

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko - technologická

Testování imunogenity vakcín proti meningokokům séroskupiny A
sérologickými metodami
Bc. Beáta Kovačová

Diplomová práce
2012

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 25. 4. 2012

Beáta Kovačová

Ráda bych tímto poděkovala Mgr. Petře Kučerové za zprostředkování zajímavého tématu diplomové práce, za vedení, pozornost, pomoc a čas, který mi během mé práce věnovala. Rovněž děkuji RNDr. Petře Mosio Ph.D. za odborný dohled. Děkuji také MVDr. Zuzaně Čermákové za poskytnuté odborné rady, Mgr. Otovi Pavlišovi za příjemnou spolupráci.

V neposlední řadě děkuji MUDr. Petru Dítěti a Centru biologické ochrany, Těchonín za poskytnutí vzorků, pracovních pomůcek a materiálů.

ANOTACE

Tato diplomová práce je zaměřena na ověření deklarované imunogenity konjugované vakcíny **Menveo** (fy Novartis).

Účinnost vakcíny byla zjišťována metodou sérového baktericidního testu, která je doporučována jako jedna z vhodných metod pro stanovení protilátek proti meningokokům v séru. Vyšetřovanými vzorky byla séra odebraná od příslušníků Armády České republiky.

KLÍČOVÁ SLOVA

Neisseria meningitidis, vakcinace, **Menveo**, sérový baktericidní test

TITLE

Testing of immunogenicity of vaccines against meningococci serogroup A with using of serological methods.

ANNOTATION

The aim of the thesis is to verify the declared immunogenicity of the conjugate vaccine *Menveo* (by company Novartis).

The efficacy of vaccine was tested with use of a Serum Bactericidal Assay which is recommended as one of the possible method for determination of antibody titer in serum. Blood samples were obtained from members of Armed Forces of the Czech Republic.

KEYWORDS

Neisseria meningitidis, vaccination, **Menveo**, Serum Bactericidal Assay

SEZNAM ZKRATEK

AČR	Armáda České republiky
App	adhezivní a penetrační protein (z angl. adhesion and penetration protein)
CAMP	kationický antimikrobiální peptid (z angl. cationic antimicrobial peptides)
CEACAM	rodina karcinoembryonálních antigenů (z angl. carcinoembryonic antigen - related cell - adhesion molecule)
CFU	jednotky formující kolonie (z angl. colony forming unit)
CNCTC	Česká národní sbírka typových kultur
CSF	kolonie stimulující faktor (z angl. colony stimulating factor)
DIK	diseminovaná intravaskulární koagulopatie
ELISA	enzymová imunoanalýza (z angl. Enzyme – Linked Immunosorbent Assay)
GC	gonokokový (z angl. gonococcal)
HEB	hematoencefalická bariéra
Hmbr	hemoglobin vázající receptor (z angl. hemoglobin binding receptor)
HSPG	rodina proteoglykanů obsahující heparansulfát (z angl. heparansulfate proteoglykan)
IL	interleukin
LbpA	laktoferin vázající protein A (z angl. lactoferin binding protein A)
LbpB	laktoferin vázající protein B (z angl. lactoferin binding protein A)
LOS	lipooligosacharid
MAC	membránu atakující komplex (z angl. membrane attack complex)
MBL	manózu vázající lektin (z angl. mannan binding lectin)
MCV	membránový kofaktorový protein (z angl. membrane cofactor protein)
MLEE	multilokusová enzymová elektroforéza
MLST	multilokusová sekvenční typizace
N.	rod <i>Neisseria</i>
NCAM	adhezivní molekulou neurálních buněk (z angl. neural cell - adhesion molecule)
NhhA	neisseriový homolog A (z angl. <i>Neisseria</i> hia homologue A)
PAF	faktor aktivující krevní destičky (z angl. platelet activating factor)

PCR	polymerázová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction)
SBA	sérový baktericidní test (z angl. Serum Bactericidal Assay)
SZÚ	Státní zdravotní ústav
TNF	tumor nekrotizující faktor (z angl. tumor necrosis factor)
TbpA	transferin vázající protein A (z angl. transferin binding protein A)
TbpB	transferin vázající protein B (z angl. transferin binding protein B)
WFS	Waterhousův-Fridrichsenův syndrom

Obsah

1 ÚVOD	11
1.1 Historie a taxonomie	12
1.2 Morfologie buněk.....	12
1.3 Antigenní struktura a faktory virulence	12
1.3.1 Polysacharidové pouzdro	13
1.3.2 Lipooligosacharid (LOS)	13
1.3.3 Pili	14
1.3.4 Proteiny vnější membrány	14
1.4 Přenos a rizikové faktory vzniku onemocnění.....	16
1.5 Patogeneze	17
1.6 Imunitní odpověď na bakteriální infekci	19
1.6.1 Přírozená imunita	19
1.6.2 Specifická imunita.....	21
1.7 Onemocnění vyvolaná <i>N. meningitidis</i>	22
1.8 Epidemiologie.....	23
1.9 Terapie.....	27
1.9.1 Antibiotická léčba	27
1.9.2 Léčba steroidy.....	27
1.9.3 Léčba komplikací meningokokových infekcí.....	28
1.10 Prevence.....	28
1.11 Přímý průkaz <i>N. meningitidis</i>	30
1.11.1 Vyšetřovaný materiál	30
1.11.2 Kultivace	30

1.11.3 Mikroskopie	31
1.11.4 Biochemické testy	31
1.11.5 Serologická typizace	32
1.11.6 Molekulárně-biologické metody	32
1.12 Nepřímý průkaz <i>N. meningitidis</i>	34
1.12.1 Sérový baktericidní test	34
1.12.2 Enzymová imunoanalýza	35
1.12.3 Dot –ELISA.....	35
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	36
2.1 Materiál	36
2.1.1 Analyzovaná séra.....	36
2.1.2 Referenční kmene <i>N. meningitidis</i> séroskupiny A a C.....	36
2.1.3 Kultivační média	36
2.1.4 Rostoky, činidla a chemikálie.....	36
2.1.5 Přístroje a pomůcky	37
2.2 Pracovní postup.....	38
2.2.1 Oživení referenčního kmene <i>N. meningitidis</i>	38
2.2.2 Ověření biochemických vlastností <i>N. meningitidis</i>	38
2.2.3 Mikroskopie	39
2.2.4 Volba vhodné sérologické metody pro detekci specifických protilátek	39
3 VÝSLEDKY	46
3.1 Růst <i>N. meningitidis</i> na různých kultivačních mediích.....	46
3.2 Produkce katalasy u referenčního kmene <i>N. meningitidis</i>	46
3.3 Produkce cytochromoxidasy u referenčního kmene <i>N. meningitidis</i>	46
3.3 Pozorování preparátu <i>N. meningitidis</i> obarveného dle Grama	46

3.4 Detekce specifických protilátek metodou SBA	46
4 DISKUZE A ZÁVĚR.....	50
PŘÍLOHY	55
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	59

1 ÚVOD

Neisseria (N.) meningitidis je společně s *N. gonorrhoeae* jedním ze dvou primárně patogenních zástupců rodu *Neisseria* spadajícího do čeledi *Neisseriaceae*. Meningokoky jsou rozšířeny celosvětově s charakteristickým výskytem jednotlivých séroskupin dle vyspělosti států.

Mají řadu struktur, které jim usnadňují invazi a přežití v organismu hostitele, kde mohou způsobovat jak neinvazivní (např. faryngitidy), tak i invazivní infekce. Právě invazivní infekce, které se projevují jako meningokoková meningitida nebo sepse, jsou velice nebezpečné pro všechny věkové skupiny a mohou končit i letálně. Nejvíce jsou jimi ohroženy děti do jednoho roku, které ještě nemají zcela vyvinutý imunitní systém a jejich obrana proti infekci je tedy nedostatečná. Nejúčinnější možností ochrany proti meningokokovému onemocnění je vakcinace jednou z pěti dostupných vakcín na českém trhu. Avšak ani vakcinace nemá stoprocentní preventivní účinek. K vytvoření protektivního titru protilátek nedochází u všech očkovaných osob. Dalším problémem je fakt, že v současnosti neexistuje žádná vakcína, která by indukovala tvorbu protilátek proti všem séroskupinám meningokoků.

Hlavní myšlenkou práce bylo tedy ověřit, zda se titry protilátek po aplikaci vakcíny **Menveo** shodují s deklarovanými protektivními hodnotami určenými výrobcem. Mimo to jsme ještě zjišťovali závislost vytvořeného titru protilátek u imunizovaných osob na jejich věku.

1.1 Historie a taxonomie

Počáteční zmínky o onemocnění způsobené *N. meningitidis* se datují již do 16. století. Avšak první, kdo popsal toto onemocnění, byl v roce 1805 Vieusseux, který dokumentoval přesný popis meningokokové sepse v souvislosti s 33 úmrtími v Ženevě. V roce 1884 Marchiafava a Celli objevili intracelulární kok ve vzorku mozkomíšního moku. O tři roky později Anton Weichselbaum objasnil souvislost mezi epidemickou cerebrospinální meningitidou a *N. meningitidis*, v té době ještě známou jako *Diplococcus intracellularis meningitidis*. Rod *Neisseria* získal svoje pojmenování po Albertu Neisserovi, který roku 1879 identifikoval původce kapavky, bakterii *N. gonorrhoeae*. Na začátku 20. století, Simon Flexner připravil koňské antisérum pro imunizaci zvířat. [1,2,3].

Meningokoky z hlediska taxonomie patří do řádu *Neisseriales*, čeledi *Neisseriaceae* a rodu *Neisseria*. V tomto rodu je v současnosti známo 28 druhů a 3 poddruhy, mezi které patří i *N. meningitidis* [4].

1.2 Morfologie buněk

N. meningitidis jsou gramnegativní koky. Ve většině případů se vyskytují se ve formě diplokoků, popřípadě mohou vytvářet krátké řetízky. Jednotlivé koky k sobě přiléhají zploštělými stranami. Tento útvar je pro rod *Neisseria* typický, připomíná tvar kávových zrn a zjednodušuje jejich identifikaci v mikroskopu.

Průměr neisserií se pohybuje od 0,5 do 1 μm [5].

1.3 Antigenní struktura a faktory virulence

Jelikož se jedná o obligátní patogeny, meningokoky mají řadu struktur, které jim umožňují invazi, přežití a obranu před imunitním systémem hostitele. Hlavní protektivní funkci však zastává pouzdro.

1.3.1 Polysacharidové pouzdro

Pouzdro nevytváří všechny meningokoky, ale pouze některé. Na základě jeho antigenní variability dělíme meningokoky do 13 séroskupin: A, B, C, D, E, H, I, K, L, W-135, X, Y, a Z. U séroskupin B, C, W135 a Y je pouzdro tvořeno různými polymery kyseliny sialové (5-*N*-acetyl neuramová kyselina). Přítomnost této kyseliny činí meningokoky méně rozpoznatelné pro imunitní systém hostitele, jelikož tato kyselina je také přirozenou součástí některých povrchů lidského organismu. Největší podobnost se strukturami lidského těla má meningokoková séroskupina B, jejíž pouzdro je identické s adhezivní molekulou neurálních buněk (NCAM – z angl. neural cell - adhesion molecule). Meningokoková séroskupina A má jako jediné pouzdro složené z homopolymeru N-acetyl-D-mansaamin-1-P). Pouzdro má antigenní a imunogenní funkci, indukuje tvorbu specifických protilátek, proto je také využíváno pro tvorbu vakcín. Jeho hlavní úlohou je ochránit bakteriální buňku před účinky fagocytů a komplementového systému [6]. Předpokládaným mechanismem obrany je zvýšení odolnosti vůči kationickému antimikrobiálnímu peptidu (CAMP - cationic antimicrobial peptide) [7]. Tyto peptidy mají ochrannou funkci, jsou produkovány především neutrofily, které pohltily bakteriální buňku, ale také ve značném množství epiteliálními a mukózními buňkami v místě infekce. Přítomnost pouzdra však meningokokům nepřináší pouze výhody. Pokud meningokokové exprimují pouzdro, dochází k maskování adhezínů a invazinů, tudíž přichycení a invaze do epitelových buněk je ztížena až potlačena [7,8].

1.3.2 Lipooligosacharid (LOS)

LOS je důležitým faktorem pro přichycení a invazi meningokoků do epiteliálních buněk nosohltanu. Jedná se o endotoxin, jehož vlastní toxickou částí je lipid A, který se váže se na jádro složené z dvou jednotek 3-deoxy-D-mano-2-oktulozonové kyseliny a dvou heptos. Na každou z heptos je navázán jeden cukerný řetězec, s označením α nebo β . Variabilita posloupnosti cukerných složek v jednotlivých řetězcích určuje příslušnost k určitému imunotypu. V současnosti je známo 11 imunotypů, jejichž označení se uvádí velkými písmeny L s arabskou číslicí [6,9]. LOS je hlavní prozánětlivý mediátor zodpovědným za vznik meningokokových sepsí a meningitid. Indukuje produkci

interleukinu (IL) 1, IL-6 a tumor nekrotizujícího faktoru (TNF) a některých chemokinů [10,11].

1.3.3 Pili

Pili jsou vláknité struktury proteinového charakteru důležité pro adhezi meningokoků na receptory epiteliálních buněk nosohltanu. Konkrétně se vážou na membránový kofaktorový protein (MCP - z angl. membrane cofactor protein) neboli receptor CD 46, což je regulátor komplementu [12,13]. Pili jsou přítomny hlavně u meningokoků, které nemají pouzdra [13].

1.3.4 Proteiny vnější membrány

Meningokoky mají na svém povrchu také tzv. proteiny vnější membrány, na základě jejichž antigenní struktury jsou meningokoky řazeny do sérotypů a subtypů [14].

IgA1 proteasa

Její specifickou funkcí je deaktivace protilátek třídy IgA, které jsou součástí slizniční imunity [12].

Proteiny spjaté s opacitou

Funkcí Opa proteinů je rozpoznání a vazba na receptory patřící mezi rodinu karcioembryonálních antigenů (CEACAM – z angl. carcinoembryonic antigen - related cell - adhesion molecule). Receptory CEACAM můžeme nalézt na epitelových a endotelových buňkách a granulocytech. Opa proteiny exprimují kromě meningokoků také gonokoky [6].

Na rozdíl od Opa jsou Opc proteiny přítomny pouze u *N. meningitidis*. Funkce Opc proteinů je shodná s Opa, liší se však typem receptorů, na které se váží. Jejich cílové receptory jsou z rodiny proteoglykanů obsahujících heparansulfát (HSPG - z angl. heparansulfate proteoglykan) na endotelových buňkách [6].

Vazba Opa a Opc proteinů na receptory vyvolá v hostitelské buňce signály indukující endocytózu meningokoků.

Minoritní adheziny

Jedná se o poměrně nově objevené struktury, mezi které patří neisseriový adhezín A (NadA – z angl. Neisserial adhesion A). Je známo, že NadA reaguje s lidskými epitelovými buňkami cestou interakce protein – protein, avšak konkrétní receptory, na které se váže, nebyly ještě odhaleny. Dále se do této skupiny zařazuje neisseriový homolog A (NhhA – z angl. *Neisseria* hia homologue A) přítomný v malých množstvích na epitelových buňkách. Adhezivní a penetrační protein (App – z angl. adhesion and penetration protein) a meningokoková serinová proteáza (MspA – z angl. meningococcal serine protease A) jsou sekreční proteiny uvolňované některými virulentními meningokoky, u nichž se předpokládá vazba na dosud nedefinované receptory [6].

