

616.988.25-022.3:576.895.421

KLÍŠŤOVÁ ENCEFALITIDA - SLEDOVÁNÍ SÉROPREVALENCE A SÉROKONVERZE

Mjr. MUDr. Petr DOUDA
Ústřední vojenský zdravotní ústav, pobočka České Budějovice
(náčelník: pplk. MUDr. Peter Gál)

Úvod

Klíšťová encefalitida (KE) je způsobena virem klíšťové encefalitisy, res. meningoencefalitisy (VKE, VTBE, VFSME), který je řazen do čeledi *Togaviridae*, rod *Flavivirus*. Tento virus je přenášen zejména členovci (v ČR klíště *Ixodes ricinus*), a proto je řazen mezi arboviry.

Virus může být přítomen také v mléku, zejména kozím. Při požití takto kontaminovaného mléka může dojít k přenosu onemocnění na člověka (van Tongeren, 1955). Virus se při tomto způsobu infekce pomnožuje v senzorických buňkách trávicího ústrojí.

Zcela ojediněle může dojít k přenosu nákazy také cestou inhalační při laboratorní činnosti. V tomto případě se virus pomnožuje v senzorických buňkách nosní sliznice.

Toto onemocnění bylo v nedávné době též známo pod označením dvouvlánná meningoencefalitida, event. dvoufázová horečka z mléka (diphasic milk fever). Virus byl izolován také z komárů *Aedes*, přesto však nejsou považováni za důležitý vektor.

Důkaz přenosu klíštětem popsal v roce 1937 Silber a spol. V téže době bylo agens izolováno. V ČR byl obdobný virus poprvé izolován v roce 1948 Galliou a Rampasem.

Výskyt viru KE byl postupně prokázán ve všech zemích střední Evropy a pak prakticky v Evropě celé. Kmeny vyskytující se ve střední, jižní a severní Evropě se označují jako virus střeoevropské klíšťové meningoencefalitisy - západní subtyp.

Dálnévýchodní subtyp (určený pomocí difuze v agarovém gelu a neutralizací specifických protilátek), je obvykle přenášen klíštětem *Ixodes persulcatus*.

V evropských a asijských oblastech Ruska byl prokázán na základě epidemiologických studií výskyt obou subtypů.

Kromě již zmíněného VKE patří do rodu *Flavivirus* dalších asi 7 virů, z nichž některé jsou přenášeny také členovci.

Antigenní komplex VKE je složený z minimálně 7 virů, které jsou schopné vyvolat lidské onemocnění. Většina je však přenášena komáry. Do tohoto komplexu patří kromě VKE ještě virus horečky Kyasanurského lesa, Langat, Louping ill, virus Omské hemoragické horečky, Powassan a Negishi. Klinicky se tato onemocnění mohou projevovat jako encefalitida, meningoencefalitida nebo hemoragická horečka.

Původce onemocnění a jeho vlastnosti

Agens obsahuje jednovláknovou RNA s pozitivní polaritou, jejíž molekulová hmotnost je 4×10^6 . Obal je tvořen glykoproteinem, velikost virionu kolísá mezi 40-50 nm, nukleokapsida má průměr 25-35 nm, symetrie je ikosaedrální.

Virus je citlivý na UV záření, účinek tukových rozpustidel a detergentů. Je rezistentní ke kyselému pH, teplota 72,0 °C ho inaktivuje během 10 sekund. Při pH 2,8-11,5 a při teplotě 4,0 °C přetrvává infekčnost viru minimálně po 24 hodin. Inaktivován je však pasteurizací při teplotě 72,0-85,0 °C již za 10 sekund.

Virus se pomnožuje v cytoplasmě, virová RNA indukuje tvorbu RNA polymerázy, která syntetizuje komplementární RNA. Ta slouží dále jako šablona pro syntézu dceřinné RNA. Bílkoviny se integrují v cytoplasmě. Maturace probíhá pučením přes membránu endoplazmatického retikula. Zralé viriony obsahují tři základní proteiny: E - envelope, C - capsid, M - membrane.

Mapování peptidů a studie vazby monoklonálních protilátek různých virových kmenů izolovaných z přenašečů, savců i lidí, v průběhu minulých 40-50 let ukazují vysoký stupeň homogenity kmenů ve vztahu k E-proteinu.

Virus vytváří hemaglutinin, aglutinuje husí erythrocyty a krvinky jednodenních kuřat při pH okolo 6,2. Nejlépe se množí v mozku sajících bílých myšek infikovaných intracerebrálně. Za několik dnů se objeví příznaky zvýšené dráždivosti, ataxie i tremoru. Později se vyskytují těžké parézy až paralýzy končící úhynem pokusného zvířete. VKE se po adaptaci množí i na buněčných kulturách (HeLa, kuřecí embryonální bb.) bez cytopatického efektu nebo vyvolává alespoň částečný CPE.

