

На правах рукописи

Оганесян Айк Наириевич

**Молекулярно-генетическая характеристика *Streptococcus pneumoniae* и
эпидемиологические аспекты пневмококковых менингитов у детей**

03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2019

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Научные руководители:

Доктор биологических наук

Воропаева Елена Александровна

Кандидат медицинских наук

Мельникова Альбина Андреевна

Официальные оппоненты:

Мартынова Алина Викторовна – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра эпидемиологии и военной эпидемиологии, профессор кафедры

Червинец Вячеслав Михайлович – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тверской государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра микробиологии и вирусологии с курсом иммунологии, заведующий кафедрой

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «_____» _____ 2019 года в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.046.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д.10

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д.10, <http://www.gabrich.ru>

Автореферат разослан «_____» _____ 2019 года

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор

Борисова Ольга Юрьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

В настоящее время *S. pneumoniae* остается одним из ведущих этиологических агентов бактериального гнойного менингита. Пневмококковый менингит характеризуется тяжелым течением, а также высокой летальностью, которая, как правило, выше, чем при бактериальных гнойных менингитах иной этиологии (Абрикосова Н.Ю. и др., 1986; Винник А.Л. и др., 1991; Миронов К.О. и др., 2011; WHO/IVB, 2011; Алешкин В.А. и др., 2013; Венгеров Ю.Я. и др., 2015; WHO/IVB, 2016).

Показатели заболеваемости в развитых странах составляют 1-2 на 100 тыс. населения, в развивающихся – 20 на 100 тыс. населения (WHO/IVB, 2011). На территории Российской Федерации в 2017 году показатель заболеваемости пневмококковым менингитом составил 0,25 на 100 тыс. населения (на основании лабораторно подтвержденных случаев) (Королева И.С. и др., 2007, 2018). Ежегодно пневмококковый менингит приводит к смерти или инвалидизации более чем 60000 детей в возрасте до 5 лет (Song J.Y. et al., 2013).

Наиболее широко для идентификации *S. pneumoniae* используются микробиологические методы исследования. Бактериологический метод считается золотым стандартом для подтверждения пневмококкового менингита (Абрикосова Н.Ю. и др., 1986; Алиева Р.О. и др., 1987), но уровень положительных результатов этого метода недостаточен для полноценной и оперативной диагностики. Это связано с трудностью соблюдения оптимальных условий хранения и транспортировки спинномозговой жидкости и/или назначением антибактериальной терапии перед проведением люмбальной пункции.

Также для идентификации *S. pneumoniae* применяются реакция агглютинации латекса и иммунохроматографические тесты, однако учет результатов данных тестов является субъективным, и их интерпретация может быть затруднена в связи с возможностью перекрестных реакций с иными возбудителями (Козлов Р.С., 2009; WHO/IVB, 2011).

В настоящее время метод полимеразной цепной реакции широко используется в диагностике и эпидемиологическом надзоре за возбудителями инвазивных бактериальных инфекций, в том числе за *S. pneumoniae*, благодаря его высокой чувствительности, специфичности и продуктивности (Murdoch D.R. et al., 2003; Rekha P. et al., 2006; WHO/IVB, 2011; De Velasco E.A et al., 2015). Однако учитывая значительное разнообразие циркулирующих серотипов пневмококков, возникает необходимость адаптации существующих схем проведения полимеразной цепной реакции, применяющихся для серотипирования, в зависимости от региона, где осуществляется исследование.

Принимая во внимание тот факт, что *S. pneumoniae* имеет широкое распространение во всем мире, высокое серотиповое разнообразие, а также значительное число нозологических форм вызываемых им заболеваний, для эффективного эпидемиологического надзора за *S. pneumoniae* необходимы

исследования, позволяющие провести популяционный анализ циркулирующих штаммов (Katz L.S. et al., 2009). Данные об эволюционном развитии и путях географического распространения *S. pneumoniae*, полученные с помощью метода мультилокусного сиквенс-типирования, наиболее информативны, так как этот метод основан на изучении генов домашнего хозяйства, не изменяющихся при селективном влиянии факторов внешней среды, в отличие от генов, кодирующих ферменты, синтезирующие полисахариды капсул возбудителя. Указанный метод позволяет определять генетические связи между штаммами и проводить оценку степени филогенетического родства *S. pneumoniae* (Selender R.K., 1987; Лукашов В.В., 2009). На основании информации о принадлежности циркулирующих возбудителей к определенным сиквенс-типам и клональным комплексам возможно прогнозировать эпидемическое неблагополучие, а также необходимость и эффективность применения вакцин.

Наиболее эффективной мерой профилактики пневмококковой инфекции является вакцинация (Козлов Р.С., 2009; WHO/IVB, 2011; Баранов А.А. и др., 2015). В настоящее время для профилактики инфекций, вызванных *S. pneumoniae*, применяются вакцины двух типов: полисахаридные (пневмококковая полисахаридная 23 валентная вакцина) и конъюгированные (пневмококковые конъюгированные вакцины 10 и 13 валентные). От использования применявшейся ранее 7 валентной пневмококковой конъюгированной вакцины в настоящее время отказались, и она не производится (Баранов А.А. и др.; 2015).

Трудность выбора препаратов для специфической профилактики пневмококковой инфекции обусловлена широким разнообразием серотипов и серогрупп *S. pneumoniae*, циркулирующих на различных территориях. В настоящее время известно более 90 серовариантов *S. pneumoniae* (Козлов Р.С., 2009; WHO/IVB, 2011).

Таким образом, эффективность вакцинации напрямую зависит от качества проводимого мониторинга циркулирующих штаммов возбудителя пневмококковой инфекции (WHO/IVB, 2011).

Степень разработанности темы исследования

В настоящее время существует большое количество методов лабораторной идентификации микроорганизмов, однако среди них выделяются молекулярно-генетические, в частности мультиплексная полимеразная цепная реакция, как наиболее эффективный метод детекции возбудителей, позволяющий установить даже малые количества микроорганизмов в биологических жидкостях.

В различных странах мира проводится мультилокусное сиквенс-типирование клинически значимых изолятов *S. pneumoniae*, с учетом вакцинных и мультирезистентных штаммов, а также описываются вновь открытые сиквенс-типы, благодаря чему становится возможным планирование модификации пневмококковых вакцин (Титов Л.П. и др., 2015; Fadlyana E. et al., 2018; Nagaoka K. et al., 2018; Zhou H. et al., 2018; Mitchell P.K. et al., 2019).

Исследования, посвященные мониторингу за пневмококковыми менингитами в странах Европейского региона Всемирной организации здравоохранения, не имеют регулярной основы (Butsashvili M. et al., 2013; Ghasemi M. et al., 2016; Qasimov V. et al., 2016; Hasan A.Z. et al., 2018). Однако данные об эпидемиологической обстановке в указанных странах важны для Российской Федерации в связи с территориальной близостью и миграцией населения, а также для подтверждения верности принятых на данный момент решений относительно схемы вакцинации против пневмококковой инфекции на территории нашей страны.

В Российской Федерации изучение циркулирующих возбудителей гнойного бактериального менингита, в том числе *S. pneumoniae*, с использованием молекулярно-генетических методов, проводится путем мониторинга серотипового пейзажа, описания сиквенс-типов, оценки антибиотикорезистентности пневмококков и покрытия пневмококковыми конъюгированными вакцинами циркулирующих штаммов (Костюкова Н.Н. и др., 1992; Платонов А.Е. и др., 2001; Королева И.С. и др., 2004; Козлов Р.С., 2009; Белошицкий Г.В. и др., 2009, 2012, 2014; Савинова Т.А. и др., 2009; Костинов М.П. и др., 2009; Маянский Н.А. и др., 2010; Миронов К.О. и др., 2011).

В Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора в лаборатории микробиологии и биотехнологии проводятся исследования образцов СМЖ, содержащих *S. pneumoniae*, и непосредственно штаммов *S. pneumoniae*, полученных из стран Европейского региона Всемирной организации здравоохранения с использованием молекулярно-генетических методов, в частности методом мультилокусного-сиквенс типирования (Алешкин В.А. и др., 2013; Афанасьев С.С. и др., 2013; Урбан Ю.Н. и др., 2013; Урбан Ю.Н., 2014).

Учитывая недостаточность сведений о штаммах *S. pneumoniae*, циркулирующих на территории отдельных государств Европейского региона, возможности смещений серотипового пейзажа при применении пневмококковых конъюгированных вакцин в рамках плановой иммунизации или только по эпидемическим показаниям, была сформирована цель настоящего исследования.

Цель исследования – изучить молекулярно-генетические особенности штаммов *S. pneumoniae* и эпидемиологические аспекты пневмококковых менингитов у детей для совершенствования и оптимизации микробиологического мониторинга в условиях вакцинопрофилактики в отдельных странах Европейского региона Всемирной организации здравоохранения.

