

УДК 616.24-002-02:579.862.1-078.083

РАЗРАБОТКА НОВОГО МОЛЕКУЛЯРНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ТИПИРОВАНИЯ *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

Тонко О.В.¹, Буландо В.Д.², Коломиец Н.Д.², Ханенко О.Н.², Соколова М.В.¹,
Романова О.Н.³, Ерчак Е.И.¹, Бабенко А.С.⁴

¹Учреждение здравоохранения «Городская детская инфекционная клиническая больница»

²Институт повышения квалификации и переподготовки кадров здравоохранения учреждения образования
«Белорусский государственный медицинский университет»

³Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»

⁴Республиканский научно-практический центр «Кардиология», г. Минск, Республика Беларусь

Реферат. В настоящее время для серотипирования пневмококка используют серологические методы, традиционную полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и полимеразную цепную реакцию в режиме реального времени (ПЦР-РВ), полногеномное секвенирование.

Несмотря на то, что мультиплексная ПЦР имеет ряд ограничений, а подходы, основанные на полногеномном секвенировании, могут с высокой точностью предсказать почти все серотипы, определить сиквенс-типы, выявить гены антибиотикорезистентности и вирулентности, использование мультиплексной ПЦР-РВ более экономически обоснованно и удобно в клинической практике.

За последние 10 лет в стране налажена система молекулярно-генетического мониторинга бактериальных инфекций, в том числе и определение серотипов возбудителей. Однако на данный момент не существует коммерческого набора реагентов для молекулярно-генетического типирования пневмококка.

Метод может стать методологической основой для слежения за изменением серотипового пейзажа пневмококка, что важно на фоне внедрения рутинной иммунизации детей пневмококковыми вакцинами в Республике Беларусь.

Ключевые слова. *Streptococcus pneumoniae*; ПЦР-РВ, серотипирование, молекулярно-генетический мониторинг.

Введение. Классическим методом серотипирования *S. pneumoniae* является реакция агглютинации на стекле, латексной агглютинации и/или набухания капсулы по Нейфельду для определения капсульного варианта. Этот метод основан на определении антигенных различий в строении капсульных полисахаридов *S. pneumoniae* с помощью типовых (групповых) антисывороток. Серологический метод – «золотой стандарт» типирования. Рекомендательный ВОЗ алгоритм для идентификации пневмококка основан на восприимчивости к оптохину, желчи и серотипировании выросших α-гемолитических колоний. Тем не менее были описаны нетипичные результаты этих традиционных фенотипических тестов. Однако использование молекулярно-генетических методов в клинической микробиологии позволило разработать методы типирования пневмококка, основанные на полимеразной цепной реакции (ПЦР) [1]. Принцип молекулярного типирования базируется на том, что синтез полисахаридной капсулы контролируют гены, расположенные в локусе CPS, центральная часть которого содержит серотипспецифичные последовательности ДНК. На ампли-

фикации таких последовательностей и основана дифференцировка серотипов с помощью ПЦР [2]. Молекулярно-генетические методы используют для типирования пневмококка с целью определения его серотипа и генетического профиля, что важно для диагностики, эпидемиологии и разработки вакцин. Хотя информация о серотипе пневмококка может не принести прямой пользы клинической диагностике или немедленному лечению пациента, знание серотипов пневмококка, циркулирующих при носительстве и заболевании, необходимо для правильной оценки воздействия пневмококковых вакцин на местном и глобальном уровнях и разработчикам политики вакцинации.

По имеющимся литературным данным методы типирования, основанные на ПЦР, включают в себя традиционную ПЦР и ПЦР-РВ. Методы позволяют идентифицировать капсульные серотипы *S. pneumoniae* не только в «чистой» культуре, но и в исходном биологическом материале [1].

