Epidemiologie 4-06 5.12.2006 13:44 Str. 140
proLékaře.cz | 21.9.2024

Epidemiol. Mikrobiol. Imunol. 55, 2006, č. 4, s. 140–150

Molekulární epidemiologie invazivního meningokokového onemocnění v České republice

Křížová P., Kalmusová J., Musílek M.

Národní referenční laboratoř pro meningokokové nákazy, Státní zdravotní ústav, Praha

Souhrn

Cílem práce je prezentace výsledků klonální analýzy izolátů *Neisseria meningitidis* z invazivního meningokokového onemocnění v České republice z období 1993–2005. Metodou multilokusové sekvenční typizace (MLST) byla zjištěna genetická heterogenita izolátů séroskupiny B a homogenita izolátů séroskupiny C. U izolátů séroskupiny B prevalovaly tři sekvenční klonální komplexy (STC-18, STC-32 a STC-41/44) a téměř čtvrtina izolátů vykazuje ST nezařaditelné do klonálních komplexů. U izolátů séroskupiny C byla zjištěna výrazná prevalence STC-11. Hypervirulentní klonální komplex STC-11 prevaloval v letech 1993–2004, v roce 2005 byl poprvé zjištěn vyšší výskyt jiného klonálního komplexu: STC-41/44. MLST analýza ukázala odlišnost populace českých meningokoků od západoevropských a ostatních populací. Výsledky klonální analýzy izolátů *Neisseria meningitidis* z invazivního meningokokového onemocnění jsou podkladem k hodnocení správnosti doporučených opatření v ohnisku onemocnění a k aktualizaci doporučené vakcinační strategie v České republice.

Klíčová slova: invazivní meningokokové onemocnění – *Neisseria meningitidis* – multilokusová sekvenční typizace, MLST – molekulární epidemiologie.

Summary

Křížová P., Kalmusová J., Musílek M.: Molecular Epidemiology of Invasive Meningococcal Disease in the Czech Republic

The study objective is to present results of clonal analysis of *Neisseria meningitidis* isolates from invasive meningococcal disease in the Czech Republic in 1993–2005. The method of multilocus sequence typing (MLST) revealed genetic heterogeneity of serogroup B isolates and homogeneity of serogroup C isolates. Three clonal sequence type complexes (STC-18, STC-32 and STC-41/44) prevailed among serogroup B isolates and almost a quarter of isolates have ST unclassifiable into clonal complexes. STC-11showed clear predominance among serogroup C isolates. Hypervirulent clonal complex STC-11 prevailed in 1993–2004 while another clonal complex, STC-41/44, became more widespread for the first time in 2005. MLST analysis showed differences between the meningococcal population in the Czech Republic and those in western European countries and elsewhere. The results of clonal analysis of *Neisseria meningitidis* isolates from invasive meningococcal disease provide background information for evaluation of the adequacy of recommended measures in the focus of the disease and for updating the recommended vaccination strategy in the Czech Republic.

Key words: invasive meningococcal disese – *Neisseria meningitidis* – MLST – molecular epidemiology.

Invazivní meningokokové onemocnění i přes pokrok v moderní medicíně stále ohrožuje život nemocných. I ve vyspělých státech se smrtnost tohoto onemocnění někdy dostává nad 10 % a v určitém procentu zůstávají po prodělaném onemocnění trvalé následky. Onemocnění v naprosté většině propuká z plného zdraví a nejvíce postihuje dětské a adolescentní věkové skupiny. Česká republika patří mezi země s nízkou incidencí invazivního meningokokového onemocnění. Nicméně, v roce 1993 byl zaznamenán vzestup nemocnosti i smrtnosti tohoto onemocnění, způsobený hypervirulentním klonálním komplexem *Neisseria meningitidis* C:2a:P1.2,5; ST-11; ET-15/37 [8, 10]. Detekce tohoto klonu byla v té době umožněna metodou multilokusové elektroforézy (MLEE) [18]. Tato metoda byla v roce 1998 nahrazena multilokusovou sekvenční typizací (MLST) [13], jejíž předností je prakticky stoprocentní typovatelnost kmenů a možnost mezilabo-

proLékaře.cz | 21.9.2024

ratorního srovnávání dat. Metodou MLST jsou určovány sekvenční typy (ST), které umožňují přiřazení do sekvenčních klonálních komplexů (STC) a detekci hypervirulentních komplexů *N. meningitidis*. Metoda MLST dává možnost provádění molekulární epidemiologie invazivního meningokokového onemocnění v národním i celosvětovém kontextu a umožňuje studium populací *N. meningitidis* [3, 4, 5, 6, 19, 20, 22].

Metoda MLST byla v pražské Národní referenční laboratoři (NRL) pro meningokokové nákazy zavedena v roce 2000 a její používání významným způsobem zpřesňuje surveillance invazivního meningokokového onemocnění v České republice. Byla vyvinuta rovněž MLST přímo z klinického materiálu [9], která umožňuje detekci ST a STC i u kultivačně negativních invazivních onemocnění. Naše sdělení prezentuje výsledky MLST analýzy izolátů z invazivního meningokokového onemocnění v České republice z let 1993–2005.

Pro orientaci v problematice MLST meningokoků, zařazujeme do úvodu stručný přehled aktuálních dat z celosvětové MLST databáze [http://pubmlst.org/neisseria/]. V originálním názvosloví MLST databáze jsou historicky nejstarší STC označeny dvěma názvy, tj. pocházejícími z nové MLST metody a původní MLEE metody: ST-11 complex/ET-37 complex, ST-1 complex/subgroup I/II, ST-23 complex/Cluster A3, ST-32 complex/ET-5 complex, ST-41/44 complex/Lineage 3, ST-4 complex/subgroup IV, ST-5 complex/subgroup III a ST-8 complex/Cluster A4. Nově objevované STC jsou v celosvětové MLST databázi označovány již pouze nomenklaturou vycházející z MLST metody. Pro lepší srozumitelnost používáme v tomto sdělení názvy vycházející z nové MLST metody, jejíž výsledky zde prezentujeme.

