

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA**

Ústav imunologie

**Michaela Mattanelli**

**Postvakační odpověď u pacientů se  
syndromem DiGeorge**

*Bakalářská práce*

Praha 2012

Autor práce: **Michaela Mattanelli**

Vedoucí práce: **Bc. Anna Skalická**

Oponent práce: **Prof. MUDr. Anna Šedivá DSc.**

Datum obhajoby: **2012**

## **Bibliografický záznam**

MATTANELLI, Michaela. *Postvakcinační odpověď u pacientů se syndromem DiGeorge*. Praha: Karlova Univerzita, 2. lékařská fakulta, Ústav imunologie, 2012. 64 s. Vedoucí bakalářské práce Bc. Anna Skalická.

## **Anotace**

Syndrom DiGeorge je autozomálně dominantně dědičné onemocnění s incidencí 1 : 4 000. Jeho charakteristické fenotypové projevy se souhrnně označují jako asociace CATCH 22. Svým nositelům může způsobovat závažné klinické obtíže. Z imunologického hlediska se syndrom řadí mezi primární vrozené deficity buněčné imunity. Dle závažnosti imunodeficiency lze rozlišovat DiGeorgův syndrom kompletní a částečný. U pacientů je vlivem nesprávného vývoje thymu postižena T buněčná imunita. Práce se zabývá humorální imunitou pacientů se syndromem DiGeorge, která by teoreticky neměla být postižena. Je zaměřena zejména na postvakcinační protilátky a jejich dynamiku a na imunoglobuliny třídy A, G, E a M. Sledování pacientů z databáze pacientů se syndromem DiGeorge vyšetřených na Ústavu imunologie 2. LF UK a FN v Motole v letech 1995 - 2011 ukazuje, že postvakcinační odpověď u syndromu DiGeorge není výrazně ovlivněna. Patologické hodnoty hladin základních sledovaných imunoglobulinů byly pozorovány.

## **Annotation**

DiGeorge syndrome is an autosomal dominantly inherited disease with an incidence of 1: 4 000. Its distinctive phenotypic manifestations are collectively referred to as CATCH 22. Its holders can cause serious clinical problems. One of the primary syndrome congenital deficits of cellular immunity from an immunological point of view. According to the severity of immunodeficiency DiGeorge syndrome can distinguish complete and partial. Patients due to improper development of thymic T cell immunity has affected. The work deals with the humoral immunity of patients with DiGeorge syndrome, which should theoretically not be affected. It is mainly focused on post-vaccination antibodies and their dynamics, and immunoglobulins A, G, E and M. Monitoring patients from the database of patients with DiGeorge syndrome examined at the Institute of Immunology, 2nd Charles University Medical Faculty and University Hospital Motol in the years 1995 - 2011 shows that post-vaccination response in

DiGeorge syndrome is not significantly affected. Abnormal levels of immunoglobulins were observed fundamental observed.

## **Klíčová slova**

DiGeorgův syndrom, CATCH 22, mikrolece 22q11, imunoglobuliny, postvakcinační protilátky, vakcíny, tetanus, pneumokokové nákazy, hemofilové nákazy typu b

## **Keywords**

DiGeorge syndrome, CATCH 22, microdeletion 22q11, immunoglobulins, post-vaccination antibody, vaccine, tetanus, pneumococcal infection, haemophilus type b infection

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci zpracovala samostatně pod vedením Bc. Anny Skalické, uvedla všechny použité literární a odborné zdroje a dodržovala zásady vědecké etiky. Dále prohlašuji, že stejná práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze 23. dubna 2012

Michaela Mattanelli

## **Poděkování**

Děkuji Bc. Anně Skalické z Ústavu imunologie 2. LF UK a FN v Motole za vedení práce a Bc. Evě Dudkové z téhož ústavu za pomoc s přípravou praktické části práce a cenné rady. Dále bych ráda poděkovala MUDr. Radaně Zachové a paní Jeleně Hladovcové za poskytnutí informací o pacientech. V neposlední řadě děkuji svému partnerovi a své rodině za toleranci a podporu během psaní práce.

# Obsah

<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....</b>	<b>9</b>
<b>ÚVOD.....</b>	<b>10</b>
<b>1 CÍL.....</b>	<b>11</b>
<b>2 SYNDROM DIGEORGE .....</b>	<b>12</b>
2.1 GENETICKÁ PODSTATA.....	12
2.2 DIAGNOSTIKA.....	13
2.2.1 Diagnostická kritéria.....	13
2.2.2 Genetické vyšetření.....	13
2.3 CATCH 22.....	14
2.3.1 Rozštěp patra a abnormální tvář.....	14
2.3.2 Hypoplázie thymu.....	14
2.3.3 Srdeční vady.....	15
2.3.4 Hypoparathyroidismus.....	15
2.4 PROGNÓZA PACIENTŮ.....	16
2.5 TERAPIE .....	16
2.6 IMUNITA U PACIENTŮ SE SYNDROMEM DIGEORGE .....	17
<b>3 IMUNOGLOBULINY .....</b>	<b>19</b>
3.1 STRUKTURA IMUNOGLOBULINŮ .....	19
3.2 FUNKCE IMUNOGLOBULINŮ.....	19
3.3 TRÍDY IMUNOGLOBULINŮ.....	20
3.3.1 Imunoglobulin A.....	20
3.3.2 Imunoglobulin D.....	20
3.3.3 Imunoglobulin E.....	21
3.3.4 Imunoglobulin G.....	21
3.3.5 Imunoglobulin M.....	21
<b>4 VAKCINACE .....</b>	<b>23</b>
4.1 VAKCÍNY.....	23
4.1.1 Vakcíny z oslabených mikroorganismů.....	23
4.1.2 Vakcíny z usmrcených mikroorganismů.....	24
4.1.3 Rekombinantní vakcíny.....	24
4.1.4 Subjednotkové vakcíny.....	24
4.1.5 Vakcíny obsahující bakteriální pouzdra.....	24
4.1.6 Toxoidy.....	25
4.2 TETANUS.....	25
4.2.1 Tetanická vakcína.....	26
4.2.2 Očkování proti tetanu.....	26
4.3 PNEUMOKOKOVÉ NÁKAZY.....	29
4.3.1 Vakcína proti pneumokokovým nákazám.....	30
4.3.2 Očkování proti pneumokokovým nákazám.....	31
4.4 HEMOFILOVÉ NÁKAZY TYPU B.....	34
4.4.1 Očkování proti hemofilovým nákazám typu b.....	35
<b>5 VZOREK PACIENTŮ.....</b>	<b>38</b>
<b>6 METODIKA .....</b>	<b>39</b>
6.1 PREANALYTICKÁ FÁZE.....	39
6.2 KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ PROTILÁTEK PROTI TETANU.....	40
6.2.1 Princip metody.....	40
6.2.2 Interpretace výsledků.....	40
6.3 STANOVENÍ PROTILÁTEK PROTI STREPTOKOKU PNEUMONIAE.....	41
6.3.1 Princip metody.....	41
6.3.2 Interpretace výsledků.....	41
6.4 STANOVENÍ PROTILÁTEK PROTI HAEMOPHILU INFLUENZAE.....	41

---

6.4.1	Princip metody .....	41
6.4.2	Interpretace výsledků .....	42
6.5	DATABÁZE PACIENTŮ .....	42
6.6	SLEDOVÁNÍ DYNAMIKY POSTVAKCINAČNÍCH PROTILÁTEK .....	43
<b>7</b>	<b>VÝSLEDKY</b> .....	<b>44</b>
7.1	DATABÁZE PACIENTŮ .....	44
7.1.1	Obecné poznatky .....	44
7.1.2	Sledování základních imunoglobulinů .....	46
7.1.3	Sledování postvakcinačních protilátek .....	48
7.2	SLEDOVÁNÍ DYNAMIKY POSTVAKCINAČNÍCH PROTILÁTEK .....	50
<b>8</b>	<b>DISKUZE</b> .....	<b>55</b>
	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>57</b>
	<b>REFERENČNÍ SEZNAM</b> .....	<b>58</b>
	<b>SEZNAM PŘÍLOH</b> .....	<b>61</b>
	<b>PŘÍLOHY</b> .....	<b>62</b>



## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

CATCH 22	mikrodelece chromozomu 22
CD3	povrchový antigen na T lymfocytech
CRM197	mutantní difterický toxoid
DGCR	kritický region DiGeorgova syndromu
DGS	syndrom DiGeorge
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace (fluorescent <i>in situ</i> hybridization)
FN	fakultní nemocnice
HIB	<i>Haemophilus influenzae</i> typu b
HIV	virus lidské imunodeficiency (human immune deficiency virus)
Ig	imunoglobulin
IgA	imunoglobulin A
IgD	imunoglobulin D
IgE	imunoglobulin E
IgG	imunoglobulin G
IgM	imunoglobulin M
LF	lékařská fakulta
PCP	pneumokokové kapsulární antigeny
SCID	těžká kombinovaná imunodeficiency
TMB	tetrametylbenzidin
UK	Univerzita Karlova

## ÚVOD

Syndrom DiGeorge je závažným vrozeným onemocněním imunitního systému. Převážná většina pacientů jsou nositelé mikrodelece chromozomu 22q11. Klinické projevy této aberace i jejich závažnost mohou být u jednotlivých pacientů značně variabilní. Onemocnění je asociované s poruchou vývoje thymu, jeho aplázií, hypoplázií nebo patologickou migrací. To je příčinou vzniku T buněčné imunodeficiencie, která je dle závažnosti rozdělena na kompletní a částečný syndrom DiGeorge. Sledování parametrů humorální imunity může pomoci dokreslit představu o celkové funkci imunitního systému pacientů se syndromem DiGeorge.

## 1 Cíl

Cílem této bakalářské práce je sestavení databáze pacientů s diagnostikovaným syndromem DiGeorge vyšetřených na Ústavu imunologie 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice v Motole v letech 1995 - 2011. Databáze bude zaměřena zejména na specifické postvakcinační protilátky a základní imunoglobuliny těchto pacientů. U pacientů se syndromem DiGeorge dochází vlivem poruchy vývoje thymu k rozvoji defektu T buněčné imunity. Cílem této práce však je zhodnocení humorální imunity pacientů, která by teoreticky neměla být postižena.

Dílním cílem práce je přinést poznatky o dynamice vybraných postvakcinačních protilátek a pomoci tak dokreslit představu o imunitním systému pacientům se syndromem DiGeorge. V neposlední řadě je cílem této bakalářské práce přinést základní teoretické poznatky o syndromu DiGeorge a o sledovaných imunitních parametrech.

## 2 Syndrom DiGeorge

Syndrom DiGeorge (DGS) je poměrně časté, geneticky podmíněné onemocnění. Je charakterizováno fenotypovými projevy, které se souhrnně označují jako CATCH 22. Z hlediska klinické imunologie je nejdůležitějším rysem hypoplázie thymu, která může vést k různě závažným defektům imunity. Příčinou klinických projevů je porucha 3. a 4. žaberního oblouku při embryogenezi (Hong, 2001).

DiGeorgův syndrom je řazen k primárním vrozeným imunodeficiencím. DGS se projevuje již v novorozeneckém věku. V tomto období se však obvykle neprojeví defektem imunity, ale častěji komplikacemi vyplývajících z postižení srdce a příštítných tělísek (Šedivá, 1999).

### 2.1 Genetická podstata

Syndrom DiGeorge je nejčastějším mikrolečným syndromem (Seemanová, 2002). Je přenášen jako autozomálně dominantní znak. Pravděpodobnost, že dítě zdědí mikrolečnici 22q11 od postiženého rodiče je 50 %. Aberace se vyskytuje u chlapců i dívek. Většina pacientů s mikrolečnicí 22q11 má heterozygotní konstituci chromozomů.

Příčinou onemocnění je intersticiální mikrolečnice dlouhého raménka chromozomu 22. Nejčastěji se u pacientů vyskytuje mikrolečnice v pruhu 22q11.2 (DGCR – DiGeorge chromozom region). U 5 % pacientů, kteří mají stejné klinické příznaky jako pacienti s delecí 22q11 je nalézána delece krátkého raménka chromozomu 10, nejčastěji pruhu 10p13-10p14 (Gennery et al., 2002). Vzácně lze pozorovat klinické příznaky DGS u pacientů, u nichž není prokázána žádná chromozomální porucha (Šedivá, 1999).

Ve většině případů je deletován úsek o velikosti asi 3Mb, vzácněji pak úsek dlouhý 1,5 Mb. Mikrolečnice 22q11.2 může zahrnovat až 40 genů. Z toho důvodu je fenotypová variabilita velmi široká. „*Intersticiální mikrolečnice dlouhého raménka chromozomu 22 (pruh 22q11) je podle některých autorů druhou nejčastější chromozomovou aberací nalézanou u člověka (po volné trizomii chromozomu 21). Současné studie udávají zpravidla incidenci 1 : 4 000 novorozenců, což je výskyt srovnatelný s nejběžnějšími aneuploidii gonozomů.*“ (Kočárek, 2010, s. 124). DiGeorgův syndrom nejčastěji vzniká, stejně jako ostatní mikrolečnicí syndromy, následkem nereciprokého crossing-overu během meiózy.

Většina mutací vzniká *de novo*. V 5-10 % případů je zaznamenán rodinný výskyt. Přítomnost výrazných fenotypových rozdílů projevujících se v rámci jedné rodiny svědčí o komplikovaném molekulárně genetickém základu onemocnění (Kitsiou-Tzeli et al., 2004).

## 2.2 Diagnostika

### 2.2.1 Diagnostická kritéria

Vzhledem k variabilitě klinických příznaků a jejich rozdílné závažnosti u jednotlivých pacientů je diagnostika DGS mnohdy složitá. Z toho důvodu byla vytvořena diagnostická kritéria. Pacienti obou pohlaví, kteří mají koncentraci lymfocytů T CD3+ menší než 500/ $\mu$ l a zároveň je u nich prokazatelná konotrunkální srdeční vada a laboratorní nebo klinické známky hypokalcémie, konotrunkální srdeční vada a delece 22q11.2, laboratorní nebo klinické známky hypokalcémie a delece 22q11.2, případně konotrunkální srdeční vada a delece 22q11.2 a laboratorní nebo klinické známky hypokalcémie mají diagnózu jistě nebo pravděpodobně potvrzenou. Možnou diagnózu mají pacienti s koncentrací lymfocytů T CD3+ pod 500/ $\mu$ l a zároveň srdeční vadou nebo laboratorními a klinickými známkami hypokalcémie nebo dysmorfii obličeje a abnormalitami horního patra (Bartůňková et al., 2007).

### 2.2.2 Genetické vyšetření

Mikrodeleci chromozomu 22q11 lze vyšetřit molekulárně cytogenetickými metodami, zejména pomocí metody fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). „Molekulárně cytogeneticky je prokazatelná u 90 % pacientů s charakteristickými projevy syndromu. Ve zbývajících případech zjišťujeme delece menšího rozsahu, než je rozlišovací schopnost sond pro FISH, popř. též bodové mutace některých genů.“ (Kočárek, 2010, s. 125).

Fluorescenční *in situ* hybridizace je v tomto případě obvykle provedena s pomocí dvou rozdílně značených sond. První sondou je sonda lokus specifická, která se váže na kritický region chromozomu 22q11. Absence jejího signálu svědčí o mikrodeleci. Dále je použita sonda centromerická, která slouží jako kontrola. Váže se na centromeru chromozomu 22 a svědčí o správnosti provedení hybridizace.

## 2.3 CATCH 22

Klinické projevy mikrodelece chromozomu 22q11 jsou souhrnně označovány jako asociace CATCH 22. Tento název vychází z počátečních písmen anglických výrazů pro jednotlivé charakteristické fenotypové projevy mikrodelece 22q11. Nejvýraznějšími znaky jsou rozštěp patra (**c**left palate), abnormální tvář (**a**bnormal face), hypoplazie thymu (**t**hymic hypoplasia), srdeční vady (**c**ardiac defects) a hypoparathyreoidismus (**h**ypoparathyreoidism). Číslice 22 v názvu asociace označuje lokalizaci na chromozomu 22. V současné době se ale stále častěji uplatňuje výraz syndrom mikrodelece chromozomu 22q11 namísto původního pojmenování CATCH 22. „Akronym CATCH 22 ne náhodou připomíná světoznámý román Josepha Hellera: „Hlava 22“ (anglický titul zní vskutku Catch22). Z etických důvodů se však nezdá únosné, aby byl syndrom spojený s klinicky závažnými projevy často ohrožujícími život pacienta pojmenován stejně jako literární dílo. Mnozí odborníci též namítají, že tento název může na rodiče dětí postižených tímto syndromem působit velmi depresivně.“ (Čalounová, 2008, s. 75).

Mezi syndromy, které zahrnuje asociace CATCH 22 patří kromě syndromu DiGeorge také Shprintzenův syndrom a velokardiofaciální syndrom. Ovlivnit embryogenezi a přispět tak ke vzniku klinických projevů typických pro syndrom DiGeorge mohou také některé vnější podmínky. Nejčastějšími environmentálními vlivy, které vedou ke vzniku typického fenotypu, ale nejsou podmíněny genetickou vadou, jsou užívání alkoholu v těhotenství a mateřský diabetes (Hong, 2001).

### 2.3.1 Rozštěp patra a abnormální tvář

Mezi nejčastější faciální stigmatizace u pacientů se syndromem DiGeorge patří zejména nápadně vyčnívající velký nos s antevertovanými nostrilami, malá mandibula a malformované, nízko posazené uši. Typická jsou malá ústa a úzké filtrum. U pacientů je obvykle patrný hypertelorismus a epikanty

Rozštěp patra charakteristický pro DiGeorgův syndrom může být kompletní, ale častěji u těchto pacientů nacházíme rozštěp patra inkompletní. V novorozeneckém věku může rozštěp patra působit značné potíže během krmení (Ryan et al., 1997).

### 2.3.2 Hypoplázie thymu

Hypoplázie, v některých případech až aplázie, nebo patologická migrace thymu vede k poruše vývoje T lymfocytů. Thymus je centrální lymfatický orgán. Nachází se

v hrudní dutině za sternem. Za fyziologických podmínek v něm dochází k diferenciaci a funkčnímu dozrávání T lymfocytů a k jejich negativní a pozitivní selekci (Šedivá et al., 2005).

