

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ



<https://elibrary.ru/nyszjr>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2025

Урбан Ю.Н.¹, Егорова Е.А.¹, Гречишникова О.Г.¹, Байракова А.Л.¹,
Афанасьев С.С.¹, Миронов А.Ю.¹, Воропаева Е.А.¹

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ АЛГОРИТМА СЕРОТИПИРОВАНИЯ *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* МЕТОДОМ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

¹ ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского»
Роспотребнадзора, 125212, г. Москва, Россия

Цель работы. Усовершенствование протокола определения серотиповой принадлежности *Streptococcus pneumoniae* с использованием комплекса методов мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (М-ПЦР-РВ) и мультиплексной ПЦР (М-ПЦР) с электрофоретической визуализацией продуктов амплификации.

Материалы и методы. Проанализирована коллекция из 195 проб ликвора, отобранных у пациентов возрастной категории до 5 лет с клинически подтвержденным диагнозом пневмококкового менингита. Верификацию присутствия ДНК *S. pneumoniae* осуществляли методом ПЦР-РВ (ген-мишень *lytA*). Определение серотипа проводили по двухуровневому алгоритму: начальная стадия включала 7 последовательных реакций М-ПЦР-РВ, на следующей стадии использовали усовершенствованный протокол М-ПЦР с анализом результатов методом электрофореза в агарозном геле (4 этапа).

Результаты. Разработанный алгоритм позволил снизить общее количество проводимых ПЦР-реакций с 16 до 11 и сократить продолжительность анализа на 22 % (до 18 час). Серотиповая идентификация успешно проведена для 78 % (152/195) исследованных образцов ликвора. Представленная схема обеспечивает детекцию всех серотипов, включенных в состав вакцин ПКВ13 и ПКВ20.

Заключение. Модифицированный протокол серотипирования *S. pneumoniae* способствует оптимизации лабораторного мониторинга посредством снижения временных и трудовых затрат при сохранении высокой точности идентификации эпидемиологически значимых серотипов, что имеет ключевое значение для эффективного эпидемиологического надзора в условиях широкого применения пневмококковых вакцин.

Ключевые слова: *Streptococcus pneumoniae*; серотипирование; полимеразная цепная реакция; пневмококковая инфекция; ПКВ13; ПКВ20

Для цитирования: Урбан Ю.Н., Егорова Е.А., Гречишникова О.Г., Байракова А.Л., Афанасьев С.С., Миронов А.Ю., Воропаева Е.А. Совершенствование алгоритма серотипирования *Streptococcus pneumoniae* методом мультиплексной полимеразной цепной реакции. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2025; 70(12): 876-879
DOI:https://doi.org/10.51620/0869-2084-2025-70-12-876-879
EDN: NYSZJR

Для корреспонденции: Воропаева Елена Александровна, д-р. биол. наук, доцент, заместитель директора по медицинской биотехнологии ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского, e-mail: anaerob.lab@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Поступила	15.09.2025
Принята к печати	18.11.2025
Опубликовано	01.12.2025

Urban Yu.N.¹, Egorova E.A.¹, Grechishnikova O.G.¹, Bayrakova A.L.¹, Afanasiev S.S.¹, Mironov A.Yu.¹, Voropaeva E.A.¹

REFINING THE *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* SEROTYPING PROTOCOL WITH MULTIPLEX PCR

¹G. N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, 125212, Moscow, Russia

The aim of the study: to refine a protocol for serotype detection in *Streptococcus pneumoniae* by integrating multiplex real-time polymerase chain reaction (mqPCR) with conventional multiplex PCR (electrophoretic visualization).

Materials and methods: We analysed 195 cerebrospinal fluid specimens from patients under five years of age with confirmed pneumococcal meningitis. *S. pneumoniae* detection was performed using real-time PCR targeting *lytA* gene. Serotyping employed a two-tier approach: an initial stage of seven sequential mqPCR assays, followed by an optimised multiplex PCR protocol with agarose gel electrophoresis (four stages).

