

Молекулярная характеристика *Neisseria meningitidis* серогруппы W в Санкт-Петербурге

Э. А. МАРТЕНС^{1,2}, Л. И. ЖЕЛЕЗОВА¹, *В. В. ГОСТЕВ^{1,2},
Д. В. ЛИХОЛЕТОВА¹, С. М. ЗАХАРЕНКО¹

¹ ФГБУ, «Детский научно-клинический центр по инфекционным болезням Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия

² ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова», Санкт-Петербург, Россия

Molecular Characterization of *Neisseria meningitidis* Serogroup W in St. Petersburg

ELVIRA A. MARTENS^{1,2}, LYUDMILA I. ZHELEZOVA¹, *VLADIMIR V. GOSTEV^{1,2},
DARIA V. LIKHOLETOVA¹, SERGEY M. ZAKHARENKO¹

¹ Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases under the Federal Medical Biological Agency, Saint Petersburg, Russia

² North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov, Saint Petersburg, Russia

Резюме

В исследование включено 14 изолятов *Neisseria meningitidis* серогруппы W, выделенных от больных генерализованными формами менингококковой инфекции в возрасте 0–17 лет в НИИДИ-ДНКЦИБ в период с 2009 г. по 2020 г., и от носителей. Изоляты от носителей (17–18 лет) были выделены в 2016–2019 гг. Идентификацию выделенных изолятов проводили методом MALDI-TOF масс-спектрометрии с использованием масс-спектрометра Microflex LT (Bruker Daltonics, Германия). Полногеномное секвенирование геномов *Neisseria meningitidis* было проведено на базе платформы Miseq Illumina, при этом была установлена их принадлежность к ST11 (cc11). Результаты проведенного полногеномного секвенирования изучаемых менингококков показали, что в Санкт-Петербурге имеются 2 группы субкластера, относящегося к хадж-кластеру. Кроме того, имеются ближайшие родственные связи с менингококками Англо-Французского и Шведского кластеров Хадж линии.

Ключевые слова: *Neisseria meningitidis*; менингококковая инфекция; полногеномное секвенирование

Для цитирования: Мартенс Э.А., Железова Л.И., Гостев В.В., Лихолетова Д.В., Захаренко С.М. Молекулярная характеристика *Neisseria meningitidis* серогруппы W в Санкт-Петербурге. *Антибиотики и химиотер.* 2022; 67: 5–6: 14–18. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-5-6-14-18>.

Abstract

The study included 14 isolates of *Neisseria meningitidis* serogroup W, isolated from patients with generalized forms of meningococcal infection aged 0–17 years at the Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases during the period from 2009 to 2020, as well as from carriers. The isolates from carriers (17–18 years old) were isolated in 2016–2019. The isolates were identified by MALDI-TOF mass spectrometry using a Microflex LT mass spectrometer (Bruker Daltonics, Germany). Whole genome sequencing of *N. meningitidis* was carried out on the basis of the Miseq Illumina platform; it was established that they belong to ST11 (cc11) sequence type. The results of the whole genome sequencing of the studied meningococci showed that there are 2 groups of the subcluster belonging to the Hajj cluster in St. Petersburg. In addition, they show close affinity with meningococci of the Anglo-French and Swedish clusters of the Hajj line.

Keywords: *Neisseria meningitidis*; meningococcal infection; whole genome sequencing

For citation: Martens E. A., Zhelezova L. I., Gostev V. V., Likholetova D. V., Zakharenko S. M. Molecular characterization of *Neisseria meningitidis* serogroup W in St. Petersburg. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy.* 2022; 67: 5–6: 14–18. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-5-6-14-18>.

