

Участие *Neisseria gonorrhoeae* в формировании микробных ассоциаций

А.П. Годовалов, Д.А. Оборин

ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера» Минздрава России, Пермь

The role of *Neisseria gonorrhoeae* in the formation of microbial associations

A.P. Godovalov, D.A. Oborin

E.A. Vagner Perm State Medical University, Perm, Russia

Аннотация

В настоящее время наблюдается трансформация ситуации потенциального конфликта между *Neisseria gonorrhoeae* и комменсальным микробным сообществом генитального тракта в сторону формирования синергичных отношений с этим безусловным патогеном.

Цель – оценка симбиотических отношений *N. gonorrhoeae* с условно патогенными микроорганизмами генитального тракта.

Методы. Для проведения исследований на основании случайной выборки были взяты 12 образцов отделяемого гениталий для метагеномного исследования. Дополнительно во всех пробах проводили обнаружение ДНК *N. gonorrhoeae* методом ПЦР. Для количественной оценки симбиотических отношений между членами микробиоценоза вычисляли коэффициент Жаккара.

Результаты. В эякуляте мужчин совместно с *N. gonorrhoeae* в 100% случаев присутствовали микроорганизмы родов *Psychrobacter*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* и *Corynebacterium*. У женщин вместе с *N. gonorrhoeae* в 100% случаев детектировали *Lactobacillus* и *Corynebacterium*. Для мужских гениталий ключевыми можно признать *E. faecalis*, бактерии родов *Lactobacillus* и *Neisseria*. Для женского генитального тракта помимо *E. faecalis*, бактерий родов *Lactobacillus* и *Neisseria*, в список ключевых необходимо отнести гарднерелл.

Заключение. В целом, *N. gonorrhoeae* в микросимбиозе генитального тракта формируют неоднозначные отношения с условно патогенными бактериями, что может влиять как на особенности клинических проявлений, так и необходимо учитывать при лабораторной диагностике воспалительных заболеваний.

Ключевые слова

Neisseria gonorrhoeae, микросимбиоз, метагеномное исследование, симбиоз, комменсальные микроорганизмы, воспаление.

Актуальность

В последнее время наблюдается стремительный рост молекулярно-генетических исследо-

Summary

Currently, we are seeing a shift in the potential conflict between *Neisseria gonorrhoeae* and the commensal microbiota of the genital tract towards the formation of synergistic relationships with this unconditional pathogen.

Aim. Evaluation of symbiotic relationships between *N. gonorrhoeae* and commensal microorganisms of the genital tract.

Methods. To conduct the research, 12 samples of genital discharge were taken randomly. Metagenomic study of 16S ribosomal RNA of the samples was carried out on the IlluminaMiSeq platform using the MiSeqReagentKits v3 kit according to the manufacturer's recommendations. Additionally, *N. gonorrhoeae* DNA was detected in all samples using PCR. Jaccard's similarity coefficient was used to quantitatively express the interaction between members of the microbiocenosis.

Results. In the ejaculate of men, microorganisms of the genera *Psychrobacter*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* and *Corynebacterium* were present in 100% of cases together with *N. gonorrhoeae*. In women, *Lactobacillus* and *Corynebacterium* were detected in 100% of cases together with *N. gonorrhoeae*. For the male genitalia, *E. faecalis*, bacteria of the genera *Lactobacillus* and *Neisseria* can be recognized as the key microorganisms. For the female genital tract, in addition to *E. faecalis*, bacteria of the genera *Lactobacillus* and *Neisseria*, gardnerella are most prevalent.

Conclusion. In general, when *N. gonorrhoeae* is introduced into the microsymbiocenosis of the genital tract, ambiguous relationships with opportunistic bacteria are formed. Obviously, the nature of the relationships that develop in this case can affect the characteristics of clinical manifestations, which should be taken into account in the laboratory diagnosis of inflammatory diseases.

Keywords

Neisseria gonorrhoeae, microsymbiocenosis, metagenomic study, symbiosis, commensal microorganisms, inflammation.

