

Получена: 25 октября 2020 / Принята: 21 декабря 2020 / Опубликовано online: 30 декабря 2020

DOI 10.34689/SH.2020.22.6.004

УДК 616.831.9-002:616.28

ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ *N. MENINGITIDIS* ЦИРКУЛИРОВАВШИХ В Г. НУР-СУЛТАН С 2010 ПО 2020 ГОДЫ

Алия Ж. Сейдуллаева^{1,2}, <https://orcid.org/0000-0002-0073-4405>

Динагуль А. Баешева^{1,2}, <https://orcid.org/0000-0001-6843-9712>

Баян Р. Турдалина^{1,2}, <https://orcid.org/0000-0001-5672-7370>

Алёна В. Алтынбекова^{1,2}, <https://orcid.org/0000-0002-4407-4525>

Айым М. Турарова¹,

Асет Ж. Данияров³, <https://orcid.org/0000-0003-3886-718X>

Улыкбек Е. Каиров³, <https://orcid.org/0000-0001-8511-8064>

Самат С. Кожаметов^{3,4*} <https://orcid.org/0000-0001-9668-0327>

¹ НАО «Медицинский университет Астана», г. Нур-Султан, Республика Казахстан;

² Многопрофильная городская детская больница №3, г. Нур-Султан, Республика Казахстан;

³ Центр наук о жизни ЧУ "National Laboratory Astana" Назарбаев Университет, г. Нур-Султан, Республика Казахстан;

⁴ Инновационный центр ArtScience, г. Нур-Султан, Республика Казахстан.

Резюме

Введение. Эпидемиология менингококковой инфекции может измениться непредсказуемо, и тип изолятов *Neisseria meningitidis* имеет решающее значение для наблюдения за инвазивным менингококком.

Цель исследования. Проведение молекулярно-эпидемиологического и генетического исследования штаммов *N.meningitidis*, циркулирующих в г. Нур-Султан.

Материалы и методы. Поведен анализ историй болезни пациентов, пролеченных с диагнозом «менингококковый менингит» в Многопрофильной городской детской больнице №3 г. Нур-Султан за 2010-2020 гг. Характеристика изолятов *Neisseria meningitidis*, собранных из спинномозговой жидкости и крови у детей (n=120), были генотипированы с помощью мультилокусного типирования последовательностей (MLST) и секвенирования генов *porB*, *porA*, *fetA*, *fHbp* и *penA*. Серотипирование проводилось с помощью метода латекс-агглютинации. Чувствительность к противомикробным препаратам определялась с помощью диско-диффузного метода и протестирована на чувствительность к антибиотикам с использованием мультилокусного типирования последовательностей (MLST). Статистическую обработку клинко-лабораторных данных рассчитывали с использованием программы SPSS IBM Statistics 20. Возраст различных линий выполнен с помощью теста Mann-Whitney U.

Результаты. Анализ показал наибольший удельный вес выявляемости среди серогрупп «А» -59,2% (n=71), на втором месте «В»- 24,2% (n=29), на третьем - «С»- 10,8% (n=13) и низкий показатель у серогрупп «W135»-4,2% (n=5) и «29E»- 1,7% (n=2). Результаты полногеномного анализа *N.meningitidis* были депонированы в международную базу данных Genbank по следующим номерам: SRX7002979, SRX7002980, SRX7002981, SRX7002982.

Выводы. Полногеномный анализ внес значительный вклад в детальную молекулярную характеристику изолятов *N. meningitidis*, выделенных в Казахстане за 10-летний период. Позволил определить уровень генетического расхождения между полученными в Казахстане и других странах изолятами. Генетическая филогения полных геномов выявила географическую циркуляцию серотипов и штаммов, а также случаи передачи между странами.

Ключевые слова: *N. meningitidis*, бактериальный менингит, секвенирование, дети.

Abstract

CHARACTERISTIC OF *N. MENINGITIDIS* STRAINS CIRCULATED IN NUR-SULTAN FROM 2010 TO 2020

Aliya Zh. Seidullayeva^{1,2}, <https://orcid.org/0000-0002-0073-4405>

Dinagul A. Bayesheva^{1,2}, <https://orcid.org/0000-0001-6843-9712>

Bayan R. Turdalina^{1,2}, <https://orcid.org/0000-0001-5672-7370>

Alyona V. Altynbekova^{1,2}, <https://orcid.org/0000-0002-4407-4525>

Aiyum M. Turarova¹,

Asset Zh. Daniyarov³, <https://orcid.org/0000-0003-3886-718X>

Ulykbek E. Kairov³, <https://orcid.org/0000-0001-8511-8064>

Samat S. Kozhakhmetov^{3,4}, <https://orcid.org/0000-0001-9668-0327>

¹ NJSC "Medical University Astana", Nur-Sultan, Republic of Kazakhstan;

² Multidisciplinary City Children's Hospital № 3, Nur-Sultan, Republic of Kazakhstan;

³ National Laboratory Astana, Nazarbayev University, Nur-Sultan, Republic of Kazakhstan;

⁴ ArtScience Innovative Center, Nur-Sultan, Republic of Kazakhstan.

Introduction. The epidemiology of meningococcal infection can change unpredictably, and the type of *Neisseria meningitidis* isolates play a crucial role for the surveillance of invasive meningococcus.

Purpose of the study. Conduct a molecular epidemiological study and determine the genetic characteristics of *N. meningitidis* strains that exist in Nur-Sultan city.

Methods. The investigation is based on the meningococcal infection registered cases in Nur-Sultan for the period 2010–2020. For characterization, *Neisseria meningitidis* isolates were collected from cerebrospinal fluid and blood from children. *N. meningitidis* isolates (n = 120) from patients were genotyped using multilocus sequence typing (MLST) and sequencing of the *porB*, *porA*, *fetA*, *fHbp*, and *penA* genes. Serotyping was performed using the latex agglutination method. Antimicrobial susceptibility was determined using a disk diffusion method and tested for antibiotic susceptibility using multilocus sequence typing (MLST). Statistical treatment of clinical and laboratory data was calculated using the program SPSS IBM Statistics 20. Age of different lines performed with the help of the Mann-Whitney U. test.

