



Zdravotně  
sociální fakulta  
Faculty of Health  
and Social Sciences

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice

**Sérologické přehledy - historie, současnost,  
budoucnost**

## **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Studijní program:

**SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ**

**Autor:** Denisa Šojslová

**Vedoucí práce:** doc. MUDr. Lidmila Hamplová, Ph.D.

České Budějovice 2020

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „Sérologické přehledy - minulost, současnost, budoucnost“ jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

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

V Českých Budějovicích dne 2. 6. 2020

.....

## **Poděkování**

Děkuji paní doc. MUDr. Lidmile Hamplové, Ph.D. za vedení mé bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat laborantkám z laboratoře Stafila k. s. za ochotu při praktické části. A nakonec děkuji své rodině, která mě po celou dobu mého studia podporovala.

## **Sérologické přehledy – historie, současnost, budoucnost**

### **Abstrakt**

V teoretické části jsem se zabývala významem sérologických přehledů, jejich historií, současným posledním přehledem z roku 2013 a budoucností přehledů. Poté jsem popsala výhody očkování a jeho druhy, typy. A v neposlední řadě jsem se věnovala klíšťové encefalitidě. Dále se věnuji historii tohoto onemocnění, jeho výskytu a šíření, klinickému průběhu a diagnostice onemocnění.

Cílem mé bakalářské práce je prokázat protilátky proti klíšťové encefalitidě, jak u lidí kteří byli očkováni, tak i u těch, kteří nemoc prodělali. Praktická část se věnuje vyšetření protilátek proti viru klíšťové encefalidity metodou ELISA. Laboratorní výsledky byly statisticky zpracovány do grafů. Vzorky krve byly testovány od dubna do října 2019. Z těch vyšlo, že testovaných bylo více žen než mužů ve věkové skupině 30-39. Výsledky mé práce také potvrdily obecně známou skutečnost, že klíšťová encefalitida je sezonního charakteru. Nejvíce vzorků se testuje v letních měsících, což souvisí se zvýšenou aktivitou klíšťat v tomto období. Byly položeny dvě hypotézy. První se týkala vlivu věku na výši ochranných protilátek po prodělání klíšťové encefalidity. Druhá se týkala vlivu věku na výši ochranných protilátek po očkování.

**Klíčová slova:** sérologický přehled, očkování, klíšťová encefalitida, ELISA

## **Serological surveys – history, present, future**

### **Abstract**

In the theoretical part, I dealt with the meaning of serological surveys, their history, the last survey from the year 2013, and the future of surveys. Then I described the advantages of vaccination and different vaccination types. Last but not least, I talked about tick-borne encephalitis. After that, I am dealing with the history of this illness, its occurrence and spreading, the clinical process, and diagnosis of the illness.

The purpose of my bachelor thesis is to prove antidotes against the tick-borne encephalitis, as with people that were vaccinated, as well as with those that had already suffered this illness. The practical part turns to the diagnosis of antidotes against tick-borne encephalitis virus, using the ELISA method. Laboratory results were statistically processed into graphs. Blood samples were being tested from April to October 2019. From these samples, we learned that more women were tested than men in the age group of 30 to 39. Results of my work confirm the general fact that the tick-borne encephalitis is a seasonal illness. Most samples are being tested during summer months, which is related to a higher activity of ticks during this season. Two hypotheses were suggested. The first hypothesis related to the impact of age on the amount of antidotes after having suffered tick-borne encephalitis. The second hypothesis related to the impact of age on the amount of antidotes after vaccination.

**Key words:** serological overview, vaccination, tick-borne encephalitis, ELISA

# Obsah

1	Teoretická část .....	9
1.1	Definice sérologických přehledů .....	9
1.2	Význam sérologický přehledů .....	9
1.3	Prevalence .....	10
1.3.1	Séroprevalence .....	10
1.4	Promořenost a kolektivní imunita .....	10
1.5	Epidemiologická surveillance .....	11
1.6	Očkování .....	12
1.6.1	Typy očkovacích látek .....	13
1.6.2	Druhy očkovacích vakcín .....	13
1.6.3	Způsoby aplikace vakcín .....	14
1.6.4	Očkovací kalendář .....	14
1.7	Sérologie .....	15
1.8	Historie sérologických přehledů .....	16
1.8.1	Použité laboratorní metody .....	17
1.8.2	Vyšetřovaná onemocnění .....	18
1.8.3	Vyšetřovaná séra .....	18
1.8.4	Přehled všech testovaných agens .....	19
1.9	Současnost sérologických přehledů .....	20
1.9.1	Spalničky .....	20
1.9.2	Příušnice .....	21
1.9.3	Hepatitida B .....	21
1.9.4	Černý kašel .....	21
1.10	Budoucnost sérologických přehledů .....	22
1.11	Klíšťová encefalitida .....	22
1.11.1	Charakteristika nemoci .....	22
1.11.2	Přenos .....	23

1.11.3	Historie.....	23
1.11.4	Patogeneze .....	24
1.11.5	Infekce u seniorů.....	25
1.11.6	Diagnostika klíšťové encefalitidy .....	25
1.11.7	Epidemiologie.....	27
1.11.8	Prevence.....	28
2	Cíl práce.....	31
3	Praktická část.....	32
3.1	Metodika.....	32
3.1.1	ELISA .....	32
3.2	Dynex Agility® .....	32
3.2.1	Reagencie a příprava vzorků.....	34
3.3	Stanovení protilátek v třídě IgG .....	34
3.4	Stanovení protilátek v třídě IgM.....	36
3.5	Hodnocení.....	37
4	Výsledky .....	38
5	Diskuze .....	45
6	Závěr.....	47
7	Seznam použitých zdrojů.....	48

## Úvod

Problematika očkování je v současnosti aktuální. Výskyt mnoha infekčních onemocnění v České republice se díky vysoké proočkovanosť udržuje dlouhodobě na minimálních hodnotách nebo došlo k jejich úplné eliminaci. Přesto se v společnosti objevují pochybnosti o prospěšnosti a důležitosti očkování.

V mediích je často zveličována závažnost nežádoucích účinků po aplikaci očkovacích látek, a tak vznikají obavy z očkování a nebezpečnost nemoci samotné je opomíjena. Pak ještě existuje několik mýtů a mylných názorů od odpůrců očkování, které lidé přejímají a na jejich základě se stavějí proti očkování. Navíc na každou z těchto pochybností existuje vědecké vysvětlení. Lidé také ignorují hrozbu, kterou přerušení kontinuity očkování znamená. Snížení výskytu některých infekčních nemocí na minimum je zásluhou vysoké proočkovanosť populace. V důsledku zvyšující se migrace obyvatelstva jsou občané ČR vystaveni zvýšenému nebezpečí infekcí a při přerušení očkování může následovat opětovný vzestup preventabilních onemocnění.

Sérologické přehledy poskytují informace o hladině protilátek a kolektivní imunitě dané populace proti vybraným infekcím. Na území ČR probíhají již od 60. let 20. století a jejich výsledky vedly několikrát k úpravám očkovacích schémat.

Sérologické přehledy slouží ke sledování hladiny protilátek proti vybraným infekcím a tím poskytují informace o imunitním stavu obyvatelstva a ověřují účinnost prováděného očkování, tvorbu a přetrvávání protilátek po jednotlivých dávkách očkovacích látek a vhodnost doporučených očkovacích schémat. Poslední sérologický přehled byl realizován v roce 2013 se zaměřením na protilátky proti spalničkám, příušnicím, pertusi a virové hepatitidě B (Tomášková et.al., 2016).



# 1 Teoretická část

## 1.1 Definice sérologických přehledů

V dostupné literatuře se uvádí: „*Prevalenční epidemiologická studie, v níž se v daném souboru sledují a hodnotí výsledky sérologických vyšetření*“ (Šejda et al., 2005, s.88).

## 1.2 Význam sérologický přehledů

V českém národním zdravotnictví mají sérologické přehledy dlouhodobou tradici a velký význam. Na realizaci každého ročníku se podílí tisíce dobrovolníků a jejich výsledky do jisté míry ovlivňují zdravotní stav populace (Ovesná, 2014).

Obecný cíl pro SP je vždy stejný, ale specifické zaměření vychází z aktuální situace a potřeb v oblasti ochrany veřejného zdraví. Aby bylo možné výsledky zobecnit, musí být splněna podmínka reprezentativnosti vzorku, a to v zastoupení věku, pohlaví, území a cíli sérologického přehledu. Při návrhu SP musí být zohledněna také situace ve společnosti, a to z pohledu ochoty jednotlivců spolupracovat na takovéto studii a záleží i na dostupnosti potřebných údajů o očkování. Pro srovnání výsledků jak na národní úrovni, tak na mezinárodní, je důležité použití doporučených vyšetřovacích metod dle ESEN 2 (Tomášková et.al., 2016).

V počátcích SP hlavně sloužily jako cenné informace o promoření a kolektivní imunitě vůči různým nákazám a eventuálních změnách v průběhu času. Slouží k vyslovení epidemiologických prognóz a hypotéz (Göpfertová et al., 2006).

S objevy a postupným zaváděním očkování proti určeným infekcím se změnil smysl provádění SP, začaly být srovnávány hodnoty protilátek očkovaných osob s hodnotami neočkovaných. Byl sledován vývoj séropozitivních titrů protilátek v průběhu let v závislosti na uplynulé době od provedení očkování a tím posuzováno přetrvávání imunity a účinnost očkování, a také změny titrů v souvislosti se zaváděním nových vakcín (Tomášková et.al., 2016).

Dnes výsledky SP ověřují účinnost očkování, tvorbu a přetrvávání protilátek po očkování a kvalitu očkovacích látek a vhodnost doporučených očkovacích schémat. SP

je také ukazatelem kolektivní imunity populace a výskytu onemocnění a tím pádem i nedílnou součástí epidemiologické surveillace infekčních onemocnění (Zprávy Centra epidemiologie a mikrobiologie, 2014).

### **1.3 Prevalence**

Prevalence je ukazatel nemocnosti. Jedná se o poměr počtu všech existujících případů onemocnění k počtu obyvatel v dané lokalitě (Tuček et al., 2016).

#### *1.3.1 Séroprevalence*

Vyjadřuje prevalenci onemocnění, založenou na sérologickém vyšetření stavu imunity. Jedná se o počet osob v populaci, které vykazují pozitivní výsledek sérologického testu na protilátky proti určitému původci nemoci. Cílem těchto testů je mít reprezentativní vzorek a dostatečně silnou studii, abychom její hodnotu mohli vztáhnout na celou populaci. Prokázání pozitivního výskytu onemocnění je založeno na průkazu přítomnosti specifických protilátek v séru proti konkrétnímu původci onemocnění (Šošovičková, 2018).

Séroprevalenční vyšetřování specifických protilátek pomáhá určit promořenost populace. Nemoci, proti kterým se očkuje, pomáhá séroprevalence stanovit míru protekce proti konkrétnímu onemocnění v populaci, tedy kolektivní imunitě. Výhodou testování je, že pomáhá odhalit i inaparentní či atypické průběhy onemocnění, které zůstaly v minulosti nediodagnostikované. Zároveň, pokud se sleduje onemocnění, proti kterému se očkuje, vyjádří séroprevalenční studie přesnější odhad kolektivní imunity v populaci než jen hodnota proočkovanost (Šošovičková, 2018).

### **1.4 Promořenost a kolektivní imunita**

Promořenost je poměr mezi počtem osob, které získaly specifickou imunitu po prodělání dané infekce, a celkovým počtem osob v populaci. (Beneš, 2009) V průběhu času a v závislosti na různorodých faktorech přírodní i společenské povahy se dynamika promořování může změnit (Göpfertová et al., 2005).

Kolektivní imunita je stav aktivní imunity v populaci získané aktivně po očkování nebo po onemocnění, kdy si organismus sám protilátky vytváří, nebo pasivně přenosem mateřských protilátek či podáním séra nebo imunoglobulinů, kdy se do těla dostávají již hotové protilátky, jejichž životnost je však krátkodobá. Pro některá infekční onemocnění jsou stanoveny hladiny proočkovanosti, které jsou považovány za dostatečné, aby nedocházelo k šíření nákaz v populaci. Kolektivní imunita může být negativně ovlivněna heterogenním osídlením území, migrací, manipulací s vakcínou (Státní zdravotní ústav, 2019).

Vyjadřuje se jako procento imunních jedinců v dané populaci (Göpfertová et al., 2005). Po dosažení určité hladiny imunity je možno pozorovat pouze sporadický výskyt nemoci (Podstatová, 2001).

Odhady účinné hladiny kolektivní imunity se u různých agens pohubují mezi 80-95%. U některých vysoce nakažlivých virových infekcí by měla přesahovat 95 % (Göpfertová et al., 2005).

Úroveň kolektivní imunity zjišťujeme ze SP jako procento osob vykazujících protilátkovou ochranu vůči určitému infekčnímu onemocnění (průkaz protekční hladiny titru protilátek) (Ovesná, 2014).

### *1.5 Epidemiologická surveillance*

Pro výraz „surveillance“ neexistuje český překlad, ani jeden z dříve doporučených českých termínů, jako „bdělost“ nebo „dohled“, nevystihuje dobře podstatu pojmu, a proto se stále používá v originálu (Hamplová, 2019).

Surveillance je souhrnné a soustavné získávání všech dostupných informací o výskytu určité nemoci či poruchy zdraví a zároveň všech podmínek a faktorů zevního prostředí, které rozvoj i výskyt onemocnění ovlivňují, čili sledování všeho, co s nemocí souvisí (Göpfertová et al., 2002).

Účelem surveillance je vyhodnocení všech zjištěných informací a odvodit a zavést taková opatření, která by vedla k likvidaci, potlačení nebo alespoň k pozitivnímu ovlivnění dané nemoci v populaci, například ke snížení výskytu nemoci nebo úmrtnosti. Zásadou je zabývat se takovými nemocemi a poruchami zdraví, vůči nimž se může vést efektivní prevence. V případě infekčních nemocí je cílem snížení výskytu nemocí na zanedbatelné hodnoty a konstantní udržení příznivé epidemiologické situace,

optimálně pak eliminace infekčního onemocnění nebo dokonce eradikace infekčního agens (Hamplová, 2019).

