

576.851.252.095[:612.014.445].095.87

FLUORESCENCE STAFYLOKOKŮ A NĚKTERÉ METODY JEJÍHO ODSTRANĚNÍ

Podplukovník inž. Otakar PROCHÁZKA, CSc.

Vojenský ústav hygieny, epidemiologie a mikrobiologie v Praze

Metoda fluorescentních protilátek, popsaná poprvé Coonsem a spol. (1942) a později dalšími autory zdokonalená a použitá při řešení imunologických, imunochemických a diagnostických otázek, nalezla rozšíření pouze v relativně vysoko odborně a přístrojově vybavených laboratořích. Širokému použití metodiky fluorescentních protilátek (FA) brání některá, dosud nezvládnutá úskalí, jejichž podstata není ještě dobře známa. Jednou z takových překážek, které se stavějí do cesty použití FA v diagnostice mikrobiálních, riketsiálních a virových nákaz, je nespecifická fluorescence tkání a fluorescence některých bakteriálních druhů s konjugáty FA. V diagnostice bakteriálních nákaz metodou FA se ukázalo, že mnohé kmeny stafyloko-

ků, převážně koaguláza-pozitivních, fluoreskují s většinou preparátů FA.

Zprávu o fluorescenci stafylokoků s konjugáty normálních králičích sér podali Wolfe a Cameron (1959), Pittman a Moody (1960) a Cohen, Cowart a Cherry (1961). Dokonce i konjugáty sér zvířat, odchovávaných za sterilních podmínek, fluoreskovaly s některými kmeny stafylokoků (Cohen, Newton, Cherry a Updyke 1963). Většina z těchto autorů uzavřela svoje práce vyslovením názoru, podepřeného aglutinačním a precipitačním průkazem protilátek proti stafylokokům v sérech normálních nebo sterilně odchovávaných zvířat, že za fluorescenci stafylokoků jsou odpovědny právě tyto protilátky. Je to názor stojící na bázi specifické reakce mezi buňkou stafy-

lokoka a preparátem FA, který obsahuje zkonjugované protilátky proti stafylokokům.

Jiný směr, zastávaný Komninosem a Tompkinsem (1963) nebo Lindovou, Reynovou a Birch-Andersenem (1964), hovoří o fluorescenci stafylokoků jako o nespecifické fluorescenci, tedy jako o jevu, při němž se uplatňují převážně jiné mechanismy než specifická reakce antigenu s protilátkou.

Proti tvrzení autorů, zastávajících názor na specifickou fluorescenci stafylokoků s příslušnými protilátkami obsaženými v preparátech FA, stojí několik závažných fakt. Jde hlavně o to, že séra, z nichž byly připraveny FA, mají relativně nízký titer antistafylokokových protilátek (prokázány aglutinačně a precipitačně) a naopak „staining titre“ těchto FA je vysoký a přesahuje titer skutečně prokázaných protilátek. Dále stojí proti tomuto názoru i zjištění, že z preparátů FA nelze antistafylokokové protilátky (jejich konjugáty) odstranit vysycením suspenzí příslušného kmene stafylokoků (formolizovanou nebo živou), který je použit pro vlastní studium fluorescence. Konečně proti myšlence specifické fluorescence stafylokoků směřuje i Hirschův (1964) nález termolabilního faktoru v čerstvém séru morčete, který je schopen vázat se na buňky stafylokoků. Tento termolabilní faktor není protilátka (termolabilita) ani komplement (nevyžaduje přítomnost dvouvalentních iontů).

Názor hájící nespecifický charakter fluorescence stafylokoků s FA má jednu základní slabinu a tou je skutečná přítomnost antistafylokokových protilátek v preparátech FA.

V naší práci (Franěk, Procházka 1965, Procházka 1965a, Procházka 1965b, Procházka, Kotýnek 1965) jsme se snažili odpovědět alespoň částečně na otázku, zda je možno fluorescenci stafylokoků úplně odstranit nebo alespoň snížit do té míry, aby při diagnostickém použití FA nedocházelo ke klamným pozitivním nálezům. Kromě toho jsme se pokusili osvětlit i charakter fluorescence stafylokoků (specifická nebo nespecifická reakce).

