

## FLUORESKUJÍCÍ PROTILÁTKY V RYCHLÉ MIKROBIOLOGICKÉ DIAGNOSTICE

### 1. Diagnostika respiračních infekcí bakteriální etiologie

Podplukovník MUDr. Jiří FRANĚK CSc.

Vojenský ústav hygieny, epidemiologie a mikrobiologie v Praze

Metoda FP byla vypracována do té míry, že je možné postupně přistupovat k jejímu převodu do praxe — samozřejmě za dodržení všech podmínek kontrolované prověrky nové reakce. Obecnými aspekty diagnostického využití imuno-fluorescence se zabývala samostatná práce (Franěk 1965). Účelem tohoto a následujících souborných referátů je usnadnit pracovníkům laboratoří hygienicko-protiepidemické služby orientaci ve světové literatuře a pokud možno rychle je informovat o dosaženém stavu, praktických možnostech a aktuálních problémech rychlé diagnostiky infekcí nejdůležitějších pro jejich denní praxi.

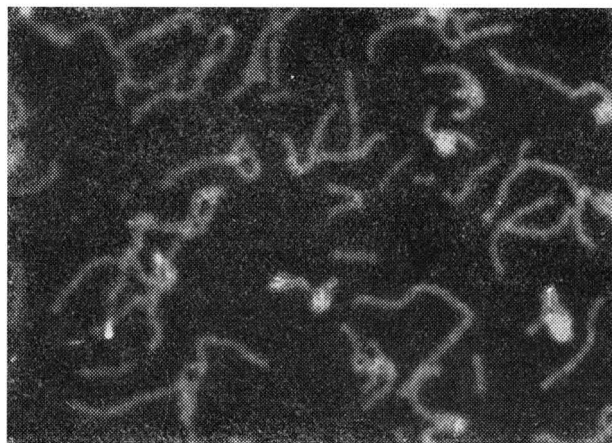
Ze skupiny bakterií, uplatňujících se v etiologii epidemiologicky nejzávažnějších respiračních infekcí, byla zatím největší pozornost věnována **beta-hemolytickým streptokokům (BHS)**. Základní práce, provedené ve Spojených státech ve Středisku pro studium infekčních chorob (CDC) v Atlantě, dokázaly možnost použít konjugátů připravených z **komerčních skupinových sér** k identifikaci BHS ve smíšené primokultuře nebo i přímo v klinickém materiálu.

Bylo používáno postupu vypracovaného Moodym a spol. (1958). Konjugát byl připraven ze séra proti A skupině BHS a vysycen suspenzí BHS skupiny C. Materiál (tampón) byl kultivován 2—4 hodiny v 1—2 ml Todd-Hewitova bujónu (tampóny dopravené do laboratoře odpoledne byly ponechány do rána při +40 C a kultivovány pak 6 hodin). Preparát byl zhotoven ze sedimentu (bujón centrifugovali při 3500 ob/min. asi 10 minut) po dvojnásobném promytí pufrovaným fyziologickým roztokem (pH = 7,2). Z každého sedimentu byly připraveny dva paralelní preparáty: na jeden byl aplikován zmíněný specifický konjugát, na druhý konjugát z normálního králičího séra (k odlišení fluorescence pyogenních stafylokoků - *Staphylococcus aureus* — jejichž některé kmeny ochotně adsorbují jakékoli FP; tento preparát musí být negativní). Pozitivní závěr byl dělán na základě nálezu intenzivně fluoreskujících koků rostoucích v řetízích. Význam intenzity fluorescence a morfologie fluoreskujících mikrobů pro hodnocení nálezu je demonstrován na obr. 1 až 4.

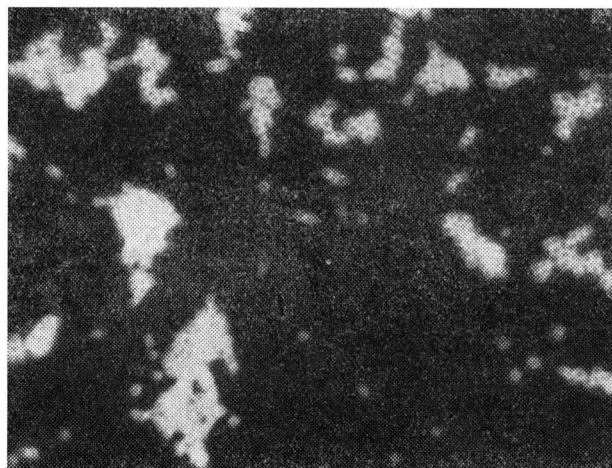
Ve všech případech byl aplikován konjugát připravený ze séra proti A skupině BHS.

Mikrosnímky byly zhotoveny na luminiscenčním mikroskopu ML-2 při zvětšení 540×; černobílý film ORWO 27 byl exponován dvě minuty.

