

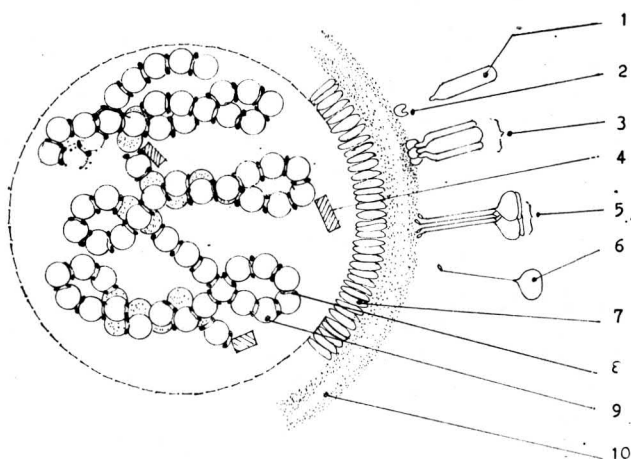
616.921.5-036.22-097:576.8:097:615.371

NEURAMINIDÁZA — INHIBIČNÍ TEST U CHŘIPKY A JEHO VYUŽITÍ

Plk. MUDr. V. HRONOVSKÝ, CSc., mjr. MUDr. Z. MORÁVEK
Vojenský ústav hygieny, epidemiologie a mikrobiologie Praha
(náčelník: plk. MUDr. Vladimír Kotlář, CSc.)

Zásadní význam v imunologii a epidemiologii chřipky mají **obalové glykoproteinové antigeny** chřipkového virionu, jejichž lokalizace a morfologie vyplývá ze schématu na **obr. 1**.

Hemagglutinin (HA) jako základní obalový antigen, představovaný 550—600 tyčinkovitými výběžky na povrchu virové částice, podmiňuje **infekci buňky** a indukuje hlavní typ **protektiv-**



Obr. 1 (legenda na konci článku)

ních protilátek. Jeho geneticky podmíněné změny, způsobené rekombinací nebo bodovými mutacemi, jsou podstatou výjimečné **antigenní variability**, jejímž výrazem jsou zvláště **shiftové**, resp. **driftové** změny chřipky typu A.

Neuraminidáza (NA) — druhý, zcela odlišný a nezávislý obalový antigen chřipky A a B, je představována houbovitými výběžky složenými ze 4 peptidových subjednotek o celkové molekulární hmotnosti 240 000 daltonů. Podléhá obdobným antigenním variacím jako HA, ale je výrazně stabilnější.

Funkčně jde o **hydrolytický enzym**, který odštěpováním hemaglutininu od N-acetyl-neuraminové kyseliny buněčných receptorů **uvolňuje virus** s povrchu buněk. In vivo se podílí na ochraně virové infekivity štěpením neuraminové kyseliny mukoproteinových inhibitorů v sekretech respiračního traktu, hlavní roli však má v terminálních fázích infekce buňky, kdy zábranou spontánní agregace umožňuje uvolňování zralých infekčních virionů a jejich šíření na další buňky. Z této zřejmě nejvýznamnější funkce enzymu vyplývá současně do značné míry i **úloha antineuraminidázových protilátek** indukovaných infekcí nebo imunizací. Mají omezený protekční účinek, protože nezabraňují infekci, ale inhibují šíření viru z rodičovských buněk **lokalizují infekční proces**, čímž zmírňují průběh, popřípadě zcela zabráňují klinickému onemocnění. Tyto poznatky podnítily mimo jiné vývoj tzv. **neuraminidázových vakcín**, zejména vakcín s purifikovanými neuraminidázovými antigeny, jimž se přisuzuje značná perspektiva. Protilátky k neuraminidáze se mohou uplatňovat zvláště při absenci specifických anti-HA protilátek, tj. u epidemií vyvolaných variantami viru s výrazněji změněným hemaglutininem při zachování antigenně nezměněné neuraminidázy, což bývá — vzhledem k její relativně větší stabilitě — v interpandemických obdobích dosti častá situace.

