

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zdravotně sociální fakulta

**Stanovení protilátek proti parotitidě a interpretace
výsledků**

bakalářská práce

Autor práce: Kateřina Nusková

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví

Studijní obor: Zdravotní laborant

Vedoucí práce: MUDr. Dana Teislerová

Datum odevzdání práce: 14. 8. 2013

Abstrakt

Stanovení protilátek proti parotidě a interpretace výsledků

Bakalářská práce je zaměřena na sérologickou diagnostiku epidemické parotitidy (příušnic) a interpretaci výsledků. Data byla získána v laboratoři virologie Nemocnice České Budějovice a.s. v období od ledna 2011 do prosince 2012.

Práce je rozdělena do dvou částí, teoretické a výzkumné.

Teoretická část zahrnuje historii onemocnění a viru. Jako první popsal příušnice Hippokrates v 5st. př. n. l. jako infekční onemocnění s otoky v blízkosti ucha a u mužů s bolestivostí a zvětšením varlat. Virus první kultivoval Habel (1945) na kuřecím embryu. Virus příušnic má velikost 150 – 200 nm, ale může dosahovat až 340 nm. Patří mezi obalené viry. Řadí se do čeledi Paramyxoviridae, podčeledi Paramyxovirinae a rodu Rubulavirus. Jediným přirozeným hostitelem je člověk. Virus parotitidy se dá prokázat nejen ze slin, ale i z mateřského mléka, krve a různých tkání. Přenáší se kapénkovou cestou, ale i kontaminovanými předměty (např. v dětských kolektivech hračkami).

Od 1.4.1987 bylo v tehdejší ČSSR zavedeno povinné očkování proti příušnicím, čímž se výrazně snížil počet onemocnění.

Vylučování viru příušnic začíná 1-3 dny před typickými klinickými projevy, kterými jsou horečka (38-41 °C) a otok jedné nebo obou příušních žláz. Mohou nastat komplikace, zejména postižení nervového systému (meningitida a meningoencefalitida, encefalitida, myelitida nebo polyradikuloneuritida) a pankreatitida. U mužů postpubertálního věku je riziko vzniku epididymitidy (bez následků neplodností), orchitidy a prostatitidy s následnou neplodností. U žen v postpubertálním věku je riziko oophoritidy. Léčba je symptomatická, pro zmírnění bolesti a snížení teploty se podávají antipyretika a analgetika. Při orchitidě a též na postižení CNS se podávají kortikosteroidy a při pankreatitidě je nutná dieta.

Laboratorní virologická diagnostika zahrnuje přímý a nepřímý průkaz. Mezi metody přímého průkazu patří kultivační metody jakými jsou izolace viru

na tkáňových kulturách (dříve izolace viru na kuřecích embryích) a průkaz virové RNA metodou RT-PCR.

Nepřímým průkazem je sérologické stanovení protilátek v současné době hlavně metodami ELISA, nepřímá imunofluorescence a nedávno vyvinutá technologie multiplex pro stanovení protilátek proti více agens současně.

Výzkumnou částí bakalářské práce bylo stanovení parotitid metodou enzymem značené imunosorbentní analýzy (ELISA) pro IgG protilátky a metodou capture ELISA pro IgM protilátky. Obě metody využívají vazbu protilátek na známý antigen viru parotitidy.

U metody ELISA je na pevné fázi navázán purifikovaný a inaktivovaný antigen viru příušnic. Po přidání vzorku (pacientského séra) se vážou k antigenu specifické imunoglobulíny. Promytím vzorků se odstraní nadbytečné proteiny. Přidá se konjugát s obsahem monoklonální protilátky proti lidskému IgG značené peroxidázou. Opět se vzorky promyjí. Po přidání peroxidázového substrátu dojde k barevné změně, která je přímo úměrná koncentraci specifických protilátek přítomných ve vzorku séra. Reakce se zastavuje pomocí roztoku kyseliny sírové a měří se ve fotometru.

U metody capture ELISA je na pevné fázi navázána monoklonální protilátka proti lidským IgM protilátkám, které zachytí protilátky IgM ze vzorku (pacientského séra). Po promytí následuje inkubace s antigenem příušnic, který je v komplexu s monoklonálními protilátkami konjugovanými s křenovou peroxidázou. Tento komplex se vychytá na specifických IgM protilátkách. Po promytí se přidá substrát, který reaguje s křenovou peroxidázou barevnou reakcí. Zbarvení je přímo úměrné množství specifických protilátek ve vzorku. Chemická reakce se zastavuje roztokem kyseliny sírové a měří se na fotometru.

Cílem výzkumné části bakalářské práce bylo zhodnocení výsledků stanovení protilátek proti parotitidě ve vzorcích od pacientů z Jihočeského kraje vyšetřených v laboratoři virologie Nemocnice České Budějovice a.s. v období od ledna 2011 do prosince 2012 a posoudit četnost výskytu v tomto regionu.

Byly stanoveny 3 hypotézy. První hypotéza předpokládala zvýšený výskyt onemocnění parotitidy v dětském věku. Podle výsledných hodnot byl výskyt u dětí

prokázán, ale zvýšený výskyt byl zaznamenán u dospívajících a dospělých jedinců. Tato hypotéza nebyla potvrzena.

Druhá hypotéza předpokládala, že někteří pacienti budou vyšetřeni opakovaně, vzhledem k náročnější laboratorní diagnostice u očkované populace. Tato hypotéza byla na základě výsledných hodnot z více odběrů potvrzena. Jelikož u většiny očkovaných pacientů byly prokázány z prvního odběru pouze protilátky IgG, byl doporučen druhý odběr za 1-2 týdny, ve kterém byly prokázány protilátky IgM.

Třetí hypotéza předpokládala séronegativní výsledky u očkované populace, která bude pravděpodobně neimunní vůči parotitis epidemica. Tato hypotéza byla potvrzena u 14,8 % mužské populace a 14,7 % ženské populace.

Výsledkem výzkumu bylo zjištění, že nejvyšší výskyt pozitivních nálezů byl u očkované populace, a to u žen ve věku 20-25 let a u mužů ve věku 16-20 let.

Zajímavé byly výsledky u nevakcinované populace, kde nejvyšší procento nemocných bylo jak u mužů, tak u žen ve věku 26-30 let.

Výsledky výzkumu mohou být použity pro virologickou laboratorní praxi, pro odborné publikace a pro potřeby vzdělávání.

Abstract

Parotitis virus antibodies testing and the interpretation of the results

The article covers diagnostics of Mumps (Epidemic Parotitis) based on the antibody testing and the interpretation of the results. Data were collected from January 2011 to December 2012 in laboratory of virology, Hospital České Budějovice.

The article is divided into a two parts, theory and investigation.

Theoretical part covers the history of the virus. Mumps were first described by Hippocrates in 5th century BC as infectious disease with swelling of the salivary glands near the ears and in adult males painful swelling of the testes was described.

The Virus was first cultured on a chick embryo by Habel (1945). The size of virion shows considerable variation. Usually the diameter is 150-200 nm, but occasionally bigger virions (up to 340 nm in diameter) are observed. The virus is enveloped. Mumps virus is taxonomically located in the family Paramyxoviridae, genus Rubellavirus. Human is the only natural host of Mumps virus. Virus can be found mainly in saliva, but occurs in maternal milk, blood and multiple organs. The virus is transmitted mainly by droplets, but transmission by contaminated toys or other items was observed.

The vaccination against Mumps was introduced in former Czechoslovakia on 1st April 1987. The vaccination significantly reduced the number of cases of the disease.

Excretion of the Mumps virus begins 1-3 days prior to typical clinical symptoms, as high fever (38-41 °C), swelling of unilateral or both parotid glands. Some complications may occur: most often the infection of central nerve system is involved (meningitis, meningoencephalitis, myelitis or polyradiculoneuritis) and pancreatitis. Postpubertal men are in risk of development of orchitis, epididymitis with infertility as the late sequelae. Adult women may develop oophoritis, but no infertility was observed.

The treatment is symptomatic. Antipyretic and analgetic treatment is given to improve the symptoms. In cases of orchitis and in severe cases of the CNS involvement, corticosteroids are administered. In cases of pancreatitis, low fat diet is necessary.

Diagnosis in the laboratory may use direct or indirect detection. The direct detection may use culture on the appropriate cell line or detection of viral RNA by RT-PCR.

Different serological tests have been used to demonstrate specific antibodies. At present, the ELISA methods are the most used. Recently developed multiplex method for detection of the antibodies to several agens in one test may be used.

The experimental part of bachelors thesis involved testing of patient's sera by the method of Enzyme Linkes Immune Sorbent Analysis (ELISA) with parotitis antigen. For detection of IgG, simple sanwich ELISA was used, for the detection of IgM capture ELISA was used.

In ELISA method for the detection of the IgG, purified, inactivated antigen of Mumps virus is bound on solid surface. Sample is added (patient serum) and specific immunoglobulins are bound on the antigen binding site. After the incubation the redundant are washed away. In next step the antibodies against human IgG, conjugated with horseradish peroxidase is added. After incubation, abundant conjugate is washed away. When the substrate is added, in positive samples change of the colour of the substrate may be observed. The reaction is topped with sulphur acid and measured on ELISA reader.

Principle of the capture ELISA is based on binding of all IgM antibodies. The anti IgM monoclonal antibody is bound on solid phase. All IgM from patient sample are captured. After the washing of the abundant proteins, mixture of the Mumps antigen and anti Mumps antibodies cojugated with horseradish peroxidase are added. This complex reacts with specific IgM. After the washing, the substrate is added and reacts in positive samples with peroxidase. Intensity of the colour depends on the amount of antibodies in the sample. The reaction is stopped by sulphur acid and the results are measured on ELISA reader.

The goal of experimental part was to evaluate the results of the testing of the Mumps antibodies in patient's samples in Hospital České Budejovice and to assess the frquency of the disease in our region. The investigation covered the period from January 2011 to December 2012.

Three hypothesis were set.

The first hypothesis presumed that most of the Mumps cases will occur in childhood. In our result, some cases in childhood were proved, but the maximum of the case was proved in young adults.

In the second hypothesis was presumed that because of the previous vaccination, the diagnosis will be more complicated and repeated testing will be necessary. This hypothesis was proved. In most of vaccinated patients with clinical Mumps, in first sample only IgG was proved and IgM occurred in second (paired) sample after 1-2 weeks.

The third hypothesis presumed, that there will be some amount of seronegative patients probably without immunity to Mumps. This was proved in 14,8 % of male and 14,7 % of female vaccinated population.

Our results showed, that highest incidence of Mumps was in vaccinated population. In females in age 20-25 years, in males in 16-20 years.

The results of the investigation can be used for laboratory practice, publication or for education.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval(a) samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených 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 – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich 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 kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 14. 8. 2013

.....

Kateřina Nusková

Poděkování

Chtěla bych poděkovat mé vedoucí bakalářské práce MUDr. Daně Teislerové za její drahocenný čas, za cenné rady a připomínky. Dále bych chtěla poděkovat celému kolektivu laboratoře virologie za jejich vstřícnost a trpělivost.

