

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2020

Lenka Mičinová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Meningokokové infekce
Bakalářská práce

2020

Lenka Mičínová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Lenka Mičinová**
Osobní číslo: **C17189**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Meningokokové infekce**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Charakterizujte původce meningokokových infekcí *Neisseria meningitidis*.
2. Popište patogenezi meningokokových infekcí.
3. Uveďte laboratorní diagnostiku *Neisseria meningitidis*.
4. Nastiňte léčbu meningokokových infekcí a možnosti prevence.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování bakalářské práce:

25 s.
dle potřeby
tištěná

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Květa Koryčanová, Ph.D.
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce:

20. prosince 2019

Termín odevzdání bakalářské práce:

3. července 2020

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2020

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., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 15. 07. 2020

Lenka Mičínová

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych ráda poděkovala své vedoucí práce paní Ing. Květě Koryčanové, Ph.D. za cenné rady a připomínky, ochotu, trpělivost a pomoc při zpracování této bakalářské práce. Dále děkuji své rodině a přátelům za podporu během celého studia.

ANOTACE

Tato bakalářská práce se zabývá meningokokovými infekcemi a jejich původcem, kterým je *Neisseria meningitidis*. V práci jsou dále popsány základní poznatky z oblasti léčby, stanovení a vakcinace. Podrobněji jsou zde také vypsány a charakterizovány další infekce způsobené touto bakterií, jako je například pneumonie či artritida.

KLÍČOVÁ SLOVA

Meningokok, infekce, *Neisseria meningitidis*, meningitida

TITLE

Meningococcal infections

ANNOTATION

This bachelor thesis deals with meningococcal infections and their causative agent, which is *Neisseria meningitidis*. The thesis also describes the basic knowledge in the field of treatment, determination and vaccination. Other infections caused by this bacterium, such as pneumonia or arthritis, are also described in more detail.

KEYWORDS

Meningococcus, infection, *Neisseria meningitidis*, meningitis

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK.....	10
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	11
TERMINOLOGIE.....	12
ÚVOD.....	13
1. NEISSERIA MENINGITIDIS.....	14
1.1 Stavba buňky.....	14
1.2 Antigenní stavba	15
2. VSTUP DO HOSTITELE	16
2.1 Přenos.....	19
2.2 Nebezpečné faktory	19
3. MENINGITIDA	21
3.1 Sepse a bakteriémie	21
3.2 Další infekce	23
3.3 Projevy	23
3.3.1 Projevy meningitidy.....	23
3.3.2 Projevy meningokokové sepse.....	24
3.3.3 Projevy meningokokemie	24
4. STANOVENÍ.....	25
4.1 Kultivace	25
4.1.1 Hmotnostní spektrometrie.....	27
4.1.2 Základní biochemické testy	28
4.2 Stanovení CSF	29
4.3 Mikroskopie	29
4.3.1 Barvení dle Grama	30
4.4 Sérologické metody	32
4.4.1 Rychlé rozpoznávací testy	32
4.5 Molekulární metody.....	32
4.5.1 Metoda PCR.....	33
4.5.2 MLST a jiné	34
5. LÉČBA.....	35
5.1 Prevence.....	36

5.2 Vakcinace.....	36
5.2.1 Vývoj a složení vakcín.....	37
5.2.2 Vakcíny v ČR.....	38
5.3 Komplikace.....	39
6. EPIDEMIOLOGIE.....	40
6.1 Stav ve světě	40
6.2 Stav v ČR.....	42
ZÁVĚR	46
POUŽITÁ LITERATURA.....	47

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1: Příčný řez meningokoka	16
Obrázek 2: Africké pásmo meningitidy	20
Obrázek 3: Petechie na rukou	22
Obrázek 4: Příznaky meningitidy	24
Obrázek 5: Kultivace bakterie <i>Neisseria meningitidis</i> na KA.....	27
Obrázek 6: Postup Gramova barvení	30
Obrázek 7: Gramovo barvení v mikroskopu	31
Obrázek 8: Složení buněčné stěny u G+ a G- bakterií	31
Obrázek 9: Oblasti s častými epidemiemi meningitidy	41
Tabulka 1: Očkování proti meningokoku typu B	39
Tabulka 2: Charakteristika a výskyt meningokoků podle séro skupiny	41
Tabulka 3: Počty nemocných podle séro skupin v určitém věku, Česká republika 2019.....	44
Graf 1: Počet onemocnění a úmrtí na invazivní meningokokové onemocnění, Česká republika, 1993 – 2019	43
Graf 2: Procentuální počet onemocnění podle séro skupin invazivního meningokokového onemocnění, Česká republika, 1993 – 2019.....	43
Graf 3: Nemocnost invazivních meningokokových onemocnění, Česká republika, 1993 – 2019	45
Graf 4: Počet úmrtí na invazivní meningokokové onemocnění, Česká republika, 1993 – 2019	45

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

BBB	Hematoencefalická bariéra
cgMLST	Sekvenční typ určený pro metodu core genome MLST
CSF	Mozkomíšní mok
DIC	Diseminovaná intravaskulární koagulace
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EMA	Evropská léková agentura
fHbp	Faktor H vážící protein
G-CSF	Růstový faktor granulocytů
IL	Interleukin
KA	Krevní agar
LAMPs	Membránové proteiny lysozomu
LOS	Lipooligosacharidový endotoxin
MALDI- TOF	Laserem indukovaná desorpce a ionizace za účasti matrice – detektor doby letu
MLST	Multilokusová sekvenční typizace
MS	Hmotnostní spektrometrie
NadA	Adhezní protein <i>Neisserie A</i>
NHBP	Protein <i>Neisserie</i> vážící heparin
NM	<i>Neisseria meningitidis</i>
PCR	Polymerázová řetězová reakce
rMLST	Ribozomální multilokusová sekvenční typizace
rRNA	Ribozomální ribonukleová kyselina
SZÚ	Státní zdravotní ústav
TNF	Tumor-nekrotizující faktor
WHO	Světová zdravotnické organizace

TERMINOLOGIE

Patogenita – schopnost bakterie poškozovat hostitelskou buňku a vyvolat onemocnění

Virulence – kvantitativní vyjádření patogenity určité bakterie

Inkubační doba – časový úsek od proniknutí infekčního agens nebo toxinu do organismu do projevení prvních klinických příznaků (čas nutný k pomnožení agens)

Sepse – život ohrožující dysfunkce orgánů způsobená aberantní odpovědí organismu na infekci

ÚVOD

Závažné hnisavé záněty mozkových blan mají známého původce, kterým je bakterie *Neisseria meningitidis*. Jedná se o bakterii, která jako jediná má schopnost vyvolávat meningitidu. Typickým znakem pro tento typ meningitidy je vyvolání epidemie, což je větší výskyt onemocnění v určitém čase na určitém místě. Mezi další významná onemocnění, která tato bakterie způsobuje, patří sepse a nosofaryngitidy, méně časté jsou potom artritidy, pneumonie a další záněty.

Tato bakterie je běžnou součástí mikroflóry lidí a lze ji najít asi u 10% populace. Nachází se především v horních cestách dýchacích. Jedná se o výhradně lidského parazita, to znamená, že v přírodě se volně nevyskytuje. Postihovat může mladé, dospělé i batolata, kteří ještě nemají dostatek protilátek. V prevenci a profylaxi se uplatňuje očkování.

1. NEISSERIA MENINGITIDIS

Neisseria meningitidis je z hlediska vědecké klasifikace organismus z domény *Bacteria* (bakterie), kmene *Proteobacteria*, třídy *Betaproteobacteria*, řádu *Neisseriales*, čeledi *Neisseriaceae*, rodu *Neisseria* (Stephens et al., 2007). Tento rod dostal své pojmenování po německém lékaři Albertu Neisserovi, který jako první objevil onemocnění zvané kapavka. Jedná se o nemoc vyvolanou bakterií *Neisseria gonorrhoeae* (Votava et al., 2003).

Neisseria meningitidis, též nazývaná jako meningokok, je gramnegativní bakterie. Má tvar diplokoků. Jedná se o heterotrofní kosmopolitní organismus (Julák, 2012). Poprvé byla izolována Antonem Weichselbaumem v roce 1887 (Ronnie, 2016).

1.1 Stavba buňky

Z hlediska mikroskopie mluvíme o gramnegativních kócih prodlouženého tvaru, které se vyskytují jako diplokoky, tzn. ve dvojicích. Jejich tvar připomíná kávové zrna (Rouphael, 2012).

Bakterie *Neisseria meningitidis* se řadí mezi prokaryontní organismy. Jedná se o jednobuněčné organismy s výrazně jednodušší stavbou buněk, než mají organismy eukaryotické. Prokaryotická buňka je chráněna buněčnou stěnou z peptidoglykanu, dále je tvořena cytoplazmatickou membránou, cytoplazmou, ve které je volně uložena jedna dvouřetězcová DNA, z hlediska organel jsou to ribozomy a plazmidy, které mohou nést důležitou genetickou informaci (Goering et al., 2016).

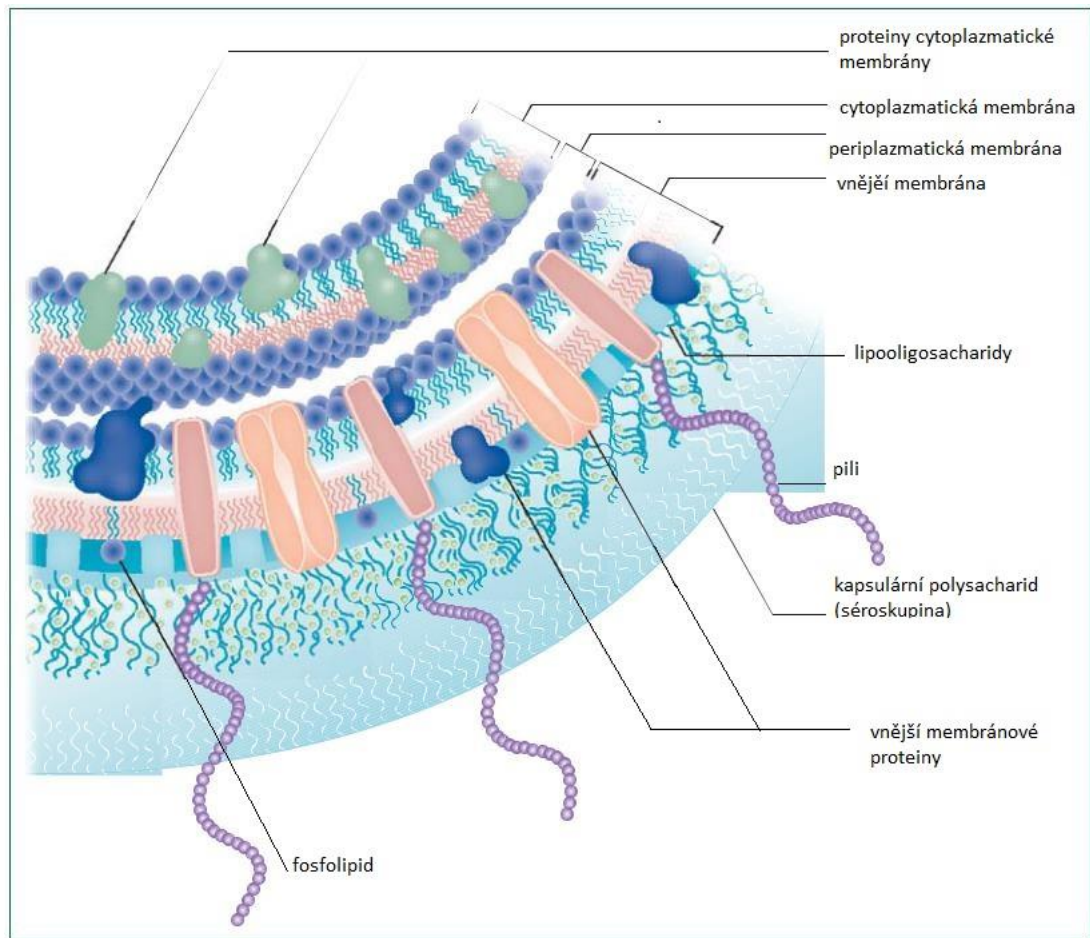
Celou buňku obklopuje pouzdro tvořené z polysacharidů. Důležitou součástí stěny jsou fimbrie, neboli pili. Jedná se o štětinovité výběžky viditelné pouze pod mikroskopem. Vyskytují se na povrchu bakterie a vyrůstají z vnitřní membrány. Tato tenká křehká vlákna jsou tvořena převážně oligomerními bílkoviny. Hlavní funkcí pilů je adheze, neboli přichycení na hostitelskou buňku. Svůj význam plní mimo jiné i při vykonávání pohybu (Votava, 2001).

Stěna buňky, jak již bylo zmíněno, je složitější i když je tenčí. Tloušťka se pohybuje kolem 15 nm. Je složena z vnější membrány, pod kterou je tenká vrstva peptidoglykanu obklopená zevnitř cytoplazmatickou membránou, která je tvořena lipidovou dvojvrstvou. (Goering et al., 2016). Vnější membránu tvoří několik podstatných složek, kterými jsou zejména fosfolipidy, lipopolysacharidy, proteiny a poriny. Fosfolipidy vytvářejí dvojvrstvu, ve které jsou uloženy různé bílkoviny. Poriny jsou kanálky, které zastávají funkci transportní. Přenášejí živiny do periplasmatického prostoru. Lipoproteiny zajišťují vazbu mezi peptidoglykanem a zevní membránou. Lipopolysacharidy v zevní vrstvě obsahují lipid A a antigen O čili tělový, somatický antigen, který je specifický pro určitý druh či sérotyp bakterie. (Votava, 2001). Rozdíly ve struktuře kapsulárních polysacharidů určují séroskupinu, rozdíly v lipooligosacharidech imunityp a rozdíly v bílkovinách vnější membrány určují sérotyp a subsérotyp (Apicella, 2005).

