

А. Н. Хархаль, Л. П. Титов, О. О. Янович

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

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭВОЛЮЦИЯ ФРАГМЕНТОВ 7 ГЕНОВ «ДОМАШНЕГО ХОЗЯЙСТВА», ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В СМЕХЕ МУЛЬТИЛОКУСНОГО СИКВЕНС-ТИПИРОВАНИЯ МЕНИНГОКОККОВ

Аннотация. Изучен характер генетической изменчивости фрагментов генов «домашнего хозяйства» (ГДХ) менингококков, циркулирующих в популяции населения Беларуси.

Секвенирование 7 ГДХ проводили по Сэнгеру (ABI3500). Филогенетические связи определяли с помощью программы MEGA X. SNPs анализировали онлайн на платформе базы данных в pubMLST.org.

Показано, что менингококки, циркулировавшие в Беларуси в 2011–2018 гг., содержат 17 аллелей фрагмента гена *abcZ* (5,9 % впервые выявленных в Беларуси – *abcZ* 1016), кодирующих 5 вариантов АВС-переносчика; 16 аллелей гена фрагмента *adk* – 2 варианта аденилатциклазы; 17 аллелей *aroE* (11,8 % «белорусских» – *aroE* 944 и *aroE* 972) – 14 вариантов шикимат дегидрогеназы; 24 аллели *fumC* (4,2 % «белорусских» – *fumC* 988) – 4 варианта фумарат дегидратазы; 18 аллелей *gdh* (16,7 % впервые выявленных в Беларуси – *gdh* 560, *gdh* 985 и *gdh* 1083) – 4 варианта глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы; 18 аллелей *pdhC* – 11 вариантов субъединицы пируватдегидрогеназы и 20 аллелей *pgm* – 13 вариантов фосфоглюкомутазы (5,6 и 5 % «белорусских» аллелей соответственно – *pdhC* 888 и *pgm* 1099). Доминирующие аллели: *abcZ* 8 – 25 %, *adk* 5 – 30, *aroE* 6 – 28,3, *fumC* 17 – 30, *gdh* 560 – 20, *pdhC* 18 – 21,7, *pgm* 2 – 25 %.

Установлено, что популяция менингококков, циркулирующих среди населения Беларуси, разнообразна и включает как локальные аллели фрагментов ГДХ (7,7 %), так и аллели, выявленные у менингококков в других странах (92,3 %). Количество SNPs в ГДХ варьируется от 29 (*adk*) до 125 (*aroE*). Полиморфизм ГДХ носит, как правило, синонимичный характер, приводя к аминокислотным заменам в диапазоне от 0,6 % случаев во фрагменте гена аденилатциклазы до 26,4 % в шикимат дегидрогеназе.

Ключевые слова: менингококк, гены «домашнего хозяйства», аллели, рекомбинация, SNPs, эволюция

Для цитирования: Хархаль, А. Н. Молекулярная эволюция фрагментов 7 генов «домашнего хозяйства», используемых в смехе мультилокусного сиквенс-типирования менингококков / А. Н. Хархаль, Л. П. Титов, О. О. Янович // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2020. – Т. 17, № 3. – С. 301–319. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2020-17-3-301-319>

Hanna N. Kharkhal, Leonid P. Titov, Olga O. Yanovich

Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Republic of Belarus

MOLECULAR EVOLUTION OF THE MENINGOCOCCAL FRAGMENTS OF 7 HOUSE-KEEPING GENES

Abstract. The objective of the article was to determine the variability of meningococcal house-keeping gene alleles circulating in Belarus.

House-keeping genes sequencing was made by Sanger (ABI 3500). The phylogenetic analysis was done in MEGA X. SNPs were analyzed at pubMLST.org.

60 Belarusian meningococci, collected during 8 years, contain 17 alleles of *abcZ* gene (5.9 % first identified in Belarus – *abcZ* 1016) encoding 5 variants of the ABC transporter; 16 *adk* gene alleles – 2 variants of adenylate cyclase; 17 alleles of *aroE* gene (11.8 % Belarusian – *aroE* 944 and *aroE* 972) – 14 variants of shikimat dehydrogenase; 24 alleles of *fumC* gene (4.2 % Belarusian – *fumC* 988) – 4 variants of fumarate dehydratase; 18 alleles of *gdh* gene (16.7 % first identified in Belarus – *gdh* 560, *gdh* 985 and *gdh* 1083) – 4 variants of glucose-6-phosphate dehydrogenase; 18 alleles of *pdhC* gene – 11 variants of pyruvate dehydrogenase subunit and 20 alleles of *pgm* gene – 13 variants of phosphoglucumutase (5.6 and 5 % of Belarusian alleles – *pdhC* 888 and *pgm* 1099 respectively). Dominant alleles are *abcZ* 8 – 25 %, *adk* 5 – 30, *aroE* 6 – 28.3, *fumC* 17 – 30, *gdh* 560 – 20, *pdhC* 18 – 21.7, *pgm* 2 – 25 %.

The Belarusian meningococcal population is diverse and includes both its own house-keeping gene alleles (7.7 %) and those circulating in other countries (92.3 %). The number of SNPs is varied from 29 (*adk*) to 125 (*aroE*). Single nucleotide

polymorphisms are mostly synonymous and, on average, lead to amino acid substitutions in the range from 0.6 % in adenylate cyclase and up to 26.4 % in shikimate dehydrogenase.

Keywords: meningococcus, house-keeping genes, alleles, recombination, SNPs, evolution

For citation: Kharkhal H. N., Titov L. P., Yanovich O. O. Molecular evolution of the meningococcal fragments of 7 house-keeping genes. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2020, vol. 17, no. 3, pp. 301–319 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2020-17-3-301-319>

Введение. Нормальная микрофлора носоглотки человека многообразна и представлена родами *Moraxella* (40 %), *Haemophilus* (20 %), *Streptococcus* (12 %), *Flavobacterium* (10 %), *Dolosigranulum* (5 %), *Corynebacterium* (2 %), *Neisseria* (2 %) и *Fusobacterium* (1 %) [1]. Наиболее частыми представителями рода *Neisseria* назофарингеального микробиома человека являются *N. perflava*, *N. sicca*, *N. mucosa*, *N. flava*, *N. cinerea*, *N. lactamica*, *N. flavescens*, *N. subflava* и *N. meningitidis* [2]. Менингококки способны справляться с изменяющимися концентрациями кислорода и с ограничениями в доступе к ключевым питательным веществам (аминокислотам и сере), что позволяет им успешно заселять носоглотку человека, выступая в качестве единственной экологической ниши [3]. Человеческий микробиом в целом считается полезным для хозяина благодаря стимуляции иммунной системы и защитных функций слизистой оболочки, которые обеспечивают «устойчивость к колонизации» патогенных микроорганизмов [1]. Традиционно проводились исследования по поиску факторов вирулентности у изолятов, ассоциированных с генерализованной формой менингококковой инфекции (ГФМИ), однако многие установленные факторы вирулентности были обнаружены также у непатогенных видов, таких как *N. lactamica* [4], изоляты которой могут использоваться в качестве альтернативного подхода к профилактике менингококковой инфекции [5], так как предполагается, что носительство *N. lactamica* приводит к стимуляции иммунитета против менингококков [6]. Паразитические микробы эволюционируют быстрее, чем их хозяева, поскольку скорость репродукции и способность генома к изменчивости у них многократно выше [7].

Менингококки образуют на эпителиальных клетках био пленку, которая состоит из экзополисахаридного волокнистого матрикса, имеет толщину до 50–60 мкм, содержит каналы, обеспечивающие питанием заключенные в матрикс бактерии [8–10]. Пластичность менингококка, его приспособляемость к изменяющимся условиям внешней среды определяются генетической неоднородностью или гетерогенностью популяции возбудителя [11], обусловленной высокой частотой мутаций, скоростью рекомбинации, возможностью захвата ДНК из окружающей среды [12–15]. Геном *N. meningitidis* в среднем состоит из 2,13 млн пар оснований (GC-состав – 51,7 %) и содержит от 2015 до 2393 генов, кодирующих до 2665 белков (NCBI, 1973 аннотированных генома) [16]. Кор-геном менингококка имеет предположительно 1630 ± 62 гена [17].

В микробных сообществах происходят как геноспецифические, так и геномно-селективные процессы, являющиеся частью процессов адаптации. Адаптация представляет собой комплексный процесс (регуляция, эпигенетические события, рекомбинации и мутации), с помощью которого организм или вид приспособляется к выживанию в занимаемой экологической нише [18]. Изменения единичных нуклеотидов вызываются точечными мутациями – SNP (однонуклеотидный полиморфизм) [19], тогда как вставки/делеции нуклеотидов обусловлены, вероятно, событиями рекомбинации участков ДНК [13]. Гомологичная рекомбинация – это метаболический процесс, который обеспечивает высокоточное восстановление сложных повреждений ДНК [20]. Комменсалы и непатогенные виды бактерий служат резервуарами аллелей вирулентности и активно участвуют в обмене генами и фрагментами генов, в основном посредством гомологичной рекомбинации [4]. Системы рестрикции-модификации могут не только обеспечивать защиту от чужеродной ДНК, но и играть важную роль при генетическом обмене [4, 17]. Так, менингококковые белки системы CRISPR-Cas II типа помимо участия в создании адаптивного иммунитета участвуют в процессах регуляции экспрессии генов, генов группового поведения, изменения вирулентности за счет модификации поверхностных структур, в ремоделировании генома и репарации ДНК [21].

На эффективность адаптации на молекулярно-генетическом уровне большое влияние оказывают условия, в которых существовала популяция до воздействия стрессорного фактора или

смены экологической ниши: интенсивность воздействия фактора, фаза роста, размер и плотность популяции, стадия жизнедеятельности бактерий (планктон, подвижная форма, биопленка), фенотипическая гетерогенность популяции [18]. В то же время один и тот же стрессорный фактор может оказывать различные эффекты на разные типы изменчивости [22]. К адаптационным процессам относится также «питательная вирулентность», включающая конкретные механизмы использования продуктов основных биосинтетических путей хозяина [3].

Цель настоящего исследования – изучение характера генетической изменчивости фрагментов 7 генов «домашнего хозяйства» (ГДХ) менингококка, поступивших в Республиканскую референс-лабораторию по диагностике инвазивных бактериальных заболеваний (лаборатория клинической и экспериментальной микробиологии РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, приказ МЗ РБ № 1102 от 20.09.2012) из учреждений здравоохранения страны за период с 2011 по 2018 г.

Материалы и методы исследования. Материалом для исследования являлись 60 изолятов *N. meningitidis*, выделенных в период с февраля 2011 г. по май 2018 г. из биологического материала пациентов с ГФМИ и бактерионосителей из различных регионов Беларуси (Минск – 45 %, Брестская обл. – 20; Могилевская обл. – 16,7; Витебская обл. – 8,3; Гродненская обл. – 5; Минская обл. – 3,3 и Гомельская обл. – 1,4 %). Распределение по годам следующее: 2011 г. – 6,7 %; 2013 г. – 21,7; 2014 г. – 8,3; 2015 г. – 10; 2016 г. – 11,7; 2017 г. – 34,9; 2018 г. – 6,7 %. Изоляты были получены от лиц мужского и женского пола (63 и 37 % соответственно) в возрасте от 5 мес. до 62 лет (средний возраст – 14,5 лет, межквартильный размах – 1 год и 1 мес.–21 год).

Культивирование микроорганизмов осуществляли на GC-агаре (Conda, Испания) с добавлением 20 %-ной лошадиной сыворотки крови («Химмедсинтез», Беларусь), а также VCNT (Himedia, Индия) в CO₂-инкубатор (37 °C) и 5–10 % CO₂ в течение 20–24 ч. ДНК из культур менингококка получали путем кипячения при 100 °C в течение 10 мин ресуспензированной 18–24-часовой культуры (3,0 McF) в 10 mM Трис-буфере (pH 8,0) (Fermentas, Латвия), после чего пробирки центрифугировали при 12 000 об/мин в течение 4 мин. ДНК из образцов биологического материала (спинномозговая жидкость (СМЖ), кровь, ткани мозга) экстрагировали с помощью коммерческих наборов innuPREP Blood DNA Mini Kit (Analyticjena, Германия) и NucleoSpin® Blood Mini Kit (Macherey-Nagel, Германия) согласно инструкциям производителя.