Rozvoj poznatků o protekčním významu anti-NA protilátek, zvláště o jejich úloze v epidemiologii chřipkové infekce, se odráží v laboratorní praxi jednak využíváním cíleně připravených zvířecích protilátek k antigenní charakte-

rizaci chřipkových izolátů, jednak zaváděním a využíváním metod měření hladin těchto protilátek zejména při sledování imunologického stavu populace v rámci **chřipkové surveillance** a při kontrolách postvakcinační **protilátkové odezvy**.

Základní technikou průkazu a určování hladin těchto protilátek je **neuraminidáza — inhibiční test (NIT)**. Je založen na měření stupně inhibice hydrolyzy glykoproteinového substrátu [obvykle alfa-2-globulinové frakce fetálního telecího séra — tzv. **fetuinu**] předem stanovenou standardní dávkou virové neuraminidázy (u chřipky A zpravidla ve formě vhodné virové **rekombinanty** s potřebným subtypem neuraminidázového antigenu). Při reakci se úměrně hladině sérových protilátek neutralizuje NA aktivita a ve srovnání s kontrolním sérem redukuje uvolňování N-acetylneuraminové kyseliny ze substrátu. Její relativní obsah se po převedení na barevnou složku a extrakci do butanolu stanovuje spektrofotometricky.

Tento technicky poměrně náročný, ale citlivý subtypově specifický test jsme v posledních letech zavedli na našem pracovišti. Kromě některých modifikací originální metodiky [1] jsme ovládli racionální **přípravu fetuinového substrátu** z albuminové i globulinové frakce fetálního telecího séra a rovněž práci s potřebným spektrem **rekombinovaných kmenů chřipky A**. Jde o antigenní hybridy obsahující hemaglutinin zvířecí — obvykle koňské — A chřipky a příslušný aktuální subtyp lidské neuraminidázy. Účelem je zabránit tzv. stérické inhibici vlivem současné reakce mezi virovým hemaglutininem a jeho sérovými protilátkami, která může vést ke zkreslení a falešně pozitivním nálezům v NI testu. S tímto fenoménem je třeba počítat u NI testů s chřipkou B, kde podobné rekombinanty nejsou k dispozici.

NIT využíváme již několik let ve prospěch vojenského terénu. Spolupráce vázaná na pracovní program 1. a 4. OHEO přinesla některé cenné výsledky a zkušenosti.

Spolupráce s virologickou skupinou 1. OHEO Plzeň se týká každoročního **hodnocení účinnosti aktuálních inaktivovaných chřipkových vakcín**, prováděného u vybraného souboru vojáků základní služby dlouhodobě sledovaného útvaru. Vyšetřování dynamiky a perzistence hladin postvakcinačních sérových protilátek k NA antigenům ve vakcíně obsažených virových subtypů vhodně doplňuje běžně prováděné sledování protilátek hemaglutinačně-inhibičních. Přispívá ke komplexnímu **posouzení imunogenity** všech složek vakcíny, dovoluje objektivněji hodnotit její **protekční efekt** a umožňuje s větší mírou spolehlivosti předvídat stupeň navozené kolektivní imunity [2]. Výsledky za poslední 3 roky ověřily mimo jiné individuální a celkově slabší stupeň rozvoje antineuraminidázové imunity, nepochybně pro nižší imunogenitu zejména N1 antigenů virových kmenů obsažených ve vakcínách Adinavira. Dále jsme prokazovali vý-

ráznou závislost protilátkové odezvy na přítomnosti prevakcinačních protilátek k neuraminidázovým antigenům, tzn. na předchozí imunologické zkušenosti podmiňující anamnestickou reakci očkovaných. Opakovaně jsme rovněž ověřili málo průkazný vliv revakcinace na hladiny antineuraminidázových protilátek při běžně užívaném imunizačním schématu.

