2. lékařská fakulta Univerzity Karlovy
1. infekční klinika Fakultní nemocnice Na Bulovce

a

Státní zdravotní ústav, Centrum epidemiologie a mikrobiologie, Národní referenční laboratoř pro meningokokové nákazy

Disertační práce

Diagnostika invazivního meningokokového onemocnění metodou PCR

MUDr. Eva Bronská
rozená Jindřichová

Školitelé: Doc. MUDr. Vilma Marešová, CSc.
1. infekční klinika
UK 2.LF FN Na Bulovce, Praha
a
MUDr. Pavla Křížová, CSc.
NRL pro meningokokové nákazy
CEM, Státní zdravotní ústav, Praha

Práce vznikla s podporou grantů:
GAČR 310/96/K102
IGA NI/7109-3

Praha 2006

OBSAH

strana

Obsah 2

Poděkování 4

Seznam zkratek 5

1 Úvod 6

1.1 *Neisseria meningitidis* 6

1.1.1 Základní charakteristika patogeny 6

1.1.2 Charakterizace kmenů 7

1.1.3 Citlivost k antibiotikům 10

1.1.4 Patogenita – faktory virulence 10

1.1.5 Nosičství 11

1.2 Invazivní meningokokové onemocnění (IMO) 11

1.2.1 Epidemiologie ve světě 12

1.2.2 Epidemiologie v ČR 13

1.2.2.1 Nemocnost 15

1.2.2.2 Smrtnost 16

1.2.2.3 Věkově specifická nemocnost a smrtnost 17

1.2.2.4 Prevalence séroskupin *Neisseria meningitidis* 20

1.2.3 Klinický obraz a léčba 22

1.2.4 Rizikové faktory 25

1.2.5 Prevence 26

1.2.6 Vakcinace 27

1.3 Diagnostika invazivního meningokokového onemocnění 28

1.3.1 Kultivace 30

1.3.2 Bezkultivační metody nemolekulární 31

1.3.2.1 Mikroskopie 31

1.3.2.2 Latexová aglutinace 31

1.3.3 Bezkultivační metody molekulární 31

1.3.3.1 PCR metoda 31

1.3.3.2 PCR ve světě 32

1.3.3.3 PCR v ČR 32

1.3.3.4 Dynamika PCR 33

2 Cíle 34
3 Metody 35
3.1 Soubory pacientů a klinické hodnocení souboru 35
3.2 Sběr materiálu 38
3.3 Laboratorní metody 39
3.3.1 PCR 39
3.3.2 Latexová aglutinace 42
3.3.3 Kultivace a mikroskopie 42
3.4 Statistické metody 43
4 Výsledky 44
4.1 Klinická a epidemiologická data souboru 44
4.2 Úspěšnost jednotlivých diagnotických metod 49
4.2.1 PCR 49
4.2.2 Latexová aglutinace 49
4.2.3 Kultivace 50
4.2.4 Určení etiologie a séroskupiny *Neisseria meningitidis* 50
4.3 Výsledky lumbální punkce ve vztahu k PCR 52
4.4 Vliv zahájené antibiotické terapie na výsledek diagnostických metod 54
4.5 Dynamika PCR a latexové aglutinace v likvoru a séru 55
4.6 Vztah PCR k závažnosti IMO 58
4.7 Srovnání primerů 59
4.8 Vztah PCR ke klinické formě IMO 61
5 Diskuse 62
5.1 Epidemiologická a klinická data 62
5.2 PCR 62
5.3 Latexová aglutinace 64
6 Závěr 66
7 Souhrn (Summary) 67
8 Použitá literatura 69
9 Seznam vlastních publikací 77
9.1 Publikace týkající se tématu 77
9.2 Publikace ostatní 80

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych chtěla poděkovat všem, kdo mi v průběhu práce poskytovali cenné rady a připomínky, zejména svým školitelkám Doc. MUDr. Vilmě Marešové, CSc. a MUDr. Pavle Křížové, CSc. za odborné vedení v průběhu celého studia, také MUDr. Jitce Kalmusové za odborné připomínky k laboratorní části práce a MUDr. Olze Džupové za odborné připomínky ke klinické problematice a všem, kdo se podílely na laboratorním zpracování materiálu, zejména Renátě Pospíšilové a Vlastě Pavlíkové. Také bych chtěla vyjádřit dík všem pracovníkům Infekční kliniky FN Na Bulovce, kteří mi pomohli se sběrem biologického materiálu.

V neposlední řadě bych chtěla vyjádřit poděkování svému manželovi Jiřímu, rodině a všem přátelům, kteří mne podporovali v průběhu celého postgraduálního studia.

SEZNAM ZKRATEK

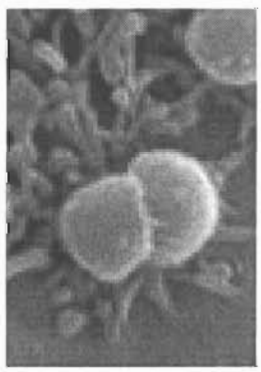
ATB	antibiotikum/a, antibiotické/á
CEF	cefalosporiny
CEM	Centrum epidemiologie a mikrobiologie
CRP	C-reaktivní protein
ČR	Česká republika
DIC	diseminovaná intravaskulární koagulopatie
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ET	elektroforetický typ
FDP	fibrin degradační produkty
GCS	Glasgow Coma Scale
Hib	*Haemophilus influenzae*
IgA,IgG	imunoglobuliny A, G
i.v.	intravenózní
IMO	invazivní meningokokové onemocnění
JIP	jednotka intenzivní péče
LA	latexová aglutinace
MLEE	multilokusová enzymová elektroforéza (Multi-Locus Enzyme Electrophoresis)
MLST	multilokusová sekvenční typizace (Multi-Locus Sequence Typing)
ND	séroskupina neurčena (not determined)
N.meningitidis	*Neisseria meningitidis*
NRL	Národní referenční laboratoř
PCR	polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
PFGE	makrorestrikční analýza DNA v pulzním poli (Pulsed Field Gel Electrophoresis)
PMN	polymorfonukleár
PNC	penicilin
ST	sekvenční typ
Sp	*Streptococcus pneumoniae*
SZÚ	Státní zdravotní ústav
UK	Velká Británie
UPV	umělá plicní ventilace
USELAT	Ultrasound-Enhanced Latex Agglutination Test
WCE	celobuněčná enzymová imunoanalýza (Whole Cell Enzyme-linked immunosorbent assay)

1. ÚVOD

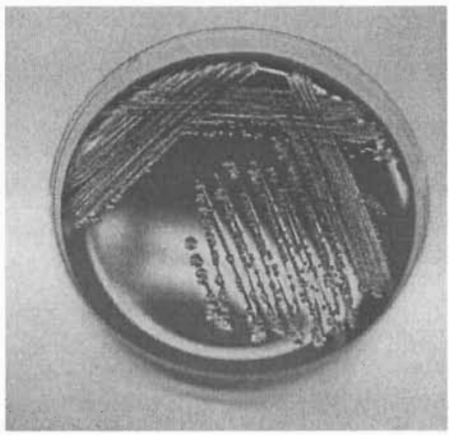
1.1. *Neisseria meningitidis*

1.1.1. Základní charakteristika patogena

Meningokoky jsou přirozeným primárním patogenem pouze pro člověka a jsou ryze parazitické. Kolonizují sliznici respiračního traktu, spojivky a genitál člověka. Jejich výskyt ve zdravé populaci výrazně převažuje počet klinických onemocnění. Meningokoky jsou kultivačně náročné, striktně aerobní, nesporulující gramnegativní diplokoky, většinou opouzdřené, uložené intracelulárně. Jsou citlivé na vlivy zevního prostředí, vyschnutí, sluněční světlo, dezinfekci a snadno podléhají autolýze zejména v alkalickém prostředí. (Obrázek 1.,2.)



Obrázek 1. ***Neisseria meningitidis***
(zdroj: http://www.sanger.ac.uk/Projects/N_meningitidis/)



Obrázek 2. ***Neisseria meningitidis***
(zdroj: http://www.schoolwork.de/mikrobiologie/agarplatten.php)

1.1.2. Charakterizace kmenů

Populace *Neisseria meningitidis* (*N.meningitidis*) je tvořena částí klonální, zahrnující uskupení - komplexy vertikálně se šířících geneticky podobných klonů a částí neklonální, geneticky významně proměnlivou. Nejvyšší míru virulence a zdravotní závažnosti vykazují meningokoky sdružené do tzv. hypervirulentních klonálních uskupení. Tato uskupení odpovídají za onemocnění s nejzávažnějším klinickým průběhem a zvýšenou smrtností, působí převážnou část onemocnění, zejména při hyperendemických situacích a vykazují nejvyšší pravděpodobnost vzniku invazivního meningokokového onemocnění (IMO) po kolonizaci hostitele. Jsou izolována hlavně z invazivních forem onemocnění a vykazují významnou genetickou stabilitu, zachovávají vysokou virulenci v průběhu dlouhodobého šíření a mohou být odpovědná za zvýšený výskyt IMO v některých lokalitách. Naopak zvýšeně proměnlivé meningokoky spolu se zástupci slabě virulentních uskupení jsou nalézány převážně u asymptomatických nosičů a zřídka u IMO.

Národní referenční laboratoř pro meningokové nákazy Státního zdravotního ústavu v Praze (NRL) sleduje příslušnost izolátů ke globálně a místně se šířícím klonálním uskupením s důrazem na identifikaci izolátů hypervirulentní povahy. Ke konální klasifikaci využívá přístupy imunochemické typizace sledující antigenní povahu povrchových struktur (určení séroskupin - aglutinace, určení sérotypů a subtypů – celobuněčná enzymová imunoanalýza - WCE) a přístupy molekulárně biologické klasifikace sledující povahu nitrobuněčných struktur (enzymů - multilokusová enzymová elektroforéza – MLEE a chromozomální DNA – multilokusová sekvenční typizace – MLST). K posouzení příbuznosti izolátů s předpokládanou epidemiologickou vazbou se používá makrosrestrikční analýza DNA pomocí elektroforézy v pulsním poli (PFGE).

Izoláty se stejným či velmi příbuzným multilokusovým genotypem mohou vykazovat značně odlišný imunochemický fenotyp a naopak i stejný fenotyp může vykazovat klonální odlišnost izolátů. Detailní monitoring antigenních a genetických vlastností meningokoků je nezbytnou podmínkou ke správnému hodnocení vývoje epidemiologické situace v naší republice, k jejímu prognózování a určení odpovídající vakcinační strategie.

a) Imunochemická fenotypizace

(aglutinační určení séroskupiny + sérotypizace a subtypizace = fenotyp)

Nejdůležitějším antigenem je pouzderný polysacharid. Podle pouzderného polysacharidu rozlišujeme aglutinací 12 séroskupin (A, B, C, X, Y, Z, W135, 29E, H, I, K, L). Na 90 %

IMO se celosvětově podílejí sérologické skupiny A, B a C. Metody používané k určování sérologických skupin v NRL zahrnují sklíčkovou aglutinaci (ITEST, Bio-Rad, Difco), latexovou aglutinaci (LA) (BioMérieux, Bio-Rad, Murex), WCE (NIBSC), polymerázovou řetězovou reakci (PCR) a sekvenaci.

Vedle pouzderných antigenů rozeznáváme ještě nekapsulární antigeny buněčné stěny - proteinové a lipopolysacharidové, podle kterých určujeme sérotyp a subtyp. U některých kmenů není možné sérotyp ani subtyp určit, takové kmeny pak označujeme jako netypovatelné (NT) a nesubtypovatelné (NST). Komplexní určení těchto povrchových antigenů je nazýváno fenotyp. K tomuto určení používáme metodu WCE založenou na stanovení antigenní specificity oblasti imunodominantního porinu PorB, resp. 2 oblastí porinu PorA pomocí monoklonálních protilátek ve standardizovaném testu.

Výsledky grantové studie ukázaly, že kmeny působící IMO jsou výrazně homogenní, zatímco kmeny izolované od zdravých nosičů vykazovaly značnou heterogenitu fenotypů. (Křížová 2002b).

b) Genetická charakterizace
(multilokusová typizace - MLEE, MLST)

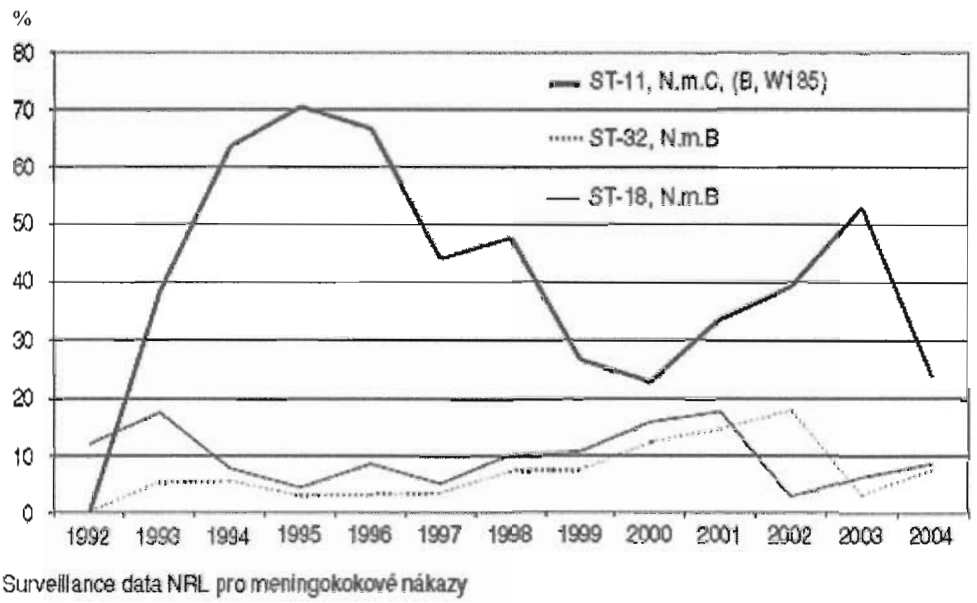
Genetická charakterizace určuje chromozomální genotyp izolátů popisem souboru genových lokusů. Proměnlivost genů není příliš ovlivněna selekčním tlakem hostitelského prostředí a umožňuje úplnou charakterizovatelnost izolátů, která je dána charakteristickým alelickým profilem.

Původní přístup – MLEE - u souboru genů nitrobuněčných metabolických struktur sleduje elektroforetickou pohyblivost korelovanou nepřímo s alelickým genotypem lokusů. Jejím výsledkem je elektroforetický typ (ET).

Novější přístup - MLST - určuje alelický genotyp přímo sekvenací lokusů a jejím výsledkem je sekvenční typ (ST). Tato typizační metoda, vyvinutá v Anglii v roce 1998, zajišťuje 100% typovatelnost populací *N.meningitidis* kmenů a umožňuje detekování hypervirulentních klonů a studium vývoje populace. Je to univerzální metoda, která poskytuje celosvětově srovnatelná data. U nás byla zavedena ve spolupráci s Univerzitou v Oxfordu a s Mikrobiologickým ústavem Akademie věd v roce 2000. Použití této metody ukázalo genetickou odlišnost populací meningokoků působících IMO od populací nosičských (Jolley 2000). Dále byla zjištěna genetická odlišnost českých kmenů od západoevropských populací (Křížová 2001b). U českých izolátů *N.meningitidis* jsou zjišťovány nové ještě nepopsané ST, které jsou verifikovány Oxfordskou univerzitou, jsou

uvedeny ve světové MLST databázi a jsou velmi zajímavým materiálem při vývoji nové vakcíny. Některé se nalézají výhradně v České republice (ČR) a některé byly nalezeny v zemích střední a východní Evropy. V NRL v Praze byla vyvinuta originální metoda MLST přímo z klinického materiálu (Kriz 2002), čímž lze určit ST u kultivačně negativních, ale PCR pozitivních IMO a významně zpřesňuje epidemiologické studium IMO.

Výskyt hypervirulentních uskupení podléhá pomalým, ale často zásadním změnám. Dominantní hypervirulentní uskupení zjišťovaná globálně ve světě a typická také pro Evropu jsou 4 pro séroskupinu B a C (ST 8/komplex A4, ST 11/ ET 37, ST 32/ET 5, ST 41/uskupení III), pro Afriku a Asii jsou typická 3 uskupení séroskupiny A (ST1/podskupina I, II, V, VI, VII, ST 4/podskupina IV, ST 5/podskupina III, VIII). Specifický výskyt séroskupiny B byl zjištěn ve státech bývalého Východního bloku s typickým hyperviruletním uskupením ST 18/komplex 22.



Graf 1. Zastoupení hypervirulentních komplexů u IMO, Česká republika, 1992-2004

Převzato z Křížová P, Zprávy Centra epidemiologie a mikrobiologie (CEM), 2005

V ČR ukázala klonální analýza příslušnost meningokoků k 7 hypervirulentním uskupením – 61 % ET-37, 16 % ET-5, 14 % komplex 22, ojediněle A4, uskupení III, E, Q. Komplex 22 byl detekován jako dosud nepopsané dominantní uskupení typické pro oblast Střední a Východní Evropy a vztažené k séroskupině B a sérotypu 22, ST 18. Od roku 1993 byl zaznamenán nárůst hypervirulentního komplexu ST 11, ET-15/37. Od roku 1996 jeho

výskyt klesá, ale je stále významný a udržuje vysokou smrtnost IMO. V letech 1999-2002 69 % izolátů od IMO patřilo k hypervirulentním komplexům, proto přetrvávala vysoká smrtnost a klinicky závažný průběh IMO (Musílek 2002). V roce 2002 byla zaznamenána v důsledku klonální náhrady vzrůstající četnost onemocnění způsobených nově se šířícími uskupeními séroskupiny B, hlavně komplexu 22 a ET-5. Vzhledem k rozšíření komplexu ET-5 v západoevropských státech lze u něj předpokládat stálý nárůst (Musílek 2003, Křížová 2005, Graf 1.).

c) Srovnávací chromozomální analýza

Metodami molekulární mikrobiologie je zjišťována genetická příbuznost meningokoků, které pomohou odlišit sporadický výskyt od případů epidemiologicky souvisejícího výskytu IMO jako důsledku šíření virulentního kmene. Ke studiu epidemilogicky a klinicky příbuzných kmenů lze použít různé typovací metody - WCE, MLEE, PFGE a analýzu náhodně apmlifikovaných genomových úseků (RAPD). Pro porovnání celkové chromozomální povahy izolátů prokázala nejvyšší rozlišovací schopnost PFGE (Kriz 2000b).

1.1.3. Citlivost k antibiotikům

Citlivost na chemoterapeutika určuje NRL pro antibiotika Státního zdravotního ústavu (SZÚ) ve spolupráci s NRL pro meningokokové nákazy SZÚ. Dlouhodobý monitoring citlivosti ukazuje, že meningokoky izolované v ČR jsou velmi dobře citlivé na antibiotika (ATB) včetně penicilinu, který zůstává stále lékem volby (Urbášková 1999, Urbášková 2000).

1.1.4. Patogenita - faktory virulence

N.meningitidis je izolována převážně z nasopharyngu, kde může růst epifyticky nebo může vyvolávat nasofaryngitidu. Z nasofaryngu může proniknout do krevního řečiště a vyvolat bakteriémii. Meningokokcémie je provázena příznaky intoxikace uvolněným endotoxinem. Jeho uvolnění ze stěny usnadňují autolytické enzymy meningokoků a jeho toxicita je vyší než u enterobakterií. Vznikají četné petechie, ve kterých je možno prokázat množící se meningokoky. Další šíření infekce může vést ke vzniku hnisavé meningitidy.

Kapsulární polysacharidy a proteiny vnější membrány nehrají pouze imunologickou roli, ale uplatňují se jako faktory virulence, zejména ve fixaci bakterie na faryngeální epitel,

rezistenci k fagocytóze a průniku skrze respirační slizniční membránu (Bednář 1996, Chippaux 2002).

Ze studia interakce kmenů *N.meningitidis* s makrofágy a epiteliálními buňkami tkáňových kultur a ze srovnání fagocytózy a adherence virulentních a nevirulentních meningokoků s antigenní a genetickou identitou vyplývá, že virulentní kmeny adherují k epiteliálním buňkám rychleji a s větší intenzitou, fagocytóza je u virulentních kmenů pomalejší a méně intenzivní. Byla popsána „coiling" fagocytóza, která umožňuje přežívání uvnitř makrofágů (Kalmusová 2000). Jako další faktory virulence byla studována biochemická aktivita RTX proteinu FrpC, který je produkován meningokoky v průběhu infekce, je vysoce imunogenní a jeho gen je polymorfní (Osička 2001, Osička 2004).

1.1.5. Nosičství

N.meningitidis se může vyskytovat až u 10% zdravých osob aniž působí jakékoliv obtíže. Tento stav označujeme jako nosičství meningokoka. Nosičské kmeny jsou vysoce diverzní, obsahují řadu genotypů a nepatří do hyperinvazivních linií. Potvrzuje se skutečnost, že o vzniku nosičství či IMO je rozhodnuto během krátké doby po setkání meningokoka s hostitelem a zdravý nosič již sám není v riziku vývoje IMO (Křížová 2002a).

1.2. Invazivní meningokokové onemocnění

Onemocnění se přenáší vzdušnou cestou kapénkovou nákazou při úzkém kontaktu. Zdrojem infekce je pouze člověk, zpravidla bezpříznakový nosič. Mezi další způsoby přenosu nákazy patří přímý kontakt s nakaženou osobou, např. líbání. V kolektivech vystavených horším hygienickým podmínkám a stresu se infekce může rychle šířit. Přenos kapénkovou cestou vede k infekci faryngu, odtud se infekce šíří hematogenní cestou a není vyloučen ani přímý přestup infekce z nasofaryngu přes sinus ethmoideus na mozkové pleny. Inkubační doba kolísá od jednoho do šesti dnů. Naprosto stejně virulentní meningokok se zachová různě, pokud se setká s dobře komponovaným či naopak oslabeným jedincem a rovněž, naprosto stejně odolný jedinec se zachová různě po setkání s různě virulentním meningokokem.

1.2.1. Epidemiologie ve světě

Epidemie IMO se vyskytují na celém světě a vždy přitahují pozornost veřejnosti. Nejvyšší výskyt IMO je trvale v subsaharském pásmu Afriky, kde působí v krátkých (většinou čtyřletých) intervalech rozsáhlé epidemie. Tato oblast je označována jako „pásmo meningitidy – meningitis belt" (Lapeyssonnie 1963). Celosvětově je zde hlášeno více než polovina případů meningokokové meningitidy. Meningitické epidemie zde patří k vedoucím případům úmrtí u osob do 15 let, po průjmových a respiračních onemocněních a malarii. Vysoká promiskuita, chudé hygienické podmínky a nízká úroveň zdravotní péče přispívají ke vzniku epidemií. Od roku 1985 byla zaznamenána řada epidemií také mino běžné limity meningitického pásu. Na rozšíření do sousedních států se mohou podílet klimatické změny, lokální ekonomické a hygienické podmínky a lidská migrace, hlavně v suché sezóně, která je současně sezónou maximálního přenosu a rozšíření bakterie. Významnou úlohu pro šíření epidemií hraje pouť do Mekky. Většinu (více než 85 %) hlavních epidemií meningitid v Africe způsobuje *N.meningitidis* séroskupiny A. Byly hlášeny i epidemie vyvolané *N.meningitidis* C, sporadické případy nebo lokální epidemie způsobené *N.meningitidis* X (zejména v meziepidemickém období) a od roku 2000 působí epidemie i *N.meningitidis* W135.

V posledních 20 letech se epidemie IMO objevily i v dalších zemích (Belgie, Řecko, Španělsko, Velká Británie (UK), Rumunsko, Rusko, Mongolsko, USA, Kanada, Brazílie, Argentina) a byly vyvolány meningokokem séroskupiny A nebo C. Tato situace byla vždy řešena cílenou vakcinací ohrožené části populace. V některých zemích byly rozsáhlé epidemie vyvolány meningokokem séroskupiny B (Kanada, Norsko, Holandsko, UK, Chile, Brazílie, Nový Zéland). Dosud není vyvinuta účinná univerzálně použitelná vakcína proti této séroskupině. Některé země řešily tuto situaci výrobou vlastní B vakcíny (Kuba, Norsko) (Chippaux 2002).

Každoroční Islámské poutě do Mekky (Hajj) se účastní více než milión osob z mnoha zemí celého světa a bývá asociována s výskytem IMO. První mezinárodní nárůst IMO následující Hajj byl způsoben *N.meningitidis* A v roce 1987. V roce 1992 vznikla další epidemie *N.meningitidis* A během Umra a Ramadanu, ale nerozšířila se mimo Saudskou Arabii. Bylo zavedeno povinné očkování poutníků do Mekky a pro Umra návštěvníky A+C vakcínou. V roce 2000 byl ve světě zaznamenán zvýšený výskyt IMO způsobený séroskupinou W135, k němuž došlo v souvislosti s poutí do Mekky. Bylo hlášeno 241 případů v Saudské Arabii a 90 případů v 9 evropských zemích (zejména v UK a Francii, dále

pak v Holandsku, Německu, Finsku, Švédsku, Belgii, Švýcarsku, Norsku). Další případy byly hlášeny v USA, státech Severní Afriky a Asie. Nejčasnější případy byly u poutníků, a pak se onemocnění rozšířilo na jejich kontakty i na osoby bez přímého kontaktu s cestovatelem. Vrchol výskytu onemocnění byl 2 týdny po návratu z Mekky. 50 % onemocnění vzniklo během prvních 4 týdnů po návratu poutníků a další případy se objevovaly sporadicky během 4 měsíců po pouti. Všechny kmeny náležely do hypervirulentního komplexu ET15/37 s antigenní charakteristikou W135:2a:P1-5,2, ST 11 (Taha 2000b).

Po epidemii v roce 2000 Francie, UK a řada jiných zemí doporučuje tetravakcínu A+C+Y+W135 pro cestovatele do Mekky. Další epidemie v následujícím roce vedla k tomu, že tetravakcína je vyžadována u všech poutníků (Aguilera 2002). Polysacharidová tetravakcína chrání proti vzniku onemocnění, ale nechrání proti vzniku asymptomatického nosičství, nemůže tedy zabránit přenosu na nevakcinované domácí kontakty. V roce 2001 0,8 % navrátivších se cestovatelů byli nosiči W135, přestože před odjezdem nebyli kolonizováni (Doganci 2004). Byla vyvinuta konjugovaná tetravakcína A+C+Y+W135, která redukuje procento nosičů ve zdravé populaci a chrání proti vzniku IMO. Je registrována v USA a o její registraci v Evropě se uvažuje.

