

Использование методов генотипирования *Neisseria gonorrhoeae*

М.В. Шpileвая, О.А. Образцова, А.В. Честков

ФГБУ «Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии» Минздрава России
107076, Москва, ул. Короленко, д. 3, стр. 6

В обзоре литературы рассматриваются современные методы генотипирования *N. gonorrhoeae*. Обсуждаются характеристика и возможности каждого метода, определены области его применения в рамках типирования *N. gonorrhoeae*. Описанные методы позволяют повысить уровень диагностики гонококковой инфекции, прогнозировать изменение антибиотикоустойчивости, проследить пути передачи и распространения инфекции, а также исследовать процессы молекулярной эволюции микроорганизма. Информация, полученная с использованием современных точных методов генотипирования *N. gonorrhoeae*, может быть применена в разработке стратегии по охране репродуктивного здоровья населения.

Ключевые слова: ***Neisseria gonorrhoeae*, генотипирование, NG-MAST, MLST, биочип.**

Контактная информация: aniram1970@list.ru. Вестник дерматологии и венерологии 2015; (6): 33—40.

The use of current genotyping assay methods for *Neisseria gonorrhoeae*

M.V. Shpilevaya, O.A. Obratsova, A.V. Chestkov

State Research Center of Dermatovenereology and Cosmetology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation
Korolenko str., 3, bldg 6, Moscow, 107076, Russia

The review deals with up-to-date genotyping assay methods of *Neisseria gonorrhoeae*. The review covers the characteristics and features of each method, application areas of genotyping assay of *Neisseria gonorrhoeae*. The methods described enable to upgrade the diagnostics of gonococcal infection, predict its antibiotic resistance, trace the contagion and channels of the infection as well as study the processes of molecular evolution of the microorganism. Information obtained based on up-to-date *N. gonorrhoeae* genotyping assay methods can be used in developing the reproductive health strategy of the population.

Key words: ***Neisseria gonorrhoeae*, genotyping assay, NG-MAST, MLST, biochip.**

Corresponding author: aniram1970@list.ru. Vestnik Dermatologii i Venerologii 2015; 6: 33—40.

■ Гонококковая инфекция является одной из самых распространенных инфекций, передаваемых половым путем (ИППП), ежегодно в мире диагностируется более 50 млн новых случаев заболевания [1]. Возбудитель *Neisseria gonorrhoeae* — грамотрицательный неспорообразующий диплококк — характеризуется пластичностью, высокой скоростью как фенотипических, так и генетических адаптивных изменений. Механизмы адаптации связаны с внутри- и межвидовой ДНК-трансформацией, приводящей к значительной вариабельности полисахаридных и белковых компонентов наружной мембраны (например, ора-белки, белки поринов). Генетический полиморфизм *N. gonorrhoeae* создает сложности в диагностике гонококковой инфекции, а также определяет реализацию механизмов лекарственной устойчивости и способствует повышению вирулентности микроорганизма. Так, в 2012 г. появилось сообщение о выделении изолятов *N. gonorrhoeae*, несущих ген *por A* менингококков [2]; в 2014 г. из 10 стран получены сообщения о неэффективности лечения гонококковой инфекции цефалоспоридами третьего поколения в связи с формированием резистентности [3]. Все это рассматривается здравоохранением разных стран как угроза репродуктивному здоровью населения, поэтому актуальной представляется разработка и внедрение в практику максимально точных, быстрых, сравнительно недорогих методов для идентификации *N. gonorrhoeae*, определения чувствительности к антибактериальным препаратам, а также изучения динамики бактериальных популяций на различных уровнях.

Классическая лабораторная диагностика, основанная на культивировании микроорганизмов, изучении особенностей их метаболизма, различной чувствительности к антибиотикам, антигенной неоднородности белка внешней мембраны порина (PorB), позволяет различать аукоциты и серовары *N. gonorrhoeae*, но эти методы не подходят для изучения и оценки структуры бактериальных популяций и эволюционных связей. Кроме того, при использовании методов классической лабораторной диагностики возможны ошибки при видовой идентификации нейссерий.

Ограничения спектра точек приложения классических культуральных методов лабораторной диагностики разрешаются применением в лабораторной практике современных высокоточных молекулярно-биологических методов исследования [4—7]. Прежде всего фенотипирование вытесняется генотипированием, в основе которого лежит определение генетических мишеней, узкоспецифичных для микроорганизмов, что позволяет достичь практически 100% точности идентификации [8]. Одни методы диагностики основываются на различиях внутри полного генома микроорганизма, другие — на вариациях внутри его специфических областей. В зависимости от выбранного метода типирование гонококков позволяет решать ши-

рокий круг проблем — от выявления штаммов с уникальными биологическими свойствами (повышенной вирулентностью, резистентностью к антимикробным препаратам) до мониторинга эволюционных изменений в популяциях, происходящих на уровне генома возбудителя и оценки их эпидемиологической значимости [9]. Методы генотипирования микроорганизмов можно разделить на две группы: методы, основанные на секвенировании ДНК, и методы, базирующиеся на гель-электрофорезе ДНК.