Práci jsme rozdělili do těchto skupin:

1. Pokusy o odstranění fluorescence stafylokoků pomocí vysycování konjugátů FA.
2. Pokusy, v nichž jsme k inhibici fluorescence stafylokoků použili vlastností normálního morčecího séra (Hirsch 1964), normálního králíčího séra, králíčího antistafylokokového séra (před vlastní aplikací FA) a teplem inaktivované preparáty FA.
3. Pokusy, v nichž jsme k odstranění fluorescence pozměňovali povrch buňky stafylokoků.
4. Pokusy, v nichž jsme použili jako FA konjugát lidského sérového albuminu, čistých protilátek proti dinitrofenylovanému bovinnímu gama globulinu a globulinové frakce selečního prekolostrálního séra.

Tabulka 1

Vliv vysycení konjugátu na fluorescenci stafylokoků

Použitý konjugát	Způsob vysycení	Fluorescence
BGG	0	+++
BGG	1 × PKJ	+++
BGG	2 × PKJ	++
NKS	0	+++
NKS	1 × PKJ	+++
NKS	2 × PKJ	++ — +++
BGG	prec. BGG-antiBGG	+
NKS	prec. BGG-antiBGG	+ — ++
BGG	susp. formol. stafyl.	++
NKS	susp. formol. stafyl.	++
BGG (1 : 2)	susp. živ. stafylok.	++
BGG (1 : 4)	susp. živ. stafylok.	++
BGG (1 : 8)	susp. živ. stafylok.	+

PKJ = prášek králíčích jater

NKS = normální králíčí sérum (konjugát)

Ke studiu fluorescence stafylokoků a jejího odstranění jsme vybrali z několika desítek kmenů *Staphylococcus pyogenes* takový kmen, který velmi intenzivně fluoreskoval se všemi použitými preparáty FA. Byl to koaguláza — pozitivní kmen č. 14 z ústavních sbírek, jehož další vlastnosti jsme nestanovovali. Kromě tohoto kmenu jsme v práci použili (při metodě formalizace stafylokoků) i řady dalších kmenů velmi podrobně antigeně specifikovaných (kmeny Oedinga 28, 1503, 2095, 2253, 3189, 3647, F - 21, 17 A, S - 365, Wood 46, a kmeny Cowan I, II a III). Kultivačním médiem pro stafylokoky byly: krevní agar, obyčejný agar a játrový bujón. Suspenze stafylokoků byly opakovaně promyty sterilním fyziologickým roztokem a pořízeny z nich preparáty na mikroskopickém skle. Fixace metanolem 3—4 minuty.

K fluorescentnímu barvení preparátů stafylokoků jsme použili konjugáty normálních i imunních sér (globulinových frakcí) s fluoresceinotiocyanátem (FITC). Byly aplikovány konjugáty normálního bovinního gama globulinu (přípraveného rivanolovou metodou), normálního králíčího séra, králíčího antitularemického séra, krysího séra proti antigenům kůže, vepřového séra proti encefalitidě, selečního prekolostrálního séra, čisté protilátky proti dinitrofenylovanému bovinnímu gama globulinu (DNP-BGG) a krystalického lidského sérového albuminu. Příprava konjugátů byla provedena podle metody Goldstein, Slizys, Chase (1961) a Lewis, Jones, Brooks a Cherry (1964). Volný FITC byl odstraněn na sloupci Sephadex G - 25 nebo G - 50. V některých případech (konjugáty králíčího normálního séra a králíčího antitularemického séra) byly konjugáty frakcionovány na sloupci Sephadex G - 200 a byly získány frakce

Tabulka 2

Vliv inkubace stafylokoků na preparátě s normálním morčecím sérem a barvení směsí konjugátu bovinního normálního gama globulinu s fyziologickým roztokem, normálním králičím sérem a králičím antistafylokokovým sérem na fluorescenci stafylokoků

Způsob inhibice	Fluorescence	
Kontrolní preparát	+++	Inkubace se sérem 30 min. při 37 °C. Konjugát BGG
Norm. morč. sérum	+++	
Norm. morč. sérum inakt. 56° 30 min.	+++	
Norm. morč. sérum 3krát vyměněné	+++	
BGG konjugát + fyziol. roztok (1:1)	++	Preparáty stafylokoků barveny směsí 30 min. při 37 °C
BGG konjugát + NKS (1:1)	+	
BGG konjugát + antistaf. král. sérum č. 86 (1:1)	±	
Teplem inaktivovaný konjugát BGG	+++	Preparáty stafylokoků barveny směsí 30 min. při 37 °C
Teplem inaktivovaný konjugát NKS	++	
Kontrolní preparát konjugátu NKS	++ — +++	

19S a 7S globulinů. Také ty byly použity k fluorescentnímu barvení stafylokoků.

