

Идентификация и серотипирование российских штаммов *Streptococcus pneumoniae* с применением методик, основанных на ПЦР

К.О. Миронов¹, А.Е. Платонов¹, Р.С. Козлов²

¹ Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

² НИИ антимикробной химиотерапии ГБОУ ВПО СГМА Минздравсоцразвития России, Смоленск, Россия

Основанные на ПЦР методики идентификации и серотипирования *Streptococcus pneumoniae* оптимизированы для использования в российской эпидемической ситуации. Протестировано 113 штаммов, изолированных в 15 городах РФ от детей в возрасте до 5 лет, преимущественно больных пневмонией (89 детей). Все штаммы *S. pneumoniae* дали истинно-положительный сигнал при ПЦР в режиме реального времени с генами *lytA* и *psaA* в качестве мишеней. Пять штаммов дали отрицательный результат в ПЦР с праймерами к локусу *cpsA* и, вероятно, были не способны к синтезу капсулы. Был определен серотип/серогруппа у 94 из оставшихся 108 штаммов; найдено 18 серовариантов пневмококков (2, 3, 4, 6А, 6В, 7FА, 8, 9NЛ, 9VА, 11AD, 14, 15AF, 15BC, 18ABCF, 19F, 22FA, 23В, 23F). Примечательно, что все 12 штаммов 19-й серогруппы принадлежали «вакциному» серотипу 19F; из 12 штаммов 23-й серогруппы

11 штаммов имели «вакцинный» серотип 23F. С помощью метода пиросеквенирования были классифицированы штаммы 6-й серогруппы: 7 из них были отнесены к серотипу 6В и 11 – к серотипу 6А. Методика основана на использовании 24 пар праймеров, распределенных на четыре ПЦР-теста; с её помощью можно выявлять все серотипы, включенные в 10-валентную или 13-валентную пневмококковую вакцины и практически все часто встречающиеся на территории РФ «невакцинные» серотипы. Мы предполагаем, что данный подход позволит определять серотип у более 85% штаммов *S. pneumoniae*, вызывающих клинические заболевания и, таким образом, оценить потенциальную протективную эффективность конъюгированных пневмококковых вакцин.

Ключевые слова: *Streptococcus pneumoniae*, ПЦР, детекция, серотипирование, российские штаммы.

PCR-based Identification and Serotyping of Russian *Streptococcus pneumoniae* Strains

K.O. Mironov¹, A.E. Platonov¹, R.S. Kozlov²

¹ Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

² Institute of Antimicrobial Chemotherapy, Smolensk, Russia

The techniques for PCR-based identification and serotyping of *Streptococcus pneumoniae* were optimized for using in Russian epidemiologic situation. One hundred

and thirteen strains isolated from children under 5 years of age in 15 Russian cities were tested; 85 of children had pneumonia. Real-time PCR assays using *lytA* and *psaA* genes gave true positive results with all *S. pneumoniae* strains. Five strains were negative in *cpsA*-based PCR assay and, possibly, did not produce a capsule. Of the remaining 108 strains, the serotype/serogroup was iden-

Контактный адрес:
Константин Олегович Миронов
Эл. почта: mironov@pcr.ru

tified for 94 strains; 18 different serovariants of pneumococci were found (2, 3, 4, 6A, 6B, 7FA, 8, 9NL, 9VA, 11AD, 14, 15AF, 15BC, 18ABCF, 19F, 22FA, 23B, 23F). Noteworthy, all twelve strains of serogroup 19 belonged to «vaccine» serotype 19F, and 11 of twelve serogroup 23 strains had «vaccine» serotype 23F. Serotypes 6B and 6A were differentiated by pyrosequencing; 7 strains belonged to serotype 6B and 11 strains had serotype 6A. The set of 24 primers pairs is joined in four PCR assays and provides the possibility to indentify all serotypes

Введение

Бактерии вида *Streptococcus pneumoniae* – возбудители широкого спектра инфекций с респираторным механизмом передачи. Клинические формы заболеваний, вызываемых *S. pneumoniae*, условно подразделяют на инвазивные и неинвазивные. К инвазивным формам пневмококковой инфекции относят заболевания, при которых возбудитель был выделен из исходно стерильных сред организма (например, спинномозговой жидкости или крови). К неинвазивным формам пневмококковой инфекции относят «небактериемическую» пневмонию (отсутствие возбудителя в крови) и локальные воспалительные процессы, например, *острый средний отит* (ОСО), риносинусит и т.п. [1, 2]. По оценкам, пневмококки ответственны примерно за 14 млн случаев серьезных заболеваний и 800 тыс. смертей в год в мире среди детей младше 5 лет [3].

Полисахаридная капсула имеет у большинства штаммов пневмококков и является важным фактором вирулентности *S. pneumoniae*, препятствующим комплемент-зависимому лизису и опсонофагоцитозу бактерий [4–6], способствуя их размножению и гематогенной диссеминации. В зависимости от химического строения полисахарида и специфичности вырабатываемых антиполисахаридных антител выделяют не менее 90 серотипов пневмококка [7]. Частота обнаружения штаммов с теми или иными серотипами зависит от географического региона, временного диапазона исследования, возраста и других эпидемиологических особенностей обследованных лиц [8–10]. Штаммы различных серотипов отличаются по способности вызывать определенные клинические формы инфекции; существует связь между серотипом пневмококка, тяжестью симптоматики и летальностью при вызываемом им заболевании [1, 6, 7, 11, 12].

Эффективным способом профилактики пневмококковой инфекции является вакцинация. В настоящее время выпускаются конъюгированные поливалентные вакцины, содержащие 7, 10 или 13

included in 10-valent or 13-valent pneumococcal vaccine, as well as most «non-vaccine» serotypes prevalent in Russia. We expect that the technique will help to reveal the serotype of more than 85% *S. pneumoniae* strains causing clinical disease, and thus to estimate the potential protective efficacy of available conjugated pneumococcal vaccines.

