

616.34-002-036.22:576.858:613.67

NEKULTIVOVATELNÉ VIRY VELIKOSTI 27 NM V EPIDEMII SUBFEBRILNÍ GASTROENTERITIDY

Plk. MUDr. Richard KAHLICH, DrSc.,¹⁾ MUDr. Miloš RÝC, CSc.,²⁾
doc. MUDr. Luděk DANEŠ, DrSc.,²⁾ RNDr. Zdena KUCHARSKÁ, CSc.,²⁾
MUDr. Antonín PALEČEK, CSc.,¹⁾ RNDr. Vratislav ŠNEJDAR, CSc.¹⁾

¹⁾Vojenský ústav hygieny, epidemiologie a mikrobiologie v Praze

(náčelník: plk. MUDr. V. Kotlář, CSc.)

²⁾Institut hygieny a epidemiologie v Praze

(ředitel: akademik B. Rosický)

V několika předchozích sděleních jsme referovali o nálezů zcela neobvyklých nebo dosud málo diagnostikovaných původců hromadných střevních onemocnění, které se podařilo zachytit u útvarů ČSLA za užití speciálních laboratorních postupů širší diagnostiky, překračující rámec vžitého stereotypu salmonela — shigela.

Mezi popsány původci epidemií byl např. enterotoxigenní *Enterobacter cloacae* [10] a *Campylobacter jejuni* [11], které nebyly předtím v ČSSR zachyceny. Jako další neobvyklé původce jsme v rámci studia soudobé epidemiologie střevních nákaz našli anaerobní klostridia, enteroinvazivní a enterotoxigenní *E. coli*, citrobaktery a yersinie [13, 14, 20].

V případě dalších dvou epidemií, z nichž jsme jednu rovněž popsali [14], zůstala interpretace rozpačitá vzdor současnému zaměření na enteropatogenní viry. Výsledek se dostavil teprve v poslední nedávné epidemii, jejíž popis předkládáme jako další doklad, že se vyplatí vytrvale pátrat po „nových“ původcích hromadných střevních onemocnění, a postupně tak vyplňovat mezery ve znalostech soudobé epidemiologie těchto zdravotně i ekonomicky významných nákaz.

Použité metodiky

Při zaměření na širší okruh původců jsme vedle klasických kultivačních postupů užívali též speciální techniky pro záchyt méně obvyk-

lých a „nových“ bakterií. K záchytu enterotoxigenního stafylokoka sloužil selektivní Chapmanův agar, pro *Bacillus cereus* krevní agar s diskem polymyxinu B, pro *Yersinia enterocolitica* pak paralelní kultivace při pokojové a chladničkové teplotě včetně opracování KOH [21].

Jako výchozí materiál pro anaerobní a mikroaerofilní kultivaci sloužily vzorky nativní stolice. Selektivní kultivaci kampylobakterů jsme popsali na jiném místě [9], kultivaci *Clostridium perfringens* jsme modifikovali v odsátých zavařovacích sklenicích s pyrogallem předplněných CO₂. K bližší diferenciaci sloužil reverzní CAMP test [7].

Zvláštní pozornost jsme věnovali laktóza-pozitivním kmenům *E. coli*. Kmenová individua jsme se snažili diferencovat podle odlišného zkvašování salicinu, dulcitu a sacharózy do 8 různých „biotypů“ označovaných kódem 0—7 [12] a podle sérotypu. Prevalující kmeny byly vyšetřovány na enterotoxigenitu s užitím stabilizované buněčné linie Y₁ derivované z nádoru myši nadledvinky dle Donty a spol. [4].

Invazivitu zachycených bakteriálních kmenů jsme vyšetřovali Serenyho testem [19].

S využitím zkušeností publikovaných Harrisem [8] jsme hledali mikroskopicky leukocyty ve vzorcích nativní stolice, které byly barveny podle Giemsy (koproleukogram).

