

Опыт молекулярного типирования и филогенетического анализа штаммов *N. gonorrhoeae* в Российской Федерации

В.С. Соломка, Р.Н. Чупров-Неточин, Н.В. Фриго, А.А. Кубанов

Experience of molecular typing and phylogenetic analysis of *N. gonorrhoeae* strains in the Russian Federation

V.S. SOLOMKA, R.N. CHUPROV-NETOCHIN, N.V. FRIGO, A.A. KUBANOV

об авторах: ►

В.С. Соломка — к.б.н., старший научный сотрудник отдела лабораторной диагностики ИППП и болезней кожи ФГБУ «ГНЦДК» Минздравсоцразвития России, Москва
 Р.Н. Чупров-Неточин — научный сотрудник отдела лабораторной диагностики ИППП и болезней кожи ФГБУ «ГНЦДК» Минздравсоцразвития России, Москва
 Н.В. Фриго — д.м.н., главный научный сотрудник, заведующий отделом лабораторной диагностики ИППП и болезней кожи ФГБУ «ГНЦДК» Минздравсоцразвития России, Москва
 А.А. Кубанов — д.м.н., профессор, заместитель директора по научной работе ФГБУ «ГНЦДК» Минздравсоцразвития России, Москва

Представлены результаты молекулярного типирования и филогенетического анализа штаммов *N. gonorrhoeae* в Российской Федерации, проведенные на большой выборке штаммов *N. gonorrhoeae*. Выявлено значительное генетическое разнообразие штаммов *N. gonorrhoeae*, циркулирующих на территории Российской Федерации, что может свидетельствовать о высокой скорости накопления мутаций генов *por* и *tbp* среди российской популяции штаммов *N. gonorrhoeae*. Установлена генетическая близость отдельных сиквенс-типов штаммов *N. gonorrhoeae*, выявлены общие и доминирующие сиквенс-типы штаммов *N. gonorrhoeae*, распространенные не только на различных территориях Российской Федерации, но и за рубежом, что может свидетельствовать о возможности переноса этих штаммов между территориями Российской Федерации и в Российскую Федерацию из-за рубежа за счет активной миграции населения.

Ключевые слова: **молекулярное типирование, *N. gonorrhoeae*, NG-MAST, филогенетический анализ.**

The article presents results of the molecular typing and phylogenetic analysis of *N. Gonorrhoeae* strains in the Russian Federation conducted based on a large sample of *N. Gonorrhoeae* strains. A considerable genetic variety of *N. Gonorrhoeae* strains circulating in the territory of the Russian Federation was revealed, which can serve as an evidence of a high rate of accumulation of *por* and *tbp* gene mutations among the Russian population of *N. Gonorrhoeae* strains. The authors established the genetic relationship between individual sequence types of *N. Gonorrhoeae* strains, and revealed total and dominating sequence types of *N. Gonorrhoeae* strains found both in different territories of the Russian Federation and abroad, which confirms that such strains can be transferred between different territories of the Russian Federation and from abroad due to active migration of population.

Key words: **molecular typing, *N. Gonorrhoeae*, NG-MAST, phylogenetic analysis.**

■ Одним из современных инструментов эпидемиологического контроля над распространением инфекций, передаваемых половым путем (ИППП), в том числе гонококковой инфекции, являются методы типирования, осуществляемые с использованием молекулярно-биологических методов [1—4].

Общие принципы и технологические подходы к молекулярному типированию различных микроорганизмов во многом сходны. Они основаны на выявлении у микроорганизмов комплекса признаков, наличие или отсутствие которых у отдельного штамма является его уникальной характеристикой. Чем больше

одинаковых признаков у двух или более штаммов, тем ближе их генетическое родство. В качестве признаков, характеризующих свойства отдельных штаммов бактерий, используют структуру генов (их первичную нуклеотидную последовательность) [5—6].

К настоящему времени биология *N. gonorrhoeae* достаточно хорошо изучена [7—9]. Геном микроорганизма содержит около 2,2 млн пар оснований, включает 2729 генов, из которых 2662 кодируют белки *N. gonorrhoeae*. Функции многих генов еще не известны, однако среди них можно выделить уникальные участки, специфичные для данного рода, вида или подвида микроорганизмов [10—11].

Для более эффективного различия штаммов *N. gonorrhoeae*, а также установления родства сравниваемых штаммов необходимо осуществлять их молекулярное типирование по нескольким генам. При выборе генов для молекулярного типирования *N. gonorrhoeae* необходимо учитывать степень их варибельности. В исследуемой популяции каждый ген должен встречаться в достаточном числе аллелей.

Одним из известных и признанных методов молекулярного типирования *N. gonorrhoeae* является NG-MAST-типирование (*Neisseria gonorrhoeae* — multi-antigen-sequence-typing), основанное на секвенировании фрагментов двух генов *N. gonorrhoeae* — *porB* гена, кодирующего белок поринового канала, и *tbpB* гена, кодирующего трансферринсвязывающий белок [12]. Данный метод, обладающий высокой дискриминирующей способностью, позволяет регистрировать сиквенс-типы *N. gonorrhoeae* в международной базе данных NG-MAST (<http://www.ng-mast.net>), при этом впервые обнаруженным сиквенс-типам присваиваются новые номера.

