

Серотиповый состав *Streptococcus pneumoniae*, циркулирующих у детей с респираторными инфекциями, оптимизация молекулярных методов оценки

Е. В. НИКИТИНА¹, И. А. ЦВЕТКОВА¹, О. С. КАЛИНОГОРСКАЯ¹,
В. В. ГОСТЕВ^{1,2}, С. С. БЕЛАНОВ³, А. С. МОХОВ², Е. Л. КАЛИСНИКОВА¹,
Д. П. ГЛАДИН⁴, В. А. АГЕЕВЕЦ¹, *С. В. СИДОРЕНКО^{1,2}

¹ ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Российская Федерация

² ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Российская Федерация

³ Университет Хельсинки, Институт Биотехнологии, Хельсинки, Финляндия

⁴ ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России, Санкт-Петербург, Российская Федерация

Serotype Composition of *Streptococcus pneumoniae* in Children with Respiratory Infections, Optimization of Molecular Assessment Methods

EKATERINA V. NIKITINA¹, IRINA A. TSVETKOVA¹, OLGA S. KALINOGORSKAYA¹,
VLADIMIR V. GOSTEV^{1,2}, SERGEY BELANOV³, ALEXEY S. MOKHOV²,
EKATERINA L. KALISNIKOVA¹, DMITRY P. GLADIN⁴,
VLADIMIR A. AGEEVETS¹, *SERGEY V. SIDORENKO^{1,2}

¹ Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases under the Federal Medical Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

² North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov of the Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation

³ University of Helsinki, Institute of Biotechnology, Helsinki, Finland

⁴ St. Petersburg State Pediatric Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Saint Petersburg, Russian Federation

Резюме

В работе представлены оптимизированные методы ПЦР- и сиквенс-типирования *Streptococcus pneumoniae*. С использованием оптимизированных методов проанализирован серотиповый состав пневмококков, выделенных от детей в возрасте до 5 лет с инфекциями верхних дыхательных путей. В период с 2016 по 2021 гг. отмечено снижение частоты серотипов, входящих в 13-валентную конъюгированную пневмококковую вакцину (ПКВ13) с 94,1 до 25,8%, преимущественно за счёт серогруппы 6ABCD и серотипа 19F. Охват циркулирующих у детей серотипов вакцинами ПКВ15 и ПКВ20 составил в 2021 г. 28,1 и 41,6%, соответственно. За период исследования наиболее существенно возросло количество невакцинных серогрупп 11AD и 15AF, а также серотипов, не детектируемых в рамках данного протокола капсульного ПЦР-типирования.

Ключевые слова: серотипирование; ПЦР; секвенирование по Сэнгеру; вакцины; *Streptococcus pneumoniae*

Для цитирования: Никитина Е. В., Цветкова И. А., Калиногорская О. С., Гостев В. В., Беланов С. С., Мохов А. С., Калисникова Е. Л., Сидоренко С. В. Серотиповый состав *Streptococcus pneumoniae*, циркулирующих у детей с респираторными инфекциями, оптимизация молекулярных методов оценки. *Антибиотики и химиотерапия*. 2021; 66: 11–12: 18–24. doi: 10.37489/0235-2990-2021-66-11-12-18-24.

Abstract

The paper presents optimized methods for PCR and sequence typing of *Streptococcus pneumoniae*. The serotype composition of pneumococci isolated from children under 5 years of age with infections of the upper respiratory tract was analyzed using optimized methods. Between 2016 and 2021, there was a decrease in the frequency of serotypes included in the pneumococcal 13-valent conjugate vaccine (PCV13) from 94.1 to 25.8%, mainly due to the 6ABCD serogroup and the 19F serotype. The coverage of serotypes circulating in children with PCV15 and PCV20 vaccines was 28.1% and 41.6% in 2021, respectively. During the study period, the number of non-vaccine serogroups 11AD and 15AF, as well as serotypes that are not detected under this capsular PCR typing protocol, increased most significantly.

Keywords: serotyping; PCR; Sanger sequencing; vaccines; *Streptococcus pneumoniae*

For citation: Nikitina E.V., Tsvetkova I.A., Kalinogorskaya O.S., Gostev V.V., Belanov S.S., Mokhov A.S., Kalisnikova E.L., Sidorenko S.V. Serotype composition of *Streptococcus pneumoniae* in children with respiratory infections, optimization of molecular assessment methods. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2021; 66: 11–12: 18–24. doi: 10.37489/0235-2990-2021-66-11-12-18-24.

