

На правах рукописи

Верещагин Владимир Александрович

**Молекулярное типирование
клинических штаммов *Neisseria gonorrhoeae***

03.00.04 – Биохимия

03.00.03-Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва - 2006

Работа выполнена в Федеральном государственном учреждении Научно-исследовательском институте физико-химической медицины Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию РФ

Научные руководители: доктор биологических наук, профессор
Говорун Вадим Маркович

кандидат биологических наук, доцент
Ильина Елена Николаевна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Колесанова Екатерина Федоровна

кандидат биологических наук,
Прилипов Алексей Геннадиевич

Ведущая организация: Федеральное государственное унитарное предприятие
"Государственный научный центр по антибиотикам"

Защита диссертации состоится «19» октября 2006 года в 14:00 часов на заседании Диссертационного Совета Д 001.010.01 при ГУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН по адресу: 119121, Москва, ул. Погодинская, 10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГУ НИИ БМХ РАМН.

Автореферат разослан «18» сентября 2006 года

Ученый секретарь Диссертационного Совета
кандидат биологических наук

В.С. Былинкина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Гонорея - одна из распространенных на сегодняшний день инфекций, передающихся половым путём, - остается актуальной проблемой в области практического здравоохранения. К особенностям гонореи относят распространение вялотекущих и диссеминированных форм, увеличение частоты выявления мультирезистентных штаммов. Для гонококка характерны высокая пластичность, естественный морфофизиологический и генетический полиморфизм, и, как следствие, выраженная гетерогенность популяции.

Молекулярные методы исследования популяции *N. gonorrhoeae* способны не только дополнить традиционные микробиологические методики идентификации и характеристики микроба, но и преодолеть ограничения последних (длительность анализа, трудоемкость и сложностью стандартизации). В настоящий момент среди многообразия предложенных методов не определен приоритетный подход, способный стать стандартным и общепринятым.

Разработка современных молекулярных подходов типирования и штаммовой идентификации гонококка особенно актуальна для нашей страны, поскольку в РФ нет стандартной системы типирования штаммов *N. gonorrhoeae*, а имеющаяся информация о региональных особенностях возбудителя крайне скудна, разрознена и зачастую неактуальна. Разработка соответствующего арсенала методов и исследование гетерогенности популяции позволит иметь ее актуальную молекулярно-эпидемиологическую характеристику, сделает возможным регулярный мониторинг и обоснованный прогноз эпидемиологической ситуации.

Цель работы. Цель работы – разработка и сравнение различных методов молекулярного типирования *N. gonorrhoeae* и использование их для характеристики популяции возбудителя, распространённой на территории Российской Федерации.

Задачи исследования:

1. Формирование коллекции образцов ДНК микробиологически охарактеризованных клинических штаммов *N. gonorrhoeae*, полученных от больных из различных регионов Российской Федерации.
2. Разработка системы комплексной оценки антибиотикоустойчивости *N. gonorrhoeae* на основе знаний о генетических механизмах формирования устойчивости возбудителя, включающей определение известных нуклеотидных полиморфизмов в реакции минисеквенирования с последующим масс-спектрометрическим анализом.
3. Оптимизация методики прямого масс-спектрометрического белкового профилирования и оценка возможности типирования клинических штаммов *N. gonorrhoeae* с использованием данного подхода.
4. Реализация схемы *por*-типирования для характеристики коллекции российских клинических штаммов *N. gonorrhoeae*.
5. Анализ гетерогенности генов «домашнего хозяйства» *N. gonorrhoeae* и разработка схемы типирования мультилокусным секвенированием клинических штаммов гонококка.
6. Молекулярно-эпидемиологическая характеристика группы клинических штаммов *N. gonorrhoeae*, выделенных на территории РФ.

Научная новизна и практическая значимость работы. В работе продемонстрированы возможности современных молекулярных подходов к характеристике и типированию клинических штаммов *N. gonorrhoeae*, условия отдельных методик отработаны впервые. На основе ПЦР-амплификации и масс-спектрометрического анализа продуктов реакции минисеквенирования предложена высокопроизводительная система одновременного исследования 15 генетических локусов гонококка - маркеров устойчивости к пяти классам антибиотиков. Впервые для характеристики штаммов *N. gonorrhoeae* использованы возможности белкового профилирования с помощью прямого масс-спектрометрического анализа. Также в ходе работы существенно дополнены

представления о возможностях анализа изменчивости *por* гена и некоторых «генов домашнего хозяйства» для типирования штаммов гонококка.

Впервые для географически неоднородной группы клинических штаммов *N. gonorrhoeae*, распространенных на территории РФ, исследован полиморфизм *por* генов и 13 генов «домашнего хозяйства» (*abcZ*, *adk*, *aroE*, *fumC*, *gdh*, *glnA*, *gnd*, *pdhC*, *pgm*, *pilA*, *pip*, *pyrD*, *serC*), показана значительная гетерогенность исследованной выборки и описаны механизмы, участвующие в формировании фенотипически регистрируемого уровня антибиотикоустойчивости.

Результаты работы имеют значение для решения ряда теоретических вопросов молекулярной эпидемиологии *N. gonorrhoeae*, однако в большей степени представляют практическую ценность и направлены на прикладное использование. Предложенные методические схемы и их технологические решения делают реальным их использование в практических лабораториях для решения двух из трех основных задач клинической микробиологии: 1) быстрая оценка антибиотикорезистентности гонококка, 2) характеристика локальной (географической, временной) структуры популяции/субпопуляции возбудителя, идентификация циркулирующих штаммов или групп штаммов.

Реализация и внедрение результатов работы в практику. Осуществляется внедрение результатов работы в клиничко-лабораторную практику бактериологической лаборатории ФГУ ЦНИКВИ Росздрава.

Апробация работы. Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на расширенном межлабораторном заседании Отдела молекулярной биологии и генетики ФГУ НИИ физико-химической медицины Росздрава (Москва, 20 июля 2006 года), а также в ходе следующих конференций: IX Всероссийский съезд дерматовенерологов (Москва, 2005), 15-я Международная конференция по патогенным нейссериям (Кэрнс, 2006).

Публикации. Материалы диссертационной работы отражены в 11 публикациях (5 в рецензируемых журналах, 6 - тезисы сообщений на конференциях).

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 140 страницах машинописного текста, содержит 20 таблиц и 14 рисунков. Состоит из сле-

дующих глав: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты», «Обсуждение», «Заключение и выводы», «Список литературы», который включает 175 источников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактериальные штаммы. Использовали контрольный (ATCC 49226) и 464 клинических штамма *N. gonorrhoeae*, выделенных от больных неосложнённой гонореей из 14 региональных центров РФ. Штаммы, охарактеризованные по чувствительности к 5 антибиотикам, представителям 4 классов (пенициллин, цефотаксим; тетрациклин; ципрофлоксацин; спектиномицин) предоставлены бактериологической лабораторией ФГУ ЦНИКВИ Росздрава.

Прямое белковое профилирование штаммов *N. gonorrhoeae*. Использовали свежую 48-ми часовую культуру гонококка, находящуюся в стационарной фазе роста. В качестве референтного микроорганизма использовали свежую 18-ти часовую культуру лабораторного штамма *E.coli* DH5 α . Материал бактериальной культуры (одиночная колония) ресуспендировали в растворе «АТ» (50% ацетонитрил / 2,5% трифторуксусная кислота). Центрифугировали 1 мин X 14000 об/мин. 1 мкл супернатанта наносили на ячейки стального планшета для масс-спектрометрии (MSP 96 target ground steel, Bruker Daltonics, Германия), смешивали с насыщенным в «АТ» раствором одного из матричных соединений (α -циано-4-гидроксициннамовая кислота, α -СНСА; синапиновая кислота, SA; феруловая кислота, FA) и высушивали на воздухе в течение 5 минут.

Масс-спектрометрический анализ проводили с использованием MALDI-TOF масс-спектрометра Microflex (Bruker Daltonics, Германия), используя следующие параметры измерения: линейный режим, частота импульсов - 10 Гц, детекция положительно заряженных ионов с ускоряющим напряжением – 20.0 кВ, напряжение на накапливающем электроде – 18.6 кВ, время задержки экстракции – 350 нсек. Образец наносили на три ячейки планшета, для каждой из которых записывали конечный спектр (500 импульсов лазера), полученный суммированием 10 одиночных спектров (50 импульсов лазера). Внешнюю калибровку проводили с использованием точных значений масс известных белков *Escherichia coli*. Полученные спектры анализировали с использованием программы flexAnalysis 2.4 (Bruker Daltonics, Германия). Формирование пик-листа проводили в автоматическом режиме, используя единые стандартные условия отбора пиков: 1) центроидный алгоритм поиска (80% высоты пика), 2) отношение сигнал/шум – 15, 3) пороговое значение относительной интенсивности – 10%, 4) максимальное число пиков – 100, 5) максимальная ширина пика – 2 m/z. Идентификацию белков проводили путем поиска совпадения значений экспериментальных масс с массами

белков, аннотированных в базах данных (SwissProt/TrEMBL) с использованием ресурсов ExPASy-сервера (<http://ca.expasy.org/srs5/>). При этом учитывали инструментальную погрешность измерения, которая составляла 3 Да, а также возможную посттрансляционную утрату N-концевого метионина.