1.2 Antigenní stavba

Nejznámější typ antigenu je polysacharidový kapsulární antigen. *Neisseria meningitidis* má k dispozici 13 séroskupin, které se od sebe odlišují na základě rozdílné kapsulární polysacharidové struktury. Z těchto 13 skupin je ale pouze 6 séroskupin příčinou většiny život ohrožujících onemocnění. Nejvýznamnější jsou A, B, C, W-135, X a Y (Rosenstein et al., 2001).

Vnější membrána buněčné stěny obsahuje lipooligosacharidový endotoxin (LOS). Jeho hlavní funkcí je adheze na hostitelskou buňku a následná kolonizace. Je tvořen ze dvou částí. První je oligosacharidové jádro, tvořeno krátkým řetězcem sacharidových zbytků. Druhou částí je lipid A, který má hydrofilní povahu a díky tomu je vázán k vnější membráně. Lipid A má pro živočichy toxický efekt (Greenwood, 1999).



Obrázek 1: Příčný řez meningokoka (Stephens, 2007)

2. VSTUP DO HOSTITELE

N. meningitidis postihuje především lidský organismus. Zhruba u 10 % populace se vyskytuje v nosohltanu bez příznaků. U lidí s narušenou rezistencí způsobuje nasofaryngitidu neboli zánět nosohltanu. Někdy může postupovat sliznicemi do oběhu krve a způsobit tak bakteriémií, která někdy vede až k rozvoji hnisavé meningitidy (Pizza a Rappuoli, 2015).

Obecně lze říci, že specifické přichycení meningokoků na cylindrické buňky epitelu, zejména v okolí nosohltanu, umožňují pily. Cílem je receptor CD46. Dojde k pomnožení na sliznici a k vytvoření biofilmu. Pouzdro, které nijak neovlivňuje přichycení, je při tvorbě v této fázi kolonizace geneticky řízeno. Pokud je meningokok k hostitelské buňce přichycen, dojde k tvorbě pseudopodií. Jedná se výběžky cytoplazmy, často nazývány jako chapadla hostitelské buňky, které mají schopnost pohltnout bakterie (Stephens, 2009). Ihned po pohlcení bakterie projde epitelovou buňkou, která slouží jako zázemí pro přežití, růst a množení bakterií. Bakterie putuje z epitelu přes bazolaterální membránu do submukózy, kde proniká do krevního řečiště. Délka průniku meningokoka přes buňky epitelu je asi 18 hodin. Průnik do vaskulárního systému zajišťují pily, které se váží na receptor CD147 (Pizza a Rappuoli, 2015).

Meningokoky přežívají intracelulárně v membránových organelách, lysozomech. Přežití bakterie v intracelulárním prostoru ovlivňuje IgA1 proteáza. Její hlavní funkcí je degradace membránových proteinů lysozomu (LAMPs), a tím dojde k zamezení dozrávání fagozomu ve fagolysozomu, kde by mohlo dojít ke smrti bakterie. Dále se zvyšuje exprese genů v pouzdře, která chrání před fagocytózou (Stephens, 2009).

Po proniknutí *Neisserie meningitidis* (NM) do krevního řečiště dojde k osídlení cév. Nejčastěji je zachycována v krevních kapilárách celého těla přichycená na cévní endotel. Zpomalený tok krve hraje významnou roli na přichycení v kapilárách a tepénkách. NM se ve formě mikrokolonií nalézá i v mozkových kapilárách. Vstupu do nervové tkáně brání hematoencefalická bariéra (BBB – z anglického překladu blood-brain barrier), přes kterou musí meningokok prostoupit. BBB se sestává z cévních endotelových buněk, které jsou spojeny téměř nepropustnými přiléhavými spoji, tzv. tight junctions. Další složky, které ji tvoří, jsou například bazální membrána, astrocytární výběžky, pedikly (cytoplazmatické výběžky podocytů). BBB slouží jako přepážka mezi krví a mozkovou tkání. Zabraňuje volnému pohybu látek hydrofilní povahy přes bariéru. Díky této funkci a nízké propustnosti chrání mozek před látkami infekčního původu i jinými nežádoucími vlivy. Hematolivorová bariéra je tvořena epitelem choroidálních plexů, který vylučuje likvor. Slouží především k oddělení likvoru od krve. Původně měla být NM vedena přes choroidální plexus, avšak výzkum tuto teorii zavrhl z důvodu neprokázání toho tvrzení. V žádném záznamu nebyl objeven zánět komory mozku, který by přítomen měl být (Miller et al., 2013).

Meningokoky interagují s endoteliálními buňkami a poté následují 4 možné průchody mozkovým endotelem:

- 1) Transcelulární transport.
- 2) Paracelulární průchod otevřenými těsnými spoji, tedy za pomoci tight junctions.
- 3) Cytotoxický účinek na bariéru. Poškození buněk endotelu.
- 4) Strategie trojského koně – infikované fagocyty byly přeneseny přes bariéru (Dupin et al., 2012).

Po přilnutí meningokoka na buňku endotelu dojde k jeho proliferaci a vytvoření mikrokolonií. Přichycení umožňují pili typu IV, které se vážou na dosud neznámý receptor. Poté dochází k interakci s β 2-adrenoreceptorem a nahromadění bílkovin pod endoteliálním povrchem. Vzniknou kortikální plaky a vytvoří se mikrokly, které jsou nepostradatelné z hlediska přilnutí a odolnosti vůči toku krve. V oblasti, kde došlo k adhezi bakterie, jsou nahromaděny bílkoviny z mezibuněčných spojů a vzniká tak cesta pro průchod NM (Miller et al., 2013).

Důležité jsou i cytokiny zánětlivých reakcí TNF- α , IL-1 a IL-6, a to především z hlediska zvýšení propustnosti BBB, čímž napomáhají NM proniknout do mozkomíšního moku (CSF – přeloženo z cerebrospinal fluid) (Stephens a Tzeng, 2000). IL-1 je klíčovým pro záněty nervového systému a má protizánětlivé účinky na astrocyty neboli astroglie. IL-1 a TNF jsou produkovány makrofágy a monocyty, ale také rezidentními buňkami (Myonagh, 2005). Pokud v lidském těle propukne zánět, v mozku dojde ke zvýšení hodnot TNF a IL-1. Jejich výskyt může zapříčinit kolaps BBB (Hofman, 1985).

Studie o průchodu NM přes BBB dosud nemají známy všechny okolnosti. Bádání po této tématice bylo i velmi pomalé. Hlavní příčinou je fakt, že NM je patogenní pouze pro člověka, tudíž zvířata jako testovací modely jsou nepřesná. Nejméně objasněnou otázkou výzkumu jsou receptory přilnutí na endotelových buňkách pro pili typu IV (Trivedi et al., 2011).

2.1 Přenos

Nejčastějším typem přenosu infekce mezi lidmi je kapénková forma. Z horních cest dýchacích obvykle vylétávají kapénky při mluvení, kašlání či kýchání. Někdy usnadňují přenos respirační infekce dýchacího ústrojí. Kritickými místy pro přenos infekce jsou malé či stísněné prostory, ve kterých se vyskytuje větší počet osob, které mohou být nositeli NM. Takovými místy rozumíme například dětské tábory, věznice, vysokoškolské koleje či internáty a jiné ubytovny (Goering et al., 2016).

Jiný typ přenosu je přímý kontakt. Tím rozumíme kontakt sliznic dvou či více osob. Typickým příkladem je líbání či pohlavní styk (Votava et al., 2003).

Období od vstupu nákazy do organismu až po vypuknutí onemocnění je asi 1 až 8 dní, někdy je uváděno 1 až 4 dny. Po osídlení nosohltanové sliznice dojde u invazivních forem k průchodu přes epiteliální buňky až do krve (Kasal, 2000). Důsledkem tohoto jevu je bakteriémie. Z buněčné stěny se uvolňuje endotoxin a dochází k zánětlivé odpovědi organismu a rozvoji sepse (Sestra a urgentní stavy, 2008).

2.2 Nebezpečné faktory

K infekci dojde, pokud se shromáždí více faktorů. Jedná se o faktory mikroba i hostitele. Na straně mikroorganismu závisí, o jaký kmen půjde a na přítomnosti virulenčních faktorů. Z hlediska hostitele hraje důležitou roli fyzický a imunitní stav jedince (Murray et al., 2013). Věková cílová skupina není nijak definována, neboť infekce se může projevit v jakémkoliv věku. Avšak mezi nejohroženější patří novorozenci, kteří ještě nemají vyvinuty vlastní protilátky, které by chránily jejich organismus (Greenwood, 1999).

Při nedostatku či porušení komplementu, značeného C, v lidském organismu se zvyšuje možnost nakažení. K nedostatkům komplementu může dojít buď vrozenou, nebo získanou cestou. V případě získaného nedostatku mluvíme například o nefritidě, jaterní cirhóze, autoimunitních chorobách nebo třeba lupusu erythematodes. S poruchami komplementu spojujeme asi 10-20 % invazivních meningokokových onemocnění. Pokud k poruše dochází na terminální části komplementu (C5-C8) odpovědného za atak bakteriální membrány, hrozí bakteriální infekce (Stephens a Tzeng, 2000).

Jedním z rizikových faktorů jsou protilátky. Sledujeme zejména jejich snížení či úplnou imunodeficienci. Protilátky jsou získávány přirozeně při stimulaci imunity v případě bezpříznakového nosičství jak přímo NM, tak i u jiných nepatogenních druhů rodu *Neisseria*. U lidí trpících Brutonovou X-vázanou agamaglobulinémií jde o úplnou imunodeficienci protilátky způsobenou vrozenou cestou. Právě tito lidé mají větší pravděpodobnost výskytu meningokokových onemocnění. Dalšími případy jsou staří lidé trpící nemocemi, které zapříčiňují zhoršenou funkci imunoglobulinů. Jedná se o poškození jater a ledvin, myelomy nebo chronickou lymfatickou leukémií (Stephens a Tzeng, 2000).

Opomenout nesmíme ani aktivní nebo pasivní kouření, které je rovněž jedním z rizikových faktorů. Významným faktorem je především, že způsobuje sníženou funkční a mechanickou celistvost epitelu. Bezřasinkový epitel vystřídá původní cylindrický řasinkový epitel, avšak tímto jevem dojde ke snížení či deficitu ochrany před adhezí (Rosenstein et al., 2001).

Cestování do postižených zemí, kde se meningitida epidemicky vyskytuje, je také nebezpečným faktorem. Nedoporučuje se vyjíždět do zemí, které se nacházejí v tzv. pásmu meningitid (viz obrázek č. 2) (Stephens, 2009).



Obrázek 2: Africké pásmo meningitidy (Mbaeyi, 2020)

3. MENINGITIDA

Meningitida je též zvaná jako zánět mozkových blan. Jedná se o zánět membrán, které chrání mozek a míchu, souhrnně nazývané mozkomíšní pleny. Bakteriální meningitida ohrožuje lidský život, neboť dochází k zánětu právě v oblasti mozku a míchy. Rozvoj klinických příznaků trvá několik hodin, proto toto onemocnění řadíme mezi urgentní stavy (Sáez-Llorens, 2003).

Na invazivních formách má meningitida bez sepse asi čtvrtinový podíl. Ve vyspělých zemích se meningitida bez sepse projevuje u asi 60 % pacientů. Smrtnost meningitidy je okolo 2 % (Rožnovský, 2007).

Pacienti prodávající meningitidu mají v plazmě sníženou koncentraci endotoxinu. Naopak v CSF je koncentrace zvýšená. V mozkomíšním moku dochází k vytvoření lokálního zánětu v oblasti subarachnoidálního prostoru (Stephens et al., 2007). Endotoxin, který byl od meningokoka uvolněn, povzbudí meningeální buňky. Ty následně vytvoří cytokiny (IL-1, IL-6, TNF- α). Dojde také ke tvorbě růstového hormonu leukocytů- granulocytů G-CSF. Na endotel se naváží neutrofil, které následně procházejí skrze endotel a zapříčiní jeho porušení. Pokud nyní odebereme likvor, bude zakalený. V mozkomíšním moku nenalezneme koagulační faktory. K úmrtí dochází díky otoku mozku, především útlaku mozečku, ve kterém se nalézá centrum dechu. Otok vzniká kvůli zvětšené propustnosti BBB či poruše buněk mozku (Křížová a Rožnovský, 2011).

Meningitidu kromě *Neisseria meningitidis* vyvolávají například *Streptococcus agalactiae* nebo *pneumoniae*, *Escherichia coli* a *Haemophilus influenzae*. Jedná se převážně o komenzály trávicího traktu a nosohltanu (Join-Lambert et al., 2010).

3.1 Sepse a bakteriémie

V případě, že se do krve vpraví meningokok, jedná se o meningokokovou bakteriémi, které rovněž říkáme meningokokcémie. Pokud je velmi rychlé rozmnožení meningokoka v krvi, dojde k rozvoji meningokokové sepse doprovázené septickým šokem. Tato nemoc je velmi závažná a může vést až ke smrti, která obvykle nastává během několika málo hodin (Křížová a Rožnovský, 2011).

