

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zdravotně sociální fakulta

**Porovnání metod stanovení *Neisseria meningitidis* v
Nemocnici ČB a.s.**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autorka: Lucie Lukšová

Vedoucí práce: doc. dr. Ing. Alexandr Popkov, CChem, MRSC, Ph.D.

Konzultanti: Mgr. Olga Jedličková; Ing. Natalja Piskunová, CSc.

2. 5. 2012

Abstrakt

Porovnání metod stanovení *Neisseria meningitidis* v Nemocnici ČB a.s.

Molekulárně biologické metody mají velký význam pro běžnou diagnostiku infekčních onemocnění. V této práci byly porovnávány dvě molekulárně biologické metody pro diagnostiku *Neisseria meningitidis* v Nemocnici ČB a.s.. Nemocnice ČB a.s. je městská nemocnice ve vlastnictví Jihočeského kraje. Při stanovení hypotézy jsem vycházela z předpokladu, že real-time polymerázová řetězová reakce je rychlejší než nested polymerázová řetězová reakce. Obě tyto metody jsou používány v centrálních laboratořích nemocnice a obě se používají pro diagnostiku *Neisseria meningitidis*. Během experimentu jsem zjistila, že se v Nemocnici ČB a.s. používá i jiná diagnostická metoda vhodná pro diagnostiku tohoto patogenu - latexová aglutinace. Latexová aglutinace je imunologická reakce, která detekuje antigeny *Neisseria meningitidis* pomocí protilátek. I přesto že je tato metoda rychlejší než molekulárně biologické metody, vykazuje vyšší procento falešně negativních výsledků. Tyto falešně negativní výsledky jsou způsobeny například degradací *Neisseria meningitidis* ve vzorku. Vzhledem k tomu, že je latexová aglutinace oproti molekulárně biologickým metodám méně spolehlivá, porovnávala jsem pouze jednotlivé metody polymerázové řetězové reakce. Polymerázové řetězové reakce jsou založeny na průkazu bakteriální DNA, latexová aglutinace je založena na imunologické reakci. U jednotlivých metod polymerázové řetězové reakce jsem porovnávala čas potřebný pro průkaz *Neisseria meningitidis*. Experimentem jsem potvrdila, že real-time polymerázová řetězová reakce je rychlejší než nested polymerázová řetězová reakce (3 h 40 min oproti 7 h 30 min). Další výhodou real-time polymerázové řetězové reakce je její vyšší citlivost, real-time polymerázová řetězová reakce byla o jeden řád citlivější než nested polymerázová řetězová reakce.

Abstract

Comparison of methods for determination of *Neisseria meningitides* in Nemocnice ČB a.s.

Molecular biology methods are of great importance for routine diagnostics of infectious diseases. In this work two such methods were compared for the case of diagnostics of *Neisseria meningitides* in Nemocnice ČB a.s. Nemocnice ČB a.s. is a municipal hospital owned by South Bohemia Region. I hypothesised that real-time polymerase chain reaction provides lower analysis time compared to nested polymerase chain reaction. These two methods are routinely used in Central Laboratories of the hospital and it is feasible to use both of them for the diagnostics of *Neisseria meningitides*. During the investigation I have found another method useful for the diagnostics of this pathogen. Latex agglutination test is an immunological reaction used to detect antibodies which appear as an immune response to infection. In spite of very quick output, the immunological origin of the latex agglutination test brings serious limitations: any suppression of the immune response or degradation of the antibodies leads to false negative results of the test. Lower reliability of the latex agglutination test compared to various polymerase chain reactions based on the detection of bacterial DNA strengthen my devotion to compare the two methodologies of reliable polymerase chain reaction and led to a decision not to include the latex agglutination test into the original research plane. In good agreement with the original expectation, practical evaluation of tests based on real-time polymerase chain reaction and on nested polymerase chain reaction displayed significant differences in the analysis time (3 h 40 min versus 7 h 30 min respectively). Another advantage of the test based on real-time polymerase chain reaction is its higher sensitivity of one order of magnitude more than in the test based on nested polymerase chain.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma **Porovnání metod stanovení *Neisseria meningitidis* v Nemocnici a.s.** vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to – v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 14. 4. 2012

.....

Lucie Lukšová

Touto cestou bych chtěla poděkovat vedoucímu práce doc. dr. Ing. Alexandru Popkovu, CChem, MRSC, Ph.D. za pomoc při psaní této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat za cenné odborné rady Mgr. Pavlu Trubačovi a konzultantům Ing. Natalji Piskunové, CSc a Mgr. Olze Dvořáčkové.

OBSAH

1 SOUČASNÝ STAV	10
1.1 MENINGITIDY	10
1.1.1 Purulentní meningitidy	10
1.1.2 Nepurulentní meningitidy	13
1.2 ROD NEISSERIA	14
1.3 NEISSERIA MENINGITIDIS	15
1.3.1 Cesta přenosu	16
1.3.2 Výskyt	16
1.3.3 Klinická charakteristika	17
1.3.4 Hlášení onemocnění	19
1.4 DIAGNOSTIKA	20
1.4.1 Biologický materiál	21
1.4.2 Mikroskopické metody	22
1.4.3 Kultivační vyšetření	22
1.4.4 Biochemické metody	24
1.4.5 Imunochemická vyšetření	25
1.4.6 Molekulárně biologická vyšetření	27
1.5 LÉČBA	33
1.6 OČKOVÁNÍ	34
1.6.1 Druhy očkovacích vakcín	34
1.6.2 Podmínky očkování	35
1.6.3 Nežádoucí účinky očkování	36
1.6.4 Druhy očkování	36
2 CÍL PRÁCE A HYPOTÉZY	38
2.1 CÍL PRÁCE	38
2.2 HYPOTÉZY	38
3 METODIKA	39
3.1 IZOLACE BAKTERIÁLNÍ DNA	40
3.2 PCR MASTER MIX	41
3.2.1 Nested PCR	41
3.2.2 Real-time PCR	42
3.3 PCR	43
3.3.1 Real-time PCR	43
3.3.2 Nested PCR	44
3.4 ELEKTROFORÉZA	44
4 VÝSLEDKY	47
4.1 NESTED PCR	47
4.1.1 Potřebný čas	47
4.1.2 Citlivost metody	47
4.2 REAL-TIME PCR	48

4.2.1 Potřebný čas.....	49
4.2.2 Citlivost metody.....	49
5 DISKUZE	50
6 ZÁVĚR	52
7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	54
8 KLÍČOVÁ SLOVA.....	58
9 PŘÍLOHY	59
9.1 SEZNAM PŘÍLOH.....	59

ÚVOD

K výběru tématu bakalářské práce s názvem „Porovnání metod stanovení *Neisseria meningitidis* v Nemocnici ČB a.s.“ mě vedla závažnost meningitidy a sepse způsobených *Neisseria meningitidis*. Vzhledem k tomu, že meningokoková meningitida a sepse jsou velmi závažná, rychle progradující onemocnění je nutné rychlé určení původce nákazy a zahájení včasné a účinné léčby.

I přesto, že výskyt meningokokové meningitidy a sepse klesl na necelých 100 případů ročně v České republice, zůstává pořád hrozbou a v některých případech smrtelným onemocněním. Meningokoková meningitida má velmi krátkou inkubační dobu a nástup prvních příznaků je rychlý. Mezi první příznaky patří vysoké horečky, bolesti hlavy, petechie na kůži, nauzea, světloplachost aj.. Při tomto onemocnění je důležité vyhledat lékařskou pomoc, pokud možno neodkladně s nástupem prvních příznaků, aby nedošlo ke komplikacím onemocnění, jako Waterhouse-Friderichsenův syndrom a sepse, nebo ke smrti. Smrtnost u meningokokové meningitidy je 2 %, při komplikacích může dosahovat až 100 %.

Cílem této bakalářské práce je porovnání různých metod PCR používaných v laboratořích molekulární biologie a genetiky v Nemocnici ČB a.s. pro stanovení *Neisseria meningitidis*. Tato bakalářská práce porovnává čas potřebný pro stanovení *Neisseria meningitidis* a citlivost jednotlivých metod PCR.

Při experimentu bylo zjištěno, že v Nemocnici ČB a.s. je používaná další diagnostická metoda – latexová aglutinace. Tato metoda se používá v bakteriologických laboratořích. Přesto, že je tato metoda rychlejší než všechny varianty PCR dostupné v Nemocnici ČB, poskytuje vyšší procento falešně negativních výsledků ve srovnání s PCR. Z praktického hlediska je stále důležité srovnání jednotlivých metod PCR pro vyloučení falešně negativních výsledků.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

CNS	centrální nervový systém
Ct	cycle thresholds (cyklus ve kterém je detekovatelná fluorescence)
DIC	disseminated intravascular coagulation (diseminovaná intravaskulární koagulopatie mikrotrombů kapilár)
DNA	deoxyribonucleid acid (deoxyribonukleová kyselina)
FRET	fluorescence resonance energy transfer (fluorescenčně rezonanční přenos energie)
IMO	invazivní meningokokové onemocnění
MBC	minimální baktericidní koncentrace
MIC	minimální inhibiční koncentrace
PCR	polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)
RNA	ribonucleic acid (ribonukleová kyselina)
Threshold	empiricky nastavený práh nad kterým je detekovatelná fluorescence

1 SOUČASNÝ STAV

1.1 Meningitidy

Meningitidy jsou závažná onemocnění, která postihují obaly mozku. Proti řadě původců způsobujících meningitidy je možné očkování (28). Meningitidy rozdělujeme na purulentní nebo-li zánětlivé a nepurulentní (nezánětlivé) (2).

1.1.1 Purulentní meningitidy

Purulentní meningitidy jsou velmi vážná onemocnění centrálního nervového systému (CNS) (28). Úmrtnost u purulentních meningitid se pohybuje mezi 5-10 %, u novorozenců dosahuje až 50 %. Díky sulfonamidům a antibiotikám zavedeným v 30.-50. letech 20.století do léčebné praxe radikálně klesla smrtelnost na tyto meningitidy. U 10-20 % vyléčených osob přetrvávají neurologické následky po prodělání nemoci (11, 28). Typické příznaky se u bakteriálních meningitid nejčastěji objevují v rozmezí 24-36 hodin od nákazy. Bakteriální spektrum purulentních meningitid je pestré, nejčastěji jsou meningitidy způsobeny bakteriemi *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* (2).

Purulentní meningitida je difúzní postižení mozkových obalů a stejně jako většina ostatních neuroinfekcí má velmi dramatický průběh. Často dochází k rozvoji onemocnění v rádech hodin, případně několika málo dní (2).

Bakterie postihují meningy nepřímo nebo přímo. Nepřímé postižení meningů je hematogenně, obvykle ze vzdáleného ložiska zánětu (pneumonie, endokarditida...). Přímo mohou bakterie postihnout meningy ze zánětu v okolí (otitida, hnisavé afekce v oblasti hlavy), nebo traumatem s porušením tvrdé pleny mozkové (nejčastěji při fraktuře base lebni) (2, 31).

Pacienti jsou při purulentních meningitidách světloupláší, bolí je hlava, rychle se u nich zvyšuje teplota a objevují se u nich meningeální příznaky. U cca 90 % nemocných se objevuje porucha vědomí (2). Mezi typické meningeální příznaky u purulentních meningitid patří reflexní svalové spasmy (ztuhnutí šíje omezující předklon

hlavy, v dalších stádiích způsobující záklon hlavy - opistotonus a stažení zádočných svalů), celková přecitlivělost (zvýšené vnímání bolesti, světloplachost), vysoké horečky, bolesti hlavy a zvracení, které je způsobeno drážděním nervových kořenů a zvýšením nitrolebního tlaku (2, 31).

V některých případech se rozvine systémová zánětlivá odpověď, která vede k rozvoji těžkého polyorgánového selhání způsobeného endotoxinem. Vysoká hladina endotoxinu způsobuje rozvoj fulminantních sepsí. Aktivací řady zánětlivých mediátorů včetně cytokinů, pomáhajících zastavit zánět, se poškodí orgány. Zároveň je také aktivována koagulační kaskáda, která vede k diseminované intravaskulární koagulopatii (DIC) (29).

Při lumbální punkci bývá likvor bílé někdy až zelenavé barvy s velkým množstvím leukocytů. Zánětlivý likvor vytéká sám pod tlakem (29).

Streptokokové (pneumokokové) purulentní meningitidy

Streptokokové purulentní meningitidy způsobuje grampozitivní opouzdřená bakterie *Streptococcus pneumoniae*. Velikost se pohybuje v rozmezí 0,5-1,25 μm , koky se ve sputu často vyskytují jednotlivě, případně v krátkých řetízích. Složení pouzdra je hlavním faktorem virulence (37). Podle pouzdrného antigenu rozlišujeme cca 90 sérotypů. Mezi invazivní sérotypy patří sérotyp 6, 14, 18, 19 a 23, které způsobují více než 80 % onemocnění způsobených *Streptococcus pneumoniae*. Nejohroženější skupinou jsou děti od 6 měsíců do 4 let a osoby starší 60 let (33). Cca 10 % zdravé populace je nosičem *Streptococcus pneumoniae*, u těchto lidí se *Streptococcus pneumoniae* nalézá v nosohltanu. Nejčastějším onemocněním způsobeným *Streptococcus pneumoniae* je pneumokoková pneumonie, která se objevuje po snížení obranyschopnosti respiračního traktu. Pokud se u pneumonie rozvine bakteriémie, dosahuje její letalita až 25 %. *Streptococcus pneumoniae* také způsobuje purulentní meningitidy. Nejčastější příčinou pneumokokové meningitidy je úraz hlavy, případně rozšíření bakterie do mozkových blan z otitidy (37). Pneumokoková meningitida má nepříznivou prognózu s mortalitou pohybující se mezi 20-30 % (2). Proti pneumokoku

je možné se nechat očkovat (37). *Streptococcus pneumoniae* je citlivý na peniciliny, při rezistenci na peniciliny se léčí makrolidy (33).

