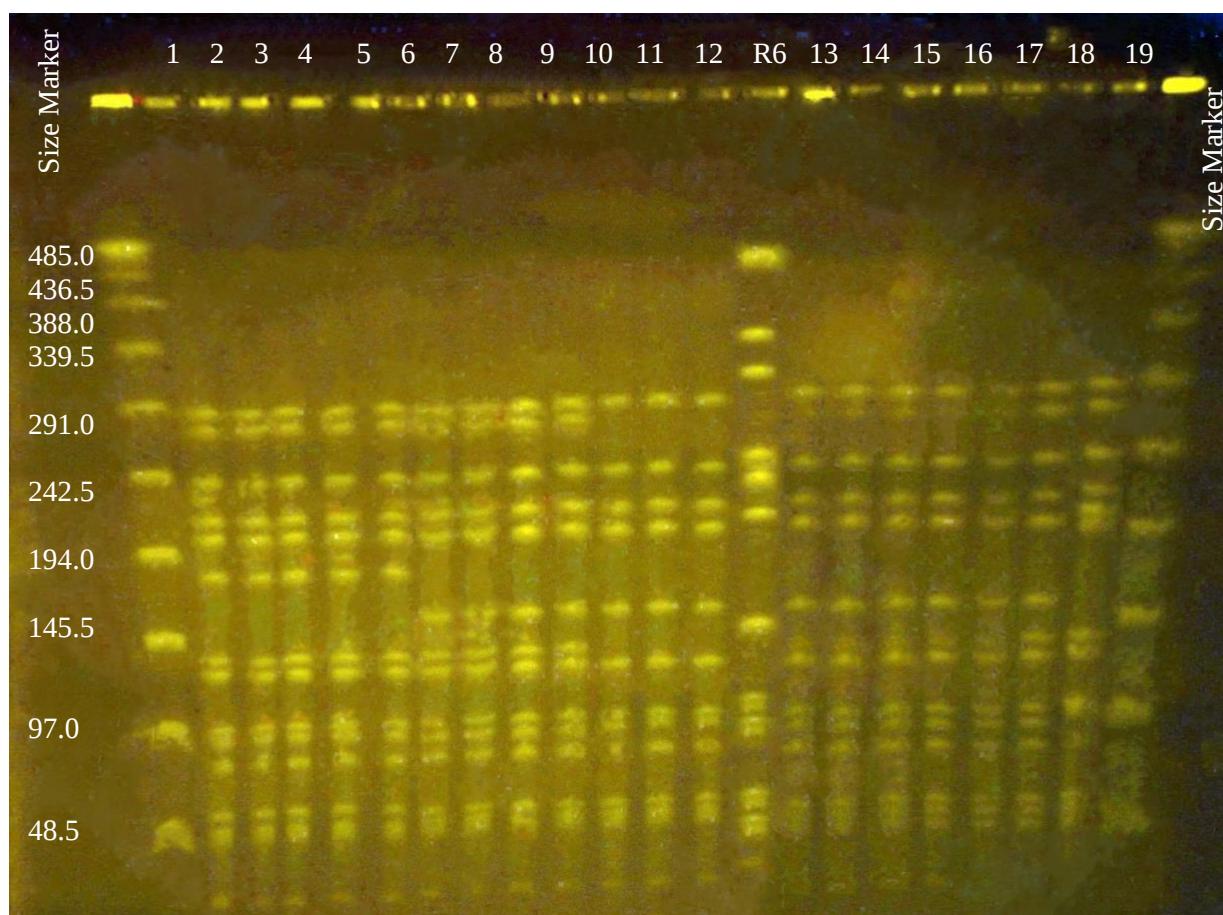
Резултатите от направените пулсови електрофорези доказаха 13 различни рестрикционни модела – от А до М и две подгрупи в рестрикционни профили С и F, в които щамовете се различаваха един от друг по повече от три бенда в PFGE-профил. Най-разпространен сред пневмококовите щамове от серотип 19А беше рестрикционен модел С (n=28, 53.8%) и обхващаще от C₁ до C₅ варианти. Вторият по разпространение след изследваните щамове беше рестрикционен модел А (n=5, 9.6%), представителите, на който се характеризираха с L4 мутация, която не бе доказана при никой друг щам, съответно. Разпространението на пневмококите с рестрикционни профили В, G и I в изучаваната популация беше еднакво - по (5.8%). Щамовете от рестрикционен модел D бяха два (3.8%). Също два бяха щамовете от PFGE - профил F, но те представляваха два различни варианта F₁ и F₂, т.като се различаваха по два бенда при визуализиране след направената

