

На правах рукописи

ЛАЗАРЕВА МАРИЯ АЛЕКСАНДРОВНА

**ЭТИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE
ПРИ РЕСПИРАТОРНЫХ ИНФЕКЦИЯХ, ЕГО НОСИТЕЛЬСТВО
И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ
У ДЕТЕЙ МЛАДШЕГО ВОЗРАСТА**

14.01.08 – Педиатрия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва-2015

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном
научном учреждении «Научный центр здоровья детей»

Научный руководитель:

Доктор медицинских наук

Татьяна Владимировна Куличенко

Научный консультант:

Доктор медицинских наук

Николай Андреевич Маянский

Официальные оппоненты:

Доктор медицинских наук, заведующий
кафедрой педиатрии Федерального государственного автономного образовательного
учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов»

Дмитрий Юрьевич Овсянников

Доктор медицинских наук, профессор,
кафедры педиатрии ГБОУ ДПО
«Российская медицинская академия последипломного образования»
Минздрава России

Андрей Леонидович Заплатников

Ведущая организация:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего
профессионального образования "Северо-Восточный федеральный университет
имени М. К. Аммосова"

Защита диссертации состоится «29» сентября 2015 года в ____ часов на заседании
диссертационного совета Д 001.023.01 при ФГБНУ «Научный центр здоровья детей»
по адресу 119991, г. Москва, Ломоносовский проспект, дом 2, стр 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке в ФГБНУ «Научный центр
здоровья детей» по адресу: 119991, г. Москва, Ломоносовский проспект дом 2, стр. 1
и на сайте <http://www.nczd.ru>.

Автореферат разослан «__» _____ 2015 года

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук

И.В. Винярская

Актуальность проблемы

Streptococcus pneumoniae (*S. pneumoniae*, пневмококк) - наиболее распространенный возбудитель респираторных бактериальных инфекций, менингитов и бактериемии у детей (Баранов А.А. и соавт., 2008; Walker C.L. et al., 2013). *S. pneumoniae* является одним из микробов, обычно колонизирующих носоглотку у детей младшего возраста, что создает основной резервуар инфекции и обеспечивает ее распространение (Simell B. et al., 2012). В настоящее время описано более 90 серотипов пневмококка, различающихся структурой капсульных полисахаридов, которые определяют вирулентность и иммуногенность микроорганизма. Не все серотипы являются одинаково патогенными, и большинство пневмококковых инфекций связаны с ограниченным числом серотипов (Hausdorff W.P. et al., 2005). Тяжесть пневмококковых заболеваний также различна, в большинстве случаев *S. pneumoniae* вызывает мукозальные инфекции, такие как острый средний отит и острый синусит. Вместе с тем именно пневмококк чаще всего является причиной тяжелых инвазивных инфекций. По данным ВОЗ, ежегодно от пневмококковой инфекции умирают 1,6 млн. человек, из них от 700 тысяч до 1 млн. детей в возрасте до 5 лет. Эта статистика отражает, главным образом, ситуацию в тех странах, где до настоящего времени не введена вакцинация детей от пневмококковой инфекции. Ежегодная частота инвазивных пневмококковых инфекций в этих регионах варьирует от 10 до 100 случаев на 100 тысяч населения. Так, пневмококк является главной причиной острых пневмоний у детей младше 2 лет. Пневмококковые пневмония, менингит и бактериемия расцениваются как тяжелые, нередко жизнеугрожающие заболевания, представляющие серьезную проблему для здравоохранения (Баранов А. А. и соавт., 2009; Сидоренко С. В. и соавт., 2010; Reinert R. R. et al., 2010).

Точная распространенность пневмококковых инфекций, а в особенности пневмококковой бактериемии в России до настоящего времени не известна. Этиологическое подтверждение бактериальных инфекций в повседневной педиатрической практике проводится редко, врачи ориентируются на клинические признаки, что затрудняет назначение этиотропной терапии. Крайне редкие исследования крови и спинномозговой жидкости в сочетании с обычной практикой лечения антибактериальными препаратами детей с подозрением на бактериемию и менингит до каких-либо лабораторных исследований исключает возможность реально оценить частоту инвазивных пневмококковых заболеваний. Кроме того, лишь несколько лабораторий в стране могут выделить, идентифицировать и серотипировать пневмококк с высокой точностью. Таким образом, статистические данные о заболеваемости в России инвазивными пневмококковыми инфекциями в основном базируются на экспертных оценках.

Широкое и нередко необоснованное назначение антибиотиков при респираторных инфекциях у детей без учета их этиологии служит одним из основных факторов,

определяющих рост антибиотикорезистентности пневмококка. Вызывает беспокойство появление пневмококков с множественной устойчивостью (т.е. полирезистентностью – нечувствительностью к 3 и более группам антибиотиков), доля которых в некоторых странах достигает 30-50%. Выраженная региональная вариабельность резистентности *S. pneumoniae* диктует необходимость получения данных о его чувствительности к используемым антибиотикам и в России.

Цель исследования:

Определить циркулирующие серотипы пневмококков и охарактеризовать спектр их резистентности к антибиотикам у здоровых носителей и детей с острыми респираторными инфекциями в возрасте до 5 лет для улучшения эмпирической антибактериальной терапии.

Задачи исследования:

1. Сравнить частоту носительства *Streptococcus pneumoniae* в носоглотке у здоровых воспитанников детских домов, дошкольных учреждений и неорганизованных детей младше 5 лет.
2. Определить спектр микробного носительства при острых респираторных бактериальных инфекциях у детей (пневмонии, отиты, синуситы) и оценить вклад *Streptococcus pneumoniae* в этиологическую структуру.
3. Определить серотипы выделенных штаммов пневмококков и сравнить серотиповое разнообразие у различных групп обследованных детей.
4. Проанализировать бактериальную этиологию острого среднего отита у детей младшего возраста, дать характеристику клональной структуры пневмококков с множественной устойчивостью к антибиотикам, выделенных у пациентов с острым средним отитом.
5. Оценить резистентность пневмококков к различным антибиотикам, используемым в педиатрии, и провести анализ молекулярно-генетических механизмов устойчивости к макролидам.
6. На основе данных о резистентности сформулировать рекомендации по рациональной эмпирической антибиотикотерапии пневмококковых инфекций у детей.

Научная новизна:

Получены современные данные о носоглоточном носительстве *S. pneumoniae* у детей младшего возраста, его частота у неорганизованных здоровых детей этой возрастной группы составляет 15%, у детей, посещающих детский сад, 24%, у воспитанников детского дома 26%. В спектре бактериальной колонизации носоглотки доля *S. pneumoniae* составила 31% у здоровых детей и 47% у детей с острыми респираторными бактериальными инфекциями.

Анализ бактериальной этиологии острого среднего отита у детей младше 5 лет показал изменившуюся в последние годы структуру отопатогенов. В нашем исследовании была подтверждена лидирующая роль *S. pneumoniae* при остром среднем отите, его доля

составила 69%. Частота выделения *S. pyogenes* (18%) в нашем исследовании значительно превышала таковую для *H. influenzae* (13%) и *M. catarrhalis* (9%).

В работе дана характеристика серотипового спектра циркулирующих пневмококков у детей младшего возраста. Установлено преобладание серотипов 19F, 6A и 6B, 23F, 14, которые составили > 75% распределения в разных когортах обследованных детей. Наиболее часто встречался серотип 19F, его доля в серотиповом спектре превышала 20%. У детей с острыми респираторными бактериальными инфекциями, в том числе с острым средним отитом, актуальными являются также серотипы 3 и 19A.

Получены новые данные о возросшей в последние годы устойчивости *S. pneumoniae* к антибиотикам. Исследования, проведенные в 2011-12 гг. и 2013-14 гг., показывают рост устойчивости штаммов *S. pneumoniae* к пенициллину с 37% до 48%, к триметоприму/сульфаметоксазолу с 52% до 60%. Резистентность пневмококка к клиндамицину не изменилась, оставаясь на уровне 31-32% в последние годы. Множественная устойчивость пневмококка выросла с 25% в 2012 г. до 37% в 2014 г. При этом актуальные штаммы *S. pneumoniae* сохраняют высокую чувствительность к амоксициллину.

Уровень резистентности циркулирующих штаммов *S. pneumoniae* к макролидным антибиотикам превышает 30%, а в группе здоровых носителей он достигает 40% к 14- и 15-членным макролидам (эритромицин, азитромицин, кларитромицин) и 31% к 16-членному макролиду спирамицину, что позволяет считать нецелесообразным их применение при пневмококковых инфекциях.