Poriny

Na základě antigenní variability porinů lze meningokoky rozdělit do sérotypů a subtypů. Sérotypy se označují arabským číslem, někdy s malým písmenem abecedy a označují různé varianty Porinu B na vnější membráně buňky. Subtypy nesou označení velkým písmenem P a číslem a označují také typy porinu, ale Porinu A. Poriny umožňují meningokokům přežít v krevním oběhu. Porin A má afinitu k C4 vazebnému proteinu (C4bp – z angl. C4-binding protein), jež je regulátorem komplementu. Porin B má anti – apoptický efekt u epitelových buněk, tudíž umožňuje přežití i infikované buňky [6].

Systém vycytávající železo

Získávání železa z hostitelského organismu je podmínkou pro přežití *N. meningitidis* v krevním řečišti.

Železité ionty jsou převážnou většinou v lidském těle vázány na bílkoviny. Intracelulárně je železo uloženo ve formě ferritinu a vázané na hemoglobin. Extracelulárně ho můžeme nalézt ve spojení s proteiny transferinem a laktoferinem. Meningokoky jsou schopni ze všech jmenovaných molekul, s výjimkou ferritinu, železo získávat a využívat jej pro přežívání v hostiteli.

Získávání železa u meningokoků je zprostředkováno specifickými receptory, jež jsou přítomny na vnější membráně bakteriální buňky. Podle zdroje železa se liší také typ receptoru, který tuto vazbu umožňuje.

Pro vazbu na transferrin využívá *N. meningitidis* dva typy receptorů transferrin vázající protein A a B (TbpA, TbpB – z angl. transferrin binding protein).

Laktoferinové receptory jsou také dva, a to laktoferin vázající protein A (LbpA – z angl. lactoferin binding protein A) a laktoferin vázající protein B (LbpB - z angl. lactoferin binding protein B).

Receptor, jenž rozpoznává proteinový komplex s navázaným železem – hemoglobin, je tzv. hemoglobin vázající receptor (HmbR – z angl. hemoglobin binding receptor).

Komplex haptoglobin – hemoglobin může být také zdrojem železa pro meningokoky, kteří ale musí mít specifický receptor označovaný HpuAB. Jedná se o dvousložkový transporter, který může vázat železo, jak z uvedeného komplexu, tak i ze samotného hemoglobinu [15,16].

1.4 Přenos a rizikové faktory vzniku onemocnění

Přenos infekce je možný pouze interhumánně. Může k němu dojít vzdušnou cestou formou kapénkové nákazy, nebo přenosem sekretů ústní dutiny u osob v dlouhodobém blízkém kontaktu [17,18].

Zdrojem nákazy může být nosič nebo nemocný člověk [19,20]. Výjimečně jsou zaznamenány přenosy jinou formou, např. při operacích [1].

I když je *N. meningitidis* považována za primárně patogenní mikroorganismus, existuje malé procento populace, u nějž tato bakterie dlouhodobě perzistuje, aniž by způsobovala vznik patologického procesu. Nosičství bylo prokázáno zhruba u 10 % zdravých jedinců [20], u kterých meningokok kolonizuje tonsily a nosohltan. Převažuje nosičství meningokoků séroskupiny B před ostatními séroskupinami. Nosičství je také častěji popisováno u mužů a kuřáků [22].

Rizikové faktory

- **Věk** - je jedním z hlavních rizikových faktorů. Nejvíce ohrožené jsou děti do 4 let věku. Důvodem zvýšeného rizika je ještě plně nevyvinutý imunitní systém, zejména nedostatečná tvorba specifických protilátek [21,23].

- **Uzavřené komunity** - meningokokové infekce se často vyskytují a hlavně se rychle šíří v uzavřeném společenství lidí, např. ve vojenských ubytovnách, internátech a jiných [26].
- **Socioekonomická úroveň** - nízká socioekonomická úroveň bývá také spojována s vyšším výskytem meningokokových nákaz [21,24].
- **Kouření** - týká se jak aktivních, tak i pasivních kuřáků. U obou typů kuřáků je zvýšené riziko invazivního onemocnění i samotného nosičství [12,21].
- **Deficity imunitního systému** - ohroženi jsou pacienti jak s primárními, tak i se sekundárními deficity. Mezi primární choroby, jež mohou mít za následek rozvoj meningokokové infekce, patří hlavně imunodeficity spojené s poruchou komplementu nebo protilátkové imunity. Sekundární (získané) imunodeficity zahrnují stavy spojené s infekcí HIV, stavy po splenektomii či po poškození sleziny [18,23,24].
- **Koinfekce horních dýchacích cest** - (jak virového, tak i bakteriálního původu) mezi něž patří např. infekce virem influenza A nebo bakterií *Mycoplasma pneumoniae* [26].

Samozřejmě existuje i řada jiných predispozičních faktorů, které usnadňují propuknutí infekce, avšak těchto šest uvedených patří mezi nejčastěji zjišťované u pacientů s meningokokovými nákazami.

1.5 Patogeneze

Vznik a progresse meningokokových onemocnění je charakterizován adhezí meningokoků na buňky slizničního epitelu, jejich průnikem přes sliznici a následným přežíváním v krevním řečišti.

V prvním kroku, přilnutí na sliznici nosohltanu, se uplatňují pili, které se váží na receptor CD46. Usnadnění kolonizace podporují některé z výše zmíněných rizikových faktorů, převážně kouření a probíhající koinfekce horních cest dýchacích. Tato vazba meningokoka se označuje jako vazba primární. Sekundární vazba je zprostředkovaná proteiny vnější membrány - Opa a Opc. Primární a sekundární vazba indukuje pohlcení meningokoka epitelovou buňkou, přes niž se dostává do krevního oběhu. Pro přežití

meningokoků je důležitá jejich schopnost získávat železo z hostitelského organismu a velkou roli také hraje přítomnost pouzdra, které ho chrání proti komplementovému systému a fagocytujícími buňkami (neutrofilů, Kupfferovými buňkami a makrofágy), jelikož imunitní systém ihned aktivuje komplement lektinovou a alternativní cestou. Tvorba specifických protilátek se dostavuje až jeden týden po infekci [12].

Meningokoky mají vysokou afinitu k meningům. Zatím ale nebylo objasněno, co je příčinou a ani nebyl odhalen mechanismus, kterým překonají hematoencefalickou bariéru (HEB). Na mozkových plenách probíhá nekontrolovatelné množení bakterií, jelikož přes HEB neprochází žádné složky imunitního systému. Dochází k uvolňování obrovského množství endotoxinu, který aktivuje řadu cytokinů se zánětlivým účinkem, jako je IL-1, IL-6, IL-8, TNF, kolonie stimulující faktor (CSF – z angl. colony stimulating factor), faktor aktivující krevní destičky (PAF – z angl. platelet activating factor). Jsou také uvolňovány molekuly přesně opačným účinkem, tzn. protizánětlivým, a to IL-10, IL-12 a mnoho dalších. Uvolněný IL-1 a TNF způsobí zvýšení permeability a umožní průchod aktivovaným neutrofilům přes HEB. Tento patologický stav charakterizujeme jako meningokokovou meningitidu [12]. Jedná se o zánětlivou reakci na mozkových blanách a zduření mozkových obalů, což je doprovázeno vzestupem intrakraniálního tlaku [12,27].

Další možností, jak odpoví imunitní systém na přítomnost bakterie, je vznik sepse. Obecně se sepsa popisuje jako systémová zánětlivá reakce v důsledku přítomnosti infekčního agens [28]. Hlavním důvodem vzniku sepse je přítomnost bakteriálního endotoxinu, jenž má značné indukční účinky na uvolnění tkáňového faktoru a tímto mechanismem spouští vnější cestu koagulační kaskády. Ovlivňuje také produkci aktivátoru tkáňového plasminogenu, který naopak způsobuje fibrinolýzu a následně umožňuje další šíření infekce [12]. Kromě koagulační kaskády ovlivňuje endotoxin také komplementový systém. Způsobuje nekontrolovatelnou aktivaci komplementu klasickou cestou. Při sepsi dochází stejně jako u meningitidy k uvolnění velkého množství zánětlivých a protizánětlivých cytokinů. Výsledkem všech těchto procesů je poškození endotelu cév, zvýšení permeability cév a vasodilatace a vznik intravaskulárních trombů. To vše může mít za následek rozvoj septického šoku a diseminované intravaskulární koagulopatie (DIK) [29].

1.6 Imunitní odpověď na bakteriální infekci

Překonání ochranných bariér meningokoky vyvolá v lidském těle kompletní obrannou reakci, při níž se uplatní humorální a buněčné složky přirozené i specifické imunity. Nejedná se o izolované reakce, ale o kooperaci všech složek, které se vzájemně aktivují nebo zesilují svoje účinky. Nezastupitelnou roli v obraně organismu při infekci *N. meningitidis* hrají hlavně komplement a protilátky [30].

1.6.1 Přirozená imunita

Komplement

Komplement zastupuje humorální složku vrozené imunity. Přestavuje ho zhruba 30 molekul, které jsou přítomny na povrchu buněk nebo jsou rozpuštěny v plazmě. Funkce komplementového systému jsou hlavně opsonizace, chemotaxe a lýza buněk.

Možnosti aktivace komplementu jsou tři: alternativní, klasickou a lektinovou cestou. Následně dochází k postupné kaskádové reakci jednotlivých složek, které ve svém výsledku mohou způsobit rozpad bakteriální buňky.

Alternativní cesta aktivace komplementu

Prvním krokem v kaskádové reakci je autoaktivace složky C3. Uvnitř molekuly dojde k rozštěpení thioesterové vazby a vznikají dva fragmenty C3a a větší C3b. Fragment C3b se aktivně váže na okolní povrchy s -OH nebo -NH₂ skupinami, které mohou být přítomny jak na povrchu bakteriálním, tak eukaryotické buňky. Tento navázaný fragment má receptor pro faktor B a H. Faktor B se váže v případě, že buňka má v sobě zakomponováno pouze malé množství kyseliny sialové, což je znakem bakteriálních buněk. V opačném případě se jedná o eukaryotickou buňku a pak dochází k vazbě faktoru H.

Pokud se tedy jedná o bakteriální buňku, dojde k rozštěpení faktoru B pomocí faktoru D na složky Ba a Bb. Právě druhá z uvedených složek se váže na vazebné místo molekuly C3b a tímto vzniká tzv. alternativní konvertasa C3bBb. Její vlastností je enzymatické štěpení iniciační složky komplementu - C3, čímž dochází k zesílení celé reakce.

Lidský organismus musí být schopný regulovat funkci komplementu, aby nedocházelo k ničení vlastních zdravých (eukaryotních) buněk. K tomu je využíván právě faktor H, jež se naváže na větší fragment složky C3. Faktor H spolu s faktorem I způsobí inaktivaci C3b a zastaví obranou reakci. Následně dojde k rozpadu C3b na menší neúčinné fragmenty.

Klasická cesta aktivace komplementu

Klasická cesta je závislá na přítomnosti protilátek. Z toho je zřejmé, že se tento způsob aktivace uplatní až v pozdějších stádiích infekce, kdy už došlo k jejich tvorbě. Na antigen prezentovaný na povrchu bakteriální buňky se naváže jedna protilátka třídy IgM nebo tři protilátky třídy IgG, vazbou se pozmění jejich konformace a tím se odhalí vazebné místo pro C1 složku komplementu. C1 je komplex jednotek C1q C1s a C1r. C1q zahajuje vazbu na Fc části imunoglobulinů. C1s a C1r se naváží společně na C1q, tím C1s nabude proteolytické aktivity a štěpí jednotky C4 a C2 na fragmenty. Vzniká klasická konvertasa C4bC2a, jež se váže na bakteriální povrch a pokračuje v kaskádě štěpení. Dochází tak k lýzi složky C3 na dva fragmenty C3a a C3b, C3b navázáním zahajuje terminální fázi komplementové reakce.

Lektinová cesta aktivace komplementu

Lektinová aktivační cesta je obdobou klasické cesty. Jediným rozdílem je iniciace procesu sérovými lektiny. Hlavní úlohu hraje tzv. manózu vázající lektin (MBL - z angl. mannan – binding lectin)

Závěrečná lytická fáze je společná všem cestám. Vznikající C3b fragment vytváří C5-klasickou nebo C5-alternativní konvertasu, která štěpí C5 na fragmenty C5a a C5b. C5b se váže na buněčný povrch a spolu se složkami C6, C7, C8 a C9 (multimerní komplex 13 - 18 molekul) utváří tzv. komplex napadající membránu (MAC – z angl. membrane attack complex). Póry, které se začínají v membráně objevovat, vedou k osmotické lýze buňky [31,32].

1.6.2 Specifická imunita

Buněčnou složku specifické imunity tvoří T a B lymfocyty, humorální zastupují protilátky.

B lymfocyty a protilátková imunita

Diferenciace B lymfocytů probíhá na dvou místech v kostní dřeni a sekundárních lymfatických orgánech. Nejprve dochází ke zrání B lymfocytu v kostní dřeni. V této fázi se buňka neseťká s cizorodým antigenem, proto je označována jako na antigenu nezávislá. V kostní dřeni je ale ověřována schopnost B lymfocytu tolerovat vlastní struktury předkládáním pro tělo vlastních antigenů, aby nedocházelo k autoreaktivitě. Na konci této fáze je na povrchu lymfocytu exprimován receptor BcR, který vznikl náhodným přeskupením genových segmentů. Tento receptor nevznikl na podnět určitého antigenu, proto bude reagovat s náhodným antigenem, se kterým se setká.

Další stádium zrání spočívá v přesunu buňky do periferních lymfatických tkání. Lymfocyt cestuje mezi lymfatickými orgány do doby, než se setká a patřičným antigenem. Antigeny jsou do periferií přiváděny buňkami prezentujícími antigen, kam patří i samotné B lymfocyty, nebo ve vazbě na T lymfocyty. Po setkání B lymfocytu s antigenem buňka vycestuje zpátky do kostní dřeni, kde následuje terciální stadium, tzn. tvorba plazmatické buňky.

Aby došlo ke změně B lymfocytu na plazmatickou buňku, je třeba nezbytné asistence Th lymfocytů. Th lymfocyty produkují cytokiny, které B lymfocyt stimuluje spolu s membránovými interakcemi mezi těmito dvěma typy buněk. Rozeznáváme tři typy Th lymfocytů, které vznikají ze stejného prekurzoru Th0. Syntézu protilátek regulují Th2 lymfocyty. Protilátky, které jsou secernovány plazmatickými buňkami, mají za úkol buď neutralizovat bakteriální exoprodukty nebo, jako v případě *N. meningitidis*, opsonizovat povrch bakterie. Takto dojde k aktivaci fagocytózy a aktivaci komplementu klasickou cestou.

V počátcích infekce jsou nejdříve produkovány protilátky třídy IgM, postupným izotopovým přesmykem dochází ke vzniku protilátek dalších tříd, tzn. IgG, IgA, popř. IgE a IgD. Při dlouhodobějším trvání infekce dochází k zesílení afinity sekretovaných protilátek na bakteriální antigen.

Velkou roli v imunitní odpovědi hraje vznik tzv. imunologické paměti. Hlavní úlohu v imunologické paměti hrají B lymfocyty, ze kterých se vytvářejí paměťové buňky. Pokud dojde k setkání této buňky s antigenem, se kterým už byla v předchozím kontaktu, rychleji a intenzivněji začne produkovat protilátky třídy IgG a IgA. Tento proces je základním kamenem aktivní imunizace [32].

