

616.15—078.73[544.83]

ZKUŠENOSTI S MIKROTECHNIKOU V SÉROLOGICKÉ DIAGNOSTICE

MUDr. Vladimír ZAVÁZAL, Jana BLOSOVÁ, pplk. MUDr. Jaromír BRUJ
z Ústavu pro mikrobiologii a epidemiologii lékařské fakulty Karlovy university v Plzni,
z Alergologické stanice fakultní nemocnice v Plzni a z Hygienicko-epidemiologického
oddílu v Plzni

Přesto, že se sérologických vyšetřovacích metod od minulého století používá stále více, technika práce se u běžně prováděných reakcí téměř nezměnila. Rozvoj metod se zaměřil spíše na zavádění nových, citlivých metod, na průkazy neúplných protilátek, precipitinů, použití korpulárních nosičů antigenu, precipitace v gelech a imunoelktroforézu. Na druhé straně se klasické sérologické reakce ve většině laboratoří provádějí bez ohledu na spotřebu reagensů i čas pracovníků. Značný přínos v zavádění nových metodik v sérologii náleží virologům. Pro svou práci s mnoha antigeny současně potřebovali metodu jednoduchou, rychlou, která by rovněž snížila spotřebu často nedostatkových antigenů. Reakce prováděné na deskách se tedy staly předchůdci nové techniky. Urychlení práce, které je současně se zvýšením bezpečnosti zajištěno poloautomatickými pipetami, umožňuje podle našich zkušeností zvýšit maximální počet vyšetření až o $\frac{1}{3}$ denně. Neodstraňuje však všechny nevýhody práce se zkumavkami a složitou přípravu laboratorního skla, které je navíc často velmi nejednotné. V roce 1950 sestrojil v Maďarsku Takátsy soupravu pro usnadnění práce s mikrovolumy a nazval ji mikrotitrátor. Použil místo ředících pipet zvláštních klíčků, místo zkumavek plexiskla s jamkami a k přenášení tekutiny zvláštních kalibrovaných pipet. Aparát se v Maďarsku velmi osvědčil, a byl proto zařazen i do výroby (1). Jeho přednosti byly potvrzeny pak celou řadou zkušeností, zvláště ve virologické sérologii. Další zdokonalení bylo provedeno ve Spojených státech, kde činnost mikrotitrátoru prověřil Šever (2). Maďarská souprava byla v posledních letech dovážena i k nám, avšak zatím nebyly publikovány v našem písemnictví zkušenosti s tímto titračním zařízením. Dovolujeme si proto sdělit své zkušenosti po několikátém vyzkoušení aparátu v běžné sérologické diagnostice.

Celá souprava se skládá z několika součástí uložených v dřevěné krabici. Ředící klíčky jsou vyrobeny z materiálu odolného k teplu — spirálového drátu, který povrchovým napětím po namočení do kapaliny umožňuje standardní náběh. 12 klíčků je určeno pro přenos 0,05 ml, 24 klíčků přenáší 0,025 ml tekutiny. Výrobce je garantována u obou typů klíčků maximální chyba $\pm 3\%$. Titrování se děje přenášením kapaliny klíčkovou z jednoho otvoru do druhého s pravidelným promícháním. Klíčky jsou dříve zúženy, takže je možno titrovat současně 6—8 sér. Údržba klíčků je v návodu doporučena pouhým vypálením.

Desky z plexiskla nahrazují zkumavky, 12 desek se 72 otvory tedy nahrazuje 864 zkumavky. Otvory jsou 6 mm široké se dnem kuželovitým, umožňujícím snazší odečítání zvláště u aglutinace. Pracovní objem činí 0,075 — 0,125 ml a umožňuje tak provedení prakticky všech reakcí. Další součástí je 6 skleněných pipet a 12 kovových násadců, zamontovaných do plexiskla, kterými lze kapáním rozplňovat tekutinu po 0,025 ml v jedné kapce.

