

6. Для рационального проведения вакцинопрофилактики Hib-инфекции в РФ необходимо организовать эпидемиологический надзор за ГБМ, в том числе Hib-этиологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вильниц А. А., Иванова М. В., Скрипченко Н. В. и др. // Эпидемиол. и инфекц. бол. — 2005. — № 3. — С. 56—58.
2. Глишская И. Н., Германович Ф. А., Чистенко Г. Н. и др. // Актуальные проблемы менингококковой инфекции и гнойных бактериальных менингитов. — М., 2008. — С. 19.
3. Девяткина Н. П., Ильина Т. В., Королева И. С. и др. // Журн. микробиол. — 1990. — № 1. — С. 45—49.
4. Демина А. А., Покровский В. И., Самсонова И. М. // Журн. микробиол. — 1996. — № 5. — С. 100.
5. Демина А. А., Спирихина Л. В., Королева И. С. и др. // Эпидемиол. и инфекц. бол. — 1998. — № 4. — С. 36—40.
6. Королева И. С., Демина А. А., Платонов А. Е. и др. // Эпидемиол. и вакцинопрофилактика. — 2003. — № 5. — С. 10—13.
7. Николаев М. К., Платонов А. Е. // Актуальные проблемы менингококковой инфекции и гнойных бактериальных менингитов. — М., 2008. — С. 38.
8. Платонов А. Е., Королева И. С., Платонова О. В., Покровский В. И. // Эпидемиол. и инфекц. бол. — 2006. — № 4. — С. 38.
9. Платонов А. Е., Королева И. С., Платонова О. В., Покровский В. И. // Эпидемиол. и инфекц. бол. — 2006. — № 4. — С. 40.

10. Платонов А. Е. и Российская группа по исследованию геммофильных менингитов // Актуальные проблемы менингококковой инфекции и гнойных бактериальных менингитов. — М., 2008. — С. 39.
11. Спирихина Л. В. Совершенствование лабораторной диагностики заболеваний, вызванных Haemophilus influenzae типа b, на основе иммуноферментного анализа: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — М., 1999.
12. Хаусдорф В. // Эпидемиол. и вакцинопрофилактика. — 2006. — № 2. — С. 5.
13. Estimating the Local Burden of Haemophilus influenzae Type b (Hib) Disease Preventable by Vaccination: a Rapid Assessment Tool. Document WHO/V and B/01.27 Feikin D., Levine O., Chris Nelson C et al. — Geneva, 2001.

Поступила 12.01.09

Сведения об авторах

**Королева Ирина Станиславовна**, доктор медицинских наук, заведующая лабораторией эпидемиологии менингококковой инфекции и гнойных бактериальных менингитов ФГУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора  
 Адрес: 111123 Москва, ул. Новогиревская, д. 3а  
 Телефон: (8-495) 672-11-28  
 E-mail: rosni@pcr.ru

**Закроева Ирина Михайловна**, старший научный сотрудник лаборатории эпидемиологии менингококковой инфекции и гнойных бактериальных менингитов ФГУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора  
 Телефон: (8-495) 672-11-28  
 E-mail: rosni@pcr.ru

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2009

УДК 579.861.1:579.253].083.1

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

**ГЕНОТИПИРОВАНИЕ NEISSERIA MENINGITIDIS**

ФГУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва

*Изложены основные подходы, рекомендуемые для генотипирования бактерий вида Neisseria meningitidis. Описаны методики антигенной и генетической характеристики менингококков. Представлена современная международная номенклатура обозначения штаммов N. meningitidis, позволяющая объединять и сопоставлять результаты, полученные независимыми исследователями, через Интернет-базу данных <http://pubmlst.org/neisseria/>.*

**Ключевые слова:** Neisseria meningitidis, мультилокусное секвенирование-типирование, клональный комплекс, субтипирование, PorA, FetA.