Preparáty po obarvení FA byly vyhodnocovány na sovětském fluorescenčním mikroskopu ML - 2, filtry SS - 15 - 2, BS - 8 - 2, S 3, S - 7 - 2, bariérový filtr čís. 2.

1. Vysycovací pokusy: Do vysycovacích pokusů jsme zahrnuli techniky adsorpce konjugátů na prášek normálních králičích jater, na imunní precipitát bovinního gama globulinu s anti-gama globulinovým sérem a na živou nebo formolizovanou suspenzi stafylokoků (byl použit týž kmen, jehož fluorescence byla studována). Při vysycování práškem králičích jater jsme použili jednonásobné a dvojnásobné vysycení 50 mg prášku králičích jater (PKJ) na 1 ml konjugátu. Přitom jsme rovněž sledovali změny v koncentraci bílkovin v konjugátu. Pozorovali jsme jejich úbytek, který znamenal i pokles intenzity specifické fluorescence. Fluorescence stafylokoků je tímto procesem postižena velmi málo (tab. 1).

Suspenze formolizovaných stafylokoků, kterou jsme použili k vysycení konjugátů, byla 100násobek zkumavky čís. 1. Mc Farlandovy stupnice zákalu, živá suspenze obsahovala 10^9 mikrobních těl v 1 ml. V tab. 1 jsou uvedeny výsledky vysycovacích pokusů pomocí stafylokokové suspenze formolizované nebo živé. Obě suspenze mají, pokud jde o stupeň odstranění fluorescence stafylokoků, přibližně stejný účinek. Zdá se, že část fluorescence (snad ta část, která náleží specifické reakci) je vysycením stafylokokovými suspen-

zemi odstraněna (pokles fluorescence ze +++ na ++). Zbývající fluorescenci, stále ještě intenzivní, nutno pravděpodobně přičíst na vrub nespecifické fluorescence.

K vysycení konjugátů jsme použili i imunního precipitátu BGG — anti BGG. Nejprve jsme provedli precipitaci a k precipitátu jsme přidali konjugát. V tabulce 1 jsou uvedeny dva příklady aplikace imunního precipitátu při odstraňování fluorescence stafylokoků. Při použití konjugátu BGG došlo k většímu poklesu fluorescence stafylokoků po vysycení imunním precipitátem,

Tabulka 3

Charakteristiky konjugátů použitých při studiu vlivu formolu na fluorescenci stafylokoků a také v dalších pokusech o odstranění fluorescence stafylokoků

Konjugát	Způsob konjugace	olekulární poměr FITC : bílkovině
BGG	borát	6,78
Antitularemické králičí		
č. 124 SIGMA celý	fosfát	9,33
frakce 19S	fosfát	7,20
7S	fosfát	4,25
č. 125 SIGMA celý	fosfát	6,03
frakce 19S	fosfát	7,73
7S	fosfát	1,55
č. 125 160563 celý	fosfát	12,20
frakce 19S	fosfát	9,82
7S	fosfát	9,50
č. 126 SIGMA celý	fosfát	7,60
frakce 19S	fosfát	8,30
7S	fosfát	4,50
č. 126 160563 celý	fosfát	11,30
frakce 19S	fosfát	11,90
7S	fosfát	11,10
Normální králičí sérum		
č. 45 160563 celý	borát	14,30
frakce 19S	borát	16,57
7S	borát	12,10
č. 45 301161 celý	borát	17,40
frakce 19S	borát	nestanoven
7S	borát	11,00
ALW krysí protikožní č. 152	fosfát	5,71
č. 153	fosfát	4,05
Vepřový antiENCEFALITICKÝ	borát	19,10
Selecí prokolostrální	fosfát	12,90

Název SIGMA nebo číslo stojící za číslem konjugátu jsou značky použitého FITC. SIGMA je preparát americký (Sigma Chemical Comp. St. Louis lot 111 B — 612 — 19), opa další preparáty jsou výrobkem Výzkumného ústavu pro farmaci a biochemii v Praze.