V současné době jsou v celosvětové MLST databázi prezentována sekvenční data 7686 izolátů *N. meningitidis* z celého světa (78 zemí), u nichž bylo zjištěno 5569 individuálních ST, které byly přiřazeny do 36 STC – tabulka 1. V celosvětové MLST databázi jsou shromažďovány kromě mikrobiologických informací i klinicko-epidemiologic-

Tab. 1. ST komplexy *Neisseria meningitidis* v celosvětové MLST databázi

Table 1. *Neisseria meningitidis* ST complexes in the worldwide MLST database

7686 izolátů, 5569 ST, 36 STC
http://pubmlst.org/neisseria/ (14. 6. 2006)

Sekvenční klonální komplex	Prevalující séroskupina
STC-103	
STC-106	
STC-1157	
STC-116	
STC-11	C
STC-162	B
STC-167	Y
STC-174	W135
STC-18	B
STC-198	
STC-1	A
STC-213	B
STC-226	B
STC-22	W135
STC-231	B
STC-23	Y
STC-254	
STC-269	B

Sekvenční klonální komplex	Prevalující séroskupina
STC-292	B
STC-32	B
STC-334	C
STC-35	B
STC-364	B
STC-376	C
STC-41/44	B
STC-461	B
STC-4821	B
STC-4	A
STC-53	
STC-549	
STC-5	A
STC-60	
STC-750	X
STC-865	
STC-8	B
STC-92	

MLST = multilokusová sekvenční typizace
STC = ST-komplex = sekvenční klonální komplex

proLékaře.cz | 21.9.2024

Tab. 2. Korelace ST komplexů a séroskupin *Neisseria meningitidis* v celosvětové MLST databázi

Table 2. Correlation between *Neisseria meningitidis* ST complexes and serogroups in the worldwide MLST database

7686 izolátů, 5569 ST, 36 STC
http://pubmlst.org/neisseria/ (14. 6. 2006)

Séroskupina	A	B	C	X	Y	W135	29E
počet izolátů celkem	450	2879	844	127	267	447	86
ST-komplex (STC)	STC-103	STC-103	STC-103	STC-103	STC-103	**STC-11**	STC-103
	STC-116	STC-106	STC-106	STC-18	STC-11	STC-167	STC-106
	STC-1	STC-1157	STC-1157	STC-198	**STC-167**	STC-174	STC-1157
	STC-4821	STC-116	STC-116	STC-254	STC-174	STC-213	STC-174
	STC-4	STC-11	**STC-11**	STC-32	STC-198	**STC-22**	STC-198
	STC-5	STC-162	STC-174	STC-35	STC-22	STC-231	STC-22
	STC-60	STC-167	STC-18	STC-376	**STC-23**	STC-23	**STC-254**
	STC-865	STC-174	STC-213	STC-41/44	STC-254	STC-254	STC-32
		STC-18	STC-226	STC-549	STC-32	STC-269	STC-35
		STC-198	STC-22	STC-750	STC-35	STC-334	STC-53
		STC-1	STC-231	STC-865	STC-41/44	STC-35	**STC-60**
		STC-213	STC-23	STC-92	STC-549	STC-53	STC-865
		STC-226	STC-254		STC-60	STC-92	
		STC-22	STC-269		STC-92		
		STC-231	STC-292				
		STC-23	STC-32				
		STC-254	STC-334				
		STC-269	STC-35				
		STC-292	STC-364				
		STC-32	STC-376				
		STC-334	STC-41/44				
		STC-35	STC-461				
		STC-364	STC-4821				
		STC-376	STC-53				
		STC-41/44	STC-549				
		STC-461	STC-60				
		STC-4821	STC-865				
		STC-4	STC-8				
		STC-53	STC-92				
		STC-549					
		STC-5					
		STC-60					
		STC-750					
		STC-865					
		STC-8					
		STC-92					
počet a % izolátů nezařazených do STC	30	700	149	90	29	30	28
	6,7	**24,3**	17,6	**70,9**	10,9	6,7	32,6

MLST = multilokusová sekvenční typizace
ST = sekvenční typ
STC = ST-komplex = sekvenční klonální komplex
prevalující STC v dané séroskupině = zvýrazněn

ké údaje, které umožňují detekovat takzvané hypervirulentní komplexy, působící celosvětově ve zvýšené míře invazivní meningokokové onemocnění, například: STC-1, STC-4, STC-5, STC-8, STC-11, STC-18, STC-32, STC-334. U většiny STC (25 z 36) je možno zjistit prevalující séroskupinu *N. meningitidis*, například pro STC-11 je typická séroskupina C, pro STC-41/44 séroskupina B a pro STC-1 séroskupina A.

Korelaci STC a séroskupin v celosvětové MLST databázi u vybraných séroskupin (těch, které jsou prezentovány v tomto sdělení, tj. působících invazivní meningokokové onemocnění v České republice v období 1993–2005) ukazuje tabulka 2. Séroskupina A je geneticky velmi homogenní. U 450 izolátů je prezentováno pouze 8 STC, z nichž 3 jsou pro tuto séroskupinu zcela typické (STC-1, STC-4, STC-5), dohromady byly zjištěny u 91,3 % izolátů séroskupiny A a nebyly dosud zjištěny u izolátů jiných séroskupin. Pouze 6,7 % izolátů séroskupiny A vykazuje ST, které nenáleží do žádného z popsaných STC. Séroskupina B je geneticky nejrůznorodější, což se mimo jiné promítá i do více než třicetileté neúspěšné snahy vyrobit univerzálně účinnou vakcínu proti této séroskupině. V celosvětové MLST databázi je u 2879 izolátů séroskupiny B prezentováno všech 36 popsaných STC, z nichž pouze dva jsou pro ni

proLékaře.cz | 21.9.2024

typické (STC-32 a STC-41/44), dohromady však zahrnují pouze 40,2 % izolátů séroskupiny B a vyskytují se i u jiných séroskupin (například STC-41/44 se vyskytuje u 4,7 % izolátů séroskupiny C). Téměř čtvrtina (24,3 %) izolátů séroskupiny B vykazuje ST, které nenáleží do žádného z popsaných STC. Séroskupina C je homogennější než B: prevaluje STC-11 (47,6 %) a pouze 17,6 % izolátů séroskupiny C vykazuje ST, které nenáleží do žádného z popsaných STC. Nicméně u 844 izolátů je v MLST databázi prezentováno 29 STC. Séroskupina X je geneticky velmi heterogenní: v celosvětové MLST databázi naprostá většina izolátů (70,9 %) vykazuje ST, které nenáleží do žádného z popsaných STC. Ve zbytku izolátů séroskupiny X je prezentováno 12 STC, z nichž žádný neprevaluje. Séroskupina Y je geneticky homogenní: v souboru 267 izolátů je prezentováno 14 STC, z nichž prevalují STC-23 a STC-167, které dohromady zahrnují 66,7 % izolátů. Pouze 10,9 % izolátů séroskupiny Y vykazuje ST, které nenáleží do žádného z popsaných STC. Séroskupina W135 je geneticky rovněž homogenní: v souboru 447 izolátů je prezentováno 13 STC, z nichž prevalují STC-11 a STC-22, které dohromady zahrnují 81,2 % izolátů. Pouze 6,7 % izolátů séroskupiny W135 vykazuje ST, které nenáleží do žádného z popsaných STC. Séroskupina 29E je prezentována nejmenším souborem (86 izolátů), v němž je prezentováno 12 STC, z nichž prevalují STC-254 a STC-60, které dohromady zahrnují 40,7 % izolátů. Třetina izolátů (32,6 %) vykazuje ST, které nenáleží do žádného z popsaných STC.

