

## TULARÉMIE

### LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA SĚROLOGICKO-IMUNOLOGICKÉ METODY

B. LUKÁŠ, M. HEJZLAR

Dosud se nepodařilo rozdělit nebo rozlišit *Past. tularensis* na sérotypy a mnozí badatelé považují tuto otázku ještě za málo vyjasněnou. Bylo však zjištěno, že mikrob tvoří celý antigenní komplex. Někteří se domnívají, že 2, jiní 4 nebo dokonce 6 složek<sup>1-4</sup>.

Na podkladě sérologických pozorování bylo zjištěno, že u S-kultur jsou 2 antigeny — povrchový (kapsulární, termolabilní) označovaný jako Vi-antigen a somatický — termostabilní označovaný jako O-antigen. Avirulentní kmeny mají pouze O-antigen<sup>1, 2, 5</sup>.

V poslední době byla prokázána odlišná virulence u kmenů izolovaných v Evropě a Asii (tzv. euroasijská varianta) a některými kmeny izolovanými v Americe (tzv. americká varianta)<sup>6, 7</sup>.

Ukazuje se, že ačkoli tyto varianty nemůžeme od sebe oddělit sérologicky, přece se poněkud od sebe odlišují, což je možno prokázat na podkladě imunologických testů (protektivní testy).

Studium antigenní struktury ukazuje, že ji můžeme považovat ještě stále za otevřený problém.

To však nic nemění na skutečnosti (dosud platné), že v sérologické diagnostice se chová *Past. tularensis* jednotně a že kromě rozdílů v závislosti na virulenci nebyly mezi kmeny prokázány sérologicky typové rozdíly.

Jednou z nejvíce užívaných metod v sérologické diagnostice tularémie je:

**1. Aglutinace.** K přípravě diagnostického antigenu je nejlépe použít kmeny avirulentní, u nichž je plně antigenní vybavení Vi, O, tzn. které na agarových půdách TKGA, TSGA, GCBA<sup>8</sup> tvoří převážně S-typy kolonií. Očkování ploten provádíme hustými čarami. Narostlou 48hodinovou kulturu stíráme kličkou do fyziologického roztoku o pH 7,2 do zkumavek opatřených na dně drobnými skleněnými perličkami a dobře suspendujeme. Po řádné homogenizaci prověříme čistotu suspenze, naředíme přibližně na hustotu  $2 \times 10^{10}$  mikrobů/1 ml a pak přidáme do každé zkumavky formalín do celkové koncentrace 0,5 %. Antigen ponecháváme 2—3 dny při pokojové teplotě, 3—5 dní při +4° C

za občasného protřepávání. Zkumavky s čistým antigenem můžeme lehce zcentrifugovat 5 min. při 2000 ot./min., resp. přefiltrovat přes Schott G 3 k odstranění hrubých balastů z agarové báze. Uchováváme při +4° C a kontrolujeme sterilitu. Do vlastní reakce ředíme antigen na denzitu  $2-5 \times 10^9/1$  ml. Formolový antigen se nám osvědčil daleko lépe než antigeny fenolové, acetonové nebo inaktivované teplem při 60 až 100° C. Poslední považujeme pro aglutinaci za málo vhodné pro termolabilitu skupiny povrchového antigenu *P. tularensis*.

Vlastní test provádíme běžnou zkumavkovou metodou (Slonim<sup>9</sup>), při ředění séra dvojkovou řadou. Pracujeme s 0,2 ml séra a 0,2 ml antigenu. Stojánky se zkumavkami inkubujeme 24 hodin při 37° C v termostatu. Před odečítáním ponecháme 1—2 hodiny při pokojové teplotě nebo +4° C.

Pozitivní reakce hodnotíme na křížky (4—1 křížek). Podle charakteru aglutinátů hodnotíme reakce jako:

Vi-aglutinát je tvořen hrubými vločkami (převážně virulentní kmeny a vakcínové), O - aglutinát tvoří jemné vločky, po protřepání difúzní zákal (avirulentní kmeny, teplem inaktivované antigeny).

Za titr séra považujeme reciprokou hodnotu nejvyššího ředění séra, v němž ještě došlo ke zřetelné aglutinaci. Jako kontrolu zařazujeme vždy standardní známé laboratorní pozitivní sérum o známém titru, kontrolu antigenu s fyziologickým roztokem a negativním a nespecifickým sérem. Je vhodné odečítat aglutinaci v postranním osvětlení proti černému pozadí.

Upozorňujeme na možnost zkřížených aglutinací s brucelovými antigeny<sup>8, 12</sup>.