V krvi NM vyvolává systémovou zánětlivou reakci. Mimo jiné aktivuje koagulační kaskádu a komplement. Do krve se vyplavuje endotoxin, LOX, který uvolňuje protizánětlivé cytokiny (IL-1, IL-6, TNF- α). Dojde k aktivaci koagulace a komplementu a k syntéze prostaglandinů a leukotrienů, čímž se poškodí endotelové buňky a zaniknou malé cévky (Batista et al., 2017).

Při uvolnění velkého množství endotoxinu do krve hrozí vznik septického šoku. Protože má NM schopnost autolýzy, zvyšuje tak právě i vypouštění endotoxinu. Pro septický šok je typický pokles krevního tlaku a přítomnost DIC (diseminované intravaskulární koagulace). Jedná se o patologický stav, pro který je charakteristická aktivace koagulačního systému za pomoci tkáňového faktoru z vnější strany monocytů a endotelu. Naopak systém fibrinolytický je deaktivován. Na kůži nalezneme červené skvrnky – petechie (viz obrázek 3), které jsou způsobeny kožním krvácením. Vzhledem k poškození cév se objevuje i sufuze, tedy podkožní krvácení. V některých případech vede k ischemii či odumření tkáně. Mohou se tvořit mikrotromby, které zapříčiňují selhání orgánů a následnou hypoxii, ke které napomáhá i vyšší spotřeba kyslíku během infekce. Vyrovnání potom zajišťuje tachypnoe či tachykardie. Koagulační faktory mohou být zcela vyčerpány, což se projeví vyšší krvácivostí (například i ze sliznic a kůže), krvácení do nadledvin, které je známo pod názvem Waterhouse-Friderichsenův syndrom. Symptomy meningitidy se nemusí projevit například při průchodu bakterie přes BBB. Úmrtnost sepsí je asi 25% (Join-Lambert et al., 2010).



Obrázek 3: Petechie na rukou (Heimer, 2018)

Meningokoková bakteriémie se vyskytuje u 20–30 % infekcí vyvolaných meningokokem. Je charakterizována výskytem meningokoka v krvi. Úmrtnost bývá kolem 35 %. Často je spojována s meningitidou, kde se úmrtnost pohybuje kolem 20 %. Projevy šoku a sepse nastávají do několika hodin (Batista et al., 2017). Jsou zaznamenány i případy chronické meningokokcémie, které trvají řádově několik týdnů až měsíců. Jsou velmi vzácné. Objevena byla ale i forma přechodná, kdy je pacient uzdraven během 2–5 dní i bez užívání antibiotik. U této formy bakteriémie se v krvi bakterie vyskytují velmi málo (Stephen et al., 2007).

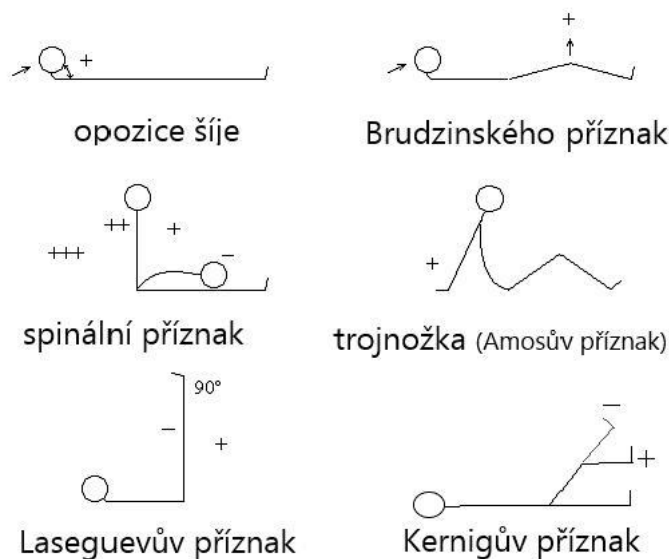
3.2 Další infekce

Dalšími onemocněními, které *Neisseria meningitidis* vyvolává, jsou artritida, pneumonie, pleuritida, perikarditida nebo uretritida. Tyto infekce jsou vzácné. Při invazivních meningokokových onemocněních se projevuje pneumonie zhruba u 5 - 15 % nemocných. Avšak ne vždy je stanovena, neboť je těžké u meningokoků z nosohltanu rozeznat nosiče a pneumonii. Artritidu nalezneme u 11 % pacientů s meningokokcémie, avšak ani tu nelze rozeznat od jiných hnisavých artritid. Důsledkem masivní tamponády srdeční je perikarditida, kterou zajišťuje meningokok séro skupiny W135 (Rosenstein et al., 2001).

3.3 Projevy

3.3.1 Projevy meningitidy

Úplně první příznaky meningitidy jsou nespecifické. Mohou se projevit 1 až 14 dní po nákaze dle rychlosti infekce. V některých případech jsou projevy v počátku rozvoje choroby velmi podobné chřipce. Hlavními a nejčastějšími symptomy jsou křeče, bolesti hlavy, ztuhlost šíje, změny v chování, ospalost, nevolnost a horečka. U 20 – 52 % pacientů se vyskytuje vyrážka s petechiemi. Někteří pacienti dokonce trpí poruchami vědomí, zvracením, bradykardií, dýchacími obtížemi, hypertenzí a mají asymetrické oční zorničky (van de Beek et al., 2016). Charakteristické symptomy meningokokové meningitidy jsou meningeální příznaky (viz obrázek 4). Dochází k podráždění motorických nervových drah, které procházejí přes zánětlivé meningy. Důsledkem je bolestivost při některých pohybech či změna pohyblivosti. Mezi takové příznaky řadíme Brudzinského, Kernigův či spinální příznak (Saber a Syed, 1999).



Obrázek 4: Příznaky meningitidy (Rozsypal, 2004)

3.3.2 Projevy meningokokové sepse

Typickými projevy sepse jsou náhradní mechanismy hypoxie, tedy zrychlené dýchání a zvýšená tepová frekvence. Dále jsou velmi časté nevolnosti a horečka. Symptomy nastupují velmi rychle a tím prudce zhoršují celkový stav pacienta. V některých případech se objevuje cyanóza až ischemie u tkání periferního původu. Oligurie až anurie je důsledkem snížení cirkulující tekutiny či nedostatečné perfuze (prokrvení) ledvin. Přítomny jsou i petechie rozesté po celém těle. Od klasické vyrážky je lze rozeznat tak, že přitlačíme sklíčko na pokožku a pozorujeme vyblednutí skvrn. Petechie totiž na rozdíl od kůže v okolí nevyblednou (Křížová a Rožnovský, 2011).

3.3.3 Projevy meningokokcémie

Meningokokcémie je označení pro přítomnost meningokoků v krvi. Základními projevy jsou horečka, studené končetiny, tělesná slabost, bolesti hlavy, bledost kůže a krevní tlak je snížen. Symptomy přicházejí pozvolna. Dalším velmi obvyklým projevem jsou petechie neboli tečkovité krvácení do kůže, které se objevuje u 40 – 80 % (Batista et al., 2017). Při chronické meningokokcémii jsou typickými projevy bolesti hlavy a kloubů, střídavé horečky a vyrážka. Tyto projevy mohou na pár dní vymizet a poté se znovu vrátit (Stephens et al., 2007).

4. STANOVENÍ

Vzhledem k tomu, že meningokokové infekce mají nespecifické příznaky, je laboratorní stanovení velmi podstatné. Pro stanovení slouží biologický materiál, kterým je nejčastěji krev a mozkomíšni mok. V některých případech se pro vyšetření používá obsah petechií, nosohltanové výtěry či tekutina z kloubů, avšak tyto vzorky nejsou tak časté. Při odběru biologického materiálu odebíráme vzorek pro kultivační i bezkultivační vyšetření. U některých pacientů by totiž čekání na kladný výsledek kultivace mohl být fatální (Křížová a Rožnovský, 2011). V oblasti bezkultivačních metod dominují molekulární metody, zejména PCR. Dále je využívána mikroskopie, latexová aglutinace a jiné metody sérologického typu. V případě podezření na meningitidu se provádí analýza CSF (mozkomíšního moku). V rozvojových zemích jsou nejčastějšími metodami stanovení kultivace, latexová aglutinace a mikroskopie CSF. Výhodami těchto metod je jednoduchost a nenáročnost na instrumentaci. Ve vyspělejších zemích se využívají zejména kultivace a metoda PCR (Rosenstein et al., 2001).

U pacientů s infekcí bakteriálního původu nalezneme v krevním obrazu leukocytózu, tedy zvýšený počet leukocytů. Nejčastěji je zvýšen počet mladších vývojových stádií neutrofilních granulocytů. Avšak pacienti mající vyšší koncentraci endotoxinu v plazmě, mají počet leukocytů normální či nižší. Příčinou tohoto úkazu je přilnutí neutrofilů v periferním cévním systému na buňky endotelu. Právě zde je vyšší množství molekul pro přilnutí a pro lehčí vstup leukocytů do oblasti zánětu (Stephens et al., 2007).

4.1 Kultivace

Tradiční laboratorní diagnostika je založena na bakteriologické kultivaci. Ovšem nesmíme zapomenout brát v úvahu vliv léčby antibiotiky na pozitivitu kultivace. Meningokoky jsou citlivé na změny prostředí, proto musíme dbát zvýšené opatrnosti zejména při špatném skladování či přepravě biologického materiálu. Mohlo by totiž dojít k usmrcení bakterie (Rosenstein et al., 2001).

N. meningitidis se řadí mezi bakterie náročné na kultivaci. Při aerobní kultivaci je vyžadována přítomnost speciálních půd se zvýšenou tenzí CO₂, asi 5-10 %. Optimální teplotou pro růst mikroorganismu je 35-37 °C. Mezi nejvhodnější půdy pro růst meningokoků patří čokoládový či modifikovaný krevní agar. Krevní agar (KA) je základní typ živné půdy, který vznikl ze zvířecí krve, která byla defibrinována. Nejčastěji se jedná o ovčí či koňskou krev. Tato defibrinovaná krev byla přidána k živnému agaru. Čokoládový agar je typem KA. V tomto případě se krev přidává do půdy při teplotě 80 °C. Půda má tmavě hnědou barvu připomínající čokoládu a je dále obohacena o antibiotika, která slouží zejména k odstínění méně významné flóry.

Dalším typem půdy je Müller-Hintonův agar, který je obohacen o kaseinový hydrolyzát a kukuřičný škrob. Na selektivní půdě Thayer-Martinově s příměsí vankomycinu a kolistinu kultivujeme především výtěry z nosohltanu. Přítomná antibiotika zabraňují růstu běžné mikroflóry (Votava, 2003).

Ke kultivaci dále využíváme i pomnožovací půdy. Uplatňují se, pokud předpokládáme nízkou koncentraci výskytu bakterií v biologickém materiálu. *N. meningitidis* dobře roste v médiích jako je např. Brain heart infusion (mozko-srdcová infuze), tekutá Müller-Hintonova půda nebo peptonový Tryptose Soya Broth bujon (Křížová a Rožnovský, 2011).

Vhodným a nejčastěji používaným biologickým materiálem pro kultivaci je likvor, krev nebo výtěr z faryngu či nosu. Odběr materiálu je nutné provést před podáním antibiotika. Jak již bylo zmíněno, transport materiálu by měl být rychlý a za pokojové teploty, neboť by mohlo dojít k autolýze a znehodnocení vzorku. Biologický materiál určený pro kultivaci tedy nelze skladovat a převážet v chladu (Ryan, 2004). Kultivace z likvoru či hemokultury dává výsledky po 24 respektive 48 hodinách. Množství odebrané krve se liší věkem, u dospělých musí mít vzorek 10 ml, u dětí potom 3-5 ml (Urgentní medicína, 2019).

Očkovací kličkou nanese kulturu na krevní agar a inkubujeme 18-24 hodin při 37 °C, poté pozorujeme nárůst kolonií. Kolonie jsou drobné s průměrem asi 1 mm, povrch lesklý, barva šedobílá, lehce vypouklé a okrouhlého tvaru bez hemolýzy (viz obrázek 5). Pokud máme podezření na meningokokovou infekci, odebereme vzorek určený k hemokultivaci (Kuzemenská, 1987).

Hemokultivaci uplatňujeme především v případě, kdy je kultivace CSF negativní nebo v případě, že je kontraindikována lumbální punkce. Významnou roli hraje podání antibiotik ještě před odběrem, kdy se snižuje pravděpodobnost záchytu pozitivní hemokultury (van de Breek, 2016).



Obrázek 5: Kultivace bakterie *Neisseria meningitidis* na KA (Mayer et al., 2011)

4.1.1 Hmotnostní spektrometrie

Dnes je v laboratořích běžně používána vyhodnocovací metoda kultivace MLADI-TOF MS (Laserem indukovaná desorpce a ionizace za účasti matrice – detektor doby letu). Výkonnost této techniky je velmi proměnlivá a to zejména u vysoce variabilních druhů jako je *Neisseria meningitidis*. Spolehlivá detekce je klíčová pro léčbu a preventivní opatření invazivních meningokokových onemocnění. Databáze proto byla obohacena o referenční kmeny identifikované za použití genomového sekvenování jako referenčního standardu. K tomuto typu vyhodnocení nejsou potřebné biochemické testy trvající dlouhou dobu, toto stanovení trvá jen několik minut. Navíc je tato technika identifikace finančně nenáročná. Postup je rovněž velmi jednoduchý (Hong, 2019).