Key words: *Streptococcus pneumoniae*, PCR, detection, serotyping, Russian strains.

серотиповых антигенов, и полисахаридная вакцина, включающая антигены 23 серотипов *S. pneumoniae*. Полисахаридная вакцина «Пневмо-23» используется для профилактики тяжёлых пневмококковых инфекций в группах риска, в частности среди лиц старше 65 лет; вакцинация у детей до 2 лет не рекомендуется. Конъюгированные вакцины предназначены, в первую очередь, для вакцинации детей, начиная с первого года жизни [1, 2, 8, 13, 14], но, за счет создания популяционного иммунитета, способствуют также снижению заболеваемости и смертности среди лиц пожилого возраста [15].

ВОЗ полагает, что «пневмококковая конъюгированная вакцина должна стать приоритетной для внедрения в национальные детские иммунизационные программы. Необходимо включать данную вакцину в иммунизационные программы в тех странах, где смертность среди детей младше 5 лет составляет >50 на 1000» [13]. Основанное на доказательной медицине введение вакцины в календарь прививок в более благополучных странах, к которым относится Российская Федерация, требует выполнения трех условий: выяснение истинной заболеваемости пневмококковой инфекцией среди детей; определение серотипового состава популяции *S. pneumoniae*, циркулирующей в регионе; соответствие предлагаемой вакцины наблюдаемому спектру серотипов. По оценкам, 10-валентная пневмококковая конъюгированная вакцина способна предотвратить более 80% случаев инвазивной инфекции у детей младше 5 лет в Северной Америке и Западной Европе, но меньше 70% среди детей в Азии [8, 10]. В настоящее время фактическая заболеваемость пневмококковой инфекцией в РФ неизвестна в силу отсутствия лабораторной расшифровки большинства клинических форм, в особенности пневмонии; представления о спектре циркулирующих серотипов основаны в большей степени на исследованиях штаммов, выделенных от носителей или больных неинвазивными формами в достаточно отдаленный период времени [1, 16, 17].

Следует подчеркнуть, что мониторинг циркулирующих серотипов следует проводить не только до,

но и после введения вакцины в календарь прививок. Известен феномен смены серотипов (serotype replacement), доминирующих в популяции *S. pneumoniae*, отчасти обусловленный интенсивным рекомбинационным процессом и явлением «переключения капсулы» (capsule switching). Серотипы могут вытеснять друг друга в ходе естественной конкуренции и эволюции [18], но специфическая вакцинация провоцирует частичную замену «вакцинных» серотипов на «невакцинные» еще более эффективно [8, 9, 19, 20].

Основным применяемым методом и «золотым стандартом» серотипирования *S. pneumoniae* является предложенная в Дании Государственным институтом вакцин (Statens Serum Institut) серологическая методика, основанная на реакции набухания капсулы (quellung reaction); для этого выпускаются реагенты, позволяющие идентифицировать все известные серотипы капсульного полисахарида. Различия в составе и строении капсулы обусловлены возникшими в ходе эволюции особенностями биохимических процессов у представителей разных серотипов. Ферменты, контролирующие процессы синтеза, транспорта компонентов и сборки капсульного полисахарида, кодируются генами, расположенными в *cps* локусе бактериальной хромосомы [21]. В 2006 году была закончена работа по секвенированию последовательностей *cps* локуса для 90 серотипов *S. pneumoniae* [22]. Показаны генетические отличия *S. pneumoniae* разных серогрупп/серотипов по этому локусу [23, 24], что позволило разработать ряд методик, основанных на ПЦР, для определения серотипов *S. pneumoniae* [22, 25-28]. Основными преимуществами данных методик являются сравнительно низкая стоимость проведения анализа и высокая производительность исследования.

Серотипированию с использованием молекулярно-биологических методов, основанных на ПЦР, естественно предшествует ПЦР-детекция и идентификация ДНК у *S. pneumoniae*, позволяющая в перспективе проводить диагностику пневмококковой инфекции без высева возбудителя [29-32]. Дополнение микробиологических методов исследования *S. pneumoniae* молекулярно-биологическими методами позволяет повысить специфичность и информативность комплексного исследования.

Цель настоящей работы – оптимизация методик, основанных на ПЦР, для идентификации пневмококков и определения их серотипов, а также тестирование предлагаемого комплекса методик на коллекционных штаммах, выделенных в различных регионах России.

Материал и методы

Штаммы *S. pneumoniae*. В исследовании использованы штаммы *S. pneumoniae*, собранные в рамках серии многоцентровых исследований резистентности микроорганизмов, проводимых НИИ антимикробной химиотерапии Смоленской государственной медицинской академии. Высев и идентификация штаммов проводились с использованием стандартных микробиологических методик [33]. Часть штаммов была охарактеризована с помощью набора «Pneumotest-Latex» (Statens Serum Institut, Дания) [34]. Набор содержит 14 пулированных сывороток, позволяющих определять следующие серогруппы: 1, 2, 3, 4, 5, 6 (6A, 6B, 6C), 7 (7F, 7A, 7B, 7C), 8, 9 (9A, 9L, 9N, 9V), 10 (10F, 10A, 10B, 10C), 11 (11F, 11A, 11B, 11C, 11D), 12 (12F, 12A, 12B), 14, 15 (15F, 15A, 15B, 15C), 17 (17F, 17A), 18 (18F, 18A, 18B, 18C), 19 (19F, 19A, 19B, 19C), 20, 22 (22F, 22A), 23 (23F, 23A, 23B), 33 (33F, 33A, 33B, 33C, 33D) и ряд «невакцинных» серогрупп; данный набор реагентов не включает факторных антисывороток, необходимых для дифференциации указанных в скобках серотипов внутри определяемых серогрупп.

