

Porovnání invazivních a neinvazivních izolátů *Neisseria meningitidis* metodou sekvenace celého genomu, Česká republika, 2005–2021

Honskus M.^{1,2}, Křížová P.¹, Okonji Z.¹, Musílek M.¹, Kozáková J.¹

¹Národní referenční laboratoř pro meningokokové nákazy, Centrum epidemiologie a mikrobiologie, Státní zdravotní ústav, Praha
²3. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Praha

SOUHRN

Cíl: Analýza potenciálních genů virulence metodou sekvenace celého genomu (WGS) u invazivních a neinvazivních izolátů *Neisseria meningitidis* příbuzných epidemiologicky a/nebo klinicky z období 2005–2021.

Materiál a metody: Pro analýzu bylo vybráno 79 izolátů ze tří různých kategorií: z případů invazivního meningokokového onemocnění (IMO) a od jejich zdravých kontaktů; z různého klinického materiálu téhož případu IMO; z různého klinického materiálu téhož případu IMO a od jejich zdravých kontaktů. Metodou WGS byly analyzovány sekvenční změny v genech potenciálních faktorů virulence *N. meningitidis*, jednalo se o více než 250 lokusů.

Výsledky: Četnost sekvenčních změn v potenciálních genech virulence *N. meningitidis* byla u studovaných invazivních a neinvazivních izolátů značně variabilní. Nejvyšší míra genetické variability byla pozorována u genů pilu, především *pilE* a *pglA*. V naší studii byly detekovány změny v genu opacitního proteinu *opaA* u více než poloviny studovaných izolátů, u MenC izolátů dosahovala četnost změn genu *opaA* téměř 70 %. Zvýšená četnost změn byla pozorována i v genech, které jsou zodpovědné za produkci kapsule, především genech kapsulárního regionu D+D'.

Závěry: Získané výsledky podporují hypotézu, že v patogenitě *N. meningitidis* se uplatňují i genetické mechanismy, které jsou séro skupinově specifické. Tyto výsledky přispívají k rozšíření vědeckého poznání, které je nezbytné pro vývoj nových účinných vakcín proti IMO.

KLÍČOVÁ SLOVA

Neisseria meningitidis – sekvenace celého genomu – faktory virulence – kapsulární geny – *pilE* – *pglA* – *opaA*

ABSTRACT

Honskus M., Křížová P., Okonji Z., Musílek M., Kozáková J.: Comparison of invasive and non-invasive isolates of *Neisseria meningitidis* by whole genome sequencing, Czech Republic, 2005–2021

Aim: Whole genome sequencing (WGS) analysis of candidate virulence genes of epidemiologically and/or clinically related invasive and non-invasive isolates of *Neisseria meningitidis* from 2005–2021.

Material and Methods: Seventy-nine isolates were selected for analysis from three different categories: cases of invasive meningococcal disease (IMD) and their healthy contacts, different clinical specimens from the same IMD case, and different clinical specimens from the same IMD case and their healthy contacts. WGS was used to analyse sequence variability in candidate *N. meningitidis* virulence factor genes, with more than 250 loci studied.

Results: The frequency of sequence changes in the candidate *N. meningitidis* virulence factor genes of invasive and non-invasive isolates varied widely. The highest level of variability was observed in the pilus genes, especially *pilE* and *pglA*. Our study detected variability in the opacity protein A (*opaA*) gene in more than half of the isolates analysed, with the frequency of *opaA* gene changes reaching almost 70% in MenC isolates. Higher frequency of changes were also observed in the genes for capsule production, especially in those of the D+D' capsular region.

Conclusions: The results obtained support the hypothesis that serogroup-specific genetic mechanisms are also involved in the pathogenicity of *N. meningitidis*. These data add to the body of knowledge necessary for the development of new effective IMD vaccines.

KEYWORDS

Neisseria meningitidis – whole genome sequencing – virulence factors – capsular genes – *pilE* – *pglA* – *opaA*

Epidemiol Mikrobiol Imunol, 2023; 72(2): 86–92

ÚVOD

Bakterie *Neisseria meningitidis*, která je výlučně lidským patogenem, kolonizuje horní cesty dýchací a vět-

šinou nezpůsobuje závažná onemocnění. Zatímco nosičství *N. meningitidis* je relativně běžné (zjišťováno až u 10 % zdravé populace), invazivní meningokokové onemocnění (IMO) je vzácné. Závažnost IMO tkví ve

vyšší smrtnosti (až 20 %) a velkém procentu těžkých celoživotních následků u přeživších. Nebezpečnost IMO také spočívá ve skutečnosti, že se během několika hodin z plného zdraví může rozvinout život ohrožující onemocnění. Většina IMO se objevuje jako sporadické případy, bez prokázaného kontaktu s jiným IMO [1].

Faktory, které ovlivňují rozvoj bezpříznakového nosičství *N. meningitidis* či rozvoj závažného, život ohrožujícího IMO, jsou popsány jak na straně hostitele (například věk, poruchy imunity, socioekonomické faktory, kuřáctví, psychické či fyzické oslabení), tak na straně meningokoka (například velikost infekční dávky, příslušnost k hypervirulentnímu klonálnímu komplexu, přítomnost faktorů virulence). Ačkoli byla popsána řada mechanismů důležitých pro virulenci *N. meningitidis*, stále ještě nejsou definovány faktory, které by jasně odlišily vysoce patogenní izoláty působící IMO od méně patogenních [2, 3].

