

361.075:614.4[:613.67]:576.8.078.13

K POUŽITÍ FLUORESKUJÍCÍCH PROTILÁTEK LABORATOŘEMI HYGIENICKO-PROTIEPIDEMICKÉ SLUŽBY

Podplukovník MUDr. Jiří FRANĚK, CSc.

Vojenský ústav hygieny, epidemiologie a mikrobiologie v Praze

Několikaletá experimentální práce s fluoreskujícími protilátkami (FP) přinesla řadu velmi pozitivních výsledků, které jednoznačně potvrzují, že imunofluorescenční metoda dnes představuje přes všechna svá omezení nejrealnější cestu k řešení otázek rychlé mikrobiologické diagnostiky i specifické detekce (přehled hlavních výsledků i celkové problematiky — viz Franěk 1964).

Převod nové metody do praxe není nikdy snadný, tím spíše, když jde o metodu technicky náročnou. Přesto **technické** otázky dnes už nejsou

nejdůležitější — alespoň ne, pokud se týká dostupnosti metody laboratořím. Největším problémem je, jak metodicky zabezpečit respektování toho, že jde o novou reakci s řadou zvláštností i dosud otevřených otázek.

K hlavním z nich patří, jak si ověřit, resp. jak zajistit při pokusech o praktickou aplikaci FP na neznámý materiál **specifičnost výsledku**.

V laboratoři amerického biochemika Coonse, autora metody, byly používány tyto testy ověřující specifičnost (Coons 1950):

a) inhibice specifické fluorescence předběž-

nou aplikací nekonjugovaného specifického séra;

b) ztráta fluorescence po vysycení konjugátu homologním antigenem;

c) negativní výsledek po aplikaci konjugátu na tkáň neobsahující homologní antigen.

Tento systém kontrol má své trvalé místo v experimentálních pracích. Na druhé straně však každá z jmenovaných reakcí má své nedostatky a omezení, které právě při aplikaci na neznámý materiál (tj. při diagnostickém použití FP) podstatně snižují jejich cenu.

Inhibiční testy: Málo výrazné výsledky dvou-
stupňové inhibice (tj. postupu, při němž se na preparát aplikuje nejprve nekonjugované a teprve po jeho odstranění konjugované homologní sérum) pozorovali v pokusech se zárodky maleu a melioidózy už Moody a ostatní (1956); tito autoři také popsali fakt oslabení fluorescence při současné aplikaci neznačkováného a značkováného séra na preparát.

Technikou inhibičních testů se později zabýval zejména Goldman, který zjistil, že při tomto posledním způsobu, tj. při současné aplikaci obou sér, se účinnost inhibice podstatně zvyšuje; autor navrhl tento postup („one-step inhibition test“) pro sérologickou diagnostiku toxoplazmózy (Goldman 1957).

Ale ani v dvoustupňovém, ani v jedностupňovém provedení nedávaly inhibiční reakce ve všech případech zcela zřetelné výsledky (Breitenfeld a Schäfer 1957, Finkelstein a La Brec 1959 aj.). Někteří autoři proto zaujali k jejich používání spíše negativní stanovisko (viz Michajlov a Djakov 1961, str. 173—174, Jentzsch a Axt 1963).

Už v prvních metodických pokusech s *B. anthracis* provedených v naší laboratoři se ukázalo, že k dosažení účinné inhibice je potřeba použít zcela určité (předběžnou titrací zjištěné) ředění konjugátu (Franěk 1961). Význam kvantitativních vztahů mezi obsahem protilátek v imunním séru, použitím k inhibici, a ve specifickém konjugátu, jehož fluorescence má být potlačena, byl pak zcela konkrétně ukázán v pozdějších pokusech s *P. tularensis* (Franěk, Procházka, v tisku).

Také v pokusech s detekcí protilátek v sérech rekonvalescentů po tularémii (Franěk, Wolfová, v tisku) jsme si ověřili, že k inhibici dochází (při sériovém ředění séra) skutečně jen v poměrně malém rozmezí a že tento postup nedovoluje přesnější stanovení titru protilátek. Tento poznatek je v rozporu s už zmíněnými pracemi Goldmana. Je však třeba říci, že Goldmanovy příznivé výsledky nebyly plně potvrzeny ani při diagnostice samotné toxoplazmózy, kde — podobně jako u tularémie — je třeba dát přednost bezprostřednímu zjišťování protilátek nepřímou imunofluorescenční reakcí (známý antigen — testované rekonvalescentní sérum — antihumánní konjugát) (Kramář 1964, ústní sdělení).

