

Генетическая характеристика московских штаммов *Neisseria meningitidis*

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

Центральный НИИ эпидемиологии, Москва, Россия

В работе представлена генетическая характеристика бактерий вида *Neisseria meningitidis*, циркулировавших на территории Москвы в 2001–2010 гг. Использован метод мультилокусного секвенирования-типирования в соответствии с международными требованиями. Проведен ретроспективный анализ генетических особенностей эпидемических штаммов менингококков серогруппы А, выделяемых в разные годы; с помощью базы данных <http://pubmlst.org/neisseria/> результаты сопоставлены с данными о штаммах, циркулирующих за рубежом.

Выявлены генетические особенности штаммов, циркулирующих на территории Москвы, и проведен комплексный анализ генетического и антигенного разнообразия штаммов эпидемически значимых серогрупп. Продемонстрирована роль молекулярно-биологических методов типирования в комплексном микробиологическом мониторинге штаммов *N. meningitidis*.

Ключевые слова: *Neisseria meningitidis*, московские штаммы, генетическая характеристика.

Genetic Characteristics of *Neisseria meningitidis* Strains in Moscow

K.O. Mironov, A.E. Platonov, I.S. Korolyova, T.A. Tagatchenkova, S.I. Braslavskaya, G.A. Shipulin

Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

This paper provides data on genetic characteristics of circulating *Neisseria meningitidis* strains in Moscow over the period of 2001–2010. Multilocus sequence typing (MLST) method was used according to international standards. Retrospective analysis of genetic characteristics of epidemic serogroup A meningococcal strains isolated during this period was performed. Using the database <http://pubmlst.org/neisseria/>, our study results were compared to data on circulating strains from other countries.

Specific genetic characteristics were identified for circulating Moscow strains. An integrated analysis of genetic and antigenic diversity of epidemic serogroups was also performed. Molecular typing methods were demonstrated to play an important role in microbiologic surveillance for circulating *N. meningitidis* strains.

Key words: *N. meningitidis*, serogroup, molecular typing, sequence type (ST), clonal complex.

Контактный адрес:
Константин Олегович Миронов
Эл. почта: k_mironov@mail.ru

Введение

Наиболее частыми возбудителями *гнойного бактериального менингита* (ГБМ) являются бактерии вида *Neisseria meningitidis*. Вызываемая ими менингококковая инфекция является антропонозом, резервуар инфекции – больной человек или носитель, для *менингококковой инфекции* (МИ) характерен аспирационный механизм передачи возбудителя. Основная форма инфекционного процесса, вызываемого *N. meningitidis* – бессимптомное носительство [1–3]. Развитие *генерализованных форм менингококковой инфекции* (ГФМИ) – менингита и/или менингококцемии – может быть связано как с индивидуальной восприимчивостью организма, так и с генетическими или антигенными особенностями циркулирующих штаммов. На сегодняшний день разработаны серологические и молекулярно-биологические методики, позволяющие описывать генетическую и антигенную гетерогенность популяции менингококков; получены данные о неодинаковом вкладе отдельных штаммов в эпидемический процесс [3–5].

Показатели заболеваемости МИ могут существенно различаться в разные годы. В России и большинстве индустриально развитых стран годовой показатель заболеваемости ГФМИ составляет от 1 до 3 случаев на 100 000 населения. Многолетние наблюдения за МИ свидетельствуют о наличии циклических изменений заболеваемости: выделяют периоды эпидемического неблагополучия и межэпидемические периоды (периоды спорадической заболеваемости) [3]. Состояние эпидемического неблагополучия может быть связано с выделением на наблюдаемой территории штаммов с повышенными вирулентными свойствами (гипервирулентных штаммов) [4–6]. Изучение особенностей и закономерностей распространения гипервирулентных штаммов позволяет, в ряде случаев, контролировать эпидемический процесс и планировать иммунопрофилактические мероприятия. Наблюдение за эпидемическим процессом МИ в XX веке позволило выявить некоторые закономерности на основании серогрупповой классификации *N.meningitidis*: подъемы заболеваемости часто сопровождаются увеличением выделения штаммов, принадлежащих к серогруппе А, значительно реже – штаммов серогруппы С. При этом количество штаммов серогруппы В существенно не изменяется. Микробиологический мониторинг штаммов *N. meningitidis* на территории Москвы во второй половине XX века также демонстрирует связь эпидемического подъема заболеваемости с долей выделяемых штаммов серогруппы А [3–6].

Внедрение в эпидемиологическую практику молекулярно-биологических методов типирования позволило внутри серогрупп *N. meningitidis* выделить группы штаммов (клональные комплексы) с повышенными вирулентными свойствами, ответственные за большую часть заболеваний ГФМИ [4, 5, 7].

В настоящее время наиболее распространенным методом, применяемым для генетической характеристики *N. meningitidis* с целью выявления гипервирулентных клональных комплексов и мониторинга эволюционных процессов в популяции возбудителя, является *мультилокусное секвенирование-типирование* (МЛСТ) [7], основанное на секвенировании фрагментов консервативных «house-keeping» генов, отвечающих, как правило, за метаболизм бактерий и не кодирующих факторы вирулентности или патогенности. Эти гены подвержены случайному мутагенезу, изменения в них постепенно накапливаются и являются маркерами генетического расстояния. МЛСТ дополняется антигенной характеристикой менингококков, основанной на классификации поверхностных переменных фрагментов белков наружной мембраны, что в ряде случаев дает возможность увеличить дискриминирующую способность исследования и дополнить данные о рекомбинационных процессах и генетических взаимоотношениях между штаммами, входящими в клональные комплексы [5, 8–11]. Сведения об антигенных свойствах *N. meningitidis* необходимы также для разработки перспективных иммунопрофилактических препаратов [1, 10–13]. Современные методики типирования, основанные на секвенировании, объединены в схемы и алгоритмы типирования [7, 14–16], лишены сложностей, связанных с межлабораторной воспроизводимостью результатов, позволяют проводить автоматическую обработку данных и объединять результаты типирования с помощью общедоступных Интернет-ресурсов [17–19].

Современная номенклатура обозначения штаммов *N. meningitidis* объединяет результаты МЛСТ и типирования антигенов и представляет собой запись характеристик штамма в следующей последовательности: серогруппа, субтип, аллель фрагмента «VR» белка FetA, сиквенс-тип, клональный комплекс [15]. Например, запись «A: P1.20.9: F3-1: ST-7 (cc5)» означает, что данный штамм принадлежит серогруппе А, имеет субтип «20.9», вариант «3-1» переменного фрагмента «VR» белка FetA и сиквенс-тип ST-7, входящий в клональный комплекс «ST-5 complex/subgroup III». Информация об антигенных свойствах штамма содержится в первой части записи (серогруппа, субтип и аллель фрагмента «VR» белка FetA), а генетической характеристи-

кой штамма является результат МЛСТ – определенный сиквенс-тип и клональный комплекс, в который входит исследованный штамм [15, 20].

Первые результаты разработки и апробации метода МЛСТ были опубликованы в 1998 г. [7]. Результаты, полученные с помощью метода МЛСТ, позволили дополнить и детализировать представления о клональной структуре *N. meningitidis*, сформулированные ранее на основании данных типирования другими методами [7, 21, 22]. В отечественной литературе первой публикацией по МЛСТ является работа А.Е. Платонова и соавт. [23]; первые практические результаты применения метода МЛСТ в эпидемиологическом анализе опубликованы в 2003 г. [24]. Алгоритм выбора нуклеотидных последовательностей для МЛСТ и предъявляемые к ним требования подробно описаны в соответствующих работах [7, 23]. Окончательная схема МЛСТ *N. meningitidis* была опубликована в работе Е.С. Holmes и соавт. [25]. Для МЛСТ необходимо провести секвенирование фрагментов 7 генов; разработчиками метода показано, что данное количество обеспечивает необходимую дискриминирующую способность для идентификации клональных комплексов в популяции *N. meningitidis* [25, 26].

