

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ДЕТСКИЙ НАУЧНО-КЛИНИЧЕСКИЙ ЦЕНТР ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ
ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА»**

На правах рукописи

Мартенс Эльвира Акрамовна

**Фенотипическая и генотипическая характеристика *Neisseria meningitidis*,
выделенных от больных генерализованными формами инфекции и носителей**

1.5.11 – Микробиология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель

член-корреспондент РАН,
доктор медицинских наук, профессор,
СИДОРЕНКО Сергей Владимирович

Санкт-Петербург - 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
Актуальность темы исследования	4
Степень разработанности темы исследования.....	6
Цель исследования	9
Задачи исследования	10
Научная новизна.....	10
Теоретическая и практическая значимость работы.....	11
Методология и методы исследования.....	13
Материалы исследования.....	13
Методы исследования.....	14
Фенотипические методы исследования.....	14
Молекулярные методы исследования.....	22
Полногеномное секвенирование	25
Статистическая обработка результатов исследования и программное обеспечение ..	27
Личное участие автора в получении результатов.....	28
Основные положения диссертации, выносимые на защиту	28
Степень достоверности и апробация результатов	29
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	31
1.1. Актуальность менингококковой инфекции	31
1.2. Общая характеристика и происхождение <i>N. meningitidis</i>	32
1.3. Диагностика менингококковых инфекций	34
1.4. Типирование <i>N. meningitidis</i>	36
1.4.1. Фенотипические методы	36
1.4.2. Генотипические методы.....	39
1.5. Эпидемиология менингококковых инфекций.....	45
1.6. Стратегии вакцинации и популяционная структура менингококков	51
1.7. Чувствительность <i>N. meningitidis</i> к антибактериальным препаратам и	

приобретенная резистентность.....	54
РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	62
ГЛАВА 2. ДЕТЕКЦИЯ <i>NESSERIA MENINGITIDIS</i> В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ	62
2.1. Диагностика генерализованных форм менингококковой инфекции	62
2.2. <i>N. meningitidis</i> у здоровых лиц.....	70
ГЛАВА 3. СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИБИОТИКОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ <i>NEISSERIA MENINGITIDIS</i>	73
3.1. Бульон-Е-тест	73
3.2. Бульон-Агар.....	77
3.3. Е-тест-Агар	81
3.4. Характеристика чувствительности к антибиотикам <i>N. meningitidis</i> (Nm) в зависимости от серогруппы.....	87
ГЛАВА 4. ПОЛНОГЕНОМНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ <i>NESSERIA MENINGITIDIS</i> ..	89
4.1. Детекция и типирование <i>N. meningitidis</i>	89
4.2. Выявление механизмов антибиотикорезистентности изолятов <i>N. meningitidis</i>	93
4.3. Предикаты, ассоциированные с инвазивностью <i>N. meningitidis</i>	95
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	98
ВЫВОДЫ	106
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	107
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....	108
ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ.....	109
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	111

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

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. Ежегодно на планете регистрируют около 1 200 000 случаев этих заболеваний, из которых по меньшей мере 135 000 заканчиваются летальным исходом [89]. В Российской Федерации показатель заболеваемости генерализованными формами менингококковой инфекции (ГФМИ) 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 [8], в отличие от спорадического характера заболеваемости среди всего населения (0,75 случаев на 100 000 в 2019 году) [13]; 0,26 - в 2020 году [14]. При этом в структуре менингококковой инфекции по данным Роспотребнадзора за 2017-2019 г.г. на генерализованные формы приходится 73,9–81,7% [13]. 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 % [17].

В настоящее время основными направлениями деятельности по сдерживанию менингококковой инфекции, одобренными системами общественного здравоохранения во многих странах, являются вакцинация и химиопрофилактика, направленные на предотвращение инфекции, и антибиотикотерапия развившихся инфекций. Современные менингококковые вакцины представлены моно-, би- и квадριвалентными полисахаридными и конъюгированными препаратами для профилактики инфекций, вызываемых *Neisseria meningitidis* серогрупп А, С, W и Y, и вакцинами, содержащими субкапсульные антигены для серогруппы В. Антибактериальная терапия и профилактика менингококковой инфекции основана на бета-лактамах, фторхинолонах, макролидах и амфениколах, ко всем этим препаратам

формируется и распространяется устойчивость.

Очевидно, для успешного сдерживания менингококковой инфекции необходима оперативная информация о популяционной структуре и уровне антибиотикорезистентности *Neisseria meningitidis*, циркулирующих в Российской Федерации. 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 [12]. Эпидемиологический мониторинг за бактериальными гнойными менингитами, одним из возбудителей, которых, является менингококк, в Российской Федерации организован в 2010 году в Референс-центре по мониторингу за бактериальными менингитами на базе ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. Характеристика поступающих штаммов *Neisseria meningitidis* проводится с помощью мультилокусного сиквенс-типирования. Несмотря на существующий комплекс мер, направленных на повышение качества лабораторной диагностики, тенденция к снижению заболеваемости генерализованными формами менингококковой инфекцией отсутствует [5]. На сегодняшний день данные по клональной структуре популяции менингококков в Санкт-Петербурге также отсутствуют. В соответствии со стандартом Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) эпидемиологического надзора за менингококковой инфекцией мониторинговые исследования должны быть направлены на изучение циркуляции и распространения штаммов *Neisseria meningitidis* от носителей и больных, включая обнаружение новых эпидемических клонов, выявление изменений в отношении циркулирующих серогрупп менингококков и отслеживание динамики антибиотикорезистентности изолятов за счет хромосомных и внехромосомных механизмов приобретения устойчивости к антимикробным препаратам [106].

Однако, существующие методы оценки антибиотикочувствительности в

рутинной практике окончательно не стандартизованы, не ясны преимущества и недостатки отдельных методов, о чем свидетельствуют рекомендации European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) и Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [49]. 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 [12], крайне ограничены сведения о чувствительности выделенных изолятов к препаратам, применяемым для профилактики и лечения менингококковых заболеваний [4].

В связи с тем, что фенотипическая и молекулярно-генетическая характеристика выделенных изолятов *Neisseria meningitidis* является одним из важнейших параметров эпидемиологического надзора за менингококковой инфекцией в Санкт-Петербурге, поскольку его результаты можно использовать для прогнозирования течения эпидемического процесса и выбора научно-обоснованной программы иммунопрофилактических мероприятий, а также определение спектра антибиотикорезистентности изолятов *Neisseria meningitidis* от носителей и больных генерализованными формами менингококковой инфекции, 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) [106], в последующем ставший основой типирования всех бактерий. Широко используемая и постоянно обновляющаяся международная база данных *Neisseria* PubMLST (<https://pubmlst.org/neisseria/>) на 01.12.2021 г. содержит коллекцию записей о более 40

000 геномах *N. meningitidis*, информацию о происхождении, фенотипе и данные молекулярного типирования более 75 000 изолятов менингококков. Интенсивное использование наиболее современных методов полногеномного секвенирования позволило сформировать целостную картину эволюции микроорганизма и патогенеза инфекции [188].

Одним из проявлений генерализованной формы менингококковой инфекции является менингит (гнойное воспаление мягких мозговых оболочек). Впервые менингит (возможно менингококковой этиологии) был описан английским анатомом Томасом Виллисом, а первый доклад о менингеальном симптоме в 1882 году на собрании врачей в Санкт-Петербурге был сделан В. М. Кернигом [16]. Рациональная методика люмбальной пункции, сохранившаяся почти без изменений до наших дней, была предложена Н. Quincke, в связи с чем появилась прижизненная возможность клинико-биохимических и микробиологических исследований спинно-мозговой жидкости [16]. Стало возможным определение таких важных признаков бактериального менингита как, плеоцитоз и сниженная концентрация глюкозы в ликворе [16].

В возникновении вспышек менингококковой инфекции важная роль принадлежит скученности, массовой миграции компактных групп населения, формированию новых организованных коллективов. Так, первая зарегистрированная в истории пандемия, вызванная *N. meningitidis*, была во время Первой мировой войны, охватившая Европу, Северную Америку, Австралию, Японию [16]. В дальнейшем улучшение санитарно-гигиенических условий привело к снижению уровня заболеваемости и носительства менингококков [16]. До начала Второй мировой войны было сделано важное открытие о полисахаридной природе капсулы *N. meningitidis* и расшифрована антигенная структура капсулы [141]. Главным событием в противомикробной терапии генерализованной формы менингококковой инфекции стало создание сульфаниламидных препаратов, благодаря которым было излечено множество пациентов [16]. После Второй мировой войны наступил

межэпидемический период, в котором заболеваемость стала ниже 1 случая на 100 тыс. населения [6]. В 70-х годах XX века началась третья пандемия менингококковой инфекции. Благодаря возможностям полногеномного секвенирования исследователями из Института молекулярной генетики (Берлин), Центрального НИИ эпидемиологии (Москва) было установлено, что возбудителем пандемии стал менингококк серогруппы А (ST-5) [16].

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» [134, 159]. 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.

В рутинную практику развитых стран внедрены молекулярные методы, позволяющие существенно повысить скорость и эффективность детекции *N.*

meningitidis в биологических образцах [52]. Изучены основные механизмы резистентности *N. meningitidis* к антибиотикам, получены данные о распространении устойчивости во многих регионах [192].

В то же время о генетических особенностях менингококков, циркулирующих на территории Российской Федерации за пределами Москвы, известно относительно немного. Ведущая роль *N. meningitidis* в этиологии гнойных бактериальных менингитов у взрослых и детей убедительно показана в ряде исследований [9, 10]. В период с 2002 по 2011 гг. в Москве в структуре менингококков на серогруппу А приходилось 34,2%, серогруппу В – 28,4%, серогруппу С – 20%, а на долю менингококка без определения серогруппы – 15,3% [3]. На территории Москвы в течение последних нескольких лет наблюдается устойчивая тенденция к снижению удельного веса *N. meningitidis* серогруппы А, в 2014–2015 гг. – повышение доли *N. meningitidis* В и W серогрупп [9]. Очевидно, что в Москве происходит смена доминирующей серогруппы. Вместе с тем эпидемиологическую настороженность вызывает увеличение менингококка серогруппы W (до 30%). По мнению исследователей необходимо проведение дополнительных исследований, включающих детекцию генетических характеристик менингококка и идентификацию гипервирулентных клональных комплексов *N. meningitidis* [9].

По данным другого исследования при молекулярном типировании менингококков, циркулирующих на территории Российской Федерации в период с 2008 года по 2012 год, было установлено, что преобладали менингококки серогрупп В и С и распределены по 5 клональным комплексам: ST-41/44 complex/Lineage, ST-18 complex, ST-226 complex и ST-37 complex [10].

Данная работа посвящена оценке фенотипической и молекулярно-генотипической характеристике менингококков, выделенных от носителей и больных генерализованными формами менингококковой инфекции в Санкт-Петербурге.

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 В. Впервые проведена оценка соответствия антигенного состава субкапсулярных вакцин 4СMenВ и rLP2086 и менингококков, циркулирующих в Санкт-Петербурге. Установлено, что нетипируемые изоляты *N. meningitidis*, несущие локус *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 В 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» Федерального медико-биологического агентства (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).

Материалы исследования

Клинический материал: (носоглоточные образцы, кровь, цереброспинальная жидкость)

В настоящей работе были исследованы образцы крови и ЦСЖ, выделенные в период 2013-2020 гг. от пациентов (0-17л) со следующими диагнозами: Острая менингококкемия (код МКБ – А39.2), другие менингококковые инфекции (код МКБ – А39.8), бактериальная инфекция неуточненная (код МКБ – А49.9), менингококковый

менингит (код МКБ – А39.0), септицемия неуточненная (код МКБ – А41.9), другая уточненная септицемия (код МКБ – А41.8). Были собраны и исследованы изоляты *N. meningitidis*, выделенные от пациентов с ГФМИ (n=50) за период 2009-2019 гг. С 2016 года по 2019 год были исследованы носоглоточные мазки у группы здоровых лиц 18-20 лет (1598 чел.) на предмет носительства *N. meningitidis*. Образцы были взяты у абитуриентов, поступающих в Военно-Медицинскую Академию им. С. М. Кирова в возрасте 18–20 лет по прибытии в тренировочный лагерь (День 1). Абитуриенты отвечали на вопросы анкеты, касающиеся вредных привычек (курения), а также посещения баров, наличия признаков ОРЗ. Размещение абитуриентов было в деревянных одноэтажных казармах (около 30 человек в одном помещении). Все абитуриенты, успешно сдавшие экзамены, прошли 25-дневный курс предварительной подготовки. Они были разделены на группы по 30 человек, и каждая группа была размещена в отдельном помещении, члены этих групп находились в тесном контакте во время повседневной деятельности. Вторые образцы были взяты у заявителей (независимо от того, были ли они включены в исследование на 1-й день) сразу после формирования групп (на 30-й день). Третьи образцы были получены на 60-й день от абитуриентов, успешно прошедших предварительный курс обучения. В 2019 году было продолжено исследование носоглоточных мазков у носителей- курсантов: перед тем, как выехать в отпуск (214 человек) и по возвращению из отпуска (220 человек). Мазок из задней стенки носоглотки был взят не ранее, чем через 3–4 ч после приема пищи обученным медицинским персоналом с использованием транспортной среды eSwabs (Coraп, Италия). После взятия мазок доставляли в лабораторию в течение 6 часов, соблюдая температурный режим (37°C).

Типовые штаммы, использованные в работе: *S. pneumoniae* ATCC 46619,

Референс-последовательности *N. meningitidis* (NCBI GenBank)¹

Методы исследования

Фенотипические методы исследования

¹ www.ncbi.nlm.nih.gov

Выделение, идентификация и хранение изолятов

В настоящей работе для идентификации фенотипическими и молекулярными методами использовались изоляты *N. meningitidis*, выделенные из крови и из ликвора от больных ГФМИ в возрасте 0–17 лет и от носителей 18–20 лет.

Выделенные изоляты *N. meningitidis* хранились в криопробирках («DeltaLab», Испания) при -70°C . Восстановление культур осуществлялось методом бактериологического посева на сывороточный агар с добавлением 5% крови барана (ЗАО «ЭКОлаб», Россия) с обязательной инкубацией в условиях 5% содержания CO_2 при 37°C . Идентификацию выросших культур *N. meningitidis* проводили методом масс-спектрометрии (MALDI-TOF) на приборе Microflex LT («Bruker Daltonics», Германия), со средним коэффициентом идентификации (score) 2,193. Для определения серогрупповой принадлежности культур *N. meningitidis* использовались типоспецифические сыворотки МЕНГРУВИД® СПбНИИВС (ФГУП «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов» ФМБА России) для проведения реакции агглютинации на стекле.

Определение чувствительности *N. meningitidis* к антибактериальным препаратам

Оценку антибиотикочувствительности *N. meningitidis* к бензилпенициллину, ампициллину, меропенему, хлорамфениколу, азитромицину, рифампицину, ципрофлоксацину, цефтриаксону проводили тремя методами: 1) методом серийных микроразведений с определением минимальной подавляющей концентрации (МПК) в мг/л в бульоне Mueller Hinton (БиоРад, США) с добавлением 5% крови барана (ЗАО «ЭКОлаб», Россия) в соответствии с рекомендациями CLSI 2011- 2013; 2) методом градиентной диффузии в агар (с использованием MIC-полосок); 3) методом разведений в агаре. Во всех трех методах постановки антибиотикочувствительности в качестве контрольного референтного штамма использовался *S. pneumoniae* ATCC 46619. Для метода серийных микроразведений и метода разведений в агаре

использовались субстанции тестируемых антибиотиков следующих производителей: Molekula, Англия (пенициллин, ампициллин, меропенем, хлорамфеникол, азитромицин, рифампицин); Sigma, США (ципрофлоксацин, цефтриаксон). Интерпретация результатов определения МПК осуществлялась согласно критериям EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) v.10.0 (2020-01-01).

Определение чувствительности *N. meningitidis* к антибиотикам методом разведений в бульоне

При постановке антибиотикочувствительности методом серийных микроразведений использовались суточные культуры *N. meningitidis*, выращенные на сывороточном агаре. Непосредственно перед проведением исследования готовили бактериальные взвеси со степенью мутности 0,5 по шкале Мак-Фарланда в стерильном физиологическом растворе. Затем приготовленные взвеси клеток разводили бульоном Mueller Hinton (БиоРад, США), содержащем 5% лизированной лошадиной крови (ЗАО «ЭКОлаб», Россия), для дальнейшей инокуляции с тестируемыми антибиотиками. Отрегулированный инокулюм, приготовленный как указано выше, содержал окончательную концентрацию числа клеток 5×10^5 КОЕ/мл.

В данной работе использовали 96-луночный планшет для иммуноферментного анализа (НПО «Медполимер», г. Санкт-Петербург), лунки которого заполняли соответствующими объемами (по 100 мкл на лунку) смеси из раствора субстанции тестируемого антибиотика с двукратно возрастающей концентрацией в бульоне Mueller Hinton («БиоРад», США), содержащем 5% лизированной лошадиной крови (ЗАО «ЭКОлаб», Россия) и определенного инокулюма *N. meningitidis*.

Один 96-луночный планшет содержал 11 двукратных разведений (ряды 1-11) восьми субстанций антибиотиков (ряды А-Н), приготовленных в день эксперимента по методике, изложенной в ГОСТ Р ИСО 20776-1-2010.

При проведении серии исследований в лунки планшета вносили 50 мкл рабочего раствора антибактериального агента и 50 мкл бактериального инокулюма. Планшеты

инокулировали в пределах 30 мин стандартизации суспензии инокулюма, чтобы сохранить концентрацию числа жизнеспособных клеток. Диапазон концентраций антибактериальных препаратов, отобранных для проведения экспериментов, варьировал в соответствии с таблицей 1 и давал полное определение конечной точки МПК для штаммов *N. meningitidis*.

Один ряд лунок (12-й ряд), каждая из которых содержала 100 мкл бактериального инокулюма (без добавления соответствующего раствора антибиотика), использовали в качестве контроля роста для каждого проверяемого штамма *N. meningitidis*.

Стоковые растворы антибиотиков, приготовленные согласно п.3.3.2 ГОСТ Р ИСО 20776-1-2010, хранили не более 6 месяцев при -70°C . Заполненные планшеты с рабочими растворами антибиотиков использовали немедленно.

После внесения всех необходимых компонентов планшеты для микроразведения запечатывали клейкой полиэтиленовой пленкой для предотвращения высыхания и инкубировали при 37°C окружающей среды в течение 18 ± 2 часов.

Для того, чтобы убедиться в том, что тестовые лунки содержали приблизительно 5×10^5 КОЕ/мл жизнеспособных клеток испытуемой суспензии, из лунки контроля роста немедленно после инокулирования брали 10 мкл и разводили эту аликвоту в 10 мл изотонического раствора. 100 мкл этого разведения распределяли по поверхности чашки Петри с сывороточным агаром, которую затем инкубировали в течение ночи при 37°C (в присутствии 5% CO_2). Результат определения МПК валидировали, если на поверхности шоколадного агара («БиоРад», США) обнаруживали от 20 до 80 колоний из суспензии штамма *N. meningitidis*.

За минимально-подавляющую концентрацию (МПК), выраженную в мг/л, принимали лунку в ряде разведений, где отсутствовал видимый рост культуры микроорганизмов при положительном росте в контрольной лунке.

Таблица 1 - Антибактериальные препараты и значения МПК для определения категории чувствительных и со сниженной чувствительностью EUCAST v.10.0 (2020-01-01)

Антибактериальный препарат	Диапазон МПК, мг/л
Бензилпенициллин	0,06 - 0,25
Ампициллин	0,125 - 1
Цефтриаксон	0,125
Меропенем	0,25
Ципрофлоксацин	0,03
Азитромицин	2
Хлорамфеникол	2
Рифампицин	0,25

Определение чувствительности *N. meningitidis* к антибиотикам методом разведений в агаре

Определение чувствительности к антибактериальным препаратам *N. meningitidis* **методом разведений в агаре** проводили в соответствии с методикой, изложенной в Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard – Tenth Edition Volume 35 Number 2 – CLSI – M07-A10-2015. Принцип проведения определения чувствительности данным методом аналогичен методу разведений в бульоне: приготовление двукратных серийных разведений антибактериального препарата. В качестве плотной питательной среды при проведении исследований использовали агар Мюллера –Хинтон (БиоРад, США) с добавлением 5% крови барана (ЗАО «ЭКОлаб», Россия). Для этого 38,0 г питательной среды (агара Мюллера-Хинтона) разводили в 1,0 литре дистиллированной воды. Навеску тщательно перемешивали и нагревали. Часто помешивая, взвесь доводили до кипения. Кипятили среду минуту до полного растворения, после чего ее стерилизовали в автоклаве 15 минут при 121°C. Когда

приготовленная вышеописанным способом среда охлаждалась до 45–50°C на водяной бане к ней добавляли 50 мл дефибрированной крови барана (ЗАО «ЭКОлаб», Россия), соблюдая правила асептики. После добавления крови в автоклавированную и охлажденную среду проверяли ее значения pH, которые должны находиться в пределах 7,2 - 7,4 при комнатной температуре.

Для приготовления чашек Петри с плотной питательной средой, содержащей соответствующие разведения антибиотиков, предварительно готовили промежуточные (10-кратные) растворы антимикробных препаратов путем последовательных разведений. Для получения конечной концентрации тестируемого антибиотика в плотной питательной среде одну часть промежуточного (10 ×) раствора антимикробного препарата добавляли к девяти частям расплавленного и охлажденного агара, хранившегося на водяной бане. Растворы антибиотика и охлажденной до 45-50°C питательной среды тщательно перемешивали в соответствующей пропорции, избегая образования пузырьков, и разливали в чашки Петри на горизонтальной ровной поверхности таким образом, чтобы толщина агара составляла 4-5 мм.

Чашки Петри с приготовленной вышеописанным способом питательной средой использовали для исследования немедленно после ее застывания, либо хранили в полиэтиленовых пакетах в течение 5 дней в холодильнике при температуре 5-8°C. Перед использованием среды чашки Петри находились при комнатной температуре, чтобы на поверхности агара не содержались следы конденсата. При необходимости чашки Петри с приоткрытой крышкой помещали в термостат на 30 минут, чтобы ускорить просушивание поверхности агара. Чашки с агаром Мюллера-Хинтона с добавлением 5% крови барана, не содержащие растворов антибактериальных препаратов, использовали в качестве контроля роста тестируемых культур менингококков.

Стандартизованный инокулят из культур *N. meningitidis* для тестирования методом разведения антибиотиков в агаре готовили путем суспендирования в 0,9%

растворе NaCl материала из изолированных колоний, выросших на 5% кровяном агаре в течение 20 – 24 часов при $35\pm 2^\circ\text{C}$ в присутствии 5% CO_2 , до достижения мутности, соответствующей стандарту 0,5 ед. по Мак-Фарланду. Поскольку у большинства бактериальных видов, включая *N. meningitidis*, суспензии культур, скорректированных по стандарту 0,5 ед. по Мак-Фарланду, содержат около $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл, тестируемые суспензии разводили в 10 раз (разведение 1:10) в стерильном физиологическом растворе, чтобы получить концентрацию 10^7 КОЕ/мл. Оптимальное время использования скорректированной для окончательной инокуляции суспензии составляло 15 минут после приготовления.

Стерильной одноразовой полимерной калиброванной микробиологической петлей для отбора 1 мкл аликвоты каждого инокулята из скорректированной для окончательной инокуляции суспензии переносили на чашку с плотной питательной средой. Таким образом достигали требуемой конечной концентрации микроорганизмов в инокуляте, равной 10^4 КОЕ на пятно диаметром 5-8 мм. Тестируемую суспензию инокулировали сначала на чашку, которую использовали для контроля роста исследуемого микроорганизма (без антимикробного агента), а затем, начиная с самой низкой концентрации, инокулировали исследуемый материал на поверхность агара, содержащего различные концентрации противомикробных препаратов. Последней инокулировали вторую контрольную чашку роста тестируемых бактерий, чтобы быть уверенным в отсутствии контаминации или случайного переноса антибиотиков во время инокуляции. Инокулированные чашки выдерживали при комнатной температуре до тех пор, пока влажность пятен посевного материала не была поглощена агаром, т. е. до тех пор, пока пятна не высыхали, но не более 30 минут. После этого чашки Петри переворачивали крышками вниз и инкубировали при $35\pm 2^\circ\text{C}$ в течение 20–24 часов в атмосфере, содержащей 5% CO_2 . Для учета результатов чашки Петри с агаровыми пластинами помещали на темную неотражающую поверхность. За МПК принимали самую низкую концентрацию антимикробного препарата, которая полностью ингибировала рост тестируемого

микроорганизма, пренебрегая единичной колонией на поверхности агаровой среды. В случаях, когда две или более колоний присутствовали в чашках с разведением антибиотика за пределами очевидной конечной точки, а также при отсутствии роста менингококков при более низких концентрациях антибиотика или наличии роста бактерий в чашках с более высокими концентрациями антибиотика, проверяли чистоту тестируемой культуры *N. meningitidis* и, при необходимости, повторяли эксперимент. При этом Мюллера-Хинтона агар расплавляли и охлаждали до температуры 45-50°C, затем добавляли баранью кровь (5%), а раствор тестируемого антибиотика и агаризованную среду смешивали непосредственно в чашке Петри (при диаметре 90 мм к 18 мл расплавленного и охлажденного агара добавляли 2 мл раствора антибактериального препарата). Для нанесения культур использовали механический дозатор или бактериологическую петлю. На поверхность агара наносили 1-2 мкл суспензии *N. meningitidis*. На одной чашке Петри определяли МПК нескольких штаммов *N. meningitidis*. После нанесения инокулята образовывалось пятно, после подсыхания которого, чашки Петри переворачивали и инкубировали при 35°C, 5% CO₂ в течение 20-24 часов. Проводили обязательный контроль видимого роста, когда инкубировались чашки с агаром без добавления в среду антибактериального препарата. За МПК принимали концентрацию антибиотика, вызвавшую полную ингибицию видимого роста микроорганизма.

Определение чувствительности штаммов *N. meningitidis* к антибиотикам методом градиентной диффузии антибиотика в агар с помощью МІС-полосок (Е-тест)

Использование **МІС-полосок** (Е-тест) согласно инструкции по использованию МІС-полосок (BioMerieux, Франция) является количественным методом определения антимикробной чувствительности *N. meningitidis*. Полоска Е-теста состоит из стандартного градиента концентрации антибиотика, который используется для определения минимальной подавляющей концентрации (МПК) в мг/л, тестируемых антибактериальных препаратов для *N. meningitidis* посредством культивирования на

агаре Мюллера-Хинтона (БиоРад, США) с добавлением 5% дефибрированной лошадиной крови в течение 20-24ч при 35°C, 5%CO₂ (Рисунок 1). Стандартизованный инокулят из культур *N. meningitidis* для тестирования методом постановки Е-теста готовили путем суспендирования в 0,9% растворе NaCl материала из изолированных колоний, выросших на колумбийском агаре (БиоРад, США) с добавлением 5% бараньей крови или на сывороточном агаре в течение 20 – 24 часов при 35±2°C в присутствии 5% CO₂, до достижения мутности, соответствующей стандарту 0,5 ед. по Мак-Фарланду.

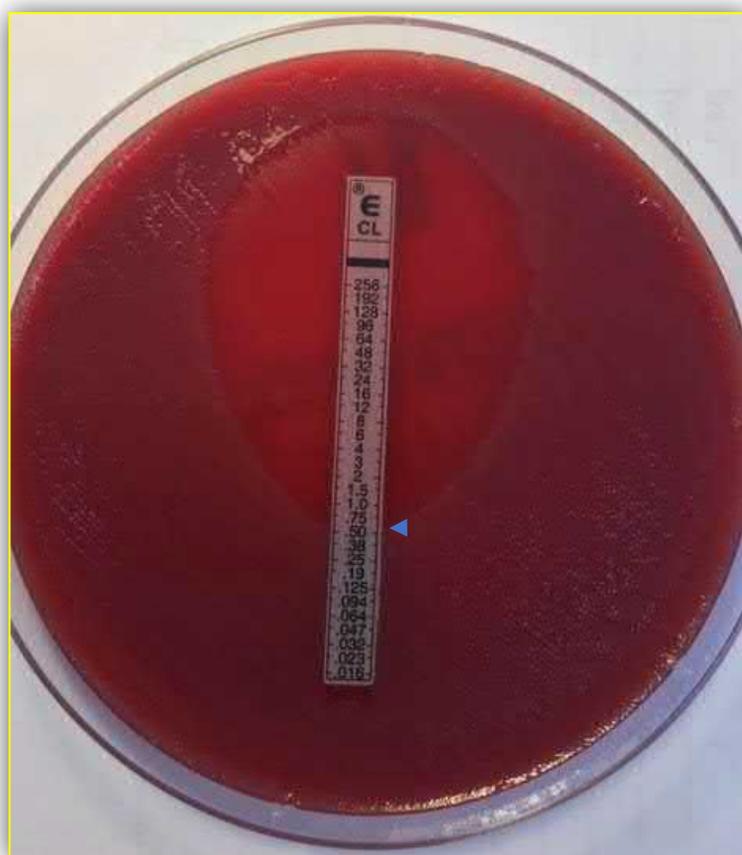


Рисунок 1 – Определение МПК (мг/л) *N. meningitidis* к хлорамфениколу с помощью МПС-полосок (Е-тест)

Примечание: стрелкой указано значение МПК (0,5 мг/л) на шкале при пересечении эллипсом зоны задержки роста микроорганизма

Молекулярные методы исследования

Выделение геномной ДНК из жидкой суспензии транспортных систем eSwab

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.

Из респираторных мазков (n=1598) был проведен культуральный посев на сывороточный агар и колумбийский агар с добавлением 5% крови барана. В результате бактериологического посева рост культур *N. meningitidis* был выявлен в 48 носоглоточных мазках. 50 изолятов выделены из крови и ликвора от больных ГФМИ. Затем были приготовлены суспензии культур для последующего выделения тотальной бактериальной ДНК с использованием комплекта реагентов «ДНК-сорб В» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) согласно инструкции производителя. Праймеры и зонды использовались для видоспецифичного гена *porA* *N. meningitidis*, а для нетипируемых образцов – обнаружение специфического *cnl*. Модифицированный видоспецифический зонд *sodC* был использован на основе ранее опубликованного метода [16]. Наиболее часто встречающиеся серогруппы определялись с использованием мультиплексных реакций (A, W) и (B, C, Y) [16].

В таблице 2 приведен список с указанием расположения зонда гидролиза, а также используемый краситель. Условия циклирования были одинаковыми для всех испытаний по серотипированию: 95°C - 7 минут 1 цикл; 95°C - 10 сек; 66°C - 10 сек; 57°C - 30 сек; 42 цикла. Считывание результатов при 57°C. Референс-последовательности *N. meningitidis* (NCBI GenBank)² использовались для проверки праймеров и оптимизации ПЦР.