Sterilní očkovací kličkou nanese kulturu na speciální terčík, přidáme matrici, vsuneme do přístroje a měříme. Hlavním úkolem matrice je desorpce a ionizace pomocí laseru. Ionizované molekuly jdou do analyzátoru TOF. Tuto část přístroje si můžeme představit jako trubičku naplněnou vakuem. Poté molekuly vstupují do detektoru. Rychlost přenosu závisí na velikosti částic. Menší molekuly putují rychleji, větší zase pomaleji. Přístroj vyhodnotí hmotnostní spektrum, které je specifické pro každou bakterii. Výsledné spektrum je následně srovnáno a hledá se největší shoda se spektry uloženými v databázi (Patel, 2013). I tato metoda může být někdy chybná a identifikovat špatný druh. Musíme tedy dbát na správnou kultivaci a čistotu stanovované kultury. Zjištěna byla například záměna *N. meningitidis* za *N. polysacharea*, protože tyto druhy jsou si velmi podobné (Cunningham et al., 2014).

4.1.2 Základní biochemické testy

Nejčastějším typem biochemických testů jsou testy na katalázu a oxidázu. Oba tyto testy jsou pozitivní, protože neisserie vlastní peroxidázu i cytochromoxidázu. Určení enzymu cytochromoxidázy je založeno na barevné změně fenylendiaminu po reakci s α -naftolem. Pokud je reakce pozitivní, vznikne indofenolová modř. Průkaz katalázy spočívá v reakci stanovované kultury s peroxidem vodíku. Pozitivita se projeví uvolněním kyslíku pozorovaného jako únik bublinek. Dalším biochemickým testem, který u NM provádíme, je zkvašování glukózy a maltózy. Specifické určení jednotlivých druhů neisserií umožňují komerčně dodávané testy, například NEISSERIAtest (výrobce je PLIVA-Lachema Diagnostika s. r. o., Brno, Czech Republic), který rozpozná gramnegativní kokobacily a koky (Votava, 2003).

4.2 Stanovení CSF

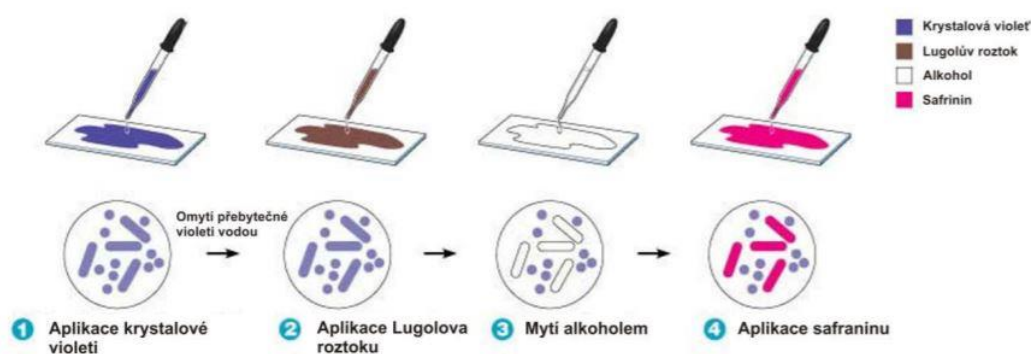
Jak již bylo zmíněno, při podezření na meningitidu se provádí analýza CSF. Právě mozkomíšní mok je nejlepším vzorkem pro stanovení původce. Odběr se provádí pomocí lumbální punkce. Jedná se o invazivní zákrok probíhající za aseptických podmínek neboli za podmínek zbavených choroboplodných zárodků. Zákrok musí být proveden zkušeným a vyškoleným lékařem (Mayer et al., 2011). Ze vzorku mozkomíšního moku sledujeme několik parametrů, a sice množství leukocytů a proteinů, koncentraci glukózy a její poměr koncentrace v CSF a krvi, nebo například hladinu laktátu. Někdy se stane, že je vzorek CSF zakalený, příčinou je velké množství leukocytů a proteinů. Při bakteriální meningitidě jsou hodnoty nad 10 leukocytů na 1 ml. Za snížené množství koncentrace glukózy považujeme hodnoty pod 2,5 mmol/l. Hodnoto do 0,6 potom udává poměr množství koncentrace glukózy v mozkomíšním moku ku krvi. O zvýšené hladině proteinů mluvíme v případě hodnot vyšších než 0,45 g/l. Další měřenou veličinou je tlak CSF, který v případě meningitidy je zvýšen, jeho hodnota je větší než 180 mm H₂O (Van de Beek et al., 2016).

4.3 Mikroskopie

Mikroskopie je považována za jednu z nerychlejších a nejjednodušších metod při stanovení meningitidy. Založena na Gramově barvení CSF nebo krve z hemokultury. Při pozorování v mikroskopu je potom specifické pozorování gramnegativních diplokoků a velkého počtu leukocytů. Průkaz bakterie nemusí být vždy 100%, proto se současně provádějí další analýzy. Při tvorbě preparátu nesmíme zapomenout rychle zafixovat sklíčko, mohlo by totiž dojít k autolýze a tím i špatnému výsledku (Votava et al., 2003).

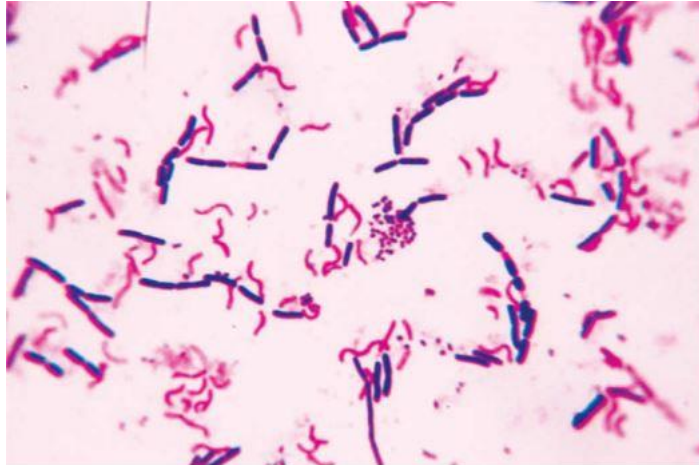
4.3.1 Barvení dle Grama

Gramovo barvení je jednou z nejdůležitějších barvicích diagnostických metod. Tento druh barvení se využívá k rozlišení grampozitivních G⁺ a gramnegativních G⁻ koků a tyčinek. Odlišení těchto dvou skupin určuje složení buněčné stěny a její schopnost udržet barvivo v přítomnosti alkoholu či acetonu. Na čisté a sterilizované sklíčko nanese suspenzi bakterií. Sklíčko následně fixujeme plamenem kahanu. Poté sklíčko překrýváme roztoky, označené zkratkou VLAK/VLAS. Nejprve se používá krystalová violet, která se nechá působit asi půl minuty. Poté překryjeme Lugolovým roztokem, který obsahuje jód, který reaguje s barvivem za vzniku barevného modrého komplexu. Toto barvivo se zachycuje v buněčné stěně G⁺ mikroorganismů. Následně je sklíčko opláchnuto alkoholem (96% ethanol), případně acetonem. Slouží především k odstranění zbytků krystalové violeti a Lugolova roztoku u G⁻ bakterií. Dehydratují proteiny a rozpouštějí z buněčné stěny lipidy. Posledním krokem je dobarvení safraninem nebo karbolfuchsinem, který necháme působit asi 1 minutu. Takovýto preparát vložíme do mikroskopu, kde jej pozoruje pod celkovým zvětšením 1000x s použitím imerzního oleje (Mašátová, 2019).



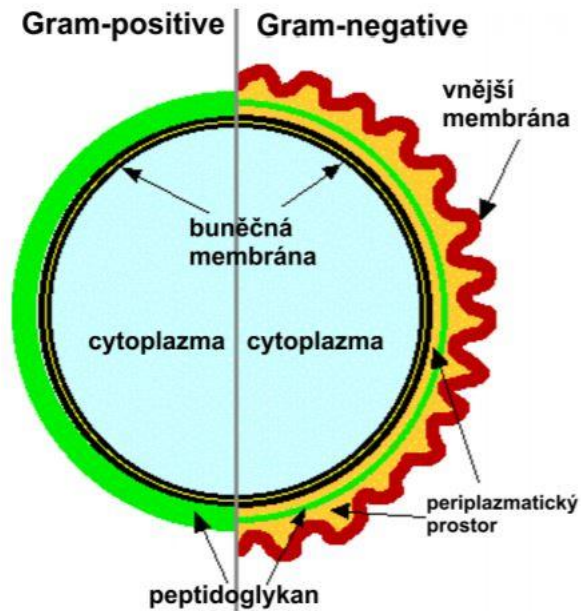
Obrázek 6: Postup Gramova barvení (Vávra, 2014)

Pod mikroskopem pozorujeme buď růžově až červeně zbarvené gramnegativní bakterie, nebo grampozitivní bakterie zbarvené do modra až fialova (viz obrázek 7).



Obrázek 7: Gramovo barvení v mikroskopu (Vávra, 2014)

Principem barvení je odlišnost ve složení stěny buněčné. Gramnegativní bakterie mají tenkou vrstvu peptidoglykanu (což je zřejmé z *obrázku 8*) a zároveň mají větší množství lipidů než bakterie grampozitivní. Lipidy po kontaktu s alkoholem tvoří ve stěně buněčné póry, kterými snadněji odtéká barvivo, proto nemají tak výrazné zbarvení. Stěna grampozitivních bakterií je tvořena z peptidoglykanu. Ten se smršťuje při kontaktu s alkoholem, a díky tomu zůstává stěna zbarvena o něco déle (Terry, 2019).



Obrázek 8: Složení buněčné stěny u G+ a G- bakterií (Terry, 2019)

Některé druhy bakterií lze barvit modře, ale i červeně. Takovýmto bakteriím říkáme gramlabilní a těžko se barví dle Grama. Využívá se proto barvení dle Ziehl-Neelsena, kdy pod mikroskopem sledujeme červené tyčinky na zeleném pozadí. Jelikož jsou velmi odolné vůči odbarvení alkoholem, říkáme jim acidorezistentní (Mašátová, 2019).

4.4 Sérologické metody

Tento druh metod slouží k určení antigenu a séroskupiny. Vzhledem k vyššímu počtu falešně negativních výsledků, je tato metoda nevýhodná a neměla by se stát jediným provedeným testem před finální diagnózou. Nejznámější metodou je latexová aglutinace (Rosenstein et al., 2001). Testujeme 5 nejrozšířenějších a nejčastěji se vyskytujících séroskupin A, B, C, W135 a Y. Pro reakci je nutné použít antisérum monovalentní či polyvalentní povahy. Může se ale stát, že nedojde k reakci vzorku a antiséra, nebo naopak reakci s větším počtem antisér, potom má vzorek označení jako nezařaditelný. Latexovou aglutinaci provádí pomocí komerčně dodávaných setů a řídíme se přiloženými pokyny, protože každý set se maličko liší (Mayer et al., 2011). Vzorek je nutné odebrat ještě před zahájením léčby antibiotiky, protože právě antibiotika snižují citlivost latexové aglutinace z 60 % na 9 % (van de Beek et al., 2016).

4.4.1 Rychlé rozpoznávací testy

K dispozici máme i rychlé diagnostické testy. Slouží především k přímému průkazu diagnostiky vzorku CSF, který předtím nebyl nijak upravený. Principem metody je vertikální imunochromatografie. Membrána je tvořena nitrocelulózou a je pokryta monoklonálními protilátkami. Ty plní zachycovací funkci u séroskupinově specifických rozpustných polysacharidových antigenů za vzniku komplexu, který je určen podle barevné změny. Jak už z názvu vyplývá, jedná se o rychlé a jednoduché testy. Jsou sestaveny ze dvou různých papírků umožňujících určení séroskupiny A, C, W135 a Y (Mayer et al., 2011).

4.5 Molekulární metody

Molekulární metody ve zdravotnictví jsou čím dál častěji využívány. Nejběžnější stanovovací metoda je PCR (polymerázová řetězová reakce), sloužící především ke stanovení meningokokových infekcí. Touto cestou bylo roku 2016 diagnostikováno 53,5 % případů (Křížová et al., 2017). Tato metoda umožňuje analyzovat i vzorky, které nelze kultivovat, mohou totiž obsahovat mrtvé či lyzované bakterie. Zabývají se rovněž studiem genetické výbavy ve vztahu s patogenitou (Mayer et al., 2011).

4.5.1 Metoda PCR

Při metodě polymerázové řetězové reakce je vyšetřovaným materiálem DNA, která je získávána ze vzorků krve nebo CSF. Tato metoda spočívá především v selektivním namnožení specifického úseku DNA. Rozděluje se na 3 základní kroky: 1) denaturace, změna prostorové struktury molekul a to rozpletením dvoušroubovice DNA na jednovláknovou DNA, 2) primery (počáteční sekvence) jsou napojeny na komplementární jednovláknovou DNA, 3) prodloužení primerů od 5'konce ke 3'konci pomocí DNA polymerázy. Na konci amplifikace u meningokoků dostaneme cílové geny *ctrA* a *sodC*. Gen označený jako *CtrA* nalezneme v lokusu a slouží především pro syntézu pouzdra (*cps* lokus), ale také kóduje přenos polysacharidů z pouzdra na buněčný povrch. Nachází se u téměř všech druhů, a proto se často využívá u real-time PCR i u klasické verze této metody. U části meningokoků je tento gen nepřítomen. Dalším genem je *sodC*, který kóduje Cu, Zn, superoxid dismutázu, která přeměňuje superoxidový radikál na peroxid vodíku a kyslík. Jelikož tento gen není spojen s pouzdrem, umožňuje analyzovat i neopouzdržené kmeny (Mayer et al., 2011).