Stafylokokové purulentní meningitidy

Stafylokokové purulentní meningitidy se mohou objevit po úrazech spojených s porušením ochranné bariéry nervového systému, při implantaci cizího tělesa, operativních zákrocích, invazivních vstupech s ponecháním katétru (28). Meningitida byla popsána u *Staphylococcus hominis ssp. novobiosepticus*, který mimo jiné způsobuje i septikémie, katérové sepse a infekty ran. V letech 1995-2002 bylo v 224 případech potvrzeno Národní referenční laboratoří pro stafylokoky onemocnění způsobené *Staphylococcus hominis ssp. novobiosepticus* (37).

Hemofilová meningitida

Hemofilová meningitida je způsobena nejčastěji bakterií *Haemophilus influenzae typ b* (ostatní typy jsou vzácné). Jedná se o drobné nepohyblivé, fakultativně anaerobní, opouzdřené, gramnegativní tyčinky o průměru do 1 µm, které netvoří spóry. Roste jako většina druhů rodu *Haemophilus* při teplotě kolem 37°C, navíc potřebuje zvýšenou koncentraci CO₂, dále potřebuje půdy obohacené o růstové faktory (X-hemin, NAD, NADP) (37). Hemofilová meningitida se přenáší kapénkami (2). Díky polyribosylribitolfosfátovému (polysacharid) pouzdru je *Haemophilus influenzae typ b* nejvirulentnějším typem z kmenu *Haemophilus influenzae* a způsobuje těžká invazivní onemocnění u dětí. V dýchacích cestách nejčastěji způsobuje lehké faryngitidy, sinusitidy až těžké pneumonie, epiglotitidy, dále způsobuje perikarditidy a meningitidy. U dětí do dvou let je nejčastějším původcem meningitidy *Haemophilus influenzae typ b*, do CNS se nejčastěji dostává z nosohltanu. Prognóza bývá dobrá, smrtnost se pohybuje mezi 3-8 %. Trvalými následky trpí 20-40 % nemocných (37). *Haemophilus influenzae* se léčí aminopeniciliny (ampicilin, amoxycilin), cefalosporiny nebo chloramfenikoly (33).

Meningokokvá meningitida

Nejčastěji se objevuje časně zjara v menších epidemiích. Šíří se mezi mladými kapénkami z meningokokové nazofaryngitidy. Způsobuje ji *Neisseria meningitidis* (2). Viz kapitola 1.3. *Neisseria meningitidis* (str.15).

1.1.2 Nepurulentní meningitidy

Nepurulentní meningitidy jsou většinou virového původu, mají většinou nízkou úmrtnost, průběh u akutních nepurulentních meningitid není tak dramatický jako u purulentních, avšak jejich komplikace mohou být závažnější. Často se jedná o meningoencefalitidy. Léčba u většiny těchto neuroinfekcí je pouze symptomatická, důležitý je klidový režim po dobu 3-6 týdnů v rekonvalescenci, sportovní zátěž se většinou doporučuje až po 3 měsících (2, 28).

Tuberkulózní meningitidu

Tuto meningitidu způsobuje *Mycobacterium tuberculosis*. Onemocnění se může projevit až roky po primoinfekci, onemocnění se často projeví při oslabené imunitě. Onemocnění začíná nenápadně několik dní až 2 týdny po nakažení. Prvotními příznaky jsou porucha nálady, zvýšená spavost, teploty, pocení a bolesti hlavy. Po prvotních příznacích nastupuje noční zmatenost, parézy a meningeální příznaky, které se objevují amentně-delirantní stavy, kóma a smrt. V dnešní době se počet nemocných značně snížil a nemocní jsou převážně vyššího věku. Smrtnost je bez léčby 100%, pokud se včas zahájí účinná léčba může smrtnost klesnout na 10 % a trvalé následky se snižují až na 10-20 %. U 1 % nemocných tuberkulózní meningitida postihuje mozek. Nejčastější trvalé následky jsou postižení okohybných nervů, slepota, hydrocefalus, demence a epilepsie. Diagnostika se provádí z likvoru, kde dochází ke zmnožení lymfocytů i polynukleárů, nárůstu hladiny bílkovin, poklesem hladiny glukózy a chloridů. Diagnózu spolehlivě, ale pozdě prokáže kultivace z likvoru. RTG plic v 50-70 % prokáže jen prodělání nedávné nebo staré tuberkulózy. Kožní tuberkulinový test je až v 90 % pozitivní (2).

Virové neboli serózní meningitidy.

Mezi nejčastější virové agens způsobující virovou meningitidu patří enteroviry, virus příušnic, *Herpes simplex typ 2* a vir Epstein-Barrové, nebo se mohou rozvinout při jiných celkových onemocnění, nebo jako reakce na podráždění mozkových plen - aseptická meningitida. Onemocnění má většinou dvoufázový průběh. První fáze se označuje jako chřipková fáze, kdy má pacient teplotu, bolesti svalů a kloubů, bolest v krku, má průjmy, zánět horních cest dýchacích, vyrážku a je unavený a malátný. Po přechodném zlepšení se dostaví druhá tzv. meningeální fáze, kdy se opět objevuje teplota, světloplachost, cefalea, nauzea až zvracení, meningeální příznaky a spavost. Toto onemocnění trvá cca 2-3 týdny, je méně závažné a má dobrou prognózu s plnou úzdavou. Léčba je symptomatická a podpůrná. V likvoru je lehce zvýšená bílkovina, proteinocytologická asociace, kde převažují lymfocyty. Cukry a chloridy jsou normální. Vir se podaří identifikovat jen v 60-80 %, kultivace je možná z likvoru při časném odběru (2).

1.2 Rod *Neisseria*

Rod *Neisseria* společně s rody *Kingalla*, *Eikenella* a *Simonsiella* patří do čeledi *Neisseriaceae* (37). Bakterie tohoto rodu jsou gramnegativní chemoorganotrofní aerobní nebo fakultativně anaerobní koky, které mají průměr 0,6-1 μm a netvoří spóry (19). Zpravidla jsou striktně aerobní, ale některé neisserie mohou slabě růst i v anaerobním prostředí. Neisserie jsou kultivačně náročné, na některých půdách vůbec nerostou, odlišnosti v kultivaci se poměrně hodně liší i v rámci rodu (37). Na krevním agaru rostou v perleťových koloniích, při optimální teplotě kolem 37 °C, ale mohou růst i při nižších teplotách. Rod *Neisseria* je vždy katalasa a oxidáza pozitivní (19, 37).

Mezi patogenní neisserie patří *Neisseria meningitidis*, původce meningitid a *Neisseria gonorrhoeae*, která je původcem kapavky (19). *Neisseria gonorrhoeae* je obligatorní patogen, který se přenáší výhradně pohlavním stykem, morfologicky je podobná *Neisseria meningitidis*. Patogenní neisserie jsou velmi citlivé na výkyvy teplot i na vyschnutí, dále vyžadují zvýšenou tenzi CO₂. Snadno podléhají autolýze.

Nejcitlivějším na vnější podmínky je *Neisseria gonorrhoeae*, která špatně snáší i slabé dezinfekční prostředky (37).

Mezi nepatogenní, nebo-li ústní neisserie patří *Neisseria flavescens*, *Neisseria sicca*, *Neisseria lactamica*, *Neisseria mucosa*, *Neisseria subflava*, *Neisseria elongata* a další. Tyto neisserie mají různorodý tvar, většinou jde o diplokoky, může se však vyskytnout i ve formě krátké tyčinky (*N. elongata*) (37). Růstově jsou nenáročné, na obyčejném krevním agaru rostou v aerobním prostředí, někdy na něm mění erythrocyty, tato změna může hraničit s beta-hemolýzou. Jejich teplotní optimum pro růst je 37°C, dobře rostou a množí se i při 22 °C. Často produkují žlutý pigment. Nachází se často jako běžná flora v nazofaryngu (19), ve výjimečných případech, zejména u jedinců s poruchami imunity, mohou vyvolávat endokarditidy a meningitidy (37). Jednotlivé druhy lze od sebe odlišit biochemicky(19).

1.3 *Neisseria meningitidis*

Neisseria meningitidis prvně izolovala Sára Branhamová-Matthewsová (1888-1962) (37). Je to gramnegativní, nesporulující, aerobní nebo fakultativně anaerobní diplokok, který vypadá pod mikroskopem jako kávové zrnko (19). Vyskytuje se ve 13 sérologických skupinách A, B, C, D, X, Y, Z, W135, 29E, H, I, K a L, které jsou rozděleny podle antigenních vlastností polysacharidového pouzdra. U některých nelze zjistit antigenní skupinu a označují se pak jako polyaglutinabilní. Tyto polyaglutinabilní meningokoky se většinou projevují jako lehká respirační onemocnění, anebo se vyskytují u zdravých nosičů. Tzv. invazivní meningokokové onemocnění způsobují hypervirulentní kmeny A, B, C, W 135 a Y. V České republice stejně jako v Evropě se nejčastěji objevují typy B a C. Typ A se vyskytuje nejčastěji (v 98%) v subsaharské Africe (nebo-li meningitis belt, oblast od Mali po Etiopii) a Číně, typ Y pak především v USA (29). Na Arabském poloostrově se nejčastěji vyskytuje typ W135 (30). Invazivní meningokokové onemocnění se endemicky vyskytují v Africe, někdy také v Asii a Jižní Americe. Epidemie se mohou vyskytovat po celém světě, největší epidemie způsobuje sérologická skupina A. Epidemie způsobené séro skupinou

B bývají většinou sporadické, séro skupina C způsobuje závažné lokální epidemie (36). Podle proteinů vnější membrány, nebo-li nekapsulárním antigenům, určujeme jednotlivé sérotypy a subtypy (37).

1.3.1 Cesta přenosu

Neisseria meningitidis se přenáší kapénkami, zdrojem nákazy je výhradně nemocný člověk nebo nosič. Inkubační doba se pohybuje nejčastěji mezi 1-3 dny, ale může trvat až 7 dní (19). Při primárním zánětu se infekce šíří hematogenní cestou, při sekundárním zánětu se infekce dostává na mozkové pleny z blízkého (sinusitidy, otitidy, mastoiditidy u dětí) nebo vzdáleného zdroje (28).

U nosičů se *Neisseria meningitidis* vyskytuje ve faryngu a nezpůsobuje u nich žádné onemocnění, případně u nich probíhá bezpříznakově (11, 19). Nosičů je v české populaci cca 10 % (37).

1.3.2 Výskyt

Smrtnost meningokokové meningitidy se v České republice hlásí od roku 1921, nemocnost se hlásí od roku 1943. V České republice stejně jako ve většině vyspělých zemí je převážně sporadický výskyt *Neisseria meningitidis*, pouze v 50. letech 20. století byla epidemie. V letech 1965-1992 se v České republice vyskytoval převážně typ B. Od roku 1993 se u nás začal vyskytovat i typ C. V polovině 90.let 20. století dosáhl výskyt *Neisseria meningitidis typ C* maxima, ve druhé polovině 90.let 20.století nemocnost poklesla na 1/100 000 obyvatel a opět začal převažovat typ B. V tabulce 1 je vývoj invazivních meningokokových onemocnění (IMO) v České republice v letech 1993-2010. V subsaharské Africe se vyskytuje endemicky nebo epidemicky (17, 34).

Tabulka 1: Invazivní meningokoková onemocnění v České republice za období 1993-2010 (20).

	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Počet onemocnění	132	195	230	218	168	98	103	74	108	122	101	105	97	79	85	87	85	67
Nemocnost (na 100 000 obyvatel)	1,3	1,9	2,2	2,1	1,6	0,9	1,0	0,7	1,0	1,2	1,0	1,0	0,9	0,8	0,8	0,8	0,8	0,6
Počet úmrtí	14	27	21	20	16	13	8	7	13	20	10	16	5	3	10	6	9	6
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	5,1	3,8	11,8	6,9	10,6	8,9
% N.m.B onemocnění	27,3	21,5	20,4	24,8	28,6	26,5	46,7	58,1	50,9	43,5	38,6	51,4	56,7	65,8	65,9	71,3	69,4	58,2
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	3,6	3,8	12,5	6,5	6,8	7,7
% N.m.C onemocnění	28,0	53,8	59,1	53,7	49,4	55,1	35,9	14,9	25,9	34,4	39,6	30,5	28,9	22,8	15,3	12,7	11,8	11,9
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	3,6	(5,5)	(7,7)	(9,1)	(20,0)	(25,0)

Meningokoková meningitida se často vyskytuje v uzavřených skupinách jako jsou školy, věznice atd. (19). Člověk může onemocnět v každém věku, ale existují tzv. rizikové skupiny, ve kterých se onemocnění nachází významně častěji než v jiných. Rizikovými skupinami jsou imunologicky oslabené osoby, děti do 1 roku věku a osoby nad 65 let, nejrizikovějšími skupinami a také nejčastěji nemocnými jsou malé děti mezi 2-6 lety a dospívající mládež mezi 14-20 lety (11, 28).