Results. The refined algorithm reduced the required number of PCR assays from 16 to 11 and decreased processing time by 22% (to 18 hours). Serotype identification was achieved for 78% (152/195) of cerebrospinal fluid specimens. The presented scheme detects all serotypes covered by both PCV13 and PCV20 vaccines.

Conclusion. The modified serotyping protocol for *S. pneumoniae* enhances laboratory surveillance efficiency by reducing processing time and labour requirements while maintaining high detection accuracy for epidemiologically relevant serotypes. This represents a significant advancement for effective epidemiological monitoring in widespread vaccination settings.

Key words: *Streptococcus pneumoniae*; serotyping; polymerase chain reaction; pneumococcal infection; PCV13; PCV20

For citation: Urban Yu.N., Egorova E.A., Grechishnikova O.G., Bayrakova A.L., Afanasiev S.S., Mironov A.Yu., Voropaeva E.A. Refining the *Streptococcus pneumoniae* Serotyping Protocol with Multiplex PCR. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*

(*Russian Clinical Laboratory Diagnostics*). 2025; 70(12): 876-879
DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2025-70-12-876-879>
EDN: NYSZJR

For correspondence: Elena A. Voropaeva, Doctor of Biological Sciences, Associate Professor, Deputy Director for Medical Biotechnology, G. N. Gabrichesky Research Institute of Epidemiology and Microbiology; e-mail: anaerob.lab@mail.ru

Information about authors:

Urban Yu.N.,	https://orcid.org/0000-0003-0189-3608 ;
Egorova E.A.,	https://orcid.org/0000-0003-1096-4324 ;
Grechishnikova O.G.,	https://orcid.org/0000-0002-0999-836X ;
Bayrakova A.L.,	https://orcid.org/0000-0001-9289-0765 ;
Afanasiev S.S.,	https://orcid.org/0000-0001-6497-1795
Mironov A.Yu.,	https://orcid.org/0000-0002-8544-5230 ;
Voropaeva E.A.,	https://orcid.org/0000-0002-0463-0136

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgment. The work was performed within the framework of the sectoral program of Rosпотребнадзор.

Received 15.09.2025

Accepted 18.12.2025

Published 01.12.2025

ВВЕДЕНИЕ

Заболевания, ассоциированные с *Streptococcus pneumoniae*, сохраняют статус одной из наиболее значимых проблем мирового здравоохранения, внося весомый вклад в общие показатели заболеваемости и смертности от бактериальных инфекций [1, 2, 3].

Наиболее действенной стратегией контроля данной инфекции признана иммунизация, в связи с чем Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) настоятельно рекомендует включение пневмококковых конъюгированных вакцин (ПКВ) в национальные календари профилактических прививок [3, 4]. Несмотря на выраженный положительный эффект от применения ПКВ, уровень заболеваемости пневмококковой инфекцией (ПИ) остается существенным, что обуславливает ее приоритетность для современных систем здравоохранения [5, 6]. Широкомасштабная вакцинация детей ПКВ способствует изменениям в серотиповом составе популяции *S. pneumoniae*, что проявляется в сокращении доли вакцинных серотипов при одновременном увеличении распространенности невакцинных штаммов [7].

В Российской Федерации использование пневмококковых конъюгированных вакцин с различным серотипным составом продолжается более полутора десятилетий (ПКВ7 лицензирована в 2009 г., ПКВ13 - в 2011 г.). С 2014 года ПКВ13, содержащая серотипы 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F, введена в Национальный календарь профилактических прививок. В 2025 году в России зарегистрирована ПКВ20, расширившая охват за счет включения серотипов 8, 10A, 11A, 12F, 15B, 22F, 33F [8].

В связи с этим, является необходимым внедрение системы постоянного микробиологического мониторинга серотипов циркулирующих штаммов *S. pneumoniae* и применение высокочувствительных, воспроизводимых и экономически целесообразных методов идентификации серотипов.