Методы, основанные на традиционной ПЦР, имеют ряд недостатков: относительная трудоемкость и неодинаковая чувствитель-

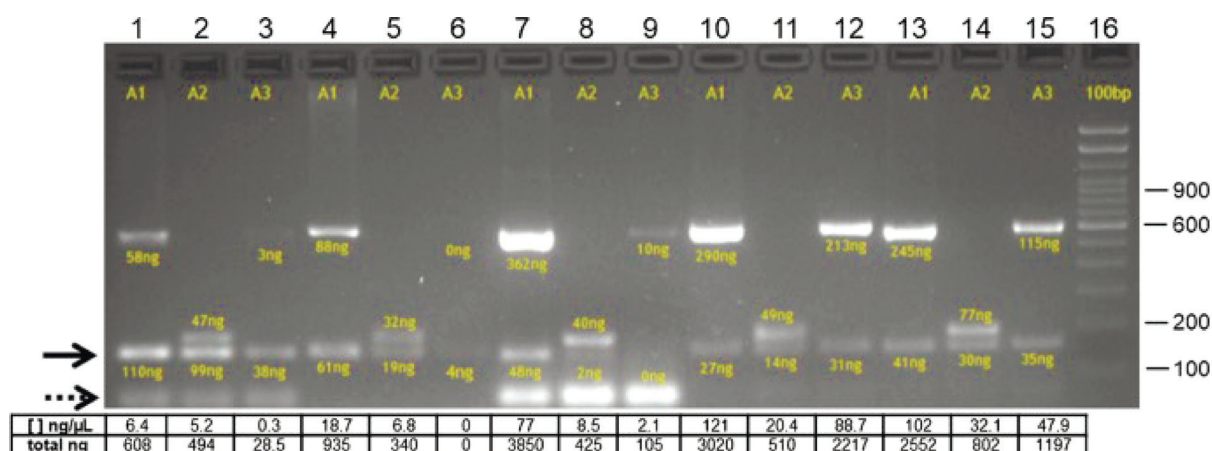


Рис. 1. Выход ампликонов при использовании ПЦР [3]

ность для серотип-специфических мишеней, обусловленная необходимостью проведения амплификации последовательностей разной длины, что выступает необходимым условием их последующего разделения в агарозном геле (рис. 1).

Преимуществом ПЦР-РВ является упрощение процедуры детекции продуктов амплификации и повышение чувствительности исследования. Мультиплексная ПЦР-РВ позволяет оперативно выполнять скрининг пневмококков (рис. 2) [1;2].