Materiál a metody

Kmeny Neisseria meningitidis

Do NRL pro meningokokové nákazy jsou zasílány k ověření a další identifikaci kmeny *N. meningitidis* izolované v laboratořích klinické mikrobiologie v celé republice od nemocných s invazivním meningokokovým onemocněním. Charakterizace meningokoků byla provedena popsanými metodami: určení kapsulárních antigenů metodou sklíčkové aglutinace, určení nekapsulárních antigenů metodou celobuněčného ELISA testu (WCE) [1], citlivost na antibiotika a sulfonamidy. V tomto sdělení jsou prezentovány výsledky MLST analýzy kmenů *N. meningitidis* izolovaných v České republice z invazivního meningokokového onemocnění, poslaných do NRL pro meningokokové nákazy během surveillance tohoto onemocnění v letech 1993–2005.

Multilokusová sekvenční typizace (MLST)

Určení ST metodou MLST [13] užívá fragmenty následujících sedmi genů: *abcZ*, *adk*, *aroE*, *fumC*, *gdh*, *pdhC*, *pgm*. Pro PCR amplifikaci fragmentů těchto genů byly použity primery prezentované na MLST webové stránce [http://pubmlst.org/neisseria/].

Primery byly připraveny v GENERI BIOTECH, ČR. Všechny PCR fragmenty byly sekvenovány ABI PRISM BigDye terminatorem v3.1 (Applied Biosystems, Warrington, UK). Terminační reakce [17] byla provedena sekvenační technikou [14, 16] v souladu s protokolem výrobce. Sekvenční reakce byly analyzovány na automatickém DNA sekvenátoru ABI PRISM 3100 (Perkin Elmer). Sekvenční data byla určena pomocí LASERGENE software (DNASTAR, Madison, Wisconsin). Porovnáním sekvenčních dat s celosvětovou MLST databází [http://pubmlst.org/neisseria/] byly určeny jednotlivé genetické lokusy (alely) a jejich kombinací sekvenční typy (ST). Klonální analýza sekvenčních dat metodou BURST [2] umožnila určit, zda zjištěný ST náleží do sekvenčního klonálního komplexu (STC).

Výsledky a diskuse

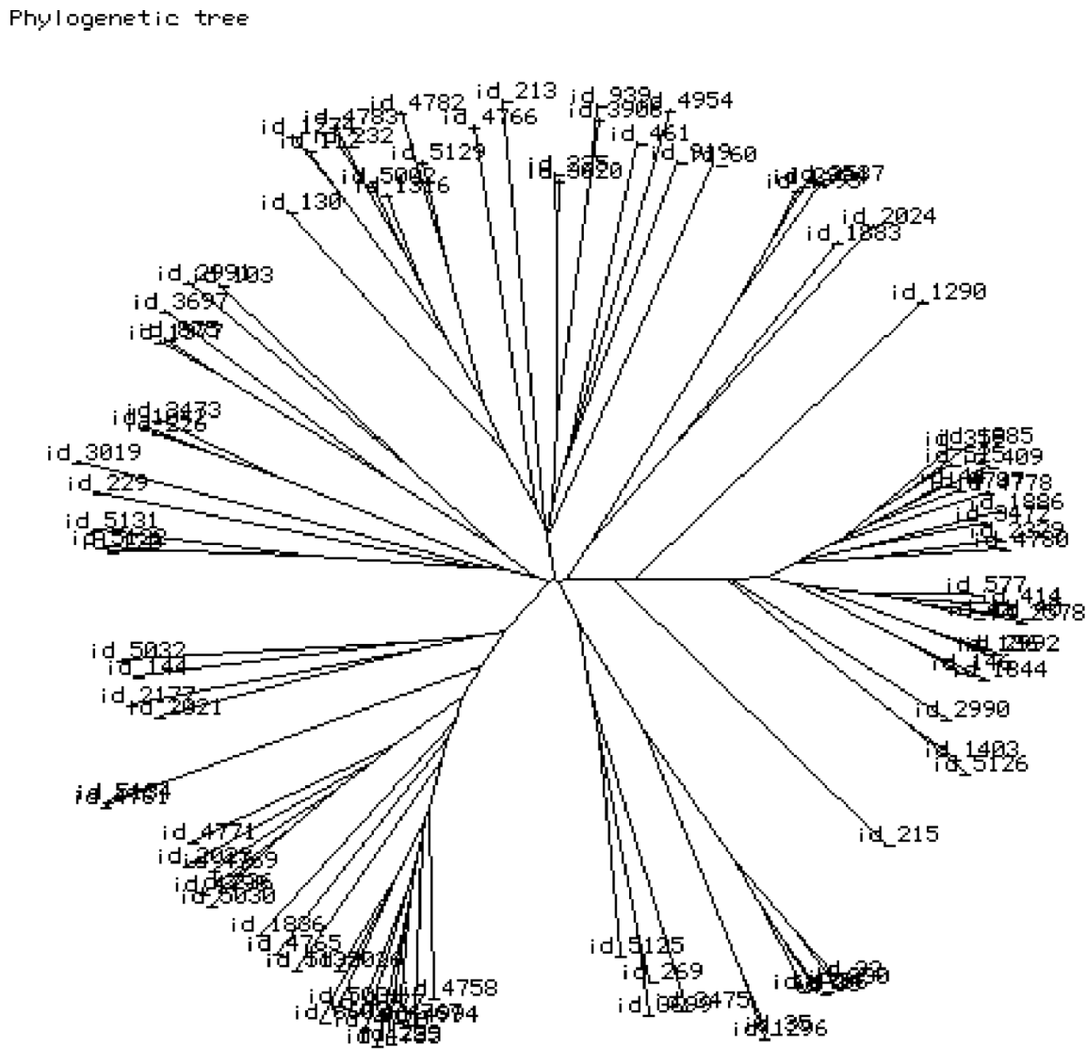
Prezentovaný soubor zahrnuje 731 izolátů *N. meningitidis* izolovaných v České republice z invazivního meningokokového onemocnění v letech 1993–2005 následujících séroskupin: A (2 izoláty), B (333), C (366), X (1), Y (19), W135 (9), 29E (1).

MLST analýzou bylo zjištěno 173 sekvenčních typů (ST), z nichž 124 (71,6 %) bylo poprvé popsáno právě na kmenech *N. meningitidis* izolovaných v České republice. Mechanismus vzniku nového ST je dvojí: byla popsána nová alela nebo byla popsána nová kombinace známých alel. Tyto nové ST byly ověřeny a označeny kurátorem celosvětové MLST databáze, kde jsou rovněž registrovány [http://pubmlst.org/neisseria/]. Nové ST byly zjištěny u 206 izolátů, což představuje téměř třetinu studovaného souboru (28,2 %). Vysoké procento nově zjištěných ST ukazuje, že populace českých meningokoků je odlišná od západoevropských a ostatních populací. Tato odlišnost byla velmi pravděpodobně ještě výraznější v minulých letech. Provedli jsme MLST analýzy 41 izolátů z invazivního meningokokového onemocnění v České republice z let 1977–1992, z nichž u 92,7 % byly zjištěny nové ST (výsledky z tohoto období nejsou zahrnuty do tohoto sdělení, vzhledem k malému počtu izolátů).

