

Přínos zavedení stanovení protilátek proti virové hepatitidě E metodou ECLIA

■ **MVDr. Václav Fejt**, Oddělení společných laboratoří, Nemocnice Havlíčkův Brod

CHARAKTERISTIKA VIROVÉ HEPATITIDY E

Virová hepatitida E (VHE) se řadí do heterogenní, klinicky utvořené skupiny virových hepatitid A, B, C, D a E (VHA, VHB, VHC, VHD, VHE). Původci, navzájem nepříbuzné víry, mají společnou afinitu k jaterním buňkám, ve kterých se množí. Poškození jater jednak účinkem virů, jednak doprovodnou imunitní reakcí se projevuje uvolněním žlučových barviv do oběhu (navenek žloutenkou – žlutým zbarvením kůže a sklér, tmavou močí, světlou stolicí), nechutenstvím, nevolností, případně i zvracením, v biochemickém nálezu elevací jaterních enzymů. Anikterické formy (bez žloutenky) mohou unikat pozornosti klinika. Nebezpečná fulminantní forma končí jaterním selháním. VHB a VHC mohou přecházet do

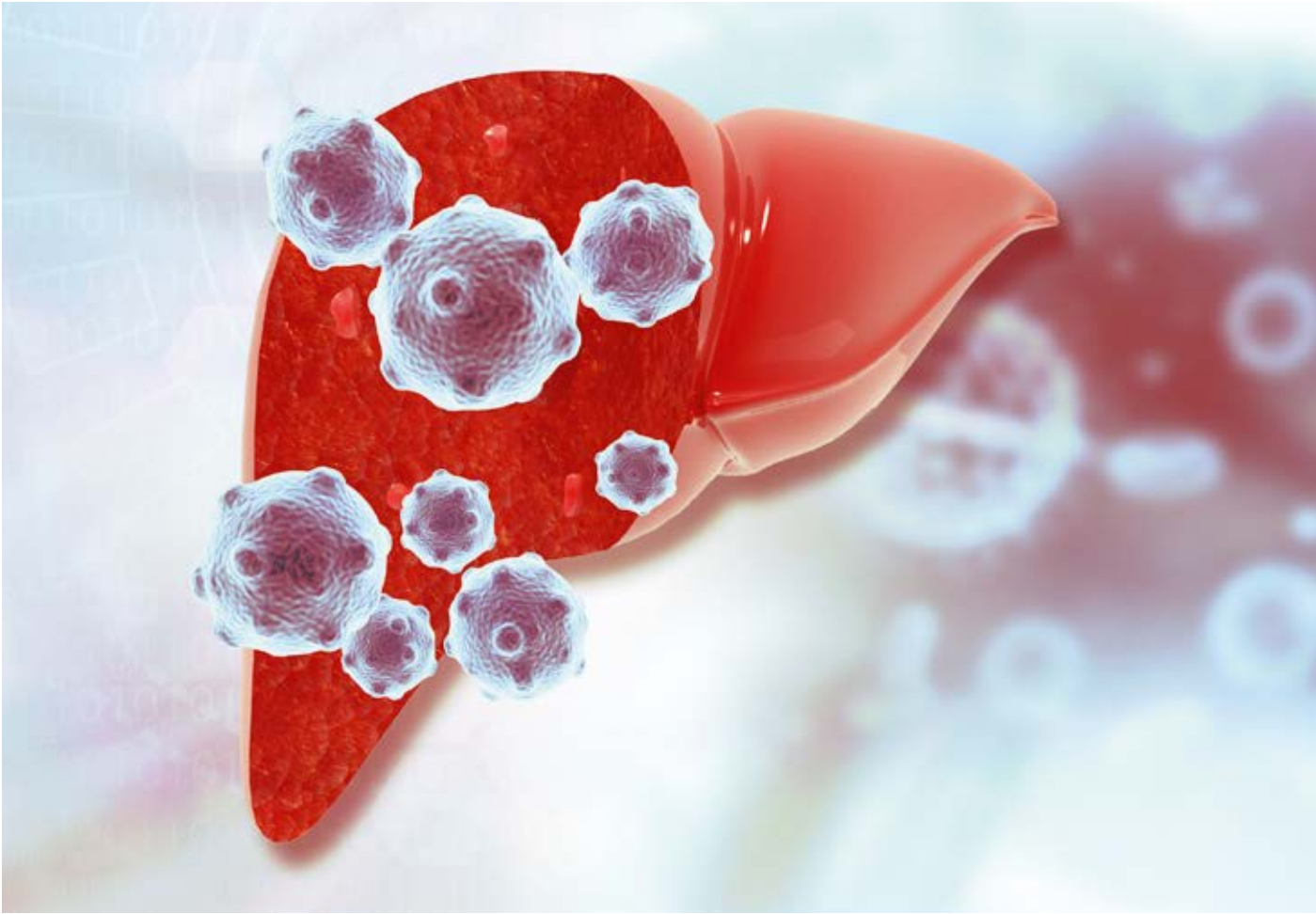
chronicity s nebezpečím jaterní cirhózy nebo karcinomů. VHA a VHB (a zprostředkovaně i VHD) jsou díky poznání biologie původce, dobrým diagnostickým nástrojům, epidemiologické práci a dostupné vakcinaci na ústupu. VHC dostupnou profylaxi nemá, ale v poslední době se dá dobře léčit a tlumení její incidence vyhledáváním chronicky nemocných je rovněž úspěšné. VHE se tak dostává do hledáčku jako aktuální problém.