Obsah:

ÚVOD	12
1. SOUČASNÝ STAV	13
1.1 HISTORIE.....	13
1.2 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA VIRU	14
1.3 EPIDEMIOLOGIE.....	15
1.3.1 Přenos.....	16
1.3.2 Epidemiologické výskyty.....	16
1.4 PATOGENEZE	16
1.5 KLINICKÝ OBRAZ	17
1.6 KOMPLIKACE	18
1.6.1 Komplikace u mužů.....	18
1.6.2 Komplikace u žen.....	18
1.7 LÉČBA	19
1.8 PREVENCE.....	19
1.9 LABORATORNÍ VIROLOGICKÁ DIAGNOSTIKA	20
1.9.1 Přímý průkaz	20
1.9.2 Nepřímý průkaz	22
2. CÍL PRÁCE A HYPOTÉZY	24
2.1 CÍL PRÁCE.....	24
2.2 HYPOTÉZY	24
3. METODIKA	25
3.1 CHARAKTERISTIKA SOUBORU	25
3.1.1 Odběr materiálu	25
3.1.2 Zpracování materiálu v laboratoři.....	25
3.2. DIAGNOSTICKÝ PRŮKAZ PAROTITIDY	26
3.2.1 Stanovení protilátek IgG proti viru příušnic	27
3.2.2 Stanovení protilátek IgM proti viru příušnic.....	32
4. VÝSLEDKY	37
4.1 VÝSLEDKY U OČKOVANÝCH JEDINCŮ	37
4.2 VÝSLEDKY U NEOČKOVANÝCH JEDINCŮ	40
4.3 VÝSLEDKY OPAKOVANÝCH VZORKŮ	43
5. DISKUSE	54
6. ZÁVĚR	57
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	58
8. KLÍČOVÁ SLOVA	62

Seznam použitých zkratk

ELISA	enzymem značená imunosorbentní analýza
KFR	komplement - fixační reakce
VNT	virus neutralizační test
IFA	nepřímá imunofluorescence
IgG	imunoglobulin G
IgM	imunoglobulin M
PCR	polymerázová řetězová reakce
RT-PCR	polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí
DNA	deoxyribonukleová kyselina
RNA	ribonukleová kyselina
CPE	cytopatický efekt
ml	mililitr
μl	mikrolitr
nm	nanometr
ČSSR	Československá socialistická republika

Úvod

Příušnice neboli epidemická parotitida je infekční onemocnění, které bylo popsáno již v 5. století př.n.l. Hippokratem.

Vyvolavatelem onemocnění je virus příušnic, který se řadí do čeledi Paramyxoviridae, podčeledi Paramyxovirinae a rodu Rubulavirus. Jediným přirozeným hostitelem je člověk.

Příušnice se vyskytují celosvětově, postihují zejména děti, ale mezi postižené mohou patřit i dospělí jedinci.

Typickým symptomem je otok slinných žláz a hlavními komplikacemi jsou postižení centrální nervové soustavy, slinivky břišní a pohlavních žláz.

Díky povinnému očkování, které bylo v tehdejší Československé republice zavedeno roku 1987 se výskyt onemocnění podstatně snížil.

V současnosti ale dochází ke zvýšení počtu onemocnění, a to i u vakcinované populace.

1. Současný stav

1.1 Historie

Původ virů není zcela znám. Existují tři hypotézy o původu viru. První hypotéza říká, že viry jsou potomky bakterií nebo jiných jednobuněčných organismů a jsou plodem jejich regresivního vývoje. Autorem je Green, kterého později podpořili Brunet, Lovov, V. L. Ryžkov. Tuto hypotézu vyvrací V. M. Ždanov r. 1975, jelikož nemůže objasnit původ virů obsahujících RNA i DNA. Druhá hypotéza zní, že viry pocházejí z buněk a jsou odloučenými buněčnými komponenty skupin genů, ribozomů a mitochondrií. Ta byla vyslovena Mullerem r. 1928 a později rozvinuta Darlingtonem r. 1960. Roku 1956 Bauer pokládal viry za přímé potomky cytoplasmy nebo jádra. Podle RNA jsou viriony nejbližší ribozomům. Buněčné nukleové kyseliny jsou schopné transformace z jedné skupiny buněk do druhé. Buňka, tak přijímá určitý faktor dědičnosti a získává možnost reprodukce nové nukleové kyseliny. Ale při virové infekci vstupuje do buňky exogenní faktor a narušuje životní pochody. Třetí hypotéza vychází z dávných podbuněčných forem života, které daly vznik buňce, ale i soudobým virům. Později byly schopny se přizpůsobit životu v buňkách (Djačenko et al. 1983).

Jelikož je známo, že na Zemi byly dříve rostliny než živočichové a prvními formami života byly RNA organismy, takový pohled si dovoluje vysvětlit existenci skupin virů. Tudíž RNA viry jsou pradávné a DNA jsou viry mladší (Djačenko et al. 1983).

Příušnice popsal již v 5. st. př.n.l. Hippokrates jako infekční onemocnění s otoky v blízkosti ucha a bolestivé zvětšení varlat.

Až do nedávné doby byly příušnice závažným zdravotním problémem u vojáků. Během 1. světové války byla u mužů americké a francouzské armády popisována vysoká úmrtnost na tuto infekci.

V 19. a 20. st. n.l. byla nemoc hlášena z většiny zemí světa. V roce 1934 Johnson a Goodpasture prokázali přítomnost viru ve slinách pacienta s příušnicemi.

O 11 let později Habel kultivoval virus na kuřecích embryích. V této době byly zkoušeny živé oslabené a inaktivované vakcíny na pokusných zvířatech a lidských dobrovolnících.

1.2 Obecná charakteristika viru

Název „virus“ je přeložen z latinského jazyka jako jed nebo šťáva. Většina druhů viru není vidět optickým mikroskopem.

Virová částice se nazývá virion. Bílkovinný obal virionu se nazývá kapsida podle I. G. Atabekova z roku 1971. Nukleokapsida, což je kapsida s nukleovou kyselinou, je u složitých virů označována jako nukleoprotein. Pomocí elektronového mikroskopu lze zjistit složky kapsidy nebo-li kapsomery. To jsou komplexy polypeptidových řetězců, které jsou nazývány jako chemické podjednotky a jsou dokazatelné pomocí chemických analytických metod (Djačenko et al. 1983).

Viry se rozdělují na viry obalené a neobalené. Neobalené viry nemají lipoproteinový obal a jsou tvořeny nukleokapsidou. Jsou relativně odolné, což napomáhá k přenosu infekce i nepřímým kontaktem. Obalené viry mají kromě kapsidy lipoproteinový obal.

Velikost virů se pohybuje od 20-300 nm (viry chřipky a paramyxoviry jsou velké kolem 100-300 nm).

Pro syntézu strukturní bílkoviny nejjednoduššího viru slouží informace obsažená v jednom genu. Podle rozmístění podjednotek a jejich spojení s jinými podjednotkami se podřizuje v kapsidě zákonu symetrie.

Virus příušnic se řadí do čeledi Paramyxoviridae. Na základě morfologických kritérií, proteinové aktivity a sekvenční homologie jsou viry v této čeledi rozděleny do sedmi různých rodů. Pět rodů patří do podčeledi Paramyxovirinae a dva do podčeledi Pneumovirinae (Chang et al. 2012). Virus parotitidy je společně s virem parainfluenzy 5 zařazen do rodu Rubulavirus v podčeledi Paramyxovirinae.

Viriony paramyxovirů jsou obalené sférické částice s výběžky na povrchu. Uvnitř virionů se nachází helikoidálně uspořádaná nukleokapsida (Zuckerman et al. 2004). Virus parotitidy je citlivý k lipidovým rozpouštědlům. Již po dvou hodinách při teplotě 4 °C virus v prostředí bez proteinu ztrácí 90 %-99 % své infekčnosti.

Velikost jeho virových částic se obvykle pohybuje v rozmezí 150-200 nm, ale může dosahovat až 340 nm. Některé viriony mohou obsahovat více kopií nukleokapsidy. Biologická funkce těchto „supervirionů“ není známa (Zuckerman et al. 2004). Virové částice mají následující chemické složení : < 1% hmotnosti virionu představuje RNA, 73% proteiny, 20% lipidy a 6% uhlohydráty. Lipoproteinová složka, která je obsažena v obalu viru, má schopnost štěpit mucin a vázat se na hostitelské buňky, kde dokáže poškodit membránu.

RNA je jednovláknová, nesegmentovaná a s negativní polaritou. Patří mezi obalené ssRNA viry. Genom kóduje 9 proteinů, 6 proteinů nukleokapsidy a 3 proteiny obalové. Geny jsou uspořádány takto : 3´- N – V / P / I – M – F – SH – HN – L - 5´ (Steven et al., 2012).

Virus parotitidy se vyskytuje v jediném antigenním typu poněkud příbuzným virům parainfluenzy (Votava a kol. 2003). Zkřížená reaktivita s ostatními paramyxoviry je možná.

1.3 Epidemiologie

Člověk je jediným přirozeným hostitelem. Virus parotitidy se vyskytuje v krvi, moči (kde je prokazatelný do 15 dní od počátku nemoci), mateřském mléce, různých tkáních a ve slinách, ve kterých se vyskytuje již 7 dní před projevem klinických příznaků a přetrvává ještě 9 dní od počátku nemoci.

1.3.1 Přenos

K přenosu dochází kapénkovou cestou. V dětských kolektivech může dojít k přenosu slinami, které se vyskytují na kontaminovaných předmětech (zejména hračky). Již od prvopočátku onemocnění až do vymizení otoku slinných žláz, z hlediska praktického, je nemoc infekční. Inkubační doba se uvádí 14-25 dní (Votava a kol. 2003).

1.3.2 Epidemiologické výskyty

Než se od r.1987 začalo u nás očkovat, byl výskyt příušnic běžný. Převážná většina populace onemocněla ve školním věku. Jelikož onemocnění postihovalo slinné žlázy, proto má název parotitida (zánět příušních slinných žláz). Po zavedení vakcinace roku 1987 došlo k výraznému snížení výskytu onemocnění. Poslední „velká“ epidemie před současnou byla evidována v letech 1995-1996. Od roku 1997 se příušnice v České republice vyskytovaly jen zřídka. Zřejmě není po vakcinaci celoživotní imunita, dochází k onemocnění příušnicemi i u vakcinovaných dětí a mladistvých.

Počet hlášených případů parotitidy v České republice v Epidatu (absolutně - předběžná data) :

2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
753	244	1803	5172	1297	402	357	1068	2885	3902

zdroj : Státní zdravotní ústav [on-line]

Příčinou šíření příušnic je nízká kolektivní imunita.

1.4 Patogeneze

I když ve většině případů onemocnění je typickým příznakem zduření slinných žláz, nemusí tomu tak být vždy. Vstupní bránou do organismu jsou ústa nebo nos. Virus

se nejprve pomnoží na sliznici dýchacích cest, odkud se postupně rozšiřuje do mízních uzlin a může generalizovat krevní cestou. Virus infikuje epitelie ve vývodech průšních a slinných žláz, což vede k hlavnímu klinickému příznaku parotitidy. Přes buňky chorioideálního plexu virus průšnic vstupuje do centrálního nervového systému. Virus dále postihuje ledviny, mléčné žlázy, gonády a pankreas (Votava a kol. 2003).

1.5 Klinický obraz

Ve většině případů začíná vylučování viru průšnic 1-3 dny před typickými klinickými projevy. Nejčastěji se objevují subfebrilie, bolesti hlavy, malátnost či nechutenství. Mezi typické klinické příznaky patří horečka, která se pohybuje kolem 38-41 °C a otok jedné nebo obou průšních žláz. Pokožka v místě otoku není však zarudlá, ale na dotek je měkká a teplá. Otok se postupně asymetricky zvětšuje. U dětí toto onemocnění nebývá bolestivé. U dospělých jedinců tomu bývá většinou naopak. Kvůli své velikosti oteklá průšní žláza způsobuje bolest ucha a tlak při žvýkání. Papily v oblasti ústí vývodu glandula parotis na bukální sliznici bývají zarudlé a zduřelé. V průběhu deseti dní jsou postiženy průšní žlázy, ale současně mohou být postiženy i podjazykové a podčelistní slinné žlázy. Po celou dobu postižení průšních žláz nebo i jiných orgánů trvá horečka.

Krevní obraz v laboratorních nálezech je bez nápadných odchylek, převážně se objevuje převaha lymfocytů, někdy mírná leukopenie. Ve většině případů bývají zvýšené hodnoty sérových amyláz (Havlík et al. 2002).