Задачи исследования:

1. Модифицировать протокол мультиплексной полимеразной цепной реакции с детекцией в агарозном геле и разработать двухэтапный алгоритм полимеразной цепной реакции для оптимизации процесса серотипирования *S. pneumoniae*.
2. Охарактеризовать серотиповой пейзаж *S. pneumoniae* и динамику его изменений на начальном этапе вакцинопрофилактики.
3. Провести геноидентификацию и филогенетический анализ клинических изолятов *S. pneumoniae*, выделенных от больных менингитом детей до 5 лет.

4. Проанализировать данные дозорного эпиднадзора с учетом серотипового пейзажа для оценки уровня заболеваемости пневмококковым менингитом среди детей до 5 лет.

Научная новизна

Модифицирован протокол проведения мультиплексной полимеразной цепной реакции с детекцией в агарозном геле, основанный на использовании четырёх комбинаций праймеров, оптимизированного состава реакционной смеси и условий амплификации, обеспечивающих специфичность реакций и позволяющих получать ампликоны разных размеров для их одновременной идентификации.

Разработан научно обоснованный двухэтапный алгоритм серотипирования с применением полимеразной цепной реакции, основанный на идентификации 10 генов-мишеней: *wzy*, *wzx*, *wzg* (*cpsA*), *galU*, *wciP*, *wcwL*, *wcrG*, *wciL*, *wcwV*, *wcrH*, позволяющий определить 41 серотип и серогруппу за 11 реакций.

Охарактеризован серотиповой пейзаж циркулирующих *S. pneumoniae* на исследуемых территориях, выявлены превалирующие серотипы (6A/B, 14, 19F, 23F), и определён процент покрытия исследованных серотипов 10 валентной пневмококковой конъюгированной вакциной, который составил 60,5%.

В результате анализа серотипового пейзажа *S. pneumoniae* на исследуемых территориях определены начальные изменения в структуре циркулирующих серотипов в странах, где вакцинация пневмококковыми конъюгированными вакцинами проводится в плановом порядке, а также показано отсутствие изменений в структуре серотипового состава *S. pneumoniae* при вакцинации только по эпидпоказаниям.

С помощью метода мультилокусного сиквенс-типирования охарактеризована популяционная структура изученных штаммов *S. pneumoniae*, вызывающих гнойный бактериальный менингит, и впервые выявлены 4 новых сиквенс-типа возбудителя, которые импортированы в международную базу *Streptococcus* PubMLST (<https://pubmlst.org>) под идентификационными номерами: 42328 (СТ14372); 42334 (СТ14386); 42335 (СТ14387); 42336 (СТ14388).

С применением филогенетического анализа выявлены два тесно связанных кластера и один клональный комплекс *S. pneumoniae*, что свидетельствует о близком родстве исследованных штаммов и позволяет сделать выводы о миграции пневмококка.

Данные опорных пунктов Азербайджанской Республики и Республики Армения за период с 2010 по 2017 гг. и с 2013 по 2017 гг. соответственно позволили оценить заболеваемость на данных территориях, которая составила в среднем 0,9 и 1,96 случая на 100 тыс. детского населения, среди которого преобладала группа детей первого года жизни.

Теоретическая и практическая значимость работы

Актуальные данные о динамике циркуляции *S. pneumoniae* в исследуемых странах позволяют расширить представление об изменчивости серотипового пейзажа в условиях проведения плановой вакцинации и в перспективе будут способствовать формированию полноценного представления о влиянии вакцинопрофилактики на изменение состава серотипов циркулирующего возбудителя, что необходимо для

принятия управленческих решений по выбору вакцинного препарата при организации иммунопрофилактики.

Применение предложенной модифицированной схемы мультиплексной полимеразной цепной реакции позволяет оптимизировать микробиологический мониторинг *S. pneumoniae* в системе эпидемиологического надзора за счет ускорения процесса серотипирования.

С учетом информативности генов-мишеней: *wzy*, *wzx*, *wzg* (*cpsA*), *galU*, *wciP*, *wcwL*, *wcrG*, *wciL*, *wcwV*, *wcrH*, разработан двухэтапный алгоритм серотипирования с применением полимеразной цепной реакции, сокративший число реакций с 15 до 11 и время исследования до 18 часов и дающий возможность идентифицировать серотипы в 78% проб, содержащих *S. pneumoniae*.

Показано, что применение ПКВ10 на исследуемых территориях по эпидпоказаниям не оказало влияния на серотиповой пейзаж циркулирующих штаммов *S. pneumoniae*, что свидетельствует о целесообразности применения пневмококковых конъюгированных вакцин по плановым показаниям.

Создана рабочая коллекция ДНК *S. pneumoniae*, которую можно использовать в дальнейших исследованиях с целью прогнозирования распространения эпидемически значимых штаммов и молекулярно-генетического мониторинга популяции возбудителя.

Полученные результаты включены в ежегодно издаваемый эпидемиологический бюллетень Всемирной организации здравоохранения по наблюдению за гнойными бактериальными менингитами в ряде стран Европейского региона Всемирной организации здравоохранения (WHO Global 12 Invasive Bacterial Vaccine-Preventable Disease and Rotavirus and Pediatric Diarrhea Surveillance Networks Bulletin, January 2019).

Результаты проведенных исследований были импортированы в базу Всемирной организации здравоохранения по эпидемиологическому надзору за гнойными бактериальными менингитами в ряде стран Европейского региона Всемирной организации здравоохранения

(<https://efs.who.int/adfs/ls/?wa=wsignin1.0&wtrealm=http%3a%2f%2fifs.who.int%2fadfs%2fservices%2ftrust&wctx=9b8cac3c-91e2-46ea-a16d-322217bf5951>).

Результаты исследований и разработок внедрены в научно-исследовательскую работу Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (акт внедрения от 09.01.2019 г.); в работу Федерального бюджетного учреждения здравоохранения «Центр гигиены и эпидемиологии в Московской области» (акт внедрения от 21.01.2019 г.); в научно-исследовательскую работу Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (акт внедрения от 21.01.2019 г.).

Материалы и методы исследований

Методология данной работы основана на современных принципах научного познания и организована согласно поставленной цели. Основными объектами

исследования стали молекулярно-генетические и филогенетические свойства циркулирующих штаммов *S. pneumoniae*, вызывающих гнойный бактериальный менингит (ГБМ), проявления эпидемического процесса пневмококкового менингита, ДНК и штаммы *S. pneumoniae*, выделенные из спинномозговой жидкости (СМЖ) детей, больных ГБМ, данные регистрации случаев заболевания и результаты лабораторных исследований.

Научная литература, посвящённая проблеме основных свойств *S. pneumoniae*, была проанализирована формально-логическими методами исследования. В работе были использованы бактериологические, иммунохимические, молекулярно-генетические, эпидемиологические и статистические методы исследования.

Настоящая работа выполнена в рамках программы Европейского регионального бюро Всемирной организации здравоохранения по дозорному эпиднадзору за инвазивными бактериальными заболеваниями (https://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/laboratory/IBVPD/en/), управляемыми вакцинацией, в отдельных странах Европейского региона Всемирной организации здравоохранения за период с 2010 по 2018 гг. (письмо Роспотребнадзора № 01/11049-9-39 от 05.08.2009, Меморандумы о взаимопонимании между Европейским региональным бюро Всемирной организации здравоохранения и Федеральным бюджетным учреждением науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора) от 12.05.2009 г. и 29.03.2012 г.).

Основополагающая роль при этом исследовании отводилась этиологической диагностике, проведение которой, по мнению специалистов Всемирной организации здравоохранения, позволит расшифровывать случаи гнойного бактериального менингита, определять их эпидемиологическую значимость и обосновывать необходимость применения вакцин (WHO/IVB, 2011; WHO/IVB, 2016).

Исследования с применением бактериологических, серологических и иммунохимических методов были проведены на базе национальных лабораторий стран-участниц программы Европейского регионального бюро (ЕРБ) Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) по дозорному эпиднадзору за инвазивными бактериальными заболеваниями, управляемыми вакцинацией, и в ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора на базе Региональной референс лаборатории ЕРБ ВОЗ по инвазивным бактериальным заболеваниям, управляемым вакцинацией (РРЛ ЕРБ ВОЗ по ИБЗ УВ). Молекулярно-генетические исследования проводились в ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора на базе РРЛ ЕРБ ВОЗ по ИБЗ УВ.

Результаты диссертационной работы основаны на лабораторном исследовании 3303 образцов СМЖ и 36 клинических изолятов, выделенных из СМЖ, взятой у детей в возрасте от 1 месяца до 59 месяцев и 29 дней, поступивших в дозорные госпитали и в ГБУЗ г. Москвы «Инфекционная клиническая больница №2 Департамента здравоохранения города Москвы» с подозрением на менингит.

Ранее свойства 11 из 36 штаммов были изучены в рамках диссертационной работы Урбан Ю.Н. (2014), в данной работе было продолжено изучение указанных штаммов.

СМЖ и клинические изоляты поступали из следующих стран:

725 образцов СМЖ, 4 клинических изолята – Азербайджанская Республика;

523 образца СМЖ, 5 клинических изолятов – Республика Армения;

60 образцов СМЖ – Республика Беларусь;

618 образцов СМЖ – Грузия;

163 образца СМЖ – Республика Казахстан;

160 образца СМЖ – Киргизская Республика;

19 клинических изолятов – Российская Федерация;

246 образцов СМЖ – Узбекистан;

808 образцов СМЖ, 8 клинических изолятов – Украина.

