

На правах рукописи

МИРОНОВ Константин Олегович

**МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ В
ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОМ НАДЗОРЕ ЗА ГНОЙНЫМИ
БАКТЕРИАЛЬНЫМИ МЕНИНГИТАМИ**

14.02.02 – эпидемиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора медицинских наук

Москва – 2017

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Научный консультант:

академик РАН,

доктор медицинских наук, профессор

Покровский Валентин Иванович

Официальные оппоненты:

Ефимов Евгений Игоревич – доктор медицинских наук, профессор,
Директор ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н.Блохиной» Роспотребнадзора

Стасенко Владимир Леонидович – доктор медицинских наук, профессор,
заведующий кафедрой эпидемиологии ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России

Цвиркун Ольга Валентиновна – доктор медицинских наук,
ведущий научный сотрудник лаборатории профилактики коклюша и кори эпидемиологического отдела ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского» Роспотребнадзора

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «_____» _____ 2018 г. в «_____» часов на заседании диссертационного совета Д 208.114.01 в ФБУН «Центральном НИИ Эпидемиологии» Роспотребнадзора (111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, д.3а)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФБУН «Центральный НИИ Эпидемиологии» Роспотребнадзора и на сайте института: <http://www.crie.ru>.

Автореферат разослан «_____» _____ 2017 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

член-корреспондент РАН,

доктор медицинских наук, профессор

Горелов Александр Васильевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Гнойные бактериальные менингиты (ГБМ) могут быть вызваны различными микроорганизмами, среди которых наибольшее этиологическое и эпидемиологическое значение имеют три возбудителя – *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae*. Бактерии видов *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* и *H. influenzae* также способны вызывать тяжелые септические состояния без выраженной клинической картины ГБМ, *S. pneumoniae* и *H. influenzae* являются возбудителями широкого спектра болезней, среди которых наибольшее клиническое и эпидемиологическое значение имеют пневмонии и другие инфекции респираторного тракта. Поскольку наиболее часто диагностируемым заболеванием, вызываемым *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* и *H. influenzae* является ГБМ, учет случаев данного заболевания, проводимый в рамках эпидемиологического надзора за ГБМ, позволяет оценить вклад данных возбудителей в структуру общей заболеваемости.

Эпидемиологический надзор за ГБМ основан на этиологической расшифровке возбудителей, выделяемых при инвазивных (генерализованных) формах соответствующих инфекций, и учете случаев заболевания в определенных группах населения на наблюдаемой территории в заданный период времени. Идентификация возбудителя ГБМ является основой эпидемиологического надзора за ГБМ и определяет тактику планируемых противоэпидемических мероприятий (Королева, 2007; Приказ МЗ РФ №375 от 23.12.98). Наиболее эффективно идентификация возбудителей ГБМ может быть проведена с использованием основанных на полимеразной цепной реакции (ПЦР) методик как отдельно, так и в сочетании с традиционными микробиологическими методами лабораторной диагностики (Платонов и соавт., 1999).

Поскольку не все представители видов *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* и *H. influenzae* способны вызывать ГБМ, помимо методов лабораторной диагностики, направленных на видовую идентификацию возбудителя, важная роль должна отводиться методам, позволяющим проводить антигенную и генетическую характеристику штаммов, принадлежащих одному виду. Определение антигенных и генетических характеристик микроорганизмов позволяет выделить в популяции возбудителя отдельные штаммы и группы штаммов, обозначаемые также как клоны или клональные комплексы, ассоциированные с генерализованными формами инфекции (клинический уровень) и с эпидемическими подъемами заболеваемости в различных группах населения (эпидемиологический уровень). В связи с этим разработка научных и методических основ мониторинга свойств возбудителей ГБМ с применением современных методов внутривидовой дифференциации, проводимой с использованием молекулярно-биологических методов, является актуальной эпидемиологической задачей. Данные, характеризующие внутривидовые

свойства возбудителей, циркулирующих на наблюдаемой территории, необходимы для постановки эпидемиологического диагноза с целью повышения эффективности надзора за ГБМ, который, в свою очередь, является залогом успешной профилактики других форм инфекций, вызываемых *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* и *H. influenzae*.

Степень разработанности темы исследования

В настоящее время внутривидовая характеристика основных возбудителей ГБМ проводится в основном при помощи широко применяемых рутинных микробиологических и серологических методов. Различия микробиологических свойств отдельных возбудителей ГБМ, определяющих в том числе характер течения эпидемического процесса, диктует необходимость разработки отдельных методик для их внутривидовой характеристики. Поскольку все фенотипические проявления (микробиологические и антигенные свойства бактерий) определяются соответствующими генетическими локусами, идентификация генов или их фрагментов является основой для разработки молекулярно-биологических методик с целью характеристики штаммов возбудителей, выделенных от больных ГБМ. На сегодняшний день геномы основных возбудителей ГБМ секвенированы и в них идентифицированы участки, кодирующие факторы, определяющие антигенные свойства. На основании работ, посвященных характеристике особенностей рекомбинационных процессов для видов *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* и *H. influenzae*, выделены гены, являющиеся маркерами генетического (филогенетического) родства различных штаммов внутри вида. В связи с этим существует возможность использования молекулярно-биологических методов, основанных на полимеразной цепной реакции (ПЦР), которые до сих пор применяются значительно реже микробиологических и серологических методов, но при этом имеют целый ряд преимуществ (Платонов и соавт., 1999; Тютюнник, 2001; Матосова и соавт., 2016). Главное преимущество основанных на ПЦР методик заключается в возможности изучения не только жизнеспособных микроорганизмов, что выражается в проведении их антигенной и генетической характеристики на основании детекции специфических фрагментов ДНК в образцах клинического материала, не прибегая к этапу культивирования возбудителей и их идентификации микробиологическими методами (Fox et al., 2007). Ввиду высокого процента как этиологически нерасшифрованных случаев ГБМ, так и не охарактеризованных возбудителей, которые все-таки были идентифицированы до вида, использование ПЦР существенно повышает результативность проводимых исследований, направленных как на идентификацию возбудителя ГБМ, так и на проведение внутривидовой характеристики возбудителя. Этиологическая расшифровка случая ГБМ, проводимая с помощью основанных на ПЦР методик, является решенной задачей: на базе ФБУН «Центрального НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора разработаны и производятся соответствующие наборы

реагентов. Видовая идентификация возбудителя, являясь основой проводимого эпидемиологического надзора (Королева, 2007; Покровский, 1986), в то же время не позволяет в полной мере охарактеризовать эпидемическую обстановку. Это связано с тем, что инвазивные (генерализованные) формы инфекций, включая ГБМ, в подавляющем большинстве могут быть вызваны только определенными штаммами (клонами, клональными комплексами) бактерий видов *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* и *H. influenzae*, в связи с чем последующая внутривидовая характеристика возбудителей является важной эпидемиологической задачей, определяющей тактику профилактических и противоэпидемических мероприятий.

Современная внутривидовая классификация *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* и *H. influenzae* предполагает обозначение антигенных вариантов, определяемых, в первую очередь, на основании антигенных свойств полисахарида капсулы. Если бактерии вида *H. influenzae*, способные вызвать инвазивные формы инфекции, представлены единственным серотипом – b (Hib), спектр капсульных антигенов *N. meningitidis* и, особенно, *S. pneumoniae* разнообразен, и определение антигенов возбудителей, ассоциированных с генерализованными (инвазивными) формами инфекции, является важнейшим эпидемиологическим параметром наблюдения и контроля заболеваемости ГФМИ и пневмококковыми инфекциями (ПИ). Антигенная характеристика *N. meningitidis* также включает и более подробную классификацию, предполагающую определение вариантов белков наружной мембраны (БНМ). Определение генетических свойств возбудителей, выполненное с помощью метода мультилокусного секвенирования-типирования (МЛСТ), является одним из наиболее удобных и распространенных способов анализа клональной структуры популяций патогенных бактерий с целью идентификации штаммов, обладающих повышенными вирулентными свойствами, и мониторинга их циркуляции (Платонов и соавт., 2000). Результат МЛСТ – сиквенс-тип возбудителя ГБМ и его принадлежность к клональному комплексу – является важным параметром эпидемиологического надзора, который позволяет проспективно оценивать и прогнозировать эпидемиологическую ситуацию.

На сегодняшний день схемы МЛСТ разработаны для всех основных возбудителей ГБМ, и, в зависимости от особенностей эпидемического процесса, обусловленного тем или иным возбудителем, эти схемы могут быть применены для решения определенных эпидемиологических задач. МЛСТ направлено на характеристику популяции микроорганизма, выявление гипервирулентных (и/или ассоциированных с резистентностью к антибиотикам) сиквенс-типов и клональных комплексов. МЛСТ используется для описания генетических взаимоотношений штаммов и эволюционных процессов в бактериальной популяции с целью своевременной идентификации уже известных и новых (не изученных или импортированных с других территорий) микроорганизмов, анализа случаев групповой

заболеваемости, а также для анализа эпидемиологического значения бессимптомного носительства штаммов различных клональных комплексов. Другими словами МЛСТ позволяет осуществить «эпидемиологическую маркировку» циркулирующих возбудителей. Результаты МЛСТ в совокупности с эпидемиологическими характеристиками типированных штаммов (год, место, источник выделения) публикуются через Интернет в общедоступных базах данных, и могут быть использованы для объединения и сопоставления результатов, полученных в разных лабораториях и/или на сопредельных территориях (Chan et al., 2001). В частности, МЛСТ успешно зарекомендовало себя в ряде работ по характеристике и анализу локальных вспышек, эпидемий и пандемий менингококковой инфекции (МИ), в которых были выявлены гипервирулентные клональные комплексы *N. meningitidis* и охарактеризованы клональные комплексы носительских штаммов, не ассоциированные с риском возникновения генерализованных форм менингококковой инфекции (ГФМИ) (Caugant et al., 2009; Maiden et al., 1998). Также неоднократно был показан различный вклад в эпидемический процесс возбудителей видов *S. pneumoniae* и *H. influenzae*, имеющих одинаковые антигенные характеристики. Причем заболеваемость, обусловленная этими возбудителями, сильно зависит как от формы инфекции, так и от групп населения, вовлеченных в эпидемический процесс (Баранов и соавт., 2013; Костинов и соавт., 1998; Козлов, 2010).

Неодинаковый характер эпидемического процесса, обусловленный штаммами одного вида с различными вирулентными свойствами, диктует необходимость разработки комплекса молекулярно-биологических методик внутривидовой характеристики для идентификации наиболее эпидемиологически значимых антигенных и генетических свойств возбудителей с целью проведения качественной эпидемиологической диагностики и повышения эффективности эпидемиологического надзора и контроля заболеваемости ГБМ.

Цель работы: Совершенствование эпидемиологического надзора за ГБМ с помощью разработанной системы молекулярно-биологического мониторинга возбудителей, циркулирующих на территории России.

Задачи исследования

1. Выявить антигенные и генетические особенности возбудителей ГБМ, вовлеченных в эпидемический процесс на территории России, и определить приоритетные направления использования комплекса молекулярно-биологических методов мониторинга в эпидемиологическом надзоре за ГБМ.
2. В соответствии с генетическими особенностями возбудителей разработать комплекс молекулярно-биологических методических подходов для внутривидовой характеристики антигенных и генетических свойств бактерий видов *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* и *H. influenzae*.

3. Провести молекулярно-биологический мониторинг и анализ клональной структуры *N. meningitidis* серогруппы А в наблюдаемый межэпидемический период на территории Москвы, проанализировать наблюдаемые эволюционные изменения и связь с заболеваемостью ГФМИ.

4. Определить клональные комплексы *N. meningitidis* серогрупп В и С, циркулирующих на территории России, охарактеризовать особенности российских штаммов и эпидемиологическую значимость циркулирующих клональных комплексов.

5. Определить клональную принадлежность *N. meningitidis* серогруппы W, циркулирующих на территории России, и охарактеризовать их эпидемиологическое значение.

6. Дать антигенную и генетическую характеристику *S. pneumoniae*, циркулирующих на территории России, и обозначить направления молекулярно-биологического мониторинга *S. pneumoniae*, вызывающих ГБМ.

7. Определить эпидемиологическую значимость *Hib*, циркулирующих на территории России, и на основании их генетической характеристики определить клональную структуру российских *Hib* в сопоставлении с зарубежными.

Научная новизна

Впервые в отечественной эпидемиологической практике разработан и применен комплекс некультуральных молекулярно-биологических подходов к характеристике антигенных и генетических свойств основных возбудителей ГБМ с учетом их эпидемиологической значимости, что позволило получить новые сведения о циркулирующих возбудителях и их вкладе в эпидемический процесс.

Получена характеристика эпидемически значимых штаммов возбудителей ГБМ (включая находящиеся в нежизнеспособном состоянии) в соответствии с международными требованиями, предъявляемыми для внутривидовой характеристики этих микроорганизмов. Результаты опубликованы в международных базах данных и доступны для проспективного микробиологического мониторинга.

Впервые представлена характеристика клональной структуры популяций основных возбудителей ГБМ, циркулирующих на территории России, и охарактеризовано эпидемиологическое значение представителей выявленных клональных комплексов, определяющее дальнейшее направление молекулярно-биологического мониторинга.

Впервые проанализирована связь заболеваемости ГБМ и генетических свойств возбудителей, что позволило определить эпидемическую опасность циркулирующих в России клональных комплексов и охарактеризовать интенсивность течения эпидемического процесса, ассоциированного с определенными клональными комплексами.

Впервые сформулированы принципы и направления молекулярно-биологического мониторинга основных возбудителей ГБМ в России с учетом их антигенных и генетических особенностей.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты молекулярно-биологического мониторинга использованы в эпидемиологической практике для ретроспективного и проспективного мониторинга возбудителей ГБМ, циркулирующих на территории России, с целью оценки эпидемической опасности циркулирующих возбудителей видов *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* и *H. influenzae*.