1.6 Komplikace

Mezi komplikace tohoto onemocnění patří postižení centrální nervové soustavy, a to aseptická meningitida nebo meningoencefalitida. Velmi vzácně se může objevit encefalitida, myelitida nebo polyradikuloneuritida, což je akutní zánětlivé postižení periferních nervů, které se projevuje svalovou slabostí neboli obrnou.

U aseptické meningitidy se v laboratorních nálezech objevuje v mozkomíšním moku zvýšené množství bílkovin a lymfocytů. Následkem postižení centrální nervové soustavy může být velice vzácně i hluchota. Další komplikací může být paréza lícního nervu.

V průběhu onemocnění příušních žláz může dojít k postižení slinivky břišní se vznikem pankreatitidy, ta se projevuje bolestí břicha, průjmem a zvracením. Její průběh je mírný a nedochází k nekróze pankreatu.

1.6.1 Komplikace u mužů

U mužů bývá až z 50 % případů onemocnění parotitis epidemica doprovázeno orchitidou a epididymitidou, vzácně i prostatitidou. Orchitida se vyskytuje u dospělých jedinců až po pubertálním věku. Otok varlat se objevuje po otoku příušních žláz za 5 až 10 dní. Od začátku onemocnění se jedná o otok pouze jednostranný. Dochází ke zvětšení varlete i nadvarlete až o dvojnásobek a více normální velikosti. Kůže v místě otoku je teplá, zarudlá a bolestivá. Bolest přetrvává i týdny po odeznění příznaků. Při edému dochází k tlakovému poškození tkáně a tkáňové ischemii, kdy může docházet až ke sterilitě.

1.6.2 Komplikace u žen

U žen v postpubertálním věku může být komplikací zánět vaječníku (oophoritida). Souvislost s neplodností nebyla však popsána. Příznakem oophoritidy bývá pánevní

bolest, kterou je důležité diferenciatně diagnosticky odlišit od pánevní bolesti doprovázející appendicitidu (Zuckerman et al. 2004).

V průběhu těhotenství může onemocnění zánětu příušních žláz vyvolávat potraty, předčasné porody, kongenitální malformace. Je možný i výskyt kožních névů, malformace zevního ucha, hydrocefalus, katarakta a stenózy střev (Velemínský a kol. 2005).

1.7 Léčba

Terapie je symptomatická, což znamená, že na oteklá místa se aplikují vlažné obklady. Pro zmírnění bolesti a ke snížení teploty se podávají analgetika a antipyretika. Kortikosteroidy se podávají při orchitidě. Celková doba léčení je 10-20 dnů. K léčbě pankreatitidy je nutná pankreatická dieta (vyloučení alkoholu, dráždivých pokrmů a přepalovaných tuků jako jsou např. smažená a pečená jídla). Podle potřeby mohou být podány antiemetika a spasmolytika.

Pacienti s diagnózou parotitis epidemica musejí být oddělení od vnímavé populace.

1.8 Prevence

Prevenčí proti parotitidě je očkování. V tehdejší Československé republice bylo roku 1987 zavedeno povinné očkování proti epidemické parotitidě a to Výnosem Ministerstva zdravotnictví ČSSR, hlavním hygienikem ČSR MUDr. Danou Zuskovou, §5 O očkování proti spalničkám a příušnicím s účinností dnem 1. 4. 1987. Teprve v roce 1991 byla první vyhláška o očkování §48/1991 Sb. Vyhláška ministerstva zdravotnictví České republiky o očkování proti přenosným nemocem. Nejprve byla používaná divakcína spolu se spalničkami a od r. 1995 se používá trivakcína s vakcínou proti spalničkám a zarděnkám. Jedná se o očkování živým atenuovaným virem. Očkuje

se od 15. měsíce věku, přeočkování se provádí ve 21. - 25. měsíci (Vyhláška Ministerstva zdravotnictví České Republiky: O očkování proti přenosným nemocem ze dne 29.1.1991 [online]).

1.9 Laboratorní virologická diagnostika

Onemocnění lze diagnostikovat virologickými laboratorními metodami přímého a nepřímého průkazu.

Mezi metody přímého průkazu patří kultivační metody a průkaz RNA viru pomocí RT-PCR.

1.9.1 Přímý průkaz

- **Izolace viru na zvířatech**

Dříve se izoloval virus průušnic na zvířatech. Schier a spol. zjistili, že po inokulaci imunnitních morčat materiálem, obsahující virus průušnic, může dojít ke zrychlené tvorbě protilátek (Edwin at al. 1974).

Technika izolace viru šla dopředu a začala se používat kuřecí embrya. Izolace viru probíhala v amniotickém vaku kuřecího embrya. Metoda byla tedy velice náročná a zdlouhavá. Průkaz infekce byl nejednoznačný, na mrtvých ani na živých embryích se nenacházely v embryonálních tkáních žádné mikroskopické ani makroskopické léze, které jsou specifické pro virus průušnic. Dalším průkazem infekce byl nález specifického hemaglutininu. Jenže nepřítomnost hemaglutininu neznamenal nepřítomnost viru. Jako složitějším, ale průkaznějším testem se ukázalo určení specifických komplementfixačních antigenů. Pozitivní výsledek bylo možné zjistit i bez přítomnosti hemaglutininu (Edwin at al. 1974).

- **Izolace viru na tkáňových kulturách**

Rychlejší a citlivější než izolace viru na kuřecích embryích se ukázala izolace viru příušnic na tkáňových kulturách. Používaly se ve většině případů opičí ledvinné buňky (VERO). Naočkované buňky byly kontrolovány každý den, kvůli cytopatickému efektu (CPE), který se objevuje u pozitivních případů již kolem šestého až sedmého dne. CPE je důsledek virového působení na buňku a jejího poškození. To se projeví zřetelnými změnami v morfologii buňky. Dochází k narušení membránové struktury lipidů v poškozené buňce a tím mohou splynout infikované buňky s neinfikovanými. Buňky s poškozenou strukturou se shlukují a jejich metabolismus se zastavuje (Blaškovič 1978). Pro kontrolu se používal hemadsorpční test. Pro identifikaci izolovaného kmene se používala inhibice hemadsorbce (HAdI) nebo neutralizační test.

- **Průkaz virové RNA**

Molekulárně-genetické metody prokazují přítomnost virové nukleové kyseliny ve vyšetřovaném vzorku. Vhodným materiálem jsou stěry ze sliznice dutiny ústní z oblasti vývodu příušní slinné žlázy, případně také z vývodu jiných postižených slinných žláz. Dále lze prokázat virovou RNA v mozkomíšním moku.

Pro stanovení viru příušnic v klinickém materiálu se využívá reverzní transkripce (RT) s následnou amplifikací. Produktem reverzní transkripce je kopie specifického úseku RNA vlákna, kplementární DNA (cDNA). Ta je termostabilní a může být použita při vysoké teplotě v procesu PCR. Klíčovým enzymem této reakce je reverzní transkriptáza.

V následující PCR dojde k dostatečnému namnožení specifického úseku nutného k průkazu přítomnosti patogena.

PCR probíhá ve třech krocích, kdy za zcela specifických teplot dojde k denuraci DNA, nasednutí specifických primerů (annealing) na DNA a v posledním kroku k elongaci (prodloužení) hledaného úseku genomu patogena. V každém novém cyklu se zdvojnásobí cílová sekvence a výsledkem je tedy exponenciální nárůst produktů amplifikace tzv. amplikonů. Ty jsou pak vizualizovány na agarózovém gelu pomocí

interkalačních látek nebo hybridizovány s oligfonukleotidovými próbami a po enzymatické reakci je výsledek hodnocen spektrofotometricky.

Základní složky PCR reakce, které umožňují specifickou amplifikaci cílové sekvence jsou nukleotidy jako stavební jednotky (obsahují báze A, C, G, T), pufr s kationty hořčíku pro vytvoření vhodného prostředí pH a soli, termostabilní Taq polymeráza (izolovaná z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*), primery tj. krátké syntetické sekvence jednovláknové DNA (komplementární sekvencím hledaného úseku genomu, které obsahují 20 až 30 bazí a jsou důležité pro zahájení syntézy DNA, mohou mít na 5' konci molekulu biotinu pro označení amplifikované DNA). Do reakce by měla být zařazena i vnitřní kontrola (IC). Je to neinfekční syntetická RNA sekvence částečně odlišná od stanovované, která váže primery stejně jako cílová RNA detekovaného agens. IC je detekována souběžně se vzorkem (firemní materiály LiferiverTM).

1.9.2 Nepřímý průkaz

Základní metodou nepřímého průkazu je sérologické stanovení protilátek.

- **Enzymem značená imunosorbentní analýza (ELISA)**

Detekují se protilátky třídy IgM, IgG nebo čtyřnásobný vzestup titru IgG protilátek (Latner et al. 2011). Běžně dostupné serologické testy jsou založeny na principu ELISA (enzymem značená imunosorbentní analýza). Tyto metody využívají vazbu protilátek na známý antigen. Komplex antigen-protilátka, který tak vznikne, je vizualizován enzymatickou reakcí. Dochází k barevné změně a její intenzita se měří ve spektrofotometru, poté se stanovuje hladina protilátek. ELISA testy lze stanovit i aviditu protilátek, pomocí které může být rozlišena primární imunitní odpověď od sekundární (Narita et al. 1998).

- **nepřímá imunofluorescence (IFA)**

Využívá protilátky značené fluoresceinem. Hodnocení probíhá pomocí fluorescenčního mikroskopu.

- **komplement-fixační reakce (KFR)**

Hodnotí čtyřnásobný vzestup IgG protilátek v párových sérech.

- **virus neutralizační test (VNT)**

Na rozdíl od technicky jednodušší a rychlejší enzymové imunoanalýzy není standardizován, je technicky i časově náročný a navíc vyžaduje velmi kvalifikovanou pracovní sílu (Mauldin et al. 2005).

- **technologie multiplex**

Tato technologie byla vyvinuta nedávno. Umožňuje stanovit protilátky proti více agens současně (Binnicker et al. 2011). Například MMRV (measles, mumps, rubella a varicella-zoster virus) IgG multiplex test, kterým lze stanovit protilátky proti spalničkám, příušnicím, zarděnkám, viru neštovic a pásového oparu (Smits et al. 2012).

Laboratorní průkaz parotitidy je u očkované populace náročnější. Na rozdíl od jasných serologických nálezů u nevakcinovaných (přítomnost IgM protilátek v séru, významné zvýšení titru IgG protilátek u párových sér) je u populace s předchozí imunitní odpovědí na virus (očkování nebo přirozená infekce) častá negativita IgM protilátek a nemusí dojít ani k významnému zvýšení titru IgG protilátek v akutním a rekonvalescentním vzorku séra (Latner et al. 2011).

2. Cíl práce a hypotézy

2.1 Cíl práce

Cílem výzkumné části bakalářské práce bylo stanovení protilátek proti parotitidě ve vzorcích od pacientů vyšetřovaných v laboratoři virologie Nemocnice České Budějovice a.s. v období 2011-2012 a jeho přínos pro laboratorní diagnostiku.

2.2 Hypotézy

H1: Předpokládám zvýšený výskyt onemocnění parotitidou v dětském kolektivu.

H2: Domnívám se, že vzhledem k náročnější laboratorní diagnostice parotitidy u očkované populace, budou někteří pacienti vyšetřeni opakovaně

H3: Předpokládám séronegativní výsledky u očkované populace, která bude pravděpodobně neimunní vůči parotitis epidemica

3. Metodika

3.1 Charakteristika souboru

Vzorky pro svou bakalářskou práci jsem zpracovávala v Nemocnici České Budějovice a.s. na pracovišti virologie, laboratoř mikrobiologie. Materiál od vyšetřovaných pacientů je z celého Jihočeského kraje nejen z nemocničních pracovišť, ale i od obvodních lékařů. Pacientská séra jsem zpracovala od ledna 2011 do konce roku 2012. Převážná většina materiálu je s diagnózou onemocnění parotitis epidemica, lymfadenitis nebo pankreatitis.