© Коллектив авторов, 2021

*Адрес для корреспонденции: ул Профессора Попова,
д. 9, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация, 197022.
E-mail: sidorserg@gmail.com

© Team of Authors, 2021

*Correspondence to: 9 Professora Popova st., St. Petersburg,
197022 Russian Federation. E-mail: sidorserg@gmail.com

Введение

Социальное и медицинское значение пневмококковых инфекций определяется высокой частотой их распространения в различных возрастных группах населения и существенной летальностью при инвазивных формах. *Streptococcus pneumoniae* относится к бактериям, хорошо адаптированным к организму человека. При этом микроорганизм реализует несколько стратегий сосуществования с хозяином: бессимптомную колонизацию слизистых оболочек верхних дыхательных путей или инфекцию, проявляющуюся выраженной в различной степени симптоматикой. Чаще всего пневмококки вызывают неинвазивные (мукозальные) инфекции — острый средний отит, параназальный синусит и пневмонию. Эти инфекции отличаются лёгким течением и склонностью к спонтанному разрешению. Основным признаком инвазивных инфекций считается выделение пневмококка из стерильных локусов организма человека, таких как кровь и цереброспинальная жидкость. К таким формам относят менингит и бактериемию, часть пневмоний также может протекать как инвазивная инфекция. Первым обязательным этапом в развитии всех пневмококковых инфекций является носительство патогена в верхних дыхательных путях [1]. Плотность пневмококков в верхних дыхательных путях существенно возрастает на фоне вирусных инфекций [2].

Дети в возрасте до 5 лет — основной резервуар пневмококков в человеческой популяции и основная группа риска развития как мукозальных, так и инвазивных инфекций. Массовая вакцинация детей этой возрастной категории обеспечивает как их индивидуальную защиту, так и защиту других возрастных групп за счёт формирования популяционного иммунитета [3]. Для иммунизации доступны полисахаридные и конъюгированные вакцины, индуцирующие иммунный ответ к основному фактору вирулентности пневмококка: полисахаридной капсуле. Описано более 100 серотипов пневмококка, близкие серотипы объединены в серогруппы [4, 5]. Полисахаридные вакцины представляют собой смесь наиболее важных и распространённых очищенных пневмококковых полисахаридов, а конъюгированные вакцины основаны на химическом соединении тех же полисахаридов с белком-носителем, способствующим индукции иммунного ответа у детей до 2 лет. Поскольку по технологическим причинам включение в состав вакцин всех известных полисахаридов невозможно, возникла необходимость в выборе ограниченной группы наиболее важных. Основными критериями являются распространённость и тяжесть вызываемых инфекций. Серотиповая структура пневмококковых популяций значительно варьирует в зависимости от геогра-

фии и времени. Кроме того, после внедрения в практику первой конъюгированной 7-валентной пневмококковой вакцины (ПКВ7) было установлено, что массовая иммунизация приводит к элиминации из циркуляции серотипов, входящих в её состав, и распространению «невакцинных» серотипов [6].

Оказалось, что для обеспечения «охвата» 70–80% серотипов пневмококковой популяции региона состав вакцины необходимо менять приблизительно один раз в 10 лет. При этом все разработчики идут по пути увеличения «валентности» вакцины, на практике доступны 10- и 13-валентные препараты, 15- и 20-валентные находятся на стадии регистрации, имеются сообщения о разработке 30-валентной вакцины. Интересно отметить, что до сих пор нет примеров исключения из новых комбинаций серотипов, входивших в состав первой ПКВ7. Из-за значительной вариабельности серотипового состава пневмококковых популяций в отдельных географических регионах интенсивно обсуждается, но не реализуется принцип создания «региональных» вакцин.

Очевидно, что для оценки эффективности вакцинации и формирования её стратегии наиболее важна информация о серотиповом составе пневмококков, вызывающих наиболее тяжёлые и инвазивные инфекции, однако в реальной практике в Российской Федерации сбор значительного количества «инвазивных» изолятов крайне затруднён. Указанный факт вызывает необходимость использования суррогатных показателей, основным из которых может быть серотиповый состав пневмококков, циркулирующих у здоровых детей и детей с респираторными инфекциями.

Эталонным методом серотипирования является реакция Нейфельда (выявляемое микроскопически набухание капсулы при обработке антителами к соответствующему серотипу). Для этого метода характерны трудоёмкость и значительная стоимость. Альтернативой классическому серотипированию могут быть молекулярные методы, основанные на анализе *cps*, локуса в котором локализованы гены, участвующие в биосинтезе капсульных полисахаридов. Нуклеотидные последовательности *cps*-локуса 90 серотипов *Streptococcus pneumoniae* были опубликованы S. D. Bentley и соавт. в 2006 г. [7], что послужило основой для использования серотип-специфичных генов *cps*-локуса в качестве мишеней для разработки методов серотипирования пневмококка при помощи полимеразной цепной реакции [8–12]. Рекомендательный протокол ПЦР-типирования *S. pneumoniae* опубликован на сайте Центров по контролю и профилактике заболеваний США [13]. В 2012 г. M. H. Leung и соавт. [14] разработали протокол

капсульного сиквенс-типирования *S.pneumoniae* путём секвенирования по Сэнгеру гена *cpsB*, входящего в *cps*-локус [15].

В Российской Федерации конъюгированная пневмококковая вакцина ПКВ13 была включена в Национальный график вакцинации в 2014 г. [7]. Очевидная необходимость наблюдения за динамикой серотипового состава пневмококков на территории РФ требует внедрения в практику эффективных и доступных методов типирования. Целью данного исследования является оптимизация методов капсульного ПЦР- и сиквенс-типирования *S.pneumoniae* и их применение для анализа серотипового состава пневмококков у детей с инфекциями дыхательных путей.