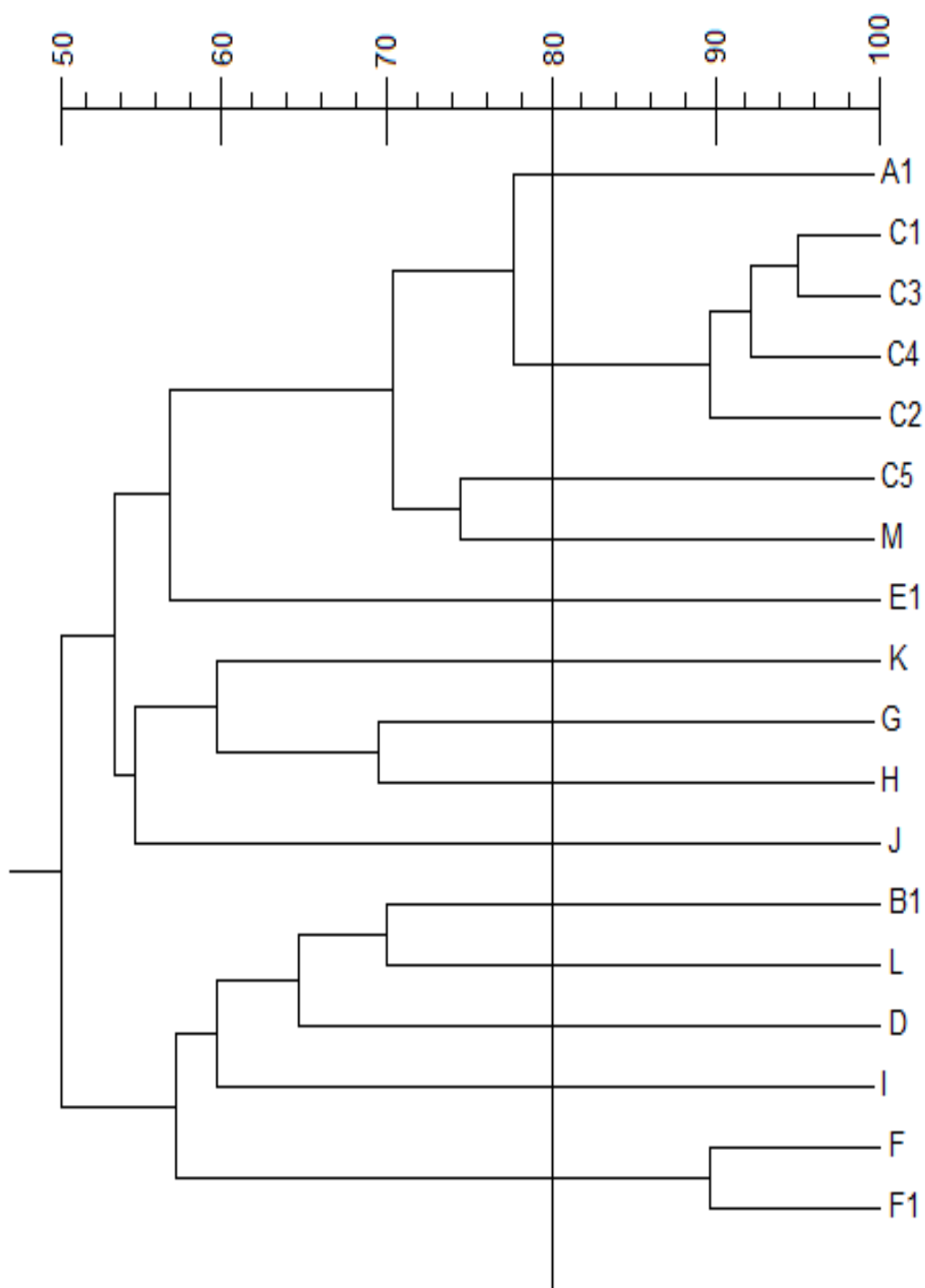
пулсова електрофореза. Всички останали щамове експресираща профили с уникален характер.

Резултати от пулсова електрофореза на тотална геномна ДНК на щамове *S.pneumoniae* са показани на Фиг.6.

Въз основа на получените резултати беше построена дендрограма, отразяваща подреждането на клъстери, произведени от групирането на отделните PFGE - профили на щамовете *S.pneumoniae* (Фиг.7).

Фиг. 6. PFGE профил на клинични щамове *S.pneumoniae* от серотип 19A с C – рестрикционен модел.





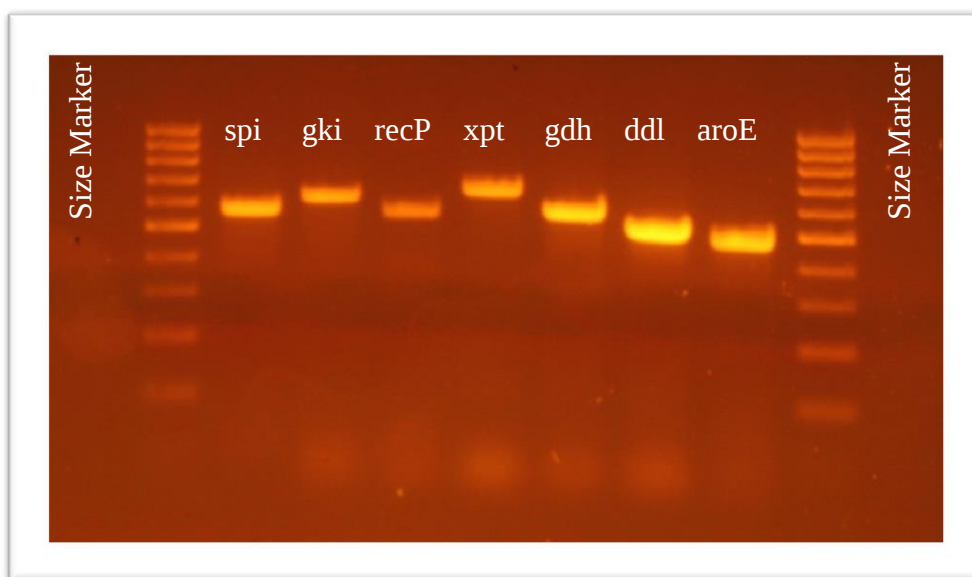
Фиг.7. Дендрограма, илюстрираща генетичната връзка между 52 щама *S.pneumoniae* от серотип 19А според техния PFGE профил. Рестрикционните профили, към които се причислиха изследваните щамове са 13 на брой – от А до М. Дендрограмата е основана на анализ с коефициента на Dice $\geq 80\%$, според който изолати с коефициент на сходство $\geq 80\%$ се приемат за клонално свързани.

10. Молекулярно типирание с MLST метод

Разнообразните генетични събития в пневмококовия геном затрудняват епидемиологичните анализи и MLST понастоящем е най-предпочитаният метод за сравняване на родственоост между щамове в даден бактериален вид.

Молекулярно типирание с MLST метод беше изпълнено за всички 52 щамове *S.pneumoniae*, които са с доказан 19A серотип. Анализирането на тези клинични щамове на нуклеотидно ниво изискваше разчитането на над 700 секвенционни реакции. Директно автоматично секвениране бе извършено в двете посоки за всички 7 консервативни гени от генома на *S.pneumoniae* (*aroE*, *gdh*, *gki*, *recP*, *spi*, *xpt*, *ddl*).

Фиг. 8. Агарозна гел-електрофореза на PCR амплификационни продукти на седем “house-keeping” гени *aroE*, *gdh*, *gki*, *recP*, *spi*, *xpt*, *ddl* от клиничен щам *S.pneumoniae*



За всеки “house-keeping” ген, различните нуклеотидни последователности в пневмококовите щамове бяха определени като отделни алели и за всеки щам, алелите на всеки от седемте локуса послужиха за определяне на алелният профил или секвенционният тип (ST).

Резултатите от мултилокусното типирание сравнени с рестрикционните типове от PFGE са представени в Таблица 8.

Анализът на данните от MLST показва присъствие на 15 секвенционни типа (ST) сред 19A пневмококовите щамове в България.

