

## OTÁZKY IMUNOFLUORESCENČNÍ METODY V PROGRAMECH ZÁPADNÍCH ARMÁDNÍCH PRACOVIŠŤ

Podplukovník MUDr. Jiří FRANĚK, CSc.,  
Vojenský ústav hygieny, epidemiologie a mikrobiologie v Praze

Předpokladem reálného vyhodnocení možností, které poskytuje použití imunofluorescenční metody specifické detekci a rychlé diagnostice, je co nejpřesnější informovanost o dosavadních výsledcích i problémech.

Určitý souhrn základních poznatků o možnostech diagnostické aplikace FP měla pracovníkům hygienicko-protiepidemické služby poskytnout série souborných referátů, ukončovaná tímto sborníkem.

Jiný zdroj informací představují publikace, vycházející z vedoucích západních armádních výzkumných pracovišť — výzkumného střediska v Portonu (P), laboratoří chemického vojska ve Fort Detrick (FD) nebo armádního výzkumného ústavu Waltera Reeda ve Washingtonu (WR). Dnešní přehled je věnován právě tomuto materiálu, jehož cena je v tom, že přesvědčivěji než co jiného ukazuje vojenské perspektivy a tendence, resp. zamýšlené místo imunofluorescence v problematice BBP.

První publikace z armádních pracovišť se objevují v letech 1958—1960, tedy až po uveřejnění nejen Coonsových prací o novém metodickém principu, ale i řady sdělení zabývajících se principiálními možnostmi rychlé diagnostiky, i otázkami specifické detekce v prostředí. Převládající představou byla v té době „aplikace Coonsovy techniky“; v soulase s tím byly jednotlivé práce zaměřeny na ověření možnosti průkazu toho kterého agens pomocí FP, připravovaných z běžně používaných diagnostických

sér, aniž by byly blíže studovány imunologické otázky reakce. Carter (1958 FD) použil v jednoduchých experimentálních podmínkách nepřímé metody FP k průkazu *P. pestis*, *P. tularensis*, *Br. suis* a *Vi. comma*. Byla zkoušena i možnost průkazu několika různých agens na jediném preparátu. Ve stejné době se Hansen (1959 FD) pokusil diferencovat spory *B. anthracis* od spor jiných příslušníků rodu *Bacillus*. Autor zjistil vysoké procento nespecifických reakcí, které se nepodařilo odstranit zkříženým vysycováním. Z tohoto období pochází i metodika kontrastního dobarvování preparátů konjugátem albuminu s LRB 200 (Smith a spol., 1959 WR).

Od samého začátku byla také propracována metodika průkazu *P. tularensis*. První metodické zkušenosti s přípravou vhodných hyperimunních sér a specifických konjugátů popsal Yager (1960 FD). FP byly zkoušeny k průkazu pasterel ve vzduchu (Jaeger a spol. 1961 FD). V experimentálních podmínkách se dařilo ve vzduchu, prosávaném rychlostí 20 litrů za minutu kaskádovým impaktorem, prokazovat i zcela ojedinělé pasterely: citlivost byla udávána počtem asi 20 mikrobů na sklíčku impaktoru, při čemž přítomnost vzdušné banální mikroflóry ani v poměru 1000 : 1 nebyla na překážku.

V pozdějších letech byly antitularemické FP používány při studiu otázek patogenezy inhalační tularémie a vakcinačního procesu při inhalační imunizaci (Eigelsbach a spol. 1962

FD, McGavran a spol. 1962 FD, White a spol. 1962 FD, White a spol. 1964 FD). V rámci úkolu jsou však sledovány i diagnostické aspekty. FP byly mj. použity i k úspěšnému průkazu pasterel ve formolinizovaných vzorcích orgánů (plic, sleziny, uzlin, kůže aj.) osmi zemřelých lidí a v excidované axilární uzlině z případu benigně probíhající ulceroglandulární formy tularémie (materiály pocházely z let 1937 až 1961) (White a spol. 1965 FD). Pozoruhodností práce je zejména stáří vyšetřovaného materiálu. Co do dokumentované morfologie specifické fluorescence se nález kryje s tím, co jsme sami pozorovali při vyšetřování přirozeně infikovaných zajíců. Práce bohužel neobsahuje žádné kvantitativní údaje o nálezu u jediného vyšetřovaného případu s benigním průběhem (z roku 1961, tj. s antibiotickou léčbou); autoři se pouze zmiňují o vlivu antibiotik na histologický obraz, který u léčených ztrácí své charakteristické rysy a diagnostickou cenu. Také pokus na zvířeti za těchto podmínek selhal.