BIOLOGIE VHE

Virus hepatitidy E (Hepatitis E virus, HEV) je malý neobalený virus. Rod Hepevirus je rozdělen do 7 genotypů a řady

podskupin, používaných v epidemiologických šetřeních. **Typ HEV-1** je rozšířený v endemických oblastech v Asii (Čína, Indie, Kyrgyzstán, Nepál, Pákistán, Thajsko, Uzbekistán) a severní Africe (Alžírsko, Maroko, Súdán, Tunis) a je příčinou popsáných epidemií šířených hlavně vodou. Zvláštností je vysoká úmrtnost nakažených gravidních žen.

Typ 2 je epidemiicky podobný typu 1, s výskytem v Mexiku a rovníkové Africe. **Typ 3** se vyskytuje po celém světě včetně Evropy a spolu s **typem 4** z Asie je zvláštní zoonotickým charakterem. Jde o jediný hepatitický virus s přenosem od zvířat. **Typy 5, 6 a 7** jsou zvířecí, bez většího významu pro člověka. V dalším textu se budeme zabývat u nás převažujícím typem **HEV-3**. VHA i VHE se



přenáší fekálně-orální cestou (kontaminovanými potravinami nebo vodou). U VHA je možný i přenos kontaktem, u onemocnění VHE je mezilidský přenos vzácný, převažuje zoonotický. Virus mohou hostit různé savčí druhy (kopytníci, hlodavci, šelmy), za nejvážnější zvířecí zdroj se považují divoká i domácí prasata, méně i jelenovití. Inkubační doba je 3–7 týdnů, v průměru 40 dní. V Evropě většinou postihuje muže ve věku nad 50 let. Imunosuprimovaní lidé mohou trpět chronickým průběhem VHE.

Na území ČR byla před rokem 2007 VHE vzácná a připisovala se spíše importovaným případům. Od té doby máme řadu zpráv o zvýšeném výskytu, epidemiických událostech a hlavně zvířecích zdrojích nákazy. Promoření chovů prasat v Evropě popisují různé zprávy mezi 20–60 %, u nás přesný recentní přehled nemáme. VHE není hlášením povinná, takže všechny epidemiologické údaje jsou do značné míry odhadem.

DIAGNOSTIKA

Nepřímá diagnostika VHE užívá detekci anti-HEV IgG a IgM v séru, metodiky jsou enzymový imunisorpční test (ELISA), imunoblot a elektrochemiluminiscenční test (ECLIA). Přímá diagnostika detekuje RNA viru pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Indikace vyšetření virových hepatitid je **1)** pro klinickou suspekci a kontakty; **2)** před potenciálně hepatotoxickou léčbou; **3)** jako předoperační vyšetření (krví přenosné nemoci). Pro VHE platí první dva body.

PROBLEMATIKA NOVĚ ZAVÁDĚNÉHO SÉROLOGICKÉHO VYŠETŘENÍ

Laboratoř zavádějící nové sérologické vyšetření se řídí především poptávkou po takové službě. Indukující lékař by měl mít jasně formulovanou otázku, jejíž odpověď následně ovlivní jeho další konání (diagnostické, terapeutické, epidemiologické).