Материал и методы

Сбор и анализ биологического материала. Использовали биологический материал от пациентов с респираторными инфекциями, получаемый в ходе стандартных диагностических исследований. Для сбора и транспортировки биологического материала из носоглотки обследуемых использовалась жидкостная система сбора и транспортировки ESwab™ (COPAN Diagnostics). Мазки были взяты в соответствии с инструкциями производителя. Биологические образцы инокулировали на чашки Петри с кровяным агаром непосредственно после доставки в лабораторию. Чашки инкубировали в течение 18–24 ч при 37°C в атмосфере с 5% CO₂. Выделенные бактерии были идентифицированы как *S.pneumoniae* в случае наличия α-гемолиза, чувствительности к оптохину.

Капсульное ПЦР-типирование. Материалом для капсульного ПЦР-типирования служит ДНК, выделенная из различных биологических жидкостей, а также из бактериальных культур. Для выделения тотальной ДНК использовали набор «АмплиСенс ДНК-сорб Б» (ИнтерЛабСервис), согласно инструкции производителя. Капсульное ПЦР-типирование проводится в несколько этапов, которые выполняются последовательно, пока не выявится положительный результат. На первом этапе обязательным является постановка скрининговой ПЦР-реакции на мишени *lytA* и *cpsA*. Положительные образцы используют для дальнейшего типирования в мультиплексных реакциях с праймерами, охватывающими наиболее часто встречающиеся серотипы и серогруппы, преимущественно относящиеся к вакцинным, с учётом возможности скомбинировать праймеры в одном мультиплексе. CDC предлагает различные по составу мультиплексные реакции для США, Латинской Америки, Африки и Азии с учётом частоты распространения серотипов в этих регионах [13]. В настоящей работе в первые реакции были включены серотипы, наиболее часто встречающиеся в Российской Федерации [15].

Согласно протоколу, оптимизированному и применяемому в нашей лаборатории, ПЦР-типирование в реальном времени проводится последовательно по схеме:

1. Детекция *S.pneumoniae* (гены-мишени *lytA* и *cpsA*)
2. Для образцов, положительных по *lytA*, последовательно проводятся мультиплексные реакции для детекции следующих групп серотипов/серогрупп:

- 6ABCD, 9AV, 23F;
- 19F, 18ABCF, 15AF;
- 19A, 3, 12FAB/44/46;
- 7AF, 4, 5;
- 11AD, 16F, 9LN.

3. При отсутствии результатов последовательно проводятся Моноплексные реакции для детекции следующих серотипов: 14, 1, 2, 22AF, 23A, 33AF/37.

Были использованы зонды и праймеры для ПЦР, согласно рекомендациям Центров по контролю и профилактике заболеваний США [13]. В реакционную смесь входят следующие компоненты (зонды производства компании Синтол, остальные реактивы — компании Евроген):

- 10×dNTP-mix;
- 5x ПЦР-буфер 0 мМ Mg²⁺;
- MgSO₄, 50 мМ раствор;
- HS Taq ДНК-полимераза;
- прямой праймер (рабочий сток 20 мкМ готовится из исходного раствора с концентрацией 100 мкМ);
- обратный праймер (рабочий сток 20 мкМ готовится из исходного раствора с концентрацией 100 мкМ);
- зонд (рабочий сток 10 мкМ готовится из исходного раствора с концентрацией 100 мкМ).
- Реакционная смесь для проведения мультиплексной ПЦР в реальном времени должна содержать следующие конечные концентрации реагентов (на 1 реакцию):
- Mg²⁺ — 4–6 мМ;
- TaqF-полимераза — 1 ед.;
- праймеры — по 160–240 нМ;
- зонды — по 160–240 нМ.

В качестве примера приведём состав реакционной смеси (табл. 1) и температурный режим реакции амплификации для скрининга на наличие гена *lytA*.

Таблица 1. Состав реакционной смеси реакции амплификации для скрининга на наличие гена *lytA*
Table 1. The composition of the reaction mixture used for amplification reaction in screening for the presence of the *lytA* gene

Компонент	Объём, мкл
Вода	7,3
10×Taq буфер (без Mg)	2,5
Смесь dNTP (10мМ каждого)	0,5
Раствор MgCl ₂ (50 мМ)	3
Прямой праймер <i>lytA</i> 20 мкМ	0,3
Обратный праймер <i>lytA</i> 20 мкМ	0,3
Зонд <i>lytA</i> 10 мкМ	0,3
Прямой праймер <i>cpsA</i> 20 мкМ	0,3
Обратный праймер <i>cpsA</i> 20 мкМ	0,3
Зонд <i>cpsA</i> 10 мкМ	0,3
HS Taq ДНК-полимераза	0,2
Образец	10

Температурный режим амплификации:

- 1 цикл: 95°C, 3 мин;
- 10 циклов: 95°C — 20 с; 62°C — 30 с;
- 35 циклов: 95°C — 30 с; 57°C — 30 с;

Приведённый протокол капсульного ПЦР типирования позволяет детектировать 11 серотипов и 10 серогрупп, которые нуждаются в дальнейшей дифференцировке.

