

## РАСШИРЕННАЯ АНТИГЕННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИЙ ВИДА *NEISSERIA MENINGITIDIS* НА ОСНОВАНИИ ТИПИРОВАНИЯ ФРАГМЕНТА VR БЕЛКА FETA

**Мионов К.О., Платонов А.Е., Королева И.С., Браславская С.И., Шипулин Г.А.**

ФГУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

### Введение

Современная номенклатура обозначения бактерий *Neisseria meningitidis* включает в себя серогрупповую характеристику штамма в совокупности с генетической характеристикой методом мультилокусного секвенирования-типирования (сиквенс-тип, клональный комплекс) и антигенной характеристикой переменных участков (эпитопов) поверхностных белков PorA и FetA [1]. Серогрупповая и генетическая характеристика позволяют проводить глобальный микробиологический мониторинг популяции *N. meningitidis*. Антигенная характеристика является дополнительным инструментом классификации менингококков и дает возможность получить необходимую информацию для разработки иммунопрофилактических препаратов. Белок FetA относится к одному из наиболее распространенных железозависимых белков наружной мембраны менингококка. Вторичная структура белка FetA представлена 26 гидрофобными трансмембранными участками и 13 петлеобразными участками, выходящими на поверхность клетки. Наиболее вариabельным участком белка FetA является фрагмент 7 петли, ответственный за связывание с антителами (фрагмент VR) [2]. Антигенная характеристика белка FetA подразумевает идентификацию аминокислотной последовательности фрагмента VR на основании секвенирования соответствующего фрагмента гена *fetA*. На сегодняшний день (октябрь 2007 г.) описано 243 последовательности фрагмента VR, которые на основании гомологии аминокислотных последовательностей распределены по 6 семействам. Каждая уникальная последовательность фрагмента VR обозначается цифрой через тире после цифры, обозначающей семейство в которое входит данная последовательность; например, запись «F5-8» означает, что данный штамм имеет аллельный вариант 8, входящий в семейство 5 фрагмента VR белка FetA. Международная номенклатура обозначения последовательностей фрагмента VR представлена на Интернет-сайте <http://neisseria.org/nm/>.

### Цели

Отработка методики антигенной характеристики бактерий вида *N. meningitidis* на основании секвенирования фрагмента гена *fetA*, соответствующего эпитопу VR белка FetA. Проведение антигенной характе-

ристики штаммов, выделенных на территории Москвы в сопоставлении со штаммами, выделенными на других территориях.

### **Материалы и методы**

Проведено типирование 16 штаммов *N. meningitidis* серогруппы В, изолированных на территории Москвы в период 1995-2002 гг. от больных с генерализованными формами менингококковой инфекции. Все штаммы были охарактеризованы ранее методом мультилокусного секвенирования-типирования, у исследованных штаммов определен субтип на основании антигенной характеристики белка PorA (см. базу данных <http://pubmlst.org/neisseria/>).

Использованные в работе наборы для выделения ДНК, ПЦР и детекции продуктов амплификации произведены в ФГУН Центральном НИИ эпидемиологии (АмплиСенс™, Россия). Для секвенирования был использован набор «ABI Prism™ Big Dye v. 1. 1» (Applied Biosystems, США). Детекция результатов секвенирования проводилась на приборе «ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer» (Applied Biosystems, США).

Обозначение аллелей фрагмента VR белка FetA проводилось согласно международной номенклатуре с помощью Интернет-ресурса <http://neisseria.org/nm/>.

### **Результаты**

Проведено выравнивание нуклеотидных последовательностей гена *fetA*, представленных в базе данных GenBank, и выбраны праймеры, позволяющие амплифицировать последовательность, соответствующую фрагменту VR белка FetA. 5'-3' последовательности выбранных праймеров следующие: прямой праймер (SFetA) – AAC-TTC-AAC-TTC-GAC-AGC-CGC-CTT-GCC-GAA-C, обратный праймер (AFetA) – GCT-GCC-AAA-TCA-CGC-CGA-AAC-TCG-GGT-TA; температура отжига праймеров – 65 °С.

С помощью выбранных праймеров проведена амплификация и секвенирование нуклеотидных последовательностей гена *fetA*, соответствующих фрагменту VR у всех исследованных штаммов. Результаты типирования и полная характеристика штаммов представлены в таблице.