Pracovníci armádních ústavů se nepodíleli na pracech publikovaných v USA a věnovaných vypracování metody průkazu *P. pestis* (Moody, Winter a spol. v letech 1957–1959). V poslední době se však objevilo sdělení obsahující tyto informace: FP (připravované ze sér králíků imunizovaných čistou frakcí Ib nebo živým vakcínálním kmenem A 1122) se v posledních 3–5 letech běžně používají v USA k identifikaci kmenů *P. pestis*, izolovaných v ohniscích. V laboratořích státní zdravotní služby bylo identifikováno celkem 7 izolátů od lidí a 168 od hlodavců (s jediným nesprávně negativním výsledkem u atypického kmene *P. pestis* „Bryan“). V roce 1962 byl na Aljašce izolován mikrob, který v pokuse na myši dával zřetelnou, i když morfologicky necharakteristickou fluorescenci s antimorovým konjugátem. Kmen neměl typické vlastnosti a byl proto podroben podrobnému studiu na několika pracovištích. Nakonec byl určen jako *P. pseudotuberculosis rhodentium*, tvořící v orgánech zvířat materiál biochemicky téměř identický s krystalickou frakcí I *P. pestis*. Otázkou se systematicky zabývala skupina odborníků, jejímž členem byl i pracovník FD (viz Quan a spol. 1965). Skupina provedla podrobnou analýzu kmene, včetně biochemické identifikace antigenních frakcí tvořených *in vitro* a *in vivo*. Pečlivě byly sledovány různé aspekty spolehlivosti imunofluorescenční reakce (která dala chybný výsledek stejně jako reakce aglutinace a hemaglutinace) a byla stanovena nová kritéria hodnocení výsledků, podložená mj. podrobným studiem morfologie fluorescence pasterel *in vivo*.

Svým způsobem odpovědí na pokusy používat k průkazu *B. anthracis* antikapsulárních fluoreskujících protilátek je práce biochemiků Leonarda a Thorna (1961 FD), kteří se snažili identifikovat protilátky reagující s d-glutamylpoly-peptidem pouzdra. Autoři takové protilátky v antikapsulárních sérech nezjistili. Získali však doklady o tom, že reakce může být vyvolána lysozymem, obsaženým v séru, které je

vedly k závěru o nespecifické precipitaci. Jako jeden z průkazů správnosti takového závěru použili i aplikaci konjugátu lysozymu s FITC na opouzdřené bacily. Ve srovnání s dnes známými fakty o charakteru imunofluorescenční reakce s pouzdrem *B. anthracis* (viz přehled publikovaný v tomto sborníku) vyniká jednostrannost pracovního zaměření autorů a velmi zjednodušená metodika práce s FP. V každém případě však jde o první práci ve světové literatuře, která se pokusila o analýzu reakce na špičkové úrovni — alespoň co do použitého komplexu biochemických a imunochemických metod. Způsob zpracování sám o sobě svědčí o rozsahu a důkladnosti práce, věnované ve Fort Detrick problematice *B. anthracis*.

Systematicky je zcela zřejmě zpracovávána i problematika diagnostiky **virových infekcí**, jejichž výběr je charakteristický.

Možnost průkazu viru VEE v tkáňové kultuře pomocí FP studovali Metzger a spol. (1961 WR + FD), kteří potvrdili reálnost takové aplikace. Práce však byla prováděna pouze s virem adaptovaným na kuřecí embrya a autoři proto sami zdůrazňují, že výsledky nelze předčasně zevšeobecňovat.

Podobně jen v experimentálních podmínkách byl studován virus žluté zimnice (De Groot 1960 WR). Autorům se podařilo prokazovat virus v perinukleární zóně buněk tkáňové kultury dříve, než došlo k vytvoření CPE.