Особую актуальность приобретает анализ клинического материала, непригодного для выделения чистой культуры возбудителя. Для таких образцов единственным решением становится применение молекулярно-генетических методов, основанных на детекции ДНК

патогена, экстрагированной непосредственно из биологических жидкостей (ликвор, кровь). В литературе представлено несколько вариантов протоколов ПЦР для серотипирования пневмококков [9–11].

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ – оптимизация методики определения серотиповой принадлежности *S. pneumoniae* в клинических образцах на основе комплексного применения мультиплексной полимеразной цепной реакции в реальном времени (М-ПЦР-РВ) и мультиплексной ПЦР (М-ПЦР) с детекцией результатов методом электрофореза в агарозном геле.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования – 195 образцов ликвора, полученных от пациентов возрастной группы до 5 лет с подтвержденным диагнозом пневмококкового менингита. Выделение ДНК из образцов ликвора проведено с помощью готового набора реактивов QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen, США). Выявление ДНК *S. pneumoniae* в образцах ликвора осуществлено методом ПЦР-РВ (ген-мишень *lytA*, кодирующий аутолизин) [4, 12]. Определение серотипов *S. pneumoniae* выполнено с помощью М-ПЦР-РВ и М-ПЦР. Последовательности использованных праймеров представлены в ряде работ [4, 13, 14].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Принятый за основу, алгоритм серотипирования *S. pneumoniae* состоял из двух последовательных стадий. На первом этапе выполняли М-ПЦР-РВ, состоящую из 7 последовательных реакций: R1-R7 (рис. 1) [14].

Условия проведения всех реакций М-ПЦР-РВ универсальны:

Денатурация: 95° С – 10 мин (1 цикл);

Амплификация: 50 циклов (95° С – 15 сек, 60° С – 1 мин);

Детекция флуоресценции: на стадии отжига (60° С).

Результат реакции считали положительным при значении порогового цикла (Ct) ≤ 40, отрицательным – при Ct > 50. Значения Ct в интервале 40–50 расценивали как неопределенные и требовали повторного тестирования.

Реакция R1 позволяет дифференцировать серотипы 14 и 19F, а также серогруппу 18. При отрицательном результате в реакции R1 производили переход к реакции R2 (серотипы 2, 5, 23F) и др.

В случае если на первом этапе не удавалось установить серотип *S. pneumoniae*, проводили второй этап - М-ПЦР. В ранее предложенной (исходной) схеме М-ПЦР использовано 9 мультиплексных реакций (рис. 2) [4].

Учитывая применение М-ПЦР-РВ на первом этапе и с целью минимизации времени анализа, нами предложена модификация протокола М-ПЦР. Вместо 9 исходных реакций разработана схема из 4 реакций, обеспечивающая сопоставимую специфичность и исключающая перекрестные реакции (табл. 1).

Условия постановки всех реакций М-ПЦР следующие:

Первичная денатурация: 94° С – 4 мин (1 цикл);

Циклы амплификации: 35 циклов (94° С – 45 сек, 56° С – 1 мин, 72° С – 2 мин);

Финальная элонгация: 72° С – 2 мин (1 цикл).

Амплифицированную ДНК детектировали при помощи электрофореза в агарозном геле (2 %).

Вторая стадия серотипирования включает последовательное проведение 4 реакций М-ПЦР (А–D). При отсутствии положительного сигнала в реакции А выполняли переход к реакции В и т. д.

Разработанный алгоритм серотипирования апробирован на коллекции образцов ликвора пациентов с пневмококковым менингитом. Из 195 проб, позитивных по видовому маркеру *lytA*, серотип или серогруппа, успешно установлены в 152 случаях (78 %) (рис. 3).

