

METODICKÁ PROBLEMATIKA ELEKTRONOVĚ MIKROSKOPICKÉHO PRŮKAZU ANTIGENU HEPATITIDY B A IMUNNÍCH KOMPLEXŮ S PROTILÁTKAMI K JEHO POVRCHOVÉ SLOŽCE

M. NOVÁK, R. BENDA, A. JELÍNKOVÁ, M. MÁCHOVÁ a R. HELM

Laboratoř elektronové mikroskopie a virologické oddělení Vojenského ústavu hygieny, epidemiologie a mikrobiologie, Praha

V souvislosti s prací věnovanou elektronově mikroskopickému (EM) průkazu antigenu hepatitidy B (HBAg) a jeho imunních komplexů u pacientů s akutním onemocněním i různými chronickými syndromy (11) jsme museli překonávat řadu technických problémů. Některé z nich jsme vyřešili experimentálně, s jinými jsme se vypořádali cestou získávání zkušeností. I v současné době jsou mnohé dílčí otázky ještě diskutabilní.

V předkládaném sdělení, jež uvádí následující práci věnovanou podrobnému popisu morfologie sérového HBAg (36), se pokusíme jednotlivé fáze EM vyšetření u hepatitidy B v přehledu popsat a rozebrat. Sledujeme při tom dvojí cíl; s pracovníky zainteresovaných laboratorních oborů bychom se chtěli o své zkušenosti podělit, klinickým lékařům pak chceme metodu natolik přiblížit, aby mohli kvalifikovaně posuzovat výsledky EM vyšetření sér svých pacientů.

1. Princip imunní EM a metodické přístupy různých autorů u hepatitidy typu B

EM vizualizace virových částic přímo v biologickém materiálu patří k novějším trendům diagnostiky (22). Úspěšnost metody je závislá na řadě faktorů, jako je rodová příslušnost viru, bohatost obsahu virových částic v odebraném materiálu, resp. způsob a míra jejich koncentrování, stupeň odstranění různých nečistot aj. První aplikací EM v diagnostice virových nemocí je průkaz negativně barevných (13) poxvirových, resp. herpesvirových tělísek v kožním, popř. slizničním a nijak zvlášť opracovaném materiálu od osob v časném stadiu onemocnění (58, 55, 46, 47, 30, 45). Navržený způsob práce je obecně přijatou metodou volby při rychlé diferenciaci varioly od varicely (18, 43, 44). Spolehlivost EM průkazu poxvirových nákaz — oproti ostatním metodám rychlé diagnostiky — byla potvrzena také z našeho pracoviště (10). Pomocí EM lze detekovat i méně známé poxviry — vyvolavatele např. orf-u nebo molluscum contagiosum (22). Všeobecně se tvrdí, že koncentrace částic v materiálu musí přesahovat 10^6 v 1 ml příslušných suspenzí.

Negativní barvení bez použití protilátek k shluknutí tělísek bylo zprvu použito rovněž při průkazu HBAg (9, 33, 7); částice byly ze séra zahuštěny ultracentrifugací. Snadná sedimentace rubello-protilátkových imunních agregátů při 12 000 G (12) a průkaz

cirkulujících imunních komplexů HBAg při zrychlení kolem 20 000 G (2) se staly podnětem pro širší rozpracování EM diagnostiky hepatitidy B (5, 19, 15, 32, 62, 53, 60, 29, 21, 57, 51, 48, 61, 16). Významným výsledkem práce tohoto oboru je později potvrzená hypotéza (19, 37, 60, 20, 1.), že Dane-ovy částice (dále DČ) představují infekční virus (virion) hepatitidy B. Přispěním k tomu jsou — vedle řady jinak zaměřených prací — i některé nové EM studie (49, 31, 54). EM průkaz antigen-protilátkových komplexů či znázornění virově protilátkových agregátů, vzniknuvších až po přidání specifických protilátek, se označuje někdy obecnějším názvem „imunní EM“; zpravidla však se obsahem imunní EM myslí tento druhý případ.

Přidávání monospecifických antisér k vyšetřovanému materiálu má význam nejen jako modus umožňující zakoncentrování částic, ale současně i jako princip imunologického určení virových druhů; tím lze rozlišit, pokud nejsou k dispozici jiné a jednodušší imunologické metody, i původce identické morfologie s rozdílnou antigenní výbavou. Nejrozsáhlejší využití tohoto způsobu práce lze evidovat — v lidské patologii — v práci s tzv. fekálními antigeny (27, 17, 23), která dokonce vedla až k morfologickému a imunologickému poznání obou typů lidské akutní virové gastroenteritidy (40, 28, 39), a zejména pak i hepatitidy typu A (25). Ještě v současné době je imunní EM výchozí metodou k zavádění jednodušší diagnostiky těchto nemocí. Je pochopitelné, že při práci se stolicovými filtráty se detekují také adenoviry a příležitostně i enteroviry (22). Imunní EM byla užita dokonce k rychlé serotypizaci enterovirů (6).

Imunní EM není však doménou metodologie rychlého průkazu virů pouze ve fekálních extraktech. V poslední době jsou publikovány studie o možnosti průkazu respiračních virů pomocí EM za přidavku specifických imunních sér k materiálu z vytřepaných výtěrů. Informativní zprávy se týkají sice většinou neopouzdřených rinovirů (38) a adenovirů (23), avšak pozdější sdělení zahrnují vedle těchto obou i myxoviry, paramyxoviry, koronaviry a reoviry (24, 50, 22). Vedle toho je možné identifikovat virové částice v sedimentech media nebo v suspenzích buněk z tkáňových kultur vykazujících cytopatický efekt během izolačního pokusu (22).