Byl popsán i úspěšný průkaz BHS v preparátech zhotovených přímo tampónem (tj. bez pomnožování) (viz Halperen a ost. 1958). Jak je však ukázáno v práci Raucha a Rantze (1963),



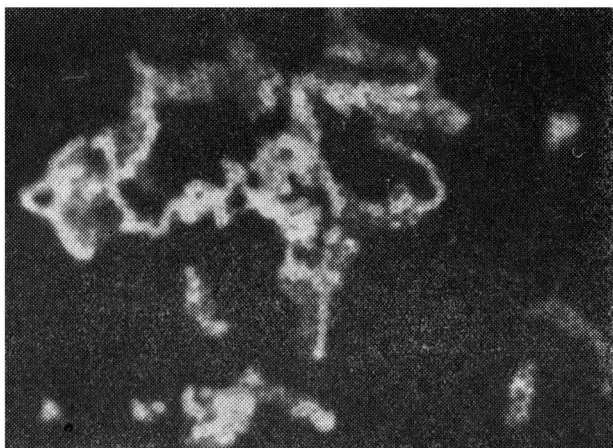
Obr. 1. 5hodinová bojónová kultura *Str. pyogenes* A-11



Obr. 2. 5hodinová bujónová kultura *St. aureus*



Obr. 3. 18hodinová bujónová kultura *Str. pyogenes* A-11



Obr. 4. Nerovnoměrná fluorescence charakteristická pro staré (laboratorní) kultury streptokoků

reakce v tomto případě nezaručuje spolehlivý výsledek. Při vyšetřování 767 pacientů s infekcemi horních dýchacích cest byly BHS kulti-vačně zachyceny 121×. Z toho u 68 byl masivní růst na krevním agar; z nich 63 (93 %) bylo správně identifikováno pomocí FP přímo v nátěru. Z 57 materiálů, u nichž byly kulti-vačně zachyceny jen jednotlivé BHS, však daly FP pozitivní reakci jen 28× (53 %). Je ovšem potřeba dodat, že FP byly pozitivní i v 24 případech kulti-vačně negativních. Autoři považují reakci v těchto případech za specifickou a domnívají se, že mohlo jít o atypicky (bez hemolýzy) rostoucí BHS, které unikly při rutinním hodnocení kulti-vačních výsledků, nebo o potla-čení růstu vlivem ATB. Považují tento meto-lický postup za vhodný pro epidemiologické vyhledávací akce, pro klinickou aplikaci je však málo spolehlivý.

Také zkušenosti CDC Atlanta potvrzují, že při aplikaci FP na preparáty zhotovené bez předkultivace jsou výsledky málo hodnověrné: jednak z kvantitativních důvodů, jednak chybí typická morfologie (řetízky), potřebná pro od-diferencování pyogenních stafylokoků; navíc je fluorescence BHS zřetelně slabší než po předkul-tivaci (Materiály panamerického kursu, díl 2). V souvislosti s tímto posledním pozorováním Rauch a Rantz (1963) připomínají názor o ad-sorpci specifických protilátek na BHS in vivo (které se pak v imunofluorescenční reakci mo-hou uplatnit ve smyslu inhibice vazby speci-fických FP).

Modifikovaný postup byl vypracován v labo-ratoři Connecticut State Dep. of Health, s ka-pacitou přes 50 000 vyšetření na BHS ročně (Redys a ost. 1963). Při tomto rozsahu labo-ratorní práce není výhodné krátkodobé pomno-žování s následným zpracováváním preparátů, protože vede k příliš velkému zatížení labo-ratoře v odpoledních hodinách. Proto se postupovalo takto: Tampón se naočkoval na krevní agar a do 3 ml bujónu. Po 18 hodinách byl pro-veden orientační výběr (screening) podle he-molýzy na krevním agaru. U všech kultur, u nichž byla zjištěna hemolýza, byly připrave-

ny preparáty pro aplikaci FP ze sedimentu bu-jónové kultury. Při negativním výsledku FP byla izolována subkultura z krevního agaru a celý postup byl opakován.

Asi 10 % vzorků bylo kompletně vyšetřeno konvenčními metodami (izolace čisté kultury, určení kmene precipitací). U náhodně vybra-ných 705 kmenů byla plná shoda s výsledkem určení pomocí FP (imunofluorescenční meto-dou bylo identifikováno celkem 7051 BHS sku-piny A.