Preparáty pro vyhledávání cyst *Giardia intestinalis* byly zhotovovány nezkrácenou Faus-tovou flotační technikou [5].

Imunoelektronmikroskopické vyšetření. Extrakty stolic jsme připravovali z 20% suspenze v PBS centrifugací 30 min při 10 000 otáčkách [Janetzki 24], smíšením stejného dílu supernatantu s Freonem 113, protřepáním, další centrifugací 30 min při 10 000 otáčkách, smíšením supernatantu s PEG 6000 (0,8 g na 10 ml). Po uložení při 40 °C přes noc jsme centrifugovali 20 min při 4000 otáčkách. Sediment byl resuspendován v 0,25 ml destilované vody, centrifugován 5 min při 2000 otáčkách a supernatant vzat k vlastnímu imunoelektronmikroskopickému vyšetření. 0,2 ml takto připraveného extraktu bylo inkubováno se stejným dílem krevního séra téhož nemocného z akutní nebo rekonvalescentní fáze onemocnění. Séra byla ředěna 1 : 100 ve fosfátovém fyziologickém roztoku (pH 7,2). Vzorky byly inkubovány 1 hodinu při 37 °C a poté přes noc při 4 °C. Po centrifugaci při 25 000 otáčkách po dobu 90 minut byly sedimenty resuspendovány v několika kapkách destilované vody a naneseny na elektronmikroskopické sítky. Preparáty byly negativně obarveny 2% fosfowolframanem draselným (pH 7,0) a hodnoceny v elektronovém mikroskopu JEDL 100 CX-II při urychlovacím napětí 80 kV.

Suspenze stolic byly rovněž vyšetřeny testem ELISA, Bioveta (Ivanovice na Hané) metodikou doporučenou v setu pro průkaz rotavirového antigenu ve stolici.

Dvojice sér byly dále využity k sérologickému vyšetření.

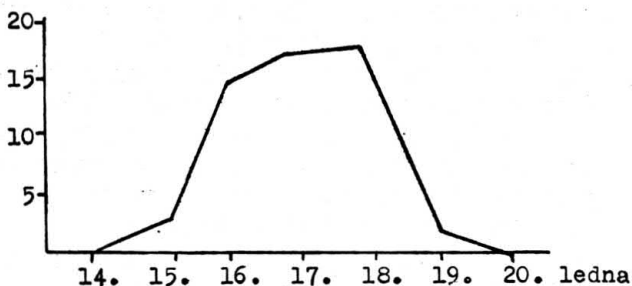
V komplement-fixčním testu byl použit jako antigen rotavirový kmen SA 11 pomnožený na buňkách MA — 104, koncentrovaný a purifikovaný. Jako kontrolní pozitivní séra sloužila morčecí hyperimunní séra vlastní výroby.

V neutralizačním mikrotestu byly použity následující enterovirové antigeny: CB 1—5, E 1—2, 4—9, 11, 20, 24, 25, 30, EV 71, CA 9 a polioviry. Podrobnosti jsou uvedeny v práci Daneše a spol. [3].

Výsledky

Hromadné onemocnění proběhlo u posádky v K. ve dnech 15. 1.—19. 1. 1985. Celkem one-

Počet nemocných



Obr. 1. Epidemie v posádce K — graf incidence

mocnělo 51 osob, což představuje 7,3 % exponovaných (obr. 1).

Nemocní udávali tlak nebo křeče v epigastriu a zhruba 2 dny trvající průjem bez krve a hlenu. Asi 40 % mělo teplotu kolem 37,5 °C, čtvrtina udávala nauzeu, někteří zvraceli.

Vzdor podrobnému epidemiologickému šetření se nepodařilo odhalit zdroj ani vehikulum nákazy, nebyla vyznačena ohniskovost výskytu dle ubytování či stravování.

Lze tedy charakterizovat uvedenou epidemii jako subfebrilní gastroenteritidu s nahodilým přenosem nákazy od osoby k osobě.