Генетический анализ штаммов *N. gonorrhoeae*. Выделение ДНК проводили по методу Boom с соавторами [Boom R. Et al., 1990]. Для амплификации фрагментов генов *N. gonorrhoeae* использовали праймеры, приведенные в таблицах 1 и 2.

Таблица 1. Праймеры, использованные для амплификации фрагментов генома *N. gonorrhoeae*, связанных с рассматриваемыми механизмами устойчивости.

Мишень	Праймер	5'-3' последовательность	Размер продукта, п.н.
<i>por</i> , А	M13F-Por01 ¹ M13R-Por08 ¹	gtcacgacgttgtaaaacgacggccagtctgactttggcagccctt cacacaggaaacagctatgaccgtattgtgcgaagaagc	500-600 ²
<i>por</i> , В	M13F-Por11 ¹ M13R-Por14 ¹	gtcacgacgttgtaaaacgacggccagtctgtccgtacgctacg cacacaggaaacagctatgaccagattagaattgtggcgc	500-600 ²
<i>bla</i>	B1f D2r B3f D4r	tactcaatcggttaattggct gccccaaaaaggacgaaag cgtatatctagttgaggcac gtgcctcaactagatatacg	340 (Asia, Africa) 142 (Toronto)
<i>penA</i>	penA-f penA-r	cgtgattgcgaaggcattgg gtgcgtcagtcgggtatagg	379
<i>ponA</i>	PonA1-f PonA1-r	gagaaaatggggaggaccg ggctgccgattgcctgaac	206
<i>gyrA</i>	GyrAFEx GyrAREx	gacggcctaaagccggtgca atgttgctgccataccgac	431
<i>parC</i>	ParCFEx ParCREx	gtttcagacggccaaaagccc ggaacaacagcaattccgcaat	300
<i>norM</i>	Nor1 Nor2	tgggcagtacgtcggcg ggcggtcagcaggcgg	449
<i>mtrR</i>	MtrAF MtrAR	gacgacagtccaatgcaacg ttaagattattccggcgcaggcag	957
<i>tet(M)</i>	Tet1 Tet2	atcctttctggcttccattg ccgagcagggatttctccac	436
<i>rpsJ</i>	RPS-for RPS-rev	gtgctgttgtaaaaggcccg cgccggcaaatccagcttc	186
<i>ermB</i>	Bfor Brev	agtaacgtacttaaattgttac gaaaaggctactcaaccaata	640
<i>ermF</i>	Ffor Frev	cgggtcagcactttactattg ggacctacctcatagacaag	466
<i>mef</i>	Mf1 Mf2	gataggaagaagataatgattgg aagagctgttgacaccgc	790
<i>rrs</i>	16Sfor 16Srev	aaggccgtgccaatatcg tgtatgacgtgtgaagccc	785

¹ – последовательности праймеров M13F и M13R подчеркнуты.

² – длины амплифицируемых фрагментов варьируют для разных генотипов.

Таблица 2. Праймеры, использованные для амплификации фрагментов 13-ти генов «домашнего хозяйства»

Мишень	Праймер	5'-3' последовательность ¹	Размер продукта, п.н.
<i>abcZ</i>	abcZ abcZ-r	gatctgtaaaacgacggccagtaaatcctcaccggcgtgca gatccaggaaaacagctatgaccgtatccacgctcttctgcg	716
<i>adk</i>	adk adk-r	gatctgtaaaacgacggccagtaggcaggcagcccttg gatccaggaaaacagctatgaccctgcccgtgggtacgacct	602
<i>aroE</i>	aroE aroE-r	gatctgtaaaacgacggccagtgc aaatcgccgcagattcatc gatccaggaaaacagctatgaccagccattgacgatgcggaac	830
<i>fumC</i>	fumC fumC-r	gatctgtaaaacgacggccagtccggcctgccgtttgtcag gatccaggaaaacagctatgaccggcaggacgaccagttcg	655
<i>gdh</i>	gdh gdh-r	gatctgtaaaacgacggccagtatcaataccgatgtggcgcgt gatccaggaaaacagctatgaccgtgatttcagacggcatatccc	1156
<i>glnA</i>	glnA glnA-r	gatctgtaaaacgacggccagtcccatatttgccattccc gatccaggaaaacagctatgaccgttcaccatggcggagcg	685
<i>gnd</i>	gnd gnd-r	gatctgtaaaacgacggccagtctctacgacgaaatgcaccgc gatccaggaaaacagctatgaccgaagaacgtaatcgccgaagcc	698
<i>pdhC</i>	pdhC pdhC-r	gatctgtaaaacgacggccagtgtacaagcggctcgcgccg gatccaggaaaacagctatgaccgcaaacaggccgtctgaaacatc	724
<i>pgm</i>	pgm pgm-r	gatctgtaaaacgacggccagtgcgaccgaccgcttg gatccaggaaaacagctatgaccgtgatgattcgggtgcgcc	533
<i>pilA</i>	pilA pilA-r	gatctgtaaaacgacggccagtaccgtgctgattaccggcg gatccaggaaaacagctatgacccttcagcagcgcgcttac	563
<i>pip</i>	pip pip-r	gatctgtaaaacgacggccagtggattgtcagaagcaatgggag gatccaggaaaacagctatgaccaagctctttttgtgcggaac	1032
<i>pyrD</i>	pyrD pyrD-r	gatctgtaaaacgacggccagtgtatgtttggcgggatttcgg gatccaggaaaacagctatgaccacgcggcgatgtcttcg	795
<i>serC</i>	serC serC-r	gatctgtaaaacgacggccagtgcgaaatgtcggactacaacgg gatccaggaaaacagctatgaccgcgtaagttgacggcgtg	719

¹ – последовательности праймеров M13F и M13R подчеркнуты.

Амплификацию проводили в 10 мкл реакционной смеси, содержащей 66 mM ТрисНСl, pH 9.0, 16.6 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgCl₂, по 100 мкМ каждого dNTP, 1 Ед Taq-полимеразы (Promega, USA) и по 10 пмолей каждого праймера в амплификаторе DNA Engine Tetrad 2 (MJ Research, США). Использовали единый температурный профиль: 94°C, 15 сек, 58°C, 15 сек, 72°C, 16 сек; 35 циклов. Продукты амплификации генов *bla*, *tet(M)*, *ermB*, *ermF*, *mefA* анализировали в 2% агарозном геле.

Дефосфорилирование dNTP и элиминацию оставшихся праймеров в пост-амплификационной смеси проводили, инкубируя образцы с 1 Ед антарктической фосфатазы (New England BioLabs, Великобритания) и 5 Ед экзонуклеазы I (Fermentas, Евросоюз) при 37°C в течение 30 минут с последующей инактивацией ферментов при 85° С в течение 10 минут.

Реакцию термоциклического минисеквенирования проводили в 10 мкл реакционной смеси: 66 mM Tris-HCl pH 9.0; 16.6 mM (NH₄)₂SO₄; 2.5 mM MgCl₂; по 0.2 mM необходимых dNTP и/или ddNTP; по 10 пмолей каждого праймера (табл. 3) и 2 Ед TermiPol DNA Polymerase (Solis Biodyne, Эстония), используя в качестве матрицы амплифицированные фрагменты ДНК. Нарботку продуктов реакции осуществляли по универсальному профилю: 94° С – 20 сек, 58° С – 20 сек, 72° С – 15 сек, 70 циклов.

Таблица 3. Праймеры, использованные в реакции минисеквенирования.