На основании полученных результатов показана возможность и целесообразность применения разработанных молекулярно-биологических методических подходов в практике эпидемиологического надзора за ГБМ. Полученные данные позволяют охарактеризовать антигенную и генетическую изменчивость возбудителей, вовлеченных в эпидемический процесс, выявлять наиболее опасные в эпидемическом отношении клональные комплексы, отслеживать их распространение в различных группах населения и следить за появлением на территории возбудителей с новыми или измененными свойствами.

Рекомендовано внедрение молекулярно-биологических методов в существующую схему микробиологического мониторинга возбудителей ГБМ для повышения эффективности эпидемиологического надзора за счет высокой дискриминирующей способности генотипирования и уменьшения доли не охарактеризованных штаммов.

Результаты молекулярно-биологического мониторинга штаммов *N. meningitidis*, выделенных в очагах ГФМИ, могут быть использованы для описания эпидемических связей между инфицированными лицами и оценке эпидемической опасности выявленных источников инфекции и определенных возбудителей.

В совокупности с уже внедренными в диагностическую практику методами этиологической расшифровки ГБМ, основанными на ПЦР, разработанный комплекс молекулярно-биологических методических подходов обеспечивает получение данных о видовых, антигенных и генетических свойствах возбудителей, содержащихся в клиническом материале, без использования микробиологических методов исследования, что сокращает время анализа для оперативного получения эпидемиологически значимой информации.

Внедрение результатов

Результаты проведенных исследований использованы при разработке нормативно-методических документов, аналитических обзоров и научных исследований, посвящённых мониторингу возбудителей и эпидемиологическому надзору за ГБМ. Результаты исследований были

использованы при составлении следующих нормативных документов Роспотребнадзора:

1. Письмо №01/9620-0-32 от 29.06.2010 «О взаимодействии территориальных органов и учреждений Роспотребнадзора с Референс-центром по мониторингу за бактериальными менингитами».

2. Научно-практическая работа «Определение особенностей менингококкового носительства в очагах менингококковой инфекции», выполненная в соответствии с письмом №17-12/517 от 22.08.2007 Управления Роспотребнадзора по Москве. М., 2011. – 49 с.

3. Письмо №01/10303-12-32 от 12.09.2012 «О результатах мониторинга за заболеваемостью менингококковой инфекцией и бактериальными менингитами в Российской Федерации в 2011 г.».

4. Информационно-аналитический обзор «Менингококковая инфекция и гнойные бактериальные менингиты в Российской Федерации 2012 год». М.: Российский референс-центр по мониторингу за бактериальными менингитами при ФБУН «Центральном НИИ эпидемиологии», 2013. – 54 с.

5. Приказ №798 Роспотребнадзора от 25.07.2014 «О совершенствовании эпидемиологического надзора и профилактики гнойных бактериальных менингитов в Российской Федерации».

6. Информационно-аналитический обзор «Менингококковая инфекция и гнойные бактериальные менингиты в Российской Федерации 2013 год». М.: Российский референс-центр по мониторингу за бактериальными менингитами при ФБУН «Центральном НИИ эпидемиологии», 2014. – 31 с.

7. Методические рекомендации МР 4.2.0114-16 «Лабораторная диагностика внебольничной пневмонии пневмококковой этиологии». – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии, 2016. – 57 с.

Апробированные при проведении исследования методические подходы и итоговые материалы работы используются в лекционном материале сертификационных курсов усовершенствования «ПЦР-диагностика инфекционных заболеваний», проводимых на базе ФБУН «Центрального НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, и сертификационных курсов усовершенствования по специальности «Бактериология», проводимых НИИ антимикробной химиотерапии Смоленской государственной медицинской академии.

Методология и методы исследования

Методологической основой диссертационного исследования послужили труды отечественных и зарубежных специалистов по эпидемиологии ГБМ. Проанализированы клинические, микробиологические и эпидемиологические особенности ГБМ различной этиологии, которые легли в основу выработанных подходов к молекулярно-биологическому мониторингу возбудителей с целью их использования в практике эпидемиологического надзора за ГБМ.

При разработке молекулярно-биологических методических подходов использован опыт исследователей, посвященный внедрению способов внутривидовой классификации возбудителей в практику эпидемиологического надзора за ГФМИ и инвазивными формами инфекций, вызываемых *S. pneumoniae* и *H. influenzae*. Для разработки способов определения капсульных антигенов возбудителей использован метод ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РРВ) как наиболее оптимальный, доступный и широко распространенный в практике клинических лабораторий. При создании подходов к генетической характеристике приоритет был отдан методам, основанным на секвенировании ДНК, поскольку только в этом случае результат исследования обладает абсолютной межлабораторной сопоставимостью и позволяет обозначить клональные комплексы в соответствии с уже имеющимися данными, тем самым обеспечивая информацию для ретроспективного и проспективного эпидемиологического анализа.

В работе применены общенаучные подходы и специальные методы научного познания классической эпидемиологии (описательные и аналитические эпидемиологические методы), а также статистические методы. Ретроспективный и проспективный эпидемиологический анализ проводился с использованием официальных данных о заболеваемости ГФМИ и доступных данных последних исследований о заболеваемости ГБМ неменингококковой этиологии. При проведении анализа использованы антигенные, генетические, микробиологические и эпидемиологические данные из международных баз данных, интегрирующих сведения об источниках и результатах генотипирования основных возбудителей ГБМ.

Положения, выносимые на защиту

1. Молекулярно-биологические подходы для антигенной и генетической характеристики возбудителей ГБМ обеспечивают накопление необходимых данных о свойствах возбудителей и являются инструментами, позволяющими усовершенствовать систему эпидемиологического надзора за ГБМ.

2. Определение капсульных антигенов *N. meningitidis* и *S. pneumoniae* с помощью ПЦР-РРВ является быстрым и удобным способом характеристики нежизнеспособных возбудителей в исследуемом клиническом материале, увеличивающим накопление эпидемиологически значимой информации для планирования иммунопрофилактических мероприятий и контроля их эффективности.

3. В масштабах наблюдаемой территории подтверждено, что метод МЛСТ позволяет определять клональные комплексы основных возбудителей ГБМ, циркулирующих на различных территориях, выявлять генетические взаимосвязи возбудителей и определять их роль в эпидемическом процессе.

4. Генетическая характеристика, осуществляемая с помощью МЛСТ, является основным инструментом мониторинга эпидемически значимых

возбудителей вида *N. meningitidis* и дополнительным инструментом характеристики возбудителей ГБМ неменингококковой этиологии.

5. Определены дальнейшие направления молекулярно-биологического мониторинга основных возбудителей ГБМ, вовлеченных в эпидемический процесс на территории России.

Степень достоверности и апробация результатов

Достаточный объем данных, полученных от больных ГФМИ и менингитами неменингококковой этиологии в течение этапов проведенного исследования, высокая информативность используемых молекулярно-биологических методов для получения результатов антигенной и генетической характеристики изучаемых штаммов. Использование секвенирования ДНК возбудителей как наиболее точного метода определения всех возможных генетических изменений в популяциях микроорганизмов. В результате использования разработанных методических подходов осуществлена возможность объединения и сопоставления полученных данных с результатами, опубликованными в международных базах данных, содержащих значительный объем информации о возбудителях, вовлеченных в эпидемический процесс на других территориях. В исследовании применены современные программные и информационные технологии для проведения генетического анализа и сопоставления полученных результатов с имеющимися данными других исследователей в рамках проведения ретроспективного и проспективного анализа эпидемиологически значимой информации. Сформулированные выводы и практические рекомендации достаточно аргументированы и логически вытекают из результатов исследования.

При проведении работы материалы диссертационного исследования регулярно представлялись на российских и зарубежных конференциях: VIII, IX и X Всероссийских съездах научно-практического Общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов (Москва, 2002, 2007, 2012), 13th, 16th и 18th International Pathogenic Neisseria Conference (Oslo, 2002; Rotterdam 2008; Würzburg, 2012), Всероссийских научно-практических конференциях «Генодиагностика инфекционных заболеваний» (Москва, 2002, 2004, 2007), I и II Российских конференциях «Актуальные проблемы менингококковой инфекции и гнойных бактериальных менингитов» (Москва, 2004, 2008), 4th World Congress of the World Society for Pediatric Infectious Diseases (Warsaw, 2005), XIV и XXIII Российских национальных конгрессах «Человек и лекарство» (Москва, 2007, 2016), 9th Meeting of The European Monitoring Group on Meningococci (Rome, 2007), Всероссийской научной конференция «Проблемы современной эпидемиологии. Перспективные средства и методы лабораторной диагностики и профилактики актуальных инфекций» (Санкт-Петербург, 2009), II, III, IV, V и VII Ежегодных Всероссийских конгрессах по инфекционным болезням (Москва, 2010, 2011,

2012, 2013, 2015, 2017), Всероссийских научно-практических конференциях с международным участием «Молекулярная диагностика» (Москва, 2010, 2014, 2017), III Межрегиональной научно-практической конференции «Инфекционные болезни взрослых и детей. Актуальные вопросы диагностики, лечения и профилактики» (Астрахань, 2012), 3-й Российской научно-практической конференции «Актуальные проблемы бактериальных и вирусных менингитов» (Москва, 2012), Международной конференции «Молекулярная эпидемиология актуальных инфекций» (Санкт-Петербург, 2013), Научно-практической конференции «Диагностика и профилактика инфекционных болезней» (Новосибирск, 2013), Межведомственных научно-практических конференциях «Инфекционные болезни – актуальные проблемы, методы борьбы и профилактика» (Москва, 2015, 2016), Международной научно-практической конференции «Перспективы сотрудничества государств – членов Шанхайской организации сотрудничества в противодействии угрозе инфекционных болезней» (Сочи, 2015) и 115th General Meeting of the American Society for Microbiology (New Orleans, 2015).

Материалы диссертационного исследования были доложены, обсуждены и рекомендованы к защите на заседании Ученого совета ФБУН «Центрального НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора 18 октября 2016 года.

Публикации

Результаты исследования были опубликованы в 106 научных работах, в том числе в 33 статьях, из которых 29 – в журналах, рекомендованных ВАК РФ и 1 глава в практическом руководстве.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, главы «Обзор литературы», пяти глав собственных исследований, включая главу «Материалы и методы», заключения, выводов, практических рекомендаций, описания перспектив дальнейшей разработки темы, двух приложений и списка используемой литературы, содержащего 237 источников, в том числе 127 отечественных и 110 – зарубежных.

Диссертация изложена на 275 страницах машинописного текста, иллюстрирована 9 рисунками и 34 таблицами.

Личный вклад автора

Автором были выполнены планирование этапов исследования, анализ данных литературы, выбор современных направлений молекулярно-биологического мониторинга возбудителей ГБМ, разработка и апробация соответствующих методик. Автору принадлежит ведущая роль в выборе направлений некоторых этапов исследований, обработке всех полученных

экспериментальных данных, их публикации в международных базах данных, анализе и обобщении полученных результатов.

Вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии на всех этапах исследования: от постановки задач, их экспериментальной и теоретической реализации до обсуждения и публикации результатов и их внедрения в практику.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Материалы исследования

Материалом для исследования послужила информация о больных ГБМ (диагноз, возраст, год, территория) в совокупности с имеющимися данными о заболеваемости и молекулярно-биологической характеристики возбудителей. Всего в исследование включена информация о 326 штаммах и клинических образцах, содержащих ДНК *N. meningitidis* (1995-2013 гг.), данные о 93 штаммах *S. pneumoniae* (1980-2010 гг.) и 116 штаммов и образцах СМЖ, содержащих ДНК *Hib*.

Большая часть охарактеризованных методом МЛСТ штаммов была выделена на территории Москвы и исследована в рамках совместных работ с Российским референс-центром по мониторингу за бактериальными менингитами (руководитель – д.м.н. И.С. Королева). В работе также использованы результаты анализа клинических образцов, содержащих ДНК *N. meningitidis*, выделенных от больных ГФМИ (2008-2012 гг.) в регионах России (информационное письмо № 01/9620-0-32 от 29.06.2010, организатор и научный руководитель исследования – д.м.н. И.С. Королева). При разработке и апробации методик для определения серотипов *S. pneumoniae* использовано 113 штаммов *S. pneumoniae* (1999-2011 гг.), предоставленных НИИ антимикробной химиотерапии Смоленской государственной медицинской академии, собранных и охарактеризованных в рамках многоцентровых исследований резистентности микроорганизмов серии «ПеГАС», проводимых НИИ антимикробной химиотерапии Смоленской государственной медицинской академии (научный руководитель исследований – д.м.н. Р.С. Козлов). Штаммы *Hib* были получены во время исследования «Эпидемиологический, на популяционной основе, надзор за *Hib*-менингитами у детей до 5-летнего возраста в Москве», проведенного ФБУН «Центральным НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора при поддержке ВОЗ (1999-2001 гг.), и при характеристике клинических образцов, содержащих ДНК *Hib*, во время изучения заболеваемости *Hib*-менингитами в регионах России (2005-2008 гг.) с использованием метода *Hib*-РАТ (организатор и научный руководитель исследований – д.б.н. А.Е. Платонов).

С целью проспективного определения серогрупп и проведения МЛСТ *N. meningitidis*, а также серотипирования *S. pneumoniae*, вызвавших ГБМ на территории Москвы, исследованы образцы СМЖ от больных ГБМ,

госпитализированных в Клиническую инфекционную больницу № 2 Департамента здравоохранения Москвы в период с 2007 по 2014 год (научные руководители исследования – д.м.н. Ю.Я. Венгеров и к.м.н. О.Ю. Шипулина).