1.3.3 Klinická charakteristika

Vývoj a vznik meningitidy závisí na několika faktorech. Mezi nejdůležitější faktory patří virulence mikroorganismu, stav imunity a aktuální fyzický stav daného jedince a stav jeho sliznice (37). *Neisseria meningitidis* může způsobovat invazivní i neinvazivní meningokokové onemocnění (2).

Neinvazivní *Neisseria meningitidis* způsobuje hlavně respirační onemocnění-faryngitidy, pneumonie, bronchitidy, tracheitidy, vzácněji otitidu a konjunktivitidu, ve velmi vzácných případech se objevuje artritida, endokarditida, myokarditida, artritida, apendicitida a další onemocnění (29).

Mezi IMO patří meningokoková meningitida a seps. Průměrná smrtnost na IMO je 10 %, smrtnost meningokokové meningitidy je 2 %, pokud je spojená se sepsí dosahuje smrtnost 5 %. U sepsy se pohybuje mezi 25-50 %, pokud se projeví

Waterhousův-Friederichsův syndrom dosahuje smrti téměř 100 %. Meningokoková meningitida či sepsis většinou začínají z plného zdraví a stav se během několika hodin dramaticky zhorší (29). *Neisseria meningitidis* způsobuje nejdramatičtější a nejrychleji postupující meningitidy. Jejich klinický obraz je různorodý a závažnost závisí na radě faktorů, ale nejvýznamnějším je stav imunity, hlavně pak komplement, porucha v koagulační kaskádě a opsonizační faktory (28).

Meningitida se projevuje bolestmi hlavy, světloplachostí, tuhnutím svalů, zejména šíje aj. - soubor těchto příznaků se označuje jako meningeální syndrom, respektive meningeální dráždění. V kombinaci se zánětem mozku jde o meningoencefalitidu. Při těžkých meningitidách se může objevit bezvědomí, selhání orgánů nebo poškození CNS s trvalými následky například hluchota, hydrocefalus, postižení hybnosti, epileptické záchvaty, snížení intelektu (2, 28, 29).

Při meningitidě dochází k rychlé poruše vědomí (29). Nejprve se objeví horečka, úporná bolest hlavy a poté dochází ke kvalitativní či kvantitativní poruše vědomí. Po poruše vědomí se dostavuje tzv. meningeální syndrom. Meningeální syndrom je souhrn příznaků, zahrnující silnou bolest hlavy, nauzeu, zvracení, světloplachost, přecitlivělost na hluk a spazmy svalů. Nemocný má ztuhlou šíji a aktivně ani pasivně není schopen se dotknout bradou sternu. Meningeální syndrom je způsoben drážděním mozkových plen, kde jsou nervová zakončení. Při dráždění míšních kořenů jejich natažením například při předklonu hlavy, vzniká dráždění mozkových plen zvýšeným nitrolebním tlakem v důsledku zánětu případně krvácení do meningeálních prostorů (2). V některých případech se vyskytují před prvními příznaky tzv. chřipkovité příznaky (ataralgie, myalgie, pálení v nosohltanu, řídká stolice (29). V mnoha případech pacienti zvrací z důvodu nitrolební hypertenze. *Neisseria meningitidis* způsobuje nejdramatičtější a nejrychleji postupující meningitidy (28).

U malých dětí mohou být příznaky odlišné, zpočátku mohou trpět hypotermií, neklidem, zvýšenou dráždivostí nebo naopak spavostí. Na kůži se mohou objevovat tečkovitá kožní krvácení, nazývaná petechie nebo sufuze, které se častěji objevují při sepsi (29).

U dospělých bývá velmi rychlý rozvoj onemocnění, kdy se v řádech hodin po nákaze objevují teploty, cefalea, zvracení a zmatenost, které vedou k poruše vědomí. Dále se mohou objevit nebolestivé petechie na kůži (2).

U sepse může být alespoň zpočátku vědomí bez alterace, po centralizaci oběhu dochází k vazokonstrikci spojené s chladnutím akrálních částí a následnou cyanózou. Infekce vede k systémové zánětlivé odpovědi, která vede k rozvoji diseminované intravaskulární koagulopatii mikrotrombů kapilár (DIC). Díky poruše krevního zásobení může dojít až k odumírání kůže a akrálních částí těla, což může vést i k amputacím ucha, nosu, končetin nebo jejich částí, někdy je nutná transplantace kůže (29).

Waterhouse-Friderichsenův syndrom jako komplikace meningeální meningitidy je závažný stav, kdy z důvodu krvácení do nadledvin, hypoglykemie a šokovému stavu, akutně selhávají nadledviny (38). Waterhouse-Friderichsenův syndrom je smrtelný u dětí (2).

Při DIC neboli diseminované intravaskulární koagulopatii vznikají mnohočetné tromby a mikrotromby v drobných cévách různých orgánů. Dochází k silnému krvácení, které poškozuje postižené orgány. DIC má několik fází: hyperkoagulační s aktivací hemostázy, kompenzovaná fáze, dekompenzovaná fáze a aktivace fibrinolýzy. DIC se objevuje jako komplikace některých operací, infekcí, těhotenství a porodu, nádorových onemocnění atd. Při léčbě DIC se podává heparin, spotřebované hemokoagulační faktory, krevní transfuze pro uhrazení krevní ztráty a dále se léčí orgánové komplikace (8).

Při sepsi dochází k výrazné aktivaci zánětových mechanismů cytokinů a mediátorů. Sepse se projevuje jako těžká infekce s celkovými systémovými projevy zánětu jakými jsou opakované prudké vzestupy horečky, celková schvácenost a příznaky z postižení orgánů. Choroboplodné zárodky se uvolňují do krve a poškozují různé orgány. Sepse může být komplikována septickým šokem (32).

1.3.4 Hlášení onemocnění

Onemocnění způsobené *Neisseria meningitidis* podléhá povinnému hlášení. Shromažďování údajů a jejich hlášení onemocnění způsobené *Neisseria meningitidis* se

řídí vyhláškou č. 473/2008 Sb., o systému epidemiologické bdělosti pro vybrané infekce (příloha 6, čl. 5). Ve vyhlášce stojí: „Osoba poskytující péči, která diagnostikuje invazivní meningokokové onemocnění, hlásí onemocnění a úmrtí na toto onemocnění. Asymptomatické nosičství nebo běžná respirační onemocnění s průkazem *N. meningitidis* se nehlásí.“ (4).

1.4 Diagnostika

Vyhláška č. 473/2008 Sb., o systému epidemiologické bdělosti pro vybrané infekce (příloha 6, čl. 2) stanovuje pravidla pro laboratorní diagnostiku *Neisseria meningitidis*:

- „1. Izolace *Neisseria meningitidis* z primárně sterilního místa (například krev nebo mozkomíšni mok, nebo méně často, z kloubní, pleurální nebo perikardiální tekutiny).
2. Detekce nukleové kyseliny *Neisseria meningitidis* z primárně sterilního místa.
3. Detekce antigenu *Neisseria meningitidis* z primárně sterilního místa.
4. Mikroskopický průkaz gramnegativních diplokoků z primárně sterilního místa.
5. Vzhledem ke skutečnosti, že výše uvedené klinické syndromy mohou být způsobeny řadou jiných etiologických agens, je laboratorní potvrzení etiologie *Neisseria meningitidis* nezbytné. Zdůrazňuje se nutnost určování agens až do úrovně určení sérologické skupiny *Neisseria meningitidis*. Provedení odběru na kultivační vyšetření před nasazením terapie je povinné.
6. Kmeny *Neisseria meningitidis* izolované z klinického materiálu, který je za normálních podmínek sterilní, nebo z tělních tekutin, získané z klinických projevů (čl. 1), jsou zasílány do Národní referenční laboratoře pro meningokokové nákazy zřízené Ministerstvem zdravotnictví k dalšímu určování. Národní referenční laboratoř pro antibiotika zajišťuje sledování antibiotické rezistence.“ (4).

Diagnostika *Neisseria meningitidis* se provádí z mozkomíšního moku nebo krve mikrobiologickými vyšetřeními. Mikrobiologickým vyšetřením můžeme izolovat či určit původce nákazy, nebo určit citlivost k antimykotickým lékům. Mezi

mikrobiologické metody vyšetření patří mikroskopie, kultivace, aglutinace, stanovení citlivosti mikroorganismu na antibiotika, PCR (4).

1.4.1 Biologický materiál

Likvor

Normální likvor je bezbarvá a čirá tekutina, nacházející se v subarachnoidálním prostoru. Dospělý člověk má 120-180 ml likvoru, kojenci pouze 40-80 ml. Obsahuje 2,2-4,2 mmol/l glukózy, 1,1-2,1 mmol/l laktátu a méně jak 0,45 g/l bílkoviny. Spektrofotometrie je negativní (16).

Likvor za normálních podmínek fyzikálně chrání mozek a míchu, transportuje biomolekuly v mozku, odstraňuje metabolity, udržuje konstantní nitrolební tlak a tvoří obranu proti patogenním mikroorganismům. Mozek chrání 3 hematoencefalické bariéry (hematoencefalická, encefalolikvorová a hematolikvorová) (16).

Pro zánětlivý likvor je typická barva moku bílá až zelenavá. Likvor je zakalený díky velkému množství leukocytů a je v něm zmnožena bílkovina. Mok vytéká pod tlakem (16).

Při purulentní meningitidě se zvyšuje množství laktátu v likvoru, při hnisavých neuroinfekcích klesá glykorachie, u virových meningitid se zvyšuje beta-2-mikroglobulin, polynukleární pleocytóza svědčí o hnisavé neuroinfekci (16). U purulentních meningitid se v likvoru po počátečním vzestupu počtu buněk výrazně zvyšuje obsah celkové bílkoviny. Cytologickým vyšetřením můžeme v likvoru u purulentní meningitidy najít tisíce polymorfonukleárních leukocytů a zvýšené množství buněk mikroorganismu (2, 16).

Pokud je to možné odebírá se mozkomíšní mok ve 3-4 dávkách po 2-5 ml do sterilních zkumavek. Odebírá se pomocí lumbální punkce, v místě spojnice vrcholů kostí kyčelních a křížení s páteří v místě L4. Mozkomíšní mok se barví podle Grama, mikroskopuje, biochemicky analyzuje, kultivuje nebo se používá pro spektrofotometrii a molekulárně-biologické metody, případně pro další testy (12).

Krev

Při podezření na bakteriémií se vzorek odebírá ze žilní krve do speciálních kultivačních nádobek pro hemokultivaci. U dospělých se odebírá cca 20ml (12).

1.4.2 Mikroskopické metody

V likvoru nacházíme velké množství leukocytů a diplokoků. Likvor barvíme nejčastěji podle Grama.

Barvení podle Grama

Na odmaštěné podložní skličko se nanese stěr, nechá se vysušit na vzduchu a po úplném zaschnutí vzorku jej můžeme fixovat. Vzorek můžeme fixovat mechanicky nebo chemicky. Mechanicky se preparát fixuje dvojitým až trojitým protažením preparátu nad horní částí svítivého plamene, každé protažení musí být kratší než 2 sekundy. Chemicky se fixuje ponořením preparátu na 10-15 minut do metylalkoholu, acetonu nebo Nikiforového činidla a následným sušením na vzduchu (13).

Fixovaný preparát převrstvíme krystalovou violetí, po 20 sekundách ji slijeme, preparát můžeme opláchnout pod tekoucí vodou. Poté preparát převrstvíme na 20 sekund Lugolovým roztokem, který slijeme jako krystalovou violet' a preparát můžeme opět opláchnout pod tekoucí vodou. Po slití Lugolova roztoku preparát odbarvíme acetonem. Podložní skličko postavíme šikmo, aby se mohl aceton odplavovat stejným směrem jako violet' a Lugolův roztok. Preparát odbarvujeme 20-30 sekund a poté ho opláchneme pod tekoucí vodou. Po opláchnutí jej dobarvíme 30-60 sekundovým přelitím safraninem, následně preparát opláchneme pod tekoucí vodou, necháme jej zaschnout a můžeme prohlížet pod mikroskopem. Grampozitivní bakterie se zbarví tmavě fialově - modročerně, gramnegativní se zbarví do růžově červené, gramlabilní bakterie jsou částečně tmavě fialové a částečně růžové (13, 22).

1.4.3 Kultivační vyšetření

Kultivační vyšetření můžeme rozdělit na kvalitativní a kvantitativní. Při kvalitativním vyšetření dokazujeme určitý mikroorganismus, při kvantitativním vyšetření určujeme množství mikroorganismu (22). Vzorek se většinou naočkuje na tuhou půdu, která se inkubuje po určitou dobu za určitých podmínek. Na této půdě po kultivaci narostou kolonie bakterií. Bakterie se dají identifikovat i podle vzhledu kolonií. Pro určení rodu a druhu bakterie se musí dělat další biochemické testy (33).

Kultivace není příliš vhodná metoda pro diagnostiku meningokoků, kvůli její časové náročnosti.

Krevní agar

Neisseria meningitidis roste, narozdíl od *Neisseria gonorrhoeae*, i na krevním agaru s několika růstovými faktory, při zvýšené tenzi CO₂ (19, 37).

Krevní agar se připravuje přidáním 5-10% defibrinované zvířecí krve (králičí krev) do masopeptonového agaru. Na krevním agaru lze odečítat i hemolýzu (19, 37).

Testy antimikrobiální citlivosti

Stanovení citlivosti bakterií na antimikrobiální látky je důležité pro nasazení účinné léčby. Za účinný lék se většinou považuje takový, jehož dosažitelné hladiny v séru jsou 2-4krát vyšší, než je zjištěná minimální inhibiční koncentrace preparátu pro daný mikroorganismus. Při určení vhodného preparátu je nutné znát kinetiku léku v těle a jeho vylučování z těla, dále je potřebné vědět, jaké koncentrace může lék dosáhnout v cílovém místě (12).

