

# PAROTITIDA – VRACEJÍCÍ SE ONEMOCNĚNÍ

**Vlasta Štěpánová<sup>1</sup>, Miroslav Fajfr<sup>1,2</sup>,  
Lenka Plíšková<sup>3</sup>**

**Ústav klinické mikrobiologie<sup>1</sup>, Ústav klinické  
biochemie a diagnostiky<sup>3</sup>, Fakultní nemocnice  
Hradec Králové,**

**Fakulta vojenského zdravotnictví Hradec Králové,  
Univerzity obrany Brno<sup>2</sup>**

# ÚVOD

- Před zavedením očkování proti parotitidě - séroprevalence po přirozeném onemocnění u dětí do 15 let více než 90%
- Po zavedení očkování - incidence parotitidy významně klesla
- Poslední dekáda 20. století , USA, další země – outbreaky příušnic u dospívajících a mladých dospělých regulérně očkovaných dvěma dávkami očkovací látky
- Od r. 2003 i v ČR - rychlý vzestup počtu onemocnění parotitidou u očkovaných dětí a mladých dospělých
  
- Náš příspěvek představuje retrospektivní studii o výskytu parotitidy ve východních Čechách založenou na využití sérologických metod a PCR v letech 2007 až 2012 a nálezy srovnává s výsledky získanými v naší starší studii z let 1997 až 2005
- Možnosti sérologické dg. onemocnění parotitis epid. u očkovaných



# ÚVOD

- **Přirozená infekce** - tvorba specifických protilátek nejprve proti solubilnímu antigenu S (≈nukleoprotein) 3 až 7 dnů po začátku onemocnění, detekovány až 6 měsíců po infekci (KFR)
- Protilátky proti V antigenu (obalovým HN glykoproteinu a glykoproteinu F) - 2 až 4 týdny po začátku infekce → virus neutralizační (VN), hemaglutinačně inhibiční (HI) protilátky → blokují adsorpci virionu na buněčné receptory membrány hostitelské buňky → **protekční imunita**
- Prožitá infekce probíhající pod klinickým obrazem nebo i subklinicky zanechává doživotní imunitu
- **Specifický IgM imunoglobulin** - produkován již od 3. až 4. dne po začátku klinických příznaků akutní infekce, nejvyšší hladiny dosahuje v prvním až druhém týdnu po začátku klinických příznaků, detekován po dobu 2 - 3 měsíce po infekci
- **Specifické IgG protilátky** se objevují po týdnu po začátku klinických příznaků - představují marker prodělané infekce nebo stav po očkování

# EPIDEMIOLOGIE

- Před zavedením očkování - 90% onemocnění u dětí mladších 15 let věku
- Infekce byly nejčastější na konci zimy a na jaře
- Epidemie před zavedením očkování - ve 2 až 4 - 5letých cyklech
- Poslední sérologické přehledy v ČR v roce 1996 a 2001 (projekty 16 zemí Evropské unie, European Seroepidemiological Network, ESEN a ESEN 2 – informace o proočkovánosti, stavu imunity jak u neočkovaných tak u očkovaných jedinců)
- Současná epidemie příušnic v evropských zemích (př. UK 2005 - cca 56 000 převážně mladých dospělých, očkování)
- Hlavní izolovaný kmen - virus parotitidy genotyp G, D (vakcinační kmen Jeryl Lynn – genotyp A)

# VIROLOGICKÁ DIAGNOSTIKA

- Základní metoda současné rutinní diagnostiky příušnic - **sérologické metody**
- **ELISA** – detekce protilátek predominantně reagujících s core proteiny viru (ne s povrchovými proteiny jako např. HN antigeny, které jsou cílem VN protilátek)
- Klasické metody HIT, VNT – protekční IgG protilátky, rutinně ne
- **Sérologická diagnostika akutního onemocnění: párová séra**
- průkaz specifických IgM protilátek v séru  
a/nebo **signifikantního 4 násobného vzestupu titru specifických IgG protilátek v séru odebraném za 2 až 3 týdny po začátku onemocnění**

