

Klonální analýza populace meningokoků z invazivního onemocnění a od zdravých nosičů izolovaných v České republice v období 1971 – 2014 (květen)

Jandová Z., Musílek M., Vacková Z., Kozáková J., Křížová P.

Centrum epidemiologie a mikrobiologie, Státní zdravotní ústav, Praha

SOUHRN

Cíl práce: Cílem tohoto sdělení je prezentace výsledků klonální analýzy meningokoků izolovaných z invazivního meningokokového onemocnění a od zdravých nosičů z České republiky za více než 40leté období.

Materiál a metody: Celkem bylo studováno 2 179 izolátů *Neisseria meningitidis* z období 1971–2014 (květen), z toho 1 093 izolátů od pacientů s invazivním meningokokovým onemocněním a 1 086 izolátů od zdravých nosičů. Veškeré izoláty byly podrobeny multilokusové sekvenční typizaci (MLST), jedné z hlavních metod molekulární epidemiologie invazivního meningokokového onemocnění.

Výsledky: U izolátů *N. meningitidis* z invazivního meningokokového onemocnění byla zjištěna výrazná převaha výskytu séroskupin B a C (souhrnně přes 94 %). Nejčastěji se vyskytující kmeny séroskupiny B byly geneticky vysoce heterogenní: u 1 093 izolátů bylo zjištěno 25 klonálních komplexů. Stejně tak kmeny druhé nejčastěji se vyskytující séroskupiny C se jeví jako geneticky heterogenní, vykazovaly příslušnost k 19 klonálním komplexům. U třetí nejčastěji se vyskytující séroskupiny Y byl stav opačný. Tato skupina izolátů z invazivních meningokokových onemocnění byla na základě detekce pouze tří klonálních komplexů hodnocena jako vysoce homogenní. Z více než 75 % byly převažující

klonální komplexy u invazivních izolátů séroskupiny Y (cc23) i séroskupiny C (cc11) řazeny mezi hypervirulentní uskupení, a vykazovaly tak nejvyšší míru virulence pro hostitelskou populaci. U invazivních izolátů séroskupiny B byly hypervirulentní klonální komplexy zjištěny více než z 80 % (cc32, cc41/44, cc18, cc269 a cc11). U 1086 izolátů *N. meningitidis* od zdravých nosičů převažovaly kmeny, u nichž nelze séroskupinu určit, kmeny značené jako *N. meningitidis* NG (41,4 %). Zařazení těchto izolátů do klonálních komplexů bylo vysoce heterogenní. Celkem bylo zjištěno 28 klonálních komplexů, jejichž příslušnost k hypervirulentním klonálním komplexům byla minoritní.

Závěry: Analýza sekvenčních dat MLST za více než 40leté období prokázala, že populace kmenů *N. meningitidis* způsobujících invazivní meningokokové onemocnění se jeví jako geneticky odlišná od kmenů *N. meningitidis* zjišťovaných u zdravých nosičů. Tyto výsledky jsou důležité pro optimální aplikaci preventivních opatření v ohnisku invazivního meningokokového onemocnění i pro vývoj účinné meningokokové vakcíny a doporučení vhodné vakcinační strategie.

KLÍČOVÁ SLOVA:

Neisseria meningitidis – multilokusová sekvenční typizace – klonální analýza

ABSTRACT

Jandová Z., Musílek M., Vacková Z., Kozáková J., Křížová P.: Clonal analysis of the meningococcal populations from invasive disease and healthy carriers isolated in the Czech Republic in 1971–2014 (May)

Objective: To present the results of clonal analysis of the meningococcal populations isolated from invasive disease and healthy carriers in the Czech Republic over four decades.

Material and methods: A total of 2179 isolates of *Neisseria meningitidis* from 1971–2014 (May) were studied: 1093 isolates from patients with invasive meningococcal disease (IMD) and 1086 isolates from healthy carriers. All study isolates were analysed by multilocus sequence typing (MLST), one of the major methods used in molecular epidemiology of IMD.

Results: More than 94 % of *N. meningitidis* isolates from IMD were assigned to serogroups B or C. The strains of the leading serogroup B were genetically highly heterogeneous: 1093 isolates were assigned to 25 clonal complexes. Similarly, the strains of the second leading serogroup C appeared genetically heterogeneous and were classified into 19 clonal complexes. The third leading serogroup Y of IMD isolates showed an opposite tendency and appeared highly homogeneous,

with only three clonal complexes being detected. Over 75% of the predominant clonal complexes of IMD isolates of both serogroup Y (cc23) and serogroup C (cc11) were classified as hypervirulent and, as such, posed the highest risk to the host population. Over 80% of IMD isolates of serogroup B were assigned to hypervirulent clonal complexes (cc32, cc41/44, cc18, cc269, and cc11). Of 1086 *N. meningitidis* isolates from healthy carriers, 41.4% were non-serogroupable, i.e. designated *N. meningitidis* NG. Classification of these isolates into clonal complexes was highly heterogeneous. In total, 28 clonal complexes were identified of which only a minority were hypervirulent.

Conclusions: The analysis of MLST data on strains collected over four decades revealed that the population of *N. meningitidis* strains involved in IMD differ genetically from *N. meningitidis* strains isolated from healthy carriers. These results are relevant to both the optimal use of preventive measures in a focus of IMD and to the development of an effective meningococcal vaccine and vaccination strategy guidelines.