Капсульное сиквенс-типирование. Капсульное сиквенс-типирование осуществлялось только для чистых культур пневмококка, серотип которых не удалось определить с помощью ПЦР.

В протоколе капсульного сиквенс-типирования *S.pneumoniae*, предложенном М. Н. Leung и соавт. [14], используется одна пара праймеров, которая амплифицирует регуляторный ген *cpsB* (*wzh*), кодирующий фосфотирозин-протеинфосфатазу всех серотипов пневмококка. Ген *cpsB* выбран для секвенирования, так как его вариабельность у разных серотипов позволяет их различать, но при этом он достаточно консервативен, чтобы амплифицировать один и тот же генный сегмент различных серотипов, используя одну смесь праймеров.

Для оптимизации метода капсульного сиквенс-типирования *S.pneumoniae* использовали загруженные из GenBank (база Nucleotide collection) 516 нуклеотидных последовательностей *S.pneumoniae*, охватывающих все известные на данный момент серотипы, включающих ген *cpsB* (732 п.н.) и

фланкирующие его области, длина нуклеотидной последовательности — 1913 п.н.

Для выбора амплифицируемого участка загруженные последовательности выровняли при помощи программы UGENE с применением алгоритма Muscle. Вручную были выбраны наиболее консервативные участки. Поскольку длина участка, который надо амплифицировать (1061 п. н.), превышает длину качественного прочтения по методу Сэнгера, последовательность была разделена на 2 перекрывающихся участка. При помощи программы FastPCR были подобраны праймеры, соответствующие наиболее консервативным участкам (в качестве референсной использовали соответствующую нуклеотидную последовательность штамма *S.pneumoniae* Nr. 141/68, серотип 19A):

1-й амплифицируемый участок (708 п.н.):

прямой праймер — 5'-GCAATGCCAGACAGTAACCTCTAT (совпал с таковым у Leung и соавт.);

обратный праймер — 5'-ACATGTGAACATTTACTTGCCTGT.

2-й амплифицируемый участок (534 п.н.):

прямой праймер — 5'-GCGATATTCATAGTGCCCTTGAGT;

обратный праймер — 5'-CCTGCTGCAAGTCTTGATT (также совпал с таковым у М. Н. Leung и соавт. [14]).

Видовая специфичность праймеров была проверена с помощью онлайн-программы Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Для оценки вариабельности амплифицируемого фрагмента (база Whole genome shotgun contigs) при помощи алгоритма MegaBLAST из GenBank загрузили 7567 нуклеотидных последовательностей гена *cpsB* с фланкирующими участками, гомологичных таковой последовательности штамма *S.pneumoniae* Nr. 141/68, и выполнили ПЦР *in silico*. Праймеры для 1-го участка позволяли амплифицировать 7478 из данных нуклеотидных последовательностей, для 2-го — 4956. Поскольку эффективности амплификации второго фрагмента явно недостаточно в качестве прямого праймера для 2-го участка использовать смесь (1:1) двух вырожденных праймеров:

5'-GCGATATTCATAGTGCCCTTGAGT;

5'-GTCAGATTCATACGGGATTGAGC.

Для амплификации выбранной нуклеотидной последовательности мы использовали готовую смесь DreamTaq™ Hot Start PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific). Разведения праймеров готовили путём разбавления стокового раствора с концентрацией 100 мкМ, конечная концентрация праймеров — 10 пкМ.

Состав реакционной смеси для амплификации:

- Dream Taq Hot Start PCR Master Mix 2×12,5 мкл.
- Прямой + обратный праймеры 4 мкМ 2,5 мкл.
- Образец 10 мкл.

Температурный режим амплификации:

- 1 цикл: 95°C, 2 мин;
- 35 циклов: 95°C — 30 с; 54°C — 30 с; 72°C — 30 с.

Полученный ампликон очищали при помощи набора D-Pure Dye Terminator CleanUp Kit (Nimagen), согласно протоколу производителя. Реакцию секвенирования проводили с помощью набора BrilliantDye Terminator, v 3.1 (Nimagen).

Условия реакции секвенирования (конечная концентрация праймера — 3,3 пкМ).

Компоненты реакции:

- готовая смесь для секвенирования 1 мкл;
- 5×буфер для секвенирования 2 мкл;
- вода 0,9 мкл;
- праймер 1,1 мкл;
- образец 5 мкл.

Температурный режим реакции секвенирования:

- 1 цикл: 96°C, 1 мин;
- 27 циклов: 96°C — 10 с; 50°C — 10 с.

Продукты реакции секвенирования очищали при помощи набора D-Pure Dye Terminator CleanUp Kit (Nimagen), согласно протоколу производителя. Секвенирование проводили на приборе 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems). Сборку нуклеотидной последовательности гена выполняли при помощи программы Vector NTI (Thermo Fisher Scientific). Капсульное сиквенс-типирование осуществляли с помощью онлайн-сервиса Streptococcus Pneumoniae CST Typing Tool Version 0.0 (RIVM, Netherlands).

