

616.921.5—036.22—07

POZNÁMKY K RYCHLÉ DIAGNOSTICE CHŘIPKY

Pplk. MUDr. Jaromír BRUJ, MUDr. Jiří FARNÍK, Karel KVĚCH,
hygienicko-epidemiologický oddíl v Plzni a Ústav pro mikrobiologii lékařské fakulty
Karlovy university v Plzni

Skupiny mladistvých představují citlivý ukazatel přítomnosti chřipkového viru v populaci. Hromadná onemocnění v těchto kolektivech často signalizují počátek periodicky vznikajících epidemických vln (11). Tento poznatek má plnou platnost i pro vojenské jednotky, kde se k životu v úzkém, uzavřeném kolektivu přidává ještě řada dalších faktorů, podporujících vznik respiračních infekcí. Ve čtyřech z pěti vln chřipky typu A2, které jsme měli možnost pozorovat na spádovém území hygienického oddílu v Plzni, probíhaly ve vojenských útvech rozsáhlé epidemie již v době, kdy výskyt chřipky v civilní populaci nebyl dosud zaznamenán. Pouze v roce 1966 jsme diagnostikovali první případy v dětském kolektivu. Protože ani zprávy o celostátním výskytu nebyly zpravidla při prvních epidemiích ještě k dispozici, byli jsme odkázáni při stanovení etiologie na vlastní vyšetření. Potřeba včasné diagnózy, nezbytné pro prognózu epidemie, přiměřená protiepidemická opatření pro přípravu a zahájení plánovaných epidemiologických studií nás vedly k prověření možností, které jsou v současné době dostupné pro menší laboratoř s převážně terénními úkoly. Jako základní metodiku jsme zvolili vyšetření stěrů z nosní sliznice fluorescenční technikou, kterou k detekci chřipkového antigenu

užili prvně Watsonová a Coons (21) v experimentu na kuřecích embryích, po nich Liu (15, 16, 17) nejprv u uměle infikovaných fretek a později u nemocných, a jejíž použití k diagnostice prověřili u nás Blaškovič se spolupracovníky (3) a Fedová se Zelenkovou (7). Další metoda námi použitá byl průkaz viru chřipky adsorbovaného na morčecí erythrocyty z nosohltanového výplachu, popsany Baratawidjajou et al. (2) a u nás na modelovém pokusu Zelenkovou (23). Dále jsme se pokusili přesněji určit minimální interval, nezbytný k sérologickému průkazu vzestupu protilátek, a vhodnost pomocných laboratorních vyšetření — sedimentace erythrocytů a bílého krevního obrazu pro diferenciální diagnózu chřipky a ostatních katarů horních cest dýchacích.

Materiál a metodika

Vyšetření jsme prováděli celkem ve třech epidemiích; v epidemiích chřipky A2 v letech 1964 a 1966 a v epidemii chřipky B1 v roce 1965. Fluorescenční metody jsme sami použili až v roce 1966.

Po zjištění charakteru a rozsahu epidemie jsme orientačně vyšetřili část nemocných a vybrali typické případy pro laboratorní vyšetře-

ní. U nemocných s kratší anamnézou, ve druhém až třetím dnu onemocnění, jsme odebírali výplach z nosohltanu s faryngeálním výtěrem do fosfátového bujónu s antibiotiky, dále stěr z nosní sliznice, který jsme nanášeli na podložní sklíčko do míst předem označených kroužkem (k stěru z nosního septa jsme, na doporučení dr. Voldřicha z ORL oddělení Ústřední vojenské nemocnice, užívali bakteriologické klíčky místo běžně používaných vatových tampónů) a krev na sérologická vyšetření a další laboratorní testy (sedimentace, počet leukocytů). Rekonvalescentní krev jsme odebírali ve třetím týdnu onemocnění.

Kromě toho jsme u části nemocných s delší anamnézou odebírali pouze krev na sérologické vyšetření: první vzorek třetí až čtvrtý den nemoci, druhý za 4–6 dnů po prvním odběru.

V roce 1966 jsme u 12 nemocných odebírali krev 2., 4., 6., 8. a 21. den nemoci.