FP byly zkoušeny i k rychlé diagnostice RVF viru na tkáňových kulturách a v orgánech experimentálních zvířat (Easterday 1963 FD). Podle zkušeností z této práce se pro diagnostiku lépe hodí tkáňové kultury než preparáty z orgánů: je zcela jasný rozdíl ve specifické a nespecifické fluorescenci a její intenzita je vyšší. V preparátech z orgánů není tak přesná lokalizace fluorescence v buňkách, není tak čisté pozadí a navíc některé elementy (např. Purkyňovy buňky) mají velkou tendenci k nespecifické adsorpci konjugátů.

Ve srovnání s těmito vysloveně experimentálními pracemi jsou pozoruhodné údaje obsažené ve sdělení Doziera (1963) na armádním sympoziu o BBP: v laboratořích zdravotnické služby americké armády se podařilo pomocí FP identifikovat viry RVF a VEE na tkáňových kulturách během 24 hodin po inokulaci klinického materiálu. To mj. znamená, že výsledky, publikované samotnými odborníky, jsou vysloveně dílčí, pocházející zřejmě z dávno ukončeného počátečního období práce.

Metodika neutralizačního testu pro kvantitativní stanovení protilátek proti viru psitakózy byla publikována v roce 1965 (Hahon a spol. 1965 a FD). Její podstatou je zjištění, že při aplikaci virové suspenze, smíchané se sérem obsahujícím specifické protilátky, na vnímavou tkáňovou kulturu dochází k signifikantnímu snížení počtu fluoreskujících buněk, prokazovaných specifickým konjugátem přímou imunofluorescenční metodou. Reakce je vysoce citlivá, výsledek je znám během 24 hodin.

Ve stejném roce publikoval Hahon zprávu

o možnosti kvantitativního průkazu viru varioly na monolayeru McCoyových buněk. Byly podrobně zjišťovány podmínky zabezpečující maximální adsorpci virového inokula na buňky tkáňové kultury a standardnost reakce. Bylo zjištěno, že hodnotitelnou fluorescenci je možné pozorovat už od samé hodiny po inokulaci. Diagnosticky optimální interval je 16–20 hodin. Autor konstatuje, že předběžné výsledky potvrzují použitelnost testu i pro ostatní pox-viry. Předběžně byla také zjišťována možnost **titrace protilátek** fluorescenčním neutralizačním testem a je považována za perspektivní (Hahon 1965 b, FD).

Zatím poslední z této série prací se týká viru žluté zimnice. I v tomto případě je možné kvantitativní hodnocení velikosti virového inokula podle počtu fluoreskujících buněk, odečítaného 24 hodin po infikování TK (Hahon 1966 FD).

Ve všech těchto pracích jde zejména o dvě metodické otázky: především byl v konkrétních podmínkách studován (už dříve známý) efekt rotace na adsorpci viru na buňky a vypracován postup, zabezpečující prakticky kompletní zachycení virového inokula (ve srovnání s nejvýše 60% adsorpci ve stacionárních podmínkách). Doba adsorpce byla mimo to zkrácena na 15 min. Za druhé byly zjišťovány vztahy mezi velikostí inokula a podmínkami a dobou kultivace, prokázána statistická pravidelnost a nalezeno matematické vyjádření, umožňující velmi přesně (podle počtu fluoreskujících buněk) stanovit množství viru v inokulovaném vzorku, resp. v pokusech se známým inokulem titrovat obsah specifických neutralizujících protilátek v testovaném séru. Je nesporné, že publikované práce vytvářejí širěji použitelný model rychlé kvantitativní detekce virů.

Možnosti průkazu viru varioly v buňkách tkáňových kultur pomocí FP byla věnována pozornost i v Portonu (Carter 1965 P). Bylo zjištěno, že jsou rozdíly v chování viru varioly a vakcínie: vakcinální virus je prokazatelný po 16 hodinách, virus varioly po 24 hodinách. Fluoreskující ložiska vakcinálního viru jsou z počátku tvořena jednotlivými buňkami, později se počet buněk v ložisku zvyšuje až na deset. Po dosažení vysoké koncentrace viru je fluorescence tkáně konfluentní. Naproti tomu ložiska viru varioly jsou po celou dobu kultivace tvořena výhradně jednotlivými buňkami. V práci je mj. potvrzována i dříve známá různá závislost tvorby ložisek oběma viry na teplotě.