Vysycení konjugátu homologním antigenem: Podobně jako u inhibičních testů byly i u tohoto

postupu už v prvních pokusech o diagnostickou aplikaci FP pozorovány nepřesvědčivé výsledky (Mejsel, Kabanova a ostatní 1957).

V pokusech s *P. tularensis* jsme si ověřili, že jde opět o otázku kvantitativních vztahů. V závislosti na obsahu protilátek v konjugátu je třeba použít k účinnému vysycení odpovídajícího množství antigenu: bakteriální suspenze schopná úplně vysytit konjugát obsahující 0,12 % bílkoviny byla zcela neúčinná při koncentraci bílkoviny v konjugátu 1,2 % (Franěk, Procházka, v tisku).

V obou případech tedy jde o reakce, které mohou být velmi užitečné při studiu vlastností příslušného séra v experimentálních podmínkách. Závislosti na kvantitativních poměrech je možné účelně využít k přesnějšímu zhodnocení významu té nebo oné protilátky v reakci, ke studiu zkřížených reakcí, k jemné diferenciaci blízkých antigenů (jak se to podařilo např. při pokusech o rozlišení *E. histolytica* a *E. hartmannii* imunofluorescenční metodou — Goldman a Gleason 1962).

Inhibiční testy jsou dále metodou volby při detekci protilátek v rekonvalescentních sérech; o účelnosti jejich použití u jednotlivých infekcí je třeba se přesvědčit. Naše výsledky o jejich výhodě ve srovnání s nepřímou imunofluorescenční metodou nesvědčí.

Při vlastní diagnostice se však mohou obě reakce uplatnit jen částečně, a to ještě jen v laboratoři, která se metodou systematicky zabývá a může předem provést příslušné kvantitativní titrace.

Také třetí způsob kontroly specifičnosti reakce, jak byl používán v Coonsově laboratoři, totiž **negativní výsledek** při aplikaci FP na tkáň **neobsahující homologní antigen**, je při diagnostice použitelný jen v omezené míře, protože materiál je neznámý a o jeho složení (obsah antigeně blízkých saprofytů, obsah látek s velkou tendencí nespecificky adsorbovat FP atd.) nic nevíme. Použití jako kontroly vzorku obdobného materiálu proto nelze považovat, alespoň ne vždy, za adekvátní kontrolu (viz odstavec o nespecifických reakcích).

Uvedené reakce jsou tedy při diagnostické aplikaci FP realizovatelné jen částečně a nezaručují skutečnou kontrolu specifičnosti reakce: řada autorů v tom vidí jednu z hlavních potíží převodu imunofluorescenční metody do mikrobiologické praxe (viz Borek 1961, Carski 1961 a jiní).

Domnívám se, že v otázce diagnostické aplikace FP je třeba jasně rozlišovat dvě pracovní etapy:*)

První je dána stadiem experimentálního vypra-

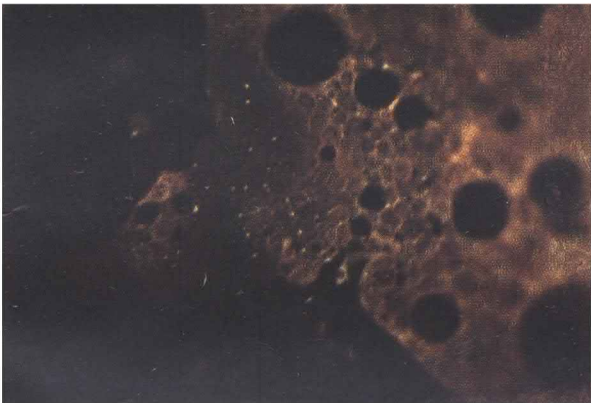
*) Z hlediska kontroly konjugátu jde vlastně o etapy tři, z nichž první je převážně biochemická a zahrnuje srovnání imunologické aktivity konjugátu s výchozím sérem a stanovení základních hodnot (obsah proteinu, množství FITC navázaného na molekulu proteinu, event. specifikací frakce konjugátu). Tyto údaje, resp. dosažení vyhovujících hodnot, jsou předpokladem další práce s konjugátem v mikrobiologické laboratoři.



