



**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.**

**Научна специалност: 01.06.12. Микробиология**

**София  
2014**

## Съдържание

### Използвани съкращения

I. Въведение.....	7
II. Литературен обзор.....	8
1. Клиничен спектър на пневмококовите инфекции и епидемиологични данни за разпространението им.....	8
2. Капсулата-основен вирулентен фактор и мишена на пневмококовите ваксини, капсулни антигени.....	12
2.1. Генетичен локус на пневмококовата капсула.....	14
2.2. Други важни фактори на вирулентност.....	15
3. Имунопрофилактика на пневмококовите инфекции.....	17
4. Промени в пневмококовата популация настъпили като резултат от масовата имунизация с пневмококови конюгирани ваксини (PCV).....	19
5. Антимикробна чувствителност при <i>S. pneumoniae</i> и методи за определянето ѝ (in vitro и in vivo активност на антибиотиците).....	24
6. Резистентност към антимикробни лекарствени средства при <i>S. pneumoniae</i> .....	26
6.1. Глобално разпространение.....	26
6.2. Причини за нарастване на резистентността.....	28
6.3. Особености в генетичната структура на <i>S. pneumoniae</i> . Пластичност на пневмококовия геном.....	30
7. Молекулярно-генетични механизми на резистентност, фенотипен и генотипен анализ.....	32
7.1. Резистентност към Penicillin и други $\beta$ - лактамни антибиотици.....	32
7.2. Резистентност към макролиди, линкозамиди, стрептограмини (MLS група).....	33
7.2.1. Характеристика на макролидните и линкозамидни антибиотици.....	33
7.2.2. Механизми на действие на антибиотиците от MLS – група.....	35
А. Метилиране.....	36
Б. Ефлукс.....	37

В. Генетични варианти на <i>mef</i> ген.....	38
7.2.3.Макролид – резистентен фенотип.....	39
7.3.Молекулярно - генетични механизми на резистентност при <i>S. pneumoniae</i> към други антимикробни лекарствени средства, използвани за лечение на пневмококовите заболявания.....	41
7.4.Множествена резистентност.....	42
8. Микробиологични методи за идентификация и типирание на <i>S.pneumoniae</i> .....	43
9. Молекулярно-биологични методи за идентификация и типирание на <i>S.</i> <i>pneumoniae</i> .....	45
9.1 PCR методи за идентификация на <i>S.pneumoniae</i> .....	45
9.2 Молекулярно – биологични методи за епидемиологично типирание и намиране на клонално сходство при щамове <i>S. pneumoniae</i> .....	46
9.2.1.Пулсова електрофореза – Pulse field gel electrophoresis (PFGE).....	46
9.2.2.Мултилокусно секвениране - Multi locus Sequence Typing (MLST).....	48
10. Други молекулярно - биологични методи използвани за изследване на генетичната структура на <i>S. pneumoniae</i> .....	49
11. Оценка на значението на утвърдените методи за намиране на клонално сходство при <i>S. pneumoniae</i> за доказване експанзията на международни пневмококови клонове през последните години.....	55
 III. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....	56
 IV. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ.....	58
 <b>Раздел I. Микробиологични изследвания.....</b>	58
1.1. Изследвани щамове <i>S. pneumoniae</i> .....	58
1.2. Микробиологични методи за идентификация.....	58
1.2.1. Тест с оптохин.....	59
1.2.2. Тест за разтворимост в жлъчни соли.....	59
1.3. Съхранение на бактериалните щамове.....	59
2. Изпитване на чувствителност към антибиотици и определяне на МИК.....	60
2.1. Дисково-дифузионен метод (ДДМ).....	60

2.2. Определяне на МИК с микробульонен метод .....	60
2.3. Определяне на МИК на антибиотиците с разреждане в агар.....	61
2.4. Определяне на МИК с градиентен тест за антибиотична чувствителност.....	61
3. Определяне на фенотип на Erythromycin-резистентни <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	61
4. Серотипиране.....	62
4.1. Метод на Нойфелд за набъбване на капсулата.....	62
4.2. Латекс-аглутинация.....	63
<b>Раздел II. Молекулярно – биологични изследвания.....</b>	<b>63</b>
1. Изолиране на тотална бактериална ДНК.....	63
2. Полимеразо-верижна реакция (PCR) за откриване на гените на макролидна резистентност при <i>S. pneumoniae</i> .....	64
3. Рестрикционен анализ за диференциране на генетични варианти на <i>mef</i> (E) и <i>mef</i> (A) гени.....	66
4. Директно автоматично секвениране на <i>mef</i> ген.....	68
4.1. Анализ на нуклеотидните последователности на <i>mef</i> -гените .....	69
5. Молекулярно типирание с PFGE (Pulse field gel electrophoresis).....	70
6. Мултилокусно секвениране - MLST (multilocus sequence typing) .....	74
7. Анализ с e-BURST алгоритъм .....	77
8. Свързване на MLST клонален комплекс със съответстващ международен клон от Pneumococcal Molecular Epidemiology Network (PMEN).....	77
9. Статистическа и софтуерна обработка на данните.....	77
 ГЛАВА V. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ.....	 78
 <b>I. Демографски и клинични данни за изследваните щамове <i>S.pneumoniae</i> от пациенти с пневмококови инфекции.....</b>	 <b>78</b>
<b>II. Микробиологични изследвания.....</b>	<b>81</b>
1. Чувствителност към антимикробни лекарствени средства.....	81
2. Серотипова характеристика на инвазивни и неинвазивни щамове <i>S.pneumoniae</i> и потенциален ваксинален обхват на пневмококовите конюгирани ваксини.....	94

<b>III. Молекулярно-биологични проучвания</b> .....	109
1. Молекулярно-биологични механизми на резистентност към MLS група антибиотици при щамове <i>S.pneumoniae</i> : 2006-2013г.....	109
2. Анализирани на връзката между фенотипиране и генотипиране на Erythromycin-резистентните пневмококи.....	113
3. Разпределение на макролид – резистентните генетични детерминанти през периода на проучване от 2006г. до 2013г. ....	115
4. Разпределение на генетичните детерминанти отговорни за еритромициновата резистентност сред пациенти от различни възрастови групи с пневмококови заболявания.....	118
5. Генотипово разпределение на Erythromycin – резистентните щамове <i>S.pneumoniae</i> сред различните клинични материали. ....	119
6. Генотипово разпределение на Erythromycin – резистентните щамове <i>S.pneumoniae</i> изолирани за периода 2006г. - 2013г. спрямо установеният им серотип.....	123
7. Диференциране на подкласовете на <i>mef</i> ген с RFLP .....	126
8. Автоматично директно секвениране на <i>mef</i> ген.....	128
9. Макрорестрикционен анализ с PFGE на щамове <i>S. pneumoniae</i> .....	130
10. Молекулярно типичане с MLST метод на щамове <i>S. pneumoniae</i> .....	136
11. Определяне на клоналния произход на щамове <i>S. pneumoniae</i> с e-BURST алгоритъм.....	139
12. Сравняване на получените резултати от e-BURST софтуерният анализ с международната пневмококовата молекулярна епидемиологична мрежа–PMEN.....	140
VI. Изводи.....	148
VII. Справка за приносите .....	152
VIII. Публикации и научни прояви, свързани с дисертацията.....	155
Литературна справка .....	157

## 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  
КОЕ - колонии образуващи единици  
МИК - минимална инхибираща концентрация  
ПГ - пептидогликан  
ПМН - Полиморфнонуклеарни левкоцити  
ПП - Пневмококовата пневмония  
ПСР (PBP) - Penicillin-свързващи протеини  
pPHK- рибозомална PHK AFLP - Amplified Restriction Fragment Polymorphism  
BOX-PCR - BOX-Polymerase Chain Reaction  
BURST - Based upon related sequence types - алгоритъм за клъстерен анализ, използващ данни от MLST  
СС - 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  
ECDC - European center for disease control and prevention  
erm(B) - ген кодиращ метилаза, отговорен за резистентността към MLS  
IS елементи - инсерционни елементи  
*lytA* - ген за пневмококов повърхностен антиген А  
*mef(E)* - ген отговорен за ефлукс механизма при макролидна резистентност  
mega - Macrolide Efflux Genetic Assembly  
MLEE - (Multilocus Enzyme Electrophoresis), Мултилокусна ензимна електрофореза  
MLS - (M -макролиди, L-линкозамиди, S-стрептограмини)  
MLST - (Multi locus sequence typing) – Мултилокусно секвениране  
PCR – (Polymerase chain reaction), Полимеразна верижна реакция  
PCV - Пневмококова конюгирана ваксина  
PFGE - (Pulsed-field gel electrophoresis), Пулсова електрофореза  
*ply* - ген за пневмолизин  
PPV - Пневмококова полизахаридна ваксина  
RAPD -Randomly Amplified Polymorphic DNA - Случайна амплификация на полиморфна  
RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism  
*sodA* - супероксид дисмутаза  
ST - (sequence type), секвенционен тип  
WGS – Whole genome sequencing  
WHO – (World Health Organization), Световна Здравна Организация

## I. Въведение

*Streptococcus pneumoniae* е основен причинител на извънболнично-придобита пневмония, менингит и бактериемия сред пациенти от всички възрастови групи и най-честия причинител на остро възпаление на средното ухо (отитис медиа) при децата. Пневмококите са чест бактериален причинител и на други неинвазивни - локални и системни инфекции, като придобити в обществото респираторни инфекции (пневмония без бактериемия, синусит и 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 множествената-резистентност при *S. pneumoniae* са допринесли много динамични процеси, които се обуславят от вертикално разпространение на резистентни клонове, придобиване и загуба 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. Литературен обзор

### 1. Клиничен спектър на пневмококовите инфекции и епидемиологични данни за разпространението им.

*Streptococcus pneumoniae* (пневмокок) е идентифициран за първи път през 1881г. от Louis Pasteur във Франция и G. M. Sternberg в САЩ. *S. pneumoniae* е представител на род *Streptococcus*, който включва почти 50 вида, които в някои случаи трудно се разграничават един от друг. За разлика от останалите  $\alpha$ -стрептококи, пневмококите са чувствителни към жлъчка и оптохин. *S. pneumoniae* е Грам – положителен диплокок, неподвижен и капсулиран, някои щамове притежават пили (3,53). Всички колонии са подложени на автолизис с остаряването им и придобиват сферична форма с вдлъбнат център. Пневмококите са факултативни анаероби и мезофили,  $\alpha$ -хемолитичният им вид е в резултат от продукцията на ензим пневмолизин, който разгражда хемоглобина, образуващ зелен продукт. На сложни хранителни среди, при 37°C, имат генерационно време от 20-30 минути.

**Фиг 1.** Електронно микроскопска снимка на *Streptococcus pneumoniae*.

**Източник:** CDC Public Health Image Library. Public domain.



*Streptococcus pneumoniae* е основен причинител на извънболнично-придобита пневмония, менингит и бактериемия сред пациенти от всички възрастови групи и най-честия причинител на остро възпаление на средното ухо (отитис медиа) при децата.

Пневмококите са чест бактериален причинител и на други неинвазивни - локални и системни инфекции, като придобити в обществото респираторни инфекции (пневмония без бактериемия, синусит и бронхити).



*S.pneumoniae* може да причини също ендокардит, спонтанен бактериален перитонит, септичен артрит, миозит, перикардит, остеомиелит.

Резервоар на инфекцията са болни и носители (20-50% деца в доучилищна възраст и 20-25% възрастни), основният път на предаване е контактен, а при наличието на инфекциозни огнища също и въздушно-капков. (139)

По данни на СЗО към 2006 г. ежегодно около 1.6 млн. човека умират от пневмококова инфекция, при това 0.7 - 1 милион от смъртните случаи са при деца под 5 години, най-вече в страни с ограничени ресурси (29,32). В Европа и Северна Америка *S.pneumoniae* е водещ причинител на придобитата в обществото пневмония при възрастни (200 - 400 случая на 100 000 души от населението). В тези региони, честотата на инвазивна пневмококова болест варира от 10 до 100 случая на 100 000 души от населението. (29,30,32).

Заболяванията са най-характерни за малките деца и възрастните, защото те имат ниски нива на защитни антитела насочени срещу пневмококовите капсуларни полизахариди.

В повечето случаи клиничните форми на инфекция, се развиват при нарушаване на резистентността на организма (нарушена почистваща функция на ресничестият епител в ГДП, намалена продукция на муцин, нарушен кашличен рефлекс, преумора, простуда), както и на фона на съпътстваща патология (сърповидноклетъчна анемия, Болест на Hodgkin, остри вирусни инфекции, миелома, захарен диабет, състояние след спленектомия) или алкохолизъм.

Пневмококите са част от нормалната флора на горните дихателни пътища в 5 до 40 % от здравите хора (36). При здрави имунокомпетентни хора колонизацията на лигавицата не е придружена с клинични симптоми, но води до създаването на краткотраен типовоспецифичен хуморален имунитет, който осигурява елиминиране на микроорганизма. Процесът на най-интензивна колонизация, в най-младите възрастови групи е след отслабване на пасивния имунитет получен от майката, около 6-месечна възраст. При настъпила инфекция, пациентът придобива нов серотип, различен от този, който е свързан с продължителното носителство. Щамовете пневмококи причиняващи заболяване са същите като тези, които се асоциират с носителство.

Въпреки, че новите серотипове се придобиват през цялата година, процесът е по-характерен за студените месеци.

Има най-малко 40 серогрупи на *S. pneumoniae*, които са потенциално патогенни, но относително малък брой от тези групи са отговорни за ИПЗ при децата по целия свят (33,50,60,76). Има географски и възрастови различия в честотата на пневмококовите серотипове, като някои серотипове се отриват по-често при ИПЗ, в сравнение с други. В САЩ, серогрупи 4, 6, 9, 14, 18, 19 и 23 причиняват 80-90% от случаите на инвазивни заболявания, докато в Европа същите серотипове причиняват 61-81% от инвазивните заболявания при децата (80,90,91, 94). Случаите на пневмония при децата са най-много в развиващия се свят, особено в Индия, Китай и Пакистан. В Бангладеш, Индонезия и Нигерия също има висока честота на случаите, изискващи хоспитализация (29,32,76,86). В Африка данните не са много точни поради по-малкия брой проучвания. В мащабно проучване на M.Nackel, 2013г. върху международна колекция от инвазивни щамове *S.pneumoniae* са представени глобални данни за серотиповото разпространение на пневмококовите щамове в различни региони по света и са описани някои тенденции за антибиотична резистентност при отделните серотипове. Следва адаптирана таблица от това проучване.

**Табл.1. Серотипово разпределение в брой и (%) на десетте най-разпространени серотипа сред 2173 инвазивни щамове *S.pneumoniae* изолирани от различни географски региони (2004 – 2008г.)**

Регион	Европа п, (%)		Северна Америка п, (%)		Южна Америка п, (%)		Среден Изток п, (%)		Азия/Тих океан п, (%)		Африка п, (%)	
Серотип п, (%)	3	40 (8.5)	19A	268 (21.0)	14	19 (13.2)	19A	12 (4.3)	3	16 (10.8)	19F	6 (14.3)
	14	36 (7.7)	6A	94 (7.3)	1	15 (10.4)	1	9 (10.7)	19A	16 (10.3)	6B	6 (14.3)
	1	35 (7.5)	7F	91 (7.1)	6A	13 (9.0)	6A	7 (8.3)	14	13 (8.3)	4	4 (9.5)
	7F	34 (7.3)	22F	82 (6.4)	6B	11 (7.6)	5	5 (6.0)	19F	12 (7.7)	23F	4 (9.5)
	19A	31 (6.6)	3	67 (5.2)	7F	9 (6.3)	9V	5 (6.0)	6A	10 (6.4)	14	3 (7.1)
	6B	26 (5.6)	23A	54 (4.2)	19A	8 (5.6)	4	4 (4.8)	6B	9 (5.8)	19A	3 (7.1)
	23F	24 (5.1)	11A	52 (4.1)	3	7 (4.9)	8	4 (4.8)	22F	8 (5.1)	1	2 (4.8)
	6A	24 (5.1)	12F	48 (3.8)	19F	7 (4.9)	14	4 (4.8)	23F	8 (5.1)	8	2 (4.8)
	9V	22 (4.7)	19F	48 (3.8)	22F	6 (4.2)	11A	4 (4.8)	17F	7 (4.5)	15B	2 (4.8)
	22F	21 (4.5)	35B	39 (3.0)	9V	5 (3.5)	19F	4 (4.8)	4	6 (3.8)	16F	2 (4.8)
Общ бр.*	293	(62.6%)	843	(65.9)	100	(69.6)	58	(59.3)	105	(67.8)	34	(81.0)
Общ бр.**	468	(100%)	1279	(100%)	144	(100%)	84	(100%)	156	(100%)	42	(100%)

**Забележка:** \* Броя на серотиповете включени в таблицата не съставлява 100%, т.като са представени десетте най-разпространени серотипа за всеки отделен географски регион.

\*\* Общият брой на всички серотипирани пневмококови щамове е представен в последния ред.

При по-големи деца и възрастни, има по-голям брой на *S. pneumoniae* серотипове, които са отговорни за ИПЗ. Заради широкия възрастов диапазон и различията в методиките, присъстват разнообразни данни в проучванията, но най-общо в световен план серотипове 19А (28%), 19F (10%) и 14 (9.0%) са най-чести при деца под 5г. възраст. При възрастни над 16г. преобладаващи са 19А (13%) и 3, 6А и 7F (общо 7%). Серотипове 19А, 6А, 19F, 6В, 15А, 9V и 14 показват най-високи нива на еритромицинова резистентност ( $P<0.05$ ), а 19А, 19F, 35В, 6А, 6В, 23А, 9V, 15А, и 14 най-високи нива на пеницилинова нечувствителност ( $P<0.05$ ) (76).

Най-честите пневмококови серотипове изолирани от ИПЗ в развитите страни са използвани за ваксинални препарати. Не винаги силния потенциал да причиняват заболявания, корелира с тяхното разпространение. Например серотипове, които са с нисък потенциал да причинят заболяване, но са широко разпространени в дадена географска област, може да предизвикат по - голям брой случаи на ИПЗ, в сравнение със серотип, който е силно “агресивен”, но рядко може да се открие като колонизиращ назофаринкса.

Vueggemann и др. през 2003г. правят сравнение между честотата на ИПЗ, причинено от даден серотип с честотата на носителство на този серотип в населението, изразено като съотношение на шансовете (OR). За серотипове 1, 4, 7F, 18С и 14 е установено, че имат висок потенциал за инвазивно заболяване, докато серотипове 6А, 6В, 23F, 9V, и 3 са сред тези, за които е установено, че сравнително рядко причиняват ИПЗ (26,77).

Интересно е, че инвазивните щамове са по-бедни откъм генетично разнообразие, отколкото тези, изолирани от носителство (77). Предполага се селекционен натиск относно определени гени.

Също така, някои щамове, които са с различни капсулни серотипове, но които принадлежат към един и същ клон, притежават същия потенциал да предизвикват заболявания (46,76). Друго изследване предполага, че свойството на *S. pneumoniae* да предизвиква ИПЗ, е свързано с конкретен клонален тип, или капсулен серотип (43,85,95,188).

## **2. Капсулата - основен вирулентен фактор и мишена на пневмококовите ваксини, капсулни антигени.**

*S.pneumoniae* се характеризира с полизахаридна капсула, която напълно обвива клетката и играе ключова роля в неговата вирулентност. Капсулата защитава бактериите от бактерицидния потенциал на фагоцитите и действието на опсонините (89). Голяма част от антипневмококовите антитела представляват антитела към антигена на капсулите. Капсуларните полизахариди се използват за серологична класификация на щамовете. Понастоящем се разграничават 95 серотипа.

Щамовете от различни серотипове се различават по инвазивен капацитет, ниво на смъртност, възрастово и географско разпределение и в това дали действат като първични причинители или са по-склонни да заразяват хора със съпровождащи заболявания (29,32,150,188). Поради тази причина, серотипирането е полезно за епидемиологични цели и за оценка на покритието на пневмококовите поливалентни ваксини. Пречистени капсулни полизахариди от най-често изолираните серотипове се използват в поливалентни ваксини.

Капсулните полизахариди са високо молекулни структури, съставени от различен брой монозахариди, които се срещат в различни комбинации. Първичната структура на полизахаридите, зависи от природата и броя на съставните монозахариди, последователността, размера на монозахаридите, вида и конфигурацията на гликозидните връзки.

Проучванията от миналото водят до заключението, че пневмококовите щамове се различават при аглутинация, и че антисерумите притежават различна способност за защита срещу пневмококова инфекция. Аглутинационните пневмококови тестове имат дълга история.

**Аглутинация от култура.** През 1918 г. Avery посява хрчка в хранителна среда, съдържаща 1% глюкоза, след 5 часа инкубация, културата се използва като аглутиниращ антиген с три вида антисеруми.

**Уринният преципитационен тест** води началото си от 1917г. след констатацията на Dochez и Avery, че пневмококите ин виво и ин витро произвеждат

специфично разтворимо вещество, което лесно се открива с подходящ имунен серум.

През 1929г. от Sabin е въведен **Микроскопски тест за аглутинация**. Той инжектира хранка в перитонеалната кухина на мишка. Няколко часа по-късно, малко количество перитонеален ексудат се изтегля и смесва с диагностични антисеруми на различни типове в отделни капки, които са оцветявани и изследвани микроскопски.

**Тестът на Neufeld** е описан от Neufeld и Etinger - Tulczynska през 1933г. Доскоро това е най-бързият, най - конкретен и най - лесен от всички методи. За щамовете се проверява чувствителност към optochin (ethylhydrocuprein hydrochlide) и жлъчка (natrium deoxycholate). За да бъдат потвърдени като пневмококи може да се използва и Omni серум, който е сборен, поливалентен, пречистен пневмококов серум, който дава капсулна реакция с тест на Quellung. Този антисерум е представен за първи път през 1966г. от Erna Lund. Днес е все още на разположение и реагира с всички известни серотипове на пневмококи. Тестът Quellung е реакция между типовоспецифичен антисерум и капсулен полизахарид, при което капсулата става видима. Въпреки това, не всички типовоспецифични антитела на Omni серум, присъстват в достатъчно висока концентрация, за да позволят на капсулата да стане видима, но дават аглутинация, която трябва понякога да се приема като единствен критерий за положителна реакция.

Първото описание на тест на базата на **латекс аглутинация** е предложен от Singer и Plotz през 1956 година (ревматоиден фактор тест). Оттогава са разработени различни тестове за откриване на микробни и вирусни инфекции.

През 2004г. е достъпен и комерсиален латекс аглутинационен кит за *S.pneumoniae*, SSI Diagnostica въвежда Kit Pneumotest Latex.

Съществуват две различни системи за номенклатура на пневмококовите серотипове: датска и американска система, от които по-разпространена е първата. Датската система се основава на кръстосани реакции между различните типове в серогрупа. В американската система, серотиповете са номерирани последователно (свързани с реда на откриването им) и не отбелязват антигенна кръстосана реактивност между различните типове.

## 2.1. Генетичен локус на пневмококовата капсула

Пневмококовата капсула се кодира от генетичен локус (CPS), който има касетъчна организация и изглежда като отделно организирана транскрипционна единица. Типоспецифичните биосинтетични гени са оградени от гени *dexB* и *aliA*, които са високо хомоложни сред различни капсулни серотипове и не играят роля в синтеза на капсулата (17).

Като цяло пневмококовите КПЗХ се синтезират по *Wzx / Wzy* зависимия-път на гени, които се намират винаги в 5' края на CPS локуса (*cpsA*, *cpsB*, *cpsC*, *cpsD*). (17).

Седем от 18 монозахаридни компоненти на капсулните полизахариди се получават от "housekeeping" метаболитни пътища, а останалите 11 са кодирани от гени в CPS локуса, който се състои от типовоспецифични гени, участващи в биосинтезата на специфичните полизахариди (17). CPS локусът кодира също полизахаридни полимерази, флипази и трансферази, които ензими са специфични за синтез и полимеризация на капсулните полизахариди и се откриват в централната част на CPS локус.

Един набор от типовоспецифични гени присъства във всеки щам на *S. pneumoniae* и се характеризира с ниска хомоложност между типовоспецифичните гени от различни капсулни серотипове. Само няколко гени (*cpsA*, *cpsB*, *cpsC*, *cpsD* и в повечето случаи *cpsE*) разположени в 5' края на CPS локус са запазени между клъстерите, както и гени, които участват в обработването, регулирането и преноса на КПЗХ към бактериалната клетъчна стена (17).

Способността на *S. pneumoniae* да регулира производството на КПЗХ на транскрипционен, транслационен или пост-транслационен ниво е важно за оцеляването му в гостоприемника (137).

Промените в структурата на полизахаридите и степента на капсулиране могат да се отразят на инвазивните и колонизиращи способности на даден щам, могат да му помогнат да избегне механизмите на имунна защита и дори да обяснят защо някои серотипове причиняват определени болестни състояния, по-често в сравнение с други (96,191).

## 2.2. Други важни фактори на вирулентност

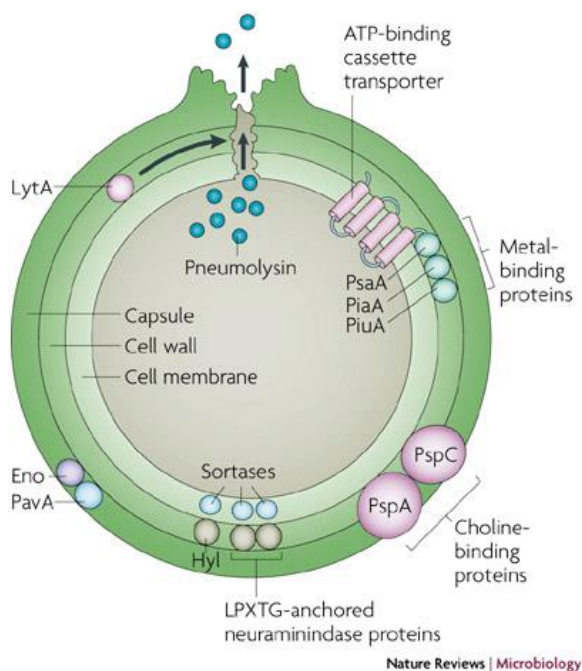
Наличието, липсата или алелните вариации в други вирулентни фактори като СбрА, пневмолизин, PspA, както и биохимичната структура на клетъчната стена могат също да повлияят върху потенциала за инвазивно заболяване.

На фиг.2 са показани важни пневмококови фактори на вирулентност .

Други важни фактори на вирулентността, компоненти на клетъчната стена, са: **Тейхоевата киселина** („С полизахарид”), която специфично взаимодейства със серумния С-реактивния протеин, което води до активиране на системата на комплемента и освобождаване на медиатори на острата фаза на възпалението. Натрупването им в белодробната тъкан стимулира миграцията на полиморфонуклеарните фагоцити. Това е полезен диагностичен тест за възпалителна реакция/заболяване.

### Фиг.2 Схематично представяне на важните пневмококови вирулентни фактори

Източник: Nature reviews / Microbiology



**Повърхностни белтъци** с адхезивни свойства (Psp). Най-важни сред тях са: *пневмококов повърхностен протеин А* (PspA), *пневмококов повърхностен протеин С* (PspC), *холин-свързващ белтък* (CbpA). Основната им роля е свързана с обезпечаване на ефективна колонизация на лигавиците, защита на пневмококите от фиксация на комплемента и като следствие понижена опсонизация. Тези факти са многообещаващи от гледна точка за създаването на нови варианти на пневмококови ваксини за човека използващи Psp (148).

**Пилите** са извънклетъчни органели, кодирани от *rlgA* остров на патогенност (125), (площ от генома, в който се извършват бързо мутации), наличен само в някои щамове *S. pneumoniae*. Те допринасят за прикрепяне към епителните клетки на ГДП, за вирулентността, както и за усилване на възпалителния отговор на гостоприемника (5,15).

**Неураминидаза.** Неураминидазата участва в „оголване“ на клетъчните рецептори за пневмококовите адхезини и способства за по - тесен контакт на бактерията с органи - мишени“. Доказано е съществуването на две пневмококови неураминидази: едната кодира локус *nanA*, втората - локус *nanB*.

**Хиалуронидаза (Ну1)** *хиалуронат лиаза*. Практически всички пневмококи имат видоспецифична хиалуронидаза, която “разцепва” хиалуроновата киселина и обезпечава ефективно проникване на пневмококите в тъканите.

**Бактериални автолизини.** *Lyt А, В и С* участват в синтез на клетъчната стена, отделяне на дъщерната клетка след делене, естествена генетична трансформация, а също и специфично разкъсване на ковалентните връзки в клетъчните стени, крайният резултат, на които е лизис и смърт на клетката (19). Пневмококът съдържа два мощни автолитични фермента – *N*-ацетилмурамил-*L*-аланинамидаза и ендо- $\beta$ -1,4-*N*-ацетилглюкозаминодаза. Детекцията на тези вдлъбнати,  $\alpha$ -хемолитични колонии и това, че те се лизират в присъствие на жлъчни соли представлява важен идентификационен тест (111).

**Пневмолизинът** е белтък, токсичен за всички клетки, имащи в състава на мембраната си холестерин. Той е токсичен към фагоцитите и клетките на респираторния епител, а също се явява и причина за развитието на възпалителни реакции чрез активиране на комплемента и индуциране на продукция на тумор некротизиращ фактор (TNF) и интерлевкин-1 (IL-1). Пневмолизинът има



способност да активира и фосфолипаза А в ендотелните клетки на белодробните артерии, което способства в значителна степен формирането на трансмембранни пори (71,104).

### **3. Имунопрофилактика на пневмококовите инфекции**

Усилията за превенция и контрол на пневмококовите заболявания са фокусирани върху развитието на ефективни антикапсуларни ваксини. Има два вида пневмококови ваксини – Пневмококова полизахаридна ваксина (PPSV) и Пневмококова конюгирана ваксина (PCV).

Първата пневмококова полизахаридна ваксина (PPSV) е одобрена в САЩ през 1977 г., и съдържа пречистен протеин от 14 типа пневмококови бактерии. През 1983 г. е одобрена PPSV ваксина (известна като PPSV23) с пречистен протеин от 23 типа пневмококови бактерии, които са причина в 88% от случаите на инвазивна пневмококова болест при възрастни (29,30). Ваксината се препоръчва да се прилага рутинно за всички възрастни над 65 години. PPSV23 се е препоръчвала и за деца над 2 г. възраст с хронични заболявания (29).

Първата PCV е одобрена в САЩ през 2000 г. за приложение при новородени и малки деца на възраст от шест седмици до 5 години, за предотвратяване на пневмококови заболявания. Тази ваксина е по-известна като PCV7. На Табл. 2 са представени серотиповете, участващи в трите лицензирани за употреба PCV.

И двете ваксини PPSV23 и PCV7 са изработени от инактивирани бактерии. PPSV23 съдържа дълги вериги на полизахаридни молекули от капсулата на бактериите. PCV7 съдържа пречистен капсулен полизахарид от седем капсулни серотипа, които са причинители на над 80% от инвазивните заболявания за периода 1978-1994г. при деца на възраст под 6 години. Тези капсулни полизахариди са конюгирани с инактивиран дифтериен токсин, за да се предизвика преминаване от тимус - независим в тимус - зависим отговор и индуциране на отговор на Т-клетките.

Полизахаридите са Т-независими антигени, които стимулират В-лимфоцитите, но не и Т-лимфоцитите. Най-малките деца отговарят с лош имунен отговор към Т-независимите антигени, така че тези ваксини са неефективни за тази възрастова група. В контраст на това, конюгирането на полизахаридите към белтъци стимулира отговор от Т-хелперните клетки, който води до силен първичен отговор при пеленачетата и ефективен отговор при реимунизация. Имунизирването със 7-валентна PCV се препоръчва за пеленачета под 2 год. възраст., докато 23-валентната ваксина се препоръчва за възрастни с повишен риск от пневмококово заболяване. 23-валентната ваксина е имуногенна при възрастни без съпътстващи заболявания, а имунитетът е дълъг и продължителен. Ваксината е по-малко ефективна при пациенти с по-висок риск от пневмококово заболяване: пациенти с аспления, сърповидноклетъчна анемия, хематологична злокачественост, HIV инфекция, пациенти с бъбречна трансплантация.

През 2009 г. PCV10, обхващаща седем серотипа от PCV7 плюс три допълнителни серотипа 1, 5 и 7F е разрешена за употреба при кърмачета и деца на възраст до 2 години за профилактика на ИПЗ (188).

Въпреки, че случаите на пневмококова болест намаляват след въвеждането на PCV10, други серотипове преобладават, особено серотипове 3 и 19A (43,4748,75,159). PCV13 включва три допълнителни серотипа: 3, 6A и 19A. Лицензирана е в САЩ през февруари 2010 г. и се препоръчва за деца.

През януари 2013 г. FDA (US Food and Drug Administration) одобри пневмококова ваксина PCV13, за профилактика на инвазивни пневмококови заболявания при деца и юноши на възраст между 6 и 17 години. През февруари 2013г., Консултативния комитет на CDC по имунизационни практики (ACIP) гласува за използването на ваксината при деца с имунодефицитни състояния. Панелът препоръчва рутинна употреба на единична доза от PCV13 за деца на възраст от 6 до 18 години, които се намират в имунокомпроментирано състояние (напр. сърповидно-клетъчна анемия, HIV инфекция) и преди това не са били ваксинирани.

**Табл. 2. Серотипове участващи в състава на конюгираните пневмококови ваксини (PCV)**

7-валентна PCV

4	6B	9V	14	18C	19F	23F
---	----	----	----	-----	-----	-----

10-валентна PCV

1	4	5	6B	7F	9V	14	18C	19F	23F
---	---	---	----	----	----	----	-----	-----	-----

13-валентна PCV

1	3	4	5	6A	6B	7F	9V	14	18C	19A	19F	23F
---	---	---	---	----	----	----	----	----	-----	-----	-----	-----

Поради непрекъснато нарастване на антибиотичната резистентност и появата на нови серотипове причинители на ИПЗ, търсенето на по-добра ваксина е в ход. Производството на пневмококов повърхностен протеин PspA е добър кандидат за ваксина, която може да се прилага през носа, вместо инжекционно. Изследванията върху бактерията *Lactococcus lactis* за използване и във ваксина също са обещаващи. Проучванията показват, че лактококовата ваксина предлага по-добра защита срещу пневмококови респираторни инфекции от инжектиране с подобни количества рекомбинантен PspA (78).

#### **4. Промени в пневмококовата популация настъпили като резултат от масовата имунизация с пневмококови конюгирани ваксини (PCV).**

Въвеждането на пневмококовите ваксини при децата е причина за бързото и значително намаляване на разпространението на ваксинални серотипове при ИПЗ и носителство. В почти всички европейски страни се отчита спад на заболяемостта колебаеща си от 20 до 50% (90,146,159,161,162,183). Много добро серотипово покритие на ваксините се цитира в проучвания от Германия, Норвегия, Швейцария, Канада. (35,44,90,162). Успоредно с това се повишава процентът на разпространение на неваксиналните серотипове (5,164,171,174,193). Това може да се дължи на феномена на "серотипово заместване", разширяване на

съществуващите неваксинални пневмококи, и/или "превключване на серотип и "промяна на серотип" на един клон чрез промяна или замяна в неговия CPS локус (43,53,93,136).

**Серотиповото превключване** е описано за първи път от Griffith през 1928г. и е във фокуса на изследванията на Avery и колеги през 1944г. върху трансформацията. Серотиповото превключване и трансформацията не са напълно независими процеси.

Вариантите на капсулно превключване може впоследствие да се разширяват в рамките на пневмококовата популация. Такива варианти обикновено възникват след рекомбинация в CPS локуса, и проучванията показват, че рекомбинационният фрагмент е с размери от ~21.9kb до ~56.5kb (136). В някои случаи, фрагментите включват част или всички *rbr2x* и *rbr1a* гени (два от трите основни гени за пеницилинова резистентност, разположени приблизително 8kb нагоре и около 7kb надолу от CPS локуса). Ваксинално - индуцираният селективен натиск допринася за следваксинални промени в епидемиологията на серотиповете, но естествените процеси в серотиповото разпространение също играят роля.

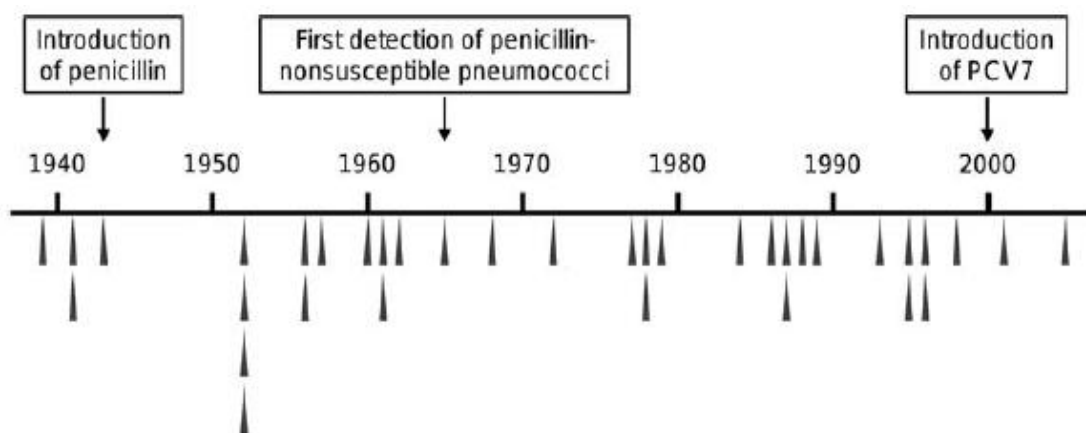
**Серотиповата замяна**, се дължи главно на разширяване на съществуващите щамове от не-ваксинални серотипове, въпреки че "бягство" от ваксината е възможно и чрез капсулно превключване (138) в която щам от ваксинален серотип придобива CPS локус на неваксинален серотип чрез рекомбинация (26). Капсулното превключване е клинично важен за *S. pneumoniae* феномен, който може да намали ефективността на сегашните конюгирани ваксини.

**Капсулните превключвания** са най-вероятно в резултат на нуклеотидна замяна и/или делеция на нуклеотид (26,96,191). Голяма част се дължат на рекомбинационни процеси.

Касетъчното подреждане на *cps* гени между гени, които са силно консервативни във всички щамове, позволява на *S. pneumoniae* да промени серотипа си чрез **рекомбинационна замяна**. Рекомбинация между пневмококите се е срещала в продължение на десетилетия (191).

На следващата фигура са представени варианти на капсулно превключване чрез рекомбинация сред историческа колекция от пневмококови щамове от 1937–2007г.

**Фиг. 3. Времево разпределение на рекомбинантни варианти на капсулно превключване сред историческа колекция от щамове *S.pneumoniae*: 1937–2007г.**



Източник: Kelly L. Wyres et al., Pneumococcal Capsular Switching: A Historical Perspective (191).

**Забележка:** Сивите триъгълници показват датите на изолиране на най-старите рекомбинантни представители на 36 независими събития на капсулно превключване, идентифицирани сред историческата пневмококова колекция.

PCV7 - 7-валентна пневмококова конюгирана ваксина.

Скоро след масовата имунизация започнала в Съединените щати се съобщава за ин виво  $rbp2x \pm CPS \pm rbp1a$  рекомбинационно събитие. Такива рекомбинанти не са докладвани преди в природата. Индуцирани от ваксината и/или от селективният антибиотичен натиск, тези събития играят роля в стимулирането на подобни генетични промени (191). Изборът на рекомбинанти се влияе от разпространението и поддържането на благоприятни гени (и/или алели), които да са с най-висока способност за оцеляване в популацията.

Потенциалните отрицателни ефекти след ваксините не бива да бъдат подценявани, пример за това е  $CC6954 \rightarrow 19A$  капсулно превключване, документирано в Съединените щати, където са първите описани такива

превключвания от пациенти с педиатрична инвазивна пневмококова болест само 3 години след въвеждането на PCV7. Две години по-късно, серотип 19A е третият най-чест серотип, причиняващ ИПЗ сред всички възрастови групи. (5,6,51,171,174,193). Тези щамове са нечувствителни към Penicillin, поради едновременното придобиване на променени *rbr2x* и *rbr1a* гени. Следователно, увеличаването на разпространението на тези щамове, вероятно е допринесло за увеличаване на пневмококовата пеницилинова нечувствителност в Съединените щати след въвеждането на PCV7 (64,124).

Основният мултирезистентен клон Spain - 23F-1 е претърпял капсулно превключване най-малко четири пъти, и е трансформиран в серотип 19F (39). Серотип 19A - вариантите на същият мултирезистентен серотип 23F също се появяват чрез няколко рекомбинационни замены в CPS локуса (39).

Изследванията на антибиотично-резистентни изолати показват, че серотиповото превключване между различни капсулни серотипове се среща и при естествени условия в рамките на пневмококовите популации (26).

Някои представители на клонални комплекси изглеждат “по – добри” донори на CPS локус. В рамките на някои CC (например CC1917F и CC21812F) се открива високо ниво на консервативност на CPS последователностите. Може би там има синергизъм между серотипът и генетичният фон на щама, който предава предимство на определени генетични комбинации пред други. Възможно е също гени, като тези, които кодират биосинтезата на ензими извън *cps* локус, да допринасят за капсулна експресия и улесняване на асоциирането генотип/серотип. (26). Много е вероятно разпространението на новопридобитите неваксинални варианти на капсулно превключване да продължи и след PCV13 - програмите за ваксинация. Penicillin - нечувствителните и множествено-резистентните варианти ще се ползват с голямо селективно и генетично предимство при разпространението на нови неваксинални варианти.

В Северна Америка през 2010г. е въведена 13-валентната пневмококова ваксина (PCV13). В Канада през 2012г. се наблюдават промени в нивата на заболяемост и разпределението на инвазивните пневмококови серотипове. Серотипове 19A, 7F, 3, and 22F са най-често преобладаващите през 2012г., като 19A

и 7F намаляват с около 10%, а 22F и 3 се повишават с около 5% при пациентите над 5-годишна възраст за 3-годишният период (44).

