

УДК 577.212.3; 579.61

Полногеномное секвенирование российских штаммов *Neisseria gonorrhoeae*, отнесенных к геногруппе ST 1407

А. А. Кубанов¹, А. В. Рунина¹, А. В. Честков¹, А. В. Кудрявцева², Ю. А. Пеков³, И. О. Корвиго³, Д. Г. Дерябин^{1*}

¹Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии Минздрава России, 107076, Москва, ул. Короленко, 3/6

²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

³Студия анализа данных «Ксивелью», 119049, Москва, Ленинский просп., 30А

* E-mail: dgderabin@yandex.ru

Поступила в редакцию 23.11.2017

Принята к печати 27.06.2018

РЕФЕРАТ Представлены данные полногеномного секвенирования трех антибиотикорезистентных штаммов *Neisseria gonorrhoeae*, выделенных в Российской Федерации в 2015 году и по результатам NG-MAST-типирования отнесенных к широко распространенной геногруппе ST 1407. Анализ резистома этих штаммов выявил отсутствие генов *ermA/B/C/F*, а также сохранение аллелей дикого типа генов *rpsE*, *rrs*, *rrl*, *rplD*, *rplV*, *macAB* и *mefA*, что объясняет чувствительность к аминоциклитолам (спектиномицин) и макролидам (азитромицин). На фоне отсутствия детерминант резистентности с конъюгативным механизмом передачи (*blaTEM*, *tetM*), а также аллелей дикого типа генов *penC/pilQ*, *parE* и *norM* в ряде генов, кодирующих мишени антимикробных препаратов, выявлены одиночные или множественные полиморфизмы, обуславливающие устойчивость к β-лактамам (penA, penA), тетрациклинам (*rpsJ*) и фторхинолонам (*gyrA*, *parC*). Присутствие полиморфизмов дополнялось мутациями в гене *porB* и промоторе гена *mtrR*, неспецифически повышающими устойчивость к антибиотикам за счет нарушения их поступления в бактериальную клетку или усиления обратного трансмембранного транспорта. Различия в спектре подобных мутаций потребовали ревизии представлений о степени филогенетической близости исследованных штаммов, выполненной на основе сравнения более 790 групп генов домашнего хозяйства. Подтверждена высокая степень гомологии геномов *N. gonorrhoeae* ST 1407 и *N. gonorrhoeae* ST 12556, последний из которых дивергировал, по-видимому, от общего предшественника в результате одиночных мутационных событий. *N. gonorrhoeae* ST 12450 оказался примером фено- и генотипической конвергенции с геногруппой ST 1407, независимо сформировавшим собственные, хотя и частично идентичные, механизмы антибиотикорезистентности.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА *Neisseria gonorrhoeae*, полногеномное секвенирование, антимикробные препараты, детерминанты резистентности, филогенетический анализ.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ МИК – минимальная ингибирующая концентрация; MLST – мультилокусное типирование ДНК; NG-MAST – мультиантигенное типирование ДНК; PBP – пенициллинсвязывающий белок; QRDR – участки, определяющие устойчивость к антибиотикам-хинолонам; ST – сиквенс-тип.

ВВЕДЕНИЕ

Гонококковая инфекция остается одним из наиболее распространенных заболеваний, передающихся половым путем. В 2012 году ВОЗ сообщала о 78.3 млн новых случаев гонореи среди лиц репродуктивного возраста [1]. В Российской Федерации в 2015 году зарегистрировано 27056 случаев гонококковой инфекции, что соответствует 18.5 на 100 000 населения [2]. И если российские показатели снижаются на 10–20%

в год, то мировой тенденцией стал устойчивый рост заболеваемости.

Это обстоятельство в значительной степени связано с появлением и распространением эпидемически значимых клонов *Neisseria gonorrhoeae*, проявляющих множественную устойчивость к антимикробным препаратам (в том числе к препаратам выбора – цефалоспорином III поколения) [3]. Среди них в настоящее время наибольшее значение приобрел

генетический вариант, который в соответствии с протоколом молекулярного типирования NG-MAST (от англ. *Neisseria gonorrhoeae* Multi Antigen Sequence Typing) [4] описан как ST 1407 [5]. К 2010 году этот ST-тип обнаружен в 20 из 21 страны Европейского союза, составляя более 10% изолятов в 13 из них (в том числе в Австрии, Бельгии, Италии, Голландии, Португалии, Румынии, Словении, Испании и Великобритании) [6]. При этом генетический анализ выявил у *N. gonorrhoeae* ST 1407 множественные детерминанты резистентности к антимикробным препаратам [7], что объясняет участвовавшие случаи неэффективной терапии гонококковой инфекции [3, 5].

Эпидемиологическая значимость ST 1407 дополнительно определяется существованием филогенетически связанных с ним молекулярных типов *N. gonorrhoeae*, имеющих более чем на 99% идентичные нуклеотидные последовательности генов *porB* или *tbpB*, используемых при проведении NG-MAST-типирования, и в этой связи обозначаемых как представители геногруппы ST 1407. С их учетом доля *N. gonorrhoeae*, выделенных в странах Европейского союза, достигает 23% [6], а на Тайване один из представителей данной геногруппы – ST 4378 – занял доминирующее положение [8].

В Российской Федерации случаи гонококковой инфекции, вызванной *N. gonorrhoeae* ST 1407, имеют спорадический характер и регистрируются в городах с интенсивной туристической (Москва) или экономической (Калуга, Мурманск) миграцией из стран Европейского союза [9]. Немногочисленные вероятные представители геногруппы ST 1407, выявленные на территории Российской Федерации, впервые были описаны нами ранее [10]. Цель данной работы состояла в углубленной генетической характеристике подобных изолятов с использованием метода полногеномного секвенирования, в настоящее время ставшего востребованным инструментом анализа молекулярных механизмов антибиотикорезистентности и филогении патогенных микроорганизмов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Штаммы *N. gonorrhoeae*

Объектом исследования стали три штамма *N. gonorrhoeae*, выделенные в 2015 году от пациентов с диагнозом «Гонококковая инфекция нижних отделов мочеполового тракта» (A54.0 по МКБ-10) и депонированные в специализированной коллекции ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России под номерами 20/15/004, 41/15/003 и 19/15/005.