С най-голямо разпространение беше секвенционен тип 230 (ST230). Срещаше се сред 25 щамове (48.1%) с доказан 19А серотип, всички множествено – резистентни и притежаващи *erm*(B) ген или *erm*(B) + *mef*(E) гени като макролидни генетични детерминанти. Всички макрорестрикционни PFGE-профили, съответстващи на ST230 бяха със С – PFGE профил, като най-чест беше С₁, следван от С₃, С₂, С₄ и С₅ в низходящ ред. Със С-рестрикционен профил бяха още три щамове от ST1611, ST7466, ST2013, съответно. ST1611 беше доказан и за други три щамове (5.8%), но за тях беше определен PFGE – модел I. Характерно за тези щамове е, че бяха с еднакъв резисто-профил: нечувствителност към Penicillin, Tetracycline, Trimethoprim-sulfamethoxazole, който е по-рядко срещан за пневмококите от проучваната популация.

ST276 беше открит при един щам (1.9%) с определен PFGE – модел E, който беше множествено-резистентен и разполагаше с *erm*(B) ген като генетична детерминанта за макролидна резистентност.

ST7466 беше определен за един щам (1.9%) с PFGE – профил B. Щамът също беше множествено-резистентен и разполагаше с *erm*(B) ген. B - рестрикционен модел бе определен и за два други пневмококови щамове от ST 66 (3.8%) с нечувствителност към Tetracycline и Trimethoprim-sulfamethoxazole и към Erythromycin, Chloramphenicol и Trimethoprim-sulfamethoxazole, съответно.

ST663 е вторият по разпространение, доказан бе при 5 на брой (9.6%) от 19А пневмококовите щамове. Тези щамове отговаряха на макрорестрикционен модел A, който е с абсолютно идентичен PFGE-профил при щамовете и се характеризира с L4 мутации, отговорни за макролидна резистентност в най-ранните години от откриването на този серотип в България (1992г. - 1995г.).

ST2632 беше определен за три щамове (5.8%). Резултатите от PFGE за тези пневмококи показаха силно различаващ се профил от другите, който беше определен като (G).

За два щамове беше доказан ST320 (3.8%). PFGE - моделите, които съответстваха на тях бяха F1 и F2. Тези пневмококи бяха резистентни към шест класа АБП и съдържаха *erm*(B) ген, а единият от изолатите в F - комплекса имаше двоен механизъм за макролидна резистентност – *erm*(B) + *mef*(E) гени.

ST352 беше определен за един множествено-резистентен щам (1.9%), който разполагаше с *erm*(B) ген, а съответстващият му рестрикционен модел беше M.

ST199 беше определен от алелния профил на един щам (1.9%). За него резултатите от PFGE показаха J-модел. Освен, че рестрикционният му профил се различаваше в

повече от 4 бенда, резистентността, която показва беше също по-рядко срещана в изследваната група от щамове - само към Trimethoprim-sulfamethoxazole.

ST3836 беше доказан за два щам (3.8%), които бяха с PFGE - модел D и нечувствителност само към Penicillin.

ST315 беше определен за множествено-резистентен щам, с доказан *erm*(B) ген за еритромицинова резистентност. Резултатите от пулсовата електрофореза показаха повече от пет различия в профил с другите щамове и за него бе определен макрорестрикционен модел (L).

ST2365 беше доказан за един чувствителен щам *S.pneumoniae* (1.9%). PFGE - профилът му се различаваше в повече от 5 бенда и беше определен като (H).

ST423 беше определен за един щам (1.9%) с нетипична резистентност за пневмококите от серотип 19A – само към Levofloxacin. Макрорестрикционният профил доказва модел, различен от другите, с повече от 5 бенда разлики и беше определен като (K).

11. Определяне на клоналния произход на щамове *S. pneumoniae* с e-BURST алгоритъм.

Чрез e-BURST анализ беше определен клоналния произход на щамове *S. pneumoniae* и бяха идентифицирани родствениите генотипове в пневмококовата популация. (Фиг.9).

Резултатите от e-Burst анализа на изследваните 52 пневмококови щам, показаха образуване на един клонален комплекс, обхващащ щамове принадлежащи към ST276, ST230, ST1611, ST7466 и ST2013. Образуваният клонален комплекс е CC230. В този комплекс попаднаха 33 щам (63.5%).

За прекурсорен тип на образуваният клонален комплекс беше посочен ST276. Прародителският тип ST276 е в най-близка генетична връзка със секвенционни типове ST230, ST1611 и ST7466, които са негови единични локусни варианти, т.като се различават по нуклеотидни замены само в един ген. Всеки един от ST230, ST1611, ST7466 и ST2013 е близкородствен до другите типове в клоналния комплекс, т.като образува по две локусни вариации и има абсолютна идентичност на нуклеотидно ниво при пет от седемте консервативни гени.

Най-широко представен в образувания комплекс CC230 е ST230 (48.1%), следван от ST1611 (7.7%), ST7466 (3.8%), ST276 (1.9%) и ST2013 (1.9%).

12. Сравняване на получените резултати от e-BURST софтуерният анализ с международната пневмококова молекулярна епидемиологична мрежа – PMEN (Pneumococcal Molecular Epidemiology Network).

Всички секвенционни типове бяха сравнени с данните от PMEN. Данните от този анализ са отразени в Таблица 8.

CC230, в който влизат прекурсорният ST276 и всички неговите прилежащи ST230, ST1611, ST7466 и ST2013 е вариант на капсулно превключване на широко разпространеният международен клон **Denmark14-32/ST230**.

Освен CC 230, бяха открити още 6 други CC принадлежащи към известни PMEN клонове и два ST без определен CC, но принадлежащи към известна eBURST група.

ST663 принадлежи към международен PMEN – клон, който за пръв път е бил изолиран в латинска Америка със серотип 23F и чувствителност към макролиди (**Colombia^{23F}-26**). Понастоящем се изолира както в Северна Америка, така и в Европа (Aguilar S.,2010, Dortet L.,2009) сред голям брой изолати с капсулно превключване, а у нас като серотип 19A, характеризиращ се с множествена резистентност. Най - вероятната причина е силен антибиотичен натиск, заедно с капсулно превключване.

За два други секвенционни типа – ST320 и ST352 се откри, че принадлежат към международен клон **Taiwan^{19F}-14**. ST320 и ST352 помежду си са двойни локусни варианти, поради единични нуклеотидни разлики в два гена – *aro* и *ddl*. Клон Taiwan^{19F}-14 е открит за първи път в пневмококов щам изолиран от пациент с менингит през 1997г. Следващите проучвания показват по-широко разпространение в Азия, но в последните 10 години се открива и в съседна Гърция (Grivea I.,2010, Ноа P.,2011, Maraki S.,2010).

