

Клональная структура популяции изолятов *Streptococcus pneumoniae*, циркулирующих в России с 1980 по 2017 гг.

*И. А. ЦВЕТКОВА¹, С. С. БЕЛАНОВ², В. В. ГОСТЕВ^{1,3}, О. С. КАЛИНОГОРСКАЯ¹, М. О. ВОЛКОВА¹, А. С. МОХОВ⁴,
Е. В. НИКИТИНА¹, Е. Л. КАЛИСНИКОВА¹, К. А. ИВАНОВА¹, А. А. ВОЛОДИНА⁵, С. В. СИДОРЕНКО^{1,3}

¹ Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург

² Университет Хельсинки, Институт биотехнологии, Хельсинки, Финляндия

³ Северо-западный государственный медицинский университет, Санкт-Петербург

⁴ Санкт-Петербургский информационно-аналитический центр, Санкт-Петербург

⁵ Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург

Clonality of *Streptococcus pneumoniae* Isolates in Russia, Circulating from 1980 to 2017

*I. A. TSVETKOVA¹, S. S. BELANOV², V. V. GOSTEV^{1,3}, O. S. KALINOGORSKAYA¹, M. O. VOLKOVA¹, A. S. MOKHOV⁴,
E. V. NIKITINA¹, E. L. KALISNIKOVA¹, K. A. IVANOVA¹, A. A. VOLODINA⁵, S. V. SIDORENKO^{1,3}

¹ Federal State-Financed Institution Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases under the Federal Medical Biological Agency, Saint-Petersburg

² University of Helsinki, Institute of Biotechnology, Helsinki, Finland

³ North-Western State Medical University, Saint-Petersburg

⁴ The Saint-Petersburg Information and Analytical Centre, Saint-Petersburg

⁵ The Saint-Petersburg Scientific Research Institute of Vaccines and Serums and the Enterprise for the Production of Bacterial Preparations of Federal Medical Biological Agency, Saint-Petersburg

Цель исследования — охарактеризовать популяцию *Streptococcus pneumoniae*, циркулирующих в России, выявить внутривидовую филогенетическую связь между штаммами пневмококков из разных географических мест. **Материал и методы.** Филогенетический анализ был проведён с помощью eBURST-анализа, а также анализа конкатенатов последовательностей шести генов домашнего хозяйства, используемых для мультилокусного сиквенс-типирования (MLST). **Результаты.** Циркулирующие в России штаммы пневмококка, описанные в этом исследовании, связаны со многими успешными международными клонами, обладающими потенциалом для распространения. Выявлена тенденция к преимущественному распространению в России антибиотикорезистентности среди отдельных генетических линий.

Ключевые слова: *Streptococcus pneumoniae*, филогенетический анализ, антибиотикорезистентность.

The objective of this study was to clarify the intraspecies phylogenetic relationship between pneumococci strains from various geographical locations. Concatenated Multilocus sequence typing (MLST) sequences of six housekeeping genes were chosen for the phylogenetic tree construction. Trees, constructed for concatenated genes, revealed that there is a tendency for a clonal spread of antibiotic resistance. Interestingly, the isolates with novel or circulating mainly in Russia genotypes, described in this study, many are related to successful international clones, with the potential to spread.

Keyword: *Streptococcus pneumoniae*, phylogenetic relationship, antibiotic resistance.

Введение

По данным Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ), пневмококковая инфекция (ПИ) является распространённой причиной заболеваемости и смертности во всем мире [1]. Проблемы эпидемиологического надзора и истинного уровня заболеваемости ПИ в России до сих пор являются актуальными [2]. В разные периоды времени в России были проведены широкомасштабные исследования роли пневмококковой инфек-

ции в структуре бактериальных инфекций у детей [3–6]. Согласно этим исследованиям, средняя заболеваемость менингитом пневмококковой этиологии в России составляет 8 на 100 тыс. детей в возрасте до 5 лет [3, 4]. Бактериальная природа острого среднего отита (ОСО) у детей в возрасте до 5 лет была подтверждена в 47% случаев, при этом в 35,3% случаев в качестве возбудителя ОСО был выявлен пневмококк [5, 6].

До введения пневмококковых конъюгированных вакцин в Национальную программу иммунизации Российской Федерации в России также были проведены многочисленные эпидемиологические исследования по оценке распределения серотипового состава *Streptococcus pneumoniae*, цир-

© Коллектив авторов, 2019

*Адрес для корреспонденции: e-mail: i.tsvetik@gmail.com

* Авторы с равным вкладом в опубликованную работу

кулирующих среди детей. Установлено, что наиболее распространёнными оказались серотипы 6B, 14, 19F и 23F [3, 7–20]. Серотип 3 часто ассоциировался с ОСО. Сниженная антибиотикочувствительность была в основном характерна для изолятов серотипов 19A, 19F, 14, 6B и 23F [7, 11, 13]. Серотипы 6A и 19A часто ассоциировались с высокой устойчивостью к антибиотикам.

Опыт иммунизации детей против *S. pneumoniae* в других странах показал эффективность применения вакцинопрофилактики для снижения распространённости инвазивных пневмококковых заболеваний [21–24]. В России 13-валентная пневмококковая конъюгированная вакцина (PCV13) была введена в Национальную программу иммунизации только в 2014 г. Однако, несмотря на высокий уровень охвата иммунизацией в большинстве регионов (87%), достигнутый за прошедший период после введения плановой вакцинопрофилактики пневмококковой инфекции, большинство детей (73%) были привиты без соблюдения стандартной схемы [25]. Это затрудняет оценку эффективности вакцинации.

Для оценки эффективности вакцинации необходимо проводить мониторинг динамики пневмококковой популяции. Реакция пневмококковой популяции на селективное давление, вызванное вакцинацией, может быть связана как с увеличением частоты ПИ с замещением серотипов [26, 27], так и с появлением устойчивости к антибиотикам у не-PCV13 штаммов [27]. Понимание популяционной генетики пневмококков позволит выявить изменения, происходящие на уровне генетических линий циркулирующих пневмококков. До недавнего времени в России не проводилось глобальной оценки распространённости генетических линий пневмококка.

По данным pubMLST [28], более половины пневмококковой популяции в России представлено штаммами, относящимися к редким сиквенс-типам. Поэтому знание филогенетических взаимосвязей между циркулирующими в России штаммами пневмококков и распространёнными в различных географических регионах эпидемиологически значимыми клонами важно для понимания эпидемиологической ситуации в России. Мы проанализировали популяцию пневмококков в России за период с 1980 по 2017 гг, включая ранний период после начала вакцинации. Мы провели филогенетический анализ для 516 штаммов пневмококка из России, зарегистрированных в базе данных PubMLST. Данная выборка также включает штаммы, выделенные и типированные в нашем исследовательском центре. Мы также оценили наличие ассоциаций между сниженной антибиотикочувствительностью и принадлежностью к генетическим линиям среди пневмококков, циркулирующих в России.