Методы, основанные на секвенировании ДНК *porB*-секвенирование

PorB — белок наружной мембраны *N. gonorrhoeae*, изменчивость которого определяет разнообразие сероваров данного микроорганизма. Белок кодируется единственной копией гена, состоящей примерно из 1000 п.н. *porB*-секвенирование базируется на анализе любой последовательности гена *porB*, которая может включать как фрагменты, затрагивающие наиболее вариабельные области, так и полную геномную последовательность. В Интернете существует международная база данных сиквенс-типов *N. gonorrhoeae*, построенная на основе секвенирования ограниченного участка ДНК *porB* (490 п.н.) с использованием метода NG-MAST. База данных имеет ограниченное применение, поскольку недостаточна для однозначной дифференциации штаммов и при необходимости дополняется другими методами (NG-MAST, PFGE или ора-типированием). Тем не менее метод применяется для описания популяций *N. gonorrhoeae* в регионе, для прослеживания сексуальных связей, для исследования причин неудачного лечения [10].

Другие методы, базирующиеся на генотипировании *porB*, — пиросеквенирование и биотиновое мечение — не получили широкого распространения из-за ограниченной доступности оборудования. Для всех описанных методов в равной степени свойственны высокие методические требования и низкая воспроизводимость.

NG-MAST

Метод NG-MAST (The *Neisseria gonorrhoeae* multiantigen sequence typing) на сегодняшний день является одним из самых известных и распространенных методов молекулярной идентификации *N. gonorrhoeae*. Данный метод обладает высокой разрешающей способностью и хорошей воспроизводимостью. Метод основан на определении вариантов последовательностей фрагментов двух гипервариабельных генов *N. gonorrhoeae* — гена *porB*, кодирующего белок внешней мембраны порин, который обеспечивает проникновение лекарственных средств внутрь клетки микроорганизма, и *tbpB* — гена, который кодирует В-субъединицу трансферринсвязывающего белка. Ре-

результатом исследования является установление сиквенс-типа (ST) штаммов *N. gonorrhoeae*. В открытой международной базе данных NG-MAST (<http://www.ng-mast.net>) хранится информация о сиквенс-типах микроорганизмов, выделяемых во всем мире, что позволяет осуществлять мониторинг распространения каждого отдельного штамма.

На сегодняшний день в результате секвенирования генов *porB* и *tbpB* охарактеризованы штаммы *N. gonorrhoeae*, полученные из различных стран мира, в том числе были проанализированы молекулярно-эпидемиологические данные о сиквенс-типах *N. gonorrhoeae*, распространенных на территории Российской Федерации [11]. В результате проведенного исследования в период с 2011 по 2012 г. был выявлен 171 вариант сиквенс-типов *N. gonorrhoeae*, более половины которых не были изучены ранее и информация о которых внесена в международную базу NG-MAST с присвоением соответствующих порядковых номеров [12].

Кроме того, метод NG-MAST применяется для отслеживания сексуальных контактов [13—15], изучения причин неудачного применения антимикробных препаратов [16, 17], а также в судебно-медицинской экспертизе [18].

MLST

MLST (multilocus sequence typing) — мультилокусное секвенирование — метод молекулярного типирования, предложенный в 1998 г., в основе которого лежит анализ варибельности нуклеотидных последовательностей большого числа консервативных, медленно эволюционирующих генов «домашнего хозяйства», характеризующихся низкой скоростью накопления мутаций [19].

В качестве мишеней выбирают ограниченное число бактериальных генов, которые являются маркерами филогенетического родства, но не кодируют известные факторы вирулентности или патогенности. Гены должны быть достаточно консервативны, а изменения в них не должны обеспечивать эволюционных преимуществ штамма. Каждый из выбранных генов должен встречаться не менее чем в десяти аллелях. Перечисленным условиям соответствуют гены цитоплазматических ферментов, отвечающих за внутриклеточный метаболизм. Нуклеотидные последовательности выбранных генов выявляются методом прямого секвенирования с последующим определением сиквенс-типа с использованием специализированного программного обеспечения.

Как и для NG-MAST, существует общедоступная мировая база данных (<http://pubmlst.org/databases.shtml>), где в стандартизированной форме хранятся сведения о каждом штамме, что открывает широкие возможности для изучения штаммов, распространенных на различных территориях [20].

Одними из первых бактерий, к которым был применен метод мультилокусного секвенирования, были менингококки [21]; позже MLST использовался при генотипировании таких микроорганизмов, как *Vibrio cholera*, *Streptococcus thermophilus*, *Staphylococcus aureus* [22—24]. При исследовании 24 изолятов *N. gonorrhoeae* в работе [25] были предложены схемы секвенирования примерно 17 500 нуклеотидов, охватывающих 18 различных генов «домашнего хозяйства». В некоторых случаях используются гены или фрагменты генов *N. gonorrhoeae*, идентичные таковым *Neisseria meningitidis* (*abcZ*, *adk*, *aroE*, *fumC*, *gdh*, *pdhC*, *pgm*), в других — используется большее число локусов, либо большая разрешающая способность достигается секвенированием меньшего количества генов «домашнего хозяйства», комбинируемых с более быстро эволюционирующими локусами.

Описанные схемы MLST применяются для изучения длительных эволюционных изменений в популяциях *N. gonorrhoeae*, поэтому определение оптимального числа локусов должно стать следующим шагом в международном эпидемиологическом надзоре за инфекцией.