V ČR je vyhláškou č. 473/2008 Sb., o systému epidemiologické bdělosti pro vybrané infekce a její novelou č. 275/2010 Sb. dán výčet infekcí, pro které je zavedena surveillance, a stanoven rozsah shromažďovaných údajů o infekcích, způsob a lhůty jejich hlášení, laboratorní diagnostika, pravidla epidemiologického šetření a stanovení druhu a způsobu provedení protiepidemických opatření. Součástí je vždy základní charakteristika, klinická definice a klasifikace jednotlivých infekčních onemocnění (Hamplová, 2019).

Nejčastěji využívanými zdroji informací o nemocích a poruchách zdraví je sběr demografických údajů a dat o podmínkách zevního prostředí, hlášení nemocnosti a úmrtnosti, výsledky epidemiologických šetření, klinických poznatků, laboratorních vyšetřování i sérologických přehledů (Göpfertová et al., 2006).

## *1.6 Očkování*

Očkování chrání před nakažlivými nemocemi s komplikovaným průběhem. Zavedením pravidelného celoplošného očkování dramaticky poklesl počet případů onemocnění, proti kterým se očkuje. Očkování je velmi úspěšnou ochranou dětí i dospělých nejen před nemocí samotnou, ale i následky, které by mohla způsobit (Gregora, 2007).

Očkování, nebo-li vakcinace, je proces aktivní umělé imunizace, kdy je aplikována vakcína (očkovací látka) do organismu s cílem zvýšení odolnosti nebo vyvolání obranyschopnosti organismu (vznik protilátek) vůči specifickému původci infekčního onemocnění. Po aplikaci vakcíny není u člověka způsobena nemoc, je ale navozena imunitní odezva, dochází k aktivní imunizaci a k tvorbě specifické imunitní odpovědi. Vakcína může obsahovat oslabené nebo usmrcené mikroorganismy nebo jejich části zodpovědné za vyvolání imunitní reakce, ale není vždy nutné očkovat celými mikroby. Stačí, aby vakcína obsahovala antigeny, vyvolávající imunitní odezvu a tím protekci (Votava, 2005; Hatala, 2018).

### 1.6.1 Typy očkovacích látek

Podle způsobu získání antigenních komponent rozlišujeme několik základních druhů očkovacích látek. **Živé oslabené vakcíny**, základem vakcíny jsou infekční původci s oslabenou virulencí, kteří jsou ovlivněni opakovaným pasážírováním bakterií nebo virů na kultivačních médiích tak, aby kmeny ztratily svoji patogenitu a zůstaly jim antigenní vlastnosti (např. proti spalničkám, zarděnkám, příušnicím, planým neštovicím, žluté zimnici, přenosné dětské obrně, tuberkulóze). **Usmrcené vakcíny (bakteriny)** jsou suspenzí chemicky nebo fyzikálně usmrcených bakterií nebo virů. (např. proti virové hepatitidě A, středoevropské klíšťové meningoencefalitidě). **Toxoidy** (anatoxiny) jsou vakcíny připravené z bakteriálních exotoxinů, jejichž toxicita byla snížena formalínem nebo zahřátím, ale musí být udržena jejich imunizační schopnost (např. proti tetanu, záškrtu) (Hamplová, 2019). **Subjednotkové vakcíny** neobsahují celý mikroorganismus, ale jen tu jeho část, která je zodpovědná za reakci systému obranyschopnosti organismu (např. proti chřipce). **Polysacharidové vakcíny** (chemovakcíny) jsou vyrobeny purifikací antigenních komponent (polysacharidová pouzdra) některých mikroorganismů (např. proti pneumokokům, meningokokům, břišnímu tyfu). **Rekombinantní vakcíny** jsou tvořeny pomocí metod molekulární biologie, kdy klon kvasinek nebo bakterií vytvoří po vnesení genu velké množství antigenu (např. proti virové hepatitidě B či lidskému papilomaviru) (Tuček et al., 2016).

### 1.6.2 Druhy očkovacích vakcín

Druh očkovací látky označuje kvalitu i kvantitu antigenu. Rozlišujeme monovalentní, které jsou namířené proti jednomu původci (např. proti virové hepatitidě) nebo polyvalentní, kdy podle počtu antigenů mohou být účinné proti několika subtypům infekčního původce (např. proti pneumokokům, přenosné dětské obrně). Kombinované vakcíny obsahují dva a více antigenů proti několika původcům onemocnění. Například bivakcína je proti virové hepatitidě A a B, trivakcína ochraňuje proti spalničkám, zarděnkám a příušnicím, hexavakcína vytváří ochranu proti záškrtu, tetanu, černému kašli, přenosné dětské obrně, virové hepatitidě b a onemocněním vyvolaným *Haemophilus influenzae* typu b (Beran et al., 2008).

### 1.6.3 Způsoby aplikace vakcín

Intramuskulární vakcíny jsou u dětí do dvou let aplikovány na anterolaterální stranu stehna, u starších dětí do deltového nebo gluteálního svalu. V současnosti se takto aplikuje většina vakcín. Subkutánní se provádí vpichem pod kůži ramene nebo stehna. Subkutánně se podává vakcína například proti spalničkám, příušnicím nebo chřipce. Intradermálně je aplikace vakcíny do levého ramene, v současnosti se takto očkuje pouze proti tuberkulóze. Perorální aplikace se používá k podání živé vakcíny proti choleře, břišnímu tyfu a poliomyelitidě (Hamplová, 2019).

### 1.6.4 Očkovací kalendář

Organizace očkovacích programů koordinuje Národní imunizační komise při MZ ČR. Pravidla očkování jsou v České republice stanovena zákonem a jeho vyhláškami. V současné době se vychází ze zákona 258/2000 Sb., o ochraně veřejného zdraví ve znění pozdějších předpisů a vyhlášky č. 40/2016, kterou se mění vyhláška č. 537/2006 Sb., o očkování proti infekčním nemocem, ve znění pozdějších předpisů (Hamplová, 2019). Podle platných předpisů rozlišujeme druhy očkování na pravidelné očkování, zvláštní očkování, mimořádné očkování a očkování při úrazech, poraněních a nehojících se ranách, které hradí a zajišťuje stát a pojišťovny. V prevenci dalších infekcí je možnost individuálního očkování na žádost jako je např. očkování proti klíšťové encefalitidě, včetně očkování osob před cestami do zahraničí (Podstatová, 2001). Programy pravidelného plošného očkování dětí, dlouhodobě uplatňované v České republice, jsou na mezinárodní úrovni, která odpovídá doporučení Světové zdravotnické organizace (Hamplová, 2019).

Na vytvoření současné podoby očkovacího programu se mnohokrát v historii podílely SP, které je potřeba i nadále využívat k hodnocení fungování takto nastaveného systému (Ovesná, 2014).

Termín – věk dítěte	Povinné očkování		Nepovinné očkování	
	NEMOC	VAKCÍNA	NEMOC	VAKCÍNA
Od 4. dne do 6. týdne	Tuberkulóza (pouze u dětí v riziku s indikací)	BCG vaccine		
Od 6. týdne			Rotavirové nákazy	ROTARIX ROTATEQ (1. dávka)
Od 9. týdne (začátek 3. měsíce)	Záškrt, tetanus, černý kašel, dětská obrna, hepatitida typu B, onemocnění vyvolaná <i>Haemophilus influenzae</i> typu B	HEXACIMA, INFANRIX HEXA (1. dávka)	Pneumokoková onemocnění	SYNFLORIX PREVENAR 13 (1. dávka)
			Rotavirové nákazy	ROTARIX ROTATEQ 2. dávka za měsíc po 1. dávce)
Začátek 5. měsíce	Záškrt, tetanus, černý kašel, dětská obrna, hepatitida typu B, onemocnění vyvolaná <i>Haemophilus influenzae</i> typu B	HEXACIMA, INFANRIX HEXA	Pneumokoková onemocnění	SYNFLORIX
		2. dávka za 2 měsíce po 1. dávce		PREVENAR 13 (2. dávka za 2 měsíce po 1. dávce)
			Rotavirové nákazy	ROTATEQ (3. dávka za měsíc po 2. dávce)

Obrázek 1 Platný očkovací kalendář k 1.9.2019 (Zdroj: Hamplová, 2019)

Termín – věk dítěte	Povinné očkování		Nepovinné očkování	
	NEMOC	VAKCÍNA	NEMOC	VAKCÍNA
11.–13. měsíc	Záškrt, tetanus, černý kašel, dětská obrna, hepatitida typu B, onemocnění vyvolaná <i>Haemophilus influenzae</i> typu B	HEXACIMA, INFANRIX HEXA (3. dávka)	Pneumokoková onemocnění	SYNFLORIX PREVENAR 13 (přeočkování)
13.–18. měsíc	Spalničky, zarděnky, příušnice	PRIORIX (1. dávka)	Plané neštovice, zarděnky, spalničky, příušnice	PRIORIX –Tetra (1. dávka)
5.–6. rok	Spalničky, zarděnky, příušnice	PRIORIX (2. dávka)	Plané neštovice, zarděnky, spalničky, příušnice	PRIORIX –Tetra (2. dávka)
5.–6. rok	Záškrt, tetanus, černý kašel,	INFANRIX ADACEL (přeočkování)		
10.–11. rok	Záškrt, tetanus, černý kašel, dětská obrna	BOOSTRIX POLIO (přeočkování)		
13.–14. rok			Onemocnění lidským papilomavirem	

Obrázek 2 Platný očkovací kalendář k 1.9.2019 (Zdroj: Hamplová, 2019)

### 1.7 Sérologie

Sérologie je nauka o protilátkách v krevním séru, které ovlivňují důležité životní funkce (Göpfertová et al., 2002).

Sérologické vyšetření je založeno na zjištění reakce mezi antigenem a protilátkou laboratorním testem in vitro prostřednictvím pozorovatelné změny některé z vlastností

vzorku (Ovesná, 2014) V sérologické reakci jde o nepřímý důkaz infekčního agens ve vyšetřovaném materiálu pomocí známých protilátek nebo o zjištění protilátkové odpovědi organismu pomocí známého antigenu (Göpfertová et al., 2006).

Přítomnost protilátek proti určitému antigenu vypovídá o předchozím styku s infekčním činitelem, akutním i chronickým onemocněním či vzniku imunity – proběhl proces zvaný sérokonverze, tedy syntéza protilátek proti specifickému antigenu a zvrát séronegativity v séropozitivitu (Ovesná, 2014).

K prokázání protilátek jsou různé metody. Často se používají imunoglobuliny vytvořené zvířaty, které jsou namířené proti lidským imunoglobulinům. Oba druhy se spojí a vytvoří se komplexy, které lze pomocí barevných reakcí nebo jinými technikami prokázat. U většiny vyšetření je při pozitivním výsledku snaha získat informace o množství protilátek. Testuje se při nich pozitivní reakce v různých stupních zředění (titr). Množství prokázaných protilátek se označuje jako protilátkový titr (Burkhardtová, 2007).

### *1.8 Historie sérologických přehledů*

Sérologické přehledy se začaly realizovat v České republice od 60. let 20. století. Od roku 1960 se stav protilátek v populaci ověřoval až do roku 1988 každoročně. Poté se interval opakování SP prodloužil na 5 až 12 let a to v letech 1992, 1996, 2001 a poslední v roce 2013 (Tomášková et.al., 2016).

Během let docházelo nejen ke změnám ve frekvenci provádění sérologických přehledů, ale také byl změněn rozsah studií z hlediska počtu vyšetřených osob i počtu vyšetřovaných onemocnění. Během let docházelo k vývoji laboratorních metod, takže se měnily i techniky vyšetřování vzorků (Tomášková et.al., 2016).

Všechny informace a zprávy týkající se sérologických přehledů byly zveřejňovány v publikacích Státního zdravotního ústavu Acta hygienica, epidemiologica et microbiologica a Zprávy Centra epidemiologie a mikrobiologie. (Ovesná, 2014)



### 1.8.1 Použité laboratorní metody

V průběhu 20. století došlo k vývoji sérologických metod nebo k vylepšení metod původních, včetně postupných zavádění automatizovaných laboratorních analyzátorů. Sérologické metody byly postupně doplňovány nebo dokonce nahrazovány enzymovou immunoanalýzou, která se vyznačuje vysokou citlivostí a širokým záběrem použitelnosti. Sérologické přehledy v dřívějších dobách využívaly k vyšetření protilátek hemaglutinačně inhibiční testy a komplement fixační reakce. Zdaleka nejširší uplatnění vykazuje metoda ELISA (Tomášková et.al., 2016).