Таблица 1

Модифицированная схема серотипирования *S. pneumoniae* методом М-ПЦР

Реакция	Серотипы <i>S. pneumoniae</i>
A	8, 15B/C, 38/25F/25A, 35B
B	39, 10F/10C/33C, 35F/47F, 10A, 17F
C	23B, 35A/35C/42, 34, 9L/9N, 31
D	24B/24F, 21, 7C/7B/40, 20, 13

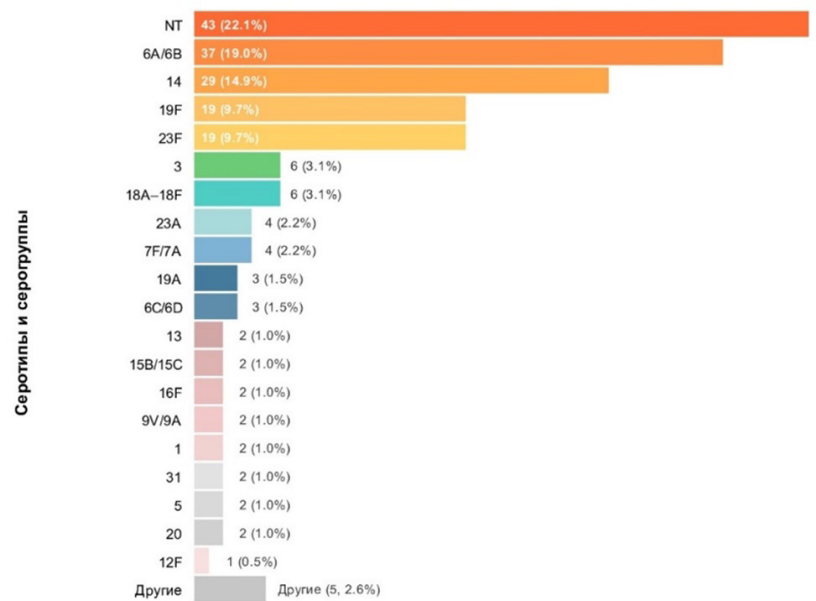


Рис. 3. Распределение серотипов *S. pneumoniae* в исследованных образцах ликвора (n=195).

Примечание: NT – серотип не установлен (Non-typable); другие серотипы: 11A/11D, 2, 22F/22A, 24A/24B/24F, 8 (по 1 изоляту)

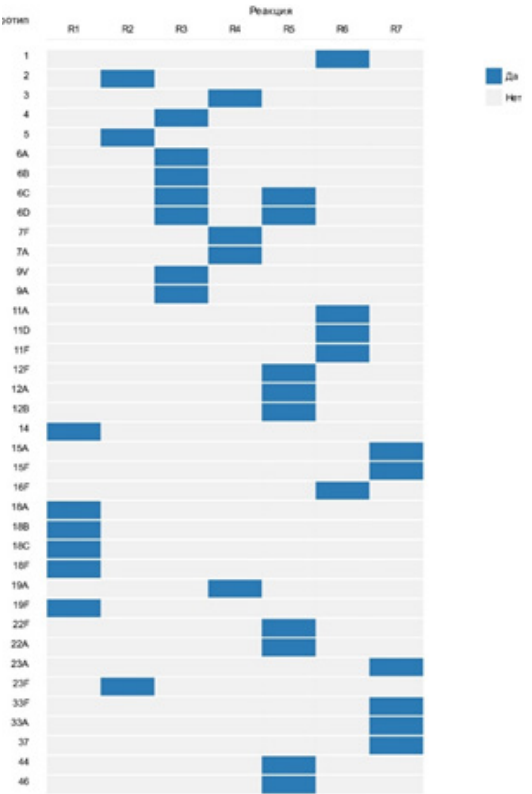


Рис. 1. Распределение серотипов *S. pneumoniae* в схеме М-ПЦР РВ (этап 1).

Примечание: серотипы, входящие в состав серогрупп (напр., 18C/18B/18A/18F), представлены отдельно; Серотипы 6C и 6D детектируются в двух реакциях (R3 и R5).