1.7 Onemocnění vyvolaná *N. meningitidis*

Invazivní infekce *N. meningitidis* se manifestuje jako meningitida (50 % případů), sepse (7 - 10 % případů), anebo může mít smíšenou formu (40 % případů). Kromě těchto závažných stavů se meningokoková infekce může také prezentovat jako neinvazivní, a to nejčastěji jako faryngitida [17]. Inkubační doba meningokokových nákaz se pohybuje v rozmezí 1 - 8 dní [33].

Meningitida

Zánět mozkových blan je charakterizován většinou rychlou progresí onemocnění s počátečním prodromálním stádiem, které se může projevovat zvýšenou teplotou, nevolností, zvracením, podrážděností, letargií, bolestmi svalů či nechutenstvím. Často se také vyskytují dýchací obtíže a bolest v krku [34,35]. Mezi klasické příznaky meningitidy patří horečka, bolesti hlavy, strnutí šíje, nauzea, zvracení, fotofobie či další psychické poruchy [18].

Sepse

Sepse je stav, při kterém musí být splněny alespoň dvě z následujících podmínek: snížená tělesná teplota pod 36 °C nebo naopak zvýšená nad 38 °C, tachykardie (> 90/min), tachypnoe a změny v diferenciálním počtu leukocytů. Při těžké sepsi dochází následně k vážným orgánovým dysfunkcím. Při rozvoji hypotenze, upadá pacient do septického šoku.

Diagnostika sepse u dětí je mnohem složitější než u dospělých. Teplota musí být pod 36 °C nebo nad 38,5 °C. Hodnoty dalších parametrů používaných jako diagnostické

markery (srdeční činnost, dechová frekvence, krevní tlak, počet leukocytů) se liší podle věku dítěte [28].

Výraznou známkou meningokokové sepse jsou petechie, které mohou přecházet v sufúze (viz příloha 5). Při DIK se rozvíjí tzv. fulminantní purpura (viz příloha 6), spontánní krvácení do kůže a sliznic. U letálních případů dochází k multiorgánovému selhání [29,36].

Waterhousův-Fridrichsenův syndrom

U meningokokého onemocnění může také propuknout tzv. Waterhousův - Fridrichsenův syndrom (WFS), což je velmi závažný stav, který bezprostředně ohrožuje život pacienta. Projevy jsou rozmanité a mohou postihnout kterýkoliv orgán lidského těla. V důsledku vzniku sepse a šoku se vytvářejí hemoragie v nadledvinkách, což je typické pro WFS [37,38]. Dochází k porušení sekrece hormonů a homogenity vnitřního prostředí. Morbidita je závislá na rozsahu poškození tkáně nadledvinek [38].

Ve většině případů se objevují kožní příznaky, jako jsou petechie nebo hemoragie. Kromě kůže mohou být přítomny také na sliznicích gastrointestinálního traktu a tkáni srdce [38]. Mezi další patologické nálezy patří hypertrofie vnitřních orgánů – především srdce, plic, jater či ledvin [37, 39].

1.8 Epidemiologie

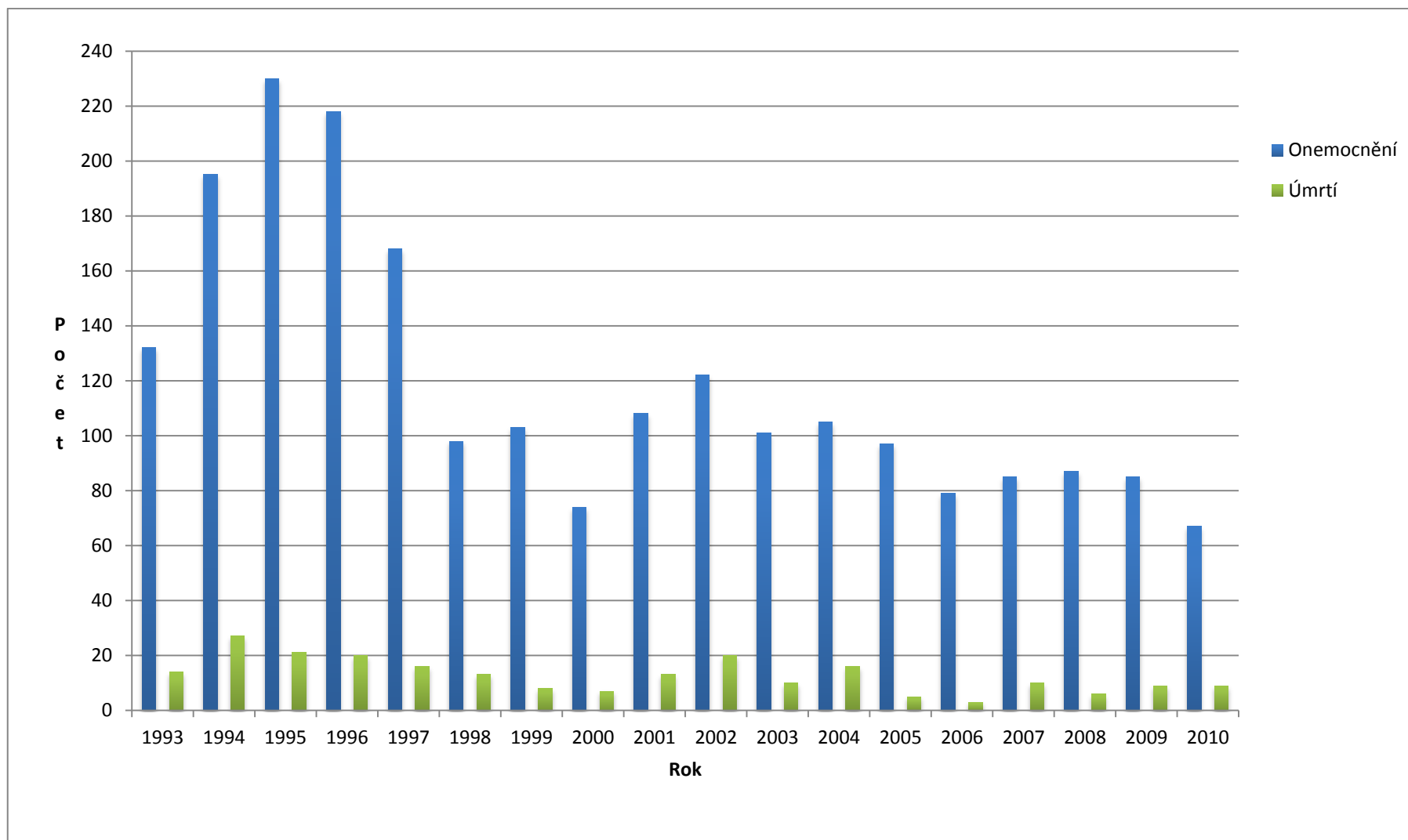
V současnosti je známo již 13 séro skupin meningokoků, celosvětově nejrozšířenější jsou však skupiny A, B, C, Y a W135, které způsobují 90 % všech meningokokových nákaz. Vyšší incidence onemocnění je udávána v zemích třetího světa, v rozmezí 10 - 25/100000 obyvatel. V Saharské a Subsaharské Africe jsou velmi časté epidemie vyvolané meningokoky séro skupiny A, proto je tato oblast nazývána také jako „meningitidový pás“ [12]. Ve vyspělých zemích se nejčastěji objevují infekce způsobené meningokoky séro skupiny B, C, Y, W135, přičemž Y a W135 jsou specifické pro oblast Spojených států amerických a Kanady [6, 12].

V České republice se stejně jako v ostatních vyspělých zemích vyskytují nejčastěji meningokoky séro skupiny B a C, sporadicky můžeme zaznamenat i séro skupiny Y a W135.

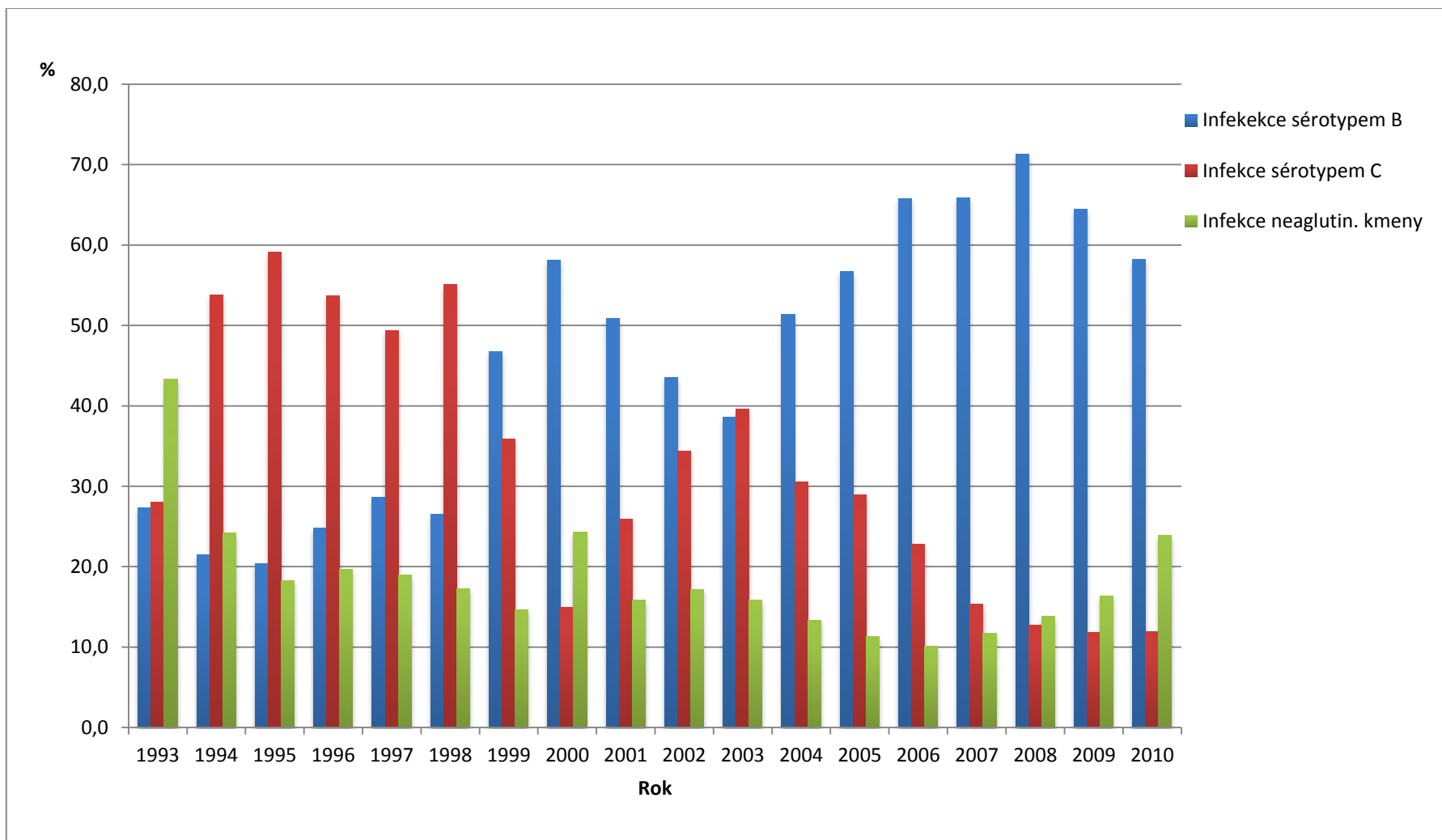
Záznamy Národní referenční laboratoře pro meningokokové nákazy z let 1993 - 2010 poukazují na to, že nejčastější výskyt invazivních meningokokových onemocnění je zaznamenán u dětí do 4 let věku a pak ve skupině mladistvých od 15 - 19 let.

Dále prezentují prudký vzestup invazivního meningokokového onemocnění v letech 1994 - 1997. Od roku 2003 již nedochází k razantnímu vzestupu nakažených. Výskyt invazivních infekcí v České republice v letech 1993 – 2010 dokumentuje graf 1.

Od roku 1999 dochází k poklesu nakažených séroskupinou C a začínají převládat invazivní infekce meningokoky séroskupiny B. Tato skutečnost je patrná z grafu 2.



Graf 1 Epidemiologie invazivních infekcí vyvolaných *N. meningitidis* v letech 1993 – 2010 [40, 41, 42,43].



Graf 2 Infekce meningokoky sérotypu B, infekce meningokoky sérotypu C, infekce neaglutinujícími kmeny meningokoků [40,41,42,43].

1.9 Terapie

Zásadní roli v léčbě invazivních meningokokových infekcí hraje nasazení antibiotické terapie. Další postup spočívá v kompenzaci změn vzniklých šířením a množením bakterie.

1.9.1 Antibiotická léčba

Při pouhém podezření na invazivní meningokokovou infekci by měla být pacientovi poskytnuta antibiotická terapie [21]. Velmi pozitivní účinek na snížení úmrtnosti má parenterální podávání penicilinu. U osob, kterým byl penicilin aplikován ještě před manifestací onemocnění, byla zaznamenána o více než polovinu nižší mortalita než u osob bez této terapie. O více jak 40 % se také snížil rozvoj těžkých následků infekčního procesu [44]. Kromě parenterálního způsobu podávání se provádí také intravenózní aplikace penicilinu [18].

Samozřejmostí by mělo být stanovení citlivosti izolovaného kmene meningokoka na vybraná antibiotika. Pokud se jedná o kmen rezistentní vůči penicilinu či v případě, že je pacient na penicilinové preparáty alergický, lékem druhé volby jsou cefalosporiny [11]. V současnosti jsou nejlepší volbou cefalosporiny třetí generace, např. ceftriaxon [18].

Antibiotická terapie se netýká pouze pacienta samotného, ale i osob, které s ním byly v těsném kontaktu. Jedná se především o členy domácnosti, rodinné příslušníky a blízké známé, se kterými byl nemocný v době 7 dní před onemocněním v kontaktu [18].

Nejdeálnějším prostředkem k profylaxi je rifampicin podávaný dvakrát denně v dávce 600 mg po dobu 2 dní. U dětí se jedná o dávku 10 mg/kg také po dobu 2 dní. Jinou možností je 500 – 750 mg ciprofloxacinu v jedné dávce, ten není ale vhodný pro děti a těhotné ženy. Ceftriaxon v dávce 5 mg/kg jednorázově může být použit k prevenci onemocnění dětí a těhotných žen [17,18].

1.9.2 Léčba steroidy

Obecně je doporučeno podávat 0,15 mg/kg dexametazonu 4x denně po dobu 4 dní. Výhodou tohoto preparátu je jeho protizánětlivé působení, což se projeví obzvláště snížením neurologického poškození. Je možné ho podat již s nasazením antibiotik [45,46].

1.9.3 Léčba komplikací meningokokových infekcí

Léčba spočívá v korekci biochemických a hematologických změn, hlavně anémie, hypoglykémie, koagulopatie a trombocytopenie. Podává se mražená plasma jako zdroj koagulačních faktorů, dále preparáty trombocytů, glukózové infúze apod. Nutností je také stabilizace dýchacích funkcí a krevního oběhu [45].