Použitá laboratorní metoda	Onemocnění a časové vymezení používání dané metody
ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)	spalničky (1996–2013), zarděnky (2001), příušnice (1984–2001), dáivý kašel (2013), infekce vyvolané RSV (1996), VHB (1996–2013), tetanus (1987–2001), VHA (1996–2001), VHC (2001), larvální toxokaróza (1982–1986), onemocnění způsobená HiB (2001), infekce vyvolané hantaviry (1996), chlamydiové infekce (1996), lymeská borelióza (1996), infekce vyvolané arboviry (1987)
Hemaglutinačně inhibiční test	spalničky (1972–1988), zarděnky (1971–1996), chřipka (1971–2001), příušnice (1971–1987), tetanus (1981–1986), infekce vyvolané viry parainfluenzy (1971–1983)
Komplement fixační reakce	onemocnění způsobená <i>Mycoplasma pneumoniae</i> (1976–1996), infekce vyvolané RSV (1976–1988), onemocnění způsobená adenoviry (1976–1987), toxoplazmóza (1977–1986), infekce vyvolané CMV (1976–1981), rotavirové infekce (1986)
Virus neutralizační test	dětská přenosná obrna (1971–2001), příušnice (1983–1988)
Aglutinační test	dáivý kašel (1971–2001), leptospiróza (1985)
Test nepřímé aglutinace	plané neštovice (1976–1982)
Test nepřímé imunofluorescence	infekce vyvolané hantaviry (1987), infekce vyvolané arboviry (1987)
Imunodifuze	chřipka (1976–1985)
Imunoprecipitace	chřipka (1974–1975)
Metabolicko-inhibiční test	záškrť (1971–2001)
MEIA (Microparticle Enzyme Immunoassay)	VHA (2001), VHB (2001), VHC (2001)
CMIA (Chemiluminiscent Microparticle Immunoassay)	VHB (2013)
Baktericidní test	invazivní meningokoková onemocnění (1983–2001)

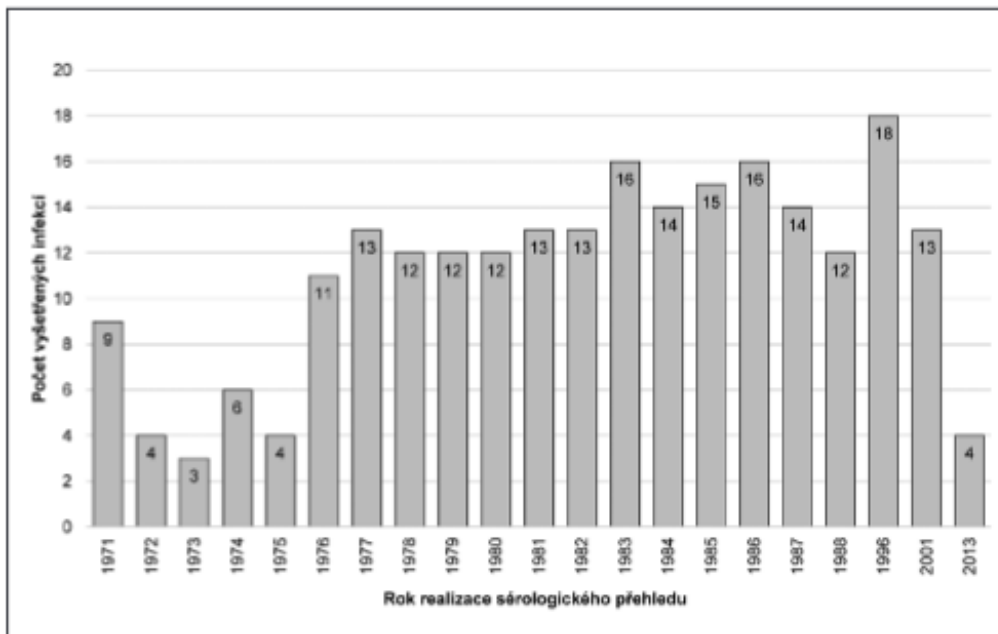
**Obrázek 3** Použité laboratorní metody v rámci sérologických přehledů (Zdroj: Tomášková et.al., 2016)

### 1.8.2 *Vyšetřovaná onemocnění*

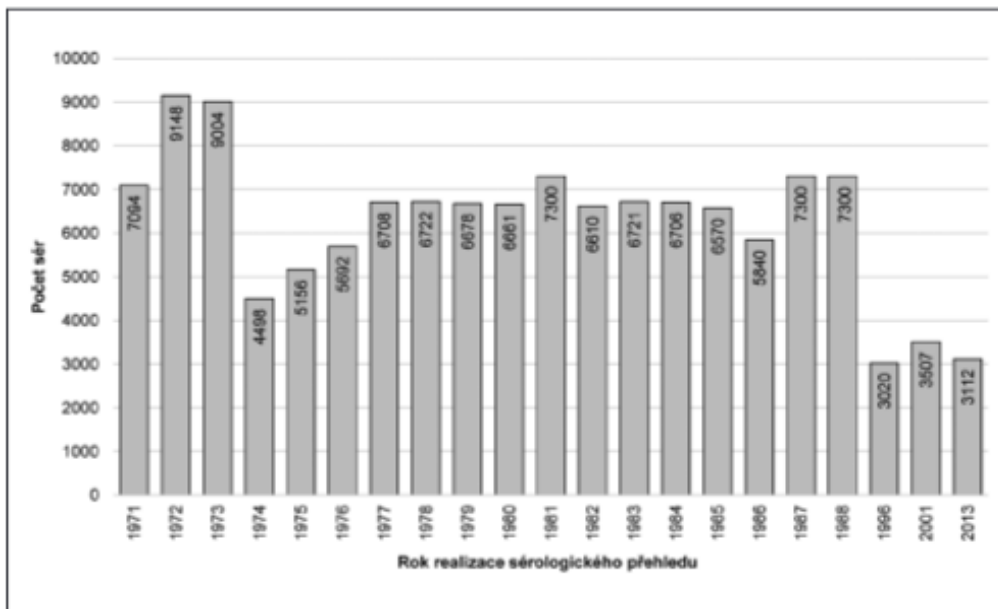
Spektrum testovaných onemocnění se vyvíjelo dle primárního účelu provádění sérologického přehledu. Dříve byly SP prováděny za účelem zjištění promořenosti a výskytu onemocnění v populaci. S postupným zaváděním očkování proti určitým infekcím se měnil i smysl provádění SP. Od roku 2001 jsou sérologické přehledy zaměřeny jen na vyšetření protilátek proti vybraným infekcím, proti kterým se očkuje. Počet onemocnění, na která byly SP zaměřeny, se v průběhu let lišil (Tomášková et al., 2016). Nejnižší počet vybraných onemocnění bylo v roce 1973 - jednalo se o spalničky, zarděnky a chřipku. (Acta hygienica, epidemiologica et microbiologica ,1973) Maximální počet bylo 18 vybraných onemocnění v roce 1996 (Tomášková et.al., 2016).

### 1.8.3 *Vyšetřovaná séra*

Počet vyšetřených sér v rámci SP se vždy pohyboval v řádech několika tisíců, napříč všemi věkovými skupinami. Cílem bylo získat reprezentativní vzorek populace s ohledem na věk, pohlaví a území. Minimální počet odebraných vzorků sér pro účely SP byl v roce 1996, kdy se vyšetřilo 3020 vzorků. Maximální počet byl až trojnásobný, a to konkrétně 9148 odebraných vzorků sér v roce 1972. Až do roku 1988 včetně byl rozsah studie z hlediska vyšetřovaných sér daleko vyšší než v novodobějších SP. Avšak výpovědní hodnota zůstává stále na podobné úrovni vzhledem k lepší laboratorní praxi a používání metod, které umožňují vyšetření jednoho odebraného vzorku séra na protilátky proti většímu počtu infekčních agens než tomu bylo dříve. Ve starších ročnících SP bylo analyzováno více onemocnění než v novodobějších SP, a proto bylo také požadováno větší množství vyšetřovaného materiálu. Na specifické protilátky proti jedné vybrané infekci bylo testováno maximálně 3942 sér v roce 1972 proti dětské přenosné obrně a minimálně 146 sér v roce 1982 proti planým neštovicím (Tomášková et.al., 2016).



Obrázek 4 Roky SP a počty vyšetřených infekcí (Zdroj: Tomášková et.al., 2016)



Obrázek 5 Rok SP a počet vyšetřených sér (Zdroj: Tomášková et.al., 2016)

#### 1.8.4 Přehled všech testovaných agens

Sledované infekce v jednotlivých sérologických přehledech v letech 1971–2013 byly dětská přenosná obrna, spalničky, zarděnky, chřipka, příušnice, infekce vyvolané *Mycoplasma pneumoniae*, infekce vyvolané respiračním syncytiálním virem, onemocnění způsobená adenoviry, dáivý kašel způsobený *Bordetella pertusis*, záškrt,

dávivý kašel způsobený *Bordetella parapertussis*, tetanus, invazivní meningokoková onemocnění, larvální toxokaróza, toxoplazmóza, infekce vyvolané cytomegalovirem, virová hepatitida B, virová hepatitida A infekce vyvolané viry parainfluenzy, virová hepatitida C, plané neštovice, invazivní onemocnění vyvolaná *Haemophilus influenzae* b, infekce vyvolané virem lidské imunitní nedostatečnosti, infekce vyvolané hantaviry, chlamydiové infekce, lymeská borelióza, leptospiróza, infekce vyvolané virem Epstein-Barrové, infekce vyvolané arboviry (klíšťová encefalitida), rotavirové infekce (Tomášková et.al., 2016).

### 1.9 Současnost sérologických přehledů

Zatím poslední SP byl realizován v roce 2013 Zdravotními ústavy v Ústí nad Labem a Ostravě. Celkem bylo vyšetřeno 3112 osob ve věku od 1 do 64 let. Děti od 1 roku a mladí dospělí do 24 let byli vyšetřeni v jednoletých věkových skupinách. Starší 25 let byli vyšetřeni v pětiletých věkových skupinách. Každá věková skupina měla být zastoupena 100 respondenty. Přehledu se zúčastnilo všech 14 krajů v České republice a z nich náhodně vybraných 30 okresů. Na doporučení Národní imunizační komise byly vyšetřeny protilátky proti příušnicím, spalničkám, virové hepatitidě B a dávivému kašli (Zprávy centra epidemiologie a mikrobiologie, 2014).

#### 1.9.1 Spalničky

Jedno z nejvíce nakažlivých onemocnění jsou právě spalničky, původcem je virus spalniček, který se přenáší kapénkami vzácně i nepřímo vzduchem. Infekce má vysokou manifestnost (Hamplová, 2019). V roce 2012 a 2013 sice nebyl zaznamenán zvýšený výskyt spalniček, ale potýkalo se s nimi mnoho evropských zemí. Výsledky ukázaly vysokou postvakační imunitu u osob do 29 let, nižší byla ve věkových skupinách 30-39 let, nejnižší séropozitivita byla ve věkové skupině 40-44 let. Vysoká séropozitivita osob byla nad 45 let věku a vyjadřuje postinfekční imunitu. Jsou to osoby, které byly očkovány v ČR jako první, a to v roce 1969 a často u nich nedošlo k dodatečnému podání druhé dávky. Se zavedením povinného očkování dvěma dávkami došlo ke snížení nemocnosti v ČR (LEXOVÁ et al., 2017).

### 1.9.2 Příušnice

Horečnaté onemocnění s bolestivým zduřením příušních žláz. Původce onemocnění je virus příušnic. Primárně se přenáší kapénkami, vzácně i vzduchem. Infekce velmi často probíhá bezpříznakově (Hamplová, 2019). U tohoto onemocnění byly vyšetřeny protilátky na příušnice, kvůli již 4. rokem probíhající epidemii v ČR. V roce 2012 bylo hlášeno 3 902 případů, v plně proočkované populaci. Z výsledků SP 2013 byla zjištěna velmi nízká séropozitivita, a to u osob očkovaných před více než 5 lety. Séropozitivita protilátek byla zjištěna pouze u 53,3 % populace. Nejvnímavější věkovou skupinou jsou osoby ve věku 15-24 let (Zprávy Centra epidemiologie a mikrobiologie, 2014).

### 1.9.3 Hepatitida B

Hepatitida B je onemocnění ze skupiny difuzních zanětlivě-nekrotizujících onemocnění jater. Původce onemocnění je virus hepatitidy B patřící mezi hepadnaviry (Hamplová, 2019). Výskyt hepatitidy B v populaci pozvolna klesal. Bylo tedy vhodné posoudit úspěšnost nastaveného očkovacího programu. Séropozitivita antiHBs protilátek v populaci v ČR podléhající pravidelnému očkování byla 84–93 %, u osob které nepodléhají plošnému očkování se prevalence pohybovala kolem 21 %. Výskyt onemocnění byl zaznamenán ve vyšších věkových skupinách v intervalu 25-64 let. Zavedení pravidelného očkování odpovídá pozitivnímu vývoji epidemiologické situace (Zprávy Centra epidemiologie a mikrobiologie, 2014).

### 1.9.4 Černý kašel

Černý kašel je akutní respirační onemocnění způsobené bakterií *Bordetella pertusis*. K přenosu dochází kapénkovou infekcí nebo vzdušnou cestou (Hamplová, 2019). Docházelo k úmrtím malých dětí do jednoho roku věku, proto bylo v roce 2009 zařazeno do očkovacího kalendáře dětí přeočkování proti pertusi. Proto pro další rozhodování bylo velmi cenné zjištění, jak dlouho protilátky po očkování a přeočkování přetrvávají. Séropozitivita slouží jako průkaz imunitní odpovědi na vakcinaci, ale nevypovídá o ochraně před infekcí a onemocněním. Jelikož byl v roce 2013 nárůst případů pertusis, byla právě tato infekce vybrána do SP. Sérologický přehled pertuse

prokazuje dobrou odpověď na podání hexavalentní vakcíny u malých dětí (Zprávy Centra epidemiologie a mikrobiologie, 2014).

### 1.10 Budoucnost sérologických přehledů

Poslední SP byl proveden v roce 2013. Na posledních zasedání NIKO nejsou v záznamech žádné informace o provedení dalšího sérologického přehledu, a proto se pravděpodobně v tak velkém rozsahu v nejbližších letech konat nebude. V budoucnu se mohou dělat prevalence na aktuálně obyvatelstvo ohrožující infekce, a jestli případné očkování napomáhá k vytvoření kolektivní imunity.

Právě v dubnu 2020 proběhla studie s názvem SARS-CoV-2-CZ-Preval na kolektivní imunitu proti infekci COVID-19, kvůli zjištění, jak velká část populace se již s virem setkala a zda si vybudovala imunitu. Testováno bylo zhruba 26 500 obyvatel ve všech věkových kategoriích. Studie zjistila, že imunizace české populace proti COVID-19 je velmi nízká, pohybuje se pouze v řádu jednotek promile. Dále prokázala malý zásah starších skupin obyvatelstva. Do budoucna dalších případných vln je potřeba na toto myslet a připravit programy na ochranu zranitelných skupin obyvatel. Například vytvořit vakcínu proti tomuto viru (HS HMP, 2020).

### 1.11 Klíšťová encefalitida

V sérologických přehledech se klíšťová encefalitida vyšetřovala pouze jednou, a to v roce 1987. Patřila mezi imunologický přehled nálezů vyvolaných arbovirem. Bylo vyšetřeno 599 vzorků.

#### 1.11.1 Charakteristika nemoci

Původcem onemocnění je RNA virus KE, který patří do skupiny arbovirů, čeledi *Flaviviridae*. Klíšťová encefalitida je infekční virové onemocnění centrálního nervového systému. Nejčastěji přenášené kousnutím infikovaných klíšťat *Ixodes ricinus*, které může způsobit zánět mozkových blan, zánět mozku a v některých případech i zánět míchy (Beauté et al., 2018).