KEYWORDS:

Neisseria meningitidis – multilocus sequence typing – clonal analysis

Epidemiol. Mikrobiol. Imunol., 64, 2015, č. 3, s. 147–152

PŮVODNÍ PRÁCE

ÚVOD

Invazivní meningokokové onemocnění (IMO) je i přes vývoj v medicíně stále život ohrožující onemocnění, které se může vyvinout i u plně zdravého jedince, zejména pak v dětské populaci. Česká republika patří mezi země s endemickým výskytem tohoto onemocnění. Vzhledem k vysoké smrtelnosti je nutné sledovat výskyt a šíření původce tohoto onemocnění. Důležitým epidemiologickým indikátorem je kromě séroscupinové charakteristiky *N. meningitidis* i parametr s vyšší diskriminační schopností, tzv. klonální komplex (cc). Vybrané klonální komplexy *N. meningitidis* jsou řazeny mezi hypervirulentní uskupení způsobující vysokou smrtelnost až přes 25 %.

Aktivní surveillance IMO v České republice byla zahájena roku 1993 v Národní referenční laboratoři (NRL) pro meningokokové nákazy Státního zdravotního ústavu v Praze. Jedním z podnětů byl v polovině devadesátých let minulého století vzestup nemoci a smrtelnosti IMO, způsobený v té době v České republice novým klonálním komplexem cc11. Tento komplex zde nebyl prokazatelně zjištěn od sedmdesátých let 20. století, ve světě však působil závažné epidemiologické situace [17]. V současné době výskyt kmenů náležejících ke komplexu cc11, který je charakteristický pro séroscupinu C, v České republice klesá. V roce 2013 dosáhlo zastoupení klonálního komplexu cc11 ve sledované meningokokové populaci v České republice hodnoty pouze 1,7 %, nejnižší hodnoty během aktivní surveillance [16]. Pro Českou republiku je dlouhodobě typická převaha onemocnění způsobených kmeny řazenými do séroscupiny B. Je očekáváno, že zavedení nové očkovací látky proti *N. meningitidis* B (MenB vakcína) by mohlo mít pozitivní dopad na snížení výskytu onemocnění působeného kmeny této séroscupiny. Třetí nejčastější séroscupinou *N. meningitidis* působící IMO v České republice je séroscupina Y. Ta začala IMO působit od roku 1993, přestože u asymptomatických nosičů byla zjišťována již od sedmdesátých let minulého století [17]. Vysokou smrtelnost onemocnění působeného *N. meningitidis* Y způsobuje hypervirulentní klonální komplex cc23.

Zde prezentovaný soubor více jak dvou tisíc izolátů *N. meningitidis* z let 1971–2014 (květen) z České republiky představuje izoláty z IMO i od zdravých nosičů. Je účelné sledovat míru podobnosti mezi těmito populacemi, zejména z příčiny změny klonálního složení kmenů *N. meningitidis* cirkulujících ve zdravé populaci, ke kterému může dojít vlivem kolektivní imunity, očekávané po zavedení Men B vakcíny. U obou skupin izolátů byla sledována genetická variabilita výskytu klonálních komplexů, a to metodologií doporučenou konsorciem IBD-LabNet (Invasive Bacterial Diseases Laboratory Network), tzv. metodou „fine typing“. Jde o multilokusovou sekvenční typizaci (MLST) [24], doplněnou analýzou genetické variability proteinů vnější buněčné membrány PorA a FetA. MLST umožňuje sekvenčně zjišťovat detailní charakterizaci *N. meningitidis* a popis přesných epidemiologických markerů, což umožňuje provádění lokální i globální epidemiologie meningokokového onemocnění. Získané poznatky jsou podkladem pro zpřesňování vakcinační strategie i pro vývoj nových meningokokových vakcín. Pro porovnání získaných sekvenčních dat a jejich sdílení je využívána celosvětová databáze PubMLST (<http://pubmlst.org/neisseria/>), která shrnuje informace o molekulární typizaci a diverzitě bakterií rodu *Neisseria*. V této databázi jsou vedle mikrobiologických informací uváděna klinicko-epidemiologická data a výsledky molekulární typizace, umožňující charakterizaci hypervirulentních komplexů působících IMO v celosvětově zvýšené míře.

Molekulární charakterizace kmenů *N. meningitidis* kolonizujících horní cesty dýchací (HCD) je nezbytná pro lepší pochopení možnosti přenosu meningokoků v lidské populaci a poskytuje nové poznatky pro epidemiologii a patogenезi IMO. *N. meningitidis* je bakterie, která může kolonizovat HCD bez vzniku invazivního onemocnění. Tento stav se označuje jako bezpříznakové nosičství. Výsledky řady studií ukazují, že v Evropě se nosičství *N. meningitidis* vyskytuje až u 35 % mladých dospělých [4, 6, 7, 11, 22]. V uzavřených populacích, jako jsou např. vysokoškolské koleje nebo rekruti, se zvyšuje možnost nosičství nad 60 % [8, 20, 23]. Evropské studie ukázaly, že nosičství *N. meningitidis* se nejvíce vyskytuje u dětí do jednoho roku života a pak u osob ve věku 20–24 let [4, 7, 11]. Kromě věku byla prokázána řada rizikových faktorů, spojených s nosičstvím *N. meningitidis* [3, 15].

