

Univerzita Karlova

3. lékařská fakulta

Studijní program: Biomedicína

Studijní obor: Preventivní medicína



MUDr. Jana Malinová, MBA.

Hladiny specifických protilátek proti spalničkám u zaměstnanců
fakultní nemocnice v době rizika jejich návratu

Levels of specific antibodies against measles, in university hospital
staff, during the 2018-2019 measles outbreak in Prague, CZ.

Dizertační práce

Školitel: Doc. MUDr. Alexander M. Čelko, CSc.

Praha, 2020

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 22.07.2020

MUDr. Jana Malinová, MBA.

Identifikační záznam:

MALINOVÁ, Jana.

Hladiny specifických protilátek proti spalničkám u zaměstnanců fakultní nemocnice v době rizika jejich návratu

Levels of specific antibodies against measles, in university hospital staff, during the 2018-2019 measles outbreak in Prague, CZ.

Praha, 2020. Počet stran 77, počet příloh 2. Dizertační práce (PhD.).

Univerzita Karlova, 3. lékařská fakulta, Ústav epidemiologie a biostatistiky 3. LF UK
Školitel: Doc. MUDr. Alexander M. Čelko, CSc.

Poděkování

Děkuji svému školiteli Doc. MUDr. Alexandru M. Čelkovi, CSc., za cenné rady a zejména za vytrvalou a všestrannou podporu během mého celého postgraduálního studia.

Zvláštním díkem jsem zavázána RNDr. Marku Petrášovi, PhD., nejen za nadstandardní statistické zpracování získaných dat a interpretaci dosažených výsledků, ale taky za nezištnou pomoc při jejich publikování.

Obsah

1. Úvod.....	6
2. Spalničky.....	8
2.1. Původce nemoci.....	8
2.2. Patogeneze onemocnění	9
2.3. Klinický obraz onemocnění.....	9
2.4. Role imunitního systému u infekce spalničkami	11
2.5. Diagnóza onemocnění	14
2.6. Imunita přirozeně získaná onemocněním	15
3. Imunizace	16
3.1. Tvorba protilátek po vakcinaci	17
3.2. Očkování proti spalničkám v České republice	18
3.3. Vakcína proti spalničkám	21
3.4. Způsob aplikace vakcíny	23
3.5. Proočkovanost proti spalničkám.....	23
4. Epidemiologická situace ve světě	26
4.1. Výskyt onemocnění v ČR.....	30
4.2. Spalničky u zdravotnického personálu a zaměstnanců nemocnic	33
4.2.1. Onemocnění spalničkami ve FNKV	34
5. Doporučení očkování zdravotnického personálu.....	35
6. Protiepidemická opatření v ohnisku spalniček.....	36
7. Význam studie	37
7.1. Primární a sekundární cíle	37
7.2. Materiály a metody	38
7.2.1. Získaná imunita proti spalničkám	38
7.2.2. Laboratorní stanovení protilátek specifických proti spalničkám	39
7.2.3. Studovaná populace	40
7.2.4. Vybrané demografické prediktory	40
7.2.5. Vybrané behaviorální prediktory	41
7.2.6. Vybrané zdravotní prediktory	42
7.3. Statistické metody.....	43

7.3.1.	Primární a sekundární veličiny	43
7.3.2.	Oprávněnost velikosti vzorku	44
7.3.3.	Deskriptivní statistika	44
7.3.4.	Analýzy a statistické metody	45
8.	Výsledky	46
8.1.	Popis studijní populace	46
8.2.	Séropozitivita proti spalničkám	49
8.2.1.	Séropozitivita studované populace podmíněná faktory	51
8.2.2.	Séropozitivita kompletně očkované populace podmíněná faktory	53
8.2.3.	Séropozitivita přirozeně imunizované populace podmíněná faktory	55
8.3.	Hladina specifických protilátek proti spalničkám	56
9.	Diskuse	59
10.	Závěr	62
11.	Souhrn	63
12.	Seznam použitých zkratk	65
13.	Seznam použitých pramenů a literatury	66
14.	Seznam příloh.	77

1. Úvod

V posledních letech bylo zaznamenáno v České republice několik ohnisek lokálního epidemického zvýšení výskytu spalniček, které díky vysoké proočkovanosti postihlo omezený počet populace. Vakcinace, která byla v České republice po několik desetiletí prováděna praktickými dětskými lékaři, vedla k vysoké proočkovanosti, a tím byla zajištěna i kolektivní ochrana pro jedince, pro které bylo toto očkování kontraindikováno. Bohužel v posledních letech v důsledku celosvětových anti-vax kampaní dochází také v České republice k mírnému poklesu proočkovanosti a kopíruje situaci známou ze zahraničí. Důvodů poklesu proočkovanosti je ale hned několik, např. náboženské přesvědčení, alternativní životní styl, nedostatek financí či migrace obyvatelstva.

Otázkou však zůstává, zda aktuální séropozitivita proti spalničkám je dostatečná a zda zajistí dostatečnou ochranu populace při šíření spalniček. S tím také souvisí i dostatečná hladina protilátek specifických proti spalničkám a jejich přetrvávání. Nelze však ani opomenout skutečnost, zda očkování indukuje srovnatelné množství těchto specifických protilátek, včetně buněčné imunity tak, jako je indukováno po prožití onemocnění spalničkami.

Sledování perzistence hladin protilátek celé populace a určování stavu imunity je finančně, časově i logisticky velmi náročné. Podstatné je nicméně to, že neznalost hladiny protilátek zdravotnického personálu a zaměstnanců nemocnic by mohlo představovat značné riziko. Při epidemickém zvýšení počtu nemocných se spalničkami může totiž dojít k ohrožení chodu oddělení, popř. celé nemocnice, neboť nemocný zaměstnanec s nedostatečnou imunitou proti spalničkám se stává zdrojem infekce nejen pro pacienty, ale také pro své kolegy.

Z těchto důvodů byla v rámci strategie prevence infekčních chorob koncipována tato studie s cílem zjistit stav séropozitivity proti spalničkám u zdravotnického personálu, respektive zaměstnanců nemocnice Fakultní nemocnice Královské Vinohrady v Praze. Studie byla vedena jako sérologická prospektivní s ověřením stavu hladin IgG protilátek specifických proti spalničkám. Kromě toho bylo vybráno několik základních prediktorů, které by mohly ovlivnit perzistenci sledované séropozitivity, tj. pohlaví, věk, nadváha či obezita, kouření a souběžná onemocnění.

Sběr studijních dat probíhal v období od května 2018 do prosince roku 2019. Data byla následně analyzována a interpretována tak, aby poskytla praktické závěry a doporučení pro zdravotnický personál v prevenci onemocnění spalničkami.

Předkládaná práce je rozdělena do dvou částí. Teoretická část je zaměřena na souhrn poznatků týkající se virologie, imunologie a epidemiologie spalniček, včetně klinického obrazu tohoto onemocnění. V praktické části je představena metodologie studie, včetně provedených analýz, výsledků a diskuze doplněné závěrem.

2. Spalničky

Spalničky patří mezi nejzávažnější virová, exantémová, systémová infekční onemocnění, která postihují celosvětovou populaci po stovky let. Zmínky o jejich existenci spadají až do 9. století, kdy byla choroba popisována perským lékařem. Spalničky jsou výhradně antroponózou a objevují se v jakékoli populaci nezávisle na kontinentu či klimatickém pásmu. Vyskytují se jak v zemích s nízkým hygienickým standardem, zvláště tam, kde je vysoká podvýživa dětí, ale i ve vyspělých zemích.

Přesto existuje zásadní rozdíl, který spočívá v jejich smrtnosti a může dosáhnout až 5 % v zemích s nízkým hygienickým standardem oproti např. zemím EU, kde dosahuje jen 0,01-0,1 %. Stejný problém lze pozorovat také v uprchlických táborech, kde smrtnost může dosáhnout až 30 % [Wolfson 2006]. Podle odhadů Světové zdravotnické organizace (WHO) byly spalničky, před zavedením vakcinace, každoroční příčinou milionů úmrtí, zejména u dětí.

2.1. Původce nemoci

Původcem nemoci je obalený ssRNA virus, patřící do čeledi Paramyxoviridae, rodu Morbillivirus. Byl poprvé izolován Johnem Endersnem a Thomasem Peeblesem v padesátých letech minulého století z infikované krve [Enders 1954].

Virová RNA je obalena spirální kapsidou, kterou tvoří N protein (nukleokapsida), enzymaticky aktivní fosfoproteinem P a velkým proteinem L. Dojde-li k proniknutí viru do hostitelské buňky, pak tyto proteiny přispívají k transkripci a replikaci viru. Na povrchu virové lipidové obálky jsou jeho receptory v podobě hemagglutinu, který je zodpovědný za vazbu s hostitelskou buňkou. Nese antigenní determinanty (epitopy), na které pak odpovídá imunitní systém tvorbou neutralizačních protilátek [de Swart 2005]. Fúzní protein, který je také součástí obálky, zajistí prostupnost viru membránou hostitelské buňky [Enders 1996].

Virus spalniček (dále MV) je sérotypově nebo antigenně stabilním, což dalo dobrý příslib k vytvoření univerzální vakcíny.

Blízkým příbuzným této čeledi virů jsou viry, které jsou původci moru skotu a psinky. Onemocnění moru skotu bylo v roce 2011 za úsilí Organizace spojených národů (OSN) a Organizace pro výživu a zemědělství (FAO) eradikováno [Morens 2011].

2.2. Patogeneze onemocnění

MV se šíří zprostředkovaně kapénkami (aerosolem) z dýchacích cest nakažené osoby nebo přímým kontaktem s nemocným. Další přenosy bývají jen vzácné, např. přenos z infikované matky na plod.

Spalničky jsou systémovou nákazou. Primárním místem infekce je nazofaryngeální epitel. Do dvou až třech dnů po expozici dochází k primární virémii (MV se pomnoží jak na epitelu, tak v regionálních lymfatických uzlinách), doprovázenou posléze infekcí retikuloendoteliálního systému. Asi za 5-7 dní se objevuje sekundární virémie doprovázená robustním množení MV v regionálních i distálních retikuloendoteliálních buňkách a MV dále infikuje buňky respiračního traktu, tonzily, případně i další orgány, jako slezinu, játra, kostní dřeň apod. Vzácně může dojít dokonce i k diseminaci do centrální nervové soustavy. Mikroskopicky se v postižených tkáních pozoruje vznik obrovských mnohojaderných syncytií. (Warthinovy – Finkeldeyovy buňky) [Plattet 2016].

MV patří mezi lymfotropní viry, tj. postihuje B i T-lymfocyty, které jsou imunitním systémem likvidovány, což vede k jejich celkovému snížení a někdy může docházet až ke vzniku imunitní amnézie. V důsledku sníženého počtu lymfocytů může být uzdravený jedinec náchylnější k jakýmkoli infekčním onemocněním i po dobu několika let [Laksono 2016].

2.3. Klinický obraz onemocnění

Zdrojem spalniček je výhradně člověk. Období nakažlivosti začíná od prvního dne před začátkem prodromálních příznaků a končí do čtyř dnů po vzniku exantému, přičemž každý nosič může dále nakazit zhruba 9-18 osob [Beneš 2009].

Asi 10 – 14 dnů po expozici dochází v organismu k replikaci MV a dále k systémovému šíření infekce bez typického klinického obrazu [Beneš 2009]. Následně dochází

k prodromálnímu stádiu přetrvávající zhruba 4 dny, během něhož se postupně objevují doprovodné symptomy a příznaky jako jsou teplota, rýma, zánět spojivek a kašel. Na bukalní sliznici, v oblasti druhých dolních molárů, se v té době vytváří šedobělé makuly, tzv. Koplikovy skvrny.

Třetí až sedmý den se hodnotí jako druhé stádium, tzv. exantémové, kdy se za ušima a na zátylku objevuje splývající makulopapulózní vyrážka, která se šíří na obličej a následně na trup a končetiny.

Pokud je průběh onemocnění nekomplikovaný, pak k uzdravení a následné rekonvalescenci dochází brzy po manifestaci vyrážky.

Z důvodu lyfotropního účinku MV může dojít k imunosupresi, která se dostaví u 10-40 % nemocných [Perry 2004]. Může způsobit také sekundární bakteriální superinfekci. Riziko komplikací se zvyšuje i v závislosti na hygienických podmínkách nemocného (počty osob v rodině, věk, tekoucí pitná voda) [Morley 1969]. Nejčastější komplikací bývá intersticiální pneumonie, encefalitida, laryngitida a apendicitida. Keratokonjunktivitida se objevuje zejména u dětí s nedostatkem vitamínu A, které trpí podvýživou a může vést až k oslepnutí, zejména u dětí žijících v oblastech s nízkým hygienickým standardem.

Vzácně se jako komplikace může objevit i reaktivace latentní tuberkulózy. Nejzávažnější pozdní komplikací spalniček s dlouhou inkubační dobou, i v řádu desetiletí [Watanabe 2019] se stává chronický zánět mozku (tzv. sklerotizující pancencefalitida), který je vyvolán persistujícím inkompletním virem spalniček. Toto onemocnění s infaustní prognózou bylo často popisováno v 50. a 60. letech minulého století a postižena jím byla především dětská populace [Štěpánová 2002]. Incidence tohoto závažného onemocnění byla u nás významně redukována díky zavedení plošné vakcinace proti spalničkám v roce 1969.

Obrázek 1: Exantém, Koplikovy skvrny



Zdroj: Archiv Infekční kliniky NNB

2.4. Role imunitního systému u infekce spalničkami

Hlavní rolí imunitního systému je udržování vnitřní rovnováhy organismu. Předpokladem pro správné fungování a udržení homeostázy je schopnost systému rozeznat vnější škodliviny tj. látky chemické povahy, viry, bakterie a další patogeny, ale i staré nebo poškozené vlastní buňky od struktur vlastních a nepoškozených [Hořejší 2017]. Tomu napomáhají regulační mechanismy, které jsou vrozené (nespecifické) a adaptivní (specifické), včetně obranných mechanismů nezávislých na imunitním systému, jako je fyzikální a chemická bariéra.

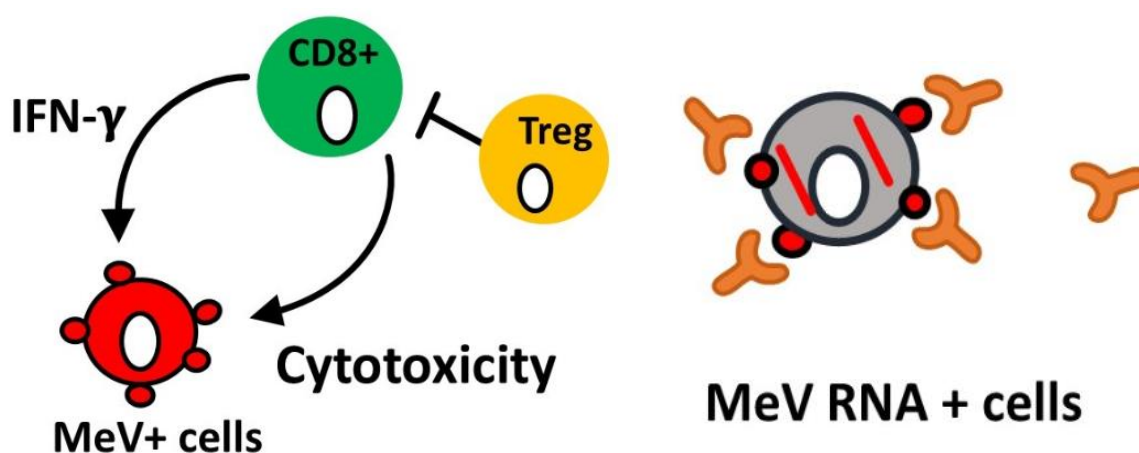
Vrozené mechanismy buněčné povahy jsou připisovány fagocytům a přirozeně cytotoxickým buňkám, jako jsou neutrofilní granulocyty, makrofágy a přirození zabijáci (NK buňky). Na povrchu těchto buněk je několik desítek typů rekognoskujících receptorů, které jsou schopny rozeznávat a vázat molekulární látky mikroorganismů. Těmi bývají polysacharidy, lipopolysacharidy, lipoproteiny, nukleové kyseliny a proteiny. Mezi významné proteinové receptory fagocytů patří lektiny (rozeznávají charakteristické mikrobiální sacharidové struktury) a receptory ze skupiny zvané TLR (Toll-like Receptor), které rychle reagují na signály a podněty přítomnosti patogenu. Aktivace systému vede k rozvoji zánětlivé reakce s cílem navodit obranné mechanismy.

Další složkou vrozeného imunitního systému jsou komplement a cytokiny (chemokíny, interferony apod.).

Mechanismy adaptivní (specifické) imunity jsou reprezentovány imunitou zprostředkovanou protilátkami (humorální imunita) a mechanismy buněčné imunity zprostředkované primárně T a B lymfocyty. Lymfocyty T a B jsou připraveny rozpoznat konkrétní antigenní podnět a reagovat na něj. Lymfocyt T je odpovědný za kooperaci s dendritickými buňkami (buňkami vrozené imunity). Mechanismy adaptivní imunity se spouští až po setkání s daným antigenem, kterým někdy mohou předcházet mechanismy vrozené imunity.

Jak již bylo uvedeno, nejprve dojde k aktivaci vrozeného imunitního systému a spuštění vrozené imunitní reakce, která doprovází prodromální fázi onemocnění. Přitom se aktivují NK buňky, dochází k uvolňování řady cytokinů (např. $\text{INF}\gamma$). Na obrázku č.2 je znázorněn $\text{INF}\gamma$ podporující fagocytózu u makrofágů [Griffin 2016]. Nicméně, nestrukturální virové proteiny jsou schopny účinně potlačit interferonovou odpověď, a proto se v této fázi nemusí objevit žádné klinické symptomy nebo příznaky [Shivakoti 2015].

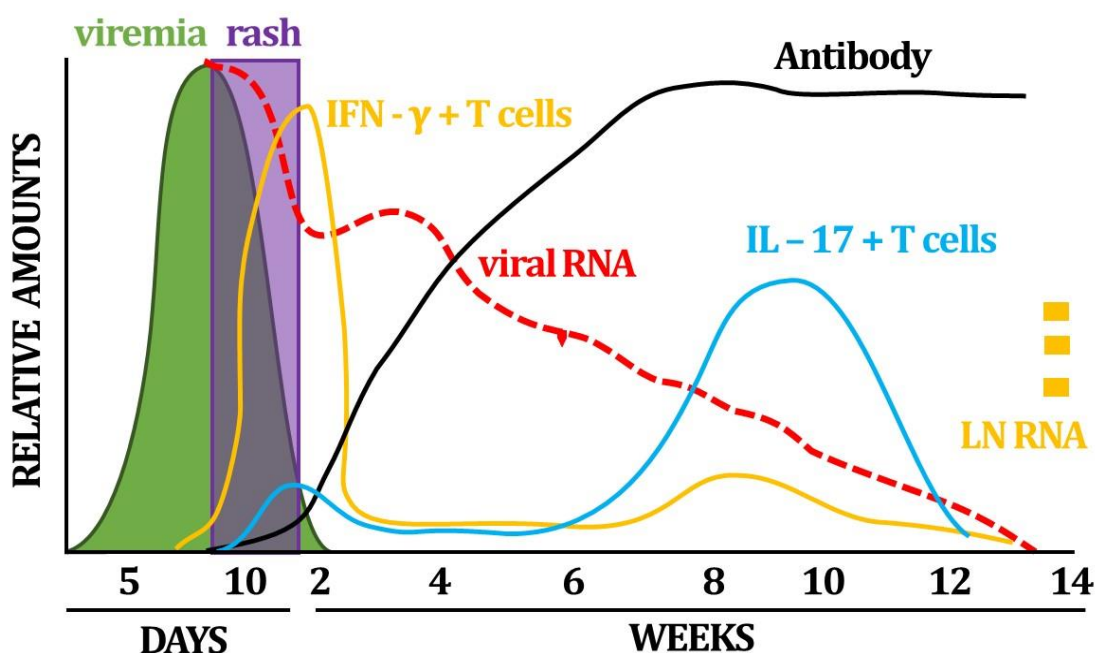
Obrázek č. 2: Působení interferonu na MV a protilátkou imunitní reakce [Lin 2012]



Adaptivní imunitní reakci zprostředkují nejen lymfocyty, ale také protilátky za doprovodu cytokiny-zprostředkovaných mechanismů. Protilátková odpověď zpravidla cílí na povrchové glykoproteiny H (hemagglutinin) a F (fúzní protein) [de Swart 2017] a indukují se virus-neutralizační protilátky. Griffin (2016) ve své práci uvedl, že hladina virus neutralizačních protilátek korelující s ochranou proti spalničkám by mohla být minimálně 120 mIU / ml. Přesto dodnes nemáme jednoznačně deklarovanou hranici séroprotektivity.

Zpočátku dochází k indukci specifických imunoglobulinů třídy IgM. K tvorbě IgM protilátek obvykle po opakované expozici nebo revakcinaci už nedochází. Proto se jejich přítomnost používá k detekci primární infekce. Spalničkové IgA protilátky se detekují v sekretech na sliznici. I když protilátky hrají v průběhu onemocnění významnou roli [Lin 2012], svou neméně významnou roli zajišťuje také buněčná imunita. Virus spalniček se šíří přímým přenosem z buňky na buňku, tudíž protilátková odpověď nemusí být tak účinná. Klíčovou se tak stává buněčná imunita, která zajišťuje eliminaci a odstranění infikovaných buněk virem spalniček. Cytotoxické $CD8^+$ T lymfocyty jsou odpovědné za potlačení šíření MV [de Vries 2010].

Obrázek č. 3: Podíl imunitního systému na tvorbě protilátek [Lin 2012]



Aktivované pomocné $CD4^+$ T-lymfocyty secernují cytokiny, které regulují humorální a buněčnou imunitní odpověď. Během akutní fáze se v plazmě objevují zvýšené hladiny IFN- γ , v rekonvalescenci pak vysoké hladiny interleukinu (IL)-4 a IL-10 [Moss 2002]. Buněčná imunitní odpověď je komplexní proces, na kterém se podílí oba typy $CD4^+$ a $CD8^+$ T lymfocytů [Nelson 2017]. Během rekonvalescence, může dojít k vyčerpání imunitních mechanismů, což může vést až k imunitní amnézii. Tento stav je odpovědný za zvýšenou

nemocnost u některých jedinců po prožití spalniček v průběhu následujících let. Přirozeně získaná imunitní odpověď po onemocnění je znázorněna na obrázku č.3.

2.5. Diagnóza onemocnění

Pokud je u spalniček přítomna charakteristická symptomatologie jako je typický morbiliformní exantém, konjunktivitida a Koplikovy skvrny na bukalní sliznici, pak je klinická diagnóza snadno určitelná. V praxi se však lze setkat s mnoha podobami tohoto onemocnění, popřípadě i mitigovanou formou. U netypických exantémů nebo u atypických případů spalniček se indikuje laboratorní vyšetření. Toto laboratorní vyšetření se provádí také u osob s nejasným stavem očkování, nebo u neočkovaných, které byly v ohnisku výskytu spalniček, nebo u osob, které vykazují atypické příznaky onemocnění.

Spalničky patří mezi nemoci, pro které byl zaveden systém epidemiologické bdělosti. Ten byl legislativně upraven vyhláškou č. 473/2008 Sb. „O systému epidemiologické bdělosti pro vybrané infekce“, podle které se postupuje.

Diagnostiku nemoci je možné provést buď izolací spalničkového viru z klinického vzorku nebo detekcí RNA kyseliny viru spalniček v klinickém vzorku odebraném v akutní fázi onemocnění.

Dále se zjišťuje přítomnost specifických protilátek proti spalničkovému viru charakteristických pro akutní infekci v séru nebo ve slinách, detekce IgM a IgG protilátek specifických proti viru spalniček. Protilátky typu IgM se objevují již po 2 – 3 dnech po nástupu exantému, následně se objevují IgG protilátky během 5 až 8 dnů.

U osob, které nebyly v posledních 6 týdnech očkovány, se provádí vyšetření párového séra a sleduje se výrazný nebo několikanásobný vzestup hladin specifických spalničkových IgG protilátek (akutní a rekonvalescentní).

Testuje se i průkaz vzestupu hladin pre-existujících spalničkových IgG protilátek u reinfekcí. Také je možná i detekce antigenu spalničkového viru pomocí přímé imunofluorescence v klinickém vzorku odebraném v akutní fázi onemocnění za použití monoklonálních protilátek specifických proti viru spalniček.

Pro správnou interpretaci laboratorních výsledků je třeba brát v úvahu klinické a epidemiologické údaje včetně stavu očkování. Pokud bylo v posledních 3 až 6 týdnech provedeno očkování, je nutné zvážit vyšetření na nepřítomnost vakcinačního viru, neboť očkování se provádí živou vakcínou.

Izoláty viru spalniček z klinického materiálu se dále zasílají do Národní referenční laboratoře pro spalničky, příušnice, zarděnky a parvovirus B19 k dalšímu určování.

2.6. Imunita přirozeně získaná onemocněním

Existuje předpoklad, že přirozeně získaná imunita by mohla být celoživotní. Vychází se z původní práce Petera Panuma, která sledovala průběh epidemie spalniček na izolovaných Faerských ostrovech v roce 1846, kde onemocnělo 6 100 ze 7 864 obyvatel. U původně přeživších nemocných byla následně prokázána dlouhodobá ochrana, neboť v komunitě přirozeně imunizovaných nebyl zaznamenán žádný případ onemocnění během následujících desetiletí, ačkoli se na ostrově objevily další dvě epidemie spalniček. Dospělí s anamnézou spalniček v dětství, neonemocněli spalničkami po opětovné expozici, ani o 65 let později. Následující studie prokázaly, že ve výjimečných případech mohou dospělí s anamnézou přirozených spalniček během dětství prožít subklinickou reinfekci virem spalniček, což vedlo k sekundární imunitní odpovědi [Panum 1940]. Nepředpokládá se však, že pro dlouhodobou imunitu by byla nezbytně nutná kontinuální či opakovaná expozice MV. Klinicky manifestní spalničky po reinfekci spalničkovým virem však nikdy nebyly popsány u lidí s přirozeně získanou imunitou.

Existuje hypotéza, že fragmenty RNA spalničkového viru by mohly přetrvávat dlouhodobě v organismu původně inikované osoby a tím by mohlo docházet ke kontinuálnímu posilování již získané imunity [Lin 2012]. Bez ohledu na to existuje imunologická paměť v podobě jak B tak T-lymfocytů, která je schopna kontinuálně obnovovat produkci specifických protilátek proti spalničkám. I když dochází v průběhu času k postupnému poklesu hladin přirozeně indukovaných protilátek, nebylo prokázáno, že by to ovlivnilo získanou ochranu proti spalničkám.

3. Imunizace

Imunizace je jedinou metodou, jak stimulovat specifickou imunitu. Rozlišujeme dva typy – aktivní a pasivní imunizace, které mohou být navozeny buď přirozeným nebo umělým způsobem.

Pasivní, přirozená imunizace, bývá zprostředkována matkou transplacentárním přenosem IgG specifických protilátek z matky na plod. Kvalita a kvantita protilátek je závislá na mnoha faktorech. Jedním z těchto faktorů je věk matky. V současné době, kdy není nic neobvyklého na tom, že se rodí děti matkám ve věku okolo 40 let, je zřejmé, že hladina těchto specifických IgG protilátek bývá nižší než u matek, které měly své potomky ve věku 20 let a byly přirozeně imunizované spalničkami nebo byly proti spalničkám očkovány v dětství. Je zřejmé, že má-li matka vysoké hladiny protilátek specifických proti spalničkám, pak je schopna předat svému potomkovi vyšší koncentraci těchto protilátek, které pak mohou perzistovat až 12 měsíců po narození. Jsou-li matky starší, pak jejich hladiny specifických protilátek bývají nižší a také mateřská imunita předaná potomkovi nemusí být dostatečně dlouhodobě protektivní. Ostatně proto se v posledních letech doporučuje očkování dětí od dosažení 9 měsíců věku, v případě, že se objeví zvýšený epidemický výskyt spalniček.

Pasivní imunizace umělým způsobem je zprostředkována podáním specifických imunoglobulinů, čehož se někdy využívá v ohnisku výskytu spalniček, pokud se podání provede nejpozději do 6 dní od přepokládané expozice infekce.

Jiný způsob aktivní imunizace je umělý – zprostředkovaný očkováním, kterým lze kontrolovatelně stimulovat imunitní systém a indukovat tak specifickou adaptivní imunitu proti spalničkám. Tímto způsobem lze zajistit ochranu, podobnou získané po přirozené imunizaci, bez rizika zatížení organismu prožitím onemocnění se všemi případnými riziky a komplikacemi.

Postvaccinační imunita se hodnotí na základě tzv. sérokonverze, tj. zpravidla procentuální proporci jedinců, kteří dosáhli předem stanoveného limitu koncentrace protilátek (tzv. sérpozitivní limit), nebo pomocí míry vakuinační odpovědi, která představuje čtyřnásobný (někdy také 2násobný) nárůst hladin protilátek oproti stavu před očkováním [Cunningham 2018]. Vedle toho se imunogenita očkování hodnotí také pomocí geometrického průměru koncentrací nebo titrů stanovených protilátek, které lépe popíší dynamiku vývoje post-

vakcinační séroresponze. Lze se mimo jiné setkat také s hodnocením nárůstu protilátek vyjádřeným jako poměr geometrických průměrů koncentrací protilátek před a po očkování. Všechny tyto ukazatele napomáhají lépe pochopit, jak bude očkování v populaci účinné. Přesto hlavním kritériem účinnosti očkování zůstává klinicky nebo epidemiologicky stanovená protekce.