Для проведения нашего исследования из коллекции было выбрано 113 штаммов, изолированных от детей до 5 лет, распределенных в три группы: первая группа – 9 штаммов, выделенных из крови или ликвора больных инвазивными формами пневмококковой инфекции (Казань, Москва, Новокузнецк, Санкт-Петербург, Ярославль – по 1 штамму, Смоленск – 4 штамма);

вторая группа – 98 штаммов, изолированных из материала нестерильного типа (мокрота и т.п.) у больных пневмонией (85 штаммов) и ОСО (13 штаммов), географическим местом выделения этих штаммов были Екатеринбург – 6 штаммов, Иркутск – 30, Казань – 5, Москва – 19, Новокузнецк – 6, Смоленск – 7, Хабаровск – 13, Ярославль – 8 и остальные города;

третья группа – 6 штаммов от носителей.

В тестируемую выборку были включены представители всех обнаруженных серогрупп, а также ряд штаммов, серотип которых не удалось определить; по сравнению с исходной коллекцией в выборке минимизировано число штаммов от носителей.

Выделение ДНК *S. pneumoniae*. Бактериальная суспензия, разведенная в 500 мкл ТЕ-буфера (Трис-HCl – 10 mM, pH 8,0, ЭДТА – 1 mM), прогревалась при 95°C в течение 5 мин. После прогрева суспензия центрифугировалась в течение 10 мин. при скорости 12000 об/мин на центрифуге «MiniSpin

plus» («Eppendorf», Германия). После центрифугирования из пробирок отбиралось 450 мкл раствора, содержащего бактериальную ДНК, и готовились разведения ДНК в ТЕ-буфере до концентрации 10^5 - 10^6 геномных эквивалентов в 1 мл для постановки ПЦР.

Постановка ПЦР. Для серотипирования *S. pneumoniae* методом ПЦР были использованы специфичные праймеры, описанные в публикациях [22, 25, 26] и рекомендованные для проведения серотипирования Центром по контролю и профилактике заболеваний (CDC, США); последовательности праймеров приведены на Интернет-сайте [35]. Рекомендованная методика предполагает постановку ПЦР с электрофоретическим разделением продуктов амплификации в агарозном геле.

ПЦР проводилась по следующей схеме: в пробирку добавлялась смесь, содержащая праймеры и нуклеотидтрифосфаты (0,44 мМ) – 10 мкл, «Воск для ПЦР» – 10 мкл, «ПЦР-смесь-2 blue» – 10 мкл, «Минеральное масло для ПЦР» – 10 мкл и 5 мкл выделенной ДНК. Во всех реакциях присутствовали праймеры «срсА-f» и «срсА-g» в концентрации 0,12 мкМ для амплификации фрагмента длиной 160 п.о., присутствующего у всех капсульных штаммов *S. pneumoniae* [22]. Амплификация проводилась на приборе «GeneAmp PCR System 2700» («Applied Biosystems», США) по следующей программе: 95 °С – 5 мин. (1 цикл); 95 °С – 20 с / 60 °С – 30 с / 72 °С – 30 с (35 циклов); 72 °С – 2 мин. (1 цикл).

Детекция продуктов амплификации проводилась в 3% агарозном геле, содержащем этидия бромид. Электрофорез проходил при напряжении 250 В в течение 30–40 мин. с использованием маркера молекулярных масс с фрагментами ДНК, соответствующими 800, 500, 400, 300, 200 и 100 п.о.

ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РРВ) проводилась в формате «мультипрайм» в объеме 25 мкл; компоненты реакции смешивались по следующей схеме: смесь, содержащая праймеры, зонды и нуклеотидтрифосфаты (0,44 мМ) – 10 мкл; реактивы «Полимераза TaqF» – 0,5 мкл и «ОТ-ПЦР-смесь-2 FER/FRT» – 4,5 мкл; ДНК-проба – 10 мкл.

Постановка ПЦР-РРВ проводилась на приборе «Mx3000P» («Stratagene», США) по следующей программе: 95 °С – 15 мин (1 цикл); 95 °С – 5 с / 60 °С – 20 с / 72 °С – 5 с (5 циклов без детекции флуоресцентного сигнала); 95 °С – 5 с / 60 °С – 20 с / 72 °С – 5 с (40 циклов

с детекцией флуоресцентного сигнала по каналам FAM и JOE на стадии 60 °С). При учете результатов положительными пробами считались образцы, кривые флуоресценции которых пересекали пороговую линию, проведенную на уровне 1000 и 800 усл. ед. флуоресценции для каналов FAM и JOE соответственно.

Все реагенты для постановки ПЦР и детекции результатов амплификации были произведены в ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» (Россия).

Определение нуклеотидных последовательностей. Секвенирование коротких фрагментов ДНК (20–30 п.о.) проводилось методом пиросеквенирования [36] на приборе «PyroMark Q24» с использованием набора реагентов «PyroMark Gold Q24 Reagents» («Qiagen», Германия). Для пиросеквенирования использовалось 20 мкл продукта амплификации. При подготовке ампликонов для секвенирования использованы частицы сефарозы, покрытые стрептавидином – «Streptavidin Sepharose High Performance» («GE Healthcare», Великобритания), и набор «ПИРО-преп» (ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии», Россия). Все действия проводились по стандартному протоколу, рекомендованному разработчиками метода, с использованием станции для пробоподготовки «PyroMark Q24 Vacuum Workstation» («Qiagen», Германия).

