

РАЗДЕЛ VII

ЧАСТЬ 2. ЭПИДЕМИОЛОГИЯ И ДИАГНОСТИКА ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ. БИОБЕЗОПАСНОСТЬ

Давыдов А. В., Титов Л. П., Хархаль А. Н.

МУЛЬТИЛОКУСНОЕ СИКВЕНС-ТИПИРОВАНИЕ ПНЕВМОКОККА — ВАЖНЫЙ ЭЛЕМЕНТ ЭПИДНАДЗОРА ЗА ИНФЕКЦИЕЙ

*Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии,
г. Минск, Республика Беларусь*

Streptococcus pneumoniae (пневмококк) является одним из основных возбудителей бактериальных инфекций (менингита, внебольничной пневмонии, бактериемии, острого среднего отита, синусита), особенно у детей. По данным ВОЗ, оставаясь одной из основных причин детской смертности, пневмококк ежегодно во всем мире уносит до 1 млн детских жизней [1]. Высокие уровни заболеваемости различными формами пневмококковой инфекции (ПИ) в сочетании с прогрессирующим ростом резистентности пневмококка к используемым для терапии антибактериальным препаратам, а также появление и распространение мультирезистентных штаммов [2], обуславливают актуальность изучения молекулярно-генетической структуры популяций пневмококка. Поскольку пневмококковые конъюгированные вакцины включены в национальные календари профилактических прививок большинства сопредельных стран (в том числе, России с 2014 г.) и имеются предпосылки для проведения массовой иммунизации в Беларуси, изучение молекулярной эпидемиологии ПИ и изменений структуры популяции возбудителя, происходящих в том числе под прессингом поствакцинального иммунитета, является важнейшей задачей эпиднадзора.

Целью данного исследования является установление молекулярно-генетической структуры популяции пневмококка, циркулирующей в Беларуси среди пациентов с различными формами ПИ, посредством мультилокусного сиквенс-типирования штаммов путем секвенирования генов домашнего хозяйства (ГДХ).

Материалом исследования явились: а) 55 штаммов пневмококка, полученные в период январь 2013 г. – июнь 2016 г. из лечебно-профилактических учреждений страны Республиканской референс-лабораторией по диагностике инвазивных бактериальных заболеваний, и сопроводительная документация к ним. С учетом наибольшей клинической значимости для секвенирования были отобраны все инвазивные (n=34) и неинвазивные, но вызвавшие пневмонию (n=4) штаммы пневмококка. Также с данной целью было отобрано 17 штаммов, выделенных из жидкости среднего уха пациентов с острыми средними отитами (n=9), а также из носоглотки или зева пациентов с бактерионосительством (n=8). Наибольшее число штаммов (29 из 55, 52,7%) было выделено в 2015 г., в 2014 г. – 14 штаммов (25,4%), 2016 г. – 9 штаммов (16,3%) и в 2013 г. – 3 штамма (5,4%).

Культивирование и идентификация культур пневмококка выполнялись в соответствии с методологией руководства по лабораторной диагностике менингитов ВОЗ и Центров по контролю и профилактике заболеваний США (2011 г.). Мультилокусное сиквенс-типирование штаммов пневмококка основано на секвенировании внутренних фрагментов семи ГДХ: ген *aroE*, кодирующий фермент шикимат дегидрогеназу; ген *gdh*, кодирующий глюкозо-6-фосфат дегидрогеназу; ген *gki*, кодирующий фермент глюкокиназу; ген *recP*, кодирующий фермент транскетолазу; ген *spi*, кодирующий сигнальную пептидазу I; ген *xpt*, кодирующий ксантин фосфорибозилтрансферазу; ген *ddl*, кодирующий фермент D-аланин-D-аланин лигаза. ГДХ характеризуются незначительной вариабельностью и используются для изучения процессов микроэволюции микроорганизмов, установления различий патоваров, а также связи между гено- и патотипами [3].