Типирование *N. gonorrhoeae* методом NG-MAST позволяет определить сиквенс-тип штамма *N. gonorrhoeae*, представляющий индивидуальную генетическую характеристику изучаемого штамма. Информация о сиквенс-типах *N. gonorrhoeae*, каждый из которых имеет свой индивидуальный номер, хранится в международной базе данных NG-MAST и позволяет проследить пути распространения каждого отдельного штамма внутри отдельных областей одного государства и между государствами.

На основании результатов молекулярного типирования штаммов *N. gonorrhoeae* методом NG-MAST может быть проведен филогенетический анализ, позволяющий оценить степень родства между отдельными штаммами и популяциями микроорганизмов, определить направления их эволюционного преобразования; зная происхождение штаммов (географическое), выяснить возможные пути их распространения в пределах отдельных регионов и между регионами.

Целью настоящего исследования явилась оценка генетического разнообразия и изучение возможных путей распространения российской популяции штаммов *N. gonorrhoeae* с использованием методов

молекулярного типирования и филогенетического анализа.

Материал и методы

Для оценки генетического разнообразия штаммов *N. gonorrhoeae*, циркулирующих на территории Российской Федерации, были проведены молекулярное типирование и филогенетический анализ 429 штаммов *N. gonorrhoeae*. В исследовании использовались чистые культуры штаммов *N. gonorrhoeae*, полученные из субъектов Российской Федерации в 2011—2012 гг. от больных с лабораторно подтвержденным диагнозом «гонококковая инфекция нижних отделов мочевого тракта», «гонококковая инфекция верхних отделов мочевого тракта».

Определение нуклеотидной последовательности генов *por* и *tbp* *N. gonorrhoeae* осуществлялось поэтапно путем: выделения ДНК *N. gonorrhoeae* из биообразцов (чистых культур *N. gonorrhoeae*); амплификации ДНК варибельных участков генов *por* и *tbp* *N. gonorrhoeae*; детекции и визуализации продуктов амплификации ДНК генов *por* и *tbp* *N. gonorrhoeae* (оценочный форец); осаждения продуктов амплификации ДНК генов *por* и *tbp* *N. gonorrhoeae*; проведения ПЦП с мечеными терминирующими нуклеотидами; осаждения продуктов ПЦП; секвенирования генов *por* и *tbp* *N. gonorrhoeae* на секвенаторе ABI 3730 (Applied Biosystem, США) с использованием программного обеспечения 3730 Data Collection v 3.0 и дальнейшей обработкой полученных данных (raw data) в программе Sequencing Analysis 5.3.1; анализа нуклеотидных последовательностей генов *por* и *tbp* *N. gonorrhoeae* с помощью программ Vector NTI 9.1 и DNA Star 7.1.0.

Амплификация и секвенирование исследуемых генов (*por* и *tbp*) осуществлялись с использованием праймеров (табл. 1), опубликованных на веб-сайте www.ng-mast.net.

Условия амплификации генов *por* и *tbp* приведены в табл. 2.

После определения нуклеотидных последовательностей генов *por* и *tbp* *N. gonorrhoeae* для них были назначены порядковые номера аллелей и сиквенс-типы в международной базе данных NG-MAST. При полном совпадении нуклеотидной последовательности исследуемого гена с одним из имеющихся в базе данных аллелей ему присваивался номер данного аллеля. При несовпадении результатов секвенирования с имеющимися аллелями оригинальную хроматограмму секвенирования направляли в международную базу данных NG-MAST для присвоения номера новому аллелю. По полученной комбинации номеров аллелей генов *por* и *tbp* определяли сиквенс-тип штамма *N. gonorrhoeae*. В случае отсутствия в базе данных искомой комбинации аллелей данные направляли в международную базу NG-MAST для присвоения номера новому сиквенс-типу.

ТАБЛИЦА 1
Последовательность праймеров, используемых для молекулярного типирования генов *por* и *tbp* *N. gonorrhoeae*

Название	Последовательность
Por forward	5' ³⁵⁰ CAA GAA GAC CTC GGC AA ³⁶⁶ 3'
Por reverse	5' ¹⁰⁸⁶ CCG ACA ACC ACT TGG T ¹⁰⁷¹ 3'
TbpB forward	5' ¹⁰⁹⁸ CGT TGT CGG CAG CGC GAA AAC ¹¹¹⁸ 3'
TbpB reverse	5' ¹⁶⁸⁶ TTC ATC GGT GCG CTC GCC TTG ¹⁶⁶⁶ 3'

ТАБЛИЦА 2
Условия проведения реакции амплификации для *por*- и *tbp*- генов *N. gonorrhoeae*