Представлены данные об изменении механизмов резистентности *S. pneumoniae* к макролидам. Показано возрастание до 52% доли эритромицин-резистентных штаммов *S. pneumoniae* с наличием *ermB*-гена в качестве одной детерминанты и до 35% – в ассоциации с *mef*-зависимым эффлюксом. Полученные данные позволяют констатировать, что в последние годы в России значительно увеличилось число штаммов, имеющих сразу два механизма резистентности к макролидам; этот фенотип связан с генетическими элементами клональных комплексов наиболее резистентных пневмококков.

Описанные в работе изоляты пневмококка с множественной устойчивостью принадлежали к ограниченному числу клональных линий, которые не были описаны в России ранее. Анализ клональной структуры пневмококков показал преобладание изолятов, относящихся к клональному комплексу CC320. Штамм пневмококка серотипа 19A с ST320, обнаруженный в ходе настоящей работы, является первым пневмококком такого рода, выявленным в нашей стране.

Практическая значимость:

Полученные в настоящем исследовании данные о чувствительности к антибиотикам, серотиповом составе изолятов пневмококка у детей младшего возраста могут быть использованы для мониторинга изменений сероэпидемиологии, сиквенс-типов и резистентности *S. pneumoniae* после начала массовой вакцинации от пневмококковой инфекции, включенной в российский календарь иммунизации в 2014г.

Представленные данные об актуальных серотипах *S.pneumoniae* позволяют прогнозировать эффективность вакцинации от пневмококковых инфекций после начала массовой иммунизации детского населения. Результаты наших исследований показывают совпадение спектра циркулирующих серотипов на 63,5 - 81% для 7-ми валентной пневмококковой конъюгированной вакцины (ПКВ7) и ПКВ10 и на 86 - 93% для ПКВ13 в различных когортах детей младшего возраста.

Установленные в работе сероэпидемиология и молекулярно-генетические характеристики *S. pneumoniae* обосновывают использование ПКВ с расширенным охватом серотипов, включая серотип 19А, даже несмотря на относительно небольшую долю этого серотипа среди циркулирующих штаммов пневмококков.

На основании полученных в исследовании новых данных об устойчивости *S. pneumoniae* к антибиотикам могут быть сформулированы рекомендации по антибактериальной терапии пневмококковых инфекций. Сохраняющаяся высокая чувствительность *S. pneumoniae* к амоксициллину (> 90%) позволяет рекомендовать его препаратом первого выбора при острых бактериальных инфекциях пневмококковой этиологии у детей.

Повышение уровня резистентности исследованных штаммов пневмококка к макролидным антибиотикам до 40% свидетельствует о нецелесообразности рутинного использования любых макролидов для лечения пневмококковых инфекций. Устойчивость *S. pneumoniae* к 14- и 15-членным макролидам (эритромицин, азитромицин, кларитромицин) не различается, резистентность к 16-членным макролидам (спирамицин), согласно результатам нашего исследования, также превышает 30%, что обусловлено едиными для всех антибиотиков этой группы механизмами устойчивости.

Представленные данные о бактериальной этиологии острого среднего отита у детей и чувствительности выявленных отопатогенов к антибиотикам позволяют рекомендовать для лечения амоксициллин±клавуланат в качестве препарата первого выбора.

Апробация работы

Основные положения и результаты исследования были представлены в виде докладов и обсуждены на XV, XVI, XVII, XVIII и XIX Конгрессах педиатров России (Москва, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015 гг.); на научно-практической конференции Союза педиатров России «Актуальные проблемы педиатрии» (Казань, 2011 г.); на Международном Конгрессе

«Europediatrics-2013» (Глазго, 2013 г.); на съезде детских инфекционистов (Санкт-Петербург, 2012 г.); на Конгрессе Европейского общества детских инфекционистов ESPID (Салоники, 2012 г.), на Конгрессах Европейского общества клинической микробиологии и инфекционных болезней ЕССМID (Барселона, 2014 г., Копенгаген, 2015 г.) на научно-практических конференциях педиатров (Рязань, 2014 г., Хабаровск, 2014 г, Ростов-на-Дону, 2015 г.).

Публикации результатов исследования

По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ для публикации материалов докторских и кандидатских диссертаций.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 143 страницах машинописного текста, иллюстрирована 15 рисунками, 19 таблицами и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, трех глав собственных исследований, обсуждения, выводов и практических рекомендаций, списка литературы. Библиографический указатель содержит 217 источников, из которых 22 отечественных и 195 зарубежных авторов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объем и методы исследования

Основой данной работы явилось определение циркулирующих серотипов *S. pneumoniae* и их чувствительности к антибиотикам у здоровых носителей и детей в возрасте до 5 лет с острыми респираторными бактериальными инфекциями.

Исследование носительства S. pneumoniae у здоровых детей младшего возраста

Дизайн исследования: открытое сравнительное исследование. *Участники исследования:* организованное и неорганизованное детское население г. Москвы. *Критерии соответствия:* в исследование включали воспитанников детского дома, детских садов, детей, не посещающих детские дошкольные учреждения (неорганизованные дети) в возрасте до 5 лет без респираторных инфекций и не получающих антибактериальную терапию на момент осмотра или в течение недели, предшествовавшей осмотру.

Условия проведения: исследование проводилось в период с февраля 2013 г. по февраль 2014 г. на базе отделения неотложной педиатрии ФГБНУ НЦЗД, в поликлиниках ЮЗАО г. Москвы при профилактических осмотрах воспитанников детских садов и при проведении диспансеризации в детском доме в ЮЗАО г. Москвы. Исследование микрофлоры носоглотки осуществляли рутинно, в процессе оториноларингологического осмотра при диспансеризации детей из детских садов и детского дома. У пациентов документировали возраст, вакцинальный статус, прием антибиотиков в течение последних 3 месяцев до взятия образца.

Сбор образцов биоматериала: носоглоточные мазки собирали с помощью набора eSWABCollectionKit (CopanDiagnostics, Италия), состоящего из зонда и контейнера с транспортной средой. Образцы доставляли в лабораторию микробиологии ФГБНУ НЦЗД в течение 2–4 ч с момента взятия.

Исследование этиологической роли и носительства *S. pneumoniae* у детей до 5 лет с острыми респираторными бактериальными инфекциями, госпитализированных в стационары г. Москвы

Дизайн исследования: многоцентровое открытое исследование. *Участники исследования:* дети до 5 лет, госпитализированные в стационары г. Москвы по поводу острой респираторной бактериальной инфекции. *Условия проведения:* исследование проводилось в период 2011 - 2012 гг. на базе стационаров г.Москвы: ФГБНУ НЦЗД, Морозовской детской городской больницы №1, детской городской клинической больницы №9, детской городской клинической больницы №13, детской инфекционной больницы №6. У пациентов документировали возраст, вакцинальный статус, прием антибиотиков в течение последних 3 месяцев до взятия образца, а также сведения о начатой антибактериальной терапии по поводу данного эпизода острой инфекции.

Критерии включения пациентов в исследование: 1) госпитализация в стационар, участвующий в исследовании; 2) время после поступления < 24 часов; 3) установленный диагноз острой бактериальной инфекции: сепсис, менингит, бактериемия, внебольничная пневмония, острый средний гнойный отит, острый гнойный синусит. *Критерии исключения из исследования:* 1) предшествующая антибактериальная терапия > 2 доз антибиотика; 2) диагностированная инфекция мочевыводящих путей; 3) диагностированная острая кишечная инфекция.

Сбор образцов биоматериала: для получения достоверных данных о распространенности пневмококковой инфекции и серотипов *S. pneumoniae* в данном исследовании были взяты образцы биоматериала из стерильных (кровь, ликвор, жидкость среднего уха) и нестерильных (отделяемое из среднего уха, назофарингеальный мазок) локусов у детей с клиническими признаками острой бактериальной инфекции, поступающих в многопрофильные стационары лечебных учреждений г.Москвы. Образцы отбирали с помощью набора eSWAB Collection Kit и доставляли в лабораторию микробиологии ФГБНУ НЦЗД.

Исследование бактериальной этиологии острого среднего отита у детей младшего возраста

Образцы жидкости среднего уха (ЖСУ) были получены в период 2011-2012 гг. в 5 педиатрических стационарах г. Москвы в ходе проспективного исследования описанного выше. Все штаммы микроорганизмов выделены из образцов ЖСУ, собранной путем тимпаноцентеза или через отверстие в барабанной перепонке при спонтанной оторее у

пациентов с острым средним отитом (ОСО) в возрасте ≤ 5 лет.