Ген	Праймер	5'-3' последовательность; масса	Смесь ddNTP; dNTP	Масса продуктов реакции минисеквенирования для дикого генотипа	Масса продуктов реакции минисеквенирования для мутантного генотипа
<i>penA</i>	penAz	ggggtaaacatgggtatcg; 5933 Да	dTTP; ddCTP	6206 Да (+ddCTP)	6510 Да (+dTTP+ddCTP) ins Asp345a
<i>ponA</i>	ponAz	gggtcaagagccgttgc; 5227 Да	dTTP; dGTP; ddCTP	6133 Да (+dTTP+dGTP+ddCTP) Leu421	5500 Да (+ddCTP) Leu421Pro
<i>gyrA</i>	grA91	ataccacccccacggcgatt; 6020 Да	dTTP; dATP; ddCTP	6293 Да (+ddCTP) Ser91	6597 Да (+dTTP+ddCTP) Ser91Phe
					6606 Да (+dATP+ddCTP) Ser91Tyr
	grA95	cgccatacggacgatggtg; 5870 Да	dTTP; ddCTP; ddGTP	6447 Да (+dTTP+ddCTP) Asp95	6143 Да (+ddCTP) Asp95Gly
					6183 Да (+ddGTP) Asp950Ala
<i>norM</i>	CT-35	ccccgtatccgccgt; 4465 Да	dATP; dTTP; ddCTP; ddGTP	4738 Да (+ddCTP) C-35	5386 Да (+dTTP+dTTP+ddGTP) C-35T
	AG-RBS	gacggcattttattgactg; 6138 Да	dATP; dTTP; ddCTP; ddGTP	7037 Да (+dATP+dATP+ddCTP) A-7	6451 Да (+ddGTP) A-7G
<i>mtrR</i>	mtrR1	acatacacgattgcacggat; 6110 Да	dATP; dCTP; ddTTP; ddGTP	7676 Да (+5dATP) A-35	7363 Да (+4dATP) delA-35
	mtrR4	attgcacggataaaaagtc; 5595 Да	dATP; dCTP; ddTTP; ddGTP	7474 Да (+6dATP)	8101 Да (+8dATP) insTT-10
	mtrR6	tgaatgccaatagagcgcg; 6175 Да	dATP; dCTP; ddTTP; ddGTP	6770 Да (+dCTP + dCTP +ddGTP) Gly45	6463 Да (+ddTTP) Gly45Asp
<i>rrs</i>	NgC1192	ggccatgaggacttgac 5236 Да	dGTP, ddATP, ddTTP	5853 Да (+dGTP+ddTTP) C1192	5533 Да (+ddATP) C1192U
<i>rrl</i>	C2611T-f	cgctcgtgagacagtttgctc 6164	dCTP, ddTTP	7030 (+dCTP, +ddTTP) C2611	6452 (+ddTTP) C2611T
<i>rpsJ</i>	RPS_Z	acattttccggtctccgcac 5979 Да	dATP, dTTP, ddGTP	6292 Да (+ddGTP) Val57	6910 Да (+dATP, +dTTP, +ddGTP) Val57Met

Очистку продуктов реакции минисеквенирования проводили следующими образом: входящий в состав набора SpectroCLEAN Kit (Sequenom, США) сорбент в количестве 8 мг растворяли в 16 мкл ультрачистой воды (Merck, Германия), полученную суспензию в объеме 24 мкл вносили в пробирку с продуктами реакции минисеквенирования. Содержимое пробирки тщательно перемешивали и инкубировали при комнатной температуре 15 мин. Затем осаждали сорбент центрифугированием в течение 5 мин при 1000 об/мин.

Для проведения масс-спектрометрического анализа продуктов реакции аликвоту образца (0.2-1 мкл) с концентрацией олигонуклеотидов 10-30 пмоль/мкл, наносили на предварительно высушенную на планшете AnchorChip (600 мкм, Bruker Daltonics, Германия) матрицу, приготовленную из насыщенного раствора 3-гидроксипиколиновой кислоты (Fluka, Германия) в 50% ацетонитриле (Merck, Германия) с добавлением 10 г/л цитрата аммония двухосновного (Fluka, Германия), и высушивали на воздухе.

Масс-спектрометрический анализ проводили с использованием MALDI-TOF масс-спектрометра Microflex (Bruker Daltonics, Германия), оснащенного азотным лазером ($\lambda=337$ нм) с частотой импульсов до 20 Гц. Все измерения проводили в линейной режиме, детектируя положительно заряженные ионы с ускоряющим напряжением – 20.0 кВ, накапливающим электроде – 18.65 кВ, фокусирующей линзе – 9.2 кВ и временем задержки анализатора – 400 нсек. Для получения каждого масс-спектра использовали 50 импульсов лазера с мощностью излучения, установленной на уровне минимального порогового значения, достаточного для десорбции-ионизации образца.

По наличию в масс-спектрах продуктов реакции пиков, соответствующих ионам определенной ожидаемой молекулярной массы, судили о нуклеотидном контексте в данном положении (табл. 3).

Определение нуклеотидной последовательности *por* генов, фрагментов гена *parC* и 13 генов «домашнего хозяйства» проводили модифицированным методом Сенгера [Sanger, et al., 1977] с использованием ABI Prism® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit и прибора ABI Prism® 3100 Genetic Analyzer (“Applied Biosystems”, США; “Hitachi” Япония) в соответствии с прилагаемыми инструкциями. В реакции секвенирования *por* генов и фрагментов 13 генов «домашнего хозяйства» использовали стандартные праймеры –21 M13 TGTAACGACGGCCAGT-3’, M13 reverse CAGGAAACAGCTATGACC-3’, в реакции секвенирования *parC* гена – те же праймеры, которые использовали в реакции амплификации (табл.1). Восстановление полноразмерных последовательностей *por* гена, выравнивание и сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей проводили с использованием программного пакета «Vector NTI® 9.0» (Informax Inc, США). Расчёт параметров гетерогенности анализируемых последовательностей и тест на селекцию проводились с использовани-

ем программы MEGA version 3.1 [Kumar et al., 2004]. Нуклеотидные последовательности *por* генов анализируемых штаммов сравнивали с последовательностями, представленными в базе данных GeneBank с помощью сервиса BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). По результатам анализа тестируемому штамму ставился в соответствие серотип *N. gonorrhoeae*, последовательность *por* гена которого максимально гомологична анализируемой.

Статистический анализ. Для учёта результатов исследования, формирования промежуточных таблиц, осуществления элементарных расчётов, описательной статистики и построения диаграмм использовали программные ресурсы пакета Microsoft Office Excel 2003.

Все статистические тесты проводили для уровня значимости $p < 0,05$. Так как в исследовании мы имели дело с качественными номинальными признаками (значения которых не могут быть упорядочены по какому-либо семантическому принципу), для подтверждения наличия ассоциации генотипов и категорий чувствительности, оценки силы связи выбраны критерий χ^2 и коэффициент сопряженности Крамера соответственно. Основные статистические расчёты производили с помощью пакета Statistica 6.0. Для численной оценки дискриминирующей способности методов типирования использовали индекс разнообразия Симпсона D [Simpson, 1949]. Согласно общепринятой практике, приемлемыми считаются методы типирования (или их комбинации), имеющие значение индекса Симпсона 0.9 и выше [Hunter et al., 1988].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Коллекция образцов ДНК клинических штаммов *N. gonorrhoeae*

В исследование включена группа из 464 клинических штаммов *N. gonorrhoeae*, выделенных от пациентов из 14 региональных центров РФ. Географическая неоднородность исследуемой группы клинических штаммов делает эту выборку хорошей моделью для отработки молекулярных подходов к характеристике и изучению внутривидовой изменчивости гонококка, рассмотренных далее. Представленность различных географических областей территории РФ в выборке, с одной стороны, даёт возможность оценить региональные особенности популяции возбудителя, с другой – обобщить получаемые данные и экстраполировать формулируемые выводы на территорию РФ в целом.

Проведено выделение ДНК клинических штаммов, сформирован лабораторный банк ДНК. Анализ генетических маркеров резистентности и *por*-

типирование осуществлены для 464 штаммов; прямое белковое профилирование реализовано для 278 штаммов; детальное сравнение методов *por*- и мультилокусного типирования проведено для группы из 84 штаммов.

Прямое белковое профилирование *N. gonorrhoeae*

С целью получения воспроизводимых и максимально насыщенных масс-спектров на лабораторном штамме *E. coli* DH5 α отработана методика белковой экстракции и условия масс-спектрометрического анализа (см. «Методы исследования»). Выбрано оптимальное матричное соединение - α -СНСА, область анализа масс-спектра ограничена диапазоном m/z 4000 – 12000, в рамках которого отработаны критерии выбора пиков при формировании пик-листа (набор значений m/z и относительных интенсивностей пиков). В предшествующих работах предлагается использовать различные матричные растворы и методики подготовки образца бактериальной культуры для масс-спектрометрического анализа [Edwards-Jones et al., 2000; Hettick et al., 2004; Meentani et al., 2005], показаны результаты разной степени качества и информативности. Сравнение достигнутых нами характеристик масс-спектра (среднее разрешение в указанном диапазоне, отношение сигнал/шум) с данными, полученными в указанных работах, свидетельствует об эффективности отработанной методики. Использование в качестве матрицы α -СНСА позволяет получить максимально гомогенную структуру и форму кристаллов в сравнении с двумя другими исследованными матрицами, что играет роль для сохранения от спектра к спектру необходимой точности измерения масс, а также для успешной записи спектров в автоматическом режиме.