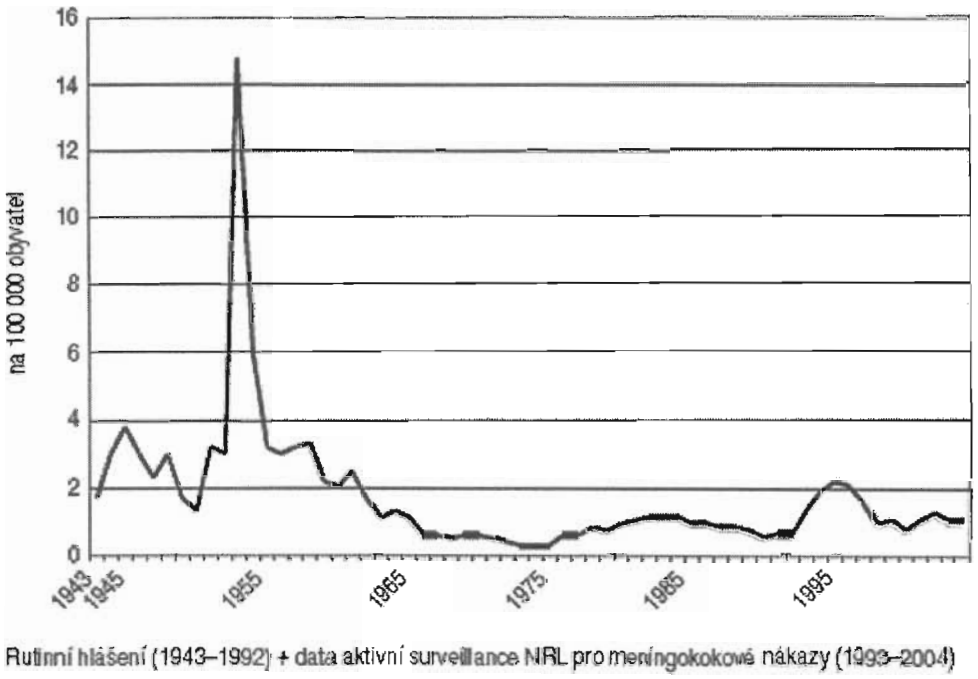
1.2.2. Epidemiologie v ČR

Sledování meningokokového onemocnění má v ČR dlouholetou tradici a dobrou kvalitu. Hlášenou úmrtnost je možno sledovat od roku 1921, nemocnost od roku 1943 (Graf 2.). IMO se v ČR vyskytuje sporadicky a jen vyjímečně zde dochází k epidemiím. Poslední epidemie byla hlášena v padesátých letech, kdy celková nemocnost přesáhla 14 případů /100 000 obyvatel.

Výskyt a klinický obraz IMO se po roce 1993 výrazně změnil. V období před rokem 1993 se roční počet IMO pohyboval v rozmezí 50-70 a smrtnost byla relativně nízká (3 %). Přes 70 % IMO bylo způsobeno meningokokem skupiny B a převládajícím klinickým obrazem byla meningitida.

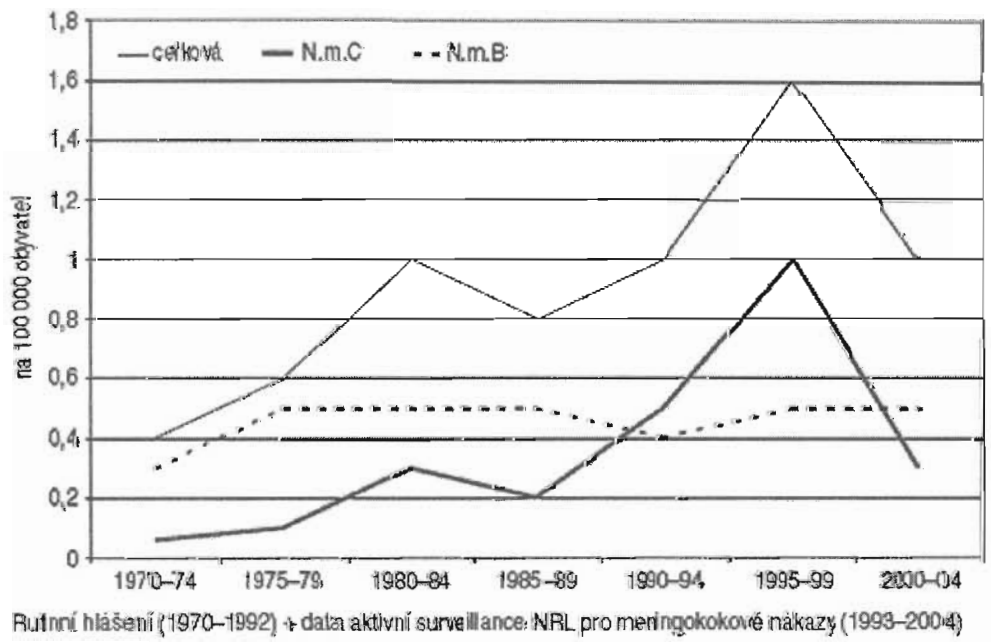
V roce 1993 došlo k rozšíření nového genetického klonu meningokoka, který se do té doby v ČR nevyskytoval (monitorováno od roku 1973), ale byl zjištěn v předchozích letech ve zvýšené míře v některých jiných zemích a byl znám svou hypervirulencí. Jednalo se o klon náležející k sérologické skupině C a vykazující nejčastěji fenotyp C:2a:P1.2,5. Metodou MLEE byl zjistěn ET-15/37 a metodou MLST ST 11. K získání rychlých a co nejpřesnějších epidemiologických dat zahájila v roce 1993 NRL pro meningokokové nákazy SZÚ aktivní

surveillance, prováděnou ve spolupráci s epidemiology, mikrobiology a infektology v celé republice. Díky tomu je možné přesně stanovit vhodná opatření v ohnisku IMO a vakcinační strategii.



Graf 2. Nemocnost invazivním meningokokovým onemocněním, ČR, 1943-2004

Převzato z Křížová P, Zprávy CEM, 2005



Graf 3. Dlouhodobá nemocnost IMO - celková a dle sérokupin, 1993-2004

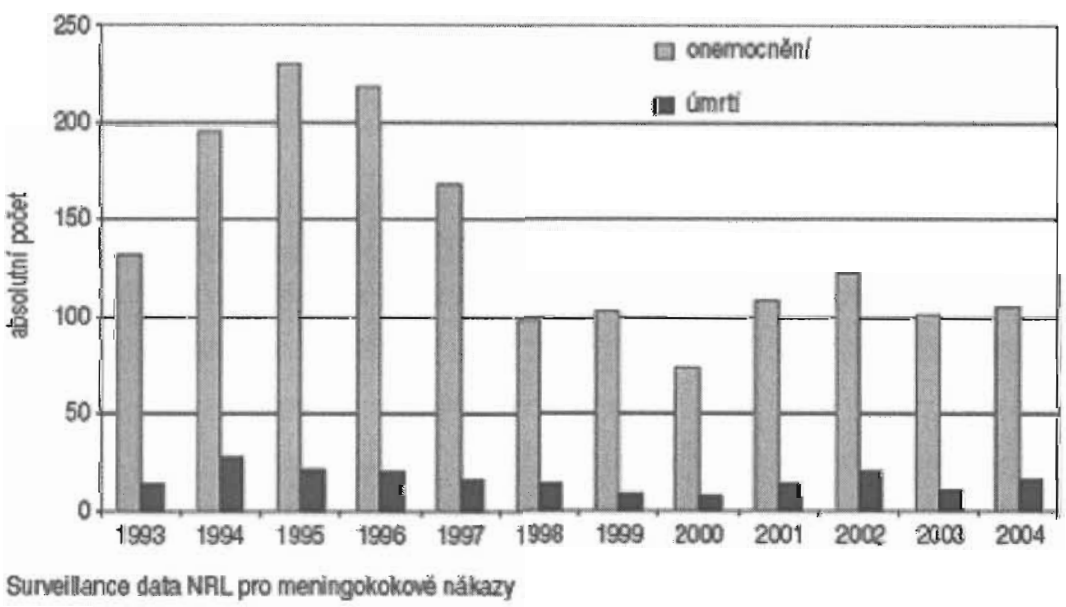
Převzato z Křížová P, Zprávy CEM, 2005

Zobrazeny průměrné hodnoty pro pětileté inervaly.

1.2.2.1. Nemocnost

Počet hlášených onemocnění v letech 1965-1992 se pohyboval v rozmezí 40-120 ročně (nemocnost 0,4-1,2/100 000 obyv.). Nejvyšší nemocnost byla zaznamenána v roce 1953 (14,8/100 000 obyv.). V letech 1982-1984 byl zaznamenán zvýšený výskyt IMO, ale tato situace se vrátila do normálu bez očkovacího zásahu a ČR opět patřila mezi země s nízkým výskytem IMO (Graf 2. a 3.).

V roce 1993 byl zaznamenán náhlý nárůst meningokokových onemocnění s vážnějším klinickým průběhem. Bylo zaznamenáno více sepsí se závažným průběhem, těžce probíhající meningitidy a vyšší procento následků (Křížová 1994, Štruncová 1999). Tato závažná epidemiologická situace kulminovala v roce 1995 (nemocnost dosáhla hodnoty 2,2/100 000, 230 případů, 80 % způsobeno novým hypervirulentním klonem) a od roku 1996 byl pozorován postupný pokles počtu onemocnění a zaznamenán pokles četnosti IMO působeného klonem ET-15/37 (Křížová 2000). Nejnižší počet IMO byl zaznamenán v roce 2000 a dosahoval téměř klidových hodnot jako před rokem 1993 (Křížová 2001a). V následujícím období (2001-2002) měl však počet IMO opět vzestupnou tendenci. Pokles počtu onemocnění byl zaznamenán opět v roce 2003 a 2004 (Graf 4., Tabulka 1., Kriz 2004).



Graf 4. Invazivní meningokokové onemocnění, ČR, 1993-2004

Převzato z Křížová, Zprávy CEM, 2005

	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004
Počet onemocnění	132	195	230	218	168	98	103	74	108	122	101	105
Nemocnost (na 100 000 obyv.)	1,3	1,9	2,2	2,1	1,6	0,9	1,0	0,7	1,0	1,2	1,0	1,0
Onemocnění N.m.C (%)	28,0	53,8	59,1	53,7	49,4	55,1	35,9	14,9	25,9	34,4	39,6	30,5
Onemocnění N.m.B (%)	27,3	21,5	20,4	24,8	28,6	26,5	46,7	58,1	50,9	43,5	38,6	51,4
Onemocnění N.m.ND (%)	43	24	18	20	19	17	15	24	16	17	16	13
Počet úmrtí	14,0	27,0	21,0	20,0	16,0	13,0	8,0	7,0	13,0	20,0	10,0	16,0
Celková smrtnost (%)	10,6	13,8	9,1	9,2	9,5	13,3	7,8	9,4	12,0	16,4	9,9	15,2
Smrtnost N.m.C (%)	16,2	15,2	7,3	9,4	12,0	18,5	13,5	27,3	21,4	19,0	10,0	9,4
Smrtnost N.m.B (%)	5,5	11,9	10,6	11,1	6,2	7,7	0,0	4,6	5,4	11,3	5,1	20,4

Tabulka 1. Epidemiologické charakteristiky IMO, ČR, 1993-2004

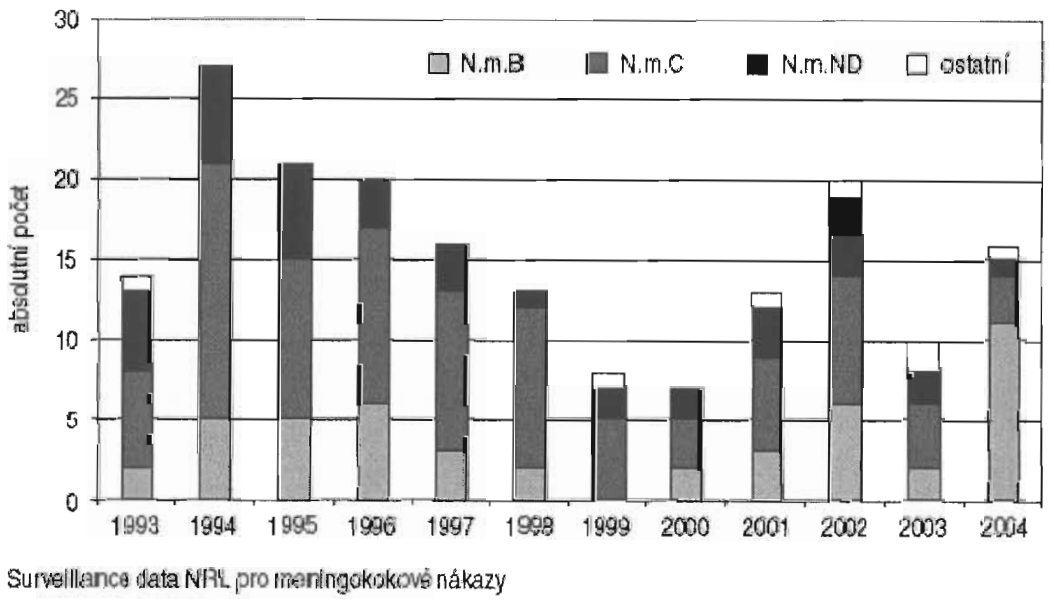
Surveillance data NRL pro meningokokové nákazy

ND = séroskupina neurčena

1.2.2.2. Smrtnost

V letech 1965-1992 byl počet hlášených úmrtí 0-12 ročně (smrtnost 3-5 %). V roce 1993 byla zaznamenána spolu s nárůstem nemocnosti i vyšší smrtnost, která dosahovala nebývalých hodnot: celková smrtnost byla v roce 1993 10,6 % a pro IMO způsobené *N.meningitidis* C:2a:P1.2,5 až 20 % (Křížová 1994, Štruncová 1999). Od roku 1996 počet úmrtí klesal, ale výrazně pomaleji než nemocnost a smrtnost zůstávala i nadále vysoká. Relativně vysoká smrtnost byla způsobena zejména meningokokem sérologické skupiny C, smrtnost meningokoka séroskupiny B byla relativě nízká. Vysoká smrtnost sérologické skupiny C byla stále působena hypervirulentním klonem ET-15/37. Od 2001 byl zaznamenán vzestupný trend i ve smrtnosti, která byla nadále způsobena zejména meningokokem C, ale smrtnost B mírně stoupla oproti roku 2000, což bylo způsobeno příslušností těchto meningokoků k hypervirulentním komplexům (Musílek 2002). Multilokusová typizace prokázala, že v současné době vzrůstá četnost onemocnění působeného nově se šířícími hypervirulentními uskupeními *N.meningitidis* séroskupiny B, zejména komplexem 22 a komplexem ET-5. Vysoká smrtnost způsobená sérologickou skupinou C je stále působena hypervirulentním komplexem menigokoka ET-15/37. V roce 1995 byla poprvé zjištěna mutace klonu ET-15/37 v B variantě (B:2a:P1.2,5) a na rozdíl od počátku 90. let se na

smrtnosti podílejí i hypervirulentní klony meningokoka séroskupiny B. I v roce 2002 měla celková smrtnost vzestupný trend, a dosáhla nejvyšších hodnot od zahájení surveillance. Meningokok C měl stále vysokou smrtnost díky příslušnosti k ST 11 a na vzestupu smrtnosti se podílel i vzestup ST 11 u séroskupiny B. Smrtnost v roce 2002 byla za posledních 30 let nejvyšší, což vedlo ke snaze změnit přístup k pacientům s podezřením na IMO a byl vypracován standardní postup (Rožnovský 2002a), podle kterého mají být nemocným se suspektním IMO ATB aplikována co nejdříve, případně ještě před hospitalizací. V roce 2003 byl zaznamnenán pokles počtu úmrtí a celková smrtnost se pohybovala těsně pod 10 %, rovněž smrtnost B a C klesla. V roce 2004 byl ale zaznamenán vzestup počtu úmrtí oproti předcházejcím dvěma letům a celková smrtnost dosáhla 15,2 %. Byla způsobena zejména séroskupinou B (20,4 %), zatímco smrtnost způsobená séroskupinou C klesla pod 10 % (Graf 5.).



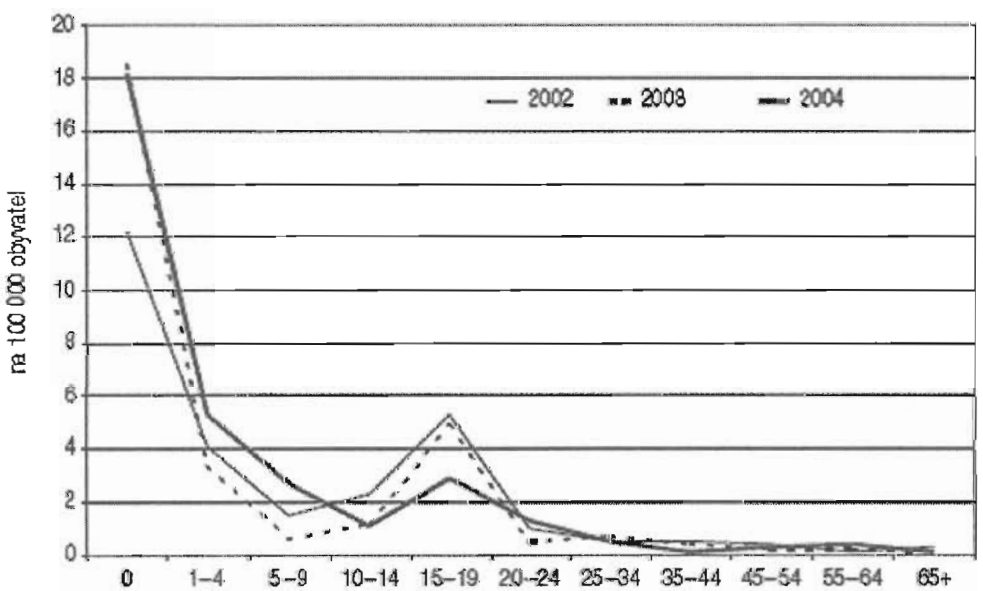
Graf 5. Séroskupiny *N.meningitidis* u úmrtí na IMO, ČR, 1993-2004

Převzato ze Zprávy CEM, 2005

1.2.2.3. Věkově specifická nemocnost a smrtnost

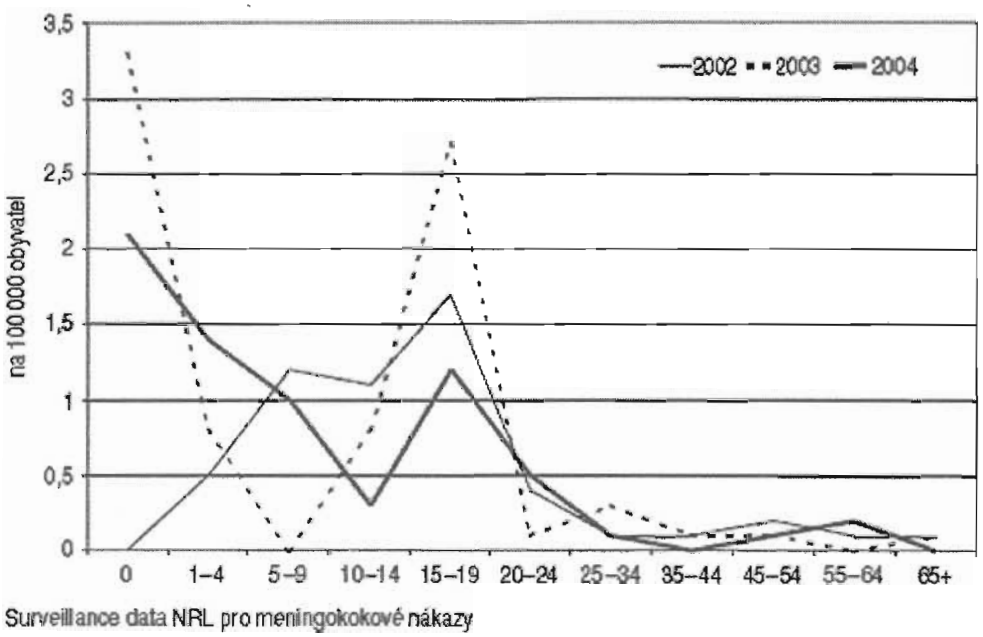
V letech 1965-1992 byla nejvyšší nemocnost i smrtnost v nejmladších věkových skupinách a prevalovala séroskupina B. V roce 1993 byla zaznamenána změna věkové distribuce. Nemocnost a smrtnost se dramaticky zvýšila hlavně ve věkové skupině 15-19 letých. V následujících dvou letech stoupla nemocnost i u malých dětí (1-4 letých) (Křížová 1994, Štruncová 1999).

V roce 2000 byla nejvyšší nemocnost v nejmladší věkové skupině (0-1 letých) a onemocnění způsobovaly převážně meningokoky sérologické skupiny B. Druhá nejvyšší věkově specifická nemocnost byla zaznamenána ve věkové skupině 1-4 letých a na třetím místě byla skupina 15-19 letých. V obou skupinách opět prevalovala séroskupina B. V roce 2001 se skupina 15-19 letých posunula na 2. místo a v této věkové skupině došlo k největšímu zvýšení nemocnosti a právě tato věková skupina způsobila i zvýšení celkové nemocnosti. Tak jako v roce 2000 bylo i v této věkové skupině významné zastoupení séroskupiny B, ale byl zjištěn vzestup počtu onemocnění vyvolaných meningokokem séroskupiny C, který náležel z 78,3 % do hypervirulentního komplexu ET-15/37. I v dalších letech zůstala specifická nemocnost nejvyšší v nejmladší věkové skupině, i když zde výrazně poklesla a absolutní počet onemocnění byl nízký. Na druhém místě byla skupina 15-19 letých, kde nemocnost séroskupiny C měla od roku 2001 vzestupný trend a v roce 2003 dosáhla vyšší hodnoty než na počátku nově vzniklé situace v roce 1993. V roce 2004 došlo ve srovnání s předchozím rokem k nevýraznějšímu poklesu nemocnosti ve věkové skupině 15-19 letých a v nejmladší věkové skupině. Naopak vzestup nemocnosti byl zaznamenán v dětských věkových skupinách (1-4 a 5-9 letých), což způsobila séroskupina C a ve skupině mladých dospělých (20-24 let), kde se naopak uplatnila séroskupina B (Graf 6.-9.).



