

VOUŽITÍ IMUNOFLUORESCENCE U RICKETTSIÍ A MIKROORGANISMŮ SKUPINY BEDSONIA

Podplukovník RNDr. F. REHN, CSc., RNDr. L. ČERVA, CSc.
Vojenský ústav hygieny, epidemiologie a mikrobiologie v Praze

Rickettsie

Účinnost metody imunofluorescence (IF) pro rickettsiální antigeny prokázal již Coons a spol. (1950) na modelu epidemického tyfu a horečky Skalistých hor. Roberts a Downs (1959) s výhodou aplikovali přímou metodu IF k vizualizaci další rickettsie a studovali růst *C. burneti* v myších a kuřecích fibroblastech. Burgdorfer a Lackman (1960) konali své pokusy s původcem horečky Skalistých hor na experimentálně infikovaných klíšťatech *Dermacentor andersoni*. Pozitivní nález *R. rickettsii* pomocí přímé metody IF získali u 90 % nakažených zvířat proti kontrolním izolačním pokusům, které byly úspěšné ve 100 %. V následujících letech počali používat výhradně IF k průkazu u přirozeně nakažených klíšťat z endemických oblastí, u nichž Burgdorfer (1965) uvádí tímto způsobem zjištěnou až 90% proměnitelnost. Toto číslo je podstatně vyšší, než počty pozitivních nálezů obvykle zjišťovaných u přirozeně infikovaných klíšťat klasickou metodou. Podobné pokusy provedli Shepard a Goldwasser (1960) jak na experimentálně nakažených klíšťatech *Dermacentor andersoni*, tak na klíšťatech odchycených v oblastech s vysokým výskytem infekce. Pracovali rovněž přímou metodou IF. U experimentálně infikovaných jedinců byl nález metodou IF jen nepatrně vyšší proti izolačním pokusům a u klíšťat z terénu byly počty pozitivních stejné oběma metodami. V hodnocení IF zaujímají autoři kritický postoj a upozorňují, že nelze očekávat zjištění malého množství rickettsií. Podle nich je podmínkou úspěchu poměrně vysoká koncentrace antigenu. Právě pro tuto skutečnost je dobře možný i průkaz *R. prowazeki* u infikovaných vší (Zdrodovskij a Sokolov 1965).

V posledních letech řada prací referuje o úspěšné aplikaci IF při zjišťování rickettsiálních antigenů v tekutinách a tkáních infikovaných makroorganismů. Goldin (1961) referuje o rychlém průkazu ojedinělých koxiel v nátěrech z krve a orgánů laboratorních zvířat opracovaných přímou metodou IF. Goldin a Amosenková (1961) v další práci uvádějí, že v nátěrech z krve experimentálně infikovaných myší je možno zjistit koxiely v koncentraci ne nižší než 2×10^6 /ml. Rickettsie leží na povrchu erytrocytů. Podobný obraz získali i při vyšetřování Q-horečky u lidí. Ve slezině a orgánech myší lze prokázat koxiely 3. až 5. den po inokulaci.

K odlišným závěrům dospěly Balajeva a Nikolskaja (1962), které studovaly možnost průkazu *R. prowazeki* v krvi experimentálně nakažených myší a morčat. Zjistily, že u myší masívně infikovaných intraperitoneálně nebo in-

travenózně lze rickettsie jen velmi obtížně v krvi demonstrovat, a to pouze několik málo minut po inokulaci. U pokusně nakažených morčat se nepodařilo mikroskopicky rickettsie prokázat ani v koncentrované plazmě, ani v erytrocytech. Usuzují, že i u lidí je velmi malá pravděpodobnost mikroskopického zachytu rickettsií. V pokusech s defibrovanou králičí krví byla citlivost biologického testu proti IF průkazu o dva řády vyšší.