Thymus je nejvíce vyvinut u novorozenců, v pubertě začne docházet k postupné involuci a je nahrazen tukovou a vazivovou tkání (Konrádová et al., 2005).

### 2.3.3 Srdeční vady

Srdeční vady jsou jednou z největších komplikací DGS. Jejich závažnost bývá velmi variabilní vzhledem k velkým rozdílům ve fenotypových projevech jednotlivých pacientů. Porucha srdečního svalu se tak nemusí projevit u každého pacienta a u některých pacientů může být zaznamenána pouze méně významná srdeční abnormalita. Z nich se u pacientů objevuje nejčastěji mírně atypická morfologie podklíčkové tepny a pravostranného aortálního oblouku. Častěji se však u pacientů s DGS objevují závažné patologie srdce. Mezi závažné srdeční vady vyskytující se u pacientů s mikrodeleci 22 q11 se řadí dvojitý aortální oblouk, hypoplazie nebo funkční poruchy aortální chlopně, absence plicní chlopně, koarktace aorty a hypoplazie levého srdce. Pro DGS typickou závažnou srdeční poruchou je Fallotova tetralogie. Jedná se o kombinovanou srdeční vadu zahrnující defekt komorového septa, pulmonální stenózu, dextropozici aorty a hypertrofii pravé komory (Ryan et al., 1997).

### 2.3.4 Hypoparathyreoidismus

Porucha vývoje příštítných tělísek vede k defektu tvorby a sekrece parathormonu. Parathormon je peptid produkovaný příštítnými tělískami. Za fyziologických podmínek je jeho syntéza a sekrece stimulována poklesem plazmatické koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$ . Parathormon pak může třemi možnými způsoby hladinu  $\text{Ca}^{2+}$  v plazmě zvýšit. Může působit přímo na kosti a zapříčinit převahu odbourávání kostní tkáně nad novotvorbou. Výsledkem je uvolnění vápníku kostí a vzestup plazmatické koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$ . Dále může parathormon působit přímo na tubuly ledvin a tím zvyšovat reabsorpci vápenatých iontů. Nepřímo může parathormon působit na tenké střevo a stimulovat absorpci  $\text{Ca}^{2+}$  střevní sliznicí (Racek et al., 2006).

Pacienti se syndromem DiGeorge, u kterých výše popsání děje neprobíhají nebo probíhají patologicky, trpí hypokalcémií a komplikacemi s ní spojenými. Nejzávažnějším projevem hypokalcémie jsou těžké křeče (Dusilová Sulková, 2010).

## 2.4 Prognóza pacientů

Závažnost onemocnění a tedy i klinická prognóza pacientů závisí na rozsahu postižení. U jednotlivých pacientů jsou obvykle patrné výrazné rozdíly. Odlišná expresivita fenotypových znaků není způsobena rozdílným rozsahem delece. Velký vliv může mít působení některých dalších genů, neležících v kritickém regionu. V neposlední řadě mohou být fenotypové projevy aberace ovlivněny působením vnějších faktorů.

Velmi častým jevem je rozdílná expresivita mezi postiženými rodiči a jejich stejně postiženými potomky. Tyto odlišnosti je možné pozorovat i u sourozenců, dokonce byly popsány i výrazné rozdíly ve fenotypových projevech u monozygotních dvojčat.

Projevy mikrodelece chromozomu 22q11 tedy mohou být velmi variabilní a prognózu nelze předem jednoznačně určit. Vyskytují se případy bezpříznakových nosičů, nebo pacienti pouze s fatální stigmatizací a mírným defektem imunity. Naopak jiní pacienti se mohou rodit s těžkými srdečními vadami, vyžadujícími okamžitý chirurgický zákrok a závažnými imunodeficiencemi nebo mohou perinatálně zemřít.

Genetická prognóza představuje 50 % riziko postižení plodu u rodin, v nichž je pozorován výskyt familiárních mikrodelecí (Seemanová, 2002).

## 2.5 Terapie

Všichni pacienti s prokázaným syndromem DiGeorge by měli být pod pravidelným dohledem lékařů. U některých z nich je ihned po narození nutná operace vrozené srdeční vady. Vzhledem k hypoparathyreodismu musí být u pacientů s mikrodelecí 22q11 a u pacientů, u kterých je podezření na tuto aberaci, pravidelně kontrolována hladina ionizovaného vápníku.

U dětí s prokázanou mikrodelecí 22q11 je potřeba zajistit imunologické vyšetření a to zejména vyšetření buněčné imunity. V případě prokázání imunodeficiencie by se tyto pacienti měli vyvarovat styku s infekcemi, které by u nich mohli mít velmi závažný průběh a následky. U pacientů, u nichž je funkce thymu výrazně redukována, případně thymus zcela chybí, může být řešením transplantace thymu nebo kostní dřeně. Případy úspěšné transplantace kostní dřeně pacientům se syndromem DiGeorge jsou však pouze ojedinělé. Naštěstí většina pacientů nemá poruchy imunity natolik závažné, aby bylo nutné transplantaci provádět (Bartůňková et al., 2007).



Rozštěp patra může často způsobit vadu řeči, proto je u dětí se syndromem DiGeorge vhodná péče logopeda.

Častým jevem nalézaným u pacientů se syndromem DiGeorge je různě závažná mentální retardace. U některých dětských pacientů lze sledovat normální nebo mírně opožděný psychomotorický vývoj. Poměrně často se u pacientů s DGS vyskytují mírné či středně závažné poruchy učení. Výjimkou však nejsou ani děti s těžkými poruchami učení a mentální retardací. Ve zvýšené míře oproti dětem bez mikrolece 22q11 se u pacientů vyskytují poruchy chování a pozornosti a změny nálad. Z tohoto důvodu je rodičům postižených dětí doporučována konzultace s psychiatrem (Ryan et al., 1997). U některých pacientů se mohou objevit psychické poruchy, zejména schizofrenie a maniodepresivní stavy.

Aby bylo možné pacientům zajistit potřebnou péči, je nezbytná včasná diagnostika. Léčba je však pouze symptomatická (Bartůňková et al., 2007). Spočívá zejména v prevenci infekcí. Ve vážných případech lze preventivně podávat antibiotika nebo antimykotika (Šedivá, 1999).

## 2.6 Imunita u pacientů se syndromem DiGeorge

Syndrom DiGeorge je spojen s poruchou vývoje thymu (hypoplázií až aplázií) nebo patologickou migrací thymu. Následně je snížena nebo zcela chybí funkce thymu při vývoji T lymfocytů – získávání imunokompetence a pozitivní a negativní selekce. Prekurzorem T lymfocytů je hemopoetická buňka nacházející se v kostní dřeni. Kostní dřeň při DGS není postižena a tedy vznik T lymfocytu není primárně ovlivněn (Šedivá et al., 2005).

Závažnost defektu imunitního systému závisí na rozsahu postižení. Na základě imunologických změn jsou pacienti zařazeni do dvou forem DGS. Kompletní DGS se vyznačuje úplnou absencí nebo přítomností pouze malého počtu T lymfocytů, případně přítomností T lymfocytů, které nereagují na mitogeny (Cancrini et al., 2005). Tato forma je velmi vzácná. Fenotypově odpovídá těžkým kombinovaným defektům imunity (SCID), jež představují nejzávažnější formu primárních imunodeficiencí. V těchto případech se u dětí již brzy po narození objevují závažné infekce. Vážné komplikace může vyvolat také očkování živými vakcínami. U pacientů s takto závažnou imunodeficiencí je nutná léčba, bez které obvykle umírají do jednoho roku po narození.

Většina pacientů má ale méně závažný průběh imunodeficiency, který se často projeví sníženým počtem T lymfocytů při jejich zachované funkční schopnosti. Je tak

pravděpodobné, „že lymfocyty T se vyvíjejí i extrathymicky, anebo je přítomna rudimentální thymická tkáň“ (Bartůňková et al., 2007). Pacienti s podezřením na DGS, kteří nesplňují diagnostická kritéria kompletního DiGeorgova syndromu bývají označováni jako pacienti s částečným DGS (Kornfeld et al., 2000).

Vzhledem k významu thymu na vznik autoimunitních onemocnění se u pacientů s DGS mohou autoimunitní choroby objevit. Nestává se tak však příliš často a obvykle u pacientů s mírnější formou DGS a v pozdějších letech (Gennery et al., 2002). Příkladem autoimunitních onemocnění, která se u pacientů ojediněle objevují, je tyreoiditida a autoimunitní hemolytická anémie (Bartůňková et al., 2007).

Dlouhodobé studie, které se zabývaly imunitou u pacientů s DGS, popisují postupné zlepšování defektů imunitního systému během dospívání. Nicméně zlepšení je velmi variabilní. Týká se zejména pacientů, u nichž byly během prvních měsíců života nalezeny velmi nízké hodnoty lymfocytů (Cancrini et al., 2005).

### 3 Imunoglobuliny

Imunoglobuliny neboli protilátky jsou glykoproteiny produkované plazmatickými bílkovinami vzniklými aktivací B lymfocytů. Hlavní funkcí imunoglobulinů je specifická vazba na antigen.

#### 3.1 Struktura imunoglobulinů

Základem molekuly imunoglobulinu jsou těžké a lehké imunoglobulinové řetězce. Rozlišujeme pět základních izotypů těžkých řetězců. Jsou to řetězce  $\alpha$  (alfa),  $\gamma$  (gama),  $\delta$  (delta),  $\epsilon$  (epsilon) a  $\mu$  (mí). Každý typ těžkého řetězce je charakteristický jen pro jednu z pěti tříd imunoglobulinů. Lehké řetězce se v imunoglobulinech vyskytují ve dvou typech. Prvním z nich je řetězec  $\lambda$  (lambda) a druhým typem je řetězec  $\kappa$  (kappa). Tyto lehké řetězce jsou společné všem třídám. Každá molekula imunoglobulinu je potom tvořena dvěma těžkými řetězci, které jsou kovalentně spojeny disulfidickými můstky a dvěma lehkými řetězci. Každý lehký řetězec je připojen k těžkému řetězci pomocí disulfidického můstku.

Každá molekula imunoglobulinu se dále skládá z variabilní a konstantní části. Konstantní část je vždy shodná pro všechny imunoglobuliny jedné třídy. Zároveň jsou tyto části rozdílné pro jednotlivé třídy imunoglobulinů. Nejdůležitější součástí konstantní oblasti imunoglobulinů je Fc fragment. Jedná se o vazebné místo pro komplement nebo jiný buněčný receptor. Zajišťuje tedy některé důležité funkce imunoglobulinu jako je aktivace komplementu nebo opsonizace. Variabilní oblast imunoglobulinu je součástí Fab fragmentu, který má význam při specifické vazbě na konkrétní antigen. Rozštěpení molekuly imunoglobulinu na fragmenty Fc a Fab je možné provést působením proteolytických enzymů. Základní strukturální jednotkou imunoglobulinu je monomer (Hořejší, Bartůňková, 1998).

#### 3.2 Funkce imunoglobulinů

Imunoglobuliny mají zejména ochranný význam. Jednou z jejich nejvýznamnějších funkcí je schopnost neutralizovat toxiny, které byly vyprodukovány mikroorganismy (Kapas et al, 1998). Protilátky se navážou na povrch patogenu a zabrání jeho přilnutí k buňkám organismu. Některé imunoglobuliny mají schopnost aktivace komplementového systému, přesněji spouští klasickou cestu aktivace komplementu. Jeho hlavní funkcí je opsonizace, osmotická lýza a chemotaxe,

imunoglobuliny tedy napomáhají zničení buněk, na něž se navázaly. Jiné imunoglobuliny mají schopnost opsonizovat a tím usnadňovat fagocytózu a následné zničení patogenu. V neposlední řadě mohou být některé imunoglobuliny součástí antigenně specifického receptoru B lymfocytů, kde plní funkci rozpoznávání antigenu (Litzman et al., 2001, Fučíková et al., 1994).

### 3.3 Třídy imunoglobulinů

Imunoglobuliny můžeme rozdělit do pěti tříd. Jednotlivé třídy se liší svými fyzikálními, biologickými a chemickými vlastnostmi. Mají rozdílné aminokyselinové složení a obsah uhlohydrátů (Kapas et al., 1998).

#### 3.3.1 Imunoglobulin A

Imunoglobulin A je dimer, je tedy tvořen ze dvou základních strukturálních jednotek. Rozlišujeme podtypy IgA<sub>1</sub> a IgA<sub>2</sub>, které se vzájemně liší subtypem těžkého řetězce  $\alpha$ . Imunoglobulin A se v lidském těle vyskytuje v slizniční nebo sérové formě. (Hořejší, Bartůňková, 1998) Hlavní funkcí imunoglobulinu A je pronikání slizničními povrchy. Odtud se dostává do sekretu exokrinních žláz. Zajišťuje tak organismu specifickou ochranu přímo na povrchu sliznic a zabraňuje uchycení mikroorganismů na povrchu sliznic. Významnou úlohu má imunoglobulin A při kojení. Přechází do mateřského mléka a zajišťuje kojenci ochranu před střevními infekcemi. V sérové formě se může vyskytovat také jako monomer a trimer (Litzman et al., 2001).

Imunoglobulin A může mít molekulovou hmotnost v rozpětí 160-1000 kDa. V séru zdravého jedince se vyskytuje v koncentraci 0,9-3,5 g/l a má poločas rozpadu 6 dní (Hořejší, Bartůňková, 1998).

#### 3.3.2 Imunoglobulin D

Funkce imunoglobulinu D není dosud příliš známa. V lidském organismu se vyskytuje ve velmi malých koncentracích. Má jednoduchou strukturu, jedná se o monomer. Nachází se v séru a na povrchu B lymfocytů.

Biologický poločas imunoglobulinu D je 3 dny. Obsažen v séru je v koncentraci zhruba 0,1 g/l, molekulová hmotnost je 180 kDa (Hořejší, Bartůňková, 1998).

### 3.3.3 Imunoglobulin E

Imunoglobulin E je monomer. Hraje významnou roli při rozvoji alergické reakce prvního typu. Jeho hlavní funkcí je vazba na receptor na povrchu žírných buněk. Následná vazba navázaného imunoglobulinu E na svůj antigen spustí aktivaci žírné buňky a dojde k uvolnění mediátorů, zejména histaminu. Za fyziologických podmínek by měl být v organismu tvořen v nízkých koncentracích. Zajišťuje ochranu před mnohobuněčnými parazity na sliznicích (Litzman et al., 2001).

Imunoglobulin E má molekulovou hmotnost 190 kDa a jeho biologický poločas je 2 dny (Hořejší, Bartůňková, 1998).

### 3.3.4 Imunoglobulin G

Nejvýznamnější a v lidském organismu nejpočetněji produkovanou protilátkou je imunoglobulin G. Jedná se o monomer. Rozlišujeme čtyři subtypy imunoglobulinu G a to IgG1 – IgG4, z nichž nejpočetnější je IgG1. Imunoglobulin G se vyskytuje jak v séru, tak i v mezibuněčných prostorech. Dokáže přecházet přes placentární bariéru a poskytovat tak novorozenci ochranu i po porodu. Imunoglobuliny G přenesené od matky pak začínají postupně klesat a zhruba v půl roce života kojence ztrácí ochranný význam. Hlavní funkcí imunoglobulinu G je aktivace komplementového systému a schopnost opsonizace. V případě vniknutí antigenu do organismu se zvýší hladina imunoglobulinu G, která poté, co skončí antigenní stimulace, začne klesat. Nevymizí však úplně a v nízkých koncentracích zůstává v organismu prokazatelná (Litzman et al., 2001).

Poločas rozpadu imunoglobulinu G je 21 dní. Má molekulovou hmotnost 155 kDa a jeho obsah v séru je 8-18 g/l (Hořejší, Bartůňková, 1998).

### 3.3.5 Imunoglobulin M

Imunoglobulin M má ze všech protilátek nejsložitější strukturu. Jedná se o pentamer a jednotlivé monomery tvoří kruh, představuje tedy největší molekulu imunoglobulinů. Funkcí imunoglobulinu M je podobně jako v případě imunoglobulinu G aktivace komplementového systému. Oproti IgG však neproniká placentární bariérou. Imunoglobulin M má velký diagnostický význam. Po vniknutí antigenu do organismu je právě IgM první protilátkou, která se začne tvořit. Po skončení stimulace pak z těla zcela vymizí, na rozdíl od IgG. Pokud je ve vzorku detekován imunoglobulin M proti

konkrétnímu patogenu, znamená to, že v organismu právě probíhá aktivní infekce (Litzman et al., 2001).

Imunoglobulin M se může vyskytovat také ve formě monomeru. Vyskytuje se na povrchu B lymfocytů a je součástí antigenně specifického receptoru B lymfocytů.

Imunoglobulin M je obsažen v séru v koncentraci 0,9-2,5 g/l. Má molekulovou hmotnost 900 kDa a jeho biologický poločas je 6 dní (Hořejší, Bartůňková, 1998).

## 4 Vakcinace

Vakcinace je umělou aktivní imunizací. Jedná se o proces navození vzniku paměťových buněk. Tohoto jevu lze docílit stimulací imunitního systému antigenem, který je pro organismus neškodný. Výsledkem je vznik primární imunitní reakce, jejímž produktem jsou paměťové B a T lymfocyty. V případě setkání organismu s antigenem při infekci je navozena rychlá sekundární imunitní reakce a nedojde ke vzniku onemocnění (Domorázková, 2000).

### 4.1 Vakcíny

V současnosti se jako vakcíny využívají různé druhy materiálu. Jsou jimi oslabené mikroorganismy, usmrcené mikroorganismy, rekombinantní vakcíny, podjednotkové vakcíny, vakcíny obsahující polysacharidová bakteriální pouzdra a toxoidy. Jednotlivé typy vakcín se vyrábí různým způsobem a mají rozdílnou kvalitu. Některé z nich poskytují ochranu po celý život, při použití jiného typu vakcín je nutné přeočkování. Společnou mají schopnost stimulovat imunitní systém a vyvolat specifickou imunitní reakci. Výsledkem je tvorba protilátek, zejména IgM a navození primární imunitní reakce. Po styku s konkrétním antigenem pak díky imunologické paměti dojde k rychlé sekundární imunitní odpovědi a mikroorganismus je imunitním systémem zneškodněn dříve, než dojde k rozvoji infekce (Litzman et al., 2001).

