

## FLUORESKUJÍCÍ PROTILÁTKY V RYCHLÉ DIAGNOSTICE VIROVÝCH INFEKČÍ

### 2. Speciální část

Podplukovník MUDr. Rudolf BENDA, CSc.

Vojenský ústav hygieny, epidemiologie a mikrobiologie v Praze

Literární prameny o aplikaci IF metody u virových nálezů jsou poměrně četné a často se v nich problematika experimentální i praktická (diagnostická) prolíná. Proto je učiněn v tomto přehledu pokus o výběr pouze těch studií, které mají výchozí (metodický) význam, a zevrubněji jsou pak komentovány ty z dalších prací, které se dotýkají nebo mají přímý vztah k ře-

šení diagnostiky virových infekcí, nejdůležitějších pro laboratoře hygienicko-epidemiologické služby.

#### **Infekce vyvolané neštovičnými viry**

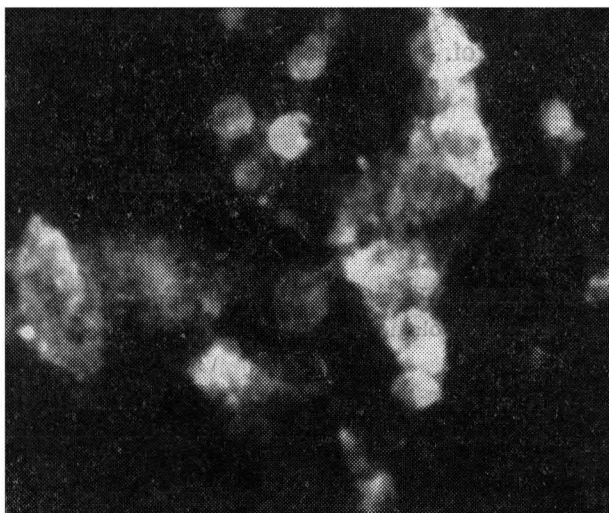
Hlavní diagnostický zájem v této skupině infekcí představuje variola. Diferencovat od ní přichází v úvahu u některých případů ge-

neralizované vakcíny nebo těžké varicelly, resp. generalizovaného zosteru (129).

Rychlá diagnostika varioly, jak ji rozpracovala v posledních letech řada autorů, vychází ze základní práce Noyese a Watsonové (115), provedené s virem vakcíny. Ačkoli prioritu v aplikaci IF k diagnostice varioly mají sovětští autoři (např. Avakjan a sp. — 5), nacházíme dobře dokumentované studie až v pozdějších, většinou západních pracích. Ty můžeme v podstatě rozdělit na dvě skupiny:

První se zabývají identifikací viru varioly (bez nároku na diferenciaci od ostatních neštovičných původců, zejména viru vakcíny) přímo v materiálu z lézí (108, 74, 129). Předběžná diagnóza je hotova do 2 hodin po odběru materiálu. Zejména studie Murraye (108) upozorňuje — kromě podrobného popsání metodického postupu — na nutnost správného odběru materiálu (seškrab spodiny vezikul) a dále pak vyslovuje kritéria pro hodnocení nálezu: diagnózu lze vyřknout tehdy, jestliže vidíme celé morfologicky ještě nepřliš změněné buňky, ve skupinách či jednotlivě, s obsahem fluoreskujícího antigenu. Bals a Caruntu (7) zdůrazňují ve své práci s virem vakcíny výhody dobarvování pozadí. Máme podobné zkušenosti a ověřili jsme si nutnost předcházejícího otitrování ingrediencí k tomu, aby bylo dosaženo maximálního kontrastu.

Druhá skupina prací se věnuje rychlé diagnostice varioly během izolačního pokusu na tkáňových kulturách. Hahon (52) aplikoval k této práci techniku počítání fluoreskujících buněk. Zvýšení citlivosti detekce dosahuje zlepšením adsorpce viru z vyšetřovaného materiálu centrifugací při 500 G po 15 minut přímo na kulatá, buňkami porostlá sklíčka ve speciálním zařízení (patrony z umělé hmoty). Diagnostiku s vysokou záchytností do 24 hodin, nediferencuje však variolu od vakcíny. Carter (26) využívá rozdílných kultivačních vlastností obou



Obr. 1. Specificky fluoreskující buňky a buněčná drť v seškrabu spodiny chráničky po skarifikaci virem vakcíny. Přímá IF metoda. Zvětš. asi 500krát

virů: růst varioly se opožďuje proti vakcíně při 36° C, takže za 24 hodin vidíme pouze jednotlivé buňky, u vakcíny již ložiska buněk. Kromě toho virus varioly neroste při 41° C, zatím co virus vakcíny vizualizujeme za tuto dobu již v jednotlivých buňkách. Spojením obou postupů a hledisek můžeme dosáhnout vysoké citlivosti záchytu varioly i její diferenciaci od vakcíny.

Důležitý materiál o diferenciaci neštovičných virů od některých virů herpetických, zejména herpesu prostého, přináší studie Gurvičova a Roihelova (51). Podobně se této otázce dotýká povšechná práce Nettera a Lapeyrea (111). Bals a Caruntu (7) diferencují neštovičné viry od viru varicelly-zosteru.

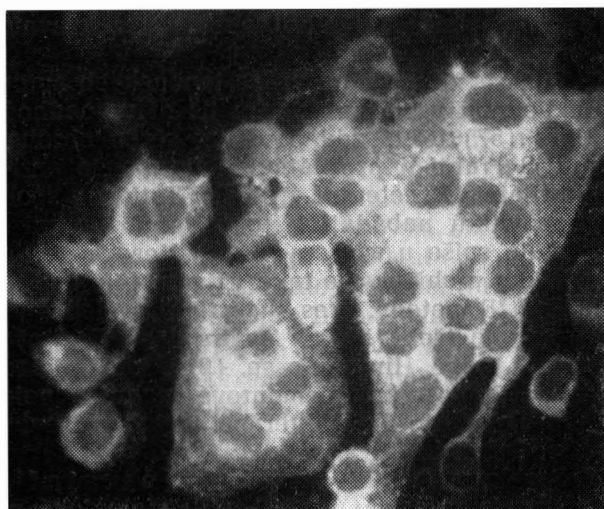
### Infekce vyvolané druhy skupiny Herpesvirus

Diagnostický interes představují zejména infekce vyvolané virem herpes simplex. V indikovaných situacích však připadá v úvahu i rychlá diagnostika varicelly a zosteru, cytomegalické nemoci, popřípadě infekce akcidentálně způsobené B virem.