Таблица 2 - Праймеры и зонды для детекции *N. meningitidis* и определения серогруппы [52]

Название	Последовательность	Краситель/гаситель	Расположение гасителя	Ссылка
<i>porA_f</i>	GCCGGCGTTGATTATGATTT			[52]
<i>porA_r</i>	AGTTGCCGATGCCGGTATT			
<i>porA</i>	CTCCGCCATCGTGTC	FAM/BHQ1	терминальное 3'	

² www.ncbi.nlm.nih.gov

Продолжение таблицы 2

<i>sodC_f</i>	GCACACTTAGGTGATTTACCTGCAT			
<i>sodC_r</i>	CCACCCGTGTGGATCATAATAGA			[53]
<i>sodC</i>	CATGATGGCACAGCAA	TAMRA/ BHQ2	терминальное 3'	[53]
<i>cnl_f</i>	GAATTGCATAGGTTATCCAAAATCAC			[52]
<i>cnl_f2</i>	GAGTTGCACAGATTATCCAGAATCAC			
<i>cnl_r</i>	TTGCCCCGATACAATCTGAAAG			
<i>cnl</i>	ATAAAACCGGTGCCGCC	VIC/ BHQ1	терминальное 3'	
NMser_A_f	AAAATTCAATGGGTATATCACGAAGA			[117]
NMser_A_r	ATATGGTGCAAGCTGGTTTCAATAG			
NMser_A	CTAAAAG"T"AGGAAGGGCACTTTGTGG CATAAT	HEX/BHQ1	"T"	
NMser_W_f	TATTTATGGAAGGCATGGTGTATG			[188]
NMser_W_r	TTGCCATTCCAGAAATATCACC			
NMser_W	AAATATGGAGCGAA"T"GATTACAGTAA CTATAATGAA	FAM/BHQ1	"T"	
NMser_X_f	TGTCCCAACCGTTTATTGG			[117]
NMser_X_r	TGCTGCTATCATAGCCGCC			
NMser_X	TGTTTGCCACA"T"GAATGGCGG	CY5/BHQ2	"T"	
NMser_B_f	GCTACCCCATTTTCAGATGATTTGT			[188]
NMser_B_r	ACCAGCCGAGGGTTTATTCTAC			
NMser_B	AAGAGATGGGYAACAACT"T"ATGTAATG TCTTTATT	CY5/BHQ2	"T"	
NMser_C_f	CCCTGAGTATGCGAAAAAATT			[117]
NMser_C_r	TGCTAATCCCGCCTGAATG			
NMser_C	TTTCAATGC"T"AATGAATACCACCGTTT TTTTGC	FAM/BHQ1	"T"	
NMser_Y_f	TCCGAGCAGGAAATTTATGAGAATAC			[188]
NMser_Y_r	TTGCTAAAATCATTCGCTCCATAT			
NMser_Y	TATGGT G"T"ACGATATCCCTATCCTTGCCTATAA T	HEX/BHQ1	"T"	
NMser_E_f	GAGGCTGGCAATGACCAATT			[52]
NMser_E_r	CCCAGCATATCGACAACCAA			
NMser_E	ATCTTATGTGAACGTGGCGC	FAM/BHQ1	терминальное 3'	
NMser_Z_f	CAGGCCGAAGAGCGTTATCA			[52]
NMser_Z_r	CGCCATTCAGGGCGATT			
NMser_Z	ACAGCTCTGGCCTTAG	TAMRA/BHQ2	терминальное 3'	
NMser_H_f	AAGCCCGTTCCAAGATCATG			[52]
NMser_H_r	GCGGTTTGGAGAAATAATATGTGTT			
NMser_H	AATGTCAGCCGTAACCTT	VIC/ BHQ1	терминальное 3'	

Полногеномное секвенирование

Выделение геномной ДНК

Геномную ДНК 41 культуры 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 проводили 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 MiSeq® Reagent Kit v3(600 cycle).

Выделение геномной ДНК проводили в следующем порядке. Чистую культуру пересеивали на агар Мюллера-Хинтона (БиоРад, США). Выросшие через 24 часа культивирования изолированные колонии инокулировали в пробирки типа эппендорф (объем - 1,5 мл, Ахуген, США) в стерильный фосфатно-солевой буфер и доводили оптическую плотность инокулированной взвеси до 3 ед. по Мак-Фарланду. Затем клетки трижды отмывали в стерильном фосфатно-солевом буфере, осадок растворяли в 200 мкл стерильного фосфатно - солевого буфера.

Подготовка библиотек ДНК

В соответствии со стандартными протоколами Rapid Library готовили библиотеки случайных фрагментов ДНК (ShotGun) с использованием набора реагентов для приготовления библиотек Nextera DNA Flex Library Prep (24 Samples), Nextera™ DNA CD Indexes (96 Indexes, 96 Samples), Набор AMPure XP для очистки продуктов ПЦР 60 мл, Набор для высокочувствительного анализа ДНК (High Sensitivity DNA Kit), арт. 5067-4626, Agilent Technologies, PhiX Control v3.

Сборка генома

Полученные в ходе полногеномного секвенирования риды (прочтения)

нуклеотидных последовательностей собирали в контиги de Novo. Полученные контиги были проаннотированы PROKKA [157]. После этого, был проведен филогенетический анализ геномов изолятов *N. meningitidis* (n=41) НИИДИ - ДНКЦИБ и предкового штамма хадж клона - M1724 [159] с использованием kSNP3 [67] и выделены группы наиболее схожих изолятов. Внутри этих групп был проведен поиск полиморфизмов с целью выявления факторов, ассоциированных с антибиотикорезистентностью. Поиск осуществляли 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) [102] и SAMtools [103], и BEDtools [139] с целью визуальной и статистической оценки покрытия сборки. После этого проводился поиск полиморфизмов с помощью программы freebayes [68] и их фильтрация по качеству с помощью программы SnpEff [47]. Полученные данные валидировались вручную посредством визуализации полиморфизмов в IGV браузере [117].

Помимо данных НИИДИ-ДНКЦИБ, в работе использовались полногеномные сборки *N. meningitidis* из публичной базы данных PubMLST [138].

Контроль качества прочтений и коррекция

Сборка геномов *N. meningitidis* осуществляли пайплайном Unicycler [190], после этого производили обратное выравнивание ридов на геном с помощью программы SAMtools [103] и BEDtools [139] с целью визуальной и статистической оценки покрытия сборки. Для анализа качества коротких прочтений были использованы программы FastQC 0.11.5³, MultiQC 1.7 [59]. Проверка на наличие контаминации с помощью сравнения GC% контента с известными значениями, а также при помощи программы MetaPhlan2 [112]. По результатам, полученным в ходе анализа качества, прочтения Illumina обрабатывали с помощью биоинформатической программы

³ ¹URL: <http://www.github.com/chgibb/FastQC0.11.5>

TrimGalore 0.6.0⁴ для удаления адаптеров и коротких прочтений. Оценка среднего покрытия генома и размер к-меров осуществлялся с помощью программы QUAST [71]. Дополнительно, изоляты *N. meningitidis* тестировали на целостность генов капсулы с помощью программы Meningotype [101] и рибосомальных генов.

Анализ вариантов генов

Анализ вариантов генов пангенома *N. meningitidis* проводили с помощью программного модуля GenomeComparator, реализованной в PubMLST. Аннотация геномов проводили с помощью программы PROKKA [157].

Для определения принадлежности изолятов *N. meningitidis* к глобальным линиям штаммов, геномы *N. meningitidis* серогруппы W НИИДИ-ДНКЦИБ и базы PubMLST [138] были типированы по генам *norB*, *fHbp* и *aniA*. Сравнительный анализ этих генов проводили также в сервисе GenomeComparator базы данных PubMLST. Для построения филогенетического дерева использовали программу IQ-TREE [127] по генам корового генома серогруппы W изолятов НИИДИ-ДНКЦИБ и изолятов PubMLST [138]. Полученное филогенетическое дерево визуализировали с помощью программы FigTree 1.4.4⁵.

Статистическая обработка результатов исследования и программное обеспечение

Все полученные в ходе исследования результаты были проанализированы с помощью следующего программного обеспечения: Microsoft «Excel» (Office 2019) (составление базы данных). Статистическую обработку проводили в среде 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,

⁴ URL: http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore

⁵ URL: <http://github.com/rambaut/figtree/releases>

использовали непараметрический критерий Манна-Уитни.

Результаты представлены в описательной форме, в форме таблиц, графиков и рисунков.

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. научно-исследовательского отдела медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России, к.б.н. Гостевым В.В., врачом КЛД клинико-диагностической лаборатории ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА Калисниковой Е.Л. Посев, выделение чистой культуры, идентификация, определение серогрупп изолятов *N. meningitidis* с помощью типоспецифических сывороток выполнены совместно с врачом-бактериологом, с.н.с. научно-исследовательского отдела ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии, к.м.н. Железовой Л.И. Биоинформатическая обработка результатов, полученных в ходе полногеномного секвенирования выполнена совместно с лаборантом-исследователем научно-исследовательского отдела ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии Лихолетовой Д.В. Статистическую обработку результатов осуществляли совместно со старшим научным сотрудником научно-исследовательского отдела по организации и управлению научно-исследовательскими работами, профессором, доктором медицинских наук Григорьевым С.Г.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. Для эффективной профилактики менингококковой инфекции в Санкт-Петербурге необходимо применение как квадριвалентной (ACWY) полисахаридной

конъюгированной менингококковой вакцины, так и вакцины против серогруппы В, однако антигенная структура современных субкапсулярных вакцин (4СМенВ 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 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.).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Актуальность менингококковой инфекции

Несмотря на значительные успехи современной медицины в области диагностики и лечения инфекционных заболеваний, существует ряд болезней, исходы которых во многом определяются своевременностью и адекватностью оказания медицинской помощи на догоспитальном этапе. К таким заболеваниям относится менингококковая инфекция.

Менингококковая инфекция (A39.0 – A39.9 по МКБ-10) — антропонозное заболевание, передающееся воздушно-капельным путем и протекающее в виде бактерионосительства, назофарингита, менингококцемии и гнойного менингита, реже с поражением других органов и систем [1]. Проявления менингококковой инфекции в виде менингита, менингококцемии и сепсиса относят к так называемым инвазивным менингококковым заболеваниям [150] или генерализованным формам менингококковой инфекции [37]. Они встречаются гораздо чаще, чем редкие формы гематогенно-генерализованной менингококковой инфекции в виде эндокардита, артрита (полиартрита, синовита), иридоциклита, пневмонии.

Ежегодно на планете регистрируют около 1 200 000 случаев этих заболеваний, из которых до 135 000 заканчиваются летальным исходом [Jafri R. et. al., 2013]. 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], в отличие от спорадического характера заболеваемости среди всего населения (0,75 случаев на 100 000 в 2019 году [13]. В структуре менингококковой инфекции в Российской Федерации в 2017–2019 годах на генерализованные формы менингококковой инфекции приходится 73,9–81,7% [13]. Несмотря на спорадический характер, генерализованная форма менингококковой инфекции у заболевших в нашей стране непредсказуема по течению и

характеризуется высоким риском летальных исходов (8-15%), частота которых при септическом шоке достигает 40-80 % [17].

1.2. Общая характеристика и происхождение *N. meningitidis*

Возбудителем менингококковой инфекции является бактерия *N. meningitidis*, впервые выделенная А. Weichselbaum в 1887 г. из цереброспинальной жидкости. Микроорганизм относится к филе *Proteobacteria*; классу *Betaproteobacteria*; порядку *Neisseriales*; семейству *Neisseriaceae* роду *Neisseria*. Это грамотрицательный диплококк, величиной 0,6–1,0 мкм, неподвижный, имеющий округлую форму, часто напоминающий бобовидные или кофейные зерна. Соприкасающиеся края из парных кокков вогнутые или почти ровные, наружные – выпуклые. Менингококки не имеют жгутиков. Они не способны к спорообразованию. При электронной микроскопии на поверхности менингококка обнаружены ворсинки, которые у различных штаммов различны по длине и морфологическому строению.

Теоретически и практически важным свойством менингококков является способность к синтезу полисахаридной капсулы. В первых работах, посвященных серологическому разнообразию менингококков, выделяли 4 варианта, в последующие годы количество известных серогрупп увеличивалось и к настоящему времени их описано 12: А, В, С, Е, Н, I, К, L, W, X, Y и Z, серогруппу D, являющуюся вариантом серогруппы С, иногда рассматривают как 13-ю серогруппу [76]. Инвазивные менингококковые инфекции вызывают бактерии, относящиеся к серогруппам А, В, С, W, X и Y.

Геном *N. meningitidis* состоит из кольцевидной хромосомы размером $2,193 \pm 0,056$ Мб со средним содержанием G + C оснований $51,63 \pm 0,25$ % [156] и у различных штаммов содержит около 2000 генов [110].

Одной из наиболее поразительных характеристик геномов изолятов *N. meningitidis* является обилие и разнообразие повторяющихся последовательностей ДНК, что способствует высокой пластичности генома и выраженной фенотипической изменчивости менингококков. По данным группы исследователей (Achaz G. и др.,

2002) при сравнительном исследовании хромосомной ДНК у 53 штаммов *N. meningitidis* было установлено, что около 20% хромосомы состоит из повторяющихся последовательностей, относящихся к различным классам повторов [19, 144].

Происхождение менингококков остается интересной и не до конца решенной проблемой. Исторически дифференцировка менингококковой инфекции от других лихорадочных заболеваний, сопровождающихся сыпью, головной болью и потерей сознания, по описаниям в ранней литературе затруднена. Первые описания заболеваний с клинической картиной, идентичной современным представлениям о менингококковой инфекции, были опубликованы в Швейцарии (вспышка, 33 погибших) 1805 г. и в США в 1806 г. [80]. Филогенетический анализ свидетельствует, что скорее всего, *N. meningitidis* имеет общего предшественника с двумя другими нейссериями: *N. lactamica* и *N. gonorrhoeae*. Маркером, отличающим *N. meningitidis* от родственных нейссерий, является инсерционная последовательность IS 1655, приобретение которой является недавним событием в видообразовании [155]. Первоначально менингококк, вероятно, представлял из себя не инкапсулированный комменсал, который в последующем в результате горизонтального переноса получил от бактерии семейства *Pasteurellaceae* комплекс генов, ответственных за синтез полисахаридной капсулы, существует предположение, что последнее событие произошло в конце XVIII - в начале XIX века [155]. Капсулообразование, скорее всего, обеспечивает менингококкам не столько повышенную вирулентность, сколько преимущества при передаче от человека к человеку. Часто выявляющиеся у бессимптомных носителей бескапсульные штаммы менингококков, имеющие в составе своего генома так называемый нулевой локус (*cnl*), возможно, являются современными потомками древних бескапсульных штаммов *N. meningitidis* [187]. Результаты более поздних исследований говорят в пользу сложной эволюции, включающей этапы потери и приобретения соответствующих генов, рекомбинационные события с родственными нейссериями и свидетельствуют о

важной роли геномных островков в адаптации к существованию в назофарингеальной области [48, 120].

1.3. Диагностика менингококковых инфекций

Менингококк является аэробом. Оптимальная температура для его размножения 36 – 37⁰С при слабощелочной реакции среды (рН = 7,2–7.4). Будучи выделен из носоглотки человека, он быстро погибает во внешней среде. Этому способствует пониженная температура, недостаточная влажность воздуха, инсоляция. С низкой жизнеспособностью микроорганизма в окружающей среде связаны проблемы с транспортировкой биологических образцов для посева. Оптимальными подходами рассматриваются посев образца «у постели больного» или транспортировка в лабораторию при 37⁰С. Разрабатываются новые среды для хранения и транспортировки менингококков при комнатной температуре [86].

Классические бактериальные методы для культивирования изолятов *N. meningitidis* применяются для исследования цереброспинальной жидкости (ЦСЖ), крови, назофарингеальных мазков. В мировой практике используются различные питательные среды. Так, по данным некоторых исследователей для посева образцов, взятых у носителей, использовали сывороточный агар Neisseria Selective Medium PLUS (NS-агар, Oxoid, Badhoevedorp, Нидерланды), затем в течение 20 минут засеянные чашки Петри помещали в инкубатор 37⁰С, 5% CO₂ до 2-х дней с ежедневным просмотром на наличие менингококкподобных колоний (серые, круглые и гладкие колонии с выпуклой формой). При подозрении 1-3 колонии были повторно пересеяны на агар Columbia Blood (CBA, bioTRADING Benelux B.V., Mijdrecht, Нидерланды) и через 24 часа идентифицировали с использованием технологии MALDI-ToF (Bruker Daltonik GmbH, Бремен, Германия). В одном из исследований жизнеспособные изоляты *N. meningitidis* удалось выделить при повторном посеве образцов, которые при первичном посеве были отрицательными по культуре, но положительны по ПЦР [114].

Для идентификации микроорганизмов используют тесты расщепления

углеводов (глюкоза, мальтоза, лактоза и сахароза). Грамотрицательные, оксидазоположительные, ферментирующие глюкозу, мальтозу, но не лактозу и сахарозу, диплококки относят к виду *N. meningitidis*. Для посева цереброспинальной жидкости 0,5 мл засевают в чашку Петри с "шоколадным" агаром непосредственно у постели больного. Далее чашку хранят в условиях термостата при 37°C до доставки в лабораторию. Применение данной методики позволяет получить культуру возбудителя бактериального менингита на 18-24 часа раньше, чем по стандартной схеме посева материала в лаборатории и, тем самым, ускорить проведение исследования и выдачу ответа. Назофарингеальную слизь с задней стенки глотки засевают на чашки (сывороточный агар и сывороточный агар с линкомицином). Посевы инкубируют в атмосфере, содержащей 5-10% CO₂ в течение 24-48 ч. При наличии роста на плотных питательных средах проводят визуальную оценку выросших колоний, готовят мазок по Граму, определяют оксидазу, каталазу и в зависимости от полученного результата проводят дальнейшую идентификацию возбудителя. Простым методом является латекс-агглютинация, которая позволяет сделать заключение об отсутствии или наличии в ЦСЖ специфических антигенов (Лабораторная диагностика менингококковой инфекции и гнойных бактериальных менингитов. Методические указания. МУК 4.2.1887 – 04). Вместе с тем, данный метод зачастую является ложноположительным или ложноотрицательным, так же как в случае определения серогруппы у менингококков в реакции агглютинации на стекле с набором типоспецифических сывороток (серогруппы А, В, С, X, У, W, E).

Рутинное микробиологическое тестирование зачастую недостаточно для выявления всех возбудителей нейроинфекций. Представляется перспективным метагеномное исследование ликвора с помощью NGS (Next Generation Sequencing), полученный от пациентов с менингитом или энцефалитом, улучшающее диагностику нейроинфекций [194].

Высокая чувствительность и специфичность молекулярных методов для обнаружения ДНК *N. meningitidis* была показана в ряде исследований. Так, проводили

исследование с помощью количественной ПЦР (qPCR) с использованием праймеров и зондов (Eurogentec, Seraing, Бельгия), нацеленных на последовательности в пределах *metA* гена, кодирующего периплазматический белок, и гена переноса капсулы *ctrA*. Мишенями амплификации qPCR были супероксиддисмутаза *sodC* и капсульные локусы/геногрупп-специфические гены (B, C, W, X и Y) и, только для культивируемых изолятов, *porA* [108]. ПЦР в реальном времени, основанная на детекции гена переноса капсулы (*ctrA*), оказывает существенную помощь в диагностике генерализованной формы менингококковой инфекции, но не выявляет высокую долю (60%) негруппируемых изолятов, связанных с носоглоточным носительством. В последние годы предлагаются более совершенные варианты как классической ПЦР, так и ПЦР в реальном времени [52], а также варианты изотермической ПЦР [163]. В различных странах и условиях подтверждается эффективность одновременной детекции основных возбудителей менингита [160].

1.4. Типирование *N. meningitidis*

Данные о структуре глобальной популяции *N. meningitidis*, и популяций, циркулирующих в отдельных географических регионах, составляют основу для эпидемиологического надзора за распространением менингококковых инфекций, а также для выработки стратегии вакцинопрофилактики. Для расшифровки структуры бактериальных популяций используют методы типирования, направленные на выявление различий между изолятами бактерий, выделенными в различное время и из различных источников, при этом идеальный метод должен позволять дифференцировать два любых штамма. Известные методы типирования можно разделить на фенотипические и молекулярные [80].

1.4.1. Фенотипические методы

Исторически первым методом типирования менингококков было серологическое типирование, основанное на выявлении различий в структуре полисахаридной капсулы бактерий.

В течение многих лет основным методом серотипирования менингококков в

клинике была реакция латекс-агглютинации с использованием кроличьих поликлональных или мышинных моноклональных антител, для анализа большого количества образцов крови применяли иммуноферментный анализ. Чувствительность и специфичность метода полностью зависела от качества антител, в целом эти методы достаточно хорошо типировали микроорганизмы, выделенные в чистой культуре, качество типирования бактерий непосредственно из клинического материала было неудовлетворительным [80]. Для определения серогрупповой принадлежности культур *N. meningitidis* в реакции агглютинации на стекле в Российской Федерации используются типоспецифические сыворотки МЕНГРУВИД® производства СПбНИИВС (ФГУП «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов» ФМБА России).

Еще в 70-х годах XX века, когда было установлено, что изоляты, относящиеся к одной серогруппе, не являются иммунологически однородными, появилась возможность субсеротипирования по антигенам белков наружной и мембраны липополисахарида.

К наиболее распространенным белкам наружной мембраны относятся белки двух пориновых каналов: PorA и PorB. Как и другие порины грамотрицательных бактерий, они состоят из трех субъединиц (каналов), через которые осуществляется транспорт различных веществ внутрь клетки. Молекулярная масса белка PorA варьируется в диапазоне 44–47 кДа. PorB присутствует в одной из двух форм: PorB2 массой 40–42 кДа или PorB3 массой 37–39 кДа. Подавляющее большинство штаммов менингококков продуцируют как PorA, так и PorB. Пориновые белки высоко иммуногенны из-за чего в ранних попытках получения антисыворотки для серологической дифференциации менингококков преобладали антитела к PorA и PorB. Анализ показал, что белок PorB отвечает за специфичность серотипа, а PorA - за специфичность субсеротипа [89].

Липополисахарид (ЛПС) *N. meningitidis* (его более точное название

липоолигосахарид - ЛОС) содержит внутреннее и внешнее олигосахаридное ядро. Внутреннее ядро ЛОС менингококков состоит из дигептозы (НерI и НерII), присоединенной к липиду А через одну из двух молекул 2-кето-3-дезоксид-маннозо-2-октулозоновой кислоты. Внешнее ядро является гетерогенным, состоит из переменного количества сахаров, прикрепленных к НерI при помощи гликозилтрансфераз, кодируемых генами *lgt* [89].

Антигенная вариабельность ЛОС в значительной степени связана с фазовой вариацией генов, которые кодируют ферменты, участвующие в удлинении сахаридных цепей, связанных с НерI. Изменения в составе цепи резко изменяют антигенные свойства ЛОС и составляют основу его классификации на разные иммунотипы. Фазовая вариация одного или нескольких генов биосинтеза ЛОС позволяет отдельным менингококкам одновременно демонстрировать репертуар различных структур ЛОС. Структура ЛОС определяет иммунотип менингококка.

Важным шагом в понимании клональной структуры менингококков стала разработка и внедрение метода **мультилокусного электрофореза ферментов** (multilocus enzyme electrophoresis - MLEE), направленного на изучение различных аллелей ферментов «домашнего хозяйства». К ферментам «домашнего хозяйства» относят группу ферментов, участвующих в ключевых метаболических путях бактерий. Гены указанных ферментов также обозначаются как гены «домашнего хозяйства». MLEE – основан на анализе относительной электрофоретической подвижности различных аллелей ферментов (изоферментов) «домашнего хозяйства», отличающихся по аминокислотному составу. Следовательно, различия в подвижности изоферментов определяются различиями нуклеотидных последовательностей соответствующих генов. Эти варианты подвижности называют электроморфами. Уникальный профиль электроморфов, образующихся для каждого штамма организма, называется электроморфным типом (ЕТ).

Широкое применение MLEE позволило выявить, что среди сотен ЕТ-типов, только некоторые служат причиной большинства случаев менингококковой инфекции

во всем мире. Оказалось, что выявленные на основании MLEE анализа эпидемические линии часто имели общие фенотипические признаки, например, изоляты подгрупп I, III и V относились исключительно к серогруппе А, а различные представители линий ET-5, ET-37 были идентифицированы как изоляты *N. meningitidis* серогруппы В. На основе данных MLEE установлено, что эпидемии и гиперэндемические волны менингококковой инфекции, как правило, связаны с распространением одного вирулентного клона в восприимчивой популяции.

1.4.2. Генотипические методы

Капсульное типирование

Принципиальный перелом в типировании менингококков произошел после получения данных о нуклеотидной последовательности генов белков внешней мембраны и *cps*-локусов (capsular polysachcride synthesis), ответственных за синтез всех полисахаридов, что позволило унифицировать номенклатуру генов [76] и разработать методы типирования, основанные на традиционной ПЦР с электрофоретической детекцией продуктов, на ПЦР в реальном времени [52], а также на секвенировании генов-мишеней.

В его пределах *cps* локуса выделяют три региона. Регион А кодирует ферменты для биосинтеза и полимеризации полисахарида, регионы В и С несут гены, отвечающие за ее транслокацию из цитоплазмы на поверхность клетки. Капсульные полисахариды серогрупп В, С, W и Y содержат сиаловую кислоту (5-N-ацетилнейраминую кислоту, NANA), *cps* регион А этих серогрупп несет группу консервативных генов *siaA*, *siaB* и *siaC*. Они ответственны за синтез сиаловой кислоты в форме CMP-NANA (5'-cytidinemo-nophospho-N-acetylneuraminic acid), необходимой для включения в капсульный полисахарид. Четвертый ген в этой области, *siaD*, кодирует серогрупп-специфичную полисиалилтрансферазу, участвующую в полимеризации капсулы. В серогруппе А локус содержит четыре гена биосинтеза маннозамина, обозначенные *mupA-D* [76, 167]. Включение сиаловых кислот в капсулу и ЛПС позволяет бактериям стать менее заметными для действия факторов иммунной

системы, так как сиаловые кислоты также часто присутствует на поверхности клеток хозяина. Однако наиболее поразительная мимикрия наблюдается в капсуле серогруппы В, поскольку α (2→8)-связанный гомополимер сиаловой кислоты структурно идентичен компоненту NCAM человека (neural cell-adhesion molecule), что имеет решающее значение для функциональной пластичности центральной и периферической нервной системы. Такая идентичность ответственна за чрезвычайно слабый иммунный ответ, генерируемый против полисахаридов серогруппы В.

Преимущества молекулярных методов в сравнении с серологическими определяются существенно большей стандартизацией, отсутствием зависимости от качества сывороток, возможностью объективизировать результаты и значительным сокращением количества нетипируемых изолятов.

Из современной схемы генотипирования менингококков исключены некоторые мишени, присутствовавшие в исторической фенотипической схеме. Несмотря на то, что ЛОС играет крайне важную роль в патогенезе менингококковой инфекции, из-за сложностей в адаптации к его типированию молекулярными методами, этот вид исследований был исключен из рекомендаций от 2007 года [92]. Из этой схемы типирования по сходным причинам был также исключен белок PorB.

В то же время в схему типирования был включен белок FetA, кодирующий его ген *fetA* экспрессируется только при дефиците в окружающей среде железа. Такие условия создаются при менингококковой инфекции в организме человека. Важность белка в патогенезе менингококковой инфекции подтверждается обнаружением антител к белку FetA, что позволяет рассматривать его как потенциальную мишень при разработке вакцин.

Мультилокусное сиквенс-типирование

В современную схему типирования включен разработанный в 1998 году Maiden et al. метод, основанный на анализе локусов генома, не связанных с поверхностными структурами менингококков, - мультилокусное сиквенс-типирование (MultiLocus-Sequence Typing – MLST) [106]. Метод MLST, по существу, представляет развитие

принципа метода MLEE. Метод заключается в секвенировании генов «домашнего хозяйства» (обычно 6–7 генов), имеющих достаточное число аллелей (более 10), характеризующихся медленным накоплением мутаций и селективно нейтральных. В результате каждый штамм характеризуется специфическим «аллельным профилем» или «сиквенс-типом» (ST - sequence type) по выбранным локусам. Выполнение полной схемы мультилокусного сиквенс-типирования, включающей данные секвенирования семи локусов, приводит к появлению сиквенс-типа, в обозначении которого используется семь целых чисел, по одному числу для каждого локуса MLST. В каждом локусе имеется достаточное количество вариаций нуклеотидных последовательностей, обеспечивающих присутствие множества аллелей и очень большого количества аллельных профилей [24,106].

Клональным комплексом на основе базы данных профилей мультилокусного сиквенс-типирования рода *Neisseria* принято считать группу сиквенс-типов, которые имеют по меньшей мере четыре из семи локусов, общих с центральным сиквенс-типом. Центральным сиквенс-типом является предполагаемый «наследственный генотип», от которого произошли другие генотипы комплекса и в честь которого назван комплекс, например, «клональный комплекс ST-11» [181]. Только в случае комплекса ST-41/44 возникла необходимость в определении двух центральных сиквенс-типов из-за его размера и разнообразия. Клональные комплексы и их центральные сиквенс-типы были идентифицированы с помощью комбинации методов кластеризации [62, 84] и эпидемиологических данных о распределении сиквенс-типов в пространстве и времени, центральные сиквенс-типы, как правило, распространены и постоянны. Статус конкретного клонального комплекса подтверждается после соответствующего анализа данных международной группой управления.

Сравнение полученных данных между собой, выяснение эволюционных связей между штаммами, их генетического расстояния производится с использованием специализированного программного обеспечения. Подход подразумевает обязательное создание общедоступной on-line базы данных для исследуемого

микроорганизма, содержащей последовательности распространенных аллелей и информацию о соответствующих аллельных профилях для различных штаммов. В настоящее время MLST является основным инструментом изучения молекулярной эпидемиологии всех бактерий, однако необходимо еще раз подчеркнуть, что впервые он был разработан именно для менингококков. Данные метода мультилокусного сиквенс-типирования доступны через Интернет (<http://pubmlst.org/neisseria/>) [44, 93].

Таким образом, современная схема молекулярного типирования менингококков основана на вариабельности локуса *cps* (определяющего принадлежность менингококков к определенной серогруппе); гена белка наружной мембраны PorA (идентифицирующего сероподтип (субтип), гена белка FetA, а также сиквенс-типа. Тип менингококка обозначается следующей формулой (в качестве примера) – В (серогруппа): P1.19,15 (аллель гена *porA*): F5-1 (аллель гена *fetA*): ST-33 (сиквенс-тип).

