

615.373.3:615.44:356.33:616.981,71-07:616.988-07

BANKA ANTIVIROVÝCH A ANTIRICKETTSIÁLNÍCH SÉR A JEJÍ VYUŽITÍ

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

Virologické a zčásti parazitologické oddělení VÚHEM řešilo během 6. pětiletky obsáhlý a náročný úkol, jehož cílem bylo zabezpečit vysoce kvalitními protilátkami rychlou polní diagnostiku virových a rickettsiálních infekcí v příslušných zařízeních ČSLA.

Protože na **rychlé a spolehlivé diagnostice** závisí do značné míry včasná léčba i účinná protiepidemická ochrana vojsk, orientovalo se naše pracoviště již v dřívějších letech na výzkum a vývoj metod časné specifické diagnostiky po-

užitelné i v polních podmínkách. Široce jsme studovali zejména diagnostické aplikace **techniky fluoreskujících protilátek**. Mnoholeté metodické, experimentální i praktické zkušenosti s širokým spektrem zejména virových původců dovolily postupně vypracovat **jednotnou**, dnes platnou **koncepci polní diagnostiky** (6). Jejím **principem** je monospecifický, popřípadě skupinový průkaz virových, bedsoniových a rickettsiálních agens, resp. jejich antigenů **technikou nepřímé imunofluorescence (NIF)**. Zahrnuje

jednak **expresní** diagnostiku, tzn. detekci antigenů přímo v lidském (zvířecím) biologickém nebo nekropickém materiálu, jednak — a to především — tzv. **zrychlenou** diagnostiku, založenou na NIF identifikaci původců z klinicko-patologického materiálu nebo vzorků zevního prostředí předmnožených na citlivých kultivačních substrátech, zvláště buněčných kulturách. Zatímco expresní diagnostika, dávající výsledky do 2–4 hodin po dodání materiálu laboratorně, má zpravidla pouze předběžný charakter, lze zkrácený izolační pokus považovat za univerzální a většinou konečnou diagnostiku, dovolující podle citlivosti detekčního systému a rychlosti replikace infekčního agens provést definitivní identifikaci v rozmezí 48 (výjimečně 24) hodin až 7 dní.

Těžištěm výzkumného programu, řešeného v letech 1974–1980, bylo zabezpečení uvedené doktríny vytvořením trvalé zásoby — čili **banky — účinných a specifických protilátek** pro komplexní (tzn. imunofluorescenční a sérologickou) identifikaci co nejširšího spektra aktuálně i potenciálně vojensky významných virových a rickettsiálních nákaz ve specializovaných hygienickoprotiepidemických zařízeních ČSLA, zvláště za mimořádných podmínek.

Kromě vlastní produkce obsáhlého souboru většinou zvířecích protilátek a testování jejich účinnosti a specifčnosti, včetně ověřování praktických diagnostických aplikací, vyžadovalo splnění úkolu na přiměřené odborné úrovni i řešení řady otázek **výzkumné povahy**. Šlo zejména o problematiku izolace a **kultivace** různých **virů in vitro** a o experimentální rozvíjení metodických přístupů, zvláště v oblasti **sérologické diagnostiky**. Při volbě konkrétních dílčích metodik jsme mohli vycházet z mnoha vlastních dřívějších zkušeností a výzkumných výsledků. Šlo např. o racionální technologii kultivace buněk s použitím práškovaných médií, o přípravu vysoce aktivních antiarbovirových protilátek na bázi hyperimunních myších ascitických tekutin indukovaných u imunizovaných zvířat peritoneální aplikací buněk myšího sarkomu (2), o využití opičí ledvinové linie CV-1 jako téměř univerzálního kultivačního systému pro arboviry různých taxonomických rodů a skupin (4) nebo o pokusné zdůvodnění důsledné orientace na nepřímou imunofluorescenční metodu jako základní identifikační reakci (3).

Dřívější zkušenosti rovněž motivovaly poměrně náročné **požadavky na vlastnosti diagnostických protilátek**, podmiňující jejich zařazení do sérové banky. Prvořadým požadavkem byla dostatečná **účinnost**, daná vysokou protilátkovou aktivitou v NIF testu (minimální pracovní ředění 1:8–10) i přiměřenými titry v konvenčních séroreakcích. Stejně důležitým kritériem byla **specifičnost**, podmíněná zejména eliminací nespecifických tkáňových reakcí a zajištěním použitelnosti co nejširšího spektra izolačních a detekčních systémů důslednou imunizací zvířat antigenními materiály pomnoženými v dru-

hově homologních substrátech. Prakticky významný byl požadavek **druhově unifikace**, tj. příprava protilátek u jednotlivých skupin původců pokud možno na stejném zvířecím druhu (myš, morče, králík) s cílem maximálně zjednodušit diagnostiku omezením spektra protidruhových konjugátů pro NIF techniku. Nezbytným požadavkem byla konečně dlouhodobá **stabilita** protilátek, podmíněná vysoce kvalitní lyofilizací, zatavením ampulí v dusíkové atmosféře a trvalým uložením preparátů při chladničkové teplotě.