Pokud je nové vyšetření obecně přínosné, a tudíž žádané, musí laboratoř zvolit i vhodnou metodu a dodavatele diagnostiky. V případě dobře zaběhlých analytů je to snadné. Lze si projít hojnou nabídku, zkušenosti dalších pracovišť, doporučení předních odborníků (např. národních referenčních laboratoří, NRL), výsledky externího hodnocení kvality (EHK) a podobně. Jsou však infekční choroby, jejichž markery nejsou ustálené, nabízená diagnostika má proměnlivou citlivost i specifickou, výrobci se liší mezi sebou a standardizace chybí. Certifikace souprav má na tento problém malý dopad. Laboratoř se v tom případě orientuje podle těchto kritérií:

- deklarovaná specifická a citlivost metod (může se lišit od reálné);
- technická a organizační náročnost (ruční metody vs. automaty, stávající přístrojové vybavení vs. nutnost nového přístroje atd.);
- pohotovost v provozu, doba odezvy (možnost testování po vzorcích, nikoli v sériích);
- cena.

Vytípané soupravy si potom musí laboratoř sama vyzkoušet, případně na vytvořeném panelu porovnat různé soupravy mezi sebou. A to vše v limitovaných podmínkách omezených finančních zdrojů, v závislosti na indikujících lékařích a v daných pracovních a přístrojových podmínkách laboratoře. Žádoucí je, aby metody používané v kombinaci jako vyhledávací, byly velmi citlivé a jejich konfirmace byly stavěny na specifickou. Právě v takové situaci jsme se nacházeli před zavedením stanovení protilátek proti VHE na systému **cobas®** metodou ECLIA (Elecsys).

HISTORIE DIAGNOSTIKY VHE NA SLEDOVANÉM PRACOVIŠTI

Protilátky anti-VHE IgG + IgM stanovujeme od roku 2006. Před tímto rokem jsme vzorky posílali do specializovaných pracovišť. Do roku 2016 jsme pracovali s ojedinelými vzorky, pak počty začaly růst, pravděpodobně s tím, jak rostlo povědomí o celé problematice. (Tab. 1)

Jednotkovou kvantitu vzorků jsme řešili pomocí imunoblotů. Srovnáním nevelké nabídky jsme vybrali dobře použitelné, ale poměrně drahé soupravy. Sporné případy jsme konfirmovali zasláním do NRL. Ani v těchto podmínkách stanovení anti-HEV nebylo luxusem, hned na začátku jsme zachytili fulminantní průběh VHE.

Rok	Počet vzorků
2016	11
2017	125
2018	134
2019	163
2020	178
2021	186
2022	201
2023	222

Tab. 1: Nárůst počtu vzorků, tj. suspektních případů VHE

S rostoucími počty jsme kvůli úspoře nákladů zavedli metody (ELISA) IgG + IgM a bloty používali dále ke konfirmaci. Citlivost metody ELISA se ukázala dosti slabá, u vážných suspekci jsme zařazovali imunoblot už od indexu pozitivitu 0,6 (šedá zóna dle výrobce 0,9–1,1) a často i u nich bloty zachycovaly pozitivitu, kterou jsme čekali podle epidemiologických, biochemických a klinických údajů. Sporné vzorky putovaly do NRL. Opakovaná komunikace s klinikem byla naprostou nutností. Pracnost opakovaných testů, vyšetřování párových vzorků a došetřování imunoblotem ukrajovaly z našich kapacit neúměrnou část.

V této situaci jsme rádi přijali nabídku stanovení na automatickém analyzátoru **cobas®** 6000, modul **e** 601.

Index pozitivitý				Počet proužků			
Proband	ECLIA	ECLIA	ELISA	ELISA	blot	blot	Klinický závěr
	IgG	IgG	IgG	IgG	IgG	IgG	IgG
Ho51	8,13	0,347	0,895 (*)	0,088	3	0	anamnest. VHE
Ko73	4,05	4,68	2,977	7,978	5	6	akutní VHE
St52	6,88	0,233	nt	nt	2	0	anamnest. VHE
Al61	25	0,232	1,8	neg	2	0	anamnest. VHE
Al52	15,43	0,203	1,04 (*)	neg	2	0	anamnest. VHE
Ko65	13,61	0,501	1,074	neg	2	0	anamnest. VHE
Ku48	1,03	0,168	neg	neg	nt	nt	toxická léze + susp. anamnest. VHE
Er75	0,05	0,207	neg	neg	nt	nt	VHB
Ma78	0,05	0,215	neg	neg	nt	nt	VHC
Ka73	0,05	0,143	neg	neg	nt	nt	EBV

(*) IP v šedé zóně

Tab. 2: Srovnání souprav

POČÁTEČNÍ SROVNÁNÍ SOUPRAV

Na malém panelu shromážděných vzorků jsme provedli srovnání metod. Všechny vzorky jevíly jaterní lézi, tři z nich neměly spojitost s VHE. V Tab. 2 jsou uvedeny hodnoty indexu pozitivitý (IP), v blotu pak počet reagujících antigenních proužků. Z jednoduchého srovnání vycházela nová metoda jako citlivější než dosavadní ELISA. Ve vzorku Ku48 (s toxickou jaterní lézí) zachytila přítomnost IgG, na blot se nedostávalo séra. Oproti tomu v metodě ELISA hraniční hodnoty vzorků Ho51 a Al52, potvrzené blotem jako specificky reaktivní, **cobas®** (ECLIA) jasně zachytil. Akutní VHE byla zachycena všemi metodami. Soupravu jsme zařadili do rutiny s tím, že všechny reaktivity budeme po schválení klinikem konfirmovat blotem.