Серотипирование в реакции агглютинации. Для подтверждения результатов капсульного ПЦР- и сиквенс-типирования чистых культур пневмококка использовали набор антисывороток Immulex™ Pneumotest Kit (SSI Diagnostica). Результаты, полученные молекулярными методами, совпали с результатами серотипирования для всех серотипов/серогрупп, входящих в протокол.

Статистика. Для оценки значимости изменений распределения серотипов использовался критерий χ^2 [16].

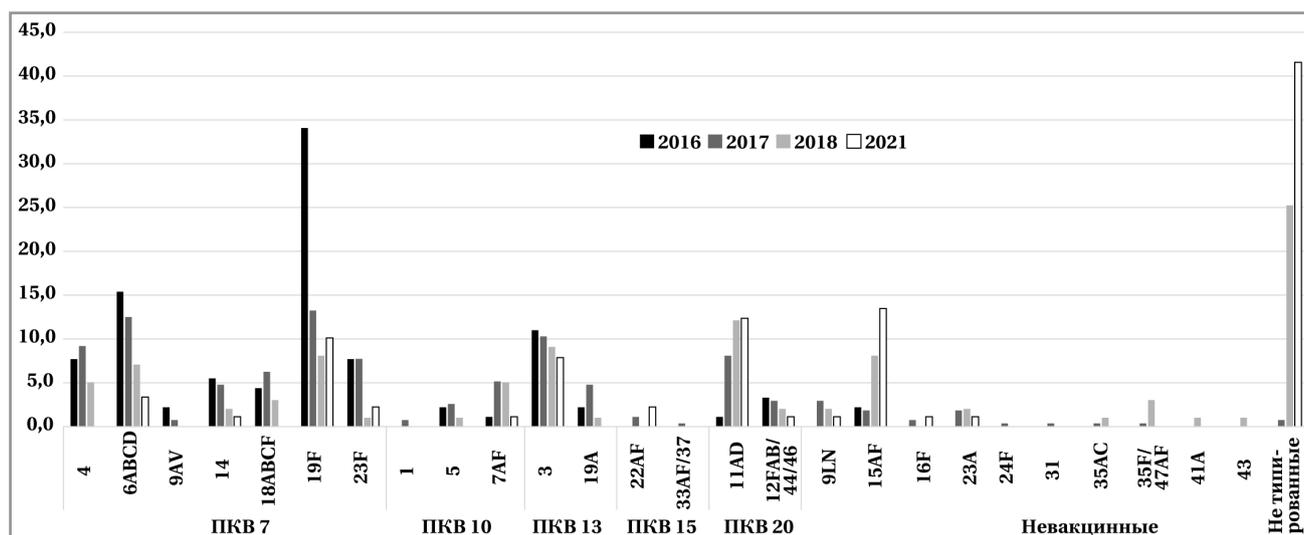
Результаты и обсуждение

Объём исследования биологического материала и характеристика обследованных групп детей представлены в табл. 2.

Сравнение распределения серотипов/серогрупп *S.pneumoniae* у детей с респираторными инфекциями по годам за период 2016–2018 гг. и за 2021 г. позволяет увидеть тенденцию к замене вакцинных серотипов пневмококка невакцинными (рис. 1): наиболее значимо снизилось количество серогрупп/серотипов 6ABCD (с 15,4% в 2016 г. до 3,4% в 2021, $p < 0,05$), 19F (с 34,1 до 10,1%, $p < 0,005$), практически исчезли из циркуляции серогруппы/серотипы 4, 9AV, 18ABCF, 1, 5, 19A. При этом возросло количество серогруппы 11AD (с 1,1% в 2016 г. до 12,4% в 2021, $p < 0,01$), входящей только в вакцину ПКВ20 и невакцинной серогруппы 15AF (с 2,2 до 13,5%, $p < 0,005$). Доля серотипов, входящих в 13-валентную ПКВ [1, 3, 4, 5,

Таблица 2. Число обследованных пациентов, типированных образцов и выявленных серотипов
Table 2. Number of examined patients, typed specimens, and identified serotypes

Параметр	Год			
	2016	2017	2018	2021
Всего пациентов обследовано	255	485	206	276
Средний возраст	2,57 лет/ 2 г 7 мес.	2,73 лет/ 2 г 9 мес.	2,68 лет/ 2 г 8 мес.	3,03 лет/ 3 г 4 мес.
Пол	м 55,5%	м 58,1%	м 59,7%	м 51,6%
	ж 44,5%	ж 41,9%	ж 40,3%	ж 48,4%
Выделено чистых культур/получены результаты типирования	60/34	166/118	47/29	61/15
Обнаружена ДНК/получены результаты типирования	41/33	160/77	68/33	83/42
Выявлено серотипов/серогрупп	85	228	71	52
Суммарная доля серотипов, входящих в состав ПКВ13	93,4	77,9	42,4	25,8



Распределение серотипов/серогрупп *Streptococcus pneumoniae* у детей с респираторными инфекциями. Санкт-Петербург 2016–2018, 2021 гг.