### 1.11.2 Přenos

Přenáší se na člověka ze zvířat, nejčastěji infekčním klíštětem. Virus KE jsou klíšťata schopna přenášet ve všech vývojových cyklech (larvy, nymfy nebo dospělí). Aktivita a vývoj klíštěte jsou ovlivněny klimatickými faktory, jako je teplota, vlhkost půdy (Tick-borne encephalitis, 2015). V minulosti a dnes již vzácně mohlo docházet k přenosu alimentární cestou, především po konzumaci syrového mléka a nepasterizovaných mléčných výrobků od nakažených zvířat jako jsou kozy, krávy, ovce (Göpfertová et al., 2015).

### 1.11.3 Historie

První zmínky o onemocnění klíšťovou encefalitidou jsou popsány roku 1931, kdy rakouský lékař pozoroval a poprvé popsal pravidelně se opakující sezónní výskyt nemoci. Onemocnění popsal jako „Epidemische akute Meningitis serosa“. Samotný virus způsobující toto onemocnění byl odhalen až v roce 1937. Ruští vědci jej detekovali ve vzorcích lidských, myších a u klíšťat. V té době byla vypravena na ruský Dálný východ zdravotnická expedice, která měla zkoumat onemocnění jménem ruská jaro-letní encefalitida. Současně s nimi byla ve výzkumu výprava Vojenského ústavu experimentální medicíny SSSR. Výpravy se účastnili virologové, patolog, epidemioložka a entomologové. Virus klíšťové encefalitidy byl poprvé izolován za druhé světové války v letech 1942–1943 v evropské části Ruska, kde došlo k epidemii mezi vojáky. V té době byl poprvé odhalen přenos viru KE přes klíště obecné. Na území České republiky byly první informace o klíšťových neuroinfekcích zaznamenány v roce 1948 (Růžek, 2015). Zásahu na tomto mají dva virologové MUDr. František Gallia a MUDr. Josef Rampas (Beneš, 2009).

V roce 1948 byla v České republice na Vyškovsku první epidemie, kde bylo nakaženo 56 pacientů. U těchto nemocných docházelo i k závažnějšímu průběhu nemoci. V roce 1951 proběhla epidemie ve městě Rožňavě v tehdejší Československu. Náhle tehdy během několika dní onemocnělo více než 300 obyvatel. U těchto případů byl popsán přenos viru na člověka pitím nedokonale tepelně opracovaného mléka infikovaných zvířat. V následujících letech byl přenos viru alimentární cestou zaznamenán i v dalších evropských zemích například Maďarsku,

Rakousku, Německu, Finsku, Švédsku, ale i v Číně a Japonsku. V roce 1973 byla vynalezena účinná vakcína, která vedla ke snížení výskytu klíšťové encefalitidy (Růžek, 2015).

#### *1.11.4 Patogeneze*

Po kousnutí klíštěte se virus nejprve replikuje v kožních buňkách. Následně se množí v Langerhansových ostrůvkách, makrofágách a neutrofilech. Rozpoznání viru vrozeným imunitním systémem vede k migraci dendritických buněk na primární místo infekce. Tyto buňky jsou aktivovány a přivedou virus do lymfatických uzlin. Virus je transportován krví a lymfou do dalších orgánů a CNS, kde dochází k replikaci viru. Pokud virus pronikne do CNS, vyvolá meningoencefalitidu (Valarcher et al., 2015).

##### *1.11.4.1 Inkubační doba*

Inkubační doba je časový úsek od proniknutí infekce do organismu do prvních příznaků onemocnění. Může trvat 2 až 28 dnů, ale většinou se pohybuje okolo 7-14 dnů. Po přenosu z potravy je inkubační doba kratší, obvykle je 3 až 4 dny (Hamplová, 2019).

##### *1.11.4.2 Klinický obraz onemocnění*

Pro onemocnění KE je typický dvoufázový průběh. V první fázi příznaky připomínají chřipku, onemocnění je spojeno s obdobím primární virémie. Nemocným se objeví nespecifické příznaky jako jsou zvýšená teplota, bolest hlavy, svalová únava cítí se malátní (Schindler, 2014). Tyto příznaky mohou trvat přibližně týden. Po první fázi může následovat uzdravení, nebo následuje několikadenní zlepšení stavu a poté dochází k rozvoji druhé fáze. Druhá fáze onemocnění může mít příznaky meningeální, myelitidní, poruchy vidění, prudké bolesti hlavy, postižení hlavových nervů, chabé parézy končetin (Seidl, 2015) Průběh nemoci je lehčí u dětí a mladých lidí, těžší průběh často i s trvalými následky bývá u osob středního a vyššího věku. Po prodělané nemoci často zůstávají neurologické následky. Úmrtnost bývá okolo 15 % (Beneš, 2009).



#### *1.11.5 Infekce u seniorů*

V souvislosti s výskytem klíšťové encefalitidy jsou nejrizikovější skupinou lidé ve věkové skupině nad padesát let, jelikož výkonnost imunitního systému s přibývajícím věkem klesá. Je u nich statisticky dokázána vyšší úmrtnost na klíšťovou encefalitidu. Starší lidé nejsou zpravidla proti KE očkováni, a tudíž proočkovanost v této věkové kategorii je nízká. Mnozí z nich se domnívají, že desítky let žít v přírodním ohnisku vede k přirozenému získání odolnosti proti nemoci. U některých mohlo dojít k tiché sérokonverzi, ale většina, pokud nebyli očkováni, jsou stále k infekci vnímaví (Růžek et al., 2015).

#### *1.11.6 Diagnostika klíšťové encefalitidy*

##### *1.11.6.1 Klinická diagnostika klíšťové encefalitidy*

Klinický průběh u této nákazy není jednoznačný, proto diagnózu nelze stanovit na základě klinického vyšetření (Veje et al., 2018). Důležitá je i anamnéza pacienta. Potřebné jsou i informace o tom, zda pacient byl v oblastech se zvýšeným výskytem KE, zda měl v posledních čtyřech týdnech prisáté klíště. Většina infikovaných si prisátí klíštěte nepamatuje, nebo larvu či nymfu přehlédne. A proto anamnestická data slouží pouze jako pomocné informace, důležitá jsou laboratorní vyšetření (Růžek, 2015).

##### *1.11.6.2 Laboratorní diagnostika KE*

Laboratorní diagnostika úzce souvisí s biochemickými a hematologickými vyšetřeními a podstatná je i virologická diagnostika. Na počátku onemocnění se v krevním obraze objevuje leukocytóza. C-reaktivní protein spolu s jaterními testy bývají lehce zvýšené. Za důležité se považuje vyšetření mozkomíšního moku, který bývá čirý nebo lehce zamlžený. Velmi časná fáze onemocnění se může jevit jako začínající hnisavá meningitida, protože se objevuje vysoký počet elementů s převahou polymorfonukleárů v likvoru. Během 24 hodin dochází ke změně obrazu a začínají převládat lymfocyty jako u dalších virových neuroinfekcí. Dalším velmi významným diagnostickým markrem je koeficient energetické bilance (KEB). Vypočítá se z koncentrace laktátu a glukózy v mozkomíšním moku. KEB bývá v normě, nebo snížený

u klíšťovú meningoencefalitidu, ale pokud se jedná o hnisavý zánět, je KEB výrazně nízký. V likvoru je bílkovina zvýšená. Vyšetření mozkomíšního moku je pomocnou metodou, ale neodliší KE od jiných virových zánětů (Růžek, 2015).

K diagnostice onemocnění KE se nejčastěji využívají metody nepřímého průkazu viru. Jedná se o průkaz specifických protilátek třídy IgM a IgG metodou ELISA, komplement fixační reakce nebo provedení virus neutralizačního testu. Pokud jsou hladiny protilátek nízké, doporučuje se vyšetření opakovat s odstupem 1 týdne. Vyšetřením avidity protilátek IgG slouží k odlišení přítomnosti protilátek po očkování. V případě nejasnosti je lepší vyšetření párových sér (Göpfertová a Polanecký, 2015).

Při přímém průkazu stanovujeme přítomnost viru nebo jeho části. Většinou bývá pozitivní záchyt v časně fázi infekce, během virémie. Při tomto testu se jedná o kultivaci virů, která je náročná a v praxi se neprovádí. Provádí se na buněčných kulturách, kde virus způsobuje cytopatický efekt. Mezi další metodu přímého průkazu můžeme zařadit polymerázovou řetězovou reakci. PCR je založené na průkazu hledané deoxyribonukleové kyseliny. Výhodou této metody je rychlost a vysoká citlivost (Růžek, 2015).

#### *1.11.6.3 Vyhodnocení výsledků*

Vyhodnocení výsledků není automatické. Jednak se bere v úvahu klinický obraz, dále fáze infekce a výsledky ostatních vyšetření. Někdy je nutné výsledek ověřit, a proto se musí uskutečnit nový odběr za 1-2 týdny. Vyšetření mozkomíšního moku je podstatné pro určení meningoencefalitidy. U vyhodnocování testů mohou nastat odlišné situace. Vyjdou-li testy na protilátky IgM i IgG negativně, nejedná se o onemocnění klíšťovou encefalidou, ale o jinou neuroinfekci nebo se jedná o časnou fázi nemoci a protilátky nemusí být ještě vytvořeny. U pacienta, který se nachází v horečnaté první fázi bez projevů neuroinfekce nebo pacienta, který měl přisáté klíšťe již před několika dny až týdny, může být výsledek vyšetření nevalidní. V této horečnaté první fázi se protilátky nedají prokázat. Protilátky se objevují, až když dojde k propuknutí klinických příznaků neuroinfekce. Z tohoto důvodu se doporučuje u klinických případů neuroinfekce opakovat odběr znovu týden po prvním negativním výsledku.

Další možnost hodnocení výsledků je, pokud vyjdou protilátky IgM pozitivně a IgG negativně. Jedná se o velmi časný záchyt, kdy protilátky IgG nebyly ještě

vytvořeny, proto by mělo být provedeno další vyšetření za 7 dnů. Prokázání pouze IgM protilátek není důvodem pro tvrzení diagnózy klíšťové encefalitidy (Růžek, 2015).

V případě, kdy máme prokázaný pozitivní nález v obou třídách protilátek IgM i IgG, tak můžeme potvrdit, že se jedná o akutní klíšťovou encefalitidu. Výjimku tvoří ti pacienti, kteří infekci již dříve prodělali anebo byli proti KE očkovaní. Může tady totiž dojít k aktivaci paměťových B-lymfocytů, a tudíž dochází k produkci nespecifických protilátek třídy IgM. U těchto pacientů je hodnota IgM nízká a naopak mají vysokou hodnotu avidity protilátek v třídě IgG. Pro vyhodnocení je potřeba znát údaje o očkování nebo případně informaci o prodělané KE (Růžek, 2015).

Když při hodnocení nalezneme výsledek protilátek IgG pozitivní a IgM negativní, většinou se jedná o pacienta, který KE již prodělal nebo byl očkován. Tady můžeme mluvit o imunním pacientovi (Růžek, 2015).

Na začátku neurologické fáze se protilátky v likvoru nevyskytují. Intrathekální syntéza probíhá přibližně 14 dnů od začátku neurologické fáze, a proto se při akutním onemocnění protilátky z první punkce nevyšetřují (Růžek, 2015).

#### 1.11.7 Epidemiologie

V Evropě je dán výskyt onemocnění aktivitou klíšťat v období od března do listopadu (Göpfertová and Polanecký, 2015). Záleží na příznivých podmínkách, vlhku a teple. V České republice je mnoho míst, kde jsou dobré klimatické podmínky pro život klíštěte *Ixodes ricinus* (Hamplová, 2019). Klíště většinou najdeme na spodní straně listu ve vlhkém prostředí s bujnou vegetací (Růžek, 2015). Nejvýznamnější ohniska v České republice jsou v oblastech smíšených a listnatých lesů, v povodí řek Vltavy a Berounky a jejich přítoků. Největšími přírodními ohnisky jsou jižní Čechy, dále okolí Brna, Opavy, Ostravy, Znojma nově i Českomoravská vrchovina (Hamplová, 2019). Promořenost klíšťat se zjišťuje pomocí vlajkování. V ČR je infikováno v průměru 1 % klíšťat virem klíšťové encefalitidy, oproti 20 % infikovaných původcem lymfské boreliózy. V bývalém Československu se onemocnění KE hlásilo od roku 1945. Podle nařízení Ministerstva zdravotnictví se od roku 1971 zaznamenávaly pouze laboratorně potvrzená onemocnění (Růžek, 2015). V České republice je hlášeno několik stovek onemocnění ročně a trend ve výskytu hlášených onemocnění se považuje za nepříznivý (Göpfertová and Polanecký, 2015).

### 1.11.8 Prevence

#### 1.11.8.1 Preventivní opatření

Primární prevencí je zdravotní výchova obyvatelstva ve smyslu informovanosti o ochraně proti napadení klíšťaty. Při pohybu v ohniskových oblastech se doporučuje nosit světlé oblečení, na kterém jsou klíšťata lépe vidět, uzavřenou vyšší obuv, dlouhé kalhoty a používat účinné repelenty. Repelent se aplikuje na oblečení. Jako další ochrana proti klíšťatům může být konzumace vitamínů skupiny B. Také si do přírody můžeme vzít sadu pro odstranění klíštěte (Bogovic et al.,2015). Po návratu z míst s výskytem klíšťat je třeba své tělo důkladně prohlédnout a případně přisátá klíšťata odstranit (usmrtit potřením dezinfekčním prostředkem a po chvíli kývavými pohyby do stran pinzetou vytáhnout, poté ranku dezinfikovat). Důležitá je doba jak dlouho bylo klíště přisáto. V rámci preventivních opatření se provádí sběr klíšťat pomocí metody vlnkování. Hlavním cílem je zjistit infekčnost klíšťat a zmapovat ohniska nákazy (Göpfertová and Polanecký, 2015).