Поиск в базе данных SwissProt/TrEMBL позволил соотнести 16 регистрируемых значений m/z с молекулярными массами бактериальных белков, причём большинство из них представляли собой белки рибосом бактерии. Установлены точные значения m/z для этих пиков в спектре штамма *E. coli* DH5 α , который дополнительно анализировали в каждом из последующих экспериментов с *N. gonorrhoeae* и использовали для внешней калибровки. Ранее было показано

преобладание в составе регистрируемых масс-спектров бактериальных клеток рибосомальных белков, что, вероятно, связано с их локализацией в цитозоле (в отличие от мембранных), присутствием в достаточно большом количестве, относительно небольшой массой, а также основностью большей части из них, что в условиях кислой экстракции повышает эффективность ионизации и десорбции, а также масс-спектрометрического анализа в режиме положительных ионов [Ryzhov and Fenselau, 2001].

Аналогичным образом получена серия масс-спектров для лабораторного штамма *N. gonorrhoeae* ATCC 49226 (рис. 1), проведен их качественный и количественный анализ. Воспроизводимость полученных спектров оценивали на основании дисперсии значений m/z , относительной интенсивности и частоты регистрации отдельных пиков: максимальное среднеквадратичное отклонение для m/z составило 2.8 Да, для относительной интенсивности – 0.24. Выделены 20 устойчиво воспроизводимых пиков, для которых частота регистрации $f \geq 0.7$. Усреднённые по 10 измерениям значения m/z этих пиков составляют: 4474, 4511, 4689, 4784, 5010, 5052, 5130, 5484, 5908, 5946, 6053, 6404, 7080, 7227, 8068, 8167, 8225, 9379, 9570, 10260. По базе данных SwissProt/TrEMBL 12 пиков соотнесены с рибосомальными белками: 4473 - RL36, 5051 - RL34, 5907 - RL33, 6402* - RL32, 6805* - RL30, 7078 - RL29, 7226* - RL35, 8165 - RL31, 8224* - RS21, 8687* - RL28, 9377* - RS20, 9568* - RL27, 10259* - RS19 (* - масса с учётом утраты начального метионина).

Сравнительный анализ масс-спектров для 278 клинических штаммов *N. gonorrhoeae* выявил три пика со значениями m/z 4473, 5051 и 8165 (согласно масс-спектру *N. gonorrhoeae* ATCC 49226), которые меняются у ряда штаммов на 4487, 5081 и 8146 соответственно. Соотнесение этих пиков с рибосомальными белками RL36, RL34 и RL31 подтвердили секвенированием полноразмерных последовательностей генов *N. gonorrhoeae* – *rpmJ*, *rpmH* и *rpmE*. В каждом из них обнаружен единственный значимый нуклеотидный полиморфизм, приводящий к соответствующей аминокислотной замене. Теоретически рассчитанные изменения массы белков при данных заменах совпадали с изменением, ре-

гистрируемым в ходе масс-спектрометрического анализа: 1) RL36: 4473 (wt) / 4487 (V7I); 2) RL34: 5051 (wt) / 5081 (A37T); 3) RL31: 8165 (wt) / 8146 (R10H).

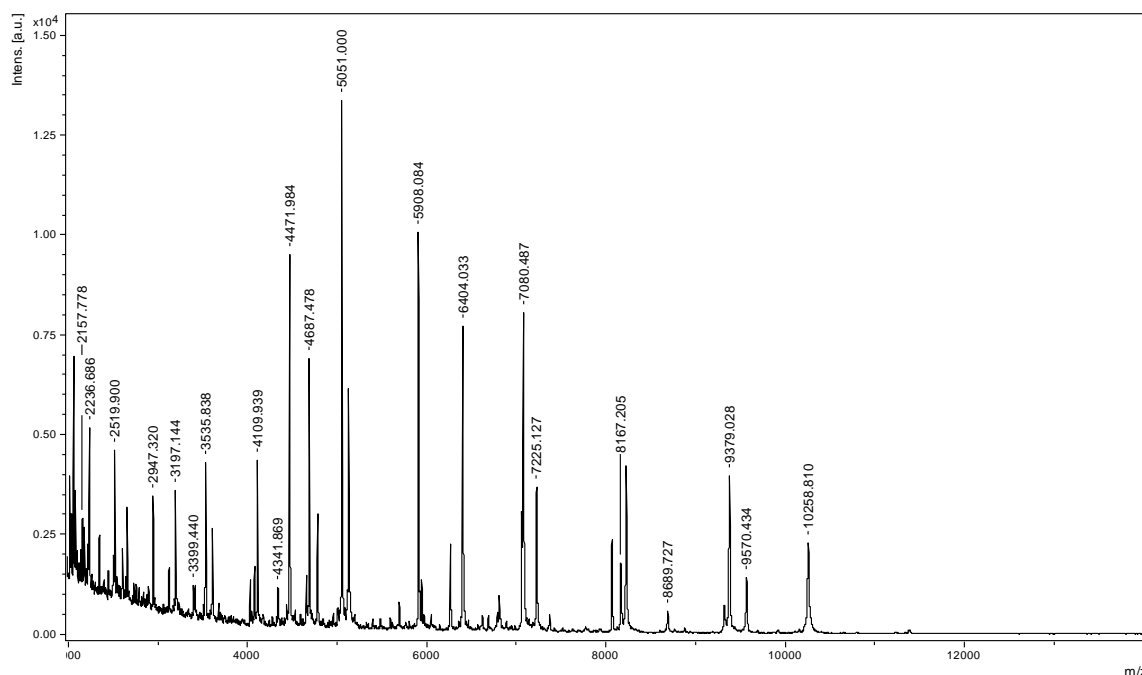


Рисунок 1. Масс-спектр белкового экстракта клеток штамма *N. gonorrhoeae* ATCC 49226, ограниченный диапазоном m/z 2000 – 16000.

Из восьми теоретически возможных комбинаций, выявленных для значений m/z 3-х белков, среди исследованной группы штаммов обнаружены четыре варианта. Учитывая неизменность остальных значений m/z в спектре, выделено четыре типа белковых масс-профилей (протеотипов) гонококка и проведена оценка их распределения в исследованной группе штаммов (табл. 4). Проведено сравнение распространенности различных протеотипов в отдельных регионах и в целом в РФ (рис.2).

Таблица 4. Распределение протеотипов гонококка в исследованной группе штаммов

Белок	M	Кластеры варьирующих пиков для:			
		типа 1	типа 2	типа 3	типа 4
RL36	4474	4474			4474
	4487		4487	4487	
RL34	5052	5052	5052	5052	
	5082				5082
RL31	8147			8147	
	8167	8167	8167		8167
Число штаммов		236	26	15	1
Относительная частота, %		84,9	9,4	5,4	0,4

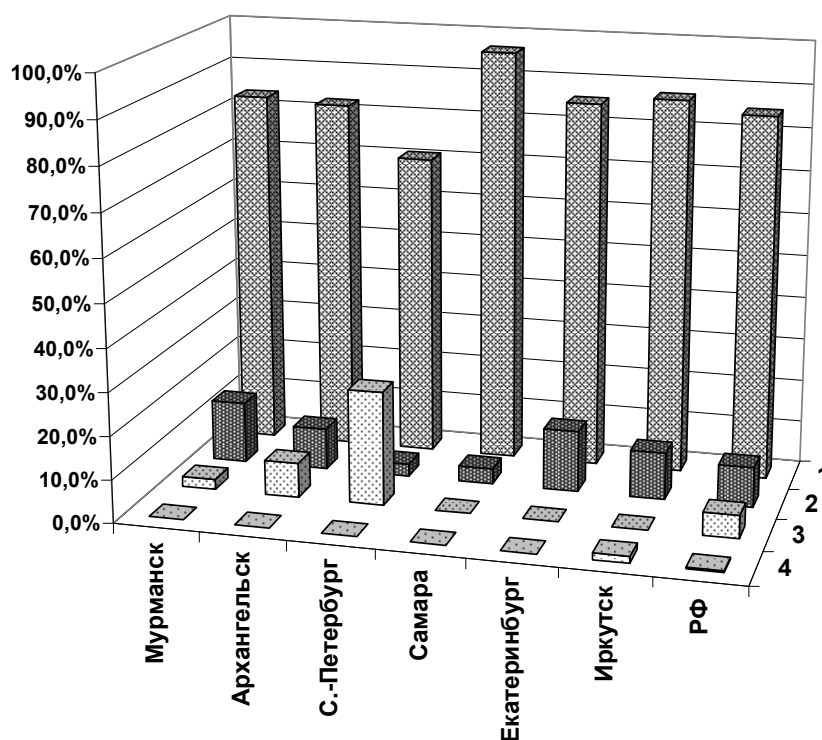


Рисунок 2. Встречаемость протеотипов гонококка в регионах РФ в сравнении с общей распространенностью (включены регионы, для которых исследовано более 10 штаммов).