**Agglutinace s celou krví<sup>10, 11</sup>** je možno použít jak u lidí, tak u zvířat (epizootologický průzkum). Antigen se používá neředěný. Ke kapce krve se přidá 1 kapka destilované vody a kapka neředěného antigenu. U silně pozitivních sér nastává aglutinace po smíchání krve s antigenem během několika vteřin. (Je nutno provádět kontrolu s negativní i známou pozitivní krví!) Nepovažujeme ji přes její jednoduchost za vhodnou, poněvadž dochází často i k chybným výsledkům a nespecifickým reakcím.

**Skličková aglutinace — zpětná.** Reakci je možno použít jednak k rychlé orientaci se sérem nemocného<sup>10</sup> (neředěný antigen, kontrola negativního a pozitivního séra), jednak k identifikaci izolovaného kmene (hyperimunní antitularémické sérum, kontrola mikrobiální suspenze s fyziologickým roztokem).

#### Příprava hyperimunního séra (králičího).

A. Suspenzi živých mikrobů (denzita  $10^8$ – $10^9$  buněk/1 ml) s lipoidními adjuvanciemi (1 díl lanolínu, 1,5 dílu paraf. oleje, 1,5 dílu suspenze) aplikujeme králíkům v dávce 1–3 ml hluboce nitrosvalově ve 14–28denním intervalu. Obvykle podáváme 3–5 dávek.

B. Suspenzi živých mikrobů aplikujeme opakovaně ve 3denních intervalech nitrožilně ve stoupající denzitě a množství (1,0 ml, 1,5 ml, 2,0 ml; denzita  $10^7$ – $10^9$  buněk. První dávku rozložíme ana partes podkožně a nitrožilně). 7.–10. den po poslední (3.–5.) imunizační dávce králíky vykrváčíme.

C. Suspenzi živých mikrobů (denzita asi  $10^8$  až  $10^9$  buněk/ml) aplikujeme podkožně v množství 1–2 ml, po 10–14 dnech dávku opakujeme, za 7–12 dnů orientační odběr a podle titru séra buď zvířata vykrváčíme nebo imunizační dávku opakujeme.

Tato schémata platí pouze pro kmeny euroasijské varianty, které mají oslabenou virulenci pro králíky. U tzv. amerických variant musíme imunizovat králíky inaktivovanými antigeny (formolový nebo fenolový), nebo provedeme předimunizaci králíků kmeny s oslabenou virulencí.

**2. Vazba komplementu:** Stanovení protilátek fixujících komplement (Kolmer, modif. Slonim<sup>9</sup>, Lukáš et al<sup>13</sup>). Antigen: velmi dobře se nám osvědčil alkoholový korpuskulární antigen (malá antikomplementarita, dobrá citlivost, snadná příprava), horší výsledky poskytoval acetonový a antigen extrahovaný podle Boivin-Mosrobeaneu.

Suspenzi mikrobů (48hodinovou kulturu o denzitě  $1 \times 5 \times 10^{10}$ ) zcentrifugujeme a přidáme čistý alkohol v čtyřnásobném objemu, necháme 2–3 dny při pokojové teplotě nebo 3–4 dny při  $+4^\circ\text{C}$  za občasných protřepávání, přefiltrujeme Schott G 3 a opět zcentrifugujeme při 10 000 obr./min., dvakrát propláchneme v čtyřnásobném objemu fyziologického roztoku o pH 7,2 a resuspendujeme ve fyziologickém roztoku na původní objem. Před hlavním pokusem provedeme titraci hemolyzinu, komplementu morčecího, dvojrozměrnou titrací antigenu (chladničkový způsob), stanovení antikomplementarity sér a antigenu. Séra jsme ředili sériovým dvojnásobným ředěním. Poměry jednotlivých složek ve zkumavce: 0,1 ml séra (inakt.), 0,1 ml antigenu, 0,1 komplementu. Po důkladném protřepání uložíme zkumavky do chladničky na 16–18 hodin, pak přidáme 0,2 ml hemolytického systému. Po protřepání inkubujeme 30 min. při  $37^\circ\text{C}$ . Pracujeme s 8–10 jedn. antigenu, 1,5–2,0 jedn. komplementu, 3 jedn. amboceptoru. V každém pokusu je nut-

no zařadit kontroly všech použitých komponent.

Titř séra jsme vyjadřovali jako reciprokovou hodnotu nejvyššího ředění samotného séra, ve kterém docházelo k reakci na 2 křížky (50% hemolýza).