Секвенирование ГДХ включало в себя следующие этапы: 1) традиционная ПЦР с бактериальной ДНК чистых культур пневмококка, либо геномной ДНК, выделенной из образцов биологического материала; 2) препаративный гель-электрофорез продуктов ПЦР-реакции; 3) очистка полученных ампликонов сорбентным методом с использованием центрифужных силика-колонок; 4) постановка сендджеровской секвенирующей ПЦР с использованием коммерческого набора с секвеназой и мечеными терминальными нуклеотидами; 5) очистка продуктов секвенирующей ПЦР методом переосаждения с этанолом, ЭДТА и ацетатом натрия. 6) гель-электрофорез с детекцией нуклеотидной последовательности в автоматическом генетическом анализаторе (капиллярном секвенаторе). Полученные нуклеотидные последовательности (прямая и обратная в соответствии с использованием разных праймеров в секвенирующей ПЦР), анализировались в программе SeqScape 3 (Applied Biosystems, США) – выполнялось совмещение и сравнение полученных последовательностей с целью получения консенсусной последовательности, обеспечивающей высокое качество прочтения необходимого участка генов (рис. 1). Для определения аллели каждого ГДХ штамма пневмококка, консенсусная последовательность сравнивалась с референтными последовательностями международной базы данных PubMLST (<http://pubmlst.org/spneumoniae/>), размещенной Оксфордским Университетом при поддержке Wellcome Trust [4]. После того, как были определены номера аллелей каждого из 7 генов определенного штамма, определялся сиквенс-тип штамма (аллельный профиль), соответствующий определенной комбинации семи аллелей. В случае отсутствия в базе определенных комбинаций аллелей, подавалась заявка на депонирование последовательностей ДНК нового сиквенс-типа (СТ). Молекулярный филогенетический анализ с использованием метода максимального правдоподобия проводился с построением дендрограмм в программе MEGA 7. Данные дендрограммы визуализируют показатели гомологичности сравниваемых нуклеотидных последовательностей и использовались для оценки филогенетических связей. Филогенетический анализ с построением минимальных покрывающих деревьев выполнялся в программе BioNumerics 7.6 (Applied Maths, Бельгия) с одновременным учетом гомологии нуклеотидных последовательностей семи ГДХ и группирующего фактора.

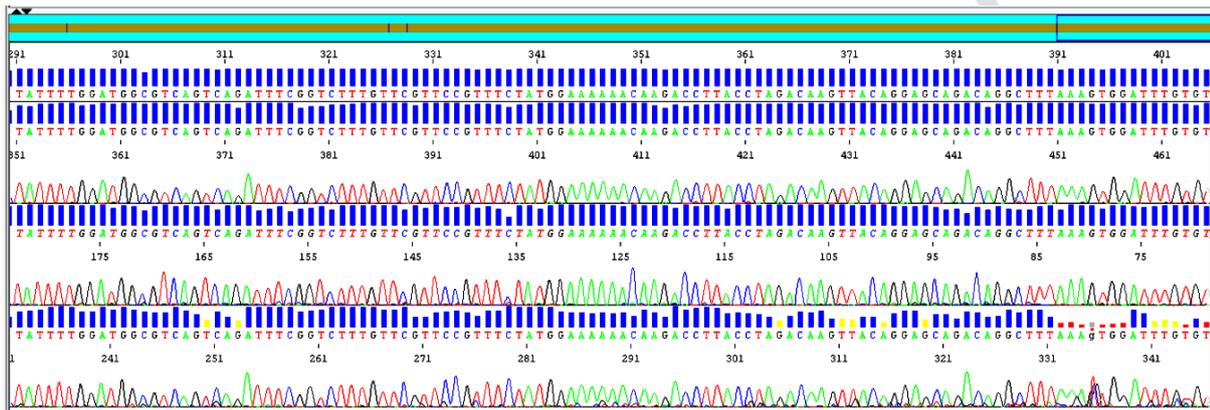


Рис. 1. Получение консенсусной последовательности высокого качества прочтения из нескольких последовательностей с дефектами прочтения

Секвенирование гена *aroE* 52 штаммов пневмококка позволило идентифицировать 10 различных аллелей (рис. 2), наиболее часто встречающимися из которых оказались 7-я (16/52 штаммов, 30,8%), 4-я (13/52 штаммов, 25,0%) и 2-я (6/52 штаммов, 11,5%). Две из аллелей (365-я и 366-я) были обнаружены впервые в мире и депонированы нами в международную базу данных PubMLST пневмококка.

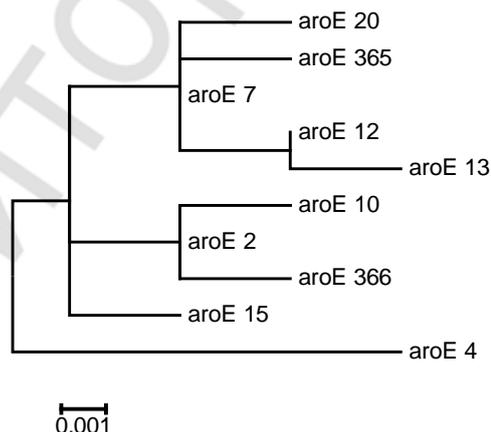


Рис. 2. Дендрограмма гомологии последовательностей аллелей гена *aroE*

Таким образом, популяция пневмококка оказалась достаточно гетерогенной: 10 аллелей гена *aroE* (12 полиморфных сайтов); 15 аллелей гена *gdh* (32 полиморфных сайта); 12 аллелей гена *gki* (25 полиморфных сайтов); 12 аллелей гена *recP* (15 полиморфных сайтов); 8 аллелей гена *spi* (18 полиморфных сайтов); 13 аллелей гена *xpt* (15 полиморфных сайтов) и 11 аллелей гена *ddl* (15 полиморфных сайтов).

На основании секвенирования семи ГДХ 38-ми штаммов пневмококка и установления их аллельных профилей с использованием базы данных PubMLST было выявлено 20 сиквенс-типов, 4 из которых (20,0%) оказались новыми и не были описаны ранее. Следует отметить, что большинство штаммов (33/38, 86,8%) принадлежат к известным 16 сиквенс-типам, частота встречаемости которых составила – СТ 320 (7/38, 18,4%), СТ 156 (5/38, 13,2%), СТ 1227 (4/38, 10,5%), СТ 306 (3/38, 7,9%), СТ 315 (3/38, 7,9%) и по 2,6%, 1/38 СТ 62, СТ 63, СТ 179, СТ 180, СТ 236, СТ 239, СТ 276, СТ 1820, СТ 2296, СТ 2998 и СТ

5972. Небольшая доля штаммов 5/38, 13,2% принадлежала к СТ, которые ранее не были зарегистрированы в базе данных PubMLST. Среди них – СТ 11899 (1/38, 2,6%), СТ 11900 (1/38, 2,6%), СТ 11901 (2/38, 5,3%) и СТ 11923 (1/38, 2,6%). Нуклеотидные последовательности ГДХ вновь описанных сиквенс-типов были депонированы в международную базу пневмококка PubMLST, на каждый сиквенс-тип (аллельный профиль) в базе была зарегистрирована новая запись. Также в базу было депонировано 28 подробно охарактеризованных штаммов пневмококка (номера аллелей, год выделения, источник выделения, диагноз, чувствительность к антибиотикам).

На рис. 3 изображено филогенетическое древо генетических взаимоотношений родства штаммов пневмококка с учетом принадлежности к серологическому типу.

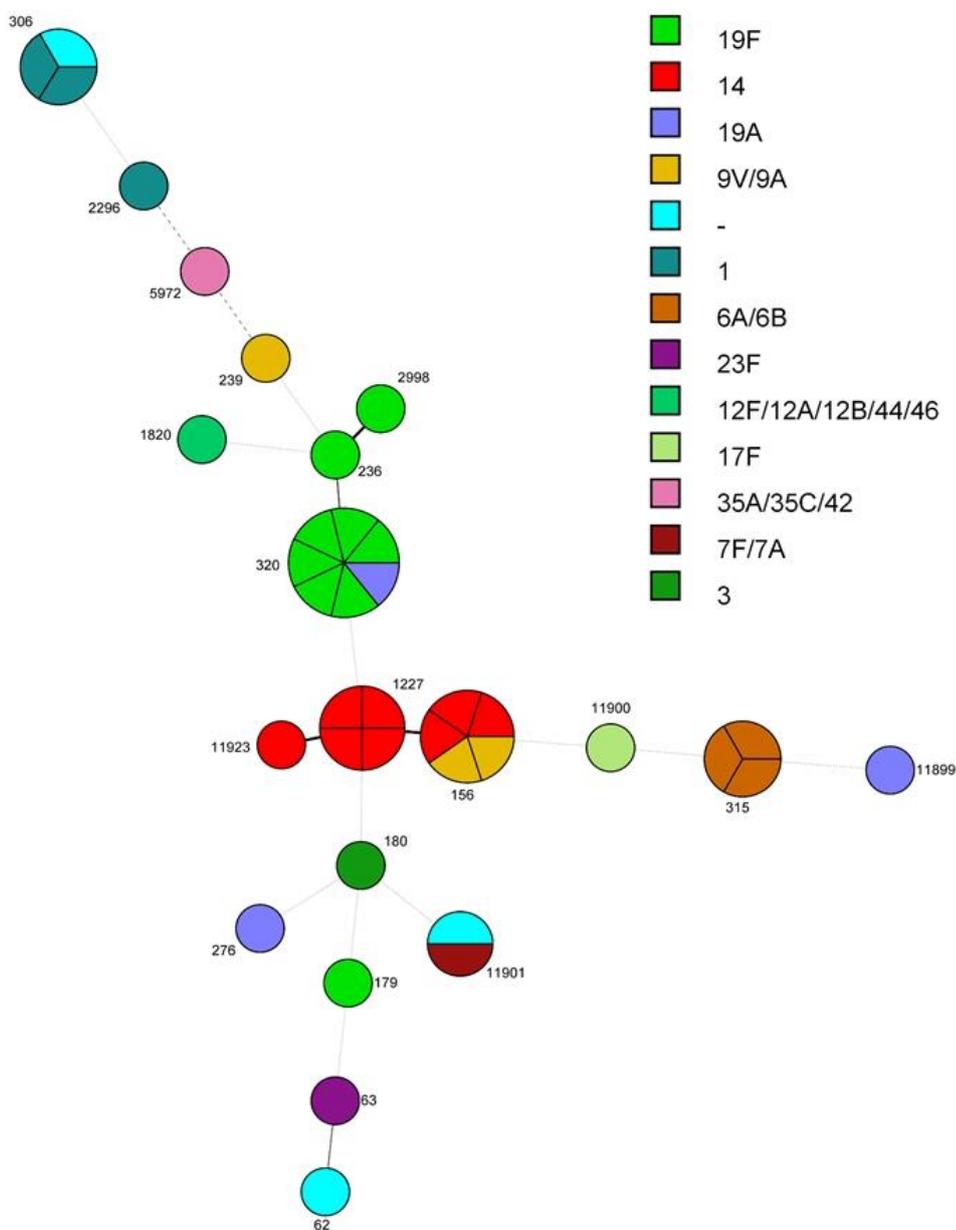


Рис. 3. Филогенетические взаимоотношения штаммов пневмококка с учетом принадлежности к СТ и серотипам

Как видно из филограммы, циркулирующие в Беларуси штаммы пневмококка разделены на 3 отдельных кластера и демонстрируют 3 четких направления эволюционных изменений. Первый кластер включает 16 штаммов (42,1% от общего числа), представленных сиквенс-типами 320, 236, 2998 и 1820 (формирующим клональный комплекс 320^{19F,19A}), а также СТ 239, 5972, 2296 и 306. Второй кластер состоит из 15 штаммов (39,5%), относящихся к сиквенс-типам 11923, 1227 и 156 (формирующим клональный комплекс 156¹⁴), а также 11900, 315 и 11899. Следует отметить, что в данном кластере по разные стороны от центрального клонального комплекса расположены 3 из 4 вновь описанных сиквенс-типа, что может свидетельствовать о наличии активных эволюционных изменений среди штаммов, относящихся к данному кластеру, эпидемиологическое значение которых предстоит оценить. Третий кластер дерева состоит из 7 штаммов (18,4%), относящихся к сиквенс-типам 180, 276, 179, 11901, 63, 62.

По данным литературы, штаммы 19-й серогруппы, относящиеся к клональному комплексу 320^{19F,19A} характеризуются высокими уровнями устойчивости к цефалоспорином III поколения, а иногда и мультирезистентностью. Международный мультирезистентный клон Spain9V-ST156, распространенный и в Беларуси, также ассоциируется со сниженной чувствительностью к пенициллину. Поскольку при эмпирической терапии гнойных менингитов пенициллин и цефалоспорины III поколения являются препаратами выбора, отслеживание в Беларуси эпидемиологии данного клонального комплекса и антибиотикочувствительности соответствующих штаммов является важнейшей задачей будущего.

Ранее нами установлена молекулярно-генетическая структура циркулирующей в стране популяции менингококка, выявлены и впервые описаны доминирующие СТ и клональные комплексы [5].

Таким образом, на основе данных мультилокусного сиквенс-типирования штаммов пневмококка выявлены и впервые описаны доминирующие сиквенс-типы и клональные комплексы, впервые установлена молекулярно-генетическая структура популяции пневмококка, циркулирующей на территории Беларуси. Установлена принадлежность обнаруженных сиквенс-типов к клональным комплексам, как к глобально распространенным (320^{19F,19A}, Spain9V-ST156), так и к клональным комплексам, имеющим ограниченное международное распространение. Установлена ассоциация клональных комплексов и доминирующих серотипов. Впервые в популяции пневмококка выявлены новые сиквенс-типы (СТ 11899, СТ 11900, СТ 11901 и СТ 11923), которые зарегистрированы в международной базе данных PubMLST.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Пневмококковая конъюгированная вакцина для иммунизации детей*. Документ по позиции ВОЗ [Электронный ресурс] // Еженедельный эпидемиологический бюллетень / ВОЗ. 2007. Т. 82, № 12. С. 93-104. Режим доступа: http://www.who.int/immunization/Pneumococcus_child_Mar07_Rus.pdf?ua=1. Дата доступа: 06.10.2016.
2. *Clonality behind the increase of multidrug-resistance among non-invasive pneumococci in Southern Finland* / L. Siira [et al.] // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2012. Vol. 31, N 5. P. 867-871.
3. *Enright, M. C. A multilocus sequence typing scheme for Streptococcus pneumoniae: identification of clones associated with serious invasive disease* / M. C. Enright, B. G. Spratt // Microbiology. 1998. Vol. 144, Pt. 11. P. 3049-3060.

4. *Jolley, K. A.* BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level / K. A. Jolley, M. C. J. Maiden // BMC Bioinform. 2010. Vol. 11. P. 595.

5. *Evolutionary* epidemiology of *Neisseria meningitidis* strains in Belarus compared to other European countries / L. P. Titov [et al.] // Acta Microbiol. Immunol. Hung. 2013. Vol. 60, N 4. P. 397-410.