

## FLUORESKUJÍCÍ PROTILÁTKY V RYCHLÉ MIKROBIOLOGICKÉ DIAGNOSTICE

### 3. Diagnostika antropozoonóz bakteriální etiologie

Podplukovník MUDr. Jiří FRANĚK, CSc.

Vojenský ústav hygieny, epidemiologie a mikrobiologie v Praze

V článku jsou používány tyto zkratky:

FP — fluoreskující protilátky,  
NIFR — nepřímá imunofluorescenční reakce,  
RA — reakce aglutinace,  
RVK — reakce vazby komplementu.

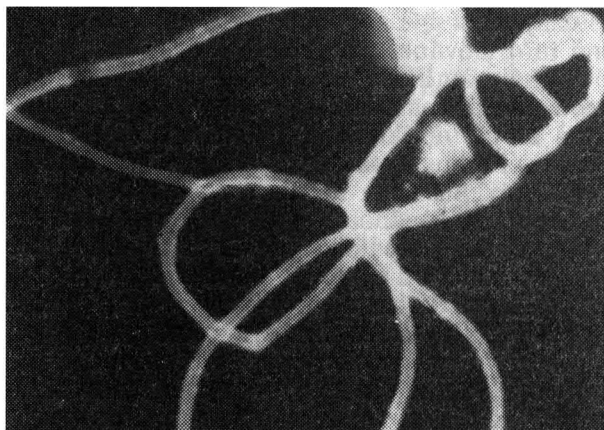
Co do pozornosti věnované detekci pomocí FP stojí v této skupině na prvním místě **B. anthracis**. Je to jistě dáno především významem antraxové infekce pro humánní i veterinární medicínu, svou roli však hraje i složitost a současně přitažlivost problematiky antigenní struktury *B. anthracis* a antigenních vztahů uvnitř rodu *Bacillus* vůbec.

Na jedinou práci zůstal omezen pokus použit kombinace specifického fága s antifágovými fluoreskujícími protilátkami (Dowdle a spol. 1960). Reakce byla použita k identifikaci mladých kultur, pomnožovaných za přítomnosti fága, a pomocí FP byla prokazována adsorpce fágových částic na bacily ještě před vznikem změn v morfologii kultury (projevy lýzy). Nehledě už na poměrně značnou pracnost, jde o postup, jehož výsledek velmi závisí na podmínkách pokusu. Mimo to je obecně známo, že právě první fáze interakce fágových částic s bakteriální buňkou může být ovlivňována různými faktory a že může docházet i k zcela nespecifické adsorpci.

Největší počet publikovaných prací se týká průkazu vegetativních forem *B. anthracis*, ke kterému jsou používány konjugáty z globulinové frakce precipitačního séra, komerčně vyráběného pro Ascoliho reakci. Je ovšem třeba vzít v úvahu, že jde vlastně výhradně o sovětské autory, pracující ve velmi podobných experimentálních podmínkách; téměř ve všech pracech šlo o vysloveně modelové pokusy s vakcinálním kmenem STI (Levina 1958, Prutulin a spol. 1959, Dolgov 1960, Achmerov 1962,

Blagověščenskij a spol. 1962, Busygin 1962, Kuzmin 1962, Lisickij 1963, Podkopajev 1964).

Vlastní zkušenosti s konjugáty tohoto typu jsme popsali dříve (Franěk 1961, 1962, 1963). Z pokusů, prováděných v různých podmínkách, vyplynulo, že rozdíly mezi *B. anthracis* a „antrakoidy“ jsou kvantitativní (tj. liší se pouze intenzita fluorescence); čím lepší luminiscenční mikroskop (tj. čím vyšší je intenzita osvětlení zorného pole), tím hůře se tyto rozdíly hodnotí. Ověřili jsme si také, že intenzita fluorescence různých kmenů *B. anthracis* je značně rozdílná. Konečně v pokusech o zvýšení specifičnosti antraxových konjugátů vysycením se ukázalo, že některé kmene *B. cereus* fluoreskují i po opakovaném vysycení konjugátu suspenzí *B. cereus*, které vede prakticky k úplné ztrátě schopnosti konjugátu reagovat s *B. anthracis*.



Obr. 1. Mladá kultura virulentního kmene *B. anthracis* na monolayeru morčecích makrofágů. Antikapsulární sérum použito k detekci tvorby pouzder jednotlivými buňkami

Naše výsledky tedy svědčily o omezených možnostech používání konjugátů připravených z precipitačních sér a další práce v tomto směru v naší laboratoři nepokračovala.

Záporné stanovisko k používání precipitačního séra bylo posilováno i faktem, že nepouzdřené bacily nejsou přirozeně se vyskytující formou a že konjugát je proto možné aplikovat až po určité předkultivaci. Jestliže však vyšetřujeme vzorky z orgánů lidí nebo zvířat, obsahují opouzdřené bacily a výhodnější je proto přímý průkaz pomocí antikapsulárních FP. Pokud jde o materiál ze zevního prostředí, bylo opakovaně potvrzeno (v USA např. Biegeleisen a spol. 1962, v SSSR např. Šapovalova 1966), že kultivace dává daleko nižší záchyt, než biologická zkouška; orientovat se na kultivaci proto není v tomto případě z hlediska detekce racionální.