Epidemiologie

Virus KE se vyskytuje v charakteristických přírodních ohniscích a lokalitách na území ČR. Množí se inaparentně v drobných lesních hlodavcích a je přenášen klíštětem *Ixodes ricinus* na hostitele. Toto klíště je i hostitelem nákazy, protože se v něm virus replikuje a přenáší transovariálně na další generaci klíšťat.

Člověk je posledním článkem v řetězu, protože se v jeho organismu virus pouze množí do nižších koncentrací a nemůže být přenášen klíštětem na

další osobu. Perzistence viru v přírodě vyžaduje velké populace malých savců, zejména hlodavců - zajíců, veverek, myši, ale i malých šelem - jezevců, lišek. Z větších zvířat jsou to srnci a domácí zvířata, jako kozy, ovce, skot a psi.

Ohniskový výskyt infekce je vázán na nízké listnaté porosty, kde vlhké a teplé počasí zvyšuje aktivitu klíšťat, hlavně od května do září. Životní cyklus klíštěte závisí na klimatických podmínkách, topografii a vegetaci. Ve středoevropských nížinách podél řek trvá životní cyklus klíštěte 2-3 roky. Klíšťata se rozmnožují vajíčky, ze kterých se líhnou larvy. Ty se po nasátí promění v nymfy a z nich po dalším sání vznikají dospělí jedinci. V nymfách přežívá virus týdny, popř. i měsíce, v dospělých klíšťatech až 285 dní. Klíště se infikuje sáním krve. Virus pak proniká do ezofagu klíštěte a infikuje tkáň slinných žláz. Při sání klíštěte virus přechází do dalšího hostitele, přičemž hostitel může být infikován i po intervalu sání pouhých několika hodin.

Klíště zůstává infekční celý životní cyklus. Poměr infekčních klíšťat k neinfekčním v ohnisku závisí na počtu viremických hostitelů a na délce sání. Kolísá od 0,1 do 5 % s průměrem 1-2 %.

Přírodní ohniska jsou velmi stabilní a virus se zde udržuje i řadu let. Pro ohniska je typická nízká a hustá vegetace, dostatečná vlhkost a dobrý úkryt pro drobné hlodavce a savce. V nadmořské výšce přes 1000 m je jejich výskyt vzácný, ale možný. Přenos alimentární cestou kontaminovaným kozím či kravským mlékem je reálný, díky pasterizaci však raritní. U obyvatel přírodních ohnisek dochází v důsledku opakovaného kontaktu s agens k postupnému promořování. Prevalence protilátek proti viru KE v ČR je asi 1-2 % na rozdíl od prevalence protilátek v přírodních ohniscích a u profesionálně exponovaných pracovníků, kde může být 15-30 % (naše sledované soubory do 5 %). Přirozená infekce indukuje celoživotní imunitu.

Počet hlášených případů onemocnění byl 744 v roce 1995, do 11. 9. 1996 pak 191.

Patogeneze klíšťové encefalitidy a klinický obraz

Po akvizi viru dochází k lokální zánětlivé reakci. Virus se pomnožuje ve fibroblastech zánětlivého kožního infiltrátu a dále v regionálních míšních uzlinách. Doba inkubace je nejčastěji 7 dní a končí průnikem viru do krevního oběhu přímo nebo cestou ductus thoracicus. Ve viremické fázi dochází k množení v lymfoidních a dalších mladých hemoblastických buňkách. Po skončení viremické fáze dochází k pomnožení v cílových orgánech (CNS, játra, slezina atd.).

Tato fáze odpovídá první horečnaté fázi (pokud je přítomna) při dvoufázovém průběhu onemocnění. Po eventuální týdenní latenci se ve druhé fázi virus množí v různých orgánech a proniká hemato-

genní bariérou do centrálního nervového systému, klinicky se jeví jako druhá fáze onemocnění.

Při vstupu viru do organismu gastrointestinálním traktem se agens absorbuje v horní části trávicího traktu a opět přes mizní uzliny a oběh proniká po pomnožení do krevního oběhu. Při replikaci v neuronech dochází k nekroze neuronů spojené s destruktivními a zánětlivými změnami.

Klinický obraz onemocnění

Po inkubační době (6-21 dní) začíná tzv. primární viremická (chřipková) fáze KE s náhlým vzestupem teploty, únavou, cefaleou. Tento stav trvá asi 7 dní a potom dochází k přechodnému zlepšení celkového stavu nebo i k úplné úzdavě.