GENOTYPING OF NEISSERIA MENINGITIDIS GENOTYPING

K. O. Mironov, G. A. Shipulin, I. S. Koroleva, A. Ye. Platonov

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

*The basic approaches recommended for the genotyping the bacteria of the species Neisseria meningitidis are outlined. Procedures for the antigenic and genetic characterization of meningococci are described. The current international nomenclature of Neisseria strains is presented, which allows one to integrate and to compare the results obtained by independent investigators through the Internet database: <http://pubmlst.org/neisseria/>.*

**Key words:** Neisseria strains, multilocus sequencing-typing, clonal complex, subtyping, PorA, FetA.

Для эпидемического процесса менингококковой инфекции характерно чередование подъемов заболеваемости с годами эпидемиологического

Для корреспонденции:

**Миронов Константин Олегович**, кандидат медицинских наук, научный сотрудник ФГУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора

Адрес: 111123 Москва, ул. Новогиревская, д. 3а  
 Телефон: (8-495) 974-96-46  
 E-mail: miriniv@pcr.ru

благополучия. В отечественных и зарубежных исследованиях второй половины XX века была охарактеризована гетерогенность популяции менингококков и изучена роль штаммов разных серогрупп в эпидемическом процессе [10, 25]. Были идентифицированы группы штаммов (клональные комплексы), выявление которых ассоциировано с подъемом заболеваемости менингококковой инфекцией [11, 12, 29].

Микробиологический мониторинг *N. meningitidis* — важный элемент системы эпидемиологиче-

ского надзора за менингококковой инфекцией. Основной целью микробиологического мониторинга *N. meningitidis* является идентификация и классификация штаммов, выделенных на наблюдаемой территории. Характеристика внутривидового разнообразия менингококков позволяет выявлять эпидемиологически значимые штаммы и анализировать эволюционные процессы в популяции *N. meningitidis*. Результаты микробиологического мониторинга можно использовать для прогнозирования течения эпидемического процесса и планирования иммунопрофилактических мероприятий [1, 12].

Базовым инструментом микробиологического мониторинга является серогруппирование. Серогруппа *N. meningitidis* определяется на основании структуры и антигенных свойств капсульного полисахарида. Серогруппирование является наиболее распространенным методом классификации *N. meningitidis*, доступным многим клинико-диагностическим лабораториям. Наблюдение за эпидемическим процессом на территории России во второй половине XX века выявило связь эпидемического подъема заболеваемости с количеством выделяемых штаммов серогруппы А. Поэтому определение доли штаммов, принадлежащих эпидемически значимым серогруппам, имеет важное прогностическое значение [1, 10, 25]. Для слежения за появлением и распространением эпидемически значимых клональных комплексов используют серологические (серогруппирование, серосубтипирование, а также некоторые другие подходы) и молекулярно-биологические методы, позволяющие классифицировать штаммы, принадлежащие одной серогруппе (методы типирования). Высокой дискриминирующей способностью, необходимой для проведения микробиологического мониторинга, обладают молекулярно-биологические методы типирования [15, 16, 22]. В последние годы наибольшее распространение получают методы, основанные на секвенировании фрагментов бактериального генома, — методы генотипирования. Результатом генотипирования является характеристика штамма на основании нуклеотидных или соответствующих им аминокислотных последовательностей. Данные секвенирования интерпретируются однозначным образом, поэтому при проведении генотипирования решается проблема межлабораторной сопоставимости результатов. Объединение результатов генотипирования, полученных в разных лабораториях, проводится с помощью общедоступных Интернет-ресурсов [12, 13, 21]. Основные подходы, используемые для генотипирования менингококков, опубликованы на Интернет-сайте <http://neisseria.org/nm/typing/>.