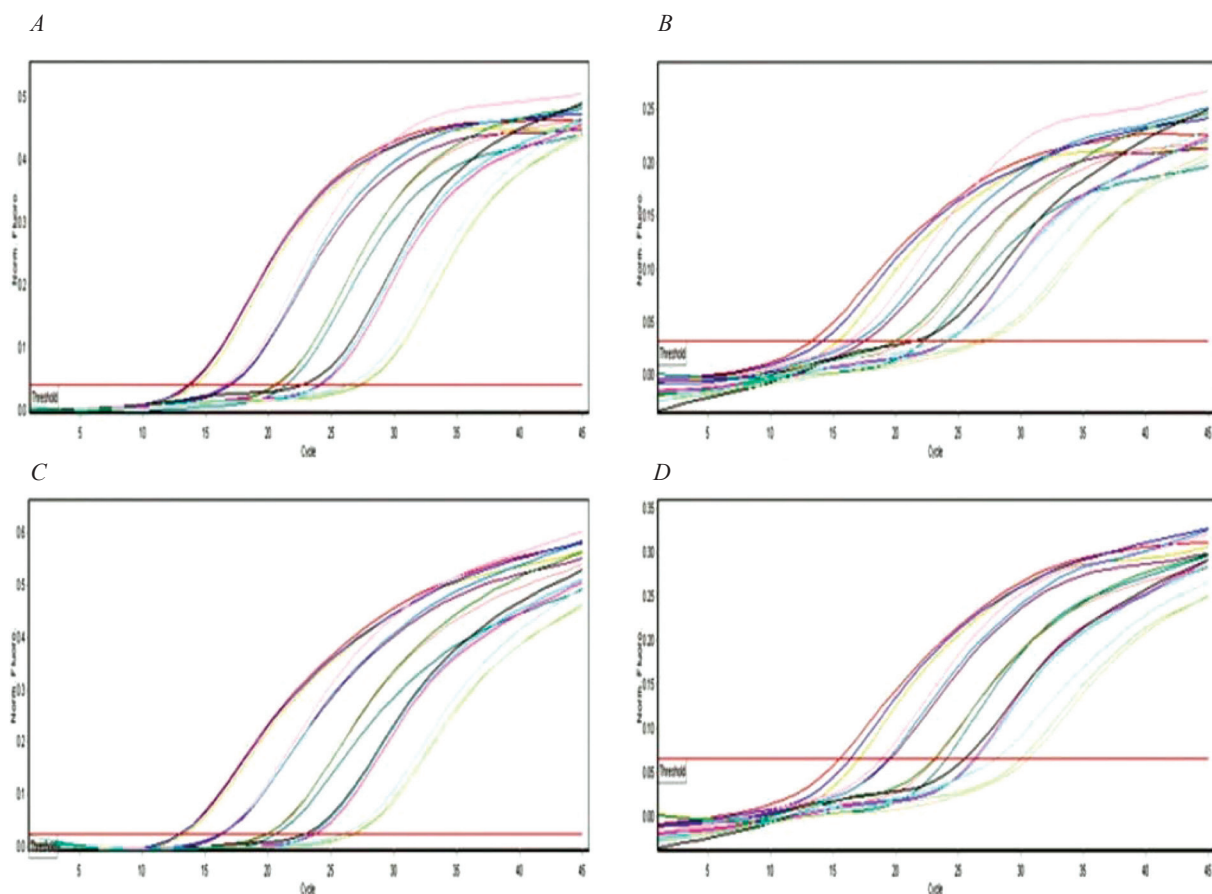


Рис. 2. Количественная мультиплексная ПЦР в реальном времени для *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 49619), показывающая профиль амплификации для *Streptococcus pneumoniae*: (А) малиновый (ply), В) зеленый (lytA), С) оранжевый (psaA)) [4]

Считается, что существенное разнообразие пневмококковых CPS (*capsular polysaccharide*, капсульный полисахарид) – локус, в котором находятся гены, кодирующие биосинтез капсульных полисахаридов, возникло в результате антигенного разнообразия, налагаемого иммунной системой человека. Литературные данные показывают, что сравнение имеющихся локусов CPS указывает на множество генетических механизмов и показывает, что центральные гены, ответственные за синтез и полимеризацию повторяющейся единицы, сильно изменчивы и часто негомологичны между серотипами (рис. 3).

Эти гены имеют низкий процент содержания гуанина и цитозина [6]. Таким

образом, новые серотипы могли быть получены путем введения новых генов CPS путем латерального переноса генов от других видов. Путь синтеза капсульных полисахаридов кодируется локусом CPS (синтез капсульного полисахарида).

Секвенирование локуса CPS 94 известных серотипов обеспечило молекулярную основу для разработок серотипирования на основе ПЦР. Первый последовательный мульти-

плексный ПЦР-анализ, специфичный для распространения инвазивных пневмококковых заболеваний (ИПЗ) в США, был разработан Паем и его коллегами. Первоначальный анализ был модифицирован на основе эпидемиологии ИПЗ, встречающейся в различных географических регионах (Бразилия, Мозамбик и Испания). Он успешно применялся для обнаружения серотипов пневмококка в образцах носоглоточной и спинномозговой жидкости. Следует отметить: большинство разработанных мультиплексных ПЦР-анализов специфичны для штаммов ИПЗ. Только в ограниченных исследованиях мультиплексная ПЦР, разработанная ИПЗ, использовалась для исследования серотипов при носительстве [5; 6].

Практическая важность типирования пневмококков резко возросла после начала массовой иммунизации различных групп населения полисахаридными и конъюгированными вакцинами, протективное действие которых основано на индукции бактерицидных антител к капсульным полисахаридам микроорганизма [7]. С 2025 г. вакцинация от пневмококковой инфекции включена в Национальный календарь прививок Республики Беларусь.