Проведение МЛСТ осуществляется следующим образом. После определения нуклеотидной последовательности проводится обозначение аллелей; аллели обозначаются цифрами, каждая уникальная последовательность фрагмента гена имеет свой номер. Набор аллелей исследуемых локусов образует аллельный профиль (последовательность из цифр, соответствующих аллелям), который определяет сиквенс-тип штамма (штаммы с одинаковым аллельным профилем относятся к одному сиквенс-типу). Дальнейший анализ заключается в определении генетического расстояния и характеристике взаимоотношений между штаммами с помощью специализированного компьютерного обеспечения [7, 20, 22, 23, 27].

Результаты МЛСТ *N. meningitidis* объединяются в общедоступную базу данных <http://pubmlst.org/neisseria/>. Помимо результатов МЛСТ в базу данных могут быть включены характеристики антигенных свойств штамма, эпидемиологические данные (время, место и источник выделения штамма), результаты типирования альтернативными методами и некоторая другая дополнительная информация [15, 17]. На основании результата МЛСТ штаммы объединяются в клональные комплексы. Вместе с данными о происхождении штамма информация о клональной структуре *N. meningitidis* представляет исключительный эпидемиологический интерес, так как создает возможность для наблюдения за появле-

нием, циркуляцией и эволюцией гипервирулентных штаммов. Запрос в базу данных позволяет эпидемиологу классифицировать обнаруженный сиквенс-тип как известный или новый и, если возможно, отнести его к тому или иному клональному комплексу, т. е. получить эпидемиологическую характеристику исследованного штамма [17, 20, 23].

Цель данной публикации – анализ генетических взаимоотношений в московской популяции менингококков различных серогрупп, выполненный на основании микробиологического мониторинга с применением метода МЛСТ в течение 2001–2010 гг.

Материал и методы исследования

Выделение штаммов проводилось из клинического материала, полученного от больных ГФМИ (ликвор или кровь), поступивших в ИКБ № 1 или ИКБ №2 города Москва, часть штаммов изолировали от здоровых носителей, обследованных в очагах менингококковой инфекции [28, 29].

Для выделения штаммов из СМЖ высев клинического материала проводился на шоколадный агар с добавлением смеси ростовых факторов PolyViteX (BioMerieux, Франция). При выделении штаммов от носителей использовался протокол исследования, опубликованный в [29]. Инкубация посевов длилась в течение 24 часов при 37 °С в обогащенной 5% CO₂ атмосфере, окончательное заключение по росту культуры давалось через 48 часов. Подробное описание использованных микробиологических методик изложено в методических рекомендациях [30].

Микробиологическая идентификация штаммов проводилась согласно [30], а также с использованием тест-систем «API NH» (BioMerieux, Франция); при определении серогрупповой принадлежности штаммов использовался диагностический набор «Slidex meningite-Kit 5» (BioMerieux, Франция) и специфические для серогрупп менингококков сыворотки «Менгрувид» (Санкт-Петербургский НИИ вакцин и сывороток, Россия).

Выделение бактериальной ДНК проводилось из бактериальных смывов с чашек Петри или разведенной лиофилизированной культуры бактерий в стерильном физиологическом растворе. Смыв, содержащий культуру бактерий в концентрации 10⁹–10¹⁰ клеток/мл, разводился до концентрации 10⁷–10⁶ клеток/мл в ТЕ-буфере (Трис-НСI – 10 мМ, рН: 8,0; ЭДТА – 1 мМ). При постановке ПЦР использовалось 10 мкл разведенной бактериальной культуры. Для части штаммов пробоподготовка была проведена по протоколу, описанному в [31].

Все штаммы были дополнительно исследованы методом ПЦР с помощью наборов реа-

гентов «АмплиСенс *Neisseria* spp., *Haemophilus* spp., *Streptococcus* spp. – EPh» или «АмплиСенс *N. meningitidis*/*H. influenzae*/*S. pneumoniae* – FL», а также тест-системы для определения серогрупп «АмплиСенс *Neisseria meningitidis* А, В, С – EPh» производства Центрального НИИ эпидемиологии (Москва). Преимущества и особенности применения использованных ПЦР-методик для идентификации возбудителей ГБМ описаны в [32, 33].

ПЦР специфических фрагментов бактериальной ДНК, используемых для проведения МЛСТ, проводилась в соответствии с международными требованиями, предъявляемыми к типированию *N. meningitidis* [5, 14, 19] с использованием методики, опубликованной в [31]. Секвенирование проводилось с использованием наборов реагентов и оборудования фирмы Applied Biosystems (США). При исследовании негруппируемых штаммов были дополнительно использованы методики, рекомендованные авторами схемы МЛСТ *N. meningitidis* и опубликованные на сайте <http://pubmlst.org/neisseria/> [28]. Для большинства штаммов было проведено генетическое субтипирование и охарактеризован фрагмент VR белка FetA [11, 16, 28, 34, 35].

Результаты секвенирования обрабатывались с помощью программы START [27] и специализированных программных средств для обработки результатов типирования (см. <http://pubmlst.org/software/>). При анализе результатов была использована информация о штаммах *N. meningitidis*, представленная в базе данных <http://pubmlst.org/neisseria/>, которая на конец марта 2011 г. содержала информацию о более чем 18 000 штаммов бактерий рода *Neisseria*, из них 235 штаммов *N. meningitidis* были выделены на территории России. Штаммы, находящиеся в базе данных, сгруппированы в клональные комплексы на основании кластеризации методом BURST [36], для бактерий вида *N. meningitidis* было обозначено 38 клональных комплексов. При анализе распределения штаммов серогруппы А по клональным комплексам также учитывалась классификация, предложенная M. Achtman и соавт. [6, 37].

Результаты исследования

В течение 2001–2010 гг. проведено исследование 178 штаммов *N. meningitidis*, принадлежавших к следующим серогруппам: 118 штаммов – к серогруппе А, 22 – к серогруппе В, 20 – к серогруппе С, 2 – к серогруппе W-135, 16 штаммов были негруппируемыми. Штаммы были выделены на территории Москвы в 1997–2009 гг. Подробная информация об исследованных штаммах, за исключением одного негруппируемого штамма, внесена в базу данных

<http://pubmlst.org/neisseria/>. Результаты генотипирования московских штаммов *N. meningitidis* представлены в табл. 1.

У штаммов серогруппы А найдено 11 сиквенс-типов. Наиболее часто выделялись штаммы с сиквенс-типами ST-3349 (52 или 44%), ST-75 (36 или 30,5%) и ST-2 (15 или 12,7%); остальные сиквенс-типы встречались реже: ST-7 и ST-68 – у трех штаммов (2,5%), ST-73, ST-3336 и ST-5803 – у двух штаммов (1,7%), ST-3337, ST-3338 и ST-7221 выявлены однократно (0,85%). Все сиквенс-типы, за исключением ST-2 и ST-7, были обнаружены только у штаммов *N. meningitidis* серогруппы А, циркулирующих в России. ST-2 был обнаружен ранее у трех штаммов из Восточной Германии, двух – из Чехии, и штамма из Израиля. Штаммы с ST-7 принадлежат гипервирулентному клональному комплексу – генетической субгруппе III [6, 38] и выделялись на территории многих стран мира начиная с 1992 г. ST-75 впервые описан у российских штаммов в исследовании [6].