Методы генотипирования позволяют проводить антигенную и генетическую характеристику штаммов *N. meningitidis*. Недавно предложенная система для обозначения штаммов *N. meningitidis* содержит запись результатов типирования штамма в следующей последовательности: серогруппа, субтип, аллель фрагмента VR белка FetA, сиквенс-тип, клональный комплекс. Например, запись "B: P1.5-1.10-1: F5-8: ST-3361 (cc11)" означает, что данный штамм принадлежит серогруппе B, имеет субтип 5-

1, 10-1, вариант 5-8 варибельного фрагмента VR белка FetA и сиквенс-тип ST-3361, входящий в клональный комплекс cc11. Информация об антигенных свойствах штамма содержится в первой части записи (серогруппа, субтипирование и аллель фрагмента VR белка FetA), генетическая характеристика представлена результатами мультилокусного секвенирования-типирования (МЛСТ) — определенным сиквенс-типом и клональным комплексом, в который входит исследованный штамм [19, 22].

#### Антигенная характеристика менингококков

Основным методом антигенной характеристики менингококков является определение серогруппы. Традиционно серогруппирование проводится серологическими методами исследования, но также может быть проведено с использованием более чувствительных генетических методов, не требующих высева возбудителя [3, 22, 26]. Для подробной антигенной характеристики менингококков применяют типирование белков наружной мембраны менингококка. Предложенное K. Jolley и соавт. [22] обозначение штаммов *N. meningitidis* содержит запись антигенной характеристики основного белка наружной мембраны 1-го класса PorA (субтип) и рецептора энтеробактина — белка FetA. Типирование белков PorA и FetA подразумевает идентификацию экстрацеллюлярных варибельных фрагментов этих белков, к которым вырабатываются антитела при менингококковой инфекции. Антигенная характеристика белка PorA (субтипирование *N. meningitidis*) заключается в определении аминокислотной последовательности двух варибельных участков VR1 и VR2, соответствующих I и IV поверхностным экстрацеллюлярным фрагментам белка [26]. Для антигенной характеристики белка FetA проводится определение аминокислотной последовательности участков VR, соответствующего VII поверхностному экстрацеллюлярному фрагменту [27]. Типирование белков PorA и FetA может быть проведено серологическими методами с помощью моноклональных антител, но в силу недостатков и ограничений серотипирования антигенную характеристику рекомендуется проводить на основании секвенирования нуклеотидных последовательностей фрагментов генов porA и fetA, соответствующих варибельным участкам [22]. Для характеристики каждого варибельного участка необходимо определить нуклеотидную последовательность длиной примерно 120 пар оснований. После проведения секвенирования и определения аминокислотных последовательностей варибельных участков проводится их обозначение согласно международной номенклатуре, доступной через Интернет-ресурс <http://neisseria.org/nm/typing/>. Обозначение варибельных участков проводится следующим образом: каждой уникальной аминокислотной последовательности присваивается номер; гомологичные аминокислотные последовательности объединяются в семейства, номер варианта аминокислотной последовательности записывается через тире после цифры, обозначающей семейство, в которое входит обнаруженная последо-

вательность. Семейство объединяет аминокислотные последовательности, отличающиеся от прототипа семейства не более чем на 80%. Прототипом семейства считают либо вариант последовательности у референтного штамма, использованного для получения соответствующих моноклональных антител, либо вариант последовательности, впервые выявленный при проведении генотипирования, не входящий ни в одно из описанных семейств. Для обозначения результатов субтипирования используется приставка P1., для результатов типирования белка FetA — приставка F [22, 26]. Например, из записи антигенного профиля "P1.5—1, 10—1: F5-8" следует, что данный штамм имеет антигенный вариант 1, входящий в семейство 5, варибельного участка VR1 и антигенный вариант 1, входящий в семейство 10, варибельного участка VR2 белка PоgA, и антигенный вариант 8, входящий в семейство 5, варибельного участка VR белка FetA.

На сегодняшний день характеристика белка PоgA представлена 187 последовательностями варибельного участка VR1, объединенными в 11 семейств, и 517 последовательностями варибельного участка VR2, объединенными в 20 семейств. Для варибельного участка VR белка FetA выявлено 290 антигенных вариантов, распределенных по 6 семействам. Результаты генетического субтипирования менингококков, циркулирующих на территории Москвы, были опубликованы [3].