Results. Thus, the analysis of case histories of patients treated with a diagnosis of meningococcal meningitis in the Multidisciplinary City Children's Hospital No. 3, Nur-Sultan for 2010-2020, showed the highest proportion of detection among serogroups "A" -59.2% (n = 71), in second place "B" - 24.2% (n = 29), in third place - "C" - 10.8% (n = 13) and a low rate in serogroups "W135" -4.2% (n = 5) and "29E" - 1.7% (n = 2). The results of genome-wide analysis of *N. meningitidis* were deposited in the international Genbank database at the following numbers: SRX7002979, SRX7002980, SRX7002981, SRX7002982 (PubMLST, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/> term).

Conclusions. Genome-wide analysis made a significant contribution to the detailed molecular characterization of *N. meningitidis* isolates that were isolated in Kazakhstan over a 10-year period. Allowed to determine the level of genetic discrepancy between isolates obtained in Kazakhstan and other countries. Genetic phylogeny of complete genomes has revealed the geographical circulation of serotypes and strains, as well as cases of transmission between countries.

Key words: *N. meningitidis*, bacterial meningitis, sequencing, children.

Түйіндеме

НҰР-СҰЛТАН ҚАЛАСЫНЫҢ 2010-2020 ЖЫЛДАР АРАЛЫҒЫНДАҒЫ N.MENINGITIDIS ШТАМЫНЫҢ АЙНАЛЫМДАҒЫ СИПАТТАМАСЫ

Алия Ж. Сейдуллаева^{1,2}, <https://orcid.org/0000-0002-0073-4405>

Динагуль А. Баешева^{1,2}, <https://orcid.org/0000-0001-6843-9712>

Баян Р. Турдалина^{1,2}, <https://orcid.org/0000-0001-5672-7370>

Алёна В. Алтынбекова^{1,2}, <https://orcid.org/0000-0002-4407-4525>

Айым М. Турарова¹,

Асет Ж. Данияров³, <https://orcid.org/0000-0003-3886-718X>

Улыкбек Е. Каиров³, <https://orcid.org/0000-0001-8511-8064>

Самат С. Кожаметов^{3,4*} <https://orcid.org/0000-0001-9668-0327>

¹ КеАҚ «Астана медицина университеті», Нұр-Сұлтан қ., Қазақстан Республикасы;

² Көпбейінді қалалық балалар ауруханасы №3, Нұр-Сұлтан қ., Қазақстан Республикасы;

³ Өмір туралы ғылымдар орталығы ЖМ "National Laboratory Astana" Назарбаев Университеті, Нұр-Сұлтан қ., Қазақстан Республикасы;

⁴ ArtScience инновациялық орталығы, Нұр-Сұлтан қ., Қазақстан Республикасы.

Кіріспе. Менингококк инфекциясының эпидемиологиясы өзгеруі мүмкін және инвазивті менингококкты ауруды бақылау үшін *Neisseria meningitidis* изоляттарының түрі өте маңызды.

Зерттеу мақсаты. Нұр-Сұлтан қаласында *N. meningitidis* штаммының айналымдағы генетикалық сипаттамасы анықтау және молекулалық-эпидемиологиялық зерттеу жүргізу.

Әдістері. Нұр-Сұлтан қаласының 2010-2020 жылдар аралығындағы менингококк инфекциясының тіркелген жағдайлары зерттелді. Балалардан *Neisseria meningitidis* изоляттарын сипаттау үшін жұлын сұйықтығы мен қаннан материал жиналды. Науқастардан бөлінген *N. meningitidis* (n=120) изоляттары мультилокустық тізбекті типтеу (MLST) және *porB*, *porA*, *fetA*, *fHbp* және *penA* секвенстеу гендік реттілігі арқылы генотиптелді. Серотиптеу латекс-агглютинация әдісі арқылы жүргізілді. Микробтарға қарсы препараттарға сезімталдық диско-диффузды әдіс және мультилокустық тізбекті типтеу (МЛТТ) әдісі арқылы анықталды. Клиникалық және зертханалық деректерді

статистикалық өңдеу SPSS IBM Statistics 20 бағдарламасын қолдану арқылы есептелді. Әр түрлі сызықтардың жасы Mann-Whitney U тестінің көмегімен жасалады.

Нәтижелері. Осылайша, 2010-2020 жж.аралығында Нұр-Сұлтан қ. №3 Көпбейінді қалалық балалар ауруханасында "менингококкты менингит" диагнозымен емделген пациенттердің ауру тарихын талдау барысында ең үлкен үлес пайызды "А" серотипі - 59,2% (n=71), екінші орында "В" - 24,2% (n=29), үшінші орында "с" - 10,8% (n=13) және төмен көрсеткіш "W135"серотипі топтары -4,2% (n=13) (n=5) және "29E" - 1,7% (n = 2) көрсетті. *N. meningitidis* толық геномдық талдау нәтижелері Genbank халықаралық дерекқорына келесі нөмірлер бойынша орналастырылды: SRX7002979, SRX7002980, SRX7002981, SRX7002982.

Тұжырымдар. Толық геномдық талдау нәтижесі Қазақстанда соңғы 10 жылдық кезеңде бөлінген *N. meningitidis* изоляттарының егжей-тегжейлі молекулярлық сипаттамасына елеулі үлес қосты. Қазақстанда және басқа елдерде алынған изоляттар арасындағы генетикалық айырмашылық деңгейін анықтауға мүмкіндік берді. Толық геномдардың генетикалық филогениясы серотиптер мен штамдардың географиялық айналымын, сондай-ақ елдер арасындағы берілу жағдайларын анықтады.

Түйінді сөздер: *N. meningitidis*, бактериялық менингит, секвенстеу, балалар.