V řadě případů v této fázi onemocnění končí. U 20 až 30 % infikovaných dochází za 2 až 3 týdny po akvizi viru ke druhé fázi, ve které dominují příznaky postižení CNS. Dostávají se prudké bolesti hlavy, nauzea, zvracení, objevují se poruchy spánku, v těžších případech i výrazné poruchy CNS (somnolentní až komatózní stavy). Nemocní mají závratě, poruchy sluchu a paměti, je přítomen také výrazný třes.

Podle charakteru a formy se rozlišují formy:

1. *abortivní*: lehký průběh, nedochází ke změnám v mozkomíšním moku, odpovídá první, již výše zmíněné fázi onemocnění;
2. *meningeální*: meningeální syndrom bez encefalidity;
3. *meningoencefalitická*: již i poruchy vědomí, parézy okohybných a dalších mozkových nervů, amenní stavy, spastické příznaky, možné centrální hemiparézy;
4. *meningoencefalomyelitická*: postižení míšních kořenů, bolesti v jednom i více segmentech, chabé parézy končetin. Častěji postižení horních končetin. Poškození prodloužené míchy i mozku vede bezprostředně k ohrožení života. Vzácně se objevuje také forma radikuloneuritická, provázená parézami pletence ramenního.

Onemocnění má relativně dobrou prognózu. Smrtnost kolísá od 0,1 do 0,3 %. U více než 30 % pacientů přetrvávají drobná neurologická rezidua (cefalea, parézy, závratě, poruchy soustředění) několik dalších měsíců. Na rozdíl od klíšťové encefalidity východního typu nejsou pozorovány chronické formy onemocnění.

Těžký průběh nemoci může být u starších osob a dětí nejnižších věkových skupin.

Diagnostika onemocnění

Z klinických příznaků a z biochemického nálezu v mozkomíšním moku lze stanovit předběžnou dia-

gnózu, která je upřesněna virologickou laboratoří.

a) přímý průkaz infekce

1. izolace viru
2. morfologický průkaz viru
3. průkaz viru pomocí IF nebo EIA
4. průkaz virového genomu (ev. jeho části) pomocí PCR (polymerázová řetězová reakce; zatím spíše pouze výzkum).

b) nepřímý průkaz infekce

1. KFR (komplement-fixační reakce)
2. HIT (hemaglutinačně-inhibiční test)
3. EIA (enzymová imunoanalýza)
4. VNT (virus-neutralizační test)

Vyšetření specifických protilátek ve třídách IgM a IgG metodou EIA je v současné době metodou volby i dobře interpretovatelné a reprodukovatelné. Z jednoho vzorku séra je možné prokázat specifické izotypy protilátek typické pro akutní infekci i stav imunity antiinfekční a postvakační, což může značně usnadnit diferenciální diagnostiku v rámci onemocnění CNS a na rozdíl od metod KFR, HIT a VNT značně urychluje sérologickou diagnostiku tím, že ji zkracuje na pouhé hodiny. Tato expresní technika je především pro klinické lékaře velkým přínosem.

Také v tomto případě však nelze tyto nálezy absolutizovat (i zde jsou výjimky, např. defekty imunity atd.). Nelze zapomenout, že i při nepřítomnosti specifických protilátek může být jedinec chráněn prostřednictvím systému buněčné imunity.

Terapie

Zatím je pouze symptomatická. Klid na lůžku významně snižuje riziko těžkého průběhu v další fázi. Protiedémovou medikací kortikoidy vyžadují těžší formy onemocnění. Specifický protivirový preparát zatím neexistuje, je ovšem relativně snadno dostupná aktivní specifická imunizace, kontrolovatelná sledováním přítomnosti specifických protilátek izotypu IgG.

Specifická prevence

Formalínem inaktivovaná vakcína byla široce používána v bývalém SSSR (Smorodincev, 1940). Byla vyrobena z mozku myši nebo sajících krys, ale i prostřednictvím tkáňových kultur kuřecího embrya a srdce opic *Cynomolgus* (Levnikov, 1962). V roce 1982 byla na našem území zkoušena sovětská inaktivovaná vakcína s adsorbentem připravená z kmene *Sofin* kultivovaného na kuřecích embryích a opracovaná formalínem.

V současné době jsou v ČR k dispozici očkovací látky FSME - IMMUN firmy IMMUNO Vídeň a Encepur, resp. Encepur K firmy Behring (Hoechst

Marion Roussel).

První jmenovaná očkovací látka obsahuje suspenzi purifikovaného viru klíšťové meningoencefalitidy kmene NEUDÖRFL v množství 2,0-3,5 µg - rozmnožená na buňkách kuřecích embryí z vajec bezmikrobních slepic a inaktivovaná formaldehydem. Preparát dále obsahuje adjuvans - aluminium hydrochlorid, stabilizátor - humánní albumin a konzervační prostředek - thiomersal.