Jde zejména o kouření (aktivní i pasivní) a časté infekce dýchacího traktu. Z mezinárodní studie vyplývá, že klonální stálost kmenů *N. meningitidis* způsobujících IMO byla ve stejném časovém období v silném rozporu s diverzitou klonů u nosičské populace [25]. Příčinou může být proměnlivost imunity u populace nebo změna virulence klonálních komplexů kmenů *N. meningitidis* v průběhu času. Lze spekulovat o časové změně populace zjišťovaných meningokoků v důsledku migrace lidské populace [5]. Vzhledem k tomu, že meningokok je vysoce variabilní a přirozeně schopný transformace, může snadno změnit svůj genom začleněním DNA z jiných kmenů a přizpůsobit se tak hostitelskému prostředí, lidské sliznici. I když je známo, že u *Streptococcus pneumoniae* může být detekováno současně více kmenů u téhož hostitele [2], u *N. meningitidis* jde o jev téměř se nevyskytující [10]. Na povrchu *N. meningitidis* se nachází vnější antigenní struktura, tzv. pouzdro. Jde o kapsulární polysacharid, který je hlavním faktorem virulence meningokoků [24] a prvořadým cílem pro humorální imunitu. Na základě antigenních variant pouzdra jsou izoláty *N. meningitidis* rozděleny do 13 séroscupin. Kmeny od pacientů jsou vybavené pouzdrům a nejčastěji řazené do pěti séroscupin (A, B, C, W135 a Y), které způsobují ve světě více než 90 % případů IMO [21]. Naproti tomu okolo 30 % kmenů izolovaných od nosičů pouzdro postrádá. Tyto kmeny nejsou sérologicky určitelné a značíme je *N. meningitidis* NG (non-groupable). Ztráta pouzdra posiluje schopnost meningokoků kolonizovat HCD a vyhnout se obrannému systému hostitele [12].

MATERIAL A METODY

Izoláty *N. meningitidis*

Izoláty *N. meningitidis* byly zaslány do Národní referenční laboratoře pro meningokokové nákazy z mikrobiologických laboratoří České republiky k verifikaci a následné charakterizaci. V této práci byly studovány kmeny *N. meningitidis* z období od roku 1971 do května roku 2014. Celkem šlo o 2 179 kmenů *N. meningitidis*, z čehož 1 093 izolátů bylo od pacientů s IMO a 1 086 izolátů od zdravých nosičů. Veškeré kmeny byly analyzovány metodou MLST.

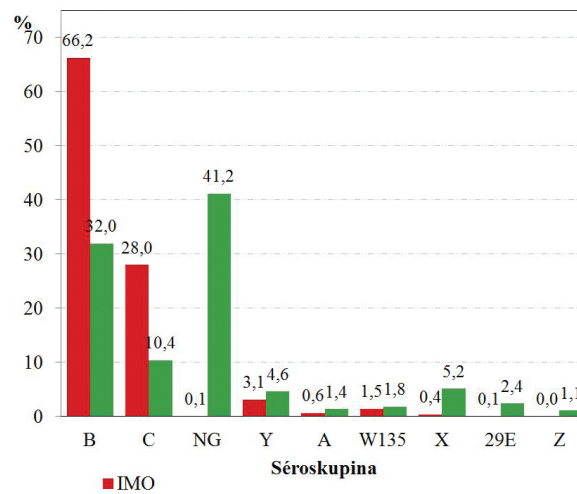
Multilokusová sekvenční typizace (MLST)***N. meningitidis***

Od roku 2000 je v NRL pro meningokokové nákazy zavedena metoda multilokusové sekvenční typizace [18]. MLST je typizační metoda, která umožňuje rozřazování mikrobiálních izolátů *N. meningitidis* porovnáním sekvencí fragmentů sedmi genů základních metabolických struktur. Zpracováním sekvencí daných lokusů dochází k určení sekvenčních typů (ST) neboli alelických variant izolátů *N. meningitidis*, což definuje členění kmenů do sekvenčních klonálních komplexů, které mohou být řazeny mezi hypervirulentní komplexy. Vyskytují se i ST, které nejsou zařaditelné do klonálního komplexu (ccUA, unassigned). K určení sekvenčních typů metodou MLST je použito fragmentů následujících sedmi genů: *abcZ*, *adk*, *aroE*, *fumC*, *gdh*, *pdhC* a *pgm*. Sekvenční reakce byly analyzovány v kapilárním sekvenátoru ABI PRISM 3130xl. Data byla zpracována za použití software Lasergene a vyhodnocena za využití celosvětové MLST databáze (<http://pubmlst.org/neisseria/>).