Podle údajů Cherryho (Materiály panameric-kého kursu, díl 2) byli v CDC Atlanta během pěti let vyškoleni odborníci z celkem 60 labo-ratoří státní zdrav. služby USA. Třicet z nich se zúčastnilo prověrky prováděné v terénních podmínkách (CDC dodalo ověřené konjugáty, precipitační séra pro kontrolní určování kmenů a periodicky prověřovalo správnost výsledků). Bylo zpracováno téměř 9000 vzorků, u nichž v 94,4 % byla zjištěna shoda mezi výsledky kultivace a vyšetření pomocí FP (v materiálu bylo 2086 pozitivních vzorků). Podrobnější rozbor výsledků jedné z dílčích akcí viz Pee-ples a ost. (1961).

Jak vyplývá ze sdělení Moodyho a ost. (1963), terénní prověrky pokračovaly: během posled-ních čtyř let bylo vyšetřeno v různých labo-ratořích (jednotnou metodikou) dalších 27 966 vzorků, z nichž 5574 bylo pozitivních pomocí FP a 5408 kulti-vačně.

Technika průkazu BHS v materiálu od ne-mocných je tedy vypracována a prověřena. O účelnosti použití jednotlivých variant je už třeba rozhodnout podle situace (epidemie nebo široká depistáž nebo rutinní vyšetřování kli-nických pacientů atp.).

Vlastní problematiku imunofluorescenční dia-gnostiky BHS však není možné omezit jen na technické otázky; ta je především v bližším studiu povahy antigenů a protilátek, které se zúčastní této reakce. Je totiž známo, že preci-pitační titer není měřítkem aktivity skupino-vých protilátek v imunofluorescenci (např. Redys a ost. uvádějí u séra zcela negativního v rourkové precipitaci staining-titer 1:200, tj. poměrně velmi vysoký). Není vždycky ani plná shoda mezi výsledky precipitace a immu-nofluorescenční reakce při skupinovém určování izolovaných kmenů: Streamer a ost. (1962) např. zjistili, že z 480 kmenů vyšetřených po-mocí reakce precipitace i FP patřilo 454 (94,6 %) ke skupině A. Ale také dalších 20 kmenů, které podle precipitace ke skupině A nepatřily, reagovalo stejně intenzivně s FP proti skupině A. A naopak 4 ze 6 kmenů FP negativních byly precipitačně určeny jako skupi-na A. Autoři uzavírají, že FP vykazují asi stej-nou chybu jako bacitracinový test (příslušné číselné vyjádření je v práci obsaženo), o roz-bor vlastních příčin odchýlných výsledků se však ani nepokusili. A přece je to jediná cesta k exaktnímu vyhodnocení nové reakce. Že to-tiž nejde o zákonitý vztah, ale o údaje platné pouze v dané sestavě, ukazuje téměř současně

publikovaná práce Estely a Shneye (1963): při srovnání na 2138 čerstvě izolovaných kulturách daly FP zcela analogické výsledky jako precipitační reakce. Bacitracinový test byl  $42\times$  nesprávně pozitivní,  $100\times$  nesprávně negativní.

Ve velkých sestavách bývá shodně určováno 90 — 95 % kmenů. Rozdíly jsou obvykle větší, když se nepracuje s izolovanými kmeny, ale přímo s primárním materiálem (nátery tampónem nebo smíšená bujónová primokultura). Ayoubová a ost. (1964) zjistili při detailním studiu malého počtu kultur i některé z možných příčin: poměrně často byly v jediném materiálu nacházeny BHS příslušející k **různým skupinám**. Pozitivita resp. negativita imuno fluorescenční reakce se pak liší nejen v závislosti na vybrané kolonii, ale je možné se setkat i s fluorescencí jen jednotlivých řetězků v preparátu zhotoveném z jediné kolonie zdánlivě čisté kultury.

Výsledky srovnávacích vyšetření mohou být dále zkresleny i tím, že dva paralelně odebrané tampóny ještě zdaleka neznamenají rovnocenný materiál. Bylo také pozorováno, že při kultivaci v bujónu BHS ostatních skupin potlačují růst BHS skupiny A (tj. výsledek vyšetření primárního materiálu nebo primokultury na agaru nemusí být shodný s vyšetřením sedimentu z bujónu).

Srovnávání FP s konvenčními postupy je proto třeba důkladně promýšlet. Samotné paralelní vyšetření vzorků může být podstatně ovlivněno uvedenými nedostatky a může dát zcela zkreslené výsledky. Domnívám se proto, že v současné době poskytují důležitější informace o fluorescenční metodě ty studie, které se snaží konkrétně analyzovat reakci antigen-protilátka, a pomáhají tak spíše pochopit příčiny rozdílných výsledků, než jen statisticky zachycovat jejich podíl.

Do této skupiny prací patří např. sdělení Köhlera a Wagnera (1962) o podílu společného antigenu 28-R na zkřížených aglutinačních reakcích mezi kmeny skupin A, B, C i G. Autoři upozorňují na nutnost přehodnocení výběru imunizačních kmenů (Wagner 1962).