Все полученные образцы доставлялись в РРЛ специализированной логистической компанией с соблюдением холодовой цепи. Полученные пробы хранятся в РРЛ при -70°C .

Микробиологические методы исследования

Посевы на колумбийском агаре инкубировали в термостате при 37°C в течение 24-48 часов в атмосфере, содержащей 5% CO_2 . Для создания капнофильных условий использовали анаэроустаты (Oxoid, Великобритания) и систему атмосферной генерации для *in vitro* диагностики (Oxoid, Великобритания).

Идентификацию *S. pneumoniae* проводили с использованием следующих тестов: каталазной активности, чувствительности к оптохину и растворимости в желчи (WHO/IVB, 2011).

Молекулярно-генетические методы исследования

В исследованиях были применены следующие молекулярно-генетические методы – мультиплексная полимеразная цепная реакция (мПЦР), полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР РВ), МЛСТ.

Для выделения ДНК из клеток *S. pneumoniae* использовали метод нагрева до 99°C в течение 10 минут водной суспензии 18-часовой культуры в концентрации 1,5 по стандарту мутности McFarland.

Выделение ДНК возбудителя из СМЖ производили с использованием готового набора для выделения QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen, США). В работе применялся протокол производителя с частичной модификацией, предложенной Урбан Ю.Н. (2014).

Видовая идентификация S. pneumoniae методом ПЦР РВ. Для контроля выделения ДНК и наличия ингибиторов использовали праймеры и флуоресцентно меченый зонд, разработанные к человеческой рибонуклеазе Р.

Аmplification проводили в 25 мкл смеси, включающей 12,5 мкл смеси для ПЦР РВ Platinum Quantitative PCR SuperMix – UDG (Qiagen, США), по 2 мкл соответствующего праймера и зонда, 0,5 мкл референтного красителя ROX (Qiagen, США), 4,0 мкл воды для ПЦР, 2,5 мкл исследуемой ДНК. Температурный режим был следующий: 1 цикл 95°C – 10 минут, 50 циклов 95°C – 15 секунд, 60°C – 1 минута.

Детекция сигнала происходила при 60°C. Значение $Ct \leq 35$ считалось положительным, а значение $Ct > 45$ – отрицательным. Значение Ct в диапазоне от 40 до 45 рассматривалось как неопределенное, и образец подлежал повторному анализу после разведения ДНК-матрицы 1:5 и 1:10 водой для ПЦР с целью снижения воздействия каких-либо ингибирующих факторов, которые могут влиять на проведение реакции. Амплификацию с детекцией в режиме реального времени производили с помощью амплификатора ABI 7500 (Applied Biosystems, США).

ПЦР-серотипирование S. pneumoniae. Для определения серотипов *S. pneumoniae* применяли метод ПЦР РВ (Pimenta F.C. et al., 2013). Последовательности праймеров для ПЦР РВ доступны в библиографических источниках и на сайте Центра по контролю и профилактике заболеваний США (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) (WHO/IVB, 2011; Fabiana C., 2013; Lang A., 2015; CDC, 2016).

В состав буфера для амплификации входят: 12,5 мкл смеси для ПЦР РВ Invitrogen-Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG (Thermo Fisher Scientific, USA), 3 мкл ДНК исследуемой пробы, праймеры согласно протоколу (CDC, 2016) и вода для ПЦР до 25 мкл.

Температурный режим: 1 цикл 95°C в течение 10 минут, 50 циклов 95°C в течение 15 секунд, далее 60°C в течение 1 минуты. Детекция проводилась при 60°C. Значение порогового цикла ≤ 40 считалось положительным, а значение > 50 – отрицательным (Урбан Ю.Н., 2014).

Значения порогового цикла в диапазоне от 40 до 50 рассматривались как неопределенные, и проба подвергалась ретестированию после разведения ДНК-матрицы 1:5 и 1:10 водой для ПЦР во избежание воздействия возможных факторов ингибирования, способных повлиять на результат. ПЦР РВ проводили с помощью амплификатора ABI 7500 (Applied Biosystems, США).

Молекулярно-генетическое типирование S. pneumoniae методом МЛСТ. В состав смеси для амплификации входили: 2,5 мкл буфера для ПЦР: 700 mM Трис-НСl, pH 8,6/25°C, 166 mM $(NH_4)_2SO_4$, (Fermentas, Латвийская Республика); 2,5 мкл 25 mM $MgCl_2$, (Fermentas, Латвийская Республика); 1 мкл 10mM dNTPs, (Fermentas, Латвийская Республика); по 1 мкл 20 mM F и R праймеров; 0,5 мкл Taq-полимеразы (Fermentas, Латвийская Республика); 2,5 мкл ДНК исследуемой пробы; вода для ПЦР – 18 мкл. Амплификацию проводили на амплификаторе GeneAmp 2700 (Applied Biosystems, США) при следующих условиях: 1 цикл: 95°C – 15 мин, 35 циклов: 94°C – 30 сек, 58°C – 45 сек, 72°C – 1 мин, 1 цикл: 72°C – 2 мин, охлаждение до 4°C с хранением при -20°C.

По прошествии амплификации, к 10 мкл исследуемой пробы добавляли буфер для загрузки и вносили в агарозный гель с концентрацией 2%. Режим электрофореза: 50 А, 100 В/см², 30 минут (камера SE-2, Helicon, Россия; источник питания Powerpac Basic Power Supply, BioRad, США). Оценку полученных результатов проводили на трансиллюминаторе ECX-20L (Vilber Lourmat, Германия).

Очистку фрагментов амплификации осуществляли с помощью ферментативной очистки ExoSap с использованием ферментов Exo I (BioLabs) – 1 мкл, rSap (BioLabs) – 1

мл, CutSmart Buffer (BioLabs) – 0,5 мл, ПЦР продукт – 7 мл, H₂O – 0,5 мл при температурном режиме: 37°C – 1 час, 85°C - 15 секунд, 4°C хранение.

Определение нуклеотидной последовательности полученных фрагментов проводили на автоматическом секвенаторе ABI Prism 3100 Genetic Analyzer, (Applied Biosystems, США) с использованием набора реагентов для секвенирования BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США).

Для одной реакции использовали BigDye[®] Terminator v3.1 Ready Reaction Mix-2 мкл, 5X Sequencing Buffer-1 мкл, праймер 3.2 пмоль – 1 мкл, ДНК – 1 мкл, вода 5 мкл. Реакцию для сиквенса проводили в амплификаторе Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems, США) со следующим температурным режимом: 25 циклов 96° – 30 сек, 55° – 10 сек, 60° – 4 минуты. Очистка смеси после амплификации осуществляли с использованием коммерческого набора BigDye X Terminator Purification Kit (Applied Biosystems, США) в соответствии с инструкцией производителя.

Эпидемиологический анализ

С учётом полноты данных и возможностью их оценки в динамике, нами проведен ретроспективный эпидемиологический анализ 2056 информационных единиц за период с 2008 по 2018 гг., хранящихся в онлайн базе данных в Share Point, с целью оценки эпидемической ситуации по пневмококковому менингиту на территории Азербайджанской республики, Республики Армения и Украины.

Эпидемиологический анализ проводили по следующим признакам: частота выявления случаев заболевания пневмококковым менингитом детей до 5 лет в стационарах дозорного эпиднадзора на исследуемых территориях с учетом возрастных групп и места жительства детей, изменений серотипового пейзажа и филогенетических характеристик *S. pneumoniae*.

В связи с республиканским уровнем выбранных стационаров уровень заболеваемости пневмококковым менингитом детей до 5 лет на исследуемых территориях рассчитывали на 100 тысяч детского населения исследуемых стран.

Статистическая обработка полученных данных

Обработка данных исследования, статистический и графический анализ материалов осуществлялся на персональном компьютере класса *IBMPC* с использованием лицензионных программных продуктов *Microsoft Word 2013*, *Microsoft Excel 2013* в операционной системе *Windows 10*.

Все материалы были обработаны стандартными методами статистического анализа (Ашмарин И.П. и др., 1962; Гланц С., 1999; Петрухина М.И. и др., 2003; Андерсон Р., 2004).

Личное участие автора в получении результатов

Личное участие соискателя в получении результатов, изложенных в диссертации, заключалось в выполнении эпидемиологического анализа, бактериологических и молекулярно-генетических (ПЦР РВ, мПЦР) исследований, теоретическом обобщении результатов, статистической обработке данных. Обработку и анализ данных секвенирования, биоинформационный анализ проводили в соавторстве с сотрудниками лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии ФБУН МНИИЭМ им.

Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора: ведущим научным сотрудником, к.б.н. Егоровой Е.А. и научным сотрудником, к.б.н. Урбан Ю.Н.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. На основе модифицированного протокола мультиплексной полимеразной цепной реакции разработан двухэтапный алгоритм полимеразной цепной реакции серотипирования, идентифицирующий 41 серотип *S. pneumoniae*.
2. В состав 10-валентной пневмококковой конъюгированной вакцины входит более 60% циркулирующих на исследуемых территориях серотипов *S. pneumoniae*. Применение 10-валентной пневмококковой конъюгированной вакцины по эпидпоказаниям не оказывает влияния на серотиповую структуру циркулирующих штаммов *S. pneumoniae*, что свидетельствует о целесообразности плановой иммунизации пневмококковой конъюгированной вакциной и использования вакцин с более широким составом серотипов.
3. Филогенетический анализ штаммов *S. pneumoniae*, выделенных у детей, больных гнойным бактериальным менингитом, в отдельных странах Европейского региона Всемирной организации здравоохранения и в Российской Федерации, выявил взаимосвязь идентифицированных сиквенс-типов.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

О достоверности полученных результатов свидетельствует достаточный объем выборки анализируемых образцов (3303 образцов СМЖ и 36 штаммов *S. pneumoniae*), использование сертифицированных бактериологических, иммунохимических и молекулярно-генетических методов, которые характеризуются высокой специфичностью и чувствительностью.

Диссертация апробирована на заседании секции Учёного Совета «Эпидемиология, микробиология, клиника инфекционных болезней» ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора (протокол №2 от 25 апреля 2019 года).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 9 печатных работ, в том числе 3 – в рецензируемых изданиях, 1 – тезисы в рецензируемых изданиях, 1 – на электронном ресурсе конференции, 4 – в материалах конференций.

Объем и структура диссертации

Материалы диссертации изложены на 145 страницах машинописного текста, иллюстрированы 18 таблицами, 37 рисунками. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, 4 глав описания результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспективы дальнейшей разработки темы, списка сокращений и списка использованной литературы. Библиографический указатель включает 195 источников литературы, из них 51 отечественных и 144 иностранных авторов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Модификация протокола мПЦР с детекцией в агарозном геле и разработка двухэтапного алгоритма ПЦР-серотипирования *S. pneumoniae*

С целью сокращения времени исследований и уменьшения числа ПЦР-реакций нами проведена модификация протокола мПЦР с детекцией в агарозном геле и разработан двухэтапный алгоритм серотипирования *S. pneumoniae*.

В основу модифицированного протокола мПЦР с детекцией в агарозном геле легли ранее разработанные протоколы мПЦР (WHO/IVB, 2011; Lang A. et al., 2015; CDC, 2016). Модификация протокола мПЦР с детекцией в агарозном геле заключалась в следующем: созданы четыре комбинации праймеров, обеспечивающие специфичность реакций и исключающие перекрестные и ложноположительные реакции; подобрано оптимальное соотношение праймеров, позволяющее получать ампликоны разных размеров для их одновременного выявления при электрофоретической детекции; оптимизирован состав реакционной смеси; оптимизированы условия амплификации; при проведении реакций предусмотрено поэтапное исключение проб, для которых был положительно идентифицирован серотип в предыдущей реакции; проведение четырех реакций серотипирования занимает по продолжительности 10 часов.

Взятие клинического материала (СМЖ) осуществлялось в стационарах на исследуемых территориях в соответствии со стандартами оказания медицинской помощи, принятыми в стране. Пробоподготовка исследуемых образцов не требовалась.

В ходе проведенной работы было определено, что наиболее оптимальной специфичностью обладает следующий композиционный состав реакционной смеси: *Реакция А*: 5 мкл готовой смеси для мультиплексной ПЦР 5Х (New England Biolabs, Англия), 5 мкл ДНК исследуемой пробы; праймеры с концентрацией 20 mM, вода для ПЦР до 25 мкл; *Реакция В*: 5 мкл готовой смеси для мультиплексной ПЦР 5Х (New England Biolabs, Англия), 5 мкл ДНК исследуемой пробы, праймеры с концентрацией 20 mM, вода для ПЦР до 25 мкл; *Реакция С*: 5 мкл готовой смеси для мультиплексной ПЦР 5Х (New England Biolabs, Англия), 5 мкл ДНК исследуемой пробы, праймеры с концентрацией 20 mM, вода для ПЦР до 25 мкл; *Реакция D*: 5 мкл готовой смеси для мультиплексной ПЦР 5Х (New England Biolabs, Англия), 5 мкл ДНК исследуемой пробы, праймеры с концентрацией 20 mM, вода для ПЦР до 25 мкл. Объемы праймеров, используемых в реакциях А, В, С, D, представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Объем праймеров, используемых в модифицированном протоколе мПЦР с детекцией в агарозном геле

Реакция А	ml	Реакция В	ml	Реакция С	ml	Реакция D	ml
<i>cps F</i>	0,1	<i>cps F</i>	0,1	<i>cps F</i>	0,1	<i>cps F</i>	0,1
<i>cps R</i>	0,1	<i>cps R</i>	0,1	<i>cps R</i>	0,1	<i>cps R</i>	0,1
8 F	0,2	39 F	0,2	23B F	0,2	24B F	0,2
8R	0,2	39 R	0,2	23B R	0,2	24B R	0,2
15 B/C F	0,3	10F F	0,3	35A F	0,3	21 F	0,2
15 B/c R	0,3	10F R	0,3	35A R	0,3	21 R	0,2
38 F	0,3	35 F F	0,3	34 F	0,3	7C F	0,3

Продолжение таблицы 1

38 R	0,3	35F R	0,3	34 R	0,3	7C R	0,3
35 B F	0,5	10A F	0,5	9N F	0,5	20 F	0,3
35B R	0,5	10A R	0,5	9N R	0,5	20 R	0,3
		17F F	0,5	31 F	0,5	13 F	0,4
		17F R	0,5	31 R	0,5	13 R	0,4

Для всех 4 реакций была подобрана оптимальная программа амплификации в амплификаторе Thermal Cycler (Bio Rad), представленная следующими условиями: 1 цикл при 94°C – 4 мин; 35 циклов: 94°C – 45 с, 56°C – 1 мин и 72°C – 2 мин; 1 цикл при 72°C – 2 мин.

Детекцию продуктов амплификации осуществляли посредством горизонтального электрофореза: к 10 мкл исследуемой пробы добавляли буфер для загрузки и вносили в агарозный гель с концентрацией 2%.

В таблице 2 представлены серотипы и серогруппы *S. pneumoniae* и их гены-мишени с указанием размера конечного продукта (пары нуклеотидов).

Таблица 2 – Размеры ампликонов реакций в соотношении генов-мишеней и серотипов и серогрупп *S. pneumoniae*

	<i>wciL</i>	<i>wciP</i>	<i>wcrG</i>	<i>wcrH</i>	<i>wcwL</i>	<i>wzx</i>	<i>wzy</i>
7C/(7B/40)					260		
8							201 п.н.
9N/9L						516 п.н.	
10A			628 п.н.				
10F/(10C/33C)						248 п.н.	
13						655 п.н.	
15B/15C							496 п.н.
17F		693 п.н.					
20	514 п.н.						
21						192 п.н.	
23B						199 п.н.	
24A/24B/24F							99 п.н.
31							701 п.н.
34							408 п.н.
35A/35C/42						280 п.н.	
35B				677 п.н.			
35F/47F							517 п.н.
38/25F							574 п.н.
39							98 п.н.

Результаты электрофоретической детекции всех определенных с применением модифицированного протокола мПЦР, в рамках настоящей работы, серотипов и серогрупп (8, 15B/15C, 31, 24B/24F, 21, 13), представлены на рисунке 1.

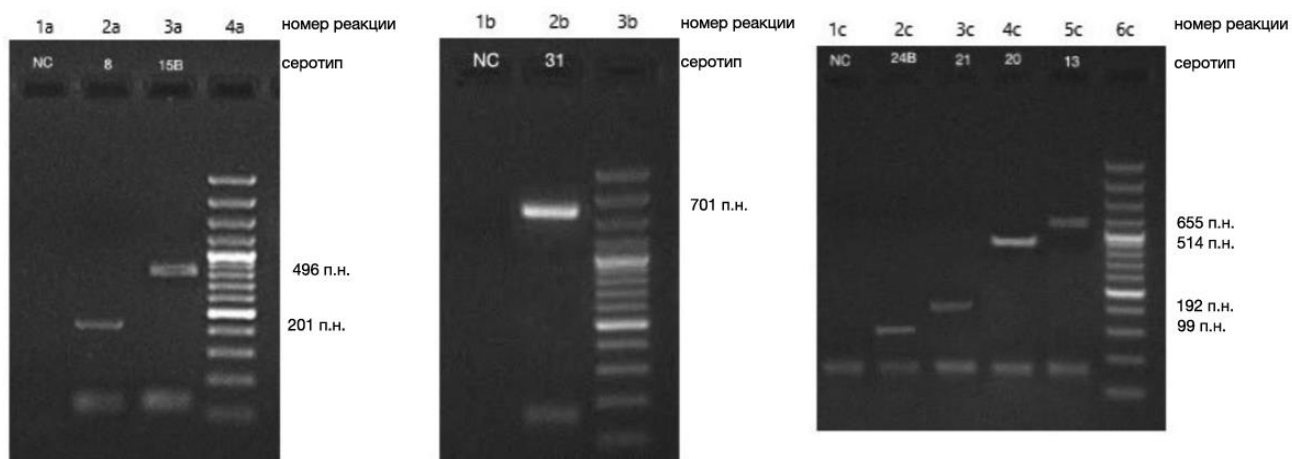


Рисунок 1 – Результаты электрофоретической детекции в агарозном геле продуктов реакций ПЦР-серотипирования с применением модифицированного протокола

Примечание: 4а, 3b, 6с – маркер молекулярных весов ДНК GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific); 1а, 1b, 1с – отрицательный контроль (ПЦР-смесь); 2а, 3а, 2b, 2с, 3с, 4с, 5с – ДНК штаммов *S. pneumoniae*.