#### 4.1.1 Vakcíny z oslabených mikroorganismů

Hlavní výhodou použití vakcíny z oslabených mikroorganismů je navození přirozené reakce organismu, která je stejná jako při šíření infekce vyvolané neoslabeným mikroorganismem. Představují tedy nejúčinnější typ vakcín. Přestože je imunitní systém stimulován stejným způsobem jako při běžné infekci, oslabené mikroorganismy nemají dostatečnou sílu k navození manifestace onemocnění. Po očkování se tedy nevyskytují žádné klinické příznaky, případně jen nepatrné. Při očkování vakcínou z oslabených mikroorganismů obvykle stačí k navození dostatečné ochrany aplikace jedné dávky vakcíny. Přesto v běžné praxi často dochází k podání posilujícího očkování.

Příkladem vakcín z oslabených mikroorganismů může být vakcína proti zarděnkám, příušnicím, spalničkám a proti dětské obrně. Běžně se také používá vakcína proti tuberkulóze (Litzman et al., 2001).

#### 4.1.2 Vakcíny z usmrcených mikroorganismů

Usmrcené mikroorganismy nemohou vyvolat infekce, ani stimulovat imunitní systém stejným způsobem jako oslabené organismy. V organismu nejsou schopny replikace. Vakcíny z usmrcených mikroorganismů využívají toho, že si usmrcené mikroorganismy zachovávají své antigeny. Takto připravená vakcína však nedokáže vyvolat dostatečnou imunitní odpověď, a tedy ani dostatečnou ochranu, již při podání první dávky. Ve většině případů je nezbytné očkování opakovat.

Běžně používanou vakcínou z usmrcených mikroorganismů je vakcína proti černému kašli (Litzman et al., 2001).

#### 4.1.3 Rekombinantní vakcíny

Rekombinantní vakcíny někdy bývají udávány jako zvláštní typ subjednotkových vakcín. Při jejich výrobě se využívá molekulárně biologických metod. Gen určitého mikroorganismu, který kóduje tvorbu vybraného antigenu, se začlení do genetické informace jiného mikroorganismu. Tím mohou být některé bakterie nebo kvasinky. Hojně je pro tyto účely využívána bakterie *Escherichia coli*. Tyto geneticky upravené bakterie nebo kvasinky produkují požadovaný antigen a ten je následně použit jako hlavní složka vakcíny. Příkladem rekombinantní vakcíny může být vakcína proti hepatitidě B (Litzman et al., 2001).

#### 4.1.4 Subjednotkové vakcíny

Základní složkou subjednotkových vakcín jsou pouze určité vybrané patogenní částice mikroorganismu. Ponechány jsou pouze ty antigeny, které dokážou stimulovat imunitní systém a vyvolat imunitní odpověď tak, aby byla zajištěna dostatečná ochrana před patogenem. Ostatní složky mikroorganismu jsou eliminovány. Tímto způsobem se dosáhne požadovaného účinku, ale sníží se riziko vzniku nežádoucích reakcí. Příkladem mohou být některé vakcíny proti chřipce (Litzman et al., 2001).

#### 4.1.5 Vakcíny obsahující bakteriální pouzdra

Některé bakterie se mohou vyskytovat v opouzdřené formě, pouzdro obvykle zvyšuje jejich schopnost virulence. Pro imunitní systém jsou takové bakterie velkou zátěží, zejména proto, že odolávají fagocytóze a jejich opsonizace je možná jen za určitých podmínek. Vakcíny účinné na opouzdřené bakterie obsahují kapsulární antigeny. Základní složkou vakcín jsou polysacharidy, v některých případech i



oligosacharidy bakteriálního pouzdra (Litzman et al., 2001). V některých literárních údajích jsou vakcíny obsahující bakteriální pouzdra řazeny jako zvláštní typ subjednotkových vakcín.

V současnosti jsou běžně používány kapsulární polysacharidové vakcíny proti pneumokokovým nákazám, proti hemofilovým a meningokokovým nákazám a břišnímu tyfu (Domorázková, 2000).

#### 4.1.6 Toxoidy

Některé bakterie samy o sobě nepoškozují organismus, ale nebezpečné jsou tím, že produkují toxiny. Toho se využívá při výrobě vakcín proti těmto bakteriím. Toxin musí být nejprve upraven a zbaven jedovatosti, aby mohl být použit při přípravě vakcíny. Zároveň je však nezbytné, aby si toxin zachoval své antigenní vlastnosti. K inaktivaci dochází nejčastěji využitím chemických vlastností formalinu. Výsledkem je toxoid, který je základem vakcíny (Domorázková, 2000). Při použití takto připravených vakcín je ochrana organismu pouze dočasná a je nezbytné posilující očkování v pravidelných intervalech.

Vakcíny obsahující toxoidy jsou dnes běžně používány i při základním očkování novorozenců. Typickým příkladem je očkování proti tetanu a záškrtu (Litzman et al., 2001).

## 4.2 Tetanus

Původcem tetanu je bakterie *Clostridium tetani*, patřící do rodu klostridií. *Clostridium tetani* patří mezi gram pozitivní pohyblivé tyče. Typickým rysem je vytváření oválných terminálně uložených spor, které mohou dlouhodobě přežívat i ve velmi nepříznivých podmínkách. *C. tetani* je striktně anaerobní. Bakterie jsou součástí přirozené flóry lidského i zvířecího zažívacího traktu. Výkaly se dostává do půdy, kde může ve formě spor přežívat velmi dlouhou dobu, až několik desítek let (Votava, 2003). Infekce se do těla člověka dostane poraněním o ostrý předmět kontaminovaný těmito bakteriemi. Typicky je přenos způsobený poraněním o hřebík nebo třísku. Spory jsou velmi rozšířeny v hnojené půdě, proto velmi často dochází k infekci *C. tetani* v zemědělství a podobných oborech. V infikované ráně začne bakterie produkovat svůj toxin, který se váže na nervovou tkáň. Dochází ke zvýšenému napětí ve svalech, které může vést až k celkovým křečím. V pokročilém stadiu může toxin zasáhnout i srdeční sval. Po uplynutí inkubační doby, která je dlouhá 3 – 30 dní, začne nemocný pozorovat

potíže při otevírání úst, které jsou způsobené napětím žvýkacích svalů. V pozdějších fázích onemocnění jsou postiženy i ostatní svaly a může dojít k udušení.

Bakterie *Clostridium tetani* produkuje specifické exotoxiny tetanolysin a tetanospamin. „*Tetanolysin, který je na kyslík citlivým hemolyzinem příbuzným streptolysinem a q-toxinu vylučovaným rodově stejnými bakteriemi, pravděpodobně sehrává pouze roli v místě inokulace tetanu.*“ (Petráš, Lesná 2010, s. 9). Druhý ze jmenovaných exotoxinů, tetanospamin bývá často označován jako tetanický toxin. Tato látka je hlavní příčinou potíží vyvolaných infekcí *C. tetani*. Syntetizuje se jako jeden polypeptidový řetězec, který je rozštěpen proteázou na těžký řetězec a lehký řetězec. Těžké řetězce jsou vazebné, zatímco lehké řetězce mají toxické účinky. Oba řetězce jsou navzájem spojeny disulfidickými můstky. V těle se toxin hromadí uvnitř buněk. V případě, že toxin pronikne do neuronu, způsobí zablokování uvolnění mediátorů, které inhibují motorické neurony, a následkem toho dochází u postiženého ke křečím. „*Naváže-li se tetanický toxin na neuronové receptory, pak antitoxin jeho patogenitu nezvrátí.*“ (Petráš, Lesná 2010, s. 10).

#### 4.2.1 Tetanická vakcína

Základem tetanické vakcíny je toxoid získaný kultivací bakterie *Clostridium tetani*. Kultivační médium je tekuté a obsahuje trypsin a natrávený kasein. V dalším kroku dochází k lýze bakteriální suspenze. Následně se supernatant, ve kterém je obsažen tetanospamin filtruje a detoxikuje formaldehydem. Množství toxoidu, tedy množství účinné látky tetanické vakcíny se udává v mezinárodních jednotkách stanovených standardizovanou biologickou zkouškou na morčatech nebo myších, nebo v jednotkách Lf, stanovených flokulačním testem.

V praxi jsou využívány dva druhy tetanických vakcín, tekutá a adjuvovaná na suspenzi anorganické soli. Tekutá vakcína neobsahuje minerální nosič a používá se pouze ve specifických případech. Běžně je používána druhá varianta tetanické vakcíny. Jako suspenze soli, na níž je vakcína adjuvovaná může sloužit hydroxid hlinitý, fosforečnan hlinitý, síran hlinito-draselný nebo fosforečnan vápenatý (Petráš, Lesná 2010).

#### 4.2.2 Očkování proti tetanu

V současné době jsou na český trh dodávány tyto komerční vakcíny:

- Alteana

- Tetavax
- Adacel
- Boostrix
- Boostrix Polio
- Infanrix
- Infanrix Hib
- Infanrix Hexa

Vakcíny Alteana a Tetavix jsou vakcíny pouze proti tetanu. Ostatní jmenované jsou kombinované vakcíny. Adacel, stejně jako Boostrix jsou vakcíny proti tetanu, záškrtu a dávivému kašli s redukováným množstvím difterického anatoxinu a acelulárních složek a jsou určeny pro starší děti a dospělé. Boostrix Polio je oproti vakcíně Boostrix navíc doplněna o inaktivovanou poliovakcínu proti dětské přenosné obrně a je taktéž určena pro starší děti a dospělé. Infanrix je vakcína proti tetanu, záškrtu a dávivému kašli s redukováným množstvím difterického anatoxinu a acelulárních složek určená pro malé děti. Infanrix Hib navíc obsahuje složku proti hemofilovým nákazám typu b. Infanrix Hexa působí stejně jako předchozí dvě vakcíny proti tetanu, záškrtu, dávivému kašli, hemofilovým nákazám typu b a navíc ještě hepatitidě typu B a dětské přenosné obrně a stejně jako Infanrix a Infanrix Hib je určená pro malé děti.

Mimo výše jmenovaných vakcín je v České republice registrována řada dalších kombinací, které ale nejsou dodávány na trh (Petráš, Lesná 2010).

Pro očkování proti tetanu platí vyhláška č. 299/2010 ze dne 25. října 2010 Vyhláška o očkování proti infekčním nemocem. Základní očkování zahrnující kromě tetanu také očkování proti dávivému kašli a záškrtu se zahajuje u dětí od započatého devátého týdne po narození. V průběhu prvního roku života jsou pak podány další dvě dávky očkovačích látek. Interval mezi jednotlivými dávkami musí být minimálně jeden měsíc. Posilující čtvrtá dávka je podána minimálně šest měsíců po podání třetí dávky a nejpozději před dovršením osmnáctého měsíce věku dítěte. U dětí, které byly očkovány proti tuberkulóze, se základní očkování provádí od započatého třináctého týdne života po zhojení postvakcinační reakce po očkování proti tuberkulóze, tj. po zhojení jizvičky. V pátém a desátém roce života se imunita posílí podáním jedné dávky kombinované vakcíny. Posilující očkování proti tetanu se provádí v průběhu života v intervalu deset až patnáct let. V případě posilujícího očkování vzniká riziko vzniku imunokomplexů specifických protilátek s vakcinačním toxoidem a tím i riziko vzniku zánětlivé reakce.

Z tohoto důvodu by měl být zachován v ideálním případě pětiletý, minimálně dvouletý interval mezi aplikací jednotlivých posilujících dávek.

Profylakticky se může vakcína podat při poranění, protože při každém poranění vzniká riziko vzniku tetanu. Zároveň je nutná důkladná dezinfekce rány, která brání vzniku anaerobního prostředí a tím i růstu tetanických spor. Pokud byl jedinec v minulosti očkován minimálně třemi dávkami vakcíny, pak další očkování jednou dávkou vakcíny obnoví protilátky během čtyř až sedmi dní. U pacientů, kteří ještě nebyli kompletně očkovaní, nebo od jeho kompletního očkování uběhlo více než deset let, může se současně s vakcínou aplikovat i tetanický imunoglobulin, který představuje pasivní imunizaci. Tetanický imunoglobulin se podává zejména u silně znečištěných ran, nebo u imunokompromitovaných pacientů.

Vakcína se aplikuje intramuskulárně, ve výjimečných případech jako jsou poruchy srážení krve lze aplikovat hluboko subkutánně. U dětí mladších dvou let do přední a postranní oblasti stehna, u dětí starších dvou let do deltového svalu. Intravenózní ani intradermální podání není možné. Vakcína proti tetanu smí být podávána současně jiným očkováním. V těchto případech musí být vakcíny aplikovány jinou injekční stříkačkou a do jiného místa vpichu. Pokud není výrobcem uvedeno jinak, nesmí se jednotlivé vakcíny před podáním míchat. Je možná aplikace se současnou léčbou krevními deriváty nebo plazmou a s podáním imunoglobulinů.

Doba použitelnosti vakcín je obvykle 24 – 36 měsíců. Vakcíny se uchovávají při teplotě od +2 °C do +8 °C a chrání se před světlem. V případě, že dojde ke zmrazení látky, nesmí se podat. Otevřená vakcína, která nebyla spotřebovaná, nesmí být dále skladována. Před aplikací vakcíny se vždy musí zkontrolovat její vzhled, vakcína nesmí obsahovat žádné cizorodé částice.

Očkování smí být pacienti v dobrém zdravotním stavu. V opačném případě je nutné očkování odložit. Kontraindikací očkování proti tetanu jsou horečnatá onemocnění. Těmto pacientům smí být aplikována vakcína minimálně dva týdny po úplném vyléčení. Látka nesmí být podána pacientům se známou přecitlivělostí na některou ze složek tetanické vakcíny. Pokud u pacienta dojde ke vzniku závažného nežádoucího účinku po podání jedné dávky, do objasnění příčiny reakce je aplikace další dávky kontraindikována. Dočasně je očkování kontraindikováno u progresivních neurologických poruch, například nekompenzované epilepsie. Pokud se do šesti týdnů po aplikaci látky objeví Guillain-Barré syndrom, další očkování by se nemělo provádět. Kontraindikací není pozitivní rodinná anamnéza, například postvakcinační reakce nebo

syndrom náhlého úmrtí dítěte vyskytující se v rodině. Dětem s nízkou porodní váhou a nedonošeným děti je možné aplikovat vakcínu až po dosažení chronologického věku třech měsíců. U pacientů s imunosupresivní léčbou je vhodné očkovat až jeden měsíc po ukončení nebo přerušení léčby.

Po aplikaci tetanické vakcíny se stejně jako u ostatních vakcín mohou vyskytovat nežádoucí reakce. V případě očkování monovalentní vakcínou proti tetanu byly popsány lokální a celkové reakce organismu. Velmi často, s frekvencí více než deset procent se v místě vpichu objeví bolest, zarudnutí nebo otok. Častou lokální reakcí se vyskytuje otok v místě vpichu vedoucí ke zvětšení obvodu končetiny, ztvrdnutí, subkutánní uzlíky a sterilní absces v místě vpichu. Mezi velmi časté celkové reakce lze zařadit zvýšená teplota, ospalost a podrážděnost. Často je možné pozorovat horečku nižší než 39 °C, generalizovaný pruritus, kopřivku nebo edém, závratě, nízký krevní tlak, bolest svalů, kloubů a hlavy. Neobvyklé, neboli méně časté celkové reakce jsou nevolnost a lymfadenopatie. Jako vzácné celkové reakce můžeme označit horečku vyšší než 39 °C. Celkové reakce vyskytující se po podání tetanické vakcíny velmi vzácně, s frekvencí nižší než 0,01 % jsou závažné stavy jako periferní neuropatie a Guillain-Barré syndrom. V případě očkování kombinovanou vakcínou obsahující tetanické, difterické a acelulární subjednotkové složky bylo popsáno velké množství možných nežádoucích reakcí (Petráš, Lesná, 2010).

### 4.3 Pneumokokové nákazy

Původcem onemocnění vyvolanými pneumokoky je bakterie *Streptococcus Pneumoniae*. Bakterie *Streptococcus Pneumoniae* jsou gram pozitivní fakultativně anaerobní koky, tvoří řetízky, případně rostou ve dvojicích. Podle charakteru pouzdrného polysacharidu se klasifikují do několika sérotypů. Pouzdro zabraňuje fagocytóze a stává se tak nejvýznamnějším faktorem virulence. V neopouzdřené formě se vyskytují na sliznicích horních cest dýchacích, kde jsou součástí přirozené mikroflóry. Opouzdřená forma bakterie vyvolává velmi závažná onemocnění (Votava, 2003). Zdrojem nákazy obvykle bývá bacilonosič a k přenosu ve většině případů dochází kapénkovou infekcí. Rizikovou skupinou pro vznik závažného, mnohdy život ohrožujícího onemocnění, jsou děti mladší pěti let, zejména kojenci a batolata. Nákaza hrozí také seniorům starším šedesáti let a chronicky nemocným se sníženou funkcí imunitního systému. Ve výjimečných případech se onemocnění rozvine u bacilonosičů s oslabenou imunitou. Bakterie *Streptococcus Pneumoniae* má krátkou inkubační dobu

v rozmezí jeden až tři dny. Častým jevem, komplikující průběh onemocnění, je antibiotická rezistence, která v posledních letech bohužel narůstá (Blechová, 2006).

Velmi závažnou komplikací pneumokokové nákazy je pneumokoková meningitida. Napadá zejména malé děti. Často se rozvíjí po neléčeném zánětu středního ucha nebo vedlejších nosních dutin, odkud se infekce rozšíří na mozkové obaly. Jedná se o závažné onemocnění, které může až ve dvaceti procentech případů skončit úmrtím pacienta. Přeživší mají obvykle trvalé následky, nejtypičtějším z nich je hluchota. Projevy pneumokokové meningitidy jsou podobné jako u zápalů mozkových blan způsobených jinými bakteriemi. Charakteristická je zejména neschopnost předklonit hlavu a dotknout se bradou hrudi. Onemocnění je provázeno vysokou horečkou a bolestí hlavy. Může docházet až k poruchám vědomí. Obrovský význam má včasná diagnostika a zahájení antibiotické léčby (Mačák, Mačáková, 2004).