ZKUŠENOSTI (PRVNÍ PŮLROK S NOVOU METODOU)

Sledovaným obdobím byl leden–červen 2024. Jednalo se o celkem 219 vzorků. V nich bylo 117 mužů s věkovým

průměrem 48,5 (9–88) a 103 žen (50,8 let, 6–86). Nejčastější diagnózy byly K769 (42x), A499 (13x), K760 (12x), K30 (10x), ostatní dg. byly v jednotkových počtech.

K769	Nemoc jater, NS
A499	Bakteriální infekce, NS
K760	Ztučnění (steatóza) jater nezařazené jinde
K30	Funkční dyspepsie

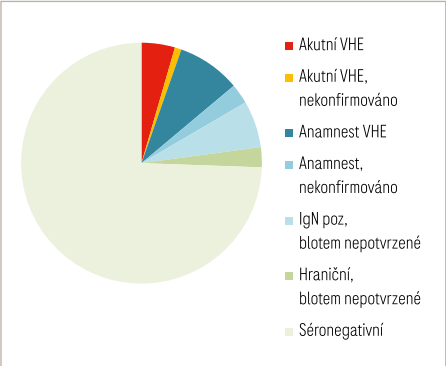
Tab. 3: Vybrané kódy dle Mezinárodní klasifikace nemocí

- Z těchto vzorků:
- 166 vzorků bylo negativních, z hlediska kliniků nebylo nutno ověřovat blotem.
 - 6 vzorků bylo reaktivních IgG, uzavřeno klinikem jako anamnestický nále z bez nutnosti došetření.
 - 2 vzorky pozitivní v obou třídách, jasné epidemiologicky (nebyly konfirmovány z důvodu společného zdroje viru, ověřeno u dalších členů rodiny).
 - 45 bylo ověřeno blotem:
 - akutní VHE byla v 10 případech (6 ověřeno přímým průkazem);
 - anamnestický nále z, shodně určený ECLIA i blotem byl u 19 vzorků;

Kategorie	Počet
Akutní VHE	10
Akutní VHE, nekonfirmováno	2
Anamnestická pozitivita VHE	19
Anamnest., nekonfirmováno	6
IgG pozit., blotem nepotvrzené	14
Hraniční, blotem nepotvrzené	6
Séronegativní	166

Tab. 4: Přehled nále zů ve vzorcích

Graf 1: Přehled nále zů ve vzorcích



- pozitivita IgG v ECLIA, blotem nepotvrzená ve 14 vzorcích;
- hraniční nále zy IgG/IgM, v blotu hraniční nebo negativní v 6 vzorcích.

DISKUSE

Z celkových počtů vyplývá, že při souběhu osvěty a lepší dostupnosti testů (na stejné žádance je anti-HEV s markery ostatních hepatitid, s krátkou dobou odezvy) se počty vzorků zdvojnásobily. Zároveň zachycujeme séropozitivitu jak u suspekci a kontaktů, tak i náhodné záchyty anamnestických stavů. Tím se nám blíží bod, kdy budeme kromě dobře provedené diagnostiky jednotlivých pacientů moci získat přehled o incidenci v populaci, a to včetně bezpříznakových průběhů. Dosavadní zprávy (viz zprávy CEM a další literatura) vesměs hovoří o nejasné situaci, podhlášenosti a poddiagnostikovanosti VHE, která navíc není dosud hlášením povinná. Ukazuje se, že zaváděná souprava je nejen dobře citlivá pro zachycení všech suspekci, ale zároveň je i v dobrém souladu se specifícností konfirmačního blotu. Akutní infekce se dobře potvrzovaly přímým průkazem v PCR. V dalším

období se zřejmě spolehne me na závěr metody ECLIA, s konfirmací jenom vybraných případů (výslovné přání klinika, hraniční nále zy, vyšetření párových sér nejasných trvajících lézí apod). Velkou výhodou je výborná pohotovost metody, což plyne z použití automatického analyzátoru.