# VIROLOGICKÁ DIAGNOSTIKA

- **Přímý průkaz viru – PCR**
- Zavedena ve FN v r. 2005
- Nested-PCR s reverzní transkripcí (RT-n-PCR), primery z oblasti genomu kódující nukleoprotein viru
- Nezastupitelný význam - průkaz RNA přímo z likvoru – rychlost a citlivost detekovat již velmi malý počet kopií RNA (parotická meningitida)  
konfirmace – RNA ze slin



# MATERIÁL A METODY

- **Vzorky sér – retrospektivní studie 11/2007 - 06/2012**
- FN HK, ÚKM – sérologie
- ÚKBD - PCR – **likvor, sliny** (pouze konfirmace)
  
- 2409 vzorků sér od 1945 pacientů z oblasti východních Čech
- DL, OL -1114 vzorků
- Pacienti FN – těžší, komplikovaný průběh - 1295 vzorků
  
- Séra od nevakcinovaných i vakcinovaných pacientů (narození před 1987 – skupina nevakcinovaných narození v roce 1987 a mladší – skupina vakcinovaných - sérolog. přehledy 2001, 97 % proočkovanosť)
- 1 278 vzorků od 952 pacientů vakcinovaných
- 1 131 vzorků od 993 nevakcinovaných osob



# MATERIÁL A METODY

- **Retrospektivní studie 1997 - 2005**
- Soubor vyšetřených pacientů čítal 1 006 mužů a 796 žen
- Metodika sérologie – dtto
- Metodika – průkaz RNA PCR – dtto
- Výsledky srovnatelné
- Statistické zpracování





# MATERIÁL A METODY

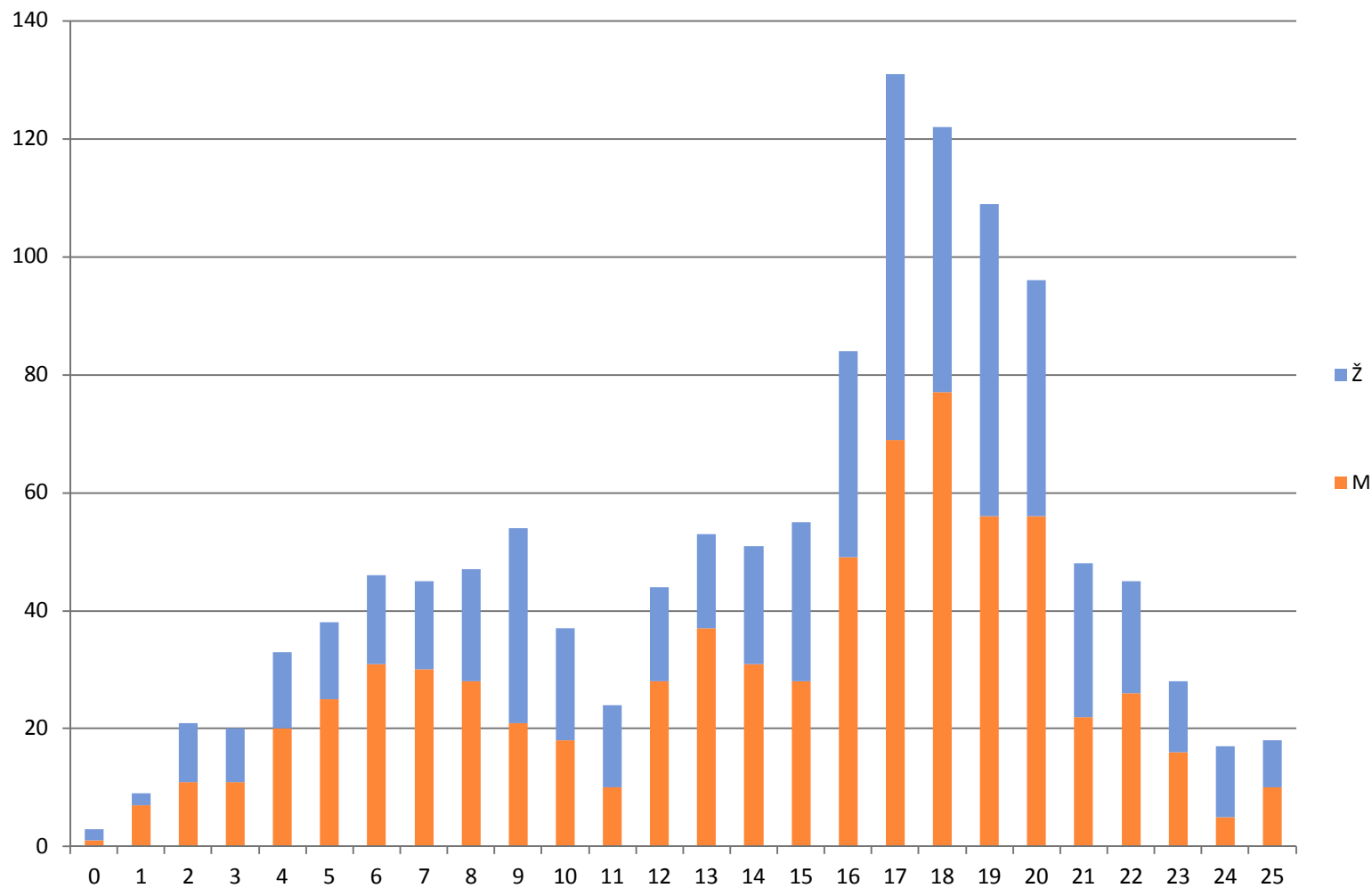
- **Sérologie**
- ELISA, RIDASCREEN Mumpsvirus IgM ,  
RIDASCREEN Mumpsvirus IgG (R-Biopharm®,  
Německo)  
semikvantitativní stanovení - U/ml  
Negativní  $\leq 24$  U/ml; Hraniční -14,0 až 24,0 U/ml;  
Pozitivní -  $\geq 24$  U/ml
- Stejný sérologický test použitý i v 1997 - 2005
- **PCR – kvalitativní in-house nested RT-PCR,  
validovaná**  
likvor – pouze u susp. parotické meningitidy,  
encefalitidy – zavedena při studii v r. 2005



