

Федеральное бюджетное учреждение науки
«Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и
микробиологии им. Г.Н. Габричевского»
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей
и благополучия человека

На правах рукописи

Оганесян Айк Наириевич

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

03.02.03 – микробиология

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор биологических наук
Воропаева Елена Александровна

кандидат медицинских наук
Мельникова Альбина Андреевна

Москва – 2019

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
Актуальность темы исследования.....	5
Степень разработанности темы исследования.....	7
Цель исследования.....	9
Задачи исследования.....	9
Научная новизна.....	9
Теоретическая и практическая значимость работы.....	11
Методология и методы исследования.....	12
Материалы исследования.....	14
Методы исследования.....	19
Микробиологические методы исследования.....	19
Молекулярно-генетические методы.....	20
Видовая идентификация <i>S. pneumoniae</i> методом полимеразной цепной реакции в реальном времени.....	20
Серотипирование <i>S. pneumoniae</i> методами мультиплексной полимеразной цепной реакции и полимеразной цепной реакции в реальном времени.....	21
Молекулярно-генетическое типирование <i>S. pneumoniae</i> методом мультилокусного сиквенс-типирования.....	22
Эпидемиологический анализ.....	24
Статистическая обработка полученных данных.....	25
Личное участие автора в получении результатов.....	26
Основные положения, выносимые на защиту.....	27
Степень достоверности и апробация результатов исследования.....	27
Объем и структура диссертации.....	28

ГЛАВА 1 Обзор литературы	29
1.1 Биологические свойства и факторы патогенности <i>S. pneumoniae</i>	29
1.2 Лабораторная диагностика пневмококковой инфекции	32
1.3 Молекулярно-генетические методы исследования <i>S. pneumoniae</i>	35
1.4 Молекулярно-генетический мониторинг пневмококковой инфекции в условиях вакцинопрофилактики	38
1.5 Заключение по обзору литературы	50
РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	51
ГЛАВА 2. Модификация протокола мПЦР с детекцией в агарозном геле и разработка двухэтапного алгоритма ПЦР-серотипирования <i>S. pneumoniae</i>	51
2.1 Заключение к Главе 2	58
ГЛАВА 3. Серотиповая характеристика и оценка изменений серотипового пейзажа <i>S. pneumoniae</i> в условиях вакцинопрофилактики в ряде стран Европейского, Закавказского и Азиатского регионов.....	60
3.1 Серотиповой пейзаж <i>S. pneumoniae</i> на территории Азербайджанской Республики.....	66
3.2 Серотиповой пейзаж <i>S. pneumoniae</i> на территории Республики Армения.	70
3.3 Серотиповой пейзаж <i>S. pneumoniae</i> на территории Украины	73
3.4 Заключение к Главе 3	78
ГЛАВА 4. Генотипическая характеристика и филогенетический анализ штаммов <i>S. pneumoniae</i>	79
4.1 Генотипическая характеристика штаммов <i>S. pneumoniae</i> с применением мультилокусного сиквенс-типирования	79
4.2 Филогенетический анализ штаммов <i>S. pneumoniae</i>	86
Заключение к Главе 4	90

ГЛАВА 5. Анализ данных дозорного эпиднадзора и характеристика уровней заболеваемости пневмококковым менингитом детей до 5 лет.....	92
5.1 Результаты идентификации <i>S. pneumoniae</i> с применением различных методов лабораторной диагностики	93
5.2 Данные дозорного эпиднадзора, полученные с территории Азербайджанской Республики.....	94
5.3 Данные дозорного эпиднадзора, полученные с территории Республики Армения	99
5.4 Данные дозорного эпиднадзора, полученные с территории Украины	103
5.5 Заключение к Главе 5	107
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	109
ВЫВОДЫ.....	115
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	117
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	118
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	119
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	120

ВВЕДЕНИЕ

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 [1, 2, 14, 26, 38, 188, 190].

Показатели заболеваемости в развитых странах составляют 1-2 на 100 тыс. населения, в развивающихся – 20 на 100 тыс. населения [188]. На территории Российской Федерации на 2017 год показатель заболеваемости пневмококковым менингитом составлял 0,25 на 100 тыс. населения (на основании лабораторно подтвержденных случаев) [28, 29]. Ежегодно пневмококковый менингит приводит к смерти или инвалидизации более чем 60000 детей в возрасте до 5 лет [169].

Наиболее широко для идентификации *S. pneumoniae* используются микробиологические методы исследования. Бактериологический метод считается золотым стандартом для подтверждения пневмококкового менингита [1, 3], 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 [26, 187].

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 [77, 131, 150, 187].

Однако учитывая значительное разнообразие циркулирующих серотипов пневмококков, возникает необходимость адаптации существующих схем полимерной цепной реакции, применяющихся для серотипирования, в зависимости от исследуемого региона.

Принимая во внимание тот факт, что *S. pneumoniae* имеет широкое распространение во всем мире, регистрируется 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 [109]. 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* [35, 163]. 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 [7, 26, 187]. 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 [7].

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* [26, 187].

Таким образом, эффективность вакцинации напрямую зависит от качества проводимого мониторинга циркулирующих штаммов возбудителя пневмококковой инфекции [187].

Степень разработанности темы исследования

В настоящее время существует большое количество методов лабораторного исследования 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.

За рубежом генетическими исследованиями *S. pneumoniae* занимаются: Давыдов А.В., Титов Л.П., Mitchell P.K., Hanage W.P., Fadlyana E, Zhou H., Nagaoka K. [49, 85, 124, 133, 195] и др. Исследования этих авторов посвящены мультилокусному сиквенс-типированию штаммов *S. pneumoniae*, полученных от пациентов с различными нозологическими формами пневмококковой инфекции на территории различных стран. В рамках данных исследований изучены сиквенс-типы штаммов *S. pneumoniae*, входящих в состав вакцин, исследуются мультирезистентные штаммы *S. pneumoniae*, а так же описываются вновь открытые сиквенс-типы. Благодаря результатам, полученным в этих работах, удастся определять эпидемиологическую значимость штаммов, выявленных на территории Российской Федерации, также у производителей вакцин появляется информация о невакцинных серотипах, входящих в клональные комплексы с вакцинными серотипами, что позволяет планировать модификацию вакцин.

Исследования, посвященные мониторингу за пневмококковыми менингитами в странах Европейского региона Всемирной организации здравоохранения, не имеют регулярной основы [68, 90, 94, 145]. Однако данные об эпидемиологической обстановке в указанных странах важны для Российской Федерации в связи с территориальной близостью и миграцией населения, а также

подтверждают верность принятых на данный момент решений относительно схемы вакцинации против пневмококковой инфекции на территории нашей страны.

В Российской Федерации мониторинг циркулирующих возбудителей гнойного бактериального менингита, в том числе *S. pneumoniae*, с использованием молекулярно-генетических методов осуществляют: Белошицкий Г.В., Миронов К.О., Королева И.С., Маянский Н.А., Костюкова Н.Н., Козлов Р.С., Платонов А.Е., Шипулин Г.А., Савинова Т.А., Сидоренко С.И. и др. [9, 10, 11, 12, 26, 30, 32, 33, 36, 38, 42, 45]. Работы этих авторов посвящены исследованию и мониторингу серотипового пейзажа *S. pneumoniae*, оценке покрытия пневмококковыми конъюгированными вакцинами циркулирующих на территории Российской Федерации штаммов, описанию сиквенс-типов, оценке их антибиотикорезистентности.

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 в себе *S. pneumoniae* и непосредственно штаммов *S. pneumoniae*, полученных из стран Европейского региона Всемирной организации здравоохранения, с использованием молекулярно-генетических методов, в частности, с применением метода мультилокусного сиквенс-типирования [2, 5, 50, 51].

Работами зарубежных и Российских ученых были выявлены изменения серотипового пейзажа *S. pneumoniae* после введения вакцинации в плановом порядке, что говорит о необходимости регулярного мониторинга циркулирующих штаммов. Также данными работами была показана клональная связь между мультирезистентными штаммами *S. pneumoniae*, выявленными на разных географических территориях.

Учитывая недостаточность сведений о штаммах *S. pneumoniae*, циркулирующих на территории отдельных государств Европейского региона, возможности смещений серотипового пейзажа при применении пневмококковых

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 ПЦР 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

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 преобладающие серотипы (6A/B, 14, 19F, 23F) и определён процент покрытия исследованных серотипов 10 валентной пневмококковой конъюгированной вакциной, который составил 52%.

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 так же 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

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%2fads%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); в научно-исследовательскую работу Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» (акт внедрения от 21.01.2019).

Методология и методы исследования

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), а так же некоторые проявления эпидемического процесса пневмококкового менингита. Предметом исследования явились 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 [187, 188, 189, 190].

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.

Материалы исследования

Специалистами ВОЗ была рекомендована организация системы дозорного эпиднадзора за бактериальными менингитами для пациентов возрастной группы от 0 до 5 лет с клиническими признаками менингеального синдрома, госпитализированными в ведущие профильные стационары стран-участниц проекта. Одной из целей данной программы являлась оценка серотипового пейзажа пневмококков, выявленных у больных менингитом, в 6 странах, принимающих участие в программе ЕРБ ВОЗ по дозорному эпиднадзору за инвазивными бактериальными заболеваниями. В программу были включены следующие государства: Азербайджанская Республика, Республика Армения, Республика Беларусь, Грузия, Узбекистан и Украина. В ходе работы по рекомендации ВОЗ дополнительно были проанализированы данные, полученные при проведении лабораторных исследований образцов СМЖ, поступивших из Киргизской Республики и Республики Казахстан. Также были проведены идентификация, серотипирование и мультилокусное сиквенс-типирование (МЛСТ) 19 штаммов *S. pneumoniae*, выделенных от детей младше 5 лет, госпитализированных с диагнозом менингит в ГБУЗ ИКБ № 2 ДЗМ, г. Москвы.

Характеристика исследуемых стран по общему числу населения, количеству детей до 5 лет, а также сроки введения 10 валентной пневмококковой конъюгированной вакцины (ПКВ10) представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Сводная характеристика исследуемых стран и сроки введения ПКВ [179, 191, 192]

Исследуемые страны	Общая численность населения, тыс.	Численность детей от 0 до 5 лет, тыс.					Дата введения ПКВ	Охват 3 дозы ПКВ, % 2017
		2017	2016	2015	2014	2013		
Азербайджанская Республика	9828	885	891	866	847	814	12.2013	96
Республика Армения	2930	198	202	206	207	208	08.2014	94
Республика Беларусь	9468	577	579	576	569	558	01.2012	98
Грузия	3912	266	271	275	279	284	12.2014	80

Продолжение таблицы 1

Республика Казахстан	18204	1970	1997	1991	1956	1893	01.2010	98
Киргизская Республика	6045	757	760	748	732	709	01.2016	88
Узбекистан	31911	3180	3184	3197	3186	3181	11.2015	100
Украина	44223	2303	2334	2410	2439	2483	01.2015 (по эпидпоказателям)	-

Азербайджанская Республика включает в себя 65 районов. Общая численность населения составляет 9593038 человек, число детей от 0 до 5 лет – 851425 [179, 191, 192]. В декабре 2013 года в национальный календарь иммунизации включена ПКВ10 по схеме 2 месяца; 4 месяца; 6 месяцев.

Эпиднадзор за ГБМ осуществлен на базе 2 стационаров:

- Караевская детская клиническая больница;
- НИИ педиатрии им. Фараджева.

Республика Армения включает в себя 44 района. Общая численность населения составляет 2956281 человек, число детей от 0 до 5 лет – 252562 [179, 191, 192]. В августе 2014 года в национальный календарь иммунизации включена ПКВ10 по схеме 1,5 месяца; 3 месяца; 4,5 месяца.

Эпиднадзор за ГБМ осуществлен на базе 3 стационаров и 2 лабораторий:

- Медицинский Центр «Арабкир», Институт здоровья детей и подростков;
- Инфекционная клиническая больница «Норк»;
- Медицинский Центр «Сурб Аствацамайр»;
- Лаборатория «Арабкир» МК ИЗДП;
- Лаборатория «Норк» ИКБ.

Республика Беларусь включает в себя 6 регионов. Общая численность населения составляет 9478716 человек, число детей от 0 до 5 лет – 570781 [179, 191, 192]. ПКВ10 включена в национальный календарь прививок в январе 2012 г. по схеме 2 месяца; 4 месяца; 12 месяцев.

Эпиднадзор за ГБМ осуществлен на базе 3 стационаров:

- Детская инфекционная клиническая больница;
- Третья городская клиническая больница;

- Гродненская областная инфекционная клиническая больница.

Грузия включает в себя 12 регионов. Общая численность населения составляет 3729500 человек, число детей от 0 до 5 лет – 256800 [179, 191, 192]. ПКВ10 включена в национальный календарь прививок с декабря 2014 по схеме 2 месяца; 3 месяца; 12 месяцев.

Эпиднадзор за ГБМ осуществлен на базе 3 стационаров:

- Детская центральная больница имени М. Иашвили;
- Инфекционная больница;
- Детская новая клиника им. Цицишвили.

Республика Казахстан включает в себя 14 областей. Общая численность населения составляет 17485195 человек, в том числе детей до 5 лет – 1787663 [179, 191, 192]. ПКВ10 включена в национальный календарь прививок с января 2010 г. по схеме 2 месяца; 4 месяца; 12-15 месяцев.

Киргизская Республика включает в себя 7 областей. Общая численность населения 5835800 человек число детей от 0 до 5 лет – 748000 [192, 179, 191]. ПКВ13 включена в национальный календарь прививок с января 2016 г. по схеме 2 месяца; 5 месяцев; 12 месяцев.

Узбекистан включает в себя 14 регионов. Общая численность населения составляет 31302328 человек, число детей от 0 до 5 лет – 3113949 [179, 191, 192]. ПКВ10 включена в национальный календарь прививок с ноября 2015 по схеме 2 месяца; 3 месяца; 12 месяцев.

Эпиднадзор за ГБМ осуществлен на базе 1 стационара и 1 лаборатории:

- Первая клиническая инфекционная больница г. Ташкент;
- Лаборатория 1 ГКИБ.

Украина включает в себя 24 области. Общая численность населения составляет 42900000 человек, число детей от 0 до 5 лет – 2500000 [179, 191, 192]. ПКВ10 включена в календарь профилактических прививок по эпидпоказаниям.

До 2009 года в дозорном эпиднадзоре участвовали 1 национальная лаборатория и 7 опорных баз, с 2009 года - 3 (г. Киев, г. Хмельницкий, г. Донецк),

с 2014 эпиднадзор за ГБМ проводился на одной базе городской детской клинической инфекционной больницы (г. Киев).

Дозорные стационары в исследуемых странах были выбраны экспертной комиссией ВОЗ по следующим критериям: республиканский уровень стационара; наличие детского профильного отделения; наличие квалифицированного персонала; возможность доставки проб в РРЛ ЕРБ ВОЗ по ИБЗ УВ (г. Москва).

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. [51], в данной диссертации было продолжено изучение этих 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 .

Основные методы и объем проведенных исследований представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Основные методы и объем проведенных исследований

Метод исследования	Общее число/число положительных
Анализ информационных единиц в Online базе данных ВОЗ	2056
Микроскопия препаратов СМЖ с окраской по Граму ¹	2056
Исследование СМЖ с применением ИХ теста ¹	2056/32
Исследование СМЖ с применением РАЛ ¹	2056/38
Посев СМЖ на питательные среды ¹	2056/17
Идентификация <i>Streptococcus pneumoniae</i> по фенотипическим тестам (чувствительность к оптохину и лизис в присутствии желчных кислот)	36/36
Выявление <i>Streptococcus pneumoniae</i> в СМЖ методом ПЦР	3303/195
Серотипирование <i>Streptococcus pneumoniae</i> методом ПЦР (ДНК)	195/152
Серотипирование штаммов <i>Streptococcus pneumoniae</i> методом ПЦР ²	36/36
МЛСТ штаммов <i>Streptococcus pneumoniae</i> ²	36

Примечание:

1 – в рамках данной работы рассмотрены результаты исследований проведенных в национальных лабораториях Азербайджанской Республики, Республики Армения и Украины.

2 – свойства 11 из указанных штаммов *S. pneumoniae* были изучены ранее в рамках диссертационной работы Урбан Ю.Н. [51]

Методы исследования

В работе была использована схема исследования СМЖ [187], представленная на рисунке 1.



Рисунок 1 – Схема исследования СМЖ [187]

Микробиологические методы исследования

Микроскопические исследования. Окраску по Граму препаратов проводили согласно общепринятым методикам. Оценку полученных мазков производили на световом микроскопе *Carl Zeiss Axio Scope A1* при тысячекратном увеличении.

Бактериологические исследования. Образцы СМЖ в течение 1 часа после забора ликвора засеивали на колумбийский агар (Oxoid, Великобритания) с добавлением 5% дефибрированной крови барана или лошади [3].

Посевы на колумбийском агаре инкубировали в термостате при 37°C в течение 24-48 часов в атмосфере, содержащей 5% CO₂. Для создания капнофильных условий использовали анаэроостаты (Oxoid, Великобритания) и систему атмосферной генерации для *in vitro* диагностики (Oxoid, Великобритания).

При отсутствии возможности доставки ликвора в бактериологическую лабораторию в течение часа СМЖ засеивали в транспортную среду Trans-Isolate medium [52]. Данная среда обеспечивает оптимальные условия для роста, хранения и транспортировки штаммов *S. pneumoniae*. При правильном посеве СМЖ на среду Trans-Isolate medium (<1 часа) с обеспечением оптимальной температуры хранения (15 – 37°C) и капнофильных условий жизнеспособные бактерии можно получить даже через 2-4 недели.

Идентификацию *S. pneumoniae* проводили с использованием следующих тестов: каталазной активности, чувствительности к оптохину и растворимости в желчи [187].

Молекулярно-генетические методы

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 водного раствора свежих колоний по стандарту McFarland 1,5.

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. [51].

Видовая идентификация *S. pneumoniae* методом полимеразной цепной реакции в реальном времени

Для видовой идентификации *S. pneumoniae* использовали метод ПЦР РВ. Для контроля выделения ДНК и наличия ингибиторов использовали праймеры и флуоресцентно меченый зонд, разработанные к человеческой рибонуклеазе Р.

Список генов-мишеней, последовательностей праймеров и флуоресцентно меченых зондов, использованных для видовой идентификации *S. pneumoniae* в реакциях ПЦР РВ представлен в таблице 3 [187].

Таблица 3 – Праймеры и флуоресцентно меченые зонды, используемые для выявления *S. pneumoniae* [187]

Мишень	Нуклеотидная последовательность праймеров (от 5'-конца к 3'-концу цепи)	Концентрация рабочих растворов (мкМ)	Предлагаемые модификации зондов
<i>S. pneumoniae</i>			
<i>lytA F</i>	ACGCAATCTAGCAGATGAAGCA	2,5	
<i>lytA R</i>	TCGTGCGTTTTAATTCAGCT	2,5	
<i>lytA Pr</i>	TGCCGAAAACGC"Т"TGATACAGG GAG	2,5	5' FAM, BHQ1 на "Т", 3' SpC6
ДНК человека			
<i>RNazeP F</i>	CCA AGT GTG AGG GCT GAA AAG	4	
<i>RNazeP R</i>	TGT TGT GGC TGA TGA ACT ATA AAA GG	4	
<i>RNazeP Pr</i>	CCC CAG TCT CTG TCA GCA CTC CCT TC	1	5' FAM, 3' BHQ1

Амплификацию проводили в 25 мкл смеси, включающей 12,5 мкл смеси для ПЦР PB 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 рассматривался 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).

Серотипирование *S. pneumoniae* методами мультиплексной полимеразной цепной реакции и полимеразной цепной реакции в реальном времени

Для определения серотипов *S. pneumoniae* применяли метод ПЦР PB (Таблица 4) [142]. Последовательности праймеров для ПЦР PB доступны в

библиографических источниках и на сайте Центра по контролю и профилактике заболеваний США (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) [72, 112, 142, 187].

Таблица 4 – Схема проведения ПЦР РВ серотипирования *S. pneumoniae*

Реакция	Включенные серотипы
1	14; 18С/18В/18А/18F; 19F
2	2; 5; 23F
3	4; 6А/6В/6С/6D; 9V/9А
4	3; 7F/7А; 19А
5	6С/6D; 12F/12А/12В/44/46; 22F/22А
6	1; 11А/11D/11F; 16F
7	15А/15F; 23А; 33F/33А/37

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 [72], и вода для ПЦР до 25 мкл.

Температурный режим: I 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 [51].

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 мультилокусного сиквенс-типирования

Молекулярно-генетическое типирование *S. pneumoniae* осуществляли методом МЛСТ с использованием специфических праймеров (Таблица 5) [187].

Таблица 5 – Список праймеров, используемых для МЛСТ *S. pneumoniae* [187]

Локус гена	Название праймера	Прямой праймер (5'-3') ^{1,2}	Название праймера	Обратный праймер (5'-3') ^{1,2}
<i>aroE</i>	<i>aroE</i> -fwd	TCCTATTAAGCATTTCTATTTCTCCCTTC	<i>aroE</i> -rev	ACAGGAGAGGATTGGCCATCCATGCCCACTG
<i>gdh</i>	<i>gdh</i> -up	ATGGACAAACCAGCNAGYTT	<i>gdh</i> -dn	GCTTGAGGGTCCCATRCTNCC
<i>gki</i>	<i>gki</i> -up	GGCATTGGAATGGGATCAC	<i>gki</i> -dn	TCTCCCGCAGCTGACAC
<i>re</i> ³	<i>recP</i> -fwd	GAATGTGTGATTCAATAATCACCTCAAATAGAAGG	<i>recP</i> -rev	TGCTGTTTCGATAGCAGCATGGATGGCTTCC
<i>spi</i>	<i>spi</i> -fwd	CGCTTAGAAAGGTAAGTTATGAATTT	<i>spi</i> -rev	GAAGAGGCTGAGATTGGTGAATCTCGGCC
<i>xpt</i>	<i>xpt</i> -fwd	ТТААСТТТТАGACTTTAGGAGGTCTTATG	<i>xpt</i> -rev	CGGCTGCTTGCAGAGTGTТТТCTTGAG
<i>ddl</i>	<i>ddl</i> -fwd	ТААААТCACGACTAAGCGTGTTCTGG	<i>ddl</i> -rev	ААGТАGТGGGTACATAGACCACTGGG

Примечание:

1 – R = A или G; Y = C или T; N = A, T, G или C.

2 – для данного случая R = смесь в равных долях A и G; W = смесь в равных долях A и T; и т.д.

В состав смеси для амплификации входили: 2,5 мкл буфера для ПЦР: 700 mM Трис-НСl, pH 8,6/25°C, 166 mM (NH₄)₂SO₄, (Fermentas, Латвийская Республика); 2,5 мкл 25 mM MgCl₂, (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 ECH-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) с следующим температурным режимом: 25 циклов 96° – 30 сек, 55° – 10 сек, 60° – 4 минуты. Очистка смеси после амплификации осуществляли с использованием коммерческого набора BigDye XTerminator Purification Kit (Applied Biosystems, США) в соответствии с инструкцией производителя.

Эпидемиологический анализ

С учётом полноты полученных 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.

Были выделены следующие возрастные группы детей: до 1 года, от 1 года – до 1 года 11 месяцев 29 дней, от 2 лет до 2 лет 11 месяцев 29 дней; от 3 лет до 3 лет 11 месяцев 29 дней; от 4 лет до 4 лет 11 месяцев 29 дней. Место жительства определялось по типам: городское и сельское население.

Статистическая обработка полученных данных

Обработка данных исследования, статистический и графический анализ материалов осуществляли 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 [4, 6, 18, 41].

Количественные изменения изучаемых показателей оценивали по следующей формуле:

$$T = (b/I_{cp}) * 100\%$$

$$b = \Sigma (x * I_{факт}) / \Sigma x^2, \text{ где}$$

I – изучаемый показатель

b – начальная скорость ряда

x – условный отрезок времени

Стандартную ошибку для экстенсивных показателей рассчитывали по формуле $m = \pm \sqrt{q * P/N}$, где

q – разность между размерностью и его величиной

P – экстенсивный показатель

N – суммарное число выборки

Стандартную ошибку для экстенсивных показателей при числе наблюдения менее 30, рассчитывали по формуле $m = \pm \sqrt{q * P/N - 1}$

Ошибку средней арифметической определяли по следующей формуле:

$$m = \pm \sigma / \sqrt{N}, \text{ где}$$

σ – среднее квадратическое отклонение

Ошибку средней арифметической при числе наблюдения менее 30 определяли по следующей формуле:

$$m = \pm \sigma / \sqrt{N - 1}$$

Доверительный коэффициент Стьюдента (t) рассчитывали по формуле:

$$t = \frac{P_1 - P_2}{mD}, \text{ где}$$

P_1 и P_2 – сравниваемые показатели

$$mD = \sqrt{m_1^2 + m_2^2}$$

m_1^2 и m_2^2 – средние ошибки сравниваемых показателей.

Достоверным считался результат при величине $t > 2$. Разность результатов считали статистически значимой при $p < 0,05$.

Результаты секвенирования, полученные в формате хроматограммы, обрабатывали в программе BioEdit Alignment Editor. Анализ последовательностей генов «домашнего хозяйства» с определением сиквенс-типов (СТ) проводили с использованием базы данных МЛСТ (<http://spneumoniae.mlst.net>).

Для определения клональности исследуемых штаммов использовали алгоритм eBURSTv3, интегрированный в программный пакет PHYLOViZ. С использованием программы «Vector NTI Suite v. 9» проводили склеивание полученных нуклеотидных последовательностей. Выравнивание последовательностей проводили с помощью сервиса BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=blast2seq&LINK_LOC=align2seq). Построение филогенетической дендограммы осуществляли методом оценки филогенетических взаимоотношений на основе генетических дистанций (UPGMA).

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 ПКВ 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 25.04.2019).

Материалы диссертации были доложены и представлены на 9 научных конференциях: VIII всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молекулярная диагностика 2014», Москва, 2014; Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Профилактическая медицина 2015», Санкт-Петербург, 2015; 13th congress European Meningococcal Disease Society, Amsterdam, 2015; European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Amsterdam, 2016; IX Ежегодный Всероссийский Конгресс по инфекционным болезням с международным участием, Москва, 2017; 14th Congress of the EMGM, The European Meningococcal and Haemophilus Disease Society, Prague, 2017; 11 Международный симпозиум «Пневмококки и пневмококковые заболевания», Мельбурн, 2018; 4-я Российская научно-практическая конференция «Актуальные проблемы менингококковой инфекции и гнойных бактериальных менингитов», Москва, 2018; V Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Перспективы внедрения инновационных технологий в медицине и фармации», Орехово-Зуево, 2018.

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.

ГЛАВА 1 Обзор литературы

1.1 Биологические свойства и факторы патогенности *S. pneumoniae*

S. pneumoniae является этиологическим агентом разнообразных инфекционных патологий, которые с клинической точки зрения делятся на инвазивные угрожающие жизни заболевания с тяжелым течением (пневмококковый менингит, пневмония, сепсис, перикардит), при которых возбудитель выделяется из стерильных в норме локусов, и неинвазивные (средний отит, синусит, конъюнктивит) [10, 20, 21, 67].

S. pneumoniae – факультативно-анаэробный, грамположительный кокк, проявляющий альфа-гемолитические свойства (в аэробной среде) [19, 156]. *S. pneumoniae* имеет овальную форму клеток и растет парами или короткими цепочками клеток, чем обусловлено его прежнее название «*diplococcus*» [20, 91].

Капсула представлена в основном веществом полисахаридной природы, в неактивном состоянии представляющим из себя студенистый гидрофильный гель, легко смываемый водой [127]. Характерной структурной особенностью является то, что они построены преимущественно из трех повторяющихся сахаров: D-галактозы, D-глюкозы и L-рамнозы, при сочетании которых образуются иммунологические типы капсульных полисахаридов. Капсульные полисахариды не только обладают антифагоцитарной активностью, но и надежно защищают пневмококки от воздействия кислородных радикалов, ферментов и других токсичных продуктов [24]. *S. pneumoniae* обладает капсульным полисахаридом, который, в большинстве штаммов, ковалентно прикреплен к клеточной стенке, благодаря незначительным изменениям в структуре которого, рассматриваемому микроорганизму удается избежать иммунного ответа. Капсульный полисахарид является критическим фактором патогенности и играет важную роль в колонизации и инвазии носоглотки, причем в данном процессе происходят попеременно экспрессия и супрессия синтеза капсульного полисахарида [81, 172]. Кроме варианта, когда капсульный полисахарид прикреплен к клеточной стенке, возможна секреция капсульного полисахарида во внеклеточную среду, что имеет

значение при развитии инфекционного процесса, но не влияет на образование биопленок, как в случае с иными возбудителями [128].

Как и другие грамположительные организмы, *S. pneumoniae* имеет толстую многослойную клеточную стенку, состоящую в основном из пептидогликана и тейхоевых кислот. Последние либо ковалентно присоединены к пептидогликану, либо прикреплены к цитоплазматической мембране. Кроме того, пептидогликан-связанные пили образуют длинные нитевидные белки, которые простираются далеко от поверхности клетки, чтобы взаимодействовать с матрицей или клетками-хозяевами [20, 40, 91].

В клетке *S. pneumoniae* находится большое количество АТФ-связывающих кассет, однонаправленно транспортирующих какой-либо субстрат, получая энергию за счет гидролиза АТФ [111]. Большинство из них являются импортерами, которые транспортируют широкий спектр субстратов в цитоплазму, часто против градиента концентрации, к основным из которых можно отнести: катионы, сахара, фосфаты, пептиды и аминокислоты. Однако 21 из них являются экспортерами, способными выводить из цитоплазмы *S. pneumoniae* различные субстанции. У экспортеров выделяют некоторые функции: повышение устойчивости бактериальной клетки к антибиотикам и бактериоцинам, за счет выведения их из цитоплазмы; выделение сигнальных пептидов; возможное увеличение устойчивости к антимикробным пептидам, что может сказываться на колонизации слизистых [25, 62, 64, 76, 80, 103, 120].

Вторым по значимости фактором патогенности *S. pneumoniae* является пневмолизин, состоящий из 471 аминокислоты [183]. Пневмолизин принадлежит к семейству тиолозависимых токсинов, обладающих двухэтапным механизмом действия. Роль пневмолизина в развитии пневмококковой инфекции заключается в разрушении плотных соединений эпителия и увеличения альвеолярной проницаемости, что ускоряет развитие бактериемии, в последствии это может привести к отеку легких, даже спустя некоторое время после элиминации возбудителя из легких. Кроме того, пневмолизин является индуктором апоптоза клеток, что очень важно при пневмококковом менингите, т.к. этот фактор

приводит зачастую к неблагоприятным исходам [60, 65, 107, 138, 154]. Также *in vitro* пневмолизин препятствует уничтожению *S. pneumoniae* нейтрофилами [84, 87]. Однако *S. pneumoniae* отчасти и «вредит» выделению пневмолизина, т.к. он провоцирует появление клеток воспаления [134].

Аутолизин – фермент, обеспечивающий выполнение различных функций в бактериальной клетке: синтез клеточной стенки; отделение дочерних клеток после деления; специфический разрыв ковалентных связей в клеточной стенке, приводящий к лизису клетки. *S. pneumoniae* содержит два аутолитических фермента – N-ацетилмурамоил-L-аланинамидазу и эндо- β -1,4-N-ацетилглюкозаминидазу. Активность обоих ферментов в значительной степени зависит от наличия остатков холина в тейхоевой кислоте клеточной стенки микроорганизма. Нарушение регуляции действия данных аутолизинов способствует обеспечению необратимых эффектов действия бета-лактамных антибиотиков на бактериальную клетку. Исследования показали, что антитела к аутолизинам и пневмолизину обеспечивают частичную защиту мышей от пневмококковой инфекции, при этом антитела к аутолизинам при инфекциях, вызванных не содержащими пневмолизин мутантами, не обеспечивают защиты. Из чего следует, что основная роль аутолизинов в патогенезе пневмококковой инфекции заключается в высвобождении пневмолизина, и иных повреждающих компонентов клеточной стенки пневмококков [26]. Стоит отметить, что воздействие аутолизина на клеточную стенку возможно только во время стагнации роста (из-за отсутствия питательных веществ или воздействия бета-лактамных антибиотиков) [122].

Адгезины помогают возбудителю присоединиться к клеткам и тканям хозяина, распознавая их [118]. Немаловажную роль в адгезии бактерии к эпителиальным клеткам верхних дыхательных путей играют пили, длинные органеллы, способные выходить за пределы полисахаридной капсулы. Кроме того, штаммы, имеющие пили, вызывают более сильную реакцию выделения фактора некроза опухоли, из чего следует, что наличие пилей не только повышает вирулентность штамма, но и стимулирует воспалительную реакцию [57].

Поверхностный протеин А (*PspA*) обнаруживается у всех *S. pneumoniae* и является одним из основных адгезинов [88]. Он необходим для обеспечения вирулентности. Основная роль *PspA* заключается в обеспечении эффективной колонизации слизистых оболочек и последующей защите *S. pneumoniae* от фиксации комплемента и, следовательно, в снижении опсонизации [26].

S. pneumoniae не обладает цитохромом, вследствие чего расходует кислород атмосферы при помощи флавопротеина с образованием перекиси водорода, которую бактериальная клетка не может самостоятельно утилизировать в виду отсутствия каталазы [26]. Выделение перекиси водорода можно считать также фактором патогенности *S. pneumoniae*, исследования на примере совместного роста *S. pneumoniae* и *H. influenzae*, а так же совместного роста *S. pneumoniae* и *S. aureus* показали, что перекись водорода, выделяемая *S. pneumoniae*, убивает *H. influenzae* и *S. aureus*, при этом в условиях добавления каталазы, рост *H. influenzae* и *S. aureus* не угнетался [140, 147].

1.2 Лабораторная диагностика пневмококковой инфекции

Микроскопия и культуральный метод направлены на идентификацию изолятов *S. pneumoniae* выявлением типичных морфологических характеристик и по результатам фенотипических тестов. При микроскопии *S. pneumoniae* определяются, как грамположительные диплококки, либо цепочки кокков. Однако классические проявления могут быть изменены в условиях антимикробной терапии и чрезмерного обесцвечивания при окраске, в сторону грамотрицательных диплококков. С целью серотипирования штамма при микроскопии проводятся реакции набухания капсулы [185].

В настоящее время, для культивирования *S. pneumoniae* используются готовые сухие среды, наиболее распространенными являются колумбийский и триптиказо-соевый агар. К указанным основам для оптимального роста *S. pneumoniae* добавляют дефибринированную кровь животных (лошади, барана, козла) [3, 15, 16, 17, 23]. Использование человеческой крови не рекомендуется экспертами ВОЗ из-за возможного наличия антител к пневмококковым антигенам и других факторов [95, 187, 188].

В процессе жизнедеятельности *S. pneumoniae* образуется перекись водорода, которую микробная клетка самостоятельно не способна утилизировать, так как не обладает каталазой. Данный фермент есть в эритроцитах, поэтому кровь включают в состав питательных сред [26]. После инкубации в течение ночи при 35°C с 5% CO₂ на 5% агаре с бараньей кровью или шоколадном агаре, колонии *S. pneumoniae* становятся сероватыми, слизистыми и окружены зеленой зоной гемолиза. После 24 – 48 ч. инкубации, колонии становятся «вдавленными» в центре [22, 185].

Для дальнейшей идентификации используются 2 ключевых реакции: чувствительность к оптохину и реакция растворения в желчи. Оптохин (этилгидрокупреин) является антибактериальным агентом, который не используется в терапевтических целях, но применяется для лабораторной идентификации пневмококков [110].

S. pneumoniae, в отличие от других стрептококков, является чувствительным к оптохину и вокруг диска, пропитанного оптохином, образуется зона задержки роста. Реакция лизиса в желчи (дезоксихолатная проба) выражается в аутолизе пептидогликана клеточной стенки аутолизинном *S. pneumoniae*, усиливающимся в присутствии 2% дезоксихолата натрия (в течение часа исчезает помутнение в водном растворе при температуре 35°C) [185]. Стоит иметь в виду, что согласно данным литературы, в 10% случаев, *S. pneumoniae* проявляет резистентность к оптохину [110].

Микроскопический и культуральный методы лабораторной диагностики, имеют некоторые ограничения, такие как: ложноотрицательные реакции, длительный срок исследования (минимум 24 часа). С целью сокращения сроков проведения, повышения точности и упрощения анализов, были разработаны методы, позволяющие обнаружить присутствие *S. pneumoniae* в различных биологических образцах, таких как: мокрота, моча, СМЖ, слюна, плевральная жидкость и периферическая кровь [53, 96, 194]. Данные методы имеют преимущество быстрого выявления пневмококков, даже если они не являются жизнеспособными. Кроме того, перспективным является использование новых

молекулярных мишеней, таких как *PspA*, поскольку его наличие может позволить дифференцировать пневмококковую инфекцию от носительства: ее синтез требует низких уровней марганца, которые есть в кровеносном русле, но отсутствуют в носоглотке [92, 105].

Распространенными являются тест-системы на выявление С-полисахарида *S. pneumoniae*. Согласно данным литературы, были сравнены чувствительность и специфичность твердофазного иммуноферментного анализа и латекс-агглютинации. При исследовании культуры из мокроты, эти методы обладают сопоставимой чувствительностью (соответственно 95 и 86%) и специфичностью (94% для обоих методов обнаружения) [96, 170].

В последнее время становится актуальным иммунохроматографический тест BinaxNOW, являющийся экспресс-тестом для качественного выявления антигена *S. pneumoniae* в образцах спинномозговой жидкости, полученных от пациентов с симптомами менингита. Тест в сочетании с культуральными и другими методами предназначен для диагностики пневмококкового менингита. Чувствительность и специфичность BinaxNOW колеблется от 95,4% до 100% и от 98,6% до 100% соответственно [97, 126, 157].

Впервые капсульный полисахарид был обнаружен в 1917 г. в моче пациента с пневмококковой пневмонией [79]. Для выявления капсульных полисахаридов *S. pneumoniae* в моче также использовали твердофазный иммуноферментный анализ и латекс-агглютинацию. Однако данные методики не были очень эффективны в связи с большим разнообразием серотипов *S. pneumoniae*, а также с зависимостью от концентрации капсульного полисахарида в моче пациентов [159, 185].

Введение мультиплексной иммуноаналитической системы на основе Luminex® для диагностики бактериемической пневмококковой пневмонии, обладающей чувствительностью (79-97%) и специфичностью (99-100%), позволяет более эффективно идентифицировать серотип возбудителя [61, 143, 166].

Вместе с тем, недостаточная скорость получения результата и чувствительность бактериологического и иммунологического методов привели к

поискам и разработке новых диагностических подходов, включая полимеразную цепную реакцию [26].

1.3 Молекулярно-генетические методы исследования *S. pneumoniae*

Для проведения ПЦР с целью идентификации *S. pneumoniae* используются следующие гены-мишени: *ply* (ответственный за синтез пневмолизина); *lytA* (ответственный за синтез аутолизина); *psaA* (ответственный за синтез капсулы), *cpsA* (ответственный за синтез *spA*, фактора адгезии) [50, 70, 112, 158].

Результаты детекции гена *ply* в материале, полученном из носоглотки зачастую были ложноложительны. Возможно, это могло быть связано с детекцией α -гемолитического стрептококка [50, 131, 176]. Таким образом, согласно данным литературы, целесообразно проведение ПЦР с детекцией *lytA* [155, 171].

Благодаря использованию ПЦР для серотипирования *S. pneumoniae*, можно типировать микроорганизм, как в исходном биологическом материале от пациентов, так и в виде отдельных штаммов [13]. В основе метода лежит детекция последовательностей локуса *cps*, регулирующего синтез полисахаридов. Генами-мишенями для ПЦР-серотипирования являются: *wzy*, *wzx*, *wzg* (*cpsA*), *galU*, *wciP*, *wcwL*, *wcrG*, *wciL*, *wcwV*, *wcrH*.

Р. Раі и др. была разработана и предложена схема ПЦР-серотипирования, основанная на мПЦР, позволяющая определить 22 серотипа и 18 серогрупп [139]. Руководством по лабораторной диагностике ВОЗ предложены различные схемы типирования *S. pneumoniae* с использованием ПЦР, в зависимости от особенностей пейзажа циркулирующих серотипов в определённых географических районах мира, таких как: Азия, Африка, Соединенные штаты Америки и др.[187].

В РРЛ ЕРБ ВОЗ на базе ФБУН МНИИЭМ им Г.Н. Габричевского использовалась схема мПЦР с детекцией в агарозном геле, состоящая из 8 основных и 1 дополнительной реакций, позволяющая определить в общей сложности 41 серогруппу и серотип в течении 23 часов от начала исследования [187] (Таблица 6).

Таблица 6 – Схема ПЦР-серотипирования *S. pneumoniae* [187]

Реакция	Включенные серотипы
1	14, 6A/6B/6C/6D, 23F, 19A, 9V/9A
2	19F, 3, 15B/15C, 18A/18B/18C/18F, 17F
3	1, 5, 9L/9N, 7F/7A, 16F
4	8, 2, 4, 20, 22F/22A
5	7C/7B/40, 12F/12A/44/46, 11A/11D, 10A, 23A
6	21, 33F/33A/37, 15A/15F, 35F/47F, 13
7	39, 23B, 35A/35C/42, 38/25F/25A, 35B
8	24A/24B/24F, 10F/10C/33C, 34, 31
9	6A/6B/6C/6D, 6C/6D

В 2014 г. в работу РРЛ была включена мПЦР РВ, позволяющая за 7 реакций в течение 8 часов определить 19 серотипов и серогрупп *S. pneumoniae* [72] (Таблица 7).