Proti původně předpokládané aktivní účasti mimoústavních pracovníků záviselo plnění úkolu především na úsilí poměrně malého řešitelského kolektivu virologického oddělení VÚHEM. Přes organizační a metodickou náročnost i rizikovost laboratorní práce se podařilo problematiku zvládnout a program, zaměřený na protilátkové pokrytí diagnostiky většiny významných lidských virových, bedsoniových a rickettsiálních patogenů, včetně řady vojensky zneužitelných agens, úspěšně splnit.

Jak demonstduje souhrnný přehled v **tabulce 1**, bylo celkově připraveno a otestováno **48 druhů protilátek**, z toho 6 polyvalentních:

- v **1. skupině** je **6 sér** pro diagnostiku tzv. velkých DNK-virů z čeledí Pox a Herpesviridae; jde konkrétně o králíčí antiséra proti neštovičným virům, oběma typům lidského viru herpes simplex a vysoce patogennímu opičímu B viru; kromě toho jsou sem zařazena lidská rekonvalescentní séra k viru varicella-zoster a cytomegaloviru;
- **2. skupina** obsahuje **9 sér** proti základním **respiračním virům**, a to 6 králíčích sér k hlavním subtypům a novějším driftovým variantám chřipky typu A a B, králíčí sérum pro skupinovou diagnostiku lidských adenovirů, morčecí sérum k parotidě a lidské rekonvalescentní sérum pro diagnostiku RS viru;
- nejpočetnější **3. skupina** zahrnuje **29 druhů protilátek** k lidským virovým **neuroinfekcím**, a to 28 myších ascitických tekutin k arbovirům — převážně původcům encefalitid a hemorragických horeček ze všech 4 základních rodů a k arenaviru LCM; tři polyvalentní ascity jsou určeny pro předběžnou skupinovou detekci alfavirů — včetně vysoce patogenních koňských encefalomyelitid, flavivirů komplexu klíšťové encefalidity a virů podskupiny dengue — žlutá zimnice; kromě toho obsahuje tato část vysoce účinné morčecí sérum k průkazu viru vztekliny;
- poslední skupinu tvoří morčecí séra proti klasické skvrnivce a Q-rickettsiáze a dvě polyvalentní morčecí séra k průkazu agens ze skupiny purpurových horeček a k diagnostice bedsoniových (chlamydiových) infekcí.

Preparáty, připravené v množstvích zabezpečujících předpokládanou potřebu, byly rozplněny po 0,2 ml a postupně šetrně a kvalitně

Přehled složení banky diagnostických protilátek

Tab. 1

SKUPINA INFEKČÍ	PROTILÁTKY		POČET DRUHŮ
	MONOVALENTNÍ	POLYVALENTNÍ	
POXVIRY HERPESVIRY	Pox, HSV-1, 2 B-virus, VZV, CMV		6
RESPIROINFEKCE (MYXO, PARAMYXO, ADENOVIRY)	Chřipka A (4) Chřipka B (2) Parotitis, RSV	Lidské adenoviry	9
NEUROINFEKCE (ARBOVIRY, ARENAVIRY, RABIES)	Alfaviry (5) Flaviviry (12) Bunyaviry (6) Orboviry (1) LCM, rabies	Poly-alfa Poly-KE Poly-dengue/YF	29
RICKETTSIE BEDSONIE	Q-horečka Skvrnivka	Skup. bedsonie Purp. horečky	4
C E L K E M	42	6	48

zlyofilizovány. Příslušné alikvóty od všech druhů protilátek byly zkompletovány do souborů pro polní diagnostické soupravy a deponovány na určených místech, část preparátů byla vyčleněna pro běžné a cvičné využití.

Jak dokumentuje obsáhlá **závěrečná zpráva** o úkolu i již uveřejněné sdělení (5), odpovídá kvalita protilátek vesměs stanoveným parametřům včetně stability účinnosti, prověřené u části protilátek po 6–8 letech. Jejich použitelnost ve smyslu diagnostické koncepce byla ověřena řadou modelových pokusů, včetně náročného studia zkřížené reaktivity. Část protilátek (například k virům chřipky, klíšťové encefalitidy, dengue, LCM, herpetickým virům) byla úspěšně vyzkoušena v diagnostické praxi. S limitacemi, danými specifikou antigenní výbavy a patogenetickými zvláštnostmi jednotlivých agens, resp. jejich skupin, jsou preparáty sérové banky obecně použitelné:

- k přímé expresní (skupinově nebo druhově specifické) imunofluorescenční detekci původců v klinických, resp. postmortálních vzorcích, obsahujících přiměřenou koncentraci příslušného antigenního materiálu;

- k zrychlenému fluorescenčnímu průkazu, resp. identifikaci izolátů, pomnožených v citlivých hostitelských substrátech, především v buněčných kulturách;

- k identifikaci původců (antigenů) pomocí konvenčních séroreakcí;

- jako kontrolní pozitivní protilátky pro účely klasické sérodiagnostiky a pro testování diagnostických antigenů.