Наблюдаемые незначительные отличия качественного состава масс-спектров в группе клинических штаммов гонококка согласуются с представлением о ключевой роли рибосомальных белков в жизнедеятельности клетки, консервативности их аминокислотных последовательностей и соответствующих генов. Напомним, что 12 из 20 устойчиво регистрируемых пиков соотносены с рибосомальными белками, другие 8 пиков также характеризовались постоянством значений m/z .

Предложенная методика получения воспроизводимых масс-спектрометрических профилей бактериальных клеток апробирована на географически неоднородной группе штаммов. Обусловленная низкой вариабельностью белковых профилей (4 протеотипа) низкая дискриминирующая способность ($D = 0.27$) делает невозможным применение этого подхода для типирования патогена. Обратная сторона этого результата – относительная стабильность качественного состава профилей – позволяет говорить о перспективности видовой идентификации возбудителя с использованием данного подхода. Сформи-

рованный набор из 20 устойчиво воспроизводимых пиков масс-спектра может рассматриваться как кандидатный список для формирования видоспецифичного профиля возбудителя.

Использование MALDI-TOF масс-спектрометрического анализа для характеристики микробной клетки предложено, например, для идентификации микробактерий [Hettick et al., 2004], представителей семейства Enterobacteriaceae [Lynn et al., 1999], типирования штаммов бетагемолитических стрептококков [Kumar et al., 2004], однако в нашей работе впервые произведена оценка этого подхода для характеристики штаммов *N. gonorrhoeae*.

Анализ генетических маркеров лекарственной устойчивости

N. gonorrhoeae

Осуществлен дизайн праймеров для реакций амплификации, минисеквенирования и секвенирования 15 генетических локусов, изменения которых ассоциированы с возникновением феномена лекарственной устойчивости *N. gonorrhoeae* к пяти классам АМП (пенициллины, тетрациклины, фторхинолоны, спектиномицин, макролиды). Используемая схема анализа включала регистрацию генетических маркеров, обусловленных как приобретением новых элементов, так и мутациями в специфических хромосомных локусах бактерии. С целью уменьшения себестоимости и повышения общей производительности анализа, отработаны универсальные условия проведения реакций амплификации, минисеквенирования и секвенирования, в цепочке последовательных технологических этапов минимизировано количество операций по переносу и разведению образцов, все процедуры приведены к формату 96-ти луночного планшета. Проведен комплексный анализ 464 клинических штаммов *N. gonorrhoeae*, для каждого из которых получен индивидуальный профиль из 15 генетических маркеров резистентности.

Осуществлено сравнение профиля чувствительности к АМП с частотами обнаружения соответствующих генетических маркеров устойчивости:

1) по данным тестов на чувствительность к пенициллину в исследованной группе 122 штамма (26,3 %) относились к категории чувствительных и 342 (73,7 %) к категории резистентных. Частоты обнаружения генетических маркеров устойчивости составили: *bla* – 3,9 % (18 из 464 штаммов), мутации в генах *ponA* – 71,3 % (326), *penA* – 87,7 % (407), *penB* – 54,3 % (252), *mtrR* – 48,3 % (224). Отсутствие выбранных маркеров резистентности наблюдалось в 12,1 % случаев (55 штаммов). По данным тестов на чувствительность к цефотаксиму все штаммы относились к категории чувствительных.

2) согласно тестам на чувствительность к тетрациклину в исследованной группе штаммов 168 (36,2 %) относились к категории чувствительных и 296 (63,8 %) – к категории резистентных. Частоты обнаружения маркеров устойчивости составили: *tetM* – 0,9 % (4 из 464 штаммов), мутации в генах *rpsJ* – 79,1 % (367), *penB* – 54,3 % (252), *mtrR* – 48,3 % (224). Отсутствие выбранных маркеров резистентности наблюдалось в 19,8 % случаев (92 штамма).

3) по данным тестов на чувствительность к ципрофлоксацину в исследованной группе штаммов 249 (53,7 %) относились к категории чувствительных и 215 (46,3 %) к категории резистентных. Для анализа генетических механизмов формирования резистентности гонококка к фторхинолонам выбраны следующие генетические маркеры: полиморфизмы генов гиразы и топоизомеразы IV (*gyrA*, *parC*), полиморфизм промотора и гена *mtrR* эффлюксного белка MtrR. Частоты обнаружения специфических маркеров устойчивости составили: *gyrA* – 45,5 % (211 из 464 штаммов), *parC* – 44,4 % (206); неспецифических маркеров: *mtrR* – 48,3 % (224). Отсутствие выбранных маркеров резистентности наблюдалось в 31,7 % случаев (147 штаммов).

4) по данным тестов на чувствительность к спектиномицину в исследованной группе подавляющее большинство штаммов - 453 (97,6 %) относились к категории чувствительных, остальные 11 (2,4%) – к категории умереннорезистентных. Для описания генетических механизмов формирования резистентности гонококка к спектиномицину в панель генетических маркеров был включен

ген 16S рРНК (*rrs*). В исследованной группе штаммов описанный в литературе полиморфизм не обнаружен.

5) с целью анализа распространенности известных генетических механизмов устойчивости гонококка к макролидам выбраны следующие генетические маркеры: *mef* (кодирует белок специфического эффлюкса), *ermB*, *ermF* (гены рибосомальных метилаз), мутации в гене *rml* (ген 23S рРНК). В исследованной группе у 5 штаммов выявлен ген *ermB*, у одного штамма – *ermF* и у 2 штаммов *mef* ген; описанного ранее полиморфизма в гене *rml* не обнаружено.

При анализе данных профиля антибиотикочувствительности обращает на себя внимание высокий процент штаммов, устойчивых к пенициллину (73,7 %), тетрациклину (63,8 %) и ципрофлоксацину (46,3 %). При этом штаммы, характеризующиеся устойчивостью одновременно к двум или трём антибиотикам (мультирезистентные), также составляют большинство (64 %). Вместе с тем практически все анализируемые штаммы чувствительны к цефотаксиму и спектиномицину. При отсутствии значимых региональных отличий в уровне лекарственной устойчивости гонококка, можно говорить о повсеместной распространенности резистентных и мультирезистентных штаммов, что подтверждает и продолжает описанную ранее тенденцию, характерную как для отдельных исследованных территорий РФ [Никулин и соавт., 1999; Страчунский и соавт., 1999; Кобенко и соавт., 1999; Верещагин и соавт., 2005], так и для микробной популяции гонококка в целом [Tapsall, 2002].

В настоящем исследовании впервые реализован одновременный анализ 15 генетических маркеров резистентности и использована методика анализа известных нуклеотидных полиморфизмов в реакции минисеквенирования с последующим MALDI-TOF масс-спектрометрическим анализом. Техническое решение данной задачи представляет отдельный интерес. Этот подход уже применяется с успехом на практике, например, для анализа полиморфизма генов человека. При этом в последние годы масс-спектрометрия как высокоточный метод молекулярного анализа получает все большее распространение в биологии и медицине. MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ все чаще

рассматривается как рутинный инструмент экспериментальной, а в отдельных его реализациях, и клинической микробиологии с достаточно широким полем возможных приложений [Fenselau and Demirev, 2001; Ben L.M. van Baar, 2000; Jackson O. Lay Jr., 2001]. Результаты нашей работы подтверждают возможность использования описанной технологии для анализа SNPs бактериального генома и, в частности, для мутаций – маркеров лекарственной устойчивости бактерии. Разработанная система (дизайн праймеров, состав реакционных смесей, протоколы детекции), а также полученные экспериментальные данные могут служить одним из компонентов комплексного анализа микроба, объединенного единой инструментальной базой (MALDI-TOF масс-спектрометр) и потому удобного для использования в практике клинико-диагностических лабораторий.

Полученные результаты позволили проанализировать частоты встречаемости различных генетических детерминант устойчивости. Ген β -лактамазы обнаружен у 3,9 % штаммов (18 из 464) со следующей географической принадлежностью: Санкт-Петербург (5), Самара (5), Москва (4), Чебоксары (1), Мурманск (1), Нижний Новгород (1), Екатеринбург (1). Все штаммы с наличием *tetM*-детерминанты (0,9 %) относились к Московскому региону. Приведенные данные свидетельствуют о большей распространенности плазмидных маркеров резистентности в субпопуляциях крупных промышленных и торговых центров с числом жителей, превышающим 1 миллион, при этом уровень распространенности плазмидных факторов резистентности в целом достаточно низкий. Последний факт на фоне общего высокого процента резистентных к пенициллину и тетрациклину штаммов указывает на то, что формирование регистрируемой резистентности, главным образом, обуславливается другими механизмами, что подтверждено высоким процентом встречаемости генетических детерминант резистентности, локализованных на хромосоме.