Tato otázka má zásadní význam: z jiných údajů je např. známo, že konjugáty vyráběné různými firmami v USA se liší specifícností (Materiály panamerického kursu, díl 1); příčina není objasňována, je však zřejmé, že znalost vlastností (přesné antigenní struktury) imunizačního kmene je předpokladem jakékoli úvahy o příčinách a významu těchto rozdílů. Je bohužel jedním z obecných nedostatků publikovaných prací, že tento základní údaj není uváděn.

Specifícnost reakce FP s BHS vůbec představuje samostatnou otázku. Jak už bylo uvedeno, anti-A konjugáty jsou běžně vysycovány suspenzí BHS skupiny C. Tento postup zavedli už Moody a spol. (1958), kteří zjistili, že nevysycený konjugát „barvil“ i 60 % kmenů skupiny G (v posledním případě však byla fluorescence podstatně slabší). Redys a ost. (1960) později

navrhli zaměnit prý ne dost účinné vysycování inhibicí (one-step inhibition test) s použitím anti-C séra v předem vytitrovaném poměru. Účelnost inhibice byla později opakovaně ověřena. Bylo zjištěno, že tímto postupem je odstraňována i fluorescence BHS skupiny G. Jablon a Brust (1963) se proto domnívají, že jde o blokování ne skupinové (charakteristické pro skupinu C), ale nějaké druhové (společné různým skupinám) antigenní frakce BHS.

Analýzu příčin zkřížených reakcí ztěžuje m. j. i ta okolnost, že v naprosté většině prací chybějí údaje o vlastnostech sér před imunizací, ačkoli je známo (viz např. Redys a ost. 1963), že protilátky proti C a G streptokokům jsou velmi častou složkou „normálních“ králičích sér. Toto pozorování můžeme jen potvrdit.

Zatímco skupinové určování BHS pomocí FP je možné - přes všechny nejasné a nedořešené otázky - už dnes považovat za vcelku reálný, v praxi použitelný postup (viz Zelenková 1962), o detekci typového M antigenu existují zatím jen první experimentální informace.

V roce 1962 zjistili Cole a Hahn, že kultivací BHS v přítomnosti homologního konjugovaného antiséra (typového nebo skupinového) je možné sledovat změny v lokalizaci skupinového C, resp. typového M antigenu v jednotlivých buňkách nově vznikajících řetězků. Autoři m. j. prokázali nesprávnost tvrzení Foxe (1962) o regeneraci M-proteinu buněčnou stěnou zasaženou trypsinem: podle jejich pozorování je jeho tvorba vázána pouze na trypsinem nepoškozenou stěnu. M-protein se proto obnovuje jen na těch místech, kde vzniká nová stěna, nikoli v těch místech, kde byl uložen před působením fermentu.

Později stejní autoři (Hahn a Cole 1963) tímto způsobem studovali závislost tvorby „dlouhých řetězků“ na přítomnosti specifických protilátek. Je to první práce, v níž nová metoda dovolila exaktně sledovat průběh reakce dlouhých řetězků (Stollerman a Ekstedt 1957) a vyjádřit se konkrétně k jejímu mechanismu.

Diagnostický aspekt je zřejmý v práci Karakawy a ost. (1964), kteří se první úspěšně pokusili o typizaci BHS (typ 1 skupiny A) pomocí anti-M FP. Základem jejich úspěchu byla příprava velmi čistého antigenu pro imunizaci, který nahradil tradičně používanou vakcínu z formolizované kultury. Při srovnání kvality protilátek získaných oběma (tradiční a novou) vakcínami zjistili, že

— precipitační reakce je silnější, je-li použito sérum králíků imunizovaných formolizovanou vakcínou, FP titr je však u obou sér stejný,

— vyšší intenzita v precipitační reakci je pravděpodobně zaviněna jinými než přísně typovými (anti-M) protilátkami. Po dvojitým vysycením séra jiným typem se totiž zřetelně snížil imuno fluorescenční titr v séru získaném imunizací formolizovanou vakcínou, zatímco

obsah protilátek v séru získaném imunizací čistým M-proteinem se nezměnil,

— je velká shoda mezi aktivitou anti-M protilátek v imunofluorescenci, bakteriostatickém testu a v reakci dlouhých řetízků. Výsledky těchto tří reakcí jsou dobře srovnatelné;

— precipitační reakce prováděná konvenčním způsobem nemusí zřejmě vždy detegovat přítomné přísně specifické anti-M protilátky.

Autoři velmi optimisticky posuzují význam FP pro typizaci BHS, ovšem za předpokladu, že se podaří připravit naprosto čistý M antigen k imunizaci. Tato otázka má klíčový metodický význam.

FP je dále možné použít už dnes k identifikaci a detekci řady dalších mikrobů uplatňujících se v etiologii infekcí šířených vzduchem.

