

© Коллектив авторов, 2013

К.О. МИРОНОВ, М.А. КОРОЛЕВА, А.Е. ПЛАТОНОВ, И.С. КОРОЛЕВА, Г.А. ШИПУЛИН

## ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ТИПИРОВАНИЕ *NEISSERIA MENINGITIDIS*, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В РЕГИОНАХ РОССИИ

Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва

Методом мультилокусного секвенирования-типирования (МЛСТ) в сочетании с определением антигенных свойств (серогруппа, субтип, аллель варибельного участка VR белка FetA) проведена генетическая характеристика 34 штаммов менингококков и 22 клинических образцов, содержащих ДНК *N. meningitidis*, выделенных на территории России от больных генерализованными формами менингококковой инфекции. Преобладали менингококки серогрупп В (31 образец) и С (20 образцов). Большая часть (33 образца) менингококков серогрупп В и С была распределена по пяти клональным комплексам, четыре из них уже наличествовали в базе данных <http://pubmlst.org/neisseria/>: «ST-41/44 complex/Lineage» (18 образцов или 35%), «ST-18 complex» (4 образца или 8%), «ST-226 complex» (1 образец или 2%) и «ST-37 complex» (1 образец или 2%). Клональный комплекс, образованный сиквенс-типами, генетически близкими к ST-9396 (9 образцов или 18%), был выделен в данном исследовании. Для 17 найденных сиквенс-типов (18 образцов или 35%) не удалось установить принадлежность к какому-либо клональному комплексу. Такая картина типична для спорадического характера заболеваемости. В то же время присутствие на наблюдаемой территории сиквенс-типов и клональных комплексов, встречающихся в странах Европы, не позволяет говорить о существенных генетических особенностях российских штаммов *N. meningitidis* серогрупп В и С.

**Ключевые слова:** *Neisseria meningitidis*, регионы России, мультилокусное секвенирование-типирование, PorA, FetA.

К.О. MIRONOV, М.А. KOROLEVA, А.Е. PLATONOV, И.С. KOROLEVA, Г.А. SHIPULIN

## GENETIC TYPING OF *NEISSERIA MENINGITIDIS* CIRCULATING IN THE REGIONS OF RUSSIA

Central Research Institute of Epidemiology, Russian Inspectorate for the Protection of Consumer Rights and Human Welfare, Moscow

34 meningococcal strains and 22 samples of cerebrospinal fluid containing *N. meningitidis* DNA were collected in the Russian regions from patients with systemic meningococcal disease and characterized by multilocus sequence typing and genetic determination of antigenic features (serogroup, subtype, allele of a variable region of FetA protein). Serogroup B (31 specimens) and serogroup C (20 specimens) meningococci prevailed. The majority of serogroup B and C meningococci (33 specimens) belonged to one of 5 clonal complexes. Four complexes were already present in database <http://pubmlst.org/neisseria/>: «ST-41/44 complex/Lineage» (18 specimens, 35%), «ST-18 complex» (4 or 8%), «ST-226 complex» (1 or 2%) and «ST-37 complex» (1 or 2%). 5 sequence types (9 specimens or 18%), which were genetically related to ST-9396, formed a new clonal complex identified in this study. 17 sequence types found in 18 (35%) specimens do not belong to any known clonal complex. This pattern is typical for sporadic morbidity. At the same time, the sequence types and clonal complexes of meningococci found in the investigated Russian regions were also present in European countries; this does not point to the fact there are substantial genetic features of Russian *N. meningitidis* serogroup B and C strains.