Frekvence výskytu jednotlivých ST je odlišná u jednotlivých séroskupin *N. meningitidis*. Vzhledem k tomu, že ve studovaném souboru je prakticky stejným dílem zastoupena séroskupina B a C, je možno provést srovnání, z něhož jednoznačně vyplývá, že séroskupina B je geneticky velmi heterogenní (u 333 izolátů bylo zjištěno 126 ST), zatímco séroskupina C je geneticky velmi homogenní (u 366 izolátů bylo zjištěno pouze 29 ST) – obrázek 1 a 2.

Uvedených 173 ST zjištěných v celém souboru 731 izolátů bylo možno přiřadit do 23 sekvenčních klonálních komplexů (STC) – tabulka 3. U 96 izolátů (13,1 %) byly zjištěny ST, které nenáleží do žádného z popsaných STC. Z uvedených 23 STC byly 3 nově popsány právě na českých izolátech:

proLékaře.cz | 21.9.2024



Obr. 1. Genetická struktura izolátů *Neisseria meningitidis* B působících invazivní meningokokové onemocnění v České republice v letech 1993–2005

Picture 1. Genetic structure of *Neisseria meningitidis* B isolates implicated in invasive meningococcal disease in the Czech Republic in 1993–2005

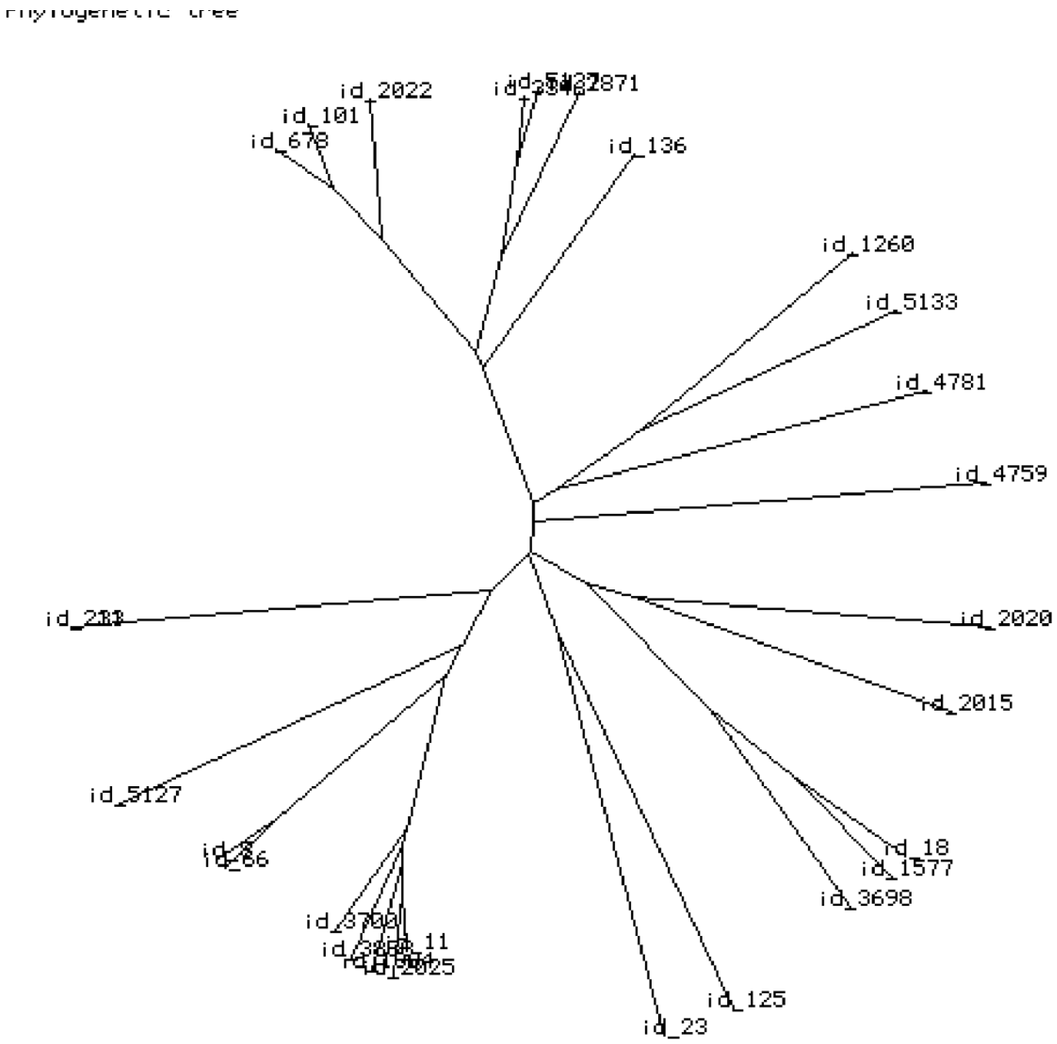
STC-106, STC-231, STC-292 [http://pubmlst.org/neisseria/]. Zjišťování a centrální registrace nových ST a STC je významné pro vývoj nových celosvětově účinných meningokokových vakcín genetickými metodami. V českých meningokokových populacích jsou nové ST a STC zjišťovány ve vysokém procentu pravděpodobně v důsledku minulé čtyřicetileté izolace české lidské populace od populace ostatního světa. Podobně jsou nové ST a STC zjišťovány například v Číně či Japonsku [19, 20].

Zjištěných 23 STC pokrývá 86,9 % izolátů. Nejčastěji byly zjištěny čtyři klonální komplexy: STC-11 (49,9 % izolátů), STC-18 (9,3 %), STC-32 (8,6 %) a STC-41/44 (7,4 %) – graf 1. Nejčastěji se vyskytující STC-11 prevaloval ve všech letech surveillance invazivního meningokokového onemocnění (s výjimkou roku 2005), s kulminací v roce 1995 (86,1 %) – graf 2. Po dosažení svého prvního minima v roce 2000 (23,2 %) došlo opět k jeho vzestupu s kulminací v roce 2003 (65,7 %) a od tohoto roku je zaznamenán opět pokles výskytu tohoto hypervirulentního komplexu v České republice. V roce 2005 poprvé v historii surveillance došlo k převýšení frekvence STC-11 jiným klonálním komplexem: STC-41/44. Zastoupení séroskupin v uvedených hlavních STC je následující:

STC-11: C (91,5 %), B (7,4 %), W135 (1,1 %)
STC-32: B (100,0 %)
STC-18: B (97 %), C (3 %)
STC-41/44: B (90,7 %), C (9,3 %)

Vzestup séroskupiny C v typickém B klonálním komplexu STC-41/44 byl zaznamenán zejména v roce 2005 [12].

proLékaře.cz | 21.9.2024



Obr. 2. Genetická struktura izolátů *Neisseria meningitidis* C působících invazivní meningokokové onemocnění v České republice v letech 1993–2005

Picture 2. Genetic structure of *Neisseria meningitidis* C isolates implicated in invasive meningococcal disease in the Czech Republic in 1993–2005

Výskyt jednotlivých STC v jednotlivých séroskupinách v letech 1993–2005 dokumentuje tabulka 3. Zastoupení izolátů v séroskupinách A, X, Y, W135 a 29E je velmi nízké, tudíž výskyt jednotlivých STC nediskutujeme. Nicméně za zmínku stojí hypervirulentní klonální komplex STC-23, který u izolátů séroskupiny Y z invazivního meningokokového onemocnění zjišťujeme v České republice teprve od roku 1993 a který způsobuje vysokou smrtnost tohoto onemocnění (prezentováno na tuzemských i mezinárodních konferencích). Zvýšení nemocnosti způsobené tímto hypervirulentním komplexem bylo v devadesátých letech zaznamenáno v USA [3].

