

616.36-002-022.7-074:576.8.077

MIKRO-ELISA NA HBsAg A JEHO PROTILÁTKY*RNDr. Rudolf HELM*

Vojenský ústav hygieny, epidemiologie a mikrobiologie Praha
(náčelník: plk. MUDr. Vladimír Kotlář, CSc.)

Virová hepatitida typu B je jednou z nejvýznamnějších nosokomiálních infekcí. Je proto pochopitelné, že se její laboratorní diagnostika,

umožňuje objevem HBsAg (povrchového antigenu viru hepatitidy typu B) a průkazem jeho vztahu k virové hepatitidě („sérové“, „B“), ne-

bývala prudce rozvíjela a rychle se orientovala na tzv. metody 3. generace (reverzní pasivní hemaglutinace (RPHA), radioimunoanalýza (RIA) a enzymatická imunoanalýza (EIA nebo ELISA z angl. „The Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay“). Porovnání relativní citlivosti vybraných diagnostických souprav různých výrobců je uvedeno v tabulce 1.

Tab. 1

Porovnání relativních citlivostí některých metod průkazu HBsAg

CIEP (ÚSOL)	1
RPHA (Ortho-Diagnostic)	30
ELISA (ÚSOL)	250—500
RIA (Abbott)	2500—4000

RPHA je nejméně citlivá metoda 3. generace, ale výrobně nejnáročnější. RIA techniky jsou nejcitlivější, ale vyžadují odpovídající nákladné vybavení diagnostických laboratoří včetně bezpečnostních opatření pro práci s izotopy. Rozpad radioaktivního izotopu navíc podstatně omezuje expiraci souprav, dosud výlučně dovážených z devizové oblasti.

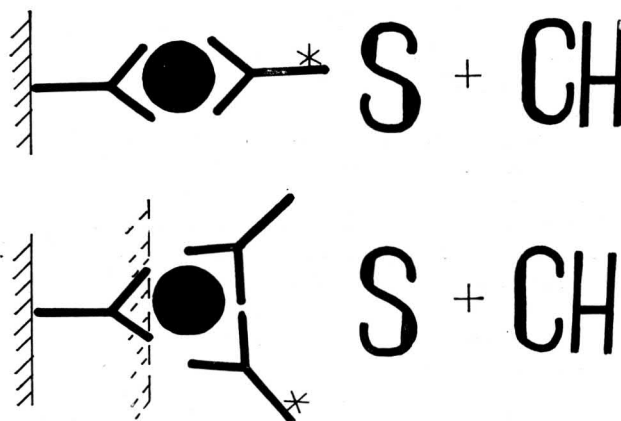
Pro naše podmínky, s ohledem na výrobní možnosti i vybavení diagnostických laboratoří, je nejvhodnější metodou ELISA, která se citlivostí blíží technikám RIA, aniž vyžaduje náročně vybavení a režimová opatření.

Z těchto důvodů byly v roce 1980 vytvořeny základní předpoklady pro postupné zahájení tuzemské výroby diagnostických souprav k průkazu HBsAg, založených na principu ELISA (obchodní označení „Sevatest-ELISA-HBsAg-Macro I.“).

König a spol. (1980) vypracovali purifikační postup, který umožnil získání dostatečně čistého a imunogenního HBsAg. Pomocí tohoto preparátu HBsAg byly na virologickém oddělení VÚHEM připraveny králíčí a kozí protilátky potřebné kvality v množství, které pokrylo výrobu prvních šarží souprav „Sevatest-ELISA-HBsAg-Macro I/ÚSOL“ (kozí protilátky jsou výrobně využívány prakticky ještě dnes). Výrobě byly předány i potřebné pracovní postupy.

Zmíněná domácí souprava využívá osvědčeného uspořádání typu tzv. „dvojitého sandwiche“, jehož schematické znázornění je na horní polovině obrázku 1.

Specifická protilátka (anti-HBs) je navázána svým Fc-fragmentem (Fc-fragment je část molekuly imunoglobulinu, která není nositelkou protilátkové specifičnosti) na „pevnou fázi“ (např. polystyrén nebo jiný plast tvořící dno a stěny reakční nádoby — zkumavky nebo jamky mikrodostičky). Po přidání vyšetřovaného vzorku dochází k vazbě HBsAg (je-li ve vzorku



Obr. 1. Schéma uspořádání reakce ELISA k průkazu antigenu a protilátek

Horní schéma: ELISA k průkazu antigenu — typ „dvojitý sandwich“

„S“ = substrát
 „CH“ = chromogen
 * = enzym (peroxidáza)

Dolní schéma: ELISA k průkazu protilátek

Antigen se váže na „pevnou fázi“ buď prostřednictvím IgG, nebo přímo.

Inhibiční varianta: detekovaná protilátka se nejprve naváže na antigen, kongulát obsahuje pouze zbylé neobsazené antigenní determinanty.