1.10 Prevence

Nejúčinnější možností ochrany oproti meningokokové nákaze je samozřejmě vakcinace. Na trhu existuje řada firem vyrábějících polysacharidové nebo konjugované vakcíny. V ČR jsou dostupné oba typy vakcín, konkrétně se jedná o vakcíny **NeisVac – C** (fy Baxter), **Menjugate**, **Menveo** (fy Novartis), **Menomune** a **Meningococcal Polysacharide A+C Vaccine** (fy Sanofi – Pasteur). U konjugovaných vakcín se jednotlivé značky liší dle druhu použité bílkoviny. Tento protein se používá pro konjugaci s imunogenním polysacharidem. Samotný protein neindukuje tvorbu protilátek. Polysacharidové vakcíny obsahují pouze samotný pouzderý polysacharid jedné nebo více séro skupin. Vhodnost použití jednoho nebo druhého typu vakcíny závisí především na věku imunizované osoby.

Očkovací schéma se liší podle typu použité vakcíny a věku jedince, jemuž je vakcína podávána. U konjugovaných se aplikuje jedna (**Menveo**), popřípadě dvě (**NeiseVac-C**, **Menjugate**) očkovací dávky. Kojencům v rozmezí 2 - 12 měsíců věku se podávají dvě očkovací dávky v minimálním rozmezí dvou měsíců. Starším dětem a dospělým postačí pouze jedna dávka. U polysacharidových vakcín (**Menomune**, **Meningococcal Polysacharide A+C Vaccine**) je indikována 1 dávka, popř. přeočkování u jedinců s vysokým rizikem kontaktu s *N. meningitidis*.

Všechny vakcíny jsou dodávány ve stejných objemech (0,5ml), mají stejný způsob aplikace a také mají obdobné nežádoucí účinky.

Aplikace se provádí intramuskulárně do anterolaterální části stehna u dětí do 12 měsíců, popř. 24 měsíců věku. U starších dětí a dospělých se provádí imunizace do oblasti deltového svalu. Vakcína **Menomune** je jediná, která se zavádí subkutánně.

Vakcinaci není vhodné provádět u osob s přecitlivělostí na kteroukoliv složku vakcíny a dále u osob s poruchou koagulace. Zvýšená pozornost by měla být věnována osobám s poruchou imunity a po splenektomii.

Nežádoucí účinky jsou poměrně četné, ale ve většině případů nejsou závažné. Dochází hlavně k hyperreaktivě v oblasti vpichu, tzn. zarudnutí, bolesti a otoku. Dále se může objevit bolest celé končetiny nebo hlavy, ospalost, nevolnost, zvracení, průjem, horečka a ztráta chuti k jídlu. Jiné vedlejší účinky jsou vzácné [47,48,49,50,51,52].

Konjugované vakcíny

NeisVac-C (fy Baxter)

NeisVac-C je konjugovaná polysacharidová vakcína s imunizačním efektem proti *N. meningitidis* séroskupiny C. Jedná se o suspenzi 10 µg pouzdrného polysacharidu, jež je konjugován s 10 - 20 µg bílkovinného nosiče, kterým je tetanický toxoid. Vše je adsorbováno na hydratovaný oxid hlinitý. Z této směsi se vytvoří vodný roztok s přídavkem chloridu sodného a rozplní se po 0,5 ml do injekčních stříkaček. Vakcína je vhodná již pro děti od 2 měsíců věku [48].

Menjugate (fy Novartis)

Přípravek Menjugate se také skládá z 10 µg oligosacharidu *N. meningitidis* séroskupiny C (kmen C11) konjugovaného s 12,5 - 25,0 µg proteinu *Corynebacterium diphtheriae* (CRM - 197). Nosičem je stejně jako u předchozí vakcíny hydroxid hlinitý. Opět je možno vakcínu použít u dětí od 2 měsíců věku [49].

Menveo (fy Novartis)

Tato vakcína na rozdíl od předchozích indukuje tvorbu protilátek proti čtyřem séroskupinám *N. meningitidis*, a to A, C, W135 a Y a je vhodná pro očkování dospívajících dětí (od 11 let). Suspenze obsahuje následující složky: 10 mg *N. meningitidis* A oligosacharidu konjugovaného s 16,7 - 33,3 µg proteinu *Corynebacterium diphtheriae* (CRM - 197), 5 µg *N. meningitidis* C oligosacharidu konjugovaného s 7,1 - 12,5 µg *Corynebacterium diphtheriae* (CRM - 197), *N. meningitidis* W135 oligosacharidu konjugovaného s 3,3 až 8,3 µg proteinu *Corynebacterium diphtheriae* a *N. meningitidis*

Y oligosacharidu konjugovaného s 5,6 až 10,0 µg proteinu *Corynebacterium diphtheriae* [50].

Polysacharidové vakcíny

Menomune (fy Sanofi-Pasteur)

Menomune je preparát určený pro děti od 2 let. Tato vakcína není konjugována s proteiny, ale je tvořena pouze čtyřmi typy pouzderných polysacharidů s imunizujícím účinkem. Konkrétně obsahuje 50 µg *N. meningitidis* polysaccharidu A, C, W135 a Y. Na rozdíl od konjugovaných vakcín se Menomune aplikuje subkutánně do oblasti deltového svalu [51].

Meningococcal Polysacharide A+C Vaccine (výrobce Sanofi-Pasteur)

Složení vakcíny je následující: 50 µg polysacharidu *N. meningitidis* A a 50 µg polysacharidu *N. meningitidis* C. Je vhodná pro děti od 2 let věku [52].

1.11 Přímý průkaz *N. meningitidis*

1.11.1 Vyšetřovaný materiál

Při podezření na infekci vyvolanou *N. meningitidis* se odebírá venózní krev a mozkomíšní mok (lumbální punkce). Při odběru likvoru je nutné zvážit kontraindikaci pro zvýšení intrakraniálního tlaku [5].

Další odebíraný biologický materiál záleží na lokalizaci infekce. Může to být synoviální, pleurální nebo perikardiální tekutina [1,5].

1.11.2 Kultivace

Mezi půdy vhodné pro růst meningokoků se řadí krevní a čokoládový agar, dále půdy obohacené antibiotiky, antimykotiky a růstovými faktory jako je Thayer-Martinův agar nebo New-York city medium.

Jelikož jsou meningokoky mikroaerofilní bakterie, vyžadující ke svému růstu zvýšenou tenzi CO₂, obvykle se kultivují za přítomnosti 3 - 10 % CO₂. Inkubace se provádí 24 - 48 hodin při 37°C. Po 24 hodinách se na agaru objevují drobné bílé kolonie, za dalších

24 hodin jsou kolonie mírně zvětšené a barva je spíše bílo-šedá. Pro potvrzení negativního růstu je odečet lepší provádět po 48 hodinách [1,5].

1.11.3 Mikroskopie

Mikroskopický nález je ve většině případů signifikantní. V mikroskopu jsou na preparátu obarveném dle Grama viditelné červeně obarvené diplokoky, kokobacily nebo krátké řetízky, které se k sobě přikládají zploštělými konci. Častým jevem bývá také intracelulární umístění koků v leukocytech [1].

1.11.4 Biochemické testy

N. meningitidis nepatří mezi bakterie s velkou biochemickou aktivitou. Mezi laboratorní testy, jež lze použít pro ověření přítomnosti meningokoků, patří test na průkaz katalasy a cytochromoxidasy. Odlišení primárně patogenních neisserií od saprofytických se provádí testem na utilizaci cukrů [1,5].

Průkaz cytochromoxidasy

Cytochromoxidasa je součástí respiračního řetězce bakterií, a tudíž se účastní buněčného dýchání. Přítomnost cytochromoxidasy se ověřuje reakcí s diagnostickým proužkem napuštěným specifickým činidlem. Toto činidlo je cytochromoxidasou rozštěpeno a jeho deriváty reagují s železem obsaženým v cytochromových respiračních komplexech, což má za následek barevnou změnu testovacího proužku. U meningokoků je tento enzym přítomný, reakce má tedy pozitivní výsledek [53]. Komerčně je dostupný např. OXItest (fy Erba - Lachema s.r.o.).

Průkaz katalasy

Tento enzym katalyzuje štěpení peroxidu vodíku na vodu a kyslík, u všech meningokoků je tento enzym přítomný, což se projeví unikajícími bublinkami uvolněného kyslíku [53].

Utilizace cukrů

Utilizace cukrů se provádí komerčně dostupnými testy (Neisseria test fy Erba – Lachema). *N. meningitidis* kromě glukosy štěpí také maltosu [1].

1.11.5 Serologická typizace

Latexová aglutinace

Základem pro uskutečnění aglutinační reakce je přítomnost korpuskulárního, tedy nerozpustného antigenu. Antigen reaguje s příslušnou protilátkou navázanou na latexových partikulích. Protilátky jsou vázány na těchto nosičích z důvodu lepší viditelnosti a odečitelnosti reakce. Komerčně jsou dostupná specifická antiséra proti jednotlivým séroskupinám meningokoků (např. diagnostická séra od fy ITEST plus s.r.o.), což usnadňuje provedení reakce. Materiálem pro stanovení přítomnosti kapsulárních antigenů je většinou likvor a sérum. Reakce, při které vzniká okem viditelný aglutinát, spočívá pouze ve smísení kapky séra (likvoru) s kapkou specifické protilátky, jež reaguje s kapsulárním antigenem. Tato metoda je vhodná pouze pro průkaz některých séroskupin, protože komerčně jsou dostupná jen antiséra proti séroskupinám A, B, C, D, W135, X, Y a Z.

Problémem latexové aglutinace je schopnost některých meningokoků aglutinovat s více antiséry, tzv. polyaglutinabilita. Dále je tu možnost spontánní aglutinace, kdy dochází k aglutinaci ve fyziologickém roztoku bez přítomnosti protilátek, které by mohly tuto reakci způsobit. Existují také meningokoky, jež neaglutinují vůbec s žádným dostupným antisérem, a proto je můžeme označit jako neaglutinující [54].

1.11.6 Molekulárně-biologické metody

Polymerázová řetězová reakce (PCR – z angl. polymerase chain reaction)

PCR je velmi důležitou součástí průkazu infekce *N. meningitidis*. Podstata reakce je jednoduchá a je založena na principu amplifikace specifické sekvence DNA, kterou „označíme“ za použití páru specifických primerů. Na základě komplementarity bazí dochází k amplifikaci řetězce DNA, reakce je katalyzována specifickým enzymem tzv. Taq polymerasou. Výsledkem je tvorba několika miliónů kopií genetické informace

dostatečných k elektroforetickému průkazu na agarózovém gelu. Pro zviditelnění amplifikované nukleové kyseliny se používá interkalační barvivo fluoreskující v UV světle – ethidium bromid.

Celý proces probíhá v zařízení zvaném termocykler. Již z názvu je patrné, že jde o přístroj uzpůsobený k tepelným pochodům, které se periodicky opakují.

Materiálem, ze kterého můžeme prokázat meningokoky je nejčastěji mozkomíšní mok a sérum. Nově bylo vyzkoušeno také stanovení *N. meningitidis* z biopsie kůže u pacientů, u kterých rutinní mikrobiologické testy byly neprůkazné a kožní změny byly nejasné etiologie. [55,56]. Metoda má velkou citlivost a specifitu. Hlavní výhodou je možnost použití metody po zahájení antibiotické terapie, kdy už není možný kultivační průkaz [57].

Multilokusová sekvenční typizace (MLST)

Tato metoda se používá pro mapování bakteriálního genomu. Byla poprvé popsána v roce 1998 profesorem Maidenem a jeho kolektivem, aplikována byla právě na *N. meningitidis*. Podstatou MLST je sekvenování sedmi tzv. housekeeping genů, které kódují základní funkce buňky, např. proteosyntézu, replikaci DNA a další nezbytné pochody. Nemapují se celé geny, ale pouze 450 – 500 párů bazí na obou řetězcích nukleové kyseliny [58].

Samotné laboratorní provedení je velice zdlouhavé a zahrnuje nejdříve inaktivaci bakteriální kultury, PCR amplifikaci, elektroforézu na agarózovém gelu, purifikaci produktů elektroforézy za pomoci centrifugace a až závěrečným krokem je vlastní sekvenace. Ta je ve svém principu v podstatě shodná s metodou PCR. Zahrnuje tři fáze, kdy se vzorek zahřívá na různé teploty, přičemž první dvě fáze trvají jen několik sekund a opakují se ve 25 cyklech. Třetí fáze trvá 40 minut bez opakování [59].

Výstupem MLST je určení tzv. sekvenčního typu mapujícího geny v daných lokusech, které se pak porovnávají s internetovými databázemi, např. PubMLST [58,60].

Vzhledem k náročnosti provedení není tato metoda vhodná pro rutinní průkaz bakterií, ale spíše pro výzkumné účely nebo pro určení příbuznosti bakteriálních kmenů při odhalování zdroje nákazy [61].

Multilokusová enzymová elektroforéza (MLEE)

MLEE byla vyvinuta dříve než technika MLST. Z názvu vyplývá, že bude docházet k rozdělení bakteriálních enzymů na základě elektroforetické mobility na škrobovém gelu. K detekci se využívají barvicí metody. Metodou MLEE získáme, podobně jako u MLST, elektroforetické typy. Velkou nevýhodou je nemožnost mezilaboratorního porovnávání výsledků měření, jelikož nelze zajistit stejné podmínky provedení v různých laboratořích [58].

1.12 Nepřímý průkaz *N. meningitidis*

1.12.1 Sérový baktericidní test

SBA (z angl. Serum Bactericidal Assay) je doporučovanou metodou pro zjištění imunitní odpovědi na infekci *N. meningitidis*. Již v roce 1974 Světová zdravotnická organizace doporučila podobný mikrotitrační test pro ověření baktericidní aktivity séra. Velmi důležitá je standardizace této metody, aby bylo možné získat výsledky porovnatelné mezi různými laboratořemi [62].

Podstata reakce je založena na navázání protilátek přítomných v pacientově séru na živé kmeny meningokoků, které způsobí jejich opsonizaci. V dalším kroku se do reakce přidá zdroj komplementu, který pro svou aktivaci klasickou cestou potřebuje právě přítomnost protilátek vázaných na bakterii. Výsledkem postupné kaskádové reakce je lýza meningokoků.

Pro zjištění počtu zlyzovaných bakterií, respektive počtu zbylých meningokoků se celá suspenze naočkuje na krevní nebo čokoládový agar, popř. jiné vhodné kultivační medium pro meningokoky. Počet narostlých kolonií se porovná s kontrolou, ve které nedochází k lýze buněk. Množství usmrcených meningokoků koreluje s množstvím přítomných protilátek v séru, takže z různých ředění sér lze určit hodnotu titru protilátek v pacientově séru.

1.12.2 Enzymová imunoanalýza

ELISA (Enzym – Linked Imunosorbent Assay) je jedna ze základních metod pro stanovení hladiny protilátek v séru či likvoru.

Standartní reakce probíhá mezi antigenem uměle navázaným na povrch mikrotitrační destičky a protilátkou přítomnou v séru (likvoru) pacienta. Následuje inkubace, při níž dochází k vazbě protilátky na antigen. V dalším kroku se do reakce přidá značená protilátka. Značení se provádí vhodným enzymem, který má určitou substrátovou specifitu. Sekundární protilátka je namířena proti primární protilátce, na kterou se naváže. Závěrečným krokem je přidání chromogenního substrátu, který je enzymaticky rozštěpen, což se projeví barevnou odezvou. Intenzita výsledného zabarvení je úměrná množství protilátek přítomných v séru či likvoru. Výsledek je odečítán spektrofotometricky.

