

DEVELOPMENT OF A VACCINE FOR THE TREATMENT OF URINARY TRACT INFLAMMATORY DISEASES

KOUKALOVA D, HAJEK V, KODUSEK R

VÝVOJ VAKCÍNY PRO LÉČBU ZÁNĚTLIVÝCH ONEMOCNĚNÍ MOČOVÝCH CEST

Abstract

Koukalova D, Hajek V, Kodousek R:
Development of a Vaccine for the Treatment of Urinary Tract Inflammatory Diseases
Bratisl Lek Listy 1999; 100 (2): 92–95

Recidivating uroinfections are predominantly treated with antibiotics and chemotherapeutics. An effective alternative treatment can be immunotherapy with inactivated bacteria. The authors have focused on the development of polybacterial vaccine with both specific and nonspecific immunostimulatory activity. The vaccine contains killed bacteria which most frequently occur as an etiological agent in urinary tract infections. Determining for the selection of particular strains for the vaccine preparation were their immunostimulatory properties evaluated after intraperitoneal application of killed cells to mice. The results were evaluated according to weight gain of liver and spleen and verified by histological examination of these organs. The final form of the vaccine URVAKOL contains immunogenically most active strains of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterococcus faecalis*, representing specific effective part of the preparation, adjuvant activity is provided by *Propionibacterium acnes*. (Tab. 1, Fig. 2, Ref. 27.)

Key words: recidivating uroinfection, vaccine URVAKOL, immunostimulatory effect.

Recidivující infekce močových cest představují závažný terapeutický problém; asi polovina akutních infekcí, zvládnutých léčbou antibiotiky nebo chemoterapeutiky, se opakuje do 1 roku po vyléčení (Sabra, 1995). Příčinou recidiv může být imunologický defekt v odolnosti sliznic vulvy, vagíny a distální části močové trubice, který umožňuje adhezi střevních mikroorganismů na epitelie urogenitálního systému (Prát a spol., 1989).

Další skupinu chronických infekcí močového traktu představují nákazy komplikující strukturální abnormality močového systému, jakými jsou například obstrukční uropatie, konge-

Abstrakt

Koukalová D., Hájek V., Kodousek R.:
Vývoj vakcíny pro léčbu zánětlivých onemocnění močových cest
Bratisl. lek. Listy, 100, 1999, č. 2, s. 92–95

K léčbě recidivujících uroinfekcí jsou většinou používána antibiotika a chemoterapeutika. Účinnou alternativou je imunoterapie inaktivovanými bakteriemi. Autoři se ve své práci zaměřili na vývoj polybakteriální vakcíny se specifickou i nespecifickou imunostimulační aktivitou. Vakcína obsahuje usmrčené bakterie, které se vyskytují jako nejčastější etiologické agens u infekcí močového traktu. Pro zařazení jednotlivých kmenů do vakcinačního preparátu byly rozhodující jejich imunostimulační vlastnosti hodnocené po intraperitoneální aplikaci usmrčených buněk myším. Výsledky byly posuzovány podle hmotnostních přírůstků jater a sleziny a verifikovány histologickým vyšetřením těchto orgánů. Finální forma vakcíny URVAKOL obsahuje imunogenně nejaktivnější kmeny druhu *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Enterococcus faecalis*, které představují specificky účinnou složku preparátu, adjuvantní aktivitu zajišťuje *Propionibacterium acnes*. (Tab. 1, obr. 2, lit. 27.)

Klíčová slova: recidivující uroinfekce, vakcína URVAKOL, imunostimulační účinek.

nitální anomálie, neurogenní měchýř nebo urolitiáza (Sabra, 1995). Vážnoucí periodické omývání sliznic močových cest proudem moči a časté instrumentace podporují chronicitu zánětlivých procesů.