#### 1.11.8.2 Očkování

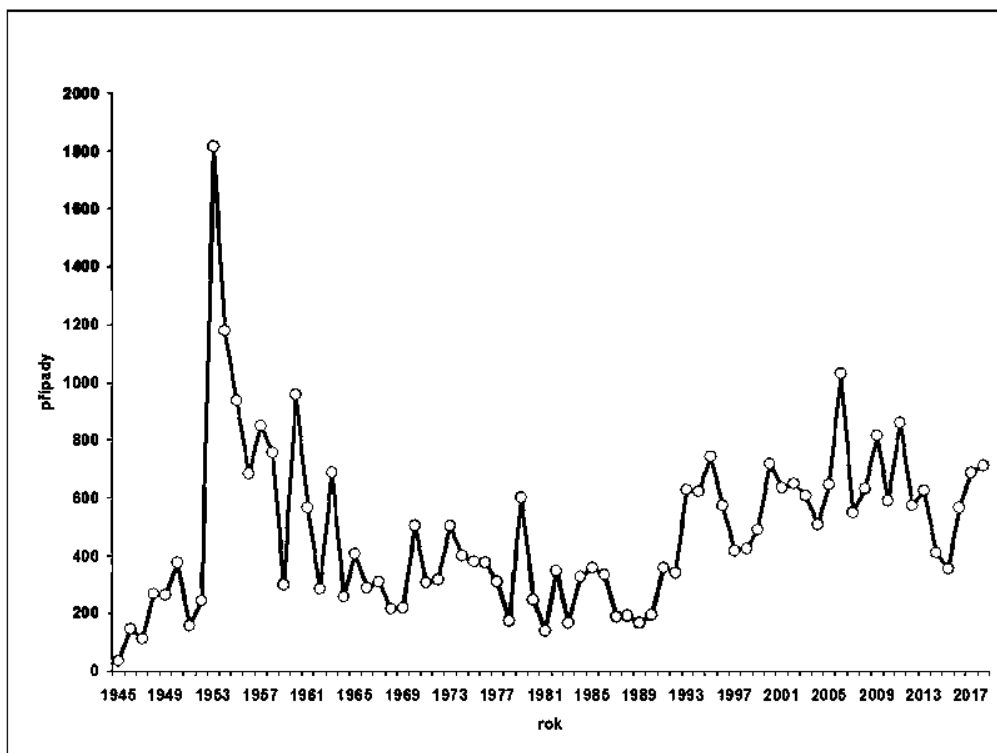
Spolehlivou specifickou prevencí před onemocněním klíšťové encefalitidy je očkování. Světová zdravotnická organizace ho doporučuje všem věkovým skupinám (Růžek, 2015). Očkovat se může v kterémkoliv období roku. Doporučuje se však očkovat v zimních měsících, aby se dosáhlo ochrany před aktivitou klíšťat (Bogovic et al.,2015).

Pomocí očkování jsou do organismu vpraveny antigeny viru, které indukují primární tvorbu protilátek a také specifickou cytotoxickou odpověď. Dlouhodobě přítomné paměťové buňky vytváří po nákaze nebo po očkování protilátky ve vysokých koncentracích. Ty se následně naváží na povrchové receptory viru, zablokují je a tím znemožní množení viru a následné ničení napadených buněk v kůži, uzlinách, kostní dřeni, játrech a ve 2. fázi i buněk nervových (Štruncová, 2009).

Děti lze očkovat již od jednoho roku života. V dnešní době je velmi populární vakcinace od 3 let. Vakcína je vysoce účinná, ochrání děti až v 99 % (Růžek, 2015).

Na počátku 70 let 20. století se objevuje první vakcína, která byla připravena z inaktivovaného viru. Standardní očkovací schéma se skládá ze tří dávek. První přeočkování je za 3 roky, následné další přeočkování po 5 letech. Aplikace je do svalu nejlépe ramenního (Růžek, 2015). Vakcína může být podávána současně s jinými vakcínami, ale nikoli na stejnou část těla (Bogovic et al., 2015).

Kolem 23 % obyvatelstva v ČR je proočkováno v závislosti na věku a regionu. Nejvíce proočkované jsou věkové skupiny od 7 do 19 let. Je potvrzeno, že riziko onemocnění KE s proočkovaností populace klesá. ČR patří každoročně k zemím s nejvyšším výskytem KE v Evropě (Růžek, 2015).



**Obrázek 6** Počty případů KE a roky (Zdroj: SZU, 2017)

### 1.11.8.3 Používané očkovací látky

FSME IMMUN 0,25 ml výrobce Baxter – tato vakcína je vhodná pro děti 1-16 let, obsahuje poloviční objem účinné látky a je aplikována ve věku 1-16 let

FSME IMMUN 0,5 ml výrobce Baxter – od 16-ti let

ENCEPUR K – od výrobce Novartis je určena pro děti a adolescenty do věku 12 let, obsahuje 0,25 ml účinné látky

ENCEPUR – od výrobce Novartis je určen pro děti od 12 let, obsahuje 0,5 ml účinné látky (Růžek, 2015)

Očkovací látka FSME IMMUN obsahuje inaktivovaný virus klíšťové encefalidity kmen Neudörfl, připravena je pomnožením na fibroblastech kuřecích embryí. (SPC FSME IMMUN, 2018) Vakcína Encepur je složena z inaktivovaného viru klíšťové encefalidity kmene K 23 pomnožením na kulturách kuřecích fibroblastů (SPC ENCEPUR, 2020)

Výše uvedené očkovací látky jsou imunogenně shodné i účinné. Aplikace dávek od těchto dvou výrobců je ale odlišná. U očkovací látky FSME IMMUN 0,25 ml a 0,5 ml od výrobce Baxter se druhá dávka aplikuje 1-3 měsíce od první a třetí za 5-12 měsíců po druhé. U očkovací látky ENCEPUR je druhá dávka rovněž aplikována 1-3 měsíce po první a třetí za 9-12 měsíců od druhé dávky. U osob starších 50 let u látky ENCEPUR je přeočkování po 3 letech. U vakcíny FSME IMMUN stačí přeočkovat po 3 letech osoby starší 60 let (Růžek, 2015).

Pro dosažení rychlé imunizace u obou vakcín se používá zrychlené očkovací schéma. Zkrácené schéma je dobré použít během sezóny nebo při neplánovaném odjezdu do ohniska nákazy. Vakcína FSME IMMUN se od běžného schématu liší v intervalu mezi první a druhou dávkou 14 dnů (SPC FSME IMMUN, 2018). Výrobce vakcíny ENCEPUR uvádí rozdíl mezi první a druhou dávkou pouze 7 dní (SPC ENCEPUR, 2020). Sérokonverze se dostaví nejdříve 14 dnů po druhé aplikaci. Třetí dávka je podána za 5 až 12 měsíců po druhé vakcinaci. Po ukončení očkování přetrvávají protilátky nejméně 12 až 18 měsíců (SPC FSME IMMUN, 2018; SPC ENCEPUR, 2020).

Popis vybraných nežádoucích účinků z klinických studií: příznaky podobné chřipce (včetně horečky, hyperhidrózy, rigoru) se mohou vyskytnout často, zejména po první dávce a obvykle odezní v průběhu 72 hodin (SPC ENCEPUR, 2020).

## 2 Cíl práce

Cílem práce je prokázat stav protilátek u pacientů po očkování proti klíšťové encefalitidě a po prodělání onemocnění pomocí metody ELISA.

Hypotézy:

1. Předpokládáme, že existuje významný statistický rozdíl ve výši ochranných protilátek proti klíšťové encefalitidě s ohledem na věk pacientů po očkování.

2. Předpokládáme, že existuje významný statistický rozdíl ve výši ochranných protilátek proti klíšťové encefalitidě s ohledem na věk pacientů po prodělání klíšťové encefalidity.

## 3 Praktická část

### 3.1 Metodika

Všechny získané vzorky od pacientů byly vyšetřeny na protilátky proti viru klíšťové encefalitidy metodou ELISA. Jedná se o metodu, které umožňuje provedení in-vitro testu pro určení lidských protilátek proti KE v jednotlivých třídách. Testování patientských sér proběhlo v obou třídách protilátek IgM a IgG.

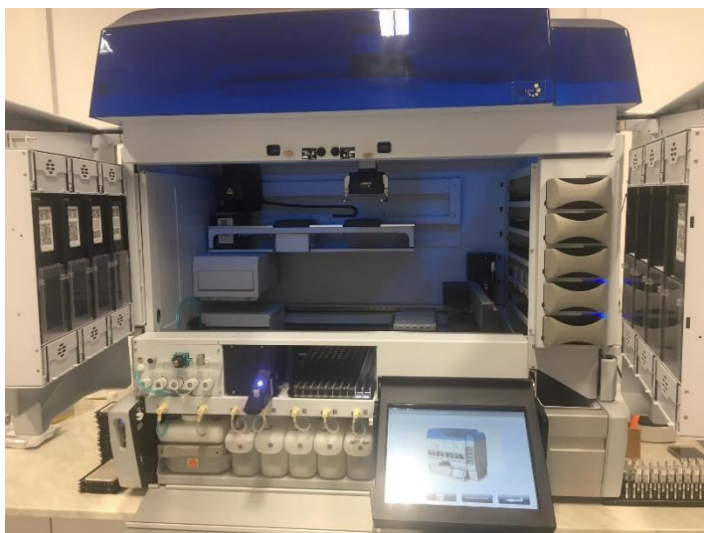
#### 3.1.1 ELISA

Umožňuje detekci specifických protilátek třídy IgM a IgG ve vzorku metodou EIA-Enzymová immunosorbent assay, která se řadí mezi reakce se značenými složkami. Test je založen na sendvičovém principu (pevná fáze s navázaným specifickým antigenem – protilátka z vyšetřovaného vzorku - značená protilátka). Testovací souprava obsahuje mikrotitrační destičky s reakčními jamkami potaženými antigeny proti viru KE. Jako první krok se v jamkách nechají inkubovat naředěná patientská séra. Jedná-li se o pozitivní vzorek, tak se na antigeny navážou specifické IgM nebo IgG protilátky. K zjištění, zda jsou protilátky navázané, slouží další inkubace, kde se použijí enzymově značené protilátky (konjugát) proti lidským IgM nebo IgG, které katalyzují barevnou reakci. Celá reakce je ukončena zastavovacím roztokem, dojde ke změně modrého zabarvení na žluté. Intenzita barevné reakce je úměrná koncentraci specifických protilátek přítomných ve vzorku. Intenzita zabarvení se měří na fotometru při vlnové délce 450 nm (návod pro použití SmartEIA TBE Virus IgM, 2018).

### 3.2 Dynex Agility®

Všechny vzorky od pacientů byly vyšetřeny na přístroji Agility®, jedná se o automatizovaný ELISA přístroj řízený počítačem, na kterém se stanovují protilátky třídy IgM a IgG. Výhodou je vysoké produktivní a bezpečné zpracování, eliminace chybovosti a jednoduchá manipulace. Automatizuje pipetování vzorků, inkubaci, přidání reagentů, promývání a měření.





**Obrázek 7** Přístroj Agility® (Zdroj: vlastní)

Přístroj obsahuje vkládací modul pro vzorky s čtečkou čárových kódů, pipetovací ramena pro reagentie a vzorky, transportní rameno, které slouží k pohybu předmětů uvnitř přístroje, dva pracovní prostory, inkubátory mikrotitračních destiček, promývačku a fotometr.

Za naprogramování jednotlivých testů, vlastní zadávání a spuštění testů odpovídá programové vybavení přístroje Agility. Obsahuje Assay generator, který umožňuje samostatné zadávání testů pro jednotlivé vzorky přes pracovní list. Po spuštění testu se aktuální stav vzorků zobrazuje na monitorovacím okně.

Základ Agility procesního systému je SmartKit™, jedná se o soupravu reagentů, která je určena k uspořádání lahví s roztoky určenými pro provedení testu. Celkový provoz systému je řízen pomocí PRACOVNÍHO LISTU popisujícího testy, které mají být provedeny podle vzorků vložených do systému.

Správnou identifikaci vzorků zabezpečuje čtečka čárových kódů. Každý vzorek pacienta je označen svým kódem. V 10 stojanech je možno umístit až 200 vzorků. Další stojany jsou určeny pro reagentie, ředící roztoky, standardy a špičky. Aby nedocházelo ke kontaminaci vzorků, používají se jednorázové špičky. Dále obsahuje nádoby na promývací roztoky a odpadní nádobu (Agility® Automatizovaný Systém ELISA, 2014).

Když se analyzátor naprogramuje, připraví se jamky podle počtu vzorků, zvláště pro protilátky třídy IgM a IgG. Vzorky se před stanovením promíchají na třepačce a pomocí čtečky se načtou do programu. Reagenty, standardy, kontroly, spotřební materiál,

mikrodestičky se vkládají do pracovního prostoru podle toho, jak nás navádí počítačový systém na obrazovce.

Jakmile dojde ke spuštění systému, vzorek se automaticky převede ze zkumavky do mikrotitrační destičky, kde dojde k jeho předředění. Dále se rozpipetují jednotlivé kontroly a standardy. Poté dojde k rozpipetování reagensů a inkubaci mikrodestičky. Následuje promývání, měření a interpretace výsledků. Pokud dojde k selhání systému nebo přístroj zaznamená nedostatečné množství reagensu, analyzátor o ní informuje. Automaticky probíhá i kontrola správnosti provedení testu, jelikož systém zaznamenává každou vykonanou operaci analyzátoru.

### *3.2.1 Reagencie a příprava vzorků*

Použité reagencie do analyzátoru jsou dodávány v komerčních setech SmartEIA TBE Virus IgM a SmartEIA TBE Virus IgG od firmy TestLine Clinical Diagnostics s.r.o. Dodávané potažené mikrotitrační destičky s navázaným antigenem obsahují 12 oddělených stripů, každý z těchto proužků má 8 jamek. Většina reagensů jsou již připravené k pracovnímu použití až na promývací pufr (20x koncentrovaný), který je nutné naředit. Kontrolní séra a kalibrátory jsou již naředěné (Agility® Automatizovaný Systém ELISA, 2014).

Pro samotnou analýzu je potřeba patientské vzorky naředit v poměru 1:101. Vzorky se mohou uschovat v ledničce při teplotě +2 °C až +8 °C pouze na jeden týden. Pokud je potřeba uschovat déle, vzorky se musí zmrazit na -20 °C (návod pro použití SmartEIA TBE Virus IgM, 2018).