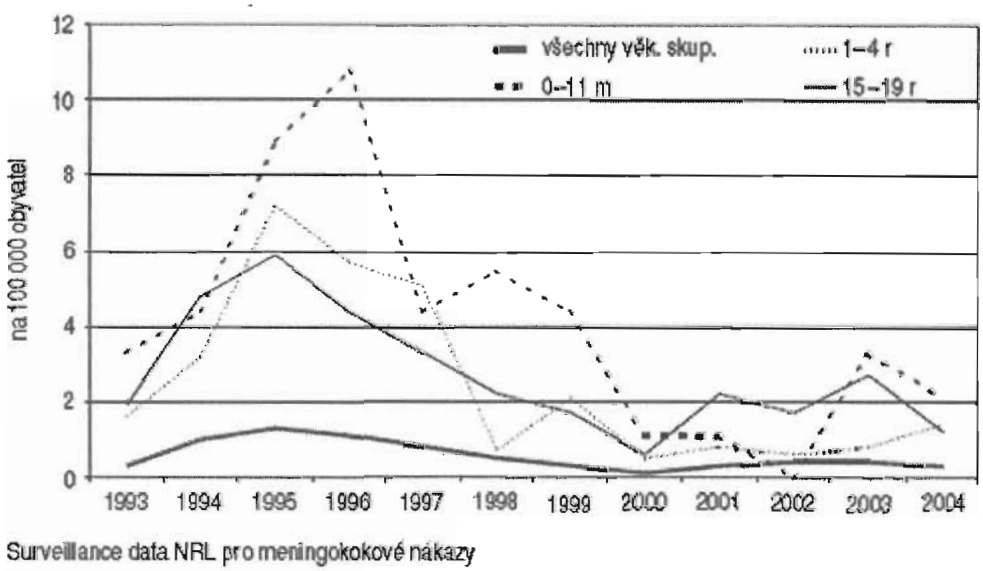
Graf 6. Specifická věková nemocnost IMO, ČR, 2002-2004

Převzato z Křížová, Zprávy CEM, 2005



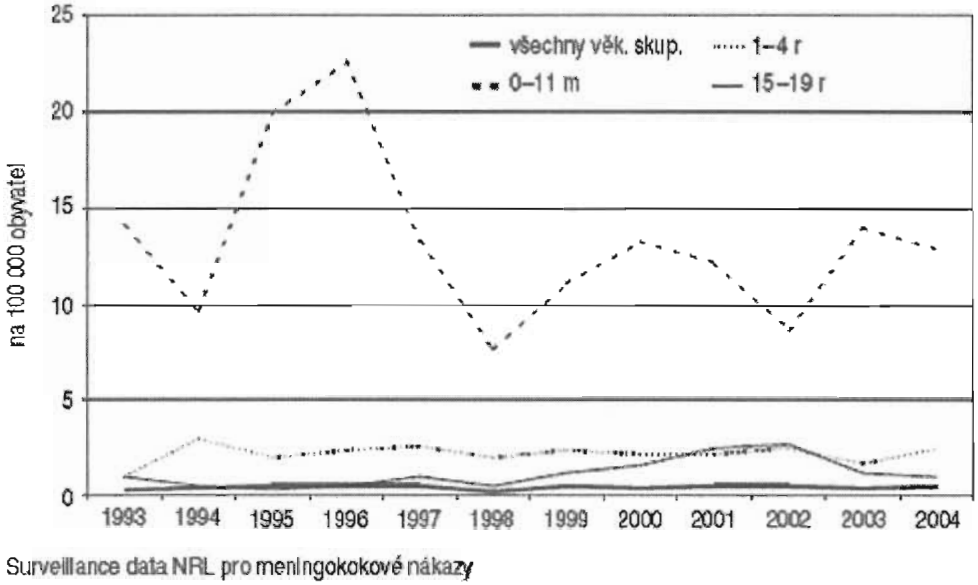
Graf 7. Specifická věková nemocnost IMO působeného *N.meningitidis* C, ČR, 2002-2004

Převzato z Křížová, Zprávy CEM, 2005



Graf 8. Nemocnost způsobená *N.meningitidis* C, ČR, 1993-2004

Převzato z Křížová, Zprávy CEM, 2005



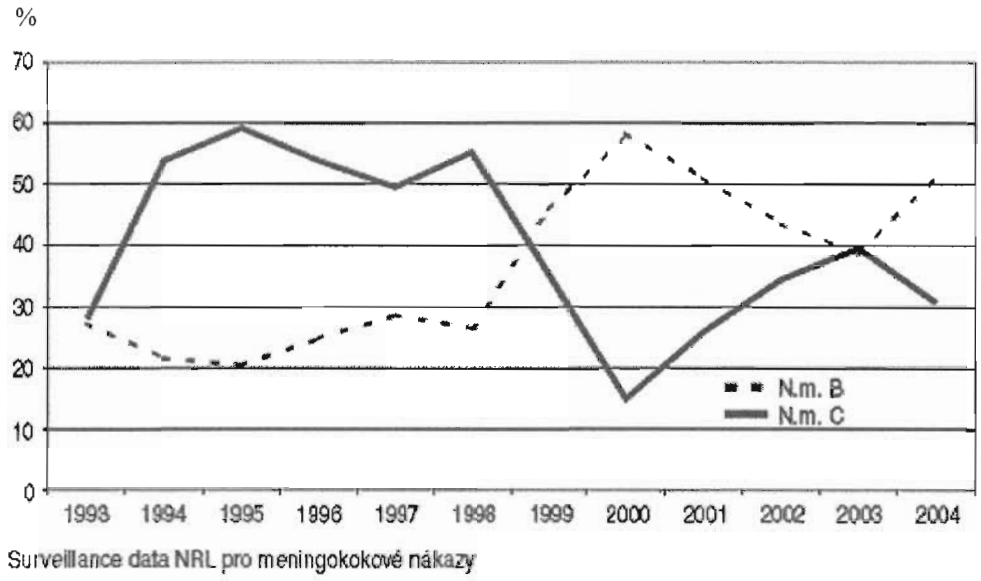
Graf 9. Nemocnost způsobená *N.meningitidis* B, ČR, 1993-2004

Převzato z Křížová, Zprávy CEM, 2005

1.2.2.4. Prevalence séroskupin *Neisseria meningitidis*

V období před rokem 1993 přes 70 % IMO bylo způsobeno meningokokem skupiny B a převládajícím klinickým obrazem byla meningitida. V letech 1982-1984 byl zaznamenán přechodně zvýšený výskyt skupiny C, která však nenáležela do hypervirulentního komplexu a zvýšila pouze nemocnost nikoli smrtnost IMO (Graf 3.). Od roku 1993 s rozšířením nového klonu významně stouplo procento zastoupení meningokoků sérologické skupiny C a v letech 1994-1998 přechodně převážilo nad séroskupinou B. Výrazná převaha sérologické skupiny B byla opět zjištěna v roce 2000, kdy také došlo k poklesu procenta onemocnění působených hypervirulentním klonem ET-15/37 (27,6 %), většina kmenů tohoto komplexu byly meningokoky séroskupiny C. V následujících letech 2001-2002 trvala převaha sérologické skupiny B, ale byl zjištěn vzestup skupiny C a také zjištěn vzestup kmenů náležejících k ST 11 na 30,9 % (2001) a 39,7 % (2002). V roce 2003 byl zaznamenán prakticky identický počet onemocnění způsobených meningokokem séroskupiy B a C. To bylo během 10 let již třetí překřížení v prevalenci séroskupiny C versus B (Graf 10.). V roce 2004 byl zaznamenán pokles procenta onemocnění způsobených *N.meningitidis* C a vzestup procenta onemocnění způsobených *N.meningitidis* B. Nejčastěji zjišťovaným hypervirulentním komplexem byl nadále komplex ST 11, kmeny tohoto komplexu náležely ve většině do séroskupiny C.

Určování příslušnosti meningokoků do klonálních uskupení umožnilo detekci nového hypervirulentního komplexu *N.meningitidis* Y, který ve zvýšené frekvenci začal v posledních letech působit IMO s vysokou smrtností (26,3 %).



Graf 10. Séroskupiny *N.meningitidis* u IMO, ČR, 1993-2004

Převzato z Křížová, Zprávy CEM, 2005

Procento hypervirulentního klonu ST 11 mělo od roku 2001 opět vzestupný trend. Z dlouhodobého sledování skupinově specifické nemocnosti vyplývá, že nemocnost séroskupiny B má dlouhodobě stabilní trend, zatímco nemocnost vyvolaná séroskupinou C má dlouhodobě vzestupný trend a přesně sleduje výchylky celkové nemocnosti (Graf 3.).

V roce 2000 byla zjištěna dvakrát a v roce 2001 jedenkrát séroskupina W135, která v posledních působilaí neobvyklou epidemiologickou situaci ve světě a byla v souvislosti s pravidelnou poutí do Mekky. Meningokoky izolované u nás na rozdíl od situace ve světě nenáležely do hypervirulentního komplexu ET-15/37.

Procento případů s neurčenou sérologická skupinou *N.meningitidis* se v posledních letech pohybovalo pod 20 %. Analýza séroskupin způsobujících úmrtí ukázala, že v letech 1993-2001 byla zjištěna prevalence séroskupiny C, ale u 22 % úmrtí však nebyla séroskupina zjištěna. Dle doporučení NRL je vhodné zařadit do standardních postupů při sekčním ověření u IMO zaslání likvoru a séra na PCR vyšetření.

1.2.3. Klinický obraz a léčba

IMO i v dnešní době život ohrožující stav, který může vést k trvalým následkům nebo smrti jedince. IMO a zejména fulminantní meningokoková sepse představují potenciálně nejrychleji smrtící infekční onemocnění. Perakutní průběh meningokokové sepse může způsobit úmrtí do 12-48 hodin od počátku příznaků.

Meningokok může způsobit onemocnění s řadou klinických obrazů, od pouze horečnatého onemocnění se spontánní úzdravou, banální respirační infekce, lokalizované infekce (konjunktivitidy, pneumonie, infekce močových cest), až po závažná a život ohrožující onemocnění. Pokud v průběhu infekce dojde k průniku přes hematoencefalickou bariéru do subarachnoidálního prostoru, dojde k primárnímu zánětu mozkových plen - meningitidě. Meningitida může probíhat izolovaně nebo současně se sepsí. U těžkých forem se objeví příznaky septického šoku se selháním ledvin, dechovou tísní a intravaskulární koagulopatií. Při poškození nadledvin krvácením hovoříme o Waterhouse–Friderichsenově syndromu (Bednář 1996).

V rámci IMO rozlišujeme dvě hlavní klinické formy, a to meningokokovou meningitidu (smrtnost do 2 %) a vzácnější sepsi (smrtnost 25 %). Mezi nimi existuje plynulý přechod a část pacientů má současně příznaky jak meningitidy, tak sepse (smíšená forma – smrtnost 5 %). Někdy se ještě vyčleňuje 4. forma onemocnění – akutní meningokokcemie, charakteristická přítomností kožních projevů a nepřítomností meningitidy či sepse.

Meningokoková onemocnění mají tři charakteristiky, které nejsou obvyklé u sepsí a purulentních meningitid jiné etiologie: věkovou distribuci (max 0-4 roky a 15-19 let), přítomnost petechií a sufuzí (Obrázek 3.) na počátku onemocnění a perakutní průběh, typický zejména pro sepse. IMO je typické náhlým začátkem a prudkým průběhem, kdy velmi často z plného zdraví během pouhých několika hodin vzniká závažný kliniký obraz. Někdy předchází katar horních cest dýchacích nebo fyzická či psychická zátěž. Mezi nejčastější příznaky se řadí horečka provázená zimnicí, třesavkou, úporné bolesti hlavy, zvracení, výrazný meningeální syndrom, celková nevolnost, bolest svalů a kloubů, u dětí křeče a bolesti břicha. Může být i údaj o průjmovitých stolicích. Septický průběh je typický krvácivými projevy na kůži, kterým může předcházet bledý necharakteristický někdy rubeoliformní exantém. Často bývá pozorován výsev rozsáhlého oparu na rtech. Nemocný mívá poruchu vědomí, kolísající od neklidu, přes somnolenci až po hluboké koma. Včas nerozpoznané a kauzálně neléčené onemocnění vyúsťuje v průběhu několika hodin do obrazu diseminované intravaskulární koagulopatie (DIC) a nevratné fáze septického šoku

s multiorgánovým selháním. DIC představuje závažnou komplikaci, při jejímž výskytu stoupá riziko úmrtí na dvojnásobek. Významně častěji dochází k úmrtí u pacientů s DIC při hodnotách trombocytů pod 50 x 10^9/l, fibrinogenu pod 2 g/l, antitrombinu pod 70 %, Quickův čas pod 30 % (Rožnovský 2001).

Obrázek 3. Sufuze a petechie u pacienta s IMO

(zdroj: fotoarchiv infekčních klinik Fakultní nemocnice Na Bulovce, Praha)

Časnými komplikacemi IMO jsou postižení srdce – perikarditida, myokarditida, artritidy, pneumonie, vaskulitidy, vzácně episkleritida. Jsou většinou důsledkem tvorby imunokomplexů, jejich subepiteliální depozice a vzniku sterilního exsudátu. Projevují se obvykle na konci 1. týdne a obvykle dobře reagují na antiflogistika a spontánně odeznívají. U kojenců je často při meningitidě pozorována tvorba subdurálních efuzí.

Pozdní komplikace jsou následkem předchozí ischemie tkání. Různě rozsáhlé a hluboké kožní nekrotické defekty je někdy nutné řešit chirurgicky, gangrény mohou vést k amputaci akrálních částí (Obrázek 4.). Neurologické následky zejména u nejmladších věkových skupin jsou obrny hlavových nervů (VI, VII, VIII), psychomotorická retardace, hluchota, slepota, epilepsie a hydrocefalus.

Obrázek 4. Periferní nekrózy u pacienta s IMO

(zdroj: fotoarchiv infekčních klinik Fakultní nemocnice Na Bulovce, Praha)

Prognóza onemocnění závisí na jeho včasné diagnóze a terapii. Zahájení léčby je doporučováno už při podezření na IMO. Perakutní průběh je typický zejména pro meningokokovou sepsi, k úmrtí může dojít i před hospitalizací. Přibližně polovina úmrtí nastane do 24 hodin od vzniku prvních klinických projevů či do 12 hodin po přijetí do nemocnice. Příčinou úmrtí je nezvládnutelný septický šok (van Deuren 2000). To je motivací pro klinické lékaře ke zvažování možnosti aplikace předhospitalizační ATB terapie, která procento smrtnosti může snížit. V některých zemích (UK, Dánsko, Norsko, Austrálie) byla vypracována doporučení k zahájení ATB léčby lékaři prvního kontaktu, většinou s intravenózní aplikací penicilinu G (PNC). V zahraničních klinických studiích byla zaznamenána nižší smrtnost u pacientů s předhospitalizační ATB terapií, ale většinou nebyly rozdíly statisticky významné (Cartwright 1992, Strang 1992). Výsledky mohly být pravděpodobně ovlivněny tím, že léčba byla častěji zahajována u pacientů se závažnými klinickými projevy. V ČR byl pozitivní vliv předhospitalizační ATB terapie ověřován v prospektivní studii (Rožnovský 2003) a byla prokázána nižší smrtnost pacientů, kteří obdrželi předhospitalizační antibiotickou léčbu ve srovnání s pacienty bez ní (7,8 % versus 10,4 %), ale rozdíl nebyl statisticky významný ($p=0,55$). Je však zřejmé, že předhospitalizační ATB léčba může příznivě ovlivnit smrtnost onemocnění a zůstává nezbytnou součástí úvodní komplexní léčby. Byla proto zařazena do celorepublikově platného standardu efektivní klinické péče v přednemocniční péči (Rožnovský 2002a).

Nedostatečný efekt samotné předhospitalizační ATB terapie podnítil změny v péči o nemocné. Nadále je zdůrazňována neodkladnost péče, urychlené zahájení komplexní léčby (podání ATB, léčba šoku resuscitací oběhu s vasoaktivní podporou, adekvátní oxygenace

s možností umělé plicní ventilace) a centralizace nemocných na specializovaných jednotkách s možností umístění na jednotce intenzivní péče. Léčebná intervence se u pacientů s meningitidou zaměřuje zejména na zvládnutí intrakraniální hypertenze a u pacientů se sepsí na léčbu septického šoku, syndromu DIC a dalších komplikací. ATB podáváme parenterálně, lékem volby je u nás vzhledem k dobré citlivosti *N.meningitidis* benzylpenicilin v dávkách 200-500 000 j/kg/den v 4-6 hodinových intervalech. Pokud není etiologie zcela jasná, používáme v iniciální terapii cefalosporiny 3. generace, cefotaxim 100-300 mg/kg/den v 8 hodinových intervalech nebo ceftriaxon 100 mg/kg/den v 12-24 hodinových intervalech. Délka ATB terapie by měla být 7 dní. Před prvním podáním ATB jsou zejména u meningitidy indikovány kortikosteroidy, dexamethason 0,6-0,8 mg/kg/den. Ke snížení edému mozku podáváme frakcionovaně manitol v dávce 1,5-2 g/kg/den obvykle v 6 hodinových intervalech. Dle koagulačních parametrů a klinického stavu se řídí intenzita terapie DIC, obvykle se podává mražená plazma, heparin a pokud je indikován, substitučně antitrombin III a protein C. Nezbytná je také péče o kůži a včasná rehabilitace. Po skončení terapie je zejména u dětí vhodné vyšetření sluchu a sledování psychomotorického vývoje.

1.2.4. Rizikové faktory

Faktory, které rozhodují o vzniku IMO nebo bezpříznakového nosičství jsou dvojí:
a) *mikrobiální faktory* (genetická odlišnost populací meningokoků působících IMO a nosičství, rozdílná adherence a fagocytóza, coiling fagocytóza u virulentních meningokoků, přítomnost FrpC jako potenciálního faktoru virulence)
b) *hostitelské faktory* (vrozené predisponující faktory, anamnestické rizikové faktory, předhospitalizační ATB terapie, diagnostika a léčba DIC, organizační změny v péči o nemocné).

Hodnocením anamnestických údajů získaných v celorepublikové prospektivní studii bylo zjištěno, že statisticky významnými ($p < 0,05$) rizikovými faktory pro vznik IMO jsou:
a) *fakrory aktuálně oslabující odolnost organismu* (horečnaté, respirační nebo jiné onemocnění, námaha, prochladnutí, psychická zátěž, úraz, pobyt mimo domov – brigáda, výcvik, přeplněná místnost)
b) *dlouhodobě působící faktory* (znečištění životního prostředí, pasivní kouření a nižší vzdělání matky, které indikují odlišný životní styl) (Křížová 1999).

Analýzou rizikových faktorů bylo jako nejvýznamnější faktor určeno aktivní a pasivní kouření, extrémní fyzická námaha či psychický stres, pobyt v přeplněných místnostech a nízká socioekonomická úroveň (Kriz 2000a). Pro vznik úmrtí byly zjištěny statisticky významné rizikové faktory: námaha, psychická zátěž, jiná zátěž (konzumace alkoholu), pobyt mimo domov.

Za vrozené predisponující faktory pro modifikovaný průběh IMO se považují Lewisův faktor, složky komplementu, deficit alfa1-antitrypsinu, metabolismus Fe, salivární imunita a asplenie (Rožnovský 2000). Antimeningokoková imunita je vázána na protilátky proti pouzdernému antigenu, které se uplatňují jako opsoniny a působí za přítomnosti komplementu baktericidně. U nemocných s nižší aktivitou komplementu je tedy nebezpečí meningokokcémie a smrti podstatně zvýšeno (Bednář 1996). Jako dispoziční faktor se mohou uplatnit snížené složky komplementu - C3 a C4, které byly u IMO zjištěny s vysokou prevalencí. Dále mohou být v souvislosti s dispozicí snížené hodnoty TCC a CH50. U pacientů s IMO byla zjištěna statisticky významně vyšší prevalence deficitních fenotypů alfa 1-antitrypsinu a statisticky vysoce významný výskyt fenotypu FM (Maurský), které mohou být podkladem zvýšené citlivosti jedinců s deficitem tohoto proteinu k IMO. Dále se může uplatnit jako dispoziční faktor deficit salivární imunity. U pacientů s IMO byla zjištěna minimální zánětlivá odpověď ve slinách oproti kontrolní skupině, která dokazuje neschopnost zánětlivé odpovědi. Byly nalezeny výrazně snížené hodnoty sekrečního IgA, enzymatické narušení IgA1 podtřídy a její nižší iniciální hodnota, snížené hodnoty přirozených aglutininů. Dále byl u pacientů s IMO zaznamenán výskyt snížených a velmi nízkých hodnot IgA. U septických stavů je zvýšená prevalence nízkých hodnot IgG, odezva IgG u nekomplikovaných onemocnění je výrazně vyšší a může sloužit jako prognostické kritérium odpovědi na léčbu a uzdravení. Vysoká prevalence nízkých hodnot IgM a přirozených protilátek u IMO také může být kritériem prognózy. Dynamika proteinů akutní fáze (C-reaktivní protein (CRP), sérový amyloid A) monitoruje nejen klinický průběh, ale i úspěšnost léčby a prognózu.

1.2.5. Prevence

Mezi invazivní formy meningokokového onemocnění se řadí meningokoková meningitida, sepse a toxický šok. Jen tyto klinické formy podléhají povinnému hlášení a platí při jejich výskytu epidemiologická opatření, která jsou uvedna v Metodickém návodu k epidemiologickým opatřením v ohnisku IMO (Věstník MZ ČR 1994). Tato opatření

zahrnují: a) zvýšený lékařský dohled u osob v kontaktu s IMO 1 týden od posledního kontaku s nemocným, b) omezení námahy u osob v kontaktu s IMO (1 týden), c) snížení expozice kapénkové infekci (1 týden), d) včasnou cílenou protektivní chemoterapii a e) vakcinaci osob v kontaktu s IMO (až po uplynutí 1 týdne). Lékem volby pro protektivní chemoterapii je PNC, podávaný perorálně, v terapeutických dávkách, po dobu 1 týdne. Protektivní chemoterapii je nutno nasadit včas. Je indikována pouze u rizikových kontaktů, což jsou osoby ve velmi úzkém styku s nemocným (líbací kontakty, v rodinách, internátech, apod.), dále děti do 1 roku věku, adolescenti, osoby nad 65 let, osoby s imunodeficitem a osoby po předchozím prodělaném respiračním onemocnění, oslabené jinou chorobou či s jiný známým rizikovým faktorem. Cílem těchto opatření je zabránit vzniku sekundárního IMO, které se dle detailního monitoringu v ČR prakticky nevyskytuje. Opakovaně bylo prokázáno, že meningokoka stejných charakteristik jako je kmen od nemocného mají v horních cestách dýchacích pouze osoby v nejužším kontaktu s nemocným a nikdy nebyl zaznamenán vznik invazivního onemocnění u osoby, u níž bylo nosičství zjištěno (Křížová 2002a).

1.2.6. Vakcinace

Specifická prevence se provádí aktivní imunizací pouzderným polysacharidem. K dispozici jsou 2 základní typy vakcín – polysacharidové a konjugované. Polysacharidová vakcína existuje ve formě monovakcíny (proti C), bivakcíny (proti A+C) a tetravakcíny (A+C+W135+Y). Ve světě je tato vakcína dostupná již 30 let, ale v žádné zemi není zařazena do rutinního očkování. Její nevýhody jsou: a) účinnost pouze na 4 séroskupiny z 12, b) neúčinnost proti B séroskupině, zatímco většina onemocnění je způsobena právě touto séroskupinou, c) použitelnost až od 2 let věku, d) krátkodost ochranného účinku (3-5 let). Naopak konjugovaná vakcína, která byla registrována v ČR v prosinci 2001 (zatím je dostupná proti C skupině) má dlouhodobější a vyšší protilátkovou odpověď, lze použít i u dětí do 2 let a má booster efekt. Pro tyto své výhody byla zařazena do plošného očkování v některých státech (Anglie, Španělsko, Holandsko, Belgie, Island, Irsko) (Ramsay 2001). V zemích, kde se plošně očkuje dosahovala nemocnost před zahájením vakcinace výrazně vyšších hodnot, než jsou v ČR (v rozmezí 2,6-6,6/100 000 obyv.). Anglie předkládá důkazy o tom, že nedochází k mutaci séroskupiny C v B. Naopak ve Španělsku byla tato mutace prokázána a hlášena jako důsledek selekčního tlaku a byl zaznamenán vzestup IMO způsobených meningokokem séroskupiny B. Proto je nutné dále pokračovat v surveillance, která umožňuje detekci rizikových skupin a jejich cílenou vakcinaci. Ve světě byla vyvinuta

konjugovaná tetravakcína (A+C+W135+Y), v roce 2005 byla registrována v USA, kde je zařazena do rutinní vakcinace 11 letých dětí. V Evropě je očekávána její registrace v roce 2007.

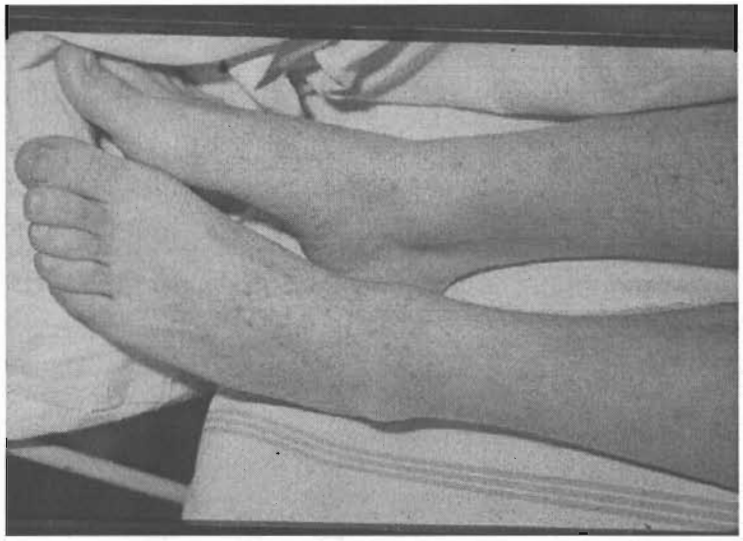
Séroskupina B je velmi špatně imunogenní, a proto není proti ní zatím očkovací látka k dispozici. V některých zemích byly zkoušeny proteinové vakcíny (Norsko, Kuba, USA) s účinností proti séroskupině B, ale nejsou univerzálně použitelné.

Za současné epidemiologické situace v ČR není masová vakcinace indikována. Zůstává strategie cílené vakcinace a vakcinace na žádost. Je ale žádoucí cílená vakcinace konjugovanou vakcínou proti séroskupině C v ohrožené části populace, t.j. ve věkové skupině 15-19 letých. Vzhledem k dlouhodobosti imunity vyvolané konjugovanou vakcínou je účelné podporovat vakcinaci i v ostatních věkových skupinách. Konjugovaná vakcína by měla nahradit polysacharidovou, s vyjímkou cestování do zemí s rizikem IMO séroskupiny A, kde je vakcínou volby polysacharidová vakcína proti A+C. Vzhledem k riziku W135 je žádoucí, aby byla pro cestovatele dostupná tetravakcína A+C+Y+ W135.

Strategie cílené vakcinace a vakcinace na žádost podle Věstníku MZ zahrnuje: a) cílenou vakcinaci rizikové části populace – při epidemiologické indikaci, řízeno epidemiologickým oddělením hygienických stanic, podkladem pro rozhodnutí je detailní monitoring IMO v NRL, zajišťují epidemiologická oddělení hygienických stanic (Kriz 1995) b) vakcinace v ohnisku IMO, po uplynutí 1 týdne od posledního kontaktu s IMO c) vojáci při zahájení základní přípravy d) vakcinace pacientů s poruchou imunity, e) na žádost za úhradu a f) při cestě do zahraničí (Věstník MZ ČR 1994).

1.3. Diagnostika invazivního meningokokového onemocnění

Prognóza IMO není určena jen intenzitou příznaků, ale je velmi ovlivněna včasností zahájení účinné léčby, která je podmíněna rychlou diagnostikou etiologie onemocnění. Rychlá a správná diagnostika je nezbytná pro optimální ošetření pacientů a pro časné zahájení protektivní chemoterapie kontaktních osob. Potvrzení etiologie onemocnění umožňuje klinikům užít úzkospektrá ATB, zkrátit dobu léčby a poskytuje prognostické informace. Vzhledem k možnému perakutnímu průběhu onemocnění je úvodní diagnostika klinická. Klinické podezření na tuto infekci je obvykle založeno na přítomnosti krvácivého kožního exantému spojeného se symptomy meningitidy nebo akutní sepse. Petechie a zejména sufuze představují jeden z nejdůležitějších diagnostických znaků IMO (Obrázek 5.).



Obrázek 5. Krvácivý kožní exantém u pacienta s IMO

(zdroj: fotoarchiv infekčních klinik Fakultní nemocnice Na Bulovce, Praha)

Klinické podezření musí být zcela dostatečné pro zahájení terapie. Ne vždy se lze spoléhat na laboratorní diagnostiku, neboť na počátku může být počet leukocytů, sedimentace i CRP v normě přibližně u poloviny nemocných. Rovněž mikrobiologické potvrzení etiologie je z klinického hlediska pozdní.