Sovětští autoři z různých pracovišť však během posledních několika let věnovali otázce získání specificky reagujících precipitačních FP velkou péči. Při srovnání konjugátů, připravených v laboratoři Leviny, Kuzmina a Sygaje, které se uskutečnilo v roce 1965, se ukázalo, že se podařilo najít kmeny vhodné pro účinné vysycování (v pokusech Sygaje to např. byl jeden z asi 1000 kmenů, izolovaných ze zevního prostředí). Výsledky jsou opět kvantitativní, *B. anthracis* se liší od „antrakoidů“ vyšší barvicího titru; na testovaných kmenech byly rozdíly nesporné.

Velkou námitkou však zůstává výběr kmenů (příliš malý počet zejména virulentních kmenů *B. anthracis*, nedefinované „antrakoidy“), a to, že ani jeden z autorů se nepokusil blíže analyzovat podstatu reakce; který antigen je odpovědný za vazbu s FP, resp. které protilátky jsou z konjugátu vysycením odstraňovány. Bez vyjasnění těchto otázek stále platí, že výsledky jsou příliš závislé na použitých kmenech, že je nelze generalizovat a že reakci je možné používat jen jako zcela orientační.

V roce 1959 navrhli Cherry a Freemanová aplikovat Coonsovu metodu na průkaz vazby tzv. antikapsulárních protilátek na pouzdro *B. anthracis*. Tento postup jsme použili i my. Pokusy, provedené v období 1963–64, umožnily značně upřesnit znalosti o charakteru této imunofluorescenční reakce, o její citlivosti a spolehlivosti, o morfologii nálezů v různých stadiích rozvoje experimentální infekce apod. (Franěk 1964). Výsledkem pak byl návrh zrychlené biologické zkoušky, kterou považujeme za nejrealnější metodu detekce *B. anthracis* v prostředí (Franěk 1965, Kubín 1966).

Zajímavou kombinaci imunofluorescenční reakce s pouzdrům *B. anthracis* s kultivací na originálním médiu použil v Bulharsku Tomov (Tomov a spol. 1965). K předkultivaci navrhl použít půdu, obsahující vaječný bílek, hovězí sérum a hemin. Toto médium silně potlačuje růst ostatních sporulujících mikrobů a dovoluje proto podle autorových údajů získat přímo z hlíny a podobných materiálů už v primokultuře opouzdřené formy *B. anthracis*; tvorba



Obr. 2. Typické pouzdro, prokazované vysoce aktivním antikapsulárním sérem. *B. anthracis* v peritoneálním exsudátu experimentálně infikované myši

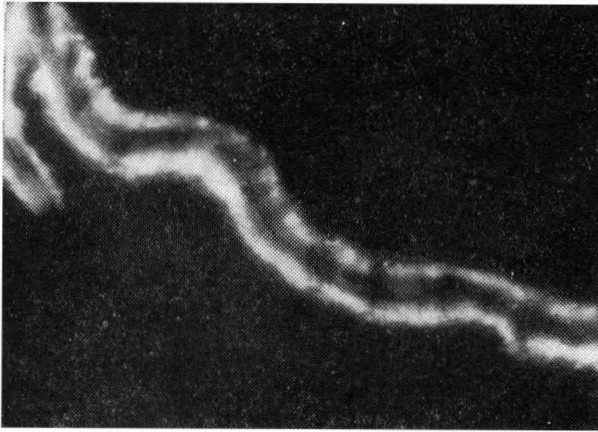
pouzder je přitom masivní. Mladé opouzdřené kultury se pak prokazují pomocí FP.

Při tomto postupu se fakticky imunofluorescenční reakce s pouzdrům pokládá za specifickou **identifikační** reakci. Sami se domníváme, že takové použití je předčasné a — jak konečně vyplývá z návrhu zrychlené biologické zkoušky — považujeme za bezpečnější kombinovat znak **tvorby pouzdra** (a jeho průkaz pomocí FP) se **znakem virulence** pro myš. Domníváme se, že kombinace těchto dvou základních znaků značně zvyšuje spolehlivost výsledků testu.

Novou otázkou, kterou přinesly pokusy o aplikaci antikapsulárních FP, je složení pouzdra *B. anthracis*.

V letech 1964–65 publikovala skupina pracovníků Gamalejova ústavu v Moskvě sérii článků, v nichž dokazují, že antikapsulární FP barví pouze některé komponenty pouzdra *B. anthracis*. Nálezy získané pomocí FP byly korelovány s elektronovou mikroskopií, a současně byly provedeny první pokusy určit biochemickou povahu jednotlivých frakcí (Levina a spol. 1964 a, b, Avakjan a spol. 1965).

Tyto práce však mají několik společných metodických nedostatků, z nichž hlavní se týká použitého séra. Tzv. antikapsulární sérum, používané autory, především reaguje s kapsulou pouze v kyselém prostředí. Při pH 7,2–7,4, jak je běžně používáme v imunofluorescenci, k vazbě nedochází. Tato okolnost vyvolává pochybnosti o povaze použitého konjugátu, tím spíše, že už před léty byla dokázána schopnost různých látek proteinové povahy vázat se při nízkém pH zcela nespecificky na pouzdro *B. anthracis* (Tomcsik a spol. 1954). Sérum bylo získáno imunizací králíků celou kulturou *B. anthracis*, vyrostlou v tekuté půdě s obsahem hovězího séra a řady jiných složek; získané sérum proto jistě obsahuje celý komplex protilátek. Autoři však používali výhradně nevysyceného séra, tj. možnost podílu zcela nespecifických faktorů na popisovaných reakcích byla dále zvýšena. Z pozornějšího srovnání publikovaných snímků také vyplývá, že morfologie



Obr. 3. *B. anthracis* pěstovaný *in vitro*. K zázornění pouzdra použito séra, obsahujícího protilátky převážně proti povrchně lokalizovanému antigenu

fluorescence pouzdra, jak je reprodukována v uvedených pracích, je značně rozdílná od té, kterou popisují Cherry a Freemanová, nebo od té, kterou jsme mohli pozorovat sami, resp. kterou publikoval Tomov.