N. gonorrhoeae 20/15/004 выделен в Калуге от 41-летнего мужчины и при NG-MAST-типировании [4] охарактеризован как представитель эпидеми-

чески значимого типа ST 1407 (аллель 908 гена *porB* и аллель 110 гена *tbpB* согласно номенклатуре базы NG-MAST). Штамм *N. gonorrhoeae* 41/15/003 выделен в Томске от мужчины 19 лет и описан как новый сиквенс-тип ST 12556, имеющий ранее неизвестную комбинацию аллеля 6 гена *tbpB* и аллеля 971 гена *porB*, последний из которых характеризовался гомологией 99.97% с сиквенс-типом ST 1407. Штамм *N. gonorrhoeae* 19/15/005 выделен в Омске от женщины 31 года и также описан как новый ST 12450, особенности которого определялись сочетанием аллеля 931 гена *porB* с ранее неизвестным аллелем 2097 гена *tbpB*, имеющим гомологию 99.74% с шестью другими описанными ранее аллелем 6 этого гена. Анализ данных штаммов в составе выборки из 124 культур *N. gonorrhoeae*, проведенный на основе сравнения слитых последовательностей генов *porB* и *tbpB* с использованием программы MEGA 6 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0) [11], объединял их в единую геногруппу, соотношенную с ST 1407 [10].

Анализ чувствительности исследуемых штаммов к шести антимикробным препаратам, ранее или в настоящее время рекомендованных при гонококковой инфекции, показал их устойчивость или умеренную чувствительность к бензилпенициллину, тетрациклину и ципрофлоксацину, дополняемую у *N. gonorrhoeae* 41/15/003 умеренной чувствительностью к азитромицину (табл. 1).

Секвенирование генома *N. gonorrhoeae*

Геномную ДНК выделяли с использованием набора «Проба-НК» («ДНК-Технология», Россия) из чистых культур *N. gonorrhoeae*, выращенных в течение 18–24 ч на шоколадном агаре с добавлением 1% ростовой добавки ISOVitalex (Becton Dickinson, США). Библиотеку случайных фрагментов ДНК размером 400–700 п.н. готовили по стандартному протоколу GS Rapid Library. Библиотеки амплифицировали с использованием эмульсионной ПЦР и комплекта реагентов GS Junior emPCR kit. Полногеномное секвенирование выполнено с применением 454 пиросеквенирующей технологии на приборе GS Junior (Roche, Швейцария). Каждый геном секвенирован в течение отдельного запуска с использованием набора реагентов GS Junior Titanium Sequencing Kit. Средняя кратность покрытия генома составляла не менее 20.

Биоинформатические методы исследования

Аннотацию секвенированных геномов *N. gonorrhoeae* проводили при помощи приложения Prokka [12] с использованием общедоступных референсных наборов аминокислотных последовательностей

Таблица 1. Показатели чувствительности исследуемых штаммов *N. gonorrhoeae* к антимикробным препаратам и их интерпретация в соответствии с МУК 4.2.1890–04*

Антимикробный препарат (области чувствительности – Ч, умеренной чувствительности – УЧ и резистентности – Р; мкг/мл)	МИК, мкг/мл		
	20/15/004	41/15/003	19/15/005
Бензилпенициллин (Ч ≤ 0.06; УЧ = 0.12–1; Р ≥ 2)	0.5 (УЧ)	2 (Р)	1 (УЧ)
Цефтриаксон (Ч ≤ 0.25; УЧ > 0.25)	0.015 (Ч)	0.03 (Ч)	0.015 (Ч)
Тетрациклин (Ч ≤ 0.25; УЧ = 0.5–1; Р ≥ 2)	2 (Р)	4 (Р)	2 (Р)
Спектиномицин (Ч ≤ 32; УЧ = 64; Р ≥ 128)	32 (Ч)	32 (Ч)	16 (Ч)
Азитромицин** (Ч ≤ 0.25; УЧ = 0.5; Р ≥ 1)	0.25 (Ч)	0.5 (УЧ)	0.25 (Ч)
Ципрофлоксацин (Ч ≤ 0.06; УЧ = 0.12–0.5; Р ≥ 1)	16 (Р)	8 (Р)	16 (Р)

*Методические указания МУК 4.2.1890–04. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: Методические указания. М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. С. 91.

**В связи с отсутствием критериев чувствительности к азитромицину в МУК 4.2.1890–04 оценка проведена по критериям European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (www.eucast.org).

Swiss-Prot и UniProt. Кластеризацию осуществляли с использованием приложения CD-HIT [13] при 90% уровне сходства белков по длине и аминокислотной последовательности. Аннотацию рибосомных генов осуществляли при помощи программы Barrnap (<https://github.com/tseemann/barrnap>), поиск геномных островов – с использованием сервиса IslandViewer4 [14].

Поиск генетических детерминант устойчивости *N. gonorrhoeae* к антимикробным препаратам осуществляли при помощи сервиса RGI базы данных CARD [15].

Для NG-MAST-типирования *N. gonorrhoeae* использовали программу NGMASTER [16], для мультилокусного MLST-типирования – программу SRST2 [17]. На основании аминокислотных последователь-

ностей белков трех исследуемых изолятов и 24 ранее секвенированных штаммов *N. gonorrhoeae*, а также *N. meningitidis*, *N. lactamica* и *N. elongata*, в приложении OrthoFinder [18] были выделены ортологические группы белков рода *Neisseria*. Проведено множественное корректирующее выравнивание каждой из 790 отобранных ортологических групп в программе MAFFT [19]. Отфильтрованные и конкатенированные выравнивания использованы для построения филогенетического дерева *N. gonorrhoeae* методом максимального правдоподобия в программе RAxML [20] с последующей визуализацией в графическом редакторе FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Для оценки взаимосвязи между общей эволюцией кодирующих последовательностей и последовательностей, связанных с развитием устойчивости к антимикробным препаратам, были сформированы две выборки конкатенированных множественных выравниваний соответствующих ортогрупп, проведено вычисление *p*-дистанции в пределах каждой выборки. Соответствие между значениями в ячейках двух полученных матриц оценено с использованием коэффициента корреляции Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Общая характеристика геномов *N. gonorrhoeae*

Сборка геномов штаммов *N. gonorrhoeae* выявила у каждого из них по одной кольцевой хромосоме размером от 2223815 до 2271213 п.н., доля G+C в которых составляла 52.5–52.7% (табл. 2).