**Key words:** *Neisseria meningitidis*, Russian regions, multilocus sequence typing, PorA, FetA.

Микробиологический мониторинг штаммов *Neisseria meningitidis* является неотъемлемой частью эпидемиологического надзора за менингококковой инфекцией. В предыдущих исследованиях было показано, что периодические колебания показателя заболеваемости менингококковой инфекцией — чередование периодов эпидемического неблагополучия и межэпидемических пери-

одов — могут быть связаны с присутствием на территории гипервирулентных штаммов менингококка [1, 2]. Изучение особенностей и закономерностей распространения гипервирулентных штаммов позволяет в ряде случаев контролировать эпидемический процесс с помощью различных типов вакцин. С этой целью разработана система обозначения штаммов *N. meningitidis*, позволяющая

дифференцировать штаммы внутри вида и включающая характеристику серологических и генетических свойств бактерии. Основными регламентированными методами характеристики штаммов *N. meningitidis* являются серогруппирование в сочетании с мультилокусным секвенированием-типированием (МЛСТ) и антигенной характеристикой трех вариабельных фрагментов белков PorA и FetA [1, 3]. Применение метода МЛСТ позволяет проводить объединение генетически близких штаммов в группы — клональные комплексы. Полученная таким образом характеристика штамма в совокупности с эпидемиологической информацией (год, источник, территория) объединяется через Интернет в общедоступную базу данных <http://pubmlst.org/neisseria/>. Запрос в базу данных позволяет идентифицировать впервые выделенный штамм как новый, или как уже известный, или как штамм, входящий в известный клональный комплекс. Для известных клональных комплексов в ряде исследований показана связь с уровнем заболеваемости на разных территориях, что позволяет говорить об эпидемической опасности исследуемого штамма [1–3].

Заболеваемость генерализованными формами менингококковой инфекции (ГФМИ) в России не превышает 2 случаев на 100 тыс. населения, в то же время заболеваемость в регионах может существенно варьировать и достигать значений 7–8 на 100 тыс. населения [4]. В предыдущих исследованиях охарактеризованы штаммы *N. meningitidis*, циркулирующие на территории Москвы [5], для которой характерны невысокие показатели заболеваемости. С целью сбора информации о свойствах штаммов, циркулирующих на территории России, было издано информационное письмо № 01/9620-0-32 от 29.06.2010 «О взаимодействии территориальных органов и учреждений Роспотребнадзора с Референс-центром по мониторингу за бактериальными менингитами». В рамках организованной работы были получены штаммы и клинический материал из регионов России. Проведена генетическая характеристика *N. meningitidis*, вызвавших ГФМИ, с целью определения серологических и генетических особенностей и потенциальной эпидемической опасности циркулирующих штаммов.

### Материалы и методы

Исследовано 34 культуры, изолированные из ликвора или крови, и 22 клинических образца (кровь, спинномозговая жидкость, аутопсийный материал). Штаммы и клинические образцы были получены от больных ГФМИ в различных регионах России и направлены в Референс-центр по мониторингу за бактериальными менингитами. Исследованный материал был собран в период с 2008 по 2012 г., 40 (71%) штаммов и клинических образцов было выделено в 2011 г. Идентификация и серогруппирование штаммов *N. meningitidis*, приготовление бактериальных смывов и выделение ДНК проведены с использованием стандартных лабораторных методик [5, 6]. Штаммы и клинический

материал были исследованы с помощью наборов реагентов «АмплиСенс *Neisseria* spp., *Haemophilus* spp, *Streptococcus* spp.-EPh» и «АмплиСенс *Neisseria meningitidis* A, B, C-EPh» (Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора).

Генотипирование проводилось согласно требованиям Европейского общества по изучению менингококковой инфекции (European Meningococcal Disease Society, <http://neisseria.org/nm/typing/>). Характеристика штаммов и образцов включала в себя определение методом МЛСТ сиквенс-типа и антигенного профиля — фрагментов VR1 и VR2 белка PorA и аллеля VR белка FetA — с помощью секвенирования соответствующих фрагментов генома *N. meningitidis* [3, 5]. При обозначении номеров аллелей, сиквенс-типов и клональных комплексов использована номенклатура базы данных <http://pubmlst.org/neisseria/>. На момент окончания работы база данных содержала записи о более чем 20 000 типированных представителей рода *Neisseria*. Для бактерий вида *N. meningitidis* было описано 47 клональных комплексов.