Metoda ELISA má oproti SBA hned několik výhod. Její snadná standardizace umožňuje mezilaboratorní porovnávání výsledků. Zpracování vzorků je jednodušší, rychlejší a hlavně je možné zpracovat velké množství vzorků najednou [63,64].

1.12.3 Dot –ELISA

Princip reakce je shodný s klasickou ELISA metodou. Rozdíl je v umístění reakce mimo mikrotitrační destičku na nitrocelulózovou membránu. Nejdříve se nanese antigen, který se pomocí blokujícího roztoku na membráně ukotví. Dále se přidá sérum (likvor) s přítomnými protilátkami. Po inkubaci a promytí se přidá enzymaticky značená protilátka, opět následuje inkubace a přidání chromogenu. Barevný proužek reprezentuje pozitivní reakci.

V porovnání s běžnou ELISA metodou u Dot - ELISA není třeba tak velké množství antigenu. Díky použití nitrocelulózové membrány lze snadno odlišit pozitivní a negativní výsledek oproti světlému pozadí [63].

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Materiál

2.1.1 Analyzovaná séra

Vzorky krevních sér příslušníků Armády České republiky (AČR) odebírali vojenští lékaři před odjezdem vojáků na zahraniční misi, poté je lékaři naočkovali vakcínou proti meningokokům séroskupiny A a C (vakcína **Menveo**). Po návratu ze zahraniční mise (po 8 měsících) lékaři opět provedli odběr krve.

Do studie jsme zařadili celkem 50 párových krevních sér od 50 příslušníků AČR. Věkový průměr u mužů činil $37,9 \pm 8,13$ (věkové rozmezí 28 – 59 let), u žen $36,0 \pm 7,18$ (věkové rozmezí 28 - 45 let), průměrný věk muži + ženy $37,7 \pm 7,92$ (věkové rozmezí 25 - 59 let).

Vzorky krevních sér jsme zamrazili a dlouhodobě skladovali při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Analyzované vzorky jsme rozmrazili těsně před testováním a po provedení experimentu jsme je opět zamrazili.

2.1.2 Referenční kmeny *N. meningitidis* séroskupiny A a C

Referenční kmen *N. meningitidis* séroskupiny A (ATCC 13077) byly objednány v České národní sbírce typových kultur (CNCTC).

2.1.3 Kultivační média

- Krevní agar s 5 % defibrinované beraní krve – LabMediaServis s.r.o, č.š. 277, 526
- Čokoládový agar – LabMediaServis s.r.o, č.š. 236
- Gonokokový agar (GC – z angl. gonococcal) – LabMediaServis s.r.o., č.š. 292

2.1.4 Roztoky, činidla a chemikálie

- 0,85% vodný roztok NaCl (fyziologický roztok) pro přípravu bakteriální suspenze a mikroskopických preparátů

- Fosfátový pufr (PBS) – pro testování baktericidní aktivity a ředění analyzovaných krevních sér
- Dulbecco pufr (fy Sigma) - pro testování baktericidní aktivity a ředění analyzovaných krevních sér
- 3% vodný roztok H₂O₂ pro průkaz katalasy
- Roztoky pro barvení preparátů dle Grama – 40% roztok krystalové violeti v 10% roztoku šťavelanu amonného, Lugolův roztok (10% vodný roztok I₂ a KI), 0,1% roztok karbolfuchsinu
- 70% ethanol
- Testatční papírky pro oxidasovou reakci OXItest (fy Erba – Lachema)

2.1.5 Přístroje a pomůcky

- Hazard box (MSC - Advantage Class II Biological Safety Cabinets, fy ThermoScientific)
- Lednička, mraznička (fy Liebherr)
- Termostat (fy Memmert)
- Vodní lázeň (fy PGW Medingen)
- Vortex (fy IKA)
- Mikropipety pro různé objemy
- Stojánky na zkumavky
- Sterilní špičky pro různé objemy
- Jednorázové bakteriologické kličky
- Plastové zkumavky
- Ependorfky
- Mikrotitrační destičky
- Rukavice
- Roušky

2.2 Pracovní postup

2.2.1 Oživení referenčního kmene *N. meningitidis*

Referenční kmen *N. meningitidis* séroskupiny A (ATCC 13077) jsme obdrželi ve formě lyofilizátu. Skleněnou ampuli s lyofilizátem jsme nejprve vyjmuli z mrazničky a ponechali k rozmražení při laboratorní teplotě. Za použití kovové žiletky jsme ampuli naříznuli a vydezinfikovali její povrch. Naříznutou ampuli jsme rozlomili, pomocí sterilní pinzety vyžíhané v plameni jsme odstranili buničitou vatu a následně vyndali vnitřní ampuli se sušinou. Do ampule jsme napipetovali 0,5 ml játrového bujónu a její obsah jsme pipetou důkladně promíchali. Vzniklou bakteriální suspenzi jsme poté naočkovali na krevní, čokoládový a GC agar, abychom mohli zhodnotit kvalitu nárůstu *N. meningitidis* na jednotlivých médiích a zároveň abychom zvolili optimální kultivační médium pro meningokoky. Inkubace probíhala při 37 °C po dobu 24 h v atmosféře 5 % CO₂.

2.2.2 Ověření biochemických vlastností *N. meningitidis*

U referenčního kmene meningokoků séroskupiny A jsme si ověřili následující biochemické vlastnosti:

Průkaz katalasy

Tvorbu katalasy jsme sledovali v kapce 3 % roztoku H₂O₂ kápnuté na podložní sklíčko. Do ní jsme pomocí bakteriologické kličky nanесли testovanou kulturu. Pokud testovaný mikroorganismus produkoval katalasu, došlo k rozkladu H₂O₂ a k následnému úniku kyslíku za tvorby bublinek. Pokud by testovaný mikroorganismus katalasu netvořil, k úniku bublinek by nedošlo.

Průkaz cytochromoxidasy

Testační papírek OXItest (fy Erba – Lachema) jsme uchopili do předem vyžíhané pinzety. Papírkem jsme se dotknuli testované kolonie a sledovali jsme jeho barevnou změnu. Pozitivní reakce pro průkaz oxidasy se projevila zmodráním papírku, při negativní reakci zůstal papírek nezbarven.

2.2.3 Mikroskopie

V kapce fyziologického roztoku na podložním sklíčku jsme pomocí mikrobiologické kličky vytvořili suspenzi testovaného kmene *N. meningitidis* a rozetřeli ji na sklíčku. Nátěr jsme nechali zaschnout a poté jsme ho fixovali plamenem. Následovalo obarvení preparátu dle Grama. Nátěr jsme převrstvili roztokem krystalové violeti a nechali jsme působit 30 s. Po této době jsme krystalovou violet slili a preparát jsme přelili Lugolovým roztokem a nechali působit 30 s. Preparát jsme opláchli destilovanou vodou, odbarvili ho 70% ethanolem a poté ho opět opláchli destilovanou vodou. V konečném kroku jsme převrstvili karbolfuchsinem a nechali působit 60 s. Barvivo jsme slili a opláchli destilovanou vodou. Preparát obarvený dle Grama jsme prohlíželi pod imerzním objektivem při celkovém zvětšení 1500x.

2.2.4 Volba vhodné sérologické metody pro detekci specifických protilátek

Jediná laboratoř v ČR, která má validovanou metodu pro detekci specifických protilátek proti meningokokům, je Referenční laboratoř pro meningokokové nákazy při Státním zdravotním ústavu (SZÚ).

Jelikož si SZÚ svoje „know how“ brání, tuto zavedenou metodiku nám odmítl poskytnout. Proto je naše pilotní studie zaměřena na výběr metodiky vhodné pro detekci specifických protilátek proti meningokokům séroskupiny A.

Metoda sklíčkové aglutinace

Inaktivace bakteriální kultury

Meningokoky na krevním agaru jsme inkubovali přes noc při 37 °C za 5% tenze CO₂. Narostlou kulturu jsme resuspendovali v 5 ml PBS a následně ji inaktivovali varem po dobu 20 min. Inaktivovanou bakteriální suspenzi jsme centrifugovali při 2000 otáčkách/min po dobu 20 min. Peletu jsme poté promyli a resuspendovali v PBS. Takto připravenou bakteriální kulturu jsme uchovávali do dalšího testování při chladničkové teplotě.

Provedení aglutinační reakce

Pro testování jsme použili modifikovanou metodiku, kterou na svých stránkách doporučuje Centrum pro kontrolu nemocí v Atlantě, USA [64].

Podložní sklíčko jsme nejprve očistili alkoholem a asepticky na něj přenesli 4 kapky (po 20 μ l) PBS. Pomocí bakteriologické kličky jsme nabrali inaktivovanou bakteriální kulturu meningokoků a v každé kapce jsme vytvořili zákal lehce mléčné barvy.

Do prvních třech kapek mléčně zakalené suspenze jsme přidali 20 μ l séra předředeného 1:2 v PBS (1. kapka pozitivní sérum, 2. kapka negativní sérum, 3. kapka testované sérum). Jako pozitivní kontrolu jsme použili postvakcinanční krevní sérum, negativní kontrola pocházela od nevakcinovaného jedince, u kterého jsme si ověřili, že v průběhu života neprodělal meningokokovou infekci. Čtvrtá kapka bakteriální suspenze v PBS sloužila jako kontrola autoaglutinace.

Po smísení bakteriální kultury s testovanými séry jsme podložním sklíčkem 2 - 5 min mírně kývali, sledovali jsme reakční čas a vznik viditelných aglutinátů proti černému pozadí.

Sérový baktericidní test (SBA)

Pracovní postup pro detekci specifických protilátek pro meningokoků séroskupiny A jsme navrhli jako modifikaci metodiky uvedené v odborné literatuře [66,67].

Pracovní postup

1. den

Ze zamražené kultury meningokoků jsme bakteriologickou kličkou setřeli inokulum, které jsme následně rozetřeli na krevní agar. Inkubace probíhala 18 h při 37 °C v atmosféře 5 % CO₂.

2. den

Příprava bakteriální kultury o vhodné koncentraci

Bakteriologickou kličkou jsme z krevního agaru s narostlou 18 h kulturou *N. meningitidis* setřeli 10 kolonií, které jsme poté rozetřeli na nový krevní agar.

Následovala inkubace v termostatu při 37 °C po dobu 4 h, abychom získali bakteriální kulturu v Lag fázi růstu.

Po uplynutí inkubační doby jsme setřeli narostlé kolonie *N. meningitidis* do zkumavky s 3 ml Dulbecco pufru takovým způsobem, aby optická densita při vlnové délce $\lambda = 650$ nm činila 0,1. Tato hodnota odpovídá 2. stupni MacFarlandovy zákalové stupnice (2×10^8 CFU/ml). Vzniklou bakteriální suspenzi jsme poté opět naředili Dulbecco puftrem na konečnou koncentraci 4×10^4 CFU/ml.

Provedení SBA

a) Ředění a inaktivace krevních sér

Všechna analyzovaná krevní séra (pozitivní kontrola – krevní sérum po nedávné aplikaci vakcíny proti meningokokům, negativní kontrola – krevní sérum od nevakcinované osoby, u níž bylo ověřeno, že v průběhu života neproděla meningokokovou infekci a testovaná prevakcinační a postvakcinační séra příslušníků AČR) jsme naředili v Dulbecco pufru v poměru 1:2 a následně inaktivovali ve vodní lázni při 56 °C po dobu 30 min, aby došlo k eliminaci nežádoucího působení komplementární aktivity.

b) Uspořádání experimentu v mikrotitračních destičkách

Do každé jamky prvního řádku mikrotitrační destičky jsme napipetovali 40 μ l inaktivovaného naředěného séra, které jsme dále naředili Dulbecco puftrem dvojkovou řadou. Od druhého řádku mikrotitrační destičky, kromě posledního řádku, jsme všude napipetovali 20 μ l Dulbecco pufru a do něho přenesli 20 μ l krevního séra z prvního řádku, dále jsme pokračovali standardním způsobem ředění. Do poslední jamky každého sloupce mikrotitrační destičky jsme připravili kontrolu T_0 – tedy kontrolu pro odečet počtu CFU narostlých na krevním agaru bez lytického působení komplementu. Tato kontrola obsahovala 20 μ l inaktivovaného séra, 10 μ l bakteriální suspenze a 10 μ l aktivního lidského komplementu. Směs jsme těsně před inkubací vyočkovali (10 μ l) pomocí bakteriologické kličky na krevní agar a inkubovali v termostatu 18 h při 37 °C v atmosféře 5 % CO_2 .

Do všech zbylých jamek mikrotitrační destičky jsme přidali 10 μ l předem připravené bakteriální suspenze denzitě 0,1 a 10 μ l aktivního lidského komplementu (neinaktivované

lidské sérum, jež neobsahovalo postvakcinační či postinfekční protilátky proti meningokokům) naředěného v Dulbecco pufru v poměru 1:3.

Do každého experimentu jsme zařadili následující kontroly:

Kontrola buněčné suspenze (KBS): 20 μ l Dulbecco pufru, 10 μ l bakteriální suspenze, 10 μ l inaktivovaného komplementu

Kontrola komplementu (KK): 20 μ l Dulbecco pufru, 10 μ l bakteriální suspenze, 10 μ l aktivního komplementu

Kontrola séra (KS): 20 μ l Dulbecco pufru, 10 μ l bakteriální suspenze, 10 μ l inaktivovaného krevního séra

Mikrotitrační destičku jsme vložili do termostatu a inkubovali při 37 °C po dobu 1 h. Po uplynutí inkubační doby jsme z každé jamky (kromě posledního řádku) odebrali 10 μ l směsi pro určení počtu CFU v čase T_{60} , a rozetřeli na krevní agar. Naočkované krevní agary jsme inkubovali v termostatu při 37 °C po dobu 18 h. Schéma uspořádání experimentu je uvedeno v tabulce 1.

Tabulka 1 Uspořádání experimentu v mikrotitrační destičce

Ředění séra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1:2	Pozitivní kontrola	Negativní kontrola	Testované sérum 1/1	Testované sérum 1/2	Testované sérum 2/1	Testované sérum 2/2	Testované sérum 3/1	Testované sérum 3/2	Testované sérum 4/1	Testované sérum 4/2	KS 1/1	KBS
1:4											KS 1/2	KK
1:8											KS 2/1	
1:16											KS 2/2	
1:32											KS 3/1	
1:64											KS 3/2	
1:128											KS 4/1	
T_0											KS 4/2	

Lengenda:

1/1 krevní sérum odebrané před vakcinací

1/2 postvakcinační krevní sérum

KS ... kontrola séra

KK ... kontrola komplementu

KBS ... Kontrola buněčné suspenze

3. den

Po uplynutí doby kultivace jsme spočetli počet CFU v čase T_0 na krevních agarech a počet CFU v čase T_{60} na krevních agarech.

Jako titer jsme stanovili takové ředění séra, které mělo za následek $\geq 50\%$ úbytek CFU v čase T_{60} na krevních agarech oproti kontrole počtu CFU v čase T_0 .

Dále jsme provedli odečet výsledků kontroly **KBS**, **KK** a **KS**, abychom ověřili platnost metodiky: **KBS** je známkou „životaschopnosti“ kultury, při správném průběhu experimentu by měl být patrný kompletní nárůst. Bakteriální nárůst u **KK** – poskytuje informaci, zda samotný komplement nezpůsobuje lýzi meningokoků. Měl by být srovnatelný či o málo nižší než u **KBS**. U **KS** jsme si ověřovali skutečnost, zda-li inaktivovaná krevní séra nevykazují „killing efekt“ samy o sobě – tedy i bez přítomnosti aktivního komplementu. V pozitivním případě by měla být tato séra titrována bez přidavku aktivního lidského komplementu. Krevní séra s vysokými titry protilátek mohou vykazovat fenomén prozóny.