В проучване от САЩ след въвеждането на PCV13 е докладвано преобладаване в разпространението на серотипове, които са включени в или свързани с PCV13 (3, 6C, 7F), като данните са подобни на тези от периода 2008-2009 г. Единственият серотип, който се е увеличил от 2008г. до 2011г. е неваксинален серотип 35B (67).

През март 2010 г., Бразилия въвежда PCV10. Докладваната ефективност на PCV10 е 83,8% срещу ваксиналните серотипове, и 77.9% срещу серотипове свързани с ваксината. Резултатите показват два най-чести ваксинални серотипа -14 и 6B и серотип 19A , роден на ваксинален серотип 19F (127).

В северните европейски страни Норвегия, Германия, Холандия, Финландия, след въвеждането на PCV се отбелязва намаляване на честотата на ваксиналните серотипове на ИПЗ при всички възрастови групи (146,159,162). PCV7 е въведена в имунизационната програма на Норвегия през 2006 г. След смяната на PCV7 с PCV13 през 2011 г., въпреки защитата от шестте допълнителни серотипа се отварят нови ниши за назофарингеална колонизация, благоприятстващи условията за серотипова замяна. Отбелязва се увеличена честота на серотипове 23B и 15A (158). В Холандия след въвеждането на PCV7 честотата на неваксинални серотипове 1 и 22F изолати е увеличена значително и се наблюдавани промени в генетичния фон на щамовете, принадлежащи към тези серотипове. Както преди, така и след въвеждането на ваксината са регистрирани няколко капсулни превключвания. Открити са щамове от периода преди ваксинацията, в която серотип 19F капсулен локус е бил хоризонтално прехвърлен към различен генетичен фон.

В Англия през 2010г. PCV13 замества PCV7. Най-често отбелязваните серотипове при инвазивни пневмококови щамове от деца са 7F, 19A, 3, 8 и 33F (36). Във Франция най-честите серотипове са 19A, 14, 7F и 6A (40). В проучване от Португалия сред повече от 60% от изследваните пневмококови щамове, преобладаващите серотипове в намаляващ ред са 19A, 6C, 22F, 23A, 35F, 11A и 23B. (5)

В съседните на нас страни най-често отбелязваните неваксинални серотипове на инвазивни пневмококови щамове са следните: В Гърция се отчита по-висок брой неваксинални серотипове извън участващите в PCV7: 6A, 11A, 15B, 23A, 15C, 19A, 6C и 7F (74). В Румъния серотипове 19A и 6A са често срещани сред неваксиналните PCV7- изолати (131).

В проучване от Турция сред назофарингеално носителство при деца по-голяма част от щамовете са от серотипове 19F (15.2 %), 6A (15.2 %), 23F (10.3 %) и 6B (9.3 %) и нито един доказан щам от широко разпространения в други страни серотип 19A (33).

## **5. Антимикробна чувствителност при *S. pneumoniae* и методи за определянето ѝ (in vitro и in vivo активност на антибиотиците).**

*S.pneumoniae* се характеризира с природна чувствителност към антибактериални препарати от много групи: бета-лактами, макролиди и линкозамиди, тетрациклини, Chloramphenicol, Trimethoprim/sulfamethoxazole, гликопептиди, Rifampin. Нивото на природната чувствителност към отделните хинолони варира. Пневмококите са практически нечувствителни към нефлуорирани хинолони. Флуорхинолони като Ciprofloxacin и Ofloxacin се характеризират с невисока активност. Много по-активни флуорхинолони към *S.pneumoniae* са Moxifloxacin, Gemifloxacin, Gatifloxacin, Sparfloxacin.

Прилагането на Chloramphenicol, гликопептид и Rifampin при леки стрептококови инфекции, не е препоръчително, тъй като има относително висок риск от странични ефекти. Тетрациклините също не са широко използвани. Назначаването им на деца, страдащи от стрептококови инфекции, е противопоказано.

Водещата позиция за лечение на инфекции причинени от *S.pneumoniae* е на бета - лактамните антибиотици: Penicillin G, Amoxicillin и цефалоспорини. Основна алтернатива на бета - лактамните антибиотици при лечението на пневмококови инфекции са макролиди и линкозамиди, някои флуорохинолони, известна стойност имат и тетрациклините.



Ролята на макролидите в лечението на стрептококовите инфекции се определя от тяхната добра поносимост, ниска честота на нежелани реакции и отсъствие на кръстосани алергии с бета-лактами. В допълнение, поради наличието на висока активност срещу "атипични" патогени, (при които не се прилагат бета-лактамни антибиотици) макролидите се явяват важни компоненти на комбинирана емпирична терапия на респираторните инфекции.

### **Методи за определяне на антибиотичната чувствителност.**

Няколко основни метода се използват за определяне на антибиотичната чувствителност на пневмококовите щамове.

**Метод на Kirby - Bauer** за изпитване на антибиотична чувствителност (или дисково дифузионен метод) е тест, който използва антибиотично импрегнирани дискове. Съединението дифундира от филтърна хартия в агара. Ако бактериите са чувствителни към конкретният антибиотик, около диска се образува площ без бактериален растеж наречена зона на инхибиране. Зоната на инхибиране и антибиотичната дифузия се използват за оценка на чувствителността на бактерия към този конкретен антибиотик. Като цяло, по-големи зони корелират с по-малка минимална инхибираща концентрация (МИК) на антибиотика за бактерия. Според измерените зони във всяка категория се разграничават чувствителни, междинни и резистентни към съответният антибиотик щамове. За чувствителни щамове, както е по дефиниция, се приемат тези, за които лечението на инфекцията, причинена от тях с антибиотици в обичайните терапевтични дози ще бъде ефективно. За щамове с интермедиерна чувствителност се приемат, тези, за които лечението е ефективно с високи дози антибиотик, при което се достигат високи концентрации поради неговите фармакокинетични характеристики. За резистентни щамове се приемат тези, за които лечението на инфекции, причинени от този микроорганизъм ще бъде неефективно дори при използване на високи дози антибиотик.

Точността и възпроизводимостта на метода са зависими от поддържането на стандартни процедури. Дисково-дифузионните тестове за *S.pneumoniae* се провеждат на Mueller-Hinton агар, с 5% овнешка кръв. Интерпретацията на

резултатите е според препоръките на CLSI (бивш NCCLS) ([www.clsi.org](http://www.clsi.org)), или EUCAST ([www.eucast.org](http://www.eucast.org)).

### **Определяне на МИК чрез разреждане в агар.**

Използваната среда за определяне на МИК чрез разреждане в агар на пневмококови щамове е Мюлер - Хинтън агар, с 5% овнешка кръв. Бактериалните суспензии се получават във физиологичен разтвор от 0.5 стандарт по McFarland. Плаките се инкубират в 5% CO<sub>2</sub> при 35°C в продължение на 24 часа.

**Определяне на МИК чрез микроразреждане в бульон.** Методът на микроразреждане се провежда съгласно стандартите на (CLSI) с катионно коригиран Мюлер - Хинтън бульон, с 5% добавена лизирана конска кръв. Плаките за микроразреждане се инкубират при 35°C в продължение на 24 часа.

**Определяне на МИК чрез градиентен тест (E test).** Използват се тест ленти (AB Biodisk, Швеция) импрегнирани със съответния антибиотик. Бактериални суспензии от 0.5 стандарт по McFarland във физиологичен разтвор се инокулират върху Mueller - Hinton среда с 5% овнешка кръв. Инкубират се при 35°C в 5% CO<sub>2</sub> в продължение на 24 часа. МИК се отчита в точката на пресичане между ръба на елипсата и тест лентата.

За всички методи, CLSI - препоръчваният щам за качествен контрол е *S. pneumoniae* (ATCC 49619). Резултатите се приемат, само ако резултатите от контрола на качеството са в рамките на CLSI - определените граници.

## **6. Резистентност към антимикробни лекарствени средства при *S. pneumoniae* (глобално разпространение, причини за нарастване на резистентността, молекулярно-генетични механизми на резистентност, фенотипен и генотипен анализ).**

### **6.1. Глобално разпространение**

Появата на заболявания, причинени от Penicillin-резистентни и множествено - резистентни пневмококи за последните двадесет години се превърна в световен проблем. Клиничните изолати *S. pneumoniae* днес са често полирезистентни - устойчиви на Penicillin, Erythromycin, Chloramphenicol, Tetracycline,

Trimethoprim/sulfamethoxazole. По-рядко се среща резистентност към флуорхинолони. Аминогликозидите са неефективни за тях. Всички тези данни правят лечението на пневмококовите инфекции изключително трудно за управление.

Първото описание на пневмококи с намалена чувствителност към Penicillin е в Австралия (120) в края на 1960г. През следващото десетилетие с все по-голямо разпространение се откриват Penicillin – нечувствителни щамове в различни части на света. Устойчивост към не- $\beta$ -лактамни антибиотици, като Chloramphenicol, Tetracycline, Erythromycin, Clindamycin, Rifampin и Trimethoprim/sulfamethoxazole също е докладвана (13, 23, 64) и често е свързвана с намалена чувствителност към Penicillin (44). Penicillin - резистентни пневмококи са били докладвани с особено високи честоти в Испания, Южна Африка и Унгария от средата на 1970 г. (120), във Франция, Исландия, и членки на Обединеното кралство (36) от средата до края на 1980г. и началото на 1990-те години, и в Далечния изток през 1990-те години (120).

Въпреки че първите Penicillin-нечувствителни пневмококи са идентифицирани при възрастен пациент, първите множествено-резистентни щамове са доказани при деца (121). За Penicillin- нечувствителните щамове е доказано, че са по-чести при деца, където и пеницилиновата резистентност е по-добре проучена. Известно е, че Penicillin-резистентните ( $MIC \geq 2mg/ml$ ) и множествено-резистентните пневмококи в световен мащаб се свеждат до няколко серогрупи, а именно: 23, 6, 19 и 9, и серотип 14, които са свързани по-специално с носителство и заболявания при деца (13, 29, 67).

Глобалното нарастване на силно устойчиви на Penicillin и множествено-резистентни пневмококи се появява в голямата си част в резултат от разпространението на отделни силно резистентни пневмококови клонове. Това явление е особено подчертано от световното разпространение на серотип 23F пневмококовия клон (Spain23F-1), идентифициран за първи път в Испания в началото на 1980 г., (120), който е резистентен към Penicillin, Chloramphenicol и Tetracycline (а понякога и към Erythromycin). Този успешен клон се установява в Съединените щати, Южна Африка, Обединеното кралство, Южна Америка, няколко други страни в Европа и Далечния изток. Варианти на този клон от

серотипове 19F, 14, 19A, 9N и 3 и 6 също са били докладвани в различни региони на света (120). От тези серотипови варианти на Spain 23F - 1 клон, 19F капсулният серотип е най-често срещан. От мониторингово проучване, проведено в САЩ през 2000г. става ясно, че близо 40% от всички високо резистентни към Penicillin пневмококи са принадлежали към този Spain23F -1 клон. (120)

Penicillin-резистентен клон от серотип 9V (Spain9V-3) е идентифициран за първи път в Испания и Франция и става широко разпространен в целия свят. Бил е идентифициран в Италия, Швеция, Германия, САЩ, Обединеното кралство, Южна Америка и Далечния изток. Серотип 14 и 9 и серогрупа 19 варианти на този клон са докладвани в много страни. Вариант от серотип 14 на Spain9V-3 клон е най-често срещаният (120).

Глобалното нарастване на силно устойчиви на Penicillin и множествено-резистентни пневмококи изисква определянето на епидемиологичното разпространение на тези щамове. Пневмококовата молекулярна епидемиологична мрежа PMEN е създадена през 1997 г. под егидата на Международния съюз на микробиологичните дружества и има за цел характеризирани, стандартизиране, именуване и класифициране на тези антибиотично резистентни пневмококови клонове. Към момента в базата данни са регистрирани 43 международни резистентни пневмококови клона с широко географско разпространение. <http://www.sph.emory.edu/PMEN/>.

## **6.2. Причини за нарастване на резистентността при *S.pneumoniae***

### **Антибиотична политика**

Една от причините за нарастване на резистентността е нерационална антибиотична политика. Многобройни проучвания потвърждават, че увеличената консумация на антибиотици е свързана с появата на АБР в световен мащаб. Като цяло, проучванията върху разпространението на множествената АБ резистентност показват най-ниски нива в Скандинавия и най-високи в страните от Средиземноморието. Тази резистентност вероятно е по-висока в южните европейски държави поради различията в системите на здравеопазване. В южните, средиземноморски и източни страни има по-висока обща употреба на антибиотици

в сравнение със северните европейски страни. България заема средни позиции по отношение на антибиотичната консумация сред страните от европейския съюз, като най-често употребявани са  $\beta$ -лактамните антибиотици, следвани от макролидите (189,190).

### **Естествена трансформация и генетичен обмен.**

Нарастването на антибиотичната резистентност при *S. pneumoniae* се дължи основно на процесите на естествена трансформация и генетичен обмен. Резистентност към антибиотиците може да се развие и чрез мутации и естествен селекционен натиск. *S. pneumoniae* има относително бърз растеж и достига бързо клетъчна плътност в условия на инфекция, което често подпомага трансформацията, благоприятстваща антибиотичната резистентност.

Естествената бактериална трансформация при *S. pneumoniae* включва пренос на ДНК от един щам към друг чрез околната среда. Трансформацията е сложен енергийно зависим процес, зависим от експресията на няколко гена (при *S. pneumoniae* поне 23 гена са необходими). За да може бактерията да свърже и рекомбинира екзогенна ДНК в нейната хромозома трябва да е в специално физиологично състояние, наречено компетентност.

Компетентността при *S. pneumoniae* се индуцира от ДНК увреждащи агенти като митомицин С (ДНК междувериген омрежващ агент) и флуорохинолонови антибиотици Norfloxacin, Levofloxacin и Moxifloxacin (инхибитори на топоизомераза, които причиняват прекъсвания на двойната верига).

Детерминантите на резистентност са локализиращи на мобилни генетични елементи и се разпространяват бързо чрез хоризонтален трансфер между членове на популацията. Разпространението на мобилни елементи може да се осъществи не само вътревидово, но и междувидово, осигурявайки по този начин неограничено разпространение на различни генетични фактори сред пневмококите и въобще сред прокариотите. Придобитата резистентност е често множествена, като тенденцията води до появата на множествено - резистентни щамове.

## Глобално разпространение на силно резистентни пневмококови клонове

Съществена причина за глобалното нарастване на Penicillin - устойчиви и множествено - резистентни пневмококи се появява като резултат от разпространението на отделни силно резистентни пневмококови клонове. Такива множествено - 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 се срещат и в нашата страна. В Европа най-често циркулиращите PMEN – клонове допринасящи за високата резистентност в пневмококовата популация са Spain9V-3, Spain6B-2 , Denmark14-32, Sweden15A – 25, Taiwan19F -14, Spain23F-1, Poland6B - 20 (22,36,40,46,51,58).

### 6.3. Особености на генетичната структура на *S.pneumoniae*. Пластичност на пневмококовият геном.

Геномът на *S. pneumoniae* е затворена, циркулярна ДНК структура, която съдържа между 2.0 и 2.1 милиона базови двойки (40% G/C съдържание), в зависимост от щама. Има основен набор от 1553 гена, плюс 154 гена, които допринасят за вирулентността и 176 гени, които поддържат неинвазивен фенотип. Генетичната информация може да варира до 10% между щамовете (87).

Към днешна дата геномите на няколко пневмококови щама са картирани, включително капсулираният, вирулентен щам D39 и некапсулираният, авирулентен щам R6. Сравненията на различните щамове показват нови мутации и още информация за метаболизма и вирулентността на бактериите (105).

При пневмококите са открити 40 отворени рамки за четене (ORF, open reading frames), които са подобни на гени в Грам-отрицателни бактерии. Такива геномни последователности не са намерени в други Грам-положителни бактерии. Това не е изненадващо, тъй като *S. pneumoniae* заема същата ниша в дихателната система на човека, както някои Грам-отрицателни видове (87,105).

**Повторени елементи (Repetitive elements).** ДНК последователности от три класа повтарящи се елементи, BOX, RUP, и IS се откриват при *S. pneumoniae* и са > 3% от неговия геном. Тези повтарящи се елементи съставляват такава част от пневмококовия геном, колкото на никой друг бактериален геном секвениран към днешна дата. Функциите за някои от тези последователности са противоречиви, но според повечето автори те осигуряват региони на хомоложност за рекомбинация с други родствени микроорганизми при придобиването на нови гени (87,105).

**BOX** елементите образуват стабилни структури, които могат да служат като свързващо място за протеин, отговорен за модулиране на експресията на гени (105).

**RUP** са 107-bp елементи, които образуват стабилни вторични структури, с предполагаема функция на активни инсерционни елементи, индуцирани от транспозазата на наскоро открития IS 630-Spn1 (105).

За почти всички BOX и RUP елементи спрямо транскрипционната им ориентация около гените, може да се предложи, че имат регулаторна роля. Предполага се, че участват в транскрипционната терминация. Тези елементи могат да усилят генната експресия или да послужат като места за свързване на регулаторни протеини.

В ДНК на различни щамове *S. pneumoniae* са представени многобройни **IS елементи**. Геномът на R6 съдържа най-малко 60 пълни или частични копия на 10 различни IS елементи, представляващи ISL3 семейства, IS5, IS630, IS3, IS30, и IS605. Повечето от копията на IS елементи са частични, само седем притежават очакваните пълни последователности на предполагаемите за транспозазата гени. Много от тях имат съществени аминокиселинни замествания, което предполага, че може би са неактивни, но не е отхвърлена напълно ролята им в развитието на генома. Те могат да предоставят региони на хомоложност, които са места за рекомбинация при придобиването на гени от родствени микроорганизми, носещи същите IS последователности, но с различни съпътстващи гени (87,105).

## 7. Молекулярно-генетични механизми на резистентност, фенотипен и генотипен анализ.

### 7.1. Резистентност към Penicillin и други $\beta$ - лактамни антибиотици

$\beta$  - лактамите са бактерицидни антибиотици, които инхибират синтеза на пептидогликановия слой от бактериални клетъчни стени чрез инактивиране на Penicillin - свързващи протеини (PBP), група мембранно-свързани цитоплазмени протеини, включени в сглобяването на пептидогликановия слой и чието инхибиране води до спиране на растежа и лизис. Устойчивост към  $\beta$  - лактамни антибиотици в клинични изолати *S. pneumoniae* се получава чрез придобиване на мозаечни гени, кодиращи променени PBP. Мозаечните гени кодират PBP варианти с по-нисък антибиотичен афинитет на свързване и са резултат от събития на вътре- и междувидово генно пренасяне между родствени стрептококови видове (64). *S.pneumoniae* съдържа шест PBP, като варианти на *pbp2x*, *pbp2b* и *pbp1a* се считат за най-значими гени за придобиване на устойчивост към Penicillin. Освен това, придобиването на ниско афинитетни *pbp2x* и *pbp2b* варианти е предпоставка за придобиване и на *pbp1a* варианти кодиращи високо ниво на устойчивост към  $\beta$  - лактамни антибиотици. Отговорни за високо ниво на резистентност към широкоспектърни цефалоспорини са промени в PBP с участието на *pbp1a* и *pbp2x* гени. PBP2x има висок афинитет към Penicillin и разнообразие от аминокиселинни замествания, които имат отношение към слабото антибиотично свързване и устойчивост (64).

Мутациите в PBP не са единствените носители на резистентност към бета-лактамни антибиотици при *S.pneumoniae*. Клетъчната стена на Penicillin - нечувствителни изолати често е високо обогатена с разклонени вериги на муропептид, явление, свързано с мозаечните алели на гена *murM*. Освен това, за тази резистентност допринасят редица мутации в пептидогликан N-ацетилглюкозамин деацетилаза, пептидогликан O-ацетилтрансфераза, предполагаема гликозилтрансфераза, серин треонин киназа, хистидин киназа, част от двукомпонентна преобразуваща сигнална система или във фосфатна ABC транспортна система (64).



Въпреки, че резистентността към  $\beta$ -лактамите е повишена,  $\beta$ -лактамните антибиотици проявяват ефективност срещу пневмококи с ниски нива на резистентност. В отговор на тези наблюдения са разработени стандартите на CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) за Amoxicillin, Cefotaxim и Ceftriaxone, което повишава процента на пневмококовите изолати, които все още могат да бъдат ефективно третирани с тези агенти (37).

## **7.2 Резистентност към макролиди, линкозамиди, стрептограмини (MLS група)**

Резистентността на *S.pneumoniae* към макролидни антибиотици е значим актуален проблем. Често при щамове пневмококи има кръстосана резистентност към Penicillin и Erythromycin. Резистентността на *S.pneumoniae* към Penicillin и макролиди в някои страни на Европа достига 40-50%, което ограничава възможността за ефективна терапията при инфекции на горни дихателни пътища (60,109). Макролидните антибиотици са предпочитани в клиничната практика за терапия на различни инфекции на дихателните пътища поради профилиът им на безопасност, техните фармакокинетични и фармакодинамични особености и възможността да бъдат приемани от деца.

### **7.2.1 Характеристика на макролидните и линкозамидни антибиотици**

Групата на MLS (макролиди-M, L-линкозамиди, S-стрептограмини) обхваща антибиотици различни по химична структура, но с почти пълна идентичност като механизъм на действие.

Макролидите се продуцират от бактерии от род *Streptomyces*. Основната химична структура на този клас антибиотици е представена от макроцикличен лактонен пръстен. В зависимост от броя на атомите въглерод в пръстена макролидите се подразделят на 14 - членни (Erythromycin, Clarithromycin, Roxithromycin и др.), 15 - членни (Azithromycin) и 16 - членни (Spiramycin, Josamycin, Midecamycin, Rokitamycin и др.). Макролидите се разделят на подгрупи кетолидни антибиотици, производни на Clarithromycin. Класификация на антибактериални препарати от тази група е представена в Таблица 2.

**Табл. 3 Класификация на антибактериалните препарати от MLS – групата**

	<b>14 C</b>	<b>15 C</b>	<b>16 C</b>
<b>Макролиди</b>	Erythromycin Clarithromycin Roxithromycin Oleandomycin Dirithromycin Matromycin Lankamycin	Azithromycin	Spiramycin Josamycin Midecamycin Rokitamycin Tylosin Carbomycin Maridomycin Cirramycin Kitasamycin
<b>Линкозамиди</b>	Lincomycin Clindamycin		
<b>Стрептограмини</b>	<b>Природни</b>	<b>Химически пречистени</b>	<b>Полусинтетични деривати</b>
	Pristinamycin Virginiamycin	Streptogramin A Streptogramin B	Quinupristin Dalfopristin Quinupristin/Dalfopristin 30:70
<b>Кетолиди</b>	Telithromycin		

Молекулите на макролидите са със значителна молекулна маса и лесно проникват през пептидогликана на клетъчната стена на Грам-положителните бактерии.

Макролидите проявяват бактериостатичен ефект, но при определени условия (високи концентрации и ниска микробна плътност) е възможен и бактерициден ефект. Те проникват с макрофагите в мястото на възпалението, което води до висока концентрация във възпалително огнище, отколкото в серума. Освен антибактериален ефект, макролидите оказват и противовъзпалително и имуномодулиращо действие. Имуномодулиращият ефект провокира активността на

неутрофилите и хемотаксиса, опсонизация, фагоцитоза и вътреклетъчно убиване, както и продукцията на възпалителни медиатори и цитокини.

Към линкозамидните антибиотици използвани в медицинската практика се отнасят *Lincomycin* и *Clindamycin*.

### **7.2.2 Механизми на действие на антибиотиците от MLS – група**

Основен механизъм на действие на антибиотиците от MLS групата е инхибиране на синтеза на рибозомалните белтъци на бактериите. Рибозомите на бактериите представляват нуклеопротени, състоящи се от рибозомална РНК (рРНК) и белтък, в съотношение 2:1. Рибозомите представляват комплекс от две субединици, които количествено се изразяват с константа на седиментация при центрофугиране, измерена в единици Сведберг *S*. Рибозомите на прокариотите се описват като *70S*. Бактериалните рибозоми имат две субединици *50S* и *30S*.

*50S* субединицата се състои от *23S* и *5S* рРНК и 31 структурни белтъка. Малката субединица *30S* съдържа *16S* рРНК, свързана с 21 рибозомални белтъци.

*30S* субединицата на рибозомите разпознава информационната и транспортна РНК и определя последователността на свързване на отделните аминокиселини към нарастващата протеинна верига. Прикачването на следващата аминокиселина се провежда в пептидилтрансферазния център на *50S* рибозомната субединица, която е в тунел, образуван от домейни I и V на *23S* рРНК и рибозомните протеини.

Макролидите са антимикробни агенти, които се свързват към *50S* субединицата на *23S* рРНК и блокират белтъчната синтеза. Те нарушават формирането на пептидните връзки и предизвикват преждевременно отделяне на незавършени пептидни вериги.

Линкозамидите нарушават правилното позициониране на аминоацил-тРНК и пептидил-тРНК на акцепторното и донорното място.

Стрептограмини А се свързват и блокират донорното и акцепторното място в пептидилтрансферазния център.

Стрептограмини А + В действат синергично и имат бактерициден ефект, тъй като блокират белтъчния синтез в две различни фази.

Кетолидите, подобно на макролидите се свързват с бактериалната рибозома, и проявяват антибактериално действие чрез инхибиране на синтеза на протеини.

Доказано е, че макролидите и кетолидите взаимодействат с два региона в бактериалната рибозома - Регион II и V на 23 S рРНК.

**Макролидната резистентност** при *S.pneumoniae* се дължи главно на мястоспецифична посттранскрипционна модификация на 23S рРНК чрез *erm*-клас метилази и по-рядко мутации в 23S рРНК, в рибозомалните протеини или активен ефлукс.

#### **А. Метилиране**

Този механизъм е идентифициран като рибозомално метилиране (*ribosomal methylation*). Метилирането (моно- или ди-) на участък от аденина (A 2058), в V домен на 23S рРНК се осъществява от семейство N<sup>6</sup>-метилтрансферази, получили название *erm* (*erythromycin ribosome methylation*). Метилирането води до изменение на пространствената конфигурация на 50S субединицата на рибозомите, което пък води до понижено свързване с макролиди, линкозамиди, стрептограмини В, чиито свързващи места съвпадат (MLS фенотип).

Генът *erm*(B) е широко разпространен при други стрептококи и ентерококи, ентеробактерии, стафилококи, което показва лесен обмен на генетична информация между филогенетично разделени видове. Друг *erm* ген, *erm* (TR) наскоро е установен при *S. pneumoniae* (180) след като е описан за първи път при *S. pyogenes*. Няколко други членове на *erm* - семейството са докладвани в стрептококи и стафилококи, включително *erm*(A), но те все още не са намерени в пневмококи (180).

При пневмококите, *erm*(B) ген се пренася от транспозони (*conjugative transposons*) *Tn1545* и *Tn917*. Транспозон *Tn917* е по-голям от транспозон *Tn3872*. В литературата е описано, че в зависимост от локализацията на гена микроорганизмите показват различна чувствителност към макролидите. При *erm*(B) ген разположен на *Tn1545* се отчитат по-ниски нива на резистентност към Erythromycin, отколкото при микроорганизми с *erm*(B) ген разположен на *Tn917* (118,140).

Щамовеите с макролид-линкозамид-стрептограмин В фенотип показват високи нива на *in vitro* резистентност към макролидите. Фенотипът определян от *erm(B)* гена е MLSb (27).

Известни са два варианта на експресия на резистентност, свързана с метилиране: конститутивен и индуцибилен. При конститутивния тип експресия синтезът на ензима метилаза се случва независимо от присъствието на индуктори, фенотипно това се проявява като кръстосана резистентност към макролиди, линкозамиди и стрептограмин В кетолиди, като се запазва активността. При експресията на индуцибилния тип, метилазата се синтезира в неактивна форма. Посттранскрипционно се извършва индуциране на експресията на иРНК-метилазата с атенюиращ индуктор. Способността на отделните антибиотици да предизвикат преструктуриране на иРНК се определя главно от структурата на атенюатора, която се различава при отделните видове бактерии.

Втори, по - наскоро разшифрован е механизмът на модификация на мишената при групата на MLS антибиотиците чрез мутации в гените на рРНК и рибозомните протеини, което води до конформационна промяна в центъра на пептидил трансферазата и съответно до намаляване на афинитета на АБ препарати (169,180).

## **Б. Ефлукс**

Ефлукс механизмът, който намалява интрацелуларната антибиотична концентрация до субтоксични нива е свързан с резистентния модел - М фенотип. Той се характеризира с резистентност към 14-и 15-членни макролиди в ниски нива, и запазена чувствителност към 16-членни макролиди и линкозамиди (166).

Генът, отговорен за този фенотип е описан за първи път от Clancy и др. при *Streptococcus pyogenes* и е кръстен на *mef(A)* (макролиден ефлукс). По-късно Tait-Kamradt et al. идентифицира подобен ген в *S. pneumoniae*, който носи името *mef(E)*. Тези гени са част от семейство MFS (*major facilitator superfamily*) и кодират транспортни системи (122).

Високата степен на хомология при *mef* гените служи като основа Roberts et al. за тяхното обединяване в една група *mef(A)* ген. По-късно се разкрива, че някои от членовете на тази група са разположени на различни мобилни елементи и

определят различни нива на резистентност към макролиди. (48,49,118,140). Някои проучвания сочат, че МПК при изолати *Streptococcus pneumoniae*, съдържащи *mef(A)* ген е значително по-висока от тази на изолати, съдържащи *mef(E)*. Тези факти са довели до изолиране на отделните подгрупи (41,151).

## **В. Генетични варианти на *mef* ген**

Проучвания от последните години сочат, че *mef(A)* генът се състои от два варианта *mef(A)* и *mef(E)*, откривани оригинално при *Streptococcus pyogenes* и *S.pneumoniae* съответно, които са 90% идентични на нуклеотидно ниво, но се носят от различни генетични елементи (118,140).

При *S.pneumoniae* *mef(A)* ген се намира в състава на транспозон *Tn1207.1*, с размер 7.2 kb, включващ осем рамки на четене, от които *mef(A)* се явява четвърта. Транспозон *Tn1207.1* има уникално място в пневмококова хромозома съответстващо на *cel* (B) ген.

Ген *mef(E)* влиза в състава на мега-елемент с размер 5.5 kb (Macrolide Efflux Genetic Assembly - mega), включващ пет рамки на четене, от които *mef(E)* е първата. Мега-елементът няма специфичен участък на интеграция в бактериалната хромозома (122).

Както в състава на *Tn1207.1*, така и в състава на мега-елемента, непосредствено след *mef* ген се намира ген *msr(D)*, сходен с *msr(A)* ген на *S. aureus* и кодиращ АТФ - зависима ефлукс помпа. Доказано е, че наличието на *msr(D)* ген е необходимо за експресията на *mef* ген, подробности за това взаимодействие не са установени.

Наскоро е открит нов подклас *mef* ген, с хомоложност 93,6% с *mef(E)* и 91,4% с *mef(A)* гени, получил название *mef(I)* (87). *Mef(I)* влиза в състава на *5216IQ*-комплекс, включващ: *IQ* елемент с размер 15,115 bp (непосредствено съдържащ *mef(I)*), *Tn916* с размер 6,003 bp, и *Tn5252* с размер 9,313 bp (38,118,140). Има съобщения и за други варианти на *mef* гени.

### 7.2.3. Макролид – резистентен фенотип.

Метилаза-свързаната корезистентност към MLS антибиотици се кодира от *erm* (B) ген и може да се експресира, да се появи конститутивно с високи нива на резистентност към всички MLS антибиотици (сMLS фенотип) или индуцибилно (iMLS фенотип). По-често индуцибилният фенотип може да се прояви с индуцибилна резистентност към 14 – членни макролиди, но не и към линкозамиди., към които тези щамове са обикновено резистентни (iMcLS фенотип) ( 27).

M фенотип се кодира от *mef* (A/E) гени и се проявява с резистентност към 14- и 15-членни макролиди в ниски нива и чувствителност към 16-членни макролиди и линкозамиди (169).

Макролид-резистентния фенотип на пневмококовите щамове се определя чрез тройният дисков метод Erythromycin/ Clindamycin/ Rokitamycin, въведен от Montanari през 2001г., с който могат да се открият и по-редки генетично-обусловени механизми сред макролид-резистентните пневмококи.

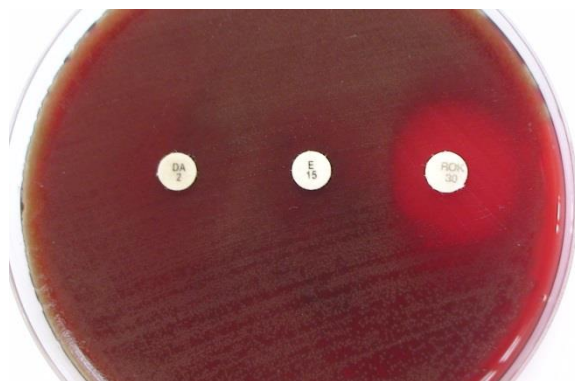
#### Фиг. 4. M-фенотип

Чувствителност към Rokitamycin и Clindamycin, резистентност към Erythromycin



### Фиг 5. iMcLS - частичен индуцибилен фенотип

Резистентност към Erythromycin и Clindamycin, със задръжка-отсичане на зоната около Rokitamycin (индуцибилна резистентност към макролиди)



### Фиг.6. iMLS - истински индуцибилен фенотип

Резистентност към Erythromycin, с притъпяване на двете зони на задръжка на Rokitamycin и на Clindamycin от вътрешната страна до еритромициновия диск

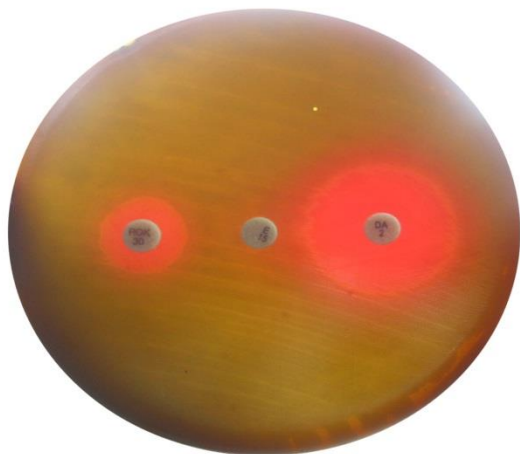


По-рядко в клинични изолати *S.pneumoniae* се срещат други модификации на мишената засягащи домен V на 23S рРНК и гени кодиращи L4 и L22 рибозомалните протеини. Мутации в L4 и L22 също водят до конформационни промени в пептидилтрансферазния център и понижен афинитет към MLS антибиотиците (169).



## Фиг.7. Мутация в L4 рибозомен протеин

Резистентни на 14- и 16-членни макролиди, но чувствителни на Clindamycin.



### 7.3 Молекулярно - генетични механизми на резистентност при *S. pneumoniae* към други антимикробни лекарствени средства, използвани за лечение на пневмококовите заболявания.

Резистентност към Tetracycline. Генетичните механизми обвързани с резистентност към Tetracycline се обуславят от *tetM* ген и по-рядко от *tetO* ген. Предполагамият произход за този фенотип е конюгативен трансфер на Tn1545 и неговите деривати и Tn5253 (185,186).

Високо ниво на резистентност към Chloramphenicol се индуцира от конюгативен трансфер на Tn5253 и *cat* ген. Tn5253 е съставна структура, състояща се от два независими конюгирани транспозона, Tn5251 (който е почти идентичен с Tn916) и Tn5252 (~ 47.5 KB), първият включен в последния. За Tn5252, който досега е само частично секвениран е известно, че носи интеграза ген, причиняващ място-специфичната му инсерция в генома на клетката гостоприемник и детерминанта за хлорамфениколова резистентност *cat* ген (121,125).

Ниско ниво на резистентност към флуорохинолони се индуцира от точкови мутации в гени за топоизомераза IV и ДНК гираза - гени *parC* и/или *gyrA*. Проучвания доказват, че с увеличаване на “missense” мутациите, МИК стойностите за всеки антибиотик нарастват. Moxifloxacin, Garenoxacin и Sitafloracin показват

мощна активност срещу пневмококовите изолатите, докато МИК на Ciprofloxacin и Pazufloxacin е по-висок от този на Levofloxacin (45).

За високото ниво на резистентност към флуорохинолони са отговорни *parE* и *gyrB* гени, допълнителни мутации и ефлукс механизъм. Всички бактериални ABC транспортни системи за множествена резистентност са показали, че работят или като хомодимери или хетеродимери. Два свързани гена, *patA* и *patB* на пневмококите, кодират половината от ABC транспортерите, които участват в флуорохинолоновата резистентност (45).

Като отговорни за резистентността към Trimethoprim - sulfamethoxazole се посочват два гена - *folA* and *folP* (42).

Schrag SJ. et al., през 2000г. докладва фенотип описващ толерантност към Vancomycin, който се кодира от *vincS*. Понастоящем този механизъм неизвестен в детайли. Открит е само в изолати от серотип 9V.

#### **7.4. Множествена резистентност**

През последните години *mef* гените, кодиращи ефлукс помпи отговорни за M тип макролидна резистентност са изследвани подробно при стрептококи. *Mef(I)* е описан наскоро *mef* вариант в щамове *S.pneumoniae*. Това проучване показва, че *mef(I)* се намира в нов композитен генетичен елемент, чиято последователност е напълно анализирана и демонстрира уникална генетична организация (121,122). Новата композиционна структура (30 505 bp.), определя комплекса 5216IQ, който се състои от две половини: лява (15 316 bp.), образувана от части на известните транспозони Tn5252 и Tn916, и дясна (15 115bp.), образувана от нов фрагмент, определен като IQ елемент. В дефектен Tn916 се съдържа мълчалив *tet(M)* ген, а IQ елементът завършва с идентични транспозаза гени от двете страни и съдържа *mef(I)* ген с прилежащ нов *msr(D)* генен вариант и ацетилтрансфераза *catQ* ген за хлорамфениколова резистентност. Този генетичен елемент е напълно различен от генетичните елементи на другите *mef* гени в пневмококите. Това е първият доклад, доказващ, *catQ* в *S.pneumoniae* и показващ връзката му с *mef* ген. Анализът на хромозомната област от ляво разкрива организацията по - близка до тази на щам *S.pneumoniae* TIGR4, отколкото до тази на щам R6. За комплекса 5216IQ се

предполага, че е неподвижен, без открито до този момент прехвърляне на еритромицинова устойчивост при трансформация и конюгиране (122,123).

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, единият (Tn2009) съдържащ *tet(M)* ген плюс *mega* елемент, а другият (Tn2010), носещ *tet(M)* и *erm(B)* гени плюс *mega* елемент. Транспозонът съдържа интегразата (*int*) и ексисаза (*xis*) гени. Интегразата гените са изключително важни, т.като причиняват място-специфичната инсерция на тези транспозони в генома на клетката гостоприемник и способстват за успешно прехвърляне на устойчивост в пневмококовата популация (118,140).

Главно средство за латерален трансфер на гените се явява Tn2010 с *tet(M)* ген, носещ Tn916 семейство с вмъкнатите в него *erm(B)* елемент и *mef(E)*-съдържащ *mega* елемент.

Друго доказателство за свързаната резистентност и преносът на подвижни генетични елементи, водещи до появата на множествено-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* (122,123).

## **8. Микробиологични методи за идентификация и типирание на *S.pneumoniae***

Микробиологичната идентификация на пневмококите се осъществява по няколко основни признака:

Микроскопски - При наличие на Грам-положителни, ланцетовидни, капсулирани диплококи има съмнение за пневмококова инфекция. В препаратите от храчки и др. се наблюдават и левкоцити, предимно ПМН.

Хемолитична активност на кръвен агар- на КА колонииите се характеризират с продукция на зона с  $\alpha$ - (зелена) хемолиза, която различава *S. pneumoniae* от група

А ( $\beta$  - хемолитични) *Streptococcus*, но не от коменсалните  $\alpha$  - хемолитични (*viridans*) стрептококи, които са обитатели на горен респираторен тракт.

Отрицателни за каталаза и Чувствителност към оптохин- зони над 14 mm при дискове с размери 6mm или над 16 mm при дискове с размери 10 mm индикират инхибиране на растежа на *S.pneumoniae*. Зеленеещите стрептококи не се инхибират от оптохин.

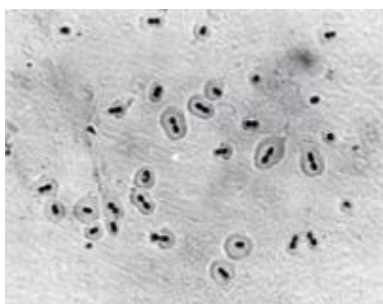
**Фиг 8. Мукоиден щам на *S.pneumoniae* върху КА с  $\alpha$  - хемолиза и зона на инхибиране около диск с оптохин**



Лизис в присъствието на жлъчни соли- Способността на Na deoxycholate да разтваря клетъчната стена зависи от присъствието на автолитичният ензим, LytA. На практика всички клинични изолати имат автолизин и подлежат на лизис с дезоксихолат.

Метод на Нойфелд (Neufeld) за набъбване на капсулата. При Quellung реакцията пневмококите се смесват с типовоспецифични серуми върху предметно стъкло. Ако реакцията е положителна в следствие на *in situ* имунопреципитация на препарат се наблюдава силно набъбване на капсулата. Тази проба се използва за бързо доказване и типирание на изолираните пневмококи.

## Фиг 9. Квелунг реакция при *Streptococcus pneumoniae*



Източник: [textbookofbacteriology.net](http://textbookofbacteriology.net)

## 9. Молекулярно - биологични методи за идентификация и типирание на *Streptococcus pneumoniae*

През последните 10-15 години бяха разработени много молекулярни методи за изследване физиологията, патогенетичните фактори, резистентността към антибиотици и генетичните връзки между изолатите *S. pneumoniae*.

