

VILNIAUS UNIVERSITETAS
FARMACIJOS FAKULTETAS
Biomedicinos mokslų institutas (Farmacijos ir farmakologijos centras)

MAGISTRO BAIGIAMASIS DARBAS

Neisseria meningitidis nešiojimo paplitimas ir ypatumai tarp Vilniaus apskrityje gyvenančių studentų

Studentė: Justina Silickaitė

5 kursas, 2 grupė

Darbo vadovas: dr. Milda Plečkaitytė

(pedagoginis vardas, mokslo vardas, vardas, pavardė, parašas)

Farmacijos ir farmakologijos centro vadovas: doc. dr. Kristina Garuolienė

Biomedicinos mokslų instituto direktorius: prof. dr. Algirdas Edvardas Tamošiūnas

Darbo įteikimo data: 2023 m. gegužės 14 d. Registracijos Nr. _____

Studento elektroninio pašto adresas: Justina.Silickaite@mf.stud.vu.lt

TURINYS

| | |
|--|----|
| SANTRUMPŲ SĄRAŠAS..... | 4 |
| ĮVADAS..... | 5 |
| 1 LITERATŪROS APŽVALGA..... | 7 |
| 1.1 <i>Neisseria meningitidis</i> | 7 |
| 1.2 <i>N. meningitidis</i> virulentiškumo ir prisitaikymo mechanizmai..... | 7 |
| 1.2.1 Invazinė meningokokinė liga, jos diagnozavimas ir gydymas..... | 13 |
| 1.2.1 IML epidemiologinė situacija pasaulyje..... | 16 |
| 1.3 <i>N. meningitidis</i> kamienų charakterizavimas..... | 17 |
| 1.4 <i>N. meningitidis</i> nešiojimas ir jo nustatymo svarba..... | 19 |
| 2 TYRIMO MEDŽIAGOS IR METODAI..... | 22 |
| 2.1 Regentai, įranga, prietaisai..... | 22 |
| 2.2 Tyrimo metodai..... | 24 |
| 2.2.1 Tyrimo dalyviai..... | 24 |
| 2.2.2 Ėminių surinkimas ir <i>N. meningitidis</i> kamienų išskyrimas..... | 24 |
| 2.2.3 Genominės DNR išskyrimas iš burnaryklės ėminių..... | 24 |
| 2.2.4 DNR koncentracijos nustatymas spektrofotometru..... | 25 |
| 2.2.5 Genų amplifikavimas TL-PGR metodu..... | 25 |
| 2.2.6 TL-PGR rezultatų analizė..... | 28 |
| 2.2.7 <i>N. meningitidis</i> izoliatų genogrupės nustatymas PGR..... | 29 |
| 2.2.8 Dauginių lokusų sekų (MLST) amplifikavimas..... | 30 |
| 2.2.9 Baltymų PorA ir FetA tipavimas..... | 32 |
| 2.2.10 PGR produktų analizė agarozės gelyje..... | 33 |
| 2.2.11 PGR produktų vertinimas agarozės gelyje..... | 33 |
| 2.2.12 PGR produktų gryninimas..... | 34 |
| 2.2.13 MLST profilio nustatymas..... | 34 |
| 2.2.14 Invaziniai <i>N. meningitidis</i> izoliatai..... | 35 |

| | |
|--|----|
| 2.2.15 Statistinė duomenų analizė | 36 |
| 3 REZULTATAI | 37 |
| 3.1 Sergamumas IML Lietuvoje 2020-2022 metais..... | 37 |
| 3.2 Tyrimo dalyvių charakteristika | 38 |
| 3.3 <i>N. meningitidis</i> nešiojimo paplitimas..... | 39 |
| 3.4 Molekulinės nešiojamų meningokokų kamienų charakteristikos | 41 |
| 3.5 Vakcinacijos poveikis <i>N. meningitidis</i> nešiojimui | 45 |
| 4 IŠVADOS..... | 46 |
| 5 REKOMENDACIJOS | 47 |
| SANTRAUKA..... | 48 |
| SUMMARY | 49 |
| PADĖKA..... | 50 |
| LITERATŪROS SĄRAŠAS..... | 51 |

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

IML – invazinė meningokokinė liga

DNR – deoksiribonukleorūgštis

MLST – dauginių lokusų sekų tipavimas (angl. *Multilocus sequence typing*)

wgMLST – viso genomo dauginių lokusų sekų tipavimas (angl. *whole-genome Multilocus Sequence Typing*)

WGS – viso genomo sekoskaita (angl. *whole genome sequencing*)

ST – sekos tipas (angl. *sequence type*)

cc – klonų kompleksas (angl. *clonal complex*)

CEACAM – karcinoembrioninės su antigenais susijusios adhezijos ląstelių molekulės (angl. *carcinoembryonic antigen-related cell-adhesion molecule*)

HSPG – heparano sulfato proteoglikanai (angl. *heparan sulfate proteoglycans*)

LOS – lipooligosacharidas (angl. *lipooligosaccharide*)

PGR – polimerazės grandininė reakcija

TL-PGR – tikro laiko polimerazės grandininė reakcija

NG – genogrupei nepriskirta (angl. *non groupable*)

PorA – meningokoko išorinės membranos baltymas - porinas A

FetA – meningokoko išorinės membranos baltymas FetA

CDC – JAV Ligų kontrolės ir prevencijos centras (angl. *Centers for Disease Control and Prevention*)

ECDC – Europos ligų kontrolės ir prevencijos centras (angl. *European Centre for Disease Prevention and Control*)

NVSC – Nacionalinis visuomenės sveikatos centras

ES – Europos Sąjunga

ES/EEE – Europos Sąjunga ir Europos ekonominė erdvė

VUL SK – Vilniaus universiteto ligoninė Santaros klinikos

VU GMC BTI IS – Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Imunologijos skyrius

NVSPL – Nacionalinė visuomenės sveikatos priežiūros laboratorija

IVADAS

Neisseria meningitidis, dar vadinama meningokoku, yra tik žmogui būdinga bakterija, kurią dažnai asimptomiškai nešioja iki 35% individų kuriame nors amžiaus tarpsnyje (1). Meningokoko nešiojimo paplitimas yra priklausomas nuo žmogaus amžiaus: industrinėse šalyse nešiojimas yra didžiausias tarp 16-24 m. amžiaus žmonių, o tyrimai Afrikoje parodė, kad nešiojimas yra didžiausias tarp 5-14 m. amžiaus žmonių (2,3). Kiti rizikos veiksniai, siejami su meningokoko nešiojimu, yra gyvenimas glaudžiose bendruomenėse, rūkymas, dažnas lankymasis baruose/klubuose/vakarėliuose (4,5). Meningokokas pernešamas oro-lašeline būdu esant glaudžiam kontaktui tarp individų. Individai tos amžiaus grupės, kurioje aptinkamas didžiausias nešiojimas, laikomi svarbiu *N. meningitidis* pernešėju (angl. *transmitter*). Didesnis *N. meningitidis* nešiojimas tiesiogiai siejamas su didesniu bakterijos pernešimu. Burnaryklėje nešiojamų *N. meningitidis* kamienų charakterizavimas yra būtinas, norint suprasti pernešimo dinamiką žmonių populiacijoje ir invazinės meningokokinės ligos (IML) epidemiologiją. Tiesioginis ryšys tarp nešiojimo ir invazinės ligos nėra išaiškintas. Nėra aišku, kodėl *N. meningitidis* kai kuriuose individuose pereina gleivinės barjerą, patenka į kraują ir sukelia įvairias ligos formas, dažniausiai sepsį ir meningitą. IML yra sunki, gyvybei pavojinga, sisteminė ir greitai besivystanti bakterinė infekcija. Didžiausias sergamumas pastebimas kūdikių iki 1 metų, 1-4 metų vaikų ir >50 metų amžiaus grupėse (6,7). Daugiausia IML atvejų pasaulyje siejama su šešiomis meningokoko serogrupėmis A, B, C, W, Y ir Z, tačiau šių serogrubių paplitimas priklauso nuo žemyno ir geografinio regiono. Pastaruosius du dešimtmečius Lietuvoje IML atvejų skaičius buvo vienas didžiausių tarp Europos Sąjungos šalių ir siekė vidutiniškai 2,24 atvejus/100 000 gyventojų (8). Kaimyninėse Latvijoje, Lenkijoje ir Estijoje atvejų skaičius buvo 0,36-0,6/100 000 gyventojų (9). Dėl Covid-19 pandemijos valdymo apribojimų ir vakcinacijos prieš B serogrupės meningokoką, IML atvejų skaičius Lietuvoje 2020-2021 m. sumažėjo iki 0,42 atvejo/100 000 gyventojų. Pasibaigus apribojimams, 2022 m. IML atvejų skaičius išliko nepakitęs (8).

N. meningitidis yra linkusi įgyti genetinę medžiagą natūralios transformacijos būdu ir rekombinuotis, todėl atsiranda didžiulė genetinė kamienų įvairovė. Invazinių, sukeliančių IML, kamienų genetinė įvairovė yra nedidelė, o nešiojami kamienai pasižymi dideliu genetiniu heterogeniškumu. Invazinių ir nešiojamų meningokoko izoliatų charakterizavimas molekuliniais metodais yra itin svarbus visuomenės sveikatai, nes suteikia informacijos apie *N. meningitidis* kamienų paplitimą, ligos protrūkių progresiją, kamienų jautrumą vakcinoms, invazinį potencialą turinčių kamienų atsiradimą ar naujų serogrubių atsiradimą. Iki 2023 m. Lietuvoje IML

molekulinės stebėsenos nebuvo (10), o epidemiologinė stebėseną daugiausia apsiribojo ligos atvejų konstatavimu.

Meningokoko nešiojimas Lietuvoje iki šiol nebuvo tirtas. Siekiant efektyviai kontroliuoti IML, sudaryti veiksmingas skiepavimo programas, stebėti naujų serogrupių ir potencialiai patogeninių kamienų atsiradimą populiacijoje, svarbu vykdyti meningokoko nešiojimo tyrimus bendroje populiacijoje.

Darbo tikslas: molekuliniiais metodais įvertinti *Neisseria meningitidis* nešiojimą tarp Vilniaus apskrityje gyvenančių studentų ir charakterizuoti nešiojamus meningokoko kamienus.

Darbo uždaviniai:

- 1) Molekuliniiais metodais nustatyti invazinių *N. meningitidis* kamienų, surinktų 2020 – 2022 m., genogrupę ir genotipą.
- 2) Nustatyti *N. meningitidis* nešiojimo paplitimą tarp 18-25 m. amžiaus Vilniaus apskrityje gyvenančių studentų.
- 3) Išskirti nešiojamus *N. meningitidis* kamienus.
- 4) Molekuliniiais metodais nustatyti nešiojamų meningokokų kamienų genogrupę.
- 5) Nustatyti nešiojamų *N. meningitidis* kamienų genotipą.

Justina Silickaitė atliko šiuos darbus tyrime:

- 1) PGR metodu nustatė 17 invazinių *N. meningitidis* izoliatų, surinktų 2020-2022 m., genogrupę, atliko šių kamienų MLST genų padauginimą PGR būdu genų, koduojančių baltymus FetA ir PorA amplifikavimą; paruošė padaugintą DNR sekoskaitai;
- 2) trys šimtai šešiolikoje burnaryklės ėminių nustatė *N. meningitidis* TL-PGR metodu ir išanalizavo gautus rezultatus;
- 3) atliko visų nešiojamų meningokoko izoliatų MLST genų padauginimą PGR būdu;
- 4) atliko genų, koduojančių baltymus FetA ir PorA, padauginimą ir paruošė padaugintą DNR sekoskaitai.

Raktažodžiai: *Neisseria meningitidis*, meningokoko nešiojimas, invazinė meningokokinė liga, serogrupė, genogrupė, sekos tipas (ST), klono kompleksas (cc), dauginis lokusų sekų tipavimas (MLST), genas *ctrA*, genas *porA*, genas *fetA*.

1 LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 *Neisseria meningitidis*

Neisseria meningitidis, arba meningokokas, yra aerobinis gramneigiamas diplokokas, priklausantis *Neisseriaceae* šeimai, β proteobakterijų tipui. Šią bakteriją, forma primenančią inkstą arba kavos pupelę, savo burnaryklėje nešioja 10-40% populiacijos, priklausomai nuo amžiaus (11). Daliai žmonių dėl ne visai aiškių priežasčių *N. meningitidis*, perėjusi gleivinę ir patekusi kraują, gali sukelti invazinę meningokokinę ligą. IML yra ūmi, sunki, gyvybei pavojinga liga, kurios dažniausia klinikinė išraiška yra meningitas arba sepsis. Žmogus yra vienintelis natūralus *N. meningitidis* šeimininkas (angl. *host*). Išorinėje aplinkoje ant paviršių meningokokas gali išgyventi vos keletą minučių. Dažniausi šios bakterijos platinimo keliai yra aerozolis arba sergančių žmonių/nešiotųjų kvėpavimo takų sekretas, perduotas tiesioginio kontakto metu (12,13).

N. meningitidis gali turėti kapsulę arba būti be kapsulės. Pagal kapsulės polisacharidų sudėtį *N. meningitidis* yra skirstoma į 12 serogrupių, iš kurių šešios grupės (A, B, C, W, Y, X) sukelia daugiau nei 90% IML atvejų pasaulyje. Kapsulė yra virulentiškumo veiksnys ir pagrindinis gleivinės bei humoralinio imuniteto taikiny, suteikiantis meningokokams atsparumą prieš antikūnus ir komplemento sistemą (2). Ši bakterija turi daug kitų mechanizmų, kurių pagalba realizuojama sąveika su šeimininko ląstelėmis ir užtikrinama kolonizacija. *N. meningitidis* pasižymi išskirtiniu genetiniu variabilumu dėl natūralios kompetencijos: bakterija keičiasi genetinė medžiaga su kitomis bakterijomis esančiomis jos aplinkoje ir tarpusavyje. Ši savybė leidžia bakterijai sukurti genetinę įvairovę ir išvengti imuninės sistemos atsako (žr. sk. 1.2).

1.2 *N. meningitidis* virulentiškumo ir prisitaikymo mechanizmai

Nors meningokokai dažniausiai kolonizuoja viršutinius kvėpavimo takus, tačiau kai kuriems asmenims *N. meningitidis* gali sukelti gyvybei pavojingą infekciją, galinčią sąlygoti meningitą ar sepsį. Ši bakterija yra apribota vienintelės biologinės nišos – žmogaus burnaryklės, kurią gali kolonizuoti, dėl to jai būdingi įvairūs apsaugos bei išlikimo mechanizmai, leidžiantys prisikabinti prie šeimininko gleivinių paviršiaus, panaudoti prieinamas mitybines medžiagas bei išvengti imuninės sistemos atakų.

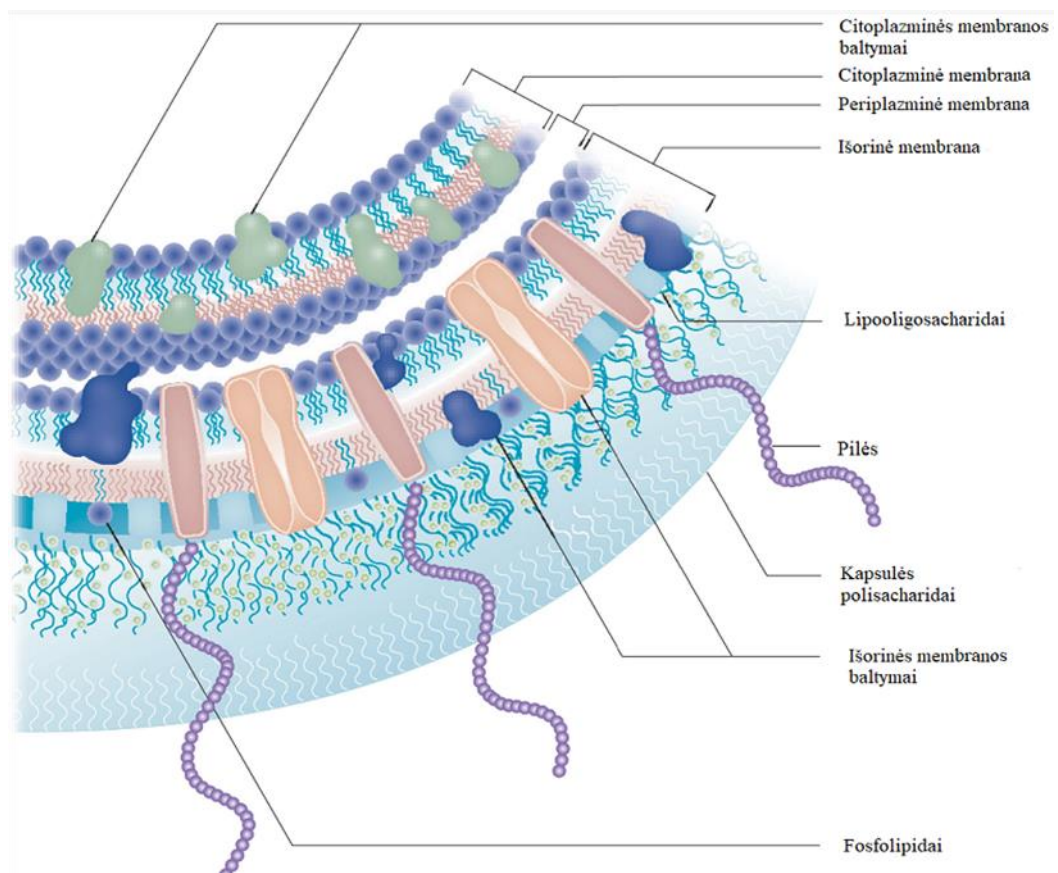
Šeimininko imuninio atsako *N. meningitidis* išvengia, moduluojant savo kapsulės paviršių šiais mechanizmais:

1) Natūralios kompetencijos būdu geba pasiimti DNR, esančią aplinkoje, tokiu būdu sukuriant genetinę įvairovę – genų alelinius variantus. Pavyzdžiui, dėl horizontalios genų pernašos

N. meningitidis kamienai gali pasikeisti genais, esančiais kapsulės biosintezės operone: įvyksta kapsulės perjungimas (angl. *capsule switching*). Natūraliai atsiradę ar vakcinos indukuoti prieškapsuliniai antikūnai taps neefektyvūs.

2) Fazių pokyčio (angl. *phase variation*) mechanizmo pagalba bakterija keičia išorinių baltymų arba paviršiaus polisacharidų raišką, tokiu būdu bakterijai padedama išgyventi jai priešiškoje aplinkoje arba išvengti žmogaus imuninės sistemos poveikio.

Pagrindinės struktūros, saugančios *N. meningitidis* ląstelės paviršių nuo šeimininko įgimto ir įgyto imuniteto, yra ne tik polisacharidinės kapsulės arba/ir lipopolisacharidai (angl. *lipopolysaccharide*, LPS), bet ir išorinės membranos adhezijos molekulės (pav. 1.1).

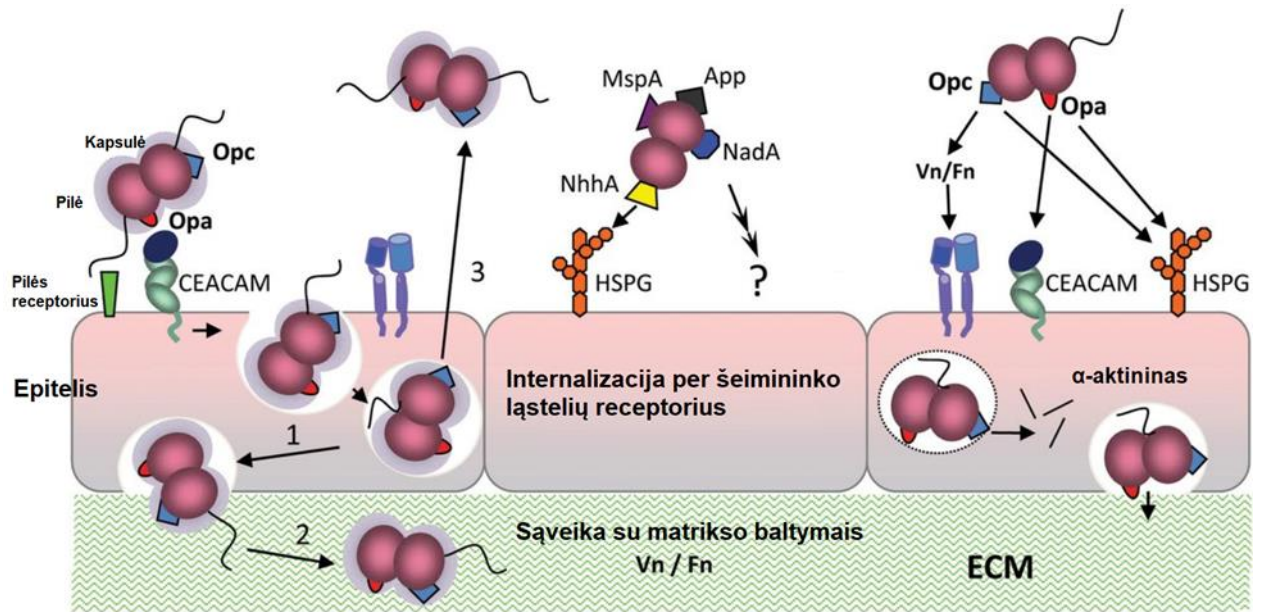


1.1 pav. *N. meningitidis* ląstelės membranos komponentai. Adaptuota pagal (14).