Optimalizace a validace metodiky

Optimalizace denzity bakteriální suspenze

V metodice Martina a kol. [66] autoři doporučují, aby koncentrace testované bakteriální suspenze byla 400 CFU/10 μ l. Jak bylo ověřeno v naší studii, s touto denzitou jsme získávali konzistentní výsledky CFU v čase T_0 , které by se dle doporučení autorů měly pohybovat mezi 60 – 120 CFU/10 μ l. U testovaných nižších koncentrací bakterií (200 a 100 CFU/ml), byly počty CFU v čase T_0 nedostatečné.

Volba ředícího pufru

V našem testování jsme nejprve jako ředící médium zařadili PBS pufr, při používání tohoto pufru však nebyly výsledky testování uspokojivé (PBS se pravděpodobně podílel na agregaci bakterií a následkem toho jsme získávali nekonzistentní počty CFU v čase T_{60} , které neodpovídaly hodnotě ředění krevního séra). Podstatně lepší výsledky jsme dosahovali při použití Dulbecco pufru s Mg^{2+} a Ca^{2+} ionty, který jsme zvolili pro další testování.

Volba vhodného krevního séra jako zdroje komplementu

Jako nejvíce problematická okolnost během našeho testování se ukázala volba vhodného krevního séra jako zdroje komplementu. Do naší studie jsme zařadili dle doporučení jiných autorů lidské sérum, králičí sérum z mladých králíků a koňské sérum. Výsledky získané za použití králičího a koňského séra jsme zhodnotili jako naprosto nevyhovující, protože počty CFU v čase T_0 byly mnohonásobně nižší, než počty CFU v čase T_{60} . Z tohoto důvodu jsme jako zdroj komplementu zvolili lidské krevní sérum od zdravého dárce, jež nebyl vakcinován proti meningokokům a neprodělal během života meningokokovou infekci. Do testování jsme zařadili celkem 10 lidských krevních sér a se všemi jsme provedli testování na párovém vzorku analyzovaného krevního séra před a po vakcinaci. Podle získaných výsledků a doporučení dalších autorů jsme stanovili, že nejvhodnějším zdrojem komplementu bude poolované lidské sérum, které bylo získáno smísením 2 krevních sér, s nimiž bylo dosaženo nejlepších výsledků během testování.

Naším dalším kritériem byla skutečnost, aby lidské krevní sérum zvolené jako zdroj komplementu samo o sobě nezapříčinilo eliminaci bakteriálních buněk vyšší než 15 % (jako indikátor tohoto jevu jsme použili kontrolu komplementu).

Validace SBA

Aby mohl být průběh experimentu považován za platný, podle doporučení autorů Martina a kol. [66] se počet CFU u KBS musel pohybovat v rozmezí 80 – 100 CFU/10 μ l a počet CFU v čase T_0 mezi 60-120 CFU/10 μ l.

Hodnocení výsledků testování

Za pozitivní výsledek testu (dostatečná koncentrace protektivních baktericidních protilátek) byl považován titr $\geq 1:8$ či čtyřnásobný vzestup titru u postvakcinačního krevního séra, za hraniční výsledek SBA byl považován titr 1:4.

3 VÝSLEDKY

3.1 Růst *N. meningitidis* na různých kultivačních mediích

Kultivaci *N. meningitidis* séroskupiny A (ATCC 13077) jsme provedli na krevním agaru (viz příloha 1), čokoládovém agaru (viz příloha 2) a GC agaru. Na všech mediích byl po 24 h inkubaci při 37 °C v atmosféře 5 % CO₂ patrný nárůst drobných bílých kolonií. Vzhledem k tomu, že *N. meningitidis* narostla ve stejné kvalitě na všech kultivačních médiích, z finančního hlediska jsme jako optimální kultivační médium zvolili krevní agar.

3.2 Produkce katalasy u referenčního kmene *N. meningitidis*

Po přenesení referenčního kmene *N. meningitidis* do kapky 3% peroxidu vodíku došlo k úniku bublinek kyslíku. Testovaný mikroorganismus je tedy katalasa pozitivní.

3.3 Produkce cytochromoxidasy u referenčního kmene *N. meningitidis*

Na testačním papírku testu OXItest (fy Erba – Lachema) jsme po přenesení bakteriální kultury zaznamenali vznik modrého zabarvení. Testovaný referenční kmen je tedy cytochromoxidasa pozitivní.

3.3 Pozorování preparátu *N. meningitidis* obarveného dle Grama

Ve světelném mikroskopu jsme při celkovém zvětšení 1500x pozorovali preparát obarvený dle Grama. V preparátu byly patrné gramnegativní koky, které byly převážně uspořádány do dvojic, tetrad či hroznů. (viz příloha 3 a 4).

3.4 Detekce specifických protilátek metodou SBA

Celkem jsme metodou SBA vyšetřili 50 párových vzorků krevních sér, jež byly odebrány vojákům AČR. Od mužů pocházelo 45 (90 %) a od žen 5 (10 %) párových vzorků. U každého testovaného vzorku jsme stanovili výši titru specifických protilátek proti meningokokům séroskupiny A metodou SBA. Jako kontrolní skupina, baseline, nám sloužila krevní séra získaná před vakcinací, imunogenitu použité vakcíny jsme zhodnotili dle výsledků výše titru u postvakcinačních sér. V tabulce 3 jsme zaznamenali pohlaví a věk příslušníků AČR a výsledky vyšetření krevních sér metodou SBA před a po aplikaci vakcíny **Menveo**.

Jak je patrné z tabulky 2, pozitivní výsledek SBA metody, tedy titr $\geq 1:8$, byl u postvakcinačních krevních sér u mužů zaznamenán ve 28 případech (56 %), u žen ve 3 případech (6 %). Pozitivní titry se pohybovaly v rozmezí od 1:8 až do 1:128. Nejvíce pozitivních reakcí získaných metodou SBA u postvakcinačních krevních sér u mužů jsme zjistili u titru 1:8, celkem 7 osob (15,4 %), stejně jako u titru 1:128. Hraniční titr u postvakcinačních krevních sér u mužů byl vyhodnocen u 2 (4 %) mužů, u žen nebyl hraniční výsledek SBA metody u krevního séra po vakcinaci detekován.

Tabulka 2 poukazuje na skutečnost, že pozitivní výsledky vyšetření protilátek metodou SBA u mužů byly u krevních sér před vakcinací zaznamenány u 14 (28,0 %), u žen ve 3 (80 %) případech.

V dalším kroku jsme se zaměřili na posouzení závislosti věku u vyšetřovaných osob na dosažené hodnotě titru u postvakcinačního séra, tabulka 3. Nejvíce pozitivních výsledků získaných metodou SBA (titr $\geq 1:8$) bylo dosaženo ve věkovém rozmezí 30 - 34, kdy jsme zaznamenali celkem 11 (22 %) pozitivních reakcí. Ve stejné věkové kategorii byl zaznamenán i nejvyšší počet negativních reakcí, 6 (12 %).

Tabulka 2 Výsledky vyšetření prevakcinačních a postvakcinačních krevních sér získané metodou SBA v závislosti na pohlaví.

	Muži				Ženy			
	Titr protilátek							
	Před vakcinací	%	Po vakcinaci	%	Před vakcinací	%	Po vakcinaci	%
Negativní	29	64,4	14	31,1	4	80	2	40
1:2	1	2,2	1	2,2	-		-	
1:4	2	4,4	2	4,4	-		-	
1:8	4	8,9	7	15,6	1	20	2	40
1:16	3	6,7	6	13,3	-		1	20
1:32	2	4,4	5	11,1	-		-	
1:64	-	-	3	6,7	-		-	
1:128	4	8,9	7	15,6	-		-	

Tabulka 3 Závislost věkového rozmezí na dosaženém titru protilátek.

Věk	Titr protilátek													
	1:2	%	1:4	%	1:8	%	1:16	%	1:32	%	1:64	%	1:128	%
25-29							1	16,7	1	20			1	14,3
30-34					4	40	2	33,3	2	40	2	66,7	1	14,3
35-39			1	50	3	30			1	20			3	42,9
40-44			1	50	1	10	1	16,7	1	20				
45-49	1	100			2	20	1	16,7			1	33,3	2	28,6
50-54							1	16,7						
55-59														

4 DISKUZE A ZÁVĚR

Primárním cílem této diplomové práce bylo ověření imunogenity testované konjugované vakcíny **Menveo** proti meningokokům séroskupiny A a C, výběr a zavedení vhodné metodiky pro detekci specifických protilátek proti meningokokům. Dle požadavku vedoucího grantového projektu Dr. Dítěte jsme se zaměřili pouze na detekci specifických protilátek proti *N. meningitidis* séroskupiny A.

Dále jsme se soustředili na charakteristiku testovaného souboru s ohledem na pohlaví a věk testovaných osob a snažili jsme se demonstrovat závislost věku na intenzitě imunitní odpovědi po aplikaci vakcíny.

Nedílnou součástí předkládané diplomové práce bylo také ověření růstových, morfologických a biochemických vlastností používaného referenčního kmene *N. meningitidis* séroskupiny A (ATCC 13077).

Do studie bylo celkem zařazeno 50 párových krevních sér, která pocházela od příslušníků AČR. Analyzované vzorky byly získány před a po aplikaci vakcíny **Menveo** (po 8 měsících, kdy se vojáci vrátili ze zahraniční mise). Soubor tvořilo 45 (90 %) mužů a 5 žen (10 %). Věkový průměr u mužů činil $37,9 \pm 8,13$, u žen $36,0 \pm 7,18$, průměrný věk muži + ženy $37,7 \pm 7,92$.

Při výběru metodiky vhodné pro detekci specifických protilátek proti meningokokům séroskupiny A v krevním séru pacienta jsme se v odborné literatuře seznámili s metodikami, jež jsou k testování běžně používány. Mezi tato vyšetření standardně patří aglutinační reakce, metoda SBA a metoda ELISA. Jelikož ELISA kity pro detekci meningokokových protilátek se komerčně nedodávají a finanční nároky na zavedení „home made“ metody by byly značné, zaměřili jsme svoji pozornost nejprve na metodu aglutinační a posléze na metodu SBA.

Pro praktické provedení aglutinačního testu jsme použili modifikaci metodiky, kterou ve svém manuálu doporučuje Centrum pro kontrolu nemocí v Atlantě, USA.

V průběhu experimentu jsme došli k závěru, že tuto metodiku k detekci specifických protilátek proti meningokokům použít nelze. Jelikož při pouhém smísení PBS pufru s inaktivovanou kulturou *N. meningitidis* (bez přítomnosti protilátek) došlo ke vzniku

aglutinátu. PBS jsme tedy během testování nahradili fyziologickým roztokem, avšak autoglutinaci jsme u inaktivované bakteriální kultury opět zaznamenali. Stejný závěr nastal i při použití aktivní bakteriální kultury. Následně jsme se zaměřili na rozbor příčin, které mohou mít za následek vznik autoaglutinace [68]. V odborných publikacích jsme zjistili zajímavou skutečnost. Autoglutinace je u čeledi *Neisseriaceae* často popisovaná, ale špatně eliminovatelná. Jako zdroj možné aglutinace jsou uváděny pili, LOS a proteiny spojené s opacitou. Z tohoto důvodu jsme práci zaměřili na výběr vhodnější metodiky, kterou se stala metoda SBA.

K zavedení SBA jsme použili modifikaci metodiky uvedené Martinem a kol. [66].

Jak je detailně rozebráno v experimentální části, zaměřili jsme u zavedení a optimalizaci metody na stanovení vhodné denzity bakteriální suspenze, volbu vhodného ředícího média a volbu vhodného krevního séra jako zdroje exogenního komplementu. Jako optimální denzitu bakteriální suspenze jsme zvolili koncentraci 400 CFU/ml, protože při této hodnotě jsme získávali konzistentní výsledky počtu CFU v čase T_0 .

Dulbecco pufr byl zvolen jako optimální ředící a pracovní médium. U PBS pufru byly získávané výsledky nevyhodnotitelné, pravděpodobně docházelo vlivem PBS pufru k autoagregačním reakcím meningokoků.

Nejvíce komplikovanou záležitostí se během zavádění metody SBA stala volba vhodného zdroje exogenního komplementu. Z výsledků získaných při použití různých zdrojů exogenního komplementu (králičí, koňské a lidské krevní sérum) jsme došli k závěru, že nejvhodnějším komplementárním zdrojem bude poolované lidské sérum.

Z celkového počtu 50 prevakcinačních krevních sér bylo jako pozitivní vyhodnoceno celkem 14 (28 %). Hraniční titr protilátek byl stanoven u 2 (4 %), negativní výsledek byl zaznamenán celkem u 16 (68 %) testovaných osob (viz tabulka 2)

V odborné studii autorů Knuf a kol. [69] vyšetřili celkem 84 prevakcinačních sér a detekovali výši titru $\geq 1:8$ specifických protilátek proti meningokokům séro skupiny A v 35,7 % případů a titr více $\geq 1:128$ v 21,4 % případů.

Relativně vysoký počet pozitivních SBA titrů získaných u prevakcinačních sér si můžeme vysvětlovat skutečností, že nezanedbatelný počet osob (v odborné literatuře je

uváděno 10 %) může být asymptomatickým nosičem *N. meningitidis* v dutině ústní a imunitní systém může následně produkovat specifické protilátky proti této bakterii [29].

Dalším, jistě důležitým faktorem, který může ovlivnit výši titru specifických protilátek u SBA metody, je i přítomnost saprofytických neisserií v dutině ústní. Není vyloučena skutečnost, že některé antigenní determinanty mohou být společné jak patogenním, tak saprofytickým neisseriím a ve vyšetřovaném krevním séru může dojít ke vzniku zkřížených reakcí.

U vedoucího grantového projektu byla dále ověřena skutečnost, zda-li vyšetřovaná prevakcinační krevní séra pocházela od osob, které byly během života či vojenské služby vakcinovány poprvé, a mohou u nich z tohoto důvodu postvakcinační protilátky nadále přetrvávat. Dotazem bylo zjištěno, že se jedná o revakcinační proces, příslušníci AČR byli již touto vakcínou očkovaní. Od poslední vakcinace uběhly však více než 3 roky. Po této době, jak je uváděno v odborné literatuře, jsou titry protektivních protilátek již nízké a z tohoto důvodu se doporučuje provést revakcinaci. Tato skutečnost ale nevylučuje možnost, že v některých případech mohou protilátky perzistovat i po takto dlouhé době.

Z výsledků vyšetření titerů specifických protilátek proti meningokokům séroskupiny A u postvakcinačních krevních sér metodou SBA je zcela zjevné, že došlo k signifikantnímu nárůstu počtu pozitivních osob. Celkem jsme zaznamenali 31 (62 %) SBA pozitivních příslušníků AČR. Nárůst počtu pozitivních postvakcinačních sér je více než dvojnásobný oproti sérům prevakcinačním.

Hraniční výsledek u postvakcinačních krevních sér byl zaznamenán ve 2 (4 %) a negativní výsledek u 17 (34 %) případů.