Материал и методы

Характеристика изолятов в ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России (Санкт-Петербург). Изоляты *S. pneumoniae* были получены от пациентов с инвазивными и неинвазивными пневмококковыми заболеваниями, а также от носителей из различных регионов России за 2010–2017 годы. Скрининг 976 изолятов на антибиотикочувствительность к пенициллину (PEN) и эритромицину (ERY) был проведён с использованием диско-диффузионного метода и рекомендаций EUCAST. ПЦП-серотипирование изолятов было выполнено с учётом рекомендаций CDC. Для MLST-типирования было отобрано 126 изолятов, включающих как PEN-резистентные, так и PEN-чувствительные пневмококки, принадлежащие либо к распространённым в России, либо редким серотипам.

Мультилокусное секвенирование (MLST-типирование). MLST-типирование и идентификация сиквенс-типов были проведены в соответствии с рекомендациями pubMLST (<https://pubmlst.org/>). Принадлежность сиквенс-типов к клональным комплексам (для однолокусных вариантов) была установлена с помощью eBURST анализа.

Формирование выборки для анализа. Анализируемая выборка была увеличена за счёт включения в исследование изолятов из России и референтных штаммов из других регионов, зарегистрированных в базе данных PubMLST (см. Результаты и обсуждение).

Филогенетический анализ. Филогенетический анализ был выполнен по конкатенатам последовательностей генов MLST (953 изолята с метаданными, 338 сиквенс-типов).

Выравнивание последовательностей. Конкатенаты последовательностей фрагментов шести из семи генов домашнего хозяйства (за исключением гена *ddl*) были выровнены с помощью программы Parsnp, версия 1.2. [29, 30]. Идентичные последовательности тех же сиквенс-типов, но соответствующие разным штаммам были добавлены в выравнивание для анализа метаданных.

Анализ структуры популяции. 416 сайтов однонуклеотидного полиморфизма (SNPs) были экстрагированы с помощью пакета Parsnp для построения филогенетического дерева в программе RaxML, версия 8.2.12. [31] с использованием стандартной модели эволюции GTR (General Time-Reversible) замены нуклеотидов с четырьмя категориями для учёта гетерогенности скорости эволюции сайтов согласно гамма распределению, с выполнением 100 бутстрэп реплик [31]. Результирующее дерево было обработано по алгоритму укоренения в среднюю точку (midpoint rooting) относительно самой длинной ветви. Аннотация филогенетического дерева с использованием различных метаданных была выполнена в программе iTOL, версия 4.3.2. [32]. То же самое выравнивание SNPs было проанализировано в программном пакете RhierBAPS (R версия 3.5.2, RhierBAPS пакет версии 1.1.0) для анализа взаимосвязей между генетическими кластерами и их субструктурами [33, 34]. Программа SplitsTree (версия 4.14.8) была использована для получения филогении по методу ближайшего соседа (neighbor joining, NJ) с выполнением 100 бутстрэп реплик, с применением алгоритма split decomposition (SD) [35]. Последовательности родственного вида *Streptococcus mitis* были использованы в качестве аутгруппы.

Попарные оценки генетических расстояний между идентифицированными в популяции группами. Генетическая дифференциация между филогенетическими кладами была проведена с помощью анализа генетических расстояний с использованием R-пакета и скрипта для попарной оценки расстояний по SNP [36].

Результаты и обсуждение

Анализируемая выборка. В данное исследование были включены зарегистрированные в базе данных PubMLST штаммы *S. pneumoniae* ($n=516$),

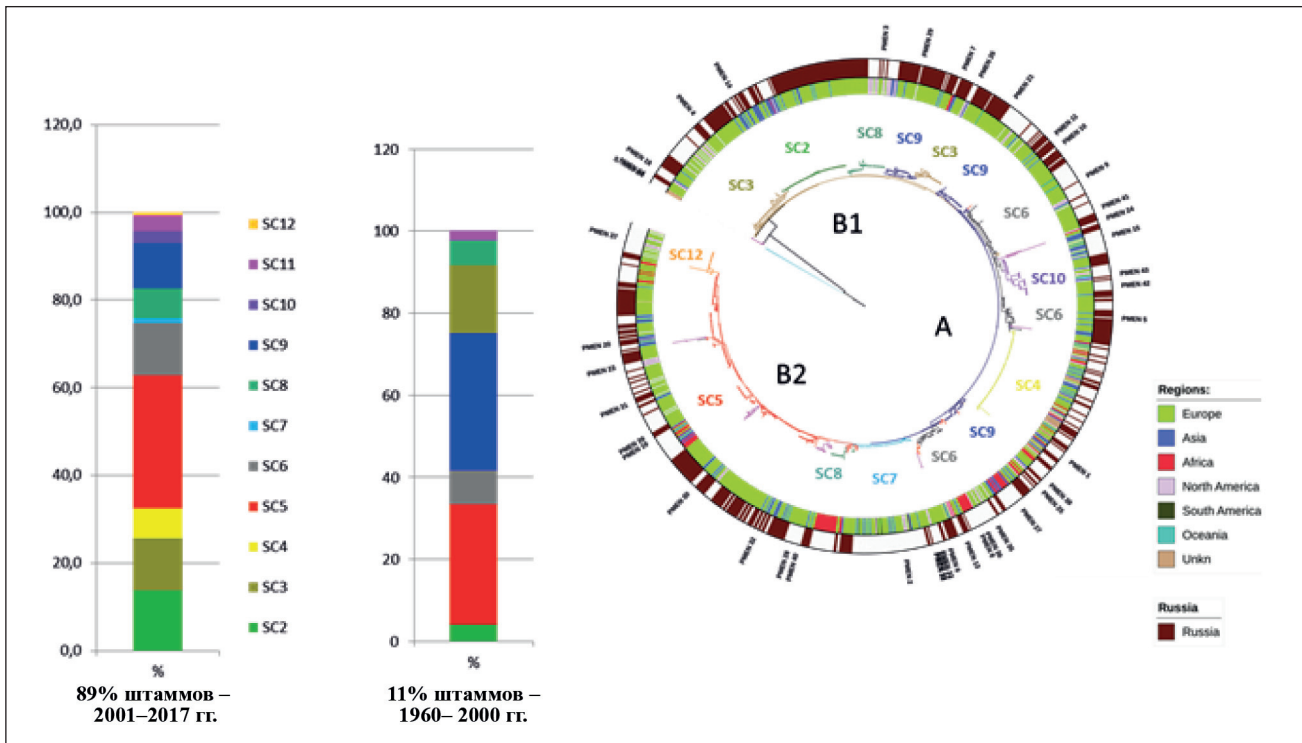


Рис. 2. Филогенетическое дерево *Streptococcus pneumoniae* по конкатенатам 6 генов домашнего хозяйства — Метод максимального правдоподобия (RaхML).

S.mitis KCOM13 используется в качестве аутгруппы. Сиквенс-кластеры (SC) идентифицированы с помощью пакета ghierbaps. Аннотации выполнены в программе iTOL. Российские изоляты показаны коричневым цветом. География регионов мира, в том числе азиатская и европейская части России, отражена цветами во внутреннем кольце области аннотаций. А, В1 В2 — расположение глобальных групп, выделенных с помощью Splits Tree (рис. 3).