Рекомендованные условия амплификации	
ген <i>por</i>	ген <i>tbp B</i>
95°C — 4 мин.	95°C — 4 мин.
95°C — 30 с.	95°C — 30 с.
58°C — 30 с.	69°C — 30 с.
72°C — 1 мин.	72°C — 1 мин.
30 циклов	30 циклов
72°C — 10 мин.	72°C — 10 мин.
4°C — хранение	4°C — хранение

Филогенетический анализ штаммов *N. gonorrhoeae*, циркулирующих на территории Российской Федерации, был проведен поэтапно путем: определения нуклеотидной последовательности генов *por* и *tbp* *N. gonorrhoeae* методом секвенирования; выравнивания последовательностей переменных участков генов *por* и *tbp* *N. gonorrhoeae* с целью установления позиционной гомологии нуклеотидов в разных последовательностях с помощью программы AlignX из пакета программ Vector NTI 9.1.0, а также с использованием сервера ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>); построения филогенетического дерева для выровненных последовательностей генов *por* и *tbp* *N. gonorrhoeae* при помощи программ AlignX из пакета программ Vector NTI 9.1.0 и MEGA 5; выявления наиболее представительных и наименее представительных кластеров штаммов *N. gonorrhoeae*.

Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований были получены молекулярно-эпидемиологические данные о вариантах штаммов (сиквенс-типах) *N. gonorrhoeae*, циркулирующих на территории Российской Федерации, и степени их генетической изменчивости.

Всего на территории РФ был выявлен 171 вариант сиквенс-типов (ST) штаммов *N. gonorrhoeae* (рис. 1).

В исследованной выборке было выявлено 209 (48,7%) штаммов *N. gonorrhoeae*, имеющих известные сиквенс-типы, описанные в международной базе дан-

ных NG-MAST, и 220 (51,3%) штаммов, представленных с новыми сиквенс-типами, новыми комбинациями известных аллелей и неизвестными аллелями *por* и *tbp* генов (рис. 2).

Данные о новых сиквенс-типах были переданы в международную базу NG-MAST, где им были присвоены соответствующие порядковые номера.

Среди выявленных штаммов *N. gonorrhoeae* встречались как штаммы, представленные единичными сиквенс-типами ($n = 94$; 21,9%), так и штаммы с повторяющимися сиквенс-типами ($n = 335$; 78,1%); при этом группы штаммов с одинаковым сиквенс-типом, который встречался от 2 до 7 раз ($n = 227$), составили 52,9% и группы штаммов с одинаковым сиквенс-типом, который встречался больше 8 раз ($n = 108$), — 25,2% (рис. 3).

Доминирующими, т. е. встречающимися 8 раз и более, были сиквенс-типы: 228 ($n = 26$), 807 ($n = 14$), 5714 ($n = 11$) и 285 ($n = 9$) (рис. 4).

Изучение географического распространения сиквенс-типов на территории РФ показало, что общие сиквенс-типы штаммов *N. gonorrhoeae* были распространены в городах Южного, Северо-Кавказского, Северо-Западного, Центрального, Приволжского и Сибирского федеральных округов РФ (табл. 3).

Анализ распространенности сиквенс-типов *N. gonorrhoeae* в разных странах мира, проведенный на основании данных литературы [13—17] (см. табл. 3; рис. 5), показал, что варианты сиквенс-типов, входящие в общероссийский пул, встречаются также в дру-