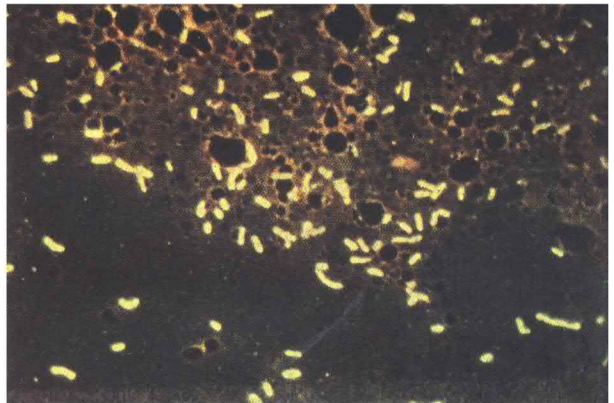
Obr. 1. Virulentní kmen *B. anthracis*, částečně narušené pouzdro u řetízku v nátěru z peritoneálního exudátu bílé myši



Obr. 2. Ojedinělé *P. tularensis* v otiskovém preparátu ze sleziny infikované myši



Obr. 2a. Totéž při přehledném zvětšení a kontrastním dobarvení



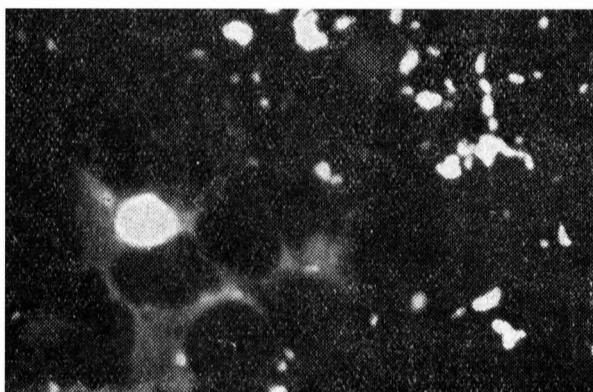
Obr. 3. *B. anthracis* v otiskovém preparátu ze sleziny infikované myši: přehledné zvětšení



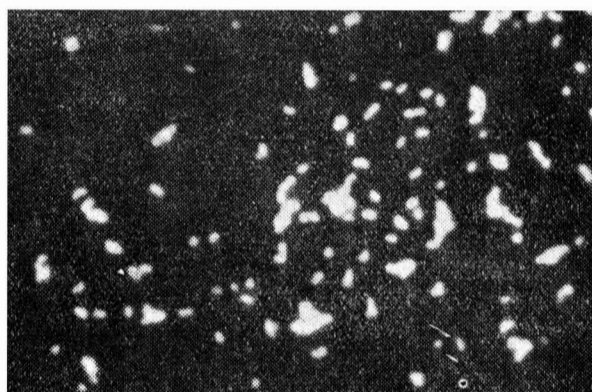
Obr. 4. *B. anthracis* v preparátu z homogenátu sleziny infikované myši



Obr. 5. *C. burnetii* v otiskovém preparátu ze sleziny infikované myši



Obr. 6. *P. tularensis* v otiskovém preparátu ze sleziny infikované myši



Obr. 7. Primokultura *P. tularensis*

cování příslušného diagnostického postupu pro dané agens, druhá aplikací už ověřeného postupu v praxi.

Během prvního období práce je potřeba:

- ověřit principiální možnost použití zvoleného séra k znázornění daného agens imunofluorescenční metodou, specifická, citlivost a spolehlivost reakce, charakter a rozsah možných nespecifických reakcí a možnosti jejich odstranění. V této době jsou používány inhibiční testy, vysycovací pokusy, je zjišťován specifický „staining-titer“ a podobné hodnoty FP;
 - specifikovat, na které konkrétní antigenní frakci reakce závisí, a vypracovat postup, který zajistí, že hledané agens bude skutečně v materiálu přítomno v potřebné formě; vypracovat adekvátní způsoby odběru a dalšího zpracování příslušného materiálu (předkultivace, fixace apod.).
- U bakterií může otázka předběžné přípravy materiálu hrát velmi důležitou roli. Tak při vypracování postupů pro důkaz *B. anthracis* a *P. tularensis* v zevním prostředí se ukázalo optimální prokazovat tato agens po krátkodobé předkultivaci in vivo, v orgánech zvířat použitých k zrychlené biologické zkoušce (Franěk, v tisku). U jiných mikrobů byly naopak nalezeny nejvhodnější podmínky pro specifický průkaz během kultivace in vitro, přičemž časové období, během kterého je potřebný antigen optimálně vytvořen, je někdy velmi krátké: u *Vi. cholerae* je to např. mezi 3—6 hodinami, u *N. gonorrhoeae* během prvních 18 hodin kultivace (viz Franěk 1964, str. 81—83);
- připravit všestranně prověřený konjugát, zaručující intenzivní specifickou fluorescenci homologního antigenu a upravený tak, aby nedocházelo k nekontrolovatelným reakcím (ověřené odstranění volného FITC, příslušné vysycení a ředění atd.);
 - získat osobní zkušenosti v hodnocení výsledků (charakteristická morfologie, intenzita fluorescence, hlavní možnosti omylů atp.).

