

**UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE
JESSENIOVA LEKÁRSKA FAKULTA V MARTINE
ÚSTAV MIKROBIOLÓGIE A IMUNOLÓGIE JLF UK**



**MIKROBIOLÓGIA – PRINCÍPY A INTERPRETÁCIA
LABORATÓRNYCH VYŠETRENÍ**

1. ČASŤ

Skriptá pre doplňujúce štúdium

*v mikrobiológii, klinickej mikrobiológii a laboratórnej diagnostike ochorení
s mikrobiálnou etiológiou*

**Doc. MUDr. Elena Nováková, PhD; Doc. MUDr. Jurina Sadloňová, PhD;
MUDr. Jana Kompaníková, PhD; MUDr. Martina Neuschlová, PhD;
MUDr. Vladimíra Sadloňová, PhD**

ISBN 978-80-89544-98-1

EAN 9788089544981

MARTIN, 2015

OBSAH

Úvod

1	Laboratórna a klinická mikrobiológia	5
2	Mikrobiológia ako veda	8
3	Mikrobiológia ako nástroj diagnostiky	12
4	Mikrobiológia ako nástroj surveillance	22
5	Mikrobiológia ako nástroj spolupráce	25
6	Imunosérológia infekčných chorôb	34
6. 1	Princípy imunitnej odpovede využiteľné v sérologickej diagnostike	35
6. 2	Základné pojmy laboratórneho dôkazu mikrobiálnej etiológie ochorenia	37
6. 3	Charakteristika špecifických súčastí imunodiagnostických postupov	42
6. 3. 1	Detekcia antigénov	44
6. 3. 2	Detekcia protilátok	48
6. 4	Prístupy k imunosérolologickej diagnostike infekčných ochorení	52
6. 4. 1	Nešpecifické indikátory infekčných ochorení	52
6. 4. 2	Typy protilátok a ich využitie v diagnostike	54
6. 4. 3	Antigény	56
6. 4. 3. 1	Rozpusťné antigény a ich reakcie s protilátkami	56
6. 4. 3. 2	Korpuskulárne antigény a ich reakcie s protilátkami	58
6. 4. 4	Lytické reakcie	60
6. 4. 5	Imunofluorescenčné analýzy	62
6. 4. 6	Imunoenzýmové techniky	65
6. 4. 7	IgM a IgG separačné metódy	72
6. 5	Požiadavky na kvalitu vyšetrovacej metódy	73
6. 6	Význam a použitie detekcie špecifických protilátok	77
6. 6. 1	Detekcia protilátok ako indikátora imunity	77
6. 6. 2	Detekcia protilátok pri diagnostike ochorenia	84
6. 6. 3	Detekcia voľných antigénov vo vzťahu k aktivite ochorenia	94
7	Záver	97
8	Literatúra	100
9	Zoznam skratiek	102

ÚVOD

Mikrobiológia je samostatný odbor zaoberajúci sa štúdiom mikroorganizmov. Na základe rôznorodosti mikroorganizmov, ktoré študuje, sa špeciálna mikrobiológia delí na bakteriológiu, virológiu, mykológiu a parazitológiu. Jej súčasťou sú ďalšie príbuzné odbory, napríklad antiinfekčná imunológia, zaoberajúce sa odpoveďou makroorganizmu na pôsobenie infikujúceho mikroorganizmu, alebo sérológia – veda o diagnosticky významných špecifických molekulách séra a ich detekcii.

Lekárska mikrobiológia - je odbor, ktorý vytvára náplň štúdijného odboru *Mikrobiológia* na lekárskech fakultách a zaoberá sa vzťahom mikroorganizmov k človeku, predovšetkým z hľadiska ich patogénneho potenciálu. Svojím hlavným zaradením patrí k predklinickým odborom štúdia medicíny (na JLF UK). V praktickej medicíne je vo veľmi úzkom kontakte s klinickými odbormi, pretože sa zaoberá vzťahom izolovaných a identifikovaných mikroorganizmov k ochoreniu človeka v období patogenézy, akútneho ochorenia, rekonvalescencie alebo chronického ochorenia. Predmetom jej štúdia je vzájomné pôsobenie obranných mechanizmov makroorganizmu a nástrojov patogenity vyvolávajúceho infekčného agensa. Pri podmienene patogénnych mikroorganizmoch (fyziologická flóra, nosičské kmene) sú to aj zmeny tejto interakcie, teda aj riziká vyplývajúce zo zlyhania nešpecifických obranných mechanizmov alebo podmienok prenosu infekčného činiteľa na vnímavých jedincov.

Diagnostická časť náplne odboru je základom všetkých ďalších činností. **Mikrobiologické vyšetrenie** je zamerané na identifikáciu infekčného agensa z biologického materiálu odobraného klinickým pracovníkom na základe súboru klinických príznakov svedčiacich o možnom infekčnom pôvode (mikrobiálnej etiológii ochorenia). Laboratórna diagnostika pri mikrobiologickom vyšetrení rieši diferenciálnodiagnostické problémy vyplývajúce z necharakteristickej symptomatológie väčšiny infekčných ochorení a ochorení s mikrobiálnou etiológiou. Klinické príznaky infekcií sú spravidla nešpecifické a môžu byť vyvolané viacerými mikroorganizmami patriacimi často do rozličných taxonomických skupín. Okrem identifikácie etiologického činiteľa, prípadne stanovenia jeho citlivosti na lieky s antimikrobiálnym účinkom je najvýznamnejšou časťou činnosti, ktorú vykonáva lekár – **klinický mikrobiológ**, spolupráca s klinickým pracovníkom. Tá sa týka predovšetkým interpretácie laboratórneho nálezu a úlohy izolovaného a identifikovaného mikroorganizmu v

patogenéze daného chorobného procesu. Jej súčasťou je aj účasť na spolurozhodovaní pri výbere etiologickej terapie pacienta, ktorého biologický materiál bol mikrobiologicky vyšetovaný. Svojimi skúsenosťami a poznatkami o mikroorganizmoch a antimikrobiálnom liečive odhaduje klinický mikrobiológ vzťah medzi výsledkom vyšetrenia *in vitro* a možným pôsobením mikroorganizmu *in vivo*. Opakovaným vyšetrením overuje úspešnosť liečebných postupov, zaznamenáva indície možného zlyhania antiinfekčnej terapie a prípadne nevyhnutnosť jej zmeny.

Informácie o výsledkoch identifikácie a charakteristikách infekčného agensa sú v stanovených prípadoch predmetom ďalšieho spracovania (hlásenie, konfirmácia v referenčnom laboratóriu, uchovanie na ďalšie vyšetovanie) a sú podkladom pre ďalšie činnosti iných zdravotníckych, vedeckých alebo forenzných pracovísk. Tento postup sa týka aj situácií súvisiacich s ohrozením verejného zdravia a ochranou pred zneužitím biologických prostriedkov na vojnové alebo teroristické ciele. V súčasnosti je činnosť mikrobiologických laboratórií a mikrobiológov zameraná aj na vyhľadávanie a identifikáciu objavujúcich sa a znovu sa objavujúcich patogénov v súvislosti s meniacou sa škálou vyvolávateľov infekčných ochorení. Ako etiologické agensy sa objavujú nové mikroorganizmy (emergentné), uplatňujú sa podmienené patogénne mikroorganizmy, znovu sa objavujú vyvolávatelia pôvodne kontrolovaných infekcií z dôvodu zlyhania alebo nedostatočného uplatňovania opatrení ochrany verejného zdravia (reemergentné), existuje riziko zneužitia mikroorganizmov na vojnové ciele (bioterrorizmus).

1. LABORATÓRNA A KLINICKÁ MIKROBIOLÓGIA

Mikrobiológia je samostatný vedný odbor, ktorý skúma javy prebiehajúce a navzájom sa ovplyvňujúce na úrovni mikrosвета živých systémov (voľným okom neviditeľné živé organizmy). Študuje štruktúru, metabolizmus, biochemické procesy, nástroje patogenity a virulencie, pôsobenie na cieľové štruktúry a prostredie, citlivosť na antibiotiká (ATB) a mechanizmy spôsobujúce rezistenciu mikroorganizmov na ATB.

Lekárska mikrobiológia je samostatný medicínsky odbor, ktorý vo svojej činnosti vychádza z vedeckých poznatkov mikrobiológie. Predmetom lekárskej mikrobiológie sú medicínsky významné mikroorganizmy, ich štruktúra, metabolizmus, biochemické procesy, patogenéza nimi vyvolaných ochorení, nástroje patogenity a virulencie, citlivosť na antibiotiká (ATB) a mechanizmy spôsobujúce rezistenciu mikroorganizmov na ATB, ako aj mechanizmy obranných reakcií imunitného systému človeka proti mikroorganizmom a ich laboratórny dôkaz. Základné skupiny medicínsky významných mikroorganizmov sú:

- baktérie,
- huby,
- prvoky.

Patria sem aj neživé štruktúry schopné vyvolať infekčné ochorenie človeka:

- vírusy,
- prióny

V mikrobiológii, predovšetkým v parazitológii, sa používajú mikrobiologické diagnostické metódy na výskum a štúdium štruktúry, životných prejavov a významu aj niektorých makroorganizmov pri vzniku infekčných ochorení:

- červy

a v procese šírenia infekcie

- článkonožce.

Klinická mikrobiológia využíva poznatky mikrobiológie a lekárskej mikrobiológie na:

- diagnostiku (identifikácia mikroorganizmov),
- terapiu (stanovenie citlivosti na antimikrobiálne látky),
- prevenciu ochorení mikrobiálnej etiológie

posúdením interakcie nástrojov patogenity, patogénneho potenciálu mikroorganizmov a obranných reakcií organizmu proti nim.

V systéme organizácie zdravotníctva tvorí klinická mikrobiológia samostatné laboratórne oddelenie spoločných vyšetrovacích a liečebných zložiek (SVLZ). Základným pracoviskom

klinickej mikrobiológie je **oddelenie klinickej mikrobiológie** (OKM). Podľa rozsahu a druhu vykonávanej činnosti môže byť oddelenie rozdelené na úseky, resp. laboratóriá. Pracovisko klinickej mikrobiológie špecializované na určitú činnosť môže byť výnimočne súčasťou iného organizačného útvaru (úradu verejného zdravotníctva - ÚVZ).

Podľa špecializácie zamerania možno v rámci pracoviska vytvoriť niekoľko laboratórií:

- bakteriológia,
- kultivácia mykobaktérií,
- virológia,
- antiinfekčná imunológia,
- sérológia,
- mykológia,
- parazitológia:
 - protozoológia,
 - helmintológia,
 - entomológia.

Dôležitou súčasťou je oddelenie prípravy kultivačných médií a roztokov a kontroly kvality. Nadstavbovú diagnostickú činnosť, kontrolu kvality práce laboratórií a expertíznu činnosť v oblasti klinickej mikrobiológie zabezpečujú referenčné laboratóriá.

Na objektivizáciu faktorov vonkajšieho prostredia sa vyčlenil samostatný odbor v rámci verejného zdravotníctva – **mikrobiológia životného prostredia**. Zaoberá sa dôkazom výskytu mikroorganizmov v prostredí, vo vode, v potravinách, na predmetoch denného používania a na neživých štruktúrach, kde ich výskyt môže mať vplyv na človeka, jeho zdravie alebo jeho aktivity (napr. kontrola sterility operačných nástrojov). Táto činnosť je v súčasnosti v kompetencii úradov verejného zdravotníctva.

Hlavnou náplňou odboru klinickej mikrobiológie je poskytovanie komplexnej mikrobiologickej diagnostiky na stanovenie etiológie mikrobiálnych ochorení a kauzálnej antiinfekčnej, prípadne imunomodulačnej terapie chorých. Zaoberá sa diagnostikou ochorení spôsobených patogénnymi baktériami, vírusmi, mikroskopickými hubami, parazitmi, ako aj oportúnne patogénnymi mikroorganizmami, ktoré sa môžu uplatniť v patogenéze ochorení u pacientov s poruchami imunity. Dokazuje prítomnosť fyziologickej mikrobiálnej flóry na koži a slizniciach človeka a prispieva k objektivizácii a posúdeniu zdravotného stavu. Vo svojej diagnostickej činnosti využíva možnosti priameho dôkazu etiologického agensa v biologických materiáloch. Na to používa mikroskopické vyšetrenia, dôkaz antigénov, nukleových kyselín, kultiváciu, izoláciu na médiách a postupy na identifikáciu pôvodcu

ochorenia. Súčasťou bežného vyšetrenia pri bakteriálnych a mykotických ochoreniach je zisťovanie citlivosti na antimikrobiálne liečivá. Na nepriamu diagnostiku mikrobiálnych ochorení sa využívajú sérologické metódy dôkazu protilátok proti antigénom mikroorganizmov, ako aj určovanie ukazovateľov zápalovej reakcie a stavu imunity. Všetky tieto činnosti sú vymenované v koncepcii odboru ako súčasť organizácie liečebno-preventívnej činnosti riadenej MZ SR (Ministerstvom zdravotníctva Slovenskej republiky). V súčasnosti je odbor mikrobiológia v SR študijným odborom 4.2.7 zaradeným v sústave študijných odborov v podskupine 4.2 vedy o živej prírode, v skupine prírodné vedy. Nie je zaradená do 7. skupiny (zdravotníctvo) a medzi lekárske študijné odbory (<http://www.minedu.sk/>).

2. MIKROBIOLÓGIA AKO VEDA

Mikrobiológia (z gréckeho $\mu\kappa\rho\omicron\varsigma$, *mīkros*, „malý“; $\beta\acute{\iota}\omicron\varsigma$, *bios*, „život“ a $-\lambda\omicron\gamma\acute{\iota}\alpha$, *-logia*, veda) je veda študujúca mikroorganizmy, čo sú mikroskopické, jednobunkové organizmy alebo bunkové zhluky. Patria sem eukaryotické organizmy (ako sú huby a protisty) a prokaryotické organizmy. Vírusy a prióny nie sú klasifikované ako žijúce organizmy. Sú však predmetom štúdia mikrobiológie. V rámci mikrobiológie sa študujú aj obranné mechanizmy vnímavého jedinca všeobecne a na pôsobenie mikroorganizmu predovšetkým vo vzťahu k patogénnemu potenciálu mikroorganizmov (imunológia, antiinfekčná imunológia).

Mikrobiológia je vednou disciplínou s aktívnym a progresívnym rozvojom. Odhaduje sa, že je preskúmané len 1 % všetkých mikroorganizmov na planéte (Amann, 1995). Aj keď prvé pozorovania mikroorganizmov boli zaznamenané asi pred 300 rokmi, mikrobiológia ako veda sa etablovala neskôr a je v porovnaní so staršími biologickými disciplínami (botanika, zoológia) relatívne mladou vedou.

V rámci mikrobiológie sa vytvorilo viacero vedných odborov. Existuje významný podiel prekrývania sa predmetov štúdia mikrobiológie s príbuznými odbormi (biológia, epidemiológia), a to aj v iných, nelekárskych vedných disciplínach.

Vedné disciplíny mikrobiologické je možné rozdeliť na: (<http://en.wikipedia.org/>)

Taxonomické – zohľadňujúce taxonomické rozdiely medzi mikroorganizmami:

- bakteriológia: veda o baktériách,
- mykológia: veda o hubách,
- protozoológia: veda o prvokoch,
- fykológia (algológia): veda o riasach,
- parazitológia: veda o parazitoch.

Integrované – aplikácia iných biologických vied na mikroorganizmy:

- cytológia mikroorganizmov: štúdium mikroskopických a submikroskopických detailov mikroorganizmov – bunkových štruktúr,
- fyziológia mikroorganizmov: štúdium biochemických funkcií bunky; zahŕňa štúdium rastu, metabolizmu a funkcie bunkových štruktúr,

- genetika mikroorganizmov: štúdium organizácie a regulácie génov v mikroorganizmoch vo vzťahu k ich bunkovým funkciám; tento odbor veľmi úzko súvisí s molekulárnou biológiou,

- evolučná mikrobiológia: štúdium evolúcie mikroorganizmov; tento odbor môže byť rozdelený ďalej na:

- taxonómiu mikroorganizmov: veda o názvosloví a klasifikácii mikroorganizmov,
- systematiku mikroorganizmov: veda o odlišnostiach a genetickej príbuznosti mikroorganizmov.

Ostatné:

- nano mikrobiológia: štúdium mikroorganizmov na nano úrovni,
- exo mikrobiológia (alebo astro mikrobiológia): štúdium mikroorganizmov v oblasti kozmu.

Aplikované:

- lekárska mikrobiológia: štúdium patogénnych a medicínsky významných mikroorganizmov, ich úlohy v patogenéze ľudských ochorení; zahŕňa štúdium úlohy mikroorganizmu pri vzniku ochorenia, postavenia mikroorganizmu v procese šírenia infekcie a má úzky vzťah k štúdiu patológie, imunológie a epidemiológie,

- farmaceutická mikrobiológia: štúdium mikroorganizmov, ktoré súvisia s produkciou antibiotík, enzýmov, vitamínov, očkovacích látok a iných farmaceutických produktov a ktoré spôsobujú farmaceutickú kontamináciu,

- priemyselná mikrobiológia: štúdium mikroorganizmov na využitie v priemysle, príkladom je priemyselná fermentácia, úprava vôd, ale aj pivovarníctvo; odbor veľmi úzko súvisí s biotechnológiou,

- mikrobiálna biotechnológia: štúdium manipulácie mikroorganizmov na genetickej a molekulárnej úrovni s cieľom vytvorenia využiteľných produktov,

- mikrobiológia potravín: štúdium mikroorganizmov zúčastňujúcich sa na procese kazení potravín a ochorení z potravín, ako aj použitia mikroorganizmov pri produkcii potravín (napríklad fermentácia),

- poľnohospodárska mikrobiológia: štúdium mikroorganizmov významných v poľnohospodárstve; tento odbor možno ďalej rozdeliť na:

- mikrobiológia rastlín: štúdium interakcie mikroorganizmov, rastlinných patogénov a rastlín,

- pôdna mikrobiológia: štúdium mikroorganizmov prítomných v pôde,
- veterinárna mikrobiológia: štúdium veterinárne významných mikroorganizmov, ich úlohy vo veterinárnej medicíne a taxonómii zvierat,
- environmentálna mikrobiológia: štúdium funkcie a diverzity mikroorganizmov v ich prirodzenom prostredí a vzťahoch; zahŕňa charakteristiku kľúčového prostredia mikroorganizmov (rizosféra a fylosféra), pôdných a územných ekosystémov, otvorených morí a extrémnych prostredí,
- mikrobiológia životného prostredia: štúdium mikroorganizmov s ohľadom na životné prostredie človeka,
- mikrobiológia vôd: štúdium mikroorganizmov, ktoré sa nachádzajú vo vodách,
- mikrobiológia vzduchu: štúdium mikroorganizmov ovzdušia.

Napriek nespochybniteľným obavám z patogénneho pôsobenia medicínsky významných mikroorganizmov na človeka niektoré mikroorganizmy súvisia s procesmi, ktoré majú priaznivý vplyv na život človeka a prinášajú úžitok. Príkladom je priemyselná fermentácia (výroba, napríklad, alkoholu, octu, mliečnych produktov, syrov, piva), výroba antibiotík, využitie mikroorganizmov ako substrátu na klonovanie komplexnejších organizmov, ako vektorov na prenos enzýmov a pod. Vedci využili poznatky o mikroorganizmoch na biotechnologickú výrobu enzýmu Taq polymerázy a jej využitie v oblasti molekulárnych biologických detekčných systémov. Všetky vedné disciplíny študujúce mikroorganizmy a ich vlastnosti majú za cieľ ich využitie na praktické použitie (Madigan, 2006).

Príkladom môžu byť niektoré mikroorganizmy. Na priemyslovú výrobu aminokyselín sa používa *Corynebacterium glutamicum*. Je najvýznamnejším bakteriálnym druhom s ročnou produkciou viac ako dvoch miliónov ton aminokyselín (Burkovski, 2008).

Mikroorganizmy produkujú množstvo polymérov (polysacharidov, polyesterov, polyamidov). Používajú sa na biotechnologickú produkciu biopolymérov s definovanými vlastnosťami vhodnými na špičkové použitie v medicíne (produkcia tkanív a liekov, biosyntéza kyseliny hyalurónovej, organických kyselín, oligosacharidov, polysacharidov; Rehm, 2008).

Mikroorganizmy sa využívajú aj pre ich schopnosť degradovať produkty (biodegradácia odpadov, znečistenej pôdy, sedimentov, vôd). Najúčinnnejším spôsobom mikrobiálnej biodegradácie je použitie zmesi druhov a kmeňov, pričom každý je špecifický na degradáciu jednej alebo viacerých kontaminujúcich zložiek (Diaz, 2008).

Význam mikroorganizmov pre zdravie v podobe probiotík (mikroorganizmy s potenciálne priaznivým účinkom na tráviaci systém) alebo prebiotík (súčasti podporujúce rozmnožovanie

a pôsobenie probiotík) je známy a využívaný. Produkcia takýchto mikroorganizmov je súčasťou priemyselnej mikrobiológie alebo farmakológie (Tannock, 2005).

Nedávne štúdie ukázali, že mikroorganizmy môžu mať aj terapeutické využitie (napríklad pri liečbe rakoviny). Rôzne nepatogénne klostrídie infiltrujú solídne nádory a replikujú sa v nich. Takéto mikrobiálne vektory môžu byť bezpečne podané a ich potenciál na dopravenie terapeutických proteínov na potrebné miesto bol demonštrovaný vo viacerých predklinických a experimentálnych modeloch (Mangesha, 2009).

3. MIKROBIOLÓGIA AKO NÁSTROJ DIAGNOSTIKY

Infekčné ochorenia, ich diagnostika, liečba a prevencia odčerpávajú významnú časť zdrojov určených na zdravotnú starostlivosť v rozpočtoch štátov. V rozvojových krajinách je to skôr liečba, vo vyspelých skôr diagnostika infekčných ochorení, ktoré sú svojim rozsahom finančne náročné. Indikovanie mikrobiologického vyšetrenia by malo byť uvážlivé. Neznamená to žiadať všetko, čo laboratórna sprievodka ponúka. Je účelné vyšetriť to, čo pomôže stanoviť diagnózu. Napriek tomu, že laboratórna diagnostika eliminuje subjektivizmus a možnosť individuálnej chyby zavedením štandardizovaných metód, algoritmov a kalibrovaných prístrojov, čím nahrádza opakovanú manuálnu a rutinnú (nie rutinérsku) prácu laboratórnych pracovníkov, každá biologická vzorka by mala byť individuálne posúdená vo výbere metodiky, načasovaní a predovšetkým interpretácii medicínsky vzdelaným mikrobiológom (Vandepitte, 2003).