У пациентов с ОСО положительным культуральным результатом считали выделение из ЖСУ этиологически значимых бактерий, к которым относили *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae* и *Moraxella catarrhalis*. Отрицательным культуральным результатом считали отсутствие бактериального роста или рост другой (этиологически незначимой) микрофлоры. Случай микробиологически подтвержденного бактериального ОСО определяли как эпизод ОСО, при котором у пациента с одно- или двусторонним процессом из одного или обоих образцов ЖСУ был выделен значимый возбудитель в виде монокультуры или в ассоциации. При наличии в ЖСУ у одного пациента двух и более видов патогенов каждый патоген считали этиологически значимым и учитывали при расчете его доли в структуре этиологии ОСО.

Методы исследования

Микробиологические методы исследования

Для микробиологического анализа использовали расходные материалы и оборудование производства BioMerieux (Франция), если не указано иное. Посев биоматериала производили на питательный агар (Columbia, Bio-Rad, США) с добавлением 3% донорской эритроцитарной массы крови человека и 3% лошадиной сыворотки, а также на «шоколадный» агар, содержащий 10 мкг/мл НАД, который добавляли в предварительно охлажденную до 50-60°C среду. Посевы инкубировали в термостате с повышенным содержанием CO₂ (5%) при температуре 37°C в течение 24 - 48 ч. Идентификацию пневмококка проводили на основании морфологических и культуральных свойств, а также с помощью теста с оптохином и реакции латекс-агглютинации (Slidex Pneumo-Kit). Пневмококковые изоляты хранили в бульоне (Nutrient Broth, HiMedia, Индия) с добавлением 17% глицерина при – 80°C. Выделенные культуры *H. influenzae* идентифицировали на основании изучения морфологии, культуральных свойств, потребности в факторах роста X и V в системе API NH. Бета-гемолитические стрептококки (*S. pyogenes*) дифференцировали по чувствительности к бацитрацину (Bacitracin, HiMedia, Индия) и методом латекс-агглютинации с реагентом Slidex Strepto Kit. *M. catarrhalis* идентифицировали на основе окраски по Граму, положительной оксидазной реакции и характерного протеомного профиля, который определяли с помощью MALDI-TOF масс-спектрометра MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Bremen, Germany;).

Серологическое типирование *S. pneumoniae* проводили в реакции латексной агглютинации и/или реакции набухания капсулы по Нейфельду. Для этого использовали набор «ImmuLex™ Pneumotest kit» (Statens Serum Institut, Дания). Реакцию набухания капсулы определяли с помощью фазово-контрастной микроскопии при 1000-кратном увеличении. Нетипируемыми считали изоляты пневмококка, которые не агглютинировались ни одной из пуловых сывороток (пулы А-I и Р-Т).

Определение чувствительности к антибиотикам

Для определения чувствительности пневмококка к оксациллину, эритромицину, клиндамицину и триметоприму/сульфаметоксазолу (ТМП/СМЗ) использовали диско-диффузионный метод (диски Bio-Rad, США) на среде Мюллера-Хинтон с добавлением 5% крови человека. Результаты интерпретировали согласно рекомендациям МУК 4.2. 1890 – 04. Чувствительными считали штаммы с диаметром зоны подавления роста ≥ 20 мм для диска с оксациллином, ≥ 21 мм для эритромицина, ≥ 19 мм для клиндамицина и триметоприма/сульфаметоксазола. Минимальную подавляющую концентрацию (МПК) пенициллина и амоксициллина определяли методом Е-теста. Чувствительными считали изоляты с МПК $\leq 0,6$ мкг/мл, нечувствительными к пенициллину – штаммы с МПК $\geq 0,06$ мкг/мл. Результаты интерпретировали согласно обновленным рекомендациям EUCAST (2013 г.).

Выделение ДНК из чистой культуры *S. pneumoniae* и детекцию генов резистентности к макролидам *ermB* и *tetA* у эритромицин-резистентных пневмококков проводили при помощи ПЦР с использованием праймеров, предложенных Reinert R. et al (2008).

Мультилокусное сиквенс-типирование (МЛСТ) пневмококков с множественной устойчивостью к антибиотикам (т.е. устойчивостью к 3 или 4 исследованным антибиотикам) проводили согласно общепринятому протоколу. Внутренние фрагменты генов *aroE*, *gdh*, *gki*, *recP*, *spi*, *xpt* и *ddl* амплифицировали путем ПЦР, а затем полученные ампликоны секвенировали. Аллели и сиквенс-типы (ST) определяли с помощью онлайн-базы данных, размещенной на сайте <http://pubmlst.org/spneumoniae/>. Сиквенс-типы анализировали и относили к клональным комплексам после их сравнения со всеми сиквенс-типами, имеющимися в онлайн-базе данных, используя программу eBURST. Сиквенс-типы, имеющие 5 одинаковых аллельных вариантов из 7 исследованных локусов относили к одному клональному комплексу.

Этическая экспертиза. У законных представителей всех включенных в исследование пациентов было получено информированное подписанное согласие на проведение диагностических и лечебных процедур при госпитализации в стационар или амбулаторном визите к врачу в соответствии с действующим законодательством Российской Федерации.

Статистический анализ. Статистическую обработку данных осуществляли при помощи программы SPSS 20.0 (SPSS Statistics, США). Для сравнения распределения патогенов и серотипов *S. pneumoniae* использовали таблицы сопряженности, критерий χ^2 или точный тест Фишера. Для сравнения долей использовали Z-критерий. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Носоглоточное носительство *S. pneumoniae* у воспитанников детских домов, дошкольных учреждений и неорганизованных детей в возрасте до 5 лет

Проведено исследование микробиоты носоглотки у 246 детей в возрасте до 5 лет, из них 76 не посещали детских дошкольных учреждений (неорганизованные дети), 144 ребенка посещали детский сад, 26 детей являлись воспитанниками детского дома. Вакцинопрофилактика гемофильной и пневмококковой инфекций у детей до включения в исследование не проводилась.

Всего было собрано 246 носоглоточных образцов, при этом в 33% (82/246) случаев отмечен рост нормальной микрофлоры. Нормофлора была представлена преимущественно коагулазонегативными стафилококками, зелеными стрептококками, различными видами энтеробактерий. Рост условно-патогенной флоры наблюдали у 67% (164/246) детей, включенных в исследование. Ни в одном образце не было отмечено роста *S. pyogenes*. В носоглоточных образцах 47% (116/246) детей присутствовали различные патогены в виде монокультуры.

У 20% (48/246) обследованных детей в носоглоточных образцах зафиксирован одновременный рост 2 или 3 видов бактерий. Частота роста смешанной флоры была существенно ниже у неорганизованных детей (8%; 6/76) по сравнению с обследованными из детских садов (19%; 27/144) и детьми из детского дома (58%; 15/26; $p < 0,01$). В целом, наиболее часто встречались ассоциации *S. pneumoniae* с *H. influenzae* ($n=12$), *S. pneumoniae* с *M. catarrhalis* ($n=12$), реже выявлялись комбинации *H. influenzae* и *M. catarrhalis* ($n=7$), а также *S. pneumoniae*, *H. influenzae* и *M. catarrhalis* ($n = 7$). В 10 случаях в комбинациях участвовал *S.aureus*.

Для сравнения долей бактерий в микробном спектре назофарингеальных образцов мы учитывали абсолютное число штаммов респираторных патогенов в положительных культурах. Всего было получено 311 изолятов различных микробов. Доля *S. pneumoniae* при носоглоточном носительстве составила 23% (72/311) и была выше, чем доля *H. influenzae* (16%; 51/311) и сопоставима с частотой выявления *M. catarrhalis* (23%; 71/311).

Частота выявления в носоглотке респираторных патогенов *S. pneumoniae*, *H. influenzae* и *M. catarrhalis* в нашем исследовании была существенно ниже в группе детей, не посещающих детские дошкольные учреждения, по сравнению с двумя другими группами обследованных носителей. *S. pneumoniae* высевался из носоглотки одинаково часто у детей из детского сада (24%) и детского дома (26%), тогда как у неорганизованных детей носительство пневмококка отмечено лишь в 15% случаев (рис. 1). Доля *H. influenzae* и *M. catarrhalis* также была значимо выше в спектре носоглоточного носительства у воспитанников детского дома и детей, посещающих детский сад, по сравнению с неорганизованными детьми.