Подробная информация обо всех исследованных микроорганизмах, включающая в первую очередь информацию об источнике, публиковалась на протяжении данного исследования (2001-2014 гг.) в базе данных PubMLST.

Лабораторные методы исследования

При разработке основанных на ПЦР некультуральных методик для антигенной характеристики и МЛСТ использованы стандартные молекулярно-биологические методы, включающие различные способы выделения ДНК, проведения ПЦР и секвенирования. Все наборы реагентов и отдельные реагенты для выделения ДНК и ПЦР были произведены в ФБУН «Центральном НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора («АмплиСенс», Россия). Секвенирование проводилось с использованием реагентов и оборудования фирмы «Applied Biosystems» (США).

Эпидемиологические и статистические методы

Использованы традиционные описательно-оценочные эпидемиологические методы: ретроспективный и оперативный анализ, а также аналитические методы. Для ретроспективного и оперативного (проспективного) эпидемиологического анализа использована информация о заболеваемости, которая включала данные официальной регистрации случаев ГФМИ и результаты оценки заболеваемости ГБМ неменингококковой этиологии в локальных исследованиях, выполненных преимущественно в ФБУН «Центральном НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, а также данные об антигенных и генетических свойствах циркулировавших ранее и циркулирующих на момент проведения исследования возбудителях. Основой для проведения эпидемиологического анализа являлась информация об источниках возбудителей и их внутривидовой характеристике (антигенных и генетических свойствах), аккумулированная с помощью специализированных баз данных <http://www.mlst.net/> и <http://pubmlst.org/> (PubMLST). Аналитические методы были использованы для выявления взаимосвязей и поиска ассоциаций между показателями заболеваемости ГБМ и характеристикой циркулирующих возбудителей с учетом их антигенных и генетических (сиквенс-типов и клональных комплексов) свойств.

В работе использован широкий спектр современных информационных технологий и компьютерных программ для анализа и статистической обработки полученных данных. Часть статистических методов была реализована в специализированном программном обеспечении при работе с оборудованием для проведения молекулярно-биологических исследований. Другая часть статистических методов была реализована через различные опции специализированного программного обеспечения для генетического анализа и классификации полученных результатов, выполненных на основании определенных нуклеотидных последовательностей и аллельных

профилей («Chromas», «DNASar», «Vector NTI», «MEGA», «START», «goeBURST» и другие). При описании генетического разнообразия и характеристики используемого способа проведения генотипирования был использован индекс разнообразия по Симпсону (численный индекс дискриминации, рассчитанный согласно Hunter et al., 1988).

В работе использованы статистические и биоинформационные возможности специализированных Интернет-ресурсов для анализа генетических и эпидемиологических данных (преимущественно PubMLST и NCBI), а также прикладные программы Microsoft Office («Excel» и «Access») и «SPSS».

Результаты исследования и их обсуждение

Разработка молекулярно-биологических методик для внутривидовой классификации возбудителей ГБМ

С целью проведения молекулярно-биологического мониторинга возбудителей ГБМ был разработан комплекс основанных на ПЦР методических подходов, направленных на идентификацию капсульных антигенных вариантов (для *N. meningitidis* и *S. pneumoniae*) и определение клональных комплексов на основании данных МЛСТ в соответствии с существующими международными требованиями. Комплекс методических подходов основан на использовании общепринятых регламентированных лабораторных методик для определения антигенных и генетических свойств возбудителей при характеристике параметров эпидемического процесса на субклеточном (молекулярно-генетическом) уровне.

Основная группа разработанных методик, предполагающих секвенирование бактериальной ДНК, была предназначена для проведения МЛСТ и характеристики переменных фрагментов БНМ *N. meningitidis*. При разработке этих методик соблюдены все основные требования, предъявляемые для генотипирования возбудителей ГБМ, главное из которых – получение результатов секвенирования нуклеотидных последовательностей заданных локусов надлежащего качества на протяжении строго определенной длины, согласно принятой номенклатуре для обозначения соответствующих аллелей. Принципиальным изменением является выбор альтернативных пар праймеров и использование собственного протокола амплификации. Выбор праймеров был продиктован необходимостью увеличения специфичности и эффективности амплификации при работе с клиническим материалом, удобством, связанным с использованием одинаковых праймеров для проведения ПЦР и секвенирующей амплификации, а также собственным опытом проведения оптимизации ПЦР с использованием имеющегося в распоряжении лабораторного оборудования. При разработке методик для характеристики аллелей переменных фрагментов БНМ *N. meningitidis* основное условие при дизайне праймеров заключалось в необходимости отжига праймеров на последовательностях, соответствующих

трансмембранным участкам БНМ, предсказанных согласно (Derrick et al., 1999; Van der Ley et al., 1991) для PorA и (Thompson et al., 2003) для FetA. Все праймеры, использованные в данной работе для проведения МЛСТ и антигенной характеристики, отличаются от праймеров, предложенных в других исследованиях. С помощью выбранных праймеров удалось получить фрагменты генов, достаточные для обозначения соответствующих аллелей при проведении МЛСТ.

Другая группа разработанных методик была направлена на определение эпидемиологически значимых капсульных антигенов. Необходимость собственной разработки была продиктована отсутствием общепринятых подходов и доступных основанных на ПЦР-РПВ наборов реагентов для определения серогрупп *N. meningitidis* и серотипов *S. pneumoniae*. Спектр детектируемых серогрупп (серотипов) сильно зависит от эпидемической ситуации на наблюдаемой территории, включающей информацию о наблюдаемых группах населения, и обусловленных этим задач по планированию иммунопрофилактических мероприятий. В связи с этим нами были разработаны собственные ПЦР-РПВ методики в формате «мультипрайм», учитывающие серологические особенности возбудителей, циркулирующих на территории России.

I. Определение серогрупп *N. meningitidis*

В основе методики для определения серогрупп *N. meningitidis* – амплификация серогрупп-специфичных мишеней (фрагментов генов *sacA* и *siaD*). Методика предполагает определение пяти мишеней в одной реакции: специфических мишеней для серогрупп А, В, С и W, а также положительного внутреннего контроля присутствия ДНК *N. meningitidis* в образце (фрагмента гена *ctrA*). Методика апробирована на референсных штаммах, в том числе с использованием штаммов других возбудителей ГБМ, с целью подтверждения аналитической специфичности методики, чувствительность методики составляет 10^4 копий ДНК *N. meningitidis* на 1 мл образца, что достаточно для определения серогруппы возбудителя в СМЖ. Эффективность методики была проверена на образцах СМЖ, полученных от больных и протестированных параллельно с исследованием, осуществленным с помощью набора реагентов «Амплиценс *Neisseria meningitidis* А, В, С – ЕPh» (Тютюнник, 2001), при проведении микробиологического мониторинга *N. meningitidis*, циркулирующих на территории Москвы в 2007-2010 годах. За указанный период было проанализировано 187 образцов СМЖ, полученных от больных ГФМИ, параллельно двумя методиками. Тестирование не выявило дискордантных результатов для проб, содержащих ДНК *N. meningitidis* А, В и С (за исключением нескольких образцов с низкой нагрузкой, не определенных референсной методикой). При проведении апробации было выявлено следующее распределение серогрупп: серогруппа *N. meningitidis*: А – 103 образца (55%), В – 45 образцов (24%), С – 30 образцов (16%), W – 5 образцов (3%) и 4 (2%) образца, содержащих ДНК *N. meningitidis* других серогрупп.

Часть *N. meningitidis* серогруппы А и все образцы серогруппы W, а также все образцы, содержащие ДНК *N. meningitidis* других серогрупп были охарактеризованы методом МЛСТ в сочетании с антигенной характеристикой переменных фрагментов БНМ в рамках проведения молекулярно-биологического мониторинга.

Использование генетических методов для определения серогрупповой принадлежности *N. meningitidis* выявило преобладание NmА (55%) среди возбудителей ГФМИ на территории Москвы, хотя согласно данным, полученным преимущественно с использованием серологических методов, на территории России ранее эта серогруппа встречалась лишь среди одной трети изученных штаммов (при этом, согласно Информационно-аналитическому обзору «Менингококковая инфекция и гнойные бактериальные менингиты в Российской Федерации 2013 год» у 19-27% штаммов серогруппа не была определена).

Методика была использована в ряде последующих исследований при проведении молекулярно-биологического мониторинга на территории Москвы (проведены и проводятся в настоящее время исследования образцов СМЖ от больных, госпитализированных в Клиническую инфекционную больницу № 2 Департамента здравоохранения Москвы, научные руководители исследования – д.м.н. Ю.Я. Венгеров и к.м.н. О.Ю. Шипулина) и при изучении штаммов *N. meningitidis*, циркулирующих на территории России (информационное письмо № 01/9620-0-32 от 29.06.2010, организатор и научный руководитель исследования – д.м.н. И.С. Королева). В целом, результаты этих исследований позволили охарактеризовать значительную часть нежизнеспособных возбудителей, при этом доля *N. meningitidis* с не определенной серогруппой составляла от 0 до 4%. Для негруппируемых *N. meningitidis*, циркулирующих на территории Москвы в 2007-2010 годах, удалось определить сиквенс-типы и аллели переменных фрагментов БНМ. Анализ полученных данных позволил установить их наиболее вероятную серогрупповую принадлежность (были выявлены сиквенс-типы и клональные комплексы, характерные для штаммов серогруппы Y и негруппируемых *N. meningitidis*) и обозначить невысокий эпидемический потенциал этих штаммов.

Таким образом, созданная методика позволяет определять четыре эпидемически значимые серогруппы *N. meningitidis* более чем в 95% случаев, и в совокупности с другими, основанными на ПЦР подходами для генотипирования *N. meningitidis*, включающих проведение МЛСТ и определение переменных фрагментов БНМ, использование разработанной ПЦР-РРВ методики позволяет проводить комплексную характеристику образцов, содержащих ДНК *N. meningitidis*, без этапа высева возбудителя в соответствии с существующими требованиями для обозначения штаммов *N. meningitidis*. Сочетание некультуральных методик, предназначенных для внутривидовой характеристики *N. meningitidis* позволяет осуществлять молекулярно-биологический мониторинг представителей основных

серогрупп, вовлеченных в эпидемический процесс и, в случае обнаружения ДНК нетипируемых или неизвестных представителей вида *N. meningitidis*, проводить их идентификацию методами генотипирования с целью определения их потенциальной эпидемической опасности.

II. Определение серотипов *S. pneumoniae*

С целью повышения эффективности наблюдения за циркулирующими штаммами *S. pneumoniae* была разработана ПЦР-РРВ методика, позволяющая определять основные серотипы микроорганизмов, способных вызывать инвазивные формы инфекций, и серотипы, входящие в состав 10- и 13-валентных конъюгированных пневмококковых вакцин.

Клиническая апробация ПЦР-РРВ методики проведена на образцах ДНК, выделенных из СМЖ и поставленных, в качестве контроля, параллельно с методикой, основанной на электрофоретической детекции результата ПЦР (ПЦР-ЭФ), в основе которой использовано 23 пары серотип-специфических праймеров (Pai et al., 2006). Клинические образцы были получены при проведении микробиологического мониторинга пневмококков, циркулировавших на территории Москвы в 2007-2010 годах. С использованием двух методик было параллельно проанализировано 89 образцов СМЖ от больных ГБМ, вызванных *S. pneumoniae*, за указанный период. Выявленное распределение серотипов и результаты постановок с использованием обеих методик представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Результаты определения серотипов *S. pneumoniae* в образцах СМЖ больных пневмококковым менингитом с помощью ПЦР-ЭФ и ПЦР-РРВ

Серотип	Количество положительных проб				
	ПЦР-ЭФ	Реакции ПЦР-РРВ			
		№1	№2	№3	№4
3	11	12	–	–	–
6BA	6	6	–	–	–
19F	3	3	–	–	–
9VA	0	0	–	–	–
1	5	–	5	–	–
14	4	–	4	–	–
23F	11	–	12	–	–
4	7	–	8	–	–
18	6	–	–	7	–
9NL	4	–	–	6	–
15AF	3	–	–	3	–
11AD	2	–	–	2	–
2	0	–	–	–	0
5	0	–	–	–	0
7FA	2	–	–	–	2
19A	0	–	–	–	0

Серотип	Количество положительных проб				
	ПЦР-ЭФ	Реакции ПЦР-РРВ			
		№1	№2	№3	№4
12FA*	1	–	–	–	–
8*	1	–	–	–	–
7C, 15BC, 22FA, 23B, 23C*	0	–	–	–	–
Всего (%)	66 (74%)	21 (24%)	29 (33%)	18 (20%)	2 (2,2%)
		70 (79%)			

* Серотип-специфические мишени, определяемые ПЦР-РРВ методикой и не входящие в состав реакций для ПЦР-ЭФ методики.

Наиболее часто были выявлены серотипы 3 (12 образцов, 13%), 23F (13%), 4 (8 образцов, 9%) и 18 (7 образцов, 8%). Из найденных образцов, содержащих ДНК *S. pneumoniae* серотипа 6А или серотипа 6В, в одном образце найдена ДНК серотипа 6А, в 5 образцах – ДНК серотипа 6В; дифференциация серотипов 6А и 6В проводилась с помощью пиросеквенирования.

В исследованных образцах СМЖ было выявлено 14 серотип-специфических мишеней ПЦР-ЭФ методикой и 12 серотип-специфических мишеней – ПЦР-РРВ методикой. В то же время серотип был определен ПЦР-ЭФ методикой в 66 (74%) образцах, а ПЦР-РРВ методикой – в 70 (79%) образцах, что обусловлено, по-видимому, более высокой чувствительностью технологии ПЦР-РРВ. Выявление ПЦР-ЭФ методикой серотипов 12F и 8, не характерных для возбудителей пневмококковых менингитов, циркулирующих на территории России, и не входящих в состав конъюгированных вакцин, не дает основания полагать, что методика ПЦР-ЭФ (также как и ее аналоги) будет иметь преимущество при проведении молекулярно-биологического мониторинга возбудителей ГБМ.