Mikrobiologické vyšetření

Od nemocných bylo získáno celkem 9 vzorků nativní stolice a 19 výtěrů na deoxycholátových tampónech a dále 9 akutních a 11 rekonvalescentních sér. Interval mezi odběry sér činil 28 dní.

Výsledky bakteriologické kultivace provedené rutinními postupy a dále v pojetí širší diagnostiky byly vesměs negativní. Několik kmenů podmíněně patogenních příslušníků čeledi Enterobacteriaceae (hemolytické varianty *E. coli*, prevalující biotyp laktóza-pozitivního *E. coli*, laktóza-pozitivní citrobaktery) bylo podrobeno vyšetření na produkci termolabilního enterotoxinu na tkáňových kulturách Y₁ (provedeno dr. Šnejdarem, VÚHEM). Žádný z testovaných kmenů neprodukoval enterotoxin.

Koproleukogram byl vesměs negativní stejně jako parazitologické vyšetření nativních stolic zaměřené na cysty giardií.

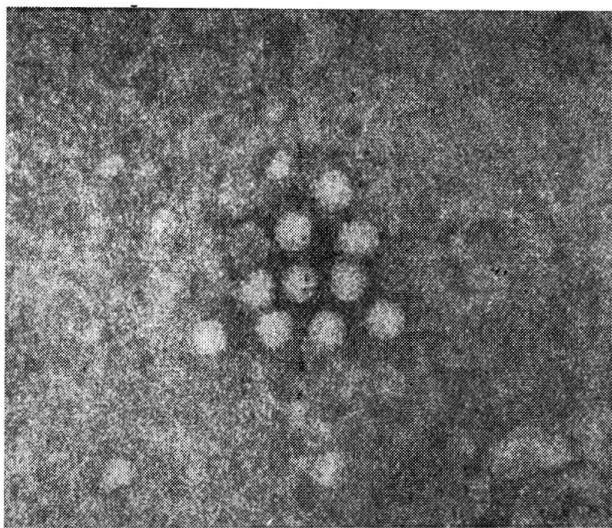
Vzhledem k nedostatku jakýchkoli stop po bakteriálním agens jsme věnovali mimořádnou pozornost virologickému vyšetření.

Kultivační vyšetření provedené pracovníky virologického oddělení VÚHEM bylo vesměs negativní.

Imunoelektronmikroskopické vyšetření extraktů stolic od 6 pacientů po inkubaci s rekonvalescentními séry prokázalo ve 2 případech přítomnost imunoagregátů virům podobných partikulí velikosti 27 nm. V imunoagregátech bylo přítomno 5—15 částic spojených morfologicky zřetelnými můstky protilátek (obr. 2). Inkubace se séry z akutní fáze onemocnění dala negativní výsledky.

Výsledky vyšetření stolic na přítomnost rotavirového antigenu testem ELISA, Bioveta bylo negativní. Reakcí vazby komplementu nebyly prokázány vzestupy titrů protilátek proti rotavirům. Zjištěné titry byly velmi nízké.

Neutralizačním mikrotestem byl zjištěn u jednoho z pacientů signifikantní vzestup protilátek (z 1 : 8 na 1 : 16) proti coxsackie viru B3 a současně nesignifikantní vzestup proti cox. B4. Nález považujeme za doklad aktuální infekce coxsackievirem u jednotlivce, avšak za nález s velmi nepravděpodobným vztahem k etiologii epidemie průjemového onemocnění.



Obr. 2. Imunoagregát Norwalk — like viru po inkubaci s lidským rekonvalescentním sérem. Negativně barveno 2% kyselinou fosfowolframovou, zvětšeno 200 000krát

Diskuse

Zprávy o uplatnění nekultivovatelných virů velikosti asi 27 nm se objevují v USA od roku 1979 [1, 6, 16, 18, 22] pod označením Norwalk, Hawaii, W-Ditschling („winter vomiting disease“), Oshiro, Norwalk-like („snow mountain disease“) apod. Vzhledem k antigenním odlišnostem se osvědčil imunoelektronmikroskopický průkaz virových agregátů v extraktech stolice inkubovaných s rekonvalescentními séry.