Na rozdíl od ostatních pracovišť používáme k průkazu pouzder **nepřímé** imunofluorescenční metody. V tomto případě se mohou uplatnit i protilátky obsažené v séru v nízkém titru (a ztracené eventuálně při přípravě konjugátu pro přímou metodu). Vzájemné srovnání vlastností sér, připravovaných postupně v období 1963—65, nám už dříve ukázalo, že morfologie fluoreskujících opouzdrěných bacilů je při aplikaci různých šarží séra různá. Systematické sledování dynamiky tvorby protilátek během imunizace a účinku postupného vysycování „antikapsulárních“ sér vedlo ke zjištění, že pouzdro virulentních kmenů *B. anthracis* je skutečně tvořeno několika (nejméně třemi) komponentami. Jejich diferenciaci je při použití nepřímé metody možná, aniž by bylo nutné (např. pomocí fermentů, používaných v pracích moskevské skupiny) strukturu pouzdra narušovat. Diferenciaci je možné dosáhnout buď použitím protilátek z různých fází imunizačního cyklu nebo úpravou výsledného „antikapsulárního séra“.

Reakce tzv. antikapsulárních protilátek s pouzdem *B. anthracis* byla vypracována Tomcsikem (Tomcsik a spol. 1951). Bylo při ní použito neředěného séra králíků imunizovaných formolizovanou nebo autoklávovanou kulturou (Eisner 1959) opouzdrěného kmene *B. anthracis*. Jako antigen sloužila nefixovaná suspenze opouzdrěné, *in vitro* pěstované kultury *B. anthracis*. Reakce byla hodnocena pomocí mikroskopu s fázovým kontrastem a jevila se jako světlo lomící lem obklopující bacily. Vzhledem k výsledkům vysycovacích pokusů je tato „Tomcsikova kapsulární reakce“ považována za projev vazby specifické protilátky na d-glutamylpolypeptid antraxového pouzdra.

Výsledky imunofluorescenční reakce, popsané v předešlém odstavci, však svědčí pro to, že v daném případě jde o vazbu **směsi protilátek**

**na různé antigenní frakce** pouzdra, určitě ne jen na d-GPP. Naopak je třeba říci, že obraz, odpovídající fluorescenci d-GPP (masivní rovnoměrná homogenní fluorescence široké zóny obklopující buňky), je poměrně vzácný: jen malá část sér — ne víc než 10 až 50 % zvířat v jednotlivých pokusných skupinách — obsahuje protilátky proti d-GPP v dostatečném titru. U většiny králíků dochází po imunizaci formolizovanou vakcínou k vytvoření protilátek pouze proti antigenům uloženým jednak těsně při stěně bacilů, jednak v zevní části pouzdra. V posledním případě v luminiscenčním mikroskopu opouzdrěné bacily fluoreskují buď jen úzkým pruhem ohraničujícím pouzdro (kultura vypěstovaná *in vivo*) nebo je patrná fluorescence granulí nepravidelně rozložených jak při okraji, tak i v hloubce pouzdra (kultura vypěstovaná *in vitro*).

Imunofluorescenční reakce tak poskytuje metodickou možnost sledovat antigenní strukturu relativně intaktního pouzdra. Z obecně metodického hlediska je významné, že FP mohou pronikat i k hlouběji uloženým antigenním frakcím, tj. že ani v tomto typu sérologické reakce nemusí vždy jít o vazbu protilátek na antigeny lokalizované pouze na povrchu buněk.

Zjištění charakteristické struktury antraxového pouzdra, prokazatelné imunofluorescenční reakcí, může mít podstatný význam pro druhovou identifikaci *B. anthracis* uvnitř rodu *Bacillus*. Předběžné výsledky, které máme k dispozici, ukazují, že pouzdra ostatních druhů bacilů podobnou strukturu nemají a dojde-li k fluorescenci zaviněné podobným chemickým složením pouzdra (obsah d-GPP), je morfologicky snadno a bezpečně odlišitelná.

Všechna tato pozorování mají charakter předběžných výsledků. Domníváme se však, že jsou vhodnou ilustrací možností i problémů, vyplývajících z aplikace FP k detekci *B. anthracis*.

Velmi reálné je praktické použití FP k průkazu ***P. tularensis*** (Yager a spol. 1960, Jaeger a spol. 1961, McGavran a spol. 1962, McCahan a spol. 1962, Leontjev 1963, Ananova a spol. 1964, White a spol. 1964, Franěk a spol. 1965 a, b).

