

616.981.455-078.73

NAŠE ZKUŠENOSTI SE SÉROLOGICKÝM VYŠETŘOVÁNÍM TULARÉMIE

MUDr. Vladislav POTUŽNÍK, PhMr. Vladimír ŠVEJNOCH
mikrobiologické oddělení KHES, České Budějovice

Tularémie u lidí zůstává stále onemocněním, kde sérologické vyšetření je u většiny případů kromě epidemiologických metod jediným, které může přispět k etiologickému objasnění infekce. Je tomu tak proto, že pozitivní kultivační nález je u lidských infekcí spíše výjimkou než pravidlem, což platí ještě větší měrou v současné době, kdy pacientům je často odebrán materiál ke kultivačnímu vyšetření obvykle až po zahájení léčby antibiotiky. V poslední době vedlo použití citlivých, rychlých a spolehlivých metod k prohloubení sérologické diagnostiky této infekce. V naší laboratoři jsme mohli v průběhu epidemie tularémie v r. 1962 vyzkoušet vedle klasické aglutinační reakce i některé novější sérologické metody, a to průkaz inkompletních protilátek, nepřímou hemaglutinační reakci, latex aglutinační test a povrchově fixační test. Smyslem této práce je zhodnocení významu jednotlivých reakcí pro rutinní praktické použití.

Bylo vyšetřováno celkem 444 sér od 195 nemocných, u nichž byla na podkladě klinického vyšetření a epidemiologického pátrání stanovena diagnóza tularémie. První vzorek séra byl odebrán nejpozději první nebo druhý den hospitalizace a následující v 5—10denních intervalech. Všechna séra byla až do sérologického vyšetření uchovávána při -20° . Kontrolní skupina obsahovala 40 sér od zdravých lidí, 60 od nemocných jinými infekcemi a 8 sér od nemocných bruceleózou.

Metodika

a) Získávání výchozí bakteriální masy k přípravě jednotlivých druhů antigenů.

Jako produkčního bylo použito kmene č. 645/62 Ref, čerstvě izolovaného v naší laboratoři z uhybnulého zajíce [1]. Kmen byl masívně naočkován na půdu podle Rhamy:

Rp.: Proteose pepton 20,0; Glukóza 20,0; NaCl 10,0; 1-Cystin 3,0; Agar 30,0; infúze z hovězího srdce 1000,0; 2% roztok hemoglobinu 1000,0; pH 6,8.

Inkubace 4 dny při 37° C za aerobních podmínek. Poté růst stažen z ploten do husté bakteriální masy.

b) Reakce aglutinační (AR).

Antigen upraven do density, odpovídající 3. stupni McFarlandovy stupnice, ředěním fyziologickým roztokem s 0,5% formaldehydu. Provedení reakce běžným způsobem (2). Při odečítání hodnocena 50% aglutinace ještě jako pozitivní, podobně jako je tomu u aglutinace s náplavem brucel (3).

c) Stanovení inkompletních protilátek (IAR) bylo prováděno technikou podle Stewarda a McKeevera (4) v modifikaci podle Potužníka a Havlíka (5).

d) Nepřímá hemaglutinační reakce (NHR).

Specifický surový polysacharidový antigen je uvolňován do vodního roztoku destrukcí bakterií varem. Čtyři díly vlhké váhy kultury smísíme s 15 díly pufovaného fyziologického roztoku a varem po dobu 60 minut v Arnoldově přístroji uvolníme surový antigen. Po následném pozvolném ochlazení oddělíme při 10 000 obr./min. buněčnou drť a surový polysacharidový antigen. Potřebná doba centrifugace je asi 10 min. Modifikace erytrocytů, provedení a odečtení reakce je obdobné jako NHR u střevních infekcí (6, 7), pouze s tím rozdílem, že bylo použito erytrocytů konzervovaných formaldehydem (8).

e) Latex aglutinační reakce (LAR).

Principem reakce je vazba antigenu na latexové částice, které jsou pak aglutinovány specifickým antisérem. Jako antigenu bylo použito stejného preparátu jako k NHR. Protože při této reakci není možné použít centrifugace k propírání směsi latex + antigen k odstranění přebytečného antigenu, je nutno nejprve box-titrací stanovit takové nejmenší ředění antigenu, které plně modifikuje latex tak, aby žádný volný antigen nezůstal v tekutině. Modifikaci částic provádíme 2 hod. při 37°. Vlastní reakce se provádí stejným způsobem jako AR, ale inkubace je nejprve 2 hod. při 56° C a pak do druhého dne při pokojové teplotě. Odečítáme jako 0 aglutinaci, avšak s poněkud jemnějším zrněním a vyjasněným supernatantem.

f) Povrchově fixační reakce (PFR).