Молекулярни проучвания са показали, че Penicillin-нечувствителните и множествено-резистентните популации са динамични и резистентността се дължи на разпространение на резистентни клонове, придобиване и загуба на резистентни гени в рамките на една клонална група и разпространение на резистентни гени към нови клонални групи. Към днешна дата няколко генотипиращи техники като, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) (172), BOX-PCR (BOX-Polymerase Chain Reaction) (177) и multi locus sequence typing (MLST) (54) намират най-широко приложение за изучаване механизмите на разпространение на резистентни щамове *S. pneumoniae* и определяне на генетичните връзки между пневмококовите изолати. Чрез тези методи се позволява диференциране на изолатите на молекулярно ниво, които с конвенционалните методи като тестовете за чувствителност към антибиотици и серотипиране не могат да бъдат ясно разграничени.

### 9.1. PCR методи за идентификация на *S.pneumoniae*

PCR е техника за експоненциално амплифициране на специфични региони ДНК, фланкирани от двойка праймери, от които започва ДНК синтез инициран от термостабилна ДНК полимераза. Методът се използва за различни проучвания на пневмококовите изолати, като главните приложения са: идентификация на вида,

откриване на бактериите в клинични материали, детектиране на гените на антибиотична резистентност и като стъпка от протокола при други техники, например при MLST (77,100,117).

PCR тестовете за идентификация на пневмококи са насочени към гени кодиращи вирулентни фактори специфични за тях, например: пневмолизин (*ply*), автолизин (*lytA*), пневмококов повърхностен антиген А, супероксид дисмутаза (*sodA*), и Penicillin-свързващи протеини (79,117,133,143). Най-често използваните PCR тестове за идентификация на пневмококи са за *lytA* (111,135) и *ply* гените (77). Пневмолизинът е специфичен 53 kDa – протеин, който се открива при всички щамове *S. pneumoniae* и е идеална мишена за антигенна детекция. Автолитичната *LytA* амидаза се открива най-често с Real-Time PCR в ДНК от инвазивни материали. Някои PCR анализи за видова идентификация са насочени към амплификационен фрагмент съдържащ 5' - края на ген кодиращ въглехидратно-специфична пермеза. Неотдавна е открит този CF<sub>Sp</sub> регион (181), специфичен за *S. pneumoniae*, който не се открива при други близкородствени видове с високо ниво на хомоложност на нуклеотидно ниво (*S.pseudopneumoniae*, *S. uberis*, *S. suis*, *S. sanguinis*).

В последните години е разшифрован *cps* локус, където са локализирани гените участващи в биосинтезата на капсулните полизахариди. Основната мишена от локуса е *wzy* ген. Той има множество алотипове, които обуславят различния строеж на капсулните полизахариди. Чрез PCR – серотипиране на гени от *cps* локуса може да се анализира ДНК от различни биологични материали (135,137,141).

## **9.2. Молекулярно – биологични методи за епидемиологично типирание и намиране на клонално сходство при щамове *S. pneumoniae***

### **9.2.1. Пулсова електрофореза – Pulse field gel electrophoresis (PFGE)**

PFGE е разработена от Schwartz, Cantor и колеги през 1982г. Методът позволява големи ДНК фрагменти с размери до 10 МВ да бъдат разделени според тяхното тегло в агарозен гел чрез мигриране при постоянно променяща се посока на електричното поле през определени интервали от време (16). За сравнение стандартните агарозни гелове позволяват разделяне на ДНК фрагменти до 75 kb.

Доскоро PFGE на геномна ДНК на щамове *S. pneumoniae* е приемана за ”златен стандарт” (16,65). Изпълнението на метода е предпоставка за ефикасен мониторинг на епидемиологичното разпространение на резистентни пневмококи. Клиничните щамове могат да се различават по географско разпространение, чувствителност към различни антибиотици, серотип и мултилокусно ензимен електрофоретичен профил – MLEE профил.

Модификациите при PFGE довеждат до развитието на FIGE - field inversion gel electrophoresis, CHEF - contour-clamped homogenous field electric field, RGE - rotate gel electrophoresis, TAFE - Transverse-Alternating Field Gel Electrophoresis и др. (83,108).

FIGE е по-лесна като приложение от PFGE, тъй като тя може да се изпълни в апарат за хоризонтална гел-електрофореза в области на изместване от 180°, директно разположени един срещу друг. Пулсациите на напрежението са с различна сила или продължителност, така че ДНК фрагментите да напредват в агарозния гел. Резолюцията на фрагментите е по-ограничена : до 2МВ в сравнение с 5МВ за PFGE (179).

В TAFE (Transverse-Alternating Field Gel Electrophoresis), гелът е ориентиран вертикално и обикновено четири електрода се поставят не в равнината на гела , а отпред и отзад. Тъй като молекулите се движат надолу по гела, те са подложени на непрекъснати промени заради силата и ъгъла на електрическото поле, което варира в горната и долна част на гела, и по този начин молекули не се движат с постоянна скорост. TAFE се използва за разделяне на фрагментите до 1,600 kb (179).

Въртяща гел електрофореза (RGE): Разработена е в Англия през 1987 г., от Southern. RGE използва хомогенно поле и променя ориентацията на електрическото поле чрез прекъсването му, като заедно с това гелът периодично се завърта. С RGE могат да бъдат разделени ДНК молекули от 50kb до 6000 kb (179).

CHEF е най-широко използваният апарат. Той разполага с двадесет и четири точкови електрода на еднакво разстояние около шестоъгълен контур. Апаратът произвежда електрически полета, които са достатъчни за движението на всички молекули. ДНК фрагменти до 7000 kb могат да бъдат разделени с CHEF –PFGE. При CHEF се използва рестрикционна ендонуклеаза *SmaI* за раздробяване на интактните хромозоми на пневмококите. (16,172). Всяко раздробяване продуцира 10 до 19

фрагмента за сравняване между щамовете. В някои случаи рестрикционните профили се различават само с няколко бенда и два изолата могат да се различават само в разположението на отделен ДНК фрагмент. Два изолата продуциращи един и същ профил на бендовете, могат да се сметнат за изолати с общ предшественик - щам или клон. Tenover и колеги (172) предлагат интерпретиране на профилите получени от PFGE. Изолати, които се различават по три бенд профила, според Tenover, могат да се приемат за високородствени - като тези промени могат да се получат от точкова мутация в рестрикционния сайт.

CHEF методът в последните години се превръща в чудесен способ за анализиране на ДНК макрорестрикционни фрагменти на пневмококовата геномна ДНК. Получените ДНК рестрикционните профили са стабилни и възпроизводими на различни нива – вътрешно-лабораторни и за сравнение между независими лаборатории (16,65,83,108).

Тъй като методът е по-бавен и усърден, в някои случаи, в зависимост от нуждите на изследването PCR - базираните методи са предпочитани пред PFGE.

### **9.2.2 Мултилокусно секвениране - Multi Locus Sequence Typing (MLST)**

MLST се разглежда като един от най-важните успехи при молекулярното типичане за последното десетилетие (18,21,58,59,77). MLST се разработва в лабораториите на Martin Maiden, Dominique Caugant, Ian Feavers, Mark Achtman and Brian Spratt.

Основните приложения при *S.pneumoniae* MLST намира за популационни анализи, характеризирани на антибиотично резистентни клонове и проследяване на епидемиологично разпространение на клоновете.

MLST е подход базиран на нуклеотидно секвениране за точно характеризирани на бактериални изолати през интернет. За осъществяването на тази цел са използвани проверени понятия от MLEE и са адаптирани така, че алелите на всеки локус се определят чрез директно нуклеотидно секвениране, по-точно от индиректното, което показва електрофоретичната подвижност на техните генни продукти.

При този метод, за всеки щам на *S.pneumoniae* ~ 450bp външни фрагменти на седем “housekeeping” гени *aroE*, *gdh*, *gki*, *recP*, *spi*, *xpt* и *ddl* се амплифицират с



PCR от хромозомна ДНК с двойка праймери, описани от Enright and Spratt (54). Амплифицираните фрагменти се секвенират във всяка посока с праймерите, които са използвани за първичната амплификация. Секвенциите на всеки от седемте локуса след това се сравняват с всички познати алели на този локус (54). Последователности, които са идентични с известен алел, имат същият алелен номер. Тези алели, които се различават дори в един нуклеотид, се означават с нов алелен номер. Алелите на всеки от седемте локуса определят алелния профил на всеки изолат и неговия секвенционен тип (ST). Алелните профили на референтните изолати на всеки клон се депозират в пневмококовата база данни в MLST web site.

Предимство на метода, освен неговата висока продуктивност, дискриминативност и ефективност, е и свободния софтуер eBURST за стандартизиране и интерпретиране на получените резултати. Понастоящем методът намира най-широко приложение в изследванията върху пневмококовите популационни анализи (54,58,77).

Пренасянето на резултатите от молекулярната епидемиология в клиничната диагностика е една от важните крайни етапи в процеса на типизиране.

## **10. Други молекулярно - биологични методи използвани за изследване на генетичната структура на *S. pneumoniae***

### **Мултилокусна ензимна електрофореза - Multilocus Enzyme Electrophoresis (MLEE)**

MLEE характеризира генетичното разнообразие на ензимните локуси на *S. pneumoniae*, което улеснява анализите за генетично сродство в пневмококовата популация. Методът детектира полиморфизъм само в кодиращия регион на гена.

Основните предположения са, че електрофоретичните варианти възникват от неутрални мутации в кодиращите гени, така че ензимите кодирани от отделните локуси представляват генома като цяло и всеки локус е независим от другите (176).

Оптимизирания MLEE метод за *S. pneumoniae* се извършва с полиакриламидна гел електрофореза и няколко електрофоретични трансфера с кратка продължителност на нитроцелулозни мембрани.

За да се получи информация за доказване на родственоост е необходимо анализирането на поне няколко гена и определянето на коефициент сходство (54). Два изолата могат да споделят един и същ алел или защото те произлизат от общ предшественик или защото единия от тях е придобил алел чрез рекомбинация (хоризонтален генен трансфер). Доказано е, че рекомбинацията е доста честа при пневмококите.

MLEE профилите представляват отлични епидемиологични маркери, но те не са подходящи за бързо и отчетливо типирание. Поради тези причини MLEE се измества от PFGE и MLST, последният от които е най-предпочитан и най-добре застъпен към днешна дата в молекулярните проучвания.

### **Случайна амплификация на полиморфна ДНК - RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA)**

RAPD методът е вид PCR реакция на големи фрагменти геномна ДНК. Използват се произволни ~10 bp ДНК праймери за генериране на полиморфни бенд профили. Те амплифицират или не сегмента ДНК, в зависимост от позициите, които са комплементарни на праймеровите секвенции (176). Избирането на правилна секвенция за праймера е много важно, защото различните секвенции продуцират различни бенд профили и могат да доведат до повече специфични разпознавания за индивидуалните щамове (176).

При използването на тотална ДНК, RAPD дава богата информация за анализирания геном. Анализиращата способност на RAPD е по-малка в сравнение с тази на ДНК методите с къси повторени последователности, но когато е в комбинация с други методи може да помогне при изготвянето на генетични карти.

### **Box A PCR**

Box - PCR е друг епидемиологичен способ за типирание на пневмококи. Той продуцира ясни и възпроизводими ДНК профили. BOX повторените ДНК последователности се състоят от различни комбинации на три субединици - boxA, boxB и boxC. Еволюционното съхранение на тези елементи е различно при бактериалните видове и това води до нуждата от проучване на мозаичната им

природа (176). Незасегнати, цели BOX елементи с трите субединици присъстват във висок брой само при пневмококовите щамове. Този модел на различно съхранение показва приспособената природа на BOX повторените елементи, в които boxA-подобните последователности са независими от boxB- и boxC-подобните субединици в бактерии различни от *S. pneumoniae*. Резултатите показват широко разпространение на boxA-подобни последователности в бактериалното царство, демонстриращи ползата от boxA-базирани праймери за ger-PCR фингърпринтинг както за пневмококи, така и за други микроорганизми.

Недостатък на Vox-PCR са разликите, които се появяват при интерпретирането на бендовете, затова и резултатите от PCR фингърпринтинг техниките не се препоръчват за обмен и анализ между различни, независими лаборатории (21).

### **RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)**

RFLP е техника, при която организмите могат да бъдат отдиференцирани чрез анализ на техните ДНК профили получени при “срязване” с рестрикционни ензими. Малки количества ДНК, необходими за RFLP анализ се получават чрез амплифициране с PCR обикновено за 2-3 часа и по този начин много проби могат да бъдат изследвани за кратко време.

RFLP изисква секвенция ДНК, която има рестрикционен сайт в таргетната последователност. Методите базирани на RFLP с тотална ДНК могат да бъдат използвани за откриването на близко родствени изолати от различни източници, независимо дали са следствие на локално клонално разпространение или са следствие на глобално разпространение на щамове (177).

RFLP се използва за доказване на мутации, определящи антибиотична резистентност и за изследване на промени в рестрикционния профил на вариабилни гени. Най-често рестрикционни реакции се използват за разграничаване на *mef(A)* и *mef(E)* генетични варианти (100,180), за детектиране на *lytA* - автолизин кодиращ ген и за *pbr* идентификация на пеницилиновата нечувствителност (64,134).

**PBP - фингърпринтингът** на гени се използва за разграничаване на Penicillin-свързващите протеини PBP 1A, 2A, 2B и 2X и анализ на Penicillin-нечувствителни пневмококови изолати (134).

Механизмите на пеницилинова резистентност в клиничните изолати на *S. pneumoniae* включват промяна на PBPs, с което се намалява значително афинитета и способността за свързване към антибиотичната молекула.

В процес на хетероложна рекомбинация непневмококови бактерии могат да изиграят ролята на ДНК донори, носещи *pbp* гени с намален афинитет към антибиотичните. Извършва се генетична трансформация на пеницилинова резистентност, която започва с появата на резистентен клон. Нов член от този клон може да участва във втора рекомбинация и така до осъществяването на множествена рекомбинация. Хомоложна рекомбинация може да бъде извършена между Penicillin-резистентни и Penicillin-чувствителни пневмококи. Всеки пневмококов изолат след тази рекомбинация се характеризира с уникален генетичен профил от резистентни *pbp* гени.

*Pbp* гените се анализират с RFLP метод, MLEE, работипиране (134,176). Понякога членовете на един клон могат да придобият различно изменени *pbp* гени, защото едната от фингърпринтинг групите съдържа изолати от един серотип, а другата от различни (два) серотипа. Идентифицирането на шамовете по-късно в една група с идентични критерии, с изключение на серотип предполага реализирала се промяна в серотипа (191). Изолати от един и същ серотип с еднакъв МИК на Penicillin не са винаги членове на един клон, което показва, че идентичността серотип и МИК не са достатъчни критерии за дефиниране на клоновете на резистентните пневмококи, дори когато бактериите са изолирани от едно и също инфекциозно отделение (19,21).

### **AFLP (amplified restriction fragment polymorphism)**

AFLP е PCR фингърпринтинг метод. Техниката е разработена от Vos and Zabeau през 1993г. (176). Има 4 важни стъпки при AFLP процедурата: 1) рестрикция с ендонуклеаза на геномна ДНК 2) лигиране на получените рестриктазни фрагменти със специфични олигонуклеотидни адаптори, 3) PCR амплификация на рестрицираните фрагменти с двойка праймери съдържащи общи

секвенции с адаптора и един до три произволни нуклеотиди, 4) анализ на амплифицирани фрагменти с денатурираща полиакриламидна гел електрофореза, чрез автордиография или флуоресцентно детектиране. Комбинацията на различни рестрикционни ензими и избора на селективни нуклеотиди в праймерите за PCR правят AFLP полезна нова система за молекулярно типирание (176).

Методът е ефективна техника за разграничаване на *S. pneumoniae* от други стрептококи и ефикасна алтернатива на пулсовата електрофореза за молекулярно типирание на пневмококи.

## **Методи за генотипиране базиращи се на секвениране**

### **Секвениране**

Секвенирането е техника за определяне на нуклеотидната последователност на даден ДНК фрагмент. Най-популярен е методът на секвениране на веригата чрез терминиране на Sanger (chain termination Sanger method). Използват се къси олигонуклеотидни праймери, а ДНК синтезата се прекратява при достигането на модифицирани нуклеотидни субстрати. Методът осигурява много точна информация за определяне на дивергенция и неродственост между видовете, негово основно приложение е при филогенетичните анализи на междувидово ниво. Причините за това са две: 1) на междувидово ниво, промените в отделна секвенция са достатъчно доказателство за интерпретиране на произхода и еволюционната история на видовете, 2) на подвидово ниво, секвенционните промени в самостоятелен локус в повечето случаи не са достатъчни за дискриминиране между високородствени, но не идентични изолати и обикновено не осигуряват достатъчна информация за клъстерни анализи. За да се получи такава информация, трябва да се секвенират няколко локуса, което увеличава времето необходимо за получаване на информация.

До преди 10 години секвенирането се приемаше като бавна и скъпоструваща процедура. В последните години обаче се наложи автоматичното секвениране, което е по-евтин и по-бърз метод.

Предимствата на секвенирането са високата диференцираща способност, високата репродуктивност, възможността за софтуерна обработка на резултатите и създаване на база данни.

### **16S рРНК секвениране**

Поради нормално случващите се промени в гена на 16SpРНК понякога се усложняват идентификационните процедури и не винаги е ясно къде може да се постави чертата между *S. pneumoniae* и генотипно сходни видове (21). Ясно е, че това не се ограничава само до 16S анализите, но важи и за всеки друг "single-gene" метод. За това е необходимо прилагането на детайлно анализиращи геномни техники, много по-малко повлияващи се от естествено случващите се минорни промени в ДНК последователностите.

### **WGS (whole genome sequencing).**

WGS (whole genome sequencing) е ново поколение секвениране, което се основава на първо поколение базирано на подхода на Сангер (21). Предимство на NGS (new generation sequencing) над традиционното Сангер секвениране е възможността за генериране на приблизително 35-700 базови двойки по дължина в едната посока при сравнително ниски разходи. За конструиране на пълната нуклеотидна последователност на генома, региони от множество къси последователности трябва да бъдат припокрити (*de novo assembly*) или сравнени с предварително секвенирани "референтни" геноми (*resequencing*) (61). WGS се превръща в мощен и изключително атрактивен инструмент за епидемиологични изследвания и в бъдеще се залагат големи надежди на WGS технологията за рутинна клинична употреба, което ще позволи точна идентификация и характеризирание на бактериални изолати. Възможностите на метода ще бъдат използвани не само за получаването на нуклеотидни последователности и бързо анализиране на съответната информация от голяма база данни, но и в идеалния случай, за директно сравняване с резултатите, получени чрез другите типиращи техники (напр. PFGE и MLST).

## **11. Оценка на значението на утвърдените методи за намиране на клонално сходство при *S. pneumoniae* за доказване експанзията на международни пневмококови клонове през последните години.**

Методите, които изследват родството на бактериалните щамове на молекулярно ниво са с висока способност за разграничаване на бактериални видове и подвидове. Изборът на метод (или методи), подходящ за молекулярна идентификация зависи в значителна степен от проблема за решаване и епидемиологичния контекст, в който методът ще се използва.

Молекулярните методи за типирание са с висока дискриминационна способност, необходима за разграничаване на всички епидемиологично несвързани бактериални щамове. В идеалния случай, такъв метод може да разграничи много тясно свързани бактериални щамове и да разкрие предаване на щам от човек на човек, което е важно за разработването на стратегия за предотвратяване на по-нататъшното разпространение. Изисквания към методите за намиране на клонално сходство са бързина, ниска цена, възпроизводимост и леснота на изпълнение и тълкуване. Когато типирането се прилага за постоянен надзор, съответния метод трябва да дава стабилни резултати във времето, за да позволи прилагането на ефективни мерки за контрол на инфекциите. Методът за типирание, който ще се използва в международните мрежи следва да предоставя данни, които са преносими между различни системи и лесно достъпни чрез отворен източник: web-базирани данни. Освен това, методите за типирание е необходимо да следват международно стандартизирана номенклатура и да се прилагат за широк спектър от бактериални видове.

Като най-утвърдени методи за намиране на клонално сходство при *S. pneumoniae* и отговарящи на най-голям брой от горепосочените критерии са се наложили PFGE, MLST и WGS. Данните, получени от тези методи са автоматизирани и лесни за съхранение, имат съответните алгоритми за групиране на щамовете и осигуряват информация полезна за откриването на огнища на инфекции. Фокусът е върху тези методи, т.к. като анализирането на резултатите от тях е в пряка връзка със силно въздействие върху общественото здраве и към тези методи има все по-голям интерес по отношение на клиничната употреба.

### III. 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 изследва 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 типирание 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.

## IV. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

### Раздел I. Микробиологични изследвания

Микробиологичните изследвания включваха изолиране, идентификация на вида, изпитване за чувствителност към антибиотици, определяне на МИК, определяне на фенотип на макролидна резистентност, серотипиране и съхранение на щамовете *S. pneumoniae*.

#### 1.1 Изследвани щамове *S. pneumoniae*

Колекцията от пневмококови щамове включва инвазивни и респираторни щамове от централна лаборатория в катедрата по медицинска микробиология, от микробиологични лаборатории на София, НЦЗПБ и лабораториите на три Университетски клиники в Пловдив, Варна и Плевен.

Всеки изолат *S. pneumoniae* беше придружаван с фиш с епидемиологични и клинични данни за пациента, от който е изолиран щам.

Информацията съпровождаща изолата включваше:

- Лабораторен номер и бактериален вид на изолата
- Вид на материала, от който е изолиран щам
- Дата на взимане на материала за микробиологично изследване
- Клинична диагноза на пациента
- Възраст на пациента
- Пол на пациента
- Прием на антибиотик (АБ) през последните 3 месеца - (какъв АБ и начин на прилагане)
- Извършена ли е ваксинация с пневмококова ваксина – (каква е ваксината)

Бактериалните щамове бяха транспортирани до лабораторията в замразен вид или на транспортни среди (Biolab, Унгария) и eSwab (Coran, Италия).

#### 1.2 Микробиологични методи за идентификация

За култивиране на щамовете *S. pneumoniae* е използван кръвен агар (КА) с добавяне на 5% дефибрирана овнешка кръв. Инкубацията е извършвана при температура от +35°C, в атмосфера с повишено съдържание на CO<sub>2</sub> (5-10%) за 24 ч.

Идентификация на пневмококите беше осъществявана въз основа на морфология на колониите на кръвен агар, наличието на  $\alpha$ -хемолиза, чувствителност към оптохин и лизис от жлъчни соли.

### 1.2.1 Тест с оптохин

Бактериалните култури, които след 18 – 24 ч. инкубиране с 6mm диск оптохин на КА имаха зона на задръжка на растежа над 14 mm бяха идентифицирани като *S.pneumoniae*. Изолати с по-малки зони бяха подлагани на допълнителен тест за разтворимост на жлъчни соли.

### 1.2.2 Тест за разтворимост в жлъчни соли

Използваният реагент е 10% натриев дезоксихолат (1g. натриев дезоксихолат, 0.1g  $\text{Na}_2\text{PO}_4$ , 10ml дест. вода). В 1 ml физиологичен разтвор бе суспендирана чиста колония на *S.pneumoniae* до получаването на млечна суспензия, която се разделяше в две епруветки по 0.5ml. В тестовата епруветка бяха накапвани по 2-3 капки натриев дезоксихолат, а в контролната епруветка по 2 - 3 капки физиологичен разтвор. Двете епруветки бяха инкубирани при 35°C за 30 минути. Ако след това време тест-епруветката беше бистра, се е осъществил лизис на *S.pneumoniae*. Контролната епруветка остава мътна.

Табл.4. Идентификация на *S. pneumoniae*:

Тест за оптохин	Лизис от 10% Na desoxycholate	Бактериален вид
S	Пълна лиза	<i>S. pneumoniae</i>
S	Неразтворими - лиза липсва	<i>S. pseudopneumoniae</i>
R	Пълна лиза	<i>S. pneumoniae</i>
R	Частична лиза	<i>S. viridans</i> group

### 1.3 Съхранение на бактериалните щамове

След потвърждаването на вида, изолатите *S. pneumoniae* бяха съхранявани чрез замразяване на щама на - 80°C в двойно концентриран skim milk (сухо обезмаслено мляко). (Oxoid,UK.)

## **2. Изпитване на чувствителност към антибиотици и определяне на МИК**

### **2.1. Дискowo-дифузионен метод (ДДМ)**

Изготвяна беше стандартна антибиограма с бактериален инокулум 0.5 по Мак Фарланд на 5% кръвен Мюлер – Хинтон агар (МН II agar, BBL). Използваните АБ дискове бяха (Bioanalyse, Турция): Oxacillin, Erythromycin, Clindamycin, Trimethoprim/Sulfamethoxazole, Levofloxacin, Tetracycline, Chloramphenicol, Rifampin..

Чувствителността към Penicillin в ДДМ беше изпитва с диск Oxacillin 1 µg. Щамове с диаметър  $\geq 20$  mm се интерпретираха като чувствителни на Penicillin и се считаха за чувствителни към аминокPenicillini  $\beta$  – лактамаза инхибитор комбинации, цефалоспорини и карбапенеми.

При щамове с диаметър на Oxacillin  $\leq 19$  mm беше определян МИК на Penicillin. Изолати с МИК  $\leq 0.06$  µg/ml бяха интерпретирани като чувствителни на Penicillin, с МИК 0.1 – 1 интермедиерно устойчиви и с МИК  $\geq 2$  µg/ml – като резистентни. При щамове с диаметър на Oxacillin  $\leq 19$  mm беше определяна МИК и за Cefotaxime или Ceftriaxone и Меропенем. Както е според изискванията на CLSI (37) чувствителността към Amoxicillin, Ampicillin, Cefepime, Cefotaxime, Ceftriaxone, Cefuroxime, Imipenem и Меропенем се изпитва надеждно само с метода за определяне на МИК.

При изолати от ликвор чувствителността към Penicillin, Cefotaxime или Ceftriaxone и Меропенем задължително беше определяна с МИК.

### **2.2. Определяне на МИК с микробульонен метод**

МИК на антибиотиците е определян на готови микроплаки за възискателни бактерии (Sensititre HPB; Trek Diagnostics Systems Ltd, Англия). Използван е Мюлер Хинтон бульон с TES буфер (20 mM EDTA, 100 mM Tris, pH 8.0, 0.8% SDS) за инокулирането на няколко колонии от ч.к. *S. pneumoniae* от КА. След това от бульона са прехвърляни по 100 µl бактериална култура в Мюлер Хинтон бульон с лизирана конска кръв (САМНВТ) за достигането на инокулум от  $5 \times 10^5$  КОЕ/ml. Плаките са инкубирани в атмосфера без CO<sub>2</sub> при 35°C за 24ч.

### **2.3 Определяне на МИК на антибиотиците с разреждане в агар:**

Използван е Мюлер Хинтон бульон за инокулиране на бактериалните щамове. За разтваряне и разреждане на антибиотиците са използвани фосфотатен буфер с рН6.0, 0.1 mol/L; 95% етанол; метанол и стерилна д.Н<sub>2</sub>О. Репликите с бактериалните бульони са правени върху МХ агар с включен антибиотик, в последователност от най-ниското към най-високото антибиотично разреждане. След инкубиране при подходящите условия за *S. pneumoniae* резултатите са отчитани след 24 часа.

### **2.4 Определяне на МИК с градиентен тест за антибиотична чувствителност (Е тест):**

Използваната среда е 5% кръвен Мюлер – Хинтон агар. Инокулум от 0.5 по Мак Фарланд се нанася със стерилен тампон върху цялата агарова повърхност. Поставя се тест лента (E-test, BioMérieux, Франция) за изпитване на антибиотична чувствителност и след инкубиране при 35°C, в атмосфера със СО<sub>2</sub> (5-10%) след 24 ч. се отчитат резултатите.

Качественият контрол на тестовете за чувствителност е правен с *S.pneumoniae* ATCC 49619. Определянето на чувствителността към антимикробни средства е извършено в съответствие със стандартите зададени в CLSI / M100-S23, 2013г. (37).

### **3. Определяне на фенотип на Erythromycin-резистентни *Streptococcus pneumoniae***

За щамовете, резистентни към макролидни антибиотици беше определен **фенотип на макролидна резистентност** по тройно-диск метод публикуван от Montanari et al. през 2001г.

#### **Фенотип на Erythromycin – резистентните *Streptococcus pneumoniae***

Фенотипът на макролидна резистентност беше определян само на клинични щамове *S.pneumoniae*, на които е направена антибиограма по ДДМ и чувствителността към Erythromycin е била  $\leq 20$  mm.

Използваната среда за определяне на фенотипа е Мюлер – Хинтон агар с 5% овнешка кръв. Използвани са три диска за фенотипизиране : Erythromycin (15 µg

диск) - поставян в центъра на петрито. От двете му страни, на разстояние максимално 2 см., са поставяни дисковете : Rokitamycin (30µg диск) и Clindamycin (2 µg диск), (Bioanalyse, Турция).

**Табл.5. Възможни фенотипни варианти при *Streptococcus pneumoniae* :**

Фенотип на макролидна резистентност	Описание
<b>iMcLS</b> (частичен индуцибилен)	<b>S</b> или <b>I</b> зона на <b>Rokitamycin</b> с притъпяване на зоната от вътрешната страна до <b>Erythromycin</b> , но <b>R</b> на <b>Erythromycin</b> и <b>Clindamycin</b>
<b>iMLS</b> (истински индуцибилен)	<b>R</b> на <b>Erythromycin</b> , с притъпяване на двете зони на задръжка на <b>Rokitamycin</b> и на <b>Clindamycin</b> от вътрешната страна до диск <b>Erythromycin</b>
<b>sMLS</b> конститутивен <b>MLS</b>	<b>R</b> на <b>Erythromycin</b> ов, <b>Rokitamycin</b> и <b>Clindamycin</b> , без притъпяване на зоните
<b>M</b>	<b>R</b> на <b>Erythromycin</b> , но чувствителен – <b>S</b> към <b>Rokitamycin</b> и <b>Clindamycin</b>

- Конститутивен **MLS** фенотип – **sMLS**. Характеризира се с високи нива на резистентност към всички **MLS** антибиотици.
- Индуцибилен **MLS** фенотип, който може да бъде:
  - ❖ Частичен индуцибилен фенотип, отбелязван като **iMcLS** – индуцибелна резистентност към 16 – членни макролиди (**Rokitamycin**), но конститутивна **R** към линкозамиди (**Clindamycin**). Този индуцибилен фенотип е най-чест сред пневмококите.
  - ❖ Истински индуцибилен **iMLS**. Изолатите показват индуцибелна резистентност към макролиди и клиндамицин – много рядко се среща.

## 4. Серотипиране

### 4.1 Метод на Нойфелд за набъбване на капсулата

Метод на Нойфелд (Neufeld), (Quellung/ Квелунг реакция) е използвана за бързо доказване и типирание на изолираните пневмококи (серотипиране/серогрупиране). Към днешна дата са описани 95 капсулни типа.

Квелунг реакцията се осъществява след взаимодействие между пневмококовите капсуларни полизахариди и тяхното хомоложно антитяло. Положителната реакция е резултат на *in situ* имунопреципитация водеща до промяна на рефракционният индекс и аглутиниране на бактериите.

Използван е Pneumotest кит (Statens Serum Institute, Дания) съдържащ селективни пневмококови диагностични антисеруми. Китът съдържа 12 серума (А до Н, и Р до Т), както и лиофолизиран Тип 1 пневмокок и хомоложен Тип серум 1 като положителна контрола. Пневмококовият антисерум на Statens Serum Institut е заешки.

Пневмококовата култура е инкубирана за 24ч. при 35°C в бульон на TSB – Trypticase Soy Broth с 0.5% конски серум. Една капка (1 - 4 µl) от бульонната култура се пренася на предметно стъкло и се размесва със същото количество от антисерума. Постава се покривно стъкло.

Реакцията е стабилна около 30мин. Наблюдавана е на фазово контрастен микроскоп - увеличение x 100, имерсионни лещи). Ако капсулата е видима и раздута, реакцията е положителна.

#### **4.2 Латекс-аглутинация**

Няколко колонии от 24-часова култура на *S.pneumoniae* са смесвани с антисеруми приложени към латексови частици, върху предметно стъкло. (Pneumotest-Latex, SSI, Дания). Положителната реакция е видима с просто око, ако латекс реагентът съдържа антисерум хомоложен на пневмококовите капсулни полизахариди. Аглутинации наблюдавани след 30 сек. са отчитани като неспецифични, фалшиво положителни реакции.

## **Раздел II. Молекулярно – биологични изследвания**

### **1. Изолиране на тотална бактериална ДНК**

Щамове *S.pneumoniae*, които са резистентни към макролидни антибиотици и представляват обект на по-нататъшни изследвания са подлагани на термична екстракция за изолиране на тотална бактериална ДНК. Пневмококите са култивирани в бульон на Todd-Hewitt (ТНВ) с 0.5 % дрождев екстракт. Със стерилно йозе е събирана от 24 часова ч.к. на съответният щам в 5 ml от ТНВ и

епруветките са вортексирани. Пробите са термостатирани при 35°C за около 6 часа до достигане на оптична плътност  $OD_{620} = 0.7-0.9$  (късна експоненциална/ранна стационарна фаза). Бактериалните култури са разреждани 1:50 с тройно дестилирана вода в епендорфки и се инкубирани на термоблок (Qiagen, Холандия). за 3 мин при 100°C. След това са охлаждани в лед и центрофугирани при 10 000 об /2 мин. Получените термоекстракти позволяват съхранение при температуре от +2°C до +8°C за няколко седмици или при - 20°C най-малко за 6 месеца.

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

Erythromycin-резистентните щамове *S. pneumoniae* са изследвани с полимеразо-верижна реакция за доказване на генетичните детерминанти на макролидна резистентност.

Амплификацията е провеждана в реакционна смес съдържаща 10-кратен PCR-буферен разтвор (50 mM TrisHCl, pH 8.3, 16.6 mM  $(NH_4)_2SO_4$ , 2mM  $MgCl_2$ ) Дезоксирибонуклеотидтрифосфати дНТФ (dNTP) - дАТФ, дГТФ, дТТФ, дЦТФ в еквимоларни количества, общо 800  $\mu$ M в реакционната смес. (Buffer IV, dNTPs, Thermo Scientific, Канада). Допълнително е добавян  $MgCl_2$  в концентрация 2 или 4 mM съответно за *erm*(B) и *mef*(E) гени. (25mM  $MgCl_2$ , Thermo Scientific) Концентрацията за всеки от праймерите е по 10 pmol/ $\mu$ l (Alpha DNA, Канада). Праймерите за *erm*(B) и *mef*(A) гени са публикуваните от Sutcliffe J et al. и са показани в Табл.6.

От Taq-полимеразата са добавяни по 1.25 единици (Abgene Taq DNA Polymerase, 250 U, Thermo Scientific, Канада).

За достигане на крайният обем на реакцията от 50  $\mu$ l е използвана дейонизирана вода. Амплификационната реакция за *erm*(B) ген е приготвена от 15  $\mu$ l реакционна смес и 35  $\mu$ l ДНК матрица, получена след термоекстракцията. За *mef* (E) ген реакцията включва 15.75  $\mu$ l реакционна смес и 34.25  $\mu$ l ДНК матрица. Количествата на реагентите участващи в амплификационните смеси са показани в Табл.7. Амплификацията е провеждана в Gene Pro Thermocycler на Bioer, Китай.



Табл. 7. Амплификационна смес за PCR реакция на *erm*(B) и *mef*(E) гени.

Реагент	Обем за 1 PCR реакция (µl)	
	<i>erm</i> (B)	<i>mef</i> (E)
PCR Buffer	5	5
MgCl <sub>2</sub>	4	8
dNTP смес	0.5	0.5
Tag polymerase	0.25	0.25
Бактериална култура	35	34.25
Праймер F	1.0	1.0
Праймер R	1.0	1.0
д. H <sub>2</sub> O	3.25	-
Общ обем:	50 µl	50 µl

Табл.6. Праймери използвани за амплификация на гени отговорни за макролидна резистентност при *S.pneumoniae*

Ген	Праймер	5'-3' последователност	Размер на продукта (н.д.)
<i>mef</i> (E)	mef_F	5' AGTATCATTAATCACTAGTGC 3'	348 н.д.
	mef_R	5' TTCTTCTGGTACTAAAAGTGG 3'	
<i>erm</i> (B)	ermB_F	5' GAA AAG GTA CTC AAC CAA ATA 3'	639 н.д.
	ermB_R	5' AGT AAC GGT ACT TAA ATT GTT TAC 3'	

Температурният профил за амплификация на *erm*(B) и *mef*(E) фрагменти е представен в Табл.8

Табл.8. Условия за провеждане на дуплекс PCR реакция за *erm*(B) и *mef*(E) гени:

Етап	Температура	Време
Въвеждаща фаза	94 °C	5 мин.
Денатурация	94 °C	1 мин.
35 цикъла	53°C - за <i>erm</i> (B) 55°C - за <i>mef</i> (A/E)	1 мин.
Хибридизация		
Синтез	72°C	1 мин.
Удължаване	72°C	10 мин.
Крайна фаза	4°C	∞

Анализирането на резултатите, получени след амплификацията се извършва с хоризонтална електрофореза. Приготвян е 1 % агарозен гел. Използваната агароза е SeaKem LE Agarose, Lonza, USA, 1 g от нея се прибавяни към 100 ml 10x TBE буфер (Tris/Борова киселина/0.5M EDTA) и е разтопявана до пълна прозрачност в микровълнова печка. Към разтопената агароза са добавяни 10  $\mu$ l - 1% разтвор на интеркалиращ агент-етидиев бромид. След изливане във формата са изчаквани 20-30 мин. за полимеризация. В ямките на гела се накапвани по 8  $\mu$ l PCR продукт и 2  $\mu$ l Loading buffer (Loading buffer DNA I, Applichem, Германия) предварително смесени. Използван е маркер за молекулно тегло PCR Sizer 100 - 1000 bp DNA Ladder, Norgen, Канада. От него са накапвани по 6  $\mu$ l. Електрофорезата протича при 150 mV и е с времетраене 40 мин. След края на електрофорезата пробите са отчитани на UV - илюминатор при 365 nm.

### **3. Рестрикционен анализ за диференциране на генетични варианти на *mef(E)* и *mef(A)* гени**

Бактериалните изолати, за които е доказано с PCR, че съдържат *mef*-ген се подлагат на следващ анализ за диференциране на генетичните варианти *mef(E)* и *mef(A)* с помощта на **RFLP** (restriction fragment length polymorphism)-метод. Амплифицираните *mef* - PCR продукти се пречистват преди да бъдат рестрицирани с NucleoSpin Extract II kit, Clontech Laboratories, Takara Bio Group. В процеса на пречистване ДНК се свързва към силициева мембрана в присъствието на хаотропна сол, добавена чрез буфер NT (100 mM Tris-Cl, pH 9.5). Предварителната подготовка за ДНК свързване включва смесване на 2 обема от буфер NT с 1 обем от ДНК-културата получена от PCR-реакцията в епандорфка. Свързващата смес се пренася директно върху NucleoSpin Extract колонка. Контаминации като соли и разтворими макромолекулни компоненти се премахват чрез етап на измиване с етанолен буфер. Пречистената ДНК накрая се елуира със слабо алкален буфер NE(5 mM Tris/HCl, pH 8.5) при ниски йонни условия. Следва инкубиране на стайна температура за 1 мин. Пречистената ДНК се събира след центрофугиране на 11 000 об. / 1 мин.

Рестрикционният ензим, който е използван за фрагментиране на ДНК при *mef* положителните бактериални изолати е *Vam*HI, NEB. Тази ендонуклеаза няма рестрикционен сайт в *mef* E и има един рестрикционен сайт в *mef* A, като генерира два фрагмента от 284 bp и 64 bp.

Със звезда е обозначено рестрикционното място, в което действа *Vam*HI ензим.

5'...G \* GATCC...3'

3'...CCTAG \* G...5'

Количествата на участващите реагенти в рестрикционната реакция са показани в следващата таблица.

**Табл.9.Количествени отношения на реагентите участващи в рестрикционна реакция на *mef* - PCR продукт**

Реагент	Количество
NEB Buffer 10x	2 µl
<i>Vam</i> HI (10 units)	1 µl
BSA (100x)	1 µl
ДНК	5 µl
H <sub>2</sub> O	1 µl
Краен обем	10 µl

Рестрикционните смеси са инкубирани на термоблок при работната температура на ензима *Vam*HI - 37°C, за цяла нощ.

За визуализиране на крайният резултат от рестрикцията е приготвян 2% агарозен гел (SeaKem® LE Agarose, Lonza, САЩ), използваният маркер е Gene Ruler Low Range DNA Ladder, 25 to 700 bp, Thermo Scientific, САЩ.

Пробите са пускани при напрежение от 110 mV за 1 час, след което са отчитани на UV- илюминатор.

#### 4. Директно автоматично секвениране на *mef* ген

За потвърждаване на резултатите от рестрикционният анализ с *Vam*HI, произволно избрани *mef*-положителни изолати са секвенирани по метода на директното автоматично секвениране на апарат модел ABI3130XL (Applied Biosystems, САЩ).

След отчитане на резултатите от гел-електрофорезата на *mef* - ДНК фрагментите, амплифицираните продукти са пречиствани с *ExoSAP* – разтвор на два хидролитични ензима – екзонуклеаза I и алкална фосфатаза (*ExoSap*, USB, САЩ). С негова помощ са отстранявани останалите в пробите дНТФ, праймери, неспецифични продукти и соли. Към 1.5 µl PCR – продукт е добавян *ExoSAP* разтвор (1,2 µl). Пробите са инкубирани при 37°C за 30 min и 80°C за 15 min. Следващият етап е приготвяне на секвенционната реакция. Използваните компоненти в нея са показани в Табл. 10. Таq - полимеразата е включена в готовият реакционен микс за секвениране.

**Табл.10. Количествени отношения на компонентите участващи в секвенционната реакция на *mef* - PCR продукт**

Компоненти	Количество
пречистен PCR продукт	2.7 µl
5x Sequencing Buffer	2.0 µl
Big Dye Terminator kit	0.4 µl
Праймер F или R (10 pmol)	0.4 µl
дН <sub>2</sub> 0	4.5 µl
Краен обем	10 µl

Използван е Big Dye Terminator kit v 3.1. (Applied Biosystems, САЩ). Секвенционният микс е смесван с пречистеният PCR продукт и праймерът за секвениране. Използваните праймери за секвениране са същите праймери както тези за амплификация на *mef*-ген. Виж Табл.6.