ST199 образува клонален комплекс с пневмококите от ST3836, последният е негов двоен локусен вариант. Двата ST199 и ST3836 принадлежат към международен клон **Netherlands^{15B}-37**.

Клонален комплекс 66 (CC66) не образува локусни варианти с другите ST. С данните от MLST беше определена принадлежността на този комплекс към PMEN- клон **Tennessee¹⁴-18**, от който се различава по нуклеотидна замяна само в *gki* ген.

В отделен клонален комплекс – CC315 попада един изолат от пациент с инфекция на горен респираторен тракт. CC315 показва принадлежност към PMEN клон - **Poland^{6B} -20** и абсолютно идентичен алелен профил със секвенционния тип на референтния международния клон.

ST2632 и ST2365 не показаха близко сходство на нуклеотидно ниво с другите секвенционни типове. Тези ST не показаха принадлежност към установените до момента международни PMEN – клонове, но принадлежаха към известни вече eBurst групи.

ST423 е интересен с това, че показва близка родственоост с два международни клона. Той показва висока степен на хомоложност със ST9, характерен за **PMEN – клон England¹⁴-9**, от който се различава по нуклеотидни замени в гени *recP* и *xpt*. Другият секвенционен тип, с който показва близко сходство е ST20 на **PMEN – клон CSR¹⁴-10**, като минимални различия се откриха в гени *recP* и *ddl*.

В международните изследвания се посочват пет разпространени глобално циркулиращи клона на *S.pneumoniae* от серотип 19А, три от които бяха открити при българските щамове. Подобни на нашите резултати бяха докладвани в MLST проучвания от Италия, Франция и Израел (Dortet L.,2009, Gherardi G.,2012). При тях също бяха открити пневмококови щамове от серотип 19А с множествена резистентност, които въз основа на секвенционните си типове се обединяваха в клон Denmark¹⁴-32 (ST230) и този клон преобладаваше над другите клонални комплекси. В тези проучвания от Европа обаче, преобладаващият секвенционен тип от клонални комплекс беше ST276.

Резултатите получени от PFGE и MLST показаха висок процент сходство, който беше изчислен с коефициент на Wallace - 0.799 (0.609 - 0.990). Само два ST бяха открити в различни PFGE групи, такива бяха ST1611 и ST7466. Стойностите на Wallace показват, че като цяло изолати, принадлежащи към един и същ ST, участват в един и същ PFGE клъстер.

Резултатите от двата най-използвани в световен план типиращи метода PFGE и MLST за определяне на клонално сходство при *S. pneumoniae* потвърдиха епидемиологичната обвързаност на българските клинични щамове *S. pneumoniae* с други антибиотично-резистентни клонове по света.

Табл. 7. Данни за изледваните щамове, антибиотична резистентност, макролид-резистентен генотип и генетична структура на 52 серотип 19А щама *S. pneumoniae*: 1992-2013г.

Щам по.	Година на изолиране	Възраст на пациента	Източник	Диагноза ^a	Антибиотично резистентен профил ^b	МИК (µg/mL) ^b		Макролид резистентен генотип	PFGE профил ^c	ST ^d
						P	CTX			
Bul 23	1992	4 y	Nose	Acute sinusitis	P,E,T,SXT,RIF,CTX	8.0	4.0	L4	A	663
Bul 29	1992	1 y 11 m	Nose	CAP	P,E,T,SXT,CTX	8.0	4.0	L4	A	663
Bul 34	1993	1 y	Eye	Conjunctivitis	P,E,T,SXT,CTX	8.0	2.0	L4	A	663
Bul 40	1993	3 y	MEF	AOM	P,E,T,SXT,CTX	8.0	4.0	L4	A	663
Bul 91	1995	4 m	MEF	AOM	P,E,T,SXT,CTX	8.0	4.0	L4	A	663
Bul 105	1995	1 y 9 m	Nose	CAP	P,E,CLI,T,SXT	0.25	≤ 0.12	ermB	C ₁	230
2194 PI	1997	3 y	Blood	CAP	P,E,CLI,T,SXT	0.12	≤ 0.12	ermB	C ₁	230
6027 Pir	1998	> 18 y	Blood	CAP	LEVO	≤ 0.03	≤ 0.12	-	K	423
268 HID	1998	63 y	CSF	Bacterial meningitis	T, SXT	≤ 0.03	≤ 0.12	-	B	66
23/1 Sof	2000	10 y	Blood	CAP	E,C,SXT	≤ 0.03	≤ 0.12	mefE	B	66
5800 CM	2000	5 y	MEF	AOM	P,E,CLI,T,SXT	0.12	≤ 0.12	ermB	C ₁	230
2402 Pd	2001	1 y	MEF	AOM	P,E,CLI,T,SXT	0.12	≤ 0.12	ermB	C ₄	1611
1458 L	2001	3 y	MEF	AOM	P,E,CLI,T,SXT	0.12	≤ 0.12	ermB	C ₁	230
476 Vr	2001	2 y	MEF	AOM	P,E,CLI,T,SXT	0.12	≤ 0.12	ermB	C ₁	230
08507 R	2002	2 y	MEF	AOM	P,E,CLI,T,SXT	0.12	≤ 0.12	ermB	C ₃	230
1195 Pd	2003	6 m	Pleural fluid	CAP	P,E,CLI,T,SXT	0.25	≤ 0.12	ermB	C ₅	230
5279 Pd	2004	5 m	MEF	AOM	P,E,CLI,T,SXT	0.25	≤ 0.12	ermB	E	276
9609 Pir	2005	77 y	Blood	CAP	P	0.12	≤ 0.12	-	D	3836
1059 PI	2005	74 y	CSF	Bacterial meningitis	Susceptible	≤ 0.03	≤ 0.12	-	G	2632
993 Pd	2005	2 y	Nose	URTI	P,T,SXT	0.25	≤ 0.12	-	I	1611
2268 PI	2006	5 m	MEF	AOM	P,E,CLI,T,SXT	0.25	≤ 0.12	ermB	C ₃	230
569 IICH	2006	6 m	Blood	Bacteraemia	P,E,CLI,T,SXT	0.12	≤ 0.12	ermB	C ₁	230
2149 CM	2006	61 y	Sputum	AECB	P,E,CLI,T,LEVO	0.25	≤ 0.12	ermB	C ₁	230
264 AH	2006	84 y	Sputum	COAD	P,E,CLI,T,SXT	0.25	≤ 0.12	ermB	C ₁	230
284 Pd	2007	4 m	MEF	AOM	P,E,CLI,T,SXT	0.12	≤ 0.12	ermB	C ₁	230
9611 Pd	2007	3 y	MEF	AOM	P,E,CLI,T,SXT	0.12	≤ 0.12	ermB	C ₂	230
1049 PI	2007	25 y	MEF	AOM	P,E,CLI,T,SXT,LEVO	0.25	0.25	ermB	C ₁	230
4203 PI	2007	8 m	Eye	Conjunctivitis	P,E,CLI,T,SXT	0.25	≤ 0.12	ermB	C ₂	230
83 PI	2007	2 y	Nph	URTI	P,E,CLI,T,SXT	0.25	0.25	ermB	B	7466
374 Pd	2007	1 y	Nph	URTI	P,T,SXT	0.12	≤ 0.12	-	I	1611
3928 Vn	2007	3 y	Nose	URTI	P,E,CLI,T,SXT	2.0	1.0	ermB	M	352
3663 CM	2007	7 y	Nph	URTI	P,E,CLI,T,SXT	0.12	≤ 0.12	ermB	C ₁	230