3.1. Tvorba protilátek po vakcinaci

Po očkování dochází k podobné imunitní odpovědi, jako je odpověď indukovaná onemocněním, protože se k očkování používá živá atenuovaná vakcína proti spalničkám. Také po očkování dochází ke vzniku post-vakcinační virémie, která je oproti přirozeně indukované významně limitována [Griffin 2018]. Podobně jako při onemocnění dochází po očkování primárně k indukci IgM protilátek, které se následně nahradí tvorbou IgG protilátek, které lze sérologicky detekovat už 12-15 dní po očkování. Ovšem jejich maximum se dosahuje teprve 4-6 týdnů po očkování. Vedle uvedených protilátek je očkování schopno stimulovat i vznik krátkodobých IgA protilátek, které pravděpodobně nemají zásadní význam v ochraně proti spalničkám.

Očkováním se rovněž stimulují oba typy T-lymfocytů (tj. pomocné i cytotoxické) [Gans 2013]. I když očkováním dochází k analogické stimulaci imunitního systému jako samotným onemocněním, stimulace očkováním zůstává pod kontrolou a nevede k zatížení imunitního systému [Uzicanin 2011].

Očkují-li se jedinci nedostatečně očkovaní, nebo v minulosti neočkovaní bez dostatečné hladiny protilátek proti spalničkám, je možné po provedeném aktuálním očkování stanovit jejich anamnestickou odpověď, pokud měly nějakou imunitu získanou v minulosti [Wittler 1991; Davidkin 1998]. V takovém případě se totiž IgG protilátky specifické proti spalničkám objeví dříve, a to již během 5-6 dnů.

Přidávání dodatečných dávek v krátké době po předešlém očkování se neukázalo jako vhodné, neboť může docházet k paradoxu snížené imunitní odpovědi v podobě nižších hladin protilátek [Davidkin 1998].

Dojde-li k situaci, že se očkuje osoba s bohatou výbavou dostatečně vysokých koncentrací protilátek proti spalničkám, pak nové očkování nikterak nesnižuje bezpečnost očkování, neboť živý vakcinační atenuovaný virus se stávajícími protilátkami neutralizuje a nedochází k jakkoli přehnané reakci imunitního systému na nové očkování, tzn. že se tím nezvyšuje riziko vzniku těžkých či závažných nežádoucích účinků po takovém očkování. I když revakcinace není nebezpečná, rozhodně se stává neekonomickou.

Persistence hladin protilátek po očkování proti spalničkám může být kratší než u jedinců s přirozeně získanou imunitou. Přesto se zatím ukazuje, že k tomuto efektu nedochází a kompletně očkováni bývají dlouhodobě chráněni, podobně jako jedinci po onemocnění spalničkami. Hladiny protilátek indukovaných očkováním mohou časem ubývat, přesto studie naznačují, že i v neendemických lokalitách přetrvávají specifické protilátky proti spalničkám v populaci dlouhodobě [Dine 2004; Hughes 2020]. V zemích či lokalitách, kde stále cirkuluje divoký virus spalniček dochází ke kontinuální stimulaci již získané imunity, což se projevuje zvýšenou koncentrací specifických protilátek [Whittle 1999].

Existuje předpoklad, že dojde-li ke snížení post-vakcinačních protilátek, dojde buď k endogenní nebo exogenní stimulaci paměťových buněk, které dále indukují specifické protilátky v hladinách důležitých pro překonání infekce. U jedinců s nedetekovatelnými hladinami protilátek dochází ke stimulaci tvorby protilátek v důsledku MV expozice, což brání k manifestaci spalniček nebo jejich manifestaci významně oslabí a klinický průběh bude velmi lehký nebo asymptomatický. Takoví jedinci však mohou být zdrojem nákazy a rizikem pro neočkované [Moss 2018].

Živé atenuované kmeny viru spalniček jsou schopné infikovat myeloidní buňky podobně jako kmeny divokého viru, přesto nejsou schopny vést k diseminaci [de Swart 2017]. Kromě toho vakcinační spalničkové viry nejsou schopny způsobit přechodné potlačení imunity a imunitní amnézii.

3.2. Očkování proti spalničkám v České republice

V Československu bylo zahájeno plošné očkování proti spalničkám v roce 1969 s cílem snížit dětskou nemocnost a úmrtnost. Před zavedením očkování bylo ještě v roce 1966 hlášeno

dokonce 89.712 případů onemocnění (zdroj EPIDAT). Spalničkami bylo postiženo v té době až 90 % dětské populace.

Od září roku 1969 se stalo očkování proti spalničkám pravidelným. Zpočátku byly očkovány děti starší 10 měsíců. O rok později, v roce 1970, bylo zahájení očkování posunuto do věku 12 měsíců. V letech 1975-78 se provádělo mimořádné očkování proti spalničkám u školních dětí v prvních třídách, kdy se podařilo proočkovat děti narozené v letech 1968-1973.

V letech 1979-81 bylo zavedeno očkování druhou dávkou a doočkovávaly se školní děti osmých tříd základní školy.

V roce 1982 bylo na základě sérologických, tehdy imunologických přehledů, rozhodnuto o rozšířeném očkování prováděném podáním dvou dávek. První se podávala ve věku 15 měsíců a druhá o 6-10 měsíců později. Toto schéma se s úspěchem aplikovalo až do roku 2018.

Tabulka č. 1: Zahájení očkování a mimořádné očkování proti spalničkám

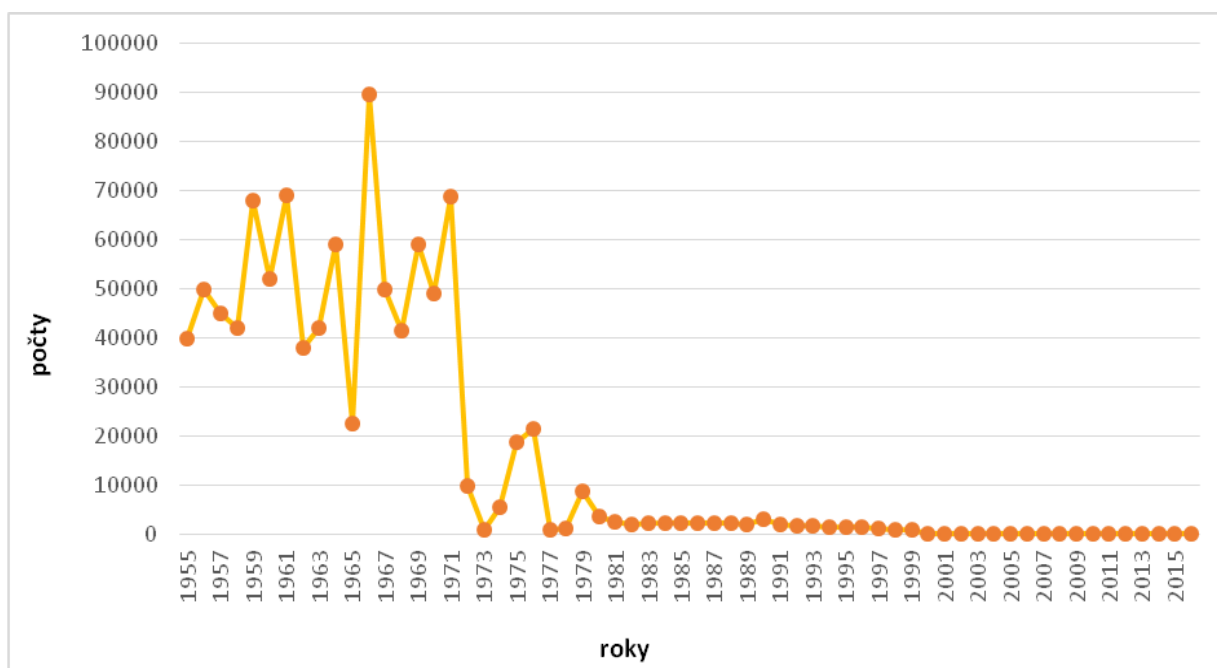
Rok		Rok narození
1969	Zahájení očkování	1968
1975 - 1976	Mimořádné očkování 1. třídy	1969 - 1973
1979 - 1981	Mimořádné očkování 8. třídy	1965 - 1968

Ke změně očkovacího kalendáře došlo v roce 2018, kdy se pro podání první dávky vymezil věk 13-18 měsíců a druhá dávka vakcíny se posunula do věku 5 let.

Prováděné změny týkající se věku dítěte pro zahájení očkování vycházely z perzistujících mateřských protilátek, které neutralizovaly vakcinační virus spalniček, což vedlo ke snížené imunitní odpovědi. Proto celosvětově nebyl věk pro zahájení očkování unifikován a vždy vycházel ze séoprevalence spalničkových protilátek u žen ve fertilním věku.

Po zavedení očkování došlo v následujících letech ke sníženému výskytu spalniček, jak dokumentuje graf č.1. Právě catch-up očkování dalších dětských ročníků přispělo k dramatickému poklesu případů v letech 1973-1979. („Catch up“ neboli vychytávací druhá dávka vakcíny se neaplikuje jako „booster dávka“ - přeočkování, ale má za cíl vyvolat imunitní odpověď u jedinců, kteří na první dávku vakcíny neodpověděli.)

Graf č. 1: **Hlášená onemocnění proti spalničkám v letech 1955- 2016**



Zdroj: SZÚ/EPIDAT

V České republice, ale i v jiných vyspělých zemích, je považováno očkování za natolik společensky významné, že je regulováno legislativou. Povinnost tohoto očkování byla u nás legislativně vymezena už Vyhláškou č. 48/1991 Sb. O očkování proti přenosným nemocem. I když bylo očkování proti spalničkám dalšími vyhláškami upravováno, vždy si zachovalo status povinného očkování. Vyhláška č. 537/2006 Sb. rozšířila možnost očkovat proti spalničkám i dospělé osoby.

Očkování se nařizuje v případech nástupu zdravotnického personálu na infekční a dermatovenerologické pracoviště. Očkování se v takovém případě provádí u těch zdravotníků, kteří v minulosti spalničkami neonemocněli nebo nemají titr či koncentraci IgG protilátek specifických proti spalničkám nad séropozitivní mez. Kromě toho lze podle legislativy nařídit tzv. mimořádné očkování u vybraných profesí, např. zdravotníků v případě, že si to vyžádá epidemiologická situace. Nepodrobení se očkování nese s sebou sankce vyplývající z díkce tohoto zákona.

3.3. Vakcína proti spalničkám

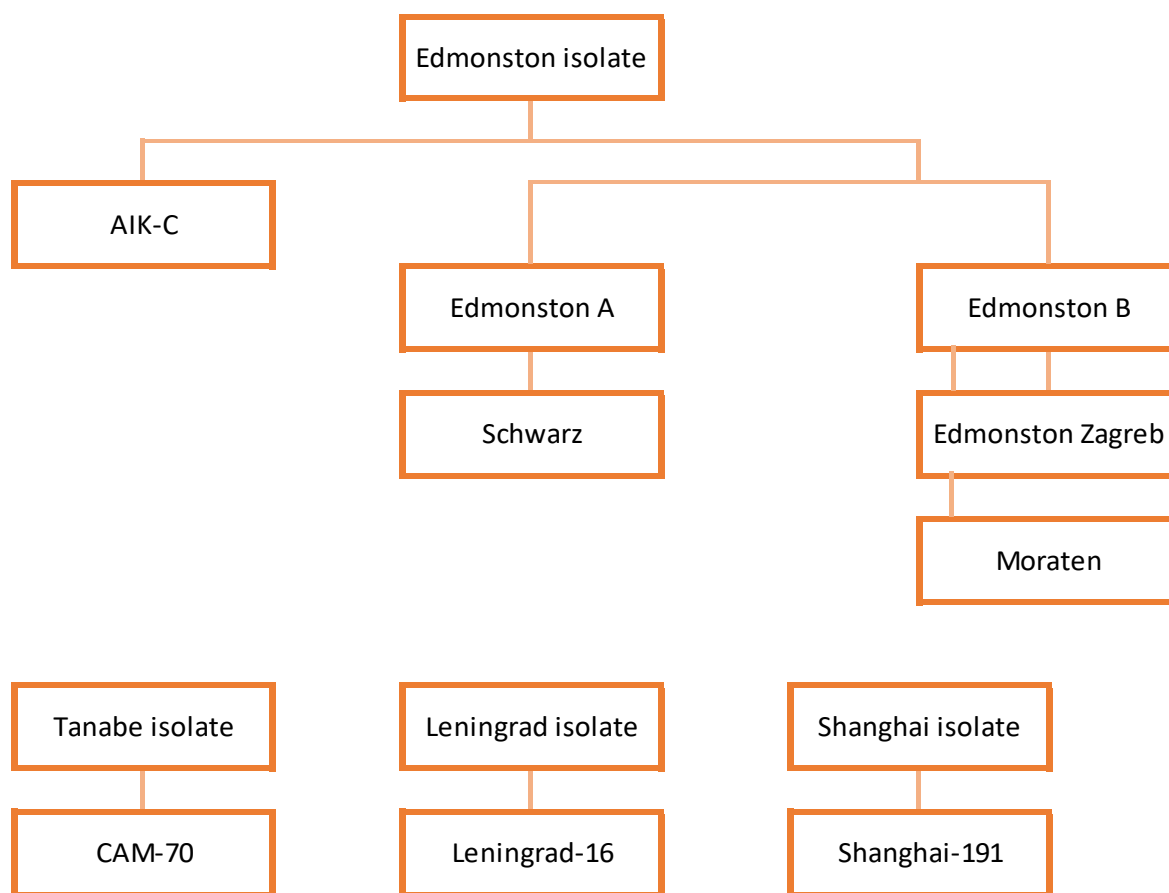
Izolace původního spalničkového viru v šedesátých letech minulého století z krve nemocného chlapce Davida Edmonstona [Griffin 2016] dala šanci k vývoji a přípravě efektivní vakcíny. Původní kmen se zprvu použil k vývoji jak celovirionové vakcíny inaktivované formalínem, tak živé oslabené vakcíny.

Očkování celovirionovou inaktivovanou vakcínou vyžadovalo podání celkem tří dávek. Přesto vytvořená ochrana byla hodnocena jen jako krátkodobá. Navíc některé očkované děti posléze onemocněly atypickými spalničkami se závažným průběhem a komplikacemi. Proto byl vývoj inaktivované vakcíny ukončen.

Naopak vývoj živé atenuované vakcíny byl úspěšně dokončen. Použil se původní virus kmene Edmonston, který se postupně mnohonásobnou kultivací – pasážováním dále oslabil. Tento proces atenuace vyžadoval různé buněčné substráty, jako např. kuřecí embryonální fibroblasty, primární psí ledvinné buňky, primární lidské ledvinné buňky atd., které napomohly virus oslabit, tj. postupně ztrácel své rizikové vlastnosti jako je patogenita, virulence, infekčnost a toxicita při zachování důležité imunogenní vlastnosti. Vzhledem k tomu, že divoký MV nepodléhá zásadním mutacím, stal se vakcinační virus dodnes stále funkčním v boji proti spalničkám. Z oslabeného původního vakcinačního viru byly dále odvozeny další vakcinační kmeny, jak dokumentuje obrázek č. 4. Ve světě se k očkování používají i jiné atenuované kmeny spalničkových virů, jako např. Tanabe nebo Leningrad apod.

V současné době byly původní monovalentní vakcíny proti spalničkám nahrazeny kombinovanými společně s vakcínami proti příušnicím a zarděnkám a planým neštovicím. První monovalentní vakcína proti spalničkám, která se u nás používala, byla vakcína Movivac. Původně se dodávala v desetidávkovém balení a bylo doporučeno jí spotřebovat nejpozději do 4 hodin po její rekonstituci. Později se u nás distribuovala bivalentní vakcína proti spalničkám a příušnicím pod názvem Mopavac. Postupně bylo vícedávkové balení upraveno na dvoudávkové, tj. jedno balení obsahovalo 2 dávky.

Obrázek č. 4: Vývoj kmene Edmonston a ostatních vakcinačních virů [Griffin 2018]



Od roku 1995 se zavedlo očkování trivalentní vakcínou proti spalničkám, příušnicím a zarděnkám pod označením Trivivac, která byla v roce 2010 vystřídána stejně valentní vakcínou Priorix. Všechny u nás používané vakcíny proti spalničkám obsahovaly kmen Schwarz [Petráš 2009], který v případě prvních třech vakcín české výroby byl adaptován na primárních psích ledvinných buňkách. Kmen Schwarz používaný ve vakcíně Priorix byl adaptován na kuřecích embryonálních fibroblastech. Alternativně se na našem trhu objevila v posledních letech také vakcína M-M-RVAXPRO, ve které složky proti spalničkám vychází z atenuovaného kmene Edmonston B nebo také Moraten, adaptovaný na kuřecích embryonálních fibroblastech.

Stávající vakcíny lze použít k očkování nejen dětí, ale také dospělých. Podle doporučení WHO musí jedna vakcinační dávka obsahovat minimální titr živého atenuovaného spalničkového viru 3,0 log TCID₅₀. Vakcína je stabilizována lyofilizací a před aplikací se musí

rekonstituovat v dodávaném ředícím roztoku do objemu 0,5 ml s přídavkem lékopisné rezervy (obvykle 0,05 – 0,1 ml) [SPC Priorix].

3.4. Způsob aplikace vakcíny

Očkování proti spalničkám je hodnoceno jako vysoce účinné a již první dávka je schopna zajistit asi 95% účinnost. Ta se pak zvýší až na 99 % po podání druhé dávky (CDC). Přesto, účinnost očkování je podmíněna správným uchováváním a aplikací.

Vakcína se přednostně podává subkutánně, popřípadě také intramuskulárně, do deltové oblasti horní části paže nebo do horní části anterolaterální oblasti stehna. Živé oslabené vakcinační viry bývají citlivé na dezinfekční prostředky např. ether a kvarterní amonné sole. Proto se po dezinfekci místa vpichu vyčká, dokud nedojde k odpaření alkoholu nebo jiných antiseptik, aby nedošlo k inaktivaci atenuovaných vakcinačních virů.

Vakcíny v lyofilizované formě jsou tepelně stabilní, ale po rekonstituci dochází k postupnému snížení koncentrace živých vakcinačních virů. Proto je třeba po rekonstituci podat vakcínu bezprostředně, aby se minimalizovala ztráta jejího účinku. Vakcíny proti spalničkám musí být uchovávány v chladu při teplotě +2 až + 8 °C a chráněny před slunečním světlem [WHO 2017].

3.5. Proočkovanost proti spalničkám

Incidence spalniček je odrazem proočkovanosti populace. Chceme-li dosáhnout eradikace, nebo alespoň eliminace spalniček, pak by minimální proočkovanost měla být v rozmezí 92-95 %, aby se tím udržela kolektivní imunita [Anderson 1990]. S vyšším počtem neočkovaných osob v populaci se proočkovanost snižuje, a tím se zvyšuje riziko vzplanutí lokálních epidemií [Simone 2012].

V tabulce č.2 je uváděna proočkovanost dětí s jednou a dvěma dávkami spalničkové vakcíny v několika evropských zemích v letech 2016-2018. Nejnižší proočkovanost dvěma dávkami (MCV2) v roce 2018 byla zjištěna v Rakousku, Itálii a Bulharsku.

Také v České republice byl v témže roce zaznamenán pokles proočkovanosti (84 %) druhou dávkou (MCV2) a to v důsledku úpravy očkovacího programu, který umožnil přesun druhé dávky do věku 5 let. Přesto proočkovanost české dětské populace jednou dávkou spalničkové vakcíny (MCV1) zůstává i nadále přiměřeně vysoká.

Tabulka č. 2: procento proočkované populace v letech 2016-2018 dvěma dávkami vakcíny [zdroj WHO]

Země:	2018	2018	2017	2017	2016	2016
	MCV 1	MCV2	MCV1	MCV2	MCV1	MCV2
Česká republika	96	84	97	90	98	93
Rakousko	94	84	96	84	95	89
Slovensko	96	97	96	97	95	97
Německo	97	93	97	93	97	93
Maďarsko	99	99	99	99	99	99
Polsko	93	92	94	93	96	93
Itálie	93	89	92	86	87	82
Bulharsko	93	87	94	92	92	88
Chorvatsko	93	95	89	95	90	96
Řecko		97		97		97
Francie		90		90		90
Španělsko	97	94	98	93	97	95

MCV1 - 1. dávka vakcíny proti spalničkám, MCV2 - 2. dávka vakcíny proti spalničkám

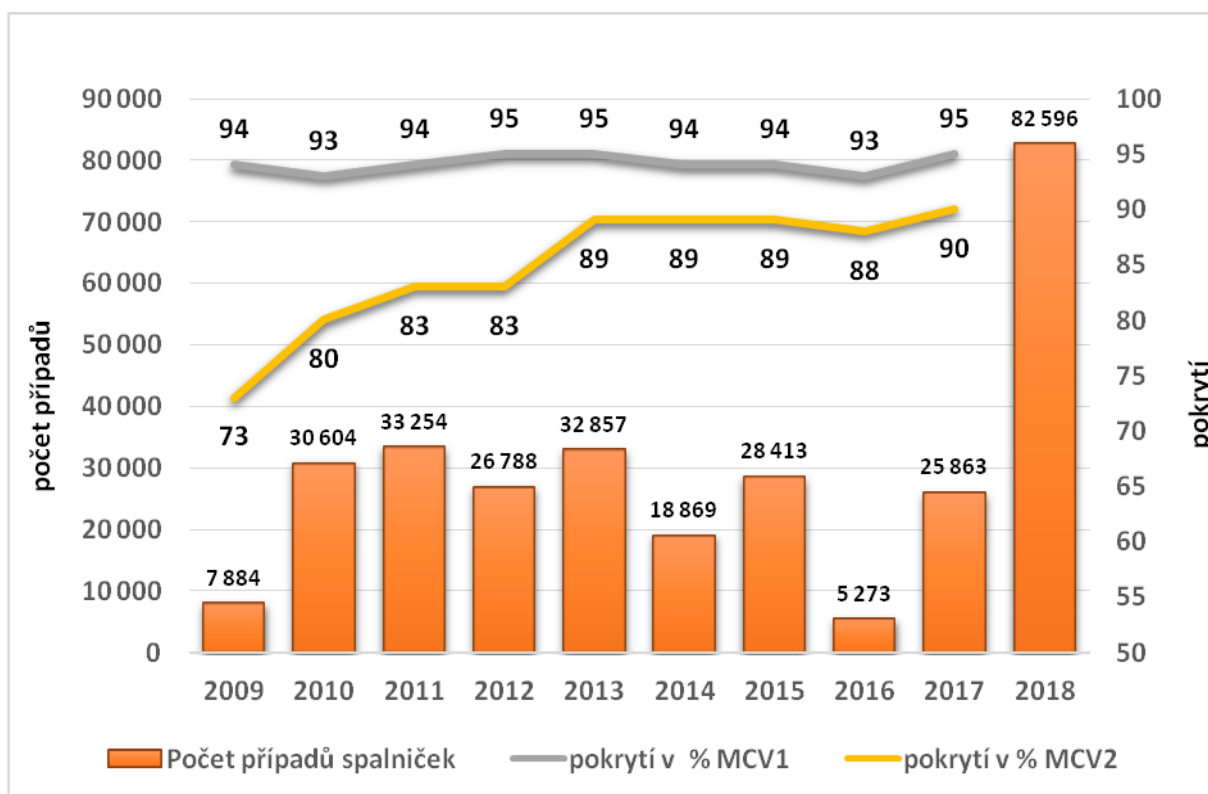
Z grafu č.2 lze zjistit, jaká je proočkovanost proti spalničkám v Evropě mezi lety 2009-18 a celkový počet případů nakažených spalničkami. Je tak zřejmé, že proočkovanost v Evropě nedosahuje takové úrovně, která by zcela znemožnila šíření spalniček, neboť v některých letech nedosáhla ani úrovně 92 %.

Podle WHO byla nejnižší proočkovanost v Evropě zjištěna v roce 2009, kdy kompletně očkováno dvěma dávkami bylo pouze 73 % dětí. Navíc tento trend setrval až do roku 2012. I když v následujících letech se sice proočkovanost zvýšila až na >89 %, přesto nebyla dosažena úroveň proočkovanosti potřebné k zajištění komunitní ochrany. Také celosvětově

byla v roce 2013 proočkovanost dětí s alespoň jednou dávkou spalničkové vakcíny pouze 84 % - v Evropě 95 %, v Indii jen 74 % [Perry 2014].

V letech 2009 až 2016 byl zaznamenán relativně nízký počet onemocnění. Naopak v roce 2018 došlo ke strmému nárůstu, což podle WHO byl důsledek snížené proočkovanosti v roce 2016, kdy bylo dosaženo jen 86% proočkovanosti u očkovaných s alespoň jednou dávkou vakcíny a 76 % u kompletně očkovaných.

Graf č. 2: Proočkovanost populace a počet případů spalniček v Evropě v letech 2009-2018 [WHO]



4. Epidemiologická situace ve světě

I přes zvýšené úsilí Světové zdravotnické organizace (WHO) dosáhnout eliminace spalniček, je stále sledován nárůst počtu nemocných v určitých regionech.

V některých ekonomicky vyspělých zemích byla míra proočkovanosti ovlivněna přístupem rodičů, kteří se očkování svých potomků vyhýbali např. kvůli náboženským, filozofickým důvodům, alternativnímu životnímu stylu nebo z důvodu nepodložených informací šířících se na sociálních sítích. Právě nejčastěji diskutovaná asociace autismu a očkování proti spalničkám se stává zábranou rodičů nechat dítě proti spalničkám očkovat.

V roce 2018 zasáhly spalničky nejvíce Libérii, Demokratickou republiku Kongo, Madagaskar, Somálsko a Ukrajinu. WHO uvedla, že v těchto pěti zemích je téměř polovina všech celosvětově zaznamenaných případů.

V roce 2010 si WHO stanovila cíl dosáhnout do roku 2015 90% proočkovanosti proti spalničkám ve všech zemích světa a snížit tak incidenci na méně než 5 případů na milion obyvatel, včetně snížení úmrtnosti o 95 % oproti roku 2000. V letech 2000 – 2013 sice byl pozorován pokles případů onemocnění spalničkami až o 72 %, což představovalo snížení ze 146 na 40 milionů případů [Perry 2014]. Přesto se původní záměr nepodařil a byl znovu nastaven do roku 2020.

Hodnotíme-li trend počtu případů spalniček ze systému TESSa (The European Surveillance System) od roku 2015 v zemích evropského regionu, aktuálně dochází k jejich nárůstu zejména v Rakousku, Německu a Chorvatsku. Celková nemocnost hlášená v zemích EU/EEA je 7,8 případů na jeden milion obyvatel ročně. V roce 2016 se nemocnost dramaticky nezvyšovala. Mezi státy, které v roce 2015 hlásily vyšší počet nemocných, se počty případů v roce 2016 normalizovaly. Naopak vzrůstající počet případů byl hlášen v Itálii, kde došlo až k více než trojnásobnému zvýšení nemocnosti. V celé EU v té době nedošlo k nekontrolovatelnému nárůstu případů spalniček.

V roce 2017 v zemích EU se situace mění a byl pozorován významný vzestup nemocnosti z původních 9 na 35,5 případů na jeden milion obyvatel ročně. Tomu přispívá především Itálie, kde bylo zaznamenáno 5.399 případů, tj. 89,1 případů na jeden milion obyvatel, a meziroční nárůst až 4.538 případů, což představovalo 6,2krát vyšší nemocnost na jeden milion

obyvatel. Dalším státem, který přispěl ke zhoršení situace se stalo Řecko, kde prakticky z nulového výskytu se nově objevilo 967 případů, což představovalo 89,8 případů na jeden milion obyvatel. I tak nejhorší situace byla zaznamenána v Rumunsku, kde nemocnost dosahovala 462 případů na jeden milion obyvatel. Nezanedbatelné zvýšení výskytu bylo dokumentováno také v Bulharsku, kde téhož roku bylo hlášeno 165 případů, což představovalo asi 23,2 případů na milion obyvatel.

V roce 2018 došlo k extrémnímu nárůstu onemocnění ve Francii, kde bylo hlášeno 2.919 nemocných a incidence se zvýšila ze 7,8 na 43,6 případů na jeden milion obyvatel. V tomto roce stále pokračoval nárůst počtu nemocných v Řecku, kde onemocnělo 2.293 osob. Neobvykle strmý nárůst byl zaznamenán také na Slovensku, kde bylo hlášeno 565 případů, což v přepočtu na milion obyvatel představovalo neuvěřitelně vysokou incidenci 103,8. Přesto na pomyslném předním místě v počtu nových případů zůstalo Rumunsko s celkovými 6.398 případy. Naopak v Itálii došlo k poklesu počtu nemocných zhruba o polovinu a bylo hlášeno méně než 2.700 případů. I tak celková nemocnost v EU se proti předešlému roku prakticky nezměnila a dosahovalo 34,4 případů na milion obyvatel (v roce 2017 to bylo 35,5).