Jako ředícího roztoku používáme veronalo-vého nárazníku podle Meyera. Beraní krvinky pro hemolytický systém jsme uchovávali ve stabilizačním roztoku:

Natr. citrici	1,1 g
Ac. citrici	0,6 g
Glukóza	3,3 g
Redestilovaná voda ad	100,0 g

(Roztok se nám pro své standardní vlastnosti dobře osvědčil.)

**Stanovení komplementfixujících protilátek mikrometodou** (kapková metoda, modif. Wiggand<sup>14</sup>).

Reakci je nutno provádět na speciálních destičkách z plexiskla a při zachování obdobného metodického postupu, jaký u virů popsal Benda et al<sup>15</sup> (přesná kalibrovaná inj. stříkačka s mikro Jehlou, termoboxové skříňky na destičky apod.).

V naší laboratoři jsme použili tzv. druhé varianty podle Wigganda, ve které jsme ponechávali konstantní množství antigenu a séra a ředili jsme komplement.

Stanovení protilátek touto metodou má pouze orientační význam a rozlišujeme séra jen na pozitivní, suspektní a negativní.

Hodnota titru nebyla v korelaci s titrem KF protilátek zjištěných zkumavkovou metodou.

**3. Hemaglutinace nepřímá** (Alexanderová et al<sup>16</sup>, Wright et al<sup>17</sup>, Charkes<sup>18</sup>, Knothe et al<sup>19</sup>).

Hemaglutinační reakce se dosud u tularémie neuzívá tak často a vůbec je jí věnována menší pozornost, než jakou si tato reakce pro svou citlivost a specifitnost zasluhuje. V podrobnostech této metodiky odkazujeme na připravovanou publikaci (Lukáš et al, Příspěvek k sérologii tularémie).

**Antigen:** Endotoxin získaný fenolovou extrakcí za tepla<sup>20</sup>. Spolehlivé využití hemaglutinační reakce je především závislé na standardní, reprodukovatelné přípravě polysacharidu, ať už v suchém nebo solubilním stavu.

**Krvinky:** lidské krvinky O-Rh- negativní v Alseverově roztoku.

**Ředící roztoky:** pufr. fyziologický roztok pH 7,2 [pufr 0,15 mol.  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , inaktivaci norm. králičí sérum v ředění 1:250 (NSK)].

Senzibilizace erytrocytů: krvinky 3krát promyjeme ve fyziologickém pufovaném roztoku a naředíme na 5,0 %. 1,0 ml endotoxinu-lipopolysacharidu (0,1 mg LPS) + 1,0 ml fyziologického pufovaného roztoku smícháme s 2,0 ml 5,0% krvinek. Inkubujeme při  $37^\circ\text{C}$  4 hodiny, 3krát promyjeme v třinásobném objemu pufr. fyziologického roztoku s přísadou 0,5% hovězího albuminu. Krvinky pak resuspendujeme na 2,5 %.

Séra inaktivujeme 30 min. při 56° C (ředěné fyziologickým roztokem nebo sérovým albuminem). Séra vysytíme krvinkami.

Do vlastní reakce dáváme 0,1 ml séra a 0,1 ml senzibilizovaných krvinek (modif. Stavitsky). Inkubujeme 2 hodiny při 37° C — odečteme a ponecháme dále při pokojové teplotě přes noc nebo při +4° C a odečteme definitivní titr.

Do testu je nutno vždy zařadit jako kontrolu všechny použité komponenty. Jako titr séra stanovíme to nejvyšší ředění samotného séra, u kterého došlo ke zřetelné a pevné aglutinaci krvinek (odečítání provádíme v postranním osvětlení).

**P o z n á m k a:** Senzibilizace „neopracovaných krvinek“ je možná jen antigenem lipopolysacharidové povahy, natrávené krvinky — (trypsin, tanin) senzibilizujeme antigenem proteinové povahy (Stavitsky<sup>21</sup>, Chen et Meyer<sup>22</sup>).

Málo používané metody, mající však určitý význam:

4. **Latexový test** (Singer, Plotz<sup>23</sup>, Tesárek, Rajholec, Houbá).

Mnozí pracovníci se snažili nahradit složitý systém, jaký představují krvinky, nějakou biologicky indiferentní a inertní látkou, se kterou by bylo možno provádět standardní a reprodukovatelné testy. Jednou z takových látek jsou tzv. latexové částice<sup>22</sup>. Latexové částice jsme dostávali laskavostí dr. Houby z VÚR a velikost částic byla asi 0,81  $\mu$ m.

Pro vlastní potřebu laboratoře jsme modifikovali pracovní postup podle Houby<sup>24</sup>, Flamma et al<sup>25</sup> a Widermanna<sup>26</sup>. Užíváme fenolový antigen o denzitě asi  $1 \times 10^9$  mikrobů.