Všechna séra jsem testovala na přítomnost IgG i IgM protilátek. IgG protilátky metodou ELISA a IgM protilátky metodou capture ELISA.

3.1.1 Odběr materiálu

Na vyšetření parotitidy se získává materiál z odběru žilní krve. Zkumavka s biologickým materiálem (krev) obsahuje protisrážlivá činidla. K tomuto vyšetření se používá sérum.

3.1.2 Zpracování materiálu v laboratoři

Pro zpracování metod ELISA a capture ELISA jsem musela nejprve zkumavky se vzorky zcentrifugovat při 3000 otáčkách 3 minuty, aby se oddělila krevní složka od séra. Poté jsem v laminárním boxu z každého vzorku přepipetovala sterilní pastérovou pipetou sérum, se kterým jsem dále pracovala.

3.2. Diagnostický průkaz parotitidy

K průkazu protilátek vyšetřovaných vzorků jsem použila komerční soupravy PLATELIA™ Mumps IgG a PLATELIA™ Mumps IgM od firmy BIO-RAD.

Test, který jsem použila na vyšetření protilátek IgG proti parotitidě, je založen na principu ELISA. Na pevné fázi je navázán purifikovaný a inaktivovaný antigen viru příušnic.

Po přidání vzorku (séra) se během inkubace váží k antigenu specifické imunoglobulíny. Nereagující proteiny se odstraní promytím. Poté se přidá konjugát, který obsahuje monoklonální protilátky proti lidskému IgG, které jsou značené peroxidázou. Aby mohlo vzniknout zbarvení úměrné koncentraci specifických protilátek přítomných ve vzorku séra, musí se přidat peroxidázový substrát a zastavit chemickou reakci pomocí roztoku kyseliny sírové zastaví chemickou reakci (Berbers et al. 1993).

Test, který jsem použila k vyšetření protilátek IgM proti viru příušnic, je založen na principu capture ELISA. Na pevné fázi jsou navázané monoklonální protilátky proti lidským IgM protilátkám, které zachytí protilátky IgM ze séra.

Poté dochází k inkubaci s antigenem příušnic, který je v komplexu s monoklonálními protilátkami konjugovanými s křenovou peroxidázou. Tento komplex vychytává specifické protilátky IgM pro antigen a pomocí peroxidázového substrátu se barevně zviditelní. Roztokem kyseliny sírové se zastaví reakce a vytvoří se žluté zbarvení, které je úměrné množství specifických protilátek přítomných ve vzorku (Berbers et al. 1993).

3.2.1 Stanovení protilátek IgG proti viru příušnic

Ke zpracování vzorků jsem si musela nejprve vytemperovat komerční soupravu na pokojovou teplotu.

Souprava obsahuje :

- stripy potažené virem příušnic
- promývací roztok WASH BUF, což je 10x koncentrovaný fyziologický roztok, který jsem si musela naředit 1:10 destilovanou vodou
- ředící roztok pro séra Sample Diluent 2, který je hotový v soupravě k přímému použití
- pozitivní kontrolu
- cut-off kontrolu
- negativní kontrolu
- konjugát (monoklonální protilátka proti lidskému IgG značená peroxidázou)
- substrát
- zastavovací roztok STOP Solution (0,3 mol/l H₂SO₄)
- fólii na zakrytí stripů

1) V prvním kroku jsem si naředila vyšetřovaná séra 1:101. Do každé sterilní zkumavky jsem napipetovala 1 ml ředícího roztoku, do kterého jsem připipetovala 10 µl vyšetřovaného séra (viz obr. č. 1).

Obrázek č. 1: vlastní zdroj



2) Připravila jsem si stripy a do jednotlivých jamek jsem napipetovala 100 μ l kontrol a naředěných sér (viz obr. č. 2)



Obrázek č. 2 : vlastní zdroj

3) Mikrotitrační destičku se vzorky jsem vložila na 45 minut do inkubátoru při 37 °C a přelepila fólií, aby nedošlo ke ztrátě (vypaření) vzorků a kontrol (viz obr. č. 3).

Orázek č. 3 : inkubátor firmy BIOSAN

Zdroj: vlastní zdroj



4) Po uplynutí doby jsem odstranila fólii a jamky 4x promyla promývacím roztokem za pomoci promývačky Columbus TECAN (viz obr. č. 4).

Orázek č. 4 : promývačka Columbus TECAN

zdroj: vlastní zdroj



5) Dále jsem do každé jamky napipetovala 100 μ l konjugátu (viz obr. č. 5) a opět jsem přelepila destičku fólií a vložila do inkubátoru na 45 minut při 37 °C.

Obrázek č.5: vlastní zdroj



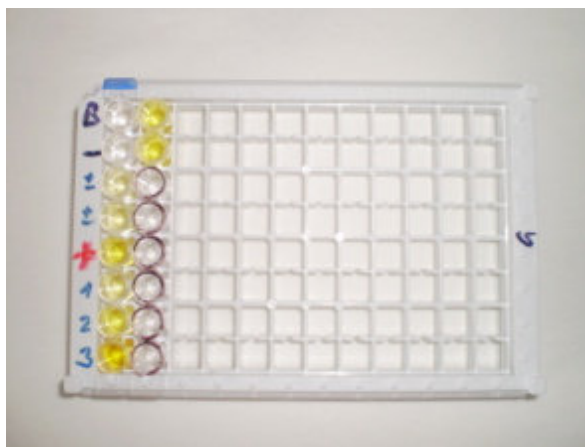
6) V dalším kroku jsem po sejmutí ochranné fólie destičku 4x promyla promývacím roztokem. Do jamek jsem napipetovala 100 μ l substrátu (viz obr. č. 6) a inkubovala jsem ve tmě při pokojové teplotě 15 minut.

Obrázek č. 6: vlastní zdroj



7) Když uplynulo 15 minut zastavila jsem průběh reakce zastavovacím roztokem 100 μ l do každé jamky (viz obr. č.7).

Obrázek č. 7: vlastní zdroj



8) Destičku jsem dala do spektrofotometru (viz obr. č. 8) a měřila jsem absorbanci při vlnové délce 450 nm.

Obrázek č. 8: Spektrofotometr BIOTEK

Zdroj: vlastní zdroj



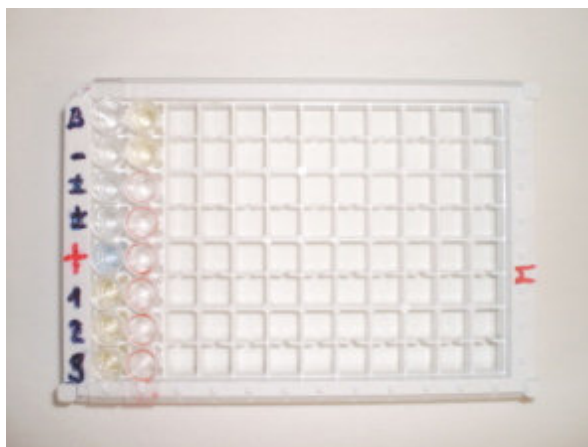
3.2.2 Stanovení protilátek IgM proti viru příušnic

Souprava obsahuje :

- mikrotitrační destičku potaženou monoklonální protilátkou proti lidskému IgM
- pozitivní kontrolu
- cutt-off kontrolu
- negativní kontrolu
- 3 lahvičky Antigenu obsahující lyofilizovaný prášek
- konjugát (monoklonální protilátka značená peroxidázou)
- promývací roztok WASH BUF (10x koncentrovaný fyziologický roztok)
- ředící roztok SAMPL DIL 2
- zastavovací roztok STOP Solution (0,3 mol/l H₂SO₄)
- fólii na zakrytí stripů

1) Stejně jako u stanovení protilátek IgG v prvním kroku jsem si naředila séra ředícím roztokem v poměru 1:101. Do jednotlivých jamek mikrotitrační destičky jsem napipetovala 100μl kontrol a naředěných sér (viz obr. č. 9).

Obrázek č. 9: vlastní zdroj



2) Inkubovala jsem 45 minut při 37 °C přelepené fólií v termostatu. Mezitím jsem si připravila imunokomplex a to tak, že jsem do lahvičky s antigenem napipetovala 3 ml konjugátu, aby se mi rozpustil do dalšího kroku. Po 45 minutách jsem z destičky sejmula fólii a 4x promyla jamky promývacím roztokem, který jsem si již naředila 10:1 destilovanou vodou již u stanovení protilátek IgG. Naředěný imunokomplex jsem napipetovala do každé jamky po 100 μ l (viz obr. č.10), přelepila jsem fólií a vložila do inkubátoru opět při 37 °C na 45 minut.

Obrázek č. 10: vlastní zdroj



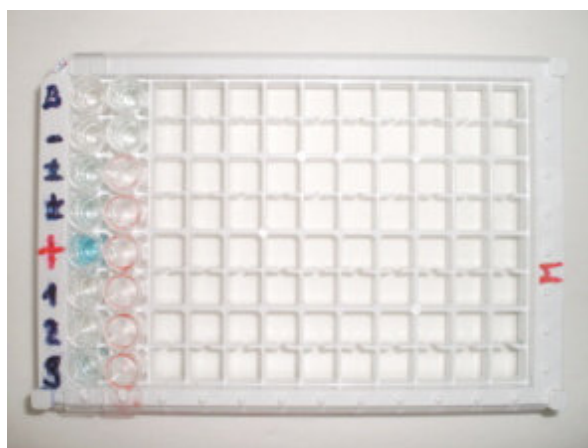
3) Když uplynula doba inkubace znovu po odejmutí fólie jsem 4x promyla jamky promývacím roztokem (viz obr. č. 11).

Obrázek č. 11 : promývačka Columbus TECAN

zdroj: vlastní foto



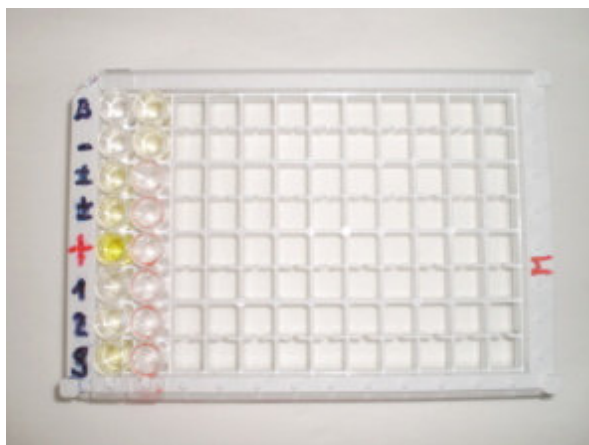
4) Dále jsem do každé jamky napipetovala 100 μ l substrátu (viz obr. č. 12) a dala na 15 minut inkubovat do temné komory.



Obrázek č. 12: vlastní zdroj

5) Pak jsem zastavila průběh reakce napipetováním 100 μ l zastavovacího roztoku (viz obr. č. 13).

Obrázek č. 13: vlastní zdroj



6) Mikrotitrační destičku se vzorky jsem vložila do spektrofotometru a změřila jsem absorbanci při vlnové délce 450 nm (viz obr. č.14).

Obrázek č. 14: Spektrofotometr BIOTEK

Zdroj: vlastní zdroj



Výsledky pro stanovení protilátek IgG i IgM proti viru průšnic vyhodnotil počítačový program na základě výpočtu poměru mezi optickou denzitou (OD) vzorku a OD cutt-of. Výsledky jsou tedy vyhodnoceny v arbitrálních jednotkách. Pro přehlednost a zjednodušení se v laboratoři virologie vydávají výsledky semikvantitativně :

Arbitrální jednotky	hodnocení
< 0,8	negativní
0,8-1,2	hraniční
1,2-2	pozit.+
2-5	pozit.++
>5	pozit. +++

Výsledky vyhodnocené jako hraniční, doporučuje laboratoř opakovat, jelikož se jedná o nejednoznačný nález.

mikrotitrační destička

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BL	vz.4										
B	KO-	vz.5										
C	CO	vz.6										
D	CO	vz.7										
E	KO+	vz.8										
F	vz.1	vz.9										
G	vz.2	vz.10										
H	vz.3	vz.11	19	27	35	43	51	59	67	75	83	91

4. Výsledky

Od ledna 2011 až do konce roku 2012 jsem zpracovala v laboratoři virologie (nemocnice ČB a.s.) celkem 646 vzorků. Výsledky mého výzkumu jsem zanesla do tabulek a graficky.