Základem je původní Castenedova metodika u brucelóz (9) v naší modifikaci (10). Růst asi z 20 ploten se suspenduje ve 100 ml fyziologického roztoku s 1% formalínem. Po 24 hod. stání při pokojové teplotě propereme pasteurely ve fyziologickém roztoku a doplníme opět na 100 ml. Barvení antigenu se provádí 1% roztokem hematoxylinu (1 g hematoxylinu se rozpustí v malém množství etylalkoholu a doplní se do 100 ml destil. vodou) a 2% roztokem ferrum sulphuricum p. a. v destil. vodě. Na každých 100 ml náplavu

pasteurel přidáme 2 ml roztoku ferrum sulphuricum a 4 ml roztoku hematoxylinu. Postavíme na světlo. Během asi 4 dnů se suspenze zbarví do tmavomodré, téměř černé barvy. Pak je nutno provést oddělení nečistot od obarvených brucel, a to diferenciální centrifugací. Nejprve při velmi nízkých obrátkách oddělíme hrubé shluky barviva a mikrobů, takže v supernatantu zůstanou pouze obarvené, difúzně rozptýlené pasteurely. Pak při 8000 obr./min. propíráme pasteurely tak dlouho, až je supernatant zcela bezbarvý. Nakonec hustou masu pasteurel přenášíme do třecí misky. Emulgace bakteriální masy se děje v nasyceném roztoku sacharózy ve vhodném poměru (viz dále). Vzniklou emulzí tiskneme pomocí dolního ústí pipety kulaté tečky o průměru 3–4 mm na filtrační papír, a to asi 2,5 cm od dolního okraje a asi ve vzdálenosti 1,5 cm od sebe. Po zaschnutí je antigen připraven k použití. K vlastnímu provedení reakce nanese na antigen 1 kapku vyšetřovaného séra, kterým antigen zcela překryjeme. Necháme lehce zaschnout. Poté ponoříme proužek filtračního papíru do nádoby s fyziologickým roztokem tak, aby skvrny byly asi 1 cm nad hladinou roztoku a ponecháme 10–15 minut difundovat. Jestliže byly v séru obsaženy specifické protilátky, dojde k fixaci antigenu, takže není strhován proudem fyziologického roztoku a skvrna se nemění (+). V opačném případě zůstane antigen volný a je vyplavován z původního místa na papíře způsobem, který je přirovnáván ke kometě (–). Je-li v séru méně protilátek nežli stačí k úplné fixaci, dojde k částečné fixaci a k částečnému vyplavování antigenu (±). Jde tedy o reakci kvalitativní. Antigen je však nutno standardizovat tak, aby zachycoval bezpečně určitou hladinu protilátek a více. Toho je možno docílit správným poměrem masy pasteurel k množství roztoku sacharózy při výrobě. V našich podmínkách to bylo asi 1 : 8.

Výsledky uvádíme souhrnně takto:

a) Nejprve jsme srovnali výsledky dosažené v AR a NHR, přičemž nás zajímal především poměr výše titrů protilátek dosažených v obou reakcích. Výsledek je shrnut v tab. 1.

Ukázalo se, že ve 34 sérech byly výsledky na stejném stupni pozitivní či negativní, tedy v 7,6 %. Sér negativních v NHR a pozitivních v AR či s vyšším titrem v AR než v NHR bylo 8, tj. v 1,8 %. Zbývajících 402 sér (91,6 %) reagovalo vyšším titrem v NHR než v AR.

b) Celá skupina kontrolních sér vykazovala v obou reakcích negativní výsledky.

c) V obou reakcích jsme mohli většinou prokázat velmi dobrou dynamiku tvorby protilátek. V tab. 2 uvádíme 3 typické ukázky.

d) Inkompletní protilátky byly pravidelně přítomny téměř ve všech sérech v titrech jen o málo vyšších nežli protilátky kompletní.

e) Latex aglutinační reakce dávala téměř shodné výsledky s reakcí aglutinační.

f) PFR byla pozitivní či částečně pozitivní od aglutinačního titru 1 : 40 a výše.

Tabulka 1

a) AR — NHR +			b) AR + NHR —			c) AR + NHR + (poměr titrů)			d) AR — NHR —		
AR	NHR	Počet sér	AR	NHR	Počet sér	AR : NHR	Počet sér	Počet sér			
—	20	4	20	—	1	1 : 2	20	15			
—	40	6	40	—	1	1 : 4	56				
—	80	6	80	—	1	1 : 8	69				
—	160	2				1 : 16	67				
—	320	3				1 : 32	58				
—	640	2				1 : 64	42				
—	1280	7				1 : 28 (a víc)	44				
—	2560	10				1 : 1	19				
—	5120	2				2 : 1	4				
—	10240	4				4 : 1	1				
Celkem		46	Celkem		3	Celkem		380	Celkem		15

Diskuse

Při vyšetřování epidemie tularémie v našem kraji v r. 1962 jsme byli postaveni před úkol vyšetřit značná množství sér. Protože nebylo v dostatečném množství k dispozici komerčně vyráběné aglutinační diagnostikum, byli jsme nuceni vyrobit si sami větší množství diagnostika. Uvedená pevná půda podle Rhamy se nám velice dobře osvědčila a dávala zhruba dvojnásobně větší výtěžek bakteriální masy než půdy užívané pro izolace *P. tularensis*, jako např. půdy s vaječnými žloutky či s thioglykolátem sodným. Disponovali jsme určitým množstvím diagnostika Behringwerke, které jsme použili pro srovnání s diagnostikem naší výroby. Při použití několika sér negativních, středně silně a silně pozitivních se ukázalo, že nebyly prakticky rozdíly v kvalitě mezi oběma srovnávanými antigeny, a proto jsme vyrobili vlastní diagnostikum ve větším množství i pro potřebu několika jiných laboratoří.

Výše tzv. „pozitivních“ aglutinačních titrů je u tularémie udávána poměrně nízko. Většina autorů udává hodnoty již 1 : 20 jako silně pozitivní a 1 : 40 a vyšší za jednoznačně pozitivní, současně je však poukazováno na rozhodující význam sledování dynamiky protilátek (11). Nechybí však ani údaje o tom, že teprve hodnoty od 1 : 100 je možno považovat za signifikantní (12). Za nejvyšší dosažitelné titry jsou udávány hodnoty 1 : 20 000. Podle našich nálezů nelze hodnoty do 1 : 80 bez opakovaného vyšetření považovat za pozitivní a je třeba vyčkat dalšího vyšetření a sledovat dynamiku titru protilátek. Teprve hodnoty od 1 : 160 je možno považovat za signifikantní a vysoké hodnoty od 1 : 640 a vyšší za jasně pozitivní. Negativní výsledek nevylučuje tularémii tehdy, jestliže odběr krve byl proveden před 10. dnem onemocnění, kdy protilátky aglutinačního typu ještě nejsou vytvořeny.

V některých sérech jsme provedli zjištění in-

kompletních protilátek. Zjistili jsme, že jsou pravidelně ve vyšším titru přítomny většinou tam, kde jsou prokazatelné i protilátky kompletní, avšak nenalezli jsme je při nepřítomnosti protilátek kompletních. Pro rutinní provoz nepovažujeme proto tuto reakci za vhodnou.

Velmi cennou sérologickou reakcí v diagnostice tularémie se ukázala být NHR. Podle Alexanderové a spol. (13) prokazujeme touto reakcí antipolysacharidové protilátky, jejichž výše má být v korelaci se stupněm imunity, a proto uvedení autoři měřili touto metodou, spolu s reakcí precipitační, vakcinační efekt. Nejistili však v této souvislosti korelaci s reakcí aglutinační. Wright a Feinberg (14) rovněž užili NHR k průkazu protilátek v sérech lidských, koňských, králíčích, krysích a ovčích s velmi dobrými výsledky. Knothe a Havemeister (15) studovali pomocí této reakce protilátkovou odpověď u zvířat a lidí očkovaných různými frakcemi pasteurel. Zjistili, že čistý polysacharid není antigenní a že jeho antigenicita stoupá s množstvím přidaného proteinu. To je v souladu s již uvedenou prací Wrighta a Feinberga, kteří mohli prokázat antigenicitu červených krvinek s adsorbovaným tularémickým polysacharidem, avšak nikoli sa-

Tabulka 2

Vzorek č.	Pacient č. 1		Pacient č. 2		Pacient č. 3	
	AR	NHR	AR	NHR	AR	NHR
1	0	0	80	640	160	320
2	80	1280	160	1280	640	2560
3	320	10000	160	2560	1280	2560
4	1280	20000	320	10240	80	1280
5	2560	20000	80	10240		
6	1280	20000				
7	320	20000				

motného polysacharidu. Ani podle našich nálezů není korelace mezi AR a NHR, i když obecně je citlivost NHR podstatně vyšší. Rozdíly jsou i v dynamice tvorby. Zatímco u AR po docílení vrcholu protilátky klesají, v NHR přetrvávají obvykle ve vysokých hodnotách. Je tedy pravděpodobné, že NHR měří jinou kvalitu protilátek než AR, což by bylo v souladu se shora uvedenou prací.

Smyslem naší práce však bylo zhodnocení významu NHR pro praktickou diagnostiku. Kromě obecných známých výhod této reakce, které spočívají v rychlosti a snadnosti provedení reakce a jejím odečítání, jsme se zabývali otázkou specifity reakce. Srovnáním vyšetření u skupiny zdravých lidí či nemocných brucelózou a jinými infekcemi se ukázala velmi dobrá specifita reakce. Překvapilo nás, že jsme nenalezli zkřížené reakce mezi séry pacienta s brucelózou s tularémickým antigenem v NHR, o nichž je velmi často v literatuře referováno, ovšem v souvislosti s reakcí aglutinační. Je pravděpodobné, že námi užitý kmen *P. tularensis* k výrobě antigenu neměl v literatuře popisovaný společný antigen *P. tularensis* a *B. abortus*. Domníváme se, že NHR by byla vhodná po přezkoušení i na jiných pracovištích pro rutinní sérologickou diagnostiku tularémie. Jako velmi výhodné by se jevilo použití této metodiky i ve studiích epidemiologických ke zjišťování imunity. Předpokladem pro to by byla centrální výroba antigenu a vhodná standardizace reakce.

Latex aglutinační reakce byla provedena pouze s menším počtem sér. Výsledky byly prakticky totožné s reakcí aglutinační, což je v souladu s prací Flamma a spol. (16). Z našich dosavadních zkušeností vyplývá, že tato reakce — za použití polysach. antigenů — nemá žádné výhody ve srovnání s klasickou AR či s NHR, přičemž je i poněkud pracnější.

Velmi perspektivní pro široké terénní použití se nám jeví reakce povrchově fixační, prováděná na filtračním papíře. Dosud jsme nenalezli v literatuře zpráv o jejím použití u tularémie. Její provedení je velice jednoduché, trvá pouze ně-

kolik minut při minimální spotřebě séra a antigenu. Jde tedy v pravém slova smyslu o tzv. rychlotest. Jde ovšem pouze o reakci kvalitativní, která má vyloučit negativně reagující séra. Pozitivně reagující séra se titrují dále AR či NHR.

V našich podmínkách jsme ji standardizovali tak, aby zachycovala aglutinační titry od 1 : 40 a výše. Snížením množství bakterií a zvýšením podílu sacharózy je ovšem možno dosáhnout toho, že jsou zachycovány i titry nižší. V tomto smyslu považujeme toto sdělení za předběžné, protože se dále hodláme zabývat standardizací tohoto testu u tularémie.

Na podkladě našich dosavadních zkušeností se domníváme, že vhodná sestava reakcí pro sérologické vyšetřování u tularémie by měla obsahovat reakci povrchově fixační jako vyhledávací reakci kvalitativní, dále pak reakci aglutinační a nepřímou hemaglutinační k měření množství protilátek.

Souhrn

Popsány zkušenosti s aglutinační, nepřímou hemaglutinační, latex-aglutinační reakcí, s průkazem inkompletních protilátek a s povrchově fixační reakcí u tularémie. Nepřímá hemaglutinační a povrchově fixační reakce vhodně doplňují reakci aglutinační, zatímco reakce latex-aglutinační a průkaz inkompletních protilátek nejsou přínosem k sérologické diagnostice tularémie.

Literatura

1. Hausner O.: Sdělení na Pracovních dnech čs. mikrobiologů a epidemiologů, Luhačovice, duben 1961.
2. Raška K. a spol.: Mikrobiologické vyšetřovací metody, SZN, Praha 1958.
3. John C., Raška K. a spol.: Mikrobiologické vyšetřovací metody, SZN, Praha 1958.
4. McKeever, J. D., J. Hyg., 48: 358.
5. Potužník V., Havlík J.: Čs. EMI, VI-5, 322, 1957.
6. Potužník V., Havlík J., Kott B.: Voj. zdrav. listy, 4, 179, 1958.
7. Potužník V., Havlík J.: Čs. EMI, VII, 1, 36, 1958.
8. Feeley J. C., Sword C. P., Manclark C. R., Pickett M. J.: Am. J. Clin. Path. 30, 77, 1958.
9. Castaneda M. R.: Bull. Wld. Hlth. Org. 24, 73, 1961.
10. Potužník V., Švejnoch V., Duniewicz M.: Čs. EMI — v tisku.
11. Beiheft zu Laboratoriumsblätter, Behringwerke, II, 128, 1958.
12. Wildführ G.; Med. Mikrob. Imm. Epid., G. Thieme Verlag, Leipzig 1961.
13. Alexander, Mary M., Wright G. G., Baldwin A. C.: J. Exp. Med. 91, 5, 1950.
14. Wright W. W., Feinberg R. J.: J. Immunol. 68, 65.
15. Knothe H., Havemeister G.: Med. Experiment. 4, 215; 5, 293, 1959.
16. Flamm H., Wiedermann G.: Wnr. klin. Woch., 818, 1961.