Антигенная характеристика менингококка определяет иммунную реакцию организма инфицированного человека. Изменения антигенной структуры менингококков связано с необходимостью постоянной адаптации к условиям обитания под давлением популяционного иммунитета. Проведение генотипирования антигенов *N. meningitidis* имеет значение при изучении особенностей менингококкового носительства и проведении дополнительной характеристики штаммов, выделенных в очагах менингококковой инфекции. Молекулярно-биологическая характеристика антигенных вариантов *N. meningitidis* обеспечивает накопление результатов, необходимых для разработки белковых (белково-полисахаридных) вакцин против менингококков серогруппы B [26—28]. Детекция новых, не описанных ранее, антигенных вариантов менингококка может свидетельствовать о появлении или случаях заноса на наблюдаемую территорию менингококков с измененными свойствами, в том числе штаммов, обладающих повышенными вирулентными свойствами. Для идентификации в популяции *N. meningitidis* групп штаммов, представляющих повышенную эпидемиологическую опасность, и слежения за их распространением применяют методы, отражающие эволюционные изменения в бактериальном геноме, не связанные с давлением иммунитета.

#### Генетическая характеристика менингококков

С 1998 г. для идентификации и классификации клональных комплексов патогенных бактерий используется метод МЛСТ [15, 23]. На сегодняшний день методики МЛСТ разработаны более чем для 50 видов микроорганизмов, в том числе для основ-

ных возбудителей гнойного бактериального менингита — *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* и *N. meningitidis* [14, 17, 24]. Информация о разработанных методиках МЛСТ и ссылки на базы данных по отдельным микроорганизмам доступны через Интернет-ресурсы <http://www.mlst.net/> и <http://pubmlst.org/>.

Одной из первых схем МЛСТ, примененной для решения эпидемиологических задач, является схема МЛСТ бактерий вида *N. meningitidis*. После незначительных модификаций первоначальная схема МЛСТ *N. meningitidis*, предложенная M. Maiden и соавт. [23], была окончательно доработана и внедрена в эпидемиологическую практику [12, 17]. В отечественной литературе метод впервые описан А. Е. Платоновым и соавт. [8], результаты применения метода для микробиологического мониторинга возбудителей гнойных бактериальных менингитов были опубликованы ранее [2, 4—6, 9].

Исследования менингококков методом МЛСТ позволили дополнить и уточнить представления о клональной структуре *N. meningitidis*, сформулированные на основании результатов типирования другими методами, до широкого использования в эпидемиологической практике методов, основанных на секвенировании. Полученные в результате МЛСТ нуклеотидные последовательности могут быть использованы для дополнительной характеристики штаммов методами филогенетического анализа, а также для выявления особенностей рекомбинантных изменений внутри вида микроорганизма [23, 24].

Методика МЛСТ для *N. meningitidis* основана на секвенировании 7 фрагментов генов, кодирующих цитоплазматические ферменты (abcZ, adk, agoE, fumC, rdhC и pgt), длина используемых для анализа нуклеотидных последовательностей — примерно 450 пар оснований. Каждой последовательности присваивается номер аллеля. Набор аллелей по 7 фрагментам образует аллельный профиль (упорядоченная последовательность из цифр, соответствующих аллелям), аллельному профилю присваивается номер — сиквентс-тип (ST) [22].

Анализ генетических взаимоотношений штаммов в популяции *N. meningitidis* проводится с помощью методов кластерного анализа на основании выявленных аллельных профилей. Для обработки результатов МЛСТ обычно пользуются алгоритмами кластеризации BURST (Based Upon Related Sequence Types) и/или UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages). Оба алгоритма оценивают генетическое расстояние между штаммами по матрице попарных расстояний, построенной на основании выявленных аллельных профилей штаммов. Обработанные результаты МЛСТ представляются в виде связанных клональных комплексов с обозначением генетического расстояния между ними. Оба метода обеспечивают разделение исследуемой выборки на одинаковые клональные комплексы; выбор метода зависит от количества штаммов и удобства представления результатов анализа. Для обработки результатов МЛСТ используется специализированное компьютерное обеспечение, в том числе программные

средства, доступные через Интернет в режиме online [18, 20].

