

616.988.524-074

ZJIŠŤOVÁNÍ PŘÍTOMNOSTI ANTI-HAV IgM PROTILÁTEK V SÉRECH OSOB V OHNISKU VHA U VÚ 4055 PŘEROV

Kpt. MUDr. Petr DOUDA
Vojenský zdravotní ústav, České Budějovice
(ředitel: pplk. MUDr. Peter Gál)

Toto sdělení se zabývá laboratorní problematikou související s virovou hepatitidou A.

Laboratoře epidemiologicko-mikrobiologického oddělení VZÚ České Budějovice postupně vyšetřily celkem 137 vzorků sér z ohniska od osob, které vytypovala voj. hyg. epid. služba. Ohnisko bylo ohraničeno počtem 36 osob. U všech určených byly v prvním vzorku séra určeny tyto znaky důležité pro VHA a VHB:

1. Přítomnost HBsAg-VHB
2. Patologie v jaterních testech
3. Přítomnost specifických IgM protilátek signalizujících akutní infekci VHA.

Vzorky od vytypovaných osob byly v průběhu 4-8 hodin od odběru krve transportovány vozidlem nebo letecky z Přerova do Českých Budějovic. Odběr žilní krve byl prováděn dle metodiky určené katedrou voj. epidemiologie VLA Hradec Králové v rámci studie HAVRIX. Šlo jednak o mražené sérum, eventuálně o chlazenou venózní krev.

Ad 1.

Přítomnost markeru pro VHB jsme testovali komerční soupravou firmy Sanofi-Pasteur Monolisa HBsAg standardním pracovním postupem.

Jedná se o soupravu na principu ELISA, doporučenou NRL pro virové hepatitidy. Souprava, kterou používáme od konce roku 1993, by měla bezpečně zachytit přítomnost HBsAg od množství 0,5 ng/ml.

V žádném z výše uvedeného množství sér nebyla zjištěna přítomnost HBsAg. Přítomnost HBsAg byla prokazována pouze při prvním sérologickém vyšetření každé vytipované osoby.

Takto byl vyšetřen i vzorek od akutně nemocného R. K.

Tabulka 1

Výskyt HBsAg u vytipovaných osob u VÚ 4055 Přerov

Počet vyšetřených osob	36 (+1)
HBsAg NEGATIVNÍ	36 (+1)
HBsAg POZITIVNÍ	0 (0)

Ad 2.

EMO laboratoře provedly screeningové vyšetření zvýšené hladiny jaterního enzymu GOT prostřednictvím komerční soupravy firmy ÚSOL Praha - Sevatest SGOT screening. Při tomto vyšetření byla zjištěna zvýšená hladina jaterní aminotransferázy ve 3 případech z celkového množství 137 dodaných vzorků sér. V prvním případě se jednalo o vzorek od akutně nemocného R. K., v dalších případech byla prokázána hepatopatie nejasné etiologie, bez vztahu k VHA. Screeningový nález byl ve všech případech potvrzen při podrobném biochemickém vyšetření jaterních testů, které pro potřeby VZÚ České Budějovice provedlo Oddělení klinických laboratorí a hematologie VN Č. Budějovice. Konkrétně u akutně nemocného, u něhož byl screening silně pozitivní, byla následující biochemie: AST 1,59...ALT 16,4.

Tabulka 2

SGOT screening u vyšetřovaných vzorků

Počet vyšetřených vzorků	137
Screening NEGATIVNÍ	134
Screening POZITIVNÍ	3

Ad 3.

Všechna dodaná séra, která byla v průběhu observace odebrána, byla vyšetřena na přítomnost specifických protilátek třídy IgM proti viru HAV. Z různých objektivních i subjektivních příčin byly jednotlivé osoby, respektive jejich séra, vyšetřena v různých časových intervalech 2krát až 6krát.

K tomuto vyšetření jsme použili soupravu Sevatest ELISA anti-HAV IgM Micro II. k detekci IgM protilátek k viru VHA od firmy ÚSOL Praha. Vyšetřování sér je založeno na principu ELISA.

Tato metoda využívá jamek stripové mikrotitrační destičky, na jejichž vnitřní povrch je navázána zvířecí protilátka proti lidskému IgM. Do jamek se aplikují v daných ředěních kontrolní a vyšetřované vzorky. Dojde tak ke specifickému zachytu lidských IgM, pokud jsou přítomny ve vzorku. Po promytí se aplikuje komerční HAV antigen, který se během inkubace naváže na přítomnou IgM specifickou protilátku, pokud ji vzorek obsahoval. Po dalším promytí se aplikuje peroxidázou značená lidská protilátka anti-HAV. Po následujícím promytí se provede detekce peroxidázové aktivity, která je úměrná množství přítomné protilátky. Detekce je založena na principu oxidace orto-fenylendiaminu kyslíkem, který je uvolněn účinkem peroxidázy z H_2O_2 obsažené v substrátovém roztoku. Intenzita oranžovohnědého zabarvení je přímo úměrná koncentraci specifické IgM protilátky ve vyšetřovaném vzorku.