K přístroji je přiložen návod, podle něhož jsme se snažili zpočátku postupovat. Prvé naše zkušenosti byly velmi špatné. I když jsme zachovávali přesně postup podle návodu, nepodařilo se nám nikdy přenést klíčkami příslušné množství kapaliny, takže pozitivní reakce u známých pozitivních sér byly pozorovány maximálně ve dvou až třech ředěních, i když v kontrolní řadě normální technikou došlo k reakci až do vysokých titrů. Určitého zlepšení jsme dosáhli až po použití postupu navrženého Ševerem (2). Shodně s ním jsme totiž pozorovali, že klíčky čerstvě vypálené přenášejí kapaliny více než klíčky vypálené např. minulého dne. Užívali jsme řadu způsobů k sledování množství přenášené kapaliny, zvláště přenášení barevných tekutin a srovnání s barvou v řadě připravené naprosto přesnou titrací ve velkém množství. Nejlépe z těchto kontrolních metod se nám osvědčilo odsávání tekutiny z klíčky filtračním papírem stejné kvality (Whatman 3). Malé klíčky pro 0,025 ml tekutiny měly vytvořit na papíru kruh o průměru asi 1,6 cm. Klíčky však přenášely kapaliny mnohem méně a navíc velmi nepravidelně, zvláště když od vypálení uplynulo několik hodin. Nejlépe pracovaly těsně po odsátí filtračním papírem (2). Tímto postupem jsme dosáhli pravidelnosti v přenášeném množství a shody s kontrolní kapkou. U velkých klíčků pak průměry odsátí na filtračním papíru dosahovaly asi 2 cm jako 2 kapky kalibrovaným kapátkem. Uvedenou technikou jsme pak provedli řadu paralelních testů pro kontrolu postupu ředění a ověřili jsme si dostatečnou přesnost, odpovídající prakticky běžné titrační technice pipetami. Mezi výsledky obou způsobů vyšetření jsme našli velmi dobrou korelaci jak v titraci ASLO, tak i v určování CRP a později i při jiných metodách v běžné práci. Zjistíme-li závady při odsávání klíčky, opakujeme vyšetření. Je-li zpracováváno jen málo vzorků, lze titrovat současně každé sérum ve dvou řadách a při výsledku hodnotit dosažený vyšší titer, neboť chyba v přenosu při správné technice může spočívat jen v přenosu menšího objemu.

Tabuka 1

Antigen Az Singapore/57

| Titř zkumav- kové reakce | Titř v mikrometodě | | | | | | | Cel- kem |
|--------------------------------|--------------------|----|----|----|----|-----|-----|-------------|
| | <8 | 8 | 16 | 32 | 64 | 128 | 256 | |
| <8 | 35 | 12 | — | — | — | — | — | 47 |
| 8 | 3 | 35 | — | — | — | — | — | 38 |
| 16 | — | 16 | 6 | — | — | — | — | 22 |
| 32 | — | — | 4 | 3 | — | — | — | 7 |
| 64 | — | — | — | 1 | 1 | 2 | — | 4 |
| 128 | — | — | — | — | 2 | 1 | — | 3 |
| 256 | — | 1 | — | — | 1 | 1 | 2 | 5 |
| Celkem | 38 | 64 | 10 | 4 | 4 | 4 | 2 | 126 |

Výsledky srovnání standardní metody s mikrometodou v hemaglutinačně inhibičním testu. Z tabulky vyplývá shoda výsledků s výjimkou ojedinělých případů, kdy klíčka přenesla méně tekutiny. Tuto závadu lze odstranit kontrolou klíček odsáváním po každém ukončení ředění sér.

Současně prováděno vyšetření ještě s antigeny B1, B Lee, D Sendai, C Bratislava. Výsledky obdobné.