### Результаты и обсуждение

Проведено генотипирование 56 штаммов и образцов, содержащих ДНК *N. meningitidis*. Исследованный материал содержал менингококки преимущественно серогрупп В (31 образец) и С (20 образцов), серогруппы А и W-135 обнаруживались существенно реже (4 и 1 образец соответственно).

Результаты МЛСТ и антигенной характеристики вместе с дополнительной информацией об источнике, годе и месте выделения менингококка внесены в базу данных <http://pubmlst.org/neisseria/>. Образцам присвоены следующие идентификационные номера: 13150, 13151, 13167, 15021, 15028, 15037, 15652, 19165-19193, 19195-19206 и 19463-19470.

При проведении антигенной характеристики выявлено несколько новых, не описанных ранее аллелей в нуклеотидных последовательностях, кодирующих антигенные белки: аллель 22-30 фрагмента VR1 белка PorA и 2 аллеля F4-35 и F3-52 фрагмента VR белка FetA. Большинство исследованных образцов (34 или 61%) содержали менингококки с сиквенс-типами, которые были впервые найдены в данном исследовании. Выявлено 22 сиквенс-типа, образованных не встречающимися ранее комбинациями аллелей, и 10 сиквенс-типов, содержащих 1 (у 8 сиквенс-типов) или 2 (у 2 сиквенс-типов) аллеля, не описанных ранее.

Три образца, содержащие ДНК менингококков серогруппы А, входили в клональный комплекс «ST-1 complex/subgroup I/II», характерный для московских штаммов менингококков этой серогруппы, выделяемых в межэпидемический период [5], и один образец с уникальным аллельным и антигенным профилем, не характерным для штаммов этой серогруппы — «А: P1.5-1,10-27: F4-35: ST-7639 (-)». Однократное (в 2009 г.) выделение возбудителя с такими характеристиками не позволяет говорить о его повышенных вирулентных свойствах. Единственный образец, содержащий ДНК менин-

гококка серогруппы W-135, имел сиквенс-тип и аллельный профиль, характерный для московских штаммов этой серогруппы – «W-135: P1.5,2: F1-1: ST-11 (cc11)». Небольшое количество образцов, содержащих менингококки серогрупп А и W-135, не позволяет с уверенностью говорить о генетических или антигенных особенностях менингококков этих серогрупп, циркулирующих на территории России.

Практически все сиквенс-типы (35) менингококков серогрупп В и С были выявлены однократно, за исключением ST-3346 (8 образцов), ST-8499 (4 образца), ST-6926 и ST-9407 (по 2 образца). Согласно содержащейся в базе данных <http://pubmlst.org/neisseria/> информации, 7 найденных сиквенс-типов у представителей этих серогрупп были выявлены ранее на территории других европейских стран (табл. 1). Сиквенс-типы ST-3346 и ST-18 (1 образец в этом исследовании) выявлялись неоднократно также и среди штаммов серогрупп В и С, выделенных на территории Москвы в предыдущие годы [5].

Хотя большинство сиквенс-типов (32 у 34 образцов), выявленных у менингококков серогрупп В и С, не выявлялись ранее на других территориях, примерно половина (24) образцов серогрупп В и С принадлежала четырем известным клональным комплексам: «ST-41/44 complex/Lineage 3» (11 образцов серогруппы С и 7 – серогруппы В), «ST-18 complex» (4 образца серогруппы В), «ST-226 complex» и «ST-37 complex» (по одному образцу серогруппы В). Сиквенс-типы и антигенные характеристики образцов, входящих в эти клональные комплексы, приведены в табл. 2. Все найденные профили, за исключением двух образцов с профилем «С: P1. 17,16-4: F2-9: ST-3346 (cc41/44)», были выявлены однократно. Согласно информации, представленной в базе данных <http://pubmlst.org/neisseria/>, клональные комплексы «ST-41/44 complex/Lineage 3» и «ST-18 complex» объединяют штаммы, выделенные преимущественно от больных ГФМИ. Клональный комплекс «ST-41/44 complex/Lineage 3» объединяет более 2700 штаммов, выделенных, начиная с 1960 г., и распространенных по всему