Продолжением развития методов секвенирования и полимеразной цепной реакции (ПЦР) стало развитие технологии изготовления биомикрочипов. Чипы представляют собой наборы из большого числа биологических макромолекул, в первую очередь ДНК или РНК, иммобилизованных на миниатюрных твердых подложках. Перед тем как происходит детекция на чипах, гены проходят специальные варианты ПЦР. Биочипы используются в биологических и медицинских исследованиях для одновременной идентификации множества возможных возбудителей инфекций и для определения их лекарственной устойчивости. Основное преимущество использования биомикрочипов для диагностики ИППП — возможность проведения параллельного анализа широкого спектра микроорганизмов/вирусов в одном клиническом образце за короткое время. В ФГУ «ГНЦД Росмедтехнологии» разработан экспериментальный ДНК-чип для определения спектра патогенных, условно-патогенных и непатогенных микроорганизмов, состоящего из 41 микроорганизма. В результате тестирования биоматериала, полученного от пациентов с жалобами на расстройства мочеполовой сферы, на разработанной экспериментальной партии ДНК-чипов установлена высокая (100%) чувствительность выявления трех патогенных микроорганизмов (*N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis* и *M. genitalium*) [26].

Методы, основанные на применении гель-электрофореза

MLEE

Метод MLEE (multilocus enzyme electrophoresis) — мультилокусный энзим-электрофорез — является

предшественником MLST. Как следует из названия, главный принцип метода — определение электрофоретической подвижности метаболических энзимов, структура которых определяется генотипом штамма. В 1991 г. С. Рох и соавт. [27] применили данный метод для оценки генетического родства 65 изолятов *N. gonorrhoeae*. При электрофорезе 9 белков было установлено 16 электрофоретических типов, которые были распределены между разными сероварами и никак не коррелировали с ними. L. de la Fuente и соавт. [28] при исследовании 7 белков 41 штамма *N. gonorrhoeae*, не продуцирующих пенициллиназу, выделили 17 электрофоретических типов. Эти и ряд других работ [29—31] показали применимость метода MLEE в решении вопросов популяционной генетики и систематики микроорганизмов. Метод имеет более низкую по сравнению с MLST разрешающую способность. Существует также ряд особенностей, которые ограничивают применение метода. Так, белки, имеющие различные аминокислотные последовательности, могут иметь близкую электрофоретическую подвижность, что затрудняет получение однозначно идентифицируемых при форе́зе полос. Мутации ДНК по типу молчащих замен могут не приводить к изменению структуры полипептидной цепи, а значит, не могут быть определены этим методом. И, наконец, фенотип белка может быстро изменяться под воздействием окружающей среды, что также отражается на воспроизводимости результатов MLEE [10].

ПДРФ-анализ и пульс-гель-электрофорез

ПДРФ-анализ (RFLP — restriction fragment length polymorphism) — метод типирования, основанный на анализе полиморфизма длин рестрикционных фрагментов. Фрагменты расщепления геномной ДНК разделяются электрофорезом в полиакриламидном геле. Степень генетического родства изолятов оценивается по количеству и положению рестрикционных фрагментов. Метод не получил широкого распространения из-за потенциально субъективной интерпретации полос в геле и невозможности стандартизовать выполняемые процедуры.

Важной инновацией было использование пульс-гель-электрофореза (PFGE) в сочетании с применением редкощепящих рестриктаз. Метод успешно использовался в ряде исследований по типированию *N. gonorrhoeae*, включая анализ антибиотикорезистентности штаммов [32—38]. Высокая разрешающая способность PFGE, особенно в сочетании с такими методами, как секвенирование *porB* и NG-MAST, позволяет исследовать локальные популяции гонококков, определять пути их распространения, контролировать антибиотикорезистентность циркулирующих штаммов. Метод особенно подходит для повышения степени дискриминации между изолята-

ми в экстремальных ситуациях, когда требуется точная идентификация микроорганизма, прежде всего в судебно-медицинской практике [39]. Однако отсутствие стандартизации в сочетании с трудоемкостью и высокой стоимостью ограничивает применение метода рамками научно-исследовательских лабораторий.

Ора-типирование

Ора-типирование представляет собой разновидность ПДРФ-метода, базирующегося на анализе вариаций 11 ора-генов, кодирующих белки, участвующие в адгезии гонококков на клетках человека. Высокая вариабельность ора-генов позволяет наблюдать изменения в пределах ауксотипа/серовара *N. gonorrhoeae*, что дает возможность подтвердить или опровергнуть сексуальное партнерство, выстроить цепь передачи инфекции, разделить случаи неудачного лечения, повторного инфицирования, смешанной инфекции [40]. Метод обладает хорошей воспроизводимостью, однако, как и все разновидности ПДРФ-метода, характеризуется рядом недостатков — трудоемкостью, субъективностью, отсутствием стандартизации. Достаточно часто ора-типирование используют в сочетании с другими методами генотипирования *N. gonorrhoeae* (например, NG-MAST) с целью повышения разрешающей способности последнего [41].

Риботипирование

Риботипирование — метод, основанный на анализе полиморфизма длин рестрикционных фрагментов генов, кодирующих рибосомальные РНК (рРНК). Метод базируется на наличии вариабельных родо- и видоспецифических последовательностей в оперонах, кодирующих рРНК, которые и являются маркерами при генетической идентификации. Для типирования *N. gonorrhoeae* метод малоприменим из-за низкой дискриминирующей способности, трудоемкости и дороговизны.