Библиографическая ссылка:

Сейдуллаева А.Ж., Баешева Д.А., Турдалина Б.Р., Алтынбекова А.В., Турарова А.М., Данияров А.Ж., Каиров У.Е., Кожакметов С.С. Характеристика штаммов *N. Meningitidis* циркулировавших в г. Нур-Султан с 2010 по 2020 годы // Наука и Здравоохранение. 2020. 6 (Т.22). С. 26-34. doi 10.34689/SH.2020.22.6.004

Seidullayeva A.Zh., Bayesheva D.A., Turdalina B.R., Altynbekova A.V., Turarova A.M., Daniyarov A.Zh., Kairov U.E., Kozhakhmetov S.S. Characteristic of *N. Meningitidis* strains circulated in Nur-Sultan from 2010 to 2020 // *Nauka i Zdravookhranenie* [Science & Healthcare]. 2020, (Vol.22) 6, pp. 26-34. doi 10.34689/SH.2020.22.6.004

Сейдуллаева А.Ж., Баешева Д.А., Турдалина Б.Р., Алтынбекова А.В., Турарова А.М., Данияров А.Ж., Каиров У.Е., Кожакметов С.С. Нұр-Сұлтан қаласының 2010-2020 жылдар аралығындағы *N.Meningitidis* штамының айналымдағы сипаттамасы // Ғылым және Денсаулық сақтау. 2020. 6 (Т.22). Б. 26-34. doi 10.34689/SH.2020.22.6.004

Введение

Бактериальный менингит (БМ) – это актуальная проблема клинической педиатрии, которая приводит к высокой заболеваемости и смертности детей до 5 лет по всему миру [14]. По данным Всемирной организации здравоохранения (2016), заболеваемость БМ в странах с высоким уровнем дохода входит в десятку основных причин смерти детей в возрасте до 14 лет [17]. Заболевание при отсутствии лечения может привести к летальному исходу в 50% случаев. Как правило, 8-15% пациентов умирают, в течение 24 и 48 часов после появления симптомов, несмотря на раннюю диагностику и адекватное лечение. Кроме того, у 10-20% выживших наблюдается необратимые последствия, включающие повреждение головного мозга, потерю слуха, когнитивные и интеллектуальные нарушения [2].

Во всем мире среди бактериальных менингитов менингококковая инфекция (МИ) имеет наибольшую значимость, вследствие широкого распространения, при котором создается сложная эпидемическая ситуация не только для пораженных менингитом территорий, но и для соседних стран [5]. Для МИ характерно возрастное распределение, характеризующееся высокой частотой заболеваемости среди грудных детей в возрасте до 1 года, а также среди подростков и молодых людей до 30 лет [10].

По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), менингококковый менингит (ММ) наблюдается на всех континентах, но самые высокие показатели этой болезни находятся в менингитном поясе Африки, к югу от Сахары, протянувшегося от Сенегала на западе и до Эфиопии на востоке [4,17]. Ежегодно в этом районе регистрируется около 30 000 случаев заболеваний. Так,

например, во время эпидемического сезона в 2014 г. в 19 африканских странах, где осуществлялся усиленный эпиднадзор, было зарегистрировано 11 908 предполагаемых случаев заболевания, включая 1 146 случаев смерти [20].

Заметными атрибутами *N. meningitidis* высокий уровень генетической изменчивости. Геномное разнообразие менингококковых клонов обширно, и изменчивость происходит по большей мере при рекомбинации, это позволяет возбудителю быстро адаптироваться к меняющимся условиям окружающей среды. Инвазивные менингококковые заболевания вызываются *N. Meningitidis*, принадлежащим к серогруппам А, В, С, W, X и Y. В большинстве случаев заболевания вызываются штаммами, принадлежащими к таким гипервирулентным клонам как ST11 CC, ST32 CC, ST41 / 44 CC и т.д [18]. Вирулентность менингококков связана с основными компонентами внешней мембраны: капсульным полисахаридом, белками внешней мембраны (пили, порины, Ора, Орс) и липоолигосахаридом (эндотоксин).

Менингококковая инфекция в РК также сохраняет свою актуальность. Согласно статистическим данным, заболеваемость МИ у детей от 0 до 14 лет с 2012 по 2019 гг. имела разнообразные показатели. В среднем заболеваемость за анализируемый период составила 2,41% на 100 тыс. детского населения. Подъем заболеваемости был отмечен в 2015 г. и составил 5,52% (в 2012г.- 1,94%). Следует отметить, что по сравнению с 2012 г. (1,94%), наибольший подъем заболеваемости зарегистрирован в г. Нур-Султан, где показатель количества заболевших МИ увеличился в 16,1 раз (47,19%). Уровень заболеваемости по Казахстану в последующие годы имел тенденцию к

снижению данного показателя в сравнении с 2015 г (5,52%): в 2016 г. – в 1,6 раз (3,42%), с наименьшим уровнем показателей в 2017 г. и 2018 г. – в 7,1 раза (0,78%; 0,77%) соответственно, с незначительным изменением в 2019 г. – 6,8 раз (0,81%) [1].

Цель исследования: проведение молекулярно-эпидемиологического и генетического исследования штаммов *N.meningitidis*, циркулирующих в г. Нур-Султан.

Материалы исследования

Материалом для исследования послужили, как истории болезни (120 историй), с изолированной формой менингококковой инфекции «менингококковый менингит» и смешанной формой «менингококковый менингит + менингококцемия» у детей с января месяца 2010г. по сентябрь 2020г. так и микробные культуры *N.meningitidis*. Чистые культуры, сохранялись при -70°C в триптиказо-соевом бульоне. Набор пациентов, включенных в исследование, проводился в отделении реанимации и интенсивной терапии, инфекционном отделении №1 и №2 Многопрофильной городской детской больницы №3 (МГДБ №3) акимата г. Нур-Султан. Все пациенты наблюдались во время стационарного лечения. Биоматериал от пациентов отбирался при поступлении в стационар. Всем больным для установления диагноза было проведено комплексное клинико-лабораторное и инструментальное исследование согласно клиническому протоколу «Диагностика и лечение менингококковой инфекции у детей» от 2014 и 2019 г. МЗ РК.