Таблица 7 – Схема проведения ПЦР РВ серотипирования *S. pneumoniae* [72]

Реакция	Включенные серотипы
1	14; 18C/18B/18A/18F; 19F
2	2; 5; 23F
3	4; 6A/6B/6C/6D; 9V/9A
4	3; 7F/7A; 19A
5	6C/6D; 12F/12A/12B/44/46; 22F/22A
6	1; 11A/11D/11F; 16F
7	15A/15F; 23A; 33F/33A/37

Lang A. и соавторами в 2015 г. была предложена схема мПЦР-серотипирования *S. pneumoniae* позволяющая идентифицировать 21 серотип *S. pneumoniae* [112].

При ПЦР-типировании пневмококка, важно иметь в виду следующее: специфические гены, кодирующие различные типы капсул, могут быть расположены на тождественных участках нуклеопротеидных структур [106]; гомологичность между специфичными генами капсул разных типов минимальна [26]; в одном штамме существует лишь одна комбинация специфичных генов [152]; гены, определяющие производство капсулярного полисахарида, есть исключительно в инкапсулированных штаммах [69].

В основу наблюдения за популяционными характеристиками *S. pneumoniae* положен метод молекулярного типирования, построенный на идентификации изменений в геноме, накапливающихся со временем и отличающихся среди генотипов, но способных идентифицировать клональные группы. Наиболее распространенными среди избирательно нейтральных участков генома являются гены домашнего хозяйства, задействованные в кодировании белков, которые ответственны за метаболизм микроорганизма. Эти гены не подвержены влиянию селективного давления и в основе их изменений лежат спонтанные мутации [162].

Используя мультилокусное сиквенс-типирование (МЛСТ), можно стандартизировать способы исследования генной структуры циркулирующих штаммов *S. pneumoniae* [119]. В основе данного метода лежит исследование указанных генов домашнего хозяйства. Данные гены постепенно накапливают изменения и отражают генетические расстояния между разными клонами микроорганизмов, благодаря чему можно систематизировать популяции и определить их филогенетическое родство.

При проведении МЛСТ *S. pneumoniae* секвенируются фрагменты 7 генов «домашнего хозяйства» [187] (Таблица 8).

Таблица 8 – Гены «домашнего хозяйства», используемые для МЛСТ *S. pneumoniae* [187]

Гены «домашнего хозяйства»	Локус гена
Шикимат дегидрогеназа	<i>aroE</i>
Глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа	<i>gdh</i>
Глюкокиназа	<i>gki</i>
Транскетолаза	<i>recP</i>
Сигнальная пептидаза I	<i>spi</i>
Ксантин фосфорибозилтрансфераза	<i>xpt</i>
D-аланин-D-аланин лигаза	<i>ddl</i>

Каждому уникальному аллелю присваивается номер (в соответствии с порядком открытия), таким образом для каждого изолята определяется специфический профиль, обозначаемый как сиквенс-тип (СТ), представленный аллельным набором всех изучаемых генетических локусов [119, 162]. Также возможно определение клональных комплексов (КК), представляющие собой группы СТ, с 4 общими локусами, также необходим центральный СТ [160, 181].

Благодаря этому возможно сопоставлять СТ *S. pneumoniae*, идентифицированные в разных лабораториях.

1.4 Молекулярно-генетический мониторинг пневмококковой инфекции в условиях вакцинопрофилактики

S. pneumoniae является одним из наиболее важных возбудителей бактериального менингита во всем мире, наряду с *N. meningitidis* и *H. influenzae*, вызывает подавляющее большинство лабораторно подтвержденных случаев бактериальных гнойных менингитов [54, 66]. Понятие инвазивные пневмококковые инфекции включает в себя серьезные заболевания, такие как менингит, бактериемия, пневмония и др. *S. pneumoniae* часто колонизирует носоглотку человека и передается в основном воздушно-капельным путем [82]. Предполагается, что дети младшего возраста являются основным источником этой инфекции с преобладанием назофарингеального носительства с 27% в развитых и до 85% в развивающихся странах. *S. pneumoniae* включает более 90 серотипов. Распределение серотипов, вызывающих заболевание, варьируется в зависимости от возраста, синдрома заболевания, тяжести заболевания, географического региона и времени [48, 184]. До введения пневмококковых конъюгированных вакцин, 6 и 11 серогруппы составляли $\geq 70\%$ от всех инвазивных пневмококковых заболеваний у детей во всем мире [31, 32, 33, 74, 104, 117].

Инвазивная пневмококковая инфекция определяется как заболевание, при котором выделяют возбудителя (*S. pneumoniae*) из тканей и органов, стерильных в норме, таких как кровотоки, или тех, которые являются вторичными при распространении через кровеносное русло. К инвазивным инфекциям относятся, например, менингит или септический артрит [184].

Большинство случаев заболевания являются спорадическими [146]. Вспышки пневмококковой инфекции встречаются редко, но могут возникать в закрытых группах населения, таких как дома престарелых, детские сады или другие учреждения [184]. Однако отмечались крупные вспышки, вызванные серотипом 1 в менингитном поясе Африки [193].

В 2008 году из общего количества смертей детей до 5 лет, составляющим 8,8 млн., ВОЗ оценила, что 476000 были вызваны пневмококковыми инфекциями [83]. Степень заболеваемости и смертность выше в развивающихся странах, чем в промышленно развитых странах, причем большинство смертей приходится на Африку и Азию. Дети с ВИЧ-инфекцией подвергаются значительному риску серьезной пневмококковой болезни [137, 151].

Наиболее тяжелые последствия при пневмококковых менингитах обусловлены наличием пневмолизина в бактериальной клетке, что способствует высокой летальности: от 10% до 60% [173].

До широкого распространения иммунизации 7-валентной пневмококковой конъюгированной вакциной, средняя годовая частота инвазивных заболеваний пневмококковой этиологии у детей в возрасте до 2 лет составляла 44,4 на 100 тыс. детского населения в Европе [101] и 167 на 100 тыс. детского населения в Соединенных Штатах [63].

Также стоит отметить, что частота бактериального менингита снизилась на 55% в Соединенных Штатах в начале 1990-х годов, когда была введена конъюгированная вакцина против *H. influenzae b* для младенцев [161]. Более поздние меры профилактики, такие как введение пневмококковой конъюгированной вакцины [71, 186] и универсальный скрининг беременных женщин на стрептококк группы В, еще больше изменили эпидемиологию бактериального менингита.

Согласно литературным источникам [56], при анализе данных о случаях бактериального менингита в США за период с 1998 по 2007 гг., понятие бактериального менингита было определено, как присутствие *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, стрептококков группы В, *L. monocytogenes* или *N. meningitidis* в спинномозговой жидкости или в другой стерильной при норме области в сочетании с клиническим диагнозом менингита. По итогу данного исследования [56] были получены следующие результаты. При изучении данных, полученных от 3188 пациентов с бактериальным менингитом, этиологически было расшифровано 3155 случаев заболевания, из которых летально закончились 466

(14,8%) случаев. Частота бактериального менингита снизилась на 31% за период наблюдения, от 2,00 случаев на 100 тыс. населения в 1998-1999 годах до 1,38 случаев на 100 тыс. населения в 2006-2007 годах. Медианный возраст пациентов увеличился с 30,3 лет в 1998-1999 годах до 41,9 года в 2006-2007 годах. Летальность существенно не изменилась: она составляла 15,7% в 1998-1999 годах и 14,3% в 2006-2007 годах. Из 1670 случаев, зарегистрированных в течение 2003-2007 гг., преобладали: *S. pneumoniae* (58,0%), за ними следуют стрептококки группы В (18,0%), *N. meningitidis* (13,9%), *H. influenzae* (6,7%) и *L. monocytogenes* (3,4%). По оценкам, в 2003-2007 годах в Соединенных Штатах ежегодно наблюдалось 4100 случаев и 500 случаев смерти от бактериального менингита [56]. Из результатов данного исследования можно сделать вывод о том, что уровни заболеваемости в США за данный период времени снизились, однако, уровень летальности остался неизменным, что говорит об острой социальной важности рассматриваемой проблемы. Также видно, что в периоде с 2003 по 2007 гг. в США лидирующим возбудителем бактериального гнойного менингита являлся *S. pneumoniae* [56].

Важно отметить, что при введении ПКВ7 в США и других странах, частота инвазивных пневмококковых заболеваний снизилась во всех возрастных группах, особенно у детей моложе 2 лет [56, 58, 63, 86, 114, 132, 174, 180]. Это снижение было несколько замедлено увеличением доли не вакцинных серотипов, особенно 19а и 7F [93, 98].

ПКВ13 была введена в 2010 году в США [136]. В литературе имеются данные о результатах анализа влияния ПКВ13 на число госпитализированных пациентов на территории США. Методом ретроспективного анализа данных NIS [135] с 2008-2014 гг. были рассмотрены три периода времени: 2008-2009 (поздний пост-ПКВ7), 2010 (переходный год) и 2011-2014 годы (после ПКВ13). За исследуемый период в США наблюдалось 10493 случая госпитализации из-за пневмококкового менингита. В целом заболеваемость пневмококковым менингитом уменьшилась с 0,62 до 0,38 случаев на 100 тыс. населения за это время. Среди детей младше 2 лет средний годовой процент пневмококкового

менингита снизился на 45% с 2,19 до 1,20 случаев на 100 тыс. населения детей до 2 лет. Заболеваемость снизилась у лиц в возрасте 18-39 лет с 0,25 до 0,15 случаев на 100 тыс. человек и среди лиц 40-64 лет с 0,95 до 0,54 случаев на 100 тыс. человек. В общей сложности 1016 смертей были вызваны пневмококковым менингитом, а уровень летальности был переменным в течение всего периода исследования 8,3% - 11,2% [102]. Как видно из данного исследования, после введения ПКВ13 показатели госпитализации в отношении пневмококкового менингита значительно снизились без последующих улучшений в отношении летальности, как и в предыдущем исследовании.

Согласно исследованию Xianding Deng [78] и др., при анализе изолятов, от детей до 5 лет с инвазивными пневмококковыми инфекциями в Онтарио, Канада с 2007 по 2012 гг. в условиях введения ПКВ13, были получены результаты, свидетельствующие о снижении количества инфекций, вызванных серотипом 19А, который входит в ПКВ13, и при этом закономерно наблюдается смещение в сторону не вакцинных серотипов, например 15 [78].

S. pneumoniae является важным этиологическим агентом бактериального менингита у детей моложе 2 лет во Франции. В литературе присутствуют данные анализа заболеваемости пневмококковым менингитом, в том числе среди детей младше 2 лет за двенадцатилетний период с 2001 по 2012 гг. в условиях применения ПКВ7 и ПКВ13 во Франции [115]. Данные были получены от 227 больниц по всей территории Франции. В рамках данного исследования были получены следующие результаты: с 2001 по 2012 гг. среди 4808 случаев бактериального менингита было зарегистрировано 1406 (29,2%) случаев пневмококкового менингита. После внедрения ПКВ13 с 2009 по 2012 годы количество случаев снизилось на 27,4%. Для детей младше 2 лет снижение составило 28,2%. В 2012 году случаи пневмококкового менингита, обусловленные серотипами, не относящимися к ПКВ13, составляли 67,6% случаев и в основном были представлены серотипами: 12F (15%), 24F (15%), 22F (7%) и 15В/С (7%). Общая летальность составила 10,6%, большинство смертей (86,4%) произошли до 15 дня заболевания. Как видно, внедрение ПКВ13 снизило заболеваемость

пневмококковым менингитом во Франции, особенно, среди детей до 2 лет, однако, наблюдается смещение серотипового пейзажа возбудителя в сторону не вакцинных штаммов [115].

В Германии сообщалось об уровне летальности от пневмококкового менингита среди детей в 7,5% [149], что является серьезной клинической угрозой. В статье Matthias Imöhl и др. [100] рассмотрены изменения серотипового пейзажа штаммов *S. pneumoniae*, приведшие к развитию менингита, после введения в 2006 г. ПКВ для иммунизации детей в возрасте до 2 лет. Была изучена заболеваемость инфекциями, этиологическим агентом которых являлся *S. pneumoniae*, в Германии с 1992 года [100]. Пневмококковые изоляты были серотипированы реакцией Neelleld Quellung. Из 22204 изолятов, полученных с июля 1992 года по июнь 2013 года, 3086 изолятов были получены от пациентов с менингитом, из них 1766 изолятов (57,2%) от взрослых (≥ 16 лет) и 1320 изолятов (42,8%) были выделены от детей (< 16 лет). В целом, ведущие серотипы были представлены следующими: 14 (9,7%), 7F (7,8%), 3 (6,9%), 19F (5,7%) и 23F (5,0%). Среди штаммов, приведших к менингиту у детей, наиболее распространенными были серотипы 14 (16,2%), 7F (8,9%) и 19F (7,1%), тогда как среди штаммов, приведших к менингиту у взрослых – 3 (9,6%), 7F (6,9%), 22F (5,0%), 23F (4,9%) и 14 (4,8%). После введения общей вакцинации против пневмококковой инфекции наблюдалось значительное снижение большинства циркулирующих вакцинных серотипов. Как видно, внедрение пневмококковых конъюгированных вакцин сократило случаи менингита, вызванного штаммами вакцинного типа, однако, изменения серотипового пейзажа должно постоянно контролироваться для определения будущих тенденций пневмококкового менингита [100].

В Англии и Уэльсе наблюдалась следующая ситуация относительно инвазивных пневмококковых инфекций [141, 165]. За период с сентября 2006 года по март 2010 года было зафиксировано в общей сложности 1342 случая инвазивных пневмококковых заболеваний у 1332 детей, 14,9% из них (198) имели сопутствующие заболевания. Количество сопутствующих заболеваний при

инвазивных пневмококковых заболеваниях, вызванных серотипами, входящими в ПКВ7, составило 44 (17,7% от всех, вызванных серотипами, входящими в ПКВ7), сопутствующие заболевания были менее распространены для дополнительных 3 серотипов, входящих в ПКВ10 (5,0%), но аналогичны 3 дополнительным серотипам ПКВ13 (13,4%) и увеличились для 11 дополнительных серотипов в ППВ23 (21,0%). 52 (3,9%) случая были результатом отказа от вакцинации; 9 (0,7%) пациентов имели рецидивирующие инвазивные пневмококковые заболевания. Летальность была на уровне 4,4% (58), но выше в случае развития менингита (11,0%) и у детей с сопутствующими заболеваниями (9,1%). Таким образом, сопутствующие заболевания были более распространены у детей с инвазивными пневмококковыми инфекциями, вызванными серотипами, не входящими в ПКВ13, и повышали летальность [59, 165].

Введение 7-валентной пневмококковой конъюгированной вакцины в программу иммунизации детей в Норвегии в 2006 году существенно снизило частоту инвазивной пневмококковой инфекции вакцинного типа во всех возрастных группах [73, 153]. Кроме того, наблюдалось небольшое увеличение частоты не вакцинных серотипов. После замены ПКВ7 на ПКВ13 в 2011 году ожидалось дальнейшее снижение частоты инвазивных пневмококковых заболеваний. Тем не менее, ввод дополнительных 6 серотипов в вакцины приведет к освобождению ниш для колонизации не вакцинными штаммами [117].

Как и в других странах, в Испании наблюдалось смещение серотипов в сторону не вакцинных после введения ПКВ7 [130]. Введение ПЦР в реальном времени с целью специфической идентификации капсулярной ДНК методом исследования образца напрямую позволило ускорить постановку диагноза и упростить надзор за пневмококковыми инвазивными заболеваниями в Испании [129]. В рамках трехгодичного исследования случаев инвазивной пневмококковой инфекции в Барселоне (январь 2007 года – декабрь 2009 года), были проведены исследования 300 образцов, полученных от пациентов с инвазивными пневмококковыми заболеваниями. Наиболее частыми серотипами были 1 (20,7%), 19А (15,7%) и 3 (12,3%). А заболеваемость увеличилась на 44% с 76,2 до 109,9

случаев на 100 тыс. населения [164]. Также в Испании, за период 1998-2006 гг. было зарегистрировано 770 случаев лабораторно подтвержденного пневмококкового менингита у детей до 14 лет. Средняя продолжительность госпитализации составила 14,7 дней [144].

Ежегодная заболеваемость инвазивными пневмококковыми инфекциями среди детей до 2 лет в Африке составила от 60 (в Южной Африке до эпидемии ВИЧ) до 797 случаев на 100 тыс. населения (в Мозамбике) [75, 108]. Некоторые из различий можно было объяснить качеством лабораторной диагностики и качеством проведения эпиднадзора, однако, заболеваемость в Африке, как видно, в целом выше, чем в Европе или Северной Америке [184].

С 2000 года некоторые страны Африки в «менингитном поясе», включая Буркина-Фасо, Чад и Гану, регистрировали вспышки пневмококкового менингита с совокупными показателями заболеваемости в одном районе, 100 на 100 тыс. населения [99, 113]. В Гане сообщалось о крупных вспышках в декабре 2015 г. и апреле 2016 г. [189]. *S. pneumoniae* был преобладающим возбудителем, выделенным в нескольких районах региона Бронг Ахафо (рядом с «менингитным поясом»), где было зарегистрировано более 1000 случаев. Эта ситуация вызвала вопросы о применении пересмотренного руководства по реагированию на вспышки менингита в Африке, к югу от Сахары, в связи с преобладанием случаев пневмококковой этиологии [190].

Заболеваемость в сухой сезон в десять раз выше, чем в сезон дождей, пневмококковый менингит регистрируется у детей старшего возраста и молодых людей в 8 раз чаще в сравнении с остальным населением [89, 113]. С 2004 по 2013 годы *S. pneumoniae* был обнаружен в более 4000 случаях бактериального менингита в менингитном поясе, что составляет 27% из всех подтвержденных случаев [123]. Учитывая, что лишь в небольшом числе подозрительных случаев проводился отбор цереброспинальной жидкости и что лабораторная диагностика часто затруднена, истинное число случаев, вероятно, будет намного выше [190].

На территории Российской Федерации в 2017 году показатель заболеваемости пневмококковым менингитом составил 0,25 на 100000 населения

(на основании лабораторно подтвержденных случаев) [29]. В период с 2010 по 2017 он колебался от 0,17 (2011 г) до 0,25 (2017 г), что можно связать с увеличением уровней выявляемости и этиологической расшифровки. При оценке заболеваемости по возрастным группам, наибольший уровень отмечается среди детей до 5 лет – 0,6 на 100 тыс. населения, а в данной возрастной группе наибольшее число случаев среди детей до 1 года. Сезонность отсутствует, пневмококковый менингит регистрируется равномерно в течение года. Из детского населения чаще болели неорганизованные дети, а среди взрослого населения – не работающие и пенсионеры. Среди лиц мужского пола заболеваемость была выше в 1,5 раза, чем среди женского, а городские жители болели в 1,6 раза чаще сельских. В 2017 году летальность от пневмококкового менингита в Российской Федерации составила 22%. Самые высокие показатели летальности были среди лиц от 45 до 64 лет и от 65 лет и старше. Среди детей до 5 лет показатель летальности составлял 17%, однако, среди детей до 1 года он составил 32%. Наибольший показатель смертности отмечен среди детей до 5 лет, в 2015 г. он составил 0,1 на 100 тыс. населения, средний уровень смертности от пневмококкового менингита в Российской Федерации составил 0,04 на 100 тыс. населения [27, 28, 29, 30, 31].

Согласно данным литературы [28, 178], на территории Российской Федерации до включения ПКВ в национальный календарь профилактических прививок, наиболее распространенными серотипами возбудителей, вызывающих пневмококковые инвазивные заболевания, были: 6В, 14, 19F и 23F. Получение изолятов было затруднено отсутствием в рутинной практики взятия крови на культуральный посев и ранним началом антибиотикотерапии до поступления в больницу. Однако, как и в других странах, среди данных изолятов чаще всего наблюдались 19F (25%) и 14 (19%). Во многих исследованиях был отмечен серотип 3, который превысил 10% случаев. В 1980-1990 годах этот серотип встречался реже и был связан с осложненной пневмонией. В отличие от наблюдений из других стран, серотип 1 почти отсутствовал в результатах исследований [28, 178].

В Российской Федерации вакцинация от пневмококковой инфекции включена в национальный календарь профилактических прививок для детей по схеме 2-6-15 месяцев [43]. Вакцинация детей, не прошедших иммунопрофилактику против пневмококковой инфекции в первые 6 месяцев жизни, проводится дважды с интервалом между вакцинациями не менее 2 месяцев. Также вакцинация от пневмококковой инфекции включена в календарь профилактических прививок по эпидемическим показаниям для детей в возрасте от 2 до 5 лет, взрослых из групп риска, включая лиц, подлежащих призыву на военную службу, а также лиц старше 60 лет, страдающих хроническими заболеваниями легких [43].

Для проведения вакцинации от пневмококковой инфекции используют вакцины различной валентности. Пневмококковая конъюгированная 7-валентная вакцина в настоящее время не производится, применялась ранее в отдельных регионах не для массовой иммунизации. В ее состав входили полисахариды 7 серотипов пневмококка (4, 6В, 9V, 14, 18С, 19F и 23F), конъюгированные с белком-носителем CRM197, адсорбированные на фосфате алюминия. Белковый конъюгат является генно-модифицированной нетоксичной формой дифтерийного анатоксина. В качестве вспомогательных веществ использовались натрия хлорид и вода для инъекций. Вакцина не содержала консерванта [32].

В настоящий момент в Российской Федерации зарегистрированы следующие пневмококковые конъюгированные вакцины. Пневмококковая конъюгированная 10-валентная вакцина включает в себя полисахариды 10 серотипов пневмококка (1, 4, 5, 6В, 7F, 9V, 14, 18С, 19F и 23F), конъюгированные с D-протеином нетипируемой *Haemophilus influenzae* (серотипы 1, 4, 5, 6В, 7F, 9V, 14, 23F), с дифтерийным (серотип 19F) и со столбнячным (серотип 18С) анатоксинами в качестве белков-носителей, адсорбированных на фосфате алюминия. Вспомогательными веществами являются натрия хлорид и вода для инъекций. Вакцина без консерванта. Пневмококковая конъюгированная 13-валентная вакцина (ПКВ13) содержит полисахариды 13 серотипов пневмококка (1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 9V, 14, 18С, 19А, 19F и 23F), индивидуально

конъюгированные с белком-носителем CRM197, адсорбированным на фосфате алюминия. Белковый конъюгат является генномодифицированной нетоксичной формой дифтерийного анатоксина. В роли вспомогательных веществ используют – алюминия фосфат, натрия хлорид, янтарная кислота, полисорбат 80, вода для инъекций. Вакцина не содержит консервант [8].

В литературе имеются сведения об экономической эффективности внедрения пневмококковых конъюгированных вакцин. Так, в США было установлено, что в большинстве случаев, использование ПКВ13 предпочтительнее использования ППВ23 [167]. Также для лиц с ослабленным иммунитетом применение ПКВ13 является более рентабельным, чем предыдущие рекомендации по вакцинации [168]. В Нидерландах применение ПКВ13 так же показало высокую экономическую целесообразность [121]. В Хорватии, согласно предварительным исследованиям, ПКВ10 и ПК13 будут иметь экономическую эффективность при стоимости дозы менее 20 долларов [182].

По результатам МЛСТ, представленным в современной литературе, а так же в международных базах данных, можно сделать вывод о клональности циркулирующих штаммов *S. pneumoniae*, которая особенно выражена среди штаммов *S. pneumoniae*, имеющих устойчивость к антибиотикам [116].

В настоящее время активно функционирует Global Pneumococcal Sequencing Project – международный проект, посвященный глобальному секвенированию штаммов *S. pneumoniae*, поступающих со всего мира. Данный проект основан такими организациями, как: Emory & CDC, Atlanta, USA; Wellcome Trust Sanger Institute, Cambridge, UK; MRC, Baku, The Gambia; MLW, Blantyre, Malawi; National Institute for Communicable Disease, Johannesburg, South Africa в ассоциации с 30 организациями по всему миру.

В рамках данного проекта опубликованы работы, в которых отражены данные о глобальном распространении серотипа 35D, после введения ПКВ13, о популяционной динамике дивергентных штаммов *S. pneumoniae* 3 серотипа, входящих в КК 180 [55, 175]

В литературе имеются данные о МЛСТ штаммов *S. pneumoniae* представленные по отдельным странам. Так, среди изолятов *S. pneumoniae*, изученных в Тегеране (Иран), были идентифицированы 6 клонов, устойчивых к пенициллину и имеющих распространение по всему, в которых преобладали следующие СТ: Spain^{23F-1} (СТ81), Spain^{6B-2} (СТ 90) и Spain^{9V-3} (СТ156) [177].

Исследование СТ штаммов *S. pneumoniae*, полученных от детей в возрасте от 1 до 12 лет в Китае, показало, что преобладающими СТ были СТ271 (23,5%), СТ 320 (21,6%) и СТ876 (11,8%), а так же большинство изолятов *S. pneumoniae* были устойчивы к эритромицину (95,1%) и клиндамицину (90,2%) [125].

В результате исследования штаммов *S. pneumoniae*, выделенных от детей до 5 лет на территории Чешской Республики, были получены следующие данные. Все изоляты 1 серотипа относились к одному СТ306, что характерно для серотипа 1. Аналогично, серотип 14 был представлен СТ124. Серотип 3 имеет высокую гетерогенность, что выражено в высоком числе СТ, в которые он входит. Также был идентифицирован клональный комплекс, включающий в себя СТ505 и СТ124. СТ124 был впервые зарегистрирован в мире для штамма *S. pneumoniae* 3 серотипа.

В литературных источниках присутствует большое число работ, посвященных исследованиям генетического разнообразия штаммов *S. pneumoniae*, на территории Российской Федерации [2, 5, 34, 37, 39, 44, 46, 47, 51, 148].

Так, при изучении 76 штаммов *S. pneumoniae*, имеющих устойчивость к макролидам, было обнаружено 2 клональных комплекса: КК 81 и КК 271, в которые входили штаммы одновременно с 2 генами устойчивости [148].

При исследовании методом МЛСТ штаммов *S. pneumoniae* со сниженной чувствительностью к пенициллину, из различных регионах России было показано, что устойчивость к пенициллину штаммов *S. pneumoniae*, связана преимущественно с распространением глобальных и множественно-устойчивых клональных комплексов [46].

В результате генотипирования штаммов *S. pneumoniae*, выделенных от детей с острым средним гнойным отитом, было определено преобладание СТ,

относящихся к широко распространенному мультирезистентному КК 320, образованному СТ 271, СТ 1464 и СТ 320, данные штаммы имели множественную устойчивость к антибактериальным препаратам: пенициллину, макролидам, клиндамицину и тетрациклину. Родоначальником данного КК считается мультирезистентный клон Taiwan^{19F}, который на данный момент имеет распространение по всему миру [44]. Факт того, что в клональной структуре мультирезистентных штаммов *S. pneumoniae*, преобладают изоляты КК 320 был подтвержден в работе М.А. Лазаревой [34]. В работе Н.А. Маянского с соавт, было показано, что 31% изученных штаммов *S. pneumoniae*, имеющих множественную лекарственную устойчивость относят к КК 320 [37].

Сотрудниками ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора были проведены исследования, направленные на геноидентификацию и филогенетический анализ результатов МЛСТ штаммов возбудителей БГМ, в том числе *S. pneumoniae*, а так же штаммов возбудителей, выделенных от здоровых носителей. Результаты данных исследований продемонстрировали широкую гетерогенность популяции *S. pneumoniae*, а так же тесное филогенетическое родство штаммов, что говорит о необходимости регулярного мониторинга за популяцией циркулирующих штаммов *S. pneumoniae* с целью оперативного выявления мутаций и смен серотипов [2, 5, 51].

В результате научной деятельности С.В. Сидоренко с соавт. была охарактеризована популяционная структура *S. pneumoniae* со сниженной чувствительностью к пенициллину. Из полученных в результате научных изысканий результатов, допустимо сделать выводы о выраженной клональности среди изолятов со сниженной чувствительностью к пенициллину, а так же о правильности принятых управленческих решений относительно включения ПКВ в национальный календарь профилактических прививок [47].

В результате проведенной работы К.О. Миронова по изучению штаммов *S. pneumoniae*, выделенных от больных ГБМ, был сделан вывод об отсутствии преобладающего сероварианта *S. pneumoniae*, циркулирующего на территории Российской Федерации, а так же об отсутствии преобладающего сероварианта

S. pneumoniae, обуславливающего ГБМ на территории Российской Федерации [39].

1.5 Заключение по обзору литературы

S. pneumoniae продолжает оставаться одним из ведущих и эпидемически значимых патогенов, вызывающим целый спектр заболеваний: пневмонию, менингит, бактериемию, острый отит. Пневмококки являются генетически крайне разнообразным и изменчивым видом, способным быстро адаптироваться к условиям окружающей среды.

Для выявления возбудителя могут использоваться различные методы идентификации от классических до МЛСТ, что позволяет производить мониторинг изменений серотипового пейзажа *S. pneumoniae*, в частности, в условиях вакцинопрофилактики. Наиболее широко для этого используется метод ПЦР-серотипирования, однако, на данный момент необходим пересмотр имеющихся протоколов ПЦР-серотипирования с учётом циркулирующих штаммов.

Одним из основных эффективных методов в профилактике пневмококковых инфекций является вакцинация. Основной сложностью этого подхода является то, что все существующие вакцины серотипспецифичны, то есть необходимо постоянное исследование серотипового состава популяции каждого отдельно взятого региона перед принятием решения о включении той или иной вакцины в календарь прививок и оценки ее эффективности. Так, согласно последним данным литературы, в зарубежных странах (США, Израиль, Англия и др.), где вакцинация проводилась на протяжении периода от 5 лет и более наблюдается значительное снижение доли вакцинных серотипов и, соответственно, увеличение доли серотипов, ранее крайне редко встречавшихся в популяции. Все вышеперечисленные факты говорят о необходимости постоянного мониторинга изменений в составе популяции *S. pneumoniae* с последующим принятием управленческих решений в отношении применения вакцин с более широким составом серотипов.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

ГЛАВА 2. 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*.

Модификация протокола мПЦР с детекцией в агарозном геле была проведена на основе использования ранее разработанных протоколов мПЦР [72, 112, 187]. Модификация протокола мПЦР с детекцией в агарозном геле заключалась в следующем:

1. Созданы четыре комбинации праймеров, обеспечивающие специфичность реакций с исключением перекрестных и ложноположительных результатов;
2. Подобрано оптимальное соотношение праймеров, позволяющее получать ампликоны разных размеров для их одновременного выявления при электрофоретической детекции;
3. Оптимизирован состав реакционной смеси;
4. Оптимизированы условия амплификации;
5. При проведении реакций предусмотрено поэтапное исключение проб, для которых был положительно идентифицирован серотип в предыдущей реакции;
6. Проведение четырех реакций серотипирования в настоящее время 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.

Выделение ДНК из СМЖ осуществлялось с использованием готового набора для выделения QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen, США). В работе применялся протокол производителя с частичной модификацией, предложенной Урбан Ю.Н. [51].

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 5X (New England Biolabs, Англия); 5 мкл ДНК исследуемой пробы; праймеры с концентрацией 20 мМ, серотип 8 5'-GAA GAA ACG AAA CTG TCA GAG CAT TTA CAT-3' и 5'-GAA GAA ACG AAA CTG TCA GAG CAT TTA CAT-3'; серогруппа 15 5'-TTG GAA TTT TTT AAT TAG TGG CTT ACC TA-3' и 5'-CAT CCG CTT ATT AAT TGA AGT AAT CTG AAC C-3'; серотип 38 и серогруппа 25 5'-CGT TCT TTT ATC TCA CTG TAT AGT ATC TTT ATG-3' и 5'-ATG TTT GAA TTA AAG STA ACG TAA CAA TCC-3'; серотип 35В 5'-GAT AAG TCT GTT GTG GAG ACT TAA AAA GAA TG-3' и 5'-CTT TCC AGA TAA TTA CAG GTA TTC CTG AAG CAA G-3'; вода для ПЦР до 25 мкл;

Реакция В: 5 мкл готовой смеси для мультиплексной ПЦР 5X (New England Biolabs, Англия); 5 мкл ДНК исследуемой пробы; праймеры с концентрацией 20 мМ, серотип 39 5'-TCA TTG TAT TAA CCC TAT GCT TTA TTG GTG-3' и 5'-GAG TAT CTC CAT TGT ATT GAA ATC TAC CAA-3'; серогруппа 10 и серотип 33С 5'-GGA GTT TAT CGG TAG TGC TCA TTT TAG CA-3' и 5'-СТА АСА ААТ ТСГ САА САС GAG GCA АСА-3'; серотипы 35F и 47F 5'-GAA CAT AGT CGC TAT TGT ATT TTA TTT AAA GCA A-3' и 5'-GAC TAG GAG CAT TAT TCC TAG AGC GAG TAA ACC-3'; серотип 10А 5'-GGT GTA GAT TTA CCA TTA GTG TCG GCA GAC-3' и 5'-GAA TTT CTT CTT TAA GAT TCG GAT ATT TCT C-3'; серотип 17F 5'-TTC GTG ATG ATA ATT CCA ATG ATC AAA CAA GAG-3' и 5'-GAT GTA АСА ААТ ТТГ ТАГ СГА СТА АГГ ТСТ GC-3'; вода для ПЦР до 25 мкл;

Реакция С: 5 мкл готовой смеси для мультиплексной ПЦР 5X (New England Biolabs, Англия); 5 мкл ДНК исследуемой пробы; праймеры с концентрацией 20 мМ, серотип 23В 5'-ССА САА ТТА G CG СТА ТАТ ТСА TTC ААТ CG-3' и 5'-GTC САС GCT GAA TAA ААТ GAA GCT CCG-3'; серогруппа 35 и серотип 42 5'-АТТ АСГ АСТ ССТ ТАТ GTG АСГ СGC АТА-3' и 5'-ССА АТС ССА АГА ТАТ АТГ САА СТА GGT T-3'; серотип 34 5'-GCT TTT GTA АГА GGA GAT ТАТ TTT САС ССА АС-3' и 5'-САА ТСС GAC TAA GTC TTC АГТ ААА ААА СТТ ТАС-3'; серогруппа 9 5'-GAA CTG ААТ ААГ ТСА GAT TTA АТС АСГ-3' и 5'-ACC ААГ АТС TGA СGG GCT ААТ САА T-3'; серотип 31 5'-GGA АГТ TTT САА GGA ТАТ GAT АГТ GGT GGT GC-3' и 5'-CCG ААТ ААТ АТА TTC ААТ АТА TTC СТА СТС-3'; вода для ПЦР до 25 мкл;

Реакция D: 5 мкл готовой смеси для мультиплексной ПЦР 5X (New England Biolabs, Англия); 5 мкл ДНК исследуемой пробы; праймеры с концентрацией 20 мМ, серогруппа 24 5'-GCT CCC TGC ТАТ TGT ААТ СТТ ТАА АГА G-3' и 5'-GTG ТСТ TTT АТТ GAC TTT АТС АТА GGT СGG-3'; серотип 21 5'-СТА TGG TTA TTT САА СТС ААТ СGT САС С-3' и 5'-GGC ААА СТС АГА САТ АГТ АТА GCA TAG-3'; серогруппа 7 и серотип 40 5'-СТА ТСТ САГ ТСА ТСТ АТТ GTT ААА GTT ТАС GAC GGG A-3' и 5'-GAA САТ АГА TGT TGA GAC АТС TTT TGT ААТ TTC-3';

серотип 20 5'-GAG CAA GAG TTT TTC ACC TGA CAG CGA GAA G-3' и 5'-CTA AAT TCC TGT AAT TTA GCT AAA ACT CTT ATC-3'; серотип 13 5'-TAC TAA GGT AAT CTC TGG AAA TCG AAA GG-3' и 5'-CTC ATG CAT TTT ATT AAC CG C TTT TTG TTC-3'; вода для ПЦР до 25 мкл.

Объемы праймеров, используемых в реакциях А, В, С, D, представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Объем праймеров, используемых в модифицированном протоколе мПЦР с детекцией в агарозном геле

Реакция А	ml	Реакция В	ml	Реакция С	ml	Реакция D	ml
cps F	0,1						
cps R	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
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 в течение 45 с, 56°C в течение 1 мин и 72°C в течение 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%.

Серотипы и серогруппы, определяемые с применением модифицированной схемы мПЦР с детекцией в агарозном геле и распределенные по 4 реакциям, представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Модифицированная схема проведения мПЦР серотипирования *S. pneumoniae* с детекцией в агарозном геле

Реакция	Включенные серотипы
А	8, 15B/C, 38/25F/25A, 35B
В	39, 10F/10C/33C, 35F/47F, 10A, 17F
С	23B, 35A/35C/42, 34, 9L/9N, 31
D	24B/24F, 21, 7C/7B/40, 20, 13

В таблице 11 представлены серотипы и серогруппы *S. pneumoniae* и их гены-мишени с указанием размера конечного продукта (пары нуклеотидов (п.н.))

Таблица 11 – 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
9N/9L						516	
10A			628				
10F/(10C/33C)						248	
13						655	
15B/15C							496
17F		693					
20	514						
21						192	
23B						199	
24A/24B/24F							99
31							701
34							408
35A/35C/42						280	
35B				677			
35F/47F							517
38/25F							574
39							98

Как следует из данной таблицы: геном-мишенью серогруппы 7C/(7B/40) является *wcwL*, а продукт реакции имеет размер 260 п.н.; за 8 серотип ответственен ген-мишень *wzy*, который так же ответственен за следующие серотипы и серогруппы: 15B/15C, 24A/24B/24F, 31, 34, 35F/47F, 38/25F, 39 продукты данных реакций имеют размер: 201, 496, 99, 701, 408, 517, 574 и 98 п.н. соответственно; серогруппа 9N/9L имеет ген-мишень *wzx*, также этот ген-мишень соответствует следующим серотипам и серогруппам: 10F/(10C/33C), 13, 21, 23B, 35A/35C/42, продукты данных реакций имеют следующий размер: 516, 248, 655, 192, 199 и 280 п.н. соответственно; серотип 10A имеет ген-мишень *wcrG*, размер продукта реакции составляет 628 п.н.; ген-мишень *wciP* соответствует серотипу 17F, продукт реакции имеет размер 693 п.н.; за 20 серотип ответственен ген-

мишень *wciL* с продуктом реакции размером 514 п.н.; серотип 35В имеет ген-мишень *wcrH*, а продукт реакции размер 677 п.н.

Результаты электрофоретической детекции всех определенных с применением модифицированного протокола мПЦР, в рамках настоящей работы, серотипов и серогрупп (8, 15В/15С, 31, 24В/24F, 21, 13), представлены на рисунке 2.

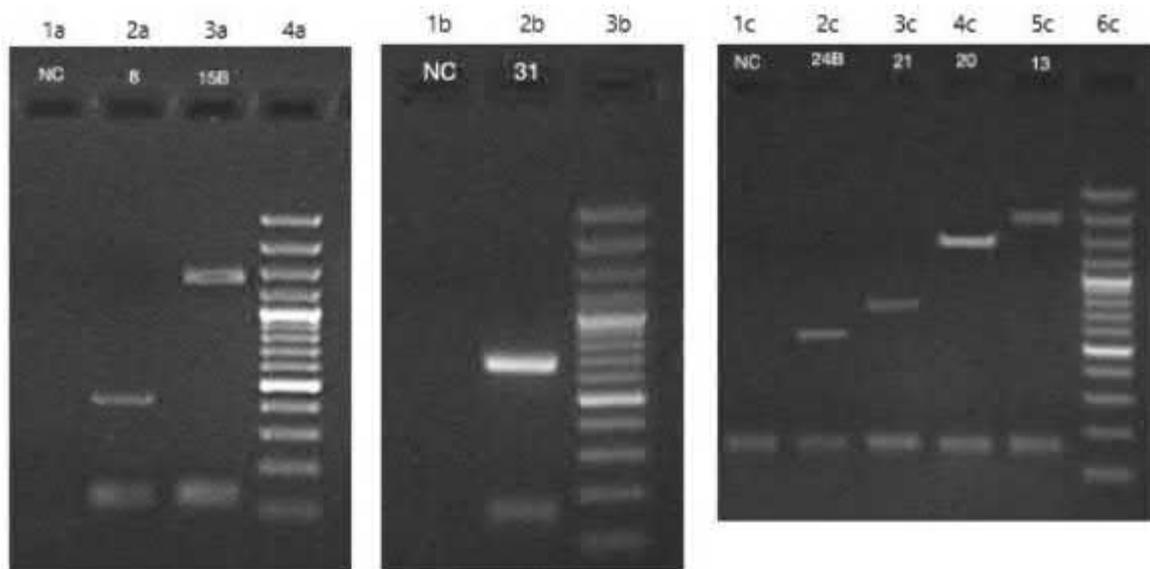


Рисунок 2 – Результаты электрофоретической детекции в агарозном геле продуктов реакций ПЦР-серотипирования с применением модифицированного протокола

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

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 (Рисунок 3).