Základní rozdělení testů antimikrobiální citlivosti je na kvalitativní a kvantitativní testy (12).

Kvalitativní testy pouze určují, zda je kmen citlivý nebo rezistentní na určité antibiotikum (12). Nejčastěji se užívá kvalitativní disková metoda neboli difúzní diskový test. Na Petriho misku s agarem se rovnoměrně rozetře suspenze s bakteriemi, položí se na ni disky napuštěné antibiotiky o známé koncentraci. Takto připravená petriho miska se inkubuje 18-24 hodin při 37°C a poté se změří průměry jednotlivých

inhibičních zón. Tyto zóny se dále vyhodnocují podle hraničních zón podle tabulek. Inhibiční zóna je kruhová zóna kolem disku, kde nerostou bakterie. Podle velikosti inhibiční a hraniční zóny se určuje, zda je bakterie vůči danému antibiotiku rezistentní nebo zda je na něj citlivá. Pokud je inhibiční zóna větší než hraniční zóna, je bakterie citlivá na antibiotikum. Pokud se vytvoří menší inhibiční zóna je bakterie vůči tomuto antibiotiku rezistentní (33). Další metodou je například stanovení citlivosti na Müllerově-Hintonové agaru, který se užívá místo diskového testu pro určení citlivosti mikroorganismu na penicilin, kde difúzní diskový test selhává (37).

Kvantitativní testy určují aktuální účinnou koncentraci antibiotika, na níž je daný kmen citlivý (12). Mezi kvantitativní testy patří i kvantitativní difúzní metoda, tzv. E-test. Na proužku z porézního materiálu, většinou papíru, jsou odděleny zóny s klesající koncentrací antibiotik, tento proužek se položí na plotnu s bakterií a nechá se za určitých podmínek kultivovat. Po kultivaci se odečte i minimální inhibiční koncentrace (MIC). MIC je místo, kde se inhibiční zóna dotýká proužku. Tato metoda je velmi pracná a nákladná, proto se pro rutinní vyšetřování nepoužívá (33).

MIC můžeme také určit rozdílem mezi kvantitativními a kvalitativními metodami. Takto se dá určit i minimální baktericidní koncentrace (MBC), která bakterii usmrtí (12).

U některých mikroorganismů se určuje MIC. Jedná se o difúzní metodu. MIC je úměrná rezistenci a citlivosti, patří mezi kvantitativní metody. Tato metoda se provádí dvojnásobným ředěním roztoku antibiotika o známé koncentraci bujonem. Provádí se na mikrotitračních destičkách s 12 sloupci a 8 řadami jamek. Pro jeden typ antibiotika se většinou používá 8 koncentrací. V jamkách je pro každé vyšetřované antibiotikum řada rovnoměrně klesajících koncentrací a do takto připravených jamek se naočkují bakterie (10^4 bakterií / jamka) a nechá se inkubovat. Pokud se po inkubaci některé jamky nezakalí, znamená to, že dané antibiotikum o určité koncentraci inhibuje růst bakterií. Nejnižší koncentrace, která zabrání růstu bakterií je MIC. V dnešní době se pro tuto metodu užívají často automaty, které zároveň identifikují i konkrétní kmen bakterie (33).

1.4.4 Biochemické metody

Při biochemických testech se většinou využívá schopností enzymů štěpit cukry, bílkoviny, atd. Tyto testy se dnes většinou provádějí v mikrozkušnicích, pozitivní reakce se projeví změnou barvy roztoku nebo půdy, díky přidanému indikátoru (33). Meningokoky na rozdíl od gonokoka štěpí glukosu a maltosu (37).

1.4.5 Imunochemická vyšetření

Používají se u mikroorganismů, které nesou na svém povrchu antigeny. Můžeme je rozdělit na imunoprecipitační a imunochemické metody a imunomagnetickou separaci. Imunoprecipitační metody jsou založeny na interakci antigenu s protilátkou a následné detekci tvorby precipitátu. Při imunomagnetické separaci se váží buňky na specifické protilátky imobilizované na magnetické částice (22).

Imunochemické metody jsou založeny na tvorbě komplexu antigen-protilátka a jeho detekci značenou další protilátkou. Mezi tyto metody patří latexová aglutinace nebo ELISA (22, 33).

Latexová (sklíčková) aglutinace

Některé bakterie produkují při svém množení v tekutém prostředí nadbytek pouzderých antigenů. Tyto antigeny lze prokazovat pomocí latexových mikročástic pokrytých protilátkou proti příslušnému antigenu, které se přidají do roztoku. Při pozitivní reakci tyto latexové mikročástice výrazně aglutinují (1).

V praxi se likvor napipetuje na speciální podložní sklíčko, přidají se k němu latexové mikročástice s protilátkou proti prokazovanému antigenu. Na jednom podložním sklíčku lze prokazovat více bakterií najednou. Tato metoda trvá cca 30 minut, ale nedá se používat, pokud jsou bakterie mrtvé, například po podání antibiotik. Také je nutné biochemicky nebo molekulárně-biologickými metodami upřesnit sérologické skupiny (1).

Pro laboratorní praxi se využívají různé komerčně dodávané soupravy. Jednou z těchto souprav je PASTOREXTM MENINGITIS od výrobce BIO-RAD. U této soupravy

se používá pro latexovou aglutinaci pouze supernatant, proto je nutné předem zpracovat biologický materiál. Mozkomíšni mok se 3 minuty centrifuguje při 2500 ot./min., odsaje se supernatant, který se zahřívá 5 minut při 100°C, nakonec se teplý supernatant nechá zchladnout. K 0,5 ml séra se přidá 1,5 ml dilučního činidla, vše se zahřeje na 100°C po dobu 3 minut, poté se vzorek nechá zchladnout a nakonec se centrifuguje při 4500ot./min. 5 minut. Hemokultura se pouze centrifuguje při 3700 ot./min. 5 minut. Z narostlé kultury se odeberou 2-3 kličky, které se suspendují v 0,5 ml fyziologického roztoku, vzniklý roztok se centrifuguje 5 minut při 4500 ot./min., takto připravená narostlá kultura se může použít pro latexovou aglutinaci. Na každé pole karty ze soupravy PASTOREX™ MENINGITIS se nanese 1 kapka (40-50 µl) zpracovaného biologického materiálu, vedle kapky se nanese 1 kapka odpovídajícího činidla (viz tabulka 2). Na každém poli karty se obě kapky smíchají plastovou tyčinkou, poté se s kartou krouží a sleduje se vznik aglutinátu. Při pozitivní reakci by se měl aglutinát vytvořit do 10 minut u séra a mozkomíšního moku, do 5 minut by měla aglutinovat hemokultura, do 2 minut by se měl vytvořit aglutinát u narostlé kultury. Podle tabulky (viz tabulka 3) se nakonec odečtou výsledky (3, 35).

Tabulka 2: Latexová činidla

značení	latexové činidlo	značení	latexové činidlo
R1	N. meningitidis B/ E.coli K1	R6	N.meningitidis A
R2	negativní kontrola "R1"	R7	N.meningitidis C
R3	H. influenzae typ b	R8	N.meningitidis Y/W135
R4	Streptococcus pneumoniae	R9	polyvalentní negativní kontrola
R5	Streptococcus agalactiae	R10	polyvalentní pozitivní kontrola

Tabulka 3: Vyhodnocení výsledků latexové aglutinace

	pozitivní	negativní	nelze hodnotit
aglutinace	na jednom z polí: R1, R3, R4, R5, R6, R7, R8	na žádném z polí	na více z polí: R1, R3, R4, R5, R6, R7, R8; nebo s jednou pozitivní kontrolou: R2, R9
bez aglutinace	R2 a R9	na všech polích	

1.4.6 Molekulárně biologická vyšetření

Molekulárně biologické metody analyzují genetickou informaci. Aby bylo možné detekovat a analyzovat genetickou informaci, je nutné před vlastní analýzou provést izolaci nukleové kyseliny (17).

Při klinickém obrazu purulentní meningitidy, epiglotitidy, sepse, horečnatého stavu nebo těžké pneumonie je vhodné udělat vyšetření DNA pro průkaz bakterií způsobujících purulentní meningitidu včetně *Neisseria meningitidis* (17).

Izolace nukleových kyselin

Před vlastním provedením PCR je potřeba izolovat nukleové kyseliny. Nukleová kyselina se izoluje z buněčné suspenze. Buněčnou suspenzi připravíme narušením stěny buněk suspenze fyzikálně nebo enzymaticky, čímž se uvolní buněčný obsah. Po uvolnění buněčného obsahu je nutné získat co nejčistší nukleovou kyselinu, proto se odstraňuje maximum nežádoucích složek, jako jsou bílkoviny, lipidy, soli atd., vhodnými purifikačními metodami. Nakonec se nukleová kyselina sráží ethanolem. Často se ověřuje čistota nukleové kyseliny pomocí spektrometrických a fotometrických metod. Potom se provádí její kvantifikace (14).

Izolace nukleových kyselin velmi ovlivňuje celý průběh PCR a všechny ostatní metody, před kterými je nutné nukleové kyseliny izolovat. Proto je potřeba izolovat nukleové kyseliny s co největší opatrností a přesností, aby se zamezilo chybám a případné kontaminaci vzorku (14).

Díky pokroku vědy lze v některých případech použít přímo buněčný lyzát. Dnes se nukleová kyselina izoluje různými komerčně vyráběnými soupravami na izolaci

DNA nebo RNA z krve nebo různých tkání. Izolovanou nukleovou kyselinu lze uchovávat krátkodobě při 0-4°C nebo dlouhodobě při teplotě -20°C až -80°C ve zředěné formě nebo v koncentrované formě v zásobních roztocích (14).

Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je molekulárně biologická metoda prokazující DNA či RNA určitého mikroorganismu v biologickém materiálu. Velmi často se takto stanovuje *Neisseria meningitidis*, *MRSA (methicilin-rezistentní zlatý stafylokok)*, *Chlamydia pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* a další bakterie (33). V Národní referenční laboratoři pro meningokokové nákazy se do roku 1997 používaly pro stanovení *Neisseria meningitidis* pouze klasické metody, od roku 1997 se začala používat i polymerázová řetězová reakce. Do roku 2002 se vzorky v Národní referenční laboratoři pro meningokokové nákazy diagnostikovali buď klasickými metodami nebo pomocí PCR. Od roku 2002 se některé vzorky diagnostikovaly zároveň klasickými metodami i PCR. Oproti rokům 2007 - 2009 v roce 2010 poklesla úroveň diagnostiky *Neisseria meningitidis* z cca 95% na 89,6%. Tento pokles byl způsoben snížením používání PCR pro laboratorního potvrzení *Neisseria meningitidis*. V roce 2009 bylo potvrzeno pomocí PCR 63,4% vzorků, v roce 2010 pouze 50,8 % vzorků (20). PCR patří mezi amplifikační metody. Princip metody objevil roku 1986 Kary Mullis (14).

Požadovaný úsek nukleové kyseliny, který chceme amplifikovat, vymezíme pomocí 2 primerů. Primery jsou komplementární se sekvencemi, které jsou na okrajích množeného úseku. První primer neboli forward primer se váže na jedno vlákno DNA a druhý primer nebo-li revers primer se váže na druhé, komplementární, vlákno denaturované DNA. Primery jsou orientovány svými 3' konci k sobě (14). Aby se mohly primery navázat na vlákna DNA je potřeba nejprve vzorek s DNA zahřát na 94°C. Zahřátí vzorku na 94°C slouží k rozvolnění DNA a následnému navázání primerů na jednotlivá vlákna. Primery jsou do reakce dodávány v přebytku (26).

Postup PCR

PCR je cyklický proces, ve kterém se 20-40krát stále opakují 3 kroky. Každý cyklus trvá několik minut. V jednom cyklu PCR se DNA zdvojnásobí, proto množství DNA ve vzorku exponenciálně narůstá. Prvním krokem je denaturace, při které se roztok s DNA zahřeje na teplotu 92-95°C a dochází k rozrušení vodíkových můstků v molekule DNA a následnému rozvolnění dvoušroubovice na 2 vlákna (14, 26).

Druhým krokem je hybridizace neboli annealing, kdy dochází k připojení primerů na jednotlivá vlákna DNA. Teplota annealingu se většinou pohybuje v rozmezí 45-60 °C, ale může se pohybovat i v rozmezí 37 - 72 °C. Teplota závisí na několika faktorech, například na délce primeru nebo jeho složení (tj. zastoupení jednotlivých bází). Annealing trvá 15-60 sekund (14, 26).

Třetím krokem je elongace nebo-li syntéza DNA, v tomto kroku se syntetizují nové řetězce DNA podle templátové DNA. Tento krok je katalyzován nejčastěji Taq polymerázou a probíhá při teplotě 72°C. Při syntéze se polymeráza posouvá po vlákně DNA směrem od primerů a začleňuje volné nukleotidy do vznikajícího řetězce, čímž vzniká dvojřetězcová molekula DNA. Doba trvání této fáze závisí na délce syntetizovaného fragmentu, obvykle trvá 30-90 sekund (14, 26).

Po proběhnutí celé PCR je potřeba amplifikovaný produkt detekovat pomocí gelové elektroforézy (18, 22).