Na splnenie tejto úlohy sú mikrobiologické laboratóriá vytvorené ako pracoviská vykonávajúce diagnostickú činnosť pre nemocničné zariadenia, ambulantných lekárov a nadstavbové činnosti. Komplexnosť práce a špecializácia laboratóriá by mala vzrastať od periférnych k stredným a centrálnym. Mikrobiologické laboratóriá predovšetkým v oblasti priamej diagnostiky zatiaľ nie sú v riziku stať sa automatmi na výsledky, ako to vidieť v niektorých veľkých laboratóriách integrujúcich všetky zložky laboratórnych SVLZ. Existuje však riziko tzv. „preťaženia z výsledkov“, ktoré je v skutočnosti plytvaním zdrojov. Výsledkov je toľko, že možno stratiť prehľad alebo odborný nadhľad a prestať sa v nich orientovať. Jedným z dôvodov je aj časový interval, ktorý uplynie od odberu vzorky po doručenie výsledku klinickému pracovníkovi.

Infekčné ochorenia sú najbežnejšou príčinou úmrtia a ich diagnostika spolu s liečbou predstavujú významnú výzvu pre zdravotníctvo vo všetkých krajinách. Vytvorenie technických a odborných štandardov pre diagnostické a výskumné laboratóriá sa po prvýkrát uskutočnilo v roku 1960 (WHO, 1977) na úrovni WHO. Po prvýkrát boli pokusy zaviesť štandardizovanú kontrolu kvality v roku 1981, keď WHO zaviedlo IEQASM – International External Quality Assessment Scheme for Microbiology (WHO, 2003).

Na diagnostiku infekčnej etiológie možno využiť dva základné princípy: priamu identifikáciu mikroorganizmu a nepriamy dôkaz infekčnej etiológie meraním špecifických markerov infekcie v sére a tkanivách.

Priama diagnostika etiologického agensa je vizualizácia mikroorganizmu, jeho súčastí alebo fyziologických vlastností postačujúcich na jeho identifikáciu. Zvyčajne s nie veľmi rozsiahlym spektrom diagnostických nástrojov možno uskutočniť kompletne mikrobiologické vyšetrenie, ktoré môže významne prispieť k procesu liečenia a starostlivosti o individuálneho pacienta stanovením etiologickej diagnózy. Schopnosť mikrobiologického laboratória uskutočniť tieto funkcie je limitovaná kvalitou vzorky odobranej od pacienta, transportom a technickými podmienkami umožňujúcimi demonštrovať mikroorganizmus vo vzorke. Metódy priamej diagnostiky sú vo väčšine prípadov založené na schopnosti mikroorganizmu rásť, preto podmienky transportu a kultivácie musia zabezpečovať životaschopnosť patogéna. Dôvodom izolácie životaschopného patogéna je okrem jeho identifikácie aj určenie antimikrobiálnej aktivity vybraných prípravkov použiteľných v terapii. Medzi základné metódy priamej diagnostiky vyvolávateľa infekcie patrí mikroskopia, kultivácia, molekulárna diagnostika a sérologická diagnostika antigénov a mikroorganizmov.

Použitie mikroskopu v mikrobiológii má dva základné ciele: prvotná detekcia mikroorganizmov a predbežná alebo definitívna identifikácia mikroorganizmu. Mikroskopické vyšetrenie klinickej vzorky sa používa predovšetkým na detekciu bakteriálnej bunky, plesní a ich častí, parazitov (vajíčka, larvy, dospelé formy) a vírusových inklúzií prítomných v infikovaných bunkách. Charakteristické morfológické vlastnosti sa môžu použiť na predbežnú identifikáciu väčšiny baktérií a definitívnu identifikáciu mnohých húb a parazitov. Mikroskopické určenie organizmov protilátkou značenou fluorescenčným farbivom alebo iným markerom sa používa na rýchlu identifikáciu mikroorganizmov. V lekárskej mikrobiológii sa podľa charakteristík mikroorganizmu a cieľov vyšetrenia môže použiť päť mikroskopických metód: svetelná mikroskopia (natívny preparát alebo farbený), mikroskopia v tmavom poli, mikroskopia s fázovým kontrastom, fluorescenčná mikroskopia, elektrónová mikroskopia (Gest, 2005).

Schopnosť mikroorganizmov (baktérií a húb) rásť na umelých médiách sa využíva pri kultivácii a zostáva aj v období rýchlych metód a molekulárnych techník dôležitou súčasťou všetkých laboratórií klinickej mikrobiológie. Pri mnohých ochoreniach je vykultivovanie mikroorganizmu z miesta infekcie definitívnou metódou identifikácie príčiny ochorenia. Úspech kultivačných metód je definovaný biologickými vlastnosťami organizmu, miestom infekcie, pacientovou imunitou a kvalitou kultivačného média. Biologické vzorky možno inokulovať na množstvo médií a ďalšie médiá sú potrebné na identifikáciu. Preto je dôležitý

precízny výber kultivačných médií a postupov predovšetkým vtedy, ak je objem vzorky malý alebo jej odber či opakovateľnosť odberu sú problematické. Preto je dôležité, aby mikrobiológ a klinik spolupracovali aj pri odbere najvhodnejšej vzorky v najvhodnejšom čase. V mnohých prípadoch to bude znamenať zvýšenie pravdepodobnosti izolácie a identifikácie etiologického agensa.

Kultivačné metódy sú zdrojom mikroorganizmu pre ďalšie testy vedúce k identifikácii kmeňa. Identifikačné metódy sú fenotypové a sú založené na dôkaze biochemických vlastností mikroorganizmov - obvykle enzýmov metabolizmu a nástrojov patogenity mikroorganizmov. Kolónie mikroorganizmov sú tiež substrátom pre moderný diagnostický postup založený na identifikácii proteínov - na proteomike (metódou MALDI TOFF),

Podobne ako u človeka aj v mikrobiológii možno použiť DNA, RNA alebo proteíny infekčného agensa v klinickej vzorke na jeho presnú identifikáciu molekulárnymi metódami a metódami proteomiky (Amann, 1995). V mnohých prípadoch možno etiologický agens takto dokázať, aj keď ho nebolo možné izolovať alebo identifikovať imunologicky. Výhodou molekulárnych techník je ich citlivosť, špecifickosť a bezpečnosť. Z pohľadu bezpečnosti tieto metódy nevyžadujú izoláciu a pomnoženie infekčného agensa. Možno ich uskutočniť aj na inaktivovaných alebo fixovaných vzorkách. Agens možno dokázať aj v prípade, ak sa nerozmnožuje v tkanivách. Táto technika umožňuje odlíšiť príbuzné kmene na základe rozdielov genotypov. Molekulárne metódy sú významné aj pri vyhľadávaní rezistentných kmeňov (mutantov), ktoré sa môžu odlišovať len v jedinom nukleotide. Vytvorením multiplexových systémov sa umožnila rýchla identifikácia etiologického agensu nastavením systému tak, že ponúka primery pre najčastejšie vyvolávatele z určitej biologickej vzorky (systém FilmArray, Idaho, Iridica), čím výrazne uľahčuje diagnostiku, skracuje ju na niekoľko hodín, spresňuje identifikáciu a posúva ju na úroveň druhu aj pri nezvyčajných etiologických agensoch. Napriek vysokým vstupným a často aj prevádzkovým nákladom sú významným ekonomickým prínosom na základe podstatného skrátenia diagnostického a terapeutického procesu. Umožňuje použiť veľmi ciele antimitikrobiálnu terapiu, pretože má potenciál identifikovať aj gény rezistencie. Znalosť vyvolávateľa znižuje potrebu aplikácie empirickej terapie a teda aj používania širokospektrálnych antibiotík, ktoré sú jedným aj keď nie jediným dôvodom nekontrolovateľného rastu rezistenice na antibiotiká.

Laboratórium testuje citlivosť mikroorganizmov na antibiotiká. Testujú sa len tie, ktoré sú schopné vyvolať ochorenia, a tiež len na terapeuticky využiteľné antimikrobiálne liečivá. Testovanie všetkých izolovaných mikroorganizmov alebo nevhodných liečiv môže viesť k nesprávnej interpretácii výsledkov s možnými nežiaducimi následkami. Nielen že pacient môže byť liečený nevhodne, ale skutočný patogén nemusí byť rozpoznaný. Výsledok *in vitro* stanovenia citlivosti je len laboratórny obraz pre odhad situácie v organizme. Virulencia mikroorganizmu, jeho množstvo, miesto infekcie a pacientova schopnosť odpovedať na infekciu ovplyvňujú interakciu pacienta a mikroorganizmu a musia sa brať do úvahy pri plánovaní liečby. Mikrobiologické vyšetrenia sú tiež základom pravidelného sledovania vývoja antibiotickej rezistencie. Môžu sa použiť ako podklady pre výber antibiotík, ktoré pripadajú do úvahy na empirickú liečbu. Sú zdrojom informácií na sledovanie trendov rezistencie, na odhalenie regionálnych rozdielov v rezistencii a na analýzu ich príčin.

Vzrast rezistencie mikroorganizmov na antibiotiká sa stáva stále významnejším a niektoré agensy dnes nie sú postihnuteľné dostupnými antibiotikami. Objavujú sa kmene, pri ktorých nie je k dispozícii žiadne známe antibiotikum alebo zostalo len jedno z celej škály (niektoré MRSA, *Pseudomonas aeruginosa*). Tento problém vznikol aj na základe nerozumných zásahov do ekológie človeka a mikroorganizmov, akými sú nadmerne a nesprávne indikované antibiotiká, používanie antibiotík v poľnohospodárstve, neprezieravá antibiotická politika v nemocniciach aj komunite a nerozumné požívanie širokospektrálnych antibiotík.

Empirické použitie antibiotík je možné pri dodržaní základných pravidiel racionálnej farmakoterapie. Antibiotiká (v užšom slova zmysle, resp. antibakteriálne antibiotiká) sa používajú pri infekcii spôsobenej baktériami. Rýchla identifikácia je možná na základe klinického obrazu, skúseností, ale aj pomocných vyšetrení, akým je napríklad stanovenie CRP, ktorého zvýšené hodnoty sú indikatívne pre vylúčenie vírusovej infekcie. S ohľadom na to, že väčšina najčastejších infekcií dýchacích ciest je vyvolaná vírusmi, a napriek tomu liečená antibiotikami, môže správne použitie a interpretácia vyšetrenia CRP pomôcť znížiť množstvo zbytočne podávaných antibiotík. Rovnako poznanie najčastejších vyvolávateľov infekcií, prirodzených rezistencií a stavu rezistencie v oblasti sú podkladom na zníženie spotreby antibiotík. Empirické použitie antibiotík musí byť podložené pravidelným testovaním a aktuálnym vyhodnotením stavu citlivosti etiologických agensov na vybrané antibiotiká v danom regióne. Spôsob, akým sa robí výber testovaných kmeňov, je s ohľadom na rozsah vyšetrovaných vzoriek rozličný. Treba splniť podmienky náhodného výberu (napríklad vyšetruje sa citlivosť len jeden týždeň v mesiaci alebo v určený deň v týždni).

Takýto spôsob je v súlade so záujmami pacienta a s racionálnym používaním antibiotík (Hoza, 2002; Hupková, 2010).

Antibiotická politika predstavuje súhrn odporúčaní pre účinné a bezpečné používanie antibiotík. Mikrobiologické vyšetrenie je významným nástrojom pre jej tvorbu. Cieľom pravidiel používania antibiotík je zabezpečiť požadovanú účinnosť a bezpečnosť antimikrobiálnej liečby, obmedziť vznik a šírenie rezistentných mikroorganizmov a znížiť spotrebu antibiotík. Antibiotiká sú lieky, ktoré majú eliminovať patogén a jeho pôsobenie a umožniť makroorganizmu, aby sa vlastnou obranyschopnosťou s infekciou vyrovnal. Aby sa mohli antibiotiká v terapii cielene využiť, mal by sa pôvodca infekcie dokázať a mala by sa zistiť jeho citlivosť na antibiotiká. Pre empirické použitie sa využíva znalosť aktuálnych a relevantných epidemiologických údajov o pravdepodobnej etiológii infekcie a o rezistencii možných pôvodcov. Bez rutinne a správne robených mikrobiologických vyšetrení sa to však nedá dosiahnuť (Steinman, 2003). V niektorých analýzach spotreby antibiotík a výskytu rezistencie v sledovaných lokalitách sa ukazuje, že intenzita expozície antibiotikám v komunite koreluje so vzrastom rezistencie. Existuje tiež veľa prác, v ktorých autori nedokázali koreláciu spotreby a rezistencie na ATB (Doczelová, 2004; Kafetzis, 2004; Winkelstein, 2001). Konkrétne fenomény rezistencie môžu byť vyvolané selekčným tlakom závislým od štruktúry spotreby a od kvantitatívneho zastúpenia jednotlivých skupín ATB. Ich odhalenie je možné vďaka pravidelnej analýze veľkého (štatisticky použiteľného) množstva vyšetrení stavu citlivosti vzoriek uskutočnených v mikrobiologickom laboratóriu.

Metódy využívajúce sérologické reakcie sú predovšetkým nástrojom nepriamej diagnostiky a používajú sa na dôkaz protilátkovej odpovede na infekciu alebo expozíciu infekčným agensom. Možno však nimi identifikovať vírusy alebo iné agensy, ktoré sa dajú ťažko izolovať alebo ich nemožno pomnožiť v laboratórnych podmienkach. Využívajú sa teda aj na detekciu, identifikáciu a kvantifikáciu mikrobiálnych antigénov v klinickej vzorke. Používajú sa tiež na bližšiu identifikáciu antigénov – sérotypizáciu – stanovením antigénovej štruktúry mikroorganizmov. Sérologické reakcie so zvýšenou citlivosťou sa používajú pri rýchlej diagnostike voľných antigénov v biologickom materiáli (napríklad v CSM, moči, krvi) napríklad latexovou aglutináciou. Špecifickosť interakcií antigénu s protilátkou a senzitivita rôznych imunologických techník určujú význam sérologických reakcií ako dôležitého laboratórneho nástroja.

Nepriama diagnostika etiologického agensa sa uskutočňuje dôkazom špecifických protilátok. Sérológia je veda zaoberajúca sa výskumom súčastí krvného séra a ostatných telesných tekutín. V praxi sa termín týka diagnostickej identifikácie protilátok v sére. Protilátky sa typicky tvoria ako odpoveď na infekciu (proti konkrétnemu mikroorganizmu, proti cudzorodým bielkovinám, proteínom alebo proti vlastným štruktúram (v prípade autoimunitného ochorenia). Sérológia sa v procese nepriamej diagnostiky používa na stanovenie histórie pacientových expozícií antigénom, na stanovenie priebehu infekcie alebo určenie typu infekcie (primárna infekcia alebo reinfekcia, akútna alebo chronická). Typ protilátok a ich koncentrácia poskytujú sérologické údaje o infekcii a jej štádiu. Koncentrácia protilátok sa spravidla uvádza kvantitatívne - v množstve medzinárodných jednotiek v jednom litri (IU/l). Relatívna koncentrácia protilátok sa uvádza ako titer. Titer je obrátená hodnota najväčšieho riedenia vzorky pacientovho séra, v ktorom sa dokázala reakcia antigénu s protilátkou. Sérologické reakcie sa používajú pri určovaní štádia infekcií na základe stanovenia protilátok proti rôznym typom antigénov vyvolávateľa. Prvé protilátky prítomné v priebehu infekcie sú nasmerované proti antigénom najväčšmi exponovaným imunitnému systému (povrchovým antigénom agensa, antigénom prítomným na povrchu infikovanej bunky). Neskôr v priebehu infekcie, keď sú bunky poškodené a nastáva ich lýza, sú protilátky nasmerované na proteíny a enzýmy prítomné intracelulárne. Sérologické testy pomáhajú aj pri diagnostike niektorých porúch imunity, predovšetkým súvisiacich s nedostatočnou tvorbou protilátok (napríklad [X-linked agammaglobulinémia](#), AIDS). V tomto prípade sú testy na prítomnosť protilátok, aj špecifických, negatívne – podobne, ako je test na identifikáciu špecifických IgA (používaných pri diagnostike akútneho ochorenia) negatívny pri najčastejšom imunodeficite (IgA imunodeficit).

Sérologické testy nie sú obmedzené len na krvné sérum, ale používajú sa aj pri detekcii protilátok, prípadne iných markerov v slinách, transsudáte, cerebrospinálnom moku, ejakuláte, punktáte. Podľa nálezu protilátok v nich alebo podľa vzájomného pomeru koncentrácií v sére a iných telesných tekutinách (najčastejšie v cerebrospinálnom moku) možno usudzovať na lokálne prebiehajúcu infekciu (príkladom je dôkaz intratekálnej tvorby protilátok pri infekciách CNS. .

Súbory výsledkov sérologických vyšetrení –imunologické prehľady – sú využívané pri príprave informácií o prevalencii ochorení v populácii alebo ako imunologické prehľady na stanovenie špecifickej imunity populácií či populačných skupín. Takéto prehľady sa uskutočňujú náhodným anonymným vyšetrením vzoriek odobraných na iné diagnostické

testovanie a vybraných podľa presne určených kritérií, prípadne odberom anonymných vzoriek podľa stanovených kritérií od dobrovoľníkov.

Odhad rizika výskytu prenosných ochorení vyžaduje sledovanie nielen individuálnej imunity jednotlivca, ale z dôvodu ochrany neimunizovateľnej a neimúnnej populácie aj sledovanie kolektívnej imunity. Takéto sledovanie je súčasťou systému epidemiologickej bdlosti – surveillance – prenosných ochorení. Sérologické testy môžu objektivizovať stav špecifickej imunity populácie pre určité ochorenie. Sú podkladom imunologických prehľadov, na základe ktorých možno identifikovať imunologickú diery alebo tendenciu vo vývoji špecifickej imunity určitej skupiny alebo celej populácie. Pravidelné imunologické prehľady umožňujú uskutočniť zmeny v imunizačných schémach pre ohrozené skupiny alebo celú populáciu. Môžu byť potvrdením správneho a účinného načasovania očkovacích schém. Podstatou dobrého imunologického prehľadu je zber vzoriek odobraných podľa požiadaviek na tvorbu štatistického súboru, ich vyšetrenie pomocou vhodného dostatočne citlivého špecifického a validného testu, správne vyhodnotenie výsledkov a ich interpretácia. Nevyhnutnosťou je šandardizácia pracovných postupov na všetkých úrovniach organizácie imunologických prehľadov, ale predovšetkým v mikrobiologickom laboratóriu (výber súboru, kódovanie vzoriek, odber, spracovanie, uchovanie vzoriek, transport, manipulácia so vzorkou, vyšetrenie, zaznamenanie a archivácia výsledku, štatistické spracovanie). Imunologické prehľady sa uskutočňujú s cieľom:

- jednorazového overenia prítomnosti protilátky v imunologicky neznámej populácii,
- zistenia dynamiky protilátok v určitom časovom období v rôznych vekových skupinách (odoberajú sa vzorky v jednom odberovom termíne),
- vytvorenia longitudinálneho prehľadu prospektívnym sledovaním koncentrácií protilátok u jednej stabilnej skupiny sledovaných počas dlhého obdobia (kohorta).

Pri výbere skupiny treba rešpektovať požiadavku na zloženie štatistického súboru. Odber krvi sa má uskutočniť vždy v rovnakých podmienkach. Jedna vzorka krvi sa spravidla použije na vyšetrenie viacerých parametrov, preto je množstvo odobranej krvi minimálne 5 ml tak, aby na každé vyšetrenie bolo aspoň 0,5 ml séra. Ku každému individuálnemu odberu musí byť vopred pripravený súbor dokumentov – dotazník, identifikačný štítok na odberovú súpravu, identifikačný štítok s kódom na všetky skúmanky pre každé vyšetrenie osobitne. Individuálny dotazník obsahuje všeobecné údaje, osobné údaje, epidemiologické údaje. Pre každú skupinu je pripravená aj spoločná epidemiologická charakteristika – výberové kritériá, na základe ktorých bola skupina vytvorená.

Špecifiká vyšetřovania vzoriek séra pre imunologické prehľady zahŕňujú:

- výber vhodnej metodiky na určenie daného typu protilátok (výber triedy protilátok, metodiky podľa typu protilátok – napr. KFR alebo VNT pri poliomyelitíde, IgG protilátky proti diftérii alebo antitoxické protilátky proti toxínu *Corynebacterium diphtheriae*),
- štandardné podmienky vo všetkých vyšetřovacích cykloch,
- štandardné podmienky počas celého vyšetřovaného obdobia,
- riešenie zmeny podmienok počas longitudinálneho sledovania (prepočet koncentrácií, tvorba indexov),
- kontrola kvality (vnútorná, vonkajšia, slepé vzorky, anonymita vzoriek),
- stanovenie koncentrácie protilátok pre pozitivitu testu,
- stanovenie koncentrácie protilátok zodpovedajúcej predpokladanej protektivitě pred vznikom ochorenia.

Interpretácia laboratórných výsledkov je činnosť, ktorá vytvára pridanú hodnotu každému mikrobiologickému vyšetřeniu. Očakávaný výsledok mikrobiologického vyšetřenia je ovplyvnený viacerými objektívnymi aj subjektívnymi faktormi a je len jedným z pomocných údajov, ktoré má k dispozícii klinický pracovník pri určení diagnózy a rozhodovaní o vhodnom terapeutickom postupe. Medzi faktory, ktoré priamo ovplyvňujú kvalitu mikrobiologického výsledku, patrí odber materiálu, jeho načasovanie a technika, transport biologickej vzorky, výber použitej metodiky, kvalita a úroveň všetkých činností laboratória a verifikácia výsledku. Spektrum vyšetření OKM je dané požiadavkami klinických pracovníkov. Úlohou mikrobiologických laboratórií je identifikovať vyvolávateľa ochorenia. Používa sa na to spektrum laboratórných postupov (mikroskopia, kultivácia, fluorescencia, enzýmová analýza, rádionuklidová analýza, sérologické metódy, metódy dôkazu NK a iné). Väčšina z nich sa nepoužíva výlučne len v mikrobiologickej praxi. Genetické metódy identifikácie mikroorganizmov patria do rúk mikrobiológa, rovnako ako stanovenie biochemických vlastností mikroorganizmov nie je doménou biochemického laboratória (Riordan, 2002). Samo vyšetřenie je jedným z celého radu úkonov, ktorých kvalita podmieňuje získanie správneho výsledku. Technické uskutočnenie vyšetřenia je vo veľkej miere dané kvalitou diagnostického setu a úrovňou laboratória, ktoré sa riadi princípmi GLP (good laboratory practice – správnej laboratórnej praxe). Interpretácia výsledku vo vzťahu k vyvolávateľovi ochorenia však patrí do rúk indikujúceho lekára a odborníka vo vlastnom odbore, pričom má k dispozícii konzultáciu s mikrobiológom (Thomson, 2004).