Meningokokų adhezijos molekulės, įgalinančios juos lokalizuotis ant specifinių šeimininko ląstelių, yra skirstomos į didžiųjų ir mažųjų grupes. Didžiųjų adhezijos molekulių grupei priskiriami išorinės membranos elementai – pilės ir Opa, Opc baltymai, o mažųjų grupei - NadA (angl. *Neisserial adhesin A*), NhhA (angl. *Neisseria hia homologue A*), App (angl. *Adhesion and penetration protein*), MspA (angl. *Meningococcal serine protease A*), HrpA (angl. *Haemagglutinin/haemolysin related protein*) ir NHBA (angl. *Neisserial Heparin Binding Antigen*).

Visos šios struktūros palengvina adheziją su eukariotų ląstelėmis, o kai kurios iš jų dalyvauja sąveikoje su endotelio ląstelėmis.

Pilės yra plaukelius primenančios struktūros, kurios padidina kapsulinių *N. meningitidis* kamienų adheziją. Jos gali pailgėti iki kelių tūkstančių nanometrų nuo kapsulės paviršiaus, taip paskatindamos prisijungimą prie gleivinės epitelio ląstelių bei susitraukinédamos palengvinti perėjimą per epitelinį gleivinės sluoksnį ir kolonijų formavimą (15). *N. meningitidis* sintetina dviejų tipų išorinės membranos baltymus - Opa ir Opc. Didžioji dalis Opa ir Opc baltymų atpažįsta vieną ar daugiau narių iš karcinoembrioninių su antigenais susijusių adhezijos ląstelių molekulių (angl. *carcinoembryonic antigen-related cell-adhesion molecule*, CEACAM) šeimos ir heparano sulfato proteoglikanų (angl. *heparan sulfate proteoglycans*, HSPG). Opa baltymai gali prisijungti prie CEACAM ir HSPG, o Opc baltymai gali sąveikauti su heparano sulfato proteoglikanais suformuodami trimolekulinį kompleksą su glikoproteinais - vitronektinu, fibronektinu ir atitinkamais jų integrinų receptoriais, taip pagerinant prikibimą prie žmogaus endotelio ląstelių (1.2 pav. 1) (16). Vykstant uždegiminiam procesui, padidėja CEACAM receptorių kiekis ant epitelio ir neutrofilų ląstelių, ir taip sustiprinama bakterinė sąveika, kuri nulemia padidėjusią meningokokų virulentinių formų ląstelinę invaziją ir šeimininko organizmo imlumą (17). Meningokokus galima aptikti ir sveikų individų subepiteliniame gleivinės sluoksnyje (1.2 pav. 2). Tikėtina, kad *N. meningitidis* taip pat gali sąveikauti su tarpląsteliniiais baltymais (pvz.: α -aktininu). Tai palengvina meningokokų patekimą į ląstelių vidų, tarpląstelinius tarpus. Greičiausiai egzistuoja ir kitas perėjimo per epitelį – prasiskverbimo į kraujotaką kelias, kuomet uždegimą išprovokuoja ankstesnė virusinė infekcija. Net patekę į epitelinių ląstelių vidų, meningokokai per HSPG ir integrinus geba migruoti atgal į jų apikalinį paviršių bei būti perduodami kitam šeimininkui (1.2 pav. 3).



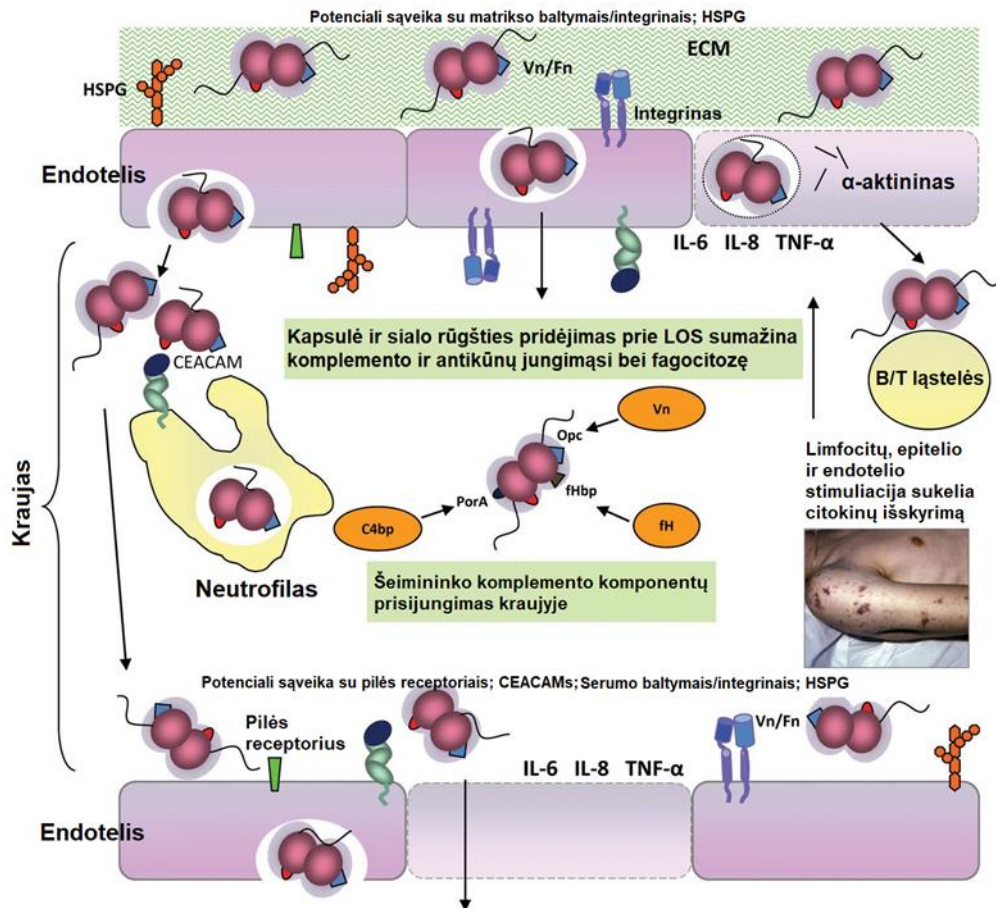
1.2 pav. *N. meningitidis* galimų sąveikų su burnaryklės epitelio barjeru schema. Adaptuota pagal (18).

Yra manoma, kad mažosios adhezijos molekulės dalyvauja burnaryklės kolonizacijoje ir invazijoje. Keli adheziniai taip pat gali veikti vienu metu, kad padidintų bakterijų prisijungimo prie ląstelės paviršiaus avidiškumą. Tai dažnai yra internalizacijos į epitelio ląsteles įžanga, o tai yra dar viena imuninės sistemos vengimo strategija (19).

N. meningitidis taip pat geba gaminti ir sekretuoti paviršiaus baltymus, kurie padeda prisikabinti prie žmogaus organizmo molekulių. Meningokokų surišantys baltymai žmogaus organizme jungiasi prie receptorių: HmbR (hemoglobino), TbpA ir TbpB (transferino), HbpA ir HbpB (laktoferino), HpnA ir HpnB (hemoglobino-haptoglobino komplekso) ir galimų sideroforo homologų. Tokie baltymų kompleksai padeda meningokokams kolonizacijos ir ligos stadijose gauti gyvybiškai svarbią augimui medžiagą – geležį.

Tarp svarbiausių *N. meningitidis* virulentiškumo veiksnių patenka ir išorinės membranos endotoksinas – lipooligosacharidas (angl. *lipooligosaccharide*, LOS), kuris paskatina uždegimo vystymąsi meningito arba meningokokinio sepsio metu, dalyvauja įgimto imuniteto inaktyvacijoje. Sergamumas ir mirtingumas nuo meningokokinio sepsio yra tiesiogiai susijęs su kraujyje cirkuliuojančiu meningokokų LOS kiekiu (20). Branduolio veiksniai kappas B (angl. *Nuclear factor- κ B*) yra suaktyvinami meningokokų endotoksiniui ekstraląstelinio būdu prisijungus prie Toll-like receptoriaus 4 (angl. *Toll-like receptor 4*) ir jo koreceptoriaus mieloidinio diferenciacijos baltymo 2 (angl. *myeloid differentiation protein 2*). Šios sąveikos pasekoje sukeliama uždegiminių citokininų (tokių kaip IL-6 bei TNF- α), inicijuojančių įgimtą imuninį atsaką, sekrecija iš dendritinių ląstelių (1.3 pav.). Nekontroliuojama citokininų gamyba gali išprovokuoti

endotelio pažeidimus bei kapiliarų pralaidumą (14). Nustatyta, kad sialo rūgšties pridėjimas prie LOS gali nulemti dendritinių ląstelių fagocitozės inhibiciją, o papildoma LOS α grandinės ekspresija suteikia galimybę spartesnei epitelio ląstelių invazijai (21). Tai gali nulemti tolimesnį ląstelių barjero pažeidimą ir pralaidumą, išprovokuojantį meningokokinio sepsio klinikinius simptomus (pvz.: petechinį bėrimą).



1.3 pav. *N. meningitidis* perėjimo į kraujotaką keliai ir apsaugos nuo šeimininko imuninės sistemos mechanizmai. Adaptuota pagal (18).

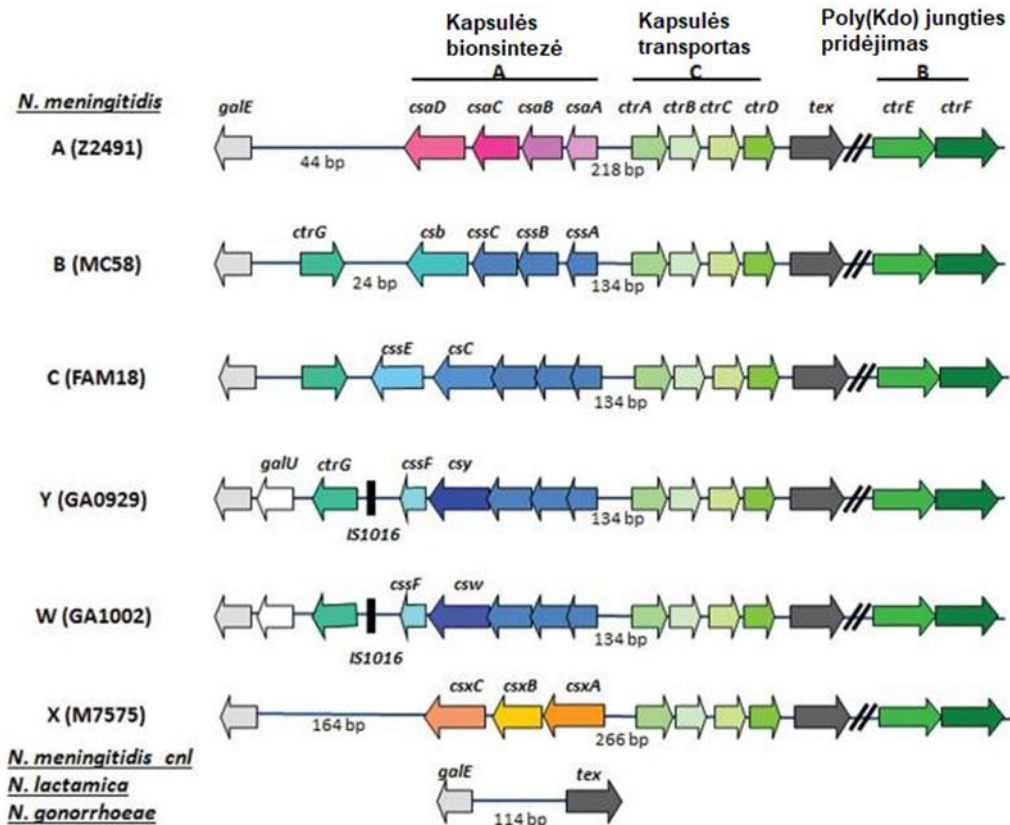
Kapiliarai, esantys šalia burnaryklės gleivinės epitelinio audinio, yra galima *N. meningitidis* patekimo į kraują vieta. *In vivo*, meningokokai pereina per bazolateralinį endotelinių ląstelių paviršių, kad patektų į kraujagysles, o integrinai ir HSPG, sintetiniai endotelinių ląstelių bazolateraliniame paviršiuje, dėl to tampa galimais taikiniais. Meningokokai taip pat pasižymi gebėjimu prisijungti neigiamus komplemento reguliatorius, tokius kaip C4b prijungiantį baltymą (angl. *C4b-binding protein*), faktorių H ir vitronektiną (1.3 pav.). Tai *in vivo* nulemia sumažintą komplemento skatinamą bakterijų žudymą (22). Patekę į kraują jame gali išgyventi tik kapsuliuoti meningokokai, nes kapsulė ir sialo rūgšties pridėjimas prie LOS saugo nuo

opsonizacinės/neopsonizacinės fagocitozės bei slopina komplemento ir antikūnų prisijungimą (22,23).

Nustatyta, kad tose srityse, kuriose neintensyvi kraujo tėkmė ir reikalingas mažesnis pasipriešinimas dėl šlyties jėgų, meningokokai prilimpa prie smegenų kraujagyslių sienelių (24). Be to, dėl lipidų mikrodomenų, susidariusių po meningokokų citoskeleto persitvarkymų, gali būti padidinamas atsparumas šlyties jėgoms (25). Iki galo nėra išsiaiškinta, ar *N. meningitidis* pereiti per hematoencefalinį barjerą reikalingas šio barjero pažeidimas, ar bakterijos tiesiog geba migruoti per nepažeistą barjerą transcitozės būdu. Perėję šį barjerą meningokokai sąveikauja su kietųjų ir minkštųjų smegenų dangalų ląstelėmis, išprovokuoja uždegiminę reakciją ir dėl šios priežasties išsivysto meningitas.

Dauguma *Neisseria* genties atstovų, pvz.: *N. lactamica*, sintetina tik vieną poriną, o meningokokai gamina du: PorA ir PorB. Jie per membraną selektyviai praleidžia mažamolekulines medžiagas, katijonus ir anijonus. Porinai gali veikti kaip adjuvantai per Toll-like receptorių 2, sustiprinant B ląstelių stimuliaciją. PorB yra pagrindinis išorinės membranos porinas, skatinantis Ca^{2+} jonų patekimą į bakteriją bei aktyvuojantis ląstelės apoptozę, o PorA yra pagrindinis baktericidinių antikūnų taikinytis bei išorinės membranos vezikulėmis (angl. *outer membrane vesicle*, OMV) paremtų vakcinų komponentas (26,27). FetA yra išorinės membranos baltymas, kuris sintetinamas priklausomai nuo geležies poreikio ir veikia kaip enterobaktino receptorių. Esant geležies trūkumui, *N. meningitidis* sintetina enterobaktiną, kuris dideliu afiniškumu jungiasi prie geležies jonų bei panaudoja juos metabolizmo keliuose.

Kapsulės komponentus koduojantys genai yra organizuoti į sudėtingą operoną (*cps*), kuris sudarytas iš A, B ir C sričių (1.4 pav.). A srityje koduojami fermentų, atsakingų už polisacharidų sintezę, genai, būdingi kiekvienai serogrupei. B srityje yra genai, kurie dalyvauja kapsulės lipidų modifikacijoje. C srityje koduojami kapsulės transporto genai *ctrA-D* (1.4 pav.). Šie genai dažniausiai aptinkami invazinių kapsuliuotų *N. meningitidis* kamienuose, nepriklausomai nuo serogrupės ir sudaro ABC transporterį (angl. *ATP-binding cassette*), kuris perkelia kapsulines polisacharidų grandines iš citoplazmos į meningokokų paviršių (28). Kapsulės neturintis meningokokų fenotipas vadinamas *capsule null locus* (cnl). Tokie kamienai neturi viso *cps* operono (1.4 pav. žymėta cnl), o genai *tex* ir *galE* yra vienas šalia kito.



1.4 pav. Genetinė *N. meningitidis* serogrūpių A, B, C, Y, W ir X kapsulės lokusų organizacija. Adaptuota pagal (29).

1.2.1 Invazinė meningokokinė liga, jos diagnozavimas ir gydymas

Invazinė meningokokinė liga yra ūmi sisteminė bakterinė infekcija, dažniausiai progresuojanti į tris sindromus: meningitą, meningitą kartu su meningokokemija, dar vadinamą meningokokiniu sepsiu, arba meningokokemiją be klinikinių meningito požymių. *N. meningitidis* patekus į burnaryklę arba nosiaryklę bei prisikabinus prie gleivinės ir greitai dauginantis, inkubacinis periodas gali varijuoti nuo 1 iki 14 dienų, tačiau dažniausiai trunka 2 dienas (30). Tačiau tik 10–20% atvejų šis patogenas geba patekti į kraujotaką ir sukelti meningokokemiją. Patys pirmieji ligos pasireiškimo požymiai būna nespecifiniai ir būdingi daugeliui virusinių infekcijų: karščiavimas, pykinimas/vėmimas, nosies ar gerklės gleivinės uždegimas, galvos skausmas, mialgijos bei koncentracijos sutrikimai. Pirmasis klasikinis IML požymis - bėrimas, galintis per keletą valandų progresuoti iš eritemos iki petechinio/purpurinio hemoraginio bėrimo, kuris dažniausiai aptinkamas liemens ar apatinių galūnių srityje. Jis pasireiškia 15–25% pacientų (31). Invazinė meningokokinė liga turi platų klinikinių požymių spektrą, tačiau nuo pirmųjų

nespecifinių simptomų pasireiškimo galima žaibiška (tunkanti vos keletą valandų) ligos progresija iki mirties.

Viena iš dažniausių IML manifestacijų yra meningitas: *N. meningitidis* iš kraujo, pereina per hematoencefalinį barjerą ir patenka į subarachnoidinį tarpą. Jam būdingas galvos smegenų dangalų uždegimas. Nors patologijos mechanizmą sudaro daugelis veiksnių, tačiau vienas svarbiausių yra gramneigiamų organizmų sienelėse esantis lipopolisacharidas, kuris suaktyvina smegenų mikrogliją, sukeldamas uždegiminių pokyčių kaskadą. Tai nulemia žievės mikrokraujagyslių pralaidumą ir difuzinę smegenų edemą bei padidėjusį intrakranijinį spaudimą. Dėl to pacientai jaučia galvos skausmą ir atsiranda karščiavimas, sprando raumenų rigidiškumas, kiek vėliau psichinės būklės pakitimai, priepuoliai ar židininiai neurologiniai sutrikimai. Kūdikių populiacijai būdinga greitesnė ligos progresija, pasireiškia sudirgimas, letargija, pastebimas momenėlio išsipūtimas (32). Nustatyta, kad apie 90% vaikų ir paauglių mirusių nuo IML, mirtis įvyksta per 24 val. po IML diagnozės patvirtinimo (33).

Meningokokemija gali turėti tipinę arba žaibinę eigą. Išsivysčiusiose šalyse meningokokinės septicemijos mirtingumas gali siekti net 25%, lyginant su 1% meningito mirtingumu (34). Meningokokinio sepsio patogenezės pagrindą apima infekcinis toksinis šokas, nulemtas spartaus *N. meningitidis* dauginimosi kraujyje, jų irimo produktų bei toksinų išskyrimo į kraują. Tai išprovokuoja stiprų uždegiminį atsaką kraujagyslėse, padidėjusį kraujagyslių pralaidumą, patologinę kraujagyslių vazokonstrikciją ir vazodilataciją, o galiausiai gali išsivystyti šokas, bei dauginis organų nepakankamumas. Dėl kraujagyslių pažeidimo masto, kraujotakos kolapso ir diseminuotos intravazalinės koaguliacijos (angl. *disseminated intravascular coagulation*, DIC) gali išsivystyti žaibinė purpura (angl. *purpura fulminans*), progresuojanti iki nekrozės, galinčios tapti gangrenine ir išplisti į poodžio audinius, apimti raumenis ar net kaulus. Dėl to gali prireikti galūnių amputacijos.

Itin sunkiu atveju, žaibinė meningokokemija pasižymi ūmia pradžia, kai ligonių būklė sparčiai blogėja – pakyla temperatūra, po kelių valandų atsiranda hemoraginiai bėrimai. Būklė greitai progresuoja, yra sutrikdomos kvėpavimo ir kraujotakos sistemos, vystosi šokas, atsiranda cianozė. Dėl meningokokemijos sukulto antinksčių nepakankamumo išsivysto Waterhouse-Friderichseno sindromas, išprovokuojantis hipotenziją ir dauginį organų nepakankamumą bei mirtį.