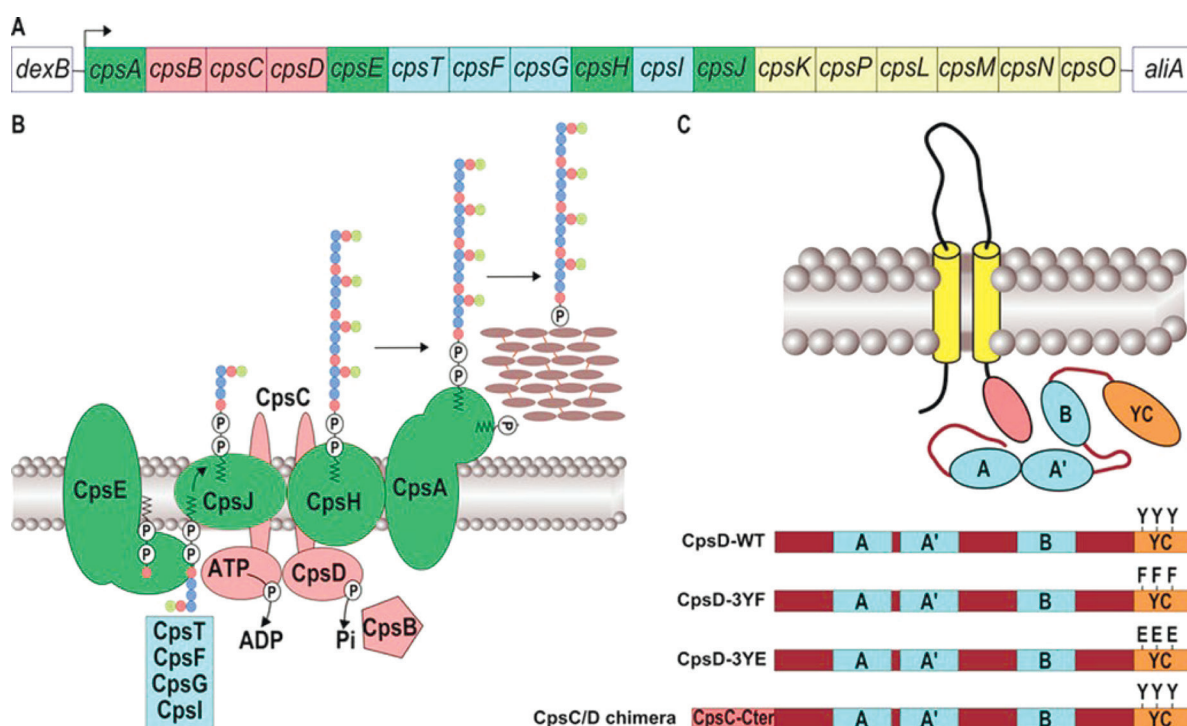


Рис. 3. Схематическая организация пневмококкового аппарата CPS и БУ-киназы: (А) Генетический локус отображает гены, участвующие в синтезе и экспорте CPS. Гены, кодирующие аппарат сборки CPS, гликозилтрансферазы, систему фосфорегуляции CpsBCD и синтазы UDP-сахара, выделены зеленым, синим, красным и желтым цветами соответственно. (В) Модель аппарата сборки CPS в мембране [5]

Материалы и методы. Проанализированы существующие методы типирования на основе ПЦР и ПЦР-РВ. С помощью программы BLAST сконструированы праймеры и зонды к основным серотипам пневмококка, распространенным на территории Беларуси, для постановки ПЦР-РВ для дальнейшего определения серотипов на основе молекулярно-генетических характеристик. Олигонуклеотидные последовательности синтезированы ОДО «Праймтех» (Республика Беларусь). Выделение ДНК из образцов проводилось с помощью набора выделения ДНК «НУКЛЕОСОРБ» ФОРМА «С» (ОДО «Праймтех»). Для ПЦР-РВ использовали готовую смесь «2X премикс для ПЦР-РВ» (ОДО «Праймтех») и амплификатор Real-time Bio-Rad CFX96 Touch.

пользования в учреждениях здравоохранения, так как большинство используемых амплификаторов имеют 3–5 каналов детекции.

Установлено, что наиболее целесообразными мишенями для подтверждения идентификации пневмококка являются ген *lytA*, кодирующий аутолизин и ген *cpsA*, кодирующий биосинтез капсульных полисахаридов (табл. 1). Некоторые авторы предлагают дополнительную постановку реакции на детекцию гена *psaA*, что по анализу данных необязательно, так как экспрессия CpsA является основой патогенности пневмококка, и постановки реакции для детекции двух перечисленных генов достаточно для подтверждения видовой идентификации пневмококка, что также более удобно в использовании.