Согласно номенклатуре, принятой в базе данных <http://pubmlst.org/neisseria/>, штаммы серогруппы А принадлежат двум клональным комплексам: комплексу «ST-1 complex/subgroup I/II», объединяющему штаммы с сиквенс-типами ST-2, ST-73, ST-75, ST-3337, ST-3349, ST-5803 (108 штаммов или 91,5%), и комплексу «ST-5 complex/subgroup III», включающему штаммы с ST-7 (3 штамма или 2,5%). Для сиквенс-типов ST-68, ST-3336, ST-3338 и ST-7221 клональный комплекс определен не был (7 штаммов или 6%).

У штаммов серогруппы В найдено 18 сиквенс-типов. Наиболее часто выявлялся сиквенс-тип ST-4, найденный у 4 штаммов (18%), сиквенс-тип ST-3346 найден у 2 штаммов (9%), остальные сиквенс-типы (ST-1815, ST-3346, ST-3350, ST-3351, ST-3352, ST-3354, ST-3355, ST-3356, ST-3357, ST-3358, ST-3359, ST-3360, ST-3361, ST-6877, ST-7640, ST-8258, ST-8259) встречались однократно (4,6%). Большинство этих сиквенс-типов были обнаружены только у штаммов, изолированных на территории Москвы, за исключением ST-18, ST-3346, ST-3352 и ST-3354, которые также были найдены у штаммов, выделенных на территории некоторых европейских стран. Типированные штаммы распределены по пяти клональным комплексам. «ST-18 complex» объединяет штаммы с сиквенс-типами ST-18, ST-3350, ST-3351, ST-3354, ST-3355, ST-3356, ST-3357, ST-3358 и ST-3359 (12 штаммов или 54,5%), комплекс «ST-41/44 complex/Lineage 3» – ST-3346 и ST-7640 (3 штамма или 13,6%), комплексы «ST-11 complex/ET-37 complex», «ST-174 complex» и «ST-213 complex» содержат по одному

Таблица 1. Результаты генотипирования московских штаммов *N.meningitidis*

Штамм	Год выделения	Источник	серо-группа	сиквенс-тип	Клональный комплекс	PorA VR1	PorA VR2	FetA VR
82/803	1969	ГФМИ	A	5	ST-5 complex/subgroup III	20	9	НД
14/1455	1970	ГФМИ	A	5	ST-5 complex/subgroup III	20	9	F3-1
1092	1970	ГФМИ	A	69	ST-1 complex/subgroup I/II	НД	10	НД
36/1756	1971	ГФМИ	A	5	ST-5 complex/subgroup III	20	9	НД
25/1622	1971	ГФМИ	A	4	ST-4 complex/subgroup IV	НД	10	НД
49/1-99982	1973	ГФМИ	A	5	ST-5 complex/subgroup III	20	9	НД
E795	1977	ГФМИ	A	5	ST-5 complex/subgroup III	20	9	НД
E797	1977	ГФМИ	A	5	ST-5 complex/subgroup III	НД	НД	НД
302/83	1983	ГФМИ	A	75	ST-1 complex/subgroup I/II	НД	10	НД
558/83	1983	ГФМИ	A	76	ST-1 complex/subgroup I/II	НД	10	НД
155/84	1984	ГФМИ	A	2	ST-1 complex/subgroup I/II	НД	10	НД
276/84	1984	ГФМИ	A	2	ST-1 complex/subgroup I/II	НД	10	НД
340/84	1984	ГФМИ	A	70	–	НД	НД	НД
47/84	1984	ГФМИ	A	76	ST-1 complex/subgroup I/II	НД	10	НД
248/84	1984	ГФМИ	A	76	ST-1 complex/subgroup I/II	НД	НД	НД
445/84	1984	ГФМИ	A	77	ST-1 complex/subgroup I/II	НД	10	НД
465/84	1984	ГФМИ	A	77	ST-1 complex/subgroup I/II	НД	10	НД
46/85	1985	ГФМИ	A	2	ST-1 complex/subgroup I/II	НД	10	НД
164/85	1985	ГФМИ	A	71	ST-1 complex/subgroup I/II	НД	10	НД
159/85	1985	ГФМИ	A	75	ST-1 complex/subgroup I/II	НД	10	НД
162/85	1985	ГФМИ	A	77	ST-1 complex/subgroup I/II	НД	10	НД
209/85	1985	ГФМИ	A	76	ST-1 complex/subgroup I/II	НД	10	НД
231/86	1986	ГФМИ	A	70	–	5	2	НД
134/87	1987	ГФМИ	A	72	ST-1 complex/subgroup I/II	22	НД	НД
278/87	1987	ГФМИ	A	2	ST-1 complex/subgroup I/II	НД	10	НД
233/88	1988	ГФМИ	A	2	ST-1 complex/subgroup I/II	5	10	НД
277/88	1988	ГФМИ	A	2	ST-1 complex/subgroup I/II	НД	10	НД
324/88	1988	ГФМИ	A	2	ST-1 complex/subgroup I/II	5	1	НД
385/88	1988	ГФМИ	A	2	ST-1 complex/subgroup I/II	5	10	НД
585/88	1988	ГФМИ	A	2	ST-1 complex/subgroup I/II	НД	10	НД
412	1993	ГФМИ	A	2	ST-1 complex/subgroup I/II	5	10	НД
338	1994	ГФМИ	A	7	ST-5 complex/subgroup III	20	9	НД
410/94	1994	ГФМИ	A	68	–	5	10	НД
14/94	1994	ГФМИ	A	75	ST-1 complex/subgroup I/II	НД	10	НД
577	1995	ГФМИ	A	7	ST-5 complex/subgroup III	20	9	НД
652/95	1995	ГФМИ	A	2	ST-1 complex/subgroup I/II	НД	10	НД
409/95	1995	ГФМИ	A	73	ST-1 complex/subgroup I/II	НД	10	НД
754/95	1995	ГФМИ	A	79	–	НД	НД	НД
495/96	1996	ГФМИ	A	7	ST-5 complex/subgroup III	20	9	НД
1038/96	1996	ГФМИ	A	7	ST-5 complex/subgroup III	20	9	НД
521/96	1996	ГФМИ	A	7	ST-5 complex/subgroup III	НД	9	НД
925/96	1996	ГФМИ	A	68	–	5	10	НД