Полногеномное типирование

Очередной этап совершенствования методов типирования менингококков связан с разработкой и внедрением в практику методов полногеномного секвенирования (WGS-whole genome sequencing) [79, 142]. Типирование менингококков с помощью WGS обеспечивает максимальную разрешающую способность [78], что, в свою очередь, позволяет детально анализировать структуру популяций менингококков, выявлять детерминанты резистентности и вирулентности, а также эволюционные связи. Реализация методов с использованием полногеномного секвенирования вносит свой значительный вклад в усиление эпидемиологического надзора и имеет важное значение при разработке стратегий вакцинации [41]. Последние достижения в области высокопроизводительных платформ, которые оценивают транскриптом, протеом и эпигеном, также используются для изучения биологии микроорганизмов рода *Neisseria*.

В отличие от обычных методов секвенирования, технологии секвенирования следующего поколения (NGS-next generation sequencing) способны производить от тысячи до многих миллионов реакций секвенирования и обеспечивают недорогую,

высокопроизводительную альтернативу традиционным подходам секвенирования MLST, при этом NGS генерирует данные о последовательности всего генома (WGS) [41]. В настоящее время доступны технологии NGS, такие как, портативный секвенатор нанопор MINION (Oxford Nanopore Technologies), который позволяет исследователям лучше изучить изменчивость последовательности многочисленных повторяющихся элементов в геноме менингококков [41], и более часто используемая платформа секвенирования Illumina [39, 115]. С помощью платформы Illumina MiSeq длина прочтения составляет до 300 нуклеотидов, длинные прочтения, до 20 000 нуклеотидов, могут быть получены с использованием платформы секвенирования Pacific Biosciences (Pacbio) PacBio RS II, преимуществом которой является перспектива восстановления содержания генома бактерии в одном непрерывном участке последовательности ДНК [183].

Процесс реконструкции генома микроорганизма и извлечения данных зависит от используемого биоинформатического подхода, который может состоять из сравнения однонуклеотидных полиморфизмов (SNP - Single nucleotide polymorphisms) по всему геному из данных краткого считывания, сопоставленных с эталонной последовательностью генома, или может альтернативно включать использование собранных данных последовательности *de novo* [39]. После сборки *de novo* нуклеотидных последовательностей (контигов) с использованием биоинформатических программ, например, таких как VELVET или SPADES [25], данные полногеномного секвенирования становятся простыми в хранении и с дополнительным удобством, заключающемся в том, что на эти данные можно многократно ссылаться и проводить повторный анализ, создавая тем самым воспроизводимые и легкодоступные данные [78]. Обе программы фрагментируют последовательность считывания на *k-меры* фиксированного размера, строя алгоритм, который впоследствии оптимизируется, что в итоге приводит к построению смежных консенсусных последовательностей (контигов). Программа VELVET была специально разработана для чтения коротких последовательностей, полученных на

платформе Illumina. Другая программа SPADES генерирует финальную сборку из нескольких *k-меров*, которые автоматически выбираются программой SPADES с использованием максимальной длины чтения входных данных, и каждый отдельный *k-мер* вносит свой вклад в окончательную сборку.

Данные полногеномного секвенирования, рода *Neisseria* представлены в pubMLST.org/neisseria [31]. В 2012 году была внедрена платформа базы данных последовательностей генома бактериального изолята (BIGSdb – Bacterial Isolate Genome Sequence Database), которая была разработана для хранения и использования данных NGS. Данная платформа состоит из двух типов баз данных: 1) базы данных определения последовательностей, которая содержит последовательности известных аллелей для локусов, а также аллельные профили для конкретных схем, таких как MLST, и 2) базы данных изолятов, содержащая происхождение изолята и другие метаданные наряду с нуклеотидными последовательностями, связанными с этим изолятом. PubMLST особенно необходим для аннотирования, сравнения и анализа данных полногеномного секвенирования. При этом имеются дополнительные инструменты, облегчающие анализ больших объёмов данных [78].

При анализе генома в PubMLST применяются различные инструменты, такие как инструмент компаратора генома для сравнения изолятов с использованием любых наборов локусов или с полным аннотированным геномом, это было продемонстрировано при вспышке менингококковой инфекции в Саутгемптоне [94]. Одним из инструментов, с помощью которого можно оперативно анализировать большие объёмы данных и визуализировать кластеры родственных изолятов, является GrapeTree, хотя вывод об эволюционных отношениях в популяции микроорганизмов не может быть сделан с точной уверенностью [203]. Использование других инструментов для обнаружения генов, Prokka и RAST, позволяет, например, определить весь набор генов, обнаруженных во всех изолятах любого вида, известный как пан-геном [78].

1.5. Эпидемиология менингококковых инфекций

Распространенные формы инвазивной менингококковой инфекции протекают в виде спорадических случаев, вспышек заболевания, эпидемий и пандемий. Уровень заболеваемости этими формами менингококковой инфекции варьирует в зависимости от времени, географии, а также от возраста. В заболеваемости также наблюдается цикличность, с подъемами через 15–20 лет. Общая заболеваемость варьирует от менее 0,5 случая /100 000 населения до 1000 случаев /100 000 населения во время эпидемий в странах Африки к югу от Сахары (так называемый «пояс менингита») [72]. Самая высокая заболеваемость наблюдается у детей в возрасте до 5 лет (особенно у младенцев), подростков и молодых людей [149, 165].

На протяжении десятилетий от 50% до 80% случаев инвазивных менингококковых заболеваний (менингита, менингококцемии и сепсиса) заканчивались летальным исходом [64, 65]. В настоящее время, несмотря на внедрение в практику эффективных антибиотиков, частота смертельных исходов инвазивной менингококковой инфекции составляет 10-15% [57] и может возрастать до 40% при развитии менингококцемии во время вспышек менингококкового менингита [152]. К 2015 году в мире ежегодно регистрировалось приблизительно 1,2 миллиона случаев инвазивной менингококковой инфекции, из которых около 135 000 заканчивались смертью пациента [88]. При этом 10-20 % выживших имели тяжелые осложнения в виде неврологических, зрительных или слуховых нарушений, ампутаций конечностей [56]. К 2016 году менингококковая инфекция являлась основной причиной смертности от менингита во всех возрастных группах [50]. При этом по данным Всемирной организации здравоохранения, точная оценка заболеваемости и смертности от инвазивной менингококковой инфекции затруднена, что обусловлено неадекватным эпидемиологическим надзором в странах со слабо развитой экономикой [37].

Практически важнейшим аспектом эпидемиологии менингококковых инфекций является динамика географического и временного распространения отдельных

генетических линий и связь этих процессов с вакцинацией. Представления о популяционной структуре менингококков эволюционировали параллельно с эволюцией методов типирования этих бактерий.

В первой половине XX века большинство инвазивных менингококковых инфекций, вероятно вызывали серогруппы А, В и С, однако многие детали сероэпидемиологии менингококков в этот период остаются неясными в связи с ограниченными возможностями типирования бактерий.

В начале XXI века в Западной Европе и Австралии доминировали серогруппы В и С; в России – А и С; в Северной и Южной Америках В, С и Y, в «менингитном поясе» Африки – А, С, W и X [74].

В мета-анализ от 2019 года включены результаты 173 исследований из 59 стран, опубликованных в период с 1 января 2010 г. по 16 октября 2017 г. [132]. Распределение серогрупп менингококков заметно различается между странами и регионами. Менингококковые серогруппы С и W составляли значительную долю менингококковых заболеваний в большинстве стран Африки и Латинской Америки. Серогруппа В была преобладающей причиной менингококковой инфекции во многих регионах Европы, Америки и Западной части Тихого океана. Серогруппа Y также вызвала множество случаев менингококковой инфекции в этих регионах, особенно в странах Северной Европы [132].

Серогруппа А (MenA) *N. meningitidis* вызывала крупные пандемические вспышки во всем мире на протяжении большей части XX века, которые сохранялись, особенно в «поясе менингита» в Африке к югу от Сахары, до появления конъюгированной вакцины против серогруппы А, MenAfriVac, в 2010 году.

Менингококки серогрупп В и С (MenB и MenC) вызывают кластеры или локальные вспышки (MenC), или локализованные более длительные вспышки и гиперэндемические заболевания (MenB) во всем мире, которые являются причиной большинства спорадических менингококковых заболеваний в развитых странах.

«Минорные» серогруппы X, Y и Z были впервые идентифицированы Slaterus в

1961 году, а серогруппы E (29E) и W (W135) были идентифицированы в 1968 году. MenY и MenW возникли как группы, вызывающие эпидемические вспышки и глобальные заболевания с 1995 года, теперь также вызывают вспышки и эндемические заболевания в некоторых частях субрегиона – в Сахаре. К настоящему времени «минорные» серогруппы приобретают значение в отдельных географических регионах [180].

Менингококковая серогруппа E (MenE) экспрессирует капсулу, либо нулевой локус капсулы (*cnI*). Бескапсульные варианты в настоящее время идентифицируются как причина инвазивного заболевания, особенно у лиц с ослабленным иммунитетом. Недавно был обнаружен неинкапсулированный менингококковый патотип cc11, вызывающий случаи вспышки ГФМИ и вспышки уретрита, передаваемого половым путем [180].

Анализ распространения серогрупп менингококков осложняется таким явлением как переключение капсульных типов. Смысл явления заключается в изменении серогрупповой принадлежности генетических линий (сиквенс-типов). Механизм переключения объясняется горизонтальным переносом фрагментов оперона биосинтеза капсулы между различными генетическими линиями. Структура капсульных локусов серогрупп B, C, W и Y (но не серогруппы A) характеризуется значительным сходством, что облегчает горизонтальный перенос [168]. Очевидно, что переключение капсульного типа позволяет менингококкам уклоняться от защитного действия естественного или поствакцинального иммунитета. Поэтому данный феномен можно считать механизмом вирулентности, проявляемым капсулированными бактериальными патогенами [168].

Переключение капсульного типа, скорее всего, происходит в результате рекомбинации *in vivo* во время совместного носительства штаммов различных серогрупп [166]. В целом такие события нельзя считать редкими. Возможно, что в части случаев причиной переключения с серогруппы C на B может быть массовая вакцинация [162]. В литературе описаны случаи переноса генов, кодирующих синтез

капсулы, из серогрупп Y в B и из серогрупп C в W [29, 177]. Среди гипервирулентных клонов *N. meningitidis* линия ST-11 – наиболее древняя, известная с 1917 года, интересной особенностью которой является связь с четырьмя серогруппами (B, C, W и Y), содержащими полисиаловую кислоту [41].

Детальный анализ эволюции генетической линии ST-11 стал возможен благодаря внедрению методов полногеномного типирования. В 1960-1970-х годах большинство изолятов *N. meningitidis* линии ST-11 относились к серогруппе C [104], линия ST-11 серогруппы W была известна с 1970-х годов, но ее распространенность была незначительной. Штаммы W ST-11 тесно связаны со штаммами серогруппы C ST-11 *N. meningitidis* и, возможно, возникли в результате феномена переключения капсулы. Группой исследователей при детальном филогенетическом изучении всего генома, а также генов, кодирующих поверхностный антиген и аллели генов рекомбинантной вирулентности, которые были уникальными для клона Хаджа, была предложена модель, в соответствии с которой штамм W ST-11 *N. meningitidis* отделялся от предкового штамма C ST-11 посредством переключения капсулы [124]. Ключевым событием в глобальной эпидемиологии стала крупная вспышка генерализованной формы менингококковой инфекции, вызванная линией MenW ST-11 среди паломников Хаджа в Саудовской Аравии в 2000 году [36]. Дальнейшее распространение по всему миру линии ST-11 MenW, сначала в Африке к югу от Сахары, затем в Южной Америке, Европе и Австралии, стало серьезной проблемой общественного здравоохранения [99, 119]. Внутри линии Men W ST-11 были выделены две сублинии: ST-11.1, включающая штаммы, циркулировавшие среди паломников Хаджа, и ST-11.2 – южноамериканский и оригинальный британский, который был идентифицирован в 2009 году в Великобритании, когда наблюдалось увеличение заболеваемости, вызванной *N. meningitidis* W:cc11 [104]. Другой вариант британского штамма (UK 2013) MenW был детектирован в 2013 году, с которым связаны резкий подъем заболеваемости и распространение в другие европейские страны [169]. По данным WGS начиная с 2016 года в Португалии отмечен рост

распространенности изолятов серогруппы W, близких к генетической линии UK 2013 [34]. Начиная с 2012 года число генерализованных форм, вызванных MenW UK 2013, увеличилось в нескольких странах Европы, включая Швецию, Великобританию, Нидерланды, Францию и Швейцарию [99]. Значительное увеличение заболеваемости среди лиц старше 50 лет с тяжелым течением наблюдалось в Швеции с 2015 года, вызванной менингококком серогруппы W ST-11, также принадлежащем генетической линии UK 2013 [154], которая в настоящее время является доминирующей в стране [58]. Группа изолятов, выделенных от паломников Хаджа, представленная французскими, английскими MenW: cc11 изолятами за период 2000-2004 г.г., а также североафриканскими изолятами того же периода и более поздними изолятами из Турции и Франции (2014 г.), получила название «Англо-французский штамм Хаджа» [104]. Филогенетический анализ изолятов *N. meningitidis* серогруппы W ST-11 из Китая показал, что два китайских подкластера тесно связаны между собой, но отличаются от сублиний MenW:cc11 Hajj-штамма и южноамериканских штаммов [205]. Недавно проведенный филогенетический анализ результатов полногеномного секвенирования показал, что китайские изоляты MenW CC ST-11 были генетически связаны и образуют одну группу с японскими изолятами, и не связаны с изолятами MenW CC ST-11 Хадж-клона Саудовской Аравии, Европы, Южной Африки, Южной Америки, Северной Америки и Океании. Изоляты MenW CC ST-11 из Восточной Азии, возможно, эволюционировали на локальном уровне [199].

С генетической линией 10 (CC5) связаны три последовательные волны эпидемий в африканском «поясе менингита», связанные с тремя отдельными клонами линии 10, а именно ST-5, ST-7 и ST-2859 [41]. Полногеномный анализ изолятов, полученных в разные периоды, выявил гетерогенность по генам, кодирующим основные метаболические процессы [189].

Линия 5 (ST-32/ET-5) отвечает за вспышки во всем мире, вызванные менингококками серогруппы B. Основные эпидемии были зарегистрированы в Норвегии, Чили, Бразилии и на Кубе в 1980-х и 1990-х годах, длительные вспышки

были зарегистрированы на тихоокеанском северо-западе США, в Нормандии, во Франции. Клоны линии 5 могут экспрессировать очень разные основные антигенные белки. Анализ глобальной коллекции изолятов линии 5 выявили три различных сублинии: «азиатская группа» (сублиния 5.1), «европейско-норвежская группа», в которую вошли изоляты с типом PorA P1.7, 16 (сублиния 5.2) и «латино-американская группа» с PorA типа P1.19, 15 (сублиния 5.3), а также несколько изолятов, не попавших ни в одну из этих групп [75].

Уникальную комбинацию аллельных вариантов антигенов, входящих в MenB вакцину, отмечали в Чехии [83]. В Катаре наиболее распространенной была серогруппа W ST-11, вторым по частоте был менингококк ST-41 серогруппы B [73].

В Азиатско-Тихоокеанском регионе данные эпиднадзора за менингококковой инфекцией значительно варьируются, это связано с тем, что заболеваемость не подлежит регистрации в некоторых странах, включая Мьянму, Бангладеш и Малайзию. Заболеваемость в регионе является низкой (<0,2 случая на 100 000 человек в год) и вызвана *N. meningitidis* серогрупп B, W и Y, хотя в некоторых районах присутствуют серогруппы A и X. Сниженная чувствительность к ципрофлоксацину также требует пристального внимания, особенно устойчивых к антибиотикам клональных комплексов (cc4821). *N. meningitidis*, принадлежащая серогруппе B, распространена во многих странах Азиатско-Тихоокеанского региона, как в случаях заболевания, так и в случаях носительства [23]. Большая доля случаев заболевания (88%) на Тайване с 2005 по 2018 год была вызвана серогруппой B. Суммируя данные, полученные из Национальной сети эпидемиологического надзора за инфекционными заболеваниями (NESID) в Японии, на серогруппу B приходилось 20%, зарегистрированных случаев заболевания в период с января 2017 года по июнь 2019 года. В Австралии более половины зарегистрированных случаев заболевания были вызваны серогруппой B в течение первых 6 месяцев 2019 года (52%). О циркуляции изолятов *N. meningitidis* серогруппы W были получены данные из Филиппин, в 16,7% случаев детектированы в образцах крови и цереброспинальной жидкости, собранных

в 2018 году. В Австралии в течение первых шести месяцев 2019 года были зарегистрированы 28% случаев, в которых был выявлен менингококк серогруппы W [87]. В России на долю менингококка серогруппы B приходится 13% в 2021 году [15].

1.6. Стратегии вакцинации и популяционная структура менингококков

Капсульные полисахариды обладают высокой иммуногенностью и являются основой для создания вакцин против ряда бактериальных инфекций (пневмококковых, гемофильных и др.). Существует два варианта вакцин: 1 - состоящие из очищенных полисахаридов (полисахаридные) и 2 - из полисахаридов, конъюгированных с белками носителями (конъюгированные). Полисахаридные вакцины начали разрабатывать и внедрять первыми, они индуцируют T-независимый иммунитет и не эффективны у детей до 2-х лет, конъюгированные вакцины лишены этого недостатка, однако технологии их производства появились позже [85]. Важным свойством как полисахаридных, так и конъюгированных вакцин является возможность использовать в одном препарате несколько полисахаридных антигенов, так, на примере пневмококковых вакцин, которые могут включать 13, 15, 20, 23 и более антигенов [129, 145].

При разработке менингококковых вакцин использовались подходы общие для всех полисахаридных вакцин. Однако необходимо отметить одну крайне важную особенность, полисахарид группы B у человека практически не иммуногенен из-за сходства с тканевыми антигенами, что крайне затрудняет профилактику соответствующих инфекций. Первые попытки разработки менингококковых вакцин относятся к началу XX века и связаны с использованием убитых культур менингококка. Эффективные полисахаридные моновалентные вакцины в отношении серогрупп A и C были разработаны в 1969 и 1971 годах соответственно, а в 1978 г была внедрена квадριвалентная (A, C, Y и W) полисахаридная вакцина [55]. Первая конъюгированная моновалентная C вакцина была внедрена в 1999 году, затем появились бивалентные (A и C). Успех конъюгированной C вакцины наглядно продемонстрирован в Великобритании. Исторически в этой стране преобладали

изоляты *N. meningitidis* серогруппы В, представленные несколькими клональными комплексами, входящие в состав гипервирулентных линий СС41/44, СС269, СС213 и СС32 [79]. Распространение в 1990-х годах прошлого столетия серогруппы С: СС11) потребовало введения массовой вакцинации детей младших возрастных групп конъюгированной вакциной против менингококков серогруппы С, в результате чего снизились заболеваемость и носительство этой серогруппы [107]. Аналогичные результаты были получены во многих странах с высоким уровнем дохода [37].

В настоящее время в мире наиболее распространены квадριвалентные конъюгированные вакцины [33], пентавалентная конъюгированная вакцина, включающая серогруппу X (А, С, Y, X и W), находится на второй стадии клинических испытаний [46].

Очевидно, что для формирования региональной или национальной стратегии вакцинации против менингококковой инфекции необходимо иметь данные о серогрупповом составе менингококков, циркулирующих в соответствующих регионах. Как было отмечено выше, профилактика инфекций, вызываемых менингококками серогруппы В с помощью полисахаридных вакцин, оказалась невозможной. Не меньше проблем связано и с разработкой белковых вакцин из-за значительной антигенной вариабельности менингококковых белков. Первые вакцины против менингококков серогруппы В представляли из себя мембранные пузырьки (outer membrane vesicles - OMV), продуцируемые клетками менингококков. Способность к продукции и выделению в окружающую среду в результате выпячиваний внешней мембраны пузырьков размером 20–400 нм является универсальным свойством всех грамотрицательных бактерий. Такие пузырьки содержат большое количество мембранных белков и других компонентов микробной клетки [174]. Мембранные пузырьки менингококков содержат большое количество белка PorA, являющегося основным иммуногенным компонентом соответствующих вакцин, но отличающегося значительной вариабельностью. Вакцины на основе OMV, проявляют защитную эффективность только в отношении штаммов, обладающих

гомологичным белком, они доказали свою эффективность в сдерживании локальных вспышек, вызываемых родственными штаммами в таких странах как Норвегия, Чили, Куба, Новая Зеландия [63].

Первой вакциной эффективной с широким охватом штаммов менингококков группы В стала многокомпонентная вакцина 4CMenB (Bexsero), разработанная с использованием методологии «обратной вакцинологии» [26, 63]. «Обратная вакцинология» предполагает поиск с использованием методов молекулярной биологии и биоинформатики потенциальных мишеней-антигенов, экспрессирующихся на поверхности микробных клеток и вызывающих протективный иммунный ответ. В состав вакцины 4CMenB входят рекомбинантные белки: *Neisseria adhesin A (NadA)*, *Neisseria Heparin-Binding Antigen (NHBA)* и фактор Н-связывающий белок (fHbp), а также OMV, полученные из штаммов менингококков во время новозеландской вспышки, содержащий белок PorA в качестве основного вакцинного антигена. Однако необходимо иметь в виду, что не только PorA, но и другие белки, входящие в состав вакцины, неоднородны по своей структуре, уровню экспрессии и антигенным свойствам. Соответственно, возникает проблема охвата вакциной штаммов, циркулирующих в отдельных географических регионах.

Для ее решения была разработана Система Типирования Менингококковых Антигенов (Meningococcal Antigen Typing System - MATS), основанная на типировании в исследуемых штаммах гена белка PorA и на выявлении в иммуноферментном анализе антигенов, входящих в состав вакцины 4CMenB [135]. Недостатками указанной системы была возможность типирования только живых изолятов, а также сложность стандартизации иммунологических реакций, что на фоне превалирования молекулярных методов диагностики резко снижала ее применимость. Для преодоления указанных недостатков были разработаны системы генетического типирования менингококковых антигенов: genetic Meningococcal Antigen Typing System – gMATS [125] и Bexsero Antigen Sequence Types (BASTs) [40], применяется также полногеномное секвенирование [147].

К недостаткам вакцины 4СMenВ относится неполный охват антигенного разнообразия белка FHbp [121]. Более полный охват вариантов FHbp обеспечивает бивалентная белковая вакцина rLP2086 (Trumenba), включающая рекомбинантные белки двух основных подсемейств FHbp [131].

Сравнительно недавно был предложен «предсказательный индекс реактивности менингококковых антигенов» (Meningococcal Deduced Vaccine Antigen Reactivity Index - MenDeVAR Index), учитывающий как аминокислотную последовательность белков-мишеней, так и перекрестную реактивность. Программное обеспечение для определения MenDeVAR Index находится в широком доступе на веб-сайте PubMLST *Neisseria* [91]. MenDeVAR Index позволяет отнести белки-мишени изучаемых изолятов к одной из четырех категорий: полное совпадение с аминокислотной последовательностью рекомбинантного белка вакцины; наличие данных о перекрестной реактивности с антителами к вакцинным белкам; наличие данных об отсутствии перекрестной реактивности с антителами к вакцинным белкам; данных для прогнозирования эффективности недостаточно.

Реальным шагом к универсальной вакцинации является разработка вакцины, представляющей собой комбинацию MenACWY и 4СMenВ антигенов [32, 151].

1.7. Чувствительность *N. meningitidis* к антибактериальным препаратам и приобретенная резистентность

N. meningitidis относится к микроорганизмам, проявляющим высокий уровень природной чувствительности к большинству антибактериальных препаратов, однако в клинической практике для лечения и профилактики менингококковой инфекции используется их ограниченное количество: бета-лактамы, хлорамфеникол, ципрофлоксацин и рифампицин. Основным фактором, ограничивающим эффективность антибиотиков при лечении и профилактике менингококковых инфекций, является формирование устойчивости. Распространение резистентности рассматривается научным сообществом как одна из наиболее серьезных угроз системе здравоохранения [122]. Однако применительно к *N. meningitidis* эта проблема,

несмотря на негативные тенденции последних лет [119, 206], не достигла такой остроты как в случае с близкородственным микроорганизмом *N. gonorrhoeae* [200] или бактериями, объединяемыми в группу ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter spp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes*) [51].

Основу терапии менингококковых инфекций составляют бета-лактамы. Согласно рекомендациям Европейского общества по клинической микробиологии и инфекционным болезням, выбор антибиотика для лечения зависит от уровня чувствительности микроорганизма к пенициллину [182]. При минимально подавляющей концентрации (МПК) пенициллина ≤ 0.1 мкг/мл рекомендовано назначать пенициллин или ампициллин (амоксициллин), при МПК более этого значения следует назначать один из цефалоспоринов (цефотаксим, цефтриаксон, цефепим) или меропенем. В качестве альтернативы рассматриваются хлорамфеникол и фторхинолоны. Федеральные клинические рекомендации по лечению менингококковой инфекции Российской Федерации регламентируют использование этих же антибиотиков [2].

Для химиопрофилактики менингококковых инфекций применяют рифампицин, ципрофлоксацин и цефтриаксон, обеспечивающие эрадикацию патогена из носоглотки [20].

На практике этиотропная терапия генерализованных менингококковых инфекций (прежде всего менингитов) основана на эмпирическом назначении антибиотиков немедленно после установления клинического диагноза, когда данные об этиологии процесса в большинстве случаев еще отсутствуют. Средствами выбора для эмпирической терапии однозначно считаются цефалоспорины III поколения, проявляющую высокую активность не только в отношении менингококков, но и других потенциальных возбудителей гнойных менингитов: *Haemophilus influenzae* и *Streptococcus pneumoniae*. При установлении этиологической роли менингококков де-эскалации терапии обычно не производят, хотя в некоторых странах пенициллин по-прежнему является антибиотиком выбора в лечении инвазивных менингококковых

инфекций с момента постановки бактериологического диагноза.

Снижение чувствительности менингококков к бета-лактамам может быть обусловлено двумя механизмами - продукцией β -лактамаз и модификацией пенициллинсвязывающих белков (ПСБ).

Пенициллинсвязывающие белки (ПСБ) – это группа ферментов, обеспечивающих последние стадии сборки пептидогликана, функционально они проявляют трансгликозилазную и транспептидазную активности. В отличие от *N. gonorrhoeae*, располагающими тремя ПСБ, у *N. meningitidis* описано 4 ПСБ [164]. ПСБ1 – это бифункциональная трансгликозилаза/транспептидаза; ПСБ2 – монофункциональная транспептидаза; ПСБ3 и ПСБ4 – низкомолекулярные карбоксипептидазы. Транспептидазные домены ПСБ являются мишенями действия бета-лактамных антибиотиков. У менингококков к летальному эффекту приводит связывание бета-лактамов с ПСБ1 и ПСБ2. Снижение чувствительности менингококков к пенициллину связано с изменением аминокислотной последовательности ПСБ2, что приводит к снижению аффинности белка к антибиотику [22]. ПСБ2 кодируется геном *penA*, который характеризуется значительной вариабельностью, известно более 600 вариантов на нуклеотидном уровне и более 130 - на аминокислотном [197]. Гены *penA* из изолятов со сниженной чувствительностью к пенициллину характеризуются «мозаичной» структурой, формирующийся в результате гомологичной рекомбинации с соответствующими генами родственных видов *N. flavescens*, *N. cinerea*, *N. mucosa* and *N. perflava* и возникновением новых мутаций [197]. Необходимо отметить, что далеко не все изоляты с мозаичными генами *penA* проявляют сниженную чувствительность к пенициллину [171]. Роль ПСБ1 в формировании устойчивости к бета-лактамам существенно ниже, в гене *penA*, кодирующем этот белок описана только одна мутация, приводящая к аминокислотной замене и снижению чувствительности к пенициллину [148]. Рост распространенности изолятов с мутациями в *penA* со сниженной чувствительностью к пенициллину отмечен во многих регионах. Так в США в период 2012-2019 г.г. до 25% штаммов

менингококков демонстрировали сниженную чувствительность к пенициллину/ампициллину, у 79% из них выявляли мозаичную структуру *penA* [137]. Распространение таких изолятов в период 1996 г. по 2016 г. отмечен в Ирландии [30]. В Китае менингококки проявляли чувствительность пенициллину – в 84,8%; к цефотаксиму в 97,4% случаев; ампициллину – в 87,7%; миноциклину - в 95,2%; ципрофлоксацину – в 24,9%; ко-тримоксазолу – в 11,2% [195]. В 2016 году в Австралии было зафиксировано появление изолятов MenW:cc11 со сниженной чувствительностью к пенициллину благодаря мутациям в *penA* [119], позже такие изоляты были обнаружены в Великобритании [193]. В Турции выявлено 8,7% изолятов, устойчивых к пенициллину, 22,8% - с промежуточным уровнем чувствительности, все изоляты были чувствительные к цефотаксиму и рифампицину [96].

Снижение чувствительности менингококков к пенициллину, связанное с мутациями в гене *penA*, обычно не сопровождается снижением чувствительности к цефалоспорином III поколения, однако в Великобритании был обнаружен один изолят, проявлявший устойчивость к цефотаксиму благодаря дополнительным мутациям в гене *penA* [192]. Формирование у менингококков устойчивости к цефалоспорином представляет реальную опасность, так у близкородственного микроорганизма *N. gonorrhoeae*, устойчивость к цефалоспорином III поколения, связанная с мутациями в гене *penA*, в последние годы стала глобальной проблемой [116].

Продукция бета-лактамаз среди менингококков встречается относительно редко, в 2018 и 2019 г.г. практически одновременно во Франции [81] и Канаде [176] были описаны изоляты менингококков, демонстрирующие высокие значения МПК пенициллина (256.0 мкг/мл) и несущие на хромосоме гены бета-лактамазы ROB-1. Указанные гены, скорее всего, были получены в результате горизонтального переноса от *H. influenzae*. Бета-лактамаза ROB-1 обладает узким спектром гидролитической активности, она не разрушает цефалоспориновые антибиотики. Тем не менее,

обнаружение в последние годы в США [113, 136, 172] и Сальвадоре [109] изолятов, продуцирующих ROB-1 бета-лактамазы и демонстрирующие устойчивость к ципрофлоксацину, вызванную мутациями в ДНК-гиразе, вызывает определенное беспокойство.