ваний микробиома человека [1,2]. Существующие крупномасштабные исследования: Human Microbiome Project (HMP) [3] и Metagenomics

of the Human Intestinal Tract (MetaHIT) [4], базирующиеся на применении методов анализа нуклеиновых кислот, инициировали обширные программы по изучению репертуара микробных генов и геномов, что существенно расширяет наши представления о микробиоме человека. Более того, результаты всех этих исследований позволили по-новому оценить роль микробиоты в поддержании здоровья и развитии патологических состояний. Так, например, известно, что микробиота желудочно-кишечного тракта участвует в образовании метаболитов, являющихся предикторами развития заболеваний сердечно-сосудистой системы [5,6].

Более чем 100 триллионов только бактерий обитают в экосистеме человека [7], что предполагает тесное взаимодействие как между представителями разных таксономических групп, так и между организмами одного вида. Коммуникации между отдельными бактериями, формирующие *quorum sensing*, являются общими как для комменсальных, так и для патогенных видов [8], что позволяет патогенам успешно встраиваться в микросимбиозы. На основании ряда исследований [9] можно предположить, что в настоящее время наблюдается трансформация ситуации потенциального конфликта между *Neisseria gonorrhoeae* и комменсальным микробным сообществом генитального тракта в сторону формирования синергичных (или мутуалистических) отношений с этим безусловным патогеном. Хотя, например комменсальные лактобактерии должны проявлять антагонистические свойства против *N. gonorrhoeae* [10]. Установлено, что состав микроорганизмов и значительная вариабельность их видовых сочетаний способны изменять клиническую картину, в том числе с преобладанием нетипичной симптоматики. На это способны повлиять характер симбиотических отношений бактерий друг с другом (антагонизм – синергизм), последовательность инфицирования и длительность персистенции микроорганизмов, а также биологические особенности микро- и макроорганизмов [11].

Однако для изучения симбиотических отношений между бактериями, существующие в настоящее время возможности относительно ограничены. В большинстве этих подходов необходимо культивирование микроорганизмов, что не всегда представляется возможным, поскольку известно, что в генитальном тракте основная масса бактерий является анаэробными [12,13]. Использование микрoэкологического индексного подхода к оценке состояния микробиоты

позволяет получить необходимую информацию об отношениях между отдельными микроорганизмами в её составе (как основными, так и случайными), что не требует культивирования микроорганизмов и может быть осуществлено на результатах молекулярно-генетических исследований [11].

Цель исследования – оценка симбиотических отношений *Neisseria gonorrhoeae* с условно патогенными микроорганизмами генитального тракта.

Материалы и методы

Дизайн исследования. Для проведения исследований на основании случайной выборки были взяты 7 образцов отделяемого заднего свода влагалища и 5 проб отделяемого уретры. У всех пациентов с помощью полимеразной цепной реакции был установлен диагноз острой генитальной гонококковой инфекции (ОГГИ). Все пациенты были разделены на группы по полу.

Условия проведения. Метагеномное исследование 16S рибосомальной РНК образцов осуществлено в отделе коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии».

Основной исход исследования. Симбиотические отношения между отдельными видами микроорганизмов изучали с помощью индексного подхода, используя коэффициент Жаккара, который рассчитывали по формуле:

$$q=c/(a+b-c)\times 100,$$

где a – число наблюдений с видом a , b – число наблюдений с видом b , c – число наблюдений, содержащих оба вида [11,14].

Методы регистрации исходов. Метагеномное исследование проводили с помощью «IlluminaMiSeq» и набора «MiSeqReagentKits v3» («600-Cycle Kit») согласно рекомендациям производителя. Для оценки результатов применяли программное обеспечение «Kraken Metagenomics v.2.0.0» (классификатор ридов – коротких нуклеотидных последовательностей).