Секвенирование фрагментов ДНК длиной 300 п.о. проводилось методом Сэнгера (Sanger) с использованием оборудования и реактивов фирмы «Applied Biosystems» (США): капиллярный электрофорез проводился с помощью системы

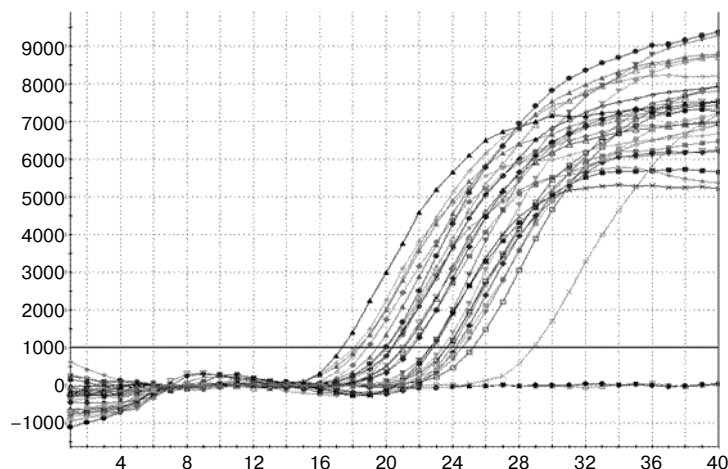


Рис. 1. Кривые флуоресценции ПЦР-РРВ при детекции фрагмента гена *lytA S. pneumoniae*. По оси абсцисс – цикл амплификации; по оси ординат – интенсивность флуоресценции, усл. ед.

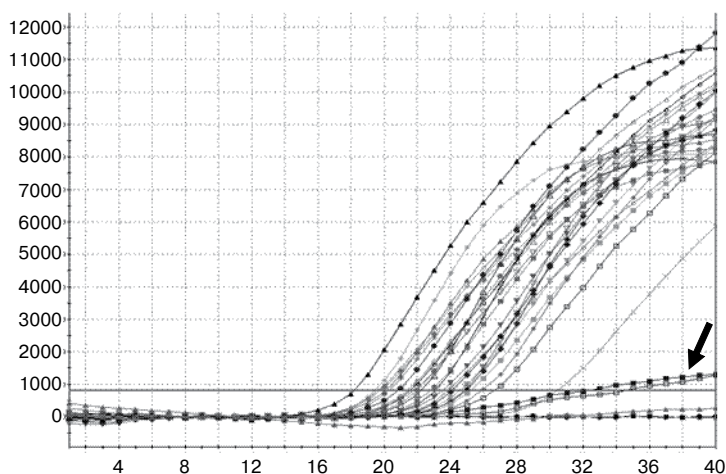


Рис. 2. Кривые флуоресценции ПЦР-РРВ при детекции фрагмента гена *psaA* *S. pneumoniae*. По оси абсцисс – цикл амплификации; по оси ординат – интенсивность флуоресценции, усл. ед.

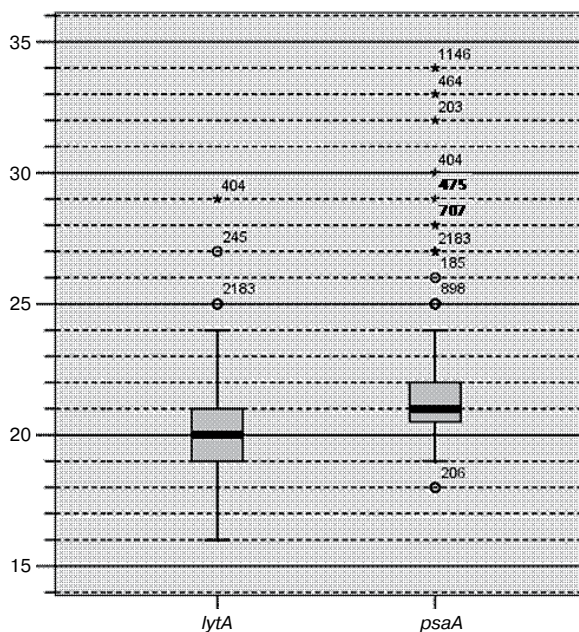


Рис. 3. Пороговые циклы кривых флуоресценции для методик детекции ПЦР-РРВ мишеней *lytA* и *psaA*. По оси ординат – значения пороговых циклов, распределение которых показано методом box-and-whisker plot: медиана – центральная линия прямоугольника; интерквартильный интервал – прямоугольник; диапазон – линии; резко отличающиеся значения выделены точками, подписи около точек соответствуют обозначениям штаммов.

генетического анализа «ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer»; при постановке секвенирующей реакции использован набор «BigDye Terminator v1.1». Все действия проводились по методике, рекомендованной изготовителем.

Хранение и статистическая обработка данных. Полученные результаты сохранены в виде файлов Excel и базы данных Access (MS Office). Для статистического анализа полученных результатов использован статистический пакет SPSS 11.0.1.