Результаты МЛСТ *N. meningitidis* объединены в общедоступную базу данных, доступ к которой осуществляется через Интернет-сайт <http://pubmlst.org/peisseria/>. База данных содержит информацию об охарактеризованных штаммах, включающую эпидемиологические данные (время, место, источник выделения), результаты антигенной характеристики, данные о типировании альтернативными методами и другую дополнительную информацию [21]. Результаты МЛСТ, содержащиеся в базе данных, группируются в клональные комплексы, обозначенные согласно общепринятой номенклатуре: в некоторых случаях не удается отнести штамм к известному клональному комплексу. Запрос в базу данных позволяет исследователю классифицировать обнаруженный сиквенс-тип как известный или новый и, если возможно, отнести его к тому или иному клональному комплексу, т. е. получить генетическую характеристику штамма. Объединение данных об источнике и принадлежности штамма к тому или иному клональному комплексу создает возможность для наблюдения за циркуляцией и эволюцией гипервирулентных штаммов *N. meningitidis* [8, 12].

На протяжении последних лет база данных регулярно пополняется результатами, поступающими из лабораторий Европы и Америки. На сегодняшний день база данных содержит результаты типирования 11 331 штамма *N. meningitidis*, этому количеству соответствует 6734 сиквенс-типа. Для охарактеризованных штаммов описано 37 клональных комплексов, для 2600 (23%) штаммов принадлежность к клональным комплексам не определена. База данных содержит информацию о 184 штаммах, распределенных по 53 сиквенс-типам, изолированных на территории России [2, 4, 6, 11].

Постепенное накопление данных о генетических и антигенных особенностях менингококков, циркулирующих на разных территориях, позволяет проводить глобальный эпидемиологический анализ распространения патогенных штаммов. Генотипирования *N. meningitidis* можно проводить, амплифицируя соответствующие участки бактериального генома непосредственно из клинического материала, без этапов выделения и хранения микроорганизмов, что позволяет сократить время анализа и дает возможность провести характеристику в отсутствие жизнеспособного возбудителя после проведения антибиотикотерапии [7, 8, 19, 23].

## ЛИТЕРАТУРА

1. Королева И. С., Белошицкий Г. В., Закроева И. М. и др. // Эпидемиол. и инфекц. бол. — 2005. — № 3. — С. 22—27.
2. Королева И. С., Белошицкий Г. В., Закроева И. М. и др. // Эпидемиол. и вакцинопрофилактика. — 2008. — № 3. — С. 21—25.
3. Миронов К. О., Платонов А. Е., Шипулин Г. А. и др. // Эпидемиол. и инфекц. бол. — 2005. — № 3. — С. 23—28.