Молекулярно-генетическую идентификацию изолятов проводили методом ПЦР в режиме реального времени с детекцией видоспецифического гена супероксиддисмутазы *S* (*sodC*) на амплификаторе Rotor-gene 3000 (Corbett Research, Австралия) с установленной программой: 1 цикл при 95 °C 10 мин, далее 45 циклов при 95 °C 15 с и при 60 °C 60 с с детекцией флуоресценции на канале FAM [23]. Амплификацию 7 ГДХ проводили в 25 мкл смеси, содержащей 0,25 мкл HF ДНК-полимеразы и 10 мкл 10×-буфера HF (Институт микробиологии НАН Беларуси), 20 мкМ праймеры (*abcZ*: F: tgttccgcttcgactgccaaac, R: tccccgctgtaaaaaacaatc; *adk*: F: ccaagccgtgtagaatcgtaaacc, R: tgcccaatcgcccaatac; *aroE*: F: ttgaaacagcggttgccg R: cagcgtaatccagtcgac; *fumC*: F: tccccgctgaaagccctg, R: gccctgcagcaagcccaac; *gdh*: F: ctgccccggggtttcatct, R: tgttgccgttattcaagaagg; *pdhC*: F: ccggccgtacgacgctgaac, R: gatgtcggaatggggcaaca; *pgm*: F: ctcaaacctacgacatccg R: cggattgcttcgatgacggc) [23], 2 мкл ДНК и необходимый объем воды для ПЦР. Температурно-временной режим на амплификаторе PCR Express (Hybaid, США): 1 цикл при 94 °C в течение 2 мин, 35 циклов при 94 °C по 1 мин, при 62 °C 40 с и при 72 °C 2 мин, 1 цикл при 72 °C в течение 1 мин. Детекцию продуктов ПЦР осуществляли в 2 %-ном агарозном геле после проведения электрофореза в течение 50 мин при напряжении 7 В/см. ДНК из геля выделяли, используя коммерческие наборы QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen, Германия) и «АртДНК MiniSpin Гель» («Артбиотех», Беларусь). Для проведения реакции циклического секвенирования использовали коммерческий набор BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США), применяя для очистки продуктов метод пересадки. Гель-электрофорез с детекцией нуклеотидной последовательности проводили в генетическом анализаторе AB3500 (Applied Biosystems, США). Аллель каждого из фрагментов 7 ГДХ определяли путем ее сравнения с имеющимися в базе PubMLST данными (<http://pubmlst.org/>), в случае определения новой аллели гена подавали заявку на регистрацию [24]. Для филогенетического анализа новых аллелей ГДХ менингококка использовали метод

17 alleles included in analysis. 75 polymorphic sites found.

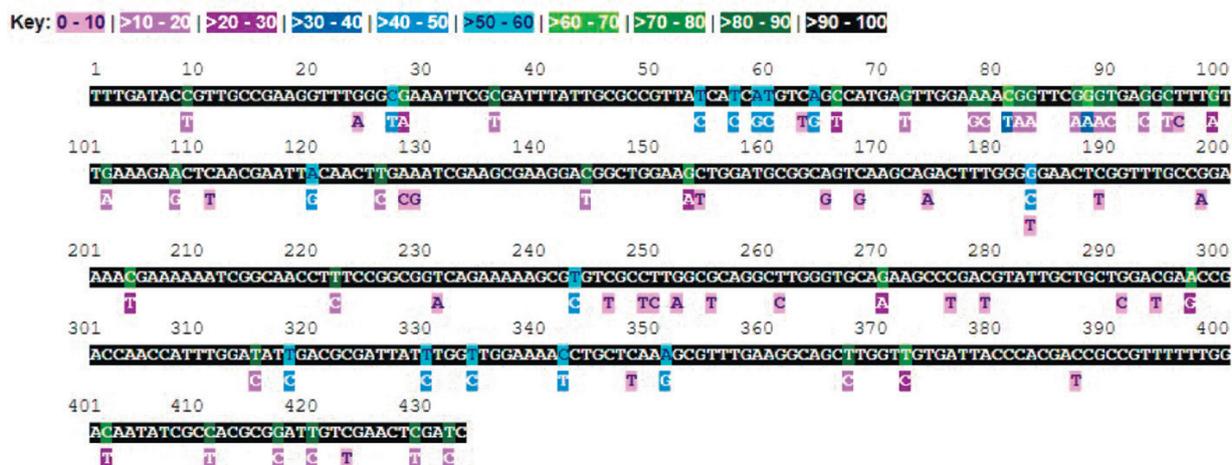


Рис. 1. Определение сайтов полиморфизма аллелей фрагмента гена *abcZ*. Цветовые коды обозначают вероятность появления нуклеотида в конкретной позиции (pubMLST.org)

Fig. 1. Determining SNPs in the *abcZ* gene. The color codes represent the percentage of alleles that have a particular nucleotide at each position (pubMLST.org)

Neighbor-Joining (программа MEGA X версии 10.0.5) [25], позволяющий определить их родство с существующими в мире аллелями *N. meningitidis* с помощью последовательностей фрагментов ГДХ *N. lactamica* и *N. gonorrhoeae* в качестве контролей. GC-состав каждой аллели определяли онлайн (www.endmemo.com/bio/gc.php), сайты полиморфизма для каждого фрагмента ГДХ – с использованием встроенных в pubMLST алгоритмов Polymorphic sites [24] с последующим разделением SNPs на транзиции и трансверсии (рис. 1). Частоту транзиций (P) и трансверсий (Q) определяли по описанным ранее формулам [26].

Перевод нуклеотидной последовательности в аминокислотную проводили онлайн (<https://web.expasy.org/translate/>). Выравнивание и анализ аминокислотных последовательностей осуществляли с помощью программы MEGA X версии 10.0.5 [25], ввод, статистическую обработку и анализ данных – с использованием пакета программ Microsoft Office, version 16.0. Для статистической оценки использовали критерий χ^2 . Различия считали статистически достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Молекулярные изменения в структуре фрагментов ГДХ, как правило, являются нейтральными, так как большинство протеиногенных аминокислот кодируются более чем одним кодоном. Тем не менее некоторые нуклеотидные вариации могут приводить к аминокислотным заменам, что может способствовать появлению высокоинвазивных вариантов патогена [27, 28].

Аллели, встречавшиеся у менингококков на территории Беларуси ранее (2006–2010) [17, 29, 30], были выявлены также в нашем исследовании. Данные аллели принадлежали большинству менингококков, различий в частоте встречаемости за оба периода не обнаружено ($p > 0,05$). Количество аллелей фрагментов генов не соответствует количеству вариантов экспрессируемого продукта и варьируется в среднем от 1,2 до 8 аллелей на один вариант фрагмента белка (табл. 1). Наиболее часто встречающиеся в белках аминокислоты лейцин и серин кодируются шестью кодонами; аланин, валин, глицин и цистеин – двумя-четырьмя; метионин и триптофан – одним [28]. Максимальное аллельное разнообразие характерно для фрагмента гена *fumC* – 24 аллели, которые кодируют лишь 4 варианта фумарат гидратазы, т. е. на один вариант аминокислотной последовательности приходится в среднем 6 аллелей *fumC*. Максимальное белковое разнообразие отмечено у шикимат дегидрогеназы, у которой в среднем один вариант аминокислотной последовательности кодируется 1–2 аллелями фрагмента гена *aroE*. Существует зависимость между GC-составом нуклеотидной последовательности и аминокислотным составом кодируемого белка (табл. 2): GC-богатые фрагменты чаще кодируют глицин, аланин, аргинин и пролин,

а GC-бедные – фенилаланин, тирозин, метионин, изолейцин, аспарагин и лизин [26]. Аминокислотный состав белка (его первичная структура) оказывает влияние на вторичную структуру. Для α -спирали характерны аланин, цистеин, лейцин, метионин, глутаминовая кислота, глутамин, гистидин и лизин. Образованию β -спирали чаще способствуют валин, изолейцин, фенилаланин, тирозин, триптофан и треонин, в местах изгиба полипептидной цепи – глицин, серин, аспарагиновая кислота, аспарагин, пролин и аргинин [29]. В свою очередь третичная структура белка определяет его функциональную активность.

Таблица 1. Характеристика ГДХ менингококка и кодируемых белков, встречающихся на территории Беларуси в 2011–2018 гг.

Table 1. Characteristics of the meningococcal house-keeping genes and encoded proteins found in Belarus in 2011–2018

Ген, длина фрагмента, число аллелей*	Аллели ГДХ менингококков
<i>abcZ</i> , 433 п. н., 1062/17 (1,6 %)	АВС-переносчик 1 (36,7 %) – <i>abcZ 8</i> , <i>abcZ 9</i> , <i>abcZ 689</i> АВС-переносчик 2 (26,7 %) – <i>abcZ 4</i> , <i>abcZ 5</i> , <i>abcZ 6</i> , <i>abcZ 20</i> , <i>abcZ 46</i> АВС-переносчик 3 (16,7 %) – <i>abcZ 2</i> , <i>abcZ 13</i> , <i>abcZ 1016</i> АВС-переносчик 4 (13,2 %) – <i>abcZ 3</i> , <i>abcZ 12</i> , <i>abcZ 25</i> , <i>abcZ 79</i> , <i>abcZ 180</i> АВС-переносчик 5 (6,7 %) – <i>abcZ 7</i>
<i>adk</i> , 465 п. н., 827/16 (1,9 %)	Аденилатциклаза 1 (96,7 %) – <i>adk 1</i> , <i>adk 3</i> , <i>adk 4</i> , <i>adk 5</i> , <i>adk 6</i> , <i>adk 7</i> , <i>adk 8</i> , <i>adk 9</i> , <i>adk 16</i> , <i>adk 17</i> , <i>adk 18</i> , <i>adk 35</i> , <i>adk 60</i> , <i>adk 80</i> , <i>adk 338</i> Аденилатциклаза 2 (3,3 %) – <i>adk 10</i>
<i>aroE</i> , 490 п. н., 1108/17 (1,5 %)	Шикимат дегидрогеназа 1 (28,3 %) – <i>aroE 6</i> Шикимат дегидрогеназа 2 (21,7 %) – <i>aroE 4</i> , <i>aroE 25</i> , <i>aroE 282</i> , <i>aroE 639</i> Шикимат дегидрогеназа 3 (11,7 %) – <i>aroE 9</i> Шикимат дегидрогеназа 4 (8,3 %) – <i>aroE 15</i> Шикимат дегидрогеназа 5–6 (по 6,7 %) – <i>aroE 10</i> , <i>aroE 7</i> Шикимат дегидрогеназа 7 (3,3 %) – <i>aroE 5</i> Шикимат дегидрогеназа 8 (3,3 %) – <i>aroE 1</i> Шикимат дегидрогеназа 9–14 (по 1,7 %) – <i>aroE 11</i> , <i>aroE 12</i> , <i>aroE 26</i> , <i>aroE 38</i> , <i>aroE 944</i> , <i>aroE 972</i>
<i>fumC</i> , 465 п. н., 1185/24 (2,0 %)	Фумарат гидратаза 1 (58,3 %) – <i>fumC 1</i> , <i>fumC 3</i> , <i>fumC 7</i> , <i>fumC 8</i> , <i>fumC 9</i> , <i>fumC 13</i> , <i>fumC 15</i> , <i>fumC 19</i> , <i>fumC 26</i> , <i>fumC 34</i> , <i>fumC 37</i> , <i>fumC 39</i> , <i>fumC 40</i> , <i>fumC 56</i> , <i>fumC 133</i> , <i>fumC 216</i> , <i>fumC 707</i> , <i>fumC 988</i> Фумарат гидратаза 2 (35 %) – <i>fumC 2</i> , <i>fumC 17</i> , <i>fumC 113</i> , Фумарат гидратаза 3 (5 %) – <i>fumC 4</i> , <i>fumC 264</i> Фумарат гидратаза 4 (1,7 %) – <i>fumC 18</i>
<i>gdh</i> , 501 п. н., 1140/18 (1,6 %)	Глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа 1 (58,3 %) – <i>gdh 3</i> , <i>gdh 5</i> , <i>gdh 8</i> , <i>gdh 21</i> , <i>gdh 25</i> , <i>gdh 67</i> , <i>gdh 560</i> Глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа 2 (31,7 %) – <i>gdh 1</i> , <i>gdh 6</i> , <i>gdh 9</i> , <i>gdh 10</i> , <i>gdh 11</i> , <i>gdh 17</i> , <i>gdh 22</i> , <i>gdh 985</i> , <i>gdh 1083</i> Глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа 3 (8,3 %) – <i>gdh 249</i> Глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа 4 (1,7 %) – <i>gdh 36</i>
<i>pdhC</i> , 480 п. н., 1076/18 (1,7 %)	Пируватдегидрогеназа 1 (25 %) – <i>pdhC 18</i> , <i>pdhC 32</i> , <i>pdhC 53</i> Пируватдегидрогеназа 2 (20 %) – <i>pdhC 6</i> , <i>pdhC 127</i> Пируватдегидрогеназа 3 (16,7 %) – <i>pdhC 3</i> , <i>pdhC 24</i> Пируватдегидрогеназа 4 (10 %) – <i>pdhC 4</i> Пируватдегидрогеназа 5 (6,7 %) – <i>pdhC 13</i> , <i>pdhC 40</i> , <i>pdhC 41</i> Пируватдегидрогеназа 6 (6,7 %) – <i>pdhC 22</i> , <i>pdhC 888</i> Пируватдегидрогеназа 7 (6,7 %) – <i>pdhC 1</i> Пируватдегидрогеназа 8 (3,3 %) – <i>pdhC 31</i> Пируватдегидрогеназа 9–11 (по 1,7 %) – <i>pdhC 10</i> , <i>pdhC 93</i> , <i>pdhC 105</i>
<i>pgm</i> , 450 п. н., 1159/20 (1,7 %)	Фосфоглюкомутаза 1 (25 %) – <i>pgm 8</i> , <i>pgm 15</i> , <i>pgm 30</i> , <i>pgm 120</i> , <i>pgm 152</i> Фосфоглюкомутаза 2 (25 %) – <i>pgm 2</i> Фосфоглюкомутаза 3 (18,3 %) – <i>pgm 9</i> , <i>pgm 16</i> , <i>pgm 18</i> , <i>pgm 74</i> Фосфоглюкомутаза 4 (10 %) – <i>pgm 6</i> Фосфоглюкомутаза 5 (5 %) – <i>pgm 21</i> Фосфоглюкомутаза 6 и 7 (по 3,3 %) – <i>pgm 3</i> , <i>pgm 464</i> Фосфоглюкомутаза 8 – 13 (по 1,7 %) – <i>pgm 1</i> , <i>pgm 12</i> , <i>pgm 13</i> , <i>pgm 20</i> , <i>pgm 121</i> , <i>pgm 1099</i>