Результаты и обсуждение

Методика детекции ДНК *S. pneumoniae*. В основе использованной в данном исследовании методики идентификации штаммов бактерий вида *S. pneumoniae* лежат опубликованные исследования [29, 30]. Рекомендуются М. Carvalho et al. [29] ПЦР-методики основаны на амплификации в ПЦР-РРВ специфичных для *S. pneumoniae* фрагментов генов *psaA* и *lytA*. В данном исследовании были использованы предложенные в [29] пары праймеров «*lytA*-CDC forward»/«*lytA*-CDC reverse» для амплификации фрагмента гена *lytA* и «*psaA* forward»/«*psaA* reverse» для амплификации фрагмента гена *psaA*. Детекция продуктов амплификации фрагмента гена *lytA* проводилась с использованием флуоресцентно меченного зонда «*lytA*-Z4»: 5'(FAM)-CCC-TgT-ATC-AAg-CgT-TTT-Cgg-CAA-ACC-gAA-(BHQ1)3', дизайн нуклеотидной последовательности которого выполнен в данном исследовании; фрагмента гена *psaA* на первом этапе исследования – с использованием зонда «*psaA* probe» [29], меченного флуорофором R6G. Были выбраны следующие концентрации олигонуклеотидов: праймеров «*lytA*-CDC forward» и «*lytA*-CDC reverse» – 0,2 мкМ, праймеров «*psaA* forward» и «*psaA* reverse» – 0,35 мкМ, зонда «*lytA*-Z4» – 0,1 мкМ, зонда «*psaA* probe» – 0,15 мкМ.

Примеры кривых флуоресценции по каналам FAM (детекция фрагмента амплификации гена *lytA*) и JOE (детекция фрагмента амплификации гена *psaA*) приведены на рис. 1 и 2; показаны результаты одновременной постановки 26 образцов, содержащих ДНК штаммов *S. pneumoniae*, и двух отрицательных контрольных образцов, для которых уровень флуоресценции не достигает порогового значения. На рис. 2 у 3 образцов детектируются поздние (более 30) значения пороговых циклов, из них у 2 образцов последующее разгорание флуоресценции нарастает медленно.

Все исследованные штаммы дали положительный результат в ПЦР-РРВ к мишеням *lytA* и *psaA*. Пять штаммов дали отрицательный результат в ПЦР с праймерами «*cpsA*-f» и «*cpsA*-r» [22], т.е. они, вероятно, были не способны к синтезу капсу-

Таблица 1. Состав ПЦР-смесей и размер амплифицируемых фрагментов для определения серогрупповой принадлежности *S. pneumoniae*

ПЦР-смесь	Названия праймеров и литературная ссылка	Размер ПЦР-продукта, п.о.	Концентрация каждого праймера в ПЦР, мкМ
№ 1	14-f и 14-г [25]	189	0,3
	6A/6B/6C-f* и 6A/6B/6C-г [22]	250	0,3
	19F-f и 19F-г [22]	304	0,3
	5-f и 5-г [22]	362	0,5
	18/(18A/18B/18C/18F)-f и 18/(18A/18B/18C/18F)-г [22]	573	0,5
	23A-f и 23-г [35]	722	0,5
№ 2	23B-f и 23B-г [35]	199	0,3
	1-f и 1-г [22]	280	0,3
	23F-f и 23F-г [22]	384	0,4
	11A/11D-f и 11A/11D-г [22]	463	0,4
	7F/7A-f и 7F/7A-г [35]	599	0,4
	9V/9A-f и 9V/9A-г [35]	816	0,5
№ 3	8-f и 8-г [35]	201	0,3
	2-f и 2-г [35]	290	0,3
	3-f и 3-г [22]	371	0,3
	4-f и 4-г [22]	430	0,3
	9N/9L-f и 9N/9L-г [35]	516	0,4
	22F/22A-f и 22F/22A-г [22]	643	0,4
№ 4	7C/(7B/40)-f и 7C/(7B/40)-г [22]	260	0,3
	12F/(12A/44/46)-f и 12F/(12A/44/46)-г [22]	376	0,3
	15A/15F-f и 15A/15F-г [22]	434	0,4
	15B/15C-f и 15B/15C-г [22]	496	0,4
	19A-f и 19A-г [26]	566	0,4

Примечание. * – праймер связан с биотином на 5'-конце для последующей дифференциации серотипов 6A и 6B с помощью пиросеквенирования.

лы. Распределение пороговых циклов для мишеней *lytA* и *psaA* показаны на рис. 3. Из 113 *lytA*- и *psaA*-положительных штаммов значения пороговых циклов по двум мишеням у 106 штаммов существенно не отличаются и равны в среднем 20–21, что отражает равную аналитическую чувствительность методик детекции фрагментов обоих генов.

Однако имеется ряд штаммов (с идентификационными номерами 203, 1146, 464, 1626, 475, 707 и 1242, при этом шесть из этих штаммов имеют серотип 9VA), для которых значения пороговых циклов при детекции мишени *psaA* хуже ожидаемых. Для этих штаммов разгорание флуоресценции при детекции мишени *psaA* нарастало медленно (см. рис. 2), в отличие от флуоресценции при детекции мишени *lytA*. Высокие значения пороговых циклов и низкий уровень кривых флуоресценции могут уменьшать аналитическую чувствительность методики, что особенно важно при работе с клини-

ческим материалом. Поскольку такие «необычные» штаммы *S. pneumoniae* не так уж редки (в нашей выборке их 6% среди штаммов, имеющих капсулу), потребовалась оптимизация методики.

С этой целью были выбраны праймеры «*psa-SF*» (5'-CgC-TCC-CAA-ACA-ACg-ATA-TTT-gAA-ACT-3') и «*psa-SR*» (5'-TTg-CCC-AAT-Cgg-AAC-gAT-ACT-ATg-AA-3'), позволяющие амплифицировать фрагмент гена *psaA* длиной 275 п.о., включающий последовательности олигонуклеотидов «*psaA forward*», «*psaA reverse*» и «*psaA probe*» [29]. Методом секвенирования по Сэнгеру (Sanger) были получены нуклеотидные последовательности этого фрагмента для 12 штаммов: 5 – «контрольных», у которых кривые флуоресценции по мишени *psaA* детектировались успешно, и 7 – атипичных. Выяснилось, что у всех штаммов, дающих атипично слабое нарастание флуоресценции при детекции мишени *psaA* (203, 1146, 464, 1626, 475, 707 и 1242),