Общее количество идентифицированных открытых рамок считывания составило 2448 (*N. gonorrhoeae* 20/15/004), 2297 (*N. gonorrhoeae* 41/15/003) и 2293 (*N. gonorrhoeae* 19/15/005), из которых 1332 (54.4%), 1266 (55.1%) и 1281 (55.9%) соответственно были аннотированы как белоккодирующие гены с известной функцией.

В анализируемых геномах обнаружены по 49 (*N. gonorrhoeae* 20/15/004 и *N. gonorrhoeae* 41/15/003) или 47 (*N. gonorrhoeae* 19/15/005) генов тРНК, одному гену тмРНК, а также по четыре копии оперона 16S–23S–5S рРНК.

У каждого штамма идентифицированы криптические плазмиды размером от 4556 (*N. gonorrhoeae* 20/15/004) до 5266 п.н. (*N. gonorrhoeae* 19/15/005), содержащие характерный для конъюгативных плазмид ген релаксомы *MobC*, гены криптических плазмидных белков А, В и С, а также по пять открытых рамок считывания с неизвестными функциями. Соотнесение среднего значения покрытия плазмиды, деленного на среднее покрытие хромосомы, у штаммов 20/15/004 и 41/15/003 приводило к показате-

Таблица 2. Общая характеристика геномов исследуемых штаммов *N. gonorrhoeae*

Характеристика	Штаммы		
	20/15/004	41/15/003	19/15/005
Размер генома, п.н.	2271213	2236575	2223815
Доля G+C, %	52.6	52.5	52.7
Число белоккодирующих генов	2448	2297	2293
Число белоккодирующих генов с известной функцией	1332	1266	1281
Количество генов 16S-23S-5S рРНК	4	4	4
Количество генов тРНК	49	49	47
Количество генов тмРНК	1	1	1
Количество «геномных островов» на бактериальной хромосоме	12	22	17
Размер плазмиды, п.н.	4556	5233	5266
Значение покрытия плазмиды относительно хромосомы	18.4	12.3	33.6

лям 18.4 и 12.3 соответственно против 33.6 у штамма 19/15/005, что характеризовало обнаруженные плазмиды как многокопийные (> 10 копий на клетку).

В целом на первом этапе биоинформатического анализа было выявлено сходство исследуемых геномов с референсным FA1090 (GenBank: AE004969) и некоторыми другими ранее секвенированными штаммами *N. gonorrhoeae* [21], в том числе относящимися к ST 1407 [22]. Некоторые количественные вариации сравниваемых геномов могли быть обусловлены их высокой пластичностью, традиционно объясняемой наличием профагов, транспозонов и инсерционных элементов IS110 и IS1016 [23], в значительном количестве обнаруженных в составе «геномных островов» у всех трех штаммов *N. gonorrhoeae* (табл. 2).

Собранные *de novo* геномы депонированы в базу данных GenBank NCBI под номерами NTCT00000000 (*N. gonorrhoeae* 20/15/004), NTCS00000000 (*N. gonorrhoeae* 41/15/003) и NTCU00000000 (*N. gonorrhoeae* 19/15/005).

Генетические детерминанты устойчивости *N. gonorrhoeae* к антимикробным препаратам

На следующем этапе биоинформатического анализа проведен поиск и изучение четырех групп генов, кодирующих: 1) ферменты инактивации антибиотиков или модификации их мишеней; 2) белки-мишени, му-

тации в которых могут приводить к снижению их аффинности к соответствующим антимикробным препаратам; 3) транспортные белки, осуществляющие поступление антибиотиков в бактериальную клетку; 4) системы эффлюкса антибиотиков (табл. 3).

Детерминанты устойчивости к β-лактамам (пенициллинам и цефалоспорином)

Проведенный поиск не выявил в составе анализируемых последовательностей *N. gonorrhoeae* генов *blaTEM-1* или *blaTEM-135*, кодирующих ферменты β-лактамазы, гидролизующие лактамное кольцо в молекуле пенициллина и других структурно близких антибиотиков [24].

С другой стороны, последовательности хромосомных генов, кодирующих пенициллинсвязывающие белки (PBP, penicillin binding proteins), содержали ряд нуклеотидных замен, значительно снижающих чувствительность к β-лактамам антибиотикам. Так, в гене *penA* (кодирует PBP₁) во всех трех штаммах обнаружена мутация, приводящая к аминокислотной замене L421P и в 3–4 раза снижающая аффинность к пенициллинам в сравнении с белком дикого типа [25]. Еще более выраженные изменения выявлены при анализе гена *penA* (кодирует PBP₂), структура которого у штаммов *N. gonorrhoeae* 20/15/004 и *N. gonorrhoeae* 41/15/003 соответствовала представлениям о мозаичном характере организации, возникшей в результате вероятной генетической рекомбинации с синантропными комменсалами видов *N. cinerea* и *N. perflava* [26]. Эта особенность сопровождалась появлением аминокислотных замен F504L, N512Y, G545S на С-концевом участке белка PBP₂, значительно снижающих скорость связывания его пептидилтрансферазного центра с антибиотиком и препятствующих функционально важным конформационным переходам [27]. В свою очередь, две другие аминокислотные замены, I312M и V316T, оцениваются как значимые при формировании устойчивости к цефалоспорином, особенно в сочетании с G545S [28]. На этом фоне особенностью аллеля *penA* у *N. gonorrhoeae* 19/15/005 было наличие только двух аминокислотных замен – F504L и P551S, способных снижать уровень ацилирования PBP₂ почти в такой же степени, как и несколько других мутаций на С-концевом участке данного белка [29].