K zvládnutí recidivujících uroinfekcí jsou většinou používána antibiotika a chemoterapeutika. Jejich alternativou je imunoterapie autovakcínou (Mošnová a spol., 1985) nebo komerčním preparátem Uro-Vaxom, případně SolcoUrovac (Prát a spol., 1989). Snahou této léčebné metody je zamezit nebo alespoň redukovat adhezi bakterií na uroepitelie.

Cílem naší práce byl výběr vhodných kmenů nejčastěji se uplatňujících etiologicky u infekcí vývodných cest močových a následná příprava polybakteriální vakcíny se specifickou i nespecifickou imunostimulační aktivitou.

Materiál a metody

Studie byla zahájena izolací 260 bakteriálních kmenů, které nejčastěji vyvolávají infekce močových cest (Lochmann a spol., 1993). Jejich výběr byl zaměřen na identifikaci druhů *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Enterococcus faecalis*. Anaerobní kultivací bylo dále izolováno 65 kmenů rodu *Propionibacterium*, které mohou mít mimořádně vysokou nespecifickou imunomodulační aktivitu (Berd, 1978).

Od nemocných s infekcí močových cest byly odebrány vzorky moče (porce středního proudu). Bezprostředně po odběru byla zahájena kultivace na krevním agaru a Endově půdě za aerobních podmínek, při 37 °C, po dobu 24 h semikvantitativní metodou (Duben a spol., 1986). Do pokusů byly vybrány kmeny narostlé v počtu 10^5 – 10^7 . Jejich předběžná identifikace podle 12 kritérií (makroskopický vzhled, motilita, štěpení indolu, tvorba plynu, sirovodíku, ureázy, oxidázy, utilizace citrátu, dekarboxylace lyzinu a ornitinu, růst v 6,5 % roztoku NaCl, hydrolyza eskulinu) byla doplněna podrobnou diagnostikou na základě 23 reakcí v komerčně vyráběných setech ENTEROTest 1, 2 a NEFERMtest (Lachema) (Rojíčková a spol., 1994).

Pro záchyt propionibakterií byl odebrán hnis z kožních lézí pacientů s akné. Vzorky byly kultivovány na VL agaru s 10 % beraní krve při 37 °C, v dusíkové atmosféře obohacené 10 % CO_2 , po dobu 48 h. Rodové zařazení získaných kmenů bylo provedeno na základě makroskopického a mikroskopického vzhledu. K jejich podrobné identifikaci bylo použito sady 12 testů komerčně vyráběného setu ANAEROTest (Lachema) a 11 doplňkových reakcí (motilita, zkapaňování želatiny, produkce lecitinázy, katalázy, lipázy, ureázy, pigmentu, redukce nitrátů, koagulace a digesce mléka, citlivost k penicilinu) (Neubauer, 1988; Závadová, 1986). Experimentální práce s propionibakteriemi pro přípravu vakcíny již byly zveřejněny (Koukalová a spol., 1992; Koukalová, 1996).

Z každého izolovaného kmene byla připravena vakcína, jejíž imunomodulační aktivita byla posuzována v další části pokusu na živém modelu.

Jednotlivé bakteriální kmeny byly množeny celofánovou metodou, kmeny druhu *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Enterococcus faecalis* na krevním agaru, v aerobním prostředí obohaceném 10 % CO_2 , při 37 °C, po dobu 24 h. Kmeny propionibakterií byly kultivovány na VL agaru s 10 % beraní krve, v atmosféře čistého dusíku, při 37 °C, po dobu 48 h. Po pomnožení byla bakteriální těla spláchnuta destilovanou vodou a po dobu 24 h inaktivována 4 % formolem (Maršálek a spol., 1971). Po kontrole sterility aerobní a anaerobní kultivací v tekutých pomnožovacích médiích po dobu 5 dní byl veškerý materiál lyofilizován (Čs. lékopis, 1987). Bezprostředně před aplikací pokusným zvířatům byla dávka 1,5 nebo 3,0 mg příslušné sušiny suspendována v 0,5 ml fosfátem pufovaného fyziologického roztoku (PBS), pH 7,2. Takto připravené ověřovací vakcíny byly aplikovány intraperitoneálně SPF-ICR outbredním myším samičího pohlaví (Velaz, Lysolaje) o hmotnosti 16–20 g. Jednotlivé preparáty byly podány vždy dvěma myším.