Pokusy, které jsme provedli, potvrdily, že se FP váží na povrchový antigen proteinové povahy, přítomný u virulentních kmenů *P. tularensis*. Mezi deseti testovanými virulentními kmeny evropského původu a americkým kmenem SCHU nebyly zjištěny žádné rozdíly v intenzitě fluorescence. Prakticky stejně dobře fluoreskuje i sovětská živá vakcína, o níž je známo, že se - co do obsahu proteinového antigenu - liší od virulentních kmenů jen kvantitativně. Naproti tomu nedochází k vazbě FP na zcela avirulentní kmeny.

Zásadní význam pro reakci má způsob přípravy diagnostického séra. V našich pokusech dala optimální výsledky jednorázová imunizace králíků živým virulentním kmenem, čerstvě izolovaným z uhynulého zajíce. U takto připravených sér je titr, zjišťovaný v NIFR, pravi-

delně v relaci s aglutinačním titrem (s tím, že hodnoty fluorescenčních titrů jsou obvykle 2krát až 4krát nižší). Podobné jsou poměry u lidských rekonvalescentních sér, kde NIFR opět dává výsledky srovnatelné s běžně prováděnou reakcí aglutinace (jak co do celkové spolehlivosti pozitivních i negativních výsledků, tak co do titrů). Pro svou rychlost a jednoduchost je NIFR vhodná zejména pro epidemiologické průzkumy.

Podstatně jiné výsledky přineslo vyšetřování sér lidí nebo králíků, imunizovaných vakcínálním kmenem *P. tularensis* (živá sovětská vakcína). Obecně je známo, že séra lidí (zvířat) očkovaných vakcínou, obsahují protilátky v nižších titrech, než séra rekonvalescentní. V aglutinační reakci byl v našich pokusech tento rozdíl vyjádřen u 32 králíčích sér průměrnými hodnotami titrů 1 : 884, resp. 1 : 167. Zhruba pětinašobné snížení průměru bylo způsobeno tím, že v postvakcinačních sérech chyběly titry vyšší než 1 : 640; této úrovně však také nedosáhla séra téměř 40 % králíků imunizovaných virulentním kmenem. Jinak řečeno, značná část sér obou skupin byla v reakci aglutinace stejně aktivní.

V NIFR je rozdíl obou skupin sér daleko větší: průměrné titry protilátek v sérech králíků očkovaných vakcínálním kmenem byly 16krát nižší než u čelenžovaných a pohybovaly se v rozmezí 1 : 5 až 1 : 40, tj. na samé hranici hodnotitelných výsledků.

Rozdíly byly pokud možno ještě výraznější u malé skupiny (osmi) lidských postvakcinačních sér, u nichž titry v NIFR byly až na jednu výjimku (1 : 80) prakticky nehodnotitelné (intenzita fluorescence nepřesahovala ani při ředění 1 : 5 ++). Průměrný titr protilátek v rekonvalescentních sérech, zjištěný při vyšetřování skupiny 149 sér, byl naproti tomu 1 : 217, při čemž přes 80 % sér fluoreskovalo alespoň na ++ — +++.

Jestliže však byla doba kontaktu postvakcinačních sér s antigenem prodloužena z obvyklých 15 na 60 minut, došlo u naprosté většiny králíčích i lidských sér k téměř úplnému vyrovnání mezi reakcí aglutinace a NIFR na vzájemný poměr, existující u rekonvalescentních sér. Tento poznatek svědčí o tom, že protilátky jsou obsaženy v obou skupinách sér, že však pro NIFR má rozhodující význam jejich avidita.

Tyto výsledky mohou mít velmi praktický význam, protože ukazují možnost odlišení postvakcinačních a postinfekčních protilátek při epidemiologických průzkumech. Tato otázka je v naší populaci, kde se každoročně očkují celé kolektivy, jistě aktuální.

Výsledky, dosažené při experimentální práci, při níž jen malou skupinu tvořila lidská séra, je ovšem třeba důkladně ověřit. Ověřovací práce by měly být zaměřeny jednak na otázku spolehlivosti testu, jednak na stanovení rozmezí signifikantních titrů — tak, aby byla umožněna korelace s dosud používanými reakcemi a přijatými hodnotami. V ČSSR, kde prakticky vše-



Obr. 4. Mukózní varianta *B. cereus*, „barvená“ anti-kapsulárním sérem, které nebylo vysyceno neopouzdřenou kulturou *B. anthracis* a obsahovalo tudíž i protilátky proti antigenům stěny

chny laboratoře jsou zásobovány konjugáty pro nepřímou metodu z jednoho zdroje, je takový úkol zcela reálný.

Správně připravená diagnostická séra dovolují získat vysoce aktivní konjugáty pro přímou metodu. Aplikace FP pak umožňuje velmi spolehlivý průkaz i ojedinělých pasterel jak v orgánech zvířat, tak ve smíšených primokultúrách. Měli jsme možnost si ověřit, že reakce je zcela spolehlivá i při vyšetřování orgánů zvířat uhynulých delší dobu před zahájením laboratorního vyšetřování, u nichž došlo k masivnímu rozmnožení banální mikroflóry (Franěk a spol. 1965 b).

Vysoké citlivosti průkazu pomocí FP je také možné — podobně jako *B. anthracis* — využít k zrychlení biologické zkoušky, při níž prokazujeme jednotlivé pasterely v orgánech v počátečním stadiu infekčního procesu.

