

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Meningokokové infekce

Markéta Malá

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Marcela Vejsová, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2018

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí mé bakalářské práce, Mgr. Marcele Vejsové, Ph.D., za trpělivost, ochotu a cenné připomínky. Svým nejbližším děkuji za podporu a pochopení.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne 24.8.2018

podpis studentky

OBSAH

1. Abstrakt	6
2. Abstract	7
3. Úvod.....	8
4. Cíl práce – zadání.....	9
5. Původce	10
5.1 Charakteristika rodu <i>Neisseria</i>	10
5.2 <i>Neisseria meningitidis</i>	10
5.2.1 Stavba buňky	10
5.2.2 Faktory virulence.....	11
6. Patofyziologie	13
6.1 Vstup do hostitele	13
6.2 Přenos.....	16
6.3 Rizikové faktory.....	16
6.4 Sepse a bakterémie.....	17
6.5 Meningitida	19
6.6 Další infekce	20
7. Epidemiologie	20
7.1 Situace ve světě.....	20
7.2 Situace v ČR.....	22
8. Klinické projevy.....	23
8.1 Meningokoková meningitida	23
8.2 Meningokoková seps.....	24
8.3 Meningokokcémie.....	25
9. Komplikace, prognóza	25

10.	Laboratorní diagnostika	26
10.1	Analýza CSF	26
10.2	Mikroskopie.....	27
10.3	Bakteriologická kultivace	27
10.3.1	Hmotnostní spektrometrie	28
10.3.2	Biochemické testy	29
10.4	Průkaz antigenu.....	29
10.4.1	Rychlé diagnostické testy.....	30
10.5	Molekulární metody.....	30
10.5.1	PCR	30
10.5.2	MLST a další molekulární metody.....	31
11.	Terapie	33
12.	Prevence	33
12.1	Profylaxe.....	33
12.2	Vakcíny	33
12.2.1	Vývoj a složení.....	34
12.2.2	Vakcíny proti meningokokům v ČR	35
13.	Diskuze	37
14.	Závěr	38
15.	Použité zkratky.....	39
16.	Seznam obrázků.....	41
17.	Seznam grafů	41
18.	Použitá literatura	42

1. ABSTRAKT

Autor: Markéta Malá

Název: Meningokokové infekce

Bakalářská práce

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Studijní obor: Zdravotnická bioanalytika

Klíčová slova: *Neisseria meningitidis*, meningokok, meningokokcémie, meningitida

Cíl: Cílem této bakalářské práce bylo shrnout poznatky o meningokokových infekcích a jejich původci, kterým je *Neisseria meningitidis*. Dále podat informace o vývoji v oblasti vakcín, léčby a diagnostiky meningokokových infekcí.

Hlavní poznatky: *N. meningitidis* se dostává do organismu z nosohltanu, kde překonává epitelové buňky a vstupuje do krevního řečiště. Podle toho, jak výkonný je imunitní systém hostitele a o jaký kmen se jedná, dochází k rozvoji různě závažného meningokokového onemocnění. Meningokok má pro průnik do organismu účinné nástroje v podobě mnoha faktorů virulence. Při propuknutí nemoci je důležité včasné rozpoznání klinických projevů a rychlé laboratorní potvrzení původce. Dnes lze meningokokovým onemocněním již předcházet konjugovanou tetravalentní vakcínou v kombinaci s vakcínou proti séro skupině B.

Závěry: Infekce způsobené *N. meningitidis* mají širokou škálu, zahrnují běžné nasofaryngitidy, bakterémii a smrtelné akutní hnisavé meningitidy. *N. meningitidis* je bakterie, která se přizpůsobila lidskému hostiteli jako žádná jiná. V současné době se výskyt meningokokových infekcí snižuje, svým průběhem a následky se však řadí mezi nejvážnější bakteriální infekce.

2. ABSTRACT

Title of Bachelor thesis: Meningococcal infections

Student: Markéta Malá

Supervisor: Mgr. Marcela Vejsová, Ph.D.

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Background: The aim of this bachelor thesis was to summarize the findings about meningococcal infections and their originator – *Neisseria meningitidis*. Further this bachelor thesis should provide information about progression in meningococcal vaccines development, treatment and diagnostics.

Main findings: *N. meningitidis* spreads into the human body from nasopharynx, through the epithelium it travels into the bloodstream. Severity of meningococcal infection depends on a strain of meningococcus and on strength of immune system on the side of a host. Meningococcus has got effective tools for invading human body, they are called virulence factors. Quick recognition of clinical signs and rapid confirmation of infection originator are important when the infection breaks out. Nowadays we can prevent meningococcal infection by effective vaccination – combining meningococcal tetravalent conjugate vaccine and meningococcal serogroup B vaccine.

Conclusions: Infections caused by *N. meningitidis* varies from ordinary nasopharyngitis to bacteremia and severe acute meningitis. *N. meningitidis* adapted itself for human host like no other bacteria. Currently the occurrence of meningococcal infection decreases, but the course and consequences of meningococcal infections are very dangerous and serious.

3. Úvod

Neisseria meningitidis je známým původcem závažných hnisavých zánětů mozkových blan, jako jediná bakterie je schopna vyvolat epidemie meningitid. Může způsobit sepsi, běžné nasofaryngitidy, méně často pak artritidy a další záněty. Tuto bakterii lze najít, u zhruba desetiny populace, v horních cestách dýchacích, kde je běžnou součástí mikroflóry. *N. meningitidis* je lidský parazit, nenachází se volně v přírodě. Největší riziko nákazy meningokokovou infekcí je u novorozenců, kteří nemají dostatek svých vlastních protilátek. V současné době existuje efektivní očkování proti hlavním séro skupinám meningokoka, které způsobují u lidí vážné infekce, tedy A, B, C a W135. Velkým problémem zůstává v některých oblastech Afriky, nazývaných pásma meningitid (van de Beek et al., 2016).

Záhadou do jisté míry zůstává, proč u některých lidí meningokok způsobuje závažná onemocnění, kdežto u některých pouze bezpříznakově přežívá v nosohltanu. Žádná jiná bakterie nedokáže tak rychle zabít zdravého člověka po průniku do cévního systému. Proto zůstává, i mezi širokou veřejností, stále velkým „strašákem“ a plní titulky odborných časopisů i masmédií (Votava et al., 2003).

4. CÍL PRÁCE – ZADÁNÍ

Cílem této práce je shrnout nové poznatky o meningokokových infekcích v návaznosti na jejich původce, kterým je *Neisseria meningitidis*. Dále je mým cílem zmapovat pokrok a možnosti v laboratorní diagnostice. Samostatná kapitola bude věnována současné možnosti prevence vakcinací proti jednotlivým séro skupinám *N. meningitidis*. Celkový pohled doplní klinické projevy, komplikace a léčba meningokokových infekcí. Pro přehled bude uvedena i epidemiologie v České republice a ve světě.

5. PŮVODCE

5.1 Charakteristika rodu *Neisseria*

Meningokokové infekce způsobuje *Neisseria meningitidis*, prokaryontní organismus z domény Bacteria. Patří do kmene Proteobacteria, třídy Betaproteobacteria, řádu Neisseriales, čeledi Neisseriaceae, rodu *Neisseria* (Stephens et al., 2007). Název rodu je odvozen od jména německého lékaře Alberta Neissera, který objevil kapavku, nemoc způsobenou bakterií *Neisseria gonorrhoeae* v roce 1855. Rod *Neisseria* obsahuje dva patogenní druhy – *Neisseria meningitidis* (neboli meningokok) a *Neisseria gonorrhoeae* (neboli gonokok), dále skupinu převážně nepatogenních koků sídlících v nosohltanu vyvolávající infekce u pacientů s oslabenou imunitou. *N. meningitidis* byla poprvé izolována mikrobioložkou Sárou Branhamovou-Matthewsovou (Votava et al., 2003).

5.2 *Neisseria meningitidis*

5.2.1 Stavba buňky

Z mikroskopického hlediska se jedná o gramnegativní prodloužené koky, vyskytující se ve dvojicích jako diplokoky, tvarem připomínající kávová zrna (Votava et al., 2003).

Bakterie se řadí mezi prokaryota, jedná se o jednobuněčný organismus a oproti doméně eukaryot je stavba buněk značně jednodušší. Prokaryontní buňku obecně tvoří buněčná stěna, cytoplazmatická membrána, cytoplazma, ribozomy a jedna kruhová dvouřetězcová DNA uložena volně v cytoplazmě. Doplňkovou genetickou informaci může buňka nést ve formě plazmidů (Goering et al., 2016).

Polysacharidové pouzdro obklopuje buňku a podílí se na patogenitě. U neisserií jsou důležitou součástí stěny pili, neboli fimbrie, vyrůstající z vnitřní membrány na

povrch bakterie. Pili jsou křehká vlákna tvořená proteiny. Pomáhají v uchycení na hostitelskou buňku a také při pohybu (Votava et al., 2003).

Buněčná stěna *N. meningitis* je typická pro gramnegativní bakterie. Tvoří ji tenká vrstva peptidoglykanu, tloušťky pouze 5-10 nm, obklopená zevnitř cytoplazmatickou membránou tvořenou lipidovou dvojrstvou a zvnějšku další membránou, která je vázána lipoproteinovými molekulami k peptidoglykanu. Hlavními složkami vnější membrány jsou kromě lipidů oligosacharidy, poriny a lipoproteiny. (Goering et al., 2016). Vnější membrána je často pokryta slizem, který je vypouštěn pomocí váčků napovrch. Obsahuje proteiny a endotoxin. Množství slizu se liší mezi jednotlivými druhy (Stephens a Tzeng, 2000). Díky vnější membráně je povrch bakterie méně hydrofilní než u grampozitivních bakterií, proto se na vnější membráně nachází porinové proteiny, tvořící kanálky pro průchod hydrofilních látek (Goering et al., 2016). Stěna uděluje buňce tvar a chrání ji před mechanickými i chemickými vlivy (Greenwood, 1999).

V poslední době probíhá výzkum genomu jednotlivých kmenů *N. meningitidis* (NM). Cílem je nalézt gen způsobující epidemie. Meningokoky jsou si schopné vyměňovat genetickou informaci, například geny, které kódují pouzdrné antigeny. Tyto změny umožňují únik přirozené imunity namířené proti jednomu typu pouzdra i imunitě vytvořené vakcínou založenou na jednom pouzdrném antigenu. Zkoumáním genetické výbavy se také podařilo najít vhodný terč pro vakcínu proti séroskupině B, kde polysacharidová vakcína není účinná (Rosenstein et al., 2001). Meningokok získává výměnou DNA další faktory virulence nebo zvyšuje svou rezistenci k antibiotikům (Stephens a Tzeng, 2000).

5.2.2 Faktory virulence

Pouzdro slouží jako ochrana meningokoka před fagocytózou. Rozlišováno je 13 sérologických skupin dle pouzdrného polysacharidu, pouze 6 z nich ale způsobuje závažné infekce u lidí, konkrétně séroskupiny A, B, C, X, Y, W135. Dále lze rozeznat sérotypy, respektive subtypy dle proteinových a lipopolysacharidových nekapsulárních antigenů a imunotypy podle lipooligolysacharidového endotoxinu (Stephens et al.,

2007). *N. meningitidis* má schopnost regulovat expresi pouzdra v různých fázích kolonizace hostitele (Tzeng et al. 2016).