Metoda PCR je metodou rychlejší ve srovnání s metodami kultivačními. Výsledky jsou známy obvykle do několika hodin po odběru. Další výhodou je poskytnutí následné sérotypizace a multilokusové sekvenční typizace (MLST). Real-time modifikace PCR napomáhá stanovení DNA dané bakterie ve vzorku. Kombinuje amplifikaci a zároveň stanovení za použití fluorescenčního barviva v jednom kroku. Stanovení rozlišujeme na nespecifické a specifické. V nespecifickém případě se barva naváže na kteroukoliv molekulu DNA. U takovýchto barviv hrozí zvýšený výskyt falešně pozitivních výsledků. Ke specifickému stanovení je zapotřebí sond, které jsou schopny rozpoznat a následně se navázat na specifickou sekvenci. Pokud je sonda navázána na cílovou specifickou sekvenci, je vysílána fluorescence, která je přímo úměrná počtu amplifikované DNA obsažené ve vzorku (Mayer et al., 2011).

Výhodou metody PCR je vysoká specifita a senzitivita. V roce 2005 bylo srovnáváno 20 vzorků v 11 různých laboratořích, z toho 10 v Evropské unii. Průměrná citlivost vyšla 89,7 % a specifita potom 92,7 %. Ke stanovení byly používány geny *ctrA*, regulátor *crgA*, část podjednotky ribozomu 16s rRNA. U genotypizace byly využívány geny *cps* a právě při genotypizaci při rozdělení séroskupin byla průměrná hodnota citlivosti nižší, a sice 72,7 % (Taha et al., 2005).

V mateřské škole v Ilámu v Íránu bylo odebráno 123 výtěrů z orofaryngu u dětí ve věku 2 až 6 let. *N. meningitidis* byla diagnostikována pomocí fenotypu i genotypu. Geny virulence (jako jsou *ctrA* a *uspA1*) a geny absorbující železo (*tbpA*) byly identifikovány pomocí metody PCR. 17 izolátů NM bylo stanoveno konvenčními biochemickými i mikrobiologickými testy, ale real-time PCR stanovila 18 pozitivních izolátů na NM. Z toho gen *tbpA* byl přítomen ve všech izolátech, v 7 izolátech byl gen *ctrA* (Maleki, 2020).

4.5.2 MLST a jiné

Multilokusová sekvenční typizace (MLST) je metoda využívaná pro subtypizaci. Umožňuje definici kmenů dle jejich alelového profilu, který byl získán z nukleotidových sekvencí fragmentů. Nejčastěji se jedná o sedm houskeeping genů, které jsou pro NM *abcZ*, *roE*, *adk*, *fumC*, *pgm*, *pdhC* a *gdh*. Stanovují se fragmenty, které mají délku alespoň 450-500 párů bází. Důvodem je bezproblémová sekvenovatelnost na sekvenčních automatických přístrojích DNA. Metodou MLST určujeme sekvenční typy. Vyhodnocení se provádí z materiálu, který byl metodou PCR amplifikován. Pro sekvenci využíváme geny *porA*, *porB*, *NadA*, *fpb*, *NHBP* a *fetA*. Data o sekvencích jsou opakovatelná a lze je porovnávat na webu pubmlst.org/neisseria, kde nalezneme celosvětovou databázi sekvenčních typů (Joelley et al., 2018). Ke dni 3. 5. 2020 se zde nacházelo 23357 genomů z celkem 61883 izolátů.

Jelikož MLST nedokáže vždy přesně rozlišit příbuzné kmény, používají se proto metody s vyšším rozlišením. Takovou metodou může být sekvenace celého genomu nebo například MLST typizace konzervativních genomových částí po celé délce, kterou nazýváme jako core genome sequencing (cgMLST). Tato metoda obsahovala pro neisserie analýzu 1605 lokusů (Jolley et al., 2018).

Pro subtypizaci *N. meningitidis* se dále používá metoda ribozomální multilokusová sekvenční typizace (rMLST). Stanovuje se proměnlivost 53 genů, které kódují bakteriální ribozomální proteinové podjednotky (*rps* geny), které jsou přítomné ve všech bakteriích (Jolley et al., 2012).

Aby mohla být zhotovena rMLST je zapotřebí znát data obsahující nukleotidovou sekvenci s 53 lokusy. Avšak ne vždy jsou dostupné pro každý kmen, proto bylo nutné vyhledat jediný lokus, který je charakteristický pro daný rod. U neisserií je to gen *rpIF*, který kóduje fragment 50S ribozomálního proteinu L6 (Bennett et al., 2014).

5. LÉČBA

Meningokokové infekce mají často rychlý až dramatický průběh, a proto je nutná správná diagnostika. Léčba by měla být zahájena do jedné hodiny od podezření na tento typ infekcí. Léčení bývá většinou zahájeno ještě před nemocniční péčí. Pacientovi jsou podána antibiotika (především cefalosporiny 3. generace) a infúze. Při podezření na meningokokovou infekci je vyžadována péče v nemocnici na specializovaném pracovišti s oddělením JIP (jednotka intenzivní péče). Právě na tomto pracovišti se neustále kontrolují základní životní funkce. Léčba sepsí závisí na stavu pacienta při přijetí na lůžko, avšak nejdůležitější je terapie antibiotiky. Nejdříve se podávají cefalosporiny 3. generace, pokud je nemocný citlivý, mění se v průběhu terapie za penicilin G. U septických stavů je léčba antibiotiky krátká, asi 7–10 dní. Nesmíme ale zapomínat na zamezení vzniku septického šoku, diseminované intravaskulární koagulace či dokonce multiorgánové selhání. V takovém případě je nutné zahájit objemovou resuscitaci, při dalším zhoršen i orgánovou podporu (Pellantová, 2016).

U meningitidy je nejběžnějším typem terapie antibiotická léčba, avšak ty podáváme delší dobu než u septických stavů. Mluvíme většinou o 10 dnech. Při objemové resuscitaci bereme ohled na možnost vzniku otoku mozku, do léčby se k jeho prevenci proto přidávají kortikoidy na 2–4 dny (Pellantová, 2016).

Pokud při léčbě antibiotiky, cefalosporiny 3. generace (mezi ně patří například ceftriaxon, cefotaxim), či cefalosporiny 4. generace (cefepim), nelze tato léčiva použít, aplikují se karbapenemy (meropenem). Pacienti, kteří jsou alergičtí na antibiotika obsahující betalaktamát, podáváme moxifloxacin (chinolonové antibiotikum). Vankomycin má uplatnění zejména v kombinační léčbě, tedy léčbě meningitidy a sepse (Hasbun, 2019).

V roce 1998 byla ve Vietnamu poprvé popsána rezistence na chloramfenikol. Bylo odebráno 8 izolátů meningokoků, které byly na chloramfenikol rezistentní, v letech 2007 – 2018. Všech 8 kmenů obsahovalo gen rezistence na chloramfenikol. Dále byly pozorovány kmeny rezistentní na penicilin, tetracyklin a ciprofloxacin. Z této studie vyplývá, že odolnost vůči chloramfenikolu je čím dál více rozšířenější, nejvíce však v jihovýchodní Asii (Batty, 2020).

5.1 Prevence

Invazivní meningokokové onemocnění je nutné ihned hlásit. Po okamžitém ohlášení následuje šetření prováděné hygienickou službou. Podle předpisů, kterými se hygienické stanice řídí, je nutné zajistit blízké okolí pacienta. Profylaxe se provádí u blízkých osob nemocného, zejména rodiny, spolužáci či spolubydlíci. Těmto lidem z úzkého okolí (věk není rozhodující) je předepsána preventivní antibiotická léčba, aby nedošlo k případnému rozvoji onemocnění. K profylaxi a eradikaci neisserie z nosofaryngu se využívají antibiotika ceftriaxon, ciprofloxacin a rifampicin (Pellantová, 2016; van de Beek et al., 2016).

5.2 Vakcinace

Vzhledem k tomu, že každá séro skupina *Neisseria meningitidis* je různorodá jak po genetické stránce, tak i v antigenní struktuře, nebyla dosud vyvinuta vakcína, která by byla univerzální pro všechny séro skupiny. Prozatím jsou v České republice dosažitelné dvě vakcíny, které zajišťují úplnou ochranu před meningokokem. Tyto vakcíny však nejsou součástí povinného očkování, řadí se do kategorie nadstandardních očkování a vzhledem k malému množství invazivních meningokokových infekcí, se ani zařazení mezi povinné vakcíny nepředpokládá (NRL pro meningokokové nákazy, 2018).

Toto dobrovolné očkování je ve většině případů hrazené pacientem a lze o něj zažádat u svého obvodního lékaře nebo v Centrech pro očkování (Pellantová, 2016). Je doporučeno zejména u:

- dětí ve věku od 2 měsíců do 2 let
- dětí ve věku 13–15 let
- dospívajících a mladých dospělých (v případě nástupu na vysokou školu, ubytování na internátech či kolejích, zúčastnění hromadných akcí)
- cestovatelů (zejména do rizikových oblastí)
- nemocných s hyposplenizmem nebo splenektomií, s imunodeficity, pacientů po transplantaci, po úrazech hlavy či po prodělané meningitidě a septikémii
- před zahájením terapie eculizumabem
- osob v rizikovém prostředí nákazy (pracovníci záchranných složek, jednotek intenzivní péče atd.)

Stručněji řečeno je doporučeno dětem a mladistvým do věku 30 let, při individuálních potřebách i u starších osob. Po kontaktu s nemocným je očkování doporučeno po skončení profylaktické léčby antibiotiky, to znamená asi za 10 – 14 dní (Česká vakcinologická společnost ČLS JEP, 2018).

5.2.1 Vývoj a složení vakcín

Polysacharidové vakcíny byly úplně první očkovací látkou, která byla proti meningokokům objevena. Výzkum ale ukázal, že nejsou účinné pro děti do 2 let. Při opakované vakcinaci docházelo ke snižování imunitní odpovědi. Díky tomu byly vynalezeny konjugované vakcíny, které jsou stejně účinné jako polysacharidové. Při opakované vakcinaci se zvyšuje imunitní odpověď a navíc mají i dlouhodobější efekt. V Africe tato konjugovaná vakcína proti séro skupině meningitidy typu A byla úspěšná v eradikaci epidemie (Tzend et al., 2016). Dnes je nejčastěji používaná tetravalentní konjugovaná vakcína zvaná MenA,C,W,Y, která obsahuje oligosacharidy každé konjugované séro skupiny. Vakcína Menveo, vyvinutá v roce 2013, obsahuje protein *Corynebacterium diphtheriae*, vakcína Nimenrix od roku 2012 potom tetanický toxoid (EMA, 2018).

Rozložení povrchových proteinů NM typu B komplikuje vývoj vakcín. Na povrchu meningokoků jsou uhlohydráty, podobné sialylovaným lidským glykoproteinům a lipopolysacharidové struktury mají terminální lakto-N-neotetaosovou strukturu, což je pravděpodobně důvodem zamezení imunitního útoku (Purmohamad, 2019). Vakcíny proti typu B musely být zaměřeny na nekapsulární antigeny, protože séro skupina B nemá imunogenní pouzdro tvořené z polysacharidů. Epitopy polysacharidu jsou příbuzné s lidskou tkání a došlo by k tvorbě protilátek proti glykoproteinům, které v lidské tkáni běžně nalezneme. První dostupnou vakcínou byla MenB, která ovšem neměla postačující účinnost proti všem kmenům. Proti séro skupině B byla následně vytvořena čtyřkomponentní 4CMenB, která je založena na různých funkcích antigenů a to fHbp, NHBP, NadA a porA (Pizza a Rappuoli, 2015). Tato vakcína byla v roce 2013 přejmenována na vakcínu Bexsero. Poslední vyvinutou vakcínou, v roce 2017, je MenB-fHbp, známá jako Trumenba. Ta se skládá ze dvou variant proteinu schopného vázat faktor H – fHbpA a fHbpB (EMA, 2018).

Evropská léková agentura stále sleduje vakcíny proti séro skupině B. Hlídkají se především faktory z oblasti bezpečnosti, efektivity a ochrany před nosičstvím. Mimo jiné jsou důležité i zprávy o vedlejších účincích. Dosud nejsou známy účinky u těhotných a kojících žen. Spojené království zahrnuje vakcínu 4CMenB do očkovacího kalendáře v roce 2015 a po deseti měsících užívání byl zjištěn pokles případů o 50 %. Efektivita vakcíny byla 83 % (Ladhani et al., 2018).

5.2.2 Vakcíny v ČR

Proti meningokokovým nákazám jsou v České republice dosažitelné vakcíny, které jsou registrované Evropskou lékovou agenturou (EMA). Jedná se o dvě konjugované tetravalentní vakcíny zvané MenA,C,W,Y a dvě vakcíny rekombinantní, které obsahují antigeny meningokoka B (MenB-4C a MenB-FHbp). Obchodní konjugované tetravakcíny, které jsou u nás nejdostupnější, jsou Menveo a Nimenrix. U obou těchto vakcín byla navíc dokázána i ochrana proti nosičství meningokoka. Vakcínu Nimenrix lze očkovat již od 6 týdnů po narození dítěte, Menveo potom od 2 let. MenB-4C je u nás známá pod názvem Baxsero a aplikuje se od věku 2 měsíce. MenB-FHbp vakcína má komerční název Trumenba a její doporučená aplikace je od 10 let. Aby byla zajištěna maximální ochrana proti meningokokovým infekcím, doporučuje se očkování proti všem séro skupinám. Pro spolehlivé pokračování imunity, je nutné přeočkování, které se u jednotlivých vakcín liší. U konjugované tetravakcíny je doporučené přeočkování po pěti letech, u MenB-4C pouze u dětí do 2 let, pro MenB-FHbp nebylo přeočkování stanoveno. Nejvíce ohrožené skupiny jsou novorozenci, děti a dospívající, zdravotníci, osoby cestující do rizikových oblastí a pacienti se sníženou imunitou. Očkování je v současnosti dobrovolné a není hrazeno pojišťovnou (Česká vakcinologická společnost ČLS JEP, 2018).