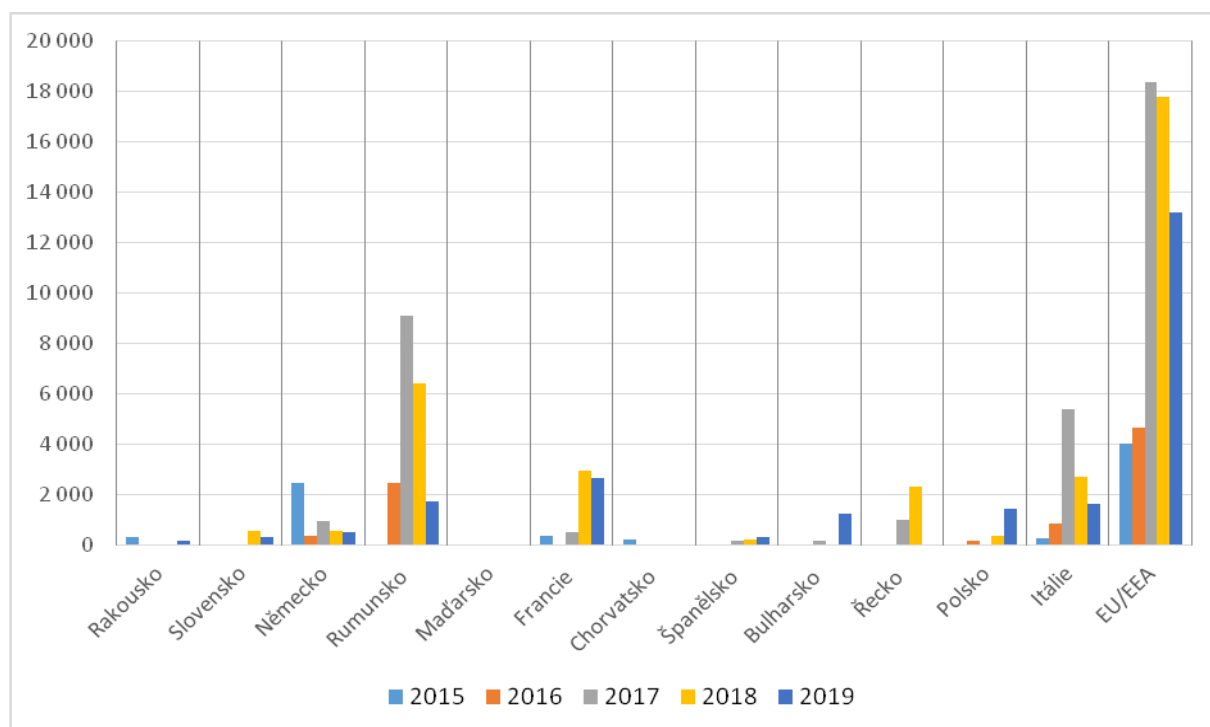
V roce 2019 nastal pozvolný pokles výskytu nových případů ve většině zemí EU s výjimkou Bulharska, které zaznamenalo další výrazný nárůst nových případů, 176,4 případů na jeden milion obyvatel. V Rakousku se nemocnost zvýšila asi dvojnásobně, ze 77 na 151 nových případů. Mírný vzestup nových případů hlásilo Maďarsko, kde 23 případů představovalo incidenci 2,4 na 1.000.000 obyvatel. Nárůst zaznamenalo i Chorvatsko, které v tomto roce mělo incidenci 12,8 případů na milion obyvatel. Také incidence 37,5 případů na milion Poláků nebyla zcela zanedbatelná. Celkový počet nemocných v zemích hlásících do TESSy dosáhl 13.200 případů, což představovalo incidenci 25,4 na jeden milion obyvatel těchto zemí.

Sledují-li se země EU s nejvyšším výskytem, tak např. podle Rumunského národního institutu veřejného zdraví (INSP) bylo od začátku roku 2016 do 9. března 2018 potvrzeno celkem 11.123 případů spalniček a dokonce 40 úmrtí.

Tabulka č. 3: Počty případů spalniček ve vybraných zemích EU [WHO], kde AP představuje absolutní počet a R – incidence spalniček na milion obyvatel

	2015		2016		2017		2018		2019	
	AP	R	AP	R	AP	R	AP	R	AP	R
Rakousko	309	36,0	27	3,1	95	10,8	77	8,7	151	17,0
Slovensko	0	0,0	0	0,0	6	1,1	565	103,8	319	58,5
Německo	2 466	30,4	326	4,0	929	11,3	543	6,6	514	6,2
Rumunsko	7	0,4	2 432	123,1	9 076	462,0	6 398	327,6	1 706	87,9
Maďarsko	0	0,0	0	0,0	36	3,7	14	1,4	23	2,4
Francie	364	5,5	79	1,2	518	7,8	2 919	43,6	2 636	39,3
Chorvatsko	219	51,8	4	1,0	7	1,7	23	5,6	52	12,8
Španělsko	55	1,2	38	0,8	157	3,4	226	4,8	292	6,2
Bulharsko	0	0,0	1	0,1	165	23,2	13	1,8	1 235	176,4
Řecko	1	0,1	0	0,0	967	89,8	2 293	213,5	45	4,4
Polsko	48	1,3	133	3,5	63	1,7	340	9,0	1 423	37,5
Itálie	256	4,2	861	14,2	5 399	89,1	2 686	44,4	1 620	26,8
EU/EEA	4 001	7,8	4 642	9,0	18 363	35,5	17 822	34,4	13 200	25,4

Graf č. 3: Absolutní počty případů v jednotlivých zemích v letech 2015 – 2019 [WHO]



V evropských zemích mimo zemí Evropské unie byl největší epidemický výskyt spalniček pozorován na Ukrajině. V roce 2017 zaznamenala Ukrajina 4.782 případů a sedm úmrtí (čtyři děti a tři dospělí). V témže roce byla zahájena masivní vakcinační kampaň, díky které se proočkovanost dětí zvýšila téměř dvojnásobně oproti předešlému roku 2016 (tj. 31% proočkovanost). Za nízkou proočkovaností dětí byl nedostatek vakcín v období okupace Krymu a konfliktu mezi Ruskem a Ukrajinou. V roce 2017 se podařilo očkovat 93,3 % dětí mladších jednoho roku a 90,7 % dětí do šesti let věku.

V roce 2018 Ukrajina hlásila 6.484 případů (66 % dětí a 34 % dospělých), včetně sedmi úmrtí (pět dětí a dva dospělí).

Ohniska spalniček v roce 2018 se objevila v zemích Balkánského poloostrova. V Srbsku byla většina případů hlášena v Bělehradě a ukázalo se, že nakažení se rekrutovali prakticky výhradně jen z neočkovaných osob nebo osob s neznámým stavem očkování.

V mnoha zemích byl pozorován pokles proočkovanosti v důsledku anti-vakcinačních nálad, které představují určitou hrozbu bránící eliminaci a eradikaci spalniček.

Dalším důvodem snížené proočkovanosti se stal krátkodobý nedostatek spalničkových vakcín, který se dotkl také našeho státu. Jednalo se však vždy jen o krátkodobou dobu, která neměla dopad na celkovou proočkovanost populace. Horší situací je absence státních financí k nákupu vakcín, což může významně přispět k dlouhodobě snížené proočkovanosti, která zabrání dosažení eliminace spalniček v populaci.

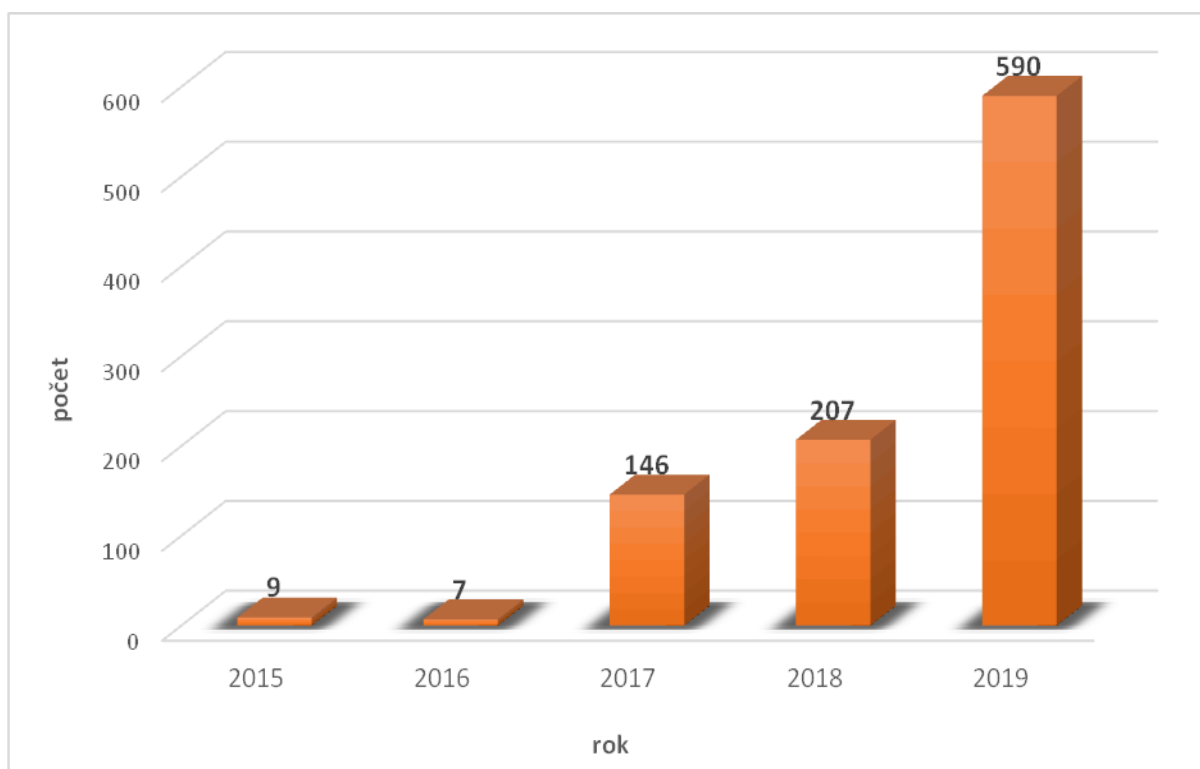
V roce 2018 byly dokonce Albánie, Česká republika, Řecko a Velká Británie vyřazeny ze seznamu zemí bez výskytu spalniček, neboť tyto země v předešlých letech zaznamenaly epidemický výskyt onemocnění.

Hlavní příčinou stávajícího neúspěchu eliminace či eradikace spalniček se stává snížená proočkovanost, protože spalničky postihují pouze lidskou populaci a není žádný důvod k nedosažení tohoto cíle. Zůstává jen na nás, jak se budeme snažit snížit vnímavost celosvětového obyvatelstva, aby jednou mohlo dojít k eradikaci také spalniček podobně, jako tomu bylo v případě pravých neštovic.

4.1. Výskyt onemocnění v ČR

Po epidemickém výskytu spalniček v Ústí nad Labem, kdy bylo v roce 2014 diagnostikováno a laboratorně potvrzeno 186 případů, došlo v následujících dvou letech k významnému poklesu nových případů (graf 4). V roce 2015 bylo v celé České republice hlášeno pouze 9 případů a o rok později, v roce 2016, se tento počet dále snížil na 7 případů. Překvapivě, v dalších třech letech se počet případů spalniček zmnohonásobil na 146 případů v roce 2017, 207 případů v roce 2018 a dokonce 590 případů v roce 2019.

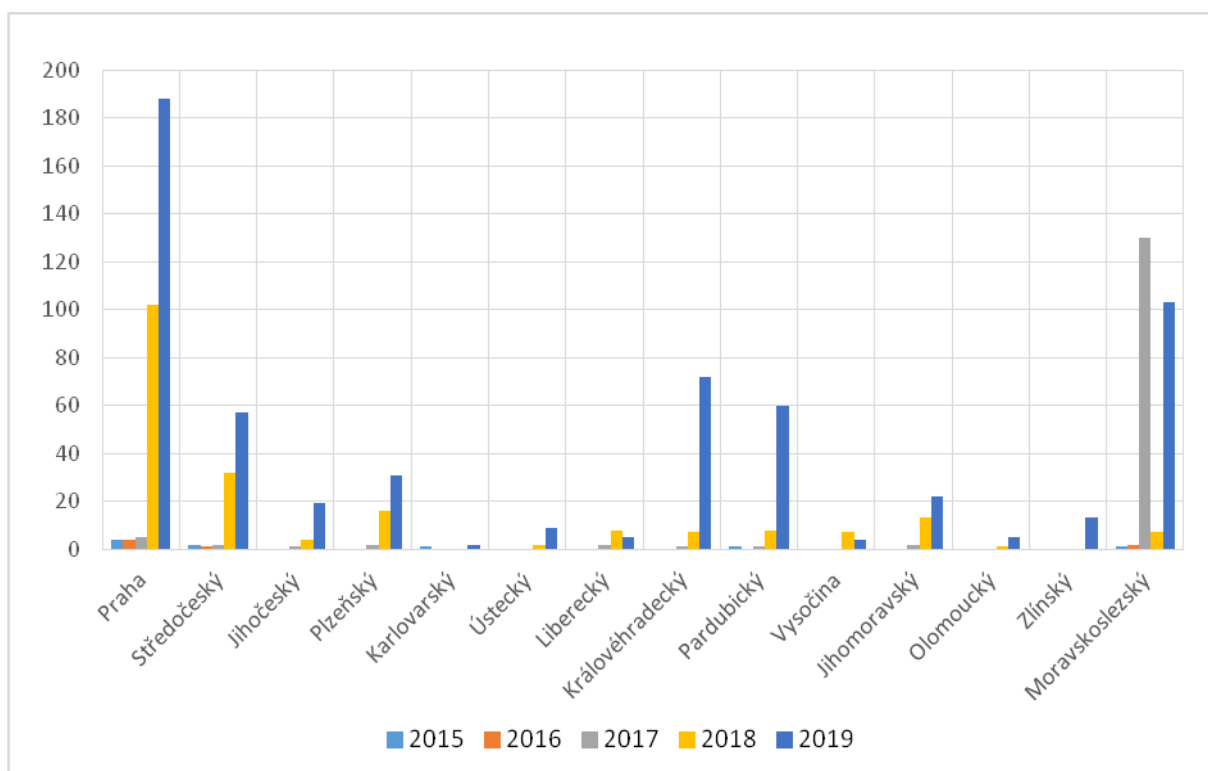
Graf č. 4: Počet případů spalniček v letech 2015 – 2019 [data z hygienických stanic]



Kumulace nových případů v těchto letech byla soustředěna do dvou ohnisek (graf č. 5, tabulka č.4) v Moravskoslezském kraji a v hlavním městě Praha. V roce 2017 dominovaly případy v Moravskoslezském kraji, kde během února až června onemocnělo 130 osob a u 123 byly spalničky laboratorně potvrzeny. Protiepidemická opatření a epidemiologické šetření se prováděla ve 156 ohniscích na území kraje a vyšetřovalo se celkem 1575 osob v blízkém kontaktu s nemocnými. O rok později došlo k epidemickému nárůstu počtu nových případů

spalniček v Praze, kde bylo hlášeno 105 případů. Nárůst nově se objevujících případů se v tomto ohnisku nezastavil ani v roce 2019, kdy bylo diagnostikováno 188 případů.

Graf č. 5: Počty nemocných v jednotlivých krajích v letech 2015 – 2019 [Data z hygienických stanic]



Tabulka č. 4: Počty nemocných v jednotlivých krajích v letech 2015 – 2019 [Data z hygienických stanic]

Kraj	2015	2016	2017	2018	2019
Praha	4	4	5	105	188
Středočeský	2	1	2	32	57
Jihočeský	0	0	1	4	19
Plzeňský	0	0	2	16	31
Karlovarský	1	0	0	0	2
Ústecký	0	0	0	2	9
Liberecký	0	0	2	8	5

Kraj	2015	2016	2017	2018	2019
Královéhradecký	0	0	1	7	72
Pardubický	1	0	1	8	60
Vysočina	0	0	0	7	4
Jihomoravský	0	0	2	13	22
Olomoucký	0	0	0	1	5
Zlínský	0	0	0	0	13
Moravskoslezský	1	2	130	7	103

Porovnají-li se všechny tři epidemické výskyty spalniček z let 2014, 2017 a 2019 (tabulka 5), ukazuje se, že nejvyšší počet případů se objevoval v kohortě osob narozených v letech 1988-1979 let, tj. ve věku 30-39 let. Naopak nejnižší výskyt spalniček byl u osob starších 50 let, tj. narozených před rokem 1958.

Vyšší výskyt případů v Ústí nad Labem se dokumentoval u 61 osob ve věku 40-49 let, tj. narozených v letech 1969-1978. Ne zcela zanedbatelný počet případů se prokázal také u těch nejmladších, tj. dětí mladších 2 let. Takových dětí onemocnělo 30 v letech 2014 i 2017.

Tabulka č. 5: Počty nemocných v jednotlivých kohortách [Data z hygienických stanic]

Rok narození	Ústí nad Labem 2014	Moravskoslezský kraj 2017	Praha 2018
2018-2016	30	30	9
2016-2014	4	14	13
2013-2009	1	2	2
2008-2004	4	3	4
2003-1999	14	8	5
1998-1989	25	11	14
1988-1979	54	32	26
1978-1969	61	25	23
1968-1959	5	5	8
1958-1949	1	0	1
Celkem	186	130	105

4.2. Spalničky u zdravotnického personálu a zaměstnanců nemocnic

V EU/EHP podle ECDC jsou opakovaně hlášena onemocnění zdravotníků. Například v roce 2017 a 2018 byla hlášena ohniska spalniček ve zdravotnických zařízeních v Belgii 35 případů, v Itálii 315 případů a v Řecku 67 případů. Onemocnění zdravotníků se nevyhnulo ani České republice. Nejvíce případů bylo sledováno během epidemie v Ústeckém kraji (2014), kde onemocnělo 88 pracovníků, 19 pracovníků v Moravskoslezském kraji (2017) a 9 zdravotníků v Praze (2018-19). Při zvýšeném epidemickém výskytu spalniček (tabulka 6) byl nejčastěji postižen střední zdravotnický personál (zejména zdravotní sestry): v Ústí nad Labem 54 SZP, 9 SZP v Moravskoslezském kraji a 5 SZP v Praze.

Tabulka č. 6: Onemocnění spalničkami u zdravotnického personálu a zaměstnanců nemocnic v ČR [Data z hygienických stanic]

	Ústí nad Labem 2014	Moravskoslezský kraj 2017	Praha 2018
Lékaři	12	4	3
SZP	54	9	5
NZP	11	4	1
OP	11	1	0
Celkem	88	19	9

Nozokomiální šíření spalniček z ošetřujícího personálu na nechráněné, vnímavé pacienty může být rychlejší než v běžné populaci. Tomu přispívá nejen vysoká nakažlivost spalniček, ale také zvýšená vnímavost pacientů v důsledku jejich souběžných onemocnění a jejich pobytu na lůžku [Mossong 2000]. Kromě toho se spalničky mohou stávat také nemocniční flórou v důsledku schopnosti viru přežívat v aerosolu minimálně jednu hodinu [Botelho-Nevers 2011]. Podobně se spalničky mohou stát rizikové i pro zdravotnický personál, není-li dostatečně dobře chráněn očkováním nebo přirozeně získanou imunitou. Oproti běžné populaci se riziko nákazy spalničkami u zdravotníků zvyšuje 13 až 19krát [Botelho-Nevers 2011; Muscat 2011].

V roce 2014 bylo publikováno, že až 6 % zdravotníků v Evropě může být séronegativní proti spalničkám [Fiebelkorn 2014]. Ve vyšším riziku mohou být zdravotníci na Blízkém Východě (9,2 % séronegativních) nebo Asii (10,3 % séronegativních). Lépe na tom jsou zdravotníci z Jižní i Severní Ameriky, kde bylo jen 1,8 % séronegativních proti spalničkám.

Tabulka č. 7: Procenta séronegativních pracovníků ve zdravotnictví 2014 [Fiebelkorn 2014]

Oblast	Medián (%)	Interkvartilové rozpětí
Evropa	6,0	0,9 - 16,9
Asie a západní Pacifik	10,3	1,7 - 18,9
Blízký východ	9,2	1,4 – 46,0
Afrika	1,8	0 – 3,5
Amerika	5,8	1,2 – 14,0

4.2.1. Onemocnění spalničkami ve FNKV

V roce 2019 bylo ve fakultní nemocnici hlášeno 9 případů onemocnění spalničkami. Ve 3 případech se jednalo o onemocnění SZP a v 6 případech o onemocnění u ambulantních pacientů. V případě onemocnění personálu byl hlášen jeden případ, kdy zdroj onemocnění byl mimo zdravotnické zařízení. Dva případy se týkaly onemocnění středního zdravotního personálu. S těmito zaměstnanci, pak bylo v kontaktu 99 osob, z nichž bylo 19 pacientů. Orgánem ochrany veřejného zdraví byla nařízena karanténa jednatřiceti osobám z důvodu nízké hladiny protilátek.

Na základě těchto případů bylo pak Hlavním hygienikem České republiky nařízeno mimořádné očkování všem osobám, které neměly séropozitivní hladinu protilátek a byli na příjmových odděleních, a to jak chirurgických, tak interních oborů.

5. Doporučení očkování zdravotnického personálu

Vzhledem k snadnému nozokomiálnímu šíření bylo v některých evropských zemích [ECDC 2013], v USA [McLean 2013], Kanadě, Austrálii i Karibiku [Skerdi 2015] doporučeno očkování veškerého zdravotnického personálu. Ve Slovinsku bylo doporučené očkování ženám pracujícím v nemocnicích.

V roce 2008 ACIP (The Advisory Committee on Immunization Practices) revidovala doporučení pro očkování ve zdravotnických zařízeních. Podle nebezpečnosti a způsobu šíření bylo rozhodnuto o rozdělení do dvou kategorií. Do první kategorie byla zařazena infekční onemocnění, proti kterým se rutinně očkuje, jako je hepatitida typu B, sezónní chřipka, spalničky, příušnice, zarděnky, dávivý kašel, neštovice. Do druhé kategorie byly zahrnuty nemoci, proti kterým se očkuje jen v určitých případech, jako jsou meningokokové nákazy, břišní tyfus, případně dětská přenosná obrna, která je na většině kontinentů již eliminována.

ACIP doporučuje, aby byl zjištěn stav imunity proti spalničkám u všech zdravotníků a aby za průkaz imunity byl považován pouze písemný doklad o aplikaci dvou dávek monovalentní nebo kombinované vakcíny, aplikované v minimálním intervalu 28 dnů. To může být alternativně nahrazeno laboratorním průkazem přítomnosti IgG protilátek proti spalničkám, nebo v anamnéze laboratorně potvrzeného prodělaného onemocnění spalničkami.

6. Protiepidemická opatření v ohnisku spalniček

Onemocnění spalničkami podléhá povinnému hlášení Orgánu ochrany veřejného zdraví. Pokud dojde k diagnostice tohoto onemocnění a jsou splněna klinická a laboratorní kritéria, lékař poskytující péči je povinen hlásit všechna onemocnění a úmrtí na toto onemocnění orgánu ochrany veřejného zdraví.

U pacienta s exantémem se dle klinické závažnosti provádí jeho izolace.

Orgán ochrany veřejného zdraví provádí aktivní epidemiologické šetření v ohnisku nákazy, vyhledává zdroje nákazy, identifikuje vnímavé osoby a zaměřuje se na osoby, se kterými byl nemocný v kontaktu 7-18 dní před nástupem exantému. Dále se vyhledávají kontakty v době nakažlivosti. U všech vnímavých osob nařizuje lékařský dohled s domácí izolací po dobu čtrnácti dnů v rozmezí 7- 21dnů od posledního kontaktu.

Praktická část

7. Význam studie

V rámci strategie prevence byla ve Fakultní nemocnici Královské Vinohrady provedena tato studie, která se zaměřila na zhodnocení séropozitivity proti spalničkám u zdravotnického personálu, které mělo napomoci zvážit případné dodatečné očkování proti spalničkám jako jediné možné prevence ochrany, a to nejen zdravotnického personálu, ale také pacientů.

Cílem studie bylo zjistit stav přetrvávání protilátek specifických proti spalničkám u zdravotnického personálu a pokusit se najít případné faktory, které by mohly ovlivňovat jejich perzistenci. K tomu byly zvoleny základní demografické prediktory, jako je pohlaví a věk účastníků studie a behaviorální a zdravotní faktory, jako je kouření, nadváha či obezita a případně souběžná onemocnění.

Studie byla vedena jako prospektivní průřezová neboli séroprevalenční.

Studie byla schválena Etickou komisí FNKV.

7.1. Primární a sekundární cíle

Primárním cílem této studie bylo ověřit a zhodnotit perzistenci protilátek specifických proti spalničkám u zdravotnického personálu, který byl v dětství očkován buď jednou nebo dvěma dávkami, případně získal imunitu díky onemocnění spalničkami v letech, kdy každoročně postihly několik desítek tisíc osob.

Byl učiněn předpoklad, že 90 % seropozitivita dosažená u zdravotnického personálu, včetně spodního limitu spolehlivosti, představuje bezpečnou komunitní ochranu a nevyžaduje žádné specifické dodatečné očkování jedinců či skupin zaměstnanců nemocnice. Jako nulová hypotéza byla přijata séropozitivita nižší než 90 % a to včetně spodního limitu 95 % intervalu

spolehlivosti. Pokud by byla tato nulová hypotéza zamítnuta, pak by platila alternativní, která by potvrdila uvedený předpoklad, že byla mezi zdravotnickým personálem dosažena minimálně 90 % séropozitivita proti spalničkám, včetně 95 % intervalu spolehlivosti.

Sekundárním cílem bylo zhodnotit vliv vybraných prediktorů na perzistenci séropozitivity. Vzhledem k tomu, že velikost souborů v podskupinách rozdělených podle prediktorů nemusela být již dostatečně velká, tj. síla testu nemusela dosahovat alespoň 80 %, bylo hodnocení dosažené séropozitivity prováděno jen relativně k referenční skupině nezávisle na testování obou shora uvedených hypotéz. Výsledky sekundárního cíle byly interpretovány s tímto ohledem obezřetně tak, aby se zabránilo případnému zkreslení.

7.2. Materiály a metody

Prospektivní studie séroprevalence proti spalničkám byla vedena u zdravotnického personálu Fakultní nemocnice Královské Vinohrady v Praze, který zde pracoval v období od května 2018 do prosince 2019. V uvedeném období byl totiž zaznamenán epidemický výskyt spalniček mezi obyvatelstvem Prahy, což vedlo k systematické kontrole stavu hladin protilátek specifických proti spalničkám u zdravotnického personálu této nemocnice.

Ve studii byla použita data získaná v rámci preventivních prohlídek zaměstnanců a z univerzálního nemocničního informačního systému (UNIS), do kterého se zadává veškerá zdravotní dokumentace o pacientech. Tato data může vkládat do systému pouze ošetřující lékař. Podmínky vymezené Etickou komisí pro účely této studie bylo schválení použití dat týkající se výhradně zdravotnického personálu. Ze systému UNIS byly po souhlasu účastníka studie použity údaje o jeho tělesné hmotnosti, výšce, pohlaví, souběžných onemocněních a je kuřáctví. Bohužel tento systém nevedl dokumentaci o provedeném očkování.

7.2.1. Získaná imunita proti spalničkám

Účastníci studie byli při preventivních prohlídkách požádáni o sdělení jejich stavu očkování proti spalničkám jednou či dvěma dávkami, nebo zda imunitu proti spalničkám mohli získat přirozeným způsobem, tj. onemocněním v dětství.

Ověření nebylo možné provést, protože nebyl k dispozici ani elektronický záznam ani očkovací průkaz (s výjimkou 32 účastníků, kteří měli očkovací průkaz k dispozici). Přesto všichni účastníci potvrdili, že byli buď očkovaní nebo že spalničky v dětství prožili. Z důvodu nemožnosti ověření počtu dávek očkování byli účastníci hodnoceni v 5letých kohortách a každá kohorta byla zařazena do skupiny buď kompletně očkovaných se 2 dávkami, nebo očkovaných jednou či dvěma dávkami a do kohorty imunizovaných přirozeným způsobem, tj. spalničkami.

Do studie bylo zařazeno celkem 2.748 osob, z nichž 600 nebylo očkováno, ale uvádělo, že spalničkami v dětství onemocnělo. Z celkem 32 účastníků, kteří měli vedený záznam v očkovacím průkazu, bylo 18 očkováno proti spalničkám dvěma dávkami a patřilo do věkových kohort 1986-90 a 1996-2000. Kohorty narozených v letech 1976-2000 byly považované za plně očkované dvěma dávkami a kohorty narozených v letech 1966-75 buď přirozeně imunizované, nebo očkované jednou nebo dvěma dávkami. Naopak kohorty narozených dříve než v roce 1966 se považovaly za přirozeně imunizované, tj. s imunitou získanou po proběhlém onemocnění v dětství.

7.2.2. Laboratorní stanovení protilátek specifických proti spalničkám

Všem zařazeným účastníkům do studie byl odebrán vzorek žilní krve, ze kterého bylo připraveno sérum pro stanovení IgG protilátek specifických proti spalničkám. Séra se uchovávala při teplotě nižší než -20 °C a následně se zpracovávala v jedné centrální laboratoři fakultní nemocnice. K tomu byl použit stále stejný test a ke stanovení specifických protilátek proti spalničkám se použila metoda ELISA (výrobce kitu Immunolab GmbH, Kassel, Německo).