Введение

Менингококковая инфекция является строгим антропонозом, её возбудитель *Neisseria men-*

ingitidis относится к бактериям с панмиктической структурой популяции, характеризуется интенсивным горизонтальным генетическим обменом и реализует две крайние стратегии взаимодей-

© Коллектив авторов, 2022

*Адрес для корреспонденции: ул Профессора Попова, д. 9, Детский научно-клинический центр по инфекционным болезням, г. Санкт-Петербург, Россия, 197022.
E-mail: guestvv11@gmail.com

© Team of Authors, 2022

*Correspondence to: 9 Professora Popova st., Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, St. Petersburg, 197022 Russian Federation. E-mail: guestvv11@gmail.com

ствия с хозяином: бессимптомное носительство и тяжёлые генерализованные (инвазивные) инфекции. Эпидемиологический надзор за менингококковой инфекцией и стратегии её вакцинопрофилактики основываются на результатах серогруппового типирования отдельных изолятов и формировании представления о структуре популяции возбудителя на глобальном уровне или в отдельных регионах. Исторически наиболее ранним и практически наиболее важным способом типирования является серогрупповое типирование, определяющее антигенную структуру полисахаридной капсулы. Определение серогрупповой принадлежности менингококков осуществляется как классическим серологическим методом с использованием специфических антисывороток, так и молекулярными методами путём анализа локуса, ответственного за синтез полисахаридной капсулы (ПЦР и секвенирование). Из 12 известных серогрупп менингококков наибольшую часть инвазивных инфекций вызывают бактерии серогрупп А, В и С. Для профилактики инфекций, вызываемых менингококками серогрупп А, С, X, Y и W, доступны вакцины на основе различных комбинаций перечисленных полисахаридов или их конъюгатов с белком носителем, проявляющие большую иммуногенность. Для профилактики инфекций, вызываемых менингококками серогруппы В разработаны рекомбинантные белковые вакцины. Необходимость в белковых вакцинах вызвана тем, что у человека иммунный ответ на полисахарид серогруппы В не развивается из-за его сходства с антигенами человека.