ветствующие сиквенс-кластерам: SC2, SC3, SC4, SC5, SC6, SC8 и SC9 (7 из 11 идентифицированных сиквенс-кластеров) (рис. 2). Распространённые в России сиквенс-типы (согласно eBURST анализу) ассоциировались со следующими сиквенс-кластерами: SC2 (ST236, ST271, ST320 и SLVs); SC3 (ST663); SC4 (ST81 и SLVs); SC5 (ST180, ST505, ST230, ST315, ST1025); SC8 (ST143); SC9 (ST239, ST2296).

Российские представители SC4 включали изоляты сиквенс-типа ST81 и его SLVs. Референсный клон Spain23F-1, PMEN-1, принадлежащий данному сиквенс-типу, впервые был зарегистрирован в 1980 годах в Испании. Начиная с 1991 г. и до массового внедрения вакцинации, было зарегистрировано межконтинентальное распространение представителей PMEN-1 в различных странах [38], в том числе и в России. В 1990 годах представители PMEN-1 составляли 40% циркулирующих в США штаммов со сниженной чувствительностью к пенициллину, распространение данного клона снизилось после введения конъюгированной вакцины PCV7 [39, 40].

Сиквенс-кластер SC6 был представлен несколькими кладами и включал референсные последовательности девяти эпидемически значимых клонов: PMEN-8 и PMEN-13 (Южная Африка), PMEN-35 и PMEN-36 (Нидерланды),

PMEN-5 (Испания), PMEN-11 и PMEN-10 (Чешская Республика), PMEN-9 (Великобритания), PMEN-41 (Португалия). Много представителей российских штаммов, циркулирующих в различные временные периоды и принадлежащих редким сиквенс-типам, кластеризовались с клонами PMEN-5, PMEN-13, PMEN-10 и PMEN-11 (см. рис. 2). В состав SC6 входил ST123, принадлежащие к нему изоляты были зарегистрированы в наиболее ранний из анализируемых периодов, в 1939 г. в Дании. Среди российских штаммов также были штаммы, принадлежащие ST123 (выделены в 2007 г.).

SC10 был представлен полифилетическим кладом, включающим представителей PMEN-15 (Taiwan23F-15), PMEN-42 (NorwayNT-42), PMEN-43 (USANT-43), циркулирующих в различных регионах мира: Азия, Европа и Северная Америка, соответственно (см. рис. 2).

Представители SC9 формировали несколько кладов (см. рис. 2). Распространённые в России представители SC9 принадлежали ST2296 (1, 19F) и ST239 (23F, 19F). Изоляты, принадлежащие ST2296, были выделены в период с 1960 по 2000 гг. (см. рис. 2). Редкие сиквенс-типы кластеризовались вместе с циркулирующими в Европе PMEN-38 (Sweden4-38, ST205), повсеместно циркулирующим PMEN-25 (Sweden15A-25, ST63) и распро-

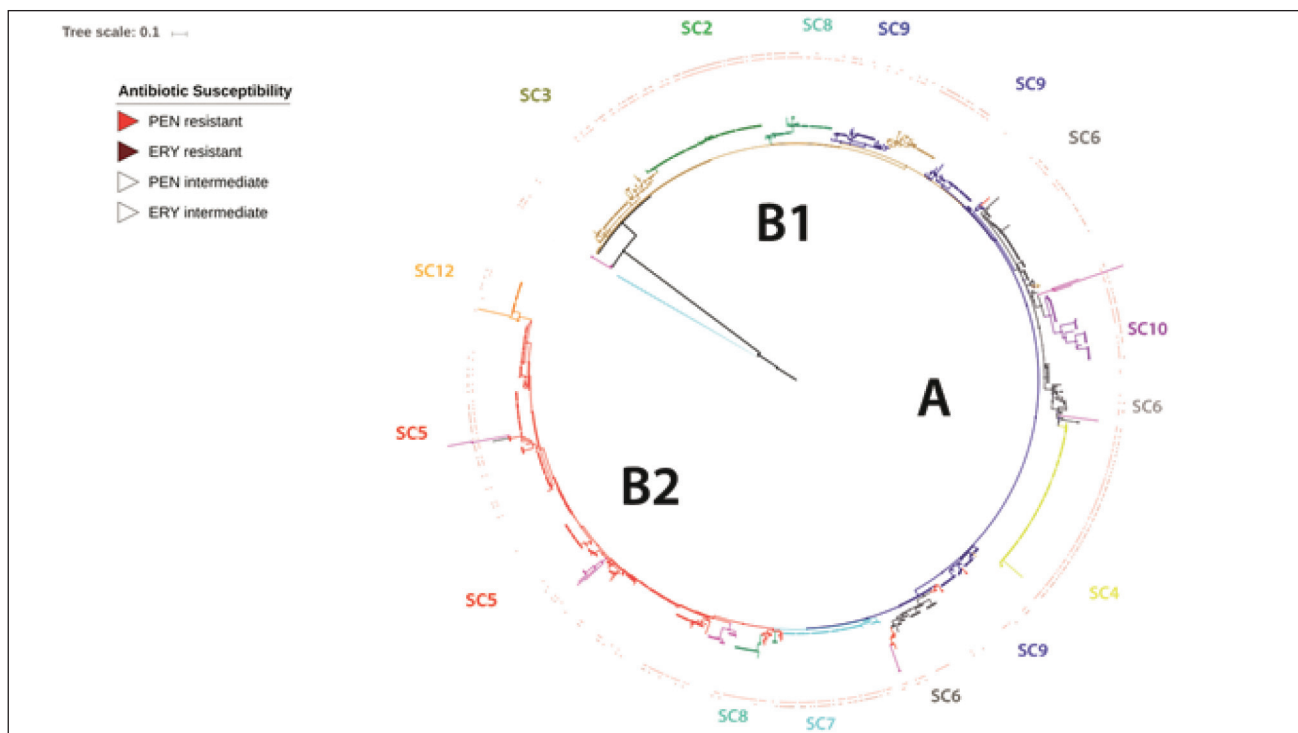


Рис. 3. Ассоциация сниженной антибиотикочувствительности и генетическими линиями популяции *Streptococcus pneumoniae*.

Сиквенс-кластеры (SC) идентифицированы с помощью R-пакета rhierbaps. Изоляты со сниженной чувствительностью к бета-лактамам и макролидам отмечены треугольниками.

странённым в Азии и Африке PMEN-27 (Sweden1-27, ST217).

Представители SC8 формировали два клада, один из которых был ассоциирован с повсеместно распространённым клоном PMEN-3 (Spain9V-3, ST156), а второй — с сиквенс-типом ST1094, распространённым в Африке в период с 1960 по 2000 гг.

SC2 был представлен широко распространёнными в России (азиатской и европейской части) и Азиатских странах изолятами, кластеризующимися вместе с референсным клоном PMEN14 (Taiwan19F-14, ST236). Данный клад также включал близкие ему ST271, ST320 и их однолокусные и двулокусные варианты.