Distribution of serotypes/serogroups of *Streptococcus pneumoniae* in children with respiratory infections. St. Petersburg 2016–2018, 2021

6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F], с течением времени существенно изменилась — с 94,1% в 2016 г. до 44,0% в 2021 ($p < 0,005$) (табл. 1).

В 2021 г. частота серотипов, входящих в вакцины ПКВ15 и ПКВ20 составила 28,1 и 41,6%, соответственно.

Также следует отметить весьма существенное увеличение доли серотипов, не определяемых при помощи принятого нами протокола серотипирования — в 2016 г. удалось типировать все выявленные в ходе исследования пневмококки, а в 2021 г. доля не типированных составила 41,6%. Это говорит о необходимости дальнейшей оптимизации протокола капсульного ПЦР-типирования, включении в него дополнительных серотипов.

Изменение серотипового состава пневмококковых популяций на фоне массовой вакцинации — универсальное явление, наблюдаемое во всех регионах, однако конкретный характер таких изменений между регионами существенно различается. Так, в Великобритании доминирующими серотипами к 2015–2016 гг. стали 12F, 8, 10A; в Израиле — 12F; в Германии — 10A и 24F; во Франции — 24F, 15BC, 23B и 12F [17].

До антипневмококковой вакцинации в России пневмококковые инфекции преимущественно ассоциировались с вакцинными серотипами. Согласно данным различных исследований, суммированных в обзоре [18], в период с 2003 по 2012 гг. ПКВ13 охватывала от 66 до 90% серотипов. Наиболее распространёнными были серогруппа 6 и серотип 19F. В 2020 г. были опубликованы результаты многоцентрового исследования серотипового состава пневмококков, вызывавших бес-

симптомное носительство у детей до 5 лет, в начальный период внедрения массовой иммунизации детей вакциной ПКВ13 (с 2016 по 2018 гг.) [19]. В указанном исследовании была выявлена четкая тенденция к снижению частоты ПКВ13-серотипов (до 49,4%) и росту частоты не-ПКВ13 серотипов, преимущественно за счёт серогрупп 11AD, 15AF и 15BC.

В работе, опубликованной в 2019 г., анализировали серотиповой состав пневмококков, выделенных от детей младше 5 лет с острыми респираторными инфекциями в Москве с 2010 по 2017 гг. [20]. Согласно полученным данным, встречаемость ПКВ13-вакцинных серотипов оставалась почти неизменной в период с 2010 по 2015 гг. (77,7%), но значительно снизилась в 2017 г. (до 58,5%) и в 2017 г. стали чаще встречаться серогруппы 11AD, 15BC и 35F.

Таким образом, очевидно, что в популяционной структуре пневмококков в Российской Федерации на фоне массовой вакцинации ПКВ13 происходят серьёзные изменения. Наиболее общей и очевидной тенденцией, выявляемой в настоящем и других исследованиях, является распространение серогруппы 11AD. Выявляемые в отдельных исследованиях тенденции к росту серогрупп 15AF, 15BC и серотипа 35F не столь однозначны.

Снижение охвата пневмококков, циркулирующих в Российской Федерации ПКВ13, и распространение «невакцинных» серотипов ставит вопрос о её замене в Национальном календаре новой вакциной расширенного серотипового состава. В Северной Америке и Западной Европе разрешены к применению у взрослых 15- и 20-валентные вакцины. В состав 15-валентной

вакцины включены серотипы, входящие в состав ПКВ13, а также 22F и 33A, а в состав 20-валентной добавлены ещё пять серотипов: 8, 10A, 11A, 12F и 15B. 20-валентная вакцина в настоящее время в большей степени соответствует серотиповому составу пневмококков на территории РФ (охватывает 41,6% серотипов), поскольку в её состав входят серотип 11A и 15B, однако имеющие тенденцию к распространению серотипы 15AF и 35F в ней отсутствуют.

Вполне закономерным представляется вывод о необходимости разработки конъюгированной пневмококковой вакцины, в максимальной степени соответствующей серотиповому составу пневмококков, циркулирующих в Российской Федерации. Для максимально надёжного обоснования серотипового состава такой вакцины необходимы данные о серотиповом составе не только пневмококков, вызывающих бессимптомное носительство у детей или выделяемых на фоне респираторных инфекций, но

и пневмококков, вызывающих инвазивные инфекции. Серьёзного рассмотрения требует проблема высокой частоты образцов, нетипируемых применяемыми молекулярными методами, вполне вероятно, что среди них распространены другие важные серотипы. Очевидна необходимость дальнейшего совершенствования методов типирования пневмококков непосредственно из биологических жидкостей. Так, недавно предложен протокол двухэтапного ПЦР сиквенс-типирования (PCRSeqTyping) [21].

Согласно международному опыту, необходимость в коррекции серотипового состава пневмококковых вакцин возникает приблизительно один раз в 10 лет. Есть все основания полагать, что к 2025–2026 гг. такая потребность возникнет и в Российской Федерации. Таким образом, потребность в расширении исследований популяционной структуры пневмококков с привлечением наиболее современных молекулярных методов очевидна.

