

VYŠETŘOVÁNÍ SÉR SE ZVÝŠENOU HLADINOU TRANSAMINÁZ JAKO ÚČINNÁ CESTA ODKRÝVÁNÍ HEPATITIDY B MEZI PACIENTY AMBULANTNÍCH A LŮŽKOVÝCH JEDNOTEK

R. BENDA, M. MACHOVÁ a J. VANČUŘÍK

Virologické oddělení VÚHEM a ústřední laboratoře ÚVN, Praha

V roce 1973 jsme zavedli — na principu protisměrné imuno elektroforézy (PIEP) — spolehlivou a rychlou modifikaci průkazu antigenu hepatitidy B (HB_{Ag}) a jeho protilátek (HB_{Ab}). Prvním naším praktickým zájmem se stalo vyšetřování sér přicházejících laboratoři klinické biochemie s určením na vyšetření jaterních funkcí; z denních kontingentů sér jsme vybírali především ta, která vykazovala zvýšenou hladinu transaminázy GPT. K srovnávacím účelům jsme postupně vyšetřili i různé jiné soubory sér. Cílem celého snažení bylo dosáhnout bez velkého rozsahu vyšetřování a v co nejkratší době zachycení hepatiků B a nosičů HB_{Ag} mezi pacienty, kteří se podrobují péči nemocničních lůžkových oddělení nebo různých ambulantních jednotek a stávají se přitom potenciálním zdrojem nákazy pro ostatní pacienty a rovněž pro zdravotnický personál. V příspěvku prezentujeme zkušenosti za období od začátku listopadu 1973 do konce prosince 1974.

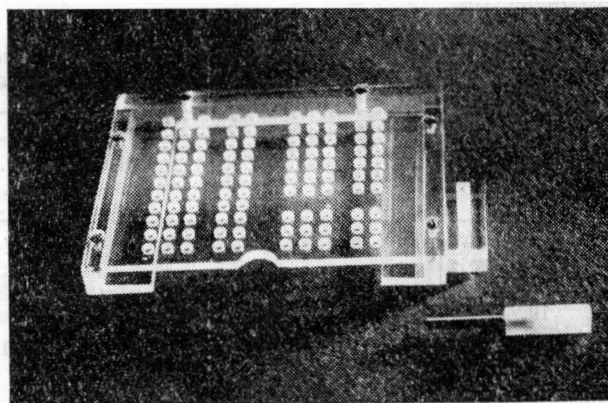
Materiál a metody

Vypracovaná technika průkazu HB_{Ag} je modifikací PIEP podle Pesendorfera a sp. (1970). Reakci jsme zrychlili tím, že pufr na elektrodách a v gelu má dvojnásobný molaritní spád (tzv. diskontinuální pufrový systém); to umožňuje zkrátit odečítání precipitačních linií z 2—3 hodin na 45 minut. Spád molarity pufru je mírnější nežli doporučují např. Wallis a Melnick (1971) nebo Combridge a Shaw (1971); odpadá proto riziko roztrhání agarového gelu během elektroforézy. Zpočátku pravidelně a nyní pouze k ověřovacím účelům při detekci HB_{Ag} provádíme — paralelně s přímou PIEP — i nepřímou elektroprecipitací neboli inhibicí průkazu antigenu, jak ji navrhli Kořínek a Švorcová (1971) a jak ji vždy doporučují Polanecský a Schön (osobní sdělení, 1973).

Z technického zařízení máme k dispozici dvě vany dodávané vývojovými dílnami Ústavu sér a očkovacích látek (ÚSOL) v Praze: malá va-

na IEP-3 je expedována se šablonou a je určena pouze k vyšetřování PIEP v agaru na dia-sklech rozměru 8,5×8,5 cm, zatímco velká vana IEP-2 je určena původně k imuno elektroforéze sérových bílkovin a je dodávána bez šablony na PIEP; v této vaně lze najednou umístit dvě dia-skla nebo dvě obdélníková skla rozměru 7,5×10 cm, k nimž šablona byla vyvinuta ve VÚHEM a ÚVN (obr. 1).