**Таблица 1. Сиквенс-типы менингококков серогрупп В и С, выявленные как в этом исследовании на территории России, так и ранее на других территориях**

Сиквенс-тип (клональный комплекс)	Страна и год выделения (в скобках – количество выявленных штаммов данного сиквенс-типа)
ST-18 (cc18)	Беларусь, Великобритания, Германия, Польша, Россия (Москва), Чехия; с 1985 по 2012 гг. (27)
ST-3346 (cc41/44)	Беларусь, Россия (Москва), Франция, Чехия; с 2002 по 2012 гг. (14)
ST-1258	Греция, 1999 г. (1)
ST-8499	Германия, 2008 г. (1)
ST-8065 (cc18)	Великобритания, 2008 г. (1)
ST-8091 (cc41/44)	Норвегия, 2009 г. (1)
ST-8981 (cc41/44)	Польша, 2011 г. (1)

**Таблица 2. Антигенная и генетическая характеристика обнаруженных в российских регионах менингококков серогрупп В и С, входящих в известные клональные комплексы**

Серогруппа	Клональный комплекс			
	ST-41/44 complex/Lineage 3	ST-18 complex	ST-226 complex	ST-37 complex
В (13 штаммов)	P1. 17,16-4: F3-9: ST-3346 P1. 17,16-4: F5-5: ST-3346 P1. 17, 16-4: F4-21: ST-8091 P1. 7,30-3: F1-15: ST-9393* P1. 12-3,4: F3-4: ST-9399 P1. 17,16-4: F3-9: ST-9401 P1. 17,16-4: F3-9: ST-9404	P1. 7,30-1: F5-5: ST-18 P1. 5-1, 10-4: F5-2: ST-8065 P1. 7-2,13-1: F3-7: ST-9394 P1. 5-1, 2-2: F3-6: ST-9402	P1. 5-1, 10-4: F4-23: ST-9386	В: P1.7-2, 13-1: F1-5: ST-9385
С (11 штаммов)	P1. 17,16-4: F2-9: ST-3346 P1. 17,16-4: F3-7: ST-3346 P1. 17,16-4: F3-9: ST-3346 P1. 17,16-4: F3-52: ST-3346 P1. 22,14-31: F3-9: ST-3346 P1. 17,16-4: F1-7: ST-8981 P1. 17,16-4: F5-59: ST-8255 P1. 17,16-4: F4-1: ST-8256 P1. 17,16-4: F1-33: ST-9397 P1. 17,16-4: F3-9: ST-9572	–	–	–

\* Жирным шрифтом выделены впервые выявленные сиквенс-типы.

Таблица 3. «Новый» клональный комплекс «сс9396», образованный пятью сиквенс-типами *N. meningitidis* серогрупп В и С

Сиквенс-типы	Количество образцов	МЛСТ*							eBURST**		
		abcZ	adk	aroE	fumC	gdh	pdhC	pgm	SLV	DLV	SAT
ST-6926	2	4	3	15	17	5	6	8	—	3	1
ST-8499	4	4	18	15	5	5	6	8	1	2	1
ST-9396	1	8	18	15	17	5	6	8	1	3	—
ST-9400	1	8	18	7	17	5	6	8	1	—	3
ST-9569	1	4	18	15	605	5	6	8	1	2	1

\* Номера аллелей МЛСТ-локусов.

\*\* Количество сиквенс-типов (аллельных профилей), с которым данный аллельный профиль не совпадает по одному (SLV), двум (DLV) и трем (SAT) локусам.