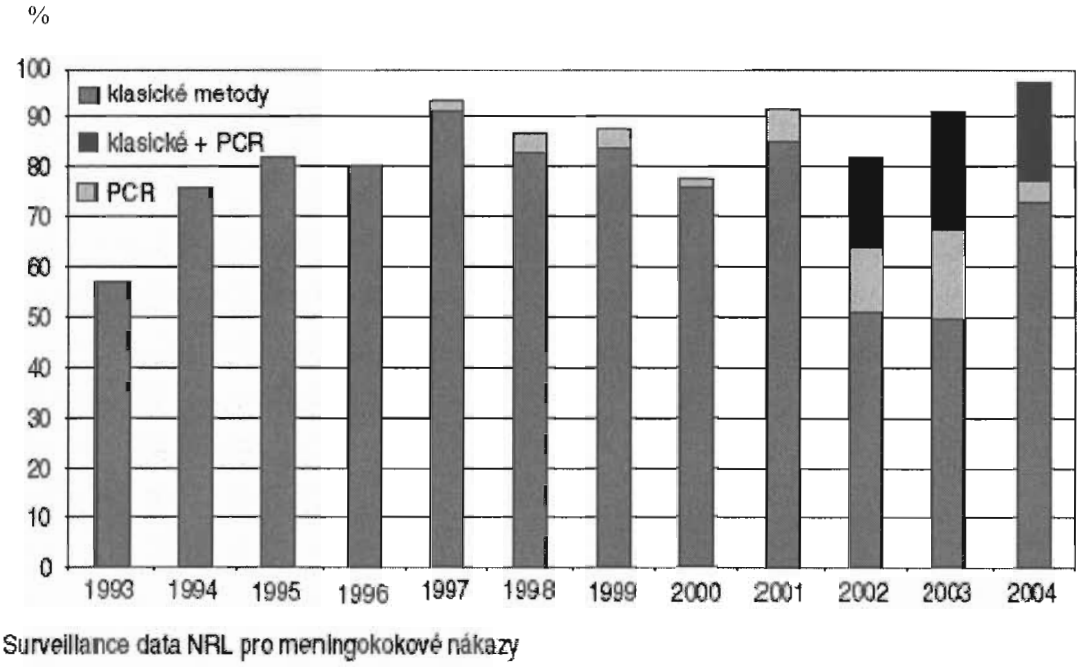
Laboratorní diagnostika zahrnuje metody kultivační a bezkultivační (mikroskopie, LA, PCR). Meningokoky je možno prokázat v hemokultuře,v likvoru, ve výtěru z nosohltanu či v kožních morfách. Mikroskopicky lze prokázat gramnegativní intracelulárně uložené diplokoky. Kultivace je prováděna na speciálních půdách. Identifikace se provádí podle biochemických vlastností.

Včasné nasazení ATB může snížit smrtnost onemocnění, a proto je doporučeno pro přednemocniční péči v některých zemích (Cartwright 1992, Strang 1992). Na druhou stranu může způsobit negativitu kultivačního vyšetření. Hemokultura je pozitivní u 50 % neléčených pacientů s meningokokovou sepsí a je redukována k 5 % po první dávce ATB. Podobně, kultivace likvoru je pozitivní v 70-85 % neléčených pacientů s meningokokovou meningitidou a signifikantně klesá při předchozím podání ATB (Cartwright 1992, Tunkel 2005).

K rychlému průkazu *N.meningitidis* se používají bezkultivační metody. Jedná se hlavně o LA a nověji o diagnostiku metodou PCR. Jsou to rychlé, senzitivní a specifické metody schopné prokázat etiologii onemocnění i po zahájení ATB terapie. Kromě *N.meningitidis* lze jimi prokázat *Haemophilus influenzae* b (Hib) a *Streptococcus pneumoniae* (Sp).

Laboratorní diagnostika IMO je v ČR na velmi dobré úrovni. Procento laboratorně potvrzených IMO má stále vzestupný trend a pohybuje se přes 90 % (v roce 2004 dosáhlo

97,1 %) (Graf 11., Křížová 2005). Na jejím zkvalitnění se významnou měrou podílí v posledních letech metoda PCR, která je od roku 2001 stále více užívána k rychlému průkazu etiologie. V roce 2003 bylo pomocí PCR potvrzeno 41,6 % případů IMO, u 17,8 % byla PCR jedinou pozitivní metodou (Křížová 2003).



Graf 11. IMO – laboratorně potvrzené, ČR, 1993-2004

Převzato z Křížová, Zprávy CEM, 2005

1.3.1. Kultivace

Meningokoky se kultivují na speciálních půdách s obsahem nativních bílkovin a inkubace se provádí při 35-37°C ve vlhkém prostředí s přídavkem CO_2 (5-10 %). Vyrůstají nejčastěji v S fázi, někdy hemolyzují (Bednář 1996). Média pro kultivaci rozlišujeme na selektivní média (Thayer-Martin-agar), specifická media (čokoládový Müller-Hinton agar) a pomnožovací média (Müller-Hinton bujon, Brain Hearth Infusion, sérový bujón). Identifikace se provádí podle biochemických vlastností, dle kterých je možno je odlišit od ostatních neisserií. Tvoří katalázu a oxydázu, okyselují sacharidy bez tvorby plynu, jsou glukóza a maltóza pozitivní, nitrity a nitráty negativní, tributyrin negativní, ONPG negativní a syntéza polysacharidů je negativní.

1.3.2 Bezkultivační metody nemolekulární

1.3.2.1. Mikroskopie

Mikroskopicky je možno v likvoru prokázat intracelulárně uložené gramnegativní diplokoky. Preparát je nutno po odběru fixovat pro nebezpečí autolýzy.

1.3.2.2. Latexová aglutinace

LA je rychlá kartičková imunologická metoda pro detekci solubilních antigenů uvolněných patogenem do biologických tekutin v průběhu infekce. Detekovatelné solubilní antigeny jsou skupinově specifické polysacharidy. Reagenční souprava obsahuje latexové partikule s navázanou specifickou protilátkou. V přítomnosti dostatečně vysoké koncentrace antigenu v biologickém materiálu se tvoří shluky viditelné pouhým okem. V nepřítomnosti antigenu si latex ponechává lehce mléčný vzhled. Soupravy komerčně dostupné na našem trhu pro diagnostiku purulentní meningitidy jsou: Slidex Méningite Kit (BioMérieux) pro detekci *N.meningitidis* A, B/E.coli, C, Hib, Sp; Pastorex Meningitis (Bio-rad) pro *N.meningitidis* A, B, C, Y/W135, Hib, PN omni, streptokoků B (Str.B.) a Wellcogen (Murex) pro *N.meningitidis* A/C/Y/W135, B, Hib, PN omni, Str.B. Výhodou LA je její snadná a rychlá proveditelnost jak v lokálních mikrobiologických laboratořích a také jako bed-side metoda. Nové metody zahrnující PCR a DNA sekvenční metoda jsou často limitovány na specializované laboratoře. V současnosti je ale diskutován význam rutinního používání LA pro etiologickou diagnostiku kvůli její nižší senzitivitě a možnosti zkřížených reakcí (Perkins 1995, Finlay 1995).

1.3.3. Bezkultivační metody molekulární

1.3.3.1. PCR metoda

PCR rozšiřuje bezkultivační metody (přímou mikroskopii a latexovou aglutinaci) dosud užívané v diagnostice IMO. Umožňuje rychlé určení patogena i o nízké koncentraci přímo z klinického materiálu a tím umožňuje včasné zahájení kauzální terapie a vykazuje vyšší specificitu a senzitivitu. PCR je schopno detekovat malé množství bakteriální DNA a nevyžaduje přítomnost živé bakterie, proto lze prokázat agens i po zahájení ATB terapie.

Tím zvyšuje procento laboratorně potvrzených onemocnění. Navíc, je možno pomocí PCR určit séroskupinu meningokoků, což má význam pro provádění epidemiologické surveillance, zajištění kontaktů a pro sledování účinnosti meningokokové vakcíny. Je žádoucí co nejširší rozšíření této metody a je účelné provádět odběry na PCR zároveň s odběry na klasické kutivační vyšetření. V případě IMO mohou kultivační metody selhat kvůli časnému přednemocničnímu podání ATB pacientovi. Od roku 2003 platí v ČR doporučený standardní postup přednemocniční péče o pacienty s podezřením na IMO, který doporučuje intravenozní podání první dávky ATB a kortikoidů před transportem do nemocnice. Do standardu byl zařazen odběr krve na PCR a kultivaci posádkami rychlé lékařské pomoci před zahájením terapie (Rožnovský 2002a, Rožnovský 2002b).

1.3.3.2. PCR ve světě

Ve světě jsou používány různé metody a primery. Detekce meningokokové DNA v biologických vzorcích byla úspěšně provedena pomocí primerů založených na genu kódujícím *16S rRNA* (Rådström 1994, Bäckman 1999). Primery navržené pro geny specifické pro jednotlivé séroskupiny mohou být využity pro identifikaci séroskupin pomocí PCR (*siaD* gen pro séroskupinu B, C, Y, W135 a *mynB/sacC* gen pro séroskupinu A) (Taha 2000a, Orvelid 1999). Pro visualizaci PCR produktů byly vyvinuty 2 přístupy – fluorescenční a gelová metoda (Sambrook 1989, Livak 1995, Diggle 2001).

1.3.3.3. PCR v ČR

V NRL pro meningokokové nákazy byla zavedena PCR metoda dle Tahy pro detekci *N.meningitidis* séroskupiny B a C v roce 2000, která vykazuje v likvoru vysokou senzitivitu (85 %) a specificitu (95 %) (Taha 2000a, Kalmusová 2001). Metoda byla odvozena od modifikace dle Zambardiho s použitím nukleotidů podle Froshe (Zambardi 1995, Frosh 1991). Následně byla rozšířena na simultánní detekci *N.meningitidis*, Sp a Hib podle Rådströma (Rådström 1994, Kalmusová 2004). V roce 2003 se NRL účastnila mezilaboratorního srovnání identifikace *N.meningitidis* pomocí PCR, v které byla zaznamenána střední sensitivita 90 % a specificita 93 % (Taha 2005). Od roku 2003 NRL na požádání poskytuje metodu PCR do mikrobiologických laboratoří v ČR. V případě pozitivního výsledku vyžaduje poslat do NRL informaci o IMO a izolovanou DNA ke

klonální analýze meningokoků a přiřazení kmene do hypervirulentních komplexů, což umožňuje zpřesnění surveillance i bez kultivačního záchytu.

1.3.3.4. Dynamika PCR

Důležitost PCR pro diagnostiku IMO je dobře známa a byla publikována v řadě studií. Rozdílné výsledky byly ale publikovány o přetrvávání pozitivity PCR v čase a v rozdílných klinických materiálech. Tyto informace mohou být užitečné pro lepší porozumění patofyziologii IMO a pro zpřesnění správného načasování PCR vyšetření.

2. CÍLE

Naše studie je zaměřena na zhodnocení významu PCR metody pro diagnostiku invazivního meningokokového onemocnění v praxi, srovnání úspěšnosti této metody s běžně používanými vyšetřovacími metodami – kultivace a latexová aglutinace a současně zhodnocení vlivu antibiotické terapie na výsledky diagnostických testů. Dalším cílem naší studie bylo stanovit dynamiku pozitivity PCR metody, která nebyla dosud publikována takto podrobně a na takto velkém souboru a určit vztah závažnosti meningokokové infekce a dynamiky PCR.

Konkrétní cíle:

1. *zhodnotit význam PCR metody pro diagnostiku invazivního meningokokového onemocnění v praxi a porovnat PCR s běžně používanými diagnostickými metodami – kultivace a latexová aglutinace.*

2. *zhodnotit vliv antibiotické terapie na výsledky diagnostickýh testů.*

3. *určit vztah mezi klinickou formou invazivního meningokokového onemocnění a výsledky dignotických testů.*

4. *popsat dynamiku pozitivity PCR a latexové aglutinace v krvi a likvoru a její vztah k závažnosti meningokokové infekce.*

5. *srovnat dynamiku použitých primerů pro PCR.*

6. *stručně zhodnotit anamnestiká a klinická data pacientů.*

3. METODY

3.1. Soubory pacientů a klinické hodnocení souboru

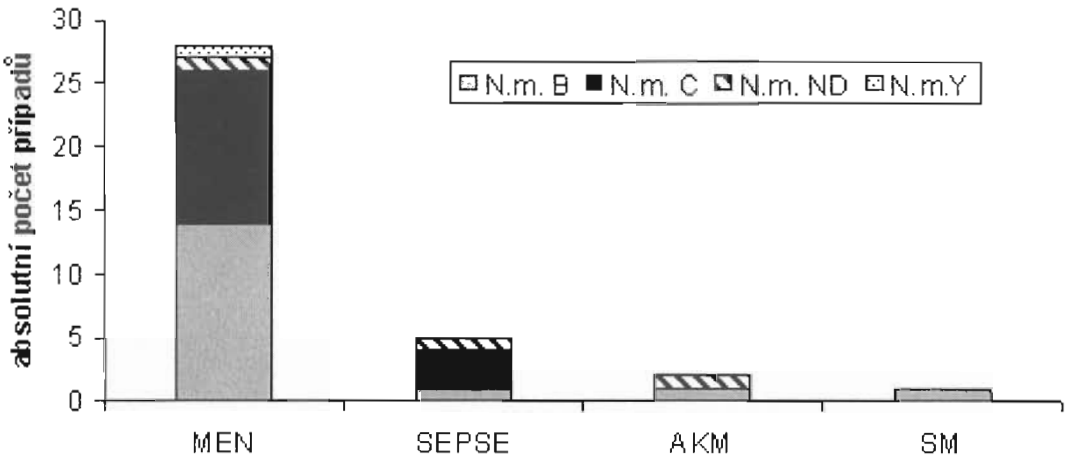
Do studie byli zařazováni prospektivně pacienti s prokázaným IMO hospitalizovaní na Infekční klinice FN Bulovka v období od ledna 2002 do března 2004. Pro zařazování byla použita následující kritéria: 1) izolace *N.meningitidis* z normálně sterilního místa (n = 20) nebo 2) typický klinický obraz IMO a pozitivita LA nebo přímé mikroskopie (n = 5) nebo 3) typický klinický obraz bez průkazu jiného etiologického angens (n = 12). Všechny zahrhuté případy IMO byly potvrzeny pozitivním PCR výsledkem z likvoru nebo/a z krve. Typický klinický obraz byl definován jako: hemoragický kožní výsev (petechie a sufuze) a přítomnost symptomů sepse/septického šoku a/nebo meningitidy. Podle těchto kritérií bylo do studie zařazeno 37 pacientů (soubor A). V tomto souboru mírně převažovali muži nad ženami (20/17), průměrný věk byl 23,2 let a pohyboval se v rozmezí od 5 měsíců do 58 let. Nejčastěji zastoupenou klinickou formou IMO byla v našem souboru purulentní meningitida (28 pacientů – 76 %) (Tabulka 2.). Do studované skupiny nebyl zařazen žádný pacient, který zemřel, protože v těchto případech nebyly provedeny všechny odběry vyžadované protokolem studie. Zastoupení klinických forem a rozložení séroskupin souhrnně ukazuje graf 12 a v jednotlivých věkových skupinách tabulka 3.

Muži/ženy	20/17
Věkový průměr v letech (rozmezí)	23,2 (5m-58 let)
Klinické formy:	
- sepse	5
- purulentní meningitida	28
- smíšená forma	1
- akutní meningokokcémie	3
Séroskupina N.m.:	
- B	17
- C	15
-Y	1
- ND	4

Tabulka 2. Základní charakteristika souboru (n = 37)

ND = séroskupina neurčena

N.m. = *Neisseria meningitidis*



Graf 12. Rozložení séroskupin *N.meningitidis* dle klinických forem IMO

AKM =akutní meningokokcémie

SM = smíšená forma IMO (sepse + meningitida)

MEN = meningitida

Věková skupina	Celkem	N.m.C	N.m.B	N.m.ND	N.m.Y	Sepse	Meningitida	Smíšená forma	Akutní meningokokcémie
0-4	6	3	3	0	0	1	5	0	0
5-14	4	1	2	1	0	0	3	0	1
15-19	11	4	7	0	0	2	8	0	1
20-34	7	2	1	2	1	1	5	0	1
nad 35	9	5	4	1	0	1	7	1	0
celkem	37	15	17	4	1	5	28	1	3

Tabulka 3. Rozložení séroskupin *N.meningitidis* a klinických forem IMO dle věkových kategorií

Ve 23 případech IMO byl v NRL dourčen fenotyp kmene *N.meningitidis.* Více než polovinu onemocnění (61 %) způsoboval hypervirulentní klon séroskupiny C, který se na našem území rozšířil od roku 1993 (Tabulka 4.).

Fenotyp *N.meningitidis*	Počet kmenů	%
C:2a:P1.2	8	35
C:2a:P1.2, P1.5	5	22
C:-:P1.2	1	4
Y:2c:P1.2, 1.5	1	4
B:4:P1.15	3	13
B:4:P1.12	1	4
B:4:P1.16	1	4
B:15:P1.4	1	4
B:-:P1.6	1	4
B:NT:NST	1	4

Tabulka 4. Zastoupení fenotypů *N.meningitidis*

Vzhledem k tomu, že u některých pacientů nebylo provedeno vyšetření LA v den přijetí buď z důvodu hemolýzy krve nebo nedostatku materiálu, byl pro hodnocení dynamiky LA vybrán užší soubor pacientů, u kterých byly dostupné pro toto vyšetření všechny vzorky a případy splňovaly následující kritéria: 1) izolace *N.meningitidis* z normálně sterilního místa (n = 12) nebo 2) typický klinický obraz IMO bez průkazu jiného etiologického agens (n = 7). Všechny případy byly potvrzeny PCR metodou. Do této skupiny bylo vybráno celkem 19 pacientů (soubor B), 12 mužů (63 %) a 7 žen (37 %), průměrný věk 25,8 let (interval od 9 měsíců do 58 let).

Pro hodnocení anamnestických údajů a klinických dat jsme rozlišovali 4 klinické formy dle následujících kritérií:

1. Akutní meningokokcémie – kožní změny chrakteru petechií či sufuzí, nepřítomnost meningitidy či sepse, průkaz meningokoků pomocí kultivace, LA nebo PCR v likvoru nebo v krvi
2. Meningokoková meningitida – buněčné elementy nad 300/3 v likvoru, nepřítomnost sepse, průkaz meningokoků pomocí kultivace, LA nebo PCR v likvoru nebo v krvi
3. Meningokoková sepse – kožní změny chrakteru petechií či sufuzí, nepřítomnost meningitidy (elementy pod 300/3), přítomnost sepse nebo septického šoku, průkaz meningokoků pomocí kultivace, LA nebo PCR v likvoru nebo v krvi. Sepse je definována přítomností alespoň 2 kritérií: tělesná teplota nad 38°C či pod 36°C,

tachykardie přes 90/min (pro děti upraveno dle věku), tachypnoe nad 20/min (pro děti upravedno dle věku), leukocyty nad 12 či pod 4 $x10^9$/l nebo 10 % tyček či nezralých forem

4. Smíšená forma – současně známky sepse i meningitidy

V souboru A bylo zastoupeno 28 případů meningitidy, 5 sepsí, 3 případy akutní meningokokcémie a 1 smíšená forma (Tabulka 2.). Pro hodnocení výsledků diagnostických testů a jejich vztahu ke klinické formě IMO jsme případy klasifikované klinicky jako akutní meningokokcémie přiřadili do kategorie sepse a smíšenou formu do kategorie meningitid. Vzhledem k malým počtům pacientů v těchto 2 kategoriích by nebylo možno tyto výsledky statisticky samostatně hodnotit.

Pro hodnocení závažnosti onemocnění byl použit skórovací systém APACHE II, který posuzuje maximální změny parametrů během prvních 24 hodin hospitalizace. Sledované parametry jsou: tělesná teplota, střední arteriální tak, puls, počet dechů, saturace, pH arteriální, natrium, kalium a kreatinin v séru, hematokrit, počet leukocytů, aktuální Glasgow coma scale (GCS), věk, anamnéza těžké orgánové nedostatečnosti či imunodeficitu.

Přítomnost DIC byla hodnocena v průběhu hospitalizace u všech pacientů dle diagnostických kritérií dle Aokiho, která sledují přítomnost sepse, krvácení, orgánového postižení, délku protrombinového času, hodnoty fibrinogenu, fibrin degradačních produktů (FDP) a trombocytů. Hodnota 7 a více bodů je hodnocena jako DIC, 6 bodů jako suspektní DIC, při hodnotě 5 bodů je nutno DIC potvrdit dalšími 2 testy (D–dimery, etanolový test, pokles AT III, vzestup schistocytů, pokles trombocytů a fibrinogenu se vzestupem FDP, zlepšení po heparinu, pokles plazminogenu) (Malý 1994).

3.2. Sběr materiálu

Pro PCR a LA vyšetření bylo sbíráno sérum nebo plná krev v den přijetí a v následujících dnech v průběhu prvého týdne hospitalizace. Likvor byl odebírán v den přijetí a při kontrolní lumbální punkci obvykle prováděné 5. den po přijetí nebo dříve, pokud byl průběh onemocnění komplikován. Odběr materiálu na PCR byl prováděn do sterilní zkumavky v množství: likvor 0,5-1 ml, krev 4,5 ml + 0,5 ml citrátu, sérum 0,5 ml. Od 37 pacientů bylo

celkem získáno 60 vzorků likvoru a 144 vzorků krve. Pro vyšetření LA byla sbírána také moč a to v den přijetí a v následujích dnech během 1. týdne hospitalizace. Pro LA vyšetření bylo získáno 93 vzorků moče. Vzorky byly ihned transportovány ke zpracování nebo byly skladovány na oddělení: krevní vzorky v lednici při 4°C a likvor byl zamražen při mínus 20°C. V den přijetí pacienta k hospitalizaci byl odebrán klinický materiál také pro detekci meningokoků běžně používanými metodami (přímá mikroskopie a kultivace).

ATB terapie byla zahájena v den přijetí pacienta nebo již před hospitalizací. K hodnocení dynamiky vyšetření byl den, kdy byla ATB terapie zahájena, označen jako den 0. Po příjetí byli všichni pacienti léčeni standardním postupem s cefotaximem nebo benzylpenicilinem. Klinická data byla získána z lékařské dokumentace.

Studie byla schválena místní etickou komisí a odběry materiálu pro účely studie byly synchronizovány s odběry ordinovanými ošetřujícím lékařem a nepředstavovaly tedy zvýšenou zátěž pacientů.

3.3. Laboratorní metody

3.3.1. PCR

Izolace DNA z klinického materiálu

DNA byla extrahována z biologického materiálu. Byla použita komerčně dostupná souprava *QIAamp* (QIAGEN, Německo). Ke zpracování byla použita plná krev nebo sérum (200 µl) a sediment získaný centrifugací cca 1 ml likroru. Izolovaná DNA byla resuspendována v 200 µl elučního pufru a vyšetřena pomocí PCR.

PCR – amplifikace a detekce fragmentů

V NRL je používána kombinace jednokrokové a seminested PCR, která vykazuje vyšší senzitivitu. Pro jednokrokovou PCR je využíván *gen CrgA* a *siaD* (Obrázek 6.). Při seminested PCR je v prvním kroku amplifikován obecný bakteriální amplikon genu *16S rRNA* a v druhém kroku oblast tohoto genu specifická pro *N.meningitidis* (Obrázek 7.). Všechny použité primery jsou shrnuty v Tabulce 5. Gen *CrgA* a *16S rRNA* byly použity pro detekci *N.meningitidis* a *siaD* gen byl použit k identifikaci séroskupiny B a C.

CR	Primer	Gen	Sekvence	Species
	98-6	*crgA*	5´-gctggcgccgctggcaacaaattc-3´	*N.meningitidis*
	98-10		5´-cttctgcagattgcggcgtgcctg-3´	
dnokroková	98-19	*siaD*	5´-ggatcatttcagtgttttccacca-3´	*N.meningitidis* B
	98-20		5´-gcatgctggaggaataagcattaa-3´	
	98-17	*siaD*	5´-tcaaatgagtttgcgaatagaaggt-3´	*N.meningitidis* C
	98-18		5´-caatcacgatttgcccaattgac-3´	
minested				
rok I	U3	*16S rRNA*	5´-aact(c/a)cgtgccagcagccgcggtaa-3´	baktérie
	ru8		5´-aaggaggtgatcca(g/a)ccgca(g/c)(g/c)ttc-3´	
rok II	NM	*16S rRNA*	5´-tgttgggcaacctgattg-3´	*N.meningitidis*
	ru8		5´-aaggaggtgatcca(g/a)ccgca(g/c)(g/c)ttc-3´	

Tabulka 5. Primery použité pro PCR

Reakční směs použitá pro PCR se skládá z (50µl): 10mM TRIS-HCL (pH 8,8), 50 mM KCL 0,1%, Triton X-100, 1,5 mM $MgCL_2$, 0,2 mM dNTP (Biogen, ČR), 0,5 µM primery a rekombinantní *Taq* DNA polymeráza 0,5U v objemu 50 µl (Top-Bio, ČR). Pro jednu reakci bylo použito 25 µl reakční směsi a 25 µl izolované DNA.

