

## **FLUORESKUJÍCÍ PROTILÁTKY V RYCHLÉ DIAGNOSTICE VIROVÝCH INFEKČÍ**

### **1. Všeobecná problematika**

Podplukovník MUDr. Rudolf BENDA, CSc.

Vojenský ústav hygieny, epidemiologie a mikrobiologie, Praha

Od prvního průkazu virového agens (parotitidy) imunofluorescenční (IF) metodou uplynulo více než 15 let. Za tuto dobu se nashromáždilo velké množství nových výsledků a experimentálních zkušeností. Svědčí o tom něko-

lik souborných, různě zaměřených studií (90, 28, 122, 57, 15, 3, 107). Nejvíce teoretické je zpracování příslušné kapitoly v nedávné monografii Nairnově (110).

Je samozřejmé, že v popředí velké řady po-

kusných prací jsou otázky diagnostiky virových infekcí. Již zde v úvodu je na místě upozornit na tři novější příspěvky, zamýšlející se nad praktickými aplikacemi i perspektivami IF metody při virologické diagnostice v zařízeních hygienicko-epidemiologické služby: na práci Coonse (31), Cheevera (27) a Schaeffera a sp. (129).

Celkově materiál ze všech citovaných příspěvků nabádá k vyslovení názoru, že by zatím nebylo správné našim diagnostickým laboratorům uniformně dekretovat, jak a v jakém rozsahu mají rychlou diagnostiku virových infekcí IF metodou převést ve skutečnost. Laboratoře jsou totiž různě začleněny do struktury hyg.-epid. služby v našem státě, mají různé pracovní podmínky a jednotliví pracovníci v nich rozdílnou odbornou zkušenost. Bude proto vhodnější zaměřit se v tomto přehledu spíše na možnosti, které nám pro budoucí dobu poskytuje bohatý materiál světové literatury, a nechat na pracovnících samých, které metodiky chtějí (a mohou) ve svých podmínkách postupně zavádět. Oni by také měli určit proporci mezi epidemiologicky zaměřenou a tzv. klinickou (kazuistickou) diagnostikou. Nejlépe pak lze ovlivňovat zaměření a možnosti práce na diagnostických laboratorích centrálním zajišťováním ingrediencí a specializovaného zařízení.

Předkládaná první část přehledu věnovaného aplikaci IF metody ve virologické diagnostice se zabývá všeobecnými otázkami, tj. převážně některými zvláštnostmi aplikačních metodik a přístupů, jimiž se liší virologie např. od bakteriologie. Spolu s druhou částí, jejímž obsahem je zhodnocení možností rychlé diagnostiky jednotlivých virových infekcí, má za účel — podobně jako práce Rehnova (126) o rickettsiích a bedsoniích — doplnit tři předcházející sdělení Fraňka (39), věnovaná základní tematice a nákazám bakteriálním.

### Příprava a vlastnosti antivirových sér

Tato dílčí otázka zahrnuje řadu problémů. Jedním z nich je přítomnost heterologních tkáňových protilátek (122, 110) v antivirových sérech, resp. v antivirových globulinech označených fluoresceinizo-thiocyanátem (FITC). Nerespektování toho vede k nespecifickému nálezu a tím neobjektivnímu závěru. Připravíme-li např. hyperimunní antipoliomyelitické sérum na necitlivém zvířeti (třeba králíku) s pomocí nečištěného viru pocházejícího z tkáně jiného druhu (třeba z buněk opičích ledvin), nemůžeme pro vytvoření nespecifických tkáňových protilátek v séru (globulinu) prokazovat příslušný virový antigen v opičích ledvinových buňkách a vůbec v tkáni opičího původu.

Z tohoto hlediska je možno považovat za lepší séra rekonvalescentní, vznikající za podmínek vhodné vnímavosti a citlivosti hostitele. Infikující virus přichází v tomto případě do organismu v nepatrném objemovém množství, takže tkáňové protilátky se nevytvářejí. Lidská

rekonvalescentní séra dospělých — proti zvířecím, připraveným v laboratoři — však nejsou příliš výhodná pro přítomnost širokého spektra protilátek k těm virům, které se často vyskytují v populaci (myxoviry, adenoviry, rhinoviry, enteroviry, virus herpes simplex aj.). Jejich použití je často přímo vyloučeno (v těch případech, kdy chceme detegovat IF metodou právě některý ze jmenovaných běžně se vyskytujících virů).