миру. Штаммы этого клонального комплекса были выделены практически во всех странах Западной Европы [1]. Клональный комплекс «ST-18 complex» содержит около 300 штаммов, выделенных на территории Европы в 1974–2012 гг. Таким образом, штаммы, входящие в эти клональные комплексы, не имеют существенных генетических отличий от штаммов, циркулирующих в Европе, и московских штаммов, описанных ранее [5].

Несмотря на то что остальные 22 сиквенс-типа менингококков серогрупп В и С (27 штаммов), не удастся отнести к известным клональным комплексам, с помощью алгоритма кластеризации eBURST [7] среди них можно выделить группу из 9 генетически близких штаммов менингококков с сиквенс-типами ST-6926, ST-8499, ST-9396, ST-9400 и ST-9569 (табл. 3). Все эти сиквенс-типы принадлежали менингококкам серогруппы В, за исключением ST-6926 (серогруппы С). Использованный для заполнения последних трех столбцов в табл. 3 метод eBURST является инструментом, позволяющим объединять генетически близкие штаммы в один клональный комплекс на основании количества несовпадений в соответствующих аллельных профилях. Аллельные профили сиквенс-типов ST-6926, ST-8499, ST-9396, ST-9400 и ST-9569 совпадают друг с другом как минимум по четырем локусам и отличаются друг от друга по одному, двум или трем локусам аллельного профиля, что позволяет объединить их в один клональный комплекс. Сиквенс-тип ST-9396 обладает наибольшим количеством близких сиквенс-типов, имеющих минимальные отличия в аллельном профиле: 1 сиквенс-тип отличается от него по одному локусу аллельного профиля и 3 сиквенс-типа — по двум.

Таким образом, из 51 изученного штамма *N. meningitidis* серогрупп В и С 33 входят в пять клональных комплексов. Клональный комплекс «ST-41/44 complex/Lineage» объединяет 18 (35%) образцов, клональный комплекс «ST-18 complex» — 4 (8%) образца, клональные комплексы «ST-226 complex» и «ST-37 complex» содержат по 1 (по 2%) образцу. В клональный комплекс, пока не выделенный в базе данных <http://pubmlst.org/neisseria/> и образованный сиквенс-типами, генетически близкими к ST-9396, входит 9 (18%) образцов. Остальные 17 сиквенс-типов (18 образцов или 35%) не удастся включить в

какой-либо клональный комплекс, что может быть связано как с недостаточным объемом анализируемой выборки штаммов для адекватного охвата наблюдаемой территории, так и с особенностями клональной структуры менингококков, циркулирующих на территории России. Одновременное присутствие нескольких клональных комплексов, а также выявление значительной доли штаммов, не объединенных в клональные комплексы, типично для спорадического характера заболеваемости. В то же время присутствие на наблюдаемой территории сиквенс-типов и клональных комплексов, встречающихся в странах Европы, не позволяет говорить о существенных генетических особенностях российских штаммов *N. meningitidis*.

## Литература

1. Brehony C., Jolley K.A., Maiden M.C. Multilocus sequence typing for global surveillance of meningococcal disease. *FEMS Microbiol. Rev.* 2007; 31(1): 15–26.
2. Watkins E.R., Maiden M.C. Persistence of hyperinvasive meningococcal strain types during global spread as recorded in the PubMLST database. *PLoS One* 2012; 7(9): e45349.
3. Миронов К.О., Шипулин Г.А., Королева И.С., Платонов А.Е. Генотипирование *Neisseria meningitidis*. *Эпидемиол. и инфекц. бол.* 2009; (4): 18–21.
4. Королева И.С., Белошицкий Г.В., Спирихина Л.В., Закроева И.М., Тагаченкова Т.А., Королева М.А. Использование некоторых параметрических характеристик для изучения эпидемиологических особенностей менингококковой инфекции и гнойных бактериальных менингитов. *Журн. микробиол.* 2010; (2): 20–23.
5. Миронов К.О., Платонов А.Е., Королева И.С., Тагаченкова Т.А., Браславская С.И., Шипулин Г.А. Генетическая характеристика московских штаммов *Neisseria meningitidis*. *Клин. микробиол. антимикроб. химиотер.* 2011; 13(2): 135–148.
6. Королева И.С., Белошицкий Г.В. *Менингококковая инфекция и гнойные бактериальные менингиты: руководство по лабораторной диагностике*. М.: Медицинское информационное агентство, 2007. 112 с.
7. Feil E.J., Li B.C., Aanensen D.M. et al. eBURST: Inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *J. Bacteriol.* 2004; 186(5): 1518–1530.