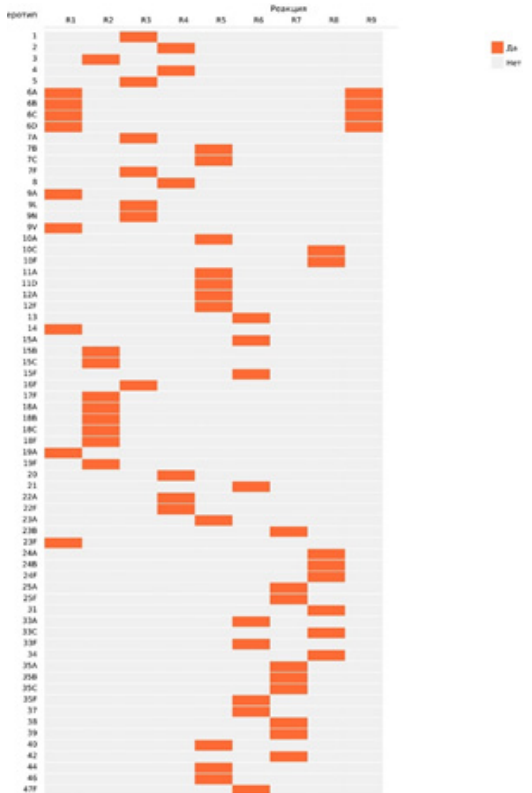


Рис. 2. Исходная схема серотипирования *S. pneumoniae* методом М-ПЦР [4].

Примечание: Реакция R9 проводится только при положительном результате для серогруппы 6A/6B/6C/6D в реакции R1.

Среди идентифицированных серотипов пневмококков доминировали 6А/6В, 14, 19F и 23F, суммарно составлявшие более половины исследованных образцов: 53,3 % (104/195). Доля серотипов пневмококков, входящих в ПКВ13, составила 66,7 % (130/195), в ПКВ20 – 69,2 % (135/195).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанный двухэтапный алгоритм ПЦР-серотипирования *S. pneumoniae* позволяет детектировать все серотипы, включенные не только в ПКВ13, но и в ПКВ20. Модификация схемы позволила сократить общее количество ПЦР-реакций с 16 до 11 и уменьшить время проведения исследования до 18 час, что на 22 % быстрее по сравнению с ранее рекомендованной схемой ВОЗ [4, 13]. Применение усовершенствованного протокола М-ПЦР способствует оптимизации микробиологического мониторинга *S. pneumoniae* за счет расширенного охвата (41 серотип) и ускорения процесса серотипирования в клинических образцах.



ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-7, 9-10, 12-14 см. REFERENCES)

8. Минздрав зарегистрировал двадцативалентную вакцину Pfizer против пневмококковой инфекции. Фармацевтический вестник. 2025 Sept 18 [cited 2025 Nov 12]; Available from: <https://pharmvestnik.ru/>
11. Современные методы капсульного типирования Streptococcus pneumoniae: возможности и доступность для практической лаборатории / А. Н. Чагарян, Н. В. Иванчик, К. О. Миронов, А. А. Муравьев // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2022; 24(1): 61-66. – DOI 10.36488/cmac.2022.1.61-66