Nejčastějším onemocněním, které je vyvolané bakterií *Streptococcus Pneumoniae*, je pneumokoková pneumonie. Obvykle se rozvine jako následek prodělané infekce dýchacích cest. Příznakem je kašel a vykašlávání hlenu nebo hnisu provázené vysokou teplotou a bolestí na hrudi, která se může zhoršovat při nádechu. Pneumokoková nákaza může vyvolat již výše zmíněný zánět středního ucha. „*Akutní otitida je jedna z nejčastějších respiračních infekcí v prvních třech letech života, prodělá ji – často opakovaně – až 80 % dětí.*“ (Blechová, 2006, s 91). Projeví se bolestivostí ucha až poruchou sluchu a zvýšenou teplotou. V případě zanedbání léčby může způsobit závažnou meningitidu, obdobně jako zánět vedlejších dutin nosních, který je vyvolaný bakterií *Streptococcus Pneumoniae*. Pro sinusitidu je charakteristická bolest v oblasti tváří a v okolí očí, způsobená nahromaděním hnisu v dutinách. Antibiotická léčba je mnohdy neúčinná a pacienti musí podstoupit punkci dutin, aby mohlo dojít k odtoku hnisu.

#### 4.3.1 Vakcína proti pneumokokovým nákazám

V současné době se používá vakcína obsahující polysacharidy izolované z pouzdra bakterií, je označována jako 23valentní vakcína. K výrobě se tradičně využívá 23 různých sérotypů bakterie *Streptococcus Pneumoniae*. Jsou jimi sérotypy 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 33F a jsou vybrány tak, aby dostatečně pokryli incidenci pneumokokových nákaz po celém světě. „*Odhaduje se, že zkřížená reaktivita postvakcinačních protilátek*

s nevakcinačními sérotypově příbuznými pneumokoky může rozšířit její pokrytí o dalších 8 %.“ (Petráš, Lesná, 2010, s. 414).

Vakcíny proti pneumokokovým nálezům mohou být také konjugované. Polysacharidy představují antigeny a každý z nich je konjugován s individuálním proteinem, který zde vystupuje jako nosič. Proteiny jsou vybrány tak, aby vyhovovali jednotlivým polysacharidům a nepoškodili jeho funkci a epitop. Jako proteinové nosiče mohou být využívány tetanické nebo difterické toxoidy, případně netoxická mutanta difterického toxoidu označovaná jako CRM197, vnější membránový proteinový komplex bakterie *Neisseria meningitidis* nebo rekombinantní protein D. Vakcíny mohou obsahovat také kombinaci jednotlivých nosičů, například některé sérotypové polysacharidy jsou konjugovány na tetanický toxoid, jiné z téže vakcíny na toxoid difterický. Výroba konjugované pneumokokové vakcíny je velmi náročná, protože pro každý sérotyp se využívá jiná metoda. Z toho důvodu bývají konjugované vakcíny méně valentní než tradiční polysacharidové vakcíny.

#### 4.3.2 Očkování proti pneumokokovým nálezům

Na trh jsou v současnosti dodávány tyto komerční vakcíny:

- Pneumo23
- Prevenar
- Synflorix
- Prevenar13

Vakcína Pneumo23 představuje tradiční polysacharidovou vakcínu obsahující 23 různých polysacharidů izolovaných z 23 sérotypů bakterie *Streptococcus Pneumoniae*. Jedna dávka vakcíny proti pneumokokovým nálezům má objem 0,5 ml. Jedná se o fyziologický roztok, ve kterém je rozpuštěno 25 µg každého z 23 kapsulárních polysacharidů. Vakcína působí proti 23 odlišným pneumokokovým nálezům a je určena pro děti od dvou let a seniory. Prevenar je sedmivalentní vakcína proti pneumokokovým nálezům konjugovaná s proteinem CRM197. Obsahuje kapsulární polysacharidy sérotypů 4, 6B, 9V, 14, 19F, 23F a oligosacharid sérotypu 18C. V jedné dávce jsou obsaženy 4 µg polysacharidu sérotypu 6B, polysacharidy i oligosacharid ostatních sérotypů je ve vakcíně každý v množství 2 µg. Na jednu dávku vakcíny je použito 20 µg proteinu CRM197. Třinásivalentní vakcína Prevenar13 obsahuje navíc oproti vakcíně Prevenar polysacharidy sérotypů 1, 3, 5, 6A, 7F a 19A. Jedna dávka obsahuje 4 µg polysacharidu sérotypu 6B a 2 µg každého antigenu ostatních sérotypů.

Všech 13 polysacharidů a oligosacharidů je konjugováno s 30 µg proteinu CRM197. Vakcíny Prevenar a Prevenar 13 jsou určeny pro děti ve věku dva měsíce až pět let. Vakcína Synflorix je desetivalentní vakcína konjugovaná s proteinem D, difterickým a tetanickým toxoidem. Polysacharidy sérotypů 1, 5, 6B, 7F, 9V, 14 a 23F jsou v jedné dávce obsaženy v množství 1 µg, polysacharidu sérotypu 4 jsou zde 3 µg. Všech osm polysacharidů je konjugováno na protein D. Antigeny sérotypů 18C a 19F jsou v množství 3 µg konjugovány na tetanický a difterický toxoid. Vakcína je určena pro děti do věku dvou let (Petráš, Lesná, 2010).

Podle Vyhlášky o očkování proti infekčním nemocem č. 299/2010 ze dne 25. října 2010 se očkování proti pneumokokovým nákazám tradiční polysacharidovou vakcínou provede u seniorů umístěných v léčebnách pro dlouhodobě nemocné a v domovech pro seniory. Dále u osob umístěných v domovech pro osoby se zdravotním postižením nebo v domovech se zvláštním režimem, v případě že tyto osoby trpí chronickým onemocněním dýchacích cest, srdce, cév, ledvin nebo se jedná o osoby s diabetem léčeným inzulinem. Očkují se dle vyhlášky také děti do věku pěti let, které mají zdravotní indikace. Těmto dětem jsou aplikovány konjugované vakcíny, případně smí být použita polysacharidová vakcíny v případě, že dítě dovršilo druhý rok života.

Očkování lze v případě zájmu provést také osobám a dětem, které nemají zvýšené riziko pneumokokové nákazy. V těchto případech je ale očkování dobrovolné a vakcínu hradí pacient sám.

Obecně je očkování doporučeno osobám, které trpí chronickým kardiovaskulárním, jaterním nebo respiračním onemocněním, pacientům s diabetem, asplénií anatomicou i funkční, likvoreou. Osobám HIV pozitivním, pacientům s nádorovým onemocněním jako jsou lymfomy, leukémie, mnohočetné myelomy. Dále pacienti s chronickým onemocněním ledvin a nefrotickým syndromem. Očkování by se mělo provádět u osob dlouhodobě léčených imunopresivou a kortikosteroidy a u osob před transplantací kostní dřeně a orgánů. Dále je aplikace vakcíny proti pneumokokovým nákazám doporučena dětem s vrozenými imunodeficiencemi. V neposlední řadě by měly být očkovány osoby, které pracují v prostředí se zvýšeným rizikem chřipky. Jedná se zejména o zdravotnický personál a zaměstnance v ústavech sociální péče. Očkování vakcínou proti pneumokokovým nákazám se obecně doporučuje osobám starším 50 let. Mírně rizikovou skupinou jsou děti ve věku od dvou do tří let a děti navštěvující jesle a mateřské školky.



V případě tradiční polysacharidové vakcíny je základní očkování prováděno jednou dávkou vakcíny. Posilující dávka se obvykle nepodává. Pouze v případě, že nadále přetrvává riziko nákazy pneumokokovou infekcí, se provede posilující očkování další dávkou vakcíny pět let po základním očkování s výjimkou dětí do deseti let, u kterých se posilující dávka podává v intervalu delším než tři roky. Polysacharidová vakcíny proti pneumokokovým nákazám se aplikuje subkutánně nebo intramuskulárně, obvykle do deltoidní oblasti, u malých dětí do stehna, přesněji do jeho přední či postranní oblasti.

Konjugovaná vakcína se podává dětem mladším šesti měsíců ve třech základních dávkách. Minimální interval mezi jednotlivými základními dávkami je jeden měsíc. Běžně se kojenci aplikuje první dávka ve věku 2-3 měsíce po narození. U dětí, které byly očkovány proti tuberkulóze, je věk podání první dávky posunut na čtvrtý měsíc života po zahojení jizvičky. Čtvrtá, posilující dávka se podá ve druhém roce života minimálně šest měsíců po aplikaci poslední dávky. V případě, že se první základní dávka konjugované vakcíny podává dítěti staršímu sedmi měsíců, podávají se celkem pouze dvě dávky základního očkování. Dětem starším dvou let stačí podat jednu dávku konjugované vakcíny, v případě potřeby je možné dítěti podat nejdříve šest měsíců po aplikaci konjugované vakcíny vakcínu polysacharidovou. Konjugovaná vakcína se aplikuje intramuskulárně do přední nebo postranní oblasti stehna kojence, v případě očkování staršího dítěte do deltového svalu. Aplikace každé dávky by měl být prováděna vždy stejnou vakcínou. Výjimkou jsou vakcíny Prevenar13 a Prevenar, v případě předchozí aplikace vakcíny Prevenar je možné očkování dokončit vakcínou Prevenar13.

Konjugované i tradiční polysacharidové vakcíny se skladují při teplotě +2 °C až +8 °C, chráněné před světlem a mrazem. Doba použitelnosti je dva až tři roky při dodržení podmínek skladování. Před aplikací se zkontroluje vzhled vakcíny, může se v ní objevit sediment nebo usazenina, která není na závadu, ale je potřeba ji důkladně roztřepat. Ve vakcíně se nesmí objevit žádné cizorodé látky, v opačném případě se vakcína nesmí použít.

Očkování proti pneumokokovým nákazám se smí provádět pouze osobám v dobrém zdravotním stavu. Kontraindikací jsou hořčičná onemocnění stejně jako známá přecitlivělost na některou složku vakcíny. Osobám s poruchami koagulace by neměla být podána konjugovaná vakcína proti pneumokokovým nákazám, neboť dosud nebylo klinicky ověřeno aplikování očkovací látky subkutánně. Očkovat tyto osoby

konjugovanou vakcínou lze pouze intramuskulárně a to jen v případech, kdy je prospěch očkování větší než riziko komplikací. Polysacharidová i konjugovaná vakcína smí být podána zároveň s jinou vakcínou, vždy ale jinou injekční stříkačkou a do jiného místa. Očkovací látka se nesmí míchat s jinou vakcínou nebo lékem.

Nežádoucí účinky se objevují spíše při posilujícím očkování, zejména u seniorů starších 65 let (Petráš, Lesná, 2010).

#### 4.4 Hemofilové nákazy typu b

Původcem hemofilových nákaz je bakterie z čeledi *Pasteurellaceae* *Haemophilus Influenzae*. Jedná se o fakultativně anaerobní, gram negativní tyčku, bakterie je nepohyblivá a netvoří spóry. Může existovat v opouzdřené i neopouzdřené formě. Opouzdřené formy se vyskytují v šesti sérotypech a-f, z nichž nejnebezpečnější pro člověka je hemofilus typu b. Bakterie *Haemophilus Influenzae* pro svůj růst potřebuje růstové faktory označované jako faktor X a faktor V (Votava, 2003). Díky svému polysacharidovému pouzdru je *Haemophilus Influenzae* typu b rezistentní vůči obranným mechanismům hostitele. Polysacharidové pouzdro je tvořeno polymery ribosylu a ribitol-fodfátu „Proč se právě sérotyp b stal významně invazivnější než ostatní sérotypy, není známo, ale předpokládá se, že se na tom mohou podílet pentózy těchto polymerů, neboť právě ostatní hemofily častěji mívají kapsulární polysacharidy vystavěné z hexóz.“ (Petráš, Lesná, 2010, s. 74). Na bakteriálním povrchu se mohou vyskytovat fimbrie a usnadnit tak její přilnutí na povrch napadené buňky a zesílit virulenci.

Nákazy způsobené bakterií *Haemophilus Influenzae* typu b nejčastěji postihují děti do věku pěti let a jejich zdrojem je výhradně člověk. Bakterie je kapénkovou infekcí rozšiřována do okolí a do těla hostitele proniká respirační cestou. Po průniku do organismu se bakterie může zachytit na sliznici nosohltanu a během dvou až deseti dní se projeví onemocnění. *Haemophilus Influenzae* typu b se v organismu pomnoží a krevní cestou se šíří po těle, kde může infikovat různé orgány. Klinické projevy se liší v závislosti na tom, který konkrétní orgán je napaden.

Nejzávažnějším projevem hemofilové nákazy typu b je meningitida, vyskytující se zejména u kojenců a batolat. Příznaky, které se mohou v tomto případě vyskytovat, jsou zejména prudká bolest hlavy a zvracení, ztuhlost šíje, případně ztráty vědomí. Pro zánět mozkových blan jsou také typické vysoké horečky. Zánět probíhá velmi rychle. Pozdě diagnostikovaná nebo neléčená meningitida může během několika desítek hodin

končit smrtí pacienta (Mačák, Mačáková, 2004). Meningitida může mít trvalé následky (až u deseti procent pacientů), obvykle je postižen zejména sluch.

V případě infekce horních cest dýchacích je nejzávažnější komplikací u dětských pacientů akutní epiglottitida. Toto zánětlivé onemocnění způsobuje mnohdy velmi masivní otoky záklopy hrtanové a může vést až k uzávěru dýchacích cest a udušení. Projevem akutní epiglottitidy je silná bolest v krku a vysoká horečka. Dítě bývá nápadně klidné, protože šetří s dechem a preferuje polohu vsedě, kdy je dýchání snadnější. Dítě s akutní epiglottitidou se nesmí položit do vodorovné polohy, neboť se dýchací cesty mohou ještě více uzavřít. U dospělých mají infekce horních cest dýchacích způsobené hemofilem typu b obvykle mírný průběh, infekce je provázena kašlem, bolestí v krku, únavou a zvýšenou teplotou.

Další častou komplikací hemofilovou nákazou typu b je zánět středního ucha (otitis media) projevující se prudkou bolestí v uchu, nevolností až zvracením. Neléčený zánět středního ucha může vést k prasknutí bubínku. To se projeví výtokem hnisu. *Hemofilus Influenzae* typu b může napadnout také plíce a zapříčinit pneumonii. Projevem je vlhký kašel a vykašlávání hlenu provázené únavou, dušností a horečkou.

#### 4.4.1 Očkování proti hemofilovým nákazám typu b

Komerčně vyráběné vakcíny používané v České republice:

- Act-Hib
- Comvax
- Menitorix
- Infanrix Hib
- Infanrix Hexa

Act-Hib je o konjugovaná vakcína proti hemofilovým nákazám typu b na tetanickém toxoidu. Očkování chrání pouze proti onemocněním způsobeným hemofilovou nákazou typu b, nechrání proti onemocněním způsobeným jiným sérotypem bakterie *Haemophilus Influenzae*, opouzdřeným i neopouzdřeným. Přestože konjugovaná vakcína proti hemofilovým nákazám typu b obsahuje tetanický toxoid, nechrání pacienta proti tetanu. Tetanický toxoid je v tomto případě nedostatečně imunizující. Dále jsou k očkování proti hemofilovým nákazám používány kombinované vakcíny, které kromě konjugované vakcíny proti hemofilovým nákazám typu b na tetanické toxoidu, obsahují také vakcíny proti tetanu, záškrtu, dávivému kašli, hepatitidě typu B nebo dětské přenosné obrně. Tyto vakcíny mohou být dodávány v různých

kombinacích. Příkladem je vakcína Comvax. Jedná se o konjugovanou vakcínu proti hemofilovým nákazám typu b na vnějším membránovém proteinu meningokoka skupiny B kombinovanou s vakcínou proti hepatitidě B. Vakcína Menitorix je kombinace konjugované vakcíny proti hemofilovým nákazám typu b na tetanickém toxoidu a konjugované vakcíny oligosacharidu skupiny C proti pneumokokovým nákazám typu C. Infanrix Hib je kombinovaná vakcína proti tetanu, záškrtu, dávivému kašli a hemofilovým nákazám typu b určená pro malé děti. Infanrix Hexa je navíc oproti Infanrix Hib obohacená o složku proti dětské přenosné obrně a hepatitidě B a taktéž je určená pro malé děti (Petráš, Lesná, 2010).

Pro očkování proti hemofilovým nákazám typu b platí Vyhláška o očkování proti infekčním nemocem č. 299/2010 ze dne 25. října 2010. Vakcína je určena pro děti a k očkování dochází od započatého devátého týdne po narození dítěte obvykle společně s očkováním proti tetanu, záškrtu, dávivému kašli, hepatitidě typu B a dětské přenosné obrně v rámci kombinovaného dětského očkování. U dětí očkovaných proti tuberkulóze se očkování provádí od započatého třináctého týdne po zhojení jizvičky po aplikaci vakcíny proti tuberkulóze. Základní očkování se provádí třemi dávkami podanými do věku šesti měsíců v intervalech jeden až dva měsíce. Čtvrtá, posilující dávka může být podána nejdříve šest měsíců po třetí dávce základního očkování a musí být podána nejpozději do věku osmnácti měsíců. V případě, že je dítěti aplikována konjugovaná vakcína proti hemofilovým nákazám typu b, očkuje se pouze dvěma dávkami v intervalu dvou měsíců. Dětem, které při základním očkování nedovršily jeden rok života, se aplikuje posilující dávka ve druhém roce života, v případě, že byla vakcína podána dítěti staršímu jeden rok, není potřeba podávat posilující dávku.

Dospělé osoby je možné očkovat, pokud hrozí riziko komplikací nákazy bakterií *Haemophilus Influenzae* typu b a pokud není výrobcem omezeno použití vakcíny u osob starších pěti let. U některých komerčně vyráběných vakcín může být omezeno jejich použití u osob starších pěti, resp. šesti let.