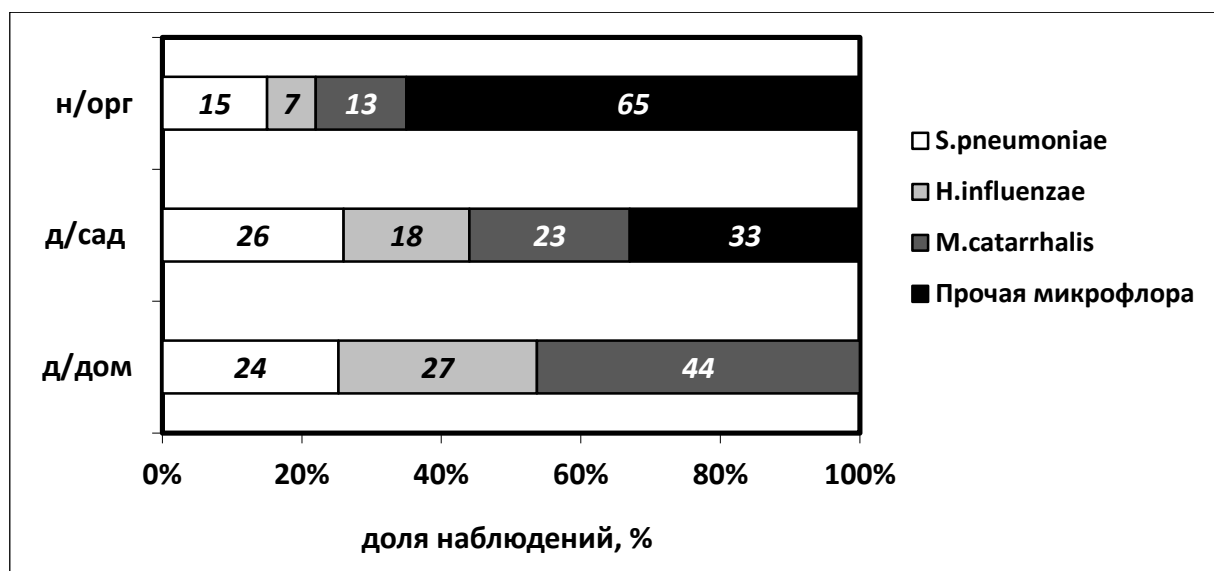


Рис. 1. Значимые респираторные патогены в структуре микробного пейзажа носоглотки у обследованных детей

Примечание. Н/орг – неорганизованные дети (не посещают детский коллектив), д/сад – дети, посещающие детский сад, д/дом – воспитанники детского дома.

Рост потенциально непатогенной флоры (нормофлоры) отмечен у половины неорганизованных детей (52%), у трети детей из детских садов (29%) и не был выявлен ни у одного из воспитанников детского дома. Вместе с тем частота микробных ассоциаций респираторных патогенов была существенно выше у детей из закрытого коллектива (58%), чем у детей из полужакрытого коллектива (19%) и у неорганизованных детей (8%).

Проведенное исследование показало высокую частоту носоглоточного носительства условно-патогенной микрофлоры у детей из закрытых и полужакрытых детских коллективов, что объясняется большим числом и плотностью контактов со сверстниками.

Анализ возрастных особенностей носоглоточного носительства респираторных патогенов показал преобладание в спектре на первом году жизни *S. pneumoniae* и *M. catarrhalis*. Доля изучаемых патогенов у детей старше 12 месяцев существенно не различалась.

В целом, частота носоглоточного носительства *S. pneumoniae* у здоровых детей составила 23% и была выше, чем носительство *H. influenzae* (16%), и сопоставима с частотой выявления *M. catarrhalis* (23%). У детей той же возрастной группы, госпитализированных в стационары по поводу острых респираторных бактериальных инфекций, пневмококк выявлялся в носоглотке с похожей частотой: у 24% детей. Оба исследования (у детей с острыми инфекциями и у здоровых носителей) были проведены в разные годы в г. Москве, при этом распространенность носительства и серотиповое разнообразие выделенных изолятов пневмококка не отличались. Наши данные согласуются с результатами других исследований, проведенных в различные годы, которые показывают, что частота носительства пневмококка является стабильной в до- и поствакцинальную эпоху. Так, по

данным литературы, распространенность носоглоточной колонизации пневмококком у детей до 5 лет оценивается в диапазоне 23 – 56% (Dunai B. et al., 2008; Harboe Z. et al., 2012; Hernandez-Bou S. et al., 2012).

Роль *S. pneumoniae* в структуре острых респираторных бактериальных инфекций у детей младшего возраста, госпитализированных в стационары г. Москвы в 2011-2012 гг.

Всего в исследование было включено 864 пациента, от которых было получено 1716 образцов биологического материала. Основную часть образцов составили носоглоточные мазки (50%) и жидкость среднего уха (43%). Посевов крови было выполнено 106 (6%), а также было проанализировано 10 образцов спинномозговой жидкости (1%).

S. pneumoniae был выделен в 352/1716 (20%) образцах. Подавляющее большинство штаммов выделено из носоглотки (59%; 208/352) и ЖСУ (40%; 140/352). В стерильных локусах (крови и ликворе) культуральным методом удалось идентифицировать 4 штамма *S. pneumoniae*.

Большинство включенных в исследование пациентов составили больные острым гнойным средним отитом и синуситом (86%; 746/864) (рис. 2). Внебольничная пневмония была диагностирована у 77 (9%) больных, сепсис и бактериемия – у 31 (3,6%) и гнойный менингит у 10 (1,2%) пациентов.



Рис. 2. Нозологическая структура включенных в исследование пациентов с острыми бактериальными инфекциями (n = 864)

В спектре бактериальной колонизации носоглотки доля *S. pneumoniae* составила 31% у здоровых детей и 47% у детей с острыми респираторными бактериальными инфекциями

Инвазивные инфекции *S. pneumoniae*

В нашем исследовании, проведенном в когорте детей с острыми респираторными бактериальными инфекциями, культуральным методом в крови и спинномозговой жидкости выделено 11 истинно инвазивных штаммов различных микроорганизмов, в том числе 4 штамма *S. pneumoniae*. Еще в двух случаях (1 образец крови и 1 образец ликвора) была выявлена ДНК пневмококка с помощью ПЦР при отрицательном результате культурального метода. Таким образом, в исследовании было отмечено 6 случаев инвазивных пневмококковых инфекций у госпитализированных детей. Несмотря на небольшое число зарегистрированных в нашем исследовании инвазивных пневмококковых инфекций, необходимо отметить тяжесть их течения. Один ребенок из числа пациентов с верифицированной инвазивной пневмококковой инфекцией (ИПИ) умер.

При исследовании инвазивных штаммов *S. pneumoniae* мы выявили серотипы 14, 23F, 3 и 15С. Распределение серотипов, ответственных за ИПИ, отличается от распределения «неинвазивных» серотипов. В Европе при этих инфекциях чаще других выделяются серотипы 14, 6В, 1, 19F, 23F (Reinert R. et al., 2010; Isaacman D. et al., 2010). Серотипы 1 и 14, а также серотипы 3 и 5 относятся к наиболее вирулентным и чаще вызывают тяжелые пневмонии с плевритом и деструкцией, что отмечают как отечественные, так и зарубежные исследователи (Катосова Л.К. и соавт., 1990; Reinert R. et al., 2010).

Роль *S. pneumoniae* в этиологии острого среднего отита у детей до 5 лет

Бактериальная этиология ОСО у детей младше 5 лет проанализирована на основании результатов микробиологического исследования ЖСУ, полученной при спонтанной перфорации барабанной перепонки или тимпаноцентезе (табл. 1).

Распределение патогенов в исследованной когорте пациентов отличалось от результатов предыдущих сообщений. В нашем исследовании была продемонстрирована лидирующая роль *S. pneumoniae* среди подтвержденных микробиологическими данными случаев ОСО, его доля составила 69%. Вторым по частоте оказался *S. pyogenes*. Он был выделен у 19% пациентов с положительным культуральным исследованием, *не получавших антибиотиков до микробиологического исследования*.

Частота выделения *S. pyogenes* в нашем исследовании значительно превышала таковую для *H. influenzae* (13%) и *M. catarrhalis* (9%). По данным литературы, доля *S. pyogenes* в структуре бактериальных отопатогенов обычно не превышает 1-5% (Vergison A. et al, 2008; Segal N. et al, 2005). Более высокую распространенность (8-17%) этот возбудитель имеет при осложненном течении ОСО, а также у пациентов со спонтанной отореей (Leibovitz E. et al., 2009; Grevers G. et al., 2012).