Senzibilizace latexových částic: 0,1 ml latexu se smíchá s určitým optimálním množstvím antigenu a doplní glycerinovým nárazníkem pH 8,2 do 10,0 ml resp. 100,0 ml (výsledný roztok vykazoval hodnotu na spektrofotometru 650 nm, kyveta 10 mm, transmise 16—18%).

**Vlastní test:** k séru (inaktivovanému i neinaktivovanému) v množství 0,2 ml, ředěnému geometrickou řadou, se přidá stejný díl latexové suspenze. Zkumavky se dobře protřepou a uloží do termostatu nebo vodní lázně (56° C) na 2 hodiny, nebo do lednice přes noc. Pak lehce zcentrifugujeme 3 min. při 2300 ot./min. a výsledky odečítáme v postranním světle proti černému pozadí. Obsah kontrolních zkumavek musí být zcela homogenní. Za titr séra považujeme to nejvyšší konečné ředění séra, které ukazuje zřetelné shluky zrnek latexových částic. Výsledky, které jsme s tímto testem dostávali, byly velmi nadějně. Vyšetřovaná séra jak osob prodělavších tularémii, tak i králíků a morčat experimentálně infikovaných měla v průměru o 2—3 zkumavky vyšší titry než při aglutinační reakci.

5. **Inkompletní protilátky** (Coombsova typu<sup>13, 19, 25</sup>).

Zkumavky s ředěním séra, ve kterých je aglutinace negativní nebo jen ve zcela nízkém a nezřetelném titru, zvláště u těch případů, kde bychom předpokládali pozitivní reakce nebo

tam, kde pozorujeme prozóny, vyšetříme na přítomnost inkompletních protilátek.

Po odečtení aglutinačního testu zkumavky zcentrifugujeme (asi 5—10 min. při 3000 ot./min.). Sediment pak 3krát promýváme ve fyziologickém roztoku v 0,5 ml. Při centrifugaci musíme postupovat tak, aby se vytvořil pevný sediment a nevyplavil antigen. Supernatanty slejeme. Pak sediment resuspendujeme v 0,1 ml fyziologického roztoku a přidáme 0,2 ml Coombsova antiglobulinového králičího séra, naředěného obvykle 1 : 20—1 : 80 (podle předcházející precipitační zkoušky nebo koloidové aglutinace Wagner<sup>27</sup>).

Stojánky inkubujeme 2 hodiny při 46° C a odečítáme proti černému pozadí a v postranním osvětlení.

6. **Fagocytární aktivita leukocytů** — Huddleson (modif. Libich-Lukáš).

Metoda s celou krví. Při této metodě vycházíme z principu, že kmene avirulentní jsou fagocytovány pouze imunními leukocyty, nebo leukocyty normálními po přidání imunního séra (nebo normálními leukocyty ze zvířat rezistentních proti tularémii). Je velmi důležité, abychom pracovali vždy se stejnou hustotou suspenzí mikrobů. Postavíme si 4 řady aglutinačních zkumavek, do 1. a 2. zkumavky napipetujeme 0,1 ml mikrobiální suspenze avirulentního kmene (denzita  $2—5 \times 10^9$  mikrobů na 1 ml), do 3. a 4. zkumavky 0,1 ml mikrobiální suspenze virulentního kmene (o stejné denzitě), přidáme 0,9 ml heparinové krve zdravého jedince (zkumavka 2. a 4. jako kontrola) a krve vyšetřované osoby (zkumavka 1. a 3.). Řádně protřepeme a inkubujeme 30 min. při 37° C ve vodní lázni za stálého mírného protřepávání. Pak zhotovíme běžnou hematologickou technikou krevní nátěry, které po zaschnutí fixujeme plamenem a barvíme 1,5 minuty toluidinovou modří (jiné barvení se nám ukázalo nevhodné).

Počítáme pak množství fagocytujících polymorfonukleárů — alespoň 50 (event. množství fagocytovaných Pasteurell v 50 polymorfonukleárech). Srovnáme pak s krví zdravého jedince a stanovíme fagocytární index (kapacita zdravého/negativního jedince = 1, vhodné je též zařadit pro kontrolu zaručeně pozitivní krev).