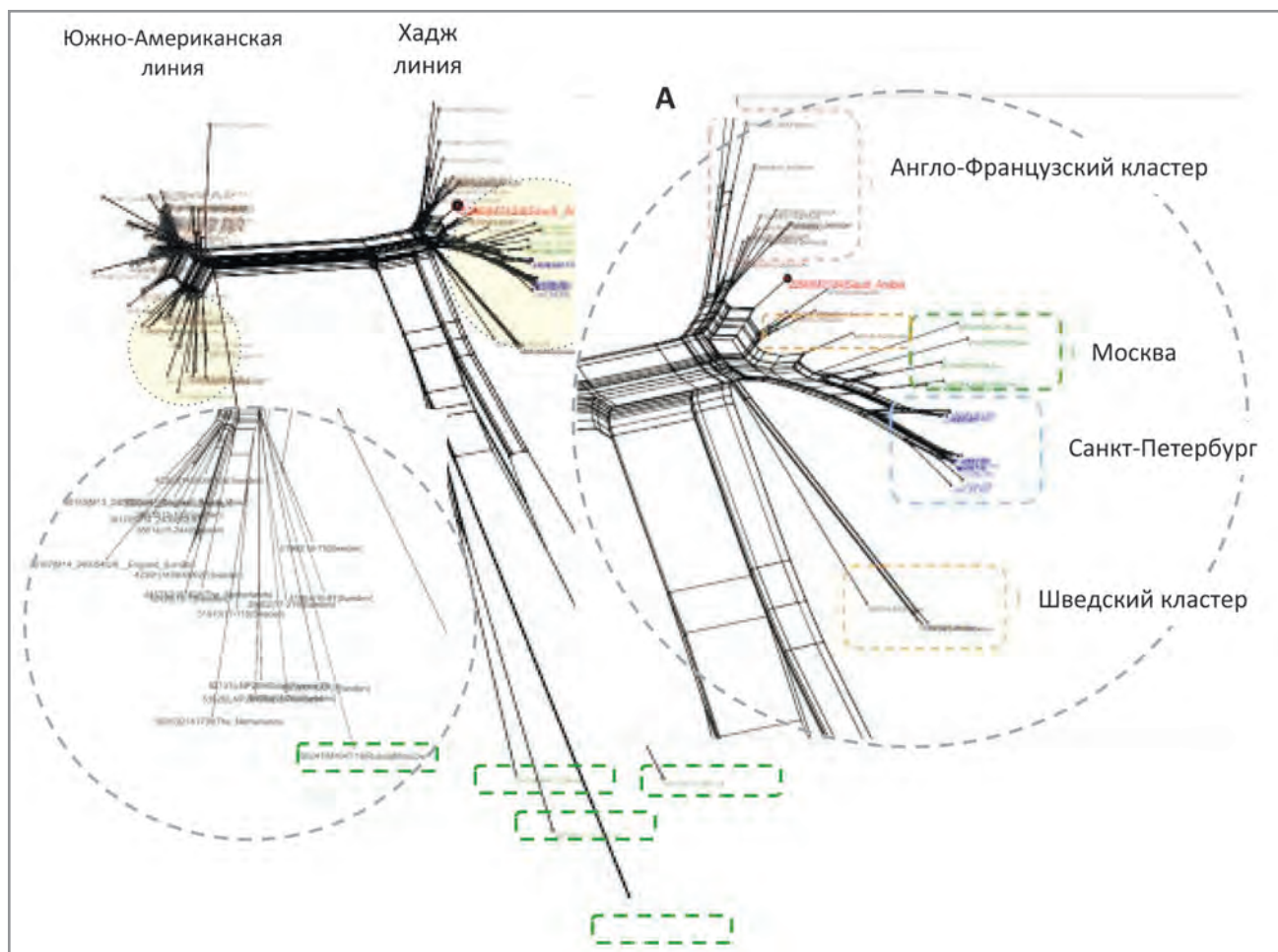
Менингококки оказались первым видом бактерий, для типирования которых был предложен метод мультилокусного сиквенс-типирования (Multilocus Sequence Typing — MLST) [1]. MLST типирование основано на секвенировании фрагментов семи консервативных генов и позволяет выделить в популяции менингококков группы генетически родственных штаммов, получивших название сиквенс-типов (Sequence Types — ST). По состоянию на 30.06.2022 в базе MLST (*Neisseria* typing (pubmlst.org)) описано более 15000 сиквенс-типов. Среди разнообразия сиквенс-типов удаётся выявить более вирулентные, выделяемые при инвазивных инфекциях, и менее вирулентные, выделяемые преимущественно у бессимптомных носителей [2]. Отдельные сиквенс-типы ассоциируются с серогруппами, однако эта связь не абсолютна. Менингококки одной серогруппы обычно представлены множеством сиквенс-типов, в свою очередь отдельные сиквенс-типы могут быть представлены несколькими серогруппами. Более того, возможно переключение капсульного типа. Смысл феномена заключается в изменении структуры и, следовательно, антигенных свойств капсульных полисахаридов вследствие изменения структуры

генов, ответственных за биосинтез капсулы, в результате рекомбинации *in vivo* во время совместного носительства штаммов различных серогрупп [3]. Применение MLST типирования, а также недавно появившаяся возможность полногеномного секвенирования позволили существенно расширить представления о структуре глобальной популяции менингококков.

Для менингококковой инфекции характерна цикличность со сменами ведущих серогрупп и пиками заболеваемости в отдельных регионах через 6–8 лет. В первой половине XX века большинство инвазивных менингококковых инфекций, вероятно вызывали серогруппы А, В и С, однако многие детали сероэпидемиологии менингококков в этот период остались неясными в связи с ограниченными возможностями типирования бактерий в тот период времени. Существенное влияние на популяционную структуру менингококков оказывает вакцинация. Так, наиболее демонстративным эффектом оказалось резкое снижение заболеваемости менингококковой инфекцией серогруппы А в странах африканского «менингитного пояса» после внедрения вакцины MenAfriVac [4, 5].