Наиболее эффективным способом определения серотипов *S. pneumoniae*, ДНК которых может быть обнаружена в СМЖ, является ПЦР-РРВ исследование с реакцией № 2, которое позволяет в одной постановке определить серотип у наибольшего количества образцов (33%). Наименее эффективным ПЦР-РРВ исследованием для образцов СМЖ является реакция № 4 (2%), которая, в первую очередь, предназначена для детекции редких в России серотипов 7F и 19A, входящих, тем не менее, в состав 13-валентной вакцины. В совокупности реакции № 1-3 позволяют определить серотип в не менее чем 75% образцах СМЖ. Поэтому, для определения серотипов *S. pneumoniae* в образцах СМЖ оптимальный алгоритм применения ПЦР-РРВ методики, должен выглядеть следующим образом: сначала проводится исследование образца в реакции № 2, затем cpsA-положительные образцы исследуются в реакциях № 1 и № 3. Если серотип не определяется, образец должен быть дополнительно исследован в реакции № 4 для определения двух серотипов, входящих в состав 13-валентной вакцины, или с использованием

методики ПЦР-ЭФ для расширенного определения серотипов. В то же время при исследовании клинического материала, забранного в рамках изучения эффективности вакцинации при других формах пневмококковой инфекции, алгоритм исследования может быть изменен. Например, при остром среднем отите, рациональнее начинать исследование с реакции № 1, с помощью которой, с учетом данных (Перова и соавт., 2012), можно рассчитывать определить серотип у 60% *S. pneumoniae*, присутствующих в образцах, взятых при парацентезе.

Таким образом, разработанная методика ПЦР-РРВ позволяет определять серотип *S. pneumoniae* у не менее 75% штаммов или клинических образцов СМЖ, содержащих ДНК *S. pneumoniae*. Методика позволяет определять серотип-специфические мишени, необходимые для планирования и мониторинга эффективности иммунопрофилактики с применением существующих конъюгированных вакцин, и в перспективе может быть использована для микробиологического мониторинга серотипов штаммов *S. pneumoniae*, ассоциированных с другими формами ПИ. При проведении расширенного микробиологического мониторинга, выходящего за рамки исследования серотиповой принадлежности *S. pneumoniae*, входящих в состав конъюгированных вакцин, может быть использована ПЦР-ЭФ методика. Определение серотипов штаммов и клинических образцов, содержащих ДНК *S. pneumoniae*, в совокупности с методиками генотипирования, в первую очередь МЛСТ, может быть использовано в комплексной характеристике циркулирующих штаммов без этапа высева возбудителя, что существенно расширяет возможности сбора эпидемиологически значимой информации.

Результаты генотипирования и их использование в эпидемиологическом надзоре за ГБМ

Генетическая характеристика проведена согласно существующим стандартам МЛСТ бактерий видов *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* и *H. influenzae*. Перед МЛСТ для всех возбудителей был проведен анализ эпидемиологической информации об источнике возбудителя, включающей диагноз заболевания, возраст пациента, времени и месте выделения штамма (забора клинического материала) и, в некоторых случаях, собраны данные о других микробиологических и эпидемиологических параметрах. Для всех *N. meningitidis* и *S. pneumoniae* перед МЛСТ была верифицирована принадлежность к серологическому варианту, для *N. meningitidis* проведено определение трех вариабельных фрагментов БНМ. Все полученные результаты генотипирования, за незначительными исключениями, в совокупности с необходимой эпидемиологически значимой информацией, опубликованы в общедоступной базе данных PubMLST и доступны для проведения текущего проспективного эпидемиологического надзора за ГБМ.

I. Молекулярно-биологический мониторинг в эпидемиологическом надзоре за ГФМИ

Основным направлением исследования являлся молекулярно-биологический мониторинг гипервирулентных штаммов, циркулирующих на территории Москвы после периодов эпидемиологического неблагополучия 1970-1980 годов и эпидемической вспышки ГФМИ в 1996 году. В связи с этим подавляющее большинство исследованных штаммов и клинических образцов, содержащих ДНК *N. meningitidis* серогруппы А (NmА), 220 (или 98%) было выделено в течение 1997-2013 годов. Другим направлением исследования являлось изучение *N. meningitidis* других ассоциированных с ГФМИ серогрупп, продиктованное следующими соображениями. Несмотря на то, что в наблюдаемый межэпидемический период в течение которого средняя заболеваемость ГФМИ в России не превышала 2 случая на 100000 населения, на различных территориях показатели заболеваемости могут существенно варьировать, превышая в некоторых регионах 7-8 случаев на 100000 населения, поэтому возникает необходимость молекулярно-биологического мониторинга возбудителей, циркулирующих на этих и сопредельных территориях. Также в предыдущие годы было показано, что одним из предвестников осложнения эпидемической обстановки на территории России может являться увеличение случаев МИ, обусловленных *N. meningitidis* серогруппы В (NmВ), представители которых в разные годы были не одинаковым образом вовлечены в эпидемический процесс.

Охарактеризованные NmА, несмотря на значительно большее количество включенных в исследование штаммов, отличаются от NmВ и *N. meningitidis* серогруппы С (NmС) меньшим разнообразием сиквенс-типов и клональных комплексов. У генотипированных в данном исследовании NmА, найдено 12 сиквенс-типов. От больных ГФМИ наиболее часто выделялись *N. meningitidis* с сиквенс-типами ST-75 (70 или 45%), ST-3349 (52 или 33%), и ST-2 (18 или 11,5%); остальные сиквенс-типы встречались существенно реже. NmА были неравномерно распределены по двум клональным комплексам: ST-1 complex/subgroup I/II, который объединяет 166 (93,8%) штаммов и ST-5 complex/subgroup III – 3 (1,7%) штаммов, и только для 8 (4,5%) штаммов клональный комплекс не был определен. Согласно более детальной классификации клональный комплекс ST-1 complex/subgroup I/II объединяет штаммы, входящие в генетические субгруппы X и VI, клональный комплекс ST-5 complex/subgroup III представлен единственной генетической субгруппой (представители генетической субгруппы IV в данном исследовании найдены не были).

NmА каждой генетической субгруппы не одинаковым образом вовлечены в эпидемический процесс и, следовательно, они могут детерминировать эпидемиологические параметры для наблюдаемой территории в тот или иной отрезок времени. В таблице 2 показаны все результаты МЛСТ штаммов NmА, изолированных на территории Москвы в период с 1969 до 2013 года. За указанный период на территории Москвы

происходила смена штаммов, принадлежащих трем генетическим субгруппам, что согласуется с показателями заболеваемости, указанным в таблице 2.

Таблица 2.

Результаты МЛСТ NmА, циркулировавших на территории Москвы в период с 1969 по 2013 годы

Год	*	NmА, %**	Генетические субгруппы и сиквенс-типы																		IV ***			
			III		VI								X											
			5	7	2	69	71	72	70	73	3337	68	76	75	77	78	3336	3338	3339	5803				
1969	5,6	НД	1																					
1970	26,5	НД	1			1																		
1971	13,3	НД	1																			1		
1973	15,3	НД	1																					
1977	7,9	НД	2																					
1983	7,9	58										1	1											
1984	8,4	41			2				1			2		2										
1985	7,9	34			1		1					1	1	1										
1986	6,9	25							1															
1987	5,3	24			1			1																
1988	5,5	18			5																			
1989	4	34			3																			
1993	2,2	30			1																			
1994	2,7	39		1							1		1											
1995	1,7	33		1	1					1													1	
1996	3,8	63		4							1													
1997	1,9	32		2	1										1									
1998	1,9	29			1					1	1					1								
1999	1,8	24								1														
2000	2	38			2								2			1								
2001	2,2	28			4						1													
2002	2,4	47									1						1	5						
2003	3,6	53		1							1							7						
2004	2,7	41			1													10						
2005	2	НД			2													3	1					
2006	2,3	НД			3								3					6	1					
2007	2	61			2								10					5				1		
2008	2,6	62											20					9						
2009	1,9	52											9					4						
2010	1,3	50											2					2						
2011	1,2	НД			1								3					1						
2012	1,6	46											12					1						
2013	1,6	41											10											
Всего			6	9	31	1	1	1	2	3	1	5	4	76	3	1	2	1	53	2	1	2		
Всего			15		45								142								1	2		

* Заболеваемость менингококковой инфекцией в Москве на 100000 населения.

** А, % – доля выявляемых штаммов *N. meningitidis* серогруппы А; НД – нет данных.

*** Изоляты *N. meningitidis*, для которых клональный комплекс не обозначен: ST-79 – в 1995 и ST-7221 – в 2007 годах.

Для периода 1969-1977 годов характерно присутствие штаммов генетической субгруппы III, все штаммы имеют сиквенс-тип ST-5. В 1983-1985 годах преобладали штаммы генетической субгруппы X и встречались штаммы генетической субгруппы VI, штаммы генетической субгруппы III

исчезли до 1994 года. В течение 1986-1996 годов преобладали штаммы генетической субгруппы VI. В период с 1997 и до 2002 года штаммы генетических субгрупп VI и X изолировались примерно с одинаковой частотой. Начиная с 2002 и до 2006 года отмечено преобладание штаммов генетической субгруппы X (преобладал сиквенс-тип ST-3349), и вновь с 2011 наблюдается преобладание штаммов генетической субгруппы X (преобладал сиквенс-тип ST-75).

Данные о показателе заболеваемости ГФМИ в Москве и доле выявляемых штаммов NmA свидетельствуют, что с 2002 года наблюдается увеличение напряженности эпидемической обстановки: наряду с постепенным ростом заболеваемости, увеличивается доля изолируемых штаммов серогруппы A. Возможным объяснением увеличения заболеваемости и преобладания после 2002 года NmA может служить наблюдаемая смена доминирующей генетической субгруппы на территории Москвы в 2002-2003 годах. Появление новых сиквенс-типов, преимущественно внутри генетической субгруппы X, и увеличение частоты их выделения свидетельствуют об эволюционных процессах в популяции возбудителя. Не исключено, что именно измененные штаммы генетической субгруппы X с сиквенс-типом ST-3339 явились причиной подъема заболеваемости ГФМИ в начале 2003 года. Наблюдаемое с 2009 года снижение заболеваемости ГФМИ можно объяснить уменьшением доли случаев, обусловленных NmA, практически все из которых имеют сиквенс-тип ST-75.

Штаммы, принадлежащие генетической субгруппе III с сиквенс-типом ST-7, изолировались в Москве во время вспышки МИ в 1996 году. Эпидемический очаг был выявлен в районе проживания граждан Вьетнама. Исследование штаммов во время и после эпидемической вспышки продемонстрировали появление штаммов, принадлежащих генетической субгруппе III, в 1994 году и их исчезновение с 1997 года. После 1997 года и до 2002 года выделялись штаммы генетических субгрупп VI и X, не ассоциированные ранее с активизацией эпидемического процесса и характерных для наблюдаемой межэпидемической ситуации.

Появление в начале 2003 года штамма с сиквенс-типом ST-7 не было ассоциировано с подъемом заболеваемости МИ. В 2003 году было характерно сезонное повсеместное увеличение заболеваемости, при этом эпидемического очага инфекции не было выявлено. Обнаружение штамма, принадлежащего генетической субгруппе III, может быть объяснено происхождением больного: штамм был изолирован от гражданина Узбекистана, временно проживающего в Москве. Последующий молекулярно-биологический мониторинг не выявил циркуляции NmA этой субгруппы, и при учете случаев ГФМИ эпидемического подъема заболеваемости также не было зафиксировано.

Некоторые наблюдаемые до 1997 года сиквенс-типы в последующих годах обнаружить не удалось. В 1998-2013 годах было обнаружено несколько не описанных ранее сиквенс-типов, но все они принадлежали генетическим субгруппам VI и X, характерным для территории Москвы. Выявление новых

сиквенс-типов и преобладание представителей генетической субгруппы Х свидетельствует об изменении популяции возбудителя и возможной тенденции к смене преобладающей генетической субгруппы на территории Москвы. Снижение показателя заболеваемости МИ, наблюдаемое после 2004 года, позволяет предположить, что представители генетической субгруппы Х не обладают эпидемическим потенциалом, и их выявление свидетельствует о наблюдаемом в последние годы межэпидемическом периоде со спорадическим характером заболеваемости.

Несмотря на наблюдаемый в настоящее время спад заболеваемости, проведение молекулярно-биологического мониторинга NmА необходимо для предотвращения случаев возможного осложнения эпидемической обстановки. Основным направлением микробиологического мониторинга NmА должно являться как наблюдение за относительной долей NmА, выделяемых от больных ГФМИ, так и проведение молекулярно-биологических исследований с целью мониторинга циркулирующих генетических субгрупп NmА, наблюдения за эволюционными изменениями внутри генетической субгруппы Х и своевременного обнаружения NmА генетической субгруппы III. Особое внимание эпидемиологов должно уделяться изучению случаев ГФМИ, выявляемых у жителей азиатских и африканских стран, а также случаев групповой заболеваемости МИ, обусловленных NmА, входящих в клональные комплексы, роль представителей которых в эпидемическом процессе уже охарактеризована. Выявление на территории России NmА, не входящих в известные клональные комплексы, по-видимому, не является предвестником активизации эпидемического процесса и, в то же время, диктует необходимость усиленного наблюдения за циркулирующими штаммами, ассоциированными с ГФМИ. В зависимости от принадлежности NmА, выделенного от больного ГФМИ, к определенному клональному комплексу возможно формирование прогноза развития эпидемической ситуации.