Tím jsou dány předpoklady, bez nichž by nikdy nemělo dojít k zahájení druhé etapy, tj. diagnostické aplikaci FP (samozřejmě příslušně kontrolované a vždy — alespoň do dosažení velké zkušenosti — srovnávané s konvenčními diagnostickými metodami).

K vlastní diagnostické aplikaci tedy dochází až po vypracování potřebné metodiky; použijeme ověřený konjugát, jehož vlastnosti známe. Za těchto předpokladů považují — vycházejí ze zkušeností získaných v naší laboratoři — za účelné, aby při hodnocení specifické fluorescence bakterií byla uplatňována tato hlediska:

a) Intenzita fluorescence

Při jejím hodnocení jsme se přidržovali této stupnice:

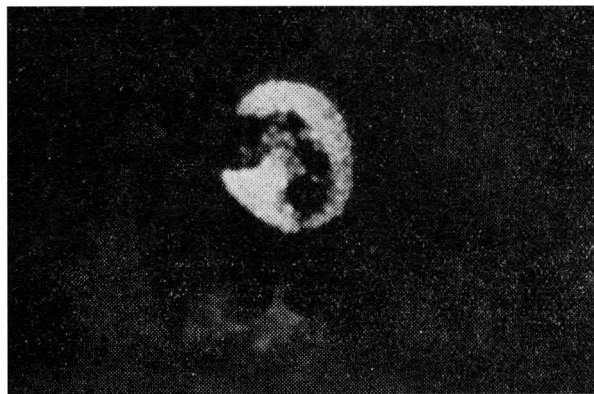
- + : sotva znatelné útvary neurčité barvy,
- + : útvary zřetelně zeleně zbarvené,
- ++ : jasně zelená barva,
- +++ : intenzivní jiskřivá zelená fluorescence;
- ++++ : intenzivní jiskřivá zelená fluorescence; rozdíl +++ a ++++ je spíše subjektivní, má umožnit srovnání dobře fluoreskujících, ale přece jen se lišících útvarů.

Spolehlivé hodnocení výsledků umožňují pouze konjugáty, po jejichž aplikaci na homologní antigen dostáváme fluorescenci v rozmezí +++ až ++++, tj. skutečně intenzivní. Mohli jsme se sami přesvědčit, že práce s konjugáty se slabší intenzitou fluorescence je spojena s neúměrně zvýšeným rizikem nesprávných výsledků: takové konjugáty není možné dostatečně vysytit a nespecifická fluorescence pozadí je proto zvýšena. Vlastní specifická fluorescence, poměrně slabá, je tím hůře odlišitelná. Při jinak velmi účinném dobarvování preparátů oranžově fluoreskujícím albumínem není v tomto případě obraz dostatečně kontrastní, takže se ztrácí všechna výhoda dvojího barvení (viz dále). Je zhoršena i možnost morfologické diferenciacie fluoreskujících útvarů.

Používání jen takových konjugátů, které i po nezbytných úpravách (vysycení jaterním práš-



Obr. 8. Eozinofilní granula v nátěru kostní dřevě bílé myši



Obr. 9. Eozinofilní granulocyt v otiskovém preparátu ze sleziny morčete

kem, orgánovým homogenátem nebo pod.) dávají intenzivní fluorescenci, by mělo být základní podmínkou. Jestliže se při vypracovávání postupu pro detekci příslušného agens nepodařilo zajistit odpovídající kvalitu konjugátu, nevylučuje to jeho použití v experimentálních pracích, není ale účelné pokoušet se o diagnostickou aplikaci. Takový pokus je spojen s příliš velkým rizikem sporných výsledků a diskreditace metody (jak tomu bylo např. v některých pracích s riketsiemi).

b) Charakteristická morfologie

Na preparátech se téměř vždy vyskytuje mimo hledaný antigen celá řada elementů, které z různých důvodů více nebo méně fluoreskují (autofluorescence, nespecifická vazba FP, ale i např. lom světla v místech poškrábání podložního sklíčka). Tyto útvary je možné do značné míry odlišit už morfologicky.

K první diferenciaci se využívá základních znalostí o morfologii mikrobů (tvar a velikost bakteriální buňky, přítomnost pouzdra, typický růst ve dvojicích, v řetězcích apod.). Přitom je jen třeba si uvědomit, že vazba FP na mikrobiální buňky vede ve srovnání s jinými způsoby barvení obvykle k zřetelnému zvětšení jejich rozměrů (především příčného průměru).