Izoláty *N. meningitidis* z IMO jsou v naprosté většině zařazeny do některé ze šesti sérologických skupin (A, B, C, X, Y, W) a velmi často patří k hypervirulentním klonálním komplexům, které působí celosvětově většinu IMO. Meningokoky izolované od zdravých nosičů jsou geneticky vysoce heterogenní, až u 30 % z nich nelze určit séroskupinu a většinou patří k nevirulentním klonálním komplexům. Přítomnost polysacharidové kapsule zvyšuje šanci k vyvolání IMO, zatímco meningokok bez kapsule pravděpodobněji způsobí pouze kolonizaci sliznic hostitele. V rámci rodu *Neisseria* můžeme expresi kapsulárního polysacharidu nalézt výhradně u *N. meningitidis* a je vysoce pravděpodobné, že získání genetického materiálu potřebného pro produkci kapsule bylo důležitým krokem v evoluci meningokoka [4]. Geny zodpovědné za syntézu a transport kapsule jsou umístěny v kapsulárních regionech: A, B, C a D+D' [5]. Nové studie prokázaly, že izoláty *N. meningitidis* z IMO, které byly dříve neodlišitelné od nosičských izolátů pomocí klasických laboratorních typizačních metod, jsou nyní rozlišitelné díky nové metodě sekvenace celého genomu (Whole Genome Sequencing, WGS) [6]. Studium metodou WGS poskytuje důkazy o tom, že virulence *N. meningitidis* je polygenní vlastností a přispívá do ní různou mírou mnoho rozdílných genů [7].

Předkládáme výsledky analýzy potenciálních genů virulence metodou WGS u 79 invazivních a neinvazivních izolátů *N. meningitidis* příbuzných epidemiologicky a/nebo klinicky z období 2005–2021.

MATERIÁL A METODY

Izoláty *N. meningitidis*

Výběr izolátů byl proveden na základě epidemiologických a klinických informací o izolátech *N. meningitidis* v databázi Národní referenční laboratoře (NRL) pro meningokokové nákazy, která obsahuje i data získaná klasickou sekvenací [8, 9, 10]. Celosvětově je k dispozici

minimum sbírek izolátů *N. meningitidis*, které disponují detailními epidemiologickými, klinickými a mikrobiologickými daty – česká sbírka je z tohoto hlediska unikátní.

Pro studium potenciálních faktorů virulence izolátů *N. meningitidis* metodou WGS byly ze sbírky NRL vybrány izoláty příbuzné epidemiologicky a/nebo klinicky z období 2005–2021, které byly zařazeny do tří kategorií:

A) z případů IMO a od jejich zdravých kontaktů (nosičů *N. meningitidis*)

– 11 souborů, 28 izolátů

B) z různého klinického materiálu téhož případu IMO (likvor, krev, horní cesty dýchací)

– 14 souborů, 30 izolátů

C) z různého klinického materiálu téhož případu IMO a od jejich zdravých kontaktů

– 7 souborů, 21 izolátů

Celkem: 32 srovnávaných souborů, 79 izolátů *N. meningitidis*.

Do těchto souborů invazivních a neinvazivních izolátů příbuzných epidemiologicky a/nebo klinicky byly vždy vybrány pouze izoláty vzájemně neodlišitelné klasickými typizačními metodami (séroskopina, sekvenční typ, klonální komplex).

Celogenomová sekvenace *N. meningitidis*

Příslušné bakteriální kultury *N. meningitidis*, které jsou uchovávány ve sbírce NRL pro meningokokové nákazy, byly vyočkovány na čokoládový Mueller-Hinton agar a kultivovány 18–24 hodin ve 37 °C v 5% CO₂ atmosféře. Správnost identifikace *N. meningitidis* byla ověřena pomocí kitu API NH (BIOMÉRIEUX). Séroskupiny byly určeny klasickými sérologickými metodami (Pastorex Meningitis Bio-RAD, antiséra *N. meningitidis* ITEST, Bio-RAD) a ověřeny metodou RT-PCR. K izolaci DNA byla použita souprava QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) a postup izolace probíhal podle pokynů výrobce. DNA byla následně odeslána k celogenomové sekvenaci na externí pracoviště EMBL (European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, Německo). Sekvenace proběhla na platformě Illumina MiSeq s využitím referenčního genomu *N. meningitidis* kmene MC58 a výsledkem byly překrývající se sekvence o délce přibližně 300 bp. K sestavení výsledných genomů z primárních celogenomových dat byl na našem pracovišti použit software Velvet *de novo* Assembler [11]. Genomy izolátů byly poté registrovány v databázi PubMLST, která využívá platformu BIGSdb (Bacterial Isolate Genome Sequence Database) [12, 13].

