



ORIGINAL ARTICLE

Evolution of *Neisseria gonorrhoeae* is a continuing challenge for molecular detection of gonorrhoea: false negative gonococcal *porA* mutants are spreading internationally

Catherine A Ison,¹ Daniel Golparian,² Pamela Saunders,¹ Stephanie Chisholm,¹ Magnus Unemo²

¹Sexually Transmitted Bacteria Reference Unit, Health Protection Agency, London, UK
²WHO Collaborating Centre for Gonorrhoea and other STIs, National Reference Laboratory for Pathogenic Neisseria, Department of Laboratory Medicine, Clinical Microbiology, Örebro University Hospital, Örebro, Sweden

Correspondence to
Professor Catherine Ison,
Sexually Transmitted Bacteria Reference Unit, Health Protection Agency, 61 Colindale Avenue, Colindale, London NW9 5HT, UK;
catherine.ison@hpa.org.uk

Accepted 3 November 2012
Published Online First
13 December 2012

ABSTRACT

Objectives Identification of genetic targets specific to *Neisseria gonorrhoeae* for use in molecular detection methods has been a challenge. The *porA* pseudogene in *N gonorrhoeae* has been commonly used but recently gonococcal isolates giving a negative result in these PCRs have been reported. Here we describe the characterisation of two such gonococcal isolates received by the reference service at the Health Protection Agency, London, England.

Methods Phenotypic characterisation was achieved using conventional biochemical and immunological tests, matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS), antimicrobial susceptibility testing, serovar determination and detection of meningococcal PorA using monoclonal antibody 4BG4-E7. Genetic species confirmation was determined using commercial and in house PCRs and 16S rRNA gene sequencing. Molecular typing using the *N gonorrhoeae* multi-antigen sequence typing (NG-MAST) and multilocus sequence typing (MLST) was performed. The DNA sequence of the full-length gonococcal *porA* pseudogene was determined and compared with published sequences.

Results Both isolates were confirmed, biochemically and immunologically as *N gonorrhoeae*, but repeatedly gave negative results with two in house real-time PCR assays for the *porA* pseudogene. Further characterisation of these isolates identified the presence of a meningococcal *porA* sequence and showed these isolates belong to serovar Bropyst, and to NG-MAST sequence type (ST) 5967 and MLST ST1901.

Conclusions Gonococcal isolates that give false negative results with *porA* pseudogene PCR assays have now been identified in four countries, three of which are in Europe, and do not appear clonal. This report highlights the genetic diversity of *N gonorrhoeae*, which remains a challenge for the molecular detection methods.

INTRODUCTION

Molecular detection methods for the diagnosis of gonorrhoea have been hampered by the challenge of identifying genetic targets specific to the infecting organism, *Neisseria gonorrhoeae*. This is due primarily to the close relatedness with the genomes of other *Neisseria* species, that is, *Neisseria meningitidis* and several of the commensal *Neisseria* spp., and the high propensity of *N gonorrhoeae* to acquire DNA from other organisms.¹ Considerable advances have been made in recent years and both

commercial and in house molecular assays have become more robust and are in routine use in many laboratories, exhibiting increased sensitivity over conventional diagnostic methods such as culture.^{2,3} However, cross-reactivity with non-gonococcal *Neisseria* species, which has historically been a problem for many nucleic acid amplification tests (NAATs), particularly for samples from extra-genital sites such as the pharynx, can still occur resulting in potentially false positive results.^{4,5} Supplementary testing using alternative targets for confirmation has been recommended both for positive results from extra-genital samples and from low prevalence populations, and often uses in house assays.⁶⁻⁸

A number of targets have been evaluated for in house assays and the *porA* pseudogene in *N gonorrhoeae* has proved to be a specific and popular target. The *porA* pseudogene, originally thought to be found as an expressed *porA* gene only in *N meningitidis*, has inactivating deletions in both the promoter and the hypothetical PorA coding region that prevent gene expression in *N gonorrhoeae*.⁹ The highly conserved *porA* pseudogene has been considered to be present in all gonococcal strains giving a high sensitivity.^{9,10} It is lacking in commensal *Neisseria* species and also is sufficiently different from the *porA* gene in *N meningitidis* to give a high specificity and is therefore useful for diagnostic purposes, both as a supplementary assay or in situations where commercial diagnostic NAATs are not appropriate or affordable. A number of in house assays detecting the *porA* pseudogene have been described and widely used.^{11,12} However, rare false negative results in *porA* pseudogene PCRs have recently been reported, firstly from Australia,¹³ and subsequently from Scotland¹⁴ and Sweden.¹⁵

In this report, we describe the first occurrence of false negative results with a *porA* pseudogene PCR from England.

MATERIALS AND METHODS**Gonococcal isolates and conventional species verification**

Clinical isolates of *N gonorrhoeae* are referred to the Sexually Transmitted Bacteria Reference Unit at the Health Protection Agency, Colindale, UK from diagnostic laboratories across England for confirmation of anomalous results. In December 2011 two such

isolates were received on chocolate agar slopes and were retrieved by inoculation on both gonococcal (GC) non-selective agar supplemented with 1% IsoVitaleX, and on gonococcal selective agar additionally supplemented with 5% laked blood and the antimicrobial agents; vancomycin, colistin, amphotericin B and trimethoprim, and then incubated at 36°C for 24 h in 5% carbon dioxide. Resulting colonies of oxidase positive, Gram negative diplococci were biochemically verified to species level using carbohydrate utilisation tests and preformed enzyme detection by API-NH (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) and Microscan HNID (Siemens Healthcare Diagnostics (UK), Camberley, UK), immunologically with the Phadebact GC Monoclonal Test (Bactus AB, Uppsala, Sweden) and by molecular confirmation using a *porA* pseudogene real-time PCR (RT-PCR)¹¹ and any negative results further tested using a *opa* gene RT-PCR.¹⁶

Further phenotypic characterisation

These isolates were confirmed as *N gonorrhoeae* using matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) with a MicroFlex LT (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

The susceptibility (mg/l) to cefixime, ceftriaxone, ciprofloxacin, azithromycin and spectinomycin was determined using the Etest methodology (bioMérieux, Solna, Sweden), according to the instructions from the manufacturer. The breakpoints used for determining antimicrobial resistance were according to the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST; <http://www.eucast.org>). β-lactamase production was detected using nitrocefin discs.

Serovar determination using the Phadebact GC Monoclonal Serovar Test (Bactus AB, Uppsala, Sweden) was performed in accordance with the instructions from the manufacturer. The monoclonal antibody 4BG4-E7 against *N meningitidis* PorA was used to confirm or rule out the expression of meningococcal PorA (<http://www.nibsc.ac.uk>).

Genetic characterisation

For additional species verification, the APTIMA Combo 2 and APTIMA GC (Gen-Probe, San Diego, California, USA) in the PANTHER system (Gen-Probe, San Diego, California, USA), GeneXpert CT/NG assay (Cepheid, Sunnyvale, California, USA) as well as 16S rDNA sequencing were applied according to the manufacturer's instructions and as previously described, respectively.¹⁷ A dual-target PCR (targeting *porA* pseudogene and *opa* genes),¹⁸ and one additional *porA* pseudogene PCR¹² were also performed.

Molecular epidemiological characterisation was performed using the *N gonorrhoeae* multi-antigen sequence typing (NG-MAST),¹⁹ and multilocus sequence typing (MLST),²⁰ as described elsewhere.