K přípravě gelu užíváme Ionagar č. 2 v konečné koncentraci 1% v prostředí acetát-veronátového pufru pH 8,1 o molaritě 0,032. Složení pufru pro elektrody (0,064 M) je následující: Natr. barbit. 8,15 g; Natr. acet. 6,48 g; 0,1 N HCl 90 ml; destilovaná voda ad 2000 ml. (Roztok 0,1 N MCl se připraví přidáním 0,8 ml koncentrované kyseliny k 89,2 ml vody.) Jamky v agarovém gelu jsou rozměru 3,5 mm, vzdáleny svými okraji asi 2,5 mm. Jako zdroj protilátek užíváme neředěné prasečí hyperimunní polyvalentní sérum anti-HBAG, vyráběné v ÚSOL. Referenční HBAG (do kontrol, případně do jamek při paralelním vyšetřování i na



Obr. 1

HBAG byla vybírána séra s hladinou nejméně 1,8 $\mu\text{mol/ml}$.

Výsledky

V tabulce 1 jsou zaznamenány sumární výsledky vyšetřování. Z dat je zřejmé, že v hlav-

Tabulka 1

Srovnání míry zachytu HBAG v různých souborech lidských sér

Charakterizace souborů sér	Období vyšetřování	Počet vyšetřených sér	Počet pozitivních nálezů	Procento pozitivních nálezů	Počet zachycených nemocných HBAG+
Vybraná séra se zvýšenou hladinou transaminázy GPT	XI a XII 1973 a 1 až XII 1974	1208	193	15,9	77
Séra s nezvýšenou hladinou transaminázy GPT	I až X 1974	489	4	0,8	2
Séra z depistážních akcí u voj. útvarů	X až XII 1974	111	0	—	0
Séra choromyslných (léčebna Horní Beřkovice)	X až XII 1973	165	1	0,6	1*)
Séra s určením na vyšetření HBAG	XI a XII 1974	112	10	8,9	9**)

*) Nezařazeno do zachytové kartotéky.

**) Vzhledem k tomu, že vyšetřování sér s určením přímo na HBAG spadá až do období konce roku 1974, bylo 8 z 9 prokázaných případů zachyceno již dříve ze sér se zvýšenou hladinou transaminázy GPT; jediný nový záchyt není zařazen do analyzovaného souboru pacientů (viz níže).

HBAb) má podobně být polyvalentní (směs HBAG-pozitivních sér od několika osob). Elektroforéza probíhá na malé vaně IEP-3 při 80–85 V, na velké vaně IEP-2 při 250 V i více; standardizace se dosahuje nastavováním stálého proudu, který je 2,5 mA/1 cm. Po 45 minutách jsou odečítány precipitační linie; ty se vždy ještě barví amidočerní nebo azokarmínem. Na každém skle musí být zakódovány pozitivní i negativní kontroly. Za takovýchto podmínek lze na jednom skle vyšetřit najednou 15–18 sér a v případě, že se neprovádí inhibice průkazu antigenu, dvojnásobek tohoto počtu. Pro jednodušší manipulaci častěji pracujeme s vanou IEP-3 (nizkovoltážní PIEP).

Transamináza GPT (alaninaminotransferáza) byla určována kolorimetrickým testem s použitím souprav, vyráběných v ÚSOL; k zjištění

ním souboru 1208 vybraných sér (se zvýšenou hladinou transaminázy GPT) je 193 pozitivních nálezů (téměř 16 %), což odpovídá odhalení přítomnosti HBAG u 77 pacientů. V dalších třech menších souborech sér (dohromady 765 vzorků) je pozitivních nálezů pod 1 %, v průměru nejvýše asi 2–3krát více než odpovídá nálezům jiných laboratoří v normální zdravé populaci; 4 pozitivní nálezy ve skupině 489 sér z biochemické laboratoře s nezvýšenou hladinou transaminázy GPT představují pro nás dva nové záchyty hepatitidy B. Důležitou skupinou je poslední soubor 112 vzorků, což jsou séra zaslaná z klinických oddělení nebo z ambulantních jednotek s přímým určením na vyšetření HBAG; pozitivní nálezy tu rovněž dosahují relativně vysokého procenta (téměř 9 %). Ve srovnání se skupinou sér se