Prenatálny skrining na zistenie existencie intrauterinnej infekcie plodu alebo zamietnutie podozrenia na výskyt vakcináciou preventabilného ochorenia u očkovaného vyžadujú zodpovedný prístup, presný algoritmus a správnu interpretáciu získaných laboratórnych údajov. V našej populácii je povinné očkovanie proti vybraným vírusovým ochoreniam (rubeola, osýpky, parotitída). Existuje len minimálny počet žien vo fertilnom veku, ktoré neboli očkované proti rubeole a rovnako minimálny počet jednotlivcov nezaočkovaných proti ostatným uvedeným infekciám, prípadne tých, ktorí neprekonali tieto ochorenia v detstve. Nedá sa však vylúčiť možnosť, že v našej populácii existujú jednotlivci, ktorí nemajú protektívne protilátky (obyvatelia krajín, v ktorých sa neočkuje, individuálne chýbajúce očkovanie, imunodeficitní jednotlivci, non-responders). Títo ľudia sú v riziku vzniku akútnej infekcie a možnými vnímavými jednotlivcami, aj keď výskyt akútneho ochorenia je z epidemiologického hľadiska málo pravdepodobný. Existuje možnosť zavlečenia etiologického agensa z krajín, kde kolektívna imunita nedosahuje hodnoty dostatočné na zabránenie jeho šírenia (85 %). V takejto epidemiologickej situácii sa pri podozrení na výskyt vakcináciou preventabilného ochorenia, resp. pri prenatálnom skriningu na možnosť intrauterinnej infekcie vírusom rubeoly vyšetruje pacient na prítomnosť IgG protilátok (testovanie protektívnej imunity) a pri negatívite tohto testu sa testuje tá istá vzorka aj na prítomnosť IgM protilátok (skrining akútnej infekcie). Pozitivita IgM protilátok musí byť interpretovaná veľmi opatrne, v súvislosti s klinickým obrazom, epidemiologickou anamnézou a dynamikou koncentrácií protilátok. Pri interpretácii sérologických testov treba brať do úvahy aj dosiahnutú koncentráciu protilátok uvádzanú v medzinárodných jednotkách alebo aspoň indexy semikvantitatívnych hodnotení. Každý komerčný alebo v laboratóriu pripravený test má určitú hraničnú hodnotu (cut off) koncentrácie detegovaných protilátok alebo dosiahnutej extinkcie tvoriacu hranicu odlišujúcu pozitívny a negatívny výsledok. Hraničná hodnota testu stanovujúceho protilátky je spravidla určená na základe najčastejších hodnôt získaných pri vyšetrovaní veľkých súborov. Preto treba citlivo zvažovať výsledky v blízkosti hraničnej hodnoty. Hodnoty v rozmedzí 10 % nad a pod cut off uvádzajú tzv. sivú zónu charakterizujúcu nejasný výsledok. Uvádzanie sivej zóny v laboratórnom výsledku sa neodporúča, pretože zvyšuje mieru neistoty pri interpretácii. Sérologické testy majú určité objektívne aj subjektívne obmedzenia, ktoré treba brať do úvahy. Falošne pozitívny výsledok môže byť spôsobený skrížene reagujúcimi protilátkami vzniknutými po expozícii antigénovo podobným agensom. Pri niektorých ochoreniach a osobitne u tehotných žien nastáva tzv. polyklonálna aktivácia buniek (nešpecifická aktivácia buniek a tvorba polyklonálnych protilátok), pričom môže vzniknúť situácia, že pri testovaní na viaceré antigény sa objaví

niekoľko pozitívnych výsledkov (triedy IgM v oblasti nízko pozitívnych koncentrácií). Príčinou môže byť aj existencia reumatoidného faktora, protilátky typu IgM proti Fc fragmentu imunoglobulínu. Tieto nešpecificky reagujúce protilátky možno odstrániť v procese prípravy vzorky v laboratóriu (Doan, 2008).

Príkladom významu interpretácie výsledku testu je vyšetovanie prítomnosti infekcie HP. Je dôležité aj s ohľadom na dostupné očkovanie proti niektorým typom vysokorizikových kmeňov HPV. Nález takýchto kmeňov v biologickej vzorke pacientky treba interpretovať v súvislosti s lokálnym klinickým nálezom, ktorý jediný je určujúci pri rozhodovaní o ďalšom liečebnom alebo profylaktickom postupe (Hausen, 2002). Prítomnosť nízkorizikových kmeňov neznamená prítomnosť nerizikových kmeňov. Očkovanie proti HPV nesie pri nesprávnej informovanosti riziko „zlyhania“. Očkovanie neznamená, že bude možné obmedziť preventívne prehliadky, pretože vakcína pokrýva len niekoľko najčastejších a vysokorizikových kmeňov a môže zabrániť len infikovaniu kmeňmi obsiahnutými v očkovacej látke. V žiadnom prípade neznamená ochranu pred vznikom malígneho ochorenia u už infikovaných osôb. Je prevenciou vzniku infekcie (Sankaranarayanan, 2005).

4. MIKROBIOLÓGIA AKO NÁSTROJ SURVEILLANCE

Mnohé prenosné ochorenia sú úspešne kontrolované alebo boli dokonca eliminované vďaka preventívnym opatreniam. Napriek tomu sa objavujú faktory znamenajúce riziko vzniku epidémií mikrobiálneho pôvodu. Takými faktormi sú zmeny v ekológii mikroorganizmov, uplatňovanie sa nových patogénov, znovu sa objavovanie patogénov pôvodne kontrolovaných prístupmi na zabránenie vzniku a šírenia infekcií, účasť podmienených patogénov na chorobných procesoch ľudí prežívajúcich aj s významnými poruchami imunity (Weiberg, 2005).

Lekárska mikrobiológia tiež využíva pri svojej činnosti postupy, ktoré sú súčasťou epidemiologických metód práce, predovšetkým programu epidemiologickej bdelosti (surveillance). Jednou zo základných podmienok surveillance je presná identifikácia etiologického agensa sledovaného infekčného ochorenia. Epidemiologické prístupy využíva lekárska mikrobiológia aj v rámci surveillance a kontroly rezistencie na antibiotiká a poskytuje podklady pre surveillance a kontrolu nozokomiálnych infekcií.

Surveillance – program epidemiologickej bdelosti – je systém práce, ktorý má poskytnúť informácie pre ďalšie aktivity. Môže prebiehať na rôznej úrovni a týkať sa rozlične rozsiahleho problému (surveillance vývoja rezistencie vybraných patogénov v regióne na ATB, surveillance krvou prenosných ochorení v stomatologickej praxi, celoslovenská surveillance hemofilových infekcií, európska surveillance infekcií vyvolaných *Clostridium difficile* – ECDIS). Stratégia surveillance môže byť rozlične detailná. Existuje tzv. „plná“ verzia alebo „ľahká - light“ verzia (Weinberg, 2005). V plnej verzii je cieľom identifikovať všetky prípady výskytu ochorenia (celoslovenská surveillance hemofilových invázných infekcií). „Light“ verzia je koncipovaná tak, aby podľa modelového súboru bolo možné zovšeobecniť údaje pre celú populáciu (ECDIS).

Surveillance s použitím špecifických laboratórnych testov, môže byť veľmi účinná. Treba zvážiť prediktívnu silu surveillance alebo špecifického testu v rozličnom čase a rozličnom prostredí. Program treba vytvoriť tak, aby cieľom bola:

- skutočne riziková populácia,
- aktivita na vytvorenie preventívnych opatrení,
- dostatočná citlivosť a špecificita systému,
- úspešnosť aj z pohľadu očakávaní odbornej a laickej verejnosti (Weiberg, 2005).

Mikrobiologické laboratória disponujú veľkým množstvom údajov a je prakticky nemožné si všimnúť nahromadenie prípadov, sezónny charakter, zmenu distribúcie etiologických agensov, vývoj stavu rezistencie. Automatizovaný systém surveillance na detekciu zmien v incidencii mikroorganizmov diagnostikovaných na OKM vo vzťahu k rôznym premenným je dnes možný vďaka laboratórnym informačným systémom (LIS), ktoré sú viac alebo menej vhodné na vykonávanie štatistických analýz. Napriek týmto technickým možnostiam žiade laboratórny systém spravidla automaticky negeneruje takéto výstupy a neinformuje o zmenách štatistických charakteristík. Pokusy o vytvorenie programov, ktoré by boli inkorporované do laboratórneho informačného systému a so stanovenou pravidelnosťou by informovali o výstupoch porovnania výskytu izolovaných kmeňov a ich charakteristík na určitom oddelení, v určitom type materiálu, v určitej nemocnici, boli po prvýkrát publikované v roku 1992 (Dessau, 1993).

Systém môže byť nastavený podľa požiadaviek na vyhľadávanie a výstupom môžu byť informácie o možnom nahromadení, napríklad, gastroenteritíd, nozokomiálnych infekcií spôsobených určitým mikroorganizmom, sezónnych epidémií vyvolaných určitým etiologickým agensom. Systém môže zaznamenávať výskyt nezvyčajných mikroorganizmov. Takéto pravidelné zdroje informácií by znamenali kontinuálnu surveillance v zmysle bdlosti pri vyhľadávaní možných závažných situácií. Má tiež potenciál obsiahnuť rozsiahle množstvo údajov, ktoré môžu byť podrobené sledovaniu.

Väčšina surveillance infekčných ochorení je založená na činnosti laboratórií, ktorých úlohou je identifikovať alebo potvrdiť výskyt určitého etiologického agensa v súvislosti so sledovaným ochorením. Preto je účasť akreditovaných mikrobiologických laboratórií základnou podmienkou porovnateľných surveillance. Ich činnosť ovplyvňuje výsledky komplexnej činnosti surveillance a postupy používané v procese kontroly a prevencie infekčných ochorení. Základnou podmienkou pri plánovaní činnosti mikrobiologického laboratória v rámci surveillance je vytvorenie jednoduchých, dostupných, ľahko aplikovateľných štandardizovaných diagnostických postupov, ktorými možno v laboratóriách rôznych úrovní zozbierať porovnateľné informácie. Rovnako mikrobiologické laboratórium ako miesto kontinuálnej nešpecifickej surveillance na odhalenie emergentných, reemergentných mikroorganizmov alebo nezvyčajných nahromadení ochorení je začiatočným článkom v procese vývoja, aplikácie a vyhodnotenia špecifických intervenčných opatrení.

Mikrobiologické pracovisko môže poskytovať priebežne údaje o etiológii infekcie a o citlivosti baktériového pôvodcu na antibiotiká. Získaný výsledok sa pre časové obdobie,

ktoré uplynie od odberu vzorky po doručenie výsledku, nie vždy použije na voľbu alebo úpravu liečby pacienta. Má však zásadný význam pre overenie správnosti diagnózy, účinnosti nasadenej liečby a najmä pre zber dát o prevalencii pôvodcu daného typu infekcie a o aktuálnom stave rezistencie v spádovej oblasti (Hoza, 2005). Týmto spôsobom možno sledovať rast rezistencie, odhadovať včas jej vývoj, účinne zasiahnuť zmenou terapeutických postupov a znížiť percento neúspešnej liečby, a tým aj náklady na liečbu antibiotikami

Úroveň rezistencie mikroorganizmov na antibiotiká má výrazný regionálny charakter a empirické podanie antibiotika pri akútnej bakteriálnej infekcii možno akceptovať za predpokladu, že terapeutická rozvaha lekára rešpektuje pravdepodobného pôvodcu ochorenia a lokálny stav jeho rezistencie, najlepšie dodatočne overeným mikrobiologickým vyšetrením pacienta (NCCLS, 2003). Z uvedeného je zrejmý zásadný význam mikrobiologického vyšetrenia bakteriálnej infekcie pre overenie správnosti diagnózy, efektívnosti zvolenej terapie a pre získavanie údajov o prevalencii jednotlivých baktériových patogénov a ich rezistencii v spádovej oblasti praktického lekára. Pravidelné spätné informácie z mikrobiologických pracovísk prispievajú k cielenej voľbe antibiotika s čo najužším spektrom účinnosti na pôvodcu infekcie a môžu tak prispieť k obmedzeniu vzrastu rezistencie a k zníženiu nákladov na liečbu.

Mikrobiologické vyšetrenia a ich výsledky môžu byť zdrojom údajov pre surveillance a pri niektorých typoch laboratórnych surveillance sú najdôležitejšou súčasťou potvrdzujúcou výskyt ochorenia podľa etiologického agensa. Mikrobiologické pracoviská bývajú pravidelne súčasťou programov sledovania výskytu určitých ochorení, stavu rezistencie, nozokomiálnych infekcií alebo iných epidemiologicky závažných situácií.

Multidisciplinárne riešenie globálneho problému rezistencie bakteriálnych patogénov infekcií dýchacích orgánov na ATB má vysokú prioritu. V SR boli vytvorené organizačné predpoklady na realizáciu antibiotickej politiky ustanovením ústrednej, nemocničných a regionálnych komisií antiinfekčnej terapie. Národné referenčné centrum v súvislosti s uskutočňovaním úloh surveillance hemofilových infekcií spolupracovalo s vybudovanou sieťou mikrobiologických pracovísk. Priebežné a cieľavedomé monitorovanie rezistencie baktérií na antibiotiká môže ovplyvniť nepriaznivý vývoj a zabezpečiť komplexný prístup k zlepšeniu úrovne racionálneho používania antibiotík v ambulantnej, ale i nemocničnej praxi.

5 MIKROBIOLÓGIA AKO NÁSTROJ SPOLUPRÁCE

Lekárska mikrobiológia je medicínskym aj biologickým odborom a zaoberá sa štúdiom mikroorganizmov vrátane baktérií, vírusov, húb a parazitov, ktoré sú medicínsky významné a schopné spôsobiť ochorenie človeka. Jej súčasťou je štúdium patogenézy mikrobiálnych ochorení a ich indikátorov v kontexte s patologickými a imunologickými mechanizmami. Odbor je zameraný predovšetkým na nasledujúce činnosti:

- diagnostika etiologických agensov ochorení a uplatnenie vedomostí o mikroorganizmoch v prevencii a surveillance prenosných ochorení a ochorení s významným dosahom na verejné zdravie,

- diagnostická činnosť mikrobiologického laboratória.

Činnosť vykonávaná na oddelení klinickej mikrobiológie zahŕňa aj aktivity klinického mikrobiológa, medzi ktoré patrí:

- poskytovanie klinických konzultácií o vyšetreniach, diagnostike a liečbe pacientov s infekčnými ochoreniami spôsobenými mikroorganizmami,

- spoluúčasť na vytváraní a realizácii programov na zabránenie šírenia infekčných ochorení v celom rozsahu zdravotnej starostlivosti.

Okrem účasti na týchto základných aktivitách je klinický mikrobiológ často zapojený do výučby na všetkých úrovniach a pôsobí vo vedeckej oblasti, či už aktivitami v základnom, alebo aplikovanom výskume. Mikroorganizmy sa môžu zúčastňovať na vzniku ochorenia ktoréhokoľvek tkaniva, orgánu alebo systému ľudského tela. Preto konzultácie a spolupráca s klinikmi patria medzi pravidelné činnosti mikrobiológa. Mikrobiológia poskytuje zdroj vedomostí o pôvode a význame patogénov a prispela k viacerým objavom v oblasti lekárskeho výskumu. Vďaka poznaniu charakteristík infekčných agensov bolo možné uskutočniť výskum v oblasti liečby a prevencie, napríklad prípravou očkovacích látok proti smrteľným a ťažkým ochoreniam.

Lekárska mikrobiológia je aj veda o patogenéze mikrobiálnych infekcií a všeobecných postupoch laboratórnej diagnostiky infekčných ochorení. Klinická mikrobiológia je veda o uplatnení výsledkov lekárskej mikrobiológie v klinickej praxi a oddelenie klinickej mikrobiológie (OKM) je nemocničné alebo poliklinické laboratórium, ktoré poskytuje služby mikrobiologickej diagnostiky a konzultácie klinického mikrobiológa.

Lekár so špecializáciou v klinickej mikrobiológii vykonáva viaceré činnosti, ktoré majú klinický význam. Spolupráca s klinickými pracovníkmi zahŕňa každodenné konzultácie

s cieľom poskytnúť a uskutočniť v praxi využiteľné mikrobiologické vyšetrenie (Bhattacharya, 2010; Gavan, 1978). Konzultácie sa týkajú odberu vzorky, jej transportu, interpretácie nálezov farbených preparátov, významu predbežného a konečného výsledku v diagnostickom procese, antibiotikogramu a jeho interpretácie pri výbere vhodnej empirickej liečby, použitia testov citlivosti pri výbere kauzálnej liečby. V niektorých väčších moderných nemocniciach je táto činnosť úlohou klinického ústavného mikrobiológa (Riordan, 2002).

Na OKM tvorí táto konzultačná činnosť súčasť pracovnej náplne lekára mikrobiológa spolu s laboratórnou diagnostikou, počítačovým spracovaním, analýzou, tvorbou výstupov pre poisťovňu, tvorbou prehľadov činnosti, citlivostí na antibiotiká, kontrolou kvality. Konzultačnú činnosť v oblasti lekárskej mikrobiológie však spravidla nemôže uskutočňovať iný vysokoškolsky vzdelaný pracovník.

Pozíciu klinického nemocničného mikrobiológa alebo činnosti tomu zodpovedajúce na OKM môže vykonávať lekár so špecializáciou v odbore klinická mikrobiológia s klinickými skúsenosťami alebo vedecký pracovník. Klinické skúsenosti s diagnostikou infekčných ochorení môžu usmerniť použitie dostupných a hľadanie nových postupov s cieľom uskutočnenia rýchlej klinicky využiteľnej diagnostiky. Vedecký prístup umožňuje aplikáciu najnovších vedeckých poznatkov v klinickej praxi, čím sa posúva úroveň diagnostiky na vyššiu úroveň, čo je konečným cieľom vedeckého výskumu a znamená zavedenie vedeckých poznatkov do praxe (Gavan, 1978).

Bez ohľadu na technickú úroveň laboratória, činnosť a kvalifikáciu ostatných pracovníkov je lekár z odboru klinická mikrobiológia predstaviteľom koncepcie klinickej mikrobiológie. Jeho primárnou úlohou je poskytovať konzultačnú činnosť, ktorá spája laboratórne nálezy pacienta s jeho anamnézou a klinickým obrazom tak, aby interpretácia testov najlepšie vystihovala skutočnosť.

Úlohou mikrobiológa v prostredí nemocnice je poskytnúť dôležité informácie vedúce k pochopeniu patogenézy ochorenia na základe charakteristík mikroorganizmov a k výberu správnej terapie vďaka porozumeniu mechanizmom pôsobenia ATB a vzniku rezistencie vo vzťahu k infekčnému ochoreniu. Je to oblasť vedomostí, ktorá spája viaceré disciplíny vedy a medicíny; také postavenie má len málo medicínskych odborov v takomto rozsahu a s takýmto dosahom na zdravotnú starostlivosť. Nadhľad a syntéza sú súčasťou metódy prác, ktorej aplikácia pri riešení úloh vytvára benefit očakávaný od klinického mikrobiológa. Mikrobiologické laboratórium, ktoré poskytuje služby vzdialeným nemocniciam, im môže

poskytovať aj konzultačnú činnosť, i keď vtedy je určitým nedostatkom chýbajúca priama komunikácia (Bhattacharya, 2010).

Administratívne činnosti klinického mikrobiológa v laboratóriu sú zamerané na povinné oznámenie výskytu etiologických agensov, vykonávanie štúdií, surveillance ochorení, prehľadov citlivostí, na aktualizáciu informácií v LIS, prípravu materiálov pre komisiu pre racionálnu antibiotickú terapiu, ktorej je spravidla členom, na vytváranie odborných usmernení, poskytovanie informácií o činnosti pre zamestnávateľa, MZ, inštitúcie v oblasti verejného zdravia, poisťovne.

Vedecká činnosť a akademické pôsobenie je súčasťou práce mnohých klinických mikrobiológov. Aktívne sa zúčastňujú na vedeckej činnosti, vychádzajúc z praktických skúseností overovaním nových poznatkov a vedeckým spracovaním náhodných alebo opakovaných úkazov z laboratórnej praxe. Vytvárajú a vedecky overujú experimenty, ktoré sú založené na dlhodobých pozorovaniach v klinickej a laboratórnej medicíne. Takáto vedecká činnosť je prínosom a vedie k akademickému rastu pracovníkov, čím sa vytvára široká základňa pre primárny výskum na jednej strane a aplikáciu vedeckých poznatkov v praxi na druhej strane.

Vlastné vzdelávanie a výučba začínajúcich lekárov je opakujúcou sa činnosťou mikrobiológov pracujúcich na OKM. Letné praxe, stáže, pobyty pred špecializačnými skúškami, ktoré sa uskutočňujú takmer vo všetkých zdravotníckych odboroch, sa realizujú aj na OKM. Príprava a prezentácia prednášok na odborných fórach, seminároch a workshoppoch sú pravidelnou súčasťou odborných aktivít aj klinických mikrobiológov. Výučba malých skupín medikov, odborníkov pred špecializačnou skúškou sa uskutočňuje takmer počas celého roka. Praktická pomoc pri získavaní a analýze údajov, vyšetrovaní podľa vedeckých protokolov pre potreby záverečných, diplomových, dizertačných prác, vedeckých projektov, publikácií a prezentácií patrí medzi aktivity špecialistov v klinickej mikrobiológii (ASCP Task Force, 2008).

Ďalšie profesionálne a dobrovoľné aktivity sú náplňou práce klinického mikrobiológa. Niektoré sú potrebné pre jeho vedecký alebo akademický rast, pre ovplyvňovanie úrovne verejného zdravia na lokálnej alebo národnej úrovni, iné môžu priniesť zdroje pre ďalší rozvoj pracoviska, medzinárodné kontakty a prezentáciu pracoviska. Patria sem expertízne činnosti, platené služby, prednášky alebo štúdie pre výskumné pracoviská, farmaceutické spoločnosti

alebo spoločnosti venujúce sa vývoju či distribúcii diagnostík pre mikrobiológiu. Túto prácu môže vykonávať dobre riadené laboratórne pracovisko, ktoré má nielen technické vybavenie a personálne obsadenie, ale aj vhodné a priaznivé prostredie spĺňajúce podmienky kvality, bezpečnosti, obchodnej, administratívnej a finančnej istoty. Atmosféra dôvery, spolupatričnosti a kolegiality je len ďalšou výhodou.

Najdôležitejšia činnosť OKM – konzultačná činnosť – by mala byť k dispozícii sedem dní v týždni, čo môže byť finančne náročné a neprijateľné v podmienkach súkromného laboratória, ktorého úlohou je okrem všetkého horeuvedeného aj tvorba zisku. Dôsledné uplatňovanie je možné v podmienkach spojenia akademických výučbových základní s OKM v liečebno-preventívnom zariadení. Zdroje pre takéto činnosti možno získať pri uplatnení viac zdrojevého financovania (poisťovne, samoplatitelia, vedecké granty, spoluúčasť súkromných laboratórií formou vyčlenenia určitej časti príjmov na uskutočňovanie nadštandardnej, vedeckej a finančne náročnej činnosti pracovísk OKM). Takýto prístup umožní optimálnu a modernú laboratórnú službu v procese starostlivosti o pacienta.