Ačkoli viru herpes simplex se věnovali již Weller a Coons (153) při popisu nepřímé IF metody, je správné považovat za výchozí až pozdější studii Lébrunové (81). Možnosti diagnostické aplikace IF metody přímo z patologického materiálu ukázali Biegeleisen a sp. (16); vyšetřovali obsah kožních a slizničních lézí při lidském herpesu. Výlučně slizniční materiál primárního i rekurentního oparu vyšetřoval Griffin (50). Korneální infekci ze seškrabu rohovky na sklíčko diagnostikoval poprvé Kaufman (72), z domácích autorů pak Benda a sp. (12). S úspěchem byla ověřena i možnost průkazu herpetické infekce v sekčním materiálu (17). Všechny tyto práce umožňují diagnózu, která je definitivní, do 2 hodin po odběru materiálu. Osvědčila se lépe — podobně jako u neštovičných virů — přímá metoda barvení (72, 12). Opět je třeba opírat se v mikroskopickém nálezu o vizualizaci celých buněk. Fluoreskující bezstrukturní masy, vyskytující se zejména v materiálu z kožního, resp. slizničního herpesu, je třeba hodnotit s obezřetností. Osvědčilo se nám barvit patologický materiál kontrastně. Velmi dobré a pozitivní zkušenosti máme rovněž z práce, při níž jsme identifikovali (obarvením mozkových otisků z myší) nové izoláty.

Ze sér nejvhodnější je králíčí, získané kombinovanou infekcí oční s následující imunizací vysokoaktivního materiálu, podaného opakovaně do peritoneální dutiny (81, 12). Antisérum k přípravě konjugátu má mít titer aspoň 1:128 (KFR).

IF průkaz varicelly a zosteru ještě není s definitivní platností vypracován. Většina autorů, věnujících se studiím in vitro, používala nepřímou metodu Wellera a Coonse (153); jejich postupy (135, 43, 125) se nijak od základní práce neliší. Konjugát k přímému barvení, připravený ze zvířecího séra (zmiňují se Gurvič



Obr. 2. Mnohojaderné buňky vytvořivší se v kultuře HeLa buněk po níže multiplacitní infekci virem herpes simplex. Fluoreskující antigen převážně v cytoplasmě. Přímá IF metoda. Zvětš. asi 500krát

a Roihel — 51], není dostatečně specifický pro obsah tkáňových protilátek. Šťastnější postup je krátce komentován v práci Balse a Caruntu (7), kteří používají ingredienci připravenou z lidských rekonvalescentních sér. Je však třeba upozornit na zkřížené sérologické reakce mezi virem herpes simplex a varicella-zoster. Proto by bylo nezbytné séra — nejlépe od dětí — předem kontrolovat vazbou komplementu s antigenem herpes simplex a ta, která by tyto protilátky obsahovala, vyloučit.

Význam rychlé diagnostiky přímo z patologického materiálu představují generalizované případy varicelly a zosteru, popřípadě zosterové (fatální) encefalitidy. Důležitost mají i řídky přicházející záněty plic, vyskytující se zejména u dětí jako komplikace po varicelle. Diagnostika těchto případů však zatím ještě nebyla ověřena. Pro identifikaci izolátů IF metodou však jsou vytvořeny dostatečné experimentální podklady (135). Je si třeba jen uvědomit, že při primoizolaci se virus adaptuje pomalu (1–2 i více týdnů).

Pro diagnostiku cytomegalické nemoci je zatím k dispozici pouze jediná, spíše teoretická práce (49).

Akcidentálně přicházející potřeba rychlé diagnostiky B-virové infekce je připravena k prověření experimentálními pracemi z našeho pracoviště (9, 13). Nejspíše může přijít v úvahu identifikovat izolát (v tkáňové kultuře, v myším či králičím mozku). Rovněž může nastat potřeba diagnózy z mozku člověka, který zemřel na akutní encefalomyelitidu. Otisky z mozku jsou vhodným materiálem k rychlé identifikaci viru (prověřeno zejména na myších).

Závažnou skutečností u B viru je jeho jednostranná antigenní shoda s virem herpes simplex. Proto při každém odůvodněném podezření na B virus je nutné vyloučit, že nejde o lidský

herpetický virus. Toho se dá dosáhnout pouze paralelním vyšetřením s ingrediencemi detegujícími virus herpes simplex (10).

### Infekce vyvolané adenoviry

Skutečnost, že žádný výchozí materiál z člověka (snad s výjimkou plic od komplikovaných, ale řídky přicházejících pneumonií dětí) se nehodí pro přímé vyšetření, je hlavním důvodem, proč na úseku adenovirů neexistuje dosud koncepce rychlé diagnostiky IF. Jsou však práce, jimiž je dokázána možnost aplikace nepřímé IF metody při experimentálním studiu (19, 20 aj.). Přímou IM metodu u adenovirů (zejména u typu 14) použili k pokusům in vitro Magureanu a sp. (97).

Diagnostický význam, i když nikoli přímé diagnostické zaměření, mají pouze dvě práce. Philipson (121) věnoval úsilí srovnání citlivosti plakové techniky s metodou počítání fluoreskujících buněk v tkáňové kultuře. Odečítání výsledků lze u adaptovaných kmenů dělat již za 28 hodin. U neadaptovaných kmenů adenovirů (při izolačním pokusu) by obvykle asi byla tato doba delší. Již citovaní rumunští autoři (97) se ve své práci přimlouvají za to, aby se pomocí IF realizovalo rychlé skupinové určení izolátů; v tomto případě by pak stačilo kterýmkoli typovým antisérem, resp. FITC značeným globulinem (nebo směsí sér, resp. globulinů k několika typům) identifikovat jakýkoli nově izolovaný adenovirus.

### Nákazy způsobené myxoviry

Nejzávažnější z infekcí této skupiny je chřipka. Za výchozí IF studii s jejím původcem se považuje práce Watsonové a Coonse (152), vykonaná na modelu chřipky in ovo. Metodicky závažné jsou pak dvě práce Liua (88), který studoval patogenezi chřipkové infekce u fretek a přinesl první upozornění o manifestaci solubilního antigenu v buněčném jádře. Těmto otázkám (i různým jiným) se pak věnovala řada autorů, z nichž nejobektivněji prokázal tvorbu solubilního a virového antigenu v buňkách telecích ledvin s pomocí anti-S a anti-V sér Holterman a sp. (62).