4704 PI	2007	10 m	Nph	URTI	P,E,CLI,T,SXT	0.12	≤ 0.12	<i>ermB</i>	C ₃	230
3618 PI	2007	10 m	Throat	URTI	P,E,CLI,T,SXT	0.12	≤ 0.12	<i>ermB</i>	L	315
45 DK-AH	2008	5 y	Throat	CAP	P,E,CLI,T,SXT	0.12	≤ 0.12	<i>ermB</i>	C ₁	230
8501 Pd	2008	2 y	MEF	AOM	P,E,CLI,T,SXT	0.12	≤ 0.12	<i>ermB+mef</i> <i>E</i>	C ₁	230
378 PI	2008	2 y	Throat	URTI	P,T,SXT	0.25	0.25	-	C ₃	2013
395 PI	2008	3 y	Nose	Acute sinusitis	P,E,CLI,T,SXT	0.12	≤ 0.12	<i>ermB</i>	C ₂	230
443 PI	2008	59 y	Nose	Chronic sinusitis	P,E,CLI,T,SXT	0.12	≤ 0.12	<i>ermB</i>	C ₂	7466
529 PI	2008	2 y	Nose	Chronic sinusitis	P,E,CLI,T,SXT	4.0	1.0	<i>ermB</i>	C ₂	230
1366 PI	2008	5 m	Nose	URTI	P,E,CLI,T,SXT	0.5	0.25	<i>ermB</i>	C ₃	230
6295 Kand	2008	2 y	Nose	URTI	P	0.12	≤ 0.12	-	D	3836
6675 Kand	2008	4 y	Nose	URTI	SXT	≤ 0.03	≤ 0.12	-	J	199
1661 CM	2008	1 y 7 m	Nose	URTI	P,T,SXT	1.0	0.5	-	I	1611
318 Kand	2009	3 y	Throat	URTI	P,E,CLI,T,SXT	0.12	≤ 0.12	<i>ermB</i>	C ₃	230
345 PI	2009	2 y	Nose	CAP	P,E,CLI,T,SXT	0.12	≤ 0.12	<i>ermB</i>	C ₄	230
2401 Pd	2010	5 m	MEF	AOM	P,E,CLI,T,SXT	1.0	0.5	<i>ermB+mef</i> <i>E</i>	F ₁	320
7643 DN	2010	28 y	Perytoneal fluid	Peritonitis	P,E,CLI,T,SXT,CTX	8.0	2.0	<i>ermB</i>	F ₂	320
301 HID	2011	8 m	Throat	Bacterial meningitis	P,SXT	2.0	1.0	-	G	2632
581 AH	2011	3 y	Eye	Conjunctivitis	Susceptible	≤ 0.03	≤ 0.12	-	H	2365
01 QI	2012	10 m	MEF	AOM	P,SXT	4.0	1.0	-	G	2632
39 QI	2013	5 y	MEF	AOM	P,E,CLI,T,SXT	0.12	≤ 0.12	<i>ermB</i>	C ₁	230

^a MEF, екссудат от средно ухо; Nph, назофаринкс; CSF, цереброспинален флуид. CAP, Обществено придобита пневмония; URTI, Инфекция на горни дихателни пътища; AOM, Остър среден отит; АЕСВ, остра екзацербация на хроничен бронхит; COAD, Хронично обструктивно заболяване на дихателните пътища.

^b Интерпретацията е спрямо CLSI, 2013. P, penicillin; CTX, cefotaxime; E, erythromycin; CLI, clindamycin; T, tetracycline; SXT, trimethoprim-sulfamethoxazole; RIF, rifampin; LEVO, levofloxacin. Използваните гранични стойности (µg/ml) за penicillin (oral penicillin V) са: чувствителни ≤0.06; интермедиерни ≥ 0.12-1.0; резистентни ≥ 2.

^c PFGE, пулсова електрофореза.

^d ST, секвенционен тип.

Табл. 8. Разпределение на клоналните комплекси (CC) и секвенционните типове (ST) спрямо PFGE профилите на 52 щама от серотип 19A.