### **3.3 Stanovení protilátek v třídě IgG**

V dnešní době se ve většině laboratoří rutinně používá výše popsáný automatizovaný systém ELISA. Test se však dá provádět i bez přístroje, a to za pomoci ručního pipetování, promývání a inkubace. Pro ruční stanovení postup níže:

Složení soupravy pro testování protilátek v třídě IgG:

- Potažená destička s navázaným antigenem
- Negativní kontrola (kalibrátor 1) 4 U/ml
- CUT-OFF (kalibrátor 2) 20 U/ml
- Pozitivní kontrola (kalibrátor 3) 80 U/ml
- Kalibrátor 4 200 U/ml
- Konjugát – zvířecí imunoglobulin proti lidskému IgG značený peroxidázou
- Ředící roztok vzorků 2
- Substrát 2 TMB-Complete 2– obsahuje TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- Promývací roztok - 20x koncentrovaný pufr
- Zastavovací roztok – roztok kyseliny

(Zdroj: návod pro použití EIA TBE Virus IgG, 2019)

### **Stanovení protilátek IgG**

1. Nejprve se naředí promývací roztok a vzorky. Promývací roztok je potřeba naředit 1:20 a patientská séra v poměru 1:101.
2. Do připravené mikrotitrační destičky se napipetuje 100 µl pozitivních a negativních kontrol, kalibrátorů a zředěných patientských sér. Vynechá se první jamka, protože do té přijde blank.
3. Destička se přikryje víčkem a nechá 30 minut inkubovat při 37 °C.
4. Po uplynutí doby je potřeba jamky 5x promýt promývacím roztokem s minutovými intervaly mezi tím.
5. Kapalina z jamek se důkladně vyklepe do filtračního papíru.
6. Dále do všech jamek se musí napipetovat 100 µl konjugátu, přikrýt destičku a nechat 30 minut při 37 °C inkubovat.
7. V dalším kroku se sejme víčko a jamky v destičce se 5x promyjí pracovním promývacím roztokem s minutovými intervaly mezi jednotlivými kroky.
8. Do všech promytých jamek se napipetuje 100 µl jednosložkového substrátu TMB-Complete. Zase přikryjí a nechají inkubovat 15 minut při 37 °C v temnu.
9. Po 15 minutách pro zastavení reakce je potřeba přidat 100 µl zastavovacího roztoku do každé jamky.
10. Poté následuje měření absorbance při vlnové délce 450 nm ve spektrofotometru.

### 3.4 Stanovení protilátek v třídě IgM

Složení soupravy pro testování protilátek v třídě IgM

- Potažená destička s navázaným antigenem
- Negativní kontrola
- CUT-OFF (roztok obsahující specifické lidské protilátky v hraniční koncentraci)
- Pozitivní kontrola
- Konjugát-zvířecí imunoglobulin proti lidskému IgM značený peroxidázou
- Ředící roztok vzorků 4 (pufr se stabilizátory bílkovin a IgG/RF sorbentem) v pracovním ředění
- TMB – Complete 2 - obsahující TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- Promývací roztok-20x koncentrovaný pufr
- Zastavovací roztok-roztok kyseliny

(Zdroj: návod pro použití EIA TBE Virus IgM, 2019)

#### Stanovení protilátek IgM

1. Stejně jako u stanovení protilátek IgG je i u stanovení IgM nejprve potřeba naředit pacientská séra ředícím roztokem vzorků 1:101.
2. Do připravených stripů se napipetuje 100 µl pozitivní a negativní kontroly, Cut-off a zředěná pacientská séra. Vynechá se první jamka, protože do té přijde blank.
3. Destička se přikryje víčkem a nechá při 37 °C 30 minut inkubovat.
4. Po uplynutí doby inkubace se obsah jamky odsaje a 5x promyje promývacím roztokem s minutovými intervaly.
5. Kapalina z jamek se důkladně vyklepe do filtračního papíru.
6. Do všech jamek se napipetuje 100 µl konjugátu proti lidským IgM, přikryje destičkou a nechá 30 minut při 37 °C inkubovat.
7. V dalším kroku se sejme víčko a jamky v destičce 5x promyjí pracovním promývacím roztokem s minutovými intervaly mezi jednotlivými kroky.
8. Do všech promytých jamek se napipetuje 100 µl jednosložkového substrátu TMB-Complete. Zase se přikryjí a nechají inkubovat 15 minut při 37 °C v temnu.

9. Po 15 minutách pro zastavení reakce se přidá 100 µl zastavovacího roztoku do každé jamky.
10. Poté následuje měření absorbance při vlnové délce 450 nm ve spektrofotometru.

### 3.5 Hodnocení

Hladiny protilátek IgG se odečtou pomocí čtyřbodové kalibrační křivky, která je sestavena z hodnot získaných změřením absorbancí jednotlivých kalibrátorů o známé koncentraci a udávají se v jednotkách U/ml. Výsledky jsou hodnoceny v komentáři k výsledku dle doporučení výrobce. Když je hladina protilátek menší než 18 jednotek je nález negativní, 18–22 jednotek je hodnoceno jako hraniční a více než 22 jednotek svědčí pro pozitivní nález protilátek v séru. Hraniční nálezy je zapotřebí zopakovat z nového odběru s časovým odstupem 2 až 6 týdnů (návod pro použití EIA TBE Virus IgG, 2018).

Hladiny protilátek IgM jsou vyhodnocovány na základě výpočtu indexu pozitivivity pro séra v poměru absorbance vzorku k průměrné absorbanci hodnoty CUT-OFF.

$$IP = \frac{\text{absorbance séra}}{\text{průměrná absorbance CUT-OFF}}$$

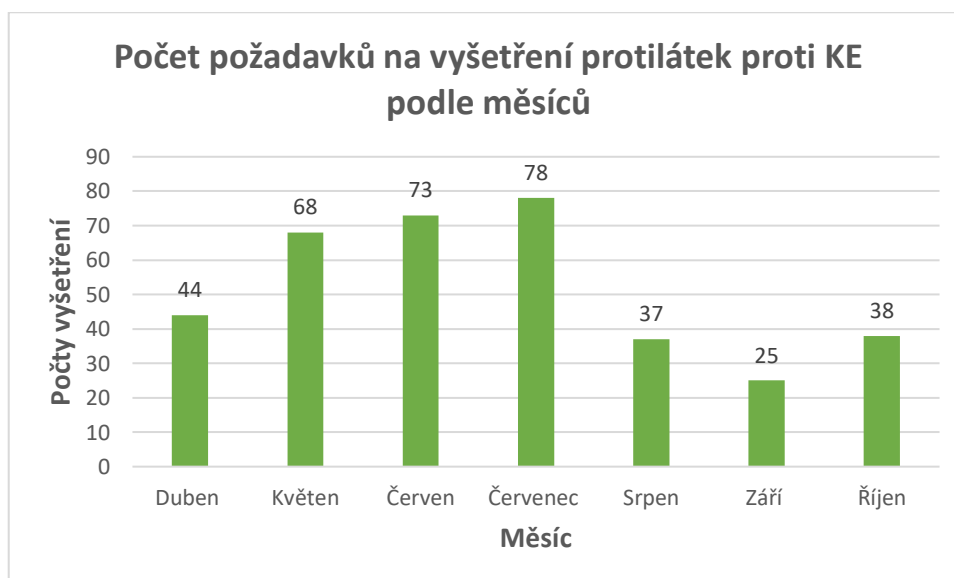
Vyjde-li výsledek indexu pozitivivity menší než 0,9 jednotek, jedná se o negativní nález, pokud jsou hodnoty indexu v rozmezí 0,9 až 1,1 hodnotí se jako hraniční, hodnoty s indexem větší než 1,1 svědčí pro pozitivní nález protilátek IgM. Vyšetření hraničních vzorků, tj. s indexem pozitivivity 0,9 až 1,1 je potřebné opakovat z nového odběru za 2 až 6 týdnů s ohledem na specifika daného onemocnění (návod pro použití EIA TBE Virus IgM, 2018).

## 4 Výsledky

Za období od dubna do října 2019 bylo vyšetřeno v laboratoři Stafila k.s. České Budějovice celkem 363 vzorků.

### Výskyt onemocnění v měsících

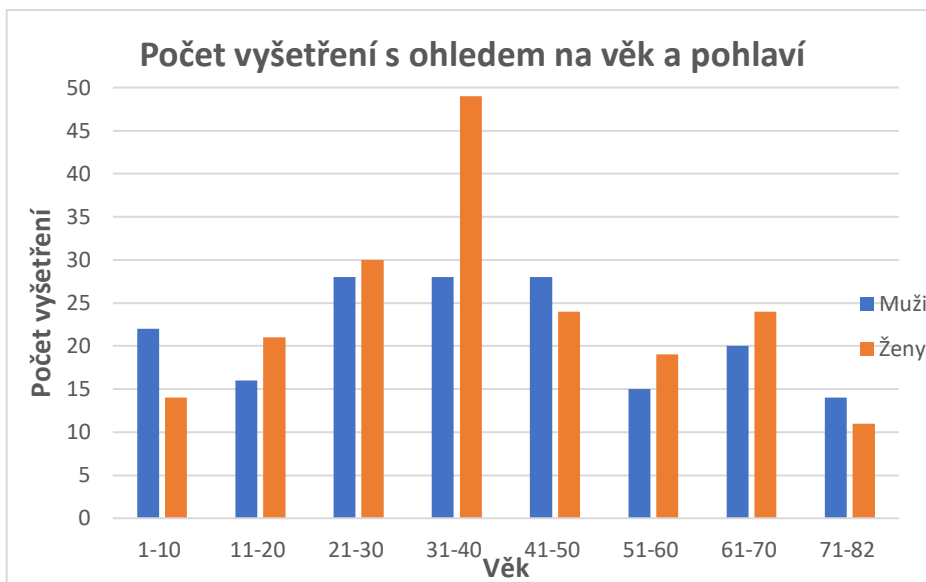
V následujícím grafu jsou vidět počty zasílaných vzorků v jednotlivých měsících od dubna do října roku 2019. Nejvíce vzorků, 21 %, bylo přijato a vyšetřeno v červenci. Za měsíce květen, červen, červenec bylo vyšetřeno více jak polovina, tedy celkem 58 % vzorků. Nejméně požadavků na vyšetření hladiny protilátek proti KE, 6 %, bylo přijato v září.



Graf č.1 Počty vyšetření rozdělené do měsíců (Zdroj: vlastní)

### Pohlaví a věk vyšetřovaných

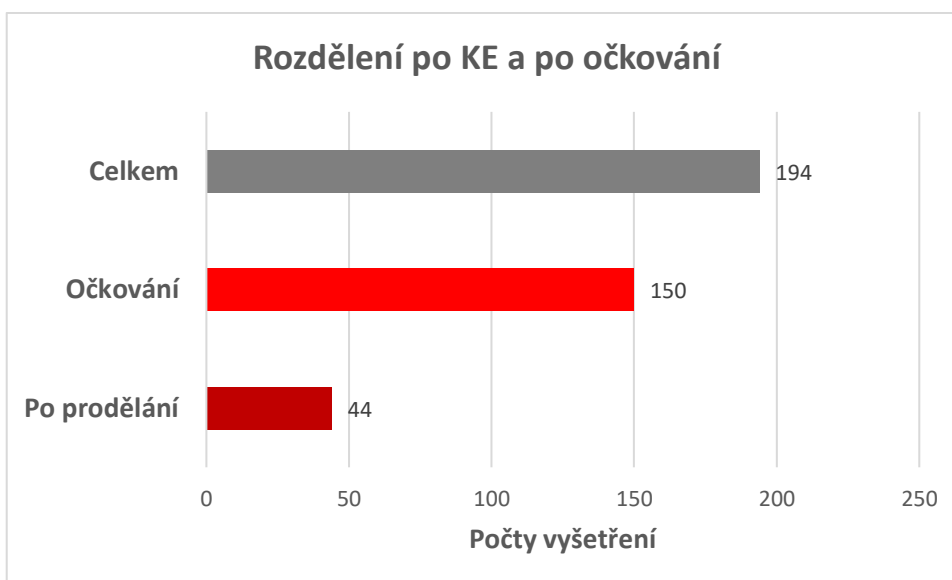
U tohoto grafu je vidět rozdělení požadavků na vyšetření protilátek proti klíšťové encefalitidě u žen a mužů v závislosti na věku. Z celkového počtu 363 vyšetření bylo 192 žen a 171 mužů. Ženy byly nejčastěji testovány na protilátky ve věku 31 až 40 let, a to ve 49 případech. U mužů došlo ve třech věkových kategoriích ke shodě požadavků na vyšetření protilátek s počtem 28, a to ve věkovém rozmezí 21 až 30, 31 až 40 a 41 až 50 let.



Graf č.2 Počty vyšetřených mužů a žen s ohledem na věk (Zdroj: vlastní)

### Rozdělení testů po očkování a po prodělání KE

Z celkového počtu 363 vyšetřených na KE bylo 194 pozitivních vzorků. V tomto grafu je rozdělení, kolik osob z tohoto počtu bylo očkovaných, a počet těch, kteří klíšťovou encefalitidu prodělali. Většina byla očkovaných, a to 77 %.



Graf č.3 Rozdělení vyšetření po očkování a po prodělání KE (Zdroj: vlastní)

### Rozdíl ve výši ochranných protilátek

Porovnání výše ochranných protilátek u osob, které onemocnění prodělaly a u osob, které byly proti viru KE očkovány. Z grafu je vidět, že průměrná výše hladiny protilátek je u osob očkovaných mírně vyšší.



Graf č.4 Průměrná hladina ochranných protilátek očkovaných a po nemoci (Zdroj: vlastní)

### Postvakcinační výskyt protilátek IgG

Rozdělení zasílání vzorků na IgG protilátky pro posouzení stavu protektivní imunity proti KE v měsících. Celkem bylo vyšetřeno 166 osob.

**Tabulka 1** Postvakcinační výskyt protilátek IgG v měsících

Duben	Květen	Červen	Červenec	Srpen	Zaří	Říjen
31	37	34	28	10	10	16

(Zdroj: vlastní)



V tabulce je vidět podrobnější rozdělení naměřených hladin IgG protilátek po očkování. Méně než 18 jednotek (negativní hodnocení) bylo prokázáno u 16 pacientů. Hraniční hodnota (18 – 22 jednotek) nebyla naměřena u žádného pacienta a pozitivní nález protilátek proti viru klíšťové encefalitidy byl zaznamenán ve vzorcích séra od 150 pacientů.