При генотипировании *N. meningitidis* серогрупп В и С на всех этапах проведения работы было найдено значительное количество новых аллелей фрагментов, используемых для проведения МЛСТ, а также сиквенс-типов, не выявляемых на других территориях: большинство исследованных штаммов и образцов, содержащих ДНК *N. meningitidis*, не принадлежали ни к одному известному на момент исследования сиквенс-типу. Меньшее количество новых аллелей и сиквенс-типов было найдено для *N. meningitidis* серогруппы W (NmW).

Согласно информации, содержащейся в базе данных PubMLST, 11 сиквенс-типов, найденных у *N. meningitidis* серогрупп В и С, были также найдены в других странах преимущественно на территории Европы. Для NmW характерно преобладание сиквенс-типа ST-11, который наблюдался у 11 из 20 представителей этой серогруппы и часто выделялся ранее в других странах.

Несмотря на то, что значительное количество сиквенс-типов у *N. meningitidis* серогрупп В и С было описано впервые, для большинства охарактеризованных *N. meningitidis* этих серогрупп, изолированных как от

больных ГФМИ, так и от здоровых носителей, удалось определить принадлежность к известному клональному комплексу, обозначаемому согласно: для 33 (56%) NmB, для 31 (60%) NmC и для 17 (85%) NmW. Выявление новых сиквенс-типов, с одной стороны, указывает на генетические особенности штаммов, циркулирующих на территории России, и, в то же время, может свидетельствовать о недостатке информации, содержащейся в базе данных PubMLST на начальных этапах исследования. С другой стороны, для большинства представителей серогрупп В и С была определена принадлежность к известным клональным комплексам, найденным на зарубежных территориях. Всего на территории России выявлена циркуляция представителей восьми клональных комплексов *N. meningitidis* серогрупп В, С и W (см. PubMLST).

Поскольку большинство сиквенс-типов у *N. meningitidis* серогрупп В и С были выявлены однократно и определить доминирующий сиквенс-тип не представляется возможным, основное направление молекулярно-биологического мониторинга представителей этих серогрупп должно заключаться в определении клональной принадлежности штаммов. Эпидемиологическая характеристика клональных комплексов, найденных у *N. meningitidis* серогрупп В, С и W, циркулирующих на территории России, представлена в таблице 3.

Таблица 3.

Эпидемиологическая характеристика клональных комплексов, найденных у *N. meningitidis* серогрупп В, С и W, циркулирующих на территории России*

Клональный комплекс	Количество изолятов**	Серогруппы	Годы циркуляции***	Территория****	Источник
ST-41/44 complex/ Lineage 3	4950	В – 78% С – 5% Другие – 1% НД – 16%	1961-2014	Европа – 85%, Америка – 6%, Азия – 3%, Африка – 2%, другая или НД – 4%	больной ГФМИ – 75%, здоровый носитель – 16%, НД – 9%
ST-18 complex	420	В – 90% С – 5% НД – 5%	1974-2014	Европа – 94%, Азия – 5%, другая или НД – 1%	больной ГФМИ – 78%, здоровый носитель – 12%, НД – 10%
ST-11 complex/ ET-37 complex	4050	С – 59% W – 25% В – 7% Другие – 2% НД – 7%	1961-2015	Европа – 79%, Африка – 9%, Америка – 8%, Азия – 3%, другая или НД – 1%	больной ГФМИ – 88%, здоровый носитель – 4%, НД – 8%
ST-174 complex	290	W – 28% Y – 28% В – 10% С – 3% Другие – 2% НД – 29%	1970-2014	Европа – 83%, Америка – 10%, Азия – 6%, другая или НД – 1%	больной ГФМИ – 54%, здоровый носитель – 21%, НД – 25%
ST-226 complex	60	В – 72% С – 3% Другие – 2% НД – 23%	1971-2014	Европа – 95%, Азия – 5%	больной ГФМИ – 36%, здоровый носитель – 47%, НД – 7%

Клональный комплекс	Количество изолятов**	Серогруппы	Годы циркуляции***	Территория****	Источник
ST-213 complex	700	В – 76% С – 2% НД – 22%	1992-2015	Европа – 94%, Америка – 2%, другая или НД – 4%	больной ГФМИ – 58%, здоровый носитель – 22%, НД – 20%
ST-37 complex	85	В – 78% С – 12% Другие – 2% НД – 8%	1960-2013	Европа – 93%, Азия – 4%, Африка – 2%, Америка – 1%	больной ГФМИ – 65%, здоровый носитель – 27%, НД – 8%
ST-865 complex	165	В – 47% С – 8% W – 7% Другие – 8% НД – 30%	1972-2014	Европа – 80%, Африка – 13%, Азия – 3%, Америка – 3%, другая или НД – 1%	больной ГФМИ – 53%, здоровый носитель – 26%, НД – 21%

* НД – нет данных.

** Округленное количество изолятов из всех стран, входящих в клональный комплекс, записи о которых содержались в базе данных PubMLST на завершающем этапе исследования.

*** Указан первый и последний год выделения штамма, подробная информация содержится в базе данных PubMLST.

**** *N. meningitidis*, охарактеризованные в нашем исследовании, отнесены в базе данных PubMLST к территории Азии.

Примерно половина охарактеризованных *N. meningitidis* серогрупп В и С распределена между двумя клональными комплексами ST-41/44 complex/Lineage 3 и ST-18 complex: 28 (47%) и 29 (55%) соответственно. Согласно информации, представленной в базе данных PubMLST, данные клональные комплексы содержат преимущественно штаммы, выделяемые при ГФМИ. Для остальных клональных комплексов, представленных в таблице 3, наличие штаммов, выделенных при ГФМИ, менее характерно, за исключением гипервирулентного клонального комплекса ST-11 complex/ET-37 complex. На особенность российских NmC указывает преимущественная принадлежность к клональному комплексу ST-41/44 complex/Lineage 3 и отсутствие штаммов, принадлежащих клональному комплексу ST-11 complex/ET-37 complex – вторым по частоте клональным комплексом, характерным для *N. meningitidis*, циркулирующих на территории Европы. На особенность российских *N. meningitidis* указывает также отсутствие представителей клонального комплекса ST-32 complex/ET-5 complex, циркуляция представителей которого также характерна для стран Европы.

Клональный комплекс ST-41/44 complex/Lineage 3 включает наибольшее количество зарубежных штаммов (около 15% всех *N. meningitidis*, записи о которых присутствуют в базе данных PubMLST), представители этого клонального комплекса были выделены практически во всех странах Западной Европы. Описаны эпидемические вспышки, вызванные штаммами клонального комплекса ST-41/44 complex/Lineage 3, на территории Европы и Америки в 1990-е годы.

Циркуляция на территории Европы *N. meningitidis*, принадлежащих клональному комплексу ST-18 complex, не характерна, о чем свидетельствуют и меньшее количество изолятов (около 1% всех *N. meningitidis*, записи о которых присутствуют в базе данных PubMLST), и данные молекулярно-биологического мониторинга.

Охарактеризованные NmW преимущественно входят в клональный комплекс ST-11 complex/ET-37 complex, который является вторым по объему клональным комплексом, характерным для зарубежных штаммов (содержит около 13% всех *N. meningitidis*, записи о которых присутствуют в базе данных PubMLST). *N. meningitidis*, принадлежащие этому клональному комплексу, ранее неоднократно выделялись в течение эпидемических подъемов заболеваемости во многих странах мира, начиная 1990-х годов. Наблюдаемая в течение многих лет невысокая частота выделения NmW от больных ГФМИ на территории России, которая составляет от 0 до 6%, не позволяет говорить об эпидемической опасности циркулирующих штаммов и свидетельствует о спорадическом характере заболеваемости на наблюдаемой территории. Возможно, клональный комплекс ST-11 complex/ET-37 complex, определяемый на основании МЛСТ, не является гомогенной группой штаммов поскольку, не исключено, что МЛСТ не обладает достаточной дискриминирующей способностью для выделения внутри этого клонального комплекса групп штаммов, имеющих различный вклад в эпидемический процесс и различный эпидемический потенциал. Данное обстоятельство должно рассматриваться как повод для инициации дальнейших разработок дополнительных молекулярно-биологических подходов, направленных на создание дополнительной классификации штаммов внутри клонального комплекса ST-11 complex/ET-37 complex с целью определения их роли в эпидемическом процессе.

В то же время увеличение в последние годы доли NmW, выделенных от больных ГФМИ, а также другие эпидемиологические параметры, такие как увеличение среднего возраста больных или увеличение количества *N. meningitidis*, принадлежащих клональному комплексу ST-11 complex/ET-37 complex, должны рассматриваться как предвестники ухудшения эпидемиологической ситуации в отношении этой серогруппы.

Заболеваемость ГФМИ на территории Москвы в период проведения молекулярно-биологического мониторинга составляла от 1,7 до 3,6 на 100000 населения. Если исключить эпидемический подъем заболеваемости в 1996 году, вызванный NmA, то показатели не превышали 3, и, в целом, были ниже эпидемического порога – 2 случаев на 100000 населения (таблица 2). Поэтому циркуляция на территории Москвы штаммов, характерных также для других территорий, типична для наблюдаемого межэпидемического периода, и выявление при последующем мониторинге штаммов с найденными сиквенс-типами, а также представителей обнаруженных клональных комплексов не является предвестником осложнения эпидемической обстановки.

Охарактеризованные в других регионах России *N. meningitidis* принадлежали пяти клональным комплексам: ST-41/44 complex/Lineage 3 (14 – NmC и 7 – NmB), ST-18 complex (4 NmB), ST-226 complex (3 NmB), ST-11 complex/ET-37 complex (3 NmW) и ST-37 complex (1 NmB). Для 34 (49%) *N. meningitidis* клональный комплекс определен не был. Значительная доля штаммов, не входящих в известные клональные комплексы, по сравнению, с выборкой московских штаммов, может объясняться незначительным количеством *N. meningitidis*, охарактеризованных на соседних территориях. С помощью метода обработки данных МЛСТ BURST охарактеризованные *N. meningitidis* были разделены на группы. В результате классификации было выделено 9 групп изолятов и 18 сиквенс-типов, не включенных в группы. Две группы соответствовали известным клональным комплексам ST-41/44 complex/Lineage 3 и ST-18 complex (см. выше), для второй по численности группы (7 сиквенс-типов у 13 изолятов), объединяющей *N. meningitidis* серогрупп В и С, клональный комплекс в базе данных PubMLST обозначен не был (центральный сиквенс-тип этой группы – ST-8499). Поэтому, несмотря на то, что согласно обозначению клональных комплексов для 30 выявленных сиквенс-типов не удастся определить известный клональный комплекс, среди российских штаммов можно выделить группу генетически близких штаммов с сиквенс-типами ST-6926, ST-9396, ST-8499, ST-9400, ST-9405, ST-9569 и ST-10438 с центральным сиквенс-типом ST-8499, также обозначаемую нами как «ST-8499 complex».

Одновременное присутствие нескольких клональных комплексов, а также выявление значительной доли штаммов, не объединенных в клональные комплексы, типично для спорадического характера заболеваемости в межэпидемический период. В то же время присутствие на наблюдаемой территории сиквенс-типов и клональных комплексов, выявленных в странах Европы, не позволяет говорить о существенных генетических отличиях российских штаммов *N. meningitidis*.

Поскольку идентификация известных представителей клональных комплексов является главной задачей молекулярно-биологического мониторинга *N. meningitidis* серогрупп В, С и W, и основная стратегия иммунопрофилактики заключается в контроле эпидемического процесса за счет элиминации только представителей капсульных гипервирулентных клональных комплексов, дальнейшие исследования должны заключаться, с одной стороны, в характеристике генетических изменений, происходящих внутри выявленных клональных комплексов и группы генетически близких *N. meningitidis* с центральным сиквенс-типом ST-8499, и, с другой стороны, в целенаправленной генетической характеристике *N. meningitidis*, циркулирующих на территориях с относительно высокой заболеваемостью. Ввиду высокого генетического разнообразия *N. meningitidis* серогрупп В и С, по сравнению с *N. meningitidis* серогрупп А и W, важным элементом молекулярно-биологического мониторинга является своевременная

публикация впервые обнаруживаемых аллелей и сиквенс-типов в совокупности с эпидемиологическими параметрами в базе данных PubMLST.

Дальнейшие исследования должны быть направлены на генотипирование *N. meningitidis*, выделенных при вспышках ГФМИ или в исследованиях групповой заболеваемости, обусловленной *N. meningitidis* серогрупп В, С и, особенно, NmW. Повышенная эпидемиологическая настороженность должна быть при анализе импортированных случаев МИ или исследовании лиц, посещавших неблагоприятные по эпидемической обстановке регионы, не исключая страны ближнего зарубежья, заболеваемость ГФМИ на территории которых и данные об эпидемиологической опасности циркулирующих возбудителей ограничены или не известны.

Молекулярно-биологический мониторинг циркулирующих клональных комплексов, основанный на определении переменных фрагментов БНМ

Характеристика антигенного разнообразия поверхностных переменных фрагментов БНМ *N. meningitidis* является дополнительным инструментом классификации, повышающим дискриминирующую способность исследования эпидемически связанных штаммов, принадлежащих одной серогруппе или одному клональному комплексу, или одному сиквенс-типу. Результаты антигенной характеристики БНМ отражают иммунные свойства популяции хозяина и, в некоторых случаях, могут быть использованы для разработки иммунопрофилактических препаратов. Поскольку появление новых антигенных вариантов у бактерий происходит быстрее, чем формирование популяционного иммунитета, своевременное определение новых антигенов возбудителя является важным эпидемиологическим инструментом, позволяющим предсказывать и в перспективе контролировать ответ популяции хозяина на появление микроорганизмов с измененными свойствами.