В нашей когорте пациентов *S. pyogenes*-ассоциированный ОСО встречался преимущественно у детей в возрасте старше 12 мес, а частота выделения этого возбудителя при оторее и тимпаноцентезе не различалась (рис. 3).

Таблица 1. Результаты культурального исследования ЖСУ пациентов с ОСО, получавших и не получавших антибиотик до взятия образца

Пациенты	Всего, n (%)	Антибиотик до взятия ЖСУ			p ^{**}
		n	Не получали	Получали	
Всего пациентов с ОСО	541 (100%)	472*	352 (75%)	120 (25%)	
Пациенты с положительным культуральным результатом	172 (32%)	149	124 (35%)	25 (21%)	0,003
Из числа пациентов с положительным культуральным результатом:***					
Всего:	172 (100%)	149	124 (100%)	25 (100%)	
<i>S. pneumoniae</i>	109 (63%)	97	86 (69%)	11 (44%)	0,015
<i>S. pyogenes</i>	44 (26%)	35	24 (19%)	11 (44%)	0,008
<i>H. influenzae</i>	20 (12%)	18	16 (13%)	2 (8%)	0,49
<i>M. catarrhalis</i>	14 (8%)	13	11 (9%)	2(8%)	0,89

Примечание. * Данные о приеме антибиотика до взятия ЖСУ были доступны для 472/541 (87%) пациентов. ** Значение p указывает на значимость различий между долями в соответствующих ячейках таблицы колонок «Не получали» и «Получали» антибиотик. NS – незначимые различия. *** Сумма долей отопатогенов превышала 100%, поскольку в некоторых образцах ЖСУ присутствовали комбинации 2 или 3 патогенов, каждый из которых считали этиологически значимым.

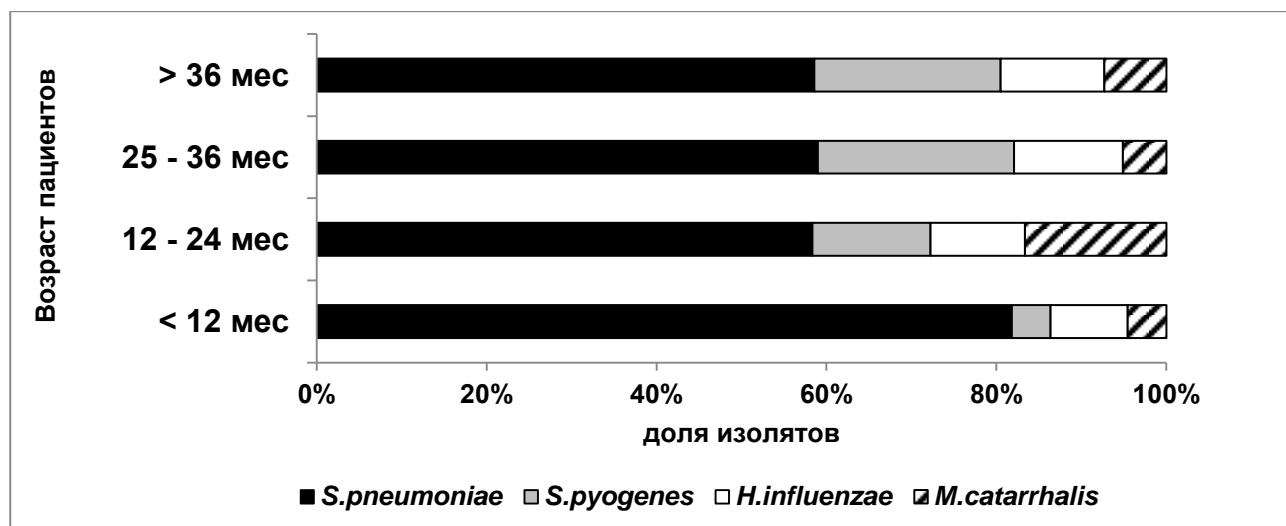


Рис. 3. Распределение отопатогенов, выделенных из ЖСУ, в зависимости от возраста (n = 124)

Примечание. Число штаммов у пациентов различных возрастных групп: < 12 месяцев – n = 22/79; 13-24 месяцев – n = 36/65; 25-36 месяцев – n = 39/96; > 36 месяцев – n = 41/112. Несмотря на различия в распределении патогенов, они не были статистически значимыми ($\chi^2=9,07$, p=0,43).

Серотиповое разнообразие штаммов *S. pneumoniae*

При анализе серотипового спектра штаммов *S. pneumoniae* у всех включенных в исследование групп детей выявлено преобладание обычных, так называемых «педиатрических» серотипов 19F, 6A и 6B, 23F, 14, которые составили > 75% распределения в разных когортах обследованных (рис. 4). Наиболее часто встречался серотип 19F, его доля в серотиповом спектре превышала 20%. У детей с острыми респираторными бактериальными инфекциями в носоглоточных образцах, а у пациентов с ОСО в образцах ЖСУ также часто встречался 3 серотип, его доля в общей структуре превышала 10%. Частота выявления 3 и 19A серотипов в ЖСУ значительно превышала таковую при носоглоточном носительстве.

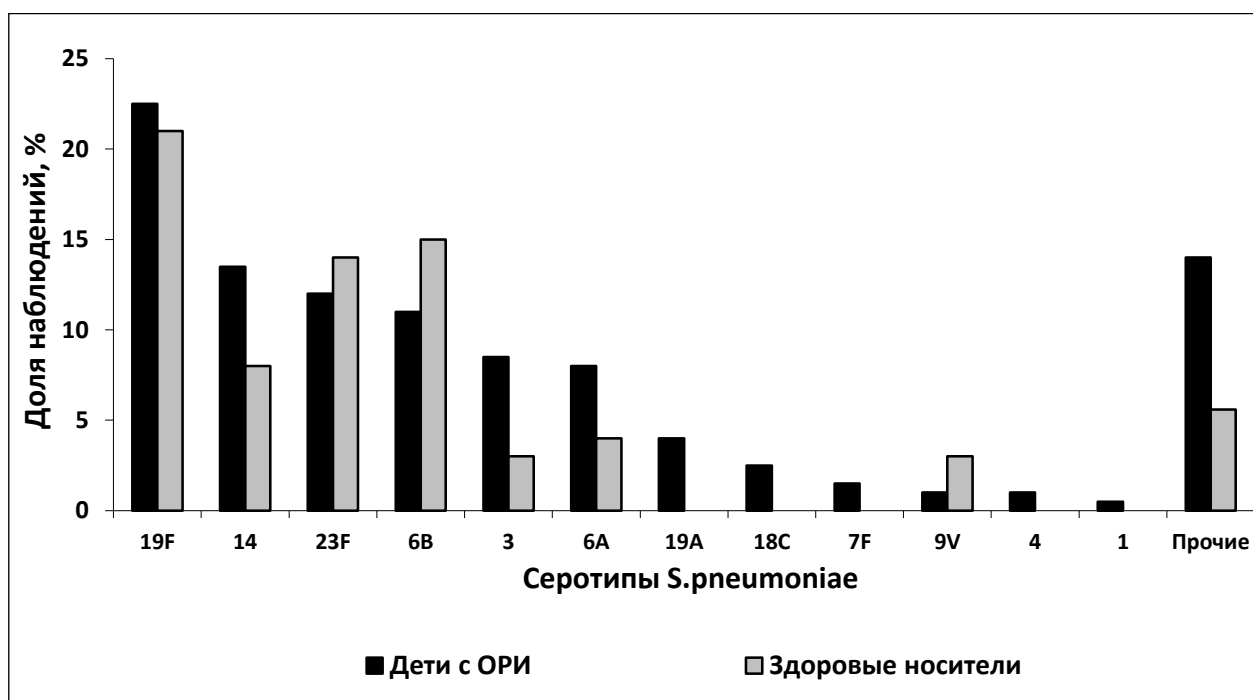


Рис. 4. Распределение серотипов *S. pneumoniae*, выделенных из носоглотки у здоровых детей и пациентов с острыми респираторными бактериальными инфекциями в возрасте до 5 лет

Примечание. ОРИ – острые респираторные инфекции.

Доля в распределении в каждой категории материала (ось Y) рассчитана по отношению к общему числу выделенных штаммов *S. pneumoniae* в этой категории: дети с ОРИ – n = 200, здоровые носители – n= 54.