Поступила 11.02.13

## References

1. Brehony C., Jolley K.A., Maiden M.C. Multilocus sequence typing for global surveillance of meningococcal disease. *FEMS Microbiol. Rev.* 2007; 31(1): 15–26.
2. Watkins E.R., Maiden M.C. Persistence of hyperinvasive meningococcal strain types during global spread as recorded in the PubMLST database. *PLoS One* 2012; 7(9): e45349.
3. Mironov K.O., Shipulin G.A., Koroleva I.S., Platonov A.E. [Genotyping *Neisseria meningitidis*]. *Epidemiologiia i Infektsionnye Bolezni* 2009; (4): 18–21. (In Russ.)
4. Koroleva I.S., Beloshitskii G.B., Spirikhina L.V., Zakroeva I.M., Tagachenkova T.A., Koroleva M.A.. [Use of several parametric characteristics for study of epidemic features of meningococcal infection and bacterial meningitis]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2010; (2): 20–23. (In Russ.)
5. Mironov K.O., Platonov A.E., Koroleva I.S., Tagachenkova T.A., Braslavskaja S.I., Shipulin G.A. [Genetic characteristics of Moscow *Neisseria meningitidis* strains]. *Klinicheskaja mikrobiologija i antimikrobnaja khimioterapija* 2011; 13(2): 135–148. (In Russ.)
6. Koroleva I.S., Beloshitskii G.B. [Meningococcal infection and purulent bacterial meningitis: a guide to laboratory diagnostics]. Moscow: Meditsinskoe Informatsionnoe Agentstvo, 2007. 112 c. (In Russ.)
7. Feil E.J., Li B.C., Aanensen D.M. et al. eBURST: Inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *J. Bacteriol.* 2004; 186(5): 1518–1530.

## Для корреспонденции:

**Миронов Константин Олегович** – канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаб. эпидемиологии природно-очаговых инфекций Центрального НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора  
 Адрес: 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. За  
 Телефон: +7(495) 974-96-46  
 E-mail: mironov@pcr.ru  
**For correspondence:** Konstantin O. Mironov, mironov@pcr.ru

## Сведения об авторах:

**Королева Мария Александровна** – мл. науч. сотр. лаб. эпидемиологии менингококковой инфекции и гнойных бактериальных менингитов Центрального НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора; gostmi@pcr.ru  
**Платонов Александр Евгеньевич** – д-р биол. наук, проф., зав. лаб. эпидемиологии природно-очаговых инфекций Центрального НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора; platonov@pcr.ru  
**Королева Ирина Станиславовна** – д-р мед. наук, зав. лаб. эпидемиологии менингококковой инфекции и гнойных бактериальных менингитов Центрального НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора; gostmi@pcr.ru  
**Шипулин Герман Александрович** – канд. мед. наук, руководитель отд. молекулярной диагностики и эпидемиологии Центрального НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора; getman@pcr.ru

\* \* \*

Список литературы оформлен в соответствии с рекомендациями Всероссийского института научной и технической информации (ВИНИТИ) РАН для учета ссылок на публикации в Российском индексе научного цитирования (РИНЦ, www.elibrary.ru) и зарубежных библиографических базах.