Pro stanovení séropozitivity byl použit limit deklarovaný výrobcem soupravy, tj. 12 AU/mL, kde AU představovaly libovolné jednotky určené výrobcem. Pokud byl výsledek stanovení vyšší než tento limit, byl jedinec považován za séropozitivní. Séropozitivita byla definována jako procentuální proporce jedinců, kteří měli hladinu protilátek nad séropozitivním limitem definovaným sérologickým stanovením, tj. >12 AU/mL. V případě, že jedinec měl hladinu protilátek v rozsahu 8-12 AU/mL (tj. v oblasti hraniční positivity) bylo měření opakováno nebo byl odebrán nový vzorek tak, aby se potvrdila buď séropozitivita (>12 AU/mL) nebo séronegativita (< 8 AU/mL).

7.2.3. Studovaná populace

Celkem bylo do studie zařazeno 2.784 subjektů. Z nich bylo 2.243 osob zdravotnického personálu (tj. lékaři, střední a pomocný zdravotnický personál). Ostatní osoby představovaly technicko-hospodářské pracovníky a administrativní pracovníky, včetně 68 pracovníků jiné národnosti. Účastníci byli hodnoceni ve věkových kohortách podle věku narození - viz tabulka č.8. Nejmladší kohortu tvořili zaměstnanci narození v letech 1996-2000, což odpovídalo nejnižšímu možnému věku zaměstnance ve zdravotnictví. Naopak nejstarší kohorta byla definována pouze horní hranicí roku narození, tj. rok 1950 a do této kohorty byly zařazeny všechny subjekty narozené v tomto či před tímto rokem.

Tabulka č. 8: Rozdělení studijní populace podle věkových kohort

Kohorta	Rok narození	Věk
1	1996 - 2000	19-23 let
2	1991 - 1995	24-28 let
3	1986 - 1990	29-33 let
4	1981 - 1985	34-38let
5	1976 - 1980	39-43let
6	1971 - 1975	44-48 let
7	1966 - 1970	49-53 let
8	1961 - 1965	54-58 let
9	1956 - 1960	59-63 let
10	1951 - 1955	64-68 let
11	<1950	69 a více let

7.2.4. Vybrané demografické prediktory

Byly zvoleny dva základní demografické faktory, tj. věk a pohlaví. Věk byl hodnocen na základě věkových kohort a přispěl k hodnocení séroperzistence, tj. hodnocení délky doby

přetrvávání protilátek po přirozené nebo umělé imunizaci jednou či dvěma dávkami vakcíny proti spalničkám.

I když zpravidla pohlaví nemá vliv na dosažení séropozitivity nezávisle na způsobu imunizace, tento prediktor byl zahrnut z důvodu případného vlivu na její přetrvávání.

7.2.5. Vybrané behaviorální prediktory

Postvakcinační imunitní odpověď na některá očkování byla ovlivněna nadváhou či obezitou očkovaného jedince. Nejčastěji byl tento vliv prokázán po očkování proti virové hepatitidě typu B. Poprvé byl negativní korelát mezi očkováním proti virové hepatitidě typu B a BMI dokumentován v roce 1985 [Weber 1985]. Pozdější práce dokonce vymezily rizikový BMI ≥ 30 kg/m², který snižuje u obézních postvakcinační odpověď 9-16krát oproti osobám s normální tělesnou hmotností nebo nadváhou [Roome 1993; Ingardia 1999; Young 2013].

Vliv nadváhy či obezity na tvorbu protilátek po očkování proti spalničkám, případně na jejich perzistenci nebyl dosud publikován. Proto jsme tento faktor hodnotili, abychom zjistili, zda v minulosti získané protilátky proti spalničkám indukované jak přirozeným, tak umělým způsobem nemohly být negativně nebo případně i pozitivně ovlivněny vyšším BMI. V literatuře byl totiž popsán také pozitivní vliv nadváhy a obezity na indukci vyšších hladin protilátek proti chřipce po očkování [Sheridan 2012, Talbot 2012].

Studijní populace byla klasifikována podle obvyklého dělení BMI – viz Tabulka 9. Údaj BMI byl vypočten z tělesné výšky a hmotnosti zařazených subjektů. Protože u některých scházely jeden z uvedených údajů, nebyl index BMI dostupný pro všechny zařazené subjekty.

Tabulka č. 9: Rozdělení BMI podle běžné klasifikace obezity

BMI [kg/m ²]	Stav
<25	Normální váha
25 - <30	Nadváha
30 - <35	Obezita I. st.
≥ 35	Morbidní obezita (II. a III. st.)

Dalším studijním faktorem bylo kouření. Obecně kouření může snižovat postvakcinační indukci specifických protilátek, jak bylo např. dokumentováno po očkování proti tetanu a/nebo proti záškrtu [Petráš 2018, Petráš 2019]. Přesto dosud schází důkaz, že by kouření snižovalo séropozitivitu či séroprotekcii indukovanou očkováním. Protože je málo poznatků o vlivu kouření na perzistenci spalničkových protilátek, byly použity záznamy vedené u účastníků studie v dokumentaci nemocniční databáze UNIS. Bohužel u některých subjektů tento údaj scházel. Možná to vzniklo tím, že někteří ošetřující lékaři během preventivních prohlídek explicitně zaznamenávali jen kuřáky a pokud pacient nebyl kuřák, záznam o nekuřákovi nebyl ošetřujícím lékařem uveden. Přesto byly záznamy dále vyhodnoceny jako kuřák, nekuřák a stav neznámý, abychom předešli případnému informačnímu zkreslení.

7.2.6. Vybrané zdravotní prediktory

Obvykle se pacienti s primární či sekundární imunodeficiencí nebo imunosupresivní medikací očkují obezřetně, neboť se vždy u nich váží přínos a riziko očkování. Navíc jejich diagnóza či léčba nedovolí všem dosáhnout požadovaných hladin postvakcinačních protilátek.

Ostatní souběžná medikace a souběžná onemocnění se zpravidla nepovažují za omezení pro očkování, ale i tak mohou někdy působit jako imunosupresivní faktory, které pak snižují imunitní odpověď a mohou u některých jedinců zabránit dosažení séropozitivní nebo séroprotektivní koncentraci protilátek. Tento efekt byl např. pozorován u zhruba poloviny dospělých se statinovou léčbou, kteří byli očkováni proti záškrtu [Petráš 2019].

Z nemocniční databáze byly u všech zařazených účastníků doplněny údaje o jejich osobní anamnéze, tj. souběžná onemocnění (medikace byla pro naše účely zanedbána). Diagnóza byla vedena podle Mezinárodní klasifikace nemocí (MKN-10). Vzhledem k pestrosti diagnóz byly subjekty rozřazeny podle prvního písmene uvedené klasifikace tak, aby vznikly hodnotitelné podskupiny.

Tabulka č. 10: Hodnocení podle prvního písmene MKN-10, tj. základních skupin onemocnění

MKN	Název skupin onemocnění
A	Infekční choroby
B	Infekční choroby
C	Novotvary
D	Nemoci krve
E	Endokrinní choroby a poruchy metabolismu
F	Poruchy duševní a poruchy chování
G	Nemoci nervové soustavy
H	Nemoci ucha
I	Kardiovaskulární choroby
J	Nemoci dýchací soustavy
K	Nemoci trávicí soustavy
L	Nemoci kůže podkožního vaziva
M	Nemoci svalové, kosterní a pojiva
N	Nemoci močové a pohlavní
O	Těhotenství a porod
P	Nemoci vzniklé v perinatálním období
R	Abnormální laboratorní výsledky
S	Poranění
T	Otravy

7.3. Statistické metody

7.3.1. Primární a sekundární veličiny

Primární veličinou byla v této studii séropozitivita, tj. procentuální proporce jedinců, kteří měli hladinu protilátek specifických proti spalničkám vyšší než 12 AU/mL. Sekundární

veličinu představovaly koncentrace specifických IgG protilátek, které byly dále hodnoceny jako geometrický průměr koncentrací.

Obě uvedené veličiny byly dále podrobeny sekundárnímu cíli, tj. byly vyhodnocovány pro skupiny a podskupiny podle předem stanovených prediktorů.

7.3.2. Oprávněnost velikosti vzorku

Velikost vzorku byla stanovena na základě jedno-vzorkové non-inferiority testované proporce (séropozitivity), tj. výhradně na primární veličině. K tomu účelu byla položena hypotetická séropozitivita (p_0) 90 % a byl učiněn předpoklad, že testovaná séropozitivita (p) ve studijní populaci dosáhne 91 %. Proto delta margin (δ) byl zvolen 1 %.

Nulová hypotéza předpokládala nedosažení non-inferiority, tj. $H_0: p_0 - p \leq \delta$. Pokud by byla nulová hypotéza zamítnuta, pak by platila alternativní, tj. $H_1: p_0 - p > \delta$, tj. byla by dosažena non-inferiorita testované proporce proti hypotetické.

Výpočet byl proveden pomocí statistického softwaru PowerandSampleSize.com (© 2013-2017 HyLown Consulting LLC, Atlanta, GA) určený pro výpočet síly testu a velikosti vzorku v klinických studiích. Pravděpodobnost chyby typu 1 (tj. hladina významnosti α) oboustranného intervalu byla 0,05 a statistická síla byla uvažována 80 % (minimální hodnota konzervativního přístupu).

Pro splnění non-inferiority primární veličiny byl stanoven soubor s minimálně 1.604 účastníky. Vzhledem k tomu, že do studie bylo nakonec zařazeno 2.784 subjektů, byl výsledek dosažen se statistickou silou testu >99 %.

7.3.3. Deskriptivní statistika

Všechny kontinuální veličiny, tj. koncentrace protilátek, BMI, věk byly popsány aritmetickým nebo geometrickým průměrem včetně 95% intervalu spolehlivosti. Kategoriální veličiny (včetně dichotomických) byly vyjádřeny proporcí v procentech a doplněny 95% interval spolehlivosti vypočteným jako exaktní interval.

7.3.4. Analýzy a statistické metody

Hodnoty koncentrací protilátek byly podrobeny testu normality (D'Agostino & Pearsonův test), který potvrdil jejich absenci, a naopak prokázal jejich normální rozložení, pokud byly logaritmicky transformovány. Proto bylo porovnávání geometrických průměrů koncentrací protilátek proti spalničkám prováděno parametrickými testy, tj. t-student test nebo jednofaktorová analýza rozptylu (ANOVA) s log-transformovanými koncentracemi. Pro vícenásobné porovnávání ANOVA byl použit Dunnettův test.

Ostatní kontinuální veličiny byly porovnávány parametrickými nepárovými testy, tj. t-student test a jednofaktorová ANOVA, protože rozložení dat splňovalo podmínku normality.

Míra séropozitivity, stejně jako ostatní kategoriální veličiny byly porovnávány buď pomocí Fisherova exaktního testu (porovnání dvou skupin) nebo χ^2 testem (porovnání více než dvou skupin). Asociace byla vyjádřena poměrem šancí, včetně asymptotického 95 % intervalu spolehlivosti.

Analýza vlivu prediktorů na perzistenci séropozitivity proti spalničkám byla provedena pomocí logistické regrese. McFaddenova determinanta, včetně p-hodnoty prokázaly přiměřenost použitého modelu, tj. zařazení všech použitých prediktorů. Velikost vzorku pro logistickou regresi byla oprávněna pro všech 7 použitých prediktorů. Výsledkem logistické regrese byly vzájemně adjustované poměry šancí, včetně 95 % intervalu spolehlivosti a p-hodnoty.

Všechny testy byly prováděny při hladině významnosti $\alpha = 0,05$ na oboustranném intervalu spolehlivosti. Analýzy a statistické metody byly provedeny za použití softwaru Prism 8 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) a STATA verze 16 (StatCorp, Lakeway Drive, TX, USA).

Statistickou analýzu získaných dat provedl odb. as. RNDr. Marek Petráš, PhD., z Ústavu epidemiologie a biostatistiky 3. LF UK.

8. Výsledky

8.1. Popis studijní populace

Do studie bylo zařazeno celkem 2.784 subjektů, z nichž převažovaly ženy 74,7 % (95% CI: 73,1-76,3 %) – tabulka č. 11. Toto zjištění korespondovalo obvyklému rozložení žen a mužů ve zdravotnictví.

Nejvíce subjektů bylo ve věkových kohortách 1976-80 a 1971-75 (14 % v obou), které následovala kohorta narozených v letech 1991-95 (12,7 %). I když ženy převažovaly ve všech věkových kohortách, v kohortách < 1970 jejich podíl dosahoval dokonce více než 80 %. Naopak v kohortách 1986-2000 jejich zastoupení kleslo na méně než 70 %. Nejméně účastníků bylo zastoupeno v kohortách < 1955 (≤ 3 %).

Tabulka č. 11: Počet a procentuální proporce (včetně 95% intervalu spolehlivosti) všech účastníků studie a žen ve studii podle sledovaného prediktoru

Prediktor		Všichni účastníci		Ženy	
		N	Procentuální proporce (95% CI)	N	Procentuální proporce (95% CI)
Všichni účastníci		2784		2080	74,7 (73,1-76,3)
Věková kohorta	1996 - 2000	168	6,0 (5,2-7,0)	115	68,5 (60,8-75,4)
	1991 - 1995	354	12,7 (11,5-14,0)	229	64,7 (59,5-69,7)
	1986 - 1990	298	10,7 (9,6-11,9)	206	69,1 (63,5-74,3)
	1981 - 1985	299	10,7 (9,6-11,9)	217	72,6 (67,1-77,6)
	1976 - 1980	391	14,0 (12,8-15,4)	308	78,8 (74,4-82,7)
	1971 - 1975	389	14,0 (12,7-15,3)	300	77,1 (72,6-81,2)
	1966 - 1970	285	10,2 (9,1-11,4)	236	82,8 (77,9-87,0)
	1961 - 1965	242	8,7 (7,7-9,8)	202	83,5 (78,2-87,9)
	1956 - 1960	207	7,4 (6,5-8,5)	167	80,7 (74,6-85,8)
	1951 - 1955	83	3,0 (2,4-3,7)	66	79,5 (69,2-87,6)
	<1950	68	2,4 (1,9-3,1)	34	50,0 (37,6-62,4)

Prediktor		Všichni účastníci		Ženy	
		N	Procentuální proporce (95% CI)	N	Procentuální proporce (95% CI)
BMI (kg/m ²)	<25	924	33,2 (31,4-35,0)	760	82,3 (79,6-84,7)
	25 - <30	512	18,4 (17,0-19,9)	360	70,3 (66,1-74,2)
	30 - <35	246	8,8 (7,8-10,0)	195	79,3 (73,7-84,2)
	≥35	63	2,3 (1,7-2,9)	45	71,4 (58,7-82,1)
	neznámý	1039	37,3 (35,5-39,1)	720	69,3 (66,4-72,1)
Souběžné onemocnění		1144	41,1 (39,3-42,9)	940	82,2 (79,8-84,3)
Zdravotnický personál		2243	80,6 (79,0-82,0)	1699	75,7 (73,9-77,5)
Cizinci		68	2,4 (1,9-3,1)	36	52,9 (40,4-65,2)
Kuřák	ne	882	31,7 (30,0-33,4)	709	80,4 (77,6-83,0)
	ano	521	18,7 (17,3-20,2)	410	78,7 (74,9-82,1)
	neznámý	1381	49,6 (47,7-51,5)	961	69,6 (67,1-72,0)

Věkový průměr studijní populace dosahoval 42 let a byl v rozmezí od 18,5 do 70,5 let. U mužů byl věkový průměr 40,1 let a jejich věk se pohyboval od 18,5 do 70,5 let. I když věkový průměr u žen byl 42,7 let, pohyboval v užším pásmu od 19,3 do 63,7 let. Přestože rozdíl průměrů věku mezi muži a ženami byl statisticky významný, zůstal malý (2,6 let) a lze ho považovat za klinicky nerelevantní.

Tabulka č. 12: Věkový průměr podle pohlaví

Pohlaví	Věk (roky)		P-hodnota
	N	Průměr (95% CI)	
Všichni	2784	42,0 (41,5-42,5)	
Muži	704	40,1 (39,1-41,2)	<0,0001
Ženy	2080	42,7 (42,1-43,2)	

Ve studijní populaci nebyl BMI určen u 37,3 % účastníků (tj. scházel některý z údajů o tělesné výšce a/nebo hmotnosti). Většina subjektů (53 %) měla BMI odpovídající normální

tělesné hmotnosti. Z celkového počtu 1.745 účastníků bylo 14 % osob s obezitou I. stupně a 3,6 % s obezitou II/III. stupně.

Průměrná hodnota BMI dosahovala 25,5 kg/m² (95 % CI: 25,3-25,7 kg/m²), přesto významně vyšší byla u mužů (26,5 kg/m²) oproti ženám (25,2 kg/m²) – viz Tabulka 13. Rozdíl BMI mezi muži a ženami byl malý a bylo možné hodnotit tento parametr na pohlaví nezávislý.

Tabulka č. 13: Průměrný BMI (kg/m²) podle pohlaví

Pohlaví	BMI (kg/m ²)		P-hodnota
	N	Průměr (95 % CI)	
Všichni	1745	25,5 (25,3-25,7)	<0,0001
Muži	385	26,5 (26,1-27,0)	
Ženy	1360	25,2 (24,9-25,5)	

Souběžné onemocnění bylo dokumentováno u 1.144 subjektů ve studii, tj. 41,1 % (95 % CI: 39,3-42,9 %).

Nejčastěji byly dokumentovány endokrinní a metabolické poruchy (písmeno E), tj. 17,9 % účastníků (95 % CI: 16,2-19,7 %). Následovaly kardiovaskulární choroby (nejčastěji hypertenze), které byly dokumentovány u 10,8 % (95 % CI: 9,5 – 12,3 %), onemocnění oka a ucha (písmeno H) pozorované u 9,6 % subjektů (95 % CI: 8,3-11 %) a onemocnění dýchacích cest u 8 % respondentů tj. 8 (95 % CI: 6,8-9,3) – viz Tabulka 14.

Četnost výskytu poruch endokrinního a/nebo metabolického systému, včetně kardiovaskulárních chorob odpovídá běžnému rozložení v české populaci.

Tabulka č. 14: Počet subjektů se souběžným onemocněním dle prvního písmene klasifikace MKN -10, včetně procentuální proporce s 95 % intervalem spolehlivosti

MKN	N	Procentuální proporce (95 % CI)
A	23	1,2 (0,8-1,8)
B	82	4,3 (3,4-5,3)
C	7	0,4 (0,1-0,7)
D	42	2,2 (1,6-2,9)
E	344	17,9 (16,2-19,7)

MKN	N	Procentuální proporce (95 % CI)
F	22	1,1 (0,7-1,7)
G	47	2,4 (1,8-3,2)
H	185	9,6 (8,3-11)
I	208	10,8 (9,5-12,3)
J	154	8 (6,8-9,3)
K	61	3,2 (2,4-4,1)
L	79	4,1 (3,3-5,1)
M	52	2,7 (2,0-3,5)
N	32	1,7 (1,1-2,3)
O	3	0,2 (0,0-0,5)
P	16	0,8 (0,5-1,3)
R	15	0,8 (0,4-1,3)
S	3	0,2 (0,0-0,5)
T	1	0,1 (0,0-0,3)

Absence záznamu kuřák/nekuřák v nemocniční databázi byla zjištěna u 1.381 subjektů ve studii, což představovalo téměř polovinu studijní populace, tj. 49,3 % (95 % CI: 47,7-51,5 %). Z celkem 1.403 účastníků bylo 521, u kterých byl veden záznam kuřák, tj. 37,1 %. Tento relativně vysoký počet kuřáků neodpovídal počtu v obecné české populaci, a proto analýzy dále prováděné, mohly být zatíženy určitým zkreslením.

8.2. Séropozitivita proti spalničkám

Z celkového počtu zařazených subjektů zůstalo séropozitivních 2.604, tj. 93,5 % (95 % CI: 92,6-94,4 %). Protože míra séropozitivity byla v testované skupině vyšší než předpokládaná hypotetická 90 % séropozitivita a to včetně spodního limitu 95% intervalu spolehlivosti, byla nulová hypotéza zamítnuta a byla tím prokázána platnost alternativní hypotézy, tj. byla dosažena non-inferiorita séropozitivity testované skupiny oproti hypotetické séropozitivitě. Jinými slovy zjištěná séropozitivita proti spalničkám byla u zdravotnického personálu fakultní nemocnice vyšší než 90 %. Tím byl prokázán primární cíl této studie.

Tento výsledek nebyl ovlivněn ani způsobem získání séropozitivity, tj. zda jedinci byli v minulosti očkovaní nebo imunitu získali přirozeným způsobem po onemocnění spalničkami. Účastníci narození v letech 1971-2000 byli očkovaní jednou nebo 2 dávkami a narození po roce 1975 byli kompletně očkovaní dvěma dávkami vakcíny proti spalničkám, zatímco přirozeně imunizovaní po onemocnění byli účastníci narození před rokem 1965. Všechny tři skupiny dosahovali séropozitivity vyšší než 90 %, neboť očkovaní 1 nebo 2 dávkami dosahovali 92,3 % séropozitivitu (95 % CI: 91,0-93,4 %), kompletně očkovaní dvěma dávkami 93,7 % séropozitivitu (95 % CI: 92,4-94,9 %) a přirozeně imunizovaní 98 % séropozitivitu (95 % CI: 96,5-99,0 %). Ve všech třech hodnocených skupinách nebyla prokázána inferiorita oproti hypotetické 90 % séropozitivitě, proto nezávisle na umělé či přirozené imunizaci byla mezi zdravotnickým personálem fakultní nemocnice séropozitivita vyšší než 90 %.

Subjekty s přirozeně získanou imunitou proti spalničkám vykazovaly významně vyšší séropozitivitu než subjekty, které byly očkovány buď kompletně (Tabulka 16) nebo alespoň jednou dávkou vakcíny proti spalničkám (Tabulka 15). Tomu odpovídaly hrubé poměry šancí, které oproti očkovaným vždy prokazovaly zvýšenou šanci pro dosažení vyšší séropozitivity. S tím pak souvisí i vyšší míra její perzistence, zohlední-li se věk subjektů s přirozenou imunitou.

Tabulka č. 15: Očkovaní účastníci a účastníci s přirozeně získanou imunitou

Subjekty	Celkem	Séropozitivních	Séropozitivita (95 % CI)	cOR (95 % CI)
Očkované	1899	1752	92,3 (91,0-93,4)	1
Přirozeně imunizované	600	588	98,0 (96,5-99,0)	4,11 (2,27-7,46)

Tabulka č. 16: Kompletně očkovaní účastníci dvěma dávkami vakcíny proti spalničkám a účastníci s přirozeně získanou imunitou

Subjekty	Celkem	Séropozitivních	Séropozitivita (95 % CI)	cOR (95 % CI)
Kompletně očkované	1510	1415	93,7 (92,4-94,9)	1
Přirozeně imunizované	600	588	98,0 (96,5-99,0)	3,29 (1,79-6,04)

8.2.1. Séropozitivita studované populace podmíněná faktory

Nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl míry séropozitivity mezi zdravotnickým personálem (92,6 % séropozitivních) a ostatním personálem nemocnice (93,8 % séropozitivních), jak dokladoval jak hrubý, tak adjustovaný poměr šancí – viz tabulka 17.

Podobně séropozitivita zaměstnanců cizí státní příslušnosti (94,1 %; 95 % CI: 85,6-98,4 %) nebyla významně odlišná od zaměstnanců české národnosti, protože adjustovaný poměr šancí séropozitivity proti spalničkám mezi oběma skupinami byl 1,27 (95 % CI: 0,84-1,92).

Přetrvávání IgG protilátek specifických proti spalničkám nad séropozitivní mezí bylo na pohlaví nezávislé, jak dokumentoval adjustovaný poměr šancí $aOR = 1,13$ (95 % CI: 0,80-1,62) tj. 93 % séropozitivita u mužů a 93,7 % séropozitivita u žen.

Oproti nejmladší kohortě narozených v letech 1996-2000, jejíž séropozitivita proti spalničkám dosahovala 94 % (95 % CI: 89,3-97,1 %), nebyla v ostatních věkových kohortách zjištěna statisticky významná odchylka. Výjimkou byla kohorta narozených v letech 1971-75, u nichž byla stanovena významně nižší séropozitivita 86,6 % (95 % CI: 82,8-89,9 %), což dokladoval adjustovaný poměr šancí 0,37 (95 % CI: 0,18-0,78). Právě tato věková kohorta pravděpodobně podstoupila dětské očkování proti spalničkám nejčastěji jen s jednou dávkou vakcíny, což mohlo snížit přetrvávání perzistence po dobu 44-48 let.

U nejstarších věkových kohort byla pozorována 100 % séropozitivita po více než 64 letech. To předznamenává extrémně dlouhou perzistenci séropozitivity přirozeně získanou po onemocnění v dětství.

Séropozitivita proti spalničkám nebyla závislá na BMI, tj. byla bez větších odchylek stejná jak u osob s normální tělesnou hmotností, tak u osob s nadváhou nebo obezitou. Ani souběžné onemocnění neovlivnilo séropozitivitu proti spalničkám, jak dokumentoval adjustovaný poměr šancí mezi účastníky bez a se souběžným onemocněním, tj. $aOR = 0,83$ (95 % CI: 0,59-1,16). U kuřáků byla zjištěna podobná séropozitivita (94 %; 95 % CI: 91,7-95,9 %) jako u nekuřáků (95 %; 95 % CI: 93,4-96,4 %). Ve skupině účastníků, kde nebyla známá informace o kuřáctví, se oproti skupině nekuřáků výrazně snížila séropozitivita na 92,4 % (95 % CI: 90,9-93,7 %). Toto zjištění však nelze interpretovat.

Tabulka č. 17: Míra séropozitivity na celém studijním souboru, včetně podskupin dle prediktorů a hrubý a adjustovaný poměr šancí séropozitivity mezi testovanou a referenční podskupinou z logistické regrese

Prediktor		N	n	Séropozitivita (95 % CI)	cOR (95 % CI)	aOR (95 % CI)
Celá studijní populace		2784	2604	93,5 (92,6-94,4)		
Pohlaví	Muži	704	655	93,0 (90,9-94,8)	1	1
	Ženy	2080	1949	93,7 (92,6-94,7)	1,11 (0,79-1,56)	1,13 (0,80-1,62)
Věkové kohorty	1996 - 2000	168	158	94,0 (89,3-97,1)	1	1
	1991 - 1995	354	337	95,2 (92,4-97,2)	1,25 (0,56-2,80)	1,17 (0,52-2,65)
	1986 - 1990	298	285	95,6 (92,7-97,7)	1,39 (0,59-3,24)	1,29 (0,53-3,13)
	1981 - 1985	299	271	90,6 (86,8-93,7)	0,61 (0,29-1,29)	0,55 (0,25-1,21)
	1976 - 1980	391	364	93,1 (90,1-95,4)	0,85 (0,40-1,80)	0,78 (0,35-1,72)
	1971 - 1975	389	337	86,6 (82,8-89,9)	0,41 (0,20-0,83)	0,37 (0,18-0,78)
	1966 - 1970	285	264	92,6 (89,0-95,4)	0,80 (0,37-1,73)	0,75 (0,33-1,71)
	1961 - 1965	242	235	97,1 (94,1-98,8)	2,12 (0,79-5,70)	1,94 (0,70-5,45)
	1956 - 1960	207	202	97,6 (94,5-99,2)	2,56 (0,86-7,63)	2,43 (0,79-7,49)
	1951 - 1955	83	83	100,0 (95,7-100,0)	nd	nd
	<1950	68	68	100,0 (94,7-100,0)	nd	nd
BMI (kg/m ²)	<25	924	863	93,4 (91,6-94,9)	1	1
	25 - <30	512	478	93,4 (90,8-95,4)	0,99 (0,64-1,53)	0,98 (0,63-1,53)
	30 - <35	246	228	92,7 (88,7-95,6)	0,90 (0,52-1,55)	0,88 (0,50-1,53)
	≥35	63	60	95,2 (86,7-99,0)	1,41 (0,43-4,64)	1,41 (0,42-4,75)
	Neznámý	1039	975	93,8 (92,2-95,2)	1,08 (0,75-1,55)	1,56 (0,99-2,47)
Souběžné onemocnění	Ne	1640	1539	93,8 (92,6-95,0)	1	1
	Ano	1144	1065	93,1 (91,5-94,5)	0,88 (0,65-1,20)	0,83 (0,59-1,16)
Zdravotnický personál	Ne	541	501	92,6 (90,1-94,7)	1	1
	Ano	2243	2103	93,8 (92,7-94,7)	1,20 (0,83-1,73)	1,27 (0,84-1,92)

Prediktor		N	n	Séropozitivita (95 % CI)	cOR (95 % CI)	aOR (95 % CI)
Cizinec	Ne	2716	2540	93,5 (92,5-94,4)	1	
	Ano	68	64	94,1 (85,6-98,4)	1,11 (0,40-3,08)	1,12 (0,37-3,43)
Kuřák	Ne	882	838	95,0 (93,4-96,4)	1	1
	Ano	521	490	94,0 (91,7-95,9)	0,83 (0,52-1,33)	0,83 (0,51-1,33)
	Neznámý	1381	1276	92,4 (90,9-93,7)	0,64 (0,44-0,92)	0,48 (0,31-0,72)

N ... počet subjektů ve skupině; n ... počet séropozitivních subjektů; cOR ... hrubý poměr šancí; aOR ... adjustovaný poměr šancí; nd ... nehodnotitelné

8.2.2. Séropozitivita kompletně očkované populace podmíněná faktory

V rámci analýzy senzitivity byla z celého studijního souboru vybrána podskupina účastníků, kteří byli očkováni dvěma dávkami vakcíny proti spalničkám. Séropozitivita skupin a podskupin roztríděných podle prediktorů v Tabulce 18 nenaznačila odlišnost od výsledků stanovených na celém souboru.