Температурният профил, при който протича секвенционната реакция е показан в следващата таблица.

**Табл.11.Условия за протичане на секвенционна реакция**

Етап	Температура	Време
Въвеждаща фаза	96 °C	5 мин.
Денатурация	96 °C	20 сек.
30 цикъла	55°C	20 сек.
Хибридизация	60°C	2 мин.
Синтез	60°C	5 мин.
Удължаване	60°C	5 мин.
Крайна фаза	4°C	∞

Секвенционният продукт се преутаява чрез преципитация с етанол, EDTA и Na ацетат. (2 µl 3M Na ацетат + 125mM EDTA и 25 µl 95% етанол). След инкубиране на стайна температура за 15 min, продуктите се центрофугират за 20 min при 14 000 rpm, стайна темп. Супернатантата се отстранява. В следващ етап секвенционният продукт се пречиства с добавяне на 35µl 70% етанол към пробата, центрофугира се за 15 min при 14 000 rpm, стайна температура и супернатантата му се отстранява. Утайките, които предварително са изсушавани на тъмно при стайна температура, се разтварят в 12 µl формамид. След вортексиране на пробата, тя се зарежда в секвенатора.

#### 4.1 Анализ на нуклеотидните последователности на *mef*-гените

Сравнителен анализ на получените секвенционни последователности и откриване на нуклеотидните несъответствия, отговорни за разграничаването на *mef*(E) и *mef*(A) е извършван със софтуерна програма FinchTV v 1.4.0, Geospiza Research Team. Нуклеотидните последователности на *mef* гените на изследваните щамове са сравнявани с последователностите на контролните щамове с регистрационни номера U83667 за *mef*(E) и U70055 за *mef*(A), представени в базата данни GeneBank. Чрез BLAST менюто (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). анализирани и контролни щамове са съпоставяни и е отбелязван техният процент хомоложност.

## 5. Молекулярно типирание с PFGE

За представителна сбирка резистентни бактериалните щамове *S. pneumoniae* от еднакъв серотип, е извършено молекулярно типирание с pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) чрез макрорестрикционен анализ на геномната им ДНК.

Методът е време-консумиращ, трудоемък и представен от много етапи.

На първият етап 24 ч. ч.к на *S. pneumoniae* се събира от КА и се инокулира в 5 мл бульон Brain Heart Infusion с 5 % конски серум, предварително инактивиран при 56 °C за 30 мин. Инокуломът се инкубира при 37°C за около 6-7 часа до достигане на оптична плътност OD 0.7 - 0.9 (късна експоненциална /ранна стационарна фаза). Измерванията за OD са правени при 620 nm на спектрофотометър (Воесо S-30 Life Science Analyser, ВОЕСО, Германия).

На следващият етап се извършва промиване на бактериалните култури. Те се пренасят в 15 ml градуирани епруветки и се центрофугират при 4000 rpm/ 4 °C за 15 мин. След отстраняване на супернатантата, бактериалната утайка се ресуспендира с 1ml охладен при 4 °C PIV буфер. (Съставът и концентрацията на всички участващи буфери е представен в Табл.12.)

PIV - суспензиите се прехвърлят в 1.5 ml епендорфки и се центрофугират отново, но при 10 000 rpm/ 4 °C за 5 мин.

След отстраняване на супернатантата следва етап на коригиране на клетъчната концентрация. Бактериалните утайки се ресуспендират със 100 µl PIV до приблизителен обем от 110 - 130 µl. Клетъчните суспензии се измерват на спектрофотометър при OD 620 nm и към всяка епендорфка се добавя PIV до получаване на OD 5.0 по формулата:

$$V_{\text{add}}(\mu\text{l}) = \text{OD} * 40 * 110) - 110$$

$$\frac{\text{OD} \times 200}{500} = \frac{V_{\text{add}} + 240}{240}$$

OD – оптична плътност измерена в кюветата

200 - разреждане в кюветата (5 µl от клетъчната суспензия в 1 ml PIV буфер)

OD x 200 – истинската OD на бактериалната култура (в 240 µl PIV буфер) в в епендорфката

5.0 – желаната крайна OD на бактериалната суспензия в епендорфката

$V_{add}$  – обемът в  $\mu\text{l}$ , който трябва да се пресметне и добави към епендорфката за получаване на OD 5.0

240 – първоначалният обем ( $\mu\text{l}$ ) на бактериалната суспензия в епендорфката

$V_{add} + 240$  - краен обем от бактериалната суспензия в епендорфките след добавянето на допълнителен PIV буфер

Критичен етап е приготвянето на ДНК агарозни дискове. За тях е използвана Low melting PFGE agarose 0.15g (USB Corp, САЩ), добавена към 10ml PIV. Разтопената агароза е съхранявана при 42°C на термоблок за най-малко 10 мин. преди нейното използване. С цел уеднаквяване на температурата клетъчните суспензии са инкубирани при същата температура. С бързо отпипетиране еднакви обеми от разтопената агароза и клетъчната суспензия за смесвани, вортексирани и накапвани в общ обем от 15 $\mu\text{l}$ . Агарозните дискове са пренасяни за 5мин. в хладилна камера при - 20 °C.

Следва лизиране на клетките. Използван е EC lysis solution (Табл.12.), в който агарозните дискове са инкубирани при 37°C на водна баня за най-малко 6 часа докато станат прозрачни.

За премахване на протеините от клетките, след отдекантиране на EC lysis solution, е прилагано третиране с Proteinase K. Използван е по 1ml ESP solution (Табл.12.), за всяка епруветка с ДНК-дискове. Инкубирането с този буфер е при 50 °C на водна баня за цяла нощ.

Последен етап от приготвянето на ДНК-агарозните дискове е промиване в 13 ml TE буфер. Процедурата трае 30 мин и се повтаря задължително поне 5 пъти, като епруветките с агарозни дискове се поставяни на люлееща се платформа. ДНК-агарозните дискове могат да бъдат съхранявани в TE-буфер (Табл.12.), при 4 °C за 2-3 месеца, като е необходима периодична подмяна на TE-буфера.

Рестрикцията на ДНК е осъществявана с ендонуклеза SmaI (20,000 units/ml, NEB, USA) Първоначално в епендорфка са поставяни по 1-2 агарозни диска от всеки бактериален изолат за престояване в 300 $\mu\text{l}$  SmaI рестрикционен буфер за 30мин. при стайна температура.

След това време буферът е отдекантиран и е поставяна реакционна смес от 45  $\mu$ l SmaI рестрикционен буфер (Табл.12.) и 20U SmaI за всеки диск. Инкубирането е за цяла нощ при работната температура на ензима - 25°C.

За прекъсването на рестрикционната реакция е използван loading buffer, добавян по 5  $\mu$ l към всяка проба.

За пулсовата електрофореза е използван 0.8% гел (SeaKem Gold agarose, Lonza, САЩ) приготвен с 0.5M TBE буфер. За полимеризация на гела са необходими около 30 мин.

ДНК-диските се поставяни надолу и към предната стена на съответните места в гела. PFGE-маркерът (Lambda Ladder PFG Marker, 50 $\mu$ g/ml, 50-1,000 kb, NEB, USA) е срязван със скалпел и поставян в началото и края на пробите. В средата е поставян контролен щам *S.pneumoniae* R6. Пробите са покривани с разтопена Sealing agarose (Табл.12.) за „запечатване“ на диските вътре в гела.

Подготовката на апаратурата за PFGE (Amersham Biosciences, Швеция) започва с включване на охлаждащата система и програмирането и за поддържане на температура от 11°C за цялото време на електрофорезата. За достигане на температурата са необходими около 30 мин.

В основния модул от апаратурата бяха добавяни около 2.2 L 0.5M TBE буфер, и агарозният гел се поставяше в него ориентиран на изток. Последен бе поставян шестгонален електрод, като най-големият електрод трябва да е ориентиран също в източната посока.

Програмата за PFGE се зарежда в Gene-navigator система. PFGE за *S. pneumoniae* беше оптимизирана да работи в две интерполационни фази от 1 до 30 пулсови времена променящи се за 22 часа.

Параметрите за напрежението бяха задавани в Power supply модул (EPS 601, Amersham, Biosciences, Швеция). Пулсовата електрофорезата протичаше при 165 mV.

След изтичането на електрофорезата, всички модули на апаратурата се изключваха и гелът се прехвърляше за оцветяване в порцеланова ваничка с 300 ml 0.5M TBE и 300  $\mu$ l етидиев бромид за около 30 – 40 мин. След това време гелът се поставяше на UV-илюминатор за визуализиране на резултатите от PFGE.



На следващата таблица са представени състава и количествените съотношения на участващите реагенти при изпълнението на пулсовата електрофореза за щамове *S. pneumoniae*.

**Табл. 12. Състав и количества на реагентите, участващи при PFGE**

<b>Реагент</b>	<b>Състав</b>	<b>Количество</b>
<b><u>PIV buffer</u></b> <b>pH 7.0</b>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> д. H <sub>2</sub> O	15.5 ml 9.5 ml До 1L
<b><u>EC lysis solution</u></b> <b>pH 8.0</b>	RNase A 1M Tris pH 8.0 NaCl 0.5M EDTA Na deoxycholate Na laurylsarcosine Brij 58 д. H <sub>2</sub> O	75 µl 3ml 29.2 g 100ml 1g 2,5g 2,5g до 500ml
<b><u>ESP solution</u></b> <b>pH 9.0</b>	Proteinase K 1M EDTA NaOH pH 9.0 Sarcosyl д. H <sub>2</sub> O	15 mg 93.1g 10g 5g до 500ml
<b><u>SmaI buffer- в същия ден!</u></b> <b>pH 8.0</b>	preSma buffer меркаптоетанол	15 ml 6.3 µl
<b><u>preSma buffer</u></b> <b>pH 8.0</b>	1M Tris KCl MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O д. H <sub>2</sub> O	3ml 0.7456g 0.61g до 500ml
<b><u>TE buffer</u></b> <b>pH 8.0</b>	1M Tris pH 7.5 0.5M EDTA д. H <sub>2</sub> O	10ml 2ml до 1L
<b><u>0.5 M TBE buffer</u></b> <b>pH 8.3</b>	10x TBE д. H <sub>2</sub> O	110ml до 1.1L
<b>Sealing agarose</b>	Low Melting Agarose 0.5M TBE	0.075 g 10 ml

## 6. Мултилокусно секвениране, MLST (multilocus sequence typing)

Бактериалните щамове принадлежащи към 19А серотип бяха анализирани с мултилокусно секвениране (MLST, multilocus sequence typing). На 7 постоянно присъстващи при *S. pneumoniae* гени (housekeeping genes) бяха определени алелните профили и принадлежността към съответен секвенционен тип, което осигурява данни за проследяване на еволюционната биология на вида.

### PCR амплификация за 7 консервативни локуса при *S.pneumoniae*

След термична екстракция на ДНК, за всеки щам са изпълнени по 7 различни PCR амплификации. В главната реакционна смес (Табл.13) са прибавяни всички реагенти, с изключение на праймерите и ДНК културата.

Табл.13. Компоненти участващи в главната реакционна смес за MLST-PCR.

Компонент	Количество
PCR буфер 1	5 µl
дНТФ	4 µl
дест. Н <sub>2</sub> О	3.75 µl
Таq ДНК полимераза	0.25 µl
Краен обем	13 µl

Към всяка епендорфка с реакционна смес са добавяни допълнително 35µl ДНК култура и 2 µl праймеров микс (праймери Metabion, Германия).

Седемте консервативни гени са:

*aroE* (шикимат дехидрогеназа)

*gdh* (глюкозо-6-фосфат дехидрогеназа)

*gki* (глюкозо-киназа)

*recP* (транскетолаза)

*spi* (сигнална пептидаза I)

*xpt* (ксантин фосфорибозилтрансфераза)

*ddl* (D-аланин-D-аланин лигаза)

Праймеровите двойки използвани за PCR амплификация на тези гени са публикуваните от M.Enright и B.Spratt (51) и са показани в Табл .14.

**Табл.14. Праймери за MLST - PCR за 7-те консервативни локуса при *S.pneumoniae***

Локус	Праймер	5'-3' последователност	Размер на продукта (н.д.)
<i>aroE</i>	aro_F	5'-GCC TTT GAG GCG ACA GC -3'	405 н.д.
	aro_R	5'-TGC AGT TCA (G/A)AA ACA T(A/T)T TCT AA-3'	
<i>gdh</i>	gdh_F	5'-ATG GAC AAA CCA GC(G/A/T/C) AG(C/T) TT-3'	459 н.д.
	gdh_R	5'-GCT TGA GGT CCC AT(G/A) CT(G/A/T/C) CC- 3'	
<i>gki</i>	gki_F	5'-GGC ATT GGA ATG GGA TCA CC -3'	483 н.д.
	gki_R	5'-TCT CCC GCA GCT GAC AC -3'	
<i>recP</i>	rec_F	5'-GCC AAC TCA GGT CAT CCA GG-3'	448 н.д.
	rec_R	5'- TGC AAC CGT AGC ATT GTA AC -3'	
<i>spi</i>	spi_F	5'-TTA TTC CTC CTG ATT CTG TC -3'	472 н.д.
	spi_R	5'-GTG ATT GGC CAG AAG CGG AA -3'	
<i>xpt</i>	xpt_F	5'-TTA TTA GAA GAG CGC ATC CT -3'	486 н.д.
	xpt_R	5'-AGA TCT GCC TCC TTA AAT AC- 3'	
<i>ddl</i>	ddl_F	5'-TGC (C/T)CA AGT TCC TTA TGT GG -3'	441 н.д.
	ddl_R	5'-CAC TGG GT(G/A) AAA CC(A/T) GGC AT -3'	

Условията за провеждане на MLST - PCR за 7-те консервативни локуса при *S.pneumoniae* са показани в следващата Табл.15.

**Табл.15. Температурен профил на MLST - PCR за 7-те консервативни локуса при *S.pneumoniae***

Етап	Температура	Време
<b>Въвеждаща фаза</b>	94 °C	4 мин.
Денатурация	94 °C	30 сек.
<b>30 цикъла</b>	Хибридизация	55°C
	Синтез	72°C
Удължаване	72°C	10 мин.
Крайна фаза	4°C	∞

Отчитането на резултатите от амплификацията е след гел-електрофореза с 2% агарозен гел (SeaKem LE agarose, Lonza,USA), за 1 час, при 110 mV. Използван е маркер за молекулно тегло PCR Sizer 100 - 1000 bp DNA Ladder, Norgen, Канада.

PCR продуктите са пречистени и обработени по описаната процедура в Директно автоматично секвениране. Секвенциите са получени и от двете ДНК вериги - F и R. Анализирането на секвенциите е осъществявано със софтуерна програма FinchTV v 1.4.0.

#### **Подаване на секвенциите в базата данни за MLST.**

За всеки шам са получени по 7 консенсусни последователности, по една за всеки локус *aroE*, *gdh*, *gki*, *recP*, *spi*, *xpt*, *ddl*. В базата данни от <http://www.mlst.net/databases/default.asp> за *S.pneumoniae* се избира Multiple locus. Всяка секвенция се поставя в съответния прозорец и след коректно въведени данни се получава седем-буквен код, отговарящ на алелния профил на щамовете. Информацията позволява директно сравняване с другите бактериални изолати в [www.mlst.net](http://www.mlst.net).

## 7. Анализ с e-BURST алгоритъм

Чрез e-BURST алгоритъмът е определен клоналния произход на щамове *S. pneumoniae* и са идентифицирани родствени генотипове в пневмококовата популация при сравнение с международната база данни MLST. Използваната версия е e-BURST v.3. <http://eburst.mlst.net/> С въведените данни, по зададеният алгоритъм е начертана радиална диаграма показваща произхода на откритите генотипове. Бактериалните щамове са разделени в групи според техните алелни профили, преброени са единичните локусни варианти Single Locus Variants (SLV) и двойните локусни варианти Double Locus Variants (DLV) на получените секвенционни типове. Идентифициран е предполагаемият първоизточник на наследствените типове.

## 8. Сравняване на получените резултати от e-BURST софтуерният анализ с Pneumococcal Molecular Epidemiology Network (PMEN)

Глобалното наблюдение на антибиотично - резистентни *S. pneumoniae* и стандартизация на номенклатурата и класификация на резистентни клонове по света се извършва в PMEN. <http://web1.sph.emory.edu/PMEN/index.html>. Получените секвенционни типове са сравнени в PMEN с класифицирани международни клонове с широко географско разпространение.

## 9. Статистическа и софтуерна обработка на данните

Изготвянето на кълстерният анализ на пробите от макрорестрикционният анализ с PFGE е извършено чрез построяване на дендрограма чрез алгоритъм посочен в <http://genomes.urv.cat/UPGMA/>.

За построяването на клоналните комплекси въз основа на данните от MLST анализа е използвана софтуерна програма eBurst V.3.

За изчисляване на статистическа значимост бе използван P- стойност. <http://www.socscistatistics.com/pvalues>.

За намиране на статистическа корелация между използваните методи за молекулярно типичане е използван алгоритъм представен в <http://biomath.itqb.unl.pt/ClusterComp>.

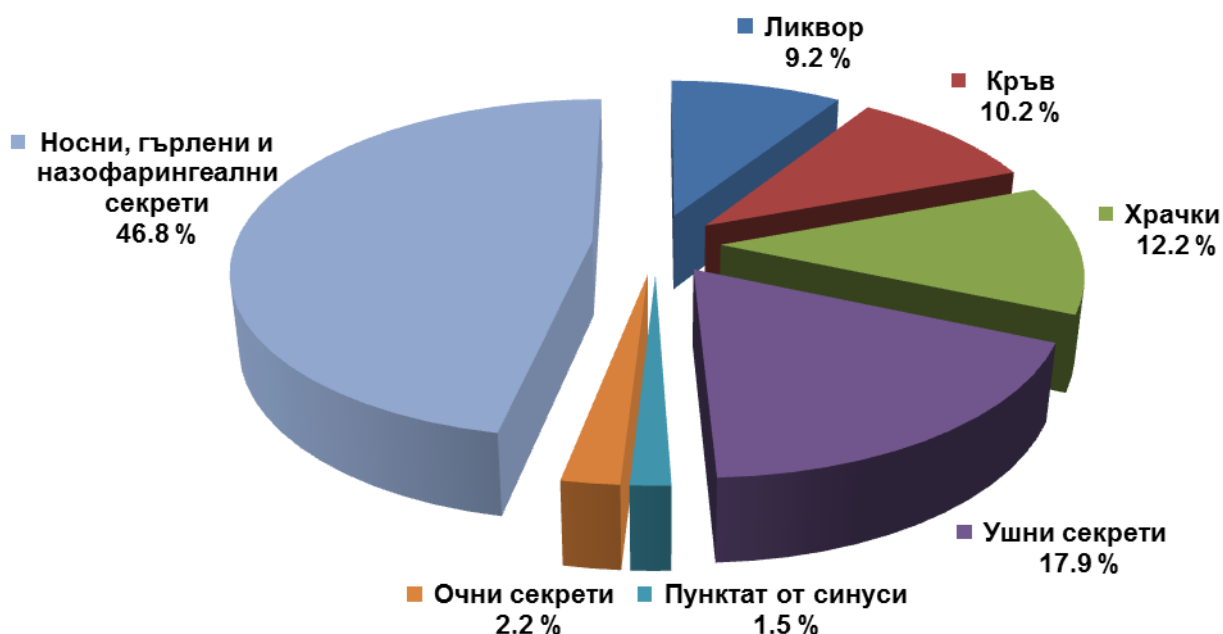
## ГЛАВА V. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

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

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.

Щамовете *S.pneumoniae* са изолирани от разнообразни клинични материали. На Графика 1 е показано разпределението на материалите, от които са изолирани щамовете *S.pneumoniae*.

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



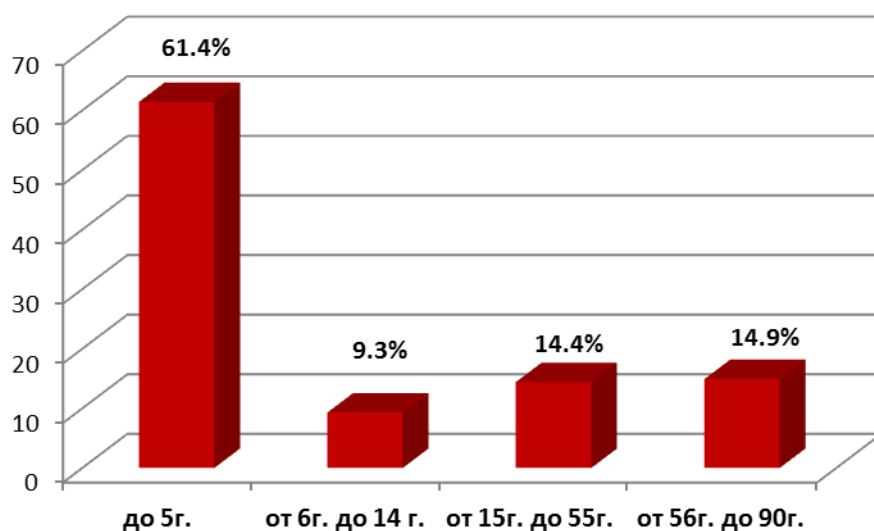
Инвазивните щамове (изолирани от стерилни области на човешкото тяло - кръв, цереброспинална течност, аутопсичен материал, бронхоалвеоларни лаважи, ендотрахеални аспирати, плеврални течности) представляваха 19.3% (n=114) от всички изследвани клинични материали. Най-честите прояви на инвазивни обществено-придобити 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%). Щамовете бяха изолирани от ушни секрети на пациенти с отоскопично потвърден остър среден отит (АОМ) взети от специалист по УНГ болести след спонтанна руптура на тъпанчевата мембрана или след тимпаноцентеза.

Останалите материали бяха проби от респираторен тракт: храчки (n=72; 12.2%), носни, гърлени, и назофарингеални секрети (n=277; 46.7%) и аспирати от синуси (n=9, 1.5%). Респираторните изолати са най-широко представени и общо съставляват 62.7% от колекцията пневмококови щамове. Пациентите, от които бяха изолирани са с инфекции на горни и долни дихателни пътища, като сред инфекциите на горни дихателни пътища най – голям брой са случаите на фарингити и синусити, а сред инфекциите на долни дихателни пътища най-голям беше броят на пациентите с пневмонии и хронична обструктивна белодробна болест (ХОББ). Малка част от щамовете бяха изолирани от очните секрети на пациенти с конюнктивит (n=13, 2.2%).

Пневмококови щамове бяха изолирани от всички възрастови групи – пациенти на възраст от 1 месец до 90 години. На следващата графика е представено възрастовото разпределение на пациентите, от които са изолирани пневмококовите щамове.

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



Най-голям беше дялът на пациентите в детска възраст до 5г. – 363 пациенти, (61.4%). В групата до 14г. бяха изолирани 55 щама (9.3%). Пациентите на възраст между 15г. - 55г. с пневмококови заболявания бяха 85, или 14.4%. Щамовете, изолирани от възрастни пациенти след 56г. бяха 88 на брой (14.9%).

Пневмококовите заболявания са най-характерни за малките деца и възрастните, защото те имат ниски нива на защитни антитела насочени срещу пневмококовите капсуларни полизахариди.

Пневмококите са важни причинители на редица сериозни заболявания при човека като придобита в обществото пневмония, менингит и сепсис. Честа причина са за възпаления на средното ухо и синусити. *S.pneumoniae* може да причини също ендокардит, спонтанен бактериален перитонит, септичен артрит, миозит, перикардит, остеомиелит.

Бактериалните менингити се срещат при всички възрасти, но засягат предимно деца. Бактериалният менингит причинен от *S.pneumoniae* води до смъртност и неврологични дефицити в 4 до 20 пъти повече в сравнение с менингити причинени от други микроорганизми (30).

Пневмококовата пневмония обикновено е асоциирана с по-ниските лобове на белите дробове (лобарна пневмония). При децата и възрастните се генерализира



бронхопневмония. Средната смъртност е 5%, но тя варира в зависимост от серотипа на микроорганизма, от възрастта и заболяването на пациента (32). Смъртността е в по-висока степен при по-възрастни пациенти и пациенти с доказана бактериемия. При пациенти с дисфункция на слезката или спленектомия заболяването е асоциирано с фул минантен курс и висока степен на смъртност.

Абсцеси обикновено не се формират при пациенти с пневмококова пневмония, с изкл. на тези, при които са доказани специфични серотипове (напр. серотип 3). Плеврални кръвоизливи се наблюдават при 25% от пациентите с пневмококова пневмония, рядко усложнение е емпием.

Инфекцията на средното ухо (otitis media) се среща обикновено при деца, но бактериален синусит има при пациенти от всякакви възрасти.

Бактериемията се случва в 25 до 30% при пациенти с пневмококова пневмония и в повече от 80% при пациенти с менингит (188).

По данни на СЗО към 2006 г. ежегодно около 1.6 млн. човека умират от пневмококова инфекция, при това 0.7 - 1 милион от смъртните случаи са при деца под 5 години, най-вече в страни с ограничени ресурси (29). В Европа и Северна Америка *S.pneumoniae* е водещ причинител на придобитата в обществото пневмония при възрастни (200 - 400 случая на 100 000 души от населението). В тези региони, честотата на инвазивна пневмококова болест варира от 10 до 100 случая на 100 000 души от населението (188).

## **II. Микробиологични изследвания**

### **1. Чувствителност към антимикробни лекарствени средства**

Определянето на чувствителността на микроорганизмите към антибиотици е неразделна част от диагностичният процес в микробиологичните лаборатории.

Инвазивните и респираторни инфекции, причинени от *S.pneumoniae* са абсолютна индикация за антибиотична терапия.

Направен е анализ на активността на 15 вида АМЛС за 591 щама *S. pneumoniae* изследвани за периода: 2006-2013г. Анализът включва определяне на МИК (минимална инхибираща концентрация) стойностите, които потискат съответно 50% и 90% от бактериалните изолати, диапазон на МИК стойностите и

интерпретация на антибиотичната чувствителност на щамовете за конкретният АБП. (Таблицы 16,17,18). Анализът на данните е направен според критериите на CLSI документите (M100-S23, 2013), (37).

В следващата таблица са показани резултатите от изследването на МИК за инвазивните щамове *S. pneumoniae*.

**Табл.16. 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 (%)
<b>Penicillin G</b>						
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)
<b>Ceftriaxone</b>						
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)
<b>Cefuroxime sodium (114)</b>	0.12	4	≤ 0.01 - 16	94 (82.5)	1 (0.9)	19 (16.6)
<b>Ampicillin</b>						
Други инвазивни (60)	0.12	2	≤ 0.12 - ≥ 8.0	54 (90.0)	1 (1.7)	5 (8.3)
<b>Amoxicillin-clavulanic acid</b>						
Други инвазивни (60)	0.06	2	≤ 0.03 - ≥ 8	54 (90.0)	4 (6.7)	2 (3.3)
<b>Erythromycin (114)</b>	0.25	64	≤ 0.03 - ≥ 64	89 (78.0)	-	25 (22.0)
<b>Clarithromycin (114)</b>	0.25	64	≤ 0.03 - ≥ 64	89 (78.0)	-	25 (22.0)
<b>Clindamycin (114)</b>	0.03	64	≤ 0.03 - ≥ 64	90 (78.9)	-	24 (21.1)
<b>Levofloxacin (114)</b>	0.25	2	≤ 0.25 - 2	114 (100.0)	-	-
<b>Meropenem (50)</b>	0.06	1	≤ 0.06 - 2	40 (80.0)	3 (6.0)	7 (14.0)
<b>Tetracycline (114)</b>	0.5	4	≤ 0.25 - 64	81 (71.0)	1 (0.9)	32 (28.1)
<b>Chloramphenicol (114)</b>	2	4	≤ 0.5 - ≥ 16	106 (93.0)	-	8 (7.0)
<b>Rifampin (114)</b>	0.03	0.06	≤ 0.03 - 0.12	114 (100.0)	-	-
<b>Trimeth-sulfameth (114)</b>	0.25	32	≤ 0.25 - 32	59 (51.8)	9 (7.9)	46 (40.3)
<b>Vancomycin (114)</b>	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.

Общият брой на чувствителните към всички тестувани антибиотици щамове е 50 (43.8%).

При инвазивните щамове *S.pneumoniae* изолирани от цереброспинална течност, стойностите на МИК на Penicillin G и Ceftriaxone са отчетени спрямо критериите за менингит, не-менингитните критерии са използвани за щамовете от

други стерилни области (37). Penicillin - нечувствителните инвазивни *S. pneumoniae* щамове бяха 21 (18.4%). По - високите нива на резистентност към Penicillin (27.8%) при пневмококовите щамове от пациенти с менингит са поради нововъведените ниски гранични стойности (37).

Тревожна е нечувствителността към цефалоспорици от трето поколение – Ceftriaxone, (13.0%) при щамове, изолирани от пациенти с менингит и (11.7%) при пневмококите изолирани от други стерилни области. При менингитните изолати преобладава междинна резистентност към Ceftriaxone. Щамове с намалена чувствителност към второгенерационни цефалоспорици - парентерален Cefuroxime бяха общо (17.5%).

В новия CLSI (M100-S23, 2013г.) няма указани критерии за Amoxicillin и Amoxicillin-clavulanic acid за изолати от менингит и нечувствителността към тези антибактериални препарати е анализирана само за не-менингитните инвазивни изолати (60 щамове). Нечувствителността към Ampicillin и Amoxicillin-clavulanic acid беше съответно по 10.0%, като делът на интермедиерните щамове е по-голям при Amoxicillin-clavulanic acid (6.7%).

Erythromycin и Clarithromycin не се различаваха по ниво на активност (22.0% нечувствителни щамове). Нивото на активност на Clindamycin беше малко по-високо от това на макролидите и резистентните щамове бяха 21.1 %.

Високо ниво на резистентност беше отбелязано към Tetracycline (29.0%), което потвърждава проучванията за свързани генетични елементи кодиращи тетрациклинова и еритромицинова резистентност.

Голям брой от инвазивните щамове показаха чувствителност към Chloramphenicol – 106 щамове (93.0%). По отношение на активността на Trimethoprim-sulfamethoxazole почти половината показаха нечувствителност (48.2%). Активността към Meropenem е изпитвана към общо 50 на брой щамове и нечувствителност беше открита при 10 щамове (20.0%). Всички тествани щамове показаха чувствителност към Levofloxacin и Rifampin. Нечувствителни пневмококи към Vancomycin също не бяха намерени. Резултатите показаха, че Penicillin G, Ampicillin, Amoxicillin-clavulanic acid са активни АБП с високи нива на чувствителност-90.0%, а флуорохинолоните са 100.0% активни за лечението 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.

Данните за антибиотичната чувствителност на 106 щамове *S. pneumoniae* от ексудати от средно ухо са представени в Таблица 17.

**Табл.17. Антимикробна чувствителност на 106 щамове *Streptococcus pneumoniae* изолирани от ексудат от средното ухо при пациенти с остър среден отит.**

Антибиотици	МИК ( $\mu\text{g/mL}$ )			Чувствителност		
	МИК50	МИК90	МИК диапазон	S n (%)	I n (%)	R n (%)
Penicillin V <sup>a</sup>	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 - $\geq 16$	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 - $\geq 64$	49 (46.2)	-	57 (53.8)
Clarithromycin	2	64	0.03 - $\geq 64$	49 (46.2)	-	57 (53.8)
Clindamycin	0.25	64	0.03 - $\geq 64$	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**<sup>a</sup> Стойностите се отнасят за “орален” penicillin (penicillin V)

Най-висока антимикробна активност сред пневмококовите 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 щамовете, като от тях пневмококите с висока степен на резистентност към Penicillin (MIC  $\geq 2 \mu\text{g /mL}$ ) бяха 29.2%.

Щамовете, които показаха нечувствителност към Amoxicillin и Amoxicillin-clavulanic acid бяха съответно 11.4% и 9.4%. Високи нива на нечувствителност бяха регистрирани към цефалоспорини от втора генерация – Cefuroxime (28.3%). При цефалоспорини от трета генерация нечувствителните *S.pneumoniae* бяха значително по-малко (6.6%). Повече от половината щамове (53.8%) показаха нечувствителност към макролиди. Почти всички пневмококи показаха чувствителност към флуорохинолони (Levofloxacin), като само два щамове бяха с междинна резистентност - (1.9%). 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%.

Щамовете *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% (P-стойност < 0.00001. Резултатът е сигнификантен при  $p < 0.05$ ) и 53.8% срещу 22.0% (P-стойност < 0.00001. Резултатът е сигнификантен при  $p < 0.05$ ), съответно.

Резултатите от изпитването на антибиотична активност при щамове *S.pneumoniae* от пациенти с инфекции на горни и долни дихателни пътища и конюнктивит, са обобщени в Таблица 18.

**Табл.18. Антимикробна чувствителност на 371 щама *Streptococcus pneumoniae* изолирани от хрчка, синус, горни респираторни материали (назофаринкс, гърлени, носни секрети) и очни секрети**

Антибиотици	МИК ( $\mu\text{g/mL}$ )			Чувствителност		
	МИК50	МИК90	МИК диапазон	S n (%)	I n (%)	R n (%)
Penicillin V <sup>a</sup>	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 - $\geq 8$	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 - $\geq 64$	214 (57.7)	1 (0.3)	156 (42.0)
Clarithromycin	0.12	64	0.03 - $\geq 64$	216(58.2)	1 (0.3)	154 (41.5)
Clindamycin	0.06	64	0.03 - $\geq 64$	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<sup>a</sup>** Стойностите се отнасят за “орален” penicillin (penicillin V)

Penicillin - нечувствителните щамове *S.pneumoniae* изолирани от пациенти с инфекции на горни и долни дихателни пътища бяха (59.8%). Най-висока пеницилинова нечувствителност сред всички респираторни щамове *S.pneumoniae* беше доказана за пневмококите изолирани от носни, гърлени и назофарингеални секрети (48.2%), като от тях делът на щамовете с междинна чувствителност беше (27.2%). Penicillin – нечувствителните щамове изолирани от хрчки бяха (8.9%), а

от пункти от синуси бяха (1.1%). Пневмококовите Penicillin-нечувствителни щамове от пациенти с конюктивит бяха (1.6%).

Резултатите за чувствителността към Ampicillin, Amoxicillin и Amoxicillin-clavulanic acid показаха висока антибактериална активност на тези препарати. Данните за тези АБП бяха идентични и показаха съответно само 6.2% резистентни щамове, като разпределението на напълно резистентни и междинно резистентни пневмококи беше почти по равно.

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%).

Макролидна резистентност беше открита при 42.0% от пневмококовите щамове от респираторни материали, като най-висок процент беше отчетен за щамове от носни, гърлени и назофарингеални секрети – (35.6%), следван от (4.8%) за щамове от хрчки, и тези от пункти от синус – (0.8%). При пневмококовите щамове от очни секрети еритромицинова резистентност беше наблюдавана в 0.8% от случаите. По отношение на Clindamycin, общата резистентност от 27.5% беше разпределена, както следва: носни, гърлени и назофарингеални секрети – 21.8%, хрчки – 4.3%, пункти от синус – 0.8%, очни секрети – 0.5%.

Малък процент от респираторните щамове показаха нечувствителност към флуорохинолони (Levofloxacin) – 3.3%, като само два щамове бяха напълно резистентни - 0.6%.

Най-високи нива на резистентност към АБП бяха регистрирани към Tetracycline - 46.9% и Trimethoprim-sulfamethoxazole - 65.2%.

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 пневмококовите щамове от ексудати от средно ухо – 66.0%.

Най – високо ниво на нечувствителност към цефалоспорини 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%).

Основният проблем с антимикробната резистентност при *S. pneumoniae* в световен мащаб е нечувствителност към Penicillin и макролиди (13,23,64,109,129) и България не прави изключение. Първо средство на избор за лечението на пневмококовите заболявания у нас са бета - лактамните антибиотици (56.4% през 2011г.) (189). Другите широко използвани у нас алтернативни препарати са антибиотиците от MLS – групата (17% през 2011) (189), заради тяхната добра поносимост и широк спектър на действие. Точно поради широката употреба на тези антибактериални препарати ефективността на тези антибиотици се ограничава от бързото образуване и разпространение на бактериална резистентност при *S.pneumoniae*, както е и за някои други класове антибиотици (Tetracycline и Trimethoprim-sulfamethoxazole).

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 ( $\geq 0.12$  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  $\geq 2$  mg/mL).

За сравнение с периода 2001г.-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 щамовете, а с високи нива (МИК,  $\geq 2$  mg/mL) – при 13.7% (155).

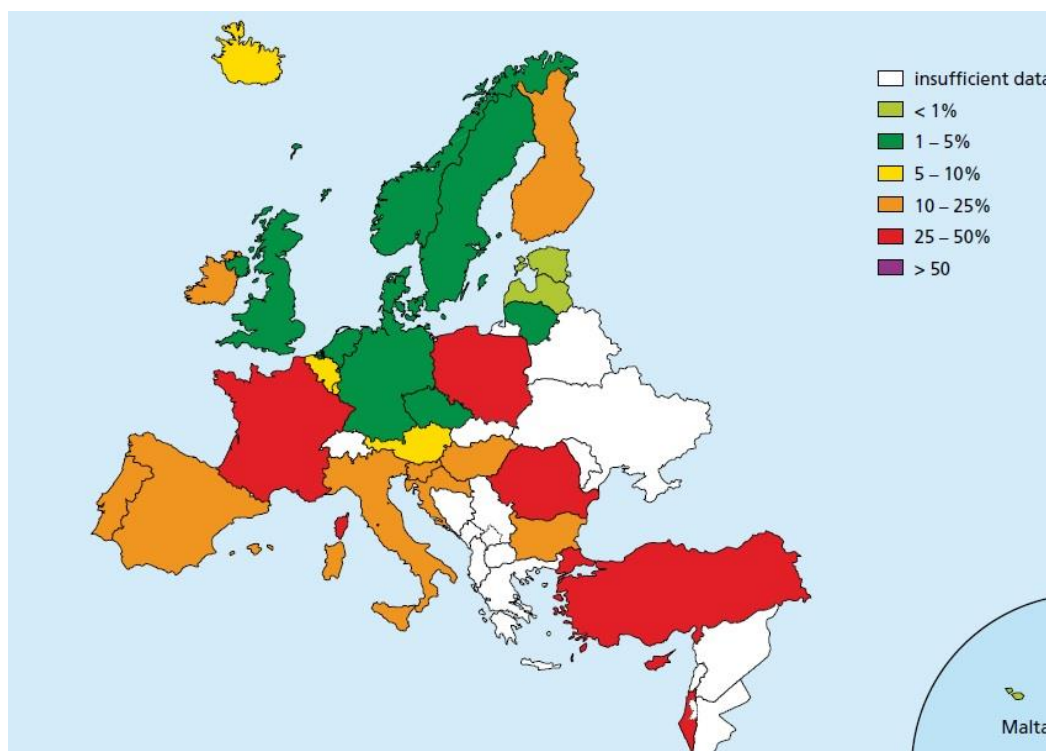
За периода 1991-1993г. нечувствителност към Penicillin са показали 24.3% от 296 изследвани пневмококови щамове (154).

Нивата на интермедиерно - резистентните и високо - резистентните пневмококови щамове към Ceftriaxone за същият период (2001г. – 2005г.) са били (2.7%) и (1.2%) (155). Тези стойности са значително по-ниски от стойностите за интермедиерно - резистентните и високо - резистентни щамове към Ceftriaxone – (24.0%) и (11.1%), намерени съответно за периода 2006г. - 2013г.

Получените данни за състоянието на антимикробната резистентност на клинични изолати *S.pneumoniae* изследвани в България ни позволява да сравним нашите резултати с международните изследвания (153-155). Като цяло нивото на пеницилинова резистентност при щамовете *S.pneumoniae* в България в сравнение с други региони по света е високо. На Фигура 10 са представени обобщени данни за нивата на Penicillin – нечувствителни инвазивни щамове *S.pneumoniae* в европейските страни.

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

**Фиг.10. Данни за честотата на инвазивните Penicillin - нечувствителни щамове *S.pneumoniae* в европейските страни (%), 2007г.**



The European Observatory on Health Systems

В по-голямата част от северните европейски страни, нивата на Penicillin – нечувствителните *S.pneumoniae* са под (5.0%); изключенията са Белгия (9.0% ), Финландия (13.0%) и Ирландия (17.0%). Нивата на Penicillin – нечувствителните



пневмококи са значително по-високи в Южна и Източна Европа, като достигат до над (25.0% ) в Кипър, Франция, Полша, Румъния и Турция (126).

От мащабно проучване през 2007 г. EARSS заключи, че най-високи нива на Penicillin – нечувствителни *S.pneumoniae* са регистрирани в Испания, Франция и Израел. В последните години нивото на Penicillin – нечувствителните *S.pneumoniae* във Финландия и Турция се е покачило значително и делът на напълно резистентни *S.pneumoniae* изолати бележи ръст в Ирландия, Словения и Турция.

Данни за разпространението на Penicillin-нечувствителни (МИК Pen  $\geq$  2 mg/mL) щамове от проучвания от последните две-три години на съседните на нас балкански държави показват също повишени нива: Турция - (50.0%) (9), Сърбия – (34%.0) (63), Румъния – (32.6%) (131), Гърция (39.5%) (72). В България нивото на Penicillin-нечувствителните щамове е (52.9%) и изпреварва съседните балкански държави в това отношение.