V tabulce uvádíme výsledky získané standardní metodou na celkový objem 0,8 ml a mikrometodou v hemaglutinačně inhibičním testu. Výsledky byly vcelku shodné, i když titry získané mikrometodou jsou v průměru poněkud nižší. V tomto pokuse bylo použito klíček, které byly již delší dobu v provozu a jejich funkce nebyla kontrolována odsáváním. Klíčky je nutno po použití ihned odsát filtračním papírem a uložit do lázně s destilovanou vodou. Přenáší-li se materiál infekční, doporučuje Sever (2) jejich ponoření do 0,5% roztoku hypochloritu sodného alespoň na 1 minutu, pak znovu odsátí filtračním papírem, na 1 min. ponoření do destilované vody, odsátí, vypálení a uložení. Ani čištění desek z plexitu nelze jen jednoduše omezit na vypláchnutí a usušení v termostatu. Pozorovali jsme na špatně umytých deskách nepříznivý vliv především tam, kde indikátorem reakce byla hemolýza. Při hemaglutinaci může nedostatečné odstranění saponátu samo způsobit aglutinaci krvinek. Proto doporučujeme postupovat podobně jako u klíček: 30 minut 0,5% hypochlorit sodný, pak důkladně opláchnutí pod proudící vodou, 30 minut ponoření do roztoku saponátu, pak opakovaně aspoň 3krát vymytí jemným kartáčkem a saponátem, pak 3krát kartáčkem s teplou vodou a 3krát mytí kartáčkem v destilované vodě, opláchnutí destilovanou vodou a nakonec usušení při 50° C. Občas je vhodné ponechat desky v 0,5% HCL přes noc, nebo v 1% HCL 10 minut. Stejným způsobem je třeba mýt pipety a násadce a podle možnosti jich používat vždy pro určitý druh přenášené látky.

Inkubační doba je při uvedené technice zpravidla kratší než při použití zkumavek. Osvědčilo se nám v některých případech pro lepší odlišení pozitivních výsledků použít centrifugace při minimálních otáčkách po dobu 1—3 minut, které stačí pro vytvoření typického obrazu na dně a projasnění tekutiny. Je však nutno si vyrobit vhodný závěs do centrifugy.

Po získání základních zkušeností v technice práce s mikrotitrátorem jsme provedli pokus o vypracování pracovních postupů pro nejběžnější sérologické reakce, kde by bylo možno využít všech uvedených výhod.

Widalova reakce může být prováděna po 0,025 i 0,05 ml obou složek. Ředění sér i ostatní postup lze volit stejný jako v klasické reakci, inkubace trvá 1 hodinu v termostatu 37° C a přes noc v chladničce. Centrifugací po 30 minutách od začátku inkubace při 37° C bylo možno dosáhnout ihned konečného výsledku, shodného se standardní metodou.

Latexová aglutinace s gamaglobulinem pro diagnostiku progresivní artritidy je rovněž dobře proveditelná. Je však třeba použít hustší suspenze latexových částic (10krát) a gamaglobulin ředěný 1 : 10. Po inkubaci 2 hodiny v termostatu při 37° C je možno již test makroskopicky odečíst. V pozitivním případě dojde k rychlejší sedimentaci a k vytvoření nepravidelného sedimentu. Reakci je možno zcitlivit centrifugací při maximálně 1000 obr./min. po dobu 3 minut.

Koloidová aglutinace s gamaglobulinem rovněž vyžaduje hustší suspenzi částic. Osvědčila se nám 20krát hustší suspenze než ve zkumavkovém pokusu, gamaglobulin ředěný 1 : 10. Desky po hodinové inkubaci při pokojové teplotě je třeba centrifugovat při nízkých otáčkách (maximálně 1000 obr./min.) po dobu 3 minut. Pro pozitivní nález je charakteristický hrubý shluknutý sediment, při negativním zůstává zákal.

Titrace hyaluronidázy a antihyaluronidázy testem MCP je mikrometodou dobře proveditelná. Změnili jsme kvantitativní poměry v pokuse jen v tom smyslu, že místo 0,05 ml séra užíváme jen 0,025 ml. Výsledky jsou sice v průměru o 1 ředění nižší, ale tato změna podmiňuje provedení testu, kde reagující složky naplňují objem pracovního prostoru. Inkubace obou částí pokusu je 20 minut v termostatu při 37° C, inkubaci v chladničce je třeba zkrátit, aby nedošlo k zmrznutí malých množství tekutin. Pro lepší znázornění výsledků stačí ochlazení na 3 minuty ve zmrazovací lednici při — 20° C nebo na 5 minut v chladničce.

Velmi dobré využití zařízení je u hemaglutinačních metod, kde pozitivní a negativní výsledky lze již za velmi krátkou dobu dobře odlišit.

Paulova-Bunnelova reakce se kvantitativně ani způsobem inkubace neliší od poměrů v zkumavkové aglutinaci. Pozitivní reakce je charakteristická širokým hrubým sedimentem, negativní tečkovitým sedimentem v centru, který při naklonění stéká.