* Приведено (через косую черту) общее число аллелей данного гена, выделенных в мире (pubMLST.org, 13.02.2020), и число аллелей, выявленных в белорусских изолятах; жирным шрифтом отмечены аллели, впервые выявленные в Беларуси; подчеркнуты аллели, встречавшиеся ранее у «белорусских» менингококков в 2006–2010 гг.

Таблица 2. Аминокислотный состав продуктов фрагментов ГДХ менингококка, n/%
 Table 2. Amino acid composition of proteins encoded by meningococcal house-keeping gene fragments, n/%

GC-состав аллелей, %	Аминокислоты			
	Неполярные	Незаряженные	Кислые	Основные
<i>АВС-переносчик, 144 АК</i>				
50,1	63/43,8	31/21,5	28/19,4	22/15,3
49,5	63/43,8	33/22,9	27/18,8	21/14,6
51,7	63/43,8	33/22,9	27/18,8	21/14,6
51,2	63/43,8	33/22,9	26/18,1	22/15,3
50,3	64/44,4	33/22,9	26/18,1	21/14,6
<i>Аденилатциклаза, 155 АК</i>				
52,5	61/39,4	36/23,2	33/21,3	25/16,1
51,8	61/39,4	36/23,2	33/21,3	25/16,1
<i>Шикимат дегидрогеназа, 163 АК</i>				
54,3	82/50,3	46/28,2	16/9,8	19/11,7
54,7	83/50,9	48/29,4	15/9,2	17/10,4
55,9	83/50,9	47/28,8	15/9,2	18/11,0
54,9	84/51,5	47/28,8	15/9,2	17/10,4
55,5	83/50,9	47/28,8	15/9,2	18/11,0
57,7	84/51,5	49/30,1	15/9,2	15/9,2
54,7	83/50,9	48/29,4	15/9,2	17/10,4
57,3	84/51,5	48/29,4	16/9,8	15/9,2
54,3	82/50,3	46/28,2	16/9,8	19/11,7
57,8	84/51,5	48/29,4	16/9,8	15/9,2
55,1	82/50,3	47/28,8	15/9,2	19/11,7
54,7	82/50,3	47/28,8	15/9,2	19/11,7
54,9	83/50,9	47/28,8	15/9,2	18/11,0
57,1	82/50,3	48/29,4	15/9,2	18/11,0
<i>Фумарат гидратаза, 155 АК</i>				
57,2	72/46,5	54/34,8	15/9,7	14/9,0
57,5	72/46,5	54/34,8	15/9,7	14/9,0
56,2	72/46,5	54/34,8	15/9,7	14/9,0
57,6	72/46,5	55/35,5	14/9,0	14/9,0
<i>Глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа, 167 АК</i>				
52,4	72/43,1	49/29,3	25/15,0	21/12,6
52,0	72/43,1	49/29,3	25/15,0	21/12,6
52,1	72/43,1	50/29,9	25/15,0	20/12,0
51,7	71/42,5	50/29,9	25/15,0	21/12,6
<i>Субъединица пируватдегидрогеназы, 160 АК</i>				
56,7	71/44,4	44/27,5	23/14,4	22/13,8
56,2	72/45,0	42/26,3	23/14,4	23/14,4
56,8	72/45,0	43/26,9	23/14,4	22/13,8
55,8	71/44,4	43/26,9	23/14,4	23/14,4
56,6	71/44,4	44/27,5	23/14,4	22/13,8
54,5	71/44,4	46/28,8	22/13,8	21/13,1
53,5	71/44,4	47/29,4	22/13,8	20/12,5
53,1	71/44,4	48/30,0	21/13,1	20/12,5

Окончание табл. 2

GC-состав аллелей, %	Аминокислоты			
	Неполярные	Незаряженные	Кислые	Основные
55,8	70/43,8	44/27,5	23/14,4	23/14,4
54,6	71/44,4	46/28,8	22/13,8	21/13,1
54,0	71/44,4	47/29,4	22/13,8	20/12,5
<i>Фосфоглюкомутаза, 150 АК</i>				
54,1	69/46,0	41/27,3	20/13,3	20/13,3
54,7	69/46,0	42/28,0	20/13,3	19/12,7
53,7	68/45,3	42/28,0	20/13,3	20/13,3
53,6	68/45,3	42/28,0	20/13,3	20/13,3
53,6	69/46,0	41/27,3	19/12,7	21/14,0
54,7	69/46,0	42/28,0	20/13,3	19/12,7
54,7	69/46,0	42/28,0	19/12,7	20/13,3
54,4	69/46,0	43/28,7	19/12,7	19/12,7
54,4	69/46,0	42/28,0	19/12,7	20/13,3
55,3	68/45,3	43/28,7	20/13,3	19/12,7
54,9	68/45,3	44/29,3	19/12,7	19/12,7
54,0	69/46,0	42/28,0	19/12,7	20/13,3
54,4	68/45,3	44/29,3	19/12,7	19/12,7

Примечание. неполярные аминокислоты – аланин, валин, лейцин, изолейцин, метионин, фенилаланин, триптофан, пролин; полярные гидрофильные незаряженные – глицин, треонин, цистеин, тирозин, серин, аспарагин, глутамин; кислые – аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота; основные – аргинин, гистидин, лизин.

Анализ фрагмента гена *abcZ*. Ген *abcZ* кодирует трансмембранный белок-переносчик, состоящий из трансмембранного и нуклеотид-связывающего доменов, и относится к эволюционно древнему суперсемейству АТФ-связывающих кассетных транспортеров [30]. При выполнении секвенирования фрагмента гена *abcZ* у 60 изолятов *N. meningitidis* идентифицировано 17 различных аллелей, GC-состав которых составлял в среднем 50,8 %. Выявленные аллели кодируют 5 аминокислотных вариантов АВС-переносчика. Наиболее часто встречающимися аллелями фрагмента гена *abcZ* являлись *abcZ* 8 (25,0 %), *abcZ* 2 (13,3 %), *abcZ* 6 и 9 (по 10,0 %). Носители аллелей *abcZ* 8, *abcZ* 2 и *abcZ* 9, впервые описанные в Нидерландах в 1960-х годах, в Беларуси циркулируют с 2006 г. Аллель *abcZ* 6 распространена среди менингококков в США с 1947 г., в Беларуси отмечена с 2009 г. на территории Витебской, Могилевской областей и г. Минска. Аллель *abcZ* 689, выявленная у MenW, полученного из отделяемого носоглотки 8-летней девочки в ноябре 2014 г. (г. Минск), была описана также в Китае в июле 2014 г. Аллели *abcZ* 79 и 180, появившиеся в Чехии в 1970-х годах, были отмечены в Беларуси в 2017 г. и составили 7,1 и 14,3 % соответственно от описанных в мире. Аллель *abcZ* 25 инвазивного MenB, выделенного в июне 2017 г. (г. Барановичи), составляет 1,5 % от всех описанных в мире менингококков с данной аллелью.

Аллель *abcZ* 1016 (GC – 52 %) впервые в мире найдена у изолята менингококка, полученного из отделяемого носоглотки 59-летнего мужчины в г. Могилев в 2017 г. (рис. 2), и встречается только на территории Беларуси. Аллель наиболее близка с другими вариантами, входящими в сиквенс-типы и образующими клональный комплекс CC-11, которые встречались в разных странах мира, в том числе вызывая вспышки ГФМИ (MenW) в Буркина-Фасо и Великобритании. Аллель *abcZ* 1016 филогенетически ближе к таковой у *N. lactamica*, чем у *N. gonorrhoeae*, что можно объяснить адаптацией к выживанию в одной экологической нише, и вместе с описанными ранее *abcZ* 2 и *abcZ* 13 кодирует один тип АВС-переносчика.

Аллели *abcZ* 2, *abcZ* 4, *abcZ* 6, *abcZ* 7, *abcZ* 9, *abcZ* 12 и *abcZ* 25, описанные ранее в Беларуси и составлявшие 60 % от исследованной популяции (12/20) [31], в анализируемый период также характерны для 80 % популяции менингококка ($p = 0,074$). Обнаруженные в 2006–2010 гг. аллели *abcZ* 11, *abcZ* 16, *abcZ* 24, *abcZ* 179, *abcZ* 207 и *abcZ* 451 в наблюдаемый период не циркулировали [31].

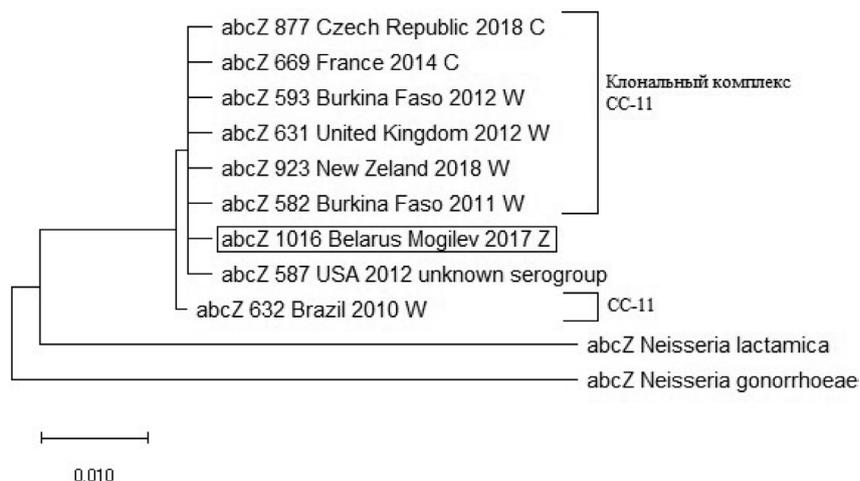


Рис. 2. Филогенетические связи новой аллели *abcZ* 1016 с наиболее близкими аллелями *Neisseria* spp. (MEGA X 10.0.5)

Fig. 2. Phylogenetic analysis of the new *abcZ* 1016 with the closest alleles of *Neisseria* spp. (MEGA X 10.0.5)

Белок, кодируемый описанными аллелями, в среднем почти наполовину (43,9 %) состоит из неполярных аминокислот. Наименьшая доля основных кислот – 14,9 %. Следует отметить, что в анализируемом белковом фрагменте не обнаружены аминокислоты метионин и цистеин (табл. 2).