Druhý zmíněný preparát obsahuje suspenzi purifikovaného formaldehydem inaktivovaného viru klíšťové meningoencefalitidy kmene K 23 (Karlsruhe) pomnoženého na buněčné kultuře kuřecích fibroblastů v množství 1,50 µg, resp. 0,75 µg, jako Encepur K. Tato očkovací látka obsahuje na rozdíl od předchozí jako stabilizátor polyželatínu a neobsahuje konzervační prostředek. Obě vakcíny také obsahují stopová množství antibiotik, jako neomycin, chlortetracyklin a gentamicin. Zajišťují ochranu proti všem kmenům viru klíšťové meningoencefalitidy, které se vyskytují v Evropě a převážné části Asie.

Při vakcinaci je možné zvolit v obou případech schéma pomalé (při začátku vakcinace v chladných měsících) ve schématu 0. den - 30. až 90. - 270. až 360 den. Ochrana při tomto schématu trvá 3-5 let, pak je nutná revakcinace, event. vyšetření hladiny specifických protilátek.

Je možno zvolit i schéma rychlé, u očkovací látky Encepur v termínech 0.-7.-21. den a další dávku ještě aplikovat za 12-18 měsíců. U preparátu FSME - IMMUN je doporučeno při užití rychlého schématu v letních měsících aplikovat 2. dávku po 14. dnech od zahájení vakcinace a 3. dávku po 12. měsících.

Aplikace očkovací látky se provádí intramuskulárně nad úpon deltového svalu. Po podání jiných vakcín, ať již živých, nebo inaktivovaných, není při tomto očkování třeba dodržovat žádný časový odstup. Pokud očkování následuje po předchozím podání hyperimunního globulinu proti klíšťové meningoencefalitidě v intervalu kratším než 4 týdny, může dojít ke snížení účinku vakcinace. V těchto případech je třeba vyšetřit výši hladiny specifických protilátek po ukončení vakcinace, a pokud nebyla vakcinace úspěšná, je třeba podání 3. dávky doplnit ještě další. Je třeba zdůraznit, že v současné době neexistuje lékařský důvod omezující očkování proti klíšťové meningoencefalitidě na určité období v průběhu roku (prof. Kunz, Vídeň 22. 9. 1994).

Podání hyperimunního imunoglobulinu (např. FSME Bulin) je indikováno na začátku inkubační doby hlavně u těch pacientů, kteří přišli do kontaktu s klíštětem z vysoce rizikové oblasti, spíše však i jinak neurologicky zdravotně stigmatizovaného jedince. Postexpoziční profylaxi specifickým imunoglobulinem lze doporučit, pokud došlo k přísátí několika klíšťat v endemické oblasti a pacient se ohlásí nejpozději do 96 hodin po možné expozici nákaze.

Metodiky nepřímého průkazu klíšťové encefalitidy

Diagnostickou soupravu IMMUNOZYM FSME lze využívat buď v konfiguraci na detekci protilátek izotypu IgG, nebo změnou značené protilátky lze prokazovat třídu IgM, jejíž přítomnost signalizuje akutní onemocnění. Jedná se o dvoustupňovou ELISU v sendvičovém uspořádání. Vnitřní povrch jamek stripových mikrodestiček je potažen inaktivovaným virem klíšťové encefalitidy, resp. antigenem. Ředěné kontrolní a vyšetřované vzorky séra se inkubují v jamkách. Z kontrol - standard o známém obsahu IgG protilátky - se vytvoří kalibrační křivka, s kterou se absorbance jednotlivých vzorků porovnávají. Během inkubace se naváže specifické protilátky proti VKE na pevnou fázi - stěnu jamek. Nespecifické složky séra se odstraní opakovaným promytím. Při druhé inkubaci nastává reakce s konjugátem. Antihumánní IgG peroxidázový konjugát specificky označí navázané IgG protilátky ze vzorku. Při další fázi opakovaného promývání se odstraňuje přebytečný, tj. nenavázaný konjugát. Při třetím reakčním kroku nastane reakce substrátu, při které peroxidáza konjugátu oxiduje substrát, což je peroxid vodíku s chromogenem tetramethylbenzidinem v alkoholu, na žlutě zbarvenou substanci. Po tomto pracovním kroku se reakce zastaví kyselinou sírovou. Vznik a intenzita zbarvení je přímo úměrná koncentraci IgG protilátek v kontrolních i vyšetřovaných vzorcích. Vyhodnocovací zařízení (Dynatech MR 5000) a tiskárna podle předem zadaného programu vytvoří kalibrační křivku, jednotlivým vzorkům přiřadí odpovídající hodnoty a vytiskne laboratorní protokol s jednotlivými výsledky. Pro přesnost bylo každé sérum (vzorek) vyšetřováno párově a výsledná hodnota stanovena z jejich průměru. Jednotlivé reakční časy jsou při inkubaci vzorků 60 minut, při konjugátové reakci také 60 minut a při substrátové reakci 30 minut. Tato metoda vyžaduje při jednotlivých inkubačních krocích pouze pokojovou teplotu. Vlastní měření optické denzity probíhá při vlnové délce 450 nm, za použití referenčního filtru 620 nm.