Antigenní struktura *P. tularensis* je poměrně dobře známá, sérologické testy se běžně provádějí a jsou prokazatelně specifické. Oddiferencování antigenně příbuzných brucel je poměrně snadno možné ředěním nebo vysycením séra. Tato situace je vcelku stejná i při aplikaci FP. Zvláštností metody je především význam hodnocení morfologie fluoreskujících mikrobů, jak to už bylo diskutováno dříve (Franěk 1965 c). Zejména v orgánech je morfologie velmi charakteristická. Při pokusech o průkaz ve smíšených kulturách by snad někdy mohla působit diagnostické potíže fluorescence pyogenních stafylokoků, zaviněná jejich tendencí nespecificky vázat jakékoli FP. Vzhledem k tomu, že jak u *P. tularensis*, tak u *S. aureus* je vazba FP závislá na povrchových antigenních frakcích proteinové povahy, je obtížné zabránit nespecifické adsorpci biochemickým ovlivňováním stafylokoků (viz Procházka 1965). Ověřili jsme si v pokusech s beta hemolytickými streptokoky, že fluorescenci stafylokoků lze velmi účinně blokovat přidáním normálního séra ke konjugátům (Franěk a spol. 1966). Tato metoda je při správném výběru inhibičního séra velmi spolehlivá; nekonjugované sérum se

mimo to uplatňuje celkově, podobně jako albumin při kontrastním dobarvování (viz Franěk 1965) a blokováním náhodné adsorpce konjugátu na různé elementy obsažené v preparátu zvyšuje přesnost a demonstrativnost výsledku.

Podstatně méně zkušeností je zatím s průkazem **brucel**. Zjištění, že brucely je možné identifikovat pomocí FP, při čemž reakce je rodově specifická, bylo popsáno Biegeleisenem a spol. (1960).

Citlivost reakce při vyšetřování kódovaných, uměle infikovaných vzorků zevního prostředí byla vyjádřena počtem  $6,5 \times 10^6/\text{ml}$  (Moody, Biegeleisen a spol. 1961). Titíž autoři studovali také možnost průkazu u experimentálně i přirozeně infikovaných zvířat. V první skupině byly v orgánech jasně prokazatelné brucely; čím déle probíhal infekční proces, tím větší podíl pozitivních nálezů tvořil solubilní antigen. Pozdější experimentální práce Janney a spol. (1962), věnovaná studiu intracelulárního množení brucel v buňkách peritoneálního exsudátu morčat pomocí FP, potvrdila, že už od 12 hodin po infikování obsahuje cytoplazma buněk jak jednotlivé brucely, tak i celé okrsky homogenní fluorescence (odpovídající akumulovanému antigenu).

V chovu vepřů, který byl prokazatelně zdrojem onemocnění více než 100 osob brucelózou, byla imunofluorescenční reakce pozitivní u 5 % zvířat. Převládajícím nálezem byl solubilní antigen a jen výjimečně byly nalezeny i fluoreskující brucely. Kultivace z orgánů nebyla úspěšná, což je možné po zkušenostech s uměle infikovanými vzorky vysvětlit potlačením růstu brucel banální mikroflórou. Autoři považují za nejúčelnější metodu záchytu při vyšetřování silně znečištěného materiálu biologickou zkoušku, kombinovanou s použitím FP (Biegeleisen a spol. 1962 a).

Větší počty brucel v orgánech je zřejmě možné očekávat pouze v experimentálních podmínkách, u zvířat infikovaných masívnými dávkami, resp. při vyšetřování materiálu z genitálního traktu zvířat při abortech (Ignatjeva 1962, Věžník a spol. 1963).

Biegeleisen a spol. (1962 b) studovali také možnosti průkazu specifických antibrucelových protilátek nepřímou metodou FP. U skupiny 96 sér byla zjištěna plná shoda s reakcí aglutinace co do positivity výsledku s tím, že titry nalézané v NIFR byly asi 10krát nižší.

Spolehlivost průkazu protilátek ověřovali i v NDR. Třemi sérologickými metodami bylo vyšetřeno 500 náhodně vybraných hovězích sér. Srovnáním výsledků bylo zjištěno v RVK 0,6 %, v NIFR 1,0 % a v RA 2,4 % nesprávně negativních (Jentsch 1963). Jak vyplývá z další práce tohoto autora, NIFR je analogicky Coombsovu testu použitelná k detekci inkompletních protilátek (Jentsch 1964).

Za poslední léta se konečně shromáždil i značný literární materiál o průkazu **leptospir**.

Už jedna z prvních prací věnovaných diagnostické aplikaci FP přinesla doklady o úspěšném znázornění leptospir v preparátech ze

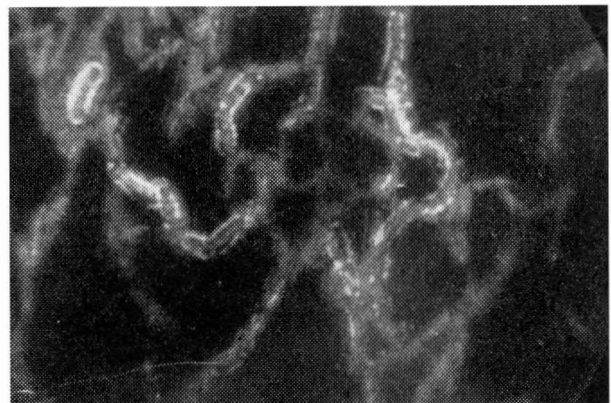
svalu nemocného člověka (biopsie byla provedena 9. den nemoci). Obvyklými barvicími metodami nebylo možné — přes celkově typický histologický obraz — leptospiry prokázat. Pomocí FP byly nalezeny ojedinělé útvary tvarově podobné leptospirám, ale zejména specificky fluoreskující ložiska antigenního materiálu (Sheldon 1953).