Tabulka 4

Vliv formolu na fluorescenci stafylokoků. A. Vliv 5% formolu při 24hodinovém působení na preparát *Staphylococcus pyogenes* kmen 14. Koncentrace bílkoviny v konjugátech byla upravena na 5 mg/ml

Použitý konjugát	Preparát stafylokoků		
	neformolizovaný	formolizovaný	
124 Sigma	celý	+++	± - +
	19S	++	0
	7S	+ - ++	0
125 — 160563	celý	+++	±
	19S	++ - +++	±
	7S	+++	±
125 Sigma	celý	+++	± - +
	19S	+ - ++	±
	7S	+++	±
126 Sigma	celý	+++	± - +
	19S	+ - ++	±
	7S	+++	±
126 — 160563	celý	++ - +++	± - +
	19S	++	±
	7S	+++	±
NKS — 301161	7S	++	+
NKS — 160563	7S	++	±
ALW č. 152		++ - +++	+
ALW č. 153		++ - +++	±
Vepřový antiencefalitický		++	±
Selecí prekolostální		++	±

zřejmě v důsledku specifčnosti precipitátu. K snížení fluorescence stafylokoků došlo i v případě NKS, a to ve větším měřítku než při vysycení konjugátu suspenzí homologního kmene stafylokoků, ať již živé nebo formolizované.

Pokusy o odstranění fluorescence stafylokoků pomocí adsorpce nedávají dostatečně spolehlivé výsledky. Podle našich zkušeností nejsou tyto metody vhodné pro diagnostické laboratoře. Tyto výsledky se nevztahují na metodu odstraňování nespecifické fluorescence tkání pomocí vysycení homologním materiálem.

2. Na základě Hirschovy zprávy (1964) o vazbě normálního morčecího séra na buňky stafylokoků jsme inkubovali preparáty stafylokoků (fixované metanolem) s čerstvým normálním (neimunním) morčecím sérem, dále s týmž sérem inaktivovaným teplem při 56 °C po dobu 30 minut nebo jsme morčecí sérum na preparátě třikrát vyměnili. Jak vyplývá z tabulky 2, nemá inkubace s normálním morčecím sérem žádný inhibiční vliv na fluorescenci stafylokoků s konjugátem normálního BGG. Inaktivace teplem rovněž nepřináší pozitivní výsledky, pokud jde o snížení fluorescence stafylokoků.

Při aplikaci směsi konjugátu BGG s fyziologickým roztokem, normálním králičím sérem nebo králičím antistafylokokovým sérem (titr 1 : 160 aglutinační) jsme našli pokles fluorescence stafylokoků, který byl zvláště v případě antistafylokokového séra významný.

Shrneme-li výsledky této skupiny, lze říci, že směs konjugátu s antistafylokokovým sérem odstraňuje z velké části fluorescenci stafylokoků. Mechanismus tohoto pochodu není ještě objasněn.

3. V pokusech zařazených do třetí skupiny, tj. při pokusech, v nichž jsme se snažili pozměnit charakter bakteriálního povrchu tak, aby nedocházelo k reakci s konjugátem, ale aby specifická reakce antigenu s FA byla nadále zachována. Použili jsme účinku tepla, formolu, papainu a trypsinu. Ve všech těchto pokusech jsme porovnávali vliv těchto činidel na fluorescenci stafylokoků a na fluorescenci *Pasteurella tularensis*. K fluorescentnímu barvení stafylokoků jsme použili řadu FA, pro barvení preparátů tularemických pasterel antitularemické sérum čís. 126 konjugované s FITC 160563.

Inaktivace teplem až do 72 °C po dobu 5 minut až 25 minut nedává standardní výsledky. V některých případech vymizela specifická fluorescence tularemických pasterel dříve než fluorescence stafylokoků. Pro tyto nedostatky jsme v pokusech s tepelnou inaktivací nepokračovali.

a) Po předcházejících pokusech jsme se obrátili k formolu jako látce modifikující bílkovinnou část povrchu a bakterií reakcí s amino-, imino- a sulfhydrylovými skupinami bílkovin (Levy a Silverman 1937, French a Edsall 1945, Fraenkel-Conrat a Olcott 1948, Landsteiner a Jablon 1914), aniž tím byla pravděpodobně postižena specifčnost reakcí s homologní protilátkou.