REFERENCES

1. GBD 2019 Antimicrobial Resistance Collaborators. Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet*. 2022;400(10369):2221-48. doi:10.1016/S0140-6736(22)02185-7
2. Hawkins PA, Chochua S, Lo SW, Belman S, Antonio M, Kwambana-Adams B., et al. A global genomic perspective on the multidrug-resistant Streptococcus pneumoniae 15A-CC63 sub-lineage following pneumococcal conjugate vaccine introduction. *Microbial Genomics*. 2023;9(4):mgen000998. doi: 10.1099/mgen.0.000998.
3. Wahl B, O'Brien KL, Greenbaum A, Majumder A, Liu L, Chu Y, et al. Burden of Streptococcus pneumoniae and Haemophilus influenzae type b disease in children in the era of conjugate vaccines: global, regional, and national estimates for 2000-15. *Lancet Global Health*. 2018;6(7):e744-e757. doi: 10.1016/S2214-109X(18)30247-X.4
4. WHO manual 2-nd ed., Laboratory Methods for the Diagnosis of Meningitis caused by Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae and Haemophilus influenza // WHO/IVB. - 2011. - 323 p.
5. Thadchanamoorthy V, Dayasiri K. Review on Pneumococcal Infection in Children. *Cureus*. 2021;13(5):e14913. doi: 10.7759/cureus.14913
6. Van De Beek D, Brouwer MC, Koedel U, Wall EC. Community-acquired bacterial meningitis. *The Lancet*. 2021;398(10306):1171-83. doi: 10.1016/S0140-6736(21)00883-7.
7. Lo SW, Gladstone RA, van Tonder AJ, Bentley SD, du Plessis M, von Gottberg A, et al. Pneumococcal lineages associated with serotype replacement and antibiotic resistance in childhood invasive pneumococcal disease in the post-PCV13 era: an international whole-genome sequencing study. *Lancet Infectious Diseases*. 2019;19(7):759-69. doi: 10.1016/S1473-3099(19)30297-X.
8. Минздрав зарегистрировал двадцативалентную вакцину Pfizer против пневмококковой инфекции. Фармацевтический вестник.

- 2025 Sept 18 [cited 2025 Nov 12]; Available from: <https://pharmvestnik.ru/content/news/Pfizer-zaregistrirovala-dvadcativalentnuu-vakcinu-protiv-pnevmonokkovoi-infekcii.html> (in Russian)
9. Moore CE, Sengduangphachanh A, Thaojaikong T, Sirisouk J, Foster D, Phetsouvanh R, et al. Enhanced determination of Streptococcus pneumoniae serotypes associated with invasive disease in Laos by using a real-time polymerase chain reaction serotyping assay with cerebrospinal fluid. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2010;83(3):451-7. doi: 10.4269/ajtmh.2010.10-0225.
10. Resti M, Moriondo M, Cortimiglia M, Indolfi G, Canessa C, Becchiolini L, et al. community-acquired bacteremic pneumococcal pneumonia in children: diagnosis and serotyping by real-time polymerase chain reaction using blood samples. *Clinical Infectious Diseases*. 2010; 51(9):1042-9. doi: 10.1086/656579.
11. Chagaryan AN, Ivanchik NV, Mironov KO, Muravyev AA. Current methods of capsular typing of Streptococcus pneumoniae: possibilities and availability for local laboratories. *Klinicheskaya Mikrobiologiya i Antimikrobnaya Khimioterapiya (Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy)*. 2022; 24(1):61-6. DOI 10.36488/cmac.2022.1.61-66 (in Russian)
12. Messmer TO, Sampson JS, Stinson A, Wong B, Carlone GM, Facklam RR. Comparison of four polymerase chain reaction assays for specificity in the identification of Streptococcus pneumoniae. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 2004;49(4):249-54. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2004.04.013
13. Lang ALS, McNeil SA, Hatchette TF, Elsharif M, Martin I, LeBlanc JJ. Detection and prediction of Streptococcus pneumoniae serotypes directly from nasopharyngeal swabs using PCR. *Journal of Medical Microbiology*. 2015;64(8):836-44. doi: 10.1099/jmm.0.000097
14. Pimenta FC, Roundtree A, Soysal A, Bakir M, Du Plessis M, Wolter N, et al. Sequential Triplex Real-Time PCR Assay for Detecting 21 Pneumococcal Capsular Serotypes That Account for a High Global Disease Burden. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013;51(2):647-52. doi: 10.1128/JCM.02927-12.

Лизангин В₆ ЭКОлаб спрей

В₆ Источник лизоцима,
витамина В₆.



Входящие в состав компоненты способствуют профилактике инфекционно-воспалительных заболеваний слизистой оболочки полости рта, десен и горла.

WILDBERRIES OZON apteka.ru Я Маркет www.ekolab.ru

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНАЯ ДОБАВКА. НЕ ЯВЛЯЕТСЯ ЛЕКАРСТВЕННЫМ СРЕДСТВОМ