V experimentálních podmínkách byla zvýšená citlivost metody ve srovnání s impregnací stříbrem, mikroskopováním v zástínu nebo kultivací opakovaně zjištěna při vyšetřování různého materiálu — např. ledvin křečků (Moulton a spol. 1957), moči morčat a telete (White a spol. 1959) nebo allantoidní tekutiny kuřecích embryí (Coffin a spol. 1962). Stejný závěr vyplývá i z práce Maestrone (1963), provedené na větším počtu i přirozeně infikovaných zvířat.

Z téže práce je současně zřejmé, že k dosažení uspokojivých výsledků je nezbytné pečlivě propracovat techniku aplikace FP na leptospiry. Autor sledoval význam řady faktorů. Ale i po výběru optimálních postupů bylo v některých případech nutné prodlužovat dobu barvení až na 2 hodiny, popřípadě po barvení specifickým konjugátem ještě dodatečně aplikovat antikráličí konjugát.

Na rozdíl od bakterií s rigidní buněčnou stěnou nedochází u leptospir k fluorescenci kontur. Leptospiry fluoreskují svou plochou. Vlivem fixace je porušována jejich morfologie. V luminiscenčním mikroskopu se proto jeví jako velmi jemné, nepravidelné nitkovité útvary (White a spol. 1959, Černuka a spol. 1965), které není vždy snadné odlišit od pozadí.

Od počátku pokusů o průkaz leptospir pomocí FP je známo, že reakce je rodově, nikoli druhově specifická (White a spol. 1959, Dacres 1961, Pillot a spol. 1963). Černuka a spol. (1965) zjistili, že zkřížené reakce je možné odstranit vysycením konjugátu heterologním kmenem leptospir. Domnívají se proto, že jde o „nespecifičnost“ zaviněnou tím, že se v imunofluorescenční reakci — na rozdíl od reakce aglutinace-lýzy — uplatňuje i rodový, všem leptospirám společný antigen, jehož existence



Obr. 5. Tatáž kultura po aplikaci antikapsulárního séra, vysycené neopouzdřenou kulturou *B. anthracis* ST1. Zvýrazněn skutečný obsah kapsulárního materiálu

byla v posledních letech zjištěna (Rothstein a spol. 1956).

Ze srovnání výsledků různých autorů vyplývá, že je předčasně obecně charakterizovat specifickou vazbu FP na leptospiry, protože rozsah vazby závisí do značné míry na použité technice přípravy preparátů (při čemž podrobná srovnávací práce nebyla dosud provedena). Bulanger a spol. (1961) už dříve zjistili, že při aplikaci FP na leptospiry fixované formalínem se ve srovnání s jeho aplikací na živé leptospiry rozšiřuje spektrum reakcí. Dacres (1963) pozoroval „skupinové“ reakce pouze na preparátech fixovaných formalínem. Naproti tomu u leptospir fixovaných kyselinou osmičelou docházelo pouze ke specifické vazbě druhových konjugátů. Tyto nálezy zatím nebyly ověřeny.

### Komentář

Vzhledem k tomu, jak rychle a do jaké šíře se rozrůstá literatura věnovaná problémům diagnostické aplikace FP, byl tento přehled zpracován ani ne tak z hlediska úplnosti jako spíše z hlediska nejzávažnějších výsledků a problémů, které tato aplikace u skupiny zárodků antropozoonóz přinesla.

Údaje, které jsou k dispozici, potvrzují, že FP je možné účelně využít v diagnostice všech uvedených zárodků antropozoonóz. Při správné aplikaci znamenají FP nejen zrychlení diagnostiky, ale i vyslovený přínos ve srovnání s dosud používanými metodami.

U *B. anthracis* poskytují antikapsulární FP unikátní možnost průkazu i ojedinělých a morfologicky necharakteristických bacilů v orgánech (částečně fagocytovaných, rozpadajících se pod vlivem aplikovaných antibiotik apod.).

Také u *P. tularensis* je nejdůležitější možnost průkazu jednotlivých pasterel v orgánech experimentálně i přirozeně infikovaných zvířat, při čemž hlavně v posledním případě je významné, že reakce není ovlivňována přítomností vedlejší banální mikroflóry.

Pokud jde o brucely, je nepochybná možnost přímého průkazu v materiálu z genitálního traktu zvířat při abortech; význam a spolehlivost detekce solubilního antigenu u chronicky nemocných zvířat je třeba dále sledovat.

Zřejmá je také účelnost použití FP k identifikaci obou druhů zárodků ve smíšených primokulturách.

U obou infekcí byla dostatečně prokázána i efektivnost nepřímé imunofluorescenční reakce při detekci specifických protilátek. Metoda má zatím omezené použití při sledování klinických případů, protože nebyla vypracována kritéria pro interpretaci jednotlivých nálezů ve vztahu k přijatým sérologickým testům. Pro epidemiologické průzkumy však může být reakce použita okamžitě.

Také u leptospir byly dosaženy dobré výsledky zejména při přímé detekci v moči a orgánech zvířat a také při identifikaci kultur. Praktický význam je však snižován tím, že neexistuje ověřená, obecně přijatá metodika. A při tom ze srovnání jednotlivých prací vyplývá, že

právě v tomto případě má postup při přípravě preparátů principiální význam pro výsledek.

Při jakékoli aplikaci FP je konečně třeba odpovědět na otázku, do jaké míry jsou výsledky této nové metody srovnatelné se známými sérologickými testy (tj. zda tato metoda informuje o stejných antigenech a protilátkách jako jiné reakce). Situace není u všech zárodků dané skupiny stejná.

Problematika detekce *B. anthracis* byla podrobněji charakterizována výše. Z hlediska rozpracovávání imunofluorescenční reakce zasluhují pozornost výsledky aplikace antikapsulárních FP. Je to jeden z těch případů, jakých je v bakteriologii zatím jen několik, kdy imunofluorescenční metoda nejen že signalizuje potřebu hlubšího studia antigenní struktury, ale sama se aktivně podílí na získání nových poznatků (týkajících se v daném případě počtu a lokalizace antigenně odlišných složek pouzdra).

Starší poznatky se plně uplatňují u *P. tularensis*, kde specifická reakce FP odpovídá vcelku specifické reakce aglutinace. V některých ohledech se však obě reakce liší. Byla už diskutována otázka avidity sér, zajímavý je také význam výběru antigenu: použití amerického kmene SCHU jako antigenu zvýší titry v RA o 2–3 ředění, zatímco v imunofluorescenční reakci zůstává titr zcela neovlivněn.

Z biochemických prací je známo, že povrchový proteinový antigen *P. tularensis* se skládá nejméně ze 6 komponent. Jejich úloha v sérologických reakcích nebyla dosud studována. Je možné, že výzkum vedený tímto směrem pomůže vysvětlit detaily vazby protilátek na mikrobiální buňku a zvýšit exaktnost nejen imunofluorescenční, ale i ostatních sérologických reakcí, používaných k identifikaci *P. tularensis*.

U brucel se aplikace FP omezila na průkaz rodové specifické konjugáty, připravených z běžně používaných aglutinačních sér, a na ověření možnosti detekce protilátek (srovnáním s RA a RVK). Podíl tzv. „A“ a „M“ antigenů na reakci (a s tím související případná možnost diferenciace *Br. melitensis* od *Br. suis* a *Br. abortus*) nebyl studován. Nebyl také zjišťován význam hlouběji uložených frakcí (tzv. „Z“ a „r“ antigeny), přítomných u některých kmenů brucel. Je však známo, že FP, připravené z komerčního aglutinačního séra, nereagují s asi 20 % čerstvě izolovaných brucelových kmenů (Uralova, ústní sdělení). Změnou imunizační techniky, spočívající v použití „polv-vakcín“, v ní je tradiční formolizovaná vakcína doplněna vakcínou inaktivovanou šetrnějším způsobem, byl tento nedostatek odstraněn. Toto pozorování svědčí pro to, že na reakci s FP se u různých kmenů mohou podílet různé antigenní frakce. Empiricky vypracovaný postup přípravy diagnostických sér vyhovuje praktickému použití, nenahrazuje však nutnost imunologického studia reakce.

Na podobnou závislost reakce na přítomnosti antigenních frakcí různé povahy (a v různé míře postižených fixačními postupy) ukazují

i uvedená pozorování týkající se leptospir. Konkrétní doklady o podílu jednotlivých antigenů nebyly dosud získány.

Z přehledu dosažených výsledků a z heslovitého nástinu imunologické problematiky vyplývá, že metoda FP vcelku vychází z dříve zjištěných poznatků o antigenní struktuře, při čemž **existující postupy umožňují u dané skupiny zárodků praktické využití FP.** Na druhé straně je zřejmé, že používané postupy jsou ve své podstatě empirické a nejsou zatím podloženy imunochemickým studiem. Tento stav je pravidlem u naprosté většiny diagnostických sérologických testů. U metody FP je však ve zvýšené míře pocítován jako nedostatek, protože vysoká citlivost reakce a její závislost na stavu (úplnosti antigenního vybavení, morfologii atd.) jednotlivých buněk detekované bakteriální populace zvyšuje nároky na znalost detailů vazby protilátky na antigen, umožňující odpovědnou interpretaci výsledků. Tyto otázky jsou proto hlavní náplní současné etapy výzkumných prací v oblasti diagnostické imunofluorescence.