Для оценки резистентности штаммов *N. gonorrhoeae* к хинолонам было применено **Lip-типирование**, основанное на количестве и последовательности чередования генов, кодирующих кластер из пяти аминокислот липопротейна наружной мембраны [42—44]. Разрешающая способность метода окончательно не оценена.

Достаточно распространенным методом генотипирования является **плазмидный анализ**, который включает характеристику как полного плазмидного профиля, так и специфических плазмид *N. gonorrhoeae* — *cppB* ген, плазмиды устойчивости к антибиотикам — *tetM*, семейство β -лактамазопродуцирующих плазмид. Плазмидный анализ используется в эпидемиологических исследованиях, при расследовании вспышек заболеваний [45—51]. Являясь мобильными генетическими элементами, плазмиды могут спонтан-

но теряться или приобретаться штаммом-хозяином, что ограничивает применение метода.

Ряд методов типирования *N. gonorrhoeae* основан на ПЦР: рестрикционный анализ амплифицированных рибосомных ДНК (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis* — *ARDRA*), произвольная амплификация полиморфной ДНК (*Random Amplification of Polymorphic DNA* — *RAPD*) или ПЦР с произвольными праймерами (*Arbitrary Primed PCR* — *AP-PCR*), анализ варьирующих по числу tandemных повторов (*variable number tandem repeat* — *VNTR*), анализ повторяющихся экстра- или внутригенных палиндромных элементов — *REP-PCR*. Большинство из них не получили широкого распространения из-за низкой дискриминационной способности, трудоемкости и недоступности для большинства лабораторий. Исключением является метод VNTR — изучение генетических локусов *N. gonorrhoeae*, содержащих различное число варьируемых tandemных повторов. Варибельные tandemные повторы представляют собой участки ДНК, содержащие несколько последовательно и монотонно повторяющихся сайтов произвольного состава. Различное число повторов наследуется в соответствии с законами генетики, может различаться у особей одного вида и является уникальной генетической характеристикой особи [52]. Для каждого изолята определяется количество tandemных повторов в каждом VNTR-локусе. В результате получают VNTR-профиль, который можно записать в виде последовательности чисел. Таким образом можно сравнивать результаты VNTR-типирования между лабораториями. В работе А. Kushnig и соавт. [8] при исследовании генетического разнообразия изолятов *N. gonorrhoeae* из разных городов России показана 100% способность метода определять VNTR-тип для каждого изолята, а также установлены возможные ассоциации между принадлежностью изолята к определенному VNTR-типу и его устойчивостью к антибиотикам.

В 2012 г. R. Neumanns и соавт. [53] выполнили работу по сравнению трех наиболее часто применяющихся методов генотипирования *N. gonorrhoeae* — VNTR, NG-MAST и *porB*-секвенирования. Изучались изоляты *N. gonorrhoeae*, выделенные в течение года в одной из клиник Амстердама: 252 изолята от 118 пациентов; 108 изолятов от 54 сексуальных партнеров; 6 — от пациентов, образующих три сексуальные цепи, а также изоляты, полученные в результате трех случаев неудачного лечения — как до, так и после антибиотикотерапии. Сравнивались также время исполнения и стоимость каждого анализа. Показано, что все три метода примерно в равной степени идентифицировали как независимые случаи инфицирования, так и связанные с сексуальными контактами, а также дифференцировали случаи заболевания гонореей в результате инфицирования новым штаммом и в ре-

зультате активации штамма, пережившего антибиотикотерапию. Авторами сделан вывод о равнозначности дискриминирующей возможности всех методов для мониторинга распространения *N. gonorrhoeae*, при этом наиболее быстрым и рентабельным методом оказался NG-MAST.

В списке электрофоретических методов, которые применяются чрезвычайно редко и в основном для научных целей, стоит упомянуть о **полногеномном секвенировании** *N. gonorrhoeae* с использованием гибридных ДНК-панелей, которые позволяют установить генетическое родство как между отдельными штаммами гонококков, так и в пределах рода.

Другие методы типирования

Мультиплексное генотипирование методом масс-спектрометрии MALDI-TOF

Альтернативой существующим методам типирования ДНК микроорганизмов является мультиплексное генотипирование с использованием масс-спектрометрии. Принцип метода заключается в переводе молекул анализируемого образца в газообразные ионы с последующим разделением на основании отношения массы к заряду (m/z) и детекцией. Масс-спектрометрические методы позволяют быстро анализировать значительное количество образцов при использовании сравнительно небольшого объема биоматериала, обладают высокой чувствительностью и высоким разрешением и активно используются в исследованиях нуклеотидов, пептидов, белков, полисахаридов и других биомолекул с молекулярными массами до нескольких сотен тысяч дальтон [54].

Основной областью приложения масс-спектрометрии являются протеомные исследования, однако метод активно используется и для генотипирования однонуклеотидных полиморфных маркеров (SNP), предварительно амплифицированных в ПЦР. Определение нуклеотидных замен в генах *N. gonorrhoeae* с использованием масс-спектрометрии входит в сборник стандартных операционных процедур по определению молекулярно-генетических детерминант штаммов *N. gonorrhoeae* [55]. Масс-спектрометрический анализ успешно применяется для визуализации результатов детекции SNP. В ряде исследований была показана чувствительность данного метода также при анализе одновременно нескольких образцов [56, 57].