SC3 представлен распространённым в Европе и Северной Америке ST62, ST67, а также российскими штаммами редких сиквенс-типов.

Анализ данных (рис. 3) выявил тенденцию к преимущественному распространению в России антибиотикорезистентности в отдельных сиквенс-кластерах: SC2 (серотипы 19F, 19A) — 21% изолятов, устойчивых к бета-лактамам; и SC4 (серотип 23F) — 12,3%. Циркулирующие в России представители сиквенс-кластеров SC8 и SC9 также несли детерминанты резистентности к бета-лактамам и макролидам: SC8 (серотипы 14, 19A, 9A/V) — 9,9%, SC9 (серотипы 19F, 19A, 14, 6 серогруппа, 9A/V, 3, 1, 4) — 8,3%. Изоляты SC6 (серотипы 14, 19F, 19A) составляли 6% устойчивых к бета-лактамам штаммов (данные штаммы были

преимущественно представлены ST423, а также редкими сиквенс-типами, в том числе изолятами ST123, 23F). Сиквенс-кластер SC5 включал только один сиквенс-тип (ST315), который устойчиво ассоциировался с наличием мультирезистентности к бета-лактамам и макролидам (см. рис. 3). Практически все представители клада, ассоциированного с SC10, несли детерминанты резистентности к бета-лактамам и макролидам. Большая часть российских штаммов из данного клада формировала отдельный субклад из резистентных к бета-лактамам (2,4%) и макролидам представителей ST10434 (19A), ST10435 (19A), ST880 (NT).

Структура глобальной популяции *Streptococcus pneumoniae*. Для подтверждения полученной топологии филогенетического дерева (см. рис. 2) те же 416 сайтов SNPs, экстрагированные из выравнивания конкатенатов MLST-аллелей, были использованы для построения филогении с помощью альтернативного метода — с объединением алгоритмов ближайших соседей и максимальной парсимонии (программа SplitsTree), и применением алгоритма splits decomposition. Данный анализ позволил выделить два глобальных кластера в пределах популяции *S.pneumoniae* (A и B) (см. рис. 4), при этом в кластере B также можно было выделить группы B1 и B2 (см. рис. 4).

Глобальные группы A и B включали представителей различных сиквенс-кластеров: A — SC4, SC6, SC10; B — SC5, SC7, SC8, SC9, SC12 (см. рис. 2).

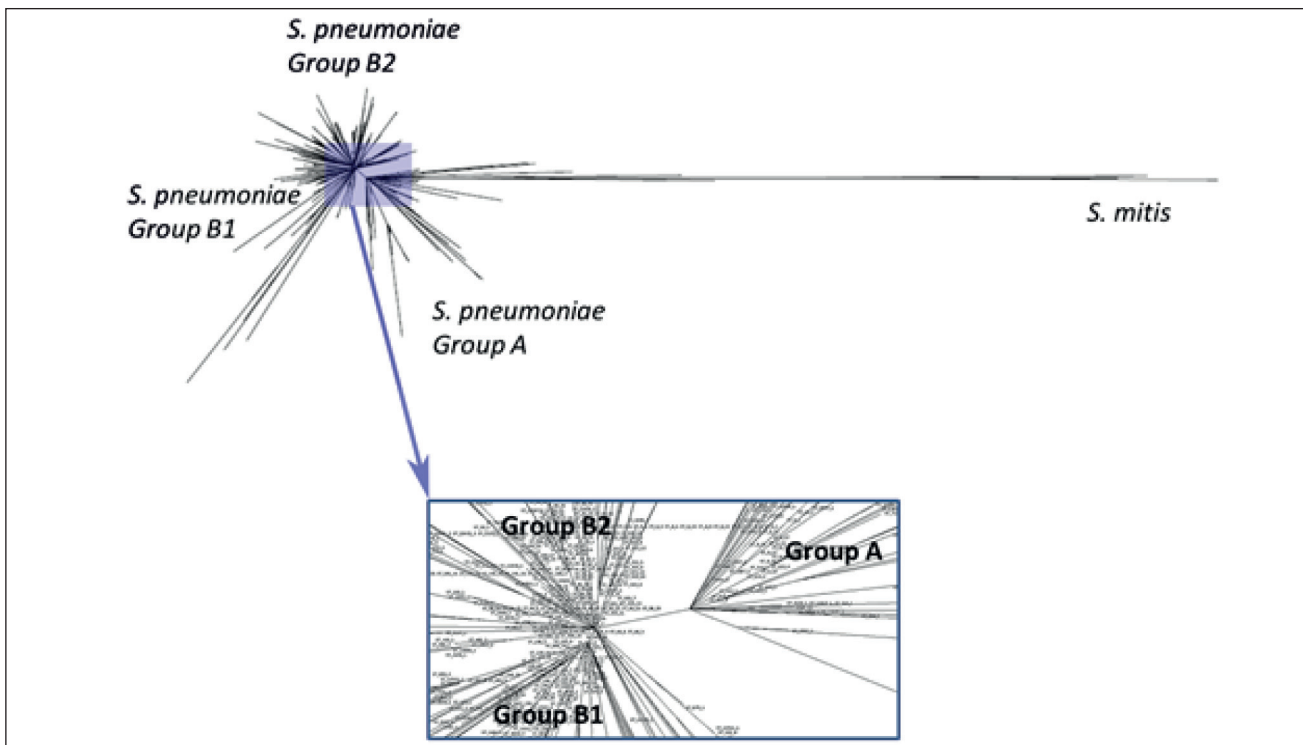


Рис. 4. Филогенетическое дерево *Streptococcus pneumoniae* по конкатенатам 6 генов домашнего хозяйства — объединение методов ближайших соседей и максимальной парсимонии (программа SplitsTree). *S.mitis* KCOM13 используется в качестве аутгруппы.

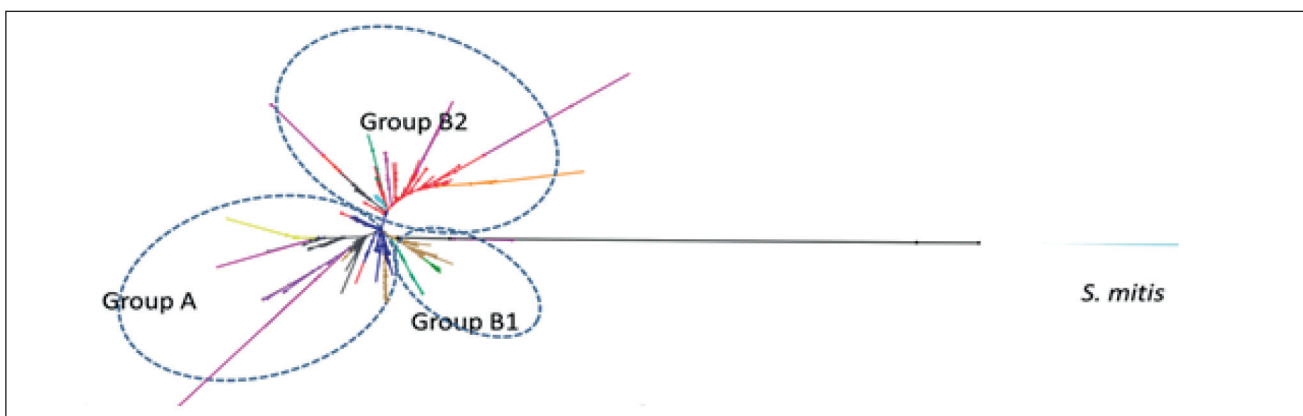


Рис. 5. Филогенетическое дерево *Streptococcus pneumoniae* по конкатенатам 6 генов домашнего хозяйства — метод максимального правдоподобия (RaxML).