Výběr potenciálních genů virulence *N. meningitidis*

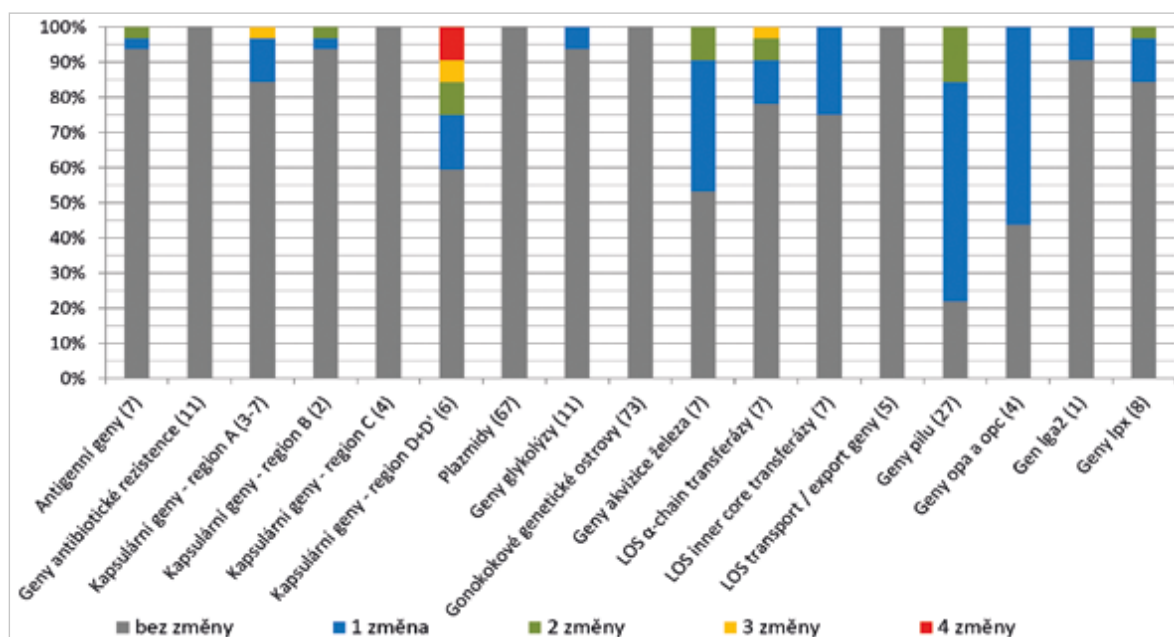
Výběr studovaných genů byl učiněn na základě rešerše literatury a dle informací v databázi PubMLST. Jednalo se o více než 250 lokusů, z nichž většina je v databázi PubMLST ve vyhledávacích schématech, která sdružují lokusy s ohledem na funkci jejich proteinových pro-

duktů. Hodnoceno bylo 7 lokusů u 5 antigenních genů (*fetA*, *nadA*, *nhba*, *porA*, *porB*), 11 lokusů u 8 genů antibiotické rezistence (*folP*, *gyrA*, *mtrR*, *parC*, *parE*, *penA*, *ponA*, *rpoB*), 3–7 lokusů kapsulárního regionu A, které jsou séro skupinově specifické, dále lokusy zbylých kapsulárních regionů – region B (*ctrE*, *ctrF*), region C (*ctrA*, *ctrB*, *ctrC*, *ctrD*) a region D+D' (*galE*, *galE2*, *rfaA*, *rfaB*, *rfaC*, *rfaC2*). Testována byla přítomnost a změny gonokokových genetických ostrovů (73 lokusů) a plazmidů – konjugativních (50 lokusů), kryptických (9 lokusů) a β -laktamázových (8 lokusů). Dále bylo hodnoceno 11 genů glykolýzy (*eno*, *fba*, *fbp*, *gapA*, *gapA2*, *gpm*, *pgi1*, *pgi2*, *pgk*, *pgm*, *pykA*), 7 genů pro proteiny spojené s akvizicí železa (*hmbR*, *hpuA*, *hpuB*, *lbpA*, *lbpB*, *tbpA*, *tbpB*), 19 genů zapojených do metabolismu lipooligosacharidů (LOS) – α -chain transferáz (*lgtA*, *lgtB*, *lgtC*, *lgtD*, *lgtE*, *lgtF*, *lst*), inner core transferáz (*lgtG*, *lot*, *lpt3*, *lpt6*, *rfaC*, *rfaF*, *rfaK*) a geny proteinů transportu/exportu LOS (*lptC*, *msbA*, *ostA*, *rlpB*, *yhbG*). Výčet hodnocených lokusů uzavírá 27 genů pilu (*pilA*, *pilB*, *pilC1*, *pilC2*, *pilD*, *pilE*, *pilF*, *pilG*, *pilH*, *pill*, *pilJ*, *pilK*, *pilM*, *pilN*, *pilO*, *pilP*, *pilQ*, *pilS*, *pilT1*, *pilT2*, *pilU*, *pilV*, *pilW*, *pilX*, *pilZ*, *pglA*, *comp*), 4 geny ze skupiny opa a opc (*opaA*, *opaB*, *opcA*, *opcB*), 8 genů *lpx* (*lpxA*, *lpxB*, *lpxC*, *lpxD*, *lpxH*, *lpxK*, *lpxL*, *lpxL2*) a gen *iga2*, jehož produktem je serinová peptidáza imunoglobulinu A.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Pro analýzu genů potenciálních faktorů virulence bylo vybráno celkem 79 izolátů *N. meningitidis* s následujícím zastoupením séro skupin: séro skupina C (MenC, 34 izolátů), séro skupina B (MenB, 31 izolátů), séro skupina W (MenW, 9 izolátů), séro skupina Y (MenY, 2 izoláty) a tři izoláty nebyly přiřazeny k žádné séro skupině (non-groupable, MenNG). U dvou z těchto MenNG byla metodou WGS prokázána genoskupina X, u jednoho genoskupina B s inaktivovanou kapsulární polymerázou. Z pohledu srovnávaných příbuzných souborů se jednalo o 13 souborů izolátů MenC, 13 souborů izolátů MenB včetně jednoho příbuzného izolátu MenNG a 6 souborů izolátů ostatních séro skupin/genoskupin (MenW, MenY a MenX). Izoláty studovaného souboru náležely do 8 klonálních komplexů: cc11 (30 izolátů), cc41/44 (15 izolátů), cc32 (5 izolátů), cc865 (5 izolátů), cc22 (4 izoláty), cc35 (3 izoláty), cc269 (3 izoláty), cc174 (2 izoláty), cc750 (2 izoláty). U 10 izolátů byl zjištěn sekvenční typ (ST), který v databázi PubMLST není přiřazen do žádného z klonálních komplexů (unassigned, ccUA).