Секвенирование следующего поколения — next-generation sequencing (NGS)

В последнее десятилетие появился новый метод для изучения полногеномных последовательностей большого числа патогенов — массивное параллельное секвенирование, иначе называемое секвенированием следующего поколения — next-generation sequencing (NGS) [58]. Принципиальное отличие тех-

нологий NGS состоит в возможности параллельного определения нуклеотидных последовательностей множества различных нитей ДНК и чтения миллиардов нуклеотидов в день [59—61]. Платформы NGS позволяют одновременно секвенировать собранные в пулы нуклеиновые кислоты, выделенные из большого количества образцов. Для дифференцировки исследуемых образцов используют наборы штрих-кодов или индексов (до 96 вариантов), представляющих собой олигонуклеотиды известной последовательности [59—62]. По технологии NGS одновременно определяются нуклеотидные последовательности множества различных нитей ДНК, что обеспечивает чтение миллиардов нуклеотидов в день.

Метод NGS был применен для ретроспективного изучения вспышки менингита, имевшей место в Италии в декабре 2007 — январе 2008 г. и характеризующейся высоким коэффициентом смертности. Была установлена генетическая неоднородность штаммов, выделенных во время вспышки. Гипервирулентный штамм K1207 *N. meningitidis* имел отличия в локусе, ответственном за синтез капсулы, что предположительно повысило инвазивность изолята или даже сделало его невосприимчивым к иммунному ответу организма-хозяина [63].

Таким образом, полногеномное секвенирование на платформах NGS может стать одним из основных методов молекулярной эпидемиологии, поскольку обладает большей разрешающей способностью обнаружения любых изменений генома, которые могут приводить к специфичным проявлениям патогенности возбудителей инфекционных заболеваний.

Методы генотипирования *N. gonorrhoeae* должны способствовать решению следующих основных задач:

1. Задача краткосрочного и локального эпидемиологического исследования, когда необходимо определить, являются ли штаммы, изолированные в конкретном очаге заболевания, генетически родственными или они не взаимосвязаны.

2. Задача долгосрочного и глобального эпидемиологического анализа, когда устанавливается взаимосвязь штаммов, циркулирующих на данной территории, со штаммами, распространенными на других территориях в пределах одного или разных интервалов времени [20].

Итогом анализа должно стать выяснение закономерностей распространения, циркуляции и эволюции патогенных штаммов и клонов, обладающих уникаль-

ными характеристиками, и создание на основе этих закономерностей методов эпидемиологического надзора и прогноза их распространения.

Для решения первой задачи лучшими методами, обладающими высокой разрешающей способностью, воспроизводимостью, объективностью, лучшим соотношением цена/качество, являются NG-MAST и *porB*-секвенирование. Преимущество первого метода в доступности международной базы данных, позволяющей сравнивать полученные результаты исследования с уже известными по всему миру. В то же время NG-MAST включает четыре реакции секвенирования ДНК, а *porB*-секвенирование — только две, что делает второй метод более дешевым и менее трудоемким. Недостатком метода секвенирования *porB*, в свою очередь, является отсутствие международной базы данных, соотносимой с таковой по NG-MAST, и отсутствие интернационального стандарта по размеру секвенированных фрагментов. Участки, секвенируемые в NG-MAST и *porB*, достаточно различны, чтобы определить уровень генетического расхождения между получаемыми сиквенс-типами. Более того, изоляты с идентичными сиквенс-типами ДНК могут далее подразделяться методами с более высоким разрешением, такими как PFGE и ора-типирование.

Для решения задач макроэпидемиологических исследований инфекции, вызываемой *N. gonorrhoeae*, методом выбора является MLST, так как секвенированию подвергаются более консервативные, эволюционно сравнительно нейтральные хромосомные гены «домашнего хозяйства». Анализ обеспечивает высокий уровень воспроизводимости и объективности. Международная база сиквенс-типов позволяет сопоставлять данные разных лабораторий, полученные этим методом.

Последовательное и широкое применение методов генотипирования *N. gonorrhoeae* предоставляет принципиально новый инструмент в руки инфекционистов и эпидемиологов. Описанные методы позволяют повысить уровень диагностики гонококковой инфекции, прогнозировать изменение антибиотикоустойчивости, проследить пути передачи инфекции, а также исследовать процессы молекулярной эволюции микроорганизма. Интенсивно разрабатываемые и распространяющиеся генетические методы нуждаются в стандартизации, сертификации и контроле качества, что невозможно без широкомасштабного сотрудничества специалистов различного профиля. ■

Литература

1. Report on global sexually transmitted infection surveillance 2013 // WHO Press; Geneva, Switzerland: 2014.
2. Ison C.A., Golparian D., Saunders P., Chisholm S., Unemo M. Evolution of *Neisseria gonorrhoeae* is a continuing challenge for molecular detection of gonorrhoea: false negative gonococcal *porA* mutants are spreading internationally. Sex Transm Infect 2013; 89: 197—201.