Сиквенс-кластеры идентифицированы с помощью пакета R-пакета rhierbaps. Группы A и B1 имеют альтернативную топологию относительно *S.mitis*, по сравнению с представленной на рис. 4. Представители SC11 показаны сиреневым цветом.

Исключение составляли изоляты SC11, объединяющего филогенетически далекие друг от друга сиквенс-типы (рис. 2, 5). Данный артефакт известен в филогенетике как «эффект притяжения длинных ветвей» (long branch attraction, LBA) — форма систематической ошибки, при которой отдалённо связанные родословные неверно выводятся как тесно связанные [41]. Другое отличие заключалось в альтернативной топологии клада B1 относительно *S.mitis* KCOM13 при использовании разных мето-

дов. Возможно, погрешность в оценке генетических дистанций между группами A, B1 и *S.mitis* KCOM13 связана с анализом насыщенного мутациями выравнивания, обусловленного введением *S.mitis* KCOM13 в качестве аутгруппы, и разными эволюционными моделями, лежащими в основе используемых методов.

Дифференциация между группами A, B1 и B2 была проведена с помощью анализа различий внутри- и межгрупповых средних генетических рас-

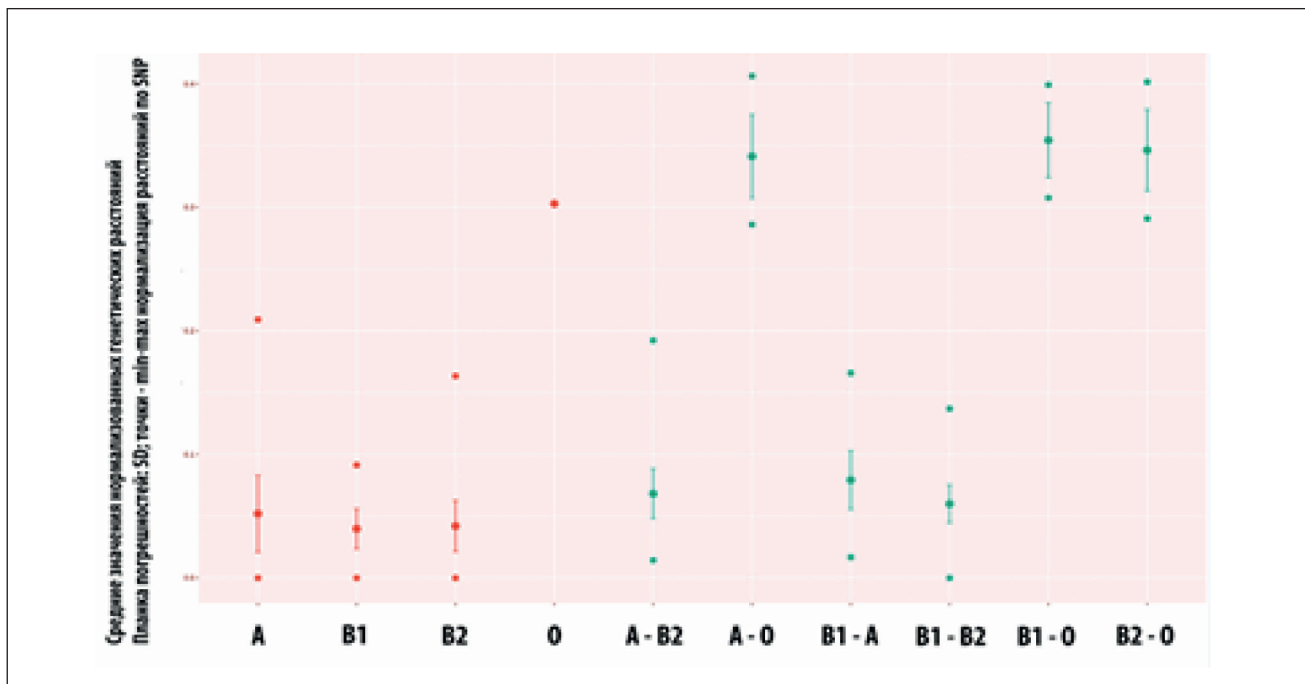


Рис. 6. Парные оценки генетических расстояний для групп А, В1 и В2.

Красным и синим цветом показаны внутригрупповые и межгрупповые оценки, соответственно. Приведены стандартизованные значения генетических расстояний после min—max нормализации. А, В1 и В2 — группы *S.pneumoniae*, соответствующие трём глобальным кладам на филогенетическом дереве на рис. 2 и рис. 3. Группа О — аутигруппа, представленная тремя штаммами *S.mitis*.

стояний, рассчитанных по матрице попарных расстояний, вычисленных по SNP. Внутригрупповые диапазоны стандартизованных значений генетических расстояний для групп В1 и В2 практически не перекрывались с межгрупповыми диапазонами для всех групп (рис. 6). Более широкий диапазон генетических расстояний внутри группы А частично перекрывался с диапазонами между группами, что отражало большую степень дивергенции между изолятами группы А. Однако средние значения генетических расстояний между группой А и группами В1 и В2 выше среднего внутригруппового значения для А. Варибельность изолятов между группами В1 и В2, меньше, чем между представителями группы В и группы А (см. рис. 6). Таким образом, изоляты, входящие в состав группы В1 и В2, генетически ближе друг к другу, чем к изолятам группы А (см. рис. 6). Результаты, полученные на основании анализа расстояний, рассчитанных по SNPs core-генома, имели ту же тенденцию и прослеживался тот же характер генетических взаимосвязей между изолятами трёх глобальных групп, однако данные по core-геному были доступны только для субвыборки и недостаточны для полноценного анализа (результаты не показаны). Полученные результаты согласуются с топологией глобальных групп А, В1 и В2 в филогенетическом дереве, построенном с помощью программы Splits Tree.