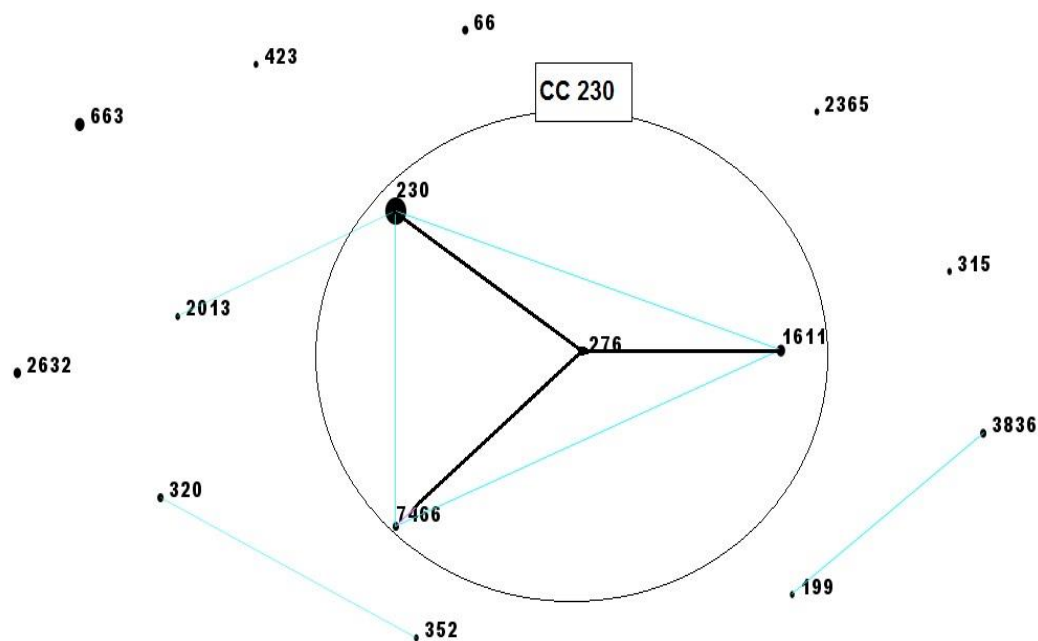
Клонален комплекс (CC) ^a	PMEN клон ^b	No. (%)	ST в рамките на всеки клон (%)	PFGE профил (No.)
CC230	Denmark ¹⁴ -32/ST230	33 (63.5)	230 (48.1), 1611 (1.9), 7466 (1.9), 2013 (1.9) 1611 (5.8) 276 (1.9) 7466 (1.9)	C (28) I (3) E (1) B (1)
CC663	Colombia ^{23F} -26/ST338	5 (9.6)	663 (9.6)	A (5)
ST2632 ^c	None	3 (5.8)	2632 (5.8)	G (3)
CC320	Taiwan ^{19F} -14/ST236	3 (5.8)	320 (3.8) 352 (1.9)	F (2) M (1)
CC199	Netherlands ^{15B} -37/ST199	3 (5.8)	199 (1.9) 3836 (3.8)	J (1) D (2)
CC66	Tennessee ¹⁴ -18/ST67	2 (3.8)	66 (3.8)	B (2)
CC315	Poland ^{6B} -20/ST315	1 (1.9)	315 (1.9)	L (1)
ST2365 ^c	None	1 (1.9)	2365 (1.9)	H (1)
CC9 (CC20) ^d	England ¹⁴ -9/ST9 (CSR ¹⁴ -10/ST20)	1 (1.9)	423 (1.9)	K (1)

^a Клоналните комплекси (CC) са определени на базата на информация от PMEN (<http://www.sph.emory.edu/PMEN>). За CC е използвана точка на отсичане от 5 идентични локуса в eBURST групата на първоначалният предшественик.

^b ST е родствен на референтен PMEN клон, ако е идентичен, SLV или DLV.

^c ST, без определен CC, но принадлежащ към известна eBURST група.

^d ST423 е DLV на две eBURST групи.



Фиг. 9. Изобразяване (snapshot) на секвенционните типове (ST) на популация от 52 щама *S.pneumoniae* от серотип 19А, открити в периода 1992г.-2013г. Всяка точка представлява отделен ST, а размерът на точките е пропорционален на броя на щамовете. Първичният предшественик е позициониран централно в клъстера. Плътните линии между STs представляват единични локусни варианти, а сивите линии показват двойни локусни варианти. За родствени към даден референтен PMEN клон бяха приети идентични STs, SLVs или DLV.

V. ИЗВОДИ

1. За периода на проучване 2006 – 2013г. изследваните 591 инвазивни и респираторни щамове *S.pneumoniae* показаха покачване на резистентността към Penicillin и макролиди в сравнение с минали периоди на проучвания.

1.1. Според критериите на CLSI, за менингитните изолати МИК стойности за парентерален Penicillin, а за всички останали щамове МИК стойности за орален Penicillin ($\geq 0.12\text{mg/L}$), 313 (53.0%) от изследваните щамове показаха нечувствителност към Penicillin, от които 28.8% бяха с интермедиерна чувствителност към Penicillin, и 24.2% бяха с висока резистентност (МИК, $\geq 2\text{mg/L}$). За сравнение, нечувствителност към Penicillin са показали 24.3% от изследваните пневмококови щамове в периода 1991-1993 г. За периода 2001г.-2005г., 39.3% от изследваните пневмококови щамове са показали резистентност към Penicillin, от които 25.6% са били с ниски нива (МИК, 0.125 до 1 mg/L) на резистентност, а 13.7% са били с високи нива (МИК, $\geq 2\text{mg/L}$).

1.2. Макролидна резистентност показаха 40.4% от пневмококовите щамове. За периода 2001г.-2005г макролид – резистентните щамове са били 24.7%.

1.3. Множествена резистентност (резистентност към три и повече класа АМЛС) показаха приблизително половината от проучените щамове *S.pneumoniae* - 46.7%.

2. Най-честите серотипове сред Penicillin-нечувствителните пневмококи бяха: 19F (33.8%), 6B (13.2%), 23F (13.2%), 9V (10.6%), 19A (10.3%) и 14 (9.6%), които заедно представляваха 90.7% от всички PRSP.

3. Най-честите серотипове сред Erythromycin-резистентните *S.pneumoniae* бяха: 19F (44.3%), 6B (21.0%), 14 (12.1%), 19A (10.9%), 6A (5.0%) и 23F (3.3%), които заедно представляваха 96.6 % от всички ERSP.

4. Преди въвеждането на масовата пневмококова имунизация в България, серотип 19A беше вече значително представен - 7.9%, поради широкото клонално разпространение, доказано с методите PFGE и MLST. Този серотип се срещаше при всички възрастови групи, щамовете бяха високо резистентни и от различни клинични източници.

Глобалното разпространение на този множествено-резистентен серотип след въвеждането на PCV7 наложи научния интерес към изследване на клоналната структура на щамовете 19А и в нашата страна.

5. Серотиповото покритие на PCV7, PCV10 и PCV13 за инвазивните пневмококови щамове от всички възрасти за предвакциналния период (2006-2010г.) беше 46.4%, 67.8% и 84.5%, съответно, което потвърди нуждата от въвеждането на по-широкоспектрна конюгирана ваксина в България. При инвазивните щамове от следвакциналния период (2011-2013г.) ваксиналните серотипове от PCV7, PCV10 и PCV13 бяха 36.6%, 43.3% и 76.6%, съответно. Потенциалното серотипово покритие за PCV7, PCV10 и PCV13 за предвакциналния период за всички останали неинвазивните щамове беше съответно: 67.3%, 68.0% и 84.0%, а за следвакциналния период за PCV7 и PCV10 беше еднакво: 67.6%, а за PCV13 - 94.1%.

