

На правах рукописи

Мартенс Эльвира Акрамовна

**ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ И ГЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
NEISSERIA MENINGITIDIS, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ БОЛЬНЫХ
ГЕНЕРАЛИЗОВАННЫМИ ФОРМАМИ ИНФЕКЦИИ И НОСИТЕЛЕЙ**

1.5.11 – Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург - 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства»

Научный руководитель:

член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук,
профессор

Сидоренко Сергей Владимирович

Официальные оппоненты:

Чеботарь Игорь Викторович - доктор медицинских наук, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, лаборатория молекулярной микробиологии, заведующий

Жуховицкий Владимир Григорьевич – кандидат медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский Центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, отдел бактериальных инфекций, ведущий научный сотрудник, лаборатория индикации и ультраструктурного анализа микроорганизмов, заведующий

Ведущая организация

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины» (ФГБНУ «ИЭМ»)

Защита диссертации состоится «__» _____ 2023 года в ____ часов на заседании диссертационного совета 64.1.004.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10, <http://www.gabrich.ru>.

Автореферат разослан «__» _____ 202__ г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

доктор медицинских наук, профессор

Борисова Ольга Юрьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Особое место среди заболеваний нервной системы занимает менингококковая инфекция, возбудитель которой был описан еще на заре развития микробиологии (Покровский В.И. и др., 1976). Многие исследователи и врачи в разное время внесли существенный вклад в развитие представлений о менингококковой инфекции (Платонов А.Е. и др., 2019). *Neisseria meningitidis* - грамотрицательный микроорганизм, единственным хозяином которого является человек, колонизирует верхние дыхательные пути и в то же время способен вызывать угрожающие жизни эндемические и эпидемические инфекционные болезни, в частности, менингококцемию, сепсис и менингит. Гнойный бактериальный менингит может развиваться в любом возрасте, но наиболее часто поражает детей первых двух лет жизни (Королева И.С. и др., 2014). Впервые менингит, возможно менингококковой этиологии, был описан в 1661 году (Willis T., 1685). В Российской Федерации показатель заболеваемости генерализованными формами менингококковой инфекции у детей первого года жизни в отдельных регионах достигает 12–18 случаев на 100 000 детей этого возраста, у детей до 14 лет – 2,16 на 100 000 (Лобзин Ю.В. и др., 2018). Несмотря на спорадический характер, генерализованная форма менингококковой инфекции непредсказуема по течению и характеризуется высоким риском летальных исходов (8–15%), которые при септическом шоке и тяжелом сепсисе достигают 40–80 % (Скрипченко Н.В. и др., 2017).

В настоящее время основными направлениями деятельности по сдерживанию менингококковой инфекции являются вакцинация и химиопрофилактика, направленные на предотвращение инфекции, и антибиотикотерапия развившихся инфекций. Современные менингококковые вакцины представлены полисахаридными, конъюгированными и содержащими субкапсульные антигены препаратами для профилактики инфекций, вызываемых *Neisseria meningitidis* серогрупп А, С, W, Y и B. Антибактериальная терапия и профилактика менингококковой инфекции основана на бета-лактамах, фторхинолонах, макролидах и амфениколах, ко всем этим препаратам формируется и распространяется устойчивость. Однако, существующие методы оценки антибиотикочувствительности в рутинной практике окончательно не стандартизованы, не ясны преимущества и недостатки отдельных методов.

Особого внимания требует выявляемая в последние годы тенденция к распространению на территории России вирулентной генетической линии sequence type (ST) 11 серогруппы W. По данным российских исследователей в Москве с 2011 года по 2016 год отмечалось увеличение доли *Neisseria meningitidis* серогруппы W в структуре возбудителей генерализованных форм менингококковой инфекции (Миронов К.О. и др., 2017). На сегодняшний день данные по клональной структуре популяции менингококков в Санкт-Петербурге отсутствуют.

На сегодняшний день на фоне углубленного изучения менингококков в мире, в Российской Федерации имеется лишь ограниченная информация об антигенной и клональной структуре популяций менингококков от носителей и больных генерализованными формами инфекции, ограниченная, как правило, тестированием штаммов *Neisseria meningitidis*, циркулирующих в Москве (Нагибина М.В. и др., 2018)., крайне ограничены сведения о чувствительности выделенных изолятов к препаратам, применяемым для профилактики и лечения менингококковых заболеваний (Королева М.А. и др., 2016).

В связи с тем, что фенотипическая и генетическая характеристика выделенных изолятов *Neisseria meningitidis* является одним из важнейших параметров эпидемиологического надзора за менингококковой инфекцией в Санкт-Петербурге, данное исследование является актуальным.

Степень разработанности темы исследования

Молекулярная эпидемиология *N. meningitidis* – одно из наиболее бурно развивающихся направлений исследований нескольких последних десятилетий. Именно для *N. meningitidis* группой Martin C. Maiden был разработан метод мультилокусного сиквенс-типирования (multilocus sequence typing – MLST) (Maiden M.C. et al., 1998), в последующем ставший основой типирования всех бактерий.

Важность изучения *N. meningitidis* подчеркивается большим количеством публикаций, представленных на web-ресурсе PubMed, ежегодно по этой теме публикуется около 300 научных работ, в которых освещается широкий спектр вопросов, в том числе методы детекции и типирования *N. meningitidis*, фенотипические и генотипические характеристики штаммов от бессимптомных носителей и больных, влияние различных схем вакцинации на антигенное и генетическое разнообразие менингококков, распространение генетических

линий и клональных групп *N. meningitidis* в определенных временных промежутках, географических регионах, среди конкретных сообществ и групп людей, механизмы резистентности к различным группам антимикробных препаратов и динамика чувствительности *N. meningitidis* к антибиотикам, применяемым для лечения и профилактики менингококковой инфекции.

Благодаря доступности метода полногеномного секвенирования были достигнуты успехи в создании вакцин. Так, например, при разработке вакцин против *N. meningitidis*, серогруппы В была впервые реализована стратегия, известная как «обратная вакцинология» (Pizza, M. et al., 2000; Sette, A. et al., 2010). Стратегия включает биоинформатический анализ генома целевого патогена, выбор потенциальных антигенов-мишеней, оценку их вариабельности в микробной популяции, изучение протективных свойств на различных экспериментальных моделях, конструирование прототипа вакцин и, наконец, его оценку в клинических испытаниях.

Цель исследования

Дать фенотипическую и молекулярно-генотипическую характеристику изолятов *N. meningitidis*, выделенных от носителей и больных генерализованными формами менингококковой инфекции в Санкт-Петербурге.

Задачи исследования

1. Провести сравнительную оценку классических культуральных и молекулярных методов детекции и серотипирования изолятов *N. meningitidis*, выделенных от носителей и больных генерализованными формами менингококковой инфекции.

2. Провести сравнительную оценку методов оценки чувствительности *N. meningitidis* к антибактериальным препаратам, характеризовать распространенность и механизмы резистентности изолятов, выделенных от носителей и больных генерализованными формами менингококковой инфекции.

3. Изучить структуру популяции *N. meningitidis*, циркулирующих в Санкт-Петербурге среди носителей и больных генерализованными формами менингококковой инфекции, и ее взаимосвязь с глобальными генетическими линиями.