Metodika formolizace byla podrobně popsána (Procházka 1965 a). Zde uvedeme jen výsledky. Charakteristiky použitých konjugátů FA jsou shrnuty v tabulce 3. Pro dokonalejší průkaz odstranění fluorescence jsme záměrně volili vyšší stupeň nakonjugování protilátek.

Výsledky působení formolu na fluorescenci stafylokoků a tularemických pasterel jsou zachyceny v tabulkách 4, 5 a 6. Z těchto údajů je zcela jasně patrné, že formolizace podstatně a někdy úplně inhibuje fluorescenci stafylokoků, nesnižuje (a když, tak jen v míře velmi nepatrné) fluorescenci *Pasteurella tularensis* se specifickým konjugátem.

b) Druhým způsobem, umožňujícím pozměnit vlastnosti povrchu bakteriální buňky, je použití papainu. První zprávu o možnosti aplikace papainu ke snížení fluorescence stafylokoků podali Komninos a Tompkins (1963). V naší laboratoři jsme potvrdili nálezy jmenovaných autorů. Zjistili jsme, že papain v jimi použité koncentraci a čistotě (surový papain) nesnižuje specifickou fluorescenci tularemických pasterel (tabulka 7). Poněkud jiný obraz jsme dostali při použití surového preparátu papainu k odstranění fluorescence stafylokoků v obtiscích tkání. Tam obvykle množství papainu již nedostačuje, protože je spo-

Tabulka 5

Vliv formolu na fluorescenci *Staphylococcus pyogenes*. B. Vliv 5% koncentrace formolu při 24hodinovém působení na preparáty *Staphylococcus pyogenes* kmeny Oedinga a Cowana. K fluorescentnímu barvení použit konjugát bovinního gama globulinu, v němž koncentrace bílkovin byla upravena na 14 mg/ml

Kmen stafylokoka	Fluorescence stafylokoka			
	neformolizovaného		formolizovaného	
	norm. agar	krevní agar	norm. agar	krevní agar
Oeding 28	+++	++ - +++	n	±
1503	++ - +++	++ - +++	0 - ±	±
2095	+++	+++	n	±
2253	+++	++ - +++	±	0
3189	+++	+++	±	±
3647	+++	+++	±	± - +
17a	++ - +++	+++	0 - ±	n
F 21	+++	+++	± - +	±
S 365	+++	++ - +++	0 - ±	±
Wood 46	+++	+++	± - +	+
Cowan I	++ - +++	+++	±	±
Cowan II	+++	+++	±	± - +
Cowan III	+++	+++	±	n

n nestanovováno

třebováno i k reakci s tkání. Proto jsme zvýšili koncentraci papainu a použili krystalického preparátu. Výsledky silně závisejí na množství tkáně na preparátu. V těchto případech vyšší koncentrace papainu má menší účinek na fluorescenci *Pasteurella tularensis*, která na čistém preparátu kultury za stejných podmínek digesce (koncentrace papainu 0,4 nebo 4 mg na 1 ml, doba digesce 10–15 minut) není průkazná.

c) Trypsin byl dalším proteolytickým enzy-

mem, kterému jsme věnovali pozornost. Štěpením bílkovin na menší polypeptidické fragmenty a složky o nižší molekulové váze jsme chtěli dosáhnout snížení fluorescence stafylokoků. Použili jsme trypsinu o nízké aktivitě (6, 7 jednotek na 1 ml). Trypsinizaci stafylokoků i *Pasteurella tularensis* jsme prováděli v suspenzi i na fixovaném (metanolem) preparátě. Ukázalo se (tabulka 8), že trypsin i při tak nízké aktivitě úplně inhiboval fluorescenci stafylokoků stejně jako

Tabulka 6

Závislost fluorescence stafylokoků na koncentraci formaldehydu a době jeho působení. K barvení použit konjugát normálního bovinního gama globulinu. Výjimky jsou uvedeny v tabulce