Критерии включения: дети от 1 месяца до 15 лет обоего пола, наличие бактериального возбудителя, идентифицированных в спинномозговой жидкости в сыворотке крови, результаты положительного посева на патогены и наличие клинических признаков менингита; информированное согласие для родителей/усыновителей пациента на участие в клиническом исследовании, подписанное одним из родителей/усыновителей ребенка. **Критерии исключения:** дети с диагнозом туберкулезный менингит, доброкачественные и злокачественные опухоли головного мозга, вирусные менингиты и менингоэнцефалиты; дети получавшие антибиотики более 2-х доз амбулаторно; дети до 1 месяца и старше 15 лет;

Возрастная характеристика исследуемых пациентов выглядела следующим образом: наблюдались преимущественно дети в возрасте от 1 до 59 месяцев.

Методы

Бактериологический метод исследования, чувствительность к антибиотикам и серотипирование изолятов. Биоматериал (ликвор/кровь) собирали с использованием тампона (482С, COPAN Diagnostics Inc., Murrieta, CA), в соответствии с инструкцией изготовителя.

От детей в возрасте от 1 месяца до 15 лет было отобрано 120 образцов. Образцы анализировались в период с 2010 по 2020 г. Проводилось как изучение среднего удельный вес заболеваемости, так и сезонные изменения числа случаев менингококковой инфекции. Для транспортировки образцов использовалась среда

LiquidAmies (Copan Diagnostics Inc.). Серотипирование *N. meningitidis* осуществлялось с использованием латекс-аглютинации, тест BIO-RADPASTOREX™ MENINGITIS.

Определение чувствительности к антимикробным препаратам

Для определения чувствительности *N. meningitidis* к ципрофлоксацину, ванкомицину, меропенему, цефтриаксону, Цеф 4, рифампицину, пенициллину использовали диско-диффузионный метод (диски Bio-Rad, США) использовали среду Мюллера-Хилтона с добавлением 5% крови человека [20].

Выделение ДНК *N. meningitidis*

Выделение ДНК из чистых культур *N. meningitidis* проводилось набором QIAamp UCP Pathogen Mini Kit согласно протоколу изготовителя.

Секвенирование *N. meningitidis*

Секвенирование *N. meningitidis* проводили на платформе MiSeq, Illumina, в соответствии с протоколом Nextera XT DNA Library Preparation Kit (24 samples) FC-131-1024.

Биоинформатический анализ

Для первичной оценки и обработки секвенсов прочтений применялся Trimmomatic [6] для удаления адаптерных последовательностей и фильтрации нуклеотидов по качеству. *De novo* сборка прочтений выполнена с использованием метода Velvet [19]. Контроль качества секвенирования: значения N50 (от 6 325 до 51 396), количество контигов (от 217 до 836).

Депонированные в базу данных Neisseria PubMLST сборки *N. meningitidis* были просканированы и помечены по определенным NEIS локусам с помощью подхода аннотации гена за геном [7]. Геномы сравнивались с публично доступными геномами из базы данных Neisseria PubMLST database (<http://PubMLST.org/neisseria>). Для сравнения были использованы 1 605 локусов *N. meningitidis* (встречаемость среди изолятов - 95%) в составе классификационной схемы *N. meningitidis* cgMLST v1.0 [9]. Неполные локусы были исключены, остальные сгруппированы на основе их типа (cgST).

В случае появления новых аллелей или неполных локусов проводилось секвенирование одного гена и ручная курация. Согласно инструментам обозначения, включенным в базу Neisseria pubMLST, изоляты характеризовались капсульным геногруппированием, тонким типированием белков внешней мембраны PorA и FetA и мультилокусным последовательным типированием (MLST) [11].

Инструментом сравнения сгенерированы матрицы расстояний на основе переменных аллелей в основных локусах, которые визуализировались с помощью SplitsTree4 (<http://www.splitstree.org>) [8].

Статистический анализ

Все полученные данные были внесены в разработанную регистрационную карту в бумажном и электронном вариантах, а также в базу данных Excel с шифрованием персональной информации пациентов.

Статистическую обработку полученных клинико-лабораторных данных проводили с использованием программы SPSS IBM Statistics 20.

Исследовательская работа была одобрена Локальным этическим комитетом National Laboratory Astana (NLA) Назарбаев Университета (№20 от 22 сентября 2017 года). Пациенты и здоровые добровольцы были включены в исследование после подписания информированного согласия.

Результаты

С 2010 по 2020 гг в г. Нур-Султан было зарегистрировано 203 случая инвазивных менингококков. Для исследования случайным образом были отобраны 120 историй болезней пациентов с изолированными чистыми культурами возбудителей менингококковой инфекции.

Для определения серогрупп *N.meningitidis*, циркулирующих в г. Нур-Султан за период 2010-2020 года нами было проведено серотипирование штаммов (n=120) методом латекс агглютинации. Ранжирование серогрупп менингококка по убыванию показало, что

серогруппа «А» встречается в 59,2% (n=71), серогруппа «В» - 24,2% (n=29), серогруппа «С» - 10,8% (n=13) и самый низкий процент «W135» - 4,2% (n=5) и «29E» - 1,7% (n=2) (рисунок 1).

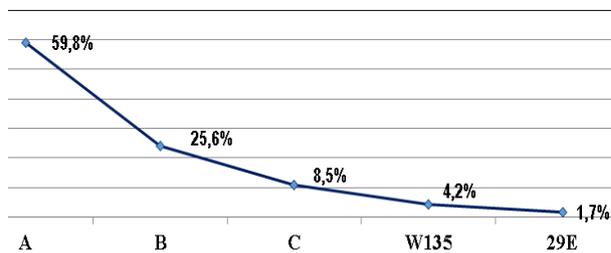


Рисунок 1. Средний удельный вес серогрупп *N.meningitidis* за 2010-2020 гг. в г. Нур-Султан.

(Figure 1. Average specific gravity of *N. meningitidis* Serogroup for 2010-2020 in Nur-Sultan).

Таблица 1.

Серогруппы менингококкового менингита циркулировавшие с 2010 по 2020 гг. в г. Нур-Султан.

(Table 1. Serogroups of meningococcal meningitis circulated from 2010 to 2020 in Nur-Sultan).