4. На основании данных о клональной структуре и антимикробной резистентности *N. meningitidis* обосновать направления оптимизации вакцинопрофилактики и этиотропной

терапии менингококковой инфекции.

Научная новизна

Впервые охарактеризована структура популяции *N. meningitidis*, циркулирующих в Санкт-Петербурге. Выявлена высокая гетерогенность менингококков по ядерному геному, 53 жизнеспособных изолята относились к 12-ти сиквенс-типам и 8-ми клональным комплексам. При этом три сиквенс-типа (ST-1136, ST-2146 и ST-9126) и три клональных комплекса (cc174, cc198 и cc1136) ранее в России не встречались.

Впервые выявлено, что российские изоляты серогруппы W, относящиеся к ST-11 (W-ST11), образуют отдельную генетическую линию, тесно связанную с англо-французской и шведской кладами кластера Hajj. Эта линия, в свою очередь, была разделена на три сублинии: одна - изоляты из Москвы и две - изоляты из Санкт-Петербурга.

В серогрупповом составе менингококков, циркулирующих в Санкт-Петербурге, выявлено преобладание серогруппы B. Впервые проведена оценка соответствия антигенного состава субкапсулярных вакцин 4CMenB и rLP2086 и менингококков, циркулирующих в Санкт-Петербурге. Установлено, что нетипируемые изоляты *N. meningitidis*, несущие locus *cnl*, распространены в основном среди здоровых носителей, но могут вызывать и генерализованные формы менингококковой инфекции у детей в возрасте от 0 до 17 лет.

Впервые установлено, что снижение чувствительности к пенициллину у менингококков, циркулирующих в Санкт-Петербурге, связано с формированием мутаций в гене *penA*. Выявлена корреляция между указанными мутациями и повышенными значениями МПК пенициллина, определяемыми методами серийных разведений в агаре и градиентной диффузии. Повышенные значения МПК пенициллина, определяемые методом серийных разведений в бульоне, не коррелировали с указанными мутациями.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученный комплекс генетических и фенотипических характеристик популяции менингококков, циркулирующих в Санкт-Петербурге, дополняет теоретические представления о распространении глобальных генетических линий и их эволюции на локальном уровне, а также позволяет обосновать стратегию профилактики и лечения менингококковых инфекций.

Обнаружение доминирования изолятов серогруппы B среди менингококков, циркулирующих в Санкт-Петербурге, обосновывает необходимость внедрения в практику

иммунопрофилактики менингококковых инфекций вакцин, обеспечивающих защиту от инфицирования бактериями этой серогруппы. В то же время, на основании полученных данных можно предположить, что современные субкапсулярные вакцины 4СMenВ и rLP2086 могут обеспечить протективный эффект в отношении соответственно 28,6% и 42,9% менингококков серогруппы В, циркулирующих в Санкт-Петербурге. Очевидна необходимость разработки отечественной вакцины в большей степени соответствующий антигенному составу менингококков, циркулирующих в регионе.

Показано, что в настоящее время цефтриаксон может рассматриваться в качестве надежного средства эмпирической терапии менингококковых инфекций, поскольку устойчивости к этому антибиотику среди менингококков не выявлено. Однако снижение чувствительности к пенициллину, обусловленное мутациями в гене *penA* белка, может быть начальным этапом формирования устойчивости к цефалоспорином. Указанная негативная тенденция обосновывает необходимость внедрения стандартных и воспроизводимых методов оценки чувствительности менингококков к антибактериальным препаратам.

Установлено, что методы оценки чувствительности менингококков в агаре (серийных разведений и градиентной диффузии) позволяют получить более достоверные результаты по сравнению с методом серийных разведений в бульоне. Методы оценки чувствительности в агаре могут быть рекомендованы для использования в лабораторной практике здравоохранения.

Показано, что внедрение молекулярных методов в алгоритм диагностики менингококковых инфекций и типирования возбудителя позволяет существенно сократить срок исследования и обеспечить идентификацию и типирование как жизнеспособных изолятов *N. meningitidis*, так и их ДНК непосредственно из биологического материала.

Материалы диссертации внедрены в образовательный процесс кафедры медицинской микробиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» МЗ РФ при проведении сертификационных циклов повышения квалификации для врачей по специальности «Бактериология» и дополнительные профессиональные программы повышения квалификации врачей «Бактериальные менингиты», «Резистентность микроорганизмов к антимикробным препаратам», а также в лекционный материал при обучении врачей-ординаторов (Акт внедрения от 28.09.2021).

Предложения по совершенствованию лабораторной диагностики менингококковой инфекции внедрены в работу клинико-диагностической лаборатории ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней» (Акт внедрения от 23.09.2021г.), специализированной централизованной бактериологической лаборатории СПб ГБУЗ «Детская городская больница № 22 (Акт внедрения от 24.09.2021).

Методология и методы исследования

Методология диссертационной работы основана на современных научно обоснованных принципах изучения клональной структуры популяции *N. meningitidis* и спланирована соответственно поставленной цели и задачам исследования. Для исследования изолятов *N. meningitidis* и их ДНК, выделенных от больных генерализованными формами и носителей, использовали комплексный подход, включающий изучение фенотипических и молекулярно-генотипических особенностей бактерий. В работе использовались классические культуральные (бактериологические), серологические, молекулярно-генетические, биоинформатические и статистические методы исследования.

Одобрение настоящей диссертационной работы было получено после проведения этической экспертизы Локальным Этическим Комитетом ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России (Выписка из протокола заседания №102 от 25 мая 2018 года).

Биологические образцы. Образцы крови, цереброспинальной жидкости и изоляты *N. meningitidis*, выделенные за период 2009–2020 г.г. от пациентов в возрасте от 0 до – 17 л с генерализованными формами менингококковой инфекции. Носоглоточные мазки и изоляты *N. meningitidis*, выделенные от здоровых лиц (абитуриенты, курсанты Военно-медицинской академии им С.М. Кирова, Санкт-Петербург) в возрасте 18-20 лет.

Микробиологические методы. Посев, культивирование и выделение *N. meningitidis* осуществляли при температуре 37 °С в течение 18-24 ч на сывороточном агаре. Идентификацию культур проводили методом масс-спектрометрии (MALDI-TOF) на приборе Microflex LT («Bruker Daltonics», Германия), со средним коэффициентом идентификации (score) 2,193. Оценку антибиотикочувствительности *N. meningitidis* к бензилпенициллину, ампициллину, меропенему, хлорамфениколу, азитромицину, рифампицину, ципрофлоксацину, цефтриаксону проводили тремя методами: методом серийных микроразведений с определением минимальной подавляющей концентрации (МПК) в мг/л в бульоне Mueller Hinton (БиоРад, США) с добавлением 5% крови барана в соответствии с

рекомендациями CLSI 2011- 2013; методом градиентной диффузии в агар (с использованием МІС-полосок); методом разведений в агаре Mueller Hinton (БиоРад, США) с добавлением 5% крови барана.

Молекулярно-генетические методы. Выделение ДНК из чистых культур *N. meningitidis* и биологических образцов проводили с помощью набора Магно-сорб (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) на автоматической станции пробоподготовки Xiril Neon 100 серии (Xiril AG, Швейцария), в соответствии с инструкциями производителя. Детекцию ДНК *N. meningitidis* в биологических образцах, типирование чистых культур бактерий и ДНК, выделенных из биологических образцов, проводили с помощью ПЦР с использованием специфичных праймеров, зондов на термоциклере CFX96 (БиоРад, США).