Borrow a kol. [70] ve své odborné práci publikují hodnoty specifických protilátek po aplikaci konjugované vakcíny proti meningokokům. Jako kontrolní skupinu v této práci zařadili 50 studentů, jenž nebyli vakcinováni. Diagnostický titer $\geq 1:8$ byl zaznamenán u 5 (10 %), titer $\geq 1:32$ u 3 (6 %) a titer $\geq 1:128$ u 1 (2 %) studenta. U 36 dobrovolníků byla aplikována vakcína a po 1 měsíci byla metodou SBA změřena hladina specifických protilátek. Titer $\geq 1:8$ autoři diagnostikovali u 31 (86 %), titer $\geq 1:32$ u 31 (86 %) a titer $\geq 1:128$ u 29 (81 %). Šest měsíců po aplikaci vakcíny byla situace následující: titer $\geq 1:8$ autoři detekovali u 26 (72 %), titer $\geq 1:32$ u 22 (61 %) a titer $\geq 1:128$ u 14 (39 %)

dobrovolníků. Naše naměřené hodnoty protilátek byly následující: titr $\geq 1:8$ jsme zaznamenali u 16 (32 %), titr $\geq 1:32$ u 8 (16%) a titr $\geq 1:128$ u 7 (14 %) sér. Námi získaná data se neshodují s poznatky Borrow a kol. [70]. Důvodem může být rozdílná doba odběru krve s vytvořenými protilátkami, za kterou už mohlo dojít k jejich poklesu. V našem případě se jednalo o 8 měsíců od aplikace vakcíny, což je o podstatně déle než ve studii Borrow a kol. [69].

Ve studii Knufa a kol. [69] vyšetřili u 193 vyšetřovaných osob postvakcinační titry protilátek proti meningokokům séro skupiny A po aplikaci tetraivalentní konjugované vakcíny ACWY. Zajímavou skutečností je fakt, že postvakcinační titry $\geq 1:8$ byly zaznamenány u 100 % a titry $\geq 1:128$ také u 100 % testovaných osob. Ve srovnání s našimi výsledky, kdy titru $\geq 1:8$ bylo dosaženo u 24 (48 %) a titr $\geq 1:128$ u 7 (14 %) vzorků. Relativně vysoké procento negativních výsledků při vyšetření postvakcinačních krevních sér metodou SBA si vysvětlujeme tím, že po 8 měsících od aplikace vakcíny **Menveo**, již došlo k jejich poklesu pod hranici positivity. Další možností výše zmíněného faktu může být skutečnost, že vakcína není dostatečně imunogenní. Jak je uvedeno v příbalovém letáku vakcíny [60], po 1 měsíci od aplikace vakcíny **Menveo** byly zaznamenány pozitivní titry protilátek proti meningokokům séro skupiny A vyšetřené metodou SBA pouze u 69 % testovaných osob. Tento výsledek se téměř shoduje s naším, kdy jsme pozitivní titry SBA diagnostikovali v 62 % případů.

Dalším zajímavým faktem, který bychom chtěli zmínit, a který může mít zásadní vliv na výši titru specifických protilátek, je kvalitativní stav vyšetřovaných krevních sér. Naše zkušenosti poukazují na skutečnost, že opakované rozmrazování a zmrazování krevních sér může významně ovlivnit hladinu protilátek u vyšetřovaných krevních sér (krevní séra se již v minulých studiích používala pro stanovení titerů protilátek proti hepatitidě A, poliomyelitidě a břišnímu tyfu). Během testování jsme také zjistili, že řada testovaných sér je chylózních, jedno vyšetřované sérum vykazovalo známky hemolýzy.

V naší studii jsme zjišťovali závislost na věku vyšetřované osoby na intenzitě imunitní odpovědi po aplikaci vakcíny. Analyzovaný soubor jsme rozdělili do sedmi věkových skupin a sledovali jsme výši dosaženého postvakcinačního titru v jednotlivých skupinách.

Nejvíce pozitivních výsledků bylo dosaženo metodou SBA (titr $\geq 1:8$ a více) ve věkovém rozmezí 30 – 34 let, kdy jsme zaznamenali celkem 11 (22 %) pozitivních reakcí, následovalo věkové rozmezí 35 - 39 s 8 (16 %) a 45 - 49 let se 7 (14 %) pozitivními reakcemi.

Voer a kol. [71] zaznamenali u postvakcinačních sér nejvíce pozitivních reakcí (28 %) ve věkovém rozmezí 26 - 30 let, což téměř shodně s námi. Následovalo věkové rozmezí 31 - 39, 40 – 49 a 50 -59 let se 24% pozitivitou titrů vyšetřených metodou SBA.

Ceyhan a kol. [72] diagnostikoval ve věkové skupině 25 – 39 let pozitivní hodnotu postvakcinačního titru (1:8 – 1:64) u 20 %, titr 1:128 byl zaznamenán u 25 % a negativní výsledek u 55 % vyšetřených osob. U osob starších 40 let byly pozitivní výsledky vyšetření (titr 1:8 – 1:64) detekovány u 20 %, titr 1:128 u 20 %. Negativní výsledek byl zaznamenán u 65 % vyšetřovaných osob.

V britské studii Torttera a kol. [73] zaznamenali nejvíce pozitivních reakcí (titr $\geq 1:8$) získaných za použití metody SBA u postvakcinačních sér u 15 % osob ve věkovém rozmezí 25 -30 let.

Invazivní meningokoková onemocnění jsou velmi nebezpečná, jelikož se mohou projevat jako meningokoková meningitida nebo sepse a skončit i úmrtím nakažené osoby. U části populace jsou protilátky proti *N. meningitidis* přirozeně přítomny i bez vakcinace. Možností prevence proti onemocnění je vakcinace. V České republice je dostupných pět vakcín zaměřených proti různým séro skupinám meningokoků. Z předchozích faktů je zřejmé, že tvorba protilátek po aplikaci vakcíny nemusí být u všech vakcinovaných osob protektivní, což uvádějí i výrobci jednotlivých typů vakcín i naše studie tento fakt prokázala. Dalším důležitým poznatkem bylo potvrzení závislosti věku vakcinované osoby na velikosti vytvořeného titru protilátek.

PŘÍLOHY

PŘÍLOHA 1: Nárůst *N. meningitidis* na krevním agaru

(zdroj: <http://www.schoolwork.de/mikrobiologie/agarplatten.php>)

PŘÍLOHA 2: Nárůst *N. meningitidis* na čokoládovém agaru

(zdroj: <http://www.flickr.com/photos/nathanreading/6826337394/>)

PŘÍLOHA 3: *N. meningitidis* v elektronovém mikroskopu

(zdroj: <http://www.bioquell.com/technology/microbiology/neisseria-meningitidis/>)

PŘÍLOHA 4: Diplokoky *N. meningitidis* barvené dle Grama

(zdroj:

http://sameens.dia.uned.es/Trabajos9/Trab_Publicos/Trab_7/Cardona_Pascual_7/Pagina%20%20modulo%207.htm)

PŘÍLOHA 5: Rozsáhlé sufúze na dolních končetinách při sepsi

(zdroj:

<http://www.kidsfriendlynz.com/Meningitis%20What%20parents%20should%20know.html>
l)

PŘÍLOHA 6: Fulminantní purpura dolních končetin místy přecházející v sufúze

(zdroj: http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Purpura%2C+Schoenlein-Henoch&lang=1)

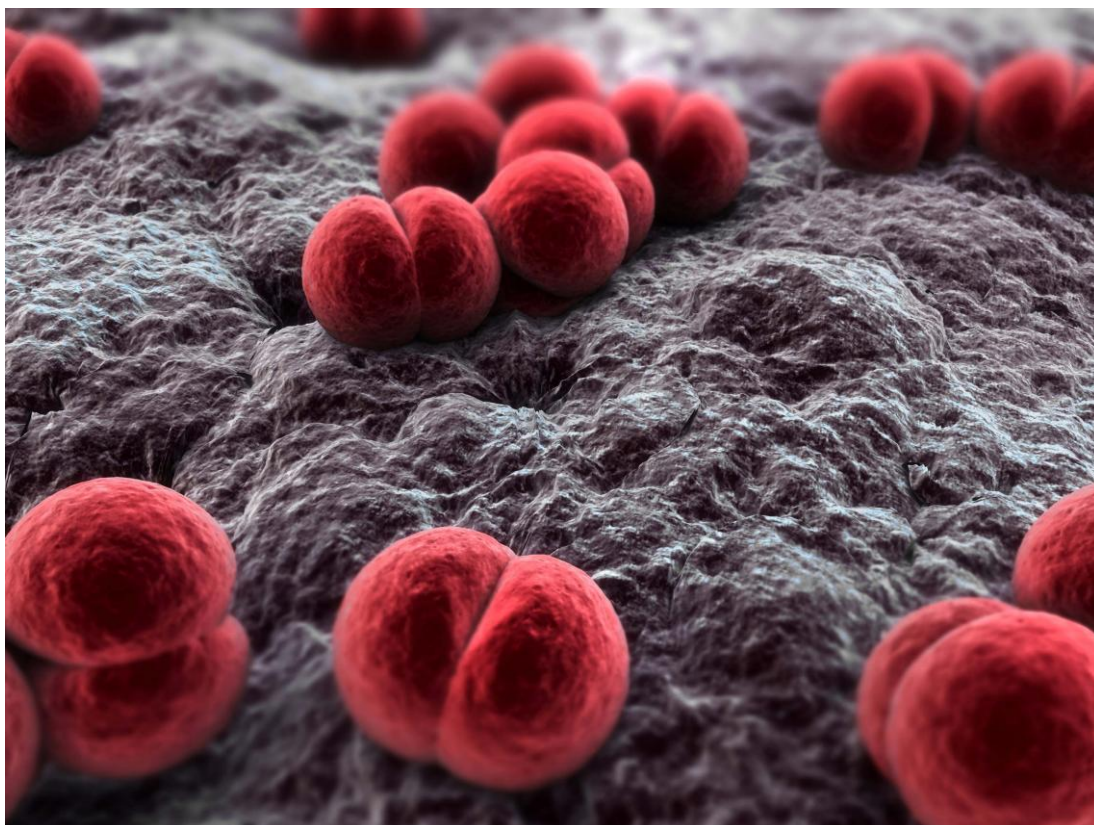
PŘÍLOHA 1 Nárůst *N. meningitidis* na krevním agaru po 24 h inkubaci v atmosféře 5 % CO₂



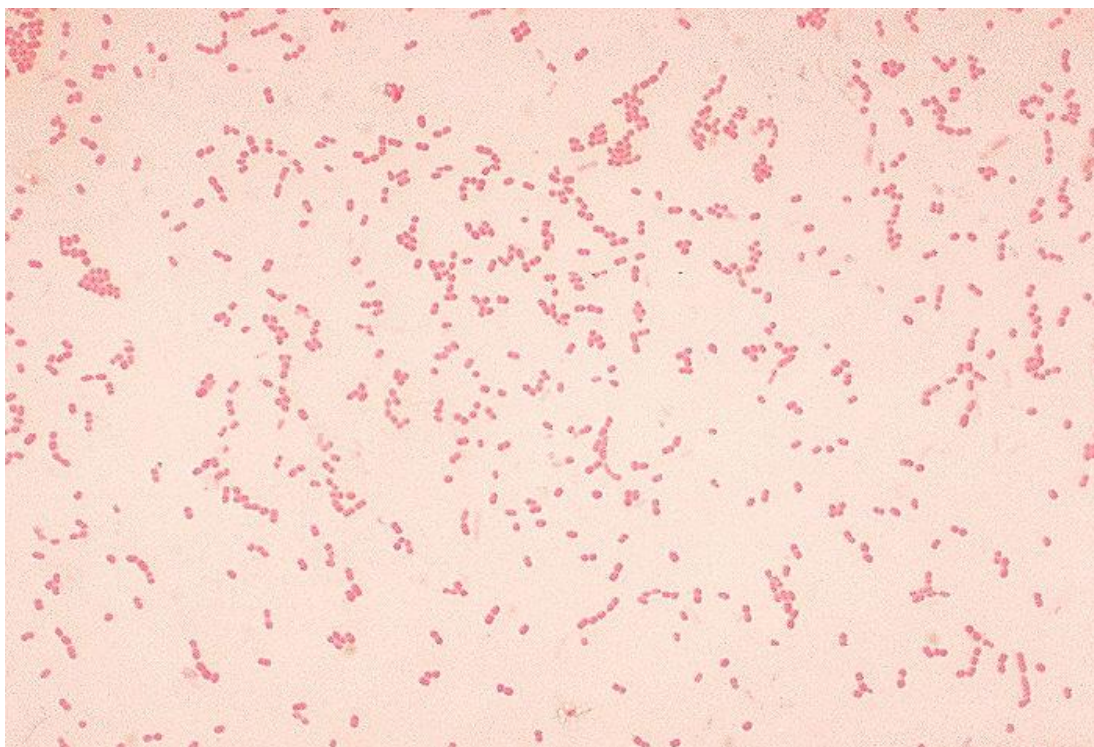
PŘÍLOHA 2 Nárůst *N. meningitidis* na čokoládovém agaru po 24 h inkubaci v atmosféře 5 % CO₂



PŘÍLOHA 3 *N. meningitidis* v elektronovém mikroskopu



PŘÍLOHA 4 Diplokoky *N. meningitidis* barvené dle Grama



PŘÍLOHA 5 Rozsáhlé sufúze na dolních končetinách při sepsi



PŘÍLOHA 6 Fulminantní purpura dolních končetin místy přecházející v sufúze



SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1] VOTAVA, M. a kol. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno, Neptun, 2003. ISBN 80-902896-6-5.

[2] SOUZA, A. L., SEGURO, A. C. Two centuries of meningococcal infection: from Vieusseux to the cellular and molecular basis of disease, *Journal of medical microbiology*, 2008, roč. 57, č. 11, s. 1313-1321, ISSN 1473-5644.

[3] MANCHANDA, V., GUPTA, S., BHALLA, P. Meningococcal disease: history, epidemiology, pathogenesis, clinical manifestations, diagnosis, antimicrobial susceptibility and prevention. *Indian journal of medical microbiology*, 2006, roč. 24, č. 1, s. 7-19, ISSN 1998-3646.

[4] EUZÉBY, J. P. *List of procariotic names with standing in nomenclature* [online]. Euzéby, aktualizováno květen 2012 [citováno 2012-04-16]. Dostupný z: WWW. <<http://www.bacterio.cict.fr/index.html>>.

[5] GREENWOOD, D., SLACK R. C. B., PEUTHERER, J. F. a kol. *Lékařská mikrobiologie, Přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie*. GRADA Publishing, 1999, ISBN 80-7169-365-0.

[6] HILL, D. J., GRIFFITHS, J., BORODINA, E. A VIRJI, M. Cellular and molecular biology of *Neisseria meningitidis* colonization and invasive disease, *Clinical science* 2010, roč. 118, č. 9, s. 547-64, ISSN 1470-8736.

[7] SPINOSA, M. R., PROGIDA, C., TALÀ, A. a kol.: The *Neisseria meningitidis* capsule is important for intracellular survival in human cells, *Infection and immunity*, 2007 roč. 75, č. 7, s. 3594-603, ISSN 1098-5522.

[8] HANCOCK, R. E., DIAMOND, G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences, *Trends in microbiology*, 2000, roč. 8, č. 9, s. 402-410, ISSN 1878-4380.

[9] CHOLTEN, R. J. P. M., KUIPERS, B., VALKENBURG, H. A. a kol. Lipooligosaccharide immunotyping of *Neisseria meningitidis* by a whole - cell ELISA with monoclonal antibodies, *Journal of medical mikrobiology*, 1994, roč. 41, s. 236-241, ISSN 1473-5644.