Po 10 dnech byla zvířata usmrcena chloroformem a pitvána. Hodnoceny byly hmotnostní přírůstky jater a sleziny a verifikovány histologicky. Jako kontrola sloužila skupina 10 myší, kterým byl intraperitoneálně aplikován pouze PBS. Stejným způsobem bylo postupováno při ověřování účinnosti finální formy vakcíny na skupině 10 myší. Výsledky hmotnostních přírůstků byly statisticky hodnocené neparametrickým U testem. Pokusy se zvířaty probíhaly v podmínkách, které odpovídaly zákonu 246/92 Sb. na ochranu zvířat proti týrání a byly schváleny etickou komisí LF UP.

Histologická vyšetření jater a sleziny očkovaných myší byla provedena obvyklou metodou parafinových řezů. Preparáty byly barveny rutinně hematoxylinem a eosinem, dále speciálními bakterioskopickými postupy podle Grama-Weigerta, Grocotta a podle Warthina a Starryho. Příležitostně byly použity i metody histochemické (PAS-reakce a vazba koloidního železa podle Haleho-Müllera).

Výsledky zmíněných experimentálních postupů a histologických vyšetření byly pak použity ke kompletizaci finální formy vakcíny.

Výsledky

Na základě identifikačních vyšetření bylo klasifikováno jako *Escherichia coli* 64 kmenů, *Klebsiella pneumoniae* 52 kmenů, *Proteus mirabilis* 50 kmenů, *Pseudomonas aeruginosa* 48 kmenů a *Enterococcus faecalis* 46 kmenů.

Ve skupině kmenů rodu *Propionibacterium* bylo klasifikováno jako *Propionibacterium acnes* 60 kmenů, *Propionibacterium avidum* 3 kmeny a *Propionibacterium granulosum* 2 kmeny (Koukalová a spol., 1992; Koukalová, 1996).

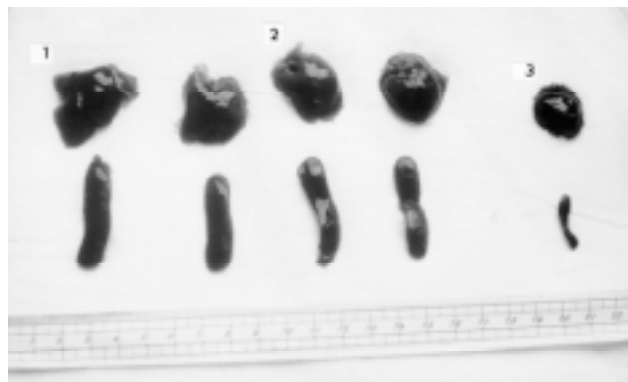
Intraperitoneální podání inaktivovaných kmenů přežily všechny myši. V průběhu pokusu nevykazovala zvířata vakcinovaná dávkou 1,5 mg změnu v chování, vzhledu a příjmu potravy. Zvířata očkovaná dávkou 3,0 mg byla v prvních dnech naopak spavá, netečná, se silným zánětem spojivek katarálního charakteru a naježenou srstí. Od 5.–6. dne se jejich stav normalizoval.

Po utracení myší a zvážení vnitřních orgánů byl, ve srovnání s kontrolní skupinou, průměr hmotnosti jater a sleziny zřetelně vyšší při použití vakcín obsahujících gramnegativní bakterie (o 48–200 %) ($p \leq 0,05$) a zvláště pak po aplikaci anaerobních grampozitivních tyčinek *Propionibacterium acnes* (o 118–481 %) ($p \leq 0,05$). Hmotnostní rozdíly vnitřních orgánů po dávkách 1,5 a 3,0 mg nebyly pozorovány. U vakcín připravených z grampozitivních enterokoků k signifikantnímu zvýšení hmotnosti jmenovaných orgánů nedošlo.