VÝSLEDKY

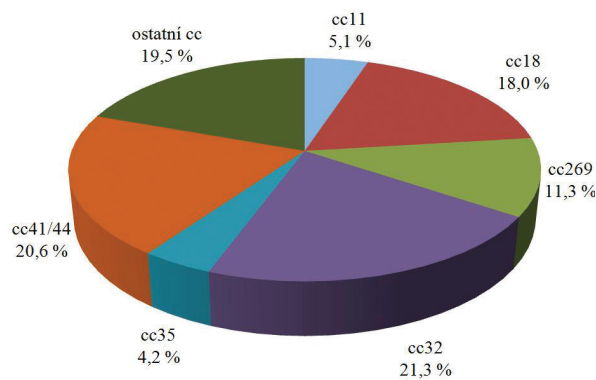
Zkoumaná populace meningokoků způsobujících IMO byla sérologicky odlišná od populace meningokoků zjišťovaných u zdravých nosičů. Graf 1 ukazuje, že sekvenované MLST izoláty od pacientů s IMO nejčastěji náležely do séroskupiny B (66,2 %), séroskupiny C (28 %) a séroskupiny Y (3,1 %). Oproti tomu nejčastěji zjišťované meningokoky izolované od zdravých nosičů byly *N. meningitidis* NG (41,2 %), tedy s neurčitelnou séroskupinou, následované séroskupinou B (32 %) a séroskupinou C (10,4 %). Séroskupiny A, X, W135, 29E a *N. meningitidis* NG byly u izolátů od pacientů s IMO detekovány minoritně (souhrnně 2,7 %). Čtvrtina (25,5 %) všech izolátů vykazovala ST nezařaditelné do klonálního komplexu. U 1093 izolátů od pacientů s IMO to bylo celkem 18,5 % a u 1086 izolátů od nosičů téměř třetina (32,5 %). Nezařaditelnost do klonálního komplexu byla u izolátů z IMO sledována nejvíce u izolátů náležících do séroskupiny Y (26,5 %), následně *N. meningitidis* B (21,5 %) a *N. meningitidis* C (10,1 %). U zdravých nosičů převládaly ST nezařaditelné do klonálního komplexu u izolátů *N. meningitidis* C (33,6 %) a *N. meningitidis* NG (33,1 %), následované izoláty *N. meningitidis* B (24,5 %). Veškeré izoláty mající ST nezařaditelné do klonálního komplexu nebyly dále v klonální analýze popisované v této studii uvažovány.

Graf 2 dokumentuje, že izoláty séroskupiny B u IMO zastoupené nejhojněji (66,2 %) byly zařazeny celkem do 24 klonálních komplexů, což poukazuje na séroskupinu geneticky vysoce heterogenní. U izolátů séroskupiny B byla nejčastěji zjišťována příslušnost k hypervirulentním klonálním komplexům cc32, cc41/44, cc18, cc269, cc11 a cc35 (souhrnně více než 80,5 %). Ostatní klonální komplexy se u izolátů séroskupiny B vyskytovaly méně než ze 4 % (cc8, cc23, cc37, cc60, cc92, cc103, cc116, cc162, cc174, cc213, cc226, cc231, cc292, cc334, cc364, cc461, cc865 a cc1157). Klonální komplex cc18, který byl třetím nejčastěji zjišťovaným komplexem ve sledovaném období, se v posledních letech téměř nevyskytuje. U pacientů s IMO byl v České republice naposledy určen v roce 2011. Oproti tomu je od 90. let minulého století sledován pozvolný nárůst výskytu hypervirulentních komplexů cc41/44 a cc269. V roce 2013 byl klonální komplex cc269 již nejčastěji zjištěným hypervirulentním komplexem *N. meningitidis* B způsobujícím IMO (11,9 %), následovaný



Graf 1. Zastoupení séroskupin *N. meningitidis* u izolátů z invazivního meningokokového onemocnění a od zdravých nosičů v České republice za období 1971–2014 (květen), n = 2179

Fig. 1. Serogroup distribution of *N. meningitidis* isolates from invasive meningococcal disease (IMD) and healthy carriers obtained in the Czech Republic in 1971–2014 (May), n = 2179

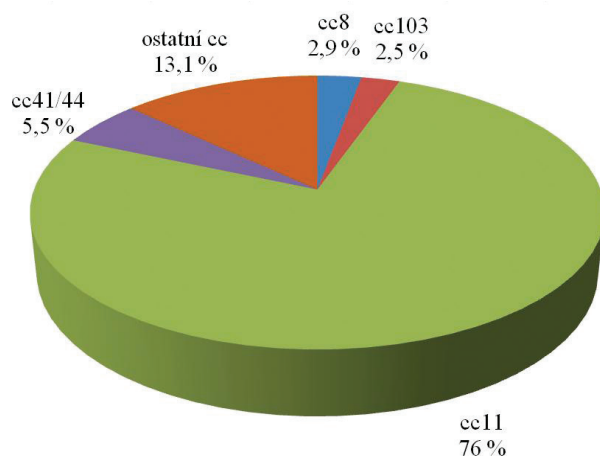


Graf 2. Zastoupení klonálních komplexů u izolátů *N. meningitidis* B z invazivního meningokokového onemocnění v České republice za období 1971–2014 (květen), n = 568

Fig. 2. Clonal complex distribution of *N. meningitidis* B isolates from IMD obtained in the Czech Republic in 1971–2014 (May), n = 568