Таблица 1 – Олигонуклеотиды для обнаружения ДНК пневмококка

Название олигонуклеотида	Последовательность олигонуклеотида, 5' → 3'
lytA _{rt-f}	TCGTGCGTTTAAATCCAGCT
lytA _{rt-r}	ACGCAATCTAGCAGATGAAGCA
lytA P	TGCCGAAAACGC(T-BHQ1)TGATACAGGGAG
cpsA _{rt-f}	GCTGTTTTAGCAGATAGTGATATCGA
cpsA _{rt-r}	TCCCAGTCGGTGCTGTCA
cpsA P	AATGTTACGCAACTGACGAG

Материалом для исследования являлись 26 изолятов *S. pneumoniae*, выделенных из ушей, мокроты, крови и ликвора, от пациентов, находившихся на лечении в детском инфекционном стационаре в 2023–2024 гг. Материал прошел предварительную идентификацию с помощью микробиологического экспресс-анализатора VITEK Compact (Biomérieux), что позволило установить принадлежность всех используемых образцов к *S. pneumoniae*.

Результаты и их обсуждение. Проанализировав данные о существующих методиках типирования методом ПЦР, для типирования выбрали ПЦР-РВ, ввиду меньшей трудоемкости и более быстрого получения результатов, что имеет большое значение в клинической практике.

Разработаны смеси для мультиплексной ПЦР-РВ, содержащие олигонуклеотидные последовательности к 2,3 мишеням, которые не имеют перекрестных реакций и не образуют димеров, что подтверждено при апробации метода. Также это сделано для более точной интерпретации результатов, упрощенного ис-

Моноплексные и мультиплексные реакции

Согласно литературным данным о серотиповом пейзаже пневмококка на территории Республики Беларусь, были выбраны серотипы, предположительно более часто встречающихся у пациентов [2]. Рекомендуются олигонуклеотидные последовательности могут быть использованы при постановке моноплексных (табл. 2) и мультиплексных реакций.

При апробации метода, когда данные праймеры использовались в мультиплексной реакции, они, вероятно, вступали в перекрестные реакции с другими праймерами, что осложняло правильную интерпретацию результатов.

Мультиплексные реакции позволяют детектировать больше мишеней за одну постановку, чем моноплексные, что удобнее в клинической практике. Составлены смеси для постановки мультиплексных реакций (табл. 3), с соблюдением правил по избежанию перекрестных реакций и образованию димеров. Способность олигонуклеотидов успешно работать вместе в одной смеси подтверждена во время апробации метода.

Таблица 2 – Олигонуклеотидные последовательности, рекомендуемые к использованию только в моноплексных реакциях

15A/15F	F: AATTGCCTATAAACTCATTGAGATAG R: CCATAGGAAGGAAATAGTATTTGTTC P: CCC(G-LNA)CA(A-LNA)AC(T-LNA)CT(G-LNA)TCCT
4	F: GCTTCTGCTGTAAGTGTGTGC R: CACCACCATAGTAACCAAGTTCC P: TTCCACAAAAGAAGAGCCTACAGGTAACCCCA
6A/6B/6C/6D	F: GTTTCACACTAGAGTATGGGAAGG R: TAGCCTTTCTGAAAACATTTAGCG P: TGTTCGCCC(T-BHQ1)GAGCAACTGGTCTTGTATC
11a/11d	F: AAATGGTTTGGATATGGTTTGTGG R: AGTGCTAACTGTAAACTTGATTATGAG P: ATTCCAACCTCTCCCAATTCTGCCACGG