В реакции 2а определяются 8 серотип, размер ампликона составляет 201 п.н. Результатом реакции 3а является определение серотипов 15В/15С с продуктом реакции размером 496 п.н. В реакции 2b идентифицируется 31 серотип, размер продукта реакции составляет 701 п.н. Реакция 2с – определение серотипов 24А/24В/24F, с размером ампликона – 99 п.н. В реакции 3с выявлен 21 серотип, продукт реакции обладает размером 192 п.н. В результате реакции 4с определяются серотип 20, продукт реакции имеет размер 514 п.н. Результатом реакции 5с является 13 серотип, продукт реакции имеет размер 655 п.н.

На основании модифицированного протокола мПЦР с детекцией в агарозном геле был разработан двухэтапный алгоритм ПЦР-серотипирования *S. pneumoniae* с использованием мПЦР РВ и мПЦР с детекцией в агарозном геле, общее количество реакций в котором составило 11.

На первом этапе разработанного двухэтапного алгоритма ПЦР-серотипирования *S. pneumoniae* идентифицируются следующие серотипы и серогруппы: 14; 18С/18В/18А/18F; 19F; 2; 5; 23F; 4; 6А/6В/6С/6D; 9V/9А; 3; 7F/7А; 19А; 6С/6D; 12F/12А/12В/44/46; 22F/22А; 1; 11А/11D/11F; 16F; 15А/15F; 23А; 33F/33А/37. Пробы, положительно не идентифицированные на первом этапе, подлежат дальнейшему изучению во втором этапе.

На втором этапе разработанного алгоритма ПЦР-серотипирования *S. pneumoniae* идентифицируются следующие серотипы и серогруппы: 8; 15В/С; 38/25F/25А; 35В; 39; 10F/10С/33С; 35F/47F; 10А; 17F; 23В; 35А/35С/42; 34; 9L/9N; 31; 24В/24F; 21; 7С/7В/40; 20; 13.

Таким образом, двухэтапный алгоритм ПЦР-серотипирования *S. pneumoniae* на основе модифицированного протокола мПЦР с детекцией в агарозном геле позволяет снизить число реакций с 15 до 11, определять 41 серотип *S. pneumoniae* и сократить

время проведения исследования до 18 часов, что на 22% быстрее используемой ранее схемы ПЦР-серотипирования.

Серотиповая характеристика и оценка изменений серотипового пейзажа *S. pneumoniae* в условиях вакцинопрофилактики в ряде стран Европейского, Закавказского и Азиатского регионов

Оценку серотипового пейзажа *S. pneumoniae* в Европейском регионе ВОЗ с учетом серотипов, включенных в состав ПКВ10 и ПКВ13, а также серотипов, не входящих в состав пневмококковых конъюгированных вакцин, проводили с распределением стран на 3 подрегиона: Азиатский, Европейский и Закавказский, в период с 2010 по 2017 гг. Исследования проб, содержащих видовой маркер *S. pneumoniae*, проводили с использованием разработанного двухэтапного алгоритма ПЦР-серотипирования.

В Азиатский подрегион были включены Республика Казахстан, Киргизская Республика, Узбекистан; в Европейский подрегион – Республика Беларусь и Украина; в Закавказский подрегион – Азербайджанская Республика, Республика Армения и Грузия. При исследовании 3303 проб СМЖ (100%), полученных от пациентов с подозрением на менингит, при помощи ПЦР РВ было определено 195 (6%) случаев БГМ пневмококковой этиологии. При дальнейшем изучении проб СМЖ, в которых был идентифицирован видовой маркер *S. pneumoniae* (ген *lytA*), серотипы и серогруппы были определены в 152 (78%) случаях.

Таким образом, в ходе работы было выявлено всего 27 серогрупп и серотипов *S. pneumoniae*. Среди 195 (100%) исследованных проб СМЖ, содержащих *S. pneumoniae*, полученных со всех исследованных территорий, преобладали следующие серотипы: 6А/6В – 37 (19,0±2,8%); 14 – 29 (14,9±2,5%); 19F – 19 (6,7±1,8%); 23F – 19 (6,7±1,8%). Число штаммов *S. pneumoniae*, входящих в состав ПКВ10, составило 118 (60,5±3,5%), в состав ПКВ13 – 125 (64,1±3,4%). Процент проб, содержащих видовой маркер *S. pneumoniae*, в которых не удалось определить серотип, составил 22,1% (Рисунок 2).

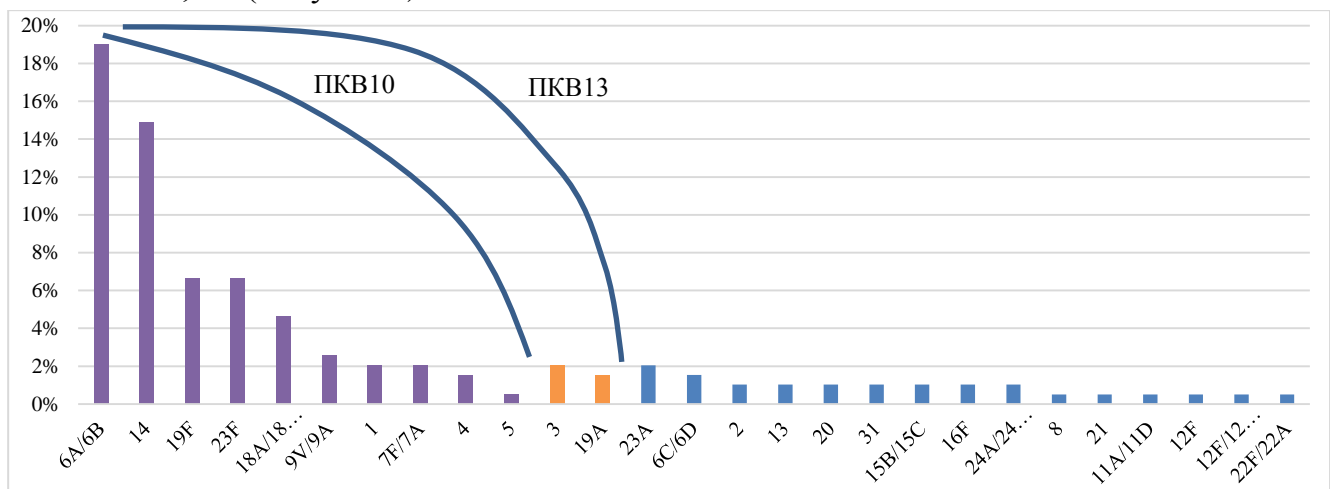


Рисунок 2 – Серотипы *S. pneumoniae*, вызвавших менингит среди детей до 5 лет на всех исследованных территориях в период с 2010 по 2017 гг., с учётом распределения в соответствии с покрытием ПКВ

Количество проб, полученных с территорий Азиатского, Европейского и Закавказского подрегионов и покрытие ПКВ10 и ПКВ13 представлены в таблице 3, из которой следует, что наибольшее покрытие ПКВ10 имеется в Азиатском подрегионе, а наименьшее – в Закавказском, при этом в Закавказском подрегионе покрытие ПКВ13 больше покрытия ПКВ10.

Таблица 3 – Количество проб и покрытие ПКВ10 и ПКВ 13 в Азиатском, Европейском и Закавказском подрегионах

	Азиатский подрегион	Европейский подрегион	Закавказский подрегион
Всего получено проб	36	64	95
Покрытие ПКВ10, %	75±7,2	65,6±5,9	51,6±5,1
Покрытие ПКВ13, %	75±7,2	65,6±5,9	58,9±5,0

С учётом полноты полученных данных и возможностью их оценки в динамике, а также с учётом разной политики в отношении проведения иммунизации с использованием пневмококковых конъюгированных вакцин дальнейшее исследование серотипового пейзажа проводилось для Азербайджанской республики, Республики Армения и Украины.

Серотиповой пейзаж S. pneumoniae на территории Азербайджанской Республики. На территории Азербайджанской Республики за весь период исследования был выявлен 61 случай пневмококкового менингита. В полученной выборке преобладали случаи, вызванные *S. pneumoniae* следующих серотипов: 14 (18,0±4,9%), 6А/6В (11,5±4,1%), 19F (8,2±3,5%), 23А (6,6±3,2%). Данные серотипы довольно распространены и, за исключением 23А, включены в состав ПКВ. Процент случаев, вызванных серотипами, входящими в состав ПКВ10, составил 52,5%.

