

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2010

*К.О. Миронов, А.Е. Платонов,
М.К. Николаев, И.С. Королева, Г.А. Шипулин*

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ HAEMOPHILUS INFLUENZAE СЕРОТИПА b, ИЗОЛИРОВАННЫХ В РЕГИОНАХ РОССИИ

Центральный НИИ эпидемиологии, Москва

Цель. Проведение генотипирования штаммов Hib, изолированных в регионах России, и характеристика генетических связей типированных штаммов со штаммами, выделенными на других территориях. *Материалы и методы.* Методом мультилокусного секвенирования-типирования проведена генетическая характеристика 31 штамма *Haemophilus influenzae* серотипа b, выделенного в регионах России в период 2005 — 2008 гг. *Результаты.* У изученных штаммов наблюдается 11 вариантов сиквенс-типов, шесть из которых были описаны в предыдущих исследованиях, пять — впервые выявлены при проведении данной работы. Наиболее часто встречались штаммы с ST-92 (13, или 42% штаммов) и ST-6 (6, или 19% штаммов). Типированные штаммы распределены по двум клональным комплексам. Клональный комплекс «A1/A2» («ST-6») объединяет все типированные штаммы, за исключением штамма с ST-93, входящего в клональный комплекс «B1b» («ST-93»). Большинство изученных штаммов (19, или 61%) имеют отличие от «центрального» сиквенс-типа клонального комплекса «A1/A2» («ST-6») не более чем по одному аллелю. *Заключение.* Клональная структура исследованных штаммов аналогична распределению, наблюдаемому у московских и зарубежных штаммов.

Журн. микробиол., 2010, № 1, С. 24—28

Ключевые слова: *Haemophilus influenzae* серотипа b, Hib-менингит, метод мультилокусного секвенирования-типирования, Россия

ВВЕДЕНИЕ

Бактерии вида *Haemophilus influenzae* серотипа b (Hib) являются возбудителями менингита, пневмонии, сепсиса, эпиглотита и других заболеваний [3, 9]. Вместе с бактериями *Neisseria meningitidis* и *Streptococcus pneumoniae* Hib является самым частым возбудителем гнойного бактериального менингита. В этиологической структуре гнойных бактериальных менин-

*K.O. Mironov, A.E. Platonov,
M.K. Nikolaev, I.S. Koroleva, G.A. Shipulin*

GENETIC CHARACTERISTIC OF HAEMOPHILUS INFLUENZAE TYPE b STRAINS ISOLATED IN RUSSIAN REGIONS

Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

Aim. Genotyping of Hib strains isolated in regions of Russia as well as characterization of genetic relations of typed strains with strains isolated in other areas. *Materials and methods.* Genetic characterization of 31 strains of Hib isolated in Russian regions during 2005 — 2008 was performed by multilocus sequence typing. *Results.* Studied strains belonged to 11 variants of sequence types, 6 of which were described in previous studies, whereas other 5 were isolated for the first time during this study. The most common isolated strains were ST-92 (13 strains or 42%) and ST-6 (6 strains or 19%). Typed strains were distributed to two clonal complexes. Clonal complex «A1/A2» («ST-6») incorporates all typed strains except ST-93 strain belonging to clonal complex «B1b» («ST-93»). The majority of studied strains (19 or 61%) had difference from «central» sequence type of clonal complex «A1/A2» («ST-6») on not more than one allele. *Conclusion.* Clonal structure of isolated strains is analogous to the one observed in Moscow and foreign strains.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2010, No. 1, P. 24—28

Key words: *Haemophilus influenzae* type b, Hib-meningitis, multilocus sequence typing, Russia

гитов, выявляемых в России у детей до 5 лет, бактерии Hib занимают, как правило, второе место после *N. meningitidis*. Заболеваемость Hib-менингитами на территории России долгое время оставалась не выясненной. В рамках популяционного исследования, проведенного в 1999 — 2001 гг. на территории Москвы, удалось установить, что заболеваемость Hib-менингитом составляет 5,7 случаев на 100 тыс. детей до

5 лет. Данный показатель существенно ниже показателя заболеваемости, регистрируемого в некоторых странах Европы и Америки до начала масштабной вакцинопрофилактики Нib-инфекции [3, 9, 10]. Результаты оценки заболеваемости Нib-менингитом в других крупных городах России с использованием метода экспресс-оценки «Нib-RAT» показали, что доля Нib-менингитов среди общего числа гнойных бактериальных менингитов известной этиологии варьировала от 10% (Новосибирск) до 55% (Владивосток), составляя в среднем 31%. Показатель заболеваемости на территории России колеблется от 2,5 до 29,5 случаев на 100 тыс. детей в возрасте до 5 лет. Таким образом, определено, что в некоторых регионах России заболеваемость Нib-менингитом превышает заболеваемость менингококковым менингитом [4]. Более высокая заболеваемость Нib-менингитом в ряде регионов России может быть связана как с социальным статусом или иммунологическими особенностями населения, так и с генетическими особенностями циркулирующих штаммов.