Еще одним геном, вовлеченным в развитие устойчивости *N. gonorrhoeae* к β-лактамам антибиотикам, стал *penB* (в настоящее время чаще обозначаемый как *porB*), кодирующий порин PorB1b наружной мембраны. Аминокислотные замены G120K и A121N в данном белке, ведущие к снижению проницаемости мембраны для гидрофильных антибиотиков [30], обнаружены у *N. gonorrhoeae* 20/15/004 и *N. gonorrhoe-*

Таблица 3. Генетические детерминанты устойчивости *N. gonorrhoeae* к антимикробным препаратам

Гены (белки)	Устойчивость к анти-микробным препаратам	Гены и нуклеотидные полиморфизмы (аминокислотные замены)		
		20/15/004	41/15/003	19/15/005
Ферменты инактивации антибиотиков или модификации их мишеней				
<i>blaTEM</i> (β-лактамаза)	β-лактамы	-	-	-
<i>ermA/B/C/F</i> (pPHK-метилазы)	макролиды	-	-	-
Белки-мишени антибиотиков				
<i>ponA</i> (PBP ₁)	β-лактамы	L421P	L421P	L421P
<i>penA</i> (PBP ₂)	β-лактамы	I312M V316T F504L N512Y G545S	I312M V316T F504L N512Y G545S	F504L P551S
<i>tetM</i>	тетрациклины	-	-	-
<i>rpsJ</i> (S10)	тетрациклины	V57M	V57M	V57M
<i>rpsE</i> (S5)	спектиномицин	wt	wt	wt
<i>rrs</i> (16S-PHK)	спектиномицин	wt	wt	wt
<i>rrl</i> (23S-PHK)	макролиды	wt	wt	wt
<i>rplD</i> (L4)	макролиды	wt	wt	wt
<i>rplV</i> (L22)	макролиды	wt	wt	wt
<i>gyrA</i>	фторхинолоны	S91F D95G	S91F D95G	S91F D95G
<i>parC</i>	фторхинолоны	S87R E91A	S87R E91A	wt
<i>parE</i>	фторхинолоны	wt	wt	wt
Транспортные белки, обеспечивающие поступление антибиотиков				
<i>penB</i> / <i>porB</i> (PorB1b)	β-лактамы тетрациклины	G120K A121N	G120K A121N	G120D
<i>penC</i> / <i>pilQ</i>	β-лактамы	wt	wt	wt
Ферментные системы эффлюкса антибиотиков				
<i>mtrCDE</i>	β-лактамы тетрациклины макролиды	wt	wt	wt
<i>mtrRpro</i>		A35del	A35del	wt
<i>macAB</i>	макролиды	wt	wt	wt
<i>macABpro</i>		wt	wt	wt
<i>mefA</i>	макролиды	wt	wt	wt
<i>norM</i>	фторхинолоны	wt	wt	wt
<i>norMpro</i>		wt	wt	wt

Примечание. «-» – ген не найден; «wt» – последовательность дикого типа.

ae 41/15/003, в то время как штамм *N. gonorrhoeae* 19/15/005 содержал одиночную замену G120D.

Другой анализируемый ген, также имеющий отношение к устойчивости *N. gonorrhoeae* к β-лактамам и другим гидрофильным антибиотикам – ген *pilQ* (ранее известный как *penC*), продукт которого формирует во внешней мембране дополнительные поры, обеспечивающие возможность диффузии антибиотиков в периплазматическое пространство бактериальной клетки. Мутация в триplete, кодирующем 666 аминокислоту (Gly), или полная делеция гена *pilQ* способны еще более повысить уровень антибиотикоустойчивости *N. gonorrhoeae*, особенно в тех случаях,

когда она сочетается с детерминантами устойчивости в генах *penA* и *penB* [31], однако в анализируемых нами геномах этот ген имел последовательность дикого типа.

Завершая анализ детерминант устойчивости *N. gonorrhoeae* к β-лактамам, следует отметить три сцепленных гена, представленных у всех проанализированных штаммов, которые входят в состав Mtr-локуса (multiple transferable resistance), контролируемого репрессором MtrR, и кодируют систему эффлюкса MtrC-MtrD-MtrE. При этом анализ промоторной области гена *mtrR* позволил выявить в нем делецию A35del, обуславливающую снятие подобной ре-

прессии с увеличением резистентности к антибиотику [32]. Эта мутация обнаружена в штамме *N. gonorrhoeae* 20/15/004 (ST 1407) и близкого к нему по структуре гена *porB* *N. gonorrhoeae* 41/15/003 (ST 12556), что согласуется с представлениями о наличии обсуждаемого механизма антибиотикорезистентности у гонококков, относящихся к NG-MAST-типу 1407 [5].

Детерминанты устойчивости к тетрациклам

Во всех трех анализируемых геномах в хромосомном гене *rpsJ* обнаружена точечная мутация, ведущая к аминокислотной замене V57M в рибосомном белке S10 30S субчастицы рибосомы. Эта замена приводит к нарушению связывания рибосомы с антибиотиком, что позволяет рассматривать указанный механизм как базовый в определении устойчивости *N. gonorrhoeae* к тетрациклам [33].

С другой стороны, голландский или американский варианты гена *tetM* [34], белковые продукты которых интерферируют с факторами элонгации EF-G и EF-Tu и делают рибосому недоступной для взаимодействия с антибиотиком, не обнаружены в геномах трех исследованных штаммов.

В свою очередь, неспецифические механизмы устойчивости анализируемых штаммов к тетрациклам (как и в случае β-лактамов) включали мутации в белке PorB1b и систему эффлюкса MtrC-MtrD-MtrE, эффективно дополняющие специфический механизм устойчивости, определяемый мутацией в гене *rpsJ* [33].

Детерминанты устойчивости к спектиномицину

Нуклеотидная последовательность гена *rrs* соответствовала последовательности гена дикого типа с сохранением остатка цитозина в положении 1186 (соответствует позиции 1192 у *Escherichia coli*), ключевого нуклеотида сайта связывания аминоклитолов на спирали 34 16S РНК [35].

Другая проанализированная хромосомная детерминанта – ген *rpsE*, кодирующий рибосомный белок S5 30S субъединицы рибосомы, мутации в котором способны вести к устойчивости к спектиномицину при сохранении гена *rrs* дикого типа. Однако поиск возможных аминокислотных замен T24P [36] и K28E, а также делеции кодона 27 (Val) [37] заставил констатировать соответствие *rpsE* гену дикого типа.

Детерминанты устойчивости к макролидам

Генетический кластер *ermA/B/C/F*, кодирующий рРНК-метилазы, модифицирующие сайты связывания макролидов с молекулой 23S рРНК, не обнаружен ни в одном из проанализированных геномов.