Je celá řada modifikací zpracování mate-

riálu k EM průkazu HBsAg (přesněji HBsAg) a jeho imunních komplexů. Úplná většina autorů barví centrifugované a promyté sedimenty částic, resp. jejich agregátů, je však navržena také jednodušší, avšak — jak ukážeme níže — méně spolehlivá technika přípravy materiálu k barvení a mikroskopování [41]; zde se barví otisky vyšetřovaného materiálu, sejmuté na sítky s povrchu řídkého agaru. Většina autorů vyhodnocuje sedimenty částic z 2 alikvotů vyšetřovaného vzorku, a to jednak ze vzorku smíchaného s protilátkami, jednak bez protilátek s pouhým PBS; někteří [29, 48, 51, 52] však vyšetřují pouze vzorek bez přídavku protilátek, zatímco např. Gudat a sp. [31] používají — při stanovení hustoty částic a jejich morfoloického diferencování — jen materiál s přidanými protilátkami. Rovněž velikost zrychlení 12 000 G používali Cross a sp. [17], zrychlení při centrifugaci směsí a jejich vymývání ve značném rozpětí kolísá. Nejnižší se zrychlením okolo 20 000 G pak zpracoval největší počet autorů [2, 4, 32, 29, 48, 31]; zrychlení 24 000 G volili Gust a sp. [32], 40 000 G pak Barker a sp. [7] a Jokelainen a sp. [37]. Vysoké zrychlení 50 000 G nebo 55 000 G po jednu hodinu používají Stannard a sp. [51] a Woolf a sp. [59]. Zuckerman [62] zavedl centrifugaci při 25 000 G pro vzorky s přidanými protilátkami a 45 000 G pro vzorky při přímé EM. Je diskutabilní, která volba je optimální z hlediska největšího zachytu částic HBsAg a dosažení potřebné čistoty vyšetřovaných sedimentů za současného vyloučení jejich případné spontánní agregace. Značně veliké variace existují samozřejmě rovněž v samotné technice negativního barvení a při mikroskopickém vyhodnocování výsledků.

Všechny shora uvedené údaje se týkaly morfologie komplexů povrchového antigenu (HBsAg). U hepatitidy však existuje ještě druhý antigen-protilátkový systém, vázaný k vnitřnímu antigenu DČ, k tzv. HBcAg. Systém HBcAg-anti-HBc popsali jako první Almeida a sp. [4] a zpracovali jej pak Stannard a sp. [52] a Barker a sp. [8]; nověji se problematikou zabývá např. Budkowska [14]. Je třeba podotknout, že volný HBcAg se v séru nevyskytuje (nebo alespoň tu nebyl prokázán), protože také se v séru nemožnou vyskytovat ani jeho imunní komplexy. HBcAg k EM testování se získává buď rozvolněním povrchového pouzdra DČ v zakoncentrované suspenzi s pomocí detergentů [4, 42] nebo separací nahých nukleokapsid viru z infikovaných, většinou lidských, popř. opičích jater [34, 14]. Takové suspenze HBcAg lze užít k testování příslušných protilátek v séru některých pacientů, zejména s chronickými formami hepatitidy B. Praktické uplatnění této metody v diagnostice nelze ovšem očekávat pro náročnost přípravy suspenze vnitřků DČ a rovněž proto, že dnes jsou

pro detekci anti-HBc k dispozici již jednodušší metody, nežli je EM.

2. Postup při první fázi metody EM vyšetření sér na HBsAg a jeho imunní komplexy

Vzorky sér určené k vyšetření po úschově 1 měsíc až 3 roky při -20°C jsme nejdříve vždy přečistili centrifugací; zprvu jsme pracovali při 2500 rpm po 30 min., později — k lepšímu odstranění případných lipidů ze sér — jsme zvýšili hodnoty až na 10 000 rpm. Poté byly vzorky rozděleny na 2 alikvoty po 0,5 nebo 0,25 ml; k prvnímu z nich byl přidán stejný objem fosfátového fyziologického roztoku (PBS) pH 7,2, k druhému též objem prasečích protilátek k HBsAg (anti-HBs), produkovaných ÚSOL Praha, v ředění 1:2. Po rozmíchání byly směsi inkubovány přes noc při $+4^{\circ}\text{C}$. Od této fáze se liší postup podle toho, bylo-li pracováno s tzv. centrifugační nebo otiskovou metodou přípravy vzorků.

a) Další postup centrifugační metodou

Ráno byly oba vzorky doplněny do objemu 2 ml s PBS a centrifugovány za chladu při 25 000 G po jednu hodinu ve středně obrátkové odstředivce MSE-25, opatřené výkyvným rotorem se šesti povzdry. Supernatant byl odsát a k sedimentu přidáno — do obou zkumavčiček každého materiálu — po 2 ml PBS. Po emulgaci byla centrifugace při 25 000 G opakována; supernatant byl znovu odsát a sediment resuspendován do 0,05 ml PBS. Tato konečná suspenze byla smíchána ana partes s 6% kyselinou fosfowolframovou, pH 6,5 a směs nanášena na 2–3 formvarem potažené a pouhlikované sítky o 400 otvorech a průměru 3 mm. Materiál ze sítěk se odsál filtračním papírem, sítky se ozářily UV světlem (30 W) ze vzdálenosti 1,5 m po 5 minut a preparáty byly prohlíženy v elektronovém mikroskopu JEM 7A při 80 kV.

b) Další postup otiskovou metodou

Směsí vyšetřovaného materiálu v alikvotech s PBS a s anti-HBs, inkubované přes noc při $+4^{\circ}\text{C}$, byly bez dalšího doředování a opracování nakápnuty na 0,8% agarový gel, na povrch příslušného počtu kapek se opatrně přiložily povrchem dolů formvarem potažené a pouhlikované sítky a ty byly nechány při pokojové teplotě tak dlouho (obvykle 30 minut), až se voda z kapky vyšetřovaného materiálu úplně vsákla do gelu a na sítkách se vytvořil otisk z biologického materiálu na vrchu agaru. Po zaschnutí preparátů se nakápl na povrch sítěk 6% roztok kyseliny fosfowolframové pH 6,5, za 30–60 sekund se tato kyselina odsála filtračním papírem, preparáty byly ozářeny UV světlem a prohlíženy v EM.

Při pokusech o srovnání centrifugační a otiskové metody přípravy vzorků pro EM byl

tedy každý vzorek séra prohlížen v mikroskopu 4 x : 2 x ve směsi s pouhým PBS a 2 x ve směsi s dodanými protilátkami anti-HBs.