**Tabulka 2** Postvakační výskyt protilátek IgG podle hladiny

U/ml	0-17	18-22	23-30	31-50	51-70	71-90	91-110	111-130	131-150	151-170	171-200	201-230	231-260
Počet pacientů	16	0	7	13	9	11	12	10	10	14	25	28	11

(Zdroj: vlastní)

### **Výskyt protilátek IgG po prodělání onemocnění**

V této tabulce je podrobný přehled naměřených hladin protilátek IgG po nemoci. Hodnota menší než 22 jednotek nebyla naměřena u žádného pacienta. Všech 44 vyšetřených pacientů mělo pozitivní výsledek.

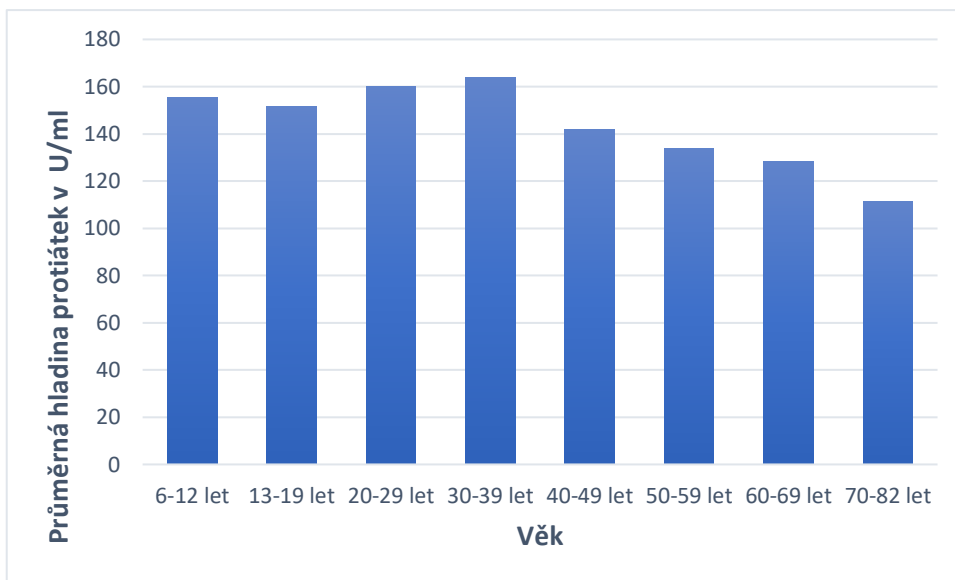
**Tabulka 3** Výskyt protilátek IgG po nemoci

U/ml	0-22	23-30	31-50	51-70	71-90	91-110	111-130	131-150	151-170	171-200	201-230	231-260
Počet pacientů	0	3	4	3	3	6	3	5	3	4	7	3

(Zdroj: vlastní)

### **Průměrné hladiny protilátek dle věkových skupin**

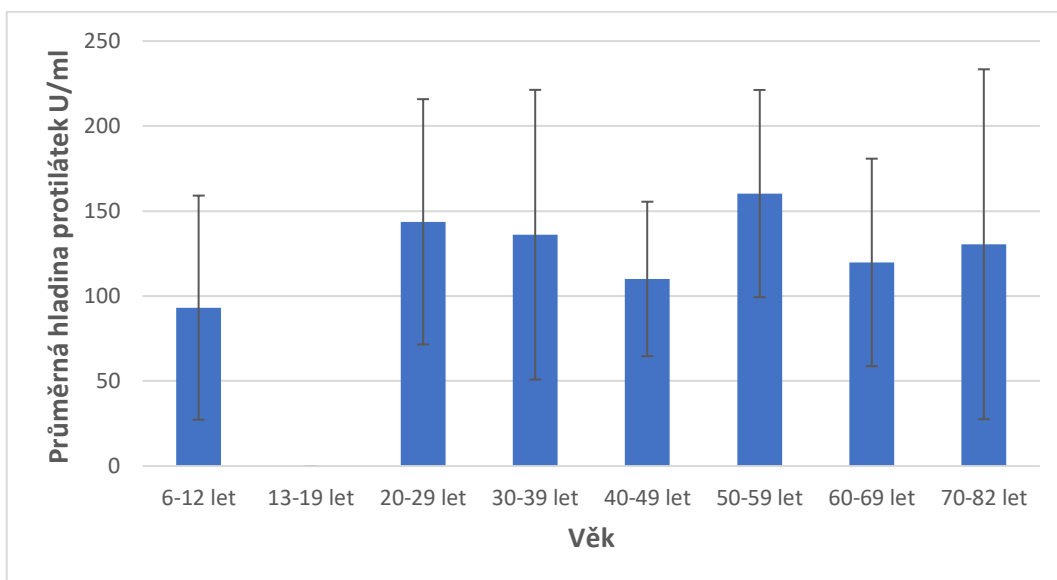
U mladších věkových kategorií je stav průměrné hladiny ochranných protilátek vyrovnaný. U starších pacientů je zjevný menší pokles.



Graf č.5 Průměrné hladiny protilátek dle věkových skupin (Zdroj: vlastní)

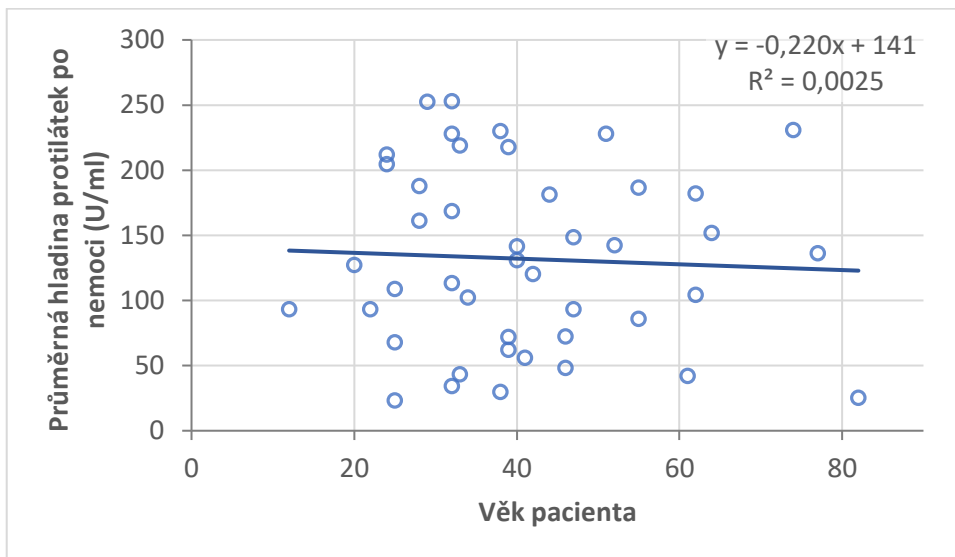
### Průměrné hladiny protilátek dle věkových skupin po prodělání nemoci

Rozdělení průměrné hladiny IgG protilátek do věkových kategorií. Vybrání pouze ti pacienti, kteří onemocnění KE prodělali.



Graf č.6 Průměrné hladiny protilátek s ohledem na věk po nemoci (Zdroj: vlastní)

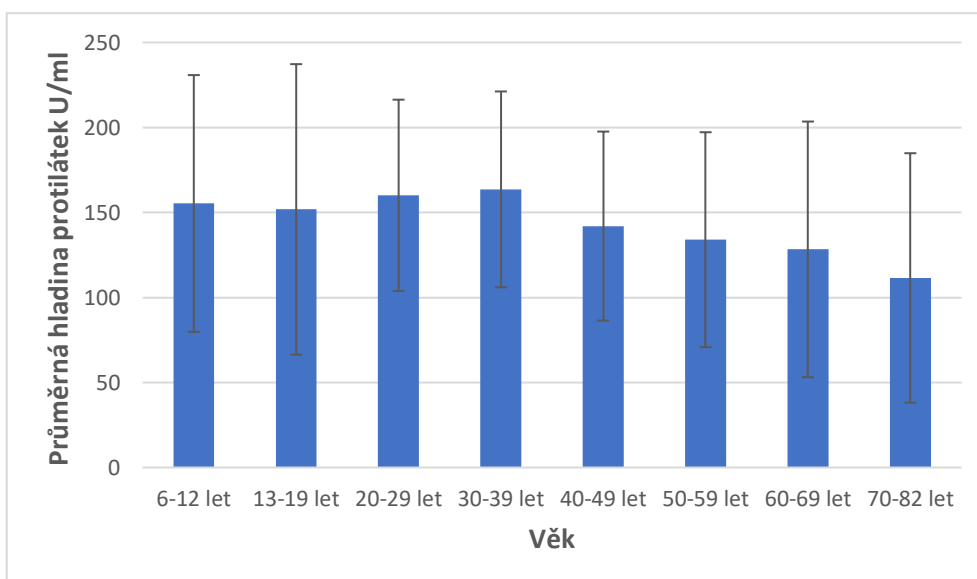
V grafu je vidět, že věk pacienta vysvětluje pouze asi 2,5 % variability v průměrné hladině protilátek.



Graf č.7 Lineární regrese u pacientů po nemoci (Zdroj: vlastní)

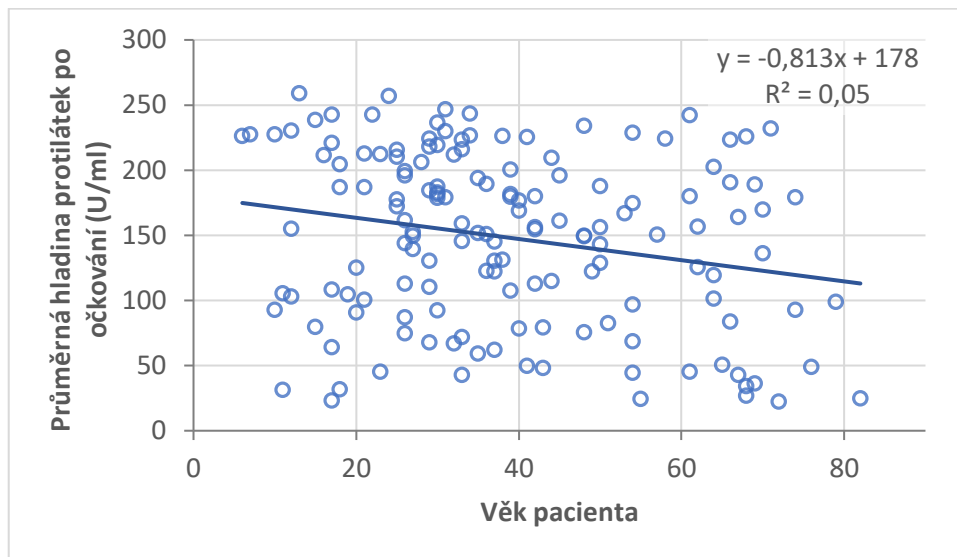
### Průměrné hladiny protilátek dle věkových skupin po očkování

V grafu je znázorněná průměrná hladina protilátek, u pacientů, kteří byli očkováni.



Graf č.8 Průměrné hladiny protilátek s ohledem na věk po očkování (Zdroj: vlastní)

V tomto grafu je vidět, že věk pacienta vysvětluje asi 5 % variability v průměrné hladině protilátek.



Graf č.9 Lineární regrese u pacientů po očkování (Zdroj: vlastní)

## 5 Diskuze

Cílem bakalářské práce bylo zjištění protilátek u pacientů po očkování proti klíšťové encefalitidě a po prodělání onemocnění. Stanovení bylo provedeno pomocí metody ELISA. Ve své práci jsem zpracovala vzorky sér, které byly zaslány ke stanovení protilátek na pracoviště Stafila k.s. České Budějovice v období od dubna do října roku 2019. Následně jsem vyhodnotila získané výsledky.

To, že se jedná o onemocnění sezónního charakteru, potvrzuje graf č.1, kdy nejvíce požadavků na průkaz protilátek proti klíšťové encefalitidě bylo zasláno ke zpracování v měsících květnu (68 požadavků), červnu (73 požadavků) a červenci (78 požadavků). Zvýšený počet požadavků na test je i v říjnu. Tento výsledek potvrzuje i článek o klíšťové encefalitidě, který tvrdí, že nejvyšší výskyt je v období od května do října (Medonosová, 2020). Příčinou zvýšeného výskytu v podzimních měsících mohou být i vyšší teploty, jelikož množství a aktivitu klíšťat kromě jiného nejvíce ovlivňuje počasí. Navíc s teplejším počasím je i vyšší výskyt lidí v přírodě a tím se počet infikovaných KE zvyšuje.

Z celkového počtu 363 vzorků bylo testováno 53 % žen a 47 % mužů. Ze získaných dat je vidět, že o něco více jsou ohroženy ženy (graf č.2). Věku nad 50 let dosáhlo 103 pacientů, což představuje 28 % testovaných osob. U těchto osob vyšších věkových kategorií podle odborné literatury dochází k závažnějšímu průběhu onemocnění (Růžek, 2015)

Celková data ukazují počet testovaných osob, které vyhledaly lékaře s klinickými příznaky onemocnění nebo s podezřením na onemocnění klíšťovou encefalitou po přisátí klíštěte nebo z důvodů posouzení imunity po očkování. Z dostupných informací bylo v období od dubna do října roku 2019 v České republice hlášeno 653 případů onemocnění KE. Přičemž Jihočeský kraj se na tomto čísle podílel 13 % (ISIN, 2019).