#### Písemnictví

- Achmerov, D. Š.: Učeň. zápisky Kazan. vet. instituta, 84, 1962, 55—58.
- Ananova, E. V., Jameljanova, O. S.: Lab. dělo, 1, 1964, 35—39.
- Avakyan, A. A., Katz, L. N., Pavlova, I. B.: J. Bacteriol. 90, 1965, 1082—1095.
- Biegeleisen, J. Z., Moody, M. D.: Bact. Proc. 1960, p. 140—141.
- Biegeleisen, J. Z., Moody, M. D., Marcus, B. B., Flynt, J. W.: Am. J. Vet. Res., 23, 1962 a, 592—595.
- Biegeleisen, J. Z., Bradshaw, B. R., Moody, M. D.: J. Immunol. 88, 1962 b, 109—112.
- Biegeleisen, J. Z., Cherry, W. B., Skaley, P., Moody, M. D.: Am. J. Hyg., 75, 1962 c, 230—239.
- Blagověščenskij, V. A., Kulberg, A. Ja., Bulatova, T. I., Korn, M. Ja.: Ž. Mikrobiol. 3, 1962, 18—23.
- Boulanger, P., Robertson: Can. J. Compar., Med. Vet. Sci., 25, 1961, 299.
- Busygin, K. F.: Učeň. zápisky Kazan. vet. instituta, 84, 1962, 65—68.
- Mc Cahan, G. R., Moody, M. D., Hayes, F. A.: Am. J. Hyg. 75, 1962, 335—338.
- Chernukha, Y. G., Korn, M. Y.: J. Hygiene (Praha), 9, 1965, 240—246.
- Cherry, W. B., Freeman, E. M.: Zbl. Bakt., I. Abt., Orig., 175, 1959, 582—603.
- Coffin, D. L., Maestrone, G.: Am. J. Vet. Res., 23, 1962, 159—164.
- Dacres, W. G.: Am. J. Vet. Res. 22, 1961, 570—572.
- Dacres, W. G.: Am. J. Vet. Res. 24, 1963, 1321—1323.
- Dolgov, A. F.: Vojenno-med. Ž. 10, 1960, 44—47.
- Dowdle, W. R., Hansen, P. A.: J. Infect. Dis. 108, 1961, 125—135.
- Eisner, Schweiz. Z. Allg. Path. Bakt. 22, 1959, 129—144.
- Franěk, J.: Čs. EMI, 10, 1961, 377—384.
- Franěk, J.: Bibliograf. zpravodaj OIS VLVDŮ Hradec Králové, 1, 1962, 54—86.
- Franěk, J.: Zprávy z epid. a mikrob., 5, 1963, 5—9.
- Franěk, J.: J. Hygiene (Praha), 8, 1964, 111—119.
- Franěk, J.: J. Hygiene (Praha), 9, 1965, 160—168.
- Franěk, J., Procházka, O.: Folia microbiol. 10, 1965 a, 77—84.
- Franěk, J., Wolfová, J.: Folia microbiol. 10, 1965 b, 85—92.
- Franěk, J.: Voj. zdrav. listy, 34, 1965 c, 21—26.
- Mc Gavran, M. H., White, J. D., Eigelsbach, H. T., Kerpsack, R. Y.: Am. J. Pathol. 41, 1962, 259—271.
- Ignatjeva, O. A.: Učeň. zápisky Kazaň. vet. instituta 84, 1962, 59—63.
- Jaeger, R. F., Spertzel, R. O., Kuehne, R. W.: Appl. Microbiol. 9, 1961, 585—587.
- Janney, G. C., Berman, D. T.: Am. J. Vet. Res. 23, 1962, 596—598.
- Jentzsch, N. D.: Arch. Exp. Veterinarmed. 16, 1963, 921—935.
- Jentzsch, K. D.: Zbl. Bakt. I. Abt. Orig., 192, 1964, 262—264.
- Kuzmin, N. A.: Ž. Mikrobiol., 3, 1962, 23—27.
- Leontjev, A. N.: Ž. mikrobiol., 11, 1963, 146.
- Levina, E. N.: Ž. mikrobiol. 1958, 9—11.
- Levina, E. N., Kay, L. N.: Ž. mikrobiol. 10, 1964, 85—89.
- Levina, E. N., Archipova, V. R.: Lab. dělo, 10, 1964, 619—623.
- Lisickij, I. P., Minčev, P. N., Matvěev, B. A.: Vojenno-med. Ž. 8, 1963, 39—41.
- Maestrone, G.: Can. J. Comp. Med. Vet. Sci. 27, 1963, 108—112.
- Moody, M. D., Niegeleisen, J. Z., Taylor, G. C.: J. Bacteriol., 81, 1961, 990—995.
- Moulton, J. E., Howarth, J. A.: Cornell Vet., 47, 1957, 524—532.
- Pillot, J., d'Azambuja, S.: Ann. Inst. Pasteur, 104, 1963, 137—141.
- Podkopajev, V. M.: Ž. mikrobiol., 2, 1964, 80—84.
- Pritulin, P. I., Kuzmin, N. A.: Veterinarija, 7, 1959, 69—73.
- Procházka, O.: Voj. zdrav. listy, 34, 1965, 268—273.
- Rothstein, N., Hlatt, C.: J. Immunol., 77, 1956, 257.
- Sheldon, W. H.: Proc. Soc. exp. Biol. Med., 84, 1953, 165—167.
- Tomcsik, J., Guex-Holzer, S.: Schweiz. Z. Pathol. Bakt. 14, 1951, 515—522.
- Tomcsik, J., Guex-Holzer, S.: J. Gen. Microbiol. 10, 1954, 97—109.
- Tomov, A., Todorov, T., Benvenisti, I.: Epidemiolog. microbiolog. i infect. bil. (Sofia) 2, 1965, 152—157.
- Věžník, Z., Věžníková, D., Žák, K.: Folia microbiol. 8, 1963, 189—190.
- White, F. H., Ristic, M.: J. Infect. Dis., 105, 1959, 118—123.
- 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.
- Yager, R. H., Spertzel, R. O., Jaeger, R. F., Tigertt, W. D.: Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 105, 1960, 651—654.