Zastoupení jednotlivých STC v séroskupinách B a C potvrzuje již výše uvedenou genetickou heterogenitu séroskupiny B (zjištěno 15 STC a 21,6 % izolátů vykazuje ST nezařaditelný do STC) a homogenitu séroskupiny C (zjištěno 11 STC a pouze 4,1 % izolátů vykazuje ST nezařaditelný do STC). Heterogenita séroskupiny B a homogenita séroskupiny C je ještě zřetelnější při znázornění procenta výskytu jednotlivých STC v uvedených séroskupinách. Procento tří prevalujících STC dosahuje u séroskupiny B nízkých hodnot (STC-18 = 19,8 %, STC-32 = 18,9 % a STC-41/44 = 14,7 %) – graf 3, zatímco u séroskupiny C je výrazná převaha STC-11 (91,2 %) – graf 4.

Detailní analýza korelace STC a jednotlivých séroskupin způsobujících invazivní onemocnění a úmrtí v roce 2005 ukazuje, že prokazatelně 43,3 % onemocnění bylo způsobeno hypervirulentními komplexy (STC-11, STC-18, STC-23,

proLékaře.cz | 21.9.2024

Tab. 3. Korelace ST komplexů a séroskupin *Neisseria meningitidis* působící invazivní meningokokové onemocnění v České republice v letech 1993–2005

Table 3. Correlation between *Neisseria meningitidis* ST complexes and serogroups causing invasive meningococcal disease in the Czech Republic in 1993–2005

(n = 731)

	Celkem				Séroskupina			
		A	B	C	X	Y	W135	29E
počet izolátů	731	2	333	366	1	19	9	1
počet zjištěných ST		2	126	29	1	8	6	1
ST-komplex (STC)	STC-1	STC-1	STC-11	STC-11		STC-23	STC-11	STC-254
	STC-11	STC-103	STC-103	STC-103		STC-92	STC-174	
	STC-103		STC-162	**STC-106**			STC-22	
	STC-106		STC-18	STC-18				
	STC-162		STC-213	STC-213				
	STC-174		STC-226	STC-226				
	STC-18		STC-269	STC-23				
	STC-213		**STC-292**	**STC-231**				
	STC-226		STC-32	STC-254				
	STC-22		STC-35	STC-41/44				
	STC-23		STC-41/44	STC-8				
	STC-231		STC-461					
	STC-254		STC-60					
	STC-269		STC-865					
	STC-292		STC-92					
	STC-32							
	STC-35							
	STC-41/44							
	STC-461							
	STC-60							
	STC-865							
	STC-8							
	STC-92							
počet a % izolátů nezařazených do STC	96	0	72	15	1	6	2	0
	13,1		21,6	4,1				

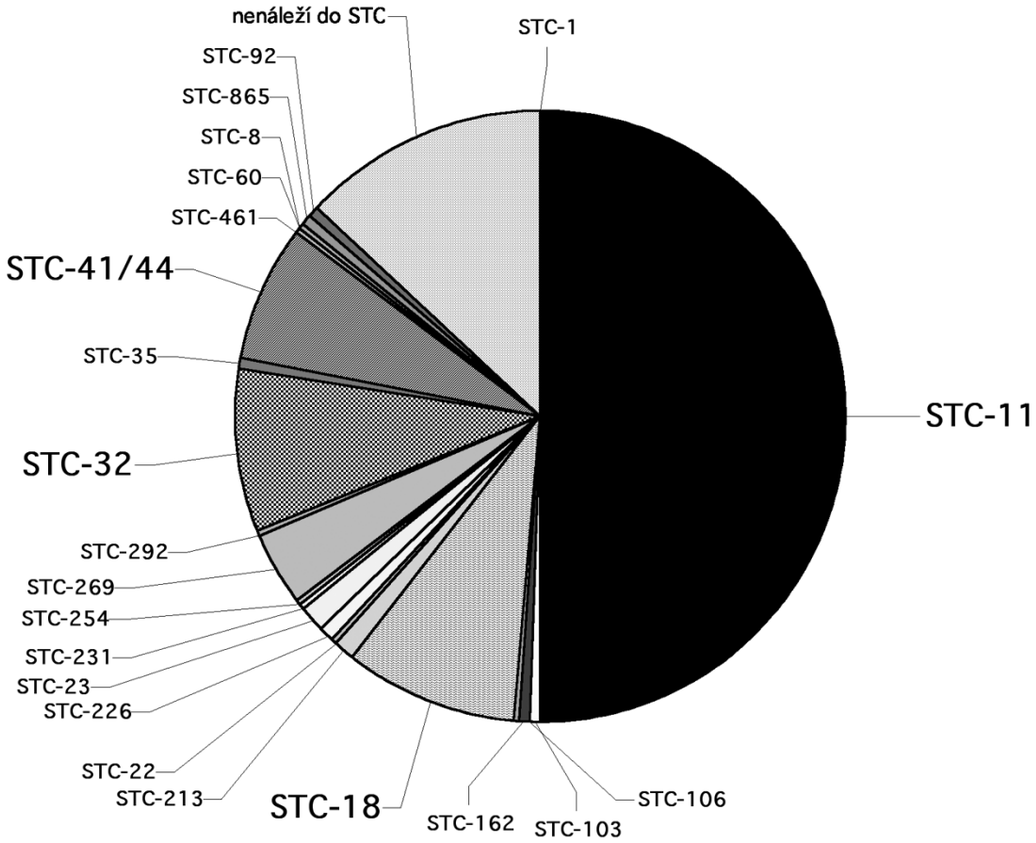
STC = ST-komplex = sekvenční klonální komplex
zvýrazněné STC = nově objevené v České republice

STC-32, STC-41/44 a STC-269) a pouze 18,6 % způsobily meningokoky, které nenáležely do hypervirulentního komplexu – tabulka 4. Při počítání procenta hypervirulentních izolátů z počtu typovaných izolátů docházíme k 60 %. Toto zjištění vysokého procenta hypervirulentních izolátů, které v roce 2005 způsobily invazivní meningokokové onemocnění je velmi zajímavé zejména v kontextu, že právě v tomto roce 2005 byla dosažena nejnižší smrtnost za celou dobu trvání surveillance (5,1 %) [12]. Nabízí se tedy úvaha, že smrtnost invazivního onemocnění je více ovlivněna včasností a správností léčby, než samotnou hypervirulencí meningokoka a že v České republice stále více nacházejí uplatnění nová terapeutická doporučení, která mají příznivý vliv na snížení smrtnosti [7, 15]. Nicméně k potvrzení této hypotézy by bylo žádoucí, aby bylo MLST analýzou určeno co nejvíce izolátů, způsobujících invazivní meningokokové onemocnění. Například v roce 2005 nebylo možno tuto analýzu provést u 38,1 % onemocnění, protože izoláty z těchto onemocnění nebyly do NRL pro meningokokové nákazy zaslány.