Bakteriální kmeny, které vyvolaly nejintenzivnější zvětšení orgánů tvorbou sterilních granulomů v játrech, hyperplazii bílé pulpy a extramedulární krvetvorbou ve slezině, byly vybrány pro finální skladbu vakcíny (obr. 1, 2, tab. 1).

Kmeny *Escherichia coli* 12, *Klebsiella pneumoniae* 16, *Proteus mirabilis* 51, *Pseudomonas aeruginosa* 70, *Enterococcus faecalis* 78 představují specificky účinnou složku preparátu URVAKOL a jsou v něm zastoupeny v poměru 3:3:1:1:2. Nespecifickou imunostimulační aktivitu zajišťuje kmen *Propionibacterium acnes* 17. Obě tyto účinné složky byly smíšeny v hmotnostním poměru 2:1.

Histologické vyšetření jater myší, očkovaných intraperitoneálně vybranými kmeny gramnegativních tyčinek, prokázalo zánětlivé lymfoidní uzlíky dispergované v parenchymu, četné mitózy v hepatocytech, známky ploidity a ojedinělé megakaryocyty. Při vyšetření slezin těchto zvířat byla popsána obrovsky vystupňova-



Obr. 1. Zvětšené orgány myši vakcinovaných intraperitoneálně kmenem *Klebsiella pneumoniae* č. 16. 1. Vakcinace dávkou 1,5 mg — průměrný hmotnostní přírůstek jater 3,235 g, slezin 0,63 g. 2. Vakcinace dávkou 3,0 mg — průměrný hmotnostní přírůstek jater 2,795 g, slezin 0,545 g. 3. Kontrolní nevakcinovaná myš — hmotnost jater 1,82 g, sleziny 0,1 g. Fig. 1. Enlarged organs of mice vaccinated intraperitoneally with strain *Klebsiella pneumoniae* No. 16. 1. Vaccination with the dose 1.5 mg — mean liver weight gain 3.235 g, mean spleen weight gain 0.63 g. 2. Vaccination with the dose 3.0 mg — mean liver weight gain 2.795 g, mean spleen weight gain 0.545 g. 3. Control nonvaccinated mouse — liver weight 1.82 g, spleen weight 0.1 g.



Obr. 2. Zvětšené orgány myši po intraperitoneální aplikaci kmene *Propionibacterium acnes* 17. Vpravo játra (2,88 g) a slezina (0,87 g) vakcinované myši. Vlevo játra (1,48 g) a slezina (0,06 g) kontrolní nevakcinované myši. Fig. 2. Enlarged organs of mice vaccinated intraperitoneally with strain *Propionibacterium acnes* 17. At the right — liver (2.88 g) and spleen (0.87 g) of vaccinated mouse. At the left — liver (1.48 g) and spleen (0.06 g) of control nonvaccinated mouse.

ná extramedulární hemopoéza. V bílé pulpě byly zastíženy ojedinělé epitelooidní uzlíčkovité mikrogranulomy (Koukalová, 1996).

Histologické vyšetření obou orgánů myši po intraperitoneální aplikaci enterokoků, prokázalo jen lehkou polyploidii hepatocytů a mírnou hyperplazii bílé i červené pulpy sleziny (Koukalová, 1996).

V parenchymu jater a sleziny myši, očkovaných stejným způsobem propionibakteriemi, byly zaznamenány rozsáhlé mnohobuněčné změny ve formě lymfohistiocytárních infiltrátů a epitelo-

idně-granulomatózních proliferací uzlíčkovitého vzhledu (Koukalová a spol., 1992; Koukalová, 1996).