4. Миронов К. О., Платонов А. Е., Королева И. С., Шипулин Г. А. // Журн. микробиол. — 2006. — № 2. — С. 31—36.
5. Миронов К. О., Платонов А. Е., Королева И. С., Шипулин Г. А. // Журн. микробиол. — 2006. — № 6. — С. 14—20.
6. Миронов К. О., Платонов А. Е., Королева И. С. и др. // Журн. микробиол. — 2008. — № 1. — С. 7—12.
7. Платонов А. Е., Шипулин Г. А., Королева И. С., Шипулина О. Ю. // Журн. микробиол. — 1999. — № 2. — С. 71—76.
8. Платонов А. Е., Шипулин Г. А., Платонова О. В. // Генетика. — 2000. — Т. 36, № 5. — С. 597—605.
9. Платонов А. Е., Миронов К. О., Яцышина С. Б. и др. // Молекул. генетика. — 2003. — № 2. — С. 21—25.
10. Покровский В. И., Фаворова Л. А., Костокова Н. Н. Менингококковая инфекция. — М., 1976.
11. Achtman M., van der Ende A., Zhu P. et al. // Emerg. Infect. Dis. — 2001. — Vol. 7, N 3. — P. 420—427.
12. Brehony C., Jolley K. A., Maiden M. C. // FEMS Microbiol. Rev. — 2007. — Vol. 31, N 1. — P. 15—26.
13. Chan M. S., Maiden M. C., Spratt B. G. // Bioinformatics. — 2001. — Vol. 17, N 11. — P. 1077—1083.
14. Enright M. C., Spratt B. G. // Microbiology. — 1998. — Vol. 144, Pt 11. — P. 3049—3060.
15. Enright M. C., Spratt B. G. // Trends Microbiol. — 1999. — Vol. 7, N 12. — P. 482—487.
16. Feavers I. M., Gray S. J., Urwin R. et al. // J. Clin. Microbiol. — 1999. — Vol. 37, N 12. — P. 3883—3887.
17. Feil E. J., Maiden M. C., Achtman M. et al. // Mol. Biol. Evol. — 1999. — Vol. 16, N 11. — P. 1496—1502.
18. Feil E. J., Li B. C., Aanensen D. M. et al. // J. Bacteriol. — 2004. — Vol. 186, N 5. — P. 1518—1530.
19. Fox A. J., Taha M. K., Vogel U. // FEMS Microbiol. Rev. — 2007. — Vol. 31, N 1. — P. 84—88.
20. Jolley K. A., Feil E. J., Chan M. S. et al. // Bioinformatics. — 2001. — Vol. 17, N 12. — P. 1230—1231.
21. Jolley K. A., Chan M. S., Maiden M. C. // BMC Bioinformatics. — 2004. — Vol. 5. — P. 86.
22. Jolley K. A., Brehony C., Maiden M. C. // FEMS Microbiol. Rev. — 2007. — Vol. 31, N 1. — P. 89—96.
23. Maiden M. C., Bygraves J. A., Feil E. et al. // Proc. Natl. Sci. USA. — 1998. — Vol. 95, N 6. — P. 3140—3145.
24. Meats E., Feil E. J., Strenger S. et al. // J. Clin. Microbiol. — 2003. — Vol. 41, N 4. — P. 1623—1636.
25. Peltola H. // Rev. Infect. Dis. — 1983. — Vol. 5, N 1. — P. 71—91.
26. Russell J. E., Jolley K. A., Feavers I. M. et al. // Emerg. Infect. Dis. — 2004. — Vol. 10, N 4. — P. 674—678.
27. Thompson E. A., Feavers I. M., Maiden M. C. // Microbiology. — 2003. — Vol. 149, Pt 7. — P. 1849—1858.
28. Urwin R., Russell J. E., Thompson E. A. et al. // Infect. and Immun. — 2004. — Vol. 72, N 10. — P. 5955—5962.
29. Zhu P., van der Ende A., Falush D. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2001. — Vol. 98, N 9. — P. 5234—5239.

Поступила 12.01.09

## Сведения об авторах

Шипулин Герман Александрович, кандидат медицинских наук, заведующий отделом молекулярной диагностики и эпидемиологии ФГУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора

Адрес: 111123 Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а  
Телефон: (8-495) 974-96-46

Королева Ирина Станиславовна, доктор медицинских наук, заведующая лабораторией эпидемиологии менингококковой инфекции и гнойных бактериальных менингитов ФГУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора

Телефон: (8-495) 672-11-28  
E-mail: rocmi@osrg.ru

Платонов Александр Евгеньевич, доктор биологических наук, заведующий лабораторией ФГУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора

Телефон: (8-495) 974-96-46  
E-mail: platonov@pcrg.ru