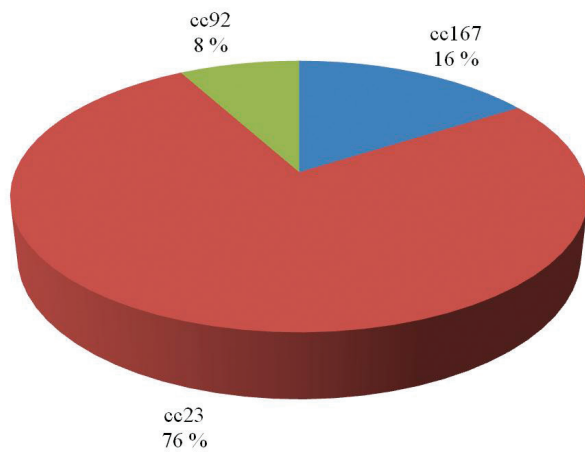
rovněž typickým hypervirulentním klonálním komplexem séroskupiny B cc41/44 (10,2 %). Graf 3 dokládá, že u izolátů séroskupiny C z IMO bylo určeno 18 klonálních komplexů, z nichž výrazně prevaloval hypervirulentní komplex typický pro tuto séroskupinu, komplex cc11 (76 %), následované komplexy cc41/44, cc8 a cc103. Od roku 2005 je u hypervirulentního klonálního komplexu cc11 sledován pokles jeho výskytu. Ostatní klonální komplexy kmenů séroskupiny C se vyskytovaly méně než ze 2 % (cc8, cc18, cc23, cc32, cc35, cc37, cc106, cc116, cc213, cc226, cc231, cc254, cc269 a cc292). U invazivních izolátů *N. meningitidis* geneticky značně homogenní séroskupiny Y byly zjištěny pouze tři klonální komplexy (graf 4), kde většinou šlo o klonální komplex cc23 (76 %), následovaný cc167 a cc92. Převládající klonální komplexy u všech

PŮVODNÍ PRÁCE



Graf 3. Zastoupení klonálních komplexů u izolátů *N. meningitidis* C z invazivního meningokokového onemocnění v České republice za období 1971–2014 (květen), n = 275

Fig. 3. Clonal complex distribution of *N. meningitidis* C isolates from IMD obtained in the Czech Republic in 1971–2014 (May), n = 275



Graf 4. Zastoupení klonálních komplexů u izolátů *N. meningitidis* Y z invazivního meningokokového onemocnění v České republice za období 1971–2014 (květen), n = 25

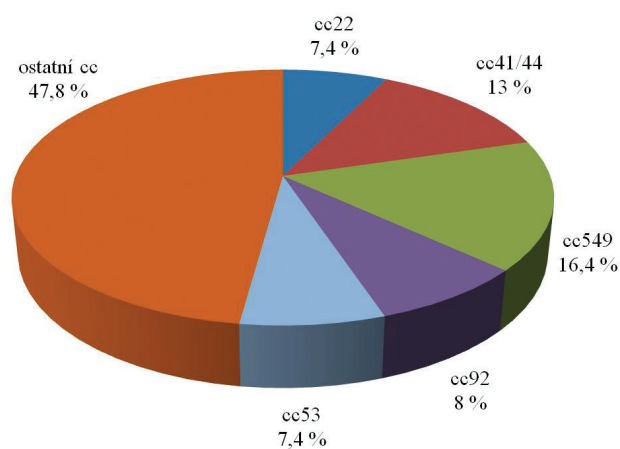
Fig. 4. Clonal complex distribution of *N. meningitidis* Y isolates from IMD obtained in the Czech Republic in 1971–2014 (May), n = 25

uvedených séro skupin jsou řazeny mezi hypervirulentní uskupení, znamenají nejvyšší míru virulence a zdravotní riziko pro hostitelskou populaci.

Graf 5 dokumentuje, že u nosičských izolátů *N. meningitidis* NG bylo určeno celkem 27 klonálních komplexů, z nichž nejčastějším byl klonální komplex cc549, následovaný cc41/44, cc92, cc22 a cc53. Ostatní klonální komplexy byly zjištěny s výskytem nižším než 7% (cc1, cc11, cc18, cc23, cc32, cc35, cc37, cc106, cc116, cc174, cc175, cc198, cc213, cc226, cc231, cc269, cc292, cc334, cc364, cc376, cc750 a cc865), v souhrnu však tvořily 47,8 %. U séro skupiny B zobrazené na grafu 6, byly nosičské izoláty zařazeny celkem do 24 klonálních komplexů, s převažujícím výskytem cc41/44 (37,8 %), následovaným komplexy cc376, cc269 a cc226. Ostatní klonální komplexy kmenů séro skupiny B

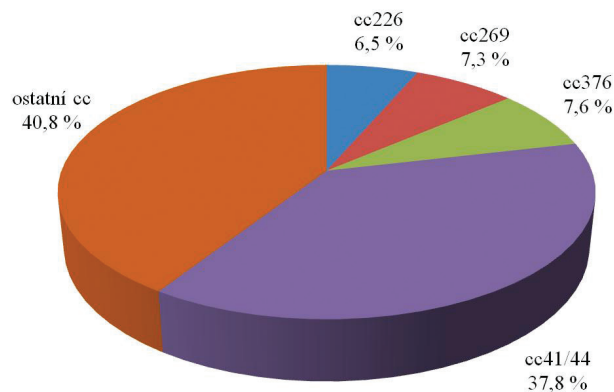
se vyskytovaly z méně než 6 % (cc11, cc18, cc22, cc32, cc35, cc37, cc53, cc92, cc106, cc116, cc174, cc175, cc231, cc254, cc292, cc334, cc364, cc549, cc865 a cc4240/6688), v souhrnu však tvořily až 40,8 %.