Литература/References

1. Simell B., Auranen K., Kayhty H., Goldblatt D., Dagan R., O'Brien K.L. et al. The fundamental link between pneumococcal carriage and disease. *Expert Rev Vaccines*. 2012; 11: 841–855.
2. Howard L.M., Zhu Y., Griffin M.R., Edwards K.M., Williams J.V., Gil A.I. et al. Nasopharyngeal Pneumococcal Density during Asymptomatic Respiratory Virus Infection and Risk for Subsequent Acute Respiratory Illness. *Emerg Infect Dis*. 2019; 25: 2040–2047.
3. Whitney C.G., Farley M.M., Hadler J., Harrison L.H., Bennett N.M., Lynfield R. et al. Decline in invasive pneumococcal disease after the introduction of protein-polysaccharide conjugate vaccine. *N Engl J Med*. 2003; 348: 1737–1746.
4. Ganaie F., Saad J.S., McGee L., van Tonder A.J., Bentley S.D., Lo S.W. et al. A new pneumococcal capsule type, 10D, is the 100th serotype and has a large cps fragment from an oral *Streptococcus*. *mBio*. 2020; 11 (3): e00937–20. doi: 10.1128/mBio.00937-20.
5. Geno K.A., Gilbert G.L., Song J.Y., Skovsted I.C., Klugman K.P., Jones C. et al. Pneumococcal capsules and their types: past, present, and future. *clinical microbiology reviews*. 2015; 28: 871–899.
6. Weinberger D.M., Malley R., Lipsitch M. Serotype replacement in disease after pneumococcal vaccination. *Lancet*. 2011; 378: 1962–1973.
7. Bentley S.D., Aanensen D.M., Mavroidi A., Saunders D., Rabinowitsch E., Collins M. et al. Genetic analysis of the capsular biosynthetic locus from all 90 pneumococcal serotypes. *PLoS Genet*. 2006; 2: e31.
8. Brito D.A., Ramirez M., de Lencastre H. Serotyping *Streptococcus pneumoniae* by multiplex PCR. *J Clin Microbiol*. 2003; 41: 2378–2384.
9. Kong F., Wang W., Tao J., Wang L., Wang Q., Sabananthan A. et al. A molecular-capsular-type prediction system for 90 *Streptococcus pneumoniae* serotypes using partial *cpsA-cpsB* sequencing and *wzy*- or *wzx*-specific PCR. *J Med Microbiol*. 2005; 54: 351–356.
10. Lawrence E.R., Griffiths D.B., Martin S.A., George R.C., Hall L.M. Evaluation of semiautomated multiplex PCR assay for determination of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and serogroups. *J Clin Microbiol*. 2003; 41: 601–607.
11. O'Halloran D.M., Cafferkey M.T. Multiplex PCR for identification of seven *Streptococcus pneumoniae* serotypes targeted by a 7-valent conjugate vaccine. *J Clin Microbiol*. 2005; 43: 3487–3490.
12. Pai R., Gertz R.E., Beall B. Sequential multiplex PCR approach for determining capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates. *J Clin Microbiol*. 2006; 44: 124–131.

Информация об авторе

Никитина Екатерина Валерьевна — к. б. н., Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Российская Федерация. ORCID: 0000-0002-9737-9496. WOS Researcher ID: AAE-4032-2022. Scopus Author ID: 57211941455

13. Conventional PCR deduction of 40 pneumococcal serotypes or serogroups. Available at: <http://www.cdc.gov/streplab/pcr.html> (Accessed 02.09.2020).
14. Leung M.H., Bryson K., Freystatter K., Pichon B., Edwards G., Charalambous B.M. et al. Sequotyping: serotyping *Streptococcus pneumoniae* by a single PCR sequencing strategy. *J Clin Microbiol*. 2012; 50: 2419–2427.
15. Калиногорская О.С., Волкова М.О., Беланов С.С., Гостев В.В., Сидоренко С.В. Антибиотикорезистентность и серотиповый состав *Streptococcus pneumoniae*, выделенных у детей в Санкт-Петербурге в 2010–2013 гг. Антибиотики и химиотер. 2015; 60 (1–2): 10–18. [Kalinogorskaya O.S., Volkova M.O., Belanov S.S., Gostev V.V., Sidorenko S.V. Antibiotikorezistentnost' i serotipovyy sostav *Streptococcus pneumoniae*, vydelennykh u detey v Sankt-Peterburge v 2010–2013 gg. Antibiotiki i khimioter. 2015; 60 (1–2): 10–18. (in Russian)]
16. <http://www.biometrika.tomsk.ru/freq1.htm>.
17. Levy C., Ouldali N., Caeyaex L., Angoulvant F., Varon E., Cohen R. Diversity of Serotype Replacement After Pneumococcal Conjugate Vaccine Implementation in Europe. *J Pediatr*. 2019; 213: 252–3 e3.
18. Tatchenko V., Sidorenko S., Namazova-Baranova L., Mayanskiy N., Kulichenko T., Baranov A. et al. *Streptococcus pneumoniae* serotype distribution in children in the Russian Federation before the introduction of pneumococcal conjugate vaccines into the National Immunization Program. *Expert Rev Vaccines*. 2014; 13: 257–264.
19. Sidorenko S., Rennert W., Lobzin Y., Briko N., Kozlov R., Namazova-Baranova L. et al. Multicenter study of serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* nasopharyngeal isolates from healthy children in the Russian Federation after introduction of PCV13 into the National Vaccination Calendar. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2020; 96: 114914.
20. Mayanskiy N., Kulichenko T., Alyabieva N., Brzhozovskaya E., Ponomarenko O., Savinova T. et al. Changing serotype distribution and resistance patterns among pediatric nasopharyngeal pneumococci collected in Moscow, 2010–2017. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2019; 94 (4): 389–390. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2019.02.010.
21. Nagaraj G., Ganaie F., Govindan V., Ravikumar K.L. Development of PCRSeqTyping—a novel molecular assay for typing of *Streptococcus pneumoniae*. *Pneumonia (Nathan)*. 2017; 9: 8.