Поиск мутаций A2059G и C2611T в гене *rml*, нарушающих взаимодействие макролидных антибиоти-

ков с мишенью – пептидилтрансферазным центром в домене V 23S рРНК [38], заставил отнести все три штамма к дикому типу.

Дикому типу соответствовали также гены *rplD* и *rplV*, продукты которых – рибосомные белки L4 и L22 – первично связаны с доменом I 23S рРНК, однако имеют множественные сайты взаимодействия с другими доменами 23S рРНК. Мутации в белках L4 и L22 приводят к изменениям конформации доменов II, III и V, что, в свою очередь, может повлиять на чувствительность микроорганизмов к макролидам [39].

Анализ механизмов устойчивости *N. gonorrhoeae* к макролидам позволил выявить во всех трех геномах функциональные аллели генов *macA* и *macB*, кодирующих комплекс MacA–MacB, специфично распознающий и удаляющий антибиотик из периплазмы бактериальных клеток [40]. Однако анализ позиции -10 промоторов этих генов указывал на его соответствие дикому типу без дополнительного усиления эффлюкса. Дикому типу в исследуемых геномах соответствовал и ген *mefA*, кодирующий другой транспортный белок, обуславливающий устойчивость к макролидам [41].

Детерминанты устойчивости к фторхинолонам

Поиск хромосомных мутаций, определяющих устойчивость *N. gonorrhoeae* к фторхинолонам, проводили путем анализа участков QRDR (quinolone resistance-determining regions) в генах *gyrA*, *parC* и *parE*, кодирующих субъединицу А ДНК-гиразы, а также субъединицы С и Е топоизомеразы IV – мишени фторхинолонов.

Во всех трех штаммах в гене *gyrA* обнаружены однонуклеотидные полиморфизмы TCC → TTC и GAC → GGC, ведущие к аминокислотным заменам S91F и D95G, связанным с устойчивостью *N. gonorrhoeae* к фторхинолонам [42].

Ген *parC* у *N. gonorrhoeae* 20/15/004 и *N. gonorrhoeae* 41/15/003 содержал триплеты дикого типа (86(D) и 88(S)), что свидетельствовало о наличии двойной мутации, приводящей к заменам S87R и E91A. В сочетании с изменениями в ДНК-гиразе такая мутация существенно модифицировала структуру так называемого хинолонового кармана [43] и исключала возможность взаимодействия антимикробного препарата с мишенью. Анализ всех четырех аминокислотных замен показал, что геном *N. gonorrhoeae* 19/15/005 содержит ген *parC* дикого типа. В свою очередь, установлено, что во всех исследованных штаммах *N. gonorrhoeae* сохранен ген *parE* дикого типа.

При характеристике неспецифического механизма устойчивости *N. gonorrhoeae* к фторхинолонам

следует указать на присутствие в геноме каждого из исследованных штаммов по одной функциональной копии гена *norM*, кодирующего мембранный транспортер, удаляющий катионные антибактериальные препараты из бактериальной клетки [44]. В то же время анализ промоторной области в позиции -35 указывает на этот ген как на ген дикого типа, что не предполагает дополнительного усиления эффлюкса.

Молекулярное типирование и филогенетический анализ *N. gonorrhoeae*

Различия в детерминантах антибиотикорезистентности в геномах исследуемых штаммов *N. gonorrhoeae* потребовали ревизии представлений о степени их филогенетической близости. С этой целью использовали сочетание типирования NG-MAST и MLST (multi locus sequence typing), а также построение дендрограммы, основанной на сопоставлении всей совокупности генов домашнего хозяйства.

Результаты анализа секвенированных геномов с использованием программы NGMASTER [16] выявили полное совпадение с исходными данными, согласно которым анализируемые штаммы относятся к типам ST 1407, ST 12556 и ST 12450 (табл. 4).

В свою очередь, SRST2-анализ [17] нуклеотидных последовательностей консервативных генов *abcZ*, *adk*, *aroE*, *fumC*, *gdh*, *pdhC* и *pgm* [45] идентифицировал штаммы *N. gonorrhoeae* 20/15/004 и *N. gonorrhoeae* 41/15/003 как штаммы, относящиеся к MLST-типу 1901, который, согласно данным NG-MAST-типирования, соответствует эпидемически значимому ST 1407 [5]. С другой стороны, характери-

стики нуклеотидных последовательностей четырех из семи аллелей *N. gonorrhoeae* 19/15/005 позволили отнести данный штамм к MLST-типу 6721, ранее не упоминаемому в публикациях по проблеме антибиотикорезистентности и не имеющему описания филогенетической общности с ST 1407.