Klinikiniai gydytojai gana retai susiduria su šia liga sergančiais ir klasikiniai/specificiniai IML požymiai, tokie kaip: hemoraginis bėrimas, meningizmas bei sąmonės sutrikimas – pasireiškia tik vėlyvoje ligos stadijoje. Tai apsunkina ankstyvo diagnozavimo ir tikslnio

antibiotikų skyrimo galimybes. Tačiau ankstyvas IML atpažinimas ir agresyvus antibiotikų skyrimo planas gali sumažinti mirtingumą iki 10-14%.

Įvairių šalių gydymo gairėse nurodoma, kad atpažinus septicemijos, meningito simptomus ar petechinį/purpuros bėrimą ir paėmus tyrimams nugaros smegenų skysčio (angl. *cerebrospinal fluid*, CSF) arba atidėjus juosmeninės punkcijos tyrimą, reikalinga kuo greičiau pradėti intraveninį empirinį gydymą trečios kartos cefalosporiniais (ceftriaksonu po 2 g kas 12 valandų, cefotaksimu po 2 g kas 6 valandas). Kai *N. meningitidis* buvo identifikuotas, kaip IML sukėlėjas, paskiriama konkreti gydymo strategija: ceftriaksonas – 2 g kas 12 val. arba penicilinas G 4×10^6 U. I. kas 4 val. Vartojant penicilinus, būtinas tolesnis gydymas ceftriaksonu, ciprofloksacinu arba rifampicinu, kad būtų sustabdytas bakterijos nešiojimas burnaryklėje (35). Rekomenduojama gydymo trukmė 5-7 dienos. Pacientams, sergantiems IML, antibiotikų terapija efektyviai sumažina cirkuliuojančių endotoksinų kiekį plazmoje. Nustatyta, kad padidėjęs endotoksinų kiekis susijęs su ligos sunkumu, įskaitant septinį šoką, daugelio organų nepakankamumą ir pacientų, sergančių IML, mirtimi (36).

Prieš pat antibiotikų skyrimą arba su pirmąja antibiotikų doze rekomenduojama skirti gliukokortikoidus (deksametazoną) po 0,15 mg/kg kas 6 valandas. Nors sergant bakteriniu meningitu antibiotikų ir gliukokortikoidų kombinuotas skyrimas reikšmingai sumažina mirtingumą bei neurologines komplikacijas (33), tačiau *N. meningitidis* sukeltos IML atveju kliniškai reikšmingų rezultatų nenustatyta (37,38).

Sergantiesiems IML yra būtina izoliacija nuo artimo kontakto su kitais asmenimis. Didžiausia rizika kyla palaikant artimą kontaktą su infekuotu asmeniu ilgiau nei 8 val. per mažiau nei 2 metrų atstumą (pvz.: bendrabučiuose ar kareivinėse) bei tiesiogiai kontaktuojant (pvz.: bučiuojantis) su sergančiuoju. Esant užsikrėtimo rizikai, gali būti skiriami antibiotikai chemoprofilaktikai: vienkartinė dozė - ceftriaksonas 250 mg (intraveniniu būdu) arba ciprofloksacinas 500 mg (peroraliai); dvi dienas, du kartus rifampicinas 600 mg (intraveniniu arba peroraliniu būdu).

Nors IML gali būti išgydyta antibiotikų terapijos pagalba, tačiau mirtingumas vis dar išlieka gana aukštas (apie 5-15%) (39,40) ir ši liga turi didžiulį neigiamą poveikį su sveikata susijusiai gyvenimo kokybei (angl. *Health-related quality of life*, HRQoL). Nustatyta, jog kūdikių ir vaikų populiacijose IML neigiami padariniai pasireiškia dažniau nei paauglių ir suaugusiųjų (40). Bent vienos didelės arba nedidelės ilgalaikės pasekmės rizika yra apie 20%, o mažiau išsivysčiusiose šalyse IML išlieka 4 pagal dažnumą negalios priežastimi (41). Ilgalaikės šios ligos pasekmės apima: kurtumą, nervų sistemos problemas (traukuliai, regėjimo, kalbos ir atminties sutrikimai), smegenų pažeidimus ir randus arba galūnių amputacijas po sepsio.

1.2.1 IML epidemiologinė situacija pasaulyje

IML epidemiologinė situacija pasaulyje yra gana dinamiška, su skirtingu geografiniu pasiskirstymu ir skirtingu *N. meningitidis* serogrupių paplitimu bei naujų kamienų variantų atsiradimu. Nors IML serga įvairaus amžiaus asmenys, didžiausias sergamumas stebimas mažų vaikų grupėje (iki 5 metų amžiaus), antrasis ligos pikas fiksuojamas tarp paauglių ir jaunų suaugusiųjų (18–25 metų amžiaus) (11). Sergamumas taip pat didelis tarp vyresnio amžiaus žmonių (≥ 65 metų) – tai amžiaus grupė, kurioje yra didžiausias mirties atvejų skaičius (angl. *case fatality rate*, CFR). Tyrimo, atlikto 2012 metais, duomenimis skaičiuojama, kad, neskaitant epidemijų, kasmet galėtų būti užfiksuojama maždaug 1,2 milijono bakterinio meningito atvejų, iš kurių 135 000 yra mirtini, atitinkamai ~ 500 tūkst. ir ~ 50 tūkst. iš jų sukelia meningokokai (42).

Pasaulinės sveikatos organizacijos (PSO) duomenimis, yra sudėtinga apskaičiuoti tikslų globalinį IML mastą. Ši problema išsivystė dėl netinkamai atliekamos arba išvis neatliekamos stebėsenos daugelyje pasaulio šalių. Tačiau IML dažnai laikoma endemine liga visame pasaulyje, nors epidemijos dažniausiai pasireiškia „meningito diržu“ (angl. *meningitis belt*) vadinamoje teritorijoje, apimančioje 26 šalis, esančias Afrikoje į pietus nuo Sacharos. Apskaičiuota, kad didelės epidemijos šiame regione kyla kas 5–12 metų, o sergamumas gali siekti iki 1 000 atv./100 000 asmenų (43). Nustatyta, kad serogrupė A yra dominuojanti bei atsakinga už maždaug 90% visų atvejų šioje teritorijoje, o prie epidemijų ir endeminių atvejų pasireiškimo daugiausiai prisidėjo hipervirulentiniai kamienai, priklausantys ST-5 klonų kompleksui (cc5) (44). Paskutiniąją plataus masto *N. meningitidis* A serogrupės sukelta epidemija įvyko 2009 metais, kuomet buvo nustatyta 80 tūkst. ligos atvejų (45,46), tačiau 2010 m. pradėjus skiepavimo monovalente su stabligės toksoidu konjuguota A serogrupės meningokoko vakcina (MenAfriVac) programą, 2010-2015 m. 9 šalyse buvo užfiksuotas 99% serogrupės A sukeltų atvejų sumažėjimas ir 2016-2017 m. serogrupė A sudarė tik 0,8% iš patvirtintų atvejų (47,48). PSO duomenimis nuo 2022 m. lapkričio 1 d. iki 2023 m. sausio 27 d. Zinder regione, į pietryčius nuo Nigerio, iš viso buvo pranešta apie 559 meningito atvejus, įskaitant 18 mirčių (bendras CFR 3,2 %) Daugumą laboratoriskai patvirtintų atvejų sukėlė C serogrupės kamienai. „Meningito diržu“ vadinamoje teritorijoje sezoniniai protrūkiai kartojasi kasmet, tačiau šiuo vykstantis protrūkis rodo ir padidėjusį atvejų skaičių, ir didesnę augimo tempą, palyginti su ankstesniais sezonais.

Sergamumas IML pasauliniu mastu kinta priklausomai nuo vietovės bei dominuojančios serogrupės. Šiuo metu Europoje, Šiaurės Amerikoje ir Australijoje sergamumas svyruoja nuo 0,3 iki 3 atvejų 100 000 gyventojų. Duomenų iš Lotynų Amerikos ir Azijos yra nedaug, tačiau žinoma, jog ten dominuoja B ir C serogrupės (49). Australijos meningokokinės infekcijos stebėjimo

programos 2020 m. metinės ataskaitos duomenimis šalyje dominuoja B, W ir Y serogrupės (50). 2019 m. JAV Ligų kontrolės ir prevencijos centro (CDC) duomenimis JAV buvo užfiksuota 400 IML atvejų, iš kurių didžiausią dalį, t.y. 0,3 atv./100 000 gyventojų sudarė B ir Y serogrupės (50). Meningitas pasireiškė 43,5% atvejų, o sepsis ir sepsis su pneumonija po lygiai - 19,4%. Tuo tarpu Europos ligų prevencijos ir kontrolės centro (ECDC) duomenimis, 2019 m. ES/EEE šalyse buvo užfiksuoti 2968 IML atvejai, iš kurių 59,2% sudarė B serogrupė, W – 19%, C – 12,5%, Y – 12,2%. Didžiausią sergančiųjų dalį sudarė vyresni nei 65 m. amžiaus žmonės bei 15-24 m. amžiaus jaunuoliai. Sepsis pasireiškė 21,9%, meningitas 17,3%, o meningitas ir sepsis 10,6% atvejų (9).

1.3 *N. meningitidis* kamienų charakterizavimas

Meningokokų kamienų charakterizavimui šiandien naudojami molekuliniai metodai, paremti DNR amplifikacija ir sekoskaita. Šie metodai pasižymi didele skiriamąja geba, atkartojamumu, suderinamumu tarp laboratorijų. *N. meningitidis* charakterizavimui rekomenduojami šie taikiniai (51):

1) Kapsulė. *N. meningitidis* polisacharidinė kapsulė, kuri apibrėžia meningokoko serogrupę, yra svarbus virulentiškumo veiksnys, ir jos nustatymas reikalingas tikslesniam prevencinių priemonių taikymui. Invaziniai izoliatai tradiciškai serotipuojami imunologiniu agliutinacijos metodu: naudojami komerciniai polikloniniai antikūnai prieš atitinkamos serogrupės kamienus (52). Kituose serogrupės nustatymo metoduose naudojami kapsulei specifiniai monokloniniai antikūnai, pritaikyti blotingo, ELISA, tėkmės citometrijos platformose (53). Šie metodai reikalauja gyvybingų meningokoko izoliatų, kuriuos galima kultivuoti, tačiau gauti izoliatų iš sergančiojo IML ėminių nėra paprasta. Be to, metodai ir reagentai nėra standartizuoti tarp laboratorijų. Dėl šių priežasčių vis plačiau naudojami DNR pagrįsti kapsulės genotipavimo metodai: tradicinis polimerazės grandininės reakcijos (PGR) (54) ir tikro laiko PGR (TL-PGR) (55).

2) Antigenai FetA ir PorA. Kamienų charakterizavimui, siekiant gauti kuo tikslesnę informaciją apie IML protrūkį, nustatoma variabilios antigenus koduojančių genų *fetA* ir *porA* sritys.

3) Septyni dauginio sekos tipavimo lokusai (angl. *MultiLocus Sequence Typing*, MLST) kamienų sekos tipo ir klono komplekso nustatymui. MLST tipavimas naudojamas nustatyti meningokoko kamieno sekos tipą ir klono kompleksą. MLST paremtas septynių bakterijos gyvybingumui būtinų genų (angl. *housekeeping genes*) nukleotidų sekų nustatymu (1.1 lentelė) (56). Genai gali būti amplifikuojami PGR būdu ir jų nukleotidų sekos nustatomos Sangerio

sekoskaita arba sekos nustatomos iš viso bakterijos genomo sekoskaitos (angl. *whole genome sequencing*, WGS).

1.1 lentelė. MLST tipavimui naudojami *N. meningitidis* genai

| Būtinai genai (angl. <i>Housekeeping genes</i>) | Geno lokusas |
|--|---------------------|
| <i>Putative ABC transporter</i> | <i>abcZ</i> |
| <i>Adenylate kinase</i> | <i>adk</i> |
| <i>Shikimate dehydrogenase</i> | <i>aroE</i> |
| <i>Fumurate dehydrogenase</i> | <i>fumC</i> |
| <i>Glucose-6-phosphate dehydrogenase</i> | <i>gdh</i> |
| <i>Pyruvate dehydrogenase subunit</i> | <i>pdhC</i> |
| <i>Phosphoglucomutase</i> | <i>pgm</i> |

Genų nukleotidų sekos arba visas bakterijos genomas pateikiamas į atviros prieigos duomenų bazę PubMLST *Neisseria* (<https://pubmlst.org/organisms/neisseria-spp>) ir bioinformatiniais įrankiais, kurie integruoti į duomenų bazę, geno sekos variantui suteikiamas alelinis numeris (angl. *allele number*). Visų MLST schemeje analizuojamų genų sekų aleliniai variantai sudaro *N. meningitidis* kamieno alelinį profilį (angl. *allelic profile*), kuriam priskiriamas sekos tipas (angl. *sequence type*, ST). Sekos tipai gali būti jungiami į dar didesnius vienetus, vadinamus klono kompleksais (angl. *clonal complex*, cc). Informacija apie kamienų genotipą, įskaitant genų sekas, alelinius variantus, sekos tipus yra kaupiama PubMLST *Neisseria* duomenų bazėje. Didelis MLST privalumas yra sekos duomenų atkartojamumas, o izoliatų alelinius profilius galima lengvai palyginti su centrinėje internetinėje duomenų bazėje esančiais profilius (priešingai nei dauguma tipavimo procedūrų, kurios apima DNR fragmentų dydžių palyginimą gelyje). Alelinius profilius taip pat galima nustatyti iš klinikinės medžiagos, PGR amplifikuojant septynis genų lokusus, panaudojant DNR, išskirtą tiesiai iš nugaros smegenų skysčio arba kraujo ėminių. Taigi, izoliatas galima tiksliai apibūdinti net tada, kai jų negalima kultivuoti iš klinikinės medžiagos, tačiau MLST turi ribotas galimybes tolimesniam genetiškai susijusių izoliatų ST atskyrimui.

Pastaruosius keletą metų vis populiarsnė ir labiau prieinama tapo viso genomo sekoskaita. Metodas suteikia informacijos apie bakterijų genomus, panaudojant daug didesnę skiriamąją gebą nei MLST (57,58). Viso genomo MLST (angl. *whole-genome Multi-Locus Sequence Typing*, wgMLST) analizė yra inovatyvesnė, nes leidžia palyginti viso genomo genus, skirtingai nei tradicinis MLST bei leidžia atpažinti genetinius ryšius tarp epidemiologiškai susijusių izoliatų ir

izoliatų, kurie gali turėti tą patį infekcijos šaltinį. WGS metodas yra sąlyginai brangus, reikalaujantis kvalifikuoto personalo ir specifinės įrangos.

Izoliatų jautrumas antibiotikams nustatomas tiriant gyvybingus kultivuojamus meningokokus. Tiriama du chemoprofilaktikai naudojami antibiotikai – rifampicinas ir chinolonai, du klinikiniam gydymui naudojami antibiotikai penicilinas ir ceftriaksonas, įtraukiant ir chloramfenikolį. *N. meningitidis* atsparumas daugeliui antibakterinių medžiagų nėra plačiai paplitęs, tačiau atsparumas sulfonamidų klasės antibiotikams tampa vis dažnesnis (59). Antibiotikų jautrumo nustatymas turi būti atliekamas remiantis tarptautiniu mastu pripažintomis Klinikinių laboratorinių standartų instituto (angl. *The Clinical & Laboratory Standards Institute*, CLSI) gairėmis.

1.4 *N. meningitidis* nešiojimas ir jo nustatymo svarba

N. meningitidis tam tikrą laiką, paprastai besimptomiai, kolonizuoja burnaryklės gleivines iki 35% žmonių kuriuo nors jų gyvenimo laikotarpiu (11). Tokie faktoriai kaip vyriška lytis, žema socialinė-ekonominė padėtis, viršutinių kvėpavimo takų pažeidimai dėl koinfekcijų (pvz.: gripo, mikoplazmos ar kitų virusinių infekcijų), gleivinių pažeidimai dėl džiūvimo bei dulkių, šeimininko organizmo jautrumas (angl. *host susceptibility*) nulemiamas jo amžiaus, imlumo virusinėms infekcijoms, rūkymo ir genetinio polimorfizmo; gali padidinti riziką tapti nešiotu (3,60). Meningokokų nešiojimas priklauso taip pat nuo žmogaus amžiaus. Industrinėse šalyse jis didžiausias 16-25 metų jaunuolių amžiaus grupėje (2). Naujagimiai yra labiausiai pažeidžiami IML, tačiau šioje amžiaus grupėje nešiojimas yra nedidelis (11,61). Kadangi *N. meningitidis* plinta tarp individų artimo kontakto metu oro-lašeline būdu, tyrimų metu nustatyta, jog glaudžiai dirbančiose/gyvenančiose bendruomenėse (armijos šauktiniai, studentai bei moksleiviai) bakterijų perdavimo ir nešiotų dažnis gali išaugti (62,63). Jungtinėje Karalystėje atlikto tyrimo metu taip pat buvo atskleista, kad socialinis elgesys – lankymasis klubuose ir baruose, cigarečių rūkymas (aktyvus ir pasyvus) bei bučiavimasis reikšmingai padidina riziką tapti *N. meningitidis* nešiotu (4).

Dar 1917 m. atlikto tyrimo metu buvo ištirtas meningokoko nešiojimo ir invazinės meningokokinės ligos sąryšis. Nustatyta, kad laikotarpiai, kuomet patalpos perpildytos kareiviais, buvo susiję su padidėjusiu meningokoko nešiojimu, o tai savo ruožtu buvo susiję su padidėjusiu šios ligos paplitimu (64).

Besimptominis meningokoko nešiojimas iššaukia organizmo imuninį atsaką: stebimas gleivinėje aptinkamų IgA klasės antikūnų padidėjimas. Nešiojimas taip pat susijęs su organizmo

humoraliniu atsaku, pasireiškiančiu baktericidinių antikūnų prieš PorA, PorB ir Opa baltymus, taip pat prieš lipopolisacharidus, padidėjimu kraujo serume. Nors organizmo atsakas yra specifinis kamienui, bet stebimas ir tam tikras kryžminis reaktyvumas (angl. *cross-reactivity*) prieš heterologinius kamienus. Manoma, jog dėl meningokoko nešiojimo atsirandantis natūralus imunitetas yra itin svarbus, nes apsaugo organizmą nuo užsikrėtimo invaziniais, IML sukeliančiais, *N. meningitidis* kamienais. Ši žinia ypač svarbi apsaugant tokias jautrias amžiaus grupes kaip naujagimiai, kurių imuninė sistema dar nėra išsivysčiusi, o iš motinos gauti antikūnai greitai prarandami.

Meningokoko nešiojimas burnaryklėje, manoma, yra būtina sąlyga IML atsiradimui, tačiau kaip vyksta perėjimas nuo nešiojimo iki invazinės ligos šiandien nėra visiškai aišku. Manoma, jog didelis *N. meningitidis* nešiojimas populiacijoje skatina meningokoką keistis genetinė medžiaga tarpusavyje ir su kitomis tą pačią nišą kolonizavusiomis bakterijomis (pvz.: *Streptococcus pneumoniae*), ir tuo pačiu skatina naujų potencialiai patogeninių kamienų atsiradimą. Aplinkos veiksniai, bakterijos genetika, žmogaus-šeimininko imunitetas – tai faktoriai, kurie įtakoja nešiojimo procesą ir reikalauja tolesnio tyrinėjimo. Nešiojamų meningokoko kamienų molekulinis charakterizavimas padeda suprasti, kokia yra bakterijos dinamika populiacijoje, kokio genotipo nešiojami kamienai yra potencialiai patogeniniai, t.y. kokia ligos epidemiologija.

Skirtingai nei invaziniai *N. meningitidis* kamienai, apie 50% nešiojamų kamienų neturi kapsulės (5,65,66), todėl jų negalima imunologiniais metodais sugrupuoti į serogrupes ar į genogrupes pasitelkus PGR. Tam yra dvi priežastys: tai gali būti kapsulės lokuso *cps* delecija arba kapsulės lokuso genų raiška yra suspenduota vienu iš daugybės genetinių mechanizmų. Kapsulės praradimas didina bakterijos gebėjimą kolonizuoti burnaryklę ir išvengti žmogaus imuninės sistemos. Vis dėlto kapsulė, matyt, yra reikšminga bakterijos pernešimui, nes ji yra išsaugojama rūšyje.

Pasaulyje IML sukelia ribotas skaičius vadinamųjų hiperinvazyvių meningokoko klonų kompleksų (cc32; cc11; cc41/44), tačiau nešiojami *N. meningitidis* kamienai pasižymi dideliu genetiniu variabilumu, o hiperinvazyvūs kamienai retai būna nešiojami, nes jie dažnai yra prasti kolonizatoriai ir sudaro trumpalaikį kontaktą su šeimininku.