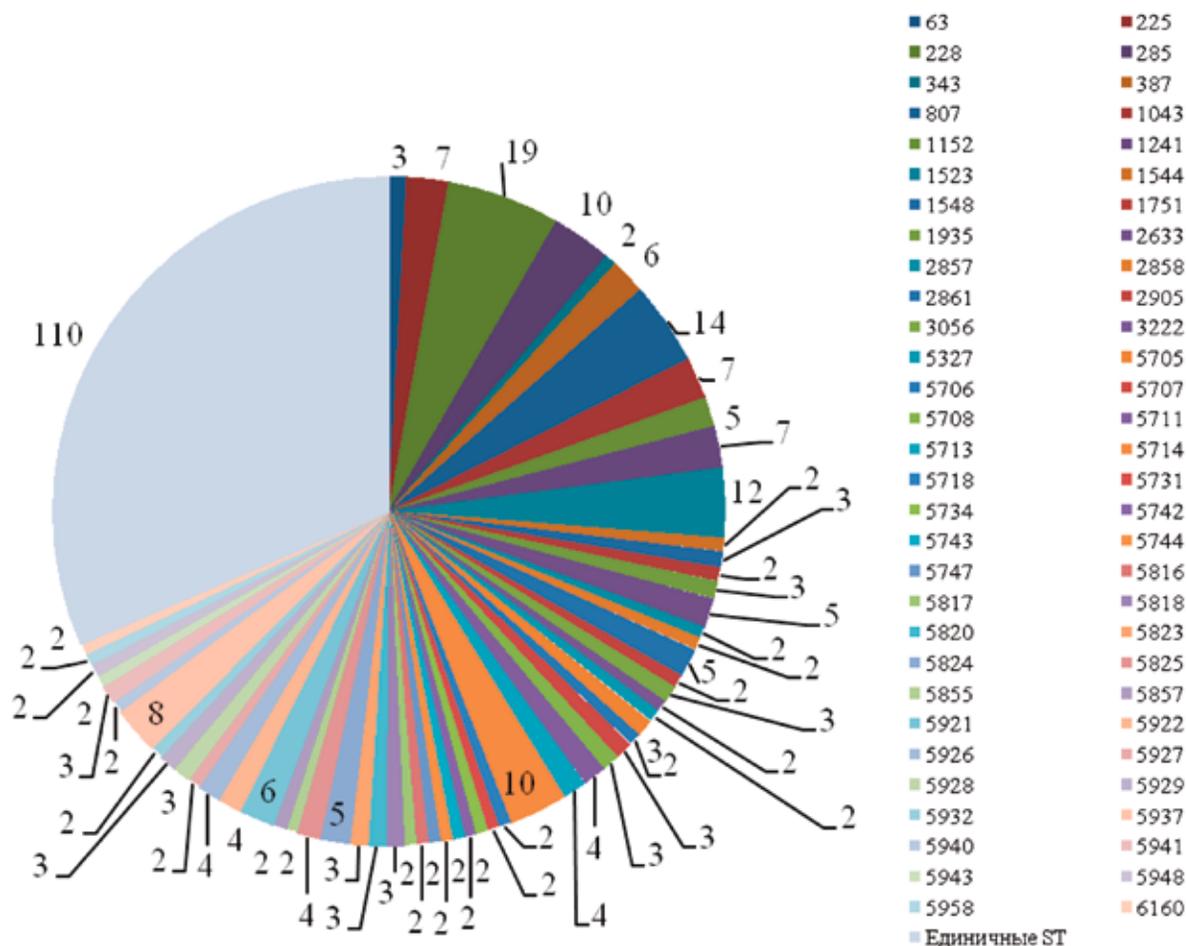


Рис. 1. Сиквенс-типы штаммов *N. gonorrhoeae*, циркулирующих на территории Российской Федерации

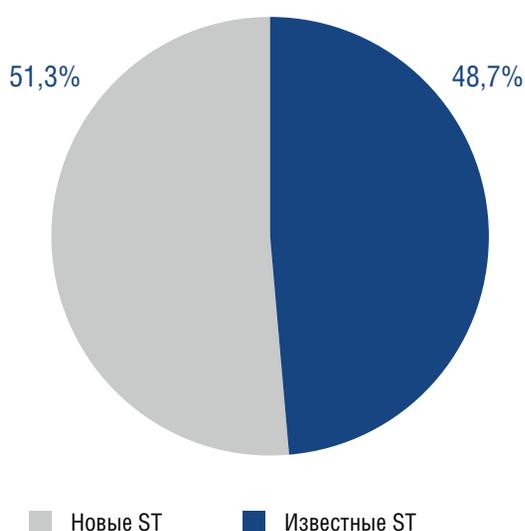


Рис. 2. Распределение известных и новых сиквенс-типов штаммов *N. gonorrhoeae*, циркулирующих на территории Российской Федерации

гих странах мира (Европа, Азия, Северная Америка, Австралия). При этом наибольшая распространенность общих сиквенс-типов наблюдается в Европе, что может быть обусловлено географической близостью европейских стран к Российской Федерации и высокой миграционной активностью населения.

Филогенетический анализ внутрипопуляционных генетических различий штаммов *N. gonorrhoeae*, полученных из различных регионов РФ, позволил выделить несколько важных особенностей.

Установлено, что для популяций *N. gonorrhoeae*, приуроченных ко всей территории РФ и к отдельным субъектам РФ, характерна иерархичная структура кластерных построений. Кластеры, объединявшие родственные сиквенс-типы штаммов *N. gonorrhoeae*, по степени родства и сложности структуры делились на более мелкие субкластеры. Крупные кластеры включали несколько субкластеров.

Филогенетический анализ штаммов *N. gonorrhoeae*, циркулирующих на территории РФ в целом, выявил 5 крупных, 9 средних и 13 мелких кластеров. Эволюционно выборка российских штаммов *N. gonorrhoeae* дивергировала в одном направлении, разбиваясь на кластеры и субкластеры, но при этом выделялся