Druhým směrem praktické aplikace NIT jsou **imunologické přehledy chřipky v ČSLA**. Jde o spolupráci se 4. OHEO České Budějovice, kde se každoročně centralizovaně vyšetřují hladiny hemaglutinačně-inhibičních protilátek v sérech vybraných kontingentů vojáků základní služby ze spádů jednotlivých OHEO. Toto séroepidemiologické sledování **kolektivní protilátkové rezistence** k aktuálním i dřívějším subtypům, resp. variantám chřipky A a B přináší podklady pro **analýzu**, event. dílčí **prognózu** epidemiologické situace i pro rozhodování o způsobu a rozsahu očkování v nadcházející chřipkové sezóně. Jsou cenným zdrojem informací i pro Ústřední protichřipkovou komisi. Testování neuraminidáza-inhibičních protilátek, které se — samozřejmě jen u části souboru — provádí s použitím rekombinant základních subtypů chřipky A již 5. rok a od r. 1981 přímo na 4. OHEO, dovoluje metodu imunologických přehledů dále objektivizovat a přispívá k zpřesnění epidemiologického prognózování.

Sledování neuraminidáza-inhibičních protilátek má podle novějších poznatků specifický význam zejména u **chřipky typu B**, která je — proti chřipce A — charakterizována relativně **vyššími hladinami i delší perzistencí NI protilátek** (3). Tyto nálezy, které evidentně souvisejí se známými epidemiologickými i klinickými zvláštnostmi chřipky typu B, nás přiměly připravit, metodicky zajistit a od r. 1982 do imunologického přehledu zařadit i NIT s kmeny chřipky B u vybraných vzorků vojenské populace.

Z předložené informace lze uzavřít, že ovládnutí a zavedení laboratorního vyšetřování NI protilátek technikou NIT významně obohacuje metodiku hodnocení stupně kolektivní imunity a je přínosem při séroepidemiologické kontrole chřipky ve vojenských kolektivech.

Souhrn

Sdělení podává charakteristiku metody neuraminidáza-inhibičního testu u chřipky a shrnuje zkušenosti s jeho využitím při hodnocení protilátkové odezvy u chřipkových vakcín a při sledování hladin protilátek ve vojenských kolektivech.

Poznámka: Předneseno na vědecké konferenci k 25. výročí založení VÚHEM v září 1982 v Sázavě u Žďáru nad Sázavou.

Literatura

1. Aymard-Henry, M. - Coleman, M. T. - Dowdle, W. R. - Laver, W. G. - Schild, G. C. - Webster, R. G.: Influenza neuraminidase and neuraminidase inhibition test procedures. Bull. Wld. Hlth Org., 48, 1973, s. 199—203.
2. Bruj, J. - Skočil, V. - Farník, J. - Hronovský, V. - Šíp, J.: Inaktivovaná chřipková vakcína (H1N1, H3N2, HswN1) — protilátková odpověď a protektivní účinek v epidemii chřipky H1N1 v roce 1979. Čs. Epidemiol., 30, 1981, č. 5, s. 287—293.
3. Štumpa, A. - Bruj, J. - Tůmová, B. - Skočil, V.: Tvorba a perzistence protilátek proti obalovým antigenům viru chřipky po vakcinaci formolizovanou monovakcínou. Čs. Epidemiol., 27, 1978, č. 1, s. 29—37.

Klíčová slova: Chřipka; Neuraminidáza-inhibiční test.

Obr. 1: Schéma struktury chřipkového virionu

1, 2 - glykoproteinové podjednotky hemaglutininu (HA1 - molekulární hmotnost 50 000 a HA2 - m. h. 25 000); 3 - kompletní hemaglutinin (trimér - m. h. 210 000); 4 - RNK-polymerázové proteiny (P1, P2, P3 — m. h. 81—94 000); 5 - neuraminidáza (tetramér — m. h. 240 000); 6 - peptidová podjednotka neuraminidázy (m. h. 58 000); 7 - M (membránový, matrix)-protein (m. h. 26 000); 8 - ribonukleová kyselina (RNK); 9 - nukleoprotein (NP - m. h. 60 000); 10 - lipidická dvouvrstva.