3. Hodnocení nálezů v EM

V elektronovém mikroskopu jsme vždy hodnotili především hustotu částic HBAg, dále pak vzájemné zastoupení částic podle typu a konečně jejich prostorové uspořádání, resp. rozmístění.

a) Hustota částic

Označovali jsme ji křížky na každé síťce zvlášť a nakonec jsme stanovili (rovněž křížky) průměrnou hustotu částic v každém vzorku. Hustotu zhodnocenou +++ jsme označili tehdy, jestliže ve většině zorných polí většiny sítěk byly přítomny četné částice HBAg, nebo na každé síťce byly velké počty částic agregovaných v komplexech. Hustotu zhodnocenou ++ jsme označili tehdy, jestliže částice byly přítomny řídce ve všech zorných polích sítěk nebo v relativně značném počtu v komplexech na každé síťce. Hustota na + byla reprezentována malým počtem částic jen v některých zorných polích nebo nevelkým počtem částic v jednotlivých komplexech na příslušných síťkách. Otazníkem byla označena hustota na + tehdy, když partikule nevelkého počtu nebylo možno s jistotou identifikovat jako částice HBAg.

b) Zastoupení jednotlivých typů částic v preparátu HBAg

Pro stanovení podílů jednotlivých morfologických forem HBAg (malých okrouhlých částic okolo 20 nm, vláken téhož průřezu až několik set nm dlouhých a kulatých viru podobných DČ s průměrem 42–45 nm — viz [36, 11]) jsme zprvu rovněž měli vypracován semikvantitativní hodnoticí systém s křížky. Diferencovali jsme podíl DČ a vláken oproti malým, obvykle zcela prevládajícím částicím. Zastoupení vláken jen výjimečně dosahovalo asi 10 % a zastoupení DČ prakticky nikdy nepřesáhlo 5 % všech částic. Jestliže proporce DČ (popř. vláken) byla relativně vysoká, tj. nad 2 % a obvykle pod 5 % všech ostatních částic, byl nálezný označován jako +++. Jestliže zastoupení DČ (vláken) bylo nižší, ale pravidelné, tj. v průměru okolo 1 % při rozsahu od asi 0,5 do 2 %, byla proporce označována ++. Při výskytu ojedinělých resp. zcela ojedinělých DČ (vláken) mezi malými kulatými částicemi, což odpovídá podílu pod 0,5 % až téměř k nule, bylo použito označení +. Při neisté morfologické identifikaci zcela ojedinělých DČ (vláken) bylo označení + doplněno otazníkem.

Od roku 1977 jsme zavedli — pokud to hustota částic dovozovala — přesný procentuální rozpočet jednotlivých částic HBAg [48, 59]. Diferencujeme nejméně ze 400 částic v obojím alikvotu séra, tj. bez protilátek

i s protilátkami anti-HBs, avšak podíl vyjadřujeme procentem jejich výskytu v alikvotu s anti-HBs, neboť ten zabezpečuje získání reprezentativnějšího výsledku; v případě rozporného nálezu diferencování, a zejména při větším nálezu DČ a vláken v alikvotu s pouhým PBS, korigujeme konečný závěr provedením průměrného procentuálního zastoupení částic v obou alikvotech (bez i s anti-HBs).

c) Vzájemné uspořádání částic v preparátech HBAg

Částice HBAg se vyskytují v séru v různém uspořádání. Poněvadž je vidíme homogenně dispergované, avšak v řadě případů se manifestují v agregátech, jež se označují jako imunní komplexy HBsAg-anti-HBs. Imunní komplexy mohou být různě velké — od malých (s 5 až nejvíce asi 30 částicemi) přes střední (s 30 až 200 částicemi) až po velké nebo obrovské (s více než 200 a často i s mnoha tisíci částic). Malé imunní agregáty nazýváme komplexy typu „přebytek antigenu“, velké typu „přebytek protilátek“. Zatímco komplexy prvního typu se vyskytují v jinak neopracovaných sérech pacientů s antigenem poměrně často, cirkulující komplexy typu „přebytek protilátek“ zachycujeme pouze výjimečně. (V alikvotech sér, k nimž byly přidány anti-HBs, vidíme většinou komplexy typu „přebytek protilátek“.)

Abychom názorně demonstrovali vztah mezi velikostí komplexů a množstvím protilátek k povrchové komponentě HBAg, provedli jsme experiment, v němž k séru vybraného pacienta s homogenně distribuovanými částicemi antigenu byla přidána sériová ředění komerčních anti-HBs. Po inkubaci při +4 °C byly příslušné směsi 2krát centrifugovány a konečné sedimenty po resuspendaci barveny, jako se píše v oddíle 2. Nálezy jsou zapsány v tabulce 1 a svědčí pro to, že na koncentraci anti-HBs závisí nejen velikost, ale i početnost vytvořených imunních komplexů.

Protože jsme již od začátku práce zjišťovali, že homogenně dispergované preparáty HBAg od různých pacientů nejsou přidáním standardního množství anti-HBs agregovány stejnou měrou, zavedli jsme při EM vyšetřování každého vzorku séra od pacientů dvojí zpracování — bez přidání a s dodáním anti-HBs; protilátky přidáváme vždy v nadbytku (v ředění 1 : 2). Alikvot séra s dodanými protilátkami zajišťuje jakousi pozitivní kontrolu k hodnocení přítomnosti a charakteru komplexů HBsAg-anti-HBs ve vyšetřovaném séru, resp. v tom z jeho obou alikvotů, k němuž přidáme pouhý PBS; tyto komplexy nazýváme cirkulujícími. Rozdílná agregovatelnost různých sér, obsahujících korpuskulární antigen, dodanými protilátkami anti-HBs je nejspíše asi podmíněna variacemi antigenního subtypu HBsAg; v dosavadních komerčních protilátkách není totiž zastoupení subtypových anti-HBs rovnoměrné, neboť se zatím nekon-

troluje výchozí směsný materiál, určený k purifikaci před imunizací prasat. Je samozřejmé, že výsledek imunní EM ovlivňují i další faktory, jako jsou např. různé cirkulující pacientovy protilátky k ostatním komponentám DČ, náhodné a technické chyby při složité preparaci materiálu a j.

4. Pokusné srovnání centrifugační a otiskové techniky přípravy materiálu k EM vyšetření u hepatitidy B

Tyto práce jsme provedli k odpovědi na otázku, zda by nebylo možno náročnou ultra-centrifugační přípravu materiálu nahradit jednodušším postupem. Celkem jsme souběžně zpracovali centrifugační a tzv. otiskovou technikou 17 sér od 11 pacientů. Vyhodnocovali jsme hustotu částic, zastoupení jednotlivých typů částic (zejména DČ) a přítomnost či nepřítomnost imunních komplexů, cirkulujících i vzniklých in vitro po přidání anti-HBs.