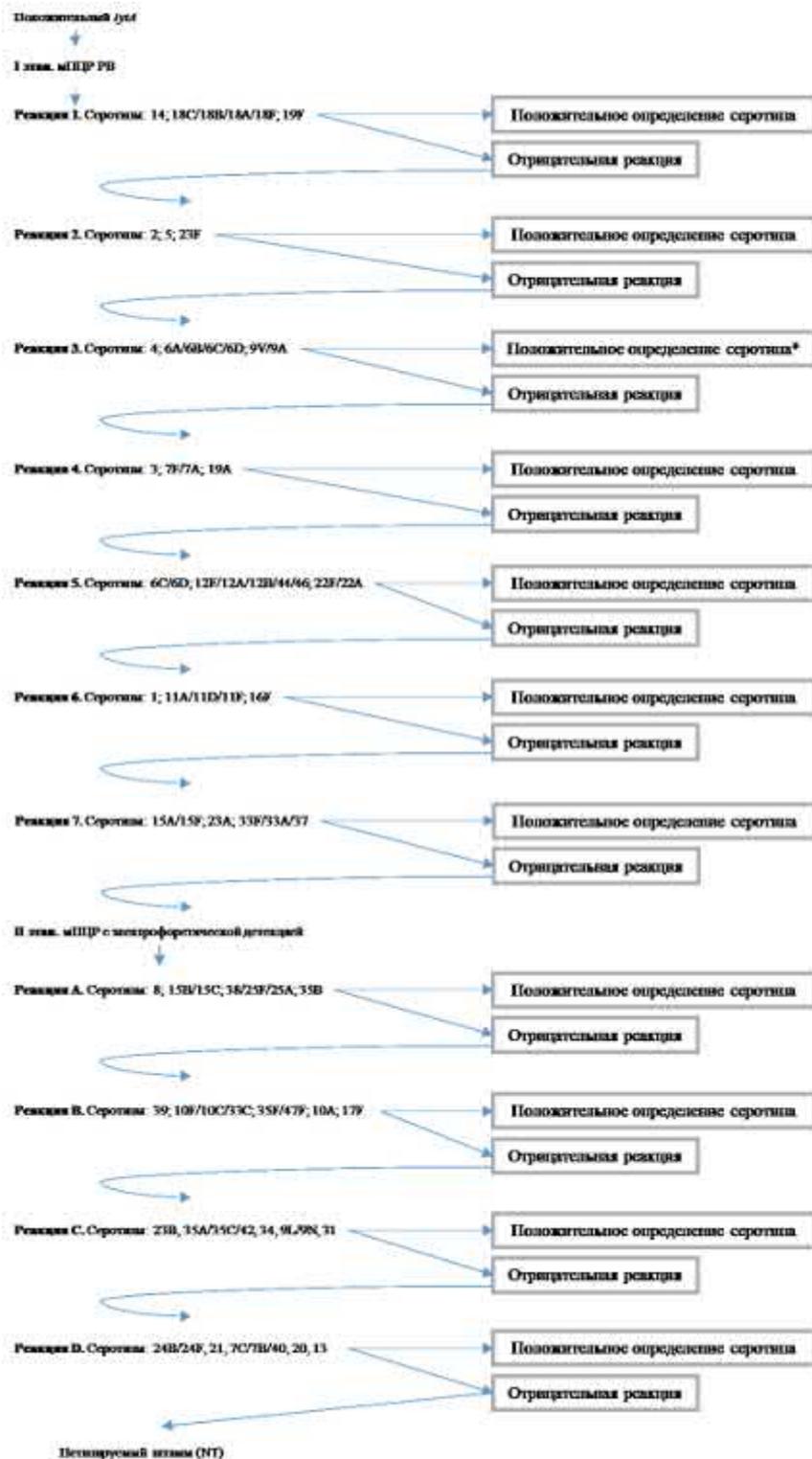


Рисунок 3 – Двухэтапный алгоритм ПЦР-серотипирования *S. pneumoniae*

Примечание:

* - в случае определения серогруппы 6, необходимо провести реакцию №5

Первый этап разработанного алгоритма ПЦР-серотипирования *S. pneumoniae* основан на схеме мПЦР РВ [72] и состоит из 7 реакций. Реакция 1 позволяет идентифицировать серотипы 14 и 19F и серогруппу 18. В случае отсутствия положительного определения серотипа в данной реакции необходимо перейти к следующей. Реакция 2 позволяет определить серотипы: 2; 5; 23F. В случае отсутствия положительного определения серотипа в этой реакции необходимо перейти к следующей. Реакция 3 позволяет определить серотип 4, 6 и 9 серогруппы. При положительном определении 6 серогруппы, необходимо перейти к 5 реакции, и в случае отсутствия положительного определения серотипа в этой реакции необходимо перейти к следующей. Реакция 4 позволяет определить 3 и 19A серотипы, а так же серогруппу 7. В случае отсутствия положительного определения серотипа в этой реакции необходимо перейти к следующей. Реакция 5 позволяет определить серогруппы 6, 12, 22 и серотипы 44 и 46. В случае отсутствия положительного определения серотипа в этой реакции, необходимо перейти к следующей. Реакция 6 позволяет определить серотипы 1 и 16F и серогруппу 11. В случае отсутствия положительного определения серотипа в данной реакции необходимо перейти к следующей. Реакция 7 позволяет определить серогруппы 15 и 33 и серотипы 23A и 37. В случае отсутствия положительного определения серотипа в данной реакции необходимо перейти ко второму этапу.

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

В основе второго этапа разработанного алгоритма ПЦР-серотипирования *S. pneumoniae* лежит модифицированный протокол мПЦР с детекцией в агарозном геле, состоящий из 4 реакций. Реакция А позволяет определить серотипы 8, 35В и 38 и серогруппы 15 и 25. В случае отсутствия положительного определения

серотипа в данной реакции необходимо перейти к следующей. Реакция В позволяет определить серотипы 39, 33С, 35F, 47F, 10А и 17F и серогруппу 10. В случае отсутствия положительного определения серотипа в этой реакции необходимо перейти к следующей. Реакция С позволяет определить серотипы 23В, 42, 34 и 31 и серогруппы 9 и 35. В случае отсутствия положительного определения серотипа в данной реакции необходимо перейти к следующей. Реакция D позволяет определить серотипы 21, 40, 20, 13 и серогруппы 7 и 24.

Как следует из этого, 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.

2.1 Заключение к Главе 2

Таким образом, модификация протокола мПЦР с детекцией в агарозном геле заключается в создании четырех комбинаций праймеров, оптимизации состава реакционной смеси и условий амплификации, обеспечивающих специфичность реакций с исключением перекрестных и ложноположительных результатов и позволяющих получать ампликоны разных размеров для их одновременного выявления при электрофоретической детекции.

Разработанный двухэтапный алгоритм ПЦР-серотипирования *S. pneumoniae*, заключающийся в поэтапном исключении проб, для которых был положительно идентифицирован серотип в предыдущей реакции, позволяет выявлять следующие серотипы и серогруппы: на первом этапе – 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, на втором этапе – 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.

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.

ГЛАВА 3. 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 так же 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 были включены Республика Беларусь и Украина; в Закавказский подрегион вошли: Азербайджанская Республика, Республика Армения и Грузия.

При исследовании проб СМЖ (n = 3303, 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 случаях (78%).

В 22% случаев не удалось определить серотипы и серогруппы *S. pneumoniae* при проведении реакций типирования ПЦР РВ и мПЦР согласно применяемой схеме, позволяющей идентифицировать 40 наиболее распространенных серотипов, и они были отнесены к категории нетипируемых образцов. По всей вероятности, их составляют серотипы *S. pneumoniae*, не включенные в состав применявшейся схемы реакций ПЦР-серотипирования. У 2% *lytA* положительных образцов не были определены серогруппы и серотипы, и они были отнесены к нетипированным из-за малого количества ДНК материала, недостаточного для проведения всех этапов ПЦР-серотипирования.

Таким образом, в ходе работы было выявлено всего 27 серогрупп и серотипов *S. pneumoniae*. Среди общего количества исследованных проб СМЖ, содержащих *S. pneumoniae* ($n = 195$, 100%), 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%.

С территории Азиатского подрегиона было получено 36 (100%) проб СМЖ, содержащих *S. pneumoniae*, среди них преобладали следующие серотипы: 6А/6В – 10 (27,8±7,5%); 14 – 6 (16,7±6,2%) Число штаммов *S. pneumoniae*, выявленных в данном подрегионе, входящих в состав ПКВ10 и ПКВ13, составило 27 (75±7,2%). Процент проб, содержащих видовой маркер *S. pneumoniae*, в которых не удалось определить серотип, составил 22,7%.

Из Европейского подрегиона были получены 64 (100%) пробы СМЖ, содержащие *S. pneumoniae*, среди них преобладали следующие серотипы: 6А/6В – 16 (25,0±5,4%); 14 – 7 (10,9±3,9%); 23F – 7 (10,9±3,9%) Число штаммов *S. pneumoniae*, выявленных в данном подрегионе, входящих в состав ПКВ10 и ПКВ13, составило 42 (65,6±5,9%). Процент проб, содержащих видовой маркер *S. pneumoniae*, в которых не удалось определить серотип, составил 20,3%.

С территории Закавказского подрегиона было получено 95 (100%) проб СМЖ, содержащих *S. pneumoniae*, среди них преобладали следующие серотипы: 14 – 16 (16,8±3,8%); 6А/6В – 11 (11,6±3,3%); 19F – 9 (9,5±3,0%). Число штаммов *S. pneumoniae*, входящих в состав ПКВ10, составило 49 (51,6±5,1%), в состав ПКВ13 – 56 (58,9±5,0%). Процент проб, содержащих видовой маркер *S. pneumoniae*, в которых не удалось определить серотип, составил 23,2%.

Вышеперечисленные данные отражены графически, с учетом покрытия ПКВ10 и ПКВ 13, на рисунках 4 – 7.

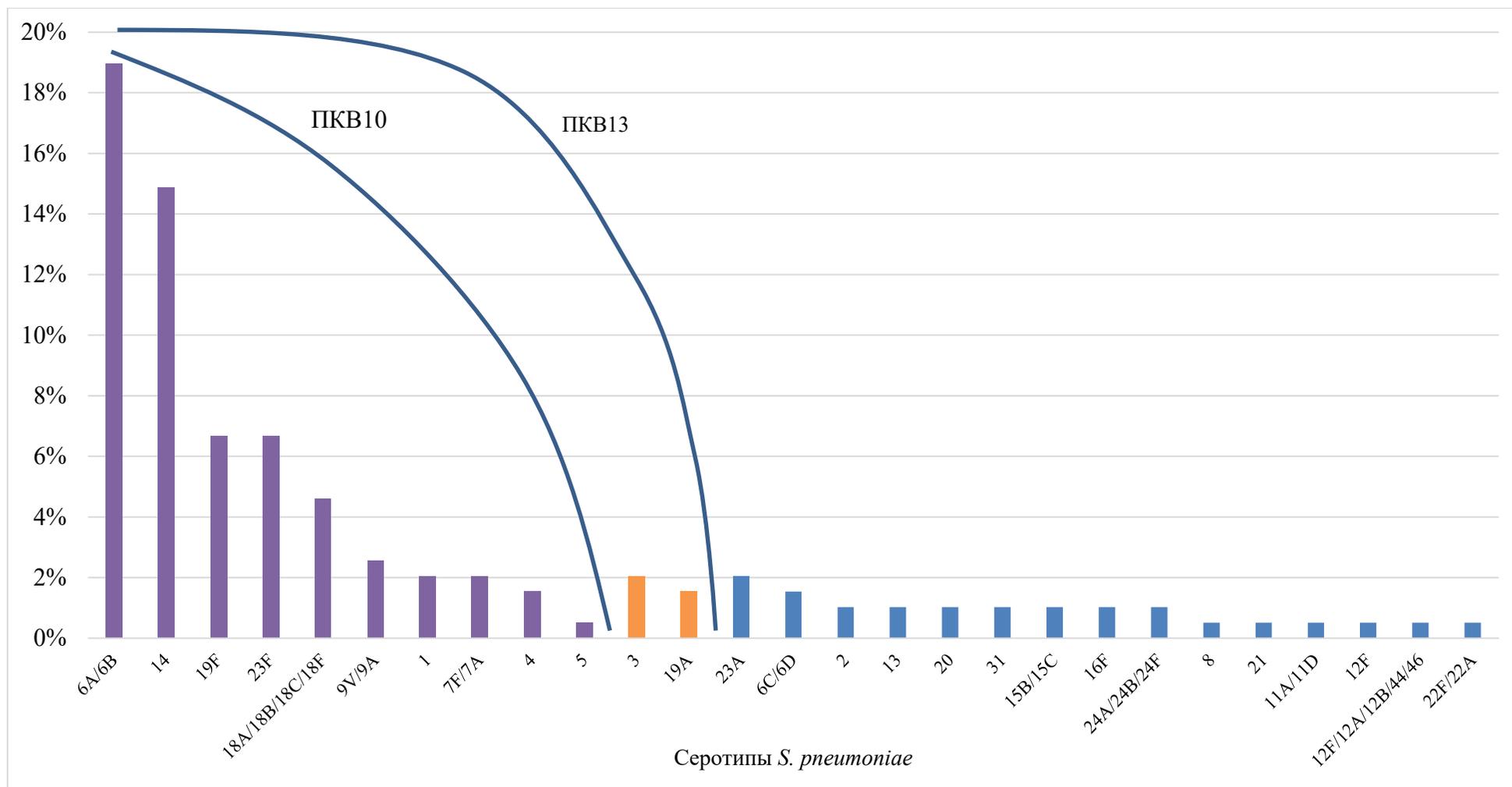


Рисунок 4 – Удельный вес серотипов *S. pneumoniae*, вызвавших менингит среди детей до 5 лет на всех исследованных территориях в период с 2010 по 2017 гг., в соответствии с покрытием ПКВ

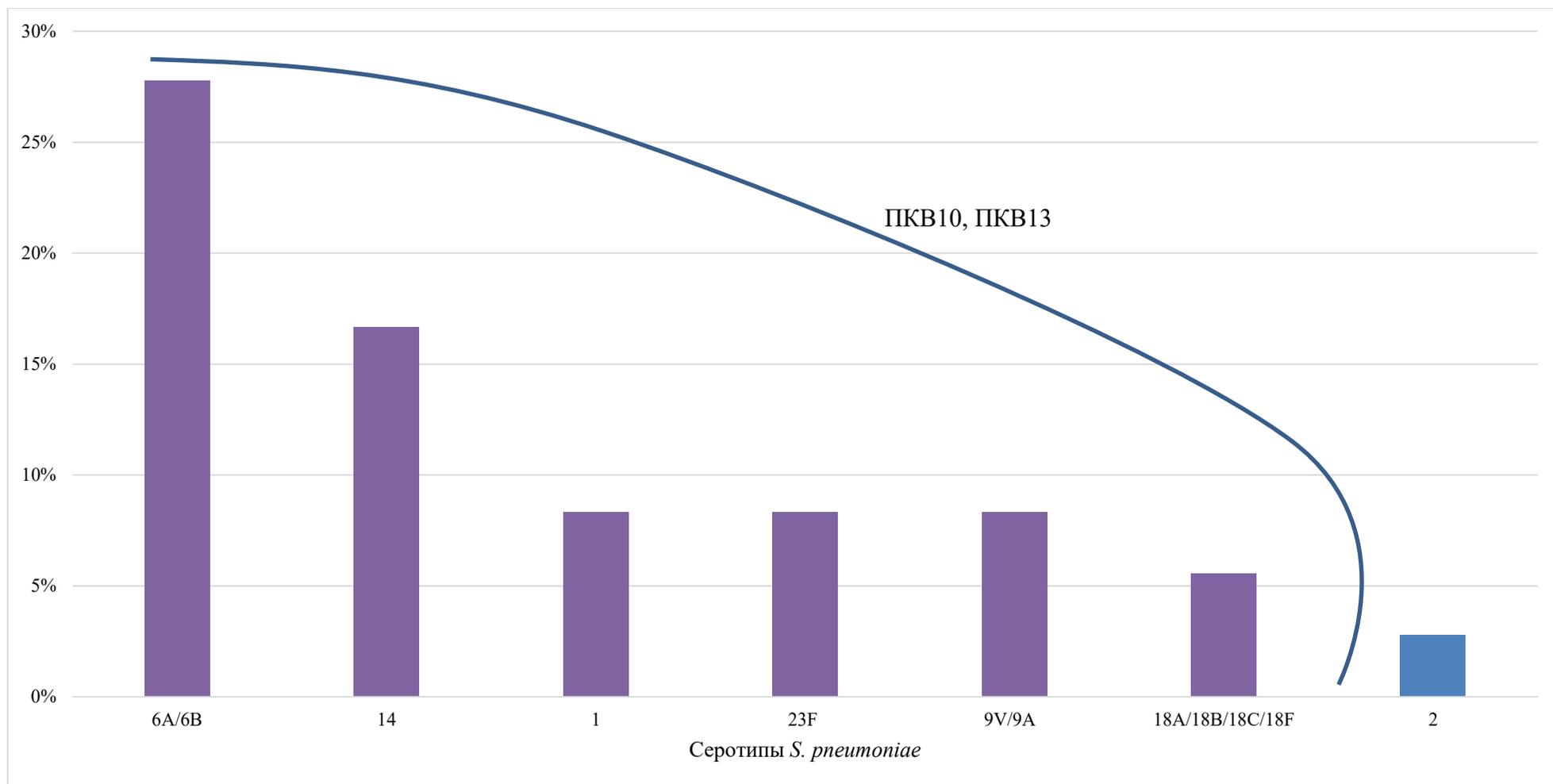


Рисунок 5 – Распределение серотипов *S. pneumoniae*, вызвавших менингит среди детей до 5 лет на территории Азиатского подрегиона в период с 2010 по 2017 гг., в соответствии с покрытием ПКВ

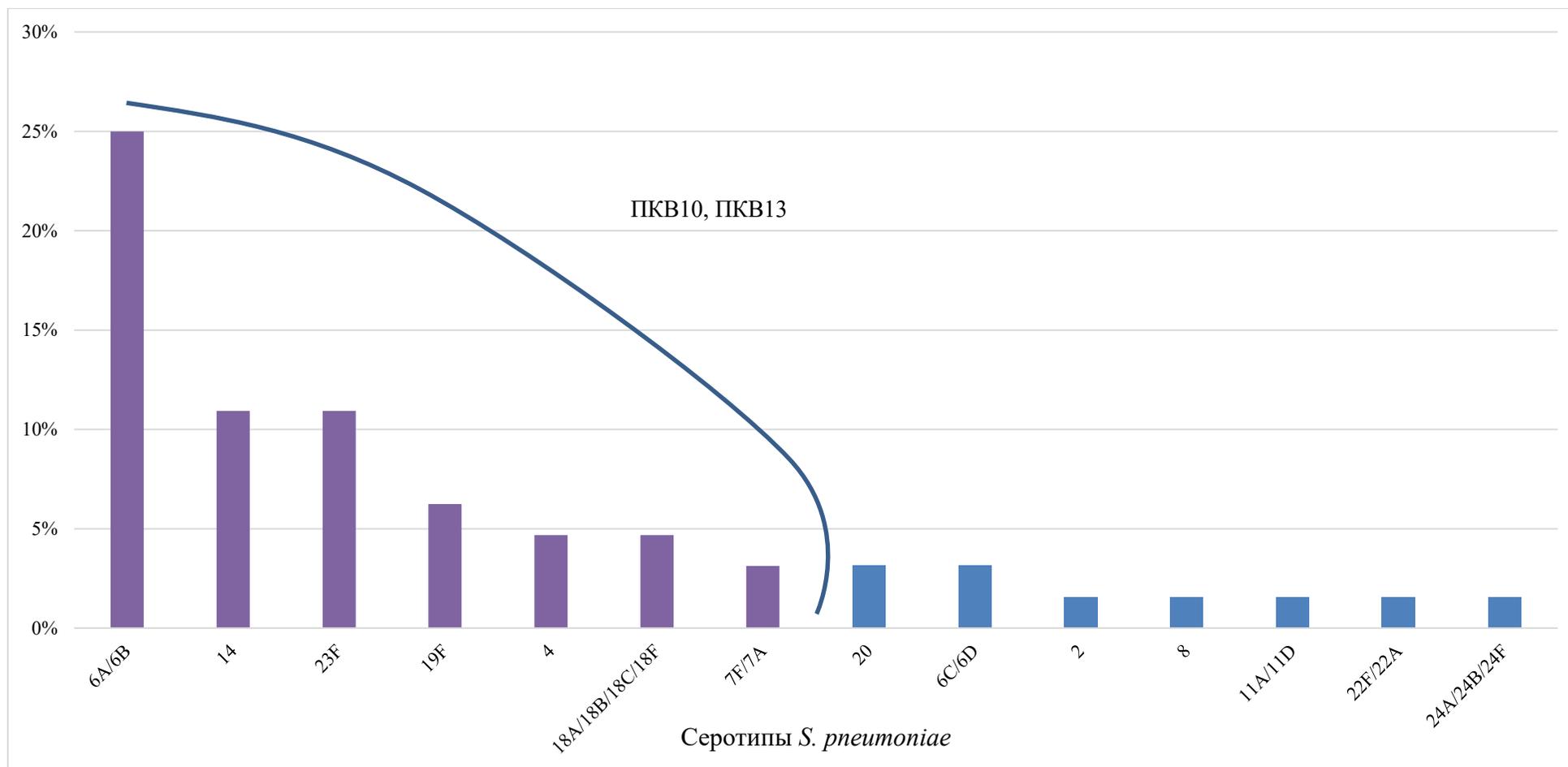


Рисунок 6 – Распределение серотипов *S. pneumoniae*, вызвавших менингит среди детей до 5 лет на территории Европейского подрегиона в период с 2010 по 2017 гг., в соответствии с покрытием ПКВ

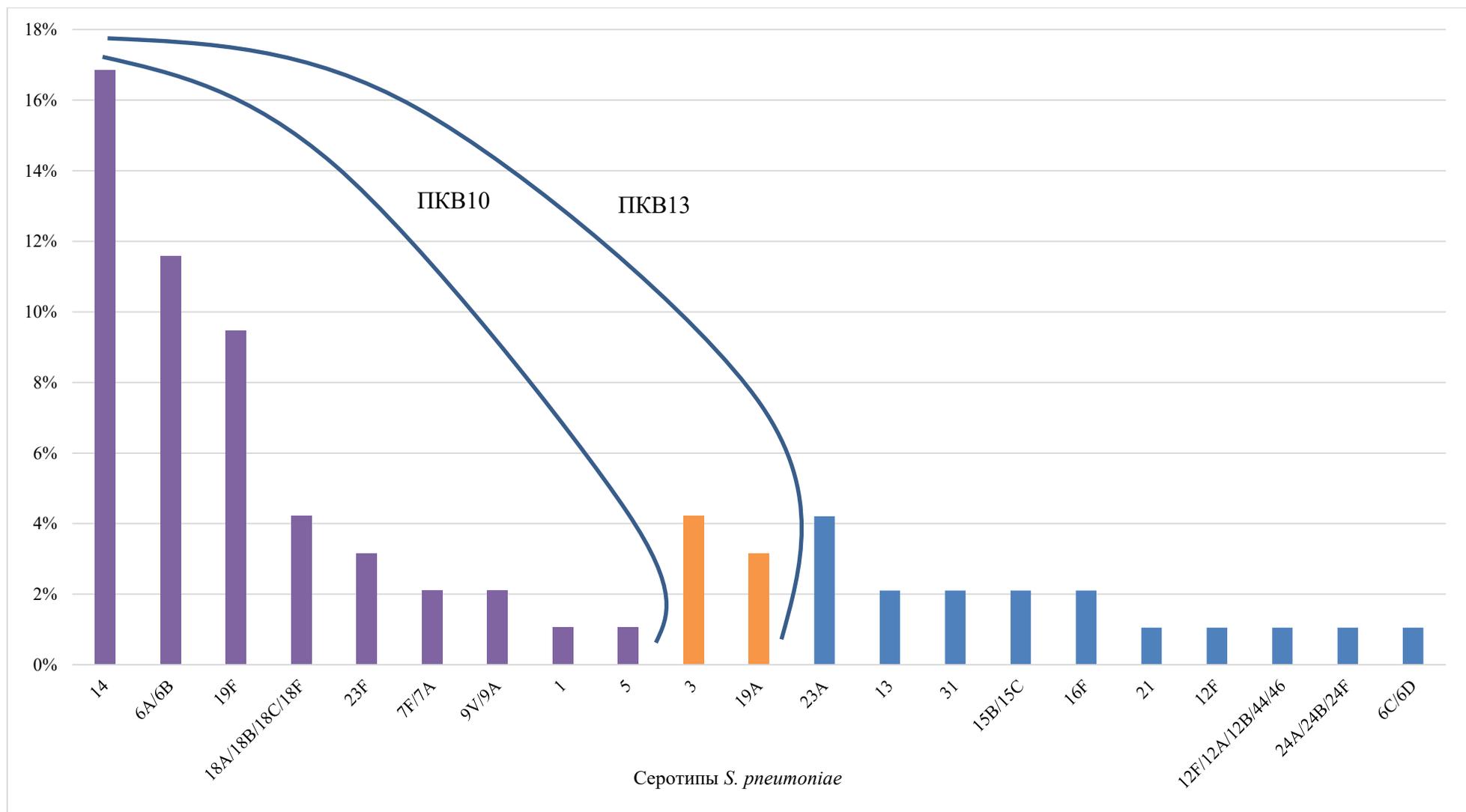


Рисунок 7 – Распределение серотипов *S. pneumoniae*, вызвавших менингит среди детей до 5 лет на территории Закавказского подрегиона в период с 2010 по 2017 гг., в соответствии с покрытием ПКВ

Таким образом, 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.

3.1 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%), 6A/6B (11,5±4,1%), 19F (8,2±3,5%), 23A (6,6±3,2%), (Таблица 12).

Таблица 12 – Серотипы *S. pneumoniae*, вызвавших менингит среди детей до 5 лет на территории Азербайджанской Республики в период с 2010 по 2017 гг.

Серотипы	Абсолютное число	Процент
14	11	18,0±4,9
6A/6B	7	11,5±4,1
19F	5	8,2±3,5
23A	4	6,6±3,2
3	3	4,9±2,8
13	2	3,3±2,3
15B/15C	2	3,3±2,3
16F	2	3,3±2,3
23F	2	3,3±2,3
7F/7A	2	3,3±2,3
9V/9A	2	3,3±2,3
1	1	1,6±1,6
12F	1	1,6±1,6
18A/18B/18C/18F	1	1,6±1,6
19A	1	1,6±1,6
31	1	1,6±1,6
5	1	1,6±1,6
6C/6D	1	1,6±1,6
NT	12	19,7±5,1

Преобладающие серотипы довольно распространены, и, за исключением 23A, включены в состав ПКВ. Процент случаев, вызванных серотипами, входящими в состав ПКВ10 составил 52, 5% (Рисунок 8).

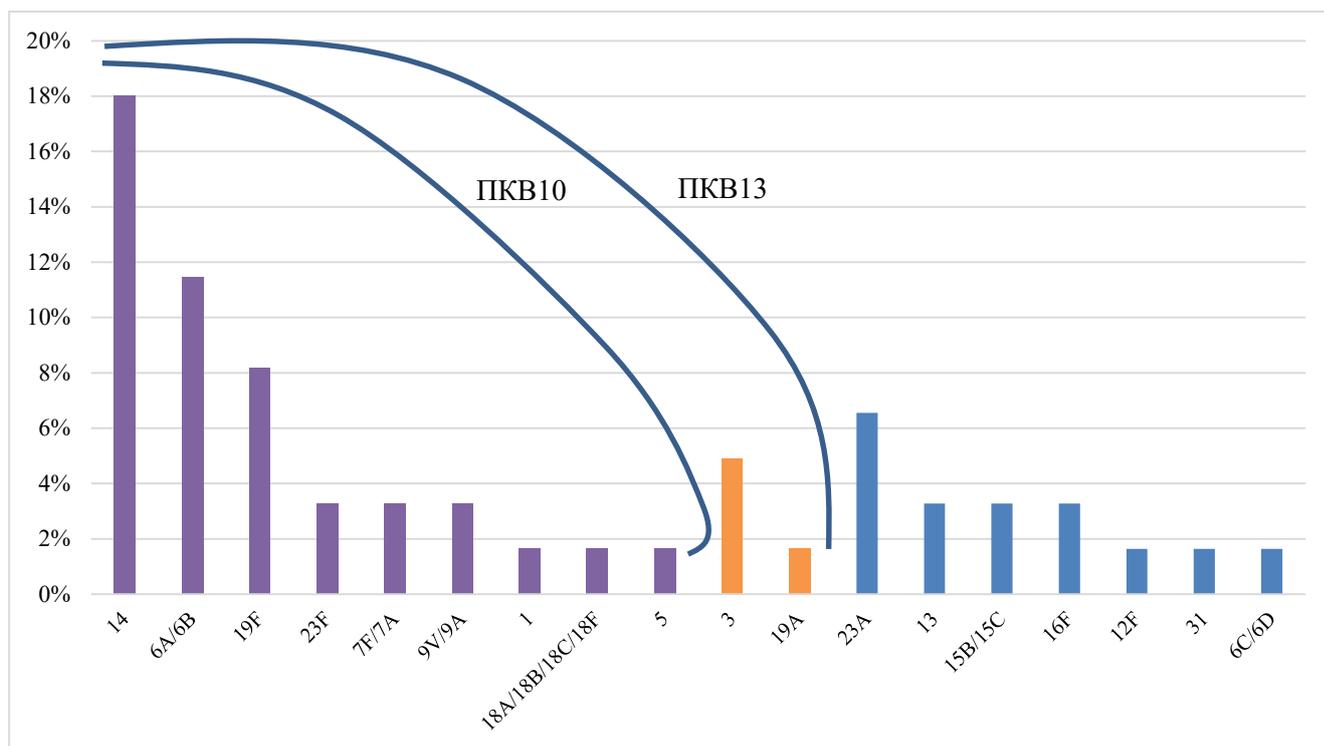


Рисунок 8 – Удельный вес серотипов *S. pneumoniae*, вызвавших менингит среди детей до 5 лет на территории Азербайджанской Республики в период с 2010 по 2017 гг., в соответствии с покрытием ПКВ

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. превалировал серотип 6A/6B, в 2013 г. наравне с ним по количеству был обнаружен серотип 23A. 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 превалировал в 2016 г. наравне с серотипом 16F. Число нетипированных штаммов колебалось от 1 до 4 в 2010, 2011, 2012, 2015 и 2016 гг.

Основное количество серотипов, входящих в состав ПКВ10, было выявлено в период с 2010 по 2014 гг. Далее их количество снизилось и лишь в 2017 г. было выявлено 3 штамма 14 серотипа и 1 штамм серотипа 6A/6B. В 2017 г. был обнаружен 1 штамм серотипа 23F, нехарактерного для данной страны (общий процент за весь период исследования 3,3%). В 2015 и 2016 гг. впервые было обнаружено 3 штамма серотипа 3, входящего в состав ПКВ13. Что может говорить о целесообразности применения вакцин с более широким составом серотипов *S. pneumoniae* (Рисунок 9).

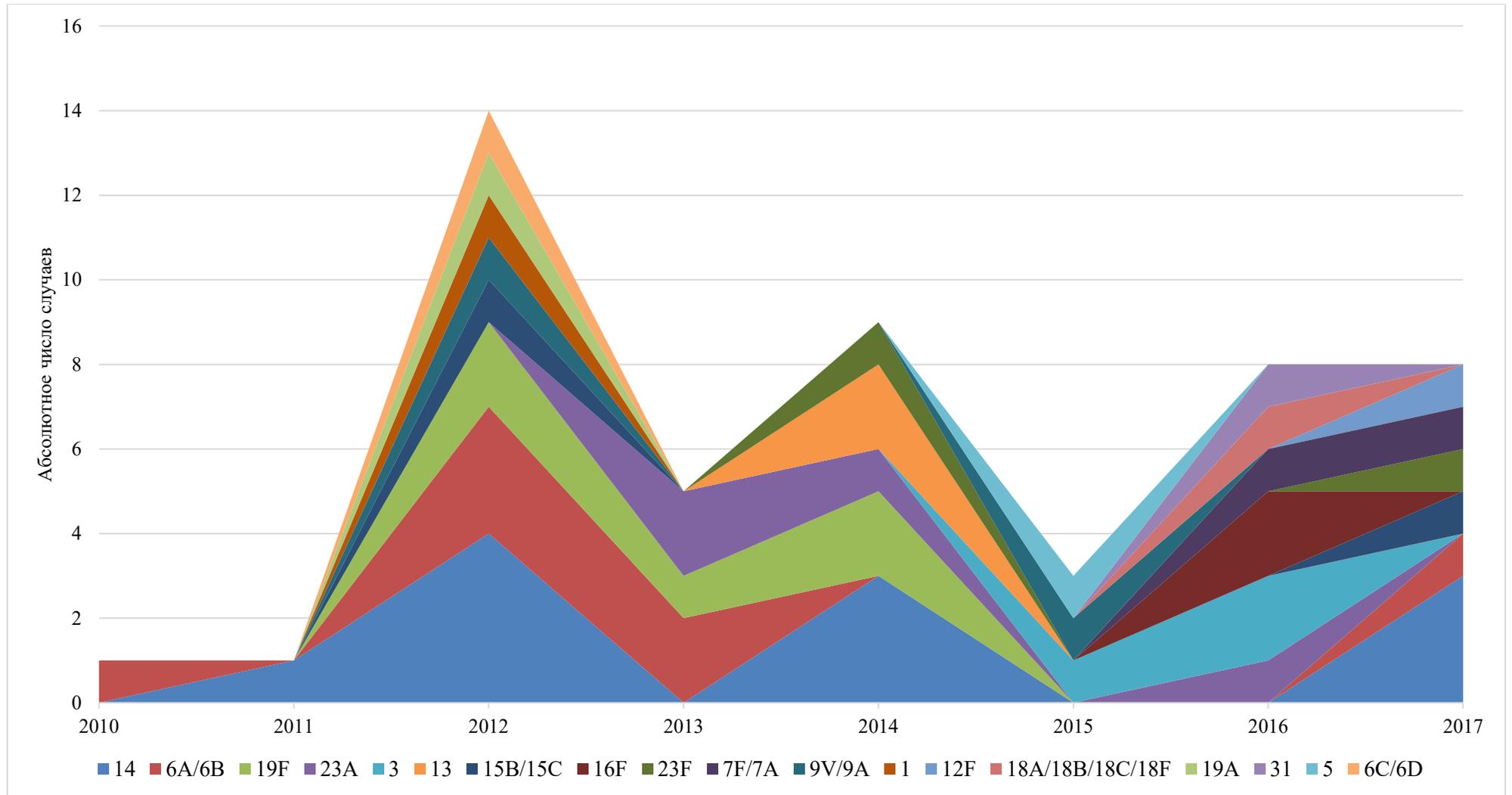


Рисунок 9 – Динамика изменения серотипового пейзажа *S. pneumoniae*, вызвавших менингит среди детей до 5 лет на территории Азербайджанской Республики в период с 2010 по 2017 гг.

При анализе динамики изменения серотипового пейзажа вакцинных штаммов (входящих в состав ПКВ10), видно, что на протяжении исследования число случаев заболеваний, вызванных вакцинными штаммами *S. pneumoniae*, снизилось (Рисунок 10).

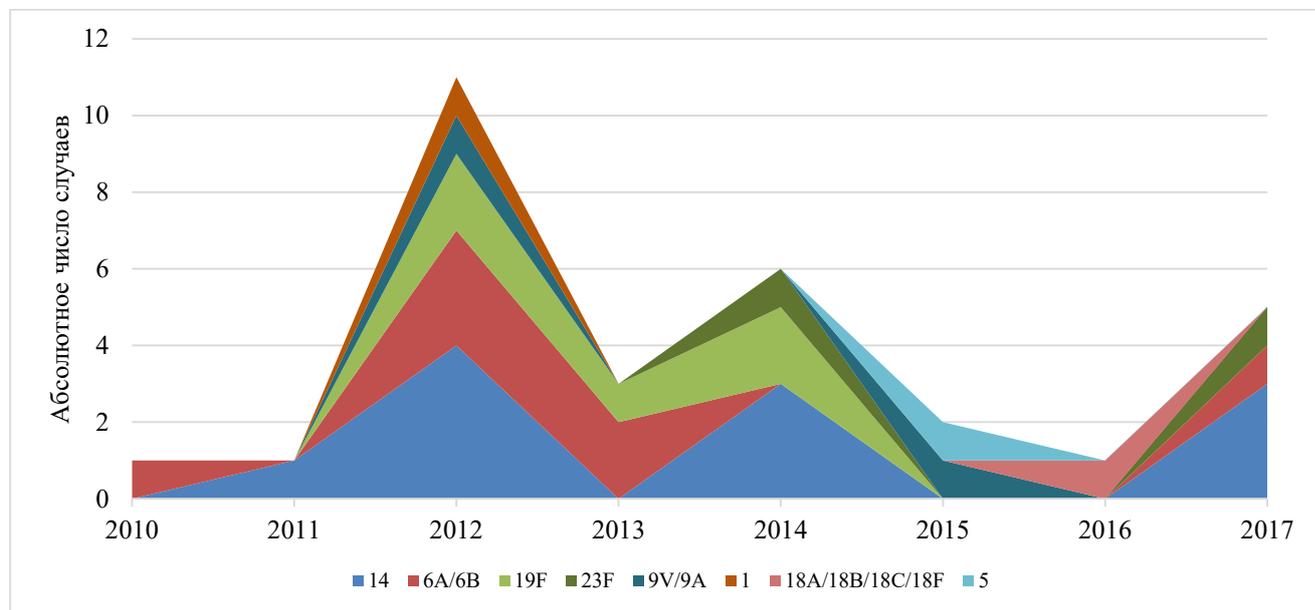


Рисунок 10 – Динамика изменения серотипового пейзажа вакцинных штаммов (ПКВ 10) *S. pneumoniae*, вызвавших менингит среди детей до 5 лет на территории Азербайджанской Республики в период с 2010 по 2017 гг.

При анализе динамики изменения серотипового пейзажа не вакцинных штаммов (не входящих в состав ПКВ10), видно, что на протяжении исследования наблюдалось увеличение числа случаев заболеваний, вызванных не вакцинными штаммами *S. pneumoniae* (Рисунок 11).

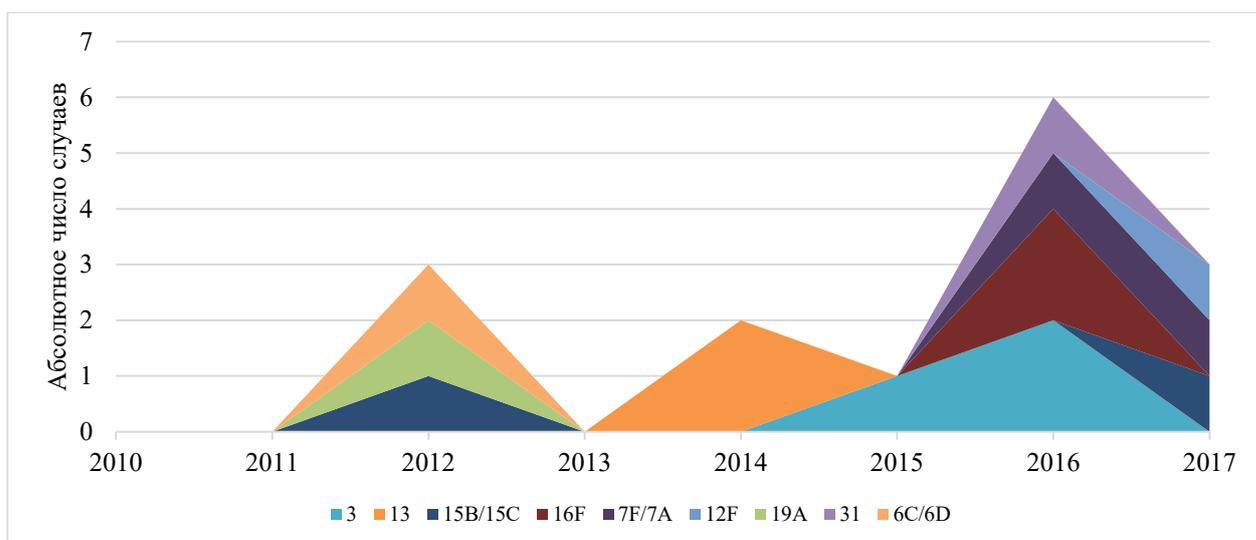


Рисунок 11 – Динамика изменения серотипового пейзажа не вакцинных штаммов (ПКВ 10) *S. pneumoniae*, вызвавших менингит среди детей до 5 лет на территории Азербайджанской Республики в период с 2010 по 2017 гг.

При статистической оценке полученных результатов изменения динамики серотипового пейзажа до и после введения вакцинации были получены следующие результаты. Процент вакцинных штаммов до введения вакцинации, за период с 2010 по 2013 гг. составил $24,6 \pm 5,5\%$, а после введения вакцинации, за период с 2014 по 2017 гг. составил $21,3 \pm 5,2\%$. В данном случае было отмечено отсутствие достоверного снижения уровня вакцинных штаммов ($p > 0,05$) в связи с малым периодом наблюдения, после введения вакцинации (4 года).

Процент выявляемости не вакцинных штаммов возрос с $9,8 \pm 3,81\%$ за период с 2010 по 2013 гг. до $24,6 \pm 5,5\%$ за период с 2014 по 2017 гг.

В данном случае, разница между показателями достоверна ($p < 0,05$), что безусловно говорит о необходимости регулярного контроля серотипового пейзажа после введения вакцинации.

3.2 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%), 6A/6B (20%). Серотипы *S. pneumoniae*, выявленные на территории Республики Армения, представлены в таблице 13.

Таблица 13 – Серотипы *S. pneumoniae*, вызвавших менингит среди детей до 5 лет на территории Республики Армения в период с 2013 по 2017 гг.