Z celkového počtu 646 pacientů je 112, od kterých laboratoř virologie získala druhý vzorek. Tudíž zpracovaných jen jednou je 534 vzorků.

pohlaví	věk	počet vzorků
muži	0-73	310
ženy	0-90	224
Celkem	-	534

4.1 Výsledky u očkováných jedinců

Jelikož je povinné očkování proti parotitis epidemica od roku 1987, lze předpokládat, že všechna séra od pacientů narozených po roce 1987 (t. j. ve věku do 25 let) jsou od očkováných jedinců. Celkový počet očkováných jedinců je 325 za rok 2011-2012 v Jihočeském kraji.

- ✓ Výsledné hodnoty u očkováných jedinců ženského pohlaví za rok 2011-2012 v Jihočeském kraji :

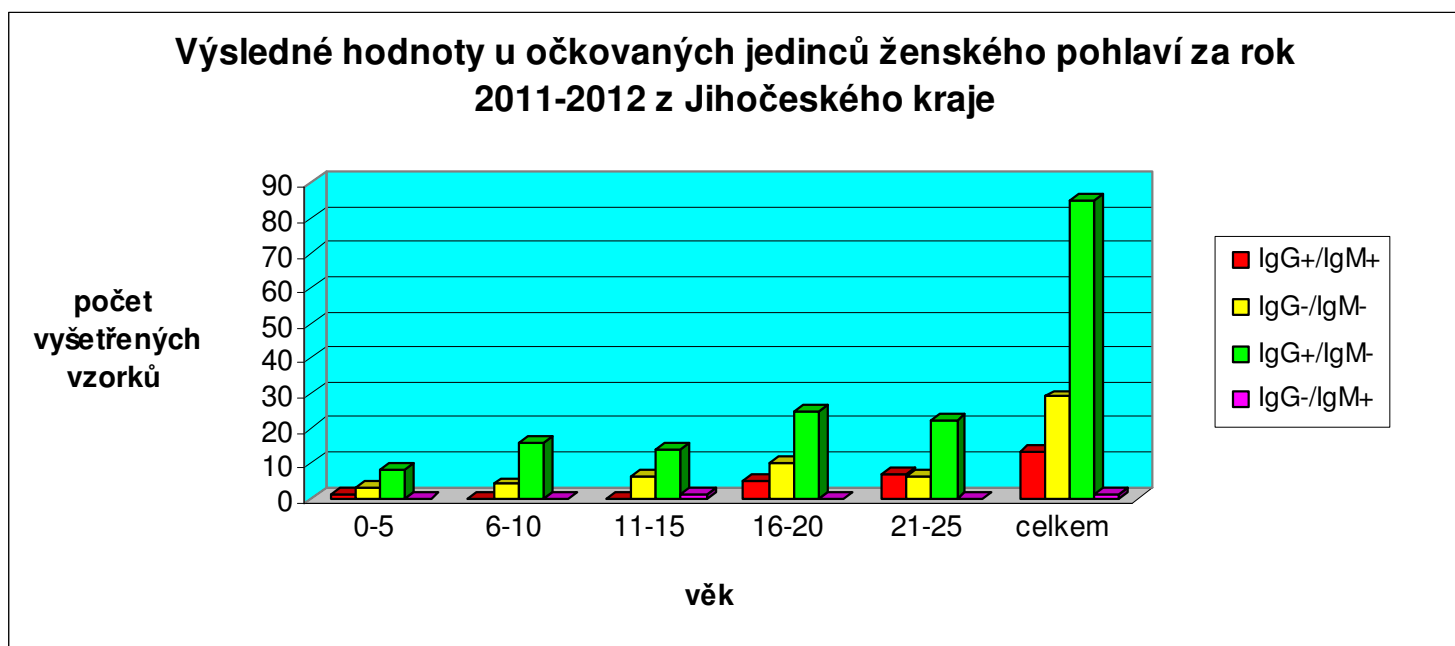
Tabulka č. 1:

věk	IgG+/IgM+	IgG-/IgM-	IgG+/IgM-	IgG-/IgM+	% pozit.IgM
0-5	1	3	8	0	7,15
6-10	0	4	16	0	0
11-15	0	6	14	1	7,15
16-20	5	10	25	0	35,7
21-25	7	6	22	0	50
celkem	13	29	85	1	100

V tabulce č.1 jsou výsledky očkované populace žen za rok 2011-2012 v Jihočeském kraji, kde se prokázalo nejvíce nemocných ve věku 21-25 let (50 %). Poté ve věku 16-20 let (35,7 %), následně ve věku 11-15 let (7,15 %) a 0-5 let (7,15 %). Ve věku 6-10 let nebyla parotitida prokázána.

Graf č. 1:

Zdroj: vlastní výzkum



✓ Výsledné hodnoty u očkováných jedinců mužského pohlaví za rok 2011-2012 v Jihočeském kraji :

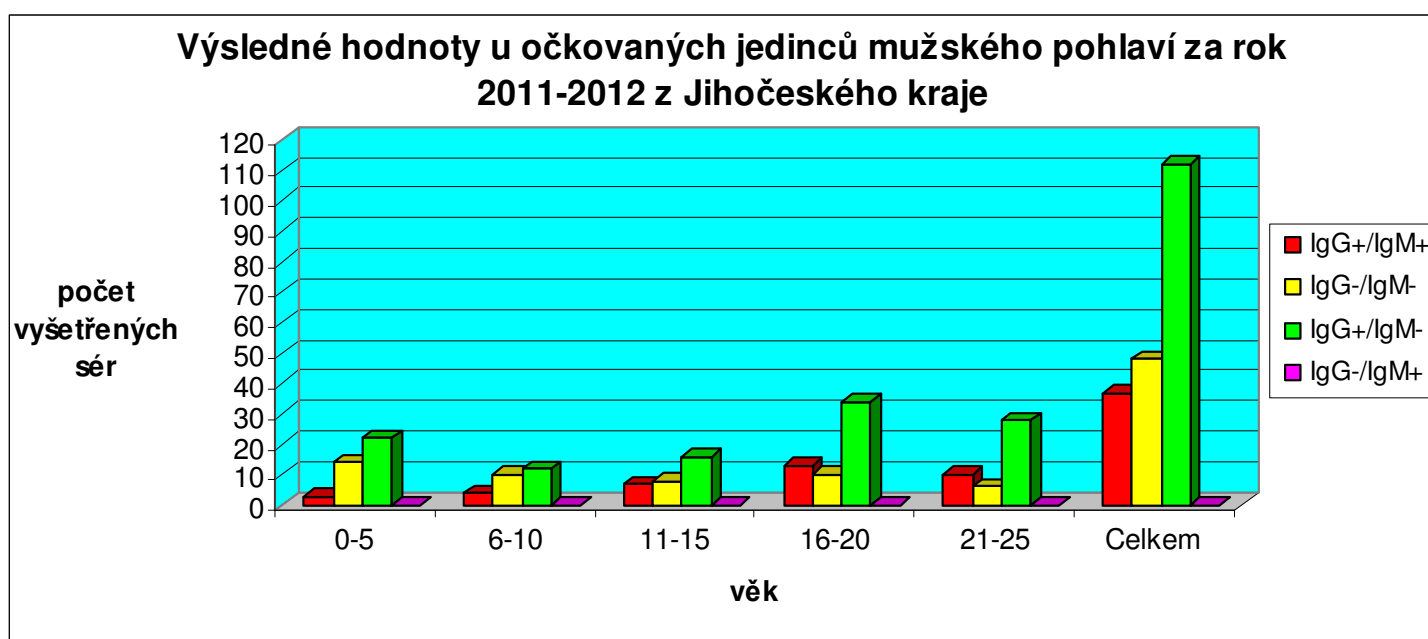
Tabulka č. 2:

věk	IgG+/IgM+	IgG-/IgM-	IgG+/IgM-	IgG-/IgM+	% pozit.IgM
0-5	3	14	22	0	8,1
6-10	4	10	12	0	10,8
11-15	7	8	16	0	18,9
16-20	13	10	34	0	35,2
21-25	10	6	28	0	27
Celkem	37	48	112	0	100

V tabulce č. 2 jsou výsledné hodnoty očkované populace mužů za rok 2011-2012 v Jihočeském kraji, kde bylo prokázáno nejvíce nemocných ve věku 16-20 let (35,2 %), dále ve věku 21-25 let (27 %), 11-15 let (18,9 %), 6-10 let (10,8 %) a v neposlední řadě i děti do 5 roku života (8,1 %).

Graf č. 2:

Zdroj: vlastní výzkum



4.2 Výsledky u neočkovaných jedinců

Celkový počet zpracovaných vzorků za rok 2011-2012 od neočkovaných jedinců je 209. Jelikož je povinné očkování od roku 1987, do této věkové kategorie tedy spadají jen dospělí jedinci.

✓ Výsledné hodnoty u neočkovaných jedinců mužského pohlaví za rok 2011-2012 v Jihočeském kraji :

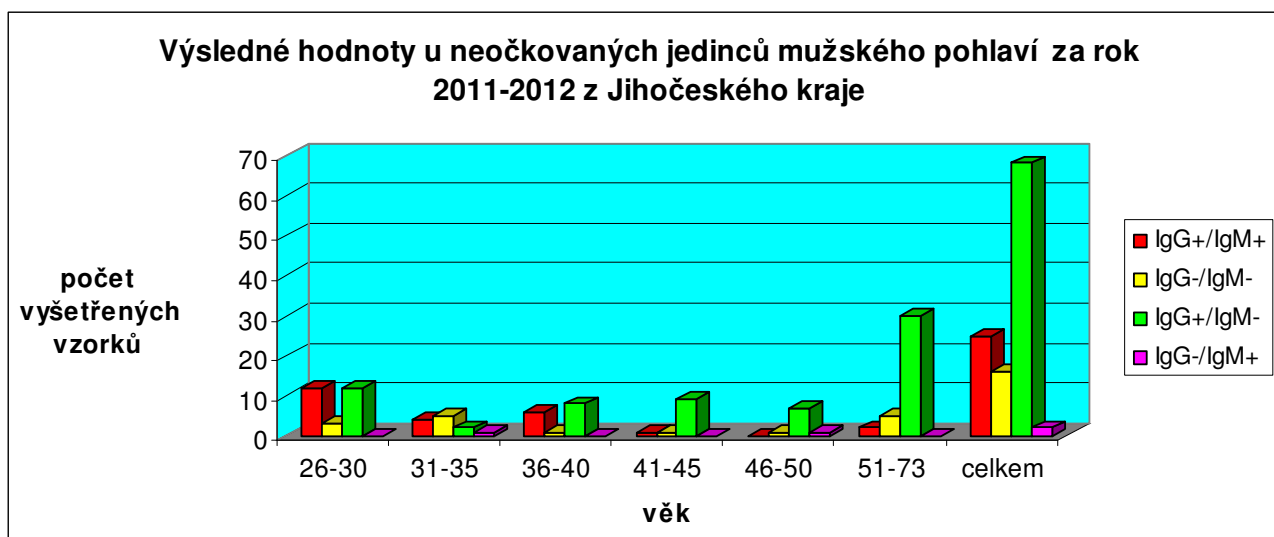
Tabulka č. 3:

věk	IgG+/IgM+	IgG-/IgM-	IgG+/IgM-	IgG-/IgM+	% pozit.IgM
26-30	12	3	12	0	44,5
31-35	4	5	2	1	18,5
36-40	6	1	8	0	22,2
41-45	1	1	9	0	3,7
46-50	0	1	7	1	3,7
51-73	2	5	30	0	7,4
celkem	25	16	68	2	100

V tabulce č. 3 jsou výsledné hodnoty neočkované populace mužů, kde bylo prokázáno, že nejvíce jich onemocnělo parotitidou ve věku 26-30 let (44,5 %), dále pak ve věku 36-40 let (22,2 %), 31-35 let (18,5 %), 51-73 let (7,4 %) a nejméně onemocněli ve věku 41-45 let (3,7 %) a 46-50 let (3,7 %).