С использованием разработанных в данном исследовании методик был определен антигенный профиль у всех *N. meningitidis*, за редким исключением. В изученной выборке *N. meningitidis*, встречается 22 аллеля фрагмента VR1, 33 аллеля фрагмента VR2 белка PorA и 36 аллелей фрагмента VR белка FetA. Результаты антигенной характеристики переменных фрагментов БНМ демонстрируют меньшее антигенное разнообразие NmA, по сравнению с NmB и NmC: для большего количества охарактеризованных изолятов наблюдается относительно меньшее количество аллелей переменных фрагментов БНМ, для всех переменных фрагментов, найденных у NmA, можно выделить преобладающий аллель, а для изолятов – преобладающий субтип и антигенный профиль.

Анализ антигенного разнообразия и результатов МЛСТ показал, что для клональных комплексов характерно свое уникальное распределение антигенных профилей.

Все охарактеризованные NmA, входящие в клональный комплекс ST-5 complex/subgroup III, имеют субтип P1.20,9. Штамм, выделенный в период спада эпидемического неблагополучия в 1997 году, имеет антигенный профиль P1.20,9: F3-1, а завозной штамм, выделенный в 1997 – P1.20,9: F4-1. Субтип P1.20,9 и антигенный профиль P1.20,9: F3-1, за редкими исключениями, характерны только для штаммов, входящих в генетическую субгруппу III. Субтип P1.20,9 часто обнаруживается у штаммов, изолированных в странах «менингитного пояса», штаммы с этим субтипом также изолировались в некоторых европейских странах на протяжении всех пандемических волн, обусловленных генетической субгруппой III, в том числе и во время эпидемической вспышки на территории Москвы в 1996 году (за исключением одного штамма с субтипом P1.10).

Для NmA, входящих в клональный комплекс ST-1 complex/subgroup I/II характерен субтип P1.5-2,10, неоднократно также были обнаружены субтипы P1.5-2,10-67 – у 6 изолятов и P1.5,10 – у 3 изолятов, 6 субтипов были выявлены однократно. NmA с субтипом P1.5-2,10 циркулировали в Москве с 1998 года в течение всего времени исследования, они распределены между генетическими субгруппами VI и X, образующих клональный комплекс ST-1 complex/subgroup I/II. На основании анализа и сопоставления данных серосубтипирования штаммов, изолированных в 1983-1997 годах (Горлина, 1994; Королева, 2000), и результатов данной работы можно сделать вывод о том, что антигенная структура NmA, циркулирующих на территории Москвы, не претерпела принципиальных изменений: по 141 (97%) охарактеризованных NmA, входящих в клональный комплекс ST-1 complex/subgroup I/II, принадлежат семействам 5 (VR1) и 10 (VR2). Исследование фрагмента VR белка FetA дает дополнительную информацию, позволяющую проводить молекулярно-биологический мониторинг NmA, входящих в клональный комплекс ST-1 complex/subgroup I/II: для представителей генетической субгруппы VI характерен антигенный профиль P1.5-2,10: F1-5, а для представителей генетической субгруппы X – антигенный профиль P1.5-2,10: F3-5.

В целом, выявление аллелей, характерных для штаммов генетической субгруппы III, может быть предвестником осложнения эпидемической обстановки, в то время как обнаружение при проведении мониторинга субтипа P1.5-2,10 (также как и других аллелей семейств 5 и 10) будут свидетельствовать о благоприятной эпидемической ситуации, не предполагающей роста заболеваемости ГФМИ, обусловленных NmA. Смена доминирующей субгруппы внутри клонального комплекса ST-1 complex/subgroup I/II может быть оценена при определении аллелей F1-5 и F3-5 варибельного фрагмента VR белка FetA.

N. meningitidis серогрупп В и С, не объединенные в клональные комплексы, за редким исключением, имеют уникальный антигенный профиль. Представители этих серогрупп, объединенные в клональные комплексы, имеют характерное распределение антигенных профилей (таблица 4).

Таблица 4.

Антигенные характеристики клональных комплексов *N. meningitidis* серогрупп В, С и W, выделенных от больных ГФМИ

Клональный комплекс*	Антигенный профиль	
	Субтип	VR FetA
ST-41/44 complex/Lineage 3 (33)	P1.17,16-4 (27)	F3-9 (14)
ST-11 complex/ET-37 complex (14)	P1.5,2 (13)	F1-1 (12)
ST-18 complex (18)	P1.5-1,2-2 (4)	F3-6 (6)
«ST-8499 complex» (12)	P1.5-3,2-16 (10)	F3-7 (4), F3-9 (4)

* В скобках указано количество штаммов и клинических образцов, содержащих ДНК *N. meningitidis*.

В отличие от *N. meningitidis* серогрупп В и С, для циркулирующих на территории России представителей NmW клонального комплекса ST-11 complex/ET-37 complex характерен антигенный профиль P1.5,2: F3-6. Также как и определение увеличения доли нетипичной для территории России NmW и/или выявление представителей клонального комплекса ST-11 complex/ET-37 complex, или выявление аллельного профиля P1.5,2: F3-6 должны вызывать эпидемиологическую настороженность.

Как следует из данных, представленных в таблице 4, для клональных комплексов ST-41/44 complex/Lineage 3, ST-11 complex/ET-37 complex и «ST-8499 complex» можно обозначить преобладающий субтип и антигенный профиль, что может быть использовано для мониторинга *N. meningitidis*, принадлежащих этим клональным комплексам. Выявленный у российских *N. meningitidis* клонального комплекса ST-41/44 complex/Lineage 3 преобладающий антигенный профиль, в отличие от представителей клонального комплекса ST-11 complex/ET-37 complex, отличается от антигенных профилей зарубежных штаммов. В то же время для представителей клонального комплекса ST-41/44 complex/Lineage 3 не характерно преобладание какого-либо антигенного профиля: начиная с 1970-х годов наблюдалось изменение антигенных свойств штаммов этого клонального комплекса (см. базу данных PubMLST). В связи с этим мониторинг антигенных свойств штаммов, принадлежащих известным клональным комплексам, необходим как для изучения эволюционных процессов, происходящих внутри известных клональных комплексов и сиквенс-типов (в том числе с повышенными вирулентными свойствами), так и для решения задач, связанных с наблюдением за эпидемическим процессом на

территориях с различным уровнем заболеваемости, но обусловленным циркуляцией *N. meningitidis*, входящих в одинаковые клональные комплексы.

Выявленные антигенные свойства могут быть использованы для проведения молекулярно-биологического мониторинга и характеристики эволюционных процессов в циркулирующей популяции микроорганизма. Циркуляция на территории Москвы «гетерогенной» популяции штаммов *N. meningitidis* с однократно встречающимися субтипами, возникшими вследствие случайных рекомбинаций, обусловленных действием популяционного иммунитета, характерно для периодов спада заболеваемости (обусловленных, в том числе сменой доминирующей циркулирующей серогруппы) и межэпидемического периода в целом. Поэтому выявление при проведении мониторинга преобладающего антигенного профиля для *N. meningitidis* серогрупп В и С может быть расценено как неблагоприятное эпидемиологическое наблюдение.

Носительство *N. meningitidis* – распространенное явление, поэтому большая часть взрослого населения имеет антитела или клетки памяти, способные распознавать те антигены, с которыми человек встречался ранее. Следовательно, субпопуляция *N. meningitidis* у которой основные антигены БНМ, такие как FetA и PorA, представлены в «нетипичном» варианте, приобретает определенные эволюционные преимущества и, в потенциале, эпидемическую опасность. Такие варианты могут возникнуть как впервые в результате мутационного процесса, так и появиться вследствие заноса штаммов с других территорий. В связи с этим определение антигенного профиля на основании определения варибельных фрагментов БНМ является важной задачей при проведении молекулярно-биологического мониторинга *N. meningitidis*. Проведенное исследование демонстрирует, что спектр антигенных вариантов белков FetA и PorA у российских штаммов достаточно специфичен и, вероятно, сложился в годы относительного эпидемического благополучия по МИ в 1998-2014 годах. Пока этот спектр будет оставаться стабильным, можно надеяться на сохранение нынешнего уровня заболеваемости или его снижение. Задачей дальнейшего молекулярно-биологического мониторинга является своевременное обнаружение новых аллелей антигенных вариантов белков FetA и PorA в циркулирующей популяции *N. meningitidis*, способных вызывать ГФМИ, появление которых может служить предвестником ухудшения эпидемической обстановки.

II. Молекулярно-биологический мониторинг в эпидемиологическом надзоре за ГБМ, вызванными *S. pneumoniae*

Результаты МЛСТ демонстрируют отсутствие выраженной клональной структуры и высокий уровень генетического разнообразия *S. pneumoniae*, ассоциированных с ГБМ, что косвенно отражено большим количеством впервые выявленных сиквенс-типов. Индекс разнообразия по Симпсону для изученной выборки штаммов равен 98,4%, что демонстрирует отсутствие близких генетических связей между штаммами с одной стороны, и высокую

дискриминирующую способность использованного метода генотипирования с другой стороны. Анализ генетических взаимоотношений (методом BURST), позволяет выделить 11 групп генетически близких штаммов, включающих от 2 до 5 сиквенс-типов. Максимальное количество штаммов (по 12) входят в две группы, которые были выделены как в 1980-е годы, так и в течение 2008-2010 годов, поэтому нет оснований предполагать, что в популяции *S. pneumoniae*, циркулирующих на территории Москвы, за описываемые периоды произошли какие-либо существенные генетические изменения или наблюдается смена преобладающего сиквенс-типа (клона или клонального комплекса).

Сравнительный анализ полученных данных с результатами МЛСТ из PubMLST о других российских *S. pneumoniae*, выделенных преимущественно при неинвазивных формах ПИ, также не позволяет выделить в обобщенной выборке российских изолятов преобладающий сиквенс-тип. Чаще других на территории России обнаруживались *S. pneumoniae* с сиквенс-типами ST-81 – найден у 22 (7,8%) изолятов и ST-2296 – у 10 (3,6%). В ряде случаев удается обнаружить генетические связи между штаммами, охарактеризованными в данном исследовании, и штаммами, выделенными ранее, но, в большинстве случаев, эти связи единичны, и не позволяют говорить о присутствии на территории или импорте, а также о закономерностях циркуляции представителей тех или иных клональных комплексов. Поэтому генетический анализ вовлеченных в эпидемический процесс *S. pneumoniae* с помощью МЛСТ вряд ли может быть применен для анализа эпидемической обстановки или формирования прогноза заболеваемости пневмококковыми менингитами и ПИ в целом.

В связи с этим, основной задачей проведения МЛСТ *S. pneumoniae* остается выявление представителей антибиотикорезистентных клонов и мониторинг их циркуляции, что также справедливо и при наблюдении за эпидемическим процессом для всех инвазивных форм ПИ. В рамках этой задачи был проведен анализ выявленных сиквенс-типов в сопоставлении с сиквенс-типами резистентных клонов *S. pneumoniae*, определенных согласно международной номенклатуре (Pneumococcal Molecular Epidemiology Network).

Таблица 5.

Обнаруженные представители известных резистентных клонов *S. pneumoniae*

Штаммы (id)*	Серотип	Сиквенс-тип	Клон
M1094/89 (15162) M1134/88 (15163) M324/89 (15164)	3	ST-180	Netherlands3-31
M1102/10 (17796)	7F	ST-191	Netherlands7F-39
M801/08 (9940)	20F	ST-81	Spain23F-1

Штаммы (id)*	Серотип	Сиквенс-тип	Клон
M344/88 (16750)	14	ST-63	Sweden15A-25

* Обозначение штамма или образца в базе данных PubMLST; год выделения штамма обозначен через знак «/».

Выделение небольшого количества штаммов, принадлежащих известным резистентным клонам, указывает на их незначительную роль в эпидемическом процессе при анализе случаев ГБМ. В сочетании с определением серотипа МЛСТ *S. pneumoniae* является необходимым дополнительным микробиологическим инструментом для идентификации как уже описанных, так и новых не выявленных ранее резистентных клонов *S. pneumoniae*, появление и распространение которых, в первую очередь для других ПИ, нельзя исключать. Роль молекулярно-биологического мониторинга с использованием метода МЛСТ в эпидемиологическом надзоре за ГБМ, вызванными *S. pneumoniae*, в сложившейся ситуации незначительна ввиду малой информативности.

Невысокие показатели заболеваемости ГБМ, обусловленных *S. pneumoniae*, в России и мире на протяжении долгого периода наблюдения свидетельствует об отсутствии клональных комплексов *S. pneumoniae*, способных вызывать эпидемические подъемы заболеваемости ГБМ (что отличает ГБМ от других форм ПИ). Поэтому основным направлением молекулярно-биологического мониторинга *S. pneumoniae*, вызвавших ГБМ, должна быть характеристика серотипового состава циркулирующих штаммов с целью планирования и оценки эффективности программ по иммунопрофилактике.

III. Молекулярно-биологический мониторинг в эпидемиологическом надзоре за ГБМ, вызванными H1b

Значительная доля аллелей и большинство сиквенс-типов, обнаруженных при проведении генотипирования штаммов и клинических образцов, содержащих H1b, были найдены впервые. На завершающем этапе исследования информация о результатах генотипирования российских H1b составляла около 19% всех результатов МЛСТ H1b, опубликованных в базе данных PubMLST. Из 19 сиквенс-типов 11 были выявлены однократно; преобладали сиквенс-типы ST-6 и ST-92. Индекс разнообразия по Симпсону для российских H1b равен 81,3%, что говорит о выраженной клональной структуре данной группы микроорганизмов.