**Bakteriotropiny** pak stanovujeme v modifikaci Jersildově.

0,02 ml inaktivovaného vyšetřovaného séra (postupně dále ředěného dvojkovou řadou) se smíchá s 0,1 ml bakteriální suspenze (virulentní kmen). Protřepeme a inkubujeme 30 minut při 37° C, smícháme s heparinovou krví (zdravého jedince) a inkubujeme dalších 30 minut při 37° C ve vodní lázni. Pak provedeme nátěry stejným způsobem jako při fagocytárním indexu (zařazujeme kontrolu zdravého jedince s kmenem virulentním a avirulentním a kontrolu s pozitivním známým sérem).

Význam obou testů pro rutinní diagnostiku je značně omezený.

## 7. Precipitace

a) **termoprecipitace** (modifikace Ascoliho testu, Larson<sup>28ab</sup>). Provádí se u rychlé diagnostiky tularémie ze zvířecích orgánů. Orgány zvířete se homogenizují se sterilním pískem ve fyziologickém roztoku v 3–5 ml (podle váhy orgánů), povaří se při 100° C po dobu 15 minut (možno vložit i do Arnoldova přístroje). Zahřátá suspenze je zcentrifugována při 3000 až 4000 ot./min. po dobu 15–30 minut, nebo se může přefiltrovat přes filtrační papír (až dostaneme téměř čistou, opaleskující tekutinu). Supernatant — filtrát slouží jako antigen (termostabilní antigen persistuje v orgánech zvířat po velmi dlouhou dobu — 14 dnů při 37° C). Test provádíme v kapilárách. Antigen opatrně podvrstvíme hyperimunním sérem a inkubujeme při pokojové teplotě (3 hodiny) nebo při 37° C (2 hodiny).

**Kontroly:** extrakt s normálním sérem, s fyziologickým roztokem, pozitivní antigen a pozitivní sérum. Pozitivní reakce se objevuje však jen tehdy, obsahoval-li orgán alespoň 10<sup>5</sup>–10<sup>6</sup> mikrobů na 1 g.

b) **Precipitace s haptinem** (Karpof-Konikov, Olsufjev<sup>1</sup>).

K orgánovým suspenzím (fyziologický roztok) přidáme několik kapek fenolové červené jako indikátoru a zředěné kyseliny solné 1–2 kapky na 1 ml suspenze o pH 4–5 (Sinaj doporučuje okyselit suspenzi 4N kys. trichloroctovou). Zahříváme nad plamenem, až uvedeme do varu. Opakujeme celkem 3krát a neutralizujeme (2N Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). Přefiltrujeme, až dostaneme opět průhlednou, mírně opaleskující tekutinu a další postup je obdobný jako u normální termoprecipitace. Autoři tvrdí, že metoda s haptinem je citlivější. Podle vlastních zkušeností jsme větší rozdíly mezi oběma metodami nepozorovali.

## c) Precipitace v agaru

Většina autorů používá metodu v modifikaci Oudina nebo Ouchterlonyho<sup>29</sup>. V laboratorní diagnostice se nepoužívá a význam má jen pro experimentální práce, např. při stanovení čistoty, jednoty nebo imunogenní potence antigenu a antigenních frakcí, imunitní odezvy mikroorganismů při použití různých imunizačních schémat<sup>30-32</sup>. Z těchto důvodů má však tato metodika pro experimentální praxi velký význam.

## 8. Pasívní protekční protilátky

Pro běžnou diagnostiku tularémie je jejich stanovení opět bez významu. Význam má ve veterinární medicíně. Vyšetřované sérum ředíme v určitém násobku (Log 0,3, 0,7). 0,2 ml ředěného séra injikujeme pěti myškám podkožně do zadní končetiny a za 2 hodiny inokulujeme do druhé zadní končetiny virulentní kmen *P. tularensis* v dávce 1 MLD. Někteří autoři používají kmen s oslabenou virulencí. Vždy zařazujeme séra negativní i známé sérum pozitivní. Použijeme-li virulentního kmene, zřídka-

kdy sérum ochrání myšky před uhynutím (pokusná zvířata pozorujeme po dobu 15 dní). Nemůžeme zde proto uplatnit např. metodu určující LD<sub>50</sub> Reeda a Muenche a hodnocení jsme proto prováděli podle testu, kterého použil Meyer, podle formule:

$$PI \text{ (protection index)} = \frac{\text{střední čas hynutí} \times 100}{\text{procento uhyn. zvířat}}$$

Porovnání indexu séra vyšetřovaného proti kontrolnímu — negativnímu nám poskytlo rozdíl vlastní protekce — prevence séra. Použijeme-li virulentního kmene, získaná čísla prakticky vyjadřují ve většině případů aritmetický střední čas hynutí. Proto jsme se snažili tento test nahradit vhodnějším, což nám poskytovala modifikace tzv. stanovení protekčního indexu podle Sulitzeanu.