Pouze v podskupině s nezjištěným BMI a neznámým stavem kouření byla zjištěna statisticky významná odchylka od referenčních skupin, tj. skupiny s normální tělesnou hmotností a skupiny nekuřáků. Zatímco účastníci bez znalosti stavu kouření měli významně nižší séropozitivitu proti spalničkám, tj. 92,6 % (95 % CI: 90,5-94,3 %) oproti nekuřákům (96 %; 95 % CI: 93,8-97,6 %), účastníci bez znalosti indexu BMI naopak vykazovali významně vyšší séropozitivitu, tj. 94,5 % (95 % CI: 92,5-96,1 %) oproti jedincům s normální tělesnou hmotností. Bohužel tyto výsledky nelze interpretovat.

Tabulka č. 18: Míra séropozitivity ve studijní populaci kompletně očkované proti spalničkám, včetně podskupin dle prediktorů a hrubý a adjustovaný poměr šancí séropozitivity mezi testovanou a referenční podskupinou z logistické regrese

Prediktor	N	n	Séropozitivita (95 % CI)	cOR (95 % CI)	aOR (95 % CI)
Kompletně očkovaná	1510	1415	93,7 (92,4-94,9)		

Prediktor		N	n	Séropozitivita (95 % CI)	cOR (95 % CI)	aOR (95 % CI)
studijní populace						
Pohlaví	Muži	435	407	93,6 (90,8-95,7)	1	1
	Ženy	1075	1008	93,8 (92,2-95,1)	1,04 (0,66-1,63)	1,02 (0,64-1,63)
Věkové kohorty	1996 - 2000	168	158	94,0 (89,3-97,1)	1	1
	1991 - 1995	354	337	95,2 (92,4-97,2)	1,25 (0,56-2,80)	1,19 (0,52-2,73)
	1986 - 1990	298	285	95,6 (92,7-97,7)	1,39 (0,59-3,24)	1,30 (0,53-3,22)
	1981 - 1985	299	271	90,6 (86,8-93,7)	0,61 (0,29-1,29)	0,55 (0,25-1,24)
	1976 - 1980	391	364	93,1 (90,1-95,4)	0,85 (0,40-1,80)	0,79 (0,35-1,77)
BMI (kg/m ²)	<25	528	490	92,8 (90,3-94,9)	1	1
	25 - <30	215	199	92,6 (88,2-95,7)	0,96 (0,53-1,77)	1,04 (0,56-1,95)
	30 - <35	103	97	94,2 (87,8-97,8)	1,25 (0,52-3,05)	1,25 (0,51-3,09)
	≥35	26	26	100,0 (86,8-100,0)	nd	nd
	Neznámý	638	603	94,5 (92,5-96,1)	1,34 (0,83-2,15)	2,29 (1,24-4,21)
Souběžné onemocnění	Ne	949	890	93,8 (92,1-95,2)	1	1
	Ano	561	525	93,6 (91,2-95,5)	0,97 (0,63-1,48)	1,07 (0,67-1,70)
Zdravotnický personál	Ne	369	343	93,0 (89,8-95,3)	1	1
	Ano	1141	1072	94,0 (92,4-95,3)	1,18 (0,74-1,88)	1,38 (0,80-2,39)
Cizinec	Ne	1444	1353	93,7 (92,3-94,9)	1	1
	Ano	66	62	93,9 (85,2-98,3)	1,04 (0,37-2,93)	0,98 (0,31-3,10)
Kuřák	Ne	451	433	96,0 (93,8-97,6)	1	1
	Ano	289	269	93,1 (89,5-95,7)	0,56 (0,29-1,08)	0,56 (0,29-1,08)
	Neznámý	770	713	92,6 (90,5-94,3)	0,52 (0,30-0,90)	0,36 (0,20-0,67)

N ... počet subjektů ve skupině; n ... počet séropozitivních subjektů; cOR ... hrubý poměr šancí; aOR ... adjustovaný poměr šancí; nd ... nehodnotitelné

8.2.3. Séropozitivita přirozeně imunizované populace podmíněná faktory

Na souboru účastníků, kteří získali imunitu proti spalničkám přirozeným způsobem, tj. onemocněním v dětství, byla séropozitivita proti spalničkám v podskupinách členěných dle prediktorů ve shodě se séropozitivitou stejných podskupin v celém souboru, tj. jak očkovaných, tak přirozeně imunizovaných – viz. tabulka č.19.

Jediným rizikovým faktorem, u kterého se snížila séropozitivita proti spalničkám, se stalo souběžné onemocnění (komorbidita). Subjekty s komorbiditami vykazovaly sníženou séropozitivitu (97,3 %; 95 % CI: 94,8-98,8 %) oproti subjektům bez zjištěné komorbidity (98,7 %; 95 % CI: 96,6-99,6 %), jak prokázal adjustovaný poměr šancí 0,17 (95 % CI: 0,03-0,88). Sice rozdíl séropozitivit mezi oběma skupinami s a bez souběžného onemocnění nebyl velký, ale je třeba souběžné onemocnění považovat za potenciálně rizikový faktor pro ztrátu dostatečného množství protilátek specifických proti spalničkám.

Proč se tento faktor neobjevil také u plně očkovaných může souviset se skutečností, že kohorta přirozeně imunizovaných byla významně starší (starší 54 let) než kohorta kompletně očkovaných (mladší 43 let). S vyšším věkem se mohou objevovat taková souběžná onemocnění, která častěji vedou k imunosupresi (v důsledku vyžadované léčby), což může snížit hladiny specifických protilátek až pod jejich séropozitivní mez.

Na souboru přirozeně imunizovaných nebyla zjištěna odlišná séropozitivita u jedinců s neznámým BMI indexem stejně jako s neznámým stavem kouření oproti referenčním skupinám.

Tabulka č. 19: Míra séropozitivity ve studované populaci přirozeně imunizované proti spalničkám, včetně podskupin dle prediktorů a hrubý a adjustovaný poměr šancí séropozitivity mezi testovanou a referenční podskupinou z logistické regrese

Prediktor	N	n	Séropozitivita (95 % CI)	cOR (95 % CI)	aOR (95 % CI)
Přirozeně imunizovaná studijní populace	600	588	98,0 (96,5-99,0)		

Prediktor		N	n	Séropozitivita (95 % CI)	cOR (95 % CI)	aOR (95 % CI)
Pohlaví	Muži	131	130	99,2 (95,8-100,0)	1	1
	Ženy	469	458	97,7 (95,8-98,8)	0,32 (0,04-2,50)	0,32 (0,04-2,76)
Věkové kohorty	1961 - 1965	242	235	97,1 (94,1-98,8)	1	1
	1956 - 1960	207	202	97,6 (94,5-99,2)	1,20 (0,38-3,85)	1,34 (0,40-4,53)
	1951 - 1955	83	83	100,0 (95,7-100,0)	Nd	nd
	<1950	68	68	100,0 (94,7-100,0)	Nd	nd
BMI (kg/m ²)	<25	173	171	98,8 (95,9-99,9)	1	1
	25 - <30	155	151	97,4 (93,5-99,3)	0,44 (0,08-2,44)	0,40 (0,07-2,37)
	30 - <35	68	67	98,5 (92,1-100,0)	0,78 (0,07-8,79)	0,70 (0,06-8,29)
	≥35	20	20	100,0 (83,2-100,0)	Nd	nd
	Neznámý	184	179	97,3 (93,8-99,1)	0,42 (0,08-2,19)	0,23 (0,03-1,84)
Souběžné onemocnění	Ne	301	297	98,7 (96,6-99,6)	1	1
	Ano	299	291	97,3 (94,8-98,8)	0,49 (0,15-1,64)	0,17 (0,03-0,88)
Zdravotnický personál	Ne	73	70	95,9 (88,5-99,1)	1	1
	Ano	527	518	98,3 (96,8-99,2)	2,47 (0,65-9,33)	2,85 (0,66-12,2)
Kuřák	Ne	198	196	99,0 (96,4-99,9)	1	1
	Ano	111	109	98,2 (93,6-99,8)	0,56 (0,08-4,00)	0,60 (0,08-4,51)
	Neznámý	291	283	97,3 (94,7-98,8)	0,36 (0,08-1,72)	0,28 (0,05-1,64)

N ... počet subjektů ve skupině; n ... počet séropozitivních subjektů; cOR ... hrubý poměr šancí; aOR ... adjustovaný poměr šancí; nd ... nehodnotitelné

8.3. Hladina specifických protilátek proti spalničkám

Geometrický průměr koncentrací IgG protilátek (GMC IgG) proti spalničkám byl ve sledovaném souboru 16,3 AU/mL (95 % CI: 16,1-16,6 AU/mL). Nebyl zjištěn žádný

statisticky významný rozdíl GMC IgG protilátek u účastníků kompletně očkovaných dvěma dávkami (15,3 AU/mL; 95 % CI: 15,1-15,5 AU/mL) oproti očkovaným alespoň jednou dávkou vakcíny proti spalničkám (15,2 AU/mL; 95 % CI: 15,0-15,4 AU/mL), / $p = 0,476$ /. Naopak účastníci přirozeně imunizovaní onemocněním měli statisticky významně vyšší GMC IgG protilátek (20,7 AU/mL; 95 % CI: 20,1-21,3 AU/mL) než očkovaní / $p < 0,0001$ /.

Zatímco séropozitivita nebyla pohlavím ovlivněna, geometrické průměry koncentrací IgG protilátek byly u žen (16,6 AU/mL) statisticky významně vyšší než u mužů (15,7 AU/mL), $p=0,0003$ – viz Tabulka 20. Oproti GMC IgG protilátek účastníků narozených v letech 1996-2000 byly hladiny postvakcinačních protilátek významně vyšší u narozených v letech 1991-95 a 1986-90. Všichni účastníci s přirozeně získanou imunitou měli hladiny protilátek vyšší než nejmladší věková kohorta, GMC IgG protilátek se u nich pohybovala v rozmezí 16,6-20,9 AU/mL.

BMI a souběžná onemocnění neměla vliv na výši hladin IgG protilátek specifických proti spalničkám. Podobně byl geometrický průměr těchto koncentrací nezávislý na tom, zda byl účastník zdravotnickým personálem či nikoli nebo zda byl cizí státní příslušnosti. Kouření také GMC IgG protilátek neovlivnilo a stejně jako byla pozorována snížená séropozitivita u účastníků s neznámým stavem kouřením, byly i hladiny IgG protilátek u nich významně nižší než u nekuřáků.

Geometrický průměr koncentrací IgG protilátek proti spalničkám byl podle očekávání nižší u subjektů, kteří nedosáhli séropozitivního limitu protilátek (8,49 AU/mL; 95 % CI: 8,09-8,90 AU/mL) oproti těm, co tento limit překročili (17,2 AU/mL; 17,0-17,4 AU/mL).

Tabulka č. 20: Geometrický průměr koncentrací (GMC) IgG protilátek specifických proti spalničkám, včetně 95 % intervalu spolehlivosti ve studijním souboru a podskupinách podle prediktorů

Prediktor		Počet subjektů	GMC (95%CI)	p-hodnota
Celá studijní populace		2784	16,3 (16,1-16,6)	
Pohlaví	Muži	704	15,7 (15,3-16,1)	ref
	Ženy	2080	16,6 (16,3-16,8)	0,0003
Věkové kohorty	1996 - 2000	168	14,5 (13,9-15,2)	ref

Prediktor		Počet subjektů	GMC (95%CI)	p-hodnota
	1991 - 1995	354	15,9 (15,4-16,5)	0,0244
	1986 - 1990	298	16,0 (15,4-16,6)	0,0222
	1981 - 1985	299	14,5 (14,0-15,0)	>0.9999
	1976 - 1980	391	15,0 (14,6-15,5)	0,8143
	1971 - 1975	389	14,7 (14,2-15,2)	0,9994
	1966 - 1970	285	16,6 (16,0-17,4)	0,0002
	1961 - 1965	242	20,9 (19,8-22,0)	<0.0001
	1956 - 1960	207	20,8 (19,8-21,9)	<0.0001
	1951 - 1955	83	20,8 (19,5-22,3)	<0.0001
	<1950	68	19,2 (18,0-20,5)	<0.0001
BMI (kg/m ²)	<25	924	16,3 (16,0-16,7)	ref
	25 - <30	512	16,6 (16,1-17,2)	0,7960
	30 - <35	246	16,6 (15,9-17,4)	0,9298
	≥35	63	16,1 (15,0-17,3)	0,9948
	Neznámý	1039	16,2 (15,8-16,5)	0,9205
Souběžné onemocnění	Ne	1640	16,2 (16,0-16,5)	ref
	Ano	1144	16,5 (16,1-16,9)	0,2851
Zdravotnický personál	Ne	541	15,9 (15,5-16,4)	ref
	Ano	2243	16,4 (16,2-16,7)	0,0696
Cizinec	Ne	2716	16,3 (16,1-16,6)	ref
	Ano	68	16,7 (15,3-18,3)	0,5855
Kuřák	Ne	882	16,8 (16,4-17,2)	ref
	Ano	521	17,0 (16,5-17,5)	0,7247
	Neznámý	1381	15,9 (15,6-16,2)	0,0005
Pre-vakcinační hladiny protilátek (AU/mL)	≤12	195	8,49 (8,09-8,90)	ref
	> 12	2604	17,2 (17,0-17,4)	<0.0001

Ref ... referenční skupina

9. Diskuse

Spalničky patří mezi vysoce nakažlivé onemocnění, což vede k jejich rychlému šíření ve vnímavé populaci, tj. buď neočkované populaci nebo, ve které došlo ke ztrátě ochrany ať už získané očkováním nebo přirozenou cestou.

Před zavedením plošného očkování se spalničky objevovaly endemicky obvykle v pravidelných cyklech po 2-5 letech. Očkování významně změnilo epidemiologickou situaci jejich výskytu a ve většině evropských zemí přestaly být endemické. Nicméně ohniska onemocnění stále přetrvávají, a proto spalničky stále patří mezi rizikové, a to zejména pro tu nejvnmavější dětskou populaci. Světová zdravotnická organizace ustanovila cíl celosvětové eradikace spalniček v letech 2005-10 [Cutts 1998], který se však nepodařilo naplnit. V roce 2016 byly oba kontinenty Jižní i Severní Amerika vyhlášeny prostými spalniček, i když i nadále se sporadicky objevují případy zejména importované [Holzmann 2016].

Tato séroprevalenční studie provedená ve fakultní nemocnici se zaměřila na séropozitivitu proti spalničkám u zdravotnického personálu, včetně ostatního nemocničního personálu, aby určila, zda nemocniční zaměstnanci mohou být ve vyšším riziku ohrožení v případě zavlečení spalniček do nemocnice, kde by představovaly riziko nozokomiální infekce.

Do studie bylo zařazeno celkem 2.784 zaměstnanců fakultní nemocnice. Během období květen 2018 až prosinec 2019 účastníci studie podstoupili vyšetření IgG protilátek specifických proti spalničkám. Bylo to v období, kde byl v Praze pozorován zvýšený epidemický výskyt spalniček. Údaje sledovaných prediktorů, jako pohlaví, věk, tělesná hmotnost a výška včetně kouření a souběžného onemocnění, byly získány z nemocniční databáze (UNIS) a stav získané imunity proti spalničkám byl získán přímým dotazem účastníka. Bohužel nebylo možné očkování či přirozeně získanou imunitu ověřit z databázových záznamů, neboť ty nebyly vedeny.

Primárním cílem bylo zjistit, zda séropozitivita u nemocničního personálu není nižší než 90 %. Počet zařazených účastníků byl dostatečně vysoký k tomu, aby mohl být tento cíl prokázán. Ve studijní populaci byla potvrzena non-inferiorita proti hypotetické míře séropozitivity, protože nejen střední hodnota ale také spodní limit 95 % intervalu spolehlivosti byl vyšší než 90 %, tj. 92,6 %. Tento výsledek byl dosažen jak u účastníků očkovaných aspoň jednou dávkou vakcíny proti spalničkám v dětství (séropozitivita spodního limitu 95 %

intervalu spolehlivosti: 91,0 %) tak u účastníků s přirozeně získanou imunitou po onemocnění spalničkami v dětství (séropozitivita spodního limitu 95 % intervalu spolehlivosti: 96,5 %). I když hladiny přirozeně nebo očkováním indukovaných protilátek proti spalničkám byly u většiny nad séropozitivním limitem, byl pozorován rozdíl mezi očkovanými a přirozeně imunizovanými účastníky.

Zdá se, že přirozená imunizace spalničkami vede k robustnější imunitní odpovědi s pravděpodobně delší perzistencí než očkování, a to ať už s jednou nebo dvěma dávkami vakcíny. Ať již byla imunita získána přirozeným nebo umělým způsobem nebyl u osob zjištěn žádný klinický rozdíl.

Podle předpokladu bylo zjištěno, že účastníci narození v letech 1971-75, z nichž většina byla očkovaná pouze jednou dávkou vakcíny proti spalničkám, měli častěji hladiny specifických protilátek nižší, než byl séropozitivní limit, tj. míra séropozitivity této kohorty byla významně nižší než u ostatních, tj. 86,6 %. Obdobný výsledek byl pozorován také v séroprevalenční studii prováděné v obecné české populaci v roce 2013 [Tomášková 2018], kde kohorta narozených v letech 1968-1978 dosahovala jen 80,4 % séropozitivity. Je tak zřejmé, že nejohroženější skupinou se v současnosti stávají ty ročníky, které byly v dětství očkovány pouze jednou dávkou vakcíny proti spalničkám.

Míra séropozitivity zjištěná v naší studii na populaci zdravotnického personálu byla srovnatelná s výsledky jiných publikací. Publikované výsledky meta-analýzy 23 studií [Bianchi 2020], které se věnovaly séroprevalenci u italských zdravotníků, potvrdily relativně vysokou séropozitivitu v této profesní komunitě - 88,5 % (95 % CI: 84,6-91,9 %) ze všech zařazených studií a 90,9 % (95 % CI: 87,5-93,8 %) ze studií se sérologickým ověřením. Vyšší než 90 % séropozitivita mezi zdravotnickým personálem byla dokumentována také v dalších zemích, například 93 % ve Francii [Botelho-Nevers 2011], 98 % ve Španělsku [Urbiztondo 2013], 91,8 % séropozitivita v Japonsku [Kumakura 2013].

Z výsledků naší studie lze předpokládat, že perzistence dostatečně vysokých hladin protilátek specifických proti spalničkám je trvalá bez ohledu na způsobu jejich získání. Přesto se zdá, že vyšší séropozitivita zůstává u jedinců po přirozeně indukovaných protilátkách než u jedinců očkovaných alespoň jednou dávkou.

Z hlediska klinického významu lze kompletní očkování považovat za odpovídající metodu dosažení dostatečně vysoké a dlouhodobé séropozitivity proti spalničkám přetrvávající

minimálně 43 let. Navíc očkování oproti onemocnění spalničkami eliminuje negativní dopady na zdraví jedince, což kompenzuje případnou mírnou ztrátu séropozitivity oproti získané přirozenou imunizací, která přetrvává minimálně 69 let. Toto zjištění bylo v souladu s dosavadními poznatky [Mossong 2003].

Séropozitivita získaná kompletním očkováním proti spalničkám nebyla závislá na pohlaví jedince a délce doby od ukončeného očkování. Nebyla ovlivněna ani souběžným onemocněním, kouřením, nadváhou a/nebo obezitou jedince. Podobně také míra séropozitivity byla u účastníků s přirozeně získanou imunitou na uvedených faktorech nezávislá s výjimkou souběžného onemocnění, které ji snižovalo. Lze to vysvětlit tím, že jedinci s přirozenou získanou imunitou patřili mezi starší věkové kohorty, což zvyšovalo riziko souběžných onemocnění, které mohly alterovat získanou specifickou imunitu, případně vyžadovaly léčbu s imunosupresivními účinky, které mohly vést ke snížení hladin protilátek pod séropozitivní mez.

Překvapivě byla však zjištěna mírně vyšší koncentrace IgG protilátek specifických proti spalničkám u žen než u mužů, ačkoli to nemělo vliv na dosažení séropozitivity. Proto není předpoklad, že by ženy mohly být proti spalničkám chráněny více než muži. Vyšší séropozitivitu u přirozeně imunizovaných kopírovaly významně vyšší geometrické průměry koncentrací IgG protilátek specifických proti spalničkám oproti těm, co byli očkováni alespoň jednou dávkou vakcíny.

10. Závěr

Výsledky naší studie potvrdily dlouhodobé přetrvávání >90 % séropozitivity proti spalničkám, a to nezávisle na způsobu získání imunity. Přesto o něco vyšší séropozitivita perzistuje u zdravotnického personálu, který získal imunitu proti spalničkám přirozeným způsobem, tj. onemocněním. Zda to má nějaký klinický význam není dosud známe, protože nebyla pozorována zvýšená vnímavost kompletně očkováných proti spalničkám oproti těm, co v dětství spalničkami onemocněli.

Přetrvávání vysoké séropozitivity nebylo ovlivněno sledovanými faktory s výjimkou souběžných onemocnění u jedinců s přirozeně získanou imunitou, kteří ji mírně ztráceli. Bylo však znovu potvrzeno, že jedinci s neúplným očkováním, tj. s očkováním jednou dávkou vakcíny proti spalničkám, se mohou později stát znovu vnímavými. Proto je na místě, zejména zdravotnický personál ať už s neznámým stavem očkování nebo s očkováním jednou dávkou, řádně očkovat, buď dvěma dávkami nebo doplnit očkování podáním druhé dávky. Výsledky této studie nevedou k přesvědčení o tom, že je třeba zdravotnický personál pravidelně očkovat přidáním třetí dávky či dalších dávek vakcíny, pokud byli kompletně očkováni v dětství nebo v dětství spalničkami onemocněli.

V každém případě by bylo vhodné do nemocniční databáze UNIS doplnit informaci o provedených očkováních, včetně očkování proti spalničkám, a to u každého nemocničního zaměstnance v rámci pracovnělékařských prohlídek. Data by měla být verifikována z dostupných údajů, nejčastěji z očkovacích průkazů, případně záznamů zdravotních pojišťoven. Tím by se lépe organizovala preventivní očkování potřebná pro zdravotnický personál.

V souladu s doporučením ACIP se domníváme, že namísto plošné revakcinace nebo sérologické kontroly protilátek je v době rizika epidemického zvýšení onemocnění vhodná jen cílená imunizace ohrožených zdravotnických pracovníků, a to s neúplným očkováním nebo s chybějící znalostí o získané imunitě.

11. Souhrn

V období mezi květnem roku 2018 a prosincem roku 2019, v době zvýšeného epidemického výskytu spalniček v České republice, zejména v Praze, byla provedena prospektivní sérologická studie u zaměstnanců fakultní nemocnice zaměřená na zjištění séropozitivity proti spalničkám. Celkem bylo vyšetřeno 2.782 zaměstnanců fakultní nemocnice ve věku 19-89 let.

Cílem studie bylo zjistit, zda míra séropozitivity proti spalničkám u zdravotnického personálu je vyšší než 90 % a zda případně není ovlivněna některým ze sledovaných prediktorů, tj. pohlaví, věk, způsob získání imunity, nadváhou či obezitou, kouřením a souběžným onemocněním. Protože se předpokládala imunita získaná zpravidla v dětství ať už očkováním nebo přirozeným způsobem, hodnotila se také perzistence séropozitivity.

Výsledky této studie potvrdily, že séropozitivita zdravotnického personálu byla vyšší než 90 % nezávisle na jejím získání. Přesto o něco vyšší (98 % séropozitivita) zůstala u těch, co v dětství spalničkami onemocněli. I když očkování alespoň jednou dávkou zajistilo 92,3 % séropozitivitu, jedinci očkováni jednou dávkou vakcíny ji ztráceli častěji a hypotetického limitu séropozitivity po více než 45 let všichni nedosáhli, tj. necelých 87 % z nich si uchovalo hladiny protilátek specifických proti spalničkám nad séropozitivní mezí. Zjištěná séropozitivita zdravotnického personálu nebyla ovlivněna sledovanými faktory (tj. pohlaví, věk, kouření, nadváha či obezita nebo souběžné onemocnění).

Závěrem lze konstatovat, že specifická imunita proti spalničkám mezi zdravotnickým personálem fakultní nemocnice je dostatečná, k zabránění nekontrolovatelného šíření spalniček v případě jejich zavlečení do nemocničního zařízení. Pokud by došlo k epidemickému zvýšení výskytu spalniček, dodatečně by se očkovali jen ti jedinci, u nichž schází záznam o získání imunity, nebo byli očkováni v minulosti pouze jednou dávkou vakcíny proti spalničkám.

Summary

Between May 2018 and December 2019, during an epidemic measles outbreak in the Czech Republic, especially in Prague, a prospective serological study was conducted by staff at the Kralovske University Hospital, which focused on determining the measles seropositivity of the Kralovske University Hospital personal. During the study, a total of 2,782 university hospital employees, between the ages of 19-89 years, were examined.

The aim of the study was to determine whether the measles seropositivity rate in health care staff was greater than 90 % and whether seropositivity was affected by any of the studied variables such as gender, age, natural vs. acquired immunity, overweight or obesity, smoking, and concomitant disease. Since childhood immunity, obtained either by infection or vaccination, was assumed, seropositivity persistence into adulthood was also evaluated.

The results of the study confirmed that the seropositivity of medical personnel was greater than 90 % independently of how it was acquired. However, seropositivity was higher (98 %) in those who had natural immunity via a childhood measles infection. Although vaccination with at least one dose of the vaccine produced 92.3 % seropositivity, it was also observed that those who only received a single dose of the vaccine were more likely to lose their immunity by 45 years after their vaccine, i.e., less than 87 % retained measles-specific antibody levels above the seropositive limit. The seropositivity of the medical staff was not affected by the monitored variables, i.e., gender, age, overweight or obesity, smoking, and concomitant disease.

In conclusion, we found that specific immunity to measles, among the health care staff at the Kralovske University Hospital, was sufficient to prevent an uncontrollable spread of measles in the event that the measles virus entered the hospital facility. Should there be an epidemic increase in measles, only those individuals without an immunization record and those who previously received only a single dose of the measles vaccine, would need to be vaccinated.

12. Seznam použitých zkratk

ACIP	The Advisory Committee on Immunization Practices
CDC	Centre for Disease Prevention and Control
DAMP	Damage Assotiated Molecular Pattern
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
EPIDAT	Informační systém pro evidenci epidemiologických údajů o infekčních onemocněních v ČR.
EU/ EHP	Evropská Unie/ Evropské hospodářské společenství/
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
MV	Morbilli Virus / virus spalniček
MCV1/2	očkování proti spalničkám1./2.dávka
MKN-10	Mezinárodní klasifikace nemocí a souvisejících zdravotních problémů 10.té vydání
NK	Natural killer
PAMP	Pathogen Assotiated Molecular Pattern
PRR	Pattern recognition receptory
SZP	Střední zdravotní personál
TEESy	The European Surveillance System
TLR	Toll – like Receptor
UNIS	Univerzální nemocniční informační systém
VCAM	Vascular Cellular Adhesion Molecule -1
VNP	Virus neutralizační protilátky
WHO	World Health Organization

13. Seznam použitých pramenů a literatury

Baxi R, Mytton OT, Abid M, Maduma-Butshe A, Iyer S, Ephraim A, Brown KE, O'Moore E. Outbreak report: nosocomial transmission of measles through an unvaccinated healthcare worker-implications for public health. *J Public Health (Oxf)* (2014); 36:375- 81.

Beneš, J. Infekční lékařství, Galén 2009, ISBN 978-7262-644-1

Bianchi FP, Mascipinto S, Stefanizzi P, et al. Prevalence and management of measles susceptibility in healthcare workers in Italy: a systematic review and meta-analysis [published online ahead of print, 2020 Jul 9]. *Expert Rev Vaccines*. 2020;1-9.

Botelho-Nevers, E.; Cassir, N.; Minodier, P.; Laporte, R.; Gautret, P.; Badiaga, S.; Thiberville, D.J.; Ninove, L.; Charrel, R.; Brouqui, P. Measles among healthcare workers: A potential for nosocomial outbreaks. *Eur. Surveill*. 2011, 16, 19764.

CDC. Measles, mumps, and rubella—vaccine use and strategies for elimination of measles, rubella, and congenital rubella syndrome and control of mumps: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR* 1998;47(No. RR-8

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Measles - United States, 2011. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* (2012); 61:253-7; PMID:22513526

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Increased transmission and outbreaks of measles—European Region, 2011. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* (2011); 60:1605-10; PMID:22129994

Coppeta, L.; Pietroiusti, A.; Lieto, P.; Ferraro, M.; Grelli, S.; Stillo, M.; Magrini, A. Measles immunity in an Italian teaching hospital. *Occup. Med. (Lond)*. 2019, 69, 143-145.