Leššo a Brezina (1964) srovnali ve své práci účinnost metod IF, klasického barvení a biologického pokusu u morčat a myší experimentálně infikovaných vysoce a málo virulentním kmenem *C. burneti*. Pracovali přímou metodou s konjugáty připravovanými ze sér imunizovaných králíků. Autoři došli k závěru, že důkaz koxiel v orgánech zvířat se daří výhradně pomocí konjugátů obsahujících protilátky vůči fázi 1. IF metoda je pro průkaz koxiel v orgánech zvířat citlivější než klasické barvicí metody a rychlejší než izolační pokus. Naproti tomu izolační a titrační pokus je podstatně citlivější než IF průkaz. Citlivost IF metody je značně ovlivňována virulencí kmene. Detekce virulentních kmenů je snadnější.

Vedle práce Robertsové a Downse (1959), studujících růst *C. burneti* v myších a kuřecích fibroblastech, sledoval Krasnik (1963) množení *R. prowazeki* metodou IF v kulturách morčecích epitelálních buněk. Množení rickettsií mohl prokázat již po 5 hodinách. Autor se domnívá, že kombinace tkáňových kultur s IF metodou by představovala schůdnou cestu k rychlé diagnostice rickettsiálních infekcí.

Přehled uvedených sdělení především přesvědčivě potvrzuje, že imunofluorescence je u rickettsií prakticky použitelná. Patrná je však rozdílnost názorů v kritickém přístupu k dosaženým výsledkům. Tato skutečnost je dána nejen individualitou autorů, ale ve značné míře metodickou nestandardností vyplývající z různé kvality konjugátů, přípravy a původu imunních sér a v neposlední řadě i použitého fluorescenčního mikroskopu.

V imunofluorescenci zaujímá obecně významné místo otázka přípravy vhodných imunních sér. Této problematice se však dotýká bezprostředně jen práce Lešša a Breziny (1964) u *C. burneti* a sdělení Goldinova (1965). Jejich zkušenosti je možno shrnout do dvou zásad: imunizaci králíků je nutné zahájit živým kmenem a doimmunizovat inaktivovaným antigenem, a pokud jde o *C. burneti*, pak použitý kmen musí být ve fázi 1. Aktuálnost přípravy kvalitního imunního séra je dána u rickettsií skutečností, že jejich vizualizace pomocí přímé metody je považována za výhodnější.

Při hodnocení vlastní fluorescence hraje

značnou roli použitý mikroskop. Zkušenosti ukázaly, že sovětský typ ML-2, mající svrchní osvětlení, poskytuje při užití imerzního objektivu mimořádný světelný efekt, což umožňuje dostatečnou intenzitu fluorescence i při použití buď slabších nebo více ředěných konjugátů a sér. Takový výsledek nedávají mikroskopy jiných značek, mající spodní osvětlení, u nichž naopak intenzita fluorescence klesá s použitím silnějších objektivů.

Prověření literárních údajů vlastními pokusy ukázalo, že rickettsie jsou imunofluorescencí bezpečně prokazatelné teprve tehdy, je-li jich v prohlíženém substrátě dostatečné množství. Vzhledem k této skutečnosti je možno souhlasit se závěrem, že izolační pokus je rozhodně metodou citlivější. Na druhé straně tam, kde je možno očekávat v primomateriálech značné kvantum infekčního agens (vši, klíšťata), je imunofluorescence metodou bezprostřední a rychlé diagnostiky. Jinak je třeba počítat s kultivačním předmnožením na citlivém zvířeti, kuřecím zárodku, popřípadě tkáňové kultuře. Ve světle těchto poznatků posuzujeme skepticky práce prosazující přímý imunofluorescenční průkaz rickettsií v krvi nemocných lidí nebo experimentálně infikovaných zvířat. V pokusech, které jsme sami provedli, jsme v těchto případech obdrželi vždy negativní výsledky.

V literatuře o imunofluorescenci u rickettsií není věnována prakticky žádná pozornost nespécifické fluorescence některých buněčných elementů. Zkušenosti nám ukázaly, že právě tento problém může být velmi aktuální při zjišťování rickettsií v tak patogeneticky významných orgánech, jako jsou slezina, plíce, lymfatické uzliny, kostní dřeň apod. (Červa 1965). Nejmenší nebezpečí nespécifické fluorescence buněčných elementů poskytují preparáty ze žloutkového vaku a tkáňových kultur. Za nezbytnou zásadu však je třeba považovat vysycování konjugátů vhodným tkáňovým homogenátem, který dokáže podstatně snížit nespécifické přisvěcování. U otisků a řezů z orgánů je kromě toho možné použít s výhodou kontrastního dobarvení lisamin-rhodaminem 200, konjugovaným na hovězí, popřípadě jiný albumin (Smith a spol. 1959, Franěk 1965).

Bedsonie

První zpráva o využití IF u mikroorganismů skupiny Bedsonia pochází z r. 1955, kdy Buckley, Whitney a Rapp (1955) publikovali výsledky studia množení původce psitakózy v kultuře myších embryonálních jaterních buněk. Detekce byla úspěšná teprve po infikování buněk větším množstvím infekčního agens. Možnosti úspěšného imunofluorescenčního průkazu psitakóзовého viru, množného na tkáňové kultuře, využili Hahon a Nakamura (1904) k vypracování titrační metody, kterou později Hahon a Cooke (1965) uplatnili u neutralizačního testu prováděného na tkáňových kulturách. Citlivost této metody se ukázala větší oproti klasickému testu uskutečňovanému na myších.

Donaldson a spol. (1958) užil přímé IF metody s konjugovaným krocaním sérem pro detekci viru ornitózy v explantátech buněk žloutkového vaku, očkovaných materiálem z kloaky a trachee krocana. Celková efektivnost popsané vyšetřovací metody je stejná jako u nepřímé KFR. Zelenková a Strauss (1963) prověřovali diagnostickou hodnotu přímého průkazu ornitózy na orgánových otiscích, využívajíce přímé i nepřímé metody IF. Po získání experimentálních zkušeností uplatnili uvedenou metodiku při vyšetřování latentně nakažených kachen na otiscích ze slezin. U tohoto materiálu uvádějí asi o 30 % vyšší citlivost IF proti nepřímé KFR. Ross a Borman (1963) se snažili především o využití IF k průkazu sérových protilátek. Srovnáním IF, inhibice hemaglutinace a KFR došli k závěru, že IF leží svou citlivostí mezi HI a KFR. Tokarevič, Krasnik a Goldin (1963) zjistili, že IF umožňuje prokázat kompletní i nekompletní protilátky a sjednocuje tak diagnostické možnosti KFR a IKFR. Goldin a Krasnik (1963) prokázali, že séra rekonvalescentních holubů, obsahující nekompletní protilátky, mají větší koncentraci bílkovin, včetně gamaglobulinu a konjugáty z nich připravené mají několikanásobně vyšší účinnost než konjugáty pouze s kompletními protilátkami. Serbětov a spol. (1965) referují o vhodnosti antisér proti virovému zmetání ovcí pro imunofluorescenční studia agens skupiny Bedsonia. Přímým konjugátem připraveným z ovčích séra byli schopni prokázat původce ornitózy v buňkách tkáňových kultur a orgánových otiscích ze zvířat experimentálně i přirozeně infikovaných.

Imunofluorescence u mikroorganismů u skupiny Bedsonia je charakterizována řadou problémů shodných s těmi, o nichž jsme se zmínili již u rickettsií. V první řadě je třeba uvést otázku imunního séra. Z vlastních zkušeností můžeme potvrdit, že nejvýhodnější jsou imunní ptačí séra, používaná především pro přímou metodu (Donaldson a spol. 1958, Ross a Borman 1963, Goldin a Krasnik 1963). Nejlépe se nám osvědčilo sérum imunizovaných kohoutů s vysokým titrem inkompletních protilátek. Potvrdili jsme tak zjištění Goldina a Krasnika (1963) o vztahu nekompletních protilátek k tzv. aviditě séra. Pro nepřímou metodu jsou použitelná rekonvalescentní séra nemocných s vysokým titrem KF protilátek. Stejně jako rickettsie musí se i Bedsonie vyskytovat v prohlíženém substrátě ve větším množství, aby byly prokazatelné imunofluorescencí. Z tohoto hlediska je možné považovat za nadějný k přímé diagnostice z primomateriálu např. průkaz původce trachomu ve spojivkovém seškrabu (Nichols a McComb, 1962). Mnohem choulostivější je diagnostika v otiskových preparátech z jater a slezin ptáků, zejména latentně infikovaných, kdy orgány obsahují relativně malé množství agens a navíc bývá specifická fluorescence rušena nespécifickým svícením některých druhů buněk. Platí tedy i u Bedsonií v imunofluorescenční diagnostice zásada předmnožení na citlivém zvířeti nebo kuřecím zá-

rodku. S výhodou lze použít potom otisků nebo řezů z myšího mozku moribundních, popřípadě čerstvě uhynulých myší, kde minimální přisvětlování pozadí neruší výraznou specifickou fluorescenci různých, intracelulárně uložených vývojových stádií Bedsonií. U otisku ze žlutkových vaků je možno počítat s masovým výskytem dobře svítících elementárních tělísek.

Pokud jde o sérologickou diagnostiku, považujeme za nadějně práce Hahona a Nakamury (1964) a Hahona a Cooke (1965), jimž se podařilo uplatněním imunofluorescence u neutralizačního testu prováděného na tkáňových kulturách zcitlivit tuto sérologickou reakci. Pokus nahradit komplement fixací s lidským rekonvalescentním sérem nepřímou metodou IF se v našich pokusech ukázal nereálný. K úspěšné sérologické diferenciaci trachomových kmenů od ostatních příslušníků skupiny Bedsonia použili imunofluorescence Katzenelsona a Bernkopf (1965).

Literatura

- Balaeva, N. N., Korn, M. I., Kulberg, A. I.:* ŽMEI, 40, 1963, 52—57.
Balaeva, N. N., Nikolskaja, V. N.: ŽMEI, 33, 1962, 137—140.
Buckley, S. M., Whitney, E., Rapp, F.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 90, 1955, 226—230.
Burgdorfer, E., Lackman, D.: J. of Inf. Dis., 107, 241 až 244, 1960.
Coons, A. H., Snyder, J. C., Cheever, E. S., Nurray, E. S.: J. Exper. Med., 91, 1950, 31—38.
Červa, L.: Čs. EMI, 14, 1965, 69—71.
Donaldson, F., Davis, D. E., Watkins, I. R., Sulkin, S. E.: Bact. Proc., 26, 1958, 65.
Franěk, J.: Voj. zdrav. listy, 34, 1965, 21—26.
Goldin, R. B.: Voprosy virusologii, 6, 1961, 37.
Goldin, R. B., Amosenkova, N. I.: Voprosy virusologii, 6, 1961, 591.
Goldin, R. B., Krasnik, F. I.: Acta virologica, 7, 1963, 561.
Hahon, N., Nakamura, R. M.: Virology, 2, 1964, 203 až 208.
Hahon, N., Cooke, K. O.: J. of Bacteriol., 6, 1965, 1465 až 1471.
Katzenelson, E., Bernkopf, H.: J. Immunol. 94, 1965, 467—474.
Krasnik, F. I.: Acta virologica, 7, 1963, 190.
Leššo, J., Brezina, R.: Čs. EMI, 13, 1964, 351—357.
Nichols, R. L., McComb, D. E.: J. Immunol., 89, 1962, 545—554.
Roberts, A. N., Downs, C. N.: J. Bact., 77, 1959, 194 až 204.
Ross, M. R., Borman, E. K.: J. Bact., 85, 1963, 851 až 858.
Serbezov, V., Ogmanov, D., Matova, E.: J. of Hyg. Epid. Microbiol. Immunol., 9, 1965, 253—255.
Shepard, C. C., Goldwasser, R. A.: Am. J. Hyg., 72, 1960, 120—129.
Smith, Ch. W., Marshall, J. D., Eveland, W. C.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 102, 1959, 179—181.
Tokarevich, K. N., Krasnik, F. I., Goldin, R. B.: Acta virologica, 7, 1963, 478—479.
Zelenková, L., Staruss, J.: Čs. EMI, 12, 1963, 140 až 144.
Zdrodovskij, P. F., Sokolov, M. I.: Rukovodstvo po laboratornoj diagnostike virusnyh i rikketsioznych boleznej, Moskva, 1965.