Lipooligosacharidový endotoxin (LOS) je přítomný ve vnější membráně. Uplatňuje se při adhezi na hostitele a jeho kolonizaci. Tvoří ho oligosacharidové jádro a lipid A, který kotví hydrofobními silami LOS do membrány. Lipid A je toxický pro živočichy (Greenwood, 1999). Oligosacharidové řetězce LOS jsou velmi podobné lidským antigenům, imunitní systém je nerozezná jako cizí. Tato strategie ochrany před antimikrobiální ochranou hostitele se nazývá mikrobiální mimikry. Liší se od lipopolysacharidového endotoxinu (LPS) běžného u většiny gramnegativních bakterií tím, že neobsahuje O-antigen, tedy polysacharid (Stephens et al., 2007).

Pro přežití NM je nutné uchycení ke sliznici hostitele, proto se na jejím povrchu nachází velké množství adhezínů. Hlavní roli v uchycení k epitelu nosohltanu a endotelu cév hrají pili. Pro těsné uchycení k epitelovým buňkám slouží opacity proteiny (Opa a Opc), které interagují s lidskými CD66, jinak nazývanými jako adhezní molekuly z rodiny karcinoembryonálních antigenů (CEACAM). Na povrchu NM se nachází ještě další, méně prozkoumané adhezní molekuly jako *Neisseria* hia homologue (Nhha) a adhezní a penetrační protein (App) nebo *Neisseria* adhezin A (NadA) (Pizza a Rappuoli, 2015).

Meningokok má velmi dobře vyvinuté mechanismy obrany proti aktivaci lidského komplementu, který je nedílnou součástí lidské přirozené imunity. Komplement má baktericidní účinky a opsonizuje bakterie, čímž urychluje jejich fagocytózu. Existují tři cesty aktivace komplementu: klasická cesta zahrnující navázání složky C1 na komplex antigen-protilátka, lektinová cesta rozeznává specifické složení mikroba a alternativní cesta začínající přímou aktivací složky C3 endotoxiny nebo bakteriemi. Všechny tři cesty spouští aktivační kaskádu, která pokračuje vytvořením komplexu atakující membránu mikroba a končí vytvořením otvorů v membráně, vynucenou smrtí bakterie. Lidský faktor H je protein regulující komplement. Meningokok umí syntetizovat protein vážící faktor H (fHbp) a blokovat tak alternativní cestu aktivace komplementu. Napojení fHbp na faktor H zvyšuje rezistenci meningokoka v séru a umožňuje jeho pomnožení v krvi. S komplementem interferuje

také polysacharid pouzdra a membránové proteiny, jako např.: povrchový protein NspA (*Neisseria* surface protein A), porin B, LOS, protein vážící heparin NHBP (Neisserial heparin binding protein). Další možnost blokády komplementu je pomocí proteázy Nalp (*Neisseria* autotransporter serine protease), která štěpí C3 složku komplementu 4 aminokyseliny před běžným štěpícím místem a vznikají tak kratší C3a a delší C3b fragmenty, které jsou nefunkční (Pizza a Rappuoli, 2015).

Meningokoky také produkují imunoglobulin A1 proteázu, která specificky štěpí hlavní slizniční protilátky, imunoglobuliny třídy A (Greenwood, 1999). Dále syntetizují receptory pro železo, které mají větší afinitu než receptory hostitelských buněk, proto meningokokům nehrozí nedostatek železa potřebného pro metabolismus. Meningokok disponuje receptory pro transferin, laktoferin nebo hemoglobin (Stephens et al., 2007).

6. PATOFYZIOLOGIE

6.1 Vstup do hostitele

N. meningitidis je přirozeným patogenem pouze pro člověka. U části populace, asi 10 %, je běžné bezpříznakové nosičství v nosohltanu. U méně odolných lidí způsobuje nasofaryngitidu, může pronikat skrze sliznici do krevního oběhu a způsobit bakterémii, v některých případech bakterémie vede až ke vzniku hnisavé meningitidy (Pizza a Rappuoli, 2015).

Meningokoky se specificky přichycují pomocí pil na cylindrické epitelové buňky bez řasinek v oblasti nosohltanu, cílovým receptorem je CD46. Na sliznici se nejprve pomnoží a vytváří biofilm. Pouzdro nepomáhá v přichycení, proto je jeho tvorba v této fázi kolonizace geneticky regulována. Těsné přilnutí meningokoka k hostitelské buňce vede k vytvoření pseudopodií – chapadel hostitelské buňky, které pohltní bakterie. Těsné přilnutí zabezpečuje velké množství adhezínů vážících se na různé receptory hostitele (Stephens, 2009). Po pohlčení dojde k průchodu epitelovou buňkou, kde bakterie přežívá, může růst a množit se. Přes bazolaterální membránu bakterie opouští epitel, šíří se do submukózy a zde vstupuje do krevního řečiště. Meningokoky jsou

schopné proniknout přes epitelové buňky asi za 18 hodin. Proniknutí do vaskulárního systému umožňují pili vážící se na CD147 receptor (Pizza a Rappuoli, 2015).

Meningokok přežívá intracelulárně v lysozomech. Zda meningokok přežije v intracelulárním prostoru, závisí na IgA1 proteáze, která degraduje membránové proteiny lysozomu (LAMPs), čímž zabrání dozrání fagozomu ve fagolysosom, ve kterém by došlo k usmrcení bakterie. V této fázi dochází také ke zvýšené expresi genů pouzdra, pro ochranu před fagocytózou (Stephens, 2009).

Pomnožení meningokoků v krvi je spojeno s vypuštěním zánětlivých cytokinů, (IL-1, IL-6, TNF- α), které jsou sekretovány zejména buňkami imunity a endotelem (Stephens a Tzeng, 2000).

N. meningitidis po vstupu do krevního řečiště kolonizuje cévy. Často se usídluje v krevních kapilárách po celém těle, kde přilne k endotelu cévy. V kapilárách a arteriolách umožňuje přilnutí pomalejší tok krve. Mikrokolonie NM se nachází i v kapilárách mozku. Aby se meningokok dostal do nervové tkáně, musí překročit hematoencefalickou bariéru (blood-brain barrier – BBB). BBB je struktura na pomezí cévního a nervového systému rozdělující krev a mozkovou tkáň. Je tvořena endotelovými buňkami cévy, spojenými velmi málo propustnými těsnými spoji, tzv. tight junctions. Dále ji tvoří bazální membrána a výběžky astrocytů, pedikly, nasedající na bazální membránu. BBB zamezuje volnému pohybu hydrofilních látek skrze bariéru a svou velmi malou propustností chrání mozek před infekčními a nežádoucími látkami. Původní myšlenkou byla cesta NM přes plexus choroideus, tedy hematolivorovou bariéru oddělující krev od likvoru. Nicméně výzkum tuto cestu vyloučil, protože v žádných klinických záznamech nebyl nalezen zánět mozkové komory, který by měl být teoreticky přítomen (Miller et al., 2013).

Meningokoky samy interagují s komponenty BBB a nepotřebují Trojského koně v podobě leukocytů pro překročení bariéry, jako např. bakterie *Listeria monocytogenes*.

Existují pravděpodobně další 3 základní možné přestupy BBB:

- 1) Transcelulární transport, adhezí vynucená transcytóza. Tento způsob se předpokládá u bakterií jako *Haemophilus influenzae* či *Streptococcus pneumoniae*.
- 2) Paracelulární přechod pomocí otevření tight junctions je podle posledních výzkumů nejpravděpodobnější možnost.
- 3) Poškození endotelových buněk cytotoxickým efektem. Tento způsob je vysoce nepravděpodobný, protože krvácení v subarachnoidálním prostoru obvykle není přítomno (Miller et al., 2013).

Poté, co se meningokoky přichytí k endotelovým buňkám, prolifерují a vytváří mikrokolonie. Adhezi NM k endotelovým buňkám zprostředkovávají pili typu IV vážící se na zatím neznámý receptor. Pili následně interagují s β 2-adrenergní receptorem a aktivují signální dráhu vedoucí ke kumulaci proteinů pod povrchem endotelu. Jsou vytvářeny specifické molekulární komplexy nazývané kortikální plaky, následuje vytvoření mikroklků. Mikroklky jsou důležité pro těsnější přilnutí a lepší odolnost proti toku krve. V místě adheze bakterie jsou shromažďovány proteiny z mezibuněčných spojů a otevírá se tak cesta pro průchod NM (Miller et al., 2013).

Svou roli hrají i zánětlivé cytokiny TNF- α a IL-1, které mohou zvyšovat permeabilitu BBB, a tak pomoci NM vstoupit do mozkomíšního moku (cerebrospinal fluid – CSF) (Stephens a Tzeng, 2000).

Výzkumy přechodu *N. meningitidis* přes BBB probíhají velmi pomalu a dosud nebyly objasněny všechny okolnosti. Důvodem je úzká specializace NM pouze na člověka, zvířecí modely nejsou dostatečně přesné. Neznámou je stále adhezní receptor na buňkách endotelu pro pili typu IV (Trivedi et al., 2011).

Jaké klinické onemocnění se rozvine, souvisí s místem rozmnožení meningokoků. Pokud dojde k významnému rozmnožení v krvi, mluvíme o sepsi. Rozmnožení v likvoru znamená meningitidu, pokud se meningokok pomnoží v obou oddílech, vzniká smíšená forma onemocnění. Průběh onemocnění pak závisí na rychlosti množení meningokoků, a na množství vypuštěného endotoxinu, které určuje odpověď imunitního systému (Křížová a Rožnovský, 2011).

6.2 Přenos

Infekce se šíří kapénkami pouze mezi lidmi. Často bývá přenos usnadněn jinými respiračními infekcemi. Typická místa nákazy jsou malé prostory s větším množstvím lidí, kteří mohou být nositelé různých kmenů NM. Například vysokoškolské koleje, tábory, či věznice (Goering et al., 2016). Může docházet k posttranslační modifikaci pil, což zapříčiní snížení adheze ke sliznici, bakterie tak mohou být přeneseny kapénkami na jiného jedince snadněji (Murray et al., 2013).

K přenosu dochází také kontaktem sliznic, např. při líbání a pohlavním styku (Votava et al., 2003).

6.3 Rizikové faktory

Infekce nastává, pokud se sejde více faktorů, jak u hostitele, tak i mikroba. Na straně meningokoka záleží, o jaký kmen se jedná a zda jsou přítomny faktory virulence, popřípadě jaké. Na straně hostitele je významný aktuální imunitní a fyzický stav (Murray et al., 2013). NM může způsobit infekce u všech věkových skupin. Velmi ohroženou skupinou jsou novorozenci po šestém měsíci života, v té době již dítě nechrání protilátky od matky a samo si ještě žádné nevytvořilo (Greenwood, 1999).

Nedostatky či defekty lidského komplementu zvyšují riziko nákazy. Nedostatky komplementu mohou být vrozené, nebo získané např. u autoimunitního onemocnění lupus erythematodes, cirhózy jater, nefritidy. Deset až dvacet procent invazivních meningokokových infekcí je spojeno s defektem komplementu. Lidé s defekty v terminálních částech komplementu (C5-C8), které jsou zodpovědné za atak membrány bakterie, jsou citlivější k bakteriálním infekcím. U těchto lidí se mohou objevovat rekurentní meningokokové infekce. Nedostatek faktoru P způsobuje defekty v alternativní cestě aktivace komplementu (Stephens a Tzeng, 2000).