Tímto způsobem je možné vyšetřovat biologický materiál, jako sérum, plazmu a mozkomíšni mok. Hranice specificity u tohoto diagnostického setu jsou uváděny v rozmezí 97,1 až 98,9 %.

V rámci sledování přítomnosti specifických protilátek před vakcinací a po vakcinaci byla porovnávána výše zmíněná dovozová EIA souprava s komerční soupravou k detekci protilátek všech izotypů proti viru klíšťové meningoencefalitidy od domácího výrobce (Test Line, Brno), která je založena na jiném principu EIA. EIA-TBEV-Ig souprava na detekci protilátek anti-TBEV je založena na principu kompetitivní ELISA.

Povrch jamek mikrodestičky je potažen antigenem TBEV. Koncentrovaný vzorek séra je v jamce simultánně inkubován s optimálně zředěnými myší-

mi protilátkami anti-TBEV. Jsou-li ve vzorku séra přítomny protilátky proti viru klíšťové meningoencefalitidy, dojde k jejich vazbě na antigen, zatímco vazba zředěných myších protilátek je kompetitivně inhibována. Nejsou-li ve vzorku přítomny specifické protilátky, k inhibici nedojde a myší protilátky se mohou na antigen navázat. Po promytí následuje v jamce inkubace s konjugátem (prasečí anti-myší protilátka značená křenovou peroxidázou). Po konečném promytí je navázaný enzymatický komplex identifikován rozkladem substrátu (peroxid vodíku) a oxidací chromogenu (TMB). Reakce je zastavena a zbarvení konvertováno kyselinou sírovou. Intenzita žlutého zbarvení (optická denzita) měřená při vlnové délce 450 nm je nepřímo úměrná množství specifických anti-TBEV (total) protilátek v testovaném vzorku.

Jednotlivé inkubační kroky při této metodě probíhají za termostátové teploty 37 °C v intervalech po 60 minutách, reakce substrátová pak pouze 20 minut při teplotě pokojové.

Vlastní provedení a vyhodnocení jednotlivých vzorků se provede jako u výše popsané metody. Jako pozitivní nález v séru se hodnotí vzorky, jejichž optické denzity jsou minimálně 2,1x nižší než průměrné OD negativních kontrolních sér.

Interpretaci výsledků jsme prováděli podle příloženého návodu u diagnostické soupravy v určité modifikaci, která nám byla doporučena prof. Kunzem. Vycházeli jsme z obdobného hodnocení, které se používá v Rakousku a SRN. Séra byla podle přítomnosti, ev. nepřítomnosti specifických protilátek zařazena do tří skupin (6, 14, 32).

Skupina č.:

1. *negativní*: 0-35 VIU/ml (Vienna units/ml)
2. *hraniční*: 36-125 VIU/ml (tato skupina byla z hlediska doporučení k vakcinaci označena také jako negativní)
3. *pozitivní*: 126 a výše VIU/ml

Současně s tímto hodnocením jsme vycházeli ze schématu doporučeného v Rakousku a SRN, které souvisí s aktivní imunizací. Podle přítomnosti specifických protilátek a zejména jejich množství lze postupovat takto:

Hladina protilátek:

- A. pod 126
 - a) u očkováných ihned přeočkovat jednou dávkou
 - b) u neočkováných doporučit zahájení očkování
- B. 126-200
 - a) za jeden rok vyšetřit protilátky
 - b) pokud nelze vyšetřit, přeočkovat za jeden rok
- C. 201-400
 - a) za dva roky vyšetřit, ev. přeočkovat
- D. 401-600
 - a) za tři roky dtto

E. a více

a) za pět let dtto

Výsledky a diskuse

Sérologické přehledy v cílené populaci

Na přelomu let 1993-1994 jsme zavedli diagnostickou metodu, která umožňuje vyšetřovat hladinu specifických protilátek třídy IgG proti klíšťové encefalitidě komerční soupravou FSME IMMUNOZYM IgG. Souprava je běžně používána zejména v německy mluvící části Evropy několik let, používá se při sledování imunitního stavu po aktivní imunizaci proti klíšťové encefalitidě a v rámci diferenciální diagnostiky různých onemocnění CNS.

Při zavádění metody jsme spolupracovali se zástupci firmy IMMUNO, kteří nám poskytli základní konzultace a zejména umožnili kontrolu a porovnání kvality naší laboratorní práce v laboratořích Virologického institutu ve Vídni u profesora Kunze.