Для полногеномного секвенирования геномную ДНК культур выделяли с использованием наборов PureLink Genome kit (InvitroGen, USA) по протоколу производителя. Концентрацию ДНК определяли на приборе Qubit с использованием наборов DNA High Sensitivity. Мультиплексирование и приготовление ДНК-библиотек проводили с помощью наборов Nextera Flex (Illumina) согласно протоколу производителя. Оценку длин фрагментов ДНК-библиотек осуществляли на приборе Agilent TapeStation 4150 (USA) с наборами High Sensitivity D1000 ScreenTape (Agilent, USA). Полногеномное секвенирование проводили на приборе Miseq (Illumina, USA), с использованием 300 п.н. парноконцевых прочтений на картридже V3 - 600 (Illumina, USA).

Биоинформатические методы. Полученные в ходе полногеномного секвенирования риды (прочтения) нуклеотидных последовательностей собирали в контиги de Novo. Полученные контиги аннотировали с помощью онлайн ресурса RAST. Полученные парные прочтения были обработаны TrimGalore 0.6.0 и после этого была проведена сборка геномов с помощью пайплайна (упорядоченной последовательности действий) Unicycler. Полученные сборки были проаннотированы PROKKA. Далее, проведен филогенетический анализ геномов НИИДИ - ДНКЦИБ с использованием kSNP3 и выделены группы наиболее схожих изолятов. Внутри этих групп был проведен поиск полиморфизмов с целью выявления факторов, ассоциированных с антибиотикорезистентностью. Поиск осуществлялся следующим образом: парные прочтения чувствительного изолята к антибиотику интереса выравнивали на геном-референс, демонстрирующий резистентность

к антибиотику интереса с помощью программ BWA (Burrows-Wheeler Aligner) и SAMtools, и BEDtools с целью визуальной и статистической оценки покрытия сборки. После этого проводился поиск полиморфизмов с помощью программы freebayes и их фильтрация по качеству с помощью программы SnpEff. Полученные данные валидировались вручную посредством визуализации полиморфизмов в IGV браузере. Помимо данных НИИДИ-ДНКЦИБ, в работе использовались полногеномные сборки *N. meningitidis* из публичной базы данных PubMLST.

Статистическая обработка результатов исследования. Все полученные в ходе исследования результаты были проанализированы с помощью следующего программного обеспечения: Microsoft «Excel» (Office 2019) составление базы данных. Статистическую обработку проводили с помощью пакета прикладных программ Statistica for Windows и таких процедур как корреляционный анализ, анализ таблиц сопряженности, описательная статистика количественных и качественных признаков. При сравнении результатов антибиотикочувствительности, полученных при постановке разными методами, использовали непараметрический критерий Манна-Уитни, поскольку распределение изучаемых показателей не соответствовало нормальному закону.

Личное участие автора в получении результатов

Личное участие автора заключалось в сборе, анализе научной литературы, планировании и проведении экспериментальной части, в выполнении молекулярно-генетических исследований, а также бактериологических и серологических, пополнении коллекции изолятов *N. meningitidis*, выделенных от больных и носителей. Разделы работы по молекулярным исследованиям, включая полногеномное секвенирование, выполнены совместно со с. н. с. НИО медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России, к.б.н. Гостевым В.В., врачом КЛД клинико-диагностической лаборатории ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России Калисниковой Е.Л. Посев, выделение чистой культуры, идентификация, определение серогрупп изолятов *N. meningitidis* выполнены совместно со с.н.с. НИО медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России, к.м.н. Железовой Л.И. Биоинформатическая обработка результатов, полученных в ходе полногеномного секвенирования, выполнена совместно с лаборантом-исследователем НИО медицинской

микробиологии и молекулярной эпидемиологии ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России Лихолетовой Д.В. Статистическую обработку результатов осуществляли совместно со с. н. с. НИО по организации и управлению научно-исследовательскими работами ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России, профессором, д. м. н. Григорьевым С.Г.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. Для эффективной профилактики менингококковой инфекции в Санкт-Петербурге необходимо применение как квадтивалентной (ACWY) полисахаридной конъюгированной менингококковой вакцины, так и вакцины против серогруппы В, однако антигенная структура современных субкапсулярных вакцин (4CMenB и rLP2086) требует модификации, поскольку она не соответствует антигенной структуре менингококков, циркулирующих в Санкт-Петербурге.

2. *N. meningitidis*, циркулирующие в Санкт-Петербурге сохраняют чувствительность к большинству антибактериальных препаратов, что позволяет рекомендовать для лечения генерализованных инфекций цефалоспорины третьего поколения. В то же время выявление мутаций в генах пенициллинсвязывающих белков является первым признаком формирования устойчивости к этим антибиотикам.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность и обоснованность полученных результатов исследования обеспечивается проведением исследовательских работ с использованием современных методов лабораторной диагностики менингококковой инфекции в соответствии с международными рекомендациями. Результаты статистически обработаны с порогом принятия значимости (p)<0,05.

Диссертационная работа по теме «Фенотипическая и генотипическая характеристика *Neisseria meningitidis*, выделенных от больных генерализованными формами инфекции и носителей», выполнена в рамках НИР 019-К1 по теме «Фенотипическая и молекулярно-генотипическая характеристика *Neisseria meningitidis*, выделенных от больных генерализованными формами менингококковой инфекции и здоровых носителей». По техническому заданию НИР 019-К1 выполнена медицинская технология «Молекулярные методы для детекции и типирования (определение серогруппы) *Neisseria meningitidis*, выделенных у пациентов с генерализованными формами менингококковой инфекции и у

носителей» и утверждена на Ученом совете от 29.09.2022 года (протокол №9).

Апробация диссертационной работы состоялась на заседании Ученого Совета в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства» 28 декабря 2021 года (Протокол №10).

Основные результаты настоящей диссертационной работы были представлены в виде докладов и тезисов: на Российской научно-практической конференции «Менингококковая инфекция: прежний опыт и новые угрозы. Другие бактериальные и вирусные поражения нервной системы» (Санкт-Петербург, 30–31 января 2018 г.); на Межрегиональной научно-практической конференции с международным участием «Санкт-Петербургский септический форум – 2018» (Санкт-Петербург, 12–14 сентября 2018 г.); на Четвертой Российской научно-практической конференции «Актуальные проблемы менингококковой инфекции и гнойных бактериальных менингитов» (Москва 14–15 ноября 2018 г.); на Международной конференции «Молекулярные основы эпидемиологии, диагностики, профилактики и лечения актуальных инфекций» (Санкт-Петербург, 4-6 декабря 2018 г.); XXII Кашкинские чтения. Российско-китайском конгрессе по медицинской микробиологии, эпидемиологии, клинической микологии и иммунологии (Санкт-Петербург, 12–15 июня 2019 г.); на Межрегиональной научно-практической конференции с международным участием «Санкт-Петербургский септический форум – 2019» (Санкт-Петербург, 11–13 сентября 2019 г.); XXIII Кашкинские чтения. Российско-китайском конгрессе по медицинской микробиологии, эпидемиологии, клинической микологии и иммунологии (Санкт-Петербург, 9–11 ноября 2020 г.); XXIV Кашкинские чтения. Всероссийском конгрессе по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии (Санкт-Петербург, 9–11 июня 2021 г.); на 31st European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (Online 9-21 July 2021); на VII Национальном конгрессе бактериологов (Санкт-Петербург, 28-30 сентября 2022 г.).