Для генетической характеристики штаммов *H. influenzae* с 2003 г. применяют метод мультилокусного секвенирования-типирования (МЛСТ) [8]. Метод обладает высокой дискриминирующей способностью, достаточной для выявления генетических отличий и проведения классификации штаммов, принадлежащих одному серотипу. Объектом типирования являются фрагменты генома микроорганизма, поэтому МЛСТ позволяет проводить генетическую характеристику эпидемически связанных штаммов и описывать эволюционные изменения в бактериальной популяции. Проведение генетического исследования методом МЛСТ заключается в идентификации сиквенс-типов у изучаемых штаммов, оценке генетического разнообразия в исследуемой выборке и определении клональной принадлежности штаммов на основании полученных последовательностей аллельных профилей. Результаты МЛСТ *H. influenzae* объединяют в международную базу данных, доступную через Интернет-сайт <http://haemophilus.mlst.net/>. Объединение результатов независимых исследователей в общедоступную базу данных обеспечивает возможность для проведения расширенной генетической и эпидемиологической характеристики вновь выделяемых штаммов, основанной на результатах предыдущих исследований. Генетическая

информация о штаммах, содержащихся в базе данных, позволяет сопоставлять вновь полученные данные и проводить характеристику эволюционных процессов в популяции *H. influenzae* [6, 7].

Цель исследования — проведение генотипирования штаммов Нib, изолированных в регионах России, и характеристика генетических связей типированных штаммов со штаммами, выделенными на других территориях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе исследован 31 штамм Нib. Штаммы были выделены от детей в возрасте до 4 лет с генерализованными формами Нib-инфекции. 29 штаммов выделены из крови или спинномозговой жидкости больных Нib-менингитом, 1 штамм («BRAb1») изолирован от больного с сепсисом, 1 образец («BRKh2») получен от больного пневмонией Нib-этиологии (аспиракт из трахеи). Штаммы были выделены в период 2005 — 2008 гг. на следующих территориях: штамм «BRT1» (идентификационный номер в базе данных <http://haemophilus.mlst.net/> — 735) — Тула; «BRY1» (741), «BRY2» (877), «BRY3» (878), «BRY4» (879), «BRY5» (880), «BRY6» (881) — Ярославль; «BRTU1» (742) — Тюмень; «BRAb1» (855) — Абакан; «BRI1» (791), «BRI2» (848), «BRI3» (949) — Иркутск; «BRUU1» (743), «BRUU2» (856), «BRUU3» (857), «BRUU4» (950), «BRUU5» (951), «BRUU6» (952) — Улан-Удэ; «BRYak1» (852), «BRYak2» (853), «BRYak3» (854) — Якутск; «BRKh2» (858) — Хабаровск; «BRV1» (846), «BRV2» (847), «BRV3» (849), «BRV4» (850) и «BRV5» (851) — Владивосток. Штаммы «BRN1» (736), «BRN2» (737), «BRN3» (738) и «BRK1» (739) были предоставлены НИИ детских инфекций (Санкт-Петербург). Дополнительная информация об исследованных штаммах содержится в базе данных <http://haemophilus.mlst.net/>.

Генотипирование штаммов проводилось в соответствии с общепринятой схемой МЛСТ для *H. influenzae* [8]. В работе использованы протоколы экстракции ДНК, проведения ПЦР и секвенирования, опубликованные в [1, 2]. При обозначении аллелей, сиквенс-типов и сопоставлении результатов типирования с данными зарубежных исследователей использованы программные возможности Интернет-ресурса <http://haemophilus.mlst.net/>. На момент окончания исследования база данных <http://haemophilus.mlst.net/> включала в себя результаты типирования 923 штаммов