965/96	1996	ГФМИ	A	7	ST-5 complex/subgroup III	20	9	НД
544/97	1997	ГФМИ	A	78	ST-1 complex/subgroup I/II		10	НД
M216/97	1997	ГФМИ	A	2	ST-1 complex/subgroup I/II	7-1	4-1	НД
M305/97	1997	ГФМИ	A	7	ST-5 complex/subgroup III	20	9	НД
M810/97	1997	ГФМИ	A	7	ST-5 complex/subgroup III	20	9	F3-1
M461/98	1998	ГФМИ	A	2	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F1-5
M486/98	1998	ГФМИ	A	3337	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F1-5
M495/98	1998	ГФМИ	A	3336	–	5-2	10	НД
M586/98	1998	ГФМИ	A	73	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F1-5
M585/99	1999	ГФМИ	A	73	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F5-2
M143/00	2000	ГФМИ	A	2	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F1-5
M150/00	2000	ГФМИ	A	75	ST-1 complex/subgroup I/II	5	10	F3-5
M151/00	2000	ГФМИ	A	2	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F1-5
M168/00	2000	ГФМИ	A	3336	–	5-2	10	F3-5
M91/00	2000	ГФМИ	A	75	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M186/01	2001	ГФМИ	A	2	ST-1 complex/subgroup I/II	22	14	F1-5
M193/01	2001	ГФМИ	A	2	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	НД
M212/01	2001	ГФМИ	A	2	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F1-5
M215/01	2001	ГФМИ	A	68	–	5	10-30	F4-1
M233/01	2001	ГФМИ	A	2	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F1-5
M32/02	2002	ГФМИ	A	3349	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M468/02	2002	ГФМИ	A	3338	–	5-2	10	F3-5
M490/02	2002	ГФМИ	A	68	–	5	10	F4-1
M309/02	2002	ГФМИ	A	3349	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M310/02	2002	ГФМИ	A	3349	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M312/02	2002	ГФМИ	A	3349	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M319/02	2002	ГФМИ	A	3349	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M412/03	2003	ГФМИ	A	3349	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M447/03	2003	ГФМИ	A	3349	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M517/03	2003	ГФМИ	A	7	ST-5 complex/subgroup III	20	9	F4-1
M678/03	2003	ГФМИ	A	3349	ST-1 complex/subgroup I/II	12-1	14	F3-5
M871/03	2003	ГФМИ	A	68	–	5	10	НД
M1204/03	2003	ГФМИ	A	3349	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	НД
M1264/03	2003	ГФМИ	A	3349	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	НД
M311/03	2003	ГФМИ	A	3349	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M316/03	2003	ГФМИ	A	3349	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M3-65/04	2004	ГФМИ	A	3349	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M3-82/04	2004	ГФМИ	A	3349	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M3-123/04	2004	ГФМИ	A	3349	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M3-133/04	2004	ГФМИ	A	2	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F1-5
M68/04	2004	ГФМИ	A	3349	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M84/04	2004	ГФМИ	A	3349	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M102/04	2004	ГФМИ	A	3349	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M106/04	2004	ГФМИ	A	3349	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M126/04	2004	ГФМИ	A	3349	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5

M74/04	2004	ГФМИ	A	3349	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M83/04	2004	ГФМИ	A	3349	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M3-194/05	2005	ГФМИ	A	3349	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M227/05	2005	ГФМИ	A	2	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F1-5
M229/05	2005	ГФМИ	A	3349	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M230/05	2005	ГФМИ	A	2	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F1-5
M256/05	2005	ГФМИ	A	5803	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M263/05	2005	ГФМИ	A	3349	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M293/06	2006	ГФМИ	A	3349	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M296/06	2006	ГФМИ	A	2	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F1-5
M300/06	2006	ГФМИ	A	3349	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10-67	F3-5
M320/06	2006	ГФМИ	A	75	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M333/06	2006	ГФМИ	A	2	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F1-5
M301/06	2006	ГФМИ	A	3349	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10-67	F3-5
M303/06	2006	ГФМИ	A	3349	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10-67	F3-5
M304/06	2006	ГФМИ	A	75	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M317/06	2006	ГФМИ	A	3349	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10-67	F3-5
M352/06	2006	ГФМИ	A	3349	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M353/06	2006	ГФМИ	A	5803	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M287/06	2006	ГФМИ	A	2	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F1-5
M294/06	2006	ГФМИ	A	75	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M362/07	2007	ГФМИ	A	7221	–	5-3	2-16	F3-9
M365/07	2007	ГФМИ	A	3349	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M372/07	2007	ГФМИ	A	75	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M375/07	2007	ГФМИ	A	3349	ST-1 complex/subgroup I/II	17	16-4	F3-9
M395/07	2007	ГФМИ	A	2	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F1-5
M396/07	2007	ГФМИ	A	75	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M389/07	2007	ГФМИ	A	75	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M392/07	2007	ГФМИ	A	3349	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10-67	F3-5
M402/07	2007	ГФМИ	A	3349	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M437/07	2007	ГФМИ	A	75	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M548/07	2007	ГФМИ	A	75	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M579/07	2007	ГФМИ	A	75	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M672/08	2008	ГФМИ	A	75	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M727/08	2008	ГФМИ	A	75	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M728/08	2008	ГФМИ	A	75	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M729/08	2008	ГФМИ	A	3349	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M715/08	2008	ГФМИ	A	75	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M722/08	2008	ГФМИ	A	3349	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M745/08	2008	ГФМИ	A	75	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M750/08	2008	ГФМИ	A	75	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M755/08	2008	ГФМИ	A	75	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M759/08	2008	ГФМИ	A	75	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M760/08	2008	ГФМИ	A	75	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M802/08	2008	ГФМИ	A	3349	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5

M812/08	2008	ГФМИ	A	75	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M817/08	2008	ГФМИ	A	75	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M1041/08	2008	ГФМИ	A	75	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M1017/08	2008	ГФМИ	A	75	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M616/08	2008	ГФМИ	A	3349	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M16/09	2009	ГФМИ	A	3349	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M124/09	2009	ГФМИ	A	75	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M858/09	2009	ГФМИ	A	75	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M872/09	2009	ГФМИ	A	75	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
221	1989	носитель	A	2	ST-1 complex/subgroup I/II	5	10	НД
228	1989	носитель	A	2	ST-1 complex/subgroup I/II	5	10	НД
235	1989	носитель	A	2	ST-1 complex/subgroup I/II	5	10	НД
M445car_A/07	2007	носитель	A	75	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M448car_A/07	2007	носитель	A	75	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M450car_A/07	2007	носитель	A	75	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M451car_A/07	2007	носитель	A	75	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M457car_A/07	2007	носитель	A	75	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M458car_A/07	2007	носитель	A	75	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M463car_A/07	2007	носитель	A	75	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M16.16_A/08	2008	носитель	A	3349	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M16.19_A/08	2008	носитель	A	3349	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M13.24_A/08	2008	носитель	A	75	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M13.44_A/08	2008	носитель	A	75	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M619car_A/08	2008	носитель	A	3349	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M621car_A/08	2008	носитель	A	3349	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M629car_A/08	2008	носитель	A	3349	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M636car_A/08	2008	носитель	A	3349	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M737car_A/08	2008	носитель	A	3349	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M741car_A/08	2008	носитель	A	3349	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M742car_A/08	2008	носитель	A	3349	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M743car_A/08	2008	носитель	A	3349	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M746car_A/08	2008	носитель	A	3349	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
M766car_A/08	2008	носитель	A	3349	ST-1 complex/subgroup I/II	5-2	10	F3-5
1000	1988	ГФМИ	B	20	ST-18 complex	5-1	10-4	F1-9
528	1989	ГФМИ	B	18	ST-18 complex	22	14	F1-5
M330/95	1995	ГФМИ	B	3357	ST-18 complex	Del	Del	F3-6
M336/95	1995	ГФМИ	B	3358	ST-18 complex	18-1	3	F5-7
M1081/96	1996	ГФМИ	B	3359	ST-18 complex	22	26	F5-8
M13/96	1996	ГФМИ	B	3360	–	5-1	10-1	F2-7
M592/97	1997	ГФМИ	B	3350	ST-18 complex	19	15	F3-6
M668/97	1997	ГФМИ	B	3354	ST-18 complex	12-1	14	F3-6
M444/98	1998	ГФМИ	B	3351	ST-18 complex	22	14-6	F3-16
M481/98	1998	ГФМИ	B	3356	ST-18 complex	5-1	2-2	F3-6
M555/99	1999	ГФМИ	B	18	ST-18 complex	21	4	F1-62
M121/00	2000	ГФМИ	B	18	ST-18 complex	5-1	2-2	F5-5