Budúcnosť mikrobiológie by mohla byť významnejšia ako kedykoľvek doteraz, ak sa podarí zastaviť zahrnutie mikrobiológie medzi tzv. SVALZ a bude sa orientovať na činnosti, ktoré sú predmetom odboru klinická mikrobiológia založeného na laboratórnej činnosti. Klinický mikrobiológ bez priamej účasti na laboratórnej mikrobiológii nemôže mať vplyv na rozsah činnosti, ktoré sa od neho očakávajú. Objavovanie sa nových, ale aj starých, zabudnutých patogénov, rozširovanie antimikrobiálnej rezistencie, bezpečnosť potravín, bioterorizmus, starnutie populácie a jej náchylnosť na bežné ochorenia, problémy verejného zdravia súvisiace s pohybom svetovej populácie – to všetko sú podmienky, ktoré ukazujú na akútnosť potreby odborníkov v laboratórnej, lekárskej a klinickej mikrobiológii (Thomson, 1995).

Oddelenia klinickej mikrobiológie prosperujú vďaka privatizácii a novým molekulárnym technológiám, ktoré sa používajú na detekciu patogénov a antimikrobiálnej rezistencie. Konflikt medzi dvoma skupinami pracovníkov v mikrobiológii – lekármi a inými vysokoškolsky vzdelanými mikrobiológmi – nemôže priniesť rozvoj odboru, ale len jeho spomalenie. Vysokoškolsky vzdelaný mikrobiológ - nelekár (laboratórny technik, magister laboratórnych vyšetrovacích metód, pracovník veľkých laboratórnych celkov) prináša do odboru vynikajúce vedomosti týkajúce sa diagnostiky a je schopný využívať najmodernejšie

technické poznatky a objavy a aplikovať ich v oblasti vyšetrovania vzoriek a identifikácie mikroorganizmov. Má však len minimálne vedomosti o patogenéze infekčného ochorenia a úlohe mikroorganizmu v jednotlivých fázach jeho vývinu. Mikrobiológ – lekár nemusí vždy disponovať technickým zázemím, ale pozná klinické následky interpretácie výsledku testu. Mikrobiologický výsledok, či už je získaný konvenčne, alebo modernými spôsobmi, musí byť interpretovaný adekvátne podľa použitej metódy a na základe ostatných charakteristík pacienta a jeho ochorenia.

Základom zlepšovania činnosti OKM bol aplikovaný alebo základný výskum uskutočňovaný v priebehu a prostredníctvom klinického testovania. Tento výskum bol financovaný komerčnými výrobcami laboratórneho vybavenia, diagnostík alebo farmaceutickým priemyslom. Udržanie produktívnych vzťahov a pokračovanie v klinickom výskume je významnou súčasťou dnešných úloh finančne úspešného laboratória (súkromného alebo nie), ktoré chce poskytovať služby na kvalitnej úrovni nelimitovanej podmienkou zisku. Je náročnou úlohou zabezpečiť zdroje pre klinické testovanie (poisťovňa, samoplatitelia) a udržanie výskumného programu.

Nevyhnutnou súčasťou práce špičkového mikrobiologického pracoviska sú klinické konzultácie. Ďalšie činnosti sú vzdelávanie, získavanie zdrojov prostredníctvom obchodných plánov na viaczdrojové financovanie rozvoja a výskumu, zvyšovanie odbornej úrovne zamestnancov, poskytovanie klinických, administratívnych, výučbových a vedeckých služieb, spolupráca s klinickými pracovníkmi a laboratóriami. Majú za cieľ vytvorenie a zavedenie nových technických metód s dobrou klinickou interpretáciou a účasť na odbornej diskusii a legislatívnom procese smerujúcom k zlepšeniu zdravotnej starostlivosti o pacienta prostredníctvom dostupných opatrení.

Informácie o úlohách klinickej a lekárskej mikrobiológie a potrebe expertov v tejto oblasti treba posunúť do tried a učební. Nedostatok vedomostí, finančná, spoločenská či profesionálna neatraktivnosť spôsobujú nedostatočný záujem o túto oblasť vedy a medicíny. Nové metódy práce profesijných inštitúcií a väčšia viditeľnosť súčasných mikrobiológov by mohli prispieť k vytvoreniu novej generácie mikrobiológov.

1. na vlastnú vedeckú činnosť v oblasti sledovania nástrojov patogenity a imunogénnych štruktúr mikroorganizmov,

2. v oblasti diagnostiky na:

- možnosti mikrobiológie pri potvrdení infekcií v diagnostickom procese vytvorením a použitím nových diagnostických postupov,
- úlohy mikrobiológa pri interpretácii získaných výsledkov,
- význam stanovenia individuálnej citlivosti na ATB a
- interpretáciu prehľadov citlivostí pre účelnú farmakoterapiu a ovplyvnenie vývoja rezistencie mikroorganizmov na ATB,

3. na možnosti a aktivity kladené na mikrobiológiu, mikrobiologické laboratórium a mikrobiológa v programoch epidemiologickej bdelosti (surveillance),

4. na úlohu mikrobiológie pri zabezpečení laboratórnych činností, pri konzultáciách, výbere diagnostického postupu a interpretácii výsledkov súvisiacich s vedeckou prácou v iných medicínskych odboroch zameraných na ochorenia s mikrobiálnou etiológiou.

Mikrobiológ sa v rámci vlastnej vedeckej práce venuje výskumu baktérií, vírusov, húb, parazitov ich patogenéze, citlivosti na antimikróbovú terapiu, diagnostickým postupom a iným oblastiam. Často je tiež požiadaný o spoluprácu pri zabezpečení vyšetrovania vzoriek pre výskumné projekty, vedecké práce, dizertačné, diplomové a záverečné práce kolegov a študentov z viacerých medicínskych odborov. To platí aj pre rôzne odborné publikácie, prezentácie, články, prednášky, v ktorých sú publikované a analyzované nové, experimentálne alebo zaujímavé informácie o výskyte, diagnostickom a terapeutickom postupe, použití nových liečebných metód ochorení spôsobených mikroorganizmami. Spravidla je účasť mikrobiológie súčasťou metodiky vedeckej práce. Podľa charakteru práce je prínos mikrobiológa v týchto prácach tiež zvyčajne inovatívny, experimentálny alebo využívajúci výsledky vlastného vedeckého výskumu či praktických skúseností. Preto býva mikrobiológ často súčasťou autorského kolektívu, spoluautorom publikácie alebo tým, ktorému sa v práci venuje poďakovanie. Nájde sa aj ojedinelá výnimka, keď sa napríklad publikácia o výskyte infekčnej keratokonjunktivitídy zaoberá bez údajov o spôsobe stanovenia etiologickej diagnózy.

Najčastejšími partnermi a najbližším spolupracovníkmi alebo najvernejšími klientmi pre mikrobiológa sú infektológovia, pediatri, epidemiológovia a lekári z odboru verejného zdravotníctva. Zaujímavé kazuistiky, dôkaz nezvyčajných infekcií (importované nákazy) sú oblasťami, kde sa vďaka blízkym kolegiálnym vzťahom podarilo dospieť k diagnostickému úspechu. Takáto spolupráca sa začína spravidla v období predatestačných a nástupných praxí

budúceho mikrobiológa na infekčnom oddelení. Rovnako prax klinického pracovníka na mikrobiológii, nech už by sa zdala akokoľvek nedôležitou pre praktickú činnosť v budúcnosti, je významná pri vytváraní priamych kontaktov a poznaní prostredia, úskalí a možností laboratórnej diagnostiky mikroorganizmov.

Pri použití celej škály diagnostických postupov sa mikrobiologické vyšetrenie alebo sérologický dôkaz špecifických protilátok stávajú diagnostickými pre určenie suspektného etiologického agensa ako vyvolávateľa ochorenia. Sérologické testy majú význam pri diferenciálnej diagnostike. Výber testov (identifikačné alebo sérologické) a načasovanie odberu vzoriek vyžadujú úzku spoluprácu mikrobiológa a infektológa, ktorá umožní spojenie klinických príznakov s poznatkami o štádiách patogenézy konkrétneho vyvolávateľa. Osobitne náročné je to pri parazitárnych ochoreniach.

Diagnostika parazitárnych nákaz má v mnohých smeroch zásadné odlišnosti od bakteriálnych a vírusových nákaz. Je to dané tým, že parazitárne agensy patria do živočíšnej ríše, pričom väčšina z nich prekonáva komplikovaný životný cyklus so striedaním dvoch i viacerých hostiteľov. Dôkladne poznanie biológie parazita je teda podstatné pre poznanie symptomatológie, patogenézy choroby, ale najmä diagnostiky a terapie. Pri nejednoznačnosti alebo absencii klinických príznakov sú hlavnou a často jediným spôsobom dôkazu parazitárnej nákazy metódy laboratórnej diagnostiky.

V lekárskej parazitológii je diagnostika ochorenia na základe klinických prejavov, s ohľadom na ich rozmanitosť, spravidla veľmi ťažká. Preto spoľahlivou a často jedinou cestou určenia správnej diagnózy sú metódy laboratórneho dôkazu. Špecifická laboratórna technika umožňuje priamy dôkaz a lokalizáciu parazita v tele človeka. Ak nie je možný priamy dôkaz, používajú sa tzv. nepriame metódy, opierajúce sa o dôkaz protilátok. Prepatentné štádium – obdobie, keď sa parazit po nákuze dá laboratórne dokázať z biologického materialu. Lekár nemusí detailne poznať správanie parazita v tele človeka. Je to však dôležité pre správne indikovanie spôsobu, množstva, frekvencie, lokalizácie, vhodného času odberu biologického materiálu a vyšetrenia. V lekárskej parazitológii platí: jediné vyšetrenie nestačí, najmä pri negatívnom výsledku. Existujú tzv. negatívne fázy infekcie, keď parazita vo vyšetřovanom materiáli nemožno nájsť, hoci nákaza pretrváva.

V čase intenzívnej migrácie svetového obyvateľstva, či už z turistických, ekonomických,

sociálnych alebo profesionálnych dôvodov, sa zvyšuje možnosť zavlečenia nových infekčných agensov do SR alebo výskytu importovaných nákaz u obyvateľov, migrantov či návštevníkov. Mikrobiologické pracoviská a mikrobiológovia majú byť pripravení na diagnostiku aj nie bežných infekcií, čo vyžaduje teoretickú pripravenosť, ale aj manažment aktivít na zabezpečenie vhodných dostupných a včasných diagnostických postupov. Takéto emergentné infekcie bývajú často akútne s potenciálom vyvolať atmosféru strachu. V posledných rokoch vzrastajú počty cudzích štátnych príslušníkov prichádzajúcich pracovať na Slovensko.

V mikrobiologických laboratóriách sa stretávajú vzorky na identifikáciu etiologických agensov z celého regiónu a ich množstvo je veľmi veľké. Jednotlivý výsledok potrebný na zvládnutie ochorenia individuálneho pacienta je neopakovateľný a jedinečný pre dané ochorenie a jeho fázy. Súbor všetkých vyšetrení alebo len niektorých vybraných podľa presne stanoveného diskriminačného kritéria je dôležitým zdrojom informácií pre vedeckú alebo praktickú činnosť v oblasti sledovania charakteristík hromadného výskytu ochorení alebo identifikácie nových vlastností v procese šírenia infekčných ochorení. Preto je epidemiológia odborom veľmi úzko spolupracujúcim s mikrobiológiou.

Opatrenia, postupy a zákony, ktoré sú súčasťou ochrany zdravia v jednotlivých oblastiach života človeka, sú predmetom štúdia a náplňou odborov hygieny a verejného zdravotníctva. Určovanie ich aktuálnosti, účinnosti, vyhodnocovanie situácií s cieľom dokázať potrebu ich obnovy sú náplňou práce odborníkov v oblasti verejného zdravotníctva a hygieny. V oblasti prevencie, profylaxie a kontroly účinnosti opatrení na zabránenie vzniku prenosných ochorení mikrobiálnej etiológie je účasť mikrobiológa nevyhnutná. Mikrobiológ spolupracuje pri objektivizácii faktorov vonkajšieho prostredia a určení významu mikroorganizmov pri ich zmene. Medzi najčastejšie oblasti patrí sledovanie endemizácie rezistentných kmeňov v prostredí, podiel kontaminovaných materiálov, nástrojov a manipulácie s nimi v procese šírenia infekcie a charakteristika vlastností mikroorganizmov pre možnosť ich prežívania v prostredí alebo pre kolonizáciu personálu či pacientov. Účasť mikrobiológa je aktívnejšia pri sledovaní a charakterizovaní nových vlastností mikroorganizmov, ako aj pri identifikácii skutočných rizík na základe objavenia meniaceho sa patogénneho potenciálu, virulencie kmeňov a ich nástrojov. V kontexte súčasných ekologických, zdravotných a sociálnych podmienok je takáto aktívna účasť nevyhnutná pri správnej interpretácii výskytu emergentných, reemergentných mikroorganizmov či mikroorganizmov s potenciálom

6. IMUNOSÉROLÓGIA INFEKČNÝCH CHORÔB

Imunodiagnostika infekčných ochorení je v súčasnosti v centre záujmu vzhľadom na významné rozšírenie v praxi využívaných moderných automatizovaných vyšetrovacích systémov a modulov. Špecializované imunoserologické laboratória oddelení klinickej mikrobiológie, ktorých je žiaľ čoraz menej a z rôznych dôvodov sa stávajú súčasťou konglomerátov laboratórnych oddelení SVLZ, si niekedy len veľmi ťažko zachovávajú svoju identitu v prítomnosti rýchlych a počítačom riadených analyzátorov. Napriek nevyhnutnosti eliminovať subjektivismus a možnosť individuálnej chyby zavedením šandardizovaných metód a napriek efektívnosti zavádzania automatizovaných prístupov nahradzujúcich manuálnu a rutinnú (nie rutinérsku) prácu zdravotníckeho personálu, každé vyšetrenie každej biologickej vzorky by malo byť individualizované vo výbere metodiky, načasovaní a predovšetkým interpretácii. V období, keď existujú automaty, ktoré za hodinu vykonajú analýzu 800 až 1000 vzoriek na takmer akýkoľvek biochemický, hematologický, imunologický či sérologický parameter, ktorý ošetrojúci lekár indikuje – a niekedy aj nie (vrátane molybdénu v slzách – čo je vžitý termín pre indikáciu klinicky nerelevantného laboratórneho vyšetrenia), je reálne riziko tzv. „results overload“ – preťaženia laboratórnymi výsledkami. To sa stane, keď ponuka presahuje možnosti využitia a interpretácie. Je to situácia, kedy je výsledkov toľko, že pri súčasnom niekedy aj alibistickom prístupe, ku ktorému lekárov často privádza nezodpovedajúce postavenie v spoločnosti, je možné stratiť prehľad alebo odborný nadhľad. Indikovať vyšetrenie neznamenať žiadať všetko, čo laboratórna sprievodka ponúka. Indikovať vyšetrenie znamená prísť na to, čo je účelné vyšetriť a čakať na výsledok, lebo ten ovplyvní rozhodovanie. Existujú rutinné bežné vyšetrovacie postupy, kde nemusí lekár dlho uvažovať a vďaka vzdelaniu, praxi a vedomostiam vie okamžite, čo potrebuje. Je to ako s jedlom. Niekedy stačí trochu sa najesť v reštaurácii rýchleho občerstvenia, ale niekedy potrebujeme, aby nás špičkoví profesionáli hýčkali a kompletne obslúžili napríklad ako u Maxima.

Tieto skriptá sú zamerané na všeobecnú charakteristiku možností imunodiagnostiky v oblasti infekčných ochorení, identifikáciu možných postupov, podmienok, ktoré ovplyvňujú výber metodiky, jej využitie pre stanovenie štádia ochorenia a v rámci imunodiagnostiky infekčných ochorení. V pripravovanej druhej časti budú detaily laboratórnych postupov pri dôkaze mikrobiálnej etiológie vybraných ochorení, ich indikácie a interpretácia.

6. 1 Princípy imunitnej odpovede využiteľné v sérologickej diagnostike

Baktérie

Imunitná odpoveď na **extracelulárne baktérie** musí reagovať na všetky mechanizmy mikroorganizmu používané pri vniknutí a invázii do ľudského organizmu s cieľom vyvolania ochorenia. Špecifická imunitná odpoveď zahŕňa predovšetkým tvorbu protilátok proti štrukturálnym antigénom (proti puzdrovým polysacharidom, povrchovým antigénom) alebo molekulám uvoľňovaným živou baktériou alebo po jej rozpade (exotoxíny, extracelulárne enzýmy). Špecifické protilátky proti niektorým typom bakteriálnych antigénom sú protektívne (napr. antikapsulárne protilátky proti PRP Hib) a ich prítomnosť v dostatočnej koncentrácii stačí na zabránenie šírenia infekcie, iné sú neutralizujúce a bránia tkanivovému poškodeniu hostiteľa (protilátky proti tetanickému alebo difterickému toxínu). Väčšina z nich má diagnostický význam svedčiaci pre prítomnosť mikroorganizmu alebo pre typ vyvolaného ochorenia. Aktivácia komplementu prispieva k úspešnej opsonizácii či už za prítomnosti špecifických protilátok alebo bez nej. MAC – membrane attack complex, vytvorený na povrchu bunkovej membrány ako konečný produkt aktivácie komplementovej kaskády narušuje štruktúru membrány niektorých gram negatívnych baktérii, čo vedie k ich lýze (*Neisseria meningitidis*). Aktivácia komplementu je potrebná na uvoľnenie chemotaktických faktorov (C5) a ich pritiažnutie do miesta infekcie. Endotoxín uvoľňovaný zo steny gram negatívnych baktérii alebo prítomný v mieste infekcie v čase masívneho množenia (*N. meningitidis*) aktivizuje komplementovú kaskádu alternatívnou cestou bez prítomnosti protilátok. Môže spôsobiť degranuláciu PMNL a uvoľnenie cytokínov s výraznými biologickými účinkami, ktoré v dostatočnej koncentrácii plnia úlohy nešpecifickej imunity. Pri neliečenej gram negatívnej infekcii alebo vysokých koncentráciách voľného endotoxínu v cirkulácii môže dôjsť k rýchlemu nástupu potenciálne letálnych účinkov tvoriacich klinický obraz endotoxínového šoku.

Imunita na **intracelulárne** patogény je primárne bunkového typu, popisovaného ako IV. typ hypersenzitívnej reakcie - opozdená precitlivosť T bunkového typu, zahŕňajúca lymfocyty, cytokíny a makrofágy. Existujú len 2 typy prístupov ako dokázať tento typ špecifickej hypersenzitivity. Je to in vivo uskutočnený kožný test stanovujúci reakciu na intradermálne podané purifikované antigény (tuberkulínový test) alebo in vitro uskutočňovaný klasický test transformácie lymfocytov po podaní purifikovaného antigénu. Iným in vitro testom v súčasnosti bežne používaným na dôkazy latentnej infekcie baktériou *Mycobacterium tuberculosis* je test IGRA - interferon gama release assay. Obidva tieto testy musia byť

interpretované veľmi citlivo vzhľadom na vysoké riziko nešpecificky falošne negatívnych výsledkov pri imunosupresii u pacientov s infekciou i.c. baktériami. Protilátky pokiaľ sú vytvorené pri infekcii intracelulárnymi patogénmi môžu byť diagnostické, obvykle ale neplnia protektívnu úlohu a nie sú znakom špecifickej imunity.

Vírusy

Protilátky (imunoglobulín G – IgG a imunoglobulín M – IgM) sú schopné naviazať sa priamo na extracelulárne umiestnené vírusy a ich antigénne derminanty (epitopy) a zabrániť väzbe vírusu na cieľovú bunku. Ak vírus spôsobuje virémiu, sú produkované neutralizujúce protilátky. Tie môžu byť dvojakého typu – na komplemente nezávislé a komplement stimulujúce. Protilátky typu IgM, IgA a IgG sú schopné neutralizovať infekčnú aktivitu všetkých známych vírusov, pokiaľ sa nachádzajú v mieste ich pôsobenia. Intracelulárne alebo vertikálne sa šíriace vírusy nie sú ovplyvnené neutralizujúcim účinkom protilátok (a unikajú pred imunitou hostiteľa). Protilátky tiež znižujú infekčnosť vírusov prevenciou ich uchytenia na špecifické receptory cieľovej bunky alebo vytvorením konformačných zmien vírusovej štruktúry, ktorá podporuje agregáciu - zhlukovanie. Agregácia uľahčuje efektívnejšiu elimináciu mechanizmami závislými na protilátkyňach akými je opsonizácia, aktivácia komplementovej kaskády alebo oboje. Vírus hepatitídy B je príkladom vírusu, ktorý môže byť eliminovaný protilátkami sprostredkovanou imunitou aj v čase ich uvoľňovania do krvi z cieľového tkaniva, v ktorom sa pomnožujú (sekundárna virémia). Pri niektorých infekciách však protilátky proti vírusovým proteínom môžu pôsobiť imunopatologicky. Napríklad sérové protilátky proti RSV – respiračno syncyciálnemu vírusu, ktoré nie sú protektívne, a ak sú súčasťou špecifickej transplacentárne pasívne prenesenej imunity od matky, môžu spôsobiť ochorenie z imunokomplexov – III. typ hypersenzitívnej reakcie tzv. Arthusova reakcia v pľúcach novorodenca po postnatálnej infekcii RSV. Podobný účinok preformovaných antivírusových protilátok sa popisoval po následnej infekcii vírusom osýpok ako aj po neskoršej infekcii divokým vírusom morbil pacienta očkovaného starším typom živej vakcíny proti morbilám. Imunitná odpoveď na intracelulárne a vertikálne sa šíriace vírusy je obvykle prejavom bunkami sprostredkovanej cytotoxicity. Cytotoxické efektorové bunky rozpoznávajú zmeny povrchových antigénov, ktoré boli spôsobené vírusovou infekciou. Endogénne zmenené antigény sú prezentované prostredníctvom MHC I molekuly na povrchu infikovanej bunky špecifickým T lymfocytom alebo nešpecificky aktivizujú cytolytické prirodzené zabíjače (natural killers) a makrofágy. Na protilátkach závislá bunkami

sprostredkovaná cytotoxicita ADCC (antibody dependent cell mediated cytotoxicity) je tiež účinným mechanizmom antivírusovej cytotoxicity

Huby

Imunita pri ochoreniach vyvolaných patogénnymi a medicínsky významnými hubami (kvasinkami a plesňami) je primárne sprostredkovaná bunkami. Detekcia špecifických IgM a IgG protilátok proti niektorým hubám vyvolávajúcim systémové postihnutie prípadne súvisiace s fungémiou môžu prispieť k stanoveniu diagnózy. Tieto protilátky však nemajú protektívne účinky. Dokazujeme ich najčastejšie imunoprecipitačnými metódami.