Pokud je amplifikovaný úsek dlouhý nebo je potřeba vysoká přesnost amplifikace, dosahuje se lepších výsledků nižším počtem cyklů nebo prodloužením doby denaturace a elongace. V dnešní době se využívají pro PCR metody přístroje (termocyklery), které jsou schopné rychle a přesně měnit teplotu reakce (14).

Primery

Primery jsou oligonukleotidy shodné s templátovou DNA, které jsou schopny vymezit svojí polohou určitý úsek na templátové DNA, který má být amplifikován. Výběr správných primerů rozhoduje o úspěšnosti celé PCR. Primery by měly být navrženy tak, aby splňovali několik základních požadavků: musí hybridizovat jednotlivé řetězce svými 3'konci proti sobě a ohraničit tak úsek pro amplifikaci. Neměly

by být moc dlouhé a nepurifikované, optimální délka je 17 - 25 basí. Teplota obou primerů, při které „nasedají“ primery na vlákna DNA, by měla být stejná nebo alespoň podobná a neměla by být vyšší než teplota polymerázy. Primery by měly být přísně komplementární pro sekvenci templátové DNA na 3'-konci primeru (začátek polymerizace) naopak na 5'-konci mohou být modifikované (14).

Polymeráza

Polymeráza je klíčová pro celou PCR. Její aktivita při vysokých teplotách PCR ovlivňuje výtěžek reakce. Všechny polymerázy potřebují pro správnou činnost templátovou DNA, specifické primery, deoxynukleozidtrifosfáty, ionty hořčíku a draslíku a optimální pH (14).

Dříve při tepelné denaturaci DNA denaturovala i původně používaná DNA polymeráza a bylo ji nutné při každém cyklu dodávat. Nyní se nejvíce používá termostabilní Taq polymeráza, izolovaná z *G⁻* bakterie *Thermus aquaticus*, která žije v horkých pramenech a je stabilní i při 95°C, ale její reakční optimum je mezi 70-80°C, při 37°C vykazuje velmi nízkou aktivitu. Po 50 cyklech PCR si uchovává stále 60% svojí aktivity, pokud trvá denaturace v každém cyklu cca 20 sekund a probíhá při 95°C. 50% svojí aktivity si udržuje po 130 minut PCR, která probíhá při 92,5°C. Taq polymeráza nemá ve směru 3'-5' opravnou exonukleázovou aktivitu, což způsobuje nemožnost zpětného opravení chyb při polymerizaci (14, 26). Největší výhodou Taq polymerázy je její vysoká amplifikační schopnost (22).

Specifita a kontaminace PCR

Specifita amplifikace je ovlivněná hlavně primery, dále ji můžeme ovlivnit vyšší teplotou annealingu, snížením množství hořčíku a enzymů (14).

U PCR může docházet ke kontaminaci, která může zkreslit nebo zničit výsledky. Největší riziko vzniká, pokud pracujeme s nízkými koncentracemi DNA. Nejčastější kontaminace vznikají z produktů předchozí amplifikace například z aerosolu při otevírání zkumavek (14).

Další častou kontaminací je tzv. cross-kontaminace, která vzniká mezi vzorky v jedné sérii PCR. Těmto kontaminacím je možné zabránit důsledným dodržováním čistoty práce. Z těchto důvodů se také při PCR používá tzv. negativní kontrola. Negativní kontrola je destilovaná čistá voda místo templátu ve zkumavce (14).

Výhody a nevýhody PCR

Jednou z nevýhod u PCR je nepřesnost replikace. Pokud během reakce vznikají mutace, tak jsou dále množeny i tyto defektní řetězce DNA. Dále pak musíme znát sekvenci, kterou chceme amplifikovat, abychom mohli použít vhodné primery (26).

Nespornými výhodami PCR jsou citlivost, rychlost, bezpečnost práce a rozlišovací schopnost. Pomocí PCR můžeme amplifikovat velmi malé množství DNA (množství DNA nacházející se v jednom genomu). Doba trvání PCR se pohybuje od 2-48 hodin. Při PCR se nepoužívají radioaktivní látky. Lze amplifikovat i silně degradované DNA (26).

Nested PCR

Jedná se o dvě po sobě následující amplifikační reakce, kdy je zapotřebí dvou druhů primerů (vnitřních a vnějších) (22). Nejprve se amplifikuje úsek z DNA z vyšetřovaného vzorku (templát), poté následuje další PCR (nested PCR), kde je templátem produkt předchozí reakce. Po první reakci se použije první řada primerů, v druhé reakci se používají primery, které jsou navrhnuty na fragmenty získané jako produkt první PCR (14). Výhodou této metody je zvýšení citlivosti a přesnosti PCR (22). První kolo nested PCR trvá cca 3 a půl hodiny, druhé kolo trvá cca 2 hodiny. Potřebný čas pro jednotlivá kola nested PCR závisí na cyclerech a typu zvoleného programu (25).

Real-time PCR

Tato metoda je založena na principu klasické PCR. Narozdíl od klasické PCR se při real-time PCR detekuje amplifikovaný produkt po každém cyklu PCR. Díky tomu umožňuje průběžnou detekci produktu a zároveň kvantifikaci výchozího množství

templátu. U real-time PCR se nepoužívá následná gelová elektroforéza, čímž se zkracuje čas pro zjištění výsledků. Celkový čas pro detekci produktu závisí vždy na cycleru a programu používaného pro detekci (14).

Do reakční směsi se přidávají fluorescenčně značené sondy vážící se na specifické části DNA, které umožňují detekci PCR produktu v průběhu reakce. Na počátku je fluorescence nedetekovatelná, pokud se zvýší množství PCR produktu zvýší se i fluorescence. Cyklus ve kterém se nahromadilo dostatečné množství produktu, kdy je fluorescence detekovatelná, se nazývá Cycle thresholds (Ct). Práh detekce nastane tím dříve, čím bylo více templátového materiálu. Real-time PCR probíhá ve speciálních cyclerech, které umí zároveň měřit fluorescenci po každém cyklu a zaznamenávat údaje o hodnotě fluorescence a průběhu reakce. Zaznamenávané údaje jsou následně speciálním softwarem vynášeny do grafu. Na ose x jsou jednotlivé cykly, na ose y je fluorescence (7, 18).

Obrovskou výhodou real-time PCR je možnost stanovení množství výchozího templátu. Může se použít buď absolutní nebo relativní kvantifikace templátové DNA. Absolutní kvantifikace vyjadřuje přesné množství templátu na počátku reakce, můžeme ji přepočítat na množství buněk vzorku. Relativní kvantifikace zaznamenává změny v množství templátu mezi vzorky, je vyjádřena v poměru k množství jiné DNA, která slouží jako standardní neboli referenční gen. Kvantifikace je relativní, protože porovnává množství templátu dvou různých vzorků. Pro obě metody kvantifikace je vyvinuto několik matematických postupů zpracování dat (18).

Typy real-time PCR

Existují dva základní typy chemických přístupů v real-time PCR. Prvním je přidání nespecifických interkalačních fluorescenčních látek do reakční směsi. Výhodou je jejich nízká cena a jednoduché provedení. Bohužel se tato metoda nedá využít pro multiplex reakce, protože nelze odlišit fluorescenční signál jednotlivých amplifikačních produktů (18).

Druhým typem chemického přístupu v real-time PCR jsou sekvenčně značené specifické primery a próby, které využívají fluorescenčně rezonančního přenosu energie

(FRET) mezi fluoroforem a zhášedčem, příp. jiným principem zhášení fluorescence. FRET je spektroskopický proces přenosu energie mezi dvěma molekulami. Tento princip se používá k zaznamenání fluorescenční próby nebo primeru před jejím specifickým navázáním při amplifikaci produktu. Nejpoužívanější technologií tohoto typu metody je využívání značené próby TaqMan. TaqMan vyžaduje sekvenčně specifické primery a sekvenčně specifické TaqMan próby, které na svém 5'-konci nesou fluorescenční reportérovou molekulu a na 3'-konci zhášedče fluorescence. Intaktní próba nevykazuje žádnou fluorescenci kvůli blízkosti reportéru a zhášedče. Při annealingu hybridizuje próba na cílovou sekvenci ve směru extenze nového řetězce. 5'-3' exonukleázová aktivita DNA polymerázy odštěpí při extenzi primeru reportérovou molekulu, poté dojde k uvolnění fluorescence a ta je detekována. Výhodou této metody je specifita reakce. Nevýhodou této metody je složitější desing a vysoká cena (18).

Elektroforéza

Pomocí elektroforézy se detekuje amplifikovaný produkt při klasické PCR (18). Elektroforéza je založena na pohybu nabitých molekul v elektrickém poli (nukleová kyselina je nabitá negativně), díky čemuž se oddělují jednotlivé částice na základě jejich pohyblivosti v agarózovém gelu. Molekuly se pohybují od katody k anodě. Rychlost pohybu závisí na velikosti a hmotnosti molekul. Používá se stejnosměrného proudu a agarózový gel s fluorescenčním barvivem (nejčastěji ethidium bromid). To umožňuje detekovat DNA v UV světle transluminátorem. Elektroforéza trvá 50-60 minut, předběžné výsledky lze odečítat již po 20 minutách (7, 14).

1.5 Léčba

Onemocnění způsobené *Neisseria meningitidis* se léčí vždy antibiotiky, která se musí nasadit nemocnému ihned při podezření na meningokokovou meningitidu nebo sepsi, i přesto že nebyla diagnóza ještě potvrzena laboratoří. Při podezření na meningokokovou meningitidu nebo sepsi se preventivně nasazuje ceftriaxon, který rychle proniká přes hematoencefalickou bariéru. Včasné nasazení antibiotik výrazně

ovlivňuje průběh a případně následky onemocnění. Po zahájení účinné léčby nakažlivost končí po 24-48 hodinách (34).

Antibiotika inhibují růst nebo usmrcují jiné mikroorganismy. Přirozeně je produkuje některé druhy plísní, pokud je jejich složení chemicky změněno, nazývají se semisyntetická nebo polosyntetická antibiotika (12).

Sérová hladina léků závisí na dávce léku, hmotnosti pacienta, způsobu podání léku (jsou rozdíly mezi per os, per rectum, intravenózním a intramuskulárním podáním), časových intervalech mezi podáním léku a rychlosti vylučování léku (12).

Pro léčbu meningitidy se používají cefalosporiny 3. generace nebo peniciliny. Cefalosporiny patří mezi antibiotika, která inhibují syntézu buněčné stěny a svojí strukturou jsou blízké penicilinovým antibiotikům. Tato antibiotika jsou produkována plísní *Acremonium*. Cefalosporiny 3. generace jsou odolné vůči beta-laktamáze, působí na všechny enterobakterie a dále na kmeny, které jsou rezistentní vůči penicilinům a cefalosporinům 1. a 2. generace. Jejich velkou a nespornou výhodou je lehký průnik do likvoru. Mezi cefalosporiny 3. generace patří cefotaxim, ceftriaxon nebo ceftazidim. Při podezření na meningokokovou meningitidu se preventivně nasazuje ceftriaxon. Ceftriaxon patří mezi širokospektrá antibiotika. Po stanovení citlivosti antibiotik se mohou nasadit jiná antibiotika, například peniciliny (12, 34).

1.6 Očkování

Očkování patří mezi nejdůležitější preventivní opatření v šíření infekčních onemocnění. Principem očkování je podnítit tvorbu specifických protilátek pomocí antigenních komponent původců infekčních chorob (11, 12).

1.6.1 Druhy očkovacích vakcín

Podle toho, jak se antigenní materiál získává a připravuje, rozlišujeme několik typů vakcín. Pro očkování proti *Neisseria meningitidis* se používají polysacharidové a konjugované vakcíny, které obsahují specifické části meningokoka (36).

První polysacharidové vakcíny proti meningokokům se objevili již ve 30. letech 20.století. V 60.letech se začaly vyvíjet vakcíny s vysokomolekulárními kapsulárními polysacharidy. Dnes se stále používají bivalentní či čtyřvalentní polysacharidové vakcíny proti séro skupinám meningokoků A a C nebo A, C, Y a W 135. Všechny tyto vakcíny obsahují minimálně 50 µg specifického polysacharidu. Tyto vakcíny nedostatečně podněcovaly T-dependentní imunitní odpověď včetně imunologické paměti a byly částečně nahrazeny konjugovanými vakcínami. Účinek polysacharidových vakcín používaných při očkování proti *Neisseria meningitidis* se odhaduje cca na 3 roky (11, 36).

Konjugované vakcíny nahradily polysacharidové vakcíny. V Evropě se používají hlavně monovalentní konjugované vakcíny proti seroskupině C, případně se používají bivalentní vakcíny proti meningokokové seroskupině C a *Haemophilus influenzae typ b*. Nyní se v České republice začala používat i čtyřvalentní konjugovaná vakcína proti meningokokovým seroskupinám A, C, Y a W 135, která se dříve používala výhradně v USA. Konjugované vakcíny by měly mít účinnost cca 8 let. Stejně jako polysacharidové vakcíny jsou konjugované vakcíny vysoce imunogenní a bezpečné (11, 36).

Dnes jsou na trhu dostupné různé očkovací vakcíny pod různými komerčními názvy (MENINGOCOCCAL, MENVEO, NEISVAC-C a další) proti *Neisseria meningitidis* séro skupině A, C, Y a W 135. Bohužel proti serologické skupině B se zatím nepodařilo vyvinout účinnou vakcínu z důvodu vysoké příbuznosti kapsulárního polysacharidu s lidskou tkání (36).

1.6.2 Podmínky očkování

Při očkování je důležité dodržovat několik základních podmínek, mezi které patří správný způsob aplikace, zhodnocení zdravotního stavu před očkováním a příp. i vyloučení pacienta z očkování, zajištění zdravotnického dohledu očkované osoby alespoň po dobu 30 minut (12, 36).