M175/00	2000	ГФМИ	B	3355	ST-18 complex	5-1	2-2	F2-7
M605/99	2000	ГФМИ	B	18	ST-18 complex	22	14	F5-8
M194/01	2001	ГФМИ	B	3361	ST-11 complex/ET-37 complex	5-1	10-1	F5-8
M271/01	2001	ГФМИ	B	3352	–	21-2	28	F3-5
M292/02	2002	ГФМИ	B	18	ST-18 complex	18-1	3	F3-6
M304/02	2002	ГФМИ	B	3346	ST-41/44 complex/Lineage 3	17	16-4	F3-9
M838/09	2009	ГФМИ	B	3346	ST-41/44 complex/Lineage 3	17	16-4	F3-9
M453car_B/07	2007	носитель	B	6877	ST-174 complex	5-1	10-1	F5-16
M762car_B/08	2008	носитель	B	7640	ST-41/44 complex/Lineage 3	21-2	28	F5-6
M848car_B/09	2009	носитель	B	8258	–	7-4	1	F5-16
M849car_B/09	2009	носитель	B	1815	ST-213 complex	22	14	F5-5
M850car_B/09	2009	носитель	B	8259	–	7	16	F1-5
M201/97	1997	ГФМИ	C	3339	ST-174 complex	5-1	2-2	НД
M409/97	1997	ГФМИ	C	3340	–	20	9	НД
M458/98	1998	ГФМИ	C	3348	ST-18 complex	5-3	2-16	НД
M537/98	1998	ГФМИ	C	3278	ST-41/44 complex/Lineage 3	18-1	34	НД
M2/99	1999	ГФМИ	C	3341	ST-18 complex	12-1	13-1	НД
M29/99	1999	ГФМИ	C	3347	–	5-1	10-8	НД
M637/98	1999	ГФМИ	C	3353	–	18-2	35	НД
M8/99	1999	ГФМИ	C	3278	ST-41/44 complex/Lineage 3	18-1	34	НД
M102/00	2000	ГФМИ	C	3346	ST-41/44 complex/Lineage 3	17	16-4	НД
M105/00	2000	ГФМИ	C	3343	–	7	16	НД
M171/00	2000	ГФМИ	C	3342	ST-865 complex	19	15	НД
M31/00	2000	ГФМИ	C	3345	ST-41/44 complex/Lineage 3	17	16-4	НД
M195/01	2001	ГФМИ	C	3346	ST-41/44 complex/Lineage 3	17	16-4	НД
M214/01	2001	ГФМИ	C	3346	ST-41/44 complex/Lineage 3	17	16-4	НД
M864/09	2009	ГФМИ	C	3346	ST-41/44 complex/Lineage 3	21	16	F3-9
M870/09	2009	ГФМИ	C	8257	–	21	16-4	F5-1
M927/09	2009	ГФМИ	C	3346	ST-41/44 complex/Lineage 3	17	16-4	F3-9
M446car_C/07	2007	носитель	C	6876	ST-41/44 complex/Lineage 3	17	16-4	F3-9
M447car_C/07	2007	носитель	C	3278	ST-41/44 complex/Lineage 3	18-1	34	F1-5
M933car_C/09	2009	носитель	C	3346	ST-41/44 complex/Lineage 3	17	16-4	F3-9
M21/99	1999	ГФМИ	W-135	2977	ST-174 complex	22	26	НД
M88/00	2000	ГФМИ	W-135	3344	–	7-2	13-1	НД
M452car/07	2007	носитель	NG	53	ST-53 complex	7	30	F1-2
M460car/07	2007	носитель	NG	6878	–	18-1	3	F3-6
M462car/07	2007	носитель	NG	931	ST-53 complex	7-2	30-3	F1-2
M551car/07	2007	носитель	NG	3342	ST-865 complex	5-2	10-1	F5-5
M612car/07	2007	носитель	NG	53	ST-53 complex	7	30-2	F1-2
M623car/08	2008	носитель	NG	8260	–	5-1	10-8	F1-3
M630car/08	2008	носитель	NG	8261	ST-865 complex	22	26	F1-5
M714car/08	2008	носитель	NG	53	ST-53 complex	7	30	F1-9
M761car/08	2008	носитель	NG	8262	ST-53 complex	18-1	3	F1-2
M622car/08	2008	носитель	NG	–	–	7-2	30-3	Del
M854car/09	2009	носитель	NG	8016	–	21	Del	F1-9

M855car/09	2009	носитель	NG	8263	–	19	15	F5-2
M863car/09	2009	носитель	NG	8264	ST-198 complex	18	25	F5-70
M930car/09	2009	носитель	NG	53	ST-53 complex	7	30-5	F1-2
M847car/08	2009	носитель	NG	53	ST-53 complex	7	30-2	Del

Примечание. В таблицу включены штаммы, внесенные в базу данных <http://pubmlst.org/neisseria/>. Штаммы, выделенные курсивом, были типированы в других работах, главным образом в [6]. NG – негруппируемые штаммы. НД – нет данных или типирование не проводилось. Del – предположительно делеция гена (фрагмента гена): не удалось получить продукт амплификации, подробности см. в [28, 35].

штамму (4,5%) с сиквенс-типами ST-3361, ST-6877 и ST-1815, соответственно; для штаммов с сиквенс-типами ST-3352, ST-3360, ST-8258 и ST-8259 клональный комплекс определен не был.

У штаммов серогруппы С найдено 13 сиквенс-типов. Наиболее часто выявлялся сиквенс-тип ST-3346, найденный у 6 штаммов (30%), сиквенс-тип ST-3278 найден у 3 штаммов (15%), остальные сиквенс-типы (ST-3339, ST-3340, ST-3341, ST-3342, ST-3343, ST-3345, ST-3347, ST-3348, ST-3353, ST-6876, ST-8257) встречались однократно (5%). Все сиквенс-типы, за исключением ST-3278, ST-3342 и ST-3346, были обнаружены только у штаммов, изолированных на территории Москвы; сиквенс-типы ST-3278, ST-3342 и ST-3346 встречались и у штаммов, выделенных в других странах. Типированные штаммы распределены по четырем клональным комплексам. В «ST-41/44 complex/Lineage 3» входят штаммы с сиквенс-типами ST-3278, ST-3345, ST-3346 и ST-6876 (11 штаммов или 55%), в комплекс «ST-18 complex» – ST-3341 и ST-3348 (2 штамма или 10%), в комплексы «ST-174 complex» и «ST-865 complex» вошли по одному штамму (5%) с сиквенс-типами ST-3339 и ST-3342 соответственно. Для штаммов с сиквенс-типами ST-3340, ST-3343, ST-3347, ST-3353 и ST-8257 клональный комплекс определен не был.

У штаммов серогруппы W-135 найдены сиквенс-типы ST-2977 (данный штамм входит в клональный комплекс «ST-174 complex») и ST-3344. Сиквенс-тип ST-2977 был ранее обнаружен у одного штамма, выделенного на территории США (1994 г.), сиквенс-тип ST-3344 впервые обнаружен при проведении данного исследования.