3. VOZ Informacionnyj byulleten' № 194 Aprel' 2014 g [ВОЗ Информационный бюллетень № 194 Апрель, 2014 г.]
4. Thompson D.K., Deal C.D., Ison C.A., Zenilman J.M., Bash M.C. A typing system for *Neisseria gonorrhoeae* based on biotinylated oligonucleotide probes to PIB gene variable regions. *J Infect Dis* 2000; 181: 1652—1660.
5. Trees D.L., Schultz A.J., Knapp J.S. Use of the neisserial lipoprotein (Lip) for subtyping *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2914—2916.
6. van Looveren M., Ison C.A., Ieven M., Vandamme P., Martin I.M., Vermeulen K., Renton A., Goossens H. Evaluation of the discriminatory power of typing methods for *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2183—2188.
7. Viscidi R.P., and J C Demma 2003. Genetic diversity of *Neisseria gonorrhoeae* housekeeping genes. *J Clin Microbiol* 41: 197—204.
8. Kushnir A.V., Il'ina E.N., Malahova M.V., Pripitnevich T.V., Filipenko M.L. VNTR-типирование изолатов *Neisseria gonorrhoeae* в России. *Vestnik NGU. Seriya: Biologiya, klinicheskaya medicina* 2012; 10: 5. [Кушнир А.В., Ильина Е.Н., Малахова М.В. Припутневич Т.В., Филипенко М.Л. VNTR-типирование изолатов *Neisseria gonorrhoeae* в России. *Вестник НГУ. Серия: Биология, клиническая медицина* 2012; 10: 5.]
9. Suggested citation: European Centre for Disease Prevention and Control. Molecular typing of *Neisseria gonorrhoeae* — results from a pilot study 2010—2011. Stockholm: ECDC; 2012.
10. Unemo M., Dillon J.-A. R. Review and international recommendation of methods for typing *Neisseria gonorrhoeae* isolates and their implications for improved knowledge of gonococcal epidemiology, treatment, and biology. *Clin Microbiol Rev* 2011 Jul; 24 (3): 447—58.
11. Kubanova A., Kubanov A., Frigo N., Solomka V., Semina V., Vorobyev D., Khairullin R., Unemo M. Russian gonococcal antimicrobial susceptibility programme (RU-GASP) — resistance in *Neisseria gonorrhoeae* during 2009—2012 and NG-MAST genotypes in 2011 and 2012. *BMC Infect Dis* 2014 Jun 19; 14 (1): 342.
12. Solomka V.S. Chuprov-Netochin R.N., Frigo N.V., Kubanov A.A. Опыт молекулярного типирования и филогенетического анализа штаммов *Neisseria gonorrhoeae* в Российской Федерации. *Vestn Dermatol Venerol* 2012; 2: 13—20. [Соломка В.С. Чупров-Неточин Р.Н., Фриго Н.В., Кубанов А.А. Опыт молекулярного типирования и филогенетического анализа штаммов *Neisseria gonorrhoeae* в Российской Федерации. *Vestn Dermatol Venerol* 2012; 2: 13—20.]
13. Bilek N. et al. 2007. Concordance between *Neisseria gonorrhoeae* genotypes recovered from known sexual contacts. *J Clin Microbiol* 45: 3564—3567.
14. Chen H. et al. 2008. Typing of *Neisseria gonorrhoeae* Opa and NG-MAST gene of 12 pairs of sexual contact gonorrhea patients in China. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 28: 472—475.
15. Abu-Rajab K. et al. To what extent does *Neisseria gonorrhoeae* multiantigen sequence typing of gonococcal isolates support information derived from patient interviews? *Int J* 2009; *STD AIDS* 20: 414—417.
16. Ota K.V. et al. Incidence and treatment outcomes of pharyngeal *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* infections in men who have sex with men: a 13-year retrospective cohort study. *Clin Infect Dis* 2009; 48: 1237.
17. Tapsall J. et al. 2009. Two cases of failed ceftriaxone treatment in pharyngeal gonorrhoeae verified by molecular microbiological methods. *J Med Microbiol* 58: 683—687.
18. Martin I.M. et al. Non-cultural detection and molecular genotyping of *Neisseria gonorrhoeae* from a piece of clothing. *J Med Microbiol* 2007; 56: 487—490.
19. Maiden M.C., Bygraves J.A., Feil E., Morelli G., Russell J.E., Urwin R., Zhang Q., Zhou J., Zurth K., Caugant D.A., Feavers I.M., Achtman M., Spratt B.G. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95 (6): 3140—3145.
20. Platonov A.E., SHipulin G.A., Tyutyunnik E.N., Platonova O.V. Genodiagnostika bakterial'nyh meningitov i genotipirovanie ih vzbuditelej. Posobie dlya vrachej FGUN «Central'nyj Nil Epidemiologii» Rospotrebnadzora. M. 2001. [Платонов А.Е., Шипулин Г.А., Тютюник Е.Н., Платонова О.В. Генодиagnostika бактериальных менингитов и генотипирование их возбудителей. Пособие для врачей ФГУН «Центральный НИИ Эпидемиологии» Роспотребнадзора. М. 2001.]