Očkování může v některých případech selhat. Nejčastěji selhává z důvodu špatného nakládání s vakcínou, nedodržení chladového řetězce, nesprávné aplikace,

přítomnosti pasivně získaných protilátek v průběhu očkování, onemocnění nebo rekonvalescence (12, 36).

Pro očkování existují určité kontraindikace, které můžeme rozdělit na dočasné a trvalé. Mezi dočasné kontraindikace patří například horečnaté onemocnění, při zjištění těchto kontraindikací se očkování pouze odkládá. Trvalé kontraindikace pacienta z očkování vylučují. Mezi tyto kontraindikace patří například alergie s následným anafylaktickým šokem po podání vakcíny, imunodeficientní onemocnění při očkování živými vakcínami nebo těžké reakce po předchozím očkování (teploty nad 40°C, kolaps, křeče...) (12, 36).

1.6.3 Nežádoucí účinky očkování

Očkování proti *Neisseria meningitidis* může být, stejně jako ostatní očkování, doprovázeno nežádoucími účinky. Mezi časté nežádoucí účinky patří lokální reakce jako zarudnutí, otok nebo bolestivost a citlivost v místě vpichu, dále sem patří celkové reakce jako bolest hlavy, únava, průjemy a další. Tyto nežádoucí účinky trvají jen několik dní a zpravidla ne déle než 3 dny. Při očkování proti *Neisseria meningitidis* se mohou vzácně objevit i křeče, různé druhy vyrážek a dokonce i anafylaktický šok (12, 36).

1.6.4 Druhy očkování

Podle zákona č. 258/2000 Sb., o ochraně veřejného zdraví a jeho prováděcích vyhlášek je v České republice 6 druhů očkování: pravidelná očkování, zvláštní očkování, mimořádná očkování; očkování při úrazech, poraněních, nehojících se ranách a před některými operacemi; očkování na žádost a očkování osob před cestami do zahraničí. Jednotlivé druhy očkování se liší mimo jiné i v peněžních úhradách pacientů za očkování a legislativních dopadech případného neočkování (5, 6).

Očkování proti *Neisseria meningitidis* patří mezi zvláštní očkování, mimořádná očkování a očkování na vlastní žádost, na rozdíl třeba od *Haemophilus influenzae typ b* nepatří mezi pravidelná očkování. Od roku 2001 jsou proti meningokokům očkování

například zaměstnanci záchranné služby, anesteticko-resuscitačního oddělení, infekčních oddělení a další. Pro tyto zaměstnance je povinné, protože jsou vystaveni při výkonu své práce zvýšenému nebezpečí nákazy. Mimořádné očkování se provádí u vybraných skupin obyvatelstva, nařizuje ho hlavní hygienik, pokud hrozí mimořádná epidemiologická činnost. Mimořádná a zvláštní očkování jsou poskytována stejně jako povinná očkování zdarma. Očkování na vlastní žádost slouží k individuální ochraně osob a hradí si ho sami klienti (11, 12).

2 CÍL PRÁCE A HYPOTÉZY

2.1 Cíl práce

Cílem této bakalářské práce je porovnání rychlosti různých metod PCR pro stanovení *Neisseria meningitidis* používaných v laboratořích molekulární biologie a genetiky v Nemocnici ČB a.s.. Dílčím cílem bylo u těchto metod porovnat jejich citlivost.

V laboratořích molekulární biologie a genetiky v Nemocnici ČB a.s. se používá real-time PCR a nested PCR. Rychlost jednotlivých metod je velmi důležitá pro včasné nasazení léčby. Citlivost těchto metod je důležitá pro správné určení *Neisseria meningitidis*.

2.2 Hypotézy

H1: Real-time PCR je nejrychlejší dostupnou metodou pro průkaz meningokoků v Nemocnici ČB a.s. .

3 METODIKA

V laboratořích molekulární biologie a genetiky v Nemocnici ČB a.s. jsou od sebe jednotlivé operace odděleny, čímž se vyloučí „křížení tzv. špinavých a čistých cest“ a sníží se riziko kontaminace vzorků na minimum. Jednotlivé operace se zde provádějí v oddělených místnostech, které se nazývají podle prováděných operací - Master mixy, Izolace, PCR, Elektroforéza. V každé místnosti je laboratorní zařízení a pomůcky pro danou operaci, aby se zabránilo kontaminaci vzorků.

Při všech operacích musí být používány ochranné pomůcky, hlavně pak rukavice a laminární boxy, aby nedocházelo k případnému nakažení personálu. Ve všech laboratořích jsou používány pipety značky Thermo Scientific typ Finnipipette o objemu 1-10 μ l; 2-20 μ l; 0,5-10 μ l; 10-100 μ l; 100-1000 μ l a špičky do těchto mikropipet značky Thermo Scientific typ Finntip Filter o objemu 10 μ l, 20 μ l, 200 μ l, 1000 μ l. Používané špičky Thermo Scientific Finntip Filter, stejně jako mikrozkušavky výrobce Eppendorf jsou sterilizovány a na jedno použití.

Metody používané v laboratořích molekulární biologie a genetiky v Nemocnici ČB a.s. se porovnávaly na zkušební, předem vyizolované DNA *Neisseria meningitidis A* o neznámé koncentraci. Čas potřebný pro stanovení zkušební DNA se měřil na stopkách. Celkový čas potřebný pro stanovení DNA *Neisseria meningitidis A* zahrnoval čas potřebný pro izolaci bakteriální DNA, míchání master mixů, real-time PCR nebo nested PCR a analýzu vzorků.

Kalibrační křivka

Jednotlivé molekulárně biologické metody byly porovnávány na kalibrační řadě v ředěních 10^{-2} - 10^{-9} (viz tabulka 4) s *Neisseria meningitidis A*, která byla ředěna v AE pufru. Při prvním ředění se přidalo do 990 μ l AE pufru 10 μ l vyizolované *Neisseria meningitidis A*. Vzniklý roztok se promíchal na vortexu a stočil se na centrifuze FV-2400 od výrobce BioSan. Při ostatních ředěních se vždy odeberalo 10 μ l z předchozího ředění, zředilo se v 90 μ l pufru a zvortexovalo. Takto připravená kalibrační řada se použila pro real-time PCR i nested PCR. Každé ředění o jeden řád by se mělo projevit při real-time PCR posunem detekovatelné fluorescence (Ct) o 3 cykly dále.

Tabulka 4: Kalibrační řada

	ředění	ředění	AE pufr [μ l]	NM A* [μ l]
1.	10^{-2}	100x	990	10
2.	10^{-3}	1000x	90	10
3.	10^{-4}	10000x	90	10
4.	10^{-5}	100000x	90	10
5.	10^{-6}	1000000x	90	10
6.	10^{-7}	10000000x	90	10
7.	10^{-8}	100000000x	90	10
8.	10^{-9}	1000000000x	90	10

*NM A= *Neisseria meningitidis* A

3.1 Izolace bakteriální DNA

Izolace se prováděla v laminárním boxu značky BioAir typ AURA-MINI. Používal se vortex značky Labnet typ VX100. Dry block pro izolaci se používal značky LABNET typ AccuBlock. Centrifuga se používala značky Eppendorf typ Centrifuge 5417 R. Dále se používaly minutky značky H+H typ 336/0001 pro měření času.

Pro izolaci bakteriální DNA se používal kit QIAgen Mini Kit od firmy QIAGEN.

Postup práce:

1. Zapnutí a nastavení Dry bloku na 56°C.
2. Do připravených zkumavek se napipetovalo 20 μ l proteinázy K.
3. Přidání 200 μ l vzorku k proteináze K.
4. Přidání 200 μ l AL pufru ke vzorku a proteináze K.
5. Vše se cca 20 sekund vortexovalo.
6. Inkubace 15 minut při teplotě 56°C.
7. Přidání 200 μ l 100% EtOH ke směsi.
8. Vzorky se znovu vortexovaly cca 20 sekund.
9. Vzorky se opatrně přelily do připravených kolonek.
10. Kolonky se centrifugovaly 1 minutu při 6000 g.

11. Kolonky se daly do čistých zkumavek a přidalo se 500 μ l AW1 pufru.
12. Kolonky se centrifugovaly 1 minutu při 6000g.
13. Kolonky se přendaly do čistých zkumavek a přidalo se 500 μ l AW2 pufru.
14. Kolonky se centrifugovaly cca 3 minuty při 13 000 g.
15. Kolonky se přendaly do sterilních mikrozskumavek a přidalo se k 100 μ l roztoku AE pufru zahřátého na 56 °C.
16. Roztok se inkuboval 3 minuty při pokojové teplotě.
17. Nakonec se roztok opět centrifugoval cca 1 minutu při 6 000 G.

Takto izolovaná DNA se může uchovávat maximálně 3 dny při 4°C, pro dlouhodobé uchování se musí zmrazit na -20°C (15).

3.2 PCR master mix

Master mixy se připravovaly špičkou s filtrem, na chlazeném stojánku, aby nedocházelo k degradaci polymerázy a primerů. Veškeré operace při přípravě master mixů se dělaly v laminárním boxu výrobce BioAir typ AURA-MINI. Používala se centrifuga a vortex typ Combi-spin FVL-2400 od výrobce BioSan.

3.2.1 Nested PCR

Při nested PCR se nejprve napipetoval master mix pro PCR I, poté se přidala izolovaná DNA a vše se nechalo amplifikovat. Po první amplifikaci se přidal master mix pro PCR II a vzorek se opět nechal amplifikovat na termocykleru od výrobce Biometra typ T3000 Thermocycler. Po druhé amplifikaci se vzorky elektroforeticky analyzovaly (23, 30).

Jednotlivé master mixy se od sebe odlišovaly použitými primery ve směsi. V PCR I byl primer 1 označen jako RU8 a primer 2 byl označován jako U3. Primery pro PCR II se značily RU8 (primer 1) a NM (primer 2).

Postup práce:

1. Podle počtu vzorků (viz tabulka 5) se napipetovala směs pro PCR I do mikrozkušavky a důkladně se promíchala na vortexu.
2. Obsah mikrozkušavky se směsí master mixu se rozpipetoval po 20 μ l do čistých mikrozkušavek.
3. V izolační místnosti se do mikrozkušavek k master mixu pro PCR I přidalo 5 μ l vyizolované *Neisseria meningitidis* A nebo destilované vody. Voda sloužila jako negativní kontrola.
4. Vzorek se poté nechal amplifikovat v termocykleru.
5. Podle počtu vzorků (viz tabulka 5) se do nové mikrozkušavky napipetovala směs master mixu pro PCR II .
6. Po důkladném promíchání PCR II se rozpipetovalo po 20 μ l PCR II do mikrozkušavek.
7. V nested boxu se přidalo 5 μ l namnoženého vzorku z PCR I.
8. Vzorek se opět amplifikoval na termocykleru (23, 30).

Tabulka 5: Dávkování jednotlivých složek pro nested PCR Master mix (μ l)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
PCR Master	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	165	180	195	210	225
voda	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36	39	42	45
primer 1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
primer 2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15

3.2.2 Real-time PCR

Používal se TaqMan Universal Master Mix *Applied Biosystems*, který se uchovával v chladu. Tento master mix obsahoval primery a hydrolytickou sondu, značenou FAM-BHQ, z oblasti *astA* genu. Hydrolytická sonda (zásobní sonda) P-FAM byla připravena v zásobní koncentraci 0,1 mM, pracovní sonda byla ředěna na koncentraci 10 μ M (v případě potřeby se ředila v poměru 5 μ l zásobní sondy s 45 μ l

vody). Zásobní i pracovní sonda byla uložena v krabičce označené LM/NM při -20°C (27).

Postup práce:

1. Podle počtu vzorků (viz tabulka 6) se připravila směs pro real-time PCR.
2. Směs se dobře promíchala na vortexu a do každé mikrozkušavky se napipetovalo 15 µl z této směsi.
3. V izolační místnosti se do 1 mikrozkušavky napipetovalo 5 µl vody, do ostatních mikrozkušavek 5 µl vyzolované DNA *Neisseria meningitidis*
A. Mikrozkušavka s vodou sloužila jako negativní kontrola (27).

Tabulka 6: Dávkování jednotlivých složek pro real-time PCR Master mix (µl)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
voda	3,4	6,8	10	13,6	17	20,4	23,8	27,2	30,6	34	37,4	40,8	44,2	47,6	51
Master mix	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150
primer F	0,6	1,2	1,8	2,4	3	3,6	4,2	4,8	5,4	6	6,6	7,2	7,8	8,4	9
primer R	0,6	1,2	1,8	2,4	3	3,6	4,2	4,8	5,4	6	6,6	7,2	7,8	8,4	9
sonda P-FAM	0,4	0,8	1,2	1,6	2	2,4	2,8	3,2	3,6	4	4,4	4,8	5,2	5,6	6

3.3 PCR

3.3.1 Real-time PCR

Real-time PCR se analyzovala na přístroji značky QIAGEN typ Rotorgene 6000 5-plex.

Postup práce:

1. Mikrozkušavky se vložily do přístroje Rotorgene 6000 5-plex.
2. Na přístroji se naastavil se program RG 6000 - RG 6000 - BAK NM, kde byl nastaven následující teplotní profil: 50°C 2 min., 95°C 10 min., 55x

(95°C 15 s, 60°C 1 min.). Treshold byl empiricky nastaven na hodnotu 0,04782.