Tabulka 2

Časový záchyt nemocných hepatitidou B nebo nosičů HBAG ze sér se zvýšenou hladinou transaminázy GPT v období listopad 1973 až prosinec 1974

Období vyšetřování		Počet vyšetřených sér	Pozitivní nálezy		Počet nových záchytů HBAG	Poznámka
rok	měsíc		počet	procento		
1973	XI	106	14	13,2	9	*)
	XII	68	10	14,7	5	**)
1974	I	60	7	11,6	3	***)
	II	75	12	16,0	6	***)
	III	81	9	11,1	2	
	IV	98	9	9,1	5	
	V	66	5	7,5	4	****)
	VI	87	11	12,3	8	
	VII	33	3	9,9	2	
	VIII	53	17	32,0	5	*****)
	IX	88	23	26,1	6	
	X	95	28	29,4	10	
	XI	190	31	16,3	5	
	XII	108	14	12,9	7	
1973/74	celkem	1208	193	15,9	77 (6,37 %)	

*) 1 další nález $\pm$, nehlášen, vyšetření neopakováno; nezařazen do tabulky ani do záchytové kartotéky;

**) 1 další nález $\pm$, nehlášen, vyšetření neopakováno; pacient však přišel znovu na jaterní testy za 1 rok, přitom HBAG pozitivní; je zařazen do tabulky v prosinci 1974 a rovněž je zahrnut do záchytové kartotéky;

***) 1 další nález v obou měsících $\pm$ (týž pacient); v říjnu 1974 potvrzen jako HBAG pozitivní ze séra, které nevykázalo zvýšenou hladinu transaminázy GPT; v této tabulce tedy není zařazen, avšak je zahrnut do záchytové kartotéky mezi séry s nezvýšenou hladinou GPT;

****) 1 další nález $2 \times$ za sebou $\pm$, po třetí negativní; jako HBAG pozitivní potvrzen v červenci 1974; proto je zařazen do tabulky i v záchytové kartotéce;

*****) 1 další nález $\pm$, nehlášen, vyšetření neopakováno, a proto není zařazen ani v tabulce, ani v záchytové kartotéce.

zvýšenou hladinou transamináz je tu však dosahováno jen něco více než poloviční pozitivity. Je vysoce pravděpodobné, že po navyknutí kliniků žádat vyšetření na HBAG se míra záchytu hepatitidy B u těchto sér přibližně srovná se záchytností v souboru vybíraných sér biochemické laboratoře, určených původně k vyšetření jaterními testy.

V tabulce 2 je zaznamenán časový záchyt hepatitidy B ve vybraných sérech se zvýšenou hladinou transaminázy GPT. Vcelku je zřejmo, že nové případy hepatitidy B se vyskytují po celý rok. Přes určitou, vlastně značnou variaci v nálezech není možno výsledky hodnotit ve smyslu sezónnosti výskytu hepatitidy B.

Od začátku vyšetřování hlásíme každý nález na příslušné oddělení a každý nový záchyt pak na infekční oddělení ÚVN a od podzimu roku 1974 také na epidemiologické oddělení VÚHEM. Měsíční výkazy jsou dalším dokumentem, který je předáván uvedeným složkám ÚVN a VÚHEM. V poslední době jsme se rozhodli zřídit záchytovou kartotéku nemocných, resp. nosičů HBAG. Kromě nacionále je v ní uvedeno bydliště, povolání a zaměstnání, klinická diagnóza při záchytu, základní diagnóza, nálezy biochemického vyšetření krve při záchytu HBAG a první zá-

znamy vyšetření na HBAG. V paralelním provedení je záchytová kartotéka rovněž na infekčním oddělení ÚVN. Evidence umožnila dedukovat některá další zjištění o souboru osob, u nichž byl prokázán HBAG v sérech, určených původně k biochemickému vyšetření funkce jater.