Cunningham AL, Heineman TC, Lal H, Godeaux O, Chlibek R, Hwang SJ, McElhaney JE, Vesikari T, Andrews C, Choi WS, Esen M, Ikematsu H, Choma MK, Pauksens K, Ravault S, Salaun B, Schwarz TF, et al. Immune Responses to a Recombinant Glycoprotein E Herpes Zoster Vaccine in Adults Aged 50 Years or Older. *J Infect Dis*. 2018;217(11):1750-60.

Cutts FT, Steinglass R. Should measles be eradicated?. *BMJ*. 1998;316(7133):765-767. doi:10.1136/bmj.316.7133.765

Davidkin I, Valle M. Vaccine-induced measles virus antibodies after two doses of combined measles, mumps and rubella vaccine: a 12-year follow-up in two cohorts. *Vaccine* 1998;16(20):2052-38

de Swart RL, de Vries RD, Rennick LJ, et al. Needle-free delivery of measles virus vaccine to the lower respiratory tract of non-human primates elicits optimal immunity and protection. *NPJ Vaccines* 2017;

de Swart RL, Yuksel S, Osterhaus AD. Relative contributions of measles virus hemagglutinin- and fusion protein-specific serum antibodies to virus neutralization. *J Virol* 2005;79(17):11547-51.

de Vries RD, de Swart RL. Measles immune suppression: functional impairment or numbers game? *PLoS Pathog* 2014; 10(12): e1004482.

de Vries RD, Yuksel S, Osterhaus AD, de Swart RL. Specific CD8(+) T-lymphocytes control dissemination of measles virus. *Eur J Immunol* 2010;40(2):388-95

Dine MS, Hutchins SS, Thomas A, Williams I, Bellini WJ, Redd SC. Persistence of vaccine-induced antibody to measles 26-33 years after vaccination. *J Infect Dis* 2004;189(Suppl 1):S123-30.

Enders JF, and Peebles TC. Propagation in tissue cultures of cytopathogenic agents from patients with measles. *Proc Soc Exp Biol Med* 1954;86:277–286 [PubMed]

Enders JF, Peebles TC. Propagation in tissue cultures of cytopathogenic agents from patients with m125. European Centre for Disease Prevention and Control. Review of outbreaks and barriers to MMR vaccination coverage among hard-to-reach populations in Europe: Venice II Consortium. (ECDC, 2013)

European Centre for Disease Prevention and Control. Measles and rubella elimination: communicating the importance of vaccination. Stockholm: ECDC; 2014.

Fiebelkorn AP, Seward JF, Orenstein WA. A global perspective of vaccination of healthcare personnel against measles: systematic review. *Vaccine* (2014); 32:4823-39

Gans HA, Yasukawa LL, Sung P, et al. Measles humoral and cell-mediated immunity in children aged 5-10 years after primary measles immunization administered at 6 or 9 months of age. *J Infect Dis* 2013;207(4):574-82.

Gonzalez-Escalada, A.; Garcia-Garcia, L.; Viguera-Ester, P.; Marin-Garcia, P.; Garcia, J.; Gil de Miguel, A.; Gil-Prieto, R. Seroprevalence of antibodies against measles, rubella, mumps, varicella-zoster, and B. Pertussis in young adults of Madrid, Spain. *Hum. Vaccine Immunother.* 2013, 9, 1918–1925.

Goodson JL, Seward JF. Measles 50 Years After Use of Measles Vaccine. *Infect Dis Clin North Am.* 2015;29(4):725-743. doi:10.1016/j.idc.2015.08.001

Griffin D.E. Measles virus. In: Knipe D.M., Howley P.M., editors. *Fields Virology*. Volume 6. Wolters Kluwer | Lippincott Williams & Wilkins; Philadelphia, PA, USA: 2013. pp. 1042–1069

Griffin DE. Measles Vaccine. *Viral Immunol.* 2018;31(2):86-95. doi:10.1089/vim. 2017.0143

Griffin DE. The immune response in measles: virus control, clearance and protective immunity. *Viruses* 2016;8(10).

Haralambieva IH, Kennedy RB, Ovsyannikova IG, Schaid DJ, Poland GA. Current perspectives in assessing humoral immunity after measles vaccination. *Expert Rev Vaccines.* 2019;18(1):75-87.

Heymann.,DL.,Control of Communicable Diseases Manual 20 th edition, 2015, ISBN 978-0-87553-018-5

Holzmann H, Hengel H, Tenbusch M, Doerr HW. Eradication of measles: remaining challenges. *Med Microbiol Immunol.* 2016;205(3):201-208.

Hořejší, V. , Bartůňková, J., Brdička.t., Špíšek., R., Triton 2017, Praha, ISBN 978-80-7553-250-3

Hughes SL, Bolotin S, Khan S, et al. The effect of time since measles vaccination and age at first dose on measles vaccine effectiveness - A systematic review. *Vaccine* 2020;38(3):460-9.

Chen SY, Anderson S, Kutty PK, Lugo F, McDonald M, Rota PA, Ortega-Sanchez IR, Komatsu K, Armstrong GL, Sunenshine R, et al. Health care-associated measles outbreak in the United States after an importation: challenges and economic impact. *J Infect Dis* (2011); 203:1517-25; PMID:21531693; [http://dx. doi.org/10.1093/infdis/jir115](http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jir115)

Chlíbek, R. et al. Očkování dospělých, Mladá fronta 2019, ISBN 978-80-204-5304-4

Choi WS, Sniadack DH, Jee Y, Go UY, So JS, Cho H, Bae GR, Lee DH, Kim K, Yoon HS, et al. Outbreak of measles in the Republic of Korea, 2007: importance of nosocomial transmission. *J Infect Dis* (2011); 204 Suppl 1:S483-S490; PMID:21666204; <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jir087>

Ingardia CJ, Kelley L, Steinfeld JD, Wax JR. Hepatitis B vaccination in pregnancy: factors influencing efficacy. *Obstet Gynecol*. 1999 Jun;93(6):983-6.

Jílek, Dalibor. Imunologická podstata vakcinace. *Alergie*. 2005, 7(3), 202-208. ISSN 1212-35

Krejsek, J, Andrýs,C., Krčmová, I. *Imunologie člověka*, Hradec Králové, ISBN 978-86472-74-4

Kumakura, S.; Shibata, H.; Onoda, K.; Nishimura, N.; Matsuda, C.; Hirose, M. Seroprevalence survey on measles, mumps, rubella and varicella antibodies in healthcare workers in Japan: Sex, age, occupational-Related differences and vaccine efficacy. *Epidemiol. Infect.* 2013, 142, 12–19.

Kumakura, S.; Shibata, H.; Onoda, K.; Nishimura, N.; Matsuda, C.; Hirose, M. Seroprevalence Survey on Measles, Mumps, Rubella and Varicella Antibodies in Healthcare Workers in Japan: Sex, Age, Occupational-Related Differences and Vaccine Efficacy. *Epidemiol. Infect.* 2014, 142, 12-19.

Laksono BM, de Vries RD, McQuaid S, Duprex WP, de Swart RL. Measles virus host invasion and pathogenesis. *Viruses* 2016; 8(8).

Laksono BM, de Vries RD, Verburgh RJ, et al. Studies into the mechanism of measles-associated immune suppression during a measles outbreak in the Netherlands. *Nat Commun* 2018; 9(1):4944.

- Lin WH, Kouyos RD, Adams RJ, Grenfell BT, Griffin DE. Prolonged persistence of measles virus RNA is characteristic of primary infection dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(37):14989-14994.
- Lin WH, Pan CH, Adams RJ, Laube BL, Griffin DE. Vaccine-induced measles virus-specific T cells do not prevent infection or disease but facilitate subsequent clearance of viral RNA. *mBio* 2014; 5(2):e01047.
- Maltezou HC, Wicker S, Borg M, Heininger U, Puro V, Theodoridou M, Poland GA. Vaccination policies for health-care workers in acute health-care facilities in Europe. *Vaccine* (2011); 29:9557-62;
- McCarthy M. Measles cases exceed 100 in US outbreak. *BMJ* (2015); 350:h622
- McLean HQ, Fiebelkorn AP, Temte JL, Wallace GS., Centers for Disease Control and Prevention. Prevention of measles, rubella, congenital rubella syndrome, and mumps:2013: summary recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep* (2013); 62:1-34.
- Mollema, L.; Smits, G.P.; Berbers, G.A.; VanDer Klis, F.R.; Van-Binnendijk, R.S.; DeMelker, H.E.; Hahné, S.J.; High risk of a large measles outbreak despite 30 years of measles vaccination in the Netherlands. *Epidemiol. Infect.* 2014,142, 1100–1108.
- Morens DM, Holmes EC, Davis AS, Taubenberger JK. Global rinderpest eradication: lessons learned and why humans should celebrate too. *J Infect Dis* 2011; 204(4): 502-5. 20.
- Morley D. Severe measles in the tropics. I. *Br Med J* 1969;1(5639):297-300
- Moss W. Measles in vaccinated individuals and the future of measles elimination. *Clin Infect Dis* 2018;67(9):1320-1.
- Moss WJ, Griffin DE. Measles. *Lancet*. 2012;379(9811):153-164.
- Moss WJ, Ryon JJ, Monze M, Griffin DE. Differential regulation of interleukin (IL)-4, IL-5, and IL-10 during measles in Zambian children. *J Infect Dis* 2002;186(7):879-8
- Mossong J, Muller CP. Estimation of the basic reproduction number of measles during an outbreak in a partially vaccinated population. *Epidemiol Infect* (2000); 124:273-8.

Mossong J, Muller CP. Modelling measles re-emergence as a result of waning of immunity in vaccinated populations. *Vaccine*. 2003 Nov 7;21(31):4597-603.

Muller CP, Huiss S, Schneider F. Secondary immune responses in parents of children with recent measles. *Lancet* 1996;348(9038):1379-80.

Muscat M. Who gets measles in Europe? *J Infect Dis* (2011); 204 Suppl 1:S353-S365.

Nelson AN, Putnam N, Hauer D, Baxter VK, Adams RJ, Griffin DE. Evolution of T Cell responses during measles virus infection and RNA clearance. *Sci Rep* 2017;7(1):11474.

O'Flanagan D, Cotter S, Mereckiene J. Analysis of determinants for low MMR vaccination coverage in Europe. at <http://venice.cineca.org/MMR_report_2010_1.0.pdf> measles. *Proc Soc Exp Biol Med* 1954;86(2):277-86.

Panum P. Observations Made During the Epidemic of Measles on the Faroe Islands in the Year 1846. New York: American Public Health Association. 1940.

Papania MJ, Wallace GS, Rota PA, Icenogle JP, Fiebelkorn AP, Armstrong GL, Reef SE, Redd SB, Abernathy ES, Barskey AE, et al. Elimination of endemic measles, rubella, and congenital rubella syndrome from the Western hemisphere: The US experience. *JAMA Pediatr* (2014) 168:148-55.

Paules CI, Marston HD, Fauci AS. Measles in 2019 - Going Backward. *N Engl J Med*. 2019;380(23):2185-2187.

Perry RT et al. Global progress towards regional measles elimination, worldwide, 2000–2013. *Wkly Epidemiol Rec* (2014); 89:509-16.

Perry RT, Halsey NA. The clinical significance of measles: a review. *J Infect Dis* 2004;189(Suppl 1):S4-16.

Petráš M, Oleár V, Molitorisová M, et al. Factors Influencing Persistence of Diphtheria Immunity and Immune Response to a Booster Dose in Healthy Slovak Adults. *Vaccines* (Basel). 2019;7(4):139.

Petráš M, Oleár V. Predictors of the immune response to booster immunisation against tetanus in Czech healthy adults. *Epidemiol Infect*. 2018;146(16):2079-2085.

Petráš, M., Lesná, IK, Manuál očkování 2010, ISBN 978-80-254-5419-0, 2009, Praha,

Petrova VN, Sawatsky B, Han AX, et al. Incomplete genetic reconstitution of B cell pools contributes to prolonged immunosuppression after measles. *Science Immunol* 2019;4(41):eaay6125. 26. Mina MJ, Kula T, Leng Y, et al. Measles virus infection diminishes preexisting antibodies that offer protection from other pathogens. *Science* 2019; 366(6465):599-606.

Piccirilli G, Lazzarotto T, Chiereghin A, Serra L, Gabrielli L, Lanari M. Spotlight on measles in Italy: why outbreaks of a vaccine-preventable infection continue in the 21st century. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2015;13(3):355-362.

Plattet P, Alves L, Herren M, Aguilar HC. b.r. „Measles Virus Fusion Protein: Structure, Function and Inhibition. *Viruses*." *Viruses*. 2016;8(4):112 2016.

Plotkin SA, Orenstein W, Offit PA. *Vaccines*. Philadelphia:Saunders (2012)

Prabhakar P, Irons B, Figueroa JP, de Quadros C. Immunization of health care workers in the CARICOM countries. *West Indian Med J* (2000); 49:353- 5; PMID:11211552

Rasmussen LD, Fonager J, Knudsen LK, et al. Phylogenetic and epidemiological analysis of measles outbreaks in Denmark, 2013 to 2014. *Euro Surveill*. 2015;20(39): 10.2807/1560-7917.ES.2015.20.39.30027.

Rauh Griffin DE. b.r. Griffin DE. Measles Vaccine. *Viral Immunol*. 2018;31(2):86-95.

Roome AJ, Walsh SJ, Cartter ML, Hadler JL. Hepatitis B vaccine responsiveness in Connecticut public safety personnel. *JAMA*. 1993 Dec 22-29;270(24):2931-4.

Rumlarová, Š., 2018. Aplikace očkovacích látek. In *Očkování dospělých*. pp. 270-274.

Sheridan PA, Paich HA, Handy J, Karlsson EA, Hudgens MG, Sammon AB, Holland LA, Weir S, Noah TL, Beck MA. Obesity is associated with impaired immune response to influenza vaccination in humans. *Int J Obes (Lond)*. 2012 Aug;36(8):1072-7.

Shivakoti R, Hauer D, Adams RJ, et al. Limited in vivo production of type I or type III interferon after infection of macaques with vaccine or wild-type strains of measles virus. *J Interferon Cytokine Res* 2015;35(4):292-301.

Simone B, Carrillo-Santistevé P, Lopalco PL. Healthcare workers role in keeping MMR vaccination uptake high in Europe: a review of evidence. *Euro Surveill*(2012); 17:pii: 20206

Skerdi Haviari, Thomas Bénet, Mitra Saadatian-Elahi, Philippe André, Pierre Loulergue & Philippe Vanhems (2015) Vaccination of healthcare workers: A review, *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 11:11, 2522-2537.

Smetana J, Chlibek R, Hanovcova I, et al. 2017. „Decreasing Seroprevalence of Measles Antibodies after Vaccination - Possible Gap in Measles Protection in Adults in the Czech Republic." *PLoS One* 2017 (2017;12(1):e0170257.

Sydnor, E.; Perl, T.M. Healthcare providers as sources of vaccine-preventable diseases. *Vaccine*. 2014, 32, 4814–4822.

Štěpánová I., Racek P., Havlová M., Nevšímalová S. a Jakoubková M.; Subakutní sklerotizující panencefalitida. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*. 2002, 65/98(5), 359-364.

Tafari, S.; Germinario, C.; Rollo, M.; Prato, R. Occupational risk from measles in healthcare personnel: a case report. *J. Occup. Health*. 2009, 51, 97–99.

Tajima K, Nishimura H, Hongo S, Hazawa M, Saotome- Nakamura AI, Tomiyama K, Obara C, Kato T. Estimation of secondary measles transmission from a healthcare worker in a hospital setting. *Int J Infect Dis* (2014); 24:11-3.

Talbot HK, Coleman LA, Crimin K, Zhu Y, Rock MT, Meece J, Shay DK, Belongia EA, Griffin MR. Association between obesity and vulnerability and serologic response to influenza vaccination in older adults. *Vaccine*. 2012 Jun 6;30(26):3937-43.

Tomášková, H.; Zelená, H.; Kloudová, A.; Tomášek, I. Serological survey of measles immunity in the Czech Republic, 2013. *Cent. Eur. J. Public Health*. 2018, 26, 22–27.

Urbiztondo, L.; Borrás, E.; Costa, J.; Broner, S.; Campins, M.; Bayas, J.M.; Esteve, M.; Domínguez-Berjón, M.F. Prevalence of measles antibodies among health care workers in Catalonia (Spain) in the elimination era. *BMC Infect. Dis*. 2013, 13, 391.

Urbiztondo, L.; Borràs, E.; Costa, J.; Broner, S.; Campins, M.; Bayas, J.M.; Esteve, M.; Domínguez, A. Working Group for the Study of the Immune Status in Healthcare Workers in

Catalonia. Prevalence of Measles Antibodies Among Health Care Workers in Catalonia (Spain) in the Elimination Era. *MC Infect. Dis.* 2013, 13, 391.

Uzicanin A, Zimmerman L. Field effectiveness of live attenuated measles-containing vaccines: a review of published literature. *J Infect Dis* 2011;204(Suppl 1):S133-48.

Wang N, Morra M, Wu C, et al. CD150 is a member of a family of genes that encode glycoproteins on the surface of hematopoietic cells. *Immunogenetics.* 2001;53(5):382-394. doi:10.1007/s002510100337

Watanabe S, Shirogane Y, Sato Y, Hashiguchi T, Yanagi Y. New insights into measles virus brain infections. *Trends Microbiol* 2019; 27(2): 164-75.

Weber DJ, Rutala WA, Samsa GP, Santimaw JE, Lemon SM. Obesity as a predictor of poor antibody response to hepatitis B plasma vaccine. *JAMA.* 1985 Dec 13;254(22):3187-9.

Wharton M, Cochi SL, Williams WW. Measles, mumps, and rubella vaccines. *Infect Dis Clin North Am.* 1990;4(1)

Whittle HC, Aaby P, Samb B, Jensen H, Bennett J, Simondon F. Effect of subclinical infection on maintaining immunity against measles in vaccinated children in West Africa. *Lancet* 1999;353(9147):98-102.

Wittler RR, Veit BC, McIntyre S, Schydlower M. Measles revaccination response in a school-age population. *Pediatrics* 1991;88(5):1024-30.

Wolfson LJ, Grais RF, Luquero FJ, Birmingham ME, Strebel PM. Estimates of measles case fatality ratios: a comprehensive review of community-based studies. *Int J Epidemiol* 2009;38(1):192-205

Young KM, Gray CM, Bekker LG. Is obesity a risk factor for vaccine non- responsiveness? *PLoS ONE* 2013;8(12):e82779.

Zipprich J, Winter K, Hacker J, Xia D, Watt J, Harriman K; Centers for Disease Control and Prevention (CDC)., Centers for Disease Control and Prevention(CDC). Measles outbreak—California, December 2014-February 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* (2015); 64:153-4.

Internetové zdroje

Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. Molecular Biology of the Cell. 4th edition. New York: Garland Science; 2002. Innate Immunity. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26846/>

Anderson RM, May RM. Immunisation and herd immunity. The Lancet (1990); 335:641-5; [http://dx.doi.org/10.1016/0140-6736\(90\)90420-A](http://dx.doi.org/10.1016/0140-6736(90)90420-A)

CDC. Immunization of Health-Care Personnel. Recommendations ACIP. MMWR. 2011;60(7), [online] [cit. 2018-05- 28] Dostupný na www: <https://www.cdc.gov/mmwr/pdf/rr/rr6007.pdf>

Enders G. Paramyxoviruses. In: Baron S, editor. Medical Microbiology. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 59. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8461/>

European Centre for Disease Prevention and Control. Measles surveillance data. at http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/measles/epidemiological_data/Pages/annual_epidemiological_reports.aspx>

Lemon K, et al. Early target cells of measles virus after aerosol infection of non-human primates. PLoS Pathog. 2011;7:e1001263. doi: 10.1371/journal.ppat.1001263 . [PMC free article] [PubMed] <https://www.ecdc.europa.eu/en/measles/facts/factsheet>

Measles (Rubeola). Centers of Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/measles/index.html> (accessed on 3 June 2020)

Measles Vaccine - Part 4 - Active Vaccines – Canadian Immunization Guide - Public Health Agency of Canada. at <http://www.phac-aspc.gc.ca/publicat/cig-gci/p04-meas-roug-eng.php>

Moss W and Scott S (2009) The Immunological Basis for Immunization Series. Module 7: Measles. Update 2009. Geneva: WHO, pp. 62. Available at http://www.who.int/immunization/documents/immunological_basis_series/en/ (Accessed 15 March 2017).

Risk of measles transmission in the EU/EEA 23 March 2018 [cit. 2020-07- 03] dostupný na https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Measles-rapid-risk-assessment-European-Union-countries_0.pdf

The Australian Immunization Handbook (Immunise - 4.9 Measles). at <http://health.gov.au/internet/immunise/publishing.nsf/Content/handbook10-4-9>

WHO vaccine-preventable diseases: monitoring system. 2019 global summary fo the Czech Republic https://apps.who.int/immunization_monitoring/globalsummary/countries?countrycriteria%5Bcountry%5D%5B%5D=CZE&commit=OK. b.r.

World Health Organization. WHO/UNICEF estimates of national immunization coverage. Available from: http://apps.who.int/immunization_monitoring/globalsummary/timeseries/tswucoveragemcv2.html.

14. Seznam příloh.

Publikace se vztahem k tématu dizertační práce:

Příloha I. **Jana Malinová**, Marek Petráš and Alexander M. Čelko: A Serosurvey Identifying Vulnerability to Measles in Health Care Workers. A Hospital - Based Prospective Seroprevalence Study. Int. J. Environ. Res. Public Health, 2020, 17, 4219; doi:10.3390/ijerph17124219.

Q1, I.F. 2,468 (2018)

Příloha II. M. Petráš, V. Olejár, M. Molitorisová, J. Dáňová, A. M. Čelko, E. Nováková, M. Štefkovičová, Z. Krištůfková, **J. Malinová** and I. Králová Lesná: Factors Influencing Persistence of Diphtheria Immunity and Immune Response to a Booster Dose in Healthy Slovak Adults. Vaccines 2019, 7, 139;doi:1010.3390/vaccines7040139

Q1, I.F. 4,760 (2018)



Article

A Serosurvey Identifying Vulnerability to Measles in Health Care Workers. A Hospital-Based Prospective Seroprevalence Study

Jana Malinová ^{1,2}, Marek Petráš ^{1,*} and Alexander M. Čelko ¹

¹ Third Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague 10000, Czech Republic; jana.malinova@fnkv.cz (J.M.); martin.celko@lf3.cuni.cz (A.M.Č.)

² Faculty Hospital Kralovské Vinohrady, Prague 10000, Czech Republic

* Correspondence: marek.petrash@lf3.cuni.cz; Tel.: +42-0774-738-727

Received: 6 May 2020; Accepted: 10 June 2020; Published: 12 June 2020

Abstract: The aim of this serological survey was to assess the persistence of measles antibodies among health care workers (HCWs) at risk of incidental measles. A prospective study of measles-specific antibodies in serum samples obtained from a total of 2782 participants aged 19–89 years was conducted between May 2018 and December 2019. The seropositivity rate of 93.7% (95% CI: 92.4–94.9%) in fully vaccinated participants aged 19–48 years was significantly lower than that of 98.0% (95% CI: 96.5–99.0%) in participants naturally immunised before 54 years. A cohort of those born in 1971–1975, vaccinated predominantly with one dose, showed lower seropositivity persistence (86.6%) than those fully vaccinated with two doses or naturally immunised. Otherwise, seropositivity was not markedly influenced by sex, age, smoking status, overweight, obesity or concomitant disease. The presence of sufficient antibody levels in a high proportion of HCWs irrespective of the way they acquired immunity is a favourable finding for managing incidental measles; hence, in the presence of a risk of a measles outbreak, it would be possible to perform targeted vaccination of only at-risk HCWs with a history of incomplete vaccination or missing information about the way in which immunity is acquired.

Keywords: serosurvey; seroprevalence; measles antibodies; persistence; health care workers

1. Introduction

Measles is a highly contagious disease caused by morbillivirus. It is reported that up to 90% of susceptible persons could be infected upon contact with a patient diagnosed with measles. The measles virus can be transmitted directly through droplets and can survive up to two hours in an airspace where the patient sneezed or coughed. Moreover, an infected person can pose a risk for others four days before the onset of clinical manifestations as well as four days after symptoms disappear [1].

Measles remains one of the leading causes of child morbidity and mortality worldwide with the greatest burden borne by the youngest children [2,3]. Therefore, the implementation of universal vaccination programs, including measles vaccinations, is a most effective tool for its prevention. Despite stepped up efforts, measles has become a public health challenge of our century. Obviously, one of the factors can be the indifference or even reluctance of parents to have their offspring vaccinated. Yet another factor not to be underestimated is the persistence of antibodies against measles that can wane with time. Therefore, a continuous follow-up of sero-immunity is conducted worldwide.

In the Czech Republic, routine vaccinations against measles were introduced with a single-dose administration in 1969 to be expanded by a two-dose schedule in 1975. The original monovalent

measles vaccine was replaced by a combination vaccine against measles, mumps and rubella in 1995. The vaccination rates in children <2 years old has ranged between 96 and 99% for the first dose, and between 84 and 99% for the second dose in the last decade [4]. The lower second-dose vaccination rate in the year 2018 was because of its intentional re-scheduling to the age of 5 years. Overall, the vaccination rate of the Czech pediatric population with at least one dose of vaccine remained high and presumably sufficient to contain the spread of the measles infection in the population. Despite this, a total of 943 cases of measles, especially in the adult population, were reported in the Czech Republic between 2017 and 2019.

As reported in many studies in the relevant literature, insufficient sero-protection in health care workers (HCWs) can pose a risk both for themselves and for patients [5–7]. Even though several observations documented >90% seroprevalence against measles among HCWs in Italy [8], France [6], Spain [9] or Japan [10], no similar study has been conducted in the Czech Republic. Therefore, this fact served as an impetus to design and conduct a serological survey among health care workers of the Prague-based Královské Vinohrady University Hospital between May 2018 and December 2019. The primary objective was to evaluate the measles antibody status among HCWs and to assess their possible vulnerability to the disease. Moreover, we attempted to find possible factors influencing HCWs seroprevalence.

2. Materials and Methods

Our prospective seroprevalence study was conducted among participants predominantly recruited from health care workers of the Faculty hospital Královské Vinohrady, in Prague. Upon receiving the consent of the would-be participants, their year of birth, weight and height, concomitant treatment and smoking status were obtained from the hospital staff database.

The participants were interviewed to determine whether or not they had been immunised or had had measles anytime in their lifetime. All declared either vaccination against measles or measles infection in childhood. As their original immunisation status could not be verified, the participants were further divided into 5-year age cohorts according to the year of birth (Table 1). The stratified cohorts were further assessed according to the history of routine vaccination against measles in the Czech Republic. The cohorts of participants born before 1966 were considered to be naturally immunised against measles while those born after 1976 were viewed as fully vaccinated with two doses of the measles vaccine. Participants born between 1966 and 1975 were either naturally immunised or vaccinated with one or two doses.

Table 1. Number and proportion of participants (including the 95% confidence intervals) stratified by assessed demographic, behavioural and health factors.

Stratification		All		Women	
		N ¹	Proportion (%); 95% CI ²	N	Proportion (%); 95% CI
Participants		2784		2080	74.7 (73.1–76.3)
Age cohort	1996–2000	168	6.0 (5.2–7.0)	115	68.5 (60.8–75.4)
	1991–1995	354	12.7 (11.5–14.0)	229	64.7 (59.5–69.7)
	1986–1990	298	10.7 (9.6–11.9)	206	69.1 (63.5–74.3)
	1981–1985	299	10.7 (9.6–11.9)	217	72.6 (67.1–77.6)
	1976–1980	391	14.0 (12.8–15.4)	308	78.8 (74.4–82.7)
	1971–1975	389	14.0 (12.7–15.3)	300	77.1 (72.6–81.2)
	1966–1970	285	10.2 (9.1–11.4)	236	82.8 (77.9–87.0)
	1961–1965	242	8.7 (7.7–9.8)	202	83.5 (78.2–87.9)
	1956–1960	207	7.4 (6.5–8.5)	167	80.7 (74.6–85.8)

	1951–1955	83	3.0 (2.4–3.7)	66	79.5 (69.2–87.6)
	<1950	68	2.4 (1.9–3.1)	34	50.0 (37.6–62.4)
BMI ² (kg/m ²)	<25	924	33.2 (31.4–35.0)	760	82.3 (79.6–84.7)
	25 – <30	512	18.4 (17.0–19.9)	360	70.3 (66.1–74.2)
	30 – <35	246	8.8 (7.8–10.0)	195	79.3 (73.7–84.2)
	≥35	63	2.3 (1.7–2.9)	45	71.4 (58.7–82.1)
	Unknown	1039	37.3 (35.5–39.1)	720	69.3 (66.4–72.1)
Concomitant disease		1144	41.1 (39.3–42.9)	940	82.2 (79.8–84.3)
Health care worker		2243	80.6 (79.0–82.0)	1699	75.7 (73.9–77.5)
Foreign national		68	2.4 (1.9–3.1)	36	52.9 (40.4–65.2)
Smoker	No	882	31.7 (30.0–33.4)	709	80.4 (77.6–83.0)
	Yes	521	18.7 (17.3–20.2)	410	78.7 (74.9–82.1)
	Unknown	1381	49.6 (47.7–51.5)	961	69.6 (67.1–72.0)

¹ N: number of participants; ² BMI: body mass index; ³ CI: confidence intervals.