Kultivace na kuřecích embryích, hemaglutinačně inhibiční test (HIT) a komplement fixační reakci (KFR) jsme prováděli podle metodiky WHO (22). HIT jsme prováděli na plexitových deskách na celkový objem 0,8 ml při pokojové teplotě, nespecifické inhibitory ve vyšetřovaných sérech jsme odstraňovali u typu A2 pomocí KIO₄ a u typu B1 pomocí CO₂. Používali jsme antigeny a imunních sér vlastní výroby ze standardních kmenů, poskytnutých laskavostí Národní referenční chřipkové laboratoře v ÚEM Praha a VÚHEM. Pro KFR jsme používali antigeny provenience ÚEM.

Nepřímé metody fluorescenčních protilátek (FP) jsme použili k průkazu viru v stěru z nosní sliznice podle metodiky popsané Fedovou a Zelenkovou (7) a k průkazu viru chřipky adsorbované na morčecí erytrocyty z výplachu podle Zelenkové (23). Preparáty jsme někdy promývali přes noc (1).

Krev na hematologické vyšetření byla odebírána do vysušené oxalátové směsi a pak byla ředěna v baničkách v poměru 1:20 n/10 HCl. Počítání se provádělo v Buerkerově komůrce na 100 čtverců. Sedimentace červených krvinek byla stanovena obvyklým způsobem.

Výsledky

Sérologická vyšetření nám umožnila předběžnou diagnózu v roce 1964 za týden (diagnosticky významný vzestup v 7 z 9 vyšetřovaných dvojic sér), v roce 1965 a 1966 již za 5 dní od prvního vyšetření. V roce 1965 jsme v epidemii chřipky typu B1 prokázali signifikantní vzestup protilátek u 9 z 10 dvojic a v roce 1966 v epidemii chřipky typu A2 vzestup u 11 z 12 dvojic. Výsledky vyšetření dynamiky protilátek u 12 nemocných chřipkou typu A2 v epidemii v roce 1966 jsou shrnuty v tabulkách 1 a 2. V HIT bylo použito antigenu A2/65 Košice.

Ve všech epidemiích chřipky A2 byla etiologie onemocnění prokázána izolací viru na kuřecím embryu a vzestupem protilátek u převážně většiny nemocných.

Tab. 1

DYNAMIKA HI PROTILÁTEK U 12 NEMOCNÝCH CHŘIPKOU TYPU A2 V EPIDEMII V ROCE 1966.

DEN NEMOCI					TITRY
2	4	6	8	21	
			•	••	512
					256
		••	•	•	128
		••	••••••	••••••	64
			•••	••	32
		•••••	•		16
•••	••••••	•••			8
••••••	••••••				0

6 11
POČET DIAGNOSTICKY VÝZNAMNÝCH VZESTUPŮ
V DANÉM INTERVALU

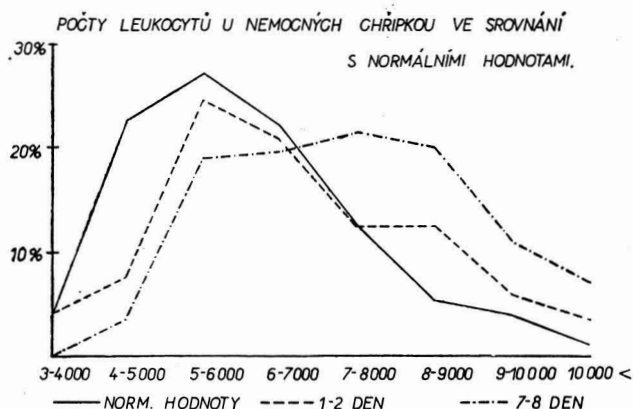
Tab. 2

DYNAMIKA KF PROTILÁTEK U 12 NEMOCNÝCH CHŘIPKOU TYPU A2 V EPIDEMII V ROCE 1966

DEN NEMOCI					TITRY
2	4	6	8	21	
			•	•	512
				••	256
		•			128
			••••	•••	64
		•	••••••	••••••	32
•	•	••			16
•	•••••	•••••			8
••••••	••••••	•			0