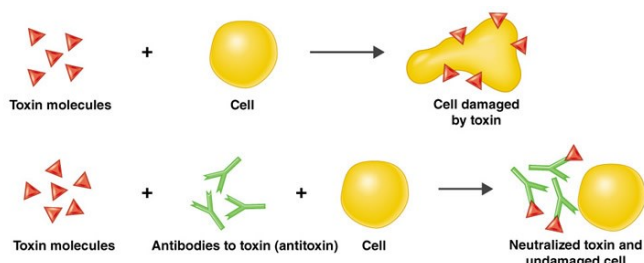
Parazity

Parazity (prvky a červy) vyvolávajú rôzne prejavy imunitnej reakcie. Infekcia červami je charakterizovaná tvorbou predovšetkým IgE protilátok. Červy špecificky stimulujú CD4+Th1 - T helper lymfocyty, ktoré produkujú IL-4 a IL-5. Cytotoxicita závislá na protilátkach (antibody dependent cell cytotoxicity ADCC) prostredníctvom eozinofilov a IgE sa považuje za účinnú pri eliminácii červov, pretože hlavný bazický protein v granulách eozinofilov je toxický pre červy. Pokrytie červov špecifickými IgE protilátkami a následné naviazanie eozinofilov cez Fc fragment molekuly IgE vedie k likvidácii červov eozinofilmi prostredníctvom ADCC. Niektoré parazity produkujú vajíčka, ktoré indukujú tvorbu granulómov (*Schistosoma mansoni*). v niektorých orgánoch – napr. v pečeni. Stimulované CD4+T lymfocyty aktivujú makrofágy, čo vedie k tvorbe granulomov a izolovaniu vajíčok od ostatného tkaniva. Tvorba fibrózy preruší zásobovanie venóznou krvou v pečeni s následnou hypertenziou a cirhózou. Intracelulárne protozoa často aktivujú špecifické cytotoxické T bunky. Je to kľúčový moment napríklad pri zabránení diseminácie intracelulárne lokalizovaných plazmódii pri malárii. Imunokomplexy tvorené protilátkami a parazitárnym antigénom môžu byť zachytávané cievami v mikrocirkulácii obličiek a viesť ku glomerulonefritide z imunokomplexov.. Parazity živočíchov si vytvorili pozoruhodné mechanizmy obrany vedúce k nastoleniu chronických infekcií predovšetkým u stavovcov. Prvky prirodzenej obrany proti parazitom sú veľmi slabé a neúčinné. U parazitov sa vyvinuli dômyselné mechanizmy ako uniknúť špecifickej imunite hostiteľa.

6.2 Základné pojmy laboratórneho dôkazu mikrobiálnej etiológie ochorenia

Priama diagnostika je určená na zviditeľnenie resp. dokázanie prítomnosti etiologického agensa alebo jeho súčastí. Používajú sa na to rôzne postupy, ktoré sú ale individuálne vhodné podľa typu mikroorganizmu a štádia ochorenia. Patria sem mikroskopické a kultivačné metódy baktérií, húb a parazitov, dôkaz antigénov (sérologickými resp. imunodiagnostickými metódami popísanými ďalej), dôkaz nukleovej kyseliny (PCR metódy), identifikácia proteínov (Malditoff, proteomika), izolácia vírusov a dôkaz ich patogénnych vlastností (cytopatický efekt, interferencia, neutralizácia).

Nepriama diagnostika - je založená na detekcii špecifických protilátok rôznych izotypov (IgG, IgA, IgM) a funkcií (neutralizačné, komplement fixačné), ktoré sú produkované hostiteľom v rôznom období a množstve v rámci imunitnej odpovede na infekciu. Pôvodné pomenovanie sérologické reakcie vystihovalo prostredie, v ktorom sa protilátky dokazovali. Dnešné pomenovanie - imunodiagnostické metódy - zdôrazňuje skutočnosť, že protilátky sú nástrojom imunity. Laboratórne postupy využívajúce **sérologické reakcie** alebo imunodiagnostické prístupy sú vždy založené na reakcii antigénu so špecifickou protilátkou v určitom prostredí.



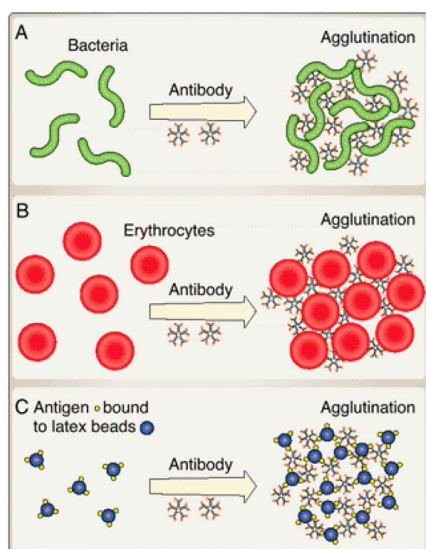
Neutralizácia - protilátky sa naviažu na toxín, čím dôjde k obsadeniu antigénnych štruktúr, ktoré sa nemôžu naviazať na špecifické receptory cieľovej bunky, čím je neutralizovaná funkcia toxínu

Jednotlivé súčasti sérologickej reakcie môžu mať rôzne charakteristiky, čo určuje ich použitie:

- **antigén** môže byť napríklad korpuskulárny, rozpustný, elektroforeticky alebo ináč separovaný a fixovaný, rekombinantný...
- **protilátky** môžu byť rôznych izotypov alebo sú celkové, monoklonálne, protektívne, neutralizujúce ...
- **prostredie**, v ktorom prebiehajú reakcie je základom pre vizualizáciu výsledku a rôznorodosť prostredí daná ich fyzikálnymi a chemickými charakteristikami určuje

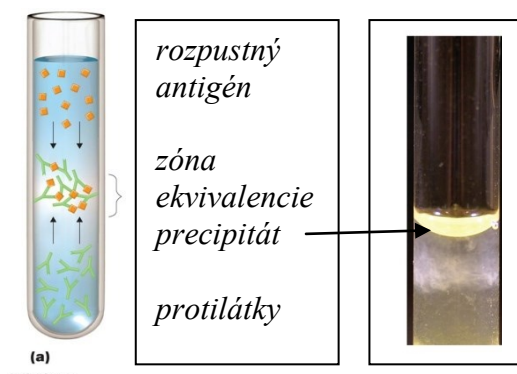
rozmanitosť dostupných diagnostických metód a postupov, pričom každá z nich má svoje opodstatnenie a presnú indikáciu.

Pri dôkaze protilátok proti korpuskulárnemu antigénu - napríklad baktérii v tekutom prostredí sa používajú aglutinačné metódy. Ich špecifická a senzitivita sa zvyšuje naviazaním antigénu (alebo protilátky) na nosič, čo je základom hemaglutinačných, resp. latexaglutinačných metód.

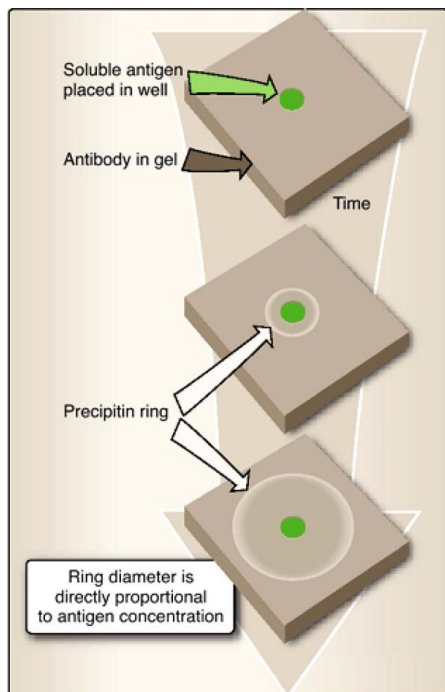


Protilátky sa môžu naviazať na antigény na bunkách alebo časticiach a pospájať ich navzájom - aglutinovať. **Aglutinácia** účinkuje tak, že vychytá mikroorganizmus do molekulovej siete a tým sa inhibuje ich pohyblivosť, čím sú náchylnejšie na deštrukciu. Protilátky môžu pospájať infekčné agensy (A), hostiteľské bunky - napríklad erytrocyty (B - **hemaglutinácia**) alebo inertný materiál napríklad latex (C - **latexaglutinácia**), na ktorých povrchu sú exprimované špecifické antigény

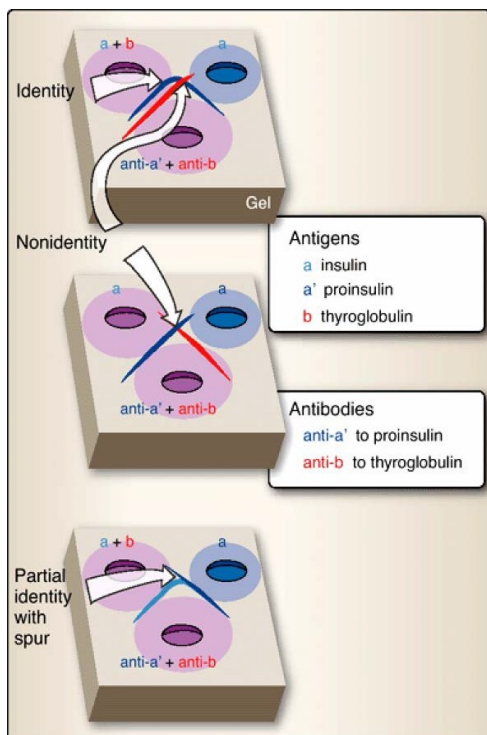
Dôkaz protilátok proti solubilným antigénom (napr. toxínom) je možné uskutočniť v tekutom alebo polotuhom prostredí (v agare), kde rozpustný antigén difunduje a pri stretnutí so špecifickou protilátkou vytvára precipitát. V tekutom prostredí prebiehajú precipitačné reakcie, pri ktorých sa navrství sérum pacienta obsahujúce protilátku na antigén v roztoku.



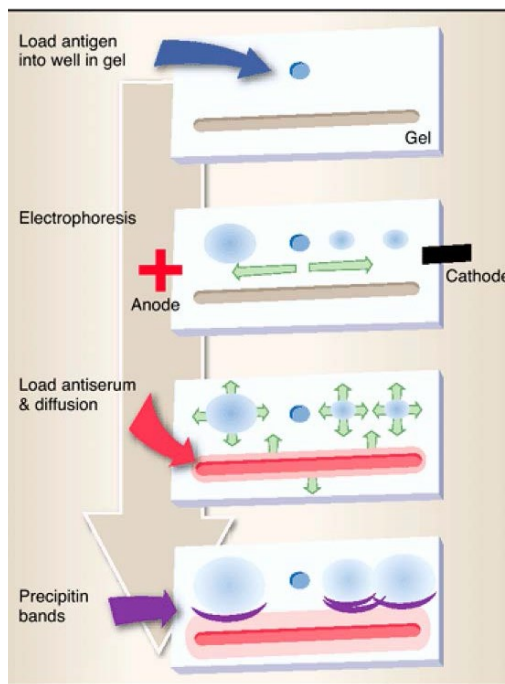
V agare prebiehajúce imunodifúzne metódy boli privedené k dokonalosti a dnes sú k dispozícii v podobe radiálnej imunodifúzie, dvojitej imunodifúzie, protismernej imonelektroforézy obvykle nesúce meno podľa autora (Mancini, Ouchterlony).



Radiálna imunodifúzia (podľa Mancinovej) je technika spočívajúca na difúzii rozpustného antigénu cez agarový gel obsahujúci protilátku. Vrstva tekutého agaru obsahujúceho protilátku je naliatá na skličko a následne sa nechá stuhnúť. Antigen je potom umiestnený do jamky, ktorá sa vyreže v geli a radiálne difunduje do gelovej hmoty. Precipitačný prstenec sa vytvorí v zóne ekvivalencie. Priemer precipitačného prestenca je priamo úmerný koncentrácii antigénu a porovnaním s koncentráciami štandardy a po vytvorení štandardnej krivky je možné stanoviť presnú koncentráciu antigénu. Metodiku je možné použiť na kvantifikovanie bielkovín séra, alebo stanovovanie protilátok proti rôznym mikrobiálnym antigénom v experimentálnom výskume.



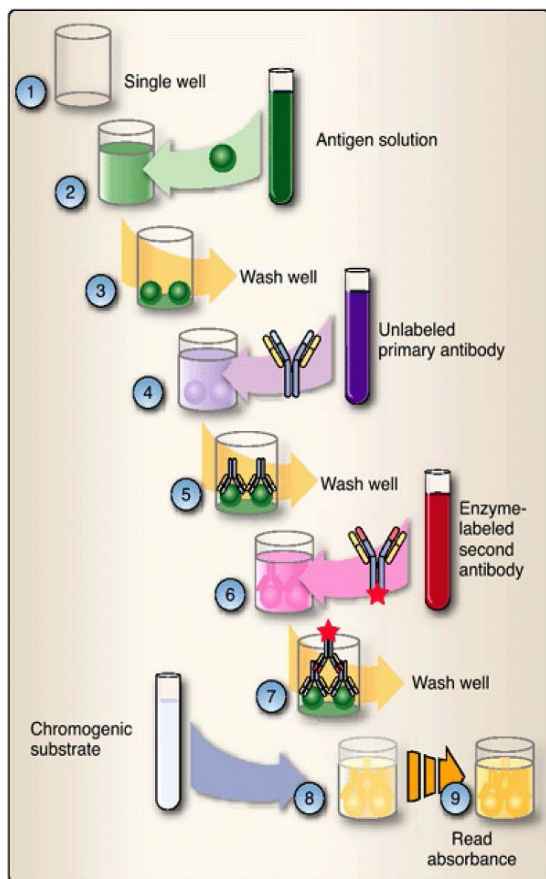
Dvojité difúzia (podľa Ouchterlonyho). Je modifikáciou radiálnej imunodifúzie. Jamky sú vyrezané do stuhnutého agarového gelu. Rozpustný antigény sa lokalizujú do jednej jamky a protilátka do druhej, obvykle uprostred, odkiaľ difundujú do gelu. **Vrchný panel:** Precipitačná línia je vytvorená v zóne ekvivalencie. Precipitačná línia (červená) sa vytvorila medzi vrchnou jamkou vľavo, obsahujúcej 2 antigény $a+b$, pričom sérum obsahovalo protilátku proti obidvom antigénom anti a aj anti b . V pravej jamke bol lokalizovaný len jeden antigén a , vytvorená precipitačná línia (modrá) determinovala protilátky anti a . Ukazuje obraz identických antigénov v dvoch jamkách. **Stredný panel:** zaznamenal dva neidentické antigény a dva typy protilátok každú proti jednému z antigénov (neidentické antigény). **Spodný panel:** Protilátka reaguje proti dvom podobným antigénom. Modrá precipitačná línia má tvar čiastočnej identity, obsahuje nešpecifický oblúčik



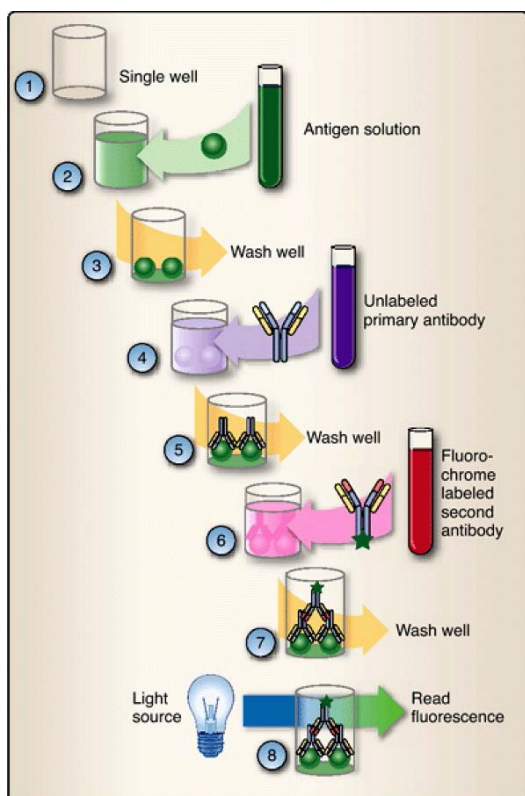
Imunoelektroforéza - je modifikáciou dvojitej difúzie. Antigén sa umiestní do jamky v agarovom geli. Aplikovaný prúd do gelu spôsobí migráciu antigénov ovplyvnenú nábojom a veľkosťou. Otvor, ktorý je následne vytvorený v geli sa naplní antisérom obsahujúcim protilátky. Obidvoje - antigény (modré) aj protilátky (čerevené) následne difundujú a vytvárajú precipitačné línie (fialové) v mieste stretu.

Rekombinantné antigény - niektoré mikroorganizmy, napríklad baktéria *E.coli*, sa používa na prípravu ľudských alebo iných antigénov. Využíva sa schopnosť bakteriálnej bunky exprimovať heterológnu genetickú informáciu. Inkorporáciou genetickej informácie požadovaného antigénu do genómu *E.coli* je umožnená transkripcia a translácia tejto cudzorodej genetickej hmoty a syntéza špecifického antigénu. Kľúčovou úlohou je purifikácia získaného antigénu od všetkých antigénov *E.coli*, ktoré v opačnom prípade sú zdrojom nešpecifických falošne pozitívnych výsledkov testov, ktoré používajú rekombinantné antigény. Aj v tomto prípade platí, že nie sme takí bohatí, aby sme kupovali lacné diagnostické sety.

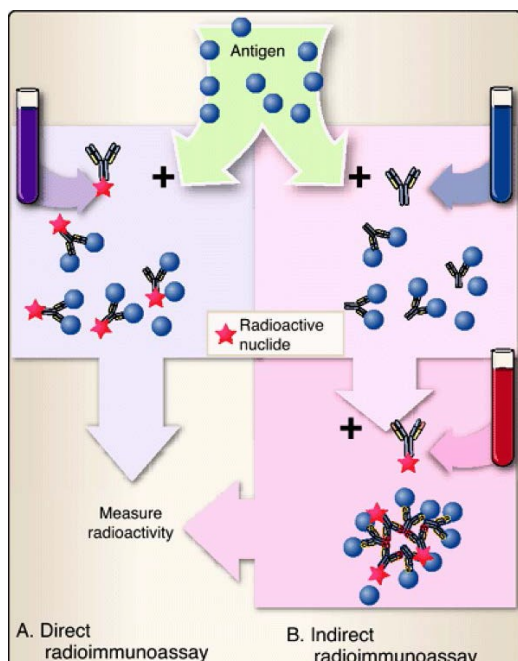
Ak je vychytávajúca molekula alebo štruktúra, či už antigén alebo protilátka naviazaná na pevnú fázu - štruktúru je možné imunokomplex po reakcii antigénu s protilátkou zviditeľniť diagnostickou protilátkou - konjugátom, označenou enzýmom, radionuklidom alebo fluorochrómom. Takéto nastavenie je podstatou ELISA, RIA resp. imunofluorescenčných testov, ktoré pri zaznamenaní intenzity značenej protilátky môžu umožniť kvantitatívne hodnotenie.



ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay - enzýmom značené protilátky sú používané na určenie špecifického epitopu (antigénu). 1. Test prebieha v jamke mikrotitračnej polystyrénovej platničky (obvykle v sete obsahujúcom 96 takých jamiek) schopných adsorbovať proteín. 2. Rozpusťný antigén je pridaný a kovalentne naviazaný na umelý povrch jamky. 3. Nenaviazaný materiál je odplavený pri premývaní. 4. Sérum obsahujúce protilátky je pridané do jamky. Špecifické protilátky sa pevne naviažu na antigén. 5. Nenaviazané protilátky sú odplavené pri premývaní. 6. Enzýmom značené protilátky proti molekulám ľudskej protilátky sú pridané do jamky. 7. Nenaviazané, enzýmom značené protilátky sa odstraňujú pri premývaní. 8. Chromogén substrát rozložiteľný enzýmom sa pridá do jamky. 9. Zmena farby ukazuje na prítomnosť enzýmom značenej sekundárnej protilátky, ktorá bola naviazaná, len ak boli prítomné špecifické protilátky proti epitopu v sére pacienta. Intenzita zmeny farby ukazuje na množstvo detekovaného epitopu.



Fluorescenčná imunoanalýza - FIA - má podobné určenie ako ELISA. 1. Test prebieha v jamke mikrotitračnej polystyrénovej platničky (obvykle v sete obsahujúcom 96 takých jamiek) schopných adsorbovať proteín. 2. Rozpusťný antigén je pridaný a kovalentne naviazaný na umelý povrch jamky. 3. Nenaviazaný materiál je odplavený pri premývaní. 4. Sérum obsahujúce protilátky je pridané do jamky. Špecifické protilátky sa pevne naviažu na antigén. 5. Nenaviazané protilátky sú odplavené pri premývaní. 6. Fluorochrómom označené protilátky proti molekulám protilátky sú pridané do jamky. 7. Nenaviazané, značené protilátky sa odstraňujú pri premývaní. 8. Fluorescencia ukazuje na prítomnosť epitopu.



Radioimunoanalýza RIA . Ako už naznačuje názov, radionuklid ako napríklad I^{125} sa používa na označenie primárnych alebo sekundárnych protilátok alebo antigénu. **A.** Pri priamej RIA sú primárne protilátky značené radionuklidom a inkubované s antigénom. Neneviazané protilátky sú prýmývaním odplavené a radioaktivita sa následne zaznamená počítačom impulzov. **B.** Pri nepriamej RIA metóde sú primárne protilátky naviazané na antigén a tie sú následne detekované radionuklidom značenými sekundárnymi protilátkami proti imunoglobulínom. Počítačom sa stanoví viazaná radioaktivita.

6. 3 Charakteristika špecifických súčastí imunodiagnostických postupov

Imundiagnostika je diagnostický prístup, ktorý stanovuje antigény alebo protilátky na identifikáciu ochorenia pacienta znázornením infikujúceho agensa alebo prvkov imunologickej odpovede na infekciu.

Imunodiagnostika infekčných ochorení zahŕňa dva prístupy

- určovanie špecifických antigénov alebo
- stanovenie antigén špecifických protilátok.

Ako už bolo konštatované určovanie špecifických mikroorganizmov a ich súčastí (antigénov) je podstatou **priamej diagnostiky** mikroorganizmu v biologickej vzorke pacienta alebo na určenie antigénnych vlastností mikroorganizmu tzv. sérotypizáciu.

Stanovenie vyvolávateľa ochorenia metódami **nepriamej diagnostiky** je možné identifikáciou antigén špecifických celkových protilátok alebo jednotlivých tried špecifických protilátok, ktoré sú molekulami jednotlivých izotypov imunoglobulínov.