Одной из наиболее неблагоприятных тенденций последних десятилетий в эпидемиологии менингококковой инфекции следует признать возрастание значение минорных серогрупп W, X, Y, E и негруппируемых изолятов [6]. При этом особого внимания заслуживает генетическая линия сиквенс-типа 11 (ST11) серогруппы W. Менингококки ST11 характеризуются гипервирулентностью, эта генетическая линия была обнаружена среди изолятов, выделенных ещё в 1917 г., в различные периоды она была представлена серогруппами B, C, W и Y [7]. ST11 серогруппы C был причиной вспышки среди военнослужащих в США в 1960-е годы и среди студентов в университетах Великобритании в 1990-е годы [8]. Менингококки ST11 серогруппы W обнаруживали ещё в 70-х годах XX века, однако до 2000 г. они вызывали лишь спорадические заболевания [9]. Ситуация резко изменилась после вспышки среди паломников Хаджа в 2000 г., вызванной менингококками этой линии [10]. Начиная с 2000 г. эти менингококки несут ответственность за крупные эпидемии менингококковой инфекции в «менингитном поясе» в Африке [11], а также эндемические заболевания в Южной Америке, Европе, Соединённом Королевстве и Китае [12–14]. Вместе с тем, результаты исследований методом полногеномного секвенирования показали, что *N.meningitidis* серогруппы W ST11 характеризуются значительной генетической гетерогенностью [15].

Цель работы — молекулярная характеристика *N.meningitidis* серогруппы W ST11 (MenW:cc11) в Санкт-Петербурге и выявление их связи с глобальными генетическими линиями.



Результаты филогенетического анализа геномов *N.meningitidis* ($n=6164$) на основе выравнивания коровой части геномов с использованием алгоритма максимального правдоподобия (Maximum likelihood phylogenetic tree).

Примечание. Представлено усредненное филогенетическое дерево, полученное в программе kSNP3. Сублинии *N.meningitidis* отмечены пунктирными сферами и представлены в увеличенном масштабе: А — Хадж сублиния; В — Южно-Американская сублиния. Геномы изолятов из Санкт-Петербурга и Москвы отмечены зеленым и синим прямоугольниками, соответственно. Синим цветом выделены изоляты шведского субкластера; оранжевым — изоляты англо-французского субкластера. Красным цветом выделен геном предкового штамма (M1724) Хадж линии.

Results of phylogenetic analysis of *N.meningitidis* genomes ($n=6164$) based on the alignment of the core part of the genomes using the Maximum likelihood phylogenetic tree algorithm.

Note. An averaged phylogenetic tree obtained using the kSNP3 program is presented. Sublines of *N.meningitidis* are marked with dotted spheres and are shown on an enlarged scale: A — Hajj sublineage; B — South American subline. The genomes of isolates from St. Petersburg and Moscow are marked with green and blue rectangles, respectively. Isolates of the Swedish subcluster are highlighted in blue; isolates of the Anglo-French subcluster — in orange. The genome of the ancestral strain (M1724) of the Hajj line is highlighted in red.

Материал и методы

Полногеномное секвенирование. Использовали 24-часовые чистые культуры изолятов *N.meningitidis* выросшие на агаре Мюллера–Хинтона (БиоРад, США). Геномную ДНК культур выделяли с использованием наборов PureLink Genome kit (Invitrogen, USA) по протоколу производителя. Концентрацию ДНК определяли на приборе Qubit с использованием наборов DNA High Sensitivity. Мультиплексирование и приготовление ДНК-библиотек проводили с помощью наборов Nextera Flex (Illumina), согласно протоколу производителя. Оценку длин фрагментов ДНК-библиотек проводили на приборе Agilent TapeStation 4150 (США) с наборами High Sensitivity D1000 ScreenTape (Agilent, США). Полногеномное секвенирование проводили на приборе Miseq (Illumina, США), с использованием 300 п.н. парноконцевых прочтений на картридже V3 — 600 (Illumina, США).