V České republice je meningokok typu B nejčastějším původcem meningokokových onemocnění. Při očkování i přeočkování této séro skupiny se řídíme věkem pacienta (viz tabulka 1) (Pelantová, 2016).

Věk	Očkování	Přeočkování
2–5 měsíců	3 dávky, minimální odstup 1 měsíc	1 dávka mezi 12. a 23. měsícem
6–11 měsíců	2 dávky, minimální odstup 2 měsíce	1 dávka ve 2. roce, nejdříve za 2 měsíce od primovakcinace
12–23 měsíců	2 dávky, minimální odstup 2 měsíce	1 dávka ve 2. – 3. roce, nejdříve za 2 měsíce od primovakcinace
2–10 let	2 dávky, minimální odstup 2 měsíce	Není stanoveno
13–15 let, adolescenti, dospělí	2 dávky, minimální odstup 1 měsíc	Není stanoveno

Tabulka 1: Očkování proti meningokoku typu B

Genová analýza složek byla ve Státním zdravotním ústavu provedena z vakcíny 4CMenB u 340 izolátů meningokokových nákaz a to z let 2007–2016. Analýza byla provedena metodou MLST a jejím cílem bylo ověření shodnosti variant genů, které nalezneme ve vakcíně Bexsero s variantami v izolátech (tedy, jestli vakcína indukuje protilátky, které jsou účinné). Dokázána byla přítomnost genů kódujících fHbp a NHBP. U třetiny izolátů byl potom objeven gen NadA. Z tohoto výzkumu vyplývá, že ochrana proti meningokokovým nákazám je při použití vakcíny dostačující (Musílek et al., 2017).

5.3 Komplikace

Komplikace meningokokových infekcí, které způsobují vážné následky, se týkají především imunitní odpovědi. Cévní endotel se stává propustnější díky indukci zánětlivých cytokinů a neutrofilů, čímž může docházet k úniku tekutin až do tkáně. Otok plic či mozku jsou velmi častou příčinou smrti. Dojde k ucpání cévního systému a vzniku ischemie, která vede k hypoxii a následnému selhání orgánu (Stephens a Tzeng, 2000). Imunitní reakce vytvářejí hnis či sraženiny, které jsou příčinou infarktu. Poškozené mohou být i hlavové nervy a může být porušen i zrak či sluch. V případě zasažení motorických nervů způsobuje paralýzu (Murray et al., 2013). Pokud je komorový systém ucpán akutním zánětem, hrozí vznik obstrukčního hydrocefalu. Jedná se však o velmi vzácný případ. Pokles průtoku ledvin může vést k celkovému selhání ledvin, avšak ty jsou reverzibilní. Při ischemiích dochází k poškození periferních částí lidského těla. Vyskytovat se mohou různě rozsáhlé jizvy, či dokonce amputace končetin nebo prstů (Křížová a Rožnovský, 2011).

V případě purulentní meningitidy jsou nejčastější komplikace neurologického a systémového původu. Při zhoršeném neurologickém stavu (zhoršení vědomí či nález nového ložiska) se provádí zobrazovací vyšetření, jako je CT, případně kontrolní vyšetření z likvoru. Komplikace systémového původu jsou komplikace sepse, která běžně meningitidu provází, případně komplikace těžkého stavu. Mezi ně řadíme srdeční selhání, koagulopatii, renální insuficienci, nozokomiální infekce či plicní embolii. Tyto komplikace potřebují odpovídající léčbu. Výskyt komplikací závisí na věku pacienta a na vyvolávající bakterii, případně její rezistenci na antibiotika. U novorozenců je meningitida zkomplikována rozvojem sepse, křečí a hydrocefalu (Džupová et al., 2017).

Nejhorší prognózou má fulminantní meningokoková sepe, jejíž úmrtnost je mezi 25 % a 55 %. Další je meningitida doprovázená septickým šokem, u které se úmrtnost pohybuje kolem 10–25 %. U meningitidy bez šoku mluvíme o úmrtnosti do 5 %. Při přechodné meningokokcémii za normálních okolností pacient neumírá (Křížová a Rožnovský, 2011).

6. EPIDEMIOLOGIE

Jediný původce meningitidy, který způsobuje epidemie, je meningokok. U nás je výskyt sporadický a epidemie se objevují výjimečně. Množství případů se pohybuje kolem 1 (0,4–1,2) pozitivních případů na 100 000 obyvatel, mortalita je potom asi 10 %. V některých zahraničních zemích jsou tato čísla zvýšená. V hospodářsky vyspělejších zemích mluvíme o 1–5 případech na 100 000 obyvatel, rozvojové země udávají počet 10–20 (Křížová, 2008).

6.1 Stav ve světě

Asi 95 % meningitidy v světě zapříčiňují meningokoky séroskupiny A, B, C, Y a W135. Západní a střední Evropa má největší počet séroskupin B a C, zatímco východní Evropa společně s Asií a Afrikou meningokoka skupiny A. Až 30 % séroskupiny typu Y nalezneme v Kanadě a USA. Tato séroskupina je původcem pneumonií. Arabsky mluvící země a část Afriky má nejvyšší počet u sérotypu A a W135. Právě séroskupina W135 byla objevena až po vypuknutí epidemie v roce 2000 v Mekce (Rožnovský, 2010).

Skupina meningokoka	Charakteristika	Výskyt
A	Způsobuje cyklické rozsáhlé epidemie	Afrika, Asie (vzácně Amerika a Evropa)
B	Sporadické infekce	Evropa, průmyslově vyspělejší státy
C	Epidemie u mladistvých, sporadické onemocnění	Celosvětový
Y	Způsobuje pneumonie	USA, Kanada
W135	Sporadické onemocnění	Jižní Amerika, Taiwan, Arabské státy

Tabulka 2: Charakteristika a výskyt meningokoků podle séroskupiny

NM je celosvětově známá bakterie s největším výskytem v „pásu meningitidy“, který se nalézá v subsaharské Africe (obrázek 9). V této oblasti jsou časté hyperendemické a periodické epidemie, zejména v období sucha, které přetrvává od prosince až do června. Počet případů tehdy dosahuje na 1000 na 100 000 obyvatel (Mbaeyi, 2020).



Obrázek 9: Oblasti s častými epidemiemi meningitidy (Mbaeyi, 2020)

Ohniska meningitidy se mohou vyskytnout kdykoliv a kdekoliv ve světě, avšak nejčastěji se objevují právě v africkém pásu. Četnost epidemie je každých 5 – 12 let. Úplně první byla skupina meningokoka A, avšak právě na tuto séroskupinu byla vynalezena monovalentní vakcína MenAfriVac a od roku 2010 byly v africkém pásmu primárně zastoupeny skupiny C a W (Mbaeyi, 2020).

Vakcína MenAfriVac byla vytvořena díky projektu Vakcinace proti meningitidě. Právě díky tomuto projektu se v roce 2010 výrazně snížil počet pozitivních případů onemocnění meningokokem typu A. Pokles byl zaznamenán až o 99%. V africkém pásu meningitidy jsou každý týden vystaveny informace o výskytu onemocnění organizací WHO (World Health Organization - Světová zdravotnická organizace) (WHO, 2017).

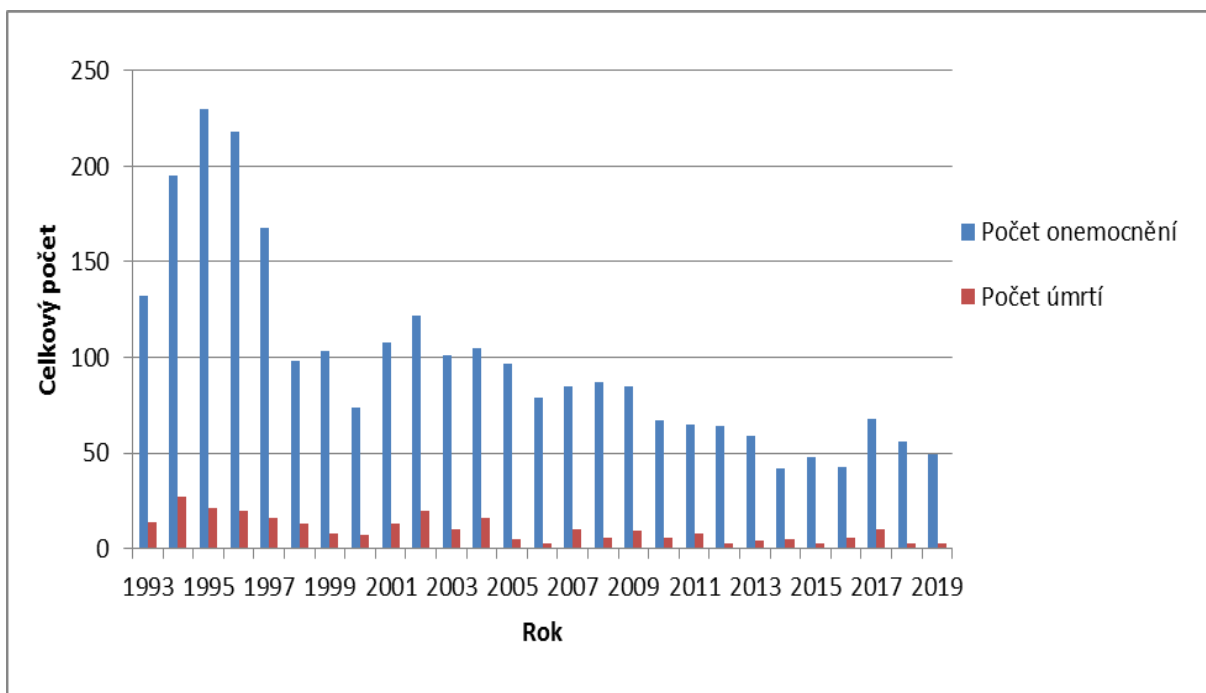
Věkové rozmezí postižených osob se v pásu meningitidy pohybuje do 30 let, největší riziko je u dětí a adolescentů od 5 do 14 let. Právě cestování do těchto zemí je rizikovým faktorem (Mbaeyi, 2020).

Dosud zatím největší pandemie v pouštní oblasti byla v roce 1996, kdy bylo evidováno 152 813 případů, z nichž 15 783 obyvatel zemřelo (Rosenstein et al., 2001).

6.2 Stav v ČR

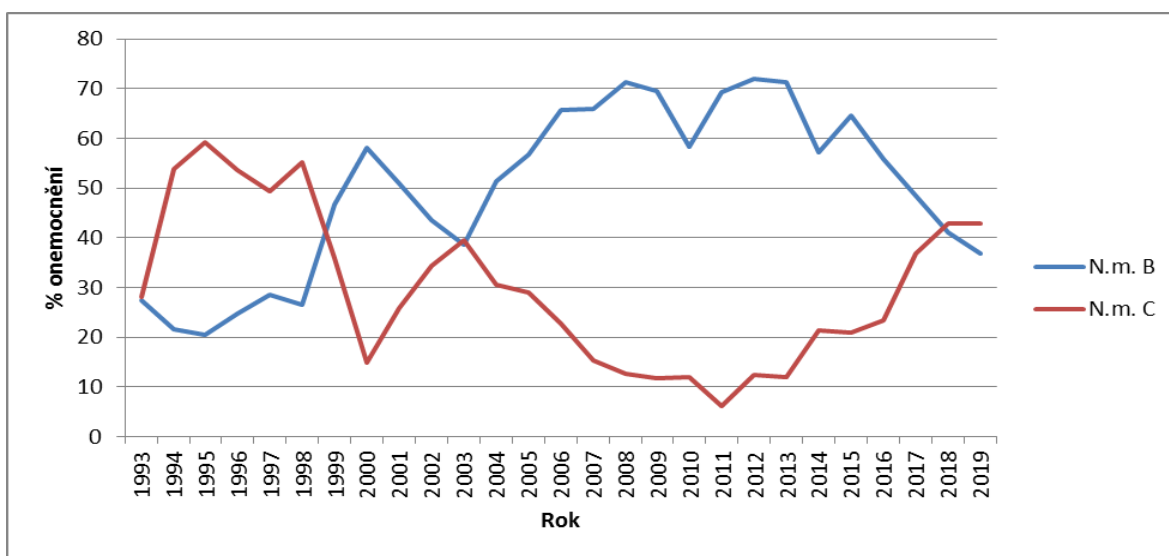
Na webové stránce SZÚ (Státního zdravotního ústavu) byla zveřejněna data pro Českou republiku ze Zpráv Centra epidemiologie a mikrobiologie, z nichž byly vytvořeny příslušné grafy.

Během uplynulých 27 let se četnost onemocnění vyvolaných NM velmi lišila. Nejvíce nemocných bylo v roce 1995, jednalo se o 230 pacientů, z nichž 21 nemoci podlehl. Od roku 1995 počet onemocnění klesá. Nejméně potvrzených případů bylo v roce 2014, kdy onemocnělo 42 lidí, z nichž 5 zemřelo. Téměř stejná bilance byla v roce 2016, tehdy bylo nemocných 43 a zemřelo 6 obyvatel (*viz graf 1*).