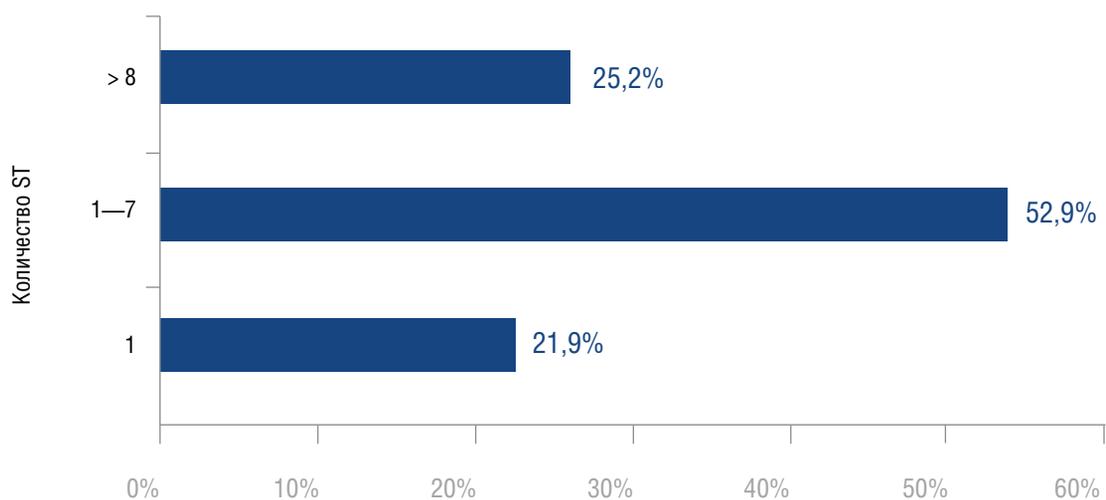


Рис. 3. Частота встречаемости единичных и повторяющихся сиквенс-типов *N. gonorrhoeae*

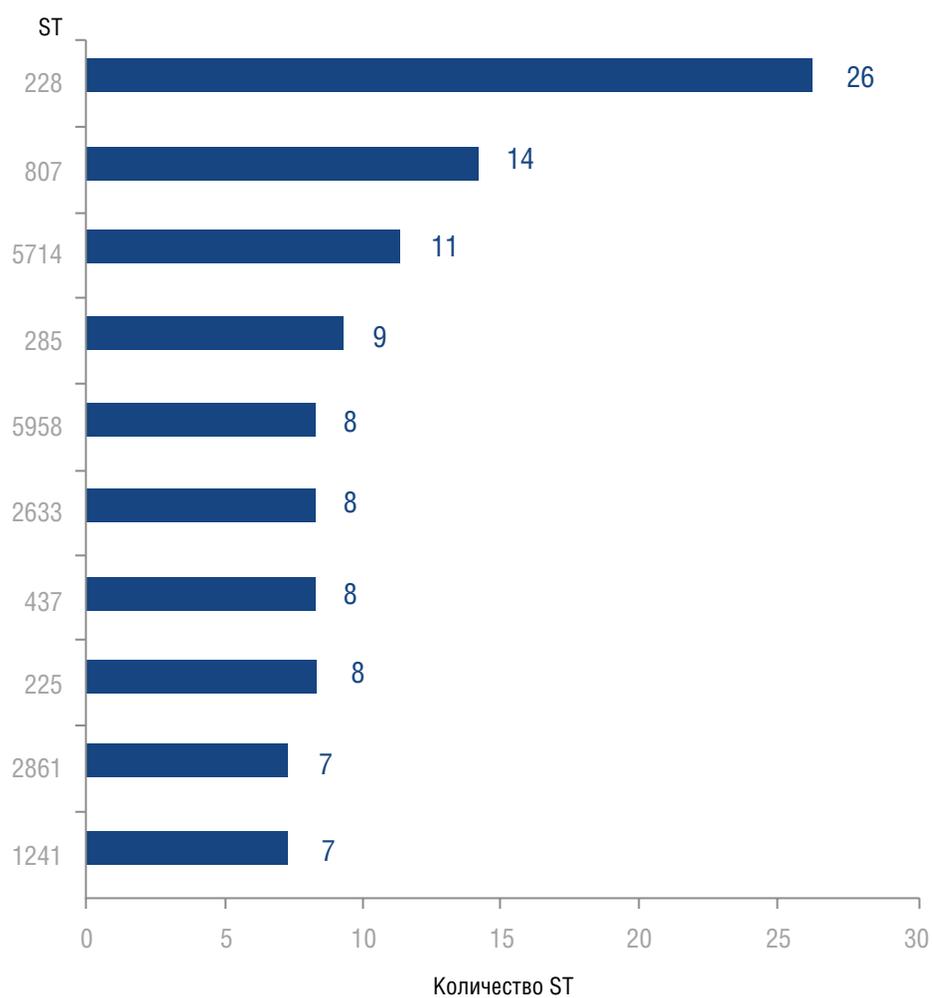
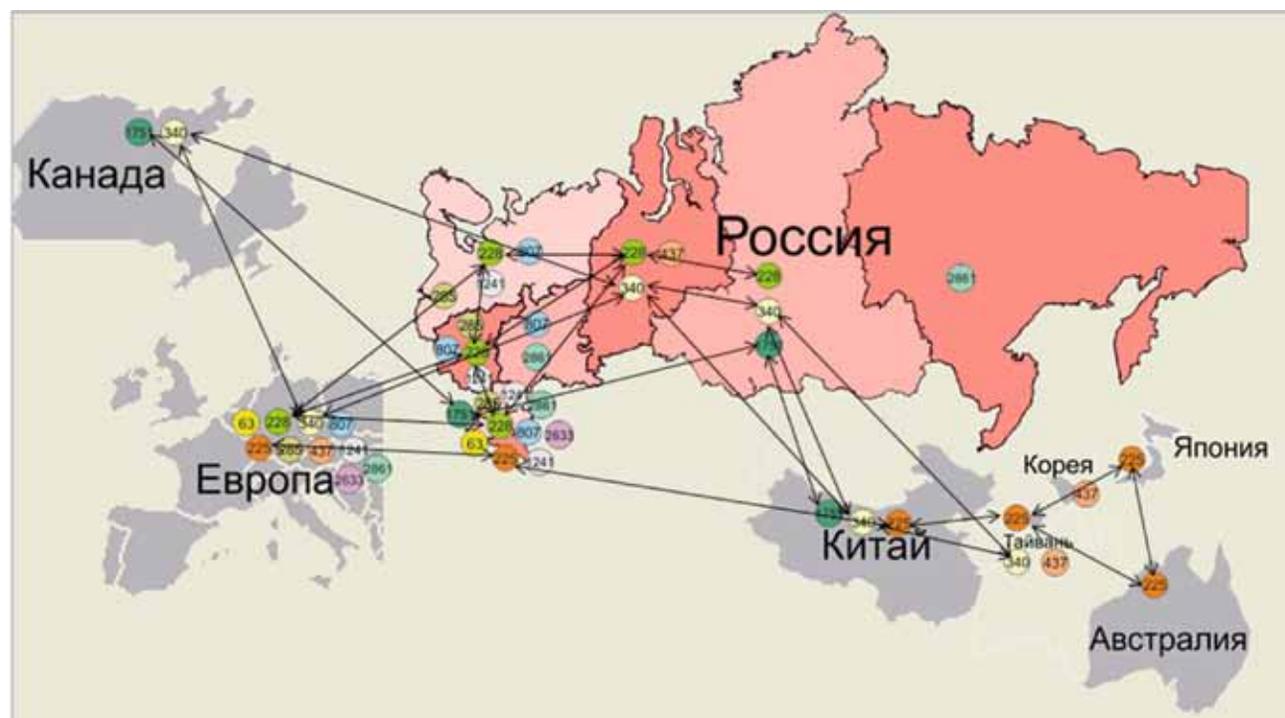