Фторхинолоны рассматриваются в качестве альтернативных средств для лечения менингококковых инфекций, а также как средства профилактики. Наиболее распространенные современные фторхинолоны (ципрофлоксацин, левофлоксацин и моксифлоксацин) по уровню природной активности в отношении менингококков существенно не различаются. Основной механизм резистентности к фторхинолонам – мутации в генах мишеней действия этих препаратов ДНК-гиразы и ДНК-топоизомеразы IV. Мутации в гене *parC* (кодирующем ДНК-топоизомеразу IV, субъединицу A), сопровождающиеся мутациями в гене *gyrA*, вызывают существенное повышение уровня резистентности к ципрофлоксацину [45].

Распространение устойчивости к фторхинолонам между отдельными странами существенно варьирует. В Китае рост частоты устойчивых к ципрофлоксацину изолятов (MIC: ≥ 0.12 мг/л) отмечен с 2005 года [204]. К настоящему времени в Китае к генетической линии MenC (cc4821), проявляющей сниженную чувствительность к ципрофлоксацину, относятся более 95% возбудителей генерализованных форм менингококковой инфекции [206]. Такие изоляты выявляются также в Японии и Канаде [97]. Из-за распространения клонального комплекса cc4821 существует вероятность того, что штамм достигнет Африки к югу от Сахары. Это, в свою очередь, может создать проблемную ситуацию в Королевстве Саудовская Аравия, где ципрофлоксацин используется в качестве антибиотика, использующегося для профилактики менингококковой инфекции среди паломников Хаджа [196]. В недавних сообщениях имеются данные об устойчивости к ципрофлоксацину изолятов (ST-23), выделенных от больных в США [113], и изолятов (ST-175), выделенных от лиц с ослабленным иммунитетом в Великобритании и Европе [191]. В Перу описана вспышка менингококковой инфекции, вызванной штаммами, устойчивыми к

фторхинолонам благодаря мутации в гене *gyrA* [95].

Устойчивость к рифампицину у менингококков наблюдается редко и может встречаться после химиопрофилактики. Кажется, что биологическая стоимость изменения конкретных структур в *N. meningitidis* может быть слишком высока для бактерий, как было предложено после экспериментов *in vitro*. Первичные случаи резистентных к рифампицину менингококков из-за точечных мутаций в гене *rpoB* (кодирующем бета-субъединицу РНК-полимеразы), являются редкими и не связаны с конкретными линиями [140, 170]. Эта резистентность, по-видимому, остается редким событием, отражающим сниженную биологическую пригодность внутри менингококка. Тем не менее, размножение клонов менингококка, резистентных к рифампицину, может вызвать ошибки химиопрофилактики, в связи с чем, надежный мониторинг восприимчивости к рифампицину будет иметь решающее значение.

Хотя хлорамфеникол больше не является стандартной терапией менингококкового менингита, он обычно используется у пациентов с непереносимостью бета-лактамовых антибиотиков и рекомендуется в качестве альтернативного антибактериального препарата в международных рекомендациях по лечению менингококкового менингита [111,178] и поэтому устойчивость к хлорамфениколу остается вопросом клинического значения. Резистентность обусловлена, главным образом, наличием гена *catP*, кодирующего фермент хлорамфениколацетилтрансферазу. О резистентности к хлорамфениколу у *N. meningitidis* сообщалось редко, впервые она была описана в 1998 году у 11 изолятов из Вьетнама и одного изолята из Франции из-за присутствия гена хлорамфениколтрансферазы (*catP*), возможно, полученного из транспонируемого элемента *Clostridium perfringens* [66]. Еще два изолята с той же вставкой гена *catP* были позже описаны в Австралии [161] среди 1382 изолятов. Совсем недавно резистентность к хлорамфениколу была зарегистрирована у одного из 2888 изолятов в Бразилии [70], и высокоустойчивый изолят был обнаружен во Вьетнаме в 2014 году [175].

Как и в случае всех других бактериальных инфекций, эффективная терапия менингококковых инфекций строится на результатах оценки антибиотикочувствительности патогена *in vitro*. Однако, между авторитетными международными организациями до настоящего времени нет полного консенсуса по методам и критериями оценки чувствительности. Европейский комитет по оценке антибиотикочувствительности (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST) предлагает использовать для оценки чувствительности менингококков только методы определения МПК (серийные разведения в бульоне и агаре, а также Е-тест), критерии чувствительности разработаны для бензилпенициллина, ампициллина, амоксициллина, цефотаксима, цефтриаксона, меропенема, ципрофлоксацина, тетрациклина, миноциклина и рифампицина [173]. Институт клинических и лабораторных стандартов (Clinical and Laboratory Standard Institution – CLSI) допускает использование для перечисленных антибиотиков (кроме бензилпенициллина и левофлоксацина) диско-диффузионный метод. Критерии чувствительности, предложенные указанными организациями для отдельных антибиотиков, несколько различаются. В 2007 году были опубликованы рекомендации Европейской Группы по Мониторингу Менингококков (European Monitoring Group on Meningococci - EMGM), с момента публикации эти рекомендации не обновляли. Критерии чувствительности отличаются от предложенных EUCAST и/или CLSI. До настоящего времени о возможности использования метода серийных разведений в бульоне четких рекомендаций нет [184].

Таким образом, резюмируя вышесказанное, до настоящего времени взаимосвязь между менингококковым носительством и развитием тяжелых форм заболевания остается не до конца изученной. Прежде всего обращает на себя внимание тот факт, что менингококковая болезнь возникает очень редко по сравнению с практически повсеместным присутствием бессимптомного носительства менингококков в человеческой популяции - один случай ГФМИ встречается на сотни и даже тысячи колонизированных [7]. Кроме того, максимальный уровень заболеваемости

генерализованными менингококковыми инфекциями наблюдается у детей первого года жизни [8]. Принято считать, что развитие генерализованных форм менингококковой инфекции может быть связано как с индивидуальной восприимчивостью организма хозяина, так и с биологическими, прежде всего антигенными и генетическими, особенностями циркулирующих штаммов *N. meningitidis*. Исследование изменяющегося состава превалирующих изолятов *N. meningitidis* от носителей и больных может стать основой для прогнозов распространения заболевания и, соответственно, разработки эффективных стратегий ее профилактики и лечения, для чего, прежде всего необходимо стандартизовать методы оценки антибиотикочувствительности.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

ГЛАВА 2. ДЕТЕКЦИЯ *NESSERIA MENINGITIDIS* В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ

2.1. Диагностика генерализованных форм менингококковой инфекции

В исследование были включены биологические образцы (кровь и цереброспинальная жидкость), полученные от пациентов с подозрением на гнойный менингит и/или менингококковую инфекцию. Для выявления *N. meningitidis* использовали классический культуральный метод и метод ПЦР.

Для определения серогруппы у штаммов *N. meningitidis* был использован оптимизированный алгоритм мультиплексной ПЦР в режиме реального времени. Для улучшения чувствительности и специфичности была проведена оптимизация условий ПЦР *in-silico* в программе Oligo v.7.0. Были проведены технические проверки всех праймеров и зондов: температура плавления (T_m) и потенциальные вторичные структуры были оценены с оптимальной T_m , варьирующейся между 56–60°C и 57–65°C для праймеров и зондов соответственно. Был проведен поиск сходства нуклеотидных последовательностей для выявления возможных перекрестных реакций с другими бактериями с помощью инструмента BLAST с использованием базы данных NCBI. Вторичные структуры или димеры были сведены к минимуму, чтобы избежать их потенциального негативного воздействия на эффективность ПЦР. Были выбраны оптимальные условия: температура отжига, концентрации праймеров и зондов. Оптимизированные мультиплексные ПЦР использовались для детекции и для определения серогруппы. При этом для детекции *N. meningitidis* мишенями служили гены *porA* и *sodC*. Совместное использование данных мишеней позволило определить изоляты менингококков с чувствительностью 96% и специфичностью 98%, что подтверждено данными, полученными в ходе исследования методом полногеномного секвенирования (WGS). При определении серогрупп штаммов *N. meningitidis* чувствительность и специфичность составила 100% соответственно. Праймеры, HS Taq ДНК-полимераза с высокоэффективным буфером использовались

производства ЗАО «Евроген», зонды производства ООО «Синтол». Конечный объем на реакцию/мультиплексную реакцию – 25 мкл, при этом объем исследуемой ДНК составлял 5 мкл. Амплификация проводилась в термоциклере CFX96 (БиоРад, США).

Детекция *N. meningitidis* в биологических образцах (респираторных мазках, крови, ЦСЖ) и в бактериальных суспензиях

Для определения оптимальной концентрации были протестированы компоненты смеси для ПЦР с различными концентрациями MgCl₂ (ЗАО «Евроген»), праймеров (ЗАО «Евроген») и зондов ООО «Синтол», буферного раствора (ЗАО «Евроген»), HS Taq ДНК-полимераза ЗАО «Евроген» для анализа. Условия термоциклирования были одинаковыми для всех испытаний при детекции *N. meningitidis* как в респираторных мазках, так и в бактериальных суспензиях: 95°C - 7 минут (мин) 1 цикл; 95°C - 10 сек; 60°C - 10 сек; 56°C - 30 сек; 43 цикла. Считывание результатов - при 56°C. Детектирование включает одну мультиплексную реакцию, при положительной детекции переходили к следующему этапу - типирования.

Таким образом, оптимальные концентрации праймеров и зондов и др. были выбраны после проведения необходимых расчетов и экспериментов. Стоковые растворы праймеров (100 мкМ) и зондов (100 мкМ), использованных для детекции и для типирования, вначале разводились до соответствующих концентраций (10 мкМ/мл) и использовались в качестве рабочих растворов в течение двух недель. Каждый раз перед постановкой ПЦР готовились промежуточные разведения *ex tempore* (для зондов *porA*: 1 мкМ/мл; *sodC*: 2 мкМ/мл; для прямого и обратного праймеров: для *porA*: 4 мкМ/мл, для *sodC*: 8 мкМ/мл) которые не подвергались хранению. Детекция флуоресцентного сигнала осуществлялась по каналам FAM, HEX. Смесь для мультиплексной реакции (*porA*, *sodC*) (общий объем 25 мкл) имеет следующий вид:

Конечная концентрация зондов и праймеров *porA* в смеси соответственно: 0,2 мкМ/мл и 0,4 мкМ/мл; *sodC*: 0,4 мкМ/мл и 0,8 мкМ/мл;

Праймер *porA_fwd*: объем (V=1,25 мкл), концентрация (C=0,4 мкМ/мл);

Праймер *porA_rev*: объем ($V=1,25$ мкл), концентрация ($C=0,4$ мкМ/мл);

Праймер *sodC_fwd*: объем ($V=1,25$ мкл), концентрация ($C=0,8$ мкМ/мл);

Праймер *sodC_rev*: объем ($V=1,25$ мкл), концентрация ($C=0,8$ мкМ/мл);

Зонд *porA*: объем ($V=2,5$ мкл), концентрация ($C=0,2$ мкМ/мл);

Зонд *sodC*: объем ($V=2,5$ мкл), концентрация ($C=0,4$ мкМ/мл);

Буферный раствор: объем ($V=5$ мкл);

dNTPs: объем ($V=0,5$ мкл);

MgCl₂: объем ($V=2$ мкл);

H₂O: объем ($V=2$ мкл);

Taq ДНК-полимераза: объем ($V=0,5$ мкл);

ДНК исследуемого образца: объем ($V=5$ мкл)

Для определения специфического *cnl* в нетипируемых образцах ДНК каждый раз готовились промежуточные разведения *ex tempore* (для зондов двух типов: *cnl_2* и *cnl_2b* 2 мкМ/мл; для прямого и обратного праймеров: 8 мкМ/мл) которые не подвергались хранению. Детекция флуоресцентного сигнала осуществлялась по каналу VIC. Использовалась смесь для мультиплексной ПЦР, которая выглядит следующим образом:

Конечная концентрация зондов и праймеров *cnl* соответственно: 0,4 мкМ/мл и 0,8 мкМ/мл

Праймер *cnl_fwd_2*: объем ($V=1,25$ мкл), концентрация ($C=0,8$ мкМ/мл);

Праймер *cnl_rev_2*: объем ($V=1,25$ мкл), концентрация ($C=0,8$ мкМ/мл);

Праймер *cnl_fwd_2b*: объем ($V=1,25$ мкл), концентрация ($C=0,8$ мкМ/мл);

Праймер *cnl_rev_2b*: объем ($V=1,25$ мкл), концентрация ($C=0,8$ мкМ/мл);

Зонд *cnl_Pb*: объем ($V=5$ мкл), концентрация ($C=0,4$ мкМ/мл);

Буферный раствор: объем ($V=5$ мкл);

dNTPs: объем ($V=0,5$ мкл);

MgCl₂: объем ($V=2$ мкл);

H₂O: объем ($V=2$ мкл);

Тақ ДНК-полимераза: объем ($V=0,5$ мкл);

ДНК исследуемого образца: объем ($V=5$ мкл)

Типирование *N. meningitidis*, выделенных из биологических образцов (крови, ЦСЖ, респираторных мазков) и изолятов *N. meningitidis* методом ПЦР

Типирование *N. meningitidis*, выделенных из респираторных мазков ($n=1598$) и культур ($n=98$) методом ПЦР проводили с праймерами, предложенными в работе Kanny Diallo, et al [52]. Серогруппы были определены с использованием оптимизированных двух мультиплексных реакций. Первая – для определения серогрупп А, W; вторая – для определения серогрупп В, С, Y. Были проведены расчеты оптимальных концентраций праймеров и зондов для разного количества исследуемых образцов выделенных ДНК, в том числе для определения серогрупп X, E, H и Z. Для всех реакций использовались зонды гидролиза Black Hole Quencher (BHQ).

Использованный оптимизированный алгоритм ПЦР-типирования позволяет в короткие сроки обнаружить и дифференцировать А, W, В, С, Y, X, E, Z серогруппы, а также выявлять негруппируемые (нетипируемые) штаммы, у которых имеется «нулевой локус капсулы» (*cnI*).

Для определения серогрупп А, W, В, С, Y были выбраны оптимальные конечные концентрации зондов и праймеров – 0,2 и 0,4 соответственно. Стоковые растворы праймеров (100 мкМ) и зондов (100 мкМ), использованных для типирования, вначале разводились до соответствующих концентраций (10 мкМ/мл) и использовались в качестве рабочих растворов в течение двух недель. Каждый раз перед постановкой ПЦР готовились промежуточные разведения *ex tempore* (для зондов серотипирования соответствующих серогрупп: 1 мкМ/мл; для прямого и обратного праймеров: 4 мкМ/мл) которые не подвергались хранению. Детекция флуоресцентного сигнала осуществлялась по каналам FAM, HEX, CY5. Смесь (общий объем 25 мкл) для мультиплексной реакции (А, W) имеет следующий вид:

Конечная концентрация зондов и праймеров при типировании серогрупп А и W

(NMser_A и NMser_W) в смеси соответственно: 0,2 мкМ/мл и 0,4 мкМ/мл;

Праймер *NMser_A_fwd*: объем ($V=1,25$ мкл), концентрация ($C=0,4$ мкМ/мл);

Праймер *NMser_A_rev*: объем ($V=1,25$ мкл), концентрация ($C=0,4$ мкМ/мл);

Праймер *NMser_W_fwd*: объем ($V=1,25$ мкл), концентрация ($C=0,4$ мкМ/мл);

Праймер *NMser_W_rev*: объем ($V=1,25$ мкл), концентрация ($C=0,4$ мкМ/мл);

Зонд *NMser_A*: объем ($V=2,5$ мкл), концентрация ($C=0,2$ мкМ/мл);

Зонд *NMser_W*: объем ($V=2,5$ мкл), концентрация ($C=0,2$ мкМ/мл);

Буферный раствор: объем ($V=5$ мкл);

dNTPs: объем ($V=0,5$ мкл);

MgCl₂: объем ($V=2$ мкл);

H₂O: объем ($V=2$ мкл);

Taq ДНК-полимераза: объем ($V=0,5$ мкл);

Смесь для постановки мультиплексной ПЦР для детекции серогрупп В, С, Y, с конечной концентрацией зондов и праймеров в смеси соответственно: 0,2 мкМ/мл и 0,4 мкМ/мл:

Праймер *NMser_B_fwd*: объем ($V=1$ мкл), концентрация ($C=0,4$ мкМ/мл);

Праймер *NMser_B_rev*: объем ($V=1$ мкл), концентрация ($C=0,4$ мкМ/мл);

Праймер *NMser_C_fwd*: объем ($V=1$ мкл), концентрация ($C=0,4$ мкМ/мл);

Праймер *NMser_C_rev*: объем ($V=1$ мкл), концентрация ($C=0,4$ мкМ/мл);

Праймер *NMser_Y_fwd*: объем ($V=1$ мкл), концентрация ($C=0,4$ мкМ/мл);

Праймер *NMser_Y_rev*: объем ($V=1$ мкл), концентрация ($C=0,4$ мкМ/мл);

Зонд *NMser_B*: объем ($V=2$ мкл), концентрация ($C=0,2$ мкМ/мл);

Зонд *NMser_C*: объем ($V=2$ мкл), концентрация ($C=0,2$ мкМ/мл);

Зонд *NMser_Y*: объем ($V=2$ мкл), концентрация ($C=0,2$ мкМ/мл);

Буферный раствор: объем ($V=5$ мкл);

dNTPs: объем ($V=0,5$ мкл);

MgCl₂: объем ($V=2$ мкл);

Taq ДНК-полимераза: объем ($V=0,5$ мкл);

ДНК исследуемого образца: объем ($V=5$ мкл).

Таким образом, алгоритм диагностики менингококковой инфекции, фенотипической и генетической характеристики изолятов включает в себя следующие обязательные моменты (Рисунок 2):



Рисунок 2 – Алгоритм диагностики менингококковой инфекции, фенотипической и генетической характеристики изолятов

В период с 2013 по 2020 годы было исследовано 193 биологических образца от больных ГФМИ. Как следует из рисунка 3, если в период с 2013–2014 г.г. применение метода ПЦР позволяло дополнительно к культуральному методу расшифровывать 29%–36% случаев подозрительных на менингококковую инфекцию, то в период с 2015 по 2020 г.г. дополнительно расшифровывали 50% - 64% случаев.

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 4).

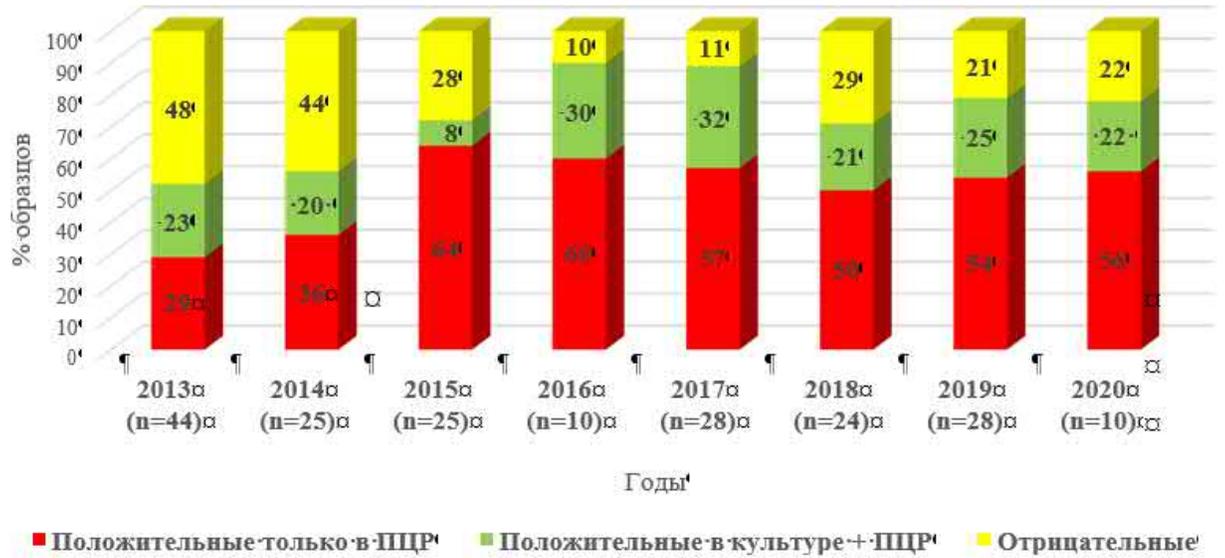


Рисунок 3 - Результаты детекции *N. meningitidis* бактериологическим методом и ПЦР в образцах крови и ЦСЖ, $p < 0,05$

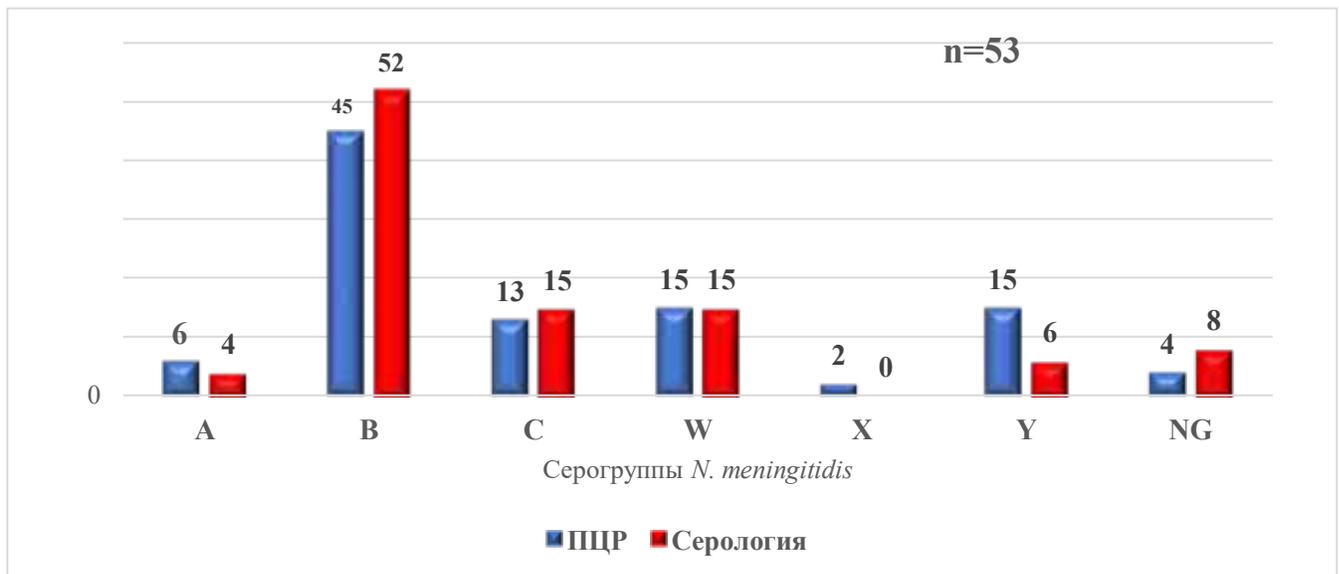


Рисунок 4 - Серогрупповой состав *N. meningitidis* (% изолятов), вызывающих генерализованные формы менингококковой инфекции в Санкт-Петербурге (результаты получены при использовании различных методов типирования: традиционного серологического и молекулярного (ПЦР))

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.о.

Суммируя вышеизложенное, необходимо отметить, что полученные результаты крайне важны для обоснования стратегии вакцинопрофилактики менингококковой инфекции. Внедрение тетравалентной 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 B. Для оценки эффективности существующих вакцин против менингококка серогруппы B в нашей работе исследованию методом полногеномного секвенирования подверглись 7 изолятов *N. meningitidis* серогруппы B, 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 3.

Таблица 3 - Характеристика перекрестной реактивности антигенов изолятов *N. meningitidis* серогруппы B (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

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. 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 B.

2.2. *N. meningitidis* у здоровых лиц

В исследование включены назофарингеальные мазки, полученные от абитуриентов/курсантов Военно-медицинской академии в ходе исследования распространения назофарингеального носительства. Все абитуриенты, включенные в исследование, были в возрасте 18-20 лет, более половины из них имели 2-4 соседей по квартире, и более 80% были курильщиками. 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).

Результаты выделения *N. meningitidis* и детекции ДНК бактерий, а также результаты типирования приведены в таблице 4. Частота выявления носительства *N. meningitidis* (суммарное выявление культуральным методом и в ПЦР) в различные временные периоды варьировала от 7.7% до 17.8%. 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 4 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 через 12-13 месяцев - практически только негруппируемые. Всего у носителей было выделено 48 жизнеспособных культур *N. meningitidis*, из них к нетипируемым относились 11 (18,75%). 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. Следовательно, только при использовании метода ПЦР представляется возможным выявление нулевого локуса капсулы у негруппируемых изолятов.

Таблица 4 - Результаты детекции и типирования *N. meningitidis* в носоглоточных мазках носителей

Серо- группа	День 1 (N=671)			День 30 (N=261)			День 60 (N=232)			12 месяцев (N=214) *			13 месяцев (N=220) **		
	Культура +ДНК, n	ДНК, n	Всего, n (%)	Культура +ДНК, n	ДНК, n	Всего, n (%)	Культура +ДНК, n	ДНК, n	Всего, n (%)	Культура +ДНК, n	ДНК, n	Всего, n (%)	Культура +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)
Носите ли, %	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

ГЛАВА 3. СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИБИОТИКОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ *NEISSERIA MENINGITIDIS*

Эволюция спектров чувствительности к антибиотикам изолятов *N. meningitidis*, наблюдаемая в разных странах, требует мониторинга антибиотикорезистентности возбудителя менингококковой инфекции в Российской Федерации для того, чтобы выявить появление устойчивости к антибиотикам, которые по-прежнему считаются эффективными в терапии этого заболевания. Вместе с тем, тестирование чувствительности менингококков к антибиотикам осложняется сохраняющимся до настоящего отсутствием единого мнения относительно выбора оптимального метода исследования, а также неоднозначной интерпретацией значений минимальных подавляющих концентраций вышеуказанных антибактериальных препаратов. Специалистами EMGM (The European Meningococcal Disease Society) для определения антибиотикорезистентности штаммов *N. meningitidis* рекомендованы методы разведения в агаре и градиентной диффузии (E-тест) [185]. Метод серийных микроразведений, являющийся референтным при определении МПК подавляющего большинства патогенных микроорганизмов, при тестировании спектра антибиотикорезистентности менингококков в Европе практически не используется из-за технических сложностей [185]. С другой стороны, институт клинических и лабораторных стандартов (CLSI) рекомендует для определения антибиотикорезистентности штаммов *N. meningitidis* методы разведения в бульоне и агаре [49]. В связи с этим, нами были проведены исследования по определению МПК (мг/л) тремя методами.

3.1. Бульон-E-тест

В данной работе для определения МПК (мг/л) изолятов *N. meningitidis* были использованы 3 метода постановки антибиотикочувствительности. При этом при сравнении полученных результатов при постановке методами **Бульон-E-тест** при

определении чувствительности к **пенициллину** совпадение в 10 (10,2%) случаях в 3-х концентрациях (Рисунок 5).

		Ампициллин												
		Е-тест, мг/л												
		0,002	0,004	0,008	0,016	0,032	0,064	0,094	0,125	0,19	0,25	0,5	1	2
Бульон, мг/л	0,002	1												
	0,004	1	1											
	0,008		1	1										
	0,016			1	1									
	0,032				1	1								
	0,064					1	1							
	0,094						1	1						
	0,125							1	1					
	0,19								1	1				
	0,25									1	1			
	0,5										1	1		
	1											1	1	
	2												1	1
	4													1

Рисунок 5 – Характеристика совпадения результатов (зеленый цвет) при определении МПК (мг/л) пенициллина методом градиентной диффузии в агар (Е-тест) и методом микроразведений в бульоне

При сравнении результатов определения чувствительности к **ампициллину** совпадение отмечалось в 25 (25,5%) случаях в 5 концентрациях. Разница на одно разведение в 20 (20,4%) случаях. Разница на 2 и более разведения при определении МПК отмечалось в 53 (54,1%) случаях (Рисунок 6).

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

Рисунок 6 – Характеристика совпадения результатов (зеленый цвет) при определении МПК (мг/л) ампициллина методом градиентной диффузии в агар (Е-тест) и методом микроразведений в бульоне

При сравнении результатов определения чувствительности к **цефтриаксону** идентичность в определении МПК отмечалась в 53 (54,1%) случаях в 1 концентрации (0,002мкг/мл). Разница на одно разведение в 8 (8,2%) случаях. Разница на 2 и более разведения при определении МПК отмечалось в 37 (37,7%) случаях (Рисунок 7).

		Цефтриаксон							
		Е-тест, мг/л							
		0,002	0,004	0,008	0,016	0,032	0,064	0,125	0,19
Бульон, мг/л	0,002	53	1						
	0,004	7							
	0,008	11				1			
	0,016	9	1						
	0,032	3							
	0,064	6							1
	0,125	3							
	0,19								
	0,25	1							
	0,5	1							

Рисунок 7 – Характеристика совпадения результатов (зеленый цвет) при определении МПК (мг/л) цефтриаксона методом градиентной диффузии в агар (Е-тест) и методом микроразведений в бульоне

При сравнении результатов определения чувствительности к **меропенему** совпадение в определении МПК отмечалась в 17 (17,3%) случаях в 4-х концентрациях. Разница в результатах определения МПК на одно разведение (больше или меньше) в 44 (44,9%) случаях. Разница на 2 и более разведения в 37 (37,8%) (Рисунок 8).

		Меропенем									
		Е тест, мг/л									
		0,002	0,004	0,008	0,016	0,032	0,064	0,125	0,25	0,5	
Бульон, мг/л	0,002	5	13	6							
	0,004			1							
	0,008	2	8	9							
	0,016	2	3	8	2	1					
	0,032		5	4	5	1	1				
	0,064			3	2	1					
	0,125		1	1	3	1					
	0,25		1		1			1			
	0,5		1	1							
	1										

Рисунок 8 – Характеристика совпадение результатов (зеленый цвет) при определении МПК (мг/л) меропенема методом градиентной диффузии в агар (Е-тест) и методом микроразведений в бульоне

При сравнении результатов определения чувствительности к **ципрофлоксацину** совпадение в определении МПК отмечалась в 8 (8,2%) случаях в 2-х концентрациях. Разница в результатах определения МПК на одно разведение (больше) в 13 (13,2%) случаях. Разница на 2 и более разведения в 77 (78,6%) (Рисунок 9).

		Ципрофлоксацин							
		Е-тест, мг/л							
		0,002	0,004	0,008	0,016	0,03	0,064	0,125	
Бульон, мг/л	0,002								
	0,004		5						
	0,008	2	10	3					
	0,016	3	9	2					
	0,032	4	23	5					
	0,064	3	12	3		1			
	0,125		1						
	0,25								
	0,5		1				1		
	1			2					
2	1	2							
4		5							

Рисунок 9 – Характеристика совпадения результатов (зеленый цвет) при определении МПК (мг/л) ципрофлоксацина методом градиентной диффузии в агар (Е-тест) и методом микроразведений в бульоне

При сравнении результатов определения чувствительности к **хлорамфениколу** методами Бульон-Е-тест совпадение в определении МПК отмечалась в 27 (27,6%) случаях в разных концентрациях. Разница в результатах определения МПК на одно разведение (больше или меньше) в 27 (27,6%) случаях. Разница на 2 и более разведения в 44 (44,8%) (Рисунок 10).