Pouze v jediném experimentu se třemi vzorky séra od pacienta s chronickou hepatitidou byly výsledky otiskové techniky po kvantitativní stránce lepší, nežli tomu bylo u nálezů při centrifugační technice přípravy materiálu. Jak ex post hodnotíme, došlo zřejmě při centrifugování k technické závadě. Ve dvou dalších experimentech (vždy se dvěma vzorky sér) byly výsledky kvantitativně víceméně shodné při obou technikách. S 10 vzorky sér v pěti dalších experimentech byly výsledky při otiskové technice v kvantitativním EM vyhodnocení podstatně horší nežli u techniky centrifugační. Ve **všech** srovnávacích vyšetřeních, a to i tam, kde kvantitativně byly výsledky lepší technikou otisků, bylo složení částic HBAg objektivnější u techniky centrifugační. To se týká zejména nálezů a diferenciace částic ve vzorcích bez protilátek, tedy ve směsích vyšetřovaných sér s PBS. Při všech srovnávacích experimentech byla morfologie částic podstatně lepší a výraznější u centrifugační techniky; naopak při otiskové technice byly v zorných polích velice časté nečistoty, které překrývaly částice HBAg, zejména jednotlivě se vyskytující, přičemž i ostrůvky agregátů, ohraničené elektron-denzním balastem, byly jakoby zastřené a nevýrazné.

Ke konkrétnější představě o některých rozdílech v kvantitě nálezů u obou metod zpracování vzorků pro EM jsme shrnuli v tabulce 2 údaje získané vyšetřením pěti typičtějších vzorků od pěti pacientů. Na základě těchto nálezů a zejména se zřetelem na shora uvedené zkušenosti jsme učinili závěr, že k seriózní práci je třeba otiskovou techniku odmítnout, a to i přesto, že je jednodušší a méně pracná nežli postup s dvojí centrifugací.

5. Imunní EM jako metoda detekce HBAg

Centrifugační technikou imunní EM jsme vyšetřili řadu sér od pacientů, kteří — po

význačné antigenémii — začali vykazovat v CIEP negativní nebo nejistý výsledek. Pouze v polovině těchto vzorků byla detekce HBAg pomocí imunní EM (v alikvotu s přidáním anti-HBs) úspěšná. To svědčí pro názor, že imunní EM je jen nemnoho citlivější detekční metodou na HBAg nežli málo citlivá CIEP. V tomto smyslu nesouhlasí naše zkušenosti s posledními zprávami z W. H. O. [56], kde imunní EM k detekci HBsAg se zařazuje mezi metody značně citlivé.

6. Závěrečný komentář

Domníváme se, že jsme vypracovali vcelku spolehlivou metodu EM vyhodnocování sér od pacientů s pozitivním HBAg. Přesto řada detailů i závažnějších otázek si zasluhuje doplňující výklad nebo komentář.

Za definitivní považujeme závěry provedené ze srovnání tzv. centrifugační a otiskové techniky přípravy preparátů k mikroskopování. Je třeba dát přednost kvalitě odečtu (který umožňuje dvojí centrifugace směsí vyšetřovaného séra s protilátkami resp. s PBS) před jednoduchostí přípravy otiskových preparátů z povrchu agaru. I přes vymytí značného množství balastu dvojí centrifugací při 25 000 G jsou však někdy obtíže s nečistotami, jež mohou překrývat jednotlivé částice HBAg nebo jejich malé agregáty [35].

Jednoznačné stanovisko zastáváme také v otázce úschovy sér a jejich „přečišťování“ před EM vyšetřením. Podobně jako např. Nielsen a sp. [48] a jiní uchováváme séra ve zmrazeném stavu, neboť se domníváme, že se zdaleka nemůže za takových podmínek uplatňovat fenomén spontánní (nespecifické, falešné) agregace částic, jako je tomu např. při +4 °C; úschova sér v nativním stavu, byť jen několikaměsíční, mohla být jedním z faktorů, které podmiňují vysokou incidenci údajných imunních cirkulujících komplexů v sestavě sér Stannardové a sp. [51]. Pokud se týká klarifikace sér před jejich smícháváním s anti-HBs, resp. s PBS a celonoční inkubací při +4 °C, ustálili jsme postup na krátkodobé centrifugaci vzorků, určených k vyšetření při 10 000 rpm. (Referenční protilátky anti-HBs však přečišťujeme při vysokých otáčkách, tj. 18 000 rpm po 30 minut.) Původně jsme séra přečišťovali nízkoobrátkovou centrifugací (2500 rpm po 15 min.), museli jsme však otáčky zvýšit, neboť v řadě vzorků zůstávalo mnoho nečistot, zejména lipidů. Na druhé straně ovšem chceme varovat před klarifikací sér při vyšších otáčkách nežli 10 000 rpm, neboť existuje riziko, že případně přítomné komplexy HBsAg-anti-HBs, zejména pokud by byly větších rozměrů, nechtěně ze sér odstraníme. Vzhledem k tomu uvažujeme o tom, že provedeme možnost snížení otáček na 6000. Chtějící se vyhnout přečišťování vzorků sér centrifugací, pokoušeli jsme se extrahovat lipidy z nich pomocí různých tukových rozpouště-

del. Záměr se nám však nezdařilo realizovat, neboť většina látek sérum zkalila [zdenaturovala bílkoviny] nebo zavinila ztrátu morfologické integrity částic HBAG; tento druhý fenomén byl zřejmě podmíněn rozpuštěním lipidické frakce zabudované v HBsAg, čímž došlo k vymizení částic. Zatím jsme nezkoušeli opracování sér trichloro-trifluoroetanem (např. Freonem TF).