Významným rizikovým faktorem je absence či pokles protilátek. Protilátky jsou získávány přirozenou stimulací imunity při bezpříznakovém nosičství jak přímo NM, tak i ostatních nepatogenních druhů *Neisserie*. Jedinci s vrozeným deficitem protilátek (Brutonova X-vázaná agamaglobulinemie) mají větší predispozici k meningokokovým onemocněním. Velkou část případů dospělých tvoří staří lidé, kteří trpí onemocněními

způsobující zhoršenou funkci imunoglobulínů. Patří mezi ně např. myelom, chronická lymfatická leukémie, onemocnění ledvin a poškození jater (Stephens a Tzeng, 2000).

Dalším rizikovým faktorem je aktivní nebo pasivní kouření způsobující sníženou funkční a mechanickou integritu epitelu. Původní cylindrický epitel s řasinkami nahrazuje epitel bez řasinek, který neposkytuje ochranu před adhezí bakterií (Rosenstein et al., 2001).



Obrázek 1: Pásmo meningitid v Africe (meningitis belt).

Tmavě modře jsou vyznačeny oblasti s velmi vysokým rizikem meningokokových epidemií, světleji oblasti s vysokým meningokokových rizikem epidemií

Zdroj: MacNeil a Meyer, 2017 (převzato)

Nebezpečné je také cestovat do oblastí postižených epidemiemi meningokokových meningitid, zejména do zemí nacházejících se v tzv. pásmu meningitid (Obrázek 1), bez ochrany očkováním (Stephens, 2009).

6.4 Sepse a bakterémie

Krev je přirozeně sterilní. Pokud se do krve dostane meningokok, mluvíme o meningokokové bakterémii, jinak zvané meningokokcémii. V případě, že je

pomnožení meningokoka v krvi velmi rychlé, nastává meningokoková sepsis se septickým šokem. Toto onemocnění může vést ke smrti během několika hodin (Křížová a Rožnovský, 2011).



Obrázek 2: Devítiměsíční dítě v septickém šoku

Přítomny charakteristické červené skvrny

Zdroj: Mahmud H. Javid, Medscape, 2017 (převzato)

N. meningitis v krevním oběhu způsobuje silnou systémovou zánětlivou reakci, aktivuje komplement a koagulační kaskádu. Hlavní roli v indukci těchto reakcí hraje LOS, tedy endotoxin, který bakterie v krvi sekretuje. Způsobí vyplavení mnoha cytokinů (např.: IL-1, IL-6, TNF- α , chemokiny) aktivujících komplement a koagulaci, syntézu leukotrienů a prostaglandinů. Spuštěním těchto dějů dochází k poškození endotelových buněk a zničení malých cév (Batista et al., 2017). Septický šok nastává, pokud meningokoky vypustí velké množství endotoxinu. *N. meningitidis* je schopná autolýzy, čímž zvyšuje uvolňování endotoxinu do krve. Septický šok je charakterizován prudkým snížením tlaku a přítomností diseminované intravaskulární koagulace (disseminated intravascular coagulation – DIC). DIC je patologický stav, při kterém je ve zvýšené míře aktivován koagulační systém tkáňovým faktorem z povrchu monocytů a endotelu. Zároveň je deaktivován fibrinolytický systém. V důsledku poškození cév se objevují kožní projevy, červené skvrny způsobené krvácením do kůže (Obrázek 2) – petechie a rozsáhlejší podkožní krvácení – sufuze. Zároveň dochází k ischemii až nekróze periferních tkání a selhávání orgánů vlivem tvorby mikrotrombů a následné hypoxie. K hypoxii přispívá také spotřeba kyslíku systémovou infekcí (zvýšená teplota

organismu, aktivace obranných mechanismů spotřebovávajících kyslík). Kompenzačními mechanismy hypoxie jsou tachykardie, tachypnoe a centralizace krevního oběhu. Může dojít k vyčerpání koagulačních faktorů projevující se zvýšenou krvácivostí a spontánním krvácením ze sliznic a kůže, objevuje se i krvácení do nadledvin, tzv. Waterhouse-Friderichsenův syndrom. Kožní krvácení v další fázi progreduje do rozsáhlých lézí purpury fulminans. Bakterie může přejít i přes BBB, ale příznaky meningitidy se ne vždy stihnou dostavit. Mortalita u fulminantní sepse se pohybuje okolo 25 % (Join-Lambert et al., 2010).

Meningokokcémie se objevuje u 20-30 % meningokokových infekcí. Je definována přítomností meningokoků v krvi. Letalita meningokokcémie bez meningitidy se pohybuje okolo 35 %. Meningokokcémie může být spojená s meningitidou, zde je letalita nižší, okolo 20 %. Rozvoj sepse a šoku se dostavuje obvykle v průběhu několika hodin (Batista et al., 2017). Vzácnými případy jsou chronické meningokokcémie, trvající týdny až měsíce. Existuje i přechodná meningokokcémie, ze které se pacienti zotaví během 2-5 dní i bez použití specifických antibiotik. Množství bakterií v krvi v tomto případě bývá nízké (Stephens et al., 2007).

6.5 Meningitida

Cerebrospinální mok proudící v CNS je fyziologicky sterilní. Meningokoky se po přestupu do likvoru začínají rychle množit, protože CSF nemá prakticky žádné obranné mechanismy. Meningitida je nejběžnějším projevem invazivní meningokokové infekce. U více než 60 % pacientů ve vyspělých zemích se objeví meningitida bez septického šoku. Pacienti s meningitidou mají obvykle nízkou koncentraci endotoxinu (<3 endotoxinové jednotky na ml) v plazmě, ale vysoké koncentrace v CSF. Systémová zánětlivá reakce je pouze mírná, nemá tak závažné projevy. V CSF se naopak rozvíjí velký lokální zánět v subarachnoidálním prostoru (Stephens et al., 2007). Vypuštěný endotoxin meningokoků aktivuje meningeální buňky, které začnou tvořit zánětlivé cytokiny (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α) a růstový hormon pro granulocytární řadu leukocytů G-CSF. Neutrofily se začnou ve velkém počtu vázat na endotel a přestupovat přes něj, čímž způsobují jeho další poškození. Odebraný likvor by byl v této fázi zakalený, mnohobuněčný. DIC je u meningitid zanedbatelná, protože v CSF se nenachází větší počet koagulačních

faktorů. Hlavním nebezpečím a nejčastějším důvodem úmrtí je edém mozku, zejména útlak mozečku, kde se nachází dechové centrum. Edém může vznikat v důsledku zvýšené propustnosti BBB, poškození mozkových buněk a obstrukci cirkulace mozkomíšního moku. Likvor je umístěn v pevné schránce, takže i malé změny objemu se projeví jako intrakraniální hypertenze (Křížová a Rožnovský, 2011).

Dále meningitidy způsobují tyto extracelulární patogeny: *Escherichia coli* K1, *Streptococcus agalactiae*, *Haemophilus influenzae* typ b, *Streptococcus pneumoniae*. Paradoxně jsou to komenzálové nosohltanu a zažívacího traktu (Join-Lambert et al., 2010).

6.6 Další infekce

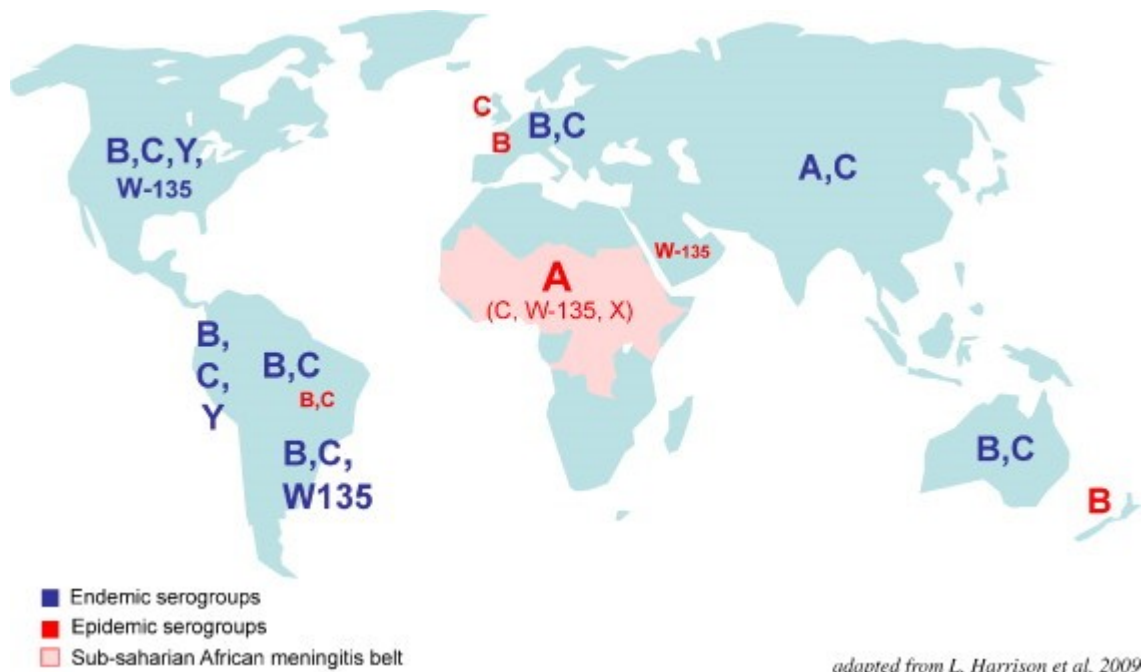
Mezi další infekce způsobené *N. meningitidis* se řadí pneumonie, perikarditida, artritida, či uretritida. Jedná se o vzácné případy. Pneumonie se objevuje u 5-15 % pacientů s invazivním meningokokovým onemocněním. Nemusí být vždy diagnostikována, protože při izolaci meningokoků z nosohltanu nelze nerozlišit mezi nosičstvím a meningokokovou pneumonií (Rosenstein et al., 2001).

7. EPIDEMIOLOGIE

7.1 Situace ve světě

Epidemiologická situace meningokokové meningitidy se v posledních desetiletích zásadně změnila, zejména vlivem nástupu vakcín. Po zvýšené incidenci na přelomu tisíciletí zařadily některé země do povinného očkovacího kalendáře vakcínu proti meningokokům séroskupiny C. V rozvinutých zemích se objevují obvykle séroskupiny B, C a Y (Obrázek 3). Evropské středisko pro kontrolu a prevenci nemocí (ECDC) shromažďuje data o incidenci meningokokových infekcí z členských zemí Evropské unie a přidružených zemí, Norska a Islandu. Nejnovější dostupná statistika z roku 2015 obsahuje data z 30 zemí. Výskyt byl 0,6 případů na 100 000 obyvatel, což se významně neliší od ročníků předchozích. Nejvyšší incidence byla pozorována v Litvě (1,9/100000), Irsku (1,5/100000) a Spojeném království (1,4/100000). Sezónně je nejvyšší výskyt pozorován v období leden-březen. Nejvíce případů (61 %) je způsobeno

séroskopinou B. Tradičně nejvíce infekcí připadá na novorozence a děti do 4 let (data ECDC, 2015).



Obrázek 3: Výskyt jednotlivých séroskopin NM ve světě.