Для установления ассоциации генотипа (совокупности определяемых генетических признаков) и фенотипа (категорий антибиотикочувствительности) проведена статистическая оценка полученных данных с помощью построения соответствующих таблиц сопряженности. Показана статистически значимая

связь анализируемых признаков по критерию χ^2 Пирсона, $p < 0,001$ и коэффициенту сопряженности Крамера, который составил 0.64 / 0.53 / 0.89 при анализе данных по устойчивости к пенициллину, тетрациклину и ципрофлоксацину соответственно. Анализ распределения отдельных маркеров и их сочетаний в группах чувствительных и резистентных штаммов позволил оценить информативность анализируемых генетических признаков для прогнозирования лекарственной устойчивости. Учитывались уровень значимости выявленных отличий в группах чувствительных и резистентных, а также абсолютная частота встречаемости маркера. Так, для каждого из трёх препаратов можно выделить генетические маркеры (и их сочетания), обнаружение которых позволяет отнести тестируемый штамм к резистентной категории с вероятностью более 81 % (табл. 5).

Таблица 5. Маркеры и их сочетания, для которых показана прогностическая ценность при оценке антибиотикорезистентности *N. gonorrhoeae* к пенициллину, тетрациклину и ципрофлоксацину.

Антибиотик	Генетический маркер	Р
Пенициллин	<i>bla_{pres}</i>	94 %
	<i>ponA_{mut}</i>	81 %
Тетрациклин	<i>tetM_{pres}</i>	100 %
	<i>rspJ_{mut}, penB_{mut}</i>	81 %
Ципрофлоксацин	<i>gyrA_{mut}</i>	83 %
	<i>parC_{mut}</i>	83 %
	<i>gyrA_{mut}, parC_{mut}</i>	93 %

Р - Вероятность отнесения штамма к резистентной категории.

Такой выбор маркеров согласуется с современными (на момент оформления работы) теоретическими представлениями о соответствующих механизмах резистентности и является ожидаемым. В частности, исключение *penA_{mut}* из числа отобранных маркеров согласуется с данными о доминирующей роли мозаичности структуры гена *penA* в механизме устойчивости не только к пенициллинам, но и цефалоспорином [Ameuama et al., 2002]. При этом описанная ранее и включенная в список анализируемых нами маркеров мутация в гене *penA* (Asp-345a) обеспечивает низкий уровень устойчивости (0.125 мкг/мл) и, вероятно, является лишь первым этапом в серии изменений структуры гена *penA*

и соответствующего ПСБ2, обуславливающих резистентность к бета-лактамам антибиотикам.

Стоит отметить, что большинство выделенных маркеров соответствуют достаточно полно изученным механизмам, определяющим высокий, клинически значимый уровень резистентности. В то же время другие рассмотренные нами маркеры ассоциированы с ещё плохо исследованными механизмами резистентности, каждый из которых в отдельности даёт незначительный вклад в общий уровень устойчивости, и, лишь действуя синергично в различных комбинациях, они способны формировать клинически значимый уровень резистентности. Например, роль маркеров *penB_{mut}* и *mtrR_{mut}* в формировании клинически значимого уровня резистентности к пенициллину остается неясной. Последние публикации на эту тему подтверждают сложность механизмов хромосомно-детерминированной устойчивости гонококка к пенициллину, в частности, указывают на существование взаимосвязи между этими двумя механизмами, которая необходима для реализации значимого уровня устойчивости [Olesky et al., 2006; Shafer et al., 2006], кроме того, описан на молекулярном уровне механизм действия обнаруженной ранее детерминанты *penC* [Ropp et al., 2002; Zhao et al., 2005].

Не показано значимого вклада двух эффлюксных механизмов, соответствующих маркерам *mtr_{mut}* и *norM_{mut}*. Примечательно, что все штаммы исследованной группы по значениям МПК ципрофлоксацина отнесены либо к чувствительным, либо к резистентным, тогда как умереннорезистентные не обнаружены. При этом сами по себе обе указанные мутации лишь незначительно повышают значения МПК фторхинолонов, не обеспечивая даже уровня порогового значения (0.06 мкг/мл), однако, действуя одновременно с модификациями мишеней действия (гиразы, топоизомеразы IV), умножают эффект последних. Таким образом, полученные результаты дают дополнительные подтверждения относительности вклада эффлюксных систем NorM и MtrRCDE в формирование устойчивости к фторхинолонам. Однако в ближайшей перспективе значимость эффлюксных механизмов может быть пересмотрена в связи с недавним описа-

нием у ряда грамположительных и грамотрицательных видов бактерий мобильных детерминант фторхинолоновой устойчивости (плазмидные гены *qnr*), обеспечивающих низкий уровень устойчивости [Jacoby et al., 2006].

Типирование штаммов *N. gonorrhoeae* и оценка гетерогенности популяции.

por-типирование. Определены нуклеотидные последовательности *por*-генов 464 клинических штаммов, по результатам сравнения с ранее описанными аллельными вариантами установлены соответствующие серотипы. Проведен анализ распространенности сероваров PIA/PIB и отдельных серотипов в группе исследованных штаммов (табл. 6, рис.3).

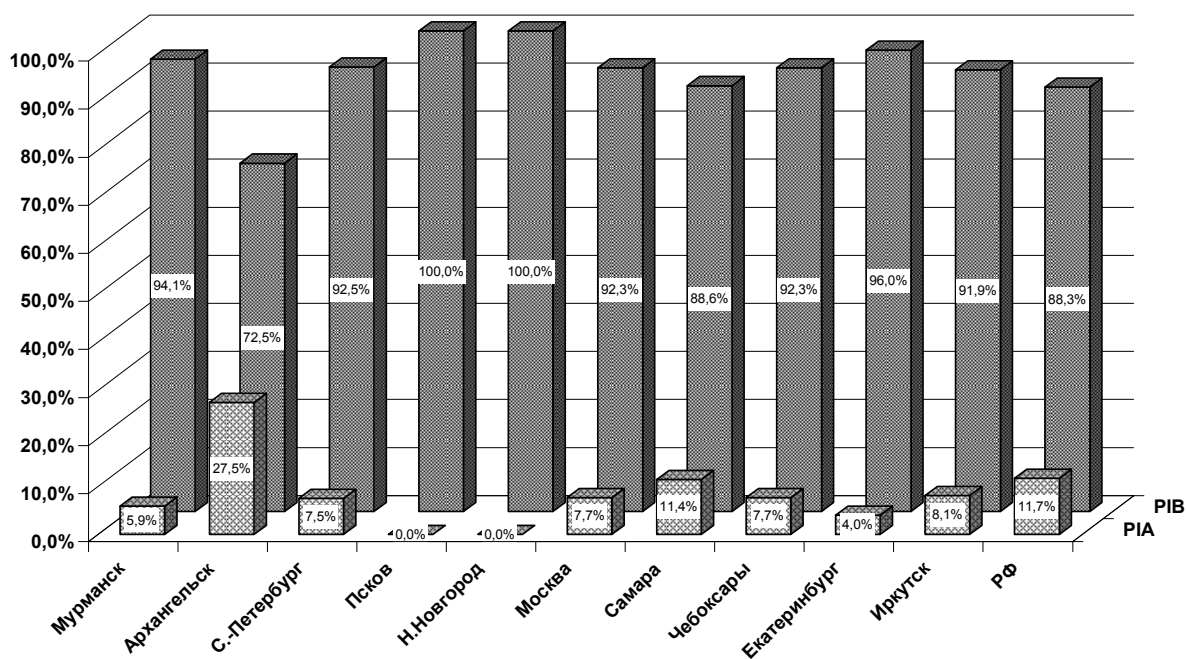


Рисунок 3. Распространенность серотипов PIA и PIB в отдельных регионах РФ в сравнении с суммарной распространенностью по всем анализируемым регионам ($p < 0,001$).

Впервые получены значимые данные, подтверждающие гетерогенность популяции гонококка, распространенной на территории РФ. Данные, представленные в рамках системы серотипирования, могут быть сопоставлены с уже накопленной в разных странах мира информацией о распространенности и многообразии циркулирующих в популяции гонококка сероваров и серотипов и, следовательно, аллельных вариантов *por* гена.