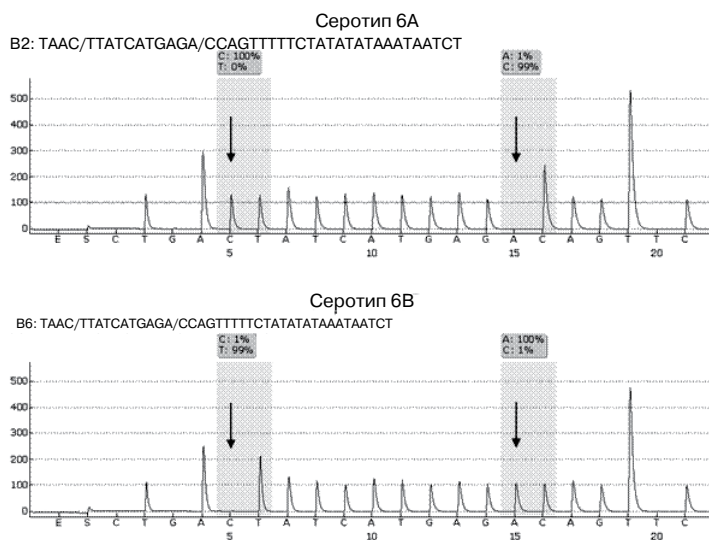


Рис. 4. Результаты секвенирования гена *wciP* штаммов пневмококка серотипов 6А и 6В. На сиквенсе выделены и отмечены стрелками полиморфные позиции нуклеотидной последовательности, позволяющие различать эти серотипы.

имеется нуклеотидная замена А на G в области отжига зонда «*psaA probe*» [29]. Эта впервые обнаруженная нуклеотидная последовательность была направлена в GenBank, ей присвоен идентификационный номер NJ108017. Штаммы, дающие ожидаемые значения пороговых циклов и нарастание кривых флуоресценции, не имели этой замены; их нуклеотидные последовательности секвенированного фрагмента не имели отличий от референсной последовательности U53509 [29]. Выявление нуклеотидной замены в месте отжига зонда потребовало оптимизации методики, в результате которой был синтезирован зонд «*psa-Z1*», содержащий вырожденную позицию: R6G-gCA-CAT-gCT-ACA-AgA-ATg-AT(BHQ1)T-gC/TA-gAA-AgA-AAg (0,15 мкМ в реакцию), что позволило детектировать все «атипичные» штаммы (с номерами 203, 1146, 464, 1626, 475, 707 и 1242) со значениями пороговых циклов от 19 до 22.

Определение серотипов *S. pneumoniae*. В работе использованы 24 пары праймеров, которые были распределены по четырем ПЦР-смесям, состав ПЦР-смесей представлен в табл. 1. Детектируемые серотипы (серогруппы) отражены в названиях праймеров. Если праймеры (или выявляемые ими серотипы) обозначены по схеме 9V/9A-f (или 9VA), значит с помощью данных праймеров можно амплифицировать как ДНК пневмококков серотипа 9V, так и ДНК серотипа 9A, не дифференцируя их.

Все исследованные штаммы были проанализированы одновременно с использованием ПЦР-

смесей № 1–3. Штаммы, положительные по фрагменту *cpsA* и отрицательные по всем специфическим мишеням, присутствующим в ПЦР-смесях № 1–3, были дополнительно исследованы в реакции с ПЦР-смесью № 4.

В связи с тем, что с помощью праймеров «6A/6B/6C-f» и «6A/6B/6C-r», используемых для детекции штаммов серогруппы 6, невозможно дифференцировать серотип 6А от «вакцинного» серотипа 6В [22], для дифференциации серотипов 6А и 6В был применен метод пиросеквенирования [36]. Предлагаемая методика основана на результатах исследования [37]. Фрагмент гена *wciP*, амплифицируемый с праймерами «6A/6B/6C-f» и «6A/6B/6C-r», имеет две специфические для серотипов А и В нуклеотидные замены. Матрицей для реакции пиросеквенирующего синтеза являлся одноцепочечный фрагмент ДНК, 5'-конец которого образован биотинилированным праймером «6A/6B/6C-f». Для

секвенирования продукта амплификации, полученного с ПЦР-смесью № 1, использован праймер «6A/6B/6C-S» – 5'-3' нуклеотидная последовательность: AgT-gCA-AAC-TTT-gCA-AAA – в концентрации 0,3 мкМ. Порядок подачи нуклеотидов в реакцию пиросеквенирующего синтеза следующий: CTGACTATCATGAGACAGTTC. Интерпретация результата секвенирования проводилась согласно [37]. Пример результата секвенирования штаммов серотипов 6А и 6В представлен на рис. 4.

ДНК 94 изолятов из 108, взаимодействующих с серотип-неспецифическими праймерами «*cpsA-f*» и «*cpsA-r*», амплифицировалась также с серотип-специфическими праймерами; оставшиеся 14 изолятов имели, вероятно, серотипы, не определяемые данной методикой. В изученной выборке найдено 18 серогрупп (серотипов) пневмококков: 2, 3, 4, 6А, 6В, 7FA, 8, 9NL, 9VA, 11AD, 14, 15AF, 15BC, 18ABCF, 19F, 22FA, 23B, 23F. Результаты определения серогрупп (серотипов) для штаммов, выделенных при разных формах пневмококковой инфекции, представлены в табл. 2.