Публикации

По теме диссертации опубликованы 10 научных работ, из которых 3 – статьи в рецензируемых изданиях, 5 статей в других изданиях, 2 тезисов в материалах конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 136 страницах машинописного текста, содержит введение,

обзор литературы, три главы собственных исследований, заключение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, списка сокращений, списка литературы. Работа иллюстрирована 6 таблицами и 30 рисунками. Список литературы включает 206 источников, 17 из которых – отечественные, 189 – зарубежные.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Детекция и серотипирование *N. meningitidis*

Биологические образцы пациентов с подозрением на генерализованные формы менингококковой инфекции (кровь и цереброспинальная жидкость) с 2013 по 2020 год (n=193) были изучены фенотипическими (бактериологическими) и молекулярно-генетическими (ПЦР) методами. Частота положительных результатов при детекции *N. meningitidis* методом ПЦР варьировала от 29% в 2013 г. до 64% в 2015 г., что существенно выше, чем при использовании бактериологического метода, при котором частота положительных находок находилась в интервале от 8% в 2015 г. до 32% в 2017 г. (Рисунок 1). Различия в частоте подтверждения диагноза в пользу метода ПЦР по сравнению с бактериологическим методом за весь период наблюдения были статистически достоверными (p<0,05).

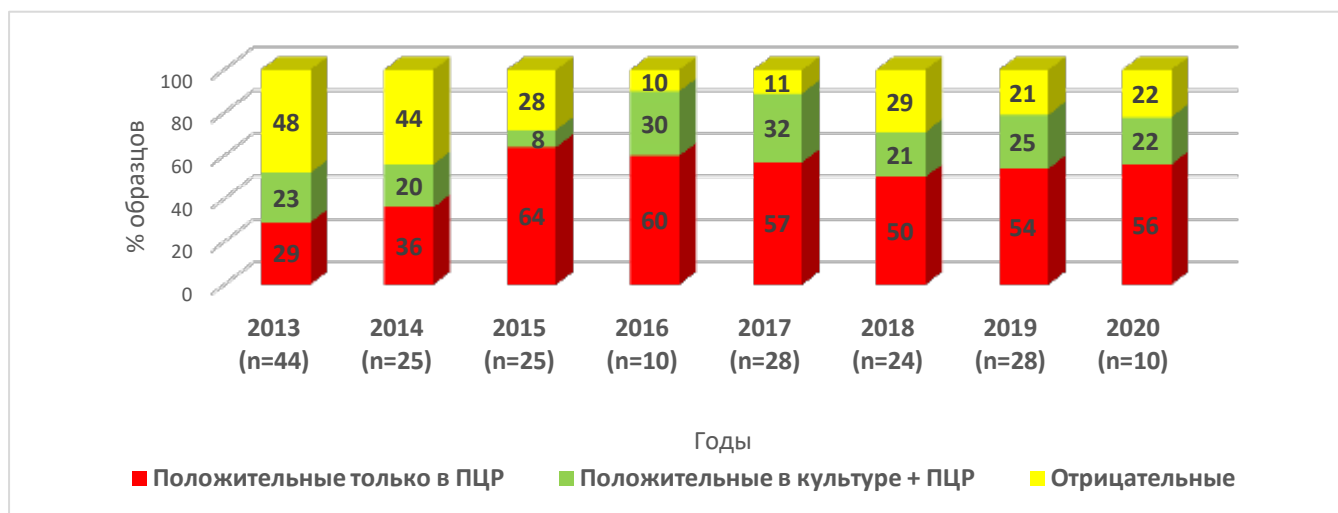


Рисунок 1 – Результаты детекции *N. meningitidis* бактериологическим методом и ПЦР в образцах крови и ЦСЖ, p<0,05

В результате исследования биологических образцов (кровь, ЦСЖ) пациентов с ГФМИ было установлено, что *N. meningitidis* детектировалась методом ПЦР чаще, чем фенотипическими методами.

В результате определения серогруппы *N. meningitidis* молекулярными методами (ПЦР в реальном времени) было установлено, что в Санкт-Петербурге среди изолятов, выделенных от больных, доминируют изоляты, относящиеся к серогруппе В - 45% (Рисунок 2). Эти результаты крайне важны для обоснования стратегии вакцинопрофилактики менингококковой инфекции. Внедрение квадριвалентной менингококковой вакцины, содержащей полисахариды групп А, С, W и Y, обеспечит охват лишь только половины циркулирующих в регионе менингококков. Очевидна необходимость внедрения в практику вакцины против серогруппы В. Следует отметить неполное соответствие между результатами, получаемыми при типировании методом ПЦР и путем традиционного серотипирования. В значительной степени это связано с субъективным характером учета агглютинации. В пользу большей достоверности результатов, получаемых при типировании молекулярным методом, говорит обнаружение у «негруппируемых» изолятов в участке генома, ответственном за образование капсулы, вставки нулевого локуса (*capsule null locus* – *cnl*) длиной 113-114 п.н.

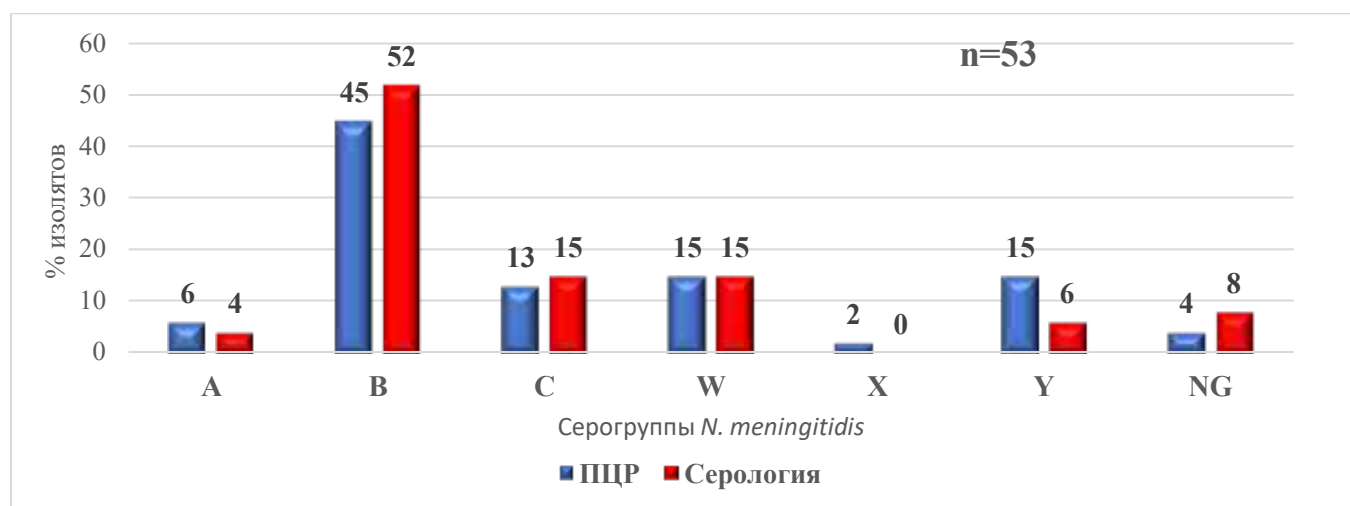


Рисунок 2 - Серогрупповой состав *N. meningitidis*, вызывающих генерализованные формы менингококковой инфекции в Санкт-Петербурге (% изолятов). Результаты получены при использовании различных методов типирования: традиционного серологического и молекулярного (ПЦР).