Poměrně velká zkušenost je nashromážděna s aplikací FP k detekci a identifikaci **B. pertussis**. Výsledky prvních pokusů lokalizovat povrchový antigen *B. pertussis* pomocí FP publikovali de Repentigny a Frappier už v roce 1956. O využití těchto poznatků pro rychlou diagnostiku se později pokusili Donaldson a Whitakerová (1960). Antigen detegovali přímo v nátěrech zhotovených odběrovým tampónem; při vyšetřování 36 neléčených pacientů daly FP pozitivní výsledek 31×. Důležitým zjištěním byla možnost detegovat bordetely ještě 48 hodin po nasazení antibiotik (všech 13 vzorků bylo jasně pozitivních, zatímco kultivace v této době naprosto selhala). Tito autoři také první upozornili na to, že ne všechna séra, vhodná pro identifikaci *B. pertussis* aglutinační reakcí, jsou použitelná pro přípravu FP, i když otázku použitelnosti spojovali pouze s dostatečně vysokým aglutinačním titrem (za nejnižší hranici byl považován titr 1:500).

Souvislost intenzity fluorescence s výškou aglutinačního titru séra popsaly ve stejné době i Levina a Nejmarková (1960), které nalézaly v pokusech s čistými kulturami intenzivní fluorescence pouze při aplikaci sér s titrem vyšším než 1:800.

Zásadní význam pro definování kvality protilátek vhodných pro imunofluorescenční reakci měla práce Elderingové a ost. (1962). Tito autoři se pokusili opakovaně pozorované diskrepance (viz Kendrick, Eldering a ost. 1961) mezi reakcí aglutinace a reakcí FP objasnit zjištěním uplatnění jednotlivých antigenních frakcí bordetel v obou reakcích. Podařilo se jim zjistit, že podstatný rozdíl skutečně existuje. Zatímco o intenzitě aglutinace rozhodují frakce 2, 3 a 5, pro intenzitu specifické reakce s FP má rozhodující význam frakce 1. To vysvětlilo, proč může být imunofluorescenční reakce negativní i při použití séra s aglutinačním titrem 1:4000, zatímco séra s aglutinačním titrem 1:160 (obsahující ale protilátky výhradně proti frakci 1) dávají brilantní, zcela specifickou fluorescence.

Z hlediska těchto nálezů je pak velmi neúplná pozdější práce Majorové a Korna (1963), kteří vlastně jen — bez analýzy imunologic-

kých příčin — potvrzují existenci rozdílů v aktivitě a specifčnosti různých sér.

Skupina pracovníků z Michiganské university (Elderingová a spol.) mezitím pokračovala v širší prověrce vypracované metody v praxi. Vyšetřili 517 výtěrů od případů s diagnózou suspektní pertuse. Z toho 138 bylo pozitivních oběma metodami, 25 jen kultivačně a 25 jen pomocí FP. FP byly nejvýhodnější pro rychlou identifikaci *B. pertussis* v mladých smíšených primokulturách. Celková doba vyšetřování se tím ve většině případů zkrátila z tří (48,7 % kultivací pozitivních) až osmi (100 % kultivací pozitivních) dní na 1 — 3 dny (75,4 % pozitivních pomocí FP). Přímá aplikace FP na preparáty z klinického materiálu není (jako ostatně i v jiných případech) dost spolehlivá, protože mohou uniknout případy s malým množstvím bakterií (Holwerda a Elderingová 1963).

K taktice použití FP v diagnostice pertuse přinesli velmi zajímavá fakta francouzští autoři Marie a ost. (1964). Při vyšetřování klinicky podrobně sledovaného souboru 1000 nemocných dětí (z nichž u 475 byla ověřena diagnóza pertuse) daly FP pozitivní odpověď u 95 %, kultivace u 86 %. Tento údaj se týká dětí vyšetřovaných v katarálním stadiu nemoci a léčených antibiotiky méně než 48 hodin. Autoři totiž zjistili, že po dvou dnech podávání antibiotik se fluorescence bordetel zřetelně snižuje, dochází ke změnám jejich morfologie a narůstá počet nespecifických reakcí v materiálu. Morfologie mikroba je zřetelně změněna i u **očkovaných** dětí. Nedostatkem práce je, že pozorované změny nejsou podrobněji dokumentovány ani analyzovány. Přesto však je třeba práci považovat za důležité upozornění na faktory, které mohou podstatně ovlivnit efekt použití FP.

Zejména vzhledem k potřebě rychlé orientace při rozhodování o terapii meningitid (tj. s vysloveně klinickým zaměřením) byly prováděny pokusy aplikovat FP k detekci a identifikaci **H. influenzae**.