[10] PLANT, L., SUNDQVIST, J., ZUGHAIER, S. a kol.: Lipooligosaccharide structure contribute to multiple steps in the virulence of *Neisseria meningitidis*, *Infection and immunity*, 2006, roč. 74, č. 2, s. 1360-1367, ISSN 1098-5522.

[11] ZUGHAIER, S. M., TZENG, Y., ZIMMER, S. M. a kol. *Neisseria meningitidis* lipooligosaccharide structure-dependent activation of the macrophage CD14/toll-like receptor 4 pathway, *Infection and immunity*, 2004, roč. 72, č. 1, s. 71-80, ISSN 1098-5522.

[12] DEUREN, M., BRANDTZAEG, P., MEER, J. W. M. Update on meningococcal disease with emphasis on patogenesis and clinical management, *Clinical microbiology reviews*, 2000, roč. 13, č. 1, s. 144–166. ISSN 1098-6618.

[13] TZENG, Y. L., STEPHENS, D. S. Epidemiology and pathogenesis of *Neisseria meningitidis*, *Microbes and infection*, 2000, roč. 2, č. 6, s. 687-700, ISSN 1769-714X.

[14] POOLMAN, J. T., KRIZ - KUZEMENNSKA, P., ASHTON a kol. Serotypes and subtypes of *Neisseria meningitidis*: results of an international study comparing sensitivities and specificities of monoclonal antibodies, *Clinical and diagnostic laboratory imunology*, 1995, roč. 2, č. 1, s. 69–72, ISSN 1098-6588.

[15] MICKELSEN, P. A. A SPARLING P. F. Ability of *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, and commensal *Neisseria* species to obtain iron from transferrin and iron compounds, *Infection and immunity*, 1981, roč. 33, č. 2, s. 555-64, ISSN 1098-5522.

[16] PERKINS-BALDING, D., RATLIFF-GRIFFIN, M., STOJILJKOVIC, I. Iron transport systems in *Neisseria meningitidis*, *Microbiology and molecular biology reviews*, 2004, roč. 68, č. 1, s. 154-171, ISSN 1098-5557.

[17] STANKOVIČ, I. Meningokoková meningitida a sepsa – naliehavá príhoda v ambulancii, *VIA PRACTICA*, 2004, roč. 4, s. 203-206, ISSN 1336-4790.

[18] Washington State Department of Health. *Meningococcal Disease*. 2011, s. 1-14.

[19] New Jersey department of health and senior services. *Invasive Meningococcal Infection* [online]. Aktualizováno 6. 1. 2010 [cit. 2012-06-02]. Dostupný z WWW: <http://nj.gov/health/cd/documents/chapters/meningococcal_ch.pdf>.

[20] CHRBOJKA, P. *Bakteriální meningitidy*, 2001, s. 1-5.

[21] KŘÍŽOVÁ, P. Invazivní meningokokové onemocnění. *Pediatric pro praxi*, 2001, č. 2, s. 74-78, ISSN 1803-5264.

[22] ORR, H. J., GRAY, S. J., MACDONALD, M. a kol. Saliva and meningococcal transmission. *Emerging infectious disease*, 2003, roč. 9, č. 10, s. 1314-5, ISSN 1080-6059.

[23] BLECHOVÁ, Z. Hnisavé meningitidy nejmladších věkových skupin, *Neurologie pro praxi*, 2006, č. 3, s. 131–133, ISSN 1803-5280.

[24] HARRISON, L. H. Epidemiological profile of meningococcal disease in the United States, *Clinical infectious diseases: an official publication of the infectious diseases society of America*, 2010, roč. 50, č. S2, s. 37-44, ISSN 1537-6591.

[25] Meningokoková meningitida může způsobit smrt pacienta během několika hodin, *ZDN, Příloha Lékařské listy*, 1999, roč. 34, s. 3, ISSN 0044-1996.

[26] MANCHANDA, V., GUPTA, S., BHALLA, P. Meningococcal disease: history, epidemiology, pathogenesis, clinical manifestations, diagnosis, antimicrobial susceptibility and prevention. *Indian journal of medical microbiology*, 2006, roč. 24, č. 1, s. 7-19, ISSN 1998-3646.

[27] Meningitis Research Foundation. *Meningitida a septikémie* [online], 2007, aktualizováno 19. 12. 2011, citováno [30. 1. 2012] Dostupný z WWW: <<http://www.meningitis.org/assets/x/50238>>.

[28] ČERNÁ, O., POKORNÁ, P., SÁDLO, M. Sepse v dětském věku, *Klinická farmakologie a farmacie*, 2007, roč. 21, č. 3, s. 34–39.

[29] ROŽNOVSKÝ, L. Meningokoková onemocnění, *Postgraduální medicína*, 2010 č. 9, s. 1064-1069.

[30] HELLERUD, B. C., AASE, A., HERSTAD, T. K. a kol. Critical roles of complement and antibodies in host defense mechanisms against *Neisseria meningitidis* as revealed by human complement genetic deficiencies, *Infection and immunity*, 2010, roč. 78, č. 2, s. 802-809, ISSN 1098-5522.

[31] KREJSEK, J., KOPECKÝ, O. *Klinická imunologie*, NUKLEUS HK, 2004, ISBN 80-86225-50-X.

[32] HOŘEJŠÍ, V., BARTŮŇKOVÁ, J. *Základy imunologie*, Praha, Triton, 2009, ISBN 978-80-7387-280-9.

[33] ROHÁČOVÁ, H. Invazivní meningokoková onemocnění, *INTERNÍ MEDICÍNA PRO PRAXI*, 2004, č. 1, s. 40-43. ISSN 1803-5256.

[34] National Institute for Health and Clinical Excellence, NICE clinical guideline 102, 2010. *Bacterial meningitis and meningococcal septicaemia, Management of bacterial meningitis*

and meningococcal septicaemia in children and young people younger than 16 years in primary and secondary care.

[35] ROŽNOVSKÝ, L., GUTVIRTH, J., BENEŠ, J., DOSTÁL, V. a kol. Standard efektivní klinické péče v přednemocniční neodkladné péči (PNP): Invazivní meningokoková onemocnění, *Urgentní medicína*, 2002, roč. 3, s. 18-20. ISSN 1212-1924.

[36] HUFOVÁ, I., MALÁSKA, J., LIPOVÝ, B. a kol. Moderní přístup k léčbě meningokokové sepse. *Interní Medicína pro praxi*, 2011, roč. 13, č. 7 a 8, s. 310–311. ISSN 1803-5256

[37] D'AGATI, V. C., MARANGONI, B. A. The Waterhouse-Fridrichsen syndrom, *New England Journal of Medicine*, 1945, roč. 232, č. 1, s. 1-7, ISSN 1533-4406.

[38] SONAVANE, A., BARADKAR, V., SALUNKHE, P. a kol. Waterhouse-friderichsen syndrome in an adult patient with meningococcal meningitis, *Indian journal of dermatology*, 2011, roč. 56, č. 3, s. 326-328, ISSN 1998-3611.

[39] FERGUSON, J. H. A CHAPMAN, O. D. Fulminating meningococcic infections and the so-called Waterhouse-Friderichsen syndrome, *The American journal of pathology*, 1948, roč. 24, č. 4, s. 763-795, ISSN 1525-2191.

[40] KŘÍŽOVÁ, P., KALMUSOVÁ, J., MUSÍLEK M. Invazivní meningokokové onemocnění v České republice v roce 2007, *Zprávy EM (SZÚ Praha)*, 2008, roč. 17, č. 12, s. 23-27, ISSN 1804 – 8676.

[41] KŘÍŽOVÁ, P., KALMUSOVÁ, J., MUSÍLEK M. Invazivní meningokokové onemocnění v České republice v roce 2008, *Zprávy EM (SZÚ, Praha)*, 2009, roč. 18, č. 4, s. 130-134, ISSN 1804 – 8676.

[42] KŘÍŽOVÁ, P., KALMUSOVÁ, J., MUSÍLEK M. Invazivní meningokokové onemocnění v České republice v roce 2009, *Zprávy EM (SZÚ, Praha)*, 2010, roč. 19, č. 12, s. 26-30, ISSN 1804 – 8676.

[43] KŘÍŽOVÁ, P., MUSÍLEK, M., VACKOVÁ, Z. a kol. Invazivní meningokokové onemocnění v České republice v roce 2010, *Zprávy EM (SZÚ, Praha)*, 2011, roč. 20, č. 2, s. 59–63, ISSN 1804 – 8676.

[44] CARTWRIGHT, K., REILLY, S., WHITE, D. A. a kol. Early treatment with parenteral penicillin in meningococcal disease, *British medical journal (Clinical research ed.)*, 1992, roč. 305, č. 6846, s. 143-147, ISSN 1756-1833.

[45] POLLARD, A. J., BRITO, J., NADEL, S. a kol.: Emergency management of meningococcal disease, *Archives of disease in childhood*, 1999, roč. 80, č. 3, s. 290-296, ISSN 1468-2044.

[46] SCHAAD, U. B., KAPLAN, S. L. A MCCracken, G. H. Steroid therapy for bacterial meningitis, *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 1995, roč. 20, č. 3, s. 685-90, ISSN 1537-6591.

[47] *Praktické lékařství* 2008, roč. 4, č. 6, s. 276-280.

[48] Baxter International Inc., NeisVac-C, Souhrn údajů o přípravku, 2010, s. 1-8.

[49] Novartis Vaccines and Diagnostics S.r.l., Menjugate, Příbalová informace: Informace pro uživatele, 2010, s. 1-6.

[50] Novartis Vaccines and Diagnostics S.r.l., *Menveo*, Příbalová informace: Informace pro uživatele, 2010, s. 1-7.

[51] Sanofi Pasteur Inc., Meningococcal Polysaccharide Vaccine, Groups A, C, Y and W-135 Combined. Menomune® – A/C/Y/W-135, 2009, s. 1-6.

[52] Sanofi Pasteur Inc. Meningococcal Polysaccharide A+C Vaccine, Příbalová informace: Informace pro uživatele. 2009, s. 1-4.

[53] VYTRÁSOVÁ, J., BÍLKOVÁ, Z. *Laboratorní cvičení z obecné mikrobiologie*, 2003.

[54] FABIÁNOVÁ, K. Meningokokové infekce - aktualizovaný Manuál IV [online], SZÚ, 2008, aktualizováno 1. 2. 2012, citováno [2012-02-20] Dostupný z WWW: <<http://www.szu.cz/tema/prevence/meningokokove-infekce-aktualizovany-manual-iv>>.

[55] PARMENTIER, L., GARZONI, C., ANTILLE, C. a kol. Value of a novel *Neisseria meningitidis* – specific polymerase chain reaction assay in skin biopsy specimens as a diagnostic tool in chronic meningococemia, *Archives of dermatology*, 2008, roč. 144, č. 6, s. 770-773, ISSN 1538-3652.

[56] DELIDOW B. C. Polymerase chain reaction, basic protocols. *Methods in molecular biology (Clifton, N. J.)*, 1993, roč. 15, s. 1-29, ISSN 1940-6029.

[57] QURBANALIZADEGAN, M., RANJBAR, R., ATAEE, R. A. a kol. Specific PCR assay for rapid and direct detection of *Neisseria meningitidis* in cerebrospinal fluid specimen. *Iranian journal of public health*, 2010, roč. 36, č. 4, s. 45-50, ISSN 2251-6093.

[58] BREHONY, C., JOLLEY, K. A., MAIDEN M. C. J. Multilocus sequence typing for global surveillance of meningococcal disease, *FEMS microbiology reviews*, 2007, roč. 31, č. 1, s. 15-26, ISSN 1574-6976.

[59] PAVÓN, A. B. I., MAIDEN M. C. J. Multilocus sequence typing. *Methods in molecular biology (Clifton, N. J.)*, 2009, roč. 551, s. 129-140, ISSN 1940-6029.

[60] JOLLEY K. *Neisseria Sequence Typing Home Page* [online]. Oxford: University of Oxford, aktualizováno 13. 4. 2012 [citováno 2012-04-01]. Dostupný z WWW: <<http://pubmlst.org/neisseria/>>.

- [61] KŘÍŽOVÁ, P. Očkování proti meningokokovým nákazám, ZDN, 2011, č. 9, s. 939-944.
- [62] MASLANKA, S. E., GHEESLING, L. L., LIBUTTI, D. E. a kol. Standardization and a multilaboratory comparison of Neisseria, *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 1997, roč. 4, č. 2, s. 156-167, ISSN 1098-6588.
- [63] BELO, E. F., FARHAT C. K., GASPARI E. N. Comparison of dot - ELISA and standard ELISA for detection of Neisseria meningitidis outer membrane complex-specific antibodies, *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*, 2010, roč. 14, č. 1, s. 35-40, ISSN 1678-439144.
- [64] GUIROLA, M., CARMENATE, T., MENÉNDEZ, T. a kol. Comparison of three ELISA protocols to measure antibody responses elicited against serogroup C meningococcal polysaccharide in mouse, monkey and human sera, *Journal of microbiological methods*, 2006, roč. 65, č. 1, s. 135-43, ISSN 1872-8359.
- [65]]POPOVIC, T. a kol. Laboratory Methods for the diagnosis of meningitidis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*. *National Center for Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention*, Atlanta, 1998.
- [66] MARTIN, D., MCCALLUM, L., GLENNIE, A. a kol. Validation of the serum bactericidal assay for measurement of functional antibodies against group B meningococci associated with vaccine trials. *Vaccine*, 2005, roč. 23, č. 17–18, s. 2218–2221. ISSN 1873-2518
- [67] ALBERT J.P. a kol. Requirements for meningococcal polysaccharide vaccine, World health organisation, study group for cerebrospinal meningitidis control, Lyons, 1975.
- [68] GARRITY, G. a kol. *Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology*, 2005
- [69] KNUF, M., PANTAZI-CHATZIKONSTANTINOOU, A., PFLETSCHINGER, U. a kol. An investigational tetravalent meningococcal serogroups A, C, W-135 and Y-tetanus toxoid

conjugate vaccine co - administered with Infanrix hexa is immunogenic, with an acceptable safety profile in 12–23-month - old children, *Vaccine*, 2011, roč. 29, č. 25, s. 4264-4273, ISSN 1873-2518.

[70] BORROW, R., JOSEPH, H., ANDREWS, N. a kol. Reduced antibody response to revaccination with meningococcal serogroup A polysaccharide vaccine in adults, *Vaccine*, 2001, roč. 19, č. 9-10, s. 1129-1132, ISSN 1873-2518.

[71] VOER, R. M., MOLLEMA, L., SCHEPP, R. M. a kol. Immunity against *Neisseria meningitidis* serogroup C in the dutch population before and after introduction of the meningococcal C conjugate vaccine, *PloS one*, 2010, roč. 5, č. 8, s. e12144, ISSN 1932-6203.

[72] CEYHAN, M., YILDIRIMA, I., BALMER, P. a kol. Age-specific seroprevalence of serogroup C meningococcal serumbactericidal antibody activity and serogroup A, C, W135 and Y-specific IgG concentrations in the Turkish population during 2005, *Vaccine*, 2007, roč. 25, č. 41, s. 7233-7237, ISSN 1873-2518.

[73] TROTTER, C. L., BORROW, R., FINDLOW, J. a kol. Seroprevalence of antibodies against serogroup C meningococci in England in the postvaccination era. *Clinical and vaccine immunology*, 2008, roč. 15, č. 11, s. 1694-1698, ISSN 1556-679X.