Téměř obecným rysem je dále „kapsulární“ charakter specifické fluorescence bakterií: centrální část bakteriální buňky je tmavá, fluoreskují pouze kontury. Jde v podstatě o optický jev, související s rovnoměrným rozložením molekul FP po celém povrchu buňky (viz Michajlov 1963). Fluorescence kontur není vyjádřena pouze v těch případech, kdy mikroorganismy nemají rigidní stěnu (leptospíry, spirochety).

V řadě případů vzniká charakteristický obraz daný uložením antigenní frakce reagující s FP. U *B. anthracis* např. vzniká při použití antikapsulárního séra velmi charakteristický obraz tím, že z povrchu antraxových bacilů fluoreskují právě jen úseky pokryté kapsulou (obr. 1). U *P. tularensis* je morfologie zase silně ovlivněna existencí „hlenového obalu“ pasterel. V otiscích

orgánů infikovaných zvířat je proto fluorescence pasterel jakoby rozmazaná, přechází bez ostrých hranic do periferie a často i do centra buněk, jejichž středy proto nejsou zcela tmavé (obr. 2, 6). Tento charakter je zachován i v primokultuřích *P. tularensis*, které se tím zřetelně liší od koků nebo brucel (obr. 7). K charakteristickému nálezu v preparátech z orgánů infikovaných (a zejména na tularémii uhynulých) zvířat dále patří intenzivně fluoreskující mikrokolonie, jejichž složení z jednotlivých pasterel je většinou patrné jen při postupném zaostřování různých rovin preparátu. Na snímcích se jeví jako velké nepravidelné bezstrukturní útvary (obr. 6). Přítomnost podobných mikrokolonií je velmi charakteristická např. i pro *C. burnetii* v orgánech infikovaných myši (obr. 5), kde je jejich nález průkaznější než nález samotných izolovaně uložených riketsií (Goldin, Amosjenkova 1961).

Znalost charakteristického obrazu vzniklého vazbou FP na příslušný antigen je proto předpokladem správného hodnocení výsledku. Základní technickou podmínkou je ovšem použití dobrého luminiscenčního mikroskopu a kvalitního konjugátu. Nesplnění těchto základních technických požadavků vede k dnes už zbytečným komplikacím a nepřesnostem v práci (viz např. Chadwick 1960 nebo Jentzsch 1963).

c) Negativní reakce s heterologním sérem

Tomuto testu je ve většině publikací přikládána velká důležitost. Pro hodnocení jeho skutečného významu je však třeba vycházet ze základních poznatků o charakteru nespecifických reakcí.

Při použití FP existují tři hlavní možnosti nespecifické vazby konjugátu:

— vazba podmíněná antigenní příbuzností (která se může, ale nemusí projevat v jiných sérologických reakcích):

V pokusech o skupinové určení pyogenních streptokoků jsme se např. setkali s tím, že spe-

S výjimkou obr. 2a a 3 byly všechny snímky zhotoveny na mikroskopu ML-2 při použití objektivu 90× a okuláru 5×. Zvětšeno z kinafilmu.

cifické, v reakci precipitace vyzkoušené sérum proti skupině A intenzivně reagovalo i s některými kmeny skupin C a G. Sérum bylo připraveno imunizací králíků standardním sbírkovým kmenem J17A4. V imunofluorescenční reakci se zřejmě uplatnily protilátky proti antigenu T4, který je přítomen i u části kmenů těchto dvou skupin, které však nemají praktický význam při provádění precipitační reakce s extrakty (otázkami významu vedlejších antigenů pyogenních streptokoků pro reakci FP se v poslední době podrobněji zabývají v NDR — viz Wagner 1963).

Konjugáty proti *P. tularensis* mohou zkrříženě reagovat s některými kmeny z čeledi *Enterobacteriaceae*. Intenzivní nespecifickou fluorescenci jednoho kmene *P. pyocyanea* popsali Yager a ostatní 1960; reakce byla odstranitelná vysycením konjugátu příslušným kmenem, tj. šlo o skutečnou imunologickou reakci zaviněnou obsahem specifických protilátek (vzniklých prokazatelně během imunizace jako důsledek existence společné antigenní frakce tohoto kmene *P. pyocyanea* a *P. tularensis*) v konjugátu. Zcela výjimečně však byly naopak pozorovány reakce s brucelami (Carter a Leise 1958, Ananova a Jemeljanova 1964), které jsou dobře známé při jiných sérologických testech;