4 11
POČET DIAGNOSTICKY VÝZNAMNÝCH VZESTUPŮ
V DANÉM INTERVALU

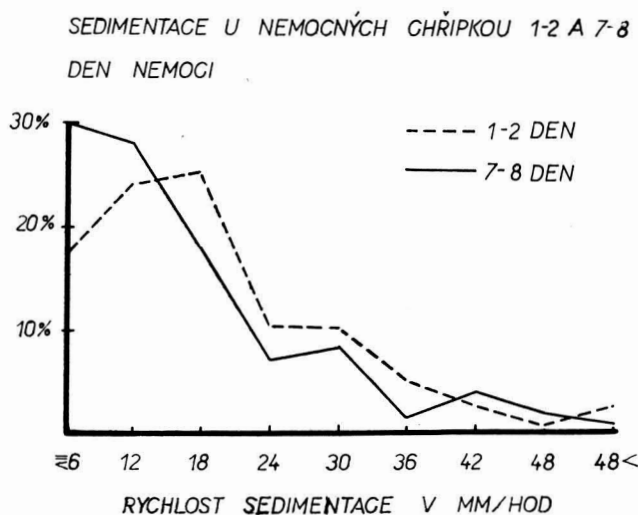
Graf 1



Virus chřipky B1 jsme ve vyšetřované epidemii nezachytili a diagnózu opíráme o zjištění pohybu protilátek. Uvedená epidemie proběhla u útvaru, kde jsme měli k dispozici séra reprezentativního vzorku celé populace z doby před epidemií. U klinicky nemocných v době epidemie docházelo významně častěji k vzestupu protilátek než u zdravých a incidence onemocnění byla závislá na hladině protilátek před infekcí, podobně jako v dříve popsané epidemii chřipky A2 (6).

Průkaz viru typu A2 metodou FP ve stěrech nosní sliznice se nám podařil ve 3 z 18 odebraných vzorků v epidemii v roce 1966. 4 vzorky jsme označili vzhledem k malým zkušenostem s touto metodou pouze jako suspektní. 3 vzorky nebylo možné hodnotit pro velké množství hlehu. U všech 18 nemocných byl sérologicky prokázán vzestup protilátek proti viru chřipky typu A2. Průkaz viru chřipky adsorbovaného na morčecí erythrocyty z nosohltanového výplachu metodou FP podle literárního popisu se nám nezdařil. Touto metodou jsme vyšetřili 12 výplachů. Z toho u 5 byl izolován virus chřipky A2 a

Graf 2



Tab. 3

Počty případů s normální a zvýšenou sedimentací erythrocytů na začátku a po týdnu onemocnění chřipkou

	FW do 10 mm/h	FW více než 10 mm
nemocní s chřipkou 1.—2. den nemoci	29/38 %	51/62 %
stejní nemocní po týdnu	28/47 %	32/53 %

$$x^2 = 4,2$$

$$0,05 > P > 0,01$$

u všech byl prokázán signifikantní vzestup protilátek. Blíže jsme se touto metodou nezabývali.

Hodnoty celkového počtu leukocytů pocházejí od 85 nemocných sérologicky prokázanou chřipkou typu A2 v epidemii 1964, sedimentace byla vyšetřena u stejných nemocných v akutním stadiu v 80 případech, vyšetření po týdnu jsou od 60 nemocných. Výsledky vyšetření jsou znázorněny distribuční křivkou; jako normální hodnoty u leukocytů jsou užitý údaje z práce Nováka a Mádlové (18), získané vyšetřením 1000 zdravých obyvatel Prahy. Počet leukocytů je proti normálním hodnotám zvýšen již v akutní fázi choroby a v dalším průběhu ještě stoupá. Sedimentace je v první fázi nemoci rovněž zvýšena, převážně v rozsahu nižších hodnot, v dalším průběhu dochází k poklesu. Zvýšení rychlosti sedimentace v první fázi choroby je statisticky významné, viz tab. 3.