3. Rotorgene 6000 5-plex se zapnul (7, 25, 27).

3.3.2 *Nested PCR*

Ve skutečnosti se používala tzv. seminested PCR, protože se při obou reakcích používal stejný primer 1 - primer RU8. Nested PCR se analyzovala na termocykleru značky Biometra typ T 3000 Thermocycler. Aby bylo možné odečíst výsledky, musely se vzorky zhodnotit pomocí elektroforézy.

Postup práce:

1. Směs master mixu pro PCR I a izolované DNA se vložila v mikrokumavkách do termocykleru, nastavil se program, který běžel cca 3 hodiny. V této reakci se pouze předmnožila nukleová kyselina.
2. Po amplifikaci se vzorky vyjmuly z přístroje a přidal se k nim master mix pro PCR II a směs se nechala znovu amplifikovat. Při této reakci se množil konkrétní bakteriální úsek nukleové kyseliny, specifický pro *Neisseria meningitidis A*.
3. Po PCR II se amplifikované vzorky elektroforeticky proměřily (24).

3.4 *Elektroforéza*

Před vlastní elektroforézou se musel vyrobit 2% agarózový gel pro elektroforézu. Používala se agaróza pro elektroforézu od dodavatele SERVA research grade a ethidiumbromid od firmy GeneTICA. S agarózovým gelem, pufrů a ethidiumbromidem se pracovalo v digestoři od firmy MERCI s.r.o.

Příprava gelu:

1. 1 g předvážené agarózy se zahřál a rozpustil v 50 ml TBE pufru.
2. Do agarózy se kápily cca 2 kapky ethidiumbromidu a vše se dobře promíchalo.

3. Rozpuštěná a zahřátá agaróza v pufru s ethidiumbromidem se nalila do připravené formy na gel.
4. Do formy s agarózou se vložily 2 tzv. hřebeny, aby se vytvořily jamky pro vzorky. Takto připravený gel se nechal ztuhnout.
5. Po zchlazení gelu se opatrně vyndaly hřebeny a připravený gel se vložil do elektroforetické vany.

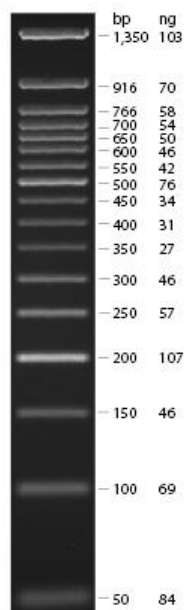
Vlastní elektroforézu se prováděla na elektroforetických vanách od firmy SCIE-PLAS typ HU 13, zdroj napětí se používal značky Biometra typ Standard Power Pack P 25.

Postup elektroforézy:

1. Agarózový gel se ponořil do TBE pufru v elektroforetické vaně.
2. Do jamek v agarózovém gelu se napipetovaly vzorky z PCR obarvené bromfenolovou modří.
3. Uzavřela se elektroforetická vana, nastavil se zdroj napětí na 100 V a zapnul se.
4. Po necelé hodině se vyjmul agarózový gel z elektroforetické vany a provedla se následná analýza obrazu.
5. Analýza obrazu se dělala na snímacím systému MiniBIS Pro od firmy DNR.

Velikostní standard používaný při elektroforéze pro nested PCR je dělen cca po 50 párech bází (viz obrázek 1). Velikost produktu *Neisseria meningitidis* je 710 bp (7, 9, 25).

Obrázek 1: Velikostní standard při elektroforéze pro nested PCR



4 VÝSLEDKY

Real-time PCR a nested PCR jsem testovala na kalibrační řadě zhotovené z izolované DNA *Neisseria meningitidis A*. U těchto metod jsem porovnávala čas, kterého bylo potřeba pro určení a stanovení *Neisseria meningitidis A*. Dále jsem si u metod všimla i jejich citlivosti, která je důležitá pro správný průkaz bakterie.

4.1 Nested PCR

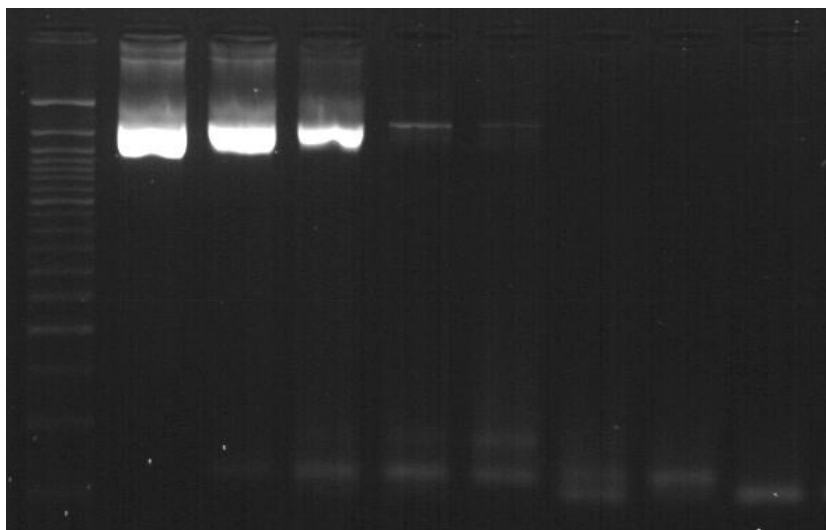
4.1.1 Potřebný čas

Izolace DNA *Neisseria meningitidis A* trvala 34 minut. První kolo nested PCR trvalo 3 hodiny 24 minut, druhé kolo nested PCR trvalo 2 hodiny a 3 minuty. Míchání 2 master mixů trvalo 30 minut. Elektroforéza trvala 56 min. Celkový čas potřebný pro prokázání *Neisseria meningitidis A* metodou nested PCR je cca 7 hodin a 30 minut.

4.1.2 Citlivost metody

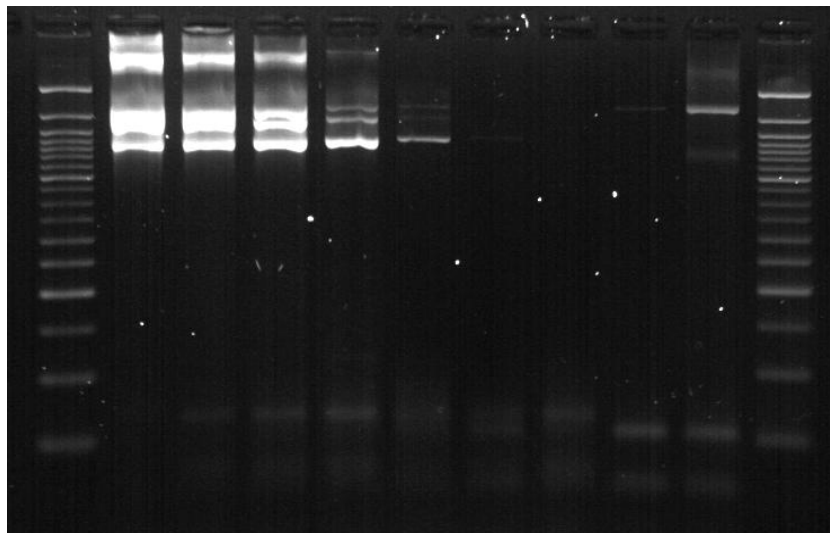
Při prvním kole nested PCR je na elektroforéze detekovatelných prvních 5 ředění (viz foto 1), posledním detekovatelným ředěním bylo 10^{-6} .

Foto 1: První kolo nested PCR



Druhé kolo nested PCR bylo o řád citlivější než kolo první. Při druhém kole nested PCR bylo detekovatelných prvních 6 ředění, tudíž posledním detekovatelným ředění bylo 10^{-7} (viz foto 2).

Foto 2: Druhé kolo nested PCR



4.2 Real-time PCR

V tabulce (viz tabulka 7) jsou uvedeny hodnoty Ct (= Cycle thresholds) při tresholdu. Hodnoty Ct označují cyklus, ve kterém se fluorescence významně zvýšila a překročila treshold. Treshold byl nastaven na hodnotu 0,04782.

Tabulka 7.: Hodnoty Ct při tresholdu a barva křivek

	vzorek	ředění	Ct	barva křivky
1.	NM A	10^{-2}	18,54	červená
2.	NM A	10^{-3}	23,25	zelená
3.	NM A	10^{-4}	26,62	modrá
4.	NM A	10^{-5}	29,63	světle zelená
5.	NM A	10^{-6}	33,37	růžová
6.	NM A	10^{-7}	37,52	světle modrá
7.	NM A	10^{-8}	38,86	černá
8.	NM A	10^{-9}		běžová
9.	negativní kontrola			tmavě zelená

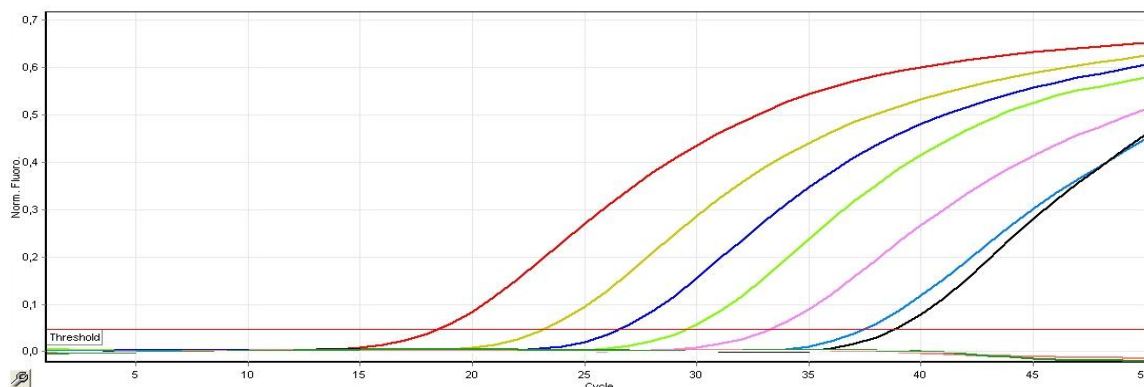
4.2.1 Potřebný čas

Izolace bakteriální DNA trvala 34 minut. Namíchání master mixu trvalo cca 16 minut. Real-time PCR trvalo 2 hodiny a 49 minut. Celkový čas potřebný pro určení *Neisseria meningitidis* A metodou real-time PCR je cca 3 hodiny a 40 minut.

4.2.2 Citlivost metody

Při real-time PCR je detekovatelných 7 ředění (viz obrázek 2.), tudíž posledním detekovatelným ředěním je 10^{-8} . Jednotlivým ředěním (křivkám) jsou přiřazeny konkrétní barvy (viz obrázek 2). Na ose x je počet cyklů, na ose y fluorescence.

Obrázek 2: Real-time PCR



5 DISKUZE

Při experimentu jsem sledovala celkový čas potřebný pro stanovení *Neisseria meningitidis* A. V celkovém čase pro stanovení *Neisseria meningitidis* A byl zahrnut čas potřebný pro izolaci bakteriální DNA, namíchání master mixů, provedení real-time PCR nebo nested PCR a čas potřebný pro analýzu jednotlivých metod PCR. Tento čas je velmi důležitým faktorem pro zahájení včasné léčby antibiotiky, zabránění dalšího šíření onemocnění a tím i zabránění vzniku případných epidemií. K celkovému času pro stanovení *Neisseria meningitidis* je nutné připočítat i čas potřebný k izolaci bakteriální DNA z biologického materiálu, bez které nelze stanovovat bakterii pomocí nested PCR a real-time PCR.

Zjištěný celkový čas potřebný pro nested PCR byl 7 hodin a 30 minut, real-time PCR trvala 3 hodiny a 40 minut. Real-time PCR byla rychlejší než nested PCR o 3 hodiny a 50 minut. Z molekulárně biologických metod používaných v Nemocnici ČB a.s. je real-time PCR nejrychlejší dostupnou metodou PCR.

V průběhu vypracování bakalářské práce jsem zjistila, že nejrychlejší metodou používanou pro stanovení *Neisseria meningitidis* v Nemocnici ČB a.s. je latexová aglutinace, která se používá v laboratořích bakteriologie. Princip latexové aglutinace je založen na průkazu antigenů pomocí protilátek. Latexová aglutinace trvá cca 30 minut. V bakteriologických laboratořích se pro latexovou aglutinaci používá souprava PASTOREXTM MENINGITIS od výrobce BIO-RAD (3, 35). Bohužel tato metoda selhává při diagnostice degradované *Neisseria meningitidis* například po špatném transportu biologického materiálu nebo po preventivním nasazení antibiotik. Antibiotika se v mnoha případech nasazují preventivně ještě před odebráním vzorku pro diagnostiku původce onemocnění, aby se zabránilo případným komplikacím meningokokové meningitidy nebo sepse. Molekulárně biologické metody jsou v těchto případech podstatně spolehlivější, protože jsou narušeny od latexové aglutinace založeny na přítomnosti nukleové kyseliny a ne na vlastnostech živé bakterie *Neisseria meningitidis*. Vzhledem k tomu, že real-time PCR trvala 3 hodiny a 40 minut a latexová aglutinace trvá cca 30 minut, nepotvrdila se hypotéza, formulovaná na začátku této bakalářské práce: „Real-time PCR je nejrychlejší dostupnou metodou pro průkaz meningokoků v

Nemocnici ČB a.s.“. Nejrychlejší dostupnou metodou pro průkaz meningokoků v Nemocnici ČB a.s. je latexová aglutinace.