Dodržení požadavku imunologické homolognosti při přípravě protilátek umožňuje specifickou IF detekci většiny původců v druhově libovolných substrátech. V souladu s požadavkem co největšího zjednodušení metodiky lze

celé spektrum protilátek pokrýt pouze čtyřmi komerčními protidruhovými konjugáty pro imunofluorescenční barvení.

Jsme si vědomi, že soubor neobsahuje protilátky k některým vojensky evidentně významným patogenům, zejména k hemorragickým horečkám Lassa a Marburg-Ebola, prostudovaným teprve v posledních letech. Práce s těmito a některými dalšími agens (jihoamerické hemor. horečky komplexu Tacaribe, rickettsie skupiny Tsutsugamushi) nebyly provedeny pro značná rizika nebo pro nedostupnost vhodných kmenů.

Přesto lze banku charakterizovat jako rozsahem a kvalitou ojedinělý soubor diagnostických protilátek, umožňující v případě potřeby **kvalifikovanou polní diagnostiku** většiny aktuálně nebo potenciálně významných lidských virových a rickettsiálních původců. Příslušné alikvóty preparátů sérové banky jsou připraveny pro vybavení novelizovaných souprav pro polní virologickou diagnostiku a v případě potřeby i pro předání potřebných kvant a druhů protilátek v rámci koaliční součinnosti hygienicko-epidemiologické služby armád států Varšavské smlouvy. Část vyčleněná pro tzv. **cvičnou spotřebu** je určena k prověřování stability účinnosti, laboratornímu hodnocení reálnosti diagnostických schémat i k praktické mírové diagnostice. Příkladem tohoto využití banky je opakované poskytnutí potřebného spektra antiarbovirových ascitických protilátek a dalších biopreparátů kubánským pracovníkům v roce 1981 pro zabezpečení diagnostického řešení epidemií horečky dengue na Kubě. Tato pomoc byla Kubánskou akademií věd velmi pozitivně oceněna.

Závěrem je třeba uvést, že kromě splnění vlastního realizačního cíle byla během řešení úkolu získána řada dílčích originálních **vědec-**

kých poznatků z oblasti biologie studovaných agens a praktické diagnostiky jimi vyvolaných infekcí. To vše přispělo k tomu, že celá práce, uzavřená koncem r. 1980, byla pro odborný přínos i praktický význam pro zdravotnické zabezpečení armády vysoce kladně hodnocena.

Souhrn

Sdělení podává povšechnou informaci o metodických přístupech a výsledcích řešení dlouhodobého úkolu, jehož cílem bylo vytvoření trvalé zásoby (banky) účinných a specifických protilátek pro komplexní zabezpečení rychlé polní diagnostiky širokého spektra virových a rickettsiálních infekcí. Jsou shrnuty základní údaje o přípravě, vlastnostech a složení obsáhlého souboru antisér a o možnostech jejich diagnostického využití.

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

Literatura

1. Benda, R.: Koncepce rychlé diagnostiky arbovirů. Inf. zpravodaj VLVDÚ JEP, 19, 1978, č. 1, s. 37—43.
2. Hronovský, V.: Příprava hyperimunních myších ascitických tekutin pro sérodiagnostiku a imunofluorescenční průkaz arbovirů. Čs. Epidemiol., 27, 1978, s. 129 až 136.
3. Hronovský, V.: K otázce použitelnosti fluorescenčního barvení komplementu v časně diagnostice arbovirů. Čs. Epidemiol., 29, 1980, s. 39—45.
4. Hronovský, V. - Plaisner, V. - Benda, R.: CV-1 monkey kidney cell line — a highly susceptible substrate for diagnosis and study of arboviruses. Acta virol., 22, 1978, s. 123—129.
5. Hronovský, V. - Benda, R. - Rehn, F.: Význam a využití banky diagnostických antivirových a antirickettsiálních sér. Sborník Voj. zdrav. Listů, 51, 1982, č. 1, s. 33—44.
6. Kolektiv autorů VÚHEM: Laboratorní diagnostika přenosných onemocnění v poli. Učební pomůcka VLVDÚ JEP, sv. 136/2, 1978, s. 317—424.

Klíčová slova: Rychlá polní diagnostika; Antivirové a antirickettsiální protilátky.