U séro skupiny C, dokumentované grafem 7, bylo určeno 11 klonálních komplexů, s převažujícím klonálním komplexelem cc11 (46,7 %), následovaným komplexy cc376, cc41/44 a cc231. Vzestup výskytu kmenů klonálního komplexu cc11 byl u zdravých nosičů zaznamenán zejména v 90. letech 20. století. I u populace nosičských meningokoků byl zaznamenán vysoký výskyt izolátů klonálního komplexu cc41/44, jehož výskyt se po celé sledované období pohyboval průměrně okolo 20 % výskytu. Ostatní klonální komplexy u této séro skupiny se vyskytovaly z méně než 6 % (cc53, cc92, cc106, cc116, cc226, cc364, cc549), v souhrnu tvořily 16 %.



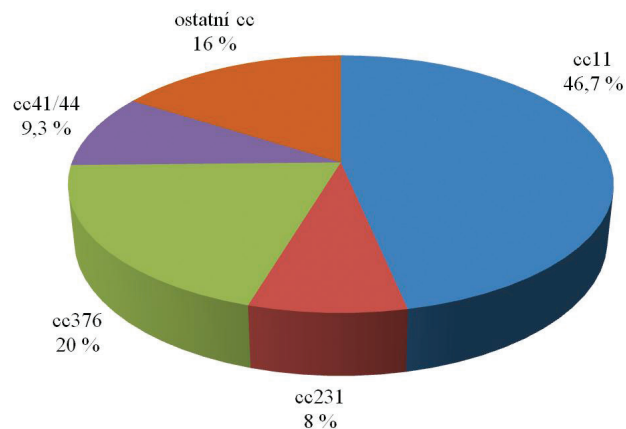
Graf 5. Zastoupení klonálních komplexů u izolátů *N. meningitidis* NG od zdravých nosičů v České republice za období 1971–2014 (květen), n = 299

Fig. 5. Clonal complex distribution of *N. meningitidis* NG from healthy carriers obtained in the Czech Republic in 1971–2014 (May), n = 299



Graf 6. Zastoupení klonálních komplexů u izolátů *N. meningitidis* B od zdravých nosičů v České republice za období 1971–2014 (květen), n = 262.

Fig. 6. Clonal complex distribution of *N. meningitidis* B from healthy carriers obtained in the Czech Republic in 1971–2014 (May), n = 262



Graf 7. Zastoupení klonálních komplexů u izolátů *N. meningitidis* C od zdravých nosičů v České republice za období 1971–2014 (květen), n = 75

Fig. 7. Clonal complex distribution of *N. meningitidis* C from healthy carriers obtained in the Czech Republic in 1971–2014 (May), n = 75

Z více než 85 % náležely izoláty cc11 do séroskupiny C jak u izolátů z IMO (86,7 %), tak u nosičských izolátů (87,5 %). Všechny izolované kmeny *N. meningitidis* klonálního komplexu cc11 od pacientů s IMO i nosičů vykazovaly sekvenční typ ST-11, centrální genotyp tohoto komplexu a to z více než 85 %. U izolátů séroskupiny B byl u dříve hojně se vyskytujících komplexů cc18 a cc92 v současném období sledován výrazný pokles výskytu, na úkor nejčastěji zachycovaných izolátů zařaditelných do klonálních komplexů cc41/44, cc269, cc22 a cc32. Komplex cc41/44 byl u izolátů séroskupiny B z případů IMO zachycen celkem z 88,6 %, zatímco u nosičů pouze z 65 % (kde 25 % ze zbylých izolátů náleželo k hojně zastoupené *N. meningitidis* NG). Zároveň byla u izolátů od nosičů celkem třetina 35,5 % v rámci zmiňovaných komplexů zařazena do sekvenčního typu ST-44, dříve hojně se vyskytujícího. Tento ústřední genotyp náležící do subkomplexu 44 jeví menší míru virulence oproti izolátům od pacientů s IMO, které často vykazují sekvenční typy vztahované k subkomplexu 41. U séroskupiny Y, která byla třetí nejčastěji izolovanou séroskupinou u případů IMO v České republice, byl nejhojněji zastoupen klonální komplex cc23 (82 %), též řazený mezi hypervirulentní uskupení. U nosičských izolátů se séroskupina Y vyskytovala nevýznamně (v naší studii 4,6 %) a výskyt komplexu cc23 v této séroskupině byl zcela minoritní. Hlavním rozdílem u izolátů od pacientů s IMO a od asymptomatických nosičů byl výskyt komplexů řazených mezi hypervirulentní. Tyto komplexy byly určovány především u izolátů od pacientů s IMO než u nosičských izolátů, kde byl jejich výskyt ojedinělý.

DISKUSE

Předložená studie je založena na analýze MLST údajů z databáze NRL více než dvou tisíc izolátů *N. meningitidis* z České republiky získaných za více jak 40leté období. Jde o izoláty *N. meningitidis* od pacientů s IMO a od zdravých nosičů, které jsou plně epidemiologicky i klinicky dokumentované. Takto rozsáhlá databáze je přínosem pro lokální i globální epidemiologii daného agens.