Серотипы	Абсолютное число	Процент
14	4	$20 \pm 8,9$
6A/6B	4	$20 \pm 8,9$
19F	3	$15 \pm 8,0$
18A/18B/18C/18F	2	$10 \pm 6,7$
19A	2	$10 \pm 6,7$
3	1	$5 \pm 4,9$
31	1	$5 \pm 4,9$
NT	3	$15 \pm 8,0$

Превалирующие серотипы имеют широкое распространение, и включены в состав ПКВ. Процент случаев, вызванных серотипами, входящими в состав ПКВ10, составил 65% (Рисунок 12).

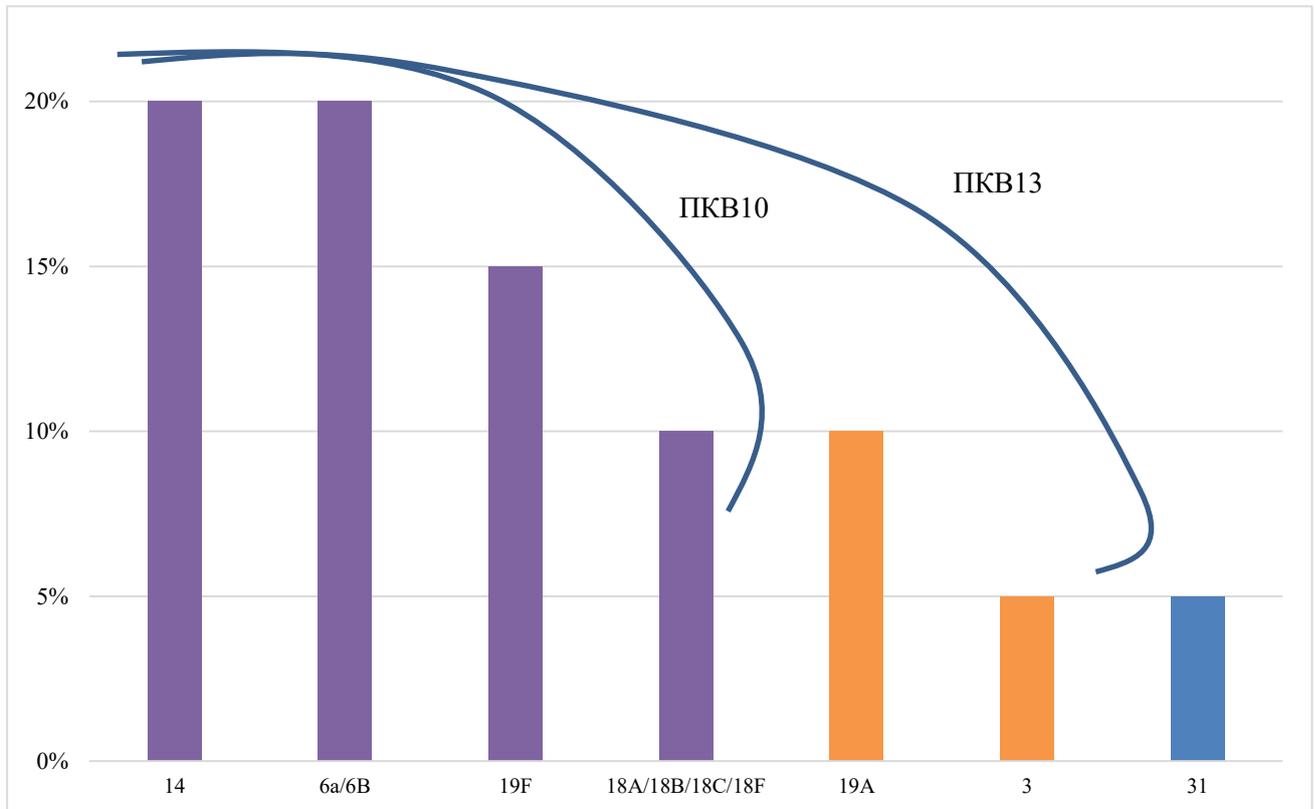


Рисунок 12 – Распределение серотипов *S. pneumoniae*, вызвавших менингит среди детей до 5 лет на территории Республики Армения в период с 2013 по 2017 гг., в соответствии с покрытием ПКВ

При анализе годового распределения серотипов видно, что в 2013 г. превалировал 14 серотип, в 2014 г. – серотип 19F, единственный случай пневмококкового менингита, зарегистрированный в 2015 г., был вызван 3 серотипом. В 2016 г. преобладал серотип 6A/6B, учитывая, что на территории Республики Армения в 2014 г. была включена в национальный календарь иммунизации ПКВ10, возможно данные случаи были вызваны не вакцинным серотипом 6B (Рисунок 13).

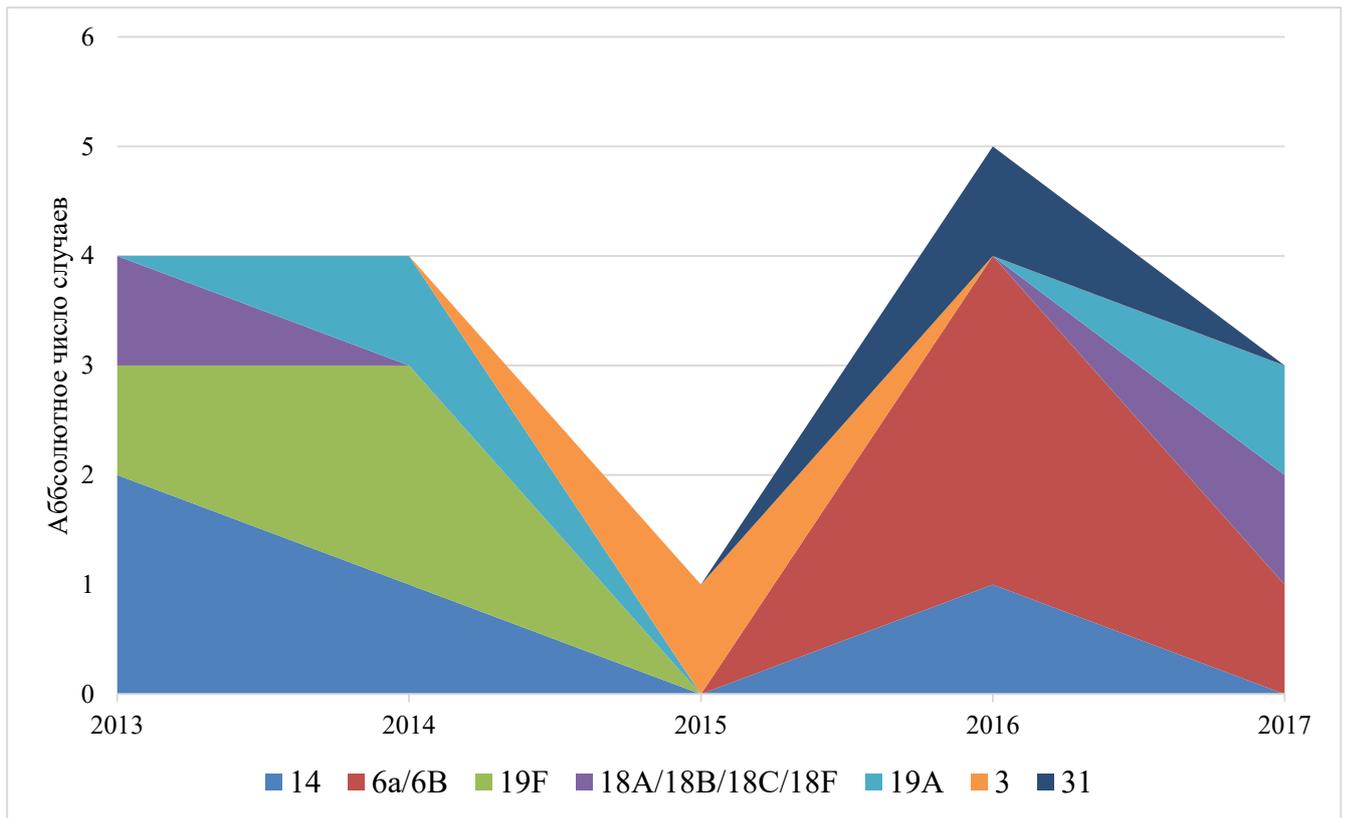


Рисунок 13 – Динамика изменения серотипового пейзажа *S. pneumoniae*, вызвавших менингит среди детей до 5 лет на территории Республики Армения в период с 2013 по 2017 гг.

При статистической оценке изменений серотипового пейзажа *S. pneumoniae* на территории Республики Армения были получены следующие результаты. Процент вакцинных штаммов до введения вакцинации за период с 2013 по 2014 гг. составил $35 \pm 10,9\%$, а после введения вакцинации за период с 2015 по 2017 гг. – $30 \pm 10,5\%$. Как и в случае с Азербайджанской Республикой, данная разница не является достоверной ($p > 0,05$), в связи с малым периодом исследования после введения вакцинации и в связи с малым числом результатов, полученных с территории Республики Армения.

Процент не вакцинных штаммов за период с 2013 по 2014 гг. составил $5 \pm 5\%$, а за период с 2015 по 2017 гг. – $15 \pm 8,19\%$. Однако данная разница так же не является достоверной ($p > 0,05$) в связи с малым числом образцов.

Несмотря на отсутствие достоверных изменений в динамике серотипового пейзажа *S. pneumoniae* на территории Республики Армения, необходимо продолжать мониторинг серотипового пейзажа для увеличения объема выборки и корректировки вакцинации.

3.3 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: 6A/6B (26,3±5,8%), 23F (12,3±4,3%), 14 (8,8±3,7%) (Таблица 14).

Таблица 14 – Серотипы *S. pneumoniae*, вызвавших менингит среди детей до 5 лет на территории Украины в период с 2008 по 2015 гг.

Серотипы	Абсолютное число	Процент
6A/6B	15	26,3±5,8
23F	7	12,3±4,3
14	5	8,8±3,7
18A/18B/18C/18F	3	5,3±3,0
19F	3	5,3±3,0
20	2	3,5±2,4
4	2	3,5±2,4
6C/6D	2	3,5±2,4
7F/7A	2	3,5±2,4
11A/11D	1	1,8±1,7
2	1	1,8±1,7
22F/22A	1	1,8±1,7
24A/24B/24F	1	1,8±1,7
8	1	1,8±1,7
NT	11	19,3±5,2

Преобладающие серотипы являются имеют широкое распространение, и включены в состав ПКВ. Процент случаев, вызванных серотипами, входящими в состав ПКВ10, составил 64,8% (Рисунок 14).

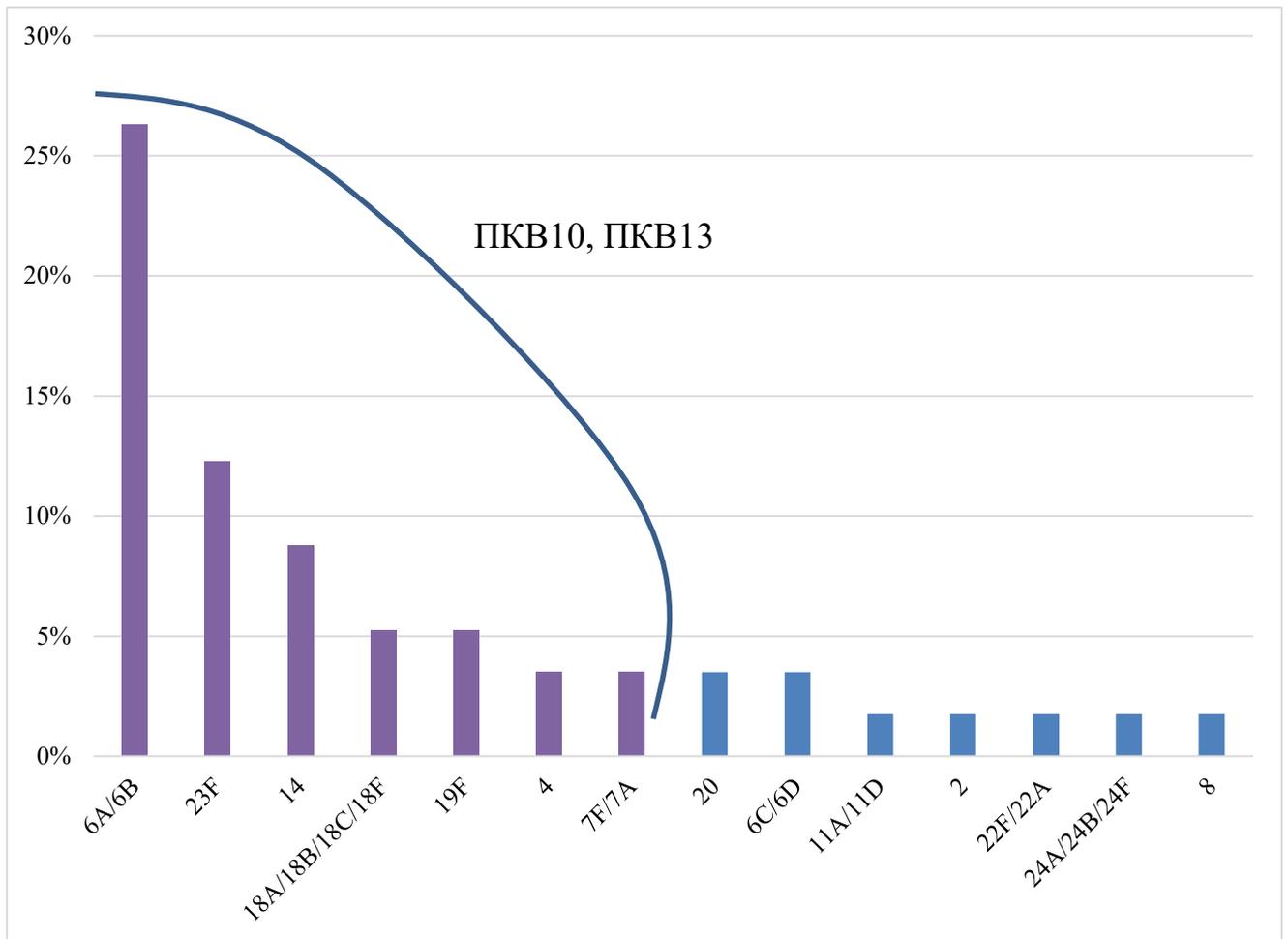


Рисунок 14 – Удельный вес серотипов *S. pneumoniae*, вызвавших менингит среди детей до 5 лет на территории Украины в период с 2008 по 2015 гг., в соответствии с покрытием ПКВ

При анализе распределения выявленных серотипов *S. pneumoniae* по годам видно, что в 2008, 2009 и в 2013 гг. серотип 6A/6B составлял наибольшее количество среди выявленных серотипов. В 2010 г. преобладал серотип 23F, в 2012 г. – 14 серотип, в 2014 г. – серогруппа 18A/18B/18C/18F. В остальные годы распределение серотипов было равномерное, в период с 2016 по 2018 гг. было выявлено по 1 случаю нетипированных образцов.

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

В динамике видно, что четыре самых распространенных серотипа преобладают в течение всего периода исследования на территории страны и вносят в общей сложности крупный вклад в заболеваемость (порядка 55%) (Рисунок 15).

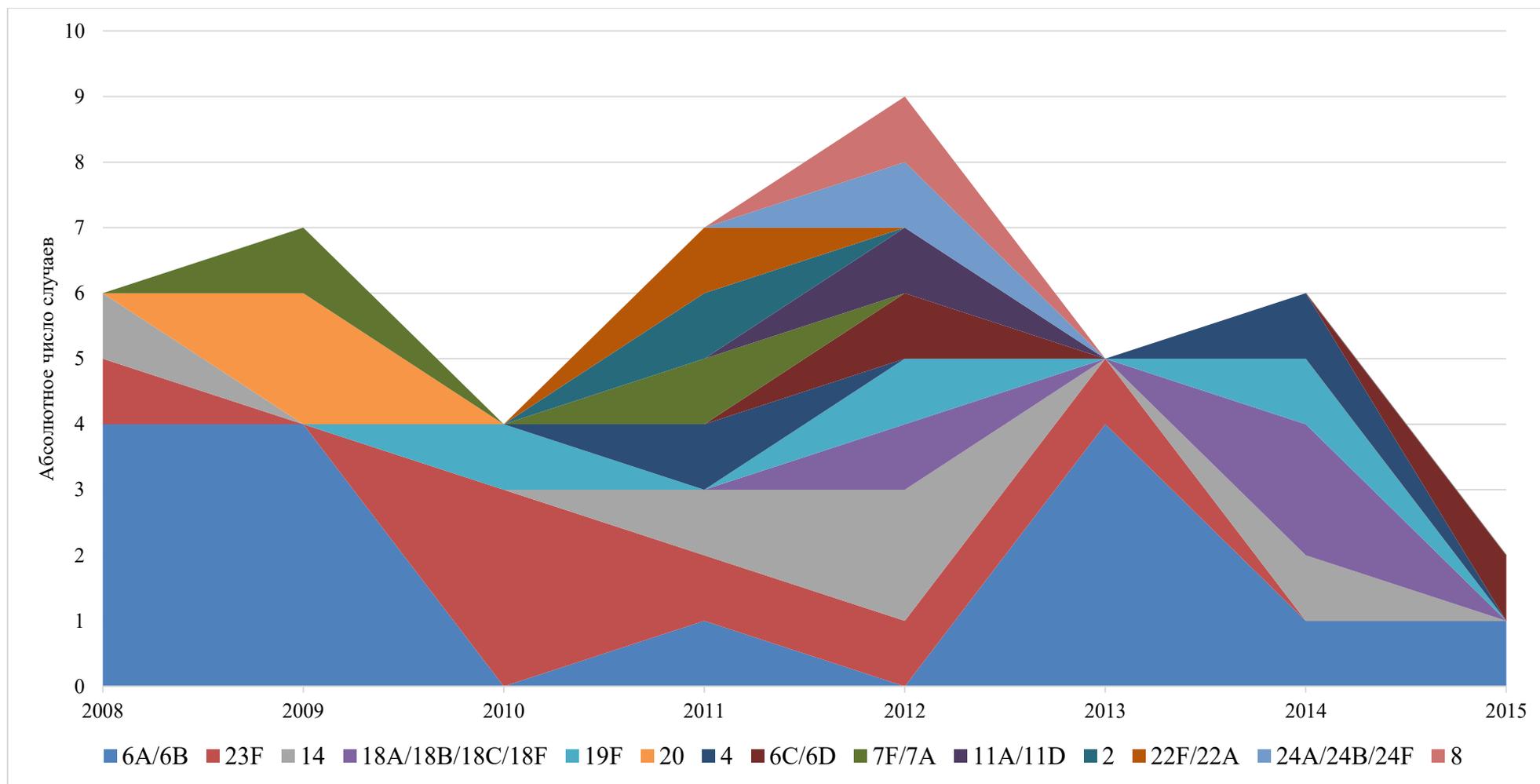


Рисунок 15 – Динамика изменения серотипового пейзажа *S. pneumoniae*, вызвавших менингит среди детей до 5 лет на территории Украины в период с 2008 по 2015 гг.

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.

При анализе динамики изменения серотипового пейзажа вакцинных штаммов (входящих в состав ПКВ10), видно, что на протяжении исследования число случаев заболеваний, вызванных вакцинными штаммами *S. pneumoniae*, не имело существенных изменений (Рисунок 16).

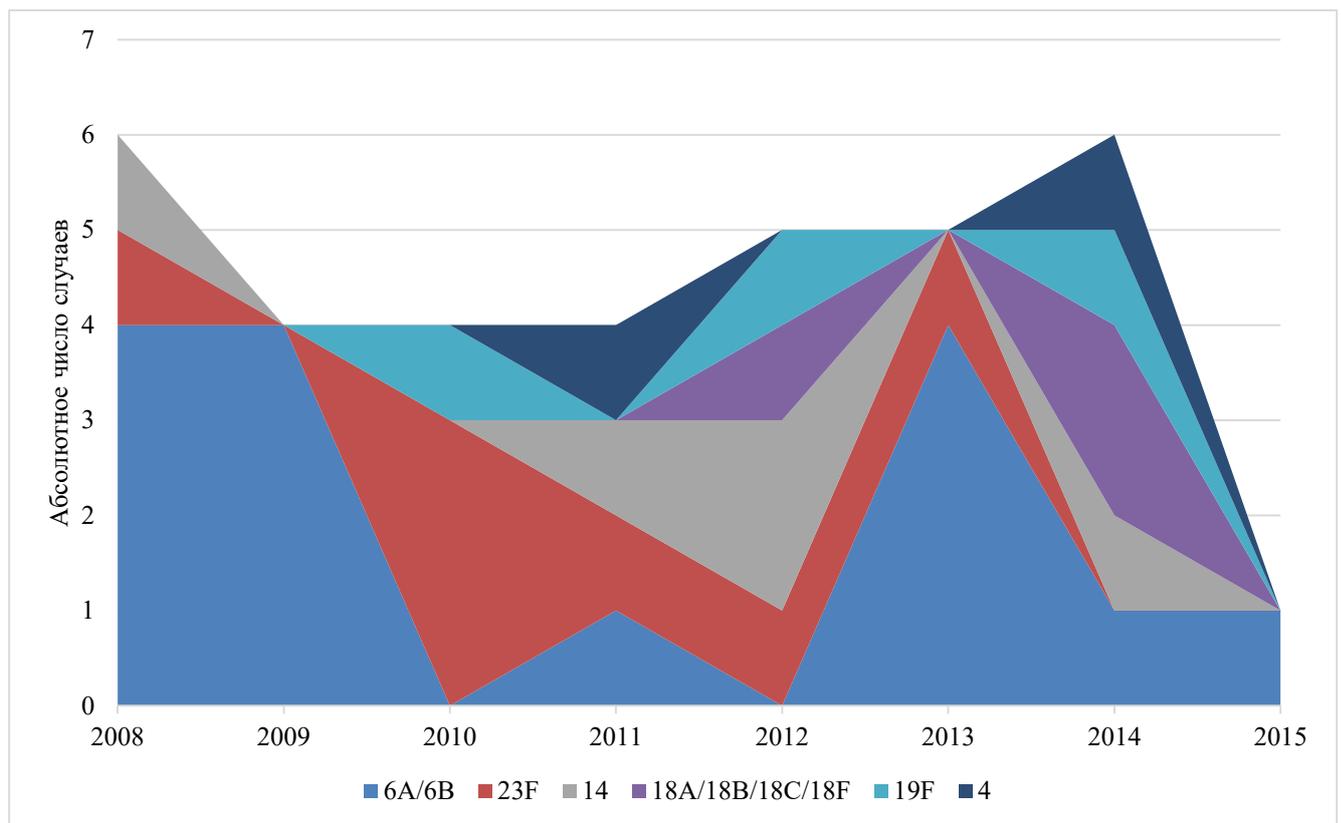


Рисунок 16 – Динамика изменения серотипового пейзажа вакцинных штаммов (ПКВ 10) *S pneumoniae*, вызвавших менингит среди детей до 5 лет на территории Украины в период с 2008 по 2015 гг.

При анализе динамики изменения серотипового пейзажа не вакцинных штаммов (не входящих в состав ПКВ10), видно, что на протяжении исследования случаи заболеваний, вызванные не вакцинными штаммами *S. pneumoniae* были единичными (Рисунок 17).

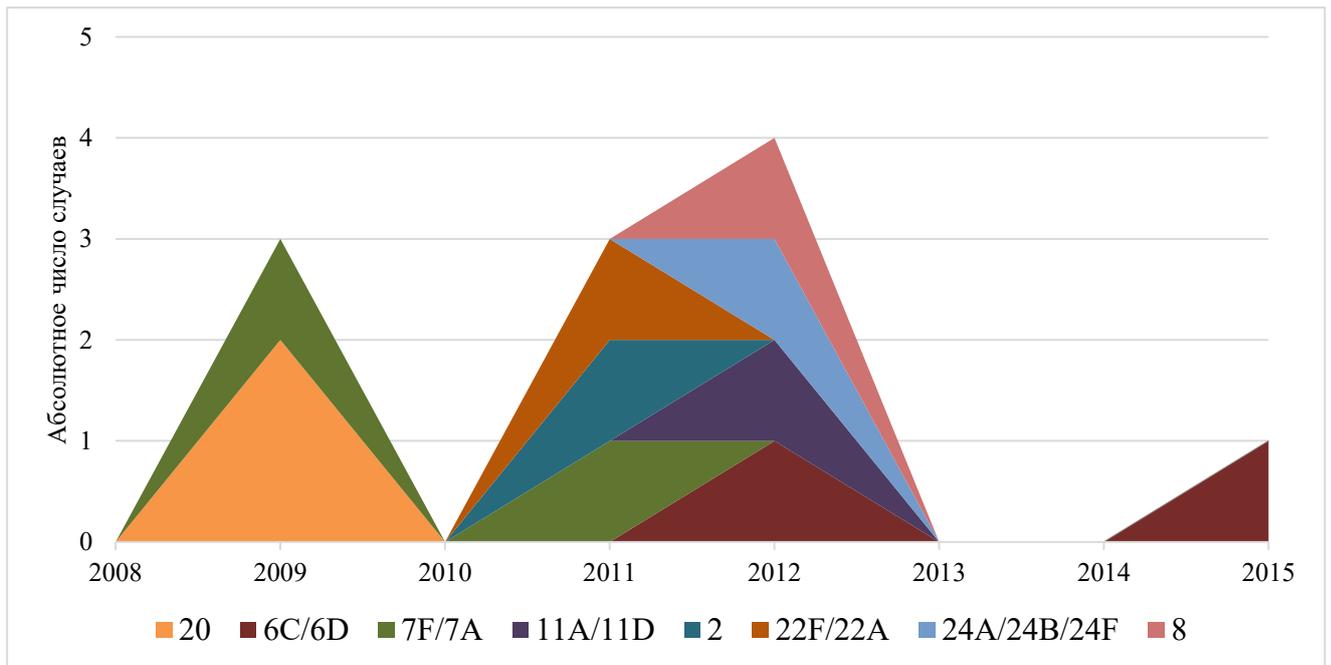


Рисунок 17 – Динамика изменения серотипового пейзажа не вакцинных штаммов (ПКВ 10) *S. pneumoniae*, вызвавших менингит среди детей до 5 лет на территории Украины в период с 2008 по 2015 гг.

В связи с тем, что на территории Украины ПКВ10 включена в календарь профилактических прививок только по эпидпоказаниям, статистическая оценка изменений динамики серотипового пейзажа была проведена следующим путем.

Были определены проценты вакцинных и не вакцинных штаммов по годам (Таблица 15). После чего был определен средний темп прироста процента вакцинных штаммов, который составил 2,4%, что свидетельствует об отсутствии каких-либо объективных изменений в серотиповом пейзаже *S. pneumoniae* на территории Украины.

Таблица 15 – Процентное распределение вакцинных и не вакцинных штаммов *S. pneumoniae* по годам на территории Украины

Год	% вакцинных штаммов	% не вакцинных штаммов
2008	100,0	0,0
2009	57,1	42,9
2010	100,0	0,0
2011	57,1	42,9
2012	55,6	44,4
2013	100,0	0,0
2014	100,0	0,0
2015	50,0	50,0

3.4 Заключение к Главе 3

Таким образом, в ходе проведенного исследования было выявлено всего 27 серогрупп и серотипов *S. pneumoniae*. Среди общего количества исследованных проб 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%), что подтверждает принятые решения в отношении включения ПКВ в календари прививок на исследуемых территориях.

Основное количество серотипов, входящих в состав ПКВ10 было выявлено в период с 2010 по 2014 гг. на территории Азербайджанской Республики. При анализе годового распределения серотипов *S. pneumoniae*, выявленных на территории Республики Армения, видно, что в 2013 г. преобладал 14 серотип, в 2014 г. – серотип 19F, единственный случай пневмококкового менингита, зарегистрированный в 2015 г. был вызван 3 серотипом, что может говорить о целесообразности применения ПКВ с более широким спектром действия.

При анализе распределения выявленных на территории Украины 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. – серотип 18А/18В/18С/18F. В остальные годы распределение серотипов было равномерное, в период с 2016 по 2018 гг. было выявлено по 1 случаю нетипированных. Также был определен средний темп прироста процента вакцинных штаммов, который составил 2,4%, что свидетельствует об отсутствии каких-либо объективных изменений в серотиповом пейзаже *S. pneumoniae* на территории Украины. Из чего допустимо сделать вывод о перспективе включения ПКВ в национальный календарь прививок по плановым показаниям.

ГЛАВА 4. Генотипическая характеристика и филогенетический анализ штаммов *S. pneumoniae*

4.1 Генотипическая характеристика штаммов *S. pneumoniae* с применением мультилокусного сиквенс-типирования

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. Полученные результаты представлены в таблице 16.

Таблица 16 – 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

Продолжение таблицы 16

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

Нуклеотидные последовательности для каждого гена из аллельных профилей впервые обнаруженных СТ представлены на рисунке 18.

СТ14388 (*aroE2-gdh8-gki5-recP4-spi6-xpt1-ddl1*)

aroE2

GAAGCGAGTGACTTGGCAGAAACAGTGGCCAATATTCGTCGCTACCAGATGTTTGGCATCAATCTGTCCATG
CCCTATAAGGAGCAGGTGATTCCTTATTTGGATAAGCTGAGCGATGAAGCGCGCTTGATTGGTGCGGTTAAT
ACGGTTGTCAATGAGAATGGCAATTAATTGGATATAATACAGATGGCAAGGGATTTTTAAAGTGCTTGCCTT
CTTTTACAATTTACAGGTA AAAAGATGACCCTGCTGGGTGCAGGTGGTGCGGCTAAATCAATCTTGGCACAGG
CTATTTTGGATGGCGTCAGTCAGATTTCCGGTCTTTGTTTCGTTCCGTTTCTATGGAAAAACAAGACCTTACCT
AGACAAGTTACAGGAGCAGACAGGTTTTAAAGTGGATTTGTGT

gdh8

AGAACACTTTATCCGTGGGCAATACCGCTCTGGTAAGATTGATGGCATGAAATACATCTCTTATCGTAGCGA
GCCAAATGTGAATCCAGAATCAACAACCTTACATCTGGTGCCTTCTTTGTAGACAGCGATCGATTC
CGTAGTGTTCCTTTCTTTTCCGTACAGGTAACGACTGACTGAAAAAGGAACTCATGTCAACATCGTCTTTA
AACAAATGGATTCTATCTTTGGAGAACCACTTGCTCCAAATATTTTGACCATCTATATTCAACCAACAGAAGG
CTTCTCTTAGCCTAAATGGGAAGCAAGTAGGAGAAGAATTTAACTTGGCTCCTAACTCACTTGATTACCGT
ACAGATGCGACTGCAACTGGTGCTTCTCCAGAACCATACGAGAAATTGATTTATGATGTCCTAAATAACAAC
TCAACTAACTTTAGCCACTGGGA

gki5

ACCCTTCAACCAATCAAAACAAAAGATTGAAAAAGCTTTGGGCATTCCATTTTTTCATCGATAATGATGCCAAC
GTAGCAGCTCTTGGTGAGCGCTGGATGGGTGCTGGAGATAACCAACCAGACGTTGTCTTTATGACACTCGGT
ACTGGTGTGGTGGCGGTATCGTCGCAGAAGGCAAATTGCTTACGGTGTGCTGGTGCAGCAGGTGAGCTT
GGTCATATCACTGTTGATTTTGACCAGCCAATCGCATGTACTTGGGTAAGAAAGGCTGCCTTGAGACAGTTG
CTTCAGCAACAGGGATTGTCAACTTGACTCGTCGCTATGCCGATGAATACGAAGGCGATGCAGCCTTGAAC
GCTTGATTGATAATGGAGAAGAAGTAAGTACTGCTAAGACTGTGTTTGTATCTCGAAAAGAAGGAGACGACCTTG
CTTTGATTGTTTACCGTAACTTCTCACGTTACTTGGGAATCGCTTGTGCT

recP4

CTCAACCAATTTGGATTAACCGCGACCGCTTTATTCTTTTACGAGGTCATGGTTCAATGCTCCTTTATGCTCTT
CTTACCTTTCTGGTTTTGAAGATGTCAGCATGGATGAGATTAAGAGTTTCCGTCAATGGGGTTCAAAAACAC
CAGGTCACCCAGAATTTGGTCATACGGCAGGATTGATGCTACGACAGGTCCTCTAGGGCAAGGGATTTCAA
CTGCTACTGGTTTTGCCAAGCAGAACGTTTCTTGGCAGCCAAATATAACCGTGAAGGCTACAATATCTTTGA
CCTACTATACTTACGTTATCTGTGGAGACGGAGACTTGATGGAAGGTGTCTCAAGCGAGGCAGCTTCATACGC
AGGTTTGCAAAAACCTTGATAAGTTGGTTGTTCTTTATGATTCAAATGATATCAACTTGGATGGTGAGACAAAG
GATTCCTTTACAG

spi6

GTATCTTTTTTTGGAGCAATGTTTCGCGTAGAAGGACATTCCATGGATCCGACCCTAGCGGATGGCGAAATTCT
CTTCGTTGTAAAACACCTTCTTATTGACCGTTTTGATATCGTGGTGGCCCATGAGGAAGATGGCAATAAGGAC

ATCGTCAAGCGCGTGATTGGAATGCCTGGCGACACCATTTCGTTACGAAAATGATAAACTCTACATCAATGAC
AAAGAAACGGACGAGCCTTATCTAGCAGACTATATCAAACGCTTCAAGGATGACAAACTCCAAAGCACTTAC
TCAGGCAAGGGCTTTGAAGGAAATAAAGGAACTTTCTTTAGAAGTATCGCTCAAAAAGCCCAAGCCTTCACA
GTTGATGTCAACTACAACACCAACTTTAGCTTTACTGTTCCAGAAGGAGAATACCTTCTCCTCGGAGATGACC
GCTTGTTTTCGAGCGACAGCCGCCACGTAGGTACCTT

xpt1

GGTGATAACATCCTCAAGGTAGATTCCTTTTTAAACCACCAAGTTGACTTTAGCTTGATGCGAGAGATTGGTA
AGGTTTTTTCGGGAAAAATTTGCTGCTACTGGCATTACCAAGGTCGTAACCATTGAAGCGTCGGGTATTGCCCC
AGCCGTTTTTACAGCTGAAGCCTTAAACGTTCCCATGATTTTCGCCAAAAAAGCTAAGAACATCACCATGAA
CGAAGGCATCTTAACTGCTCAAGTCTACTCCTTTACCAAGCAGGTGACCAGCACTGTTTCTATCGCTGGAAAA
TTCCTCTCACCAGAGGACAAGGTTTTGATTATCGACGATTTCTTGCTAATGGCCAAGCTGCTAAAGGCTTGA
TTCAAATCATCGAACAGGCCGGTGCCACAGTCCAAGCTATCGGTATCGTGATTGAGAAATCCTTCCAAGATG
GTCGTGATTTGCTTGAAAAAGCAGGCTACCCTGTCCTATCACTTGCTCGC

ddl1

GCTAAAATAGCTGAAGTGGAAGAAAAATTGGCTTATCCAGTCTTCACTAAGCCGTCAAACATGGGGTCTAGT
GTCGGTATTTCTAAGTCTGAAAACCAAGAAGAAGTCCGTCAAGCCTTAAAACTTGCCTTCCGATATGACAGC
CGTGTCTTGTTGAGCAAGGAGTGAATGCCCGTGAATTGAGGTTGGCCTCTTGGGTAACACTACGATGTCAAG
AGCACGCTACCTGGAGAAGTTGTCAAGGACGTTGCCTTTTATGACTACGATGCCAAGTATATTGATAACAAG
GTTACTATGGATATTCCTGCCAAAATCAGTGATGATGTGGTGGCTGTCATGCGTCAAAATGCAGAAACAGCC
TTCCGTGCCATTGGTGGCCTTGGTCTATCTCGTTGCGATTTCTTCTATACAGATAAAGGAGAGATTTTTCTCAA
CGAGCTC

CT14386 (*aroE7-gdh16-gki53-recP15-spi6-xpt20-ddl26*)

aroE7

GAAGCGAGTGACTTGGTAGAAACAGTGGCCAATATTCGTCGCTACCAGATGTTTGGCATCAATCTGTCCATG
CCCTATAAGGAGCAGGTGATTCCTTATTTGGATAAGCTGAGCGATGAAGCGCGCTTGATTGGTGCGGTTAAT
ACGGTTGTCAATGAGAATGGCAATTTAATTGGATATAATACAGATGGCAAGGGATTTTTTAAGTGCTTGCCTT
CTTTTACAATTTTACAGTAAAAAGATGACCCTGCTGGGTGCAGGTGGTGCGGCTAAATCAATCTTGGCACAGG
CTATTTTGGATGGCGTCAGTCAGATTTTCGGTCTTTGTTTCGTTCCGTTTCTATGGAAAAACAAGACCTTACCT
AGACAAGTTACAGGAGCAGACAGGCTTTAAAGTGGATTTGTGT

gdh16

AGAACACTTTATCCGTGGGCAATACCGCTCTGGTAAGATTGATGGCATGAAATACATCTTATCGTAGCGA
ACCAAATGTGAATCCAGAATCAACAACCTTACATCTGGTGCCTTCTTTGTAGACAGCGATCGATTC
CGTGGTGTTCCTTTCTTTTCCGTACAGGTAAACGACTGACTGAAAAAGGAACTCATGTCAACATCGTCTTTA
AACAAATGGATTCTATCTTTGGAGAACCCTTGTCCAAATATTTTGACCATCTATATTCAACCAACAGAAGG
CTTCTCTTAGCCTAAATGGGAAGCAAGTAGGAGAAGAATTTAACTTGGCTCCTAACTCACTTGATTATCGT
ACAGACGCGACTGCAACTGGTGTCTTCCAGAACCATACGAGAAATTGATTTATGATGTCCTAAATAACAAC
TCAACCAACTTTAGCCACTGGGAT

gki53

ACCCTTCAACCAATCAAACAAAAGATTGAAAAAGCTTTGGGCATTCCATTTTTTCATCGATAATGATGCCAAC
GTAGCAGCTCTTGGTGAGCGCTGGATGGGTGCTGGAGATAACCAACCAGACGTTGTCTTTATGACTCGGT
ACTGGTGTGGTGGTGGTATTGTTCGAGAAGGCAAATTGCTTCATGGTGTGCTGGTGCAGCAGGTGAACTT
GGTCATATCACTGTTGATTTTGACCAACCAATTGCATGTACTTGTGGTAAAAAAGGCTGTCTTGAGACAGTCG
CTTCTGCAACAGGAATTGTCAATTTGACTCGTCGCTATGCCGATGAATACGAAGGCGATGCAGCCTTGAAC
GCTTGATTGATAACGGAGAAGAAGTAACTGCTAAGACTGTCTTTGATCTCGAAAAGAAGGAGACGACCTTG
CTTTGATTGTTTACCGTAACTTCTCACGTTACTTGGGAATCGCTTGTGCT

recP15

CTCAACCAAAATTGGATTAACCGCGACCGCTTATTCTTTTCAGCAGGTTCATGGTTCAATGCTCCTTTATGCTCTT
CTTACCTTTCTGGTTTTGAAGATGTCAGCATGGATGAGATTAAGAGCTTCCGTCAATGGGGTTCAAAAACAC
CAGGTCACCCAGAATTTGGTCATACGGCAGGATTGATGCTACGACAGGTCCTTAGGGCAAGGGATTTCAA
CTGCTACTGGTTTTGCCCAAGCAGAACGTTTCTTGGCAGCCAAATATAACCGTGAAGGCTACAATATCTTTGA
CCACTATACTTACGTTATCTGTGGAGACGGAGACTTGATGGAAGGTGTCTCAAGCGAGGCAGCTTCATACGC
AGGTTTGCAAAAACCTTGATAAGTTGGTTGTTCTTTATGATTCAAATGATATCAACTTGGATGGTGAGACAAAG
GATTCCTTTACAG

spi6

GTATCTTTTTTTGGAGCAATGTTTCGCGTAGAAGGACATTCCATGGATCCGACCCTAGCGGATGGCGAAATTCT
CTTTCGTTGTAACACCTTCTTATTGACCGTTTTGATATCGTGGTGGCCCATGAGGAAGATGGCAATAAGGAC
ATCGTCAAGCGCGTGATTGGAATGCCTGGCGACACCATTTCGTTACGAAAATGATAAACTCTACATCAATGAC
AAAGAAACGGACGAGCCTTATCTAGCAGACTATATCAAACGCTTCAAGGATGACAAACTCCAAAGCACTTAC
TCAGGCAAGGGCTTTGAAGGAAATAAAGGAACTTTCTTTAGAAGTATCGCTCAAAAAGCCCAAGCCTTCACA