Mezi 79 studovanými invazivními a neinvazivními izoláty *N. meningitidis* nebyly v rámci jednotlivých příbuzných souborů detekovány žádné sekvenční změny u genů antibiotické rezistence, genů, které kódují proteiny transportu/exportu LOS, a genů kapsulárního regionu C, které se podílejí na translokaci kapsulárního polysacharidu s vysokou molekulovou hmotností na buněčný povrch (obr. 1). Žádné změny nebyly rovněž pozorovány v případě plazmidů, jejichž přítomnost byla potvrzena pouze u jednoho srovnávaného souboru izolátů (2 lokusy ze skupiny kryptických plazmidů), a gonokokových genetických ostrovů, které byly detekovány u dvou souborů (60 a 61 různých lokusů).



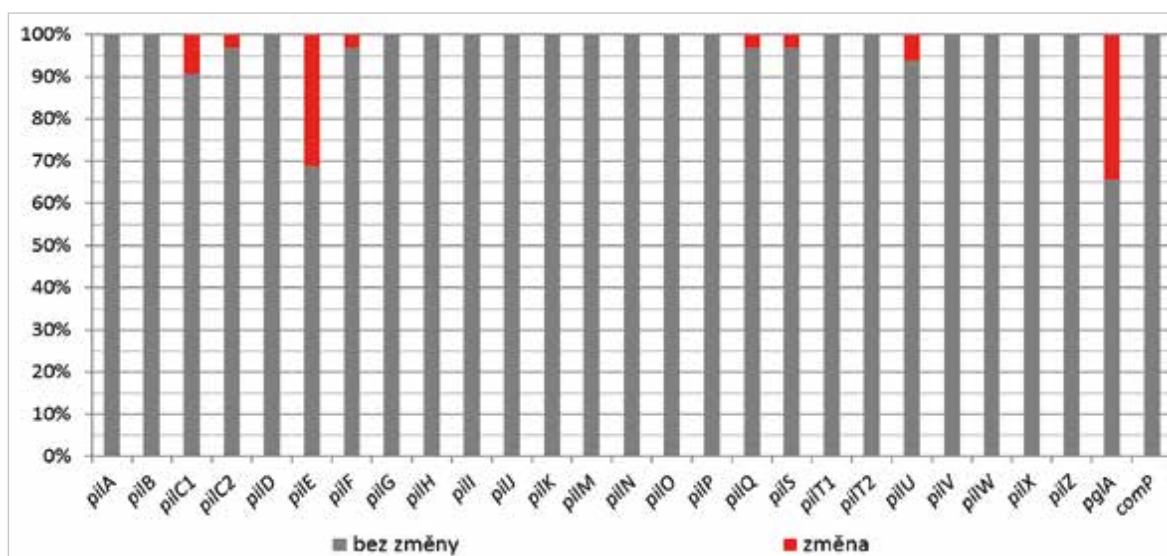
Obr. 1. Četnost změn ve studovaných potenciálních genech virulence *N. meningitidis* u 32 skupin invazivních a neinvazivních izolátů, rozděleno podle funkce genů

Figure. 1. Frequency of changes in candidate *N. meningitidis* virulence factor genes in 32 groups of invasive and non-invasive isolates, by gene function

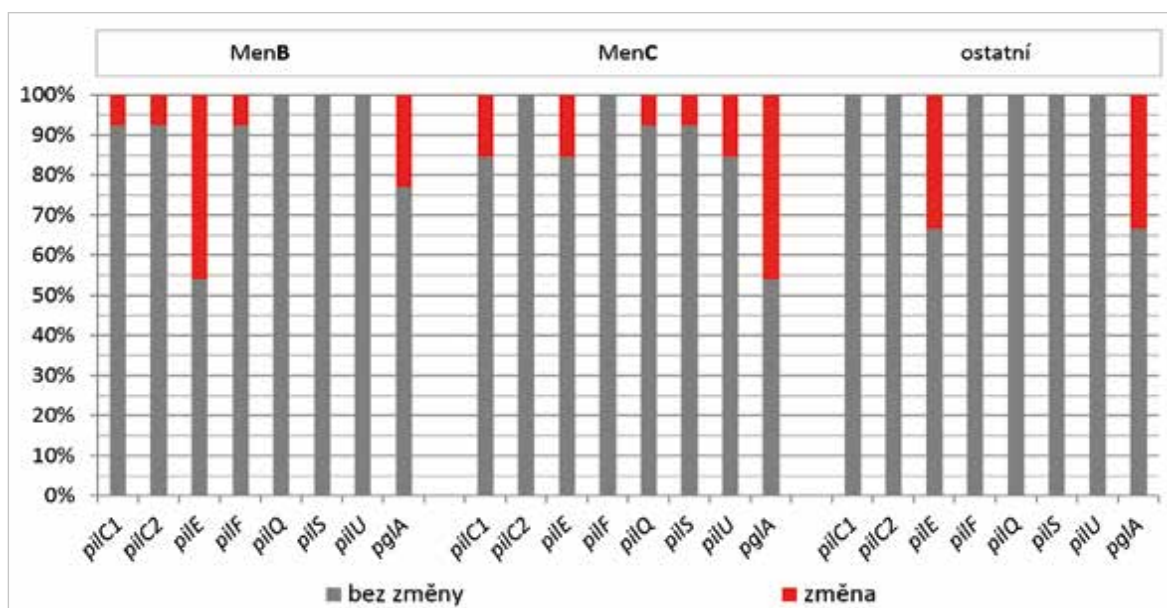
Minimální míra sekvenčních změn byla zjištěna u anti-genních genů, genů glykolýzy, genu *iga2* a genů kapsulárního regionu B, které jsou zapojeny do translokace kapsulárního polysacharidu. Vyšší variabilitu vykazovaly séroscupinově specifické geny kapsulárního regionu A, které jsou nezbytné pro syntézu kapsulárního polysacharidu, geny LOS α -chain transferáz (zejména geny *IgtA*, *IgtC* a *IgtD*), geny *Ipx* (především gen *IpxL*) a v případě genů LOS inner core transferáz byly změny zaznamenány výhradně u genu *IgtG* (u 8 souborů z 32). Nejvýraznější genetická variabilita byla pozorována u genů pilu (téměř 80 % studovaných souborů), genů ze skupiny opa a opc (více než 50 % souborů), genů klíčových pro akvizici železa a genů kapsulárního regionu

D+D', jejichž produkty se účastní syntézy kapsulárního polysacharidu.