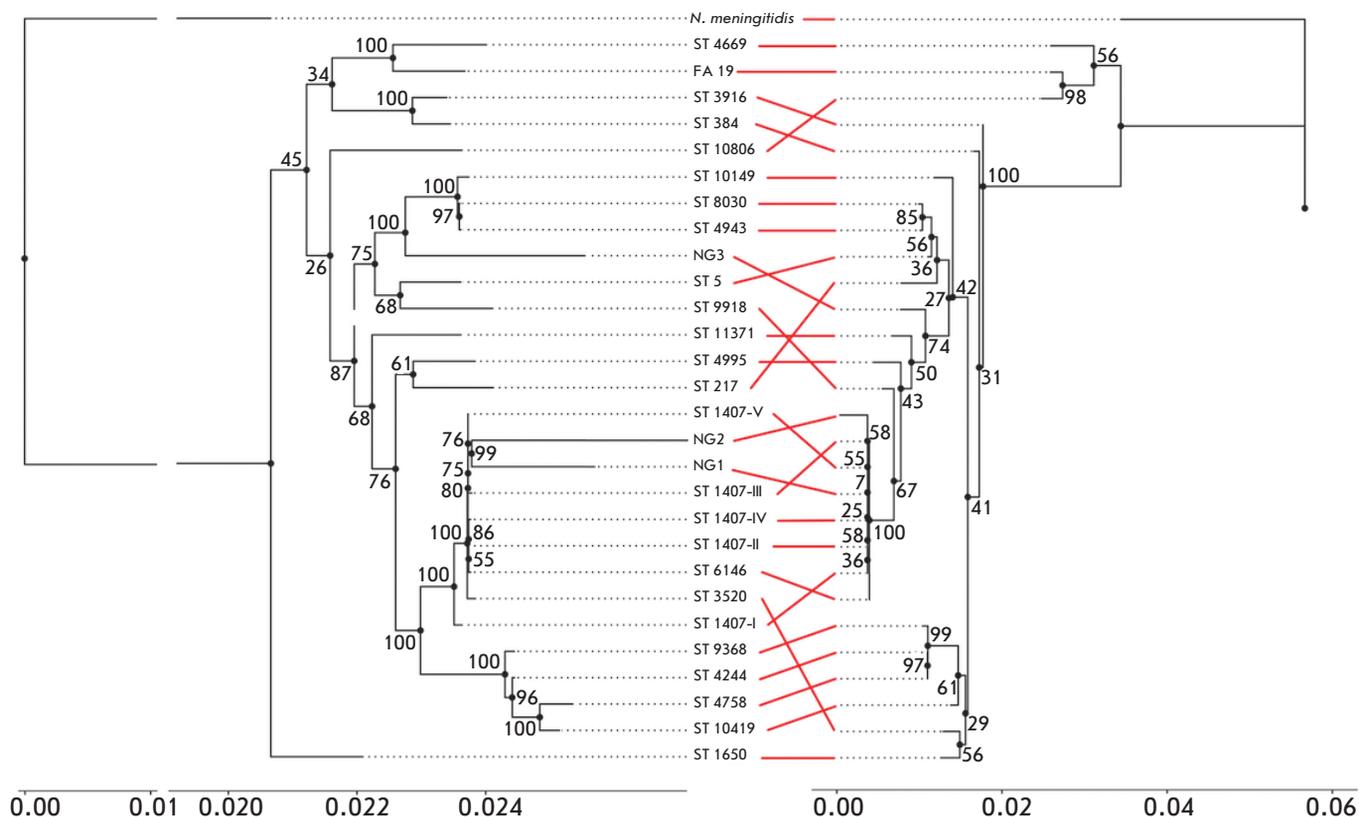
Филогенетические взаимоотношения между штаммами оценивали на основе сравнения всей совокупности 790 ортологических групп генов домашнего хозяйства у представителей семейства *Neisseriaceae*. Дополнительно использовали представленные в базе данных NCBI сведения о геномах *N. meningitidis* и 24 штаммов *N. gonorrhoeae*, в том числе референсного штамма FA 19, пяти ранее секвенированных штаммов ST 1407 и 18 штаммов других NG-MAST-типов. Филогенетическое дерево, построенное по методу максимального подобия с использованием программы RAxML [20] на основе модели замен Gamma в сочетании с матрицей весов BLOSUM62, представлено на рисунке. Для оценки взаимосвязи эволюции нейтральных кодирующих последовательностей и последовательностей, вовлеченных в развитие антибиотикорезистентности, данному дереву была противопоставлена дендрограмма, построенная для ортогрупп, связанных с устойчивостью к антимикробным препаратам.

Полученные данные указывали на чрезвычайно высокую степень генотипического подобия штаммов 20/15/004 (ST 1407) и 41/15/003 (ST 12556) на основе совокупности генов домашнего хозяйства, объединяемых в единый кластер с другими ранее секвенированными представителями ST 1407, а также ST 6146 и ST 3520. Тем самым результаты проведенного исследования подтверждали версию о тесной генетической связи между анализируемыми штаммами, первый из которых появился в российской популяции *N. gonorrhoeae* при вероятной трансграничной миграции, а второй произошел от их общего предка в результате единичных мутационных событий. С другой стороны, на филогенетическом дереве генов домашнего хозяйства третий исследуемый штамм 19/15/005 (ST 12450) был достаточно удален от геногруппы ST 1407, не обладая выраженной генотипической близостью с какой-либо из сформированных геногрупп. Соответственно установлено выраженное расхождение между первичным молекулярным типированием и результатами полногеномного секвенирования данного штамма, что указывает на полифилетичность антибиотикорезистентных штаммов в современной российской популяции *N. gonorrhoeae*.

Сопоставление конкатенированных множественных выравниваний нейтральных кодирующих последовательностей и последовательностей, связанных с развитием устойчивости к антимикробным препа-

Таблица 4. Результаты молекулярного типирования *N. gonorrhoeae*

Гены и определяемые ими молекулярные типы (NG-MAST и MLST)	ST-типы и номера аллелей штаммов <i>N. gonorrhoeae</i>		
	20/15/004	41/15/003	19/15/005
NG-MAST	1407	12556	12450
<i>porB</i>	908	971	931
<i>tbpB</i>	110	6	2097
MLST	1901	1901	6721
<i>abcZ</i>	109	109	126
<i>adk</i>	39	39	39
<i>aroE</i>	170	170	67
<i>fumC</i>	111	111	111
<i>gdh</i>	148	148	146
<i>pdhC</i>	153	153	153
<i>pgm</i>	65	65	133



Филогенетическое положение исследуемых штаммов (NG1 = 20/15/004; NG2 = 41/15/003; NG3 = 19/15/005) относительно других ранее секвенированных штаммов *N. gonorrhoeae*, оцененное на основе сравнения генов домашнего хозяйства (слева) и ортологичных групп, связанных с развитием устойчивости к анти-микробным препаратам (справа). Соответствие нумерации геномов в базе данных NCBI: ST 1407-I = SRR3349203; ST 1407-II = SRR3349826; ST 1407-III = SRR3357181; ST 1407-IV = SRR3357194; ST 1407-V = PMC3486552; ST 5 = SRR3349550; ST 217 = SRR3349568; ST 384 = SRR3350138; ST 1650 = SRR3343502; ST 3520 = SRR3357021; ST 3916 = SRR3343568; ST 4244 = SRR3350168; ST 4669 = SRR1661263; ST 4758 = SRR3343553; ST 4943 = SRR3349831; ST 4995 = SRR3349564; ST 6146 = SRR3349969; ST 8030 = SRR3349209; ST 9368 = SRR2736298; ST 9918 = SRR3349572; ST 10149 = SRR3349522; ST 10419 = SRR3343607; ST 10806 = SRR3349206; ST 11371 = SRR3349525.

Длина ветвей филогенетического дерева (по оси абсцисс) соответствует количеству ожидаемых аминокислотных замен на одну позицию. Значения около узлов ветвления представляют уровень поддержки. Красные линии соединяют одноименные ветви деревьев.