GTTGATGTCAACTACAACACCAACTTTAGCTTTACTGTTCCAGAAGGAGAATACCTTCTCCTCGGAGATGACC
GCTTGGTTTTCGAGCGACAGCCGCCACGTAGGTACCTTCA

xpt20

GGTGATAACATCCTCAAGGTAGATTCCTTTTTAAACCCACCAAGTTGACTTTAGCTTGATGCGAGAGATTGGTA
AGGTTTTTTCGGAAAAAATTTGCTGCTACTGGCATTACCAAGGTCGTAACCATTGAAGCGTCGGGTATTGCCCC
AGCCGTTTTTACAGCTGAAGCCTTAAACGTTCCCATGATTTTCGCCAAAAAAGCTAAGAACATCACCATGAA
CGAAGGCATCTTAACTGCTCAAGTCTACTCCTTTACCAAGCAGGTGACCAGCACTGTTTCTATCGCTGGAAAA
TTCCTCTCACCAGAGGACAAGGTTTTGATTATCGACGATTTCTTGCTAATGGCCAAGCTGCTAAAGGCTTGA
TTCAAATCATCGAACAGGCCGGTGCCACAGTCCAAGCTATCGGTATCGTGATTGAGAAATCCTTCCAAGATG
GTCGTGATTTGCTTAAAAAGCAGGCTACCCTGTCCTATCACTTGCTCGC

ddl26

GCTAAAATCGCTGAAGTGGAAGAAAAATTGGCTTATCCAGTCTTCACTAAGCCGTCAAACATGGGGTCTAGT
GTCGGTATTTCTAAGTCTGAAAACCAAGAAGAAGTCCGTCCAGCCTTAGAACTTGCCTTCCGATATGATAGCC
GTGTCTTGGTTGAGCAAGGAGTGAATGCCCGTGAAATTGAGGTTGGCCTCTTGGGTAAGTACGATGTCAAGA
GCACGCTACCAGGAGAAGTTGTCAAGGATGTTGCCTTTTATGACTACGATGCCAAGTATATTGATAACAAGA
TTACTATGGATATTCCTGCCAAAATCAGTGATGATGTGGTGGCTGTGATGCGTCAAATGCAGAAACAGCCT
TCCGTGCCATTGGTGGCCTTGGTCTATCTCGTTGCGATTTCTTCTATACAGATAAGGGAGAGATTTTTCTCAAC
GAGCTC

CT14372 (*aroE4-gdh16-gki19-recP15-spi401-xpt20-ddl26*)

aroE4

GAAGCGAGTGACTTGGCAGAAACAGTGGCCAATATTCGTCGCTACCAGATGTTTGGCATCAATCTGTCCATG
CCCTATAAGGAGCAGGTGATTCTTATTTGGATAAGCTGAGCGATGAAGCGCGCTTGATTGGTGGGTTAAT
ACGGTTGTCAATGAGAATGGCAATTTAATTGGATATAATACAGATGGCAAGGGATTTTTTAAGTGCTTGCCTT
CTTTTACAATTTACAGTAAAAAGATGACCCTGCTGGGTGCAGGTGGTGGGCTAAATCAATCTTGGCACAGG
CTATTTTGGATGGCGTCAGTCAGATTTCCGGTCTTTGTTTCGTTTCAAGTTTCTATGGAAAAACAAGACCTTACCT
AGACAAGTTACAGGAGCAAACAGGCTTTAAAGTGGACTTGTAT

gdh16

AGAACACTTTATCCGTGGGCAATACCGCTCTGGTAAGATTGATGGCATGAAATACATCTTATCGTAGCGA
ACCAAATGTGAATCCAGAATCAACAACCTTACATCTGGTGCCTTCTTTGTAGACAGCGATCGATTC
CGTGGTGTTCCTTTCTTTTTCCGTACAGGTAAACGACTGACTGAAAAAGGAACTCATGTCAACATCGTCTTTA
AACAAATGGATTCTATCTTTGGAGAACCCTTGTCCAAATATTTTGACCATCTATATTCAACCAACAGAAGG
CTTCTCTTAGCCTAAATGGGAAGCAAGTAGGAGAAGAATTTAACTTGGCTCCTAACTCACTTGATTATCGT
ACAGACGCGACTGCAACTGGTGTCTTCCAGAACCATACGAGAAATTGATTTATGATGTCCTAAATAACAAC
TCAACCAACTTTAGCCACTGGGAT

gki19

ACCCTTCAACCAATCAAACAAAAGATTGAAAAAGCTTTGGGCATTCCATTTTTTCATCGATAATGATGCCAAC
GTAGCAGCTCTTGGTGAGCGCTGGATGGGTGCTGGTGATAACCAACCAGATGTTGTCTTTATGACACTCGGT
ACTGGTGTGGTGGTGGTATTGTGCGAGAAGGCAAATGCTTCATGGTGTGCTGGTGCAGCAGGTGAACTT
GGTCATATCACTGTTGATTTTGACCAACCAATTGCATGTACTTGTGGTAAAAAAGGCTGTCTTGAGACAGTCG
CTTCTGCAACAGGAATTGTCAATTTGACTCGCTATGCCGATGAATACGAAGGCGATGCAGCCTTGAAC
GCTTGATTGATAACGAGAAGAAGTAACTGCTAAGACTGTCTTTGATCTCGCAAAGAAGGAGACGACCTTG
CTTTGATTGTTTACCGTAACTTCTCACGTTACTTGGGAATCGCTTGTGCT

recP15

CTCAACCAAATTGGATTAACCGCGACCGCTTATTCTTTTCAGCAGGTCATGGTTCAATGCTCCTTTATGCTCTT
CTTACCTTTCTGGTTTTGAAGATGTCAGCATGGATGAGATTAAGAGCTTCCGTCAATGGGGTTCAAAAACAC
CAGGTCACCCAGAATTTGGTCATACGGCAGGATTGATGCTACGACAGGTCCTCTAGGGCAAGGGATTTCAA
CTGCTACTGGTTTTGCCCAAGCAGAACGTTTCTTGGCAGCCAAATATAACCGTGAAGGCTACAATATCTTTGA
CCACTATACTTACGTTATCTGTGGAGACGGAGACTTGATGGAAGGTGTCTCAAGCGAGGCAGCTTCATACGC
AGGTTTGCAAAAACCTTGATAAGTTGGTGTCTTTATGATTCAAATGATATCAACTTGGATGGTGGAGACAAAG
GATTCCTTTACAG

spi401

GTATCTTTTTTTGGAGCAATGTTTCGCGTAGAAGGACATTCCATGGATCCGACCCTAGCGGATGGCGAAAATTCT
CTTCTGTTGTAAAAACACCTTCTTATTGACCGTTTTGATATCGTGGTGGCCCATGAGGAAGATGGCAATAAGGAC
ATCGTCAAGCGCGTGATTGGAATGCCTGGCGACACCATTCTGTTACGAAAATGATAAACTCTACATCAATGAC
AAAGAAACGGACGAGCCTTATCTAGCAGACTATATCAAACGTTCAAGGATGACAACTCCAAAGCACTTAC
TCAGGCAAGGGCTTTGAAGGAAATAAAGGAACTTTCTTTAGAAGTATCGCTCAAAAAGCCCAAGCCTTCA
GTTGATGTCAACTACAACACCAACTTTAGCTTTACTGTTCCAGAAGGAGAATACCTTCTCCTCGGAGATGACC
GCTTGGTTTTCGAACGACAGCCGCCACGTAGGTACCTTCA

xpt20

GGTGATAACATCCTCAAGGTAGATTCCTTTTTAAACCACCAAGTTGACTTTAGCTTGATGCGAGAGATTGGTA
 AGGTTTTTTCGGGAAAAATTTGCTGCTACTGGCATTACCAAGGTCGTAACCATTGAAGCGTCGGGTATTGCCCC
 AGCCGTTTTTACAGCTGAAGCCTTAAACGTTCCCATGATTTTCGCCAAAAAAGCTAAGAACATCACCATGAA
 CGAAGGCATCTTAACTGCTCAAGTCTACTCCTTTACCAAGCAGGTGACCAGCACTGTTTCTATCGCTGGAAAA
 TTCCTCTCACCAGAGGACAAGGTTTTGATTATCGACGATTTCTTGCTAATGGCCAAGCTGCTAAAGGCTTGA
 TTCAAATCATCGAACAGGCCGGTGCCACAGTCCAAGCTATCGGTATCGTGATTGAGAAATCCTTCCAAGATG
 GTCGTGATTTGCTTGAAAAAGCAGGCTACCCTGTCCTATCACTTGCTCGC

ddl26

GCTAAAATCGCTGAAGTGGAAGAAAAATTGGCTTATCCAGTCTTCACTAAGCCGTCAAACATGGGGTCTAGT
 GTCGGTATTTCTAAGTCTGAAAACCAAGAAGAACTCCGTCCAGCCTTAGAACTTGCCTTCCGATATGATAGCC
 GTGTCTTGGTTGAGCAAGGAGTGAATGCCCGTGAAATTGAGGTTGGCCTCTTGGGTAACCTACGATGTCAAGA
 GCACGCTACCAGGAGAAGTTGTCAAGGATGTTGCCTTTTATGACTACGATGCCAAGTATATTGATAACAAGA
 TACTATGGATATTCCTGCCAAAATCAGTGATGATGTTGGTGGCTGTCATGCGTCAAATGCAGAAACAGCCT
 TCCGTGCCATTGGTGGCCTTGGTCTATCTCGTTGCGATTTCTTCTATACAGATAAGGGAGAGATTTTTCTCAAC
 GAGCTC

CT14387 (*aroE269-gdh5-gki500-recP5-spi32-xpt4-ddl4*)

aroE269

GAAGCGAGTGACTTGGCAGAAACAGTGGCCAATATTCGTCGCTACCAGATGTTTGGCATCAATCTGTCCATG
 CCCTATAAGGAGCAGGTGATTCCTTATTTGGATGAGCTAAGCGATGAAGCGCGCTTGATTGGTGGGTTAAT
 ACGGTTGTCAATGAGAATGGCAATTTAATTGGATATAATACAGATGGCAAGGGATTTTTAAGTGCTTGCCTT
 CTTTTACAATTTACAGTAAAAAGATGACCTTGCTGGGTGCAGGTGGTGGCGCTAAATCAATCTTGGCACAGG
 CTATTTTGGATGGCGTCAGTCAGATTTCCGGTCTTTGTTGTTCCGTTTTCTATGGAAAAACAAGACCTTACCT
 AGACAAGTTACAGGAGCAGACAGGCTTTAAAGTGGATTTGTGT

gdh5

AGAACACTTTATCCGTGGGCAATACCGCTCTGGTAAGATTGATGGCATGAAATACATCTTATCGTAGCGA
 GCCAAATGTGAATCCAGAATCAACAACCTTACATCTGGTGCCTTCTTTGTAGACAGCGATCGATTC
 CGTGGTGTTCCTTTCTTTTTCCGTACAGGTAAACGACTGACTGAAAAAGGAACTCATGTCAACATCGTCTTTA
 AACAAATGGATTCTATCTTTGGAGAACCCTTGCTCCAAATATTTTGACCATCTATATTCAACCAACAGAAGG
 CTTCTCTTAGCCTAAATGGGAAGCAAGTAGGAGAAGAATTTAACTTGGCTCCTAACTCACTTGATTACCGT
 ACAGATGCGACTGCAACTGGTGTCTTCCAGAACCATAACGAAAAATTGATTTATGATGTCCTAAATAACAAC
 TCAACTAACTTTAGCCACTGGGAT

gki500

ACCCTTCAACCAATCAAACAAAAGATTGAAAAAGCTTTGGGCATTCCATTTTTTCATCGATAATGATGCCAAC
 GTAGCAGCTCTTGGTGAGCGCTGGATGGGTGCTGGAGATAACCAACCAGACGTTGTCTTTATGACACTCGGT
 ACTGGTGTGGTGGTGGTATTGTGCGAGAAGGCAAATTCATGTTGTTGCTGGTGCAGCAGGTGAACCTT
 GGTCAATCACTGTTGACTTTGACCAACCAATCTCATGTACTTGTGGTAAAAAAGGCTGCCTTGAGACAGTTG
 CTTACAGCAACAGGGATTGTCAACTGACTCGTCGCTATGCCGATGAATACGAAGGCGATGCAGCCTTGA AAC
 GCTTGATTGATAACGGAGAAGAAGTAAGTACTGCTAAGACTGTCTTTGATCTCGAAAAAGAAGGAGACAACCTTG
 CTTTGATTGTTTACCGTAACTTCTCACGTTACTTGGGAATCGCTTGTGCT

recP5

CTCAACCAAACTGGATTAACCGCGACCGCTTTATTCTTTTACGCAGGTCATGGTTCAATGCTCCTTTATGCTCTT
 CTTACCTTTCTGGTTTTGAAGATGTCAGCATGGATGAGATTAAGAGTTTCCGTCAATGGGGTTCAAAAACAC
 CAGGTCACCCAGAATTTGGTCATACGGCAGGATTGATGCTACGACAGGTCCTTAGGGCAAGGGATTTCAA
 CTGCTACTGGTTTTGCCCAAGCAGAACGTTTCTTGGCAGCCAAATATAACCGTGAAGGTTACAATATCTTTGA
 CCACTATACTTACGTTATCTGTGGAGACGGAGACTTGATGGAAGGTGTCTCAAGCGAGGCAGCTTCATACGC
 AGGCTTGCAAAAACCTTGATAAGTTGGTTGTTCTTTATGATTCAAATGATATCAACTTGGATGGTGAGACAAAG
 GATTCCTTTACAG

spi32

GTATCTTTTTTTGGAGCAATGTTTCGCGTAGAAGGACATTCCATGGATCCGACCCTAGCGGATGGCGAAATTCT
 CTTGCTTGTA AAAACACCTTCTATTGACCGTTTTGATATCGTGGTGGCCCATGAGGAAGATGGCAATAAGGAC
 ATCGTCAAGCGCGTGATTGGAATGCCTGGCGACACCATTGTTACGAAAATGATAAACTCTACATCAATGAC
 AAAGAAACGGACGAGCCTTATCTAGCAGACTATATCAAACGTTCAAGGATGACAACTCCAAAGCACTTAC
 TCAGGCAAGGGCTTTGAAGGAAATAAAGGAACTTTCTTTAGAAGTATCGCTCAAAAAGCCCAAGCCTTCACA
 GTTGATGTCAACTACAACCAACTTTAGCTTTACTGTTCCAGAAGGAGAATACCTTCTCCTCGGAGATGACC
 GCTTGGTTTTCGAACGACAGCCGCCACGTAGGTACCTTCA

xpt4

GGTGATAACATCCTCAAGGTAGATTCCTTTTTAAACCACCAAGTTGACTTTAGCTTGATGCGAGAGATTGGTA
 AGGTTTTTTCGGGAAAAATTTGCTGCTGCCGGCATTACCAAGGTCGTAACCATTGAAGCGTCGGGTATTGCCCC
 AGCCGTTTTTACAGCTGAAGCCTTAAACGTTCCCATGATTTTCGCCAAAAAAGCTAAGAACATCACCATGAA

CGAAGGCATCTTAACTGCTCAAGTCTACTCCTTTACCAAGCAGGTGACCAGCACCGTTTCTATCGCTGGAAAA
 TTCCTCTCACCAGAGGACAAGGTTTTGATTATCGACGATTTCTTGCTAATGGCCAAGCTGCTAAAGGCTTGA
 TTCAAATCATCGAACAGGCCGGTGCCACAGTCCAAGCTATCGGTATCGTGATTGAGAAATCCTTCCAAGATG
 GCCGTGATTTGCTTGAAAAAGCAGGCTACCCTGTCCTATCACTTGCTCGT

ddl4

GCTAAAATCGCTGAAGTTGAAGAAAAATTGACTTATCCAGTCTTCACAAAACCATCAAACATGGGTTCAAGT
 GTCGGTATTTCTAAGTCTGAAAATCAAGAGGAACCTTCGTCAGCCTTGAAACTTGCCTTCCAATATGACAGCC
 GTGTCTGGTAGAGCAAGGAGTGAATGCCCGTGAAATTGAGGTTGGCCTCTTGGGTAACCTACGATGTCAAGA
 GCACGCTACCTGGAGAAGTTGTCAAGGACGTTGCCTTTTATGACTACGATGCCAAGTATATTGATAACAAGA
 TTAATATGGATATTCCTGCCAAAATCAGTGATGATGTGGTGGCTGTCATGCGTCAAATGCAGAAACAGCCT
 TCCGTGCCATTGGTGGCCTTGGTCTATCTCGTTGCGATTTCTTCTATACAGATAAGGGAGAGATTTTCTCAAC
 GAGCTC

Рисунок 18 – Нуклеотидные последовательности генов аллельных профилей впервые обнаруженных СТ.

Указанные СТ импортированы в международную базу *Streptococcus* PubMLST под идентификационными номерами: 42328 (СТ14372); 42334 (СТ14386); 42335 (СТ14387); 42336 (СТ14388).

Далее нами было проведено сопоставление между выявленными серотипами и СТ исследованных штаммов. К СТ246 относились 2 штамма *S. pneumoniae* серотипа 4, полученные с территории Украины. В СТ230 вошли 2 штамма серотипа 19F, выделенные на территории Азербайджанской Республики, 3 штамма серотипа 6А, выделенные с территории Азербайджанской Республики и Украины, были определены как СТ473. В СТ320 вошли 2 штамма близкородственных серотипов 19А и 19F, полученные с территории Республики Армения. Остальные известные СТ были представлены единичными штаммами, выделенными на территории Украины. В СТ239 вошел штамм серотипа 19F, СТ2436 включал в себя штамм серотипа 14, в СТ1176 вошел штамм серотипа 7В, СТ235 включил штамм серотипа 20.

Впервые обнаруженные 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, обнаруженным на территории Республики Армения.

В рамках настоящей диссертационной работы также были изучены штаммы *S. pneumoniae*, поступающие из ГБУЗ ИКБ № 2 ДЗМ, г. Москва, что позволит судить о филогенетическом родстве со штаммами, полученными с территорий Азербайджанской республики, Республика Армения и Украины.

Анализ сочетания всех семи генов домашнего хозяйства, проведенный в международной базе МЛСТ *S. pneumoniae* (http://spneumoniae.mlst.net/sql/allelicprofile_choice.asp), показал, что все штаммы, полученные с территории Российской Федерации (г. Москва) относились к известным 18 СТ. Полученные результаты представлены в таблице 17.

Таблица 17 – 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
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

Серотипы исследованных штаммов, полученных из ГБУЗ ИКБ № 2 ДЗМ, г. Москва, были соотнесены с полученными СТ. СТ 2331 был представлен двумя штаммами серотипа 8, а остальные СТ были представлены единичными штаммами, среди которых преобладали следующие серотипы: 14, 19F, 8 и 23F. Нетипируемых штаммов выявлено не было.

4.2 Филогенетический анализ штаммов *S. pneumoniae*

С целью определения родственных связей между СТ была построена UPGMA дендрограмма попарных различий СТ исследуемых штаммов (Рисунок 19).

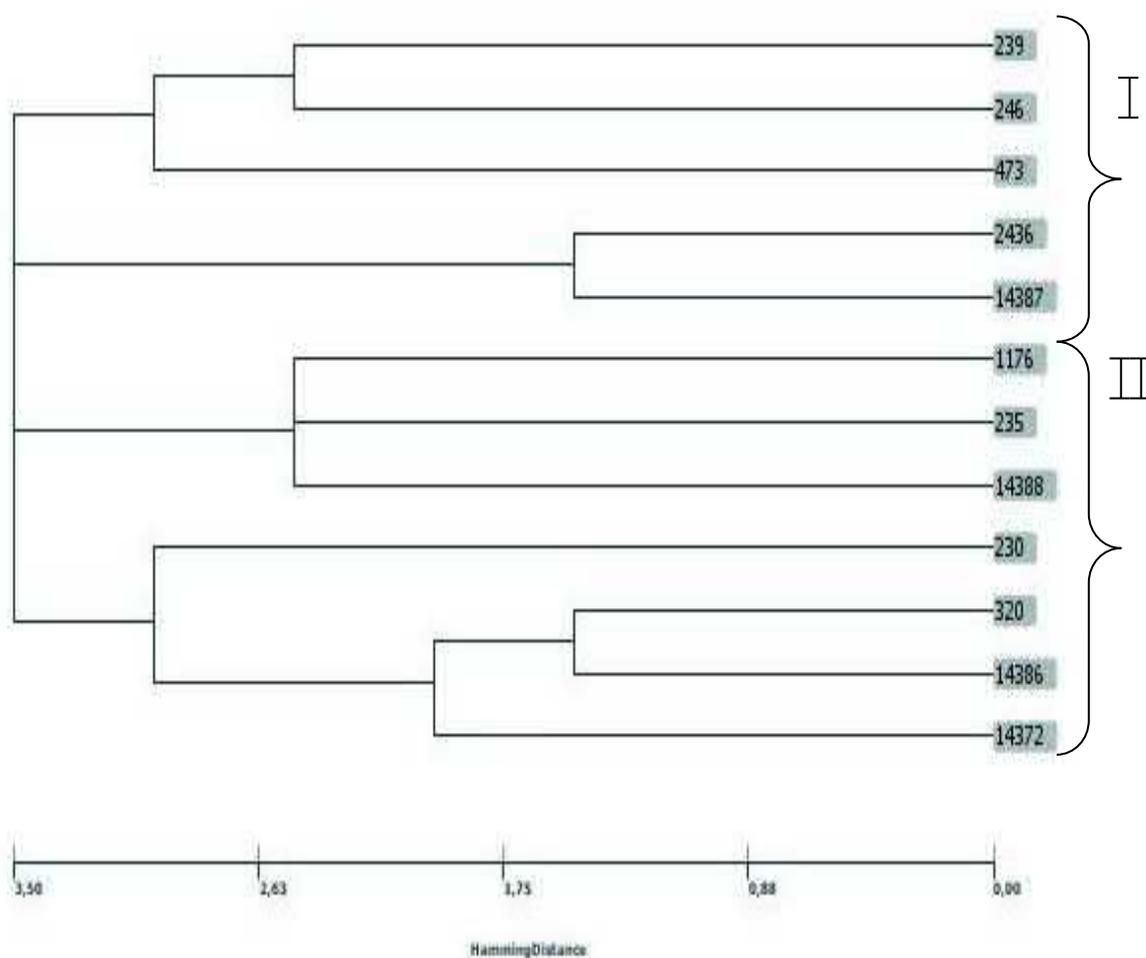


Рисунок 19 – UPGMA дендрограмма попарных различий СТ исследуемых штаммов *S. pneumoniae*

Анализ филогенетического родства показал, что все обнаруженные СТ, вошли в два близкородственных кластера 1 и 2. В I кластер вошел штамм нового

СТ14387, который имеет близкое родство с редким СТ2436. В данный кластер также вошли: штамм встречающегося повсеместно СТ473, штамм характерного для территории Российской Федерации и Республики Беларусь СТ239, штамм СТ246, широко распространенный в Азиатском регионе, и редкий штамм СТ2436, зарегистрированный в Великобритании.

Штаммы новых СТ14388, СТ14386 и СТ14372 вошли во II кластер. Штаммы СТ14388 и СТ14386 имеют близкую филогенетическую связь со штаммом СТ320, а штамм СТ14372 имеет близкое родство со штаммом СТ235, встречающимся в основном на Европейской территории, и со штаммом СТ1176, не имеющим широкого распространения в мире.

Кластеризация с использованием goeBURST анализа МЛСТ с учетом исследуемых территорий показала, что обнаруженные СТ образуют две тесно связанные группы (Рисунок 20).

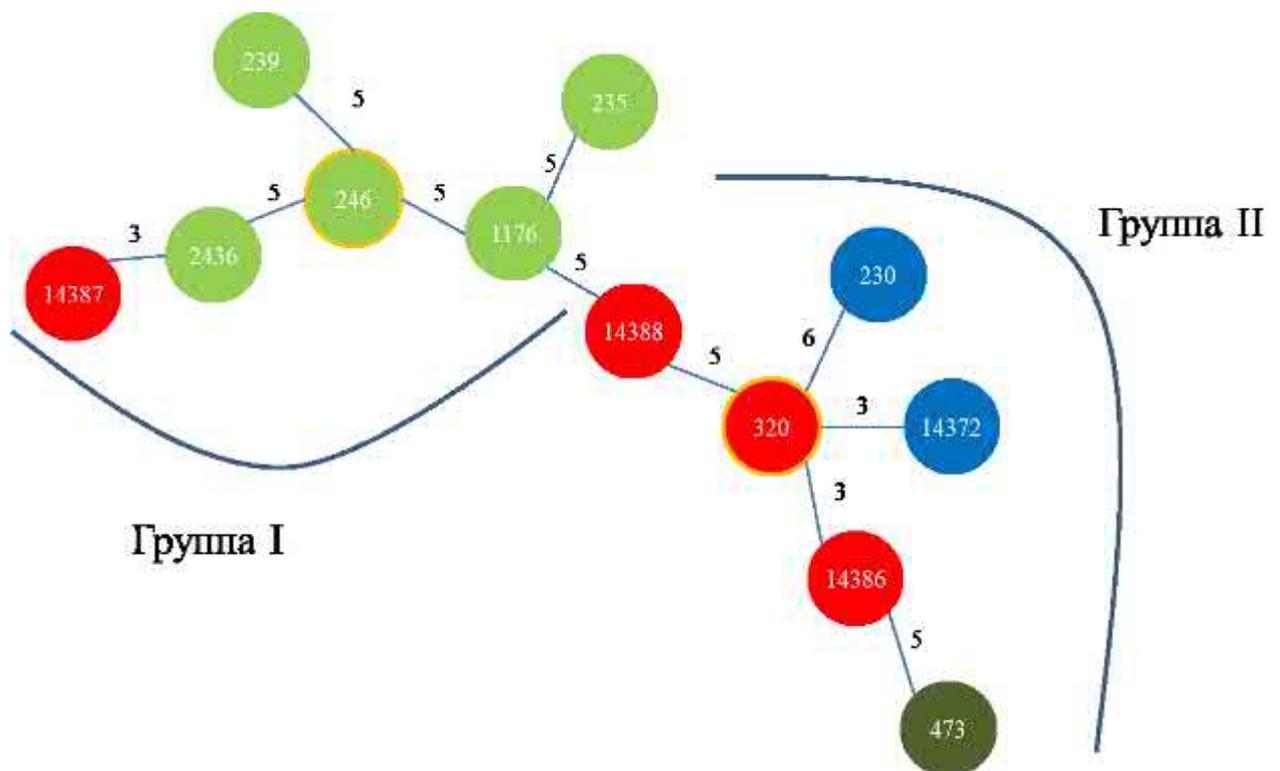


Рисунок 20 – goeBURST анализ МЛСТ с учетом исследуемых территорий

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

В группу I вошли штаммы СТ, распространённых в основном на территории Украины, при этом штамм СТ 246, широко распространённого в Японии и некоторых Европейских странах, является родственным для большинства штаммов, входящих в данную группу. Так же в эту группу вошёл штамм нового СТ14387, обнаруженного на территории Республики Армения.

В группу II вошли в основном штаммы СТ, распространённых в Закавказском регионе, а также штамм СТ473, который был обнаружен как на территории Украины, так и в Азербайджанской Республике, данный СТ является широко распространённым во всем мире. Во II группе центральным сиквенс-типом является высоко инвазивный СТ320, один из широко распространённых во всем мире.

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).

Было показано, что штамм нового СТ14388, циркулирующий на территории Республики Армения, не имеет близких филогенетических связей ни с одним из обнаруженных в данном исследовании СТ, но имеет отдаленную связь с разницей в 4 аллели с обнаруженными в России штаммами: СТ3735, характерным в основном для Азиатского региона, и СТ505, циркулирующим в Восточной Европе.

Штаммы новых СТ14386 и СТ14372, обнаруженные на территории Республики Армения и Азербайджанской республики соответственно, были наиболее близки к высоко инвазивному штамму широко распространённому во всем мире СТ320, с разницей в 3 аллеля. Также со штаммом СТ320 имел близкую филогенетическую связь штамм СТ12822, который в настоящее время обнаружен только на территории Российской Федерации. Штамм нового СТ14387, циркулирующий на территории Республики Армения, был наиболее близок (с разницей в 2 аллели) к штамму СТ2436, обнаруженному на территории Украины. К штамму данного СТ был близок, так же с разницей в 1 аллель, штамм СТ15,

Федерации, имеющий близкую связь разницей в 1 аллель с клонообразующим штаммом, а так же штаммы новых СТ14386 и СТ14372, обнаруженные на территории Республики Армения и Азербайджанской республики соответственно (Рисунок 22).

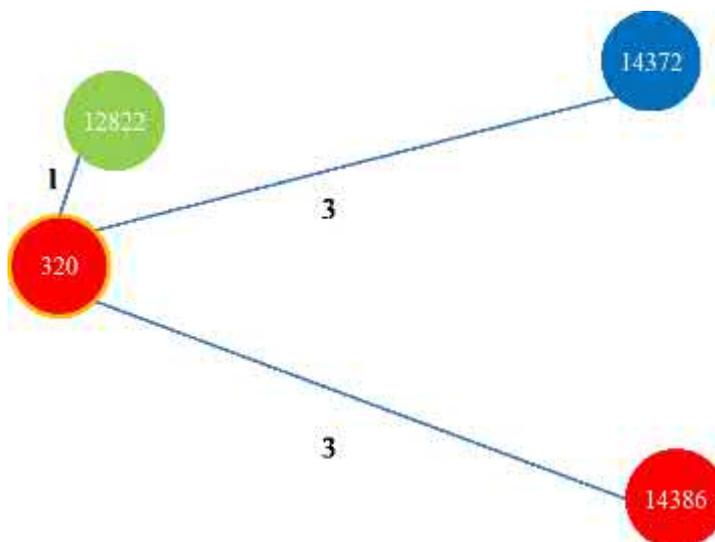


Рисунок 22 – Клональный комплекс, обнаруженный в ходе проведения goeBURST анализа МЛСТ

Примечание: синий цвет – Азербайджанская Республика; красный цвет – Республика Армения, зелёный цвет – Российская Федерация

Заключение к Главе 4

Анализ филогенетического родства показал, что штаммы всех СТ *S. pneumoniae*, циркулирующих на территории Азербайджанской Республики, Республики Армения и Украины, вошли в два близкородственных кластера.

Штаммы новых СТ14388 и СТ14386, выявленные на территории Республики Армения, являются близкородственными со штаммом СТ320, являющимся высоко инвазивным и циркулирующим по всему миру, включая Российскую Федерацию. Штамм нового СТ14372 имеет близкое родство со штаммом СТ235, встречающимся в основном на Европейской территории.

Штамм нового СТ14387, выявленный на территории Республики Армения, имеет близкое родство со штаммом редкого СТ2436, зарегистрированного только на территории Соединенного Королевства Великобритании и Северной Ирландии, а в настоящем исследовании выявленным на территории Украине.

Благодаря внесению впервые определенных СТ в международную базу *Streptococcus* PubMLST, были расширены данные о молекулярно-генетическом разнообразии *S. pneumoniae*, что в свою очередь повышает качество дальнейшего изучения возбудителя, позволяя более широко оценивать происходящие генетические изменения в популяциях.

Кластеризация с использованием eBURST анализа МЛСТ с учетом исследуемых территорий показала, что штаммы полученных СТ образуют две тесно связанные группы. В группу I вошли штаммы СТ, распространённых в основном на Украине, при этом штамм СТ246, широко распространённый в Японии и в некоторых Европейских странах, является родственным для большинства штаммов, входящих в данную группу. Так же в эту группу вошёл штамм СТ14387, обнаруженный на территории Республики Армения.

В группу II вошли в основном штаммы СТ, распространённых в Кавказском регионе, а также штамм СТ473, который был обнаружен как на территории Азербайджанской Республики, так и на территории Украины. Штаммы данного СТ являются широко распространёнными по всему миру. В данной группе центральным сиквенс-типом, является высоко инвазивный штамм широко распространённого по всему миру СТ320. Таким образом, полученные данные позволяют проводить оценку миграции эпидемиологически значимых штаммов.

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

Известно, что эпидемиологический надзор как информационная система снижает неопределенность при принятии управленческих решений. Уровень контроля за инфекцией напрямую зависит от уровня охвата вакцинацией. В условиях низкого охвата прививками, на начальном этапе борьбы с инфекцией порой единственным источником информации являются опорные пункты дозорного надзора. Ценность полученной информации заключается не только в определении тенденций в заболеваемости, приоритетных задач здравоохранения, но и оценке эффективности программ иммунизации. Следует отметить, что до начала настоящего исследования отсутствовала централизованная регистрация данной патологии.

Рассмотренные страны, для которых были проведены анализ и сопоставление заболеваемости пневмококковым менингитом в возрастной группе детей повышенного риска инфицирования, имеют разную тактику иммунизации пневмококковыми вакцинами. Так, анализ заболеваемости пневмококковым менингитом, выявленным и лабораторно верифицированным на базе опорных пунктов дозорного эпиднадзора, осуществлялся в государстве, где вакцинация проводится только по эпидемическим показаниям, что не предусматривало формирование популяционного иммунитета. Поэтому, полученные результаты заболеваемости и микробиологического пейзажа циркулирующих штаммов возбудителя могут служить контролем по сравнению с данными стран с плановой тактикой иммунизации, направленной на увеличение популяционного иммунитета.

В настоящем исследовании учтены данные о заболеваемости, основанные только на лабораторно подтверждённых случаях заболевания. Эти данные были получены с применением различных методов лабораторных исследований: культуральный, иммунохроматографический, РАЛ и ПЦР. Далее представлены результаты идентификации *S. pneumoniae* в клиническом материале (СМЖ) указанными методами.

Оценка заболеваемости пневмококковым менингитом среди детей до 5 лет в исследуемых странах проводилась с учетом распределения серотиповой характеристики *S. pneumoniae* в зависимости от возрастных групп и гендерных различий пациентов на начальном этапе вакцинопрофилактики. Полученные в настоящем исследовании результаты могут быть применены с целью совершенствования системы эпиднадзора и оценки принятых управленческих решений в отношении профилактических мероприятий.

5.1 Результаты идентификации *S. pneumoniae* с применением различных методов лабораторной диагностики

При исследовании 2056 образцов СМЖ в 138 образцах был выявлен *S. pneumoniae*, что составило $6,7 \pm 0,6\%$ от всего числа проб.

При бактериологическом исследовании СМЖ с целью выявления *S. pneumoniae* была использована схема, включающая посев СМЖ на кровяной агар и/или шоколадный агар, с последующим определением типа гемолиза и микроскопией культуры при окраске по Граму. В качестве дополнительных тестов проводили определение каталазной активности, чувствительности к оптохину и растворимости в солях желчных кислот.

С использованием культурального метода штаммы *S. pneumoniae* выделены и идентифицированы в 16 пробах СМЖ, что составило $0,8 \pm 0,2\%$ от всех исследованных образцов и $11,6 \pm 2,7\%$ от всех положительных на *S. pneumoniae* результатов.

Применение ИХ экспресс-теста BinaxNOW позволило повысить количество этиологически расшифрованных проб, содержащих *S. pneumoniae*, на 16 проб – до 32, что составило $1,6 \pm 0,3\%$ от всех исследованных проб, и увеличило процент выявления *S. pneumoniae* на $11,6 \pm 2,7\%$.

Необходимо отметить, что при проведении некорректной пункции СМЖ, в результате которой в пробу попадала кровь, результат ИХ теста мог быть ложноположительным и не подтверждался иными лабораторными методами исследованиями.

При использовании дополнительно РАЛ количество положительных в отношении *S. pneumoniae* проб возросло на 6 проб до 38, что составило $1,8 \pm 0,3\%$ от всех исследованных проб, и увеличило процент выявления *S. pneumoniae* на $4,3 \pm 1,7\%$.

Применение ПЦР повысило детекцию возбудителя ГБМ пневмококковой этиологии в пробах на 100 проб до 138, что составило $6,7 \pm 0,6\%$ от всех исследованных проб, и увеличило процент выявления *S. pneumoniae* на $72,5 \pm 3,8\%$. Полученные результаты представлены в таблице 18.

Таблица 18 – 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	$0,8 \pm 0,2$	16	$11,6 \pm 2,7$
VinaxNOW	32	$1,6 \pm 0,3$	16	$11,6 \pm 2,7$
Латексагглютинация	38	$1,8 \pm 0,3$	6	$4,3 \pm 1,7$
ПЦР	138	$6,7 \pm 0,6$	100	$72,5 \pm 3,8$

Таким образом, наибольшее число проб клинического материала (СМЖ), содержащих в себе *S. pneumoniae*, в данном исследовании было идентифицировано методом ПЦР, который достоверно повысил выявляемость *S. pneumoniae* в 9 раз в сравнении с культуральным методом ($p < 0,05$) и в 4 раза по сравнению с ИХ и РАЛ тестами ($p < 0,05$).

5.2 Данные дозорного эпиднадзора, полученные с территории Азербайджанской Республики

Согласно полученным результатам дозорного эпиднадзора, заболеваемость пневмококковым менингитом детей до 5 лет на территории Азербайджанской Республики за период с 2010 по 2017 гг. колебалась от 0,25 (2011 г.) до 2,09 (2012 г.) на 100 тыс. детского населения, составив в среднем – 0,9 на 100 тыс. детского населения (Рисунок 23).

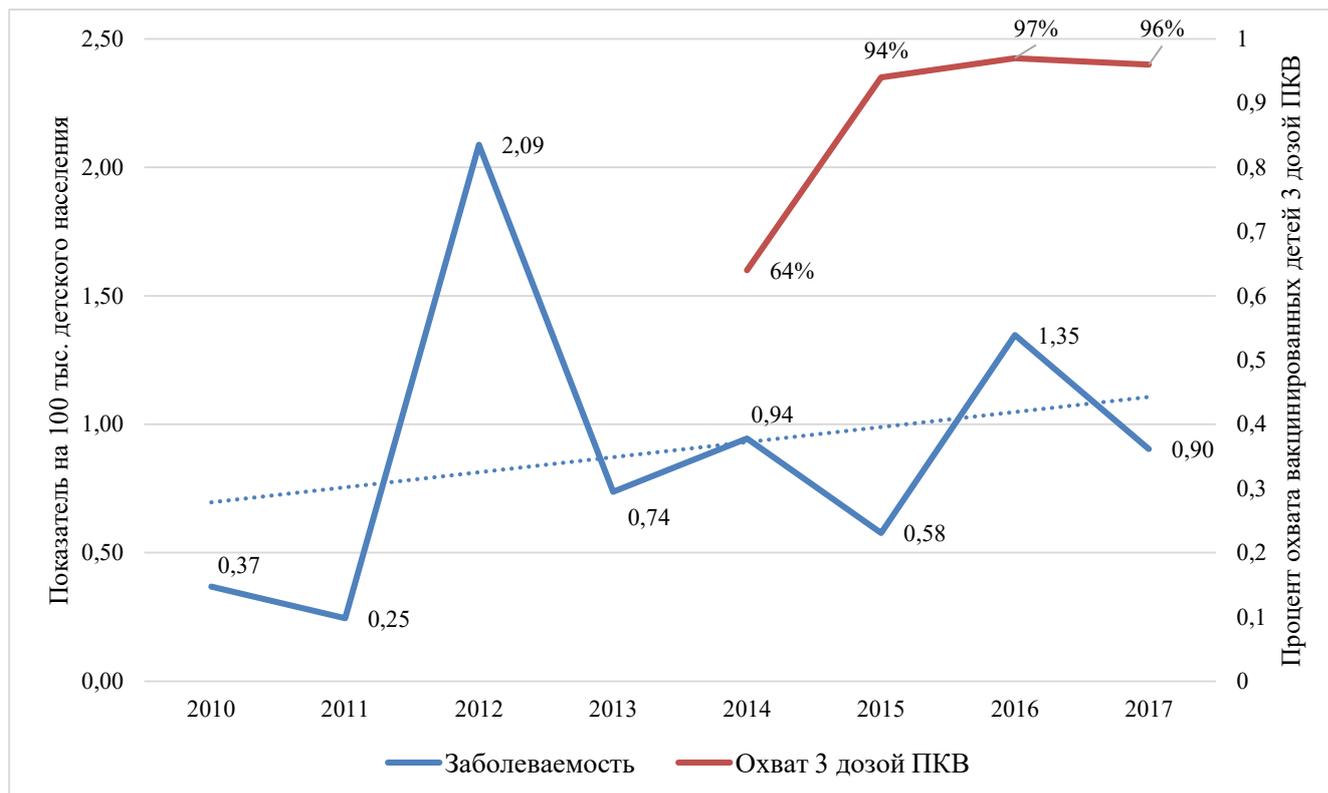


Рисунок 23 – Заболеваемость пневмококковым менингитом и охват 3 дозой ПКВ детей до 5 лет на территории Азербайджанской Республики в период с 2010 по 2017 гг.

Абсолютное число случаев колебалось от 2 (2011 г.) до 17 (2012 г.), в целом за анализируемый период составив 61.

Средний темп роста составил 110,4%. Возможно подобную тенденцию в многолетней динамике заболеваемости определил низкий уровень выявления случаев пневмококкового менингита у детей до 5 лет в стационарах дозорного эпиднадзора на территории Азербайджанской Республики в 2010 и 2011 гг., который был обусловлен трудностями на начальном этапе организации системы дозорного эпиднадзора в данной стране.

Летальность за весь период наблюдения составила 10 случаев (16,4%). Из них 9 случаев было у не вакцинированных детей, а 1 случай заболевания был у вакцинированного ребенка в 2015 г., у которого, несмотря на полный курс вакцинации (3 дозы), заболевание закончилось летальным исходом заболевания, что обусловлено 3 серотипом *S. pneumoniae*, не входящим в состав ПКВ10, остальные летальные случаи были вызваны 3 серотипом, 14 серотипом и серогруппами 7 и 15.

Усредненные уровни заболеваемости пневмококковым менингитом детей до 5 лет на территории Азербайджанской Республики до (2010-2013 гг.) и после (2014-2017 гг.) введение вакцинации составили $0,82 \pm 0,47$ и $0,97 \pm 0,19$ на 100 тыс. детского населения соответственно. При статистической оценке было показано отсутствие достоверной разницы между данными уровнями заболеваемости ($p > 0,05$), что объясняется увеличением заболеваемости, вызванным штаммами, не входящими в состав ПКВ10.