21. Feavers I.M., Gray S.J., Urwin R., Russell J.E., Bygraves J.A., Kaczmarek E.B., Maiden C. Multilocus sequence typing and antigen gene sequencing in the investigation of a meningococcal disease outbreak. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3883—3887.
22. Rahaman M.H., Islam T., Colwell R.R., Alam M. Collection 2015. Molecular tools in understanding the evolution of *Vibrio cholerae*. *Front Microbiol* 2015 Oct 6; 6: 1040.
23. Yu J., Sun Z., Liu W., Xi X., Song Y., Xu H., Lv Q., Bao Q., Menghe B., Sun T. Multilocus sequence typing of *Streptococcus thermophilus* from naturally fermented dairy foods in China and Mongolia. *BMC Microbiol* 2015 Oct 26; 15 (1): 236.
24. Hu H.C., Kao K.C., Chiu L.C., Chang C.H., Hung C.Y., Li L.F., Liu T.P., Lin L.C., Chen N.H., Huang C.C., Yang C.T., Lu J.J. Clinical outcomes and molecular typing of heterogenous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* bacteremia in patients in intensive care units. *BMC Infect Dis*. 2015 Oct 23; 15 (1): 444.
25. Viscidi R.P., Demma J.C. Genetic Diversity of *Neisseria gonorrhoeae* Housekeeping Genes. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 197—204.
26. Kitaeva N.V., Frigo N.V., Volkov I.A., Lihareva V.V. Biomikrochipy i vozmozhnost' ih primeneniya v dermatovenerologii. *Vestn Dermatol Venerol* 2009; 6: 33—45. [Китаева Н.В., Фриго Н.В., Волков И.А., Лихарева В.В. Биомикрочипы и возможность их применения в дерматовенерологии. *Вестн дерматол венерол* 2009; 6: 33—45.]
27. Poh C.L., Ocampo J.C., Loh G.K. 1992. Genetic relationships among *Neisseria gonorrhoeae* serovars analysed by multilocus enzyme electrophoresis. *Epidemiol Infect* 108: 31—38.
28. De la Fuente L., Vazquez J.A. Multilocus enzyme analysis of African type penicillinase producing *Neisseria gonorrhoeae* (PPNG) strains isolated in Spain. *Sex Transm Dis* 1991; 18: 150—152.
29. Gutjahr T.S., O'Rourke M., Ison C.A., Spratt B.G. Arginine-, hypoxanthine-, uracil-requiring isolates of *Neisseria gonorrhoeae* are a clonal lineage with a non-clonal population. *Microbiology* 1997; 143: 633—640.
30. Ng L.K., Dillon J.R. Typing by serovar, antibiogram, plasmid content, riboprobing, and isoenzyme typing to determine whether *Neisseria gonorrhoeae* isolates requiring proline, citrulline, and uracil for growth are clonal. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1555—1561.
31. Selander R.K. et al. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl Environ Microbiol* 1986; 51: 873—884.
32. Azariah S., Perkins N. Risk factors and characteristics of patients with gonorrhea presenting to Auckland Sexual Health Service, New Zealand. *N Z Med J* 2007; 120: U2491.
33. Li H., Dillon J.R. Utility of ribotyping, restrictionendonuclease analysis and pulsed field gel electrophoresis to discriminate between isolates of *Neisseria gonorrhoeae* of serovar 1A-2 which require arginine, hypoxanthine and uracil for growth. *J Med Microbiol* 1995; 43: 208—215.
34. Poh C.L., Lau Q.C. Subtyping of *Neisseria gonorrhoeae* auxotype-serovar groups by pulsed-field gel electrophoresis. *J Med Microbiol* 1993; 38: 366—370. 133.
35. Poh C.L., G.K. Loh, Tapsall J.W. Resolution of clonal subgroups among *Neisseria gonorrhoeae* IB-2 and IB-6 serovars by pulsed-field gel electrophoresis. *Genitourin Med* 1995; 71: 145—149.
36. Unemo M. et al. 2007. Molecular characterization of *Neisseria gonorrhoeae* identifies transmission and resistance of one ciprofloxacin-resistant strain. *APMIS* 115: 231—241.
37. van Looveren M. et al. Evaluation of the discriminatory power of typing methods for *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2183—2188.
38. Xia M., Whittington W.L., Holmes K.K., Plummer F.A., Roberts M.C. Pulsed-field gel electrophoresis for genomic analysis of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Infect Dis* 1995; 171: 455—458.