Diskuse

Úsilí o rychlou diagnostiku chřipky by se mohlo zdát malicherné, měříme-li ho možnostmi protiepidemické práce, nebo vlivem, jaký tato opatření mají na průběh epidemii. Přesto je za určitých okolností rychlá diagnóza potřebná. Po několika letech zkušeností se studiem respiračních infekcí ve vojenských kolektivech víme, že diagnosticky dostupná virová agens se vyskytují jen sporadicky nebo v menších nahromaděních. Na větších epidemiích onemocnění chřipkového charakteru se prakticky podílí jen adenoviry a viry chřipky typů A a B. Adenoviry mohou způsobit epidemie sice se značnou nemocností, ale zpravidla ojedinele, bez tendence šířit se na další kolektivy (4, 10). Chřipka typu B může probíhat v epidemické formě ve vojenských kolektivech na určitém území, bez zjevné souvislosti s výskytem v civilním sektoru (vlastní zkušenosti — nepublikováno). Chřipka typu A způsobuje až na malé výjimky epidemie vždy v souvislosti s celostátním výskytem. Rychlá diagnóza nemá vliv na průběh vyšetřované epidemie, ale preventivní opatření, zaměřená na nepostižené útvary, se mohou podle etiologie výrazně lišit, zejména je-li nutno rozhodnout o realizaci větších cvičení nebo o jiných podstatnějších zásadách do života vojsk.

Diagnostika pomocí fluorescence dává pozitivní výsledky během několika hodin po odběru materiálu. Záchytnost je sice menší než u ostatních diagnostických metod, přesto již řada prací potvrzuje praktickou použitelnost této metody (3, 7, 17). Bez sérologického vyšetření se však výsledky zpravidla berou s rezervou. Vzestup protilátek nemůžeme urychlit, můžeme ale zkrátit na minimum odstup mezi odběrem akutního a rekonvalescentního séra, provedeme-li odběry akutních sér u nemocných s několikadenní anamnézou v době, kdy dosud nedošlo k většímu vzestupu protilátek a rekonvalescentní sérum odebereme v intervalu, kdy vzestup sice ještě není maximální, ale diagnosticky již postačující. V letech 1964—1965 jsme tohoto způsobu použili vždy v první ze série epidemií ve vojenských kolektivech. V roce 1966 jsme provedli podrobnější sledování dynamiky protilátek, abychom si ověřili nejvhodnější interval k odběrům pro KFR a HIT. Z výsledků je zřejmé, že k strmému vzestupu protilátek v diagnosticky významných rozmezích dochází v pátém až sedmém dnu nemoci. Dvojice sér můžeme tedy odebírat ve 3.—4. a 7.—8. dnu nemoci. Kombinací fluorescenční techniky a vhodných termínů k odběru krve je možné stanovit diagnózu chřipky v epidemiích se značnou dávkou jistoty již za 4—5 dní od prvního vyšetření. I když se obvykle uvádí, že komplement-fixační protilátky vznikají dříve než protilátky, které se uplatňují v HIT (12), zdá se, že v promořené populaci, nejde-li o první setkání s příslušným antigenem, můžeme s úspěchem užít obou metod.

Chřipka se obvykle považuje za onemocnění vyznačující se v akutní fázi leukopenií a nízkými hodnotami sedimentace (5, 19, 20). Ve starším vydání učebnice infekčních chorob byly tyto údaje interpretovány dokonce jako diagnosticky významné při odlišení chřipky od katarů horních cest dýchacích jiné etiologie (14). V našem souboru je leukopenie výjimkou a ve srovnání s normálními hodnotami uváděnými Novákem a Mádlovou (18) je počet leukocytů naopak zvýšen již na začátku nemoci. Vysvětlení rozporu vidíme v tom, že není obecná shoda v názorech na normální hodnoty. Při dolní hranici 6000 leukocytů, udávané v některých učebnicích, byla leukopenie v Novákově souboru zdravých lidí u 53 % všech vyšetřovaných. Je zřejmé, že při užití podobných kritérií najdeme leukopenii i u značného procenta nemocných chřipkou. Leukocytózu již za 12 hodin od začátku prvních příznaků onemocnění zjistil také Loda u osob uměle infikovaných chřipkou A2 (13). Zvýšená

sedimentace krve, kterou jsme zjišťovali v časné fázi onemocnění, byla sice zřejmá, ale v rozmezí poměrně nízkých hodnot. Odpovídající pozorování z literatury jsme našli pouze v práci Haffa a spol. (9), kteří v pokusech na fretkách našli změny v poměru albuminů a globulinů a korespondující zvýšení rychlosti sedimentace již za 24 hodin od začátku infekce. Vyšetření bílého krevního obrazu a sedimentace erytrocytů nám nemůže z hlediska diferenciální diagnózy nijak prospět, ale údaje, které jsme získali v poměrně velkém souboru nemocných lehkou, nekomplikovanou chřipkou, nám mohou být prospěšné jako základní hodnoty při odlišení bakteriálních komplikací.