Obě nevýhodné vlastnosti antivirových sér, tj. obsah heterologních tkáňových protilátek ve zvířecích sérech hyperimunních nebo současná přítomnost řady různých jiných protivirových protilátek ve zvířecích sérech a hlavně v lidských rekonvalescentních sérech nasvědčují tomu, že hlavní perspektivní cestou je příprava zvířecích sér s pomocí vysoce purifikovaných a koncentrovaných virových suspenzí nebo jednotlivých z nich separovaných frakcí. Příkladem takového postupu jsou — kromě jiných — klasické práce s virem vakcíny (115) nebo s myxoviry (152, 20, 62).

Uvedený požadavek na způsob přípravy sér je dnes již všeobecně znám, dokázán i objasněn a vžívá se do metodologie práce s viry. Neobjasněny zůstávají (vzhledem k aplikaci metody fluoreskujících protilátek) možnosti využití zkušeností, že se navzájem liší kvalitativně svými vlastnostmi 19S a 7S protilátky antivirových sér.

### Konjugace sér s FITC a nespecifická fluorescence

Jako v ostatních disciplínách i ve virologii je v současné době používá ke konjugaci s protilátkami výhradně FITC. Ke konjugační proceduře se obvykle bere celá globulinová frakce séra. Výjimkou téměř jedinou je příprava na západě používaného a vysoce aktivního anti-rabického značeného gama-globulinu z hyperimunního koňského séra (37).

Konjugační techniky se všelijak navzájem liší a nemělo by význam se na tomto místě jimi zabývat. Poučení o této problematice najdeme v imunochemických pracích z let 1960—1964, provedených na modelových (nikoli protivirových) globulinech. Výsledky tohoto studia, zejména pak práce McDevitta a sp. (101), McKinneye a sp. (102) a Lewise a sp. (86) zásadně ovlivnily a zmodernizovaly technologii konjugace v celé sféře oborů, v nichž se metoda fluoreskujících protilátek používá.

S otázkou konjugace protilátek úzce souvisí problém nespecifické fluorescence. Její redukce je zvláště důležitá při diagnostické práci, poněvadž nespecifické nálezy podmiňují omylné výsledky a ty pak zase samu metodu diskreditují. Snížení fluorescence pozadí má vůbec největší význam při přímém vyšetřování patologického materiálu.

Jak bylo řečeno již v předcházející kapitole, může být nespecifické přibarvování výsledkem heterogenity protilátek užitých k označení. Tyto nespecifické reakce jsou těžko odstranitelné a často vůbec neodstranitelné, podobně jako

např. nespecifické přibarvování granul v eozinofilech. Ostatní nespecifická fluorescence, podmíněná nespecificky svázaným fluoresceinem nebo volným fluorochrómem, se odstraní. Metody zahrnují prolongovanou dialýzu při +4° C, frakcionaci na sloupci z DEAE celulózy, adsorpci na uhlí, gelovou filtraci s použitím Sephadexu nebo kombinované techniky (45, 33, 86, 110). Purifikované preparáty obvykle vyžadují ještě další opracování tkáňovými suspenzemi nebo prášky extrahovanými acetonem. Často se doporučuje — zejména ve virologii — používat kontrastního dobarvení albuminem, který je konjugován s rhodaminem (136). Nejlepším preparátem je pro oranžově červenou fluorescenci komerční lissamine-rhodamin B-200. Podle našich zkušeností je tento fluorochróm výhodnější než např. chemicky stálejší, ale málo intenzivně fluoreskující sulfofluorid rhodaminu (113). K mikroskopům s velkým pozadím, jako je např. ML-2, však se tento poslední výborně hodí. Kontrastní barvení se může provádět současně se specifickým barvením i po něm (dvoufázově). Rozhodně však nesmíme kontrastní dobarvování považovat za samospasitelné a nevěnovat přitom pozornost kvalitě konjugovaného imunního globulinu. Tato stále zůstává základní a určující. Ostatní podrobnosti o nespecifické fluorescenci viz úvodní příspěvek Fraňka (39).