Структура распределения серотипов *S. pneumoniae*, выделенных из носоглотки у пациентов с ОСО, более чем на 90% совпадала с серотиповой структурой ЖСУ. Всего было определено 13 различных серотипов, а лидирующие позиции занимали те же серотипы, что и в ЖСУ, их суммарная доля составила 83%. Присутствие конкретного серотипа в носоглотке не доказывает его этиологической роли, однако такое совпадение свидетельствует в пользу того, что инфекцию вызывает серотип, колонизирующий носоглотку. Таким образом,

исследуя серотиповой пейзаж *S. pneumoniae* в носоглотке у пациентов с ОСО, можно с высокой долей определенности судить и о серотипах, присутствующих в ЖСУ.

Ведущими серотипами *S. pneumoniae*, выделенными из ЖСУ, стали серотипы 19F, 3, 6B, 14, 19A и 23F, которые в сумме заняли более 80% всего распределения. Не было получено ни одного изолята с серотипом 1 или 5. Полученные данные в целом согласуются с мировыми и отечественными исследованиями, в которых указывается на ведущую роль при пневмококковом ОСО этих же серотипов (Rodgers G. et al., 2009; Козлов Р.С. и соавт., 2011; Перова А.Л. и соавт., 2012; Falup-Prcurariu O. et al., 2013). К особенностям полученного нами серотипового пейзажа по сравнению с другими странами следует отнести более весомое место серотипа 3, который составил 12% (13/107) в структуре серотипов.

Прогнозирование эффективности вакцинации от пневмококковых инфекций

Реальная эффективность применяемых пневмококковых вакцин может быть оценена, исходя из соответствия их состава серотипам *S. pneumoniae*, циркулирующим в конкретном регионе. Результаты наших исследований показывают совпадение спектра циркулирующих серотипов на 63,5 - 81% для ПКВ7 и ПКВ10 и на 86 - 93% для ПКВ13 в различных когортах детей (табл. 2).

Таблица 2. Совпадение спектра циркулирующих серотипов *S. pneumoniae* в исследованных когортах детей с серотипами, включенными в современные конъюгированные пневмококковые вакцины (% охвата вакцинными серотипами)

ПКВ	Серотипы <i>S. pneumoniae</i> при носоглоточном носительстве		Серотипы <i>S. pneumoniae</i> в ЖСУ у детей с острым средним отитом
	2011-2012 гг.	2013-14 гг.	
ПКВ7	63,5	81	66
ПКВ10	63,5	81	67
ПКВ13	86	90	93

Примечание. Штаммы, входящие в состав современных ПКВ:

ПКВ7: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F и 23F

ПКВ10: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F + 1, 5, 7F

ПКВ13: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F + 1, 5, 7F + 3, 6A, 19A

Наши данные сопоставимы с результатами исследования в Санкт-Петербурге (Харит С.М. и соавт., 2011). С учетом того, что ИПИ обязательно предшествует колонизация возбудителем нестерильных локусов, наши данные позволяют прогнозировать хорошую эффективность имеющихся ПКВ в РФ.

Устойчивость штаммов *S. pneumoniae* к антибиотикам

Наше исследование показало существенное нарастание нечувствительности пневмококка к антибиотикам, заметное даже в течение периода реализации этапов

настоящего исследования с 2011 по 2014 гг. Доля штаммов со сниженной чувствительностью или резистентностью к пенициллину в 2012 г. составила 37%, а в 2014 г. - 48%; к эритромицину в 2014 г. были резистентны 40% изолятов против 31% в 2012 г. Устойчивость к клиндамицину и ТМП/СМЗ выросла незначительно (рис. 5). В более ранних исследованиях, проведенных в России в конце 1990-х и в 2001-2002 гг., доля пенициллин-резистентных штаммов *S. pneumoniae* была менее 10%, устойчивыми к макролидам были около 5% штаммов, а полирезистентность наблюдалась только у 2% изолятов. (Страчунский Л.С., 2000, 2006). Уровень резистентности к ТМП/СМЗ был сопоставим с нашими наблюдениями (53%-65%). Таким образом, в последние годы резистентность *S. pneumoniae* существенно выросла.

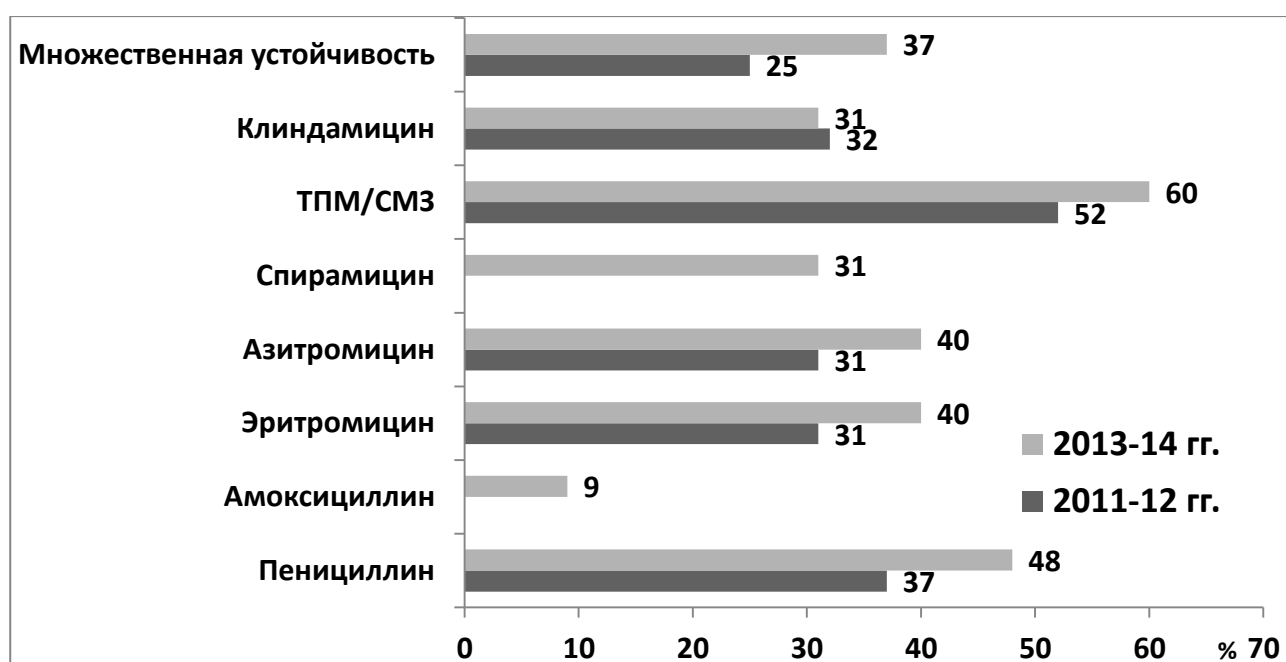


Рис. 5. Устойчивость к антибиотикам штаммов *S. pneumoniae*, выделенных при носоглоточном носительстве в различные годы (2011-12 гг., n = 199; 2013-14 гг., n = 54)

Ситуация с резистентностью пневмококка к макролидам требует особых комментариев. Данные многоцентрового проспективного исследования ПеГас за период 1999-2009 гг. свидетельствовали об относительно стабильном уровне устойчивости пневмококка к 14-, 15- и 16-членным макролидам в течение указанного периода времени, она составляла не более 6,3-8,2% (Козлов Р.С. и соавт., 2010). В этом же исследовании нечувствительность к клиндамицину варьировала от 2,9% в 1999-2003 гг. до 4,5% в 2006-2009 гг. Наши данные показывают критически возросший уровень резистентности к макролидам и клиндамицину. Уровень резистентности циркулирующих штаммов достиг 40% в 2014 г. к 14- и 15-членным макролидам (это

эритромицин, азитромицин, кларитромицин) и 31% к 16-членному макролиду спирамицину, что позволяет считать нецелесообразным рутинное применение всей этой группы препаратов для лечения пневмококковых инфекций.

Множественная устойчивость пневмококка, то есть устойчивость к 3 и более классам антибиотиков, выросла с 25% в 2012 г. до 37% в 2014 г. (рис. 5).