Graf č. 3:

Zdroj: vlastní výzkum



✓ **Výsledné hodnoty u neočkovaných jedinců ženského pohlaví za rok 2011-2012 v Jihočeském kraji :**

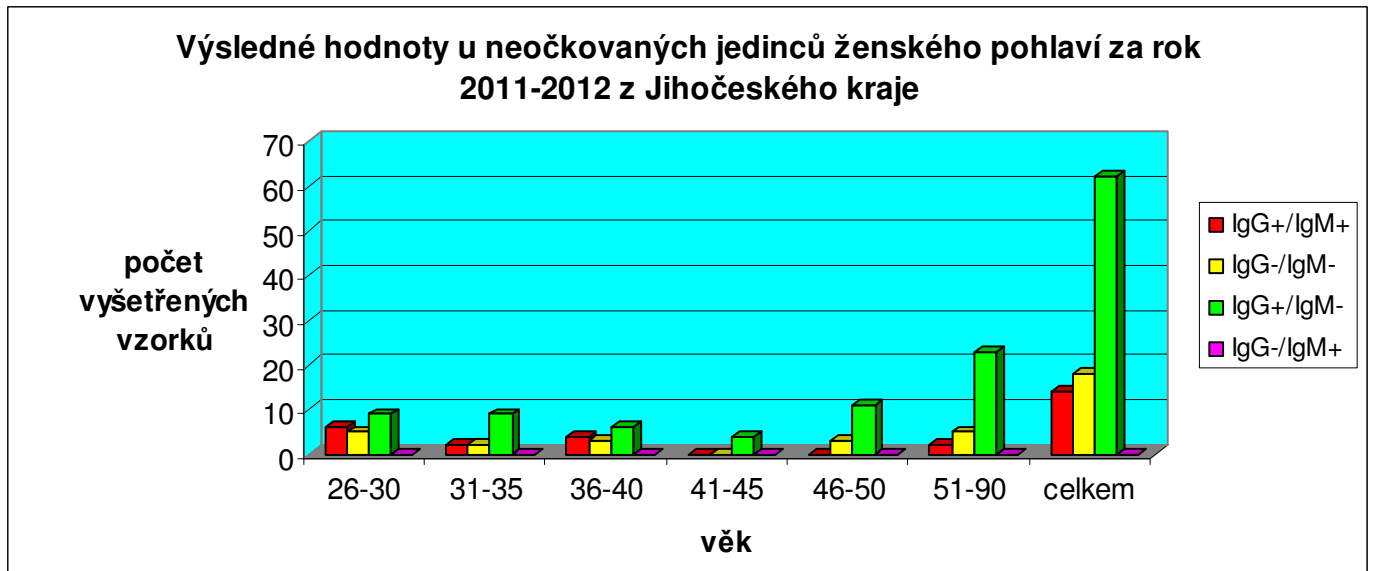
Tabulka č. 4:

věk	IgG+/IgM+	IgG-/IgM-	IgG+/IgM-	IgG-/IgM+	% pozit.IgM
26-30	6	5	9	0	42,9
31-35	2	2	9	0	14,25
36-40	4	3	6	0	28,6
41-45	0	0	4	0	0
46-50	0	3	11	0	0
51-90	2	5	23	0	14,25
celkem	14	18	62	0	100

V tabulce č. 4 jsou výsledné hodnoty neočkované populace žen, kde bylo prokázáno, že nejvíce žen onemocnělo parotitidou ve věku 26-30 let (42,9 %), dále pak ve věku 36-40 let (28,6 %), 31-35 let (14,25 %), 51-90 let (14,25 %).

Graf č. 4:

Zdroj: vlastní výzkum



4.3 Výsledky opakovaných vzorků

Zpracováno 224 vzorků ze dvou odběrů.

pohlaví	věk	počet vzorků
muži	0-70	62
ženy	0-74	50
Celkem	-	112

- ✓ Výsledné hodnoty opakovaných vzorků u jedinců mužského pohlaví za rok 2011-2012 v Jihočeském kraji :

Tabulka č. 5:

Muži ve věku 0-5 let				
1. odběr		2. odběr		
		<i>IgG+/IgM+</i>	<i>IgG+/IgM-</i>	<i>IgG-/IgM-</i>
<i>IgG+/IgM+</i>	1	1	0	0
<i>IgG+/IgM-</i>	6	2	4	0
<i>IgG-/IgM-</i>	2	0	0	2
<i>celkem</i>	9	3	4	2

V tabulce č. 5 je z prvního odběru 6 dětí ve věku 0-5 let s pozitivními protilátkami IgG a negativními IgM, v druhém odběru se u dvou případů objevily pozitivní protilátky IgM spolu s protilátkami IgG.

- Muži ve věku 6-10 let nebyli zpracováni ze dvou odběrů.

Tabulka č. 6:

Muži ve věku 11-15 let				
1. odběr		2. odběr		
		<i>IgG+/IgM+</i>	<i>IgG+/IgM-</i>	<i>IgG-/IgM-</i>
<i>IgG+/IgM+</i>	1	1	0	0
<i>IgG+/IgM-</i>	8	1	7	0
<i>IgG-/IgM-</i>	1	0	1	0
<i>celkem</i>	10	2	8	0

V tabulce č. 6 je osm dětí ve věku 11-15 let s pozitivními protilátkami IgG a negativními protilátkami IgM. V jednom případě se z druhého odběru kromě pozitivních IgG objevily ještě pozitivní protilátky IgM. U sedmi případů se v druhém odběru výsledné hodnoty nemění.

Tabulka č. 7:

Muži ve věku 16-20 let				
1. odběr		2. odběr		
		<i>IgG+/IgM+</i>	<i>IgG+/IgM-</i>	<i>IgG-/IgM-</i>
<i>IgG+/IgM+</i>	1	1	0	0
<i>IgG+/IgM-</i>	21	8	13	0
<i>IgG-/IgM-</i>	1	0	0	1
<i>IgG-/IgM+</i>	1	1	0	0
<i>celkem</i>	24	10	13	1

V tabulce č. 7 je 21 chlapců ve věku 16-20 let, kteří měli v prvním odběru pozitivní protilátky IgG a negativní protilátky IgM, z druhého odběru přetrvávají protilátky IgG avšak v 8 případech se objevily i protilátky IgM. U jednoho jedince se z prvního odběru zachytily protilátky IgM a druhém odběru i protilátky IgG, což odpovídá typické sérologické protilátkové odpovědi.

Tabulka č. 8:

Muži ve věku 21-25 let				
1. odběr		2. odběr		
		<i>IgG+/IgM+</i>	<i>IgG+/IgM-</i>	<i>IgG-/IgM-</i>
<i>IgG+/IgM+</i>	1	1	0	0
<i>IgG+/IgM-</i>	3	1	1	1
<i>IgG-/IgM-</i>	1	0	1	0
<i>celkem</i>	5	2	2	1

V tabulce č. 8 jsou 3 muži ve věku 21-25 let, kteří měli v prvním odběru pozitivní IgG protilátky, avšak v druhém odběru u jednoho jedince protilátky úplně vymizely, u dalšího jedince přetrvaly a objevily se i protilátky IgM a u třetího jedince nenastala žádná změna. U jednoho muže v prvním odběru nebyly žádné protilátky a v druhém odběru se prokázaly protilátky IgG.

Tabulka č. 9:

Muži ve věku 26-30 let				
1. odběr		2. odběr		
		<i>IgG+/IgM+</i>	<i>IgG+/IgM-</i>	<i>IgG-/IgM-</i>
<i>IgG+/IgM+</i>	1	1	0	0
<i>IgG+/IgM-</i>	1	0	1	0
<i>IgG-/IgM-</i>	2	0	0	2
<i>celkem</i>	4	1	1	2

V tabulce č. 9 u mužů ve věku 26-30 let není rozdíl mezi prvním a druhým odběrem.

Tabulka č. 10:

Muži ve věku 31-35 let				
1. odběr		2. odběr		
		<i>IgG+/IgM+</i>	<i>IgG+/IgM-</i>	<i>IgG-/IgM-</i>
<i>IgG+/IgM+</i>	1	1	0	0
<i>IgG+/IgM-</i>	2	0	2	0
<i>IgG-/IgM-</i>	1	0	0	1
<i>celkem</i>	4	1	2	1

V tabulce č. 10 u mužů ve věku 31-35 let není rozdíl mezi prvním a druhým odběrem

Tabulka č. 11:

Muži ve věku 36-40 let				
1. odběr		2. odběr		
		<i>IgG+/IgM+</i>	<i>IgG+/IgM-</i>	<i>IgG-/IgM-</i>
<i>IgG+/IgM+</i>	0	0	0	0
<i>IgG+/IgM-</i>	0	0	0	0
<i>IgG-/IgM-</i>	1	0	0	1
<i>celkem</i>	1	0	0	1

V tabulce č. 11 u mužů ve věku 36-40 let není rozdíl mezi prvním a druhým odběrem

Tabulka č. 12:

Muži ve věku 41-50 let				
1. odběr		2. odběr		
		<i>IgG+/IgM+</i>	<i>IgG+/IgM-</i>	<i>IgG-/IgM-</i>
<i>IgG+/IgM+</i>	0	0	0	0
<i>IgG+/IgM-</i>	1	0	1	0
<i>IgG-/IgM-</i>	0	0	0	0
<i>celkem</i>	1	0	1	0

V tabulce č. 12 u mužů ve věku 41-50 let není rozdíl mezi prvním a druhým odběrem

Tabulka č. 13:

Muži ve věku 51-70 let				
1. odběr		2. odběr		
		<i>IgG+/IgM+</i>	<i>IgG+/IgM-</i>	<i>IgG-/IgM-</i>
<i>IgG+/IgM+</i>	0	0	0	0
<i>IgG+/IgM-</i>	3	0	3	0
<i>IgG-/IgM-</i>	1	0	0	1
<i>celkem</i>	4	0	3	1

V tabulce č. 13 u mužů ve věku 51-70 let není rozdíl mezi prvním a druhým odběr

- ✓ Výsledné hodnoty opakovaných vzorků u jedinců ženského pohlaví za rok 2011-2012 v Jihočeském kraji :

Tabulka č. 14:

Ženy ve věku 0-5 let				
1. odběr		2. odběr		
		<i>IgG+/IgM+</i>	<i>IgG+/IgM-</i>	<i>IgG-/IgM-</i>
<i>IgG+/IgM+</i>	0	0	0	0
<i>IgG+/IgM-</i>	2	0	2	0
<i>IgG-/IgM-</i>	0	0	0	0
<i>celkem</i>	2	0	2	0

V tabulce č. 14 u dětí ve věku 0-5 let není rozdíl mezi prvním a druhým odběrem.

Tabulka č. 15:

Ženy ve věku 6-10 let					
1. odběr		2. odběr			<i>hraniční IgG/IgM-</i>
		<i>IgG+/IgM+</i>	<i>IgG+/IgM-</i>	<i>IgG-/IgM-</i>	
<i>IgG+/IgM+</i>	0	0	0	0	0
<i>IgG+/IgM-</i>	4	1	3	0	0
<i>IgG-/IgM-</i>	2	0	1	0	1
<i>celkem</i>	6	1	4	0	1

V tabulce č. 15 jsou děti ve věku 6-10 let. U 4 případů jsou v prvním odběru pozitivní protilátky IgG a negativní IgM protilátky, avšak v druhém odběru u jednoho jedince se vytvářejí i protilátky IgM. Dvě děti v prvním odběru byly negativní a v druhém odběru měl jeden vzorek pozitivní protilátky IgG. Druhý vzorek měl ve druhém odběru hraniční protilátky IgG.