Таблица 3 – Предлагаемые смеси для мультиплексных реакций

Варианты стоков для мультиплексных реакций		
№ варианта	Серотипы	Олигонуклеотиды
1	23 F	F: GACAGCAACGACAATAGTCATCTC R: TCCATCCCAACCTAACACACTTC P: ATTGTGTCCA(T-BHQ2) AACCCTTCGTCGTATTTCCAAAG
	18C/18A/18B/18F	F: TCGATGGCTAGAACAGATTTATGG R: CCATTGTCCCTGTAAGACCATTG P: AGGGAGTTGAATCAACCTATAATTCGCCCC
	19F	F: TGAGGTAAAGATTGCTGATCG R: CACGAATGAGAACTCGAATAAAAAG P: CGC(A-LNA)CT(G-LNA)TC(A-LNA)AT(T-LNA)CACCTTC
2	19A	F: CGCCTAGTCTAAATACCA R: GAGGTCAACTATAATAGTAAGAG P: TATCAATGAGCCGATCCGTCCTT
	9V/9A	F: AGGTATCTATATACTGCTTTAGG R: CGAATCTGCCAATATCTGAAAG P: ACA(C-LNA)AT(T-LNA)GA(C-LNA)AA(C-LNA)CGCT
	19F	F: TGAGGTAAAGATTGCTGATCG R: CACGAATGAGAACTCGAATAAAAAG P: CGC(A-LNA)CT(G-LNA)TC(A-LNA)AT(T-LNA)CACCTTC
3	7F/7A	F: ATGAAGGCTTTGGTTTGACAGG R: ATTCTCGCCATCAATTGCATATTC P: ACACCACTATAGGCTGTTGAGACTAACGCACA
	9L/N	F: CGTGGAATTTTCTATACTGCAATAGG R: CTAAGTCTACGATACCATATCTACAG P: CAGCAATTCTTAGCCGATTCTCTCACC
	16F	F: TAATGTATGACCTTGTAATCTTCCC R: TCCCAAAGGATAATCAATAACTTTTAGAAG P: AGCCATAAGTCT(T-BHQ1)CCAAATGCTTAACCGCT
4	23F	F: GACAGCAACGACAATAGTCATCTC R: TCCATCCCAACCTAACACACTTC P: ATTGTGTCCA(T-BHQ2) AACCCTTCGTCGTATTTCCAAAG
	18C/18A/18B/18F	F: TCGATGGCTAGAACAGATTTATGG R: CCATTGTCCCTGTAAGACCATTG P: AGGGAGTTGAATCAACCTATAATTCGCCCC
5	23F	F: GACAGCAACGACAATAGTCATCTC R: TCCATCCCAACCTAACACACTTC P: ATTGTGTCCA(T-BHQ2) AACCCTTCGTCGTATTTCCAAAG
	19F	F: TGAGGTAAAGATTGCTGATCG R: CACGAATGAGAACTCGAATAAAAAG P: CGC(A-LNA)CT(G-LNA)TC(A-LNA)AT(T-LNA)CACCTTC

Окончание табл. 3

Варианты стоков для мультиплексных реакций		
№ варианта	Серотипы	Олигонуклеотиды
	18C/18A/18B/18F	F: TCGATGGCTAGAACAGATTTATGG R: CCATTGTCCCTGTAAGACCATTG P: AGGGAGTTGAATCAACCTATAATTCGCCCC
6	5	F: CATGATTTATGCCCTCTTGCAA R: GACAGTATAAGAAAAAGCAAGGGCTAA P: TCTTCTTCTCA(T-BHQ1)CGTTTCCGCATGCTTTT
	3	F: CCACTAAAGCTTTGGCAAAAGAAA R: CCCGAACGTAAAGCTTCTTCA P: TTGTAGACCGCCCCACAA(T-BHQ1)TCATTTTGT

локус	частота (%)	диагноз	частота (%)
ухо	65,5	острый гнойный средний отит	57,7
нос	19,2	острый верхнечелюстной синусит	3,8
ликвор	11,5	гастроэнтерит	3,8
рана	3,8	диагноз неизвестен	34,7

Рис. 4. Основные диагнозы и биологический материал при выделении культур пневмококка

Смеси составлены с учетом того, что на одном канале детекции может проходить только одна мишень.

Количество реагентов для приготовления ПЦР-смеси для моноплексных и мультиплексных реакций взято из инструкции к набору от производителя.

Результаты апробации метода

Проведено типирование 26 изолятов пневмококка, предварительно прошедших пробоподготовку из культур в жидкой среде. Пневмококки выделены от госпитализированных пациентов, средний возраст (Me) составил два

года. Основными локусами, из которых выделен пневмококк, являлись отделяемое ушей и носа, ликвор, раневое отделяемое (рис. 4).

При проведении типирования установлено, что доминирующими серотипами пневмококков, выделенных у госпитализированных детей, являются 19 F, 3 и 23 F серотипы (рис. 5).

Диагнозы госпитализированных детей и установленный серотип в качестве примера приведены на рис. 6.

На основании проведенных исследований разработана Инструкция по применению «Молекулярно-генетический метод серотипирования *Streptococcus pneumoniae*», внедренная в настоящее время в работу УЗ ГДИКБ.