Sequencing of the full-length gonococcal *porA* pseudogene was performed as previously described;⁹ however, including also meningococcal primers described elsewhere,²¹ in the sequencing. The *porA* gene sequence was used to acquire the meningococcal *porA* genosubtype and for GenBank BLAST analysis. Multiple-sequence alignments of the *porA* nucleotide sequences and the deduced corresponding amino acid sequences of PorA were performed in the software BioEdit Sequence Alignment Editor V7.0.9.0 with manual adjustment.

RESULTS

Species verification of *porA* pseudogene PCR negative

N gonorrhoeae isolates from England (n=2)

In December 2011 two urethral isolates, 356 and 088, were received at the Health Protection Agency from male individuals

who were 26 years old and had attended a genitourinary medicine clinic and were 30 years old and had attended general practice, respectively. These patients were not known to be linked and their sexual orientation was unknown. The isolates were positive for *N gonorrhoeae* in all phenotypic assays but gave negative results in both the *porA* pseudogene PCRs.^{11 12} All the conventional phenotypic tests, MALDI-TOF-MS analysis, APTIMA Combo 2 test, APTIMA GC test, GeneXpert CT/NG assay, the dual-target gonococcal PCR (only positive for the *opa* genes), *opa* gene PCR and 16S rDNA sequencing unequivocally identified the isolates as *N gonorrhoeae* (table 1).

Phenotypic characterisation of *porA* pseudogene PCR negative *N gonorrhoeae* isolates from England (n=2)

The two isolates displayed similar antimicrobial sensitivity pattern, and both isolates were resistant to ciprofloxacin but susceptible to cefixime, ceftriaxone, azithromycin and spectinomycin (table 1). Neither of the isolates produced β-lactamase. Furthermore, serovar determination assigned both isolates as gonococcal serovar Broyst (table 1), and both reacted strongly with the monoclonal antibody 4BG4-E7 against *N meningitidis* PorA.

Genetic characterisation of *porA* pseudogene PCR negative *N gonorrhoeae* isolates from England (n=2)

Both isolates were of the same NG-MAST sequence type (ST), that is, ST5967, and were assigned as MLST ST1901. The isolates displayed an identical *porA* gene sequence, which had a 98% sequence identity to the *porA* gene sequence of *N meningitidis* strain MC 278 (GenBank accession no. GQ173789) (figure 1), and was assigned to meningococcal genosubtype P1.22-New,14-5,36-2.

DISCUSSION

In this report, we describe the identification and detailed characteristics of two isolates of *N gonorrhoeae* from patients diagnosed in England, which lacked the traditional gonococcal *porA* pseudogene. Both isolates were confirmed, biochemically and immunologically as *N gonorrhoeae*, but repeatedly gave false negative results in two different in house real-time PCR assays for the *porA* pseudogene,^{11 12} which are commonly used in many laboratories globally. Further characterisation identified the presence of a meningococcal *porA* sequence instead of the conventional gonococcal *porA* pseudogene.

The isolates displayed an identical *porA* gene sequence, which was also identical to the partial *porA* gene sequence reported in the previously described isolate in Australia,¹³ and, with exception of a single nucleotide deletion, GC1 in Scotland.¹⁴ However, the *porA* gene sequence substantially differed from the *porA* gene in the previously described isolate in Sweden (53 nucleotides),¹⁵ and GC3 in Scotland (62 nucleotides)¹⁴ (figure 1). Both the primer and probe binding sites used in previously published *porA* pseudogene PCRs^{11 12} have multiple mismatches and deletions in all the described gonococcal *porA* mutants (figure 1), which explains the false negative reaction for these gonococcal strains. This evidence is confirmed further by the positive reaction of the isolates to the monoclonal 4BG4-E7 indicating the presence of the expressible meningococcal *porA* gene and not the *porA* pseudogene.

The isolates were assigned to gonococcal serovar Broyst, NG-MAST ST5967, an ST which has not been identified in other studies performed at the Health Protection Agency, and MLST ST1901 indicating again that these isolates were

Table 1 Detailed description of PCR false negative *porA* mutant *Neisseria gonorrhoeae* isolates identified in England, and comparison to previously reported *porA* mutant isolates from Sweden, Scotland and Australia.

	<i>porA</i> mutant gonococcal isolates (country)					
	356 (England)	088 (England)	Variant (Sweden)*	GC1 (Scotland)*	GC3 (Scotland)*	Variant (Australia)*
Screening and confirmatory tests						
<i>porA</i> pseudogene PCR†	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
Culture‡	<i>N gonorrhoeae</i>	<i>N gonorrhoeae</i>	<i>N gonorrhoeae</i>	<i>N gonorrhoeae</i>	<i>N gonorrhoeae</i>	<i>N gonorrhoeae</i>
Gen-Probe APTIMA	<i>N gonorrhoeae</i>	<i>N gonorrhoeae</i>	<i>N gonorrhoeae</i>	<i>N gonorrhoeae</i>	<i>N gonorrhoeae</i>	§
16s rDNA (100% ID)	<i>N gonorrhoeae</i>	<i>N gonorrhoeae</i>	<i>N gonorrhoeae</i>	§	§	§
MALDI-TOF-MS	<i>N gonorrhoeae</i>	<i>N gonorrhoeae</i>	<i>N gonorrhoeae</i>	§	§	<i>N gonorrhoeae</i>
<i>porA</i> gene sequencing						
<i>porA</i> GenBank BLAST	98% identity to MC 278	98% identity to MC 278	92% identity to MC 278¶	99% identity to MC 278¶	99% identity to MC 278¶	99% identity to MC 278¶
Meningococcal <i>porA</i> genosubtype	P1.22-New,14-5,36-2	P1.22-New,14-5,36-2	P1.21-6,2-48,35-1	P1.¶,14-5,36-2	P1.¶,23-13,36-2	P1.¶,14-5,36-2
Molecular epidemiological typing						
NG-MAST	5967	5967	2382	5967	3149	5377
MLST	1901	1901	7367	§	§	1901
Serovar	Bropyst	Bropyst	Byust	WII/III	WII/III	Bropyst
Antimicrobial susceptibility, MIC (mg/l)						
Cefixime	<0.016	<0.016	<0.016	S**	S**	§
Ceftriaxone	0.016	0.032	0.002	S**	S**	0.03
Ciprofloxacin	>32	>32	0.002	R**	R**	16
Azithromycin	0.125	0.25	6	S**	S**	S**
Spectinomycin	8	12	8	S**	S**	S**
Case						
Anatomical site	Urethral	Urethral	Pharyngeal	Rectal	Urethral	Rectal, pharyngeal
Year	2011	2011	2011	2011	2010	2011
Sexual orientation	Not known	Not known	Heterosexual	MSM	MSM	MSM

*Previously published isolates.^{13–15}†*porA* pseudogene PCR,^{11,12} and/or dual-target PCR (*porA* and *opa* genes).¹⁸

‡Including species confirmation using selective culture, rapid oxidase production, microscopy after Gram staining, sugar utilisation test, API NH (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) and Phadebact GC Monoclonal Test (Becton AB, Uppsala, Sweden).

§Analysis not performed.

¶Performed in this study on available full-length or partial *porA* gene sequences. Variable region 1 in the meningococcal *porA* genotyping was not possible to determine due to the lack of full-length *porA* sequence in previously published papers from Scotland and Australia.^{13,14}

**MIC data not available.

MALDI-TOF-MS, matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry; MC 278, *Neisseria meningitidis* strain 278 (GenBank accession no. GQ173789); MLST, multilocus sequence typing; MIC, minimum inhibitory concentration; MSM, men who have sex with men; NG-MAST, *Neisseria gonorrhoeae* multi-antigen sequence typing.

indistinguishable from one of the two previously described gonococcal *porA* mutants in Scotland¹⁴ and similar to the first reported *porA* mutant in Australia,¹³ but clearly different from the second *porA* mutant found in Scotland,¹⁴ and the one reported in Sweden.¹⁵

Accordingly, several different gonococcal strains that cannot be detected in *porA* pseudogene PCRs are spreading internationally (presently identified in three European countries and Australia). Thus it appears clear that more than one gonococcal clone has acquired a meningococcal *porA* sequence, probably through horizontal gene transfer and subsequent recombination. Pharyngeal gonorrhoea is predominantly asymptomatic and more difficult to treat than urogenital gonorrhoea. The pharynx is an environment where gonococci and *N meningitidis* strains can coexist and this may provide the means for this gene transfer. The pharynx is also a frequent site of gonococcal infection in men who have sex with men (MSM). Worryingly, most of the gonococcal *porA* mutant isolates previously reported have been identified among MSM (table 1), and accordingly these strains are already circulating in a high-frequency transmitting risk group.

In conclusion, gonococcal isolates that give false negative results with *porA* pseudogene PCRs have now been identified in

four countries, three of which are in Europe, and the identified strains do not appear clonal. This report highlights the genetic diversity and ongoing evolution of *N gonorrhoeae*, which remains a major challenge for the molecular detection methods. Strains circulating in the population which can go undetected by standard methods and can cause asymptomatic infection can have a significant effect on the epidemiology of the infection. This was highlighted by the emergence of the new variant of *Chlamydia trachomatis*, which had a deletion covering the target sites of two commercial NAAT assays in frequent use in Sweden and other countries worldwide.²² The *porA* pseudogene is mostly used as a diagnostic target of in house assays and these assays are unlikely to be in widespread use in England, and the target is not used in any of the commercial assays from the main manufacturers of gonococcal NAATs used in the European Union or the USA, so the potential for these isolates to spread widely in these regions is limited. However, enhanced awareness in laboratories and among clinicians of the spread of such strains is needed, and screening for them can be crucial. The opportunities to use combinations of different diagnostic methods (such as NAAT and culture) and multi-target (separately detected) NAATs in a laboratory remain exceedingly valuable.

Basic science

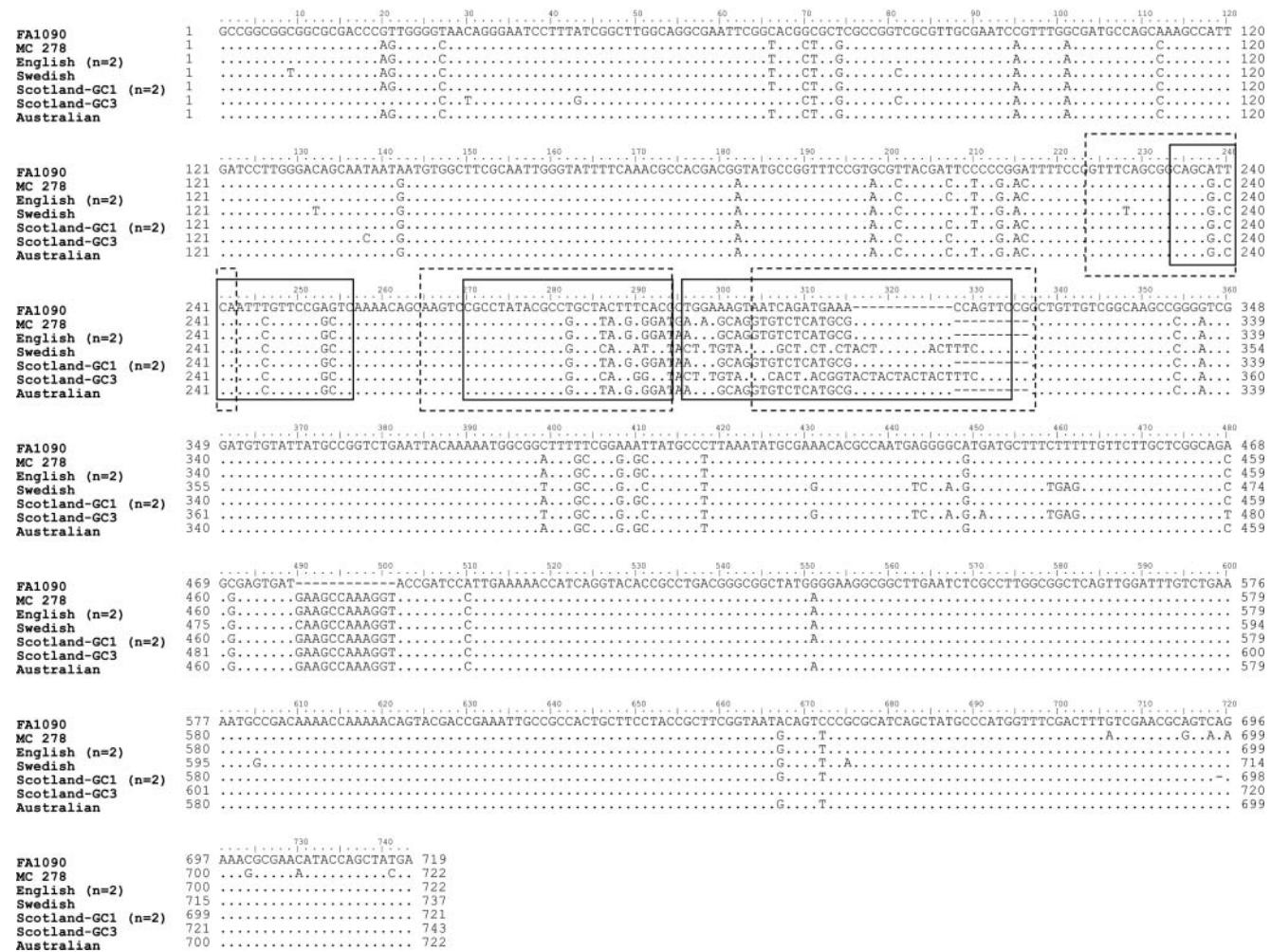


Figure 1 Nucleotide sequence alignment of *porA* gene sequences from the examined English *Neisseria gonorrhoeae* *porA* mutants, compared to the *porA* sequences of previously identified *porA* mutants in Sweden,¹⁵ Scotland,¹⁴ and Australia,¹³ as well as the wild-type *porA* pseudogene sequence of *N gonorrhoeae* reference strain FA1090 (GenBank accession no. AJ223447) and the *porA* gene sequence of *Neisseria meningitidis* strain 278 (GenBank accession no. GQ173789). Sequences in full boxes and in dashed boxes indicate PCR primer and probe binding sites for the *porA* pseudogene PCR described by Whiley *et al*¹¹ and Hjelmevoll *et al*¹² respectively.

Key messages

- ▶ Molecular detection of gonorrhoea is dependent on choice of a nucleic acid target specific to *Neisseria gonorrhoeae* and presents an ongoing challenge.
 - ▶ The *porA* pseudogene in *N gonorrhoeae* is not expressed and is sufficiently different from the *porA* gene in *Neisseria meningitidis* to be useful for diagnostic purposes.
 - ▶ This is the first report of two gonococcal isolates from England that lack the *porA* pseudogene.
 - ▶ If these gonococcal isolates are undetected they have the potential to impact on the epidemiology of gonorrhoea.

Acknowledgements The authors would like to thank Professor Friedrich Muhschlegel and the staff of the Department of Laboratory Medicine, East Kent Microbiology Service, Ashford, Kent for the primary isolation and referral of these isolates and Michael Dawson for critical review of the manuscript.

Contributors CI and MU designed the study, analysed and interpreted the data and wrote the initial draft of the manuscript. DG, PS and SC performed all the laboratory analysis. All authors were involved in the preparations of the final draft of the paper.

Funding This work was supported by the Örebro County Council Research Committee and the Foundation for Medical Research (09/029, 25/3 2009) at Örebro University Hospital, Sweden.

Competing interests None.

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

REFERENCES

1. **Biswas GD**, Thompson SA, Sparling PF. Gene transfer in *Neisseria gonorrhoeae*. *Clin Microbiol Rev* 1989;2(Suppl):S24–8.
 2. **Cook RL**, Hutchison SL, Østergaard L, et al. Systematic review: noninvasive testing for *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Ann Intern Med* 2005;142:914–25.
 3. **Alexander S**. The challenges of detecting gonorrhoea and chlamydia in rectal and pharyngeal sites: could we, should we, be doing more? *Sex Transm Infect* 2009;85:159–60.
 4. **Palmer HM**, Mallinson H, Wood RL, et al. Evaluation of the specificities of five DNA amplification methods for the detection of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol* 2003;41:835–7.
 5. **Tabrizi SN**, Unemo M, Limnios AE, et al. Evaluation of six commercial nucleic acid amplification tests for detection of *Neisseria gonorrhoeae* and other *Neisseria* species. *J Clin Microbiol* 2011;49:3610–15.
 6. **Health Protection Agency 2010**. Guidance for gonorrhoea testing in England and Wales. http://www.hpa.org.uk/webc/HPAwebFile/HPAweb_C/1267550166455 (accessed 19 Nov 2012).
 7. **Bignell C**, IUSTI/WHO. 2009 European (IUSTI/WHO) guideline on the diagnosis and treatment of gonorrhoea in adults. *Int J STD AIDS* 2009;20:453–7.
 8. **Whiley DM**, Garland SM, Harnett G, et al. Exploring 'best practice' for nucleic acid detection of *Neisseria gonorrhoeae*. *Sexual Health* 2008;5:17–23.

9. **Unemo M**, Norlén O, Fredlund H. The *porA* pseudogene of *Neisseria gonorrhoeae*—low level of genetic polymorphism and a few, mainly identical, inactivating mutations. *APMIS* 2005;**113**:410–9.
10. **Whiley DM**, Anderson TP, Barratt K, et al. Evidence that the gonococcal *porA* pseudogene is present in a broad range of *Neisseria gonorrhoeae* strains; suitability as a diagnostic target. *Pathology* 2006;**38**:445–8.
11. **Whiley DM**, Sloots TP. Comparison of three in-house multiplex PCR assays for the detection of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* using real-time and conventional methodologies. *Pathology* 2005;**37**:364–70.
12. **Hjelmevoll SO**, Olsen ME, Sollid JU, et al. A fast real-time polymerase chain reaction method for sensitive and specific detection of the *Neisseria gonorrhoeae porA* pseudogene. *J Mol Diagn* 2006;**8**:574–81.
13. **Whiley DM**, Limnios A, Moon NJ, et al. False-negative results using *Neisseria gonorrhoeae porA* pseudogene PCR—a clinical gonococcal isolate with an *N. meningitidis porA* sequence, Australia, March 2011. *Euro Surveill* 2011;**16**: pii=19874.
14. **Eastick K**, Winter A, Jamdar S. Identification of *Neisseria gonorrhoeae* isolates with a recombinant *porA* gene in Scotland, United Kingdom, 2010 to 2011. *Euro Surveill* 2012;**17**:pii=20101.
15. **Golparian D**, Johansson E, Unemo M. Clinical *Neisseria gonorrhoeae* isolate with a *N. meningitidis porA* gene and no prolylminopeptidase activity, Sweden 2011 —danger of false negative genetic and culture diagnostic results. *Euro Surveill* 2012;**17**:pii=20102.
16. **Tabrizi SN**, Chen S, Tapsall J, et al. Evaluation of *opa*-based real-time PCR for detection of *Neisseria gonorrhoeae*. *Sex Transm Dis* 2005;**32**:199–202.
17. **Hjelmevoll SO**, Olsen ME, Sollid JU, et al. Clinical validation of a real-time polymerase chain reaction detection of *Neisseria gonorrhoeae porA* pseudogene versus culture techniques. *Sex Transm Dis* 2008;**35**:517–20.
18. **Goire N**, Nissen MD, LeCorne GM, et al. A duplex *Neisseria gonorrhoeae* real-time polymerase chain reaction assay targeting the gonococcal *porA* pseudogene and multicity *opa* genes. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008;**61**:6–12.
19. **Martin IM**, Ison CA, Aanensen DM, et al. Rapid sequence-based identification of gonococcal transmission clusters in a large metropolitan area. *J Infect Dis* 2004;**189**:1497–505.
20. **Ohnishi M**, Watanabe Y, Ono E, et al. Spread of a chromosomal cefixime-resistant *penA* gene among different *Neisseria gonorrhoeae* lineages. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;**54**:1060–7.
21. **Mölling P**, Unemo M, Bäckman A, et al. Genosubtyping by sequencing group A, B and C meningococci; a tool for epidemiological studies of epidemics, clusters and sporadic cases. *APMIS* 2000;**108**:509–16.
22. **Ripa T**, Nilsson PA. A variant of *Chlamydia trachomatis* with deletion in cryptic plasmid: implications for use of PCR diagnostic tests. *Euro Surveill* 2006;**11**:E061109.2.



Sexually Transmitted Infections

sti.bmj.com

Генетические перестройки *Neisseria gonorrhoeae* – серьёзная проблема для молекулярных методов диагностики гонореи. Мутантные штаммы, не содержащие *porA*, получают всемирное распространение

Кетерин А.Айсон, Дэниэль Голпарян, Памела Саундерс, Стефани Чисхолм, Магнус Унено

Sex Transm Infect 2013;89:197–201. опубликовано на сайте 13 декабря 2012 года
doi:10.1136/sextrans-2012-050829

Источник статьи:

<http://sti.bmj.com/content/89/3/197.full>

Источники литературы:

Авторы данной статьи ссылаются на 21 статью, 7 из которых можно скачать бесплатно на сайте:

<http://sti.bmj.com/content/89/3/197.full.html#ref-list-1>

Адрес для получения разрешений:

<http://group.bmj.com/group/rights-licensing/permissions>

Адрес для заказа репринтов:

<http://journals.bmj.com/cgi/reprintform>

Адрес для оформления подписки:

<http://group.bmj.com/subscribe/>

Translated by the International Union against Sexually Transmitted Infections

BMJ Publishing Group Limited takes no responsibility for the accuracy of the translation from the published English original and is not liable for any errors which may occur.



Перевод Т.А. Румянцевой

Оригинальная статья

Генетические перестройки *Neisseria gonorrhoeae* – серьёзная проблема для молекулярных методов диагностики гонореи. Мутантные штаммы, не содержащие *rogA*, получают всемирное распространение

Кетерин А. Айсон¹, Дэниэль Голпарян², Памела Саундерс¹, Стефани Чисхолм¹, Магнус Унено²

¹Референс-центр по бактериальным инфекциям, передаваемым половым путём, Агентство по Защите Здоровья Населения, Лондон, Великобритания

² Центр сотрудничества ВОЗ по гонорее и другим ИППП, Национальная Референс-Лаборатория по патогенным нейссериям, отделение лабораторной медицины, клинической микробиологии, Университетский Госпиталь Эребру, Эребру, Швеция.

Адрес для корреспонденции:

Профессор Кетерин Айсон,
Референс-центр по
бактериальным инфекциям,
передаваемым половым
путём, Агентство по Защите
Здоровья Населения, Улица
Колиндейл 61, Колиндейл,
Лондон NW9 5HT ,
Великобритания
(61 Colindale Avenue,
Colindale,
London NW9 5HT, UK);
catherine.ison@hpa.org.uk

Принято в печать 3 ноября
2012, опубликовано в системе
Online First 13 декабря 2012

Основные положения

Цель: Определение специфичных генетический мишней для детекции *Neisseria gonorrhoeae* молекулярно-генетическими методами всегда было проблемой для разработчиков. Наиболее часто в качестве мишени используют *rogA* псевдоген *N.gonorrhoeae*, однако недавно появились сообщения об изолятах гонококка, для которых были получены отрицательные результаты при проведении ПЦР с использованием подобных тестов. В этой работе дано описание двух изолятов, поступивших в Референс-центр Агентства по Защите Здоровья Населения, Лондон, Англия.

Материалы и методы: Для получения фенотипической характеристики изолятов применяли рутинные биохимические и иммунологические исследования, времяпролётную масс-спектрометрию с лазерной ионизацией и десорбцией из жидкой матрицы (MALDI-TOF-MS), определяли чувствительности к антибактериальным препаратам, а также серовар гонококков; проводили детекцию *rogA* гена менингококков с использованием моноклональных антител 4BG4-E7. Подтверждение принадлежности изолятов к виду *N.gonorrhoeae* на генетическом уровне проводили с использованием наборов реагентов для амплификации как серийно выпускаемых, так и самостоятельно разработанных, а также с помощью секвенирования гена 16S rRNA.

Мультиантигенное секвенирование-типовирование (NG-MAST) и мультилокусное секвенирование-типовирование (MLST) применяли для молекулярного типирования изолятов. Был проведен анализ полной последовательности *rogA* псевдогена и сравнение этой последовательности с опубликованными ранее данными.

Результаты: Было получено подтверждение того, что оба изолята являются изолятами *N.gonorrhoeae*, однако при проведении серии постановок ПЦР с использованием двух наборов реагентов собственного производства (мишень - *rogA* псевдоген) были получены отрицательные результаты. При дальнейшем изучении было установлено, что данные изоляты несут в себе ген *rogA* менингококков, определено, что изучаемые изоляты относятся к серовару B:group, NG-MAST сиквенс-типу (CT) 5967 и MLST CT 1901.

Выводы: К настоящему моменту изоляты *N.gonorrhoeae*, для которых были получены отрицательные результаты ПЦР с использованием *rogA* псевдогена в качестве мишени, были обнаружены в четырёх странах (три из которых находятся в Европе). Скорее всего, эти изоляты не являются производными одного клона. Данная публикация описывает генетический полиморфизм *N.gonorrhoeae*, который создаёт существенные проблемы для молекулярных методов диагностики гонореи.

Введение

Выявление генетических мишеней, специфичных для *Neisseria gonorrhoeae*, всегда являлось препятствием на пути развития молекулярных методов диагностики гонореи. Для этого есть 2 основные причины: схожесть генома *N.gonorrhoeae* с близкородственными видами рода *Neisseria* (*Neisseria meningitidis* и несколько видов непатогенных нейссерий); а также склонность *N.gonorrhoeae* к включению в свою ДНК участков генома других микроорганизмов.¹ Как бы то ни было, за последние годы удалось добиться значительных успехов в этой области, что привело к появлению наборов реагентов как выпускаемых серийно, так и in-house (внутрилабораторных); такие тест-системы применяются во многих лабораториях. Показано, что чувствительность данных наборов реагентов превышает чувствительность «классических» методов диагностики гонореи, например, посева.^{2,3} Стоит отметить, что перекрёстные реакции с другими видами нейссерий, которые всегда осложняли использование методов амплификации нуклеиновых кислот (МАНК), в особенности для экстрагенитальных образцов (например, мазки из зева), всё ещё встречаются. Такие реакции могут приводить к получению ложноположительных результатов.^{4,5} В связи с этим было рекомендовано тестиовать положительные образцы на наличие альтернативной мишени гонококков (рекомендации для экстрагенитальных образцов, а также для популяций с низкой распространенностью гонококковой инфекции). Такой подход часто реализуется в in-house наборах реагентов.⁶⁻⁸

К настоящему моменту проведена оценка целого ряда потенциальных генетических мишеней для выявления *N.gonorrhoeae*. Было показано, что *porA* псевдоген является достаточно специфичной и часто используемой мишенью в in-house наборах реагентов. Ранее считалось, что ген *porA* обнаруживается только у *N.meningitidis*, находясь у данного микроорганизма в экспрессированном состоянии. Позднее

было установлено наличие мутаций как в промоторе, так и в кодирующем участке гена *porA* у *N.gonorrhoeae*. Данные мутации приводят к инактивации гена у гонококков.⁹ Многие полагали, что высококонсервативный *porA* псевдоген присутствует во всех штаммах гонококков, что позволяет добиться высокой чувствительности при использовании данной мишени.^{9,10} Кроме того *porA* псевдоген отсутствует у непатогенных нейссерий и имеет достаточно значимые отличия от гена *porA* у *N.meningitidis*, благодаря чему обеспечивается высокая специфичность исследований. Описанные характеристики позволяют использовать *porA* псевдоген в качестве мишени для диагностики гонореи как подтверждающий тест или же как основной тест в тех лабораториях, где серийно выпускаемые наборы реагентов не применяются по тем или иным причинам. К настоящему моменту разработан и широко применяется ряд in-house тестов, направленных на выявление *porA* псевдогена.^{11,12} Однако в последнее время появились сообщения о получении ложноотрицательных результатов при использовании данной мишени. Впервые такие данные были получены в Австралии¹³, позднее в Шотландии¹⁴ и Швеции¹⁵.

В данной работе описан первый случай получения ложноотрицательного результата в Англии при использовании *porA* псевдогена в качестве мишени для диагностики гонореи.

Материалы и методы

Получение изолятов и видовая идентификация «классическими» методами

Для подтверждения спорных результатов тестиирования клинические изоляты *N.gonorrhoeae* направляются в Референс-центр по бактериальным инфекциям, передаваемым половым путём, (Агентство по Защите Здоровья Населения, Колиндейл, Великобритания) из всех лабораторий Англии. В декабре 2011 года 2 таких изолята было получено на скошенном шоколадном агаре. Для восстановления культуры были пересеяны на

неселективную гонококковую среду с добавлением 1% IsoVitaleX (комерческое название добавки, избирательно стимулирующей рост гонококков – прим. переводчика), а также на селективный агар с 5% лаковой крови с добавлением антибактериальных препаратов: ванкомицина, колистина, амфотерицина В и триметопrima. Инкубировали культуру при 36°C в течение 24 часов в присутствие 5% CO₂. Для видовой идентификации полученных оксидаз-позитивных Грам-отрицательных колоний проводили тест утилизации углеводов; ферментный анализ с использованием API-NH (bioMérieux, Франция) и Microscan HNID (Siemens Healthcare Diagnostics, Великобритания); иммунологический анализ с использованием набора реагентов Phadebact GC Monoclonal Test (Bactus AB, Швеция); молекулярно-биологическое исследование с использованием набора реагентов в формате ПЦР в реальном времени для определения рогА псевдогена;¹¹ все отрицательные результаты по данным ПЦР были повторно исследованы с использованием набора реагентов в формате ПЦР в реальном времени для определения гена ора.¹⁶

Дальнейшая фенотипическая характеристика

Для подтверждения принадлежности изолятов к виду *N.gonorrhoeae* была использована времяпролётная масс-спектрометрия с лазерной ионизацией и десорбцией из жидкой матрицы (MALDI-TOF-MS) с применением оборудования MicroFlex LT (Bruker Daltonics, Бремен, Германия). Для определения чувствительности(мг / л) к цефаксону, цефтриаксону, ципрофлоксацину, азитромицину и спектиномицину технологию Etest (bioMérieux, Solna, Швеция), в соответствии с инструкцией производителя. Для установления устойчивости к препаратам использовали граничные значения в соответствии с рекомендациями Европейского комитета по тестированию чувствительности к антимикробным препаратам (EUCAST;

<http://www.eucast.org>). Продукцию β-лактамаз определяли с использованием нитроцефиноевых дисков.

Для определения серовара использовали Phadebact GC Monoclonal Test

(Bactus AB, Уппсала, Швеция) в соответствии с инструкцией производителя.

Для подтверждения или исключения экспрессии менингококкового гена рогA применяли моноклональные антитела 4BG4-E7 к гену рогA *N. meningitidis* (<http://www.nibsc.ac.uk>).

Генетическая характеристика

Для подтверждения принадлежности полученных культур к виду *N. gonorrhoeae* использовали наборы реагентов APTIMA Combo 2 и APTIMA GC (Gen-Probe, Сан-Диего, Калифорния, США) на приборе PANTHER (Gen-Probe, Сан-Диего, Калифорния, США),

а также GeneXpert CT / NG (Cepheid, Саннивейл, Калифорния, США) в соответствии с инструкцией производителя. Кроме того, проводили секвенирование фрагмента 16S rDNA в соответствии с технологией, описанной в предыдущих работах.¹⁷

Дополнительно проводили ПЦР на 2 мишени *N. gonorrhoeae* (рогА псевдоген и ген ора)¹⁸, а также дополнительную ПЦР на рогА псевдоген.¹²

Для молекулярно-эпидемиологической характеристики штаммов проводили Мультиантigen-Сиквенс-Типирование *Neisseria gonorrhoeae* (NG-MAST),¹⁹ и Мультилокусное Секвенирование-Типирование (MLST),²⁰ (подробные методики описаны в других работах).

Секвенирование полной последовательности псевдогена проводили по описанной ранее методике,⁹ но с добавлением в реакционную смесь праймеров на менингококк, описанных в других источниках.²¹ Полученная последовательность гена рогА проанализирована в программе BLAST (GenBank) для определения генетического субтипа.

Выравнивание последовательностей гена рогА осуществляли в программе BioEdit

Sequence Alignment (V.7.0.9.0) с ручной корректировкой.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Подтверждение видовой принадлежности изолятов *N. gonorrhoeae* из Англии, демонстрирующих отрицательный результат при проведении ПЦР на *porA* псевдоген (N=2)

В декабре 2011 года два изолятов (356 и 088), полученных из биоматериала из уретры мужчин, были доставлены в Агентство по Защите Здоровья Населения. Изоляты получены от следующих пациентов: 1) пациент 26 лет, обратившийся в клинику по лечению заболеваний мочеполовой сферы; 2) пациент 30 лет, обратившийся к врачу общей практики. Нет данных об эпидемиологической связи этих двух случаев; сексуальная ориентация пациентов неизвестна. Для двух изолятов получен положительный результат

с применением всех фенотипических методов выявления *N. gonorrhoeae*, но в двух ПЦР на *porA* псевдоген результат был отрицательным.^{11, 12} Все используемые в данной работе методы однозначно доказали принадлежность изолятов к виду *N. gonorrhoeae*: рутинные фенотипические тесты, MALDI-TOF-масс-спектрометрия, APTIMA Combo 2, APTIMA GC, GeneXpert CT / NG, ПЦР на 2 мишени *N. gonorrhoeae* (положительный результат для гена *ora*), дополнительная ПЦР на ген *ora*, секвенирование фрагмента 16S rDNA , (таблица 1).

Фенотипическая характеристика изолятов *N. gonorrhoeae* из Англии, демонстрирующих отрицательный результат при проведении ПЦР на *porA* псевдоген (N = 2)

Для двух изолятов получены одинаковые профили antimикробной чувствительности: оба изолятов продемонстрировали резистентность к ципрофлоксацину; чувствительность к цефиксому, цефтриаксону, азитромицину и спектиномицину (таблица 1). Ни один из этих штаммов не продуцировал β-лактамаз.

Для двух изолятов определена принадлежность к серовару Bropyst (таблица 1), для обоих получен резко-положительный результат реакции с моноклональными антителами 4BG4-E7 к гену *porA* *N. meningitidis*.

Генетическая характеристика изолятов *N. gonorrhoeae* из Англии, демонстрирующих отрицательный результат при проведении ПЦР на *porA* псевдоген (N=2)

Оба изоляты принадлежали к одному и тому же NG-MAST сиквенс-типу, ST5967, а также к одному MLST сиквенс-типу, 1901. Последовательность гена *porA* также была идентичной и демонстрировала сходство 98% с последовательностью гена *porA* *N.meningitidis* (штамм MC 278, идентификационный номер в GenBank GQ173789) (рис. 1), вследствие чего изоляты были отнесены к генетическому субтипу менингококков P1.22-New,14-5,36-2.

ОБСУЖДЕНИЕ

В этом сообщении описан процесс идентификации, а также подробные характеристики двух изолятов *N. gonorrhoeae*, не содержащих *porA* псевдоген (оба изолят получены в Англии). Принадлежность изолятов к виду *N. gonorrhoeae* была подтверждена как биохимическими, так и иммунологическими методами, при этом для обоих изолятов неоднократно были получены ложноотрицательные результаты при постановке ПЦР в реальном времени с *porA* псевдогеном в качестве мишени (с использованием in-house наборов реагентов).^{11, 12} Стоит отметить, что подобные наборы реагентов используются во многих лабораториях по всему миру. При дальнейшем изучении было установлено, что данные изоляты содержат в геноме ген *porA*, характерный для менингококков, вместо *porA* псевдогена, характерного для гонококков.

Последовательность гена *porA* у двух изолятов совпадала; совпадала она и с последовательностью (неполной) *porA* гена изолят, полученного в Австралии¹³ и, за

исключением единичной однонуклеотидной делеции, с GC1, выделенным в Шотландии.¹⁴ В то же время, у данных изолятов имелись существенные отличия от последовательности гена *rogA* изолятов, выделенных ранее в Швеции¹⁵ (53 нуклеотида) и Шотландии¹⁴ (GC3, 62 нуклеотида) (рис. 1). Во всех описанных на сегодняшний день мутантных штаммах имеются замены и делеции как в области посадки праймеров, так и в области посадки зондов всех ранее разработанных ПЦР с *rogA* псевдогеном в качестве мишени^{11,12} (рис. 1). Этим и объясняются ложноположительные результаты, полученные неоднократно при проведении ПЦР для описанных изолятов. Эта теория подтверждается положительной реакцией изолятов с моноклональными антителами 4BG4-E7, что доказывает наличие у изучаемых изолятов экспрессируемого гена *rogA* менингококков вместо *rogA* псевдогена.

Изоляты были отнесены к серовару *Bgoryst*, NG-МАСТ сиквенс-типу 5967 (сиквенс-тип, который не был получен ни для одного из штаммов, охарактеризованных ранее в Агентстве по Защите Здоровья Населения), а также MLST сиквенс-типу 1901. Это опять же указывает на то, что данные изоляты неотличимы от одного из двух описанных ранее мутантов из Шотландии¹⁴ и впервые описанного мутантного изолята из Австралии,¹³ но имеют существенные отличия от второго мутанта из Шотландии¹⁴ и изолята, описанного в Швеции.¹⁵

Таким образом, несколько различных штаммов гонококков, которые не могут быть обнаружены при проведении ПЦР с использованием *rogA* псевдогена в качестве мишени, получают всё более широкое распространение (в данный момент выявлены в трёх европейских странах и в Австралии). Таким образом, очевидно, что более одного клона гонококков приобрели последовательность *rogA* менингококков, возможно, путем горизонтального переноса генов с последующей рекомбинацией.

Гонококковая инфекция глотки часто протекает бессимптомно и хуже поддаётся

лечению в сравнении с урогенитальной гонококковой инфекцией. Глотка является тем локусом, в котором гонококки и менингококки могут сосуществовать, что обеспечивает возможность для переноса генов. Стоит отметить, что гонококковая инфекции глотки чаще обнаруживается среди мужчин, имеющих секс с мужчинами (МСМ). Вызывает обеспокоенность то, что большинство мутантных штаммов были изолированы именно от МСМ (таблица 1), что означает циркуляцию этих штаммов в группе риска. Таким образом, изоляты *N.gonorrhoeae*, для которых получены ложноотрицательные результаты ПЦР на *rogA* псевдоген, в настоящее время описаны в четырех стран, три из которых находятся в Европе. Установлено, что эти штаммы не являются потомками одного клона. Стоит обращать особое внимание на генетическое разнообразие и постоянную эволюцию *N.gonorrhoeae*, что становится серьезной проблемой для молекулярных методов детекции микроорганизмов. Штаммы, циркулирующие в популяции, и не выявленные стандартными методами, могут приводить к развитию бессимптомной инфекции и, таким образом, оказывать существенное влияние на дальнейшее распространение инфекции. Особенно ярко данный феномен проявился в связи с появлением нового варианта (nv) *Chlamydia trachomatis* с делецией в области мишени двух наиболее часто используемых в Швеции и других странах коммерческих ПЦР-тестов.²² В основном *rogA* псевдоген используется в качестве мишени в наборах реагентов собственного производства (*in-house*). Такие наборы не получили широкого распространения в Англии, кроме того, эта мишень не используется ни в одном из серийно выпускаемых на территории США и Европейского Союза наборов реагентов для выявления *N.gonorrhoeae*. Это означает, что в данных регионах подобные изоляты не должны получить широкого распространения. Однако осведомленность лабораторных сотрудников и врачей о возможности распространения таких штаммов имеет принципиальное значение, также как и

проведение скрининга на наличие подобных мутантных штаммов. В сложившихся условиях чрезвычайно важно иметь возможность использовать для выявления *N.gonorrhoeae* либо комбинацию

различных диагностических методов (например, МАНК и посев), либо МАНК с определением нескольких мишеней, детектируемых отдельно друг от друга.

Основные положения

- Эффективность выявления *N.gonorrhoeae* в значительной степени зависит от используемой мишени, что является, на сегодняшний день, существенной проблемой для молекулярных методов диагностики
- *porA* псевдоген *N.gonorrhoeae* не экспрессируется, а его последовательность в существенной мере отличается от гена *porA* *N.meningitidis*, что позволяет использовать данную область в диагностических целях
- Данная статья является первым сообщением об обнаружении изолятов гонококка без *porA* псевдогена в Англии
- Если такие изоляты будут оставаться невыявленными, они могут оказать существенное влияние на дальнейшее распространение гонококковой инфекции

Благодарность: Авторы выражают благодарность профессору Фридриху Мухлшгелю, а также сотрудникам клинико-диагностического отделения Микробиологической службы Восточного Кента, Эшфорд, Кент, за выделение изолятов и направление их для дальнейшего изучения; Михаэля Доусона за рецензирование статьи.

Вклад авторов: Кетерин А.Айсон и Магнус Унемо разрабатывали дизайн исследования, проводили анализ и интерпретацию полученных данных, создавали черновой вариант статьи. Дэниэль Голпарян, Памела Саундерс, Стефани Чисхолм проводили все описанные лабораторные исследования. Все авторы участвовали в создании финальной версии статьи.

Финансирование: Финансирование осуществлялось при поддержке Исследовательского Совета Эребру, а также Фонда Медицинских Исследований (09/029, 25/3 2009) Университетского Госпиталя Эребру, Швеция.

Конфликт интересов: Не заявлен

Исходные данные и рецензирование: Не проверялись; рецензия статьи независимым экспертом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Biswas GD, Thompson SA, Sparling PF. Gene transfer in *Neisseria gonorrhoeae*. Clin Microbiol Rev 1989;2(Suppl):S24–8.
2. Cook RL, Hutchison SL, Ostergaard L, et al. Systematic review: noninvasive testing for *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. Ann Intern Med 2005;142:914–25.
3. Alexander S. The challenges of detecting gonorrhoea and chlamydia in rectal and pharyngeal sites: could we, should we, be doing more? Sex Transm Infect 2009;85:159–60.
4. Palmer HM, Mallinson H, Wood RL, et al. Evaluation of the specificities of five DNA amplification methods for the detection of *Neisseria gonorrhoeae*. J Clin Microbiol 2003;41:835–7.
5. Tabrizi SN, Unemo M, Limnios AE, et al. Evaluation of six commercial nucleic acid amplification tests for detection of *Neisseria gonorrhoeae* and other *Neisseria* species. J Clin Microbiol 2011;49:3610–15.
6. Health Protection Agency 2010. Guidance for gonorrhoea testing in England and Wales. http://www.hpa.org.uk/webc/HPAwebFile/HPAweb_C/1267550166455 (accessed 19 Nov 2012).
7. Bignell C. IUSTI/WHO. 2009 European (IUSTI/WHO) guideline on the diagnosis and treatment of gonorrhoea in adults. Int J STD AIDS 2009;20:453–7.
8. Whiley DM, Garland SM, Harnett G, et al. Exploring ‘best practice’ for nucleic acid detection of *Neisseria gonorrhoeae*. Sexual Health 2008;5:17–23.
9. Unemo M, Norlen O, Fredlund H. The *porA* pseudogene of *Neisseria gonorrhoeae* —low level of genetic polymorphism and a few, mainly identical, inactivating mutations. APMIS 2005;113:410–9.
10. Whiley DM, Anderson TP, Barratt K, et al. Evidence that the gonococcal *porA* pseudogene is present in a broad range of *Neisseria gonorrhoeae* strains; suitability as a diagnostic target. Pathology 2006;38:445–8.
11. Whiley DM, Sloots TP. Comparison of three in-house multiplex PCR assays for the detection of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* using real-time and

- conventional methodologies. *Pathology* 2005;37:364–70.
12. Hjelmevoll SO, Olsen ME, Sollid JU, et al. A fast real-time polymerase chain reaction method for sensitive and specific detection of the *Neisseria gonorrhoeae* porA pseudogene. *J Mol Diagn* 2006;8:574–81.
 13. Whiley DM, Limnios A, Moon NJ, et al. False-negative results using *Neisseria gonorrhoeae* porA pseudogene PCR—a clinical gonococcal isolate with an *N. meningitidis* porA sequence, Australia, March 2011. *Euro Surveill* 2011;16: pii=19874.
 14. Eastick K, Winter A, Jamdar S. Identification of *Neisseria gonorrhoeae* isolates with a recombinant porA gene in Scotland, United Kingdom, 2010 to 2011. *Euro Surveill* 2012;17:pii=20101.
 15. Golparian D, Johansson E, Unemo M. Clinical *Neisseria gonorrhoeae* isolate with a *N. meningitidis* porA gene and no prolyliminopeptidase activity, Sweden 2011—danger of false negative genetic and culture diagnostic results. *Euro Surveill* 2012;17:pii=20102.
 16. Tabrizi SN, Chen S, Tapsall J, et al. Evaluation of opa-based real-time PCR for detection of *Neisseria gonorrhoeae*. *Sex Transm Dis* 2005;32:199–202.
 17. Hjelmevoll SO, Olsen ME, Sollid JU, et al. Clinical validation of a real-time polymerase chain reaction detection of *Neisseria gonorrhoeae* porA pseudogene versus culture techniques. *Sex Transm Dis* 2008;35:517–20.
 18. Goire N, Nissen MD, LeCorne GM, et al. A duplex *Neisseria gonorrhoeae* real-time polymerase chain reaction assay targeting the gonococcal porA pseudogene and multicopy opa genes. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008;61:6–12.
 19. Martin IM, Ison CA, Aanensen DM, et al. Rapid sequence-based identification of gonococcal transmission clusters in a large metropolitan area. *J Infect Dis* 2004;189:1497–505.
 20. Ohnishi M, Watanabe Y, Ono E, et al. Spread of a chromosomal cefixime-resistant penA gene among different *Neisseria gonorrhoeae* lineages. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:1060–7.
 21. Molling P, Unemo M, Backman A, et al. Genosubtyping by sequencing group A, B and C meningococci; a tool for epidemiological studies of epidemics, clusters and sporadic cases. *APMIS* 2000;108:509–16.
 22. Ripa T, Nilsson PA. A variant of Chlamydia trachomatis with deletion in cryptic plasmid: implications for use of PCR diagnostic tests. *Euro Surveill* 2006;11:E061109.2.

Таблица 1. Подробное описание изолятов *N. gonorrhoeae* из Англии, демонстрирующих отрицательный результат при проведении ПЦР на рогА псевдоген, а также сравнение полученных изолятов с ранее описанными мутантными изолятами из Швеции, Шотландии и Австралии

	изоляты гонококков с мутациями в гене рогA (страна выделения)					
	356 (Англия)	088 (Англия)	Вариант (Швеция)*	GC1 (Шотландия)*	GC3 (Шотландия)*	Вариант (Австралия)*
Скрининговый и подтверждающий тест						
ПЦР на рогA псевдоген†	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный
Посев‡	<i>N.gonorrhoeae</i>	<i>N.gonorrhoeae</i>	<i>N.gonorrhoeae</i>	<i>N.gonorrhoeae</i>	<i>N.gonorrhoeae</i>	<i>N.gonorrhoeae</i>
APTIMA (Gen-Probe)	<i>N.gonorrhoeae</i>	<i>N.gonorrhoeae</i>	<i>N.gonorrhoeae</i>	<i>N.gonorrhoeae</i>	<i>N.gonorrhoeae</i>	§
16S rDNA (100% совпадение)	<i>N.gonorrhoeae</i>	<i>N.gonorrhoeae</i>	<i>N.gonorrhoeae</i>	§	§	§
MALDI-TOF-MS	<i>N.gonorrhoeae</i>	<i>N.gonorrhoeae</i>	<i>N.gonorrhoeae</i>	§	§	<i>N.gonorrhoeae</i>
Последовательность рогA						
porA GenBank BLAST	Совпадение 98% с MC 278	Совпадение 98% с MC 278	Совпадение 92% с MC 278 ¶	Совпадение 99% с MC 278 ¶	Совпадение 99% с MC 278 ¶	Совпадение 99% с MC 278 ¶
Менингококковый рогA генетический субтип	P1.22-New,14-5,36-2	P1.22-New,14-5,36-2	P1.21-6,2-48,35-1	P1.¶,14-5,36-2	P1.¶,23-13,36-2	P1.¶,14-5,36-2
Молекулярно-эпидемиологическая характеристика						
NG-MAST	5967	5967	2382	5967	3149	5377
MLST	1901	1901	7367	§	§	1901
Серовар	Bropyst	Bropyst	Byust	WII/III	WII/III	Bropyst
Чувствительность к антимикробным препаратам, МПК (мг/л)						
Цефаксим	<0.016	<0.016	<0.016	S**	S**	§
Цефтриаксон	0.016	0.032	0.002	S**	S**	0.03
Ципрофлоксацин	>32	>32	0.002	R**	R**	16
Азитромицин	0.125	0.25	6	S**	S**	S**
Спектиномицин	8	12	8	S**	S**	S**
Источник						
Локус	Уретра	Уретра	Глотка	Прямая кишка	Уретра	Прямая кишка, глотка
Год выделения	2011	2011	2011	2011	2010	2011
Сексуальная ориентация пациента	н/д	н/д	гетеросексуальная	MCM	MCM	MCM

* Ранее опубликованные изоляты.¹³⁻¹⁵

† ПЦР на рогA спевдоген,^{11,12} ПЦР на 2 мишени *N. gonorrhoeae* (рогA псевдоген и ген ора).¹⁸

‡ Включая подтверждающие тесты с использованием селективных сред, теста быстрой продукции оксидаз, микроскопии с окраской по Граму, теста утилизации сахаров, API NH (bioMerieux, Марси Л'Этуаль, Франция) и Phadebact GC Monoclonal Test (Bactus AB, Уппсала, Швеция)

§ Данный вид анализа не проводился

¶ Проводили на полученных последовательностях гена рогA (полных или частичных). Не было возможности определить вариабельный участок 1 для менингококкового субтиповирования в связи с неполным сиквенсом рогA в опубликованных данных из Шотландии и Австралии.^{13,14}

** нет данных о МПК

MALDI-TOF-MS - времяпролётная масс-спектрометрия с лазерной ионизацией и десорбцией из жидкой матрицы
MC 278 - *Neisseria meningitidis*, штамм 278 (идентификационный номер в GenBank GQ173789)

MLST - Мультилокусное Секвенирование-Типирование

МПК - минимальная подавляющая концентрация

MCM - мужчины, имеющие секс с мужчинами

NG-MAST - Мультиантаген-Сиквенс-Типирование *Neisseria gonorrhoeae*

Рисунок 1. Выравнивание нуклеотидной последовательности гена porA мутантных штаммов *Neisseria gonorrhoeae*, выделенных в Англии, в сравнении с сиквенсами porA мутантных штаммов, выделенных ранее в Швеции,¹⁵ Шотландии¹⁴ и Австралии,¹³ а также сиквенс porA псевдогена референсного штамма *N. gonorrhoeae* FA1090 (идентификационный номер в GenBank AJ223447) и гена porA штамма 278 *N. meningitidis* (идентификационный номер в GenBank GQ173789). Участки, заключённые в прямоугольники с целыми и пунктирными границами, обозначают участки посадки праймеров и зондов в ПЦР с выявлением porA псевдогена, описанных Whiley и соавт.¹¹ и Hjelmevoll и соавт.¹² соответственно