Diskutabilní otázkou je centrifugační zrychlení, které volíme při sedimentaci, resp. při omývání částic HBAG a jejich komplexů s protilátkami v té fázi zpracování materiálu, kdy končí inkubace směsí vyšetřovaného séra s anti-HBs, resp. s PBS. Hlavní riziko spočívá podle našeho názoru v tom, aby zbytečně vysokým zrychlením nenastávala nespecifická (falešná) agregace částic. Naopak zase při nízké odstředivé síle nesesedimentují všechny jednotlivé částice HBAG homogenně distribuované ve vyšetřovaném séru; ztráta těchto částic pak výrazně zkresluje hustotu i složení partikulí v alikvotu séra s PBS. Jak je zřejmé z popisu v oddíle 2, zvolili jsme střední zrychlení 25 000 G, nechtějíc riskovat (předešlým) možnost vzniku falešných „imunních“ komplexů; mikroskop JEM 7A nemá totiž takovou rozlišovací schopnost, která by dovolovala spolehlivě odlišit nespecifickou agregaci částic od specifické v imunních komplexech, neboť neumožňuje vizualizovat ony příčné „můstky“ mezi naléhajícími částicemi, které jsou představovány protilátkovými molekulami (3, 4). Naproti tomu se nám nezdálo velkou chybou to, že při relativně nevysokém zrychlení ztrácíme část partikulí jednotlivě se vyskytujících ve vzorcích, k nimž se přidává pouhý PBS; hustotu i rozpočet všech tří typů částic HBAG můžeme totiž stanovit v alikvotu séra, k němuž přidáváme anti-HBs. Stojíme před rozhodnutím, zda bychom neměli volit dvojí odstředivou sílu, nižší (25 000 G) pro vzorky s anti-HBs a vyšší (45 000 G) pro vzorky bez nich (viz 62, 54).

Domníváme se, že není třeba zvláště zdůrazňovat, že resuspendace sedimentů po první centrifugaci směsí „sérum + anti-HBs“ a „sérum + PBS“ při 25 000 G musí být prováděna šetrně a relativně dlouho, a nikoliv brutálně nebo ledabyle. Nedodržení technické preciznosti v této fázi práce může zavinovat hrubé variace ve výsledcích. Totéž se týká kontrastního barvení. Tady nejvíc záleží na šarži barviva, vyzkoušení jeho optimální koncentrace, pH, atd. (35). Vzhledem k novým zkušenostem různých autorů bychom chtěli časem přejít na jiné prostředky negativního barvení, než je kyselina fosfowolframová (např. ammonium-molybdenát nebo kyselina silikowolframová /35/).

Pokud se týká hodnocení EM nálezů, jeví se nám jako důležité zabezpečení co největší objektivizace při odečítání. Metoda EM vyšetřování je totiž relativně složitá a náročná, má různá technická úskalí, výsledky zčásti

závisí na výchozí kvalitě vyšetřovaného séra, kromě toho na sítky přijde relativně málo materiálu atd.; to všechno přináší možnost značné variace výsledků.

Hodnocení hustoty částic stačí provádět — podle našeho mínění — za pomoci stupnice s křížky. Doporučujeme hodnotit z alikvotu, k němuž byly přidány anti-HBs. Obvykle je hustota v tomto alikvotu značně vyšší nežli v alikvotu s pouhým PBS. Důvody toho byly vysvětleny v jednom z předcházejících odstavců a rovněž už v oddíle 3.

Rovněž diferencování podílů jednotlivých typů částic provádíme primárně v alikvotu séra s přidávanými anti-HBs. Zásadně se snažíme stanovit přesné procento jednotlivých morfologických forem HBAG. Z nich nejdůležitější je — pro prognózu — podíl DČ (marker virulence); nad 2 % se označuje jako vysoký a nepříznivý, v rozmezí od 0,5 do 2,0 % jako střední, resp. průměrný, pod 0,5 % jako nízký, resp. prognosticky příznivý (48, 11). Může se stát, že v alikvotu séra s dodanými protilátkami je nízký podíl DČ a v alikvotu s pouhým PBS je — při nižší hustotě — relativně vysoký podíl DČ; v tomto případě můžeme korigovat nález v alikvotu s protilátkami nálezem z přímé EM (obvykle na průměrnou hodnotu).

Diferencování jednotlivých typů částic HBAG při jejich nízké hustotě je ovšem dost choulostivý problém. Zejména to platí tehdy, když nelze stanovit podíly příslušných morfologických forem HBAG z celkového počtu aspoň 200 (lépe 400) částic, jak je předepsáno. Za takové situace — pokud je to ještě možné — doplňujeme vyšetření o prohlédnutí dalších sítěk a v žádném případě nevyjadřujeme závěr stanovením procentuálního podílu částicových typů, ale pouze semikvantitativně (křížky) při zdůraznění toho, že jde o nízkou hustotu částic v preparátu. Druhá možnost je 2–3krát zakoncentrovat takový materiál (31), k čemuž je ovšem potřebné mít vhodné pomůcky (Minicon, Osterhoud, Holandsko), které zatím nejsou k dispozici.

Přítomnost cirkulujících komplexů HBsAg-anti-HBs odečítáme výhradně z preparátů, které byly pořízeny z alikvotu vyšetřovaného séra smíchaného s pouhým PBS. Vzhledem k datům tabulky 1 hodnotíme nejen velikost imunních komplexů (od obrovských přes velké ke středním a malým), ale i jejich počet. Při závěrečném hodnocení přítomnosti a charakteru komplexů (od +++ do + resp. +?) přihlídneme rovněž k obrazu, který je v alikvotu séra, k němuž byly přidány anti-HBs. Jak bylo ukázáno v předcházející diagnostické studii (11), je hodnocení přítomnosti imunních komplexů složitou otázkou. U akutních a sterilní imunitou končících hepatitid typu B se imunní komplexy vyskytují spíše jen krátkodobě a v období kolem vrcholení klinického obrazu nemoci. Ve srovnání s markerem DČ nemá jejich přítomnost či nepřítomnost

tomnost zvláštní prognostický význam; dokazuje jen to, že organismus je schopen odpovídat na přítomnost HBsAg tvorbou protilátek k jeho povrchové komponentě. U chronických forem onemocnění dovoluje přetrvávající výskyt imunních komplexů, vázaný na silně nebo středně pozitivní marker DC, vyřknout soud o nepříznivé prognóze. Na druhé straně stabilizovaná a trvalá nepřítomnost imunních komplexů v oběhu dovoluje stanovit diagnózu imunologické tolerance organismu na virus, resp. jeho povrchový antigen. Imunologická snášenlivost k HBsAg může být geneticky determinována nebo indukována, např. imunosupresivní léčbou. Při geneticky podmíněné toleranci na HBsAg a chybění známek poškození jater mluvíme o pravém bezpříznakovém nosičství HBsAg; v úplné většině je vázáno k negativnímu nebo slabému markeru DC. Existuje však celá škála forem chronické hepatitidy B a dosud není jasno, zda komplexním hodnocením opakovaně provedeného EM vyšetření bude moci být odlišena — bez biotických vyšetřování — aktivní (agresivní) forma od prognosticky benigních, tzv. persistentních forem.