		Хлорамфеникол												
		Е-тест, мг/л												
		0,002	0,004	0,008	0,016	0,032	0,064	0,125	0,25	0,5	0,75	1	2	3
Бульон, мг/л	0,002													
	0,004													
	0,008													
	0,016													
	0,032													
	0,064											1		
	0,125											1		
	0,25											1		
	0,5									2		3		
	0,75									4	1	23	1	
	1									1	3	24	2	1
	2								1	3	1	24	2	1
	3											17	1	
	4											8		
	8											2	1	
16											2			
32											1			

Рисунок 10 – Характеристика совпадения результатов (зеленый цвет) при определении МПК (мг/л) хлорамфеникола методом градиентной диффузии в агар (Е-тест) и методом микроразведений в бульоне

При сравнении результатов определения чувствительности к **рифампицину** методами Бульон-Е-тест в соответствии с рисунком 7, совпадение в определении МПК отмечалась в 19 (19,4%) случаях в разных концентрациях. Разница в результатах определения МПК на одно разведение (больше или меньше) в 23 (23,5%) случаях. Разница на 2 и более разведения в 56 (57,1%) (Рисунок 11).

		Рифампицин																
		Е-тест, мг/л																
		0,002	0,004	0,008	0,016	0,032	0,064	0,094	0,125	0,25	0,38	0,5	1	2	4	8	16	32
Бульон, мг/л	0,002	1																
	0,004		1															
	0,008			1														
	0,016				1													
	0,032					1												
	0,064						1											
	0,094							1										
	0,125								1									
	0,25									1								
	0,38										1							
	0,5											1						
	1												1					
	2													1				
	4														1			
	8															1		

Рисунок 11 – Характеристика совпадения результатов (зеленый цвет) при определении МПК (мг/л) рифампицина методом градиентной диффузии в агар (Е-тест) и методом микроразведений в бульоне

Следовательно, исходя из вышеизложенного, совпадение результатов находится в интервале 8,2%-54,1%. Несовпадающий процент случаев находится в интервале 8,2%-78,6%.

3.2. Бульон-Агар

Для определения МПК (мг/л) использовался метод разведений в агаре. При дальнейшем сравнении полученных результатов определения чувствительности к **пенициллину** методами Бульон-Агар в 12 (12,2%) случаях совпадение в 3-х концентрациях. Также в 12 (12,2%) случаях отмечалось расхождение на одно разведение. В 74 (75,6%) случаях в разных концентрациях разница составляла на 2 и более разведения (Рисунок 12).

		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
Бульон, мг/л	0,002												
	0,004												
	0,008												
	0,016	1				4	3						
	0,032	15	2	1		5	3		2				
	0,064	3	3			3	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	4						1						

Рисунок 12 – Характеристика совпадения результатов (зеленый цвет) при определении МПК (мг/л) пенициллина методом разведений в агаре и методом микроразведений в бульоне

При сравнении полученных результатов определения чувствительности к ампициллину методами Бульон-Агар совпадение в 30 (30,6%) случаях в 5 концентрациях. Разница на одно разведение отмечалась в 20 (20,4%) случаях. Отличие на 2 и более разведения в 48 (49%) случаях (Рисунок 13).

		Ампициллин												
		Агар, мг/л												
		0,002	0,004	0,008	0,016	0,032	0,064	0,094	0,125	0,19	0,25	0,5	1	2
Бульон, мг/л	0,002													
	0,004													
	0,008													
	0,016													
	0,032					2	4		1					
	0,064					8	10		4		4	1		
	0,094					3	5		10		2			
	0,125						8		9					
	0,19													
	0,25													
	0,5							2	1		7	2		
	1							1	2				1	
	2							3	2					
4								1						

Рисунок 13 – Характеристика совпадения результатов (зеленый цвет) при определении МПК (мг/л) ампициллина методом разведений в агаре и методом микроразведений в бульоне

При сравнении полученных результатов определения чувствительности к **цефтриаксону** методами Бульон-Агар совпадение в 53 (54,1%) случаях в 1 концентрации. Разница на одно разведение отмечалась в 10 (10,2%) случаях. Отличие на 2 и более разведения в 35 (35,7%) случаях (Рисунок 14).

		Цефтриаксон							
		Агар, мг/л							
		0,002	0,004	0,008	0,016	0,032	0,064	0,125	0,19
Бульон, мг/л	0,002	53	1						
	0,004	7							
	0,008	9	2			1			
	0,016	10	1						
	0,032	3							
	0,064	6							
	0,125	3							
	0,19								
	0,25	1							
	0,5	1							

Рисунок 14 – Характеристика совпадения результатов (зеленый цвет) при определении МПК (мг/л) цефтриаксона методом разведений в агаре и методом микроразведений в бульоне

При сравнении полученных результатов методами определения чувствительности к **меропенему** Бульон-Агар совпадение в 17 (17,3%). Разница в результатах определения МПК на одно разведение (больше или меньше) в 44 (44,9%) случаях. Разница на 2 и более разведения в 37 (37,8%) случаях (Рисунок 15), картина аналогичная Бульон-Е-тест отображена на рисунке 8.

		Меропенем								
		Агар, мг/л								
		0,002	0,004	0,008	0,016	0,032	0,064	0,125	0,25	0,5
Бульон, мг/л	0,002	5	18	6						
	0,004			1						
	0,008	2	8	9						
	0,016	2	3	8	2	1				
	0,032		5	4	5	1	1			
	0,064		1	2	2	1				
	0,125		2	1	2	1				
	0,25		1		1			1		
	0,5		1	1						
	1									

Рисунок 15 – Характеристика совпадения результатов (зеленый цвет) при определении МПК (мг/л) меропенема методом разведений в агаре и методом микроразведений в бульоне

При сравнении полученных результатов методами определения чувствительности к **ципрофлоксацину** Бульон-Агар совпадение в в 8 (8,2%) случаях в 2-х концентрациях. Разница в результатах определения МПК на одно разведение (больше) в 12 (12,2%) случаях. Разница на 2 и более разведения в 78 (79,6%) (Рисунок 16).

		Ципрофлоксацин					
		Агар, мг/л					
		0,002	0,004	0,008	0,016	0,03	0,064
Бульон, мг/л	0,002						
	0,004		5				
	0,008	2	10	3			
	0,016	3	10	2			
	0,032	3	24	5			
	0,064	3	12	3			
	0,125		1				
	0,25						
	0,5		1				1
	1		2				
2	1	2					
4		5					

Рисунок 16 – Характеристика совпадения результатов (зеленый цвет) при определении МПК (мг/л) ципрофлоксацина методом разведений в агаре и методом микроразведений в бульоне

При сравнении полученных результатов методами определения чувствительности к **хлорамфениколу** Бульон-Агар совпадение в 28 (28,6%) случаях в разных концентрациях. Разница в результатах определения МПК на одно разведение в 25 (25,5%) случаях. Разница на 2 и более разведения в 45 (45,9%) (Рисунок 17).

		Хлорамфеникол												
		Агар, мг/л												
		0,002	0,004	0,008	0,016	0,032	0,064	0,125	0,25	0,5	0,75	1	2	3
Бульон, мг/л	0,002													
	0,004													
	0,008													
	0,016													
	0,032													
	0,064												1	
	0,125												1	
	0,25												1	
	0,5									2			3	
	0,75										4		2,4	1
	1									1	3		2,4	3
	2												1,8	1
	3												8	
	4												2	1
8												1		
16														
32														

Рисунок 17 – Характеристика совпадения результатов (зеленый цвет) при определении МПК (мг/л) хлорамфеникола методом разведений в агаре и методом микроразведений в бульоне

При сравнении полученных результатов методами определения чувствительности к **рифампицину** Бульон-Агар совпадение в 21 (21,4%) случаях в разных концентрациях. Разница в результатах определения МПК на одно разведение в 20 (20,4%) случаях. Разница на 2 и более разведения в 57 (58,2%) (Рисунок 18).

	Рифампицин											1	2
	Агар, мг/л												
	0,002	0,004	0,008	0,016	0,032	0,064	0,094	0,125	0,25	0,38	0,5		
0,002	1												
0,004		1											
0,008			1			1						1	
0,016		1		1	2	1		4					1
0,032				3	6	4							1
Бульон, мг/л				5	6	7		6					1
0,064													
0,094													
0,125				1	6	5		5					
0,25				3	2	2		1	1		1		1
0,38													
0,5				1		2		4			1		
1						2		1			2		
2						2					1		
4													1
8						1							

Рисунок 18 – Характеристика совпадения результатов (зеленый цвет) при определении МПК (мг/л) рифампицина методом разведений в агаре и методом микроразведений в бульоне

Следовательно, совпадение результатов при сравнении методов Бульон-Агар находилось в интервале 8,2%-54,1%, а расхождение - в диапазоне 12,2%-79,6%.

3.3. Е-тест-Агар

При определении МПК (мг/л) изолятов *N. meningitidis* с помощью МПС-полосок и методом разведений в агаре было получено наибольшее число случаев совпадения. Так, при сравнении методов определения МПК к **пенициллину** Е-тест-Агар 75 (76,5%) совпадений при определении чувствительности в 6 (концентрациях-разведениях); в 21 (21,4%) случаях расхождение на одно разведение. В двух случаях (2,1%) существенное различие: разница в разведениях больше чем на 2 разведения (Рисунок 19).

		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	
E-тест, мг/л	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	
	0,5													1
	1													
	2													

Рисунок 19 – Характеристика совпадения результатов (зеленый цвет) при определении МПК (мг/л) пенициллина методом градиентной диффузии в агар (E-тест) и методом разведений в агаре

При сравнении результатов определения МПК к ампициллину методами E-тест-Агар совпадение при определении МПК в 80 (81,6%) случаях, и только в 18 (18,4%) случаях разница на одно разведение. Разницы на 2 и более разведения не наблюдалось (Рисунок 20).

		Ампициллин												
		Агар, мг/л												
		0,002	0,004	0,008	0,016	0,032	0,064	0,094	0,125	0,19	0,25	0,5	1	2
E-тест, мг/л	0,002													
	0,004													
	0,008													
	0,016													
	0,032						12							
	0,064							31						
	0,094								9					
	0,125									26				
	0,19										2			
	0,25											7		
	0,5												2	
	1													2
	2													
	4													

Рисунок 20 – Характеристика совпадения результатов (зеленый цвет) при определении МПК (мг/л) ампициллина методом градиентной диффузии в агар (E-тест) и методом разведений в агаре

При сравнении результатов определения МПК к **цефтриаксону** методами Е-тест-Агар совпадение при определении МПК в 95 (96,9%) случаях, и только в 3 (3,1%) случаях разница на одно разведение. Разницы на 2 и более разведения не наблюдалось (Рисунок 21).

		Цефтриаксон									
		Агар, мг/л									
		0,002	0,004	0,008	0,016	0,032	0,064	0,125	0,19	0,25	0,5
Е-тест, мг/л	0,002	92	2								
	0,004		2								
	0,008										
	0,016										
	0,032					1					
	0,064										
	0,125										
	0,19									1	
	0,25										
	0,5										

Рисунок 21 – Характеристика совпадения результатов (зеленый цвет) при определении МПК (мг/л) цефтриаксона методом градиентной диффузии в агар (Е-тест) и методом разведений в агаре

При сравнении результатов определения МПК к **меропенему** методами Е-тест-Агар совпадение при определении МПК в 97 (99%) случаях в разных концентрациях. В одном случае (1%) при определении МПК методом Е-тест больше на одно разведение, чем при определении методом разведений в агаре. Разницы на 2 и более разведения в меньшую или большую сторону не выявлено (Рисунок 22).

		Меропенем									
		Агар, мг/л									
		0,002	0,004	0,008	0,016	0,032	0,064	0,125	0,25	0,5	
Е-тест, мг/л	0,002	9									
	0,004		37								
	0,008		1	32							
	0,016				13						
	0,032					4					
	0,064						1				
	0,125							1			
	0,25										
	0,5										

Рисунок 22 – Характеристика совпадения результатов (зеленый цвет) при определении МПК (мг/л) меропенема методом градиентной диффузии в агар (Е-тест) и методом разведений в агаре

При сравнении результатов определения МПК к **ципрофлоксацину** методами Е-тест-Агар совпадение при определении МПК в 97 (99%) случаях в разных концентрациях. В одном случае (1%) при определении МПК методом Е-тест больше на одно разведение, чем при определении методом разведений в агаре. Разницы на 2 и более разведения в меньшую или большую сторону не выявлено (Рисунок 23).

		Ципрофлоксацин							
		Агар, мг/л							
		0,002	0,004	0,008	0,016	0,03	0,064	0,125	
Е-тест, мг/л	0,002	12	1						
	0,004		70						
	0,008			13					
	0,016								
	0,032					1			
	0,064						1		
	0,125								
	0,25								
	0,5								

Рисунок 23 – Характеристика совпадения результатов (зеленый цвет) при определении МПК (мг/л) ципрофлоксацина методом градиентной диффузии в агар (Е-тест) и методом разведений в агаре

При сравнении результатов определения МПК к **хлорамфениколу** методами Е-тест-Агар совпадение при определении МПК в 96 (98%) случаях в разных концентрациях. В 2-х случаях (2%) при определении МПК методом Е-тест разница на одно разведение, чем при определении методом разведений в агаре. Разницы на 2 и более разведения в меньшую или большую сторону не выявлено (Рисунок 24).

		Хлорамфеникол												
		Агар, мг/л												
		0,002	0,004	0,008	0,016	0,032	0,064	0,125	0,25	0,5	0,75	1	2	3
Е-тест, мг/л	0,002													
	0,004													
	0,008													
	0,016													
	0,032													
	0,064													
	0,125													
	0,25								1					
	0,5									9				
	0,75										1			
	1											81		
	2												5	
	3													1

Рисунок 24 – Характеристика совпадения результатов (зеленый цвет) при определении МПК (мг/л) хлорамфеникола методом градиентной диффузии в агар (Е-тест) и методом разведений в агаре

При сравнении результатов определения МПК к **рифампицину** методами Е-тест-Агар совпадение при определении МПК в 80 (81,6%) случаях в разных концентрациях. В 16 случаях (16,4%) при определении МПК методом Е-тест разница на одно разведение, чем при определении методом разведений в агаре. Разницы более чем на 2 разведения в 2-х (2%) (Рисунок 25).

	Рифампицин Агар, мг/л												
	0,002	0,004	0,008	0,016	0,032	0,064	0,094	0,125	0,25	0,38	0,5	1	2
0,002	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,004	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,008	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,016	0	0	0	16	3	0	0	0	0	0	0	0	0
0,032	0	0	0	0	19	0	0	0	0	0	0	0	0
0,064	0	0	0	0	0	27	0	0	0	0	0	0	0
0,094	0	0	0	0	0	0	11	0	0	0	0	0	0
0,125	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0
0,25	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
0,38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0
0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2

Рисунок 25 – Характеристика совпадения результатов (зеленый цвет) при определении МПК (мг/л) рифампицина методом градиентной диффузии в агар (Е-тест) и методом разведений в агаре

Следовательно, совпадение результатов при использовании методов Е-тест-Агар находилось в диапазоне 76,5%-99%, расхождение – в интервале 1%-21,4%.

Таким образом, при определении МПК (мг/л) тремя методами отмечалась удовлетворительная воспроизводимость для всех исследуемых антибиотиков. Метод с использованием МИС-полосок (Е-тест) и метод разведений в агаре показали более точную воспроизводимость. Обращает на себя внимание метод разведений в бульоне, поскольку полученные результаты данным методом о сниженной чувствительности к антибиотикам, не были подтверждены молекулярными методами. Хотя это наиболее часто используемый метод для определения МПК к антибиотикам прихотливых микроорганизмов. Это исследование подтверждает, что метод разведений в агаре и метод Е-тест для определения чувствительности могут обеспечить воспроизводимые

и точные МПК при тестировании *N. meningitidis*.

Результаты оценки определения чувствительности включенных в исследование изолятов *N. meningitidis* к актуальным для них антибиотикам приведены на рисунке 26.

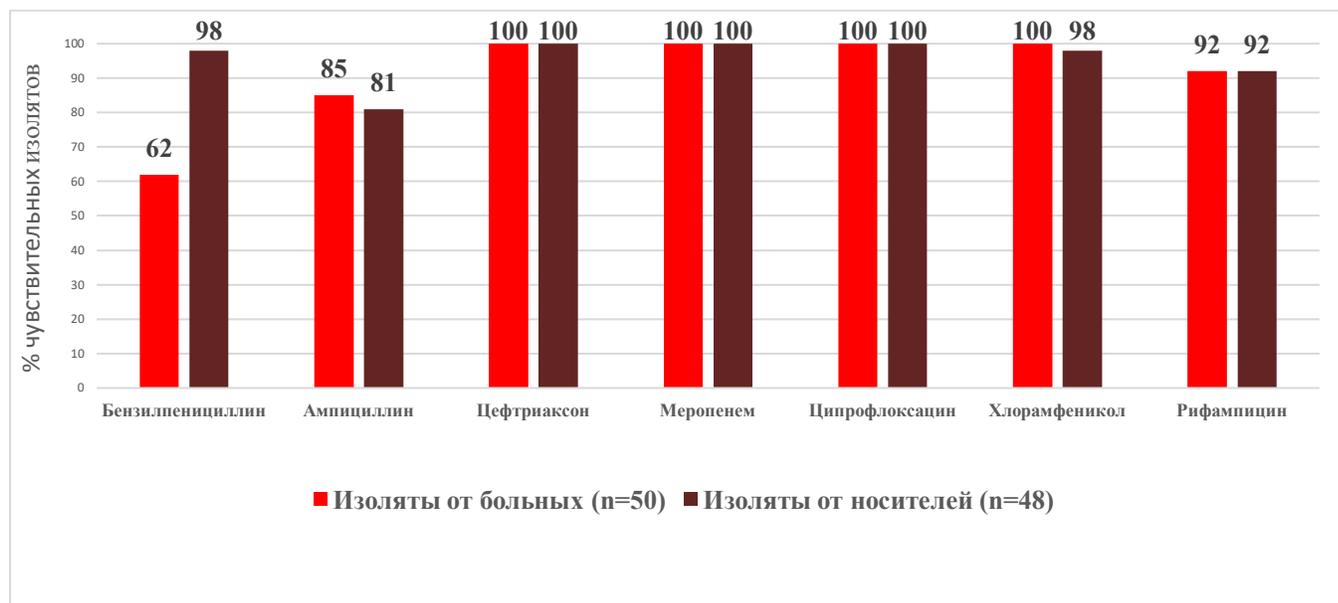


Рисунок 26 - Характеристика чувствительности к антибактериальным препаратам *N. meningitidis*, выделенных от больных генерализованными формами менингококковой инфекции и здоровых носителей

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%). 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.

3.4. Характеристика чувствительности к антибиотикам *N. meningitidis* (Nm) в зависимости от серогруппы

Один из принципиально важных вопросов, касающихся чувствительности *N. meningitidis* к антибактериальным препаратам - имеется ли взаимосвязь между сниженной чувствительностью и серогруппой, в соответствии с таблицей 5 представлены результаты чувствительности менингококков различных серогрупп к антибиотикам.

Таблица 5 - Характеристика чувствительности изолятов *N. meningitidis* к антибактериальным препаратам по серогруппам

	Nm A	Nm B	Nm C	NmX	NmY	NmW	NG
Пенициллин n=100, p=0,75	1/5	10/45	3/14	0	2/9	5/22	1/5
Ампициллин n=98, p=0,5	1/6	6/34	2/12	0	3/18	2/12	3/18
Цефтриаксон	0	0	0	0	0	0	0
Меропенем	0	0	0	0	0	0	0
Ципрофлоксацин	0	0	0	0	0	0	0
Хлорамфеникол n=100, p=0,85	0	0	0	0	0	1/100	0
Рифампицин n=98, p=0,2	0	3/34	2/22	0	0	1/11	3/33

Полученные данные о сопряженности уровня чувствительности к пенициллину и серогруппой Nm, выделенных от носителей и от больных, показали, что не было установлено достоверных различий в зависимости от серогрупповой принадлежности ($\chi^2=3,5$, $p=0,75$). При этом в группе штаммов *N. meningitidis* со сниженной чувствительностью чаще встречается NmB (45%). Остальные серогруппы распределились равномерно. Изолятов со сниженной чувствительностью среди NmX при определении МПК (мг/л) с использованием полосок Е-теста не было выявлено в соответствии с таблицей 5.

Полученные данные о сопряженности уровня чувствительности к ампициллину и серогруппой Nm, показали, что не было установлено достоверных различий в зависимости от серогрупповой принадлежности ($\chi^2=5,3$, $p=0,5$)

При этом в группе изолятов с МПК>0,125мг/л (со сниженной

чувствительностью) чаще встречается NmB (34%). Остальные серогруппы распределились равномерно. Изолятов со сниженной чувствительностью среди NmX при определении МПК (мг/л) с использованием МПС-полосок не было выявлено в соответствии с таблицей 5.

Полученные данные о сопряженности уровня чувствительности к рифампицину и серогруппой изучаемых менингококков показали, что между этими характеристиками достоверных различий не было установлено в зависимости от серогрупповой принадлежности ($\chi^2=8,2$, $p=0,2$)

В группе изолятов с МПК $>0,25$ мг/л (со сниженной чувствительностью) не были обнаружены NmA, NmY, NmX (Таблица 5).

При определении МПК к цефтриаксону, ципрофлоксацину для *N. meningitidis* методом разведений в агаре и методом постановки E-теста обращает на себя внимание факт, при котором не удалось разделить изоляты на 2 группы (чувствительные и со сниженной чувствительностью), так как *N. meningitidis* всех серогрупп являются чувствительными. Аналогичная картина наблюдалась при определении МПК к меропенему методом разведений в агаре и методом постановки E-теста.

Полученные данные о сопряженности уровня чувствительности к хлорамфениколу и серогруппой Nm показали, что достоверных различий не было установлено в зависимости от серогрупповой принадлежности ($\chi^2=2,6$, $p=0,85$)

В группе штаммов с МПК >2 мг/л (со сниженной чувствительностью) встречается 1 изолят NmW (Таблица 5).

Проанализировав полученные данные, было установлено, что отсутствует взаимосвязь между серогруппой *N. meningitidis* и сниженной чувствительностью к тестируемым антибактериальным препаратам, а также выявлена однородность результатов при использовании метода диффузии в агар (E-тестов) и метода разведений в агаре. Доказано в ходе корреляционного анализа и анализа таблиц сопряженности.

ГЛАВА 4. ПОЛНОГЕНОМНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ *NESSERIA MENINGITIDIS*

4.1. Детекция и типирование *N. meningitidis*

В настоящей работе были получены данные для последующего анализа с помощью биоинформатических программ - парные прочтения полногеномного секвенирования по технологии Illumina MiSeq Sequencing System: изоляты *N. meningitidis* (n=39). В работе также использовались данные полногеномной сборки *N. meningitidis* из публичной базы данных PubMLST. Изучаемые изоляты были представлены культурами, выделенными от больных (n=21) и от носителей (n=18). Следует отметить, что в результате проведения биоинформатической обработки результатов полногеномного секвенирования выделенных культур *N. meningitidis*, выяснилось, что 2 изолята не являются *N. meningitidis*, а являются лишь близкородственными видами, что требует дальнейшего детального изучения. Таким образом, для фенотипической и молекулярно-генетической характеристики не использовались результаты по двум вышеуказанным изолятам.

Типирование изолятов в базе PubMLST показало, что 665large_S8_FG - *Neisseria subflava*, 665white_S7_FG - *Neisseria polysaccharea*, а 97_S4_FG - возможно представляет собой смешанную культуру, с превалирующей в ней *Neisseria polysaccharea* (Рисунок 27). В последующем анализе контаминированные изоляты были использованы только при определении серогрупп, сиквенс-типов, а также при анализе антибиотикоустойчивости.

В ходе проведения полногеномного секвенирования выяснилось, что *N. meningitidis*, выделенные от больных и носителей в Санкт-Петербурге, представлены различными серогруппами. Необходимо было установить связь выделенных изолятов менингококков с представителями гипервирулентных линий.

Так, в связи с глобальным распространением *N. meningitidis* серогруппы W по всему миру, были зарегистрированы местные случаи выделения *N. meningitidis* серогруппы W как среди больных, так и среди носителей.

665large_S8_FG

Taxon [support]	Taxonomy
SPECIES <i>Neisseria subflava</i> 100*	<i>Proteobacteria</i> > <i>Beta</i> proteobacteria > <i>Neisseriales</i> > <i>Neisseriaceae</i> > <i>Neisseria</i> > <i>Neisseria subflava</i>

665white_S7_FG

Taxon Support	Taxonomy
SPECIES <i>Neisseria polysaccharea</i> 100*	<i>Proteobacteria</i> > <i>Beta</i> proteobacteria > <i>Neisseriales</i> > <i>Neisseriaceae</i> > <i>Neisseria</i> > <i>Neisseria polysaccharea</i>

97_S4_FG

Taxon	Taxonomy
SPECIES <i>Neisseria polysaccharea</i> 69%	<i>Proteobacteria</i> > <i>Beta</i> proteobacteria > <i>Neisseriales</i> > <i>Neisseriaceae</i> > <i>Neisseria</i> > <i>Neisseria polysaccharea</i>
SPECIES <i>Neisseria cinerea</i> 19%	<i>Proteobacteria</i> > <i>Beta</i> proteobacteria > <i>Neisseriales</i> > <i>Neisseriaceae</i> > <i>Neisseria</i> > <i>Neisseria cinerea</i>
SPECIES <i>Neisseria lactamica</i> 19%	<i>Proteobacteria</i> > <i>Beta</i> proteobacteria > <i>Neisseriales</i> > <i>Neisseriaceae</i> > <i>Neisseria</i> > <i>Neisseria lactamica</i>

Рисунок 27 — Определение видовой принадлежности изолятов 665large_S8_FG, 97_S4_FG

Были проанализированы геномы 41 изолята с помощью скрипта Meningotype [32], из которых 13 оказались представителями серогруппы W- ST-11 [29]. Особый интерес к группе изолятов W- ST-11 вызван их гипервирулентностью, ассоциированной с приобретением уникальных генов вирулентности - *aniA*, *norB*, *fHbp*. Типирование генов *aniA*, *norB* и *fHbp* проводилось с помощью сервиса GenomeComparator в PubMLST. Типирование 14 изолятов серогруппы W, ST-11 НИИДИ ДНКЦИБ по этимгенам показало их 100% схожесть с предковым штаммом хадж клона (M1724), что, вкупе с анализом корового генома, говорит о принадлежности изолятов к Хадж-кластеру.

На выделенном фрагменте рисунка 28 показано, что Санкт-Петербургские изоляты представляют собой две клады, сестринские по отношению к кластеру англо-французской группы, изолята из шведского кластера и предкового штамма хадж клона (M1724). Помимо этого, 14 изолятов НИИДИ-ДНКЦИБ формируют две клады, структура которых может быть ассоциирована с инвазивностью.

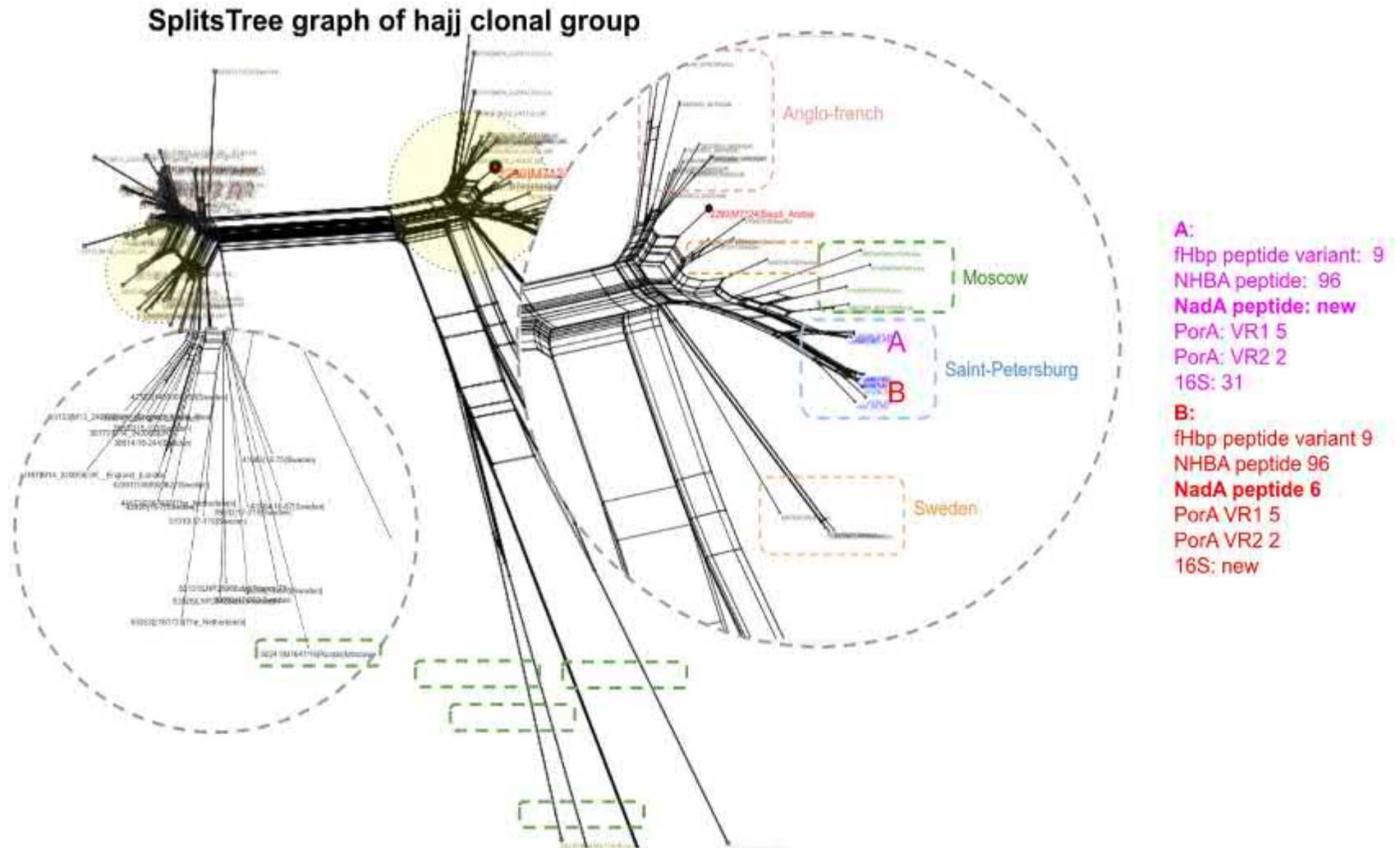


Рисунок 28 — Характеристика групп изолятов внутри Хадж-кластера

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)

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.