Анализ фрагмента гена *adk*. Ген *adk* кодирует фермент аденилатциклазу, осуществляющую расщепление АТФ на пирофосфат и цАМФ, играющий роль вторичного посредника в сигнальных путях. При выполнении секвенирования фрагмента гена *adk* у 60 изолятов *N. meningitidis* было идентифицировано 16 различных аллелей, GC-состав которых составлял в среднем 52,5 %. Выявленные аллели кодируют лишь два варианта аденилатциклазы. Наиболее часто встречающимися на территории Беларуси аллелями фрагмента гена *adk* являлись *adk* 5 (30,0 %), *adk* 3 (20,0 %), *adk* 6 (10,0 %). Аллель *adk* 5, впервые описанная в Великобритании в 1941 г., в Беларуси циркулирует с 2006 г. в Брестской, Витебской, Могилевской областях и г. Минске. Аллель *adk* 3 с 1915 г. циркулирует в США, а с 2006 г. – в Беларуси. Аллель *adk* 6 была распространена в Нидерландах с 1960-х годов и отмечена в Беларуси с 2007 г. на территории Гродненской, Могилевской областей и в г. Минске. Аллели *adk* 80 и 338, появившиеся в Германии в 2000 и 2007 гг., были отмечены в Беларуси в 2017 г. Аллель *adk* 60 изолята MenB, полученного из отделяемого носоглотки 48-летней женщины в октябре 2013 г. в г. Слуцк, ранее была описана в Чехии в 1975 г. Всего в мире отмечено 4 изолята с данной аллелью: 1 – в Беларуси, 3 – в Чехии (1975, 2014, 2017). «Белорусские» менингококки с аллелью *adk* 9 составляют 22,2 % от всех описанных в мире и отмечены в городах Брест и Ивацевичи в 2017 г. Аллель описана в Дании (1940), Норвегии и Германии (1991), Испании (2000), Нидерландах (2006) и во Вьетнаме (2014, 2019). Для последовательности фрагмента гена *adk* характерны высокая степень консервативности и низкий темп эволюции, что объясняется высокой функциональной значимостью аденилатциклазы в сигнальных путях бактерий [30]. Аллели *adk* 3, *adk* 5, *adk* 6, *adk* 8, *adk* 17 и *adk* 18, описанные ранее в Беларуси и составлявшие 85 % от аллелей исследованной популяции (17/20) [31], в анализируемый период были характерны также для 72 % популяции менингококка ($p = 0,234$). Обнаруженные в 2006–2010 гг. аллели *adk* 2 и *adk* 143 в наблюдаемый период отмечены не были [31]. Исследуемые белковые фрагменты аденилатциклазы не содержали лишь одну протеиногенную аминокислоту – триптофан (см. табл. 2).

Анализ фрагмента гена *aroE*. Ген *aroE* кодирует фермент шикимат дегидрогеназу, участвующую в процессе НАДФН⁺-зависимого синтеза ароматических аминокислот по шикиматному метаболическому пути, и большое число других метаболитов [3]. При выполнении секвенирования фрагмента гена *aroE* у 60 изолятов *N. meningitidis* было идентифицировано 17 различных аллелей (GC – 55,5 %), кодирующих 14 вариантов шикимат дегидрогеназы, при этом 13 (76,5 %) аллелям соответствовала отдельная аминокислотная последовательность. Наиболее часто встре-

чаюцца аллелямі фрагмента гена *aroE* яўляліся *aroE* 6 (28,3 %), *aroE* 4 (16,7 %) і *aroE* 9 (11,7 %). Аллель *aroE* 6, впершыце апісаная ў Нідэрландах у 1960 г., у Беларусі цыркулюе з 2006 г. на тэрыторыі Брэстскай, Гомельскай, Могілеўскай абласцей і ў г. Мінску. Аллель *aroE* 4 з 1952 г. цыркулюе ў Вялікабрытаніі, а з 2006 г. – у Беларусі на тэрыторыі Брэстскай, Віцебскай, Мінскай, Могілеўскай абласцей і ў г. Мінску. Аллель *aroE* 9 была распаўсюджаная ў Даніі ў 1940 г. і адзначена ў Беларусі з 2006 г. на тэрыторыі гарадоў Мінск і Могілеў. Аллель *aroE* 944 (GC – 54,9 %), впершыце ў свеце апісаная ў ізоляце менингококка, атрыманым ад аддзяляемага носоглоткі 50-гадовага мужчыны ў г. Могілеў у 2017 г., мае агульныя сувязі з еўрапейскімі аллелямі, але больш высокую скорасць эвалюцыі. Аллель *aroE* 972 (GC 57,1 %) выяўлена ў г. Слуцк у 2013 г. Новыя аллелі сустракаюцца толькі на тэрыторыі Беларусі (рис. 3) і кодуюць свой тып шікімат дегідрогеназы. Аллель *aroE* 639, выяўленая ў MenB ў г. Мінск у студзені 2018 г., 9 гадамі раней впершыце была апісаная ў Даніі. Аллель *aroE* 26 «беларускіх» менингококкаў, складаючая 6,3 % ад усіх выяўленых у свеце, таксама апісаная ў Нідэрландах (1961), Чэхіі і США (1993), Германіі (2000), Польшы (2002), Расіі (2011). Аллель *aroE* 282 апісаная ў MenA ў трых краінах свету: ў Расіі («расійскія» штабмы складаюць 95,7 % ад апісаных у свеце і цыркулявалі ў перыяд з 2002 па 2012 г.), Беларусі (г. Баранавічы, 2013) – 1,4 %, Турцыі (2014) – 2,9 % ізолятаў.

Аллелі *aroE* 4, *aroE* 6, *aroE* 7, *aroE* 9 і *aroE* 15, апісаныя раней у Беларусі і складаючыя 85 % ад аллелей даследаванага папуляцыі (17/20) [31], у аналізаваны перыяд былі характэрны таксама для 72 % папуляцыі менингококка ($p = 0,234$). Обнаўленыя ў 2006–2010 гг. аллель *aroE* 243 і «беларускія» аллелі *aroE* 602 і *aroE* 603 ў аналізаваны перыяд не выяўлены [31].

Аналіз фрагмента гена *fumC*. Ген *fumC* кодуюць фермент цыкла Кребса – фумарат гідратазу, складаючы з 4 аднаковых суб’ядынак і каталізуе пераўтварэнне фумарата шляхам яго гідратацыі [3]. Пры выкананні секвеніравання фрагмента гена *fumC* у 60 ізолятаў *N. meningitidis* было ідэнтыфіцыравана 24 розных аллелей (GC-склад – у сярэднім 57,2 %), якія кодуюць 4 тыпаў фумарат гідратазы. Найбольш часта сустракаюцца аллелямі фрагмента гена *fumC* яўляліся *fumC* 17 (30 %), *fumC* 3 (10 %), *fumC* 9 і *fumC* 13 (па 8,3 %). Аллелі *fumC* 17 і *fumC* 3, впершыце апісаныя ў Нідэрландах у 1960 г., на тэрыторыі Беларусі цыркулююць з 2006 г. Аллель *fumC* 9 з 1947 г. цыркулюе ў США, а з 2006 г. – у Беларусі. Аллель *fumC* 13 была распаўсюджаная ў Даніі ў 1940 г., а з 2011 г. адзначена ў Беларусі. Аллель *fumC* 216, выяўленая ў MenB ў г. Могілеў у снежні 2017 г., апісаная раней толькі ў Нідэрландах (2001) у пацыента з ГФМІ. «Беларускія» менингококкі з аллелью *fumC* 113 складаюць 14,3 % ад усіх апісаных у свеце (1/7), якая выяўлена таксама ў Еўросоюзе, Ізраіле, Кітае і Чылі. Аллель *fumC* 133 апісаная ў MenA ў 6 краінах свету: на Кубе (1983, 1989), ў Германіі (2000, 2002), Расіі

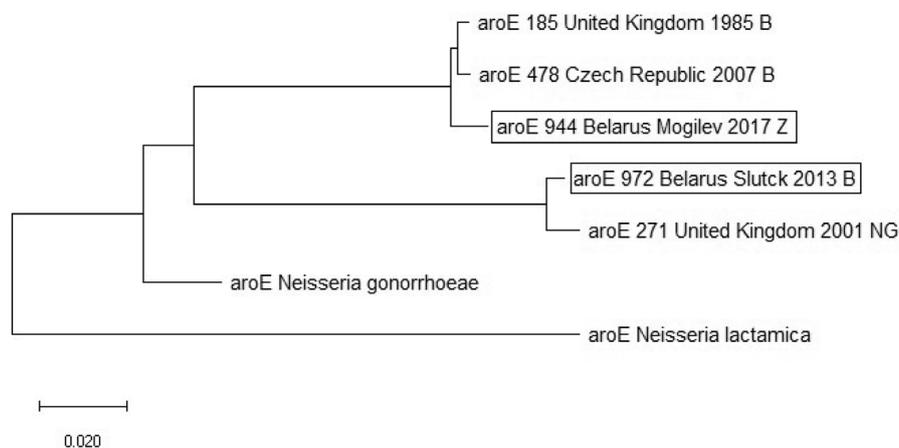


Рис. 3. Филогенетические связи новых аллелей *aroE* 944 и *aroE* 972 с наиболее близкими аллелями *Neisseria* spp. (MEGA X 10.0.5)

Fig. 3. Phylogenetic analysis of the new *aroE* 944 and *aroE* 972 with the closest alleles of *Neisseria* spp. (MEGA X 10.0.5)

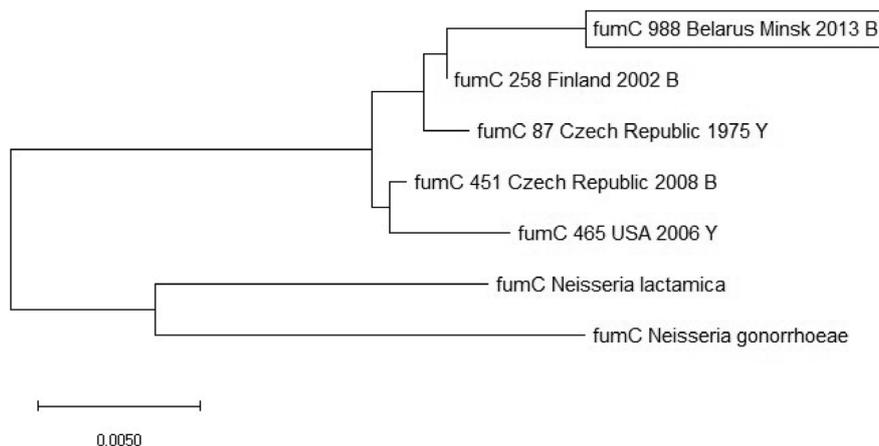


Рис. 4. Филогенетические связи новой аллели *fumC* 988 с наиболее близкими аллелями *Neisseria* spp. (MEGA X 10.0.5)

Fig. 4. Phylogenetic analysis of the new *fumC* 988 with the closest alleles of *Neisseria* spp. (MEGA X 10.0.5)

(2010, 2011), Чехии (1997, 2003), Польше (2005, 2012) и Беларуси (2013). Аллель *fumC* 988 (GC – 57 %) впервые выделена в г. Минске в 2013 г. из СМЖ 5-месячной девочки и имеет общего предшественника с «финской» аллелью *fumC* 258, скорость эволюции которой значительно ниже (рис. 4). Аллель *fumC* 988 и описанные ранее аллели *fumC* 2, *fumC* 17 и *fumC* 113 кодируют один вариант фумарат гидратазы.

Аллели *fumC* 3, *fumC* 7, *fumC* 9, *fumC* 17, *fumC* 19, *fumC* 37 и *fumC* 39, описанные ранее в Беларуси и составлявшие 65 % от аллелей исследованной популяции (13/20) [31], в анализируемый период были характерны также для 58 % популяции менингококка ($p = 0,599$). Описанные в 2006–2010 гг. аллели *fumC* 5, *fumC* 25, *fumC* 58, *fumC* 69, *fumC* 361 и «белорусская» *fumC* 541 в 2011–2018 гг. обнаружены не были [31].