Дополнительно во всех пробах проводили обнаружение ДНК *N. gonorrhoeae* методом ПЦР с наборами «Реал-бест ДНК *Neisseria gonorrhoeae*» (Россия).

Этическая экспертиза. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера» Минздрава России (протокол № 11 от 11.01.2021).

Статистический анализ. Размер выборки предварительно не рассчитывался.

Анализ различия качественных признаков осуществлялся при помощи построения таблиц сопряжённости с последующим расчётом χ^2 критерия Пирсона, точного критерия Фишера.

Результаты

В образцах всех участников исследования обнаружена ДНК *N. gonorrhoeae*. Во всех пробах, полученных от мужчин с ОГГИ, обнаружены *Psychrobacter spp.*, *Enterococcus spp.*, *Lactobacillus spp.* и *Corynebacterium spp.* При этом не были обнаружены *Pseudoalteromonas spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Morganella spp.*, *Bacteroides spp.*, *Clostridium spp.*, *Escherichia spp.* В целом, у мужчин вне зависимости от остроты процесса преобладали кокковые формы бактерий, реже встречались палочковидные морфотипы.

При оценке микрофлоры содержимого влагалища у пациенток с острой гонококковой инфекцией установлена следующая картина. При детекции в образцах *N. gonorrhoeae* в 100% случаев обнаружены одновременно генетические маркеры микроорганизмов родов *Lactobacillus*, *Corynebacterium*.

В настоящее время установлено, что даже при наличии безусловного патогена определённую роль в развитии заболевания принимают условно патогенные микроорганизмы, например, *E. faecalis*, которые встречаются у человека в разных биотопах достаточно часто. Так, три четверти проб от пациентов с ОГГИ содержали *E. faecalis* ($\chi^2=44,8$; $p=0,001$). При этом комбинация *E. faecalis* и *N. gonorrhoeae* чаще обнаруживалась у женщин ($\chi^2=10,3$; $p=0,002$), что отчасти может быть обусловлено выраженным синергизмом, который наблюдается между этими видами ($q>75\%$). С другой стороны, при малосимптомном течении ОГГИ во всех случаях присутствовали в пробах энтерококки, что позволяет предположить ситуацию, когда *E. faecalis* не позволяет в полной мере *N. gonorrhoeae* проявлять свои патогенные свойства. Так, в исследованиях Brosnahan et al. (2013) [15] показано, что штаммы *E. faecalis* обладают факторами, препятствующими развитию острого воспалительного процесса, который могут инициировать, например, *N. gonorrhoeae*. Этот феномен реализуется за счёт выработки энтерококками производных тетрамовой кислоты, которые в свою очередь подавляют функциональную активность Т-лимфоцитов. Другой механизм сохранения жизнеспособности *N. gonorrhoeae*

реализуется за счёт их включения в биоплёнки, сформированные энтерококками.

Среди грамположительных кокков отдельного внимания заслуживает вид *Staphylococcus haemolyticus*, поскольку эти микроорганизмы как часть комменсальной микрофлоры могут участвовать в развитии воспалительных заболеваний урогенитального тракта, вплоть до гнойных процессов, и в то же время у практически здоровых людей обнаруживаются в достаточно большом числе случаев. В настоящем исследовании генетические маркеры стафилококков идентифицированы в 100% случаев, как и представители вида *S. haemolyticus*. Среди генетического материала бактерий рода *Staphylococcus* доля такого для *S. haemolyticus* у мужчин с ОГГИ составила $37,4\pm 10,2\%$. У женщин аналогичный показатель был $37,8\pm 11,1\%$. Между *S. haemolyticus* и *N. gonorrhoeae* выявлен выраженный синергизм, вплоть до мутуализма, на что указывает коэффициент Жаккара в группе мужчин – 60% и в группе женщин – 93%. Поскольку *S. haemolyticus* продуцируют соединения, которые могут ингибировать рост гонококка [16], при лабораторной диагностике можно не получить рост колоний *N. gonorrhoeae*, что указывает на важность изучения симбиотических отношений микроорганизмов. С клинической точки зрения присутствие гемолитических стафилококков может обуславливать менее выраженную картину заболевания у пациентов с ОГГИ.