Среди изученных методом полногеномного секвенирования изолятов было установлено, что *N. meningitidis*, циркулирующие в Санкт-Петербурге, характеризуются значительным генетическим разнообразием (Рисунок 29).

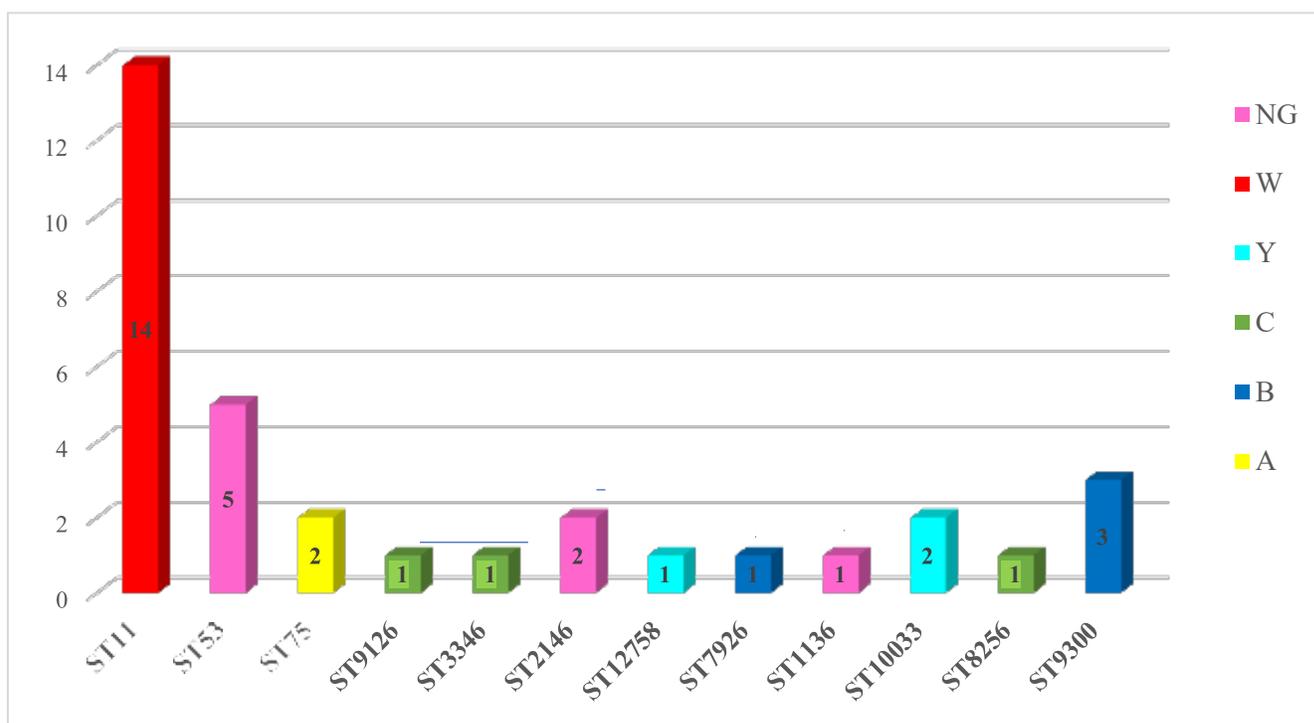


Рисунок 29 – Серогруппы и сиквенс-типы выделенных изолятов *N. meningitidis*, n=34

Основываясь на полученных в ходе полногеномного секвенирования результатах, а также проанализировав данные российских изолятов менингококков в базе данных PubMLST на ресурсе pubMLST.org/neisseria [31], было установлено, что в Санкт-Петербурге среди носителей и больных ГФМИ циркулируют штаммы менингококков, относящиеся к различным сиквенс-типам (ST), три из которых (ST-1136, ST-2146, ST-9126) были детектированы впервые в Российской Федерации, и соответствующие клональные комплексы (СС-1136, СС-198, СС-174) были впервые выявлены в нашей стране в соответствии с таблицей 6.

Таблица 6 – Сиквенс-типы и клональные комплексы выделенных изолятов *N. meningitidis* в НИИДИ-ДНКЦИБ

Сиквенс-тип (ST)	Клональный комплекс (CC)	Серогруппа (n=38)					
		A	B	C	Y	W	NG*
11	11					14	
53	53						5
75	1	2					
9126	174			1			
3346	41/44			1			
2146	198						2
12758	Не определен				1		
7926	Не определен		1				
1136	1136						1
10033	Не определен				2		
8256	41/44			1			
9300	103		3				
Не определен	-		3				1

Примечание: *NG – негруппируемые изоляты

Анализируя полученные данные о серогрупповом пейзаже изучаемых менингококков, было установлено, что не во всех случаях удалось определить сиквенс-тип и соответствующий клональный комплекс.

4.2. Выявление механизмов антибиотикорезистентности изолятов *N. meningitidis*

Было установлено, что среди нечувствительных к пенициллину изолятов аминокислотная замена D350N в *penA* обнаружена у двух, а комбинация аминокислотных замен F504L, A510V и N512Y в *penA* - у 12. Изоляты с пониженной чувствительностью к пенициллину относятся к ST-10023, ST-7926, ST-8256, ST-12758, ST-9126, ST-11 и ST-75. Гены *penA* и *penA* дикого типа наблюдались во всех чувствительных к пенициллину изолятах. Мутации в *rpoB* (A473T, H481N и A473T) были связаны с устойчивостью к рифампицину.

Устойчивость к рифампицину наблюдалась у 21% (7 из 34 изолятов). Все изоляты были полностью чувствительны к фторхинолонам, цефалоспорином, карбапенемам и макролидам. Данные об антибиотикорезистентности были получены

in vitro. Изоляты 60 и 70 показали наибольшую степень устойчивости к рифампицину - их МПК (32 мг/л).

Схожие результаты были получены и для еще двух штаммов: 219 и 694, их МПК превышен в два раза. Помимо устойчивости к рифампицину, изолят 694 демонстрирует устойчивость к хлорамфениколу (3 мг/л). Мишенью хлорамфеникола является 50S субъединица рРНК и один из механизмов устойчивости к нему - альтерация структуры мишени с помощью аминокислотных замен. Этим же механизмом обуславливается устойчивость к рифампицину; его мишенью является 3-субъединица РНК-полимеразы. Устойчивость к хлорамфениколу также зависит от наличия гена о-ацетилтрансферазы. Внимание было сконцентрировано на анализе изолята 694, поскольку, по данным вариант-коллинга, он является близким родственником изолята 212. Между этими изолятами было обнаружено различие в 12 SNP, из которых 8 расположены в гене *pile*, 1 в гене фосфоэтаноламинтрансферазы *OrgE*, 1 в гене с гликозилтрансферазным доменом, и еще 2 в генах гипотетических белков без консервативных доменов.

Отсутствие SNP в известных мишенях рифампицина и хлорамфеникола означает наличие другого механизма устойчивости к этим антибиотикам. Дополнительно установлено, что имеются в наличии замены в генах, которые были обнаружены с помощью обратного выравнивания прочтений на последовательность генов и вариант-коллинга.

Согласно проведенному анализу литературных данных [34], наибольший потенциал как детерминант устойчивости к хлорамфениколу и рифампицину, имеет фосфоэтаноламинтрансфераза *OrgE* (Рисунок 30), которая участвует в формировании и поддержании стабильности мембраны. В этом гене у изолята 694 был обнаружен сдвиг рамки считывания, который привел к делеции 1-135 аминокислот и обособления домена *LptA*. И, как следствие, сформировалась устойчивость к хлорамфениколу (МПК=3 мг/л) и к рифампицину (МПК=1 мг/л).

событий [21]. Особый интерес для анализа представляет устойчивость к антибиотикам, к которым ранее не отмечалась сниженная чувствительность. Этот интерес обусловлен тем, что у таких патогенов могут быть обнаружены новые или заимствованные механизмы резистентности. В ходе проведения анализа полногеномного секвенирования одной из задач было определение детерминанты резистентности и вирулентности изолятов *N. meningitidis*. В выборку изолятов НИИДИ-ДНКЦИБ были включены изоляты от носителей и от пациентов с генерализованными формами менингококковой инфекции. И, закономерно, большая часть изолятов от носителей была представлена бескапсульными *N. meningitidis*, а большая часть изолятов от пациентов - *N. meningitidis* серогруппы W, которая ранее редко встречалась на территории России и Санкт-Петербурга. Определяют две группы штаммов W-серогруппы ST-11: до вспышки менингококковой инфекции в Саудовской Аравии и после нее. Вспышка заболевания в Африке была обусловлена гипервирулентным штаммом M7124, и в исследовании Fazio *et al.*, 2019 было высказано предположение о событиях рекомбинации, которые привели к появлению новых вариантов FNbr и AniA, белков, которые использовались для создания вакцины от *N. meningitidis* серогрупп А и В [61].

Типирование изолятов НИИДИ-ДНКЦИБ по генам вирулентности и исследование их филогенетических отношений с Хадж-кластером показало принадлежность к этой глобальной группе *N. meningitidis*. Это наблюдение означает, что при условии отсутствия введения вакцинации от W-серогруппы *N. meningitidis* существует опасность очередного подъема заболеваемости менингококковой инфекцией в Санкт-Петербурге. Несмотря на высокую вирулентность, исследуемые изоляты проявляют по большей части чувствительность к основным используемым антибиотикам - пенициллину, рифампицину, хлорамфениколу, ципрофлоксацину, макролидам и фторхинолонам, что согласуется с общей концепцией «чем выше вирулентность - тем меньше резистентность» [28].

В нашей выборке присутствовало 6 изолятов, проявляющих резистентность к

рифампицину и хлорамфениколу, один из которых превысил уровень чувствительности к рифампицину в 4 раза, что послужило причиной пристального изучения именно этого изолята - 694. Для поиска детерминант резистентности у изолята 694 был использован близкородственный, чувствительный к антибиотикам изолят 212, но отличающийся 12-ю SNP. В ходе анализа SNP было установлено наличие делеции N-терминального участка *OrgE* - фосфоэтаноламинтрансферазы периплазматических гликанов. Делеция была обусловлена появлением инсерции гуанина в 412 позиции и последующим появлением стоп-кодона, что привело к обособлению *LptA* - домена фосфоэтаноламинтрансферазы липида А. *OrgE*, ранее называемый *YbiP*, располагается на внутренней мембране клеточной стенки бактерий, участвует в определении пермеабильности, гидрофобности и образовании липидных рафтов за счет конвертирования осморегулируемых периплазматических гликанов и фосфадиетанолamina в диацилглицерол, который впоследствии конвертируется в фосфатидилсерин [60]. *OrgE* - состоит из двух доменов: трансмембранного и периплазматического. Согласно моделированию, проведенного с помощью сервиса Quick2D, *OrgE* трансмембранный домен *N. meningitidis* в норме простирается с 11 по 156 аминокислоту. Из-за мутации у изолята 694 трансмембранный домен укорочен, его длина - 26 п.н. Рифампицин, как и хлорамфеникол, липофильный антибиотик. Рифампицин связывается с РНК- полимеразой и ингибирует таким образом элонгацию тРНК. Особенностью рифампицина является его активность против активно растущих бактерий. Хлорамфеникол, в свою очередь, связывается с 50S или 30S субъединицей рибосомы и ингибирует синтез белка. Исходя из имеющихся литературных данных [60], можно предположить, что формирование устойчивости к антибиотикам обусловлено сниженной проницаемостью и повышенной гидрофильностью мембраны *N. meningitidis*, однако сам механизм устойчивости остается неясным, для его изучения требуются исследования *in vivo*. Полученные данные представляют собой широкий простор для дальнейших исследований механизмов резистентности и вирулентности *in vivo* и *in silico*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на результаты, достигнутые в области профилактики и лечения менингококковой инфекции, генерализованные формы этого заболевания по-прежнему остаются серьезной проблемой общественного здравоохранения. *N. meningitidis* является комменсалом носоглотки человека и вызывает бессимптомное носительство приблизительно у 10% населения планеты [69]. Основным фактором, влияющим на распространение менингококков, является скученность совместного проживания, что облегчает аэрозольный путь передачи штаммов *N. meningitidis*. К декретированным группам, имеющим высокую частоту менингококкового носительства из-за действия этого фактора, относят, прежде всего, военнослужащих и студентов учебных заведений [133]. Высокие показатели носительства менингококков отмечались у военнослужащих во многих странах. В исследовании, проведенном в Норвегии, показатели носительства у военнослужащих превышали 70% [42]. Среди студентов в первые месяцы учебного года число здоровых носителей *N. meningitidis* также быстро растет, и значительная часть этого увеличения происходит в течение первой недели обучения. Так, например, исследование, проведенное в университете Ноттингема (Англия), показало, что количество бессимптомных носителей среди студентов составило 6,9% в 1-й день обучения, 11,2% во 2-й день обучения, 19,0% в 3-й день обучения и 23,1% в 4-й день. По мнению авторов этот рост вызвало значительное социальное смешение обучающихся [126].

Приведенные данные не оставляют сомнения в том, что закрытые и полужакрытые по условиям размещения и жизнедеятельности коллективы молодых людей, каковыми являются студенты начальных курсов университетов и военнослужащие, представляют собой максимально благоприятную среду для циркуляции штаммов *N. meningitidis*.

За повышенный уровень опасных для жизни генерализованных форм менингококковой инфекции – менингита и/или сепсиса, ответственны несколько генотипов, принадлежащих к гиперинвазивным линиям, обладающих эпидемическим

и пандемическим потенциалом [38, 105]. Взаимосвязь между риском развития инвазивных форм болезни и широкой распространенностью бессимптомного носительства менингококков в носоглотке является до настоящего времени не до конца изученной комплексной проблемой, зависящей как от биологических особенностей менингококков, так и человека. Однако, рост заболеваемости генерализованной формой менингококковой болезни пропорционален росту носоглоточного носительства [43, 128]. Развитие инвазивных форм заболевания, сохраняющих до настоящего времени летальность 8-15% [17], можно предотвратить путем проведения эффективных программ вакцинации и экстренной химиопрофилактики лиц, находившихся в тесном контакте с больным или носителем изолятов гиперинвазивной линии.

В настоящем исследовании для оценки популяции менингококков, циркулирующих в Санкт-Петербурге, был применен комплекс оптимизированных молекулярно-генетических и классических культуральных методов детекции, типирования и оценки антибиотикочувствительности. В ходе исследования было осуществлено выделение и типирование 98 культур *N. meningitidis*, а также детекция и типирование ДНК менингококков из 193 образцов крови и цереброспинальной жидкости от пациентов с подозрением на генерализованную форму менингококковой инфекции и из 1598 образцов назофарингеального секрета от здоровых молодых людей.

Установлено, что частота положительных результатов при детекции *N. meningitidis* методом ПЦР варьировала от 29% до 64%, что существенно выше, чем при использовании классического культурального (бактериологического) метода, при котором частота положительных находок находилась в интервале от 8% до 32%. Кроме этого, применение ПЦР обеспечивает получение результатов на 24 – 48 часов быстрее в сравнении с классическими культуральными методами выделения жизнеспособных культур. Применение комплекса молекулярных методов для диагностики менингококковой инфекции не исключает необходимость проведения

исследований классическими культуральными методами для выделения жизнеспособных культур возбудителя, необходимых для оценки его антибиотикочувствительности и углубленной генетической характеристики.

Внедрение оптимизированного алгоритма типирования, позволяет в короткие сроки (1,5-2 часа) обнаружить и определить серогруппу большинства менингококков (капсульных и бескапсульных) непосредственно из биологического материала.

Таким образом, полученные результаты позволяют рекомендовать в качестве приоритетного комплекс молекулярных методов для диагностики менингококковой инфекции и типирования возбудителя в повседневной практике.

Несмотря на то, что устойчивость возбудителя к антибиотикам, используемым для профилактики и лечения менингококковой инфекции, до настоящего времени остается относительно редким явлением, не следует игнорировать участвовавшие в последнее десятилетие случаи выделения на разных континентах изолятов *N. meningitidis* со сниженной чувствительностью к этим препаратам [27, 206]. Однако выявление таких изолятов затруднено из-за отсутствия стандартизации методов оценки чувствительности.

В ходе анализа сравнения методов оценки антибиотикочувствительности менингококков было установлено, что при использовании метода серийных разведений в бульоне 12,2% изолятов оцениваются как ложноустойчивые, что подтверждается данными генетического анализа. Метод серийных разведений в бульоне не может быть рекомендован для повседневной практики, несмотря на наличие таких рекомендаций в документах CLSI и EUCAST, что, возможно, объясняется известной вариабельностью роста менингококков на жидких питательных средах различного состава и даже на разных партиях одной и той же бульонной среды [130]. Для повседневной практики могут быть рекомендованы методы серийных разведений в агаре или градиентной диффузии, результаты которых статистически значимо коррелируют с данными генетического анализа ($p < 0,05$).

При оценке чувствительности изолятов *N. meningitidis*, выделенных в ходе

настоящей работы, установлено: среди изолятов, выделенных от больных ГФМИ, сохраняется 100%-я чувствительность к цефтриаксону, меропенему, ципрофлоксацину и хлорамфениколу. Среди изолятов, выделенных от носителей - 100%-я чувствительность к цефтриаксону, меропенему, ципрофлоксацину. Чувствительность к рифампицину составила 92%. При этом не было выявлено корреляции между уровнем резистентности и серогрупповой принадлежностью выделенных штаммов ($p > 0,05$), что является основой предположения о формировании устойчивости в результате развития процессов на локальном популяционном уровне [119, 153]. Полученные данные позволили рекомендовать в качестве препаратов выбора для лечения менингококковых инфекций цефалоспорины третьего поколения (цефтриаксон или цефотаксим), а для профилактики – ципрофлоксацин или цефтриаксон или рифампицин с учетом возрастных ограничений. В то же время необходимо обратить внимание на появление изолятов менингококков со сниженной чувствительностью к пенициллину, обусловленной аминокислотными заменами в ПСБ2. Несмотря на то, что этот факт не имеет существенного клинического значения, формирование устойчивости к пенициллину может быть первым шагом развития устойчивости к цефалоспорином III поколения, составляющим основу лечения менингококковых инфекций. Уместно указать, что такая траектория развития устойчивости к бета-лактамам описана у гонококков – бактерий максимально генетически родственных с менингококками [77].

В ходе настоящего исследования были получены результаты, важные для понимания популяционной структуры менингококков в Санкт-Петербурге и их связи с генетическими линиями в других регионах. Выделенные менингококки относились к 8-ми клональным комплексам и 12 сиквенс-типам, три из которых (ST-1136 (cc1136), ST-2146 (cc198) и ST-9126 (cc174)) ранее в России не встречались. В настоящем исследовании изолят ST-1136 (cc1136) был выделен от здорового носителя. Изоляты этого сиквенс-типа с высокой частотой выделяли от здоровых носителей в Польше [98], Чехии [82], Греции [179] и Бразилии [118]. Негруппируемый изолят ST-2146

(cc198) был выделен в Санкт-Петербурге также от здорового носителя, имеются сообщения о выделении изолятов этого сиквенс-типа от носителей в Китае [198, 201, 202]. На сегодняшний день информация о распространении ST-9126 (cc174) имеется в единичных публикациях. Так, по данным британских исследователей с 2010/11 год по 2018/19 год, вышеупомянутый сиквенс-тип (ST-9126) был выделен лишь однажды, из крови и детектирована принадлежность к серогруппе В [192]. В нашем исследовании *N. meningitidis* ST-9126 был выделен от больного с принадлежностью к серогруппе С.

Особое внимание и беспокойство в последние годы вызывает распространение *N. meningitidis* ST-11 (cc11), связанного с высокими показателями летальности [105]. Генетическая линия W-ST11 в 2000 году вызвала вспышку среди паломников, совершающих Хадж, а затем распространилась в Африканском «поясе менингита», Южной Африке, Южной Америке, Европе, Австралии [123]. Изоляты серогруппы С-ST-11 вызывали вспышки среди мужчин, вступающих в половые связи с мужчинами, было установлено, что возбудителем стал менингококк [100].

В результате филогенетического анализа изолятов *N. meningitidis*, гипервирулентной генетической линии W-ST11, выделенных в Санкт-Петербурге в ходе настоящего исследования, и изолятов, выделенных в Москве (данные, получены из общедоступной базы данных GenBank), установлено, что в пределах глобального кластера Najj штаммы из Российской Федерации образуют отдельную генетическую линию, наиболее близкую к англо-французской и шведской кладам кластера. В свою очередь, российская линия подразделяется на три сублинии, штаммы, относящиеся к одной из них, встречаются в Москве, а к двум другим – в Санкт-Петербурге.

Из вышеизложенного следует, что серологический и молекулярно-биологический мониторинг выделенных менингококков является одним из важнейших параметров эпидемиологического надзора за менингококковой инфекцией, поскольку его результаты можно использовать для прогнозирования

течения эпидемического процесса и выбора научно-обоснованной программы иммунопрофилактических мероприятий. До настоящего времени вакцинация против возбудителей менингококковой инфекции не входит в Национальный календарь прививок, за исключением регионального календаря профилактических прививок г. Москвы, хотя чередование четких временных периодов подъема и спада заболеваемости указывает на возможность начала очередного периодического подъема.

Опыт многих стран, реализовавших программы массовой вакцинации против менингококковой инфекции, убедительно свидетельствует, что применение полисахаридных или конъюгированных вакцин приводит к вытеснению серогрупп, входящих в состав вакцин и распространению новых. Так, в Европе, Северной и Латинской Америке на фоне применения полисахаридных вакцин (против менингококков серогрупп А, С, W, Y) широко распространилась серогруппа В [186].

В ходе нашего исследования в Санкт-Петербурге среди *N. meningitidis*, выделенных от больных генерализованными формами, выявлено преобладание серогруппы В (45%), при этом в целом по Российской Федерации в 2021 году преобладала серогруппа А (27%), а на серогруппу В приходилось 13% [15]. Эти данные свидетельствуют о необходимости учитывать локальные особенности при определении стратегии вакцинации от менингококковой инфекции. Если в большинстве регионов России удовлетворительный охват возможен при использовании квадριвалентной вакцины (ACWY), то в Санкт-Петербурге необходимо вакцинировать и против серогруппы В. Обращает на себя внимание также тот факт, что генерализованные формы менингококковой инфекции вызывают преимущественно изоляты *N. meningitidis* серогруппы В, а среди носителей преобладают изоляты *N. meningitidis* серогруппы W.

Стоит отметить, что только в региональном календаре профилактических прививок г. Москвы предусмотрена вакцинация детей 3-6 лет против менингококковой инфекции перед поступлением в детские дошкольные

образовательные учреждения, на остальной территории Российской Федерации вакцинируют только по эпидемическим показаниям и лиц, подлежащих призыву на военную службу (приложение №2 к приказу МЗ РФ от 06 декабря 2021 года №1122Н). Имеющиеся вакцины в Российской Федерации, «Менинго А+С», «Менцевакс», «Менактра» направлены против менингококков серогрупп А, С, W, Y. Можно предположить, что со временем произойдет изменение серотипового состава циркулирующих штаммов менингококков, это приведет к распространению менингококков серогруппы B, однако возможности вакцинопрофилактики инфекций, вызываемых бактериями этой серогруппы ограничены.

На сегодняшний день в мире существуют две субкапсульные белковые вакцины против менингококков серогруппы B: 4CMenB (Bexsero; GSK) и rLP2086 (Trumenb; Pfizer, Inc.). Вакцина 4CMenB зарегистрирована в Российской Федерации в 2022.

Принципиальным моментом, ограничивающим эффективность субкапсульных вакцин, является вариабельность в менингококковой популяции аминокислотных последовательностей перечисленных белков-мишеней [90, 158].

По нашим данным, у двух из семи изолятов из Санкт-Петербурга фактор H, связывающий белок (fHbp_peptide:37) проявляет перекрестную реактивность с антителами к fHbp вакцины 4CMenB. В трех случаях из семи имеется перекрестная реактивность компонентов вакцины rLP2086 с антигенами изолятов: fHbp_peptide:25. Следует отметить, что ни в одном из изученных изолятов не было обнаружено полного соответствия с рекомбинантными белками вакцин. Для большинства изолятов из Санкт-Петербурга в настоящее время невозможно прогнозировать протективный эффект обеих субкапсульных вакцин поскольку структуры белков-мишеней ранее не были описаны. Таким образом, на основании полученных ограниченных данных можно предположить, что вакцина 4CMenB обеспечивает охват 28,6% менингококков серогруппы B, циркулирующих в Санкт-Петербурге, а вакцина rLP2086 – 42,9%.

Следовательно, несоответствие структуры антигенов, входящих в вакцины

Trumenba, Bexsero, и антигенов менингококков, выделенных в Санкт-Петербурге, не позволяет рассчитывать на получение защитного эффекта при вакцинации, указанной вакцинами в этом регионе. Ограниченность полученных данных не позволяет их экстраполировать на всю территорию Российской Федерации. Очевидно, что для принятия решения о возможности использования этих вакцин для массовой вакцинации необходимо проведение дополнительных масштабных исследований.

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 эпсилOMETрический (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 – ципрофлоксацин 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 МИС-полосок (Е-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 – ципрофлоксацин 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.

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ

- ВМА – Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова
- ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения
- ГФМИ – генерализованная форма менингококковой инфекции
- ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота
- МПК – минимальная подавляющая концентрация
- ЛПС – липополисахарид
- П. н. – пар нуклеотидов
- ПСБ – пенициллинсвязывающий белок
- ПЦР – полимеразно-цепная реакция
- РНК – рибонуклеиновая кислота
- СС – clonal complex (клональный комплекс)
- CDC – Centers for Disease Control and Prevention (Центр по контролю и профилактике заболеваний)
- CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute (Институт клинических и лабораторных стандартов)
- Cnl – capsule null locus (нулевой локус капсулы)
- EUCAST – European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (Европейский комитет по тестированию чувствительности к противомикробным препаратам)
- MALDI-TOF – Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight (временнoлетная масс-спектрометрия)
- MenA - *N. meningitidis* серогруппы А
- MenB - *N. meningitidis* серогруппы В
- MenC - *N. meningitidis* серогруппы С
- MenE - *N. meningitidis* серогруппы Е
- MenX - *N. meningitidis* серогруппы Х
- MenY - *N. meningitidis* серогруппы Y

MenW - *N. meningitidis* серогруппы W

MLEE - Multilocus Enzyme Electrophoresis (мультилокусный электрофорез ферментов)

MLST - Multilocus Sequence Typing (мультилокусное сиквенс-типирование)

NHBA - Neisseria Heparin-Binding Antigen (гепарин связывающий антиген)

Nm - *N. meningitidis*

SNP - single nucleotide polymorphism (единичная нуклеотидная замена)

ST - sequence type (сиквенс-тип)

WGS – Whole Genome Sequencing (полногеномное секвенирование)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Клинические рекомендации (протокол лечения) оказания медицинской помощи детям больным менингококковой инфекцией. – Санкт-Петербург: ФГБУ научно-исследовательский институт детских инфекций ФМБА России, 2015. – 80 с.
2. Клинические рекомендации. Менингококковая инфекция у взрослых. Менингококкемия. – М.: Кафедра инфекционных болезней и эпидемиологии ГБОУ ВПО "МГМСУ им. А.И. Евдокимова" Минздрава России, 2015. – 69 с.
3. Королева, И.С. Менингококковая инфекция и гнойные бактериальные менингиты в Российской Федерации: десятилетнее эпидемиологическое наблюдение / И.С. Королева, Г.В. Белошицкий, М.А. Королева, И.М. Закроева, Л.В. Спирихина, К.О. Миронов, Г.А. Шипулин // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. – 2013. - №2. – С. 15-20.
4. Королева, М.А. Динамика чувствительности к антибактериальным препаратам московских инвазивных штаммов *Neisseria meningitidis* в 2006 – 2015 годах / М.А. Королева, И.С. Королева, И.М. Закроева, И.М. Грубер // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2016. – Т. 3, №88. – С. 7-14.
5. Королева, М.А. Эпидемиологический надзор за гнойными бактериальными менингитами и меры профилактики: дисс. ... д-ра мед. наук: 3.2.2 / Королева Мария Александровна. – М., 2021. – 342 с.
6. Костюкова, Н.Н. Менингококковая инфекция в России: прошлое и ближайшие перспективы / Н.Н. Костюкова, В.А. Бехало, Т.Ф. Чернышова // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. – 2014. - №2. – С. 73-79.
7. Костюкова, Н.Н. Менингококковое носительство: эпидемиология, возбудитель, формирование иммунной защиты / Н.Н. Костюкова, В.А. Бехало // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2017. – Т. 16, №5. – С. 87-97.
8. Лобзин, Ю.В. Современные клиничко- эпидемиологические особенности течения генерализованной менингококковой инфекции и новые возможности терапии

/ Ю.В. Лобзин, М.В. Иванова, Н.В. Скрипченко, А.А. Вильниц, В.Е. Карев, Е.Ю. Горелик, К.В. Средняков, А.И. Конев // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. – 2018. – Т. 7, №1. – С. 69-77.

9. Матосова, С.В. Молекулярно-биологический мониторинг возбудителей гнойного бактериального менингита на современном этапе / С.В. Матосова, К.О. Миронов, А.Е. Платонов, О.Ю. Шипулина, Г.А. Шипулин, М.В. Нагибина, Ю.Я. Венгеров // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. – 2018. – Т. 7, №1. – С. 93-99.

10. Миронов, К.О. Генетическое типирование *Neisseria meningitidis*, циркулирующих в регионах России / К.О. Миронов, М.А. Королева, А.Е. Платонов, И.С. Королева, Г.А. Шипулин // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. – 2013. - №2. – С. 36-40.

11. Миронов, К.О. Характеристика *Neisseria meningitidis* серогруппы W, циркулирующих на территории Москвы, с помощью массового параллельного секвенирования / К.О. Миронов, В.А. Животова, С.В. Матосова // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2017. – Т. 4, №95. – С. 33-38.

12. Нагибина М.В. Генерализованная форма менингококковой инфекции, вызванная *N. meningitidis* серогруппы W, на территории г. Москвы в 2011-2016 гг. / М.В. Нагибина, Ю.Я. Венгеров, С.В. Матосова, К.О. Миронов, А.Е. Платонов, Т.С. Свистунова, Д.В. Чернышов, Т.Ю. Смирнова, В.А. Кадышев, Г.Э. Рыжов // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. – 2018. – Т. 7, №1(24). – С. 100-105.

13. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2019 году: Государственный доклад. – М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2020. – С.177-178.

14. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2020 году: Государственный доклад. – М.: Федеральная

служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2021. – С.165-166.

15. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2021 году: Государственный доклад. – М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2022. – С. 214-215.

16. Платонов, А.Е. История изучения менингококковой инфекции и бактериальных менингитов (1661-1961 гг.) / А.Е. Платонов, О.В. Платонова, В.В. Малеев // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. – 2019. - №1. – С. 100-106.

17. Скрипченко, Н.В. Нейроинфекции у детей в современных условиях / Н.В. Скрипченко, А.А. Вильниц, Е.Ю. Скрипченко, М.В. Иванова, В.Е. Карев, Е.Ю. Горелик, М.В. Бухалко // Практическая медицина. – 2017. – Т. 10 (111). – С. 7-15.

18. Стандарты эпиднадзора за управляемыми инфекциями, второе издание [Surveillance standards for vaccine-preventable diseases, second edition. Лицензия: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. – Женева, 2018.

19. Achaz G. Origin and fate of repeats in bacteria / G. Achaz, E.P. Rocha, P. Netter, E. Coissac // Nucleic Acids Res. – 2002. – Vol. 30 (13). – P. 2987-2994.

20. Alemayehu, T. Nasal carriage rate and antibiotic susceptibility pattern of *Neisseria meningitidis* in healthy Ethiopian children and adolescents: A cross-sectional study / T. Alemayehu, A. Mekasha, T. Abebe // PLoS One. – 2017. – Vol. 12 (10). – P. 187-207.

21. Andreae, C.A. Bioinformatic analysis of meningococcal Msf and Opc to inform vaccine antigen design / C.A. Andreae, R.B. Sessions, M. Virji, D.J. Hill // PLoS One. – 2018. – Vol. 13 (3). – P. 193-194.

22. Antignac, A. Correlation between alterations of the penicillin-binding protein 2 and modifications of the peptidoglycan structure in *Neisseria meningitidis* with reduced susceptibility to penicillin G / A. Antignac, I.G. Boneca, J.C. Rousselle, A. Namane, J.P.

Carrier // J Biol Chem. – 2003. – Vol. 278 (34). – P. 31529-31535.

23. Aye, A.M.M. Meningococcal disease surveillance in the Asia-Pacific region (2020): The global meningococcal initiative / A.M.M. Aye, X. Bai, R. Borrow, D.A. Caugant, C.S. Chiou // J Infect. – 2020. – Vol. 81 (5). – P. 698-711.

24. Bandelt, H.J. Split decomposition: a new and useful approach to phylogenetic analysis of distance data / H.J. Bandelt, A.W. Dress // Mol Phylogenet. Evol. – 1992. – Vol. 1 (3). – P. 242- 52.

25. Bankevich, A. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing / A. Bankevich, S. Nurk, D. Antipov, A.A. Gurevich, M. Dvorkin // J Comput. Biol. – 2012. – Vol. 19 (5). – P. 455-77.

26. Banzhoff, A. Multicomponent meningococcal B vaccination (4CMenB) of adolescents and college students in the United States / A. Banzhoff // Therapeutic Advances in Vaccines. – 2017. – Vol. 5 (1). – P. 3-14.

27. Batty, E.M. The spread of chloramphenicol- resistant *Neisseria meningitidis* in Southeast Asia / E.M. Batty, T.P. Cusack, J. Thaipadungpanit, W. Watthanaworawit, V. Carrara, S. Sihalath // Int. J. Infect. Dis. – 2020. – Vol. 95. – P. 198-203.

28. Beceiro, A., Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world? / A. Beceiro, M. Tomas, G. Bou // Clin. Microbiol. Rev. – 2013. – Vol. 26 (2). – P. 185-230.

29. Beddek, A.J. Evidence for capsule switching between carried and disease-causing *Neisseria meningitidis* strains / A.J. Beddek, M.S. Li, J.S. Kroll, T.W. Jordan // Infect. Immun. – 2009. – Vol. 77 (7). – P. 2989-2994.

30. Bennett, D.E. Antibiotic susceptibility and molecular analysis of invasive *Neisseria meningitidis* recovered in the Republic of Ireland, 1996 to 2016 / D.E. Bennett, K.L. Meyler, M.T. Cafferkey, R.J. Cunney // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. – 2021. – Vol. 40 (6). – P. 1127- 1136.

31. Bennett, J.S. A genomic approach to bacterial taxonomy: an examination and proposed reclassification of species within the genus *Neisseria* / J.S. Bennett, K.A. Jolley,

S.G. Earle, C. Corton, S.D. Bentley, J. Parkhill // *Microbiology (Reading)*. – 2012. – Vol. 158 (6). – P. 1570-1580.

32. Beran, J. Immunogenicity and Safety of Investigational MenABCWY Vaccine and of 4CMenB and MenACWY Vaccines Administered Concomitantly or Alone: a Phase 2 Randomized Study of Adolescents and Young Adults / J. Beran, D. Dražan, I. Enweonye, C. Bhusal, D. Toneatto // *mSphere*. – 2021. – Vol. 6 (6). – P. 521-553.

33. Berti, F. Carbohydrate based meningococcal vaccines: past and present overview / F. Berti, M.R. Romano, F. Micoli, R. Adamo // *Glycoconjugate Journal*. – 2021. – Vol. 38 (4). – P. 401-409.

34. Bettencourt, C. Genomic surveillance of *Neisseria meningitidis* serogroup W in Portugal from 2003 to 2019 / C. Bettencourt, A. Nunes, J.P. Gomes, M.J. Simoes // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* – 2021. – Vol. 41 (2). – P. 289-298.

35. Bontemps-Gallo, S. New insights into the biological role of the osmoregulated periplasmic glucans in pathogenic and symbiotic bacteria / S. Bontemps-Gallo, J.M. Lacroix // *Environ. Microbiol. Rep.* – 2015. – Vol. 7 (5). – P. 690-697.

36. Booy, R. Recent changes in the epidemiology of *Neisseria meningitidis* serogroup W across the world, current vaccination policy choices and possible future strategies/ R. Booy, A. Gentile, M. Nissen, J. Whelan, V. Abitbol // *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. – 2019. – Vol. 15 (2). – P. 470-480.

37. Borrow, R. The Global Meningococcal Initiative: global epidemiology, the impact of vaccines on meningococcal disease and the importance of herd protection / R. Borrow, P. Alarcon, J. Carlos, D.A. Caugant, H. Christensen, R. Debbag // *Expert Rev. Vaccines*. – 2017. – Vol. 16 (4). – P. 313-328.

38. Borrow, R. Meningococcal disease in the Middle East and Africa: Findings and updates from the Global Meningococcal Initiative / R. Borrow, D.A. Caugant, M. Ceyhan, H. Christensen, E.C. Dinleyici, J. Findlow, L. Glennie, A. Von Gottberg, A. Kechrid, J. Vázquez Moreno, A. Razki, V Smith, M.K. Taha, H. Tali-Maamar, K. Zerouali // *J. Infect.* – 2017. – Vol. 75 (1). – P. 1-11.

39. Bratcher, H.B. Genome Sequencing and Interrogation of Genome Databases: A Guide to *Neisseria meningitidis* Genomics / H.B. Bratcher, O.B. Harrison, M.C.J. Maiden // Methods Mol. Biol. – 2019. – Vol. 1969. – P. 51-82.
40. Brehony, C. Distribution of Bexsero(R) Antigen Sequence Types (BASTs) in invasive meningococcal disease isolates: Implications for immunization / C. Brehony, C.M.C. Rodrigues, R. Borrow, A. Smith, R. Cunney, E.R. Moxon, M.C.J. Maiden // Vaccine. – 2016. – Vol. 34 (39). – P. 4690-4697.
41. Caugant, D.A. *Neisseria meningitidis*: using genomics to understand diversity, evolution and pathogenesis / D.A. Caugant, O.B. Brynildsrud // Nat. Rev. Microbiol. – 2020. – Vol. 18 (2). – P. 84- 96.
42. Caugant, D.A. Clonal diversity of *Neisseria meningitidis* from a population of asymptomatic carriers / D.A. Caugant, B.E. Kristiansen, L.O. Froholm, K. Bovre, R.K. Selander // Infect. Immun. – 1988. – Vol. 56 (8). – P. 2060-2068.
43. Caugant, D.A. Meningococcal carriage and disease—Population biology and evolution / D.A. Caugant, M.C.J. Maiden // Vaccine. – 2009. – Vol. 27. – P. 64-70.
44. Chan, M.S. Database-driven multi locus sequence typing (MLST) of bacterial pathogens / M.S. Chan, M.C.J. Maiden, B.G. Spratt // Bioinformatics. – 2001. – Vol. 17 (11). – P. 1077-83.
45. Chen, M. Meningococcal Quinolone Resistance Originated from Several Commensal *Neisseria* Species / M. Chen, C. Zhang, X. Zhang // Antimicrob Agents Chemother. – 2020. – Vol. 64 (2).
46. Chen, W.H. Safety and immunogenicity of a pentavalent meningococcal conjugate vaccine containing serogroups A, C, Y, W, and X in healthy adults: a phase 1, single-centre, double-blind, randomised, controlled study / W.H. Chen, K.M. Neuzil, C.R. Boyce, M.F. Pasetti, M.K. Reymann, L. Martellet, N. Hosken // Lancet Infect. Dis. – 2018. – Vol. 18 (10). – P. 1088-1096.
47. Cingolani, P. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain

w1118; iso-2; iso-3 / P. Cingolani, A. Platts, L. Wang, M. Coon, T. Nguyen, S.J. Land, X. Lu, D.M. Ruden // *Fly (Austin)*. – 2012. – Vol. 6 (2). – P. 80-92.

48. Clemence, M.E.A. Characterization of capsule genes in non-pathogenic *Neisseria* species / M.E.A. Clemence, M.C.J. Maiden, O.B. Harrison // *Microb. Genom.* – 2018. – Vol. 4 (9).

49. CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute. - 2012.

50. Collaborators, G.B.D.R.F. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks in 188 countries, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013 / G.B.D.R.F. Collaborators, M.H. Forouzanfar, L. Alexander, V.F. Bachman, S. Biryukov, M. Brauer, R. Burnett, D. Casey, M.M. Coates // *Lancet*. – 2015. – Vol. 386 (10010). – P. 2287-323.

51. De Oliveira, D.M.P. Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens / De D.M.P. Oliveira, B.M. Forde, T.J. Kidd, P.N.A. Harris, M.A. Schembri, S.A. Beatson, D.L. Paterson, M.J. Walker // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2020. – Vol. 33 (3). – P. 181-190.

52. Diallo, K. Development of a PCR algorithm to detect and characterize *Neisseria meningitidis* carriage isolates in the African meningitis belt / K. Diallo, M.D. Coulibaly, L.S. Rebbetts, O.B. Harrison, J. Lucidarme, K. Gamougam // *PLoS One*. – 2018. – Vol. 13 (12). – P. 1-16.

53. Dolan Thomas, J. sodC-based real-time PCR for detection of *Neisseria meningitidis* / J. Dolan Thomas, C.P. Hatcher, D.A. Satterfield, M.J. Theodore, M.C. Bach, K.B. Linscott, X. Zhao, X. Wang // *PLoS One*. – 2011. – Vol. 6 (5). – P. e19361.

54. Donnelly, J. Qualitative and quantitative assessment of meningococcal antigens to evaluate the potential strain coverage of protein-based vaccines / J. Donnelly, D. Medini, G. Boccadifuoco, A. Biolchi, J. Ward, C. Frasch, E.R. Moxon, M. Stella, M. Comanducci //

Proc. Natl. Acad. Sci U S A. – 2010. – Vol. 107 (45). – P. 19490-19495.

55. Dretler, A.W. Progress toward the global control of *Neisseria meningitidis*: 21st century vaccines, current guidelines, and challenges for future vaccine development / A.W. Dretler, N.G. Roupael, D.S. Stephens // Human Vaccines & Immunotherapeutics. – 2018. – Vol. 14 (5). – P. 1146-1160.

56. Edmond, K. Global and regional risk of disabling sequelae from bacterial meningitis: a systematic review and meta-analysis / K. Edmond, A. Clark, V.S. Korczak, C. Sanderson, U.K. Griffiths, I. Rudan // Lancet Infect. Dis. – 2010. – Vol. 10 (5). – P. 317-328.

57. Epidemiology and prevention of vaccine-preventable diseases. – Washington DC: Public Health Foundation. - 2015.

58. Eriksson, L. Whole-Genome Sequencing of Emerging Invasive *Neisseria meningitidis* Serogroup W in Sweden / L. Eriksson, S.T. Hedberg, S. Jacobsson, H. Fredlund, P. Mölling, B. Stenmark // J. Clin. Microbiol. – 2018. – Vol. 56 (4). – P. e01409-17.

59. Ewels, P. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report / P. Ewels, M. Magnusson, S. Lundin, M. Käller // Bioinformatics. – 2016. – Vol. 32 (19). – P. 3047-3048.

60. Falchi, F.A. Mutation and Suppressor Analysis of the Essential Lipopolysaccharide Transport Protein LptA Reveals Strategies To Overcome Severe Outer Membrane Permeability Defects in *Escherichia coli* / F.A. Falchi, E.A. Maccagni, S. Puccio, C. Peano, C. De Castro, A. Palmigiano, D. Garozzo // J. Bacteriol. – 2018. – Vol. 200 (2). - e00487-17.

61. Fazio, C. Cocirculation of Hajj and non-Hajj strains among serogroup W meningococci in Italy, 2000 to 2016 / C. Fazio, A. Neri, P. Vacca, A. Ciammaruconi, M. Arghittu, A.M. Barbui, C. Vocale, P. Bernaschi, P. Isola // Euro Surveill. – 2019. – Vol. 24 (4). - e1800183.

62. Feil, E.J. EBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters

of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data / E.J. Feil, B.C. Li, D.M. Aanensen, W.P. Hanage, B.G. Spratt // *J. Bacteriol.* – 2004. – Vol. 186 (5). – P. 1518-1530.

63. Findlow, J. Vaccines for the prevention of meningococcal capsular group B disease: What have we recently learned? / J. Findlow // *Human Vaccines & Immunotherapeutics.* – 2016. – Vol. 12 (1). – P. 235-238.

64. Flexner, S. The Results of the Serum Treatment in Thirteen Hundred Cases of Epidemic Meningitis/ S. Flexner // *J. Exp. Med.* – 1913. – Vol. 17 (5). – P. 553-576.

65. Flexner, S. An Analysis of Four Hundred Cases of Epidemic Meningitis Treated with the Anti-Meningitis Serum / S. Flexner, J.W. Jobling // *J. Exp. Med.* – 1908. – Vol. 10 (5). – P. 690-733.

66. Galimand, M. High-level chloramphenicol resistance in *Neisseria meningitidis* / M. Galimand, G. Gerbaud, M. Guibourdenche, J.Y. Riou, P. Courvalin // *N. Engl. J. Med.* – 1998. – Vol. 339 (13). – P. 868-74.

67. Gardner, S.N. KSNP3.0: SNP detection and phylogenetic analysis of genomes without genome alignment or reference genome / S.N. Gardner, T. Slezak, B.G. Hall // *Bioinformatics.* – 2015. – Vol. 31 (17). – P. 2877-2878.

68. Garrison, E. Haplotype-based variant detection from short-read sequencing / E. Garrison, G. Marth // [q-bio.GN]. – 2012. – T. arXiv preprint arXiv:1207.3907.

69. Gianhecchi, E. An unwanted guest: *Neisseria meningitidis* - carriage, risk for invasive disease and the impact of vaccination with insight on Italy incidence / E. Gianhecchi, G. Piccini, A. Torelli, R. Rappuoli, E. Montomoli // *Expert Rev. Anti Infect Ther.* – 2017. – Vol. 15 (7). – P. 689- 701.

70. Gorla, M.C. Surveillance of antimicrobial resistance in *Neisseria meningitidis* strains isolated from invasive cases in Brazil from 2009 to 2016 / M.C. Gorla, J.M. Pinhata, U.J. Dias, C. de Moraes, A.P. Lemos // *J Med Microbiol.* – 2018. – Vol. 67 (6). – P. 750-756.

71. Gurevich, A. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies / A. Gurevich, V. Saveliev, N. Vyahhi, G. Tesler // *Bioinformatics.* – 2013. – Vol. 29 (8). – P.

1072-1075.

72. Halperin, S.A. The changing and dynamic epidemiology of meningococcal disease / S.A. Halperin, J.A. Bettinger, B. Greenwood, L.H. Harrison, J. Jelfs, S.N. Ladhani, P. McIntyre, M.E. Ramsay, M.A. Sáfadi // *Vaccine*. – 2012. – Vol. 30 (2). – P. 26-36.

73. Hamed, M.M. Molecular characteristics of *Neisseria meningitidis* in Qatar / M.M. Hamed, F.A. Mir, E.B.I. Elmagboul, A. Al-Khal, M.A.R.S.A. Maslamani, A.S. Deshmukh, H.E. Al-Romaihi, M.A.M.S. Janahi, F.B. Abid, A.S.A. Kashaf, G. Sher, V.K. Gupta, G.J. Wilson, J. Kadalayi, S.H. Doiphode // *Sci Rep*. – 2021. – Vol. 11 (1). – P. 4812.

74. Harrison, L.H. Global epidemiology of meningococcal disease / L.H. Harrison, C.L. Trotter, M.E. Ramsay // *Vaccine*. – 2009. – Vol. 27 (2). – P. 51-63.

75. Harrison, O.B. Genomic Analysis of the Evolution and Global Spread of Hyper-invasive Meningococcal Lineage 5 / O.B. Harrison, J.E. Bray, M.C. Maiden, D.A. Caugant // *EBioMedicine*. – 2015. – Vol. 2 (3). – P. 234-243.

76. Harrison, O.B. Description and nomenclature of *Neisseria meningitidis* capsule locus / O.B. Harrison, H. Claus, Y. Jiang, J.S. Bennett, H.B. Bratcher, K.A. Jolley, C. Corton, R. Care, J.T. Poolman, W.D. Zollinger // *Emerging infectious diseases*. – 2013. – Vol. 19 (4). – P. 566- 573.

77. Harrison, O.B. Genomic analyses of *Neisseria gonorrhoeae* reveal an association of the gonococcal genetic island with antimicrobial resistance / O.B. Harrison, M. Clemence, J.P. Dillard, C.M. Tang, D. Trees, Y.H. Grad, M.C. Maiden // *J. Infect.* – 2016. – Vol. 73 (6). – P. 578-587.

78. Harrison, O.B. *Neisseria* genomics: current status and future perspectives / O.B. Harrison, C. Schoen, A.C. Retchless, X. Wang, K.A. Jolley, J.E. Bray, M.C.J. Maiden // *Pathog. Dis.* – 2017. – Vol. 75 (6).

79. Hill, D.M.C. Genomic epidemiology of age-associated meningococcal lineages in national surveillance: an observational cohort study / D.M.C. Hill, J. Lucidarme, S.J. Gray, L.S. Newbold, R. Ure, C. Brehony, O.B. Harrison, J.E. Bray, K.A. Jolley, H.B. Bratcher, J. Parkhill, C.M. Tang, R. Borrow, M.C. Maiden // *The Lancet Infectious Diseases*. – 2015. –

Vol. 15 (12). – P. 1420-1428.

80. Historical Aspects / Handbook of Meningococcal Disease // Germany: Wiley-VCH, Weinheim. - 2006. – P. 1–13.

81. Hong, E. Acquisition of Beta-Lactamase by *Neisseria meningitidis* through Possible Horizontal Gene Transfer / E. Hong, A.E. Deghmane, M.K. Taha // Antimicrob. Agents Chemother. – 2018. – Vol. 62 (9). – P. e00831-18.

82. Honskus, M. Whole genome sequencing of *Neisseria meningitidis* W isolates from the Czech Republic recovered in 1984–2017 / M. Honskus, Z. Okonji, M. Musilek, J. Kozakova, P. Krizova // PLOS ONE. – 2018. – Vol. 13. – P. e0199652.

83. Honskus, M. Detailed molecular characterization of *Neisseria meningitidis* isolates by whole genome sequencing (WGS), Czech Republic, 2010- 2019 / M. Honskus, Z. Okonji, M. Musilek, P. Křížová // Epidemiol. Mikrobiol. Imunol. – 2021. – Vol. 70 (3). – P. 168-177.

84. Huson, D.H. SplitsTree: analyzing and visualizing evolutionary data / D.H. Huson // Bioinformatics. – 1998. – Vol. 14 (1). – P. 68-73.

85. Hütter, J. Carbohydrate-Based Vaccines: An Overview / J. Hütter, B. Lepenies // Methods Mol. Biol. – 2015. – Vol. 1331. – P. 1-10.

86. Ikken, Y. The novel biphasic medium for transport, culture and conservation at an ambient temperature of *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* / Y. Ikken, R. Charof, M. Elouennass, Y. Sekhsokh // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2021. – Vol. 37 (11). – P. 187.

87. Invasive meningococcal disease national surveillance report / National Center for Immunization and Respiratory Diseases Office of Infectious Diseases - 2019.

88. Jafri, R.Z. Global epidemiology of invasive meningococcal disease / R.Z. Jafri, A. Ali, N.E. Messonnier, C. Tevi-Benissan, D. Durrheim, J. Eskola, F. Fermon, K.P. Klugman, M. Ramsay, S. Sow, S. Zhujun, Z.A. Bhutta, J. Abramson // Popul Health Metr. – 2013. – Vol. 11 (1). – P. 17.

89. Jennings, M.P. The genetic basis of the phase variation repertoire of

lipopolysaccharide immunotypes in *Neisseria meningitidis* / M.P. Jennings, Y.N. Srikhanta, E.R. Moxon, M. Kramer, J.T. Poolman, B. Kuipers, P. van der Ley // *Microbiology (Reading)*. – 1999. – Vol. 145 (11). – P. 3013-3021.

90. Jiang, H.Q. Broad vaccine coverage predicted for a bivalent recombinant factor H binding protein based vaccine to prevent serogroup B meningococcal disease / H.Q. Jiang, S.K. Hoiseth, S.L. Harris, L.K. McNeil, D. Zhu, C. Tan, A.A. Scott, K. Alexander, K. Mason, L. Miller // *Vaccine*. – 2010. – Vol. 28 (37). – P. 6086-6093.

91. Jolley, K.A. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications / K.A. Jolley, J.E. Bray, M.C.J. Maiden // *Wellcome Open Res*. – 2018. – Vol. 3. – P. 124.

92. Jolley, K.A. Molecular typing of meningococci: recommendations for target choice and nomenclature / K.A. Jolley, C. Brehony, M.C. Maiden // *FEMS Microbiol Rev*. – 2007. – Vol. 31 (1). – P. 89-96.

93. Jolley, K.A. MlstdbNet - distributed multi-locus sequence typing (MLST) databases / K.A. Jolley, M.S. Chan, M.C. Maiden // *BMC Bioinformatics*. – 2004. – Vol. 5. – P. 86.

94. Jolley, K.A. Resolution of a meningococcal disease outbreak from whole-genome sequence data with rapid Web-based analysis methods / K.A. Jolley, D.M. Hill, H.B. Bratcher, O.B. Harrison, I.M. Feavers, J. Parkhill, M.C. Maiden // *J Clin Microbiol*. – 2012. – Vol. 50 (9). – P. 3046-53.

95. Juscamayta-Lopez, E. Emergence of ciprofloxacin-resistant *Neisseria meningitidis* B from asymptomatic carriers during an outbreak in Peru, 2017 / E. Juscamayta-Lopez, F. Valdivia, S. Morales, L.F. Donaires, V. Fiestas-Solórzano, M. Oré, P. Pachas, N. León-Janampa, R. Gavilán // *J Med Microbiol*. – 2021. – Vol. 70 (1). – P. 1-6.

96. Karadag Oncel, E. Surveillance of penicillin resistance of *Neisseria meningitidis* strains from invasive infections between 2013 and 2018 in Turkey / E. Karadag Oncel, M. Ceyhan, S. Tanir Basaranoglu, V. Gurbuz, A.E. Aycan, Y. Ozsurekci, Z. Kurugol // *J Chemother*. – 2020. – Vol. 32 (4). – P. 213-216.

97. Kawasaki, Y. Invasive meningococcal disease due to ciprofloxacin-resistant *Neisseria meningitidis* sequence type 4821: The first case in Japan / Y. Kawasaki, K. Matsubara, H. Takahashi, M. Morita, M. Ohnishi, M. Hori, K. Isome, A. Iwata, H. Nigami, M. Ikemachi, G. Yamamoto, K. Ohkusu // *J Infect Chemother.* – 2018. – Vol. 24 (4). – P. 305-308.
98. Korzeniewski, K. Evaluation of *Neisseria meningitidis* Carriage with the Analysis of Serogroups, Genogroups and Clonal Complexes among Polish Soldiers / K. Korzeniewski, M. Konior // *Pol J Microbiol.* – 2018. – Vol. 67 (4). – P. 493-500.
99. Krone, M. Increase of invasive meningococcal serogroup W disease in Europe, 2013 to 2017 / M. Krone, S. Gray, R. Abad, A. Skoczyńska, P. Stefanelli, A. van der Ende, G. Tzanakaki // *Euro Surveill.* – 2019. – Vol. 24 (14). – P. 1-9.
100. Kupferschmidt, K. Infectious diseases. Bacterial meningitis finds new niche in gay communities/ K. Kupferschmidt // *Science.* – 2013. – Vol. 341 (6144). – P. 328 – 340.
101. Kwong, J.C. Meningotype: in silico typing for *Neisseria meningitidis* / J.C. Kwong, A. da Silva Gonçalves, T.P. Stinear // *Book meningotype: in silico typing for Neisseria meningitidis.* – Editor. - 2017.
102. Li, H. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform / H. Li, R. Durbin // *Bioinformatics.* – 2009. – Vol. 25 (14). – P. 1754-1760.
103. Li, H. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools / H. Li, B. Handsaker, A. Wysoker, T. Fennell, J. Ruan, N. Homer, G. Marth, G. Abecasis, R. Durbin // *Bioinformatics.* – 2009. – Vol. 25 (16). – P. 2078-2079.
104. Lucidarme, J. Genomic resolution of an aggressive, widespread, diverse and expanding meningococcal serogroup B, C and W lineage / J. Lucidarme, D.M. Hill, H.B. Bratcher, S.J. Gray, M. du Plessis, R.S. Tsang, J.A. Vazquez, M.K. Taha, M. Ceyhan, A.M. Efron, M.C. Gorla, J. Findlow, K.A. Jolley, M.C. Maiden, R. Borrow // *J Infect.* – 2015. – Vol. 71 (5). – P. 544-552.
105. Lucidarme, J. Frequent capsule switching in 'ultra- virulent' meningococci - Are we ready for a serogroup B ST-11 complex outbreak? / J. Lucidarme, A. Lekshmi, S.R.

Parikh, J.E. Bray, D.M. Hill, H.B. Bratcher, S.J. Gray, A.D. Carr, K.A. Jolley, J. Findlow, H. Campbell, S.N. Ladhani, M.E. Ramsay, M.C.J. Maiden, R. Borrow // *J Infect.* – 2017. – Vol. 75 (2). – P. 95-103.

106. Maiden, M.C. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms / M.C. Maiden, J.A. Bygraves, E. Feil, G. Morelli, J.E. Russell, R. Urwin, Q. Zhang, J. Zhou, K. Zurth, D.A. Caugant, I.M. Feavers, M. Achtman, B.G. Spratt // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1998. – Vol. 95 (6). – P. 3140-3145.

107. Maiden, M.C. Impact of meningococcal serogroup C conjugate vaccines on carriage and herd immunity / M.C. Maiden, A.B. Ibarz-Pavon, R. Urwin, S.J. Gray, N.J. Andrews, S.C. Clarke, A.M. Walker, M.R. Evans, J.S. Kroll // *J Infect Dis.* – 2008. – Vol. 197 (5). – P. 737-743.

108. Manigart, O. Alternative Molecular Methods for Improved Detection of Meningococcal Carriage and Measurement of Bacterial Density / O. Manigart, J. Okeakpu, A. Odutola, S. Jarju, E. Foster-Nyarko, K. Diallo, A. Roca, B. Kampmann, U. D'Alessandro, S. Sow, M. Antonio, M.J. Maiden, R. Borrow, J.M. Stuart, C.L. Trotter, B.M. Greenwood // *J Clin Microbiol.* – 2016. – Vol. 54 (11). – P. 2743-2748.

109. Marin, J.E.O. Emergence of MDR invasive *Neisseria meningitidis* in El Salvador, 2017-19 / J.E.O. Marin, E. Villatoro, M.J. Luna, A.M. Barrientos, E. Mendoza, A.P.S. Lemos, C.H. Camargo, C.T. Sacchi, M.P.V. Cunha, M. Galas, J.M. Gabastou // *J Antimicrob Chemother.* – 2021. – Vol. 76 (5). – P. 1155-1159.

110. Marri, P.R. Genome sequencing reveals widespread virulence gene exchange among human *Neisseria* species / P.R. Marri, M. Paniscus, N.J. Weyand, M.A. Rendón, C.M. Calton, D.R. Hernández, D.L. Higashi, E. Sodergren, G.M. Weinstock, S.D. Rounsley, M. So // *PLoS ONE.* – 2010. – Vol. 5 (7). – P. e11835.

111. McGill, F. Acute bacterial meningitis in adults / F. McGill, R.S. Heyderman, S. Panagiotou, A.R. Tunkel, T. Solomon // *Lancet.* – 2016. – Vol. 388 (10063). – P. 3036-3047.

112. McIver, L.J. BioBakery: a meta'omic analysis environment / L.J. McIver, G.

Abu-Ali, E.A. Franzosa, R. Schwager, X.C. Morgan, L. Waldron, N. Segata, C. Huttenhower // *Bioinformatics*. – 2018. – Vol. 34 (7). – P. 1235-1237.

113. McNamara, L.A. Detection of Ciprofloxacin-Resistant, beta-Lactamase-Producing *Neisseria meningitidis* Serogroup Y Isolates - United States, 2019-2020 / L.A. McNamara, C. Potts, A.E. Blain, A.C. Retchless, N. Reese, S. Swint, D. Lonsway, M. Karlsson, K. Lunquest, J.J. Sweitzer, X. Wang, S. Hariri, L.M. Fox // *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. – 2020. – Vol. 69 (24). – P. 735-739.

114. Miellet, W.R. Detection of *Neisseria meningitidis* in saliva and oropharyngeal samples from college students / W.R. Miellet, R. Mariman, G. Pluister, L.J. Jong, I. Grift, S. Wijkstra, E.M. van Logchem, J. van Veldhuizen, M.M. Immink, A.J. Wijmenga-Monsuur, N.Y. Rots, E.A.M. Sanders, T. Bosch, K. Trzeciński // *Scientific Reports*. – 2021. – Vol. 11 (1). – P. 231-238.