Prior to their enrolment in the study, the participants were thoroughly informed about the study and signed informed consent forms. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Third Faculty of Medicine, Charles University in Prague (N° 0120/17).

The current sero-immunity status of participants was assessed by serological analysis of serum samples that had been collected, stored at below −20 °C and processed in one central laboratory (Laboratory of Clinical Immunology, Královské Vinohrady University Hospital, Prague, Czech Republic). The levels of antibodies were determined using a measles IgG ELISA kit (Immunolab GmbH, Kassel, Germany). The seropositivity cut-off of >12 AU/mL (arbitrary units per millilitre) was adopted from marginal positivity declared by the serological kit manufacturer [11].

Persistence of specific antibodies against measles was assessed both by the seropositivity rate, defined as the proportion of participants having antibody levels higher than the cut-off value, and by the geometric mean concentrations (GMCs) of measles antibodies. The demographic, behavioural and health characteristics were considered possible factors that could influence seropositivity persistence. Therefore, participants' antibody levels or seropositivity were assessed in groups categorised by these factors. The differences in the GMCs between two groups or among several groups were investigated with the parametric t-Student test or by Dunnett multiple comparisons testing following one-way analysis of variance (ANOVA) after the log-transformation of antibody levels that met the normal distribution. Categorical variables were represented by the proportion including a 95% confidence interval computed by the method of Clopper and Pearson.

The differences in seropositivity rates were statistically evaluated with Fisher's exact test, including crude odds ratios (cORs) obtained from the 2 × 2 table. The sample size was justified for logistic regression with 7 covariates—investigated predictors—that provided the adjusted odds ratios (aORs) including a 95% confidence interval (95% CI). Moreover, McFadden's R squared as well as the p-value of this approach were sufficient for the predictive ability of this model.

All tests were two-tailed, and the level of significance was set at 0.05. Statistical analyses and logistic regression were performed using Prism 8 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) and STATA version 16 software (StatCorp, Lakeway Drive, TX, USA), respectively.

3. Results

Between May 2018 and December 2019, serum samples were obtained from a total of 2784 subjects with a mean age of 42 years (95% CI: 41.5–42.5 years). Although the participants were mostly

women (74.7%), the age means for men and women did not differ relevantly (42.7 years for females and 40.1 years for males).

Body mass index (BMI) was not recorded in a total of 1039 subjects, i.e., 37.3% (95% CI: 35.5–39.1%), and was unavailable, especially in women (69%). The mean of BMI was significantly higher in men (26.5 kg/m²) than in women (25.2 kg/m²) but the difference did not reach clinical relevance. Almost 53% of subjects with known BMI had a normal body weight <25 kg/m², i.e., 33.2% of all enrolled participants. The distribution of participants by the BMI category is shown in Table 1.

A concomitant disease was present in 41.1% of subjects having been diagnosed most often with endocrine, nutritional and metabolic diseases (13%)—especially thyroid gland diseases or impaired lipoprotein metabolism, and cardiovascular disease (8%)—especially hypertension heart disease; or respiratory diseases (6%).

The survey participants were recruited mostly from among hospital medical staff (80.6%; broadly defined as physicians, nurses and allied health professionals) and among hospital support (laundry, cleaning, administrative, etc.) staff, with the latter group including 2.4% of foreign nationals. Information about cigarette smoking vs. non-smoking status was missing in 50% of the serologically assessed subjects.

The youngest cohort, aged 19–23 years (years of birth 1996–2000), made up 6% of the whole group. Larger cohorts comprised those born in 1976–80 and 1971–75 (participants aged 39–43 years and 44–48 years, respectively). Fully vaccinated participants were defined as those born after the year of 1975 (1510 subjects). Conversely, 600 participants with naturally acquired immunity were assigned to age cohorts <1966.

Seropositivity against measles was detected in 93.5% of participants (95% CI: 92.6–94.4%) independently of sex, age, comorbidities, and other investigated factors (Table 2). The overall GMCs in all participants achieved 16.3 AU/mL (95% CI: 16.1–16.6 AU/mL), differing significantly between seronegative (8.5 AU/mL; 95% CI: 8.1–8.9 AU/mL) and seropositive participants (17.2 AU/mL; 95% CI: 17.0–17.4 AU/mL).

The seropositivity rate in the cohorts fully immunised with vaccine only (participants aged 19–43 years) was 93.7% (95% CI: 92.4–94.9%). Conversely, 98.0% (95% CI: 96.5–99.0%) of those naturally immunised by measles maintained their seropositivity longer than 54 years. Naturally acquired immunity against measles persisted in significantly more subjects than immunity induced by a vaccine, as demonstrated by an odds ratio of 3.29 (95% CI: 1.79–6.04). Likewise, the GMCs of measles antibodies were significantly higher in participants who had had measles (20.7 AU/mL; 95% CI: 20.1–21.3 AU/mL) than in those fully vaccinated (15.3 AU/mL; 95% CI: 15.1–15.5 AU/mL) or in those having received at least one vaccine dose (15.2 AU/mL; 95% CI: 15.0–15.4 AU/mL).

The seropositivity rate for measles did not differ between males and females although the GMCs of antibodies were significantly higher in women (Table 2). A sensitivity analysis demonstrated that the difference in the GMCs between males and females depended on of the way in which immunity is acquired. While the persistence of naturally acquired antibody levels did not differ between both sexes, vaccinated women had significantly higher GMCs of measles antibodies (16.1 AU/mL; 95% CI: 15.1–15.6 AU/mL) than vaccinated men (14.8 AU/mL; 95% CI: 14.4–15.2 AU/mL), with a *p*-value of 0.036.

The time since childhood vaccination did not influence the persistence of antibody levels as no difference in seropositivity rates between the two-dose vaccinated cohorts was found, i.e., the 5-year cohorts since the year of 1976 did not exhibit different seropositivity rates. Participants born in the 1971–1975 period, immunised predominantly with a single vaccine dose, achieved a seropositivity rate of 86.6% (95% CI: 82.8–89.9%), a value significantly lower compared with that seen in the youngest, fully vaccinated participants (i.e., 94%; 95% CI: 89.3–97.1%).

The survey did not find an impact of BMI on the persistence of seropositivity rates, which did not differ among the categories of normal weight, overweight, obesity or severe obesity. The antibody levels remained consistent across all BMI categories, as demonstrated by their similar GMCs. Moreover, sensitivity analysis confirmed consistent seropositivity rates stratified by BMI categories both in fully vaccinated participants and those naturally immunised by measles.

The persistence of seropositivity rates was similar in smokers and non-smokers irrespective of the way in which immunity had been acquired. Unknown smoking status in 1381 participants was associated with lower seropositivity rates as well as GMCs compared to those of non-smokers (Table 2). This difference was confirmed only in naturally immunised participants (aOR = 0.36; 95% CI: 0.20–0.67).

No difference in serological persistence was observed in participants with or without concomitant disease, as demonstrated by their seropositivity rates and the GMCs of measles antibodies.

Likewise, the seropositivity rates in patients with endocrine, nutritional or metabolic diseases (93.7%; 95% CI: 90.6–96.0%) and in those with cardiovascular disease (92.7%; 95% CI: 88.5–95.8%) did not differ from those of healthy participants. The sensitivity analyses showed lower seropositivity rates in naturally immunised participants with any concomitant disease (97.3%; 95% CI: 94.8–98.8%) than in those without it (98.7%; 95% CI: 96.6–99.6%) as documented by an aOR of 0.17 (95% CI: 0.03–0.88). There was no difference in the persistence of seropositivity rates or GMCs of measles antibodies between hospital medical staff and hospital support staff as defined above, as well as between foreign nationals and Czech citizens.

Table 2. Persistence of seropositivity against measles and geometric mean concentrations (GMCs) of measles antibodies, crude and mutually adjusted odds ratios (cORs, aORs) including the 95% confidence interval.

Predictors		N ¹	n ²	Seropositivity %	cOR ³	aOR ⁴ (95% CI)	GMC ⁵ (95%CI); AU/mL ⁶
Total		2784	2604	93.5 (92.6–94.4)			16.3 (16.1–16.6)
Sex	Male	704	655	93.0 (90.9–94.8)	1	1	15.7 (15.3–16.1)
	Female	2080	1949	93.7 (92.6–94.7)	1.11 (0.79–1.56)	1.13 (0.80–1.62)	16.6 (16.3–16.8) †
Age cohort	1996–2000	168	158	94.0 (89.3–97.1)	1	1	14.5 (13.9–15.2)
	1991–1995	354	337	95.2 (92.4–97.2)	1.25 (0.56–2.80)	1.17 (0.52–2.65)	15.9 (15.4–16.5)
	1986–1990	298	285	95.6 (92.7–97.7)	1.39 (0.59–3.24)	1.29 (0.53–3.13)	16.0 (15.4–16.6)
	1981–1985	299	271	90.6 (86.8–93.7)	0.61 (0.29–1.29)	0.55 (0.25–1.21)	14.5 (14.0–15.0)
	1976–1980	391	364	93.1 (90.1–95.4)	0.85 (0.40–1.80)	0.78 (0.35–1.72)	15.0 (14.6–15.5)
	1971–1975	389	337	86.6 (82.8–89.9)	0.41 (0.20–0.83) *	0.37 (0.18–0.78) *	14.7 (14.2–15.2)
	1966–1970	285	264	92.6 (89.0–95.4)	0.80 (0.37–1.73)	0.75 (0.33–1.71)	16.6 (16.0–17.4) †
	1961–1965	242	235	97.1 (94.1–98.8)	2.12 (0.79–5.70)	1.94 (0.70–5.45)	20.9 (19.8–22.0) ‡
	1956–1960	207	202	97.6 (94.5–99.2)	2.56 (0.86–7.63)	2.43 (0.79–7.49)	20.8 (19.8–21.9) ‡
	1951–1955	83	83	100.0 (95.7–100.0)	x	x	20.8 (19.5–22.3) ‡
	<1950	68	68	100.0 (94.7–100.0)	x	x	19.2 (18.0–20.5) ‡
	<25	924	863	93.4 (91.6–94.9)	1	1	16.3 (16.0–16.7)
BMI ⁷ (kg/m2)	25 – <30	512	478	93.4 (90.8–95.4)	0.99 (0.64–1.53)	0.98 (0.63–1.53)	16.6 (16.1–17.2)
	30 – <35	246	228	92.7 (88.7–95.6)	0.90 (0.52–1.55)	0.88 (0.50–1.53)	16.6 (15.9–17.4)
	≥35	63	60	95.2 (86.7–99.0)	1.41 (0.43–4.64)	1.41 (0.42–4.75)	16.1 (15.0–17.3)
	Unknown	1039	975	93.8 (92.2–95.2)	1.08 (0.75–1.55)	1.56 (0.99–2.47)	16.2 (15.8–16.5)
Concomitant disease	No	1640	1539	93.8 (92.6–95.0)	1	1	16.2 (16.0–16.5)
	Yes	1144	1065	93.1 (91.5–94.5)	0.88 (0.65–1.20)	0.83 (0.59–1.16)	16.5 (16.1–16.9)

Health care worker	No	541	501	92.6 (90.1–94.7)	1	1	15.9 (15.5–16.4)
	Yes	2243	2,103	93.8 (92.7–94.7)	1.20 (0.83–1.73)	1.27 (0.84–1.92)	16.4 (16.2–16.7)
Foreign national	No	2716	2540	93.5 (92.5–94.4)	1	1	16.3 (16.1–16.6)
	Yes	68	64	94.1 (85.6–98.4)	1.11 (0.40–3.08)	1.12 (0.37–3.43)	16.7 (15.3–18.3)
Smoker	No	882	838	95.0 (93.4–96.4)	1	1	16.8 (16.4–17.2)
	Yes	521	490	94.0 (91.7–95.9)	0.83 (0.52–1.33)	0.83 (0.51–1.33)	17.0 (16.5–17.5)
	Unknown	1381	1276	92.4 (90.9–93.7)	0.64 (0.44–0.92) †	0.48 (0.31–0.72) †	15.9 (15.6–16.2) †

¹ N: total number of factor-stratified participants; ² n: total number of seropositive participants; ³ cOR: crude odds ratio; ⁴ aOR: mutually adjusted odds ratio; ⁵ GMC: geometric mean concentration; ⁶ AU/mL: arbitrary units per millilitre; ⁷ BMI: body mass index; * $p < 0.05$; † $p < 0.001$; ‡ $p < 0.0001$.

4. Discussion

The seropositive levels of measles antibodies were observed in almost all (94%) of the survey participants, especially in HCWs, irrespective of the way in which immunity was acquired. This value is close to that reported for adult populations reported by seroprevalence studies in other countries [12,13], in the Czech Republic in 2013 [14] as well as studies conducted in HCWs [6,8–10]. Even though these findings are favourable, it does not mean that they will remain permanent since serological surveys conducted in Italy (in 2003–2019) showed a steep decline in seropositivity rates induced by measles vaccinations that ranged between 77.2 and 84.4% in the population younger than 50 years [15–17].

We found that the persistence of seropositivity rates was not dependent on the time since acquisition of immunity, but was determined by the way in which immunity was acquired, i.e., if the seropositivity was induced by vaccination or by childhood measles. Almost all of the participants (98%) with naturally induced antibodies against measles in childhood maintained higher antibody levels (20.7 AU/mL) than those fully or partially vaccinated (15.2 AU/mL). As no significant variation in seropositivity rates was observed among the 5-year cohorts of naturally immunised participants (range, 97–100%), naturally acquired immunity could presumably persist at least 54–70 years. This was in accordance with the rates used in modelling measles re-emergence [18].

In line with published data, long-term seropositivity induced by full vaccination was present in almost 94% participants aged 19–43 years [12–14]. This value differed significantly from that of participants born in the 1971–1975 period, the majority of whom received only a single dose of the measles vaccine (86.6%). It was consistent with a previous finding that the Czech population born between 1968 and 1978 exhibited a lower seroprevalence of 80.4% compared to a younger or older study population [14].

Our survey did not identify a single clinically relevant factor influencing the persistence of seropositivity. Even if slightly higher GMCs of antibodies were observed in women than in men, the difference, about 1 AU/mL, was non-significant. While concomitant diseases did not change the seropositivity rates in vaccinated participants, they may have contributed to a small decrease in seropositivity persistence in naturally immunised individuals. Again, it was not clear whether this finding was of clinical importance because the rate difference was less than 2%. Otherwise, the seropositivity rates in smokers, overweight and obese individuals as well as the hospital support staff did not differ significantly from those of the study population based on the way in which immunity was acquired.

It follows from the above that the persistence of antibodies against measles is determined primarily by the way in which immunity is acquired. The vaccine-induced humoral immunity, persisting 20 years or longer, was always shorter than the persistence of naturally acquired immunity, with the reduction likely occurring within the first 10–15 years after full vaccination [19,20]. Nevertheless, the seropositive levels of antibodies were observed in more than 87% of those vaccinated with at least one dose within 48 years.

The question yet to be answered is whether or not the observed sero-persistence is sufficient to counter measles resurgence. Unfortunately, the results of our study are not able to provide the answer since further immune mechanisms and factors such as complement, immunological memory, and cellular immunity play an important role in one's protection [21]. Furthermore, the threshold of enzyme immunoassay for determining protective antibody levels has not been yet standardised [22,23].

Furthermore, our results may have been biased by indirect booster immunisation due to an exposure to measles, especially in those born in the 1970–1985 period, which we hope is not the case. Even if the main study population was that of hospital medical staff, less than 20% of participants were enrolled from among hospital support staff. A selection bias with this small subgroup could not have a major impact on our results, as demonstrated by the similar seropositive rates. A potential limitation of the present serological survey was the lack of immunisation status verification—our inability to verify the immunization status of our study participants, which was only self-reported.

However, we are not convinced that fully vaccinated or naturally immunised health care workers need to be systematically revaccinated by one or more vaccine doses in adult age. Moreover, the outcome of our study in HCWs was similar to that of another survey conducted in the Czech general population in 2013, making it unlikely that this specific subgroup of individuals would be at higher risk than the rest of the population.

5. Conclusions

A full measles vaccination in childhood was capable of inducing sufficient antibody levels that persisted at seropositive values that most of the health care workers acquired over a period of 43 years. As expected, the levels of vaccine-induced antibodies were lower than those acquired naturally. Despite this, we recommend that, instead of systematic revaccination or the serological monitoring of antibodies, targeted immunisation of at-risk health care workers with incomplete vaccinations or with missing information about their sero-immunity status could prove a quick, highly effective and reasonable tool in the event of a measles outbreak.

Author Contributions: Conceptualization, J.M. and A.M.Č.; methodology, M.P., J.M. and A.M.Č.; resources, J.M.; investigation, M.P. and J.M.; formal analysis, M.P.; writing—original draft preparation, M.P.; writing—review and editing, M.P., J.M. and A.M.Č. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Charles University, UK PROGRES Q16—Environmental research.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Measles (Rubeola). Centers of Disease Control and Prevention. Available online: <https://www.cdc.gov/measles/index.html> (accessed on 3 June 2020).
2. Nandy, R.; Handzel, T.; Zaneidou, M.; Biey, J.; Caddy, R.Z.; Perry, R.; Strebel, P.; Cairns, L. Case-Fatality Rate during a Measles Outbreak in Eastern Niger in 2003. *Clin. Infect. Dis.* **2006**, *42*, 322–328, doi:10.1086/499240.
3. Wolfson, L.J.; Grais, R.F.; Luquero, F.J.; Birmingham, M.E.; Strebel, P.M. Estimates of measles case fatality ratios: A comprehensive review of community-based studies. *Int. J. Epidemiol.* **2009**, *38*, 192–205, doi:10.1093/ije/dyn224.
4. World Health Organization. Vaccine-Preventable Diseases: Monitoring System. 2019 Global Summary for the Czech Republic. Available online: https://apps.who.int/immunization_monitoring/globalsummary/countries?countrycriteria%5Bcountry%5D%5B%5D=CZE&commit=OK (accessed on 2 June 2020).
5. Tafuri, S.; Germinario, C.; Rollo, M.; Prato, R. Occupational risk from measles in healthcare personnel: A case report. *J. Occup. Health* **2008**, *51*, 97–99, doi:10.1539/joh.n8006.
6. Botelho-Nevers, E.; Cassir, N.; Minodier, P.; Laporte, R.; Gautret, P.; Badiaga, S.; Thiberville, D.J.; Ninove, L.; Charrel, R.; Brouqui, P. Measles among healthcare workers: A potential for nosocomial outbreaks. *Eur. Surveill.* **2011**, *16*, 19764.
7. Sydnor, E.R.; Perl, T.M. Healthcare providers as sources of vaccine-preventable diseases. *Vaccine* **2014**, *32*, 4814–4822, doi:10.1016/j.vaccine.2014.03.097.
8. Coppeta, L.; Pietroiusti, A.; Lieto, P.; Ferraro, M.; Grelli, S.; Stillo, M.; Magrini, A. Measles immunity in an Italian teaching hospital. *Occup. Med.* **2018**, *69*, 143–145, doi:10.1093/occmed/kqy132.
9. Urbiztondo, L.; Borrás, E.; Costa, J.; Broner, S.; Campins, M.; Bayas, J.M.; Esteve, M.; Domínguez-Berjón, M.F. Prevalence of measles antibodies among health care workers in Catalonia (Spain) in the elimination era. *BMC Infect. Dis.* **2013**, *13*, 391, doi:10.1186/1471-2334-13-391.
10. Kumakura, S.; Shibata, H.; Onoda, K.; Nishimura, N.; Matsuda, C.; Hirose, M. Seroprevalence survey on measles, mumps, rubella and varicella antibodies in healthcare workers in Japan: Sex, age, occupational-Related differences and vaccine efficacy. *Epidemiol. Infect.* **2013**, *142*, 12–19, doi:10.1017/S0950268813000393.
11. World Health Organization. Measles Virus Vaccine: WHO Position Paper. *Wkly. Epidemiol. Rec.* **2009**, *84*, 349–360.

12. González-Escalada, A.; García-García, L.; Viguera-Ester, P.; Marin-García, P.; García, J.; Gil-De-Miguel, A.; Gil Prieto, R. Seroprevalence of antibodies against measles, rubella, mumps, varicella-zoster, and B. Pertussis in young adults of Madrid, Spain. *Hum. Vaccines Immunother.* **2013**, *9*, 1918–1925, doi:10.4161/hv.25127.
13. Mollema, L.; Smits, G.P.; Berbers, G.A.; Van Der Klis, F.R.; Van Binnendijk, R.S.; De Melker, H.E.; Hahné, S.J.M. High risk of a large measles outbreak despite 30 years of measles vaccination in The Netherlands. *Epidemiol. Infect.* **2013**, *142*, 1100–1108, doi:10.1017/s0950268813001532.
14. Tomaskova, H.; Zelena, H.; Kloudová, A.; Tomášek, I. Serological survey of measles immunity in the Czech Republic, 2013. *Central Eur. J. Public Health* **2018**, *26*, 22–27, doi:10.21101/cejph.a5251.
15. Rota, M.C.; Massari, M.; Gabutti, G.; Guido, M.; De Donno, A.; Degli Atti, M.L.C. Measles serological survey in the Italian population: Interpretation of results using mixture model. *Vaccine* **2008**, *26*, 4403–4409, doi:10.1016/j.vaccine.2008.05.094.
16. Bechini, A.; Boccalini, S.; Tiscione, E.; Pesavento, G.; Mannelli, F.; Peruzzi, M.; Rapi, S.; Mercurio, S.; Bonanni, P. Progress towards measles and rubella elimination in Tuscany, Italy: The role of population seroepidemiological profile. *Eur. J. Public Health* **2010**, *22*, 133–139, doi:10.1093/eurpub/ckq134.
17. Anichini, G.; Gandolfo, C.; Fabrizi, S.; Miceli, G.; Terrosi, C.; Savellini, G.G.; Prathymnan, S.; Orsi, D.; Battista, G.; Cusi, M.G. Seroprevalence to Measles Virus after Vaccination or Natural Infection in an Adult Population, in Italy. *Vaccines* **2020**, *8*, 66, doi:10.3390/vaccines8010066.
18. Mossong, J.; Muller, C.P. Modelling measles re-emergence as a result of waning of immunity in vaccinated populations. *Vaccine* **2003**, *21*, 4597–4603, doi:10.1016/s0264-410x(03)00449-3.
19. Krugman, S. Further-Attenuated Measles Vaccine: Characteristics and Use. *Clin. Infect. Dis.* **1983**, *5*, 477–481, doi:10.1093/clinids/5.3.477.
20. Gonçalves, G.; Frade, J.; Nunes, C.; Mesquita, J.R.; Nascimento, M.S.J. Persistence of measles antibodies, following changes in the recommended age for the second dose of MMR-vaccine in Portugal. *Vaccine* **2015**, *33*, 5057–5063, doi:10.1016/j.vaccine.2015.08.057.
21. Laksono, B.M.; De Vries, R.D.; Verburgh, R.J.; Visser, E.G.; De Jong, A.; Fraaij, P.L.A.; Ruijs, W.L.M.; Nieuwenhuijse, D.F.; Ham, H.-J.V.D.; Koopmans, M.P.G.; et al. Studies into the mechanism of measles-associated immune suppression during a measles outbreak in the Netherlands. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 4944, doi:10.1038/s41467-018-07515-0.
22. Diaz-Ortega, J.-L.; Forsey, T.; Clements, C.; Milstien, J. The Relationship Between Dose and Response of Standard Measles Vaccines. *Biologicals* **1994**, *22*, 35–44, doi:10.1006/biol.1994.1006.
23. Report of a Collaborative Study to Assess the Suitability of a Replacement for the 2nd International Standard for Anti-Measles Serum. World Health Organization. Available online: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/70612> (accessed on 2 May 2020).





Article

Factors Influencing Persistence of Diphtheria Immunity and Immune Response to a Booster Dose in Healthy Slovak Adults

Marek Petráš ^{1,*}, Vladimír Oleár ², Milica Molitorisová ³, Jana Dáňová ¹, Alexander M. Čelko ¹, Elena Nováková ⁴, Mária Štefkovičová ², Zuzana Krištúfková ⁵, Jana Malinová ¹ and Ivana Králová Lesná ⁶

¹ Preventive Medicine, Third Faculty of Medicine, Charles University in Prague, 100 00 Prague, Czech Republic; jana.danova@lf3.cuni.cz (J.D.); martin.celko@lf3.cuni.cz (A.M.Č.); jana.malinova@fnkv.cz (J.M.)

² Faculty of Healthcare, Alexander Dubček University of Trenčín, 911 50 Trenčín, Slovakia; vladimirolear@gmail.com (V.O.); tn.stefkovicova@uvzsr.sk (M.Š.)

³ Faculty of Pharmacy, Comenius University in Bratislava, 832 32 Bratislava, Slovakia; milica.molitorisova@uniba.sk

⁴ Jessenius Faculty of Medicine in Martin, Comenius University in Bratislava, 036 01 Martin, Slovakia; elena.novakova@uniba.sk

⁵ Faculty of Public Health, Slovak Medical University in Bratislava, 831 01 Bratislava, Slovakia; kristufkova@gmail.com

⁶ Laboratory for Atherosclerosis Research, Centre for Experimental Medicine, Institute for Clinical and Experimental Medicine, 140 21 Prague, Czech Republic

* Correspondence: marek.petras@lf3.cuni.cz; Tel.: 00420 774 738 727

Received: 31 August 2019; Accepted: 1 October 2019; Published: 7 October 2019

Abstract: We assessed the long-term persistence of humoral immunity against diphtheria in adults with childhood vaccination and the immunogenicity of a booster dose considering demographic, behavioural and vaccinating factors. We conducted a trial in 200 healthy Slovak adults aged 24–65 years, immunised against diphtheria in childhood and against tetanus at regular 10–15 year intervals, and receiving a dose of a tetanus-diphtheria toxoid vaccine. The response was determined by ELISA antibody concentrations of paired sera before and at 4 weeks post-vaccination. A seroprotection rate of 21% (95% confidence interval, CI 15.6–27.3%) was found in adults up to 59 years since the last vaccination with seroprotective levels of antibodies against diphtheria ≥ 0.1 IU/mL and a geometric mean concentration of 0.05 IU/mL. Conversely, seropositive levels ≥ 0.01 IU/mL were observed in 98% of adults (95% CI 95–99.5%). Booster-induced seroprotection was achieved in 78% of adults (95% CI 71.6–83.5%) clearly depending on pre-booster antibody levels correlating with age and time since the last vaccination. Moreover, only 54.2% of smokers and 53.3% of patients on statins exhibited seroprotection. Booster vaccination against diphtheria was unable to confer seroprotection in all recipients of only childhood vaccination.

Keywords: diphtheria vaccination; seroprotection rate; smoking; statins; pre-vaccination levels; immunity persistence

1. Introduction

Diphtheria and tetanus vaccines are the most commonly used vaccines worldwide and generally considered successful in the immunoprophylaxis of both preventable infection diseases, also due to the relatively high vaccination rate of children and regular booster immunisation in adulthood.

While a monovalent vaccine against tetanus is usually used for booster or post-exposure vaccination after an injury, the diphtheria vaccine is available only as part of combined vaccines. The bivalent vaccine against diphtheria and tetanus indicated for both booster and primary vaccination in adults contains a reduced amount of diphtheria toxoid. Some countries require the booster dose to be repeated every 10–15 years, either with a bivalent or combined vaccine containing both toxoids. Implementation of the original program of booster immunisation against tetanus at a regular interval of 10–15 years was changed by Slovak legislation in the year of 2008 when it was expanded to include a booster dose of a bivalent vaccine against diphtheria and tetanus.

While immunisation against diphtheria has been carried out worldwide for more than 80 years, knowledge about long-term diphtheria immunity as well as results of the immune response after booster dose administration, including factors that impact it, are still not satisfactorily explored. We first focused on assessing the persistence of humoral immunity against diphtheria and, second, attempted to evaluate the immune response elicited by a bivalent vaccine containing diphtheria toxoid. For this purpose, we used data obtained from our clinical trial designed to evaluate immunogenicity of two alum-adsorbed tetanus and diphtheria vaccines (EudraCT 2018-001604-10).

2. Materials and Methods

Two hundred healthy adults aged between 24 and 65 years requiring routine booster immunisation against tetanus and diphtheria were enrolled in the trial designed as a single-blind, randomised, parallel-group one like our previous trial evaluating booster-vaccination against tetanus [1]. All vaccinated subjects were selected from four Slovak outpatient clinics. Previous vaccination against tetanus carried out 10–15 years earlier was confirmed by each patient's medical records kept by their practitioner, with confirmation of the last vaccination against diphtheria obtained in the same way. All participants had been properly and completely vaccinated with at least five doses of a combined vaccine against tetanus and diphtheria in childhood.

Subjects were randomly assigned (at a 1:1 ratio) to one of two vaccine groups stratified by sex and age to receive, from September through November 2017, either Imovax DT Adults (Sanofi Pasteur SA, Lyon, France) or Vacdite (Biodrug s.r.o., Bratislava, Slovakia). Both vaccines were administered intramuscularly into the deltoid region according to manufacturers' recommendations.

The reference vaccine (Imovax DT Adults) was supplied in a pre-filled syringe fitted with a 16 mm needle while the test one (Vacdite) was available in an ampoule. As the needle length of the pre-filled syringe was shorter than generally recommended [2], two clinical sites were equipped with 16 mm needles while the other two with needles of the recommended minimal length (25 mm) for administration of the ampouled vaccine. Single blinding was performed by simple overlapping of subject's eyes with a mask during the administration of vaccine in order to reduce the bias of adverse events reports dependently of the used vaccine.