V tabulce 3 je v souboru 79 evidovaných osob zaznamenáno pohlaví, věk a vztah nemocných k ČSLA resp. některé údaje týkající se sociálního zařazení. Prevalence mužů nad ženami je podmíněna složením pacientů vojenských zdravotnických zařízení. Ve věkové distribuci je zřejmé narůstání nemocnosti mezi osobami vyššího věku, což je především důsledkem dlouhodobější příležitosti ke styku s nosiči HBAG a k akvizici hepatitidy při různých zdravotnických zákrocích; současně je to asi i výrazem chronicity hepatitidy B. Poměrně značné procento nemocných bez přímého vztahu k ČSLA je určitě zkresleno nedokonalostí naší evidence, neboť ze záznamů na ambulancích i z chorobopisů se tyto údaje přesně nedo- vídáme (např. u důchodců). Poměrně vysoké procento postižených zdravotnických pracovníků svědčí o profesionalitě hepatitidy B.

V tabulce 4 je též soubor 79 evidovaných

osob analyzován podle oddělení, z nichž vyšel popud k vyšetření jaterní funkce. Vidíme prevalenci pacientů hospitalizovaných na internách, přičemž druhou velkou skupinu zachytí tvoří nemocní přicházející na pracoviště, která mají charakter ambulantních jednotek. U pacientů z interních oddělení jde většinou o chroniky, z nemocných ambulantních jednotek a rovněž z infekčního oddělení se rekrutuje určitá část čerstvých případů. Z tabulky je zřejmé, že nemocní hepatidou B, popřípadě bezpříznakoví nosiči HBAG přicházejí na téměř všechna oddělení nemocnice.

V tabulce 5 je soubor 79 evidovaných osob rozdělen podle klinických diagnóz při zachytu HBAG. Při pestré škále syndromů, kterými se infekce může projevovat, vyniká zejména chronická obtíž. Nejčastěji zaznamenáváme různé příznaky s přímým vztahem k onemocnění jater. Akcentovat je však třeba zejména mírnější dyspeptické a podobné obtíže nemocných; část z nich jsou onemocnění čerstvá nebo nedávná. Rovněž nemoci ledvin a kloubů, cukrovka, krevní choroby a další jsou někdy sdruženy s příznakovým komplexem, při němž lze evidovat chronickou infekci vyvolanou virem hepatitidy typu B. Prognosticky nejzávažnější jsou zejména agresivní formy chronického zánehtu jater nebo cirrhózy, event. ještě sdružené s jinými vnitřními chorobami; je jich

Tabulka 3

Některé základní údaje o souboru 79 pacientů s pozitivním HBAG

Heslo	Počet	Procento
Pohlaví		
muži	62	78,4
ženy	17	21,6
	79	100,0
Věková distribuce		
do 18 let	3	3,8
19–25 let	12	15,1
26–35 let	9	11,3
36–50 let	21	26,5
nad 50 let	28	35,4
věk nezjištěn	6	7,5
	79	99,6
Vztah k ČsLA		
vojáci prezenční služby	10	12,6
praporčíci a důstojníci	20	25,2
důstojníci v. v.	3	3,8
občanští pracovníci voj. správy	3	3,8
civilní osoby	39	49,4
nezjištěno	4	5,0
	79	99,8
Některé jiné sociální vrstvy		
zdravotníci prac. (v závorce lékaři)	8 (3)	10,1
důchodci	17	21,5
ostatní včetně nezjištěných	54	68,2
	79	99,8

Tabulka 4

Rozdělení evidovaných osob s pozitivním HBAG podle odborných oddělení, z nichž vyšel popud k biochemickému vyšetření jaterní funkce