ратам, позволило выявить статистически значимую ($p < 0.001$) положительную корреляцию (коэффициент Пирсона 0.44) между ними. В частности, подобное соответствие показано для представителей генотипа ST 1407 (в том числе штаммов 20/15/004 и 41/15/003), за исключением ST 3520, описываемого так же, как изолят с мозаичной структурой гена *penA* [46], но, вероятно, относительно независимо сформировавшим собственными механизмами антибиотикорезистентности. Анализ *N. gonorrhoeae* 19/15/005

(ST 12450) подтвердил его относительно независимое филогенетическое положение.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами проведено полногеномное секвенирование трех штаммов *N. gonorrhoeae*, выделенных на территории Российской Федерации в 2015 году [10]. Эти штаммы обладают множественной устойчивостью к анти-микробным препаратам и по результатам NG-MAST-типирования предварительно отнесены к эпидеми-

чески значимой геногруппе ST 1407, получившей в настоящее время глобальное распространение [6, 8].

Анализ геномов этих штаммов выявил их принципиальное соответствие референсному штамму *N. gonorrhoeae* FA1090 [21] и ранее секвенированным представителям ST 1407 [22]. Обнаруженное отсутствие генов *ermA/B/C/F*, а также сохранение аллелей дикого типа генов *rpsE*, *rrs*, *rpl*, *rplD*, *rplV*, *macAB* и *mefA*, мутации в которых связаны с формированием устойчивости к аминоциклитолам (спектиномицин) и макролидам (азитромицин), объясняет чувствительность исследуемых штаммов к названным группам антимикробных препаратов. С другой стороны, на фоне отсутствия детерминант резистентности с конъюгативным механизмом передачи (*blaTEM*, *tetM*) и аллелей дикого типа *penC/pilQ*, *parE* и *norM* в ряде генов, кодирующих мишени антимикробных препаратов, выявлены одиночные или множественные полиморфизмы. Эти полиморфизмы, обуславливающие устойчивость к β-лактамам (*ponA*, *penA*), тетрациклинам (*rpsJ*) и фторхинолонам (*gyrA*, *parC*), дополняют мутации в гене *porB* и промоторе гена *mtrR*, неспецифически повышающие устойчивость к антибиотикам за счет нарушения их поступления в бактериальную клетку или усиления эффлюкса. Таким образом, результаты полногеномного секвенирования достаточно хорошо согласуются с предварительно полученными данными фенотипического анализа. Одновременно следует отметить, что анализ генетических детерминант резистентности позволил лишь прогнозировать чувствительность или устойчивость к определенным группам антимикробных препаратов, не позволяя конвертировать полученные данные в значения их МПК. В частности, при высоком сходстве генотипов *N. gonorrhoeae* 20/15/004 (ST 1407) и 41/15/003 (ST 12556) необъясненным

остается 2–4-кратный рост устойчивости последнего к пенициллину, цефтриаксону, тетрациклину и азитромицину. С другой стороны, на фоне различий в спектрах мутаций в генах, вовлеченных в формирование антибиотикорезистентности у *N. gonorrhoeae* 20/15/004 (ST 1407) и 19/15/005 (ST 12450), параметры их устойчивости к антимикробным препаратам оказались достаточно близкими. Указанное обстоятельство определяет актуальность поиска дополнительных механизмов антибиотикорезистентности *N. gonorrhoeae*, а также значимость разработки компьютерных алгоритмов, призванных обеспечить достаточную сходимость результатов генотипического и фенотипического анализа [47].

Другим важным результатом стала ревизия представлений о степени филогенетической близости исследуемых клинических изолятов, изначально сформированных на основе данных NG-MAST-типирования. Проведенное исследование подтвердило высокую степень гомологии геномов *N. gonorrhoeae* 20/15/004 (ST 1407) и *N. gonorrhoeae* 41/15/003 (ST 12556), последний из которых, вероятно, сформировался в Российской Федерации вследствие дивергенции от представителя глобально распространенного клона ST 1407. С другой стороны, штамм *N. gonorrhoeae* 19/15/005 (ST 12450) можно рассматривать как пример фено- и генотипической конвергенции с названной выше геногруппой, у которого независимо выработались собственные, хотя и частично сходные, механизмы антибиотикорезистентности. Полученный результат свидетельствует о полифилетичности антибиотикорезистентных штаммов в российской популяции *N. gonorrhoeae*, что определяет необходимость выявления и учета расширенного перечня эпидемически значимых генотипов. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Newman L., Rowley J., Vander Hoorn S., Wijesooriya N.S., Unemo M., Low N., Stevens G., Gottlieb S., Kiarie J., Temmerman M. // PLoS One. 2015. V. 10. e0143304.
- Кубанова А.А., Кубанов А.А., Мелехина Л.Е., Богданова Е.В. // Вестник дерматологии и венерологии. 2016. № 3. С. 12–28.
- Ohnishi M., Golparian D., Shimuta K., Saika T., Hoshina S., Iwasaku K., Nakayama S., Kitawaki J., Unemo M. // Antimicrob. Agents Chemother. 2011. V. 55. № 7. P. 3538–3545.
- European centre for disease prevention and control. Molecular typing of *Neisseria gonorrhoeae* – results from a pilot study 2010–2011. 2012. Stockholm. ECDC.
- Unemo M., Golparian D., Sary A., Eigntler A. // Euro Surveill. 2011. V. 16. № 43. Pii. 19998.
- Chisholm S.A., Unemo M., Quaye N., Johansson E., Cole M.J., Ison C.A., van de Laar M.J. // Euro Surveill. 2013. V. 18. № 3. Pii. 20358.
- Unemo M. // BMC Infect. Dis. 2015. V. 15. P. 364.
- Chen C.C., Yen M.Y., Wong W.W., Li L.H., Huang Y.L., Chen K.W., Li S.Y. // J. Antimicrob. Chemother. 2013. V. 68. № 7. P. 1567–1571.
- Воробьев Д.В., Соломка В.С., Плахова К.И., Дерябин Д.Г., Кубанов А.А. // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2016. № 4. С. 42–50.
- Kubanov A., Vorobyev D., Chestkov A., Leinsoo A., Shaskolskiy B., Dementieva E., Solomka V., Plakhova X., Gryadunov D., Deryabin D. // BMC Infect. Dis. 2016. V. 16. P. 389.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipinski A., Kumar S. // Mol. Biol. Evol. 2013. V. 30. № 12. P. 2725–2729.
- Seemann T. // Bioinformatics. 2014. V. 30. № 14. P. 2068–2069.
- Fu L., Niu B., Zhu Z., Wu S., Li W. // Bioinformatics. 2012. V. 28. № 23. P. 3150–3152.
- Bertelli C., Laird M.R., Williams K.P., Lau B.Y., Hoad G., Winsor G.L., Brinkman F.S. // Nucl. Acids Res. 2017. V. 45. W30–W35.
- McArthur A.G., Waglechner N., Nizam F., Yan A., Azad