C-reaktivní protein, určený hemaglutinací s C-polysacharidem maďarské výroby, je jednou z nejvhodnějších metod pro mikrotitraci. Lze použít jak množství po 0,025 ml, tak i po 0,05 ml obou složek, inkubace se však zkracuje na 1 hodinu v termostatu, místo 24 hodin při zkumavkové metodě. Odečítání je stejné jako u ostatních hemaglutinací.

Hemaglutinačně inhibiční test: titraci virů doporučujeme provést obvyklou metodou ve zkumavkách (3). Při vlastním pokusu pipetujeme po 0,025 ml séra, jednu kapku 4 jednotek viru a po 15 minutách, při pokojové teplotě nebo v chladničce, přidáme 2 kapky 0,5% krvinek a inkubujeme 30 minut při pokojové teplotě, nebo 60 minut v chladničce. Dáváme přednost ledničkové metodě, protože výsledky jsou lépe hodnotitelné. Odečítáme na bílém podkladu. Inkubace přes noc (2) není nutná, protože již neovlivňuje výsledek. Pro krátkou dobu inkubace není nutné krytí desek, aby se zabránilo odpařování (2).

Krevní skupiny včetně určování Rh faktoru jsou velmi dobře proveditelné, a to i bez centrifugace.

Rovněž reakce založené na lýze červených krvinek lze aplikovat na tuto techniku. Antistreptolysin-O je v mikrotitrátoru určován ve stejných vzájemných poměrech jako ve zkumavkové metodě, rovněž doby inkubace nebylo nutno měnit. Pokus je odečítán za 1 hodinu při 37° C a 1 hodinu při pokojové teplotě.

Deviaci komplementu lze rovněž zjednodušit v technice provedení. Zde však doporučujeme využít tohoto aparátu jen pro reakce kvantitativní, neboť při práci s jedním ředěním séra nejsou přednosti nové techniky dostatečně využity.

Je samozřejmé, že řada dalších sérologických metod i některé metody prováděné v biochemických laboratořích a založené na flokulaci jsou vhodné pro uvedenou techniku. Výhody celého postupu jsou značné. Mikrotitrátor umožňuje vyšetření mnohem většího počtu vzorků, než běžnou technikou. V řadě metod zkracuje inkubační

dobu, výsledky lze odečítat s větším přehledem a je možno lépe srovnávat reakce v jednotlivých sérech. Důležitou předností je 4krát—10krát menší spotřeba reagensů. Jednou z nejcennějších výhod je však výrazné omezení laboratorního skla pro sérologii — pipet a zkumavek — včetně jeho mytí, které v rutinních laboratořích značně zaměstnává myčku skla.

Přístroji lze však vytknout i určité nedostatky, které mohl výrobce či dodavatel jistě odstranit. Kličky totiž nejsou vyrobeny z dostatečně kvalitního drátu, takže po delším použití ztrácejí přesnost v kalibraci. Též uchycení drátu v držátku často není pevné a vede k chybné funkci. Proto by bylo vhodné zajistit dovoz rezervních kliček.

Vzhledem k tomu, že mikrotitrátor při svých výhodách vcelku nahrazuje podle naší zkušenosti klasickou sérologickou titrační techniku, doporučujeme všem pracovištím, aby využila výhod tohoto maďarského přístroje. Uvedená mechanizace práce jistě na mnoha pracovištích může zlepšit nedostatky v personálním vybavení a zvýšit bezpečnost práce. Případné použití přístroje v polních podmínkách vzhledem k výše uvedeným výhodám je jasné.

Souhrn

Autoři popisují své zkušenosti se soupravou mikrotitrátoru maďarské výroby v sérologické práci. Podle výsledků paralelního vyšetření tento přístroj prakticky nahrazuje běžnou sérologickou techniku a umožňuje zrychlení a zlevnění pracovního procesu. V práci je třeba zachovávat určitý postup, kterým autoři doplňují návod výrobního podniku.

Literatura

1. Tatátsy, G.: Návod k přístroji Mikrotitrátor fy. Laboratoriumi Felszereselek Gyára, Budapešť.
2. Sever J. L.: Application of a microtechnique to viral serological Felszerilesek Gyára, Budapest.
3. Raška a kol.: Mikrobiologické vyšetřovací metody 1958, str. 98—102.