Ve tkáni jater myši, očkovaných intraperitoneálně finální formou vakcíny, byla pozorována drobná granulomatózní ložiska a periportální zánětlivé infiltráty ze středně velkých mononukleárů a buněk histiocytární řady. Ve slezinách vakcinovaných zvířat bylo výrazné vystupňování extramedulární hemopoézy, zejména ve složce megakaryocytární a granulocytární. Megakaryocyty byly nalezeny v různém stupni zralosti a ploidity, s relativně častými mitózami multipolárního typu. V bílé pulpě byly přítomny ojedinělé germinativní folikly. Nápadnější bylo rozšíření marginálních zón reaktivních fagocytů (Koukalová, 1996).

Tab. 1. Hmotnostní hodnoty jater a sleziny (průměry v g) po intraperitoneální aplikaci vybraných kmenů a finální formy vakcíny.

Tab. 1. Weight values of liver and spleen (mean in g) after intraperitoneal application of selected strains and the final form of the vaccine.

Bakteriální kmen Bacterial strain	Dávka (mg) Dose (mg)	Játra Liver	Slezina Spleen
<i>Escherichia coli</i> 12	1,5	3,74	0,93
<i>Escherichia coli</i> 12	3,0	3,77	0,82
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 16	1,5	3,24	0,63
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 16	3,0	2,80	0,15
<i>Proteus mirabilis</i> 51	1,5	3,62	0,91
<i>Proteus mirabilis</i> 51	3,0	3,72	1,01
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 70	1,5	2,58	0,26
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 70	3,0	2,63	0,31
<i>Enterococcus faecalis</i> 78	1,5	1,88	0,18
<i>Enterococcus faecalis</i> 78	3,0	1,87	0,14
<i>Propionibacterium acnes</i> 17	1,5	2,90	0,88
<i>Propionibacterium acnes</i> 17	3,0	2,93	0,88
URVAKOL	1,5	2,35	0,32
URVAKOL	3,0	2,47	0,33
PBS (kontrolní skupina) PBS (control group)		1,82	0,13

$p \leq 0,05$

Diskuse

Vnímavost jedince k infekci močových cest je výsledkem interakce několika faktorů — virulence určitých druhů a variant bakterií (např. *Escherichia coli* s P fimbriemi), stavu obranyschopnosti makroorganismu a charakteru prostředí, v němž dochází ke kontaktu jedince a bakterie (moč se všemi jejími antibakteriálními složkami — pH, lysozym, slgA, Tamm-Horsfallův glykoprotein) (Sabra, 1995; Svanborg-Edén a spol., 1982).

Závažnost infekce je tedy ve velké míře určována druhem a virulencí původce. Druhové zastoupení bakteriálních kmenů v naší vakcíně vychází proto ze znalosti nejčastějších původců infekcí močových orgánů v olomoucké nemocnici i jiných českých regionech (Lochmann a spol., 1993) a je srovnatelné se složením injekční vakcíny SolcoUrovac švýcarské proveniencí (Prát a spol., 1989). Za zcela nový a odlišující prvek v našem preparátu považujeme přítomnost kmene *Propionibacterium acnes*, jehož imunomodulační aktivita ve smyslu nespecifické imunitní odpovědi byla opakovaně popsána v odborné literatuře (Berd, 1978; Beuth a spol., 1990; Duncan a spol., 1992; Lipton a spol., 1991; Marel a spol., 1989; Mikulenkova a spol., 1986; Pulverer, 1982; Raica a spol., 1989; Ros-

zkowski a spol., 1990; Werner, 1987) a je ověřena i našim pracovištěm jak na živém modelu v laboratorních podmínkách (Kala a spol., 1993; Koukalová a spol., 1992), tak v klinické praxi (Bystroň a spol., 1992; Kolek a spol., 1992; Koukalová a spol., 1995).