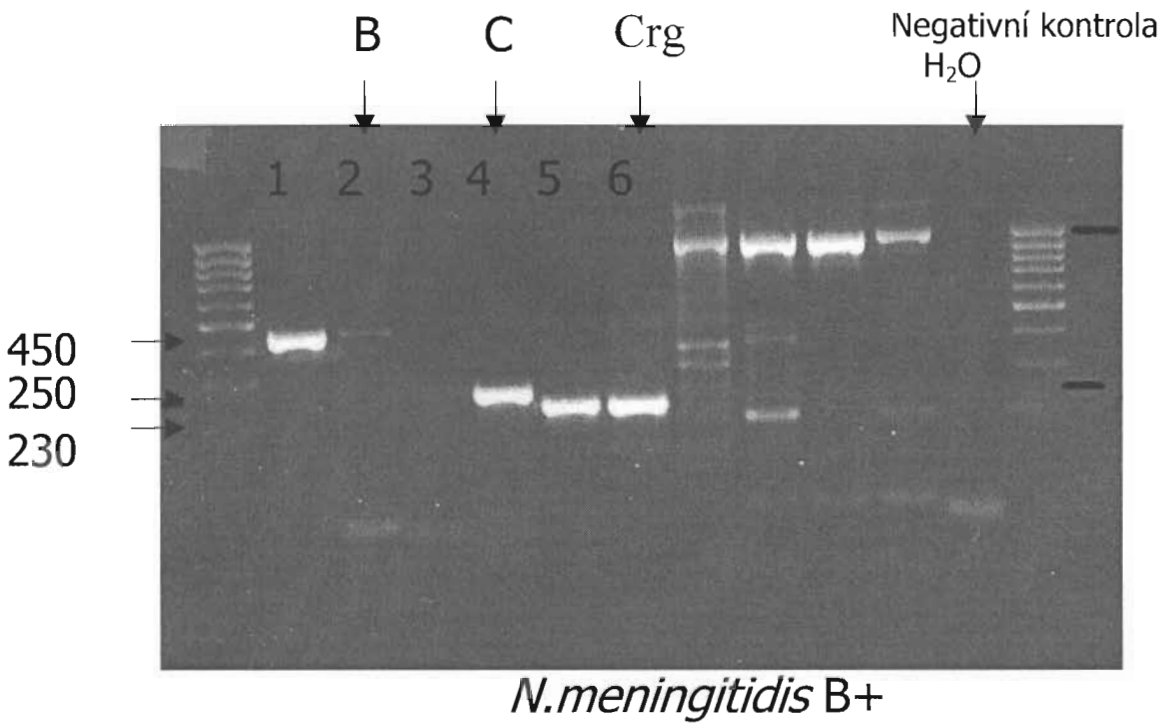
Amplifikace byla provedena v termocykleru Amplitron II (Thermolyne, IA, USA) podle následujícího programu: iniciální denaturace při 94°C / 2 min byla následována 35 cykly (94°C / 1 min, 55°C / 1 min, 72°C / 1 min) s polymerizací při 72°C / 2 min. Produkty amplifikace DNA z prvního kroku byly ředěny 1:500 sterilní vodou a pro druhou reakci bylo použito 5 µl naředěného roztoku a 45 µl PCR směsi. Během druhého kroku byl počet PCR cyklů redukován na 20.

Každá reakce zahrnovala negativní kontrolu (voda) a pozitivní kontrolu (DNA izolovaná z kmenů *N.meningitidis*).

PCR produkty byly vizualizovány na 2% agarozovém gelu s ethidium bromidem pod UV světlem. Délka amplifikovaných fragmentů je ukázána v Tabulce 6.

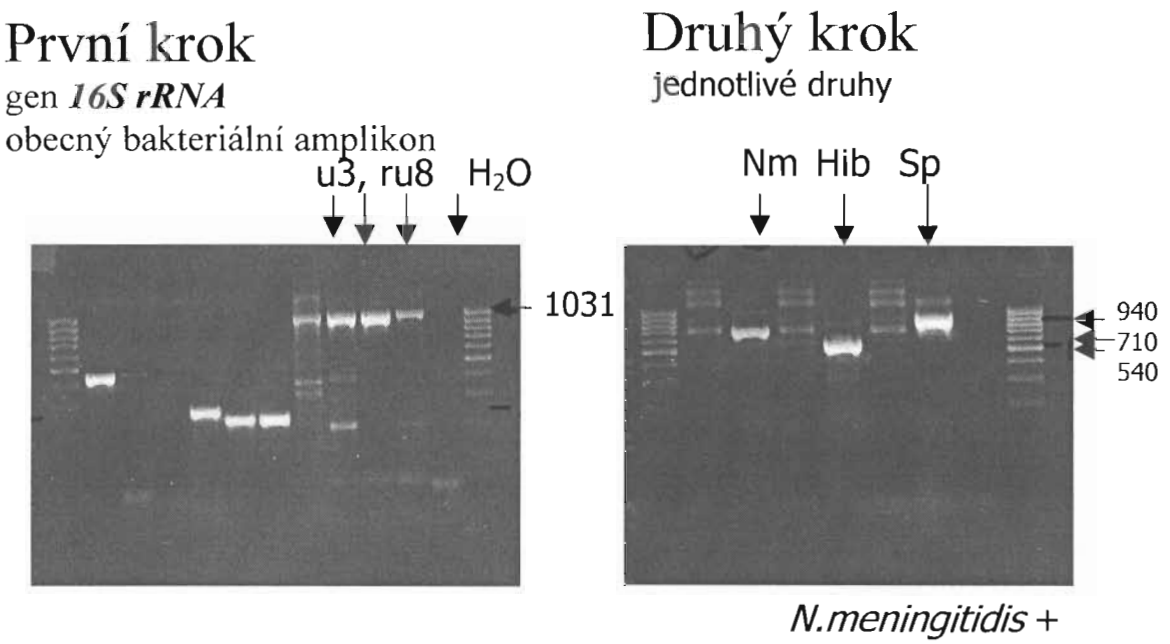
Gen	Délka amplikonu (bp)	Species
crgA	230	*N.meningitidis*
siaD	450	*N.meningitidis* B
siaD	250	*N.meningitidis* C
16S rRNA v prvním kroku	1031	baktérie
16S rRNA v druhém kroku	710	*N.meningitidis*

Tabulka 6. Délka amplifikovaných fragmentů



Obrázek 6. Jednokroková PCR

(B = pozitivní kontrola pro *N.meningitidis* B (450 bp), C = pozitivní kontrola pro *N.meningitidis* C (250 bp), Crg = pozitivní kontrola pro *N.meningitidis* (230 bp), číslo 1 = pozitivní vzorek – *N.meningitidis* B, číslo 5 = pozitivní výsledek reakce pro *N. meningitidis*)



Obrázek 7. Seminested PCR

Nm = *Neisseria meningitidis* (710 bp), Hib = *Haemophilus influenzae b* (540 bp), Sp = *Streprococcus penumoniae* (940 bp)

3.3.2. Latexová aglutinace

Byly použity komerčně dostupné soupravy: Slides méningite-Kit 5 (BioMérieux, Francie) pro vyšetření likvoru a Pastorex meningitis kit (Bio-rad, Francie) pro vyšetření krve a moče. Testování bylo provedeno podle firemních doporučení s 1 kapkou (30-40 µl) biologického materiálu. Moč nebyla před vyšetřením koncentrována. Dle Ckarke koncentrace nezvyšuje LA pozitivitu (Clarke 2001).

3.3.3. Kultivace a mikroskopie

Vzorky likvoru a krve od pacientů s podezřením na IMO byly zasílány do lokální mikrobiologické laboratoře FN Bulovka k provedení přímé mikroskopie a kultivace. *N.meningitidis* kmeny byly kultivovány na krevním agaru při teplotě 37°C v atmosféře s 5% CO_2 po dobu 48 h. Kmeny *N.meningitidis* byly zasílány k dalšímu studiu a dourčení do NRL pro meningokoky SZÚ.

3.4. Statistické metody

Statistická analýza dat byla provedena s využitím statistického software Prism 4.0 od firmy Graph Pad, Inc. Výsledky jsou prezentovány v procentech nebo jako aritmetický průměr s minimálními a maximálními hodnotami. Korelace jsou vyjádřeny jako Pearsonův (pro normálně rozložená data) nebo Spearmanův (pro nenormálně rozlořená data) korelační koeficient. U skupin s normálním rozložením dat byly rozdíly mezi jednotlivými skupinami porovnány nepárovým t-testem. V případě signifikantně rozdílného rozptylu mezi skupinami byla použita Welchova korekce. U skupin s nenormálním rozložením dat byl k hodnocení rozdílů mezi jednotlivými skupinami použit Mann-Whitneyho test. Hodnocení vlivu nasazené ATB terapie na výsledky testů a jejich vztah ke klinické formě onemocnění bylo provedeno Fisherovým testem. Za statisticky signifikantní byla považována hodnota $p \leq 0,05$.

4. VÝSLEDKY

4.1. Klinická a epidemiologická data souboru

Klinické příznaky a anamnestické údaje ve vztahu k formě onemocnění shrnuje tabulka 7. U obou klinických forem IMO (sepse a meningitida) byla nejčastějším příznakem horečka provázená bolestmi hlavy a zvracením. Všechny případy sepse byly spojeny s hemoragickými kožními projevy a častěji jsme v těchto případech zaznamenali průjem a bolest břicha. Většina pacientů s meningitidou vykazovala známky menigeálního dráždění. Mezi skupinou pacientů s meningitidou a sepsí jsme neprokázali statisticky významný rozdíl v hodnotě APACHE II, výskytu komplikací a věkovém rozložení. Doba do hospitalizace na specializovaném pracovišti a doba do zahájení kauzální ATB terapie byla kratší u pacientů se sepsí, ale rozdíl také nebyl statisticky významný. Častěji byla aplikována předhospitalizační ATB terapie u pacientů se sepsí.

17 onemocnění ve studované skupině bylo vyvoláno *N.meningitidis* séroskupiny B, 15 případů vyvolala sérokupina C, 1x byla zastoupena séroskupina Y a ve 4 případech nebyla séroskupina určena. V případech IMO vyvolaných *N.meningitidis* C byly častěji přítomné krvácivé kožní projevy (petechie a sufuze), gastrointestinální symptomy (průjem, nauzea) a častěji byla tato onemocnění spojena s komplikacemi (Tabulka 8.).

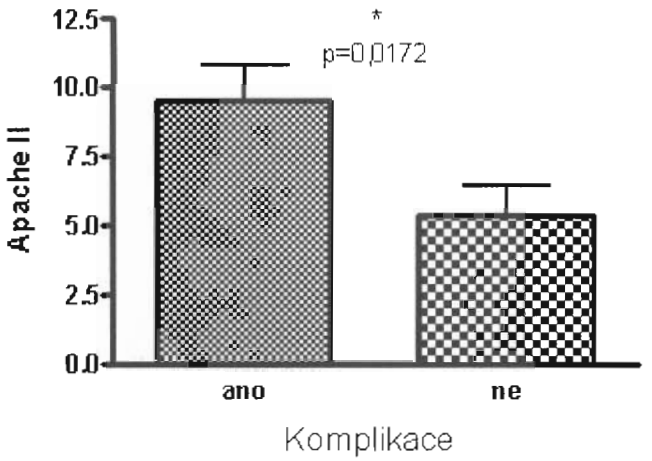
Případy IMO s komplikacemi nebyly spojeny s delší dobou do zahájení kauzální intravenózní (i.v.) ATB terapie (IMO s komplikacemi – průměrná doba od prvních příznaků onemocnění do zahájení kauzální i.v. ATB terapie byla 30,5 hod., IMO bez komplikací – průměrná doba 32,6 hod., rozdíl statisticky nesignifikantní). Doba do podání i.v. ATB nekorelovala s výší APACHE II skóre. Vyšší hodnota skóre byla zjištěna u pacientů s komplikacemi IMO, rozdíl byl statiticky významný na hladině $p = 0,0172$ (Graf 13.). Biochemické a cytologické vyšetření likvoru (proteinorhachie, glykorhachie, počet polymorfonukleárů (PMN) a lymfocytů) z první diagnostické lumbální punkce neprokázalo statistický rozdíl u těchto 2 skupin případů.

	Sepse (n=5)		**Purulentní meningitida (n=28)**		**Smíšená forma (n=1)**		**Akutní meningo-kokcémie (n=3)**	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Horečka (>38°C)	4	80	27	96	0	0	3	100
Bolest hlavy	3	60	19	68	1	100	2	67
Zvracení	3	60	19	68	1	100	2	67
Stav vědomí (GCS)	14,6 (13-15)		12,7 (7-15)		14		15	
Petechie, sufuze	5	100	19	68	1	100	3	100
Exantém	1	20	4	22	0	0	1	33
Pozitivní meningeální příznaky	1	20	27	96	1	100	3	100
Jiné neurologické příznaky (křeče, spasmy, třes)	0	0	2	7	0	0	0	0
Průjem	2	40	3	11	0	0	0	0
Bolest břicha	1	20	1	4	0	0	0	0
Myalgie, artralgie	2	40	10	36	1	100	1	33
Nevolnost	1	20	4	22	0	0	1	33
Kolaps, prekolaps	0	0	5	18	0	0	0	0
Bolest v krku, faryngitida	1	20	7	25	0	0	0	0
Průměrná doba do přijetí v hod. (rozmezí)	26,4 (10-59)		33,2 (12-75)		25		37,3 (22-49)	
Předhospitalizační ATB terapie	4	80	11	39	0	0	0	0
Průměrná doba do zahájení kauzální léčby v hod. (rozmezí)	26 (12-60)		31,5 (8-77)		26		38,3 (22-50)	
Věk v letech (rozmezí)	25,2 (1-58)		22,8 (1-57)		44		17 (8-25)	
APACHE II (rozmezí)	10,8 (5-23)		8,6 (2-25)		3		1,3 (0-4)	
Komplikace	3	60	20	71	0	0	2	67

Tabulka 7. Anamnestické údaje a klinické příznaky ve vztahu ke klinické formě IMO

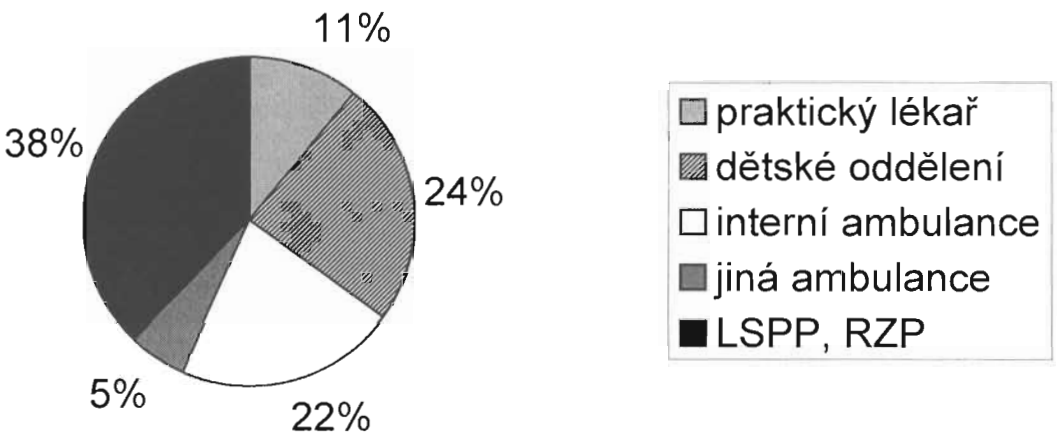
	N.m.C (n=15)		N.m.B (n=17)		N.m.ND + Y (n=5)	
	n	%	n	%	n	%
Horečka (>38°C)	15	100	14	82	5	100
Bolest hlavy	8	53	13	76	4	80
Zvracení	9	60	14	82	2	40
Stav vědomí (GCS)	12,7 (7-15)		13,05 (7-15)		15	
Petechie, sufuze	13	87	10	59	5	100
Exantém	1	8	4	24	1	20
Pozitivní meningeální příznaky	12	80	16	94	4	80
Jiné neurologické příznaky (křeče, spasmy, třes)	2	15	0	0	0	0
Průjem	4	27	1	6	0	0
Bolest břicha	0	0	2	12	0	0
Myalgie, artralgie	5	33	5	29	3	60
Nevolnost	3	20	1	6	3	60
Kolaps, prekolaps	0	0	5	29	0	0
Bolest v krku, faryngitida	5	33	3	18	0	0
Průměrná doba do přijetí v hod. (rozmezí)	31,9 (10-75)		29,7 (13-75)		43 (22-59)	
Předhospitalizační ATB terapie	6	40	5	29	1	20
Průměrná doba do zahájení kauzální léčby v hod. (rozmezí)	28 (12-59)		30,7 (8-77)		42,4 (22-60)	
Věk v letech (rozmezí)	23,9 (1-54)		21,3 (1-57)		27,8 (8-58)	
APACHE II (rozmezí)	10,9 (2-23)		7,0 (0-25)		3,8 (0-7)	
Komplikace	12	80	8	47	5	100

Tabulka 8. Anamnestické údaje a klinické příznaky ve vztahu k séroskupině *N.meningitidis*

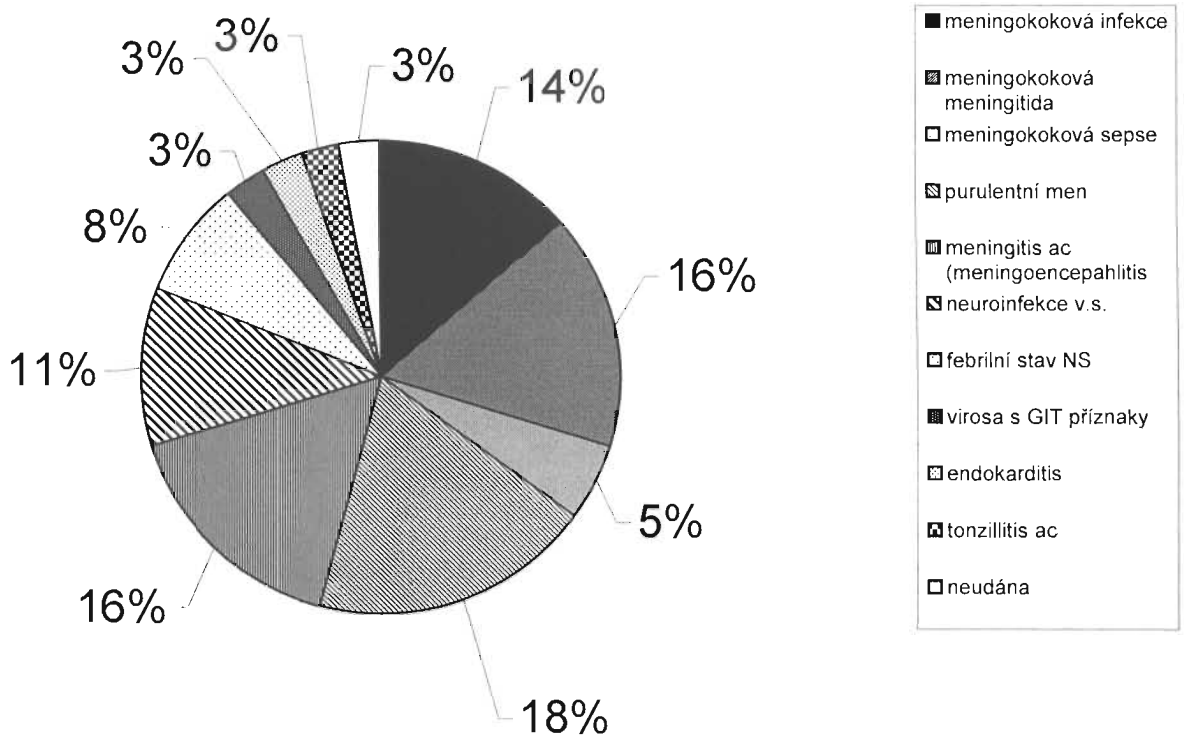


Graf 13. Hodnota APACHE II skóre ve skupině pacientů s komplikovaným a nekomplikovaným průběhem IMO.

Na Infekční kliniku FNB bylo přijato 14 (38 %) pacientů překladem z jiného oddělení a 14 (38 %) pacientů bylo přijato z domova přes lékaře LSPP nebo RZS (Graf 14.). U 13 (35 %) pacientů bylo v terénu vysloveno podezření na invazivní meningokokovou infekci (Graf 15.).



Graf 14. Odesílající lékař



Graf 15. Diagnóza stanovená před přijetím na infekční kliniku

Délka hospitalizace (dny)	20,9 dní (9-100)
JIP (dny)	8 (1-67), 89 % pacientů
Předhospitalizční ATB terapie: - oralní - parenterální	12/37 (32 %) 5/37 (14 %) 7/37 (19 %)
Kauzální ATB terapie (1. volba): - PNC - CEF	 5/37 (14 %) 32/37 (86 %)
Manitol (dny)	3,12 dní (2-7 dní), 34/37 (92 %)
Dexamethason (dny)	3,18 dní (1-8 dní), 35/37 (95 %)
Mražená plazma	16/37 (43 %)
UPV	4/37 (11 %)
Vazoaktivní podpora	4/37(11 %)

Tabulka 9. Terapie

Pouze u 10 (27 %) pacientů byla v terénu zahájena adekvátní ATB terapie. 90 % pacientů bylo přijato na jednotku intenzivní péče, ostatní byli přijati na jednotku intermediární péče s možností monitorace životních funkcí. 4 pacienti vyžadovali umělou plicní ventilaci (UPV). Iniciální ATB terapie byla zahájena ve většině případů cefalosporinem 3. generace (32 pacientů, 86 %). U většina pacientů byl podáván v průměru 3 dny manitol a dexamethason. (Tabulka 9.).

4.2. Úspěšnost jednotlivých diagnostických metod

4.2.1. PCR

Ve studované skupině pacientů byl použitím kombinace jednokrokové a seminested PCR metody získán pozitivní výsledek v likvoru u 34 (92 %) případů a v krvi u 17 (46 %) případů. V 15 (40 %) případech byl získán pozitivní výsledek v obou biologických materiálech (Tabulka 10.). Séroskupina *N.meningitidis* byla určena u 31 případů, z toho séroskupina C ve 14 případech a séroskupina B v 17 případech.

Materiál	Test	Provedená vyšetření	Test pozitivní	% pozitivních
Likvor	**PCR**	37	34	92
	LA	24	11	46
	Kultivace	37	13	35
Krev	**PCR**	37	17	46
	LA	26	10	38
	Kultivace	36	14	39

Tabulka 10. Výsledky diagnostických metod ve skupině pacientů pro hodnocení PCR testu (soubor A, n=37)

Hodnoceny jen vzorky odebrané v den přijetí.

4.2.2. Latexová aglutinace

Ve vybrané skupině pacientů, kde bylo provedeno vyšetření LA v den přijetí, byly získány pozitivní výsledky LA v likvoru u 9 (47%) případů, v krvi u 8 (42%) případů a v moči ve 4 (24%) případech. Séroskupina *N.meningitidis* byla určena u 16 případů, z toho séroskupina C v 8 případech a séroskupina B v 8 případech. Vyřazeni byli ti pacienti, kde

nebyl dostatek materiálu na provedení LA vyšetření nebo ho nebylo možno provést pro hemolýzu (Tabulka 11.).

Materiál	Test	Provedená vyšetření	Test pozitivní	% pozitivních
Likvor	**LA**	19	9	47
	PCR	19	18	95
	Kultivace	19	7	37
Krev	**LA**	19	8	42
	PCR	19	9	47
	Kultivace	18[a]	9	50
Moč	**LA**	17[b]	4	24

Tabulka 11. Výsledky diagnostických metod ve vybrané skupině pacientů pro hodnocení LA testu (soubor B, n=19)

Hodnoceny jen vzorky odebrané v den přijetí.

[a] v 1 případě nebyla krev odebrána na kultivaci

[b] ve 2 případech nebyla moč odeslána k vyšetření LA

4.2.3. Kultivace

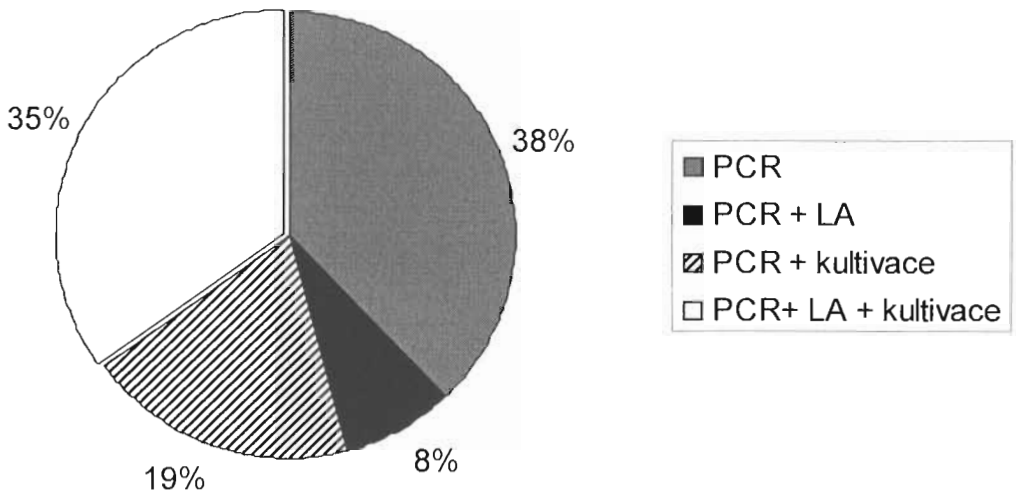
Ve studované skupině bylo 13 (35 %) pozitivních kultivací likvoru a 14 (39 %) pozitivních hemokultivací. Séroskupina *N.meningitidis* byla určena u 15 případů, z toho séroskupina C v 10 případech, séroskupina B ve 4 případech a jedenkrát séroskupina Y.

4.2.4. Určení etiologie a séroskupiny *Neisseria meningitidis*

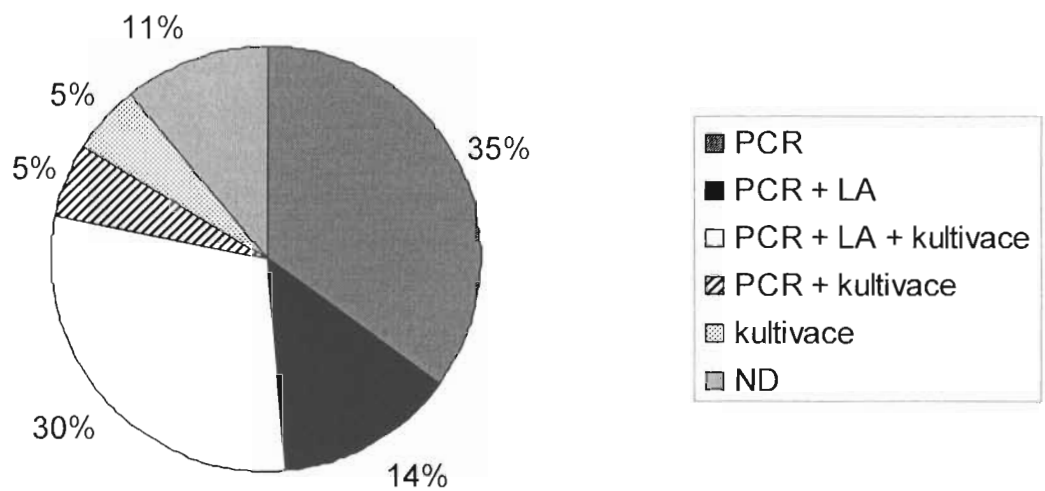
Etiologie meningokokového onemocnění byla prokázána pomocí PCR, kultivace a LA u 13 (35 %) pacientů, pomocí PCR a kultivace u 7 (19 %) pacientů, pomocí PCR a LA u 3 (8 %) pacientů a u 14 (38 %) pacientů PCR byla jedinou pozitivní metodou (Graf 16.).