Таблица 6. Рог-типирование клинических штаммов *N. gonorrhoeae*, выделенных в регионах РФ

Региональный центр	Количество штаммов	PIA серотипы					PIB серотипы											
		IA2	IA3	IA6	IA8	IA10	IA18	IB1	IB2	IB3	IB4	IB5	IB3/6	IB8	IB9	IB22	IB26	IB29
Архангельск	109	0	0	25	3	2	0	0	29	30	0	5	0	1	4	2	8	0
Екатеринбург	25	1	0	0	0	0	0	0	18	2	0	1	0	0	1	1	1	0
Иркутск	74	0	0	3	1	1	1	2	12	24	0	6	1	0	2	20	1	0
Калуга	5	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Киров	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Москва	26	0	0	1	1	0	0	0	13	7	0	1	1	0	0	1	1	0
Мурманск	85	0	0	5	0	0	0	0	52	17	0	1	2	0	0	4	4	0
Н. Новгород	26	0	0	0	0	0	0	0	10	9	0	2	0	0	0	4	0	0
Псков	11	0	0	0	0	0	0	0	2	5	1	0	2	1	0	0	0	1
Рязань	6	0	0	0	0	0	0	0	4	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Санкт-Петербург	40	0	0	2	0	1	0	0	8	14	1	3	4	2	2	3	0	1
Самара	35	0	2	1	0	1	0	3	9	5	8	0	1	0	0	3	2	8
Ставрополь	8	0	0	0	0	0	0	0	5	1	0	1	0	0	0	1	0	0
Чебоксары	13	0	0	0	0	1	0	1	3	6	0	0	0	0	0	1	1	0
ВСЕ РЕГИОНЫ	464	1	2	37	5	6	1	6	170	122	10	20	11	4	9	41	18	1
	%	0,22	0,43	7,97	1,08	1,29	0,22	1,29	36,64	26,29	2,16	4,31	2,37	0,86	1,94	8,84	3,88	0,22
		52 (11,2%)					412 (88,6%)											
ОТДЕЛЬНЫЕ РЕГИОНЫ ¹	444	1	2	37	5	6	1	6	156	119	10	19	11	4	9	39	18	1
	%	0,23	0,45	8,33	1,13	1,35	0,23	1,35	35,14	26,80	2,25	4,28	2,48	0,9	2,03	8,78	4,05	0,23
		52 (11,7%)					392 (88,3%)											

Примечания: ¹ - включены регионы, для которых исследовано более 10 штаммов, жирным шрифтом отмечены частоты встречаемости доминирующих серотипов.

Всего в исследованной группе штаммов выявлено 11 РІВ и 6 РІА сероваров, отмечено преобладание в выборке РІВ серовара (88,6%) с высоким процентом встречаемости серотипов ІВ2 (41,3%), ІВ3 (29,6%) и ІВ22 (9,9%). В группе штаммов, относящихся к РІА серовару (11,2%), доминирует серотип ІА6 (71,2%). Результаты согласуются с данными, полученными нами ранее для небольшой группы клинических изолятов, выделенных в Москве, Московской области и Смоленске [Ильина и соавт., 2003]. Следует отметить, что убедительные данные о низкой встречаемости РІА серовара и представленности основных серотипов также получены для российской популяции впервые.

Для проверки гипотезы о связи РІВ серовара с феноменом мультирезистентности гонококка [Bygdem et al., 1984, Backman et al., 1985], определенной как устойчивость к двум классам АМП и более, проведен соответствующий статистический анализ. Построены таблицы сопряженности, вычислены критерий χ^2 Пирсона и коэффициент сопряженности Крамера: 1) для оценки наличия ассоциации между сероваром и признаком мультирезистентности (табл. 7), 2) а также для проверки гипотезы о роли в этой ассоциации мутаций *penB* локуса (табл. 8).

Таблица 7. Наличие ассоциации между сероваром и фенотипом резистентности.

Серовар	Фенотип			
	S	R	Multi-R	Всего
РІА	7	19	26	52
	50 %		50 %	
РІВ	78	63	271	412
	34 %		66 %	
Критерий χ^2 Пирсона, $p < 0,001$; Коэффициент сопряженности Крамера - 0,17				

Таблица 8. Вклад мутаций *penB* локуса в ассоциацию между РІВ сероваром и мультирезистентностью.

Серовар / генотип	Фенотип			
	S	R	Multi-R	Всего
РІА	7	19	26	52
	50 %		50 %	
РІВ	68	28	63	159
	60 %		40 %	
РІВ / <i>penB_{mut}</i>	10	35	208	253
	18 %		82 %	
Критерий χ^2 Пирсона, $p < 0,001$; Коэффициент сопряженности Крамера - 0,36				

Статистический анализ полученных данных показал достоверно слабую ассоциацию между ними (коэффициент сопряженности Крамера составил 0,17). Отчасти это может быть объяснено резким количественным отличием сравниваемых групп – относящихся к PIA серовару (52 штамма) и относящихся к PIV серовару (412 штамма), что снижает точность статистической оценки. Возможно, в будущих работах при значительном увеличении выборки штаммов и, как следствие, увеличения абсолютного числа штаммов PIA серовара можно будет выявить более выраженную ассоциацию или опровергнуть наблюдаемый феномен. С другой стороны, полученные результаты показывают, что частота встречаемости мультирезистентных штаммов в группе серовара PIV достоверно выше частоты «немультрезистентных» (чувствительные + резистентные к одному препарату) штаммов: 66 % и 34 % соответственно ($p < 0,001$). Высказано предположение, что наблюдаемая нами слабая ассоциация обусловлена известными изменениями *penB* локуса, которые, как было показано [Gill et al., 1998; Olesky et al., 2002, Olesky et al., 2006], вносят определенный вклад в формирование неспецифической резистентности гонококка путём снижения проницаемости поринового канала для ксенобиотиков. Проведенный статистический анализ распределения относительных частот указывает на справедливость высказанного предположения.

Для ограниченной группы, включающей 87 штаммов, проведен детальный сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей *por* генов с оценкой их гетерогенности. При сравнении двух основных вариантов *por* гена для аллели *porB* показана сравнительно большая гетерогенность, выражающаяся в большем числе аллельных вариантов, полиморфных сайтов, наличии 3-, 6-, 12-нуклеотидных инсерций и 6-нуклеотидных делеций. Вычисление нуклеотидного разнообразия (π) подтвердило эту предварительную оценку: величина π составила 0,004 и 0,03 для аллельных вариантов *porA* и *porB*, соответственно. Тест на селекцию также выявил отличия в эволюции этих аллельных вариантов: *porB* аллель достоверно вероятнее подвержена положительной селекции; в случае *porA* варианта получены противоположные результаты, свидетельствующие

о действии стабилизирующего отбора в эволюции этого локуса. Полученные данные согласуются с имеющимися в литературе указаниями на отличия в особенностях изменчивости и эволюции этих вариантов гена [Posada et al., 2000].

В ходе исследования описаны 55 нуклеотидных вариантов *por* гена. Для *por*-типирования индекс разнообразия Симпсона составил 0.97, что говорит о высокой дискриминирующей способности. Дендрограмма, построенная с использованием матрицы попарных нуклеотидных отличий между анализируемыми *por*-последовательностями, позволила разделить исследованную выборку на две крупные группы, соответствующие аллелям *porA* и *porB*, а также несколько групп внутри *porB* аллели, однако это разделение не выявило какой-либо ассоциации с географией выделения этих штаммов. В целом, полученные данные свидетельствуют о достаточно высоком уровне гетерогенности исследованной выборки.

Типирование мультилокусным секвенированием. Определены нуклеотидные последовательности фрагментов 13 генов «домашнего хозяйства» для 84 штаммов *N. gonorrhoeae*. Для каждого из 13 локусов проведено сравнение полученных последовательностей между собой, а также с последовательностями, представленными в базе данных GenBank. В соответствии с ранее принятой практикой каждый уникальный вариант последовательности (отличающийся от другого как минимум на один нуклеотид) рассматривался как отдельный аллельный вариант, которому присваивался соответствующий номер (согласно данным, полученным Vischidi с соавт. и представленным в базе данных GenBank) или новый номер для аллелей, обнаруженных впервые. Таким образом, для каждого штамма получен аллельный профиль, представленный набором аллельных вариантов по всем 13 локусам.

Анализ гетерогенности фрагментов 13 генов «домашнего хозяйства» выявил значительные отличия в уровне их изменчивости. При выборе генетических локусов, которые могут быть в дальнейшем использованы для схемы мультилокусного типирования гонококка, ориентировались на максимально

выявленное количество аллельных вариантов. Полученные характеристики генов были сравнимы с результатами, полученными ранее Viscidi et al. на группе из 25 штаммов [Viscidi et al., 2003]. В 2005 году этой же группой авторов (параллельно с ходом нашей работой) были опубликованы результаты аналогичного исследования, проведенного уже на группе около 200 штаммов, но представляющих территориально ограниченную популяцию гонококка (штаммы выделены в двух клиниках Балтимора).