Исследованные штаммы и клинические образцы, содержащие H1b, за редким исключением, были выделены от детей в возрасте до 5 лет, больных H1b-менингитом. Различия эпидемиологических параметров заключались в территориях, на которых циркулировали возбудители, и времени их выделения. Сопоставление результатов генотипирования трех групп

российских *Nib* с изолятами, охарактеризованными за рубежом и присутствующими в базе данных PubMLST, представлено в таблице 6.

Таблица 6.

Частота обнаружения сиквенс-типов у российских и зарубежных *Nib*.

Сиквенс- типы*	Территория			
	Россия**			Зарубежные страны
	Москва (1999-2002 гг.)	Москва (2007-2009 гг.)	Другие регионы (2005-2008 гг.)	
ST-6	20	9	6	179
ST-92	8	9	13	11
ST-95	2	7	4	2
ST-80	1	5	2	11
ST-78	4	–	1	–
ST-93	1	1	1	2
ST-563	–	2	1	–
Выявленные однократно	2	4	5	172

* В таблицу внесены только те сиквенс-типы, которые были выявлены у 3 и более изолятов; однократно выявленные сиквенс-типы в таблице не указаны.

Из таблицы следует, что наиболее характерным сиквенс-типом для *Nib* является сиквенс-тип ST-6, который образует клональный комплекс, объединяющий 114 или 97% штаммов *Nib*, циркулирующих на территории России; остальные 4 или 3% *Nib* имеют сиквенс-тип ST-93. Наблюдаемое распределение российских *Nib* по клональным комплексам аналогично клональной структуре *Nib*, выявленной на зарубежных территориях: зарубежные *Nib* также неравномерно распределены по двум клональным комплексам, обозначенным как A1/A2 (соответствует клональному комплексу, образованному ST-6) и B1b (включает сиквенс-тип ST-93). Несмотря на типичную для *Nib* клональную организацию, некоторые сиквенс-типы за рубежом обнаружены не были. Невысокая частота их выявления не может говорить о высоком эпидемическом потенциале штаммов с этими сиквенс-типами.

Наблюдаемая в период с 1999 по 2001 год заболеваемость *Nib*-менингитами у детей до 5-летнего возраста в Москве составила 5,7 случаев в год на 100000 детей до 5 лет, что ниже по сравнению со странами Европы и Америки – порядка 10-25 случаев в той же популяции соответственно до введения вакцинопрофилактики. Более низкую заболеваемость вряд ли можно объяснить циркуляцией на территории Москвы отличных от европейских и американских, менее вирулентных штаммов *Nib*, поскольку большинство московских штаммов входят в клональный комплекс A1/A2, представители которого также наиболее часто выделяются на территориях Европы и США. Невысокая заболеваемость *Nib*-менингитами на территории Москвы, скорее всего, связана с социальными и иммунологическими особенностями

популяции хозяина, определяющими характер эпидемического процесса Hib-инфекции, на территории Москвы.

Охарактеризованные российские Hib, циркулирующие вне Москвы, также неравномерно распределены по двум клональным комплексам аналогично московским и зарубежным штаммам. Различия в частотах встречаемости сиквенс-типов могут объясняются особенностями изученных выборок: московские штаммы были выделены на одной территории в короткий промежуток времени, в то время как максимальное количество штаммов, выделенных на территории одного региона, не превышает шести. Наблюдаемые различия в эпидемической обстановке на территориях некоторых регионов России объясняются, по-видимому, иными причинами, не связанными с генотипом возбудителя. Например, Hib, выделенные на территориях с высокой заболеваемостью Hib-менингитами (и ГБМ в целом) имеют либо сиквенс-типы, выявляемые на других территориях с более низкой заболеваемостью (сиквенс-тип ST-92), либо сиквенс-типы, не имеющие существенных отличий от уже известных сиквенс-типов клонального комплекса с центральным сиквенс-типом ST-6 (сиквенс-типы ST-561 и ST-564).

Показатели заболеваемости Hib-менингитом на территориях, охваченных исследованием с использованием метода Hib-RAT (Платонов, Николаев, 2007), также демонстрировали относительно невысокие значения по сравнению с заболеваемостью, наблюдаемой или наблюдавшейся на территориях других стран до введения массовой вакцинации против Hib в Африке, Америке, Австралии и других странах Тихоокеанского бассейна, на севере и северо-западе Европы. Средняя заболеваемость Hib-менингитом в регионах России составляла 7,3 случая на 100000 детей до 5 лет в год. Данный показатель не сильно отличается от заболеваемости на территории Москвы, что также не позволяет говорить о циркуляции на территориях штаммов с повышенными или отличающимися вирулентными свойствами. В то же время относительно высокая заболеваемость в некоторых регионах России, которая составляет около 20 случаев на 100000 детей до 5 лет, не превышает заболеваемость в той же возрастной группе на американском континенте до введения программ по вакцинопрофилактике. Это подтверждает предположение о том, что более низкая заболеваемость на территории России не связана с особенностями циркулирующих возбудителей.

Небольшое количество клональных комплексов, характерное для популяции Hib в целом, говорит о невысоком уровне рекомбинаций в популяции и, как следствие, низком эпидемическом потенциале данного вида бактерий, что подтверждается отсутствием данных о масштабных эпидемиях Hib-инфекции (за исключением отдельных популяций коренных жителей Америки и Австралии) и преимущественно спорадическим характером заболеваемости Hib-менингитами. Наибольшее эпидемиологическое значение представляет наблюдение за группами населения, вовлеченными в эпидемический процесс, а именно за группами детей раннего возраста.

Важной задачей эпидемиологического надзора является мониторинг штаммов Hib, ассоциированных с ГБМ. Наблюдение за популяцией возбудителя является необходимым этапом наблюдения за эпидемическим процессом, поскольку нельзя исключить появление новых штаммов с повышенными вирулентными свойствами. Поскольку для популяции Hib все эволюционные изменения происходят преимущественно внутри клонального комплекса A1/A2 особое внимание должно быть уделено мониторингу штаммов, входящих в этот клональный комплекс.

ВЫВОДЫ

1. Выявленные генетические и антигенные особенности возбудителей, вовлеченных в эпидемический процесс, легли в основу углубленного молекулярно-биологического мониторинга, проводимого в 2005-2015 годах, который позволил расширить представления о клональной структуре возбудителей и охарактеризовать эволюционные процессы в бактериальных популяциях. В зависимости от особенностей эпидемического процесса, обусловленного различными возбудителями, определена роль молекулярно-биологического мониторинга в системе эпидемиологического надзора за ГБМ и определены направления проведения эпидемиологической диагностики с целью отслеживания появления или импорта на наблюдаемую территорию новых штаммов возбудителей, что в целом повышает эффективность эпидемиологического надзора за ГБМ.

2. Разработаны и апробированы варианты молекулярно-биологических методов мониторинга антигенных и генетических свойств возбудителей ГБМ – бактерий видов *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* и *H. influenzae*, позволяющие проводить характеристику микроорганизмов, циркулирующих на территории России. Методики для определения основных капсульных антигенов позволяют определять серогруппу 98% *N. meningitidis* и не менее 75% серотипов *S. pneumoniae*, вызвавших ГБМ. Разработанные методики позволяют проводить характеристику как выделенных штаммов, так и нежизнеспособных микроорганизмов, содержащейся в клиническом материале, что существенно расширяет возможности мониторинга антигенных и генетических свойств циркулирующих возбудителей в рамках проведения эпидемиологических исследований.

3. Молекулярно-биологический мониторинг популяции NmA, циркулирующих на территории Москвы в 1998-2013 годах, выявил отсутствие штаммов известного гипервирулентного клонального комплекса ST-5 complex/subgroup III, что согласуется с данными о невысоком показателе заболеваемости в эти годы. Спорадический характер заболеваемости, обусловленной NmA, объясняется преобладанием представителей генетических субгрупп X и VI, входящих в клональный комплекс ST-1 complex/subgroup I/II, но редко встречающихся в иных регионах мира. Эволюционные изменения NmA выражаются в смене преобладающей

генетической субгруппы после 2002 года (с VI на X), а также в смене преобладающего сиквенс-типа внутри генетической субгруппы X после 2008 года (с ST-3339 на ST-75). Определение принадлежности к клональному комплексу является ведущим направлением молекулярно-биологического мониторинга возбудителей ГФМИ, обусловленных NmA.

4. Особенности российских NmB и NmC заключаются в отсутствии представителей некоторых эпидемически опасных клональных комплексов, характерных для европейских стран (в частности представителей клонального комплекса ST-32 complex/ET-5 complex) и циркуляции «нового» эндемического клонального комплекса – группы генетически близких штаммов с центральным сиквенс-типом ST-8499. Для российских популяций NmB и NmC характерен интенсивный рекомбинационный процесс, приводящий к изменению и нестабильности генетических характеристик штаммов и клонов. Большинство эволюционных изменений происходят в пределах известных клональных комплексов, из которых преобладают *N. meningitidis*, входящие в клональные комплексы ST-41/44 complex/Lineage 3 и ST-18 complex, характерные также для европейских стран. Одновременное присутствие нескольких клональных комплексов, а также выявление значительной доли генетически гетерогенных штаммов, не объединенных в клональные комплексы, характерно для спорадического характера заболеваемости в наблюдаемый межэпидемический период.

5. Для NmW, циркулирующих на территории России, характерна клональная структура и преобладание представителей клонального комплекса ST-11 complex/ET-37 complex, считающегося гипервирулентным, и, в частности, штаммов с сиквенс-типом ST-11. Поскольку заболеваемость ГФМИ, вызванная NmW, в период проведенного исследования в России была сравнительно невысока, следует предположить, что эпидемический потенциал этого клона в российских условиях пока не был реализован, хотя само его присутствие на территории вызывает настороженность и требует постоянного усиленного мониторинга популяции NmW.

6. Отсутствие выраженных подъемов заболеваемости ГБМ, обусловленных *S. pneumoniae*, и наблюдаемый стабильный характер эпидемического процесса согласуются с отсутствием преобладающего антигенного и генетического варианта *S. pneumoniae*, циркулирующих на территории России. Для штаммов *S. pneumoniae*, обуславливающих ГБМ (и другие формы инвазивных ПИ) на территории России, наблюдается отсутствие выраженной клональной структуры, поскольку отсутствуют преобладающие сиквенс-типы или клональные комплексы. В связи с этим более информативным методом молекулярно-биологического мониторинга *S. pneumoniae* является определение серотипа, в то время как МЛСТ является дополнительным методом, позволяющим своевременно выявлять единичные штаммы или клоны *S. pneumoniae*, которые потенциально могут быть антибиотикорезистентными.

7. Более низкая заболеваемость на территории Москвы ГБМ, обусловленным *Nib*, по сравнению со странами Европы и Америки (до введения в них программ по вакцинопрофилактике *Nib* инфекции), не связана с особенностями штаммов, циркулирующих на российской территории, поскольку клональная структура *Nib*, циркулировавших на территории Москвы и в некоторых других регионах России, аналогична клональной структуре популяций *Nib*, характерных для зарубежных стран. Течение эпидемического процесса при гемофильной инфекции, предположительно, определяется как особенностями популяционного иммунитета у детей младшего возраста, являющихся основной группой риска, так и иными, еще не изученными особенностями эпидемического процесса при этой инфекции, не связанными с генетическими особенностями *Nib*.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Рекомендуется внедрить разработанные варианты молекулярно-биологические методов, в первую очередь методики для антигенной характеристики капсульных антигенов *N. meningitidis* и *S. pneumoniae*, в практику диагностических и научно-исследовательских учреждений России с целью повышения качества и точности оценки параметров течения эпидемического процесса, мониторинга эффективности иммунопрофилактических мероприятий и проспективной оценки эпидемической ситуации.

2. Молекулярно-биологический мониторинг основных возбудителей ГБМ должен базироваться, в первую очередь, на расшифровке этиологической структуры возбудителей и, во вторую очередь, на антигенной характеристике возбудителей. Проведение генетической характеристики методом МЛСТ является обязательным компонентом эпидемиологического надзора за ГФМИ и дополнительным для эпидемиологического надзора за ГБМ, вызванными *S. pneumoniae* и *H. influenzae*. Метод МЛСТ является важным инструментом комплексного эпидемиологического изучения эпидемически связанных случаев и групповой заболеваемости ГБМ, характеристики возбудителей, ассоциированных с особо тяжелыми или летальными случаями ГБМ, а также анализа случаев заболеваний у привитых лиц, обусловленных неэффективностью вакцинопрофилактики.

3. Метод МЛСТ необходимо использовать для генотипирования возбудителей ГБМ при анализе импортированных случаев заболевания и исследовании клинического материала от инфицированных лиц, посещавших неблагоприятные по эпидемической обстановке регионы, с целью предотвращения распространения гипервирулентных штаммов или штаммов, ассоциированных с резистентностью к антибиотикам. Увеличение случаев ГБМ, обусловленных микроорганизмами, принадлежащих новым или уже описанным гипервирулентным клональным комплексам, должно рассматриваться как предвестник осложнения эпидемической ситуации.

4. Молекулярно-биологический мониторинг *N. meningitidis* должен обеспечить как своевременное выявление циркуляции представителей уже известных гипервирулентных клональных комплексов (в частности, клональных комплексов ST-5 complex/subgroup III и ST-11 complex/ET-37 complex), так и проспективное наблюдение за эволюционными изменениями возбудителей, циркулирующих на различных территориях, и, в первую очередь, на территориях регионов с повышенными показателями заболеваемости. Эффективный молекулярно-биологический мониторинг *N. meningitidis*, направленный на обнаружение представителей известных клональных комплексов и детекцию новых штаммов с измененными антигенными свойствами, может быть также проведен на основании определения антигенного профиля по трем вариабельным фрагментам БНМ.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

1. Проведение молекулярно-биологического мониторинга серогрупп *N. meningitidis*, вызвавших ГФМИ, с целью определения доли случаев, обусловленных *N. meningitidis* серогрупп А и W в динамике.