Závažnost onemocnění způsobeného *N. meningitidis* po dlouhá léta orientovala pozornost výzkumu zejména na meningokoky izolované od pacientů s IMO. Pozornost je třeba věnovat i *N. meningitidis* od zdravých nosičů. Z pohledu nosičství *N. meningitidis* tvoří zvláštní část hostitelské populace osoby nacházející se v úzkém kontaktu s nemocným, kdy je nosičství příslušného hypervirulentního kmene četnější než u běžné populace. Pro očekávaný efekt nově vyvíjených vakcín na invazivní i nosičskou populaci meningokoků je důležité jejich antigenní složení. Nadějnou perspektivou detailního studia těchto antigenů je sekvenace celého genomu *N. meningitidis*. Teprve tento přístup otevřel potenciální cestu převratné technologii výroby univerzálně účinné meningokokové vakcíny. Výsledky populačních studií prokazují, že populace nosičských meningokoků je velmi různorodá a nachází se v ní řada genotypů, které nejsou nalézány mezi kmeny působícími IMO [9, 10, 25]. To souhlasí se skutečností, že cílem opatření v ohnisku IMO je prevence vzniku sekundárního IMO nikoliv vymýcení meningokoků z HCD zdravé hostitelské populace. Diverzitu populace nosičských meningokoků zvyšuje horizontální výměna DNA [13], k níž v HCD dochází a která může vyústit ve vznik nového meningokokového klonu. I přes možnosti přenosu DNA jsou kmeny *N. meningitidis* strukturovány do uskupení podobných genotypů – klonálních komplexů, které přetrvávají po desetiletí i během světové migrace obyvatel [5]. Klonální komplexy jsou považovány za vývojové linie bakterií, vzniklé ze stejného prapůvodce [18]. Populace *N. meningitidis* je tvořena částí klonální, zahrnující uskupení (komplexy) vertikálně šířících se geneticky blízkých klonů, a částí neklonální, geneticky zvýšeně proměnlivé. Nejvyšší míru virulence pro hostitelskou populaci vykazují meningokoky sdružené do tzv. hypervirulentních klonálních komplexů.

Výsledky předložené studie, ukazují, že u izolátů *N. meningitidis* z IMO v České republice převažovaly meningokoky zejména séroskupin B, C a Y. Za 40leté sledované období byl nalezen u IMO pouze jediný izolát s neurčitelnou séroskupinou (z roku 2009, klonální komplex cc198). Tyto závěry korespondují s mezinárodními výsledky studie, které se v rámci projektu EU-MenNet „Impact of meningococcal epidemiology and population biology on public health in Europe“ účastnily Česká republika, Norsko a Řecko [25]. U izolátů z těchto tří zemí v období 1991–2000 též statisticky významně převládaly séroskupiny B a C u izolátů z IMO, zatímco u nosičských izolátů, které vykazovaly vyšší genotypovou diverzitu, převládaly kmeny *N. meningitidis* NG (40,5 %). Klonální komplexy kmenů spojených s výskytem IMO byly zejména komplexy cc41/44, cc269, cc11, cc32 a cc269, zatímco komplexy cc23 a cc35 byly pozitivně spojeny s nosičstvím. Na základě následně publikovaných dat [1] shrnujících stav celosvětové databáze PubMLST k březnu roku 2012 byl zaznamenán obdobný výskyt klonálních komplexů. U izolátů z IMO šlo zejména o cc41/44, cc11, cc32 a cc5, zatímco výrazně převažující nosičské komplexy cc53, cc22 a cc198 se u IMO téměř nevyskytují. Tyto údaje ukazují, že populace nosičů *N. meningitidis* není panmiktická a poskytuje další důkazy o tom, že existují významné rozdíly ve virulenci mezi jednotlivými klonálními komplexy meningokoků.

Uvedená data molekulární charakterizace kmenů *N. meningitidis* byla získána metodou multilokusové sekvenční typizace (MLST) [18], která poskytuje dostatečně validní

PŮVODNÍ PRÁCE

data. Přesto metodu MLST v současné době v mnoha ohledech předčí sekvenování nové generace (NGS). Přístup sekvenování celého genomu (Whole Genome Sequencing, WGS) vyniká zejména vysokým výkonem, rychlostí a vysokodiskriminační schopností. Všestranným a účinným prostředkem zkoumání souborů celogenomových sekvenčních variant je metodika gene-by-gene [19], neboli „MLST like“ přístup k sestavování genomu *de novo*, který může být použit pro vysoce detailní typizaci a porovnávání charakteristik izolátů bez potřeby znalosti dat referenčního genomu [1, 14]. Postup gene-by-gene popisuje funkční, evoluční a typové vztahy bakterií od domén až po kmeny.

ZÁVĚR

Hlavním rozdílem ve výskytu jednotlivých klonálních komplexů je výskyt komplexů řazených mezi hypervirulentní, zejména u izolátů od pacientů s IMO, zatímco u nosičských izolátů je tento jev výjimečný. Používání molekulárních metod, jako je MLST, rozšiřuje diagnostiku onemocnění a výrazně zkvalitňuje surveillance. Výsledky klonální analýzy izolátů *N. meningitidis* z IMO jsou podkladem k aktualizaci doporučené vakcinační strategie v České republice.