H. influenzae, в том числе 290 штаммов серотипа b, которым соответствовало 125 сиквенс-типов. Анализ результатов МЛСТ и построение рисунка проводились с помощью программного обеспечения «eBURSTv3» (<http://eburst.mlst.net/>) [6]. Принадлежность выявленных сиквенс-типов к клональным комплексам, выделенным для *H. influenzae*, обозначалась в соответствии с результатами типирования несколькими методами, опубликованными в [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Определены аллельные профили и присвоены соответствующие им сиквенс-типы всем исследованным штаммам; информация о штаммах и результаты типирования внесены в базу данных <http://haemophilus.mlst.net/>. Выявленным вариантам аллельных профилей соответствует 11 сиквенс-типов, шесть из которых были описаны в предыдущих исследованиях (ST-6, ST-78, ST-80, ST-92, ST-93 и ST-95) [1, 8]. У типированных штаммов найдено 5 сиквенс-типов, не описанных ранее: ST-516, ST-561, ST-562, ST-563 и ST-564. Сиквенс-типы ST-516, ST-562 и ST-564 являются не встречавшимися ранее комбинациями известных аллелей. У двух штаммов найдены новые последовательности генных фрагментов: у штамма «BRV4» обнаружен аллель *mdh-164*, у штамма «BRYak3» — аллель *adh-109*, этим штаммам присвоены сиквенс-типы ST-561 и ST-563 соответственно.

Наиболее часто в исследованной выборке штаммов встречались сиквенс-типы ST-92, обнаруженный у 13 (42%) штаммов, и ST-6 — у 6 (19%) штаммов. Остальные сиквенс-типы встречались реже: ST-95 — у 3 (10%) штаммов, ST-80 — у 2 (6,5%) штаммов; сиквенс-типы ST-78, ST-93, ST-516, ST-561, ST-562, ST-563 и ST-564 встречались однократно (3,2%).

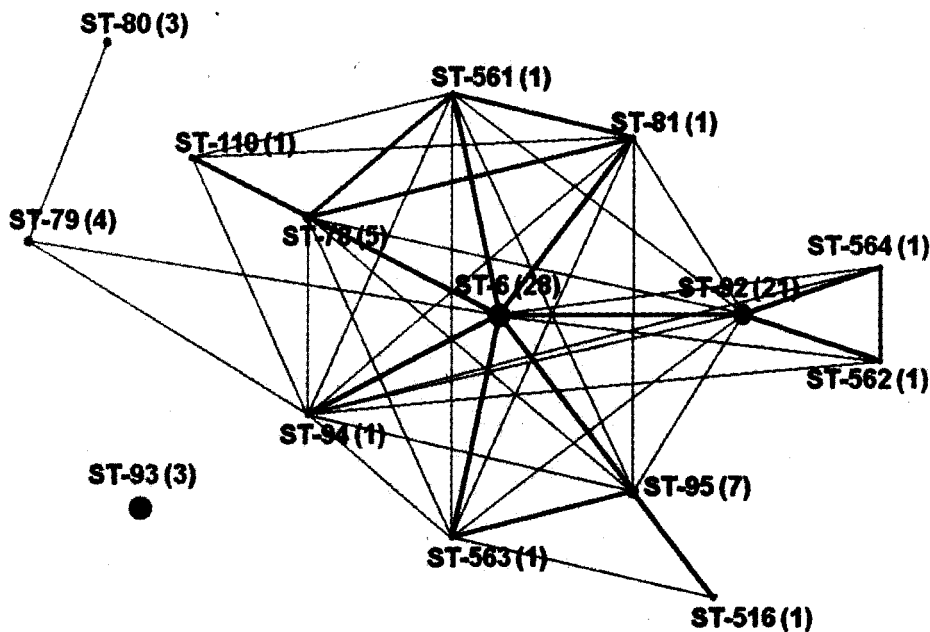
Запрос в базу данных <http://haemophilus.mlst.net/> позволил получить информацию об исследованных ранее иностранных и московских штаммах Hib, имеющих сиквенс-типы, найденные у штаммов, типированных в данном исследовании. ST-6 был выявлен ранее у 15 штаммов из США в 1999 — 2000 гг., 15 штаммов из Чехии в 2001 г., 19 штаммов из Польши в 1997 — 2004 гг., 1 штамма из Норвегии в 1976 г. и 22 московских штаммов, изолированных в период 1998–2001 гг. ST-78 — у 4 московских штаммов в 2000 — 2001 гг. ST-80 — у 1 штамма из