Vakcína proti hemofilovým nákazám se nejčastěji aplikuje intramuskulárně do přední či postranní části stehna nebo do hýžděové svaloviny dětí mladších dvou let. U dětí starších dvou let je aplikace provádí do deltového svalu. V případě rizika poruch koagulace je možné očkovací látku aplikovat subkutánně. Očkování smí být prováděno současně s jiným očkováním. Jednotlivé vakcíny ale musí být aplikovány jinou injekční stříkačkou a k aplikaci musí být použito jiné místo vpichu. Očkovací látka se nesmí míchat s jinou vakcínou.

Doba použitelnost konjugovaných vakcín je 24 – 36 měsíců. Vakcína musí být uskladněna v lednici při +2 °C až +8 °C chráněná před světlem a mrazem. Lyofilizované vakcíny se před použitím rozpustí v rozpouštědle, které je součástí balení dodaného výrobcem. Před samotnou aplikací je nutné zkontrolovat vzhled vakcíny, měla by být čirá a bezbarvá, případně mléčně zbarvená pokud se jedná o vakcínu s minerálním hliníkem.

Očkování smí být prováděno pouze u dětí v dobrém zdravotním stavu. Imunokompromitované pacienty lež očkovat, je ale vhodné sledovat hladiny postvakcinačních protilátek. Kvůli možné nižší imunitní odpovědi nemusí být dostatečně chráněni. Kontraindikací očkování jsou známé alergie na některou ze složek očkovací látky.

Konjugovaná vakcína proti hemofilovým nákazám nenese příliš velká rizika vzniku nežádoucích účinků. V případě použití konjugované vakcíny na tetanickém toxoidu je riziko vzniku nežádoucích účinků, zejména lokálních, čtenější (Petráš, Lesná, 2010).

## 5 Vzorek pacientů

Vzorkem pacientů použitých pro provedení experimentální části této bakalářské práce jsou všichni pacienti s potvrzeným syndromem DiGeorge, kteří byli vyšetřeni na Ústavu imunologie 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice v Motole v letech 1995 – 2011. Tito pacienti jsou zahrnuti do databáze pacientů se syndromem DiGeorge.

Z těchto pacientů jsou vybráni ti, jimž byly opakovaně vyšetřeny specifické postvakcinační protilátky proti tetanu, pneumokokovým nákazám a hemofilovým nákazám typu b. Tito pacienti byli použiti pro sledování dynamiky jmenovaných postvakcinačních protilátek.

Vzorek pacientů zahrnuje velké množství pacientů rozdílného věku, od novorozenců starých pár dní po dospělé pacienty. Pacienti staší 15 - ti let se však vyskytují pouze ojediněle. Poměr mužů a žen je vyrovnaný.

## 6 Metodika

Kvantitativní stanovení hladiny postvakcinačních protilátek je založeno na principu ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay). Každý ELISA set pro stanovení postvakcinačních protilátek sledovaných v praktické části této bakalářské práce obsahuje 12 stripů po 8 jamkách potažených příslušným antigenem. Dále je v setu obsažen promývací pufr a ředící pufr určený pro ředění vzorků, standardní séra v různých koncentracích pro konstrukci kalibrační křivky, pozitivní a negativní kontrola. Set obsahuje také konjugát proti lidským IgG protilátkám, TMB (tetrametylbenzidin) působící v reakci jako substrát a stop roztok pro zastavení chemické reakce. Z přístrojového vybavení je k provedení ELISA testu nezbytný zejména spektrofotometr. Dále je nutné použití promývačky a termostatu.

Reagencie musí před použitím dosahovat teploty 21 °C – 25 °C. Ředí se pouze promývací roztok pro promývání jamek, ostatní reagencie jsou určeny k přímému použití bez ředění. Před použitím se musí důkladně promíchat. Naředěné vzorky séra lze použít do osmi hodin po naředění.

Set s reagenty se skladuje v lednici při teplotě +2 °C až +8 °C. Naředěný promývací roztok je možné skladovat po dobu 4 týdnů při laboratorní teplotě.

### 6.1 Preanalytická fáze

Kvantitativní stanovení postvakcinačních IgG protilátek se provádí v lidském séru. Vzorek se odebírá venepunkcí do zkumavek určených pro sérum s aktivátorem hemokoagulace. Odběr probíhá aseptickým způsobem. Sérum se odděluje až po kompletní přirozené koagulaci. Je nutné ho včas oddělit, aby se zabránilo vzniku hemolytického séra. Kvantitativní stanovení IgG protilátek ELISA testem nevyžaduje speciální podmínky transportu biologického materiálu do laboratoře.

Vzorky se mohou skladovat při teplotě +2 °C až +8 °C po dobu maximálně 48 hodin. Po uplynutí této doby se vzorky uchovávají hluboko zmražené. Vzorky u nichž dochází k opakovanému zmrazování a rozmrazování a vzorky nesprávně skladované mohou vykazovat sníženou aktivitu protilátek a dávat chybné výsledky.

Pro kvantitativní stanovení postvakcinačních protilátek je možné použít pouze vzorky čirého séra. Hemolytická, hyperlipemická nebo bakteriálně kontaminovaná séra mohou dávat falešně pozitivní nebo falešně negativní výsledky.

## 6.2 Kvantitativní stanovení protilátek proti tetanu

### 6.2.1 Princip metody

Kvantitativní stanovení protilátek proti tetanu je založeno na principu ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay). Stanovuje se hladina IgG protilátek proti toxinu bakterie *Clostridium tetani*. Stěny jamek mikrotitrační destičky jsou potaženy inaktivovaným toxinem tetanu, který funguje jako antigen. Po přidání vyšetřovaného séra se na antigen navážou protilátky ze vzorku. Po následném promytí se ze vzorku odstraní nenavázané proteiny. Do jamek se přidá konjugát protilátek proti lidským IgG obsahující křenuvou peroxidázu. Konjugát se naváže na protilátky proti tetanickému toxinu, které se v předchozím kroku navázaly na antigen na stěně jamek. Vytvoří se imunokomplex. Nenavázané protilátky se opět odstraní promytím. Následně se přidá tetrametylbenzidin jako substrát a dojde k jeho reakci s imunokomplexem za vzniku modrého zbarvení, jehož intenzita je přímo úměrná množství protilátek proti toxinu Tetanu ve vyšetřovaném séru. Přidáním stop roztoku obsahujícím směs kyselin dojde k zastavení imunochemické reakce a změně zbarvení z modré na žlutou. Následně se měří absorbance roztoku v jednotlivých jamkách pomocí spektrofotometru při vlnové délce 450 nm.

### 6.2.2 Interpretace výsledků

Výsledky kvantitativního stanovení IgG protilátek proti tetanovému toxinu pomocí ELISA testu se udávají v jednotkách IU/ml. Referenční mez je  $> 0,1$  IU/ml. Pacienti s koncentrací protilátek proti tetanu  $< 0,03$  nemají žádnou vakcinační ochranu a je doporučeno provést základní schéma očkování. V rozmezí koncentrací  $0,03 - 0,1$  IU/ml není vakcinační ochrana zaručená a doporučuje se provést posilující očkování, stejně jako v případě hladiny protilátek proti tetanu  $0,1 - 0,5$  IU/ml, kdy je vakcinační ochrana nízká. Koncentrace protilátek  $0,5 - 1,0$  IU/ml již zajišťuje dostatečnou vakcinační ochranu, vhodné je v tomto případě provést kontrolu za dva roky. Dlouhodobá vakcinační ochrana je u pacientů s hladinami protilátek  $1,1 - 5,0$  IU/ml, doporučuje se kontrola za 5 – 10 let. Koncentrace protilátek proti tetanu  $> 5,0$  IU/ml zajišťuje extrémně vysokou vakcinační ochranu, kontrola za deset let je dostačující.



## 6.3 Stanovení protilátek proti *Streptokoku Pneumoniae*

### 6.3.1 Princip metody

Kvantitativní stanovení IgG protilátek proti pneumokokovým kapsulárním polysacharidům (PCP) se provádí ELISA metodou. Jamky mikrotitrační destičky jsou potaženy antigenem PCP sérotypů 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F, 33F. Na antigen se navážou protilátky proti PCP ze vzorku séra a nenavázané proteiny se odstraní promytím. Poté se do jamek přidá konjugát globulinové frakce králičího antiséra proti lidským IgG. Peroxidázou značený konjugát se naváže na protilátky proti PCP. Nadbytek konjugátu se odstraní následným promytím. Přidáním substrátu TMB se docílí zviditelnění vzniklého imunokomplexu modrým zbarvením. Intenzita zbarvení je přímo úměrná koncentraci protilátek proti PCP ve vzorku. Chemická reakce se zastaví přidáním stop roztoku, který obsahuje kyselinu fosforečnou. Dojde ke změně barvy roztoku v jamkách z modré na žlutou. Toto zbarvení se měří spektrofotometricky při vlnové délce 450 nm.

### 6.3.2 Interpretace výsledků

Výsledky kvantitativního stanovení hladiny IgG protilátek proti PCP jsou udávány v jednotkách mg/l. Referenční mez stanovení je  $> 6$  mg/l. Pacienti s koncentrací protilátek  $> 6$  mg/l mají dostatečnou vakcinační ochranu proti *Streptokoku Pneumoniae*.

## 6.4 Stanovení protilátek proti *Haemophilu Influenzae*

### 6.4.1 Princip metody

Kvantitativní stanovení hladiny IgG protilátek proti *Haemophilu Influenzae* typu b (HIB) je založeno na principu ELISA. Jamky mikrotitrační destičky jsou potaženy antigenem kapsulárního polysacharidu HIB konjugovaným s lidským sérovým albuminem. Protilátky IgG proti HIB ze vzorku séra se navážou na antigen a nenavázané proteiny se odstraní promytím. Přidá se konjugát globulinové frakce králičího antiséra proti lidským IgG protilátkám, která je značená peroxidázou. Konjugát se specificky váže na lidské IgG protilátky navázané na antigen. Nadbytek konjugátu se odstraní promytím. Přidáním substrátu TMB dojde ke zviditelnění vzniklého imunokomplexu, výsledkem chemické reakce je modrý reakční produkt.

Intenzita zabarvení je přímo úměrná hladině protilátek ve vzorku séra. Stop roztok obsahující kyselinu fosforečnou způsobí změnu zabarvení z modré na žlutou. Žluté zabarvení se následně měří při vlnové délce 450 nm.

#### 6.4.2 Interpretace výsledků

Výsledky kvantitativního stanovení hladiny IgG protilátek proti *Haemophilu Influenzae* typu b jsou udávány v jednotkách mg/l. Referenční mez stanovení je > 1 mg/l. Koncentrace protilátek proti HIB > 1 mg/l zajišťuje pacientovi dostatečnou vakcinační ochranu.

#### 6.5 Databáze pacientů

Databáze pacientů se syndromem DiGeorge je sestavena ze všech pacientů, kteří byli v letech 1995 – 2011 alespoň jednou vyšetřeni v Ústavu imunologie 2. lékařské fakulty UK a FN v Motole. U každého z těchto pacientů byly zaznamenány výsledky vždy z posledního vyšetření, které jim na Ústavu imunologie bylo provedeno. Bylo tak kvůli větší přehlednosti a vzhledem k množství dat učiněno i v případě, že posledním vyšetřením určitého pacienta byl jiný než některý ze sledovaných parametrů.

Databáze je zaměřena na postvakcinační protilátky a na humorální imunitu. Byly vybrány tři základní a nejvíce vyšetřované postvakcinační protilátky a to IgG protilátky proti *Clostridium Tetani*, IgG protilátky proti *Streptokoku Pneumoniae* a IgG protilátky proti *Haemophilu Influenzae* typu b. Tyto postvakcinační protilátky byly vybrány s ohledem na četnost jejich vyšetření a na počet pacientů, jimž byly vyšetřeny tak, aby byla zajištěna co největší objektivnost a průzkum mohl přinést co nejrelevantnější poznatky.

Z hlediska humorální imunity se databáze zaměřuje na čtyři základní protilátky a to imunoglobulin G, imunoglobulin A, imunoglobulin M a imunoglobulin E. Do databáze nebyly zahrnuty jednotlivé podtypy imunoglobulinů ani imunoglobulin D, jehož funkce dosud není zcela známa a jeho sledování u pacientů se syndromem DiGeorge by tak nemělo příliš velký význam. Dalším důvodem je nízká četnost jeho vyšetření u pacientů, jež tato databáze sleduje. Výsledek průzkumu by tak mohl být zkreslen.

Ostatní imunologické parametry nejsou předmětem této práce, a proto nebyly do databáze zahrnuty. A to i v případě, kdy pacient nemá vyšetřeny sledované parametry. Kromě vyšetřených protilátek byly do databáze dále zaznamenány údaje o pacientovi. A

to pohlaví, rok posledního vyšetření a věk v době posledního vyšetření. Každému pacientovi bylo přiřazeno číslo.

Kromě konkrétních hodnot koncentrace vybraných parametrů bylo sledováno také rozložení vyšetření v jednotlivých rocích a z hlediska pohlaví a věku pacienta.

## 6.6 Sledování dynamiky postvakcinačních protilátek

Ze základní databáze pacientů se syndromem DiGeorge byly vybráni pacienti, jimž bylo opakovaně provedeno stanovení hladiny postvakcinačních protilátek IgG proti tetanickému toxinu, proti pneumokokovým kapsulárním polysacharidům a proti hemofilovým nálezům typu b. Tito pacienti pak posloužili jako vzorek pro sledování dynamiky vybraných postvakcinačních protilátek v závislosti na věku. Výsledky vyšetření každého ze sledovaných parametrů jednotlivých pacientů v jednotlivých letech pak byly zaznamenány do tabulky. Ke každé hodnotě hladiny postvakcinačních protilátek byl zaznamenán rok, kdy bylo vyšetření provedeno a věk pacienta v době konkrétního vyšetření. Do tabulky byly zahrnuty pouze výsledky těch vyšetření, při kterých byly vyšetřeny všechny tři sledované postvakcinační protilátky současně. Z této základní tabulky pak byly výsledky jednotlivých vyšetření roztrženy do dílčích tabulek znázorňujících konkrétní věky pacientů. Poté byly vypočteny průměrné hodnoty hladin specifických postvakcinačních protilátek proti tetanu, pneumokokovým nálezům a hemofilovým nálezům typu b v jednotlivých letech života.

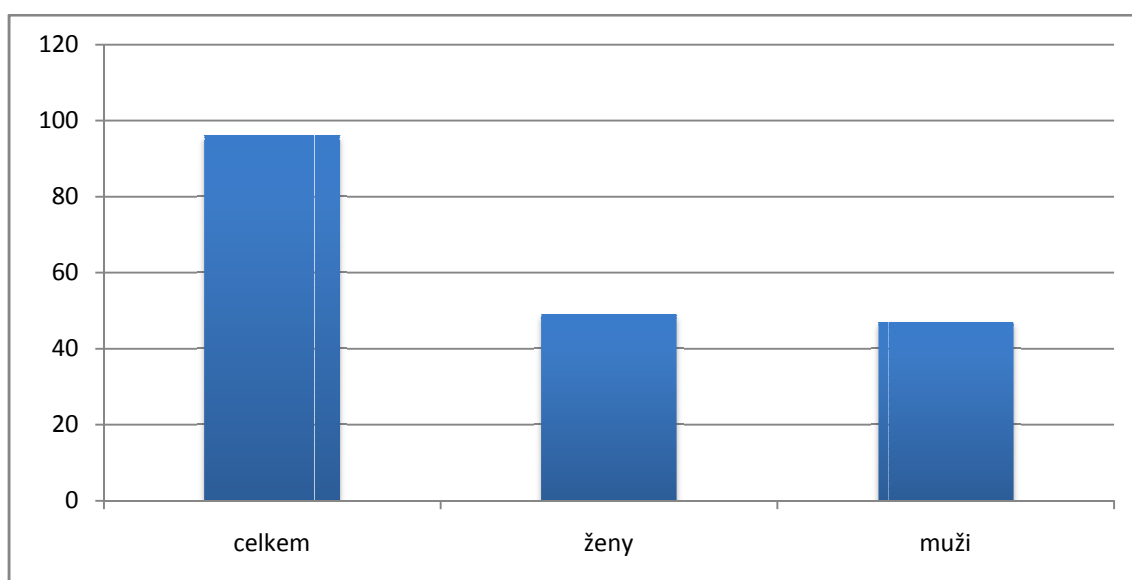
Všichni pacienti byli při sledování vývoje jednotlivých postvakcinačních protilátek v závislosti na věku zaznamenáni pod číslem, které jim bylo přiřazeno v základní databázi pacientů se syndromem DiGeorge vyšetřených na Ústavu imunologie 2. lékařské fakulty UK a FN v Motole.

## 7 Výsledky

### 7.1 Databáze pacientů

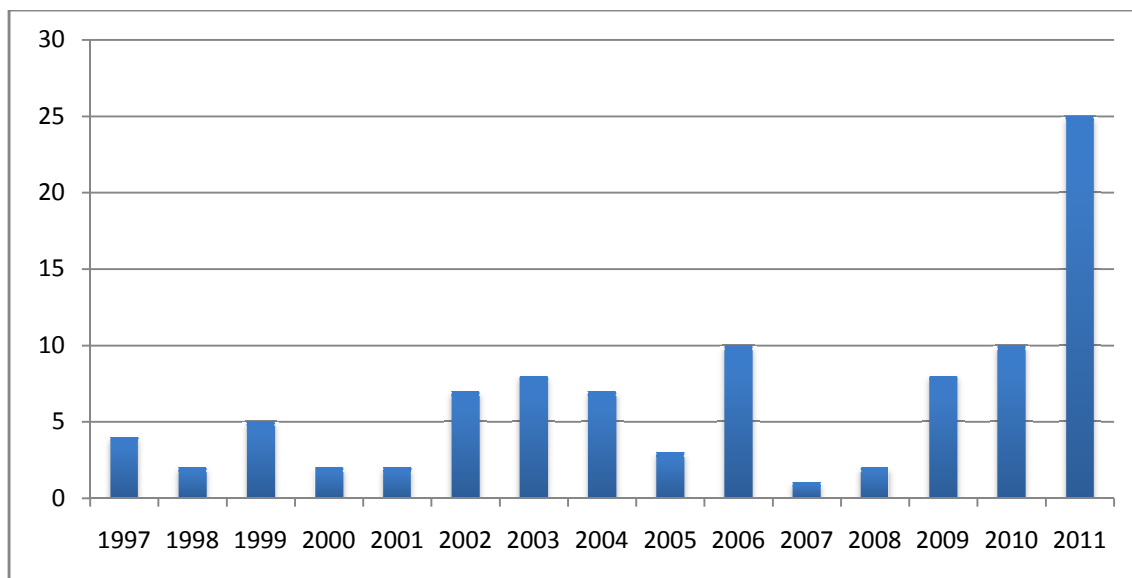
#### 7.1.1 Obecné poznatky

Databáze pacientů s diagnostikovaným syndromem DiGeorge vyšetřených na Ústavu imunologie 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice v Motole v letech 1995 – 2011 zahrnuje 96 pacientů. Z tohoto celkového počtu pacientů je 47 pacientů mužského pohlaví a 49 pacientů pohlaví ženského.