LITERATURA

1. Bratcher HB, Bennett JS, Maiden MC. Evolutionary and genomic insights into meningococcal biology. *Future Microbiol*, 2012; 7(7):873–885.
2. Bronsdon MA, O'Brien KL, Facklam RR, et al. Immunoblot method to detect *Streptococcus pneumoniae* and identify multiple serotypes from nasopharyngeal secretions. *J Clin Microbiol*, 2004; 42(4):1596–1600.
3. Cartwright K. Meningococcal carriage and disease. Meningococcal Disease, Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 1995.
4. Cartwright KA, Stuart JM, Jones DM, et al. The Stonehouse survey: nasopharyngeal carriage of meningococci and *Neisseria lactamica*. *Epidemiol Infect*, 1987; 99(3):591–601.
5. Caugant DA. Population genetics and molecular epidemiology of *Neisseria meningitidis*. *APMIS*, 1998; 106(5):505–525.
6. Caugant DA, Fogg C, Bajunirwe F, et al. Pharyngeal carriage of *Neisseria meningitidis* in 2–19-year-old individuals in Uganda. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2006; 100(12):1159–1163.
7. Caugant DA, Hoiby EA, Magnus P, et al. Asymptomatic carriage of *Neisseria meningitidis* in a randomly sampled population. *J Clin Microbiol*, 1994; 32(2):323–330.
8. Caugant DA, Hoiby EA, Rosenqvist E et al. Transmission of *Neisseria meningitidis* among asymptomatic military recruits and antibody analysis. *Epidemiol Infect*, 1992; 109(2):241–253.
9. Caugant DA, Kristiansen BE, Froholm LO, et al. Clonal diversity of *Neisseria meningitidis* from a population of asymptomatic carriers. *Infect Immun*, 1988; 56(8):2060–2068.
10. Caugant DA, Tzanakaki G, Kriz P. Lessons from meningococcal carriage studies. *FEMS Microbiol Rev*, 2007; 31(1):52–63.
11. Claus H, Maiden MC, Wilson DJ, et al. Genetic analysis of meningococci carried by children and young adults. *J Infect Dis*, 2005; 191(8):1263–1271.
12. Hammerschmidt S, Birkholz C, Zahringer U, et al. Contribution of genes from the capsule gene complex (cps) to lipooligosaccharide biosynthesis and serum resistance in *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol*, 1994; 11(5):885–896.
13. Jolley KA, Kalmusova J, Feil EJ, et al. Carried meningococci in the Czech Republic: a diverse recombining population. *J Clin Microbiol*, 2000; 38(12):4492–4498.
14. Jolley KA, Maiden MC. Automated extraction of typing information for bacterial pathogens from whole genome sequence data: *Neisseria meningitidis* as an exemplar. *Euro Surveill*, 2013; 18(4):20379.
15. Krizova P, Kriz B. Factors affecting the occurrence and development of invasive meningococcal disease and development of *Neisseria meningitidis* carrier state – results of a nationwide prospective questionnaire survey of cases and controls. *Epidemiol Mikrobiol Imunol*, 1999; 48(4):140–152.
16. Krizova P, Musilek M, Vackova Z, et al. Invazivní meningokokové onemocnění v České republice v roce 2013. *Zprávy centra epidemiologie a mikrobiologie*, 2014; 23:83–89.
17. Krizova P, Roznovsky L. Meningokokové onemocnění, Praha: Maxdorf; 2011.
18. 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.
19. Maiden MC, Jansen van Rensburg MJ, Bray JE, et al. MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. *Nat Rev Microbiol*, 2013; 11(10):728–736.
20. Olcen P, Kjellander J, Danielsson D, et al. Epidemiology of *Neisseria meningitidis*: prevalence and symptoms from the upper respiratory tract in family members to patients with meningococcal disease. *Scand J Infect Dis*, 1981; 13(2):105–109.
21. Pollard AJ. Global epidemiology of meningococcal disease and vaccine efficacy. *Pediatr Infect Dis J*, 2004; 23(12 Suppl):S274–279.
22. Stephens DS. Uncovering the meningococcus: dynamics of carriage and disease. *Lancet*, 1999; 353(9157):941–942.
23. Tyski S, Grzybowska W, Dulny G, et al. Phenotypical and genotypical characterization of *Neisseria meningitidis* carrier strains isolated from Polish recruits in 1998. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2001; 20(5):350–353.
24. Vogel U, Frosch M. Mechanisms of neisserial serum resistance. *Mol Microbiol*, 1999; 32(6):1133–1139.
25. Yazdankhah SP, Kriz P, Tzanakaki G, 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(11):5146–5153.

Studie byla částečně podpořena MZ ČR-RVO (Státní zdravotní ústav - SZÚ, 75010330).

Do redakce došlo dne 27. 4. 2015.

Adresa pro korespondenci:

Ing. Zuzana Jandová

Centrum epidemiologie a mikrobiologie
Státní zdravotní ústav
Šrobárova 48
100 42 Praha 10
e-mail: zuzana.jandova@szu.cz