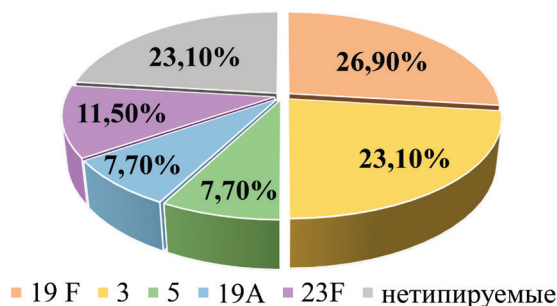


Рис. 5. Распределение серотипов пневмококка



Рис. 6. Основные серотипы пневмококка и диагнозы госпитализированных детей

Закключение

Использование ПЦР-РВ для типирования пневмококка удобный и экономически приемлемый метод для применения в клинической практике. Разработанные смеси олигонуклеотидов целесообразны для использования в учреждениях здравоохранения, не образуют перекрестных реакций и димеров. Метод апробирован с учетом возможных ошибок и готов к использованию в учреждениях здравоохранения.

Таким образом, в отсутствии на данный момент коммерческого набора реагентов для проведения молекулярно-генетического серотипирования пневмококка, разработанный метод рекомендуется использовать для мониторинга за динамикой серотипового пейзажа *S. pneumoniae*, что является необходимым условием оценки рутинной иммунизации населения пневмококковыми вакцинами.

Список цитированных источников

1. Современное состояние проблемы капсульного типирования *Streptococcus pneumoniae* // Антибиотики и химиотерапия / Ю.А. Захарова [и др.]. – 2022. – Т. 67. – № 9–10.
2. Совершенствование эпидемиологического надзора за инвазивными бактериальными заболеваниями в Республике Беларусь / Л.П. Титов [и др.]. – Минск : РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, 2019.
3. Multiplex PCR to *Streptococcus pneumoniae* serotype identification directly in cerebrospinal fluid samples / M. B. de Souza [et al.]. – European J. of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2023.
4. Standardisation and evaluation of a quantitative multiplex real-time PCR assay for the rapid identification of *Streptococcus pneumoniae* / F.A. Ganaie, V. Govindan, K.L. Kumar. – Pneumonia, 2015.
5. Autophosphorylation of the Bacterial Tyrosine-Kinase CpsD Connects Capsule Synthesis with the Cell Cycle in *Streptococcus pneumoniae* / J. Noirikyan [et al.]. – PLOS Genetics, 2015.
6. Genetic Analysis of the Capsular Biosynthetic Locus from All 90 Pneumococcal Serotypes / S. D. Bentley [et al.]. – PLOS Genetics, 2006.
7. Идентификация и серотипирование российских штаммов *Streptococcus pneumoniae* с применением методик, основанных на ПЦР // Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. / К.О. Миронов, А.Е. Платонов, Р.С. Козлов. – 2011. – Т. 13. – № 4. – 304 с.

DEVELOPMENT OF A NEW MOLECULAR ANALYSIS FOR TYPING STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE

Tonko O.V.¹, Bulando V.D.², Kolomiets N.D.², Khanenko O.N.², Sokolova M.V.¹, Romanova O.N.³, Erchak E.I.¹, Babenko A.S.⁴

¹Healthcare institution "City Children's Infectious Diseases Clinical Hospital"

²Institute for Advanced Training and Retraining of Healthcare Personnel of the educational institution "Belarusian State Medical University",

³Educational institution "Belarusian State Medical University"

⁴Republican Scientific and Practical Center "Cardiology" Minsk, Republic of Belarus

Currently, serological methods, traditional polymerase chain reaction (PCR) and real-time polymerase chain reaction (PCR-RT), and whole-genome sequencing are used for pneumococcal serotyping.

Despite the fact that multiplex PCR has a number of limitations, and approaches based on whole-genome sequencing can predict almost all serotypes with high accuracy, determine sequence types, and identify antibiotic resistance and virulence genes, the use of multiplex RT-PCR is more feasible, economically justified, and convenient in clinical practice.

Over the past 10 years, a system of molecular genetic monitoring of bacterial infections has been established in the country, including the determination of pathogen serotypes. However, at the moment there is no commercial reagent kit for molecular genetic serotyping of pneumococcus.

The developed method can become a methodological basis for monitoring changes in the serotype landscape of pneumococcus, which is important against the background of routine immunization of the population with pneumococcal vaccines.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*; PCR-RT; serotyping; molecular genetic monitoring.