Čekijoje, Norvegijoje ir Graikijoje atliktų tyrimų metu nustatyta, kad cc11, cc32, cc269 yra reikšmingai labiau susijęs su ligos pasireiškimu, kai tuo tarpu cc23, cc5 ir cc41/44 klonų kompleksai yra daug geriau prisitaikę komensalinių santykių palaikymui su šeimininko organizmu (2,67). Kituose geografiniuose rajonuose aptikta cc11 asociacija tiek su liga, tiek su nešiojimu (2). Nešiojimo dažnis gali būti stabilus, bet IML sukeliančių kamienų dažnis gali kisti. Norvegijoje atliktas ilgalaikis tyrimas parodė, jog cc32 nešiojimo dažnis yra apie 5%, bet 1991 m. jis sukėlė

apie 70% IML, o 2003 m. tik 15% (67). Ligos dažnis sumažėjo, bet nešiojimo dažnis išliko toks pats. Ligos dažnio sumažėjimo paaiškinimas galėtų būti toks, jog populiacija įgijo atsparumą šiam kamienui arba pats kamienas laikui bėgant pakito. Kitaip tariant, iš nešiojimo dažnumo negalima numatyti IML epidemiologinių pokyčių ar hipervirulentinių kamienų paplitimo.

Per paskutinius keletą metų buvo atlikta nemažai tęstinių (longitudinių) tyrimų siekiant nustatyti *N. meningitidis* nešiojimo burnaryklėje trukmę. Šie tyrimai parodė, kad *N. meningitidis* nešiojimas ir perdavimas kitiems gali būti chroniškas arba trumpalaikis, trukti nuo 2 iki daugiau nei 9 mėnesių, vykti su pertraukomis (68). Tyrimo, atlikto 1983 m. Belgijoje, metu, apskaičiuota vidutinė nešiojimo trukmė yra 11,7 mėnesiai, tačiau 2016 m. „meningito diržu“ vadinamoje teritorijoje Afrikoje, nustatytas trumpesnis nešiojimo trukmės vidurkis – 3,4 mėnesiai (69,70). Taip pat buvo atskleistas santykis tarp nešiojimo trukmės bei serogrupių: serogrupės B 16,2 mėnesių, serogrupės C 18 mėnesių, serogrupių Y ir W bei poliagliutinuojančių kamienų 10 mėnesių (69). Nustatytas įgijimo dažnis (angl. *acquisition rate*) per mėnesį 2,9% (71).

Tyrimai rodo, jog žmogus nešioja tą patį meningokoko kamieną apie 5-6 mėn., t.y. nusistovi ilgalaikiai bakterijos ir šeimininko santykiai (68,70). Ši savybė priklauso nuo kamienų, pvz.: cc23 yra labai geras kolonistas ir gerai perduodamas kitiems individams. Retai nešiojamas cc11, bet tose šalyse sukeliantis IML, neaptinkamas ilgalaikėse studijose Graikijoje ir Čekijoje (67), o tai galėtų būti paaiškinama, jog šis klono kompleksas puikiai perduodamas, bet negali būti nešiojamas ilgą laiką.

2 TYRIMO MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1 Regentai, įranga, prietaisai

2.1 lentelė. Regentai, jų koncentracijos ir gamintojai

| Regentas | Koncentracija | Gamintojas |
|---|------------------|---|
| Vanduo be nukleazių (Water, nuclease-free) | | Thermo Fisher Scientific (Vilnius, Lietuva) |
| PGR mišinys Phire Green Hot Start II PCR Master Mix | 2x koncentruotas | Thermo Fisher Scientific (Vilnius, Lietuva) |
| TL-PGR mišinys TaqMan™ Fast Advanced Master Mix | | Applied Biosystems (JAV) |
| Žmogaus DNR teigiama kontrolė (TaqMan™ Control Genomic DNA) | | Applied Biosystems (JAV) |
| PGR pradmenys | 100 μM | Metabion (Vokietija) |
| Agarozės milteliai (Agarose (Low-EEO/Multi-Purpose/Molecular Biology Grade)) | | Thermo Fisher Scientific (Vilnius, Lietuva) |
| Etilendiamino tetra acto rūgštis (EDTA) | | Sigma-Aldrich (JAV) |
| Ledinė acto rūgštis | | Sigma-Aldrich (JAV) |
| Tris bazė (Tris(hidroksimetil)aminometanas) | | Sigma-Aldrich (JAV) |
| DNR užnešimo dažas (Orange DNA Loading Dye 6X) #R0631 | 6x koncentruotas | Thermo Fisher Scientific (Vilnius, Lietuva) |
| DNR fragmentų ilgio agarozės gelyje standartai (GeneRuler DNA Ladder Mix) #SM0333 | 5x koncentruotas | Thermo Fisher Scientific (Vilnius, Lietuva) |
| Etanolis | 99,8% | Honeywell (JAV) |

2.2 lentelė. DNR gryninimo rinkiniai

| Rinkinio pavadinimas | Gamintojas |
|---|---|
| DNR fragmentų gryninimo rinkinys (DNA Clean & Concentrator) | Zymo research (JAV) |
| Genominės DNR gryninimo rinkinys (Genomic DNA Purification Kit) | Thermo Fisher Scientific (Vilnius, Lietuva) |

2.3 lentelė. Tirpalai, jų koncentracijos ir paruošimas

| Tirpalas | Koncentracija | Paruošimas |
|--------------------------|----------------------|--|
| TAE buferinis tirpalas | 50x koncentruotas | Į 750 ml distil. H ₂ O pridėti 242 g Tris bazės, 57.1 ml ledinės acto rūgšties, 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0); pripilti distil. H ₂ O iki 1L |
| Agarozės tirpalas geliui | 1,2% | 1,2 g agarozės ištirpinti 100 ml TAE 1x buferinio tirpalo (50x TAE praskiestas distil. H ₂ O iki TAE 1x); tirpinti mikrobangų krosnelėje vis pamaišant, kol tirpalas taps skaidrus. Po 10–15 min atvėsusį tirpalą įpilti į gelio formą (horizontalios elektroforezės sistema Cleaver Scientific, JK). |
| Etidžio bromido tirpalas | 10 mg/ml | |

2.4 lentelė. Naudota įranga, prietaisai

| Pavadinimas | Gamintojas |
|--|------------------------------------|
| Stalinė centrifuga 5424 R | Eppendorf (Vokietija) |
| Srovės šaltinis | Pharmacia Biotech. (JAV) |
| Tikro laiko PGR termocikleris 'Rotor-Gene Q 5plex HRM' | Qiagen (Vokietija) |
| Termocikleris 'SimpliAmp™' | Applied Biosystems (JAV) |
| Spektrofotometras 'NanoDrop 2000' | Thermo Scientific (JAV) |
| Gelių dokumentavimo sistema UV kamera 'MiniBIS Pro' | DNR Bio-Imaging Systems (Izraelis) |
| UV-cabinet for PCR 'UVC/T-M-AR' | Biosan (JAV) |
| DNR horizontalios elektroforezės sistema | Cleaver Scientific |

2.2 Tyrimo metodai

2.2.1 Tyrimo dalyviai

N. meningitidis nešiojimo paplitimo įvertinimui ir nešiojamų kamienų genetiniam charakterizavimui 405 burnaryklės ėminiai buvo surinkti iš Vilniaus apskrityje gyvenančių ir vienoje Vilniaus aukštojoje mokykloje besimokančių 18-25 m. jaunuolių. Savanoriškas sutikimas dalyvauti tyrime buvo gautas iš visų tyrimo dalyvių. Jaunuoliai nebuvo įtraukti į tyrimą, jei buvo anksčiau vakcinuoti bet kokia vakcina prieš meningokoką, naudojo antibiotikus mažiausia 4 savaitės prieš ėminio paėmimą, turėjo viršutinių kvėpavimo takų infekciją ėminio paėmimo metu. Ėminių rinkimas buvo atliktas Vilniaus universiteto Santaros klinikų (VUL SK) medicinos personalo. Mėginių rinkimui ir analizei buvo gautas Vilniaus regioninio biomedicininio tyrimų komiteto leidimas „Meningokokų kamienų, išskirtų iš Vilniaus apskrityje gyvenančių 18-25 m. jaunuolių burnaryklės, genetinės charakteristikos bei nešiojimo dažnumo tyrimas“, Nr. 2021/9-1372-854, 2021-09-21.

2.2.2 Ėminių surinkimas ir *N. meningitidis* kamienų išskyrimas

Paimtas burnaryklės ėminys buvo paimtas paėmėju, turinčiu 1 mL Amies terpės (ESwab, Cpona, Italija). Ėminys saugotas kambario temperatūroje 2 val. laikotarpyje nuo paėmimo ir buvo nugabentas į VUL SK Mikrobiologijos laboratoriją, kurioje apie 50 µL ėminio išsėta ant lėkštelių su Thayer-Martin agarizuota terpe (Oxoid, UK). Lėkštelės inkubuotos 48-72 val. 35°C 5% CO₂. Užaugusios kolonijos persėtos ant šokolado agaro (Oxoid, JK) ir padaugintos. Izoliatų pirminė identifikacija atlikta MALDI-TOF masių spektrometrijos metodu (angl. *Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry*, MALDI-TOF MS) (Bruker, Vokietija). Identifikuoti *N. meningitidis* kamienai padauginti ir biomasė suspenduojama apie 200µL vandens ir inaktyvuota pakaitinant 95°C 10 min. Prieš atliekant tolimesnius tyrimus, burnaryklės ėminiai VUL SK laboratorijoje inaktyvuoti karščiu (60°C, 30 min) ir kartu su *N. meningitidis* izoliatais perduoti VU GMC BTI IS darbuotojams.

2.2.3 Genominės DNR išskyrimas iš burnaryklės ėminių

Iš 500 µl burnaryklės ėminio išgryninta genominė DNR (gDNR), panaudojant rinkinį GeneJET PCR Genomic DNA Purification Kit (protokolas D) pagal gamintojo rekomendacijas. gDNR išskyrė VU GMC IS doktorantė Aistė Sližienė.

2.2.4 DNR koncentracijos nustatymas spektrofotometru

Išgrynintos gDNR koncentracija nustatyta „NanoDrop 2000” spektrofotometru matuojant sugertį (angl. *absorbtion*) esant 260 nm bangos ilgiui. Prietaiso programinė įranga pateikia šiuos parametrus: DNR koncentraciją ng/μL; DNR grynumą: pagal 260 nm (sugeria DNR) ir 280 nm (sugeria baltymai) absorbcijos santykį, kuris turi būti ~ 1,8, o 260/230 (sugeria mažamolekulinės medžiagos) santykis turi būti $\geq 2,0$. Po matavimo mėginiai laikomi -25 °C temperatūroje.

2.2.5 Genų amplifikavimas TL-PGR metodu

Siekiant nustatyti ar asmuo yra *N. meningitidis* nešiotojas, ištirti ėminiai iš nešiotojų burnaryklių. Iš ėminių išskirta gDNR, kaip aprašyta 2.2.3 sk. ir nustatyta jos koncentracija (2.2.4 sk.). TL-PGR metodu nustatomi du genai *ctrA* ir *porA*. Į 1,5 ml Eppendorf tipo mėgintuvėlius „DNA LoBind®“ (Eppendorf) paeiliui išpilstyti 2.6 lentelėje nurodyti TL-PGR komponentai, išskyrus DNR. Panaudoti pradmenys ir zondai, skirti aptikti *ctrA* ir *porA* genus, pateikti 2.5 lentelėje. Vidinė kontrolė yra žmogaus geno, koduojančio ribonukleazę P (*RNAseP*) pradmenys ir zondai (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific). Vidinė kontrolė skirta patikrinti ar ėminio gDNR tinkamai išskirta ir ar nėra PGR inhibicijos (2.5 lentelė). Į atšaldytą stovėlį sudėlioti 0,1 ml mėgintuvėliai (4-strip „Rotor-Gene Q®” (Starlab)), įnešta po 23 μl TL-PGR mišinio. Vienos reakcijos tūris yra 25 μl. Neigiamos kontrolės mėginiai (be DNR) išpilstyti pradžioje, įnešant po 2 μl sterilaus vandens be nukleazių. Reakcijos atliktos „Rotor-Gene Q” (Qiagen) termocikleriu. Kiekvienam mėginiui atlikti du pakartojimai, siekiant padidinti analizės rezultatų tikslumą ir išvengti klaidingai teigiamų rezultatų.

Meningokoko kamienai, turintys *ctrA* ir *porA* genus (teigiamos kontrolės) gauti iš NVSPL izoliatų kolekcijos. *RNAseP* genų teigiamoms kontrolėms panaudoti „TaqMan™ Control Genomic DNA (human)” mėginiai.

2.5 lentelė. Naudoti TL-PGR amplifikacijos pradmenys ir zondai

| Genas | Pradmens/ zondo pavadinimas | Seka (5' → 3') | Zondo modifikacijos | Literatūros šaltinis |
|-------------|-----------------------------------|-----------------------|------------------------|-------------------------|
| <i>ctrA</i> | F753 | TGTGTTCCGCTATACGCCATT | | (72) |
| | R846 | GCCATATTCACACGATATACC | | (72) |

| | | | | |
|---------------------------|--------------------|--|------------------------------------|------|
| | Pb820i | AACCTTGAGCAA'T'CCATTTAT CCTGACGTTCT | 5' FAM, BHQ1 on ,T', 3' SpC6 | (72) |
| <i>porA</i> | NmporA – F860 | TGGGCGGTTTGCAAGATC | | (55) |
| | NmporA - R1055 | CGTTTGGAAAAATCATAATCAA CG | | (55) |
| | NmporA - Pr1009 | TGGTATTTTCGCCTTTTTTACCG CGTT | 5' FAM, BHQ1 on ,T',3' | (55) |
| <i>RNAas</i> <i>eP</i> | RNAsePF | CCAAGTGTGAGGGCTGAAAAG | | (72) |
| | RNAsePR | TGTTGTGGCTGATGAACTATAA AAGG | | (72) |
| | RNAsePPb | CCCCAGTCTCTGTCAGCACTC CCTTC | 5' FAM, 3' BHQ1 | (72) |

FAM – zondo dažo žymė; BHQ1 – slopiklis;

2.6 lentelė. TL–PGR komponentai *ctrA*, *porA* ir *RNAseP* genų nustatymui

| Komponentai <i>ctrA</i> nustatymui | Pradinės koncentracijos | Galutinės koncentracijos | Tūris, µl (1 reakcijai) | Tūris, µl (26 reakcijoms) |
|---------------------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|------------------------------|
| Sterilus vanduo, be nukleazių | - | - | 4,5 | 117 |
| TaqMan® Fast Advanced Master Mix | 2x koncentruota | 1x koncentruota | 12,5 | 325 |
| Tiesioginis pradmuo F753 | 3,75 µM | 0,3 µM | 2 | 52 |
| Atvirkštinis pradmuo R846 | 11,25 µM | 0,9 µM | 2 | 52 |
| Zondas Pb820i | 1,25 µM | 0,1 µM | 2 | 52 |
| Išgryninta genomine DNR | 0,4 – 28 ng | - | 2 | 52 |
| Bendras tūris: | | | 25 | 650 |

| Komponentai <i>porA</i> nustatymui | Pradinės koncentracijos | Galutinės koncentracijos | Tūris, µl (1 reakcijai) | Tūris, µl (26 reakcijoms) |
|---|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| Sterilus vanduo, be nukleazių | - | - | 4,5 | 117 |
| TaqMan® Fast Advanced Master Mix | 2x koncentruota | 1x koncentruota | 12,5 | 325 |
| Tiesioginis pradmuo F928 | 5 µM | 0,3 µM | 2 | 52 |
| Atvirkštinis pradmuo R1055 | 5 µM | 0,9 µM | 2 | 52 |
| Zondas Pb1009 | 2,5 µM | 0,1 µM | 2 | 52 |
| Išgryninta genomine DNR | 0,4 – 28 ng | - | 2 | 52 |
| Bendras tūris: | | | 25 | 650 |

| Komponentai <i>RNAseP</i> nustatymui | Pradinės koncentracijos | Galutinės koncentracijos | Tūris, µl (1 reakcijai) | Tūris, µl (26 reakcijoms) |
|---|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| Sterilus vanduo, be nukleazių | - | - | 4,5 | 117 |
| TaqMan® Fast Advanced Master Mix | 2x koncentruota | 1x koncentruota | 12,5 | 325 |
| Tiesioginis pradmuo | 0,4 µM | 0,3 µM | 2 | 52 |
| Atvirkštinis pradmuo | 0,4 µM | 0,9 µM | 2 | 52 |
| Zondas | 0,1 µM | 0,1 µM | 2 | 52 |
| Išgryninta genomine DNR | 0,4 – 28 ng | - | 2 | - |
| Bendras tūris: | | | 25 | 650 |

TL-PGR atlikimo sąlygos nurodytos 2.7 lentelėje ir pritaikytos pagal gamintojo rekomendacijas, naudojant „TaqMan™ Fast Advanced Master Mix” reakcijos mišinį.

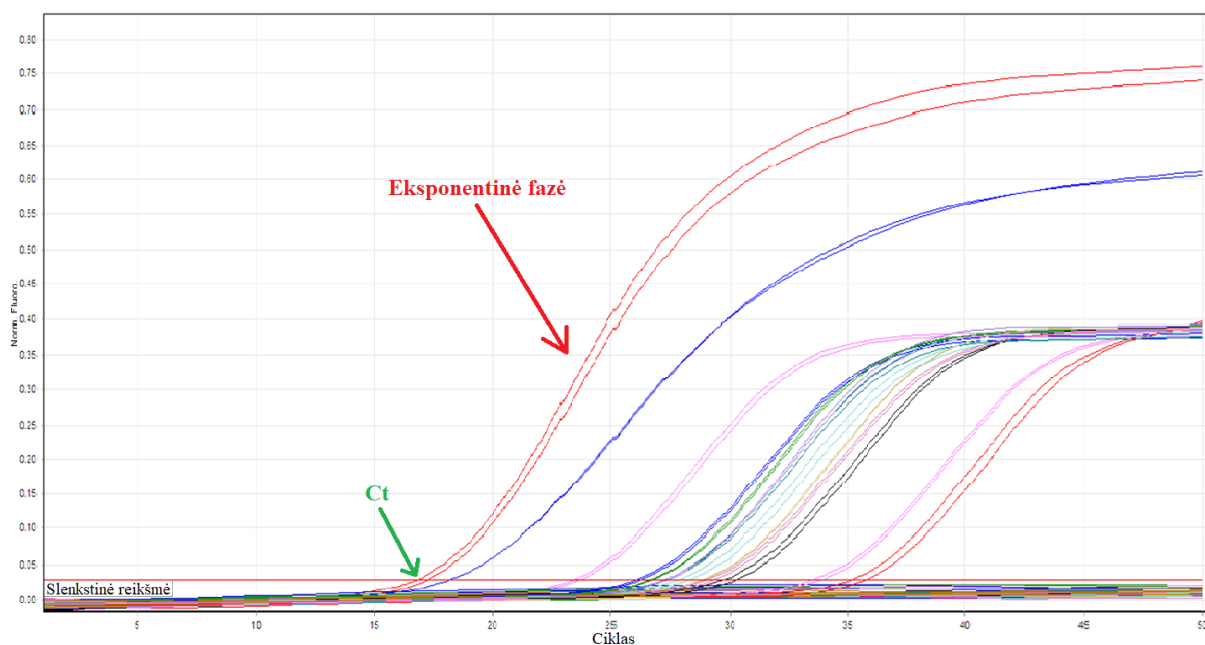
2.7 lentelė. TL-PGR sąlygos

| Sąlygos (temperatūra, laikas) | Ciklų kiekis |
|-------------------------------|--------------|
| 50 °C, 2 min | 1 ciklas |
| 95 °C, 2 min | 1 ciklas |
| 95 °C, 10 s | 50 ciklų |
| 60 °C, 40 s | |

TL-PGR nustatymai pasirinkti taip, kad zondo, ženklinto FAM dažu, fluorescencija būtų nustatoma atitinkamame bangos ilgyje.

2.2.6 TL-PGR rezultatų analizė

TL-PGR rezultatai analizuoti, nustačius fiksuotą slenkstinę reikšmę (angl. *fixed threshold*) 0,03 (parinkta pagal praktinius rezultatus). Slenkstinė reikšmė turi būti nustatyta didesnė nei neigiamų kontrolinių ir turi būti eksponentinės fazės pradžioje. Prieš mėginių analizavimą, patikrinami teigiamų ir neigiamų kontrolių rezultatai. Neigiamos kontrolės (be gDNR) turi nerodyti jokios Ct (angl. *cycle threshold*) reikšmės ir amplifikacijos kreivės ties nuline reikšme turėtų atrodyti kaip tiesi linija. Teigiamos kontrolės Ct reikšmės turėtų būti mažiau už 35 ir amplifikacijos kreivės turi būti sigmoidinės formos, o artėjant paskutiniam ciklui tapti plokščios formos (2.1 pav.). Jeigu šie reikalavimai netenkinami, PGR atliekamas iš naujo.