Naším záměrem bylo v první fázi zjistit přítomnost specifických IgG protilátek u osob, které převážnou část roku tráví v městské a příměstské oblasti - soubor tvořili dobrovolníci z řad zaměstnanců Vojenského zdravotního ústavu (VZÚ) a Vojenské nemocnice České Budějovice a jejich rodinní příslušníci. Celkem se jednalo o 195 osob.

Takto vyšetřeným osobám jsme pak mohli doporučit, zda se za úhradu nechat očkovat, či zda mají dostatek protilátek. V tomto souboru byli také jedinci, kteří v různém časovém odstupu již očkování prodělali. Dále jsme vyšetřili vzorky sér od 73 pracovníků Vojenských lesů (VL) Horní Planá - jednalo se tedy o skupinu osob, která se téměř výhradně pohybuje dlouhodobě a celoročně v přírodě a je často ohrožena klíšťaty. Tato skupina byla vybrána i z toho důvodu, že zaměstnavatel uvažoval o očkování proti klíšťové meningoencefalitidě, které by finančně pokryl. Bylo rozhodnuto, že vakcinační akci provede epidemiologicko-mikrobiologické oddělení VZÚ České Budějovice. Odběry i očkování byly provedeny v termínech doporučených výrobcem vakcíny.

Podnětem pro celou akci byla snaha vyřadit ze souboru očkovaných osob jedince, kteří již mají dostatečné množství ochranných protilátek v těle. Tím bylo ušetřeno určité množství očkovací látky a také nebyl zatěžován organismus séropozitivního jedince aplikací cizorodé látky.

Z obdobného důvodu došlo v říjnu 1995 také k vyšetření vzorků od 48 osob z lokality výcvikového prostoru Libavá, okres Olomouc. Jednalo se převážně o pracovníky zabezpečující provoz této oblasti, kteří se často pohybují v terénu. Na základě stanovení hladin protilátek také v tomto případě došlo k vakcinaci výše zmíněných osob.

Specifické IgG protilátky jsou průkazné v intervalu týdnů až měsíců po proběhlé virémii, resp. antigenemii. Infekcí se získá přirozená, zpravidla celo-

životní imunita.

Ochrana proti nákaze může být vytvořena také prostřednictvím vakcíny. Takto vzniklá ochrana by měla být pravidelně sérologicky v určitých stanovených termínech kontrolována a případně další dávkou očkovací látky posílena (booster efekt).

Sérologické nálezy

V průběhu února a března 1994 bylo odebráno 268 vzorků sér. Odběry jsme prováděli jednak na VZÚ, pracovníky VL Horní Planá jsme odebírali přímo v jejich střediscích v okolí Horní Plané. Každá osoba nám poskytla následující údaje: Příjmení, jméno, rodné číslo, zaměstnání, onemocnění CNS v anamnéze a údaje o očkování. U pracovníků VL jsme ještě zjišťovali počet odpracovaných let v terénu. Do provedení testu byla séra uložena při teplotě -18 až -20 °C.

Virologický institut ve Vídni provedl kontrolní vyšetření 13 vzorků sér. Ve 12 případech byl závěr shodný, v 1 případě byl náš závěr stanoven jako pozitivní, ale laboratoře prof. Kunze jej uzavřely jako hraniční až slabě pozitivní.

Počet pozitivních nálezů, které byly získány z testovaných vzorků od neočkovaných osob a bez klíšťové meningoencefalitidy v anamnéze, byl u pracovníků VL Horní Planá (4,3 %) o 0,3 % vyšší než u zaměstnanců VZÚ a VN České Budějovice (4,0 %) (takto hodnoceny byly pouze vzorky o hladině protilátek vyšší než 126 VIU/ml). Tento rozdíl je statisticky nevýznamný. Stav, kdy není rozdíl v přirozené séropozitivitě mezi populací městskou a „lesní“ je jistě ovlivněn výskytem a promořením přenašeče v Jihočeském regionu.

V populaci osob z výcvikového prostoru Libavá (48 osob) byl pouze jeden nález pozitivní (250 VIU/ml) bez KE a očkování v anamnéze (2,1 %). Z důvodu omezenosti souboru nebyla zjišťována statistická významnost. Průměrná séroprevalence ve skupinách osob č. 1-3, které neprodělaly KME a nebyly vakcinovány je 3,7 %.

Všem osobám, jejichž výsledky v testovaných vzorcích byly negativní nebo hraniční (resp. slabě pozitivní), bylo doporučeno očkování.

V různých okresech Západočeského regionu byla promořenost obyvatelstva začátkem roku 1990 v průměru 1,1 %, při tomto přehledu byly vzorky vyšetřovány mikromodifikací virus neutralizačního testu (VNT) s kmenem Hypr.