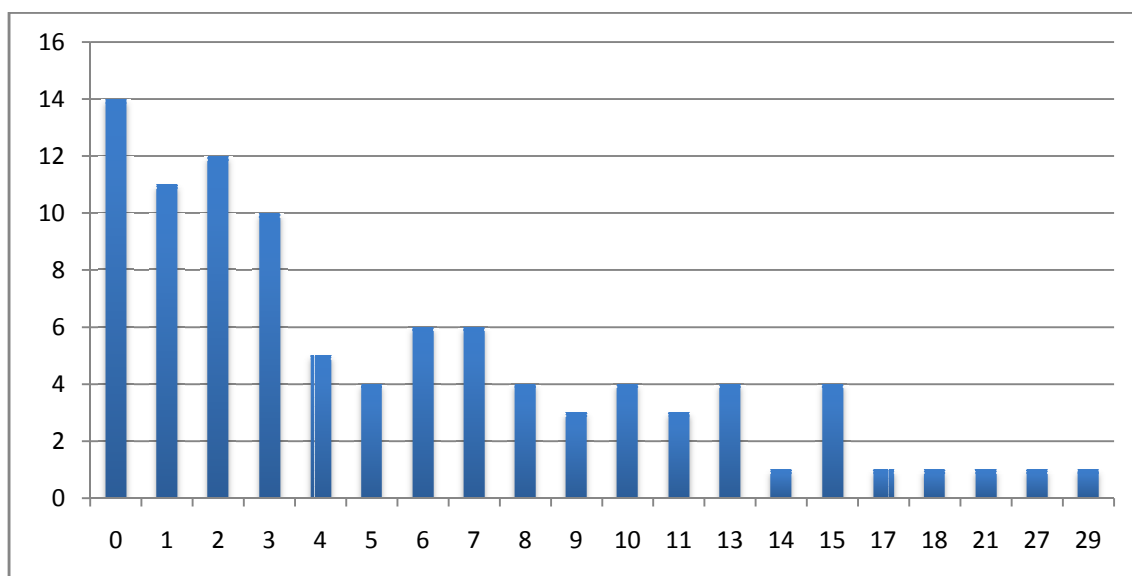
Graf č. 1: počet pacientů v databázi a jejich rozložení v závislosti na pohlaví

Celkem 25 vyšetření z celkového počtu 96 vyšetření zahrnutých v databázi pacientů se syndromem DiGeorge bylo provedeno v roce 2011. Roky 2010 a 2006 shodně představují 10 vyšetření z celkového počtu vyšetření v databázi. V letech 2008 a 2003 bylo provedeno 8 vyšetření, v letech 2004 a 2002 celkem 7 vyšetření. Ostatní roky představují pouze malou část z celkového počtu vyšetření zahrnutých v databázi. Vyšetření provedené v roce 1995 je v databázi zahrnuto 5 krát, v roce 1997 pouze 4 krát. Celkem 3 pacienti reprezentují vyšetření provedená v roce 2005. Roky 2008, 2001, 2000 a 1998 představují 2 vyšetření z celkového počtu vyšetření zahrnutých v databázi. Rok 2007 byl v databázi reprezentován pouze jednou.



Graf č. 2: počet vyšetření zahrnutých v databázi v jednotlivých letech

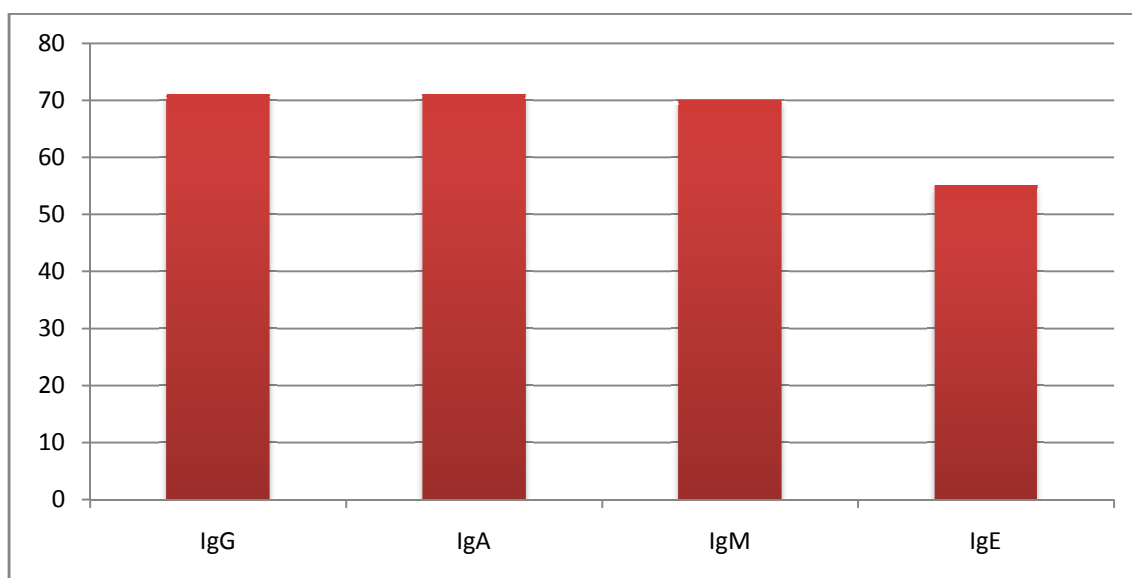
Největší část pacientů zahrnutých v databázi pacientů se syndromem DiGeorge jsou děti mladší jednoho roku. Novorozenci představují 14 pacientů z celkového počtu 96 pacientů v databázi. Děti ve věku 1 rok života jsou v databázi zastoupeny 11 krát. Celkem 12 pacientů jsou děti ve věku 2 let a 10 pacientů ve věku 3 let. Čtyřletých pacientů je v databázi 5, pětiletých 4 a shodně 6 pacientů je ve věku 6 a 7 let. Celkem 4 krát jsou v databázi zastoupeni 8 letí, 10-ti, 13-ti a 15-ti letí pacienti. 9 let a 3 roky je věk 3 pacientů z databáze. Vždy pouze jednomu pacientovi bylo v době vyšetření 14, 17, 18, 21, 27 a 29 let.



Graf č. 3: rozložení věku pacientů v době vyšetření zahrnutého v databázi

### 7.1.2 Sledování základních imunoglobulinů

V databázi pacientů s diagnostikovaným syndromem DiGeorge se vyskytují pacienti, u kterých nebyly všechny imunoglobuliny vyšetřeny. Proto je nelze zahrnout do vzorku pacientů, kteří byli použiti v grafické interpretaci výsledků vyšetření hladiny imunoglobulinů. Níže je uveden graf znázorňující počet vyšetření jednotlivých protilátek IgG, IgA, IgM, IgE. Z celkového počtu 96 pacientů byly imunoglobuliny G a A vyšetřeny u 71 pacientů, imunoglobulin M byl vyšetřen 70 pacientům a imunoglobulin E 55 pacientům. Celkem 25 pacientům nebyly vyšetřeny imunoglobuliny G a A, IgM nebylo vyšetřeno 26 pacientům a IgE 41 pacientům. Poslední vyšetření jednotlivých pacientů se syndromem DiGeorge provedené na Ústavu imunologie nezahrnovalo stanovení hladiny ani jednoho ze sledovaných imunoglobulinů ve 24 případech.



Graf č. 4: počet vyšetření jednotlivých imunoglobulinů zahrnutých v databázi

V následujících tabulkách jsou shrnuty referenční meze jednotlivých imunoglobulinů v závislosti na věku pacienta. Níže je uveden graf zachycující poměr pacientů se sníženými, zvýšenými hodnotami protilátek a pacientů s hodnotami protilátek v normě. IgG bylo v 35 případech v normě, u 24 pacientů bylo zvýšeno, sníženo u 12 pacientů. IgA dosahovalo normálních hodnot u 28 pacientů, zvýšených u 33 pacientů a snížených u 10 pacientů. V případě vyšetření IgM mělo celkem 47 pacientů normální hodnoty, zvýšené IgM mělo 6 pacientů, snížené 17 pacientů. 45 pacientů mělo normální hladinu IgE, 10 pacientů mělo IgE zvýšeno.

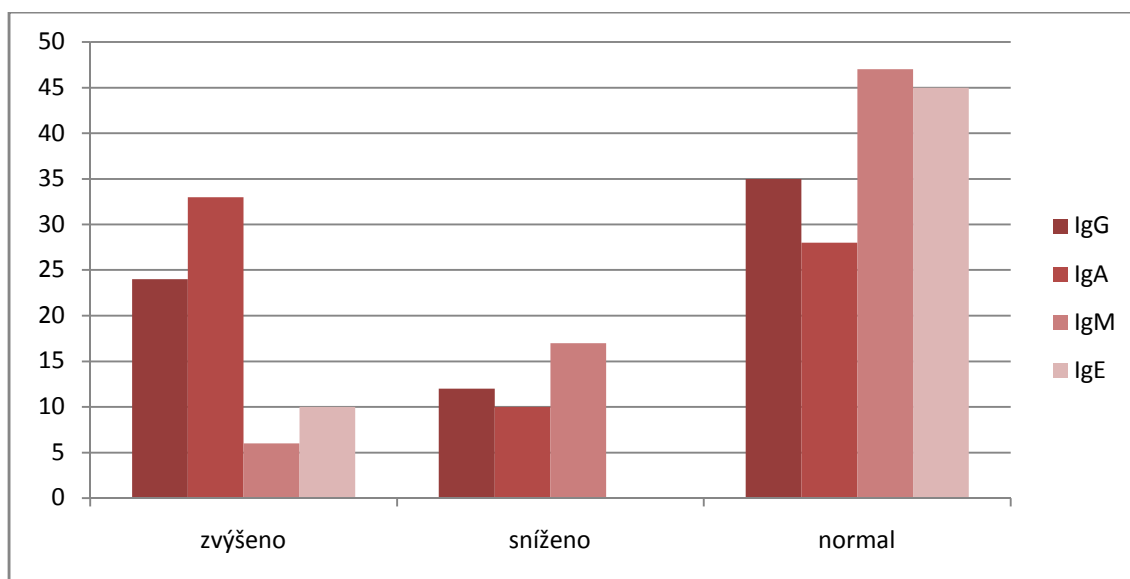
IgG	
věk	hodnoty g/l
0 - 1 měsíc	5,78 - 9,01
1 - 3 měsíce	4,59 - 7,48
3 - 6 měsíců	6,65 - 6,37
6 - 10 měsíců	3,64 - 7,73
10 měsíců- 1 rok	3,91 - 8,5
1 - 3 roky	5, 53 - 10,2
3 - 6 let	6,37 - 11,05
6 - 10 let	7,05 - 11,9
10 - 15 let	7,31 - 12,75
15 let a více	7,65 - 13,6

IgA	
věk	hodnoty g/l
0 - 1 měsíc	0,0 - 0,08
1 - 3 měsíce	0,07 - 0,22
3 - 6 měsíců	0,12 - 0,46
6 - 10 měsíců	0,12 - 0,62
10 měsíců- 1 rok	0,17 - 0,75
1 - 3 roky	0,33 - 0,91
3 - 6 let	0,58 - 1,16
6 - 10 let	0,79 - 1,38
10 - 15 let	0,91 - 1,7
15 let a více	0,91 - 2,9

IgM	
věk	hodnoty g/l
0 - 1 měsíc	0,17 - 0,50
1 - 3 měsíce	0,17 - 0,64
3 - 6 měsíců	0,30 - 1,30
6 - 10 měsíců	0,30 - 1,37
10 měsíců- 1 rok	0,30 - 1,51
1 - 6 roky	0,47 - 1,67
6 - 10 let	0,47 - 1,73
10 - 15 let	0,47 - 1,80
15 let a více	0,47 - 1,95

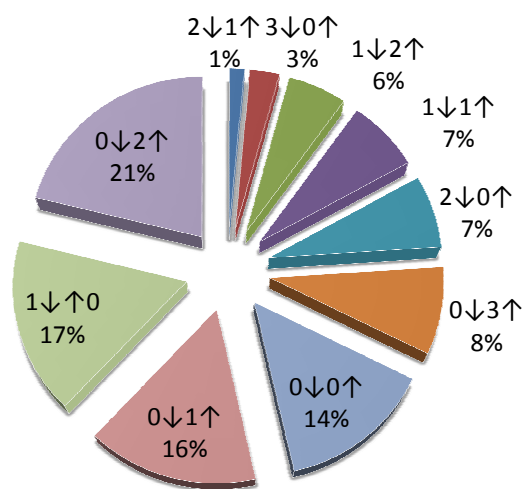
IgE	
věk	hodnoty IU/ml
0 - 1 týden	0 - 1,5
1 týden - 2 roky	0 - 30
2 - 7 let	0 - 60
7 - 9 let	0 - 90
9 - 16 let	0 - 200
16 let a více	0 - 150

Tab. č. 1: referenční meze základních imunoglobulinů



Graf č. 5: počet pacientů s normálními a patologickými hodnotami jednotlivých imunoglobulinů

Z celkového počtu pacientů z databáze mělo 21 % pacientů 2 ze čtyř sledovaných imunoglobulinů zvýšené a ostatní v normě. 17 % pacientů mělo jeden parametr snížený a ostatní dosahovaly normálních hodnot, 16 % pacientů 1 imunoglobulin zvýšený, ostatní v normě. Ani jednu patologickou hodnotu hladin imunoglobulinů nemělo 14 % pacientů. 8 % pacientů z databáze mělo 3 ze sledovaných imunoglobulinů zvýšené, ostatní v normě. Shodně 7 % pacientů mělo 2 protilátky snížené a žádnou zvýšenou a 1 imunoglobulin snížený a 1 zvýšený. 6 % pacientů mělo 2 sledované parametry zvýšené a 1 snížený. 3 z imunoglobulinů snížené a 1 v normě měly 3 % pacientů. Zbylé 1 % pacientů mělo 2 imunoglobuliny snížené a 1 zvýšený.

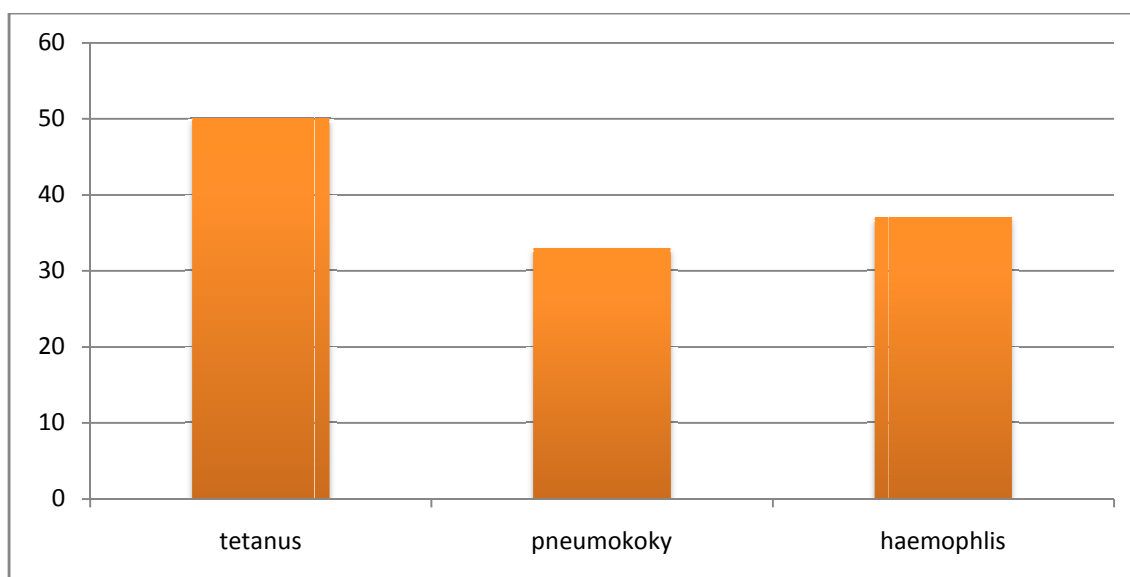


Graf č. 6: kombinace patologických a normálních hodnot imunoglobulinů u jednotlivých pacientů

### 7.1.3 Sledování postvakcinačních protilátek

Postvakcinační protilátky byly vyšetřeny pouze některým pacientům z databáze. Protilátky IgG proti tetanu byly vyšetřeny 50 pacientům z celkového počtu 96 pacientů v databázi, IgG protilátky proti pneumokokovým nákazám 33 pacientům a IgG protilátky proti hemofilovým nákazám typu b 37 pacientům. Protilátky proti tetanu nebyly vyšetřeny 46 pacientům z databáze pacientů se syndromem DiGeorge, protilátky proti pneumokokům 63 pacientům a protilátky proti Haemophilu Influenzae typu b 59 pacientům z databáze. Ani jedna ze sledovaných protilátek nebyla do vyšetření zahrnuta ve 45 případech.