Субструктура кладов и топология групп А, В1 и В2 были также подтверждены анализом генетичес-

ких расстояний между сиквенс-кластерами (рис. 7). Некоторые сиквенс-кластеры соответствовали монофилетическим кладам (см. рис. 2), представленным изолятами близких сиквенс-типов, в частности: SC2 (ST236, ST271, ST320, а также их SLVs), SC3 (ST62 и ST53), SC4 (ST81 и SLVs), SC7 (ST90, ST 238, ST384). Сиквенс-кластеры SC2 и SC3 входили в состав одного клада В1 в филогенетических деревьях (см. рис. 2, 4). Расположение кладов SC2 и SC3, а также близкородственные связи внутри монофилетических кладов согласовались с результатами попарной оценки генетических расстояний (рис. 7). На рис. 7 прямой линией выделены минимальные средние значения генетических расстояний, соответствующие наиболее близким сиквенс-кластерам. При этом SC2-SC3, SC2-SC9, SC2-SC8, SC3-SC8, SC3-SC9 соответствуют группе В1; SC5-SC7, SC5-SC8, SC5-SC9, SC6-SC7, SC6-SC9, SC7-SC8, SC7-SC9, SC8-SC9 соответствуют группе В2. Представители SC8 и SC9 поделились между группами В1 и В2, что свидетельствовало о более близком родстве групп В1 и В2. Другими близкими друг к другу сиквенс-кластерами между группами В1 и В2 являются SC3-SC7. Сиквенс-кластеры, входящие в состав клада А (SC4, SC6 и SC10), находились на более отдалённом генетическом расстоянии от сиквенс-кластеров, входящих в состав групп В1 и В2 (см. рис. 2, 7). Похожая тенденция прослеживалась по результатам анализа core-генома (данные не показаны).

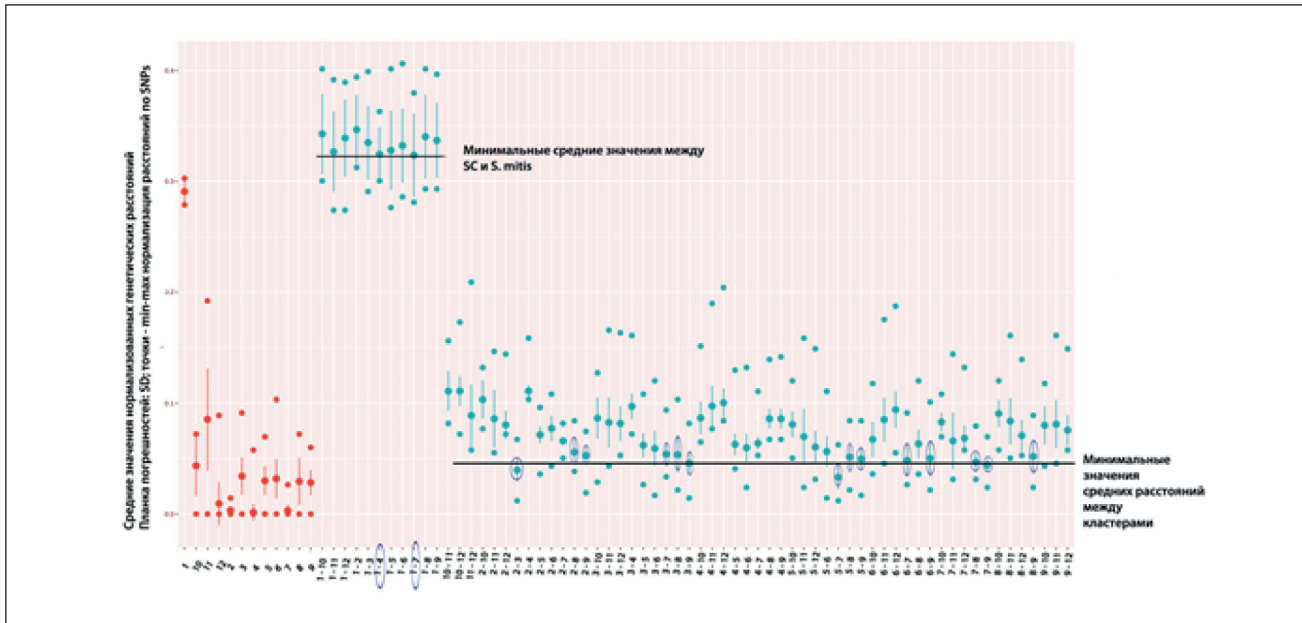


Рис. 7. Попарные оценки генетических расстояний для сиквенс-кластеров SCs 1–12, рассчитанные по SNPs конкатенатов последовательностей генов MLST.

Красным и синим цветом показаны внутригрупповые и межгрупповые оценки, соответственно. Приведены стандартизированные значения генетических расстояний после min–max нормализации. Прямой линией выделены минимальные средние значения нормализованных расстояний между группами: между сиквенс-кластерами пневмококка (снизу) и между сиквенс-кластерами пневмококка и SC1, включающего представителей *S. mitis*.

Таким образом, поскольку популяция *S. pneumoniae* близка к панмиктической, установить истинные филогенетические взаимосвязи между отдалёнными сиквенс-типами может быть трудно. Тем не менее, наблюдается общая тенденция для взаимосвязей между изолятами *S. pneumoniae* анализируемой выборки как по данным SNP генов MLST, так и по SNP core-генома. Следовательно, филогенетическое дерево, отражающее деление популяции на три глобальные группы, можно считать видовым деревом.

Заключение

Для характеристики популяции *S. pneumoniae*, циркулирующих в России, помимо eBURST-анализа, мы использовали дополнительные методы, которые позволили получить новую информацию. Удалось установить филогенетические взаимосвязи для редких сиквенс-типов, которыми представлена более половины популяции пневмококков в России. Благодаря этому была полу-

чена связанная филогенетическая картина. Изоляты, циркулирующие в России, связаны с большинством выявленных генетических линий. Выявлена тенденция к преимущественному распространению в России антибиотикорезистентности среди отдельных сиквенс-кластеров — SC2, SC4. Установлена взаимосвязь циркулирующих в России генетических линий с распространёнными в различное время в разных регионах эпидемически значимыми клонами. Установлено деление глобальной популяции пневмококков на 3 группы. Был проведён анализ взаимосвязей между глобальными группами A, B1 и B2 и их субструктурами (кладами дерева и ассоциирующимися с ними сиквенс-кластерами). Были выявлены и охарактеризованы 11 сиквенс-кластеров.

Знание особенностей генетических линий пневмококка, циркулирующих на территории России «до начала вакцинации» позволит в будущем оценивать влияние антипневмококковых вакцин на популяцию пневмококка.