2.1 pav. TL-PGR amplifikacijos kreivės pavyzdys. Tai grafikas, rodantis kiekvienos reakcijos amplifikacijos ciklų skaičių X ašyje ir fluorescencijos vienetus (dRn) Y ašyje. dRn yra pradinis

fluorescencinis rodmuo, normalizuotas pagal etaloninius dažus. Slenkstinė reikšmė paryškinta raudona linija, Ct paryškinta žalia rodykle, o eksponentinė fazė paryškinta raudona rodykle.

Gautiems mėginių rezultatams analizuoti naudojamos Ct reikšmių interpretacijos pagal JAV Ligų kontrolės ir prevencijos centro duomenis (73): jeigu $Ct \leq 35$, tai mėginys yra laikomas teigiamu; jeigu Ct yra 36-40, tai rezultatas laikomas abejotinu/dviprasmišku; jeigu $Ct > 40$, tai mėginys yra laikomas neigiamu. Jeigu gaunami abejotini mėginio rezultatai, TL-PGR yra pakartojamas su 4 ir 10 kartų praskiesta DNR. Taip siekiama sumažinti PGR inhibitorių koncentraciją, jei dėl to gaunamas abejotinas rezultatas. Jeigu po pakartojimo Ct reikšmė pakyla iki teigiamų verčių (≤ 35 , amplifikuojant *ctrA*; ≤ 30 kai amplifikuojama *porA*), tai mėginys laikomas teigiamu. Vertinant mėginius taip pat svarbu patikrinti ar dviejų pakartojimų variacijos koeficientas (angl. *variation coefficient*, CV) nėra didesnis už 10% (skaičiavimai atlikti pagal 2.2.15 sk. nurodytą formulę). Jeigu rezultatuose yra užfiksuojama Ct reikšmė tik vieno iš dviejų pakartojimų metu arba variacijos koeficientas yra didesnis už 10%, TL-PGR kartojamas iš naujo.

Mėginiai, kuriuose Ct reikšmė nustatoma tik viename iš dviejų pakartojimų arba nenustatoma abejuose pakartojimuose pagal *RNAseP*, nevertinami.

2.2.7 *N. meningitidis* izoliatų genogrūpės nustatymas PGR

N. meningitidis genogrūpė nustatyta PGR būdu, panaudojus 2.8 lentelėje nurodytus pradmenis.

2.8 lentelė. Pradmenys genogrūpės nustatymui PGR metodu

| Genogrūpė | Amplifikuojamas genas | Pradmens seka | DNR fragmento ilgis (bp) | Šaltinis |
|-----------|-----------------------|-------------------------------|--------------------------|----------|
| A | <i>orf-2</i> | GCAATAGGTGTATATATTCTT CC | 400 | (54) |
| | | CGTAATAGTTTCGTATGCCTT CTT | | |
| B | <i>synB</i> | GGATCATTTTCAGTGTTTTCCA CCA | 450 | (54) |
| | | GCATGCTGGAGGAATAAGCA TTAA | | |

| | | | | |
|-----------------------------|-------------|--|------|------|
| C | <i>synE</i> | TCAAATGAGTTTGCGAATAG AAGGT | 250 | (54) |
| | | CAATCACGATTTGCCCAATT GAC | | |
| W | <i>synG</i> | CAGAAAGTGAGGGATTTCCA TA | 120 | (54) |
| | | CACAACCATTTTCATTATAGT TACTGT | | |
| Y | <i>synF</i> | ACGATATCCCTATCCTTGCCT A | 75 | (54) |
| | | CTGAAGCGTTTTTCATTATAAT TGCTAA | | |
| X | <i>ctrA</i> | AATGCAAATTCAATTGGTTG CTTGGGCCTTATACAAAGAC | 190 | (54) |
| | | | | |
| Capsule null locus (cni) | <i>cni</i> | GTCGTCTGAAAGCTTGCCTT GCTC | ~400 | (74) |
| | | CGCGCCATTTCTTCCGCC | | |

PGR atliekama, panaudojus PGR mišinį Phire Green Hot Start II PCR Master Mix, kiekvieno pradmens koncentracijos buvo 0,4 µM. PGR reakcijos sąlygos nurodytos 2.9 lentelėje.

2.9 lentelė. *N. meningitidis* izoliatų genogrupei būdingų sekų amplifikavimo reakcijos sąlygos

| Ciklas | Temperatūra | Trukmė | Ciklų skaičius |
|----------------------|-------------|-----------|----------------|
| Pradinė denatūracija | 98°C | 10 s | 1 |
| Denatūracija | 98°C | 5 s | 30 |
| Pradmenų prilydymas | 60°C | 5 s | |
| Ilginimas | 72°C | 15 s/1 kb | |
| Papildomas ilginimas | 72°C | 1 min | 1 |

Gautų PGR produktų analizė atlikta 1,2-2,5% agarozės gelyje (žr. sk. 2.2.10).

2.2.8 Dauginių lokusų sekų (MLST) amplifikavimas

N. meningitidis genų sekos *abcZ*, *adk*, *aroE*, *gdh*, *fumC*, *pdhC*, *pgm* sekos buvo padaugintos PGR metodu, panaudojus pradmenis, nurodytus 2.10 lentelėje. PGR matrica naudotas

centrifuguojant nuskaidrintas meningokokų izoliatų ląstelių lizatas (2.2.2 sk.). Regentų pradinės ir galutinės koncentracijos bei tūriai 1 reakcijai atlikti pateikti 2.11 lentelėje. Vienos reakcijos tūris mėgintuvėlyje 25 µl. PGR mišinio komponentų koncentracijos ir PGR reakcijos sąlygos nurodytos atitinkamai 2.11 ir 2.12 lentelėse. Neigiama kontrolė – reakcijos mišinys be DNR.

2.10 lentelė. Pradmenys dauginių lokusų sekų (MLST) amplifikavimui

| Genas | Pradmenys pavadinimas | Tiesioginis/ atvirkštinis pradmuo | Seka (5'→3') | Literatūros šaltinis |
|--------------|------------------------------|--|------------------------------|---------------------------------|
| <i>abcZ</i> | abcZ-P1C | Tiesioginis | TGTTCCGCTTCGACTGCCAA C | (75) |
| | abcZ-P2C | Atvirkštinis | TCCCCGTCGTAAAAACAAT C | |
| <i>adk</i> | adk-P1B | Tiesioginis | CCAAGCCGTGTAGAATCGTA AACC | (75) |
| | adk-P2B | Atvirkštinis | TGCCCAATGCGCCAATAC | |
| <i>aroE</i> | aroE-P1B | Tiesioginis | TTTGAAACAGGCGGTTGCGG | (75) |
| | aroE-P2B | Atvirkštinis | CAGCGGTAATCCAGTGCGA C | |
| <i>fumC</i> | fumC-P1B | Tiesioginis | TCCCCGCCGTAAAAGCCCTG | (75) |
| | fumC-P2B | Atvirkštinis | GCCCGTCAGCAAGCCCAAC | |
| <i>gdh</i> | gdh-P1B | Tiesioginis | CTGCCCCCGGGGTTTTTCATC T | (75) |
| | gdh-P2B | Atvirkštinis | TGTTGCGCGTTATTTCAAAG AAGG | |
| <i>pdhC</i> | pdhC-P2B | Tiesioginis | CCGGCCGTACGACGCTGAA C | (75) |
| | pdhC-P2B | Atvirkštinis | GATGTCGGAATGGGGCAAA CA | |
| <i>pgm</i> | pgm-P1 | Tiesioginis | CTTCAAAGCCTACGACATCC G | (75) |
| | pgm-P2 | Atvirkštinis | CGGATTGCTTTCGATGACGG C | |

2.11 lentelė. PGR komponentai dauginių lokusų sekų amplifikavimo reakcijoms

| Regentai | Pradinės koncentracijos | Galutinės koncentracijos | Tūris, µl (1 reakcijai) |
|---|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| PGR mišinys (Phire Green Hot Start II PCR Master Mix) | 2x koncentruota | 1x koncentruota | 12,5 |
| Sterilus vanduo, be nukleazių | - | - | 8,5 |
| Tiesioginis pradmuo | 10 µM | 0,4 µM | 1 |
| Atvirkštinis pradmuo | 10 µM | 0,4 µM | 1 |
| DNR | | | 2 |
| Bendras tūris: | | | 25 |

2.12 lentelė. Dauginių lokusų sekų amplifikavimo reakcijų sąlygos

| Ciklas | Temperatūra | Trukmė | Ciklų skaičius |
|----------------------|--------------------|---------------|-----------------------|
| Pradinė denatūracija | 98°C | 10 s | 1 |
| Denatūracija | 98°C | 5 s | 30 |
| Pradmenų prilydymas | 60-69°C | 5 s | |
| Ilginimas | 72°C | 15 s/1 kb | |
| Papildomas ilginimas | 72°C | 1 min | 1 |

2.2.9 Baltymų PorA ir FetA tipavimas

Genų, koduojančių baltymus FetA ir PorA, sekos buvo amplifikuotos, panaudojus pradmenis nurodytus 2.13 lentelėje ir reakcijos sąlygas, kaip aprašyta 2.2.3 skyriuje ir 2.5 lentelėje.

2.13 lentelė. Pradmenys *fetA* ir *porA* genų amplifikavimui

| Genas | Pradmens pavadinimas | Tiesioginis/atvirkštinis pradmuo | Seka (5'→3') | Literatūros šaltinis |
|--------------|-----------------------------|---|------------------------------|-----------------------------|
| <i>porA</i> | 210F | Tiesioginis | ATGCGAAAAAACTTAC CGCCCTC | (76) |
| | 211R | Atvirkštinis | AATGAAGGCAAGCCGTC AAAAACA | (76) |
| <i>fetA</i> | S1 | Tiesioginis | CGGCGCAAGCGTATTCG G | (77) |

| | | | | |
|--|----|--------------|---------------------------|------|
| | S8 | Atvirkštinis | CGCGCCCAATTCGTAAC CGTG | (77) |
|--|----|--------------|---------------------------|------|

Genų sekoskaitai, panaudoti šie pradmenys:

2.14 lentelė. Pradmenys *porA* ir *fetA* genų sekoskaitai

| Genas | Pradmens pavadinimas | Tiesioginis/ atvirkštinis pradmuo | Seka (5'→3') | Literatūros šaltinis |
|-------------|----------------------|---|-----------------------------|----------------------|
| <i>porA</i> | 210F | Tiesioginis | ATGCGAAAAAACTTACCGCC CTC | (76) |
| | VR2-seq | Atvirkštinis | GGCGAGATTCAAGCCGCC | (76) |
| <i>fetA</i> | S12 | Tiesioginis | TTCAACTTCGACAGCCGCCTT | (75) |
| | S15 | Atvirkštinis | TTGCAGCGCGTCRTACAGGCG | (75) |

2.2.10 PGR produktų analizė agarozės gelyje

PGR produktų analizė atlikta elektroforezės būdu, 1,2% agarozės gelyje (gelio paruošimas nurodytas 2.3 lentelėje). Į agarozės gelio šulinėlius įnešta po 5 µl PGR mėginio sumaišyto su DNR užnešimo dažu (DNA loading dye) (2.1 lentelė). Jei naudotas PGR mišinys „Green“, kuriame jau yra DNR dažo, paruoštas PGR mėginys užnešamas tiesiai į šulinėlius. Elektroforezė atliekama esant 10 V/cm² įtampai (srovės šaltinis Pharmacia Biotech.), o laikas kontroliuojamas pagal indikatorinio dažo judrumą mėginyje.

2.2.11 PGR produktų vertinimas agarozės gelyje

Pasibaigus elektroforezei agarozės gelis dažomas 15-20 min etidžio bromido 0,5 µg/mL tirpale. Geliai analizuoti transiliumatoriuje (DNR MiniBis Pro, Izraelis) UV šviesoje. Gautas vaizdas dokumentuotas su integruota programine įranga – GelCapture.

PGR produktai laikomi tinkamais tolimesnei analizei, jeigu užfiksuotame vaizde yra matoma ryški viena/vienalytė juostelė, atitinkanti reikiamo fragmento ilgį, kuris nustatomas pagal DNR fragmentų ilgio standartus (2.15 lentelė).

2.15 lentelė. Amplifikuoti PGR produktai: genų pavadinimai ir ilgis (bp)

| Genas | PGR fragmento ilgis (bp) |
|--------------|---------------------------------|
| <i>abcZ</i> | 850 |
| <i>adk</i> | 708 |
| <i>aroE</i> | 835 |
| <i>fumC</i> | 820 |
| <i>gdh</i> | 650 |
| <i>pdhC</i> | 818 |
| <i>pgm</i> | 1322 |
| <i>fetA</i> | 1200 |
| <i>porA</i> | 1100 |

2.2.12 PGR produktų gryninimas

PGR būdu gauti DNR fragmentai buvo gryninami panaudojus DNA Clean & Concentrator rinkinį, vadovaujantis gamintojo pateiktomis rekomendacijomis. Į PGR mėginio (~20 µl) PGR mišinys sumaišomas su DNR surišančiu buferiniu tirpalu (angl. *DNA Binding Buffer*) santykiu 1:5. Šis mišinys perkeltas į kolonėlę ir centrifuguotas stalinėje centrifugoje 30 s. maksimaliomis apskukomis. Kolonėlė praplauta 200 µl DNR plovimo buferiu (angl. *DNA Wash Buffer*) ir centrifuguota 30 s. Praplovimas ir centrifugavimas pakartotas du kartus. DNR eliucijai naudota 20µl distiliuoto vandens. Gautas DNR tirpalas saugomas -25°C temperatūroje.

2.2.13 MLST profilio nustatymas

Išgrynintų *N. meningitidis* izoliatų amplifikuotų dauginių lokusų DNR sekoskaita nuo abiejų DNR grandinių (pradmenys nurodyti 2.16 lentelėje) atlikta BaseClear B.V. (Leidenas, Olandija). Sekoskaitos analizę ir sekų pateikimą į PUBMLST/Neisseria duomenų bazę (<https://pubmlst.org/>) izoliato MLST profilio nustatymui atliko Dr. M.Plečkaitytė (GMC VU BTI IS).

2.16 lentelė. Dauginių lokusų sekoskaitos pradmenys

| Genas | Pradmenis pavadinimas | Tiesioginis/ atvirkštinis pradmuo | Seka (5'→3') | Literatūros šaltinis |
|-------------|-----------------------|---|----------------------------|----------------------|
| <i>abcZ</i> | abcZ-S1A | Tiesioginis | AATCGTTTATGTACCGCAGR | (75) |
| | abcZ-S2 | Atvirkštinis | GAGAACGAGCCGGGATAGG A | |
| <i>adk</i> | adk-S1A | Tiesioginis | AGGCWGGCACGCCCTTGG | (75) |
| | adk-S2 | Atvirkštinis | CAATACTTCGGCTTTCACGG | |
| <i>aroE</i> | aroE-S1A | Tiesioginis | TCGGTCAAYACGCTGRTK | (75) |
| | aroE-S2 | Atvirkštinis | ATGATGTTGCCGTACACATA | |
| <i>fumC</i> | fumC-S1 | Tiesioginis | TCCGGCTTGCCGTTTGTGTCAG | (75) |
| | fumC-S2 | Atvirkštinis | TTGTAGGCGGTTTTGGCGAC | |
| <i>gdh</i> | gdh-S3 | Tiesioginis | CCTTGGCAAAGAAAGCCTGC | (75) |
| | gdh-S4C | Atvirkštinis | RCGCACGGATTTCATRYGG | |
| <i>pdhC</i> | pdhC-S1 | Tiesioginis | TCTACTACATCACCCCTGATG | (75) |
| | pdhC-S2 | Atvirkštinis | ATCGGCTTTGATGCCGTATTT | |
| <i>pgm</i> | pgm-S1 | Tiesioginis | CGGCGATGCCGACCGCTTGG | (75) |
| | pgm-S2A | Atvirkštinis | GGTGATGATTTCCGGTYGCRC C | |

Nukleotidų žymėjimas: R = A arba G; W = T arba A; K = T arba G; Y = C arba T; N = A, T, G, arba C.

2.2.14 Invaziniai *N. meningitidis* izoliatai

Vadovaujantis Lietuvos Respublikos Sveikatos apsaugos ministro 2009-05-21 įsakymu Nr. V-385 „Dėl patogeninių bakterijų, nustatytų asmens ir visuomenės sveikatos priežiūros įstaigų laboratorijose, identifikavimo ir tipavimo tvarkos aprašo patvirtinimo“ visi invaziniai *N. meningitidis* izoliatai turi būti siunčiami į NVSPL. Laikotarpyje 2020-2022 m. gauti 20 izoliatų. Dviejų izoliatų, gautų 2021 m., nepavyko išauginti, todėl jie nebuvo įtraukti į tyrimą, o kiti du izoliatai (2022 m.) buvo iš to paties individo, todėl tik vienas iš jų įtrauktas į tyrimą. Iš viso ištirta 17 meningokoko izoliatų (n=6, 2020; n=6, 2021; n=5, 2022). Izoliatai išskirti iš kraujo ar stuburo smegenų skysčio. Informacija apie izoliatų serogrupę gauta iš NVSPL, o genogrupė nustatyta, kaip

aprašyta 2.2.7 skyrelyje. Viso genomo sekoskaita (WGS) atlikta izoliatams, gautiems 2020 m. (n=6). Sekoskaitą finansavo ECDC, o atliko Eurofins (Vokietija), panaudojus Illumina platformą. Genomo surinkimas (angl. *genome assembly*) atliktas kaip aprašyta (10). Izoliatams, kuriems nebuvo atlikta WGS, nustatytas MLST profilis ir atliktas PorA ir FetA baltymų tipavimas, kaip aprašyta 2.2.9 skyrelyje. Sekoskaitos analizę ir sekų pateikimą į PUBMLST/Neisseria duomenų bazę izoliato baltymų FetA ir PorA variabilių sričių variantų (FetA-VR, PorA-VR1 ir PorA-VR2) nustatymui atliko Dr. M.Plečkaitytė (GMC VU BTI IS).

2.2.15 Statistinė duomenų analizė

TL-PGR tyrimo Ct vidurkis (Rep. Ct) ir dviejų pakartojimų Ct standartinio nuokrypio (Rep. Ct Std. Dev.) reikšmės buvo automatiškai sugeneruotos Rotor-Gene Q Series programinės įrangos, versija 2.3.5.

Variacijos koeficiento (CV) skaičiavimo formulė:

$$CV = \frac{Rep. Ct Std. Dev.}{Rep. Ct} \times 100$$

Rep. Ct – Ct reikšmių vidurkis tarp pakartojimų.

Rep. Ct Std. Dev. – Ct standartinio nuokrypio reikšmė visiems to paties DNR mėginiams.

Aprašomoji statistinė duomenų analizė atlikta naudojant R programą (4.2.2 versija), DescTools paketą (0.99.47 versija) ir Microsoft Excel. Nuokrypio apie nešiojimo paplitimą įverčiui apskaičiuotas proporcijų 95% pasikliautinis intervalas (PI) naudojant Wilsono metodą (angl. *Wilson Score method*) (78), kuris po to paverstas į procentus.

Meningokoko nešiojimo paplitimo statistinę analizę atliko V. Gegžna VU GMC Biomokslų institutas.

3 REZULTATAI

3.1 Sergamumas IML Lietuvoje 2020-2022 metais

Sergamumas IML Lietuvoje pastaruosius du dešimtmečius buvo vienas didžiausių ES. 2009-2019 m. IML buvo nustatyta vidutiniškai 2,24 atv./100 000 gyventojų, o 2013 ir 2017 m. siekė 3 atv./100 000 gyventojų (8,79). Sergamumas IML Europoje pastoviai mažėjo, o kaimyninėse Lenkijoje, Latvijoje, Estijoje buvo nedidelis (0,3-0,6/100 000) (8,9). Didžioji dalis (90,5%) 2009-2019 m. išskirtų invazinių meningokoko kamienų priklausė B serogrupei. C, Y ir X serogrupės sudarė atitinkamai 7,5%, 1% ir 0,68% visų izoliatų (10).

Sergamumas IML Lietuvoje 2020-2022 m. sumažėjo iki 0,42 atvejo/100 000 gyventojų (8). Manoma, kad sumažėjimas susijęs su 2020-2021 m. Covid-19 pandemijos įvestais apribojimais. Tuo metu buvo imtasi įvairių priemonių (pvz.: medicininių kaukių/respiratorių dėvėjimas, rekomendacijos likti namuose, viešai prieinamų paslaugų/vietų veiklos ribojimas), siekiant sumažinti koronavirusinės infekcijos plitimą. Reaguojant į Covid-19 pandemiją Lietuvos švietimo sistemoje taip pat buvo priimtas nuotolinis mokymas ir mokymasis (<https://koronastop.lrv.lt>). Tačiau nuo 2021 m. rugsėjo 1 d. kontaktinės paskaitos ir kita dėstymo veikla yra leista daugumoje Lietuvos aukštųjų mokyklų ir universitetų (80). Kadangi šios abi infekcijos yra platinamos oro-lašeliniu būdu, tad ribojimai įvesti Covid-19 pandemijos valdymui prisidėjo ir prie *N. meningitidis* platinimo sumažėjimo. Daugumos infekcinių ligų sumažėjimo dėl ribojimų tendencija buvo stebima pasauliniu mastu. Tačiau kai kuriose šalyse po pandemijos valdymo apribojimų panaikinimo pastebėta ligų, tame tarpe sukeltų ir *N. meningitidis*, išaugimas (81). Lietuvoje 2022 m. IML sergamumas išliko toks pats, kaip ir 2020-2021 m.