Obecnější charakterizace oddělení	Počet zachycených pacientů	Jednotlivá oddělení	Počet zachycených pacientů
Pracoviště mající charakter ambulantních jednotek	21	Fyziatrie Hematologie Transfúzní ÚLZ Záv. lékař Poli I Poli II Pracovní Ošetrovna MNO Voj. útvary	2 4 1 3 1 1 5 1 2 2 1
Infekční a expektační odd.	5	Infekční	5*)
Interny	48	Int. I Int. II Int. III	4 32 12
Ostatní lůžková oddělení	5	Neurochirurgie Ortopedie Neurologie Psychiatrie ORL	1 1 1 1 1
Celkem	79		79

*) 4 další pacienti zachyceni navíc, avšak nikoli ze souboru sér určených původně na biochemické jaterní testy a nikoli v naší laboratoři.

určitě více, nežli jsme mohli ze zachytové kartotéky zaznamenat, a jsou asi zejména ve skupině hepatopatií a chronických hepatitid. Pokud je nám známo, tři z pacientů s cirrhózou, resp. s chronickou agresivní hepatitidou, již zemřeli, všichni na selhání jater. Tato skutečnost — spolu s chronicitou — podtrhuje známý fakt, že hepatitis typu B je prognosticky závažnějším onemocněním než hepatitis typu A.

Vcelku lze říci, že různé statistické údaje dedukované ze zachytové kartotéky jsou v souladu s všeobecnými zkušenostmi zahraničními i domácími. Pokud se týká těchto druhých, bude nejlépe odkázat na vědecký materiál, který přinesla na téma „Antigen hepatitidy B“ poslední pracovní schůze obou národních hepatologických společností z konce roku 1973 (Česká a Slov. hepatologická spol., 1974).

Závěr

Ve vyšetřování sér se zvýšenou hladinou transaminázy GPT spatřujeme efektivní způsob odkrývání HBAG mezi pacienty ambulantních i lůžkových oddělení nemocnic. Různé zkušenosti poukazují na to, že za kritické by se měly považovat nižší hladiny enzymu v sérech, nežli jsme volili při jejich výběru:

Tabulka 5

Rozdělení evidovaných osob s pozitivním HBAG podle diagnóz, které byly podnětem k biochemickému vyšetření funkce jater

Diagnózy	Počet pacientů	Procento
Dyspeptický syndróm čerstvý i chronický, gastritis, ulcus včetně ca, cholecystopatie, pancreatitis, collitis a podobně	12	15,1
Virová hepatitis	8	10,1
Stav po virové hepatitidě	12	15,1
Iktus včetně ikteru obstrukčního	3	3,8
Hepatopatie, hepatomegalie, persistující hepatitis, chronická hepatitis apod.	13	16,4
Agresivní hepatitis a cirrhóza	4	5,0
Komplikované syndrómy s hepatití (při nich diabetes mell., pyelonefritida, nefritida, arthropatie, ischemie, infarkt myokardu)	4	5,0
Steatóza jater	2	2,5
Různé renální syndrómy včetně pyelonefritidy	3	3,8
Arthropatie, m. Bechtěrev, artralgie, revmatismus	3	3,8
Stav po operacích	4	5,0
Různé (infarkt myokardu, ischemická choroba, fraktura, duševní poruchy, předoperační vyšetření, dárce krve)	6	7,6
Nezjištěno	5	6,3
	79	99,5

místo hodnoty 1,8 hodnota 1,5 $\mu\text{mol/ml}$. Jinak se volba transaminázy GPT jako indikátoru pro vyšetření na HBAG plně osvědčila a není účelné brát v úvahu např. stanovení transaminázy GOT (asparátaminotransferázy). V těch nemocnicích, kde ve vstupním screeningu se vyšetřuje i gamaglutamyltransferáza (GGTP), lze se řídit při výběru sér rovněž stanoveními zvýšených hodnot této zkoušky.