Sledování postvakcinační imunity

Sérologickou diagnostiku a imunologickou odezvu v organismu po očkování jsme sledovali výše uvedenou první diagnostickou soupravou.

Očkování

Před zahájením vlastní očkovací akce byla séra možných očkovaných vyšetřena na přítomnost spe-

Tabulka 1

**Sérologický přehled - vyšetření vzorků sér na přítomnost anti FSME IgG v letech 1994 a 1995
- séroprevalence bez anamnestické korekce**

	KME		Očkování		Pozitivní		Hraniční		Negativní		Celkem
	[n]	[%]	[n]	[%]	[n]	[%]	[n]	[%]	[n]	[%]	
1. VZÚ, VN Č. Budějovice	2	1,0	16	8,2	17	8,7	29	14,9	149	76,4	195
2. VL H. Planá	1	1,7	3	4,1	4	5,5	16	21,9	53	72,6	73
3. Libavá	0	0	0	0	1	2,1	3	6,3	44	91,6	48
Celkem	3	0,9	19	6,0	22	7,0	48	15,2	246	77,8	316

Tabulka 2

**Sérologický přehled - vyšetření vzorků sér na přítomnost anti FSME IgG v letech 1994 a 1995
- séroprevalence v témže souboru po anamnestické korekci**

	Pozitivní		Hraniční		Negativní		Celkem
	[n]	[%]	[n]	[%]	[n]	[%]	
1. VZÚ, VN České Budějovice	7	4,0	27	15,2	143	80,8	177
2. VL Horní Planá	3	4,3	15	21,7	51	73,9	69
3. Libavá	1	2,1	3	6,3	44	91,6	48
Celkem	11	3,7	45	15,3	238	81,0	294

Tabulka 3

**Vyšetření vzorků sér na přítomnost anti FSME IgG v letech 1994 a 1995 - sérologický nálezu u osob po vakcinaci
a s onemocněním v anamnéze**

	Protektivní hladina		Hraniční hladina		Negativní hladina		Celkem
	[n]	[%]	[n]	[%]	[n]	[%]	
Počet očkových	11	57,9	5	26,3	3	15,8	19
KME v anamnéze	3	100,0	0	0,0	0	0,0	3

Tabulka 4

Postvakcinační sérologické nálezy - odběry sér provedené v období duben až březen 1995

Aktivita	Účast osob	Protektivní hladina		Hraniční hladina		Negativní hladina	
		[n]	[%]	[n]	[%]	[n]	[%]
Odběr před očkováním	73	4	5,47	16	21,91	53	72,60
Den 0 (očkování 1. dávka)	71	0	0,00	0	0,00	71	100,00
Měsíc 10 (odběr+3. dávka)	57	8	14,04	34	59,64	15	16,31
Měsíc 12 (odběr)	45	42	93,33	3	6,66	0	-

cifických IgG-protilátek. Tímto jsme z očkování vyřadili seropozitivní jedince, kteří protilátky získali přirozenou cestou, ev. vakcinací. Z celkového počtu 73 osob, zaměstnanců VL Horní Planá, jsme přímo vyřadili 4 osoby pro vysokou pozitivitu specifických protilátek. Dalším osobám bylo doporučeno očkování, protože množství protilátek v séru bylo hraniční nebo negativní. Při hodnocení nálezů jsme vycházeli z výše uvedeného schématu doporučeného výrobcem očkovací látky i diagnostické soupravy.

Vlastní očkování prováděli příslušníci epidemiologicko-mikrobiologického oddělení ve vyčleněných

prostorách VZÚ. Byla použita výše charakterizovaná vakcína FSME IMMUN Injekt.

Vždy při transportu i manipulaci s vakcínou byl důsledně zachován chladový řetězec. Při aplikaci očkovací látky jsme se striktně drželi doporučení výrobce s ohledem na kontraindikace i možné interakce. Celkově bylo 3 dávkami očkováno 60 osob, z důvodu migrace pracovní síly, event. dlouhodobé nemoci, 3. dávku neobdrželo 11 osob. Celkem se jednalo tedy o 71 očkovaných (69 před aplikací první dávky seronegativních, 2 osoby později zařazené do souboru nebyly vyšetřeny na přítomnost specifických IgG-protilátek před aplikací 1. dávky). Při

očkovaní jsme se nesetkali s žádnou vážnější lokální nebo celkovou reakcí, ojediněle očkovaní uváděli zarudnutí a bolestivost v místě vpichu, zcela ojediněle neurčitou cefaleu.

Vlastní očkování proběhlo v termínech od května 1994 do března 1995.

Sledování sérokonverze

Hladinu specifických protektivních protilátek jsme sledovali u očkovaných ve 3 vzorcích sér. Poprvé před zahájením vlastní očkovací akce (viz výše), podruhé těsně před aplikací 3. dávky očkovací látky (tedy asi 10 měsíců po aplikaci 1. dávky) a potřetí 2 měsíce po aplikaci 3. dávky (tab. 4).