Vakcina 4CMenB prieš B serogrupės meningokoką 2018 m. įtraukta į Nacionalinę imunizacijos programą ir ja skiepijami 3,5 mėn. bei 12-15 mėn. amžiaus vaikai. Kita vakcina - MenB-Fhbp, taip pat prieš B serogrupės meningokoką, yra registruota Lietuvoje 2014 m. ir ja skiepijami vyresni nei 10 m. asmenys. Ši vakcina yra mokama. Atsižvelgiant į statistikoje užfiksuotą sergamumo sumažėjimą manoma, jog vakcinacija taip pat turėjo įtakos IML atvejų sumažėjimui Lietuvoje.

2020-2022 m. Lietuvoje buvo užfiksuoti 36 IML atvejai, NVSPL saugomi 17 invazyvių *N. meningitidis* izoliatų, o tai sudarė 47,2% nuo visų IML atvejų. Informacija apie izoliatų serogrupes buvo gauta iš NVSPL, bet genogrupė buvo patvirtinta papildomai, kaip aprašyta 2.2.7 sk. Pagal tarptautines molekulinės meningokoko tipavimo rekomendacijas (51), buvo nustatyta šių izoliatų

MLST profilis, sekos tipas (ST), klono kompleksas (cc) ir baltymų FetA bei PorA variabilių (FetA-VR ir PorA-VR1 ir PorA-VR2) sričių variantai (51). Rezultatai pateikti 3.1 lentelėje.

3.1 lentelė. Molekulinės invazyvių *N. meningitidis* izoliatų (2020-2022 m.) charakteristikos

| Serogrupė/ genogrupė | Izoliatų skaičius | PorA | | FetA-VR | Sekos tipas (ST) | Klono kompleksas (cc) |
|-------------------------|----------------------|------|------|---------|---------------------|-----------------------------|
| | | VR1 | VR2 | | | |
| B | 7 | 19 | 15 | F4-28 | 34 | 32 |
| B | 1 | 19 | 15 | F4-28 | 9775 | 32 |
| B | 1 | 19 | 15 | F4-28 | 9779 | 32 |
| B | 1 | 21 | 9 | F4-28 | 16805 | 32 |
| B | 1 | 19 | 15 | F4-28 | 16791 | 32 |
| B | 1 | 22 | 14 | F5-5 | 213 | 213 |
| B | 1 | 19-2 | 13-1 | F3-9 | 17490 | 461 |
| B | 2 | 21 | 21 | F5-8 | 15967 | UA |
| B | 1 | 5-1 | 10-1 | F1-7 | 16806 | UA |
| X | 1 | 22 | 14 | F5-5 | 17491 | UA |

Nustatyta, kad vienas izoliatas buvo X serogrupės (gautas 2022 m.), o 16 izoliatų priklausė B serogrupei, kuri sukėlė didžiąją daugumą IML atvejų ir praėjusį dešimtmetį (10). Izoliatai buvo sugrupuoti į 10 sekos tipų (ST). Tarp 6 naujai aptiktų ST, trys buvo priskirti trims klono kompleksams (cc), o likę ST nesiejami nei su vienu cc (ccUA). Izoliatai buvo priskirti trims cc, iš kurių labiausiai paplitęs cc32 (52,9%, n=9). Baltymų PorA ir FetA tipavimas parodė, jog kamienas P1.19,15: F4-28: ST-34 (cc32) sudarė 41,2% (n=7) visų izoliatų. Šis kamienas sudarė 64,1% visų 2009-2019 m. išskirtų invazinių izoliatų (10). Vyraujantis klono kompleksas cc32 išliko toks pats kaip ir per praėjusį dešimtmetį.

2020-2022 m. išskirti invaziniai izoliatai pateikti į PubMLST *Neisseria* duomenų bazę (<https://pubmlst.org/organisms/neisseria-spp>); teikėjas Dr. M. Plečkaitytė (VU GMC BTI IS). Izoliatų numeriai (id) yra šie: 110092-110093, 110182, 110184, 110189, 110195, 110205, 110208, 122226-122229, 127474-127478.

3.2 Tyrimo dalyvių charakteristika

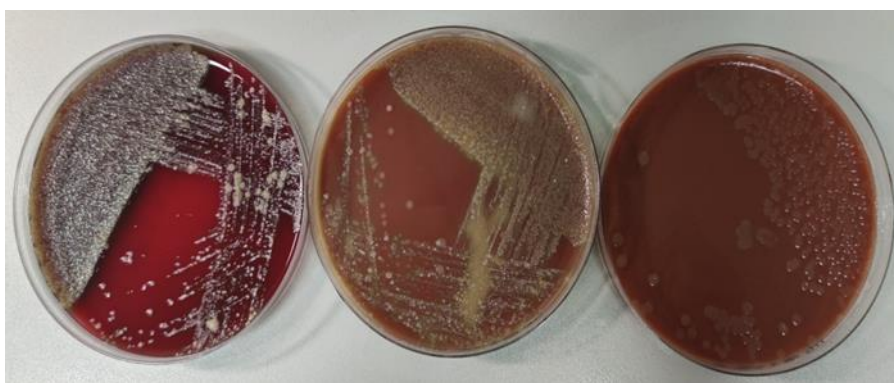
Šis tyrimas buvo atliktas 2021 m. gruodžio mėn.–2023 m. balandžio mėn. Jame dalyvavo 405 savanoriai (18-25 m. amžiaus). Visi ėminiai buvo surinkti iš Vilniaus apskrityje gyvenančių

ir vienoje Vilniaus aukštojoje mokykloje besimokančių studentų, siekiant nustatyti ar jie yra *N. meningitidis* nešiotojai. Vilnius yra labiausiai IML paveikta Lietuvos apskritis, kurioje nustatoma iki 90% visų IML atvejų bendroje populiacijoje (10). Keturių dalyvių burnaryklės ėminiai atmesti, nes TL-PGR mėginiuose nebuvo aptikta žmogaus *RNAseP* koduojančio geno (teigiamos kontrolės). Iš 401 surinkto ėminio 50 ėminių (12,5%) buvo surinkti 2021 m. gruodį, 290 (72,3%) ėminių 2022 m. ir 61 (15,2%) ėminys 2023 m. sausio-vasario mėnesiais. Devyniasdešimt vienas (22,7%) asmuo iš tyrimo dalyvių buvo vyras ir 310 (77,3%) dalyvių buvo moterys. Amžiaus vidurkis 22,4 m. (imtis 18-25 metų).

3.3 *N. meningitidis* nešiojimo paplitimas

N. meningitidis nustatymui burnaryklės ėminiuose TL-PGR metodu taikiniai buvo naudojami du genai *ctrA* ir *porA*. Genas *ctrA* yra kapsulės lokuse, todėl naudojamas tik kapsulę turinčių meningokokų nustatymui. Yra žinoma, jog didelė nešiojamų meningokokų dalis neturi kapsulės (65,74,82), todėl nustatymui pasirinktas ir *porA* genas, kurį turi beveik visi meningokokų kamienai (55). Genas *porA* koduoja transmembraninį baltymą, kuris atsakingas už mažamolekulinių medžiagų transportą į ląstelę. Šis meningokoko nustatymo metodas toliau tekste vadinamas ėminio TL-PGR.

Meningokokų nešiojimas taip pat buvo nustatytas tradiciniu mikrobiologiniu pasėlio metodu, siekiant išauginti nešiojamą *N. meningitidis* kamieną dalį ėminio pasėjant ant specialių agarizuotų terpių (3.1 pav.). Išaugusios *N. meningitidis* kolonijos buvo identifikuotos MALDI-TOF.



3.1 pav. *N. meningitidis* kultūros išaugintos po 48 val. inkubacijos ant agarizuotos terpės. Nuotrauka gauta iš Dr. S. Kiverytės (VUL SK Mikrobiologijos laboratorija).

Jeigu *N. meningitidis* aptikta abiem metodais (pasėlio ar ėminio TL-PGR) arba bent vienu metodu, tai ėminys laikomas teigiamu. Taigi, 20 iš 401 ėminių aptikta *N. meningitidis* (3.2 lentelė).

Dešimtyje iš 20 meningokoko ėminių aptikta meningokokas abejais metodais. Tiriamojoje grupėje meningokoko nešiojimo paplitimas (angl. *carriage prevalence*) buvo 4,99% (n=20; 95% CI 3,25–7,58). Pagal TL-PGR teigiamų ėminių nustatytas nešiojimas 3,74% (n=15; 95% CI 2,28–6,08), o pasėlio metodu nustatytas 3,74% (n=15; 95% CI 2,28–6,08) nešiojimas.

3.2 lentelė. Burnaryklės ėminių TL-PGR rezultatai ir izoliatų genogrūpės nustatymas

| Ėminio nr. | Burnaryklės ėminio TL-PGR | | Pasėlio metodas | Izoliato genogrūpė | | | |
|------------|---------------------------|------------|-----------------|--------------------|---------------------------|-----------|----------------------|
| | ctrA genas | porA genas | | Izoliato PGR | | | Genogrūpės žymėjimas |
| | | | | ctrA genas | Genogrūpei būdingas genas | cnl genas | |
| NM-028 | – | – | + | – | – | + | cnl |
| NM-036 | + | + | + | + | + | – | B |
| NM-038 | – | + | – | – | – | – | – |
| NM-059 | – | + | + | – | – | + | cnl |
| NM-063 | – | + | + | – | – | + | cnl |
| NM-089 | + | + | + | + | + | – | Y |
| NM-110 | – | + | + | – | + | + | cnl |
| NM-115 | – | – | + | + | – | – | NG* |
| NM-120 | – | + | – | – | – | – | – |
| NM-138 | – | + | – | – | – | – | – |
| NM-164 | – | + | – | – | – | – | – |
| NM-168 | + | + | + | + | – | – | NG |
| NM-176 | + | + | + | + | + | – | B |
| NM-201 | + | + | + | + | + | – | B |
| NM-212 | – | + | – | – | – | – | – |
| NM-253 | – | + | + | – | – | + | cnl |
| NM-281 | – | – | + | – | – | + | cnl |
| NM-295 | – | + | + | + | + | – | B |
| NM-402 | – | – | + | + | + | – | Y |
| NM-409 | – | – | + | – | – | + | cnl |

*NG, genogrūpei nepriskirta (angl. *non groupable*)

Nėra 1:1 atitikimo tarp *N. meningitidis* aptikimo pasėlio ir TL-PGR metodų (3.2 lentelė). Nedidelis meningokoko kiekis ėminyje yra dažniausiai siejamas su meningokoko kamienų neišaugimu pasėlyje. Tiesioginis meningokoko nustatymas ėminyje TL-PGR metodu turėtų būti jautresnis metodas, nepriklausomas nuo pasėlio, tačiau šiame darbe didesnių šio metodo pranašumų neaptikta. Kol kas yra atlikta nedaug tyrimų, kuriuose meningokoko nešiojimo nustatymui naudojama abu minėti metodai. Kanadoje buvo ištirtas meningokoko nešiojimas tarp 13-25 m. jaunuolių abejais metodais ir nustatyta, jog ėminio TL-PGR yra jautresnis metodas nei izoliatų PGR. Tik 50% kitais metodais nustatytų *N. meningitidis* pavyko aptikti izoliatų PGR (83). Kitame tyrime TL-PGR metodo tiesiogiai iš ėminio jautrumas buvo 75%, palyginus su izoliatų PGR, o apie 24% izoliatų buvo nepatvirtinti TL-PGR (84).

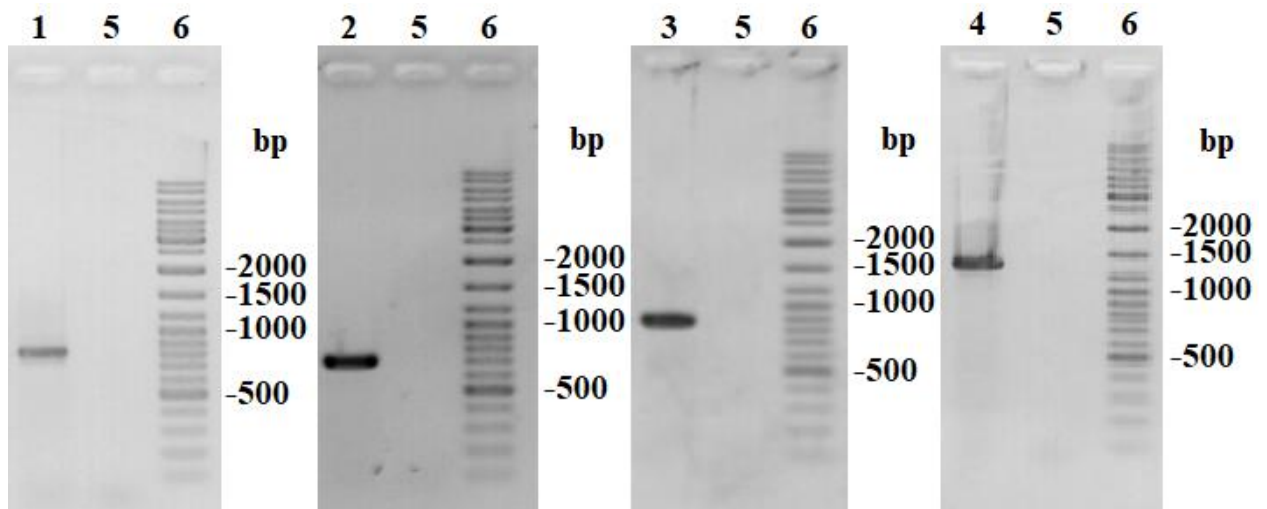
Nustatytas 5% meningokoko nešiojimo paplitimas tarp Vilniaus aukštosios mokyklos studentų yra nedidelis. Švedijoje atliktame tyrime, kuriame vidutinis dalyvių amžius buvo toks kaip šiame darbe, nešiojimas buvo 9,1% (5). Kanadoje nustatytas nešiojimas tarp 18-25 m. studentų buvo 21,9% (83). Australijoje ir Italijoje atliktuose tyrimuose nešiojimo procentas buvo atitinkamai 7 ir 17%, bet dalyviai buvo jaunesni (14-19 m. amžiaus) nei šiame tyrime (66,85). Norvegijoje didžiausias nešiojimas buvo nustatytas 18 m. amžiaus grupėje (16,4%), o jaunesnių dalyvių grupėje 1,9% (13-15 m. amžiaus) ir 9,7% (16-18 m. amžiaus) (65). Industrinėse valstybėse didžiausias nešiojimo paplitimas yra nustatytas 18-19 m. jaunuolių tarpe (11). Šio amžiaus jaunuolių dalis šiame tyrime yra nedidelė: 18 m. amžiaus sudarė 0,75% (3/401), o 19 m. amžiaus -5,2% (21/401). Šiame darbe nustatytas nešiojimo paplitimas gali būti mažesnis nei iš tiesų yra 18-25 m. amžiaus grupėje. Didesnio masto jaunesnių dalyvių (pvz.: vyresnių klasių vidurinių mokyklų moksleivių) įtraukimas į tyrimą yra sunkiai įgyvendinamas uždavinys, nes Lietuva yra pasirinkusi griežtą nuostatą: reikalaujama abiejų tėvų sutikimo, jog <18 m. amžiaus žmonės dalyvautų biomediciniuose tyrimuose. Daugumoje ES valstybių reikalaujama tik vieno tėvų sutikimo arba abiejų tėvų sutikimų tik vaikams iki 16 m. amžiaus. Lietuvoje dėl sociodemografinių veiksnių gauti abiejų tėvų sutikimą yra sunkiai įgyvendinamas uždavinys.

TL-PGR metodu ėminiuose nenustatytas *ctrA* genas, vadinasi kamienai neturėjo kapsulės. Detalesnis nekapsuliuotų izoliatų charakterizavimas pateiktas 3.4 skyriuje.

3.4 Molekulinės nešiojamų meningokokų kamienų charakteristikos

N. meningitidis kolonijos, išaugusios iš burnaryklės ėminio, buvo identifikuotos MALDI-TOF ir *N. meningitidis* izoliatai charakterizuoti nustatant genogrupę, izoliato MLST profilį

(3.2 pav.) bei tipuojant baltymų PorA ir FetA variabilias sritis (VR). Iš kiekvieno ėminio analizei buvo imami mažiausiai du *N. meningitidis* klonai.



3.2 pav. Amplifikuotų *aroE*, *fumC*, *pdhC* ir *pgm* genų, sudarančių MLST profilį, elektroforezės agarozės gelyje vaizdas. 1 takelis – *aroE* genas (835 bp); 2 takelis – *fumC* genas (820 bp); 3 takelis– *pdhC* genas (818 bp); 4 takelis – *pgm* genas (1322 bp); 5 takelis – neigiama kontrolė (PGR reakcijos mišinyje nėra DNR); 6 takelis – DNR fragmentų ilgio agarozės gelyje standartas (Thermo Fisher Scientific). Standarto DNR fragmentų ilgiai bazių poroms (bp) pažymėti dešinėje paveikslų pusėje.

Penkiolikoje iš 401 ėminio pasėlių buvo išauginti meningokoko izoliatai (3.2 lentelė), kuriems buvo nustatyta genogrupė, amplifikuoti MLST profilį sudarantys genai (3.2 pav.) ir padauginti genai, koduojantys baltymus FetA bei PorA, norint nustatyti šių baltymų variabilių (FetA-VR ir PorA-VR1 ir PorA-VR2) sričių variantus (3.3 lentelė). *N. meningitidis* kamienai, neturintys *ctrA* geno pagal TL-PGR, buvo be kapsulės, nes PGR būdu genogrupės nustatyti nepavyko. Ėminių ir jų izoliatų kapsulės aptikimo/neaptikimo rezultatai sutampa (3.2 lentelė). Šie izoliatai vadinami *cnl* (angl. *capsule null locus*), nes vietoje operono, koduojančio genus, kurių produktai dalyvauja kapsulės sintezėje, jie turi apie 100 bp nekoduojantį DNR fragmentą, vadinamą *cnl* genu. *N. meningitidis* izoliatų iš ėminių NM-115 ir NM-168 genogrupės nustatyti nepavyko, nors kamienai turėjo *ctrA* geną, kuris būdingas kapsulę turintiems meningokokams. Šie izoliatai pavadinti negrupuojamais (NG, angl. *non genogroupable*) (3.2 lentelė).

Neturinčių kapsulės *cnl* izoliatų buvo 46,7%, (7/15), B genogrupės 26,7% (4/15), Y genogrupės 13,3% (2/15) ir 2 izoliatai priklausė NG kategorijai. Nekapsuliuoti kamienai sudaro daugumą nešiojamų *N. meningitidis* kamienų daugelyje šalių (5,65,66).

Visi izoliatai pagal MLST profilį buvo sugrupuoti į 14 sekos tipų (ST), iš kurių keturi buvo nauji (ST-16644, ST-16804, ST-17028, ST-17519). Izoliatai buvo priskirti devyniems cc (3.3 lentelė). Keturių izoliatų ST nebuvo priskirti jokiam cc. Cnl izoliatai siejami su cc53 (n=1), cc198 (n=1), ir cc1136 (n=2). B genogrupės izoliatai priklausė cc269 (n=2), cc213 (n=1), ir cc4821 (n=1). Vieno izoliato (63-3) *fetA* genas neaptiktas, o dviem izoliatams (168-1 ir 281-3) neaptikta baltymo PorA-VR2 sritis (3.3 lentelė).

Nešiojami *N. meningitidis* izoliatai pateikti į PubMLST Neisseria duomenų bazę (<https://pubmlst.org/organisms/neisseria-spp>); teikėjas Dr. M. Plečkaitytė (VU GMC BTI IS). Izoliatų numeriai (id) yra šie: 118981-118985, 122231-122232, 123221-123223, 128578-128582.