Ze všech 193 provedených pozitivních testů tvořilo 77 % výsledků jen kontrolu na vytvořenou dostatečnou hladinu protilátek po očkování (graf č.3). Ke zhodnocení postvakcinační imunity bylo testováno 166 vzorků krve, u kterých bylo požadováno pouze stanovení IgG protilátek proti viru klíšťové encefalidity. Nejčastěji byla séra zasílána v květnu a červnu. Tato skutečnost zobrazuje zájem populace o očkování a obecnou povědomost o sezónním charakteru onemocnění. 166 testovaných vzorků bylo od osob ve věkovém rozmezí 6 až 79 let. Z nich 42 vzorků, to je 25 %, bylo od osob

starších 55 let. To odráží nedostatečně aktivní přístup k vlastnímu zdraví u starší populace, i s touto skutečností, že je průběh nemoci u nich závažnější. Podle tabulky, kterou uvádí výrobce diagnostické soupravy, bylo 23 vzorků hodnoceno jako negativní a žádný výsledek nebyl hraniční. Ve 143 vzorcích byla prokázána sérokonverze protektivních protilátek s různou hladinou IgG. V literatuře se uvádí, že tyto hodnoty jsou pouze orientační, nelze pouze na základě výsledku ELISA testu přeočkování doporučit nebo nedoporučit. Laboratoř informuje ošetřujícího lékaře o výsledku a záleží na něm a na pacientovi, k jakému postupu se rozhodnou (Růžek et al., 2015).

Na základě výsledků byly porovnány průměrné hodnoty výše protilátek u pacientů po očkování a u pacientů, kteří nemoc prodělali. Průměrná výše hladiny protilátek byla u osob očkovaných mírně vyšší (graf č.4). Očkovaných bylo 166 pacientů a z nich 98 (59 %) mělo protilátky vyšší než 110 U/ml (viz tabulka č.2). Ze 44 pacientů, kteří onemocněli, 25 (56 %) mělo hladinu protilátek IgG vyšší než 110 U/ml (viz tabulka č.3).

První hypotéza předpokládala, že existuje významný statistický rozdíl ve výši ochranných protilátek proti klíšťové encefalitidě s ohledem na věk pacientů po očkování. Z výsledků vyšetřených pacientů po očkování je nejvyšší hladina IgG protilátek ve věkovém rozmezí 30-39 let, naopak nejnižší hladina je u 70-82 let. Rozdíl mezi nimi je 52,2 U/ml, to je 32 %. Do věkových kategorií 30-39 let je rozdíl maximálně do 8 %, poté je pokles až o 22 % (graf č.6). Závislost průměrné hladiny protilátek na věku u osob po očkování je statisticky významný. Hypotéza byla potvrzena.

Druhá hypotéza předpokládala, že existuje významný statistický rozdíl ve výši ochranných protilátek proti klíšťové encefalitidě s ohledem na věk pacientů po prodělání KE. Z výsledků vyšetření protilátek pacientů po prodělání infekce jsou nejnižší protilátky ve věkových rozmezí 6-12 a 40-49, nejvyšší jsou 50-59 (graf č.8). Závislost průměrné hladiny protilátek na věku není statisticky významný. Na každých 10 let věku klesne hladina protilátek o 2 U/ml. Tento pokles není statisticky významný. U ochranných protilátek u pacientů po nemoci hypotéza, která předpokládala statistický rozdíl ve výši ochranných protilátek proti klíšťové encefalitidě po prodělání nemoci s ohledem na věk pacientů potvrzena nebyla (testováno t testem).

## 6 Závěr

Sérologické přehledy se používají k zjištění promořenosti a kolektivní imunity obyvatelstva. Tyto informace o populaci vůči vybraným infekcím získané ze SP jsou důležité i právě s ohledem na stále zvyšující se migraci. S příchodem očkování, díky kterému se podařilo některá infekční onemocnění dostat pod kontrolu, začaly výsledky SP sloužit ke změnám a úpravám očkovacích schémat. SP se začaly provádět v 60 letech 20. století. Až do roku 1988 se víceúčelové imunizační přehledy vytvářely každý rok. Poslední sérologický přehled proběhl v roce 2013. Zkoumal účinnost očkování a vhodnost plošných očkovacích schémat proti černému kašli, příušnicím, spalničkám a virové hepatitidě B. Do budoucna se zatím o žádném SP neuvažuje. Výjimkou jsou SP realizované z důvodu náhle vzniklé akutní nepříznivé epidemiologické situace, jako je např. pandemie způsobená COVID 19. Jednou z příčin mohou být i velké finanční náklady na realizaci. Klíšťová encefalitida je virové onemocnění, přenášené hlavně klíštětem obecným *Ixodes ricinus*. Onemocnění může mít lehký průběh připomínající chřipku, ale i těžší s trvalými následky, či může skončit smrtí. Diagnostika je z důvodu častých nespecifických příznaků složitá a bez laboratorního vyšetření nedetekovatelná. Nejúčinnější preventivní opatření je očkování. V naší zemi není očkování proti klíšťové encefalitidě povinné a ani plně hrazené pojišťovnou. Vzhledem k ceně se ne každý dospělý člověk rozhodne nechat očkovat, a tak starší lidé, kteří jsou nejvíce ohroženou skupinou, nejsou dostatečně chráněni. Proočkovanost v České republice je velmi nízká, okolo 25 % a je nezbytné cílenými kampaněmi zvyšovat zdravotní gramotnost populace o významu tohoto očkování v prevenci této závažné infekce.

## 7 Seznam použitých zdrojů

1. Acta hygienica, epidemiologica et microbiologica: Příloha č. 7/74 Víceúčelový imunologický přehled nákaz v ČSR 1973. Praha: Státní zdravotní ústav, 1974.
2. Agility® Automatizovaný Systém ELISA: Návod k Obsluze [online], 2014. Dostupné:[https://www.dynex.cz/data/machines/agility\\_operatorsmanual\\_version\\_cz.pdf](https://www.dynex.cz/data/machines/agility_operatorsmanual_version_cz.pdf)
3. BEAUTÉ, J., SPITERI, G., WARNS-PETIT E., ZELLER, H., 2018. Tick-borne encephalitis in Europe, 2012 to 2016. *Euro Surveill.* **23**(45). DOI: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.45.1800201>.
4. BENEŠ, J., 2009. *Infekční lékařství*. Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-644-1.
5. BERAN, J., HAVLÍK J., 2008. *Lexikon očkování*. Praha: Maxdorf. Jessenius. ISBN 978-80-7345-164-6.
6. BURKHARDOVA, D., 2007. *Laboratorní hodnoty*. Bratislava: Noxi. ISBN 987-80-7345-164-9.
7. GÖPFERTO VÁ, D., JANOVS KÁ, D., DOHNAL K., MELICHERČÍKOVÁ, V., 2007. *Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie, hygiena*. Praha: Triton. ISBN 80-7254-223-0.
8. GÖPFERTO VÁ, D., PAZDIORA, P., DÁŇOVÁ J., 2006. *Epidemiologie: (obecná a speciální epidemiologie infekčních nemocí)*. Praha: Karolinum. ISBN 80-246-1232-1.
9. GÖPFERTO VÁ, D., PAZDIORA, P., PETROUŠOVÁ, I., DÁŇOVÁ, J., 2015. *100 infekcí: (epidemiologie pro praxi)*. Praha: Stanislav Juhaňák - TRITON. ISBN 978-80-7387-846-7.
10. GÖPFERTO VÁ, D., POLANECKÝ, V., 2015. *Manuál praktické epidemiologie – díl 1*. Institut postgraduálního vzdělávání ve zdravotnictví. Praha.
11. GREGORA, M., 2005. *Očkování a infekční nemoci dětí*. Praha: Grada. Pro rodiče. ISBN 8024711265.
12. HAMPLOVÁ, L., 2019. *Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie, hygiena pro bakalářské studium a všechny typy zdravotnických škol*. 2., aktualiz. vyd. Praha: Stanislav Juhaňák - TRITON. ISBN 978-80-7553-729-4.
13. HATALA, D., 2018. *Povinné očkování v České republice*. Pardubice. Bakalářská práce. Univerzita Pardubice.
14. Infekce COVID-19 prošla českou populací velmi mírně, podobně jako v okolních zemích. *Hygienická stanice hlavního města Praha* [online]. 2020 [cit.



- 2020-05-20]. Dostupné z: <http://www.hygpaha.cz/dokumenty/infekce-covid-19-prosla-ceskou-populaci-velmi-mirne--podobne-jako-v-okolnich-zemich>
15. ISIN, Informační systém. [cit.2020-05-14]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/publikace/data/infekce-v-cr>
  16. *Kolektivní imunita [online]*, 2019. Praha: Státní zdravotní ústav [cit. 2020-05-15]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/tema/vakciny/kolektivni-imunita?highlightWords=kolektivn%C3%AD+imunita>
  17. LEXOVÁ P., MANDÁKOVÁ, Z., KOŠŤALOVÁ, J., KYNČL J., LIMBERKOVÁ, R., 2017. *Spalničky – význam onemocnění a aktuální situace v Evropě*. Praha: Státní zdravotní ústav. Dostupné z: [http://www.szu.cz/uploads/Epidemiologie/2017\\_Spalnicky\\_vyznam\\_onemocneni\\_a\\_aktualni\\_situace.pdf](http://www.szu.cz/uploads/Epidemiologie/2017_Spalnicky_vyznam_onemocneni_a_aktualni_situace.pdf)
  18. MEDONOSOVÁ, A., 2020. Klíšťová encefalitida. *SYNLABIANER* [online]. 7(2), 12 [cit. 2020-05-22]. Dostupné z: <https://synlabianer.cz/wp-content/uploads/2020/05/20030TM-SYNLAB-synlabianer-042020-07.pdf>
  19. NYAMBE, A., 2012. *Surveillance infekčních onemocnění z pohledu mezinárodní spolupráce v podmínkách EU*. České Budějovice. Diplomová práce. Jihočeská univerzita.
  20. OVESNÁ, V., 2014. *Sérologické přehledy v České republice*. Ostrava. Bakalářská práce. Ostravská univerzita v Ostravě
  21. PODSTATOVÁ, H., 2001. *Mikrobiologie, epidemiologie, hygiena*. Olomouc: EPAVA. ISBN 80-86297-07-1.
  22. RŮŽEK, D., 2015. *Klíšťová encefalitida*. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-247-5305-8.
  23. PODSTATOVÁ, H., 2009. *Základy epidemiologie a hygieny*. Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-597-0.
  24. SEIDL, Z., 2015. *Neurologie pro studium i praxi*. 2., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-5247-1.
  25. SCHINDLER, J., 2014. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Grada. Sestra (Grada). ISBN 978-80-247-4771-2.
  26. SPC ENCEPUR PRO DOSPĚLÉ, datum revize textu: 20. 1. 2020
  27. SPC FSME IMMUN PRO DOSĚLÉ, datum revize textu: 31. 10. 2018
  28. ŠEJDA, J., ŠMERHOVSKÝ Z., GÖPFERTO VÁ, D., 2005. *Výkladový slovník epidemiologické terminologie*. Praha: Grada. ISBN 80-247-1068-4.

29. Šošovičková, R., 2018. *Séroprevalence protilátek proti spalničkám a průušnicím u dospělé populace v České republice*. Hradec Králové. Disertační práce. Univerzita obrany.
30. ŠTRUNCOVÁ, V., SEDLÁČEK, D., 2009. Klíšťová encefalitida u dětí. *Pediatric pro Praxi*. **10**(2), 70-71.
31. Test-Line Clinical Diagnostics s.r.o, návod pro použití SmartEIA TBE Virus IgM, 2018
32. Test-Line Clinical Diagnostics s.r.o, návod pro použití SmartEIA TBE Virus IgG, 2018
33. Test-Line Clinical Diagnostics s.r.o, návod pro použití EIA TBE Virus IgM, 2019
34. Test-Line Clinical Diagnostics s.r.o, návod pro použití EIA TBE Virus IgG, 2019
35. Tick-borne encephalitis, 2015. *Travel health pro* [online]. [cit. 2020-05-14]. Dostupné z: <https://travelhealthpro.org.uk/factsheet/22/tick-borne-encephalitis>
36. TOMÁŠKOVÁ, H., OVESNÁ, V., KLOUDOVÁ, A., HOZÁK a., JANOUT, V., 2016. Historie sérologických přehledů v České republice. *Hygiena: Časopis pro ochranu a podporu zdraví*. **61**(4), 161-166. DOI: <http://dx.doi.org/10.21101/hygiena.a1445>. ISSN 1803-1056.
37. TUČEK, M., SLÁMOVÁ, A., 2012. *Hygiena a epidemiologie pro bakaláře*. V Praze: Karolinum. ISBN 978-80-246-2136-4.
38. VALARCHER, J.F., HÄGGLUND, S., 2015. Tick-borne encephalitis. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*. **34**(3), 453-466.
39. VOTAVA, M., 2005. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2. přeprac. vyd. Brno: Neptun. ISBN 80-86850-00-5.
40. VEJE, M., STUDAHL, M., JOHANSSON, M., JOHANSSON, P., NOLSKOG P., BERGSTRÖM, T., 2018. Diagnosing tick-borne encephalitis: a re-evaluation of notified cases. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. **37**, 339–344. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10096-017-3139-9>.
41. *Zprávy centra epidemiologie a mikrobiologie: Víceúčelový sérologický přehled*, 2014. 23. ISSN 1804-8676.

## Seznam obrázků

<b>Obrázek 1</b> Platný očkovací kalendář k 1.9.2019.....	15
<b>Obrázek 2</b> Platný očkovací kalendář k 1.9.2019.....	15
<b>Obrázek 3</b> Použité laboratorní metody v rámci sérologických přehledů .....	17
<b>Obrázek 4</b> Roky SP a počty vyšetřených infekcí.....	19
<b>Obrázek 5</b> Rok SP a počet vyšetřených sér.....	19
<b>Obrázek 6</b> Počty případů KE a roky .....	29
<b>Obrázek 7</b> Přístroj Agility® .....	33

## Seznam tabulek

<b>Tabulka 1</b> Postvakcinační výskyt protilátek IgG v měsících.....	40
<b>Tabulka 2</b> Postvakcinační výskyt protilátek IgG podle hladiny .....	41
<b>Tabulka 3</b> Výskyt protilátek IgG po nemoci.....	41

## Seznam zkratek

SP	sérologický přehled
KE	klíšťová encefalitida
IgM	imunoglobulin M
IgG	imunoglobulin G
ELISA	enzymově značený imunosorbentní test
PCR	polymerázová řetězová reakce
KEB	klíšťová energetická bilance
ČR	Česká republika
MZČR	Ministerstvo zdravotnictví České republiky
RNA	ribonukleová kyselina
CNS	centrální nervová soustava
SSSR	Svaz sovětských socialistických republik
NIKO	Národní imunizační komise