Tmavě modrá písmena značí výskyt endemických séroskopin NM, červená písmena výskyt epidemických séroskopin a růžově je vyznačeno africké pásmo meningitidy (meningitis belt)

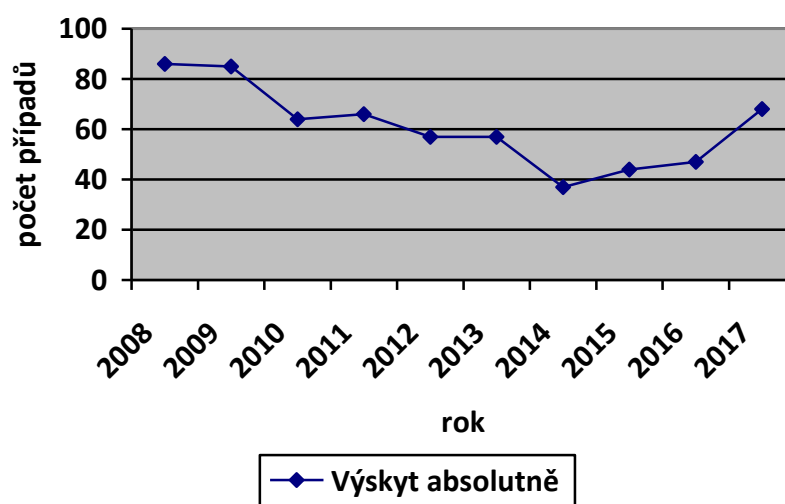
Zdroj: Join-Lambert et al., 2010 (převzato)

V rozvojových zemích se nejčastěji vyskytují případy meningokokových infekcí způsobených séroskopinami A, C a W-135. Největším problémem zůstává pásmo meningitid v subsaharské Africe. Zde v minulosti způsobila mnoho rozsáhlých epidemií zejména séroskopina A. Sezónní epidemie invazivních meningokokových onemocnění se zde obvykle objevují na konci období sucha a bývají spojovány s písečnými větry z pouští (Stephens a Tzeng, 2000). Cyklické pandemie se objevují každých 8-10 let. Incidence v průběhu epidemií či pandemií vzrůstá nad více než 1/1000. Mortalita se pohybuje okolo 10 %, nicméně toto číslo je mnohonásobně vyšší, protože mnoho pacientů se vůbec nestihne dostat do nemocnice. V roce 1996 propukla zatím největší

pandemie v této oblasti, zaznamenaných případů bylo 152 813, z toho 15 783 úmrtí. Znovu je nutné poznamenat, že skutečný počet případů však byl pravděpodobně vyšší (Rosenstein et al., 2001). Konjugovaná vakcína MenA (MenAfriVac™) byla vyvinuta v rámci projektu Vakcinace proti meningitidě (Meningitis Vaccine Project). Po úspěšném projektu distribuce MenA konjugovaných vakcín v roce 2010 klesl počet případů meningokokových onemocnění způsobených séroskupinou A o 99 %. Nově je největší hrozbou hypervirulentní kmen séroskupiny C. Informace o výskytu meningitid v 13 zemích pásu meningitid jsou vydávány každý týden organizací WHO jako „Meningitis weekly bulletin“. (WHO, 2017).

7.2 Situace v ČR

V České republice je výskyt meningokokových infekcí evidován Státním zdravotním ústavem. Případy podléhají povinnému hlášení. Z dostupných dat pro období let 2008-2017 vyplývá, že počet meningokokových infekcí v ČR se v posledních letech zásadně nemění (Graf 1). Je pozorován mírný pokles počtu případů s minimem v roce 2014. Relativní výskyt se pohybuje v rozmezí 0,4-0,8 případů na 100000 obyvatel (SZÚ, 2018).



Graf 1: Výskyt meningokokových infekcí v České republice v letech 2008-2017

Zdroj dat: Státní zdravotní ústav, 2018

Podle zprávy Centra mikrobiologie a epidemiologie za rok 2016 připadá nejvíce případů i úmrtí v ČR na séro skupinu B. Nejvyšší smrtnost je typicky u dětí do 11 měsíců věku, v tomto roce zemřely 3 z 6 nakažených novorozenců.

V roce 2016 byla provedena multilokusová sekvenční typizace (MLST) u všech kmenů, které byly poslány do národní referenční laboratoře. Nejčastěji zjištěným hypervirulentním kmenem byl cc11, který tvořil 26,9 %. Cc11 patří mezi hypervirulentní klonální komplexy séro skupiny C. Posledních deset let převažovaly hypervirulentní komplexy typické pro séro skupinu B (cc32 a cc41/44). Dále byl hypervirulentní komplex zjištěn ještě pro séro skupinu W (cc865) (Křížová et al., 2017).

V roce 2017 je pozorován poměrně strmý vzestup případů invazivní meningokokové infekce, a to ze 43 na 68 případů, z toho 10 skončilo úmrtím. Polovina úmrtí připadá na skupinu B, druhá na skupinu C. Potvrdil se trend poklesu výskytu skupiny B a vzestup skupiny C na našem území. Po provedení MLST byl zjištěn nejčastější hypervirulentní komplex cc11, tvořil již 41,9 % případů (Křížová et al., 2018).

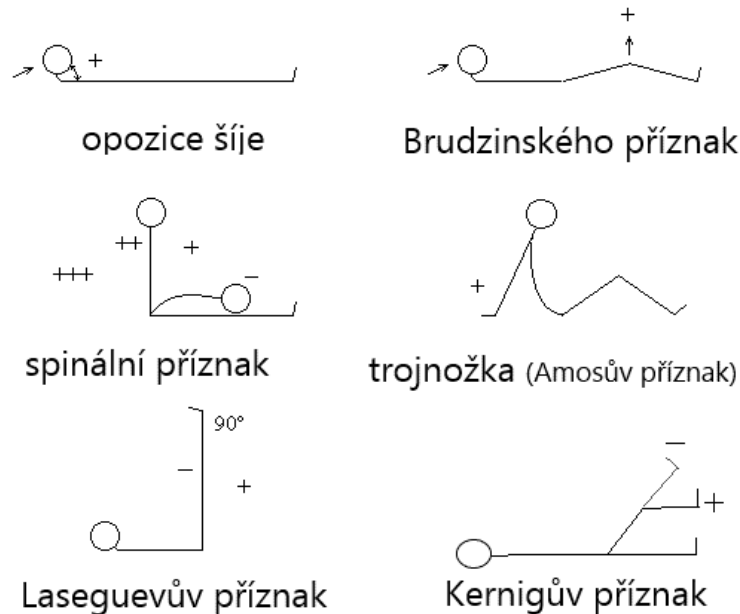
8. KLINICKÉ PROJEVY

Invazivní meningokoková onemocnění se klinicky rozdělují do čtyř kategorií: meningokoková meningitida bez septického šoku, fulminantní meningokoková seps, meningokokcémie a smíšená meningitida se septickým šokem (Křížová a Rožnovský, 2011).

8.1 Meningokoková meningitida

První symptomy meningokokové meningitidy jsou značně nespecifické. Projeví se za 1 až 14 dní po nakažení, podle rychlosti infekce. U některých pacientů se symptomy úvodních stádií infekce velmi podobají projevům chřipky. Častými projevy jsou u meningitid změny chování, křeče, bolesti hlavy, horečka a nevolnost. Hemoragická vyrážka s petechiemi se objevuje pouze u 20-52 % pacientů (van de Beek et al., 2016). V důsledku intrakraniální hypertenze pacient trpí poruchami vědomí, hypertenzí, bradykardií, potížemi s dýcháním a má asymetrické zornice (Křížová a Rožnovský, 2011). Pro meningitidu jsou typické meningeální příznaky (Obrázek 4). Změny v pohyblivosti těla a bolestivost některých pohybů jsou způsobeny podrážděním

motorických nervových drah procházejících skrze zánětem postižené meningy. Patří mezi ně Kernigův příznak, Brudzinského příznak, či příznak opozice šíje (Saberí a Syed, 1999).



Obrázek 4: Meningeální příznaky

Meningeální příznaky patří mezi klinické příznaky meningokokové meningitidy.

Zdroj: Hanuš Rozsypal, 2004 (převzato, upraveno)

8.2 Meningokoková sepe

Příznaky sepe se projevují jako kompenzační mechanismy hypoxie, tedy tachykardie a tachypnoe, dále horečka a nevolnost. Příznaky nastupují velmi rychle a stav pacienta se obvykle prudce zhoršuje. Při centralizaci oběhu se objevuje cyanóza až ischemie periferních tkání. Neobjevují se však meningeální příznaky. Zhoršená perfuze ledvin a snížení objemu cirkulující tekutiny vede k oligurii, až anurii. Pro diagnostiku jsou cenné petechie a sufuze, vyskytující se po celém těle. Petechie od běžné vyrážky lze odlišit přitlačením sklíčka na kůži, kdy petechie na rozdíl od okolní kůže nevyblednou (Křížová a Rožnovský, 2011).

8.3 Meningokokcémie

Meningokokcémie se projevuje horečkou, celkovou tělesnou slabostí, studenými končetinami, bledostí kůže, bolestí hlavy, sníženým krevním tlakem. Příznaky nastupují pozvolně. Obvyklým projevem jsou u 40-80 % petechie (Batista et al., 2017). Chronické meningokokcémie jsou charakterizovány střídavými horečkami, nespecifickou vyrážkou, bolestí kloubů a bolestmi hlavy. Symptomy se mohou na pár dní vytratit a znovu vrátit, postupně se přidávají příznaky vaskulitidy (Stephens et al., 2007).

9. KOMPLIKACE, PROGNÓZA

Vážné následky meningokokových infekcí mají původ hlavně v imunitní odpovědi. Endotel cév je vlivem indukce zánětlivých cytokinů, neutrofilů, či bradykininu více propustný a dochází k úniku tekutin do tkání. Edém plic, nebo edém mozku jsou častou příčinou úmrtí. Koagula ucpávají cévní systém, vzniká ischemie a vede k hypoxii a selhávání orgánů (Stephens a Tzeng, 2000). Vlivem imunitní reakce se také vytváří hnis a sraženiny, které mohou způsobit infarkt. Infekce poškozuje i hlavové nervy a může být poškozen sluch a zrak. Nebo se poškození může týkat motorických nervů a způsobit paralýzu (Murray et al., 2013). Vzácně nastává obstrukční hydrocefalus, pokud dojde k ucpání komorového systému akutním zánětem. Centralizace oběhu a snížení perfuze ledvin může vést až k akutnímu selhání ledvin, které je většinou plně reverzibilní. Větší sufuze a ischemie způsobují poškození periferních částí těla. Časté jsou amputace prstů, končetin a rozsáhlé jizvy. (Křížová a Rožnovský, 2011).

Pro stanovení dobré prognózy je velmi důležitá včasná diagnostika a rychlé podání antibiotik. Prognóza závisí také na stavu a věku postiženého, či citlivosti daného kmenu NM k penicilínům (Votava et al., 2003). Nejméně optimistickou prognózu má fulminantní meningokoková seps, mortalita se pohybuje okolo 25-55 %, následuje meningitida se septickým šokem (mortalita 10-25 %) a meningitida bez šoku (mortalita do 5%). Přejícné meningokokcemii běžně pacient nepodléhá (Křížová a Rožnovský, 2011).

10. LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA

Laboratorní diagnostika je vzhledem k nespecifickým příznakům meningokokové infekce velmi důležitá. Biologickým materiálem odebíraným pro laboratorní vyšetření je nejčastěji krev a mozkomíšní mok, dále v menší míře obsah petechií, kloubní tekutina, či výtěry z nosohltanu. Doporučuje se odebírat vzorky biologického materiálu zároveň pro kultivační i bezkultivační vyšetření. Čekání na pozitivitu kultivace by mohlo být v některých případech pro pacienta fatální (Křížová a Rožnovský, 2011). Mezi nekultivační metody používané k průkazu *N. meningitidis* patří molekulární metody v čele s metodou PCR, mikroskopie, latexová aglutinace likvoru nebo séra a další sérologické metody. Při podezření na meningitidu je vhodné provést analýzu CSF. Zejména v rozvíjejících se zemích se stále nejčastěji používá k diagnostice bakteriologická kultivace, mikroskopie CSF a latexová aglutinace, jelikož jsou to metody jednoduché a nenáročné na instrumentaci. Ve vyspělých zemích je vedle klasické kultivace nejužívanější metodou PCR (Rosenstein et al., 2001).

Krevní obraz u pacientů s bakteriální infekcí vykazuje leukocytózu. V diferenciálním rozpočtu leukocytů je charakteristický zvýšený počet mladších vývojových forem neutrofilních granulocytů. U pacientů s vysokou koncentrací endotoxinu v plazmě (>10 EU/ml), počet leukocytů klesá na normální, či nižší hodnoty. Tento jev je vysvětlován tak, že neutrofilny hojně adherují na endotelové buňky v periferním cévním systému, kde je zvýšený počet adhezních molekul pro snadný přestup leukocytů do místa zánětu. Následně je cytokiny indukováno vypuštění neutrofilních segmentů ze zásob, proto se vyskytují v krvi i mladší vývojové formy (Stephens et al., 2007).

10.1 Analýza CSF

Pokud má lékař podezření na meningitidu, je CSF nejlepším vzorkem pro izolaci a určení původce. Odebrání CSF lumbální punkcí je invazivní zákrok, který musí probíhat za aseptických podmínek, zkušeným personálem (Mayer et al., 2011). Při analýze mozkomíšního moku je sledován zejména počet leukocytů, koncentrace glukózy a poměr koncentrace glukózy v CSF a krvi, množství proteinů, hladina laktátu. Odebraný vzorek CSF může být zakalený, v důsledku zmnožení leukocytů a většího množství

proteinů. Zmnožení se týká především polymorfonukleárů, hodnoty pro bakteriální meningitidu jsou nad 10 leukocytů na 1 ml. Koncentrace glukózy v CSF je snižena, pod 2,5 mmol/l, spotřebovávají ji leukocyty i bakterie. Poměr koncentrací glukózy CSF/krev je menší než 0,6. Zvýšená hladina proteinů (>0,45 g/l) je v rámci zánětlivé odpovědi. Při odběru je také možné měřit tlak mozkomíšního moku, který je u meningitidy zvýšený (> 180 mm H₂O) (van de Beek et al., 2016).

10.2 Mikroskopie

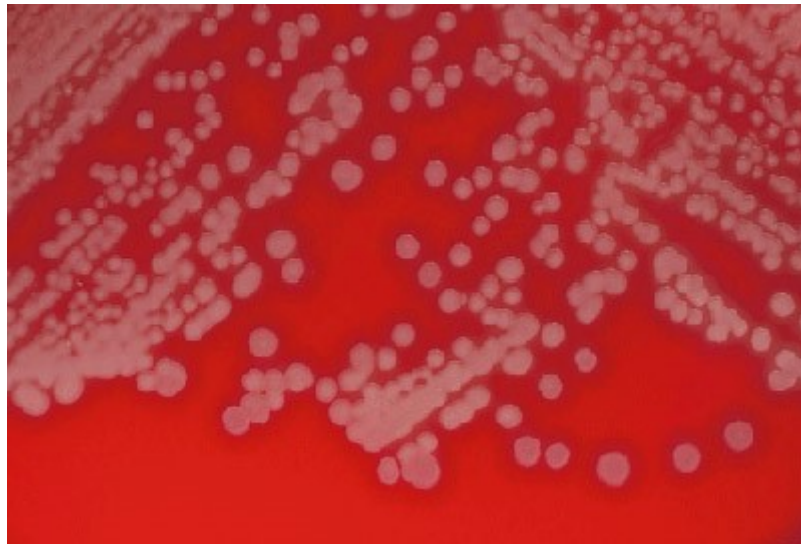
Jednoduchá a rychlá diagnostická metoda při podezření na meningitidu je Gramovo barvení mozkomíšního moku, či krve z hemokultury. Typickým nálezem jsou intracelulární a extracelulární gramnegativní diplokoky a zvýšené množství leukocytů. Bakterie nemusí být vždy zachycena a je užitečné současně provést jiná vyšetření. Při vytváření nátěru je třeba dbát na rychlou fixaci, aby nedošlo k autolýze meningokoků a získání falešně negativního výsledku (Votava et al., 2003).

10.3 Bakteriologická kultivace

Klasická laboratorní diagnostika je postavená na bakteriologické kultivaci, ale je nutné brát v úvahu vliv antibiotické léčby na pozitivitu kultivace. Meningokok je citlivý na změny prostředí, může dojít k usmrcení bakterie při nesprávném transportu, či skladování biologického materiálu (Rosenstein et al., 2001).

Meningokok je aerobní kapnofilní bakterie náročná na podmínky kultivace. Optimální teplota pro kultivaci je 35-37 °C. Pro lepší růst je vhodné vlhké prostředí a přidavek CO₂ (5-10 %). Vyrůstá dobře na čokoládovém agaru, Müller-Hintonově agaru obohaceném o hydrolyzát kaseinu nebo na krevním agaru s přidavkem živin. Výtěry z nosohltanu se kultivují na selektivní Thayer-Martinově půdě s příměsí antibiotik vankomycinu a kolistinu, které zabraňují růstu běžné mikroflóry. Test antibiotické citlivosti je prováděn na Müller-Hintonově agaru (Votava, et al., 2003). Co se týče pomnožovacích půd, používaných při předpokládané nízké koncentraci bakterie v biologickém materiálu, meningokok dobře roste v obohacených médiích jako např.: tekutá Müller-Hintonova půda, Brain heart infusion nebo peptonový Tryptose Soya Broth (Křížová a Rožnovský, 2011).

Za 18-24 hodin po naočkování vyrůstají drobné kolonie šedobílé barvy, s průměrem okolo 1 mm, lesklé, lehce vypouklé a okrouhlé (Obrázek 5). Hemolýza není přítomna. Při podezření na meningokokovou infekci se vždy odebírá vzorek k hemokultivaci (Kuzemenská et al.,1987).



*Obrázek 5: Kultura Neisserie meningitidis na krevním agaru
Charakteristické kolonie s průměrem okolo 1 mm, lesklé, vypouklé, okrouhlého tvaru a
šedobílé barvy*

Zdroj: Mayer et al., 2011 (převzato)

Hemokultivace nabírá na důležitosti, pokud je kultivace CSF negativní nebo pokud je kontraindikována lumbální punkce. Pravděpodobnost záchytu pozitivní hemokultury klesá při léčbě antibiotiky před odběrem (van de Beek et al., 2016).

10.3.1 Hmotnostní spektrometrie

V mikrobiologických laboratořích je již rozšířenou metodou vyhodnocení kultivace pomocí MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Fly Mass Spectrometry). Vyhodnocení probíhá bez nutnosti zdlouhavých biochemických testů, identifikace je hotová během pár minut. Stačí nanést čistou kolonii z kultury na speciální terčík, přidat matici a vložit do přístroje. Matrice se účastní desorpce a ionizace analytu způsobené vysokou energií laseru. Ionizované

částice analytu jsou přeměřovány do analyzátoru TOF (time of fly), což je trubice vyplněná vakuem. Částice putují k detektoru různou rychlostí, malé částice rychleji, velké pomaleji a vytvoří se hmotnostní spektrum typické pro danou bakterii. Spektrum je porovnáno s databází a je nalezena nejvyšší shoda (Patel, 2013). Chyby v určení druhu se mohou objevit i u MALDI-TOF. Je potřeba čistá kultura, metoda závisí na úspěšnosti kultivace. Byla popsána záměna blízkých druhů *N. polysacharea* a *N. meningitidis* (Cunningham et al., 2014).

10.3.2 Biochemické testy

Neisserie obsahují enzymy peroxidázu i cytochromoxidázu, mají pozitivní katalázový i oxidázový test. Detekce cytochromoxidázy se provádí pomocí barevné reakce fenylendiaminu s alfa-naftolem za vzniku indofenolové modři, v případě positivity reakce. Katalázový test na průkaz peroxidázy se provádí smícháním kultury bakterie s peroxidem vodíku, v případě pozitivní reakce vznikají bublinky uvolňovaného kyslíku. Jedinou biochemickou aktivitou je zkvašování glukózy, a na rozdíl od gonokoka, i maltózy. Pro bližší určení gramnegativních koků a kokobacilů biochemicky slouží komerčně dostupné panely, například NEISSERIAtest (Votava et al., 2003).

10.4 Průkaz antigenu

Využívány jsou též sérologické metody pro detekci antigenů. Umožňují určení séroskupiny. Nevýhodou je větší množství falešně negativních výsledků, proto by neměly být jediným testem potvrzujícím diagnózu. Průkaz specifických protilátek nemá význam, vzhledem k rychlosti průběhu infekce. Využívá se zejména latexová aglutinace (Rosenstein et al., 2001). Lze použít monovalentní nebo polyvalentní antiséra. Většinou se testuje 5 nejčastějších séroskupin: A, B, C, W135 a Y. V některých případech vzorek nereaguje s žádným antisérem nebo reaguje s více antiséry, pak je označen jako nezařaditelný. Sety pro latexovou aglutinaci jsou komerčně dodávány. Vždy je nutné přesně dodržovat pravidla a pokyny dodavatele (Mayer et al., 2011). Senzitivita latexové aglutinace prudce klesá u vzorků likvoru odebraných po zahájení antibiotické léčby, a to ze 60 % na 9 % (van de Beek et al., 2016).

10.4.1 Rychlé diagnostické testy

Existují rychlé diagnostické testy pro přímé testování vzorků CSF bez předchozích úprav. Fungují na principu vertikální imunochromatografie. Částičky zlata a membrána z nitrocelulózy jsou pokryty monoklonálními protilátkami, aby zachytily rozpustné séroscupnově specifické polysacharidové antigeny. Vznikají komplexy, které jsou detekovány barevnou reakcí. Test se skládá ze dvou papírků, které dohromady umožňují identifikaci séroscupin A, C, W135 a Y (Mayer et al., 2011).

10.5 Molekulární metody

V současné době je používání molekulárních metod v laboratořích na vzestupu. Již běžnou diagnostickou metodou se pro meningokoky stala polymerázová řetězcová reakce (Polymerase Chain Reaction, PCR). V roce 2016 bylo 53,5 % případů meningokokových infekcí v ČR prokázaných metodou PCR (Křížová et al., 2016). Výhodou je možnost analýzy vzorků, které obsahují zemřelé či lyzované bakterie, tudíž by nebylo možné je vykultivovat. Molekulární metody také umožňují studovat vztah mezi genetickou výbavou a patogenitou (Mayer et al., 2011).