Анализ фрагмента гена *gdh*. Ген *gdh* кодирует глюкозо-6-фосфат дегидрогеназу, являющуюся одним из ферментов пентозофосфатного пути и катализирующую окисление глюкозо-6-фосфата с одновременным восстановлением НАДФ⁺. При выполнении секвенирования фрагмента гена *gdh* у 60 изолятов *N. meningitidis* было идентифицировано 18 различных аллелей (GC – 52,2 %), как впервые выявленных (23,3 %), так и широко распространенных в мире, которые кодируют 4 типа глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы. Наиболее часто встречающимися аллелями фрагмента гена *gdh* являлись *gdh* 560 (20 %), *gdh* 8 (15 %) и *gdh* 5 (13,3 %). Аллель *gdh* 560 (GC – 51,9 %) была впервые описана в Беларуси в 2006 г., в настоящее время в базе pubMLST зарегистрировано 19 изолятов, 89,5 % из которых распространены в Беларуси с 2006 по 2017 г. В 2017 г. аллель *gdh* 560 описана в Германии (ST-14163, CC-103), а в 2019 г. – в России (ST-9300, CC-103, Москва). Аллель *gdh* 8, впервые выявленная в Дании в 1940 г., на территории Беларуси циркулирует с 2006 г. Аллель *gdh* 5 с 1964 г. циркулирует в Нидерландах, а с 2007 г. – в Беларуси. Доля наиболее распространенных в Беларуси аллелей *gdh* 560, *gdh* 8 и *gdh* 5 среди всех описанных в pubMLST изолятов (по состоянию на 13.02.2020) составляет 88,9; 0,1 и 0,6 % соответственно. Аллель *gdh* 249, циркулирующая в Беларуси с 2006 г., впервые выявлена в России с 2000 г., а кроме того, отмечена на территории как соседних стран (в Польше – с 2003 г., в Украине – с 2007 г., в Литве – с 2011 г.), так и других стран Европы. В Беларуси аллель *gdh* 25 менингококков (2018) составила 4,2 % от всех выявленных в мире (1/24) и была отмечена также в Чехии (1992) – 19/25, Германии (2010) – 2/25, Польше (2011) и Швеции (2018) – по 1/25). Аллели *gdh* 985 (GC – 51,9 %) и *gdh* 1083 (GC – 51,7 %) впервые в мире описаны у изолятов менингококка, полученного из отделяемого носоглотки бактерионосителей в городах Слуцк (2013) и Жлобин (2014) соответственно и кодируют один тип глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы. В сравнении с уже существующими аллелями новые «белорусские» аллели входят в разные кластеры филогенетического дерева, которое отличается ступенчатым характером дивергенции, т. е. сохранением промежуточных форм фрагмента гена *gdh* в процессе эволюции (рис. 5). Аллели *gdh* 1, *gdh* 5, *gdh* 8, *gdh* 9, *gdh* 10,

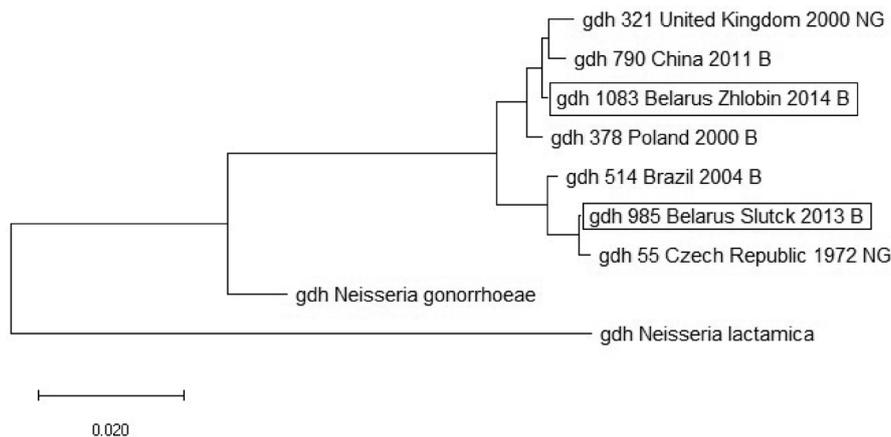


Рис. 5. Филогенетические связи новых аллелей *gdh* 985 и *gdh* 1083 с наиболее близкими аллелями *Neisseria* spp. (MEGA X 10.0.5)

Fig. 5. Phylogenetic analysis of the new *gdh* 985 and *gdh* 1083 with the closest alleles of *Neisseria* spp. (MEGA X 10.0.5)

gdh 17, *gdh* 21, *gdh* 249 и «белорусская» *gdh* 560, описанные ранее в Беларуси и составлявшие 85 % от аллелей исследованной популяции (17/20) [31], в анализируемый период были характерны также для 83 % популяции менингококка ($p = 0,862$). Обнаруженные в 2006–2010 гг. аллели *gdh* 13, *gdh* 18 и *gdh* 621 в наблюдаемый период не выявлены [31].

Анализ фрагмента гена *pdhC*. Ген *pdhC* кодирует субъединицу пируватдегидрогеназного комплекса – звена цикла трикарбоновых кислот. При выполнении секвенирования фрагмента гена *pdhC* у 60 изолятов *N. meningitidis* было идентифицировано 18 различных аллелей (GC – 55,6 %), кодирующих 11 вариантов субъединицы пируватдегидрогеназы. Наиболее часто встречающимися аллелями фрагмента гена *pdhC* являлись *pdhC* 18 (21,7 %), *pdhC* 6 (18,3 %) и *pdhC* 24 (11,7 %). Аллель *pdhC* 18, впервые описанная в Нидерландах в 1961 г., выявлена в Польше (1998), России (1999) и Беларуси (2006). Аллель *pdhC* 6 с 1960 г. циркулирует в Нидерландах, с 1998 г. – в России, с 2001 г. – в Польше, с 2010 г. – в Литве, с 2006 г. – в Беларуси. Аллель *pdhC* 24 была распространена в Нидерландах в 1960 г., а затем отмечена в России (1997), Польше (1998), Беларуси (2006), Украине (2007) и Литве (2012). Аллель *pdhC* 888 (GC 54,4 %) впервые в мире выявлена у изолята менингококка, полученного из СМЖ девочки в возрасте 1 год и 1 мес., в г. Барановичи отмечена в 2017 г. (рис. 6). Так же как и описанная в 1960-х годах в Нидерландах *pdhC* 22, *pdhC* 888 кодирует один вариант субъединицы пируватдегидрогеназы. Аллели *pdhC* 4, *pdhC* 6, *pdhC* 13, *pdhC* 18, *pdhC* 22 и *pdhC* 24, описанные ранее в Беларуси и составлявшие 80 % от аллелей

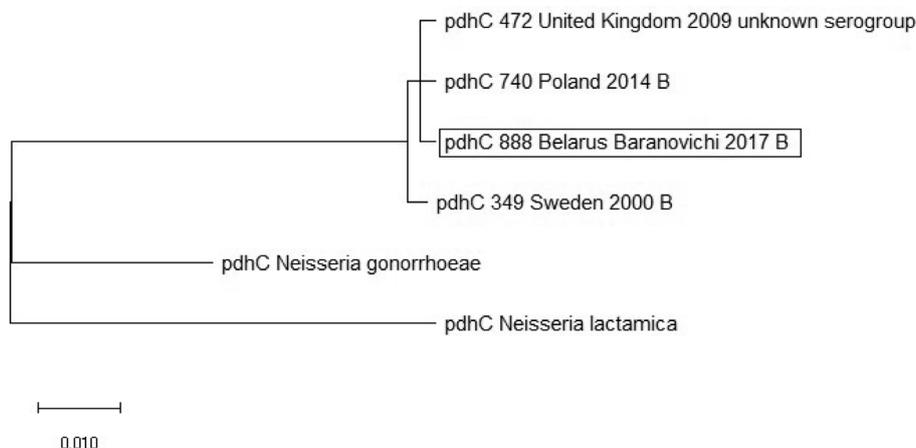


Рис. 6. Филогенетические связи новой аллели *pdhC* 888 с наиболее близкими аллелями *Neisseria* spp. (MEGA X 10.0.5)

Fig. 6. Phylogenetic analysis of the new *pdhC* 888 with the closest alleles of *Neisseria* spp. (MEGA X 10.0.5)

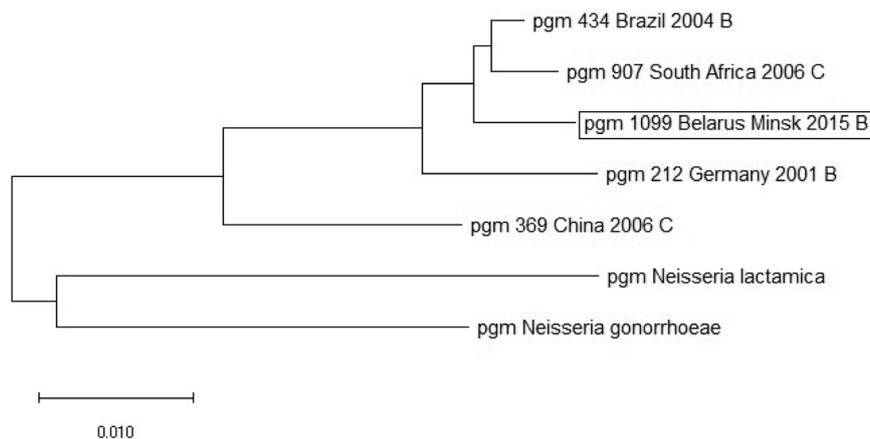


Рис. 7. Филогенетические связи новой аллели *pgm* 1099 с наиболее близкими аллелями *Neisseria* spp. (MEGA X 10.0.5)

Fig. 7. Phylogenetic analysis of the new *pgm* 1099 with the closest alleles of *Neisseria* spp. (MEGA X 10.0.5)

исследованной популяции (16/20) [31], в анализируемый период были характерны также для 68 % популяции менингококка ($p = 0,319$). Обнаруженные в 2006–2010 гг. аллели *pdhC* 11, *pdhC* 15, *pdhC* 22, *pdhC* 25 и *pdhC* 425 в наблюдаемый период не выявлены [31].

Анализ фрагмента гена *pgm*. Ген *pgm* кодирует фосфоглюкомутазу, которая осуществляет внутримолекулярный перенос фосфата при преобразовании глюкозо-1-фосфата в глюкозо-6-фосфат в процессе гликолиза [3]. При выполнении секвенирования фрагмента гена *pgm* у 60 изолятов *N. meningitidis* было идентифицировано 20 различных аллелей (GC – 54,2 %), кодирующих 13 вариантов фосфоглюкомутазы. Наиболее часто встречающимися аллелями фрагмента гена *pgm* являлись *pgm* 2 (25 %), *pgm* 8 (15 %) и *pgm* 9 (13,3 %). Аллель *pgm* 2, впервые описанная в Нидерландах в 1960 г., выявлена в России (1989), Польше (1997), Литве (2010), на территории Беларуси (2006 г). Аллель *pgm* 8 с 1960 г. циркулирует в Нидерландах, с 1995 г. – в России, с 1997 г. – в Польше, с 2010 г. – в Литве, с 2006 г. – в Беларуси. Аллель *pgm* 9 была распространена в Нидерландах в 1960 г., а позднее отмечена в России, Польше (1998), Беларуси (2006) и Литве (2010). Аллель *pgm* 1099 (GC – 54,4 %) впервые в мире описана у изолята менингококка, полученного из отделяемого носоглотки двухлетнего мальчика из г. Минска в 2015 г., и встречается только на территории Беларуси, однако ближайшие аллели выявлены в Европе, Азии, Африке и Южной Америке (рис. 7). Следует отметить, что в аминокислотных последовательностях, кодируемых описанными аллелями, отсутствует цистеин. Аллели *pgm* 2, *pgm* 6, *pgm* 8, *pgm* 9, *pgm* 16 и *pgm* 74, описанные ранее в Беларуси и составлявшие 55 % от аллелей исследованной популяции (11/20) [31], в анализируемый период были характерны также для 67 % популяции менингококка ($p = 0,348$). Обнаруженные в 2006–2010 гг. аллели *pgm* 17, *pgm* 22, *pgm* 54, *pgm* 131, *pgm* 244 и *pgm* 347 в настоящем исследовании не выявлены [31].

Определение SNPs во фрагментах ГДХ. Однонуклеотидный полиморфизм кодирующих участков бывает синонимическим (без изменения аминокислотной последовательности белка) и несинонимическим. Несинонимические полиморфизмы могут быть миссенс-мутациями, что приводит к кодированию другой аминокислоты, либо нонсенс-мутациями, в результате которых происходит преждевременная терминация трансляции. Среди фрагментов генов *abcZ*, *aroE*, *pdhC* и *pgm* отмечены сайты, в которых возможно наличие одного из трех нуклеотидов (табл. 3).