Graf 1: Počet onemocnění a úmrtí na invazivní meningokokové onemocnění, Česká republika, 1993 – 2019 (zdroj dat Křížová, 2020)

Nejčastěji se objevující sérotyp je meningokok B a C. Právě séroskupina B byla nejvíce zastoupena v roce 2012, kdy tvořila 71,9 %. Ani v roce 2013 příliš neklesla, držela hodnotu 71,2 %. Lze ale říci, že od roku 2015 procento onemocnění *Neisseria meningitidis* skupiny B stále klesá. Naopak séroskupina C od roku 2011 stoupá. V tomto roce bylo procento onemocnění 6,2 %, kdežto v roce 2012 byla hodnota 12,5 %, což je téměř dvojnásobný nárůst. V roce 2019 vystoupalo % onemocnění až na 42,9 %. Tyto změny pozorujeme v grafu 2.



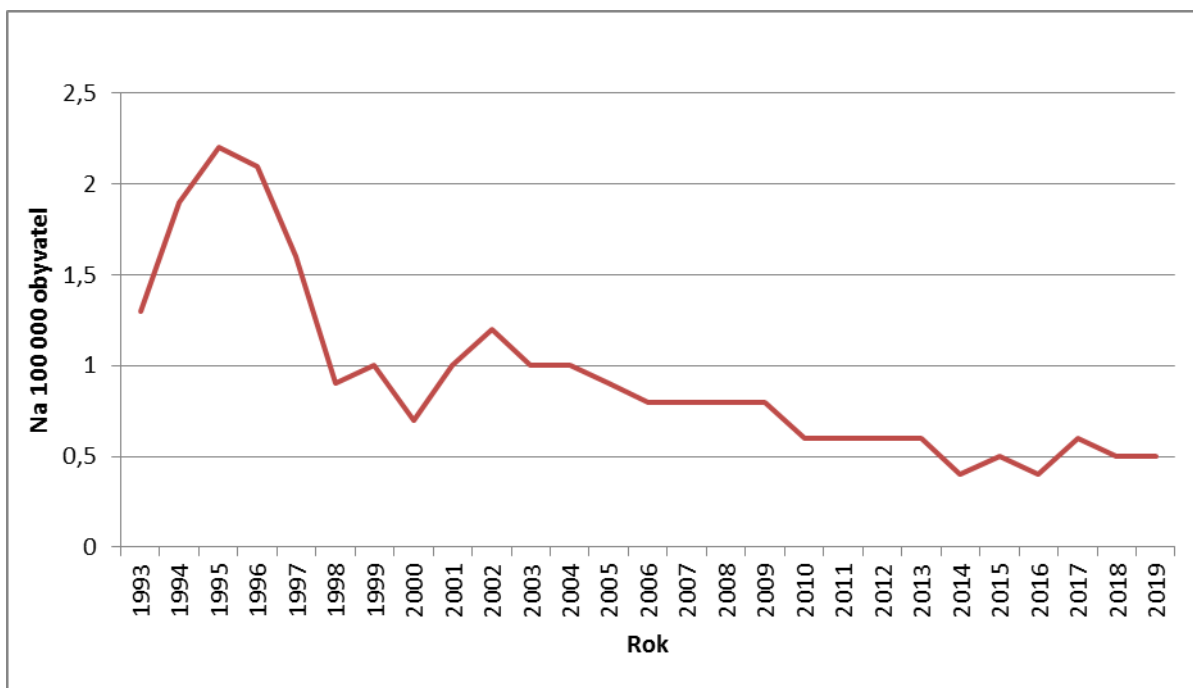
Graf 2: Procentuální počet onemocnění podle séroskupin invazivního meningokokového onemocnění, Česká republika, 1993 – 2019 (zdroj dat Křížová, 2020)

Z hodnot v tabulce 3 je zřejmé, že nejvíce ohroženy jsou děti od narození po 11 měsíců a od 1 do 4 roku. Tyto věkové kategorie jsou nejvíce ohrožené meningokokem skupiny B. Statisticky nejméně ohrožené jsou děti od 10–14 let, kdy u obou séroskupin nebyl potvrzen žádný případ. V loňském roce bylo tedy evidováno 18 případů meningokoka skupiny B a 21 séroskupiny C.

Věk	séroskupina B	séroskupina C
0-11 m	5	4
1-4 r	5	2
5-9 r	1	3
10-14 r	0	0
15-19 r	0	1
20-24 r	0	2
25-34 r	1	3
35-44 r	1	1
45-54 r	3	3
55-64 r	1	1
65+	1	1

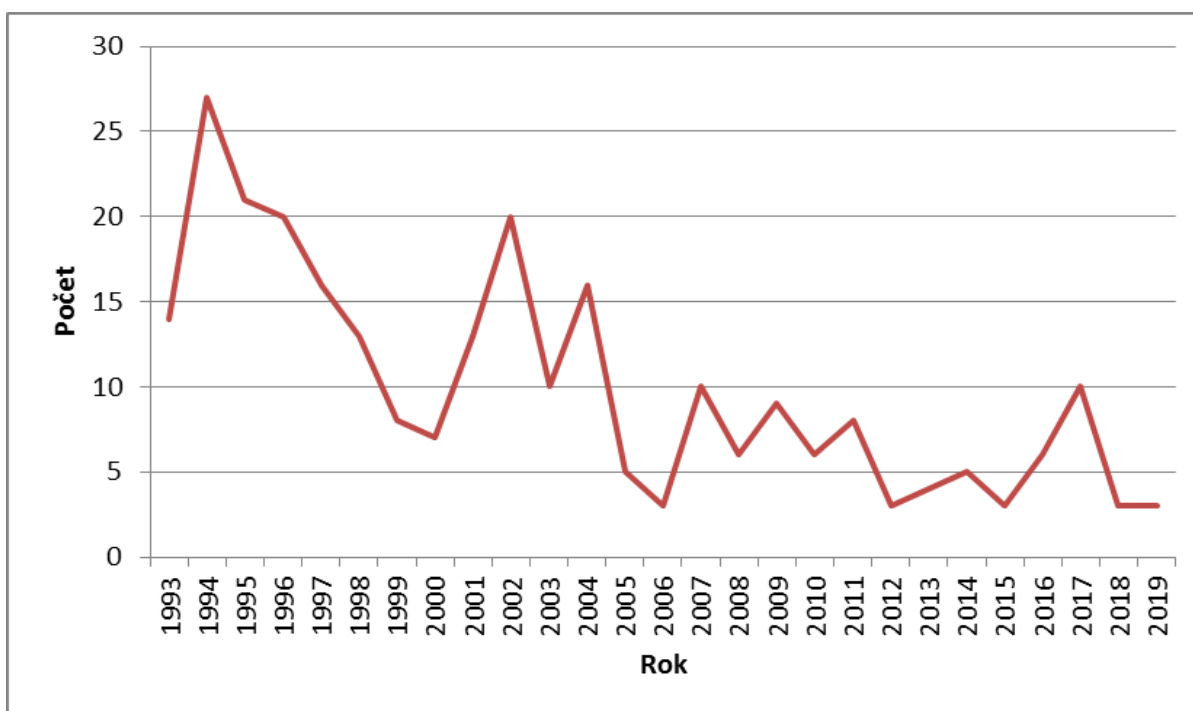
Tabulka 3: Počty nemocných podle séroskupin v určitém věku, Česká republika 2019 (zdroj dat Křížová, 2020)

V roce 1995 byla nahlášena největší nemocnost, kdy hodnoty dosahovala 2,2/100 000 obyvatel. Během dalších let se však nemocnost snižovala. V letech 2014 a 2016 byly nemocnost nejnižší, teda 0,4/100 000 obyvatel (viz graf 3).



Graf 3: Nemocnost invazivních meningokokových onemocnění, Česká republika, 1993 – 2019 (zdroj dat Křížová, 2020)

Nejvíce případů, které skončily smrtí, bylo evidováno v roce 1994. Jednalo se o 27 pacientů. Od té doby počet úmrtí klesal, avšak od roku 2001 má opět stoupající tendence. Nejméně mrtvých bylo v roce 2006, 2012, 2015, 2018 a 2019, kdy počet mrtvých nepřesáhl hranici 3 obyvatel. O tomto stavu vypovídá graf číslo 4.



Graf 4: Počet úmrtí na invazivní meningokokové onemocnění, Česká republika, 1993 – 2019 (zdroj dat Křížová, 2020)

ZÁVĚR

Meningokokové infekce jsou stále velmi častým a rozšířeným onemocněním nejen v naší republice. Velmi důležité je onemocnění včas diagnostikovat a následně léčit.

V práci byl stručně popsán původce těchto onemocnění, tedy meningokok *Neisseria meningitidis*. Uvedena byla jeho buněčná i antigenní stavba. Byly shrnuty onemocnění a jejich klinické příznaky, ačkoliv ty jsou velmi variabilní. Část práce byla věnována stanovení a následné léčbě těchto nemocí. Na konci práce byla vypsána epidemiologie.

Díky nejrůznějším výzkumům byly objeveny vakcíny, které napomáhají zpomalení či vymizení těchto nemocí. V některých evropských zemích je očkování proti meningokokům běžnou součástí očkovacího kalendáře. V naší republice je toto očkování dobrovolné. Cena očkování je různá. U konjugované vakcíny A, C, Y, W135 značky Menveo se cena pohybuje kolem 1570,- Kč, pro Nimenrix potom 1400,- Kč. Pro vakcínu Bexsero určenou proti séroskupině B 2150,- Kč, Trumenba stojí 2500,- Kč. Některé zdravotní pojišťovny tato očkování částečně proplácejí.

Podle uvedených grafů vypadá, že jsou meningokokové infekce na ústupu, možná právě vlivem očkování. Je však důležité myslet na to, že je meningokok stále nežádoucí patogen a pro člověka velice nebezpečný.

POUŽITÁ LITERATURA

APICELLA M. *Neisseria meningitidis*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Principles and Practice of Infectious Diseases 6th edn. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone Publishers, 2005: pp 2498–513.

BATISTA R. S., GOMES A. P., DUTRA GAZINEO J. L., BALBINO MIGUEL P. S., SANTANA L. A., OLIVEIRA L., GELLER M. *Meningococcal disease, a clinical and epidemiological review*. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. 2017, 10(11), 1019-1029. DOI: 10.1016/j.apjtm.2017.10.004.

BATTY E. M., CUSACK T.P., THAIPADUNGPANIT J., WATTHANAWORAWIT W., CARRARA V., SIHALATH S., HOPKINS J., SOENG S., LING C., TURNER P., DANCE D. A. B. *The spread of chloramphenicol-resistant Neisseria meningitidis in Southeast Asia*, International Journal of Infectious Diseases. 2020, 198-203. DOI: 10.1016/j.ijid.2020.03.081.

BENNETT J. S., WATKINS E. R., JOLLEY K. A., HARRISON O. B., MAIDEN M. C. J. *Identifying Neisseria Species by Use of the 50S Ribosomal Protein L6 (rplF) Gene*. Journal of Clinical Microbiology. April 2014, 52(5), 1375-1381. DOI: 10.1128/JCM.03529-13.

CUNNINGHAM S. A., MAINELLA J. M., PATEL R. *Misidentification of Neisseria polysaccharea as Neisseria meningitidis with the Use of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry*. Journal of Clinical Microbiology. 2014, 52(6), 2270-2271. DOI: 10.1128/JCM.00664-14.

ČESKÁ VAKCINOLOGICKÁ SPOLEČNOST ČLS JEP. *Doporučení České vakcinologické společnosti ČLS JEP pro očkování proti invazivním meningokokovým onemocněním*. 2018 [cit. 2020-05-15]. Dostupné z: <http://www.vakcinace.eu/doporuceni-a-stanoviska>.

DUPIN N., LECUYER H., CARLOTTI A., POYART C., COUREUIL M., CHANAL J., SCHMITT A., VACHER-LAVENU M. C., TAHA M. K., NASSIF X., MORAND P. C. *Chronic Meningococemia Cutaneous Lesions Involve Meningococcal Perivascular Invasion Through the Remodeling of Endothelial Barriers*, Clinical Infectious Diseases, April 2012, 54 (8), 1162–1165. DOI: 10.1093/cid/cis120.

DŽUPOVÁ O., HELCL M., KRAČMAROVÁ R., KRBKOVÁ L., PAŘÍZKOVÁ R., ROŽNOVSKÝ L. Nemocnice Jindřichův Hradec, *Doporučený postup diagnostiky a léčby purulentní meningitidy*. 2017 [cit. 2020-05-25]. Dostupné z: http://www.nemjh.cz/documents/laboratorni_pirucka_olm/HVEZDAKAAF.htm.

EMA – EUROPEAN MEDICINES AGENCY. 1. *Bexsero: EPAR - Product Information*, 2. *Trumenba: EPAR - Product Information*, 3. *Menveo: EPAR - Product Information*, 4. *Nimenrix: EPAR - Product Information*. 1995-2020 [cit. 2020-05-15]. Dostupné z: 1.http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/002333/human_med_001614.jsp&mid=WC0b01ac058001d124 2.http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/004051/human_med_002101.jsp&mid=WC0b01ac058001d124 3.http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/001095/human_med_001323.jsp&mid=WC0b01ac058001d124 4.http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/002226/human_med_001548.jsp&mid=WC0b01ac058001d124.

GOERING R. V., DOCKRELL H. M., ZUCKERMAN M. A. a CHIODINI P. L. *Mimsova lékařská mikrobiologie*. 5. vydání. Praha: Stanislav Juhaňák – Triton, 2016. ISBN 978-80-7387-928-0.

GREENWOOD D., PEUTHERER J. F. a SLACK R.C.B. *Lékařská mikrobiologie: přehled infekčních onemocnění: patogenese, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie*. Vydání 1. české. Praha: Grada, 1999, s. 255-265. ISBN 80-7169-365-0.