Kompetitivní varianta: detekovaná protilátka i konjugát jsou přidány současně a vzájemně soutěží o vazbu na antigenní determinanty.

přítomen) na „pevnou fázi“ prostřednictvím imunoglobulinových molekul (anti-HBs). Po promytí váže takto fixovaný HBsAg peroxidázový konjugát (= anti-HBs + peroxidáza). Po inkubaci (kratší než je inkubace se vzorkem) je nenavázaný konjugát odstraněn a po promytí je přidán substrát (H_2O_2) současně s chromogenem (orthofenylendiaminem, OPD). Substrát (na obr. 1 značen „S“) je peroxidázou štěpen a vznikající atomární kyslík oxiduje chromogen (na obr. 1 značen „CH“) a mění tím jeho světelnou absorpci. Makroskopicky se sled těchto reakcí projeví vznikem žlutočerveného zbarvení, jehož intenzita zhruba odpovídá množství antigenu ve vyšetřovaném vzorku.

Denaturace enzymu kyselinou sírovou zastavuje reakci a umožňuje standardní odečtení výsledků.

Popsaná makro-souprava je srovnatelná se zahraničními soupravami obdobné koncepce.

V diagnostické praxi jsme ověřili a zavedli mikromodifikaci této soupravy, umožňující vyšetření dvojnásobného počtu sér pomocí jedné sady ingrediencí při zachování stejné citlivosti. Mikromodifikace navíc umožňuje využití některých pomůcek a přístrojů, odstraňujících pracnost (Minivash, spec. fotometr apod.).

Touto technikou jsme vyšetřili již přes 2000 sér. Většina HBsAg pozitivních sér byla dále vyšetřena konfirmačním testem (ÚSOL) k potvrzení pozitivitu nebo byla paralelně vyšetřena testem AUSRIA na oddělení nukleární me-

dicíny ÚVN. Zjistili jsme, že nespecificky pozitivní mohou být pouze séra s podstatně nižší absorbancí, než je absorbance pozitivních kontrol.

ÚSOL v současné době již vyrábí mikrotest „Sevatest-ELISA-HBsAg-Micro I/ÚSOL“, jehož kvalita odpovídá absolutní světové špičce (podle dobrozdání referenční laboratoře W. H. O.).

Doplňkem k vyšetření HBsAg je vyšetření protilátek anti-HBs. Protisměrná imunoelektroforéza umožňovala provedení obou vyšetření současně, ale s velmi malou citlivostí. Protilátky v sérech rekonvalescentů po primoinfekcích nebyly zpravidla touto metodou detekovány. ELISA naproti tomu dává možnost detekce protilátek s podstatně vyšší citlivostí.

Současný projekt ÚSOL počítá s využitím komerčních souprav Macro-I k detekci anti-HBs. Principem reakce je neutralizace HBsAg protilátkami. Ke známému množství vyšetřovaného séra (v němž mají být stanoveny protilátky) se přidá přesně známé množství HBsAg. Po preinkubaci se v této směsi detekuje zbylý, vázatelný HBsAg běžným rutinním postupem. Pokles intenzity zabarvení (v porovnání s kontrolou) indikuje přítomnost protilátek ve vyšetřovaném vzorku. Tato metoda je alespoň 10krát citlivější než protisměrná imunoelektroforéza při stanovení protilátek (anti-HBs).

Na našem pracovišti ověřujeme jiné varianty ELISA ke stanovení anti-HBs. Jak vyplývá ze spodní poloviny schématu na obr. 1, pracujeme s antigenem navázaným na „pevnou fázi“ (buď prostřednictvím protilátky, nebo přímo). Detekovaná protilátka vzorku se váže na antigen a později přidaný konjugát se může vázat jen na zbylá vazebná místa (antigenní determinanty) HBsAg (inhibiční varianta) nebo detekovaná protilátka soutěží o vazbu na antigenní determinanty HBsAg se současně přidaným

konjugátem (kompetitivní varianta). Snížení absorbance vzorku v porovnání s kontrolami svědčí o přítomnosti protilátek ve vyšetřovaném vzorku.

Každá z uvedených variant je minimálně řádově citlivější než protisměrná imunoelektroforéza v detekci anti-HBs. V nejbližší budoucnosti lze očekávat doplnění sortimentu ÚSOL o upravené soupravy ELISA-HBsAg-Macro I s možností průkazu anti-HBs, což bude mít bezesporu pozitivní ohlas v řadě diagnostických pracovišť.

Souhrn

Enzymatická immunoanalýza představuje nejmodernější metodický trend zejména v imunodiagnostice virových antigenů. Československé soupravy „Sevatest-ELISA-HBsAg-Macro I“ a „Sevatest-ELISA-HBsAg-Micro I“ určené k průkazu HBsAg jsou plně srovnatelné s nejlepšími zahraničními výrobky. Jejich zavedení do diagnostické praxe představuje výrazný kvalitativní posun, i když současně zvyšuje nároky na přesnost rutinní práce.

Zvolená metodická koncepce (ELISA) umožňuje rovněž s minimálními úpravami detekci anti-HBs s dostačující citlivostí.

Literatura

König, J. - Benda, R. - Němeček, V. - Helm, R. - Jelínková, A.: Purifikace povrchového antigenu hepatitidy typu B. Čs. Epidem. Mikrobiol., 29, 1980, č. 6, s. 323–333.

Klíčová slova: Virová hepatitida; Preparát HBsAg; Souprava „Sevatest-ELISA-HBsAg-Macro I“; Souprava „Sevatest-ELISA-HBsAg-Micro I“.

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