Diagnostickou studii zásadního významu představuje další práce Liua (89), zabývající se průkazem chřipky A1 a B v nátěrech z buněčného sedimentu nazálních výplachů nemocných. Autor použil přímou IF metodu a zejména u chřipky A zjistil poměrně vysokou citlivost proti sérologickému vyšetření pomocí HIT. Znamenal pouze jeden falešný výsledek. Svoje zkušenosti doplnil a upřesnil ve své pozdější práci (91). Martin a sp. (98) a Hers a Mulder (58) pak ukázali na možnost průkazu asijské chřipky v patologickém materiálu z fatálních případů. Martin se spolupracovníky jako první prokázal virový antigen i v makrofázích a leukocytech člověka. Hers (57) ve své studii

dokázal možnost IF průkazu chřipky v epitelích ze sputa nemocných. Určité naděje vzbudily zprávy Baratawidjaji a sp. (8) a Hinumy a sp. (60) o možnosti IF průkazu chřipkového viru adsorbovaného na červené krvinky. Zatím však, jak nasvědčují zkušenosti Zelenkové (157) a zejména pak Fraňkové a Moravové (40), není metoda ještě tak propracovaná, aby mohla být zaváděna již nyní do praxe.

První diagnostické zkušenosti Liuovy prověřila v letech 1961—63 řada japonských autorů; skutečným rozvinutím problematiky v této době však jsou práce Blaškoviče a sp. (18). Představují dva základní přístupy k řešení rychlé diagnostiky v probíhající epidemii chřipky:

První z nich je modifikací Liuovy techniky — vyšetřuje se v ní nátěr z buněčného sedimentu vytřepaných nazálních stěrů (nikoli výplachů). V práci se zdůrazňuje, že diagnostický význam má vizualizace morfoloogicky málo změněných cylindrických buněk nazálního epitelu, nikoli vizualizace makrofágů nebo degenerovaných elementů, která může vést k omylným závěrům pro nespecifickou fluorescenci. Druhý navržený postup využívá možnosti urychlené identifikace viru během izolačního pokusu na kuřecím embryu. Fluoreskujícími protilátkami se barví sediment odloupaných epitelů v plodových tekutinách.

Potvrzením prací Blaškovičových (18) i prací japonských autorů, zejména Tatena a sp. (142), jsou obě studie Fedové a Zelenkové (38). Autorky potvrdily v materiálu z výtěrů diagnózu chřipky v 63 % jednotlivých případů. Virus z kuřecích zárodků identifikovaly IF metodou již v první pasáži. Ze zkušeností z armádních pracovišť (40) se navrhuje zjednodušený odběr vyšetřovaného materiálu od nemocných: nátěry na sklíčko se provádějí přímo klíčkou, kterou lehce seškrábneme nosní sliznici nemocných, kteří se předtím vsmrkali. Eventuálně přítomný mucin je možno snadno diferencovat od specificky fluoreskujících epitelů.

Na nejobsáhlejším materiálu je přímá IF diagnostika chřipky ověřena v nedávných třech sděleních Tatena a sp. (143, 144, 145). Japonci používají přímou metodu s konjugáty vyrobenými z morčích antivirových sér, která připravují tak, že po sérii intranazálních instilací viru aplikují ještě další dávku koncentrovaného viru intraperitoneálně. Séra mají vysoké titry antihemaglutininů (1:2000—1:4000) a při vyšetření vazbou komplementu titry anti-S protilátek v rozmezí 1:64—1:128, anti-V protilátek mezi 1:128 a 1:256. V prvním dílčím sdělení autoři popisují a podrobně dokumentují morfoloogii fluoreskujících elementů a stanovují kritéria její diagnostické významnosti, specifčnosti atd. V druhém sdělení určují relaci mezi imunocytologickými, sérologickými a klinickými nálezy. (Jen pro zajímavost uvedu, že pomocí IF prokazují 89 % sérologicky ověřených chřipkových onemocnění.) Takto vyšetřili na 150 případů. V posledním příspěvku pak upozorňují na možnosti rychlé diagnostiky chřipky

protrahované, z očního sekretu a z krevních leukocytů.

Zdá se, že poslední práce japonských autorů rozhodnou v otázce, kterou již dříve nadhodil Hers (57), totiž zda používat sér s obsahem anti-S i anti-V protilátek, nebo pouze anti-V protilátek. Excelentní výsledky Tatena a spolupracovníků nabádají k tomu, aby v praxi se zůstalo spíše u smíšených sér. Nerozhodnutou otázkou u chřipky je také užívání přímé či nepřímé IF metody. Přes sugestivní výsledky Tatenovy je třeba brát v úvahu i studie jiných autorů, např. Hinumy a sp. (61), kteří ukázali na výhodnost komplementové techniky nejen u chřipky, ale i u některých jiných myxovirových infekcí.

Problematika IF diagnostiky parainfluenzy je pro svůj menší epidemiologický význam poměrně málo rozpracována. První zmínky jsou v pracích Travera a sp. (149), Liua a sp. (92), podrobnější údaje poskytl Ždanov a sp. (158), Maassab s Lohem (96) a Omar (117). Praxi nejbližší (pro urychlenou identifikaci izolátů) je sdělení Kashiwazakiho a sp. (71), věnované relaci IF a hemadsorpční techniky počítání buněk při dokazování viru Sendai v tkáňové kultuře.

Podobně je tomu s průkazem onemocnění vyvolaných respiračně syncytiálním virem. Prvními studiemi jsou práce Kishe a sp. (73) a Benneta a Hamreho (14), základ pro urychlenou identifikaci izolátů představuje sdělení Schielbeho a sp. (130). Na možnost imunohistologického průkazu fatálních bronchiolitid dětí s etiologií RSV upozorňuje studie Sheddena a Emeryho (132).

Závěrem kapitoly o myxovirech ještě zhodnocení situace u parotitidy. Ačkoliv virus příušnic byl prvním z virových agens vizualizovaných IF metodou (32) a i později byla parotická infekce studována in ovo (151a-), v tkáňových kulturách (151b-, 149, 83) a u opic (29), není dosud kromě nedávné práce Lešša s Vaškebovou (84) publikován žádný příspěvek s výlučně diagnostickou aplikací. Leššova studie ukazuje na možnost urychlené identifikace viru předmnoženého v kuřecím embryu při izolačním pokusu, a to často i v těch případech, kdy není evidentní hemaglutinace amniovou tekutinou. Zatím předložená technika předpokládá barvení kryotomových řezů amniové blány, takže ještě nemůžeme počítat s jejím zavedením do hyg.-epid. praxe. (V praxi připadá nejspíše v úvahu kazuistická diagnostika parotitických meningitid.) V Leššových pracích (83, 84) se doporučuje přímá metoda s použitím konjugátu připraveného z králičího antiséra.