Суммируя вышеизложенное, необходимо отметить, что полученные результаты важны для обоснования стратегии вакцинопрофилактики менингококковой инфекции. Для оценки эффективности существующих вакцин против менингококка серогруппы В в нашей работе исследованию методом полногеномного секвенирования подверглись 7 изолятов *N.*

meningitidis серогруппы В, выделенных от больных (0-17 л). При загрузке последовательностей соответствующих геномов на ресурс PubMLST *Neisseria* с целью изучения MenDeVAR Index были получены следующие результаты в соответствии с таблицей 1. Основываясь на полученных данных, иммуногенные компоненты вакцины 4CMenB (Bexsero), а именно, один из геномных белков (фактор H, связывающий белок, fHbp) имеет перекрестную реактивность с антигенами двух изолятов из семи: fHbp_peptide:37.

Таблица 1 - Характеристика перекрестной реактивности антигенов изолятов *N. meningitidis* серогруппы В (НИИДИ-ДНКЦИБ) и компонентов вакцин

Изолят (n=7)	PubMLST Id	Вакцина	
		4CMenB (Bexsero)	rLP2086 (Trumenba)
70	118273	Недостаточно данных*	fHbp_peptide:25**
57	118276	Недостаточно данных	fHbp_peptide:25
344	118274	fHbp_peptide:37	Недостаточно данных
62	118277	fHbp_peptide:37	Недостаточно данных
171	118275	Недостаточно данных	Недостаточно данных
42	118272	Недостаточно данных	fHbp_peptide:25
60	118278	Недостаточно данных	Недостаточно данных

Примечание: *Изолят содержит антигены, для которых недостаточно данных для сравнения;
 **Изолят содержит ≥ 1 вариант антигена, который по результатам экспериментальных исследований считается перекрестно-реактивным к компонентам вакцины

В трех случаях из семи имеется перекрестная реактивность компонентов вакцины Trumenba с антигенами изолятов: fHbp_peptide:25. Однако, следует отметить, что в изолятах не было обнаружено ни одно точное соответствие последовательностей аминокислот антигенам вакцин, только отдельные пептиды соответствуют вариантам вакцин против менингококков серогруппы В.

***N. meningitidis* у здоровых лиц.** Носоглоточные мазки у абитуриентов/курсантов ВМА были получены в следующие временные промежутки: в первый день - по прибытии в учебный лагерь перед экзаменами (n=671); на 30-й день - после сдачи экзаменов, зачисления в ВМА и формирования коллектива (n=261); на 60-й день (n=232); через 12 месяцев – перед отъездом на каникулы (n=214); через 13 месяцев – после возвращения с каникул (n=220). Частота выявления носительства *N. meningitidis* (суммарное выявление культуральным

методом и в ПЦР) в различные временные периоды варьировала от 7.7% до 17.8% (Таблица 2). Культуру *N. meningitidis* удавалось выделить с частотой от 2.7% до 10.3%. Все образцы, положительные по культуральному методу, были положительны и по ПЦР. Из образцов, отрицательных в ПЦР, не было выделено жизнеспособных изолятов. Из представленных в таблице данных следует, что в течение периода наблюдения изменялся серогрупповой состав менингококков, циркулирующих в коллективе. На момент прибытия в учебный лагерь серогрупповой состав отличался наибольшим разнообразием, были обнаружены все серогруппы, кроме А, преобладали изоляты серогрупп В и W, а также негруппируемые. С 30-го по 60-й день наблюдения в коллективе циркулировали менингококки серогруппы W и негруппируемые, а в более поздний период – только негруппируемые. Большинство негруппируемых менингококков было выявлено методом ПЦР, у всех у них была обнаружена вставка нулевого локуса (*capsule null locus – cnl*) длиной 113-114 п.н.

Таблица 2 - Результаты детекции и типирования *N. meningitidis* в носоглоточных мазках носителей

Серо- груп па	День 1 (N=671)			День 30 (N=261)			День 60 (N=232)			12 месяцев (N=214) *13 месяцев (N=220) **					
	Культ ура +ДНК, n	ДНК, n	Всего n (%)	Культ ура +ДНК, n	ДНК, n	Всего n (%)	Культ ура +ДНК, n	ДНК, n	Всего n (%)	Культ ура +ДНК, n	ДНК, n	Всего n (%)	Культ ура +ДНК, n	ДНК, n	Всего n (%)
A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	17	-	17 (16.1)	-	-	-	-	-	-	-	1	1(2.6)	-	-	-
C	1	-	1 (0.9)	-	-	-	1	-	1 (2.7)	-	-	-	-	-	-
W	4	7	11 (10.4)	1	5	6 (30.0)	14	11	25 (67.6)	-	-	-	-	-	-
X	2	1	3 (2.8)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Y	2	4	6 (5.7)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Z	1	-	1 (0.9)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NG	13	54	67 (63.2)	6	8	14 (70.0)	9	2	11 (29.7)	4	33	37 (97.4)	-	19	19 (100)
Всего	40	66	106 (100)	7	13	20 (100)	24	13	37 (100)	4	34	38 (100)	-	19	19 (100)
Носи тели, %	6.0	9.8	15.8	2.7	5.0	7.7	10.3	6.5	15.9	1.9	15.9	17.8	-	8.6	8.6

Примечание: * через 12 месяцев – перед отъездом на каникулы;

** через 13 месяцев – после возвращения с каникул

Сравнительная оценка методов определения антибиотикочувствительности изолятов *N. meningitidis*

В ходе проведения сравнительного анализа методов оценки антибиотикочувствительности менингококков (МПК, мг/л) установлена различная диагностическая эффективность исследуемых методов (Рисунок 3). Так, при оценке чувствительности менингококков к пенициллину (Рисунок 3а) следует, что из 98 исследованных штаммов для 75 (76.5%) значения МПК, полученные с помощью метода серийных разведений в агаре и с помощью Е-теста, полностью совпали. Для 21 штамма (21.4%) различия составили одно разведение. Различия более чем на одно разведение были выявлены только для двух штаммов (2.1%). При сравнении метода серийных разведений в агаре и бульоне (Рисунок 3б) различия более чем на одно разведение были выявлены для 74 штаммов (75.5%). При сравнении Е-теста и метода серийных разведений в бульоне (Рисунок 3в) различия больше чем на одно разведение также были выявлены для 69 штаммов (70.4%). При этом в большинстве случаев значения МПК, выявленные методом серийных разведений в бульоне, существенно превышали МПК, выявленные методом серийных разведений в агаре или Е-тестом. Для 12 изолятов (12.2%), охарактеризованных как чувствительные к пенициллину методами основанными на агаре, методом разведений в бульоне были получены значения МПК, соответствующие критерию устойчивости. Однако устойчивость к пенициллину у этих изолятов не была подтверждена молекулярными методами, нуклеотидные последовательности пенициллинсвязывающих белков соответствовали дикому типу.