Другой микроорганизм, имеющий медицинское значение и обнаруженный в пробах мужчин ($1,7\pm 0,6\%$) и женщин ($0,6\pm 0,2\%$) – *Gardnerella vaginalis*. Если обнаружение и значение *G. vaginalis* в женском микробиоме относительно детально описано [17], то для мужчин присутствие этого микроорганизма и его роль в патогенезе заболеваний остаётся дискуссионной [18]. Более того, установлено, что выявление *G. vaginalis* в урогенитальном тракте мужчин, как правило, ассоциировано с коморбидной патологией [18,19], что не описано для женщин.

Во всех образцах отделяемого генитального тракта женщин и мужчин обнаружены лактобактерии. Их доля среди всех бактерий в образцах мужчин с ОГГИ составила $8,4\pm 2,8\%$. У женщин аналогичный показатель составил при ОГГИ – $3,3\pm 1,1\%$. Поскольку лактобактерии обладают способностью снижать, а некоторые виды полностью ингибировать функциональную активность и рост *N. gonorrhoeae* [20-22], можно ожидать, что при их большей численности не будет полноценного проявления патогенных свойств гоно-

кокков, что реализуется либо в слабой выраженности клинических симптомов, либо в скрытой форме ОГГИ. Кроме этого, длительный прессинг со стороны лактобактерий *in vivo*, вероятно, обуславливает потерю способности гонококков расти на питательных средах.

При оценке симбиотических отношений с помощью индексного метода показано, что в группе мужчин наиболее часто встречалось сосуществование *N. gonorrhoeae* с *Peptoniphilus* ($q=100$), *Psychrobacter* ($q=71,4$), что говорит о склонности к мутуализму в отношениях между этими бактериями. Коэффициент Жаккара менее 70 был установлен для следующих пар микроорганизмов: *N. gonorrhoeae* с *Prevotella* ($q=42,8$), *Corynebacterium* ($q=41,6$), *Lactobacillus* ($q=38,5$). Такой симбиоз, согласно [23], характерен для совместного существования, переходящего в состояние синергизма. Антагонистические отношения *N. gonorrhoeae* выявлены с бактериями родов *Gardnerella* ($q=16,7$), *Atopobium* ($q=16,7$), *Shewanella* ($q=12,5$), *Porphyromonas* ($q=9,1$), *Ureaplasma* ($q=7,7$), *Streptomyces* ($q=6,2$), *Mycoplasma* ($q=6,2$), а также *Morganella*, *Aerococcus*, *Bifidobacterium*.

При анализе проб женщин с ОГГИ коэффициент Жаккара более 50 выявлен для пар *N. gonorrhoeae* с *Prevotella* spp., *Bifidobacterium* spp., *Atopobium* spp., *Gardnerella* spp., *Corynebacterium* spp., *Lactobacillus* spp., что указывает на выраженные синергистические отношения между этими видами бактерий. При этом с видами *Psychrobacter*, *Mycoplasma*, *Moraxella* и *Enterococcus* для гонококка характерны антагонистические отношения (коэффициент Жаккара менее 30). *Morganella* spp., *Shewanella* spp., *Peptoniphilus* spp., *Aerococcus* spp., *Bacteroides* spp., *Porphyromonas* spp., *Streptomyces* spp., *Ureaplasma* spp. при ОГГИ не встречались, что может косвенно указывать на ярко выраженный антагонизм этих микроорганизмов с гонококками.