Citlivost jednotlivých molekulárně biologických metod je velmi důležitým faktorem pro správné stanovení *Neisseria meningitidis*. Na citlivosti je závislá mimo jiného i správná léčba meningokokové meningitidy a sepse. U pacientů, kterým byly preventivně nasazena antibiotika je množství bakterie v biologickém materiálu nižší než u pacientů, kteří ještě léčbu nedostali. U zaléčených pacientů je v biologickém materiálu také více degradovaných bakterií. Latexová aglutinace vykazuje oproti molekulárně biologickým metodám vyšší procento falešně negativních výsledků (20). Tyto falešně negativní výsledky jsou způsobeny již výše zmíněnými důvody - molekulárně biologické metody prokazují bakteriální DNA ve vzorku, latexová aglutinace prokazuje schopnosti *Neisseria meningitidis* (1, 22).

Pomocí real-time PCR jsem detekovala prvních 7 ředění s *Neisseria meningitidis* A, posledním detekovatelným ředěním bylo ředění 10^{-8} . U nested PCR jsem detekovala pouze prvních 6 ředění, posledním detekovatelným ředěním, které jsem prokázala pomocí nested PCR, bylo 10^{-7} . V prvním kole nested PCR jsem detekovala pouze prvních 5 ředění s *Neisseria meningitidis* A, tj. nejnižší ředění 10^{-6} . Z toho vyplývá, že druhé kolo nested PCR zvyšuje citlivost o řád. Real-time PCR je o dva řády citlivější než první kolo nested PCR a o jeden řád citlivější než druhé kolo nested PCR. Nejcitlivější molekulárně biologickou metodou používanou v laboratořích molekulární biologie a genetiky Nemocnici ČB a.s. je real-time PCR, pomocí které jsem detekovala prvních 7 ředění s *Neisseria meningitidis* A, kde bylo nejnižším detekovatelným ředěním 10^{-8} .

Ředění o jeden řád by se mělo projevit při real-time PCR posunutím Ct hodnoty o 3 cykly (25). Z tabulky (viz tabulka 7) vyplývá, že jednotlivé Ct hodnoty se posouvaly v rozmezí 1,34 - 4,71 cyklu. Tato odchylka od teoretického předpokladu mohla vzniknout pipetovací chybou při přípravě kalibrační řady. Dále mohla vzniknout částečnou degradací Taq polymerázy v průběhu reakce real-time PCR (14, 26).

6 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo porovnání času a citlivosti různých metod PCR používaných na posuzovaném pracovišti, kterými se stanovuje *Neisseria meningitidis*. Hypotéza, že real-time PCR je nejrychlejší dostupnou metodou pro průkaz meningokoků v Nemocnici ČB a.s. se nepotvrdila. Nejrychlejší dostupnou metodou pro průkaz meningokoků v Nemocnici ČB a.s. je latexová aglutinace, která se používá v laboratořích bakteriologie.

U onemocnění způsobených *Neisseria meningitidis* je velmi důležitá rychlost i citlivost diagnostických metod, kvůli jejich rychlému a závažnému průběhu. Rychlost metody výrazně ovlivňuje následky onemocnění, včasné zahájení léčby, zabránění dalšího šíření onemocnění a zabránění případné epidemie. Citlivost metody je důležitá pro vlastní diagnostiku onemocnění, vyšší citlivost metody výrazně snižuje procento falešně negativních výsledků.

Díky tomu, že se pomocí molekulárně biologických metod prokazuje přítomnost specifické bakteriální DNA ve vzorku, lze provádět diagnostiku narozdíl od latexové aglutinace i u znehodnoceného vzorku (například vzorek biologického materiálu byl odebrán od pacienta až po nasazení účinných antibiotik nebo byly bakterie usmrceny nesprávnou manipulací se vzorkem atd.). Pokud je *Neisseria meningitidis* prokazována ve znehodnoceném vzorku pomocí latexové aglutinace, může být vzorek hodnocen jako falešně negativní.

Pro zefektivnění stanovení *Neisseria meningitidis* by se měly podezřelé vzorky zasílat jak do bakteriologických laboratoří na latexovou aglutinaci s následným určením seroskupiny a citlivosti na antibiotika, tak i do laboratoří molekulární biologie a genetiky pro stanovení pomocí real-time PCR. Tímto by se urychlil průkaz *Neisseria meningitidis*, pokud byl vzorek nějakým způsobem poškozený. Zároveň by tento postup mohl sloužit jako kontrola. Tento postup ale předpokládá dostatečné množství vzorku, které nemůže být vždy zaručeno (například u kojenců atd.), v takových případech by bylo vhodné posílat vzorek rovnou do laboratoří molekulární biologie a genetiky.

Zajímavé by bylo porovnání rychlosti a citlivosti metod průkazu *Neisseria meningitidis* používaných v laboratořích molekulární biologie a genetiky Nemocnice ČB a.s., s metodami používanými pro v bakteriologických laboratořích.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

1. BEDNÁŘ, M. Imunologické stanovení druhu vyvolavatele v odebraném materiálu: Latexová aglutinace - stanovení v biologických tekutinách. In: *Univerzita Karlova v Praze 3. lékařská fakulta: Ústav lékařské mikrobiologie* [online]. 7.4. 2012 [cit. 2012-04-14]. Dostupné z: <http://old.lf3.cuni.cz/mikrobiologie/bak/uceb/obsah/>.
2. BRICHTA J.. Infekční onemocnění nervového systému. In: *NEUROLOGIE pro sestry*. První vydání. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2003. ISBN 80-7013-287-6.
3. Clinical diagnostics. *BIO - RAD* [online]. © 2012 Bio-Rad Laboratories [cit. 2012-04-14]. Dostupné z: <http://www.bio-rad.com/prd/en/CZ/adirect/biorad?cmd=catProductDetail&isFromSearch=true&productID=61607&vertical=CDG&parentCategoryGUID=LO5CT88WI>.
4. ČESKO. Vyhláška č. 473/2008 Sb., o systému epidemiologické bdělosti pro vybrané infekce.
5. ČESKO. Vyhláška č. 537/2006 Sb., o očkování proti infekčním nemocem.
6. ČESKO. Zákon č. 258/2000 Sb., o ochraně veřejného zdraví.
7. Data Analysis (for Users of QuantiFast SYBR Green Kits and QuantiTect SYBR Green Kits). In: *QIAGEN - Sample & Assay Technologies* [online]. © QIAGEN 2003-2012, [cit. 2012-03-05]. Dostupné z: http://www.qiagen.com/resources/info/guidelines_rtpcr/dataanalysis_sybr.aspx.
8. DIC. In: *Velký lékařský slovník* [online]. © Maxdorf 2008 -, [cit. 2012-04-14]. Dostupné z: <http://www.lekarske.slovniky.cz/pojem/dic>.
9. *Elektroforéza - bakteriologie*. Nemocnice ČB a.s., 2008.
10. Fakultní nemocnice Brno. Vybraná infekční onemocnění - charakteristika, postupy. In: *fnbrno.cz* [online]. © 2012 Fakultní nemocnice Brno [cit. 2012-03-17] Dostupné z: <http://www.fnbrno.cz/detska-nemocnice/klinika-detskych-infekcnich-nemoci/vybrana-infekcni-onemocneni-charakteristika-postupy/t2848>.
11. GÖPFERTO VÁ D. et kol., *Epidemiologie*. 1.vydání. Praha: Karolinum, 2006. ISBN 80-246-1232-1.

12. GÖPFERTO VÁ D. et kol., Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie a hygiena. 3.doplněné vydání. Praha: TRITON, 2002. ISBN 80-7254-223-0.
13. HLÁSKOVÁ, Milena. Barvení podle Grama. *Biologie a mikrobiologie*. Analýza potravin. Střední odborná škola pro ochranu a tvorbu životního prostředí, Veselí nad Lužnicí. 24.9.2008.
14. HULÁK M.. Molekulárno-genetické metody. In: *Molekulárne základy biológie a genetiky v rybárstve*. První vydání. Vodňany: VÚRH JU, 2008. ISBN 978-80-85887-81-5.
15. *Izolace DNA*. Nemocnice ČB a.s., 2008.
16. KALAUŠOVÁ M.. Patobiochemie likvoru. In: PATOBIOCHEMIE ve schématech. První vydání. Praha: Grada, 2006. ISBN 80-247-1522-8.
17. KALMUSOVÁ, Jitka. PCR z různého klinického materiálu - průkaz N. meningitidis, H. influenzae, S. pneumonie In: *szu.cz* [online] 16.4.2008 [cit. 2011-12-07]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/tema/prevence/pcr-z-ruzneho-klinickeho-materialu-prukaz-n-meningitidis-h?highlightWords=klinick%C3%A9+obrazy>.
18. KASALOVÁ, Tereza. *Kvantifikace progresu virové infekce virů RaMV a TuRSV pomocí real-time PCR*. České Budějovice, 2008. Diplomovaná práce. Jihočeská univerzita. Přírodovědecká fakulta.
19. KLAHUN V.. Ilustrovaný mikrobiologický slovník. 1. české vydání. Praha: Galén, 2005. ISBN 80-7262-341-9.
20. KŘÍŽOVÁ, P., MUSÍLEK, M., VACKOVÁ, Z., KOZÁKOVÁ, J.. Invazivní meningokokové onemocnění v České republice v roce 2010. *Zprávy Centra epidemiologie a mikrobiologi*. 2011,20(2), 59-63. ISSN 1804-8668.
21. KULICH. Meningokok. In: *blog.cz* [online]. 10.4.2009 [cit. 2012-03-17]. Dostupné z: honzicekx666.blog.cz/0904/meningokok.
22. PAZLAROVÁ, Jarmila. Metody v mikrobiologické laboratoři. In: *Elektronické Studijní Opory* [online]. 14. 5. 2010 [cit. 2012-04-14]. Dostupné z: http://eso.vscht.cz/cache_data/1191/biomikro.vscht.cz/metmiklab/Metmiklab.pdf

23. *PCR MASTER (ROCHE)*. Nemocnice ČB a.s., 2008.
24. *PCR - Neisseria meningitidis*. Nemocnice ČB a.s., 2008.
25. Podle ústního sdělení Pavla Trubače (pracovníka Nemocnice České Budějovice, a.s. - laboratoře molekulární biologie a genetiky, Boženy Němcové 585/54, České Budějovice 7) dne 22.2.2012.
26. PRITCHARD D.J., KORF B.C. Polymerázová řetězová reakce. In: *Základy lékařské genetiky*. První české vydání. Praha: Galén, 2007. ISBN 978-80-7262-449-2.
27. *Real-time PCR - Neisseria meningitidis*. Nemocnice ČB a.s., 2008.
28. ROHÁČOVÁ J., Meningitidy a meningoencefalitidy u dětí a jejich prevence. In: *Lékařské listy*. 2011, 60(8), 17-20. ISSN 1214-7664.
29. ROHÁČOVÁ J., Meningokokové infekce a možnosti jejich prevence. In: *Lékařské listy*. 2010, 59(13), 9-14. ISSN 1214-7664.
30. ROCHE APPLIED SCIENCE. PCR Master. In: *roche-applied-science.com* [online]. © 1996-2012 Roche Diagnostics [cit. 2012-02-03]. Dostupné z: https://e-labdoc.roche.com/LFR_PublicDocs/ras/11636103001_en_10.pdf.
31. SEIDL Z.. Zánětlivá onemocnění nervového systému. In: *Neurologie pro nelékařské zdravotnické obory*. První vydání. Praha: Grada Publishing, 2008. ISBN 978-80-247-2733-2.
32. Sepse. In: *Velký lékařský slovník* [online]. © Maxdorf 2008 - , [cit. 2012-04-14]. Dostupné z: <http://www.lekarske.slovniky.cz/pojem/sepse>.
33. SCHINDLER, Jiří. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, 2010. ISBN 978-80-247-3170-4.
34. ŠNEDAROVÁ, Martina. *Nebezpečí importované nákazy způsobené bakterií Neisseria meningitidis*. České Budějovice, 2010. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita. Zdravotně sociální fakulta.
35. *URČENÍ SEROSKUPINY Neisseria meningitidis PASTOREX™ MENINGITIDIS/*. Nemocnice ČB a.s., 2008.
36. *Vakciny.net* [online]. 11.4. 2012 [cit. 2012-02-03]. Dostupné z: <http://www.vakciny.net>

37. VOTAVA, M. et. al.: *Lékařská mikrobiologie speciální*. Praha: NEPTUN, 2006. ISBN 80-902896-6-5.
38. Waterhousův-Friderichsenův syndrom. In: *Velký lékařský slovník* [online]. Copyright © Maxdorf 2008 - [cit. 2012-04-14]. Dostupné z: <http://www.lekarske.slovníky.cz/pojem/waterhousuv-friderichsenuv-syndrom>.
39. Zdravotnické noviny. Infekce vyvolané meningokokoky. In: *zdn.cz* [online]. 7.6 2006 [cit. 2012-03-16]. Dostupné z: www.zdn.cz/clanek/postgraduální-medicina/infekce-vyvolane-meningokokoky-173279.

8 KLÍČOVÁ SLOVA

Elektroforéza

Izolace nukleové kyseliny

Latexová aglutinace

Neisseria meningitidis

Nested PCR

Real-time PCR

9 PŘÍLOHY

9.1 Seznam příloh

- Příloha 1: Petechie při meningokokové meningitidě
- Příloha 2: Sufuze při meningokokové meningitidě
- Příloha 3: Nekróza při meningokokové sepsi

Příloha 1: Petechie při meningokokové meningitidě (21).



Příloha 2: Sufuze při meningokokové meningitidě (10).



Příloha 3: Nekróza při meningokokové sepsi (39).