При анализе распределения выявленных серотипов *S. pneumoniae* по годам видно, что в 2011, 2012, 2014 и в 2017 гг. серотип 14 составлял наибольшее количество среди выявленных серотипов. В 2011, 2012 и 2013 гг. также преобладал серотип 6А/6В, в 2013 г. наравне с ним по количеству был обнаружен серотип 23А. Так же в 2012 и 2014 гг. было отмечено большое число случаев, связанных с серотипом 19F, в 2014 г. наравне с ним был выявлен серотип 13. Серотип 3 преобладал в 2016 г. наравне с серотипом 16F. Число нетипированных штаммов колебалось от 1 до 4 в 2010, 2011, 2012, 2015 и 2016 гг.

Серотиповой пейзаж S. pneumoniae на территории Республики Армения. На территории Республики Армения за весь период исследования было выявлено 20 случаев пневмококкового менингита среди детей до 5 лет. В полученной выборке достоверно преобладали случаи, вызванные *S. pneumoniae* следующих серотипов: 14 (20%), 6А/6В (20%). Данные серотипы являются распространенными и включены в состав ПКВ. Процент случаев заболевания, вызванных серотипами, входящими в состав ПКВ10, составил 65%.

При анализе годового распределения серотипов видно, что в 2013 г. преобладал 14 серотип, в 2014 г. – серотип 19F, а единственный случай пневмококкового менингита, зарегистрированный в 2015 г., был вызван 3 серотипом. В

2016 г. преобладал серотип 6А/6В, учитывая, что на территории Республики Армения в 2014 г. была включена в национальный календарь иммунизации ПКВ10, возможно данные случаи были вызваны не вакцинным серотипом 6В.

Серотиповой пейзаж S. pneumoniae на территории Украины. На территории Украины за весь период исследования (2008 – 2015 гг.) было выявлено 57 случаев пневмококкового менингита у детей до 5 лет. В полученной выборке достоверно преобладали случаи, вызванные *S. pneumoniae* следующих серотипов: 6А/6В (26,3±5,8%), 23F (12,3±4,3%), 14 (8,8±3,7%). Данные серотипы являются распространенными и включены в состав ПКВ. Процент случаев заболевания, вызванных серотипами, входящими в состав ПКВ10, составил 64,8%.

Оценивая изменения серотипового пейзажа во времени важно иметь в виду, что на территории Украины ПКВ не включена в национальный календарь профилактических мероприятий.

При анализе распределения выявленных серотипов *S. pneumoniae* по годам видно, что в 2008, 2009 и в 2013 гг. серотип 6А/6В составлял наибольшее количество среди выявленных серотипов. В 2010 г. преобладал серотип 23F, в 2012 г. – 14 серотип, в 2014 г. – серогруппа 18А/18В/18С/18F. В остальные годы распределение серотипов было равномерное, в период с 2016 по 2018 гг. было выявлено по 1 случаю нетипированных образцов. В динамике видно, что 4 самых распространенных серотипа преобладают в течение всего периода исследования на территории страны и вносят в общей сложности крупный вклад в заболеваемость (порядка 55%). Это может говорить о том, что проводимые на данный момент мероприятия не могут качественно влиять на управление ситуацией и для повышения эффективности необходим переход на иммунизацию в плановом порядке.

Генотипическая характеристика и филогенетический анализ штаммов

S. pneumoniae

В рамках данной работы было проведено МЛСТ 7 генов домашнего хозяйства: *aroE*, *gdh*, *gki*, *recP*, *spi*, *xpt*, *ddl*, 17 штаммов *S. pneumoniae*, полученных с территорий Азербайджанской Республики, Республики Армения и Украины в период с 2007 по 2017 гг., и 19 штаммов *S. pneumoniae*, полученных с территории Российской Федерации (г. Москва) в период с 2011 по 2017 гг.

Анализ сочетания всех семи генов домашнего хозяйства, проведенный в международной базе МЛСТ *S. pneumoniae* (http://spneumoniae.mlst.net/sql/allelicprofile_choice.asp), показал, что 13 из 17 штаммов, полученных с территорий Азербайджанской Республики, Республики Армения и Украины, относились к 9 известным СТ, а 4 штамма были отнесены к 4 новым СТ: 14388, 14386, 14372, 14387. Впервые идентифицированные СТ были представлены следующими штаммами: СТ14388 не серотипируемым штаммом, выделенным на территории Республики Армения, СТ14386, СТ14372 штаммами серотипа 19F, полученными с территории Азербайджанской Республики и Республики Армения, а СТ14387 представлен штаммом серотипа 14, полученным с территории Республики Армения. Указанные СТ импортированы в международную базу *Streptococcus* PubMLST под

идентификационными номерами: 42328 (СТ14372); 42334 (СТ14386); 42335 (СТ14387); 42336 (СТ14388) (Таблица 4).

Таблица 4 – Серотипы и СТ штаммов *S. pneumoniae*, полученных с исследуемых территорий

N штамма	Серотип	Гены домашнего хозяйства							СТ	Страна
		<i>aroE</i>	<i>gdh</i>	<i>gki</i>	<i>recP</i>	<i>spi</i>	<i>xpt</i>	<i>ddl</i>		
AZ_069_15	19F	12	19	2	17	6	22	14	230	Азербайджанская Республика
AZ_140_13	6A	7	25	4	4	15	20	28	473	Азербайджанская Республика
AZ_072_12	19F	12	19	2	17	6	22	14	230	Азербайджанская Республика
AZ_084_15	19F	4	16	19	15	401	20	26	14372	Азербайджанская Республика
AM_064_16	19F	4	16	19	15	6	20	1	320	Республика Армения
AM_005_15	NT	2	8	5	4	6	1	1	14388	Республика Армения
AM_028_14	19F	7	16	53	15	6	20	26	14386	Республика Армения
AM_070_14	14	269	5	500	5	32	4	4	14387	Республика Армения
AM_126_14	19A	4	16	19	15	6	20	1	320	Республика Армения
UA_028_10	19F	15	17	4	16	6	19	7	239	Украина
UA_26_09	4	16	13	4	5	6	10	18	246	Украина
UA_019_07	4	16	13	4	5	6	10	18	246	Украина
UA_29_12	14	1	5	4	5	5	4	8	2436	Украина
UA_23_08	6A	7	25	4	4	15	20	28	473	Украина
UA_21_08	6A	7	25	4	4	15	20	28	473	Украина
UA_24_09	7B	10	20	8	10	6	1	18	1176	Украина
UA_27_09	20	15	8	8	18	15	1	31	235	Украина

В рамках настоящей диссертационной работы также были изучены штаммы *S. pneumoniae*, поступающие из ГБУЗ ИКБ № 2 ДЗМ, (г. Москва). Анализ сочетания всех семи генов домашнего хозяйства, проведенный в международной базе МЛСТ *S. pneumoniae* (http://spneumoniae.mlst.net/sql/allelicprofile_choose.asp), показал, что все штаммы, полученные с территории Российской Федерации (г. Москва), относились к известным 18 СТ (Таблица 5).

Таблица 5 – Серотипы и СТ штаммов *S. pneumoniae*, выделенных на территории Российской Федерации (г. Москва)

N штамма	Серотип	Гены домашнего хозяйства							СТ
		<i>aroE</i>	<i>gdh</i>	<i>gki</i>	<i>recP</i>	<i>spi</i>	<i>xpt</i>	<i>ddl</i>	
RU_950	11A	2	5	29	18	42	3	18	1012
RU_1766	14	8	11	10	1	6	8	1	1569

Продолжение таблицы 5

RU_1799	8	10	16	150	1	17	1	29	2331
RU_1782	8	10	16	150	1	17	1	29	2331
RU_1934	19F	4	16	19	394	6	20	1	12822
RU_274	23F	7	8	8	6	10	6	14	1078
RU_495	28A	10	32	6	24	33	28	18	225
RU_599	25F	5	15	4	1	6	1	6	105
RU_1624	19F	7	41	2	6	10	26	1	1262
RU_2050	35F	5	5	87	1	6	1	8	2991
RU_103	16F	8	61	4	10	15	14	6	12519
RU_471	14	7	5	1	8	14	11	14	124
RU_2212	19F	7	14	40	12	1	1	14	179
RU_34	18C	5	13	11	388	15	12	19	12824
RU_200	14	1	5	4	5	5	3	8	15
RU_477	10F	2	8	62	16	6	130	309	3735
RU_1274	4	8	70	4	1	6	116	6	801
RU_1023	3	46	8	2	10	6	1	22	505
RU_2188	23F	1	8	9	1	6	4	6	311

Кластеризация с использованием goeBURST анализа МЛСТ с учетом исследуемых территорий показала, что идентифицированные СТ образуют две тесно связанные группы (Рисунок 3).