	A		B		C		W135		29E		Итого
	абс	%	абс	%	абс	%	абс	%	абс	%	
2010	2	22,3	7	77,7	0	0	0	0	0	0	9
2011	3	75	1	25	0	0	0	0	0	0	4
2012	2	33,4	3	50	0	0	1	16,4	0	0	6
2013	3	30	3	30	1	10	1	10	2	20	10
2014	4	50	4	50	0	0	0	0	0	0	8
2015	47	78,4	5	8,3	8	0	0	0	0	0	60
2016	8	66,6	4	33,4	0	0	0	0	0	0	12
2017	0	0	1	33,4	0	0	2	66,6	0	0	3
2018	0	0	1	50	1	0	0	50	0	0	2
2019	1	50	0	0	1	50	0	0	0	0	2
2020	1	25	0	0	2	50	1	0	0	0	4
итого	71		29		13		5		2		120

В таблице 1 представлена серогруппы менингококкового менингита по годам с 2010 по 2020гг. В результате исследования установлено, что из года в год отмечается вариабельность выделенных серогрупп менингококка. Как представлено на рисунке - 2 в г. Нур-Султан в 2010 году преобладала серогруппа «В» - 77,7% (n=7), в 2011г. увеличилась частота серогруппы «А» - 75% (n=3), в 2013 году выявлена новая серогруппа «29E» - 20% (n=2) и в 2015г. в период пика заболеваемости МИ наиболее часто регистрировалась серогруппа «А» - 78,4% (n=47) случаев. В 2016г. наблюдалось снижение частоты серогруппы «А» в 5 раз (в сравнении с 2015 годом от 47 до 8 случаев-66,7%), а серотип «В» составил 33,3% (n=4). В 2017г. вновь появилась серогруппа «W135»- 66,7% (n=2), снизилась частота серогруппы «В» до 33,1% (n=1), в 2018 г и 2019 г отмечены единичные случаи регистрации серотипов «А», «В», «С» и в 2020 г. до сентября месяца включительно «А»-25% (n=1), «С»-50% (n=2), «W135»-25% (n=1) (таблица 1).

Для выявления сезонности менингококка у исследуемых пациентов нами была проанализирована частота обращаемости пациентов в стационар с января по декабрь 2010 - 2020гг. Как показано на графике

сезонный подъем регистрации менингита (*N.meningitidis*) приходился на март-май месяц (рисунок 2).

Наименьшие показатели встречаемости данной патологии отмечаются с одинаковой частотой в летне-осенний период (август-октябрь) в 0,08% случаев соответственно.

Также в рамках данной задачи у исследуемых детей мы определяли чувствительность *N.meningitidis* к антибиотикам. По нашему клиническому опыту пенициллин, по-прежнему, сохраняет высокую эффективность при лечении менингококкового менингита, а при пневмококковом менингите – цефтриаксон, цефотаксим в комбинации с ванкомицином. Проведенный анализ показал абсолютную чувствительность (100%) к ципрофлоксацину, ванкомицину, меропенему, цефтриаксону, Цеф 4, рифампицину, наименьшая чувствительность в 87,5% случаев была отмечена к пенициллину.

С целью дополнительной характеристики штаммов выделенных в период подъема заболеваемости (2015г.) нами проведена генетическая характеристика штаммов *N.meningitidis* методом полногеномного секвенирования.

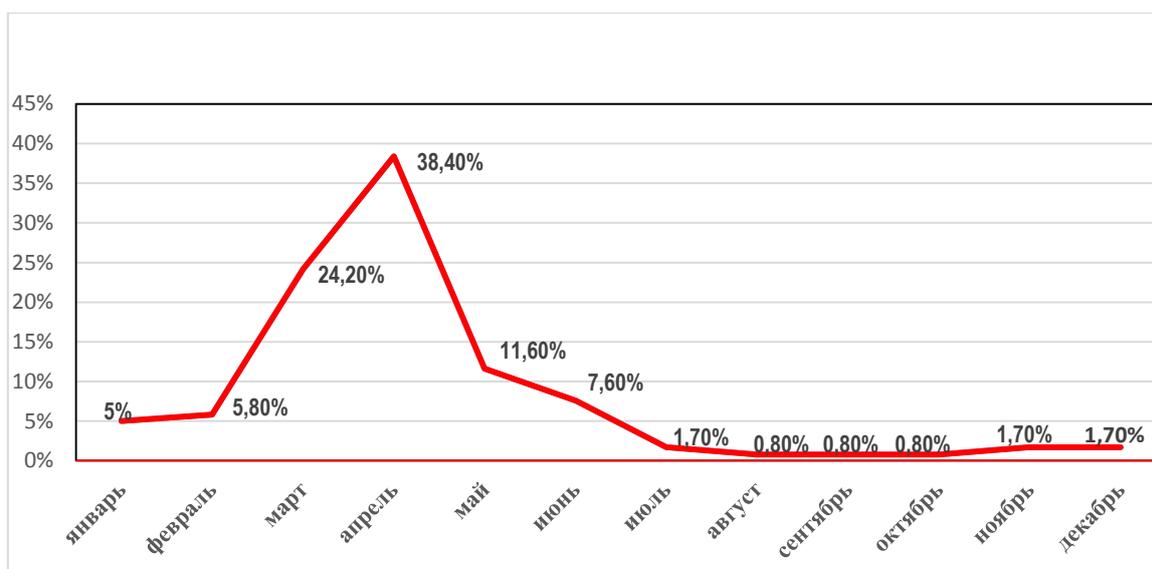


Рисунок 2. Средний удельный вес сезонного изменения числа случаев заболеваний менингококкового менингита за 2010-2020 гг. в г. Нур-Султан.

(Figure 2. Average share of seasonal changes in the number of cases of meningococcal meningitis for 2010-2020 in Nur-Sultan).

С целью дополнительной характеристики штаммов выделенных в период подъема заболеваемости (2015г.) нами проведена генетическая характеристика штаммов *N.meningitidis* методом полногеномного секвенирования.