Рис. 4. Распределение доминирующих сиквенс-типов в российской популяции штаммов *N. gonorrhoeae*

ТАБЛИЦА 3

Распространение общих сиквенс-типов *N. gonorrhoeae* в федеральных округах Российской Федерации и странах мира

ST	Федеральный округ России	Страна	Источник
63	Южный, Дальневосточный, Северо-Кавказский	Англия	Международная база данных NG-MAST
225	Северо-Западный, Северо-Кавказский	Англия, Греция, Дания, Португалия, Шотландия, Германия, Франция, Гонконг, Тайвань, Япония, Австралия	С. Florindo и соавт., 2010 М. Tapaka и соавт., 2011 А. Mavroidi и соавт., 2011 L. Monfort и соавт., 2009 W. Wong и соавт., 2008
228	Центральный, Южный, Северо-Западный, Сибирский, Уральский, Северо-Кавказский	Англия, Франция, Германия	Международная база данных NG-MAST
285	Центральный, Южный, Северо-Западный	Англия	Международная база данных NG-MAST
340	Сибирский, Уральский	Тайвань, Англия, Канада, Франция, Гонконг, Китай	Международная база данных NG-MAST
437	Уральский	Корея, Франция, Тайвань	Международная база данных NG-MAST
807	Центральный, Южный, Северо-Западный Приволжский, Северо-Кавказский	Англия	Международная база данных NG-MAST
1241	Центральный, Южный, Северо-Западный Северо-Кавказский	Англия	Международная база данных NG-MAST
1751	Южный, Сибирский	Канада, Гонконг	Международная база данных NG-MAST
2633	Дальневосточный, Северо-Кавказский	Греция	Международная база данных NG-MAST
2861	Южный, Дальневосточный, Приволжский	Англия	Международная база данных NG-MAST