Анализ повозрастного распределения случаев пневмококкового менингита показал, что наибольший вклад в заболеваемость за весь исследуемый период (61, 100%) внесла возрастная группа детей первого года жизни – 27 случаев (44,3%), далее дети от 4 до 5 лет – 15 случаев (24,6%), в возрастных группах детей от 1 года до 2 лет и от 2 лет до 3 лет было по 7 случаев (11,5%), в возрастной группе от 3 до 4 лет – 5 случаев (8,2%) (Рисунок 24).

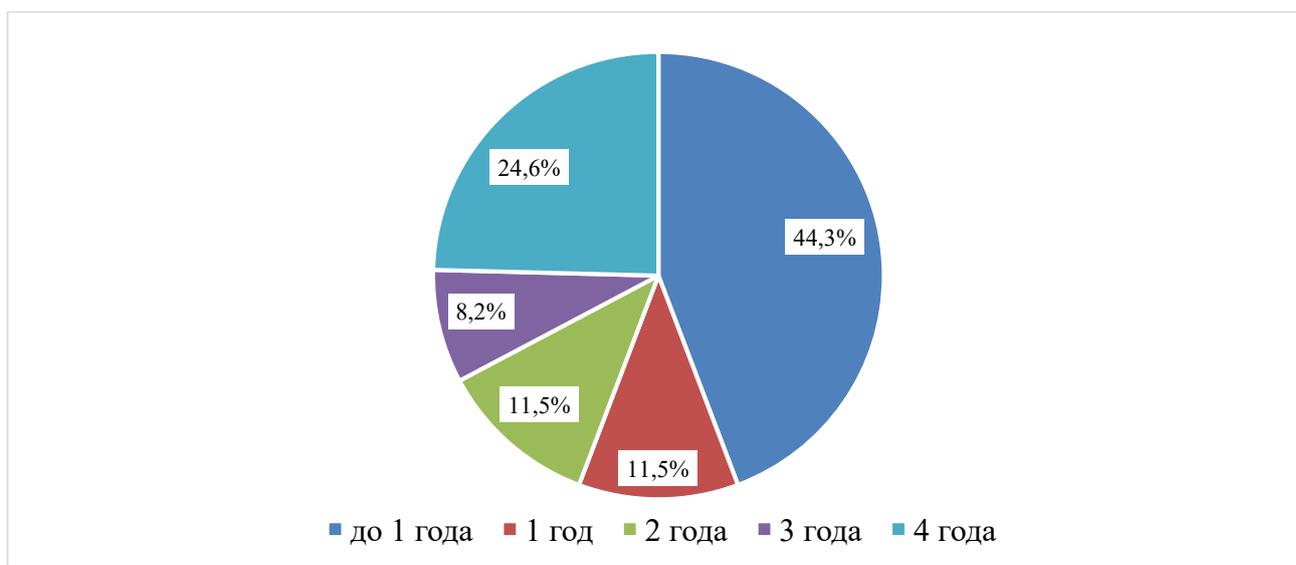


Рисунок 24 – Возрастные группы детей до 5 лет, заболевших пневмококковым менингитом на территории Азербайджанской Республики в период с 2010 по 2017 гг.

При анализе изменений возрастных групп детей видно, что число случаев заболевания, выявленного среди детей возрастной группы до 1 года, преобладало в 2010, 2012, 2015, 2016 гг., а в 2011, 2013 гг. было равно числу случаев заболевания, выявленных в остальных возрастных группах. В 2014 г. преобладало число случаев заболевания, выявленных в возрастной группе детей 4 лет. В 2017 г. преобладало число случаев заболевания, выявленных в возрастной группе детей от 1 года до 2 лет (Рисунок 25).

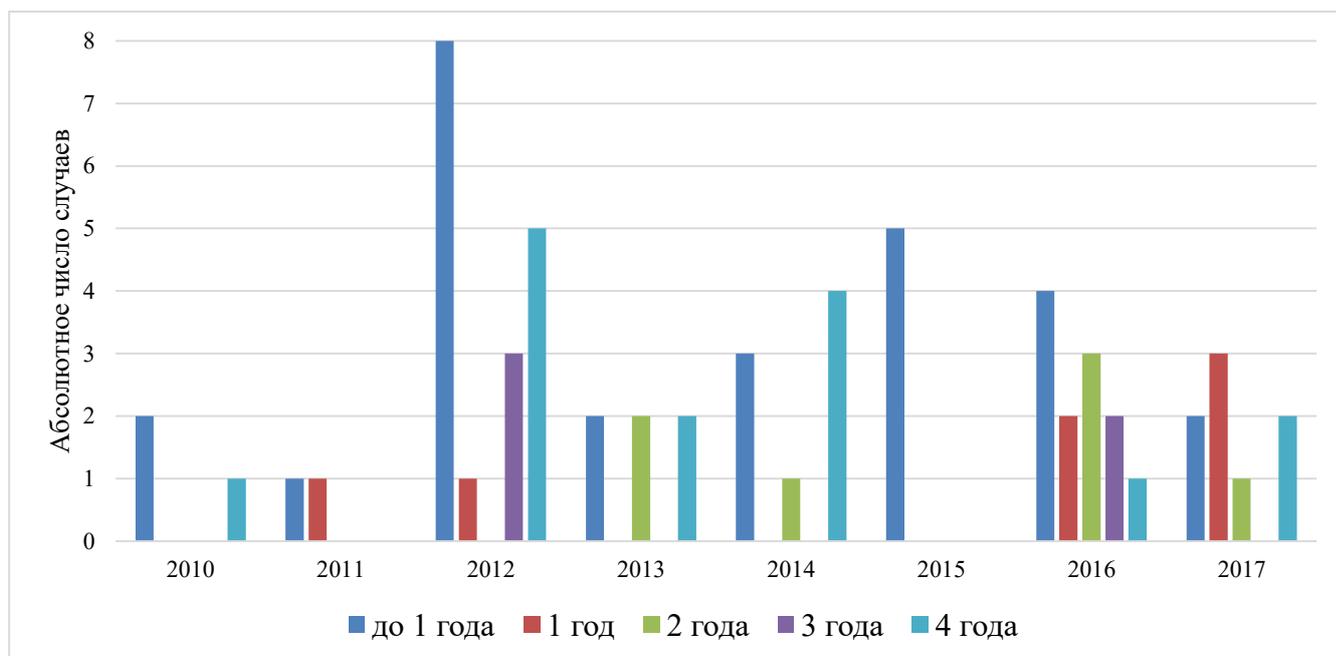


Рисунок 25 – Изменения возрастных групп детей до 5 лет, заболевших пневмококковым менингитом на территории Азербайджанской Республики в период с 2010 по 2017 гг.

При оценке преобладающих серотипов *S. pneumoniae*, в зависимости от возрастных групп, были получены следующие результаты: в возрастной группе детей первого года жизни преобладал серотип 6А/6В (14,8%), в группе детей возрастом 1 год 42,9% случаев было вызвано серотипом 14; в возрастных группах детей от 2 до 3 лет и от 3 до 4 лет не было обнаружено преобладающих серотипов; в возрастной группе детей от 4 лет преобладали серотипы 14 (33,3%) и 19F (26,7%).

В целом данная картина распределения серотипов по возрастным группам перекликается с общим серотиповым пейзажем, как на территории Азербайджанской республики, так и на территории Закавказского региона.

Ведущим серотипом как среди девочек, так и среди мальчиков был 14, однако важно отметить, что серотип 23А был этиологическим агентом только у мужского населения.

Существенных гендерных различий в заболеваемости пневмококковыми менингитами выявлено не было. Дети мужского пола болели несколько чаще, чем дети женского пола – 35 случаев (57,4%) и 26 случаев (42,6%) соответственно. Однако эта тенденция не была устойчивой и в 2010 и 2015 гг. мы наблюдали

преобладание доли случаев заболевания, выявленных среди девочек по сравнению с мальчиками (Рисунок 26).

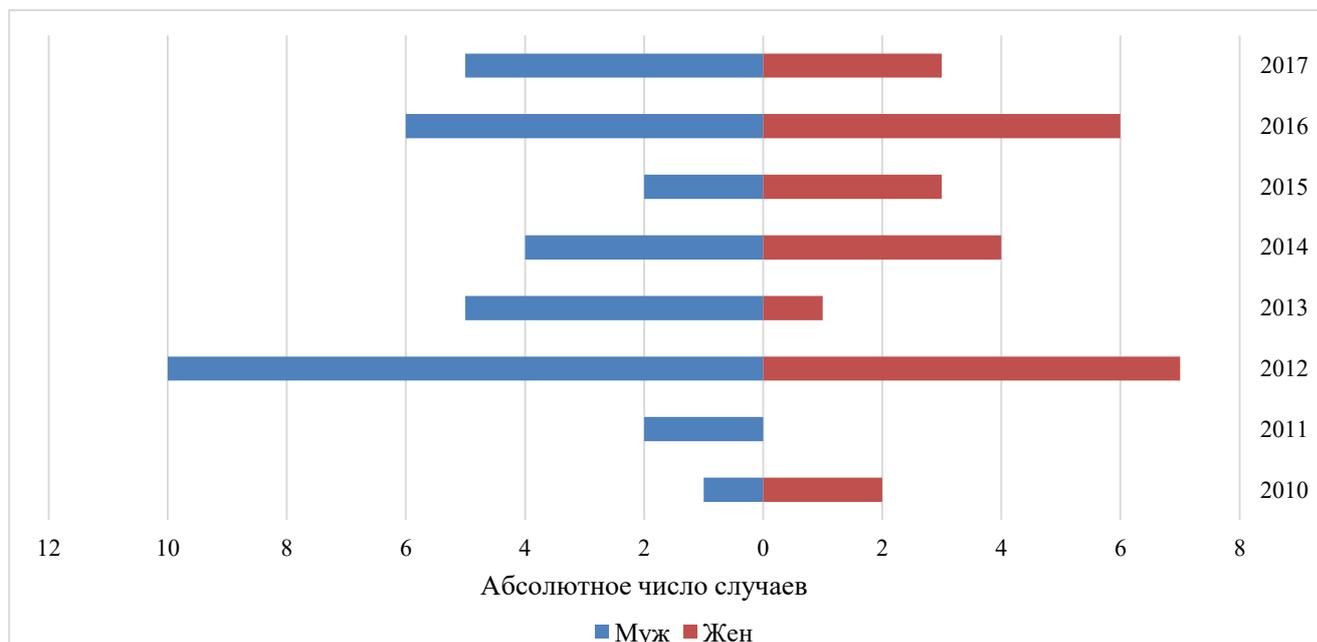


Рисунок 26 – Распределение детей до 5 лет, заболевших пневмококковым менингитом на территории Азербайджанской Республики за период с 2010 по 2017 гг. по половому признаку

Среди городского населения число случаев заболевания составило 28 (45,9%), а среди сельского – 33 (54,1%). Существенной разницы между рассматриваемыми группами населения выявить не удалось (Рисунок 27).

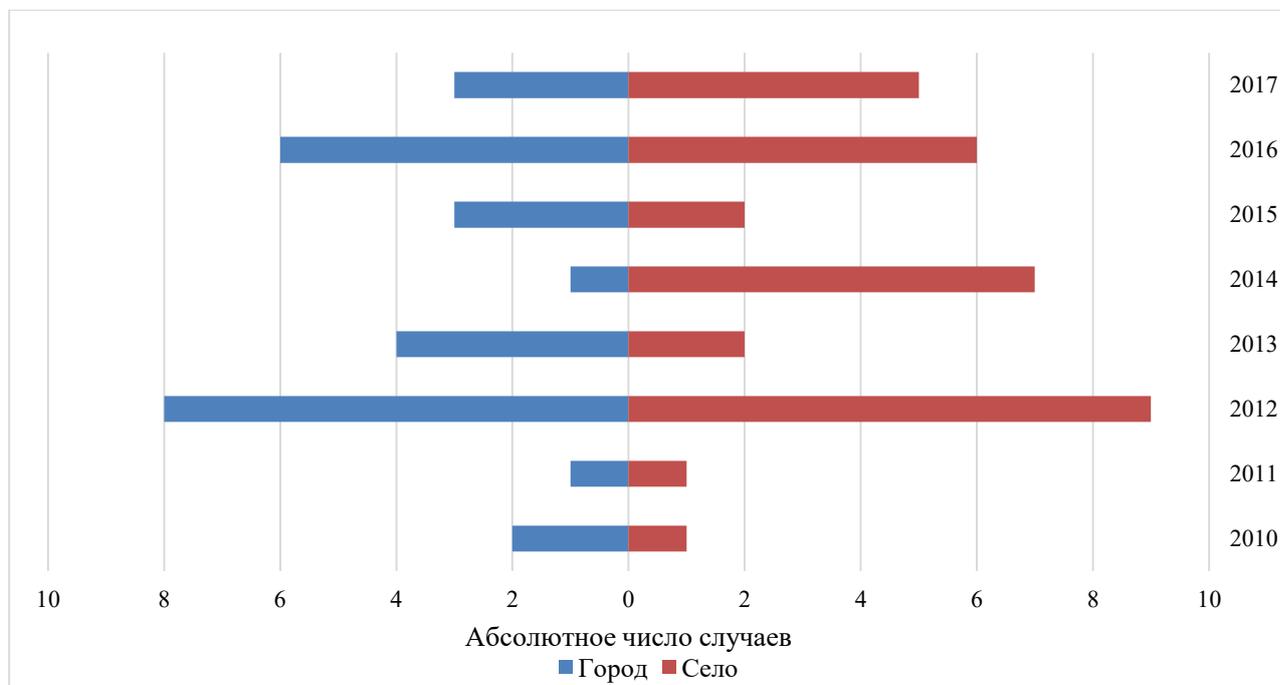


Рисунок 27 – Место жительства детей до 5 лет, заболевших пневмококковым менингитом на территории Азербайджанской Республики за период с 2010 по 2017 гг.

5.3 Данные дозорного эпиднадзора, полученные с территории Республики Армения

Согласно полученным результатам дозорного эпиднадзора, заболеваемость пневмококковым менингитом детей до 5 лет на территории Республики Армения в период с 2013 по 2017 гг. колебалась от 0,49 (2015 г.) до 2,88 (2013 г.) случаев на 100 тыс. детского населения, составив в среднем – 1,96 случаев на 100 тыс. детского населения (Рисунок 28).

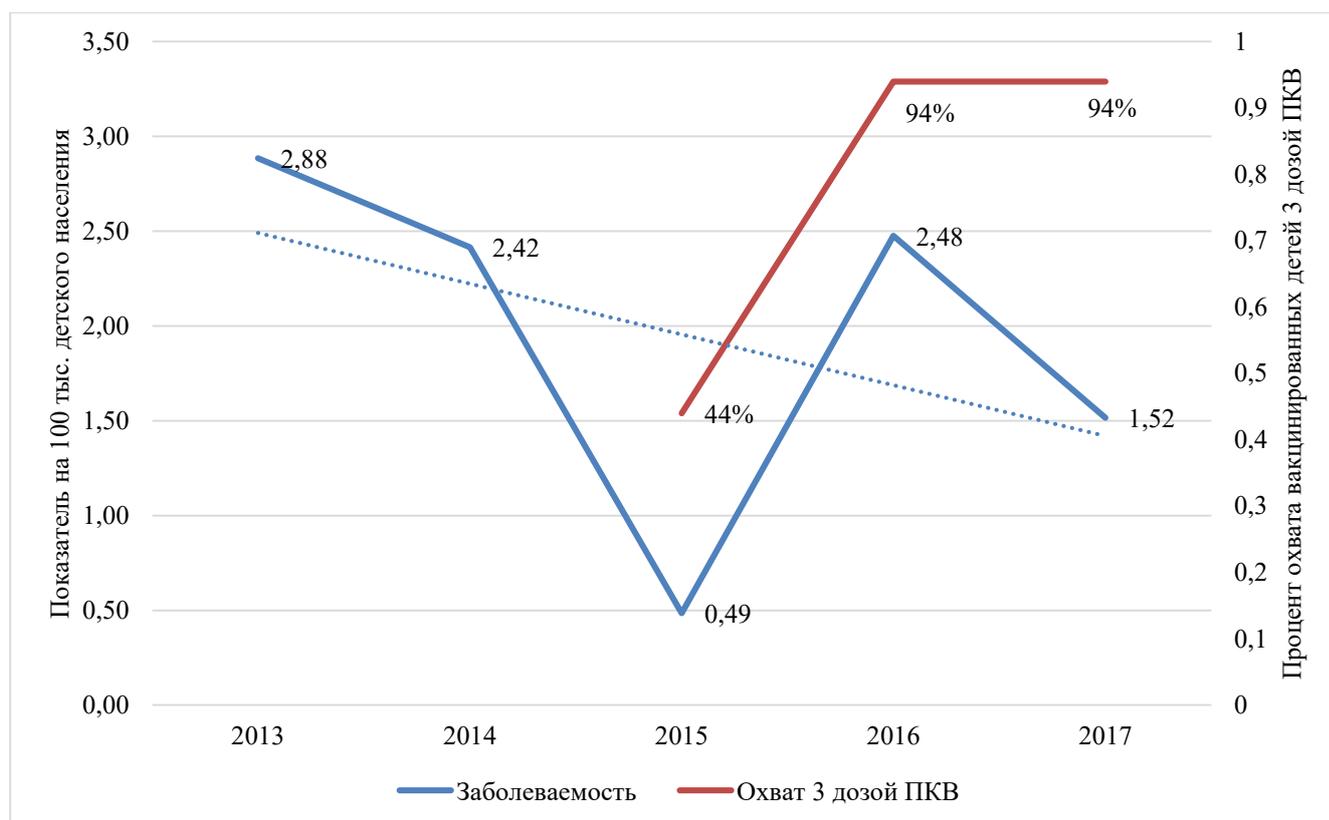


Рисунок 28 – Заболеваемость пневмококковым менингитом и охват 3 дозой ПКВ детей до 5 лет на территории Республики Армения за период с 2013 по 2017 гг.

Средний темп роста составил 64,6%. Абсолютное число случаев составляло от 6 (2013 г.) до 1 (2015 г.), суммарно за все время наблюдения – 20. Летальность за весь период наблюдения составила 1 случай (5%), вызванный 18 серогруппой. 3 случая заболеваний были у вакцинированных детей: 2 – в 2016 г., 1 – в 2017 г. В обоих случаях в 2016 году дети получили только одну дозу вакцины и 1 из них имел осложнения. Заболевший в 2017 году ребёнок получил полный курс вакцины (3 дозы), исход заболевания остался неизвестен. Случаи заболевания у вакцинированных детей были вызваны серотипами: 6А/6В, 19А и 31.

Усредненные уровни заболеваемости до (2013-2014 гг.) и после (2015-2017 гг.) введения вакцинации составили $2,18 \pm 0,28$ и $1,19 \pm 0,56$ на 100 тыс. детского населения соответственно. При статистической оценке было показано отсутствие достоверной разницы между данными уровнями заболеваемости ($p > 0,05$), что может быть объяснено малым числом выявленных случаев пневмококкового менингита на территории Республики Армения.

Анализ повозрастного распределения случаев пневмококкового менингита показал, что наибольший вклад в заболеваемость за весь исследуемый период внесла возрастная группа детей первого года жизни – 7 случаев (35%), далее дети от 1 года до 2 лет – 5 случаев (25%), дети от 4 до 5 лет – 4 случая (20%), дети от 3 до 4 лет – 3 случая (15%) и наименьшее число случаев заболевания было среди детей от 2 до 3 лет – 1 случай (5%) (Рисунок 29).

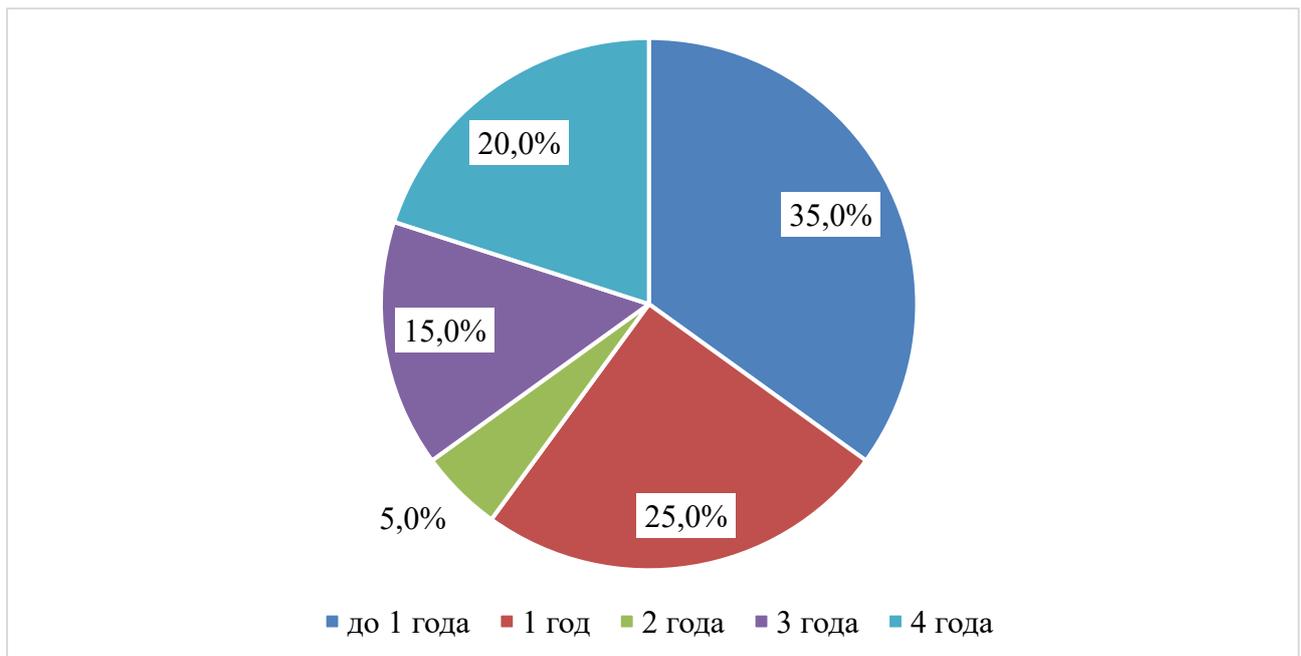


Рисунок 29 – Возрастные группы детей до 5 лет, заболевших пневмококковым менингитом на территории Республики Армения за период с 2013 по 2017 гг.

При анализе годовых изменений видно, что число случаев заболевания, выявленных среди детей возрастной группы до 1 года, преобладало в 2014 и 2015 гг., а в 2016 г. было равно числу случаев заболевания, выявленных среди детей 1 года. В 2014 г. преобладало число случаев заболевания, выявленных в возрастных

группах детей 1 года и 3 лет. В 2017 г. преобладало число случаев заболевания, выявленных в возрастной группе детей 4 лет (Рисунок 30).

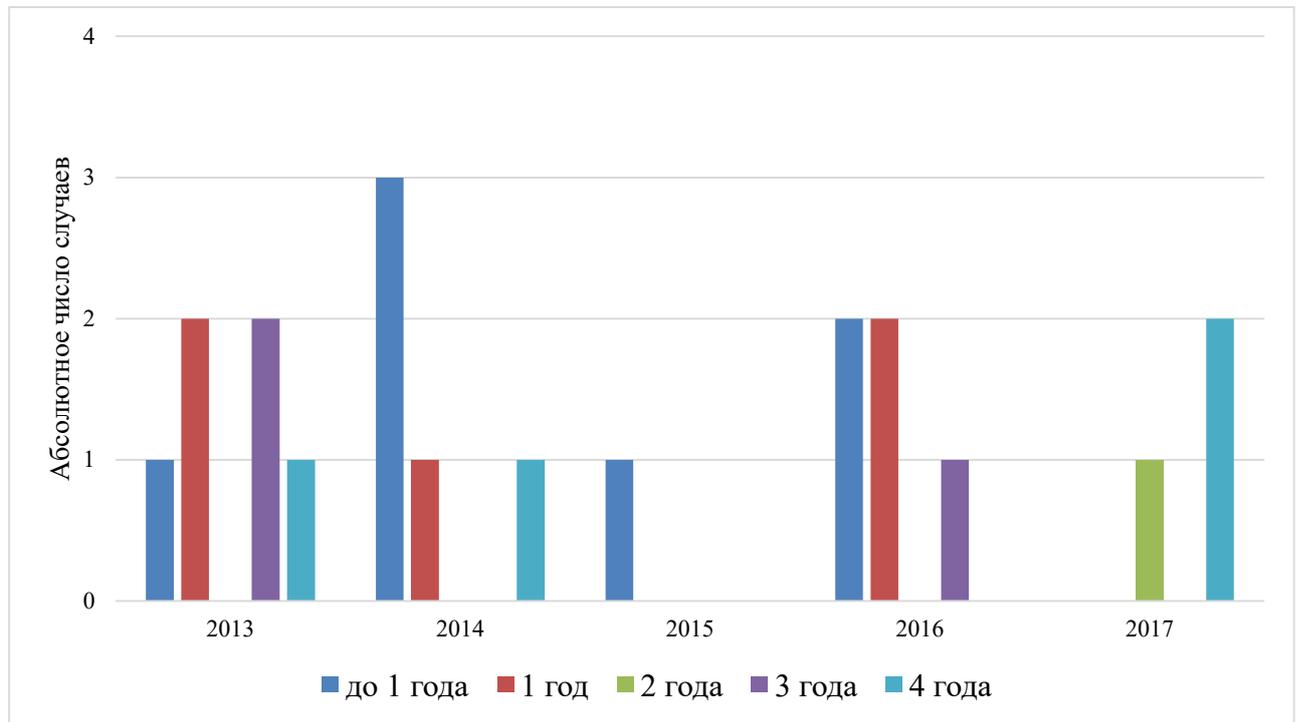


Рисунок 30 – Изменения возрастных групп детей до 5 лет, заболевших пневмококковым менингитом на территории Армении в период с 2013 по 2017 гг.

При оценке преобладающих серотипов *S. pneumoniae*, в зависимости от возрастных групп, преобладающие серотипы выявлены не были, что может быть связано с малой выборкой.

При изучении распределения серотипов *S. pneumoniae*, в зависимости от полового признака заболевших детей, было отмечено, что в группе девочек превалировал 14 серотип, его этиологией было обусловлено 36,4% случаев, так же важно отметить, что все случаи пневмококкового менингита, вызванные 14 серотипом на территории Республики Армения, были среди девочек. В группе мальчиков превалировал серотип 6А/6В, им было вызвано 33,3 % случаев. Серотип, «специфичный» для мужского населения, выявлен не был.

Анализ гендерных различий в заболеваемости показал, что дети мужского пола болели незначительно чаще, чем дети женского пола – 11 (55%) случаев среди мальчиков и 9 (45%) случаев среди девочек (Рисунок 31).

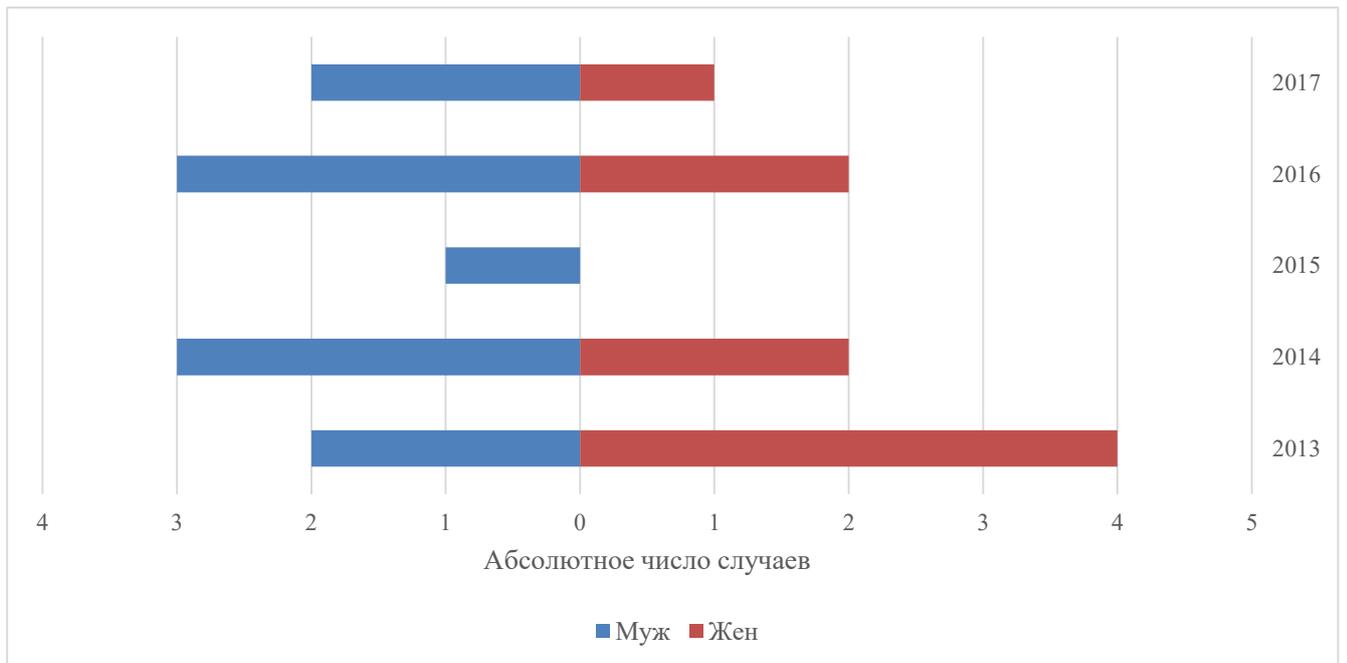


Рисунок 31 – Распределение детей до 5 лет, заболевших пневмококковым менингитом на территории Республики Армения за период с 2013 по 2017 гг. по половому признаку

Среди городского населения число случаев заболевания составило 14 (70%), а среди сельского – 6 (30%). Можно предположить, что это связано с плотностью населения, наличием организованных групп детей, а также, возможно, низкой выявляемостью среди сельского населения в связи с большой удаленностью от госпиталей (Рисунок 32).

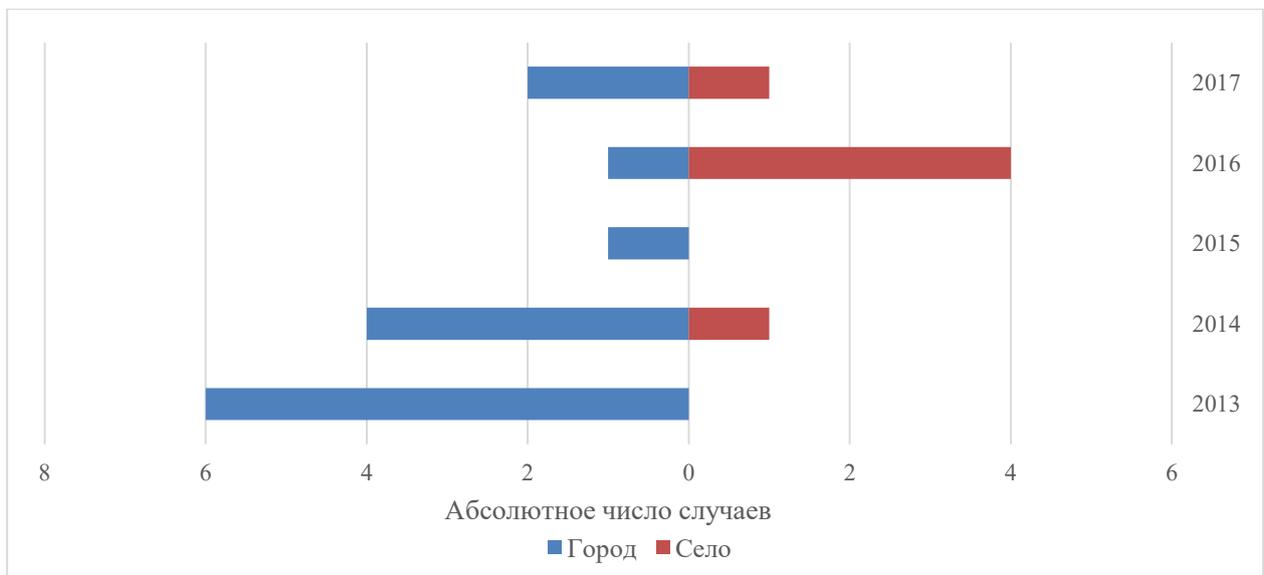


Рисунок 32 – Место жительства детей до 5 лет, заболевших пневмококковым менингитом на территории Республики Армения за период с 2013 по 2017 гг.

5.4 Данные дозорного эпиднадзора, полученные с территории Украины

Согласно полученным результатам дозорного эпиднадзора, заболеваемость пневмококковым менингитом детей до 5 лет на территории Украины за период с 2008 по 2018 гг. изменялась с 0,40 (2012 г.) до 0,04 (2016 г.) случаев на 100 тыс. детского населения, составив в среднем – 0,21 случаев на 100 тыс. детского населения (Рисунок 33).

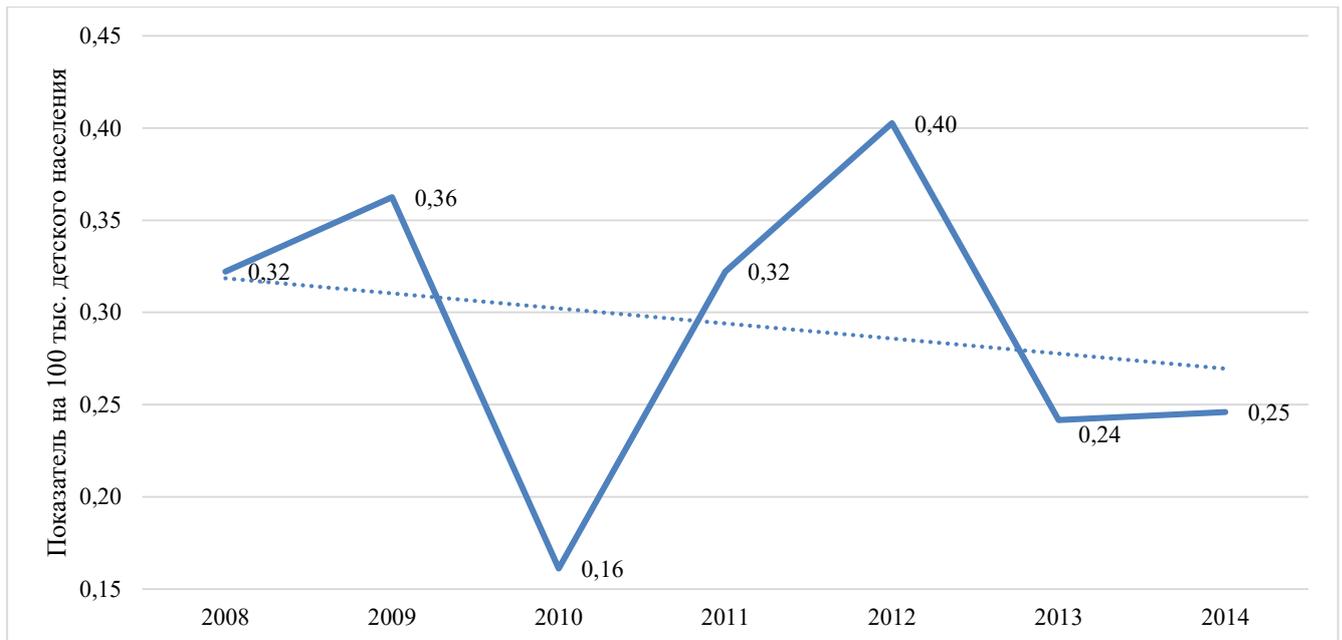


Рисунок 33 – Заболеваемость пневмококковым менингитом детей до 5 лет на территории Украины за период с 2008 по 2014 гг.

Средний темп роста составил 4,2%. Однако эта тенденция в многолетней динамике не отражает реальной ситуации, поскольку число опорных пунктов дозорного эпиднадзора на территории Украины снизилось с 9 в 2010 году до 1 в 2014 г.

Абсолютное число случаев колебалось от 1 (2018 г.) до 10 (2012 г.). Общее число случаев составило 57. Летальность за весь период наблюдения составила 6 случаев (11,1%). Случаев заболеваний среди вакцинированных детей не зарегистрировано.

Анализ по возрастному распределению случаев пневмококкового менингита показал, что наибольший вклад в число случаев заболеваний за весь исследуемый период внесла возрастная группа детей первого года жизни – 29 случаев (50,9%), далее дети от 2 до 3 лет – 11 случаев (19,3%), в возрастной группе детей от 1 года

до 2 лет было зарегистрировано 10 случаев (17,5%), от 3 до 4 лет – 6 случаев (10,5%), среди детей возрастной группы от 4 до 5 лет был зарегистрирован 1 случай (1,8%) (Рисунок 34).

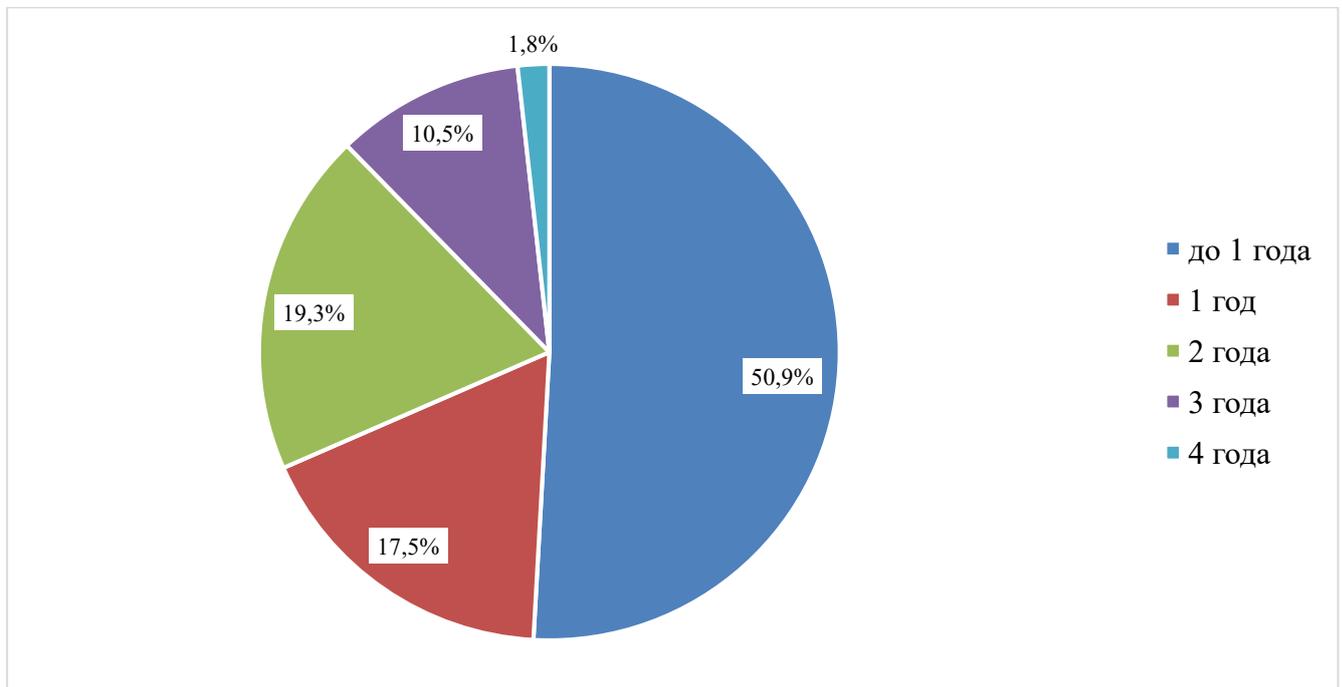


Рисунок 34 – Возрастные группы детей до 5 лет, заболевших пневмококковым менингитом на территории Украины за период с 2008 по 2018 гг.

Как и в случае с Азербайджанской республикой и Республикой Армения, преобладание в структуре заболевших детей до 1 года соответствует данным других исследователей, которые объясняли это заражением от взрослых и пожилых членов семьи – здоровых носителей *S. pneumoniae*. Поскольку обследование контактных лиц в семейных очагах не было целью проекта, наши исследования лишь подтвердили целесообразность проведения подобных исследований в будущем для оценки носительства *S. pneumoniae*. Нельзя не учитывать и низкий уровень не только популяционного иммунитета, но и целевой группы детей до 5 лет на момент начала проведения исследований.

При анализе годовых изменений видно, что число случаев заболевания, выявленных среди детей возрастной группы до 1 года, преобладало в 2008, 2009, 2011, 2012, 2014, 2018 гг., а в 2010 г. было равно числу случаев заболевания, выявленных среди детей 1 года. В 2013 г. преобладало число случаев заболевания, выявленных в возрастных группах детей 1 года и 3 лет. В 2015 и 2016 гг.

преобладало число случаев заболевания, выявленных в возрастной группе детей 4 лет. В 2017 г преобладало число случаев заболевания, выявленных в возрастной группе детей 1 года (Рисунок 35).