HASBUN R. *Initial therapy and prognosis of bacterial meningitis in adults*. UpToDate. 2019 [cit. 2020-05-07]. Dostupné z: <https://www.uptodate.com/contents/initial-therapy-and-prognosis-of-bacterial-meningitis-in-adults>.

HEIMER I., *Kazuistika: Meningokoková seps v netypické věkové kategorii*. Avenir. 2018. [cit. 2020-06-05]. Dostupné z: <https://odbornost.avenir.cz/cz/kazuistika-meningokokova-seps-v-netypicke-vekove-kategorii>.

HOFMAN F. M., VON HANWEHR R. I., DINARELLO C. A. *Immunoregulatory molecules and IL 2 receptors identified in multiple sclerosis brain*. Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950). 1986, 9, 3239–3245. ISSN 0022-1767.

HONG E., BAKHLAEK Y., TAHA K. M. *Identification of Neisseria meningitidis by MALDI-TOF MS may not be reliable*, Clinical Microbiology and Infection . 2019, 25(6), 717-722. DOI: 10.1016/j.cmi.2018.09.015.

JOIN-LAMBERT O., MORAND P. C., CARBONNELLE E., COUREUIL M., BILLE E., BOURDOULOUS S., NASSIF X. *Mechanisms of meningeal invasion by a bacterial extracellular pathogen, the example of Neisseria meningitidis*. Progress in Neurobiology. 2010, 91(2), 130-139. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2009.12.004.

JOLLEY K., CAUGANT D., FROSCHE M., MAIDEN M., STEPHENS D., VAN DER ENDE A. *Multi Locus Sequence Typing of Neisseria. Public databases for molecular typing and microbial genome diversity*. University of Oxford. 2018 [cit. 2020-04-20]. Dostupné z: <https://pubmlst.org/neisseria/>.

JOLLEY K. A., BLISS C. M., BENNETT J. S., BRATCHER H. B., BREHONY C. *Ribosomal multilocus sequence typing: universal characterization of bacteria from domain to strain*. Microbiology. 2012, (158), 1005–1015. DOI: 10.1099/mic.0.055459-0.

JULÁK J.. *Klinicky významné bakterie*. Praha: Triton. 2012. ISBN 978-80-7387-588-6.

KASAL E. *Úloha skórovacích systémů při volbě léčebné strategie u invazivního meningokokového onemocnění*. Plzeň. lék. Sborn., 2000, 75, s. 121–227.

KŘÍŽOVÁ P., ROŽNOVSKÝ L. *Meningokokové onemocnění: klinický obraz, epidemiologie, diagnostika, léčba a prevence*. Praha: Maxdorf, 2011. Jessenius. ISBN 978-80-7345-239-1.

KŘÍŽOVÁ P. *Meningokokové infekce: stručný přehled*. In: Státní zdravotní ústav. 2008 [cit. 2020-06-09]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/tema/prevence/meningokokove-infekce-aktualizovany-manual-iv>.

KŘÍŽOVÁ P., MUSÍLEK M., OKONJI Z., HONSKUS M., KOZÁKOVÁ J., ŠEBESTOVÁ H. *Invazivní meningokokové onemocnění v České republice v roce 2019*. Zprávy Centra epidemiologie a mikrobiologie. Praha: SZÚ. 2020, 29(3), 105-114.

KŘÍŽOVÁ P., MUSÍLEK M., VACKOVÁ Z., JANDOVÁ Z., KOZÁKOVÁ J., ŠEBESTOVÁ H. *Invazivní meningokokové onemocnění v České republice v roce 2016*. Zprávy centra epidemiologie a mikrobiologie: SZÚ Praha. 2017, 26(2), 60-66.

KŘÍŽOVÁ P., TICHÁČEK M., PLÍŠEK S., ŠTRUNCOVÁ V. *Standard efektivní klinické péče v přednemocniční neodkladné péči (PNP): Invazivní meningokoková onemocnění*. Urgentní medicína: časopis pro neodkladnou lékařskou péči. 2002, č. 5, s. 18-20. ISSN 1212-1924.

KUZEMENSKÁ P., SCHINDLER J., TICHÁČEK B., POTUŽNÍK V. *Neisseria meningitidis. Mikrobiologické vyšetřovací metody: Laboratorní průkaz gramnegativních koků a kokobacilů*, Praha: Avicenum. 1987, s. 24-34. ISBN 08-043-87.

LADHANI S. N., BORROW R., ANDREWS N. J. *Growing evidence supports 4CMenB effectiveness*. The Lancet: Infectious diseases. April 2018, 18(4), 370-371. DOI: 10.1016/S1473-3099(18)30051-3.

MALEKI A., MIRNASERI Z., KOUHSARI E., TAHERIKALANI M., PAKZAD I., MOHAMADI J., SADEGHIFARD N. *Asymptomatic carriers of Neisseria meningitidis and Moraxella catarrhalis in healthy children*, New Microbes and New Infection. 2020, 36. DOI: 10.1016/j.nmni.2020.100691.

MAŠÁTOVÁ E. *Vaginální mikrobiota a její vliv v těhotenství*. Hradec Králové, 2019. 57 s. Bakalářská práce. Univerzita Karlova, Fakulta farmaceutická. Vedoucí práce Mgr. Marcela Vejsová, Ph.D.

MAYER L., HARCOURT B., HATCHER C., JACKSON M., KATZ L., MAIR R., CASTILLO D., NOVAK R., RAHALISON L., SCHMINK S., THEODORE M. J., THOMAS, VUONG J. J., WANG X. *Laboratory Methods for the Diagnosis of Meningitis caused by Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae, and Haemophilus influenzae: WHO manual*, WHO. 2011, Chapter 7 - Identification and Characterization of *Neisseria meningitidis*. [cit. 2020-03-26]. Dostupné z: <https://www.cdc.gov/meningitis/lab-manual/authors.html>.

MBAEYI S. A., MCNAMARA L. A. Meningococcal Disease. *CDC Yellow Book 2020*. 2020, Chapter 4 - Meningococcal Disease [cit. 2020-02-25]. Dostupné z: <https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2020/travel-related-infectious-diseases/meningococcal-disease>.

MILLER F., LÉCUYER H., JOIN-LAMBERT O., BOURDOULOUS S., MARULLO S., NASSIF X., COUREUIL M. *Neisseria meningitidis colonization of the brain endothelium and cerebrospinal fluid invasion*. Cellular Microbiology. 2013, 15(4), 512–519 DOI: 10.1111/cmi.12082.

MOYNAGH P. N. *The interleukin-1 signalling pathway in astrocytes: a key contributor to inflammation in the brain*. Journal of Anatomy. 2005, 3, 265–269. DOI:10.1111/j.1469-7580.2005.00445.x.

MURRAY P. R., ROSENTHAL K. S., PFALLER M. A. *Medical microbiology*. 7. vydání, s. 248-258. Philadelphia: Elsevier/Saunders. 2013. ISBN 978-0-323-08692-9.

MUSÍLEK M., JANDOVÁ Z., VACKOVÁ Z., KOZÁKOVÁ J., KŘÍŽOVÁ P. *Genová analýza složek čtyř komponentní peptidové vakcíny proti Neisseria meningitidis séroskupiny B u izolátů z invazivního meningokokového onemocnění z České republiky v období 2007–2016*. KMINE 2017 - Kniha abstraktů, GUARANT International. 2017, s. 97. ISBN 978-80-906662-5-2.

NRL PRO MENINGOKOKOVÉ NÁKAZY. *Očkování proti meningokokovým onemocněním*. SZÚ. 2018 [cit. 2020-05-15]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/ockovani-proti-meningokokovym-onemocnenim>.

PATEL R. *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization– Time of Flight Mass Spectrometry in Clinical Microbiology*. *Clinical Infectious Diseases*. 2013, 57(4), 564-572. DOI: 10.1093/cid/cit247.

PELLANTOVÁ V. *Meningokoková onemocnění a jejich prevence*. *Medicína pro praxi*. 2016, roč. 13, vol. 5, s. 226-228. ISSN 1214-8687.

PIZZA M., RAPPUOLI R. *Neisseria meningitidis: pathogenesis and immunity*. *Current Opinion in Microbiology*. 2015, 68-72. DOI: 10.1016/j.mib.2014.11.006.

PURMOHAMAD A., ABASI E., AZIMI T., HOSSEINI S., SAFARI H., NASIRI J. M., FOOLADI I. A. A., *Global estimate of Neisseria meningitidis serogroups proportion in invasive meningococcal disease: A systematic review and meta-analysis*, *Microbial Pathogenesis*. 2019, 134. DOI: 10.1016/j.micpath.2019.103571.

RONNIE H. *Etymologia: Neisseria*. *Emerging Infectious Diseases*. June 2016, 22(6), 1141. DOI:10.3201/eid2206.et2206.

ROSENSTEIN N. E., PERKINS B. A., STEPHENS D. S., POPOVIC T., HUGHES J. M. *Meningococcal Disease*. *The New England Journal of Medicine*. 2001, 344(18), 1378-1388. DOI: 10.1056/NEJM200105033441807.

ROUPHAEL N. G, STEPHENS D. S. *Neisseria meningitidis: biology, microbiology, and epidemiology*. *Methods in molecular biology*. 2012; 799:1-20. DOI: 10.1007/978-1-61779-346-2_1.

ROZSYPAL H. *Meningeal signs*. *Infections of the Nervous System I: A Lecture Outline*. 2004 [cit. 2020-05-27]. Dostupné z: <http://www1.lf1.cuni.cz/~hrozs/engl/mening2.gif>.

ROŽNOVSKÝ L. *Meningokoková onemocnění*. *Zdravotnické noviny: Postgraduální medicína*. 2010, 9. ISSN 0044-1996.

ROŽNOVSKÝ L. *Meningokokové infekce*. *Remedia*. 2007, 6. ISSN 0862-8947.

RYAN K. J., RAY C. G., SHERRIS J. C. *Sherris medical microbiology: an introduction to infectious diseases*. 4. vydání. New York: McGraw-Hill, 2004. ISBN 08-385-8529-9.

SABERI A., SYED S. A. *Meningeal Signs: Kernig's Sign and Brudzinski's Sign*. *Hospital Physician*. Review of clinical signs, 1999, 23-24.

SÁEZ-LLORENS X. a MCCRACKEN G. H. *Bacterial meningitis in children*. Lancet. 2003, 2139–48. DOI:10.1016/S0140-6736(03)13693-8.

Sestra a urgentní stavy. 1. české vyd. Překlad Libuše Čížková. Praha: Grada, 2008. ISBN 80-247-2548-7.

STEPHENS D. S., TZENG Y. L. *Epidemiology and pathogenesis of Neisseria meningitidis*. Microbes and Infection. 2000, 2(6), 687-700. DOI: 10.1016/S1286-4579(00)00356-7.

STEPHENS D. S. *Biology and pathogenesis of the evolutionarily successful, obligate human bacterium Neisseria meningitidis*. Vaccine. 2009, 27(2). DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.04.070.

STEPHENS D. S., GREENWOOD B., BRANDTZAEG P. *Epidemic meningitis, meningococcaemia, and Neisseria meningitidis*. The Lancet. 2007, 369(9580), 2196-2210. DOI: 10.1016/S0140-6736(07)61016-2.

TAHA M. K., ALONSO J. M., CAFFERKEY M., CAUGANT D. A. C., CLARKE S. C., DIGGLE M. A., FOX A., FROSCHE M. *Interlaboratory Comparison of PCR- Based Identification and Genogrouping of Neisseria meningitidis*. Journal of Clinical Microbiology. 2005, 43(1), 144-149. DOI: 10.1128/JCM.43.1.144-149.2005.

TERRY T. M. *Prokaryote anatomy: cell envelope, motility, endospores*. 2019, [cit. 2020-04-20]. Dostupné z: <http://www.biologie.uni-hamburg.de/bonline/library/micro229/terry/229sp00/lectures/cells2.html>.

TRIVEDI K., TANG Ch. M., EXLEY R. M. *Mechanisms of meningococcal colonisation*. Trends in Microbiology. 2011, 19(9), 456-463. DOI:10.1016/j.tim.2011.06.006.

Urgentní medicína: časopis pro neodkladnou lékařskou péči. České Budějovice: MEDIPRAX CB, 2019. ISSN 1212-1924.

VAN DE BEEK D., CABELLOS C., DŽUPOVÁ O., ESPOSITO S., KLEIN M., KLOEK A. T., LEIB S. L., MOURVILLIE B., OSTERGAARD C., PAGLIANO P., PFISTER H. W., READ R. C., SIPAHI R. O., BROUWER M. C., *ESCMID guideline: diagnosis and treatment of acute bacterial meningitis*. Clinical Microbiology and Infection. Elsevier. 2016, 22(3), 37-62. DOI: 10.1016/j.cmi.2016.01.007.

VÁVRA T. *Řídicí jednotka automatického manipulačního systému pro laboratoře*. Brno, 2014. 83 s. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií. Vedoucí práce Ing. Jiří Dřínovský, Ph.D.

VOTAVA M. *Lékařská mikrobiologie speciální*. 1. vydání. Brno: Neptun, 2003, 495 s., 85-93. ISBN 80-902896-6-5.

VOTAVA M. *Lékařská mikrobiologie obecná*. Brno: Neptun, 2001. ISBN 80-902896-2-2.

WHO: World Health Organization. *Situation update on meningitis C epidemic risk*, WHO. 2017 [cit. 2020-06-09]. Dostupné z: <http://www.who.int/emergencies/diseases/meningitis/meningitis-c-epidemic-risk/en/>.