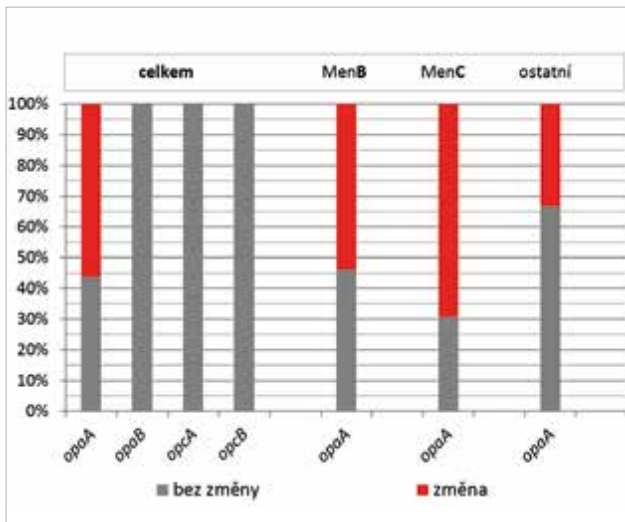
Vysoká genetická variabilita genů pilu byla z velké části tvořena sekvenčními změnami u genů *pilE* a *pgIA* (obr. 2). Ostatní z celkových 27 genů pilu nevykazovaly žádné (*pilA*, *pilB*, *pilD*, *pilG*, *pilH*, *pilI*, *pilJ*, *pilK*, *pilM*, *pilN*, *pilO*, *pilP*, *pilT1*, *pilT2*, *pilV*, *pilW*, *pilX*, *pilZ*, *comp*), nebo jen minimální změny (*pilC1*, *pilC2*, *pilF*, *pilQ*, *pilS*, *pilU*). V případě rozdělení studovaných souborů příbuzných izolátů podle příslušných séroscupin lze u izolátů MenB pozorovat vyšší četnost změn u genu *pilE*, oproti tomu u izolátů MenC dominovaly změny genu *pgIA* (obr. 3). U izolátů ostatních séroscupin byla četnost změn v genech *pilE* a *pgIA* srovnatelná.



Obr. 2. Frekvence sekvenčních změn u 27 genů pilu *N. meningitidis*
Figure 2. Frequency of sequence changes in 27 *N. meningitidis* pilus genes



Obr. 3. Frekvence sekvenčních změn u vybraných 8 genů pilu, rozděleno podle příslušných séroscupin
Figure 3. Frequency of sequence changes in selected eight pilus genes, by serogroup



Obr. 4. Frekvence sekvenčních změn u genů opa a opc, pro gen *opaA* rozděleno podle séroskupin

Figure 4. Frequency of sequence changes in the opa and opc genes, by serogroup for the *opaA* gene

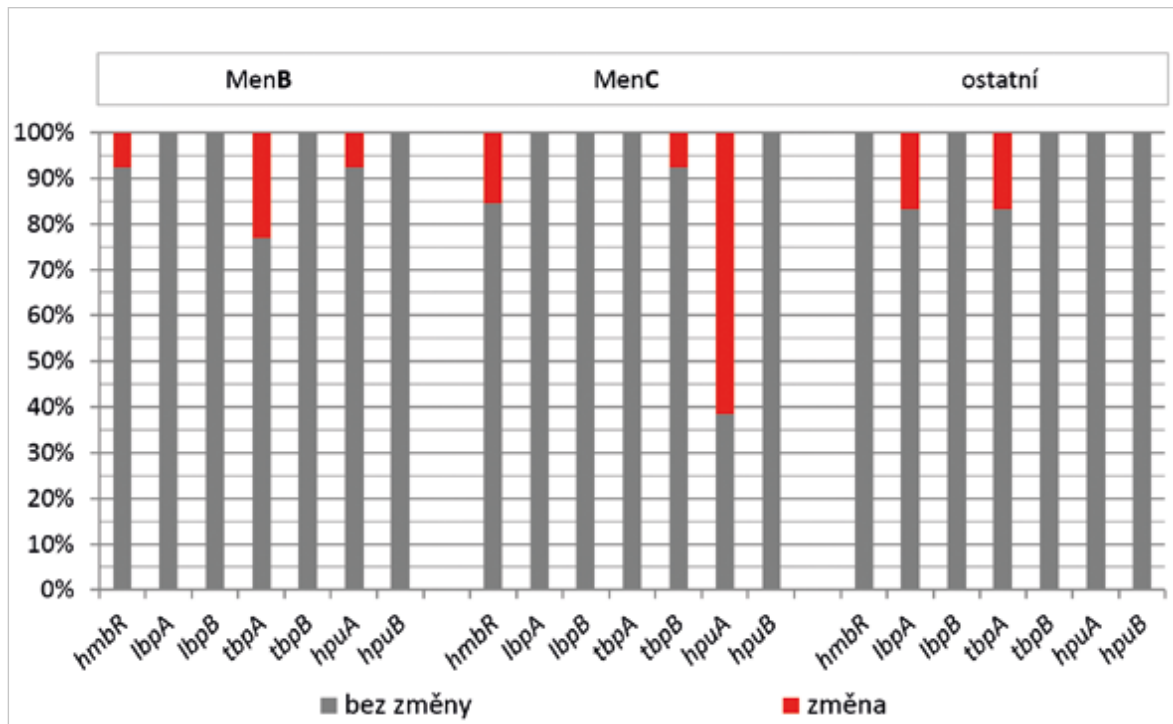
Detailnější pohled na změny u 4 genů skupiny opa a opc odhalil skutečnost, že genetická variabilita, zjištěná v rámci této skupiny genů, byla způsobena výhradně sekvenčními změnami genu pro opacitní protein *opaA* (obr. 4). Změny v sekvenci *opaA* byly zjištěny u více než poloviny studovaných souborů izolátů, oproti tomu ostatní geny skupiny opa a opc (*opaB*, *opaC*, *opcB*) žádnou variabilitu nevykazovaly. Rozdíl v četnosti změn ve studovaných souborech byl také pozorován