6. Потенциалното PCV-серотипово покритие за всички видове щамове от предвакциналния период (2006–2010г.) за децата до 5г. (целевата група за ваксинация) беше 72.5%, 74.8% и 89.7% за PCV7, PCV10 и PCV13 съответно. За следвакциналния период (2011-2013г.) серотиповото покритие на PCV7, PCV10 и PCV13 при децата до 5г. беше 62.1%, 64.9% и 94.6%, съответно.

7. Механизмите на макролидна резистентност при *S.pneumoniae* бяха свързани с разпространението на две генетични детерминанти в България за периода от 2006г. до 2013г.: *erm*(B) и *mef*(E). Преобладаваща генетична детерминанта беше *erm*(B) ген – 56.5%, която се характеризираше и с по-високи нива на резистентност към Erythromycin. Прави впечатление тенденцията за увеличаване на броя на щамовете, носещи и двата гена ($n = 34$, 14.2%), което осигурява на тези пневмококове щамове по-голямо генетично селективно предимство и стабилност.

8. RFLP анализът и Директното автоматично секвениране на *mef* ампликона при всички *mef*-позитивни с PCR пневмококови щамове, доказаха наличие на подклас *mef*(E). При всички проби беше открита точковата мутация и две специфични точки на полиморфизъм характерни за оригиналната нуклеотидна последователност на *mef*(E) ген.

9. Анализът на геномна ДНК с PFGE доказва 13 различни рестрикционни профили (от А до М - PFGE тип) сред всички изследвани 19А пневмококови щамове. Най-разпространен сред пневмококовите щамове от серотип 19А беше рестрикционен профил С (n=28) щама (53.8 %) и обхващаше пет субтипа (C₁ до C₅) рестрикционни варианти.

10. MLST молекулярното типичане показва присъствие на 15 секвенционни типа (ST) сред 19А пневмококовите щамове в България. Беше определен клоналният произход на щамовете *S. pneumoniae* и бяха идентифицирани филогенетично родствени гено типове. Беше доказан основният клонален комплекс CC 230 (ST230) (63.5%), който отговаря на международния PMEN клон Denmark¹⁴-32. Този клон е често срещан и в голяма част от европейските страни, но преобладаващият секвенционен тип при тях беше ST276 от клоналният комплекс. В международните изследвания се посочват пет циркулиращи клона на серотип 19А *S.pneumoniae* разпространени глобално, три от които бяха открити при българските щамове.

11. За останалите 36.5% от проучените 19А изолати беше установена принадлежност към 6 генетично разнородни клонални комплекси според MLST типичането, а два ST типа не принадлежаха към известни PMEN-клонове, но съответстваха на известна eBURST група.

12. Молекулярните проучвания доказаха много динамични промени при Penicillin-резистентните, Erythromycin-резистентните и множествено-резистентните пневмококови популации и показаха че, резистентността се дължи на разпространение на резистентни клонове, придобиване на резистентни гени в рамките на една клонална група и разпространение на резистентни гени към нови клонални групи.

VI. СПРАВКА ЗА ПРИНОСИТЕ

Приноси с потвърдителен характер

1. Направени са проучвания върху антибиотичната чувствителност на 591 инвазивни и респираторни щамове *S.pneumoniae* от пациенти с пневмококови инфекции за период от осем години (2006 – 2013г.) и сравнително е анализирана чувствителността на АБП според локализацията на инфекцията. Резултатите доказаха увеличение на Penicillin- и макролид-резистентните щамове, което се наблюдава и в глобален план.
2. Беше потвърдено широкото разпространение на *erm(B)* ген, който се явява основна генетична детерминанта за макролидна резистентност в световен план.
3. Потвърдено беше покритие на PCV от над 60%, както е според изискванията на СЗО, което доказва нуждата от включване на пневмококова конюгирана ваксина в Имунизационния календар на България.

Приноси с оригинален характер

1. За първи път в нашата страна е направено диференциране на генетичните подкласове на *mef(A/E)* гени с RFLP и директно автоматично секвениране, които отговарят за ефлукс механизма на макролидна резистентност при *S.pneumoniae*.
2. За първи път в нашата страна беше направено MLST типирание на 7 “housekeeping” гена на *S.pneumoniae*, като основен метод за молекулярно типирание.
3. Доказан беше клонален произход на пневмококови щамове в България с eBurst алгоритъм за първи път.
4. Беше доказана статистическа корелация между два молекулярно-генетични типиращи метода - PFGE и MLST.
5. Резултатите от настоящият дисертационен труд са основа за създаване на база данни за резистентните пневмококови щамове в България, чрез която да се следи движението и еволюцията им в нашата страна и връзката им с международните клонове.

Приноси с приложен характер

1. Представен е алгоритъм от методи за доказване и характеризиране на клинично значими щамове *S.pneumoniae*, включващ:
 - 1.1. Антибиотична чувствителност
 - 1.2. Фенотип на макролидна резистентност
 - 1.3. Серотипиране
 - 1.4. Генотипиране на антибиотико-резистентни щамове и на пневмококовият геном
2. Внедрени бяха молекулярно-генетични методи за изследване и анализ на щамовете *S. pneumoniae*:
 - 2.1. Нуклеотидно секвениране на резистентни гени.
 - 2.2. Рестрикционен-ендонуклеазен анализ на генни фрагменти (RFLP)
 - 2.3. Епидемиологично молекулярно типичане с PFGE.
 - 2.4. Мултилокусно секвениране на седем постоянни гени при *S. pneumoniae* и определяне на секвенционния MLST тип.
 - 2.5. Използване на софтуерни продукти и „online” програми за обработка и анализ на резултатите от молекулярно-генетичните проучвания, като:
 - Работа с eBURST алгоритъм за определяне на секвенционния тип (ST) и определяне на клонален комплекс (CC);
 - Сравняване с международна база данни в PMEN
 - Използване на „online” програми за доказване на корелация (статистически анализ) на резултатите получени с молекулярно-генетичните методи за типичане.