Detekcia jednotlivých typov špecifických protilátok niektorou metódou má vlastnú výpovednú hodnotu. Pri klasických metódach (aglutinácia, KFR, precipitácia a ďalšie) sa detekuje zmes tried protilátok a pre diagnostiku je potrebné sledovať dynamiku ich tvorby minimálne z 2 odberov v rozsahu 14-21 dní. Prítomnosť špecifických protilátok rôznych izotypov je charakteristická pre jednotlivé štádiá ochorenia:

Imunoglobulíny M (IgM protilátky) sa objavujú na začiatku infekcie a sú detekovateľné od 7. až 10. dňa po infekcii podľa citlivosti testu. Sú znakom akútnej infekcie ale pretrvávajú 3-6 mesiacov po primoinfekcii. U novorodenca sú znakom intrauterínnej infekcie. Keďže prítomnosť IgM v sére je dočasná, ich nález svedčí pre nedávnu akútnu infekciu a na jej potvrdenie stačí obvykle jedna vzorka. IgM protilátky sa nevyskytujú výhradne pri primárnej infekcii a v niektorých prípadoch perzistujú dlhodobo. Stanovené IgM protilátky je potrebné hodnotiť pre každé infekčné agens individuálne

Imunoglobulíny IgG sa objavujú neskôr (okolo 14.dňa) a vrchol dosahujú v 4. – 6. týždni po infekcii. Perzistujú dlhodobo a pretrvávajú dlhodobo až celoživotne (podľa prvotného antigénneho stimulu, imunitného stavu pacienta a následnej reexpozície s booster efektom na koncentráciu protilátok). Sú znakom protektívnej imunity. Imunologické testy stanovujúce IgG protilátky vyžadujú niekedy párové vzorky. Prvá vzorka by mala byť odobratá v priebehu akútnej fázy infekcie a druhá v období rekonvalescencie podobne ako pri klasických sérologických metódach (KFR, nepriama aglutinácia).

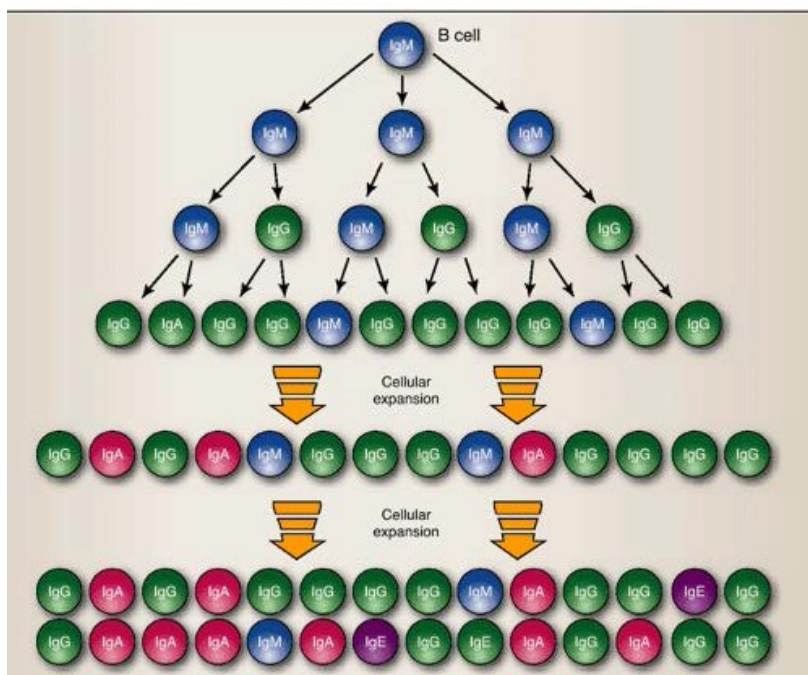
Sérové IgA protilátky majú rôznu výpovednú hodnotu pre rôzne etiologické agensy. Všeobecne sa IgA protilátky tvoria v akútnej fáze ochorenia, avšak vytvárajú sa aj pri reaktivácii chronického ochorenia, alebo pri reexpozícii infekčnému agensu.

IgE protilátky súvisia s parazitárnymi ochoreniami. Diagnostický význam IgD nie je určený, uplatňujú sa predovšetkým pri prezentácii antigénu a jeho spracovaní v období tvorby, aktivácie a stimulácie špecifickej imunitnej odpovede.

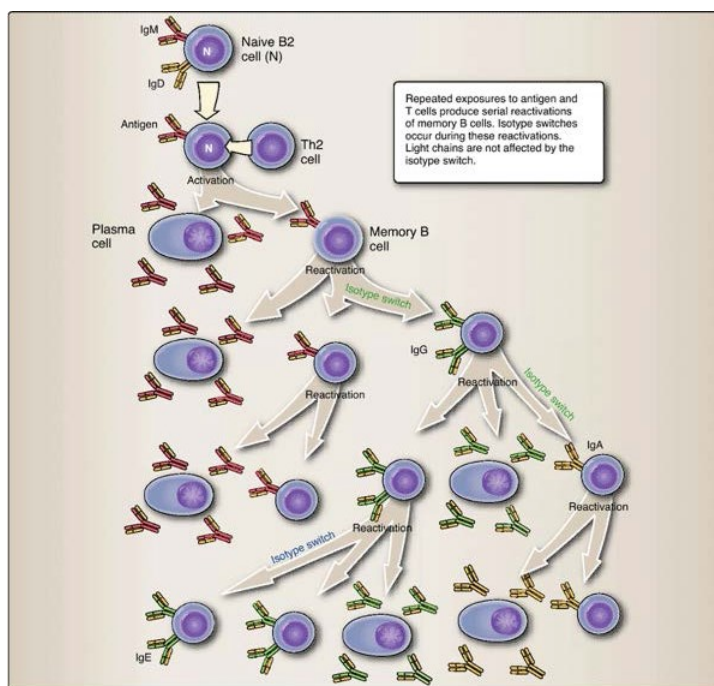
Interpretácia laboratórnych nálezov vyžaduje skúsenosti a dobré teoretické znalosti, pretože perzistencia protilátok mnoho rokov po akútnej infekcii a chronický priebeh infekcie s možnou reaktiváciou poskytuje škálu mnohých kombinácií laboratórnych nálezov.

Schématická interpretácia nálezov jednotlivých izotypov špecifických

Štádium infekcie	IgM	IgA	IgG
Akútna infekcia	+	- (+)	-
Postakútna fáza, rekonvalescencia	+	+ (-)	+
Anamnestické protilátky, prekonaná infekcia, postavakcinačné protilátky	-	-	+
Reexpozícia vyvolávateľovi Reaktivácia chronickej infekcie	-	+	+



Humorálna protilátková odpoveď môže byť rôznorodá a môžu sa produkovať postupne rôzne izotypy molekúl s tým istým epitopom - s tou istou špecifitou (IgM, IgG, IgA, IgE)



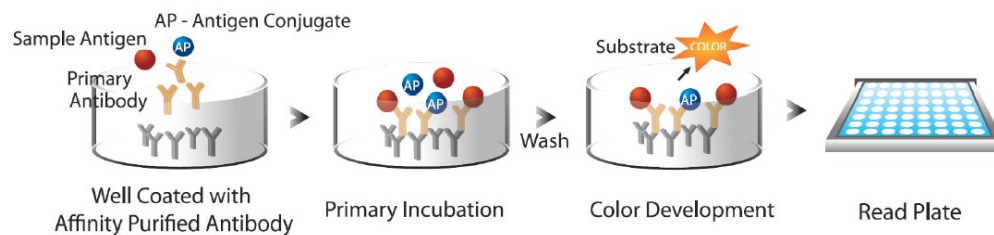
Opakované expozície antigénu vedú k aktivácii pamäťových B buniek, počas ktorých dochádza postupne k preladeniu izotypov imunoglobulínov a k zmene IgM na IgG, IgA až IgE

6. 3. 1 Detekcia antigénov

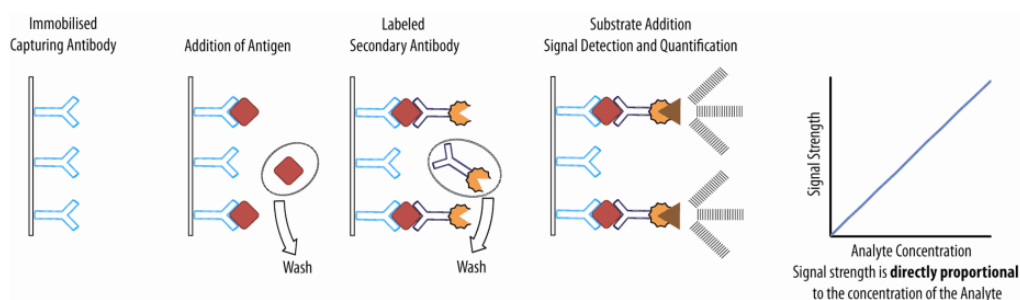
SPIA – solid phase immuno assay – imunoanalýza na pevnej fáze – je bežne používaný termín v anglickej literatúre na označenie imunoanalýz v pevnom prostredí. Na detekciu je možné využiť trojaké nastavenie systému: kompetitívna analýza, priama sendvičová metóda a nepriama sendvičová metóda.

Kompetitívna analýza – označený antigén je zmiešaný s biologickou vzorkou, ktorá môže obsahovať antigén a táto zmes je pridaná na pevnú fázu (do jamky doštičky). Obidva antigény súťažia o voľné väzobné miesto obmedzeného množstva protilátky naviazanej na pevnú fázu. Negatívna kontrolka obsahuje len označený antigén. Meria sa rozdiel aktivity medzi kontrolkou a vzorkou. Detekčné protilátky sú označené enzýmom.

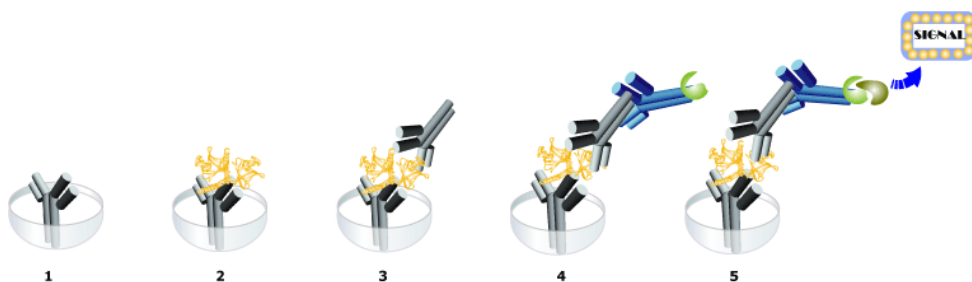
www.enzolifesciences.com



Priama sendvičová metóda (dvojité protilátky) – klinická vzorka sa pridá k naviazaným vychytávacím protilátkam (capture). Nenaviazaný antigén je odstránený premytím. Potom sa pridajú enzýmom označené detekčné protilátky. Po pridaní substrátu je aktivita produktu priamo úmerná množstvu označenej protilátky naviazanej na antigén na pevnej fáze. (Nenaviazaná označená protilátka bola odstránená premytím). Testy, v ktorých sa používajú polyklonálne vychytávajúce a monoklonálne detekčné protilátky dávajú najlepšie výsledky.



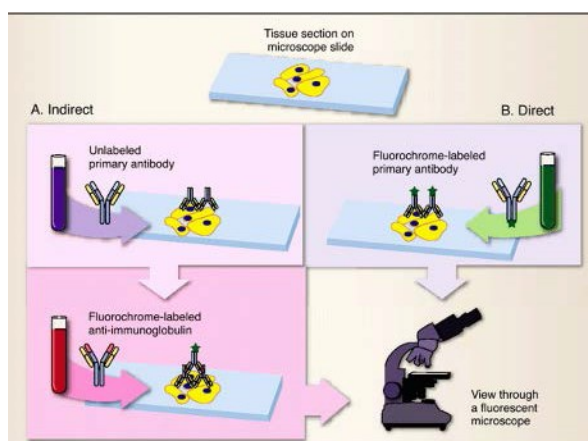
Nepriama sendvičová metóda (dvojité protilátky a antiglobulínové protilátky) – používa vychytávacie protilátky (capture) a detekčné protilátky, ale tie nie sú označené enzýmom. Okrem nich sa pridáva indikátor, ktorým sú enzýmom označené antiglobulínové zvieracie protilátky proti detekčným protilátkam. Vzhľadom na komerčnú dostupnosť antiglobulínových označených zvieracích protilátok, je tento systém s obľubou používaný. Je to veľmi citlivý postup, ale antiséra proti rôznym druhom môžu byť zdrojom nešpecifických skrížených reakcií.



www.genwaybio.com

Imunodot (IDA) - na detekciu antigénu je podobnou metódou ako Western blot (WB) na konfirmáciu špecifických protilátok. Obidve prebiehajú na nitrocelulózonej membráne, ktorá slúžia ako pevná fáza testu. Antigén v klinickej vzorke je aplikovaný na nitrocelulóзовý reakčný strip, na ktorom sú imobilizované protilátky. Modifikáciou imunodotu je imune complex dot assay, pri ktorom antigén reaguje s protilátkou a tento komplex je potom aplikovaný na nitrocelulózu a detekovaný koloidnými značenými zvieracími protilátkami. Je citlivejší na detekciu antigénu v klinickej vzorke

Imunofluorescencia - bunky z klinickej vzorky, v ktorej predpokladáme prítomnosť mikroorganizmu, sa premyjú a aplikujú na sklíčko (pevná fáza). Po zafixovaní sa pridávajú protilátky značené fluoresceínom (priama IFA – imunofluorescenčná analýza) alebo sa pridávajú protilátky a následne fluoresceínom značené antiimunoglobulínové protilátky (nepriama IFA). Ak sa použije viacero fluorescenčných farbív, ktoré sa prejavajú rôznymi farbami, na označenie viacerých špecifických protilátok, je možné identifikovať na jednom sklíčku aj niekoľko antigénov vo vzorke. Podobne môže byť pri nepriamej IFA identifikovaných vo vzorke mnoho antigénov za použitia rôznych capture (vychytávajúcich) protilátok a rovnakej fluoresceínom značenej antiimunoglobulínovej protilátke. Tento postup sa používa vo virológii v prípade, že je potrebné pripraviť viacero preparátov zo vzorky (detekcia respiračných vírusov z nasofaryngeálneho výplachu).

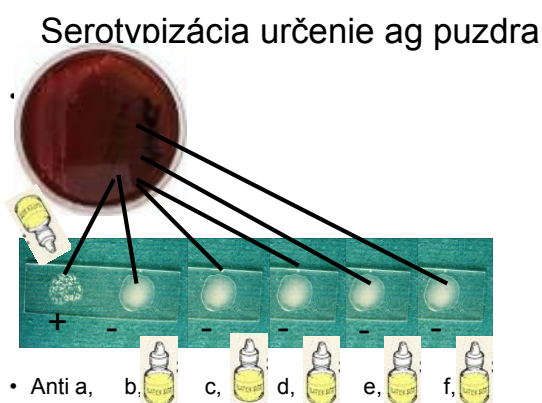
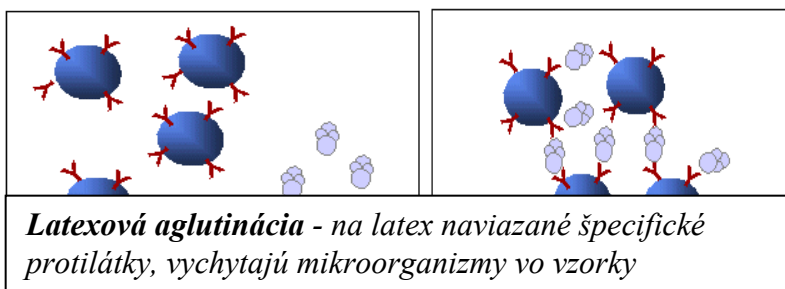


*Imunofluorescencia používa fluorescenčné farbivo, ktoré sa kovalente viaže na protilátku. Tenké zmrazené rezy tkaniva sú inštalované na sklo a následne je aplikovaný roztok obsahujúci značené protilátky (**priama imunofluorescencia, B.** alebo roztok obsahujúci primárne protilátky a po premývaní sa aplikujú fluoresceínom farbené anti imunoglobulínové protilátky (**nepriama IF, A**) Prítomnosť epitopov je vizualizovaná fluorescenčným mikroskopom.*

Imunoelektrónová mikroskopia IEM – používa klinickú vzorku zaliatu do vhodnej chemickej substancie. Tenké rezy sa následne aplikujú na mriežku a farbja špecifickými antisérmi (sérum obsahujúce špecifickú protilátku) a koloidnými zlatom značenými antiimunoglobulínovými protilátkami a to tak, že sú rez nasiakne kvapku reagencie aplikovanú na parafrínový list. Pri IEM sa môže použiť aj elektronmikroskopická mriežka pokrytá špecifickými protilátkami na vychytávanie (capture) špecifických antigénov.

Imunohistochemické farbenie - využíva histologickú prípravu tkanivového preparátu, ku ktorému sa ako posledné kroky pridajú špecifické protilátky a enzýmom farbené zvieracie protilátky a vhodný substrát na detekciu antigénu priamo v tkanivách.

Aglutinácia - je klasická metóda využívajúce špecifické protilátky v roztoku (priama aglutinácia), alebo viazané na latexové čiastočky na detekciu mikroorganizmu (latex aglutinácia) alebo jeho antigénnej štruktúry (sklíčková aglutinácia).



Sérotypizácia - použitím špecifických antisér proti jednotlivým antigénom je možné určiť antigénnu štruktúru baktérie. Kolónia baktérie *Haemophilus influenzae* je testovaná protilátkami proti možným puzdrovým antigénom (a,b,c,d,e,f). Pozitívna aglutinácia vznikne len s jedným antisérom a. Čím je určený sérotyp baktérie

Antigén v biologickej vzorke reaguje so špecifickými protilátkami a vytvorí neroztrepatelné zhluky za súčasného vyčistenia tekutého prostredia alebo suspenzie. Využíva sa na rýchlu

diagnostiku vyvolávateľov meningitíd detekciou v CSM, alebo u rozpustných antigénov v moči. Nevýhodou týchto metodík je nízka senzitivita. Sú založené na sledovaní viditeľného komplexu antigénu s protilátkou. Obvykle stačí na detekciu bakteriálnych antigénov, ale nie vírusových, ktoré sú menšie a na vytvorenie viditeľných zhlukov je potrebné väčšia antigénna hmota.

6. 3. 2 Detekcia protilátok

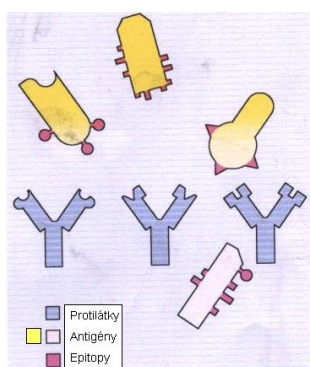
Kompetitívne testy umožňujú dôkaz ľudských protilátok proti vírusovým a bakteriálnym, resp. mikrobiálnym antigénom reakciou vzorky s presne určeným množstvom konjugovanej špecifickej protilátky a inkubáciou zmesi s pevnou fázou, na ktorej je naviazaný antigén. Špecifické protilátky, ak sú prítomné vo vzorke, budú súťažiť s konjugovanými protilátkami o väzbové miesta na pevnej fáze. Veľkosť, intenzita alebo aktivita vzniknutej reakcie je nepriamo úmerná množstvu protilátky vo vzorke. Protilátky proti antigénom je možné pripraviť na zvieratách alebo purifikáciou z ľudských séra alebo sa použijú monoklonálne protilátky. Príprava konjugátu vyžaduje sériovú titráciu konjugátu a sériovú titráciu antigénu na vytvorenie takej dvojice konjugát - antigén, ktorá by pri najvyššom riedení generovala signál, ktorý by sa redukoval v prítomnosti protilátky vo vzorke. Výhodou kompetitívnych testov na meranie protilátok je jednoduchá príprava špecifických protilátok, monoklonálnych a konjugovaných protilátok. Je jednoduchšie purifikovať protilátky ako antigén a aj relatívne nečistý antigén je možné použiť na naviazanie na pevnú fázu. Kompetitívne testy sú citlivejšie ako nepriame testy. Pevná váza je obvykle pokrytá antigénom alebo antiimunoglobulínovými protilátkami (anti total, anti IgG, IgM, IgA) .

Ak je pevná fáza pokrytá antigénom, zachytávajú sa celkové protilátky, alebo sa ako detekčné použijú protilátky proti ľudským IgA, IgM alebo IgG zo zvieracích sér. Takýto postup si ale vyžaduje adsorbciu reumatoidného faktoru. Ak je pevná fáza pokrytá antiimunoglobulínovými protilátkami sú to obvykle IgM protilátky. Tento postup vychytá len IgM, ktoré budú potom k dispozícii pre detekčné označené protilátky. V ďalšom kroku sa pridá neznačený antigén, ktorý je následne detekovaný detekčnými protilátkami. Na pokrytie pevnej fázy sa pri detekcii špecifických IgG používa aj RF IgM (reumatoidný faktor). Vzorka so špecifickým IgG je zmiešaná so značeným konjugátom a inkubovaná s pevnou fázou s RF IgM. Len špecifická IgG molekula sa naviaže na antigén a na pevnú fázu, preto stačí len jeden krok (jedna inkubácia). Potrebná je ale vysoká kvalita antigénu a RF IgM.

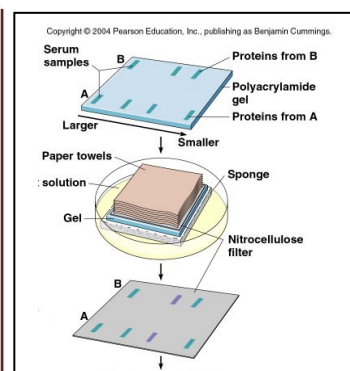
Stanovenie IgM – je dôkazom akútnej infekcie. Najbežnejšou technikou je nepriama imunoanalýza na pevnej fáze, na ktorej je antigén imobilizovaný a sekundárnymi IgM špecifickými detekčnými protilátkami. Falošne pozitívne reakcie sú časté a sú spôsobené RF IgM v pacientovom sére. Falošne negatívne výsledky sa môžu vyskytnúť pri kompetitívnej inhibícii IgM väzby v prítomnosti vysokých hladín špecifických IgG. Tieto problémy je možné riešiť odstránením IgG zo séra pacienta napríklad pridaním precipitujúcich anti IgG protilátok, alebo odstránením RF prostredníctvom RF sorbentu (agregované IgG).