V klinickém obraze převládá teplota 38 °C (v 49–63 %), nauzea a zvracení (v 81–85 %) a průjem (65–84 %) s některými celkovými příznaky. Následuje spontánní úzdrava a rychlá rekonvalescence.

Většinou šlo o vodní epidemie (pitná voda či koupání v bazénech) s výskytem sekundárních kontaktů. Inkubační doba se udává v mezích od 18 do 48 hodin. V USA bylo retrospektivně toto agens obviněno z účasti na větším počtu (asi třetině) bakteriologicky negativních epidemií febrilní gastroenteritidy.

Naše epidemie nebyla svou klinicko-epidemiologickou charakteristikou v rozporu s výše popsanými rysy hromadných onemocnění vyvolaných viry velikosti 27 nm. Přestože jsme je zachytili jen ve dvou ze šesti vyšetřených vzorků, svědčí pro jejich etiologickou účast negativní nálezy při užití sér z akutního stadia onemocnění a nedostatek jakýchkoli stop po bakteriálním agens vzdor užití již osvědčené širší diagnostiky soudobých původců střevních nákaz.

V této souvislosti nelze opominout zmínku o jiné naší recentní epidemii febrilní gastroenteritidy z léta 1984, kdy jsme vzdor obdobnému úsilí nenalezli žádné bakteriální agens a imunoelektronmikroskopické vyšetření vyznělo negativně. Již tehdy jsme pojali podezření, že by mohlo jít o nepoznanou virovou záleži-

tost, a čekali na novou příhodu obdobného charakteru, která by byla podrobena rozšířenému vyšetření.

Jediný nález viru velikosti 27 nm, publikovaný u nás již dříve, pochází od Brůčkové aj. [2]. Nebyla však vyloučena eventuální účast některého ze širší palety bakteriálních agens a virus byl — v rozporu s literárními údaji — kultivovatelný.

Na našem pracovišti jsme nedávno vyšetřili velkou sestavu 515 hospitalizovaných pacientů a zjistili 33,5 % obligátních patogenů a 17,8 % „nových agens“ vázaných na speciální postupy širší diagnostiky [15]. Vedle toho však opravňoval vysoký podíl podmíněných patogenů (38,1 %), jejichž etiologická role je u sporadických onemocnění velice často problematická, a dále 10,7 % nálezů fyziologické flóry k představě, že řada těchto onemocnění mohla být ve skutečnosti vyvolána viry. To je ve vztahu k nekultivovatelným virům zvláště naléhavé pro případy neobjasněné febrilní gastroenteritidy. Tato naše epidemie se zdá jen podporovat již vyjádřené předsevzetí [14], že bude třeba v rámci výzkumu soudobé epidemiologie střevních nákaz přistoupit k imunoelektronmikroskopickému vyšetření reprezentativní sestavy bakteriologicky nevyjasněných sporadických onemocnění, která by upřesnila naše představy o skutečném podílu těchto virů na febrilní gastroenteritidě dospělých.

Pokud jde o dětskou populaci, je všeobecně známa úloha rotavirů. Některé zprávy z literatury však naznačují, že nelze tyto viry přehlížet ani u dospělých [17].

Souhrn

Je popsána epidemie subfebrilní gastroenteritidy s postižením 7,3 % příslušníků vojenské jednotky, trváním 6 dnů a zřejmým uplatněním nahodilých kontaktů. Výsledky bakteriologického vyšetření provedeného rutinně i v pojetí širší diagnostiky bylo kompletně negativní stejně jako zaměření na rotaviry a enteroviry. Imunoelektronmikroskopické vyšetření extraktů nativních stolic odhalilo agregáty nekultivovatelných virů o velikosti 27 nm pouze ve spojení s rekonvalescentními séry. Úsudek o jejich etiologickém uplatnění byl podpořen typickou klinicko-epidemiologickou charakteristikou. Příhoda podpořila záměr prohloubit představu o skutečném podílu enteropatogenních virů na soudobých sporadických infekcích i v epidemiích.