První informace o možnostech přímého průkazu *H. influenzae* v sedimentu z cerebrospinálního moku poskytla práce Page a ost. (1961). Při vyšetřování 50 nemocných dětí se průkaz pomocí FP podařil u 26, kultivačně u 24 (u dalších dvou je negativní kultivace vysvětlována nasazením antibiotik).

Později byla metoda FP zkoušena především k identifikaci kmenů a bylo zjištěno, že na rozdíl od aglutinace je možné typizovat i kmeny v R-fázi (Sellová a ost. 1963a).

Stejná pracovní skupina vypracovala i metodu pro **detekci specifických protilátek** proti *H. influenzae* pomocí nepřímé imunofluorescenční reakce. Akutní a rekonvalescentní séra byla testována na kmenech izolovaných od příslušných pacientů. Autoři došli k závěru, že NIFR je v daném případě citlivější než reakce aglutinace, která je schopna zachytit jen velké změny v obsahu protilátek. Domnívají se také, že rozhodně existuje víc než šest typů

*H. influenzae* (Sellová a ost. 1963b) dnes známých.

Poznatky o ostatních agens byly zatím získány pouze z experimentálních prací: pracovníci CDC Atlanta např. publikovali zprávy o možnosti rozlišování toxigenních a netoxigenních *C. diphteriae* pomocí FP připravených z antitoxického séra (Jones a Moody 1960, Moody a Jones 1960).

Tato možnost však nebyla pozdějšími autory potvrzena; výsledky prověrky postupu a kritický rozbor jeho nedostatků viz u Allena a Cluffa (1963). Také původní autoři později upřesnili své závěry v tom smyslu, že diferenciace korynebakterií podle schopnosti tvořit toxin není sice možná, považují však přesto reakci za vhodnou pro rychlou identifikaci *C. diphteriae* ve smíšených primokulturách (Moody a Jones 1963).

Už na symposiu o FP ve Švýcarsku v r. 1959 referovali Rotter a Meyersbach o použití nepřímé imunofluorescenční reakce k detekci protilátek proti **M. tuberculosis** v sérech infikovaných morčat. Antigen představovaly bakterie, ale antigen obsahující ložiska v orgánech morčat. Shepard a Kirsh (1961) později potvrdili, že intaktní mykobakteria nelze barvit pomocí FP. Navrhli však originální postup, který použití FP umožňuje. Třepáním bakteriální suspenze za přítomnosti skleněných perliček dosahují dezintegrace bakterií; centrifugováním oddělují frakci protoplazmy a frakci bakteriálních stěn. Specifický konjugát pak může proniknout k **vnitřnímu povrchu** bakteriální stěny, na kterou se za těchto podmínek velmi intenzívně váže. Metoda umožnila přistoupit i k studiu sérologických vztahů mezi mykobakteriemi (Kirsh a Shepard 1961).

Metodicky neobvyklý je i způsob použití FP k diagnostice **infekční mononukleózy**: při aplikaci sér pacientů s pozitivní Paulovou-Bunellovou reakcí na řezy hovězí tyreoidní tkáň byla (při použití nepřímé imunofluorescenční metody) pozorována intenzívní fluorescence endotelu kapilár a erytrocytů v jejich lumenech. Reakci je možné inhibovat vysycením séra hovězími nebo beraními erytrocyty. Podstata reakce je dále studována, autoři ji však už dnes považují za cenný test zejména pro epidemiologické vyhledávací studie (Johnson a Holborow 1963).

### Komentář

Detekce celé popisované skupiny agens má některé společné problémy.

Na prvním místě stojí nespecifická fluorescence, zaviněná schopností některých kmenů pyogenních stafylokoků velmi intenzívně adsorbovat jakékoli FP (literatura k této otázce — viz Franěk 1964).

Podstata reakce dosud není známa, a neexistuje proto ani spolehlivý způsob, jak nespecifické fluorescence stafylokoků zabránit. Obecně uznávanou nejúčinnější cestou je předběžný výběr zvířat určených pro imunizace:

používat by se měla jen ta, jejichž séra reakci se stafylokoky nedávají. Tento požadavek je ovšem těžko realizovatelný — k vazbě na stafylokoky dochází i u sér od „bezmikrobních zvířat“ (Cohen a spol. 1963); sami jsme během čtyř let práce neměli konjugát, který by se stafylokoky vůbec nereagoval. Také komerční konjugované antiglobuliny dávají tuto reakci zcela pravidelně (jak naše, tak i zahraniční).

V pracích věnovaných detekci BHS bývá popisováno snížení, až i úplné odstranění fluorescence stafylokoků po vysycení konjugátu BHS skupiny C a G (Warfieldová a spol. 1961 a j.). Tento údaj nemůžeme po svých zkušenostech považovat za obecně platný. Je konec konců známo, že ani vysycení suspenzí samotných stafylokoků tuto fluorescenci neodstraní; k její charakteristice naopak patří, že intenzita neklesá ani při aplikaci konjugátu ředěného **nad** specifický staining titer (tj., že konjugáty se intenzívněji váží na stafylokoky než na homologní antigen).