9. **Stanovení protekčního indexu** (modif. Sulitzeanu<sup>33</sup>).

Tímto testem můžeme hodnotit účinnost nejenom sér, ale i vakcín a jiných preparátů, ovlivňujících rezistenci vůči *P. tularensis*. Vyšetřované sérum injikujeme podkožně pěti myškám a za 2 hodiny čelenujeme virulentním kmenem *P. tularensis*. Můžeme postupovat tak, že použijeme jak vyšetřovaného séra, tak infekce konstantní dávky, nebo můžeme sérum ředit, nebo infikovat zvířata odstupňovanými dávkami infekce. Nejlépe je použít konstantní jedné nebo dvou dávek séra, ředění 1:5 až 1:20 a 1. dávky infekce (1–10 MLD). Za 3–4 dny po infekci zabíjíme myšky a zjišťujeme počet mikrobů ve slezinách u skupin kontrolních (pouze infikovaných) a u skupin pokusných. Protekční index PI pak stanovíme podle formule:

$$PI = \frac{dA}{dB} \text{ resp. } d \cdot \log A - d \cdot \log B$$

A = skupina kontrolní

B = vyšetřované sérum

(V podrobnostech odkazujeme na sdělení připravené do tisku „Příspěvek k sérologii tularémie“).

10. **Stanovení sérových protilátek chromatografickou metodou** (modif. Spalding et al<sup>34</sup>).

(Podrobně bude popsána metodika ve sdělení „Příspěvek k sérologii tularémie“.)

Antigen (diagnostikum) obarvíme ředěným hematoxylinem. Antigen nakápneme na chromatografický papír Whattmann 3, necháme zaschnout (můžeme si předem připravit a použít i za různě dlouhou dobu, uchovávané ve skleněných miskách). Na antigen přidáme kapku vyšetřovaného séra a necháme zaschnout, konec chromatografického papíru ohneme a vložíme do misky s fyziologickým roztokem (vzestupná chromatografie) a ponecháme po několik minut probíhat. Pozitivní sérum je pevně fixováno antigenem (kapka je přesně ohraničena), negativní se vyplavuje a vytváří na papíře barevnou stopu. Kontrolu provedeme se známým pozitivním sérem (event. určitého ředění, které nám může přibližně určit i titr vyšetřovaného séra), a negativním sérem.

### 11. Flokulační test (Hunter et al.<sup>35</sup>)

K suspenzi mikrobů se přidá fenol do 0,5 % a uloží na 10 dnů do lednice. Pak se provede dialýza a centrifugace při 10 000 ot./min. po dobu 15—30 minut. K supernatantu se přidá merthiolát. Extrakt se pak adsorbuje na 1% cholesterol v přítomnosti lecitinu. Takto získaná směs se pak používá pro vlastní test. Test provádíme buď na podložních sklíčkách nebo ve zkumavkách, do kterých ředíme 0,5 ml antigenu — extrakt a 0,5 ml séra vyšetřovaného. Směs se třepe 5 minut a centrifuguje při 2000 až 3000 ot./min.

Podle autora je test velmi specifický, rychlý, výsledky jsou jasné a reprodukovatelné a titry vyšší než při aglutinačních testech.

Pro úplnost připomínáme, že v experimentálních pracích a pro rychlou diagnostiku je možno použít *fluorescentní techniky*, která však vyžaduje speciálního postupu a speciálně vybavené laboratoře. Samotná technika tzv. fluorescentních protilátek vytváří dnes vlastně již samostatné odvětví v mikrobiologii, a proto odkazujeme zájemce na speciální literaturu.

O celkové protekci makroorganismu po provedené imunizaci nebo prodělané infekci (platí pro experimentální podmínky) se můžeme přesvědčit tzv. *aktivním protekčním testem*, který zde rovněž pro úplnost uvádíme. Zvířata, která jsme imunizovali (resp. která přežila primoinfekci), zatížíme (čelenujeme) obvykle podkožně odstupňovanými dávkami plně virulentního kmene *P. tularensis*, a to nejlépe mezi 21.—30. dnem. Stupeň protekce hodnotíme podle procenta přežitých zvířat.