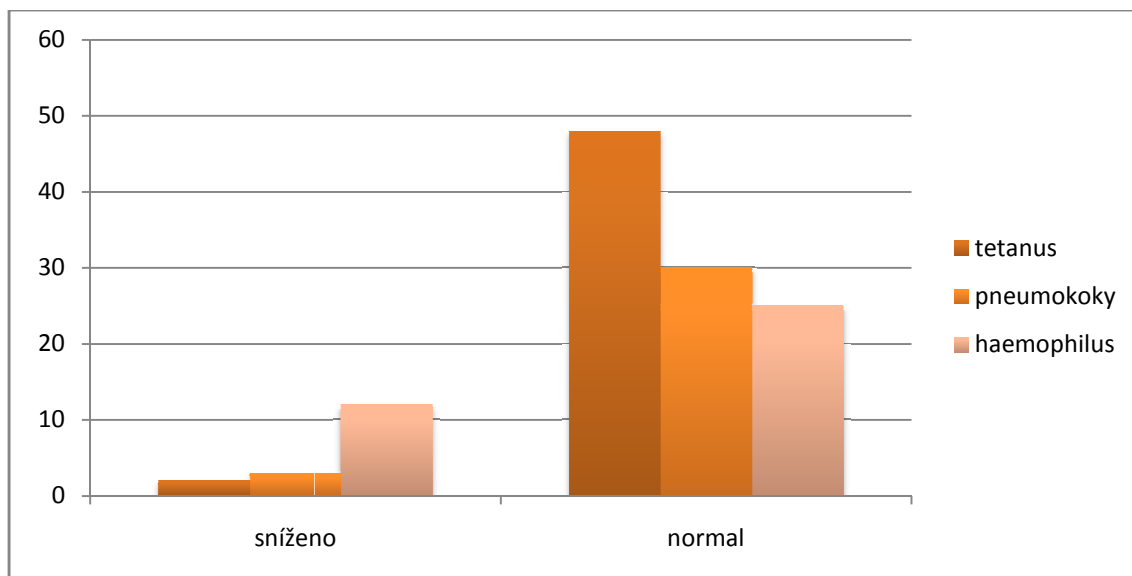


Graf č. 7: počet vyšetření jednotlivých postvaccinačních protilátek zahrnutých v databázi

Z celkového počtu pacientů, kterým byly vyšetřeny postvaccinační protilátky proti tetanu, mělo 48 pacientů hodnoty v normě, 2 pacienti měli hodnoty snižené. Celkem 30 pacientů mělo normální hodnoty postvaccinačních protilátek proti pneumokokovým nákazám a 3 pacienti měli snižené hodnoty. V případě postvaccinačních protilátek proti hemofilovým nákazám typu b byly hodnoty v normě u 25 pacientů a snižené u 12 pacientů. V následující tabulce jsou shrnuty referenční meze jednotlivých postvaccinačních protilátek.

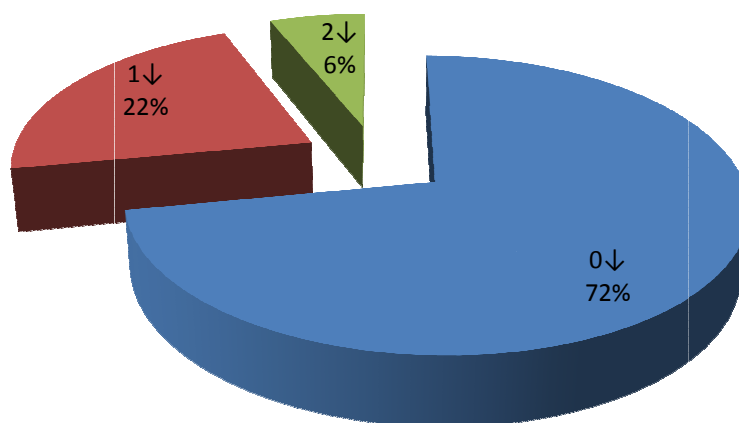
postvaccinační protilátky	referenční mez
IgG tetanus	> 0,1 IU/ml
IgG pneumokoky	> 6 mg/l
IgG haemophilus	> 1 mg/l

Tab. č. 2: referenční meze postvaccinačních protilátek



Graf č. 8: počet pacientů s normálními a patologickými hodnotami postvaccinačních protilátek

Z celkového počtu pacientů v databázi pacientů se syndromem DiGeorge mělo 72 % pacientů všechny tři postvaccinační protilátky v normě. 22 % pacientů mělo sníženou 1 z postvaccinačních protilátek, zbylých 6 % mělo snížené hodnoty hladin 2 postvaccinačních protilátek.



Graf č. 9: kombinace normálních a patologických hodnot postvaccinačních protilátek

## 7.2 Sledování dynamiky postvaccinačních protilátek

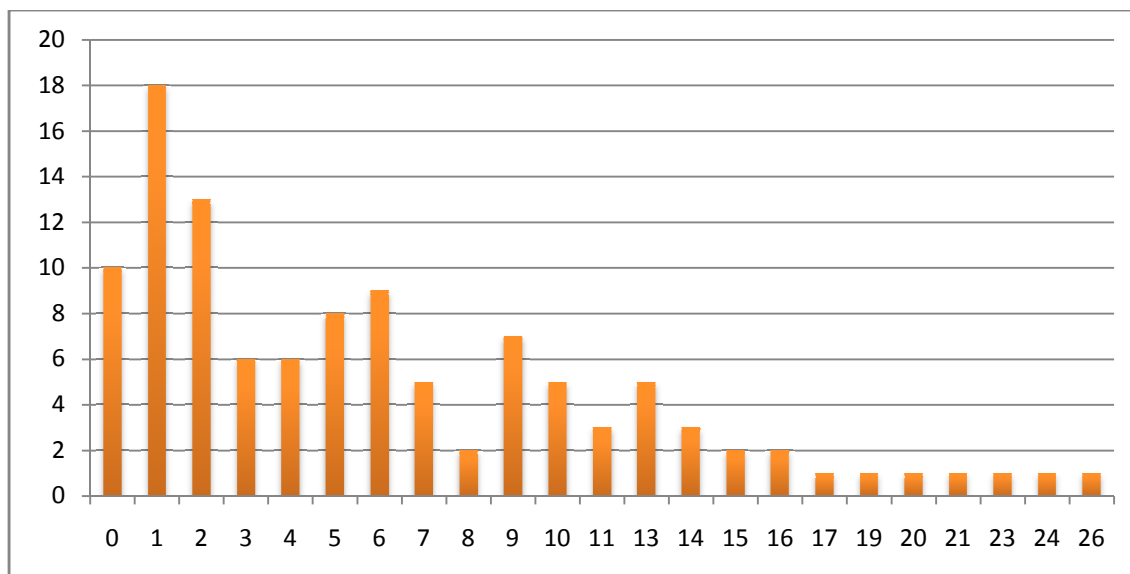
Do sledování dynamiky specifických postvaccinačních protilátek proti tetanu, pneumokokovým nákazám a hemofilovým nákazám typu b byly zahrnuti následující

pacienti z databáze pacientů se syndromem DiGeorge vyšetřených na Ústavu imunologie 2. lékařské fakulty UK a FN v Motole v letech 1995 - 2011:

<b>muži</b>	<b>ženy</b>
pacient č. 7	pacient č. 6
pacient č. 10	pacient č. 9
pacient č. 15	pacient č. 12
pacient č. 24	pacient č. 14
pacient č. 27	pacient č. 30
pacient č. 39	pacient č. 32
pacient č. 56	pacient č. 35
pacient č. 59	pacient č. 36
pacient č. 64	pacient č. 38
pacient č. 70	pacient č. 48
pacient č. 81	pacient č. 49
pacient č. 87	pacient č. 52
	pacient č. 61
	pacient č. 69
	pacient č. 72
	pacient č. 75
	pacient č. 80
	pacient č. 86

Tab. č. 3: pacienti zahrnutí do sledování dynamiky postvakcinačních protilátek

Jednotlivá vyšetření všech výše jmenovaných pacientů byla zaznamenána do tabulky a roztríděna do dílčích tabulek znázorňujících jednotlivé roky života. Vyšetření novorozenců do jednoho roku života bylo do sledování zahrnuto 10 krát. Nejpočetnější skupina vyšetření byla provedená v 1 roce života a to 18 krát. Vyšetření 2 letých pacientů bylo zahrnuto 13 krát, 3 letých a 4 letých 6 krát. Dále bylo použito 8 vyšetření ve věku 5 let a 9 vyšetření ve věku 6 let. 7 letých pacientů bylo sledováno 5, 8 letých pouze 2. Ve věku 9 let bylo 7 pacientů, 10 - ti letých pacientů bylo 5. Shodně bylo do sledování zahrnuto také 13 - ti letých pacientů. Po třech pacientech bylo sledováno ve věku 11 a 14 let. Pouze dva pacienty zahrnovaly tabulky vyšetření provedených v 15 a 16 roce života. Ostatní roky života, tedy 17, 19, 20, 21, 23, 24 a 26 let byly reprezentovány vždy pouze jedním pacientem.



Graf č. 10: rozložení věku pacientů v době vyšetření zahrnutých do sledování dynamiky

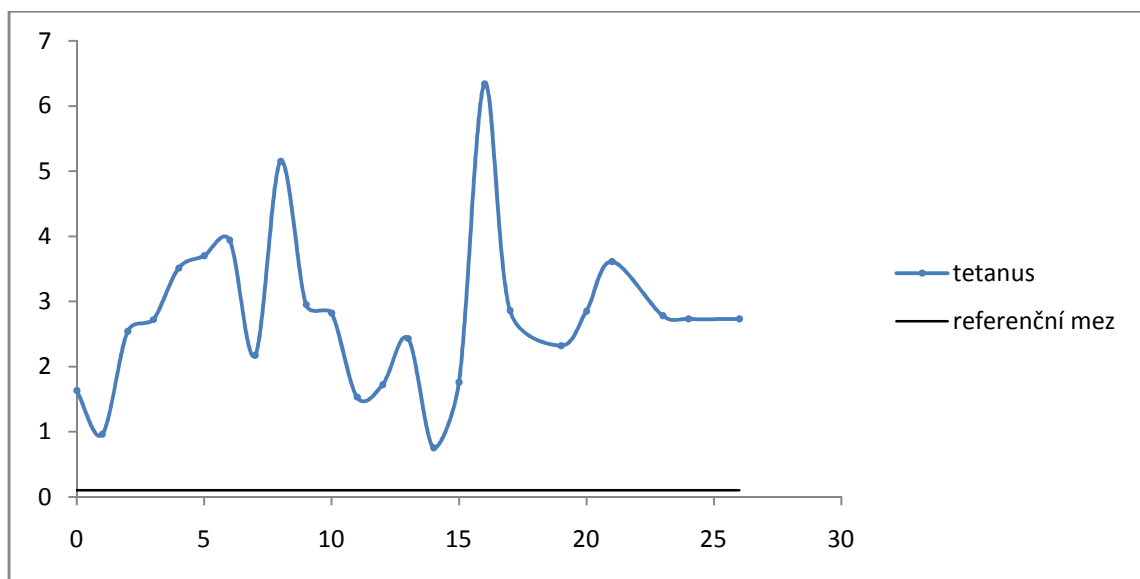
V následující tabulce jsou znázorněny průměrné hodnoty hladin jednotlivých postvakcinačních protilátek v konkrétních letech života. Hodnoty jsou zaokrouhleny na dvě desetinná místa.

věk	IgG tetanus IU/ml	IgG pneumokoky mg/l	IgG hemofilus mg/l
0	1,63	38,25	2,95
1	0,96	17,15	3,13
2	2,54	24,25	8,42
3	2,72	42,53	3,7
4	3,51	42,94	3,21
5	3,7	34,93	5,73
6	3,94	49,6	3,45
7	2,17	45,3	2,75
8	5,15	51,83	4,39
9	2,95	23,36	4,16
10	2,82	47,03	2,32
11	1,53	67,09	1,1
12	1,72	37,73	0,73
13	2,43	68,04	1,29
14	0,75	64,41	3,99
15	1,76	34,02	1,94
16	6,34	64,18	26,37
17	2,86	3,24	0,22
19	2,32	55,93	5,15
20	2,85	47,26	2,16
21	3,61	40,21	3,9
23	2,78	55,76	3,08

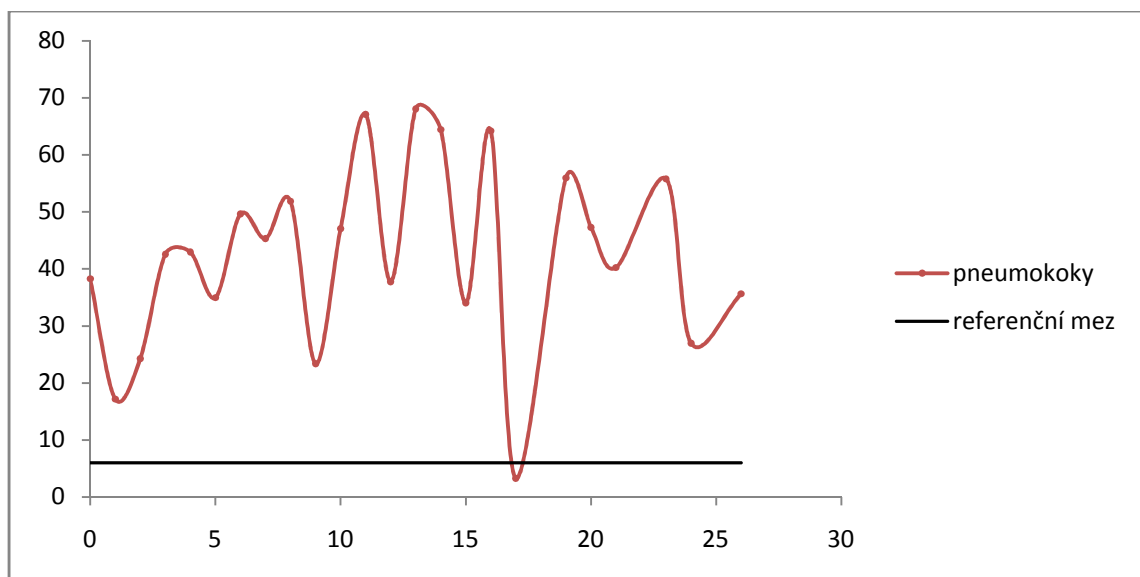
<b>24</b>	2,73	26,95	1,9
<b>26</b>	2,73	35,61	3,01

Tab. č. 4: průměrné hodnoty hladin postvakačních protilátek v jednotlivých letech života

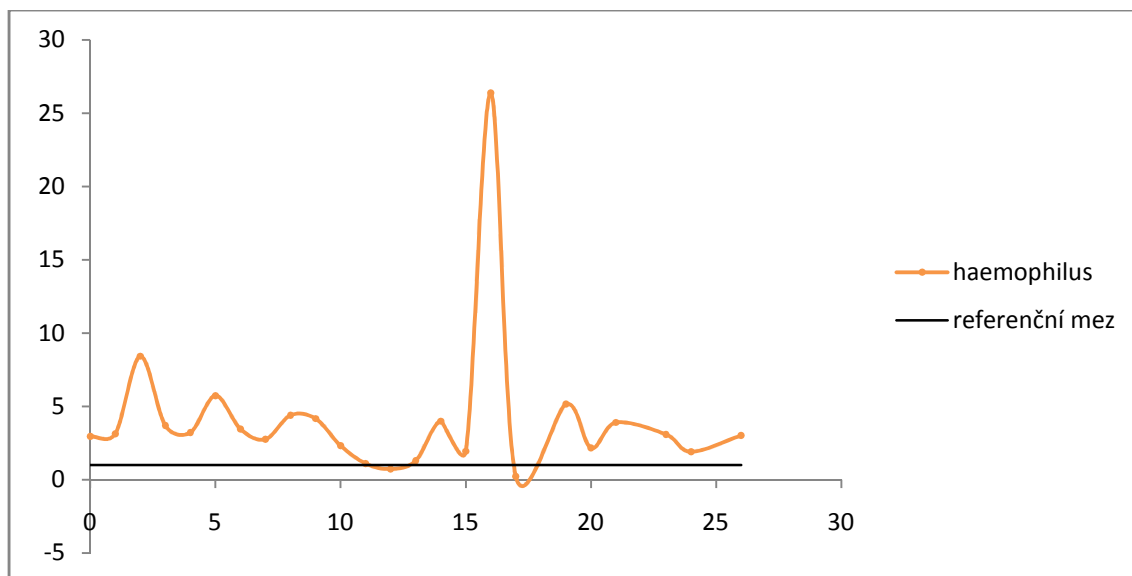
Z níže uvedených průměrných hodnot byly sestrojeny grafy znázorňující dynamiku postvakačních protilátek v závislosti na věku pacienta. Současně jsou v grafech znázorněny referenční meze jednotlivých postvakačních protilátek.



Graf č. 11: graf závislosti hladiny postvakačních protilátek proti tetanu na věku pacienta

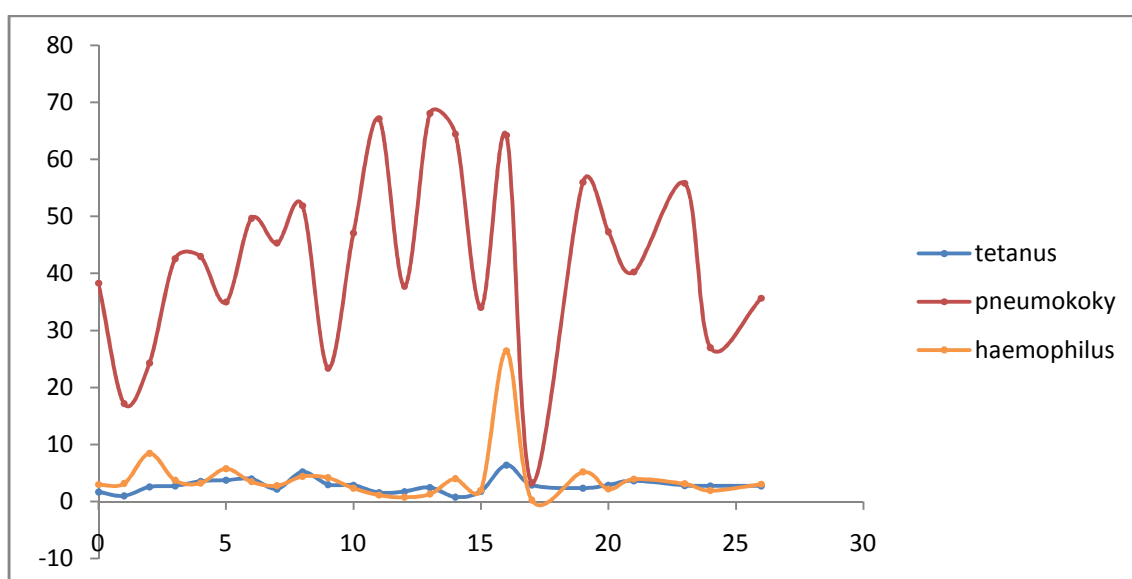


Graf č. 12: graf závislosti hladiny postvakačních protilátek pneumokokovým nákazám na věku



Graf č. 13: graf závislosti hladiny postvakcinačních protilátek proti hemofilovým nákazám typu b na věku

Pro lepší vzájemné porovnání jednotlivých postvakcinačních protilátek jsou v následujícím grafu znázorněny křivky dynamiky postvakcinačních protilátek proti tetanu, proti pneumokokovým nákazám a proti hemofilovým nákazám typu b současně.