Tabulka č. 16:

Ženy ve věku 11-15 let				
1. odběr		2. odběr		
		<i>IgG+/IgM+</i>	<i>IgG+/IgM-</i>	<i>IgG-/IgM-</i>
<i>IgG+/IgM+</i>	0	0	0	0
<i>IgG+/IgM-</i>	7	2	3	2
<i>IgG-/IgM-</i>	1	0	0	1
<i>celkem</i>	8	2	3	3

V tabulce č. 16 je 7 dětí ve věku 11-15 let, kteří měli v prvním odběru pozitivní protilátky IgG a negativní protilátky IgM. V druhém odběru u dvou jedinců protilátky nebyly prokázány, u třech případů se stav nezměnil a ve dvou případech kromě protilátek IgG, byly pozitivní i protilátky IgM.

Tabulka č. 17:

Ženy ve věku 16-20 let				
1. odběr		2. odběr		
		<i>IgG+/IgM+</i>	<i>IgG+/IgM-</i>	<i>IgG-/IgM-</i>
<i>IgG+/IgM+</i>	0	0	0	0
<i>IgG+/IgM-</i>	9	6	3	0
<i>IgG-/IgM-</i>	0	0	0	0
<i>celkem</i>	9	6	3	0

V tabulce č. 17 je 9 dívek, které měly v prvním odběru pozitivní protilátky IgG a negativní protilátky IgM. V druhém odběru se u třech z nich výsledek nezměnil, ale u 6 dívek byly kromě pozitivních protilátek pozitivní i protilátky IgM.

Tabulka č. 18:

Ženy ve věku 21-25 let				
1. odběr		2. odběr		
		<i>IgG+/IgM+</i>	<i>IgG+/IgM-</i>	<i>IgG-/IgM-</i>
<i>IgG+/IgM+</i>	0	0	0	0
<i>IgG+/IgM-</i>	5	1	4	0
<i>IgG-/IgM-</i>	1	1	0	0
<i>celkem</i>	6	2	4	0

V tabulce č. 18 je 5 žen které měly v prvním odběru pozitivní protilátky IgG a negativní protilátky IgM. V druhém odběru se u jedné z nich objevily navíc protilátky IgM a u 4 se výsledné hodnoty nezměnily. V prvním odběru je jedna žena s negativními protilátkami, která v druhém odběru měla prokázána pozitivní protilátky jak IgG, tak protilátky IgM.

Tabulka č. 19:

Ženy ve věku 26-30 let				
1. odběr		2. odběr		
		<i>IgG+/IgM+</i>	<i>IgG+/IgM-</i>	<i>IgG-/IgM-</i>
<i>IgG+/IgM+</i>	1	0	1	0
<i>IgG+/IgM-</i>	1	0	1	0
<i>IgG-/IgM-</i>	0	0	0	0
<i>IgG-/IgM+</i>	2	2	0	0
<i>celkem</i>	4	2	2	0

Tabulka č. 19 poukazuje na typickou sérologickou protilátkovou odpověď a to u 2 neočkovaných žen ve věku 26-30 let, které měly v prvním odběru pozitivní protilátky IgM a v druhém odběru se prokázaly i pozitivní protilátky IgG. Jedna žena měla v prvním odběru pozitivní protilátky jak IgG, tak i IgM a v druhém odběru vymizely protilátky IgM.

- Ženy ve věku 31-35 nebyly zpracované ze dvou odběrů.

Tabulka č. 20:

Ženy ve věku 36-40 let				
1. odběr		2. odběr		
		<i>IgG+/IgM+</i>	<i>IgG+/IgM-</i>	<i>IgG-/IgM-</i>
<i>IgG+/IgM+</i>	0	0	0	0
<i>IgG+/IgM-</i>	3	0	3	0
<i>IgG-/IgM-</i>	0	0	0	0
<i>celkem</i>	3	0	3	0

V tabulce č. 20 u žen ve věku 36-40 let není rozdíl mezi prvním a druhým odběrem.

Tabulka č. 21:

Ženy ve věku 41-50 let				
1. odběr		2. odběr		
		<i>IgG+/IgM+</i>	<i>IgG+/IgM-</i>	<i>IgG-/IgM-</i>
<i>IgG+/IgM+</i>	0	0	0	0
<i>IgG+/IgM-</i>	3	0	3	0
<i>IgG-/IgM-</i>	1	0	0	1
<i>celkem</i>	4	0	3	1

V tabulce č. 21 u žen ve věku 41-50 let není rozdíl mezi prvním a druhým odběrem.

Tabulka č. 22:

Ženy ve věku 51-74 let				
1. odběr		2. odběr		
		<i>IgG+/IgM+</i>	<i>IgG+/IgM-</i>	<i>IgG-/IgM-</i>
<i>IgG+/IgM+</i>	0	0	0	0
<i>IgG+/IgM-</i>	8	0	7	1
<i>IgG-/IgM-</i>	0	0	0	0
<i>celkem</i>	8	0	7	1

V tabulce č. 22 je 8 žen ve věku 51-74 let, které měly v prvním odběru pozitivní protilátky IgG, v druhém odběru u jedné z nich protilátky úplně vymizely.

Pro zajímavost uvádím počet pozitivních nálezů u diagnóz týkajících se onemocnění parotitidy, kterými jsou :

- příušnice-parotitis epidemica (B26)
- orchitis parotitica (B26.0)
- parotitis epidemica s jinými komplikacemi (B26.8)
- parotitis epidemica bez komplikací (B26.9)

Tabulka č.23:

diagnóza	muži	ženy	celkový počet	%
<i>B26</i>	3	2	5	6,5
<i>B26.0</i>	5	0	5	6,5
<i>B26.8</i>	7	2	9	11,7
<i>B26.9</i>	40	18	58	75,3

- Do laboratoře virologie byly zaslány vzorky pro zpracování samotných protilátek IgG. Důvodem bylo zjištění stavu imunity proti parotitidě:

Tabulka č. 24:

<i>pohlaví</i>	<i>IgG pozitivní</i>	<i>IgG negativní</i>
muži	0	2
ženy	1	1

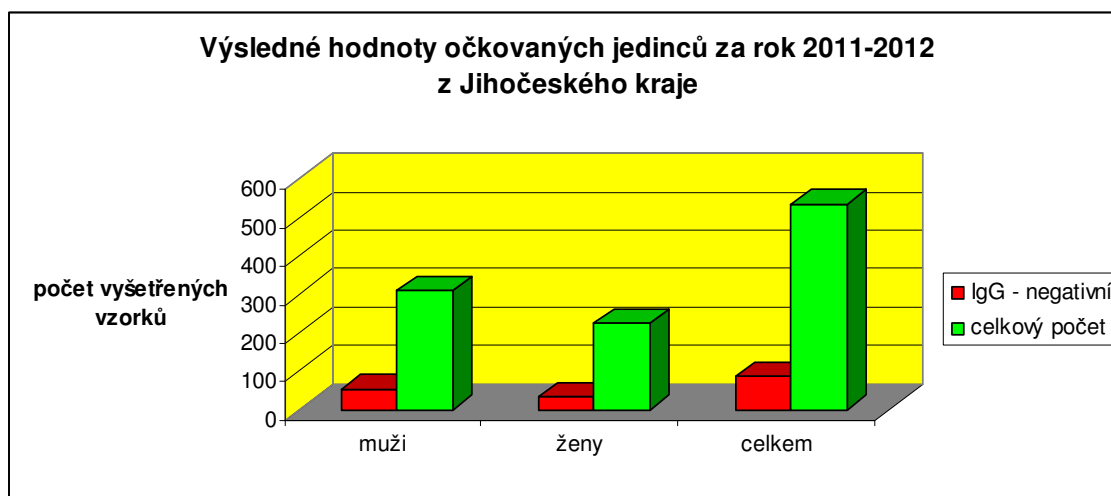
U očkovaných jedinců vyplývá předpoklad séronegativních výsledků, které budou pravděpodobně neimunní vůči parotitis epidemica (IgG negativní).

Tabulka č. 25:

	IgG - negativní	celkový počet	% séronegativních jedinců
muži	53	310	14,8
ženy	33	224	14,7
celkem	86	534	29,5

Graf č. 5:

Zdroj: vlastní výzkum



Z tabulky č. 25 vyplývá, že séronegativní výsledky u očkované populace, které budou od pravděpodobně neimunních vůči parotitis epidemica, byly potvrzeny u žen celkem 14,7 % a u mužů 14,8 %.

5. DISKUSE

V této bakalářské práci jsem zpracovala výsledky vyšetření protilátek proti parotitidě v období od ledna 2011 do prosince 2012 v laboratoři virologie Nemocnice České Budějovice a.s. Vzorky z této laboratoře pochází z celého Jihočeského kraje, to znamená nejen z nemocnic, ale i od obvodních lékařů.

Celkem jsem vyšetřila vzorky od 646 pacientů, z toho 112 opakovaně. Počet vyšetřených pacientů jen z jednoho odběru byl 534.

Z celkového počtu 534 patientských sér bylo 224 žen (42 %) ve věku 0-90 let a 310 mužů (58 %) ve věku 0-73 let. Tuto skupinu pacientů jsem rozdělila na očkované a neočkované jedince. Vzhledem k zavedení povinného očkování proti parotitidě v roce 1987, lze předpokládat, že pacienti narození po tomto roce jsou očkovaní.

Počet očkovaných pacientů ve sledovaném období byl 325. Za sérologický průkaz infekce virem parotitidy jsem považovala nález IgM protilátek. Samostatný vzestup IgG, který se rovněž považuje za průkaz infekce jsem nezaznamenala. V tabulce č.1 a grafu č.1 jsou výsledky očkované populace žen za rok 2011-2012 v Jihočeském kraji, kde se prokázalo nejvíce nemocných ve věku 21-25 let (50 %). Poté ve věku 16-20 let (35,7 %), následně ve věku 11-15 let (7,15 %) a 0-5 let (7,15 %). Ve věku 6-10 let nebyla parotitida prokázána. V tabulce č. 2 a grafu č. 2 jsou výsledné hodnoty očkované populace mužů za rok 2011-2012 v Jihočeském kraji, kde bylo prokázáno nejvíce nemocných ve věku 16-20 let (35,2 %), dále ve věku 21-25 let (27 %), 11-15 let (18,9 %), 6-10 let (10,8 %) a v neposlední řadě u dětí do 5 roku života (8,1 %). Tyto výsledné hodnoty odpovídají údajům v literatuře, podle kterých může být pokles imunity po očkování příčinou parotitis epidemica. Není známa doba přetrvání imunity indukované vakcínací, mnoho studií demonstuje postupný pokles hladiny protilátek (Limberková 2012, s102-105). Podle některých autorů imunita přetrvává 10-15 let (Trmal a kol. 2011)

Počet neočkovaných pacientů byl 209. Jednalo se o dospělé jedince. V tabulce č. 3 a grafu č. 3 jsou výsledné hodnoty neočkované populace mužů, kde bylo prokázáno, že nejvíce onemocnělo parotitidou ve věku 26-30 let (44,5 %), dále pak ve věku 36-40 let

(22,2 %), 31-35 let (18,5 %), 51-73 let (7,4 %) a nejméně pozitivních nálezů bylo ve věku 41-45 let (3,7 %) a 46-50 let (3,7 %). V tabulce č. 4 a grafu č. 4 jsou výsledné hodnoty neočkované populace žen, kde bylo prokázáno, že nejvíce žen onemocnělo parotitidou ve věku 26-30 let (42,9 %), dále pak ve věku 36-40 let (28,6 %), 31-35 let (14,25 %), 51-90 let (14,25 %). Výsledné hodnoty tedy ukázaly, že nejvíce pozitivních nálezů bylo jak u žen, tak u mužů ve věku 26-30 let. To odpovídá literárním údajům, které předpokládají pokles imunity po 10-15 letech po očkování (Trmal a kol. 2011).