Hodiny Koncentrace formolu	1	3	5	24	
0	+++	n	n	n	A) Stafylokoky fixovány metanolem před působením formolu
1%	+++	++	± - +	± - +	
5%	++	+	± - +	±	
10%	++	n	± - +	±	
37%	+ - ++	±	±	±	
0	+++	n	n		B) Kontrolní preparáty <i>Pasteurella tularensis</i> . Barveno konjugátem č. 126 (FITC 160563). Ostatní podmínky jako v A)
1%	+++	+++	++	++	
5%	+++	++	++	++	
10%	+++	++ - +++	++	++	
37%	+++	++	++	++	
0	+++	n	n	n	C) Stafylokoky inkubovány s formolem před fixací metanolem (provedeno v suspenzi)
1%	++	++	++	+ - ++	
5%	+ - ++	+ - ++	+	+	
10%	+ - ++	+ - ++	+ - ++	±	
37%	++	+	+	±	

n nestanovováno

Tabulka 7

Vliv papainové digesce na fluorescenci *Staphylococcus pyogenes* kmen 14 a *Pasteurella tularensis* kmen SCHU. Preparát stafylokoka byl barven pomocí konjugátu normálního BGG (koncentrace bílkovin 8,9 mg/ml; molekulární poměr FITC: bílkovině 6,78), preparát *Past. tularensis* barven konjugátem antitularemického séra č. 126 s FITC 160563 (koncentrace bílkovin 10,0 mg/ml; mol. poměr FITC: bílkovině 7,6). Použit surový preparát papainu. Aktivace 0,01M cysteinhydrochloridem

Použitý mikroorganismus	Doba působení papainu				
	0	10	20	30	50 min.
Staph. pyogenes kmen 14	+++	0	0	0	0
Past. tularensis SCHU	+++	+++	+++	+++	+++

specifickou fluorescenci tularemických pasterel při inkubaci již fixovaných preparátů. U čistých kultur závisí vymizení fluorescence na koncentraci trypsinu. Zdá se, že *Pasteurella tularensis* je k účinkům trypsinu citlivější než stafylokok.

Shrneme-li výsledky této skupiny pokusů, v nichž byl pozměněn charakter povrchu bakteriální buňky, jeví se nám jako univerzálně použitelný (zatím pro systém stafylokok: *Pasteurella tularensis*) způsob odstranění fluorescence stafylokoků pomocí formolu. Při použití papainu je odstranění fluorescence, zvláště v otiscích silně závislé na empirickém stanovení koncentrace papainu vzhledem k množství tkáně na otiscích. Pro tento systém není použitelná metoda trypsinizace.

4. V posledním bodě jsme se pokusili řešit, mimo vlastní program odstranění fluorescence stafylokoků, i otázku charakteru bílkovin, které hrají při nespecifické fluorescenci hlavní úlohu. Na rozdílnost bílkovin konjugátu poukázali ve svých pracích Curtain (1958), který pomocí elektroforézy — konvekce rozdělil konjugát na 6 frakcí, z nichž ty, které obsahovaly nejméně protilátek a u nichž poměr FITC: bílkovině byl nejvyšší, dávaly největší nespecifickou fluorescenci, a Goldstein a spol. (1961), kteří frakcionací konjugátu na DEAE celulóze získali v první frakci (0,0175 M fosfátový pufr) nejvíce protilátek a nejméně nespecifické fluorescence.

Tvrzení těchto autorů a těch, kteří zastávají názor na specifickou fluorescenci stafylokoků s konjugáty FA, jsme chtěli podložit dalšími daty. Předně jsme chtěli zjistit, zda nespecifickou fluorescenci vyvolávají konjugáty albuminu, který, jak známo, neobsahuje žádné protilátky. Pokusy ukázaly, že z řady preparátů lidského sérového albuminu (HSA) dával malou fluorescenci jen preparát vysoko nakonjugovaný (poměr FITC: bílkovině molekulární = 8,78). Preparáty s nižším poměrem nedávaly žádnou fluorescenci. Proto jsme obrátili pozornost na globulinovou frakci FA. Abychom vyloučili možnou účast stafylokokových protilátek v konjugátech, začali jsme pracovat s takovými séry nebo jejich frakcemi, o nichž nám bylo známo, že nemohou obsahovat protilátky proti stafylokokům. Použili jsme konjugátu globulinové frakce prekolostrálního

selečního séra (Procházka, Kotýnek 1965), které neobsahuje žádné protilátky. V tabulce 4 je uveden výsledek barvení stafylokoka konjugátem selečního prekolostrálního séra. Ačkoli nebyly přítomny žádné protilátky, dával konjugát fluorescenci se stafylokokem. Tímto pokusem bylo částečně vyvráceno tvrzení, že fluorescence stafylokoků je vyvolána přítomností protilátek proti nim v konjugátu. V současné době se zabýváme podrobněji charakterem bílkovin konjugátu prekolostrálního selečního séra, které mají schopnost fluoreskovat se stafylokokem.