Použitie IgM capture testu eliminuje niektoré problémy. Polyklonálne anti IgM protilátky sú naviazané na pevnú fázu a pri inkubácii s pacientovým sérom sa všetok IgM naviaže na pevnú fázu. Potom sa pridá testovaný antigén, ktorý sa viaže na špecifický antigén. Značené sekundárne protilátky identifikujú pacientové IgM. Pri takomto nastavení sú všetky IgG protilátky vyplavené pri premývaní, čím sa eliminuje možnosť falošne negatívneho výsledku. Falošne pozitívny výsledok sa môže vyskytnúť ako následok väzby IgM RF s IgG konjugátom alebo s akýmkoľvek IgG vo vzorke. Je možné sa tomu vyhnúť použitím Fab konjugátov alebo priamou technikou, pri ktorej sa použije značený antigén v 2. kroku, čím sa eliminujú imunoglobulíny viažuce RF. Problematické ale stále zostávajú hraničné a nízkopozitívne výsledky.

Imunoblot - molekuly mikroorganizmu vytvárajúce jeho antigény a antigénne determinanty (epitopy) – je možné separovať na polyakrylamide gélovou elektroforézou a preniesť na nitrocelulózu. Tým je pripravená pevná fáza reakcie. Pacientovo sérum, moč alebo sliny sa aplikujú na pevnú fázu a po reakcii a zafarbení sa identifikujú protilátky proti jednotlivým antigénom mikroorganizmu, čím sa zvyšuje špecificitu testu.



Elektroforézou separované antigény mikroorganizmu vytvoria viditeľný prúžok – band - obsahujúci viacero molekúl antigénu. Antigény sú potom prenesené na nitrocelulózu. Následne sa aplikuje pacientovo sérum a jednotlivé protilátky proti všetkým antigénom sa lokalizujú na



Westernblot používa na identifikáciu vytvoreného imunokomplexu enzýmom značený konjugát.

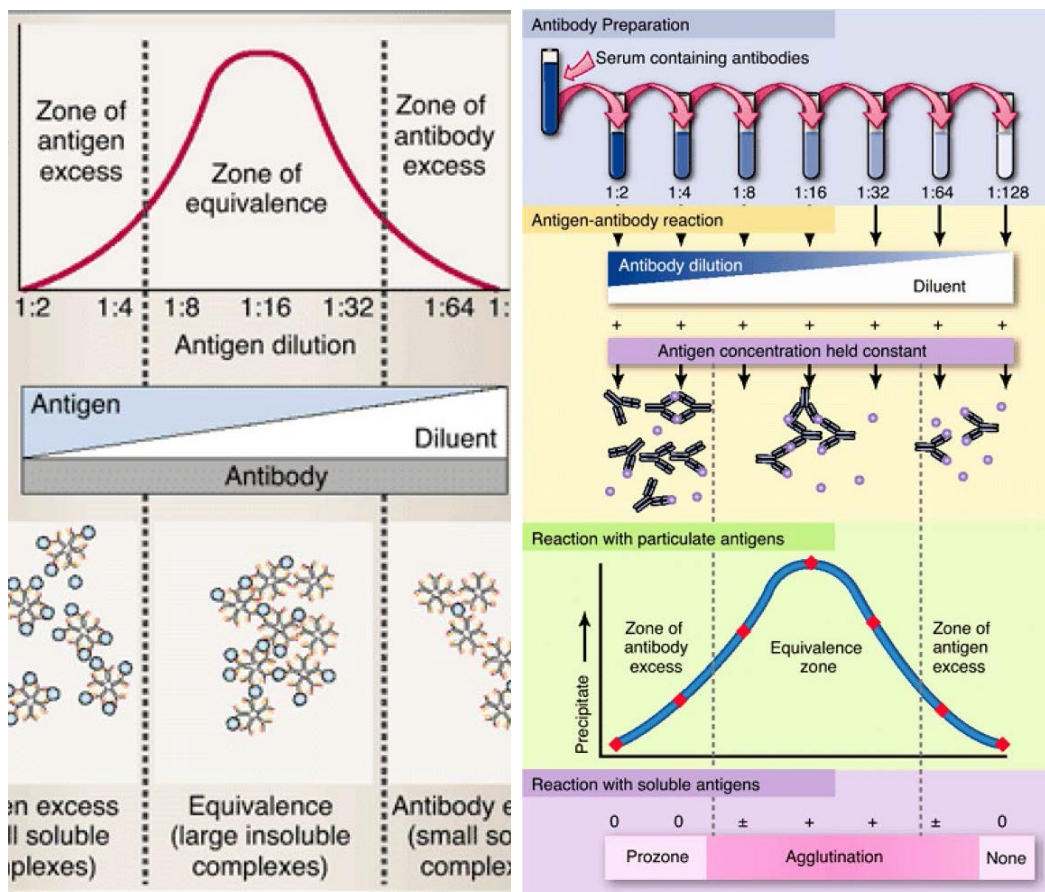
RIBA – rekombinantná imunoblot analýza využíva rekombinantné antigény.

Radioimunoprecipitácia - tento typ testu využíva na detekciu špecifických protilátok imunoprecipitáciu radionuklidom značného mikrobiálneho proteínu s následnou detekciou scintigrafom a autoradiografiou. Táto metóda ako aj ostatné metódy používajúce radionuklidy nie je v praxi využívaná. Svoje uplatnenie našla v konfirmačných testoch.

Imunofluorescencia – nepriama imunofluorescencia sa používa aj na detekciu špecifických protilátok v pacientovom sére. Za týmto účelom sa antigén aplikuje na sklíčko, kam po vysušení a fixovaní acetónom alebo metanolom je aplikované testované sérum (vhodne nariadené). Fluoresceínom značené anti imunoglobulínové protilátky sa aplikujú na sklíčko a po inkubácii a premytí je vzorka zakvapkaná pufrovaným glycerolom. Detekčný systém sa znázorní vo fluorescenčnom mikroskope. Táto metóda je vhodná na detekciu protilátok, napríklad pri parazitárnych infekciách (malária, trypanozomiáza), kedy je hladina protilátok vysoká z dôvodu chronicity ochorenia. Mikroskopicky detekovaná fluorescencia je subjektívne hodnotená a jej aktivita postupne zaniká. Novšie systémy umožňujú strojové odčítanie fluorescencie s možnosťou kvantifikácie intenzity. Pri fluorescenčnej mikroskopii bolo možné nálež kvantifikovať riedením séra a zaznamenaním titra pri ktorom bola fluorescencia ešte detekovateľná.

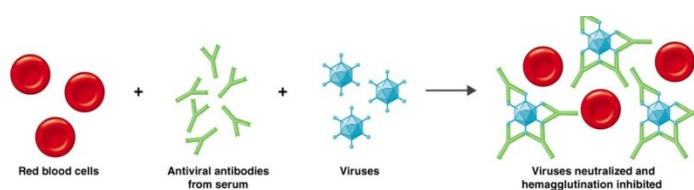
Automatizované systémy odčítavania fluorescencie zachovávajú princíp pevnej fázy, pri ktorom je antigén imobilizovaný na nitrocelulóзовý prúžok, ten je ponorený do séra a špecifické protilátky, pokiaľ sú prítomné sa naviažu na antigén na stripe. Strip je potom ponorený do roztoku fluoresceínom značených anti imunoglobulínových IgG protilátok. Výsledok testu je určený fluorometrom. Je to technicky nenáročná metóda, ktorá našla uplatnenie pri skriningových vyšetreniach. Nevýhodou oproti fluorescenčnej mikroskopii je, že nie je možné vidieť tvar prípadne typ fluorescencie.

Aglutinácia – nepriama sa používa na detekciu protilátok v sére pacienta. K séru pacienta sa pridá antigén, proti ktorému sa v sére hľadajú protilátky. Ak sú prítomné, vytvorí sa neroztrepatelný zhluk. Aglutinačné protilátky sú celkové. Pri nastavovaní testu je potrebné vytvoriť systém v oblasti ekvivalencie, aby množstvo antigénu pridaného k séru zodpovedalo množstvu protilátok. Inak je možný falošne negatívny výsledok a fenomén prozóny. Oblasť ekvivalencie sa určuje riedením séra a antigénu. Aglutinačné reakcie je možné hodnotiť aj kvantitatívne. Pozitívny výsledok udáva najvyššie riedenie séra, v ktorom je dokázateľná aglutinácia (napr. 1:128). Výsledok je možné realizovať aj vo forme titra, čo je prevrátená hodnota riedenia séra (titer 128).



Sérum obsahujúce protilátky sa riedi **geometrickou radou**, pričom každá nasedujúca skúmavka obsahuje polovičnú koncentráciu protilátok v predchádzajúcej skúmavke (1:2, 1:4, 1:8, 1:16...). Reakcie antigénu s protilátkou: Antigen obsahujúci viaceré epitopy sa pridá v stálej koncentrácii do riedeného séra – roztoku protilátok a nastane reakcia antigénu s protilátkou pokiaľ špecificita protilátky zodpovedá antigénu. Reakcia prebieha v troch zónach: V zóne ekvivalencie je koncentrácia antigénu zodpovedajúca koncentrácii protilátky a vytvára sa maximálny počet imunokomplexov (aglutínátov, precipitátov...). V zóne s nadbytkom protilátok je nedostatok antigénu na vytvorenie viditeľného množstva imunokomplexov. Nadbytok protilátok (vo vysokopozitívnej vzorke) bráni zosieťovaniu častíc a výsledok sa javí ako negatívny (falošne negatívny). V zóne s nadbytkom antigénu je nedostatok väzobných miest a nevytvorí sa viditeľné množstvo imunokomplexov. Preto je dôležité presné nastavenie reakcií a riedenie sér.

Pasívna hemaglutinácia a hemaglutinačne inhibičný test sú modifikácie aglutinácie používané v širokom meradle na detekciu protilátok proti vírusovým aj bakteriálnym antigénom (*Treponem pallidum*, vírus rubeolly, chrípky, RSV). Hemaglutinačne inhibičný test detekuje prítomné protilátky na základe zábrany hemaglutinácie, ktorú spôsobujú niektoré mikroorganizmy spontánne. Najvyššie riedenie, v ktorom nie je viditeľná hemaglutinácia určí titer protilátok v testovanom sére.



*Vírus normálne spôsobuje hemaglutináciu červených krviniek. Ak sú protilátky proti vírusom prítomné, neutralizujú funkciu vírusu a inhibujú hemaglutináciu **hemaglutináciu inhibujúci test, neutralizačný test***

6. 4 Prístupy k imunoserologickej diagnostike infekčných ochorení

6. 4. 1 Nešpecifické indikátory infekčných ochorení

Prejavom lokálnej odpovede na infekciu alebo tkanivové poškodenie, prípadne oboje je akútny zápal. Jeho podstatou sú vaskulárne zmeny a nahromadenie leukocytov. V priebehu prvých dní po infekcii dochádza k systémovým a metabolickým zmenám charakterizovaným ako odpoveď akútnej fázy zápalu. Proteíny akútnej fázy sú tie, ktorých koncentrácia sa v priebehu tohto obdobia výrazne zvyšuje. O takmer polovicu stúpa koncentrácia súčastí komplementu a feritínu, o viac ako 200% stúpa koncentrácia alfa 1 antitrypsínu, fibrinogénu, haptoglobínu a takmer tisícnásobne stúpa koncentrácia CRP – C reaktívneho proteínu pri bakteriálnych a hubových infekciách a ťažkom tkanivovom poškodení. CRP a súčasti komplementu sú jediné proteíny akútnej fázy zápalu, ktoré sú dokázateľne priamo účinné pri fyzickej eliminácii mikroorganizmov.

CRP

C – reaktívny proteín je významným markerom akútnej fázy zápalu. Je to proteín produkovaný v pečeni a prítomný v sére v minimálnych koncentráciách za fyziologického stavu. Svoj názov získal podľa toho, že je schopný reagovať s tzv. C substanciou bunkovej steny gram pozitívnej kokovitej baktérie - *Streptococcus pneumoniae*. Nie je to však špecifický proteín proti pneumokokom. Jeho zvýšená syntéza je vyprovokovaná v období akútneho akéhokoľvek bakteriálneho alebo hubového zápalu a pri výraznej tkanivovej deštrukcii. CRP je schopný sa viazať na fosfocholín a zvyšky galaktózy, čo sú ligandy, ktoré sú prítomné na mikrobiálnych produktoch baktérií, plesní a niektorých parazitov. Po väzbe na tieto povrchy aktivizuje komplementovú kaskádu na úrovni C1q, čo vedie k zvýšenej opsonizácii. Ľudský CRP v pokuse na myšiach poskytuje in vivo ochranu pred letálnymi dávkami *Str.pneumoniae*. Jeho koncentrácie stúpajú z fyziologických hodnôt na stovky

mikrogramov na mililiter v priebehu 3 dní. Najvyššie hodnoty sú u pacientov s bakteriálnymi infekciami (viac ako 100 mikrogramov na mililiter). Pri chronických zápaloch, autoimunitných ochoreniach ale aj malignitách, toxických hepatitídach, zlyhávaní srdca, poškodení myokardu a v tehotenstve sú koncentrácie v sére mierne zvýšené. Sledovanie dynamiky CRP pri chronických zápaloch môže potvrdiť bakteriálnu alebo hubovú superinfekciu. Dynamika koncentrácií CRP je významná pre sledovanie štádia ochorenia. CRP stúpa rýchlejšie a skôr dochádza k jeho poklesu pri uzdravovaní z infekčného procesu ako hodnoty rýchlosti sedimentácie erytrocytov a počty leukocytov. Meranie CRP je možné aj v iných telesných tekutinách. Prítomnosť CRP v cerebrospinálnom moku je senzitívnu a špecifickou metódou pri diferenciácii vírusovej a bakteriálnej infekcie mozgu. Rovnako je vyšetrenie CRP opodstatnené pri odlíšení pacientov s bakterémiou od pacientov, u ktorých bola hemokultivácia pozitívna v dôsledku kontaminácie, pri monitorovaní paraplegických pacientov na skorú diagnostiku močového infektu, pri odlíšení cystitídy a pyelonefritídy u detí, pri odlíšení bakteriálnej a vírusovej pneumónie u detí aj dospelých, pri odlíšení bakteriálnej pneumónie a akútnej bronchitídy.

Endotoxín

Endotoxín je lipopolysacharid (LPS) bunkovej steny gram negatívnych baktérií. In vivo má toxické, pyrogénne a ďalšie biologické účinky podmienené uvoľnením cytokínov (interleukín-1, tumor necrosis factor), ktoré majú v nízkych koncentráciách priaznivé účinky vo fáze uplatnenia sa nešpecifických obranných reakcií. Endotoxín môže vo vyšších koncentráciách spôsobiť metabolické a patofyziologické pochody prejavujúce sa ako sepsa alebo gram-negatívny - endotoxínový šok. Endotoxín je pri priaznivom priebehu fagocytovaný a detoxifikovaný v pečeni. V priebehu infekcie je koncentrácia LPS detekovateľná už len v portálnej véne a nie v periférnej cirkulácii. Metódou detekcie endotoxínu je test lyzátny *Limulus polyphemus*. Stanovujú sa stopy endotoxínu testom, ktorého princípom je schopnosť LPS zmeniť lyzát kraba *Limulus polyphemus* na želatínu. Tento test nie je špecifický pre niektorý mikroorganizmus, ale detekuje prítomnosť endotoxínu, ktorý je súčasťou bunkovej steny gram-negatívnych baktérií. Endotoxín je veľmi rýchlo fagocytovaný, preto jeho stanovenie v periférnej krvi nie je klinicky významné, ale jeho detekcia v CSM je citlivým indikátorom gram negatívnej bakteriálnej meningitídy.

TNF

Tumor necrosis factor - kachexín je cytotoxín podieľajúci sa na imunitnej reakcii proti mikroorganizmom. Tiež ovplyvňuje protinádorové reakcie, odkiaľ získal názov. V pokuse na

myšiach s prítomným nádorom došlo po injekcii séra s TNF k nekróze a regresii nádoru. Tento faktor bol identifikovaný aj pri hľadaní látky zodpovednej za kachexiu – neprospievanie - v súvislosti s parazitárnymi ochoreniami. Pôvodne boli TNF a kachexín považované za samostatné látky, ale DNA sekvenčná analýza určila homológiu a dnes sú považované za identické. TNF v pokusoch na laboratórnych myšiach navodil metabolickú acidózu, hemokoncentráciu, zmeny glukózového metabolizmu, edém pľúc, hemorhagickú nekrózu nadobličiek a pankreasu, tubulárnu nekrózu obličiek. Po neutralizácii TNF pri súčasnom podaní špecifických protilátok bolo možné týmto príznakom predísť. V súčasnosti sa protilátky proti TNF používajú v presne stanovených indikáciách vrátane tzv. biologickej liečby niektorých autoimunitných alebo chronických zápalových ochorení (Crohnova choroba, progresívna polyartritída). Je možné stanovovať koncentrácie TNF v ľudskom sére. Existujú informácie o korelácii medzi hladinami TNF a stupňom septického šoku a rizikom smrti u pacientov s meningococcaemiou. Hoci je TNF nešpecifický marker, nešpecificky indukovaný cytotoxín, jeho stanovenie môže poskytnúť informáciu o rozsahu poškodenia alebo jeho povahe pri niektorých infekčných procesoch.

6. 4. 2 Typy protilátok a ich využitie v diagnostike

Polyklonálne protilátky

Základnými zložkami imunosérologických reakcií používaných na imunoanalýzu infekčných ochorení sú protilátky, antigény a prostredie, v ktorom reakcia prebieha. Imunosérologická reakcia je vždy reakciou antigénu s protilátkou. Ich vlastnosti a charakteristiky určujú výber laboratórnej metódy a možnosti vizualizácie komplexu antigénu s protilátkou. Dokazujú sa neznáme protilátky známym antigénom, alebo použijeme známe protilátky na identifikáciu neznámeho antigénu. Výber metódy závisí na fyzikálnych vlastnostiach antigénu, jeho solubilitě (rozpuštné alebo korpuskulárne antigény). Kvalita protilátok je daná ich vysokou špecifitou. Aj nešpecifické a skrížené reagujúce protilátky sa pri niektorých testoch s výhodou využívajú (VDRL – skriningový test na syfilis).

Antiséra používané v imunosérologických testoch boli pripravované hyperimunizáciou zvierat purifikovanými antigénmi s adjuvansom. Séra imunizovaných zvierat boli testované na monošpecifitu. V prípade prítomnosti kontaminujúcich protilátok alebo nešpecifických sér, boli nežiadúce protilátky odstraňované adsorpciou zodpovedajúcim antigénom. Imunoglobulínová frakcia sa zo séra získava izoláciou selektívnou precipitáciou pomocou síričitanu amónneho alebo chromatograficky. Dokonca aj v hyperimúnných sérach je obsah špecifických protilátok len 10 – 15% celkovej IgG frakcie polyklonálnych protilátok. Ostatné

IgG molekuly sú neznámej špecificity odzrkadľujúce zmes antigénov, ktorým bolo zviera exponované v priebehu života. Preto je potrebné často pracne identifikovať všetky polyklonálne protilátky, aby sa detekovali len žiadané protilátky. Ostatných 85 - 90% nežiadúcich protilátok zvyšuje výskyt nešpecifických väzieb konjugovaných (ale nežiadúcich) protilátok v testovacom systéme.

Purifikované protilátky

Za účelom odstránenia protilátok nežiadanej špecificity je možné IgG frakciu polyklonálnych protilátok purifikovať ich naviazaním na nerozpustný antigén a vyplavením. Toto sa uskutočňuje slpcovou chromatografiou.

Imunizujúci antigén je naviazaný na matrix spolu s inertnou molekulou plniacou funkciu nosiča. Nosič je kovalentne viazaný na antigén aj na nerozpustnú matrix, tak aby boli zachované dôležité antigénne determinanty. Protilátky sú potom aplikované na stĺpec, pričom sa dodržiavajú optimálne podmienky pre reakcie antigénu s protilátkou (pH 7,5 až 8,5; fyziologické ionové zloženie roztoku). IgG molekuly nevhodnej špecificity prejdú cez stĺpec spolu s premývacím roztokom. Antigénšpecifické IgG molekuly sú vyplavené z antigénnej matrix pričom sa použije vymývací pufer nižšieho pH a s nižšou koncentráciou iónov. Takto sa zachová funkčná integrita IgG molekúl pričom protilátky sú opatrne disociované z nerozpustného antigénu. Protilátka, ktorá sa takto získa má významne vyššiu špecificitu (85 – 90%).

Takýto postup znižuje alebo celkom eliminuje nešpecifické väzby s inými protilátkami, čo má za následok vyššiu špecificitu imunologických analýz. Polyklonálne protilátky, ktoré boli purifikované a získali tak vyššiu afinitu, majú rôznorodé použitie. Väčšina protilátok proti ľudským imunoglobulínom konjugovaných s fluorescenčným farbivom alebo enzýmom používaných v dostupných laboratórnych testoch sú purifikované polyklonálne protilátky s vysokou afinitou. Polyklonálne protilátky sa viažu na viaceré antigénne determinanty, čím sa zvyšuje ich schopnosť detekovať zodpovedajúce antigény.

Frakcionované protilátky

Niektoré protilátky v sérach používaných na detekciu antigénov sa viažu nešpecificky na IgG Fc receptor buniek. Účinným prístupom k znižovaniu týchto nešpecifických väzieb je frakcionovanie IgG antisér, čím sa eliminujú Fc oblasti molekuly IgG. V kontrolovaných podmienkach enzým pepsín oddelí C koniec IgG molekuly (Fc fragment). Vznikne tak N - fragment viažúci F(ab)₂ oblasť. Tieto F(ab)₂ fragmenty je možné konjugovať

s fluorochrómom alebo enzýmami. Purifikované polyklonálne protilátky so zvýšenou afinitou môžu byť opracované pepsínom, čím vzniknú tzv. afinitné-purifikované F(ab)₂ antiséra.

Monoklonálne protilátky

Produkcia monoklonálnych protilátok po prvý raz popísali Kohler a Milstein v roku 1975. Okamžite sa ukázal obrovský potenciál pre využitie v klinických laboratórnych testoch a imunoterapii. Monoklonálne protilátky (MAb) sú pripravené hybridizáciou bunky produkujúcej protilátku (B lymfocyt, plazmatická bunka) s replikujúcou sa bunkovou líniou. Takto sa každá protilátku produkujúca bunka naprogramovaná na syntézu protilátky jedinej špecificity s jedným typom ťažkého a jedným typom ľahkého reťazca môže naklonovať a replikovať takmer nekonečne. Tieto protilátky produkujúce klóny buniek (hybridómy) sa používajú na prípravu takmer neobmedzeného množstva monoklonálnych protilátok s definovanými vlastnosťami. Hybridómy môžu byť dlhodobo skladované v tekutom dusíku. V prípade potreby môžu byť regenerované vo forme tkanivových kultúr alebo sú aplikované laboratórnym myšiam, u ktorých vytvoria nádorový ascites, z ktorého sú monoklonálne protilátky izolované. Výhody monoklonálnych protilátok sú jednoznačné. Je potrebná len ich minimálna purifikácia a len jednorázové stanovenie špecificity. Monoklonálne protilátky sa obvykle nešpecificky neviažu na ľudské IgG Fc fragmenty a obvykle nereagujú skrížene a nešpecificky. Nevýhodou monoklonálnych protilátok je to, že neumožňujú využitie v testoch, kde je potrebná krížová väzba antigénu a protilátky (napr. aglutinácia, precipitácia), hoci zmesi (koktaily) viacerých monoklonálnych protilátok môžu čiastočne riešiť tento problém. Monoklonálne protilátky produkované na myšiach sa tiež neviažu na C1q súčasť komplementu, a preto neaktivizujú komplementovú kaskádu. Tiež jediná antigénna determinanta, proti ktorej je monoklonálna protilátka nasmerovaná, nemusí byť v niektorých situáciách prezentácie antigénu exprimovaná (živé a fixované mikroorganizmy). Pri znalosti možností a obmedzení monoklonálnych protilátok je ich použitie v terapii a diagnostike takmer neobmedzené.