Rok 2005 byl z hlediska používání MLST zajímavý nejen tím, že se poprvé podařilo provést MLST u všech kmenů z invazivního meningokokového onemocnění poslaných do NRL, ale i tím, že díky této metodě bylo možno popsat dva jevy popisované ve světové literatuře: „capsule replacement“ (jedná se o výměnu stávající populace meningokoků jinou populací, která vykazuje odlišnou séroskupinu) a „capsule switching“ (jedná se o změnu polysacharidového pouzdra *N. meningitidis*, ke které dochází horizontální výměnou DNA mezi meningokoky). Oba tyto jevy byly zjištěny v ústeckém kraji [12].

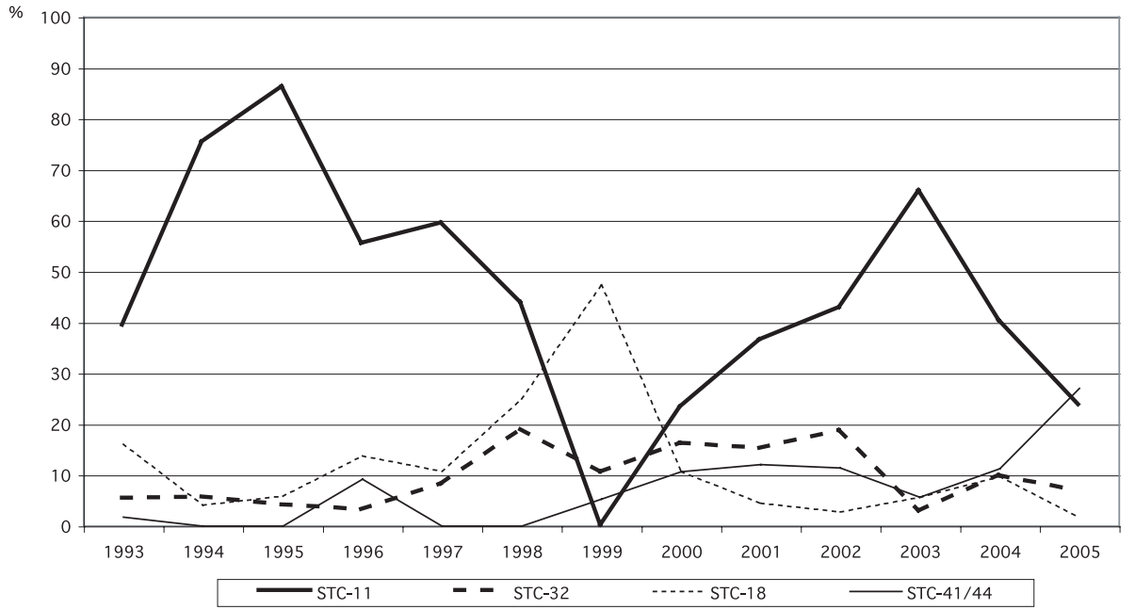
Určování ST meningokoků a jejich příslušnosti do klonálních komplexů spolu s datem začátku onemocnění dává možnost přesně posoudit epidemiologickou souvislost mezi onemocněními v jednotlivých lokalitách. NRL provedla tyto analýzy za rok 2005 na úroveň okresů a výsledky potvrzují, že v naprosté většině není mezi invazivními meningokokovými onemocněními přímá epidemiologická souvislost a že v České republice se prakticky nevyskytují sekundární invazivní meningokoková onemocnění. MLST analýzy rovněž potvrzují, že

proLékaře.cz | 21.9.2024



Graf 1. ST komplexy *Neisseria meningitidis* působící invazivní meningokokové onemocnění v České republice v letech 1993–2005 (n = 731)

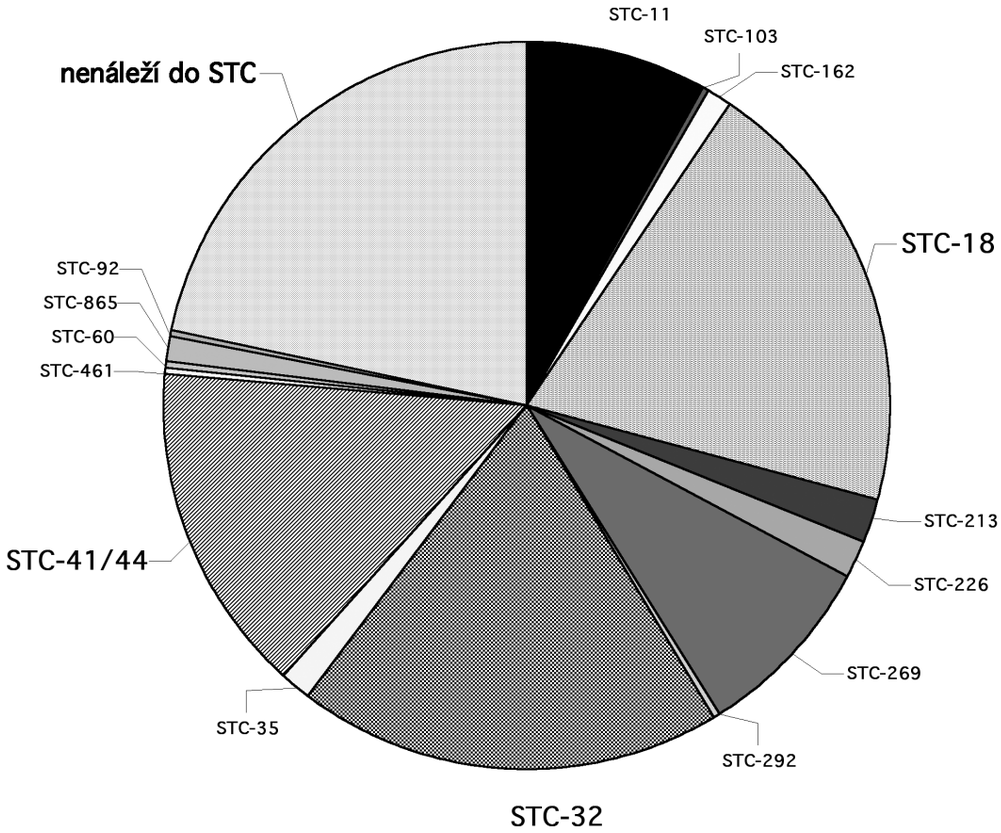
Graph 1. *Neisseria meningitidis* ST complexes causing invasive meningococcal disease in the Czech Republic in 1993–2005 (n = 731)