Рис. 5. Распространение общих сиквенс-типов штаммов *N. gonorrhoeae* в мире

Приволжский федеральный округ

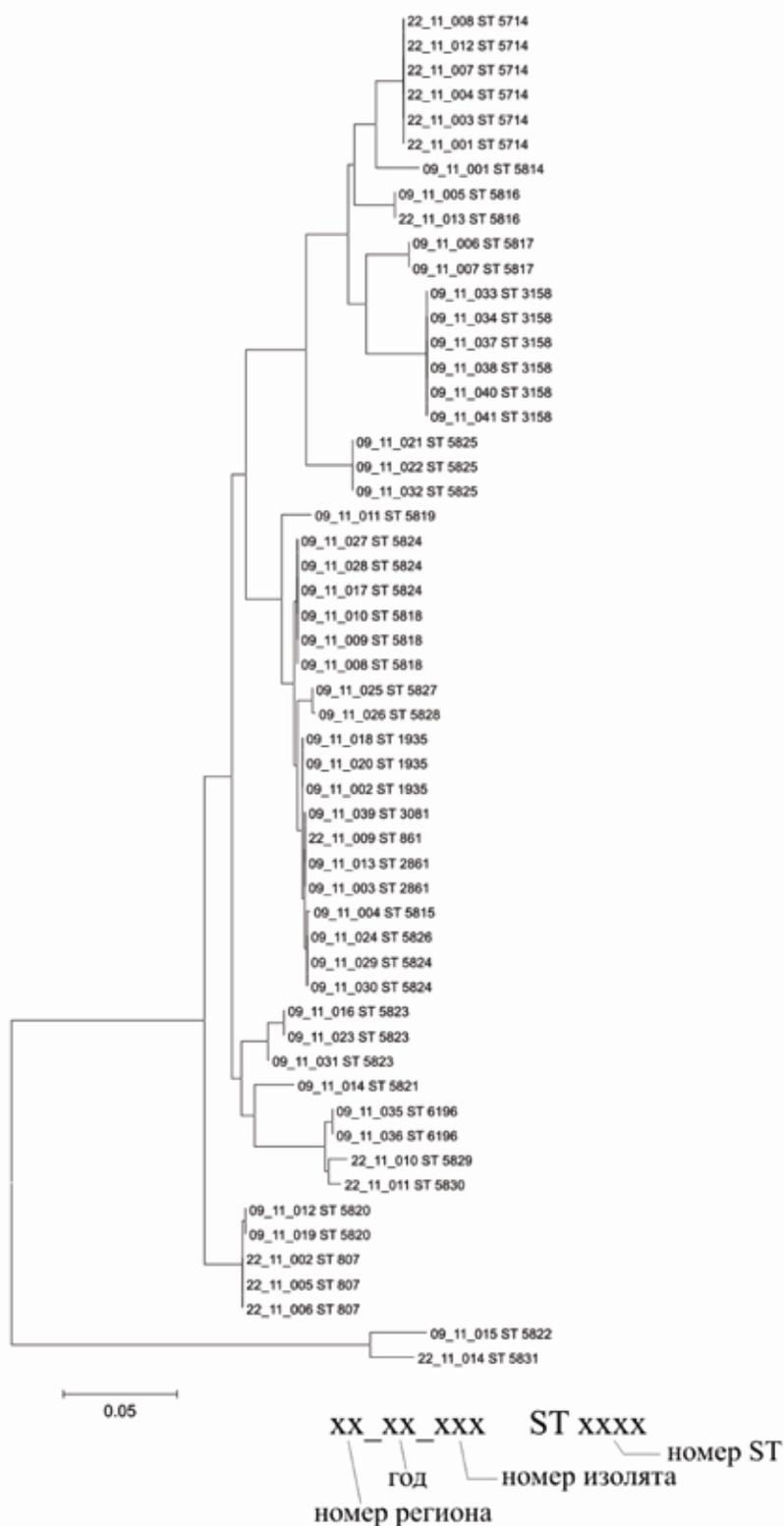


Рис. 6. Филогенетическое древо, рассчитанное для штаммов *N. gonorrhoeae* Приволжского федерального округа.

Среди 55 штаммов *N. gonorrhoeae*, полученных из ПФО, выявлено 26 сиквенс-типов. Наиболее представленными сиквенс-типами являются: 3158 (11%), 5714 (11%) и 5824 (9%). На дендрограмме хорошо выделяются 4 крупных и 3 мелких кластера, эволюционно удаленных друг от друга

1 кластер, состоявший из 27 штаммов, который был эволюционно дистанцирован от остального массива штаммов. Учитывая, что входившие в состав данного кластера штаммы *N. gonorrhoeae* были выделены в основном в Южном федеральном округе, можно предположить, что штамм — предшественник (родоначальник) данного кластера мог быть привнесен в РФ извне.

В результате филогенетического анализа штаммов *N. gonorrhoeae*, выделенных в пределах одного федерального округа, была установлена внутривидовая генетическая гетерогенность кластерных построений штаммов *N. gonorrhoeae*, индивидуальная для каждого федерального округа. На рис. 6 представлено филогенетическое древо, на котором отражена генетическая гетерогенность в популяции *N. gonorrhoeae* на примере Приволжского федерального округа.

В результате филогенетического анализа была установлена генетическая близость между отдельными сиквенс-типами штаммов *N. gonorrhoeae*, циркулирующими внутри различных округов РФ. Это подтвердило результаты, полученные методом NG-MAST, свидетельствующие о возможности переноса этих сиквенс-типов между территориями РФ за счет миграционного компонента.

Заключение

В результате исследований, проведенных на большой выборке штаммов *N. gonorrhoeae*, были определены сиквенс-типы данных штаммов *N. gonorrhoeae*

методом NG-MAST и осуществлен их филогенетический анализ. Выявлено значительное генетическое разнообразие штаммов *N. gonorrhoeae*, циркулирующих на территории Российской Федерации. Полученные данные могут свидетельствовать о высокой скорости накопления мутаций генов *por* и *tbp* среди российской популяции штаммов *N. gonorrhoeae*.