Konečně jsme použili i preparátu čistých protilátek proti dinitrofenylovanému bovinnímu gamma globulinu (Procházka, Kotýnek 1965). Konjugát těchto čistých protilátek nedával se stafylokoky žádnou fluorescenci, přestože poměr FITC: bílkovině ve dvou použitých konjugátech těchto protilátek byl vysoký (7,25 resp. 8,41). Tak jsme prokázali, že konjugáty čistých protilátek nedávají žádnou fluorescenci stafylokoků, a že tato fluorescenci musí být vyvolávána jinými frakcemi globulinové části konjugátu.

Závěr

Při použití imunofluorescenční metody k diagnostice nález způsobených bakteriálním antigenem je nutno mít vždy na zřeteli, že může dojít ke klamným pozitivním výsledkům následkem fluorescence stafylokoků (popř. i jiných bakterií). V práci autor uvádí přehled způsobů vedoucích k odstranění fluorescence stafylokoků v systému *Staphylococcus pyogenes* — *Pasteurella tularensis*. Ukazuje i na některé další způsoby, které však nevedly k cíli.

Formolizace preparátů s použitím minimální koncentrace formolu 5% a doby 3 hodin odstranila fluorescenci stafylokoků z velké části nebo úplně, takže rušivý vliv při diagnostice je prakticky vyloučen. Odstranění fluorescence stafylokoků pomocí papainu se daří lépe u preparátů čistých kultur než v otiscích tkání. Trypsin sice úplně inhibuje fluorescenci stafylokoků, ale jeho použitelnost je pro diagnostickou praxi malá, neboť potlačuje i specifickou fluorescenci homologního antigenu.

Literatura

- Cohen, J. O., Cowart, G. S., Cherry, W. B.: *J. Bacter.* 82, 110 (1961).
- Cohen, J. O., Newton, W. L., Cherry, W. B., Updyke E. L.: *J. Immunol.* 90, 358 (1963).
- Curtain, C. C.: *Nature* 182, 1305 (1958).
- Fraenkel-Conrat, H., Olcott H. S.: *J. Am. Chem. Soc.* 70, 2673 (1948).
- Franěk, J., Procházka, O.: *Folia Microbiol.* (Praha) 10, 77 (1965).
- French, D.: Edsall, J. T.: *Advances in Protein Chem.* 2, 278 (1945).
- Goldstein, G., Slizys, I. S., Chase M. W.: *J. Exp. Med.* 114, 89 (1961).
- Hirsch, J. G.: *J. Immunol.* 29, 155 (1964).
- Komninos, G. N., Tompkins, V. N.: *Am. J. Clin. Pathol.* 40, 319 (1963).
- Landsteiner, K., Jablon, B.: *Z. Immunitätsf.* 20, 618 (1914).
- Levy, M., Silverman, D. E.: *J. Biol. Chem.* 118, 723 (1937).
- Lewis, V. J., Jones, W. L., Brooks, J. B., Cherry, W. B.: *Appl. Microbiol.* 12, 343 (1964).
- Lind, I., Reyn, A., Birch-Andersen A.: *Electron Microscopy, Proc. of the IIIrd European Regional Conference, Prague 1964, Vol. B, str. 535.*
- Pittman, B., Moody, M. D.: *Bact. Proc.* 140 (1960).
- Procházka, O.: *Folia Microbiol.* (Praha) 1965 a v tisku.
- Procházka, O.: *J. Hyg. Epid. Mikrob. Immunol.* 1965 b v tisku.
- Procházka, O., Kotýnek, O.: *Folia Microbiol.* 1965 v tisku.
- Wolfe, M. D., Cameron, G. M.: *Publ. Health Lab.* 17, 76 (1959).