### 12. Tularinový kožní test

48hodinovou kulturu *P. tularensis* (kultivace na tuhých půdách TKGA) seškrábeme do 3% glycerin-fyziologického roztoku (pH 7,2). Suspenzi zahříváme při 65° C po dobu 1 hodiny za stálého míchání (denzita cca 10<sup>9</sup> mikrobů v 1 ml). Suspenzi naředíme do 0,3% fenol-fyziologického roztoku na denzitu 10<sup>8</sup> buněk v 1 ml. Po provedení kontrolního testu (čistota, sterilita, neškodnost) titrujeme v různých ředěních (koncentrovaný 1:10, 1:100, 1:1000) účinnost tularinu na imunních (infikovaných) morčatech a králících. Pro kontrolu používáme zvířata zdravá a provádíme srovnání se standardním preparátem (např. firmy Behring). Tularin injikujeme intradermálně v 0,1 ml (pupenec velikosti hrachu). Paralelně injikujeme kontrolu glycerin-fenol-fyziologického roztoku.

Reakci odečítáme za 2, 24, 48, 72 hod. resp. 1 týden. Lépe se nám osvědčuje tularin připravený z virulentních kmenů než z kmene vakcínového (titrace byla prověřena na morčatech a králících infikovaných virulentními kmeny a vakcínovým kmenem EG 15).

Do vlastního testu většinou užíváme ředění tularinu 1:10 (tj. v 0,1 ml 10<sup>6</sup> inaktivovaných mikrobů).

Při provádění tularinového testu postupujeme podobně, tj. podáme 0,1 ml tularinu intradermálně a kontrolu glycerin-fenol-fyziologického roztoku. Reakce odečítáme opět za 2, 24, 48, 72 hodin a intenzitu hodnotíme podle modifikovaného schématu Metaxas-Buehler<sup>13, 36</sup> na +++ , ++ , + , ± , —.

### Zhodnocení jednotlivých sérologicko-imunologických reakcí

Především chceme upozornit, že u tularémie převládá a má hlavní význam buněčný typ imunity (Allen<sup>37</sup>, Gordon<sup>38</sup>). Humorální protilátky nám slouží pak jako indikátor onemocnění, které nemusí být a také nejsou vždy v korelaci s dosaženým stupněm celkové imunity resp. nemoci. Pro laboratorní diagnostiku tularémie má velký význam kožní test (tularinový), a to jednak pro časnost a jednak pro svou persis-tenci.

K běžné diagnostice tularémie plně dostačuje aglutinační test. Rovněž však se domníváme, že tato reakce by měla být doplňována. Pro jemnější posouzení sérových protilátek by se v praxi měla více uplatňovat hemaglutinace (potiže přináší standardní příprava polysacharidů), nebo latexový test (poměrně rychlé stanovení protilátek — titry jsou v průměru o něco vyšší než aglutininy). Protilátky fixující komplement mají již spíše význam pro experimentální studium. Z ostatních sérologických reakcí by si podle našeho posouzení zaslouhoval poněkud větší pozornost orientační skryningový test pomocí papírové, kapkové chromatografie. Stanovení fagocytární aktivity leukocytů by snad bylo možno využít pro rychlé rozlišení virulentních a avirulentních kmenů *P. tularensis*. Ostatní testy se spíše hodí již pro experimentální studium patogeneze a imunogeneze.

První sérové protilátky se objevují v séru lidí aneb i u zvířat na konci prvního týdne onemocnění. Vrcholu je pak dosaženo mezi 3.—6. týdnem a pak nastává pozvolný pokles až k nulovým hodnotám (zvláště u aglutininů). Komplement fixující protilátky, inkomplementní protilátky typu Coombsova, bakteriotropiny, dosahují přibližně stejně vysokých hladin titrů a jsou pravidelně o 2—3 zkumavky vyšší než aglutininy. Podobně to platí i o titrech při hemaglutinaci. Samotné stanovení výšky titrů není vždy rozhodující pro diagnózu onemocnění, důležité je posuzovat dynamiku sérových protilátek (v několika odběrech) a podle vzestupu nebo poklesu protilátek usuzovat na průběh onemocnění. Sérové protilátky nás především informují o styku specifického antigenu (zvláště u aglutininů) s makroorganismem. V poslední době se začíná přisuzovat z hlediska prognostického větší význam hemaglutininům.

Nejčastější z imunologických reakcí je tularinový kožní test, který je pozitivní již od 4.—5. dne (podobně i fagocytární aktivita leukocytů). Po prodělané nemoci velmi dlouho přetrvává, 14—16 let, podle některých autorů po celý život. U vakcínovaných osob je kožní

test méně výrazný než u lidí, kteří prodělali skutečné onemocnění. Tato reakce má proto velký diagnostický význam.

Pokusili jsme se podat přehled sérologicko-imunologických metodik, dosud používaných v diagnostice tularémie, a to jednak abychom zainteresované pracovníky souhrnně informovali, a jednak abychom se seznámili a podělili s nimi o zkušenosti, které naše pracoviště při studiu tularémie v období více než deseti let nashromáždilo.