po rozdělení podle séroskupin. Zatímco u MenB izolátů vykazoval gen *opaA* změnu u více než 50 % a u izolátů ostatních séroskupin více než u 30 % studovaných souborů, u MenC izolátů dosahovala četnost změn u genu *opaA* téměř 70 %.

Skoro polovina studovaných souborů izolátů vykazovala změny u genů, které jsou klíčové pro akvizici železa (viz obr. 1). V tomto případě byla genetická variabilita rozložena mezi 5 různých genů, pouze u genů *lbpB* a *hpuB* nebyly v jednotlivých souborech pozorovány žádné změny (obr. 5). Při rozdělení podle příslušných séroskupin lze u izolátů MenB pozorovat mírně zvýšenou frekvenci změn v genu *tbpA*, zatímco u izolátů MenC dominují změny u genu *hpuA*, který kóduje hemoglobin-haptoglobin utilizační protein.

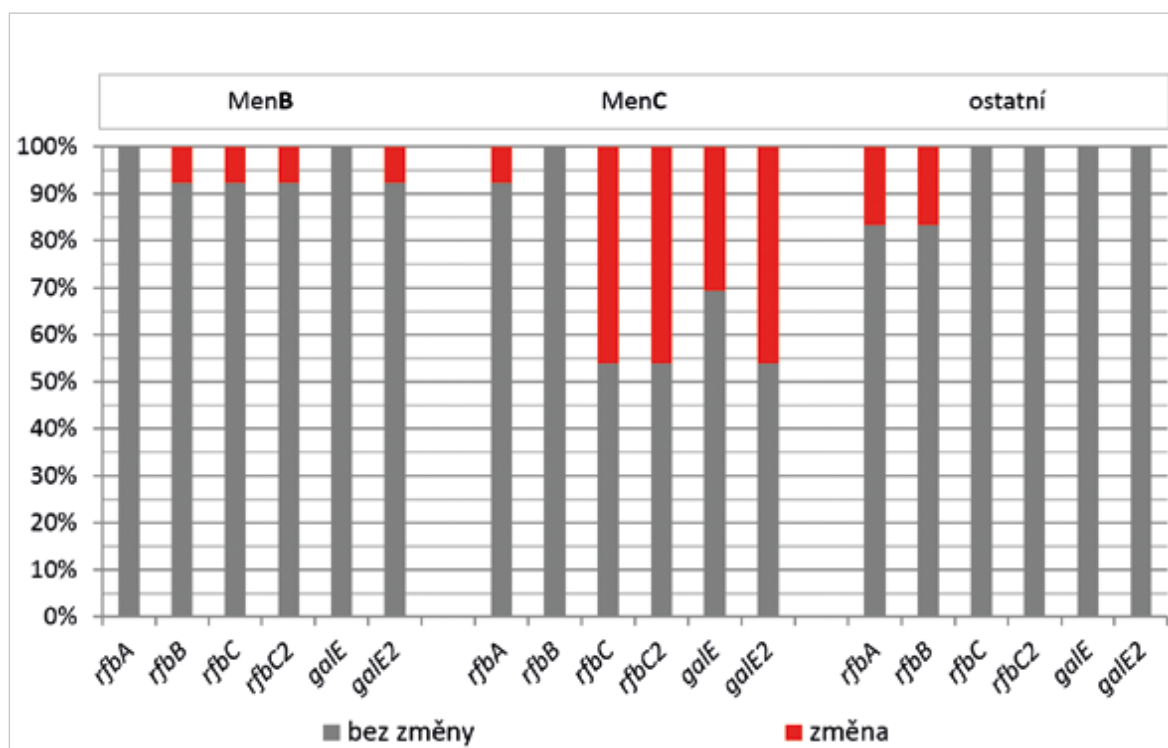
Vysoká variabilita, zejména z pohledu změn u více než jednoho genu (viz obr. 1), byla v rámci studovaných souborů invazivních a neinvazivních izolátů zaznamenána u všech 6 genů kapsulárního regionu D+D' (obr. 6). U izolátů MenB byla četnost změn minimální, oproti tomu u MenC izolátů byla tato četnost výrazně vyšší, zejména u genů *rfbC*, *rfbC2*, *galE* a *galE2*. U izolátů ostatních séroskupin byly naopak zjištěny změny pouze u genů *rfbA* a *rfbB*.