Принципиально сходные результаты были получены и при сравнении трех методов при оценке чувствительности менингококков к другим антибиотикам (ампициллину, меропенему, хлорамфениколу, азитромицину, рифампицину, ципрофлоксацину, цефтриаксону). Очевидно, что метод разведений в агаре и метод Е-тест обеспечивают получение более достоверных результатов при тестировании *N. meningitidis*.

	Пенициллин											
	Агар, мг/л											
	0,002	0,004	0,008	0,016	0,032	0,064	0,094	0,125	0,19	0,25	0,38	0,5
0,002	35	9										1
0,004		1	1									
0,008				1								
0,016					1							
0,032						13						
0,064							19					
0,094								6				
0,125									5			
0,19										2		
0,25											2	
0,38						1						1
0,5												

	Пенициллин											
	Агар, мг/л											
	0,002	0,004	0,008	0,016	0,032	0,064	0,094	0,125	0,19	0,25	0,38	0,5
0,002												
0,004												
0,008												
0,016	1					4	3					
0,032	15	2				5	3		2			
0,064	3	3	1			3	3			1		
0,094							1					
0,125	6	4		1		2		4		3		1
0,19												
0,25	4	1				4		2				
0,38												
0,5	1	2			1	2						
1	1				1							1
2	2					1						
4						1						

	Пенициллин											
	Е-тест, мг/л											
	0,002	0,004	0,008	0,016	0,032	0,064	0,094	0,125	0,19	0,25	0,38	
0,002												
0,004												
0,008												
0,016	1					4	3					
0,032	16	2			1	4	3	1	1			
0,064	6					3	3	3			1	
0,094												
0,125	10			1		3		1	3	2	1	1
0,19									1			
0,25	5					3						1
0,38												
0,5	3				1	2						
1	2				1							
2	2					1						
4						1						

Рисунок 3 – Результаты сравнения методов разведения в агаре и бульоне и Е-теста при оценке чувствительности к пенициллину

Примечание: Зеленым цветом выделены совпадающие значения МПК, желтым – различающиеся на одно разведение; а): МПК, определенная методами Е-тест-Агар; б) МПК, определенная методами Бульон-Агар; в) МПК, определенная методами Бульон-Е-тест

В результате определения чувствительности изолятов *N. meningitidis*, выделенных от больных и носителей к антибактериальным препаратам, используемых для лечения и профилактики, выяснилось, что количество изолятов со сниженной чувствительностью к маркерному антибиотику – бензилпенициллину больше в группе изолятов, выделенных от больных (38%). Результаты оценки определения чувствительности включенных в исследование изолятов *N. meningitidis* к актуальным для них антибиотикам приведены на рисунке 4.

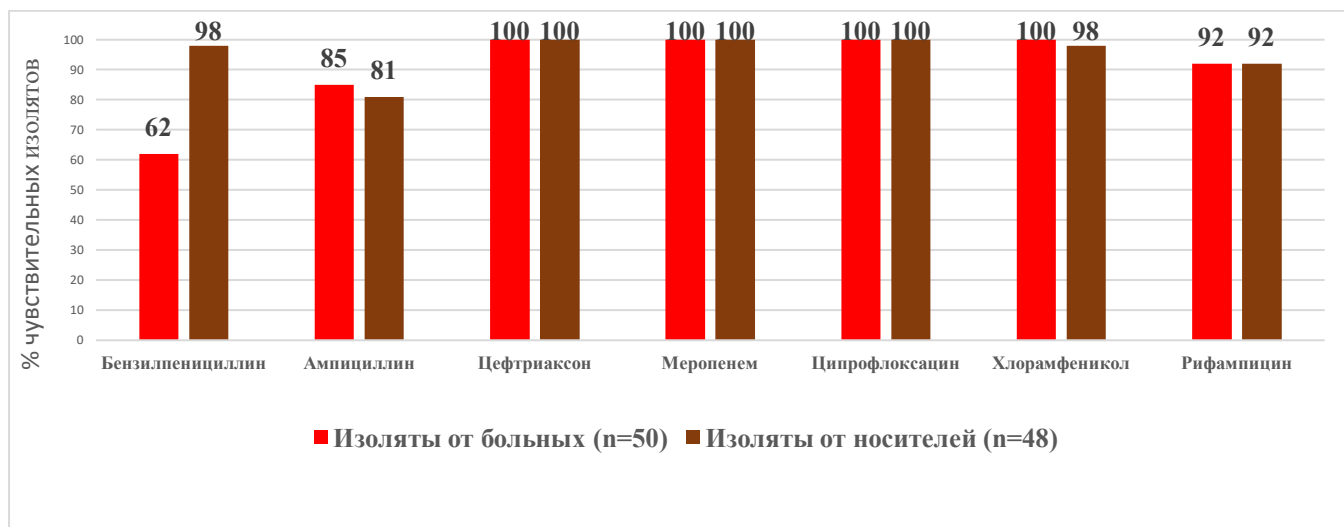


Рисунок 4 - Характеристика чувствительности к антибактериальным препаратам *N. meningitidis* выделенных от больных генерализованными формами менингококковой инфекции и здоровых носителей

Обращает на себя внимание тот факт, что к цефтриаксону, меропенему, а также к ципрофлоксацину сохраняется чувствительность (100%) как в группе изолятов, выделенных от больных, так и в группе изолятов, выделенных от носителей. Следует отметить обнаружение единичных изолятов, устойчивых к рифампицину и хлорамфениколу как у носителей, так и у больных ГФМИ.

Полногеномное секвенирование

На основании проведенного полногеномного секвенирования выявлено, что в Санкт-Петербурге изоляты *N. meningitidis*, выделенные от больных генерализованными формами инфекции и носителей, представлены различными серогруппами и сиквенс-типами (ST) (Рисунок 5).

Впервые в Санкт-Петербурге выявлена высокая гетерогенность среди изолятов *N. meningitidis*, относящихся к 12 сиквенс-типам, из которых 3 (ST-1136, ST-2146 и ST-9126)

ранее в России не встречались. Идентифицированные сиквенс-типы входили в состав 8 клональных комплексов. Кроме того, впервые в Российской Федерации были выделены штаммы *N. meningitidis*, входящие в клональные комплексы (clonal complex) CC-1136 и CC-198, CC-174.