Séroskupina *N.meningitidis* způsobující IMO byla určena u 33 (89 %) pacientů. Nejvíce se na jejím určení podílela PCR metoda, která určila séroskupinu *N.meningitidis* u 31 (84 %)

případů, z toho ve 13 (35%) případech byla séroskupina určena pouze pomocí PCR (Graf 17., Tabulka 12. a 13.).



Graf 16. Určení etiologie IMO



Graf 17. Určení séroskupiny *N.meningitidis*

	PCR	LA	Kultivace
N.meningitidis B	17	8	4
N.meningitidis C	14	8	10
N.meningitidis Y	0	0	1

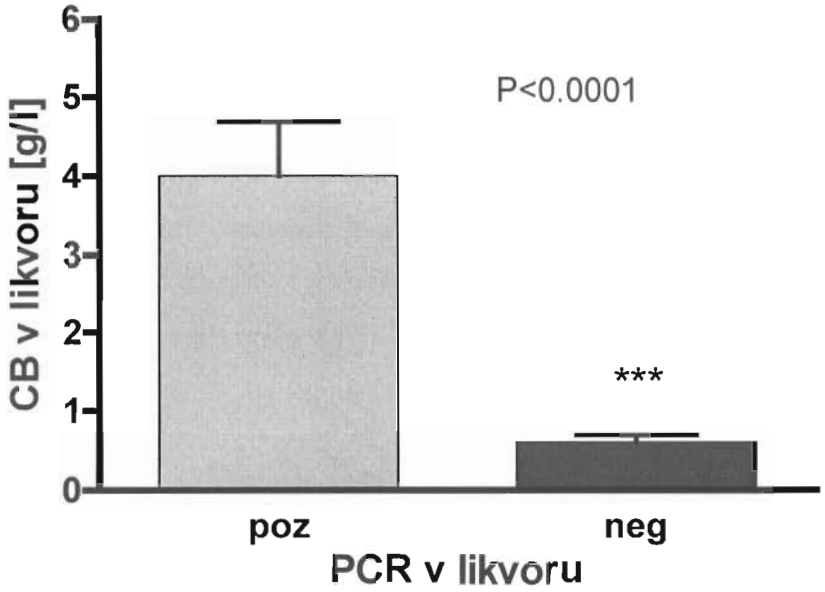
Tabulka 12. Určení séroskupin jednotlivými diagnostickými metodami

	PCR pozitivní (%)		LA pozitivní (%)			Kultivace pozitivní (%)	
	Likvor	Krev	Likvor	Krev	Moč	Likvor	Krev
IMO N.m.C (n=15)	13 (86)	6 (40)	6 (40)	4 (27)	1 (7)	5 (33)	9 (60)
IMO N.m.B (n=17)	17 (100)	6 (35)	5 (30)	6 (35)	4 (24)	7 (41)	4 (24)
IMO N.m.ND (n=4)	4 (100)	4 (100)	0	0	1 (25)	0	0
IMO N.m.Y (n=1)	0	1	0	0	0	1	1

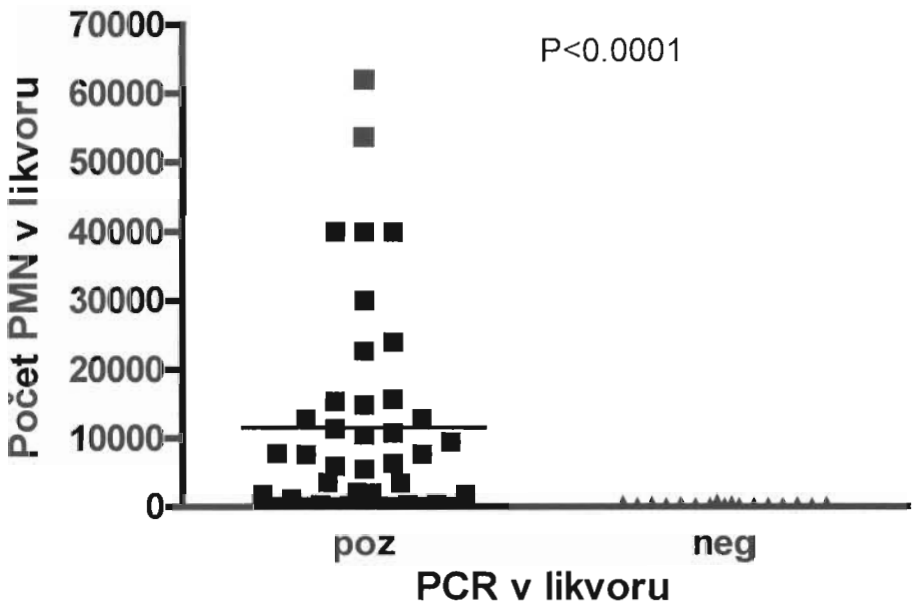
Tabulka 13. Úspěšnost jednotlivých diagnostických metod podle séroskupiny vyvolávající IMO

4.3. Výsledky lumbální punkce ve vztahu k PCR

Ve vzorcích likvoru s pozitivním výledkem PCR byly při biochemickém a cytologickém vyšetření naměřeny vyšší hodnoty celkové bílkoviny a vyšší počet PMN než u vzorků likvoru s negativním výsledkem PCR, rozdíl byl statisticky významný (Graf 18. a 19.). Mezi hodnotami glykorhachie a počty lymfocytů nebyl zjištěn významný rozdíl. Výsledky u vzorků pozitivních při LA vyšetření a při kultivaci se v těchto hodnotách statisticky nelišily. (Pozn. pro toto hodnocení byly využity výsledky ze všech provedených lumbálních punkcí včetně kontrolních.)



Graf 18. Proteinorhachie ve vztahu k výsledku PCR v likvoru



Graf 19. Počet PMN v likvoru a výsledek PCR

4.4. Vliv zahájené antibiotické terapie na výsledek diagnostických metod

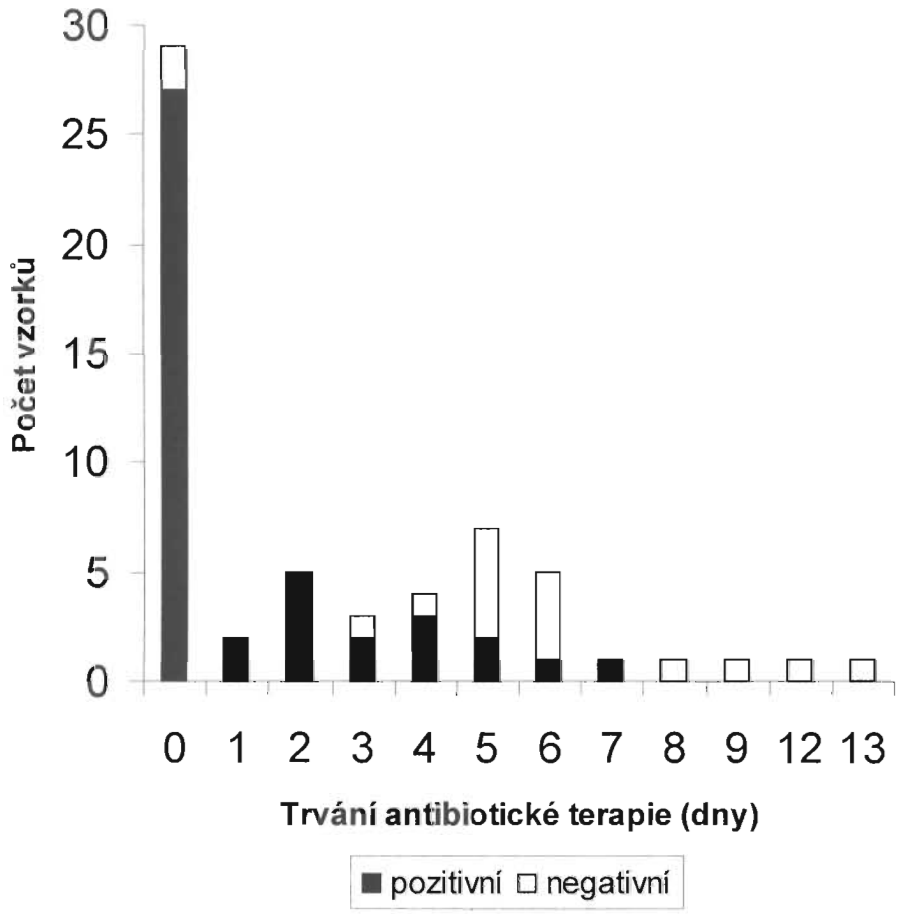
U 16 (43 %) pacientů byla zahájena ATB terapie před odběrem likvoru na PCR a LA vyšetření a 20 pacientů (54 %) dostalo ATB před odběrem krve. 14(38 %) pacientů dostalo ATB před odběrem likvoru na kultivaci a 10 (28 %) pacientů dostalo ATB před odběrem hemokultury. Ve skupině pacientů, kteří obdrželi předcházející ATB terapii jsme nalezli signifikantní redukci pozitivity kultivace likvoru (p=0,01) a značný, ale nesignifikantní pokles pozitivity kultivace krve a LA pozitivity v krvi i likvoru. Pozitivita PCR výsledků nebyla téměř změněna. Data jsou shrnuta v tabulce 14.

	Likvor				
	Odběr před zahájením ATB terapie		Odběr po zahájení ATB terapie		
Test	Pozitivní test/počet vyšetření	%	Pozitivní test/počet vyšetření	%	Fisher test
PCR	21/21	100	13/16	81	p=0,07
LA	9/15	60	2/9	22	p=0,10
Kultivace	12/23	52	1/14	7	p=0,01*
	Krev				
	Odběr před zahájením ATB terapie		Odběr po zahájení ATB terapie		
Test	Pozitivní test/počet vyšetření	%	Pozitivní test/počet vyšetření	%	Fisher test
PCR	8/17	47	9/20	45	p=1,00
LA	6/12	50	4/14	29	p=0,42
Kultivace	12/26	46	2/10	20	p=0,25

Tabulka 14. Vliv ATB terapie na pozitivitu diagnostických metod v krvi a likvoru
Zahrnuty jen první vzorky odebrané v den přijetí. Použita kombinovaná PCR – jednokroková a seminested.

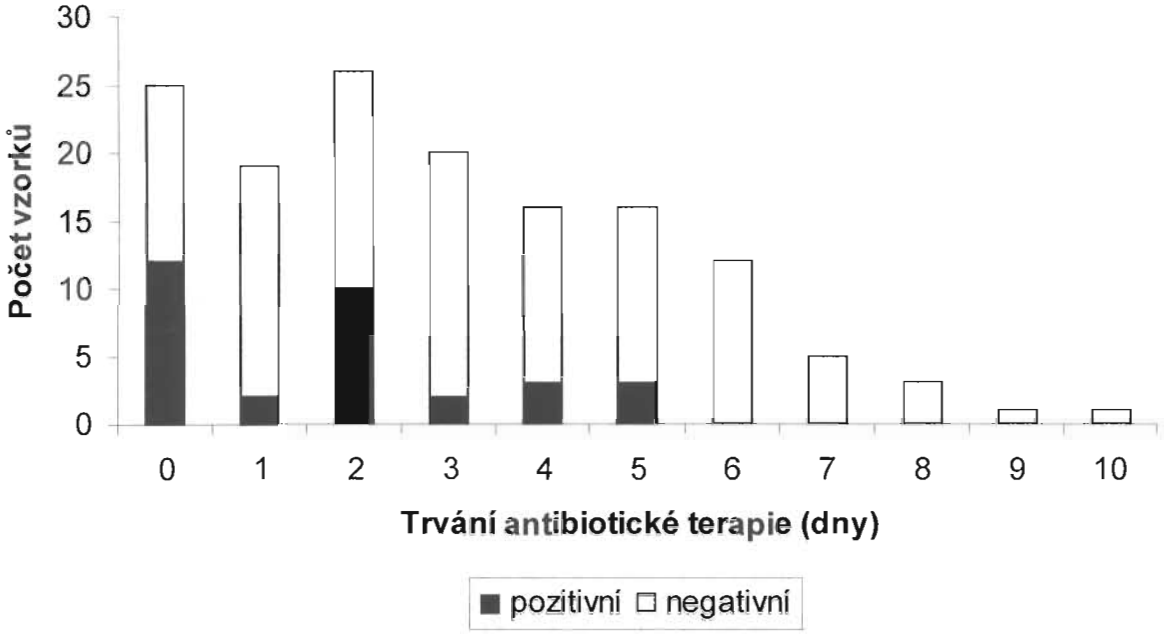
4.5. Dynamika PCR a latexové aglutinace v likvoru a séru

Dynamika obou diagnostických metod se liší v různých klinických materiálech a obě metody poskytují největší procento pozitivních výsledků v den zahájení ATB terapie. Poslední pozitivní výsledek PCR vyšetření byl získán z likvoru v den 7 po první dávce ATB a z krve v den 5 (Graf 20. a 21.). Při LA vyšetření byl poslední pozitivní výsledek získán v den 2 po první dávce ATB z likvoru, v den 3 z krvi a v den 4 z moči. (Graf 22.-24.). Ze srovnání těchto 2 metod vyplývá, že PCR umožňuje déle záchyt agens.



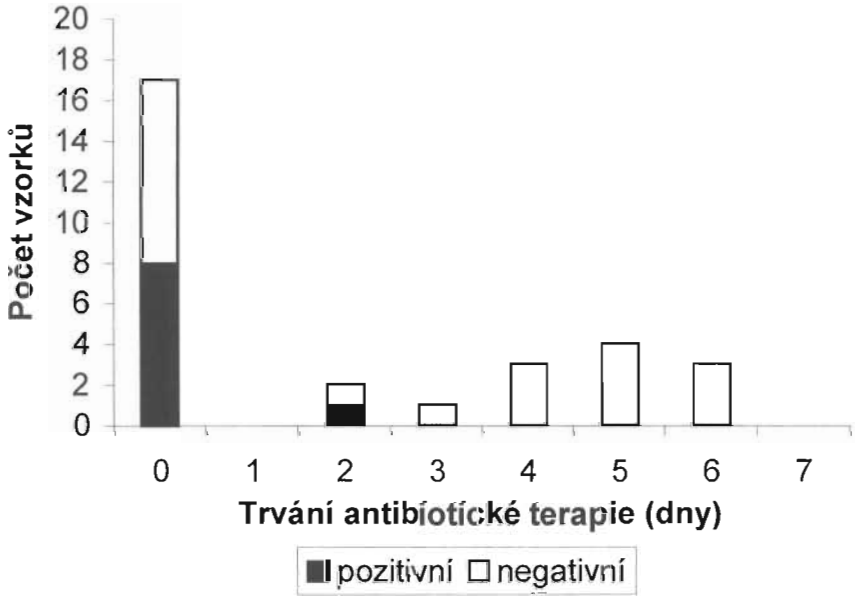
Graf 20. Trvání pozitivity PCR v likvoru

Den 0 = zahájení ATB terapie



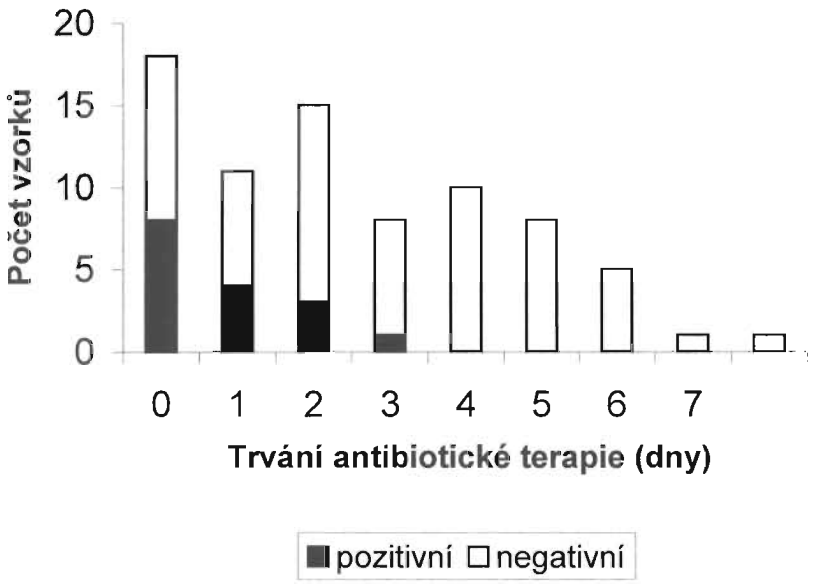
Graf 21. Trvání pozitivity PCR v krvi

Den 0 = zahájení ATB terapie



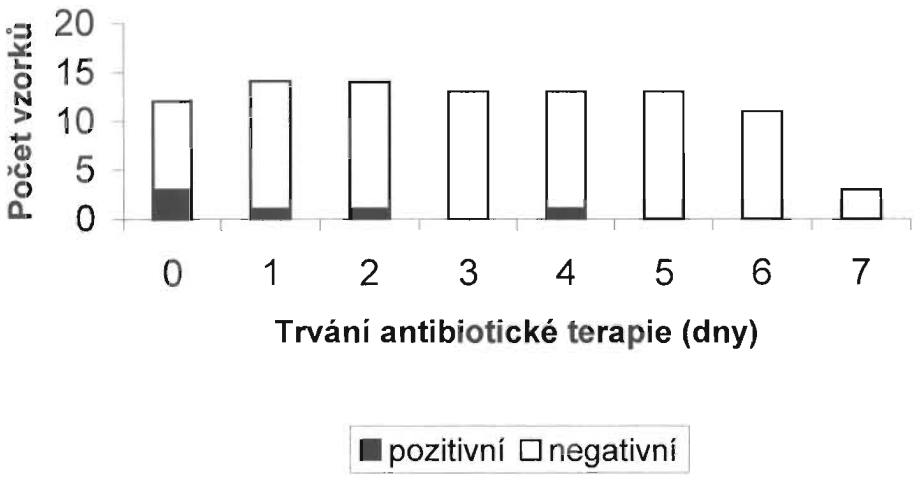
Graf 22. Trvání pozitivity LA v likvoru

Den 0 = zahájení ATB terapie



Graf 23. Trvání pozitivity LA v krvi

Den 0 = zahájení ATB terapie

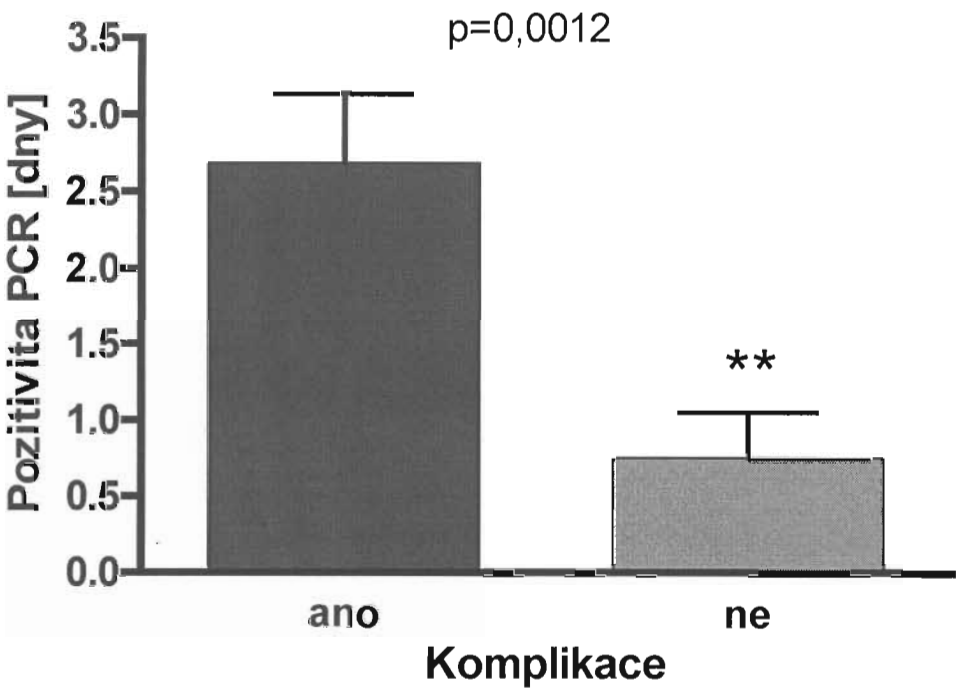


Graf 24. Trvání pozitivity LA v moči

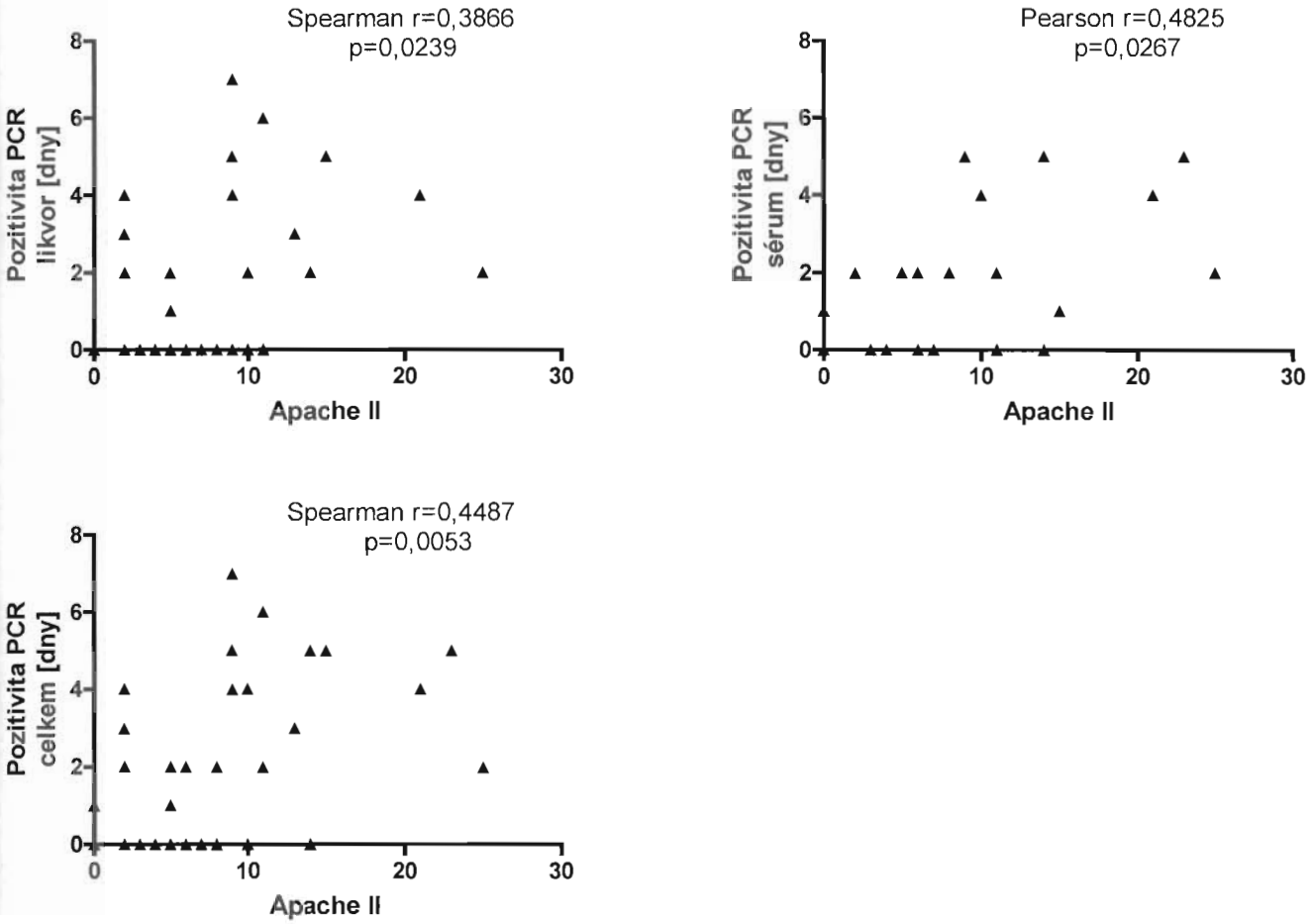
Den 0 = zahájení ATB terapie

4.6. Vztah PCR k závažnosti onemocnění

Při posuzování vztahu mezi závažností průběhu IMO hodnoceného pomocí APACHE II skóre a trváním pozitivity PCR vyšetření jsme nalezli pozitivní korelaci (Graf 25.). Rovněž ve skupině pacientů s komplikacemi bylo přetrvávání pozitivity PCR delší než u pacientů bez komplikací (Graf 26.). Dynamika pozitivity PCR se nelišila u pacientů s meningitidou a sepsí. Nebyla zjištěna korelace mezi délkou pozitivity a délkou doby do zahájení kauzální ATB terapie. Také nebyl prokázán vztah přetrvávání pozitivity PCR v likvoru a výsledků lumbální punkce (proteinorhachie, glykorhachie, počet PMN a lymfocytů).