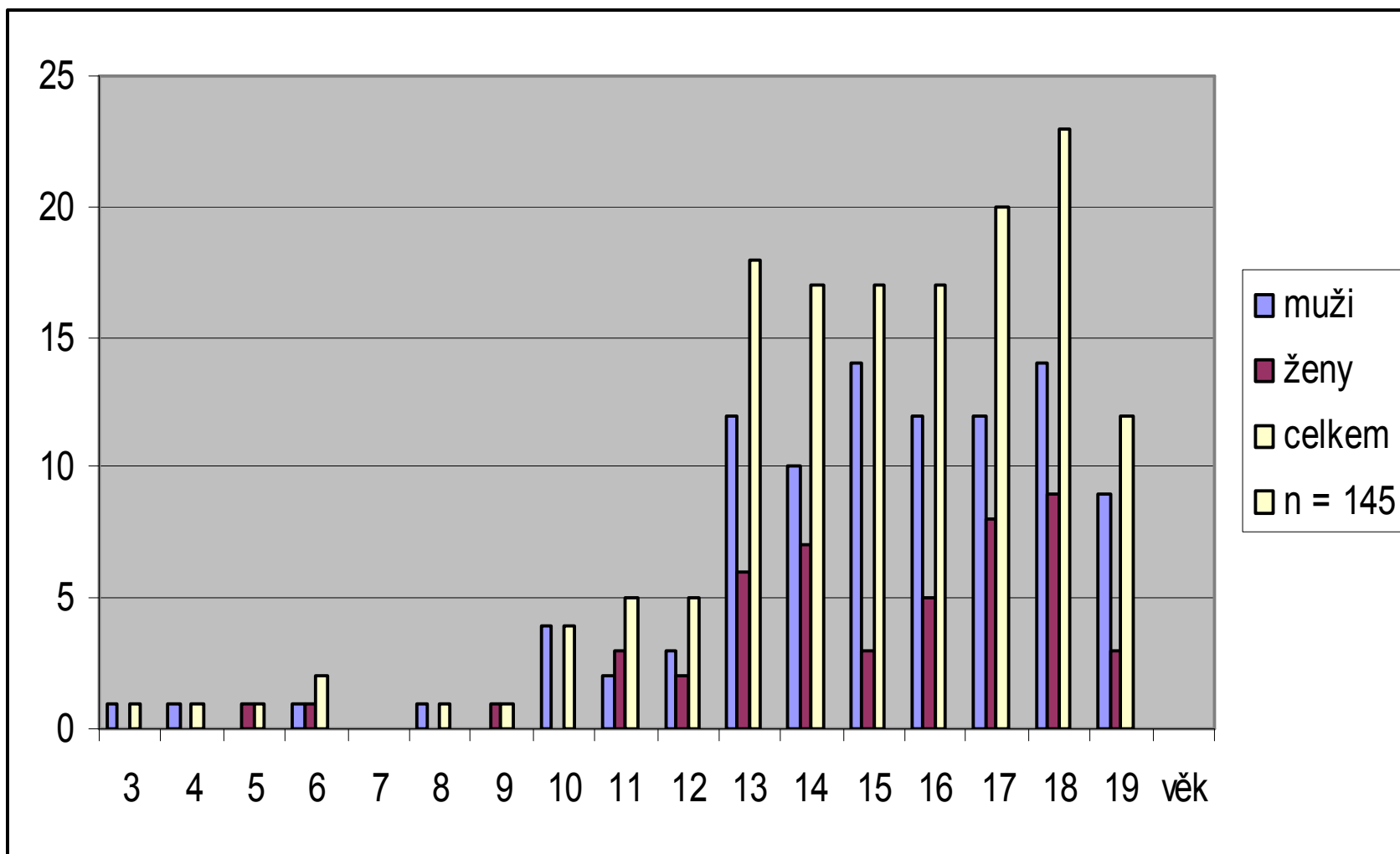
# METODY A VÝSLEDKY

- **Hodnocení sérologických nálezů – současné onemocnění**
- **A:** I. Sérum - průkaz specifických IgM (H,+,-), negativní IgG
- II. Sérum - průkaz specifických IgM (+, H), sérokonverze IgG neočkovaní; očkování - primární selhání očkování → onemocnění
- **B:** I. Sérum – negativní IgM, průkaz specifických IgG (H,+)
- II. Sérum - negativní IgM, sérokonverze IgG očkování – stávající nízká hladina specifických IgG protilátek nestačí neutralizovat virus → onemocnění
- **C:** I. Sérum – negativní IgM, průkaz specifických IgG (+)
- II. Sérum - negativní IgM, průkaz specifických IgG (+) bez signifikantního vzestupu hladiny očkování – stávající hladina specifických IgG protilátek nestačí neutralizovat virus → onemocnění
- **Konfirmace onemocnění:** Klinická diagnóza, průkaz RNA PCR
- III. vzorek séra – signifikantní vzestup hladiny IgG protilátek

# ONEMOCNĚNÍ PAROTITIS EPID. U OČKOVANÝCH 2007 – 2012 – VĚK



# ONEMOCNĚNÍ PAROTITIS EPID. U OČKOVANÝCH 2005 – VĚK



# VÝSLEDKY 2007-2012 X 2005

- Počty sérologicky prokázaných onemocnění – pouze dle hodnocení „A“ a „B“
- Nebyly zahrnuty případy bez IgM a signif. vzestupu IgG
- Počet onemocnění parotitis epid. – daleko vyšší
  
- 1997 – 2005 – ze všech vyš. očkovaných - 20,4 % sérolog. potvrzených očkovaných nemocných, maximum ve věku 13 – 18 let, větší počet muži, maximum případů – březen až červen (po celý rok)
  
- 2007 – 2012 - 22,8 % sérolog. potvrzených očkovaných nemocných, maximum ve věku 17 – 20 let, větší počet muži, maximum případů v první polovině roku