У негруппируемых штаммов было определено 10 сиквенс-типов, сиквенс-тип двух штаммов (12,5%) определить не удалось предположительно из-за полной или частичной делеции фрагментов *abcZ* и *agoE*. Наиболее часто выявлялся сиквенс-тип ST-53, найденный у 5 штаммов (31%), остальные сиквенс-типы (ST-931, ST-3342, ST-6878, ST-8016, ST-8260, ST-8261, ST-8262, ST-8263 и ST-8264) встречались однократно (6%). Все сиквенс-типы, за исключением ST-53, ST-931 и ST-3342, были обнаружены только у штаммов, изолированных на территории Москвы.

Типированные штаммы распределены по трем клональным комплексам. Штаммы с сиквенс-типами ST-53, ST-931 и ST-8262 (7 штаммов или 44%) принадлежат комплексу «ST-53 complex», ST-3342 и ST-8261 (2 штамма или 12,5%) – комплексу «ST-865 complex», единственный штамм с сиквенс-типом ST-8264 входит в «ST-198 complex»; для штаммов с сиквенс-типами ST-6878, ST-8016, ST-8260 и ST-8263 клональный комплекс определен не был.

Обсуждение результатов исследования

Распределение серогрупп у исследованных штаммов не отражает реального распределения серогрупповой принадлежности у штаммов *N. meningitidis*, циркулирующих на территории Москвы в исследуемый период времени, так как при отборе штаммов для типирования предпочтение отдавалось штаммам серогруппы А в связи с их повышенной эпидемической опасностью. В предыдущих исследованиях было показано, что во время эпидемического подъема заболеваемости на территории Москвы в 1970-х годах, а также при расследовании эпидемической вспышки в 1996 г. преимущественно выделялись менингококки серогруппы А. Результаты МЛСТ этих штаммов позволили связать подъемы заболеваемости в Москве с присутствием на данной территории штаммов, принадлежащих генетической субгруппе III (в базе данных <http://pubmlst.org/neisseria/> этот клональный комплекс обозначен как «ST-5 complex/subgroup III»), импортированных предположительно из стран Азии. Штаммы генетической субгруппы III выделялись на протяжении трех последних пандемических волн во многих странах мира, в том числе и на территории Москвы. При этом в 1970-х годах, так же как и на всем протяжении первых двух пандемий, выделялись штаммы с сиквенс-типом ST-5, а в 1996 г. эпидемическая вспышка была вызвана штаммами с сиквенс-типом ST-7 [3, 4, 6, 38]. В связи с этим, микробиологический мониторинг штаммов серогруппы А является приоритетной задачей специалистов Центрального НИИ эпидемиологии. После эпидемической вспышки 1996 г. штаммы генетической субгруппы III выделялись три раза: дважды в 1997 г. и однократно в 2003 г. Выделение

штаммов генетической субгруппы III в 1997 г., по-видимому, связано с эпидемической вспышкой ГФМИ в 1996 г. Штамм, изолированный в 2003 г., был выделен от гражданина Узбекистана [31]; поскольку при проведении последующего мониторинга штаммов серогруппы А не было выявлено штаммов, входящих в генетическую субгруппу III, можно предположить, что дальнейшего распространения на территории Москвы гипервирулентных штаммов с сиквенс-типом ST-7 не последовало, что косвенно подтверждается данными о снижении заболеваемости ГФМИ в последующие годы [34, 37].

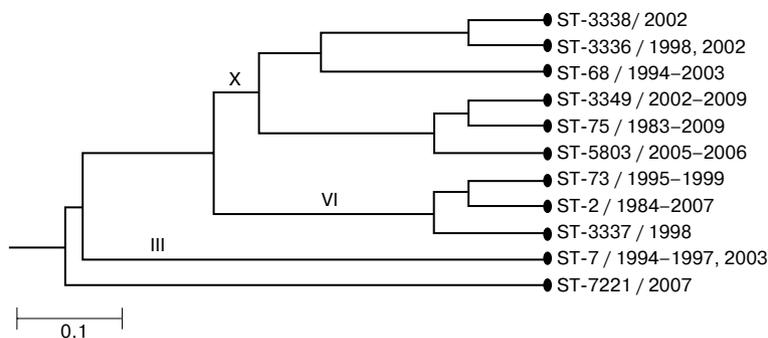
Генетические взаимоотношения московских штаммов серогруппы А и годы циркуляции штаммов, принадлежащих основным генетическим субгруппам, показаны на рисунке. Из четырех не включенных в клональный комплекс «ST-1 complex/subgroup I/II» сиквенс-типов только ST-7221 имеет существенные отличия в аллельном профиле от штаммов, входящих в этот клональный комплекс: ST-7221 отличается от всех сиквенс-типов клонального комплекса «ST-1 complex/subgroup I/II» по 6 фрагментам аллельного профиля. Сиквенс-типы ST-3336 и ST-3338 отличаются между собой по одному фрагменту аллельного профиля и по двум фрагментам – от аллельного профиля ST-75. Сиквенс-тип ST-68 отличается по двум фрагментам от аллельного профиля ST-2. Согласно классификации штаммов серогруппы А, предложенной в [6], сиквенс-типы ST-3336 и ST-3338, так же как и сиквенс-типы ST-75, ST-3349 и ST-5803, должны быть обособлены в генетическую субгруппу X, а сиквенс-тип ST-68 и ST-2 – в генетическую субгруппу VI. Эта, более подробная по сравнению с обозначениями клональных комплексов, принятыми в базе данных <http://pubmlst.org/neisseria/>, классификация штаммов позволяет описать эволюционные изменения в популяции штаммов серо-

группы А, происходящие в межэпидемический период [37].

Изолируемые с 1997 г. штаммы серогруппы А, за исключением штамма с сиквенс-типом ST-7221 и штаммов генетической субгруппы III, распределены по двум генетическим субгруппам: VI и X [6, 31, 37]. При этом большая часть штаммов – 96 (81%) входит в генетическую субгруппу X, а в генетическую субгруппу VI входит 18 (15%) штаммов. Штаммы генетической субгруппы VI выделялись на территории Москвы преимущественно в период 1983-1993 гг. После эпидемической вспышки в 1996 г. штаммы генетической субгруппы VI выделялись реже и преобладали штаммы генетической субгруппы X. Штаммы генетической субгруппы VI последний раз были обнаружены в 2003 г. (ST-68) и 2007 г. (ST-2). Эволюция штаммов наблюдалась преимущественно внутри генетической субгруппы X: среди вновь выявляемых сиквенс-типов после 1997 г. только один сиквенс-тип входит в генетическую субгруппу VI (ST-3337). В то же время внутри генетической субгруппы X было найдено четыре новых сиквенс-типа (ST-3336, ST-3338, ST-3349 и ST-5803) [31, 37].

При сравнении результатов МЛСТ штаммов серогруппы А, выделенных от больных ГФМИ и носителей, генетических отличий обнаружено не было: носительские штаммы принадлежали сиквенс-типам ST-3349 (12 штаммов или 57%) и ST-75 (9 штаммов или 43%) [28].

При проведении антигенной характеристики менингококков серогруппы А была обнаружена связь между антигенным профилем и принадлежностью штамма к определенному клональному комплексу. У штаммов генетической субгруппы X наиболее часто выявлялся антигенный профиль P1.5-2, 10; F3-5. Для штаммов генетической субгруппы VI характерен антигенный профиль P1.5-2, 10; F1-5 (штаммы с сиквенс-типом ST-2). Также



Генетические взаимоотношения московских штаммов серогруппы А и годы циркуляции исследованных штаммов (см. пояснения в тексте).