10.5.1 PCR

Vyšetřovaným materiálem je DNA vyextrahované ze vzorků krve nebo CSF. Metoda PCR spočívá v selektivní amplifikaci specifického úseku DNA. Má tři základní kroky: 1) denaturace, rozpletení dvoušroubovice DNA na jednovláknovou DNA; 2) připojení počátečních sekvencí (primerů) na komplementární jednovláknovou DNA; 3) prodlužování primerů ve směru 5' -> 3' DNA polymerázou. Počet kopií se každým krokem násobí. Cílem amplifikace u meningokoků jsou zejména geny *ctrA* a *sodC*. *CtrA* gen se nachází v lokusu pro syntézu pouzdra (*cps* lokus) a kóduje transport polysacharidů pouzdra na povrch buňky. Vyskytuje se u téměř všech druhů a je používán u real-time modifikace PCR i klasické PCR. U části meningokoků gen *ctrA* chybí. Dalším cílem PCR je *sodC*, gen kódující Cu, Zn superoxid dismutázu, jejíž funkcí je přeměna superoxidového radikálu na kyslík a peroxid vodíku. Gen *sodC* není spjat s lokusem pouzdra a umožňuje tak detekovat i neopouzdržené kmeny. PCR je rychlejší oproti metodám kultivačním, výsledky jsou obvykle v řádu několika hodin od odběru a

umožňuje i následnou sérotypizaci a multilokusovou sekvenční typizaci (MLST). Real-time modifikace PCR umožňuje kvantifikaci DNA bakterie ve vzorku. Kombinuje amplifikaci a detekci pomocí fluorescenčních barviv v jednom kroku. Existuje detekce nespecifická a specifická. Nespecifické barvy se váží na jakoukoliv molekulu DNA, proto mají vyšší náchylnost k falešné pozitivitě. Specifická detekce se provádí pomocí sond, které rozpoznávají a váží se na specifickou sekvenci. Fluorescence je vysílána pouze tehdy, pokud se sonda naváže na cílovou sekvenci. Výsledná fluorescence je úměrná množství amplifikované DNA ve vzorku (Mayer et al., 2011).

Genetické odlišnosti v lokusu pro syntézu pouzdra umožňují používání real-time PCR pro detekci specifických genů séro skupin jednotlivých izolátů. Pro genotypizaci jsou používány geny v lokusu pouzdra (*cps*). Geny jsou uspořádány ve 4 operonech. 1 kóduje syntézu pouzdra (*syn*), další tři kódují transport složek pouzdra na povrch buňky (*ctr*). U séro skupiny B, C, Y a W135 je používán gen *sia* (někdy nazývaný též *syn*), kódující syntézu sialové kyseliny tvořící pouzdro. U séro skupiny A je detekován gen proteinu s katalytickou aktivitou *sacB*, u séro skupiny X je to gen fosfotransferázy *xcbA* (Mayer et al., 2011).

PCR se vyznačuje vysokou specifitou i senzitivitou. Ve studii z roku 2005 bylo porovnáváno 20 klinických vzorků v 11 referenčních laboratořích, z toho deset se nacházelo v Evropské unii a jedna v Burkina Faso. Průměrná citlivost PCR byla 89,7 % a specifita 92,7 %. K detekci byly používány geny *ctrA*, transkripční regulátor *crgA*, část malé podjednotky ribozomu 16S rRNA, *porA*. U genotypizace k rozlišení séro skupiny byla průměrná citlivost nižší, a to 72,7 %. V některých laboratořích nedošlo k přiřazení séro skupiny, protože vzorky zde byly testovány pouze na dvě nejběžnější séro skupiny v Evropě – B a C (Taha et al., 2005).

10.5.2 MLST a další molekulární metody

Další molekulární metody nejsou rozšířeny v běžných mikrobiologických laboratořích, ale jsou používány v národních referenčních laboratořích, epidemiologických výzkumech a dalších vědeckých pojednáních o *N. meningitidis*. Vysoké rozlišení těchto metod umožňuje zjistit nepatrné rozdíly v genotypech jednotlivých kmenů. Housekeeping geny jsou exprimovány ve všech buňkách

organismu, kódují proteiny metabolismu. První metodou využívající tyto geny byla multilokusová enzymová elektroforéza (MLEE). MLEE analyzuje elektroforetickou pohyblivost metabolických enzymů na gelu a srovnává změny v mobilitě každého enzymu s alelovou variantou každého lokusu. Porovnávají jsou elektroforetické typy (ET). Pro přesnou analýzu je třeba zpracovat aspoň 20 lokusů. Metoda je technicky náročná a není možné mezilaboratorní srovnání (Mayer et al., 2011).

Multilokusová sekvenční typizace (MLST) je široce používaná metoda pro subtypizaci. MLST definuje kmeny podle jejich alelového profilu získaného z nukleotidových sekvencí fragmentů obvykle sedmi houskeeping genů. Pro *N. meningitidis* jsou to geny: *abcZ*, *adk*, *aroE*, *fumC*, *gdh*, *pdhC* a *pgm*. Analyzují se fragmenty o délce 450-500 párů bazí, aby byly bez problému sekvenovatelné na automatických DNA sekvenačních přístrojích. Pomocí MLST jsou určovány sekvenční typy (ST). Analýza se provádí z PCR amplifikace klinického materiálu. Dalšími cílovými geny pro sekvenaci jsou *porA*, *porB*, *fetA*, *fhpB*, *NHBP* a *NadA*. Data o sekvenaci jsou reprodukovatelná a mohou být objektivně porovnávána mezi laboratořemi. Na webu pubmlst.org/neisseria je celosvětová databáze všech ST. Ke dni 1.6.2018 se zde nacházelo 13681 ST, databáze obsahovala data ze 46038 izolátů (Jolley et al., 2018).

MLST nemá vždy dostatečné rozlišení mezi příbuznými kmeny (Jolley et al., 2012). Dnes už jsou proto používány metody s vyšším rozlišením. Mezi ně patří sekvenace celého genomu nebo MLST typizace konzervativních částí genomu po celé jeho délce (core genome sequencing – cgMLST). Pro *Neisserie* byla vyvinuta cgMLST metoda o analýze 1605 lokusů. V současnosti se v databázi nachází 12636 cgST (Jolley et al., 2018).

Další metodou používanou pro subtypizaci *N. meningitidis* je ribozomální multilokusová sekvenční typizace (ribosomal multilocus sequence typing – rMLST). Analyzuje se proměnlivost 53 genů kódujících bakteriální ribozomální proteinové podjednotky (*rps* geny). *Rps* geny jsou přítomny ve všech bakteriích a distribuovány po celém chromozomu. Metoda poskytuje větší rozlišení než samotná typizace 16S malé ribozomální podjednotky, u které může být problém rozlišit členy stejného rodu (Jolley et al., 2012). Pro vyhotovení rMLST jsou nutné data o nukleotidové sekvenci 53 lokusů,

které nemusí být vždy dostupné pro všechny kmeny. Snahou tedy bylo vybrat jediný lokus, který by dostatečně popsal daný rod. Pro *Neisserie* byl vybrán gen rplF, kódující fragment 50S ribozomálního proteinu L6 (Bennett et al., 2014).

11. TERAPIE

U invazivních infekcí s fulminantním průběhem je nutné zabezpečit životní funkce. Obnovit cirkulaci krevního řečiště podáním krevních infuzí, plazmy a aktivovat metabolismus a fibrinolýzu podáním heparinu, či streptokinázy. Empirická antibiotická léčba musí být zahájena při podezření na meningokokovou infekci ihned. V České republice se jako antibiotikum obvykle podává penicilin, ke kterému je zde citlivost vysoká. Dále lze použít ampicilin, kotrimoxazol, ceftriaxon, popř. chloramfenikol (Votava et al., 2003).

Ve studii Evropské unie „Impact of meningococcal epidemiology and population biology on public health in Europe“ z let 2001-2005, které se zúčastnilo 26 států Evropy, byla zjištěna snížená citlivost k penicilínům pouze ve Španělsku. Pokud je u pacienta podezření na infekci NM a nachází se v oblasti zvýšeného výskytu rezistence, jsou první volbou cefalosporiny třetí generace, dokud nejsou provedeny testy citlivosti. Bylo zjištěno, že sníženou citlivost k penicilinu způsobuje gen penA. Citlivost k penicilinu lze tedy zjistit, kromě klasických kultivačních metod, i molekulární metodou, pomocí sledování polymorfismu genu penA (Křížová a Rožnovský, 2011).

12. PREVENCE

12.1 Profylaxe

Profylaktická léčba se provádí u blízkých postiženého, zejména spolubydlících. Ceftriaxon, rifampicin a ciprofloxacin se používají k profylaxi a k eradikaci *N. meningitidis* z nasofaryngu (van de Beek et al., 2016).

12.2 Vakcíny

Různorodost v genetické a antigenní výbavě jednotlivých kmenů dosud neumožnila vyvinout vakcínu univerzální pro všechny séro skupiny

N. meningitidis. V České republice jsou nyní k dispozici dvě vakcíny, jimiž lze dosáhnout téměř úplné ochrany před meningokokem. Nejsou součástí povinného očkovacího kalendáře a vzhledem k nízkému výskytu invazivních meningokokových infekcí, se jejich zařazení ani nepředpokládá. Není tedy možné spoléhat na kolektivní imunitu (NRL pro meningokokové nákazy, 2018).

12.2.1 Vývoj a složení

První očkovací látkou proti meningokokům byly polysacharidové vakcíny. Zjistilo se však, že nejsou efektivní pro děti do 2 let, opakovanou vakcinací se snižuje imunitní odezva a nezabezpečují doživotní imunitu. Proto byly vyvinuty konjugované vakcíny, které mají nejméně stejnou účinnost jako polysacharidové, opakované dávky zvyšují imunitní odezvu a mají dlouhodobější efekt. Konjugovaná vakcína proti séro skupině A byla úspěšná v eradikaci epidemií této séro skupiny v pásu meningitid v Africe (Tzeng et al. 2016). V současné době se používá tetravalentní konjugovaná vakcína MenA,C,W,Y, která se skládá z oligosacharidu každé séro skupiny konjugované, v případě vakcíny Menveo s proteinem *Corynebacterium diphtheriae*, v případě vakcíny Nimenrix s tetanickým toxoidem (EMA, 2018).

Séro skupina B nemá imunogenní polysacharidové pouzdro, protože polysialové kyseliny jsou součástí lidských glykoproteinů. Vývoj vakcíny proti této séro skupině se tak musel zaměřit na nekapsulární antigeny. První vakcínou byla MenB, obsahující vezikly z vnější membrány, části PorA. MenB nebyla dostatečně účinná proti všem kmenům. Další vakcínou proti séro skupině B je čtyřkomponentní 4CMenB, založená na antigenech s různou funkcí. Protilátky vytvořené po vakcinaci by měly indukovat usmrcení bakterie aktivací klasické komplementové cesty nebo nepřímo předcházet vázání faktoru H na povrch bakterie (Pizza a Rappuoli, 2015). 4CMenB je rekombinantní vakcína založená na antigenech fHbp, NHBP, NadA a porA. Evropská komise schválila používání 4CMenB, obchodním názvem Bexsero, v roce 2013. Poslední novinka, vakcína MenB-fHbp, neboli Trumenba, byla registrována Evropskou unií v roce 2017. Trumenba se skládá ze dvou variant rekombinantního lipidovaného proteinu vázajícího faktor H – fHbpA a fHbpB (EMA, 2018).