řování preparátů UV světlem se nesmí překročit (v případě použití lampy 30 W a vzdálenosti 1,5 m) interval 5 min., neboť jinak dochází k morfologickému poškození částic. K dezinfekci se používá 5% chloramin nebo čerstvě připravený 0,1% Persteril se saponátem Corona (ke zmírnění antikorozivního účinku); pomůcky dezinfikované Persterilem v zápětí oplachujeme destilovanou vodou, aby nedocházelo ke korozi kovového materiálu.

Souhrn

Obsahem předloženého sdělení je metodická problematika EM průkazu HBsAg a imunních komplexů jeho povrchové složky (HBsAg) s příslušnou protilátkou. Srovnání poměrně náročné centrifugační a jednoduché otiskové techniky přípravy materiálu pro EM vyšetření přineslo výsledky, které jednoznačně mluví ve prospěch centrifugační metody. V příspěvku je také popsán způsob hodnocení nálezů v EM (stanovení hustoty částic, zastoupení jednotlivých morfologických forem HBsAg a přítomnost cirkulujících imunních komplexů) a zásady aplikace výsledků tohoto vyšetření

Tab. 1

Závislost tvorby imunních komplexů na množství přidávaných protilátek anti-HBs

Ředění přidávaných anti-HBs	Konfigurace částic HBsAg po inkubaci směsí a po promytí				Celkový počet částic*)
	volné částice	malé agreg. (5–30 částic)	střední agreg. (30–200 částic)	velké a obrovské agreg. (více než 200 částic)	
1:2	ojediněle	řídce	většina	ojediněle	+++
1:4	ojediněle	většina	četně	0	+++
1:8	četně	četně	ojediněle	0	+++
1:16	většina	četně	0	0	+++

*) Východí vzorek séra (pac. P. M.), smíchaný s pouhým PBS, obsahoval homogenně dispergované částice hustoty +++;

diferencování částic ve vzorku: malé částice asi 98 %
vlákna asi 1 %
DC méně než 1 %

Stupňování: 0, ojediněle, řídce, četně, většina.

Naše dosavadní zkušenosti mluví pro to, že u akutních hepatitid typu B se má EM vyšetření provést následně a aspoň 2krát (v období vrcholení klinických příznaků a biochemických testů a po začátku jejich signifikantního poklesu), zatímco u chronických hepatitid je třeba vyšetřovat na jednou aspoň 3 vzorky séra, odebrané v intervalech 2 nebo lépe 3 měsíců. Při jednom z 2 posledních odběrů by měla být provedena punkční jaterní biopsie [11].

Závěrem je třeba se dotknout bezpečnostních otázek při EM vyšetřování na HBsAg. Všechny operace se provádějí za uplatnění přísných mikrobiologických kautel. Při oza-

k upřesňující diagnostice hepatitidy typu B. Je specifikována rovněž citlivost imunní EM jako metody detekce HBsAg. Většina pracovních zkušeností i experimentálních výsledků je podrobně diskutována a konfrontována s metodickými přístupy jiných autorů.

Klíčová slova: elektronová mikroskopie — HBsAg a jeho imunní komplexy — metodické zkušenosti.

Literatura

1. Almeida, J. D.: Individual morphological variations seen in Australia antigen positive sera. Am. J. Dis. Child., 123, 1972, s. 300–309.
2. Almeida, J. D. - Waterson, A. P.: Immune complexes in hepatitis. Lancet, II. 1969, s. 983–986.

Tab. 2

Náhodně vybrané příklady nálezů u sér, zpracovaných paralelně centrifugační a otiskovou technikou imunní EM

Pacient, pohlaví, datum odběru krve	Zpracování séra přidáním	Centrifugační technika imunní EM			Otisková technika imunní EM		
		hustota částic	morfologické diferencování (§)	imunní komplexy	hustota částic	morfologické diferencování (§§)	imunní komplexy
F. L., m. 7. 11. 75	PBS anti-HBs	++ ++	MČ V1 DČ MČ V1 DČ	0 všech velikostí	++ ++	MČ (V1) DČ MČ (V1) DČ	1 stř. + malé všech velikostí
J. K., m. 26. 4. 76	PBS anti-HBs	+ ++	MČ V1 MČ V1 DČ	0 vel. + střední	+ ? +	MČ (V1) MČ (V1)	0 stř. + malé
J. C., ž. 26. 1. 77	PBS anti HBs	+ +++	MČ (V1) (DČ) MČ V1 (DČ)	1 × malý všech velikostí	+ ? ++	(V1) MČ (V1)	0 malé
F. Ž., m. 17. 6. 76	PBS anti-HBs	++-+++ +++	MČ (V1) DČx MČ (V1) DČx	1 × malý stř. + malé	+ ? +	MČ MČ (V1) (DČ)	0 stř. + malé
V. R., m. 17. 1. 77	PBS anti-HBs	++-+++ +++	MČ (V1) DČ MČ (V1) DČ	0 střed. + malé	++ +	MČ (V1) DČ MČ (V1) DČ	1 × malý? 1 × střední

(§) většinou pěkná až perfektní morfologie

(§§) většinou špatná struktura částic a „zamlžení“

x) - větší proporce DČ nežli 2 %

MČ - malé částice v převaze (90-99 %)

V1 - vlákna (1-5 %)

DČ - Dančovy částice (0.5-2 %)

(V1) a (DČ) znamená malý nebo nepatrný počet těchto částic, resp. jejich nejistou identifikaci

Hustota částic - + ? + + + + + viz text oddílu 3a.