Ojedinelé práce, týkající se otázek mikrobiologické diagnostiky převážně mírového charakteru, se zdají být spíše projevem osobního zaměření některých pracovníků než součástí širěji koncipovaného programu. Ústav W. Reeda byl např. jedním z prvních pracovišť, kde se propracovával a na značném materiálu ověřoval FTA test (Fife a spol. 1961 WR). V poslední době odtud vyšla publikace věnovaná rychlé diagnostice beta hemolytických streptokoků skup. A; z textu vyplývá, že podnětem k práci byla myšlenka vypracovat metodu vhodnou pro

široké každodenní použití v diagnostických laboratořích, s cílem pomoci většímu uplatnění imunofluorescenční reakce v praxi (Smith 1965).

Před časem byla publikována krátká informace o výsledcích vývoje automatizovaného luminiscenčního mikroskopu (Hovnanian a spol. 1964). Autoři vyvinuli přístroj, umožňující přesné a rychlé měření intenzity fluorescence jednotlivých částic (do velikosti spor) v zorném poli, včetně automatického vyhodnocení srovnáním se standardní škálou intenzit a fotografické dokumentace. Jednou z podstatných novinek v konstrukci je použití monochromátoru, filtru, propouštějícího jen paprsky o přesně stanovené vlnové délce. Tím je fakticky vylučován rušivý vliv autofluorescence a podstatně zvyšována spolehlivost odečítaných výsledků. Mikroskop byl vyvinut v AVCO Research and Advanced Development Division. Spolehlivost diferenciací specifických a nespecifických reakcí byla testována zejména na sporách (s „vynikajícími výsledky“), při čemž antigeny i konjugáty dodal Fort Detrick.

#### Komentář

Z celkového přehledu západní literatury je zřejmé, že těžiště výzkumných i prověřkových prací v oblasti diagnostické imunofluorescence (alespoň pokud jde o bakterie a protozoa) je v ústavu státní zdravotní služby, Communicable Disease Center v Atlantě, USA. Odtud pochází nejméně 20–30 autorů, zabývajících se dlouhodobě touto tematikou. Odtud také vyšla skupina vůbec prvních prací světové literatury, které začaly systematicky z hlediska rychlé diagnostiky a detekce imunofluorescenční reakcí studovat (Moody, Cherry, Thomasonová a spol. 1956–57). Toto pracoviště organizuje výcvik laboratorních odborníků v práci s FP v USA i v ostatních zemích amerického kontinentu, připravuje referenční konjugáty, zpracovává metodické pokyny a příručky atd.

Práce vycházející ze západních vojenských pracovišť tvoří jen zlomek literatury věnované diagnostické aplikaci FP (sotva více než 1 %). Při poměrně malém počtu prací je několik věcí charakteristických:

Především je zřejmé, že jsou prováděny velmi systematicky. Aplikace FP je většinou jen součástí komplexního zpracovávání dané problematiky a podle výběru agens je to problematika vysloveně armádní.

Ani pracoviště s takovou kapacitou jako FD nemůže pokrýt všechny otázky. Spolupráce mezi FD a WR jsou celkem samozřejmé. Velmi zajímavé však je, s jakou pohotovostí se pracovníci FD podílejí na aktuálních problémech majících armádní význam a řešených státní zdravotní službou.

Odborníci FD byli např. ve skupině vyšetřující epidemii inhalačního antraxu v prádelně v New Hampshire, při čemž jejich otázkou bylo zejména zkoušení různých metod odběru vzorků vzduchu (včetně celodenního automatického odběru) a testování virulence izolovaných

kmenů (Brachman a spol. 1960, Biegeleisen a spol. 1962). Totéž se týká výše zmiňované identifikace sporného kmene *P. pestis*.

V jiných případech je spolupráce s civilními řešiteli zřejmě cílevědomě plánovaná z hlediska účelné dělby práce — např. při vývoji automatického luminiscenčního mikroskopu. Technické otázky zabezpečilo firemní pracoviště, FP však dodal konjugáty a antigeny. Výběr spor jako testovacího objektu znovu potvrzuje cílevědomost práce: možnost objektivně (kvantitativně) odlišit nespecifickou adsorpci od specifické vazby FP je v tomto případě základním předpokladem vyřešení vojensky vysoce aktuální otázky, u níž žádná jiná metoda (pokusy o přípravu specifických protilátek vysycováním apod.) dosud nevedla k úspěchu.