— **vazba podmíněná jinými specifickými faktory než (známými) protilátkami:**

Při analýze sér připravených očkováním králíků vakcínou z opouzdřených antraxových bacilů nebo i čistým d-glutamylpolypeptidem (d-GPP) se americkým biochemikům Leonardovi a Thornemu (1961) nepodařilo v reakci precipitace v agarovém gelu dokázat žádné specifické protilátky proti d-GPP, ačkoli reakce byla výrazně pozitivní. Zjistili však, že je způsobena v sérech přítomným lysozymem, přičemž jde o reakci vysoce citlivou — je možné dokazovat až 0,06 mikrogramu d-GPP. Autoři současně dokázali, že lysozym, značkován FITCem, je použitelný v přímé imunofluorescenční metodě k průkazu kapsuly virulentních kmenů stejně jako tzv. antikapsulární sérum.

Velkým problémem diagnostické aplikace FP je nespecifická fluorescence pyogenních stafylokoků (viz Franěk 1964, str. 72—74). Byla popsána u nejrůznějších sér, dokonce i u sér získaných od bezmikrobních zvířat. Reakci nelze odstranit vysycováním konjugátů suspenzí stafylokoků. Její podstata dosud není jasná, byla však vyslovena domněnka, že nejde o skutečnou protilátku (Cohen a spol. 1963). Cestu, která může vést k pochopení mechanismu reakce, ukazuje nedávno publikované sdělení Komninose a Tompkinse (1963) o odstranění schopnosti stafylokoků vázat na sebe heterologní konjugáty působením papainu (který, jak je známo ze starších prací, destruuje pouze část povrchových antigenů stafylokoků).

Oba popsané typy reakcí jsou ve skutečnosti specifické, tj. jsou vázány na jedné straně na určitou komponentu imunního séra a na druhé

straně na zcela určitý antigen. Podstatou třetího typu zkrřížených reakcí je naproti tomu vysloveně

— **nespecifická adsorbce FP různými elementy tkání apod.**

Patří sem např. nespecifická adsorbce FP na zbytky organických látek v znečištěných povrchových vodách, ve stolici atd. Její negativní význam pro detekci patogenních mikrobů v zevním prostředí byl diskutován již dříve (Franěk 1963).

Jiný případ takové adsorbce představují degenerativně změněné buňky tkáňové kultury v období tvorby cytopatického efektu. Stejně jako kterékoli jiné barvivo, jsou těmito buňkami ochotně přijímány i FP. Objevení zdegenerovaných buněk v tkáňové kultuře proto může znesnadnit detekci viruů v pozdějších obdobích kultivace (viz Fraňková a spol. 1963).

Při pokusech věnovaných transovariálnímu přenosu *R. rickettsii* Burgdorfer (1963) pozoroval v larvách klíštěte *Dermacentor andersoni* velké množství malých (asi 1/4 rozměru riketsií), naprosto pravidelných kulatých granulí, které byly přítomny i u zdravých larev a intenzivně fluoreskovaly po aplikaci jakéhokoli konjugátu. Studium jejich bližšího charakteru se autor nezabýval, odlišení bylo prováděno čistě morfologicky (velikost, tvar: je zajímavé, že u *R. rickettsii* byla přes jejich malé rozměry tímto autorem pozorována specifická fluorescence vysloveně „kapsulárního“ typu, jak je běžné u bakterií).

V otiskových preparátech slezin i lymfatických uzlin, a zejména pak v nátěrech kostní dřevě, na něž byly aplikovány nejrůznější FP (včetně např. samotných konjugátů pro nepřímou metodu), je možné pozorovat velmi intenzivní fluorescenci drobných zrníček, nakupených charakteristickým způsobem v některých buňkách nebo jejich bezprostřední blízkosti. Bližší rozbor ukázal, že jde o inkluze eozinofilních granulocytů (Grossi a Zaccheo 1963). Jejich intenzivní fluorescenci, kterou lze jen částečně snížit vysycením konjugátu jaterním práškem, se může stát vážnou překážkou detekce mikroorganismů malých rozměrů, intracelulárně uložených, jako jsou např. *Coxiely* (Červa, ústní sdělení 1963), tím spíše, že počet eozinofilních granulocytů v orgánech myší infikovaných právě *C. burneti* zřetelně vzrůstá.