Graf 2. Frekvence hlavních ST komplexů působících invazivní meningokokové onemocnění v České republice v letech 1993–2005

Graph 2. Distribution of the major *Neisseria meningitidis* ST complexes causing invasive meningococcal disease in the Czech Republic in 1993–2005

proLékaře.cz | 21.9.2024



Graf 3. ST komplexy *Neisseria meningitidis* B působící invazivní meningokokové onemocnění v České republice v letech 1993–2005 (n = 333)

Graph 3. *Neisseria meningitidis* B ST complexes causing invasive meningococcal disease in the Czech Republic in 1993–2005 (n = 333)

Tab. 4. Korelace ST komplexů a séroskupin *Neisseria meningitidis* působící invazivní meningokokové onemocnění v České republice v roce 2005

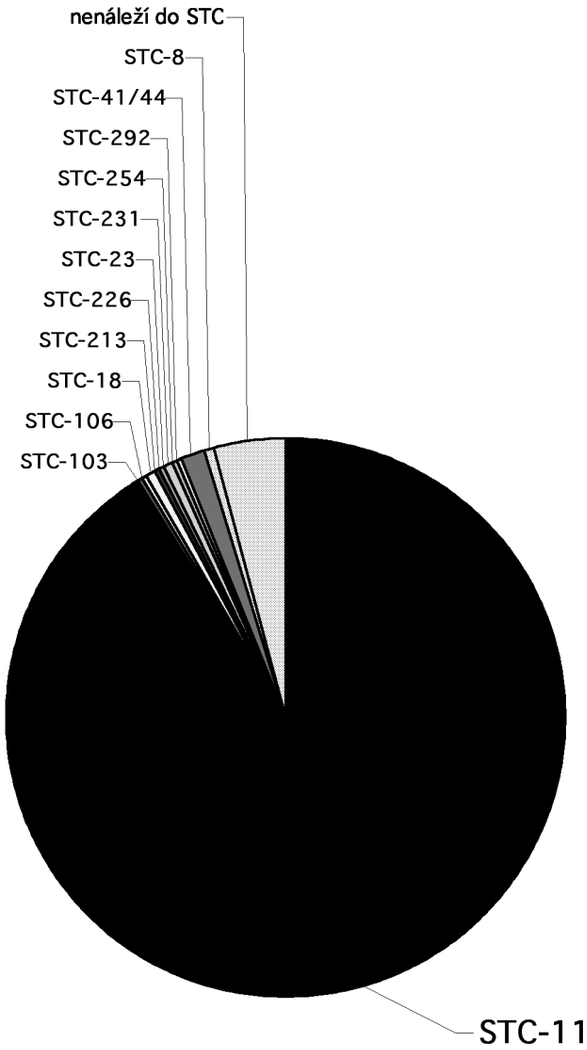
Table 4. Correlation between *Neisseria meningitidis* ST complexes and serogroups causing invasive meningococcal disease in the Czech Republic in 2005

Séroskupina	Počet IMO (počet úmrtí)	Hypervirulentní komplex							
		STC-11	STC-18	STC-23	STC-32	STC-41/44	STC-269	NE	nd
A	1								1
B	55 (2)		1		3 (1)	12	6	15	18 (1)
C	28 (1)	14				5***** (1*)		2	7
Y	2			1				1	
nd	11 (2)								11 (2)
Celkem	97 (5)	14	1	1	3 (1)	17 (1)	6	18	37 (3)
% z IMO		14,4	1,0	1,0	3,1	17,6	6,2	18,6	38,1
hypervirulentní komplex celkem		42							
% z IMO		43,3							
% z typovaných izolátů		60,0							

STC = ST-komplex = sekvenční klonální komplex
NE = nenáleží k hypervirulentnímu komplexu
nd = neděláno
*kmen séroskupiny C v typickém B komplexu
IMO = invazivní meningokokové onemocnění
počet úmrtí je v závorkách

v některých lokalitách (byť výjimečně) stejný klon působil invazivní meningokoková onemocnění v rozmezí několika měsíců. Nejednalo se tedy o klasická sekundární onemocnění, nicméně lze předpokládat šíření určitých klonů meningokoků ve zdravé populaci daných lokalit [12].

proLékaře.cz | 21.9.2024



Graf 4. ST komplexy *Neisseria meningitidis* C působící invazivní meningokokové onemocnění v České republice v letech 1993–2005

Graph 4. *Neisseria meningitidis* C ST complexes causing invasive meningococcal disease in the Czech Republic in 1993–2005

Populační studie s využitím MLST analýzy však prokázaly, že populace meningokoků způsobujících invazivní meningokokové onemocnění, jsou geneticky odlišné od populací zjišťovaných u zdravých nosičů *N. meningitidis* [5, 22]. Tyto nálezy tedy potvrzují správnost opatření doporučených v ohnisku invazivního meningokokového onemocnění [21], jejichž cílem je prevence vzniku invazivního meningokokového onemocnění u „rizikových“ kontaktních osob, nikoli vymýcení meningokoků z horních cest dýchacích zdravé populace.

Naše sdělení prezentuje výsledky MLST izolátů z invazivního meningokokového onemocnění za dvanáctileté období (1993–2005). NRL pro meningokokové nákazy má sbírku izolátů *N. meningitidis*, která pokrývá více než třicetileté období (izoláty z invazivního meningokokového onemocnění jsou od roku 1971), nicméně limitací interpretace MLST analýz z let před započetím surveillance je nízký počet izolátů, které NRL z invazivního meningokokového onemocnění získávala v minulosti. Nutno říci, že i ve světové literatuře jsou MLST analýzy pokrývající delší období ojedinělé [20].

Trend používání molekulárních metod v mikrobiologii je celosvětově prosazován. Například na 8. setkání EMGM (European Monitoring Group on Meningococci) v roce 2005 bylo konstatováno, že molekulární metody jsou používány v 80 % evropských Národních referenčních meningokokových laboratoří. Jejich použití nejenže zlepšuje diagnostiku a včasnost léčby onemocnění, ale výrazně také zkvalitňuje surveillance, včetně stanovení vakcinační strategie odpovídající epidemiologické situaci. Na základě znalosti výskytu hypervirulentních komplexů v České republice byla recentně publikována vakcinační strategie aktuálně doporučená NRL pro meningokokové nákazy [11].

Určování příslušnosti meningokoků do klonálních komplexů by mělo být využíváno všemi epidemiology. Výsledky klonální analýzy meningokoků zasílá NRL mikrobiologům, kteří poskytli izoláty k vyšetření. Metoda MLEE byla v průběhu roku 2005 nahrazena metodou MLST, která umožňuje detailnější klonální analýzu meningokoků.