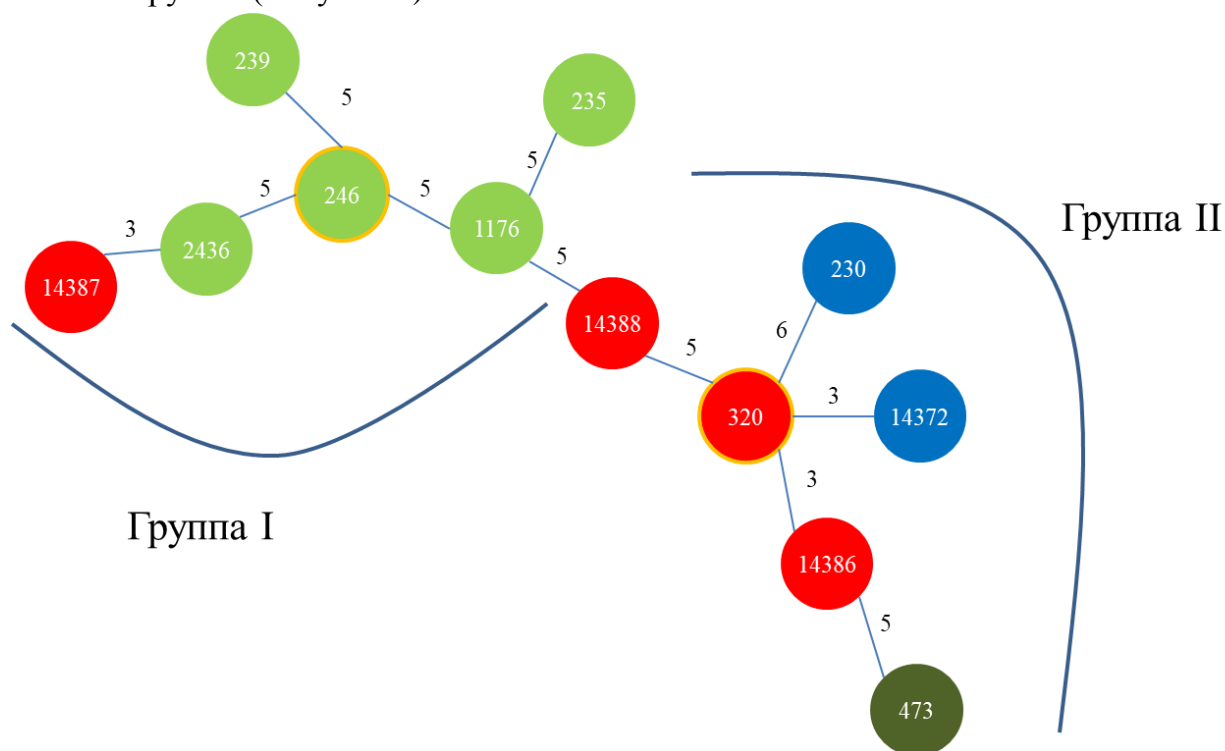


Рисунок 3 – goeBURST анализ МЛСТ с учетом исследуемых территорий

Примечание: синий цвет – Азербайджанская Республика; красный цвет – Республика Армения, зелёный цвет – Украина, темно-зелёный цвет – Украина и Азербайджанская Республика

Также было проведено сравнение СТ штаммов, циркулирующих на территории Азербайджанской Республики, Республики Армения и Украины, с СТ штаммов, выделенных от больных пневмококковым менингитом детей на территории Российской Федерации (г. Москва) (Рисунок 4).

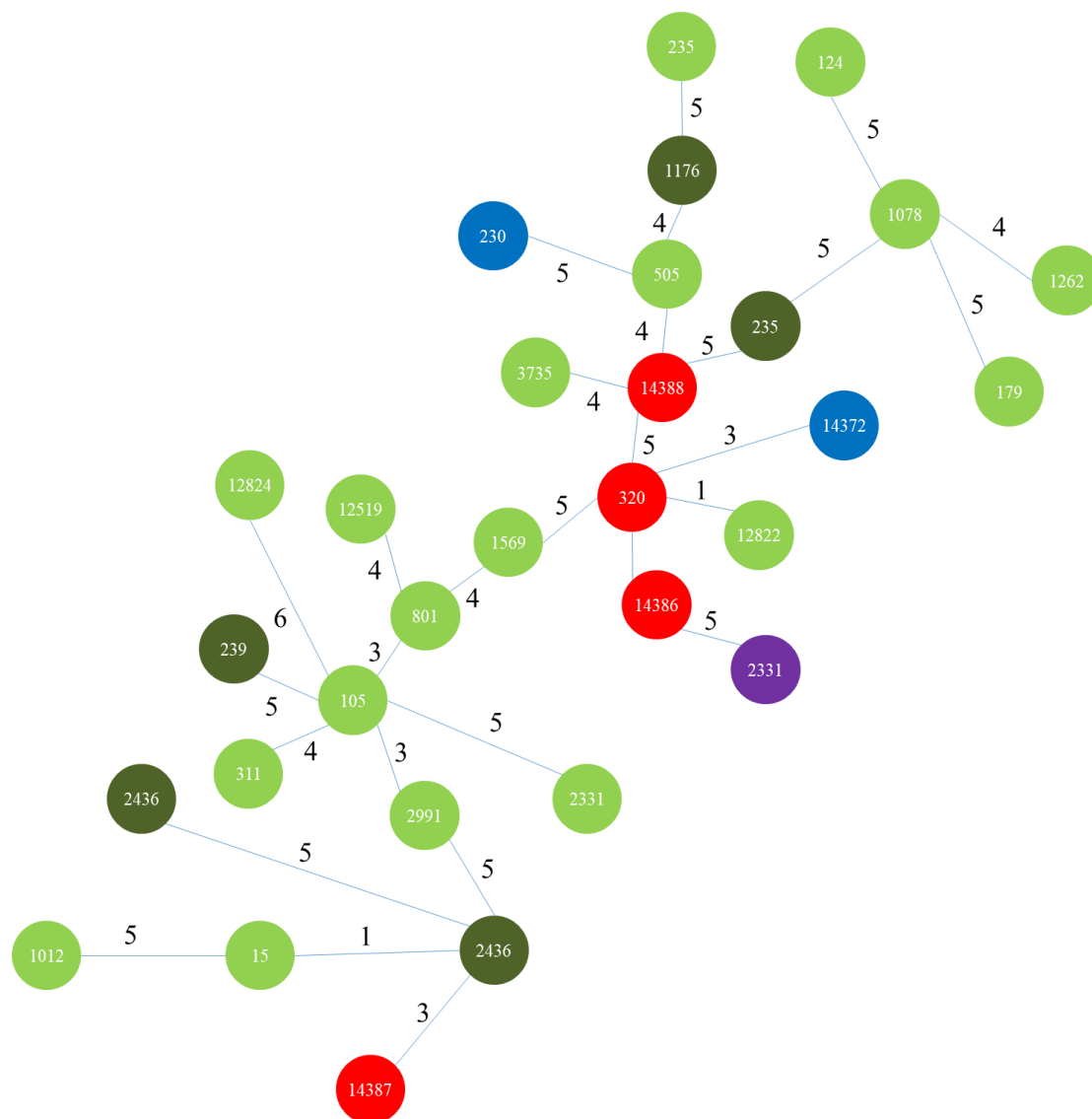


Рисунок 4 – goeBURST анализ МЛСТ штаммов с циркулирующими на территории Российской Федерации

Примечание: синий цвет – Азербайджанская республика; красный цвет – Республика Армения; зеленый цвет – Российская Федерация; темно-зеленый цвет – Украина, фиолетовый цвет – Азербайджанская Республика и Украина

В ходе проведенной работы был установлен клональный комплекс, в который вошли: клоннообразующий штамм СТ320, обнаруженный на территории Республики Армения; штамм СТ12822, обнаруженный на территории Российской Федерации, имеющий близкую связь разницей в 1 аллель с клоннообразующим штаммом, а также штаммы новых СТ14386 и СТ14372, полученные с территории Республики Армения и Азербайджанской Республики соответственно.

Анализ данных дозорного эпиднадзора и характеристика уровней заболеваемости пневмококковым менингитом детей до 5 лет

В настоящем исследовании учтены данные о заболеваемости, основанные только на лабораторно подтвержденных случаях заболевания. Эти данные были получены с применением различных методов лабораторных исследований: культуральный, иммунохроматографический, РАЛ и ПЦР (Таблица 6).

Таблица 6 – Результаты идентификации *S. pneumoniae* с применением различных методов лабораторной диагностики

Метод исследования	Абсолютное число положительных образцов	Процент положительных образцов от общего числа исследованных проб, %	Абсолютный вклад метода в число положительных образцов	Относительный вклад метода в число положительных образцов, %
Культуральный	16	0,8±0,2	16	11,6±2,7
BiaxNOW	32	1,6±0,3	16	11,6±2,7
Латексагглютинация	38	1,8±0,3	6	4,3±1,7
ПЦР	138	6,7±0,6	100	72,5±3,8

Согласно полученным результатам исследования, на территории Республики Армения был отмечен самый высокий уровень заболеваемости пневмококковым менингитом (2,38 случаев на 100 тыс. населения в возрастной группе детей до 5 лет). На территории Азербайджанской республики и Украины заболеваемость колебалась от 0,25 до 2,09 случаев и от 0,25 до 0,4 случаев на 100 тыс. населения в возрастной группе детей до 5 лет соответственно. Самый высокий уровень летальности за весь период наблюдения был отмечен на территории Азербайджанской Республики – 16,4%. На территории Украины летальность составила 11,1%, а на территории Республики Армения – 5%.