Наше исследование показало, что преобладающим механизмом резистентности к макролидам была модификация мишени путем метилирования, обусловленная наличием *ermB*-гена, который был выявлен у 52% эритромицин-резистентных штаммов *S. pneumoniae* в качестве одной детерминанты и в 35% – в ассоциации с *mef*-зависимым эффлюксом (табл. 3). В 9% случаев наблюдался только *mef*-зависимый механизм устойчивости. Доля штаммов с *ermB* и его комбинацией с *mef* увеличилась по сравнению с российскими данными 2004-2005 гг. (Reinert R.R. и соавт., 2008). Таким образом, в последние годы в России значительно возросла распространенность пневмококков, имеющих сразу два механизма резистентности к макролидам, что вызывает обеспокоенность, т.к. этот фенотип связан с генетическими элементами клональных комплексов наиболее резистентных бактерий (Linares J. et.al., 2010).

Таблица 3. Генетические детерминанты резистентности к макролидам у штаммов *S. pneumoniae*, устойчивых к эритромицину

Гены резистентности	Число штаммов	%
<i>ermB</i> +	43	52
<i>mef</i> +	7	9
<i>ermB</i> +/ <i>mef</i> +	29	35
<i>ermB</i> -/ <i>mef</i> -	3	4
Всего	82	100

Большинство (93%) изолятов пневмококка, обладавшие множественной устойчивостью к антибиотикам, относились к вакцинным серотипам (входили в состав серотипов в ПКВ7, ПКВ10 и ПКВ13). Множественная устойчивость к антибиотикам была выявлена у 28% изолятов пневмококка; ею обладали все штаммы, нечувствительные к пенициллину и амоксициллину. В нашем исследовании в 2013-14 гг. выявлена устойчивость к амоксициллину у 6 из 54 штаммов пневмококка. Нечувствительными к амоксициллину были изоляты, относившиеся к серотипам 19F и 14, при этом все они были выявлены у организованных детей.

Практика назначения системных антибактериальных препаратов при респираторных инфекциях у детей младшего возраста

Резистентность к антибиотикам тесно связана с практикой назначения и применения этих препаратов. В структуре острых бактериальных инфекций, обуславливающих

подавляющее число госпитализаций детей младшего возраста в стационар, преобладают болезни слизистых оболочек, прежде всего отиты и синуситы. В большинстве случаев эти респираторные заболевания не являются жизнеугрожающими, однако их распространенность еще раз свидетельствует о том, что это самая частая причина назначения антибиотиков детям. Вместе с тем столь большая доля острых отитов как причина госпитализации детей может обсуждаться, разумеется, и с точки зрения целесообразности лечения таких пациентов в круглосуточном стационаре. Наше исследование в этой связи наглядно демонстрирует реальную педиатрическую практику в детских больницах Москвы: госпитализируются практически все, кто обращается в приемное отделение больницы; лечение мукозальных инфекций, обычно не требующих инфузионной терапии, длительно (до 7-10 дней) осуществляется в стационарных условиях; тимпаноцентез является рутинной процедурой у пациентов с ОСО и проводится практически всем больным с этим диагнозом. Такая практика существенно отличается от общепринятой в большинстве развитых стран и требует скорейшего пересмотра. Этот вывод относится к сфере организации здравоохранения, но очевиден при анализе полученной в нашем исследовании структуры госпитализаций.

Следует отметить также клиническую практику назначения антибактериальной терапии детям с подозрением на острую бактериальную инфекцию на догоспитальном этапе. Антибиотик до взятия биоматериала в нашем исследовании получили 240 детей, из них 197 (82%) – на этапе приемного отделения или стационарного отделения до постановки диагноза и включения в исследование (табл. 4).

Таблица 4. Эмпирическая антибактериальная терапия при острых респираторных инфекциях в реальной клинической практике в г. Москве

Антибактериальные препараты	Пациенты, получавшие антибактериальную терапию
Всего назначений антибиотиков до верификации диагноза	240/864 (28%)
Из них парентерально	197/240 (87%)
<i>Цефалоспорины I поколения</i>	79/240 (33%)
<i>Цефалоспорины II поколения</i>	5/240 (2%)
<i>Цефалоспорины III поколения</i>	115/240 (48%)
<i>Макролиды (азитромицин)</i>	14/240 (6%)
<i>Амоксициллин (± клавуланат)</i>	19/240 (8%)
<i>Аминогликозиды (амикацин)</i>	2/240 (1%)
<i>Другие</i>	4/240 (2%)

Выбор антибактериального препарата в 50% случаев пришелся на цефалоспорины третьего поколения (преимущественно цефтриаксон) и в 33% случаев на цефалоспорины первого поколения (цефазолин). В амбулаторной практике предпочтение при эмпирической

антибиотикотерапии отдается азитромицину и цефиксиму. Основной антибиотик, показанный при отитах, синуситах и пневмониях у детей, амоксициллин, на догоспитальном этапе был эмпирически выбран врачами лишь в 8% случаев.

Таким образом, выбор антибактериального препарата при подозрении на острую бактериальную инфекцию у детей в реальной практике в Москве нередко не соответствует рекомендациям ВОЗ и международных руководств. Кроме того, преобладает парентеральное введение антибактериальных препаратов, хотя подавляющую долю средних отитов и пневмоний у детей можно вылечить при пероральном приеме амоксициллина.

Клональная структура *S. pneumoniae* с множественной устойчивостью к антибиотикам

Выявленные из ЖСУ штаммы пневмококков с множественной устойчивостью к антибиотикам (n = 32) генотипировали с помощью МЛСТ. Всего было обнаружено 13 известных сиквенс-типов, принадлежащих к 8 клональным комплексам, а также 3 новых сиквенс-типа, имеющих связь с СС320, и 1 синглетон (генотип-«одиночка», не принадлежащий ни к одному из известных клональных комплексов).

В нашей выборке преобладали представители СС320 (31%, 10/32). Они включали 3 изолята с ST320, 6 однолокусных вариантов (single locus variant, SLV) и 1 двулокусный вариант (double locus variant, DLV) этого сиквенс-типа. Примечательно, что 5 из 6 SLV обладали идентичным вариантом последовательности локуса *dll* и принадлежали к единственному новому сиквенс-типу, который ранее не был описан в базе данных PMEN (табл. 5.5). Большинство изолятов СС320 имели серотип 19F (8/10), а 2 из 10 изолятов – серотип 19A. Все СС320-пневмококки характеризовались высокими МПК пенициллина и амоксициллина (≥ 1 мкг/мл). Кроме того, 9/10 этих штаммов являлись носителями комбинации детерминант устойчивости к макролидам *ermB* и *mef*, что обуславливало их MLS_B-фенотип. Один штамм (DLV ST320) был носителем гена *mef* и сохранял чувствительность к клиндамицину. Изолят-синглетон с серотипом 19F демонстрировал высокую МПК пенициллина (4 мкг/мл) и имел обе детерминанты резистентности к макролидам.

Оставшиеся изоляты серогруппы 19 (n = 8) принадлежали к 4 различным клональным комплексам, включая СС236 (n = 3), СС193 (n = 2), СС230 (n = 2) и СС156 (n = 1). В этой группе МПК к пенициллину отличалась сравнительно низким уровнем (все МПК $\leq 0,5$ мкг/мл, за исключением 1 штамма из СС156 с МПК пенициллина 1 мкг/мл), а 3/8 изолятов обладали единственной детерминантой резистентности к макролидам (у 2 был ген *ermB*, у 1 – ген *mef*).

Клональный комплекс СС156 был представлен пневмококками ST790 и ST865 (n=3 каждый). Большинство (5/6) этих изолятов относились к серотипу 14 и были носителем *ermB* как единственной детерминанты резистентности к макролидам, а один изолят обладал

индуцибельным MLS_B-фенотипом. Оставшийся CC156-изолят с ST790 обладал капсулой 19A и двойным механизмом резистентности к макролидам. Все пневмококки CC156 демонстрировали высокую МПК пенициллина (≥ 1 мкг/мл). Один штамм с серотипом 14 имел ST15 и относился к CC15.

Клональный комплекс CC315 был представлен 6 изолятами (все с серотипом 6B) и 3 сиквенс-типами, которые включали ST315 (n = 4), ST1032 и ST386 (n = 1 каждый). Лишь один штамм имел высокую МПК пенициллина (1 мкг/мл), но был чувствителен к триметоприму/сульфаметоксазолу. Остальные были чувствительны к пенициллину или обладали невысоким уровнем МПК. Один изолят с множественной устойчивостью с серотипом 23F имел ST81 и представлял CC81.