Typická sérologická odpověď organismu na infekci se projevuje v akutní fázi tvorbou IgM protilátek, po kterých nastupují protilátky IgG. IgG protilátky přetrvávají jako anamnestické protilátky a jsou známkou imunity.

V opakovaných vzorcích bylo celkem 62 mužů (55,4 %) ve věku 0-70 let a 50 žen (44,6 %) ve věku 0-74 let. Z výsledků vyšetření opakovaných odběrů (tabulky č. 5-8 u mužů a tabulek č. 15-18 u žen) vyplývá, že u očkovaných jedinců mohou mít sérologické odpovědi netypický průběh. U těchto pacientů byly IgM protilátky prokázány často až z druhého odběru krve. V prvním odběru byly zachyceny pouze IgG protilátky. To potvrzuje údaje o tom, že laboratorní průkaz u proočkované populace je náročnější. Očkování jedinci nemusí mít IgM protilátky detekované již v prvním odběru, zdánlivě jde o imunní jedince s pozitivními IgG protilátkami (Limberková, 2012, s23-25).

Dále z tabulky č.25 a grafu č. 5 vyplývá, že séronegativní výsledky u očkované populace, která bude pravděpodobně neimunní vůči parotitis epidemica, bylo potvrzeno u žen celkem 14,7 % a u mužů 14,8 %. Toto vysoké procentuální zastoupení vede dále k zamyšlení nad očkovací tematikou.

V laboratoři virologie je u všech očkovaných jedinců výsledek komentován lékařem, u očkovaných jedinců je doporučen druhý odběr s časovým odstupem 1 až 2 týdnů z důvodů častých netypických nálezů.

V tabulce č. 23 je uveden počet pozitivních nálezů u diagnóz týkajících se onemocnění parotitidy. Největší zastoupení měla diagnóza parotitis epidemica bez komplikací (B26.9) a to 75,3 %.

Známkou imunity proti parotitidě je přítomnost IgG protilátek. Pro zjištění stavu imunity byly zaslány během roku 2011-2012 do laboratoře virologie 3 vzorky, jak znázorňuje tabulka č. 24, avšak pouze u jednoho vzorku byly prokázány protilátky IgG.

6. Závěr

Cílem bakalářské práce bylo stanovení protilátek proti parotidě ve vzorcích od pacientů vyšetřovaných v laboratoři virologie nemocnice České Budějovice a.s. v období 2011-2012 a jeho přínos pro laboratorní diagnostiku.

Hypotéza H1 předpokládala zvýšený výskyt onemocnění parotidou v dětském kolektivu. Na základě výsledku bylo zjištěno, že výskyt v dětském kolektivu byl potvrzen, ale nejvyšší výskyt pozitivních nálezů byl u žen ve věku 20-25 let a u mužů ve věku 16-20 let. U neočkované populace byl nejvyšší výskyt pozitivních nálezů u mužů i u žen stejného věku (26-30let). Tato hypotéza nebyla potvrzena.

Hypotéza H2 předpokládala, že kvůli náročnější laboratorní diagnostice parotitidy u očkované populace, bude nutné některé pacienty vyšetřit opakovaně. Z prvního odběru bylo 25 žen a 38 mužů, kteří měli být zdánlivě proti parotitis epidemica imunní, ale z druhého odběru se objevily i protilátky IgM a to u 10 žen a 12 mužů. Tato hypotéza se na základě výsledků potvrdila.

Hypotéza H3 předpokládala u očkované populace výskyt séronegativních, pravděpodobně neimunních pacientů. Bylo potvrzeno 14,8% u mužů a 14,7% u žen. Proto lze očekávat výskyt dalších i epidemických epizod parotitidy. To dále potvrzuje význam vyšetření protilátek proti parotidě.

7. Seznam použitých zdrojů

1. BEDNÁŘ, M. a kol. Lékařská mikrobiologie. 1. vydání. Praha: Marvil, 1999. 558s. ISBN 978-80-238-0297-9.
2. BENEŠ, J. Infekční lékařství. 1. vydání. Galén, 2009. 651s. ISBN 978-80-7262-644-1.
3. BERBERS, G.A., MARZEC, A.H., BASTMEIJER, M., VAN GAGELDONK, P.G., PLANTIGA, A.D. Blocking ELISA for detection of mumps virus antibodies in human sera. *J. Virol. Methods*. 1993, 42: s155-68.
4. BINNICKER, M.J., JESPERSEN, D.J., ROLLINS, L.O. Evaluation of the Bio-Rad BioPlex Measles, Mumps, Rubella, and Varicella-Zoster Virus IgG Multiplex Bead Immunoassay. *Clin Vaccine Immunol*. 2011, 18: s1524-1526.
5. BLAŠKOVIČ, D. Základy lékařské virologie. Bratislava: VEDA, 1978. 524s.
6. BONEBRAKE, A.L., SILKAITIS, C.H., MONGA, G., GALAT, A., ANDERSON, J., TRAD, J.T., HEDLEY, K., BURGESS, N., ZEMBOWER, T.R. Effects of Mumps Outbreak in Hospital, Chicago, Illinois, USA, 2006. *Emerg Infect Dis*. 2010, 16: s426-432.
7. BITSKO, R.H., CORTESE, M.M., DAYAN, G.H., ROTA, P.A., LOWE, L., IVERSEN, S.C., BELLINI, W.J. Detection of RNA of Mumps Virus during an Outbreak in a Population with a High Level of Measles, Mumps, and Rubella Vaccine Coverage. *J Clin Microbiol*. 2008, 46: s1101-1103.
8. DJAČENKO, S.S., SINJAK, K.M., DJAČENKO, N.S. patogenní viry člověka. Vydání 1. Praha: Avicenum, 1983. 384s.
9. HAVLÍK, J. et al. Infekční nemoci. 2. rozšířené vydání. Praha: Galén, 2002. 186s. ISBN 80-7262-173-4.
10. Hlášený výskyt vybraných infekčních nemocí v České republice v Epidatu v letech 2002-2012 - absolutně - předběžná data [online]. [cit. 2013-07-29]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/publikace/data/vybrane-infekcni-nemoci-v-cr-v-letech-2003-2012-absolute>

11. CHANG, A., DUTCH, R.E. Paramyxovirus Fusion and Entry : Multiple to a Common End. *Viruses*. 2012, 4: s613-636.
12. LATNER, D.R., MCGREW, M., WILIAMS, N., LOWE, L., WERMAN, R., WARNOCK, E., GALLAGHER, K., DOYLE, P., SMOLE, S., LETT, S., COROCOS, N., DEMARIA, A., KONOMI, R., BROWN, C.J., ROTA, P.A., BELLINI, W.J., HICKMAN, C.J. Enzyme-Linked Immunospot Assay Detection of Mumps-Specific Antibody-Secreting B Cells as an Alternative Method of Laboratory Diagnosis. *Clin Vaccine Immunol*. 2011, 18: s35-42.
13. LENNETTE E.H., NATAHALIE J., SCHMIDT a kol. Laboratorní vyšetřovací metody virových a rickettsiálních nákaz. Vydání 1. Praha 1: AVICENUM, 1974. 590s.
14. LIMBERKOVÁ, R. Příušnice-aktuální problém. Zprávy centra epidemiologie a mikrobiologie (SZÚ, Praha). 2012, 21(1): s23-25
15. LIMBERKOVÁ, R. Příušnice-aktuální problém. Zprávy centra epidemiologie a mikrobiologie (SZÚ, Praha). 2012, 21(3): s102-105
16. LOBOVSKÁ, A. Infekční nemoci: Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. Praha: Nakladatelství Karolinum, 2001. 263s. ISBN 80-246-0116-8.
17. MAULDIN, J.M., CARBONE, K., HSU, H., YOLKEN, R., RUBIN, S. Mumps Virus-Specific Antibody Titres from Pre.Vaccine Era Sera: Comparison of the Plaque Reduction Neutralization Assay and Enzyme Immunoassays. *J Clin Microbiol*. 2005, 43: s4847-4851.
18. NARITA, M., MATSUZONO, Y., TAKEKOSHI, Y., YAMADA, S., ITAKURA, O., KUBOTA, M., KIKUTA, H., TOGASHI, T. Analysis of Mumps Vaccine Failure by Means of Avidity Testing for Mumps Virus-Specific Immunoglobulin G. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1998, 5: s799-803.
19. Příbalový leták Mumps Virus Real Time RT-PCR Kit User Manual For In Vitro Diagnostic Use Only firmy Liferiver™
20. Příbalový leták PLATELIA™ Mumps IgG firmy BIO-RAD
21. Příbalový leták PLATELIA™ Mumps IgM firmy BIO-RAD

22. SMITS, G.P., GAGELDONK, P.G., SCHOULS, L.M., KLIS, F.R.M., BERBES, G.A.M. Development of a Bead-Based Multiplex Immunoassay for Simultaneous Quantitative Detection of IgG Serum Antibodies against Measles, Mumps, Rubella, and Varicella-Zoster Virus. *Clin Vaccine Immunol.* 2012, 19: s396-400.
23. STAŇKOVÁ, M., MAREŠOVÁ V., VANIŠTA J. Infekční lékařství: Minimum pro praxi. 1. vydání. Praha: TRITON, 2000. 199s. ISBN 80-7254-115-3.
24. STEVEN, A.R., LINK, M.A., SAUDER, C.J., ZHANG, C.H., NGO, L., RIMA, B.K., DUPREX, W.P. Recent Mimos Outbreaks in Vaccinated Populations: No Evidence of Immune Escape. *J Virol.* 2012, 86: s615-620.
25. ŠRÁMOVÁ, H. a kol. Nozokomiální nákazy. Praha 4: MAXDORF-JESSENIUS, 1995. 224s. ISBN 80-85912-00-7.
26. TRMAL, J., KOČÍ, J., ŠIMŮNKOVÁ, L., ŠTORKÁNOVÁ, O., TRMALOVÁ, Z. Zprávy centra epidemiologie a mikrobiologie (SZÚ, Praha). 2011, 20(6): s219-223.
27. VELEMÍNSKÝ, M., ŠVIHIVEC, P., VELEMÍNSKÝ, M., jr. Infekce plodu a novorozence. Praha : TRITON, 2005. 414s. ISBN 80-7254-614-7.
28. VOTAVA, M., HORVÁTH, R., DENIS, M. Polymerázová řetězová reakce v mikrobiologické diagnostice. *Praktický lékař 80.* 2000, 11: s632-634.
29. VOTAVA, M. Lékařská mikrobiologie speciální. Brno : Neptun, 2003. 495s. ISBN 80-902896-6-5.
30. VOTAVA, M. a kol. Lékařská mikrobiologie vyšetřovací metody. 1.vydání. Brno: Neptun, 2010. 495s. ISBN 978-80-86850-04-07.
31. Vyhláška MZ ČR 48/1991sb. O očkování proti přenosným nemocem. § 5-O očkování proti spalničkám a příušnicím. [online]. 1991 [cit. 2013-07-23]. Dostupné z <http://www.esipa.cz/sbirka/sbsrv.dll/sb?DR=SB&CP=1991s048>
32. ZAHRADNICKÝ, J. a kol. Mikrobiologie: Příručka pro zdravotní laboranty. Vydání 2. Praha 1: Středočeské tiskárny, 1961. 588/38s.
33. ZAHRADNICKÝ, J. a kol. Mikrobiologie a epidemiologie. Vydání 1. Brno: Avicem, 1987. 623s.

34. ZUCKERMAN, A.J. et al. Principles and Practice of Clinical Virology: Mumps.
5. vydání. Hoboken USA: WILEY, 2004, s459-466. ISBN 0-470-84338-1.

8. Klíčová slova

Parotitis epidemica

Protilátky IgG

Protilátky IgM

ELISA