Vakcinační preparát byl testován imunologickým pracovištěm v Těchoníně (Vojenská lékařská akademie J.E. Purkyně, Hradec Králové). Sledování jeho vlivu na humorální i buněčnou imunitu po perorálním i intraperitoneálním podání, prokázalo vysokou imunostimulační aktivitu přípravku a je předmětem dalšího sdělení. Předběžná klinická studie na malém souboru nemocných s chronickými uroinfekcemi potvrdila, že léčba vakcínou URVA-KOL je účinná (Koukalová, 1996).

Závěr

Z klinického materiálu bylo izolováno a identifikováno 320 kmenů druhů *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* a *Propionibacterium acnes*. Imunostimulační aktivita usmrcených kmenů byla testována na živém modelu myši po intraperitoneální aplikaci metodou hodnocení hmotnostních přírůstků jater a slezin a jejich histologickým vyšetřením.

Do finální formy vakcíny URVA-KOL byly vybrány kmeny, které způsobily největší zvětšení obou orgánů potvrzené histologickým nálezem. Preparát obsahuje kmeny *Escherichia coli* 12, *Klebsiella pneumoniae* 16, *Proteus mirabilis* 51, *Pseudomonas aeruginosa* 70, *Enterococcus faecalis* 78 a *Propionibacterium acnes* 17. Rovněž kompletní vakcína má při intraperitoneálním podání myším výrazný imunostimulační účinek.*

Literatura

Berd D.: Effects of *Corynebacterium parvum* on immunity. *Pharmac. Ther. A*, 2, 1978, s. 373—395.

Beuth J., Ko H.L., Peters K.M., Bornhofen B., Pulverer G.: Behaviour of lymphocyte subsets in response to immunotherapy with *Propionibacterium avidum* KP-40 in cancer patients. *Int. J. Med. Microbiol.*, 273, 1990, s. 386—390.

Bystroň J., Boháč S., Braunová J., Koukalová D.: Naše zkušenosti s léčbou recidivujících herpetických infekcí kombinovanou nespecifickou imunostimulací. *Čas. Lék. Čes.*, 131, 1992, s. 137—141.

Čs. lékopis, IV. vyd., sv. 1, 1987.

Duben J., Hausner O. a kol.: Vyšetření při bakteriálních onemocněních. *Mikrobiologické vyšetřovací metody* 4. Praha, Avicenum 1986.

Duncan J., Adler J.R., Martin D., Conley F.K.: IntraleSIONAL immunotherapy with *C. parvum* and rIL-2: A phase I study. *J. Neurosurg.*, 76, 1992, s. 381A.

Kala M., Bystroň J., Kolařík J., Kolář Z., Koukalová D., Houdek M.: Application of *Corynebacterium parvum* lysate into the brain of rats — morphological study. *Acta Univ. Palacki. Olomuc., Fac. Med.*, 136, 1993, s. 41—43.

Kolek V., Koukalová D., Bystroň J., Minařík J., Kolář M.: Zhodnocení intrapleurálního podávání vakcíny *Propionibacterium acnes* u maligních výpotků. *Klinická a imunologická studie. Stud. Pneumol. Phtiseol. Cechoslov.*, 52, 1992, s. 179—183.

Koukalová D., Koďoušek R., Hájek V., Kolář M.: Experimental non-specific immunostimulation by the *Propionibacterium acnes* vaccine. *Acta Univ. Palacki. Olomuc., Fac. Med.*, 133, 1992, s. 19—23.

Koukalová D., Viktorinová M.: Perorální vakcinoterapie v dermatologii. *Epidemiol. Microbiol. Immunol.*, 44, 1995, s. 36—43.

Koukalová D.: Vývoj vakcíny pro léčbu zánětlivých onemocnění močových cest. *Kandidátská disertační práce. Olomouc, LF UP* 1996.