3.3 lentelė. Nešiojamų meningokoko izoliatų charakteristikos

| Izoliato nr. | Genogrupė | <i>abcZ</i> * | <i>adk</i> | <i>aroE</i> | <i>fumC</i> | <i>pdhC</i> | ST | cc | ST | cc | FetA-VR | PorA-VR1 | PorA-VR2 |
|--------------|-----------|---------------|------------|-------------|-------------|-------------|-----|-----|-------|------|---------|----------|----------|
| 36-1 | B | 7 | 5 | 1 | 13 | 36 | 53 | 15 | 213 | 213 | F5-5 | 22 | 14 |
| 176-1 | B | 4 | 10 | 7 | 9 | 9 | 11 | 20 | 10864 | 269 | F1-5 | 19 | 15-1 |
| 295-2 | B | 4 | 10 | 7 | 9 | 9 | 11 | 20 | 10864 | 269 | F1-5 | 19 | 15-1 |
| 201-1 | B | 222 | 3 | 58 | 17 | 1130 | 249 | 255 | 17028 | 4821 | F3-36 | 12-6 | 13-22 |
| 28-1 | cnl | 16 | 2 | 6 | 25 | 17 | 25 | 22 | 53 | 53 | F1-2 | 7 | 30 |
| 63-3 | cnl | 5 | 4 | 17 | 15 | 30 | 7 | 12 | 823 | 198 | 0 | 18 | 25-14 |
| 281-3 | cnl | 5 | 4 | 17 | 15 | 14 | 7 | 12 | 198 | 198 | F5-5 | 18 | 0 |
| 59-2 | cnl | 405 | 4 | 38 | 15 | 22 | 40 | 13 | 6096 | 1136 | F5-8 | 18-4 | 25 |
| 110-1 | cnl | 5 | 4 | 38 | 15 | 22 | 40 | 13 | 1136 | 1136 | F5-8 | 18-4 | 25 |
| 253-1 | cnl | 1185 | 2 | 159 | 17 | 77 | 25 | 112 | 17519 | UA | F3-7 | 17-1 | 23-7 |
| 409-1 | cnl | 46 | 3 | 13 | 375 | 6 | 756 | 77 | 11563 | UA** | F3-8 | 21-2 | 23 |
| 115-1 | NG | 8 | 25 | 7 | 17 | 24 | 26 | 49 | 16804 | 1157 | F5-36 | 21-7 | 16 |
| 168-1 | NG | 20 | 3 | 2 | 26 | 26 | 15 | 112 | 5953 | UA | F5-7 | 18-1 | 0 |
| 402-2 | Y | 8 | 5 | 15 | 17 | 8 | 21 | 2 | 865 | 865 | F1-6 | 7-1 | 1 |
| 89-1 | Y | 6 | 5 | 10 | 17 | 21 | 24 | 21 | 16644 | UA | F1-66 | 7-1 | 1 |

*Genų *abcZ*, *adk*, *aroE*, *fumC*, *pdhC* ir *pgm* salelės sudaro kamieno MLST profilį.

**UA, nepriskirta jokiam klonų kompleksui (angl. *unassigned*).

Daugumą IML atvejų Š. Amerikoje ir Europoje sukelia hiperinvasyvūs *N.meningitidis* kamienai, priklausantys tam tikriems klonų kompleksams, kurie pasižymi jiems būdingomis serogrupės, PorA ir FetA baltymų kombinacijomis (86).

Vienas nešiojamas *N. meningitidis* B serogrupės kamienas (36-1), priklausantis ST-213 (cc213), kurio genotipas B: P1.22,36: F5-5 yra artimas Lietuvoje aptiktam invaziniam kamieniui B: P1.22,14: F5-5: ST-213 (cc213). B serogrupės kamienai, priskiriami cc269, yra vieni

dažniausių IML sukėlėjų Europoje ir JAV (83,87,88). Lietuvoje aptikti genogrupės B kamienai ST-10864 (cc269) gali būti laikomi kamienais, turinčiais invazinį potencialą. NG kamienas NM-115-1, kurio genotipas P1.21-7,16:F5-36 artimas invaziniams kamienams, aptinkamiems daugelyje šalių (<https://pubmlst.org/neisseria>, prieiga 2023 m. balandžio mėn.).

Cnl izoliatai, priklausantys cc198 ir cc1136, aptikti *N. meningitidis* nešiojimo tyrimuose tarp Italijos (66) ir Norvegijos (65) paauglių bei Švedijos universiteto studentų (5). Įdomu, jog B serogrupės cc32 kamienai, kurie 2009-2019 m. buvo atsakingi už didžiąją dalį IML atvejų Lietuvoje, neaptikti tarp nešiojamų kamienų. Nepatikta ir kamieno ST-32 (cc32), kuris sudarė 64% visų invazinių izoliatų (10). Tam gali būti kelios priežastys:

- 1) cc32 kamienai necirkuliuoja populiacijoje, juos išstūmė kiti kamienai, tačiau 2020-2022m. cc32 sudarė 64% (11/17) invazinių izoliatų;

- 2) kai kurie invazyvūs meningokoko klonų kompleksai yra prasti kolonistai, todėl išsilaiko trumpalaikiai santykiai su šeimininku, kaip ir kitų hipervirulentiškų klonų kompleksų, pvz.: cc11. Pietų Australijoje tarp nešiojamų *N. meningitidis* kamienų neaptikta hipervirulentiško invazinio B serogrupės kamieno, kuris sukėlė daugumą IML atvejų regione (89). Duomenys, surinkti iš dvylika metų trukusių tyrimų Norvegijoje parodė, jog nešiojamo cc32 paplitimas per visą laikotarpį buvo nedidelis (5%), tačiau 1991 m. šis cc sukėlė 70% IML atvejų, o 2003 m. 15% atvejų (2). Kitaip tariant, hiperinvazyvių kamienų nešiojimo paplitimas negali būti tiesiogiai siejamas su IML sergamumu. Taigi, labiausiai paplitusio invazyvaus B serogrupės cc32, kurio PorA variantas yra 1.19,15, o FetA yra F4-28, šiame meningokoko nešiojimo tyrime neaptikta.

Daugumą IML atvejų Š. Amerikoje ir Europoje sukelia tam tikros serogrupės ir klonų komplekso kamienai, tokie kaip B serogrupės cc32, cc41/44, cc269, ir C serogrupės cc11 ir cc8. Serogrupės Y kamienai, kaip IML sukėlėjai, Europoje pasirodė apie 2000 metus (90). Tačiau pastaruosius dešimtmečius IML atvejų, sukeltų Y serogrupės kamienų dažnai priklausančių cc23, skaičius žymiai padidėjo daugelyje šalių, įskaitant Europą ir Š. Ameriką, o daugiausia Y serogrupės sukeltų IML atvejų aptinkama Švedijoje (88,91). *N. meningitidis* nešiojimo jaunuolių tarpe tyrimuose, atliktuose 2008-2009 m. Jungtinėje Karalystėje, nustatytas žymus Y serogrupės padidėjimas palyginus su 1997-1998 m. (90). Lietuvoje Y serogrupės kamienai, atsakingi už IML atvejus, pasirodė 2017 m. (10). Du Y serogrupės kamienai, siejami su IML Lietuvoje, taip pat priklausė cc23 (www.pubmlst.org/neisseria, prieiga 2023 m. balandžio mėn.). Faktas, jog tarp 15 nešiojamų izoliatų du priklauso Y serogrupei rodo, jog Y serogrupės sukeltų IML atvejų greičiausiai daugės ir Lietuvoje.

3.5 Vakcinacijos poveikis *N. meningitidis* nešiojimui

Vakcinos, naudojamos apsisaugoti nuo IML, taip pat sumažina nešiojimo paplitimą tarp vakcinuotų individų. Mažesnis *N. meningitidis* nešiojimas tarp vakcinuotų žmonių, mažina bakterijos perdavimą nevakcinuotiems žmonėms ir tuo būdu suteikiamas „bandos“ imunitetas (angl. *herd protection*). *N. meningitidis* nešiotųjų skaičiaus sumažinimas nulemia sumažėjusią infekcijos platinimo dažnį ir naujų infekcijos židinių atsiradimą. Kadangi didžiausias meningokoko nešiojimas industrinėse valstybėse aptinkamas 16-18 m. amžiaus grupėje (11), daugelyje šalių vakcinacijos programos skirtos 1-18 m. ar 12-18 m. individams (79), o ne tik naujagimiams ar vaikams iki 5 m. amžiaus. Kadangi vakcinos prieš C, A, Y ir W serogrupės meningokokus pasaulyje registruotos daug anksčiau nei prieš B serogrupės, yra atlikta nemažai tyrimų patvirtinančių, jog skiepijant paauglius vakcina, nukreipta prieš C serogrupės meningokokus, žymiai sumažinamas nešiojimas ir sergamumas IML sukuriant „bandos“ imunitetą šalyse (JK ir Prancūzijoje), kuriose paplitęs šios serogrupės meningokokas (3,92,93). Panašūs rezultatai gauti ir panaudojus vakcinas prieš A, W ir Y serogrupes (1).

Kitokie rezultatai gauti apie vakcinacijos įtaką B serogrupės nešiojimui: tyrimai Australijoje parodė, jog 15-18 m. amžiaus individų vakcinacija 4CMenB vakcina neturėjo pastebimo poveikio *N. meningitidis* (įskaitant ir B serogrupės) nešiojimui šioje amžiaus grupėje (89). Panašūs rezultatai gauti ir JAV (94). Kadangi šalys naudoja skirtingas B serogrupės vakcinas – vienos dviejų komponentų (MenB-Fhbp), kitos keturių komponentų (4CMenB), tad gautų rezultatų negalima vertinti vienareikšmiškai.

Nėra pakankamai duomenų apie vyresnio mokyklinio amžiaus žmonių poreikį skiepijimui vakcina prieš *N. meningitidis* Lietuvoje. Šis *N. meningitidis* nešiojimo tyrimas yra kol kas vienintelis ir jame dalyvavo nedidelė 18 m. amžiaus žmonių dalis, todėl nešiojimo paplitimas gali būti daug didesnis.

4 IŠVADOS

1. Molekuliniais metodais charakterizuoti 2020-2022 m. surinkti invaziniai *N. meningitidis* kamienai: vyravo B serogrupės klono kompleksui 32 priklausantys kamienai, kaip ir 2009-2019 metais.
2. Nustatytas 5% meningokoko nešiojimo paplitimas tarp 18-25 m. amžiaus studentų.
3. Išskirta penkiolika nešiojamų *N. meningitidis* kamienų.
4. Nekapsuliuotų nešiojamų *N. meningitidis* izoliatų buvo nustatyta beveik pusė (46,7%), B genogrupės aptikta 26,7%, Y genogrupės 13,3%.
5. Apie 30% nešiojamų *N. meningitidis* kamienų turi invazinį potencialą. Tarp nešiojamų neaptikta klono komplekso 32 kamienų, kurie 2009-2022 m. sukėlė didžiąją dalį IML atvejų Lietuvoje.

5 REKOMENDACIJOS

1. Meningokoko nešiojimo paplitimas (5%) tarp 18-25m. amžiaus Vilniaus apskrityje gyvenančių ir vienoje Vilniaus aukštojoje mokykloje besimokančių studentų yra nedidelis, tačiau tyrime dalyvavo nedaug (iki 5%) 18-19 m. amžiaus individų, tarp kurių nešiojimas turėtų didžiausias. Gauti rezultatai gali nepilnai atspindėti tikrąjį *N. meningitidis* nešiojimo paplitimo mastą amžiaus grupėje. Būtina įvertinti nešiojimo paplitimą tarp 16-18 m. amžiaus žmonių. Šiuo tikslu atsakingos Lietuvos institucijos turėtų pakeisti esamą ydingą nuostatą, nustatančią žmonių iki 18 m. dalyvavimo biomedicininuose tyrimuose tvarką, atsisakant abiejų tėvų sutikimo, o paliekant tik vieno iš tėvų sutikimą. Tik vieno iš tėvų sutikimas taikomas daugelyje ES šalių arba abiejų tėvų sutikimas reikalaujamas vaikams iki 16 m. amžiaus. Pakeitimas, be abejonės, atlieptų viešąjį interesą ne tik infekcinių, bet ir kitų ligų stebėsenos, kontrolės ir profilaktikos, vaistų tyrimuose.

2. Aptikti nešiojami Y genogrupės izoliatai parodo, jog IML sergamumas, sukiamas šios genogrupės kamienų, gali išaugti. Reikalinga pastovi nešiojamų ir invazinių *N. meningitidis* kamienų stebėsenos, siekiant numatyti vakcinacijos strategijas.

3. Nustatytas nedidelis *N. meningitidis* nešiojimas gali būti ir Covid-19 pandemijos ribojimų pasekmė: nors didžioji ėminių dalis surinkta 2022 m., žmonių socialinio gyvenimo ribojimas buvo taikomas iki 2021 m. pavasario. Reikia pakartoti nešiojimo tyrimą, praėjus, pvz.: 5 metams nuo Covid-19 pandemijos ribojimų pabaigos ir palyginti gautus rezultatus.

SANTRAUKA

Bakterija *Neisseria meningitidis* yra atsakinga už gyvybei pavojingos invazinės meningokokinės ligos (IML), dažniausiai siejamos su dviejų klinikinių išraiškų – sepsio arba meningito pasireiškimu, sukeltamą atvejus pasaulyje. IML atvejų skaičius Lietuvoje 2009-2019 m. buvo vienas didžiausių Europoje. IML siejama su šešiomis meningokoko serogrupėmis. Meningokokas gali besimptomiai reziduoti žmogaus burnos ir ryklės gleivinėje. *N. meningitidis* nešiojimas siejamas su žmonių amžiumi ir socialiniu elgesiu – dažnu lankymasis klubuose/baruose, rūkymu, gyvenimu glaudžiose bendruomenėse (kareivinėse, studentų bendrabučiuose). Industrinėse valstybėse didžiausias nešiojimas yra 16-25 m. amžiaus žmonių grupėje. Didelis nešiojimo dažnis siejamas su didesniu *N. meningitidis* pernešimu. Siekiant stebėti naujų serograpių ir potencialiai patogeninių kamienų atsiradimą, svarbu vykdyti meningokoko nešiojimo tyrimus bendroje populiacijoje. Meningokoko nešiojimas Lietuvoje iki šiol nebuvo tirtas. Šiame darbe molekuliniais metodais charakterizuoti invaziniai *N. meningitidis* kamienai, surinkti 2020-2022 metais, siekiant geriau suprasti nešiojimą Lietuvoje cirkuliuojančių invazyvių meningokoko kamienų kontekste. Nustatytas meningokoko nešiojimo paplitimas tarp 18-25 m. amžiaus žmonių (n=401), gyvenančių Vilniaus apskrityje ir besimokančių vienoje Vilniaus aukštojoje mokykloje, ir genotipuoti nešiojami *N. meningitidis* kamienai. Tikro laiko PGR metodu nustatytas 5% *N. meningitidis* nešiojimo paplitimas, tačiau gautas rezultatas gali nepilnai atspindėti tikrąjį *N. meningitidis* nešiojimo paplitimo mastą amžiaus grupėje, nes 18-19 m. amžiaus žmonių tyrime dalyvavo ne daugiau 5%. Beveik pusė nešiojamų *N. meningitidis* kamienų neturėjo kapsulės. B serogrupės kamienai atsakingi už daugumą IML atvejų Lietuvoje 2009-2022 m. ir šios serogrupės nešiojamų kamienų aptikta 26,7%. Y serogrupės kamienai sudarė apie 1% nuo visų 2009-2019 m. surinktų invazinių kamienų, o tarp nešiojamų kamienų jų buvo 13,3%. Ši tendencija rodo, jog Y serogrupė gali tapti vyraujančia IML priežastimi Lietuvoje. B serogrupės klono kompleksas 32 kamienai, kurie 2009-2022 m. buvo atsakingi didžiąją dalį IML atvejų Lietuvoje, neaptikti tarp nešiojamų kamienų, nes šie kamienai greičiausiai yra prasti kolonistai ir sudaro trumpalaikį santykį su šeimininku.

SUMMARY

The bacteria *Neisseria meningitidis* is responsible for the worldwide cases of life-threatening invasive meningococcal disease (IMD), the most commonly associated with clinical manifestations such as sepsis or meningitis. The incidence of IMD in Lithuania was among the highest in Europe from 2009 to 2019. IMD is associated with six meningococcal serogroups. Meningococci is often carried asymptotically by humans in their oropharyngeal mucosa. *N. meningitidis* carriage is associated with age and social behavior such as frequent attendance at clubs/bars, smoking, living in close communities (military barracks, student dormitories). In industrialized countries, the highest carriage rate of *N. meningitidis* was found among 16-25-year-olds. A high frequency of carriage is associated with a greater transmission of *N. meningitidis*. In order to observe the novel emergence of serogroups and potentially pathogenic strains, it is important to carry out studies on meningococcal carriage among the general population. No studies on *N. meningitidis* carriage have been conducted in Lithuania among the general population. In this study, invasive strains of *N. meningitidis* collected in 2020-2022 were characterized by molecular methods, to better understand the meningococcal carriage in the context of prevailing invasive meningococcal strains in Lithuania. The prevalence of meningococcal carriage was detected among 18-25-year-old (n=401) university students living in Vilnius County and the carried *N. meningitidis* strains were genotyped. The real-time PCR method determined a 5% carriage prevalence of *N. meningitidis*. A small proportion of 18-19-year-olds were included in the study, which could potentially cause underestimated results of the incidence rate of carriage in the overall study population. Almost half of the carried *N. meningitidis* strains were without a capsule. Serogroup B strains were responsible for the majority of IMD cases in Lithuania from 2009 to 2022, and strains of this genogroup accounted for 26,7% of all carriage isolates. Y serogroup strains constituted about 1% of all invasive strains recovered in 2009-2019, but this serogroup was detected in 13,3% carriage isolates. This trend demonstrates that serogroup Y may increase IMD incidents in Lithuania. The serogroup B strains which belong to clonal complex 32 and accounted for most of meningococcal isolates recovered from 2009 to 2022 were not detected among carriage isolates. It is presumed that these strains are poor colonists and form a short-term relationship with the host.

PADEKA

Nuoširdžiai dėkoju savo magistrinio darbo vadovei Dr. Mildai Plečkaitytei už visokeriopą pagalbą, suteiktą rašant magistro darbą ir atliekant tyrimus laboratorijoje, suteiktas žinias, pasidalinimą sukaupta patirtimi ir galimybę mokytis bei tobulėti.

Dėkoju VU GMC lektoriui Vilmantui Gėgžnai už pagalbą atliekant statistinę duomenų analizę, Emilijai Sereikaitei ir Dr. Indrei Kučinskaitei-Kodzei už suteiktą pagalbą bei patarimus atliekant tyrimą.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Balmer P, Burman C, Serra L, York LJ. Impact of meningococcal vaccination on carriage and disease transmission: a review of the literature. *Hum Vaccin Immunother.* 2018 m.;14(5):1118–30.
2. Caugant DA, Tzanakaki G, Kriz P. Lessons from meningococcal carriage studies. *FEMS Microbiol Rev.* 2007 m.;31(1):52–63.
3. Soriano-Gabarro M, Wolter J, Hoge C, Vyse A. Carriage of *Neisseria meningitidis* in Europe: a review of studies undertaken in the region. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2011 m.;9(9):761–74.
4. MacLennan J, Kafatos G, Neal K, Andrews N, Cameron JC, Roberts R, ir kt. Social behavior and meningococcal carriage in British teenagers. *Emerg Infect Dis.* 2006 m.;12(6):950.
5. Olof S, Lorraine E, Alexander P, Anders M, Sara TH, Martin S, ir kt. Prevalence and persistence of *Neisseria meningitidis* carriage in Swedish university students. *Epidemiol Infect.* 2023 m.;151:e25.
6. Guedes S, Bricout H, Langevin E, Tong S, Bertrand-Gerentes I. Epidemiology of invasive meningococcal disease and sequelae in the United Kingdom during the period 2008 to 2017 – a secondary database analysis. *BMC Public Health.* 2022 m.;22(1):521.
7. Di Pietro GM, Biffi G, Castellazzi ML, Tagliabue C, Pinzani R, Bosis S, ir kt. Meningococcal Disease in Pediatric Age: A Focus on Epidemiology and Prevention. *Int J Environ Res Public Health.* 2022 m.;19(7):4035.
8. Nacionalinis visuomenės sveikatos centras prie Sveikatos apsaugos ministerijos. Statistika: sergamumas užkrečiamosiomis ligomis Lietuvoje [Prieiga per internetą]. 2019. Adresas: <https://npsc.lrv.lt/lt/uzkrečiamuju-ligu-valdymas/statistika-apie-uzkrečiamasias-ligas?fbclid=IwAR0Y0bJLAIEjKI6HPSke9Ca54svzBxiQVUV0Ec3TvF0KqOnsxK6zeacy6l4>
9. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance Atlas of Infectious Diseases [Prieiga per internetą]. 2019. Adresas: https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx?Dataset=27&HealthTopic=36&fbclid=IwAR3IDN8_1wiPUxKGWbarm3a-fN5MQr3N1k62IBCsyfuvxIGIBwvkq6RUNQk
10. Sereikaitė E, Plepytė R, Petrutienė A, Stravinskienė D, Kučinskaitė-Kodžė I, Gėgžna V, ir kt. Molecular characterization of invasive *Neisseria meningitidis* isolates collected in

- Lithuania (2009-2019) and estimation of serogroup B meningococcal vaccine 4CMenB and MenB-Fhbp coverage. *Front Cell Infect Microbiol.* 2023 m.;13:151.
11. Christensen H, May M, Bowen L, Hickman M, Trotter CL. Meningococcal carriage by age: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2010 m.;10(12):853–61.
 12. Coureuil M, Join-Lambert O, Lécuyer H, Bourdoulous S, Marullo S, Nassif X. Pathogenesis of meningococemia. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013 m.;3(6):a012393.
 13. Ladhani SN, Lucidarme J, Parikh SR, Campbell H, Borrow R, Ramsay ME. Meningococcal disease and sexual transmission: urogenital and anorectal infections and invasive disease due to *Neisseria meningitidis*. *The Lancet.* 2020 m.;395(10240):1865–77.
 14. Stephens DS, Greenwood B, Brandtzaeg P. Epidemic meningitis, meningococcaemia, and *Neisseria meningitidis*. *The Lancet.* 2007 m.;369(9580):2196–210.
 15. Merz AJ, So M. Interactions of pathogenic neisseriae with epithelial cell membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2000 m.;16(1):423–57.
 16. Virji M, Makepeace K, Peak IRA, Ferguson DJP, Jennings MP, Moxon ER. Opc-and pilus-dependent interactions of meningococci with human endothelial cells: molecular mechanisms and modulation by surface polysaccharides. *Mol Microbiol.* 1995 m.;18(4):741–54.
 17. Cartwright K. Meningococcal carriage and disease. *Meningococcal disease.* 1995 m.;115–46.
 18. Hill DJ, Griffiths NJ, Borodina E, Virji M. Cellular and molecular biology of *Neisseria meningitidis* colonization and invasive disease. *Clin Sci.* 2010 m.;118(9):547–64.
 19. Griffiths NJ, Bradley CJ, Heyderman RS, Virji M. IFN- γ amplifies NF κ B-dependent *Neisseria meningitidis* invasion of epithelial cells via specific upregulation of CEA-related cell adhesion molecule 1. *Cell Microbiol.* 2007 m.;9(12):2968–83.
 20. Brandtzaeg áP, Bryn K, Kierulf P, Ovstebø R, Namork E, Aase B, ir kt. Meningococcal endotoxin in lethal septic shock plasma studied by gas chromatography, mass-spectrometry, ultracentrifugation, and electron microscopy. *J Clin Invest.* 1992 m.;89(3):816–23.
 21. Plant L, Sundqvist J, Zughaier S, Lövkvist L, Stephens DS, Jonsson AB. Lipooligosaccharide structure contributes to multiple steps in the virulence of *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun.* 2006 m.;74(2):1360–7.
 22. Jarva H, Ram S, Vogel U, Blom AM, Meri S. Binding of the complement inhibitor C4bp to serogroup B *Neisseria meningitidis*. *The Journal of Immunology.* 2005 m.;174(10):6299–307.