Graf č. 14: znázornění dynamiky postvakcinačních protilátek v závislosti na věku

## 8 Diskuze

Z grafu č. 1 znázorňujícího rozložení počtu pacientů v databázi pacientů se syndromem DiGeorge vyšetřených na Ústavu imunologie 2. lékařské fakulty UK a FN v Motole v letech 1995 – 2011 v závislosti na pohlaví je patrné, že počet pacientů mužského a ženského pohlaví je vyrovnaný. Ženy v databázi představují 51 % pacientů, muži 49 %. Tento fakt odpovídá způsobu dědičnosti této aberace. Syndrom DiGeorge jako autozomálně dominantní onemocnění postihuje mužské i ženské potomky se stejnou pravděpodobností. V databázi pacientů bylo zahrnuto vždy jen poslední uskutečněné vyšetření u jednotlivých pacientů. Graf č. 2, který znázorňuje počet vyšetření v konkrétních letech, ukazuje, že většina pacientů byla vyšetřena v posledním sledovaném roce, tedy v roce 2011. Z toho lze usuzovat, že minimálně těchto 26 % pacientů je aktuálně zaregistrováno v kartotéce ambulance Ústavu imunologie a do ambulance v současné době dochází. Naopak u pacientů z databáze, jejichž poslední vyšetření je z roku 2000 a starší lze předpokládat, že v současnosti nejsou aktuálními pacienty ambulance. Z grafu č. 3 je patrné, že převážná část pacientů jsou malé děti. Syndrom DiGeorge je vrozené onemocnění, jehož komplikace se obvykle projevují již krátce po narození. Z toho důvodu je 15 % pacientů v databázi novorozenci mladší jednoho roku. Přítomnost pacientů, kteří v době vyšetření zahrnutého do databáze, dosahovaly vyššího věku, případně dospělosti, dokazuje, že někteří pacienti jsou dlouhodobě sledováni v ambulanci Ústavu imunologie.

Charakteristickým rysem DiGeorgova syndromu je hypoplázie, v nejtěžších případech až aplázie thymu, případně patologická migrace thymu. Tyto anomálie vedou k defektům T buněčné imunity. Místem vzniku imunokompetence B lymfocytů je oproti T lymfocytům kostní dřeň, která u DiGeorgova syndromu není zasažena a tedy i B buněčná imunita pacientů a tvorba protilátek by neměla být postižena. Přesto byla oproti předpokladu u pacientů v databázi relativně často zjištěna patologická hodnota hladin protilátek. Imunoglobulin G byl zvýšen u 34 % vyšetřených pacientů, imunoglobulin A dokonce u 46 % pacientů. Zvýšení těchto imunoglobulinů svědčí o chronické zánětlivé imunizaci. Významný vzestup hladiny IgA souvisí s jeho funkcí na povrchu sliznic. Lze tedy předpokládat, že nalezené zvýšené hodnoty protilátek souvisí s respiračními infekcemi. Primárně je tedy postižena pouze T buněčná imunita. Její defekt vede k nedostatečné ochraně organismu před patogeny a tedy i ke zvýšenému výskytu chronických infekcí. Tímto způsobem je nepřímo ovlivněna také humorální imunita.

Pouze 9 % pacientů v databázi mělo zvýšené hodnoty IgM, které by svědčily o akutní infekci.

V případě imunoglobulinu E, jehož zvýšení svědčí o alergické reakci, nebyly v databázi pozorovány příliš velké odchylky od normálních hodnot. 82% pacientů, u nichž bylo v databázi zahrnuto vyšetření IgE mělo hodnoty v normě, 18 % pacientů zvýšené. Alergie u pacientů s mikrodeleci 22q11 byly v minulosti popsány a předpokládá se, že mohou nastat. V databázi pacientů se syndromem DiGeorge vyšetřených na Ústavu imunologie 2. lékařské fakulty UK a FN v Motole však oproti předpokladu nebyl zjištěný abnormální výskyt alergických reakcí.

Celkové hladiny protilátek nedávají kompletní obraz o funkci imunity v organismu. Pro zpřesnění je vhodné sledovat současně specifické protilátky. Hladina sledovaných postvakcinačních protilátek nebyla u pacientů v databázi výrazně změněna oproti normálu. V případě postvakcinačních IgG protilátek proti tetanickému toxinu byly patologické hodnoty nalezeny pouze u 2 pacientů, jenž představují 4 % z celkového počtu vyšetření protilátek proti tetanu. Nedostatečnou ochranu proti pneumokokovým nákazám měli pouze 3 pacienti představující 9 % vyšetřených pacientů. Největší podíl snížených hodnot postvakcinačních protilátek bylo zaznamenáno u protilátek proti hemofilovým nákazám typu b. Celkem 32 % z pacientů v databázi, jimž byly vyšetřeny postvakcinační protilátky proti hemofilovým nákazám typu b, dosahovalo patologických hodnot. Lze tedy usuzovat, že nižší vakcinační ochranu pacientům se syndromem DiGeorge zajišťují zejména polysacharidové vakcíny obsahující bakteriální pouzdra patogenů, proti nimž jsou vakcíny namířeny.



## ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo sestavení databáze pacientů se syndromem diGeorge vyšetřených na Ústavu imunologie 2. lékařské fakulty UK a FN v Motole v letech 1995 – 2011 a zhodnocení jejich humorální imunity. Práce byla zaměřena zejména na postvakcinační protilátky proti tetanu, PCP a HIB. Databáze byla sestavena a v práci je uvedena jako Příloha č. 1. U převážné většiny pacientů nebyla zjištěna patologická hladina postvakcinačních protilátek a lze tedy předpokládat, že vakcinační ochrana pacientů se syndromem diGeorge není výrazně změněna oproti zdravé populaci.

## REFERENČNÍ SEZNAM

- BARTUŇKOVÁ, Jiřina, Anna ŠEDIVÁ a Aleš JANDA. *Imunodeficiencie*. 2., přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada Publishing, 2007. 254 s. ISBN 978-80-247-1980-1.
- BLECHOVÁ, Zuzana. Pneumokokové infekce v dětském věku. *Pediatric pro praxi*. 2006, č. 2.
- CANCRINI, Caterina, Maria Luisa ROMITI, Andrea FINOCCHI, Silvia DI CESARE Patrizia CIAFFI, Claudia CAPPONI, Savita PAHWA, Paolo ROSSI. Post-Natal Ontogenesis of the T-cell Receptor CD4 and CD8 V $\beta$  Repertoire and Immune Function in Children with DiGeorge Syndrome. *Journal of Clinical Immunology*. 2005, č. 25. DOI: 10.1007/s10875-005-4085-3
- Clostridium tetani. *REPETITORIUM* [online]. [cit. 2012-04-14]. Dostupné z: <http://old.lf3.cuni.cz/ustavy/mikrobiologie/bak/uceb/obsah/rep/clte.htm>
- ČALOUNOVÁ, Gabriela, Eduard KOČÁREK a Jakub MINKS. *Vybrané aspekty lékařské genetiky*. Praha: Ústav dědičných metabolických poruch, 2008. Projekt Metabolické vzdělávací centrum.
- ČECHOVÁ, Dana a Ludmila PROKEŠOVÁ, SANQUIS PLUS: Imunitní systém a mikroorganismy: nejčastěji užívané strategie mikrobů k překonání obrany hostitele. *Sanquis.cz* [online]. [cit. 2012-04-14]. Dostupné z: <http://www.sanquis.cz/index2.php?linkID=pls56&kat=2>
- ČR. VYHLÁŠKA o očkování proti infekčním nemocem. In: <http://www.infekce.cz/vyhl2992010.htm>. 2010, č. 299.
- DOMORÁZKOVÁ, Eva. Očkování u dětí. [Http://www.zdn.cz](http://www.zdn.cz) [online]. 4. 5. 2000 [cit. 2012-04-14]. Dostupné z: <http://www.zdn.cz/clanek/postgradualni-medicina/ockovani-u-deti-126763>
- FUČÍKOVÁ, Terezie, Jiřina BARTUŇKOVÁ, Jiří LITZMAN a Petr PANZNER. *Základy klinické imunologie*. Praha: RDI PRESS a Agentura KRIGL, 1994. 148 s. ISBN 80-90067-4-3.
- Genetické poruchy imunity: Geneticky podmíněné poruchy imunitního systému. <http://genetika.wz.cz> [online]. 9. 6. 2006 [cit. 2012-04-14]. Dostupné z: <http://genetika.wz.cz/clanky/clanek8.php>
- GENNERY A. R., D. BARGE, J. J. O'SULLIVAN, T. J. FLOOD, M. ABINUN, A. J. CANT. Antibody deficiency and autoimmunity in 22q11.2 deletion syndrome. *Arch Dis Child*. 2002, č. 86. s. 422 – 425.

- HONG, Richard. The DiGeorge Anomaly. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*. 2001. s. 43 – 60.
- HOŘEJŠÍ, Václav a Jiřina BARTUŇKOVÁ. *Základy imunologie*. Vydání 1. Praha: TRITON, 1998. 219 s. ISBN 80-85875-73-X.
- Hypokalcémie a hyperkalcémie. *Http://www.zdn.cz* [online]. 7. 5. 2010 [cit. 2012-04-14]. Dostupné z: <http://www.zdn.cz/clanek/postgradualni-medicina/hypokalcemie-a-hyperkalcemie-451659lni-medicina/ockovani-u-deti-126763>
- KAPRAS, Jan, Milada KOHOUTOVÁ a Berta OTOVA. *Kapitoly z lékařské biologie a genetiky I*. Praha: Karolinum, 1998. ISBN 80-7184-322-9.
- KITSIOU-TZELI S., A. KOLIALEXI, H. FRYSSIRA, A. GALLA-VOUMVOURAKI, K. SALAVOURA, M. KANARIOU, G. TH. TSANGARIS, E. KANAVAKIS and A. MAVROU. Detection of 22q11.2 Deletion Among 139 Patients with Di George/Velocardiofacial Syndrome Features. *In vivo*. 2004, č. 18. s. 603 – 608.
- KOČÁREK, Eduard, Martin PÁNEK a Drahúše NOVOTNÁ. *Klinická cytogenetika I.: Vyšetřovací metody v klinické cytogenetice*. 2., upravené vydání. Praha: Karolinum, 2010. 134 s. ISBN 978-80-246-1880-7.
- KONRÁDOVÁ, Václava, Luděk VAJNER a Jiří UHLÍK. *Histologie: Přednášky pro bakalářské studium*. Vydání první. Praha: H & H Vyšehradská, s.r.o., 2005. 186 s. ISBN 80-7319-009-5.
- KORNFELD, Stephen J., Bernard ZEFFREN, Chris S. CHRISTODOULOU, Noorbibi K. DAY, Gail CAWKWELL, Robert A. GOOD. DiGeorge Anomaly: A Comparative study of the clinical immunologic characteristics of patients positive and negative by fluorescence in situ hybridization. *J Allergy Clin Immunol*. 2000. s. 938 – 987.
- LITZMAN, Jiří, Pavel KUKLÍNEK a Ondřej RYBNÍČEK. *Alergologie a klinická imunologie*. Vydání první. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví v Brně, 2001. 144 s. ISBN 80-7013-345-7.
- MAČÁK, Jirka a Jana MAČÁKOVÁ. *Patologie*. Vydání první. Praha: Grada Publishing, a.s., 2004. 347 s. ISBN 80-247-0785-3.
- PETRÁŠ, Marek a Ivana K. LESNÁ. *Manuál očkování 2010*. 3. vydání. Praha: Marek Petráš, 2010. 650 s. ISBN 978-80-254-5419-0.
- Poruchy vývoje jednotlivých orgánových systémů. *Http://atlases.muni.cz* [online]. [cit. 2012-04-14]. Dostupné z: [http://atlases.muni.cz/atlas/feto/atl\\_cz/main+fetopatologie+vvvorgsyst.html#vvvsrdcevvvsrdcef+digeorge](http://atlases.muni.cz/atlas/feto/atl_cz/main+fetopatologie+vvvorgsyst.html#vvvsrdcevvvsrdcef+digeorge)

- RACEK, Jaroslav et al. *Klinická biochemie*. Druhé, přepracované vydání. Praha: Galén, 2006. 329 s. ISBN 80-7262-324-9.
- RYAN, A. K., J. A. GOODSHIP, D. I. WILSON, N. PHILIP, A. LEVY, H. SEIDEL, S. SCHUFFENHAUER, H. OECHSLER, B. BELOHRADSKY, M. PRIEUR, A. AURIAS, F. L. RAYMOND, J. CLAYTON-SMITH, E. HATCHWELL, C. McKEOWN, F. A. BEEMER, B. DALLAPICCOLA, G. NOVELLI, J. A. HURST, J. IGNATIUS, A. J. GREEN, R. M. WINTER, L. BRUETON, K. BRONDUM-NIESEL, F. STEWART, T. Van ESSEN, M. PATTON, J. PATERSON, P. J. SCAMBLER. Spectrum of clinical features associated with interstitial chromosome 22q11 deletions: a European collaborative study. *J Med Genet*. 1997, č. 34. s. 798 – 804.
- SEEMANOVÁ, Eva. Mikrodeleční syndromy. *Časopis lékařů českých*. 2002, roč. 2002, č. 12, s. 363-370. ISSN 0008-7335.
- Streptococcus pneumoniae*. In: REPETITORIUM [online]. [cit. 2012-04-14]. Dostupné z: <http://old.lf3.cuni.cz/ustavy/mikrobiologie/bak/uceb/obsah/rep/stpn.htm>
- ŠEDIVÁ, Anna, Jiřina BARTŮŇKOVÁ, Radana ZACHOVÁ, Andrea POLOUČKOVÁ, Ondřej HRUŠÁK, Aleš JANDA, Eduard KOČÁREK, Drahuše NOVOTNÁ, Kamila NOVOTNÁ, Tibor KLEIN. Early development of immunity in diGeorge syndrom. *Med Sci Monit*. 2005, 11(4). s. 182 – 187.
- ŠEDIVÁ, Anna. *Imunitní systém u dětí*. Vydání 1. Praha: TRITON, 1999. 150 s. ISBN 80-85875-95-0.
- ŠTEFÁNEK, Jiří. Hemofilus. *Medicína, nemoci, studium na 1. LF UK* [online]. 2011 [cit. 2012-04-14]. Dostupné z: <http://www.stefajir.cz/?q=hemofilus>
- ŠTEFÁNEK, Jiří. Pneumokok. *Medicína, nemoci, studium na 1. LF UK* [online]. 2011 [cit. 2012-04-14]. Dostupné z: <http://www.stefajir.cz/?q=pneumokok>
- Velký lékařský slovník [online]. 2008 [cit. 2012-04-14]. Dostupné z: <http://lekarske.slovniky.cz>

## **SEZNAM PŘÍLOH**

Příloha č. 1: Databáze pacientů se syndromem DiGeorge (tabulka) .....	62
---	----

## PŘÍLOHY

**Příloha č. 1: Databáze pacientů se syndromem DiGeorge (tabulka)**

<b>pacient</b>	<b>pohlaví</b>	<b>věk</b>	<b>rok vyšetření</b>
1	M	3	2010
2	M	0	2004
3	M	0	2006
4	M	7	1999
5	F	2	2004
6	F	10	2010
7	M	14	2010
8	F	1	2011
9	F	15	2009
10	M	3	2011
11	M	1	1999
12	F	6	2011
13	M	4	2004
14	F	7	2011
15	M	3	2006
16	M	8	2011
17	M	0	2002
18	F	3	2006
19	M	1	2007
20	F	27	2006
21	M	4	2001
22	M	13	2006
23	M	8	2002
24	M	3	2011
25	F	0	1997
26	M	2	2003
27	M	4	2009
28	F	5	2003
29	F	2	1999
30	F	3	2011
31	M	0	1999
32	F	13	2010
33	M	0	2006
34	F	2	2010
35	F	9	2006
36	F	6	2009
37	M	2	2001
38	F	10	2011
39	M	8	2011

<b>pacient</b>	<b>pohlaví</b>	<b>věk</b>	<b>rok vyšetření</b>
40	M	15	2011
41	F	7	2009
42	F	3	1998
43	F	2	2009
44	M	8	2010
45	F	3	2009
46	F	1	2008
47	F	1	2009
48	F	10	2008
49	F	6	2004
50	F	4	2002
51	M	4	1999
52	F	18	2011
53	M	5	2002
54	F	3	1998
55	M	1	2006
56	M	17	2011
57	F	9	2000
58	F	5	2002
59	M	13	2011
60	F	2	2004
61	F	6	2011
62	M	0	2002
63	F	1	2003
64	M	15	2011
65	F	10	2004
66	M	13	2000
67	F	21	2006
68	M	11	2006
69	F	11	2011
70	M	29	2011
71	F	3	2009
72	F	7	2010
73	M	0	2003
74	M	0	2003
75	F	1	2010
76	F	1	2003
77	M	7	2011
78	M	15	2005
79	F	0	2011
80	F	9	2011

<b>pacient</b>	<b>pohlaví</b>	<b>věk</b>	<b>rok vyšetření</b>
81	M	6	2011
82	M	1	2004
83	M	0	1997
84	M	2	2003
85	F	0	2010
86	F	11	2005
87	M	7	2011
88	M	2	2005
89	F	0	2003
90	F	1	2010
91	M	5	1997
92	M	6	2011
93	F	2	2011
94	F	0	2002
95	M	2	2011
96	F	2	1997