Souhrn

V epidemiích chřipky vyvolaných takovými typy chřipkového viru, se kterými již byla vyšetřovaná populace ve styku, je možné kombinací fluorescenční techniky u nosních výtěrů a vyšetřením protilátek v sérech, odebraných 3.—4. a 7.—8. den nemoci, dosáhnout poměrně spolehlivé diagnózy již za 4—5 dní od prvního vyšetření. KFR a HIT se nám ukázaly stejně vhodné. Průkaz viru chřipky adsorbovaného z výplachu na morčecí krvinky fluorescencí se nám nezdařil.

Celkový počet leukocytů a sedimentace erytrocytů nemá pro diferenciální diagnózu žádný význam.

Literatura

1. Albrecht: Vizualizacia antigénov metódou fluorescenčných protilátok, s. 107.
2. Baratawidjaja, R. K., Howson, A., Labzoffsky, N. A.: *Canad. J. Microbiol.* 1963, 9: 563—65.
3. Blaškovič, D., Albrecht, P., Lackovič, V., Leššo, J., Rathová, V., Styk, B.: *Čs. Epid. Microb. Imun.* 1963, 12: 129—139.
4. Bruj, J., Farník, J., Sedmidubský, V.: *Čs. Epid. Microb. Imun.* 1966, 15: 165—171.
5. Burney, LeRoy, E.: *JAMA* 1957, 164: 2029—2033.
6. Farník, J., Bruj, J.: *J. Infect. Dis.* 1966, 118: 425—428.
7. Fedová, D., Zelenková, L.: *J. Hyg. Epid. Microb. Imun.* (Prague) 1965, 9: 127—134, 135—146.
8. Fraňková, V., Franěk, J., Černý, E., Marek, M.: *Voj. zdrav. listy* 1961, 30: 250—253.
9. Haff, R. E., Schriver, P. W., Engle Claire, C., Stewart, R. C.: *J. Immunol.* 1966, 96: 659—667.
10. Heinz, F., Sklenička, J., Střelček, J.: *Voj. zdrav. listy* 1963, 32: 200—204.
11. Jordan, W. S.: *Am. Rev. Resp. Dis.* 1961, 82: 29—35, Supplem.
12. Kalter, S. S., Casey, H. L., Jensen, K. E., Corrie, R. H.: *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 1959, 100: 367—370.
13. Knight, V., Kasel, J. A., Alford, R. H., Loda, F., Morris, J. A., Davenport, F. M., Robinson, R. Q., Buescher, E. L.: *Ann. Intern. Med.* 1965, 62: 1307—1325.
14. Kredba, V., Ondráček, J., Procházka, J.: *Infekční nemoci, SZN, Praha* 1955, p. 400.
15. Liu, Ch.: *J. Exper. Med.* 1955, 101: 665—676.
16. Liu, Ch.: *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 1956, 92: 883—887.
17. Liu, Ch.: *Amer. Rev. Resp. Dis.* 1961, 83: 130—133, Supplem.
18. Novák, J., Mádlová, Z.: *Čas. lékařů českých* 1962, 101: 837—842.
19. Pospíšil, V.: *Praktický lékař* 1957, 37: 733—736.
20. Šmahel, O.: *Praktický lékař* 1957, 37: 917—919.
21. Watson, Barbara, K., Coons, A. H.: *J. Exper. Med.* 1954, 99: 419—428.
22. WHO Tech. Rep. Series No 170, 1959.
23. Zelenková, L.: *Čs. Epid. Microb. Imun.* 1966, 15: 65—68.