2. Проведение молекулярно-биологического мониторинга *S. pneumoniae* с целью определения спектра циркулирующих штаммов и контроля эффективности используемых на территории России вакцин.

3. Расширение спектра детектируемых серотип-специфических мишеней с целью увеличения процента определяемых серотипов *S. pneumoniae* в образцах СМЖ и определение доли контролируемых с помощью вакцинации ГФМИ, обусловленных *N. meningitidis* серогруппы Y.

4. Регулярный молекулярно-биологический мониторинг циркулирующих клональных комплексов NmA и проведение генотипирования возбудителей, изолированных в очагах ГФМИ.

5. Применение упрощенного и экономически целесообразного молекулярно-биологического мониторинга *N. meningitidis*, основанного на определении антигенов БНМ, с целью увеличения доли охарактеризованных возбудителей, вовлеченных в эпидемический процесс.

6. Мониторинг циркуляции резистентных клонов *S. pneumoniae* на основании МЛСТ штаммов, выделенных от больных инвазивными формами ПИ. Разработка дополнительных основанных на ПЦР методик, направленных на идентификацию резистентных штаммов *S. pneumoniae*.

7. Разработка подходов, основанных на массовом параллельном секвенировании, с целью повышения дискриминирующей способности молекулярно-биологического мониторинга возбудителей ГБМ и поиска генетических локусов, ассоциированных с инвазивными формами инфекции.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ

1. Королева, И.С. Эпидемиологический надзор за гнойными бактериальными менингитами: материалы 20-летних наблюдений / И.С. Королева, А.А. Демина, А.Е. Платонов, Г.В. Белошицкий, А.М. Грачева, Л.В. Спирихина, И.М. Закроева, **К.О. Миронов**, Р.Н. Быкова // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2003. – № 5. – С. 10-13.
2. Платонов, А.Е. Характеристика московских штаммов *Haemophilus influenzae* типа b методом мультилокусного секвенирования-типирования / А.Е. Платонов, **К.О. Миронов**, С.Б. Яцышина, И.С. Королева, О.В. Платонова, А.Е. Гущин, Г.А. Шипулин // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2003. – № 2. – С. 21-25.
3. **Миронов, К.О.** Генетическое субтипирование *Neisseria meningitidis* / К.О. Миронов, А.Е. Платонов, Г.А. Шипулин, А. van der Ende, И.С. Королева // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2005. – № 3. – С. 23-28.
4. **Миронов, К.О.** Анализ московской популяции штаммов *Neisseria meningitidis* методом мультилокусного секвенирования-типирования / К.О. Миронов, А.Е. Платонов, И.С. Королева, Г.А. Шипулин // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2006. – № 2. – С. 31-36.
5. **Миронов, К.О.** Генетические взаимоотношения московских и зарубежных штаммов *Haemophilus influenzae* серотипа b / К.О. Миронов, А.Е. Платонов, И.С. Королева, Г.А. Шипулин // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2006. – № 6. – С. 14-20.
6. Королева, И.С. О современных особенностях менингококковой инфекции в Москве / И.С. Королева, Г.В. Белошицкий, И.М. Закроева, **К.О. Миронов**, Г.А. Шипулин, А.Е. Платонов, И.Н. Лыткина, А.П. Пяева, В.Л. Заикин, Л.Я. Соловьева, Т.А. Тагаченкова // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2008. – № 3. – С. 21-25.
7. **Миронов, К.О.** Генетические субгруппы бактерий вида *Neisseria meningitidis* серогруппы А, выделенных от больных генерализованными формами менингококковой инфекции на территории Москвы в 1969-2006 гг. / К.О. Миронов, А.Е. Платонов, И.С. Королева, В.Л. Заикин, Л.Я. Соловьева, С.И. Браславская, Г.А. Шипулин // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2008. – № 1. – С. 7-12.
8. **Миронов, К.О.** Генотипирование *Neisseria meningitidis* / К.О. Миронов, Г.А. Шипулин, И.С. Королева, А.Е. Платонов // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2009. – № 4. – С. 18-21.
9. Платонов, А.Е. Проспективное популяционное изучение заболеваемости гнойными менингитами у детей в возрасте до 5 лет в 8 городах России / А.Е. Платонов, М.К. Николаев, И.С. Королева, **К.О. Миронов**, О.В. Платонова, М.Л. Яковенко, Л.П. Кошелева, Т.В. Честнова, О.Н. Княгина, Т.Г. Корсакова, Т.А. Кириллова, С.И. Демин, М.Ю. Тарасов, Е.М. Ибрагимов // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2009. – № 4. – С. 33-43.

10. Тагаченкова, Т.А. Менингококковое носительство в очагах менингококковой инфекции / Т.А. Тагаченкова, И.С. Королева, **К.О. Миронов**, И.Н. Лыткина, А.П. Пяева, И.М. Закроева, В.Л. Заикин, Л.Я. Соловьева // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2009. – № 4. – С. 6-10.
11. **Миронов, К.О.** Мониторинг бактерий вида *Neisseria meningitidis* на основании последовательностей варьируемых фрагментов поверхностных белков FetA и PorA / К.О. Миронов, А.Е. Платонов, И.С. Королева, Т.А. Тагаченкова, И.М. Закроева, В.Л. Заикин, Л.Я. Соловьева, С.И. Браславская, Г.А. Шипулин // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2009. – № 3. – С. 23-27.
12. Королева, И.С. Основные направления и результаты научных исследований по проблеме менингококковой инфекции и гнойных бактериальных менингитов / И.С. Королева, Г.В. Белошицкий, Л.В. Спирихина, А.М. Грачева, И.М. Закроева, Т.А. Тагаченкова, М.А. Королева, **К.О. Миронов**, Г.А. Шипулин // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2009. – № 2. – С. 40-44.
13. **Миронов, К.О.** Генетическая характеристика штаммов *Haemophilus influenzae* серотипа b, изолированных в регионах России / К.О. Миронов, А.Е. Платонов, М.К. Николаев, И.С. Королева, Г.А. Шипулин // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2010. – № 1. – С. 24-28.
14. **Миронов, К.О.** Генетические характеристики бактерий *Haemophilus influenzae* серотипа b, вызывавших гнойный менингит у детей в г. Москве в 2007-2009 гг. / К.О. Миронов, Т.А. Тагаченкова, А.Е. Платонов, М.Л. Яковенко, И.С. Королева, Г.А. Шипулин // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2010. – № 4. – С. 3-8.
15. **Миронов, К.О.** Идентификация и серотипирование российских штаммов *Streptococcus pneumoniae* с применением методик, основанных на ПЦР / К.О. Миронов, А.Е. Платонов, Р.С. Козлов // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2011. – Том 13, № 4. – С. 304-313.
16. Белошицкий, Г.В. Фенотипическая и генотипическая характеристика штаммов пневмококков, выделенных от больных пневмококковым менингитом / Г.В. Белошицкий, И.С. Королева, **К.О. Миронов** // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2011. – Т. 13, № 3. – С. 261-266.
17. **Миронов, К.О.** Генетическая характеристика московских штаммов *Neisseria meningitidis* / К.О. Миронов, А.Е. Платонов А.Е., И.С. Королева, Т.А. Тагаченкова, С.И. Браславская, Г.А. Шипулин // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2011. – Т. 13, № 2. – С. 135-148.
18. **Миронов, К.О.** Генетическая характеристика штаммов *Neisseria meningitidis*, выделенных от здоровых носителей в очагах менингококковой инфекции / К.О. Миронов, Т.А. Тагаченкова, И.С. Королева, А.Е. Платонов,

Г.А. Шипулин // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2011. – № 2. – С. 22-29.

19. Королева, И.С. Серотиповая характеристика пневмококков, выделенных от больных пневмококковым менингитом / И.С. Королева, Г.В. Белошицкий, **К.О. Миронов** // Вопросы современной педиатрии. – 2012. – Т. 11, № 4. – С. 122-126.

20. **Миронов, К.О.** Генетическое типирование *Neisseria meningitidis*, циркулирующих в регионах России / К.О. Миронов, М.А. Королева, А.Е. Платонов, И.С. Королева, Г.А. Шипулин // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2013. – № 2. – С. 36-40.

21. Королева, И.С. Менингококковая инфекция и гнойные бактериальные менингиты в Российской Федерации: десятилетнее эпидемиологическое наблюдение / И.С. Королева, Г.В. Белошицкий, М.А. Королева, И.М. Закроева, Л.В. Спирихина, **К.О. Миронов**, Г.А. Шипулин // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. – 2013. – № 2. – С. 15-20.

22. **Миронов, К.О.** Методика ПЦР в режиме реального времени для определения серотипов *Streptococcus pneumoniae* / К.О. Миронов, А.Е. Платонов, Е.А. Дунаева, В.И. Кусева, Г.А. Шипулин // Журн. микробиол. – 2014. – № 1. – С. 41-48.

23. Козлов, Р.С. Результаты исследования распространённости в России внебольничной пневмонии и острого среднего отита у детей в возрасте до 5 лет (PAPIRUS). Роль *S. pneumoniae* и *H. influenzae* в этиологии данных заболеваний / Р.С. Козлов, О.И. Кречикова, А.А. Муравьёв, А.Е. Платонов, **К.О. Миронов**, Е.А. Дунаева, В.К. Таточенко, М.Е. Щербаков, В.Ю. Родникова, В.В. Романенко, К.Н. Сафьянов и группа исследователей PAPIRUS // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2013. – Т. 15, № 4. – С. 246-260.

24. **Миронов, К.О.** Методика для определения серогрупп А, В, С и W *Neisseria meningitidis* методом ПЦР в режиме реального времени / К.О. Миронов, А.Е. Платонов, О.П. Дрибноходова, В.И. Кусева, Г.А. Шипулин // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2014. – № 6. – С. 35-42.

25. Белошицкий, Г.В. Генетические типы инвазивных пневмококков в Москве / Г.В. Белошицкий, **К.О. Миронов**, И.С. Королева, Г.А. Шипулин // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2014. – Т. 78, № 5. – С. 20-30.

26. Королева, М.А. Эпидемиологический мониторинг за гнойными бактериальными менингитами в историческом и современном аспектах / М.А. Королева, В.И. Покровский, **К.О. Миронов**, А.Е. Платонов, Г.А. Шипулин, Г.В. Белошицкий, И.М. Закроева, А.А. Мельникова, Н.А. Кошкина, И.С. Королева // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. – 2014. – № 2. – С. 52-56.

27. Матосова, С.В. Молекулярно-биологический мониторинг *Neisseria meningitidis* на территории Москвы в период с 2011 по 2015 г. / С.В. Матосова,

К.О. Миронов, А.Е. Платонов // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. – 2016. – № 2. – С. 4–9.

28. **Миронов, К.О.** Клональные комплексы *Neisseria meningitidis*, циркулирующие на территории России, и их роль в эпидемическом процессе менингококковой инфекции / К.О. Миронов // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. – 2016. – № 6. – С. 52-61.

29. **Миронов, К.О.** Мультилокусное секвенирование-типирование *Haemophilus influenzae* серотипа b в эпидемиологическом надзоре за Hib-менингитами на территории России / К.О. Миронов // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. – 2017. – № 2. – С. – 44-49.

Другие публикации

1. Платонов, А.Е. Эпидемиология менингококковой инфекции в России и мире на современном этапе / А.Е. Платонов, И.С. Королева, **К.О. Миронов** // Вакцинация. – 2004. – № 1. С. 6-7.

2. **Миронов, К.О.** Результаты генетической характеристики *Neisseria meningitidis* и *Haemophilus influenzae* серотипа b (Hib) / К.О. Миронов, Т.А. Тагаченкова, И.С. Королева, А.Е. Платонов, Г.А. Шипулин // Медицинский алфавит. Эпидемиология и санитария. – 2010. – №2. – С. 13-14.

3. Tatochenko V. Streptococcus pneumoniae serotype distribution in children in the Russian Federation before the introduction of pneumococcal conjugate vaccines into the National Immunization Program. / V. Tatochenko, S. Sidorenko, L. Namazova-Baranova, N. Mayanskiy, T. Kulichenko, A. Baranov, Y. Lobzin, S. Kharit, R. Kozlov, I. Andreeva, A. Muravjev, A. Chagaryan, I. Koroleva, G. Beloshitskiy, **K. Mironov**, E. Degtyareva, R.R. Reinert // Expert Rev. Vaccines. – 2014. – Vol. 13, Iss. 2. – P. 257-264.

4. Глава «Менингококковая инфекция». Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней: Практическое руководство / Под ред. академика РАМН Г.Г.Онищенко, академика РАМН В.В.Кутырева. – Изд. 2-е переработанное и дополненное. – М.: ЗАО «Шико», 2013. – 560 с. С. 421-440.

Публикации в сборниках научных трудов и тезисах конференций: 67 отечественных и 6 зарубежных.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БНМ – белок наружной мембраны

ГБМ – гнойный бактериальный менингит

ГФМИ – генерализованная форма менингококковой инфекции

МИ – менингококковая инфекция

МЛСТ – мультилокусное секвенирование-типирование

ПИ – пневмококковая инфекция

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЦР-PPV – полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

ПЦР-ЭФ – полимеразная цепная реакция с электрофоретической детекцией результата амплификации

BURST – based upon related sequence types, метод (для обработки данных МЛСТ), основанный на анализе родственных сиквенса-типов

Hib – *Haemophilus influenzae* серотипа b

NmA – *Neisseria meningitidis* серогруппы A

NmB – *Neisseria meningitidis* серогруппы B

NmC – *Neisseria meningitidis* серогруппы C

NmW – *Neisseria meningitidis* серогруппы W