При сопоставлении результатов, полученных с помощью серологической методики, и результатов, полученных методом ПЦР, у исследованных штаммов выявлены следующие особенности. Обращает на себя внимание, что все 12 штаммов серогруппы 19 принадлежали вакцинному серотипу 19F. Серотип 19А, присущий широко распространяющемуся по миру мультирезистентному клону пневмококков [38], отсутствовал. Данное обстоятельство

Таблица 2. Результаты серотипирования 113 штаммов *S. pneumoniae*

Серотип	Число штаммов	Тип заболевания и источник штамма			
		пневмония, нестерильный материал	инвазивное заболевание, кровь, СМЖ	острый отит, отделяемое из среднего уха	носители, мазок из зева
1	0				
2	1		1		
3	10	8	1	1	
4	4	2		2	
5	0				
6BA	17	14	1	1	1
7FA	2	1			1
7C	0				
8	1	1			
9VA	6	4		2	
9NL	4	3	1		
11AD	6	5			1
12FA	0				
14	7	4	1	2	
15AF	3	3			
15BC	3	2			1
18ABCF	4	3			1
19F	12	9	2	1	
19A	0				
22FA	2	1		1	
23F	11	9		1	1
23B	1		1		
23A	0				
Не определен, ПЦР на серотипы отрицательна	14	12	1	1	
ПЦР отрицательна, продукт амплификации cpsA отсутствует	5	4		1	
Всего	113	85	9	13	6

не могло быть выявлено с использованием набора для серологического типирования «Pneumotest-Latex» (Statens Serum Institut, Дания) [34]. Оба штамма серогруппы 7 имели серотип 7FA (в вакцинах – серотип 7F). Из 12 штаммов серогруппы 23 одиннадцать штаммов имели «вакцинный» серотип 23F и только один – 23B. Приблизительно в равных количествах были представлены серотипы 9VA (6 штаммов) и 9NL (4), а также серотипы 15BC (3) и 15AF (3 штамма); в вакцинах присутствует серотип 9V. Штаммы серогруппы 6 распределе-

ны следующим образом: 7 штаммов принадлежали серотипу 6B (включен во все конъюгированные пневмококковые вакцины) и 10 – серотипу 6A (включен только в 13-валентную вакцину).

Заключение

Испытанная на штаммах модифицированная ПЦР-РРВ методика идентификации *S. pneumoniae* предположительно позволит с высокой чувствительностью и специфичностью выявлять ДНК *S. pneumoniae* при клинических инвазивных и

неинвазивных формах пневмококковой инфекции [31, 32].

Протестированная в данном исследовании выборка штаммов является «смещенной» и не отражает реальной частоты встречаемости различных серотипов среди детей с пневмококковой инфекцией. Поэтому, несмотря на то что в данном исследовании удалось определить серотип (серогруппу) у более 80% штаммов, картина может быть иной при работе с реальными клиническими образцами. Однако, поскольку данная ПЦР методика позволяет выявлять 23 серотипа, на основании имеющихся предварительных данных [1, 2, 8–10] можно предположить, что в проспективном эпидемиологическом исследовании с ее помощью удастся харак-

теризовать не менее 85–90% изолятов, если в клиническом образце будет достаточно бактериальной ДНК. В частности, с помощью предложенной методики можно выявлять все серотипы, включенные в 13-валентную конъюгированную пневмококковую вакцину, и практически все часто встречающиеся на территории РФ невакцинные серотипы. Таким образом, можно будет определять потенциальную эффективность вакцин, разработанных для контроля этого тяжелого и распространенного инфекционного заболевания.

Исследование выполнено при финансовой поддержке фирмы «ГлаксосмитКляйн».

Литература

1. Козлов Р.С. Пневмококки: уроки прошлого – взгляд в будущее. МАКМАХ. Смоленск, 2010. 128 с.
2. Эпидемиология и вакцинопрофилактика инфекции, вызываемой *Streptococcus pneumoniae*. Методические рекомендации. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2011. 27с.
3. O'Brien K.L., Wolfson L.J., Watt J.P., et al. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet* 2009, 374(9693):893-902.
4. Melin M., Trzcinski K., Antonio M., et al. Serotype-related variation in susceptibility to complement deposition and opsonophagocytosis among clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 2010, 78(12): 5252-61.
5. Hyams C., Yuste J., Vax K., Camberlein E., et al. *Streptococcus pneumoniae* resistance to complement-mediated immunity is dependent on the capsular serotype. *Infect Immun* 2010, 78(2):716-25.
6. Weinberger D.M., Trzcinski K., Lu Y.J., et al. Pneumococcal capsular polysaccharide structure predicts serotype prevalence. *PLoS Pathog* 2009, 5(6): e1000476.
7. Kamerling J.P. Pneumococcal polysaccharides: a chemical view. In: *Streptococcus pneumoniae: molecular biology and mechanisms of disease*. Tomasz A. (ed). Mary Ann Liebert, Inc., 2000, 81-114.
8. McIntosh E.D., Reinert R.R. Global prevailing and emerging pediatric pneumococcal serotypes. *Expert Rev Vaccines* 2011, 10(1):109-29.
9. Hanquet G., Kissling E., Fenoll A., et al. Pneumococcal serotypes in children in 4 European countries. *Emerg Infect Dis* 2010, 16(9): 1428-39.
10. Johnson H.L., Deloria-Knoll M., Levine O.S., et al. Systematic evaluation of serotypes causing invasive pneumococcal disease among children under five: the pneumococcal global serotype project. *PLoS Med* 2010, 7(10).
11. Weinberger D.M., Harboe Z.B., Sanders E.A., et al. Association of serotype with risk of death due to pneumococcal pneumonia: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2010, 51(6): 692-9.
12. Harboe Z.B., Thomsen R.W., Riis A., et al. Pneumococcal serotypes and mortality following invasive pneumococcal disease: a population-based cohort study. *PLoS Med* 2009, 6(5):e1000081.
13. Конъюгированная пневмококковая вакцина для иммунизации детей - рекомендации ВОЗ. Педиатрическая фармакология 2007, 4(5): 1-3.
14. Paradiso P.R. Advances in pneumococcal disease prevention: 13-valent pneumococcal conjugate vaccine for infants and children. *Clin Infect Dis* 2011, 52(10): 1241-7.
15. Simonsen L., Taylor R.J., Young-Xu Y., Haber M., et al. Impact of pneumococcal conjugate vaccination of infants on pneumonia and influenza hospitalization and mortality in all age groups in the United States. *MBio* 2011, 2(1): e00309-10.
16. Маянский Н.А., Алябьева Н.М., Катосова Л.К., и др. Определение капсульных серотипов пневмококка методом мультиплексной ПЦР. Вопросы диагностики в педиатрии 2010, 2(6):6-10.
17. Таточенко В.К., Катосова Л.К., Уланова М.А., и др. Периодические и региональные особенности серотипового спектра пневмококков у детей с респираторными заболеваниями и здоровых носителей. Журн микробиол 1994, 3:3-10.
18. Jefferies J.M., Smith A.J., Edwards G.F., et al. Temporal analysis of invasive pneumococcal clones from Scotland illustrates fluctuations in diversity of serotype and genotype in the absence of pneumococcal conjugate vaccine. *J Clin Microbiol* 2010, 48(1):87-96.
19. Flasche S., van Hoek A.J., Sheasby E., et al. Effect of pneumococcal conjugate vaccination on serotype-specific carriage and invasive disease in England: a cross-sectional study. *PLoS Med* 2011, 8(4):e1001017.
20. Gladstone R.A., Jefferies J.M., Faust S.N., Clarke S.C. Continued control of pneumococcal disease in the UK - the impact of vaccination. *J Med Microbiol* 2011, 60(Pt 1): 1-8.