ЛИТЕРАТУРА

1. World Health Organization. Pneumococcal disease. Доступно на: <https://www.who.int/immunization/diseases/pneumococcal/en/>.
2. Брико Н.И. Бремя пневмококковых инфекций и направления совершенствования эпидемиологического надзора в России. Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2013; 6: 4–9. / Briko N. I. The burden of pneumococcal infections and the directions of improving epidemiological surveillance in Russia. Epidemiol. i Infekc. Bolezn. Aktual. Vopr. Epidemiology Infect. Dis Curr Items 2013; 6: 4–9. [in Russian]
3. Королева И.С., Харит С.М., Рулева А.А., Перова А.Л., Сидоренко С.В. Пневмококковая инфекция в России — эпидемиологическая ситуация. Вакцинация в современном мире. 2010; 12–18. / Koroleva I. S., Kharit S. M., Ruleva A. A., Perova A. L., Sidorenko S. V. Pneumococcal infection in Russia: epidemiological situation. 2010; 12–18. [in Russian]
4. Королева И.С., Королева М.А., Мельникова А.А. Эпидемиология гнойных бактериальных менингитов в период вакцинопрофилактики пневмококковой и гемофильной инфекций в Российской Федерации. Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2017; 6: 63–68. / Koroleva, I. S., Koroleva M. A., Melnikova A. A. Epidemiology of purulent bacterial meningitis in the

- period of pneumococcal and haemophilus vaccination in the Russian Federation. *Epidemiologia i Infekc. Bolezn Aktual Vopr. Epidemiol Infect Dis Curr Items* 2017; 6. [in Russian]
5. 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., Дегтярева Е.А., Кондратенко Н.В., Корсунский А.А., Константинов К.В., Тулунов Д.А., Лазарева М.А. Роль *Streptococcus pneumoniae* в структуре бактериальных инфекций у детей, госпитализированных в стационары г. Москвы в 2011–2012 гг. *Педиатрическая фармакология*. 2013; 10 (5): 6–12. / *Baranov A. A. et al. Role of Streptococcus pneumoniae in the Structure of Bacterial Infections in the Children Hospitalized to Inpatient Hospitals in Moscow in 2011–2012*. *Pediatr Pharmacol* 2013; 10: 6–12. [in Russian]
 6. Козлов Р.С., Кречикова О.И., Муравьев А.А., Миронов К.О., Платонов А.Е., Дунаева Е.А., Таточенко В.К., Щербаков М.Е., Родникова В.Ю., Романенко В.В., Сафьянов К.Н. и группа исследователей RAPIRUS. Результаты исследования распространенности в России внебольничной пневмонии и острого среднего отита у детей в возрасте до 5 лет (RAPIRUS). Роль *S.pneumoniae* и *H.influenzae* в этиологии данных заболеваний. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2013; 15: 246–260. / *Kozlov R. S. et al. Incidence of Community-Acquired Pneumonia and Acute Otitis Media in Children 0–5 Years in Russia and Role of S.pneumoniae or H.influenzae in the Etiology of the Diseases*. *Clin Microbiol Antimicrob Chemother* 2013; 15: 246–260. [in Russian]
 7. Таточенко В. и др. *Streptococcus pneumoniae* serotype distribution in children in the Russian Federation before the introduction of pneumococcal conjugate vaccines into the National Immunization Program. *Expert Rev. Vaccines* 2013; 13: 257–264.
 8. Маянский Н.А., Алябьева Н.М., Иваненко А.М., Пономаренко О.А., Катосова Л.К., Лазарева А.В., Куличенко Т.В., Намазова-Баранова Л.С. Бактериальная этиология острого среднего отита у детей до 5 лет: роль *Streptococcus pneumoniae*. *Вопросы диагностики в педиатрии*, 2013, 5(3): 5–13. / *Mayanskiy N. A. et al. Bacterial etiology of acute otitis media in children below 5 years of age: the role of Streptococcus pneumoniae*. *Vopr Diagnostv Pediatr. Diagn Issues Pediatr Russ* 2013; 5: 5–13. [in Russian]
 9. *Mayanskiy N., Alyabieva N., Kozlov R. S. Serotype distribution and antibiotic-resistance of paediatric Streptococcus pneumoniae in Moscow*. в Abstract (poster session) P217329 April 2013. Abstract (poster session). ECCMID 2013. (2013).
 10. *Gostev V., Volkova M., Belanov S. et al. Etiology of acute otitis media and pneumococcal serotypes in children from Saint Petersburg*. в ECCMID 2012. Abstract P984. (2013).
 11. Калиногорская О.С., Беланов С.С., Волкова М.О., Гостев В.В., Сидоренко С.В. Антибиотикорезистентность и серотиповый состав *Streptococcus pneumoniae*, выделенных у детей в Санкт-Петербурге в 2010–2013 гг. *Антибиотики и химиотерапия*. 2015; 60: 1–2. / *Kalinogorskaya O. S., Belanov S. S., Volkova M. O., Gostev V. V., Sidorenko S. V. Antibiotic Resistance and Serotype Pattern of Streptococcus pneumoniae Isolated from Children in St.Petersburg in 2010–2013*. 2015; 60: 1–2: 10–18. [in Russian]
 12. Перова А.Л., Рулева А.А., Беланов С.С., Харит С.М., Сидоренко С.В. Клинические и бактериологические особенности острых средних отитов у детей в возрасте до 5 лет: предварительные данные. *Педиатрическая фармакология*. 2012; 9 (5): 22–27. / *Perova A. L., Ruleva A. A., Belanov S. S., Kharit S. M., Sidorenko, S. V. Clinical and bacteriological peculiarities of the acute otitis media in children of 0–5 years of age: provisional data*. *Pediatricheskaya farmakologiya* 2012; 5: 22–27. [in Russian]
 13. Муравьев А.А., Козлов Р.С., Лебедева Н.Н. Эпидемиология серотипов *S.pneumoniae* на территории Российской Федерации. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2017; 19 (3): 200–206. / *Muravyev A. A., Kozlov R. S., Lebedeva N. N. Epidemiology of S.pneumoniae serotypes in the Russian Federation*. *Clin Microbiol Antimicrob Chemother Russ* 2017; 19: 200–206. [in Russian]
 14. Алябьева Н.М., Лазарева А.В., Пономаренко О.А., Маянский Н.А., Иваненко А.М., Куличенко Т.В., Намазова-Баранова Л.С. Серотиповый пейзаж и антибиотикоустойчивость *Streptococcus pneumoniae*, выделенных у детей с острым средним отитом. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия* 2013; 15 (2): 12. / *Alyabeva N.M., Lazareva A.V., Ponomarenko O.A., Mayanskiy N.A., Ivanenko A.M., Kulichenko T.V., Namazova-Baranova L.S. Serotipovoj pejzazh i antibiotikochuvstvitel'nost' Streptococcus pneumoniae, vydelenykh u detej s ostrym srednim otitom. Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya* 2013; 15: 2: 12. [in Russian]
 15. *Kozlov R., Chagaryan A., Kozlova L., Muraviov A. Penicillin resistance of predominant serotypes of Streptococcus pneumoniae in children of the Russian Federation*. в Poster ECCMID 2012.
 16. *Сидоренко С.В., Савинова Т.А. Популяционная структура пневмококков со сниженной чувствительностью к пенициллину и перспективы антипневмококковой вакцинации для сдерживания распространения антибактериальной резистентности. Антибиотики и химиотерапия*. 2011; 56: 11–18. / *Sidorenko S.V., Savinova T.A. Populyatsionnaya struktura pnevmokokkov so snizhennoj chuvstvitel'nost'yu k penitsillinu i perspektivy antipnevmokokkovoj vaksinatcii dlya sderzhivaniya rasprostraneniya antibakterial'noj rezistentnosti. Antibiotiki i khimioter* 2011; 56: 5: 11–18. [in Russian]
 17. *Козлов Р.С., Сивая О.В., Шпынев К.В., Кречикова О.И. и др. Антибиотикорезистентность Streptococcus pneumoniae в России в 1999–2005 гг: результаты многоцентровых проспективных исследований ПеГАС-I и ПеГАС-II. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2006; 8 (1): 33–47. / *Kozlov R. Antimicrobial resistance of Streptococcus pneumoniae in Russia in 1999–2005: results of Multicentre Prospective Studies PEHASus-I and PEHASus-II. Clin Microbiol Antibiotiki i Khimioter* 2006; 8: 33–47. [in Russian]
 18. *Alyabeva N., Mayanskiy N., Ponomarenko O. et al. Nasopharyngeal carriage of Streptococcus pneumoniae in children with acute bacterial infection in Russia*. в Poster ECCMID; 2012.
 19. *Koroleva I., Beloshitskiy G. Epidemiological characteristics of pneumococcal meningitis in children aged under 6 years of age in the Russian Federation*. *Epidemiol Infect Dis* 2012; 1: 18–21.
 20. *Савинова Т.А., Ильина Е.Н., Сидоренко С.В. Перспективы применения антипневмококковой вакцинации для сдерживания распространения антибиотикорезистентности среди пневмококков. Антибиотики и химиотерапия* 2011; 56: 3–10. / *Savinova T., Sidorenko S. Prognosis of antipneumococcal vaccination application to control the spread of resistance among pneumococci in Russia. Antibiotiki i Khimioter* 2011; 56: 5: 2–10. [in Russian]
 21. *Griffin M. R., Zhu Y., Moore M. R., Whitney C. G., Grijalva C. G. U.S. Hospitalizations for Pneumonia after a Decade of Pneumococcal Vaccination*. *New Engl Med* 2013; 369: 683–683.
 22. *Hortal M. et al. Hospitalized children with pneumonia in Uruguay: Pre and post introduction of 7 and 13-valent pneumococcal conjugated vaccines into the National Immunization Program*. *Vaccine* 2012; 30: 4934–4938.
 23. *Farkouh R. A. et al. Cost-effectiveness of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine: Germany, Greece, and The Netherlands*. *J Infect* 2011; 64: 54–67.
 24. *Fletcher M. A., Fritzell B. Pneumococcal Conjugate Vaccines and Otitis Media: An Appraisal of the Clinical Trials*. *Int J Otolaryngol* 2012; 1–15.
 25. *Брико Н. И. и др. Результаты трехлетней вакцинации детей против пневмококковой инфекции в России. Педиатрическая фармакология*. 2018; 15 (4): 287–299. / *Briko N. I. i dr. Rezul'taty trekhletnej vaksinatcii detej protiv pnevmokokkovoj infekcii v Rossii. Pediatricheskaya farmakologiya* 2018; 15: 287–299. [in Russian]
 26. *Overturf G. D. Technical report: prevention of pneumococcal infections, including the use of pneumococcal conjugate and polysaccharide vaccines and antibiotic prophylaxis*. *Pediatrics* 2000; 106: 367–376.
 27. *Ubukata K. et al. Serotype changes and drug resistance in invasive pneumococcal diseases in adults after vaccinations in children, Japan, 2010–2013*. *Emerg Infect Dis* 2015; 21: 1956–1965.
 28. PubMLST database. Доступно на: <https://pubmlst.org/>.
 29. *Treangen T. J., Ondov B. D., Koren S., Phillippy A. M. Rapid Core-Genome Alignment and Visualization for Thousands of Microbial Genomes*. *bioRxiv* 2014. doi:doi: <http://dx.doi.org/10.1101/007351>
 30. *Edgar R. C. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput*. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: 1792–1797.
 31. *Stamatakis A. RAXML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies*. *Bioinformatics* 2014; 30: 1312–1313.
 32. *Letunic I., Bork P. Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees*. *Nucleic Acids Res* 2016; 44: W242–W245.
 33. *Tonkin-Hill G., Lees J. A., Bentley S. D., Frost S. D. W., Corander J. R. hierBAPS: An R implementation of the population clustering algorithm hierBAPS*. *Wellcome Open Res* 2018; 3: 93.
 34. *Cheng L., Connor T. R., Sirén J., Aanensen D. M., Corander J. Hierarchical and spatially explicit clustering of DNA sequences with BAPS software*. *Mol Biol Evol* 2013; 30: 1224–1228.
 35. *Huson D. H., Bryant D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies*. *Mol Biol Evol* 2006; 23: 254–267.
 36. *Anders Goncalves da Silva. Pairwise SNP difference summary*. https://github.com/MDU-PHL/pairwise_snp_differences/blob/master/pairwise_snp_differences.Rmd.
 37. *Enright M. C., Spratt B. G. Extensive Variation in the ddl Gene of Penicillin-Resistant Streptococcus pneumoniae* Results from a