### Spalničky a rubella

Přes dřívější nálezy Endersovy se za výchozí IF studii se s p a l n í č k o v ý m virem považuje práce Cohenové a sp. (30); v níž již je — podobně jako v pozdější práci Toyoshimy a sp. (148) — ukázána možnost diagnostické apli-

kace (urychlení identifikace izolátů). Nepřímý diagnostický význam má i další japonská práce (112), věnovaná imunohistologickému průkazu spalničkového viru v lymfatických uzlinách opic; studie nabádá k použití IF metody k etiologickému objasnění komplikovaných (fatálních) bronchopneumonií dětí spalničkového původu. Závažným přínosem obou japonských prací (148, 112) je zavedení opičího antiséra místo lidského rekonvalescentního, a to pro přímou i nepřímou IF metodu.

Pokud se týká *rubelly*, byly až do nedávna obtíže s IF průkazem jejího původce. Poprvé se to podařilo Schaefferovi a sp. (129) a Brownovi a sp. (22), kteří užili ledvinových primokultur z opic *Cercopithecus*, resp. buněk kontinuální linie opičích ledvin. Autoři aplikovali dosažené výsledky k zavedení rychlého sérologického průkazu *rubelly* u těhotných.

### Nákazy vyvolané REO-viry

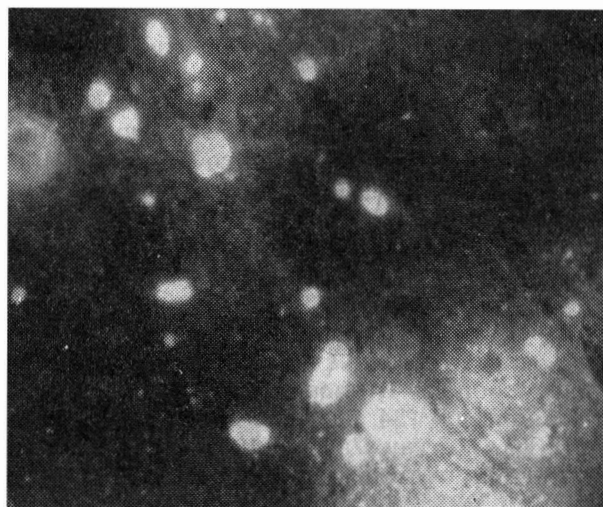
IF průkaz REO-virů (plakovou technikou) nejpodrobněji rozpracovali v třech příspěvcích Spendlove a sp. (140, 141). Zejména první z citovaných prací je možno využít k urychlení identifikace izolátů.

### Vzteklina

Studium IF viru *lyssy* mělo od začátku velmi úzký vztah k diagnostické aplikaci. Již první práce Goldwassera a Kisslinga (46, 47) umožnily průkaz rabické etiologie v otiscích z mozků a slinných žláz podezřelých zvířat. IF metoda umožňovala detekci i v těch případech, kde nejsou prokazatelné Negriho inkluze. Autoři pracovali přímou, nepřímou i komplementovou technikou a používali králičí antisérum, resp. z něj připravený značený globulin. Někteří jejich, zejména diagnostické zkušenosti, potvrdili později McQueen a sp. (103) a Topleninova (147). Naše vlastní poznatky (64) se zejména vážou k použití IF při detekci viru v otiscích mozku myši v inkubační době. Všechny dosavadní výsledky plně opravňují k tvrzení, že lze *lyssu* diagnostikovat (do 2 hodin) i z patologického materiálu lidského.

Počínaje rokem 1960 upřesnila ve svých pracích řada autorů dosavadní znalosti o rozvoji virového antigenu v buňce *in vitro*, o relaci antigenních mas k Negriho tělískům, o variabilitě kmenů v buněčné kultuře a podobně. Z téměř desítky prací vysoké metodické úrovně ocitují jen první (69) a dvě z novějších (93, 67).

Prakticky využitelným se stalo zjištění, že nepřímou metodou IF lze detegovat antirabické protilátky u očkovaných (46). Technicky otázku pak vypracoval zejména Thomas a sp. (146) a prakticky prověřili Larschová (80) a Gispén se Saathofem (44), kteří stanovili relaci neutralizačních a IF protilátek. Podle zkuše-



Obr. 3. Specificky fluoreskující Negriho inkluze v otisku z mozku myšky infikované uličním virem vztekliny. Nepřímá IF metoda. Z práce V. Hronovského. Zvětš. asi 1100krát

ností z naší laboratoře (64) lze s výhodou použít k této práci nejen mozkové myši otisky, ale i infikované buněčné kultury.

Z prací vztahujících se k technologii výroby konjugátů je třeba citovat dvě: Etchebarneovu a sp. (37), která přináší informace o výhodnosti značení gama-2 globulinové frakce hyperimunního koňského séra a která se stala základem pro výrobu komerční diagnostické ingredience na západě, a Nadelovu a Carskiho (109), v níž se studují faktory ovlivňující barvicí intenzitu rabických imunních konjugátů. K přípravě konjugátů lze však užít i sér s nižším neutralizačním indexem, jaké dosahujeme např. u králíků: NI mezi 1000 a 10 000 (137).

### Lymfocytární choriomeningitis

První IF studií s tímto virem je práce Remezova a Topleninové (127), kteří ověřili použití nepřímé metody k průkazu viru LCM v experimentálně infikovaných buněčných kulturách a v otiscích z myších mozků. Upřesnění výsledků a doplnění nálezy patogenetickými i dokumentací bylo provedeno naším pracovištěm (11). Přímou IF metodu vypracovali při studiu patogeneze LCM Wilsnack a Rowe (155); autoři připravili konjugáty z morčích antisér.

Nejlépe je diagnostická aplikace zřejmě z naší práce. Zejména spolehlivý je průkaz LCM v otiscích z myších mozků. Aplikace IF k měření protilátek vyplývá z ještě nepublikovaných zkušeností J. Hotchina a sp. (osobní sdělení 1965); za předpokladu dostatečně antigenem naplněných seškrábaných buněk na sklech a s dobrým značeným antiglobulinem lze detegovat i poměrně nízké hladiny protilátek v lidských sérech. Reakce IF protilátek se dynamikou spíše podobá KFR než neutralizačnímu testu.

### Nákazy vyvolané arboviry

Prvním druhem z této velké skupiny původců, u něž byla aplikována metoda IF, je virus West-Nile (114). Noyesovu práci je možno považovat za výchozí, neboť je v ní použita přímá metoda a virus je vizualizován nejen v tkáňových kulturách, ale i v myších orgánech. Pozdější práce s tímto virem (např. Kundinovy — 76) jsou již aplikacemi první klasické studie.

Počínaje rokem 1959 se začínají objevovat další IF studie s ostatními arboviry. Nejvíce byly zatím zpracovávány druhy skupiny B: virus japonské B encefalidity (54, 63, 94, 6), žluté zimnice (34, 53), encefalidity Rift Valley (65, 36), Murray Valley (106) a zejména pak klíšťové encefalidity (1, 2, 41, 6, 94, 95, 77, 87, 138, 119, 133, 134). Do této poslední skupiny patří i nedávná studie s virem omské hemoragické horečky (70). Za výchozí studii s arboviry skupiny A je správné považovat práci Metzgera a sp. (105) s virem VEE, metodicky závažná je i patogeneticky zaměřená studie s virem Sindbis (66), příbuzným s virem EEE. Z jiných arbo-skupin je nutné citovat práci s původcem argentinské hemoragické horečky (104), virem horečky Colorado (25) a virem Ťahyňa (150).

K přípravě konjugátů pro přímou reakci se převážně doporučuje a používá králičích imunních sér. Většina sovětských autorů v poslední době užívá pro práci s virem komplexu klíšťové encefalidity konjugát z komerčního hyperimunního séra koňského (gamaglobulin).

Nepřímý diagnostický význam má většina prací provedených na tkáňových kulturách: zejména s virem West-Nile (114), žluté zimnice (34, 53), japonské B encefalidity (94), klíšťové encefalidity (94, 41, 77 aj.), VEE (105) a argentinské hemoragické horečky (104). Pouze diagnostické zaměření má druhá studie Lvovy (95), která jako první identifikovala izoláty viru klíšťové encefalidity v kuřecích embryonálních buňkách očkovaných krví nemocných, a dále práce Easterdaye a Jaegera (36), kteří za krátkou dobu identifikují izoláty viru Rift Valley encefalidity. Nový a zdá se pro budoucnost nejperspektivnější způsob zachytu a identifikace arbovirů a virů vůbec ukazuje ve své nedávné práci Hahon (53), který techniku počítání fluoreskujících buněk kombinuje se zesílením míry adsorpce viru žluté zimnice na sklíčka s buňkami ve speciálních patrónách z umělé hmoty pomocí centrifugace při 15 000 obrátkách. Je schopen diagnostikovat za 24 hodin. Je zajímavé, že přes poměrně velký počet patogenetických prací na myších se nevžila technika identifikace arbovirů z mozkových otisků. Albrecht tvrdí (ústní sdělení 1965), že není spolehlivá.

Vzhledem k tomu, že nás nejvíce zajímají viry komplexu klíšťové encefalidity, je třeba komentovat ještě dvě závažné diagnostické studie, mající navíc i obecný význam. První z nich je nedávná práce Kunze (78), který se

pokouší přímou metodou IF za užití mikrofotometrie objektivně vyhodnocovat intenzitu fluorescence a diferencovat tím mezi sebou všechny druhy antigenně příbuzných virů komplexu klíšťové encefalidity. Reakce se téměř vyrovná inhibičně hemaglutinačnímu testu. Další práci, která má širší koncepční význam, je nedávná studie Albrechtova (4), rozlišující nepřímou metodou s použitím morčích antisér různé arboviry skupiny B. Autor spolehlivě odlišuje od viru klíšťové encefalidity viry japonské B encefalidity, West-Nile horečky, St. Louis encefalidity, pomnožené v kuřecích embryonálních buňkách. Obě studie nejsou dosud prověřeny, ale není vyloučeno, že by se mohly stát východiskem k vypracování diferenciální rychlé diagnostiky všech arbovirů.

### Enterovirové nákazy

Virus poliomyelitidy prokázalo pomocí IF několik autorů v přibližně současné době (23, 24, 82, 116). Všichni použili nepřímou metodu, jíž vizualizovali antigenní masy v cytoplasmě a později i v jádře. (Oddo — 116 a Goldwasser a Shepard — 48) popisují antigen výlučně jen v cytoplasmě. Zejména podrobně byl sledován časový rozvoj viru v buňce; tyto otázky — spolu se shora citovanými autory — řešila i řada pozdějších prací (99, 100, 85, 59).

Diagnostický význam mají zejména práce Kaltera a sp. (68) a Hache a sp. (56), kteří řešili otázku typování izolátů pomocí IF barvení nátěrů verzenovaných buněk. Závažná je i experimentální studie Kovace (75), který identifikoval poliovirus v parafinových řezech opičí míchy. Techniku IF detekce poliomyelitických protilátek vypracovali Riggs a Brown (128).

Prvním modelem ostatních nepoliomyelitických enterovirů se stal echovirus typu 9, který v organismu sajících myšek prokazoval IF Gädecke (42), v opičích ledvinových buňkách pak Dostal a sp. (35). Metodicky je důležitá patogenetická práce Rabina a sp. (124) s virem Cocksackie B 1. Značné obtíže byly u Cocksackie virů skupiny A. Larson (79) pracoval s typem 14 a využíval k přípravě konjugátů separovaných protilátek z ascitické tekutiny imunizovaných myší, jimž byl implantován ascites produkující nádor. Nedávno navrhli Zalan a sp. (156) jiný způsob řešení IF průkazu Cocksackie virů skupiny A: adaptovali řadu prototypových kmenů k lidským amniovým buňkám a infekčními tekutinami pak imunizovali králíky. Králičí séra lze použít v nepřímé IF reakci k rychlé identifikaci izolátů (na sajících myškách), jak již dříve to ukázali u Cocksackie virů skupiny B a u echovirů podle vzoru poliomyelitidy Shaw a sp. (131) a pak i Hatch (55), Page se Stulbergem (118) a jiní. Nejzávažnější z těchto studií je první (131), v níž bylo k identifikaci virů použito šesti směsí antisér, celkem proti 25 různým prototypům.

Nejkomplexněji se pokusili ve svých příspěv-

cích vypracovat rychlou diagnostiku enterovirů (poliovirů, Coxsackie virů skupiny B a echovirů typu 9) Brown (21) a Riggs s Brownem (128). K identifikaci virů (v seškrábaných buňkách) používají přímou metodu (konjugáty z králičích antisér).

Zatím tedy není ještě navrženo schéma rychlé identifikace skutečně všech typů enterovirů. Metodicky však je otázka již připravena. Bezsporné je, že metodou volby je použití králičích antisér, a to asi i u virů Coxsackie skupiny A.

### Závěry

V současné době je (podle světové literatury) vypracován IF průkaz většiny animálních virových infekcí. Výjimku činí zatím pouze lidská hepatitida, nákazy způsobené rhinoviry a virem encefalomyokarditidy. Diagnostické aplikace stávajících postupů však ještě nejsou plně využity a vymezeny.

V našich podmínkách je nezbytné ovládnout (reprodukovat a dále rozvinout) především přípravu sér a konjugátů pro přímou IF reakci. Na základě zkušeností je pak třeba vypracovat pokud možno jednotné návody pro diagnostiku jednotlivých infekcí, resp. jejich skupin, ať přímou nebo nepřímou IF technikou. Za perspektivní je možno považovat postup navržený Hahonem (52, 53). Rovněž je třeba věnovat pozornost IF detekci protilátek.

### Souhrn

V předložené druhé části souborné práce je ukázáno na současně i perspektivní možnosti rychlé imunofluorescenční diagnostiky většiny lidských virových infekcí. Zatím má metoda největší význam při diagnostice varioly, chřipky, herpesu a lyssy.

### Literatura

(společná k oběma sdělením)

- Albrecht, P.: Acta virologica, 4, 1960, 150.
- Albrecht, P.: Sb. Biology of tick-borne encephalitis complex. Příloha Acta virologica 6, 1962, 247.
- Albrecht, P.: Vizualizácia antigénov metodou fluorescenčných protilátok, stran 157, 1963, Praha SZN.
- Albrecht, P.: Acta virologica, 9, 1965, 338.
- Avakjan, A. A., Alt'stejn, A. D., Kirillova, F. M., Bykovskij, A. F.: Vopr. virusol. 6, 1961, 215.
- Avakjan, A. A., Alt'stejn, A. D., Yan Chu-Tsi: Sb. Poliomieliticheskie i nepoliomieliticheskie enterovirusy i kleščevoj encefalit, 1961, stran 229, Moskva.
- Bals, M., Caruntu, F.: Rev. Roum. Inframicrob. 2, 1965, 187.
- Baratawidjaja, R. K., Hewson, A., Labzoffsky, N. A.: Canad. J. Microb. 9, 1963, 563.
- Benda, R.: Acta virologica, 9, 1965, 172.
- Benda, R.: Acta virologica, 10, 1966, 348.
- Benda, R., Hronovský, V., Červa, L., Činál, J.: Acta virologica 9, 1965, 347.
- Benda, R., Myška V., Procházka, O., Červa L., Hronovský, V., Dubanská, H.: Čs. epidem. 14, 1965, 257.
- Benda, R., Procházka, O., Červa, L., Rehn, F., Dubanská, H., Hronovský, V.: Acta virologica 10, 1966, 149.
- Bennet, C. R., Hamre, D.: J. Inf. Dis. 110, 1962, 8.
- Beutner, E. H.: Bact. Rev. 25, 1961, 49.
- Biegeleisen, J. Z., Jr., Vernon Scott, L., Levis, V., Jr.: Science 129, 1959, 640.
- Biegeleisen, I. L., Vernon Scott, L., Joel, W.: Am. J. Clin. Path. 37, 1962, 289.
- Blaškovič, D., Albrecht, P., Lackovič, V., Leššo, J., Rathová, V., Styk, B.: Čs. Epidem. 12, 1963a, 129 a Acta virologica 7, 1963b, 192.
- Boyer, G. S., Denny, F. W., Ginsberg, H. S.: J. Exp. Med. 109, 1959a, 85 a 110, 1959b, 827.
- Breitenfeld, P. M., Schäffer, W.: Virology 4, 1957, 328.
- Brown, G. C.: Arch. ges. Virusforsch. 13, 1963, 30.
- Brown, G. C., Maassab, H. F., Veronelli, J. A., Francis, T., Jr.: Science 145, 1964, 943.
- Buckley, S. M.: Arch. ges. Virusforsch. 6, 1956, 388.
- Buckley, S. M.: Am. J. Path. 33, 1957, 691.
- Burgdorffer, W., Lackman, D.: J. Bact. 80, 1960, 131.
- Carter, G. B.: Virology 25, 1965, 659.
- Cheever, F. S.: Bact. Rev. 28, 1964, 400.
- Cherry, W. B., Goldman, M., Carski, T. R., Moody, M. D.: Publ. Health Service Public. No. 729, stran 71, ed. Communicable Disease Center, Atlanta, Georgia.
- Chu, T. H., Cheever, T. S., Coons, A. H., Daniels, J. B.: Proc. Soc. Ex. Biol. Med. 76, 1951, 571.
- Cohen, S. M., Gordon, I., Rapp, F., Macauley, J. C., Buckley, S. M.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 90, 1955, 118.
- Coons, A. H.: Bact. Rev. 28, 1964, 397.
- Coons, A. H., Snyder, J. C., Cheever, F. S., Murray, E. S.: J. Exp. Med. 91, 1950, 31.
- Curtain, C. C.: J. Histochem. Cytochem. 9, 1961, 484.
- De Groot, C. J., Metzger, J. F., Smith, Ch. W., Hoggan, M. D.: Virology 12, 1960, 317.
- Dostal, V., Gädecke, R., Grünwald, H., Mauler, R., Mittelstrass, H. K., Sauthoff, R.: Z. Hyg. 146, 1960, 367.
- Easterday, B. C., Jaeger, R. F.: J. Inf. Dis. 112, 1963, 1.
- Etchebarne, M., Berna, P. G., Leyton, G. R.: J. Immunol. 84, 1960, 6.
- Fedová, D., Zelenková, L.: J. Hyg. Epidem. Microb. Immunol. 9, 1965a/b, 127 a 135.
- Franěk, J.: Voj. zdrav. listy 34, 1965 a), b), c), 21, 38, 44.
- Fraňková, V., Moravová, I.: Čs. Epidem. (v tisku) 1966; rovněž osobní sdělení.
- Gajdamovič, S. Ja., Lvova, A. T., Klimentko, S. M.: Vopr. virusol. 6, 1961, 399.
- Gädecke, R.: Schw. Z. f. Allgem. Path. 22, 1959, 751.
- Gédér, L., Koller, M., Gönczöl, E., Jeney, E., Gönczöl, J.: Acta Microb. Hung. 10, 1963, 183.
- Gispen, R., Saathof, B.: Arch. ges. Virusforsch. 15, 1964, 377.
- Goldstein, G., Slizys, I. S., Chase, M. W.: J. Exp. Med. 114, 1961, 89.
- Goldwasser, R. A., Kissling, R. E.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 98, 1958, 219.
- Goldwasser, R. A., Kissling, R. E., Carski, T. R., Hosty, T. S.: Bull. W. H. O. 20, 1959, 579.
- Goldwasser, R. A., Shepard, C. S.: J. Immunol. 80, 1958, 122.
- Goodheart, C. R., Jaross, L. B.: Virology, 19, 1963, 532.
- Griffitt, J. W.: Oral Surg. 17, 1963, 945.
- Gurvič, F. M., Roihel, V. M.: Acta virologica, 9, 1965, 165.
- Hahon, N.: Appl. Microb. 13, 1965, 865.
- Hahon, N.: J. Inf. Dis. 116, 1966, 33.
- Hamashima, Y., Kyogoku, M., Hiramatsu, S., Nakashima, Y., Yamauchi, R.: Acta Path. Japon. 9, 1959, 89.
- Hatch, M. H.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 114, 1963, 161.
- Hatch, M. H., Kalter, S. S., Ajello, G. W.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 107, 1961, 1.
- Hers, J. F.: Am. Rev. Resp. Dis. 88, Suppl. 1963, 316.
- Hers, J. F., Mulder, J.: Am. Rev. Resp. Dis. 83, Suppl. 1961, 84.
- Hinuma, Y., Hummeler, K.: J. Immunol. 87, 1961, 367.
- Hinuma, Y., Miyamoto, T., Ohta, R., Ishida, N.: Virology 20, 1963, 405.
- Hinuma, Y., Ohta, R., Miyamoto, T., Ishida, N.: J. Immunology 89, 1962, 19.
- Holtermann, O. A., Hillis, W. D., Moffat, M. A. J.: Acta Path. Microb. Scand. 50, 1960, 398.
- Honda, T.: Sapporo Med. J. 19, 1961, 356.

64. Hronovský, V., Benda, R.: Čs. Epidem. 15, 1966 (v tisku).
65. Iwasu, S.: Jap. J. Exp. Med. 29, 1959, 323.
66. Johnson, R. T.: Am. J. Path. 46, 1965, 929.
67. Johnson, R. T., Mercer, E. H.: Austr. J. Exp. Biol. Med. 42, 1964, 449.
68. Kalter, S. S., Hatch, M. H., Ajello, G. W.: Bact. Proc. 1959, 89.
69. Kaplan, M. M., Forsek, Z., Koprowski, H.: Bull. W. H. O. 22, 1960, 434.
70. Karnyševa, V. Ja., Gavrilovskaja, I. N., Čumakov, M. P.: Vopr. virusol 10, 1965, 557.
71. Kashiwazaki, H., Homma, M., Ishida, N.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 120, 1965, 134.
72. Kaufman, H. E.: Arch. Ophthalm. 64, 1960, 382.
73. Kish, A. L., Johnson, K. M., Chanock, R. M.: Virology 16, 1962, 177.
74. Kirsch, D., Kissling, R.: Bull. W. H. O. 29, 1963, 126.
75. Kovacs, E.: Nature 200, 1963, 497.
76. Kundin, W. D., Liu, Ch., Hysell, P., Hamachige, S.: Arch. ges. Virusforsch. 12, 1963, 515 a 529.
77. Kunz, Ch.: Zbl. f. Bakt. I. Orig. 184, 1962, 362.
78. Kunz, Ch.: Virology 24, 1964, 672.
79. Larson, V. M.: Virology 18, 1962, 497.
80. Larsch, S. E.: Ann. Int. Med. 63, 1965, 955.
81. Lébrun, J.: Virology 2, 1956, 496.
82. Lébrun, J.: Ann. Inst. Pasteur 93, 1957, 225.
83. Leššo, J., Szántó, J., Albrecht, P.: Acta virologica 7, 1963, 37.
84. Leššo, J., Vaškebová, M.: Acta virologica 9, 1965, 282.
85. Levy, H. B.: Virology 15, 1962, 173.
86. Lewis, V. J., Jones, W. L., Brooks, J. B., Cherry, W. B.: Appl. Microb. 12, 1964, 343.
87. Libíková, H., Albrecht, P.: Biology of viruses of tickborne encephalitis complex. Příloha Acta virologica 6, 1962, 171.
88. Liu, Ch.: J. Exp. Med. 101, 1955 a), b), 665 a 677.
89. Liu, Ch.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 92, 1956, 883.
90. Liu, Ch.: Ergebn. d. Mikrob. u. Immunoforsch. 33, 1960, 242.
91. Liu, Ch.: Am. Rev. Resp. Dis. 83: 130.
92. Liu, Ch., I. S., Sarp, E., Detert, A.: Fed. Proc. 20, 1961, 446.
93. Love, R., Fernandes, M. V., Koprowski, H.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 116, 1964, 560.
94. Lvova, A. I.: Abstr. 14, naučn. sessiji Inst. virusol. AMN, Moskva 1961.
95. Lvova, A. I.: Acta virologica 7, 1962, 280.
96. Maassab, H. F., Loh, P. C.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 109, 1962, 897.
97. Magureanu, E., Grobnico, M., Musetescu, M., Bona, C.: Arch. Roum. Path. Exp. Microb. 23, 1965, 1011.
98. Martin, C. M., Kunin, C. M., Gottlieb, L. S., Barnes, M. W., Liu, Ch., Finland, M.: Arch. Inst. Med. 103, 1959, 515.
99. Mayor, H. D.: Texas Rep. Biol. Med. 19, 1961, 106.
100. Mayor, H. D., Jordan, L. E.: Virology 16, 1962, 325.
101. McDevitt, H. O., Petera, J. H., Pollard, L. W., Harter, J. G., Coons, A. H.: J. Immunol. 90, 1963, 634.
102. McKinney, R. M., Spilane, J. T., Pearce, G. W.: J. Immunol. 93, 1964, 232.
103. McQueen, L., Lewis, A. L., Schneider, N. J.: Am. J. Publ. Health. 50, 1960, 1743.
104. Mettler, N., Buckley, S. M., Casals, J.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 107, 1961, 684.
105. Metzger, J. F., Banks, I. S., Smith, Ch. W., Hoggan, M. D.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 106, 1961, 212.
106. Mims, C. A.: Brit. J. Exp. Path. 41, 1960, 52.
107. Mims, C. A.: Bact. Rev. 28, 1964, 30.
108. Murray, H. G.: Lancet. 1, 1963, 847.
109. Nadel, M. K., Carski, T. R.: Health Lab. Sci. 1, 1964, 60.
110. Nairn, R. C.: Fluorescent protein tracing, stran 334, 1964, ed. E. & S. Livingstone Ltd, Edinburgh and London.
111. Netter, R., Lapeyere, D.: Rev. Hyg. Med. Soc. 12, 1964, 475.
112. Nii, S., Kamahora, J.: Biken J. 7, 1964, 71.
113. Noskov, F. S., Boldanov, V. K., Goldin, R. B., Jermakov, N. V., Volkova, L. A.: Vopr. virusol. 10, 1965, 613.
114. Noyes, W. F.: J. Exp. Med. 102, 1955, 243.
115. Noyes, W. F., Watson, B. W.: J. Exp. Med. 102, 1955, 237.
116. Oddo, F. G.: Gen. Microb. 4, 1957, 153 (itals.).
117. Omar, A. R.: J. Comp. Path. 75, 1965, 287.
118. Page, R. H., Stulberg, C. S.: Bact. Proc. 137, 1962.
119. Parjanovič, M. I., Sokolov, N. N.: Acta virologica 9, 1965, 352.
120. Periera, H. G., Allison, A. C., Balfour, B.: Virology 7, 1959, 300.
121. Philipson, L.: Virology 15, 1961, 263.
122. Poetschke, G.: Progr. Med. Virol. 3, 1961, 79.
123. Pollard, M., Starr, T. J.: Progr. Med. Virol. 4, 1962, 54.
124. Rabin, E. R., Hassan, S. A., Bennett Jenson, B. A., Melnick, J. L.: Am. J. Path. 44, 1964, 775.
125. Rapp, F., Vanderslice, D.: Virology 22, 1964, 321.
126. Rehn, F.: Vojen. zdrav. listy 35 (v přípravě).
127. Remezov, P. I., Topleninova, K. A.: Vopr. Psich. Nevropat. 7, 1961, 113.
128. Riggs, J. L., Brown, G. C.: J. Immunol. 89, 1962, 868 a Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 110, 833.
129. Schaeffer, M., Orsi, E. V., Widelock, D.: Bact. Rev. 28, 1964, 402.
130. Schielbe, J. H., Lennette, E. H., Kase, A.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 120, 1965, 203.
131. Shaw, E. D., Newton, A., Powel, A. W., Friday, Ch. J.: Virology 15, 1961, 208.
132. Shedden, W. I. H., Emery, J. L.: J. Path. Bact. 89, 1965, 343.
133. Shi-tsze, Khan, Pogodina, V. V.: Acta virologica 8, 1964, 22.
134. Shi-tsze, Khan, Pogodina, V. V.: J. Hyg. Epidem. Microb. Immunol. 9, 1965, 346.
135. Slotnik, V. B., Rosanoff, E. I.: Virology 19, 1963, 589.
136. Smith, C., Marshall, J. G., Eveland, W. C.: J. Bact. 83, 1959, 1358.
137. Sokolov, N. N., Vanag, K. A.: Acta virologica 6, 1962, 452.
138. Sokolov, N. N., Parjanovič, M. I., Mekler, L. B.: Acta virologica 8, 1963, 209 a 217.
139. Sommerville, R. G., MacFarlane, P. S.: Lancet 1, 1964, 911.
140. Spendlove, R. S., Lennette, E. H.: J. Immunol. 89, 1962, 106.
141. Spendlove, R. S., Lennette, E. H., Knight, Ch. O., Chin, J. N., John, A. Ch.: J. Immunol. 90, 1963 a), b), 548 a 554.
142. Tateno, I., Suzuki, S., Kawamura, H., Kusano, N., Aoyama, Y., Sugiura, A., Akao, Y., Oikawa, K., Naito N.: Jap. J. Exp. Med. 32, 1962, 531.
143. Tateno, I., Suzuki, S., Nakamura, S., Kawamura, A.: Jap. J. Exp. Med. 35, 1965, 383.
144. Tateno, I., Kitamoto, O., Makino, M., Takeuchi, Y., Sonoguchi, T.: Jap. J. Exp. Med. 35, 1965, 401.
145. Tateno, I., Kitamoto, O.: Jap. J. Exp. Med. 35, 1965, 411.
146. Thomas, J. B., Sikes, R. K., Ricker, A. S.: J. Immunol. 91, 1963, 721.
147. Topleninova, K. A.: Vopr. virusol. 6, 1961, 174.
148. Toyoshima, K., Takahashi, M., Hata, S., Kunita, N., Okuno, Y.: Biken J. 2, 1959, 305.
149. Traver, M. I., Northrop, R. L., Walker, D. L.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 104, 1960, 268.
150. Wallnerová, Z., Albrecht, P.: Acta virologica 8, 1964, 474, Acta virologica 10, 1966, 140.
151. Watson, B. K.: J. Exp. Med. 96, 1952 a), b), 653 a Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 79, 222.
152. Watson, B. K., Coons, A. H.: J. Exp. Med. 99, 1954, 419.
153. Weller, T. H., Coons, A. H.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 86, 1954, 789.
154. Wheelock, E. F., Tamm, I.: J. Exp. Med. 113, 1961, 301.
155. Wilsnack, R. E., Rowe, W. P.: J. Exp. Med. 120, 1964, 829.
156. Zalan, R., Kelen, A. E., Labzoffsky, N. A.: Arch. ges. Virusforsch. 15, 1964, 668.
157. Zelenková, L.: Čs. Epidem. 15, 1966, 65.
158. Ždanov, V. M., Azadova, N. B., Bukrinskaja, A. G.: Vopr. virusol. 7, 1962, 162.