3. Almeida, J. D. - Waterson, A. P.: The morphology of virus-antibody interaction. *Adv. in Virol.*, 14, 1970, s. 307-338.
4. Almeida, J. D. - Rubenstein, D. - Stott, E. J.: New antigen-antibody system in Australia-antigen positive hepatitis. *Lancet*, II, 1971, s. 1225-1227.
5. Almeida, J. D. - Zuckerman, A. J. - Taylor, P. E. - Waterson, A. P.: Immune electron microscopy of the Australia-SH (serum hepatitis) antigen. *Microbios*, 2, 1969, s. 117-123.
6. Anderson, N. - Doane, F. W.: Specific identification of enteroviruses by immuno-electron microscopy using a serum-in-agar diffusion method. *Canad. J. Microb.*, 19, 1973, s. 585-589.
7. Barker, L. F. - Smith, K. O. - Gehle, W. D. - Shulman, N. R.: Some antigenic and physical properties of virus-like particles in sera of hepatitis patients. *J. Immunol.*, 102, 1969, s. 1529-1532.
8. Barker, L. F. - Almeida, J. D. - Hoofnagle, J. H. - Gerety, R. J. - Jackson, D. R. - McGrath, P. P.: Hepatitis B core antigen: Immunology and electron microscopy. *J. Virol.*, 14, 1974, s. 1532-1538.
9. Bayer, M. E. - Blumberg, B. S. - Werner, B.: Particles associated with Australia antigen in sera of patients with leukemia, Down's syndrome and hepatitis. *Nature*, 218, 1968, s. 1057-1059.
10. Benda, R. - Jelínková, A. - Novák, M.: Metody expresního důkazu ortovirových infekcí, prověřované na materiálu z kožních vakcinačních lézí králíků. *Cs. EMI*, 26, 1977, s. 65-72.
11. Benda, R. - Jelínková, A. - Novák, M. - Máchová, M. - Helm, R. - Stránický, J. - Jerie, M.: Diagnostika hepatitidy typu B elektronově mikroskopickým průkazem serového korpukulárního antigenu a jeho imunních komplexů. *Čas. Lék. čes.*, 116, 1977, s. 1433-1439.
12. Best, J. M. - Banatvala, J. E. - Almeida, J. D. - Watson, A. P.: Morphological characteristics of rubella virus. *Lancet*, II, 1967, s. 237-239.
13. Brenner, S. - Horne, W.: A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Biochim. Biophys. Acta*, 34, 1959, s. 103 až 110.
14. Budkowska, A.: Immunochemical and morphological studies of hepatitis B core antigen isolated from the nuclei of hepatocytes. *J. Inf. Dis.*, 135, 1977, s. 463-467.
15. Cossart, Y. E. - Field, A. M.: Virus-like particles in serum of patients with Australia antigen associated hepatitis. *Lancet*, I, 1970, s. 848.
16. Couleru, O. - Moulis, H. - Peter, F. - Bousquet, O. - German, A. - Leoper, J.: Etude ultrastructurale de l'antigène „Australie“. *Nouv. Presse Méd.*, 2, 1973, s. 1633-1644.
17. Cross, G. F. - Waugh, M. - Ferris, A. A. - Gust, I. D. - Kaldor, J.: Virus-like particles associated with faecal antigen from hepatitis patients and Australia antigen. *Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 49, 1971, s. 1-10.
18. Cruickshank, J. G. - Benson, H. S. - Watson, D. H.: Electron microscopy in the rapid diagnosis of smallpox. *Lancet*, II, 1966, s. 527-530.
19. Dane, D. S. - Cameron, C. H. - Briggs, M.: Virus-like particles of Australia antigen. *Lancet*, I, 1970, s. 695-698.
20. Demmyer, J. - Liu Wu Tse - Cremers, J.: The large particle of Australia antigen. *Am. J. Dis. Child.*, 123, 1972, s. 215-218.
21. Drouhet, V. - Dao Van Lau - Netter, R.: Development of antigen during the course of serum hepatitis. Measurements by electron microscopy and by immunodiffusion. *Am. J. Dis. Child.*, 123, 1972, s. 320-321.
22. Editorials: Rapid identification of virus infections. *Brit. Med. J.*, 11, September, 1976, s. 601-602.
23. Edwards, E. A. - Valters, W. A. - Boehm, L. G. - Rosenbaum, M. J.: Abstracts. *Bact. Abstr.*, V., 180, 1974, s. 230.
24. Edwards, E. A. - Valters, W. A. - Boehm, L. G. - Rosenbaum, M. J.: Visualization by immune electron microscopy of viruses associated with acute respiratory disease. *J. Immunol. Meth.*, 8, 1975, s. 159-168.
25. Feinstone, S. M. - Kapikian, A. Z. - Purcell, R. H.: Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a virus-like antigen associated with acute illness. *Science*, 182, 1973, s. 1026-1028.
26. Ferris, A. A.: Antigens in infectious hepatitis. *Brit. Med. B* 11., 28, 1972, s. 131-133.
27. Ferris, A. A. - Kaldor, J. - Gust, I. D. - Cross, G.: Faecal antigen in viral hepatitis. *Lancet*, II, 1970, s. 243-244.
28. Flewett, T. H. - Bryden, A. S. - Davies, H.: Virus particles in gastroenteritis. *Lancet*, II, 1973, s. 1497.
29. German, A. - Couleru, O. - Panouse-Perrin, J. - Peter, F.: L'antigène „Australie“ et les agents des hépatites. Méthodes sérologiques de détection et microscope électronique. *Progr. Immunobiol. Stand.*, 5, 1972, s. 55-62.
30. Gordon, C. W. - Donnelly, J. D. - Fothergill, R. - Ker, F. L. - Miller, E. L. M. - Flewett, T. H. - Bedson, H. S. - Gruickshank, J. G.: Variola minor - A preliminary report from Birmingham Hospital Region. *Lancet*, I, 1966, s. 1311-1313.
31. Gudat, F. - Bianchi, L. - Stalder, G. A. - Schmid, M.: Klassifizierung und Infektivität der chronischen Hepatitis B, definiert durch Dane Partikel im Blut und Virus. Komponenten in der Leber. *Schweiz. Med. Wchschr.*, 106, 1976, s. 812-824.
32. Gust, I. D. - Cross, G. - Kaldor, J. - Ferris, A. A.: Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet*, I, 1970, s. 953.
33. Hirschman, R. J. - Shulman, N. R. - Barker, L. F. - Smith, K. O.: Virus-like particles in sera of patients with infectious and serum hepatitis. *J. Am. Med. Ass.*, 208, 1969, s. 1167-1170.
34. Hirschman, S. Z. - Gruber, M. - Garfinkel, E.: Purification of naked intranuclear particles from human liver infected by hepatitis B virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 71, 1974, s. 3345-3349.
35. Horne, R. W.: Recent advances in the application of negative staining techniques to the study of virus particles, examined in the electron microscopy. *Advances in optical and electron microscopy* [Barer, R., Coslett, V. E.] Acad. Press, London, N. Y. 1975, s. 227-274.
36. Jelínková, A. - Novák, M. - Benda, R.: Morfologie antigenu hepatitidy B a jeho imunních komplexů. *Voj. zdrav. Listy*, 47, v tisku.
37. Jokelainen, P. T. - Krohn, K. - Prince, A. M. - Finlayson, N. D. C.: Electron microscopic observations on virus-like particles associated with SH antigen. *J. Virol.*, 6, 1970, s. 685-689.
38. Kapikian, A. Z. - Almeida, J. D. - Stott, E. J.: Immune electron microscopy of rhinoviruses. *J. Virol.*, 10, 1972a, s. 142-146.
39. Kapikian, A. Z. - Kim, H. W. - Wyatt, R. G. - Rodriguez, W. J. - Cline, W. L. - Parrot, R. H. - Chanock, R. N.: Reovirus-like agent in stools: association with infantile diarrhea and development of serological tests. *Science*, 185, 1974, s. 1043-1053.
40. Kapikian, A. Z. - Wyatt, T. G. - Dolin, R. - Thornhill, T. S. - Kalica, A. R. - Chanock, R. M.: Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J. Virol.*, 10, 1972b, s. 1075-1081.
41. Ke'en, A. E. - Harthaway, A. E. - McLeod, D. A.: Rapid detection of Australia/SH antigen and anti-