Souhrnně lze říci, že u potenciálních genů virulence *N. meningitidis* byla četnost sekvenčních změn v rámci studovaných souborů invazivních a neinvazivních příbuzných izolátů značně variabilní. Zatímco u mnoha skupin studovaných genů byly zjištěny minimální nebo žádné změny, u několika skupin genů byla četnost změn mezi invazivními a neinvazivními izoláty



Obr. 5. Frekvence sekvenčních změn u genů akvizice železa *N. meningitidis*, rozděleno podle séroskupin

Figure 5. Frequency of sequence changes in the *N. meningitidis* iron acquisition genes, by serogroup



Obr. 6. Frekvence sekvenčních změn u 6 genů kapsulárního regionu D+D'; rozděleno podle séroskopin
Figure 6. Frequency of sequence changes in six genes of the D+D' capsular region, by serogroup

vysoká. Nejvyšší míra genetické variability byla pozorována u genů pilu, který se řadí mezi hlavní adhezivní molekuly a představuje významný faktor virulence *N. meningitidis* [14]. Dominantní podíl na této variabilitě měly geny *pilE* a *pglA*. Vysoká míra sekvenční variability genu *pilE*, který kóduje hlavní subjednotku pilu, je dobře popsána [15, 16] a vychází ze schopnosti genu *pilE* rekombinovat s inaktivními kopiemi genu *pilS* [17]. Gen *pglA* se účastní post-translační glykosylace pilu a podléhá fázovým variacím v důsledku přítomnosti poly-G úseku ve své sekvenci [14, 17, 18]. V našem souboru byla u izolátů MenB prokázána vyšší četnost změn genu *pilE*, oproti tomu u izolátů MenC dominovaly změny genu *pglA*. U izolátů ostatních séroskopin byla četnost změn v genech *pilE* a *pglA* srovnatelná. Opacitní proteiny skupiny opa a opc jsou hlavní proteiny vnější membrány *N. meningitidis* a přispívají k patogenitě meningokoků svoji významnou rolí v adhezi bakterií k buňkám nosohltanu a modulaci imunitního systému díky interakci s imunokompetentními buňkami [19, 20]. Jejich význam potvrzuje i to, že v minulosti patřily tyto proteiny mezi vakcinační kandidáty [21]. V naší studii byly detekovány změny v sekvenci genu *opaA* u více než poloviny studovaných izolátů, v případě MenC izolátů dosahovala četnost změn genu *opaA* téměř 70 %. Možnou příčinou tak vysoké genetické variability může být přítomnost transformačního hot-spotu v blízkosti genu *opaA* [22, 23]. Izoláty klinicky nejvýznamnějších séroskopin B, C, W a Y produkují na svůj povrch kapsulární polysacharid obohacený kyse-

linou sialovou, který hraje klíčovou roli v patogenitě *N. meningitidis* [24]. Zvýšená četnost změn v genech, které jsou zodpovědné za produkci kapsule, byla pozorována i v souborech námi studovaných izolátů, což odpovídá skutečnosti, že *N. meningitidis* disponuje řadou genetických mechanismů k regulaci produkce kapsule [25]. Zjištěná genetická variabilita byla výrazně vyšší u genů, které se účastní syntézy kapsulárního polysacharidu (kapsulární region A a zejména region D+D'), než u genů zapojených do translokace polysacharidu na buněčný povrch (kapsulární regiony B a C). Výsledky zjištěné v této studii zároveň podporují hypotézu, že v patogenitě *N. meningitidis* se uplatňují i genetické mechanismy, které jsou séroskopinově specifické [26]. V naší studii se jednalo především o změny v genech pilu a genech kapsulárního regionu D+D'.

ZÁVĚRY

Četnost sekvenčních změn v potenciálních genech virulence *N. meningitidis* byla u studovaných invazivních a neinvazivních izolátů značně variabilní. Nejvyšší míra genetické variability byla pozorována u genů pilu, především *pilE* a *pglA*. V naší studii byly detekovány změny v genu opacitního proteinu *opaA* u více než poloviny studovaných izolátů, u MenC izolátů dosahovala četnost změn genu *opaA* téměř 70 %. Zvýšená četnost změn byla pozorována i v genech, které jsou zodpovědné za produkci kapsule, především genech

kapsulárního regionu D+D'. Získané výsledky podporují hypotézu, že v patogenitě *N. meningitidis* se uplatňují i genetické mechanismy, které jsou séro skupinově specifické. Tyto výsledky přispívají k rozšíření vědeckého poznání, které je nezbytné pro vývoj nových účinných vakcín proti IMO.