- M.A., Baylay A.J., Bhullar K., Canova M.J., De Pascale G., Ejim L., et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013. V. 57. № 7. P. 3348–3357.
16. Kwong J.C., Gonçalves da Silva A., Dyet K., Williamson D.A., Stinear T.P., Howden B.P., Seemann T. // *Microb. Genom.* 2016. V. 2. № 8. e000076.
17. Inouye M., Dashnow H., Raven L.A., Schultz M.B., Pope B.J., Tomita T., Zobel J., Holt K.E. // *Genome Med.* 2014. V. 6. № 11. P. 90.
18. Emms D.M., Kelly S. // *Genome Biol.* 2015. V. 16. № 1. P. 157.
19. Katoh K., Standley D.M. // *Mol. Biol. Evol.* 2013. V. 30. № 4. P. 772–780.
20. Stamatakis A. // *Bioinformatics.* 2014. V. 30. № 9. P. 1312–1313.
21. Abrams A.J., Trees D.L., Nicholas R.A. // *Genome Announc.* 2015. V. 3. № 5. e01052–15.
22. Anselmo A., Ciammaruconi A., Carannante A., Neri A., Fazio C., Fortunato A., Palozzi A.M., Vacca P., Fillo S., Lista F., et al. // *Genome Announc.* 2015. V. 3. № 4. e00903–15.
23. Бодоев И.Н., Ильина Е.Н. // *Мол. генет. микробиол. вирусол.* 2015. Т. 33. № 3. С. 22–27.
24. Muhammad I., Golparian D., Dillon J.A., Johansson A., Ohnishi M., Sethi S., Chen S.C., Nakayama S., Sundqvist M., Bala M., et al. // *BMC Infect. Dis.* 2014. V. 14. P. 454.
25. Ropp P.A., Hu M., Olesky M., Nicholas R.A. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002. V. 46. № 3. P. 769–777.
26. Ameyama S., Onodera S., Takahata M., Minami S., Maki N., Endo K., Goto H., Suzuki H., Oishi Y. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002. V. 46. № 12. P. 3744–3749.
27. Takahata S., Senju N., Osaki Y., Yoshida T., Ida T. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006. V. 50. № 11. P. 3638–3645.
28. Tomberg J., Unemo M., Davies C., Nicholas R.A. // *Biochemistry.* 2010. V. 49. № 37. P. 8062–8070.
29. Powell A.J., Tomberg J., Deacon A.M., Nicholas R.A., Davies C. // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. № 2. P. 1202–1212.
30. Olesky M., Zhao S., Rosenberg R.L., Nicholas R.A. // *J. Bacteriol.* 2006. V. 188. № 7. P. 2300–2308.
31. Helm R.A., Barnhart M.M., Seifert H.S. // *J. Bacteriol.* 2007. V. 189. № 8. P. 3198–3207.
32. Veal W.L., Nicholas R.A., Shafer W.M. // *J. Bacteriol.* 2002. V. 184. № 20. P. 5619–5624.
33. Hu M., Nandi S., Davies C., Nicholas R.A. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005. V. 49. № 10. P. 4327–4334.
34. Turner A., Gough K.R., Leeming J.P. // *Sex Transm. Infect.* 1999. V. 75. № 1. P. 60–66.
35. Galimand M., Gerbaud G., Courvalin P. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000. V. 44. № 5. P. 1365–1366.
36. Iilina E.N., Malakhova M.V., Bodoev I.N., Oparina N.Y., Filimonova A.V., Govorun V.M. // *Front. Microbiol.* 2013. V. 4. P. 186.
37. Unemo M., Golparian D., Skogen V., Olsen A.O., Moi H., Syversen G., Hjelmevoll S.O. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013. V. 57. № 2. P. 1057–1061.
38. Jacobsson S., Golparian D., Cole M., Spiteri G., Martin I., Bergheim T., Borrego M.J., Crowley B., Crucitti T., van Dam A.P., et al. // *J. Antimicrob. Chemother.* 2016. V. 71. № 11. P. 3109–3116.
39. Gregory S.T., Dahlberg A.E. // *J. Mol. Biol.* 1999. V. 289. № 4. P. 827–834.
40. Rouquette-Loughlin C.E., Balthazar J.T., Shafer W.M. // *J. Antimicrob. Chemother.* 2005. V. 56. № 5. P. 856–860.
41. Cousin S.J., Whittington W.L., Roberts M.C. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003. V. 47. № 12. P. 3877–3880.
42. Shultz T.R., Tapsall J.W., White P.A. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001. V. 45. № 3. P. 734–738.
43. Su X., Lind I. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001. V. 45. № 1. P. 117–123.
44. Rouquette-Loughlin C., Dunham S.A., Kuhn M., Balthazar J.T., Shafer W.M. // *J. Bacteriol.* 2003. V. 185. № 3. P. 1101–1106.
45. Jolley K.A., Maiden M.C. // *Future Microbiol.* 2014. V. 9. № 5. P. 623–630.
46. Ison C.A., Town K., Obi C., Chisholm S., Hughes G., Livermore D.M., Lowndes C.M.; GRASP collaborative group. // *Lancet Infect. Dis.* 2013. V. 13. № 9. P. 762–768.
47. Eyre D.W., De Silva D., Cole K., Peters J., Cole M.J., Grad Y.H., Demczuk W., Martin I., Mulvey M.R., Crook D.W., et al. // *J. Antimicrob. Chemother.* 2017. V. 72. № 7. P. 1937–1947.