Touto metodou a za použití uvedené soupravy lze získat výsledky do 48 hodin. Při provádění i vyhodnocování testu používáme dávkovací, promývací a vyhodnocovací systém od firmy Dynatech, zejména fotometr MR 5000 ve spojení s tiskárnou. Dle námi zadaného programu fotometr s počítačem automaticky vyhodnocuje absorbance pozitivních a negativních kontrolních vzorků, počítá jejich průměry, udává absorbance vyšetřovaných vzorků, stanovuje hraniční meze positivity a negativity. Naše konkrétní nálezy shrnuje tabulka 3.

Tabulka 3

Sevatest ELISA anti-HAV IgM

Počet vyšetřených vzorků	137
Anti-HAV IgM HRANIČNÍ	4
Anti-HAV IgM NEGATIVNÍ	132
Anti-HAV IgM POZITIVNÍ	1

Celkem bylo vyšetřeno 137 vzorků sér. Všechna séra z důvodu vyloučení laboratorní chyby byla vyšetřována ve dvou jamkách, byl počítán průměr absorbancí. Absorbance pozitivních kontrol se pohybovaly v průměru okolo 0,500-1,000 dle šarže soupravy, absorbance negativních kontrol byla v průměru 0,030-0,100.

Ve všech případech byla splněna numerická kritéria stanovená výrobcem pro platnost vyšetření. Hodnoty hraniční meze pro určení negativity a již positivity se pohybovaly v rozmezí 0,063-0,210. Pozitivní nález s průměrnou absorbancí 0,550 byl pouze ve vzorku séra od akutně nemocného.

Hraniční meze bylo téměř dosaženo ve 4 případech, z toho u jedné vyšetřované 2krát. Jednalo se o lékařku, které byl aplikován preparát Norga. Při vyšetření 13. 6. 1994 byl výsledek negativní, při odběrech 20. 6. a 18. 7. byl závěr z opakovaných testů těsně pod hranicí positivity, vyšetření z 26. 7. dalo již zcela negativní

výsledek. Lékařka byla celé období sledována jak klinicky, tak laboratorně. Mimo hraničního nálezu anti-HAV IgM žádné další abnormality nebyly zjištěny. Nabízí se vysvětlení, že snad šlo o pasivní přenos specifických protilátek z preparátu Norga. U dalších očkováných však tato skutečnost zjištěna nebyla.

Závěr

Pro sledování přítomnosti anti-HAV IgM protilátek v sérech osob v ohnisku VHA jsme použili domácí komerční soupravu. Žádný pozitivní nález (mimo akutně nemocného) jsme v ohnisku neprokázali. Nikdo z vytípaných osob ne onemocněl. Nadále při výskytu VHA ve vojenských kolektivech budeme sledovat markery HBsAg, patologické jaterní testy a hlavně přítomnost specifických anti-HAV IgM protilátek. Při diagnostice VHA je průkaz specifických protilátek anti-HAV metodou volby, protilátky vznikají prakticky u všech infikovaných, s ojedinělou výjimkou osob s deficitem tvorby protilátek. Protilátková aktivita je včasná a snad i dostatečně silná, takže průkaz anti-HAV protilátek je spolehlivým ukazatelem onemocnění i bezpříznakové infekce.

Vyšetření anti-HAV IgG po vakcinaci preparátem Havrix provedla NRL pro VH ve SZÚ Praha.

Souhrn

Laboratoře epidemiologicko-mikrobiologického oddělení Vojenského zdravotního ústavu České Budějovice postupně vyšetřily celkem 137 vzorků sér z ohniska virové hepatitidy A. Ohnisko bylo ohraničeno počtem 36 osob. U všech určených byly v prvním vzorku séra určeny tyto znaky: HBsAg-VHB, patologie v jaterních testech, IgM anti-HAV. Prováděná vyšetření neprokázala výskyt žádného případu, který by byl pozitivní.

Literatura

1. BENDA, R. et al.: Laboratorní diagnostika virových hepatitid. Praha. Avicenum 1989. 112 s.
2. MANČAL, P.: Využití dělených destiček (stripů) při provádění ELISA testů. Zprávy SEVAC, 1990, č. 3.
3. Sevatest ELISA souprava na detekci IgM protilátek k viru hepatitidy A Micro II.
4. Laboratorní knihy EMO

Klíčová slova: VHA; IgM anti-HAV; HBsAg; Sérologie; Diagnostika.

Do redakce došlo 1. 11. 1994