23. McNeil G, Virji M. Phenotypic variants of meningococci and their potential in phagocytic interactions: the influence of opacity proteins, pili, PilC and surface sialic acids. *Microb Pathog.* 1997 m.;22(5):295–304.
24. Mairey E, Genovesio A, Donnadiou E, Bernard C, Jaubert F, Pinard E, ir kt. Cerebral microcirculation shear stress levels determine *Neisseria meningitidis* attachment sites along the blood–brain barrier. *J Exp Med.* 2006 m.;203(8):1939–50.
25. Mikaty G, Soyer M, Mairey E, Henry N, Dyer D, Forest KT, ir kt. Extracellular bacterial pathogen induces host cell surface reorganization to resist shear stress. *PLoS Pathog.* 2009 m.;5(2):e1000314.
26. Massari P, Ram S, Macleod H, Wetzler LM. The role of porins in neisserial pathogenesis and immunity. *Trends Microbiol.* 2003 m.;11(2):87–93.
27. Vermont CL, van Dijken HH, Kuipers AJ, van Limpt CJP, Keijzers WCM, van der Ende A, ir kt. Cross-reactivity of antibodies against PorA after vaccination with a meningococcal B outer membrane vesicle vaccine. *Infect Immun.* 2003 m.;71(4):1650–5.
28. Frosch M, Müller D, Bousset K, Müller A. Conserved outer membrane protein of *Neisseria meningitidis* involved in capsule expression. *Infect Immun.* 1992 m.;60(3):798–803.
29. Tzeng YL, Thomas J, Stephens DS. Regulation of capsule in *Neisseria meningitidis*. *Crit Rev Microbiol.* 2016 m.;42(5):759–72.
30. Sabatini C, Bosis S, Semino M, Senatore L, Principi N, Esposito S. Clinical presentation of meningococcal disease in childhood. *J Prev Med Hyg.* 2012 m.;53(2):116–9.
31. Darmstadt GL. Acute infectious purpura fulminans: pathogenesis and medical management. *Pediatr Dermatol.* 1998 m.;15(3):169–83.
32. Dass Hazarika R, Deka NM, Khyriem AB, Lyngdoh W v, Barman H, Duwarah SG, ir kt. Invasive meningococcal infection: analysis of 110 cases from a tertiary care centre in North East India. *The Indian Journal of Pediatrics.* 2013 m.;80:359–64.
33. Rayanakorn A, Ser HL, Pusparajah P, Chan KG, Goh BH, Khan TM, ir kt. Comparative efficacy of antibiotic (s) alone or in combination of corticosteroids in adults with acute bacterial meningitis: A systematic review and network meta-analysis. *PLoS One.* 2020 m.;15(5):e0232947.
34. Correia JBB, Hart CAA. Meningococcal disease. *Clin Evid.* 2004 m.;2004.
35. van de Beek D, Farrar JJ, de Gans J, Mai NTH, Molyneux EM, Peltola H, ir kt. Adjunctive dexamethasone in bacterial meningitis: a meta-analysis of individual patient data. *Lancet Neurol.* 2010 m.;9(3):254–63.

36. Brandtzaeg P, Kierulf P, Gaustad P, Skulberg A, Bruun JN, Halvorsen S, ir kt. Plasma endotoxin as a predictor of multiple organ failure and death in systemic meningococcal disease. *Journal of Infectious Diseases*. 1989 m.;159(2):195–204.
37. van de Beek D, de Gans J, McIntyre P, Prasad K. Steroids in adults with acute bacterial meningitis: a systematic review. *Lancet Infect Dis*. 2004 m.;4(3):139–43.
38. Brouwer MC, McIntyre P, de Gans J, Prasad K, van de Beek D. Corticosteroids for acute bacterial meningitis. *Cochrane database of systematic reviews*. 2010 m.:(9).
39. World Health Organization. Meningitis [Prieiga per internetą]. 2021. Adresas: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/meningitis>
40. Olbrich KJ, Müller D, Schumacher S, Beck E, Meszaros K, Koerber F. Systematic review of invasive meningococcal disease: sequelae and quality of life impact on patients and their caregivers. *Infect Dis Ther*. 2018 m.;7:421–38.
41. Edmond K, Clark A, Korczak VS, Sanderson C, Griffiths UK, Rudan I. Global and regional risk of disabling sequelae from bacterial meningitis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2010 m.;10(5):317–28.
42. Verma R, Khanna P. Meningococcal vaccine: a new vaccine to combat meningococcal disease in India. *Hum Vaccin Immunother*. 2012 m.;8(12):1904–6.
43. Broutin H, Philippon S, Constantin de Magny G, Courel MF, Sultan B, Guégan JF. Comparative study of meningitis dynamics across nine African countries: a global perspective. *Int J Health Geogr*. 2007 m.;6:1–8.
44. Lamelas A, Harris SR, Röltgen K, Dangy JP, Hauser J, Kingsley RA, ir kt. Emergence of a new epidemic *Neisseria meningitidis* serogroup A Clone in the African meningitis belt: high-resolution picture of genomic changes that mediate immune evasion. *mBio*. 2014 m.;5(5):e01974-14.
45. Mohammed I, Iliyasu G, Habib AG. Emergence and control of epidemic meningococcal meningitis in sub-Saharan Africa. *Pathog Glob Health*. 2017 m.;111(1):1–6.
46. Lingani C, Bergeron-Caron C, Stuart JM, Fernandez K, Djingarey MH, Ronveaux O, ir kt. Meningococcal meningitis surveillance in the African meningitis belt, 2004–2013. *Clinical infectious diseases*. 2015 m.;61(suppl_5):S410–5.
47. WHO WER. Epidemic meningitis control in countries of the African meningitis belt, 2016. *Wkly Epidemiol Rec*. 2017 m.;3(92):145–64.
48. Trotter CL, Lingani C, Fernandez K, Cooper L v, Bitá A, Tevi-Benissan C, ir kt. Impact of MenAfriVac in nine countries of the African meningitis belt, 2010–15: an analysis of surveillance data. *Lancet Infect Dis*. 2017 m.;17(8):867–72.

49. Al-Tawfiq JA, Clark TA, Memish ZA. Meningococcal disease: the organism, clinical presentation, and worldwide epidemiology. *J Travel Med.* 2010 m.;17(suppl_1):3–8.
50. Centers for Disease Control and Prevention. Active Bacterial Core Surveillance Report, Emerging Infections Program Network, *Neisseria meningitidis* [Prieiga per internetą]. 2019. Adresas: http://www.cdc.gov/abcs/downloads/NMEN_Surveillance_Report_2019.pdf
51. Jolley KA, Brehony C, Maiden MCJ. Molecular typing of meningococci: recommendations for target choice and nomenclature. *FEMS Microbiol Rev.* 2007 m.;31(1):89–96.
52. Mothershed EA, Sacchi CT, Whitney AM, Barnett GA, Ajello GW, Schmink S, ir kt. Use of real-time PCR to resolve slide agglutination discrepancies in serogroup identification of *Neisseria meningitidis*. *J Clin Microbiol.* 2004 m.;42(1):320–8.
53. Jones CH, Mohamed N, Rojas E, Andrew L, Hoyos J, Hawkins JC, ir kt. Comparison of phenotypic and genotypic approaches to capsule typing of *Neisseria meningitidis* by use of invasive and carriage isolate collections. *J Clin Microbiol.* 2016 m.;54(1):25–34.
54. Fraiser C, Stor R, Tenebray B, Sanson Y, Nicolas P. Use of a new single multiplex PCR-based assay for direct simultaneous prediction of 6 *Neisseria meningitidis* serogroups. *J Clin Microbiol.* 2009 m.;
55. Rojas E, Hoyos J, Oldfield NJ, Lee P, Flint M, Jones CH, ir kt. Optimization of molecular approaches to genogroup *Neisseria meningitidis* carriage isolates and implications for monitoring the impact of new serogroup B vaccines. *PLoS One.* 2015 m.;10(7):e0132140.
56. Centers for Disease Control and Prevention. Meningitis Lab Manual: Characterization - Molecular Typing [Prieiga per internetą]. 2016. Adresas: <https://www.cdc.gov/meningitis/lab-manual/chpt12-molecular-typing-methods.html>
57. Durand G, Javerliat F, Bes M, Veyrieras JB, Guigon G, Mugnier N, ir kt. Routine whole-genome sequencing for outbreak investigations of *Staphylococcus aureus* in a national reference center. *Front Microbiol.* 2018 m.;9:511.
58. Itsko M, Topaz N, Ousmane-Traoré S, Popoola M, Ouedraogo R, Gamougam K, ir kt. Enhancing Meningococcal Genomic Surveillance in the Meningitis Belt Using High-Resolution Culture-Free Whole-Genome Sequencing. *J Infect Dis.* 2022 m.;226(4):729–37.
59. Fiebelkorn KR, Crawford SA, Jorgensen JH. Mutations in folP associated with elevated sulfonamide MICs for *Neisseria meningitidis* clinical isolates from five continents. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 m.;49(2):536–40.
60. Moore PS, Hierholzer J, DeWitt W, Gouant K, Djoré D, Lippeveld T, ir kt. Respiratory viruses and mycoplasma as cofactors for epidemic group A meningococcal meningitis. *JAMA.* 1990 m.;264(10):1271–5.

61. Caugant DA, Fogg C, Bajunirwe F, Piola P, Twesigye R, Mutebi F, ir kt. Pharyngeal carriage of *Neisseria meningitidis* in 2–19-year-old individuals in Uganda. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2006 m.;100(12):1159–63.
62. Caugant DA, Høiby EA, Rosenqvist E, Frøholm LO, Selander RK. Transmission of *Neisseria meningitidis* among asymptomatic military recruits and antibody analysis. *Epidemiol Infect.* 1992 m.;109(2):241–53.
63. Olcéan P, Kjellander J, Danielsson D, Lindquist BL. 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 m.;13(2):105–9.
64. Glover JA. The cerebro-spinal fever epidemic of 1917 at X Dépôt. *Epidemiol Infect.* 1918 m.;17(2–3):350–65.
65. Watle S V, Caugant DA, Tunheim G, Bekkevold T, Laake I, Brynildsrud OB, ir kt. Meningococcal carriage in Norwegian teenagers: strain characterisation and assessment of risk factors. *Epidemiol Infect.* 2020 m.;148.
66. Neri A, Fazio C, Ambrosio L, Vacca P, Barbui A, Daprai L, ir kt. Carriage meningococcal isolates with capsule null locus dominate among high school students in a non-endemic period, Italy, 2012–2013. *International Journal of Medical Microbiology.* 2019 m.;309(3–4):182–8.
67. Yazdankhah SP, Kriz P, Tzanakaki G, Kremastinou J, Kalmusova J, Musilek M, ir kt. 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 m.;42(11):5146–53.
68. Ala'Aldeen DAA, Neal KR, Ait-Tahar K, Nguyen-Van-Tam JS, English A, Falla TJ, ir kt. Dynamics of meningococcal long-term carriage among university students and their implications for mass vaccination. *J Clin Microbiol.* 2000 m.;38(6):2311–6.
69. de Wals P, Gilquin C, de Maeyer S, Bouckaert A, Noël A, Lechat MF, ir kt. Longitudinal study of asymptomatic meningococcal carriage in two Belgian populations of schoolchildren. *Journal of Infection.* 1983 m.;6(2):147–56.
70. Ali O, Aseffa A, Omer AB, Lema T, Demissie TM, Tekletsion Y, ir kt. Household transmission of *Neisseria meningitidis* in the African meningitis belt: a longitudinal cohort study. *Lancet Glob Health.* 2016 m.;4(12):e989–95.
71. Basta NE, Berthe A, Keita M, Onwuchekwa U, Tamboura B, Traore A, ir kt. Meningococcal carriage within households in the African meningitis belt: A longitudinal pilot study. *Journal of Infection.* 2018 m.;76(2):140–8.

72. Centers for Disease Control and Prevention. Chapter 10: PCR for Detection and Characterization of Bacterial Meningitis Pathogens: *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* [Prieiga per internetą]. 2012. Adresas: http://medbox.iiab.me/modules/en-cdc/www.cdc.gov/meningitis/lab-manual/chpt10-pcr.html?fbclid=IwAR3PZs-VpWFdkyOFqmEiFQ9i-77v2AMWLfs4wra6qtsPkZ_baJK0hPFzo
73. Centers for Disease Control and Prevention. Chapter 7: Identification and Characterization of *Neisseria meningitidis* [Prieiga per internetą]. 2012. Adresas: <http://medbox.iiab.me/modules/en-cdc/www.cdc.gov/meningitis/lab-manual/chpt07-id-characterization-nm.html#>
74. Claus H, Maiden MCJ, Maag R, Frosch M, Vogel U. Many carried meningococci lack the genes required for capsule synthesis and transport. *Microbiology* (N Y). 2002 m.;148(6):1813–9.
75. Centers for Disease Control and Prevention. Chapter 12: Characterization of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* by Molecular Typing Methods [Prieiga per internetą]. 2012. Adresas: http://medbox.iiab.me/modules/en-cdc/www.cdc.gov/meningitis/lab-manual/chpt12-molecular-typing-methods.html?fbclid=IwAR1UUpI_OvYwaK9R3YfxtsjgkiBZJypB8cSLkUy053WAVa_SoYFJMUcWLS
76. Lucidarme J, Comanducci M, Findlow J, Gray SJ, Kaczmarski EB, Guiver M, ir kt. Characterization of fHbp, nhba (*gna2132*), *nadA*, *porA*, and sequence type in group B meningococcal case isolates collected in England and Wales during January 2008 and potential coverage of an investigational group B meningococcal vaccine. *Clinical and vaccine immunology*. 2010 m.;17(6):919–29.
77. Thompson EAL, Feavers IM, Maiden MCJ. Antigenic diversity of meningococcal enterobactin receptor FetA, a vaccine component. *Microbiology* (N Y). 2003 m.;149(7):1849–58.
78. Agresti A, Coull BA. Approximate is better than “exact” for interval estimation of binomial proportions. *Am Stat*. 1998 m.;52(2):119–26.
79. Sohn WY, Tahrat H, Novy P, Bekkat-Berkani R. Real-world implementation of 4-component meningococcal serogroup B vaccine (4CMenB): implications for clinical practices. *Expert Rev Vaccines*. 2022 m.;21(3):325–35.

80. Vilniaus universiteto Senato sprendimai. Dėl 2021–2022 studijų metų rudens semestro studijų Vilniaus universitete vykdymo [Prieiga per internetą]. 2021. Adresas: <https://www.vu.lt/apiemus/struktura/senatas/senato-sprendimai>
81. Deghmane AE, Taha MK. Changes in Invasive *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus influenzae* Infections in France during the COVID-19 Pandemic. *Microorganisms*. 2022 m.;10(5):907.
82. Gentile A, Della Latta MP, Bloch M, Martorelli L, Wisner B, Sorhouet Pereira C, ir kt. Oropharyngeal meningococcal carriage in children and adolescents, a single center study in Buenos Aires, Argentina. *PLoS One*. 2021 m.;16(3):e0247991.
83. Gilca R, De Wals P, Nolan SM, Kitchin N, Eiden JJ, Jiang Q, ir kt. A longitudinal epidemiology study of meningococcal carriage in students 13 to 25 years old in Quebec. *mSphere*. 2018 m.;3(6):e00427-18.
84. Van Ravenhorst MB, Bijlsma MW, van Houten MA, Struben VMD, Anderson AS, Eiden J, ir kt. Meningococcal carriage in Dutch adolescents and young adults; a cross-sectional and longitudinal cohort study. *Clinical Microbiology and Infection*. 2017 m.;23(8):573-e1.
85. McMillan M, Walters L, Sullivan T, Leong LEX, Turra M, Lawrence A, ir kt. Impact of meningococcal B (4CMenB) vaccine on pharyngeal *Neisseria meningitidis* carriage density and persistence in adolescents. *Clinical Infectious Diseases*. 2021 m.;73(1):e99–106.
86. Urwin R, Russell JE, Thompson EAL, Holmes EC, Feavers IM, Maiden MCJ. Distribution of surface protein variants among hyperinvasive meningococci: implications for vaccine design. *Infect Immun*. 2004 m.;72(10):5955–62.
87. Sofer-Sali N, Roif-Kaminsky D, Motro Y, Khalfin B, Avramovich E, Galor I, ir kt. Prevalence and characteristics of carriage of *Neisseria meningitidis* among young Israeli adults. *Open Forum Infectious Diseases*. Oxford University Press US; 2022. p. ofac482.
88. Asturias EJ, Bai X, Bettinger JA, Borrow R, Castillo DN, Caugant DA, ir kt. Meningococcal disease in North America: Updates from the Global Meningococcal Initiative. *Journal of Infection*. 2022 m.;
89. McMillan M, Koehler AP, Lawrence A, Sullivan TR, Bednarz J, MacLennan JM, ir kt. B part of it school leaver study: a repeat cross-sectional study to assess the impact of increasing coverage with meningococcal B (4CMenB) vaccine on carriage of *Neisseria meningitidis*. *J Infect Dis*. 2022 m.;225(4):637–49.
90. Oldfield NJ, Harrison OB, Bayliss CD, Maiden MCJ, Ala'Aldeen DAA, Turner DPJ. Genomic analysis of serogroup Y *Neisseria meningitidis* isolates reveals extensive

- similarities between carriage-associated and disease-associated organisms. *J Infect Dis.* 2016 m.;213(11):1777–85.
91. Säll O, Stenmark B, Glimåker M, Jacobsson S, Mölling P, Olcen P, ir kt. Clinical presentation of invasive disease caused by *Neisseria meningitidis* serogroup Y in Sweden, 1995 to 2012. *Epidemiol Infect.* 2017 m.;145(10):2137–43.
 92. Trotter CL, Maiden MCJ. Meningococcal vaccines and herd immunity: lessons learned from serogroup C conjugate vaccination programs. *Expert Rev Vaccines.* 2009 m.;8(7):851–61.
 93. Gabutti G, Stefanati A, Kuhdari P. Epidemiology of *Neisseria meningitidis* infections: case distribution by age and relevance of carriage. *J Prev Med Hyg.* 2015 m.;56(3):E116.
 94. Marjuki H, Chang HY, Topaz N, Whaley MJ, Vuong J, Chen A, ir kt. Genetic Diversity of Meningococcal Serogroup B Vaccine Antigens among Carriage Isolates Collected from Students at Three Universities in the United States, 2015–2016. *mBio.* 2021 m.;12(3):e00855-21.