Таблица 1.

id*	Штамм	VR	Полная характеристика штамма
4656	M121/00	F5-5	B: P1.5-1,2-2: F5-5: ST-18 (cc18)
4657	M175/00	F2-7	B: P1.5-1,2-2: F2-7: ST-3355 (cc18)
4658	M194/01	F5-8	B: P1.5-1,10-1: F5-8: ST-3361 (cc11)
4659	M271/01	F3-5	B: P1.21-2,28: F3-5: ST-3352 (-)
4660	M292/02	F3-6	B: P1.18-1,3: F3-6: ST-18 (cc18)
4661	M304/02	F3-9	B: P1.17,16-4: F3-9: ST-3346 (cc41/44)
4662	M444/98	F3-16	B: P1.22,14-6: F3-16: ST-3351 (cc18)
4663	M555/99	F1-62	B: P1.21,4: F1-62: ST-18 (cc18)
4664	M592/97	F3-6	B: P1.19,15: F3-6: ST-3350 (cc18)
4665	M605/99	F5-8	B: P1.22,14: F5-8: ST-18 (cc18)
4666	M668/97	F3-6	B: P1.12-1,14: F3-6: ST-3354 (cc18)
4667	M481/98	F3-6	B: P1.5-1,2-2: F3-6: ST-3356 (cc18)
4668	M330/95	F3-6	B: P1.ND,ND: F3-6: ST-3357 (cc18)
4669	M336/95	F5-7	B: P1.18-1,3: F5-7: ST-3358 (cc18)
4670	M1081/96	F5-8	B: P1.22,26: F5-8: ST-3359 (cc18)
4671	M13/96	F2-7	B: P1.5-1,10-1: F2-7: ST-3360 (-)

\* – «id» – номер штамма в базе данных мультилокусного секвенирования-типирования, последние две цифры в названии штамма – год выделения.

Полная характеристика штаммов менингококков содержит запись в следующей последовательности: [серогруппа] : [субтип] : [аллельный вариант фрагмента VR белка FetA] : [«ST» – сиквенс-тип], затем в скобках указывается клональный комплекс («cc»), в которых входит данный штамм (если клональный комплекс не определен, ставится прочерк) [1].

Результаты типирования по фрагменту VR белка FetA не позволяют выявить доминирующего аллельного варианта фрагмента VR белка FetA в популяции московских штаммов. У типированных штаммов наблюдается 9 аллельных вариантов фрагмента VR белка FetA. Чаще других встречается вариант F3-6, обнаруженный у 5 штаммов, вариант F5-8 найден у 3 штаммов, вариант F2-7 – у 2 штаммов, остальные варианты встречаются однократно. Все штаммы с аллельным вариантом F3-6 входят в клональный комплекс СТ-18. Наиболее часто встречаются аллели, входящие в семейство 3, обнаруженные у 8 или 50% штаммов, и 5 – у 5

или 31% штаммов. У 2 штаммов найдены аллели, входящие в семейство 2 (аллельные варианты F2-7) и у 1 штамма – в семейство 1 (F1-62).

База данных <http://pubmlst.org/neisseria/> содержит информацию о 209 иностранных штаммах *N.meningitidis* серогруппы В, выделенных от больных генерализованными формами менингококковой инфекции, типированных по фрагменту VR белка FetA. Самый распространенный аллельный вариант – F1-5, найденный у 62 (30%) штаммов. Из наиболее часто встречающихся вариантов можно отметить F1-7 (17 штаммов; 8%), F3-3 (16; 7,7%), F5-1 (15; 7,2%) и F3-9 (12; 5,7%). Аллельный вариант F3-6 обнаружен у 11 иностранных штаммов (5,3%), остальные варианты встречаются реже. Из охарактеризованных по фрагменту VR белка FetA иностранных штаммов, 10 принадлежат клональному комплексу СТ-18, в который входит большинство московских штаммов *N.meningitidis* серогруппы В. Среди зарубежных штаммов, входящих в клональный комплекс СТ-18, чаще всего встречаются аллели, принадлежащие семейству 3: варианты F3-4, F3-6 (по 3 штамма) и F3-1 (1 штамм).

### **Выводы**

Отработана методика антигенной характеристики бактерий вида *N.meningitidis* на основании секвенирования фрагмента гена *fetA*, соответствующего эпитопу VR белка FetA, и проведена характеристика менингококков серогруппы В, изолированных на территории Москвы. Частота встречаемости аллельных вариантов фрагмента VR белка FetA среди московских штаммов отличается от частоты встречаемости аллельных вариантов фрагмента VR белка FetA у зарубежных штаммов. В то же время среди иностранных штаммов, входящих в клональный комплекс СТ-18, наблюдается преобладание аллельных вариантов, принадлежащих 3 семейству фрагмента VR белка FetA, который включает аллельные варианты найденные у 8 (50%) московских штаммов.

### **Литература**

1. Jolley K.A., Brehony C., Maiden M.C. Molecular typing of meningococci: recommendations for target choice and nomenclature. *FEMS Microbiol Rev.* 2007, 31(1):89-96.
2. Thompson E.A., Feavers I.M., Maiden M.C. Antigenic diversity of meningococcal enterobactin receptor FetA, a vaccine component. *Microbiology.* 2003, 149(Pt 7):1849-1858.