About the author

Ekaterina V. Nikitina — Ph. D. in biology, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases under the Federal Medical Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation. ORCID: 0000-0002-9737-9496. WOS Researcher ID: AAE-4032-2022. Scopus Author ID: 57211941455

Цветкова Ирина Анатольевна — к. б. н., Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Российская Федерация. ORCID: 0000-0002-0170-6975. WOS Researcher ID: F-9426-2017. Scopus Author ID: 57197832461

Калиногорская Ольга Серафимовна — к. м. н. Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Российская Федерация. ORCID: 0000-0003-1419-9068. WOS Researcher ID: AAW-3832-2020. Scopus Author ID: 56525317800

Гостев Владимир Валерьевич — к. б. н., Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства»; Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова» Минздрава России. Санкт-Петербург, Российская Федерация. ORCID: 0000-0002-3480-8089. WOS Researcher ID: P-1949-2016. Scopus Author ID: 55614534400

Беланов Сергей Сергеевич — к. б. н., Университет Хельсинки, Институт Биотехнологии, Хельсинки, Финляндия. ORCID: 0000-0003-3419-3659

Мохов Алексей Сергеевич — Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова» Минздрава России. Санкт-Петербург, Российская Федерация. ORCID: 0000-0002-1519-5299. WOS Researcher ID: AAV-2943-2021. Scopus Author ID: 57206484035

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

Гладин Дмитрий Павлович — к. м. н., доцент, и. о. заведующего кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России, Санкт-Петербург, Российская Федерация. ORCID: 0000-0003-4975-7110. Scopus Author ID: 6603374770

Агеевец Владимир Андреевич — к. б. н., Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Российская Федерация. ORCID: 0000-0002-3963-0144. WOS Researcher ID: F-9282-2017. Scopus Author ID: 55949608900

Сидоренко Сергей Владимирович — д. м. н., профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства»; Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова» Минздрава России. Санкт-Петербург, Российская Федерация. ORCID: 0000-0003-3550-7875. WOS Researcher ID: E-5870-2011. Scopus Author ID: 7102484509

Irina A. Tsvetkova — Ph. D. in biology, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases under the Federal Medical Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation. ORCID: 0000-0002-0170-6975. WOS Researcher ID: F-9426-2017. Scopus Author ID: 57197832461

Olga S. Kalinogorskaya — Ph. D. in medicine, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases under the Federal Medical Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation. ORCID: 0000-0003-1419-9068. WOS Researcher ID: AAW-3832-2020. Scopus Author ID: 56525317800

Vladimir V. Gostev — Ph. D. in biology, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases under the Federal Medical Biological Agency, North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov of the Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation. ORCID: 0000-0002-3480-8089. WOS Researcher ID: P-1949-2016. Scopus Author ID: 55614534400

Sergey Belanov — Ph.D. in biology, University of Helsinki, Institute of Biotechnology, Helsinki, Finland. ORCID: 0000-0003-3419-3659

Alexey S. Mokhov — North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov of the Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation. ORCID: 0000-0002-1519-5299. WOS Researcher ID: AAV-2943-2021. Scopus Author ID: 57206484035

Ekaterina L. Kalisnikova — Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases under the Federal Medical Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

Dmitry P. Gladin — Ph. D. in medicine, St. Petersburg State Pediatric Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Saint Petersburg, Russian Federation. ORCID: 0000-0003-4975-7110. Scopus Author ID: 6603374770

Vladimir A. Ageevets — Ph. D. in biology, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases under the Federal Medical Biological Agency, Saint Petersburg, Russian Federation. ORCID: 0000-0002-3963-0144. WOS Researcher ID: F-9282-2017. Scopus Author ID: 55949608900

Sergey V. Sidorenko — D. Sc. in medicine, Professor, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases under the Federal Medical Biological Agency, North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov of the Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation. ORCID: 0000-0003-3550-7875. WOS Researcher ID: E-5870-2011. Scopus Author ID: 7102484509