Все 75 SNPs в 17 аллелях фрагмента гена *abcZ* имели 7 вариантов: замена пиримидиновых нуклеотидов С и Т – 53,3 % от всех SNPs с доминированием С в 60,5 % полиморфизмов; замена пуриновых нуклеотидов А и Г – 29,3 % с доминированием Г в 31,2 % полиморфизмов; 5,3 % замен С и Г с преобладанием Г; по 2,7 % замен А на С и Г на Т с преобладанием пуринов; 1,3 % полиморфизма с преобладанием Т над А; 1,3 % полиморфизма с 3 нуклеотидами – С, Г и Т. Наибольшей вариабельностью с практически 50 %-ной вероятностью появления каждого нуклеотида характеризовались 13 положений: ^{27, 54, 57, 60, 243, 318, 330, 334, 342}С↔Т, ^{59, 64, 351}А↔Г, ¹⁸³С↔Г↔Т. Только 18 (24 %) из 75 SNPs приводили к заменам аминокислот в 10 (6,9 %) положениях из 144.

Таблица 3. Характеристика SNP и аминокислотных замен в ГДХ менингококка, встречавшихся на территории Беларуси в 2011–2018 гг.

Table 3. Characteristic of SNP and amino acid substitutions in the meningococcal house-keeping genes isolated in Belarus in 2011–2018

Ген, длина фрагмента, число аллелей/количество SNP, нуклеотидные замены	Белок, число видов, аминокислотные замены
<p>abcZ – 433 п. н. – 17 аллелей / 75 SNPs Транзиции – 86,7 % (65/75), P = 15 % 24, 28, 59, 64, 78, 82, 83, 87–89, 99, 102, 108, 120, 129, 153, 165, 174, 198, 252, 270, 297, 351 A↔G, 9, 27, 54, 57, 60, 63, 66, 81, 90, 95, 96, 111, 126, 144, 154, 189, 204, 222, 243, 246, 250, 261, 276, 279, 294, 315, 318, 330, 334, 342, 348, 367, 372, 387, 402, 411, 420, 423, 429, 432 C↔T Трансверсии – 12 % (9/75), Q = 2,1 % 93, 168, 291, 417 C↔G, 72, 255 G↔T, 79, 128 A↔C, 231 A↔T Прочие замены – 1,3 % (1/75) 183 C↔G↔T</p>	<p>ABC-переносчик – 144 АК 5 белков/10 замен 10E→K, 20H→R, 22S→G, 24, 31D→E, 27H→N, 28N→G, 30D→G→S, 32V→A, 43E→A</p>
<p>adk – 465 п. н. – 16 аллелей / 29 SNPs Транзиции – 86,2 % (25/29), P = 5,4 % 126, 135, 174, 411, 459, 462 A↔G, 18, 21, 30, 103, 108, 114, 127, 171, 177, 189, 213, 216, 261, 297, 366, 391, 396, 438, 456 C↔T Трансверсии – 13,8 % (4/29), Q = 0,9 % 144, 460 C↔G, 309 A↔C, 390 G↔T</p>	<p>Аденилатциклаза – 155 АК 2 белка/1 замена 154P→A</p>
<p>aroE – 490 п. н. – 17 аллелей / 125 SNPs Транзиции – 56 % (70/125), P = 14,3 % 11, 14, 15, 23, 49, 64, 76, 97, 114, 137, 153, 166, 177, 214, 247, 259, 261, 278, 299, 300, 329, 333, 340, 343, 352, 353, 363, 364, 366, 377, 383, 406, 415, 445, 455, 467, 490 A↔G, 12, 19, 24, 37, 39, 46, 58, 61, 62, 65, 68, 82, 121, 148, 154, 211, 253, 256, 257, 277, 280, 286, 295, 355, 373, 384, 385, 400, 424, 433, 436, 454, 466 C↔T Трансверсии – 39,2 % (49/125), Q = 10 % 22, 26, 32, 35, 42, 43, 57, 142, 269, 276, 281, 298, 334, 341, 345, 361, 365, 367, 369, 378, 379, 388, 394, 432, 434, 488 A↔C, 4, 70, 250, 285, 305–307, 344, 370, 421, 431 C↔G, 67, 103, 173, 212, 325, 332, 386, 418 G↔T, 2, 40, 289, 368 A↔T Прочие замены – 4,8 % (6/125) 31, 274, 283 C↔G↔T, 282, 380 A↔C↔G, 297 A↔G↔T</p>	<p>Шикимат дегидрогеназа – 163 АК 14 белков/43 замены 1,90,145I→L, 4A→T→V, 5N→G, 8T→V, 9, 11Q→K, 12N→H, 13I→T, 14A→E, 19T→N, 38E→G, 46, 93, 156I→V, 51H→R, 58, 129A→S, 59R→Q, 71V→L, 87S→N, 92A→D, 94S→P→N, 95P→R, 96E→D, 99L→Q→R, 100G→N→D, 102R→A, 110G→S, 111C→D→E, 114Q→K, 115E→P→A, 118, 152N→D, 121Q→R, 122S→Q, 123N→S, 126A→K, 127E→K→Q, 128V→T, 144A→H, 163M→L</p>
<p>fumC – 465 п. н. – 24 аллели / 37 SNPs Транзиции – 89,2 % (33/37), P = 7,1 % 9, 54, 186, 201, 255, 261, 326, 370, 387, 438, 441, 461 A↔G, 7, 33, 46, 55, 72, 78, 93, 114, 141, 165, 183, 219, 249, 297, 327, 339, 378, 435, 439, 447, 456 C↔T Трансверсии – 10,8 % (4/37), Q = 0,9 % 207, 330, 429 C↔G, 6A↔C</p>	<p>Фумарат гидратаза – 155 АК 4 белка/3 замены 109R→H, 124I→V, 154E→G</p>
<p>gdh – 501 п. н. – 18 аллели / 30 SNPs Транзиции – 76,7 % (23/30), P = 4,6 % 60, 78, 141, 217, 290, 420, 427, 487 A↔G, 13, 24, 30, 46, 64, 69, 84, 102, 129, 132, 145, 189, 261, 432, 492 C↔T Трансверсии – 23,3 % (7/30), Q = 1,4 % 12, 15, 48, 390 G↔T, 66, 108 C↔G, 174 A↔C</p>	<p>Глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа – 167 АК 4 белка/4 замены 97R→K, 130K→N, 143A→T, 163G→S</p>
<p>pdhC – 480 п. н. – 18 аллелей / 80 SNPs Транзиции – 75 % (60/80), P = 12,5 % 15, 115, 118, 153, 177, 205, 210, 211, 240, 244, 255, 294, 463, 475 A↔G, 12, 28, 42, 43, 66, 69, 78, 82, 90, 93, 102, 103, 130, 150, 165, 180, 190, 195, 201, 204, 212, 219, 238, 246, 261, 267, 270, 274, 291, 300, 315, 321, 330, 336, 342, 348, 360, 375, 384, 390, 393, 402, 405, 417, 426, 435 C↔T Трансверсии – 20 % (16/80), Q = 3,3 % 213, 232, 248, 271, 418 A↔C, 6, 30, 99, 114, 464, 474 C↔G, 237, 258, 297, 354, 432 G↔T Прочие замены – 5 % (4/80) 129, 453, 477 A↔G↔T, 456 A↔C↔T</p>	<p>Субъединица пируватдегидрогеназы – 160 АК 11 белков/12 замен 39, 69I→V, 40, 82A→T, 43E→D, 71A→T→V, 78N→H, 83A→E, 91Q→K→L, 140S→R, 155S→A, 159D→E→N</p>
<p>pgt – 450 п. н. – 20 аллелей / 67 SNPs Транзиции – 59,7 % (40/67), P = 8,9 % 3, 45, 69, 71, 82, 83, 108, 124, 151, 157, 159, 202, 213, 342, 359, 414, 421, 426, 442, 444 A↔G, 6, 24, 27, 43, 49, 78, 81, 96, 102, 117, 156, 183, 215, 219, 315, 384, 408, 420, 432, 447 C↔T Трансверсии – 31,3 % (21/67), Q = 4,7 % 1, 57, 105, 154, 192, 372, 393, 429 C↔G, 84, 140, 267, 386, 412, 423 A↔C, 51, 66, 123, 129, 369, 417 G↔T, 438 A↔T Прочие замены – 9 % (6/67) 33, 87, 93, 216 A↔C↔G, 193 A↔G↔T, 126 C↔G↔T</p>	<p>Фосфоглюкомутаза – 150 АК 13 белков/17 замен 1V→L, 24N→S, 28G→K, 42A→T, 47A→E, 51, 68, 148K→E, 52A→P, 53V→I, 65A→S→T, 72P→L, 120S→N, 129A→D, 138K→Q, 141N→D→E, 146K→E</p>

Примечание. P – частота транзиций (количество транзиций/общая длина фрагмента·100 %), %; Q – частота трансверсий (количество трансверсий/общая длина фрагмента·100 %), %.

В 16 аллелях фрагмента гена *adk* все 29 SNPs представлены 5 вариантами: замена пиримидиновых нуклеотидов С и Т – 65,5 % от всех SNPs с доминированием С в 65 % случаев; замена пуриновых нуклеотидов А и G – 20,7 % с доминированием А; 6,9 % замен С и G с преобладанием С; по 3,4 % замен А на С и G на Т с преобладанием пиримидинов. При этом только замены $^{460}G \rightarrow C$ и $^{462}A \rightarrow G$ привели к замене 154-й аминокислоты пролина на аланин в аллели *adk* 10. Таким образом, среди белорусской популяции менингококка отмечено наличие лишь двух вариантов: аденилатциклазы с пролином в 154-м положении – 97 % (58/60) и аланином – 3 % (2/60).

Наибольшее количество SNPs (125) содержали 17 аллелей фрагмента гена *aroE*, 63,2 % которых приводили к аминокислотным заменам. SNPs представлены 9 вариантами: замена пуриновых нуклеотидов А и G – 29,6 %; замена пиримидиновых нуклеотидов С и Т – 26,4 % от всех SNPs; 20,8 % замен А и С; 8,8 % замен С и G; 6,4 % замен G и Т и 3,2 % замен А и Т с преобладанием Т в обоих вариантах; три варианта по три возможных нуклеотида в 4,8 % SNPs. Помимо наибольшего количества вариантов аллели фрагмента гена *aroE* характеризовались также наибольшей вариабельностью с практически 50 %-ной вероятностью появления каждого нуклеотида – 24 (19,2 %) положения: $^{76, 153, 177, 259, 261, 278, 333, 352, 406}A \leftrightarrow G$, $^{269, 276, 281, 298, 361}A \leftrightarrow C$, $^{257, 277, 280, 286}C \leftrightarrow T$, $^{305, 306, 307}C \leftrightarrow G$, $^{103, 332}G \leftrightarrow T$, $^{289}A \leftrightarrow T$. Из 163 аминокислот фрагмента шикимат дегидрогеназы аминокислотные замены отмечены в 43 (26,4 %) позициях.

В 24 аллелях фрагмента гена *fumC* 37 SNPs представлены 4 вариантами: замена пиримидиновых нуклеотидов С и Т – 56,8 % от всех SNPs; замена пуриновых нуклеотидов А и G – 32,4 % с доминированием G; 8,1 % замен С и G с преобладанием С; 2,7 % замен А на С. Наибольшей вариабельностью с практически 50 %-ной вероятностью появления каждого нуклеотида характеризовались 4 SNPs: $^{114, 249}C \leftrightarrow T$, $^{330}C \leftrightarrow G$ и $^{441}A \leftrightarrow G$. Только 4 (10,8 %) из 37 SNPs приводили к заменам аминокислот в 3 (1,9 %) положениях из 155.

Обнаруженные в 18 аллелях фрагмента гена *gdh* 30 SNPs представлены 5 вариантами: замена пиримидиновых нуклеотидов С и Т – 50 % от всех SNPs с доминированием С; замена пуриновых нуклеотидов А и G – 26,7 %; 13,3 % замен Т и G с преобладанием G; 6,7 % замен С и G; 3,3 % SNPs с А и С. Наибольшей вариабельностью с практически 50 %-ной вероятностью появления каждого нуклеотида характеризовались 8 (26,7 %) положений: $^{64, 69, 132}C \leftrightarrow T$, $^{60, 141, 290, 420}A \leftrightarrow G$, $^{66}C \leftrightarrow G$. Только 4 (13,3 %) из 30 SNPs приводили к заменам аминокислот в 4 (2,4 %) положениях из 167.