Literatura

1. APPLETON, H. - BUCKLEY, M.: Lancet, 1, 1977, č. 8008, s. 409.
2. BRŮČKOVÁ, M. - RÝC, M. - ZELENKOVÁ, L. aj.: Čs. Epid. Mikrobiol. Imunol., 31, 1982, č. 2, s. 67.
3. DANEŠ, L. - KOZA, J. - MATYÁŠOVÁ, I. aj.: Acta Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol., 13, 1983, č. 4, s. 36.

4. DONTA, S. T. - MOON, H. W. - WHIP, S. C.: Science, 183, 1974, s. 334.
5. FAUST, E. C. - SAEITZ, J. - TOBIE, J.: J. Parasitol., 25, 1939, č. 2, s. 261.
6. GREENBERG, H. B. - VALDESUSO, J.: J. Infect. Dis., 139, 1979, s. 564.
7. HANSEN, M. V. - ELIOT, L. P.: J. Clin. Microbiol., 12, 1980, č. 4, s. 617.
8. HARRIS, J. C. - DUPONT, H. L. - HORNICK, R. B.: Ann. Intern. Med., 76, 1982, č. 4, s. 697.
9. KAHLICH, R. - PALEČEK, A. - PAROUBEK, M. aj.: Bull. Čs. Spol. Mikrobiol. ČSAV, 22, 1981, č. 6, s. 7.
10. KAHLICH, R. - PALEČEK, A. - KORYCH, B. aj.: Voj. Zdrav. Listy, 51, 1982, č. 5, s. 260.
11. KAHLICH, R. - KOTLÁŘ, V. - PALEČEK, A. aj.: Čas. Lék. čes., 121, 1982, č. 47, s. 1452.
12. KAHLICH, R. - NEMEC, A. - CAHA, J. aj.: Voj. Zdrav. Listy, 51, 1982, č. 3, s. 108.
13. KAHLICH, R. - PALEČEK, A. - MANKOVECKÝ, L. aj.: Voj. Zdrav. Listy, 53, 1984, č. 3, s. 70.
14. KAHLICH, R. - PALEČEK, A.: Výzkum soudobé epidemiologie střevních nákaz. [Závěrečná zpráva o výzkumném úkolu.] Praha 1985.
15. KAHLICH, R. - PALEČEK, A. - TESAŘOVÁ, J. aj.: Voj. Zdrav. Listy, 54, 1985, č. 2, s. 58.
16. KAPIKIAN, A. Z. - WYATT, R. G.: J. Virol., 10, 1972, č. 5, s. 1075.
17. MARRIE, T. J. - LEE, S. H. S. - FAULKNER, R. S. et al.: Arch. Intern. Med., 142, 1982, č. 2, s. 313.
18. MURPHY, A. M.: Med. J. Austral., 2, 1979, č. 8, s. 329.
19. SERÉNY, B.: Acta Microbiol. Hung., 5, 1957, č. 2, s. 367.
20. SKOČIL, V.: Voj. Zdrav. Listy, 49, 1980, č. 3, s. 96.
21. WEISSFELD, S. A. - SONNENWIRTH, A. C.: J. Clin. Microbiol., 15, 1982, č. 3, s. 508.
22. WOLF, J. K. - SCHREIBER, D. S.: Med. Clin. N. Amer., 66, 1982, č. 3, s. 576.

Klíčová slova: Širší mikrobiologická diagnostika; Nekultivovatelné viry; Klinicko-epidemiologická charakteristika.