Киргизии в 2002 г., 2 штаммов из Польши в 1999 и 2004 гг. и 1 московского штамма в 2000 г. ST-92 — у 9 штаммов из Польши в 1997–2003 гг. и 8 московских штаммов в 2000 — 2001 гг. ST-93 — у 1 штамма из США в 1985 г., 1 штамма из Польши в 1998 г. и 2 московских штаммов в 1984 и 2001 г. ST-95 — у 1 штамма из Польши в 1997 г., 1 московского штамма в 1984 г. и 3 московских штаммов в 2001 — 2002 гг. Зарубежных штаммов, имеющих сиквенс-типы, впервые обнаруженные при выполнении данной работы, на момент окончания исследования в базе данных не было.

ОБСУЖДЕНИЕ

Для характеристики генетических связей штаммов и сопоставления полученных данных с результатами типирования московских штаммов использован алгоритм обработки данных МЛСТ «BURST» [6]. Используемая методика обработки данных заключается в определении генетического расстояния между штаммами (сиквенс-типами) на основании отличий в их аллельных профилях с последующим обозначением групп генетически близких штаммов (клональных комплексов). Результаты кластеризации исследуемой выборки представляются в виде таблицы с указанием количества несовпадений в аллельных профилях или в виде рисунка. Для каждого сиквенс-типа обозначается количество сиквенс-типов, имеющих отличие от него по одному, по двум и более локусам, указывается «центральный» (founding) генотип — сиквенс-тип, связанный с максимальным количеством сиквенс-типов, имеющих отличие от него не более чем по одному локусу. На рис. представлена иллюстрация генетических взаимоотношений штаммов Hib, выделенных на территории России. Рисунок объединяет результаты типирования, полученные при проведении данного исследования, а также данные типирования московских штаммов, выделенных в 1984 и 1997 — 2002 гг., и двух образцов из Екатеринбурга, полученных в 1986 и 2001 гг. [1, 2]. На рис. показаны генетические взаимоотношения 79 российских штаммов Hib; штаммы представлены 15 вариантами сиквенс-типов.

Типированные штаммы распределены по двум клональным комплексам аналогично результатам обработки данных типирования московских штаммов, представленным в [1]. Эти клональные комплексы были обозначены как клональный комплекс «ST-6»



Генетические взаимоотношения штаммов H1b, выделенных на территории России.

ST — сиквенс тип, цифра в скобках — количество штаммов с данным сиквенс-типом. Жирные линии объединяют сиквенс-типы, отличающиеся по одному аллелю, тонкие линии — сиквенс-типы, отличающиеся по двум аллелям.

и клональный комплекс «ST-93». Подавляющее большинство штаммов входит в клональный комплекс «ST-6», который объединяет все сиквенс-типы, за исключением штаммов с ST-93, образующих отдельный клональный комплекс. ST-93 имеет отличия в аллельном профиле от штаммов клонального комплекса «ST-6» по всем семи генным фрагментам, за одним исключением (ST-110). В данном исследовании только у одного штамма найден ST-93 («BRUU1»), все остальные штаммы входят в клональный комплекс «ST-6». Из 14 сиквенс-типов, включенных в клональный комплекс «ST-6», 7 имеют отличие от центрального сиквенс-типа по одному локусу аллельного профиля и 5 по двум локусам аллельного профиля, ST-80 отличается от ST-6 по трем локусам аллельного профиля. Большинство изученных штаммов (19, или 61%) имеют отличие от «центрального» сиквенс-типа клонального комплекса «A1/A2» («ST-6») не более чем по одному аллелю.

Результаты кластеризации сиквенс-типов, впервые обнаруженных в данном исследовании, не позволяют говорить о существенных генетических отличиях штаммов с этими сиквенс-типами от штам-

мов, циркулировавших на территории Москвы в 1997 — 2002 гг. Сиквенс-типы ST-561 и ST-563 отличаются от ST-6 по одному локусу аллельного профиля, ST-516, ST-562 и 564 — по двум локусам аллельного профиля. Наиболее часто встречавшиеся среди изученных штаммов сиквенс-типы ST-92 и ST-6 были найдены ранее у московских штаммов, выделенных в 1997 — 2002 гг.: ST-92 — у 8 (20%) штаммов и ST-6 — у 22 (55%) штаммов. Различия в частоте встречаемости штаммов объясняются особенностями изученных выборок: московские штаммы были выделены на одной территории в короткий промежуток времени, в то время как максимальное количество штаммов, выделенных на территории одного региона, не превышает шести.