Сравнение результатов нескольких исследований, проведенных с использованием качественно разных выборок клинических штаммов, позволяет с ещё большей уверенностью считать обоснованным выбор 7 локусов (*fumC*, *gdh*, *glnA*, *gnd*, *pilA*, *pyrD*, *serC*) для использования в схеме мультилокусного типирования гонококка.

Выбранные локусы были использованы для оценки дискриминирующей способности метода, анализа гетерогенности и структуры исследованной выборки. В сравнении с другими рассмотренными методами типирования показана максимальная дискриминирующая способность этого подхода: индекс разнообразия Симпсона составил 0.98. Дендрограмма, построенная с использованием матрицы попарных отличий между аллельными профилями штаммов, подтвердила высокий уровень гетерогенности, разделила исследованную выборку на несколько групп, отличных от групп, полученных по результатам сравнительного анализа аллелей *por* гена.

Полученные данные вносят вклад в создание наиболее информативной, стандартизированной системы мультилокусного типирования *N. gonorrhoeae*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Высокий уровень изменчивости *N. gonorrhoeae* обуславливает продолжающийся рост лекарственной устойчивости возбудителя и увеличение числа бессимптомных, хронических и диссеминированных форм инфекции. В РФ отсутствует какая-либо система эпидемиологического мониторинга популяции *N. gonorrhoeae*. Разработка методов молекулярного типирования штаммов *N. go-*

norrhoeae для российской популяции возбудителя актуальна и имеет важное практическое и эпидемиологическое значение.

В настоящей работе предложен комплексный подход оценки клинически и эпидемиологически значимых свойств возбудителя, апробированный на географически неоднородной группе российских штаммов *N. gonorrhoeae*. Для всех исследованных регионов подтверждена высокая распространенность резистентных и мультирезистентных штаммов, охарактеризованных с позиций известных генетических механизмов формирования лекарственной устойчивости. Впервые исследованы возможности прямого белкового профилирования для характеристики штаммов гонококка. Полученные результаты указывают на возможность использования этого подхода для видовой идентификации возбудителя. Данные о гетерогенности исследованной выборки штаммов получены с использованием двух подходов (*por*-типирование, мультилокусное секвенирование), основанных на прямом анализе нуклеотидных последовательностей фрагментов генома, отличающихся по уровню изменчивости и подверженности селекции в эволюционном процессе. Описана дискриминирующая способность и специфика молекулярно-эпидемиологической информации, получаемой каждым из методов.

Результаты представленной работы способствуют осуществлению на территории РФ мониторинга гонококковой инфекции на современном методологическом и технологическом уровне.

ВЫВОДЫ

1. Сформирована коллекция из 464 образцов ДНК клинических штаммов *N. gonorrhoeae*, выделенных от пациентов из 14 региональных центров РФ.
2. Разработан и реализован подход к оценке антибиотикорезистентности *N. gonorrhoeae*, основанный на одновременном анализе 15 генетических локусов, позволивший выделить маркеры (и их сочетания), обнаружение которых с точностью более 81 % прогнозирует фенотипическую устойчивость гонококка к пенициллинам, тетрациклину, фторхинолонам.

3. Предложена методика прямого белкового профилирования с использованием MALDI-TOF масс-спектрометрии. Показана низкая дискриминирующая способность этого подхода ($D = 0.27$), что не позволяет использовать его для типирования *N. gonorrhoeae*, но указывает на возможность видовой идентификации.
4. Показана высокая дискриминирующая способность *por*-типирования ($D = 0.97$) и возможность анализа получаемых данных в рамках системы серотипирования ($D = 0.78$). Установлен вклад мутаций *penB* локуса *por* гена в формирование мультирезистентности.
5. Анализ нуклеотидных вариаций 13 генов «домашнего хозяйства» *N. gonorrhoeae* позволил установить 7 наиболее информативных локусов: *fumC*, *gdh*, *glnA*, *gnd*, *pilA*, *pyrD*, *serC*, позволяющих осуществлять молекулярного типирования с высокой степенью дискриминации ($D = 0.98$).
6. Впервые на основании молекулярно-эпидемиологической характеристики географически неоднородной группы штаммов *N. gonorrhoeae*, выделенных на территории РФ, а) показан преимущественно хромосомный механизм формирования лекарственной устойчивости к пенициллину и тетрациклину; б) определены частоты встречаемости различных серотипов с преобладание Р1В серовара (88.6 %); в) выявлено значительное генетическое разнообразие циркулирующих в популяции штаммов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Малахова М.В., Верещагин В.А., Ильина Е.Н., Говорун В.М., Зубков М.М., Припутневич Т.В., Кисина В.И., Кубанова А.А. Анализ генетических маркеров резистентности *N. gonorrhoeae* к *b*-лактамным антибиотикам // Бюлл. экспер. биол. мед. – 2006. – Т. 141, № 5. – С. 549-554.
2. Верещагин В. А., Ильина Е. Н., Зубков М. М., Припутневич Т.В., Кубанова А. А., Говорун В. М. Использование MALDI-TOF масс-спектрометрии для выявления в генах *gyrA* и *parC* *Neisseria gonorrhoeae* однонуклеотидных замен, определяющих формирование устойчивости к фторхинолонам // Мол. биол. – 2005. – Т. 39, № 6. – С. 923-932.

3. Верещагин В.А., Ильина Е.Н., Малахова М.В., Зубков М.М., Сидоренко С.В., Кубанова А.А., Говорун В.М. Устойчивость к фторхинолонам среди Российских изолятов *Neisseria gonorrhoeae* // Мол. ген. микробиол. вир. – 2005 – № 1. – С. 23-27.

4. Vereshchagin V.A., Ilina E.N., Malakhova M.V., Zubkov M.M., Sidorenko S.V., Kubanova A.A., Govorun V.M. Fluoroquinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Russia: molecular mechanisms implicated // J. Antimicrob. Chem. – 2004. – Vol. 53. – P. 653–656.

5. Ильина Е.Н., Малахова М.В., Верещагин В.А., Говорун В.М., Сергиенко В.И., Зубков М.М., Васильев М.М., Кубанова А.А. Молекулярное типирование штаммов *N. gonorrhoeae*, распространенных на территории РФ // Бюлл. экспер. биол. мед. – 2003. – Т.136, № 8. – С. 205-208.

6. Vereshchagin V., Ilina E., Al-khafaji N., Pripitnevich T., Kubanova A., Sidorenko S. and Govorun V. Intact-cell MALDI-TOF Mass-spectrometry for Identification and Subtyping of Pathogenic *Neisseria*. // In 15th International Pathogenic *Neisseria* Conference (IPNC 2006 Australia). Program and Abstract Book. – 2006. – P. 77.

7. Ilina E. N., Vereshchagin V. A., Malakhova M. V., Pripitnevich T. V., Al-khafaji N. C., Kubanova A. A., Govorun V. M. Molecular Characterization of Clinical *Neisseria Gonorrhoeae* (NG) Strains in Russia. Poster # ICAAC06-A-2308-ASM in “46th ICAAC (USA, San Francisco) Abstracts book”. – 2006.

8. Верещагин В.А., Ильина Е.Н., Припутневич Т.В., Кострюкова Е.С. Челышева В.В., Момыналиев К.Т., Говорун В.М. Прямое белковое профилирование для идентификации и типирования бактерий // В Тезисах научных работ IX всероссийского съезда дерматовенерологов. – 2005, Москва. – Т. 2. - С. 40.

9. Ильина Е.Н., Малахова М.В., Верещагин В.А., Припутневич Т.В., Говорун В.М. Масс-эрей как инструмент анализа резистентности бактериальной флоры // В Тезисах научных работ IX всероссийского съезда дерматовенерологов. – 2005, Москва. - Т.2 - С.41.

10. Ilina E.N., Malakhova M.V., Vereschagin V.A., Kubanova A.A., Zubcov M.M. and V.M. Govorun. Typing *N. gonorrhoeae* Strains In Russia // GENOMES 2004: International Conference on the Analysis of Microbial and Other Genomes, Abstract Book. – 2004. - P. 50.

11. Sidorenko S.V., Vereschagin V.A., Malakhova M.V., Ilina E.N., Govorun V.M., Zubkov M.M., Kubanova A.A. Emergence of Fluoroquinolone Resistance among *Neisseria gonorrhoeae* in Russia // 42th ICAAC Abstracts book. – 2003, Chicago, Illinois.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АМП – антимикробные препараты

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

МПК – минимальная подавляющая концентрация

п.н. – пар нуклеотидов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РФ – Российская Федерация

ФГУ ЦНИКВИ – Федеральное государственное учреждение Центральный научно-исследовательский кожно-венерологический институт

MALDI-TOF масс-спектрометрия - времяпролётная масс-спектрометрия с матричной лазерной десорбционной ионизацией (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass-Spectrometry)