были выявлены определенные аллельные варианты поверхностных фрагментов VR1-2 (PorA) и VR (FetA), характерные для некоторых сиквенс-типов. Подробная антигенная характеристика менингококков серогруппы А и анализ результатов сопоставления антигенного типирования и данных МЛСТ были представлены в [34, 35].

При проведении МЛСТ штаммов *N. meningitidis*, принадлежащих серогруппам В и С, было найдено значительное количество новых сиквенс-типов, не выявляемых на других территориях. Из 18 обнаруженных сиквенс-типов у штаммов серогруппы В только четыре сиквенс-типа были найдены ранее вне Москвы, из 13 обнаруженных сиквенс-типов у штаммов серогруппы С – три. В то же время большинство изолятов от больных ГФМИ, а именно 15 (88%) штаммов серогруппы В и 12 (70%) штаммов серогруппы С входят в известные клональные комплексы, типичные для штаммов серогрупп В и С. Не входят в описанные комплексы два штамма серогруппы В (ST-3352 и ST-3360) и 5 штаммов серогруппы С (ST-3340, ST-3343, ST-3347, ST-3353 и ST-8257).

Наибольшее количество московских штаммов серогрупп В и С входит в клональный комплекс «ST-18 complex», представленный в базе данных <http://pubmlst.org/neisseria/> 306 штаммами, изолированными преимущественно на территориях европейских стран начиная с 1984 г. Более 90% штаммов, входящих в этот комплекс, принадлежат серогруппе В, и около 4% штаммов – серогруппе С. В связи с этим, выявление на территории Москвы штаммов, входящих в этот клональный комплекс, не позволяет говорить об их существенных генетических отличиях от штаммов, выделенных на других территориях. В клональный комплекс «ST-41/44 complex/Lineage 3» входит 2445 штаммов, изолированных в Европе (80%), Америке (6,5%) и других регионах. Штаммы комплекса «ST-41/44 complex/Lineage 3» впервые были выделены

в 1960 г.; большинство из этих штаммов принадлежит серогруппе В (73%), значительно меньше – серогруппе С (5%). Наибольшее количество штаммов серогрупп В и С, циркулирующих на территории Европы, принадлежит именно комплексу «ST-41/44 complex/Lineage 3», а также комплексам «ST-11 complex/ET-37 complex» и «ST-32 complex/ET-5 complex». Штаммы серогруппы С комплекса «ST-41/44 complex/Lineage 3» вызвали ряд вспышек менингококковой инфекции на территории Европы и Америки в 1990-е годы [5, 26]. К особенностям московских штаммов можно отнести повышенную долю менингококков серогруппы С среди штаммов, входящих в комплекс «ST-41/44 complex/Lineage 3», редкое (однократное) выделение штамма, входящего в «типично европейский» клональный комплекс «ST-11 complex/ET-37 complex» и отсутствие в исследованной выборке штаммов, принадлежащих комплексу «ST-32 complex/ET-5 complex». Краткая характеристика клональных комплексов, обнаруженных у московских штаммов серогрупп В и С, представлена в табл. 2.

Для большинства штаммов серогрупп В и С, выделенных от носителей, также удалось определить принадлежность к клональным комплексам. Все штаммы серогруппы С и один – серогруппы В входят в клональный комплекс «ST-41/44 complex/Lineage 3». Штаммы серогруппы В входят также в клональные комплексы «ST-174 complex» и «ST-213 complex». Согласно информации, представленной в базе данных <http://pubmlst.org/neisseria/>, примерно половина штаммов, входящих в каждый из этих клональных комплексов, выделена от носителей.

В отличие от штаммов серогруппы А, подробная антигенная характеристика штаммов серогрупп В и С не позволяет выявить преобладающий аллельный профиль и проследить связь между принадлежностью штамма к определенному клональному комплексу и его антигенными свойствами. Подробный анализ антигенного разнообразия менингококков,

Таблица 2. Характеристика клональных комплексов, обнаруженных у московских штаммов серогрупп В и С, выделенных от больных ГФМИ

Клональный комплекс	Территория, годы	Московские штаммы: количество, серогруппа
ST-18 complex	Европа, с 1984 г.	12 – В 2 – С
ST-41/44 complex/Lineage 3	Европа, Америка, с 1960 г.	2 – В 8 – С
ST-11 complex/ET-37 complex	Европа, Америка, с 1961 г.	1 – В
ST-174 complex	Европа, Америка, с 1970 г.	1 – С 1 – W-135
ST-865 complex	Европа, Африка, с 1974 г.	1 – С

циркулирующих на территории Москвы, представлен в [13, 34, 35]. В то же время типирование, проведенное по двум или трем переменным фрагментам, дает возможность дополнительно дифференцировать штаммы, входящие в один клональный комплекс, что может быть использовано для эпидемиологического расследования случаев ГФМИ и характеристики очагов менингококковой инфекции [8, 28, 29].

Негруппируемые штаммы, за очень редкими исключениями, не вызывают ГФМИ и отличаются высоким уровнем генетического и антигенного разнообразия. Полную характеристику удалось получить для 13 (81%) штаммов: два штамма оказались нетипируемыми методом МЛСТ и два предположительно имели полную или частичную делецию гена *FetA*. Большинство негруппируемых штаммов входит в клональный комплекс «ST-53 complex», что не позволяет говорить об особенностях бескапсульных штаммов, циркулирующих на территории Москвы. Зарубежные штаммы, относящиеся к комплексу «ST-53 complex», также преимущественно являются негруппируемыми. Среди негруппируемых штаммов не представляется возможным выделить преобладающий сиквенс-тип или аллель фрагментов *PorA* или *FetA*. Подробное описание с использованием индекса разнообразия по Симпсону [39] генетического и антигенного разнообразия носительских штаммов в сопоставлении со штаммами эпидемически значимых серогрупп опубликовано в [28]. Вклад носительских штаммов в эпидемический процесс, по всей видимости, заключается в увеличении рекомбинационного потенциала популяции *N. meningitidis*. Способность

бактерий, колонизирующих верхние дыхательные пути, к внутри- и межвидовой рекомбинации может приводить к появлению новых, в т.ч. и гипервирулентных штаммов [1, 22].

Заключение

Проведение комплексного микробиологического мониторинга бактерий вида *N. meningitidis*, сочетающего классические микробиологические методики (идентификация, серогруппирование) и молекулярно-биологические методики (МЛСТ, типирование поверхностных фрагментов белков наружной мембраны), интегрированные в общую схему типирования, позволяет проводить характеристику генетических и антигенных свойств возбудителей, циркулирующих на наблюдаемой территории. Применение современных генетических и биоинформационных технологий позволяет объединять результаты типирования штаммов, изолируемых на разных территориях, что, в свою очередь, обеспечивает глобальный надзор за эволюционными процессами, происходящими в бактериальной популяции. В совокупности с эпидемиологическими параметрами (показатель заболеваемости, особенности очагов МИ, возрастное распределение заболевших и др.) данные микробиологического мониторинга могут быть использованы для комплексной оценки эпидемической обстановки с целью своевременного выявления новых потенциально опасных или уже охарактеризованных гипервирулентных штаммов *N. meningitidis*, что необходимо для планирования и проведения противоэпидемических мероприятий.