Выявленные 80 SNPs в 18 аллелях фрагмента гена *pdhC* представлены 7 вариантами: замена пиримидиновых нуклеотидов С и Т – 57,5 % от всех SNPs; замена пуриновых нуклеотидов А и G – 17,5 % с доминированием G (73,3 %); 7,5 % замен С и G; по 6,3 % замен $C \rightarrow A$ и $T \rightarrow G$; 5 % SNPs с тремя возможными нуклеотидами. Наибольшей вариабельностью с практически 50 %-ной вероятностью появления каждого нуклеотида характеризовались 8 (10 %) положений: $^{103, 212, 246, 270, 375}C \leftrightarrow T$, $^{210, 463}A \leftrightarrow G$, $^{464}C \leftrightarrow G$. Из 80 SNPs 17 (21,3 %) приводили к заменам аминокислот в 12 (7,5 %) положениях из 160.

Все 67 SNPs в 20 аллелях фрагмента гена *pgt* представлены 9 вариантами: замена пиримидиновых нуклеотидов С и Т – 29,9 % от всех SNPs; замена пуриновых нуклеотидов А и G – 29,9 %; 11,9 % замен С и G; по 9 % замен $A \rightarrow C$ и $G \leftrightarrow T$; 1,5 % замен А и Т; 9 % SNPs с тремя вариантами нуклеотидов. Наибольшей вариабельностью с практически 50 %-ной вероятностью появления каждого нуклеотида характеризовались 13 (19,4 %) положений: $^{81, 117, 156, 215}C \leftrightarrow T$, $^{82, 83, 108, 157, 159}A \leftrightarrow G$, $^{84}C \rightarrow A$, $^{51}T \leftrightarrow G$, $^{105, 154}C \leftrightarrow G$. Во фрагменте гена *pgt* 27 (40,3 %) из 67 SNPs приводили к заменам аминокислот в 17 (11,3 %) положениях из 150.

Большинство мутаций нуждается в энергетических затратах менингококка на проведение репарации. Все живые организмы содержат системы, поддерживающие целостность собственной ДНК и защищающие от внедрения чужеродной последовательности [32, 33]. Например, система репарации, представленная генами *mut*, проводит удаление поврежденных или неправильно спаренных оснований. Транзиция, т. е. замена пуринов – пуринов ($A \leftrightarrow G$) либо пиримидинов – пиримидинов ($C \leftrightarrow T$), энергетически более вероятна, чем трансверсия (пуринов \leftrightarrow пиримидинов), что связано со структурой пуриновых (2) и пиримидиновых (1) колец. Это подтверждают и результаты нашего исследования: доля транзиций варьировалась от 56 % во фрагменте гена *aroE* до 89,2 %

в *fumC*. Трансверсии относятся к сложным, или перекрестным, заменам, которые менее благоприятны, так как при замещении аминокислот оказывают большее влияние на уровне композиции и функции белка в сравнении с транзициями [28]. Так как анализируемые ГДХ крайне важны для обеспечения жизнедеятельности менингококка, бактерия стремится к сохранению аллелей, кодирующих белок, который способен максимально эффективно выполнять свою функцию. Менингококки-носители менее продуктивных аллелей, как правило, элиминируются из популяции. Системы репарации не способны различить, какой вариант последовательности является «диким» типом, а какой – мутацией, однако компоненты систем обладают определенной избирательностью. Так, белки MutL и MutS избирательно удаляют T в обнаруженных некомплементарностях G-T и C-T, а белок MutY удаляет A при спаривании A с G [34]. Таким образом может происходить закрепление точечной мутации, приводящее к однонуклеотидному полиморфизму. Только незначительное число мутаций фиксируется в геноме новых генераций микроорганизмов. Наиболее часто в качестве нейтральных выступают замены в некодирующих участках [28]. Нами показано, что нуклеотидный полиморфизм кодирующих участков ГДХ, как правило, синонимический. Наибольшей консервативностью характеризовались фрагменты генов *gdh* (6 % сайтов SNPs) и *adk* (6,2 %), что, вероятно, связано с высокой функциональной значимостью глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы в пентозофосфатном пути и аденилатциклазы в сигнальных путях [30]. Наибольшая вариабельность отмечена у шикимат дегидрогеназы, 63,2 % SNPs которой приводили к аминокислотным заменам, затрагивающим 26,4 % сайтов.

Выводы

1. Популяция менингококков, вызывающих различные формы инфекции, гетерогенна. У 60 изолятов менингококков, выявленных за период с 2011 по 2018 г., обнаружено 130 аллелей 7 фрагментов ГДХ, которые кодируют 53 варианта аминокислотных последовательностей. Из них 9 (6,9 %) аллелей выявлены и впервые в мире описаны только на территории Беларуси. Наибольшее разнообразие продуктов фрагментов ГДХ характерно для ферментов шикимат дегидрогеназы, фосфоглюкомутазы и пируватдегидрогеназы (14, 13 и 11 вариантов белка соответственно), а наименьшее – для аденилатциклазы (2 варианта).

2. Менингококки – носители впервые выявленных аллелей фрагментов ГДХ (*abcZ* 1016, *aroE* 944, *aroE* 972, *fumC* 988, *gdh* 560, *gdh* 985, *gdh* 1083, *pdhC* 888, *pgm* 1099), 8 (88,9 %) из которых циркулируют среди населения только на территории Беларуси, а менингококки – носители аллели *gdh* 560 распространились также на территории Германии (2017) и России (Москва, 2019).

3. Среди фрагментов ГДХ менингококков, циркулирующих в Беларуси, установлены доминирующие аллели: АВС-переносчика – *abcZ* 8 (25 %) и *abcZ* 2 (13,3 %); аденилатциклазы – *adk* 3 (20 %), *adk* 5 (13,3 %) и *adk* 6 (10 %); шикимат дегидрогеназы – *aroE* 6 (28,3 %), *aroE* 4 (16,7 %) и *aroE* 9 (11,7 %); фумарат гидратазы – *fumC* 17 (30 %), *fumC* 3 (10 %) и *fumC* 13 (8,3 %); глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы – *gdh* 560 (20 %), *gdh* 8 (15 %) и *gdh* 5 (13,3 %); субъединицы пируватдегидрогеназы – *pdhC* 18 (21,7 %), *pdhC* 6 (18,3 %) и *pdhC* 24 (11,7 %); фосфоглюкомутазы – *pgm* 2 (25 %), *pgm* 8 (15 %) и *pgm* 9 (13,3 %).

4. Механизмы молекулярной эволюции популяции менингококков характеризуются наличием сайтов полиморфизма в аллелях фрагментов ГДХ менингококка: АВС-переносчика – 75 (17,3 % от всех нуклеотидов фрагмента гена); аденилатциклазы – 29 (6,2 %); шикимат дегидрогеназы – 125 (25,5 %); фумарат гидратазы – 37 (8 %); глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы – 30 (6 %); субъединицы пируватдегидрогеназы – 80 (16,7 %); фосфоглюкомутазы – 67 (14,9 %). Транзиции преобладают во всех 7 фрагментах ГДХ и составляют от 56 % в *aroE* (70 SNPs, 14,3 % от всех нуклеотидов фрагмента гена) до 89,2 % в *fumC* (33 SNPs, 7,1 %). Встречаемость трансверсий во всех фрагментах ГДХ ниже – от 10,8 % в *fumC* (4 SNPs, 0,9 %) до 39,2 % в *aroE* (49 SNPs, 10 %). Наличие сайтов с вероятностью появления одного из трех нуклеотидов установлено только среди фрагментов ГДХ *pgm* (6 SNPs, 1,3 %), *aroE* (6 SNPs, 1,2 %), *pdhC* (4 SNPs, 0,8 %) и *abcZ* (1 SNP, 0,2 %).

5. Установлена ассоциация SNPs и определен характер аминокислотных замен в продуктах фрагментов ГДХ. Мутации в основном носили синонимичный характер и лишь 25,7 % SNPs

в среднем были несинонимичными и сопровождалась заменами аминокислот: 24 % SNPs у *abcZ* привели к формированию 5 вариантов АВС-переносчика; 6,9 % SNPs *adk* – 2 вариантов аденилатциклазы; 63,2 % SNPs *aroE* – 14 вариантов шикимат дегидрогеназы; 10,8 % SNPs *fumC* – 4 вариантов фумарат гидратазы; 13,3 % SNPs *gdh* – 4 вариантов глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы; 21,3 % SNPs *pdhC* – 11 вариантов субъединицы пируватдегидрогеназы, 40,3 % SNPs *pgm* – 13 вариантов фосфоглюкомутазы. Отмечено отсутствие цистеина и метионина в анализируемых фрагментах АВС-переносчика, триптофана в аденилатциклазе и цистеина в фосфоглюкомутазе. Фенотипическая вариабельность ферментов, участвующих в ключевых метаболических путях, может приводить к появлению более вирулентных и гиперинвазивных клонов менингококка.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Variability and diversity of nasopharyngeal microbiota in children: a metagenomic analysis / D. Bogaert [et al.] // PLoS ONE. – 2011. – Vol. 6, N 2. – P. e17035. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017035>
2. Sáez Nieto, J. A. Multicolonization of human nasopharynx due to *Neisseria* spp. / J. A. Sáez Nieto, C. Marcos, A. Vindel // Int. Microbiol. – 1998. – Vol. 1, N 1. – P. 59–63.
3. Metabolism and virulence in *Neisseria meningitidis* / C. Schoen [et al.] // Front. Cell. Infect. Microbiol. – 2014. – Vol. 4. – Art. 114. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00114>
4. Extensive genomic variation within clonal complexes of *Neisseria meningitidis* / W. Hao [et al.] // Genome Biol. Evol. – 2011. – Vol. 3. – P. 1406–1418. <https://doi.org/10.1093/gbe/evr119>
5. Nasal inoculation of the commensal *Neisseria lactamica* inhibits carriage of *Neisseria meningitidis* by young adults: a controlled human infection study / A. M. Deasy [et al.] // Clin. Infect. Dis. – 2015. – Vol. 60, N 10. – P. 1512–1520. <https://doi.org/10.1093/cid/civ098>
6. Bratcher, H. B. Evolutionary and genomic insights into meningococcal biology / H. B. Bratcher, J. S. Bennett, M. C. Maiden // Future Microbiol. – 2012. – Vol. 7, N 7. – P. 873–885. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.62>
7. Титов, Л. П. Классификация, номенклатура и эволюция значимых для медицины бактерий / Л. П. Титов // Мед. журн. – 2006. – № 1. – С. 13–18.
8. Tzeng, Y. L. Antimicrobial peptide resistance in *Neisseria meningitidis* / Y. L. Tzeng, D. S. Stephens // Biochim. Biophys. Acta. – 2015. – Vol. 1848, N 11. – P. 3026–3031. <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2015.05.006>
9. Никифоров, В. А. Актуальные и нерешенные проблемы менингококковой инфекции на современном этапе / В. А. Никифоров, В. В. Кичикова, Е. И. Ефимов // Мед. альманах. – 2011. – № 4. – С. 94–99.
10. Абрамцева, М. В. Менингококковая инфекция. Современные представления о возбудителе, эпидемиологии, патогенезе и диагностике. Сообщение 1 / М. В. Абрамцева, А. П. Тарасов, Т. И. Немировская // Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2014. – № 3 (51). – С. 4–10.
11. Титов, Л. П. Менингококковая инфекция: современное состояние проблемы / Л. П. Титов // Здравоохранение. – 2010. – № 12. – С. 15–23.
12. Vigué, L. The comparative population genetics of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae* / L. Vigué, A. Eyre-Walker // PeerJ. – 2019. – Vol. 7. – P. e7216. <https://doi.org/10.7717/peerj.7216>
13. Whole genome sequencing reveals within-host genetic changes in paired meningococcal carriage isolates from Ethiopia / G. K. Barnes [et al.] // BMC Genomics. – 2017. – Vol. 18, N 1. – P. 407–421. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3806-3>
14. Genomic epidemiology of hypervirulent serogroup W, ST-11 *Neisseria meningitidis* / M. M. Mustapha [et al.] // EBioMedicine. – 2015. – Vol. 2, N 10. – P. 1447–1455. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.09.007>
15. Tibayrenc, M. How clonal are *Neisseria* species? The epidemic clonality model revisited / M. Tibayrenc, F. J. Ayala // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2015. – Vol. 112, N 29. – P. 8909–8913. <https://doi.org/10.1073/pnas.1502900112>
16. Genome Assembly and Annotation report [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/172>. – Дата доступа: 18.02.2020.
17. *Neisseria meningitidis* is structured in clades associated with restriction modification systems that modulate homologous recombination / S. Budroni [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2011. – Vol. 108, N 11. – P. 4494–4499. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019751108>
18. Ryall, B. Culture history and population heterogeneity as determinants of bacterial adaptation: the adaptomics of a single environmental transition / B. Ryall, G. Eydallin, T. Ferenci // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2012. – Vol. 76, N 3. – P. 597–625. <https://doi.org/10.1128/MMBR.05028-11>
19. Spontaneous point mutations in the capsule synthesis locus leading to structural and functional changes of the capsule in serogroup A meningococcal populations / E. Ispasanie [et al.] // Virulence. – 2018. – Vol. 9, N 1. – P. 1138–1149. <https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1467710>
20. Li, X. Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance / X. Li, W.-D. Heyer // Cell Res. – 2008. – Vol. 18, N 1. – P. 99–113. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.1>
21. Хархаль, А. Н. Иммунная система прокариот: молекулярные механизмы, применение в микробиологии / А. Н. Хархаль, Л. П. Титов // Вес. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2017. – № 3. – С. 121–128.
22. Maharjan, R. Mutational signatures indicative of environmental stress in bacteria / R. Maharjan, T. Ferenci // Mol. Biol. Evol. – 2015. – Vol. 32, N 2. – P. 380–391. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu306>