39. Sakda Sathirareuangchai, Peerayuhth Phuangphung, Amornrut Leelaporn, Vitharon Boon-ya-sidhi. The usefulness of *Neisseria gonorrhoeae* strain typing by Pulse-Field Gel Electrophoresis (PFGE) and DNA detection as the forensic evidence in child sexual abuse cases: a case series Int J Legal Med January 2015; 129 (1): 153—157.
40. Khaki P. et al. 2009. Molecular typing of *Neisseria gonorrhoeae* isolates by Opa-typing and ribotyping in New Delhi, India. Int J Microbiol 2009; 934823.
41. Chen H. et al. Typing of *Neisseria gonorrhoeae* Opa and NG-MAST gene of 12 pairs of sexual contact gonorrhoea patients in China. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci 2008; 28: 472—475.
42. Morris S.R. et al. Strain typing and antimicrobial resistance of fluoroquinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* causing a California infection outbreak. J Clin Microbiol 2009; 47: 2944—2949.
43. Morris S.R. et al. Using strain typing to characterise a fluoroquinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* transmission network in southern California Sex Transm Infect 2008; 84: 290—291.
44. Trees D.L., Schultz A.J., Knapp J.S. Use of the neisserial lipoprotein (Lip) for subtyping *Neisseria gonorrhoeae*. J Clin Microbiol 2000; 38: 2914—2916.
45. Carballo M., Ng L.-K., Dillon J.R. Detection of the *tetM* determinant in *Neisseria gonorrhoeae* using a non-radioactively labeled oligonucleotide probe. Mol Cell Probes 1994; 8: 205—208.
46. Dillon J.R. Molecular epidemiology of antibiotic resistant *Neisseria gonorrhoeae*. Ann. Inst. Pasteur Actual. 1994; 5: 148—156.
47. Dillon J.R., Pauze M. Relationship between plasmid content and auxotype in *Neisseria gonorrhoeae* isolates. Infect Immun 1981; 33: 625—628.
48. Dillon J.R., Li H., Yeung K., Aman T.A. A PCR assay for discriminating *Neisseria gonorrhoeae*-lactamase-producing plasmids. Mol Cell Probes 1999; 13: 89—92.
49. Dillon J.R., Carballo M., King S.D., Brathwaite A.R. Auxotype, plasmid content and serovars of gonococcal isolates (PPNG and non-PPNG) from Jamaica. Genitourin Med 1987; 63: 233—238.
50. Dillon J.R., Pauze M., and Yeung K.-H. Molecular and epidemiological analysis of penicillinase producing strains of *Neisseria gonorrhoeae* isolated in Canada 1976—84: evolution of new auxotypes and beta-lactamase encoding plasmids. Genitourin Med 1986; 62: 151—157.
51. Dillon J.R., Rahman M., Yeung K.-H. Discriminatory power of typing schemes based on Simpson's index of diversity for *Neisseria gonorrhoeae*. J Clin Microbiol 1993; 31: 2831—2833.
52. Vodop'yanov A.S. Vodop'yanov S.O. i dr. Sistemnyj analiz, matematicheskoe modelirovanie, informacionnye sistemy. Biotekhnologiya, 2001; 6: 85—88. [Водопьянов А.С., Водопьянов С.О. и др. Системный анализ, математическое моделирование, информационные системы. Биотехнология 2001; 6: 85—88.]
53. Heymans R., Golparian D., Bruisten S.M., Schouls L.M., Unemo M. Three *N. gonorrhoeae* genotyping methods provided similar cluster patterns for the large majority of isolates. J Clin Microbiol 2012; 50: 180—83.
54. Diamandis E.P. Mass spectrometry as a diagnostic and a cancer biomarker discovery tool: opportunities and potential limitations. Mole Cell Proteomi 2004; 3 (4): 367—378.
55. Sbornik standartnyh operacionnyh procedur po opredeleniyu molekulyarno-geneticheskikh determinantov shtamnov *Neisseria gonorrhoeae* M: DEKKS-PRESS 2008; 20. [Сборник стандартных операционных процедур по определению молекулярно-генетических детерминант штаммов *Neisseria gonorrhoeae* M: ДЭКС-ПРЕСС 2008; 20.]
56. Griffin T.J., Hall J.G., Prudent J.R., Smith L.M. Direct genetic analysis by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. Proc Natl Acad Sci USA. 1999 May 25; 96 (11): 6301—6.
57. Li J., Butler J.M., Tan Y., Lin H., Royer S., Ohler L., Shaler T.A., Hunter J.M., Pollart D.J., Monforte J.A., Becker C.H. Single nucleotide polymorphism determination using primer extension and time-of-flight mass spectrometry. Electrophoresis 1999 Jun; 20 (6): 1258—65.
58. Alekseeva A.E., Brusnigina N.F. Vozможности i perspektivy primeneniya metodov massivnogo parallel'nogo sekvenirovaniya v diagnostike i ehpidemiologicheskom nadzore za infekcionnyimi zabolevaniyami. Medial' (Analiticheskie obzory) № 2 (12) maj 2014. [Алексеева А.Е., Бруснигина Н.Ф. Возможности и перспективы применения методов массивного параллельного секвенирования в диагностике и эпидемиологическом надзоре за инфекционными заболеваниями. Медиаль (Аналитические обзоры) 2014 май; 2 (12).]
59. Pareek C.S., Smoczynski R., Tretyn A. Sequencing technologies and genome sequencing. J Appl Genetics 2011; 52 (4): 413—435.
60. Moorhith S., Mattocks C.J., Wright C.F. Review of massively parallel DNA sequencing technologies. Hugo J 2011; 5: 1—12.
61. Zhang J., Chioldini R., Badr A. et al. The impact of next-generation sequencing on genomics. J Genet Genomics 2011; 38 (3): 95—109.
62. Pettersson E., Lundeberg J., Ahmadian A. Generations of sequencing technologies. Genomics 2009; 93 (2): 105—111.
63. Enrico Lavezzo, Stefano Toppo, Elisa Franchin, Barbara Di Camillo? Francesca Finotello, Marco Falda, Riccardo Manganelli, Giorgio Palu and Luisa Barzon. Genomic comparative analysis and gene function prediction in infectious diseases: application to the investigation of a meningitidis outbreak/ BMC Infectious Diseases 2013, 13: 554.

об авторах:

М.В. Шпилевая — к.б.н., старший научный сотрудник отдела ИППП и дерматозов ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, Москва
 О.А. Образцова — к.б.н., старший научный сотрудник отдела ИППП и дерматозов ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, Москва
 А.В. Честков — к.б.н., старший научный сотрудник отдела ИППП и дерматозов ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, Москва

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье