

БИОЛОГИЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МЕДИЦИНА

УДК 616.9:579.861.1]-036.22-076575.21](470.5)

ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ *NEISSERIA GONORRHOEAE*, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НА ЗАПАДНОМ УРАЛЕ

М.А. Румянцева^{1,2*}, *А.В. Коломойцев*^{1,2}, *Т.И. Карпунина*², *В.Д. Елькин*²

¹Пермский краевой кожно-венерологический диспансер,

²Пермский государственный медицинский университет

им. академика Е.А. Вагнера, Россия

PHENOTYPICAL AND MOLECULAR-GENETIC MONITORING OF *NEISSERIA GONORRHOEAE*, CIRCULATING IN WESTERN URAL

M.A. Rumyantseva^{1,2}, *A.V. Kolomoitsev*^{1,2}, *T.I. Karpunina*², *V.D. Elkin*²

¹Perm Regional Dermatovenerologic Dispensary,

²Academician Ye.A. Vagner Perm State Medical University, Russian Federation

Цель. Изучить биологические особенности штаммов *N. gonorrhoeae*, изолированных от больных, проживающих в Пермском крае.

Материалы и методы. Представлен анализ заболеваемости гонококковой инфекцией за 2010–2015 гг. по Пермскому краю с применением интенсивных показателей. В работе использовано 60 клинических штаммов *N. gonorrhoeae*. Первичная идентификация культур проведена в ККВД бактериоскопическим и бактериологическим методами в соответствии со стандартными операционными процедурами. Для подтверждения видовой принадлежности изолированных культур применяли метод ПЦР в режиме реального времени.

Результаты. Приближенное значение среднегодового темпа прироста равнялось 5,85 %. Показано, что привлечение молекулярно-генетического анализа существенно дополняет фенотипи-

© Румянцева М.А., Коломойцев А.В., Карпунина Т.И., Елькин В.Д., 2017

тел. +7 (342) 226 58 71

e-mail: mashagreat@mail.ru

[Румянцева М.А. (контактное лицо) – аспирант кафедры дерматовенерологии; Коломойцев А.В. – кандидат медицинских наук, доцент кафедры дерматовенерологии; Карпунина Т.И. – доктор биологических наук, профессор кафедры микробиологии и вирусологии с курсом клинической лабораторной диагностики; Елькин В.Д. – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой дерматовенерологии].

ческий мониторинг *N. gonorrhoeae*, что позволяет оценить генетическое разнообразие и механизмы устойчивости к антибактериальным препаратам штаммов, циркулирующих на административной территории.

Выводы. Первый опыт подобных исследований показал генетическое разнообразие *N. gonorrhoeae*, циркулирующих в Пермском крае, и выявил ряд особенностей распространенности генов, детерминирующих их чувствительность/резистентность к АМП.

Ключевые слова. Мониторинг, *N. gonorrhoeae*, фенотипические и молекулярно-генетические методы анализа.

Aim. To study the biological peculiarities of *N.gonorrhoeae* strains, isolated from patients of Perm Krai.

Materials and methods. Gonococcal infection sickness rate for 2010–2015 in Perm Krai was analyzed using intensive indices. Sixty clinical *N.gonorrhoeae* strains were used in this work. Primary identification of cultures was carried out at Regional Venereologic Dispensary using bacterioscopic and bacteriological methods with standard surgical procedures. To confirm the species belonging of isolated cultures, PCR method in real-time mode was applied.

Results. An approximate value of the average annual increase was 5,85 %. It was shown that use of molecular-genetic analysis essentially adds to phenotypical monitoring of *N.gonorrhoeae* that permits to assess genetic variety and mechanisms of resistance to antibacterial agents of the strains, circulating throughout the administrative territory.

Conclusions. The first experience of such studies showed genetic variety of *N.gonorrhoeae*, circulating in Perm Krai, and revealed a number of peculiarities of gene prevalence, determining their sensibility/resistance to antimicrobial drugs.

Key words. Monitoring, *N.gonorrhoeae*, phenotypical and molecular-genetic methods of analysis.

ВВЕДЕНИЕ

Гонококковая инфекция (ГИ) с ее доминирующей манифестной формой – острой генитальной гонореей – одна из самых распространенных бактериальных инфекций, передаваемых половым путем, заболеваемость которой, несмотря на использование эффективных противо гонококковых препаратов, остается трудно контролируемой. На ее эпидемиологию влияют многочисленные факторы: демографические, социально-экономические, сексуальное поведение и культура населения. Однако «неуправляемость» ГИ определяется в первую очередь свойствами ее возбудителя, важнейшее из которых – постоянная изменчивость антиген-

ных детерминант микроорганизма, а также быстрое изменение его чувствительности к антибактериальным препаратам [1]. Антигенная изменчивость *Neisseria gonorrhoeae* ведет к тому, что перенесенная инфекция не оставляет после себя иммунологической защиты и делает пока невозможным создание вакцинных препаратов, весьма успешно работающих при инфекциях с широким распространением. Невозможность эффективного воздействия на третье звено эпидемического процесса вынуждает исследователей к совершенствованию старых и поиску новых путей, оказывающих влияние на распространение этой инфекции. В свете охарактеризованных выше аспектов анализируемой проблемы становится очевидной значимость микробиологиче-

ского мониторинга штаммов *N. gonorrhoeae*, циркулирующих в отдельных субъектах Российской Федерации, с учетом рационального использования современных методов бактериологического анализа.

Цель работы – изучение биологических особенностей штаммов *N. gonorrhoeae*, изолированных от больных в Пермском крае.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовано 60 клинических штаммов *N. gonorrhoeae*. Первичная идентификация культур проведена в ККВД бактериоскопическим и бактериологическим методами в соответствии со стандартными операционными процедурами «Проведение видовой идентификации возбудителя гонореи» (СОП № 003/02 ГОН, СОП № 004/02 ГОН, СОП № 005/02 ГОН). Выделение ДНК осуществляли методом R. Boom et al. (1990). Для подтверждения видовой принадлежности изолированных культур применяли метод ПЦР в режиме реального времени с использованием коммерческой тест-системы производства АО «Вектор-Бест» (кат. № D-4498, РУ № ФСР 2016/4015) на детектирующем амплификаторе CFX 96 (BioRad, США). Режимы термостатирования и параметры оценки результатов задавались автоматически согласно рекомендуемому производителем программному обеспечению «Реал Бест Диагностика. Версия 4.1» («Вектор-Бест», Россия). Предварительная оценка генетического разнообразия *N. gonorrhoeae* выполнена с помощью RAPD-ПЦР с праймерами D11344 и D8635, адаптированными для типирования гонококков [4]. Для амплифика-

ции фрагментов генов, имеющих prognostическую ценность при оценке антибиотикорезистентности *N. gonorrhoeae* (bla, tet(M), ermB, mefA), использовали праймеры, рекомендованные В.А. Верещагиным [2]*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Лабораторная диагностика гонореи в Пермском крае, как и в целом по России, базируется на двух основных методах исследования: бактериоскопическом и бактериологическом. Выявление гонококка в препаратах, окрашенных метиленовым синим и по методу Грама, возможно лишь при наличии в патологическом отделяемом типичных форм возбудителя и при правильной его окраске. Однако в препаратах нередко встречаются гонококки с измененными морфологическими и тинкториальными свойствами. Кроме того, при вялотекущих формах гонореи диагностика осложняется либо обилием сопутствующей микрофлоры, затрудняющей поиск гонококка, либо малым количеством возбудителя гонореи в патологическом материале.

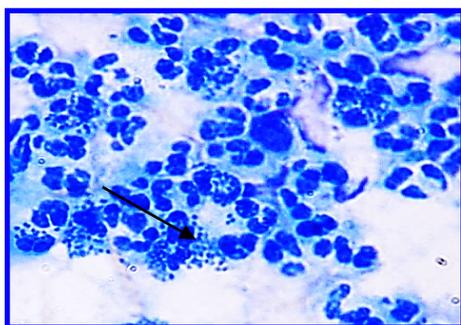
Предпринятое нами изучение 38 штаммов, изолированных от мужчин, и 22 – от женщин, позволило установить следующее. Бактериоскопическое исследование оказалось результативным в 100 % случаев

* Авторы выражают искреннюю признательность за помощь в проведении и анализе результатов молекулярно-генетических исследований доктору медицинских наук, старшему научному сотруднику Лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии ИЭГМ УрО РАН М.В. Кузнецовой и кандидату медицинских наук, заведующему лабораторией иммуногенетики ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» Роспотребнадзора А.В. Кривцову.

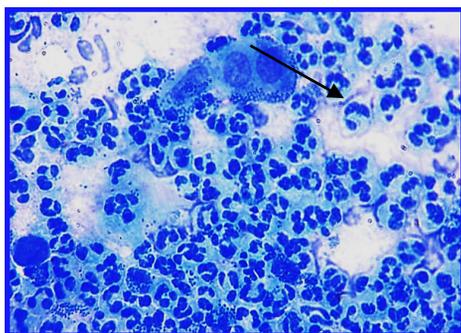
изучения «мужских» мазков с выявлением типичных морфотипов с преимущественно внутриклеточной локализацией возбудителя (рис. 1, а).

Только в 12 из 22 образцов вагинально-цервикального отделяемого были обнаружены грамтрицательные диплококки бобовидной формы (рис. 1, б). Важно подчеркнуть,

пестротой с обилием цитологических вариантов, отражающих особенности, в том числе различную степень выраженности патологического процесса. В составе эпителиальных пластов присутствовали клетки разной степени дифференцировки: от представителей базального и парабазального слоев (их большинство) до поверхностных (рис. 2, а).



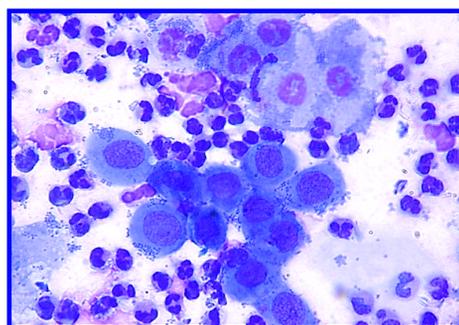
а



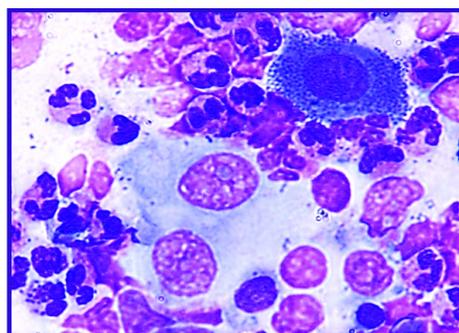
б

Рис. 1. Микроскопическая картина в образцах отделяемого уретры (а) и вагинально-цервикальной слизи (б) мужчин и женщин, больных острой гонореей ($\times 100$)

что в препаратах отмечены различия в размерах клеток, образующих пару. Внутриклеточную локализацию возбудителей регистрировали спорадически, напротив, в полях зрения преобладали гонококки, адгезированные на эпителиальных клетках. Микроскопическая картина при этом характеризовалась



а



б

Рис. 2 Цитологический «пейзаж» образцов вагинально-цервикальной слизи женщин, больных острой гонореей (Ч100)

В значительном количестве мазков регистрировали обилие лимфоцитов, что указывало на длительное течение заболевания. Хотя признаки воспалительной реакции были налицо, цитологическая картина отличалась пестротой клеточных морфотипов, за которыми, зачастую, не удавалось увидеть не только диплококки бобовидной формы, но и про-

чую вагинально-цервикальную микрофлору. Нередко встречали «усыпанные» бактериями эпителиальные клетки, напоминающие «ключевые», встречающиеся при бактериальном вагинозе. Однако в подобных случаях дифференцировать таксономическую принадлежность бактерий с помощью обычного светового микроскопа, как правило, не представлялось возможным (рис. 2, б).

Посев биологического материала на не-селективные питательные среды позволил обнаружить колонии, «подозрительные» на гонококки (положительный оксидазный тест), во всех «мужских» образцах и лишь в 40,9 % «женских». Посевы отделяемого из уретры мужчин характеризовались типичным единообразием сформировавшихся колоний: от 1 до 3 мм в диаметре, округлые, выпуклые, с ровным краем, бесцветные, чаще непрозрачные или слегка мутные, с блестящей поверхностью. При культивировании образцов вагинально-цервикальной слизи внешний вид колоний отличало значительное разнообразие. Морфометрические показатели колебались в пределах от 0,6 до 4,7 мм в диаметре. Более того, если формирование колоний в первом случае происходило в течение 24–48 часов, то во втором – появление вновь образовавшихся колоний отмечали до 5–6-х суток. К концу периода наблюдения появлялись особенно мелкие колонии, напоминающие капли росы. Микроскопическое исследование материала из колоний, окрашенного по Граму, в определенном смысле дополнило информацию, полученную при микроскопии нативного материала. В «мужских» мазках регистрировалась однотипная картина: компактно упакованные, особенно в центральной части, скопления грамотрицательных дипло-

кокков, что косвенно указывает на наличие у бактерий пилей и/или Ора-белка. В то же время в колониях, сформировавшихся при посевах вагинально-цервикальной слизи, отмечали выраженный полиморфизм кокков как по форме, так и по размерам. В мазках обнаруживали полиморфную флору, в том числе округлые грамотрицательные бактерии, по размерам – от мелких до гигантских. Интенсивность окраски клеток также варьировалась в широких пределах. Зачастую гонококки находились в ассоциации с грамотрицательными палочками, притом, что на чашках колонии выглядели однородно, и попытки разобщить («рассеять») представителей разных таксонов не приносили желаемого результата. В колониях, появившихся на 5–6-е сутки, отмечали очень мелкие разрозненные полиморфные бактерии, что характерно для ауксотрофных вариантов.

Как показали наши исследования [3], в Пермском крае фенотипическая чувствительность/резистентность к антибактериальным препаратам изученных штаммов *N. gonorrhoeae*, изолированных от мужчин и женщин, не имела достоверной разницы. Установлена высокая чувствительность возбудителей инфекции к цефтриаксону, спектиномицину, что коррелирует с общероссийскими данными, при этом клиническая эффективность цефалоспоринов оказалась выше при лечении мужчин. Более 80 % штаммов *N. gonorrhoeae* проявляли устойчивость к ампициллину, доксициклину и азитромицину, что, в соответствии с критериями ВОЗ, делает нецелесообразным их использование для лечения гонореи в Пермском крае.

В соответствии с задачей совершенствования микробиологической диагностики и

мониторинга гонококковой инфекции нами впервые была предпринята попытка изучения и анализа молекулярно-генетических особенностей штаммов *N. gonorrhoeae*, циркулирующих на территории субъекта. Для формирования коллекции образцов ДНК клинических изолятов *N. gonorrhoeae* было отобрано 27 культур, видовая принадлежность которых подтверждена методом ПЦР в режиме реального времени с использованием коммерческой тест-системы про-

изводства АО «Вектор-Бест». Предварительная оценка генетического разнообразия *N. gonorrhoeae* выполнена с помощью RAPD-ПЦР с праймерами D11344 и D8635, которые, согласно М. Van Looveren et al. [4], имели достаточную дискриминирующую способность (ДИ = 0,849) для региональных исследований. По результатам RAPD-типирования отобрано 25 штаммов *N. gonorrhoeae*, имеющих индивидуальный генетический профиль (рис. 3).

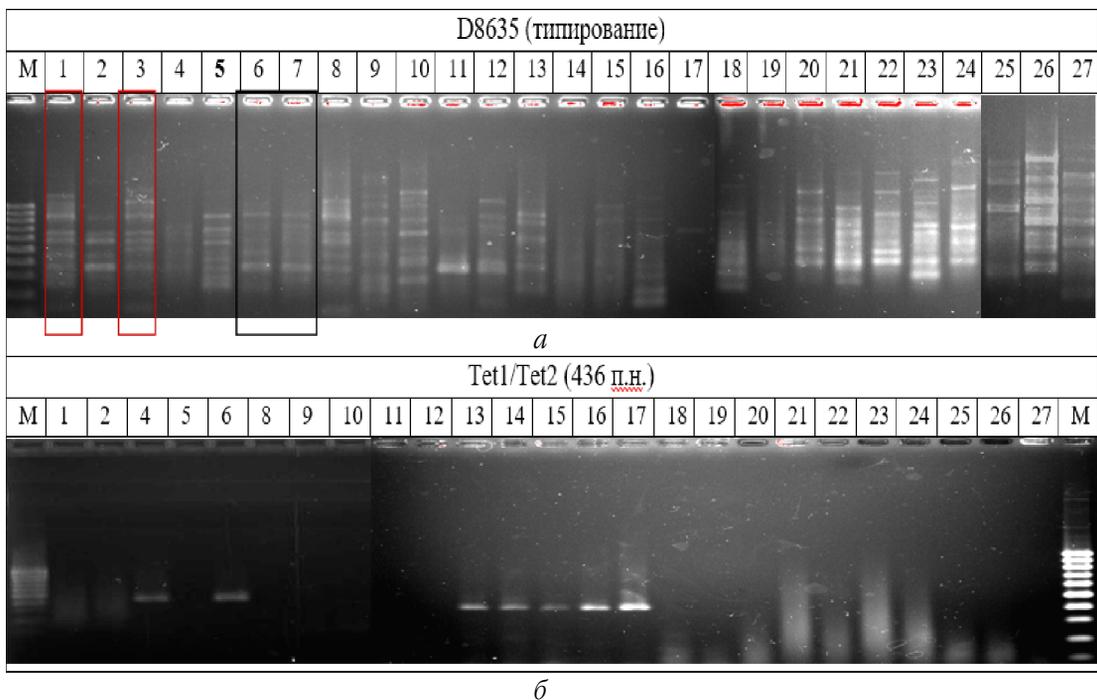


Рис. 3. Электрофореграммы продуктов RAPD-ПЦР клинических изолятов *N. gonorrhoeae*: а – с праймером D8635; б – пример продуктов амплификации гена *tet* (М – маркер молекулярных масс 100 bp)

Полное совпадение результатов в образцах 1 и 3, а также 6 и 7 (рис. 3, а), очевидно, связано с тем, что эти образцы были изолированы от контактных больных. При сравнении профиля чувствительности к антимикробным препаратам (АМП) с частотами обнаружения соответствующих генетических мар-

керов устойчивости установлено, что по данным тестов на чувствительность к пенициллину, тетрациклину и макролидам в исследованной группе 22 (88 %), 3 (12 %) и 7 (28 %) штаммов относились к категории резистентных. Частота обнаружения генетических маркеров устойчивости составила:

*bla*_{TEM-1} – 4 % (1 из 25), *tet*(M) – 36 % (9 из 25), *ermB* – 20 % (5 из 25), *mefA* – 4 % (1 из 25 штаммов). У 4 штаммов выявлено сочетание *tet*(M)+*ermB*, у одного *bla*_{TEM-1}+*tet*(M)+*mefA*. Отсутствие выбранных маркеров резистентности наблюдалось в 60 % случаев (15 штаммов). Таким образом, несмотря на высокую устойчивость нейссерий к бета-лактамам антибиотикам и тетрациклину, *bla*_{TEM-1} детектировали только в одном случае. Плазмидный ген *tet*(M), продукт которого защищает малую субъединицу рибосомы, – у 9 штаммов (рис. 3, б). Устойчивость к макролидам в большей степени обеспечена метилированием рибосом, чем с эфлюксом.

Результаты мониторинга антибиотикорезистентности *N. gonorrhoeae* показали, что при отсутствии значимых региональных отличий в антибиотикостойкости с гонококками, изолированными на других территориях Российской Федерации, следует отметить, что в Пермском крае более высокий процент культур *N. gonorrhoeae*, несущих генетические детерминанты *tetM* и *ermB*.

Выводы

Одним из способов устранения сохраняющихся проблем по контролю над распространением генитальной гонореи может стать внедрение в медицинскую практику молекулярно-генетических методов диагностики. Первый опыт подобных исследований показал генетическое разнообразие *N. go-*

norrbhoeae, циркулирующих в Пермском крае, и выявил ряд особенностей распространенности генов, детерминирующих их чувствительность/резистентность к АМП.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Администрации Пермского края в рамках научного проекта «р_а 17-44-590404».

Библиографический список

1. Костюкова Н.Н., Бехало В.А. Эпидемиологический процесс гонококковой инфекции – анализ и современные тенденции. Эпидемиология и вакцинопрофилактика 2012; 62 (1): 40–48.
2. Верещагин В.А. Молекулярное типирование клинических штаммов *Neisseria gonorrhoeae*: автореф. дис. ... канд. биол. наук. М. 2006; 29.
3. Румянцева М.А., Елькин В.Д. Сравнительная оценка чувствительности клинических изолятов *Neisseria gonorrhoeae* к антибактериальным препаратам. Пермский медицинский журнал 2015; 32 (1): 51–55.
4. Van Looveren M., Ison C.A., Ieven M. Evaluation of the discriminatory power of typing methods for *Neisseria gonorrhoeae*. Clin Microbiol 1999; 37 (7): 2183–2188.

Материал поступил в редакцию 25.05.2017