Превалирующие серотипы *S. pneumoniae* среди отдельных возрастных групп заболевших детей были сопоставимы с общим серотиповым пейзажем пневмококков, полученных от детей до 5 лет в рамках данной работы. На территории Республики Армения и Украины все случаи пневмококкового менингита, вызванные 14 серотипом (за исключением 1 на территории Украины), были среди девочек.

На территории Украины был обнаружен наибольший процент случаев заболевания пневмококковым менингитом, выявленных среди детей до 1 года (50,9%), что может быть связано с отсутствием плановой иммунизации.

ВЫВОДЫ

1. Модифицированный протокол мультиплексной полимеразной цепной реакции, основанный на использовании четырех комбинаций праймеров, оптимизированного состава реакционной смеси и условий амплификации, обеспечивает специфичность реакции, исключает ложноположительные результаты и позволяет получать ампликоны разных размеров, обеспечивающих возможность единовременной электрофоретической детекции, сокращает число реакций с 8 до 4.
2. Разработанный двухэтапный алгоритм полимеразной цепной реакции серотипирования, идентифицирующий 41 серотип *S. pneumoniae*, позволил типировать возбудителя в 78% исследованных образцов спинномозговой жидкости, положительных на ген *lytA*.
3. При оценке серотипового пейзажа *S. pneumoniae* наиболее часто выявлялись сероварианты 6A/6B, 14, 19F, 23F. При исследовании 138 положительных образцов процент встречаемости “вакцинных” серотипов составил 60,5% для 10 валентной

пневмококковой конъюгированной вакцины и 64,1% для 13 валентной пневмококковой конъюгированной вакцины, чем показана необходимость увеличения числа серотипов в применяемых вакцинах в виде замены 10 валентной пневмококковой конъюгированной вакцины на 13 валентную пневмококковую конъюгированную вакцину на исследуемых территориях.

4. При проведении филогенетического анализа штаммов *S. pneumoniae* были выявлены: клональный комплекс, образованный сиквенс-типом 320, 4 новых сиквенс-типа *S. pneumoniae* (14372, 14386, 14387, 14388), а также тесно взаимосвязанные кластеры с центральными сиквенс-типами: 246, 320, 105, 14388.

5. Анализ результатов дозорного эпиднадзора за период с 2010 по 2017 гг. на территориях с плановой тактикой вакцинации против пневмококковой инфекции показал, что заболеваемость пневмококковым менингитом среди детей до 5 лет была сопоставимой с уровнем заболеваемости в Российской Федерации и колебалась от 0,25 до 2,88 случаев на 100 тыс. детского населения.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для молекулярного типирования *S. pneumoniae* в пробах спинномозговой жидкости рекомендуется использование разработанного двухэтапного алгоритма полимеразной цепной реакции серотипирования, который позволяет надежно определить серотип в более чем 75% исследованных пробах.

2. Необходимо проведение регулярного мониторинга серотипового пейзажа циркулирующих штаммов *S. pneumoniae* с целью оценки влияния вакцинации на популяцию возбудителя.

3. Совершенствование системы дозорного эпиднадзора целесообразно осуществлять путем увеличения охвата исследуемого населения, повышения качества лабораторной диагностики, что дает возможность получения более полной информации об уровнях заболеваемости и циркулирующих штаммах *S. pneumoniae*.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

1. Дальнейший филогенетический анализ циркулирующих штаммов *S. pneumoniae* необходим для совершенствования системы эпиднадзора за пневмококковой инфекцией.

2. Продолжение исследований по изучению молекулярно-генетических механизмов антибиотикорезистентности у штаммов *S. pneumoniae*.

3. Для снижения уровней заболеваемости бактериальными гнойными менингитами у детей необходимы исследования по выявлению возможных источников инфекции среди их ближайшего семейного окружения.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Урбан, Ю.Н. Молекулярно-генетическая, фенотипическая и филогенетическая характеристики штаммов *Streptococcus pneumoniae* в оценке их эпидемиологической роли / Ю.Н. Урбан, Е.А. Воропаева, С.С. Афанасьев, В.А. Алешкин, А.В. Караулов, Е.А. Егорова, М.С. Афанасьев, Ю.В. Несвижский, А.В. Алешкин, А.Н. Оганесян, А.Д. Воропаев // Астраханский медицинский журнал. – 2014 – Т. 9, № 1. – С. 83-92.

2. Урбан, Ю.Н. Молекулярно-генетическая и филогенетическая характеристика штаммов *Streptococcus pneumoniae*, выделенных от больных менингитом и носителей / Ю.Н. Урбан, Е.А. Егорова, Е.А. Воропаева, С.С. Афанасьев, М.С. Афанасьев, **А.Н. Оганесян** // Молекулярная диагностика 2014: сборник трудов VIII всероссийской научно-практической конференции с международным участием. – М., 2014. – Т. 1. – С. 416-417.
3. Воропаева, Е.А. Оценка распределения серотипов *S. pneumoniae*, вызывающих менингит у детей раннего возраста в ряде стран европейского и азиатского регионов / Е.А. Воропаева, Е.А. Егорова, Ю.Н. Урбан, В.А. Алешкин, **А.Н. Оганесян**, А.Д. Воропаев // Профилактическая медицина-2015: материалы всероссийской научно-практической конференции с международным участием (Санкт-Петербург, 25 ноября 2015 г.). – 2015. – С. 62-63.
4. Voropaeva, E. Estimation of serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* causing meningitis in infants in selected countries of the European and Asian regions (2009 - 2014) [Electronic resource] / E. Voropaeva, Y. Yegorova, Y. Urban, A. Voropaev, A. Wasley, D. Videbaek, V. Alyoshkin, **A. Oganessian** // P0894 Paper Poster Session Pneumococcus and pneumococcal diseases in the conjugate vaccine era (26th ESMID 9-12 Apr 2016. Amsterdam, the Netherlands) – 2016. – Available at : www.esmid.org (accessed 01.02.2019).
5. **Оганесян, А.Н. Серотиповая характеристика пневмококков, выявленных у больных менингитом в ряде стран европейского и азиатского регионов / А.Н. Оганесян, Е.А. Воропаева, А.А. Мельникова, Ю.Н. Урбан, Е.А. Егорова, В.А. Алёшкин // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2017. – Т. 16, № 3. – С. 39-49.**
6. **Оганесян, А.Н. Серотиповая характеристика пневмококков, выявленных у больных менингитом в ряде стран европейского и азиатского регионов / А.Н. Оганесян, Е.А. Воропаева, А.А. Мельникова, Ю.Н. Урбан, Е.А. Егорова, В.А. Алёшкин // Инфекционные болезни. – 2017. – Т.15, Приложение №1. – С. 202.**
7. Voropaeva, E. Population structure and erythromycin resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolates collected in Moscow between 2011-2015 / E. Voropaeva, Y. Urban, E. Egorova, **A. Oganessian**, S.D. Bentley, R.F. Breiman, L. McGee, R.A. Gladstone, S.W. Lo // 11th International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases abstract book. – 2018. – P.462.
8. Миронов, А.Ю. Микробиологическая диагностика гнойного бактериального менингита / А.Ю. Миронов, Е.А. Воропаева, **А.Н. Оганесян**, А.А. Мельникова // Сборник материалов V Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Перспективы внедрения инновационных технологий в медицине и фармации» (Орехово-Зуево, 30 ноября 2018 г.). – 2018. – С.137-142.
9. **Оганесян, А.Н. Эффективность методов лабораторной диагностики гнойного бактериального менингита / А.Н. Оганесян, Е.А. Воропаева, А.А. Мельникова, А.Ю. Миронов, Е.А. Егорова, Ю.Н. Урбан, О.Г. Гречишникова, В.А. Метельская, А.Д. Воропаев // Клиническая лабораторная диагностика. – 2019. – Т. 62, № 2. – С. 117-121.**

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ВОЗ – Всемирная Организация Здравоохранения
ГБМ – гнойный бактериальный менингит
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
ЕРБ – Европейское региональное бюро
МЛСТ – мультилокусное сиквенс-типирование
мПЦР – мультиплексная полимеразная цепная реакция
ПКВ10 – 10 валентная пневмококковая конъюгированная вакцина
ПКВ13 – 13 валентная пневмококковая конъюгированная вакцина
ПКВ7 – 7 валентная пневмококковая конъюгированная вакцина
п.н. – пара нуклеотидов
ППВ23 – 23 валентная пневмококковая полисахаридная вакцина
ПЦР – полимеразная цепная реакция
ПЦР РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени
РРЛ – региональная референс лаборатория
СМЖ – спинномозговая жидкость
СТ – сиквенс-тип
CDC – центры по контролю и профилактике заболеваний США (англ. Centers for Disease Control and Prevention)
MLST – мультилокусное сиквенс-типирование (англ. Multilocus sequence typing)
NT – нетипируемый пневмококк
WHO – Всемирная Организация Здравоохранения (англ. World Health Organization)