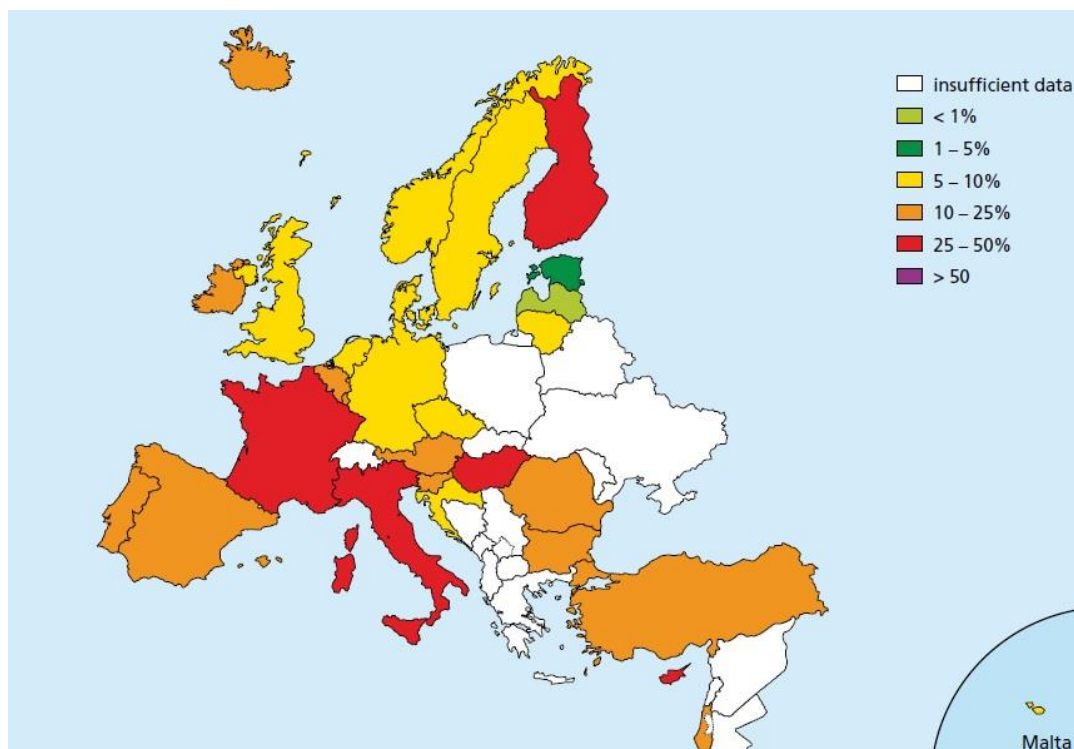
Макролидната резистентност е другият значим проблем както в глобален план, така и за нашата страна.

В България за периода от 2001г. до 2005г. е отчетено ниво на Erythromycin – резистентни пневмококови щамове от (24.7%), а Clindamycin – резистентни са били (10.7%) от пневмококите (156). За периода 2006г. - 2013г. резултатите показват почти двойно нарастване на Erythromycin – резистентните *S.pneumoniae* за изследваните 591 щама (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).

Данните показват, че за последните години България в сравнение с другите балкански държави се нарежда на водещо място по отношение на високия брой Erythromycin - резистентни щамове *S. pneumoniae*. В съседните на България държави в проучвания от последните години са докладвани следните нива на еритромицинова резистентност: Гърция (24.0%) (72), Турция - (26.4%),(75), Русия – (26.5%) (116), Сърбия (36.0%) (63), Румъния – (30.9%) (131).

Обобщени данни за нивата на инвазивните Erythromycin-резистентни щамове *S.pneumoniae* в Европейските страни са показани на Фигура.11.

**Фигура 11. Данни за честотата на инвазивните Erythromycin – резистентни щамове *S.pneumoniae* в европейските страни (%), 2007г.**



The European Observatory on Health Systems

Делът на инвазивните Erythromycin - резистентни щамове *S.pneumoniae* от пневмококовата колекция за проучвания период 2006г. – 2013г. беше (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%). Както следва от фигурата, най-високи нива на макролидна резистентност сред инвазивните пневмококови щамове са наблюдавани във Франция, Италия, Унгария, Кипър и Финландия – (25.0% - 50.0 %). Най-ниски нива са наблюдавани в скандинавските страни - Норвегия, Швеция, Дания и Германия - под (5.0 %). Нива на резистентност към Erythromycin (>10.0 %) при пневмококите са докладвани в Австрия, Великобритания, Ирландия (126).

В някои от азиатските страни са регистрирани изключително високи нива на макролидна резистентност. В проучвания от Китай почти всички изследвани

пневмококи от назофарингеални секрети на деца до 5г. с респираторни инфекции са резистентни на Erythromycin, за деца в същата възрастова група със септицемия, нивото е отново много високо - (84%),(86).

В Северна Америка честотата на макролидна резистентност е в диапазон от (13.0% - 29.0 %) (97). Тези анализи разкриват определена връзка между общото антибиотично потребление в страните и честотата на разпространение на резистентност. В страните с най-голяма антибиотична консумация (Франция и Италия) са регистрирани и най-висок брой резистентни пневмококи (68,189,190). Изключение е Финландия където, въпреки ниската антибиотична консумация се отчита висок ръст на устойчивост при пневмококите (160).

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

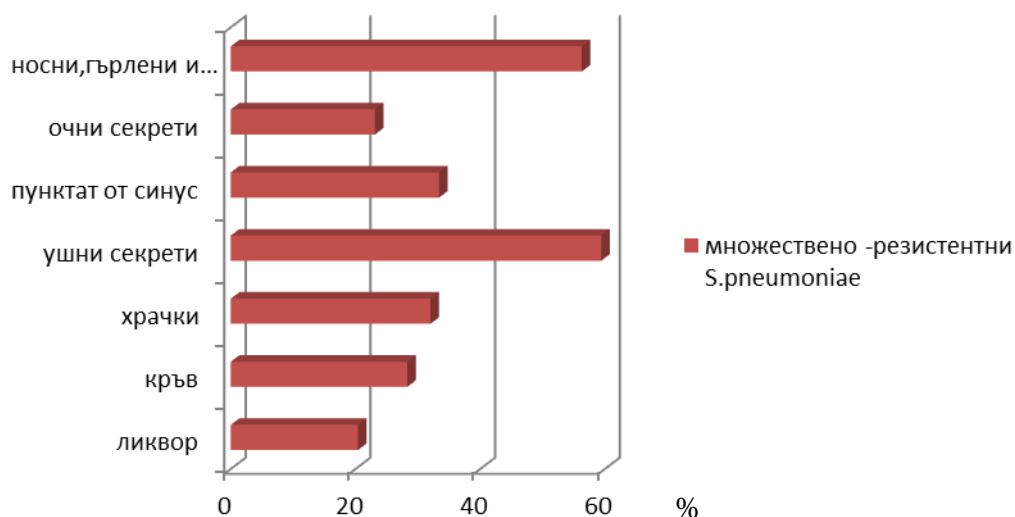
За рационална антибиотична терапия и предотвратяване на глобалното разпространение на множествено - резистентни щамове се изисква систематична бактериологична и епидемиологична оценка на разпространението на придобитата резистентност на бактериите към АМЛС. Резултатите сред изследваните 591 клинични щамове *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 щамове (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 щамове (9.8%) и към Penicillin, Erythromycin, Chloramphenicol и Trimethoprim-sulfamethoxazole - 23 щамове (8.4%).

Графика 3. Разпределение на множествено-резистентните щамове според вида на материала за 591 щамове *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. Разпространението на мобилни елементи може да се осъществи не само вътревидово, но и междувидово, осигурявайки по този начин неограничено разпространение на различни генетични фактори сред пневмококите и въобще сред прокариотите. 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, единият (Tn2009) съдържащ *tet(M)* gene плюс *mega* елемент, който съдържа *mef(E)* ген, а другият (Tn2010), носещ *tet(M)* и *erm(B)* гени плюс *mega* елемент.

Главно средство за латерален трансфер на гените се явява Tn2010 с *tet(M)* ген, носещ Tn916 с вмъкнатите в него *erm(B)* ген и *mef(E)*-съдържащ *mega* елемент (122).

Друго доказателство за свързаната резистентност и преносът на подвижни генетични елементи, водещи до появата на множествено-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* (121,122).

Интеграза гените са изключително важни, т.като причиняват място-специфичната инсерция на тези транспозони в генома на клетката гостоприемник и способстват за успешно прехвърляне на устойчивост в пневмококовата популация.

Съществена причина за глобалното нарастване на Penicillin - устойчивите и множествено - резистентните пневмококи е появата и разпространението на антибиотико - резистентни пневмококови клонове. Такива множествено - 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 (5,14,22,158).

Като цяло, проучванията върху разпространението на множествената АБ резистентност показват най-ниски нива в Скандинавия и най-високи в страните от Средиземноморието. Тази резистентност вероятно е по-висока в южните европейски държави поради различията в системите на здравеопазване, като например антибиотични политики. В южните, средиземноморски и източни страни

има по-висока обща употреба на антибиотици в сравнение със северните европейски страни (189,190). Многобройни проучвания потвърждават, че увеличената консумация на антибиотици е свързана с появата на АБР в световен мащаб (189). 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  $\beta$ -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.

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

Определянето на серотипа на отделните пневмококови щамове предоставя изключително важна информация за въздействието от въвеждането на ваксини, с която се осигурява надзор върху серотиповата замяна, както и разкриване на връзката на определени серотипове с носителство или инвазивни заболявания.

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 не е използвана в България преди въвеждането на PCV10.

Сред Penicillin-нечувствителните щамове (МИК  $\geq 0.1\mu\text{g/mL}$ ), 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%).

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

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

При щамовете *S.pneumoniae* от инвазивни заболявания се наблюдаваше висока серотипова хетерогенност. Сред пневмококовите щамове изолирани от пациенти с менингит бяха представени 21 различни серотипа, като с най-широко разпространение бяха серотипове 3 – (13.0% ), 19F – (11.1%), 7F - (9.3%), 1 - (9.3%), 6B – (9.3%). При пневмококовите щамове изолирани от други стерилни области се наблюдаваха също 21 различни серотипа като най-чести бяха 19F – (18.3%), 6B – (8.3%), 4 – (8.3%), 19A – (6.7%), 9V - (6.7%).

Най - разпространените серотипове през предвакциналният период общо за всички 114 инвазивни щамове бяха вакцинални серотипове 19F (14.3%), 6B (12.0%), 3 (12.0%), 1 (8.3%), 7F (7.1%), 5 (6.0%), 4 (6.0%) и 19A (4.8%). Невакциналните 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 - широкозастъпеният серотип 19F се открива по-често за периода 2006г. - 2010г., в сравнение с 1995 - 2005 г. (7,1%) (151). Серотип 6B също се среща по-често в периода 2006г. - 2010г. в сравнение с 1995г. - 2005 г. (5.5%) (153). 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 2011-2013г. в сравнение с предвакциналния период от 9.4% на 1.2 %. Забелязва се тенденция за серотиповата подмяна след националната PCV10 ваксинация, като най-

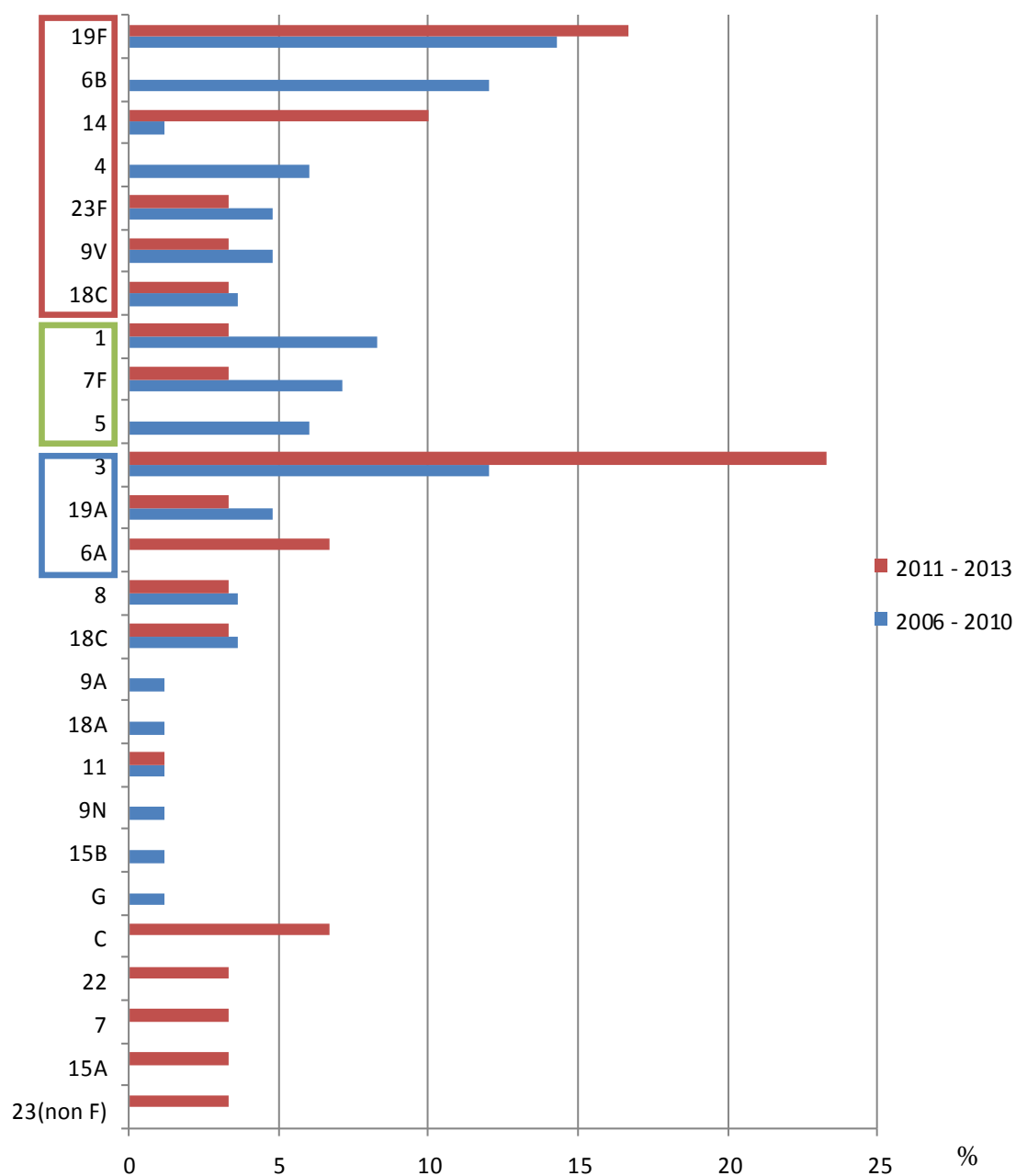
разпространени серотипове в след-вакциналния период бяха серотипове 3 (не-вакцинален) и 19F (вакцинален тип).

Подобно широко разпространение на серотип 19F в предвакциналния период е регистрирано и в съседните на нас страни Гърция и Турция (32,69,70). В други европейски страни, като Германия, Унгария, Полша за този период най-чест изолиран серотип от инвазивни изолати, особено в детска възраст, е серотип 14 (46,88,144). Серотипове 7F, 5, 3 и 1 обикновено са чувствителни към всички антибиотици, докато 19F, 6B, 14 и 19A са високо резистентни. Най-висок процент множествено - резистентни щамове се откриха сред серотипове 19F - (15.5%), следвани от 6B (6.0%) и 19A (3.6%).

След въвеждането на PCV10 в имунизационния календар, броят на изолираните инвазивни щамове намаля 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 %), 6A (6.7%). Вакциналните серотипове за всички инвазивни щамове за следвакциналния период от PCV7 бяха 36.6%, от PCV10 бяха 43.3%, а тези от PCV13 бяха 76.6%



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



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 серотипове в червено влизат в състава на PCV7

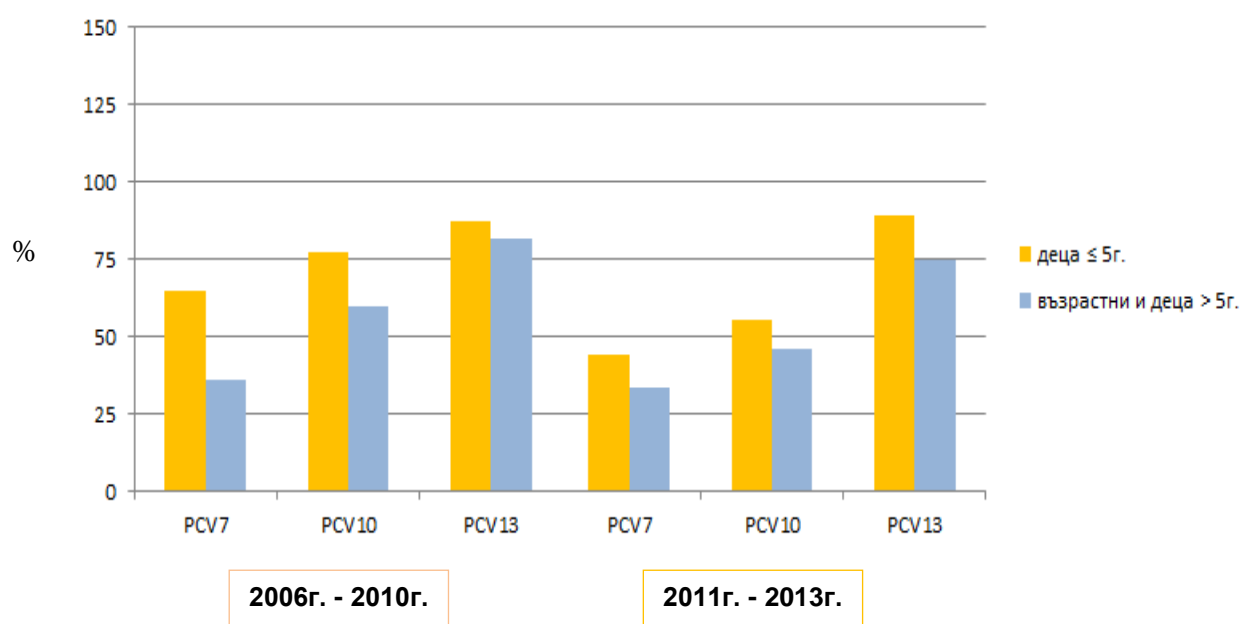
Оградените серотипове в зелено влизат в състава на PCV10

Оградените серотипове в синьо влизат в състава на PCV13

Наблюдава се увеличаване на процентът на неваксиналните серотипове, които съставят (23.3%) от всички серотипове, доказани за периода 2011-2013г. в сравнение с (15.5%) за периода – 2006г. - 2010г., което увеличаване отново е в подкрепа на тезата за пластичността на пневмококовия геном и феноменът на бягство от ваксината, коментиран в редица проучвания (39).

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 предваксиналния (2006 - 2010г.) и следваксиналния (2011 - 2013г.) периоди.**



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 предваксиналния 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 следвакциналния период се отбеляза значителен спад при броя изолирани щамове (n=30, 26.3%). Серотиповете, които бяха 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.

Първата PCV – (PCV7) е одобрена в САЩ през 2000 г. и има широка употреба по света. След въвеждането и се отчита драстично намаляване на честотата на пневмококовите заболявания при деца (29). 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 (109,110,113,127,132). Въпреки това, честотата на ИПЗ и резистентността отново нарастват поради появата на множество резистентни, не-вакцинални "заменени" серотипове (39).

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 невакцинален такъв (120).

Подобно изследване на Croucher et al. (2011г.) докладва за "бягство" на PMEN1 клон, от PCV7 и серотипово превключване на PMEN1 щамове от ваксиналния серотип 23F до невакцинални серотипове.

Вероятно вследствие на серотипова замяна е все по - често регистрираният серотип 19A, който не присъства в PCV7 и PCV10. Серотип 19A е чест тип в България, изолира се от различни видове клинични материали, множество-

резистентен е, и представен във всички възрастови групи. Освен това, серотип 19А в глобален план е най-широко разпространеният серотип при деца под 5г. възраст за последните 5-6 години (73).

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 PCV 10 – имунизираниите. Трябва да се очаква, че пневмококите ще се адаптират бързо към постоянния антибиотичен натиск и ваксини като PCV10 и PCV13. Това подчертава значението на мониторинга за появата на нови пневмококови клонове и генетични варианти.

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

Всички щамове *S.pneumoniae* от пациенти с остър среден отит, без един щам, който показва чувствителност към всички изпитвани антибактериални препарати, бяха серотипирани (n=105).

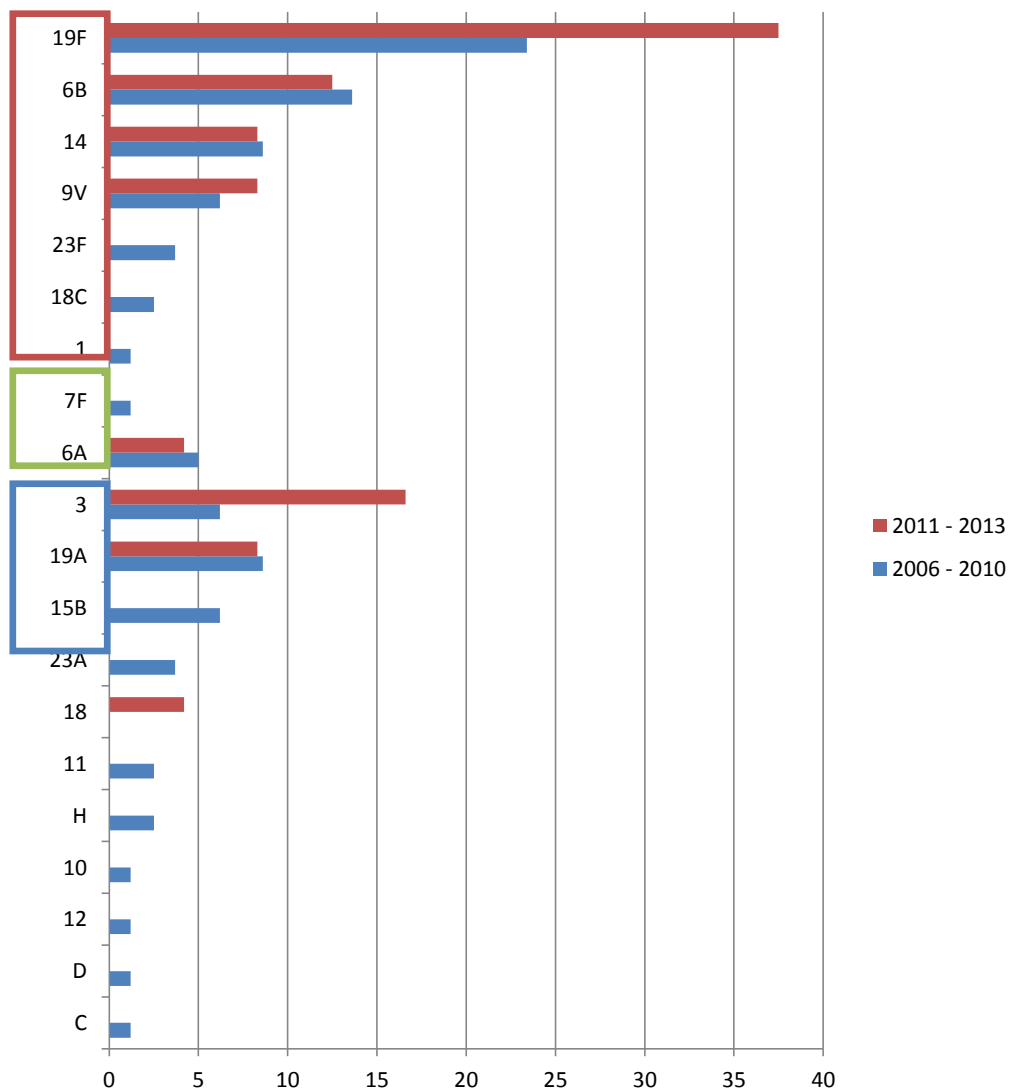
Резултатите показаха, че сред пневмококовите щамове, изолирани от ушни ексудати както в пред-вакциналния, така и в след-вакциналния период се открояват предимно множествено - резистентни серотипове, което затруднява ефикасното лечение на възпаления на средното ухо.

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

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 2 (6.2%) и 6A (5.0%). Подобно е и глобалното разпределение на серотиповете отговорни за голям процент от случаите на отит на средното ухо (34).

Потенциалното серотипово покритие за PCV7, PCV10 и PCV13 за предвакциналния период за щамовете от ушни ексудати беше съответно: 59.3%, 61.8% и 82.8%. Разпространението на невакциналните серотипове беше 17.2%.

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



%

**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)

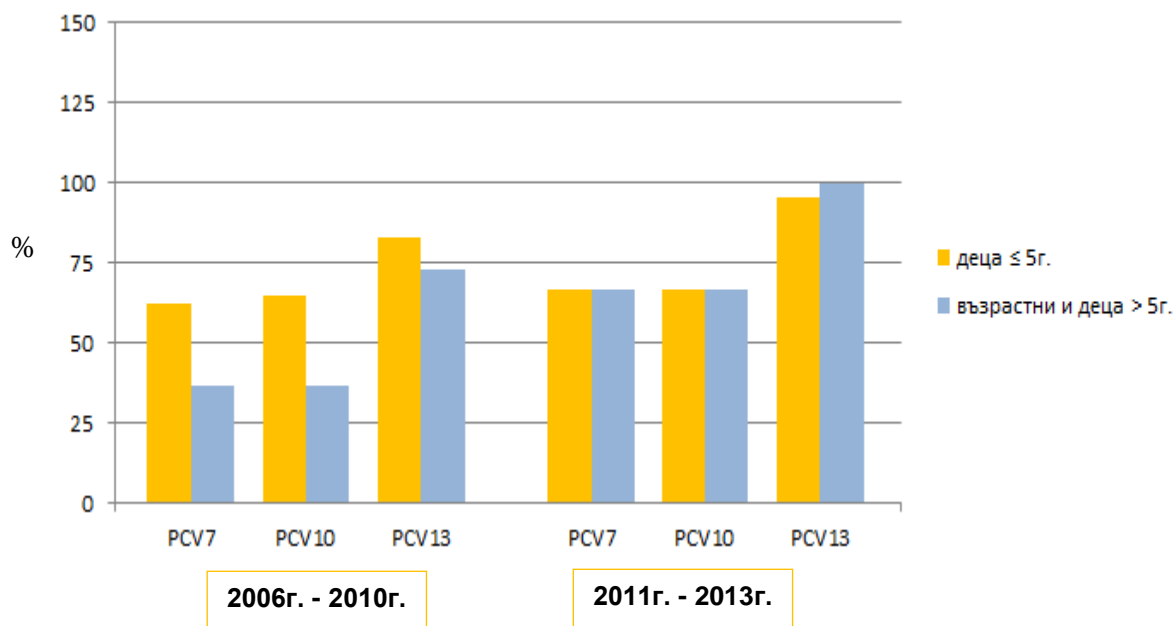
Оградените серотипове в червено влизат в състава на PCV7

Оградените серотипове в зелено влизат в състава на PCV10

Оградените серотипове в синьо влизат в състава на PCV13

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

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



Сред детската възрастова група до 5г. трите най-чести изолирани серотипове в предвакционалният период бяха 19F (n=18, 22.2%), 6В (n=11),(13.6%) и 19А (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%). Разликата между PCV7 и PCV10 вакционално покритие е незначителна от 2-3%.

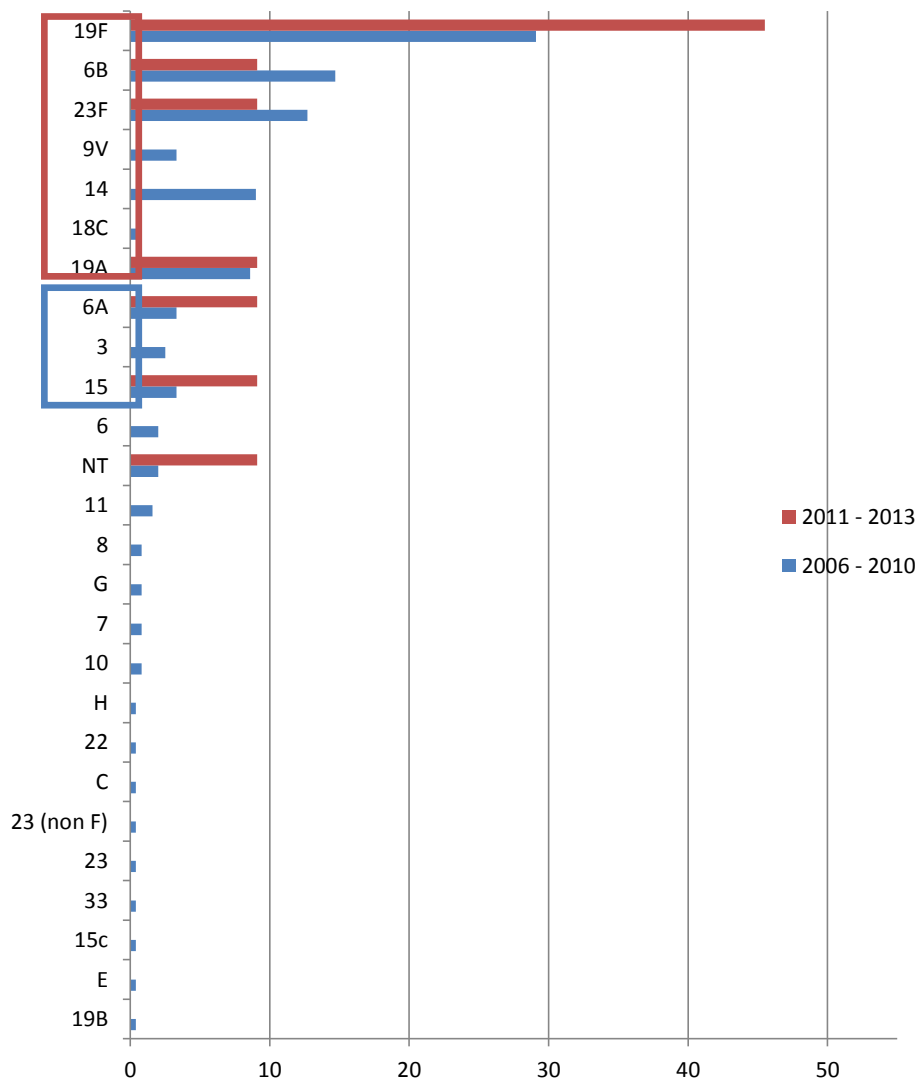
Серотиповото покритие беше по-ниско в сравнение с покритието за същия период при инвазивните щамове. Причината е в наличието на два серотипа – 15В (n=5) и 23А (n=3), които се откриваха съответно в (6.2%) и (3.7%) от случаите на остър отит при деца и не присъстват в нито една от лицензираните пневмококови конюгирани ваксини. При по-големите от 5г. деца и при възрастните пациенти броят на изолираните серотипове беше значително по-малък, но два серотипа се откриха – 19А и 6А, които нямат покритие от PCV10. Потенциалното серотипово покритие за тази група 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 щамовете, 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 (40). Потенциалното серотипово покритие за PCV7, PCV10 и PCV13 за следващия 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.**

В групата на щамовете *S.pneumoniae* от пациенти с инфекции на горни и долни дихателни пътища се откриха 26 различни серотипа. Респираторните изолати, които бяха серотипирани бяха 254 на брой, тези които показаха чувствителност към всички тествани антибиотици не бяха серотипирани.

**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: С, 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 серотипове в червено влизат в състава на PCV7

Липсваха серотипове участващи в състава на PCV10

Оградените серотипове в синьо влизат в състава на PCV13



С най-голяма серотипова хетерогенност се открояваха клиничните щамове от носни, гърлени и назофарингеални секрети, при които се доказаха 25 различни серотипа, сред изолатите от храчки серотиповете бяха 21 на брой.

Най - разпространени серотипове в предвакциналния период при респираторните изолати от носни, гърлени и назофарингеални секрети бяха серотипове 14 (n=70, 36.3%), 19F (n=59, 30.6%), 23F (n=29, 15.0%), 6B (n=28, 14.5%) и серотип 19A (n=18, 9.3%).

Сред пневмококовите изолати от храчки се откриха следните серотипове, подредени по честота на разпространение: 6B (n=7, 10.3%), 19F (n=6, 8.8%), 9V (n=6, 8.8%) и 23F (n=5, 7.3%).

Сред щамовете получени след пункция на синусите резултатите показаха предимно ваксинални серотипове и само един неваксинален серотип 15. При пневмококите, изолирани от очни секрети прави впечатление по-широкото разпространение на неваксинални серотипове и на PCV13-серотипове – 11, 15, 3, 19A.

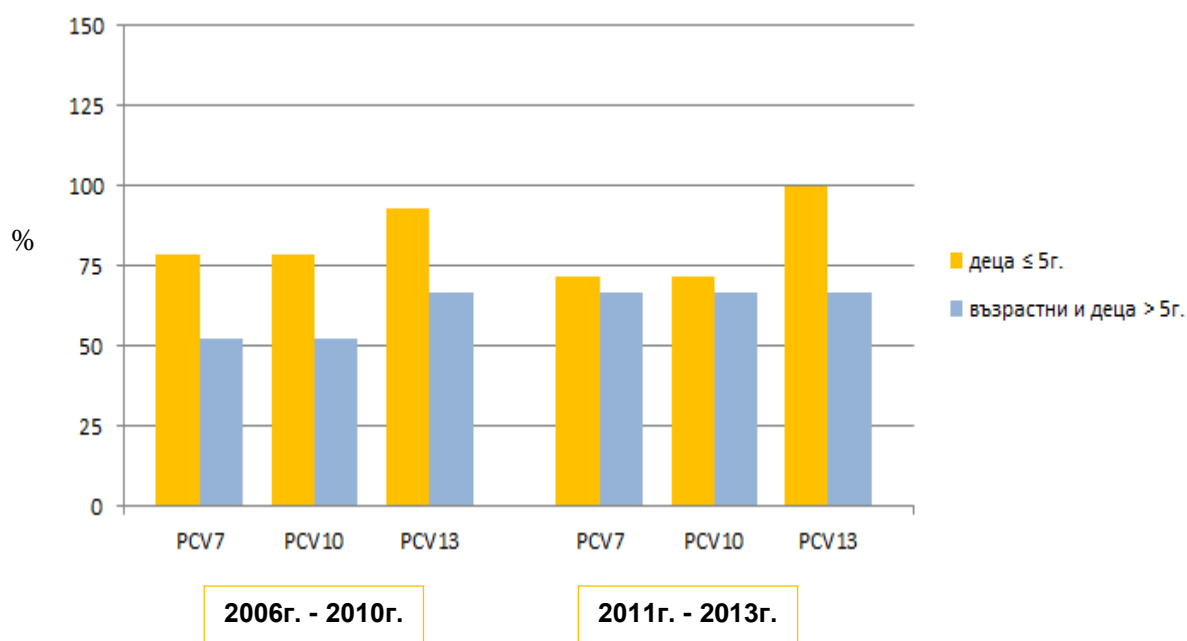
Потенциалното серотипово покритие за PCV7, PCV10 и PCV13 за респираторните щамове от предвакциналния период беше съответно: 70.0%, 70.0% и 84.3%. Разпространението на неваксиналните серотипове за периода (2006 - 2010г.) беше 16.0%.

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

Потенциалният ваксинален обхват за респираторните изолати е изобразен на Графика 9.

В предвакциналния 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 децата до 5г. възраст 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 по-малко, съответно (52.4%), (52.4%) и (66.7%), поради големият брой невакцинални серотипове, които се откриха в тази група и представляваха (33.3%) от всички серотипове доказани за тези пациенти през периода 2006г. – 2010г. Невакциналните серотипове/серогрупи, които преобладаваха бяха 15 и 11, като невакциналният серотип 15B преобладаваше и сред щамовете от ушни ексудати в детската възраст до 5г. Серотиповете, които бяха най-широко разпространени и съответно обхванати от ваксините за тази 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.

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



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 19А 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%).

Обобщението, което може да се направи е, че най-често доказваните серотипове в пневмококовата колекция за предваксиналния период от 2006г. до 2010г. са от серотипове 19F (n=102, 25.1%), 6В (n=57, 14.0%), 23F (n=39, 9.6%), 19А (n=32, 7.9%) и 14 (n=30, 7.4%) подредени в низходящ ред, а за следваксиналния период - 19F (n=19, 28.8%), 3 (n=11, 16.7%), 14 (n=5, 7.6%), 6В (n=4, 6.1%) и 19А (n=4, 6.1%).

Налице е увеличение с течение на времето в разпространението на серотип 3, особено сред инвазивните щамове. Серотипове 19F и 19А 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 19А е настъпило в някои страни преди въвеждането на PCV7, а в други е възникнало след това. Изследванията на антибиотично-резистентни изолати показват, че серотиповото превключване между различни капсулни серотипове се среща при естествени условия в рамките на пневмококовите популации (26). Най – вероятната причина обаче за серотиповата замяна, се дължи главно на разширяване на съществуващите щамове от не-ваксинални серотипове, въпреки че “бягство” от ваксината е възможно и чрез капсулно превключване, в която щам от ваксинален серотип придобива CPS locus на неваксинален серотип чрез рекомбинация (26,39,43).

Доскоро е обсъждана хипотезата за кръстосана защита на серотип 19F към серотип 19А. Тези констатации са обсъждани в контекста на имуногенни анализи, които посочват, че PCV7 и PCV10 предизвикват функционално активни анти - 19А антитела след бустер доза, и че тези 19F - съдържащи ваксинални препарати, могат да предизвикат по - високи нива на тези антитела след двете първични и бустер дози. В Съединените щати и някои европейски страни с висока антибиотична употреба обаче, след последващо доказване на щамове от серотип 19А от различни

клинични материали и особено при ИПЗ е взето под внимание, че 19F във ваксината не осигурява кръстосана защита срещу имунологично свързаният с него 19A серотип (81). Предполага се известно въздействие на PCV7 и PCV10 върху 19A за ограничаване и превенция на болестта след колонизиране, но не и за предотвратяване на вече осъществена 19A колонизация.

Освен факта, че серотип 19A може да запълни екологична ниша след редукия на серотиповете при прилагането на PCV 7 и PCV 10 (39) 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, което го поставя под още по-голям антибиотичен натиск (39).

(II) антибиотичен натиск заедно с капсулно превключване от резистентен клон (96,191).

(III) появата в серотип 19A на минорен устойчив клон съществуващ преди въвеждането на PCV7 (64),

(IV) появата на нови устойчиви клонове (5,14,158) или

(V) всеки един от тях самостоятелно или в комбинация в пневмококовата популация, в която възникват глобални промени в серотиповата честота (147,150,191). 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.

Данните за степента на резистентност при *S.pneumoniae* към макролидни антибиотици имат съществено практическо значение, но за по - надеждно проучване на емпиричното лечение на стрептококови инфекции и общата оценка на тенденциите в разпространението на резистентността е необходимо да се анализират генетичните механизми на това явление.

Познанията за молекулярните механизми на резистентност, както и развитието на техниките на молекулярната биология, ни позволяват да проследим молекулярната епидемиология на инфекциозните болести и дават възможност да се предвидят и предотвратят евентуални промени в устойчивостта към АБП в бъдеще.

Доказването на генетичните механизми на макролидна резистентност при българските изолати *S. pneumoniae* има и теоритична стойност, т.като позволява да се направят епидемиологични изводи за произхода и пътя на разпространение на резистентните щамове.

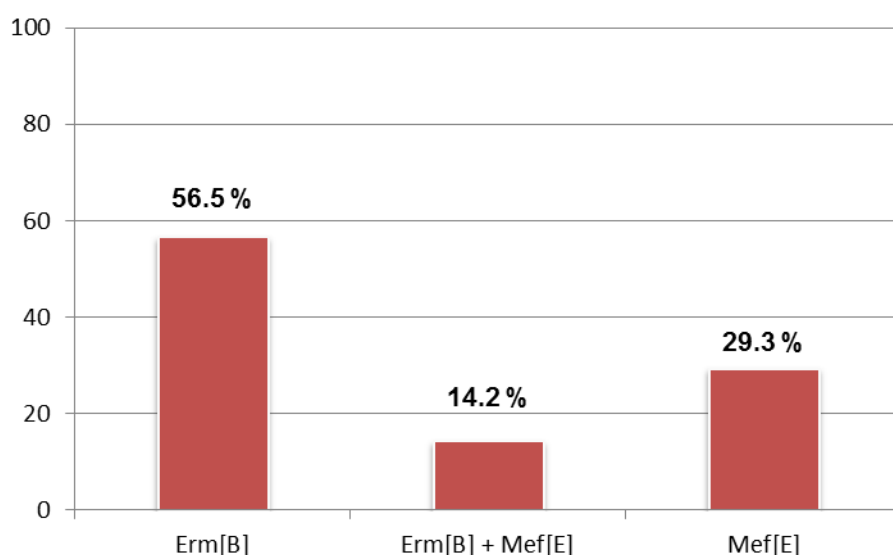
Най-важните механизми на резистентност при *S.pneumoniae* към макролидни антибиотици са резултат от метилиране на аденин в позиция 2058, 23S рРНК, и активна екскреция (ефлукс) от бактериалната клетка (118,180).

PCR методите позволяват детекцията на генетичните детерминанти, отговорни за тази резистентност и са се наложили в практиката поради големия брой предимства, с които разполагат, а именно: висока чувствителност, специфичност, бързина - поставяне на диагноза в течение на работния ден, директно доказване от клиничен материал и извършване на анализа в минимално количество проба.

С PCR метод са доказани *erm(B)* гените, кодиращи метилаза и *mef* гените, отговорни за активната екскреция на макролиди.

Резултатите показаха, че сред 591 клинични щамове *S.pneumoniae*, макролид - резистентните щамове са 239 (40.4%), като разпределението на генетичните детерминанти, отговорни за тази резистентност е изобразено на Графика 10.

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 в България за периода от 2006г. до 2013г. : *erm(B)*, идентифициран с рибозомалното метилиране и *mef(E)*, отговорен за ефлукс механизма. Преобладаващият брой е на щамовете с *erm(B)* ген – 135 на брой, (56.5%), а *mef(E)* ген е представен в 70 щама (29.3%) от всички Erythromycin-резистентни пневмококи. Прави впечатление увеличаването на броя на щамовете, носещи и двата гена – (n = 34, 14.2%). Резултати от PCR амплификацията на *erm(B)* и *mef(E)* гени са представени на Фиг.12 и 13.