Для полногеномного секвенирования (WGS) были отобраны 4 клинических изолятов *N.meningitidis* выделенные во время вспышки менингококковой инфекцией в г. Нур-Султан. Собранные *de novo* геномы были отсканированы платформой BIGSdb для определения: генотипических профилей, cgMLST, вариантов вакцинного антигена и аллельных типов

генов, связанных с резистентностью к антимикробным препаратам, а также локусов путей денитрификации. Количество контигов (от 136 до 407), кратность покрытия (от 55 до 163). Параметр длины K-mer варьировал между изолятами от 91 до 180 (в среднем 149). *N. meningitidis* 33 (размер генома 2 113 281 п.н., 261 контиг, GC контент 51,7%), *N. meningitidis* 41 (размер генома 2 235 228 п.н., 594 контигов, GC контент 51,0%), *N. meningitidis* 165 (размер генома 2 111 985 п.н., 343 контигов, GC контент 51,8%), *N. meningitidis* 197 (размер генома 2 205 055 п.н., 380 контигов, GC контент 51,6%).

Таблица 2.

Таблица 2. Определение PubMLST серогрупп и страны первичного изолирования *N. meningitidis*.

(Table 2. Definition of PubMLST serogroups and country of primary isolation for *N. meningitidis*).

№ штамм	Наименование изолята	PubMLST серогруппа	PubMLST Страна первичного изолята	PubMLST ID
33	<i>N. meningitidis</i>	Y	Russia	63030
41	<i>N. meningitidis</i>	A	Russia	83978
165	<i>N. meningitidis</i>	B	USA	13795
197	<i>N. meningitidis</i>	B	USA	53516

Как известно, MLST является наиболее подходящим инструментом для характеристики популяции штаммов *N. meningitidis*, выявления эпидемически значимых клональных комплексов и циркулирующих штаммов. В нашем исследовании геномы сравнивались с публично доступными в *Neisseria* PubMLST database (<http://PubMLST.org/neisseria>). Для сравнения между геномами использовались 1 605 локусов *N. meningitidis* (локусы встречаются в 95% изолятов в *Neisseria* PubMLST database) в *N. meningitidis* cgMLST v1.0 (№27).

На основе полученных данных были определены серогруппы изученных возбудителей. Аллели,

обнаруженные и идентифицированные в каждой сборке, скринировали в отношении генов в областях А (синтез капсулы), В (транслокация капсулы), С (транспорт капсулы). Для серогрупп А, В, С, W и Y, и 10 капсульных генов, присутствующих в этих областях. Геногруппу капсулы определяли на основе идентификации по меньшей мере одного серогрупп-специфического гена. Серогруппы штаммов *N. meningitidis* №33, 41, 197 были подтверждены. Серогруппа штамма *N. meningitidis* №165 была уточнена, штамму была присвоена серогруппа «В» (таблица 3).

Описание генов антибиотикорезистентности *N. meningitidis*.(Table 3. Description of antibiotic-resistant genes of *N. meningitidis*).

Механизм АМП	Гены
Антибиотик-мишень у восприимчивых видов	Alr, Ddl, dxr, EF-G, EF-Tu, folA, Dfr, folP, gyrA, gyrB, inhA, fabI, Iso-tRNA, kasA, MurA, rho, rpoB, rpoC, S10p, S12p
Дренажный насос, придающий устойчивость к антибиотикам	EmrAB-TolC, MacA, MacB
Ген, придающий устойчивость через отсутствие	gidB
Белок, изменяющий заряд клеточной стенки, придающий устойчивость к антибиотикам	PgsA
Регулятор, модулирующий экспрессию генов устойчивости к антибиотикам	OxyR

Обсуждение результатов

Таким образом, анализ историй болезни пациентов, пролеченных с диагнозом «менингококковый менингит» в МГДБ №3 г. Нур-Султан за 2010-2020 гг., показал наибольший удельный вес выявляемости среди серогрупп «А» - 59,2% (n=71), на втором месте «В» - 24,2% (n=29), на третьем - «С» - 10,8% (n=13) и низкий показатель у серогрупп «W135» - 4,2% (n=5) и «29E» - 1,7% (n=2).

При полногеномном секвенировании выявлен аллельный профиль расширенного MLST клонального комплекса серогруппы *N. meningitidis*: «А» (ST11- ST12) – 40%, «В» (ST- 6) – 20%, «У» (ST-10) – 20% «С» (ST-1) – 20%, определена их 100% чувствительность к рифампицину и 50% устойчивость к пенициллину. Результаты полногеномного анализа *N. meningitidis* были депонированы в международную базу данных Genbank со следующими номерами: SRX7002979, SRX7002980, SRX7002981, SRX7002982 (PubMLST, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/term>). Определен уровень генетического расхождения между изолятами полученными в Казахстане и других странах. Анализируемые штаммы имели аллели repA 83, кодирующих пенициллин-связывающий белок 2 (PBP2). Известно, что изменения в PBP2 напрямую связаны со снижением восприимчивости к менингококков к пенициллину [12]. Так, штаммы несли резистентность к пенициллину 50% (rep A allele: 83) и чувствительность к рифампицину 100% (rpo B allele: 1 (rifampicin MIC: <=1)). Что также подтверждено культуральными методами. Наши данные согласуются с литературными данными [13].

Также анализ нуклеотидных последовательностей выявил присутствие и других генов, связанных с антибиотикорезистентностью, таблица 2. Хотя пенициллин не является первым препаратом выбора для лечения, его все же рекомендуется использовать, если может быть задержка доступа к цефалоспорином третьего поколения. Вместе с тем в этом исследовании нам не удалось генетически подтвердить фенотипические характеристики антибиотикорезистентности к другим исследованным противомикробным препаратам у изученных штаммов, кроме пенициллина и рифампицина, что требуют дальнейшей проработки.

Характеристика сезонности бактериального менингита имеет важное значение для углубленного

понимания эпидемиологии, экологии и динамики передачи заболевания и является ключом к разработке и реализации оптимальных стратегий профилактики и контроля. По данным *Paireau J. с соавт.* (2016) в странах Африканского пояса менингита сезонный пик заболеваемости приходится на засушливый сезон. МИ имеет значительные сезонные закономерности в странах, анализируемых за пределами пояса, где более высокая заболеваемость наблюдается зимой как в северном, так и в южном полушариях [13,16].

Mueller J.E. (2013) также отмечал сезонность заболеваемости менингитами, которая характеризуется увеличением числа бактериальных менингитов зимой и серозных менингитов в летний период, что подтверждает результаты нашего исследования [15].