В результате проведенных исследований была установлена генетическая близость отдельных сиквенс-типов штаммов *N. gonorrhoeae*, выявлены общие и доминирующие сиквенс-типы штаммов *N. gonorrhoeae*, распространенные не только в различных федеральных округах Российской Федерации, но и за рубежом. Это свидетельствует о возможности переноса данных штаммов между территориями Российской Федерации и в Российскую Федерацию из-за рубежа за счет активной миграции населения (туризм, деловые поездки, миграция беженцев, военнослужащих и т. д.).

Исследования показали, что изучение молекулярных особенностей и генетической изменчивости молекулярных типов возбудителя гонококковой инфекции *N. gonorrhoeae* является важным фактором обеспечения контроля над распространением гонореи на территории Российской Федерации, так как позволяет на регулярной основе осуществлять молекулярное наблюдение (мониторинг) и определять пути распространения отдельных сиквенс-типов штаммов *N. gonorrhoeae* на территории Российской Федерации. ■

Литература

- Bennett J.S., Jolley K.A., Sparling P.F. et al. Species status of *Neisseria gonorrhoeae*: evolutionary and epidemiological inferences from multilocus sequence typing. *BMC Biol* 2007; 5: 35.
- Bilek N., Martin I.M., Bell G. et al. Concordance between *Neisseria gonorrhoeae* genotypes recovered from known sexual contacts. *J Clin Microbiol* 2007; 45 (11): 3564—3567.
- В. Сидоренко С.В., Фриго Н.В., Кухарева Е.Н. и др. Генетическое разнообразие штаммов *Neisseria gonorrhoeae*, выявленных от больных гонореей из территорий Российской Федерации. *Вестн. дерматол. и венерол.* 2008; 3: 31—36.
- Vidovic S., Horsman G.B., Liao M. et al. Influence of conserved and hypervariable genetic markers on genotyping circulating strains of *Neisseria gonorrhoeae*. *PLoS One* 2011; 6 (12): e28259.
- Сидоренко С.В., Соломка В.С., Кожушная О.С. и др. Методы типирования возбудителей инфекций, передаваемых половым путем (*N. gonorrhoeae*, *C. Trachomatis*, *T. Pallidum*). *Вестн. дерматол. и венерол.* 2010; 3: 12—21.
- Unemo M., Dillon J.A. 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; 24 (3): 447—458.
- Knapp J.S. Historical perspectives and identification of *Neisseria* and related species. *Clin Microbiol Rev* 1988; 1: 415—431.
- Tapsall J. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *WHO/CDS/CSR/DRS/2001.3*
- LeCuyer B.E., Criss A.K., Seifert H.S. Genetic characterization of the nucleotide excision repair system of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol* 2010; 192 (3): 665—673.
- Snyder L.A., Saunders N.J. The majority of genes in the pathogenic *Neisseria* species are present in non-pathogenic *Neisseria lactamica*, including those designated as 'virulence genes'. *BMC Genomics* 2006; 7: 128.
- Marri P.R., Paniscus M., Weyand N.J. et al. Genome sequencing reveals widespread virulence gene exchange among human *Neisseria* species. *PLoS One*. 2010; 5 (7): e11835.
- Martin I.M., Ison C.A., Aanensen D.M. et al. Rapid sequence-based identification of gonococcal transmission clusters in a large metropolitan area. *J Infect Dis* 2004; 189 (8): 1497—1505.
- Florindo C., Pereira R., Boura M. et al. Genotypes and antimicrobial-resistant phenotypes of *Neisseria gonorrhoeae* in Portugal (2004—2009). *Sex Transm Infect* 2010; 86 (6): 449—453.
- Tanaka M., Koga Y., Nakayama H. et al. Antibiotic-resistant phenotypes and genotypes of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Japan: identification of strain clusters with multidrug-resistant phenotypes. *Sex Transm Dis* 2011; 38 (9): 871—875.
- Mavroidi A., Tzelepi E., Siatravani E. et al. Analysis of emergence of quinolone-resistant gonococci in Greece by combined use of *Neisseria gonorrhoeae* multiantigen sequence typing and multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol* 2011; 49 (4): 1196—1201.
- Monfort L., Caro V., Devaux Z. et al. First *Neisseria gonorrhoeae* genotyping analysis in France: identification of a strain cluster with reduced susceptibility to ceftriaxone. *J Clin Microbiol* 2009; 47 (11): 3540—3545.
- Wong W.W., Huang C.T., Li L.H. et al. Molecular epidemiological identification of *Neisseria gonorrhoeae* clonal clusters with distinct susceptibility profiles associated with specific groups at high risk of contracting human immunodeficiency virus and syphilis. *J Clin Microbiol* 2008; 46 (12): 3931—3934.