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 щама *S.pneumoniae* с мутации в L4 рибозомалния протеин, които в следващите години не бяха доказани при нито един изолат (155). 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%) (155).

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 пневмококове щамове по - голямо селективно предимство и стабилност.

Ефлукс механизмът, кодиран от *mef(E)* ген, намалява интрацелуларната антибиотична концентрация до субтоксични нива и се характеризира с резистентност към 14- и 15-членни макролиди в ниски нива, и запазена чувствителност към 16-членни макролиди и линкозамиди.

Придобиването на допълнителен *mef(E)* ген от пневмококи притежаващи *erm(B)* ген е по-малко вероятно, тъй като това няма да доведе до увеличаване на устойчивостта и гарантиране на генетични селективни предимства на причинителя.

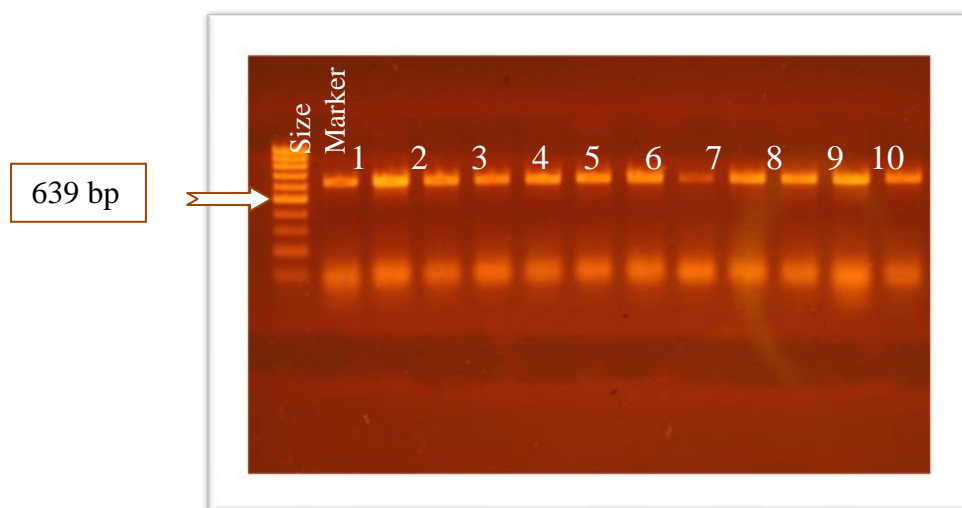
Подобни процеси на придобиване на нови генетични детерминанти са регистрирани в много европейски държави и в Северна Америка, където на фона на широко разпространените микроорганизми с *mef(E)* ген се отбелязва увеличение в честотата на щамове с две детерминанти на устойчивост. В съседните на нас държави, ситуацията е сходна. В Гърция, Сърбия и Румъния в проучвания от последните три години се докладва нарастване на броя на щамовете, споделящи и двата гена (70,63,131). В Турция драстично спада броя на щамовете с доказан *mef* ген, за сметка на щамовете с *erm(B)* ген (34).

От европейските държави, изключение прави Германия, където ефлуксът, кодиран от *mef(E)* ген е преобладаващ механизъм на еритромицинова резистентност (90).

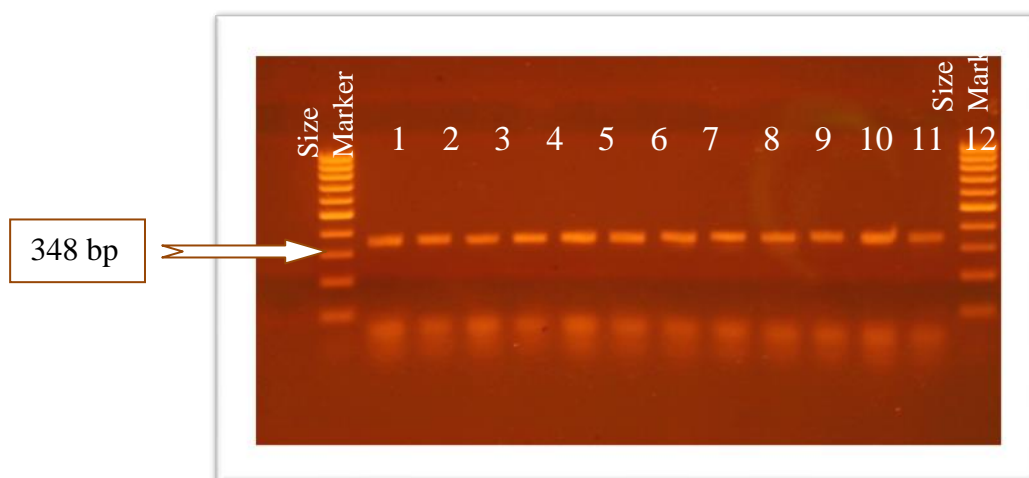
Най-общо разпространението на генетичните фактори, отговорни за макролидната резистентност в световен мащаб показва преобладаване на резистентни щамове с *erm(B)* ген в Северна Америка и южните части на Европа; в по-северните европейски държави е регистрирано по - голямо присъствие на *mef*

(E) ген, а в проучвания от Югоизточна Азия са докладвани все повече щамове с двата вида гени за макролидна резистентност (86). В съседните на нас държави – Турция, Гърция, Сърбия и Румъния преобладаващият механизъм за макролидна резистентност се кодира също от *erm(B)* ген (34,70,63,131). Тези анализи разкриват определена връзка между общото антибиотично потребление в страните, честотата на разпространение на резистентност и генетичните детерминанти отговорни за това явление обуславящи по-високи или по-ниски нива на устойчивост.

Фиг. 12. Агарозна гел-електрофореза на PCR амплификационни продукти на *erm(B)* гени в клинични щамове *S.pneumoniae*



Фиг. 13. 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<sub>B</sub> групата.

**Табл. 19. Разпределение на МИК стойностите за макролиди и Clindamycin на 239 щамове *S. pneumoniae* според генотипа.**

Генотип (%)	No	АБП	МИК (mg/L)			
			диапазон	% S	% I	% R
<i>mef</i> (A/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> (A/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. Това беше потвърдено и от нашите резултати, като 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. Clindamycin като представител на линкозамидните антибиотици показва 100% чувствителност при всички щамове, за които бе доказан ефлукс механизъм. При щамовете 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. Анализирание на връзката между фенотипиране и генотипиране на Erythromycin-резистентни пневмококи

Методът за фенотипиране на Erythromycin-резистентните пневмококи има практическо приложение за микробиологичните лаборатории, които могат да го използват за откриване на съответния генотип отговорен за разпространението на

резистентни щамове. Енергийно зависимия ефлукс на макролиди от клетките мишени чрез клетъчен мембранен преносител е свързан с присъствието на *mef* гени, които определят М – фенотип и резистентност към 14- и 15-членните макролиди. Щамове носещи *mef* - ген обаче са чувствителни към 16-членни макролиди - рокитамицин, линкозамид и стрептограмин В и основно показват ниско ниво на *in vitro* резистентност към тези антимикробни агенти.

Другият важен механизъм е модификация на мишената, кодирана от *erm(B)* ген. Като резултат от това се осъществява метилиране и блокиране на свързането на MLS антибактериалните агенти. Щамове с MLSb фенотип показват високи нива на *in vitro* резистентност към макролидите в сравнение с щамове от М фенотип. Метилаза - свързаната корезистентност към MLS антибиотици кодирана от *erm(B)* ген се експресира конститутивно с високи нива на резистентност към всички MLS антибиотици (сMLS фенотип) или индуцибилно (iMLS фенотип). По - често индуцибилният фенотип се проявява с индуцибилна резистентност към 14 – членни макролиди, но не и към линкозамиди, към които тези щамове са обикновено резистентни (iMcLS фенотип).

Нарастващата резистентност в последните години при пневмококите и покачването на стойностите на МИК на Erythromycin на *mef(A/E)* позитивните щамове налага детектирането на гените отговорни за макролидната резистентност чрез молекулярно-биологични методи.

Определянето на фенотипа на макролидна резистентност по тройният дисков метод с Erythromycin, Clindamycin и Rokitamycin позволява откриването не само на най-честите фенотипове, каквито са MLS и М фенотип при пневмококите, но и откриването на по-редки генетично - обусловени механизми. Резултатите от съпоставянето на фенотипа и генотипа на Erythromycin – резистентните пневмококи са представени в Табл.20.

**Табл. 20. Фенотипове на макролидна резистентност и връзката им с Erythromycin – резистентните гени сред 136 щамове *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	-	-

Определяне на фенотипа на макролидна резистентност беше изпълнено за 136 Erythromycin – нечувствителни пневмококи. По-голям брой от щамове се характеризираха с MLS<sub>B</sub> фенотип – 93 (68.4%), а за 43 пневмококи беше доказан M фенотип (31.6%). Сред щамове с MLS<sub>B</sub> фенотип най-голям беше броят на пневмококите, които проявяваха индуцибилна резистентност към 14 – членни макролиди, но не и към линкозамиди, към които тези щамове са обикновено конститутивно резистентни (iMcLS фенотип). Такива бяха 77 щамове (56.7%) и при всички представители с iMcLS фенотип беше доказан *erm*(B) ген. Конститутивно експресиране с високи нива на резистентност към всички MLS антибиотици (cMLS) беше открито при 13 щамове (9.5%), като 8 от тях носеха *erm*(B) ген, а 5 притежаваха едновременно *erm*(B) и *mef*(E) гени. Най-редкият фенотип iMLS бе открит само при 3 щамове, за които бе установено, че носят *erm*(B) ген. При представителите с M-фенотип (31.6%), във всички случаи бе доказан *mef*(E) ген.

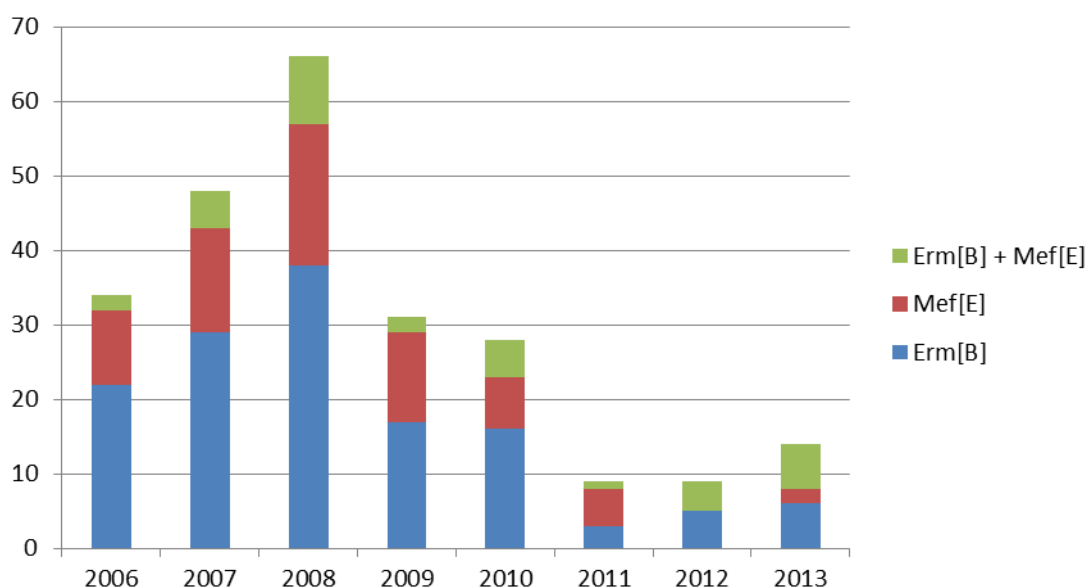
### **3. Разпределение на макролид – резистентните генетични детерминанти през периода на проучване от 2006г. до 2013г.**

В периода на проучването от 2006г. до 2013г. наблюдавахме разпределението на генетичните детерминанти, обусловени от *erm*(B) и *mef*(E) гени през годините. Това разпределение позволи да бъде проследено преобладаването на едни генетични механизми над други свързани с макролидната резистентност.

Различните механизми на макролидна резистентност обуславят различна активност на антибиотиците от MLS<sub>B</sub> групата. Определянето на резистентните фенотипове и генотипове на Erythromycin-резистентните *S. pneumoniae* позволява по-точно да се определи ефекта, който може да се очаква от отделните MLS<sub>B</sub> антибиотици, и това има важно практическо значение за лечебната практика на пневмококовите инфекции.

Разпределението на генетичните детерминанти, отговорни за макролидната резистентност на щамове от пневмококовата колекция са представени на следващата графика.

Графика 10. Разпределение на гените, отговорни за макролидна резистентност при 239 щамове *S.pneumoniae* за периода от 2006г. до 2013г.



През 2006г. макролид – резистентните щамове бяха 34 на брой (14.2%), като най-често доказваният генотип беше кодиран от *erm(B)* ген, който бе открит при 22 щамове (64.7%). При 10 щамове беше доказан *mef(E)* ген (29.4%) и само при два щамове бяха открити и двата гена (5.9%). През 2007г. бяха изолирани 48 (20.1%) макролид-резистентни пневмококи, като 29 от тях (60.4%) носеха *erm(B)* ген, за 14 (29.2%) бе доказан *mef(E)* ген и при 5 щамове (10.4%) се откриха и двете генетични детерминанти. Най - голям процент макролид – резистентни пневмококи бяха

открити през 2008г. (27.6%), като съответно и броят на тестваните щамове бе най-висок - 66 на брой. Метилаза - кодиращите пневмококи бяха 38 (57.6%). Пневмококите, за които бе доказан ефлукс механизъм бяха 19 (28.8%) и значително повишение бе отбелязано при щамове, които разполагаха и с двата гена - 9 пневмококови щамове с *erm(B)* + *mef(E)* гени (13.6%). През 2009г. събраните пневмококови щамове, за които бе установена макролидна резистентност бяха 31 (13.0%), като от тях 17 (54.8%) притежаваха *erm(B)* ген, 12 (38.7%) притежаваха *mef(E)* ген и 2 щамове (6.5%) носеха и двата гена. През 2010г. изследваните макролид-резистентни пневмококи бяха 28 на брой (11.7%). Отново преобладаващи бяха щамове с *erm(B)* ген – 16 (57.1%), 7 щамове бяха с *mef(E)* ген (25.0%) и 5 щамове разполагаха и с двата гена (17.9%). През следващите три години броят на събираните пневмококови щамове намалява, което съвпада и с въвеждането на пневмококова конюгирана ваксина в българският имунизационен календар, като за годините 2011г., 2012г. и 2013г. щамове са съответно (n=9, 3.8%); (n=9, 3.8%) и (n=14, 5.9%). През 2011г. 3 щамове показаха присъствие на *erm(B)* ген (33.3%), 5 щамове бяха с *mef(E)* ген (55.6%) и при един щам бяха доказани заедно *erm(B)* + *mef(E)* гени (11.1%). През 2012г. не бяха доказани щамове с *mef(E)* ген, 5 щамове бяха с *erm(B)* ген (55.6%) и при 4 щамове бяха открити и двете генетични детерминанти (44.4%). През последната година от проучването щамове с *erm(B)* ген бяха 6 (42.9%), за 2 щамове (14.3%) беше доказан ефлукс механизъм и при 6 щамове (42.9%) бяха доказани и двата вида гени.

През целият период на изследване най - честият доказван генотип беше обусловен от *erm(B)* ген. В последните години, в нашата страна се увеличила 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 силният антибиотичен натиск и увеличаването на резистентността, както и в еволюцията на пневмококите към по - приспособим геном. Както беше отбелязано, 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 (8,167,170,180).

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

Разпределението на гените, обуславящи еритромициновата резистентност сред пациентите с пневмококови заболявания от различни възрасти е разгледано за всички пневмококови щамове изолирани от пациенти в две възрастови групи : деца - от 0 до 14г. и възрастни от 15г. до 90г. за всички години от периода на проучване. Проследяването на разпределението на гените, обуславящи еритромициновата резистентност сред различните възрастови групи е в помощ на епидемиологичните и генетични проучвания за установяване на най-значимите механизми обуславящи тази резистентност сред пациентите от различни възрастови групи. Резултатите са представени в Табл.21

Табл.21. 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 по.	Е-R n (%)	<i>erm(B)/mef(E)/erm(B)+mef(E)</i> n	Общ по.	Е-R n %	<i>erm(B)/mef(E)/erm(B)+mef(E)</i> 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/
<b>Общ брой (n=591)</b>	<b>421</b>	<b>198 (47.0)</b>	<b>108/58/32</b>	<b>170</b>	<b>41 (24.2)</b>	<b>28/12/1</b>

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 Erythromycin-резистентни щамове. Делът на пневмококовите изолати от възрастни пациенти беше представен от 170 щамове (28.8%), като Erythromycin-резистентни бяха (n=41, 24.1%).

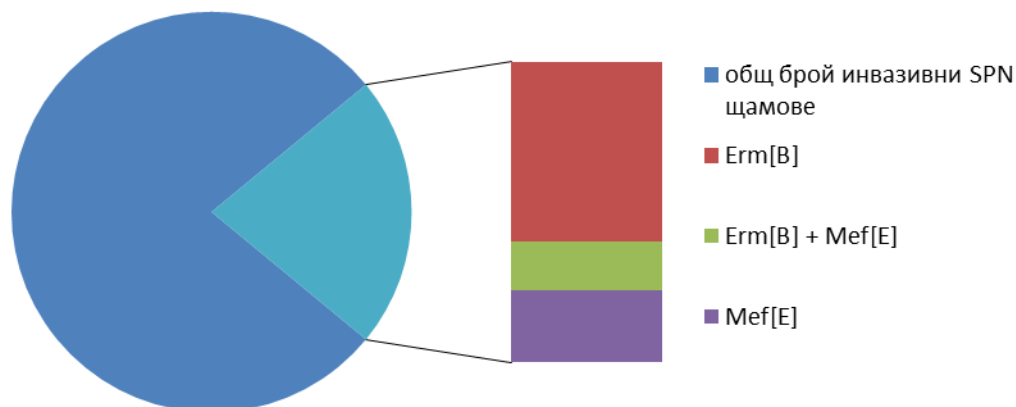
През всички години на проучването, както при децата, така и при възрастните, най - голямо разпространение имаха пневмококовите щамове с доказан *erm*(B) ген, съответно 108 щамове (54.5%) при деца и 28 щамове (68.3%) при възрастни. Активен ефлукс, кодиран от *mef*(E) ген беше доказан за 58 (29.3%) клинични 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.**

Клиничните щамове могат да се различават по географско разпространение, чувствителност към различни антибиотици, серотип и генотип. Генотипирането позволява диференцирането на различните клинични изолати на молекулярно ниво, които с конвенционалните методи като тестовете за чувствителност към антибиотици и серотипиране не могат да бъдат ясно разграничени. Нивата на макролидната резистентност сред пневмококовите щамове от различни клинични източници варира. Гените, обуславящи тази резистентност са в различна степен застъпени при отделните групи клинични щамове.

Генотиповото разпределение беше разгледано за всички макролид-резистентни щамове *S.pneumoniae* разделени в следните три групи: щамове от инвазивни клинични материали, от ексудати от средно ухо и от респираторни материали. Резултатите за всяка една от групите клинични щамове са представени на Графики 11,12, 13.

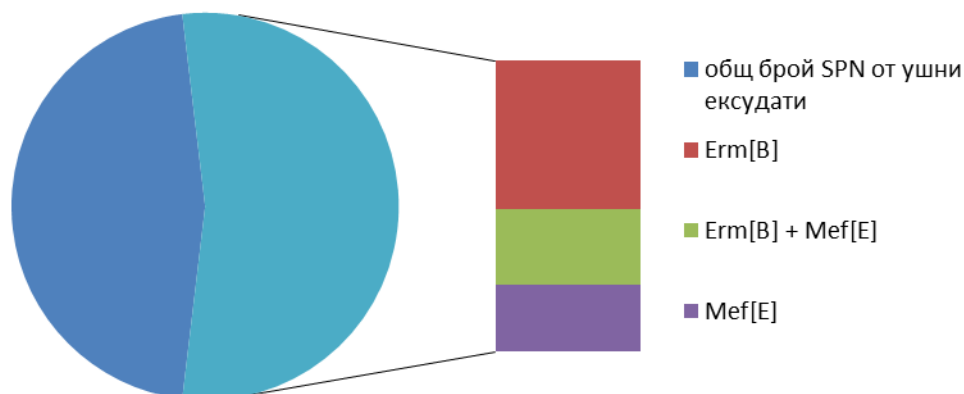
Графика.11. Генотипово разпределение на 25 Erythromycin-резистентни щама *S.pneumoniae* изолирани от 114 инвазивни клинични материали.



Сред 114 инвазивни пневмококови щамове, 25 (21.9 %) бяха резистентни на Erythromycin (ERSP). При всички инвазивни Erythromycin - резистентни изолати бяха доказани *erm(B)* или *mef(E)*, или комбинация от двата гена. През периода 2006г. - 2013г. , *erm(B)* ген бе открит при 15 щама (13.1%) и съответно беше най-разпространеният генотип за макролидна резистентност сред инвазивните пневмококови щамове. Ефлукс механизъм кодиран от *mef(E)* ген беше доказан при 6 щама (5.3%), а двойният механизъм на резистентност беше представен при 4 инвазивни пневмококови щама (3.5%). Всички Erythromycin - резистентни инвазивни щамове бяха и множествено - резистентни. Високо беше и нивото на Penicillin - нечувствителните щамове – 18 на брой (72.0%) от всички 25 Erythromycin - резистентни инвазивни пневмококи.

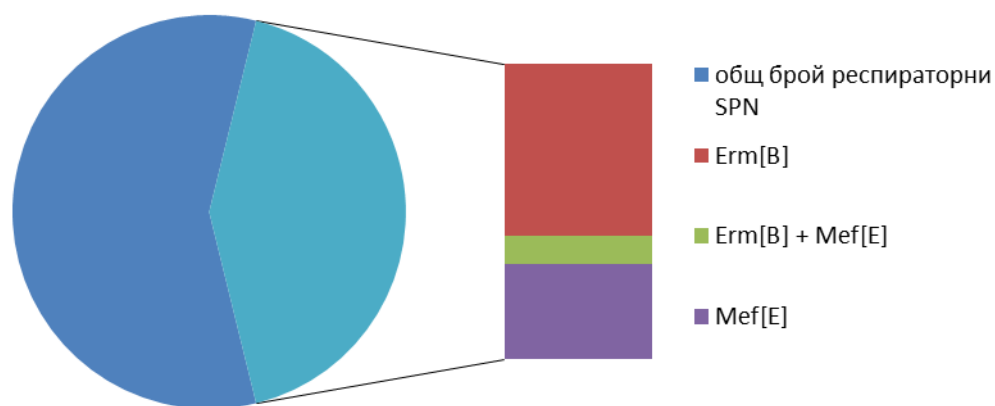


Графика.12. Генотипово разпределение на 57 Erythromycin-резистентни *S.pneumoniae* щамове изолирани от 106 ушни ексудати на пациенти с остър среден отит (АОМ)



От общо 106 щамове от ушни ексудати, 57 на брой (53.8%) бяха Erythromycin – резистентни. Генът *erm(B)* беше открит в 29 щамове (27.3%). За разлика от инвазивните и респираторни пневмококи, при щамове от ушни ексудати 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, както 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. (155).

Графика.13. 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 Erythromycin – резистентни. 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. Сред макролид-резистентните щамове от храчки разпределението на гените за макролидна резистентност беше представено от *erm(B)* ген при 13 щамове (72.2%), а присъствие и на двата гена беше доказано в 3 щамове (16.7%), като изпревари по брой изолатите притежаващи само *mef (A/E)* ген, каквито бяха 2 щамове (11.1%). При клиничните материали получени след пункция на синусите самостоятелно присъствие на *mef(E)* ген не беше доказано, *erm(B)* ген беше открит при два щамове (22.2%), а един щам споделяше и двата гена (11.1%). Сред всички щамове *S.pneumoniae* от носни, гърлени и назофарингеални секрети, макролидна резистентност показаха 133 (48.0%) пневмококи. При тези пневмококи PCR резултатите показаха следното разпространение на генетични фактори : за повече от половината щамове - 74 на брой (55.6%) беше установена *erm*-метиلاза, за 48 щамове беше доказан активен ефлукс кодиран само от *mef(E)* ген (36.1%) и за 11 щамове (8.3%) беше установено, че притежават и двата гена. За изолатите от други

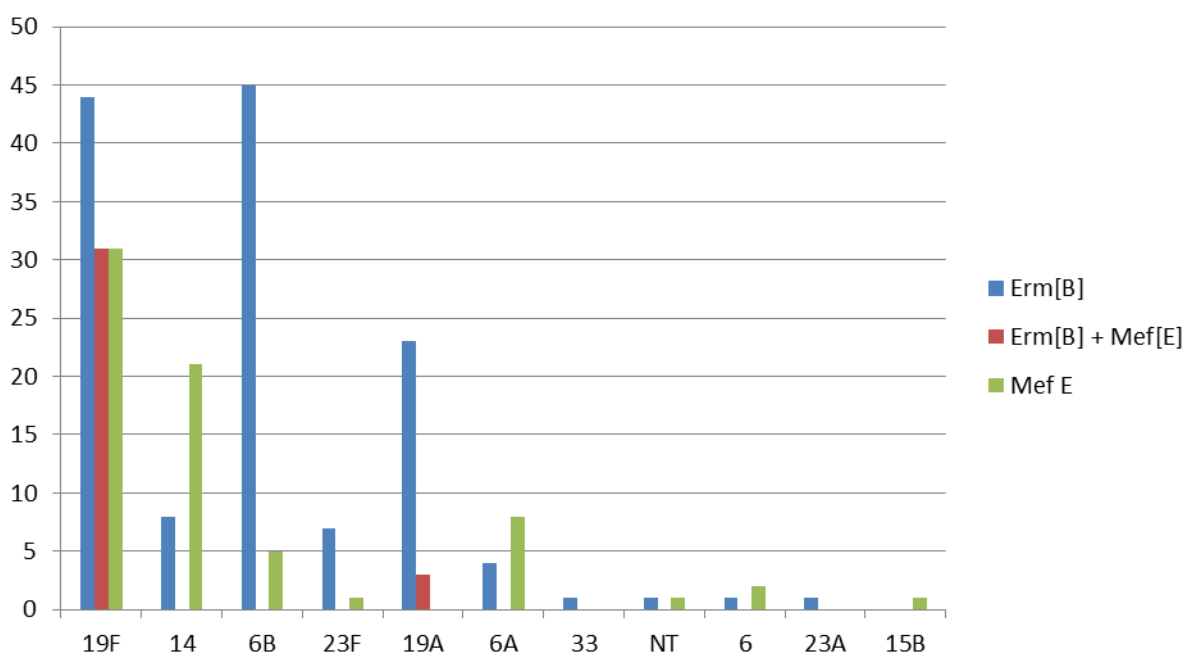
клинични материали, каквито бяха очните секрети, комбинация от двата гена не беше доказана. Разпределението беше между *erm*(B) ген и *mef*(E) ген беше както следва : (n=3, 23.1%) и (n=1, 7.7%) от всички изследвани щамове от очни секрети.

#### **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 Erythromycin – резистентните щамове *S.pneumoniae*. Съществени различия в серотиповото разпределение има и в зависимост от източника на изолата и формата на пневмококовата инфекция, напр.: щамове от носители срещу инвазивни щамове; серотипове от респираторни мукозни инфекции срещу инвазивни; и т.н. Освен това, пневмококите чрез генетична трансформация променят капсулния си серотип, което подпомага избягване на имунния отговор в организма на човек (96,191). Мащабни проучвания в целия свят показаха, че има най-малко 40 серогрупи на *S. pneumoniae*, които са потенциално патогенни, но относително малък брой от тези групи са отговорни за ИПЗ при децата по целия свят (52,76). Има географски и възрастови различия в честотата на пневмококовите серотипове, като някои серотипове се отриват по-често при ИПЗ, в сравнение с други. В САЩ, серогрупи 4, 6, 9, 14, 18, 19 и 23 причиняват 80-90 % от случаите на инвазивни заболявания, докато в Европа същите серотипове причиняват 61-81% от инвазивните заболявания при децата. При по-големи деца и възрастни се открива по-голям брой серотипове на *S. pneumoniae*, които са отговорни за ИПЗ. Заради широкият възрастов диапазон и различията в методиките, присъстват разнообразни данни в проучванията, но най-общо - серогрупи 14, 4, 1, 3, 6 и 19 се посочват като предизвикващи значителна част от ИПЗ в тази възрастова група, и то в различни, широки географски области (76,90,91,94,96,109).

Въпреки голямата серотипова хетерогенност, която се откри при щамовете от пневмококовата колекция, няколко основни серотипа преобладаваха сред Erythromycin-резистентните пневмококи. Резултатите от съпоставянето на генотипа и серотипа при Erythromycin – резистентните пневмококи са представени на следващата Графика.

Графика.14. Генотипово разпределение на 239 Erythromycin – резистентни щамове *S.pneumoniae* спрямо установеният серотип за периода 2006г. - 2013г.



Анализът на серотиповото разпределение сред всички 239 макролид-резистентни щамове показва присъствие на 10 серотипа, към които бяха причислени 237 щамове и само два щамове бяха нетипируеми (NT = nontypeable). Всички серотипове, доказани при макролид-резистентните щамове, бяха открити и при Penicillin-нечувствителните щамове, с изключение на серотип 9V, който се откриваше само при Penicillin-нечувствителни пневмококи без резистентност към erythromycin. Серотип 23F беше втори по честота на разпространение при Penicillin-нечувствителните пневмококи, докато при Erythromycin – резистентните, той зае шесто място по разпространение.

Най-широко представеният серотип сред Erythromycin – резистентните пневмококи беше 19F (44.3%) и той беше представен от 106 щамове, които

разполагаха както поотделно с двете генетични детерминанти *erm*(B) и *mef*(E), така и заедно. Щамовете *S.pneumoniae* от серотип 19F, които носят *erm*(B) са 44 на брой (41.6%). Сред останалите 19F щамове, гените са разпределени по равно - по (29.2%) за *mef*(E) и *erm*(B) + *mef*(E) гени. Пневмококовите щамове от серотип 6B бяха 50 на брой (21.0%) и съответно бяха втори по разпространение. Сред тях не се откриваха щамове с две генетични детерминанти, а основно преобладаваха щамовете с *erm*(B) ген – 45 на брой (90.0%) и *mef*(E) ген – 5 на брой (10.0%). Сред Erythromycin -резистентните щамове от серотип 14 (n=29, 12.1%) преобладаваха тези с *mef*(E) гени – 21 на брой (72.4%) а при 8 щамове (27.6%) беше доказан *erm*(B) ген. Серотип 19A, присъстваше в (n=26, 10.9%) от всички Erythromycin-резистентни щамове, освен това почти всички бяха множествено - резистентни. Генотипното разпределение при 19A изолатите беше между щамове с *erm*(B) ген (88.5%) и такива с комбинация от двата гена *erm*(B) и *mef*(E) - (11.5%). Серотип 6A беше другият серотип, както 19A, който не участва в PCV10 и се откри при (n=12, 5.0%) от Erythromycin-резистентните пневмококи, като от тях щамовете бяха предимно с *mef*(E) ген – (66.7%), а (33.3%) бяха с *erm* (B) ген. Щамовете от серотип 23F бяха (n=8, 3.3%), като по-голямата част от тях бяха носители на *erm*(B) ген – (87.5%), а (12.5%) притежаваха с *mef*(E) ген.

Всички останали серотипове, които бяха открити при Erythromycin – резистентните щамове бяха неваксинални и те съставяха (2.5%) от всички такива пневмококи.

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, затова и MLS<sub>B</sub> генотип е най - широко разпространен. Щамовете, при които се доказва *mef*(E) ген са главно от серотип 19F, 14 и 6A. Механизмът на двойна резистентност *erm*(B) + *mef*(E) е намерен в изолати от 19F и 19A серотипове. Подобно разпределение на серотип - специфична резистентност спрямо Erythromycin за серотипове 19F, 14, 6B, и 19A е сравнимо с резултатите, съобщени от други европейски страни (6,14,51,90,91,93,109). Разпространението на серотипове 19F, 6B и 19A са допринесли за масовото преобладаване на *erm*(B) генотип в съседните на нас страни, почти всички европейски страни и САЩ (109).

Изключения са Германия и Канада (44,90), където ефлукс механизмът при макролидите, обуславящ *mef* генотип, преобладава. Серотиповете, преобладаващи в подобни проучвания от тези страни са 14, 23F, 1, 6B, 7F, 3, и 4 (90,151). Една от държавите с най-голямо разпространение на двоен механизъм на резистентност е Испания и серотиповете, които преобладават сред макролид – резистентните щамове са 19F, 23F, 6B и 19A (14,60,66).

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

Ефлукс-медирана еритромицинова резистентност при *S.pneumoniae* е свързана с *mef* ген, който е представен от различни подкласове *mef* гени. В макролид - резистентните щамове *S.pneumoniae* този механизъм се кодира предимно от подклас *mef*(E) и в по-малка част от *mef*(A). Подклас *mef*(A) се открива оригинално в *S.pyogenes*, като и при този микроорганизъм се среща разнообразие от генетични елементи свързани с ефлукс механизма (48).

Поради високата хомоложност на нуклеотидно ниво разграничаването на *mef* - гените чрез PCR е практически невъзможно. Диференцирането се свежда до откриване на единични нуклеотидни полиморфизми, специфични за техните отделните подгрупи. Чрез рестрикционен анализ на PCR продуктите с RFLP метод може да бъде разчетен полиморфизмът чрез получаването на различни размери на ампликоните. Разграничаването на *mef*(A) и *mef*(E) беше извършено със специфична BamHI ендонуклеаза, която “срязва” молекулата на ДНК в специфични нуклеотидни секвенции.

Методът беше подбран заради неговата бързина и поради малките количества ДНК, необходими за RFLP анализа. В редица световни проучвания предпочитан за диференциране на двата генетични подкласа беше рестрикционният анализ (48,123,140). Методите базирани на RFLP с тотална ДНК могат да бъдат използвани за откриването на близко родствени изолати от различни източници, независимо дали са следствие на локално клонално разпространение или са следствие на глобално разпространение на щамове.

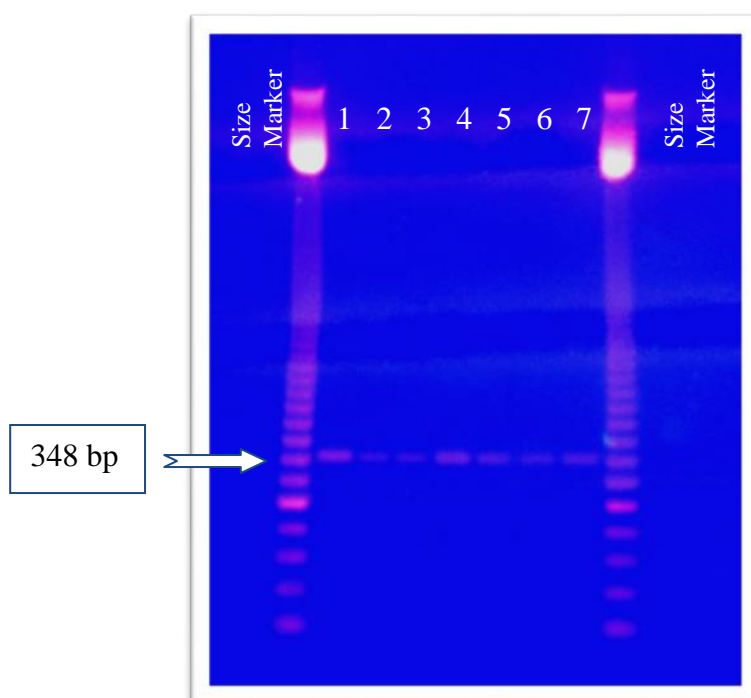
RFLP се използва и за доказване на мутации, определящи антибиотична резистентност и за изследване на промени в рестрикционния профил на вариабилни гени.

Макролид - резистентните щамове *S.pneumoniae*, които след PCR амплификацията бяха определени, че носят *mef*-гени бяха подбрани за по-нататъшни молекулярно - генетични проучвания. Всички 104 *mef* – положителни щамове бяха подложени на рестрикционен анализ (RFLP) за диференциране на подкласовете *mef*(A) и *mef*(E).

RFLP изследването търсеше специфична ДНК секвенция, която има рестрикционен сайт с таргетна последователност. Резултатите от рестрикцията с ендонуклеаза *VamH1* показаха, че всички изследвани щамове нямаха 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 генерирани два фрагмента от 284 bp и 64 bp, което е индикация за наличието на *mef*(A) ген.

Резултати от рестрикционната реакция на *mef*(E) – амплификационни продукти с рестрикционна ендонуклеаза *VamH1* са показани на Фигура.14.

Фигура.14. Агарозна гел-електрофореза на *mef* – положителни PCR амплификационни продукти от щамове *S.pneumoniae* след рестрикционна реакция с ендонуклеаза *VamH1*.



Подобни резултати, в които всички изследвани щамове съдържат подклас *mef(E)* гени са документирани в Русия и Холандия (116). В други европейски страни като Италия, Германия, Белгия при *mef* – положителни пневмококови щамове се откриват генетични елементи принадлежащи и към двата подкласа. (88,125,179).

## 8. Автоматично директно секвениране на *mef* ген

За потвърждаването на резултатите от рестрикционният анализ беше избран методът на Автоматично директно секвениране. Той е най-точната техника за определяне на нуклеотидната последователност на даден ДНК фрагмент. Предимствата на секвенирането са високата диференцираща способност, високата репродуктивност, възможността за софтуерна обработка на резултатите и създаване на база данни. Автоматично директно секвениране беше проведено за произволно избрани 19 на брой от общо 104 (18.3%) *mef*-положителни *S.pneumoniae* проби.

Анализът включваше сравняване на получените секвенции с представените в GenBank последователности на подгрупи *mef(A)* и *mef(E)* гени. Бяха отбелязани точките на полиморфизъм в положения: 264bp и 267bp, които са специфични за отделните подгрупи гени. Беше открита и базовата замяна, която не позволява рестрикция и гениране на два фрагмента, което е характерно само за представители с *mef(A)* ген.

Оригиналните последователности на *mef(A)* и *mef(E)* гени, които са депозирани в GenBank са с регистрационни номера: U70055.1 и U83667.1, съответно (45).

На следващата фигура е показано сравняването на оригиналните нуклеотидни последователности на гените *mef(A)* и *mef(E)* от базата данни на GenBank с два секвенционни продукта: 257-АН – от инвазивен клиничен материал и QI\_05 - от ексудат от средно ухо, за които е доказан *mef* - ген като генетична детерминанта за макролидна резистентност с PCR метод и впоследствие с рестрикционен анализ бяха доказани като *mef(E)* ген.



Фиг.15. Сравняване на нуклеотидните последователности на *mef(A)* и *mef(E)* от базата данни на GenBank с два секвенционни продукта на *mef*-положителни щамове *S.pneumoniae*

Mef A	374	TCATTAATCACTAGTGCCATCTTGCAAATGGCGATTATTTTTTACCTTACAGAAAAAACT	433
MEF E	61	TCATTAATCACTAGTGCCATCCTGCAAATGGCGATTATTTTTTACCTTACAGAAAAACA	120
257-AH	294	TCATTAATCACTAGTGCTATCCTGCAAATGGCGATTATTTTTTACCTTACAGAAAAACA	235
QI_05	293	TCATTAATCACTAGTGCCATCCTGCAAATGGCGATTATTTTTTACCTTACAGAAAAACA	234
Mef A	434	GGATCCGCGATGGTCTTGTCTATGGCTTCACTATTAGGTTTTTTACCTATGCGGTCTTT	493
MEF E	121	GGATCTGCGATGGTCTTGTCTATGGCTTCATTAGTAGGTTTTTTACCTATGCGATTTTG	180
257-AH	234	GGATCTGCGATGGTCTTGTCTATGGCTTCACTAGTAGGTTTTTTACCTATGCTGTCTTT	175
QI_05	233	GGATCTGCGATGGTCTTGTCTATGGCTTCATTAGTAGGTTTTTTACCTATGCGATTTTG	174
Mef A	494	GGACCTGCAATTGGTGTGCTAGTGGATCGTCATGATAGGAAGAAGATAATGATTGGTGCT	553
MEF E	181	GGACCTGCCATTGGTGTGCTAGTGGATCGTCATGATAGGAAGAAGATAATGATTGGTGCC	240
257-AH	174	GGACCTGCCATAGGTGTATTAGTGGATCGTCATGATAGGAAGAAGATAATGATTGGTGCT	115
QI_05	173	GGACCTGCCATTGGTGTGCTAGTGGATCGTCATGATAGGAAGAAGATAATGATTGGTGCC	114
Mef A	554	GATTTAATTATCGCAGCAGCTGGTCCAGTGCTTACTATTGTTGCATTCTATATGGAGCTA	613
MEF E	241	GATTTAATTATCGCAGCAGCTGGTCCAGTGCTTACTATTGTTGCATTCTGTATGGAGCTA	300
257-AH	114	GATTTAATTATCGCAGCAGCTGGTCCAGTGCTGGCTATTGTTGCATTGTATATGGAGTTA	55
QI_05	113	GATTTAATTATCGCAGCAGCTGGTCCAGTGCTTGGCTATTGTTGCATTCTGTATGGAGCTA	54
Mef A	614	CCTGTCTGGATGGTTATGATAGTATTGTTTATCCGTAGCATTGGAACAGCTTTTCACACC	673
MEF E	301	CCTGTCTGGATGATTATGATAGTATTGTTTATCCGTAGCATTGGAACAGCTTTTCATACC	360
257-AH	54	CCTGTCTGGATGATTATGATAGTATTGTTTATCCGTAGCAT-GGAACAGCTT	2
QI_05	53	CCTGTCTGGATGATTATGATAGTATTGTTTATCCGTAGCAT-G-AACAGCTT	2

Забележка:

*mef(A)* : регистрационен номер: U70055.1

*mef(E)* : регистрационен номер: U83667.1

Точките на полиморфизъм в положение 264 bp и 267bp, които са специфични за *mef(A)* и *mef(E)* са маркирани в червено. Точковата мутация, отговорна за разграничаването на двата подкласа е подчертана.

Резултатите от RFLP бяха в пълно съответствие с резултатите от Директното автоматично секвениране. Точките на полиморфизъм при всички секвенирани *mef* – проби се оказаха идентични с тези на *mef(E)* номер U83667.1. При всички проби беше открита точковата мутация, която е отговорна за отсъствието на рестрикционно място за BamHI ензим, както се открива по принцип и при оригиналната нуклеотидна последователност на *mef(E)* - ген.

Бъдещите проучвания ще бъдат насочени към новооткритият нов подклас *mef* ген – *mef(I)*, който се характеризира с висока хомоложност на нуклеотидно ниво и към двата вида гени *mef(E)* и *mef(A)*, съответно 93,6% и 91,4% , и който при използване на RFLP метод за ген *mef(I)* не позволява разграничаване от *mef(E)* ген (122).

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

Молекулярните проучвания са показали, че Penicillin-резистентните и множествоно-резистентните популации са много динамични и резистентността се дължи на генетични процеси като хоризонтално разпространение на резистентни генетични детерминанти чрез трансформация и рекомбинация и вертикално придобиване на резистентни гени чрез клоналното им разпространение в населението.

Генотипиращи техники като PFGE се използват за определяне на генетичните връзки и епидемиологично маркиране на пневмококовите изолати. С молекулярните методи за типирание на бактериите се получават специфични за щама фингърпринти, които се използват за анализ на епидемиологичните връзки между щамовете. Техниките за фингърпринтинг на пневмококи представляват сравняване на ДНК профилите. Чрез тях се регистрират различия в генетичния материал. Всяка от тези

техники може да бъде използвана за сравняване на близкородствени пневмококи, както и за разграничаване на неродствени видове с един и същ серотип.

Епидемиологичното типизиране е необходимо както за изучаване на генетичната родственоост между пневмококите, така и за изучаване на механизмите на разпространение на резистентни щамове *S. pneumoniae* сред хората. То позволява диференцирането на изолатите на молекулярно ниво, които с конвенционалните методи като тестовете за чувствителност към антибиотици и серотипизиране не могат да бъдат ясно разграничени.

Събраната информация от молекулярната биология и конвенционалните биохимични методи водят до спорни резултати, но PFGE доскоро е смятан за "златен стандарт" при определянето на епидемиологичното сродство при пневмококовите изолати (16,83). Изпълнението на PFGE е предпоставка за ефикасен мониторинг на епидемиологичното разпространение на резистентни пневмококи като точен идентификационен метод. Клиничните щамове могат да се различават по географско разпространение, чувствителност към различни антибиотици и серотип.

Използвахме CHEF - (contour-clamped homogeneous electric field) гел електрофореза за анализиране на ДНК макрорестрикционни фрагменти на пневмококовата геномна ДНК. ДНК рестрикционните профили получени чрез CHEF бяха стабилни и възпроизводими и позволяваха сравняване между отделните щамове *S.pneumoniae*. В редица проучвания PFGE е доказан като много добър дискриминиращ метод и ефективен способ за субтипизиране на щамове *S. pneumoniae*, при който може да се осъществи подразделяне на серотипове (16).

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.

Серотип 19А буди внимание с по-голямото си разпространение не само у нас, а и Европа и в Северна Америка (5,14,47,51,112,124). Понастоящем най-голям брой

проучвания са фокусирани върху него, поради глобалното разпространение на този множествено-резистентен пневмококов клон. Значително увеличение 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 (5,14,47,171,174,178).

Чрез щамовото типизиране се осигуряват лабораторни доказателства, че епидемиологично свързаните изолати са също и генетично свързани.

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. 22.

Серотип 19А се среща отдавна в България, в продължение на 21 години. Първите 19А пневмококови щамове са от 1992г. и продължават да се изолират и в последната 2013г. от проучването. Серотип 19А се среща при пациенти от всички възрастови групи, но най-голям беше процентът на пациентите в детската възраст до 5г. (78.8%). Сред останалите изолати, преобладаващ е броят на пациентите в горната екстремна възрастова група, след 55г. (9.6%). Клиничните материали, от които бяха изолирани щамове със серотип 19А са разнообразни. Срещаха се както инвазивни щамове - (17.3%) изолирани от пациенти с менингит, бактериемия, перитонит, така и неинвазивни респираторни щамове от пациенти с пневмония, остър и хроничен синусит и други инфекции на горните дихателни пътища - (42.3%). Делът на щамове от пациенти с остър среден отит беше също голям - (30.7%). Както беше споменато, серотип 19А е високо резистентен, почти всички щамове бяха множествено-резистентни, като от тях, тези, които проявяваха нечувствителност към четири и повече класа АБП преобладаваха в голям процент - (73.1%). Penicillin - нечувствителните 19А щамове бяха 46 (88.5%), като високо - резистентните с MIC  $\geq 2$  бяха 21.7%. Макролидната резистентност беше също широко представена : 39 щамове (75.0%) показваха такава резистентност. В първите години от изолирането на пневмококи от серотип 19А - (1992г. – 1995г.) причина за макролидната резистентност е била точкова мутация в L4 протеин - (9.6%), която в следващите години не се открива повече. В следващите години рибозомалното

метиране изцяло доминира над макролидните детерминанти за резистентност : *erm* (B) – (79.5%). Двойният механизъм представен от *erm*(B) и *mef*(E) се срещаше при (3.8%) от щамовете, а самостоятелно кодиран от *mef*(E) ген ефлукс – механизъм беше доказан само при един щам.

Определянето на макрорестрикционни PFGE - профили на пневмококовите щамове от серотип 19A беше извършено спрямо класифициране по Tenover (172). Според тази класификация, за принадлежащи към един рестрикционен модел се причисляват изолати, които при визуализиране след пулсова електрофореза дават разлики до 3 бенда. Тези изолати приехме за близкородствени до прекурсорният щам с определен рестрикционен модел. Техният PFGE профил се различаваше от основния с едно генетично събитие, напр. точкова мутация или инсерция или делеция на ДНК. Например, една спонтанна мутация създава нов хромозомен рестрикционен сайт (едно генетично събитие) с разделяне на рестрикционният фрагмент на два по-малки фрагменти, като сумата на размерите на двата по-малки фрагменти трябва да се доближава до размера на по-големият фрагмент. Загубата на първоначалният голям фрагмент е една разлика, а появата на два нови малки фрагмента представлява две допълнителни бенд разлики. По този начин се оформят три бенд разлики от основния рестрикционен модел. Останалите рестрикционни модели са потенциално – родствени. Техните PFGE профили се различават помежду си най-вероятно с две независими генетични събития, които продуцират 4-6 бенд разлики, които могат да се обяснят с прости инсерции или делеции на ДНК или прибавяне или загуба на рестрикционни места.

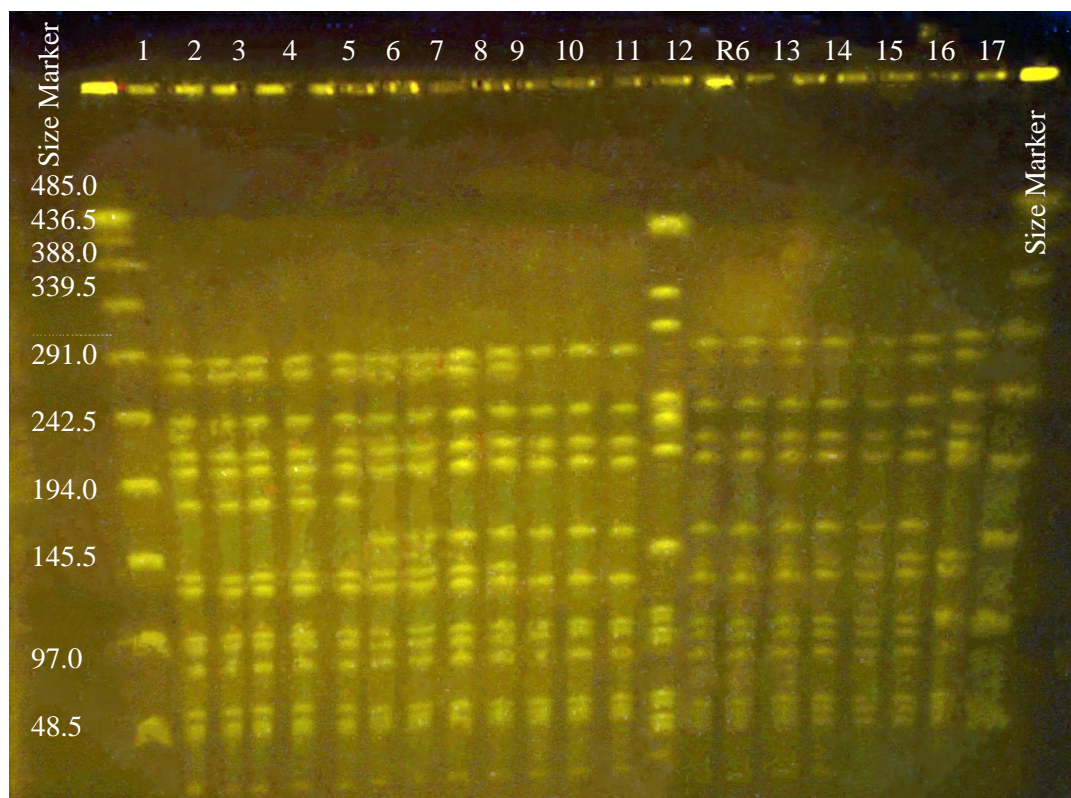
Резултатите от направените пулсови електрофорези доказаха 13 различни рестрикционни модела – от А до М и две подгрупи в рестрикционни профили С и F, в които щамовете се различаваха един от друг по повече от три бенда в PFGE-профил. Най-разпространен сред пневмококовите щамове от серотип 19A беше рестрикционен модел С (n=28) щам (53.8%) и обхващаща от C<sub>1</sub> до C<sub>5</sub> варианти. При всички щамове от рестрикционен модел С бяха доказани *erm*(B) гени, а при един щам бяха открити и двата гена *erm*(B) + *mef*(E). 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. За три представителя бяха определени рестрикционни

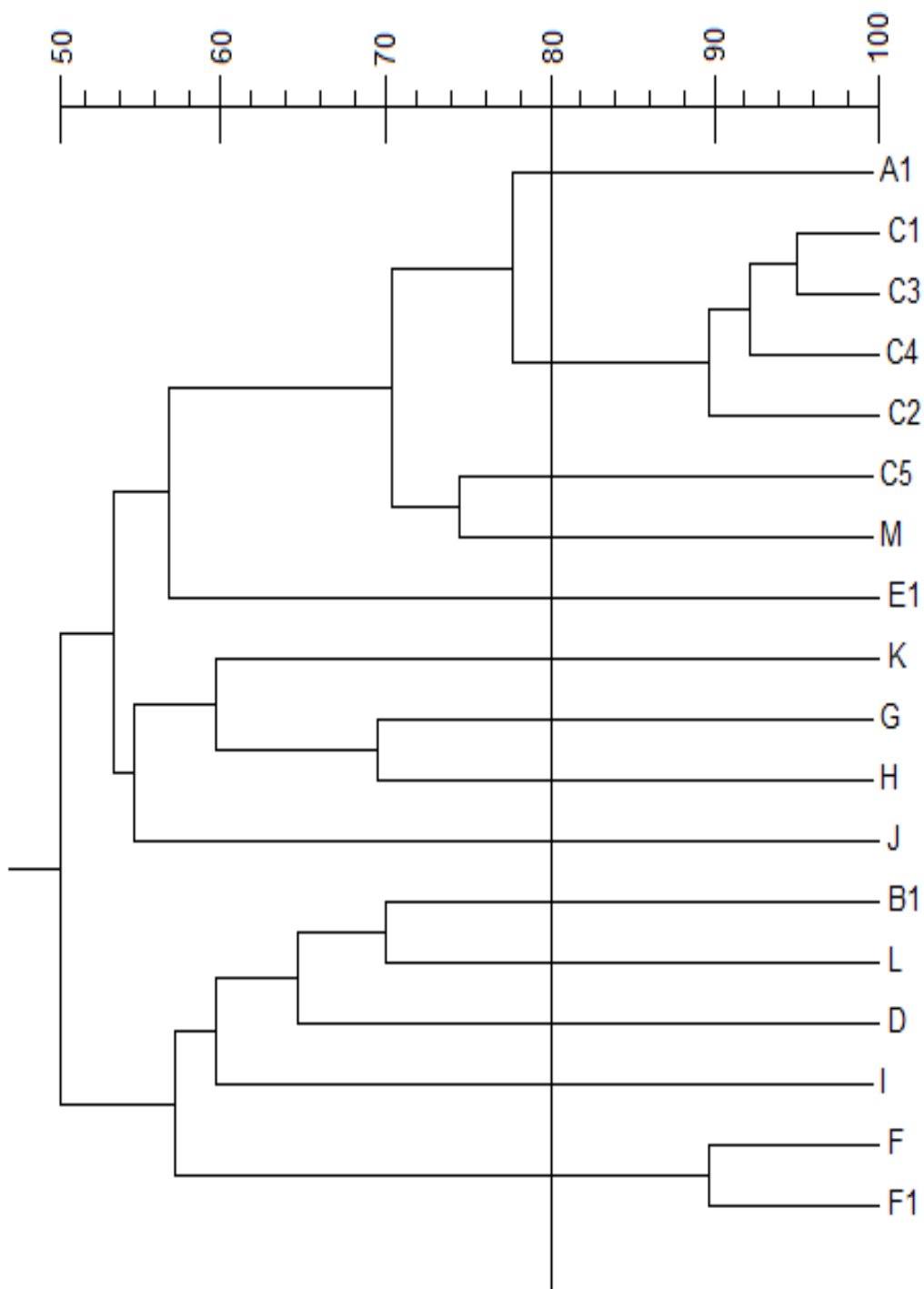
профили В, Е и G, съответно. Разпространението на всеки от тях в изучаваната популация беше по (5.8%). Щамовете от рестрикционен модел D бяха два (3.8%). Също два бяха щамовете от PFGE - профил F, но те представляваха два различни варианта F<sub>1</sub> и F<sub>2</sub>, т.като се различаваха по два бенда при визуализиране след направената пулсова електрофореза.

Резултати от пулсова електрофореза на тотална геномна ДНК на щамове *S.pneumoniae* са показани на Фигура.16.

Въз основа на получените резултати беше построена дендрограма, илюстрираща групирането на отделните рестрикционни модели, към които се причисляваха пневмококовите щамове. Дендрограмата отразяваше подреждането на клъстери, произведени от групирането на отделните PFGE - профили на щамовете *S.pneumoniae*. “Дървовидната структура” (дендрограмата) на получените PFGE- рестрикционните профили от 52 пневмококови щама от серотип 19А е изобразена на Фигура 17.

Фиг.16. PFGE профил на клинични щамове *S.pneumoniae* от серотип 19А с определен еднакъв С – рестрикционен модел.





Фиг.17. 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

Мултилокусното секвениране (MLST) е точен метод за автоматично ДНК секвениране и характеризирание на клинични пневмококови изолати, използващ секвенциите от външни фрагменти на седем (“house-keeping”) постоянно присъстващи гени при *S. pneumoniae* (21,54).

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. Комбинирането на алелите на седемте локуса осигурява алелен профил или секвенционен тип (ST). Връзката между пневмококовите изолати се получава чрез анализиране на различията между секвенционните типове (STs). Схемата на типирание е валидна за пневмококи с известна генетична неродственоост и чрез нея може да анализират до 6 билиона секвенционни типове.

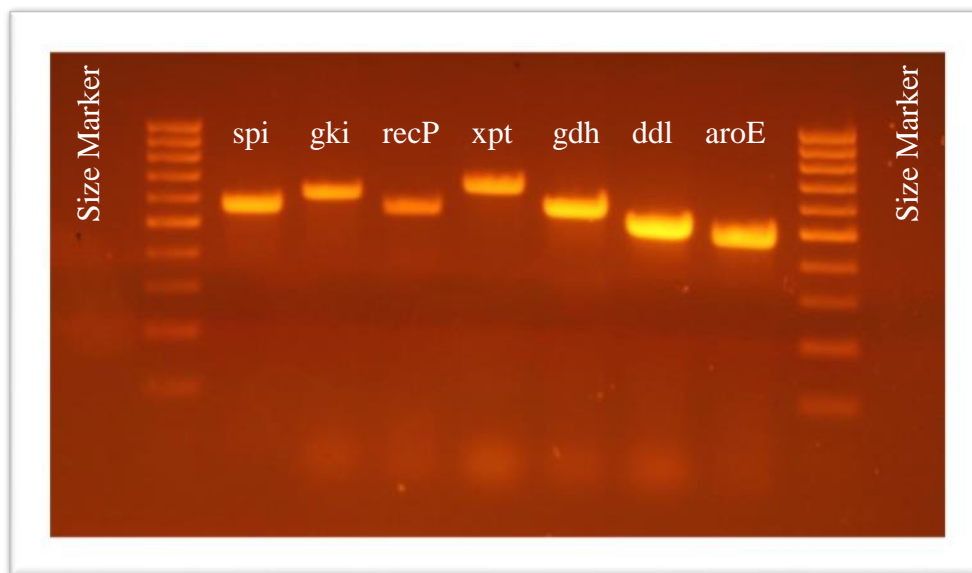
Родствената връзка между STs и серотиповете, предполага, че в по-продължителен период, капсуларните гени се пренасят хоризонтално в пневмококовата популация. MLST осигурява мощен нов подход за характеризирание на пневмококи, като осигурява молекулярно типирание на щамовете, което е електронно преносимо между лабораториите и може да се използва за проучване на популацията и еволюционната биология на тези микроорганизми.

Молекулярно типирание с MLST метод беше изпълнено за всички 52 щама *S.pneumoniae*, които са с доказан 19А 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*).

На следващата фигура са представени амплификационните продукти на седемте консервативни пневмококови гени.



Фиг.18. 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 секвенционния тип (ST).

Резултатите от мултилокусното типирание сравнени с рестрикционните типове от PFGE са представени в Таблица 23.

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

С най-голямо разпространение беше секвенционен тип 230 (ST230). Срещаше се сред 25 щам (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 С<sub>1</sub>, следван от С<sub>3</sub>, С<sub>2</sub>, С<sub>4</sub> и С<sub>5</sub> в низходящ ред. Със С-рестрикционен профил бяха още три щам от ST1611, ST7466, ST2013, съответно. ST1611 беше доказан и за други три щам (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 при пациент на 2г. възраст с инфекция на горни дихателни пътища. Щамът също беше множествено-резистентен и разполагаше с *erm(B)* ген. B - рестрикционен модел бе определен и за два други пневмококови щама от ST 66 (3.8%), единият от пациент с менингит, а другият от пациент с пневмония, с нечувствителност към Tetracycline и Trimethoprim-sulfamethoxazole и Erythromycin, Chloramphenicol и Trimethoprim-sulfamethoxazole, съответно.

ST663 е вторият по разпространение, доказан бе при 5 на брой (9.6%) от 19A 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 щама (5.8%). Резултатите от PFGE за тези пневмококи показаха силно различаващ се профил от другите, който беше определен като (G).

За два щама 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 щам (1.9%) от пациент с инфекция на горни дихателни пътища. Щамът беше множествено-резистентен и 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 щамове (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 еритромициновата 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.**

Анализите от MLST и eBurst доказват освен епидемиологична и генетична връзка между пневмококовите изолати в комплекса. Чрез e-BURST софтуерна програма беше определен клоналния произход на щамове *S. pneumoniae* и бяха идентифицирани родствените генотипове в пневмококовата популация.

С въведените данни, по зададения алгоритъм беше начертана радиална диаграма показваща произхода на откритите генотипове. Бактериалните щамове бяха разделени в групи според техните алелни профили, установени бяха единичните локусни варианти (SLV) и двойните локусни варианти (DLV) на получените секвенционни типове. Идентифициран беше предполагаемият първоизточник на наследствените типове.

Пространственото представяне на резултатите от e-Burst анализа са обобщени на Фигура 19.

Резултатите от e-Burst анализа на изследваните 52 пневмококови щамове, показва 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 щамове (63.5%). Всички тези секвенционни типове се различаваха само по един или два алела помежду си, като вариациите бяха в гени *aro*, *spi* или *ddl*. Останалите 11 секвенционни типа не попадаха в комплекс при така зададените условия. Те присъстваха като самостоятелни ST.

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%) подредени в низходящ ред.

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

Глобалното наблюдение на антибиотично – резистентни клонове *S. pneumoniae* по света се извършва в PMEN. Всички секвенционни типове бяха сравнени с данните от международната пневмококовата молекулярна епидемиологична мрежа – PMEN, която има за цел характеризиране, стандартизиране, именуване и класифициране на антибиотично - резистентни пневмококови клонове. Беше избрана идентичност от 5 алела от седемте локусни варианти и според това беше търсена принадлежност на изследваните пневмококови щамове към международно установените пневмококови клонове. Данните от този анализ са отразени в Таблица 23.

В СС230, 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 СС 230, бяха открити още 6 други СС принадлежащи към известни PMEN клонове и два ST без определен СС, 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<sup>23F</sup>-26). Различава се от първоначалният секвенционен тип на (Colombia<sup>23F</sup>-26) в два от седемте локуса. Понастоящем се изолира както в Северна Америка, така и в Европа (6,51) сред голям брой изолати с капсулно превключване, у нас като серотип 19A, характеризиращ се с множествена резистентност. Най-вероятната причина е силен антибиотичен натиск, заедно с капсулно превключване. СС663 стои по-далече във филогенетично отношение до прекурсорния тип и образува самостоятелен клонален комплекс, т.като се различава в повече от три алела с другите пневмококови изолати.

ST2013 се различава само в два – (*gki* и *xpt*) от седемте гени със ST230 и затова е негов двоен локусен вариант и най-близък във филогенетично отношение до него. Поради тази причина, той също е обхванат от PMEN – клон Denmark<sup>14</sup>-32.

За два други секвенционни типа – ST320 и ST352 се откри, че принадлежат към международен клон Taiwan<sup>19F</sup>-14. ST320 и ST352 помежду си са двойни локусни варианти поради единични нуклеотидни разлики само в два гена – *aro* и *ddl*. Клон Taiwan<sup>19F</sup>-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 (72,86,113).

ST199 стои по-далече във филогенетично отношение от коментираните до момента секвенционни типове - налице са нуклеотидни разлики в повече от четири от седемте гени. Данните от e-Burst анализите показват, че ST199 образува клонален комплекс с друг изолат от 19A – популацията - ST3836.

ST3836 е различен от ST199 само в гени – *aro* и *xpt* и затова е негов двоен локусен вариант. Двата ST199 и ST3836 попадат в международен клон

Netherlands<sup>15B</sup>-37, като ST199 е с абсолютно идентичен секвенционен профил със секвенционният профил на този клон в PMEN, а ST3836 има разлика с него само в един ген.

Клонален комплекс 66 (CC66) не образува локусни варианти с другите ST. С данните от мутилокусното типирание беше определена принадлежността на този комплекс към PMEN- клон Tennessee<sup>14</sup>-18, от който се различава по нуклеотидна замяна 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<sup>6B</sup> -20 и абсолютно идентичен алелен профил със секвенционният тип на референтният международния клон.

ST2632 не показва близко сходство на нуклеотидно ниво с другите секвенционни типове. Този ST не показва принадлежност към установените до момента PMEN – клонове, но принадлежеше към известна вече eBurst група.

Подобни резултати се получиха и за ST2365, който беше определен за един чувствителен пневмококов щам изолиран от конюктивален секрет. ST2365 също не показва принадлежност към установен до момента международен PMEN – клон, но принадлежеше към известна eBurst група.

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 England<sup>14</sup>-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 CSR<sup>14</sup>-10, като минимални различия се откриха в гени *recP* и *ddl*.

Подобни на нашите резултати бяха докладвани в MLST проучвания от Италия, Франция и Израел (51,64). При тях също бяха открити пневмококови щамове от серотип 19A с множествена-резистентност, които въз основа на секвенционните си типове се обединяваха в клон Denmark<sup>14</sup>-32 (ST230) и този клон преобладаваше над другите клонални комплекси. В тези проучвания от Европа обаче, преобладаващият секвенционен тип от клоналния комплекс беше ST276.

Няколко основни клона доминираха сред 19A пневмококовите изолати в световен план: CC81, CC193, CC199, CC230, CC320. В европейските страни като Швеция и Норвегия доминиращите клонални комплекси са CC 320, CC 199, CC 230

(135,163). С най-широко разпространение бяха щамове принадлежащи към Sweden<sup>15A</sup> – 25, Columbia<sup>23F</sup> -26, Taiwan<sup>19F</sup> – 14 и Denmark<sup>14</sup>-32. В Испания и Португалия преобладаваха щамове от Spain<sup>23F</sup>-1, Denmark<sup>14</sup>-32, Spain<sup>6B</sup>-2, France<sup>9V</sup>-3, В съседната на нас Турция преобладаваха СС66 и СС320, които се срещат и у нас (34). В по-северните европейски държави каквито са Дания и Финландия най – цитираните клонални комплекси бяха СС320, СС156 и СС 81 (103,159). В Полша изследваните 19А пневмококови щамове в по-голямата си част принадлежаха към РМЕМ – клонове – Spain<sup>23F</sup> -1, Poland<sup>23F</sup> – 16 и Netherlands<sup>14</sup>-35 (161).В различни проучвания от САЩ върху щамовете *S.pneumoniae* от серотип 19А най-коментирани бяха Columbia<sup>23F</sup> -26, Taiwan<sup>19F</sup> – 14 и Denmark<sup>14</sup>-32 и Tennessee<sup>14</sup>-18 (22,85,94).

Резултатите получени от PFGE и MLST показаха висок процент сходство-0.799 (0.609 -0.990), който беше изчислен с коефициент на Wallace. Въпреки тези високи стойности на Wallace, два ST бяха открити в различни PFGE групи, такива бяха ST1611 и ST7466. Независимо от това, стойностите на Wallace показват, че повечето изолати, които принадлежат към същата генетична линия, определена от eBURST анализа, са класифицирани 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.

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

**Табл.22.** Данни за изледваните щамове, антибиотичната резистентност, макролид-резистентния генотип и генетичната структура на 52 серотип 19А щама *S. pneumoniae*: 1992-2013г.

Щам по.	Година на изолиране	Възраст на пациента	Източник	Диагноза <sup>a</sup>	Антибиотично резистентен профил <sup>b</sup>	МИК ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sup>b</sup>		Макролид резистентен генотип	PFGE профил <sup>c</sup>	ST <sup>d</sup>
						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	$\leq 0.12$	<i>ermB</i>	C <sub>1</sub>	230
2194 Pl	1997	3 y	Blood	CAP	P,E,CLI,T,SXT	0.12	$\leq 0.12$	<i>ermB</i>	C <sub>1</sub>	230
6027 Pir	1998	> 18 y	Blood	CAP	LEVO	$\leq 0.03$	$\leq 0.12$	-	K	423
268 HID	1998	63 y	CSF	Bacterial meningitis	T, SXT	$\leq 0.03$	$\leq 0.12$	-	B	66
23/1 Sof	2000	10 y	Blood	CAP	E,C,SXT	$\leq 0.03$	$\leq 0.12$	<i>mefE</i>	B	66
5800 CM	2000	5 y	MEF	AOM	P,E,CLI,T,SXT	0.12	$\leq 0.12$	<i>ermB</i>	C <sub>1</sub>	230
2402 Pd	2001	1 y	MEF	AOM	P,E,CLI,T,SXT	0.12	$\leq 0.12$	<i>ermB</i>	C <sub>4</sub>	1611
1458 L	2001	3 y	MEF	AOM	P,E,CLI,T,SXT	0.12	$\leq 0.12$	<i>ermB</i>	C <sub>1</sub>	230
476 Vr	2001	2 y	MEF	AOM	P,E,CLI,T,SXT	0.12	$\leq 0.12$	<i>ermB</i>	C <sub>1</sub>	230
08507 R	2002	2 y	MEF	AOM	P,E,CLI,T,SXT	0.12	$\leq 0.12$	<i>ermB</i>	C <sub>3</sub>	230
1195 Pd	2003	6 m	Pleural fluid	CAP	P,E,CLI,T,SXT	0.25	$\leq 0.12$	<i>ermB</i>	C <sub>5</sub>	230
5279 Pd	2004	5 m	MEF	AOM	P,E,CLI,T,SXT	0.25	$\leq 0.12$	<i>ermB</i>	E	276
9609 Pir	2005	77 y	Blood	CAP	P	0.12	$\leq 0.12$	-	D	3836
1059 Pl	2005	74 y	CSF	Bacterial meningitis	Susceptible	$\leq 0.03$	$\leq 0.12$	-	G	2632
993 Pd	2005	2 y	Nose	URTI	P,T,SXT	0.25	$\leq 0.12$	-	I	1611
2268 Pl	2006	5 m	MEF	AOM	P,E,CLI,T,SXT	0.25	$\leq 0.12$	<i>ermB</i>	C <sub>3</sub>	230
569 ПСН	2006	6 m	Blood	Bacteraemia	P,E,CLI,T,SXT	0.12	$\leq 0.12$	<i>ermB</i>	C <sub>1</sub>	230
2149 CM	2006	61 y	Sputum	AECB	P,E,CLI,T,LEVO	0.25	$\leq 0.12$	<i>ermB</i>	C <sub>1</sub>	230
264 AH	2006	84 y	Sputum	COAD	P,E,CLI,T,SXT	0.25	$\leq 0.12$	<i>ermB</i>	C <sub>1</sub>	230
284 Pd	2007	4 m	MEF	AOM	P,E,CLI,T,SXT	0.12	$\leq 0.12$	<i>ermB</i>	C <sub>1</sub>	230
9611 Pd	2007	3 y	MEF	AOM	P,E,CLI,T,SXT	0.12	$\leq 0.12$	<i>ermB</i>	C <sub>2</sub>	230
1049 Pl	2007	25 y	MEF	AOM	P,E,CLI,T,SXT,LEVO	0.25	0.25	<i>ermB</i>	C <sub>1</sub>	230
4203 Pl	2007	8 m	Eye	Conjunctivitis	P,E,CLI,T,SXT	0.25	$\leq 0.12$	<i>ermB</i>	C <sub>2</sub>	230
83 Pl	2007	2 y	Nph	URTI	P,E,CLI,T,SXT	0.25	0.25	<i>ermB</i>	B	7466
374 Pd	2007	1 y	Nph	URTI	P,T,SXT	0.12	$\leq 0.12$	-	I	1611
3928 Vn	2007	3 y	Nose	URTI	P,E,CLI,T,SXT	2.0	1.0	<i>ermB</i>	M	352



3663 CM	2007	7 y	Nph	URTI	P,E,CLI,T,SXT	0.12	≤ 0.12	<i>ermB</i>	C <sub>1</sub>	230
4704 PI	2007	10 m	Nph	URTI	P,E,CLI,T,SXT	0.12	≤ 0.12	<i>ermB</i>	C <sub>3</sub>	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 <sub>1</sub>	230
8501 Pd	2008	2 y	MEF	AOM	P,E,CLI,T,SXT	0.12	≤ 0.12	<i>ermB+mefE</i>	C <sub>1</sub>	230
378 PI	2008	2 y	Throat	URTI	P,T,SXT	0.25	0.25	-	C <sub>3</sub>	2013
395 PI	2008	3 y	Nose	Acute sinusitis	P,E,CLI,T,SXT	0.12	≤ 0.12	<i>ermB</i>	C <sub>2</sub>	230
443 PI	2008	59 y	Nose	Chronic sinusitis	P,E,CLI,T,SXT	0.12	≤ 0.12	<i>ermB</i>	C <sub>2</sub>	7466
529 PI	2008	2 y	Nose	Chronic sinusitis	P,E,CLI,T,SXT	4.0	1.0	<i>ermB</i>	C <sub>2</sub>	230
1366 PI	2008	5 m	Nose	URTI	P,E,CLI,T,SXT	0.5	0.25	<i>ermB</i>	C <sub>3</sub>	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 <sub>3</sub>	230
345 PI	2009	2 y	Nose	CAP	P,E,CLI,T,SXT	0.12	≤ 0.12	<i>ermB</i>	C <sub>4</sub>	230
2401 Pd	2010	5 m	MEF	AOM	P,E,CLI,T,SXT	1.0	0.5	<i>ermB+mefE</i>	F <sub>1</sub>	320
7643 DN	2010	28 y	Perytoneal fluid	Peritonitis	P,E,CLI,T,SXT,CTX	8.0	2.0	<i>ermB</i>	F <sub>2</sub>	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 <sub>1</sub>	230

<sup>a</sup> MEF, ексудат 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.

<sup>b</sup> 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.

<sup>c</sup> PFGE, пулсова електрофореза.

<sup>d</sup> ST, секвенционен тип.

**Табл.23.** Разпределение на клоналните комплекси (CC) и секвенционните типове (ST) спрямо PFGE профилите на 52 щама от серотип 19А.

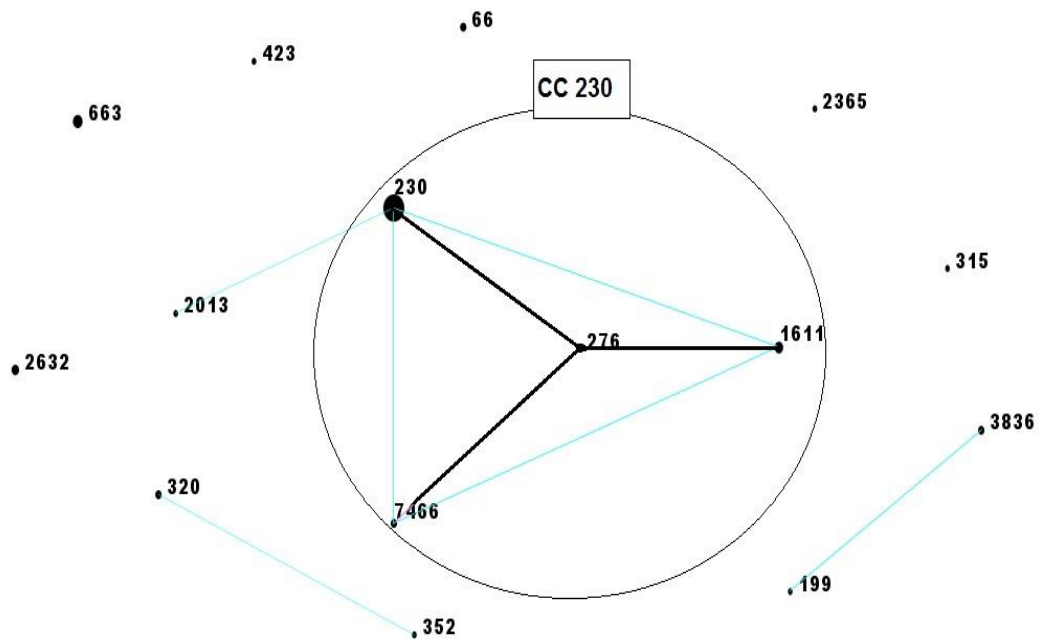
Клонален комплекс (CC) <sup>a</sup>	PMEN клон <sup>b</sup>	Но. (%)	ST в рамките на всеки клон (%)	PFGE профил (No.)
CC230	Denmark <sup>14</sup> -32/ST230	33 (63.5)	230 (48.1), 1611 (1.9), 7466 (1.9), 2013 (1.9) 1611 (5.8) 276 (1.9) 7466 (1.9)	C (28) I (3) E (1) B (1)
CC663	Colombia <sup>23F</sup> -26/ST338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

<sup>a</sup> 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 първоначалния предшественик.

<sup>b</sup> ST е родствен на референтен PMEN клон, ако е идентичен, SLV или DLV.

<sup>c</sup> ST, без определен CC, но принадлежащ към известна eBURST група.

<sup>d</sup> ST423 е DLV на две eBURST групи.



Фиг. 19. 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 щамове. 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.

## Изводи

1. За периода на проучване 2006 – 2013г. изследваните 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 ( $\geq 0.12$  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 към Penicillin (МИК,  $\geq 2$  mg/L). За сравнение с 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,  $\geq 2$  mg/L).

За периода 1991-1993г. нечувствителност към Penicillin са показали **24.3%** от изследваните пневмококови щамове.

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-нечувствителните *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 19А 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-широкоспектърна 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 еритромицин. Прави впечатление тенденцията за увеличаване на броя на щамовете, носещи и двата гена (n = 34, 14.2%), което осигурява на

тези пневмококови 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 модела (от А до М - PFGE тип) сред всички изследвани 19А пневмококови щамове. Най-разпространен сред пневмококовите щамове от серотип 19А беше пулсотип С (n=28) щама (53.8 %) и обхващаше пет субтипа (C<sub>1</sub> до C<sub>5</sub>) рестрикционни варианти.

**10.** MLST молекулярното типичане показва присъствие на 15 секвенционни типа (ST) сред 19А пневмококовите щамове в България. Беше определен клоналния произход на щамовете *S. pneumoniae* и бяха идентифицирани родствениите генотипове. Беше доказан основният клонален комплекс CC 230 (ST230) (63.5%), който отговаря на международния PMEN клон Denmark<sup>14</sup>-32. Този клон е често срещан и в голяма част от европейските страни, но преобладаващият секвенционен тип при тях беше ST276 от клоналния 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 и загуба на резистентни гени в рамките на една клонална група и разпространение на резистентни гени към нови клонални групи.

## VII. Справка за приносите

### Приноси с потвърдителен характер

1. Направени са проучвания върху антибиотичната чувствителност на инвазивни и неинвазивни респираторни щамове *S.pneumoniae* от пациенти с пневмококови инфекции за период от осем години (2006 – 2013г.) и са направени сравнителни проучвания върху чувствителността на АБП според локализацията на инфекцията. Резултатите доказаха увеличение на пеницилин 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 задължителният имунизационен 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 “house keeping” 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 настоящия 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 характеризирание на клинично значими щамове *S.pneumoniae*, включващ:
  - 1.1. Антибиотична чувствителност
  - 1.2. Фенотип на макролидна-резистентност
  - 1.3. Серотипиране
  - 1.4. Генотипиране за антибиотико-резистентни щамове и на пневмококовия геном
2. Внедрени бяха молекулярно-генетични методи за изследване и анализ на щамовете *S. pneumoniae*:
  - 1.1. Нуклеотидно секвениране на резистентни гени.
  - 1.2. Рестрикционен-ендонуклеазен анализ на генни фрагменти (RFLP)
  - 1.3. Епидемиологично молекулярно типирание с PFGE.
  - 1.4. Мултилокусно секвениране на седем постоянни гени при *S. pneumoniae* и определяне на секвенционния MLST тип.
  - 1.5. Използване на софтуерни продукти и „on line” 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-генетичното типирание.

## VIII. Публикации и научни прояви, свързани с дисертацията

### Реализирани научни публикации:

1. **Александрова А.**, Сечанова Л. Молекулярно - биологични методи за епидемиологично типирание 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<sub>B</sub> genotype is predominant molecular genetic mechanism among erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* for the period : 2006 - 2008 – Journal of IMAV. 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  
(IF<sub>2012</sub> - 0. 825)
5. Setchanova LP, Kostyanov 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>  
(IF<sub>2012</sub> - 1.623)

### 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. MLSB генотип преобладава като молекулярно-генетичен механизъм при еритромицин-резистентните *Streptococcus pneumoniae* за периода: 2006-2008. XIX асамблея на ИМАВ – 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. 7<sup>th</sup> 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. 24<sup>th</sup> annual assembly of International medical association Bulgaria (IMAB), Varna, 2014
6. Kostyanev T, Setchanova L, **Alexandrova A**, Mitov I, Nashev D, Kantardjiev T. Serotype distribution and antibiotic resistance among *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* isolates from children with acute otitis media in Bulgaria before the introduction of conjugate vaccines. 23<sup>th</sup> ECCMID (European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases). 27-30 April, Berlin, Germany, 2013. (eP740).

## Литературна справка

1. Александрова А., Сечанова Л. Молекулярно-биологични методи за епидемиологично типирание и изследване на антибиотичната резистентност на *Streptococcus pneumoniae*. Инфектология. 2008. XLV, 2:4-11.
2. Сечанова Л, Александрова А., Хайдушка И, Средкова М, Божкова К. и И. Митов. Серотип и антимикробна резистентност на щамове *Streptococcus pneumoniae* изолирани от деца с инвазивна и респираторна инфекция преди въвеждането на пневмококовите конюгирани ваксини в България. Педиатрия. 2010. L, 2:39-43.
3. 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. 2009,3: 3-6.
4. Сечанова Л., Гергова Р, Йонева М, Средкова М, Томова И, И. Митов. In vitro активност на антимикробни средства за респираторни изолати *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* и *Moraxella catarrhalis*. Съвременна медицина, 2004. LV, 6: 3-12.
5. Aguiar SA, Pinto RA, Nunes S., Serrano JM et al. Denmark14-230 Clone as an Increasing Cause of Pneumococcal Infection in Portugal within a Background of Diverse Serotype 19A Lineages. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. 2010, Vol. 48, No. 1, p. 101–108
6. Aguiar SI, Brito MJ, Gonçalo-Marques J, Melo-Cristino J, Ramirez M: Serotypes 1, 7F and 19A became the leading causes of pediatric invasive pneumococcal infections in Portugal after 7 years of heptavalent conjugate vaccine use. *Vaccine* 2010, 28:5167-5173
7. Aguiar SI, Isa Serrano, Francisco R Pinto, José Melo-Cristino and Mario Ramirez. The presence of the pilus locus is a clonal property among pneumococcal invasive isolates. *BMC Microbiology* 2008, 8:41 doi:10.1186/1471-2180-8-41
8. Alexandrova A., Setchanova L., Sredkova M. et al. MLSB genotype is predominant molecular genetic mechanism among erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* for the period : 2006-2008. Journal of IMAB. 2009, book 1,p:36-38.