Lipton A., Harvey H.A., Balch C.M., Antle C.E., Heckard R., Bartolucci A.A.: *Corynebacterium parvum* versus bacille Calmette-Guerin adjuvant immunotherapy of stage II malignant melanoma. *J. Clin. Oncol.*, 9, 1991, s. 1151—1156.

Lochmann O., Lochmannová J., Klimešová M., Nyč O.: Současná aktivita chemoterapeutik in vitro u nejčastějších bakteriálních agens vyvolávajících močové infekce. *Čs. Epidem.*, 42, 1993, s. 155—160.

Marel M., Melínová L., Bednář M.: Porovnání efektu a vedlejších účinků československé vakcíny připravené z *Corynebacterium parvum* s anglickým preparátem Coparvax firmy Wellcome při léčení maligních pleurálních výpotků. *Čas. Lék. Čes.*, 128, 1989, s. 1071—1074.

Maršálek E., Černá I., Malota H., Horák V., Kadlčíková H., Baťová D., Horáčková P.: Příprava mikrobiálního alergického komplexu k diagnostice a léčbě infekčně alergických onemocnění. *Čs. Epidem.*, 20, 1971, s. 175—183.

Mikulenka V., Lochmann O., Zeman V., Peřík F.: Paliativní léčba pleurálních nádorových výpotků vakcínou *Corynebacterium parvum* podanou intrapleurálně. *Stud. Pneumol. Phtiseol. Cechoslov.*, 46, 1986, s. 684—689.

Mošnová H., Čejková J., Barnová M., Osten J., Horáčková M., Vrzáňová M.: Pokus o léčbu chronické intersticiální nefritidy autovakcínami. *Čs. Epidem.*, 34, 1985, s. 23—31.

Neubauer M.: Metody kultivace a diagnostiky anaerobních bakterií. *Mikrobiologické vyšetřovací metody* 7. Praha, Avicenum 1988.

Prát V., Matoušovic K., Horčíčková M., Hatala M., Milotová Z.: Profylaxe recidivujících močových infekcí polymikrobiální vakcínou SolcoUrovac. *Čas. Lék. Čes.*, 128, 1989, s. 1106—1109.

Pulverer G.: Immunomodulation mit Hilfe von *Propionibacterien*. *Dtsch. Med. Wschr.* 107, 1982, s. 1491—1492.

Raica M., Ioart I., Gurtavenco A.: Microscopic changes of the urinary bladder in patients with primary tumors locally treated with *Corynebacterium*. *Morphol. Embryol.*, 35, 1989, s. 275—277.

Rojíčková R., Pakrová E.: Využití soupravy NEFERMtest pro identifikaci gramnegativních nefermentujících tyček vyskytujících se v klinickém materiálu. *Epidemiol. Mikrobiol. Immunol.*, 43, 1994, s. 107—110.

Roszkowski W., Roszkowski K., Ko H.L., Beuth J., Jeljaszewicz J.: Immunomodulation by *propionibacteria*. *Int. J. Med. Microbiol.*, 274, 1990, s. 289—298.

Sabra R.: Vezikoureterální reflux, refluxová nefropatie a močové infekce. Praha, Maxdorf-Jessenius 1995.

Svanborg-Edén C., Fasth A., Hagberg L., Hanson L.A., Korhonen T., Leffler H.: Host interaction with *Escherichia coli* in the urinary tract. S. 113—131. In: Robbins J.B., Hill J.C., Sadoff J.C. (Eds.): *Bacterial vaccines*. New York, Thieme-Stratton Inc. 1982.

Werner G.H.: Immunostimulants: The western scene. S. 3. In: Azuma I., Jollés G. (Eds.): *Immunostimulants now and tomorrow*. Japan Scient. Soc. Press, 1987.

Závadová M.: Anaerobní bakterie a anaerobní infekce. Praha, Avicenum 1986.

* Tato dílčí studie byla finančně podporována grantem IGA MZ ČR č. 0716-3.