115. Mikheyev, A.S. A first look at the Oxford Nanopore MinION sequencer / A.S. Mikheyev, M.M. Tin // *Mol Ecol Resour*. – 2014. – Vol. 14 (6). – P. 1097-1102.

116. Młynarczyk-Bonikowska, B. Multiresistant *Neisseria gonorrhoeae*: a new threat in second decade of the XXI century / B. Młynarczyk-Bonikowska, A. Majewska, M. Malejczyk, G. Młynarczyk, S. Majewski // *Medical microbiology and immunology*. – 2020. – Vol. 209 (2). – P. 95-108.

117. Mothershed, E.A. Use of real-time PCR to resolve slide agglutination discrepancies in serogroup identification of *Neisseria meningitidis* / E.A. Mothershed, C.T. Sacchi, A.M. Whitney, G.A. Barnett, G.W. Ajello, S. Schmink, L.W. Mayer, M. Phelan // *J Clin Microbiol*. – 2004. – Vol. 42 (1). – P. 320-328.

118. Moura, A. Molecular characterization of *Neisseria meningitidis* isolates recovered from 11-19-year-old meningococcal carriers in Salvador, Brazil / A. Moura, C.B. Kretz, I. E. Ferreira, A.M.P.B. Nunes, J.C. de Moraes, M.G. Reis, A.J.A. McBride, X. Wang, L.C. Campos // *PLoS One*. – 2017. – Vol. 12 (9). – P. e0185038.

119. Mowlaboccus, S. Clonal Expansion of New Penicillin-Resistant Clade of *Neisseria meningitidis* Serogroup W Clonal Complex 11, Australia / S. Mowlaboccus, K.A.

Jolley, J.E. Bray, S. Pang, Y.T. Lee, J.D. Bew, D.J. Speers, A.D. Keil, G.W. Coombs, C.M. Kahler // *Emerg Infect Dis.* – 2017. – Vol. 23 (8). – P. 1364-1367.

120. Mullally, C.A. Modelling evolutionary pathways for commensalism and hypervirulence in *Neisseria meningitidis* / C.A. Mullally, A. Mikucki, M.J. Wise, C.M. Kahler // *Microb Genom.* – 2021. – Vol. 7 (10). – P. 1-18.

121. Murphy, E. Sequence diversity of the factor H binding protein vaccine candidate in epidemiologically relevant strains of serogroup B *Neisseria meningitidis* / E. Murphy, L. Andrew, K.L. Lee, D.A. Dilts, L. Nunez, P.S. Fink, K. Ambrose, R. Borrow, J. Findlow, M.K. Taha, A.E. Deghmane // *J Infect Dis.* – 2009. – Vol. 200 (3). – P. 379-389.

122. Murray, C.J.L. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis / C.J.L. Murray, K.S. Ikuta, F. Sharara // *The Lancet.* – 2022. - Vol. 399 (10325). - P. 629-655.

123. Mustapha, M.M. Global epidemiology of capsular group W meningococcal disease (1970-2015): Multifocal emergence and persistence of hypervirulent sequence type (ST)-11 clonal complex / M.M. Mustapha, J.W. Marsh, L.H. Harrison // *Vaccine.* – 2016. – Vol. 34 (13). – P. 1515-1523.

124. Mustapha, M.M. Genomic Epidemiology of Hypervirulent Serogroup W, ST-11 *Neisseria meningitidis* / M.M. Mustapha, J.W. Marsh, M.G. Krauland, J.O. Fernandez, A.P. de Lemos, J.C. Dunning Hotopp, X. Wang, L.W. Mayer, J.G. Lawrence, N.L. Hiller, L.H. Harrison // *EBioMedicine.* – 2015. – Vol. 2 (10). – P. 1447-1455.

125. Muzzi, A. Genetic Meningococcal Antigen Typing System (gMATs): A genotyping tool that predicts 4CMenB strain coverage worldwide / A. Muzzi, A. Brozzi, L. Serino, M. Bodini, R. Abad, D. Caugant, M. Comanducci, A.P. Lemos, M.C. Gorla, P. Křížová, C. Mikula, R. Mulhall // *Vaccine.* – 2019.- Vol. 37 (7). – P. 991-1000.

126. Neal, K.R. Changing carriage rate of *Neisseria meningitidis* among university students during the first week of term: cross sectional study / K.R. Neal, J.S. Nguyen-Van-Tam, N. Jeffrey, R.C. Slack, R.J. Madeley, K. Ait-Tahar, K. Job, M.C. Wale, D.A. Ala'Aldeen // *BMJ.* – 2000. – Vol. 320 (7238). – P. 846-849.

127. Nguyen, L.T. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies / L.T. Nguyen, H.A. Schmidt, A. von Haeseler, B.Q. Minh // *Mol Biol Evol.* – 2015. – Vol. 32 (1). – P. 268-274.

128. Oldfield, N.J. Rise in Group W Meningococcal Carriage in University Students, United Kingdom / N.J. Oldfield, C. Cayrou, M.A.K. AlJannat, A.A.A. Al-Rubaiawi, L.R. Green, S. Dada, O.D. Steels, C. Stirrup, J. Wanford, B.A.Y. Atwah, C.D. Bayliss D.P.J. Turner // *Emerg Infect Dis.* – 2017. – Vol. 23 (6). – P. 1009-1011.

129. Oliveira, G.S. Pneumococcal Vaccines: Past Findings, Present Work, and Future Strategies / G.S. Oliveira, M.L.S. Oliveira, E.N. Miyaji, T.C. Rodrigues // *Vaccines (Basel).* – 2021. – Vol. 9 (11). – P. 1-16.

130. Pascual, A. Comparison of broth microdilution and E-test for susceptibility testing of *Neisseria meningitidis* / A. Pascual, P. Joyanes, L. Martinez-Martinez, A.I. Suarez, E.J. Perea // *J Clin Microbiol.* – 1996. – Vol. 34 (3). – P. 588-591.

131. Perez, J.L. From research to licensure and beyond: clinical development of MenB-FHbp, a broadly protective meningococcal B vaccine / J.L. Perez, J. Absalon, J. Beeslaar, P. Balmer, K.U. Jansen, T.R. Jones, S. Harris, L.J. York, Q. Jiang, D. Radley, A.S. Anderson, G. Crowther, J.J. Eiden // *Expert Rev Vaccines.* – 2018. – Vol. 17 (6). – P. 461-477.

132. Peterson, M.E. Meningococcal serogroups and surveillance: a systematic review and survey / M.E. Peterson, Y. Li, A. Bitá, A. Moureau, H. Nair, M.H. Kyaw // *Journal of global health.* – 2019. – Vol. 9 (1). – P. 1- 16.

133. Peterson, M.E. Serogroup-specific meningococcal carriage by age group: a systematic review and meta-analysis / M.E. Peterson, Y. Li, H. Shanks, R. Mile, H. Nair, M.H. Kyaw // *BMJ Open.* – 2019. – Vol. 9 (4). – P. 1-9.

134. Pizza, M. Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing / M. Pizza, V. Scarlato, V. Masignani, M.M. Giuliani, B. Aricò, M. Comanducci, G.T. Jennings, L. Baldi, E. Bartolini // *Science.* – 2000. – Vol. 287 (5459). – P. 1816-1820.

135. Plikaytis, B.D. Interlaboratory standardization of the sandwich enzyme-linked immunosorbent assay designed for MATS, a rapid, reproducible method for estimating the strain coverage of investigational vaccines / B.D. Plikaytis, M. Stella, G. Boccadifuoco, L.M. DeTora, M. Agnusdei, L. Santini, B. Brunelli, L. Orlandi, I. Simmini, M. Giuliani, M. Ledroit, E. Hong, M.K. Taha // *Clin Vaccine Immunol.* – 2012. – Vol. 19 (10). – P. 1609-1617.

136. Potts, C.C. Acquisition of Ciprofloxacin Resistance Among an Expanding Clade of beta-Lactamase-Positive, Serogroup Y *Neisseria meningitidis* in the United States / C.C. Potts, A.C. Retchless, L.A. McNamara, D. Marasini, N. Reese, S. Swint, F. Hu, S. Sharma, A.E. Blain, D. Lonsway, M. Karlsson, S. Hariri, L.M. Fox, X. Wang // *Clin Infect Dis.* – 2021. – Vol. 73 (7). – P. 1185-1193.

137. Potts, C.C. Antimicrobial Susceptibility Survey of Invasive *Neisseria meningitidis*, United States 2012-2016 / C.C. Potts, L.D. Rodriguez-Rivera, A.C. Retchless, F. Hu, H. Marjuki, A.E. Blain, L.A. McNamara, X. Wang // *J Infect Dis.* – 2022. – Vol. 225 (11). – P. 1871-1875.

138. PubMLST / Book PubMLST / - pubmlst.org. - Editor, 2020.

139. Quinlan, A.R. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features / A.R. Quinlan, I.M. Hall // *Bioinformatics.* – 2010. – Vol. 26 (6). – P. 841-842.

140. Rainbow, J. Rifampin-resistant meningococcal disease / J. Rainbow, E. Cebelinski, J. Bartkus, A. Glennen, D. Boxrud, R. Lynfield // *Emerg Infect Dis.* – 2005. – Vol. 11 (6). – P. 977-979.

141. Rake G. Studies on meningococcus infection: III. The antigenic complex of the meningococcus – a type-specific substance / G. Rake, H.W. Scherp // *J Exp Med.* – 1933. Vol. 58(3). – P. 341–360.

142. Reuter, S. Rapid Bacterial Whole-Genome Sequencing to Enhance Diagnostic and Public Health Microbiology / S. Reuter, M.J. Ellington, E.J.P. Cartwright, C.U. Köser, M.E. Török, T. Gouliouris, S.R. Harris, N.M. Brown, M.T. Holden, M. Quail, J. Parkhill, G.P. Smith, S.D. Bentley, S.J. Peacock // *JAMA Internal Medicine.* – 2013. – Vol. 173 (15).

– P. 1397-1404.

143. Robinson, J.T. Variant Review with the Integrative Genomics Viewer / J.T. Robinson, H. Thorvaldsdottir, A. M. Wenger, A. Zehir, J.P. Mesirov // *Cancer Res.* – 2017. – Vol. 77 (21). – P. 31-34.

144. Rocha, E.P. Inference and analysis of the relative stability of bacterial chromosomes / E.P. Rocha // *Mol Biol Evol.* – 2006. – Vol. 23 (3). – P. 513-522.

145. Rodgers, G.L. Triumph of Pneumococcal Conjugate Vaccines: Overcoming a Common Foe / G.L. Rodgers, C.G. Whitney, K.P. Klugman // *J Infect Dis.* – 2021. – Vol. 224 (4). – P. 352-359.

146. Rodrigues, C.M.C. Meningococcal Deduced Vaccine Antigen Reactivity (MenDeVAR) Index: a Rapid and Accessible Tool That Exploits Genomic Data in Public Health and Clinical Microbiology Applications / C.M.C. Rodrigues, K.A. Jolley, A. Smith, J.C. Cameron, I.M. Feavers, M.C.J. Maiden // *J Clin Microbiol.* – 2020. – Vol. 59 (1). – P. e02161-20.

147. Rodrigues, C.M.C. Genomic Surveillance of 4CMenB Vaccine Antigenic Variants among Disease-Causing *Neisseria meningitidis* Isolates, United Kingdom, 2010-2016 / C.M.C. Rodrigues, J. Lucidarme, R. Borrow, A. Smith, J.C. Cameron, E.R. Moxon, M.C.J. Maiden // *Emerg Infect Dis.* – 2018. – Vol. 24 (4). – P. 673-682.

148. Ropp, P.A. Mutations in *ponA*, the gene encoding penicillin-binding protein 1, and a novel locus, *penC*, are required for high-level chromosomally mediated penicillin resistance in *Neisseria gonorrhoeae* / P.A. Ropp, M. Hu, M. Olesky, R.A. Nicholas // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2002. – Vol. 46 (3). – P. 769-777.

149. Rosenstein, N.E. Meningococcal disease / N.E. Rosenstein, B.A. Perkins, M.L. Tondella, T. Popovic // *N Engl J Med.* – 2001. – Vol. 344 (18). – P. 1378-1388.

150. Roupael, N.G. *Neisseria meningitidis*: biology, microbiology, and epidemiology / N.G. Roupael, D.S. Stephens // *Methods Mol Biol.* – 2012. – Vol. 799. – P. 1-20.

151. Saez-Llorens, X. Immunogenicity and safety of investigational vaccine

formulations against meningococcal serogroups A, B, C, W, and Y in healthy adolescents / X. Saez-Llorens, Aguilera D.C. Vaca, K. Abarca, E. Maho, M.G. Graña, E. Heijnen, I. Smolenov, P.M. Dull // *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. – 2015. – Vol. 11 (6). – P. 1507-1517.

152. Safadi, M.A. Meningococcal Disease: Epidemiology and Early Effects of Immunization Programs / M.A. Safadi, E.N. Berezin, L.H. Arlant // *J Pediatric Infect Dis Soc*. – 2014. – Vol. 3 (2). – P. 91-93.

153. Saito, R. Penicillin- and Ciprofloxacin-Resistant Invasive *Neisseria meningitidis* Isolates from Japan / R. Saito, J. Nakajima, I. Prah, M. Morita, S. Mahazu, Y. Ota, A. Kobayashi, S. Tohda, H. Kamiya, H. Takahashi, M. Ohnishi // *Microbiol Spectr*. – 2022. - Vol. 10 (3). – P. e0062722.

154. Sall, O. Atypical presentation of *Neisseria meningitidis* serogroup W disease is associated with the introduction of the 2013 strain / O. Sall, B. Stenmark, S. Jacobsson, L. Eriksson, S. Thulin Hedberg, O. Hertting, H. Fredlund, M. Sundqvist, P. Mölling // *Epidemiol Infect*. – 2021. – Vol. 149. – P. 1-9.

155. Schoen, C. Whole-genome comparison of disease and carriage strains provides insights into virulence evolution in *Neisseria meningitidis* / C. Schoen, J. Blom, H. Claus, A. Schramm-Glück, P. Brandt, T. Müller, A. Goesmann, B. Joseph, S. Konietzny, O. Kurzai, C. Schmitt, T. Friedrich, B. Linke, U. Vogel, M. Frosch // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2008. – Vol. 105 (9). – P. 3473-3478.

156. Schoen, C. Genome flexibility in *Neisseria meningitidis* / C. Schoen, H. Tettelin, J. Parkhill, M. Frosch // *Vaccine*. – 2009. – Vol. 27 (2). – P. 103-111.

157. Seemann, T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation / T. Seemann // *Bioinformatics*. – 2014. – Vol. 30 (14). – P. 2068-2069.

158. Serruto, D. The new multicomponent vaccine against meningococcal serogroup B, 4CMenB: immunological, functional and structural characterization of the antigens / D. Serruto, M.J. Bottomley, S. Ram, M.M. Giuliani, R. Rappuoli // *Vaccine*. – 2012. – Vol. 30 (2). – P. 87-97.

159. Sette, A. Reverse vaccinology: developing vaccines in the era of genomics / A. Sette, R. Rappuoli / *Immunity*. – 2010. – Vol. 33 (4). – P. 530-541.

160. Sharma, S. Detection of *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus influenzae* in Culture Negative Cerebrospinal Fluid Samples from Meningitis Patients Using a Multiplex Polymerase Chain Reaction in Nepal / S. Sharma, J. Acharya, D.A. Caugant, M.R. Banjara, P. Ghimire, A. Singh // *Infect Dis Rep*. – 2021. – Vol. 13 (1). – P. 173-180.

161. Shultz, T.R. Chloramphenicol-resistant *Neisseria meningitidis* containing catP isolated in Australia / T.R. Shultz, J.W. Tapsall, P.A. White, C.S. Ryan, D. Lyras, J.I. Rood, E. Binotto, C.J. Richardson // *J Antimicrob Chemother*. – 2003. – Vol. 52 (5). – P. 856-859.

162. Simoes, M.J. Molecular surveillance of *Neisseria meningitidis* capsular switching in Portugal, 2002-2006 / M.J. Simoes, M. Cunha, F. Almeida, C. Furtado, L. Brum // *Epidemiol Infect*. – 2009. – Vol. 137 (2). – P. 161-165.

163. Soleimani, M. Molecular design real time loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of *Neisseria meningitidis* / M. Soleimani, A. Morovvati, A.K. Majidzadeh // *Folia Med (Plovdiv)*. – 2021. – Vol. 63 (2). – P. 221-227.

164. Stefanova, M.E. Overexpression and enzymatic characterization of *Neisseria gonorrhoeae* penicillin-binding protein 4 / M.E. Stefanova, J. Tomberg, C. Davies, R.A. Nicholas, W.G. Gutheil // *European Journal of Biochemistry*. – 2004. – Vol. 271 (1). – P. 23-32.

165. Stephens, D.S. Biology and pathogenesis of the evolutionarily successful, obligate human bacterium *Neisseria meningitidis* / D.S. Stephens // *Vaccine*. – 2009. – Vol. 27 (2). – P. 71-77.

166. Stephens, D.S. Epidemic meningitis, meningococcaemia, and *Neisseria meningitidis* / D.S. Stephens, B. Greenwood, P. Brandtzaeg // *Lancet*. – 2007. – Vol. 369 (9580). – P. 2196-2210.

167. Swartley, J.S. Characterization of the gene cassette required for biosynthesis of the (alpha1-->6)-linked N-acetyl-D-mannosamine-1-phosphate capsule of serogroup A

Neisseria meningitidis / J.S. Swartley, L.J. Liu, Y.K. Miller, L.E. Martin, S. Edupuganti, D.S. Stephens // J Bacteriol. – 1998. – Vol. 180 (6). – P. 1533-1539.

168. Swartley, J.S. Capsule switching of *Neisseria meningitidis* / J.S. Swartley, A.A. Marfin, S. Edupuganti, L.J. Liu, P. Cieslak, B. Perkins, J.D. Wenger, D.S. Stephens // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1997. – Vol. 94 (1). – P. 271-276.

169. Taha, M.K. Whole genome sequencing reveals Trans-European spread of an epidemic *Neisseria meningitidis* serogroup W clone / M.K. Taha, A.E. Deghmane, M. Knol, A. van der Ende // Clin Microbiol Infect. – 2019. – Vol. 25 (6). – P. 765-767.

170. Taha, M.K. Rifampin- resistant *Neisseria meningitidis* / M.K. Taha, M.L. Zarantonelli, C. Ruckly, D. Giorgini, J.M. Alonso // Emerg Infect Dis. – 2006. – Vol. 12 (5). – P. 859-860.

171. Taha, M.K. Target gene sequencing to characterize the penicillin G susceptibility of *Neisseria meningitidis* / M.K. Taha, J.A. Vázquez, E. Hong, D.E. Bennett, S. Bertrand, S. Bukovski, M.T. Cafferkey, F. Carion // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2007. – Vol. 51 (8). – P. 2784-2792.

172. Taormina, G. Beta-Lactamase-Producing, Ciprofloxacin-Resistant *Neisseria meningitidis* Isolated From a 5-Month-Old Boy in the United States / G. Taormina, J. Campos, J. Sweitzer, A.C. Retchless, K. Lunquest, L.A. McNamara, N. Reese, M. Karlsson, B. Hanisch // J Pediatric Infect Dis Soc. – 2021. – Vol. 10 (3). – P. 379-381.

173. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 11.0, 2021. <http://www.eucast.org/>.

174. Toyofuku, M. Types and origins of bacterial membrane vesicles / M. Toyofuku, N. Nomura, L. Eberl // Nature Reviews Microbiology. – 2019. – Vol. 17 (1). – P. 13-24.

175. Tran, T.X. Whole-genome sequencing and characterization of an antibiotic resistant *Neisseria meningitidis* B isolate from a military unit in Vietnam / T.X. Tran, T.T. Le, L.P. Trieu, C.M. Austin, D. Van Quyen, H.M. Nguyen // Ann Clin Microbiol Antimicrob. – 2019. – Vol. 18 (1). – P. 2-9.

176. Tsang, R.S.W. WGS analysis of a penicillin-resistant *Neisseria meningitidis* strain containing a chromosomal ROB-1 beta-lactamase gene / R.S.W. Tsang, T. Ahmad, F.B. Jamieson, G.J. Tyrrell // *J Antimicrob Chemother.* – 2019. – Vol. 74 (1). – P. 22-28.

177. Tsang, R.S.W. Potential capsule switching from serogroup Y to B: The characterization of three such *Neisseria meningitidis* isolates causing invasive meningococcal disease in Canada / R.S.W. Tsang, D.K. Law, S.D. Tyler, G.S. Stephens, M. Bigham, W.D. Zollinger // *Can J Infect Dis Med Microbiol.* – 2005. – Vol. 16 (3). – P. 171-174.

178. Tunkel, A.R. Practice guidelines for the management of bacterial meningitis / A.R. Tunkel, B.J. Hartman, S.L. Kaplan, B.A. Kaufman, K.L. Roos, W.M. Scheld, R.J. Whitley // *Clin Infect Dis.* – 2004. – Vol. 39 (9). – P. 1267-1284.

179. Tzanakaki, G. Conventional and molecular investigation of meningococcal isolates in relation to two outbreaks in the area of Athens, Greece / G. Tzanakaki, A.R. Tunkel, K. Kesanopoulos, S. Levidiotou, J. Kremastinou, D.A. Caugant // *Clinical Microbiology and Infection.* – 2006. – Vol. 12 (10). – P. 1024-1026.

180. Tzeng, Y.L. A Narrative Review of the W, X, Y, E, and NG of Meningococcal Disease: Emerging Capsular Groups, Pathotypes, and Global Control / Y.L. Tzeng, D.S. Stephens // *Microorganisms.* – 2021. – Vol. 9 (3). – P. 1-16.

181. Urwin, R. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology / R. Urwin, M.C. Maiden // *Trends Microbiol.* – 2003. – Vol. 11 (10). – P. 479-487.

182. Van de Beek, D. ESCMID guideline: diagnosis and treatment of acute bacterial meningitis / D. Van de Beek, C. Cabellos, O. Dzupova, S. Esposito, M. Klein, A.T. Kloek, S.L. Leib // *Clin Microbiol Infect.* – 2016. – Vol. 22 (3). – P. 37-62.

183. Van Dijk, E.L. Ten years of next-generation sequencing technology / E.L. Van Dijk, H. Auger, Y. Jaszczyszyn, C. Thermes // *Trends Genet.* – 2014. – Vol. 30 (9). – P. 418-426.

184. Vázquez, J.A. Resistance testing of meningococci: the recommendations of the European Monitoring Group on Meningococci / J.A. Vázquez // *FEMS Microbiology*

Reviews. – 2007. – Vol. 31 (1). – P. 97-100.

185. Vazquez, J.A. Interlaboratory comparison of agar dilution and Etest methods for determining the MICs of antibiotics used in management of *Neisseria meningitidis* infections / J.A. Vazquez, L. Arreaza, C. Block, I. Ehrhard, S.J. Gray, S. Heuberger, S. Hoffmann, P. Kriz, P. Nicolas, P. Olcen, A. Skoczynska, L. Spanjaard, P. Stefanelli, M.K. Taha, G. Tzanakaki // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2003. – Vol. 47 (11). – P. 3430-3434.

186. Villena, R. Global epidemiology of serogroup B meningococcal disease and opportunities for prevention with novel recombinant protein vaccines / R. Villena, M.A.P. Safadi, M.T. Valenzuela, J.P. Torres, A. Finn, M. O'Ryan // *Hum Vaccin Immunother.* – 2018. – Vol. 14 (5). – P. 1042-1057.

187. Vogel, U. Genetic lineages and their traits in *Neisseria meningitidis* / U. Vogel, H. Claus, M. Frosch // *Int J Med Microbiol.* – 2004. – Vol. 294 (2-3). – P. 75-82.

188. Wang, X. Clinical validation of multiplex real-time PCR assays for detection of bacterial meningitis pathogens / X. Wang, M.J. Theodore, R. Mair, E. Trujillo-Lopez, M. du Plessis, N. Wolter, A.L. Baughman, C. Hatcher, J. Vuong, L. Lott, A. von Gottberg, C. Sacchi, J.M. McDonald, N.E. Messonnier, L.W. Mayer // *J Clin Microbiol.* – 2012. – Vol. 50 (3). – P. 702-708.

189. Watkins, E.R. Metabolic shift in the emergence of hyperinvasive pandemic meningococcal lineages / E.R. Watkins, M.C. Maiden // *Sci Rep.* – 2017. – Vol. 7. – P. 1-9.

190. Wick, R.R. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads / R.R. Wick, L.M. Judd, C.L. Gorrie, K.E. Holt // *PLoS Comput Biol.* – 2017. – Vol. 13 (6). – P. e1005595.

191. Willerton, L. Geographically widespread invasive meningococcal disease caused by a ciprofloxacin resistant non-groupable strain of the ST-175 clonal complex / L. Willerton, J. Lucidarme, H. Campbell, D.A. Caugant, H. Claus, S. Jacobsson, S.N. Ladhani, P. Mölling, A. Neri, P. Stefanelli, M.K. Taha, U. Vogel, R. Borrow // *J Infect.* – 2020. – Vol. 81 (4). – P. 575-584.

192. Willerton, L. Antibiotic resistance among invasive *Neisseria meningitidis* isolates in England, Wales and Northern Ireland (2010/11 to 2018/19) / L. Willerton, J. Lucidarme, A. Walker, A. Lekshmi, S.A. Clark, L. Walsh, X. Bai, L. Lee-Jones, R. Borrow // PLoS One. – 2021. – Vol. 16 (11). – P. e0260677.

193. Willerton, L. Increase in penicillin-resistant invasive meningococcal serogroup W ST-11 complex isolates in England / L. Willerton, J. Lucidarme, A. Walker, A. Lekshmi, S.A. Clark, S.J. Gray, R. Borrow // Vaccine. – 2021. – Vol. 39 (19). – P. 2719-2729.

194. Wilson, M.R. Clinical Metagenomic Sequencing for Diagnosis of Meningitis and Encephalitis / M.R. Wilson, H.A. Sample, K.C. Zorn, S. Arevalo, G. Yu, J. Neuhaus, S. Federman, D. Stryke, B. Briggs // New England Journal of Medicine. – 2019. – Vol. 380 (24). – P. 2327-2340.

195. Xu, L. Analysis on antimicrobial sensitivity of *Neisseria meningitidis* in China from 2005 to 2019 / L. Xu, F.Y. Han, D. Wu, B.Q. Zhu, W.Y. Gao, Y. Gao, Y.X. Li, Z.J. Shao // Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi. – 2021. – Vol. 55 (2). – P. 207-211.

196. Yezli, S. Prevention of meningococcal disease during the Hajj and Umrah mass gatherings: past and current measures and future prospects / S. Yezli, A.A. Bin Saeed A.M. Assiri, R.F. Alhakeem, M.A. Yunus, A.M. Turkistani R. Booy, B.M. Alotaibi // Int J Infect Dis. – 2016. – Vol. 47. – P. 71-78.

197. Zapun, A. Resistance to beta-Lactams in *Neisseria ssp* Due to Chromosomally Encoded Penicillin-Binding Proteins / A. Zapun, S. Yezli, C. Morlot, M.K. Taha // Antibiotics (Basel). – 2016. – Vol. 5 (4). – P. 1-12.

198. Zhang, X. Molecular characterization of serogroup C *Neisseria meningitidis* isolated in China / X. Zhang, Z. Shao, E. Yang, L. Xu, X. Xu, M. Li, J. Ren, Y. Zhu, F. Yang, X. Liang, L.W. Mayer, J. Xu, Q. Jin // Journal of medical microbiology. – 2007. – Vol. 56. – P. 1224-1229.

199. Zhang, Y. The Epidemiology of Meningococcal Disease and Carriage, Genotypic Characteristics and Antibiotic Resistance of *Neisseria meningitidis* Isolates in Zhejiang Province, China, 2011–2021 / Y. Zhang, X. Deng, Y. Jiang, J. Zhang, L. Zhan, L.

Mei, H. Lu, P. Yao, H. He // *Frontiers in Microbiology*. – 2022. – Vol. 12. – P. 1-11.

200. Zhao, L. Trends in antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* and molecular characteristics of *N. gonorrhoeae* with decreased susceptibility to ceftriaxone in Shandong, China, 2007 to 2014 / L. Zhao, A. Liu, R. Li, S. Zhao // *International Journal of Antimicrobial Agents*. – 2018. – Vol. 51 (1). – P. 52-56.

201. Zhao, P. Evolutionary analysis of *gyrA* gene from *Neisseria meningitidis* bacterial strains of clonal complex 4821 collected in China between 1978 and 2016 / P. Zhao, L. Xu, A. Zhang, B. Zhu, Z. Shao // *BMC Microbiol.* – 2020. – Vol. 20 (1). – P. 1-12.

202. Zhou, H. Distribution of serogroups and sequence types in disease-associated and carrier strains of *Neisseria meningitidis* isolated in China between 2003 and 2008 / H. Zhou, Y. Xu, L. Gao, M. Li, Q. Li, Y. Li, X. Liang, H. Luo, B. Kan, J. Xu, Z. Shao // *Epidemiology and Infection*. – 2011. – Vol. 140 (7). – P. 1296-1303.

203. Zhou, Z. GrapeTree: visualization of core genomic relationships among 100,000 bacterial pathogens / Z. Zhou, N.F. Alikhan, M.J. Sergeant, N. Luhmann, C. Vaz, A.P. Francisco, J.A. Carriço, M. Achtman // *Genome Res.* – 2018. – Vol. 28 (9). – P. 1395-1404.

204. Zhu, B. Genetic diversity and clonal characteristics of ciprofloxacin-resistant meningococcal strains in China / B. Zhu, Y. Fan, Z. Xu, L. Xu, P. Du, Y. Gao, Z. Shao // *J Med Microbiol.* – 2014. – Vol. 63 (11). – P. 1411-1418.

205. Zhu, B. Comparative genomic analyses of Chinese serogroup W ST-11 complex *Neisseria meningitidis* isolates / B. Zhu, J. Lucidarme, X. Bai, P. Guo, A. Zhang, R. Borrow, W. Gao, L. Xu, Y. Gao, Z. Shao // *J Infect.* – 2020. – Vol. 80 (1). – P. 54-60.

206. Zouheir, Y. Emergence and spread of resistant *N. meningitidis* implicated in invasive meningococcal diseases during the past decade (2008- 2017) / Y. Zouheir, T. Atany, N. Boudebouch // *J Antibiot (Tokyo)*. – 2019. – Vol. 72 (3). – P. 185-188.