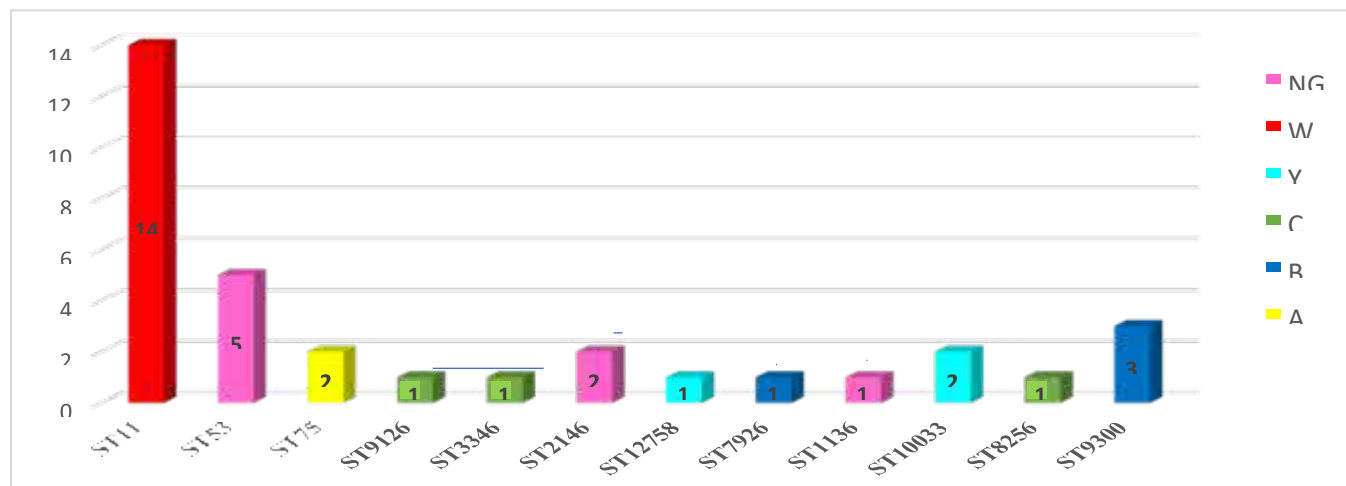


Рисунок 5 – Серогруппы и сиквенс-типы выделенных изолятов *N. meningitidis*, n=34

В ходе проведения анализа полногеномного секвенирования определены детерминанты резистентности и вирулентности изолятов *N. meningitidis*, изучены 23 пенициллинчувствительных и 14 нечувствительных к пенициллину изолятов *N. meningitidis*.

Филогенетический анализ показал, что российские изоляты W-ST11 образуют отдельную линию, тесно связанную с англо-французской и шведской кладами кластера Hajj.

Эта линия, в свою очередь, была разделена на три подлинии: одна – изоляты из Москвы и две – изоляты из Санкт-Петербурга (Рисунок 6).

Это означает, что при условии отсутствия введения вакцинации от W-серогруппы *N. meningitidis* существует опасность очередного подъема заболеваемости менингококковой инфекцией.

Четыре изолята в одной из подлиний продемонстрировали сниженную чувствительность к пенициллину. Клада А полностью состоит из инвазивных изолятов, в то время как в кладе В все, кроме одного - 90_FG – были изолированы от носителей. Это может быть ассоциировано с вариантами NadA, одного из факторов вирулентности, ассоциированного с прикреплением к эпителию. Типирование изолятов NmW (n=14) по генам вирулентности и исследование их филогенетических отношений с Хадж-кластером определило их принадлежность к глобальной группе Хадж-кластера *N. meningitidis*.

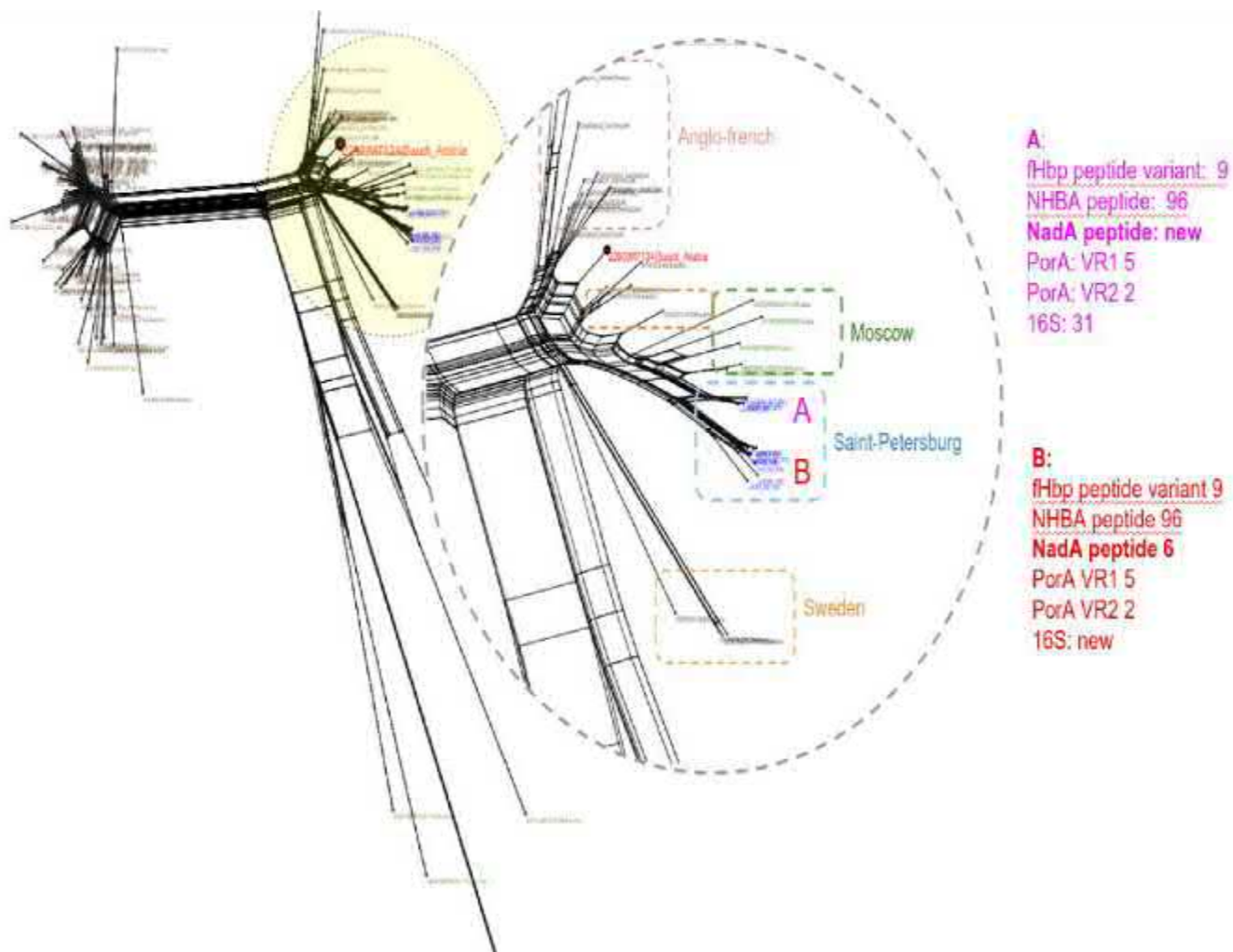


Рисунок 6 - Характеристика групп изолятов внутри Хадж-кластера

Примечание: изоляты из Санкт-Петербурга (n=14) представлены в двух кладах А и В. Всего штаммов n=6150 серогруппы W; изоляты из Москвы (n=11)

ВЫВОДЫ

1. Применение ПЦР повышает эффективность диагностики менингококковой инфекции за счет сокращения сроков исследования и увеличения числа положительных результатов, а также позволяет определять серогрупповую принадлежность ДНК непосредственно из биологических образцов и верифицировать принадлежность жизнеспособных изолятов и ДНК к негруппируемой категории.

2. В популяции *N. meningitidis*, циркулирующих в Санкт-Петербурге, доминируют изоляты серогруппы В (52%), на серогруппы С и W приходится по 15%, на каждую из серогрупп А, Х и Y приходится менее 10%. Популяция представлена 12-ю сиквенс-типами, три из которых (ST-1136, ST-2146 и ST-9126) ранее в России не встречались. Для изолятов

линии W-ST11, выделенных в Санкт-Петербурге и в Москве, установлена филогенетическая связь с англо-французской и шведской кладами кластера Hajj.