Анализ клональной структуры пневмококков с множественной устойчивостью к антибиотикам показал преобладание изолятов, относящихся к клональному комплексу CC320. К нему принадлежало большинство пневмококков с высокими МПК пенициллина и амоксициллина. До настоящего времени в PMEN не было депонировано ни одного изолята из России с сиквенс-типом ST320, т.е. штамм пневмококка серотипа 19A с ST320, обнаруженный в ходе настоящей работы, является первым пневмококком такого рода, выявленным в нашей стране. Эти данные указывают на то, что, несмотря на ранее наблюдавшуюся ограниченную распространенность CC320 на территории России, в настоящее время этот клональный комплекс выходит на лидирующие позиции среди пневмококков с множественной устойчивостью к антибиотикам.

ВЫВОДЫ

1. Частота носоглоточного носительства *S. pneumoniae* у неорганизованных здоровых детей в возрасте до 5 лет составляет 15%, у посещающих детский сад 24%, у воспитанников детского дома 26%. В спектре бактериальной колонизации носоглотки доля *S. pneumoniae* составила 31% у здоровых детей и 47% у детей с острыми респираторными бактериальными инфекциями.
2. В этиологической структуре острого среднего отита у детей младшего возраста в г. Москве по данным микробиологического анализа жидкости среднего уха лидирует *S. pneumoniae* (69%), вторым по частоте обнаруживается *S. pyogenes* (19%), реже встречаются *H. influenzae* (13%) и *M. catarrhalis* (9%).
3. В серотиповом спектре *S. pneumoniae* преобладают серотипы 19F, 6A и 6B, 23F, 14, которые составляют > 75% распределения во всех когортах обследованных детей. Наиболее распространен серотип 19F (доля в серотиповом спектре превышает 20%). У детей с острыми респираторными бактериальными инфекциями, в том числе с острым средним отитом, актуальными являются также серотипы 3 и 19A.

4. В период 2011-2014 гг. зафиксирован рост доли нечувствительных к пенициллину штаммов *S. pneumoniae* с 37% до 48%, а также штаммов с множественной устойчивостью к антибиотикам с 25% до 37%. Резистентность пневмококка к клиндамицину не изменилась, оставаясь на уровне 31-32%. Актуальные штаммы *S. pneumoniae* сохраняют высокую чувствительность к амоксициллину.
5. Уровень резистентности циркулирующих штаммов *S. pneumoniae* к макролидным антибиотикам превышает 30%, а в группе здоровых носителей он достигает 40% к 14- и 15-членным макролидам (эритромицин, азитромицин, кларитромицин) и 31% к 16-членному макролиду спирамицину.
6. Ведущим молекулярным механизмом резистентности *S. pneumoniae* к макролидам является наличие гена *ermB* у 52% штаммов в качестве одной детерминанты устойчивости и у 35% – в ассоциации с *mef*-зависимым эффлюксом.
7. В клональной структуре пневмококков с множественной устойчивостью к антибиотикам преобладают изоляты клонального комплекса CC320 (30%).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Данные о чувствительности к антибиотикам, серотиповом составе изолятов пневмококка у детей младшего возраста целесообразно использовать для мониторинга изменений сероэпидемиологии, сиквенс-типов и резистентности штаммов *S. pneumoniae* после начала массовой вакцинации от пневмококковой инфекции, включенной в российский календарь иммунизации в 2014 г.
2. Представленные данные об актуальных серотипах *S.pneumoniae* позволяют прогнозировать эффективность вакцинации от пневмококковых инфекций после начала массовой иммунизации детского населения. Результаты наших исследований показывают совпадение спектра циркулирующих серотипов на 63,5 - 81% для ПКВ7 и ПКВ10 и на 86 - 93% для ПКВ13 в различных когортах детей младшего возраста.
3. Сероэпидемиология и молекулярно-генетические характеристики *S.pneumoniae* со множественной устойчивостью к антибиотикам (преобладание штаммов, относящихся к серогруппам 19 и 6) обосновывают использование ПКВ с расширенным охватом серотипов, включая серотипы 19А и 6А.
4. Сохраняющаяся высокая чувствительность *S.pneumoniae* к амоксициллину (> 90%) позволяет рекомендовать его препаратом первого выбора при острых бактериальных инфекциях пневмококковой этиологии у детей.
5. Устойчивость циркулирующих штаммов *S.pneumoniae* к пенициллину и триметоприму/сульфаметоксазолу, превышающая 40%, не позволяет применять эти препараты для лечения пневмококковых инфекций.
6. Повышение уровня резистентности исследованных штаммов пневмококка к макролидным

- антибиотикам до 30-40% свидетельствует о нецелесообразности рутинного использования любых макролидов для лечения пневмококковых инфекций. Данная рекомендация ограничивает применение как 14- и 15-членных, так и 16-членных макролидов, учитывая единые генетические механизмы антимикробной устойчивости у этой группы антибиотиков.
7. Выявление колонизации носоглотки *S. pneumoniae* или *S. pyogenes* повышает вероятность того, что именно эти бактерии являются причиной острого среднего отита у ребенка, до 60-75%.
 8. Учитывая данные о чувствительности к антибиотикам всех выявленных бактериальных отопатогенов, для лечения острого среднего отита у детей целесообразно использовать в качестве препарата выбора амоксициллин ± клавуланат.

Список работ, опубликованных по теме диссертации.

1. Лазарева, М.А. Мальчик с лихорадкой и обструктивным синдромом. Клиническая задача № 31//Вопросы диагностики в педиатрии.2012.-Т.4.-№5.-С.57-58.
2. **Лазарева, М.А. Роль *Streptococcus pneumoniae* в структуре бактериальных инфекций у детей, госпитализированных в стационары г. Москвы в 2011–2012 гг / Баранов А.А., Намазова-Баранова Л.С., Маянский Н.А., Куличенко Т.В., Полунина Т.А., Лазарева А.В., Алябьева Н.М., Катосова Л.К., Пономаренко О.А., Колтунов И.Е., Иваненко А.М, Дегтярёва Е.А., Кондратенко Н.В., Корсунский А.А., Константинов К.В., Тулупов Д.А., Лазарева М.А. // Педиатрическая фармакология.-2013.-Т.10. -№5.-С.6–12.**
3. Lazareva, M. Noninvasive pneumococcal in hospitalized children in Moscow (Russia) / Mayanskiy N., Alyabieva N., Lazareva A., Ponomarenko O., Katosova L., Ivanenko A., Lazareva M., Kulichenko T., Namazova-Baranova L. // В книге: Abstracts from 24 th ECCMID, Barselona.-2014.-С.6.
4. **Lazareva, M. Bacterial etiology of acute otitis media and characterization of pneumococcal serotypes and genotypes among children in Moscow, Russia / Mayanskiy N., Alyabieva N., Ponomarenko O., Pakhomov A., Kulichenko T., Ivanenko A., Lazareva M., Lazareva A., Katosova L., Namazova-Baranova L., Baranov A. // Pediatric Infectious Disease Journal.-2014.-V.20.-P. 214-623.**
5. **Лазарева, М.А. Носоглоточное носительство *Streptococcus pneumoniae* у воспитанников детских домов, дошкольных учреждений и неорганизованных детей младше 5 лет / Лазарева М.А., Куличенко Т.В., Алябьева Н.М., Пономаренко О.А., Лазарева А.В., Катосова Л.К., Маянский Н.А. // Вопросы современной педиатрии.-2015. Т. 14. -№2- С.246-255.**
6. Lazareva, M. Genotype characterization of multidrug resistant pneumococci among children with acute otitis media in Moscow, Russia / Alyabieva N., Ponomarenko O., Lazareva A., Katosova L., Lazareva M., Kulichenko T., Mayanskiy N. // В книге: Abstracts from 25th ECCMID, Kopenhagen.-2015.-С.111.
7. **Лазарева, М.А. Нарушение календаря вакцинопрофилактики детей: взгляд врачей и родителей / Куличенко Т.В., Дымшиц М.Н., Лазарева М.А., Бабаян А.Р. // Педиатрическая фармакология.-2015.- Т.12.-№3-С.68-72.**

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- MLS_B тип резистентности – устойчивость к макролидам, линкозамидам, стрептограмину В
- PMEN – Pneumococcal Molecular Epidemiology Network, пневмококковая молекулярная эпидемиологическая сеть
- ЖСУ – жидкость среднего уха
- ИПИИ – инвазивная пневмококковая инфекция
- МЛСТ – мультилокусное сиквенс-типирование
- МПК – минимальная подавляющая концентрация
- ОСО – острый средний отит
- ПКВ – пневмококковая конъюгированная вакцина
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- ТМП/СМЗ – триметоприм-сульфаметоксазол