

NEPŘÍMÝ FLUORESCENČNÍ TEST PRO LUES

MUDr. Petr SCHNEIDERKA, podplukovník MUDr. Josef VANČUŘÍK, CSc.

Vojenský ústav hygieny, epidemiologie a mikrobiologie v Praze

V sérologii lues stojí dnes v popředí zájmu fluorescenční test pro detekci syfilitických protilátek v séru pacienta (FTAT). Byl zaveden a rozpracován Deaconem (1957) a bylo o něm publikováno mnoho prací v odborném tisku. Údaje o jeho významu pro diagnostiku jsou však často protichůdné. Příčinou je okolnost, že neznáme antigenní strukturu treponem a tedy ani povahu protilátek, které se FTAT účastní. Kromě toho je však závažná i technika provedení testu a technické rozdíly pak mohou být příčinou rozličného názoru na jeho hodnotu.

Převážná většina autorů používá jako antigen Nicholsův patogenní kmen *Treponema pallidum*. Király a Jobbágy (19) užívají kmen budapeštský, Covert a spol. (4), Kent a spol. (18), Poetschke (31) a Pillot (32) užívají tzv. Reiterovy treponemy se stejnými výsledky. Deacon a Hunter však soudí, že podobnost těchto treponem je dána jediné přítomností nespecifického antigenu společného i s ostatními saprofytickými treponemy (16). Reakce přirozených protilátek proti těmto antigenům pak považují za zdroj falešně pozitivních výsledků, a proto vysycují vyšetřovaná séra suspenzí Reiterovy treponemy.

Kultivačním organismem je králík, z jehož

varlat je po vzniku viditelné orchitidy 8. až 12. den po inokulaci izolován antigen stejným způsobem jako pro TPI test podle Nelsona (25, 26). Mnoho autorů izoluje antigen do fyziologického roztoku nebo do pufrovaného fyziologického roztoku (12, 19, 29). Někteří izolují treponemy do média pro TPI test s přísadou penicilínu a streptomycinu (18), jiní popisují přípravu antigenu v 5% dimethylsulfoxidu s 10% normálním králičím sérem ve fyziologickém roztoku (21) za účelem ochrany treponem při zmrazení a k získání brilantní fluorescence. Přísada 0,002% NaClO má sloužit k zvýšení přilnavosti treponem ke sklu při zhotovování nátěru. Přisuzuje se mu rovněž ochranný význam před změnou morfologie treponem a jejich aglutinací.

K odstranění hrubého tkáňového detritu, spermií a krvinek se užívá jednak jednoduché centrifugace při 1000–2000 G, jednak dvojí až trojí frakcionované centrifugace (11, 12, 19, 21, 29). V antigenní suspenzi nesmí být žádné balastní hmoty, tkáňová drť ani bílkoviny, neboť u mikroskopu ML 2 intenzívně přisvěcují na pozadí a ruší tak vzhled zorného pole preparátu. Požadované počty organismu v zorném poli se různí podle typu mikroskopu a způsobu práce, řádově však odpovídají desítkám při

suchém zvětšení 450krát, tj. asi 10^6 organismů v 1 ml suspenze (5, 9, 10, 12, 13, 18, 19, 21, 22, 26, 27).

Na uchování treponem jsou odlišné názory. Bylo popsáno dlouhodobé skladování při $+4^\circ\text{C}$ bez konzervačních činidel za sterilních podmínek (5, 12, 13, 29) s merthiolatem při $+4^\circ\text{C}$ (19, 27), ve zmrzlém stavu při -20°C (9 aj.) a -65°C s konzervačními látkami (21) nebo v lyofilizovaném stavu (6, 9, 10, 13, 24). Nielsen a spol. (29) a Kent a spol. (18) se shodně vyjadřují o zmrazených a lyofilizovaných treponemách jako o antigenu s méně jasnou svítivostí.

Podstatně se různí názory na barvitelnost treponem, popřípadě na schopnost reagovat se specifickými protilátkami v různém intervalu od jejich izolace z varlat. Zatímco Metzger a někteří další popisují nebarvitelnost čerstvě izolovaných organismů do 6 hodin po izolaci (19, 22), užívají jiní autoři bezprostředně připravených suspenzí se stejným výsledkem (5, 17, 21, 29).

Mezi různými fixačními prostředky převládá užívání acetonu, i když jsou autoři, kteří viděli po takové fixaci méně jasný obraz (29). Někteří fixují nátěry jen teplem 45°C (17) nebo 56°C (19), jiní chladem ve směsi aceton-suchý led (21). Sami jsme srovnali různé fixační prostředky (aceton, etanol, 4% formaldehyd, teplo) a aceton se nám jeví jako nejlepší z nich. Na rozdíl od údajů Borela a Niela (1, 27) jsme nespatriili porušení morfologie.

O uchování fixovaného antigenu na skle se zmiňuje několik prací (9, 13, 17), některým se ale naopak nepodařilo fixované nátěry uchovat (27). Király a Jobbágy sdělují (19), že fixované preparáty se po skladování barví hůře než čerstvé.

Fluorescenčním testem lze zjišťovat protilátky v séru, plazmě i mozkomíšním moku. Lehká bakteriální kontaminace není na závadu a ani běžná antiseptika nezhoršují průběh reakce (27, 29). Séra se většinou inaktivují podobně jako pro ostatní sérologické reakce: 30 minut při 56°C nebo se reaktivují 10 minut při 56°C .

Naprostě zásadní význam má podle literatury i podle našich zkušeností způsob čtení a hodnocení intenzity fluorescence a stanovení kritického rozhraní mezi negativitou a pozitivitou při postupném zředování zkoumaného séra. Deaconovy práce z let 1957 a 1960, později i americké standardní návody (13) a desítky prací, které na ně navazovaly, hodnotí intenzitu fluorescence v různých ředěních séra jedním až čtyřmi křížky. Jako konečný titer (endpoint) séra hodnotí vesměs ředění, které dává dvoukřížkovou fluorescenci. Výjimečné postavení má práce Niela a Fribourg-Blanca (28), kteří jako konečný titer séra hodnotí ředění s jednokřížkovou fluorescencí. Stejně významné je i ředění, které určuje rozhraní mezi pozitivním a negativním výsledkem fluorescenčního vyšetření. V publikovaných pracích není v tomto ohledu shody. Deacon

od původního ředění 1:5 přešel k ředění 1:200 a k provádění kvantitativního testu (5, 6, 33). Shodně s ním považují ředění 1:200 za hraniční hodnotu Nielsen a Idsøe (29), Kent a spol. (18) Wilkinson a spol. (37) a jiní. Naproti tomu Borel určoval jako hraniční ředění 1:10 (1), Gronspiron 1:30, Király 1:50 (19), Leibowitz a Fife 1:100 (10, 21).

Práce amerických a západoevropských autorů jsou založeny převážně na užití komerčních konjugovaných antiglobulinů. Jsou to kozí (5, 21), koňské (6) nebo králičí antihumánní globuliny konjugované s fluoresceinizothiocyanátem (FITC). Mnoho autorů popisuje také přípravu vlastního konjugátu (2, 5, 8, 14, 15, 19, 22, 29). Deacon a Hunter (7) vysycují konjugáty kostní dřeví, Király (19) a Goldwasser (14) jaterním práškem, zatímco ostatní považují filtraci na sloupci Sephadexového gelu za dostačující pro odstranění nespecifické fluorescence (8, 16, 22, 29, 35). Těmto otázkám se věnují hlavně autoři pracující s přímým fluorescenčním testem (17 a jiní). Zásobní konjugát bývá většinou lyofilizován a po rozpuštění skladován při $+4^\circ\text{C}$. Někteří jej však uchovávají ve formě roztoku zmrzlý při -20°C . Ředění konjugátu ve fosfátovém pufru s 2 % Tweenu 80 se sice popisuje v původních pracích (5, 6, 10, 13), avšak Nielsen a Idsøe v rozsáhlém rozboru FTAT (29) shledávají jeho význam nejasným.

Vlastní zkušenosti

V naší laboratoři provádíme FTAT od listopadu 1965. Do května 1966 jsme vyšetřili celkem 224 séra, z toho 204 sérologicky pozitivní. Vycházíme z metodiky navržené Deaconem a spol. (5), kterou jsme si poněkud upravili.

Používáme Nicholsův kmen *Treponema pallidum* pasážovaný na králičích varlatech. Suspenzi připravujeme podle Weberschinkeho a Kittnara (36). K odstranění tkáňového detritu se osvědčila diferenciální centrifugace 10 minut při 800 G a zahuštění treponemové suspenze při 9000 G. Resuspendováním ve fosfátovém pufru o pH 7,2 do množství 15–20 organismů v zorném poli při zvětšení 720krát jsme získali antigen vhodný k zhotovování nátěrů. Uchováváme jej při $+4^\circ\text{C}$ bez přidání konzervačních činidel, po dobu 3 i více týdnů. Neosvědčilo se nám použití treponem lyofilizovaných laboratorním lyofilizačním přístrojem. Naproti tomu vhodný byl antigen zmrazený a skladovaný při -20°C . Po opakovaném rozmrazení však dochází k destrukci treponem. Užívali jsme i bezprostředně připravené suspenze a nepozorovali jsme přitom úbytek svítivosti.

Z literatury i z vlastních zkušeností jsme se přesvědčili o základním významu kvality konjugovaných antiglobulinů. Připravili jsme si proto dva vlastní králičí antilidské s FITC konjugované globuliny podle Sokola a spol. (34) a srovnali jejich vlastnosti s dvěma komerčními konjugáty: Fluorescein — Conjugated Rabbit Antiserum Globulin vs. Human Serum

Vzorek	$\frac{\mu\text{g FITC}}{\text{mg bílkoviny}}$	Počet molekul FITC na 1 molekulu bílkoviny	Precipit. titr konjugátu	Nejčastější „staining titer“
I	4,6	1,98	10 000	10
II	15,0	6,40	10 000	20
III	18,4	7,86	5 000	10
IV	22,8	9,76	3 000	konc. —10

Tabulka 1. Charakteristika konjugátů. I – Microbiological Associates INC., II – vlastní, III – vlastní, IV – ÚSOL

Skupina		FTAT		BWR		Kolm		Kahn		VDRL	
LUES	PRIMARIA	13 13	100 %	7 13	53,8 %	5 6	83,3 %	8 13	61,5 %	13 13	100 %
	LATENS	16 27	59,2 %	14 27	51,9 %	17 23	73,9 %	18 27	66,6 %	25 27	92,5 %
	CONGENITA	11 21	52,4 %	14 21	66,6 %	16 20	80,0 %	11 21	52,4 %	20 21	95,2 %
	OSTATNÍ	23 39	58,9 %	23 39	58,9 %	26 37	70,2 %	34 37	91,8 %	39 39	100 %
NESPECIFICKÉ DIAGNÓZY		3 26	11,5 %	14 26	53,8 %	2 12	16,6 %	13 26	50,0 %	22 26	87,6 %
NEZNÁMÉ dg. a DEPISTÁŽE		22 78	28,2 %	30 78	38,4 %	35 76	46,0 %	45 78	57,6 %	67 78	85,7 %
ZDRAVÍ LIDÉ		0 20	0	0 20	0	0 20	0	0 20	0	0 20	0

Tabulka 2. Přehled vyšetřených sér a srovnání FTAT s ostatními séroreakcemi

Globulin, Microbiological Associates INC. a králičí antilidský FITC značený antiglobulin, ÚSOL. Tab. 1. Vzorek I. měl nazelenalý typ fluorescence, který byl méně kontrastní než u ostatních vzorků a pro naše potřeby tedy méně vhodný. Vzorek IV. pro velké množství vázaného FITC silně barvil pozadí preparátu a ulpíval na skle. Také jeho precipitační titr byl velmi nízký. Jako nejvýhodnější se nám z těchto důvodů jevil vlastní vzorek č. II.

Pozitivní luetická séra jsme před provedením FTAT inaktivovali 30 minut při 56° C nebo reinaktivovali 10 minut při 56° C. Skladovali jsme je zmrzlá při -20° C. Kontrolní pozitivní a negativní séra byla standardizována se známými antigeny a konjugáty boxovou titrací.

Provedení FTAT. Na dokonale čistá a odmaštěná podložní skla jsme označili 6 kroužků o průměru 5 mm a do každého z nich nakapali mikropipetou 0,003 ml antigenní suspenze. Po zaschnutí jsme nátěry fixovali 10 minut v acetonu, potom je 10 minut koupali ve fosfátovém pufru a 30 minut v destilované vodě. Na fixované nátěry jsme aplikovali po 0,005 ml vyšetřovaného séra v 6 ředěních: 1 : 10, 50, 100, 200, 400 a 800 a inkubovali je při pokojové teplotě 30 minut ve vlhké komůrce. Poté byly preparáty opět omyty v pufru (10 minut) a destilované vodě (30 minut). Vytitrovaný anti-

lidský konjugát se aplikuje ve stejném množství jako vyšetřovaná séra. Tento „barvicí titr“ (staining-titer) je určován před každým pokusem pro konjugát ředěný dvojkovou řadou s kontrolním pozitivním sérem. Užíváme o 1 stupeň nižší ředění než je to, v němž je poslední čtyřkřížková fluorescence. Nátěry s nakapaným konjugátem inkubujeme opět 30 minut ve vlhké komůrce a potom je oplachujeme 10 minut puforem a 30 minut destilovanou vodou. Toto závěrečné koupání nátěru je možno prodloužit i přes noc při +4° C bez negativního ovlivnění výsledku. Vlhké preparáty montujeme do pufrovaného glycerinu. Považujeme to za rozhodující pro kvalitu obrazu v zorném poli mikroskopu ML 2 za použití imerzního objektivu i pro uchování preparátů k pozdějšímu prohlížení. Výsledky odečítáme na fluorescenčním mikroskopu ML 2 s výbojkou DRŠ-250, excitačními filtry BS 8-2, SS 15-2 a S3S 7-2, zábranným filtrem č. 2, imerzním objektivem 90 a okulárem 8. Všichni autoři se v literatuře shodují v hodnocení významné úlohy optického systému pro kvalitu fluorescence. Na základě srovnání s mikroskopy Leitz-Wetzlar (výbojka Philips CS 150, excitační filtr BG 12, zábranný filtr žlutý bez označení, kondenzor D 0,80 pro suchý zástin, objektiv 25, okulár 12) a Reichert – Zetopan (výbojka HBO 200, excitační filtr E 3, BG 12, zábranný filtr GG

9/1 a OG 1/1,5, kondenzor UV 1,4, objektiv 45 a okulár 12,5) jsme došli k závěru, že mikroskop ML 2 je velmi vhodný k FTAT, a to především pro velké soustředění UV-světla objektivem na malou plochu preparátu a pro možnost velkého zvětšení imerzí.

Fluorescenci hodnotíme jedním až čtyřmi křížky. Z našich zkušeností při výše popsané metodě vyplynula nutnost označovat za pravděpodobně pozitivní takové sérum, které poskytuje nejméně dvoukřížkovou fluorescenci od titru 1 : 100 výše. Sestava kontrol u každého pokusu je tato:

1. pozitivní kontrola se známým standardním pozitivním sérem,
2. negativní kontrola se známým standardním negativním sérem,
3. kontrola nespecifické fluorescence bez vyšetřovaného séra,
4. kontrola přítomnosti králičích protilátek kozím antikráličím konjugátem (ÚSOL), aplikovaným na fixovaný antigen.

Výsledky a závěry

Přehled vyšetřených sér a srovnání s ostatními sérologickými reakcemi uvádí tab. 2. Procenta pozitivních výsledků z celkového počtu sér v jednotlivých stadiích lues svědčí o tom, že FTAT nepatří mezi nejcitlivější reakce. Pouze u 13 případů primárního stadia byl tento test vždy pozitivní, a to i tam, kde ostatní sérologické reakce byly dosud negativní. Naproti tomu ve skupině nespecifických diagnóz a neznámých diagnóz a depistáží dokazují výsledky FTAT vysokou specifitu tohoto vyšetření ve srovnání s běžnými sérologickými reakcemi. Přehled je doplněn skupinou zdravých lidí, dárců krve. Někteří autoři vysvětlují nespecificky pozitivní reakce v FTAT přítomností protilátek proti společným antigenům treponem ze zaživacího i genitálního traktu. My jsme nespátřili u zcela zdravých lidí žádný pozitivní FTAT. Naproti tomu byl někdy pozitivní tam, kde je i vyšší frekvence falešně pozitivních reakcí s lipidickými hapteny. Nespecificky pozitivní reakce v těch případech, kde jsou poměry v séru změněny některou z neluetických chorob (skupina nespecifických diagnóz) nás vede k domněnce, že v FTA testu se účastní na rozdíl od TPI značně široké spektrum specifických i nespecifických protilátek, mimo jiné i reaginy proti lipidickým hapténům.

Nejvyšších títů bylo dosaženo ve skupině s diagnózou primární lues. Pohybují se okolo horní hranice užitého ředění, tj. okolo 800. U diagnostikované lues latens jsou naopak na dolní hranici, kterou ještě hodnotíme jako pozitivní, tj. okolo titru 100. Stejných výsledků jsme dosáhli u vrozené lues a neurolues. Stanovením různých títů jako kritických na jedné straně a hodnocením svítivosti na druhé straně lze podstatně ovlivnit postavení FTAT mezi rutinní sérologií lues. Specifitu reakce lze zvýšit zvýšením kritického titru a odečítáním dvoukřížkové fluorescence jako konečné, za-

tímco snížením kritického titru a snížením nároků na intenzitu fluorescence lze zvýšit citlivost reakce. Potom by byl FTAT vhodný jako vyhledávací reakce. Domníváme se, že FTAT jako vyhledávací test je pro běžnou sérologickou laboratoř příliš náročný. Jestliže je však ze všech reakcí nejspecifičtější, může se stát testem, jenž z nejasných výsledků provádí výběr pro další vyšetření imobilizačním testem. FTAT si v tomto smyslu zaslouží další pozornost.

Literatura

1. Borel, L. J., Durel, P.: Path. Biol. 7, 1959, 2317.
2. Brooks, J. B., Lewis, V. J., Pittman, B.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 119, 1965, 748.
3. Cherry, W. B., Moody, M. D.: Bact. Rev. 29, 1965, 222.
4. Covert, S. V., Kent, J. F., Stevens, R. W.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 106, 1961, 729.
5. Deacon, W. E., Falcone, V. H., Harris, A.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 96, 1957, 477.
6. Deacon, W. E., Freeman, E. M., Harris, A.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 103, 1960, 827.
7. Deacon, W. E., Hunter, E. F.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 110, 1962, 352.
8. Dedmon, R. E., Holmes, A. W., Deinhardt, F.: J. Bact. 89, 1965, 734.
9. Edwards, E. A.: Publ. Health Rept. 77, 1962, 427.
10. Fife, E. H.: Am. J. Clin. Path. 36, 1961, 105.
11. Franěk, J.: Voj. zdrav. listy 34, 1957, 21.
12. The Fluorescent Treponemal Antibody Test (FTA 200), cyklostyl WHO.
13. Fluorescent Treponemal Antibody Test, Lab. Proc. for Modern Syph. Serology, US DHEW 1962.
14. Goldwasser, R. A., Shepard, C. C.: J. Immunol. 80, 1958, 122.
15. Gordon, M. A., Edwards, M. R., Tompkins, V. N.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 109, 1962, 96.
16. Hunter, E. F., Deacon, W. E., Meyer, P. E.: Publ. Health Rept. 79, 1964, 410.
17. Kellog, D. S., Deacon, W. E.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 115, 1964, 963.
18. Kent, J.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 109, 1962, 584.
19. Király, K., Jobbágy, A., Mecher, T.: Bull. WHO, 33, 1965, 687.
20. Laboratory Procedures for Modern Syphilis Serology, US DHEW, Publ. Health Service 1962.
21. Leibowitz, A. a spol.: Am. J. Clin. Path. 40, 1963, 480.
22. Metzger, M., Ruczowska, J.: Arch. imm. therap. exp. 12, 1964, 702.
23. Miller, J. N.: J. Bact. 90, 1965, 297.
24. Montgomery, H., Suhrland, S., Knox, J. M.: J. Invest. Derm. 35, 1960, 95.
25. Nelson, R. A., Mayer, M. M.: J. Exp. Med. 89, 1949, 369.
26. Nelson, R. A., Diesenbruck, J. A.: J. Immunol. 66, 1951, 667.
27. Niel, G., Fribourg-Blanc, A.: Ann. Inst. Past. 102, 1962, 616.
28. Niel, G., Fribourg-Blanc, A.: Bull. WHO 33, 1965, 89.
29. Nielsen, H. A., Idsøe, O.: A. path. et micr. Scand. 57, 1963, 331.
30. Ovčinnikov, N. M.: Čs. dermatol. 39, 1964, 297.
31. Poetschke, G., Killisch, L.: Schweiz. Z. Path. 22, 1959, 765.
32. Pillot, J., Borel, L. J.: C. R. Ac. Sci (Paris), 252, 1961, 954.
33. SERA Study 1956—7, US Publ. Health Service, PHS Publication No 650, Washington DC 1959.
34. Sokol, F., Hulka, A., Albrecht, P.: Fol. Micr. 7, 1962, 155.
35. Wagner, M.: Zentr. Bakt. 185, 1962, orig. 124.
36. Weberschinke, J., Kittnar, E.: J. Hyg. Epid. Micr. Imm. VII, 1963, 415.
37. Wilkinson, A. E.: Proc. Roy. Soc. Med. 56, 1963, 478.