# METODY A VÝSLEDKY

- **Avidita specifických IgG protilátek:**
- Potvrzení onemocnění u očkovaných parotitidou bez průkazu IgM a sérokonverze IgG
- Přítomnost specifických IgG protilátek s **nízkou aviditou** - probíhající infekce
- Přítomnost specifických IgG protilátek s **vysokou aviditou** - současné onemocnění vyloučeno
- Fyzikální vazba mezi jednotlivým vazebným místem na protilátce a specifickým antigenním epitopem = **vazebná afinita protilátky**  
Čím vyšší je afinita  $\approx$  tím pevnější je spojení protilátky a antigenu  
Afinita protilátky stoupá s opakovanou expozicí antigenu, plazmatické bb. produkují protilátky se stoupající afinitou (pevností vazby na jednotlivé antigenní epitopy)
- **Avidita** je funkcí afinity a upevňuje se opakovanou vazbou protilátky na identické epitopy antigenu
- → Opakovaná infekce vede k rychlé produkci IgG protilátek s vysokou aviditou k danému antigenu

# METODY A VÝSLEDKY

- **Stanovení avidity IgG viru parotitidy in-house metodou** – denaturační metoda naruší vazbu IgG protilátek s nízkou aviditou na antigen viru parotitidy na povrchu jamky mikrotitrační destičky
- avidita je stanovena v % IgG , které zůstaly navázány na antigen, tzv. indexem avidity
- Liter. údaje:
- index avidity  $\leq 30\%$  = současná infekce
- index avidity ve střední hladině, 40 – 60 %
- Index avidity  $\geq 80\%$  - avidita vysoká, kdy k infekci došlo před delší dobou, v anamnéze



# VÝSLEDKY VYUŽITÍ TESTU AVIDITY IGG PROTILÁTEK

- Očkování s onemocněním parotitidou, ale sérologickou odpovědí typ C, bez sérokonverze nebo vyšetřené pouze 1. sérum odebrané na začátku onemocnění
- C: I. Sérum – negativní IgM, průkaz specifických IgG +
- II. Sérum - negativní IgM, průkaz specifických IgG +

Avidita IgG – předpoklad u onemocnění očkovaných:


Sérum I: nízká, ve střední hladině

Sérum II: vysoká

- Očkování před více lety → bez styku s Ag zůstává malý počet spec. B-bb. a plazmatických bb. → nízká nedostatečná ochranná hladina, IgG s nízkou aviditou, ve střední hladině
- II. Sérum → probíhající onemocnění → rychlá produkce IgG protilátek s vysokou afinitou k danému antigenu, protože jsou tvořeny po expanzi paměťových buněk → vysoká avidita IgG



# DISKUSE

- Stanovení avidity → zlepšení sérolog. confirmace onemocnění u očkovaných
  - Porovnání výsledků onemocnění parotitis epid. u očkovaných v r. 2007 – 2012 – srovnatelné s l. 1997 - 2005
  - Maximum případů u očkovaných – věk. skupina 17 – 20 let (2007 – 2012) x 13 – 18 let (2003, 2005) → nedostatečná hladina protektivních protilátek za 10 až 18 let po vakcinaci, zhodnocení
  - Vliv cirkulace jiného genotypu na selhání vakcíny? – současné outbreaky v Evropě a USA – genotyp G – imunitní escape? – očkovací kmen Jerryl-Lynn genotyp A
  - Nutnost molekulárně epidemiologické analýzy a surveillance
- 

# ZÁVĚR

- U cca 23 % vakcinovaných pacientů bylo onemocnění parotitidou sérologicky potvrzeno tvorbou IgM protilátek a/nebo – dvojice sér! sérokonverze/4násobný vzestup hladiny IgG protilátek
- Hodně nemocných „uteče“, vysoké hladiny IgG již v 1. séru – záleží na době odběru po začátku onemocnění
- Odběr pouze 1 vzorku séra s pozitivitou jen IgG protilátek
- Přínos stanovení avidity IgG - v 1. séru by měla být nízká avidita IgG
- Výsledky retrospektivní studie onemocnění parotitis epid. v 2007 – 2012 odpovídají nálezům z předchozí studie s maximem případů v letech 2003 a 2005 i literárním údajům

# ZÁVĚR

- Pro zlepšení surveillance a zavedení event. nové strategie očkování – nutné zhodnotit dynamiku poklesu hladiny protilátek, nejlépe virus neutralizačních a porovnat s protilátkami proti antigenům prokázanými metodou ELISA, za 10 a více let po vakcinaci
- Nutné zhodnotit význam a diskutovaný vliv genetické variability kmenů viru parotitidy



# DĚKUJI ZA POZORNOST