Биоинформатический анализ. Предварительная обработка полученных парных прочтений (ридов), включающая удаление адаптерных последовательностей, фильтрация по качеству и длине, проводилась с помощью TrimGalore 0.6.01 (http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore). Фильтрованные обработанные риды собирали в контиги de novo с помощью пакета программ Unicycler [16]. Полученные сборки геномов были аннотированы в PROKKA [17]. Сравнительный филогенетический анализ с использованием программы kSNP3 [18], включал 6164 генома *N.meningitidis*: 14 геномов, полученных в настоящем исследовании и 6150 геномов серогруппы W из базы данных PubMLST, в том числе геном предкового штамма Хадж клона M1724 [19]. Полученные данные проверялись посредством визуализации полиморфизмов в IGV браузере (<https://software.broadinstitute.org/software/igv/download>).

Результаты и обсуждение

Результаты филогенетического анализа геномов *N.meningitidis* генетической линии MenW:cc11 (14 изолятов, выделенных в Санкт-Петербурге и геномов из международных баз данных, в том числе геномов изолятов, выделенных в Москве) представлены на рисунке. Как уже было показано в предыдущих работах, геномы линии MenW:cc11 делятся на две основные линии: Хадж и Южно-Американскую [8].

Большинство геномов из Москвы и Санкт-Петербурга относятся к линии Хадж. Среди них можно выделить несколько кластеров и субкластеров. Основной кластер российских геномов представлен геномами изолятов родственных со Шведским и Англо-Французским кластерами линии Хадж. Очевидно чёткое разделение на московский и санкт-петербургский субкластеры. Геномы московского субкластера гетерогенны, в пределах санкт-петербургского субкластера выделяются две группы геномов. В одну группу вошли геномы изолятов, выделенных от больных ($n=6$). Вторая представлена семью геномами изолятов, выделенных от носителей и одним геномом изолята, выделенного от больного.

Литература/References

1. Maiden M.C., Bygraves J.A., Feil E., Morelli G., Russell J.E., Urwin R., Zhang Q., Zhou J., Zurth K., Caugant D.A. et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 3140–3145. doi: 10.1073/pnas.95.6.3140.
2. Yazdankhah S.P., Kriz P., Tzanakaki G., Kremastinou J., Kalmusova J., Musilek M., Alvestad T., Jolley K.A., Wilson D.J., McCarthy N.D. et al. Distribution of serogroups and genotypes among disease-associated and carried isolates of *Neisseria meningitidis* from the Czech Republic, Greece, and Norway. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 5146–5153. doi: 10.1128/JCM.42.11.5146-5153.2004.
3. Stephens D.S., Greenwood B., Brandtzaeg P. Epidemic meningitis, meningococcaemia, and *Neisseria meningitidis*. *Lancet.* 2007; 369: 2196–2210. doi: 10.1016/S0140-6736(07)61016-2.
4. Daugla D.M., Gami J.P., Gamougam K., Naibei N., Mbainadji L., Narbe M., Toralta J., Kodbesse B., Ngadoua C., Coldiron M.E. et al. Effect of a serogroup A meningococcal conjugate vaccine (PsA-TT) on serogroup A meningococcal meningitis and carriage in Chad: a community study [corrected]. *Lancet.* 2014; 383: 40–47. doi: 10.1016/S0140-6736(13)61612-8. Epub 2013 Sep 12.
5. Gamougam K., Daugla D.M., Toralta J., Ngadoua C., Fermon F, Page AL, Djingarey M.H., Caugant D.A., Manigart O., Trotter C.L. et al. Continuing effectiveness of serogroup A meningococcal conjugate vaccine, Chad, 2013. *Emerg Infect Dis.* 2015; 21: 115–118.
6. Tzeng Y.L., Stephens D.S. A Narrative Review of the W, X, Y, E, and NG of Meningococcal Disease: Emerging Capsular Groups, Pathotypes, and Global Control. *Microorganisms.* 2021, 9 (3): 519. doi: 10.3390/microorganisms9030519.
7. Caugant D.A., Brynildsrud O.B. *Neisseria meningitidis*: using genomics to understand diversity, evolution and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol.* 2020; 18: 84–96. doi: 10.1038/s41579-019-0282-6.
8. Lucidarme J., Hill D.M., Bratcher H.B., Gray S.J., du Plessis M., Tsang R.S., Vazquez J.A., Taha M.K., Ceyhan M., Efron A.M. et al. Genomic resolution of an aggressive, widespread, diverse and expanding meningococcal serogroup B, C and W lineage. *J Infect* 2015, 71: 544–552.
9. Caugant D.A., Brynildsrud O.B. *Neisseria meningitidis*: using genomics to understand diversity, evolution and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* 2020, 18: 84–96. doi: 10.1038/s41579-019-0282-6.