- Hitchhiking Effect Driven by the Penicillin- Binding Protein 2b Gene. 1998; 1687—1695.
38. *Wyres K. L. et al.* The multidrug-resistant PMEN1 pneumococcus is a paradigm for genetic success. *Genome Biol* 2012. doi:10.1186/gb-2012-13-11-r103
39. *Richter S. S. et al.* Pneumococcal Serotypes before and after Introduction of Conjugate Vaccines, United States, 1999—2011. *Emerg Infect Dis* 2013; 19: 1074—1083.
40. *Simoes A. S., Pereira L., Lencastre H. D., Sa R.* Clonal Evolution Leading to Maintenance of Antibiotic Resistance Rates among Colonizing Pneumococci in the PCV7 Era in Portugal 2011; 49: 2810—2817.
41. *Philippe H. et al.* Resolving Difficult Phylogenetic Questions? Why More Sequences Are Not Enough. *PLoS Biol.* 9, e1000602. 2011.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Цветкова Ирина Анатольевна — младший научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург

Беланов Сергей Сергеевич — к. б. н., Университет Хельсинки, Институт Биотехнологии, Лаборатория геномики и секвенирования ДНК, научный сотрудник, Хельсинки, Финляндия

Гостев Владимир Валерьевич — к. б. н., Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург; Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург

Калиногорская Ольга Серафимовна — к. м. н., научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург

Волкова Марина Олеговна — к. м. н., врач-микробиолог, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург

Мохов Алексей Сергеевич — ведущий специалист-аналитик сектора анализа социальных и демографических процессов отдела анализа общественного мнения и социальных проблем, Санкт-Петербургское государственное

унитарное предприятие «Санкт-Петербургский информационно-аналитический центр» (СПб ГУП «СПб ИАЦ»), Санкт-Петербург

Никитина Екатерина Валерьевна — к. б. н., младший научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург

Калисникова Екатерина Леонидовна — врач клинической лабораторной диагностики, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург

Иванова Ксения Алексеевна — лаборант-исследователь, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург

Володина Анастасия Александровна — иммунолог II категории, ФГУП «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург

Сидоренко Сергей Владимирович — д. м. н., профессор, Отдел медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург; Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург