

С.Э. Глазкова, Е.С. Носова, Л.П. Титов

Молекулярно-генетический анализ хаускипинг генов *adk* и *aroE* штаммов *Neisseria meningitidis*, выделенных от больных менингитом

*НИИ эпидемиологии и микробиологии Министерства здравоохранения
Республики Беларусь*

В статье приведены результаты проведения молекулярно-генетического исследования изолятов *N. meningitidis*, выделенных в период 2006 – 2007 гг.. Было установлено, что среди исследованных 205 штаммов преобладала серогруппа В (52,2%), частота выделения менингококков серогруппы А составила 21,5%, а серогруппы С – у 26,3%. Секвенирование генов *adk* и *aroE* *N. meningitidis*, выделенных от больных, свидетельствует, что они составляют одну геногруппу, но отличаются от референс – штаммов, полученных из базы данных. Ключевые слова: мультилокусное секвенирование-типирование, *adk* и *aroE* хаускипинг гены.

Neisseria meningitidis-грамотрицательные диплококки размером 6-8 мкм, обладающие высокой вирулентностью и вызывающие у человека системную гнойно-воспалительную инфекцию осложняющуюся поражением центральной нервной системы-менингитом. Возбудитель менингококковой инфекции характеризуется низкой устойчивостью во внешней среде, но достаточно быстро приспосабливается к воздействию лекарственных препаратов [2]. Высокая бактериальная адгезивность и инвазивность по отношению к эпителию дыхательных путей являются важными механизмами патогенности [1]. Эти начальные этапы могут завершиться локальными или системными проявлениями инфекции.

По антигенному составу менингококки разделяются на 13 серогрупп [14], определяемых специфичностью капсульного полисахарида, причем более 90% заболеваний вызывают организмы пяти серогрупп (А, В, С, W-135 и Y). Менингококковая инфекция регистрируется повсеместно и составляет 1-3/100 тыс. населения в развитых и 10-25/100 тыс. в развивающихся странах [8]. Для здравоохранения Беларуси менингококковая инфекция является одной из главных среди бактериальных нейроинфекций. Актуальность данной проблемы для медицинской науки и практики определяется тем, что заболеваемость менингококковой инфекцией в стране в последние годы остается еще достаточно высокой – в 2004 г. она составляла 3,13/100 тыс. населения, в 2005 г. – 3,38/100 тыс. населения и в 2006 г. – 2,82/100 тыс. населения [7].

Геном *N. meningitidis* состоит из 2.3 миллиона пар оснований и содержит около 2160 генов. Функции многих генов еще неизвестны, однако среди них можно выделить уникальные участки, специфичные для рода, вида или подвида микроорганизма. Среди множества важных для жизнеобеспечения микроорганизма генов выделяют гены «домашнего хозяйства» (хаускипинг

гены): *adk* (аденилатциклаза), *gdh* (глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа), *aroE* (шикимат дегидрогеназа), *abcZ* (предположительно-ABC-переносчик), *pdhC* (субъединица пируват дегидрогеназы), *pgm* (фосфоглюкомутаза), *fumC* (фумарат гидратаза) [5]. Они отвечают за внутриклеточный метаболизм (обеспечивают процессы гликолиза, биосинтеза аминокислот и нуклеотидов, катаболизм белков и т.п.). Хотя изменения в структуре хаускипинг генов, вызванные как точечными мутациями, так и рекомбинационными процессами являются нейтральными, такие процессы приводят к важным изменениям небольших сегментов генома и появлению более высокоинвазивных и более вирулентных клональных вариантов патогена [9]. Применение мультилокусного секвенирования-типирования (МЛСТ) становится наиболее распространенным и удобным в практике современных бактериологических лабораторий. Секвенирование фрагментов 450-500 п.о хаускипинг генов позволяет идентифицировать их аллели среди популяции бактерий. МЛСТ имеет ряд преимуществ: является высоко специфичным; может быть автоматизирован; может проводиться непосредственно амплифицируя соответствующие локусы из клинического материала (крови, спинномозговой жидкости, и т.п.); позволяет определить клональные комплексы среди бактериальных популяций путем сравнения последовательностей фрагментов в хаускипинг генах. Каждая уникальная последовательность определяет аллель локуса. Для каждого изолята аллели семи локусов определяют аллельную линию или сиквенс-тип (СТ) [8]. В общемировой базе данных хранятся в стандартизованной форме индивидуальные сведения о каждом штамме, включающие СТ. Форма и анализ секвенирования поддаются почти абсолютной стандартизации, позволяя сопоставлять и интегрировать данные независимо работающих лабораторий в единый, общедоступный с помощью сети Интернет, массив. [4].

Целью настоящей работы является проведение секвенирования хаускипинг генов *adk* и *aroE* *N. meningitidis*, выделенных от больных менингитом и биоинформатического анализа полученных данных.

Материал и методы

Материалом для исследований служили штаммы *N. meningitidis*, выделенные от больных менингитом, контактных лиц и бактерионосителей в период 2006 – 2007 гг. Всего было выделено 205 изолятов из Минска и Минской области, Бреста и Брестской области, Гомеля и Гомельской области, Могилева и Могилевской области.

Для детекции генов *adk* и *aroE* и последующего секвенирования были отобраны 8 штаммов, выделенных от больных-2 из Могилева (№ 1, 82 – выделены 09. 01.06 и 15.03.06, соответственно), 3 из Бреста (№ 33, 121, 123- выделены 18.01.06, 22.02.06 и 23.02.06 соответственно) и 3 из Минска (№ 17, 272, 295 – выделены 13.05.06, 20.01.07 и 14.03.07 соответственно).

Экстракцию ДНК из бактериальных клеток проводили набором «ДНК-сорб» (АмплиСенс), согласно прилагаемой инструкции производителя. Идентификацию возбудителей гнойных менингитов проводили методом

ПЦР. Для амплификации специфичных последовательностей генов, специфичных серогруппам А, В, С *N. meningitidis* (серогруппа А – 349 п.н., серогруппа В – 539 п.н., серогруппа С – 209 п.н.) проводили ПЦР. Реакция проводилась с постановкой отрицательных и положительных контрольных образцов, прилагаемых к набору. Для амплификации использовали следующие пары праймеров:

adk-P1B 5-CCAAGCCGTGTAGAATCGTAAACC-3,

adk-P2B 5-TGCCCAATGCGCCCAATAC-3,

aroE-P1B 5-TTTGAAACAGGCCGGTTGCGG-3,

aroE-P2B 5-CAGCGGTAATCCAGTGCGAC-3.

Амплифицированные фрагменты ДНК разделяли методом электрофореза в 1% агарозном геле в присутствии бромистого этидия. После окончания электрофореза гель переносили на стекло трансиллюминатора и просматривали в ультрафиолетовом свете.

Детекция генов adk и aroE, являющихся маркерами филогенетического родства, отвечающих за внутриклеточный метаболизм, была проведена методом ПЦР. Фрагменты генов размером приблизительно в 600 пар оснований были амплифицированы с помощью специфической ПЦР и секвенированы. При постановке секвенс-реакции использовали следующие праймеры:

adk-S1A 5'-AGGCTGGCACGCCSTTGG-3',

adk-S2A 5'-CAATACTTCGGCTTTCACGG-3',

aroE-S1A 5'-GCGGTCAAYACGCTGRTK-3',

aroE-S2 5'-ATGATGTTGCCGTACACATA-3'.

Электрофорез проводили на аппарате фирмы Amersham Biosciences. Учет результатов проводили помощью программы ALFwin Software. С помощью данной программы данные могут быть обработаны, чтобы сгенерировать актуальные последовательности ДНК для каждого клона, и эти сгенерированные последовательности могут быть выровнены для сравнения. Программа представляет результаты на экране в виде изображения геля или кривой (рис. 1, рис. 2) и печатает отчет по проведенному анализу.

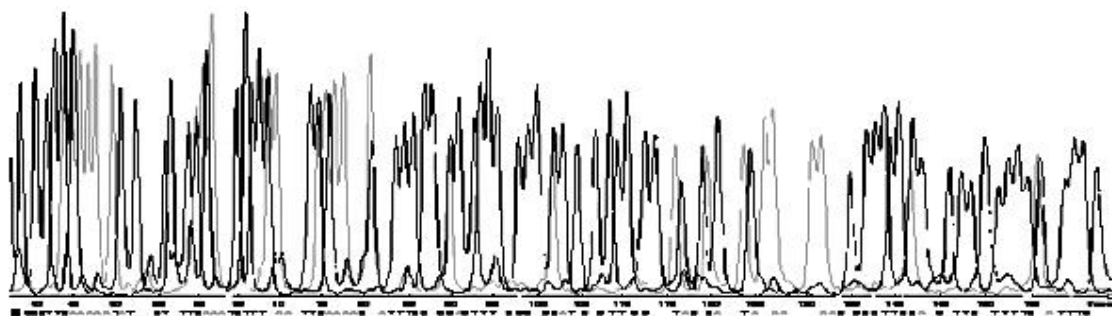


Рис.1. Результаты секвенирования и вид секвенационных кривых.

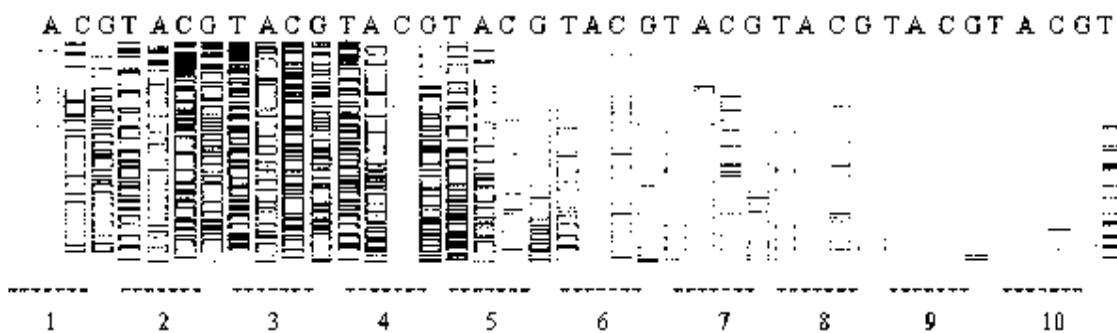


Рис. 2. Вид геля. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10-образцы проб исследуемого гена.

Полученные нуклеотидные последовательности генов выравняли и сравнивали между собой с помощью программы MEGA 3.1.

Результаты и обсуждение

1. В результате детекции последовательностей генов 205 изолятов, специфичных серогруппам А, В, С было установлено, что среди циркулирующих бактерий доминируют менингококки группы В (52,2%). Серотип А выявлен у 21,5% исследованных изолятов, и серотип С – у 26,3%. Доля менингококков серогруппы В, выделенных от больных, была также достоверно выше (70,6%) в сравнении с А и С серогруппами: 23,5% и 5,9%, соответственно. Частота встречаемости менингококков серогрупп В и С от носителей (45,3% и 37,9%, соответственно) выше таковой серогруппы А (16,8%). Несколько иная картина наблюдается у штаммов, выделенных от контактных лиц: менингококки серогруппы В были выделены в 60% случаев, а серогруппы А и С в 29% и 11% случаев, соответственно.

2. Результаты секвенирования *aroE* гена *N.meningitidis* и анализ эволюционных взаимосвязей между выделенными штаммами

В ходе сравнения последовательностей гена *aroE* (5 последовательностей) от разных изолятов было установлено, что практически все исследуемые последовательности идентичны между собой. При сравнении их с последовательностями референс-штаммов, взятых в базе МЛСТ в сети Internet, наиболее схожими с исследуемыми последовательностями оказались аллель 6 *aroE* (Англия, 1998) и аллель 11 *aroE* (США, 2002) (сходство составляло 98% и 97%, соответственно). При сравнении исследуемых изолятов и *aroE* – аллель 6, были отмечены различия в 9 участках (в положении 14, 86, 91, 92, 94, 95, 96, 441, 442), а при сравнении с *aroE* – аллель 11-в 11 участках (в положении 14, 86, 91, 92, 94, 95, 96, 441, 442, 488, 490). Отличия показаны в таблице 1 и на рисунке 3.

Таблица 1

Отличия в последовательностях гена *aroE* исследуемых изолятов и *aroE* аллелей 6 и 11.

Положение нуклеотида (nt)	Аллель 6 agoE	agoE исследуемых изолятов	Аллель 11 agoE
14	G	A	G
86	G	A	G
91	C	G	C
92	G	C	G
94	C	T	C
95	G	T	G
96	T	G	T
441	G	C	G
442	C	T	C
488	A	A	C
490	G	G	A

```

          10          20          30          40          50
1: TTTGGGTTTGGTCAGCGATATAGTGAAGGTGCAACACACAGAAATTGAAG
2: .....G.....
3: .....G.....

          60          70          80          90          100
1: GCAAAAATATCCTATTGCTCGGCCGGGGCGCGGATGCGGGCGTTGGATT
2: .....G.....CG.CGT.....
3: .....G.....CG.CGT.....

          110         120         130         140         150
1: CCGGTTTTGAAAGAACACCGTCCTGCCCGTATCGTCATTGCCAACCGTAC
2: .....
3: .....

          160         170         180         190         200
1: CCGCGCCAAAGCCGAGGAATTGTCGCGGCTTTTCGGCATGGAAGCCGTCC
2: .....
3: .....

          210         220         230         240         250
1: CGATGGCGGATTTGAACGGCGGTTTTGATATCATCATCAACGGCACGTCG
2: .....
3: .....

          260         270         280         290         300
1: GCGGGTCTAAACGGTCAAGATCCCGATATTCGCCCCGATATTTTCAAAA
2: .....
3: .....

          310         320         330         340         350
1: CTGCGCGCTTGCCCTACGATATGGTGTACGGCTGCGGGGCAAAACCGTTTT
2: .....
3: .....

          360         370         380         390         400
1: TAGATTTTGCACGACAATCGGGTGCGAAAAAACTGCCGACGGACTGGGT
2: .....
3: .....

          410         420         430         440         450
1: ATGCTAGTCGGTCAAGCGGCGGCTTCTCTACGCCCTCTGGCCTGGATTTAC
2: .....GC.....
3: .....GC.....

          460         470         480         490
1: GCCCCGATATCCGCCCTGTTATCGAATACATGAAAGCCATG
2: .....
3: .....C A

```

Рис.3. Выравнивание нуклеотидных последовательностей в исследуемых штаммах.

1- Исследуемые последовательности *aroE*, 2-аллель 6 *aroE* (Англия, 1998), 3- аллель 11 *aroE* (США, 2002).

Из таблицы видно, что в последовательностях *aroE* гена исследуемых штаммов, при сравнении с аллелями 6 и 11 *aroE*, выявлены следующие замены: в положениях 14, 86 имеется замена G-A, в положении 91-замена C-G, в положениях 92 и 441-замена G-C, прямая и обратная замены C-T и C-T в положениях 94 и 442, прямая и обратная замены G-T и T-G в положениях 95 и 96, а также отличия с последовательностью аллели 11 *aroE*-замены в положениях 488 и 490 A-C и G-A, соответственно.

На основании сиквенсов *aroE* была построена дендрограмма при помощи программы MEGA (рис. 4).

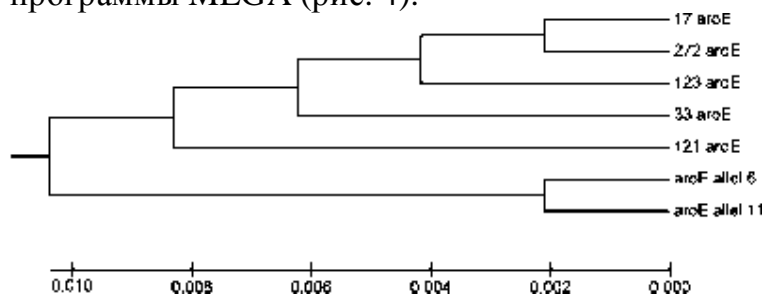


Рис. 4: Дендрограмма исследуемых последовательностей гена *aroE* по методу UPGMA.

17 *aroE* (Минск, 2006), 272 *aroE* (Минск, 2007) – исследуемые штаммы *N. meningitidis*; 33 *aroE*, 121 *aroE*, 123 *aroE*-штаммы *N. meningitidis* (Брест, 2006); *aroE* allele 6 (Англия, 1998), *aroE* allele 11 (США, 2002)-референс – штаммы из базы МЛСТ в сети Internet.

Из дендрограммы видно, что последовательности нуклеотидов *aroE* гена штаммов № 17 и 272, выделенных в Минске идентичны друг другу и отличаются от штаммов № 33, 121 и 123, выделенных в Бресте. И хотя данные штаммы находятся на одной ветви дендрограммы, все же имеются различия с референс штаммами, выявленными в Англии и США. Исследуемый штамм №121 (Брест) наиболее близок по первичной структуре штаммам Англии и США и находится в основании ветви исследуемых белорусских штаммов, что позволяет полагать, что данный изолят является корневым для остальных анализируемых изолятов (штаммы № 17, 272, 123, 33), которые ассоциировались друг с другом в зависимости от степени гомологии исследованных последовательностей *aroE* гена.

3. Анализ результатов секвенирования *adk* гена *N.meningitidis* и эволюционных взаимосвязей исследованных штаммов

В ходе сравнения последовательностей гена *adk* (3 последовательности) от разных изолятов было установлено, что они также различаются между собой. Причем два из них (№ 1 и 295) практически идентичны, и при сравнении с последовательностями референс-штаммов, взятых в базе МЛСТ в сети Internet, наиболее схожими с данными последовательностями оказались аллель 3 (США, 2002), аллель 5 (Англия, 1998), аллель 6 (Англия, 1998) и

аллель 14 (Англия, 1990) гена *adk*. Наиболее схожей последовательностью обладает аллель 5 гена *adk*-различия в 6 участках (в положениях 36, 43, 70, 221, 229, 235, 465). Отличия в последовательностях исследуемых генов и референс – штаммов показаны в таблице 2 и на рисунке 5. Последовательность гена *adk* у штамма № 82, выделенного в Могилеве, существенно отличалась от исследуемых нами последовательностей, поэтому в результатах она не представлена.

Таблица 2

Отличия в последовательностях гена *adk* исследуемых штаммов и *adk* аллелей 3, 5, 6 и 14.

Положение нуклеотида (nf)	Аллель 3 <i>adk</i>	Аллель 5 <i>adk</i>	Аллель 6 <i>adk</i>	Аллель 14 <i>adk</i>	<i>adk</i> исследуемых изолятов
21	С	С	Т	С	С
36	G	G	G	G	С
43	G	G	G	G	A
70	С	С	С	С	A
108	С	Т	Т	Т	Т
189	С	Т	Т	С	Т
216	Т	С	С	Т	С
221	G	G	G	G	Т
229	С	С	С	С	Т
235	С	С	С	С	Т
465	A	A	A	A	G

10 20 30 40 50
1 GAAGCGAAAAAATCATTGACGAAGGCGGCTTGGTCCGCGACAACATCAT
2C.....G.....G.....
3C.....G.....G.....
4T.....G.....G.....
5C.....G.....G.....

60 70 80 90 100
1 TATCGGCATGGTCAAAGAAAGCATCGCGCAAGACGACTGCAAAAAACGGTT
2C.....
3C.....
4C.....
5C.....

110 120 130 140 150
1 TCCTGTTTGACGGTTTCCCGCGCACATTGGCACAAAGCCGAAGCGATGGTT
2C.....
3T.....
4T.....
5T.....

160 170 180 190 200
1 GAAGCAGCCGTGGATTTGGATGCAGTCGTTGAAATCGATGTGCCTGACAG
2C.....
3T.....
4T.....
5C.....

210 220 230 240 250
1 CGTGATTGTCGACCGCATGATCGGCCGCTGCGTGTATTTGGCTTCCGGCC
2T.....G.....C.....C.....
3C.....G.....C.....C.....
4C.....G.....C.....C.....
5T.....G.....C.....C.....

260 270 280 290 300
1 GTACTTACCACGTTACCTACAACCCGCCCAAAGTTGAAGGCAAAGACGAC
2
3
4
5

310 320 330 340 350
1 GTAACCGGCGAAGATTTGATTCAGCCGACGACGACAAAGAAGAAACCGT
2
3
4
5

360 370 380 390 400
1 GAAAAAACGCCTTGCCGTTTACCACGAGCAAACCGAAGTTTGGTCCGATT
2
3
4
5

410 420 430 440 450
1 TTTACAGCAAACCTGGAAGGCGAACACCGCGCTAAATACATCAAAGTTGAC
2
3
4
5

460
1 GGCACCTCAGCCGGTG
2A
3A
4A
5A

Рис.5. Выравнивание нуклеотидных последовательностей adk в исследуемых штаммах. 1-Исследуемые последовательности adk, 2-аллель 3 adk (США, 2002), 3-аллель 5 adk (Англия, 1998), 4-аллель 6 adk (Англия, 1998), 5-аллель 14 adk (Англия, 1999).

Из таблицы видно, что в последовательности adk гена исследуемых изолятов (№ 1 и № 295), при сравнении с последовательностью референс штамма (аллель 5 adk гена), имеются замены нуклеотидов G-C в положении 36, замена G-A в положении 43, замена C-A в положении 70, замена G-T в положении 221, замены C-T в положениях 229 и 235, замена A-G в положении 465.

На основании сиквенсов генов adk исследуемых и референс штаммов была построена дендрограмма (рис. 6).

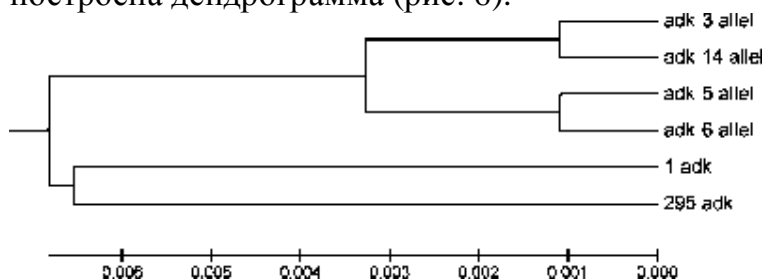


Рис. 6. Дендрограмма исследуемых последовательностей гена adk по методу UPGMA. 1-штамм *N. meningitidis*-Могилев, 2006; 295-штамм *N. meningitidis*-Минск, 2007; adk allele 3 (США, 2002), adk allele 5 (Англия, 1998), adk allele 6 (Англия, 1998), adk allele 14 (Англия, 1999)-референс – штаммы из базы МЛСТ в сети Internet.

Судя по дендрограмме, анализируемые сиквенсы гена adk штаммов № 1 и 295 представляют отдельный кластер, т.к. составили отдельную ветвь. Последовательности adk референтных штаммов относятся к другой ветви.

Впервые менингококковая инфекция была описана в XVII веке. Сейчас менингококковая инфекция регистрируется повсеместно с частотой 1-3 случая на 300 тыс. населения в развитых и 10-25/100 тыс. в развивающихся странах [12]. Описаны крупные вспышки заболевания во время 1-ой и 2-ой Мировых Воин. Начиная с 1909 года на Африканском континенте сформировался стойкий очаг инфекции с эпидемическим циклом в области так называемого «менингитного пояса Африки» (8-15 лет) [10]. В 1996 году было зафиксировано почти 190 000 случаев заболеваний менингококковой инфекцией в Мали, Чаде, Нигерии и других странах Африки. Следующая вспышка инфекции была зафиксирована в 2001 году. В 2006 году в странах этого региона было зафиксировано более 5700 случаев заболеваний менингококковой инфекции, из них умерло 580 человек (летальность более 10%) [10]. В странах Азии за последние 30 лет также были зафиксированы эпидемические вспышки менингококкового менингита: во Вьетнаме (1974), в Китае (1980), в Йемене (1988), в Монголии (1995), в Индии (2005). В марте 2000 г. более 1,7 млн. мусульман совершили паломничество в Саудовскую Аравию. К августу этого года было зарегистрировано более 400 случаев заболевания менингококковой инфекцией среди пилигримов и контактных с

ними лиц в 16 странах Западной Европы, Америки, Азии, в первую очередь, во Франции и Великобритании. Молекулярно-генетические исследования доступных изолятов показали, что все они принадлежали к одной разновидности менингококков серогруппы W135, а именно к так называемому клональному комплексу ST11 (антигенная формула W135:2a:p5,2), причем, представители этого клона встречались на территории Африки и других стран мира и до 2000 г. Более того, оказалось, что приблизительно с 1980 г. менингококки серогрупп В и С, принадлежащие клональному комплексу ST11 и имеющие серосубтипную формулу 2a:P5,2, неоднократно вызывали эпидемические вспышки МИ в Северной Америке и Европе [3]. В Великобритании в 2006 году было зафиксировано увеличение числа случаев заболеваемости менингококковой инфекцией на 18% (по сравнению с 2005 годом), при снижении уровня смертности с 6,7% в 2005 г. до 4,9 % в 2006 г. [13]. А весной 2007 в Дании от менингококковой инфекции умерло 4 человека [11]. В России продолжается снижение заболеваемости-в 2006 году показатель заболеваемости менингококковой инфекцией составил 2,1 на 100 тыс. населения [6].

Мониторинг за циркуляцией менингококков приобретает высокую актуальность. Важным элементом в мониторинге возбудителем инфекции является контроль распространения резистентности к антибиотикам. Так, по данным ВОЗ, в западных странах были выявлены менингококки, обладающие резистентностью к таким антибиотикам, как пенициллин и ципрофлоксацин (показатель-0,06/100 000 человек) [15].

Молекулярно-генетический мониторинг популяции менингококков приобретает важнейшее значение в системе противоэпидемических мероприятий, так как позволяет проследить за эволюцией возбудителя, изучить его патогенные свойства (фазовые сдвиги-механизм, который регулирует адгезию и инвазию микроорганизма, специфичность капсульного полисахарида, репарационные изменения генома), а также установить взаимосвязь патогенов, и установить наличие клональных групп и их распределение на территории страны, связь с клиническим течением и исходом заболевания.

Выводы

1. Среди исследованных изолятов *N. meningitidis*, выделенных в период 2006 – 2007 гг., преобладает серогруппа В (52,2%), частота выделения менингококков серогруппы С уменьшилась до 26,3%.
2. Секвенирование генов *adk* и *aroE* штаммов от больных свидетельствует, что они составляют одну геногруппу, но отличаются от референс – штаммов, полученных из базы данных. Отличия установленных последовательностей от референс – штаммов указывают на иное происхождение исследуемых изолятов *N. meningitidis*, выделенных от больных, и требует дальнейшего изучения.

Литература

1. Дрожжина, О.Н., Колодкина, В.Л., Денисевич, Т.Н., Титов, Л.П. Генетическая характеристика лиганд-связывающего фрагмента гена адгезина штаммов *Corynebacterium Diphtheriae* с разными уровнями адгезивной активности// Материалы международной научно-практической конференции «Молекулярная диагностика инфекционных болезней», Минск, 17-18 мая 2007 г.
2. Медицинская микробиология / Под ред. В.И.Покровского, О.К.Поздеева.- М.: ГЭОТАР Медицина, 1998.-1200 с.
3. Платонов, А.Е., Королева, И.С., Миронов, К.О. Эпидемиология менингококковой инфекции в России и мире на современном этапе // Менингококковая инфекция-2004.-№1. Электронный адрес: <http://medi.ru/doc/15b31.htm>
4. Платонов, А.Е., Шипулин, Г.А., Тютюнник, Е.Н., Платонова, О.В. Генодиагностика бактериальных менингитов и генотипирование их возбудителей. Пособие для врачей. Москва, 2001 г.
5. Платонов, А.Е., Шипулин, Г.А. Платонова, О.В. Мультилокусное секвенирование-новый метод генотипирования бактерий и первые результаты его применения // Генетика. – 2000.-Т.36, № 5.-С.597-605.
6. «Санитарно-эпидемиологическая обстановка в Российской Федерации: актуальные проблемы». Электронный адрес: <http://www.rospotrebnadzor.ru/press/pressreleases/?id=809>
7. Титов, Л.П., Шиманец, О.В., Янович, О.О., Строганова, Р.А., Левшина, Н.Н., Шитикова, П.В., Михнович, Э.М., Колос, Т.П., Дарахвелидзе, Д.И. Молекулярно-генетический мониторинг *Neisseria meningitidis* на территории Республики Беларусь// Здоровоохранение-2006-№11/2006-С. 16-18.
8. Alexander, H.L., Rasmussen, A.W., Stojiljkovic, I. Identification of *Neisseria meningitidis* Genetic Loci Involved in the Modulation of Phase Variation Frequencies// Infection and Immunity-2004.-Vol. 72, No. 11-P. 6743 – 6747
9. Enright, M.C., Spratt, B.G. Multilocus sequence typing//Trends in Microbiology – Dec. 1999.-Vol. 7, No. 12-P. 482-487.
10. Meningococcal disease in the African Meningitis Belt, epidemic season 2006. Электронный адрес: http://www.who.int/csr/don/2006_03_21/en/index.html
11. National surveillance of communicable diseases//EPI-News-2007.-No. 16
12. Ramsay, M.// European Union Invasive Bacterial Infections Surveillance Network.-London-2003.
13. Rebecca Close. Enhanced Meningococcal Disease Surveillance South West Regional Report. Health Protection Agency (SW)-2006.
14. Vedros, N. A. In Evolution of Meningococcal Disease, ed. Vedros N. A. (CRC Press, Boca Raton, FL)-1987.-Vol. 2.-P. 20 – 32.
15. World Health Organization Report on Infectious Diseases – 2000. Электронный адрес: <http://www.who.int/infectious-disease-report/2000/index.html>