Информация об авторах

Мартенс Эльвира Акрамовна — заведующий клинико-диагностической лабораторией, младший научный сотрудник, ФГБУ «Детский научно-клинический центр

Среди московских изолятов линии Хадж обнаружено четыре генома, не связанных с выше-описанным кластером, а также один геном, относящийся к Южно-Американской линии.

Несмотря на относительно небольшое количество геномов линии MenW:cc11 из России, включённых в исследование, полученные результаты позволяют сделать некоторые выводы.

Скорее всего импорт изолятов MenW:cc11 в Россию происходил неоднократно. Изоляты линии Хадж, родственные с Англо-Французским и Шведским кластерами, судя по всему, получили существенно большее распространение чем изоляты Южно-Американской линии. При этом уже в ходе эволюции на территории России происходит формирование групп, связанных с отдельными регионами.

Учитывая повышенную вирулентность менингококков линии MenW:cc11, для эпидемиологического наблюдения за указанными микроорганизмами принципиально необходимо применение наиболее современных молекулярных методов, таких как полногеномное секвенирование.

10. Mayer L.W., Reeves M.W., Al-Hamdan N., Sacchi C.T., Taha M.K., Ajello G.W., Schmink S.E., Noble C.A., Tondella M.L., Whitney A.M. et al. Outbreak of W135 meningococcal disease in 2000: not emergence of a new W135 strain but clonal expansion within the electrophoretic type-37 complex. *J Infect Dis.* 2002; 185: 1596–1605. doi: 10.1086/340414.
11. Fazio C., Neri A., Vacca P., Ciammaruconi A., Arghittu M., Barbui A.M., Vocale C., Bernaschi P., Isola P., Galanti I.A. et al. Cocirculation of Hajj and non-Hajj strains among serogroup W meningococci in Italy, 2000 to 2016. *Euro Surveill.* 2019; 24 (4): 1800183. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2019.24.4.1800183.
12. Mustapha M.M., Marsh J.W., Harrison L.H. Global epidemiology of capsular group W meningococcal disease (1970–2015): Multifocal emergence and persistence of hypervirulent sequence type (ST)-11 clonal complex. *Vaccine* 2016, 34: 1515–1523. doi: 10.1016/j.vaccine.2016.02.014.
13. Lucidarme J., Scott K.J., Ure R., Smith A.J., Lindsay D.S.J., Stenmark B., Jacobsson S., Fredlund H., Cameron J.C., Smith-Palmer A. et al. An international invasive meningococcal disease outbreak due to a novel and rapidly expanding serogroup W strain, Scotland and Sweden, July to August 2015. *Euro Surveill.* 2016; 21 (45): 30395. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.45.30395.
14. Ladhani S.N., Beebejaun K., Lucidarme J., Campbell H., Gray S., Kaczmarek E., Ramsay M.E., Borrow R. Increase in Endemic *Neisseria meningitidis* Capsular Group W Sequence Type 11 Complex Associated With Severe Invasive Disease in England and Wales. *Clin Infect Dis.* 2014; 60 (4): 578–585. doi: 10.1093/cid/ciu881. Epub 2014 Nov 10.
15. Lemos A.P., Gorla M.C., de Moraes C., Willemann M.C.A., Sacchi C.T., Fukasawa L.O., Camargo C.H., Barreto G., Rodrigues D.S., Gonçalves M.G. et al. Emergence of *Neisseria meningitidis* W South American sublineage strain variant in Brazil: disease and carriage. *J Med Microbiol.* 2022; 71 (2). doi: 10.1099/jmm.0.001484.
16. Wick R.R., Judd L.M., Gorrie C.L., Holt K.E. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Comput Biol.* 2017; 13:e1005595. doi: 10.1371/journal.pcbi.1005595.
17. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics.* 2014; 30: 2068–2069. doi: 10.1093/bioinformatics/btu153.
18. Gardner S.N., Slezak T., Hall B.G. kSNP3.0: SNP detection and phylogenetic analysis of genomes without genome alignment or reference genome. *Bioinformatics.* 2015; 31 (17): 2877–2878. doi: 10.1093/bioinformatics/btv271.
19. <https://pubmlst.org/>