Vakcíny proti séro skupině B jsou stále pod zvýšeným dohledem Evropské lékové agentury a sbírají se statistická data o bezpečnosti, efektivitě a ochraně před nosičstvem meningokoka této skupiny. Účinnost vakcín nebyla hodnocena v klinických studiích, byla pouze odvozena na základě schopnosti indukovat sérovou baktericidní protilátkovou odpověď na vakcinační antigeny. Sbírány jsou důležité informace o vedlejších účincích, které podléhají hlášení. Nejsou zatím známy účinky u těhotných a kojících žen a u imunokompromitovaných pacientů. V roce 2015 Spojené království zařadilo vakcínu 4CMenB do svého očkovacího kalendáře. Po deseti měsících vakcinace novorozenců byl zjištěn pokles případů způsobených meningokokem séro skupiny B o 50 %. Zjištěná efektivita vakcíny byla 83 %, ekvivalentní 94 % proti kmenům, které jsou preventabilní očkovaním (88 %) (Ladhani et al., 2018).

12.2.2 Vakcíny proti meningokokům v ČR

V České republice jsou dostupné vakcíny registrované Evropskou lékovou agenturou (EMA): dvě konjugované tetravalentní vakcíny (MenA,C,W,Y) a dvě rekombinantní vakcíny obsahující antigeny meningokoka séro skupiny B (MenB-4C a MenB-FHbp). Komerčně dostupné konjugované tetra vakcíny jsou Nimenrix a Menveo. U těchto vakcín byla prokázána i ochrana proti nosičství meningokoka. Nimenrix lze očkovat od 6 týdnů po narození, Menveo od 2 let. U MenB-4C je doporučena aplikace od 2 měsíců věku, u nás je dostupná vakcína Bexsero. Pro MenB-FHbp vakcínu, obchodním názvem Trumenba, je minimální věk 10 let. Pro co největší ochranu je doporučeno očkování proti všem séro skupinám. K udržení spolehlivé imunity je nutné přeočkování, u konjugované tetra vakcíny po pěti letech, u MenB-4C je zatím pouze doporučené přeočkování u dětí do 2 let věku, pro MenB-FHbp vakcínu nebyla ještě přeočkování vůbec stanovena. Mezi rizikové skupiny, pro které Česká vakcinologická společnost očkování zejména doporučuje, patří: novorozenci, děti a dospívající, zdravotní pracovníci, osoby pohybující se v oblasti zvýšeného výskytu meningokokových infekcí a pacienti s porušenou funkcí imunity. Očkování proti meningokokům je dobrovolné a není hrazené pojišťovnami (Česká vakcinologická společnost ČLS JEP, 2018).

Ve Státním zdravotním ústavu v České republice byla provedena genová analýza složek vakcíny 4CMenB u 340 izolátů meningokokových infekcí z let 2007-2016. Metoda byla prováděna pomocí MLST. Cílem bylo ověřit, zda se varianty genů obsažené ve vakcíně Bexsero shodují s variantami v izolátech, jinými slovy, zda vakcína indukuje účinné protilátky. U všech izolátů byly přítomny geny kódující fHbp a NHBP. Genová varianta fHbp1, která je součástí vakcíny, převažovala nad ostatními variantami. Gen NadA byl přítomen u přibližně třetiny izolátů, gen porA v použité variantě P1.4 téměř nebyl přítomen. Z analýzy vyplývá, že vakcína poskytuje na našem území dostatečnou ochranu proti meningokokovým infekcím (Musílek et al., 2017).

13. DISKUZE

Cílem této práce bylo shrnout nové poznatky o *N. meningitidis* a meningokokových infekcích. Poslední vydanou publikací byla v roce 2011 kniha Meningokokové onemocnění od Pavly Křížové a Ludka Rožnovského. Za posledních 7 let nastal převratný rozvoj hlavně v oblasti očkování, před 7 lety ještě neexistovala žádná vakcína proti meningokokům séro skupiny B, dnes už máme k dispozici dokonce 2 druhy a stále se pracuje na vylepšení jejich složení. Byla nalezena spousta nových antigenních struktur. Nesmím zapomenout na nové metody v subtypizaci, vedle již klasického MLST, je dnes populární celogenomové sekvenování a cgMLST, které dokáže odhalit výskyt nebezpečných hypervirulentních kmenů. Díky intenzivnímu výzkumu se podařilo téměř úplně porozumět vzniku meningokokových infekcí a získali jsme možnost jim předcházet. Otázkou je využití prevence. V mnoha zemích Evropy je již očkování hrazené veřejným zdravotním pojištěním a je zařazeno do očkovacího kalendáře. V České republice je očkování proti meningokokovým infekcím doporučeno pouze pro jednotlivce a není hrazeno z veřejného zdravotního pojištění (ECDC – Vaccine Scheduler, 2018). Zejména finanční otázka může být pro mnoho lidí rozhodující. Například ceník Střediska očkování a cestovního lékařství s. r. o. (<https://www.ockovani-zahranici.cz/cenik-ockovani-a-sluzeb>) udává cenu za 1 dávku pro konjugovanou vakcínu A,C,W,Y (Menveo, Nimenrix) 1750 Kč a pro vakcínu proti séro skupině B (Bexsero) dokonce 3080 Kč. U dětí ovšem nestačí jedna dávka. Ve věku 2-5 měsíců je doporučená aplikace rekombinantní MenB-4C vakcíny ve schématu 3+1. Konjugovaná MenA,C,W,Y vakcína se aplikuje ve věku do 12 týdnů ve schématu 2+1, ve věku do 5 měsíců věku ve schématu 2+0. U dospělých je doporučena aplikace pro séro skupinu B 2+0 a pro MenA,C,W,Y 1+0 (Česká vakcinologická společnost ČLS JEP, 2018). Lze si jednoduše spočítat, že pro mnoho rodin s více dětmi je to záležitost finančně velice náročná. Je zřejmé, že prosazovat očkování proti meningokokovým infekcím v době jejich ústupu je těžké, přesto si myslím, že přínos očkování je nezanedbatelný a bylo by vhodné jej zařadit do očkovacího kalendáře i u nás.

14. ZÁVĚR

Vědecký pokrok, zejména ve studiu genetické výbavy meningokoka a jeho antigenních struktur nám pomohl osvětlit proces kolonizace člověka meningokokem. Intenzivní výzkum meningokoka pomohl k vytvoření účinných vakcín proti všem séro skupinám. Laboratorní diagnostika při podezření na meningokokovou infekci se stále více opírá o rychlejší nekultivační metody, v čele s PCR. Zdá se, že v současné době je meningokok na ústupu, ale měli bychom mít na paměti, že je pro nás stále nebezpečným nepřítelem.

15. POUŽITÉ ZKRATKY

zkratka	význam zkratky	český význam
App	adhesion and penetration protein	adhezivní a penetrační protein
BBB	blood-brain barrier	hematoencefalická bariéra
DNA	deoxyribonucleic acid	deoxyribonukleová kyselina
CD	cluster of determination	diferenční skupina
CEACAM	carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule	adhezín z rodiny karcinoembryonálních antigenů
CSF	cerebrospinal fluid	mozkomíšní mok
cgMLST	core genome multilocus sequence typing	multilokusová sekvenční typizace vybraných částí celého genomu
cgST	core genome sequence type	sekvenční typ pro metodu core genome MLST
DIC	disseminated intravascular coagulation	diseminovaná intravaskulární koagulace
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control	Evropské středisko pro kontrolu a prevenci nemocí
EMA	European Medicines Agency	Evropská léková agentura
ET	electrophoretic type	elektroforetický typ
fHbp	factor H binding protein	faktor H vážící protein
G-CSF	granulocyte-colony stimulating factor	růstový faktor granulocytů
Ig	immunoglobulin	protilátka
IL	interleukin	interleukin
LAMPs	lysosome associated membrane proteins	membránové proteiny lysozomu
LOS	lipooligosaccharide	lipooligosacharid
LPS	lipopolysaccharide	lipopolysacharid
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Fly	Laserem indukovaná desorpce a ionizace za účasti matrice – detektor doby letu
MLEE	Multi-Locus Enzyme Electrophoresis	multilokusová enzymová elektroforéza
MLST	multilocus sequence typing	multilokusová sekvenční typizace
MS	Mass Spectrometry	hmotnostní spektrometrie

NadA	<i>Neisseria</i> adhesin A	adhezní protein <i>Neisserie</i> A
Nalp	<i>Neisseria</i> autotransporter serine protease	neisseriová autotransportní serinová proteasa
NHBP	<i>Neisserial</i> heparin binding protein	protein <i>Neisserie</i> vážící heparin
NhhA	<i>Neisseria</i> hia homologue A	homolog A <i>Neisserie</i>
NM	<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>
NspA	<i>Neisserial</i> surface protein A	neisseriový povrchový protein A
Opa	opacity protein	„neprůhledný“ protein
PCR	polymerase chain reaction	polymerázová řetězcová reakce
rMLST	ribosomal multilocus sequence typing	ribozomální multilokusová sekvenční typizace
ST	sequence type	sekvenční typ
TNF	tumor necrosis factor	tumor-nekrotizující faktor
WHO	World Health Organization	Světová zdravotnická organizace

16. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Pásmo meningitid v Africe (meningitis belt).	17
Obrázek 2: Devítiměsíční dítě v septickém šoku	18
Obrázek 3: Výskyt jednotlivých séroskupin NM ve světě.	21
Obrázek 4: Meningeální příznaky	24
Obrázek 5: Kultura Neisserie meningitidis na krevním agaru	28

17. SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Výskyt meningokokových infekcí v České republice v letech 2008-2017.....	22
--	----

18. POUŽITÁ LITERATURA

BATISTA, Rodrigo Siqueira, Andreia Patrícia GOMES, Jorge Luiz DUTRA GAZINEO, Paulo Sergio BALBINO MIGUEL, Luiz Alberto SANTANA, Lisa OLIVEIRA a Mauro GELLER. Meningococcal disease, a clinical and epidemiological review. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* [online]. 2017, 10(11), 1019-1029 [cit. 2018-02-27]. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.10.004>. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1995764517308714?via%3Dihub>

BENNETT, Julia S., Eleanor R. WATKINS, Keith A. JOLLEY, Odile B. HARRISON a Martin C. J. MAIDEN. Identifying *Neisseria* Species by Use of the 50S Ribosomal Protein L6 (rplF) Gene. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 2014, 52(5), 1375-1381 [cit. 2018-06-13]. Dostupné z: <http://jcm.asm.org/content/52/5/1375>

CUNNINGHAM, Scott A., Jill M. MAINELLA a Robin PATEL. 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* [online]. 2014, 52(6), 2270-2271 [cit. 2018-06-13]. Dostupné z: <http://jcm.asm.org/content/52/6/2270>

ČESKÁ VAKCINOLOGICKÁ SPOLEČNOST ČLS JEP. *Doporučení České vakcinologické společnosti ČLS JEP pro očkování proti invazivním meningokokovým onemocněním* [online]. 15.1.2018 [cit. 2018-06-15]. Dostupné z: <http://www.vakcinace.eu/doporuzeni-a-stanoviska>

EMA – EUROPEAN MEDICINES AGENCY. 1. *Bexsero: EPAR - Product Information*, 2. *Trumenba: EPAR - Product Information*, 3. *Menveo: EPAR - Product Information*, 4. *Nimenrix: EPAR - Product Information* [online]. 2018 [cit. 2018-06-15]. 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

ECDC – VACCINE SCHEDULER, 2018. Meningococcal Disease: Recommended vaccinations. *Vaccine Scheduler* [online]. 2018 [cit. 2018-07-23]. Dostupné z: <https://vaccine-schedule.ecdc.europa.eu/>

European Centre for Disease Prevention and Control, ECDC. Invasive meningococcal disease. In: ECDC Annual epidemiological report for 2015. Stockholm: ECDC; 2017 [cit. 2018-02-28]. Dostupné z: <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data?f%5B0%5D=diseases%3A380>

GOERING, Richard V., Hazel M. DOCKRELL, Mark A. ZUCKERMAN a Peter L. CHIODINI, JULÁK, Jaroslav, ed. *Mimsova lékařská mikrobiologie*. 5. vydání. Praha: Stanislav Juhaňák – Triton, 2016. ISBN 978-80-7387-928-0.