Для более детальной оценки симбиотических отношений микроорганизмов генитального тракта следует выделить ключевые таксоны, которые характеризуются существенным клиническим значением, имеют выраженную пробиотическую активность либо наиболее часто встречаются в микробиоте этого биотопа. Так, для мужских гениталий ключевыми можно признать *E. faecalis*, бактерии родов *Lactobacillus* и *Neisseria*. В настоящем исследовании у мужчин с ОГГИ для этих микроорганизмов установлены исключительно мутуалистические и синергистические взаимоотношения. Более того, в состав такого сообщества

активно включаются коринебактерии, проявляя мутуализм с нейссериями и синергизм с лактобактериями и энтерококками при ОГГИ у мужчин. Наличие в составе нейссерий безусловного патогена при ОГГИ приводит к антагонизму с мико- и уреоплазмами, а также к полному вытеснению из сообщества стафилококков и кишечной палочки. При этом активную роль в вытеснении стафилококков оказывают лактобактерии и коринебактерии, а в элиминации *E. coli* – мутуалистические отношения между нейссериями и *E. faecalis*.

Для женского генитального тракта помимо *E. faecalis*, бактерий родов *Lactobacillus* и *Neisseria*, в список ключевых необходимо отнести гарднерелл. При ОГГИ между нейссериями и *E. faecalis*, гарднереллами и *E. faecalis* наблюдается антагонизм. Лактобактерии при этом проявляют синергизм и с нейссериями, и с гарднереллами, а с энтерококками их сосуществование проявляется мутуализмом. Можно предположить, что синергизм между коринебактериями, лактобактериями и нейссериями при ОГГИ приводит к вытеснению микро- и уреоплазм из биотопа. В свою очередь, синергизм между нейссериями и гарднереллами не позволяет *E. coli* успешно колонизировать генитальный биотоп.

Заключение

В целом, в случае колонизации микросимбиоза генитального тракта *N. gonorrhoeae* формируются неоднозначные взаимоотношения с условно патогенными и комменсальными бактериями этого биотопа, что может отражаться как на клинической картине ОГГИ, так и на результатах лабораторных исследований.

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

Информированное согласие на участие в исследовании. Все участники исследования до включения в исследование добровольно подписали форму информированного согласия, утвержденную в составе протокола исследования этическим комитетом.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией).