About the authors

Elvira A. Martens — Head of the Clinical Diagnostic Laboratory, Junior Researcher, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases under the Federal Medical Bio-

инфекционных болезней ФМБА России»; ассистент кафедры медицинской микробиологии ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И. И. Мечникова Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия. WOS Researcher ID: CAG-4447-2022. ORCID: 0000-0001-6093-7493. Scopus Author ID: 57206470215

Железова Людмила Ильинична — к. м. н., старший научный сотрудник отдела медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней ФМБА России», Санкт-Петербург, Россия. ORCID: 0000-0001-8071-3243. WOS Researcher ID: G-9662-2012. Scopus Author ID: 6505716185

Гостев Владимир Валерьевич — к. б. н., старший научный сотрудник отдела медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней ФМБА России»; Доцент кафедры медицинской микробиологии ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И. И. Мечникова Минздрава, Санкт-Петербург, Россия. ORCID: 0000-0002-3480-8089. WOS Researcher ID: P-1949-2016. WOS Researcher ID: 55614534400

Лихолетова Дарья Вадимовна — лаборант-исследователь отдела медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней ФМБА России», Санкт-Петербург, Россия

Захаренко Сергей Михайлович — к. м. н., доцент, заместитель директора, ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней ФМБА России», Санкт-Петербург, Россия. ORCID: 0000-0001-8666-6118. SCOPUS: 6701402980.

logical Agency; Assistant at the Department of Medical Microbiology North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov, Saint-Petersburg, Russia. WOS Researcher ID: CAG-4447-2022. ORCID: 0000-0001-6093-7493. Scopus Author ID: 57206470215

Lyudmila I. Zhelezova — Ph. D. in medicine, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases under the Federal Medical Biological Agency, Saint-Petersburg, Russia. ORCID: 0000-0001-8071-3243. WOS Researcher ID: G-9662-2012. Scopus Author ID: 6505716185

Vladimir V. Gostev — Ph. D. in biology, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases under the Federal Medical Biological Agency, North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov, Saint-Petersburg, Russia. ORCID: 0000-0002-3480-8089. WOS Researcher ID: P-1949-2016. WOS Researcher ID: 55614534400

Daria V. Likholetova — Laboratory researcher at the Department of Medical Microbiology and Molecular Epidemiology, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases under the Federal Medical Biological Agency, Saint-Petersburg, Russia

Sergey M. Zakharenko — Ph. D. in medicine, associate professor; Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases under the Federal Medical Biological Agency, North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov, Saint-Petersburg, Russia. ORCID: 0000-0001-8666-6118. SCOPUS: 6701402980.