Soubor očkovaných jednoznačně potvrzuje dobrou imunogenitu použité očkovací látky proti viru klíšťové meningoencefalitidy v rámci AČR. V souvislosti s námi použitým očkovacím schématem došlo k poklesu profylaktické hladiny protilátek v zimním období roku (malé riziko akvirence nákazy). Přes tento trend další booster dávka vakcíny jednoznačně aktivovala imunitní systém k tvorbě vysoké hladiny specifických protilátek. Lze zatím pouze spekulovat, jak by se zachoval organismus v případě přirozené booster dávky při napadení infikovaným klíštětem.

K prokazatelné sérokonverzi došlo u všech námi vyšetřených osob, pouze ve 3 případech byla hladina specifických protilátek nižší. U těchto osob byla doporučena další booster dávka. Předpokládáme další spolupráci s VL Horní Planá s následným vyšetřením specifických IgG-protilátek u tohoto kolektivu v jarních měsících roku 1998 s ev. aplikací 4. booster dávky u vybraných osob na základě sérologického nálezu. Tento postup ušetří jak finanční prostředky na nákup vakcíny, tak omezí nadbytečné zatěžování organismu cizorodou imunogenní látkou.

Na přelomu let 1995-1996 jsme porovnali celkem 90 vzorků sér a 10 simulovaných vzorků (různá pozitivní i negativní kontrolní séra) výše uvedenými technikami. Pouze u jednoho vzorku byl rozdílný závěr v hodnocení (hraniční x negativní). Na základě tohoto nálezu a také z důvodu značné ekonomické náročnosti dovozové soupravy (konfigurace na průkaz IgM a IgG) jsme upravili postup vyšetřování vzorků, které virologická laboratoř přijímá a vyšetřuje pro spádová zařízení a území. V současné době při suspektním onemocnění klíšťovou meningoencefalitidou nejprve používáme tuzemskou soupravu jako screening a až na jeho podkladě se rozhodujeme pro další, finančně náročnější metodiky.

Závěry

1. Séroprevalence ve skupině č. 1 - osoby bez profesního rizika onemocnění klíšťovou menin-

goencefalitidou (KME) - se v souboru pohybovala kolem 4 %. Séroprevalence ve skupině č. 2 - osoby s profesním rizikem onemocnění KME - v souboru činila 4,3 % v jihočeské a 2,1 % v moravské lokalitě (skupina č. 3). Stav, kdy není statistický rozdíl v přirozené séropozitivitě mezi populací profesně zatíženou a bez zátěže, je ovlivněn výskytem viru a promořením přenašeče v Jihočeském regionu. V Západočeském regionu byla průměrná promořenost sledované skupiny osob začátkem roku 1990 1,1 %. Séroprevalence může být v současné době také podstatně ovlivněna neuvedenou vakcinací a proběhlým onemocněním CNS.

2. Soubor očkovaných potvrdil při sledování postvakcinační protilátkové imunity dobrou imunogenitu použité očkovací látky. Z důvodu použitého očkovacího schématu došlo k poklesu profylaktické protilátkové hladiny v zimních měsících; tento pokles byl rychle vyrovnán aplikací třetí dávky očkovací látky v předepsaném termínu.

3. Byla porovnána komerční diagnostická souprava tuzemská s dovozovou, která je přímo doporučená ke sledování postvakcinační imunity výrobcem očkovací látky. Na základě vyšetření 100 vzorků těmito technikami bylo konstatováno, že z ekonomického hlediska je možno upřednostnit tuzemskou diagnostickou soupravu.

Souhrn

Na základě zjištěných sérologických nálezů (sledování séroprevalence a sérokonverze prostřednictvím přítomnosti specifických protilátek izotypu IgG, resp. total protilátek) práce potvrzuje dobrou imunogenitu používaných očkovacích látek v České republice při prevenci klíšťové meningoencefalitidy.

V rámci této práce byly zavedeny nové metodiky na principu komerčních diagnostických souprav, které jsou následně využívány pro diferenciální diagnostiku různých onemocnění.

Byla potvrzena srovnatelnost tuzemské diagnostické soupravy na průkaz všech izotypů protilátek proti viru klíšťové meningoencefalitidy s dovozovou soupravou a na základě tohoto porovnání s přihlédnutím na vysokou ekonomickou náročnost dovozu byl modifikován laboratorní postup ve virologické laboratoři.

Literatura u autora

Klíčová slova: Klíšťová meningoencefalitida; Sérologické přehledy; Sérokonverze; Specifické protilátky; Očkování; Imunogenita; Diagnostická souprava.