Анализ сезонности при заболеваемости МИ в г. Нур-Султан показал, что наиболее часто заболевание регистрируется в весеннее время (март-май).

Расшифровка этиологического агента при менингитах имеет важное значение для обоснования лечебно-профилактических и противоэпидемических мероприятий [2].

Несмотря на возможности эффективного проведения антимикробной и интенсивной терапии, общие показатели смертности при бактериальных менингитах остаются высокими, в среднем составляя от 20 до 25% [3].

Аналогичная ситуация у детей с БМ отмечается в МГДБ №3, г. Нур-Султан, в связи с чем нами определялась чувствительность выделенных патогенов к антибиотикам, в результате которого, высокая чувствительность (100%) отмечена к ципрофлоксацину, ванкомицину, меропенему, цефтриаксону, Цеф 4, рифампицину, наименьшая чувствительность в 87,5% случаев была определена к пенициллину. Наши данные относительно чувствительности к антибиотикам согласуются с отчетами многих европейских стран [21].

Эти результаты убедительно подтверждают использование цефалоспоринов третьего поколения для эмпирического лечения ИМИ в РК. Наблюдаемая устойчивость к часто используемым антибиотикам может быть связана с широким распространением использования безрецептурных антибиотиков.

Наши результаты подчеркивают важность молекулярного эпиднадзора за менингококками в регионе, а также потенциальной разработкой доступной вакцины против циркулирующих серотипов.

Вклад авторов:

Сейдуллаева А.Ж. – набор данных, описательная часть, формальный анализ.

Баешева Д.А., Турдалина Б.Р. - научное руководство, концепция и концептуализация.

Алтынбекова А.В. - набор данных и менеджмент ресурсов исследования.

Турарова А.М. - набор данных.

Данияров А.Ж. – биоинформатический и статистический анализ.

Каиров У.Е. - биоинформатический анализ.

Кожаметов С.С. - критический анализ, научное сопровождение статьи, ревизия статьи.

Финансирование: Данное исследование проводилось в рамках проекта МОН РК по грантовому финансированию AP05135091.

Конфликтов интересов не заявлен.

Сведения о публикации: ни один фрагмент данной статьи не был опубликован в других журналах и не находится на рассмотрении другими издательствами.

Литература:

1. Баешева Д.А., Жаксылыкова Г.А., Сейдуллаева А.Ж. Мониторинг заболеваемости менингококковой инфекцией в Республике Казахстан за 2012-2017 гг. среди детского населения // Валеология. 2018. № 3: С. 41-47.

2. Ералиева Л.Т. Совершенствование диагностики бактериальных менингитов у детей и иммунопатогенетические подходы к терапии: дис. ... д-ра мед.наук. Алматы. 2010, 210 с.

3. Ералиева Л.Т., Мусаев А.Т., Ешманова А.К., Уалиева С.Т. Характеристика клинико-биохимических критериев пневмококкового менингита у детей // Вестник КазНМУ. 2014. №4. С. 246-250.

4. Ahmed M.M., Nour M.A.K., Soheir S.M. Detection of Neisseria meningitidis DNA in blood samples using direct-PCR test // Egyptian pharmaceutical journal, 2013. 1(1): p. 115-119.

5. Batista, R.S., Gomes A.P., Gazineo J.L.D., Miguel P.S.P. Santana L.A., Geller L.O.M. Meningococcal disease, a clinical and epidemiological review // Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 2017. 10(11): P. 1019-1029.

6. Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data // Bioinformatics, 2014. 30(15): P. 2114-2120.

7. Bratche, H.B., Corton C., Jolley K.A., Parkhill J., Maiden M.C.J. A gene-by-gene population genomics platform: de novo assembly, annotation and genealogical analysis of 108 representative Neisseria meningitidis genomes // BMC Genomics, 2014. 15(1): p. 1138.

8. Huson D.H., Bryant D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies // Mol Biol Evol, 2006. 23(2): P. 254-67.

9. Jolley K.A., Bray J.E. Maiden M.C.J. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications // Wellcome open research, 2018. 3: p. 124-124.

10. Kambiré D., Soeters H.M., Ouédraogo-Traoré R., Medah I., Sangare L. Nationwide Trends in Bacterial Meningitis before the Introduction of 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine-Burkina Faso, 2011-2013 // PloS one, 20. 11(11): P. e0166384-e0166384.

11. Kim H.-J., Fay M.P., Feuer E.J. Midthune D.N. Permutation tests for joinpoint regression with applications to cancer rates // Statistics in Medicine, 2000. 19(3): P. 335-351.

12. Kim K.S. Acute bacterial meningitis in infants and children // Lancet Infect Dis. 2010. Vol. 10. P. 32-42.

13. Levy C., de La Rocque F, Cohen R. Epidemiology of pediatric bacterial meningitis in France // Med Mal Infect. 2009.39. P. 419-431.

14. Martin N.G., Sadarangani M., Pollard A.J., Goldacre M.J. Hospital admission rates for meningitis and septicaemia caused by Haemophilus influenzae, Neisseria meningitidis, and Streptococcus pneumoniae in children in England over five decades: a population-based observational study // Lancet Infect Dis. 2014. 14. P. 397-405.

15. Mueller J.E. Conjugate vaccine introduction in the African meningitis belt: meeting surveillance objectives // Tropical Medicine and International Health. 2013. Vol. 18. 1. P. 58-64.

16. Paireau J., Chen A., Broutin H. Grenfell B., Basta N.E. Seasonal dynamics of bacterial meningitis: a time-series analysis // Lancet Glob Health. 2016 Jun; 4(6): e370-e377.

17. WHO, Global burden of disease estimates. Geneva: World Health Organization, 2016. 01.09.2020.

18. Yazdankhah S.P., Kriz P., Tzanakaki G., Kalmusova J., Musilek M., Alvestad T., Jolley K.A., Wilson D.J., McCarthy N.D., Caugant D.A., Maiden M.C.J. Distribution of serogroups and genotypes among disease-associated and carried isolates of Neisseria meningitidis from the Czech Republic, Greece, and Norway // J Clin Microbiol. 2014. 42. P. 5146-5153.