9. Altun HU, Hascelik G, Gür D, Eser OK. Invasive pneumococci before the introduction of pneumococcal conjugate vaccine in Turkey: antimicrobial susceptibility, serotype distribution, and molecular identification of macrolide resistance. *J Chemother*. 2014 Feb 18;1973947814Y0000000176.
10. Ambrose KD, Nisbet R, Stephens DS: Macrolide efflux in *Streptococcus pneumoniae* is mediated by a dual efflux pump (*mel* and *mef*) and is erythromycin inducible. *Antimicrob Agents Chemother* 2005, 49:4203-4209
11. Antonio M., Hannah Dada-Adegbola, Ekow Biney, Tim Awine et al., Molecular epidemiology of pneumococci obtained from Gambian children aged 2–29 months with invasive pneumococcal disease during a trial of a 9-valent pneumococcal conjugate vaccine *BMC Infectious Diseases* 2008, 8:81
12. Antonio MM., Dada-Adegbola H, Ekow B. et al. Molecular epidemiology of pneumococci obtained from Gambian children aged 2–29 months with invasive pneumococcal disease during a trial of a 9-valent pneumococcal conjugate vaccine. *BMC Infectious Diseases*. 2008, 8:81
13. Appelbaum PC. Resistance among *Streptococcus pneumoniae*: implications for drug selection. *Clin Infect Dis*. 2002; 34:1613-1620.
14. Ardanuy C., Rolo D., Fenoll A, David Tarrago et al. Emergence of a multidrug-resistant clone (ST320) among invasive serotype 19A pneumococci in Spain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2009, 64, 507–510
15. Bagnoli F., Moschioni M., Donati C. et al. A Second Pilus Type in *Streptococcus pneumoniae* Is Prevalent in Emerging Serotypes and Mediates Adhesion to Host Cells. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, Vol. 190, No. 15, 2008, p. 5480–5492
16. Basim E. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) Technique and its use in Molecular Biology. *Turk J Biol* 25 (2001) 405-418
17. Bentley SD, Klugman KP, McGee L. Determinants of invasiveness beneath the capsule of the pneumococcus. *J Infect Dis*. 2014 Feb 1;209(3):321-2. doi: 10.1093/infdis/jit483.
18. Birtles A., McCarthy N., Sheppard CL et al. Multilocus Sequence Typing Directly on DNA from Clinical Samples and a Cultured Isolate To Investigate Linked Fatal Pneumococcal Disease in Residents of a Shelter for

- Homeless Men. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, 2005, Vol. 43, No. 4, p. 2004–2008
19. Blaschke AJ. Interpreting Assays for the Detection of *Streptococcus pneumoniae*. CID 2011;52, Suppl 4.
  20. Bley C, van der Linden M, Reinert RR: *mef(A)* is the predominant macrolide resistance determinant in *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* in Germany. *Int J Antimicrob Agents* 2011, 37:425-431
  21. Boers SA, van der Reijden WA, Jansen R. High-Throughput Multilocus Sequence Typing: Bringing Molecular Typing to the Next Level. *PloS ONE*. 2012, 7(7): 39630.
  22. Bowers JR, Driebe EM, Nibecker JL et al. Dominance of multidrug resistant CC271 clones in macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Arizona. *BMC Microbiology* 2012, 12:12
  23. Bozdogan B, Appelbaum PC, Kelly LM et al. Activity of telithromycin and seven other agents against 1034 pediatric *Streptococcus pneumoniae* isolates from ten central and eastern European centers. *Clin. Microbiol. Infect.* 2003; 9: 653-661.
  24. Brito DA, Ramirez M, de Lencastre H. Serotyping *Streptococcus pneumoniae* by multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2003. 43(6):2378-2384.
  25. Brown SD., Farrell DJ and Morrissey I. Prevalence and Molecular Analysis of Macrolide and Fluoroquinolone Resistance among Isolates of *Streptococcus pneumoniae* Collected during the 2000-2001 PROTEKT US Study. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, 2004, Vol. 42, No. 11, p. 4980–4987
  26. Brueggemann AB, Golubchik T, Street T, Gertz RE Jr, Pneumococcal genome sequencing tracks a vaccine escape variant formed through a multi-fragment recombination event. *Nat Genet.* 2012 Jan 29;44(3):352-5. doi: 10.1038/ng.1072
  27. Canu A, Malbruny B, Coquemont M, Davies TA, Appelbaum PC, Leclercq R: Diversity of ribosomal mutations conferring resistance to macrolides, clindamycin, streptogramin, and telithromycin in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2002, 46(1):125-131
  28. Carrico JA, Silva-Costa C., Melo-Cristino J, Pinto FR et al. Illustration of a Common Framework for Relating Multiple Typing Methods by Application

to Macrolide-Resistant *Streptococcus pyogenes*. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, 2006, Vol. 44, No. 7, p. 2524–2532

29. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases, The Pink Book. 9th ed., Jan. 2006a.
30. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Invasive pneumococcal disease in children 5 years after conjugate vaccine introduction-eight states, 1998-2008. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2008; 57(6): 144-148
31. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Licensure of a 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV13) and recommendations for use among children—Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2010. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2010 Mar 12;59(9):258–61.
32. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Morbidity and Mortality Weekly Report. Prevention of Pneumococcal Disease Among Infants and Children - Use of 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine and 23-Valent Pneumococcal Polysaccharide Vaccine [www.cdc.gov/mmwr.2010 / Vol. 59 / No. RR-11](http://www.cdc.gov/mmwr.2010/Vol.59/No.RR-11)
33. Ceyhan M, Gurler N, Yaman A, Ozturk C, Oksuz L, Ozkan S et al. Serotypes of *Streptococcus pneumoniae* Isolates from Children with Invasive Pneumococcal Disease in Turkey: Baseline Evaluation of the Introduction of the Pneumococcal Conjugate Vaccine Nationwide. Clin Vaccine Immunol 2011; 18 (6); 1028-1030.
34. Ceyhan M, I. Yildirim, C.L.Sheppard, R.C.George. Pneumococcal serotypes causing pediatric meningitis in Turkey: application of a new technology in the investigation of cases negative by conventional culture. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2010. 29:289-293.
35. Chappuy H, Keite K, Gehri M, Tabin R. et al., Nasopharyngeal carriage of individual *Streptococcus pneumoniae* serotypes during pediatric radiologically confirmed community acquired pneumonia following PCV7 introduction in Switzerland. BMC Infectious Diseases 2013, 13:357
36. Clarke SC. Control of pneumococcal disease in the United Kingdom - the start of a new era. J Med Microbil 2006; 55: 975-980.
37. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 23<sup>th</sup> informational supplement. 2013. M100-S23.



38. Cochetti I., Vecchi M, Mingoia M. et al. Molecular Characterization of Pneumococci with Efflux-Mediated Erythromycin Resistance and Identification of a Novel *mef* Gene Subclass, *mef*(I). *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, 2005, Vol. 49, No. 12, p. 4999–5006
39. Coffey TJ, Enright MC, Daniels M et al. Recombinational exchanges at the capsular polysaccharide biosynthetic locus lead to frequent serotype changes among natural isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* 1998 Jan;27(1):73-83.
40. Cohen R, Levy C, Bonnet E, et al. Dynamic of pneumococcal nasopharyngeal carriage in children with acute otitis media following PCV7 introduction in France. *Vaccine* 2010, 28:6114-6121
41. Corne' H., Klaassen W. and Mouton JW. Molecular Detection of the Macrolide Efflux Gene: To Discriminate or Not To Discriminate between *mef*(A) and *mef*(E). *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, 2005, Vol. 49, No. 4, p. 1271–1278
42. Cornick JE, Harris SR, Parry CM, et al., Genomic identification of a novel co-trimoxazole resistance genotype and its prevalence amongst *Streptococcus pneumoniae* in Malawi. *J Antimicrob Chemother.* 2014 Feb; 69(2):368-74.
43. Croucher NJ, Simon R. Harris, Fraser C et al. Rapid pneumococcal evolution in response to clinical interventions. *Science.* 2011 January 28; 331(6016): 430–434.
44. D. Greenberg, Speert DP, E. Mahenthiralingam and the CPS/LCDC IMPACT Monitoring Network Division of Infectious and Immunological Diseases, Department of Pediatrics, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada. Emergence of Penicillin-Nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* Invasive Clones in Canada. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, 2002, Vol. 40, No. 1, p. 68–74
45. Dabboussi F, Allouche S, Mallat H, Hamze M. Prevalence of first-step mutants among levofloxacin-susceptible isolates of *Streptococcus pneumoniae* in north Lebanon. *J Chemother.* 2013 ;25(6):328-31.
46. Dagan R, Klugman KP. Impact of conjugate pneumococcal vaccines on antibiotic resistance. *Lancet Infect Dis* 2008; 8: 785-795.

47. Dagan R., Givon-Lavi N., Leibovitz E., et al. Introduction and Proliferation of Multidrug-Resistant *Streptococcus pneumoniae* Serotype 19A Clones That Cause Acute Otitis Media in an Unvaccinated Population. *The Journal of Infectious Diseases* 2009; 199:776–85
48. Del Grosso M, Camilli R, Iannelli F, Pozzi G, Pantosti A. The *mef(E)*-carrying genetic element (mega) of *Streptococcus pneumoniae*: insertion sites and association with other genetic elements. *Antimicrob Agents Chemother* 2006, 50:3361-3366
49. Del Grosso M, Iannelli F, Messina C, Santagati M, Petrosillo N, Stefani S, Pozzi G, Pantosti A: Macrolide efflux genes *mef(A)* and *mef(E)* are carried by different genetic elements in *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 2002, 40:774-778
50. Dobay O, Ungvari A, Kardos S, Kristof K, Hajdu E, Szabo J et al. Genotypic and phenotypic characterisation of invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates from Hungary, and coverage of the conjugate vaccines. *J Clin Pathol* 2010; 63(12): 1116-1120.
51. Dortet L, Ploy MC, Poyart C, Raymond J. Emergence of *Streptococcus pneumoniae* of serotype 19A in France: molecular capsular serotyping, antimicrobial susceptibilities, and epidemiology. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009. 65(1):49-57.
52. Elberse K, Witteveen S, van der Heide H. et al. Sequence Diversity within the Capsular Genes of *Streptococcus pneumoniae* Serogroup 6 and 19. *PLoS ONE.* 2011, 6(9): 25018.
53. Elberse KEM, Nunes S, Sa'-Lea~o R et al. Multiple-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis for *Streptococcus pneumoniae*: Comparison with PFGE and MLST. *PLoS ONE* 2011. 6(5): 19668.
54. Enright M. and Spratt B. A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae* : identification of clones associated with serious invasive disease *Microbiology* 1998, 144 : 3049-3060
55. European Medicines Agency (EMA). Summary of positive opinion for Prevenar 13. London, 24 September 2009. Available from: <http://emea.europa.eu/>
56. Farrell DJ, Jenkins SG, Brown SD, Patel M, Lavin BS, Klugman KP: Emergence and spread of *Streptococcus pneumoniae* with *erm(B)* and *mef(A)* resistance. *Emerg Infect Dis* 2005, 11:851-858

57. Farrell DJ, Morrissey I, Bakker S, Morris L, Buckridge S, Felmingham D: Molecular epidemiology of multiresistant *Streptococcus pneumoniae* with both *erm*(B) and *mef*(A)-mediated macrolide resistance. *J Clin Microbiol* 2004, 42:764-768
58. Feil E., Bao C. Li, David M. Aanensen, William P. Hanage and Brian G. Spratt. eBURST: Inferring Patterns of Evolutionary Descent among Clusters of Related Bacterial Genotypes from Multilocus Sequence Typing Data. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 2004, p. 1518–1530 Vol. 186, No. 5, p: 1518–1530
59. Feil E., Smith J., Enright M. and Spratt B. Estimating Recombinational Parameters in *Streptococcus pneumoniae* From Multilocus Sequence Typing Data *Genetics* 2000, 154: 1439–1450
60. Fenoll A, Granizo JJ, Aguilar L. et al. Temporal trends of invasive *Streptococcus pneumoniae* serotypes and antimicrobial resistance patterns in Spain from 1979 to 2007. *J Clin Microbiol.* 2009; 47(4):1012-1020.
61. Fereshteh F., Leprohon Ph, Légaré D. and Ouellette M. Whole genome sequencing of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* reveals mutations in penicillin-binding proteins and in a putative iron permease *Genome Biology* 2011, 12:R115
62. Francisco A., Bugalho M., Ramirez M., and Carriço J. Global optimal eBURST analysis of multilocus typing data using a graphic matroid approach *BMC Bioinformatics* 2009, 10:152
63. Gajić I, Mijač V, Ranin L, Andjelković D, Radičević M, Opavski N. Invasive isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Serbia: antimicrobial susceptibility and serotypes. *Srp Arh Celok Lek.* 2013;141(1-2):48-53.
64. Gherardi G., Fabio D'Ambrosio, Visaggio D. et al. Serotype and Clonal Evolution of Penicillin-Nonsusceptible Invasive *Streptococcus pneumoniae* in the 7-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine Era in Italy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2012, Vol. 56 - 9 p. 4965–4968
65. Goering RV. Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. *Infect Genet Evol.* 2010;10(7):866-75.
66. Gomez EG. de la Pedrosa, Morosini M, van der Linden M. et al., Polyclonal Population Structure of *Streptococcus pneumoniae* Isolates in Spain

Carrying *mef* and *mef* plus *erm*(B). *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, 2008, Vol. 52, No. 6, p. 1964–1969

67. Goosens H, Riedel S, Beekmann SE et al. Antimicrobial use in Europe and antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2007 Jul;26(7):485-90.
68. Grall N, Hurmic O, Al Nakib M., et al., Epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* in France before introduction of the PCV-13 vaccine. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011. 30:1511-1519.
69. Green M., Mason E., Kaplan SL et al. Increase in Prevalence of *Streptococcus pneumoniae* Serotype 6C at Eight Children's Hospitals in the United States from 1993 to 2009. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, 2011, Vol. 49, No. 6, p. 2097–2101
70. Green MC, Mason EO, Sheldon L. et al. Increase in Prevalence of *Streptococcus pneumoniae* Serotype 6C at Eight Children's Hospitals in the United States from 1993 to 2009. *J Clin Microbiol* 2011, Vol. 49, No. 6: 2097–2101
71. Greiner O., Day PJ., Bosshard P. et al., Quantitative Detection of *Streptococcus pneumoniae* in Nasopharyngeal Secretions by Real-Time PCR. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*
72. Grivea IN, Sourla A, Ntokou E et al. Macrolide resistance determinants among *Streptococcus pneumoniae* isolates from carriers in Central Greece. *BMC Infect Dis*. 2012;12:255.
73. Grivea IN, Tsantouli AG, Chryssanthopoulou DC, Syrogiannopoulos GA: Interaction of the heptavalent pneumococcal conjugate vaccine and the use of individual antibiotics among children on nasopharyngeal colonization with erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010, 29:97-105
74. Grivea IN, Tsantouli AG, Michoula AN, Syrogiannopoulos GA. Dynamics of *Streptococcus pneumoniae* nasopharyngeal carriage with high heptavalent pneumococcal conjugate vaccine coverage in Central Greece. *Vaccine* 2011, 29:8882-8887.
75. Gulay Z, Ozbek OA, Bicmen M, Gur D: Macrolide resistance determinants in erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Turkey. *Jpn.J.Infect.Dis* 2008, 61(6):490-493

76. Hackela M., Lascols C, Bouchillon S. et al. Serotype prevalence and antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates among global populations. *Vaccine* 31 (2013) 4881– 4887
77. Hanage W., Kaijalainen T., Herva E., et al., Using Multilocus Sequence Data To Define the Pneumococcus *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 2005, Vol. 187, No. 17: 6223–6230
78. Hanniffy SB, Carter AT, Hitchin E, Wells JM. Mucosal delivery of a pneumococcal vaccine using *Lactococcus lactis* affords protection against respiratory infection. *J Infect Dis.* 2007;195(2):185-93.
79. Hassan-King M., Baldech I., Secka O., Falade A. and Greenwood B. Detection of *Streptococcus pneumoniae* DNA in Blood Cultures by PCR. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, 1994, Vol. 32, No. 7, p. 1721-1724
80. Hathaway LJ, Brugger SD, Morand B, Bangert M, Rotzetter JU. et al. Capsule Type of *Streptococcus pneumoniae* Determines Growth Phenotype. *PLoS Pathog* 2012. 8(3): 1002574
81. Hausdorff WP. Do pneumococcal conjugate vaccines provide any cross-protection against serotype 19A? *BMC Pediatr.* 2010;10:4. doi: 10.1186/1471-2431-10-4.
82. Hausdorff WP, Hoet B. and Schuerman L. Do pneumococcal conjugate vaccines provide any cross-protection against serotype 19A? *BMC Pediatrics* 2010, 10:4
83. Herschleb J., Ananiev G. and Schwartz DC. Pulsed-field gel electrophoresis. *Nature.*2007:10.1038
84. Hicks LA, Harrison LH, Flannery B, Hadler JL, Schaffner W, Craig AS et al. Incidence of pneumococcal disease due to non-pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) serotypes in the United States during the era of widespread PCV7 vaccination, 1998-2004. *J Infect Dis* 2007; 196(9):1346-1354.
85. Hiller NL, Eutsey RA, Powell E, Earl JP, Janto B, et al. Differences in Genotype and Virulence among Four Multidrug-Resistant *Streptococcus pneumoniae* Isolates Belonging to the PMEN1 Clone. *PLoS ONE* 2011. 6(12): 28850.
86. Hoa PL, Susan S. Chiub, Anga I. and Yu-Lung L. Serotypes and antimicrobial susceptibilities of invasive *Streptococcus pneumoniae* before

- and after introduction of 7-valent pneumococcal conjugate vaccine, Hong Kong, 1995–2009 *Vaccine* 29 (2011) 3270–3275
87. Hoskins J., Alborn W., JR., Arnold J, Blaszcak L. et al. Genome of the Bacterium *Streptococcus pneumoniae* Strain R6. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*,2001, Vol. 183, No. 19,p. 5709–5717
  88. Hsueh PR, Lee-Jene T, Li-Na Lee et al. Dissemination of High-Level Penicillin-, Extended-Spectrum Cephalosporin-, and Erythromycin-Resistant *Streptococcus pneumoniae* Clones in Taiwan. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*.1999, Vol. 37, No. 1, p. 221–224
  89. Hyams C., Camberlein E., Cohen JM, Bax K. and Brown JS. The *Streptococcus pneumoniae* Capsule Inhibits Complement Activity and Neutrophil Phagocytosis by Multiple Mechanisms. *INFECTION AND IMMUNITY*, 2010, Vol. 78, No. 2 p. 704–715
  90. Imöhl M, Reinert RR, Mutscher C, van der Linden M. Macrolide susceptibility and serotype specific macrolide resistance of invasive isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Germany from 1992 to 2008. *BMC Microbiology* 2010;10: 299.
  91. Inverarity D., Lamb K, Diggle M, Robertson C. et al. Death or survival from invasive pneumococcal disease in Scotland: associations with serogroups and multilocus sequence types *Journal of Medical Microbiology* (2011), 60, 793–802
  92. Isaacman DJ, McIntosh ED, Reinert RR. Burden of invasive pneumococcal disease and serotype distribution among *Streptococcus pneumoniae* isolates in young children in Europe: impact of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine and considerations for future conjugate vaccines. *Int J Infect Dis* 2010; 14(3):e197-209.
  93. Jacobs M., Bajaksouzian S., Bonomo R., Good C., Windau A. et al. Occurrence, Distribution, and Origins of *Streptococcus pneumoniae* Serotype 6C, a Recently Recognized Serotype *J Clin Microbiol* 2009, Vol. 47, No. 1: 64–72
  94. Jacobs MR, Good CE, Beall B, Bajaksouzian S, Windau AR, Whitney CG: Changes in serotypes and antimicrobial susceptibility of invasive *Streptococcus pneumoniae* strains in Cleveland: a quarter century of experience. *J Clin Microbiol* 2008,46:982-990.

95. Jae-Hoon S, Jin YB and Kwan SK. Comparison of Capsular Genes of *Streptococcus pneumoniae* Serotype 6A, 6B, 6C, and 6D Isolates. *J Clin Microbiol* 2011, Vol. 49, No. 5 : 1758–1764
96. Jefferies JM., Smith A., Clarke S., Dowson C., and Timothy J. Mitchell. Genetic Analysis of Diverse Disease-Causing Pneumococci Indicates High Levels of Diversity within Serotypes and Capsule Switching. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, 2004, Vol. 42, No. 12, p. 5681–5688
97. Jenkins SG, Brown SD, Farrell DJ: Trends in antibacterial resistance among *Streptococcus pneumoniae* isolated in the USA: Update from PROTEKT US years 1-4. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2008, 7:1
98. Jenkins SG, Farrell DJ: Increase in pneumococcus macrolide resistance, United States. *Emerg Infect Dis* 2009, 15:1260-1264
99. Kadioglu A., Weiser JN, Paton JC et al. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nature Reviews Microbiology* 6,2008, p.288-301
100. Klomberg D., de Valk HA, Johan W. Mouton et al. Rapid and reliable real-time PCR assay for detection of the macrolide efflux gene and subsequent discrimination between its
101. Ko KS, Song JH: Evolution of erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* from Asian countries that contains *erm(B)* and *mef(A)* genes. *J Infect Dis* 2004, 190(4):739-747
102. Kojouharova M., N. Gatcheva, L. Setchanova, V. Mechandjieva, Study Team BH. Childhood bacterial meningitis in Bulgaria: a population-based retrospective study in six regions during 1992-96. *Int J Infect Dis*. 2003 Jun; 7(2): 109-11.
103. L. Siira, Jalava J, Tissari P , Vaara M., T. Kaijalainen and A. Virolainen. Clonality behind the increase of multidrug-resistance among non-invasive pneumococci in Southern Finland *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012, 31:867–871
104. Lahti E., Mertsola J., Kontiokari T et al., Pneumolysin polymerase chain reaction for diagnosis of pneumococcal pneumonia and empyema in children. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2006, 25:783–789
105. Lanie J., Wai-Leung N, Kazmierczak K, Andrzejewski T. et al. Genome Sequence of Avery's Virulent Serotype 2 Strain D39 of *Streptococcus pneumoniae* and Comparison with That of Unencapsulated Laboratory

Strain R6. JOURNAL OF BACTERIOLOGY, 2007, Vol. 189, No. 1, p. 38–51

106. Lee S., Seong-Han K, Misun P., and Songmee B. High prevalence of multiresistance in levofloxacin-nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* isolates in Korea. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2013, 76, p: 227–231
107. Leea MR, Chenc CM, Tzu-Yi C et al. Capsular serotypes and antimicrobial susceptibilities of *Streptococcus pneumoniae* causing invasive pneumococcal disease from 2009–2012 with an emphasis on serotype 19A in bacteraemic pneumonia and empyema and  $\beta$ -lactam resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2013. Vol 42, p:395–402.
108. Lefèvre, JC., Faucon G, Sicard AM et al. DNA fingerprinting of *Streptococcus pneumoniae* strains by pulsed field gel electrophoresis. *J. Clin. Micro.*1993;31:2724-2728.
109. Linares J, Ardanuy C, Pallares R., and Fenoll A. Changes in antimicrobial resistance, serotypes and genotypes in *Streptococcus pneumoniae* over a 30-year period. *Clin Microbiol Infect* 2010. 16:402-410.
110. Liu Z, Nachamkin I, Edelstein PH et al., Serotype Emergence and Genotype Distribution among Macrolide- Resistant Invasive *Streptococcus Pneumoniae* Isolates in the Postconjugate Vaccine (PCV-7) Era *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* p.Vol 743–750
111. Llull D., Lopez R and Garcia E. Characteristic Signatures of the *lytA* Gene Provide a Basis for Rapid and Reliable Diagnosis of *Streptococcus pneumoniae* Infections. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, 2006, Vol. 44, No. 4, p. 1250–1256
112. Mahjoub-Messai F., Doit C, Koeck JL et al. Population Snapshot of *Streptococcus pneumoniae* Serotype 19A isolates before and after Introduction of Seven-Valent Pneumococcal Vaccination for French Children. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, 2009, Vol. 47, No. 3, p. 837–840
113. Maraki S, Samonis G, Galanakis E: Serotypes and susceptibilities of paediatric clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Crete, Greece, before and after the heptavalent pneumococcal conjugate vaccine. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010, 29:1449-1451



114. Marimón JM and Alonso M. Molecular characterization of *Streptococcus pneumoniae* invasive serotype 19A isolates from adults in two Spanish regions (1994–2009). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* (2012) 31:1009–1013
115. Martínez G, Lozano SJ, Navarro Gómez ML, Santos Sebastián MM et al. Increase in the incidence of invasive pneumococcal disease caused by serotype 19A prior to the implementation of the expanded pneumococcal vaccines. *An Pediatr (Barc)*. 2013;79(5):288-292
116. Mayanskiy N, Alyabieva N, Ponomarenko O et al. Serotypes and antibiotic resistance of non-invasive *Streptococcus pneumoniae* circulating in pediatric hospitals in Moscow, Russia. *Int J Infect Dis*. 2014, p:S1201-9712
117. Mcavin J., Reilly PA, Roudaboush RM, et al. Sensitive and Specific Method for Rapid Identification of *Streptococcus pneumoniae* Using Real-Time Fluorescence PCR . *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*
118. McDougal LK, Tenover FC, Lee LN, Rasheed JK, Patterson JE, Jorgensen JH, LeBlanc DJ: Detection of Tn917-like sequences within a Tn916-like conjugative transposon (Tn3872) in erythromycin-resistant isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998, 42(9):2312-2318
119. McGee L, Klugman KP, Wasas A, Capper T, Brink A, and the Antibiotics Surveillance Forum of South Africa: Serotype 19F multiresistant pneumococcal clone harboring two erythromycin resistance determinants [*erm(B)* and *mef(A)*] in South Africa. *Antimicrob Agents Chemother* 2001, 45:1595-1598
120. McGee L, McDougal L, Zhou J, Spratt BG, Tenover FC, George R, Hakenbeck R, Hryniewicz W, Lefèvre JC, Tomasz A, et al.: Nomenclature of major antimicrobial-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae* defined by the pneumococcal molecular epidemiology network. *J Clin Microbiol* 2001, 39(7):2565-2571
121. Mingoia M, Tili E, Manso E, Varaldo PE, Montanari MP. Antimicrob Agents Chemother. 2011 Apr;55(4):1453-9. Heterogeneity of Tn5253-like composite elements in clinical *Streptococcus pneumoniae* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Nov;51(11):3983-7
122. Mingoia M., Vecchi M, Cochetti I. et al. Composite Structure of *Streptococcus pneumoniae* Containing the Erythromycin Efflux Resistance

Gene *mef(I)* and the Chloramphenicol Resistance Gene *catQ*.  
ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, 2007, Vol. 51,  
No. 11, p. 3983–3987

123. Montanari MP, Mingoia M, Cochetti I, Varaldo PE: Phenotypes and genotypes of erythromycin-resistant pneumococci in Italy. *J Clin Microbiol* 2003, 41(1):428-431
124. Moore MR, Gertz RE Jr, Woodbury RL et al. Population snapshot of emergent *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A in the United States, 2005. *J Infect Dis.* 2008 ;197(7):1016-27.
125. Moschioni M., Donati C, Muzzi A. et al. *Streptococcus pneumoniae* Contains 3 *rlrA* Pilus Variants That Are Clonally Related. *JID* 2008:197
126. Mossialos E., Morel CM, Edwards S. et al., Policies and incentives for promoting innovation in antibiotic research. The European Observatory on Health Systems and Policies World Health Organization 2010
127. Mott M, Caierão J, Rosa da Cunha G. et al. Susceptibility profiles and correlation with pneumococcal serotypes soon after implementation of the 10-valent pneumococcal conjugate vaccine in Brazil. *Int J Infect Dis.* 2013. p: S1201-9712
128. Murdoch DR, Anderson TP, Beynon KA et al., et al. Evaluation of a PCR Assay for Detection of *Streptococcus pneumoniae* in Respiratory and Nonrespiratory Samples from Adults with Community-Acquired Pneumonia. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, 2003, Vol. 41, No. 1, p. 63–66
129. Nagai K, Appelbaum PC, Davies TA, Kelly LM et al. Susceptibilities to telithromycin and six other agents and prevalence of macrolide resistance due to L4 ribosomal protein mutation among 992 pneumococci from 10 central and eastern european countries. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2002, 46(2):371-377
130. Nashev D, Velinov T, Kouzmanov A, Setchanova L. et al. Study of etiologic structure of acute otitis media in Bulgaria before introduction of pneumococcal conjugate vaccine. *Практическа педиатрия. (Pract. Pediatriya)* 2011, 1:18-20.
131. Năstase E, Dorneanu O, Dorobăț C. Antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae*, 2003-2009 *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi.* 2011;115(2):536-41.

132. O'Brien KL, Dagan R. The potential indirect effect of conjugate pneumococcal vaccines. *Vaccine* 2003; 21(17-18): 1815-1825.
133. Obert C., Gao G., Sublett J., Tuomanen E. and Orihuela C. Assessment of molecular typing methods to determine invasiveness and to differentiate clones of *Streptococcus pneumoniae* *Infect Genet Evol.* 2007 ; 7(6): 708–716.
134. Obregon V., García P., García E. et al. Molecular Peculiarities of the *lytA* Gene Isolated from Clinical Pneumococcal Strains That Are Bile Insoluble. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, 2002, Vol. 40, No. 7, p. 2545–2554
135. Pai R, Gertz RE, Beall B. et al. Sequential multiplex PCR approach for determining capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 2006, 44(1):124-131
136. Pandya GA, McEllistrem MC, Venepally P. et al. Monitoring the Long-Term Molecular Epidemiology of the Pneumococcus and Detection of Potential 'Vaccine Escape' Strains. *PLoS ONE*, 2011, 6(1):15950
137. Park IH, Kyung-Hyo K, Andrade AL et al. Nontypeable Pneumococci Can Be Divided into Multiple *cps* Types, Including One Type Expressing the Novel Gene *pspK*. 2012 Volume 3 Issue 3: 00035-12
138. Perez-Trallero E., Marimon JM, Ercibengoa M. et al. Invasive *Streptococcus pneumoniae* infections in children and older adults in the north of Spain before and after the introduction of the heptavalent pneumococcal conjugate vaccine. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2009. 28:731-738.
139. Pickering LK, Baker CJ, Kimberlin DW, Long SS, editors. Red Book: 2009 Report of the Committee on Infectious Diseases. 28th ed., Academy of Pediatrics; Pneumococcal infections, 2009. p. 524–35.
140. Pietro EV, Montanari MP and Giovanetti E. Genetic Elements Responsible for Erythromycin Resistance in Streptococci. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, 2009, Vol. 53, No. 2, p. 343–353
141. Prèrea M. and Fayeta OA. A specific polymerase chain reaction test for the identification of *Streptococcus pneumoniae* *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2011.70 p: 45–53

142. Prymula R, Hanovcova I, Splino M, Kriz P, Motlova J, Lebedova V et al. Impact of the 10-valent pneumococcal non-typable *Haemophilus influenzae* protein D conjugate vaccine (PHiD-CV) on bacterial nasopharyngeal carriage. *Vaccine* 2011; 29(10): 1959-1967.
143. Reinert RR, Ringelstein A, van der Linden M, Cil MY, Al-Lahham A, Schmitz FJ: Molecular epidemiology of macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates in Europe. *J Clin Microbiol* 2005, 43(3):1294-1300
144. Reinert RR., Filimonova O., Al-Lahham A., Grudinina S. et al., Mechanisms of Macrolide Resistance among *Streptococcus pneumoniae* Isolates from Russia. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, 2008, Vol. 52, No. 6, p. 2260–2262
145. Rivera-Olivero IA, del Nogal B, Sisco MC. et al. Carriage and invasive isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Caracas, Venezuela: the relative invasiveness of serotypes and vaccine coverage. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011. 30:1489-1495.
146. Rückinger S, van der Linden M, Reinert RR, von Kries R, Burckhardt F, Siedler A. Reduction in the incidence of invasive pneumococcal disease after general vaccination with 7-valent pneumococcal conjugate vaccine in Germany. *Vaccine* 2009, 27:4136-4141
147. Rudolph K., Bruce MG, Bulkow L, Zulz T. et al. Molecular epidemiology of serotype 19A *Streptococcus pneumoniae* among invasive isolates from Alaska, 1986-2010. *Int J Circumpolar Health* 2013, 72: 20854
148. Sadowy E., Skoczynska A., Fiett J., Gniadkowski M., and Hryniewicz W. Multilocus Sequence Types, Serotypes, and Variants of the Surface Antigen PspA in *Streptococcus pneumoniae* Isolates from Meningitis Patients in Poland *CLINICAL AND VACCINE IMMUNOLOGY*, 2006, Vol. 13, No. 1 p. 139–144
149. Sá-Leão R, Nunes S, Brito-Avô A et al. Changes in pneumococcal serotypes and antibiotypes carried by vaccinated and unvaccinated day-care centre attendees in Portugal, a country with widespread use of the seven-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Clin Microbiol Infect* 2009, 15:1002-1007
150. Salleras L, Dominguez A., Ciruela P, Izquierdo C. et al. Changes in serotypes causing invasive pneumococcal disease (2005-2007 vs. 1997-1999) in children under 2 years of age in a population with intermediate

- coverage of the 7-valent pneumococcal conjugated vaccine. *Clin Microbiol Infect* 2009. 15:997-1001.
151. Santagati M, Iannelli F, Oggioni MR, Stefani S, Pozzi G: Characterization of a genetic element carrying the macrolide efflux gene *mef(A)* in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000, 44:2585-2587
  152. Setchanova L, Tomasz A. Molecular characterization of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates from Bulgaria. *J Clin Microbiol*. 1999; 37:638-48.
  153. Setchanova L., Alexandrova A, Mitov I, Nashev D, Kantardjiev T and 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. *J Chemotherapy*. 2012, Feb; 24 (1):12-17.
  154. Setchanova L. Clinical Isolates and Nasopharyngeal Carriage of Antibiotic-Resistant *Streptococcus pneumoniae* in Hospital for Infectious Diseases, Sofia, Bulgaria, 1991-1993. *Microbial Drug Resist*. 1995; 1:79-84.
  155. Setchanova L., Ouzounova-Raykova V, Zhelezova G. and Mitov I. Prevalence and macrolide resistance phenotypes and genotypes among clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* collected in Sofia, Bulgaria from 2001 to 2005. *J Chemother*. 2007; 19:256-262.
  156. Severiano A., Francisco R. Pinto, Mario Ramirez and Joao A. Carrico. Adjusted Wallace Coefficient as a Measure of Congruence between Typing Methods. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, 2011, Vol. 49, No. 11, p. 3997–4000
  157. Sheppard CL., Salmon JE., Harrison TG., Lyons M. and George RC. The clinical and public health value of non-culture methods in the investigation of a cluster of unexplained pneumonia cases. *Epidemiol. Infect.* (2008), 136, 922–927.
  158. Shin J, Baek JY, Kim SH, Song JH, Ko KS: Predominance of ST320 among *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A isolates from 10 Asian countries. *J Antimicrob Chemother* 2011, 66(5):1001-1004
  159. Siira L., J. Jalava, P. Tissari, M. Vaara et al. Clonality behind the increase of multidrug-resistance among non-invasive pneumococci in Southern Finland. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* .2012. 31:867–871

160. Siira L., Merja Rantala, Jari Jalava et al. Temporal Trends of Antimicrobial Resistance and Clonality of Invasive *Streptococcus pneumoniae* Isolates in Finland, 2002 to 2006 ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, 2009, Vol. 53, No. 5, p. 2066–2073
161. Skoczynska A, Sadowy E, Bojarska K, Strzelecki J, Kuch A, Golebiewska A et al. The current status of invasive pneumococcal disease in Poland. Vaccine 2011; 29(11): 2199-2205.
162. Sogstad MK, Høiby EA and Caugant DA. Molecular Characterization of Non-Penicillin-Susceptible *Streptococcus pneumoniae* in Norway. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. 2006, Vol. 44, No. 9, p. 3225–3230
163. Sogstad MK, Littauer P, Aaberge IS, Caugant DA, Høiby A: Rapid spread in Norway of an erythromycin-resistant pneumococcal clone, despite low usage of macrolides. *Microb Drug Resist* 2007, 13:29-36
164. Song JH, Jin Yang Baek and Kwan Soo Ko. Comparison of Capsular Genes of *Streptococcus pneumoniae* Serotype 6A, 6B, 6C, and 6D Isolates. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, 2011, Vol. 49, No. 5, p. 1758–1764
165. Sorensen UBS. Typing of pneumococci by using 12 pooled antisera. J Clin Microbiol 1993; 31: 2097-2100.
166. Sutcliffe J, Grebe T, Tait-Kamradt A, Wondrack L. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40: 2562-2566.
167. Taha N., George F Araj, Rima H Wakim et al. Genotypes and serotype distribution of macrolide resistant invasive and non- invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates from Lebanon. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials 2012, 11:2 p
168. Tait –Kamradt A., Clancy J, Cronan M et al. *mef(E)* Is Necessary for the Erythromycin-Resistant M Phenotype in *Streptococcus pneumoniae*. ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, 1997, Vol. 41, No. 10, p. 2251–2255
169. Tait-Kamradt A., Davies T, Cronan M. et al. Mutations in 23S rRNA and Ribosomal Protein L4 Account for Resistance in Pneumococcal Strains Selected In Vitro by Macrolide Passage. ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, 2000, Vol. 44, No. 8, p. 2118–2125

170. Tait-Kamradt A., Davies T., P. C. Appelbaum PC et al. Two New Mechanisms of Macrolide Resistance in Clinical Strains of *Streptococcus pneumoniae* from Eastern Europe and North America. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, 2000, Vol. 44, No. 12, p. 3395–3401
171. Tarrago D., Aguilar L., García R, Gimenez MJ et al. Evolution of Clonal and Susceptibility Profiles of Serotype 19A *Streptococcus pneumoniae* among Invasive Isolates from Children in Spain, 1990 to 2008. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, 2011, Vol. 55, No. 5, p. 2297–2302
172. Tenover F., Arbeit RD, Goering RV et al., Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, 1995, Vol. 33, No. 9, p. 2233–2239
173. Tunkel AR, Hartman BJ, Kaplan SL, Kaufman BA, Roos KL, Scheld WM, et al. Practice guidelines for the management of bacterial meningitis. *Clin Infect Dis*. 2004 Nov 1;39(9):1267–84.
174. Tyrrell GJ., The Changing Epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* Serotype 19A Clonal Complexes. *JID* 2011:203
175. Vainio A., Kaijalainen T, Hakanen AJ, Virolainen A. Prevalence of pilus-encoding islets and clonality of pneumococcal isolates from children with acute otitis media *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011, 30:515–519
176. Van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L., et al. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin Microbiol Infect*. 2007;13 Suppl 3:1-46.
177. Van der Linden M., Reinert RR, Kern WV and Imöhl M. Epidemiology of serotype 19A isolates from invasive pneumococcal disease in German children. *BMC Infectious Diseases* 2013, 13:70
178. Van der Linden M., Reinert RR, Kern WV and Imöhl M. Epidemiology of serotype 19A isolates from invasive pneumococcal disease in German Children. *BMC Infectious Diseases* 2013, 13:70
179. Van Eldere J, Meekers E, Lagrou K, Massonet C, et al.: Macrolide resistance mechanisms in *Streptococcus pneumoniae* isolates from Belgium. *Clin Microbiol Infect* 2005, 11:332-334

180. Varaldo PE, Montanari MP, Giovanetti E: Genetic elements responsible for erythromycin resistance in streptococci. *Antimicrob Agents Chemother* 2009, 53:343-353
181. Vickers I, O'Flanagan D., Cafferkey M, Humphreys H. et al. Multiplex PCR to determine *Streptococcus pneumoniae* serotypes causing otitis media in the Republic of Ireland with further characterization of antimicrobial susceptibilities and genotypes. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2010. DOI 10.1007/s10096-010-1108-7.
182. Werno AM, Murdoch DR. Medical microbiology: laboratory diagnosis of invasive pneumococcal disease. *Clin Infect Dis*. 2008;46(6):926-32. doi: 10.1086/528798.
183. Whitney CG, Farley MM, Hadler J, et al. Active Bacterial Core Surveillance of the Emerging Infections Program Network. Decline in invasive pneumococcal disease after the introduction of protein-polysaccharide conjugate vaccine. *N Engl J Med* 2003;348:1737-1746.
184. Whitney CG, Farley MM, Hadler J, Harrison LH, Bennett NM, Lynfield R et al. Decline in invasive pneumococcal disease after the introduction of protein-polysaccharide conjugate vaccine. *N Engl J Med* 2003; 348(18): 1737-1746.
185. Widdowson CA, Klugman KP, Hanslo D: Identification of the tetracycline resistance gene, tet(O), in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996, 40(12):2891-2893
186. Widdowson CA, Klugman KP: The molecular mechanisms of tetracycline resistance in the pneumococcus. *Microb Drug Resist* 1998, 4(1):79-84
187. Wikler MA. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Eighteenth Informational Supplement. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
188. World Health Organization (WHO): Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization-WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec* 2007, 82(12):93-104.
189. [www.ecdc.europa.eu](http://www.ecdc.europa.eu). Surveillance of antimicrobial consumption in Europe, yearbook 2011.
190. [www.ecdc.europa.eu](http://www.ecdc.europa.eu). Surveillance of antimicrobial consumption in Europe, yearbook 2006.



191. Wyres KL., Lambertsen LM, Croucher NJ et al., Pneumococcal Capsular Switching: A Historical Perspective. *JID* 2013:207
192. Xu X, Cai L, Xiao M, Kong F, Oftadeh S, Zhou F, Gilbert GL. Distribution of serotypes, genotypes, and resistance determinants among macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2010, 54:1152-1159
193. Zhenying L., Nachamkin I, Edelstein PH et al. Serotype Emergence and Genotype Distribution among Macrolide-Resistant Invasive *Streptococcus Pneumoniae* Isolates in the Postconjugate Vaccine (PCV-7) Era. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* Vol p. 743–750
194. Zisis NP, Syriopoulou V, Kafetzis D. et al. Serotype distribution and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* causing invasive infections and acute otitis media in children. *Eur J Pediatr* 2004; 163(7): 364-368.