#### **Přímá a nepřímá technika a ostatní modifikace IF metody**

V souvislosti s velkým počtem virových druhů se vynořuje otázka, zda používat přímou nebo nepřímou techniku IF barvení. Bez ohledu na obecné výhody a nevýhody obou postupů se zdá být oprávněn názor, že k typové diferenciaci širokého spektra virů, přináležejících k jednomu nebo několika rodům, resp. skupinám (enteroviry, adenoviry, chřipkové viry a viry parainfluenzy, arboviry i jiné) je výhodnější nepřímá metoda. Ke skupinové diagnostice, která nám někdy může docela postačit (adenoviry) nebo musí postačit (neštovičné viry), je možno s výhodou užít přímé metody. Přímé barvení je metodou volby také u takových nákaz, jejichž původci představují jedinečný imunologický typ (virus rabický, LCM). Zdá se však, že vyhraněně uvažovat nelze, neboť volba barvicí procedury často vychází nejen z daného úkolu nebo všeobecného zaměření laboratoře, ale i z možností, které jsou k dispozici. V každém případě se nepřímá metoda hodí při ovládnutí IF diagnostiky. Zbavuje starostí ty, kteří — za špatné situace u nás s centrální výrobou antivirových značených globulinů — nemají na svých pracovištích imunochemický servis.

S nepřímou IF metodou (153) souvisejí ještě dvě další otázky. Prvou z nich je tzv. komplementová metoda (48, 61) detekce virových antigenů, doporučovaná řadou pracovišť v zahraničí. K rutinní diagnostice je oprávnění ji doporučovat v tom případě, že protimorčí, resp.

protikomplementový konjugovaný antigamaglobulin je vysoce aktivní a zejména pak vysoce specifický. Náš komerční preparát v současné době není v tomto smyslu na úplně odpovídající úrovni.

Pokud se týká doporučení druhé modifikace klasické nepřímé IF metody k rutinní diagnostice, tj. využití jí k IF detekci protilátek v sérech, jak je popsáno u enterovirových infekcí (21), rabiesu (146), rubelly (22, 129), LCM (ústní sdělení J. Hotchina 1965), je správné ještě určitý čas vyčkat. U rabiesu (pokud chceme detekci protilátek zjistit v krátké době účinností použité očkovací látky) nebo u rubelly je navržený postup účelný. Technika vypracovaná u LCM je v současné době prověřována na jiných necytopatických virech (arboviry skupiny B) a mohla by se stát v budoucnosti metodou volby, aspoň u klíštové encefalitidy. IF detekce protilátek u enterovirových infekcí se jeví pro velký počet druhů diskutabilní. (Mimořádně je třeba upozornit na to, že absolutní podmínkou pro úspěšnou detekci protilátek pomocí IF je nejen dostatečné zhuštění antigenu, na něž vyšetřované protilátky navazujeme, ale i vysoká kvalita [svítivost] příslušného značeného antiglobulinu.)

Důležitou modifikací IF metody (přímého i nepřímého barvení) je průkaz virů pomocí tzv. počítání fluoreskujících buněk v tkáňové kultuře (154, 121, 49, 52, 53). Základ techniky (průkaz fluoreskujících ložisek nebo mikroplaků) položili svými pracemi již Noyes s Watsonovou (114, 115) a na rozpracování a zjednodušení participovala řada dalších autorů. Metoda se hodí nejen k titraci, ale i k detekci virů, a svou citlivostí — při dosažení rychlejšího výsledku i u necytopatických agens — se vyrovná konvenčním technikám.

#### **Vizualizace virového antigenu a jeho lokalizace v buňce**

Virus obarvený fluoreskujícími protilátkami můžeme pozorovat\* ) pro omezenou rozlišovací schopnost fluorescenčního mikroskopu pouze jako menší nebo větší nakupeniny antigenu. Ten je lokalizován podle druhu viru a jeho vývojového stadia v jádře, v perinukleární zóně cytoplazmy nebo difúzně v cytoplasmě, popřípadě v celé morfologicky změněné nebo i normální buňce tkáňové kultury, tkáně, či patologického materiálu. Lokalizace antigenu závisí někdy i na druhu použitého antivirového séra. Zvláště perspektivní — vzhledem k diagnostickým účelům — je pokusně ještě neuzavřený a praxí neproověřený IF průkaz v bílých krvinkách (139).

Prokazovat virový korpuskulární antigen mimo buňku (volné inkluze, fluoreskující buněčná drť) v tkáňové kultuře a zejména pak v pato-

\* ) Na rozdíl od bakteriologie používáme ve virologii většinou menší zvětšení (100—250krát); imerzního systému používáme pouze při vyhodnocení detailů, popřípadě k dokumentaci vhodných nálezů.

logickém materiálu je při diagnostice diskutabilní a nese s sebou riziko omylu. Limitace však není absolutní. Při určité zkušenosti za podmínek slabě přibarvujícího pozadí a dobrého odstranění nespecifické fluorescence (včetně zakódování pozitivní specifické fluorescence známého materiálu) a po dokonalém vymytí preparátu můžeme spolehlivě hodnotit i specificky fluoreskující antigen vně buňky. Jako příklad lze uvést zprávu Kirsche a Kisslinga [74], Goldwassera, Kisslinga a sp. [46, 47] i Biegel-eisena a sp. [16] o nálezech při vyšetřování patologického materiálu, obsahujícího virus varioly, rabiesu, resp. herpes simplex. Je si třeba ovšem uvědomit, že při takovém vyšetření obvykle vidíme vedle extracelulárně fluoreskujícího antigenu i obarvený virus uvnitř celých (zřetelných) a aspoň ojediněle se vyskytujících buněk. Zkušenost máme na naší laboratoři ověření u rabiesu, herpetické infekce a u materiálu z vakcinálních kožních lézí.

Přehled možných lokalizací fluoreskujícího specifického antigenu v buňce u jednotlivých virových infekcí je zpracován v monografii Nairnově [110]. Odkazují přímo tam s vysvětlením, že rozdíly u některých infekcí (např. chřipky), pozorované různými autory, jsou podmíněny vlastnostmi sér i celou řadou dalších faktorů, jako je druh buněk, stadium infekčního procesu, způsob barvení aj. Zdá se, že pro jednoduchou, avšak spolehlivou praktickou diagnostiku je nejvýhodnější takový výběr ingrediencí (sér), které se vážou na povrchový antigen (většinou protein) zralé virové partikule. Z tohoto hlediska je od začátku řešena např. detekce neštovičných virů [115] a podobně rychlou diagnostiku chřipky i některých ostatních myxovirových infekcí mají tendenci někteří autoři realizovat s pomocí sér získaných imunizací čištěným V antigenem [57, 62].

Při vizualizaci virů IF metodou v buňce je vhodné, jak již bylo řečeno shora, dobarvovat pozadí oranžově červeně fluoreskujícím rhodaminem. Často se také specifické IF barvení kombinuje (na paralelních preparátech) s barvením akridinovou oranží, fluorochrómem, kte-

rý umožňuje v buňce diferencovat DNK od RNK (přehled o aplikacích včetně barvicí techniky viz Pollard a Starr 123). Podobný doplňující význam má fázově kontrastní mikroskopie, konvenční barvení nebo jiné histochemické techniky než je barvení akridinovou oranží. S výjimkou akridinové oranže nejsou však zatím u žádné z uvedených technik ještě stanoveny přesné indikace jejich doplňujícího významu a aplikace při rychlé diagnostice virových nákaz fluoreskujícími protilátkami.

### Závěry

Rychlou diagnostiku virových infekcí je možno zásadně řešit dvěma způsoby.

První spočívá v průkazu virového antigenu přímo ve vhodném patologickém materiálu z člověka, obsahujícím postižené buňky. Zdaleka však zatím tuto techniku nelze aplikovat u všech infekcí, resp. klinických syndromů. Příkladem takového způsobu jsou klasické práce s chřipkou [89], rabiesem [47], herpesem prostým [16] a variolou [74].

Základem druhého způsobu je urychlení identifikace agens po jeho předmnožení při izolačním pokuse, prováděném na tkáňových kulturách, v kuřecím embryu nebo pokusném zvířeti. Tento postup byl využit mnoha autory a je realizovatelný u všech infekcí, jichž původce umíme s poměrnou spolehlivostí zachytit z patologického materiálu na citlivém kultivačním systému. Příkladem takového způsobu rychlé IF diagnostiky je v nedávné době precizně vypracována detekce varioly a žluté zimnice, založená na vizualizaci fluoreskujících buněk nebo mikroplaků v tkáňové kultuře očkované podezřelým materiálem [52, 53].

### Souhrn

V této první části práce jsou krátce a z praktického hlediska zhodnoceny některé dílčí otázky, které mají význam při diagnostické aplikaci metody fluoreskujících protilátek u virových infekcí.