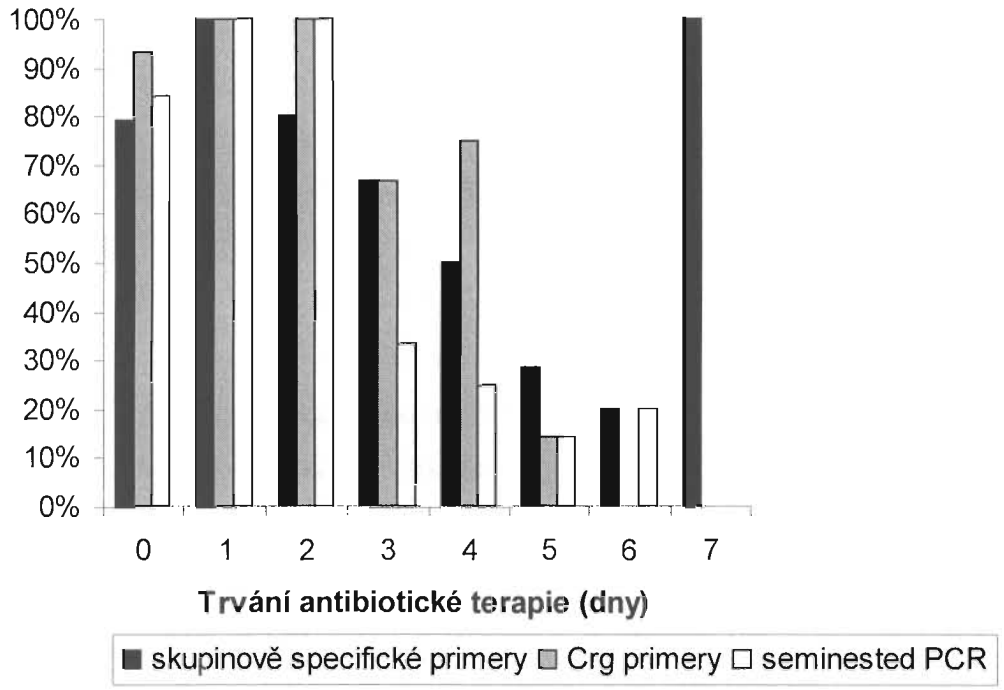
Graf 25. Dynamika PCR a komplikace IMO



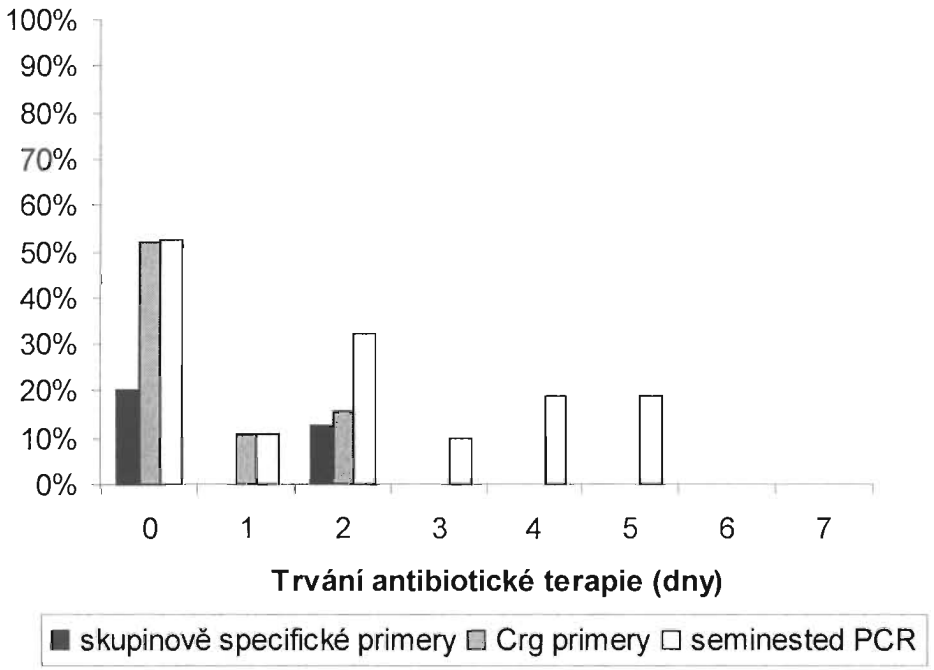
Graf 26. Dynamika PCR v likvoru, séru a celkově v obou materiálech a závažnost IMO (APACHE II skóre)

4.7. Srovnání primerů

Při porovnání úspěšnosti rozdílných primerových párů použitých k detekci meningokokové DNA jsme byli schopni detekovat DNA pomocí skupinově specifických primerů do dne 7 v likvoru, ale v krvi jen do dne 2. Při použití seminested PCR jsem byli schopni získat pozitivní výsledek do dne 6 v likvoru a do dne 5 v krvi. Nízký počet vzorků ale neumožňuje jejich statistické vyhodnocení (Graf 27. a 28.).



Graf 27. Úspěšnost použitých primerů v detekci DNA v likvoru



Graf 28. Úspěšnost použitých primerů v detekci DNA v krvi

4.8. Vztah PCR ke klinické formě IMO

Vztah mezi výsledky testů a klinickou formou onemocnění ukazuje tabulka 15. U meningitických forem onemocnění jsme častěji detekovali agens v likvoru než v krvi všemi použitými metodami (PCR, LA, kultivace), přičemž statistisky významně vyšší byla jen pozitivita PCR (na hladině $p<0,0001$). U forem septických byl záchyt agens pomocí kultivace uspěšnější z krve, ale rozdíl nebyl signifikantní ($p=0,29$), PCR bylo úspěšné v obou materiálech stejně. LA vyšetření nelze hodnotit pro malý počet vyšetřených vzorků. Při hodnocení pozitivity biologického materiálu (likvor, krev, moč) ve vztahu ke klinické formě IMO (sepse versus meningitida) byl likvor častěji pozitivní u meningitických forem a krev častěji pozitivní u sepse, ale rozdíly nebyly statisticky významné (Tabulka 15.).

	PCR pozitivní (%)		LA pozitivní (%)			Kultivace pozitivní (%)	
	Likvor	Krev	Likvor	Krev	Moč	Likvor	Krev
Sepse (n=9)	7 (78)	7 (78)	0	0	1 (11)	1 (11)	3 (33)
Meningitida (n=28)	27 (96)	10 (36)	11 (55)	10 (45)	5 (19)	12 (43)	11 (41)
Fisher test	0,14	0,05	0,04	0,08	1,00	0,12	1,00

Tabulka 15. Vztah diagnostických metod (PCR, LA a kultivace) ke klinické formě onemocnění.

Pozitivní výsledky hodnoceny nezávisle na době odběru (zahrnuty první i následné vzorky, každý pacient zařazen jen jedenkrát).

5. DISKUSE

5.1. Epidemiologická a klinická data

Nejčastěji zastoupenou klinickou formou IMO byla v naší studii purulentní meningitida, mírně převažovala onemocnění vyvolaná *N.meningitidis* séroskupiny B a nejpočetněji zastoupenou věkovou skupinou byla skupina 15-19 letých. Při hodnocení klinických příznaků v době přijetí pacienta k hospitalizaci nebyly nalezeny výrazné rozdíly mezi septickou a meningitickou formou onemocnění. Přestože u 76 % pacientů byly již při přijetí přítomné pro IMO typické hemoragické kožní projevy (petechie, sufuze) a 86 % pacientů mělo pozitivní meningeální příznaky, jen u 35 % pacientů bylo vysloveno odesílajícím lékařem podezření na IMO. Pouze u 27 % pacientů byla v terénu zahájena adekvátní ATB terapie, která je již součástí standardu efektivní péče o pacienty s podezřením na IMO. Častěji byla ATB v předhospitalizační péči aplikována u pacientů se septickou formou IMO a v této skupině byla i kratší doba do hospitalizace a do zahájení kauzální ATB terapie. Pravděpodobně se na tom podílel těžší klinický stav pacientů se sepsí.

5.2. PCR

Tato studie dokazuje důležitost PCR metody pro určení etiologie IMO a prokázala, že v klinické praxi PCR zvyšuje významně počet laboratorně potvrzených meningokokových onemocnění. Kombinovaná PCR metoda (jednokroková + seminested) použitá v naší studii byla efektivnější než běžně používané metody pro diagnostiku IMO - kultivace a LA. Ve 14 (38%) případech byla etiologie onemocnění identifikována pouze PCR metodou. 3 případy byly následně potvrzeny multilokusovou sekvenční typizací provedenou přímo z likvoru (Kriz 2002). Ostatních 9 případů mělo typický klinický průběh IMO a nebylo detekováno jiné agens. PCR byla také nejúspěšnější metodou v určování séroskupiny *N.meningitidis*, které je nezbytnou součástí monitoringu epidemiologické situace a určování vakcinační strategie. PCR určila séroskupinu u 84 % onemocnění a u 35 % byla jedinou metodou, která séroskupinu určila.

Téměř polovina pacientů ve studii obdržela ATB před přijetím do nemocnice, proto možnost získat pozitivní výsledek kultivace byl limitován. PCR projevilo jeho vysokou

důležitost zejména u takovýchto pacientů, protože procento pozitivity u pacientů léčených ATB před odběrem biologického materiálu na vyšetření PCR se téměř nelišilo od pacientů bez léčby, zatímco pozitivita kultivace byla signifikantně redukována.

Zaměřením naší studie na trvání pozitivity PCR v čase a v různém klinickém materiálu jsme se snažili přispět k zodpovězení otázky, do kterého dne ATB terapie je DNA ještě detekovatelná. Předcházející studie zaznamenaly rozdílné nálezy. Ve studii publikované Ragunathanem byla krev PCR pozitivní pouze 24 hodin a likvor 72 hodin po zahájení ATB terapie (Ragunathan 2000). Bryant a kol. popsali pozitivitu nested a real-time PCR v krvi do 9. dne po nasazení i.v. ATB (Bryant 2004). V naší studii jsme prokázali, že meningokoková DNA může být detekovatelná v likvoru do 7.dne a v krvi do 5. dne po zahájení ATB terapie. Výsledky odrážejí skutečnost, že DNA perzistuje i po té, co bakterie byly zabity a clearence meningokokové DNA je pomalejší z likvoru než z krve. Rozdíly ve výsledcích zmíněných studií mohou vyplývat z několika faktorů, které zahrnují (1) koncentraci bakterie v likvoru na počátku terapie; (2) citlivost bakterie na ATB; (3) počet leukocytů v likvoru a jejich schopnost zabíjet (leukocyty ničí bakteriální DNA po fagocytóze a lýze bakterie); (4) permeabilita hematoencefalické bariéry (která ovlivňuje nejen penetraci antibitotika a imunoreaktivních komponent, ale také clearenci bakteriálních reziduí).

Nalezli jsme pozitivní korelaci mezi závažností průběhu IMO hodnocenou APACHE II skóre a dynamikou pozivity PCR a delší přetrvávání pozitivity PCR u pacientů s komplikacemi IMO. Důvodem může být vyšší bakteriální nálož na počátku onemocnění u závažnějších případů. Nenalezli jsem korelaci mezi délkou pozitivity PCR a dobou do zahájení ATB terapie, která také není v korelaci s APACHE II skóre a výskytem komplikací. Vzhledem k tomu, že *N.meningitidis* je intracelulární patogen, vzorky likvoru pozitivní při PCR vykazovaly signifikantně vyšší počet PMN než vzorky PCR negativní, přesto v 10 případech bylo PCR v likvoru pozitivní, aniž by počet buněčných elementů splnil kritérium stanovené pro meningitidu (300/3 elementů).

Vzhledem k poklesu PCR pozitivity v průběhu onemocnění, doporučujeme odebírat biologické vzorky pro PCR vyšetření stejně jako pro ostatní diagnostické metody jak nejdříve je to možné. Je vhodné zasílat k vyšetření oba materiály, likvor i sérum, bez ohledu na klinickou formu IMO. U meningitických forem byl v naší studii zaznamenán častěji pozitivní likvor (96 %), ale procento pozitivních sér není zanedbatelné (36 %). U septických forem byla detekce *N.meningitidis* stejně úspěšná v krvi i v likvoru. 78 % pozitivních vzorků likvoru u sepsí může souviset s vysokou citlivostí PCR metody, která detekuje i minimální

množství meningokokové DNA, která může přestoupit přes hematoencefalickou bariéru v rámci septického stavu bez rozvoje klinických příznaků meningitidy.

5.3. Latexová aglutinace

LA detekce *N.meningitidis* z biologických vzorků je rychlejší test než PCR a snáze proveditelný a tedy i dostupnější. Vykazuje ale nižší senzitivitu, a proto negativita LA testu ještě nevylučuje přítomnost meningokokové infekce. Může také vykazovat falešně pozitivní výsledky kvůli zkřížené reakci (Weinberg 1985). Navíc, v naší studii průkaz antigenu v likvoru neovlivnil empiricky zvolený druh ATB, zatímco u 6 pacientů (32 %) byla terapie změněna z cefalosporinu na benzylpenicilin po potvrzení etiologie IMO pomocí PCR nebo kultivace. Senzitivita LA testu může být zlepšena použitím ultrasound-enhanced LA (USELAT) (Porritt 2003, Barnes 1998, Sobanski 1999). Tato technika signifikantně redukuje počet falešně negativních výsledků při kartičkové LA a nebyly zaznamenány falešně pozitivní výsledky (Barnes 1998). Sobanski publikoval přibližně 30 násobné zlepšení senzitivity při použití (USELAT) (Sobanski 2000). Výsledky USELAT jsou srovnatelné s výsledky PCR a mohl by se uplatnit jako metoda rychlého bezkultivačního průkazu v laboratořích, kde není dostupná metoda PCR (Gray 1999). Sledování vztahu mezi koncentrací antigenu a klinickými následky ukázalo, že stoupající koncentrace antigenu signifikantně koreluje s tíží následků a mortalitou. USELAT může tedy poskytnout rychlou prognostickou informaci pro pacienty s IMO (Sobanski 2000).

Rutinně používané materiály pro antigenní detekci pomocí LA jsou likvor a krev. Vzhledem k možnosti neinvazivního odběru bývá jako další vhodný materiál někdy uváděna moč. Clarke a kol. publikovali LA vyšetření moče jako klinicky užitečný test, použitelný jako rychlou a levnou (cost-effective) skreeningovou metodu pro IMO (Clarke 2001, al Wali 1998). V naší studii bylo v den přijetí pouze 24 % pozitivních vzorků moče, proto považujeme LA test v moči za méně spolehlivý pro dignostiku IMO. Navíc proteiny přítomné v moči nebo kontaminující flóra v moči může způsobit falešnou pozitivitu LA výsledků (Perkins 1995, Weinberg 1985).

Pokles LA pozitivity po nasazení ATB terapie je významnější než u PCR, což souvisí s faktem, že pro pozitivitu LA testu je nezbytná přítomnost intaktního bakteriálního antigenu, zatímco PCR vyžaduje pouze fragment bakteriální DNA. Clearence bakteriálního antigenu z lidského organismu je pravděpodobně rychlejší než clearence DNA, protože bakteriální

antigeny jsou více imunogenní pro lidský imunitní systém a jsou rozpoznány jako cizí materiál mechanismy nespecifické imunity. S ohledem na možnost selhání LA testu může být považován za pomocnou metodu v diagnostice IMO. Může být užitečný jako rychlý test pro potvrzení meningokokové etilologie a séroskupiny *N.meningitidis* v lokálních mikrobiologických laboratořích, kde PCR metoda není dostupná nebo jako metoda u lůžka nemocného pro klinické pracovníky, zejména u pacientů, kteří byli léčeni ATB před přijetím do nemocnice. Tunkel a Scheld doporučují LA test pro pacienty s předpokládanou bakteriální meningitidou a negativním mikroskopickým průkazem v likvoru (Tunkel 2005). Fernandez-Rodriguez doporučuje, aby forenzní diagnostika nejasných úmrtí zahrnovala také LA jak v případech, kde je podezření na fulminantně proběhlou infekci *N.meningitidis* tak i u úmrtí, kde je příčina neznámá (Fernandez-Rodriguez A 2005). LA považujeme spíše za pomocnou metodu, cennou pro její rychlost a dostupnost, která ale nemůže nahradit ani klasické mikrobiologické metody – mikroskopie a kultivace, ani nově vyvinuté metody, například PCR.

6. ZÁVĚR

Byla provedena studie zaměřená na zhodnocení významu PCR metody pro diagnostiku IMO v praxi a určení dynamiky pozitivity této metody. Úspěšnost PCR metody byla srovnána s běžně používanými vyšetřovacími metodami – kultivace a latexová aglutinace. Současně byl hodnocen vliv antibiotické terapie na výsledek diagnostických testů a vztah závažnosti meningokokové infekce a dynamiky PCR. Práce uvádí také stručné zhodnocení anamnestických a klinických údajů pacientů.

1. *Potvrdili jsme význam PCR metody pro zlepšení diagnostiky IMO. PCR metoda výrazně zvyšuje procento laboratorně potvrzených meningokokových onemocnění a umožňuje rychlou identifikaci etiologie onemocnění včetně určení séroskupiny N.meningitidis i po zahájení ATB léčby.*
2. *PCR poskytuje lepší výsledky v diagnostice IMO než běžně používané laboratorní metody (kultivace, LA).*
3. *Větší procento PCR pozitivních výsledků jsme získali z mozkomíšního moku než z krve.*
4. *U meningitid jsme pomocí PCR statisticky signifikantně častěji prokázali N.meningitidis z mozkomíšního moku než z krve.*
5. *Výsledky PCR nejsou ovlivněny předchozí ATB terapií, zatímco pravděpodobnost pozitivního kultivančního nálezu po zahájení ATB terapie je signifikantně snížena.*
6. *Přetrvání pozitivity PCR v mozkomíšním moku je delší než v séru.*
7. *Pomocí seminested PCR jsme detekovali meningokokovou DNA déle než pomocí jednokrokové PCR metody.*
8. *Nalezli jsme pozitivní korelaci mezi závažností IMO a trváním PCR pozitivity.*

Dynamika PCR metody nebyla dosud publikována takto podrobně a na takto velkém souboru. Na základě výsledků naší studie doporučujeme při podezření na invazivní meningokokovou infekci zasílat vzorek likvoru a krve na PCR vyšetření ihned při přijetí pacienta, eventuelně do 3. dne od zahájení antibiotické terapie. Přes užitečnost PCR metody pro potvrzení etiologie IMO, zůstává kultivace likvoru a krve nezbytná pro testování citlivosti k ATB a pro další detailní výzkum meningokokových kmenů. LA považujeme spíše za pomocnou metodu, cennou pro její rychlost a dostupnost, která však nemůže nahradit ani PCR ani kultivační vyšetření.

7. SOUHRN

Úvod: Invazivní meningokokové onemocnění patří stále mezi život ohrožující stavy. Rychlá diagnostika je důležitá pro včasné zahájení adekvátní léčby. PCR je přímá, rychlá a bezkultivační metoda detekující meningokokovou DNA. Naše studie je zaměřena na zhodnocení významu PCR pro potvrzení meningokokové etiologie, srovnání PCR s ostatními diagnostickými metodami, stanovení dynamiky PCR a LA pozitivity v různých klinických materiálech, hodnocení vlivu nasazené antibiotické terapie na výsledek diagnostických metod a hodnocení anamnestických a klinických údajů pacientů.

Metody: Vyšetřeny byly vzorky mozkomíšního moku a séra odebrané během prvního týdne hospitalizace od pacientů s laboratorně potvrzeným IMO. Bakteriální DNA byla izolována Qiagen kitem a byla použita jednokroková a dvoukroková (seminested) PCR. PCR produkty byly detekovány na 2% gelové elektroforéze. Současně bylo provedeno kultivační vyšetření a latexová aglutinace.

Výdledky: PCR pozitivita v likvoru dosáhla 92 % a v séru 46 %, LA byla pozitivní u 47 % vzorků likvoru, 42 % vzorků krve a 24 % vzorků moče. Kultivace likvoru byla pozitivní jen v 35 % a hemokultivace v 39 %. Poslední pozitivní výsledek PCR byl detekován 7. den v likvoru a 5. den v séru, což ukazuje na rychlejší eliminaci patogena ze séra. Trvání pozitivity LA v likvoru a séru (2. a 3.den) je kratší než u PCR, poslední pozitivní výsledek LA v moči byl získán 4. den od zahájejí ATB terapie. Prokázali jsme signifikantní redukci pozitivity kultivace po nasazení ATB a téměř nezměněnou pozitivitu PCR. Byla nalezena pozitivní korelace mezi závažností onemocnění a dynamikou PCR. Zaznamenali jsem vysoké procento PCR pozitivních vzorků likvoru u septických forem IMO.

Závěry: Potvrdili jsme významný přínos PCR ke zlepšení diagnostiky IMO. PCR je výrazně citlivější než ostatní metody (LA, kultivace) běžně používané k diagnostice IMO a její výsledek není ovlivněn předcházející antibiotickou terapií. Vyšší procento PCR pozitivních výsledků jsme získali z livoru, kde jsem také prokázali delší přetrvávání pozitivity než v séru. Doporučujeme odebírat materiál na PCR vyšetření v počátku onemocnění, jak nejdříve je to možné.

SUMMARY

Introduction: Invasive meningococcal disease continues to be a life-threatening condition. Rapid diagnosis is important for the administration of appropriate treatment. Our study focuses on evaluation of importance of PCR method for diagnosis of meningococcal disease. We describe in detail the dynamics of PCR method and its relationship to other diagnostic methods (LA, culture) and to the course of the disease. We also evaluated the influence of previously applied antibiotics therapy to results of these diagnostic methods.

Methods: We have investigated cerebrospinal fluid and serum samples collected during the 1st week of hospitalization from patients hospitalized at the department of infectious diseases with laboratory confirmed invasive meningococcal disease. Bacterial DNA was isolated from biological material by Qiagen kit and one-step and seminested PCR method was used. PCR products were detected on the 2% gel electrophoresis. In parallel, we performed culture and LA methods.

Results: The PCR positivity in cerebrospinal fluid and serum achieved 92 % and 46 %, respectively, LA positivity in cerebrospinal fluid, serum and urine achieved 47 %, 42 % and 24 %, respectively. Culture of CSF and blood was positive only in 35 % and 39 %, respectively. The latest PCR positivity was detected at Day 7 in cerebrospinal fluid and Day 5 in serum, what points to more rapid elimination of pathogen from serum. The duration of the positivity of LA in CSF and serum (Day 2 and Day 3) is shorter than in PCR, and the last positive result of LA in urine was achieved at Day 4 after the onset of the ATB therapy. We proved significant reduction of positivity of culture after the onset of ATB therapy and almost unchanged positivity of PCR. We found positive correlation between the severity of the disease and the dynamics of PCR. We encountered a high percentage of PCR-positive CSF samples in septic forms of the IMD.

Conclusions: We confirmed the importance of PCR method for improvement of diagnosis of IMD. PCR is more successfull than other methods (LA, culture) routinely used for diagnosis of the IMD and its results are not influenced by previous ATB therapy. We acquired higher percentage of PCR positive results from CSF, where the duration of the positivity was also longer than in serum. It is recommended to collect samples for PCR diagnosis early in the course of invasive meningococcal disease.

8. POUŽITÁ LITERATURA

AGUILERA JF, PERROCHEAU A, MEFFRE C, HAHNÉ S: Outbreak of serogroup W135 meningococcal disease after the Hajj Pilgrimage, Europe, 2000. *Emerg Infect Dis* **8**: 761-767, 2002

AL-WALI W, HUGHES C: Urine antigen detection can be quicker than PCR in the diagnosis of meningococcal disease. *J Hosp Infect* **40**: 326-328, 1998.

BARNES RA, JENKINS P, COAKLEY WT: Preliminary clinical evaluation of meningococcal disease and bacterial meningitis by ultrasonic enhancement. *Arch Dis Child* **78**: 58-60, 1998.

BÄCKMAN A, LANTZ PG, RÅDSTRÖM P, OLCÉN P: Evolution of an extended diagnostic PCR assay for detection and verification of the common causes of bacterial meningitis in CSF and other biological samples. *Mol Cell Probes* **13**: 49-60, 1999.

BEDNÁŘ M, FRAŇKOVÁ V, SCHINDLER J, SOUČEK A, VÁVRA J: Lékařská mikrobiologie. Vydavatal Marvil, Praha, 1996.

BRYANT PA, LI HY, ZAIA A, GRIFFITH J, HOGG G, CURTIS N, CARAPETIS JR: Prospective study of a real-time PCR that is highly sensitive, specific, and clinically useful for diagnosis of meningococcal disease in children. *J Clin Microbiol* **42**: 2919-2925, 2004.

CARTWRIGHT K, REILLY S, WHITE D, STUART J: Early treatment with parenteral penicillin in meningococcal disease. *BMJ* **305**: 143-147, 1992.

CLARKE SC, REID J, THOM L, EDWARDS GFS: Confirmation of meningococcal disease by urinary antigen testing. *Clin Microbiol Infect* **7**: 565-570, 2001.

DIGGLE MA, EDWARDS GF, CLARKE SC: Automation of fluorescence-based PCR for confirmation of meningococcal disease. *J Clin Microbiol* **39**: 4518-4519, 2001.

DOGANCI L, BAYSALLAR M, SARACLI MA, HASCELIK G, PAHSA A. *Neisseria meningitidis* W135, Turkey. *Emerg Infect Dis* **10**: 936-937, 2004.

FERNANDEZ-RODRIGUEZ A, VAZQUEZ JA, SUAREZ-MIER MP, AGUILERA B, BALLESTEROS S, De La FUENTE L, VALLEJO G, SANCHO M: Latex agglutination for bacterial antigens and meningococcus PCR: two useful tools in legal sudden deaths. *Forensic Sci Int* **147**: 13-20, 2005.

FINLAY FO, WITHEROW H, RUDD PT: Latex agglutination testing in bacterial meningitis. *Arch Dis Child* **73**: 160-161, 1995.

FROSH M, EDWARDS U, BOUSSET K, KRAUSSE B, WEISBERG C: Evidence for a common molecular origin of the capsule gene loci in Gram-negative bacteria expressing group II capsular polysaccharides. *Mol Microbiol* **5**: 1251-1263, 1991.

GRAY SJ, SOBANSKI MA, KACZMARSKI EB, GUIVER M, MARSH WJ, BORROW R, BARNES RA, COAKLEY WT: Ultrasound-enhanced latex immunoagglutination and PCR as complementary methods for non-culture-based confirmation of meningococcal disease. *J Clin Microbiol* **6**: 1797-1801, 1999.

CHIPPAUX JP, DEBOIS H, SALIOU P: A critical review of control strategies against meningococcal meningitis Epidemics in Sub-Saharan African Countries. *Infection* **30**: 216-224, 2002.

JOLLEY KA, KALMUSOVA J, FEIL EJ, GUPTA S, MUSILEK M, KRIZ P, MAIDEN MJ: Carried meningococci in the Czech Republic: a Diverse Recombining Population. *J Clin Microbiol* **38**: 4492-4498, 2000.