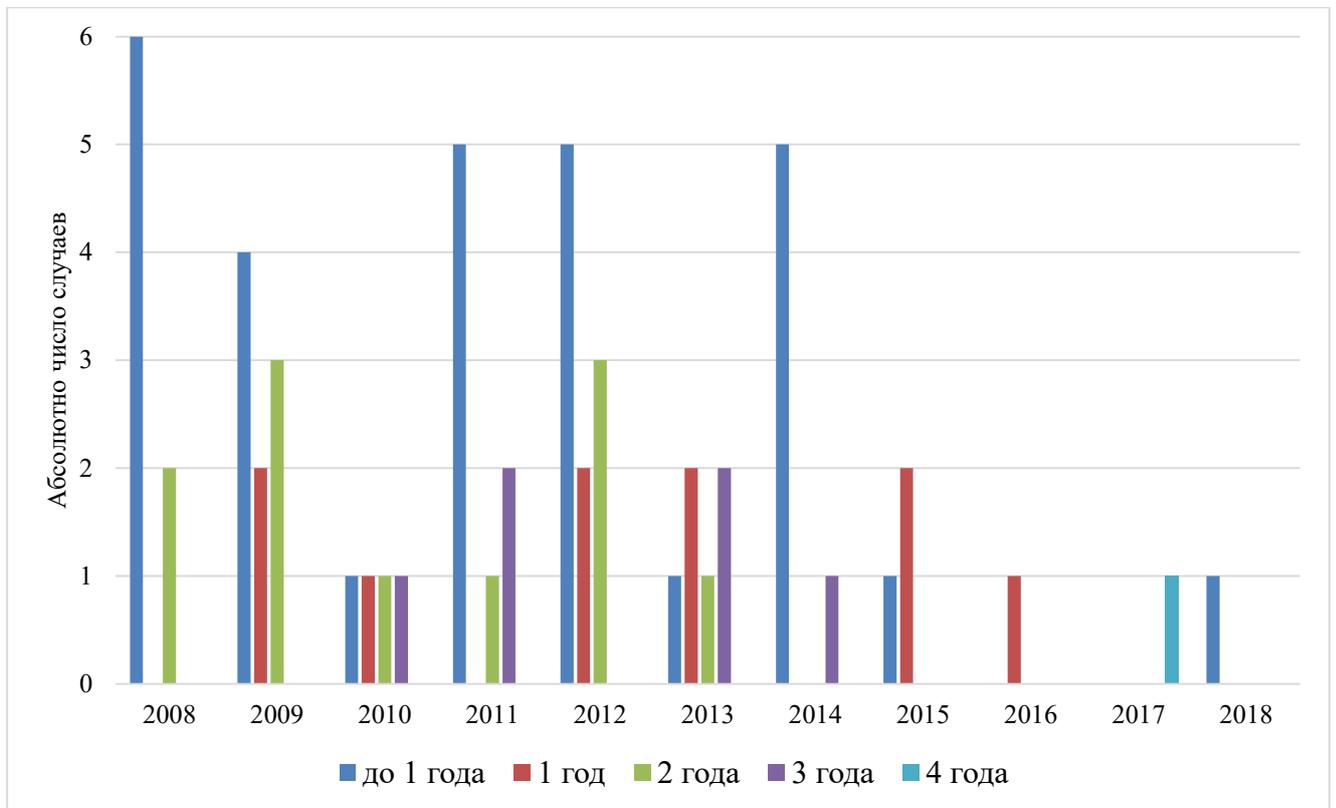


Рисунок 35 – Изменения возрастных групп детей до 5 лет, заболевших пневмококковым менингитом на территории Украины в период с 2008 по 2018 гг.

При оценке преобладающих серотипов *S. pneumoniae*, в зависимости от возрастных групп, были получены следующие результаты: в возрастных группах детей первого года жизни, детей возрастом 1 год и возрастом 3 года превалировал серотип 6А/6В, вызвавший 17,24%, 40% и 66,7% случаев, соответственно, в возрастной группе детей 2 лет превалировал серотип 23F (36%).

Как и в случае с Азербайджанской республикой, данная ситуация сопоставима с общим серотиповым пейзажем в Европейском регионе и на территории Украины в целом.

При исследовании распределения серотипов *S. pneumoniae*, в зависимости от полого признака заболевших детей, было отмечено, что в группе девочек, превалировали серотипы: 14, 23F и 6А/6В, по 13,8% случаев, так же важно отметить, что все случаи пневмококкового менингита (за исключением 1),

вызванные 14 серотипом на территории Украины, как и на территории Республики Армения, были среди девочек. В группе мальчиков, как и на территории Республики Армения превалировал серотип 6А/6В, им было вызвано 39,3 % случаев. Серотип, «специфичный» для мужского населения выявлен не был, т.к. имелись случаи заболевания, вызванные данным серотипом и среди женского населения.

Дети женского пола болели незначительно реже, чем дети мужского пола – 29 (50,9%) случаев среди мальчиков и 28 (49,1%) случаев среди девочек. Также, при рассмотрении числа случаев по годам, видно, что 2008, 2009 и 2012 гг. мальчики болели чаще (Рисунок 36).

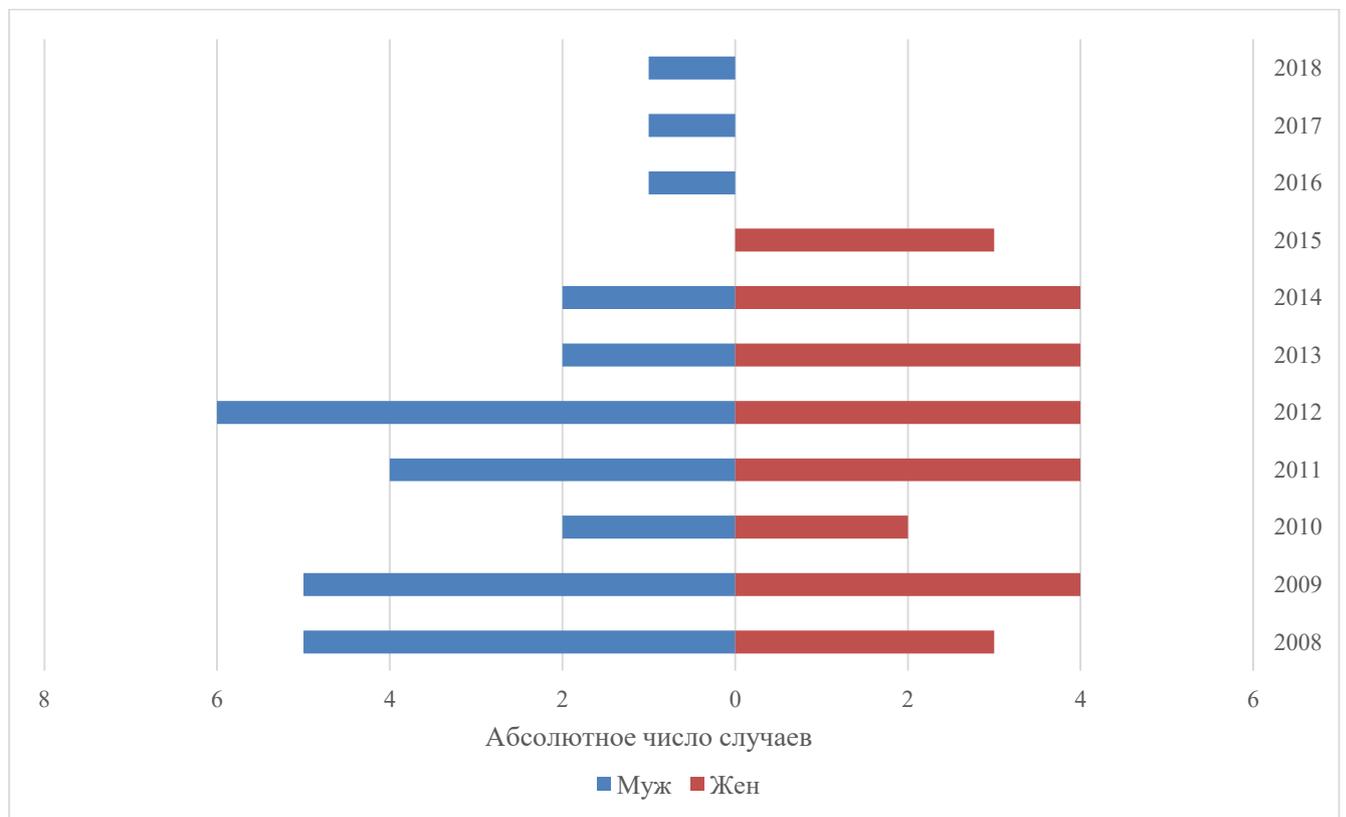


Рисунок 36 – Распределение детей до 5 лет, заболевших пневмококковым менингитом на территории Украины за период с 2008 по 2018 гг. по половому признаку.

Среди городского населения число случаев заболевания составило 38 (66,7%), а среди сельского – 19 (33,3%) (Рисунок 37). Что может быть связано с плотностью населения, наличием организованных групп детей, а также, возможно, низкой выявляемостью среди сельского населения в связи с большой удаленностью от госпиталей.

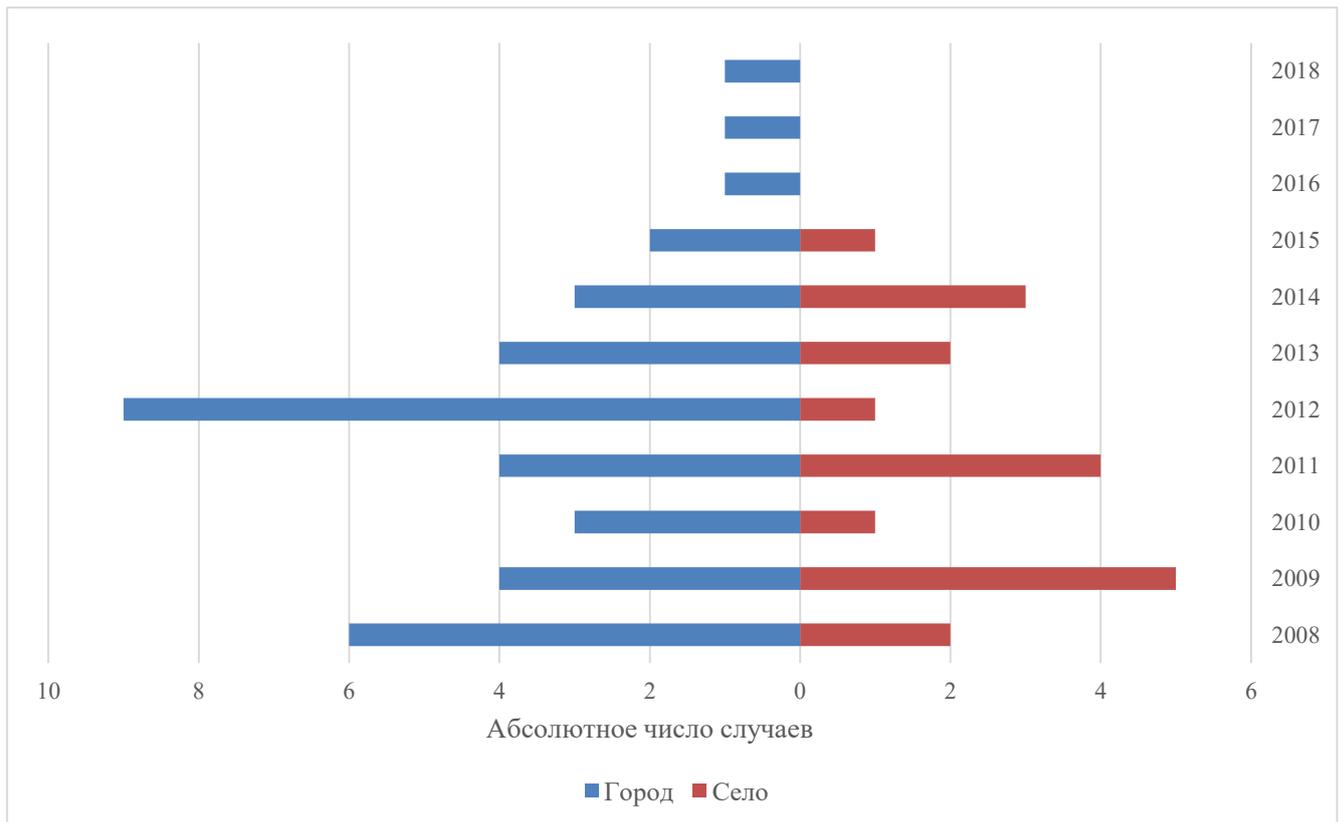


Рисунок 37 – Место жительства детей до 5 лет, заболевших пневмококковым менингитом на территории Украины в период с 2008 по 2018 гг.

5.5 Заключение к Главе 5

Таким образом, благодаря республиканскому уровню выбранных стационаров в качестве опорных пунктов надзора, была обеспечена репрезентативность выборки детей по данной инфекционной патологии по отношению ко всему детскому населению стран. При отсутствии официальной регистрации случаев пневмококкового менингита данные, полученные при использовании дозорного эпиднадзора, позволяют оценить пораженность самой уязвимой группы детского населения – до 5 лет и в последующем – влияние вакцинации на заболеваемость пневмококковым менингитом.

Необходимо регулярное совершенствование надзора в исследуемых странах путем увеличения потока информации с труднодоступных территорий, повышения качества выявляемости для получения более полной картины заболеваемости по странам.

Как видно из данного исследования, на территории Республики Армения был отмечен самый высокий уровень заболеваемости пневмококковым

менингитом (2,38 случаев на 100 тыс. населения детей до 5 лет) среди исследуемых стран. Возможно это связано с высоким уровнем выявляемости.

Самый высокий уровень летальности за весь период наблюдения был отмечен на территории Азербайджанской Республики 10 случаев (16,4%). На территории Украины летальность составила 6 случаев (11,1%), а на территории Республики Армения - 1 случай (5%).

Превалирующие серотипы *S. pneumoniae* среди возрастных групп заболевших детей были сопоставимы с общим серотиповым пейзажем исследуемых регионов. На территории Республики Армения и Украины все случаи пневмококкового менингита (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. Применяемая тактика прививок по эпидемическим показаниям не обеспечивает должного увеличения популяционного иммунитета.

На территории Азербайджанской Республики и Республики Армения проценты случаев заболевания пневмококковым менингитом, выявленных среди детей до 1 года, составили 44,3% и 40,0% соответственно. Вероятно, это связано с недостаточным уровнем иммунной прослойки детей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пневмококковый менингит – это опасное инфекционное заболевание, требующее быстрой диагностики и своевременного лечения, занимающее второе, после менингококкового менингита, место в этиологической структуре ГБМ. Заболевание имеет высокий уровень летальности и осложнений с последующей инвалидизацией.

Наиболее эффективной мерой профилактики пневмококковой инфекции на данный момент является вакцинация. Выбор препаратов для специфической профилактики пневмококковой инфекции обусловлен актуальным серотиповым пейзажем циркулирующих возбудителей и широким разнообразием серотипов и серогрупп *S. pneumoniae*, циркулирующих на исследуемой территории. Эффективность вакцинации напрямую зависит от соответствия циркулирующих серотипов *S. pneumoniae* составу выбранных вакцин и от качества проводимого мониторинга циркулирующих штаммов возбудителя пневмококковой инфекции. Мониторинг циркулирующих возбудителей с применением молекулярно-генетических методов позволяет быстро получать наиболее полную информацию о возбудителе.

В настоящей диссертационной работе представлены результаты лабораторных исследований 3303 образцов СМЖ и 36 клинических изолятов, выделенных из СМЖ, полученной от детей в возрасте от 1 месяца до 59 месяцев и 29 дней, поступивших с подозрением на менингит в медицинские учреждения на исследуемых территориях.

Модифицирован протокол мПЦР с детекцией в агарозном геле, основанный на использовании четырех комбинаций праймеров, оптимизации состава реакционной смеси и условий амплификации, обеспечивающих специфичность реакций с исключением перекрестных и ложноположительных результатов, что позволяет получить ампликоны разных размеров для их одновременного выявления при электрофоретической детекции.

На основе модифицированного протокола мПЦР с детекцией в агарозном геле, разработан двухэтапный алгоритм ПЦР-серотипирования *S. pneumoniae*,

закрывающийся в поэтапном исключении проб, для которых был положительно идентифицирован серотип в предыдущей реакции, он позволяет выявлять следующие серотипы и серогруппы: на первом этапе – 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, на втором этапе – 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. Двухэтапный алгоритм ПЦР-серотипирования *S. pneumoniae* 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 [187].

В ходе исследования серотипового пейзажа было идентифицировано 27 серогрупп и серотипов *S. pneumoniae*. Среди проб, полученных со всех исследуемых 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%). Процент серотипов от общего числа положительных проб на *S. pneumoniae*, входящих в состав ПКВ10, составил 118 (60,5±3,5%), в состав ПКВ13 – 125 (64,1±3,4%). Данный факт подтверждает правильность принятых управленческих решений на исследуемых территориях.

Отдельно оценена динамика изменений серотипового пейзажа *S. pneumoniae* на территории Азербайджанской Республики, Республики Армения и Украины, в связи с тем, что с данных территорий поступали наиболее полные и информативные данные, позволяющие провести их комплексную оценку. Кроме того, данные страны имеют разную политику в отношении проведения иммунизации с использованием пневмококковых конъюгированных вакцин.

На территории Азербайджанской Республики, где была введена в национальный календарь иммунизации ПКВ10, наблюдается некоторое снижение числа выявления случаев заболевания, вызванных вакцинными штаммами, при этом происходит увеличение числа выявления случаев заболевания, вызванных не вакцинными штаммами, а на территории Украины, где ПКВ10 включена в

национальный календарь иммунизации только по эпидпоказаниям, не наблюдается выраженных изменений серотипового пейзажа *S. pneumoniae* и преобладают вакцинные штаммы, что свидетельствует о перспективности включения ПКВ в национальный календарь иммунизации по плановым показаниям. Об этом дополнительно можно судить исходя из рассчитанного среднего темпа прироста процента вакцинных штаммов *S. pneumoniae*, который составил 2,4 %

При рассмотрении изменений серотипового пейзажа *S. pneumoniae* на территории Республики Армения, где ПКВ10 так же включена в национальный календарь иммунизации, видно, что появились случаи заболевания, вызванные *S. pneumoniae* серотипов 3, и 19А. Данные серотипы не входят в ПКВ10, но включены в состав ПКВ13.

Основываясь на наметившихся изменениях серотипового пейзажа *S. pneumoniae* на территориях Азербайджанской Республики и Республики Армения, и учитывая опыт, изложенный в зарубежной литературе, допустимо предположить, что при накоплении достаточной иммунной прослойки на территории данных стран будет наблюдаться смещение серотипового пейзажа *S. pneumoniae* в виде снижения числа случаев заболевания, вызванных вакцинными штаммами, и увеличения числа случаев заболевания, вызванных не вакцинными штаммами. Исходя из этого, необходим постоянный мониторинг за уровнем заболеваемости и серотиповым пейзажем пневмококков с целью обоснования ввода вакцин с большей валентностью, на данный момент ПКВ13.

На основании филогенетического анализа результатов МЛСТ штаммов *S. pneumoniae*, циркулирующих на территории Азербайджанской Республики, Республики Армения и Украины, было показано, что все исследуемые штаммы входят в 2 близкородственных кластера.

Штаммы новых СТ14388 и СТ14386, выявленные на территории Республики Армения, имеют близкое родство со штаммом СТ320, являющимся высоко инвазивным и циркулирующим по всему миру, включая Российскую Федерацию. Штамм нового СТ14372, выявленный на территории

Азербайджанской республики, является близкородственным со штаммом СТ235, встречающимся в основном на Европейской территории.

Штамм нового СТ14387, выявленный на территории Республики Армения, близкородственен со штаммом, имеющим редкий СТ2436, зарегистрированный только на территории Соединенного Королевства Великобритании и Северной Ирландии, а в настоящем исследовании обнаруженным на территории Украины.

Кластеризация с использованием eBURST анализа МЛСТ, проведенная с учетом исследуемых территорий, показала, что исследуемые штаммы образуют две группы с тесной связью. В группу I вошли штаммы СТ, распространённых в основном на Украине, при этом штамм СТ246, широко распространённого в Японии и в некоторых Европейских странах, является родственным для большинства штаммов, входящих в данную группу. Так же в эту группу вошёл штамм СТ14387, обнаруженный на территории Республики Армения. В группу II вошли в основном штаммы СТ, распространённых в Кавказском регионе, а также штамм СТ473, который был обнаружен как на территории Азербайджанской Республики, так и на территории Украины. Штаммы данного СТ являются широко распространёнными по всему миру. В данной группе центральным сиквенс-типом, является высоко инвазивный штамм широко распространённого по всему миру СТ320.

Наибольшее число проб клинического материала (СМЖ), содержащих в себе *S. pneumoniae*, в данном исследовании было идентифицировано методом ПЦР, который достоверно повысил выявляемость *S. pneumoniae* в 9 раз в сравнении с культуральным методом ($p < 0,05$) и в 4 раза по сравнению с ИХ и РАЛ тестами ($p < 0,05$).

Также в рамках настоящей диссертационной проведен ретроспективный анализ данных, полученных при реализации программы ЕРБ ВОЗ по дозорному эпиднадзору за инвазивными бактериальными заболеваниями, управляемыми вакцинацией за период с 2008 по 2018 гг. на территории отдельных стран: Азербайджанской Республики, Республики Армения и Украины.

Республиканский уровень стационаров, где осуществляется дозорный надзор за бактериальными менингитами, обеспечил репрезентативность выборки детей по данной инфекционной патологии в отношении ко всему детскому населению стран, и позволил получить объективные и актуальные данные о регистрации случаев заболевания пневмококковым менингитом на исследуемых территориях.

Из данных стран, Республика Армения и Азербайджанская Республика включили в национальный календарь иммунизации ПКВ10: Азербайджанская Республика - в декабре 2013 г. по схеме 2, 4, 6 месяцев; Республика Армения - в августе 2014 г. по схеме 1,5, 3, 4,5 месяца. На территории Украины ПКВ включена в национальный календарь иммунизации с 2015 г. по эпидпоказаниям.

На территории Республики Армения были отмечены наибольшие показатели заболеваемости пневмококковым менингитом. Заболеваемость пневмококковым менингитом детей до 5 лет в период с 2013 по 2017 гг. колебалась от 0,49 (2015 г.) до 2,88 (2013 г.) случаев на 100 тыс. детского населения.

Заболеваемость пневмококковым менингитом детей до 5 лет на территории Азербайджанской Республики за период с 2010 по 2017 гг. колебалась от 0,25 (2011 г.) до 2,09 (2012 г.) на 100 тыс. детского населения.

На территории Республики Армения было зафиксировано 3 случая заболеваний у вакцинированных детей: 2 – в 2016 г., 1 – в 2017 г. В обоих случаях в 2016 году дети получили только одну дозу вакцины (заболевания были вызваны серотипами 6А/6В и 31), в 2017 году ребёнок получил полный курс вакцины (заболевание было вызвано серотипом 19А).

На территории Азербайджанской Республики был зарегистрирован 1 летальный случай заболевания у вакцинированного ребенка в 2015 г., ребёнок получил полный курс вакцины (заболевание было вызвано серотипом 3). Этот серотип, вызвавший заболевания у вакцинированного ребенка, не входит в состав ПКВ10, но присутствуют в ПКВ 13, за исключением 31 серотипа. Таким образом,

очевидна необходимость увеличения числа серотипов в применяемых вакцинах, в том числе замена ПКВ10 на ПКВ 13 в этих странах.

Превалирующие серотипы *S. pneumoniae* среди возрастных групп заболевших детей были сопоставимы с общим серотиповым пейзажем пневмококка в исследуемых регионах. На территории Республики Армения и Украины все случаи пневмококкового менингита (за исключением 1 на территории Украины) были среди девочек.

Самый высокий уровень летальности, за весь период исследования, отмечен на территории Азербайджанской Республики – 16,4% (10 случаев). Наименьший уровень – на территории Республики Армения – 5% (1 случай).

На территории Республики Армения, Азербайджанской Республики, Украины наибольший вклад в заболеваемость внесла группа детей до 1 года, что может говорить о недостаточном охвате вакцинацией, и, как следствие, об отсутствии иммунной прослойки.

Результаты, полученные в рамках настоящей диссертационной, позволяют расширить представление об изменчивости серотипового пейзажа *S. pneumoniae*, и в перспективе будут способствовать формированию полноценного представления о влиянии вакцинопрофилактики на изменение состава серотипов циркулирующего возбудителя.

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 ПКВ 10 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 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)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абрикосова, Н.Ю. Этиологическая структура острых бактериальных менингитов и ее расшифровка с использованием иммунодиагностики / Н.Ю. Абрикосова, Н.Н. Костюкова, А.А. Туманян // Менингококковая инфекция и гнойные менингиты: тез. докл. всесоюзн. конф. (Архангельск, 1986 г.). - С. 47-50.
2. Алешкин, В.А. Молекулярногенетическая и филогенетическая характеристика штаммов *Streptococcus pneumoniae*, изолированных от пациентов с менингитами и носителей / В.А. Алешкин, А.В. Караулов, В.В. Слободенюк, С.С. Афанасьев, Ю.Н. Урбан, Е.В. Воропаева, М.С. Афанасьев, Е.А. Егорова, В.А. Метельская, А.В. Алешкин, О.Г. Гречишникова, А.Л. Байракова, Ю.В. Несвижский, Е.О. Рубальский // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2013. - № 5. - С. 53-60.
3. Алиева, Р.О. Разработка набора сухих сред для бактериологической диагностики заболеваний, вызванных пневмококком / Р.О. Алиева, А.Г. Гаджиева, Т.И. Осокина // Вопр. физиол. метаболизма и идентификации микроорганизмов: сб. науч. тр. / НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалея. – М., 1987. – С. 53.
4. Андерсон, Р. Инфекционные болезни человека. Динамика и контроль / Рой Андерсон, Роберт Мэй ; пер. с англ. А. Романюх, С. Руднев – М.: Мир, «Научный мир», 2004. – 784 с.
5. Афанасьев, С.С. Мониторинг сиквенс-типов штаммов *Streptococcus pneumoniae*, выделенных от больных менингитом и носителей / С.С. Афанасьев, В.В. Слободенюк, В.А. Алешкин, А.В. Караулов, Е.А. Воропаева, А.В. Алешкин, М.С. Афанасьев, Ю.Н. Урбан, Е.А. Егорова // Аллергология и иммунология. – 2013. – Т.14, №1. – С.40-41.
6. Ашмарин, И.П. Статистические методы в микробиологических исследованиях / И.П. Ашмарин, А.А. Воробьев – Л.: Медгиз, 1962. – 180 с.

7. Баранов, А.А. Вакцинопрофилактика пневмококковой инфекции. Федеральные клинические рекомендации / А.А. Баранов, Л.С. Намазова-Баранова, Н.И. Брико, Ю.В. Лобзин, Р.С. Козлов, М.П. Костинов, И.С. Королёва, А.В. Рудакова, С.В. Сидоренко, В.К. Таточенко, Е.Я. Фролова, С.Р. Харит, М.В. Федосеенко, Е.А. Вишнева, Р.В. Полибин, Л.Р. Селимзянова. – М., 2015. – 24 с.
8. Баранов, А.А. Клинические рекомендации по вакцинопрофилактике пневмококковой инфекции у детей / А.А. Баранов, Л.С. Намазова-Баранова, Н.И. Брико, Ю.В. Лобзин, Р.С. Козлов, М.П. Костинов, И.С. Королёва, А.В. Рудакова, С.В. Сидоренко, В.К. Таточенко, Е.Я. Фролова, С.Р. Харит, М.В. Федосеенко, Е.А. Вишнева, Р.В. Полибин, Л.Р. Селимзянова. – М., 2016. – 24 с.
9. Белошицкий, Г.В. Генетические международные клоны пневмококка, изолированные от больных пневмококковым менингитом в Москве / Г. В. Белошицкий, К.О. Миронов, И.С. Королева // Молекулярная диагностика – 2014: сб. тр. VIII всероссийской научно-практической конференции с международным участием (Москва, 18-20 марта 2014 г.). – Т. 1. – С. 410-411.
10. Белошицкий, Г.В. Пневмококковые менингиты в Российской Федерации / Г.В. Белошицкий, И.С. Королева, Н.И. Кошкина // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2009. – № 21. – С. 6-10.
11. Белошицкий, Г.В. Серотиповой пейзаж инвазивных пневмококков в г. Москве, выделенных от больных пневмококковым менингитом / Г.В. Белошицкий, И.С. Королева // Молекулярная диагностика – 2014: сб. тр. VIII всероссийской научно-практической конференции с международным участием (Москва, 18-20 марта 2014 г.). – Т. 1. – С. 408-409.
12. Белошицкий, Г.В. Фенотипическая и генетическая характеристика штаммов пневмококков, выделенных от больных пневмококковым менингитом / Г.В. Белошицкий, К.О. Миронов, И.С. Королева // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2011. – Т. 13, № 3. – С. 261-266.

13. Боронина, Л.Г. Результаты типирования капсулы штаммов *Streptococcus pneumoniae* методом мультиплексной полимеразной реакции, выделенных у детей на Среднем Урале / Л.Г. Боронина., Е.В. Саматова. // Молекулярная диагностика – 2014: сб. тр. VIII всероссийской научно-практической конференции с международным участием (Москва, 18-20 марта 2014 г.). – Т. 1. – С. 412-413.
14. Венгеров, Ю.Я. Проблема высокой летальности. Пневмококковый менингит / Ю.Я. Венгеров, М.В. Нагибина, Е.П. Михалинова, С.Е. Раздобарина, Т.Н. Молотилова, Ю.Г. Пархоменко, Н.В. Мозгалева, Т.Ю. Смирнова, Т.С. Свистунова // Лечащий врач. – 2015. – №5. – С. 14-18.
15. Винник, А.Л. Питательная среда для выделения и культивирования пневмококка / А.Л. Винник, А.К. Варгина, З.И. Ершова // Микробиология. – 1985. – № 8. – С. 19-22.
16. Винник, А.Л. Экспериментальное клинико-микробиологическое обоснование новых методов диагностики пневмококковой инфекции : автореф. дис. д-ра мед. наук : 03.00.07 / Винник Андрей Леонтьевич. – М., 1991. – 52 с.
17. Вишнякова, Л.А. Питательная среда для выделения и культивирования пневмококка и гемофильных палочек / Л.А. Вишнякова, М.В. Герасимова, М.Е. Фаустова // Лабораторное дело. – 1981. – № 1. – С. 38-41.
18. Гланц, С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц. – М.: Практика, 1999. – 459 с.
19. Горлина, М.Х. Железо и патогенность бактерий / М. Х. Горлина // Микробиология. – 1985. – № 5. – С. 103-108.
20. Грубер, И.М. Физиологические особенности пневмококков / И.М. Грубер, Л.Г. Жданова, Ю.В. Мохов // Микробиология. – 1981. – № 12. – С. 24-29.
21. Жданова, Л.Г. К 100-летию открытия пневмококка / Л.Г. Жданова // Микробиология. – 1981. – № 12. – С. 3-5.
22. Зубков, М.Н. Микробиологические аспекты диагностики пневмоний / М.Н. Зубков, Е.Н. Гугуцидзе // Пульмонология. – 1997. – № 1. – С. 41-45.

23. Иванова, Л.Г. Повышение коэффициента использования компонентов при балансировке питательной среды для выращивания пневмококков / Л.Г. Иванова, А.К. Варгина, А.Л. Винник // Антибиотики и медицинская биотехнология. – 1986. – № 8. – С. 596-600.
24. Игнатов, П.Е. Иммуитет и инфекция / П.Е. Игнатов – М.: Время, 2002. – 352 с.
25. Кветная, А.С. микробиологические основы патогенеза пневмококковой инфекции у детей : автореф. дис. д-ра наук : 03.00.07 / Кветная Ася Степановна – СПб., 1995. – 36 с.
26. Козлов, Р.С. Пневмококки: взгляд сквозь призму истории / Р.С. Козлов – Смоленск: Смол. гос. мед. академия, 2009. – 127с.
27. Колпаков, С.Л. О методологии оценки эпидемиологической ситуации / С.Л. Колпаков, А.А. Яковлев // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2015. – Т. 20, №4. – С. 34-39.
28. Королева, И.С. Менингококковая инфекция и гнойные бактериальные менингиты / И.С. Королева, Г.В. Белошицкий – М.: Медицинское Информационное Агентство, 2007. – 112 с.
29. Королева, И.С. Менингококковая инфекция и гнойные бактериальные менингиты в Российской Федерации / И.С. Королева, М.А. Королева, Г.В. Белошицкий, Л.В. Спирихина, Е.Б. Ежлова, А.А. Мельникова, Н.А. Кошкина, Морозова Н.С., Черепанова Е.А. – М.: «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, 2018. – 41 с.
30. Королева, И.С. Эпидемиология менингококковой инфекции в России и в мире на современном этапе / И.С. Королева, А.Е. Платонов, К.О. Миронов // Вакцинация. – 2004. – № 1(31) – С. 7-15.
31. Королева, М.А. Эпидемиологический мониторинг за гнойными бактериальными менингитами в Российской Федерации : автореф. дис. канд. мед. наук : 14.02.02 / Королева Мария Александровна – М., 2014. – 24 с.

32. Костинов, М.П. Вакцинопрофилактика пневмококковых инфекций и гриппа при аутоиммунных заболеваниях / М.П. Костинов, А.А. Тарасова – М.: «МДВ», 2009. – 250 с.
33. Костюкова, Н.Н. Этиологическая структура бактериальных менингитов в различных регионах / Н.Н. Костюкова, Н.А. Коржуева, С.А. Деркач // Микробиология. – 1992. – №7-8. – С. 14-17.
34. Лазарева, М.А. Этиологическая роль *Streptococcus pneumoniae* при респираторных инфекциях, его носительство и чувствительность к антибиотикам у детей младшего возраста : автореф. дис. канд. мед. наук : 14.01.08 / Лазарева Мария Александровна – М., 2015. – 25 с.
35. Лукашов В.В. Молекулярная эволюция и филогенетический анализ / В.В. Лукашов – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. – 256 с.
36. Маянский, Н.А. Определение капсульных серотипов пневмококка методом мультиплексной ПЦР / Н.А. Маянский, Н.М. Алябьева, Л.К. Катосова, Т.А. Гречуха, В.Г. Пинелис, Л.С. Намазова-Баранова // Вопросы диагностики в педиатрии. – 2010. – Т. 2, № 6. – С. 6-10.
37. Маянский, Н.А. Чувствительность к антибиотикам, клональное и серотиповое разнообразие пневмококков у детей с острым средним отитом в г. Москве / Н.А. Маянский, Н.М. Алябьева, М.А. Лазарева, А.М. Иваненко, О.А. Пономаренко, А.В. Лазарева, Л.К. Катосова, Т.В. Куличенко // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2018. – Т. 18, № 2. – С. 84-92.
38. Миронов, К.О. Идентификация и серотипирование российских штаммов *Streptococcus pneumoniae* с применением методик, основанных на ПЦР / К.О. Миронов, А.Е. Платонов, Р.С. Козлов // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2011. – Т. 13, № 4. – С. 304-319.
39. Миронов, К.О. Молекулярно-биологический мониторинг в эпидемиологическом надзоре за гнойными бактериальными менингитами : автореф. дис. докт. мед. наук : 14.02.02 0 Миронов Константин Олегович – М., 2017. – 45 с.

40. Падюков, Л.Н. Структурная организация бактериальной клетки пневмококка / Л.Н. Падюков // Микробиология. – 1985. – № 3. – С. 96-99.
41. Петрухина, М.И. Статистические методы в эпидемиологическом анализе: методическое пособие / М.И. Петрухина, Н.В. Старостина – М.: Петит – А, 2003. – 94 с.
42. Платонов, А.Е. Генодиагностика бактериальных менингитов и генотипирование их возбудителей : пособие для врачей / А.Е. Платонов, Г.А. Шипулин, Е.Н. Тютюнник – М.: «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, 2001. – 37 с.
43. Приказ Об утверждении национального календаря профилактических прививок и календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям [Электронный ресурс] : приказ Министерства здравоохранения РФ от 21 марта 2014 г. № 125н (с изменениями и дополнениями от: 16 июня 2016 г., 13 апреля 2017 г.) – Режим доступа: КонсультантПлюс.
44. Протасова, И.Н. Этиологическая роль мультирезистентных *Streptococcus pneumoniae* при остром среднем гнойном отите у детей / И.Н. Протасова, С.В. Домрачева, О.Ю. Волкова, В.А. Каленский, О.В. Перьянова, О.Ф. Веселова, Е.Н. Бочанова, Т.А. Елистратова, Н.В. Бахарева, С.В. Сидоренко // Педиатрия. – 2017. – Т. 6, № 96. – С. 92-98.
45. Савинова, Т.А. Динамика распространения резистентности к бета-лактамам среди *Streptococcus pneumoniae* и её клиническая значимость / Т.А. Савинова, С.В. Сидоренко, С.В. Буданов, С.А. Грудина // Антибиотики и химиотерапия. – 2010. – Т. 1, №2. – С.12-20.
46. Савинова, Т.А. Генетическое разнообразие пенициллинустойчивых *Streptococcus pneumoniae* / Т.А. Савинова, О.Ю. Филимонова, С.А. Грудина, С.В. Сидоренко // Журнал инфектологии. – 2009. – Т. 1, № 4. – С. 66-71.
47. Сидоренко, С.В. Популяционная структура пневмококков со сниженной чувствительностью к пенициллину и перспективы антипневмококковой вакцинации для сдерживания распространения антибактериальной

- резистентности / С.В. Сидоренко, Т.А. Савинова, Е.Н. Ильина, М.А. Сырочкина // Антибиотики и химиотерапия. – 2011. – №56. – С. 11-18.
48. Сорокина, М.Н. Бактериальные менингиты у детей / М.Н. Сорокина, В.В. Иванова, Н.В. Скрипченко – М.: Медицина, 2003. – 314 с.
49. Титов, Л.П. Мониторинг резистентности микроорганизмов к антибактериальным средствам как элемент системы эпидемиологического надзора и ключевое направление европейского стратегического плана действий по проблеме / Л. П. Титов, В. А. Горбунов, А. В. Давыдов, Т. С. Ермакова, Ф. А. Лебедев, Н. Н. Левшина, И. А. Карабан // Современные проблемы инфекционной патологии человека – 2012. – № 6. – С. 152-161.
50. Урбан, Ю.Н. Выявление основных возбудителей бактериального гнойного менингита методом ПЦР в реальном времени / Ю.Н. Урбан, Е.А. Егорова, В.В. Слободенюк, С.С. Афанасьев // Инфекция и иммунитет. Материалы международной конференции «Молекулярная эпидемиология актуальных инфекций». – Санкт-Петербург, 2013. – Т.3, №2. – С. 181.
51. Урбан, Ю.Н. Определение фенотипических и молекулярно-генетических характеристик штаммов *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* и *Streptococcus pneumoniae*, выделенных из ликвора детей, больных гнойным бактериальным менингитом : автореф. дис. канд. биол. наук : 03.02.03 / Урбан Юлия Николаевна – М., 2014. – 24 с.
52. Ajello, G.A. Trans-Isolate Medium: a New Medium for Primary Culturing and Transport of *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae* / G.A. Ajello, J.C. Feely, P.S. Hayes, A.L. Reingold, G. Bolan, C.V. Broome, C.J. Phillips // J Clin Microbiol. – 1984. – N 20. – P. 55-58.
53. Andreo, M. Persistence of *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen excretion after pneumococcal pneumonia / M. Andreo, C. Prat, J. Ruiz-Manzano, L. Lores, S. Blanco, M.A. Cuesta, M. Giménez, J. Domínguez // J. Clin Microbiol Infect Dis. – 2009. – N 28. – P. 197-201.
54. Austrian, R. Pneumococcus: the first one hundred years / R. Austrian // Reviews of Infectious Diseases. – 1981. – Vol. 3, N 2. – P.183–189.

55. Azarian, T. Global emergence and population dynamics of divergent serotype 3 CC180 pneumococci [Electronic resource] / T. Azarian, P. Mitchell, M. Georgieva, C.M. Thompson, A. Ghouila, A. Pollard, A. von Gottberg, M. du Plessis, M. Antonio, B. Kwambana-Adams, S. Clarke, D. Everett, J. Cornick, E. Sadowy, W. Hryniewicz, A. Skoczynska, J. Moïsi, L. McGee, B. Beall, B. Metcalf, R. Breiman, P. Ho, R. Reid, K. O'Brien, R. Gladstone, S. Bentley, W. Hanage // *PLoS Pathog.* – 2018. – Vol. 26. – P. 1-26.
56. Bagmen, M. Bacterial Meningitis in the United States, 1998–2007 / M. Bagmen, C. Whitney, N. Messonnier, E. Zell, R. Lynfield, J. Hadler, L. Harrison, M. Farley, A. Reingold, N. Bennett, A. Craig, W. Schaffner, A. Thomas, M. Lewis, E. Scallan, A. Schuchat // *New England J. of Medicine.* – 2011. – Vol. 364. – P. 2016-2025.
57. Barocchi, M.A. A pneumococcal pilus influences virulence and host inflammatory responses / M.A. Barocchi, J. Ries, X. Zogaj, C. Hemsley, B. Albiger, A. Kanth, S. Dahlberg, J. Fernebro, M. Moschioni, V. Massignani, K. Hultenby, A.R. Taddei, K. Beiter, F. Wartha, A. von Euler, A. Covacci, D.W. Holden, S. Normark, R. Rappuoli, B. Henriques-Normark // *J. Proceedings of the National Academy of Sciences USA.* – 2006. – Vol. 103, N 8. – P. 2857–2862.
58. Ben-Shimol, S. Rapid reduction in invasive pneumococcal disease after introduction of PCV7 into the national immunization Plan in Israel / S. Ben-Shimol, D. Greenberg, N. Givon-Lavi // *Vaccine.* – 2012. – Vol. 30. – P. 6600–6607.
59. Bentley, S.D. Genetic analysis of the capsular biosynthetic locus from all 90 Pneumococcal Serotypes [Electronic resource] / S.D. Bentley, D.M. Aanensen, A. Mavroidi, S. Saunders, E. Rabinowitsch, M. Collins // *PLOS Genetics.* – 2006. Available at : journals.plos.org (accessed 01.02.2019).
60. BERPohl, D. Bacterial programmed cell death of cerebral endothelial cells involves dual death pathways / D. BERPohl, A. Halle, D. Freyer, E. Dagand, J.S. Braun, I. Bechmann // *J. Clin Invest.* – 2005. – Vol. 115, N 6. – P. 1607-1615.