ZÁVĚR

Nově zavedená souprava anti-HEV IgG + IgM na systému **cobas®** je krokem k výraznému zlepšení diagnostiky VHE na našem pracovišti. Nový způsob stanovení je v provozu rychlejší a pohotovější, jako vyhledávací test je citlivější než dosavadní ELISA a specifícností se blíží konfirmačnímu blotu.

Reference:

- Příkazská, Beneš: Virová hepatitida E v ČR (Zprávy CEM; SZÚ, Praha) 2015; 24(2), https://szu.cz/wp-content/uploads/2023/02/2015_vir_hep_E.pdf
- <https://szu.cz/temata-zdravi-a-bezpecnosti/a-z-infekce/h/virove-hepatitidy-infekcni/hepatitida-e/zakladni-informace/>
- Beneš J. a kol: Infekční lékařství
- <https://www.ecdc.europa.eu/en/hepatitis-e/facts>

Zkratky

VHA, HAV – Virová hepatitida A, virus hepatitidy A
VHB, HBV – Virová hepatitida B, virus hepatitidy B
VHC, HCV – Virová hepatitida C, virus hepatitidy C
VHD, HDV – Virová hepatitida D, virus hepatitidy D
VHE, HEV – Virová hepatitida E, virus hepatitidy E
IgG, IgM – Imunoglobulin G, imunoglobulin M
IP – Index pozitivitý (hodnota vzorku/hodnota hraniční kontroly)
ECLIA – Elektrochemiluminiscenční test
ELISA – Enzymový imunosorpční test
PCR – Polymerázová řetězová reakce
SZÚ – Státní zdravotní ústav
CEM – Centrum epidemiologie a mikrobiologie
NRL – Národní referenční laboratoř
EHK – Systém externího hodnocení kvality
NT – Netestováno



MVDr. Václav Fejt

Je absolventem Vysoké školy veterinární v Košicích, pracuje od roku 1993 v laboratoři imunologie a sérologie na Oddělení společných laboratoří Nemocnice Havlíčkův Brod. Zabývá se infekční sérologií, imunologií a likvorovou diagnostikou. Je členem Laboratorní sekce České společnosti alergologie a klinické imunologie a Sdružení mikrobiologů, imunologů a statistiků. Svůj honorář věnuje na opravu kostela sv. Kateřiny v Havlíčkově Brodě.



Následující přístroje jsou zdravotnickými prostředky *in vitro*. Jsou určeny pouze k použití laboratorními profesionály vyškolenými v laboratorní technice a instruovanými v používání systému. Více informací najdete na go.roche.com/Navody Reagenční souprava **Elecsys® Anti-HEV IgM** je diagnostický zdravotnický prostředek *in vitro*. Test je určen pro imunochemickou kvalitativní detekci IgM protilátek proti viru hepatitidy E (hepatitis E virus: HEV) v lidském séru a plazmě. Stanovení Elecsys Anti-HEV IgM se používá jako pomůcka při detekci akutní nebo nedávno získané infekce HEV. Elektrochemiluminiscenční imunostanovení „ECLIA“ je určeno pro použití na analyzátozech imunostanovení **cobas®e**.

Reagenční souprava **Elecsys® Anti-HEV IgG** je diagnostický zdravotnický prostředek *in vitro*. Test je určen pro imunochemické kvantitativní stanovení IgG protilátek proti viru hepatitidy E (hepatitis E virus: HEV) v lidském séru a plazmě. Stanovení Elecsys Anti-HEV IgG se používá jako pomůcka při detekci nedávné nebo prodělané infekce HEV. Elektrochemiluminiscenční imunostanovení „ECLIA“ je určeno pro použití na analyzátozech imunostanovení **cobas®e**.

Systém **cobas® 6000 analyzer series** je plně automatizovaný, počítačem řízený diagnostický zdravotnický prostředek *in vitro* určený ke kvantitativním a kvalitativním stanovením široké škály biochemických, imunochemických a ionselektivních parametrů v různých biologických kapalinách, např. v séru, plazmě, moči, mozkomíšním moku, plné krvi, slinách aj. Systém je vytvořen modulárně použitím modulů **cobas® c 501** společně s **cobas® e 601**. K analýze uvedených typů vzorků využívá systém **cobas® 6000 analyzer series** potenciometrii pro stanovení elektrolytů (Na+, CL-, K+) na jednotce ISE, fotometrii na modulu **cobas® c 501** a technologii elektrochemiluminiscence na imunochemickém modulu **cobas® e 601**. Systém **cobas® 6000** může být provozován vyškolenou obsluhou v klinických laboratořích.