V experimentálních podmínkách byla zjištěna možnost selektivního ovlivnění povrchové struktury stafylokoků působením fermentů — papainu (Komminos a Tompkins 1963), trypsinu nebo pepsinu (Jablon a Brust 1963) — které odstraňují schopnost vázat na sebe FP. Bereznickaja (1964) zjistila, že podobného účinku lze dosáhnout i předběžným obarvením preparátů podle Grama (přičemž nejdůležitější je moření Lugolovým roztokem).

Všechny tyto postupy mají zatím jen omezenou možnost využití. Spolu se stafylokoky jsou totiž ovlivňovány i povrchové antigeny jiných mikrobů; stupeň jejich poškození je rozhodně větší, než uvádějí autoři metodik. Je ovšem možné, že rozdílná čistota např. fermentových preparátů používaných u nás a v zahraničí nebo jiné technické okolnosti ovlivňují reprodukovatelnost postupů. V každém případě jde o metody, které je potřeba všestranně propracovat v experimentálních podmínkách dříve, než bude možné stanovit pravidla pro jejich použití v praxi.

Zatím je možné používat pro vyloučení nespecifické fluorescence stafylokoků tato hlediska: charakteristická morfologie, fluorescence jak při aplikaci různých konjugátů, tak pro aplikaci specifického (pro hledané agens) konjugátu ředěného nad staining-titer.

V některých pracích byly uváděny potíže vznikající nespecifickou vazbou konjugátů na mucin a leukocyty (při pokusech o detekci různých agens přímo v klinickém materiálu). Tento druh nespecifických reakcí by však při dnešní technice čištění konjugátů, možnosti kontrastního dobarvování a při úrovni u nás používaných specializovaných luminiscenčních mikroskopů (dovolujících detailní sledování morfologie fluoreskujících útvarů) neměl hrát podstatnější úlohu.

S otázkami specifičnosti souvisí i možnost použití **nepřímé metody FP** k detekci této skupiny agens. Byla už uváděna (téměř obecná)

vlastnost antiglobulinových konjugátů reagovat s pyogenními stafylokoky. V citované již práci Sellové a ost. (1963a) je uvedeno, že v pokusech s *H. influenzae* docházelo v nepřímé imunofluorescenční reakci ke zcela nespecifické fluorescenci jak pyogenních stafylokoků, tak i některých typů pneumokoků a dokonce i *Sh. flexneri*, ačkoli při použití přímé metody byla reakce zcela specifická. Podobně i Majorové a Kornovi (1963) se dařilo diferencovat *B. pertussis* a *B. parapertussis* pouze přímou metodou, zatímco zkřížené reakce různé intenzity, ke kterým docházelo v nepřímé reakci, toto odlišení zcela znemožnily. Pokud jde o BHS, pracovali zatím všichni autoři až na Raucha a Rantze (1963) výhradně přímou metodou.

Z publikovaných zpráv není jasné, zda zhoršená specifičnost nepřímé metody vyplývá vždy z vlastností konjugátů nebo z toho, že se mohou lépe uplatnit i protilátky obsažené v diagnostickém séru (použitím v první etapě reakce) v nízkých titrech, tj. v množství, které při přímé metodě nemůže mít vzhledem ke ztrátám protilátek provázejícím přípravu specifických konjugátů žádný význam.

### Závěr

Z přehledu tedy vyplývá, že FP je už nyní možné efektivně využít v rychlé diagnostice BHS, zejména pro určování skupinové příslušnosti kmenů ve smíšených primokulturách. Při epidemiologických depistážích může být metoda s úspěchem použita i k přímému průkazu BHS skupiny A v náterech nebo preparátech z bujónových smíšených primokultur po krátkodobé předkultivaci. Perspektivně by imunofluorescence měla umožnit především zjednodušení sérologických postupů jak při identifikaci BHS (skupinové i typové určování kmenů), tak při detekci anti-M protilátek.

Také rychlá diagnostika a identifikace *B. pertussis* je (za předpokladu přípravy séra o vyhovujících vlastnostech) dobře možná. Zdaleka však dosud není znám dosah všech faktorů ovlivňujících reakci (stadium nemoci, aplikace antibiotik a vakcíny atd.), jejichž cílené studium mělo být součástí ověřovacích pokusů.

Metodu FP je také možné zařadit do metod používaných při bakteriologické diagnostice meningitid (identifikace *H. influenzae* a *N. meningitidis*).