Po už citovaném sdělení Metzgera o VEE se v nedávné době objevily dvě práce, věnované studiu patogeny infekce vyvolávané VEE virem. Těžiště zájmu autorů, pocházejících z university v Kansasu a financovaných grantem Fort Detrick, je v možnostech aplikace FP k těmto cílům (Kundin a spol. 1966, Kundin 1966).

Nechceme z těchto dílčích skutečností dělat žádné závěry o celkové úrovni nebo organizaci amerického vojenského výzkumu. Nesporné je, že prováděné (veřejně publikované) práce jsou cílené, že se řeší týmovým způsobem, že mají přímý vztah k potřebám rychlé diagnostiky a specifické detekce a že se při tom plně využívá civilních laboratoří, s nimiž existuje trvalý pohotovostní kontakt.

Pokud jde o samu imunofluorescenční metodu, je zřejmé, že je systematicky propracovávána z hlediska průkazu antigenů i protilátek. Je věnována velká pozornost agens, důležitým jako BBP.

Nezdá se, že by byly organizovány zvláštní prověrky metody po linii vojenské zdravotní služby. Metoda je však kontrolovaným způsobem zaváděna v laboratořích stát. zdravotní služby; z pohotovosti, s jakou se např. FD podílí na řešení aktuálních praktických otázek, vyplývá, že o průběhu prací v laboratořích Státní zdravotní služby musí být armádní zdravotní služba průběžně informována.

Zdá se, že imunochemický výzkum není běžnou součástí studia. Avšak v těch případech, kde se při aplikaci FP narazilo na nejasnosti ve specifčnosti reakce (*P. pestis*, *B. anthracis*), byla otázka řešena rychle a s neobyčejnou metodickou důkladností. Z toho vyplývá, že existuje široká metodická báze umožňující rychle aplikovat už zavedené biochemické metody k řešení aktuálních otázek. Na vysoké úrovni je zvládnuta především frakcionace antigenů a jejich identifikace.

Vývoj plně automatizovaného mikroskopu svědčí mj. o snaze získat možnost soustavného vyšetřování velkého množství vzorků (což je např. podmínkou provádění systematické trvalé kontroly vzduchu apod.).

S tím souvisí i další otázka: ve většině prací se používá nejmodernější složitá laboratorní

technika (automatický mikroskop představuje se svým nezbytným příslušenstvím např. celou specializovanou laboratoř). Z publikovaných prací nevyplývají žádné tendence zjednodušovat metodiky ve prospěch polních podmínek. Metodické postupy, které jsou používány, vloženy předpokládají zpracování materiálu ve velkých, dokonale vybavených laboratorních bázích.

Z publikovaných prací je zřejmé, že je uveřejňována jen část výsledků. Porovnání uvedených údajů o průkazu virů VEE a RVF, obsažených v odborných publikacích, s referátem Doziera to demonstrovuje zcela jasně. Totéž platí např. o průkazu spor. Nikdy nebylo publikováno nic o jejich tendenci nespecificky adsorbovat konjugáty. Význam objektivního hodnocení intenzity fluorescence byl zjištěn v řadě případů (u stafylokoků, améb a j.) a bylo by logické při vývoji nového přístroje provést zkoušky s některým z těchto dříve ověřených modelů. Přesto byly zvoleny právě spory, při čemž potřebné konjugáty byly k dispozici.

Z toho mj. vyplývá, že při hodnocení stavu výzkumu podle publikací je analýza dlouhodobě se projevujících tendencí celkově nejen významnější, ale i po faktické stránce cennější (spolehlivější) než komentování jednotlivých citací. Podmínkou také je, aby byla prováděna systematicky a s vlastními konkrétními zkušenostmi v problematice.

V daném případě je možné takové dlouhodobé tendence vyjádřit asi takto:

Jsou studovány otázky průkazu, antigenů i protilátek, jen zcela ojediněle (a pocházející výhradně z počátečního období výzkumu) jsou však zprávy o detekci přímo z prostředí. Pokusy o objektivní hodnocení fluorescence spor však svědčí o tom, že i v této oblasti se pracuje.