Литература

- Gupta A, Singh V, Mani I. Dysbiosis of human microbiome and infectious diseases. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2022;192(1):33-51. doi:10.1016/bs.pmbts.2022.06.016.
- Eloe-Fadrosh EA, Rasko DA. The human microbiome: from symbiosis to pathogenesis. *Annu. Rev. Med.* 2013;64:145-63. doi:10.1146/annurev-med-010312-133513.
- Peterson J, Garges S, Giovanni M, et al. The NIH Human Microbiome. *Project. Genome Res.* 2009;19:2317-23. doi:10.1101/gr.096651.109.
- The Human Microbiome Project Consortium. A framework for human microbiome research. *Nature.* 2012;486:215-21. doi:10.1038/nature11209.
- Wang ZN, Klipfell E, Bennett BJ, et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature.* 2011;472:57-82. doi:10.1038/nature09922.
- Степанов М.С., Карпунина Н.С., Хлынова О.В. и соавт. Влияние кишечной микробиоты на патогенез кардиоваскулярных заболеваний. *Пермский медицинский журнал.* 2023;40(1):94-107. doi:10.17816/pmj40194-107
- Malard F, Dore J, Gaugler B, et al. Introduction to host microbiome symbiosis in health and disease. *Mucosal. Immunol.* 2021;14:547-554. doi:10.1038/s41385-020-00365-4
- Curtis M, Sperandio V. A complex relationship: the interaction among symbiotic microbes, invading pathogens, and their mammalian host. *Mucosal. Immunol.* 2011;4:133-138. doi:10.1038/mi.2010.89
- Huang SH, Triche T, Jong AY. Infectomics: genomics and proteomics of microbial infections. *Funct. Integr. Genomics.* 2002;1(6):331-44. doi:10.1007/s10142-002-0048-4.
- Breshears LM, Edwards VL, Ravel J, Peterson ML. *Lactobacillus crispatus* inhibits growth of *Gardnerella vaginalis* and *Neisseria gonorrhoeae* on a porcine vaginal mucosa model. *BMC Microbiol.* 2015;15:276. doi:10.1186/s12866-015-0608-0.
- Годовалов А.П., Гушин М.О., Карпунина Т.И. Особенности межмикробных отношений в микробиоте влагалища infertильных женщин. *Медицинский вестник Северного Кавказа.* 2019;14(1-1):40-44. doi:10.1186/s12866-015-0608-0.
- Chen X, Lu Y, Chen T, Li R. The Female Vaginal Microbiome in Health and Bacterial Vaginosis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021;11:631972. doi:10.3389/fcimb.2021.631972.
- Tuddenham S, Ravel J, Marrazzo JM. Protection and Risk: Male and Female Genital Microbiota and Sexually Transmitted Infections. *J. Infect. Dis.* 2021;223(12 Suppl 2):S222-S235. doi:10.1093/infdis/jiaa762.
- Захарова Е. А., Азизов И. С. Микроэкологическая характеристика кишечного микробиоценоза часто болеющих детей. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2012;2:63-68.
- Brosnahan AJ, Merriman JA, Salgado-Pabón W, et al. *Enterococcus faecalis* inhibits superantigen toxic shock syndrome toxin-1-induced interleukin-8 from human vaginal epithelial cells through tetramic acids. *PLoS One.* 2013;8(4):e61255. doi:10.1371/journal.pone.0061255.
- Watson DC, Yaguchi M, Bisailon JG, et al. The amino acid sequence of a gonococcal growth inhibitor from *Staphylococcus haemolyticus*. *Biochem. J.* 1988;252(1):87-93. doi:10.1042/bj2520087.
- Morselli S, Salvo M, Foschi C, et al. Characterization of *Gardnerella vaginalis* isolates: correlations among clades, biofilm formation and cytokine stimulation. *New Microbiol.* 2023;46(1):56-59.
- Akamine CM, Chou A, Tavakoli-Tabasi S, Musher DM. *Gardnerella vaginalis* Bacteremia in Male Patients: A Case Series and Review of the Literature. *Open Forum Infect Dis.* 2022;9(10):ofac176. doi:10.1093/ofid/ofac176.
- Boyanova L, Marteva-Proevska Y, Gergova R, Markovska R. *Gardnerella vaginalis* in urinary tract infections, are men spared? *Anaerobe.* 2021;72:102438. doi:10.1016/j.anaerobe.2021.102438.
- Placzkiewicz J, Chmiel P, Malinowska E, et al. *Lactobacillus crispatus* and its enolase and glutamine synthetase influence interactions between *Neisseria gonorrhoeae* and human epithelial cells. *J. Microbiol.* 2020;58(5):405-414. doi:10.1007/s12275-020-9505-9.
- Ruiz FO, Pascual L, Giordano W, Barberis L. Bacteriocins and other bioactive substances of probiotic lactobacilli as biological weapons against *Neisseria gonorrhoeae*. *Pathog. Dis.* 2015;73(3):ftv013. doi:10.1093/femspd/ftv013.
- Foschi C, Salvo M, Cevenini R, et al. Vaginal Lactobacilli Reduce *Neisseria gonorrhoeae* Viability through Multiple Strategies: An in Vitro Study. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2017;7:502. doi:10.3389/fcimb.2017.00502.
- Чубукова О.А., Шкарин В.В. Особенности эпидемиологии внебольничных пневмоний с сочетанной этиологией. *Медицинский альманах.* 2017;49(4):149-156.

Сведения об авторах

Годовалов Анатолий Петрович – кандидат медицинских наук, доцент ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера» Минздрава России. 614990, г. Пермь, ул. Петропавловская, д. 26. E-mail: AGodvalov@gmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5112-2003>; eLibrary SPIN: 4482-4378. Оборин Денис Александрович. E-mail: daoborin@yandex.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6426-5217>; eLibrary SPIN: 3140-5812.

Поступила 16.05.2025.