Литература

1. Костюкова Н.Н., Бехало В.А. Менингококковая вакцинация и носительство. Эпидемиология и вакцинопрофилактика 2010; 6:67-72.
2. Костюкова Н.Н., Бехало В.А. Менингококковое носительство: загадки и разгадки. Эпидемиология и инфекционные болезни 2010; 1:30-4.
3. Покровский В.И., Фаворова Л.А., Костюкова Н.Н. Менингококковая инфекция. М.: Медицина, 1976. 275 с.
4. Meningococcal disease. Cartwright K. (ed). John Wiley & Sons Ltd, 1995. 316 p.
5. Meningococcal disease: methods and protocols. Pollard A.J., Maiden M.C.J. (eds). Humana Press, 2001. 721 p.
6. Achtman M., van der Ende A., Zhu P., et al. Molecular epidemiology of serogroup A meningitis in Moscow, 1969 to 1997. Emerg Infect Dis 2001; 7 (3):420-7.
7. Maiden M.C., Bygraves J.A., Feil E. et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. Proc Natl Acad Sci USA 1998, 95:3140-5.
8. Bart A., Dankert J., van der Ende A. Antigenic variation of the class I outer membrane protein in hyperendemic *Neisseria meningitidis* strains in the Netherlands. Infect Immun 1999, 67(8):3842-6.
9. Derrick J.P., Urwin R., Suker J., et al. Structural and evolutionary inference from molecular variation in *Neisseria* porins. Infect Immun 1999, 67(5):2406-13.
10. Feavers I.M., Fox A.J., Gray S., et al. Antigenic diversity of meningococcal outer membrane protein *PorA* has implications for epidemiological analysis and vaccine design. Clin Diagn Lab Immunol 1996, 3 (4):444-50.
11. Thompson E.A., Feavers I.M., Maiden M.C. Antigenic diversity of meningococcal enterobactin receptor *FetA*, a vaccine component. Microbiology 2003, 149(Pt. 7):1849-58.
12. Платонов А.Е., Харит С.М., Платонова О.В. Вакцинопрофилактика менингококковой инфекции в мире и в России. Эпидемиология и вакцинопрофилактика 2009, 5:32-46.

13. Koroleva I.S., Platonov A.E., van Der Ende A., et al. Characteristics of pathogenic *Neisseria meningitidis* in Moscow: prevalence of 'non-European' strains. *Clin Microbiol Infect* 1998, 4(3):123-8.
14. Fox A.J., Taha M.K., Vogel U. Standardized nonculture techniques recommended for European reference laboratories. *FEMS Microbiol Rev* 2007, 31 (1):84-8.
15. Jolley K.A., Brehony C., Maiden M.C. Molecular typing of meningococci: recommendations for target choice and nomenclature. *FEMS Microbiol Rev* 2007, 31(1):89-96.
16. Sacchi C.T., Lemos A.P., Brandt M.E., et al. Proposed standardization of *Neisseria meningitidis* PorA variable-region typing nomenclature. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998, 5(6):845-55.
17. Jolley K.A., Chan M.S., Maiden M.C. mlstdbNet – distributed multi-locus sequence typing (MLST) databases. *BMC Bioinformatics* 2004, 5:86.
18. Jolley K.A., Maiden M.C. BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. *BMC Bioinformatics* 2010; 11:595.
19. Taha M.K., Fox A. Quality assessed nonculture techniques for detection and typing of meningococci. *FEMS Microbiol Rev* 2007, 31(1):37-42.
20. Миронов К.О., Шипулин Г.А., Королева И.С., Платонов А.Е. Генотипирование *Neisseria meningitidis*. *Эпидемиология и инфекционные болезни* 2009, 4:18-21.
21. Bart A., Schuurman I.G.A., Achtman M., et al. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) genotyping of serogroup A meningococci yields similar results to multilocus enzyme electrophoresis (МЕЕ) and reveals new genotypes. *J Clin Microbiol* 1998, 36(6):1746-9.
22. Feil E.J., Maiden M.C., Achtman M., et al. The relative contributions of recombination and mutation to the divergence of clones of *Neisseria meningitidis*. *Mol Biol Evol* 1999, 16(11):1496-502.
23. Платонов А.Е., Шипулин Г.А., Платонова О.В. Мультилокусное секвенирование – новый метод генотипирования бактерий и первые результаты его применения. *Генетика* 2000, 36(5):597-605.
24. Платонов А.Е., Миронов К.О., Яцышина С.Б. и др. Характеристика московских штаммов *Haemophilus influenzae* типа b методом мультилокусного секвенирования-типирования. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология* 2003, 2:21-5.
25. Holmes E.C., Urwin R., Maiden M.C. The influence of recombination on the population structure and evolution of the human pathogen *Neisseria meningitidis*. *Mol Biol Evol* 1999, 16(6):741-9.
26. Brehony C., Jolley K.A., Maiden M.C. Multilocus sequence typing for global surveillance of meningococcal disease. *FEMS Microbiol Rev* 2007, 31(1):15-26.
27. Jolley K.A., Feil E.J., Chan M.S., et al. Sequence type analysis and recombinational tests (START). *Bioinformatics* 2001, 17(12):1230-1.
28. Миронов К.О., Тагаченкова Т.А., Королева И.С. и др. Генетическая характеристика штаммов *Neisseria meningitidis*, выделенных от здоровых носителей в очагах менингококковой инфекции. *Журн микробиол* 2011, 2:22-9.
29. Тагаченкова Т.А., Королева И.С., Миронов К.О. и др. Менингококковое носительство в очагах менингококковой инфекции. *Эпидемиология и инфекционные болезни* 2009, 4:6-10.
30. Королева И.С., Белошицкий Г.В. Менингококковая инфекция и гнойные бактериальные менингиты: руководство по лабораторной диагностике. Медицинское информационное агентство, 2007. 112 с.
31. Миронов К.О., Платонов А.Е., Королева И.С., Шипулин Г.А. Анализ московской популяции *Neisseria meningitidis* методом мультилокусного секвенирования я-типирования. *Журн. микробиол* 2006, 2:31-6.
32. Платонов А.Е., Шипулин Г.А., Королева И.С. и др. Перспективы диагностики бактериальных менингитов. *Журн микробиол* 1999, 2:71-6.
33. Платонов А.Е., Королева И.С., Платонова О.В. и др. Заболеваемость гнойными менингитами у детей в возрасте до 5 лет в Москве. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2006, 4:36-43.
34. Миронов К.О., Платонов А.Е., Королева И.С., и др. Мониторинг бактерий вида *Neisseria meningitidis* на основании последовательностей варьируемых фрагментов поверхностных белков FetA и PorA. *Журн микробиол* 2009, 3:23-7.
35. Миронов К.О., Платонов А.Е., Шипулин Г.А. и др. Генетическое субтипирование *Neisseria meningitidis*. *Эпидемиология и инфекционные болезни* 2005, 3:23-8.
36. 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):1518-30.
37. Миронов К.О., Платонов А.Е., Королева И.С. и др. Генетические субгруппы бактерий *Neisseria meningitidis* серогруппы А, выделенных от больных генерализованными формами менингококковой инфекции на территории Москвы в 1969-2006 гг. *Журн микробиол* 2008, 1:7-12.
38. Zhu P., van der Ende A., Falush D., et al. Fit genotypes and escape variants of subgroup III *Neisseria meningitidis* during three pandemics of epidemic meningitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, 98(9):5234-9.
39. Hunter P.R., Gaston M.A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol* 1988, 26:2465-6.