Výběr agens nevymezuje jistě celý rozsah potenciálních BBP. Všechna studovaná agens ale mají nepochybný vojenský význam (*P. pestis*, *B. anthracis*, *P. tularensis*, viry VEE, RVF, YF, varioly a psitakózy).

Systematičnost a rozsah práce, přísně výběrová aplikace imunochemických metod na prakticky nejdůležitější otázky, u virů zřejmě snaha o propracování diagnostiky různých agens (včetně průkazu protilátek) s využitím jediného metodického přístupu, hledání možností automatizace a objektivizace odečítání výsledků — to všechno svědčí o existenci neobyčejně cílevědomě řízeného programu; metoda je tedy považována za významnou a perspektivní.

#### Literatura

- Biegeleisen, J. Z., Cherry, W. B., Skaley, P., Moody, M. D.: *Am. J. Hyg.* 75, 1962, 230—239.  
 Brachmann, P. S., Plotkin, S. A., Bumford, F. H., Atchinson, M. M.: *A. J. Hyg.* 72, 1960, 6—23.  
 Carter, G. B.: *Virology* 25, 1965, 659—662.  
 Carber, Ch. H., Leise, J. M.: *J. Bact.* 76, 2, 1958, 152—154.  
 Dozier, S. M.: *Military Med.* 128, 1963, 97—99.  
 Easterday, B. C., Jeger, R. F.: *J. Infect. Dis.* 112, 1963, 1—6.

- Eigelsbach, H. T., Tulis, J. J., Mc Gavran, M. H., White, J. D.:* J. Bacteriol. 84, 1962, 1020—1027.
- Fife, E. H., Bryan, B. M., Sanders, R. W., Muschel, L. H.:* Am. J. Clin. Pathol. 36,2, 1961, 105—113.
- DeGroot, C. J., Metzger, J. F., Smith, C. W., Hoggan, M. D.:* Virology 12, 1960, 317—320.
- Hahon, N.:* J. Infect. Dis. 116, 1966, 33—40.
- Hahon, N.:* Appl. Microbiol. 13, 1965, 865—871.
- Hahon, N., Cooke, K. O.:* J. Bacteriol. 89, 1965, 1465—1471.
- Hansen, P. A.:* ústní sdělení, cit. podle Cherry, W. B., Goldman, M., Carski, T. R.: Fluorescent antibody techniques in the diagnostic of communicable diseases, PHS, publ. No 729, Washington 1960.
- Hovnanian, H. P., Brennan, T. A., Botan, E. A.:* J. Bact. 87, 1964, 473—476.
- Jaeger, R. F., Spetzel, R. O., Knehne, R. W.:* App. Microbiol. 9, 1961, 585—587.
- Kundin, W. D., Liu, C., Rodina, P.:* J. Immunol. 96, 1966, 39—48.
- Kundin, W. D.:* J. Immunol. 96, 1966, 49—58.
- Leonard, C. G., Thorne, C. B.:* J. Immunol. 87, 1961, 175—188.
- Mc Gavran, M. H., White, J. D., Eigelsbach, H. T., Kerpsack, R. Y.:* Am. J. Pathol. 41, 1962, 259—271.
- Metzger, J. F., Banks, I. S., Smith, C. W., Hoggan, M. D.:* Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 106, 1961, 212—215.
- Quan, S. F., Knapp, W., Goldenberg, M. I., Hudson, B. W., Lawton, W. D., Chen, T. H., Katman, L.:* Am. J. Trop. Med. and Hyg. 14, 1965, 424—432.
- Smith, C. W., Marshall, J. D., Eveland, W. C.:* Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 102, 1959, 179—181.
- Smith, T. B.:* J. Bacteriol. 39, 1965, 198—204.
- White, J. D., Mc Gavran, M. H., Prickett, P. A., Tulis, J. J., Eiselbach, H. T.:* Am. J. Pathol. 41, 1962, 405—414.
- White, J. D., Rooney, J. R., Prickett, P. A., Derrenbacher, E. B., Beard, C. W., Griffith, W. R.:* J. Infect. Dis. 114, 1964, 277—283.
- White, J. D., Mc Gavran, M. H.:* JAMA 194, 1965, 294—296.
- Yager, R. H., Spetzel, R. O., Jaeger, R. F., Tiggert, W. D.:* Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 105, 1960, 651—654.