GREENWOOD, David, John F. PEUTHERER a Richard C. B. SLACK. *Lékařská mikrobiologie: přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie*. Vyd. 1. české. Praha: Grada, 1999, 686 s, s.255-265. ISBN 80-7169-365-0.

JAVID H., Mahmud. Meningococemia. *Medscape* [online]. 2017 [cit. 2018-07-24]. Dostupné z: <https://emedicine.medscape.com/article/221473-overview>

JOIN-LAMBERT, Olivier, Philippe C. MORAND, Etienne CARBONNELLE, Mathieu COUREUIL, Emmanuelle BILLE, Sandrine BOURDOULOUS, Xavier NASSIF. Mechanisms of meningeal invasion by a bacterial extracellular pathogen, the example of *Neisseria meningitidis*. *Progress in Neurobiology* [online]. 2010, **91**(2), 130-139 [cit. 2017-12-20]. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2009.12.004>. ISSN 0301-0082. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301008209001981>

JOLLEY, Keith, Dominique CAUGANT, Matthias FROSCHE, Martin MAIDEN, David STEPHENS a Arie VAN DER ENDE. Multi Locus Sequence Typing of *Neisseria*. *Public databases for molecular typing and microbial genome diversity* [online]. University of Oxford, 2018 [cit. 2018-06-03]. Dostupné z: <https://pubmlst.org/neisseria/>

JOLLEY, Keith A., Carly M. BLISS, Julia S. BENNETT, Holly B. BRATCHER a Carina BREHONY. Ribosomal multilocus sequence typing: universal characterization of bacteria from domain to strain. *Microbiology* [online]. 2012, (158), 1005–1015 [cit. 2018-06-03]. DOI: 10.1099/mic.0.055459-0. Dostupné z: <http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.055459-0>

KŘÍŽOVÁ, Pavla, Martin MUSÍLEK, Zuzana VACKOVÁ, Zuzana JANDOVÁ, Jana KOZÁKOVÁ a Helena ŠEBESTOVÁ. Invazivní meningokokové onemocnění v České republice v roce 2016. *Zprávy centra epidemiologie a mikrobiologie: Státní zdravotní ústav Praha* [online]. 2017, **26**(2), 60-66 [cit. 2018-03-12]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/publikace/zpravy-epidemiologie-a-mikrobiologie/zpravy-cem-2-unor-2017>

KŘÍŽOVÁ, Pavla, Martin MUSÍLEK, Zuzana OKONJI, Michal HONSKUS, Jana KOZÁKOVÁ a Helena ŠEBESTOVÁ. Invazivní meningokokové onemocnění v České republice v roce 2017. *Zprávy Centra epidemiologie a mikrobiologie* [online]. Praha: SZÚ, 2018, **27**(1), 16-23 [cit. 2018-05-31]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/publikace/zpravy-epidemiologie-a-mikrobiologie/rocnik-27-rok-2018>

KŘÍŽOVÁ, Pavla a Luděk ROŽNOVSKÝ. *Menogokokové onemocnění*. Praha: MAXDORF, 2011. ISBN 978-80-7345-239-1.

KUZEMENSKÁ, Pavla, J. SCHINDLER, B. TICHÁČEK a V. POTUŽNÍK. *Neisseria meningitidis. Mikrobiologické vyšetřovací metody: Laboratorní průkaz gramnegativních koků a kokobacilů*. 1., Praha: Avicenum, 1987, s. 24-34. ISBN 08-043-87.

LADHANI, Shamez N., Ray BORROW a Nick J. ANDREWS. Growing evidence supports 4CMenB effectiveness. *The Lancet: Infectious diseases* [online]. 2018, **18**(4), 370-371 [cit. 2018-06-15]. Dostupné z: [https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099\(18\)30051-3/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(18)30051-3/fulltext)

MACNEIL, Jessica R. a Sarah A. MEYER. Meningococcal Disease. *CDC Yellow Book 2018* [online]. 2017, Chapter 3 - Infectious Diseases Related to Travel [cit. 2018-02-25]. Dostupné z: <https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2018/infectious-diseases-related-to-travel/meningococcal-disease>

MAYER, Leonard, Brian HARCOURT, Cynthia HATCHER, Michael JACKSON, Lee KATZ, Raydel MAIR, Dana CASTILLO, Ryan NOVAK, Lila RAHALISON, Susanna SCHMINK, M. Jordan THEODORE, Jennifer THOMAS, Jeni VUONG, Xin WANG. *Laboratory Methods for the Diagnosis of Meningitis caused by Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae, and Haemophilus influenzae: WHO manual* [online]. 2. World Health Organization, 2011, Chapter 7 - Identification and Characterization of Neisseria meningitidis. [cit. 2018-03-26]. Dostupné z: <https://www.cdc.gov/meningitis/lab-manual/authors.html>

MILLER, Florence, Hervé LÉCUYER, Olivier JOIN-LAMBERT, Sandrine BOURDOULOUS, Stefano MARULLO, Xavier NASSIF a Mathieu COUREUIL. Neisseria meningitidis colonization of the brain endothelium and cerebrospinal fluid invasion. *Cellular Microbiology* [online]. 2013, **15**(4), 512–519 [cit. 2018-01-02]. DOI: 10.1111/cmi.12082. ISSN 1462-5822. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cmi.12082/full>

MURRAY, Patrick R., Ken S. ROSENTHAL a Michael A. PFALLER. *Medical microbiology*. 7th Edition, s. 248-258. Philadelphia: Elsevier/Saunders, c2013. ISBN 978-0-323-08692-9.

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

NRL PRO MENINGOKOKOVÉ NÁKAZY. Očkování proti meningokokovým onemocněním. SZÚ [online]. 26.1.2018 [cit. 2018-06-15]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/ockovani-proti-meningokokovym-onemocnenim>

PATEL, Robin. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization– Time of Flight Mass Spectrometry in Clinical Microbiology. *Clinical Infectious Diseases* [online]. 2013, **57**(4), 564-572 [cit. 2018-06-13]. Dostupné z: <https://academic.oup.com/cid/article/57/4/564/347370>

PIZZA, Mariagrazia a Rino RAPPUOLI. Neisseria meningitidis: pathogenesis and immunity. *Current Opinion in Microbiology* [online]. 2015, **23**(Host–microbe interactions: bacteria), 68-72 [cit. 2017-11-25]. DOI:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2014.11.006>. ISSN 1369-5274. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527414001659>

ROSENSTEIN, Nancy E., Bradley A. PERKINS, David S. STEPHENS, Tanja POPOVIC a James M. HUGHES. Meningococcal Disease. *The New England Journal of Medicine* [online]. 2001, **344**(18), 1378-1388 [cit. 2017-11-25]. DOI: 10.1056/NEJM200105033441807. ISSN 1533-4406. Dostupné z: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM200105033441807>

ROZSYPAL, Hanuš. Meningeal signs. In: *Infections of the Nervous System I: A Lecture Outline* [online]. 2004 [cit. 2018-05-29]. Dostupné z: <http://www1.lf1.cuni.cz/~hrozs/engl/mening2.gif>

SABERI, Asif a Saeed A. SYED. Meningeal Signs: Kernig's Sign and Brudzinski's Sign. *Hospital Physician* [online]. 1999, **Review of clinical signs**, 23-24 [cit. 2018-05-28]. Dostupné z: http://www.turner-white.com/pdf/hp_jul99_signs.pdf

STÁTNÍ ZDRAVOTNÍ ÚSTAV, SZÚ. Vybrané infekční nemoci v ČR v letech 2008-2017 - absolutně. *NRC pro analýzu epidemiologických dat.: Oddělení biostatistiky. Útvar ředitelky SZÚ*. [online]. 2018 [cit. 2018-03-12]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/publikace/data/vybrane-infekcni-nemoci-v-cr-v-letech-2008-2017-absolutne>

STEPHENS, David S. Biology and pathogenesis of the evolutionarily successful, obligate human bacterium *Neisseria meningitidis*. *Vaccine* [online]. 2009, **27**(supplement 2), B71-B77 [cit. 2017-11-17]. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.04.070. ISSN 0264-410X. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X09006355>

STEPHENS, David S., Brian GREENWOOD a Petter BRANDTZAEG. Epidemic meningitis, meningococcaemia, and *Neisseria meningitidis*. *The Lancet* [online]. 2007, **369**(9580), 2196-2210 [cit. 2017-11-25]. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61016-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61016-2). ISSN 0140-6736. Dostupné z: [http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(07\)61016-2/fulltext](http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(07)61016-2/fulltext)

STEPHENS, David S. a Yih-Ling TZENG. Epidemiology and pathogenesis of *Neisseria meningitidis*. *Microbes and Infection* [online]. 2000, **2**(6), 687-700 [cit. 2018-01-02]. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)00356-7](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)00356-7). ISSN 1286-4579. Dostupné z: www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1286457900003567?via%3DIihub

TAHA, Muhamed-Kheir, Jean-Michel ALONSO, Mary CAFFERKEY, Dominique A. Caugant CAUGANT, Stuart C. CLARKE, Mathew A. DIGGLE, Andrew FOX a Matthias FROSCH. Interlaboratory Comparison of PCR-Based Identification and Genogrouping of *Neisseria meningitidis*. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 2005, **43**(1), 144-149 [cit. 2018-04-27]. DOI: 10.1128/JCM.43.1.144-149.2005. Dostupné z: <http://jcm.asm.org/content/43/1/144.full#sec-9>

TRIVEDI, Kaushali, Christoph M. TANG a Rachel M. EXLEY. Mechanisms of meningococcal colonisation. *Trends in Microbiology* [online]. 2011, **19**(9), 456-463 [cit.

2018-01-02]. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.06.006>. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0966842X11001284?via%3Dihub>

TZENG, Yih-Ling, Jennifer THOMAS a David S. STEPHENS. Regulation of capsule in *Neisseria meningitidis*. *Critical Reviews in Microbiology* [online]. 2016, **42**(5), 759-772 [cit. 2017-11-11]. DOI: 10.3109/1040841X.2015.1022507. ISSN 1549-7828. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/1040841X.2015.1022507>

VAN DE BEEK, D., C. CABELLOS, O. DZUPOVA, et al. ESCMID guideline: diagnosis and treatment of acute bacterial meningitis. *Clinical Microbiology and Infection* [online]. Elsevier, 2016, **22**(Supplement 3), S37-S62 [cit. 2018-02-21]. DOI: 10.1016/j.cmi.2016.01.007. Dostupné z: [http://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X\(16\)00020-3/fulltext](http://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(16)00020-3/fulltext)

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

World Health Organization, WHO. Situation update on meningitis C epidemic risk. *WHO.int* [online]. 2017 [cit. 2018-02-28]. Dostupné z: <http://www.who.int/emergencies/diseases/meningitis/meningitis-c-epidemic-risk/en/>