LITERATURA

1. Caugant DA, Tzanakaki G, Kriz P. Lessons from meningococcal carriage studies. *FEMS Microbiol Rev.* 2007;31(1):52–63. Doi: 10.1111/j.1574-6976.2006.00052.x. PMID: 17233635.
2. Tan A, Hill DM, Harrison OB, et al. Distribution of the type III DNA methyltransferases modA, modB and modD among *Neisseria meningitidis* genotypes: implications for gene regulation and virulence. *Sci Rep.* 2016;6:21015. Doi: 10.1038/srep21015. PMID: 26867950.
3. Bärnes GK, Brynildsrud OB, Børud B, et al. Whole genome sequencing reveals within host genetic changes in paired meningococcal carriage isolates from Ethiopia. *BMC Genomics.* 2017;18:407. Doi: 10.1186/s12864-017-3806-3.
4. Claus H, Maiden MCJ, Maag R, et al. Many carried meningococci lack the genes required for capsule synthesis and transport. *Microbiology (Reading).* 2002;148(6):1813–1819. Doi: 10.1099/00221287-148-6-1813. PMID: 12055301.
5. Jones CH, Mohamed N, Rojas R, et al. Comparison of Phenotypic and Genotypic Approaches to Capsule Typing of *Neisseria meningitidis* by Use of Invasive and Carriage Isolate Collections. *J. Clin. Microbiol.*, 2016;54(1):25–34. Doi: 10.1128/JCM.01447-15. PMID: 26311858.
6. Ren X, Eccles DA, Greig GA, et al. Genomic, Transcriptomic, and Phenotypic Analyses of *Neisseria meningitidis* Isolates from Disease Patients and Their Household Contacts. *mSystems.* 2017;2(6):e00127–17. Doi: 10.1128/mSystems.00127-17. PMID: 29152586.
7. Joseph B, Schneiker-Bekel S, Schramm-Glück A, et al. Comparative genome biology of a serogroup B carriage and disease strain supports a polygenic nature of meningococcal virulence. *J Bacteriol.*, 2010;192(20):5363–77. Doi: 10.1128/JB.00883-10. PMID: 20709895.
8. Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, 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(6):3140–3145. Doi: 10.1073/pnas.95.6.3140. PMID: 9501229.
9. Brehony C, Jolley KA, Maiden MC. Multilocus sequence typing for global surveillance of meningococcal disease. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2007;31(1):15–26. Doi: 10.1111/j.1574-6976.2006.00056.x. PMID: 17168997.
10. Jolley KA, Maiden MC. Using multilocus sequence typing to study bacterial variation: prospects in the genomic era. *Future Microbiol.*, 2014;9(5):623–630. Doi: 10.2217/fmb.14.24. PMID: 24957089.
11. Zerbino DR. Using the Velvet de novo assembler for short-read sequencing technologies. *Curr. Protoc. Bioinformatics.* 2010;11:Unit 11.5. Doi: 10.1002/0471250953.bi1105s31. PMID: 20836074.
12. Jolley KA, Maiden MC. BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. *BMC Bioinformatics.* 2010;11:595. Doi: 10.1186/1471-2105-11-595. PMID: 21143983.
13. Jolley KA, Bray JE, Maiden MCJ. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Res.*, 2018;3:124. Doi: 10.12688/wellcomeopenres.14826.1. PMID: 30345391.
14. Jennings MP, Virji M, Evans D, et al. Identification of a novel gene involved in pilin glycosylation in *Neisseria meningitidis*. *Mol. Microbiol.*, 1998;29(4):975–984. Doi: 10.1046/j.1365-2958.1998.00962.x. PMID: 9767566.
15. Rytönen A, Albiger B, Hansson-Palo P, et al. *Neisseria meningitidis* undergoes PilC phase variation and PilE sequence variation during invasive disease. *J. Infect. Dis.*, 2004;189(3):402–409. Doi: 10.1086/381271. PMID: 14745697.
16. Sun X, Zhou H, Xu L, et al. Prevalence and genetic diversity of two adhesion-related genes, pilE and nadA, in *Neisseria meningitidis* in China. *Epidemiol Infect.* 2013;141(10):2163–2172. Doi: 10.1017/S0950268812002944. PMID: 23290624.
17. Carbonnelle E, Hill DJ, Morand P, et al. Meningococcal interactions with the host. *Vaccine.* 2009;27(Suppl 2):B78–89. Doi: 10.1016/j.vaccine.2009.04.069. PMID: 19481311.
18. Power PM, Roddam LF, Rutter K, et al. Genetic characterization of pilin glycosylation and phase variation in *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol.* 2003;49(3):833–847. Doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03602.x. PMID: 12864863.
19. Sadarangani M, Pollard AJ, Gray-Owen SD. Opa proteins and CEACAMs: pathways of immune engagement for pathogenic *Neisseria*. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2011;35(3):498–514. Doi: 10.1111/j.1574-6976.2010.00260.x. PMID: 21204865.
20. Gasparini R, Amicizia D, Lai PL, et al. *Neisseria meningitidis*, pathogenetic mechanisms to overcome the human immune defences. *J. Prev. Med. Hyg.*, 2012;53(2):50–55. PMID: 23240160.
21. Sadarangani M, Hoe JC, Callaghan MJ, et al. Construction of Opa-positive and Opa-negative strains of *Neisseria meningitidis* to evaluate a novel meningococcal vaccine. *PLoS One.* 2012;7(12):e51045. Doi: 10.1371/journal.pone.0051045. PMID: 23251421.
22. Claus H, Frosch M, Vogel U. Identification of a hotspot for transformation of *Neisseria meningitidis* by shuttle mutagenesis using signature-tagged transposons. *Mol. Gen. Genet.*, 1998;259(4):363–371. Doi: 10.1007/s004380050823. PMID: 9790590.
23. Linz B, Schenker M, Zhu P, et al. Frequent interspecific genetic exchange between commensal *Neisseriae* and *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol.* 2000;36(5):1049–1058. Doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.01932.x. PMID: 10844690.
24. Tzeng YL, Swartley JS, Miller YK, et al. Transcriptional regulation of divergent capsule biosynthesis and transport operon promoters in serogroup B *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun.*, 2001;69(4):2502–2511. Doi: 10.1128/IAI.69.4.2502-2511.2001. PMID: 11254613.
25. Tzeng YL, Thomas J, Stephens DS. Regulation of capsule in *Neisseria meningitidis*. *Crit. Rev. Microbiol.*, 2016;42(5):759–772. Doi: 10.3109/1040841X.2015.1022507. PMID: 26089023.
26. Talà A, Cogli L, De Stefano M, et al. Serogroup-specific interaction of *Neisseria meningitidis* capsular polysaccharide with host cell microtubules and effects on tubulin polymerization. *Infect Immun.*, 2014;82(1):265–274. Doi: 10.1128/IAI.00501-13. PMID: 24166951.

Podpora projektu

Podpořeno z programového projektu Ministerstva zdravotnictví ČR s reg. č. NV19-09-00319.

Do redakce došlo dne 20. 12. 2022.

Adresa pro korespondenci:
MUDr. Pavla Křížová, CSc.
SZÚ Praha
Šrobárova 49/48
100 42 Praha 10
e-mail: pavla.krizova@szu.cz