- body by a simple and sensitive technique of immunoelectron microscopy. *Canad. J. Microb.*, 17, 1971, s. 993—1000.
42. Lipman, M. B. - Hierholzer, W. J. - Schluederberg, A.: Isolation of cores from hepatitis B Dane particles. *J. Inf. Dis.*, 128, 1973, s. 664—667.
43. Long, G. N. - Noble, J. Jr. - Murphy, F. A. - Herrman, K. L. - Lourie, B.: Experience with electron microscopy on the differential diagnosis of smallpox. *Appl. Microb.*, 20, 1970, s. 437—504.
44. Malceva, N. N. - Marennikova, S. S.: Elektronnaja mikroskopija v bystroj diagnostike zabojevanij, vyzyvajemych virusami grupy i herpesa. *Vopr. Virusol.*, No 1, 1974, s. 25—31.
45. Montplaisir, S.: Contribution of electron microscopy to rapid diagnosis of a vaccinal skin lesion. *Union Med. Canad.*, 99, 1970, s. 653—656.
46. Nagington, J.: Electron microscopy in differential diagnosis of poxvirus infections. *Brit. Med. J.*, No 2, 1964, s. 1499—1500.
47. Nagington, J. - Macrae, A. D.: Smallpox diagnosis and electron microscopy. *Mon. Bull. Min. Health. Pub. Health Lab. Serv.*, 24, 1965 s. 382—383.
48. Nielsen, J. O. - Nielsen, M. H. - Elling, P.: Differential distribution of Australia-antigen-associated particles in patients with liver diseases and normal carriers. *New Engl. J. Med.*, 288, 1973, s. 484 až 487.
49. Nordenfelt, E. - Kjellen, L.: Dane particles, DNA polymerase and e-antigen in two different categories of hepatitis B antigen carriers. *Interiology*, 5, 1975, s. 225—232.
50. Rýc, M. - Brůčková, M.: Möglichkeiten der elektronmikroskopischen Schnelldiagnostik einiger Virusinfektionen des Respirationstraktes. II. Gemeinschaftstagung der Gesellsch. für Mikrob. und Epidemiol. der CSSR und DDR, Kühlungsborn, May, 1977, s. 57 (Abstr.).
51. Stannard, L. M. - Moodie, J. W. - Keen, G. A. - Kipps, A.: Electron microscope study of the distribution of the Australia antigen in individual sera of 50 serologically positive blood donors and two patients with serum hepatitis. *J. Clin. Pathol.*, 26, 1973a, s. 209—216.
52. Stannard, L. M. - Polson, A. - Kipps, A. - Parker, J. R.: Two antigen-antibody systems in serum hepatitis: preparation of immunoglobulins and their reaction with Australian antigen and particles in liver cell homogenates. *Microbios*, 8, 1973b, s. 87 až 100.
53. Taylor, P. E. - Zuckerman, A. J. - Bird, R. G.: Electron microscopy of hepatitis associated antigens. *Vox Sang.*, 19, 1970, s. 246—253.
54. Trepo, C. - Bird, R. G. - Zuckerman, A. J.: Correlations between the detection of a antigen or antibody and electron microscopic pattern of hepatitis B surface antigen (HBsAg) associated particles in the serum of HBsAg carriers. *J. Clin. Pathol.*, 30, 1977, s. 216—220.
55. Watson, D. H. - Russel, W. C. - Wildy, P.: Electron microscopic particle counts on herpes virus using the phosphotungstate negative staining technique. *Virology*, 19, 1963, s. 250—260.
56. W. H. O. Expert Com. on Viral Hepatitis: Advances in viral hepatitis Techn. Rep. Ser., No 602, 1977, (Geneva), s. 1—62.
57. Williams, A. O. - Almeida, J. D.: Hepatitis-associated (Australia) antigen in Nigerians - an ultrastructural study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 21, 1972, s. 473—475.
58. Williams, M. G. - Almeida, J. D. - Howadon, A. F.: Electron microscope studies on viral skin lesions, *Arch. Dermat.*, 86, 1962, s. 290—297.
59. Woolf, I. L. - Jones, D. M. - Tapp, E. - Dymock, I. W.: Electron microscopy of serum of healthy hepatitis B antigen carriers. *J. Clin. Pathol.*, 28, 1975, s. 260—262.
60. Wright, R.: The Australia antigen in chronic active hepatitis. *Vox Sang.*, 19, 1970, s. 320—326.
61. Yamada, G.: Electron microscopy observations on hepatitis B antigen associated particles in the sera of patients with various liver diseases. *Acta Med. Okayama*, 24, 1974, s. 27—45.
62. Zuckerman, A. J.: Electron microscopy and immune electron microscopy. V souboru prací „Viral hepatitis and tests for the Australia (hepatitis - associated) antigen and antibody“. *Bull. W. H. O.* 42, 1970, s. 975—977.