Neznalost této skutečnosti může vést k hrubému omylu v hodnocení výsledků, jak se — soudě podle reprodukováných mikrofotografií — stalo např. v práci Ignatjevy, věnované detekci brucel u experimentálních zvířat (Ignatjeva 1962). Při určité zkušenosti je možné tuto fluorescenci většinou odlišit podle charakteristického uložení v buňkách a podle typické morfologie (velmi jemné, celou plochou fluoreskující tyčinky u myší, zcela uniformní kulatá zrníčka u morčat — obr. 8, 9) a také podle schopnosti intenzivně vázat i albumin (viz dále).

Tento druh reakcí, jejichž podstata není stále ještě zcela jasná, není možné předem ovlivnit. Proto je třeba užívat takovou techniku barvení,

kteř by dovolila nespecifickou adsorpci co nej-spolehlivěji odlišit.

S tímto cílem bylo v řadě prací zkoušeno do-barvování preparátů roztoky jódu a metylénové modři (viz Michajlov a Djakov, 1961, str. 168), papainem konjugovaným s lissaminem rhodaminem B 200 (Alexander a Potter, 1963), 1% roztokem Evansovy modři (Nichols a spol. 1963) aj.

Sami jsme získali při používání roztoků různých barev negativní zkušenosti — tento způsob pravidelně oslaboval nebo barevně zkresloval i specifickou fluorescenci, zatímco potlačení nespecifické nebylo vždy dostatečně účinné.

Daleko nejlepší výsledky dalo v našich pokusech dobarvování preparátů hovězím albuminem, konjugovaným s oranžově fluoreskujícím lissaminem rhodaminem B 200. Tento postup navrhli Smith a ost. (1959), kteří používali k barvení preparátů směs specifického (konjugovaného se zeleně fluoreskujícím FITC) a albuminového (konjugovaného s LRB 200) konjugátu v poměru 20 : 1. Tuto metodiku dnes používají mnozí autoři. V našich pokusech však dalo lepší výsledky dvoustupňové barvení, při kterém se albuminový konjugát aplikuje na preparát už obarvený specifickým konjugátem a promytý. Při tomto způsobu nejen že nedochází k žádné interferenci obou barev (obr. 2a, 3, 4), ale navíc je možné podle potřeby — upravením doby barvení — měnit intenzitu fluorescence pozadí (Metodika přípravy konjugátu — viz Franěk, v tisku).

Původní autoři považovali reakci za fyzikálně chemickou vazbu. Domnívám se, že velký význam mají i malé rozměry molekul albuminu a jejich poměrná plasticita (ve smyslu rychlého přizpůsobování různým vazebným skupinám antigenů — viz Talmage a Cann 1961, str. 118—119). To vytváří ve srovnání s velkými molekulami globulinu, charakterizovanými naopak „rigidností“ vlastních vazebných skupin, daleko lepší podmínky pro nespecifickou vazbu na příslušný substrát. Tím lze vysvětlit, že albumin aplikovaný po globulinu zakryje nespecifickou fluorescenci i značné intenzity (např. právě i fluorescenci eozinofilních granul), zatímco nijak neovlivní fluorescenci podmíněnou specifickou vazbou konjugátu na homologní antigen.

Domnívám se proto, že jde v podstatě o sérologickou reakci, při které uvedené vlastnosti molekul albuminu vytvářejí optimální podmínky pro odlišení specifické a nespecifické vazby konjugátu. Proto považují kontrastní dobarvování albuminovým konjugátem nejen za metodiku pro zvýšení kontrastnosti a demonstrativnosti mikroskopického obrazu, ale současně i za cennou kontrolní reakci, účelnější než aplikace heterologního konjugovaného globulinu. Jak totiž vyplývá z provedené charakteristiky povahy „nespecifických“ reakcí, heterologní sérum je ve skutečnosti kontrolou pouze pro poslední skupinu (nespecifická adsorpce FP). Tuto úlohu splňuje kontrastně fluoreskující albumin lépe, protože na preparátech, kde se vyskytuje specifická i nespecifická fluorescence, ji přímo umož-

ňuje diferencovat, zatímco heterologní konjugovaný globulin pouze „signalizuje“ přítomnost nespecifické. Kontrola se mimoto provádí přímo na hodnoceném preparátu, není potřeba zhotovovat zvláštní kontrolní (který nemusí být ve všech směrech totožný).

Závěry

Při zavádění imunofluorescenční metody do diagnostické praxe je třeba mít stále na zřeteli, že jde o metodu v mnoha směrech (a to nejen svou technikou) značně odlišnou od běžně používaných sérologických reakcí.