KALMUSOVÁ J, BRONSKÁ E, KŘÍŽOVÁ P: Diagnostika invazivního meningokokového, hemofilového a pneumokokového onemocnění metodou PCR. *Klin Mikrobiol Infekc Lek* **10**: 130-133, 2004.

KALMUSOVA J, NOVOTNY J, HULINSKA D, MUSILEK M AND KRIZ P: Interactions of invasive and non-invasive strains of *Neisseria meningitidis* with monkey epithelial cells, mouse monocytes and human macrophages. *Microbiologica* **23**: 185-200, 2000.

KALMUSOVÁ J, PAVLÍKOVÁ V, KŘÍŽOVÁ P, ROZNOVSKY L, STRUNCOVÁ V, DOSTÁL V, PLISEK S, BURGET I, CHALUPA P, SVEJDA J, DLOUHY P: První výsledky PCR diagnostiky invazivního meningokokového onemocnění. *Klin Mikrobiol Infekc Lek* **7**: 15-19, 2001.

KRIZ P: Surveillance of invasive meningococcal disease in the Czech Republic. *Euro Surveill* **9**: 11-12, 2004.

KRIZ P, BOBAK M, KRIZ B: Parental smoking, socioeconomic factors and risk of invasive meningococcal disease in children: a population based case-control study. *Arch Dis Child* **83**: 117-121, 2000a.

KRIZ P, KALMUSOVA J, FELSBERG J: Multilocus sequence typing of *Neisseria meningitidis* directly from cerebrospinal fluid. *Epidemiol Infect* **128**:157-160, 2002.

KRIZ P, MUSILEK M, SKOCZYNSKA A, HRYNIEWICZ W: Genetic and antigenic characteristics of *Neisseria meningitidis* strains isolated in the Czech Republic in 1997-1998. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **19**: 452-459, 2000b.

KRIZ P, VLCKOVA J, BOBAK M: Targeted vaccination with meningococcal polysacharide vaccine in one district of the Czech Republic. *Epidemiol Infect* **115**: 411-418, 1995.

KŘÍŽOVÁ P: Invazivní meningokokové onemocnění v České republice. *Urg Med* **4**: 25-30, 2002a.

KŘÍŽOVÁ P: Mikrobiální a hostitelské faktory vývoje invazivního meningokokového onemocnění. *Závěrečná zpráva o řešení grantového projektu GAČR 310/96/K102,* 2002b.

KŘÍŽOVÁ P, KALMUSOVÁ J, MUSÍLEK M: Invazivní meningokokové onemocnění v České republice v roce 2000. *Zprávy CEM* (SZÚ, Praha) **10**: 112-116, 2001a.

KŘÍŽOVÁ P, KALMUSOVÁ J, FELSBERG J, PAVLÍKOVÁ V, MUSÍLEK M: První výsledky MLST provedené v České republice na kmenech *Neisseria meningitidis*. *Zprávy CEM* (SZÚ, Praha) **10**: 68-69, 2001b.

KŘÍŽOVÁ P, KALMUSOVÁ J, MUSÍLEK M: Invazivní meningokokové onemocnění v České republice v roce 2003. *Zpravy CEM* **13**: 78-84, 2003.

KŘÍŽOVÁ P, KALMUSOVÁ J, MUSÍLEK M: Invazivní meningokokové onemocnění v České republice v roce 2004. *Zprávy CEM* (SZÚ, Praha) **14**: 129-139, 2005.

KŘÍŽOVÁ P, KŘÍŽ B: Faktory ovlivňující vznik a vývoj invazivního meningokokového onemocnění a vznik nosičství *Neisseria meningitidis* – výsledky celorepublikové prospektivní dotazníkové studie případů a kontrol. *Epidemiol Microbiol Imunol* **48**: 140-152, 1999.

KŘÍŽOVÁ P, MUSÍLEK M, KALMUSOVÁ J: Invazivní meningokokové onemocnění v České republice v roce 1999. *Zprávy CEM* (SZÚ, Praha) **9**: 125-128, 2000.

KŘÍŽOVÁ P, MUSÍLEK M, LEBEDOVÁ V: Nová epidemiologická situace v České republice způsobená meningokokem C:2a:P1.2 (P1.5). *Epidemiol Mikrobiol Imunol* **43**: 183-187, 1994.

LAPEYSSONNIE L: La méningite cérébro-spinale en Afrique. *Bull WHO* **28**: 1-114, 1963.

LIVAK KJ, FLOOD SJ, MARMARO J, GIUSTI W AND DEETZ K: Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridisation. *PCR Methods Appl* **4:** 357-362, 1995.

MALÝ J,PECKA M, PIDRMAN V, BLAHA M, SIROKY O, JEBAVY L: Diagnostika a léčba DIC. *Čas Lék Česk* **133**: 719-722, 1994

MUSÍLEK M, KŘÍŽOVÁ P: Hypervirulentní klonální uskupení *Neisseria meningitidis* v České republice v roce 2002. *Zprávy CEM* (SZÚ, Praha) **12**: 126-128, 2003.

MUSÍLEK M, KŘÍŽOVÁ P: Změny v zastoupení hypervirulentních klonálních uskupení *Neisseria meningitidis* v České republice v období 1993-2001. *Zprávy CEM* (SZÚ, Praha) **11**: 75-80, 2002.

ORVELID P, BACKMAN A, OLCEN P: PCR identificaton of the group A *Neisseria meningitidis* in cerebrospinal fluid. *Scand J Infect Dis* **31**: 481-483, 1999.

OSIČKA R, KALMUSOVÁ J, KRIŽOVA P, ŠEBO P: *Neisseria meningitidis* RTX protein FrpC Induces High Levels of Serum Antibodies during Invasive Disease: Polymorphism of *frpC* Alleles and purification of recombinant FrpC. *Infect Immun* **69**: 5509-5519, 2001.

OSIČKA R, PROCHÁZKOVÁ K, ŠULC M, LINHARTOVÁ I, HAVLÍČEK V, ŠEBO P: A novel "clip-and-link" activity of repeat in toxin (RTX) proteins from gram-negative pathogens. Covalent protein cross-linking by an Asp-Lys isopeptide bond upon calcium-dependent processing at an Asp-Pro bond. *J Biol Chem* **279**: 24944-24956, 2004.

PERKINS MD, MIRRETT S, RELLER LB: Rapid bacterial antigen detection is not clinically useful. *J Clin Microbiol* **33**: 1486-1491, 1995.

PORRITT RJ, MERCER JL, MURO R: Ultrasound-enhanced latex immunoagglutination test (USELAT) for detection of capsular polysaccharide antigen of *Neisseria meningitidis* from CSF and plasma. *Pathology* **35**: 61-64, 2003.

RÅDSTRÖM P, BÄCKMAN A, QIAN N, KRAGSBJERG P, PAHLSON C, OLCÉN P: Detection of bacterial DNA in cerebrospinal fluid by an assay for simultaneous detection of *Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae* and streptococci using a seminested PCR strategy. *J Clin Microbiol* **32**: 2738-2744, 1994.

RAGUNATHAN L, RAMSAY M, BORROW R, GUIVER R, GRAY S, KACZMARSKI E B: Clinical features, laboratory findings and management of meningococcal meningitis in England and Wales: Report of a 1997 survey. Meningococcal meningitis: 1997 survey report. *J Infect* **40**: 74-79, 2000.

RAMSAY ME, ANDREWS N, KACZMARSKI EB, MILLER E: Efficacy of meningococcal serogroup C conjugate vaccine in teenagers and toddlers in England. *Lancet* **357**: 195-196, 2001.

ROŽNOVSKÝ L. GUTVIRTH J, BENEŠ J, DOSTÁL V, KASAL E, HOBSTOVÁ J, KUMPEL P, KŘÍŽOVÁ P, TICHÁČEK M, PLÍŠEK S, ŠTRUNCOVÁ V: Standard efektivní klinické péče v přednemocniční neodkladné péči (PNP): Invazivní meningokoková onemocnění. *Urg Med* **3**: 18-20, 2002a.

ROŽNOVSKÝ L. GUTVIRTH J, BENEŠ J, DOSTÁL V, KASAL E, HOBSTOVÁ J, KUMPEL P, KŘÍŽOVÁ P, TICHÁČEK M, PLÍŠEK S, ŠTRUNCOVÁ V: Návrh Standardu efektivní klinické péče v přednemocniční neodkladné péči (PNP): Invazivní meningokoková onemocnění. *Klin Mikrobiol Infekc Lek* **8**: 57-59, 2002b.

ROZNOVSKY L, KRIZ P, STRUNCOVA V, DOSTAL V, PLISEK S, KASAL E, BURGET I, CHALUPA P, DLOUHY P: Administration of antibiotics before admission in patients with meningococcal disease. *Cent Eur J Public Health* **11**: 14-18, 2003.

ROŽNOVSKÝ L, PLÍŠEK S, DOSTÁL V: Kde se nacházíme v diagnostice a léčbě meningokokových onemocnění? *Klin Mikrobiol Infekc Lek* **7**: 90-96, 2001.

ROZNOVSKY L, STRUNCOVA V, DOSTAL V, PLISEK S, BURGET I, SVEJDA J, KRIZ P: Anamnestic data and prognostic scores in 109 patients with meningococcal disease. In: Abstracts of the 10th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Stockholm, Sweden, May 28-31, 2000. *Clin Microbiol Infect, Supplementum* **6**: 231-232, 2000.

SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T: Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold spring Harbor Laboratory. N.Y.: Cold spring Harbor, 1989.

SOBANSKI MA, BARNES RA, GRAY SJ, CARR AD, KACZMARSKI EB, O´ROUKE A, MURPHY K, CAFFERKEY M, ELLIS RW, PIDCOCK K, HAWTIN P, COAKLEY WT: Measurement of serum antigen concentration by ultrasound-enhanced immunoassay and

correlation with clinical outcome in meningococcal disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **19**: 260-266, 2000.

SOBANSKI MA, GRAY SJ, CAFFERKEY M, ELLIS RW, BARNES RA, COAKLEY WT: Meningitis antigen detection: interpretation of agglutination by ultrasound-enhanced latex immunoassay. *Br J Biomed Sci* **56**: 239-246, 1999.

STRANG JR, PUGH EJ: Meningococcal infections: reducing the case fatality rate by giving penicillin before admission to the hospital. *BMJ* **305**: 141-143, 1992.

ŠTRUNCOVÁ V, KASAL E, SEDLÁČEK D, TÁBORSKÁ J, ŠUBRT I, MATOUŠKOVÁ D, BÁRTA R, PAZDIORA P, VALCHOVÁ M, KŘÍŽOVÁ P: Následky invazivních meningokokových onemocnění v souvislosti s výskytem invazivního klonu *Neisseria meningitidis* ET-15/37. *Praktický lékař* **79**: 310-314, 1999.

TAHA MK: Simultaneous approach for non-culture PCR based identification and serogroup prediction of *Neisseria meningitidis*. *J Clin Microbiol* **38**: 855-857, 2000a.

TAHA MK, ACHTMAN M, ALONSO JM, GREENWOOD B, RAMSAY M, FOX A, GRAY S, KACZMARSKI E: Serogroup W135 meningococcal disease in Hajj pilgrims. *Lancet* **356**: 23-30, 2000b.

TAHA MK, ALONSO JM, CAFFERKEY M, CAUGANT DA, CLARKE SC, DIGGLE MA, FOX A, FROSCH M, GRAY SJ, GUIVER M, HEUBERGER S, KALMUSOVA J, KESANOPOULOS K, KLEM AM, KRIZ P, MARSH J, MOLLING P, MURPHY K, OLCEN P, SANOU O, TZANAKAKI G, VOGEL U: Interlaboratory comparison of PCR-based identification and genogrouping of *Neisseria meningitidis*. *J Clin Microbiol* **43**: 144-9, 2005.

TUNKEL AR, SCHELD WM: Acute meningitis, pp. 1083-1125 in G.L. Mandell, J.E. Bennett, R. Dolin (Eds): *Principles and practice of infectious diseases,* 6th ed. Elsevier, Churchill Livingstone, Philadelphia 2005.

URBASKOVA P, KRIZ P: Longterm monitoring of meningococcal susceptibility to anttbiotics in the Czech Republic (1981-1999). In: Abstracts of the 12th International Pathogenic Neisseria Conference, Galvestone, Texas, USA, November 12-17, **246**: p 77, 2000.

URBÁŠKOVÁ P, KŘÍŽOVÁ P: Dlouhodobé sledování citlivosti *Neisseria meningitidis* k penicilinu a dalším antibiotikům v České republice (1981-1999). *Klin Mikrobiol Infekc Lek* **9-10**: 298-304, 1999.

VAN DEUREN M, BRANDTZAEG P: Parents´and GPs´ key role in diagnosis of meningococcal septicaemia. *Lancet* **356**: 954-955, 2000.

Věstník MZ ČR: Metodický návod k epidemiologickým opatřením v ohnisku invazivního meningokokového onemocnění. 8, 25.2. 1994.

WEINBERG GA, STORCH GA: Preparation of urine samples for use in commercial latex agglutination tests for bacterial antigen. *J Clin Microbiol* **21**: 899-901, 1985.

ZAMBARDI G, DRUETTA A, ROURE C, ZAMBARDI G,DRUETTA A, ROURE C, FOUQUE B, GIRARDO P, CHYPRE C, MARCHAND J, FRENEY J, FLEURETTE J: Rapid diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infections by an ELISA-like detection of polymerase chain reaction products. *Mol Cell Probes* **9**: 91-99, 1995.

9. SEZNAM VLASTNÍCH PUBLIKACÍ

9.1. Publikace týkající se tématu

Články

1. KALMUSOVÁ J., **BRONSKÁ E.**, KŘÍŽOVÁ P.: Diagnostika invazivního meningokokového, hemofilového a pneumokokového onemocnění metodou PCR. *Klin Mikrobiol Infekc Lek* **10**: 130-133, 2004, ISSN 1211-264X.

2. **BRONSKA E.**, DZUPOVA O., KRIZOVA P., KALMUSOVA J., MARESOVA V.: Invasive meningococcal disease and latex agglutination test – is still beneficial for diagnosis? *Folia Microbiol (Praha)*, **50**: 453-456, 2005, ISSN 0015-5632, **IF=0,918.**

3. **BRONSKA E.**, KALMUSOVA J., DZUPOVA O., MARESOVA V., KRIZ P., BENES J.: Dynamics of PCR-based diagnosis in patients with invasive meningococcal disease. *Clin Microbiol Infect* **12**: 137-141, 2006, ISSN 1198-743X, **IF= 2,679**.

Oponovaná abstrakta v časopisech s definovaným impakt faktorem

1. **JINDRICHOVA E.**, MARESOVA V., KRIZOVA P., KALMUSOVA J., DZUPOVA O: Dynamics of PCR pozitivity in patients with invasive meningococcal disease. *Clin Microbio Infect* **9**(Suppl.1): 103, 2003, ISSN 1198-743X, **IF= 2,679**.

2. **BRONSKA E.**, MARESOVA V., KRIZOVA P., KALMUSOVA J., DZUPOVA O.: Correlation of latex agglutination and PCR method in patients with invasive meningococcal disease. *Clin Microbiol Infect* **10**(Suppl.3): 524, 2004, ISSN 1198-743X, **IF= 2,679**.

3. **BRONSKA E.**, DZUPOVA O., MARESOVA V., SOLTYSOVA K.: Invasive meningococcal disease in children in 1999-2003. *Clin Microbiol Infect* **11**(Suppl.2): 548, 2005, ISSN: 1198-743X, **IF= 2,679**.

Postery

1. **JINDŘICHOVÁ E.**, MAREŠOVÁ V., KŘÍŽOVÁ P., KALMUSOVÁ J., DŽUPOVÁ O.: Diagnostika invazivního meningokokového onemocnění metodou PCR a dynamika detekce meningokokové DNA. VII. Pracovní setkání mladých biochemiků a molekulárních biologů. Brno, ČR, 29. leden, 2003. Sborník abstrakt, ISSN 80-210-3053-4.

2. **JINDŘICHOVÁ E.**, MAREŠOVÁ V., KŘÍŽOVÁ P., KALMUSOVÁ J., DŽUPOVÁ O.: Dynamika PCR pozitivity u pacientů s invazivním meningokokovým onemocněním – první výsledky. Studentská vědecká konference 2. LF UK, Praha, ČR, 25. duben, 2003. Sborník abstrakt.

3. **JINDRICHOVA E.**, MARESOVA V., KRIZOVA P., KALMUSOVA J., DZUPOVA O: Dynamics of PCR pozitivity in patients with invasive meningococcal disease. 13th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Glasgow, UK, 10.-13. květen 2003. Publikováno v *Clin Microbio Infect* **9**(Suppl.1): 103, 2003, ISSN1198-743X, **IF=2,679**.

4. **BRONSKA E.**, MARESOVA V., KRIZOVA P., KALMUSOVA J., DZUPOVA O.: Correlation of latex agglutination and PCR method in patients with invasive meningococcal disease. 14th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Praha, 1.-4.květen 2004. Publikováno v *Clin Microbiol Infect* **10**(Suppl.3): 524, 2004, ISSN 1198-743X, **IF= 2,679**.

5. **BRONSKÁ E.**, MAREŠOVÁ V., KŘÍŽOVÁ P, KALMUSOVÁ J., DŽUPOVÁ O: Současné možnosti diagnostiky invazivního meningokokového onemocnění. FONS, Pardubice, 19.- 21. září , 2004. Sborník abstrakt, ISBN 80-903167-3-5.

6. **BRONSKA E.**, DZUPOVA O., MARESOVA V., SOLTYSOVA K.: Invasive meningococcal disease in children in 1999-2003. 15th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Kodaň, Dánsko, 2.-5. dubna 2005. Publikováno v *Clin Microbiol Infect* **11**(Suppl.2): 548, 2005, ISSN 1198-743X, **IF= 2,679**.

7. **BRONSKA E.**, DZUPOVA O., MARESOVA V., SOLTYSOVA K .: Retrospective analysis of invasive meningococcal diseases in children (1999-2003). - 14th Meeting of Paediatric Research of Central European Countries, Praha, ČR, 17.červen 2005. Sborník abstrakt.

Přednášky

1. **JINDŘICHOVÁ E.**, MAREŠOVÁ V., KALMUSOVÁ J., KŘÍŽOVÁ P.: PCR v diagnostice a epidemiologii invazivního meningokokového onemocnění. – Studentská vědecká konference 2. LF UK, Praha, ČR, 19.duben, 2002. Sborník abstrakt.

2. **BRONSKÁ E.**, MAREŠOVÁ V., KŘÍŽOVÁ P., KALMUSOVÁ J., DŽUPOVÁ O: Dynamika latexové aglutinace a PCR vyšetření u pacientů s invazivním meningokokovým onemocněním. Studentská vědecká konference 2. LF UK, Praha, ČR, 30.duben, 2004. Sborník abstrakt.

3. **BRONSKÁ E.**, MAREŠOVÁ V., DŽUPOVÁ O., ŠOLTYSOVÁ K.: Invazivní meningokoková onemocnění u dětí ve FN Bulovka v letech 1999 – 2003. VI. český pediatrický kongres s mezinárodní účastí, Ostrava, ČR, 8.-11. září, 2004. Sborník abstrakt, ISBN 80-239-3292-6.

4. **BRONSKÁ E.**, DŽUPOVÁ O.: Meningokokové invazivní onemocnění. 4. Chebská neurologická konference, Františkovy lázně, ČR, 19.- 20. listopad, 2004.

5. **BRONSKÁ E.**, DŽUPOVÁ O., KALMUSOVÁ J., MAREŠOVÁ V., KŘÍŽOVÁ P.: Invazivní meningokokové onemocnění – vztah PCR diagnostiky a klinického průběhu onemocnění. Studentská vědecká konference 2. LF UK, Praha, ČR, 28.duben, 2005. Sborník abstrakt.

9.2. Publikace ostatní

Články:

1. VANIŠTA J., **JINDŘICHOVÁ E.**: Leptospirózy. *Lékařské listy, ZDN* **51**: 18-19, 2002, ISSN 0044-1996.

2. VANIŠTA J., **JINDŘICHOVÁ E.**: Leptospirózy. *Causa Subita*, **5**: 337-338, 2002, ISSN 1212-0197.

3. MARESOVA V., MALY M., KYNCL J., **BRONSKA E.**, BENES C.: Varicella and its complications: a five–year retrospective analysis of hospitalized patients. *Antibiotiques* **8**: 131-135, 2006.

4. BRONSKY J., KARPISEK M., **BRONSKA E.**, PECHOVA M., JANCIKOVA B., KOTOLOVA H., STEJSKAL D., PRUSA R., NEVORAL J.: Adiponectin, adipocyte fatty acid binding protein (AFABP), and epidermal fatty acid binding protein (EFABP) – proteins newly identified in human breast milk. *Clin Chem* **52**: 1763-1770, 2006, ISSN 0009-9147, **IF=7,717**.

Oponovaná abstrakta v časopisech s definovaným impakt faktorem

1. MARESOVA V., MALY M., KYNCL J., BRONSKA E., BARTOSOVA D., KOSTRICOVA E., DOSTAL V., CHALUPA P., CHMELIK P., CHMELIK V., TABORSKA J., DLOUHY P., SEDIVY K.: Varicella and its complications: a five-year-long retrospective analysis of hospitalized patients. *Clin Microbiol Infect* **10**(Suppl.3): 669, 2004, ISSN 1198-743X, **IF= 2,679**.

2. SOLTYSOVA K., **BRONSKA E.**, PICHA D., MARESOVA V.: Herpes simplex virus – causative agent, or innocent bystander? *Clin Microbiol Infect* **11**(Suppl.2): 502, 2004, ISSN:1198-743X, **IF= 2,679**.

3. MARESOVA V., MALY M., KYNCL J., **BRONSKA E.**: Varicella and its complications: a five-year-long retrospective analysis of hospitalized patients. *International Journal of Antimicrobial Agents* **24**(S2): 277-278, 2004, ISSN 0924-8579, **IF 2,428**.

4. BRONSKY J., KARPISEK M., **BRONSKA E.**, PECHOVA M., JANCIKOVA B., KOTOLOVA H., PRUSA R., NEVORAL J**:** Identification of three new proteins in human breast milk. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **42**: E100, 2006, ISSN 0277-2116, **IF=2,077**.

Postery:

1. MARESOVA V., MALY M., KYNCL J., **BRONSKA E.**, BARTOSOVA D., KOSTRICOVA E., DOSTAL V., CHALUPA P., CHMELIK P., CHMELIK V., TABORSKA J., DLOUHY P., SEDIVY K.: Varicella and its complications: a five-year-long retrospective analysis of hospitalized patients. 14th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Praha, ČR, 1.- 4. květen, 2004. Publikováno v *Clin Microbiol Infect* **10**(Suppl.3): 669, 2004, ISSN 1198-743X, **IF= 2,679**.

2. SOLTYSOVA K., **BRONSKA E.**, PICHA D., MARESOVA V.: Herpes simplex virus – causative agent, or innocent bystander? 15th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Kodaň, Dánsko, 2.-5. dubna 2005, publikováno v *Clin Microbiol Infect* **11**(Suppl.2): 502, 2004, ISSN:1198-743X, **IF= 2,679**.

3. **BRONSKA E.**, MALY M., KYNCL J., SKOVRANKOVA J., MARESOVA V.: Varicella and its complications in children in 1997-2004. 4th World Congress of the World Society for Pediatric Infectious Diseases – WSPID, Varšava, Polsko, 1.-4. září, 2005, Sborník abstrakt.

4. BRONSKY J., KARPISEK M., **BRONSKA E.**, PECHOVA M., JANCIKOVA B., KOTOLOVA H., PRUSA R., NEVORAL J.: Identification of three new proteins in human breast milk. 38th Annual Meeting of ESPGHAN, Drážďany, Německo, červen 2006, publikováno v *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **42**: E100, 2006, ISSN 0277-2116, **IF=2,077**.

5. BALOUN R., **BRONSKA E.**, BENES J., SMISKOVA D., BAZALOVA Z.: Antibiotic prescription in primary care in the Czech Republic. V recenzním řízení na 17th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Mnichov, 2006.

Přednášky:

1. MAREŠOVÁ V., **JINDŘICHOVÁ E.**, ROHÁČOVÁ H., ROZSYPAL H., VANIŠTA V.: Komplikace varicely na infekční klinice FNB Praha. VII. Slovensko - Český kongres o infekčních nemocech, Tále, Slovensko, 11. září, 2002.

2. MARESOVA V., **JINDRICHOVA E.**, ROHACOVA H., ROZSYPAL H., VANISTA V.: Varicella in the Czech Republic: Retrospective analysis of complications in 1997 – 2001. 7th meeting of European Working Group on Varicella EuroVar, Varšava, Polsko, 9. listopad, 2002

3. MARESOVA V., MALY M., KYNCL J., **BRONSKA E.**: Varicella and its complications: a five-year-long retrospective analysis of hospitalized patients. 6th European Congress of Chemotherapy and Infection, prosinec 2004, Paříž, Francie. Publikováno v *International Journal of Antimicrobial Agents* **24**(S2): 77-278, 2004, ISSN 0924-8579, **IF 2,428.**

4. SOLTYSOVA K, SOJKOVA N., **BRONSKA E.**, BLECHOVA Z., MARESOVA V.: Broken seasonality – winter outbreak of enteroviral meningoencephalitis in children. 4th World Congress of the World Society for Pediatric Infectious Diseases – WSPID, Varšava, Polsko, 1.-4. září, 2005. Sborník abstrakt.

5. BRONSKÝ J., KARPÍŠEK M., **BRONSKÁ E.**, PECHOVÁ M., JANČÍKOVÁ B., KOTOLOVÁ H., PRŮŠA R., NEVORAL J.: Identifikace tří nových proteinů v mateřském mléce. Český pediatrický kongres, Praha,ČR, 2006. Publikováno v *Česko – slovenská pediatrie* **5**: 254, 2006, ISSN 0069-2328.

6. BRONSKÝ, J., KARPÍŠEK M., **BRONSKÁ E.**, PECHOVÁ M., JANČÍKOVÁ B., KOTOLOVÁ H., NEVORAL J., PRŮŠA R.: Adiponektin, AFABP, EFABP – nové nutriční hormony mateřského mléka. FONS, Pardubice, 2006. Sborník abstrakt, ISBN 80-903167-3-5.