### Závěr

Autoři podávají úplný přehled současných diagnostických metod u tularémie s uvedením potřebných technických dat. Užívanější metody jsou kriticky zhodnoceny a konfrontovány s praktickými zkušenostmi autorů. Práce je doplněna přehledem základní literatury.

### Literatura

1. *Olsufjev N. G.*: v kn. Tuljaremija, Medgiz, Moskva 1960.
2. *Jemeljanova O. S.*: v kn. Tuljaremija, Medgiz, Moskva 1960.
3. *Majskij N. I.*: Immunologija tuljaremii, Medgiz, Moskva 1953.
4. *Ormsbee N. A., Larson C. L.*: J. Immunol. 74:359; 1955.
5. *Olsufjev N. G., Jemeljanova O. S.*: Žurn. Gig. Epid. Mikrobiol. Immunol. (Praga) 1:305; 1957.
6. *Olsufjev N. G., Jemeljanova O. S.*: Žurn. Gig. Epid. Mikrobiol. Immunol. (Praga) 6:1; 1962.
7. *Olsufjev N. G., Jemeljanova O. S.*: Žurn. Gig. Epid. Mikrobiol. Immunol. (Praga) 7:41; 1963, a J. Hyg. Epid. Mikrobiol. Immunol. 7:178; 1963.
8. *Hejzlar M., Lukáš B.*: Tularémie. Laboratorní diagnostika. I. sdělení.
9. *Slonin B.*: v kn. Mikrobiologické vyšetřovací metody SZN, Praha 1958.
10. *Henninger G.*: Zbl. Bakt. Orig. I. 140:105; 1937.
11. *Chatenever L. M.*: v kn. Tuljaremijnaja infekcija, Medgiz, Moskva 1943.
12. *Saslaw S., Carlisle H. N.*: Amer. J. Med. Sci. 242:166; 1961.
13. *Lukáš B., Libich J., Hejzlar M.*: Folia Microbiol. 8:80; 1963.
14. *Wigand R.*: Zschr. f. Hyg. 143:188; 1956.
15. *Benda R., Daneš L., Obenberger J.*: Voj. zdrav. listy 27:573; 1958.
16. *Alexander M. M., Wright G. G., Baldwin A. C.*: J. Exp. Med. 91:561; 1950.
17. *Wright G. G., Feinberg R. J.*: J. Immunol. 68:65; 1952.
18. *Charkes N. D.*: J. Immunol. 83:213; 1959.
19. *Knothe H., Havermeister G.*: Zbl. Bakt. Orig. I. 181:80; 1961.
20. *Westphal O., Lüderitz O., Bister F.*: Z. Naturwissenschaften 70:148; 1952.
21. *Stavitsky A. B.*: J. Immunol. 72:360; 1954.
22. *Chen T. H., Meyer K. F.*: J. Immunol. 72:282; 1954.
23. *Singer J., Plotz C. M.*: Amer. J. Med. 21:888; 1956.
24. *Houba V.*: Čs. EMI 11:53; 1962.
25. *Flamm H., Wiederman G.*: Zbl. Bakt. Orig. I, 180:254; 1960.
26. *Wiederman G.*: Zbl. Bakt. Orig. I, 182:106; 1962.
27. *Wagner V.*: Schw. Zschr. f. Allg. Path. Bakt. 17:94; 1954.
28. *Larson C. L.*: Ann. Med. Am. Soc. Bact. 1947, Philadelphia, a J. Immunol. 66:249; 1951.
29. *Šourek J.*: Mikrobiologické vyšetřovací metody, SZN, Praha 1958.
30. *Larson C. L., Bell J. F., Owen C. R.*: J. Immunol. 73:221; 1954.
31. *Saslaw S., Carlisle H. N., Hinchliffe V.*: Amer. J. Med. Sci., 244:175; 1962.
32. *Carlisle H. N., Hinchliffe V., Saslaw S.*: J. Immunol. 89:638; 1962.
33. *Sulitzeanu D.*: J. Hyg. (Camb.) 53:133; 1955.
34. *Spalding D. H., Metcalf T. G.*: Bact. Proc. p. 76; 1954.
35. *Hunter C. A., Burgdorf R., Cobert B.*: J. Lab. Clin. Med. 51:134; 1958.
36. *Metaxas M. N., Metaxas-Buehler M.*: J. Immunol. 75:333; 1955.
37. *Allen W. P.*: J. Exp. Med. 115:411; 1962.
38. *Gordon M.*: J. Immunol. 90:209; 1963.