Выделенным при типировании российских штаммов клональным комплексом «ST-6» и «ST-93» соответствуют клональные комплексы «A1/A2» и «B1», обозначенные зарубежными авторами [8]. Клональные комплексы «A1/A2» и «B1b» объединяют штаммы H1b; штаммы других серотипов и бескапсульные штаммы имеют выраженные генетические отличия от штаммов, входящих в эти клональные комплексы. Основанная на данных МЛСТ

клональная структура штаммов Hib была подтверждена результатами филогенетического анализа, проведенного на основании совокупности всех нуклеотидных последовательностей, соответствующих обозначенным сиквенс-типам [8].

Результаты типирования штаммов Hib, выделенных в регионах России, демонстрируют ту же клональную организацию популяции штаммов Hib, типичную для штаммов, изолируемых на территории Москвы, а также для обширной выборки зарубежных штаммов. Выявление новых, не описанных ранее сиквенс-типов, не позволяет говорить о генетических особенностях изученных штаммов. Если предположить, что какие-то существенные генетические различия между штаммами, выделенными в Москве, и штаммами, выделенными в других российских городах, существуют, то их следует искать в других фрагментах генома Hib. Генетические изменения в генах метаболических ферментов (МЛСТ-локусах) не отражают возможных отличий в вирулентности исследуемых штаммов. Разный уровень заболеваемости Hib-менингитами может объясняться особенностями, связанными с вирулентными свойствами циркулирующих штаммов, поэтому в качестве объектов генотипирования Hib, возможно, следует использовать маркеры вирулентности, например, гены, связанные с синтезом капсульного полисахарида [5, 11].

ЛИТЕРАТУРА

1. Миронов К.О., Платонов А.Е., Королева И.С., Шипулин Г.А. Генетические взаимоотношения московских и зарубежных штаммов *Haemophilus influenzae* серотипа b. Журн. микробиол. 2006, 6: 14-20.
2. Платонов А.Е., Миронов К.О., Яцышина С.Б. и др. Характеристика московских штаммов *Haemophilus influenzae* типа b методом мульт

тилокусного секвенирования-типирования. Мол. ген. микробиол. вирусол. 2003, 2: 21-25.

3. Платонов А.Е., Королева И.С., Платонова О.В. и др. Заболеваемость гнойными менингитами у детей в возрасте до 5 лет в Москве. Эпидемиол. инфекц. бол. 2006, 4: 36-43.
4. Платонов А.Е., Николаев М.К. Заболеваемость гнойными менингитами у детей в возрасте до 5 лет в регионах России. Там же. 2007, 3: 10-18.
5. Cerquetti M., Cardines R., Ciofi Degli Atti M.L. et al. Presence of multiple copies of the capsulation b locus in invasive *Haemophilus influenzae* type b (Hib) strains isolated from children with Hib conjugate vaccine failure. J. Infect. Dis. 2005, 192 (5): 819-823.
6. 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.
7. Jolley K.A., Chan M.S., Maiden M.C. mlstdbNet — distributed multi-locus sequence typing (MLST) databases. BMC Bioinformatics. 2004, 5: 86.
8. Meats E., Feil E.J., Stringer S. et al. Characterization of encapsulated and noncapsulated *Haemophilus influenzae* and determination of phylogenetic relationships by multilocus sequence typing. J. Clin. Microbiol. 2003, 41 (4): 1623-1636.
9. Peltola H. Worldwide *Haemophilus influenzae* type b disease at the beginning of the 21st century: global analysis of the disease burden 25 years after the use of the polysaccharide vaccine and a decade after the advent of conjugates. Clin. Microbiol. Rev. 2000, 13 (2): 302-317.
10. Platonov A.E., Griffiths U.K., Voeykova M.V. et al. Economic evaluation of *Haemophilus influenzae* type b vaccination in Moscow, Russian Federation. Vaccine. 2006, 24 (13): 2367-2376.
11. Schouls L., van der Heide H., Witteveen S. et al. Two variants among *Haemophilus influenzae* serotype b strains with distinct *bcs4*, *hcsA* and *hcsB* genes display differences in expression of the polysaccharide capsule. BMC Microbiol. 2008, 8: 35.

Поступила 08.09.09

Контактная информация: Миронов Константин Олегович, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, 3а, р.т. (495)176-79-40