Jednou z nejdůležitějších metodických otázek diagnostické aplikace FP je vypracování vhodného, v praxi realizovatelného způsobu kontroly specifčnosti výsledků. Vycházejí z kritiky kontrolních reakcí používaných v experimentálních pracích autor navrhuje, aby za předpoklad praktického použití FP bylo v každém případě považováno předběžné studium (jehož program je uveden) zvláště při průkazu příslušného infekčního agens, ukončené přípravou diagnostického séra (konjugátu) o co nejpřesněji definovaných vlastnostech. Při používání tohoto konjugátu k rychlé diagnostice je pak při hodnocení výsledků třeba vycházet zejména z intenzity fluorescence a morfologie fluoreskujících útvarů; případnou nespecifickou adsorpci FP kontrolovat kontrastním dobarvováním preparátů oranžově fluoreskujícím konjugátem albuminu.

Literatura

- Alexander W. R., Potter J. L.: *Immunology* 6:450—452, 1963.
- Ananova E. V., Jemeljanova O. S.: *Lab. dělo* 1, 35—39, 1964.
- Borek F.: *Bull. Wld. Hlth. Org.* 24:249—256, 1961.
- Breitenfeld P. M., Schäfer W.: *Virology* 4:328—345, 1957.
- Burgdorfer W.: *Exp. Parasitol.* 14:152—159, 1963.
- Carski T. R.: *Am. J. Clin. Pathol.* 35:260—262, 1961.
- Carter C. H., Leise J. M.: *J. Bacteriol.* 76:152—154, 1958.
- Cohen J. O., Newton W. L., Cherry W. B., Updyke E. L.: *J. Immunol.* 90:358—367, 1963.
- Coons A. H., Kaplan M. H.: *J. Exp. Med.* 91:1—13, 1950.
- Finkelstein R. A., LaBrec E. H.: *J. Bacteriol.* 78:886—891, 1959.
- Franěk J.: *Čs. epidemiologie* 10:377—383, 1961.
- Franěk J.: *Sborník věd. prací VLVD* 4:184—190, 1963.
- Franěk J.: *Inform. zpravoděj VLIS* 5(1—2):30—96, 1964.
- Franěk J.: *J. Hygiene (Praha)*, 1965 v tisku.
- Franěk J., Procházková O.: *Folia microbiol. (Praha)*, 1965 v tisku.
- Franěk J., Wolfová J.: *Folia microbiol. (Praha)*, 1965 v tisku.
- Fraňková V., Franěk J., Marhouš Z.: *Zprávy z epid. a mikrob. (ÚEM)*, 5:33—35, 1963.
- Goldin R. B., Amosjenkova N. I.: *Uskorennaja diagnostika rikketosiozov pri pomošči fluorescirujušičich antitěl, VMOLA, Leningrad* 1961.
- Goldman M.: *J. exp. Med.* 105:557—573, 1957.
- Goldman M., Gleason N. N.: *J. Parasitol.* 48:778—783, 1962.
- Grossi C. E., Zaccheo D.: *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* 39:421—424, 1963.
- Chadwick P., Slade J. H.: *J. Hyg. (Camb.)* 58:147—156, 1960.
- Ignatjev O. A.: *Učen. zapiski Kazan. vet. inst.* 84:59—63, 1962.
- Jentzsch K. D., Axt J.: *Arch. Exp. Veterinärmed.* 16:173—180, 1963.
- Kominos G. N., Tompkins V. N.: *Am. J. Clin. Pathol.* 40:319—324, 1963.
- Leonard C. G., Thorne C. B.: *J. Immunol.* 87:175—183, 1961.
- Mejsel M. N., Kabanova E. A., Levina E. N., Piščurina M. M.: *Izvěstija AN SSSR, biolog. serija*, 6, 718—732, 1957.
- Michajlov I. F., Djakov S. I.: *Ljuminiscentneja mikroskopija, Medgiz* 1961.
- Michajlov I. F.: *Ž. mikrobiol. (Moskva)* 7, 94—97, 1963.
- Moody M. D., Goldman M., Thomason B. M.: *J. Bacteriol.*, 72:357 až 361, 1956.
- Nichols R. L., McComb D. E., Haddad N., Murray E.: *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 12:223—229, 1963.
- Smith C. W., Marshall J. D., Eveland W. C.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 102:179—181, 1959.
- Talmage D. W., Cann J. R.: *The chemistry of immunity in health and disease*, C. C. Thomas publ., Springfield, Illinois, USA 1961.
- Wagner M.: *Symposium on Streptococcus pyogenes (these)*, Jena 1963.
- Yager R. H., Spertzel R. O., Jaeger R. T., Tigertt W. D.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 105:851—854, 1960.