Závěry

Klonální analýzou izolátů *N. meningitidis* z invazivního meningokokového onemocnění v České republice z let 1993–2005 byla metodou MLST zjištěna genetická heterogenita izolátů séroskupiny B a homogenita izolátů séroskupiny C. U izolátů séroskupiny B prevalovaly tři sekvenční klonální komplexy (STC-18, STC-32 a STC-41/44) a téměř čtvrtina izolátů vykazuje ST nezařaditelné do klonálních komplexů. U izolátů séroskupiny C byla zjištěna výrazná prevalence STC-11. Hypervirulentní klonální komplex STC-11 prevaloval v letech 1993–2004, v roce 2005 byl poprvé zjištěn vyšší výskyt jiného klonálního komplexu: STC-41/44. V tomto klonálním komplexu STC-41/44, který je typický pro séroskupinu B, byly v roce 2005 zjištěny ve vyšší frekvenci izoláty séroskupiny C (capsule switching). MLST analýza ukázala odlišnost populace českých meningokoků od západoevropských a ostatních populací.

proLékaře.cz | 21.9.2024

Poděkování

Detailní charakteristika kmenů Neisseria meningitidis byla podpořena projektem IGA MZ ČR reg č. 1A/8688-3. Definování alel a sekvenčních typů bylo provedeno srovnáním sekvenčních dat s MLST databází (http://pubmlst.org/neisseria/). Na MLST některých izolátů se podíleli M. Maiden a K. Jolley (University of Oxford, UK), D. Caugant (NIPH Oslo, Norsko), J. Felsberg a R. Haugvicová (MÚ AV ČR, Praha) v rámci již ukončených výzkumných projektů. Za technickou pomoc autoři děkují laborantkám NRL pro meningokokové nákazy SZÚ Praha. Autoři děkují všem mikrobiologům, epidemiologům a klinickým lékařům za spolupráci při realizaci programu surveillance invazivního meningokokového onemocnění v České republice a zejména za posílání izolátů Neisseria meningitidis a klinického materiálu k detailní charakterizaci.

Literatura

1. **Abdillahi, H. and Poolman, J. T.** Definition of meningococcal class 1 OMP subtyping antigens by monoclonal antibodies. FEMS Microbiol Immunol, 1988, 1, 139–144.
2. **Feil, E. J., Li, B. C., Aanensen D. M., Hanahe, W. P., Spratt, B. G.** BURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from nultilocus sequence typing data. J Bacteriol, 2004, 186, 1518–1530.
3. **Harisson, L. H., Jolley, K. A., Shutt, K. A., Marsh, J. W. et al.** Antigenic shift and increased incidence of meningococcal disease. J Infect Dis, 2006, 193, 9, 1266–1274.
4. **Chiou, C. S., Liao, J. C., Liao, T. L., Li, C., C. et al.** Molecular epidemiology and emergence of worldwide epidemic clones of *Neisseria meningitidis* in Taiwan. BMC Infect Dis 2006 Feb 15;6:25.
5. **Jolley, K. A., Kalmusova J., Feil E.J., Gupta S., et al.** Carried meningococci in the Czech Republic: A diverse recombining population. J Clin Microbiol, 2000, 38, 4492–4498.
6. **Jolley, K. A., Wilson, D. J., Kriz, P., McVean, G., Maiden, M.** The Influence of Mutation, Recombination, Population History, and Selection on Patterns of Genetic Diversity in *Neisseria meningitidis*. Mol Biol Evol., 2005, 22, 562–569.
7. **Kasal E., Rožnovský L., Křížová P. et al.** Léčebný protokol invazivního meningokokového onemocnění (IMO). Praktický lékař, 2005, 85, 4, 196–199.
8. **Křížová P., Musílek M., Lebedová V.** Nová epidemiologická situace v České republice způsobená meningokokem C:2a:P1.2(P1.5). Epidemiol Mikrobiol Imunol, 1994, 43, 4, 183–187.
9. **Kriz P., Kalmusova J., Felsberg J.** Multilocus sequence typing of *Neisseria meningitidis* directly from cerebrospinal fluid. Epidemiol Infect, 2002, 128, 157–160.
10. **Kriz P.** Surveillance of invasive meningococcal disease in the Czech Republic. Eurosurveillance Monthly, 2004, 9, 11, 11–12.
11. **Křížová P.** Současné možnosti vakcinace proti meningokokům. Klinická mikrobiologie a infekční lékařství, 2005, 11, 25–29.
12. **Křížová, P., Kalmusová, J., Musílek, M.** Invazivní meningokokové onemocnění v České republice v roce 2005. Zprávy CEM (SZÚ, PRAHA), 2006, 15, 3–4, 45–51.
13. **Maiden, M. C. J., Bygraves, J. A., Feil, E., Morelli, G. et al.** Multilocus sequence typing a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95, 3140–3145.
14. **Murray, V.** Improved double-stranded DNA sequencing using linear polymerase chain reaction. Nucleic Acins Res., 1989, 17, 8889.
15. **Rožnovský L., Gutvirth J., Beneš J., Dostál V. et al.** Standard efektivní klinické péče v přednemocniční neodkladné péči (PNP): Invazivní meningokoková onemocnění. Urgentní medicína, 2002, 3, 18–20.
16. **Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B. et al.** Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sicle cell anemia. Science, 1985, 230, 1350–1354.
17. **Sanger, F., Nickeln, S., Coulson, A. R.** DNA Sequencing with chain-terminator inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA, 1977, 74, 5463–5467.
18. **Selander, R. K., Caugant, D. A., Ochman, H., Musser, J. M. et. al.** Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. Appl Environ Microbiol, 1986, 51, 873–884.
19. **Shao, Z., Li, W., Ren, J., Liang, X. et al.** Identification of a new *Neisseria meningitidis* serogroup C clone from Anhui province, China. Lancet, 2006, 367(9508), 419–423.
20. **Takahashi, H., Kuroki, T., Watanabe, Y., Tanaka, H. et al.** Characterization of *Neisseria meningitidis* isolates collected from 1974 to 2003 in Japan by multilocus sequence typing. J Med Microbiol, 2004, 53, 657–662.
21. Věstník MZ ČR: Metodický návod k epidemiologickým opatřením v ohnisku invazivního meningokokového onemocnění. 1994, 8, 25. 2.
22. **Yazdankhah, P. S., Kriz, P., Tzanakaki, G., Kremastinou, J. et al.** Distribution of serogroups and genotypes among diseaes-associated and carried isolates of *Neisseria meningitidis* from the Czech Republic, Greece and Norway. J Clin Microbiol, 2004, 42, 11, 5146–5153.

Do redakce došlo 17. 7. 2006

MUDr. Pavla Křížová, CSc.
Státní zdravotní ústav
Šrobárova 48
100 42 Praha 10
e-mail: pavla.krizova@szu.cz