23. Laboratory methods for the diagnosis of meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*. – Pub. 2. – Geneva : WHO Press, 2011. – 311 p.
24. Jolley, K. A. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST. org website and their applications / K. A. Jolley, J. E. Bray, M. C. Maiden // Wellcome Open Res. – 2018. – Vol. 3. – Art. 124. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14826.1>
25. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms / S. Kumar [et al.] // Mol. Biol. Evol. – 2018. – Vol. 35, N 6. – P. 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
26. Бутвиловский, А. В. Изучение состава белков и нуклеиновых кислот / А. В. Бутвиловский, Е. В. Барковский, В. Э. Бутвиловский // Мед. журн. – 2009. – № 1. – С. 32–36.
27. Глазкова, С. Э. Молекулярно-генетический анализ хаускипинг генов *adk* и *aroE* штаммов *Neisseria meningitidis*, выделенных от больных менингитом / С. Э. Глазкова, Е. С. Носова, Л. П. Титов // Мед. журн. – 2007. – № 4. – С. 47–50.
28. Титов, Л. П. Геномико-протеомические основы эволюции и молекулярной эпидемиологии вирусов / Л. П. Титов, В. И. Вотяков // Вес. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2011. – № 1. – С. 109–124.
29. Чиркин, А. А. Биохимия / А. А. Чиркин, Е. О. Данченко. – М. : Мед. литература, 2010. – 624 с.
30. Аллельное разнообразие и филогения генов домашнего хозяйства изолятов *N. meningitidis*, циркулирующих на территории Республики Беларусь / С. Э. Глазкова [и др.] // Вес. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2011. – № 3. – С. 99–105.
31. 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. <https://doi.org/10.1556/AMicr.60.2013.4.2>
32. Specificity of the DNA mismatch repair system (MMR) and mutagenesis bias in bacteria / H. Long [et al.] // Mol. Biol. Evol. – 2018. – Vol. 35, N 10. – P. 2414–2421. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy134>
33. DNA repair profiles of disease-associated isolates of *Neisseria meningitidis* / T. Davidsen [et al.] // FEMS Immunol. Med. Microbiol. – 2007. – Vol. 49, N 2. – P. 243–251. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695x.2006.00195.x>
34. Кребс, Дж. Гены по Льюису / Дж. Кребс, Э. Голдштейн, С. Килпатрик ; пер. с англ. Д. В. Ребрикова, Н. Ю. Усман. – 2-е изд., испр. и доп. – М. : Лаб. знаний, 2017. – 919 с.

References

1. Bogaert D., Keijsers B., Huse S., Rossen J., Veenhoven R., van Gils E., Bruin J., Montijn R., Bonten M., Sanders E. Variability and diversity of nasopharyngeal microbiota in children: a metagenomic analysis. *PLoS ONE*, 2011, vol. 6, no. 2, p. e17035. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017035>
2. Sáez-Nieto J. A., Marcos C., Vindel A. Multicolonization of human nasopharynx due to *Neisseria spp.* *International Microbiology*, 1998, vol. 1, no. 1, pp. 59–63.
3. Schoen C., Kischkies L., Elias J., Ampattu B. J. Metabolism and virulence in *Neisseria meningitidis*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2014, vol. 4, art. 114. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00114>
4. Hao W., Ma J. H., Warren K., Tsang R. S., Low D. E., Jamieson F. B., Alexander D. C. Extensive genomic variation within clonal complexes of *Neisseria meningitidis*. *Genome Biology and Evolution*, 2011, vol. 3, pp. 1406–1418. <https://doi.org/10.1093/gbe/evr119>
5. Deasy A. M., Guccione E., Dale A. P., Andrews N., Evans C. M., Bennett J. S., Bratcher H. B., Maiden M. C., Gorringer A. R., Read R. C. Nasal inoculation of the commensal *Neisseria lactamica* inhibits carriage of *Neisseria meningitidis* by young adults: a controlled human infection study. *Clinical Infectious Diseases*, 2015, vol. 60, no. 10, pp. 1512–1520. <https://doi.org/10.1093/cid/civ098>
6. Bratcher H. B., Bennett J. S., Maiden M. C. Evolutionary and genomic insights into meningococcal biology. *Future Microbiology*, 2012, vol. 7, no. 7, pp. 873–885. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.62>
7. Titov L. P., Classification, nomenclature and evolution of bacteria significant for medicine. *Meditsinskii zhurnal* [Medical journal], 2006, no. 1, pp. 13–18 (in Russian).
8. Tzeng Y. L., Stephens D. S. Antimicrobial peptide resistance in *Neisseria meningitidis*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2015, vol. 1848, no. 11, pp. 3026–3031. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.05.006>
9. Nikiforov V. A., Kichikova V. V., Efimov E. I. Actual and unsolved problems of meningococcal infection at the present stage. *Meditsinskii al'manakh* [Medical almanac], 2011, no. 4, pp. 94–99 (in Russian).
10. Abramtseva M. V., Tarasov A. P., Nemirovskaya T. I. Meningococcal infection. Modern ideas about the pathogen, epidemiology, pathogenesis and diagnosis. Message 1. *Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie* [Biological products. Prevention, diagnosis, treatment], 2014, no. 3 (51), pp. 4–10 (in Russian).
11. Titov L. P. Meningococcal infection: current status of the problem. *Zdravookhranenie* [Healthcare], 2010, no. 12, pp. 15–23 (in Russian).
12. Vigué L., Eyre-Walker A. The comparative population genetics of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *PeerJ*, 2019, vol. 7, p. e7216. <https://doi.org/10.7717/peerj.7216>
13. Bärnes G. K., Brynildsrud O. B., Børud B., Workalemahu B., Kristiansen P. A., Beyene D., Aseffa A., Caugant D. A. Whole genome sequencing reveals within-host genetic changes in paired meningococcal carriage isolates from Ethiopia. *BMC Genomics*, 2017, vol. 18, no. 1, pp. 407–421. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3806-3>
14. Mustapha M. M., Marsh J. W., Krauland M. G., Fernandez J. O., de Lemos A. P. S., Dunning Hotopp J. C. [et al.]. Genomic epidemiology of hypervirulent serogroup W, ST-11 *Neisseria meningitidis*. *EBioMedicine*, 2015, vol. 2, no. 10, pp. 1447–1455. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.09.007>

15. Tibayrenc M., Ayala F. J. How clonal are *Neisseria species*? The epidemic clonality model revisited. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, vol. 112, no. 29, pp. 8909–8913. <https://doi.org/10.1073/pnas.1502900112>
16. *Genome Assembly and Annotation report*. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/172> (accessed 18.02.2020).
17. Budroni S., Siena E., Dunning Hotopp J. C., Seib K. L., Serruto D., Nofroni C. [et al.]. *Neisseria meningitidis* is structured in clades associated with restriction modification systems that modulate homologous recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, vol. 108, no. 11, pp. 4494–4499. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019751108>
18. Ryall B., Eydallin G., Ferenci T. Culture history and population heterogeneity as determinants of bacterial adaptation: the adaptomics of a single environmental transition. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2012, vol. 76, no. 3, pp. 597–625. <https://doi.org/10.1128/MMBR.05028-11>
19. Ispasanie E., Micoli F., Lamelas A., Keller D., Berti F., De Riccio R., Di Benedetto R., Rondini S., Pluschke G. Spontaneous point mutations in the capsule synthesis locus leading to structural and functional changes of the capsule in serogroup A meningococcal populations. *Virulence*, 2018, vol. 9, no. 1, pp. 1138–1149. <https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1467710>
20. Li X., Heyer W. D. Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Research*, 2008, vol. 18, no. 1, pp. 99–113. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.1>
21. Kharkhal' A. N., Titov L. P. Procariotic immune system: molecular mechanisms, application in microbiology. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2017, no. 3, pp. 121–128 (in Russian).
22. Maharjan R., Ferenci T. Mutational signatures indicative of environmental stress in bacteria. *Molecular Biology and Evolution*, 2015, vol. 32, no. 2, pp. 380–391. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu306>
23. *Laboratory methods for the diagnosis of meningitis caused by Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae, and Haemophilus influenzae*. Geneva, WHO Press Publ., 2011. 311 p.
24. Jolley K. A., Bray J. E., Maiden M. C. J. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Research*, 2018, vol. 3, prt. 124. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14826.1>
25. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, vol. 35, no. 6, pp. 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
26. Butvilovskii A. V., Barkovskii E. V., Butvilovskii V. E. The study of the composition of proteins and nucleic acids. *Meditinskii zhurnal* [Medical journal], 2009, no. 1, pp. 32–36 (in Russian).
27. Glazkova S. E., Nosova E. S., Titov L. P. Molecular genetic analysis of housekeeping genes *adk* and *aroE* of *Neisseria meningitidis* strains isolated from patients with meningitis. *Meditinskii zhurnal* [Medical journal], 2007, no. 4, pp. 47–50 (in Russian).
28. Titov L. P., Votyakov V. I. Genomic-proteomic foundations of viral evolution and molecular epidemiology. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2011, no. 1, pp. 109–124 (in Russian).
29. Chirkin A. A., Danchenko E. O. *Biochemistry*. Moscow, Meditsinskaya literatura Publ., 2010. 624 p. (in Russian).
30. Glazkova S. E., Titov L. P., Sinyuk K. V., Tulin S., Unemo M. *Allelic diversity and phylogeny of housekeeping genes of N. meningitidis isolates circulating in the Republic of Belarus*. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2011, no. 3, pp. 99–105 (in Russian).
31. Titov L. P., Siniuk K. V., Wollenberg K. K., Unemo M., Hedberg S. T., Glazkova S. E. [et al.]. Evolutionary epidemiology of *Neisseria meningitidis* strains in Belarus compared to other European countries. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 2013, vol. 60, no. 4, pp. 397–410. <https://doi.org/10.1556/AMicr.60.2013.4.2>
32. Long H., Miller S. F., Williams E., Lynch M. Specificity of the DNA Mismatch Repair System (MMR) and mutagenesis bias in bacteria. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, vol. 35, no. 10, pp. 2414–2421. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy134>
33. Davidsen T., Amundsen E. K., Rødland E. A., Tønjum T. DNA repair profiles of disease-associated isolates of *Neisseria meningitidis*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 2007, vol. 49, no. 2, pp. 243–251. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695x.2006.00195.x>
34. Krebs J. E., Goldstein E. S., Kilpatrick S. T. *Lewin's genes*. Burlington, Jones & Bartlett Learning, 2014. 940 p. (Russ. ed.: Krebs Dzh., Goldshtein E., Kilpatrik S. *Geny po L'yuinu*. 2nd ed. Moscow, Laboratoriya znanii Publ., 2017. 919 p.).

Информация об авторах

Хархаль Анна Николаевна – аспирант. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: anna-madlen69@yandex.ru. <https://orcid.org/0000-0003-4738-4681>.

Титов Леонид Петрович – член-корреспондент, д-р мед. наук, профессор, заведующий лабораторией. Республиканский научно-практический центр эпидемио-

Information about the authors

Hanna N. Kharkhal – Postgraduate student. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: anna-madlen69@yandex.ru. <https://orcid.org/0000-0003-4738-4681>.

Leonid P. Titov – Corresponding Member, D. Sc. (Med.), Professor, Head of the Laboratory. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23,

логии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: leonidtitov@tut.by

Янович Ольга Олеговна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: oyanov74@mail.ru

Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: leonidtitov@tut.by

Olga O. Yanovich – Ph. D. (Biol.), Leading Researcher. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: oyanov74@mail.ru