3. Оптимальными методами определения чувствительности менингококков к антибактериальным препаратам являются эпсилотрихический (E-тест) и серийных разведений в агаре. Менингококки, циркулирующие в Санкт-Петербурге, характеризуются высоким уровнем чувствительности к большинству антибактериальных препаратов, за исключением пенициллинов, снижение чувствительности к которым связано с мутациями в генах пенициллинсвязывающих белков.

4. На основании оценки чувствительности к антибактериальным препаратам изолятов *N. meningitidis*, выделенных от больных генерализованными формами менингококковой инфекции и от носителей, установлено, что для лечения генерализованных форм менингококковой инфекции в качестве препаратов выбора следует рекомендовать цефалоспорины третьего поколения (цефтриаксон или цефотаксим), а для профилактики – цiproфлоксацин или цефтриаксон или рифампицин при учете возрастных ограничений.

5. Преобладание в Санкт-Петербурге *N. meningitidis*, серогруппы В необходимо учитывать при формировании стратегии вакцинации от менингококковой инфекции.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для определения антибиотикочувствительности изолятов *N. meningitidis* метод с использованием MIC-полосок (E-тест) и метод разведений в агаре могут быть рекомендованы для использования в лабораторной практике здравоохранения.

2. Для лечения генерализованных форм менингококковой инфекции в качестве препаратов выбора следует рекомендовать цефалоспорины третьего поколения (цефтриаксон или цефотаксим), а для профилактики – цiproфлоксацин или цефтриаксон или рифампицин с учетом возрастных ограничений.

3. При микробиологической диагностике менингококковой инфекции целесообразно проводить углубленное изучение выделенных изолятов для выявления родственных связей с глобальными гипервирулентными генетическими линиями, а также для отслеживания динамики антибиотикорезистентности изолятов *N. meningitidis*.

4. Оптимизированный алгоритм исследования рекомендуется использовать для идентификации и типирования *N. meningitidis* как изолятов, так и для обнаружения

возбудителя в биологических образцах (кровь, цереброспинальная жидкость) больных генерализованными формами менингококковой инфекции и носителей (назофарингеальные мазки) в практических лабораториях здравоохранения.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

1. Пополнять имеющуюся коллекцию изолятов *N. meningitidis* для дальнейшего мониторинга за циркуляцией менингококков как среди больных, так и среди носителей с выявлением механизмов резистентности к антибактериальным препаратам.

2. Дальнейшее изучение серогрупповой принадлежности изолятов, выделенных от носителей, для прогнозирования серогруппового пейзажа при возможном очередном подъеме заболеваемости.

3. Необходимо исследовать респираторные образцы детей от 0 до 17 лет в различных организованных коллективах с целью изучения частоты и спектра носительства *N. meningitidis*.

4. Дальнейшее проведение мониторинга нуклеотидных последовательностей изолятов *N. meningitidis* серогруппы В, выделенных в Санкт-Петербурге от больных генерализованными формами менингококковой инфекции и носителей, с определением индекса MenDeVAR для определения полноты охвата покрытия вакцинами против менингококков серогруппы В.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Мартенс, Э.А.** Использование метода мультиплексной ПЦР в реальном времени для выявления и идентификации патогенов в гемокультурах у педиатрических пациентов / **Э.А. Мартенс, Е.Е. Киселева, В.Н. Чеботкевич, С.С. Бессемельцев** // Вестник гематологии. – 2018. - Т. 14, №4. - С. 36.

2. **Martens, E.A.** Comparison of phenotypic and molecular-genetic properties of the strains *Neisseria meningitidis* isolated from patients with generalized forms of meningococcal infection and carriers / **E.A. Martens, S.V. Sidorenko, L.I. Zhelezova** // Мат. международной конф. «Молекулярные основы эпидемиологии, диагностики, профилактики и лечения актуальных инфекций», Санкт-Петербург, 4-6 декабря 2018 г. – Инфекция и иммунитет. – 2018. – Т. 8, №4. – С. 515.

3. **Martens, E. Observational study of nasopharyngeal carriage of *Neisseria meningitidis* in entrants and first-year military students in the Russian Federation / E. Martens, S. Sidorenko, Y. Lobzin // International Journal of Infectious Diseases. – 2019. - Т. 81. - Р. 12-16.**
4. **Мартенс, Э.А.** Менингококковая инфекция в современных условиях: клинические, микробиологические и профилактические аспекты / **Э.А. Мартенс**, К.В. Маркова, Н.В. Скрипченко, Ю.В. Лобзин, В.Е. Карев, А.А. Вильниц, Е.Ю. Горелик, С.В. Сидоренко // Педиатр. – 2020. - Т.11, №3. - С. 81-92.
5. **Мартенс, Э.А.** Последствия перенесенной менингококковой инфекции тяжелого течения/ **Э.А. Мартенс**, В.В. Шарабханов, К.В. Жданов, С.М. Захаренко, С.В. Сидоренко, К.С. Иванов, М.В. Яременко // Лечение и Профилактика. – 2020. – Т. 10, №2. - С. 71-76.
6. **Мартенс, Э.А.** Проблемы вакцинопрофилактики менингококковой инфекции в Вооруженных Силах / **Э.А. Мартенс**, К.В. Жданов, С.М. Захаренко, К.С. Иванов, К.В. Козлов, Ю.И. Ляшенко, С.В. Сидоренко // Военно-медицинский журнал. - 2021. - Т. 342, №6. - С. 36-42.
7. **Мартенс, Э.А.** Клинико-микробиологические особенности менингококковой инфекции у детей / **Э.А. Мартенс**, К.В. Маркова, Е.Ю. Скрипченко, Н.В. Скрипченко, А.А. Вильниц, Л.Н. Мазанкова, С.В. Сидоренко, Е.Ю. Горелик // Практическая медицина. – 2021.- Т. 19, №2. - С. 61-69.
8. **Martens, E.** Genomic characterization of *Neisseria meningitidis* from the Russian Federation / **E. Martens**, L. Zhelezova, D. Likholetova, V. Gostev, S. Sidorenko// Materials of the 31th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Viena, Austria, 9-11 July 2021 г. – 04542. – ePoster Presentation.
9. **Мартенс, Э.А.** Молекулярная характеристика *Neisseria meningitidis* серогруппы W в Санкт-Петербурге / **Э.А. Мартенс**, Л.И. Железова, В.В. Гостев, Д.В. Лихолетова, С.М. Захаренко // Антибиотики и химиотерапия – 2022. - Т. 67, №5-6. – С. 14-18.
10. **Мартенс, Э.А.** Антибиотикочувствительность *Neisseria meningitidis*, выделенных от больных генерализованными формами менингококковой инфекции и от здоровых носителей / **Э.А. Мартенс**, Л.И. Железова, В.В. Гостев, Д.В. Лихолетова, Д.П. Гладин // Антибиотики и химиотерапия – 2022. - Т. 67, №5-6. – С. 19-24.

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ

МПК – минимально подавляющая концентрация

ST – sequence type (сиквенс-тип)

Nm – *N. meningitidis*

П.н. – пар нуклеотидов