19. Zerbino D.R., Birney E. Velvet: Algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs // Genome Research, 2008. 18(5): P. 821-829.

20. Zhang Y., Wei D., Guo X., Han M., Yuan L. Kyaw H.M. Burden of Neisseria meningitidis infections in China: a systematic review and meta-analysis // Journal of global health, 2016. 6(2): P. 020409-020409.

21. Zouheir Y., Atany T. Boudebouch N. Emergence and spread of resistant N. meningitidis implicated in invasive meningococcal diseases during the past decade (2008-2017) // The Journal of Antibiotics. 2019. Vol. 72. P. 185-188.

References:

1. Baesheva D.A., Zhaksylykova, G.A., Seidullaeva, A.Zh. Monitoring zabolevaemosti meningokokkovoï infektsiei v Respublike Kazakhstan za 2012-2017 gg. sredi detskogo naseleniya [Monitoring the incidence of meningococcal infection in the Republic of Kazakhstan for 2012-2017 among the child population]. *Valeologiya* [Valeology]. 2018. Vol. 3: pp. 41-47 [in Russian].

2. Eralieva L.T. *Sovershenstvovanie diagnostiki bakterial'nykh meningitov u detei i immunopatogeneticheskie podkhody k terapii* [Improving the diagnosis of bacterial meningitis in children and immunopathogenetic approaches to therapy]: dokt. diss. Almaty. 2010. 210p. [in Russian].

3. Eralieva L.T., Musayeva A.T., Echmanova A., Ualiyeva S. Kharakteristika kliniko-biokhimicheskikh kriteriev pnevmokokkovogo meningita u detei [Characteristics of clinical and biochemical criteria for pneumococcal meningitis in children]. *Vestnik KazNMU* [Bulletin KazNMU]. 2014. 4. pp. 246-250 [in Russian].
4. Ahmed M.M., Nour M.A.K., Soheir S.M. Detection of *Neisseria meningitidis* DNA in blood samples using direct-PCR test. *Egyptian pharmaceutical journal*. 2013. 1(1): p. 115-119.
5. Batista R.S., Gomes A.P., Gazineo J.L.D., Miguel P.S.P., Santana L.A. Geller L.O.M. Meningococcal disease, a clinical and epidemiological review. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2017. 10(11): P. 1019-1029.
6. Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014. 30(15): p. 2114-2120.
7. Bratcher H.B., Corton C., Jolley K.A., Parkhill J., Maiden M.C.J. A gene-by-gene population genomics platform: de novo assembly, annotation and genealogical analysis of 108 representative *Neisseria meningitidis* genomes. *BMC Genomics*. 2014. 15(1): P. 1138.
8. Huson D.H., Bryant D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol Biol Evol*. 2006. 23(2): P. 254-67.
9. Jolley K.A., Bray J.E., Maiden M.C.J. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome open research*. 2018. 3: P. 124-124.
10. Kambiré D., Soeters H.M. Ouédraogo-Traoré R., Medah I., Sangare L. Nationwide Trends in Bacterial Meningitis before the Introduction of 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine-Burkina Faso, 2011-2013. *PloS one*. 20. 11(11): p. e0166384-e0166384.
11. Kim H.-J., Fay M.P., Feuer E.J., Midthune D.N. Permutation tests for joinpoint regression with applications to cancer rates. *Statistics in Medicine*. 2000. 19(3): P. 335-351.
12. Kim K.S. Acute bacterial meningitis in infants and children. *Lancet Infect Dis*. 2010. Vol. 10. P. 32-42.
13. Levy C., de La Rocque F., Cohen R. Epidemiology of pediatric bacterial meningitis in France. *Med Mal Infect*. 2009.39. P. 419-431.
14. Martin N.G., Sadarangani M., Pollard A.J., Goldacre M.J. Hospital admission rates for meningitis and septicaemia caused by *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, and *Streptococcus pneumoniae* in children in England over five decades: a population-based observational study. *Lancet Infect Dis*. 2014. 14. P. 397-405.
15. Mueller J.E. Conjugate vaccine introduction in the African meningitis belt: meeting surveillance objectives. *Tropical Medicine and International Health*. 2013. Vol. 18. 1. P. 58-64.
16. Paireau J., Chen A., Broutin H., Grenfell B., Basta N.E. Seasonal dynamics of bacterial meningitis: a time-series analysis. *Lancet Glob Health*. 2016 Jun; 4(6): e370-e377.
17. WHO., *Global burden of disease estimates*. Geneva: World Health Organization, 2016. 01.09.2020.
18. Yazdankhah S.P., Kriz P., Tzanakaki G. Kalmusova J., Musilek M., Alvestad T., Jolley K.A., Wilson D.J., McCarthy N.D., Caugant D.A., Maiden M.C.J. Distribution of serogroups and genotypes among disease-associated and carried isolates of *Neisseria meningitidis* from the Czech Republic, Greece, and Norway. *J Clin Microbiol*. 2014. 42. P. 5146-5153.
19. Zerbino D.R., Birney E. Velvet: Algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Research*. 2008. 18(5): P. 821-829.
20. Zhang Y., Wei D., Guo X., Han M., Yuan L. Kyaw H.M. Burden of *Neisseria meningitidis* infections in China: a systematic review and meta-analysis. *Journal of global health*. 2016. 6(2): P. 020409-020409.
21. Zouheir Y., Atany T., Boudebouch N. Emergence and spread of resistant *N. meningitidis* implicated in invasive meningococcal diseases during the past decade (2008-2017). *The Journal of Antibiotics*. 2019. Vol. 72. P. 185-188.

Контактная информация:

Кожаметов Самат Серикович – к.б.н., ведущий научный сотрудник, Центр наук о жизни, National Laboratory Astana, Назарбаев Университет, Нур-Султан, Республика Казахстан.

Почтовый адрес: Республика Казахстан, 010000, г. Нур-Султан, пр. Кабанбай батыра 53, Астана.

E-mail: skozhakhmetov@nu.edu.kz

Телефон: +7 705 910 0932