21. McEllistrem M.C. Genetic diversity of the pneumococcal capsule: implications for molecular-based serotyping. *Future Microbiol* 2009, 4:857-65.
22. Pai R., Gertz R.E., Beall B. Sequential multiplex PCR approach for determining capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates. *J Clin Microbiol* 2006, 44(1): 124-31.
23. Bentley S.D., Aanensen D.M., Mavroidi A., et al. Genetic analysis of the capsular biosynthetic locus from all 90 pneumococcal serotypes. *PLoS Genet* 2006, 2(3):e31.
24. Mavroidi A., Aanensen D.M., Godoy D., et al. Genetic relatedness of the *Streptococcus pneumoniae* capsular biosynthetic loci. *J Bacteriol* 2007, 189(21):7841-55.
25. Dias C.A., Teixeira L.M., Carvalho M. da G., Beall B. Sequential multiplex PCR for determining capsular serotypes of pneumococci recovered from Brazilian children. *J Med Microbiol* 2007, 56(Pt 9):1185-8.
26. Pimenta F.C., Gertz R.E., Jr., Roundtree A., et al. Rarely occurring 19A-like cps locus from a serotype 19F pneumococcal isolate indicates continued need of serology-based quality control for PCR-based serotype determinations. *J Clin Microbiol* 2009, 47(7):2353-4.
27. Azzari C., Moriondo M., Indolfi G., et al. Realtime PCR is more sensitive than multiplex PCR for diagnosis and serotyping in children with culture negative pneumococcal invasive disease. *PLoS One* 2010, 5(2): e9282.
28. Tomita Y., Okamoto A., Yamada K., et al. A new microarray system to detect *Streptococcus pneumoniae* serotypes. *J Biomed Biotechnol* 2011, 2011:352736.
29. Carvalho M. da G., Tondella M.L., McCaustland K., et al. Evaluation and improvement of real-time PCR assays targeting *lytA*, *ply*, and *psaA* genes for detection of pneumococcal DNA. *J Clin Microbiol* 2007, 45(8):2460-6.
30. El Aila N.A., Emler S., Kaijalainen T., et al. The development of a 16S rRNA gene based PCR for the identification of *Streptococcus pneumoniae* and comparison with four other species specific PCR assays. *BMC Infect Dis* 2010, 10:104.
31. Sacchi C.T., Fukasawa L.O., Goncalves M.G., et al. Incorporation of real-time PCR into routine public health surveillance of culture negative bacterial meningitis in Sao Paulo, Brazil. *PLoS One* 2011, 6(6): e20675.
32. Avni T., Mansur N., Leibovici L., Paul M. PCR using blood for diagnosis of invasive pneumococcal disease: systematic review and meta-analysis. *J Clin Microbiol* 2010, 48(2):489-96.
33. Кречикова О.И., Козлов П.С., Богданович Т.М. и др. Выделение, идентификация и определение чувствительности к антибиотикам *Streptococcus pneumoniae*. *Клин микробиол антимикроб химиотер* 2000, 1(2): 88-98.
34. Slotved H.C., Kaltoft M., Skovsted I.C., et al. Simple, rapid latex agglutination test for serotyping of pneumococci (Pneumotest-Latex). *J Clin Microbiol* 2004, 42(6): 2518-22.
35. PCR deduction of pneumococcal serotypes. <http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/pcr.htm>
36. Ronaghi M., Uhlen M., Nyren P. A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science* 1998, 281(5375):363-5.
37. Pai R., Limor J., Beall B. Use of pyrosequencing to differentiate *Streptococcus pneumoniae* serotypes 6A and 6B. *J Clin Microbiol* 2005, 43(9):4820-2.
38. Reinert R., Jacobs M.R., Kaplan S.L. Pneumococcal disease caused by serotype 19A: review of the literature and implications for future vaccine development. *Vaccine* 2010, 28(26):4249-59.