The immune response was assessed by serological analysis of paired serum samples obtained from each subject before and 4 weeks after vaccination. The samples were collected, stored at below -20°C and measured with the ELISA method using the following kits: VaccZyme Anti-Tetanus Toxoid IgG Enzyme Immunoassay with a reported measuring range of 0.01–7.0 IU/mL for tetanus antibodies and VaccZyme Anti-Diphtheria Toxoid Ig Enzyme Immunoassay with a measuring range of 0.012–3.0 IU/mL for diphtheria antibodies (Binding Site Group Ltd., Birmingham, UK). Antibody concentrations were determined in one central laboratory (Institute of Microbiology and Immunology, Martin, Slovakia) and maximum accuracy was ensured by measurement of paired samples in one run. The potential bias of serological results dependently of investigated factors was completely excluded because the laboratory staff determining antibody concentrations was blinded to subject identity.

This clinical trial was conducted in compliance with the rules of Good Clinical Practice and approved by the Ethics Committee of the Region of Trenčín and the State Institute for Drug Control in Slovakia. All subjects expressed their voluntary participation in the study by signed informed consent.

Primary seroconversion rates (SCR4) for booster response were adopted from the World Health Organization's (WHO) requirements for post-vaccination immunogenicity comparing two vaccines

[3], defined as the proportion of subjects with a four-fold increase in antibody levels before and after vaccination if attaining ≥ 0.4 IU/mL. In our study, seroprotection rates at levels ≥ 0.1 IU/mL (SPR01) and ≥ 1.0 IU/mL (SPR1) were considered to confer full and long-term protection against diphtheria, respectively. Immunogenicity was also assessed using geometric mean concentrations (GMCs) of diphtheria antibodies.

As antibody levels after log-transformation exhibited normal distribution, the parametric t-Student tests or one-way ANOVA test could be used for comparison of GMCs among the analysed groups. The proportions including rates were statistically evaluated with Fisher's exact test. The sample size of 200 subjects was based on the null hypothesis investigating inferiority of the SCR4 of the test vaccine against the reference one with a delta margin of 10%.

Logistic regression was used to assess any potential association of predictors with the seroprotection rate. The demographic and behavioural characteristics were selected as possible factors influencing persistence of protective levels. Factors of immunisation were added to investigate their potential association with the booster-induced seroprotection rate. All predictors including sex and study vaccine are reported in Table 1, where they are divided into two groups according to dichotomous values or according to the median of continuous variables. The sample size was justified for logistic regression using up to 10 covariates [4]. McFadden's R squared of this approach was >0.2 , including a p value < 0.0001 , indicating a sufficient predictive ability of this model for the selected predictors. The association was evaluated with the odds ratio mutually adjusted for all selected predictors (aOR), including a 95% confidence interval (95% CI). All tests were two-tailed, and the level of significance was set at 0.05. Statistical analyses and logistic regression were performed using Prism 8 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) and STATA version 15.1 software (StatCorp, Lakeway Drive, TX, USA), respectively.

Table 1. Characteristics of the study population according to predictors expressed with proportions or means including the 95% confidence interval.

Predictors	N ¹	Proportion % (95% CI)	Predictors	N	Mean (95% CI)
Smoker	Yes 24	12 (7.8–17.3)	Age (years)	≤ 43.3 100	32.6 (31.3–33.8)
	No 176	79.5 (73.2–84.9)		> 43.3 100	53.8 (52.4–55.2)
Pre-booster concomitant medication	Yes 73	36.5 (29.8–43.6)	² BMI (kg/m ²)	≤ 25.2 100	22.2 (21.8–22.7)
	No 127	63.5 (56.4–70.2)		> 25.2 100	29.6 (28.8–30.3)
Related adverse events	Yes 44	22 (16.5–28.4)	Time since last dose (years)	≤ 33.9 100	17.1 (15.5–18.7)
	No 156	78 (71.6–83.5)		> 33.9 100	45.0 (43.5–46.4)
Needle length (mm)	16 150	75 (68.4–80.8)	Pre-vaccination anti-DT	≤ 0.05 101	0.03 (0.02–0.03)
	25 50	25 (19.2–31.6)	³ GMCs (IU/mL)	> 0.05 99	0.11 (0.09–0.12)

¹ N: number of subjects; ² BMI: body mass index; ³ anti-DT anti-diphtheria toxin antibodies; ⁴ IU: international unit; ⁵ GMC: geometric mean concentration. Note: males and females as well as both vaccines at a 1:1 ratio, i.e., proportions of 50% (95% CI 42.9–57.1%).

3. Results

Before booster immunisation, there were only 42 subjects with diphtheria antibody concentrations ≥ 0.1 IU/mL, i.e., 21% (95% CI 15.6–27.3%) with none having antibody concentrations ≥ 1.0 IU/mL. The pre-booster geometric mean concentration was 0.05 IU/mL (95% CI 0.05–0.06 IU/mL) and did not vary depending on the investigated factors (Table 2).

Table 2. Pre- and post-booster geometric mean concentrations (GMCs) of diphtheria antibodies, including the 95% confidence interval and p value between subgroups.

Predictors		GMCs (IU/mL), (95% CI)	
		Pre-Booster	Post-Booster
Sex	Male	0.06 (0.05–0.07)	0.35 (0.26–0.45)
	Female	0.05 (0.04–0.06)	0.26 (0.20–0.34)
	p value	NS	NS
Vaccine	Vaccine	0.06 (0.05–0.07)	0.33 (0.25–0.44)

	Imovax DT Adult	0.05 (0.04–0.05)	0.27 (0.21–0.35)
	<i>p</i> value	NS	NS
Smoker	Yes	0.04 (0.03–0.06)	0.16 (0.08–0.31)
	No	0.05 (0.05–0.06)	0.33 (0.27–0.40)
	<i>p</i> value	NS	0.0125
Needle length (mm)	16	0.05 (0.04–0.06)	0.29 (0.23–0.36)
	25	0.06 (0.05–0.07)	0.33 (0.23–0.47)
	<i>p</i> value	NS	NS
Pre-booster concomitant medication	Yes	0.06 (0.05–0.08)	0.22 (0.16–0.29)
	No	0.05 (0.04–0.05)	0.36 (0.28–0.46)
	<i>p</i> value	NS	0.0142
Related adverse events	Yes	0.04 (0.03–0.05)	0.31 (0.20–0.48)
	No	0.06 (0.05–0.06)	0.29 (0.24–0.37)
	<i>p</i> value	0.0409	NS
Age, median (years)	≤43.3	0.06 (0.05–0.07)	0.49 (0.38–0.64)
	>43.3	0.05 (0.04–0.06)	0.18 (0.14–0.23)
	<i>p</i> value	NS	<0.0001
BMI, median (kg/m ²)	≤25.2	0.05 (0.04–0.06)	0.34 (0.26–0.45)
	>25.2	0.05 (0.04–0.06)	0.26 (0.20–0.34)
	<i>p</i> value	NS	NS
Time since last immunisation, median (years)	≤33.9	0.06 (0.05–0.07)	0.46 (0.35–0.59)
	>33.9	0.05 (0.04–0.06)	0.19 (0.15–0.25)
	<i>p</i> value	NS	<0.0001
Pre-vaccination anti-DT GMCs, median (IU/mL)	≤0.05	0.03 (0.02–0.03)	0.18 (0.14–0.24)
	>0.05	0.11 (0.09–0.12)	0.49 (0.39–0.61)
	<i>p</i> value	<0.0001	<0.0001

Note: For abbreviations, see Table 1; NS: not significant; *p* value calculated with the unpaired *t*-test.

Persistence of the SPR01 was not dependent on any of the investigated factors except concomitant medication (Table 3). Although the study was conducted in healthy adults, it was not possible to exclude subjects with concomitant diseases not constituting a contraindication to both vaccinations, such as hypertensive disease (17.5%), impaired lipoprotein metabolism (7.5%), impaired thyroid function (4.5%) and other conditions (14.5%). A higher chance of maintaining protective levels ≥0.1 IU/mL was observed in subjects without concomitant treatment, i.e., an aOR of 2.86 (95% CI 1.27–6.45). However, the concomitant treatment had no impact on the persistence of the pre-booster GMCs (Table 2).

Table 3. Seroprotection rate with a threshold of 0.1 IU/mL pre- and post-booster immunisation against diphtheria, crude and mutually adjusted odds ratios (cORs, aORs) including the 95% confidence interval.

Predictors		Rate %	cOR	aOR	P ¹	Rate %	cOR	aOR	P ¹
Vaccine	I ²	NA ²				75 (65–83)	1	1	
	V ⁴					81 (72–88)	1.4 (0.7–2.8)	0.8 (0.3–2.1)	NS
Sex	M ⁵	24 (16–34)	1	1	NS	63 (53–72)	1	1	NS
	F ⁶	18 (11–27)	0.7 (0.4–1.4)	0.6 (0.3–1.2)		79 (70–87)	2.2 (1.2–4.2)	0.8 (0.3–1.9)	
Smoker	Yes	8.3 (1–27)	1	1	NS	54 (33–74)	1	1	0.002
	No	23 (17–30)	3.2 (0.7–14)	4.4 (0.9–21)		81 (75–87)	3.7 (1.5–8.9)	6.5 (2.0–21)	
Pre-booster CM ⁷	Yes	17 (11–24)	1	1	0.01	71 (60–81)	1	1	NS
	No	29 (19–41)	2.0 (1.0–4.0)	2.9 (1.3–6.5)		80 (72–87)	1.7 (0.9–3.2)	1.3 (0.5–3.2)	
Age (years)	≤43.3	21 (14–30)	1	1	NS	87 (79–93)	1	1	NS
	>43.3	21 (14–30)	1.0 (0.5–2.0)	1.0 (0.4–2.9)		69 (59–78)	0.3 (0.2–0.7)	0.7 (0.2–2.7)	
BMI (kg/m ²)	≤25.2	19 (12–28)	1	1	NS	77 (68–85)	1	1	NS
	>25.2	23 (15–33)	1.3 (0.6–2.5)	1.0 (0.5–2.1)		79 (70–87)	1.1 (0.6–2.2)	0.8 (0.3–1.9)	
Time since last dose (years)	≤33.9	23 (15–33)	1	1	NS	87 (79–93)	1	1	NS
	>33.9	19 (12–28)	0.8 (0.4–1.6)	0.5 (0.2–1.4)		69 (59–78)	0.3 (0.2–0.7)	0.3 (0.1–1.0)	
Related adverse events	Yes	NA				77 (62–89)	1	1	NS
	No					78 (71–84)	1.1 (0.5–2.4)	0.7 (0.3–2.1)	
Pre ⁸ anti-DT GMCs (IU/mL)	≤0.05	NA				63 (53–73)	1	1	<0.001
	>0.05					93 (86–97)	7.6 (3.2–18)	7.5 (2.9–19)	
Needle length (mm)	16	NA				84 (71–93)	1	1	NS
	25					76 (68–83)	0.6 (0.3–1.4)	1.4 (0.4–4.6)	

¹ *p* value; ² NA: not applicable; ³ I: Imovax DT Adult; ⁴ V: Vaccite; ⁵ M: Male; ⁶ F: Female; ⁷ CM: concomitant medication; ⁸ Pre-vaccination; ⁹ NS: not significant. Note: For abbreviations, see Table 1.

Even if smoking was not associated with a reduction of protective levels ($p = 0.06$), they were more often observed in non-smokers (22.7%; 95% CI 16.8–29.6%) than in smokers (8.3%; 95% CI 1.0–27%). No other association between the explored factors and duration of seroprotective levels was found (Table 3).

The immune response to a single booster dose of bivalent vaccines increased both tetanus and diphtheria antibodies ($p < 0.0001$). Although the post-vaccination response to the tetanus vaccine was much stronger than that against diphtheria, both vaccines did not differ in the SCR4 achievement and induction of the GMCs of both antibodies. The SCR4 was lower for both diphtheria vaccines (39%; 95% CI 29.4–49.3% for Vacdite and 30%; 95% CI 21.2–40% for Imovax DT Adult) than that for both tetanus vaccines (75%; 95% CI 65.3–83.1% for Vacdite and 67%; 95% CI 56.9–76.1% for Imovax DT Adult). Even if most of the subjects (78%; 95% CI 71.6–83.5%) responded with protective levels of diphtheria antibodies, levels ≥ 1.0 IU/mL were seen in only 23.5% (95% CI 17.8–30.0%).

The immune response elicited by both study combined vaccines were independent of the vaccine since the seroconversion or seroprotection rates difference between both vaccines was always below 10% including the lower limit of a 95% confidence interval. The same results were confirmed by the non-inferior GMCs ratio of both vaccines.

The booster-induced immune response was influenced by the pre-booster levels of diphtheria antibodies, as demonstrated by an aOR of 7.5 (95% CI 2.9–19.4) for achieving SPR01 in subjects with levels >0.05 IU/mL compared to those with levels ≤ 0.05 IU/mL as well as a p value < 0.0001 for GMCs between both groups (Table 2).

While the pre-booster levels of diphtheria antibodies did not correlate with either age or time since the last vaccination, the booster-induced GMCs was higher in younger ≤ 43.3 years than in older subjects ($p < 0.0001$) and in those with the last vaccination ≤ 33.9 years earlier than later ($p < 0.0001$) in conformity with the booster-induced GMCs for levels higher or lower than 0.05 IU/mL (Table 3).

The booster-elicited seroprotection rates and GMCs of diphtheria antibodies were furthermore investigated for quartile-stratified predictors, i.e., pre-booster levels and time since the last vaccination (Figure 1). At pre-booster levels ≥ 0.09 IU/mL, single-dose vaccination increased SPR01 to 95.5% (95% CI 77.2–99.9%) and SPR1 to 34.7% (95% CI 21.7–49.6%) achieving the highest GMCs (0.54 IU/mL; 95% CI 0.40–0.73 IU/mL). Conversely, only 56% and 8% of subjects with pre-booster levels of 0.01–0.03 IU/mL had protective levels ≥ 0.1 IU/mL and ≥ 1.0 IU/mL, respectively. Moreover, their booster-induced GMCs of diphtheria antibodies were low, i.e., 0.14 IU/mL (95% CI 0.09–0.21 IU/mL).

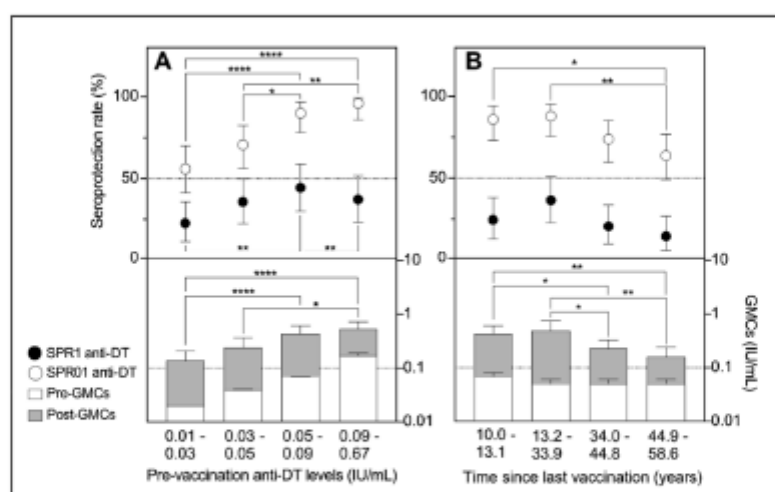


Figure 1. Seroprotection rates of 0.1 IU/mL and 1.0 IU/mL thresholds including the GMCs of pre- and post-booster immunisation against diphtheria in dependence on the quartile-stratified pre-booster levels (A) and time since the last vaccination (B).

Subjects immunised 10 to 13 years earlier achieved seroprotective levels more often (86%; 95% CI 73.3–94.2%) than those with the last vaccination against diphtheria 45–59 years earlier (64%; 95% CI 49.2–77.1%). The GMCs of diphtheria antibodies consistent with the seroprotection rates were also higher in those vaccinated 10–13 years (0.43 IU/mL; $p = 0.0127$) as well as 13–34 years (0.49 IU/mL; $p = 0.0055$) earlier compared to those with a longer time since the last vaccination (0.19 IU/mL). However, the quartile-stratified period between the last and current immunisation against diphtheria did not show any impact on SPR1 ($p = 0.0657$).

The adjusted odds ratio of 6.5 (95% CI 2.0–21.2) revealed a difference in achieving seroprotective levels between smokers and non-smokers. While 81% of non-smokers responded to booster vaccination with seroprotective concentrations, the same response was found in only 54% of smokers (Table 3). The GMCs of diphtheria antibodies were also lower in smokers (0.16 IU/mL) than in non-smokers (0.33 IU/mL; $p = 0.0125$).

Although concomitant treatment did not reduce antibody levels under the protective threshold, it did contribute to lower their total concentrations (Table 2). A detailed analysis of the most frequently reported concomitant diseases showed that 15 patients with impaired lipoprotein metabolism (E78) had lower GMCs (0.12 IU/mL; 95% CI 0.07–0.21 IU/mL) than others (0.32 IU/mL; 95% CI 0.26–0.39 IU/mL). Moreover, only 53.3% (95% CI 26.2–78.8%) of them achieved seroprotective levels. The immune response induced by a booster dose was not influenced by any other factor explored.

Adverse events (AEs) were reported by a total of 53 subjects, i.e., 26.5% (95% CI 20.5–33.2%). Neither serious nor severe AEs were documented during the entire study. Most of the vaccination-related AEs, i.e., 79.2% (95% CI 65.9–89.2%) were mild. Their occurrence was extremely higher in subjects vaccinated with the 16-mm needle (86.4%; 95% CI 72.6–94.8%) compared to those receiving the vaccine with a longer needle (13.6%; 95% CI 5.2–27.4%). Common AEs were consistent with usual and expected reactions, such as redness, swelling, induration and itching at injection site, arm or shoulder pain, fatigue, headache, nausea and abdominal pain. The safety profile of vaccines showed good tolerability with no difference.

4. Discussion

The last decade has witnessed a re-emergence of vaccine-preventable diseases and, although occurrence of diphtheria is still not under control, the hazard of imported cases increases the potential threat to unvaccinated population as well as to adults immunised a long time ago. Our results could contribute to diphtheria control precautions, especially in emergency situations.

The persistence of humoral immunity within 10 to 59 years after the last dose of the vaccine against diphtheria did not exhibit any variability, independently of age. Although almost all of subjects (except four) had serum antibodies against diphtheria toxin above the putative lowest protection threshold of 0.01 IU/mL, only 21% of them retained seroprotective levels ≥ 0.1 IU/mL as those internationally considered to confer full protection. The present study results are in accordance with current knowledge obtained from other seroepidemiological studies [5–8]. The immune response elicited with one booster dose of both study vaccines against diphtheria and tetanus did not differ in the seroconversion rates or in the GMCs of both antibodies.

Interestingly, booster vaccination against diphtheria did not induce such a strong immune response as that against tetanus. While all subjects achieved seroprotective levels of tetanus antibodies after booster dose administration within 10–16 years, only 88.1% and 31.3% of subjects achieved seroprotective levels of diphtheria antibodies ≥ 0.1 IU/mL and ≥ 1.0 IU/mL, respectively. However, if adults younger than 30 years were regularly booster-immunised at an interval of 10–16 years, then 100% of them were seroprotected. Similar results were documented in other studies focused on booster immunisation of adults [9–11].

Our data support the recommendation of Slovak legislation to regularly administer, every 15 years, one booster dose of a combined vaccine against diphtheria and tetanus independently of the age of the adult. It is just the regular repetition of booster immunisation that can help to afford full protection of the population. Unfortunately, this study could not evaluate the effect of repeated

booster immunisation against diphtheria in older adults because the law has been in force since the year of 2008 and only a negligible number of participants in this study was immunised in that year.

The antibody concentrations prior to booster immunisation suggested that not only antibody levels but, also, immunological memory may wane within a few decades.

Especially in cases where the pre-booster levels of antibodies dropped under 0.05 IU/mL, the chance to achieve protective levels of antibodies decreased by about 87%. This finding could be explained by the decrease in long-lived plasma B lymphocytes that helps to trigger a sufficient immune response after vaccine re-exposure [12]. Therefore, it is likely that, in this particular case, there could be a booster dose as a putative one with another dose required to achieve seroprotective levels.

Even if the key predictor of the booster-induced immune response is a persistent concentration of antibodies, it could be replaced by the time since the last vaccine administration as one more suitable for practice [13]. The present data showed that adults with the last diphtheria vaccination >34 years earlier were less responsive to booster immunisation since seroprotective levels were observed in only 69% of them. If the epidemiological situation markedly worsened, the time interval since the last vaccination could comfortably predict if only one, or two doses should be administered in an emergency. It was found that a second dose can improve an insufficient response induced by a booster dose and can contribute to increasing the levels above 0.1 IU/mL [13,14].

As the effect of cigarette smoking on vaccination is generally accepted [15], the finding of lower seroconversion rates and GMCs of diphtheria antibodies in smokers comes as no surprise. One can even speculate that smoking contributes to loss of diphtheria antibodies because a very small proportion of smokers (8.3%) had diphtheria antibodies at protective levels prior to booster immunisation.

While long-term concomitant treatment or diseases had no impact on achieving seroprotection, the post-vaccination GMCs of diphtheria antibodies were higher in healthy adults compared to patients, especially those on statins. We could not conclusively confirm in this trial if patients taking statins achieve worse post-booster immunogenicity since 15 patients represented too small a sample size and the power of test was lower than the usual 80%. This premise is, however, biologically plausible as numerous studies showed an ability of statins to modulate immuno-inflammatory processes [16]. One can assume that statins treatment can impact the vaccine-induced response in some way. Moreover, several studies have already documented that statins reduced the influenzae vaccine-induced response or protection [17–19]. Conversely, the fact why the same response to tetanus toxoid did not reveal any influence of this treatment can be explained by both regular immunisation and a stronger effect of tetanus toxoid than that of the diphtheria one.

Both vaccines were very well tolerated, and occurrence of AEs was not dependent on any of the investigated factors except one. It was confirmed that the vaccination-related AEs, especially local ones, were more frequent in subjects immunised with the shorter 16-mm needle than in those immunised with the longer one. Use of the 25 mm needle is probably associated with fewer moderate or mild local reactions after vaccination compared to the 16 mm needle as demonstrated in our study in accordance with other authors [20]. Vaccines supplied in pre-filled syringes reflect the current universal use for both children and adults which is why the 16 mm needle employed for childhood immunisation is generally accepted also for adults.

5. Conclusions

Booster immunisation against diphtheria in adults carried out with bivalent tetanus-diphtheria vaccines produced a protective immune response dependent on persistent levels of diphtheria antibodies prior to the booster dose. The persistence of antibody levels is the key predictor of seroprotection achievement correlating with time since the last vaccination.

Therefore, two-dose vaccination should be considered, in an emergency, in recipients with the last dose received >34 years earlier. Based on our data, we can further anticipate a higher increase in diphtheria antibodies more often in non-smokers and in adults without statin treatment. If these factors have any clinical impact on protection against diphtheria is yet to be established.

Author Contributions: Conceptualization, V.O.; methodology, M.P., J.D. and M.A.Č.; resources, E.N., M.Š. and Z.K.; investigation, M.M. and J.M.; formal analysis, M.P.; writing—original draft preparation, M.P. and I.K.L.; writing—review and editing, M.P., V.O., M.M., J.D., M.A.Č., E.N., M.Š., J.M., Z.K. and I.K.L.

Funding: This research was funded by Biodrug s.r.o. Slovakia.

Acknowledgments: The authors would like to thank the following physicians participating in the study as investigators: Darina Kordíková, Daniela Šustáková, Radovan Litva and Roman Podolák.

Conflicts of Interest: Marek Petráš, Milica Molitorisová, Jana Daňová, Alexander Čelko, Elena Nováková, Mária Štefkovičová, Zuzana Krištúfková, Jana Malinová and Ivana Králová Lesná have no conflicts of interest to declare. Vladimír Oleár has received lecture fees from Biodrug s.r.o. (Slovakia), the study sponsor. The funder had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, and in the decision to publish the results.

References

- Petráš, M.; Oleár, V. Predictors of the immune response to booster immunisation against tetanus in Czech healthy adults. *Epidemiol. Infect.* **2018**, *146*, 2079–2085.
- CDC. Vaccine Administration. General Best Practice Guidelines for Immunization, Best Practices Guidance of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). Available online: <https://www.cdc.gov/vaccines/hcp/acip-recs/general-recs/administration.html#ref24> (accessed on 15 March 2019).
- WHO Expert Committee on Biological Standardization. Sixty-Third Report. WHO Technical Report Series No. 980, 2014. Available online: https://www.who.int/biologicals/WHO_TRS_980_WEB.pdf (accessed on 21 June 2019).
- Peduzzi, P.; Concato, J.; Kemper, E.; Holford, T.R.; Feinstein, A.R. A simulation study of the number of events per variable in logistic regression analysis. *J. Clin. Epidemiol.* **1996**, *49*, 1373–1379.
- Cohen, D.; Green, M.S.; Katzenelson, E.; Slepon, R.; Bercovier, H.; Wiener, M. Long-term persistence of anti-diphtheria toxin antibodies among adults in Israel. Implications for vaccine policy. *Eur. J. Epidemiol.* **1994**, *10*, 267–270.
- Edmunds, W.J.; Pebody, R.G.; Aggerback, H.; Baron, S.; Berbers, G.; Conyn-van Spaendonck, M.A.; Hallander, H.O.; Olander, R.; Maple, P.A.; Melker, H.E.; et al. The sero-epidemiology of diphtheria in Western Europe. ESEN Project. European Sero-Epidemiology Network. *Epidemiol. Infect.* **2000**, *125*, 113–125.
- Tanriover, M.D.; Soyler, C.; Asciglu, S.; Cankurtaran, M.; Unal, S. Low seroprevalence of diphtheria, tetanus and pertussis in ambulatory adult patients, the need for lifelong vaccination. *Eur. J. Intern. Med.* **2014**, *25*, 528–532.
- Yao, N.; Zeng, Q.; Wang, Q. Seroepidemiology of diphtheria and pertussis in Chongqing, China, serology-based evidence of *Bordetella pertussis* infection. *Public Health*. **2018**, *156*, 60–66.
- Gil, A.; Dal-Ré, R.; González, A.; Lasheras, L.; Aguilar, L.; del Rey, J. Immunogenicity and safety of a tetanus-diphtheria vaccine (adult type), clinical trial in adults. *Med. Clin. (Barc.)* **1995**, *104*, 126–129.
- Hasselhorn, H.M.; Nübling, M.; Tiller, F.W.; Hofmann, F. Factors influencing immunity against diphtheria in adults. *Vaccine*. **1998**, *16*, 70–75.
- Lee, J.; Choi, J.H.; Wie, S.H.; Park, S.H.; Choi, S.M.; Lee, M.S.; Kim, T.H.; Lee, H.J.; Kang, J.H. A phase III study to evaluate the immunogenicity and safety of GC1107 (adult tetanus diphtheria vaccine) in healthy adults. *J. Korean Med. Sci.* **2019**, *34*, e31.
- Crotty, S.; Ahmed, R. Immunological memory in humans. *Semin. Immunol.* **2004**, *16*, 197–203.
- Hasselhorn, H.M.; Nübling, M.; Tiller, F.W.; Hofmann, F. Diphtheria booster immunization for adults. *Dtsch. Med. Wochenschr.* **1997**, *122*, 281–286.
- Choi, J.H.; Choo, E.J.; Huh, A.; Choi, S.M.; Eom, J.S.; Lee, J.S.; Park, S.H.; Kang, J.H. Immunogenicity and safety of diphtheria-tetanus vaccine in adults. *J. Korean Med. Sci.* **2010**, *25*, 1727–1732.
- Younas, M.; Carrat, F.; Desaint, C.; Launay, O.; Corbeau, P.; ANRS HB03 VIH-VAC-B Trial Group. Immune activation, smoking, and vaccine response. *AIDS* **2017**, *31*, 171–173.
- Diamantis, E.; Kyriakos, G.; Quiles-Sanchez, L.V.; Farmaki, P.; Troupis, T. The anti-inflammatory effects of statins on coronary artery disease, an updated review of the literature. *Curr. Cardiol. Rev.* **2017**, *13*, 209–216.

17. Black, S.; Nicolay, U.; Del Giudice, G.; Rappuoli, R. Influence of statins on influenza vaccine response in elderly individuals. *J. Infect. Dis.* **2016**, *213*, 1224–1228.
18. Omer, S.B.; Phadke, V.K.; Bednarczyk, R.A.; Chamberlain, A.T.; Brosseau, J.L.; Orenstein, W.A. Impact of statins on influenza vaccine effectiveness against medically attended acute respiratory illness. *J. Infect. Dis.* **2016**, *213*, 1216–1223.
19. McLean, H.Q.; Chow, B.D.; VanWormer, J.J.; King, J.P.; Belongia, E.A. Effect of statin use on influenza vaccine effectiveness. *J. Infect. Dis.* **2016**, *214*, 1150–1158.
20. Beirne, P.V.; Hennessy, S.; Cadogan, S.L.; Shiely, F.; Fitzgerald, T.; MacLeod, F. Needle size for vaccination procedures in children and adolescents. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2018**, *8*, CD010720.



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).