61. Bewick, T. Serotype prevalence in adults hospitalised with pneumococcal non-invasive community-acquired pneumonia / T. Bewick, C. Sheppard, S. Greenwood, M. Slack, C. Trotter, R. George, W.S. Lim // *J. Thorax.* – 2012. – Vol. 67, N 6. – P. 540-545.
62. Bhakdi, S. Membrane damage by pore-forming bacterial cytolysins / S. Bhakdi, J. Taranum-Jensen // *Microb. Pathogen.* – 1986. – Vol. 1. – P. 5-14.
63. Black, S. Pneumococcal conjugate vaccine and pneumococcal common protein vaccines / S. Black // *Vaccines.* – 2008. – N 5. – P. 531–567.
64. Bos, L.D. Volatile metabolites of pathogens: a systematic review [Electronic resource] / L.D. Bos, P.J. Sterk, M.J. Schultz // *J. PLOS Pathogens.* – 2013. – N 9. Available at : journals.plos.org (accessed 01.02.2019).
65. Braun, J.S. Pneumococcal pneumolysin and H₂O₂ mediate brain cell apoptosis during meningitis / J.S. Braun, J.E. Sublett, D. Freyer, T.J. Mitchell, J.L. Cleveland, E.I. Tuomanen // *J. Clin Invest.* – 2002. – Vol. 109, N 1. – P. 19-27.
66. Brouwer, M.C. Epidemiology, diagnosis, and antimicrobial treatment of acute bacterial meningitis / Matthijs C. Brouwer, Allan R. Tunkel, Diederik van de Beek // *Clinical microbiology reviews.* – 2010. – Vol. 23, N 3. – P. 467-492.
67. Butler, J. The Pneumococcus / J. Butler, I. Elaine, I. Tuomanen, J. Timothy, J. Mitchell, A. Donald, L. Morrison, G. Brian // Washington, DC: American Society for Microbiology. – 2004. – Vol. 2. – P. 148-168.
68. Butsashvili, M. Surveillance of bacterial meningitis in the country of Georgia, 2006-2010 / M. Butsashvili, G. Kandelaki, M. Eloshvili, R. Chlikadze, P. Innadze // *J. Community Health.* – 2013. – N 38. – P. 724-726.
69. Caimano, M.J. Capsule Genetics in *Streptococcus pneumoniae* and a Possible Role for Transposition in the Generation of the Type 3 Locus / M.J. Caimano, G.G. Hardy, J. Yother, A. Tomasz // *Microb Drug Resist.* – 2000. – P. 115-127.
70. Carvalho, M.G.S. Evaluation and Improvement of Real-Time PCR Assays Targeting *lytA*, *ply*, and *psaA* Genes for Detection of Pneumococcal DNA / Maria da Gloria S. Carvalho, Maria Lucia Tondella, Karen McCaustland, Luciana

- Weidlich, Lesley McGee, Leonard W. Mayer // *J. of Clinical Microbiology*. – 2007. – Vol. 45, N 8. – P. 2460–2466.
71. Centers for Disease Control and Prevention, (CDC) Direct and indirect effects of routine vaccination of children with 7-valent pneumococcal conjugate vaccine on incidence of invasive pneumococcal disease — United States, 1998–2003 / Centers for Disease Control and Prevention (CDC) // *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. – 2005. – N 54. – P. 893-897.
 72. Centre for disease control and prevention [Electronic resource] / Resources related to identifying *Streptococcus pneumoniae* and its serotypes or serogroups (small sets of highly related serotypes, for example 9A/9V) are below. Available at : <https://www.cdc.gov/streplab/pneumococcus/resources.html> (accessed 01.02.2019).
 73. Childhood vaccination programme in Norway. Report for 2011 / Norwegian Public Health Institute – 2012.
 74. Ciapponi, A. Epidemiology of Pediatric Pneumococcal Meningitis and Bacteremia in Latin America and the Caribbean / A. Ciapponi, N. Elorriaga, J.I. Rojas, M. Romano, S.G. Martí, A. Bardach, S. Ruvinsky // *The Pediatric Infectious Disease Journal*. – 2014. – Vol. 33, N 9. – P. 971-978.
 75. Cutts, F.T. Efficacy of nine-valent pneumococcal conjugate vaccine against pneumonia and invasive pneumococcal disease in The Gambia: randomised, double-blind, placebo-controlled trial / F. Cutts, S. Zaman, G. Enwere, S. Jaffar, O. Levine, J. Okoko, C. Oluwalana, A. Vaughan, S. Obaro, A. Leach, K. McAdam, E. Biney, M. Saaka, U. Onwuchekwa, F. Yallop, N. Pierce, B. Greenwood, R. Adegbola // *Lancet*. – 2005. – N 3. – P. 1139–1146.
 76. Davidson, A.L. Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems / A.L. Davidson, E. Dassa, C. Orelle, J. Chen // *Microbiol Mol Biol Rev*. – 2008. – N 72. – P. 317-364.
 77. De Velasco, E.A *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors, pathogenesis and vaccines / E.A. De Velasco, A.F.M. Verheul, J. Verhoef, H. Snippe // *Microb. Rev*. – 1995. – Vol. 59 – P. 591-603.

78. Deng, X. Genetic Analysis of Invasive Pneumococcal Isolates from Children in Ontario, Canada, 2007–2012 / Xianding Deng, Gitanjali Arya, Nader Memari, Ronald Mackenzie, Gregory MacMullin, Donald E. Low // *The Pediatric Infectious Disease J.* – 2015. – Vol. 34, N 6. – P. 594-598
79. Dochez, A.R. The elaboration of specific soluble substance by pneumococcus during growth / A.R. Dochez, O.T. Avery // *J. Exp Med.* – 1917. – N 26. – 477-493.
80. Durmort, C. *Streptococcus pneumoniae* Lipoproteins and ABC Transporters : *Streptococcus Pneumoniae* Molecular Mechanisms of Host-Pathogen Interactions / Claire Durmort, Jeremy S. Brown // Academic Press. – 2015. – 482 p.
81. Eberhardt, A. Attachment of capsular polysaccharide to the cell wall in *Streptococcus pneumoniae* / A. Eberhardt, C.N. Hoyland, D. Vollmer, S. Bisle, R.M. Cleverley, O. Johnsborg, L.S. Håvarstein, R.J. Lewis, W. Vollmer // *Microb Drug Resist.* – 2012. – N 18. – P. 240-255.
82. Ebockhaus, E. Epidemiology of invasive pneumococcal infections: manifestations, incidence and case fatality rate correlated to age, gender and risk factors / E. Ebockhaus, S. Berg, R. Andersson, G. Ockborn, P. Malmström, M. Dahl, S. Nasic, B. Trollfors // *BMC Infectious Diseases.* – 2016. – N 16. – P. 367-374.
83. Estimated Hib and pneumococcal deaths for children under 5 years of age, 2008 [Electronic resource] / WHO/IVB, 2012. Available at : http://www.who.int/immunization_monitoring/burden/Pneumo_hib_estimates/en/index.html, accessed March 2012 (accessed 01.02.2019).
84. Faden, H. Changes in nasopharyngeal flora during otitis media of childhood / H. Faden, J. Stanievich, L. Brodsky, J.M. Berstein // *Pediatr. Infect. Dis. J.* – 1990. – Vol. 9. – P. 623-626.
85. Fadlyana, E. Risk factors associated with nasopharyngeal carriage and density of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, and *Staphylococcus aureus* in young children living in Indonesia / E. Fadlyana, E.M. Dunne, K. Rusmil, R. Tarigan, S. Sudigdoadi, C. Murad, E. Watts, C. Nguyen, C.

- Satzke, N.E. Dewi, S.A.K. Indriyani, F.F. Yani, K. Mulholland, C. Kartasasmita // *Pneumonia*. – 2018. – Vol. 25. – P. 1-14.
86. Feikin, D.R. Serotype-specific changes in invasive pneumococcal disease after pneumococcal conjugate vaccine introduction: a pooled analysis of multiple surveillance sites [Electronic resource] / Daniel R. Feikin, Eunice W. Kagucia, Jennifer D. Loo // *PLOS Medicine*. – 2013. – N 10. Available at : journals.plos.org (accessed 01.02.2019).
87. Ferrante, A. Inhibition of in vitro human lymphocyte response by the pneumococcal toxin pneumolysin / A. Ferrante, B. Rowan-Kelly, J.C. Paton // *J. Infection and Immunity*. – 1984. – Vol. 46, N 2. – P. 585-589.
88. Galan-Bartual, S. Structure and Function of Choline-Binding Proteins : *Streptococcus Pneumoniae* Molecular Mechanisms of Host-Pathogen Interactions / Sergio Galan-Bartual, Inmaculada Perez-Dorado, Pedro Garcia and Juan A. Hermoso // Academic Press. – 2015. – 482 p.
89. Gessner, B.D. African meningitis belt pneumococcal disease epidemiology indicates a need for an effective serotype 1 containing vaccine, including for older children and adults / B.D. Gessner, J.E. Mueller, S. Yaro // *BMC Infectious Diseases*. – 2010. – N 10. – P. 22.
90. Ghasemi, M. Investigation of the Antibacterial Effect of Native Peganum harmala, Mentha pulegium and Alcea rosea Hydro-alcoholic Extracts on Antibiotic Resistant *Streptococcus pneumoniae* and *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Baku, Azerbaijan / Mehdi Ghasemi, Yemen Atakishiyeva // *J. IEM*. – 2016. – Vol. 2. – P. 12-14.
91. Gisch, N. The Pneumococcal Cell Wall : *Streptococcus Pneumoniae* Molecular Mechanisms of Host-Pathogen Interactions / Nicolas Gisch, Katharina Peters, Ulrich Zahringer, Waldemar Vollmer // Academic Press. – 2015. – 482 p.
92. Glover, D.T. *Streptococcus pneumoniae* surface protein *PcpA* elicits protection against lung infection and fatal sepsis / D.T. Glover, S.K. Hollingshead, D.E. Briles // *J. Infection and Immunity*. – 2008. – N 76. – P. 2767-2776.

93. Hanquet, G. Pneumococcal serotypes in children in 4 European countries / G. Hanquet, E. Kissling, A. Fenoll // *Emerging Infectious Diseases*. – 2010. – N 16. – P. 1428–1439.
94. Hasan, A.Z. Using pneumococcal and rotavirus surveillance in vaccine decision-making: A series of case studies in Bangladesh, Armenia and the Gambia / A.Z. Hasan, S. Saha, S.K. Saha, G. Sahakyan, S Grigoryan // *J. Vaccine*. – 2018. – N 36. – P. 4939-4943.
95. Henriques, B. Molecular epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* causing invasive disease in 5 countries / B. Henriques, M. Kalin, A. Ortqvist // *J. Infect. Dis.* – 2000. – Vol. 182. – P. 833-839.
96. Holmberg, H. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay with coagglutination and latex agglutination for rapid diagnosis of pneumococcal pneumonia by detecting antigen in sputa / H. Holmberg, A. Krook // *Eur. J. of Clinical Microbiology*. – 1986. – N 5. – P. 282-286.
97. Horita, N. Sensitivity and specificity of the *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen test for unconcentrated urine from adult patients with pneumonia: A meta-analysis / Nobuyuki Horita, Naoki Miyazawa, Ryota Kojima, Naoko Kimura, Miyo Inoue, Yoshiaki Ishigatsubo // *Respirology*. – 2013. – N 18. – P. 1177–1183.
98. Hsu, H.E. Effect of pneumococcal conjugate vaccine on pneumococcal meningitis / Heather E. Hsu, Kathleen A. Shutt, Matthew R. Moore, Bernard W. Beall // *The New England J. of Medicine*. – 2009. – Vol. 360. – P. 244–256.
99. Ihekweazu, C. Outbreaks of serious pneumococcal disease in closed settings in the post-antibiotic era: a systematic review / C. Ihekweazu, M. Basarab, D. Wilson, I. Oliver, D. Dance, R. George // *J. Infect.* – 2010. – Vol. 61, N 1. – P. 21–27.
100. Imöhl, M. Pneumococcal meningitis and vaccine effects in the era of conjugate vaccination: results of 20 years of nationwide surveillance in Germany / Matthias Imöhl, Jens Möller, Ralf René Reinert, Stephanie Perniciaro, Mark van der

- Linden and Orhan Aktas // BMC Infectious Diseases. – 2015. – Vol. 15. – P. 61-70.
101. Isaacman, D.J. Burden of invasive pneumococcal disease and serotype distribution among *Streptococcus pneumoniae* isolates in young children in Europe: impact of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine and considerations for future conjugate vaccines / D.J. Isaacman, E. McIntosh, R. Reinert // International J. of Infectious Diseases. – 2010. – N14. – P. 197-209.
102. Jacobs, D.M. Trends in pneumococcal meningitis hospitalizations following the introduction of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in the United States / David M. Jacobs, Francine Yung, Emily Hart, Melanie N.H. Nguyen, Amy Shaver // J. Vaccine. – 2017. – N 35. – P. 6160-6165.
103. Johnsborg, O. Regulation of natural genetic transformation and acquisition of transforming DNA in *Streptococcus pneumoniae* / O. Johnsborg, L.S. Havarstein // FEMS Microbiology Reviews. – 2009. – N 33. – P. 627-642.
104. Johnson, H.L. Systematic evaluation of serotypes causing invasive pneumococcal disease among children under five: the pneumococcal global serotype project [Electronic resource] / H.L. Johnson // PLOS Medicine. – 2010. – N 7. Available at : journals.plos.org (accessed 01.02.2019).
105. Johnston, J.W. Mn²⁺-dependent regulation of multiple genes in *Streptococcus pneumoniae* through PsaR and the resultant impact on virulence / J.W. Johnston, D.E. Briles, L.E. Myers, S.K. Hollingshead // J. Infection and Immunity. – 2006. – Vol. 74. – P. 1171-1180.
106. Jones, C. Capsular polysaccharides from *Neisseria meningitidis* and *Streptococcus pneumoniae* / C. Jones // Carbohydr. Eur. – 1998. – Vol. 21. – P. 10-16.
107. Kadioglu, A. Upper and lower respiratory tract infection by *Streptococcus pneumoniae* is affected by pneumolysin deficiency and differences in capsule type / A. Kadioglu, S. Taylor, F. Iannelli, G. Pozzi, T.J. Mitchell, P.W. Andrew // J. Infection and Immunity. – 2002. – Vol. 70, N 6. – P. 2886-2890.

108. Karstaedt, A.S. Pneumococcal bacteremia during a decade in children in Soweto, South Africa / A.S. Karstaedt // *Pediatric Infectious Disease J.* – 2000. – N 9. – P. 454-457.
109. Katz, L.S. Meningococcus genome informatics platform: a system for analyzing multilocus sequence typing data/ L.S. Katz, C.R. Bolen, B.H. Harcourt, S. Schmink, X. Wang, A. Kislyuk, R.T. Taylor, L.W. Mayer, I.K. Jordan // *Nucleic Acids Research.* – 2009. – Vol. 37. – P. 606-611.
110. Kellogg, J.A. Identification of *Streptococcus pneumoniae* revisited / J.A. Kellogg, D.A Bankert, C.J. Elder, J.L. Gibbs, M.C. Smith // *J. of Clinical Microbiology.* – 2001. – Vol. 39. – P. 3373–3375.
111. Lacks, S. Genetic basis of the complementary DpnI and DpnII restriction systems of *S. pneumoniae*: An intracellular cassette mechanism / S. Lacks, B. Mannarelli, S. Springhorn, B. Greenberg // *Cell.* – 1986. – Vol. 46. – P. 993-1000.
112. Lang, A. Detection and prediction of *Streptococcus pneumoniae* serotypes directly from nasopharyngeal swabs using PCR / Amanda L. S. Lang, Shelly A. McNeil, Todd F. Hatchette, May Elsherif, Irene Martin, Jason J. LeBlanc // *J. of Medical Microbiology.* – 2015. – Vol. 64. – P. 836-844.
113. Leimkugel, J. An outbreak of serotype 1 *Streptococcus pneumoniae* meningitis in northern Ghana with features that are characteristic of *Neisseria meningitidis* meningitis epidemics / J. Leimkugel, A. Forgor, S. Gagneux, V. Pflüger, C. Flierl, E. Awine, M. Naegeli, J.P. Dangy, T. Smith, A. Hodgson, G. Pluschke // *J. Infectious Disease.* – 2005. – Vol. 192, N 2. – P. 192–199.
114. Levy, C. Bacterial Meningitis Study group. Pneumococcal meningitis in French children before and after the introduction of pneumococcal conjugate vaccine / C. Levy, E. Varon, E. Bingen, A. Lécuyer, M. Boucherat, R. Cohen // *Pediatr Infectious Disease J.* – 2011. – Vol. 30. – P. 168–170.
115. Levy, C. Trends of Pneumococcal Meningitis in Children After Introduction of the 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine in France / Corinne Levy, Emmanuelle Varon, Capucine Picard, Stéphane Béchet, Alain Martinot, Stéphane

- Bonacorsi // *The Pediatric Infectious Disease J.* – 2014. – Vol. 33, N 12. – P. 1216-1221.
116. Linares, J. Changes in antimicrobial resistance, serotypes and genotypes in *Streptococcus pneumoniae* over a 30-year period / J. Linares, C. Ardanuy, R. Pallares, A. Fenoll // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2010. – Vol. 16. – P. 402-410.
117. Lipsitch, M. Vaccination against colonizing bacteria with multiple serotypes / M. Lipsitch // *J. PNAS.* – 1997. – Vol. 94. – P. 6571–6576.
118. Lofling, J. Cellular interactions by LPxTG-anchored pneumococcal adhesins and their streptococcal homologues / J. Lofling, V. Vimberg, P. Battig, B. Henriques-Normark // *Cell Microbiol.* – 2011. – Vol. 13, N 2. – P. 186-197.
119. Maiden, M.C. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms / M.C. Maiden, J.A. Bygraves, E. Feil, G. Morelli, J.E. Russell, R. Urwin, Q. Zhang, J. Zhou, K. Zurth, D.A. Caugant, I.M. Feavers, M. Achtman, B.G. Spratt // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1998. – Vol. 95, N 6. – P. 3140-3145.
120. Majchrzykiewicz, J.A. Generic and specific adaptive responses of *Streptococcus pneumoniae* to challenge with three distinct antimicrobial peptides, bacitracin, LL-37, and nisin / J.A. Majchrzykiewicz, O.P. Kuipers, J.J. Bijlsma // *J. Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* – 2010. – Vol. 54. – P. 440-451.
121. Mangen, M.J. Cost-effectiveness of adult pneumococcal conjugate vaccination in the Netherlands / M.J. Mangen, M.H. Rozenbaum, S.M. Huijts, C.H. van Werkhoven, D.F. Postma, M. Atwood // *Eur. Respiratory J.* – 2015. – Vol. 46, N 5. – P. 1407-1416.
122. Mellroth, P. Structural and functional insights into peptidoglycan access for the lytic amidase *LytA* of *Streptococcus pneumoniae* [Electronic resource] / P. Mellroth, T. Sandalova, A. Kikhney, F. Vilaplana, D. Heseck, M. Lee // *MBio.* – 2014. – Vol. 5, N 1. Available at : mbio.asm.org (accessed 01.02.2019).
123. Meningitis Outbreak Response in Sub-Saharan Africa: WHO Guideline. Geneva, World Health Organization, 2014 [Electronic resource] / WHO/IVB, 2016. Available at :

http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/144727/1/WHO_HSE_PED_CED_14.5_eng.pdf?ua=1&ua=1 (accessed 01.02.2019).

124. Mitchell, P.K. Population genomics of pneumococcal carriage in Massachusetts children following introduction of PCV-13 / P.K. Mitchell, T. Azarian, N.J. Croucher, A. Callendrello, C.M. Thompson, S.I. Pelton, M. Lipsitch, W.P. Hanage // *Microb Genom.* – 2019. – Vol. 4. – P. 11-18.
125. Moll, Z. Molecular characterization of *Streptococcus pneumoniae* in children living in southwest China and assessment of a potential protein vaccine, rPfbA / Z. Moll, Y. Cui, W. Zhou, W. Li, X. Tan, W. Chen, J. Zhang, Y. Jiang // *Vaccine.* – 2019. – Vol. 37, N 5. – P. 721-731.
126. Molinos, L. Sensitivity, Specificity, and Positivity Predictors of the Pneumococcal Urinary Antigen Test in Community-Acquired Pneumonia / Luis Molinos, Rafael Zalacain, Rosario Menendez, Soledad Reyes, Alberto Capelastegui, Catia Cilloniz // *AnnalsATS.* – 2015. – Vol. 12, N. 10. – P. 1482 – 1489.
127. Morona, J.K. Attachment of capsular polysaccharide to the cell wall of *Streptococcus pneumoniae* type 2 is required for invasive disease / J.K. Morona, R. Morona, J.C. Paton // *J. Proceedings of the National Academy of Sciences USA.* – 2006. – Vol. 103, N 22. – P. 8505-8510.
128. Moscoso, M. Biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae*: role of choline, extracellular DNA, and capsular polysaccharide in microbial accretion / M. Moscoso, E. Garcia, R. Lopez // *J. Bacteriol.* – 2006. – Vol. 188, N 22. – P. 7785-7795.
129. Munoz-Almagro, C. DNA bacterial load in children and adolescents with pneumococcal pneumonia and empyema / C. Munoz-Almagro, S. Gala // *Eur J. Clin Microbiol Infect Dis.* – 2011. – Vol. 30. – P. 327-335.
130. Munoz-Almagro, C. Emergence of invasive pneumococcal disease caused by non-vaccine serotypes in the era of 7-valent conjugate vaccine / C. Munoz-Almagro, I. Jordan, A. Gene // *Clin Infect Dis.* – 2008. – Vol. 46. – P. 174-182.

131. Murdoch, D.R. Evaluation of a PCR assay for detection of *Streptococcus pneumoniae* in respiratory and nonrespiratory samples from adults with community-acquired pneumonia / D.R. Murdoch, T.P. Anderson, K.A. Beynon, A. Chua, A.M. Fleming, R.T. Laing, G.I. Town, G.D. Mills, S.T. Chambers, L.C. Jennings // J. of Clinical Microbiology. – 2003. – Vol. 41. – P. 63-66.
132. Myint, T.T.H. A review of the impact of pneumococcal polysaccharide conjugate vaccine (7-valent) on pneumococcal meningitis / Myint Tin Tin Htar, Harish Madhava, Paul Balmer, Dina Christopoulou, Damianos Menegas, Eric Bonnet // Adv Ther. – 2013. – Vol. 30. – P. 748-762.
133. Nagaoka, K. Complete Genome Sequence of *Streptococcus agalactiae* Serotype III, Multilocus Sequence Type 335 Strain HU-GS5823, Isolated from a Human Patient in Japan with Severe Invasive Infection / K. Nagaoka, S. Konno, K. Murase, T. Kikuchi, I. Nakagawa // Microbiol Resour Announc. – 2018. – Vol. 21 – P. 15-19.
134. Neill, D.R. Pneumolysin : *Streptococcus pneumoniae* Molecular Mechanisms of Host-Pathogen Interactions / Daniel R. Neill, Timothy J. Mitchell, Aras Kadioglu // Academic Press. – 2015. – 482 p.
135. NIS Database Documentation [Electronic resource]. Available at : <https://www.hcup-us.ahrq.gov/db/nation/nis/nisdbdocumentation.jsp> (accessed 01.02.2019).
136. Nuorti, J.P. Prevention of pneumococcal disease among infants and children – use of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine and 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine – recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) / J.P. Nuorti, C.G. Whitney // MMWR Recomm Rep. – 2010. – Vol. 59. – P. 1-18.
137. O'Brien, K.L. Hib and Pneumococcal Global Burden of Disease Study Team. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates / K.L. O'Brien, L. Wolfson, Watt J., E. Henkle, M. Deloria-Knoll, N. McCall, E. Lee, K. Mulholland, O. Levine, T. Cherian // Lancet. – 2009. – Vol. 374. – P. 893-902.

138. Orihuela, C.J. Tissue-specific contributions of pneumococcal virulence factors to pathogenesis / C.J. Orihuela, G. Gao, K.P. Francis, J. Yu, E.I. Tuomanen // *J. Infect Dis.* – 2004. – Vol. 190, N 9. – P. 1661-1669.
139. Pai, R. Sequential multiplex PCR approach for determining capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates / R. Pai, R.E. Gertz, B. Beall // *J. Clin. Microbiol.* – 2006. – Vol. 44. – P. 124-131.
140. Pericone, C. Inhibitory and Bactericidal Effects of Hydrogen Peroxide Production by *Streptococcus pneumoniae* on Other Inhabitants of the Upper Respiratory Tract / Christopher Pericone, Overweg Karin, Hermans Peter W. M., Weiser Jeffrey N. // *Infect Immun.* – 2000. – Vol. 68, N 7. – P. 3990–3997.
141. Pichon, B. Changes in Molecular Epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* Causing Meningitis following Introduction of pneumococcal Conjugate Vaccination in England and Wales / B. Pichon, S.N. Ladhani, M.P.E. Slack, A. Segonds-Pichon, N.J. Andrews, P.A. Waight // *J. of Clinical Microbiology.* – 2013. – Vol. 51, N 3. – P. 820-827.
142. Pimenta, F.C. Sequential Triplex Real-Time PCR Assay for Detecting 21 Pneumococcal Capsular Serotypes That Account for a High Global Disease Burden / Fabiana C. Pimenta, Alexis Roundtree, Ahmet Soysal, Mustafa Bakir, Mignon du Plessis // *J. of Clinical Microbiology.* – 2013. – Vol. 51, N 2. – P. 647–652.
143. Pride, M.W. Validation of an immunodiagnostic assay for detection of 13 *Streptococcus pneumoniae* serotype-specific polysaccharides in human urine / M.W. Pride, S.M. Huijts, K. Wu, V. Souza, S. Passador, C. Tinder, E. Song, A. Elfassy, L. McNeil, R. Menton, R. French, J. Callahan, C. Webber, W.C. Gruber, M.J. Bonten, K.U. Jansen // *Clin Vaccine Immunol.* – 2012. – Vol. 19. – P. 1131-1141.
144. Prieto, R.G. Epidemiology of pneumococcal meningitis hospitalizations in pediatric population in Spain (1998–2006) / R. Gil Prieto, J. San Román Montero, C. Gómez Alejandre, L.A. Alvaro Meca, A. Rivero, A. Gil de Miguel // *Vaccine.* – 2009. – Vol. 27. – P.2669–2673.

145. Qasimov, V. Integration from patient registration to WHO reporting in Azerbaijan and Georgia / V. Qasimov, V. Allahverdiyeva, Innadze Paata, Zakhshvili Khatuna, Burdakov Aleksey // *International J. of Infectious Diseases*. – 2016. – Vol. 45. – P. 299.
146. Radetsky, M.S. Multiply resistant pneumococcus causing meningitis: Its epidemiology within a day-care centre / M.S. Radetsky, G.R. Istre, T.L. Johansen // *Lancet*. – 1981. – Vol. 440. – P. 771-773.
147. Regev-Yochay, G. Interference between *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*: In vitro hydrogen peroxide-mediated killing by *Streptococcus pneumoniae* / G. Regev-Yochay, K. Trzcinski, C.M. Thompson, R. Malley, M. Lipsitch // *J. Bacteriol.* – 2006. – Vol. 188, N 13. – P. 4996–5001.
148. Reinert, R.R. Mechanisms of macrolide resistance among *Streptococcus pneumoniae* isolates from Russia / R.R. Reinert, O.Y. Filimonova, A. Al-Lahham, S.A. Grudinina, E.N. Ilina, LM. Weigel, S.V. Sidorenko // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2008. – Vol. 52. – P. 2260-2262.
149. Reinert, R.R. Pneumococcal conjugate vaccines—a European perspective / R.R. Reinert // *Int J. Med Microbiol.* – 2004. – Vol. 294, N 5. – P. 277–294.
150. Rekha, P. Sequential Multiplex PCR Approach for Determining Capsular Serotypes of *Streptococcus pneumoniae* Isolates / P. Rekha, E. Robert, N. Gertz, B. Beall // *J. of Clinical Microbiology*. – 2006. – Vol. 44, N 1. – P. 124–131.
151. Roca, A. Invasive pneumococcal disease in children <5 years of age in rural Mozambique / A. Roca // *Tropical Medicine and International Health*. – 2006. – Vol. 11. – P. 1422–1431.
152. Rodriguez-Barradas, M.C. Antibody to capsular polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae* after vaccination of human immunodeficiency virus-infected subjects with 23-valent pneumococcal vaccine / M.C. Rodriguez-Barradas, D.M. Musher, C. Kahart // *J. Infectious Disease*. – 1992. – Vol. 165. – P. 553-556.
153. Rozenbaum, M.H. Observed differences in invasive pneumococcal disease epidemiology after routine infant vaccination / M.H. Rozenbaum, C. Boersma, M.J. Postma, E. Hak // *Expert Rev Vac.* – 2011. – Vol. 10. – P. 187–199.

154. Rubins, J.B. Dual function of pneumolysin in the early pathogenesis of murine pneumococcal pneumonia / J.B. Rubins, D. Charboneau, J.C. Paton, T.J. Mitchell, P.W. Andrew, E.N. Janoff // *J. Clin Invest.* – 1995. – Vol. 95, N 1. – P. 142-150.
155. Rubins, J.B. Pneumolysin activates phospholipase A in pulmonary artery endothelial cells / J.B. Rubins, T.J. Mitchell, P.W. Andrew, D.E. Niewoehner // *Infect. Immun.* – 1994. – Vol. 62 – P. 3829-3836.
156. Ryan, K.J. Sherris Medical Microbiology / K.J. Ryan, C.G. Ray // McGraw Hill. – 2004. – 961 p.
157. Samra, Z. Use of the NOW *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen test in cerebrospinal fluid for rapid diagnosis of pneumococcal meningitis / Z. Samra, H. Shmueli, E. Nahum, D. Paghis, J. Ben-Ari // *Diagn Microbiol Infect Dis.* – 2003. – Vol. 45, N 4. – P. 237-240.
158. Saukkoriipi, A. *LytA* Quantitative PCR on Sputum and Nasopharyngeal Swab Samples for Detection of Pneumococcal Pneumonia among the Elderly / Annika Saukkoriipi, Arto A. Palmu, Thierry Pascal, Vincent Verlant, William P. Hausdorff, Jukka Jokinen // *J. of Clinical Microbiology.* – 2018. – Vol. 56. – P. 27-31.
159. Schaffner, A. Detection of capsular polysaccharide in serum for the diagnosis of pneumococcal pneumonia: clinical and experimental evaluation / A. Schaffner, C. Michel-Harder, S. Yeginsoy // *J. Infect Dis.* – 1991. – Vol. 163. – P. 1094-1102.
160. Schouls, L.M. Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat analysis of *Neisseria meningitidis* yields groupings similar to those obtained by Multilocus Sequence Typing / L.M. Schouls, A. Van der Ende, M. Damen, I. Van de Pol // *J. of Clinical Microbiology.* – 2006. – Vol. 44. – P. 1509-1518.
161. Schuchat, A. Bacterial meningitis in the United States in 1995 / A. Schuchat, K. Robinson, J.D. Wenger, L.H. Harrison, M. Farley, A.L. Reingold, L. Lefkowitz, B.A. Perkins // *New England J. of Medicine.* – 1997. – Vol. 337. – P. 970-976.

162. Selender, R.K. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacteria population genetics and systematics / R.K. Selender, D.A. Caugant // *Appl. Environ Microbiol.* – 1986. – Vol. 51. – P. 873-884.
163. Selender, R.K. Population genetics of pathogenic bacteria / R.K. Selender // *Microb. Pathog.* – 1987. – Vol. 3. – P. 1-7.
164. Sevilla, M.F. Clinical Presentation of Invasive Pneumococcal Disease in Spain in the Era of Heptavalent Conjugate Vaccine / M.F. de Sevilla, J.-J. García-García, C. Esteva, F. Moraga, S. Hernandez, L. Selva, F. Coll // *The Pediatric Infectious Disease J.* – 2012. – Vol. 31, N 2. – P. 124-128.
165. Shamez, N. Invasive Pneumococcal Disease after Routine Pneumococcal Conjugate Vaccination in Children, England and Wales / N. Shamez // *Emerging infectious diseases.* – 2013. – Vol. 19, N 1.
166. Sheppard, C.L. Development of a sensitive, multiplexed immunoassay using xMAP beads for detection of serotype-specific *Streptococcus pneumoniae* antigen in urine samples / C.L. Sheppard, T.G. Harrison, M.D. Smith, R.C. George // *J. Med Microbiol.* – 2011. – Vol. 60. – P. 49-55.
167. Smith, K.J. Cost-effectiveness of adult vaccination strategies using pneumococcal conjugate vaccine compared with pneumococcal polysaccharide vaccine / K.J. Smith, A.R. Wateska, M.P. Nowalk, M. Raymund, J.P. Nuorti, R.K. Zimmerman // *JAMA.* – 2012. – Vol. 307, N 8. – P. 804-812.
168. Smith, K.J. Cost-effectiveness of pneumococcal conjugate vaccination in immunocompromised adults / K.J. Smith, M.P. Nowalk, M. Raymund, R.K. Zimmerman // *Vaccine.* – 2013. – Vol. 31, N 37. – P. 3950-3956.
169. Song, J.Y. Clinical Implications of Pneumococcal Serotypes: Invasive Disease Potential, Clinical Presentations, and Antibiotic Resistance / J.Y. Song, M.H. Nahm, M.A. Moseley // *J. Korean Med Sci.* – 2013. – Vol. 28, N 1. – P. 4-15.
170. Song, J.Y. Diagnosis of Pneumococcal Pneumonia: Current Pitfalls and the Way Forward / Joon Young Song, Byung Wook Eun, Moon H. Nahm // *Infect Chemother.* – 2013. – Vol. 45, N 4. – P. 351-366.

171. Spik, V.C. Improvement of pneumococcal pneumonia diagnostics by the use of rt-PCR on plasma and respiratory samples / Vesna Cvitkovic Spik, Bojana Beovic, Marko Pokorn, Ana Drole Torkar, Darja Vidmar, Lea Papst, Katja Seme, Rok Kogoj, Manica Müller Premru // *Scandinavian J. of Infectious Diseases*. – 2013. – Vol. 45, N 10. – P. 731–737.
172. Standish, A.J. Capsule Structure, Synthesis, and Regulation : *Streptococcus Pneumoniae* Molecular Mechanisms of Host-Pathogen Interactions / Alistair J. Standish, Renato Morona // Academic Press. – 2015. – 482 p.
173. Stanek, R.J. A 20-year epidemiological study of pneumococcal meningitis / R.J. Stanek, M.A. Mufson // *Clin Infect Dis*. – 1999. – Vol. 28, N 6. – P. 1265–1272.
174. Steens, A. Prompt effect of replacing the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine with the 13-valent vaccine on the epidemiology of invasive pneumococcal disease in Norway / Anneke Steens, Marianne A. Riise Bergsaker, Ingeborg S. Aabergea, Karin Rønninga, Didrik F. Vestrheima // *Vaccine*. – 2013. – Vol. 31. – P. 6232–6238.
175. Stephanie, W.L. Global distribution of invasive serotype 35D *Streptococcus pneumoniae* post PCV13 introduction / W.L. Stephanie // *J. Clin. Microbiol*. – 2018. – Vol. 56. – P. 1-9.
176. Suzuki, N. Genotypic identification of presumptive *Streptococcus pneumoniae* by PCR using four genes highly specific for *S. pneumoniae* / N. Suzuki, M. Yuyama, S. Maeda, H. Ogawa, K. Mashiko, Y. Kiyoura // *J. of Medical Microbiology*. – 2006. – Vol. 55. – P. 709-714.
177. Talebi, M. High Rate of Serotype Switching and Genetic Variations Indicates Widespread Recombination Between Clinical and Commensal Penicillin-Nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* in Tehran / M. Talebi, J. Sadeghi, A. Ahmadi, V. Lohrasbi, P. Owlia, M.R. Pourshafie // *Microb Drug Resist*. – 2019. – Vol. 20. – P. 1-9.
178. Tatochenko, V. *Streptococcus pneumoniae* serotype distribution in children in the Russian Federation before the introduction of pneumococcal conjugate vaccines into the National Immunization Program / Vladimir Tatochenko, Sergey

- Sidorenko, Leila Namazova-Baranova, Nikolay Mayanskiy, Tatiana Kulichenko, Alexander Baranov // *Expert Rev. Vaccines*. – 2014. – Vol. 13, N 2. – P. 257–264.
179. The demographic profiles [Electronic resource] / United Nations. DESA/Population Division. Available at : <https://population.un.org/wpp/Graphs/DemographicProfiles/> (accessed 01.02.2019)
180. Tsai, C.J. Changing epidemiology of pneumococcal meningitis after the introduction of pneumococcal conjugate vaccine in the United States / C.J. Tsai, M.R. Griffin, J.P. Nuorti // *Clin Infect Dis*. – 2008. – Vol. 46. – P. 1664-1672.
181. Urwin, R. Multilocus sequence typing: a tool for global epidemiology / R. Urwin, M. C. Maiden // *Trends in Microbiology*. – 2003. – Vol. 11. – P. 479-487.
182. Vučina, V.V. Cost-effectiveness of pneumococcal conjugate vaccination in Croatia / V.V. Vučina, S.K. Filipović, N. Kožnjak, V. Stamenić, A.D. Clark, Mounaud B., Blau J., Hoestlandt C., Kaić B. / *Vaccine*. – 2015. – Vol. 7, N 33. – P. 209-218.
183. Walker, J.A. Molecular cloning, characterization, and complete nucleotide sequence of the gene for pneumolysin, the sulfhydryl-activated toxin of *Streptococcus pneumoniae* / J.A. Walker, R.L. Allen, P. Falmagne, M.K. Johnson, G.J. Boulnois // *Infect Immun*. – 1987. – Vol. 55, N 5. – P. 1184-1189.
184. Weekly epidemiological record [Electronic resource] / WHO/IVB, 2012. Available at : who.int (accessed 01.02.2019).
185. Werno, A.M. Medical microbiology: laboratory diagnosis of invasive pneumococcal disease / A.M. Werno, D.R. Murdoch // *Clin. Infect. Dis*. – 2008. – Vol. 46, N 6. – P. 926–932.
186. Whitney, C.G. Decline in invasive pneumococcal disease after the introduction of protein–polysaccharide conjugate vaccine / C.G. Whitney, M.M. Farley, J. Hadler // *The New England J. of Medicine*. – 2003. – Vol. 348. – P. 1737-1746.

187. WHO manual 2nd ed., Laboratory Methods for the Diagnosis of Meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* // WHO/IVB. – 2011. – 323 p.
188. WHO Vaccine Preventable Diseases Monitoring System: Immunization schedules by antigen selection centre [Electronic resource] / WHO/IVB, 2011. Available at : http://apps.who.int/immunization_monitoring/en/globalsummary/ScheduleResult.cfm (accessed 01.02.2019).
189. WHO. Meningitis Weekly Bulletin. World Health Organization West African InterCountry Support Team, Ouagadougou, 2016 [Electronic resource] / WHO/IVB, 2016. Available at : <http://www.who.int/csr/disease/meningococcal/epidemiological/en/> (accessed 01.02.2019).
190. WHO. Weekly epidemiological record [Electronic resource] / WHO/IVB, 2016. Available at : [who.int](http://www.who.int) (accessed 01.02.2019)
191. WHO/IVB [Electronic resource] / WHO vaccine-preventable diseases: monitoring system. 2018 global summary, 2018. Available at : http://apps.who.int/immunization_monitoring/globalsummary/ (accessed 01.02.2019)
192. World Population Prospects [Electronic resource] : United Nations. DESA/Population Division. Available at : <https://population.un.org/wpp/Download/Standard/Population/> (accessed 01.02.2019)
193. Yaro, S. Epidemiological and molecular characteristics of a highly lethal pneumococcal meningitis epidemic in Burkina Faso / S. Yaro, M. Lourd, Y. Traoré, B.M. Njanpop-Lafourcade, A. Sawadogo, L. Sangare, A. Hien, M.S. Ouedraogo, O. Sanou, I. Parent du Châtelet, J.L. Koeck, B.D. Gessner // *Clinical Infectious Diseases*. – 2006. – Vol. 43. – P. 693–700.

194. Yu, J Pneumococcal serotypes causing pneumonia with pleural effusion in pediatric patients / J. Yu, D. Salamon, M. Marcon, M.H. Nahm // J. Clin Microbiol. – 2011. – Vol. 49. – P. 534-538.
195. Zhou, H. Serotype and MLST-based inference of population structure of clinical *Streptococcus pneumoniae* from invasive and noninvasive pneumococcal disease / H. Zhou, J. Guo, T. Qin, H. Ren, Y. Xu, C. Wang, X. Xu // Infect Genet Evol. – 2017 – Vol. 55 – P. 104-111.