VII. Публикации и научни прояви, свързани с дисертацията

Реализирани научни публикации:

1. **Александрова А.**, Сечанова Л. Молекулярно - биологични методи за епидемиологично типизиране и изследване на антибиотичната резистентност на *Streptococcus pneumoniae*. Инфектология. 2008, Том XLV: брой 2, 3-11
2. Сечанова Л., **Александрова А.**, Хайдушка И, Средкова М, Божкова К. и И. Митов. Очакван ефект на конюгираните *Streptococcus pneumoniae* ваксини за превенция на пневмококовите инфекции сред децата в България. Практическа Педиатрия, 2009г., брой 3, 3-6
3. **Alexandrova, A.**, Setchanova L, Sredkova M. et al. MLS_B genotype is predominant molecular genetic mechanism among erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* for the period : 2006 - 2008 – Journal of IMAB. Issue 2009, book 1, p: 36-38
4. Setchanova LP, **Alexandrova A**, Mitov I, Nashev D, Kantardjiev T., the Group for Microbiological Surveillance of Pneumococci. Serotype distribution and antimicrobial resistance of invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates in Bulgaria before the introduction of pneumococcal conjugate vaccine Journal of Chemotherapy, 2012, vol.24, No1:12-17.
(IF₂₀₁₃ - 1.073)
5. Setchanova LP, Kostyanev T, **Alexandrova A**, Mitov I, Nashev D. and T.Kantardjiev. Microbiological characterization of *Streptococcus pneumoniae* and non-typeable *Haemophilus influenzae* isolates as primary causes of acute otitis media in Bulgarian children before the introduction of conjugate vaccines. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials 2013, 12:6 <http://www.ann-clinmicrob.com/content/12/1/6>
(IF₂₀₁₃ - 1.51)

Участия в научни прояви:

1. **Александрова А.**, Маркова Б., Хайдушка И., Средкова М, Божкова К, Проевска Ю. и Л.Сечанова. Антимикробна чувствителност и механизми на макролидна резистентност на клинични изолати *Streptococcus pneumoniae*: 2006 – 2007. VI-ти национален конгрес по Клинична Микробиология и Инфектология на Българската Асоциация на Микробиолозите (БАМ). Пловдив, 03-06.04.2008г.
2. **Alexandrova A.**, Markova B, Haydoushka I, Sredkova M, Bojkova K, Proevska U and L. Setchanova. Antimicrobial susceptibility and macrolide-resistance mechanisms among clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Bulgaria, 2006–2007 XVIII European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) - Barcelona, Spain 19-22 April 2008 Volume 14, supplement No7, [R2306]2.
3. **Александрова А.**, Сечанова Л, Средкова М, Хайдушка И, Маркова Б, Проевска Ю, Божкова К и И. Митов. MLS_B генотип преобладава като молекулярно-генетичен механизъм при еритромицин-резистентните *Streptococcus pneumoniae* за периода: 2006-2008. XIX асамблея на IMAB – Варна, 2009
4. Setchanova LP, **Alexandrova A**, Sredkova M, Haydoushka I, Bojkova K, Markova B and I. Mitov. The pneumococcal disease in Bulgarian children before the introduction of the pneumococcal conjugate vaccines. 7th International symposium on pneumococci and pneumococcal diseases. Tel Aviv, Israel, 2010
5. **Alexandrova A.**, Setchanova L, Mitov I. Trends in serotype prevalence in invasive pneumococcal disease before and after pneumococcal vaccination in Bulgaria, 2006-2013. 24th annual assembly of International medical association Bulgaria (IMAB), Varna, 2014

SUMMARY

Objectives: A total of 591 invasive and respiratory clinical strains *S.pneumoniae* isolated during 2006-2013 from medical centers in Sofia, Plovdiv, Pleven and Varna were studied to evaluate the current levels of antimicrobial resistance, macrolide resistance mechanisms, pneumococcal serotype and sequence type (ST) distribution and population genetic structure.

Results: According to the criteria of the CLSI (M100-S23, 2013), 313 (53.0%) of the studied strains were Penicillin-nonsusceptible. Macrolide resistance was observed in 40.4% of the pneumococcal strains. Multidrug resistance strains (resistant to three or more classes AB) were almost half of the studied pneumococci - 46.7%. The most spread serotypes in PRSP were: 19F (33.8%), 6B (13.2%), 23F (13.2%), 9V (10.6%), 19A (10.3%) and 14 (9.6%), which represented 90.7% of all PRSP. The most predominant serotypes in ERSP were: 19F (44.3%), 6B (21.0%), 14 (12.1%), 19A (10.9%), 6A (5.0%) and 23F (3.3%), which were 96.6% of all ERSP. The serotype coverage of PCV7, PCV10 and PCV13 for invasive pneumococcal strains of all ages patients for the prevaccinal-period (2006-2010) was 46.4%, 67.8% and 84.5%, respectively, and confirmed the requirement for a broader spectrum PCV in Bulgaria. The potential serotype coverage of PCV7, PCV10 and PCV13 for all clinical strains of the prevaccinal-period (2006-2010) for children up to 5 years (target group for vaccination) was 72.5%, 74.8% and 89.7%, respectively. For the post-vaccinal period (2011-2013) the potential serotype coverage of PCV7, PCV10 and PCV13 in children up to 5 years was 62.1%, 64.9% and 94.6%, respectively. The predominant macrolide resistance gene was *erm*(B) – (n=135, 56.5%) of all ERSP. A total of 70 (29.3%) isolates carried *mef*(E) gene, whereas (n=34, 14.2%) harbored both *erm*(B) and *mef*(E) genes. RFLP analysis and direct automated sequencing of *mef* amplicon in all *mef*-positive pneumococcal strains verified a subclass *mef*(E). Before the introduction of mandatory immunization in Bulgaria, serotype 19A was already significantly represented - 7.9%. This serotype was presented in all age groups, the strains were highly resistant and from various clinical sources. Global spread of this multi-resistant serotype after the introduction of PCV7 contributed the investigation of clonal structure of strains 19A in our country. The analysis of genomic DNA with PFGE revealed 13 different restriction patterns (A-M) among all 19A pneumococcal strains. The results from MLST showed presence of 15 ST among 19A researched strains. The most prevalent genotype (63.5%) among 19A pneumococcal strains was the multidrug-resistant clonal complex CC230, which is a capsular switched variant of the Denmark¹⁴-32 (ST230) global clone. The remaining 36.5% of 19A strains belonged to six genetically diverse CCs and two ST did not belong to known PMEN-clone, but to a known eBURST group. Five clones of serotype 19A *S.pneumoniae* were distributed globally and three of them were found in Bulgarian strains.

Conclusion: The current research of antimicrobial resistance, serotype distribution and genetic structure of pneumococcal strains is giving the basis for future monitoring the evolution and genetic relatedness of Bulgarian *S.pneumoniae* strains with the global spread resistant clones.