Ostatní výsledky mají zatím význam spíše pro experimentální práce a bylo by předčasné se pokoušet o jejich využití v praktické diagnostice (*C. diphtheriae*, *M. tuberculosis* aj.).

### Literatura

Allen J. C., Cluff L. E.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 112: 194–199, 1963.  
Ayoub E. M., Wannamaker L. W.: J. Am. Med. Ass. 187: 908–913, 1964.

Bereznickaja E. R.: ŽMEI 35(8):71–75, 1964.  
Cohen J. O., Newton W. L., Cherry W. B., Updyke E. L.: J. Immunol. 90:358–367, 1963.  
Colle R. M., Hahn J. J.: Science 135:722–724, 1962.  
Curso internacional de técnicas de diagnóstico con anticuerpos fluorescentes (rozmnóžené texty), Panama 1963.  
Donaldson J., Whitaker J. A.: Am. J. Dis. Child 99:423–427, 1960.  
Eldering G., Eveland W. C., Kendrick P. L.: J. Bact. 83: 745–749, 1962.  
Estella L. A., Shney H. E.: Am. J. Clin. Path. 40:591–597, 1963.  
Fox E. N.: Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 109:577–579, 1962.  
Franěk J.: Inform. zpravodaj VLIS, 5(1–2):30–96, 1964.  
Franěk J.: Voj. zdr. listy, 1965, 34:21–26.  
Hahn J. J., Cole R. M.: J. Exp. Med. 117:583–594, 1963.  
Halperen S., Donaldson J., Sulkin S. E.: J. Bact. 76: 223–224, 1958.  
Holwerda J., Eldering G.: J. Bact. 86:449–451, 1963.  
Jablon J. M., Brust B.: Bact. Proc. p. 89, 1963.  
Johnson G. D., Holborow E. J.: Nature 198:1316–1317, 1963.  
Jones W. L., Moody M. D.: Bact. Proc. p. 141, 1960.  
Karakawa W. W., Borman E. K., McFarland C. R.: J. Bact. 87:1377–1382, 1964.  
Kendrick P. L., Eldering G., Eveland W. C.: Am. J. Dis. Child. 101:149–154, 1961.  
Kirsh D., Shepard C. C.: Fed. Proc. 20, part I, p. 16, 1961.  
Köhler W., Wagner M.: Z. Immunitätsforsch. 123:200–207, 1962.  
Kominos G. N., Tompkins V. N.: Am. J. Clin. Pathol. 40:319–324, 1963.  
Levina E. N., Nejmark F. M.: ŽMEI 31(5):3–7, 1960.  
Majorova T. F., Korn M. J.: ŽMEI 34(9):42–48, 1963.  
Marie J., Herzog F., Badillet M., Gaiffe M.: Pediatrics 19:53–59, 1964.  
Moody M. D., Ellis E. C., Updyke E.: J. Bact. 75:553–560, 1958.  
Moody M. D., Jones W. L.: Bact. Proc. p. 145–146, 1960.  
Moody M. D., Siegel A. C., Pittman B., Winter C. C.: Am. J. Publ. Hlth. 53:1083–1092, 1963.  
Moody M. D., Jones W. L.: J. Bact. 86:285–293, 1963.  
Page R. H., Calderoney G. L., Stulberg C. S.: Am. J. Dis. Child. 101:155–159, 1961.  
Peeples W. J., Spielman D. W., Moody M. D.: Publ. Mith. Rep. 76:651–654, 1961.  
Rauch H. C., Rantz L. A.: J. Lab. Clin. Med. 61:529–536, 1963.  
Redys J. J., Ross M. R., Borman E. K.: J. Bact., 80:823–829, 1960.  
Redys J. J., Parzick A. B., Borman E. K.: Publ. Hlth. Rep. 78:222–226, 1963.  
De Repentigny J., Frappier A., Canad. J. Microbiol. 2:677–683, 1956.  
Rotter K., Mayersbach H., Schweiz. Z. Path. Bakt. 22: 732–742, 1959.  
Sell S. H. W., Cheatham W. J., Young B., Welch K., Am. J. Dis. Child 105:466–469, 1963a.  
Sell S. H. W., Sanders R. S., Cheatham W. J.: Am. J. Dis. Child. 105:470–474, 1963b.  
Shepard C. C., Kirsh D.: Fed. Proc. 20, part I, p. 16, 1961.  
Stollerman G. H., Ekstadt R. D.: J. Exp. Med. 106:345, 1957.  
Streamer C. W., Williams P. M. a ost.: Am. J. Dis. Child. 104:157–160, 1962.  
Wagner M., Heinrich H.: Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 186: 292–302, 1962.  
Warfiel M. A., Page R. H. a ost.: Am. J. Dis. Child. 101: 160–163, 1961.  
Zelenková L.: Čs. EMI 11:145–149, 1962.