Postup, který jsme zvolili při začátku vyšetřovacích možností na HBAG, zabezpečuje aktivní vyhledávání nemocných či nosičů HBAG v celém patientském kolektivu, který přichází do nemocničního areálu. Řešení problematiky lze hodnotit jako účinný vstupní element studia nozokomiální manifestace hepatitidy B. Vysoká míra pozitivit HBAG, kterou jsme prokázali za relativně krátkou dobu vyšetřování, nabádá k soustředění pozornosti a zájmu o toto onemocnění v odborných kolektivech nemocnic. V ÚVN evidujeme již nyní, že při klinické diagnostice se na hepatitidu typu B myslí více nežli např. před rokem, prokázané případy se hospitalizují na interních k upřesnění diagnózy nebo na infekčním oddělení k léčbě čerstvých případů, z interen je vyvíjen tlak na zkomplexnění laboratorní

diagnostiky, zavádějí se přezkumy atd. Od začátku — z kliniků — se vysoce angažují všichni pracovníci infekčního oddělení a rovněž řada internistů.

Pokud se týká vlastního laboratorního vyšetřování na HBAG, jsme teprve na začátku. Zavedená modifikace PIEP je sice vysoce spolehlivá a rychlá, ale přece jen nepříliš citlivá. Ve spolupráci s různými odděleními VÚHEM se pokoušíme o zvládnutí některých citlivějších technik průkazu HBAG a rovněž bychom chtěli pomoci při objektivním hodnocení imunologického stavu nemocných chronickými formami hepatitidy (průkaz antigen-protilátkových komplexů, autoimunních protilátek, úrovně buněčné imunity). Pokusíme se zavést také subtypovou identifikaci povrchového HBAG. Velice potřebným, avšak technicky značně svízelným problémem bude ovládnout vhodnou a zejména citlivou techniku v průkazu postinfekčních protilátek, využitelnou k epidemiologickým aplikacím. Dosavadní elektroforetická detekce protilátek je k těmto účelům — pro svoji nízkou citlivost — nevhodná.

Souhrn

Během 14měsíčního období bylo vyšetřeno protisměrnou elektroforézou v mírně diskontinuálním pufrovém systému 2085 sér několika různých skupin na přítomnost HBAG. Jednoznačně nejvyšší pozitivita (téměř 16%, což odhalilo nákazu u 77 různých nemocných) byla v hlavní skupině 1208 sér se zvýšenou hladinou transaminázy GPT. Vyšetřování takovýchto sér je považováno za ekonomicky vysoce účinný způsob odkrývání hepatitidy B mezi pacienty velkých zdravotnických komplexů. Analýzou dat záchytové kartotéky je poukázováno na některá další fakta, která mohou být užitečná pro studium nozokomiální manifestace hepatitidy typu B.

Literatura

1. Combridge, B. S. — Shaw, C.: Immuno-electrophoresis using discontinuous buffer system to detect Australia antigen in pooled human plasma. *Lancet*, II, 1971, s. 1184—1185.
2. Česká a Slovenská hepatologická společnost: Vědecké materiály z pracovní schůze na téma „Antigen hepatitidy B“, Olomouc, listopad 1973. *Čs. gastroenterol.*, 28, 1974, s. 493—506.
3. Kořínek, J. — Švorcová, V.: Inhibitory electroimmuno-precipitation. A sensitive method for detection Australia antigen in human serum. *Haematologia (Budapest)* 5, 1971, s. 451—457.
4. Pesendorfer, F. — Krassnitzky, O. — Wewalka, F.: Immuno-electrophoretischer Nachweis von „Hepatitis-Associated-Antigen“ (Au/SH-Antigen) *Klin. Wchnschr.*, 48, 1970, s. 58—59.
5. Polanecký, V. — Schön, E.: osobní sdělení, 1973.
6. Wallis, C. — Melnick, J. L.: Enhanced detection of Australia antigen in serum hepatitis patients by discontinuous counterimmuno-electrophoresis. *Appl. Microb.*, 21, 1971, s. 867—869.