6. 4. 3 Antigény

6. 4. 3. 1 Rozpustné antigény a ich reakcie s protilátkami

Dvojité difúzia v agare (Ouchterlonyho reakcia)

Klasická metóda detekcie protilátok umožňuje hodnotiť ich špecificitu (identita, čiastočná identita a neidentita – vid' obrázok vyššie). Tiež je možné použiť ju pri charakterizovaní

antigénov, ak sú k dispozícii protilátky so známou špecificitou. Táto metóda vyžaduje 18 – 24 hodinovú difúziu a nie je využiteľná pre rýchlu diagnostiku akútnych ochorení. Stále je však použiteľná pri detekcii precipitujúcich protilátok pri suspektnej histoplazmóze, coccidioidomykóze alebo aspergilóze prípadne iných hubových antigénov súvisiacich s hypersenzitívnou pneumonitídou. V modifikácii podľa Eleka - Elekov test je vhodnou metódou identifikácie toxinogénnych kmeňov *Corynebacterium diphtheriae*.

Imunodifúzia v agare

Pri štandardizovaných podmienkach je to presná a užitočná metóda vizualizácie reakcie antigénu s protilátkou v agare. Po fixácii a ofarbení je možná archivácia a zdokumentovanie výsledku. Je možné ju uskutočňovať v kvantitatívnom nastavení a bola jednou z prvých metód, pri ktorých sa využívali počítače na výpočty koncentrácií a odchýliek pre sadu testov. Napriek tomu, že podobne ako Ouchterlonyho difúzia aj táto metóda nepatrí medzi rýchle diagnostické testy, je možné ju použiť na stanovenie takmer akejkolvek protilátky alebo antigénu. Jej výhodou je vizualizácia absolútnej nuly (IgA deficit), kedy automatické počítačom riadené prístroje znázornia vždy určitú minimálnu koncentráciu alebo hodnotu blížiacu sa nule. S výhodou sa využíva pri odlíšení zníženej tvorby IgA protilátok a neschopnosti tvoriť protilátky. Na toto určenie je možné použiť aj iné metódy (napr. ELISA imunoanalýzu). Pri frekvencii výskytu takéhoto postihnutia v populácii, by čakanie na dostatočný počet pacientov, ktorý by opodstatňoval k použitiu testu, mohlo predstavovať aj niekoľko mesiacov. Je to jeden z testov, kedy dostatočná kvalita a cenová prístupnosť je odôvodnením k zachovaniu tohto testu v praxi. Skúsené oko diagnostika dokáže pri tomto type testu odhaliť nie normálny obraz difundujúcich protilátok a upozorniť na existenciu interferujúcich, nešpecifických alebo patologických protilátok.

Protismerná imunoelektroforéza (CIE)

Je jednorozmerová dvojité elektroforéza, ktorá špecificky smeruje pohyb antigénu a protilátky proti sebe v elektrickom poli. pH prostredia je upravené tak, aby smerovalo protilátky ku katóde (negatívne nabitá elektróda) a antigén ku anóde (pozitívna elektróda). Tento pohyb rýchlo skoncentruje antigén a protilátku v oblasti medzi štartovacími jamkami. Táto metóda je citlivejšia ako dvojité difúzia. Je to metóda, ktorá sa použila ako prvá na detekciu HbsAg. Je užitočná na rýchlu diagnostiku – identifikáciu antigénov z baktérií pri niektorých závažných infekciách (meningitída, septikémia, DIC, pneumónia). Napriek tomu, že je vo väčšine použití nahradená menej pracnou latexovou aglutináciou je využiteľná na

dôkaz antigénov, u ktorých nie sú komerčné sety k dispozícii, teda aj na experimentálne účely. Podľa kvality použitých protilátok (senzitivita a špecificita) je minimálna detekovateľná koncentrácia bakteriálneho antigénu touto metódou 50 až 10 ng/ml.

6. 4. 3. 2 Korpuskulárne antigény a ich reakcie s protilátkami

Hemaglutinácia

Na zviditeľnenie väzby antigénu s protilátkou sa používa hemaglutinácia ako senzitívna a špecifická metóda. Množstvo antigénov môže byť naviazaných na erytrocyty, ktoré sú vlastne indikátorovým systémom na detekciu väzby antigénu s protilátkou. Sacharidové antigény boli schopné sa naviazať na erytrocyty priamo. Proteínové antigény vyžadovali opracovanie tanínom. Tanínom opracované erytrocyty zvyšovali senzitivitu testu. Následné opracovanie formalínom alebo glutaraldehydom tanínových erytrocytov s naviazaným proteinovým alebo sacharidovým antigénom umožňuje ich dlhodobé skladovanie. Test sa používal na detekciu protilátok proti toxínom *Corynebacterium diphtheria*, *Clostridium tetani*. Antigény *Treponema pallidum* absorbované na taninové erytrocyty sa používajú na detekciu špecifických protilátok v teste MHA-TP mikrohmaglutinačný test *T. pallidum*

Hemaglutináciu inhibujúci test – HIT

Princíp tohoto testu je založený na schopnosti niektorých vírusových antigénov (hemaglutinínov) aglutinovať erytrocyty niektorých zvieracích alebo vtáčích druhov. Špecifické protilátky proti týmto antigénom v ľudskom sére bránia takejto spontánnej aglutinácii, takže inhibícia hemaglutinácie erytrocytov je známkou prítomnosti špecifických protilátok proti určitým vírusovým antigénom. Tento test sa pôvodne používal na detekciu protilátok proti vírusu ružienky (v. rubeolly). Nedokáže však odlíšiť IgG a IgM protilátky. Používa sa tiež na detekciu protilátok proti niektorým ďalším vírusom – vírusy chrípky, arbovírusy, reovírusy, niektoré enterovírusy.

Agglutinácia – priama - klasická metóda využívajúce špecifické protilátky v roztoku, Antigen v biologickej vzorke reaguje so špecifickými protilátkami a vytvorí neroztrepateľné zhluky za súčasného vyčistenia tekutého prostredia alebo suspenzie. Využíva sa na rýchlu diagnostiku vyvolávateľov meningitíd detekciou v CSM, alebo u rozpustných antigénov v moči. Nevýhodou týchto metodík je nízka senzitivita. Sú založené na sledovaní viditeľného komplexu antigénu s protilátkou. Obvykle stačí na detekciu bakteriálnych antigénov, ale nie

vírusových, ktoré sú menšie a na vytvorenie viditeľných zhlukov je potrebné väčšia antigénna hmota.

Latexová aglutinácia

Latexové častice sú guľičky polystyrénu, ktoré sa viažu na Fc fragment IgG molekuly. Neobsadené Fab oblasti molekuly protilátky môžu viazať špecifický antigén. Cieľové antigény majúce opakujúce sa antigénne determinanty (polysacharidy), viacvalentné protilátky naviazané na viaceré latexové častice viažu antigénne molekuly a navzájom viažu latexové častice, čo sa prejaví ako viditeľná aglutinácia. Latexové častice slúžia a indikátorový systém zviditeľnenia reakcie antigénu s protilátkou. Teoreticky každý antigén (ale nie haptén), proti ktorému sa tvoria protilátky môže byť detekovný latexovou aglutináciou. V súčasnosti sa používa na detekciu voľných polysacharidových antigénov v CSM, moči. Latexová aglutinácia nahradila CIE pri detekcii polysacharidových antigénov v CSM (*N. meningitidis*, *H. influenzae b*, *S. pneumoniae*, *E.coli*, *S. agalactiae*) alebo plesní *Cryptococcus neoformans* a *Candida albicans*.

Koaglutinácia

Staphylococcus aureus obsahuje proteín A na povrchu bunkovej steny. Tento proteín je schopný viazať Fc fragmenty IgG podtried 1, 2, a 4 podobne ako je možné naviazať Fc fragment na latexové častice). Protilátkami pokrytý stafylokok sa tak môže stať indikátorom detekcie antigénu, protilátky proti ktorému sú nešpecificky naviazané na jeho povrchu. Koaglutinácia sa používala na detekciu bakteriálnych antigénov v CSM. Používa sa pri imunologickej skupinovej typizácii streptokokov, prípadne pri detekcii produkci koagulázy *St.aureus*. Akýkoľvek zhluk antigénu so zodpovedajúcim IgG sa svojimi Fc fragmentami môže viazať na proteín A, čo má za následok časté nešpecifické reakcie. Nešpecifickým reakciám je možné predísť opracovaním telesných tekutín, ktoré sa testujú rozpustným proteínom A, ktorý zablokuje väzby imunokomplexov. Druhou možnosťou je zahriatie telesnej tekutiny na 100 st. C, čím sa denaturujú IgG molekuly pacienta pred testovaním. Koaglutinácia je veľmi chýlostivá na nešpecifické reakcie, nevýhodou je krátka doba trvácnosti, vzhľadom na možnosť denaturácie baktérie. Väčšina testov, pri ktorých sa koaglutinácia používala bolo nahradených latexovou aglutináciou alebo imunoanalýzou.

6. 4. 4 Lytické reakcie

Komplement fixačná reakcia

Snáď najklasickejšia sérologická metóda je dvojstupňovou procedúrou, ktorá využíva komplement na lýzu indikátorových erytrocytov.

Prvá etapa reakcie je reakcia antigénu s protilátkou v prítomnosti komplementu. Komplement používaný v teste musí byť štandardizovaný, pokiaľ ide o jeho lytickú aktivitu. Preto sa pred testom používa titrácia komplementu – určenie lytickej aktivity komerčného zvieracieho komplementu. Aby v systéme neboli prítomné dva komplementy (štandardný a prirodzený v testovanom sére) je vo vzorke, ktorá má byť testovaná, komplement inaktivovaný zahriatím na 56 st.C. Ak je v testovanom sére prítomná špecifická protilátka, vytvorí sa komplex pridaného antigénu s protilátkou, ktorý má potenciál aktivizovať komplementovú kaskádu klasickou cestou. Dôjde k vyvيزaniu komplementu v testovanom systéme.

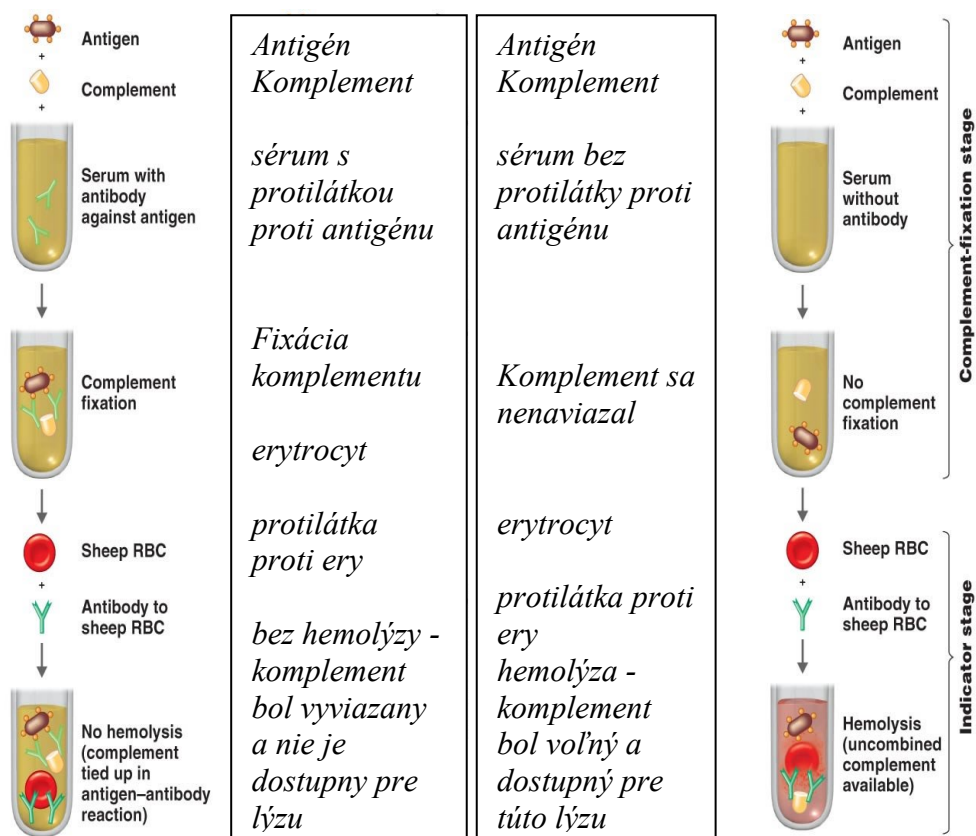
V druhej etape sa zvieracie erytrocyty naviazané na antierytrocytárne protilátky (indikátorový systém) pridajú k prvému stupňu.

Ak v prvej etape testu boli prítomné špecifické protilátky, naviazali sa na antigén a táto väzba aktivizovala komplementovú kaskádu. Tým bol komplement spotrebovaný, nezostal žiaden voľný komplement, aby sprostredkoval lýzu erytrocytov v prítomnosti ich protilátok v systéme druhej etapy reakcie.

Pozitívny výsledok (prítomnosť protilátky v sére pacienta) sa prejaví neprítomnosťou hemolýzy.

Druhá možnosť nastane, ak v prvej etape reakcie nie sú prítomné špecifické protilátky proti antigénu. Nedôjde k vytvoreniu imunokomplexov Ag-Ab, komplement nemá čím byť aktivizovaný a nie je spotrebovaný. Je k dispozícii, aby po pridaní indikátorového systému (erytrocyty + protilátky proti nim) bol týmto komplexom aktivovaný a spôsobil hemolýzu systému. Negatívny výsledok sa prejaví hemolýzou. KFR je semikvantitívna metóda používaná na detekciu antigénu alebo protilátky podľa nastavenia testu. KFR nedokáže odlišiť IgG od IgM, pretože obidve triedy sú schopné viazať komplement. Je výnimočne senzitívna a pri kvalitných diagnostikách (predovšetkým antigénu) aj veľmi špecifická. Náročnosť jej uskutočnenia spôsobila, že napriek dobrým výsledkom bola používaná len v laboratóriách s dobrou laboratórnou tradíciou a kvalitnou praxou. Je metódou, ktorá sa používa na testovanie protilátok proti menej prevalujúcim infekciám. Výhodou je, že s výnimkou špecifického antigénu, všetky súčasti testovacieho systému sú použiteľné nezmenené vo viacerých testoch.

Aglutinačné a lytické testy je možné nastaviť kvalitatívne alebo sú nastavené kvantitatívne, kedy je výsledok udávaný ako titer. Titer je prevrátená hodnota riedenia séra v poslednej skúmavke, v ktorej došlo k pozitívnej reakcii. Test je potrebné nastaviť tak, aby množstvu protilátok v sére zodpovedalo množstvo použitého antigénu a test prebiehal v zóne ekvivalencie. Pri nadbytku antigénu alebo protilátky je možné získať falošne negatívny výsledok.



© 2013 Pearson Education, Inc.

Niektoré baktérie, napríklad *Streptococcus agalactiae* – beta hemolytický streptokok skupiny A, produkujú rôzne extracelulárne toxíny, ktoré môžu stimulovať tvorbu protilátok u infikovaného pacienta. Viaceré z týchto toxínov plnia funkciu hemolyzínov, pričom špecifické protilátky neutralizujú funkciu toxínov a zabránia hemolýze. Podobne ako pri KFR potom pozitívny test je predstavovaný neprítomnosťou hemolýzy. Negatívny test – neprítomnosť špecifických protilátok – sa prejaví hemolýzou erytrocytov. Najbežnejšie

používaným testom je **test titrácie ASLO**, ktorý je imunologickým dôkazom invázie baktérie *Str. pyogenes*

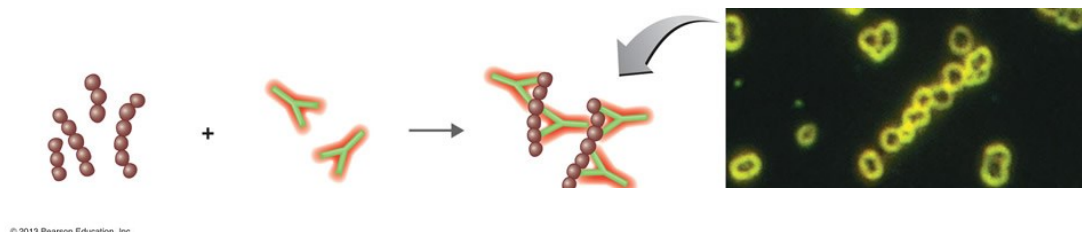
6. 4. 5 Imunofluorescenčné analýzy

Imunofluorescenčné analýzy sú najčastejšie využívanými imunohistochemickými technikami. Imunohistochémia je prístup, pri ktorom sa na povrchu histologického preparátu určitého tkaniva alebo buniek (bunky opíich pažerákov, obličiek a i.) vychytávajú špecifické protilátky proti nemu zo séra pacienta (imunoglobulíny) a takýto komplex je potom identifikovaný konjugátom značeným chemickou substanciou (napr. fluorescenčné farbivo - fluorochróm). Imunofluorescencia využíva tkanivo alebo bakteriálne bunky ako substrát (zdroj antigénu) pripevnený na sklíčku a fluorochrómom konjugovaný (protilátkový) detekčný systém. Imunofluorescencia zostáva „zlatým štandardom“ pre sérologickú diagnostiku mnohých infekčných ochorení. Výhodami imunofluorescencie je, že substrát môže byť vizualizovaný, čo zaisťovalo špecificitu niektorých reakcií, že je významne menej pracná ako niektoré iné metodiky – predovšetkým KFR, že je vysoko reprodukovateľná pri rutinnej práci a pri nepriamej imunofluorescencii môže byť rovnaký konjugát použitý na detekciu protilátok proti rôznym anatiénom. To umožňuje vyšetriť jednu vzorku na viacero protilátok alebo anatiénov na jednom sklíčku rámci diferenciálnej diagnostiky, čo môže výrazne skrátiť diasnostiku. Nevýhodami imunofluorescencie je, že vyžaduje čerstvé alebo mrazené tkanivo alebo bunky, že tkanivá alebo nátery používané pre Gramovo farbenie nie sú použiteľné, že vyžaduje špeciálne vybavenie (fluorescenčný mikroskop), že vyžaduje intenzívnu laboratórnu prácu vo viacerých krokoch (riedenie, viacnásobná inkubácia, premývanie, krycie sklíčka), že odčítavanie je subjektívne, že vyžaduje skúsenosti a viaceré kontrolky špecificity a senizitivity. Výhodou je však rýchlosť a individualizácia vyšetrenia, čo ju robí výhodnou pre experimentálnu prácu.

Priama imunofluorescencia

Priama fluorescencia sa používa na detekciu anatiénov alebo organizmov prítomných v bunkách alebo tkanivách za použitia s fluorochrómom konjugovaným antisérom (konjugát) špecifickým k testovanému anatiénu. Využitie priamej imunofluorescencie je dôležité pri detekcii prítomných anatiénov v tkanivách (elementárne telieska *Chlamydia trachomatis* v epiteliálnych bunkách pohlavných orgánov, *Treponema pallidum* z miesta ulcusu alebo mukokutánnej lézie, *Borrelia burgdorferi* z miesta infekcie a identifikáciu ťažko

kultivovateľných alebo nekultivovateľných mikroorganizmov v tkanivách – vírusy HSV, CMV, RSV, VZV, baktéria *Legionella pneumophila*, *Leptospira sp.*).



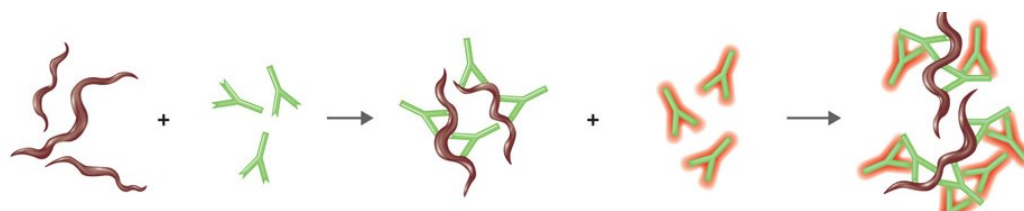
Nepriama imunofluorescencia

Nepriama imunofluorescencia sa používa predovšetkým na detekciu protilátok v sére pacienta. Známy antigén je fixovaný na sklíčko. Pacientovo sérum aplikované na príslušné miesto obsahujúce substrát sa inkubuje tak, aby došlo k vytvoreniu komplexu antigénu s protilátkou. Nenaštiežené nespecifické protilátky sú pri premývaní odplavené. Naštiežené špecifické protilátky sú potom inkubované s fluorescenčným konjugátom, aby sa vytvoril ďalší komplex antigénu s protilátkou (fluorescenčný konjugát protilátky proti imunokomplexu antigén + sérová špecifická protilátka). Fluorescenčný konjugát je potom treťou vrstvou na sklíčku. Nepriama imunofluorescencia môže byť určená na detekciu IgG, Ig total alebo IgM protilátky.

S fluoresceínom konjugované protilátky proti ľudským imunoglobulínom sú obvykle anti IgG proti kappa a lambda ľahkým reťazcom. Táto reaktivita s ľahkými reťazcami tiež môže detekovať IgA a IgM, čo môže znamenať, že test detekuje Ig total. Ak je test nastavený na stanovenie protilátok v priebehu akútnej infekcie, konjugát musí byť špecifický s IgM ťažkými reťazcami a nie ľahkými reťazcami alebo ťažkými reťazcami iných špecifícit.

Klasicky sa imunofluorescencia používala na detekciu protilátok proti *Treponema pallidum* v teste FTA ABS – fluorescenčný absorbný test. Antigén *Treponema pallidum* Nicholsonov kmeň je fixovaný na sklíčko. Pred inkubáciou je pacientovo sérum inkubované na nepatogénny Reiterov kmeň *Treponema pallidum*. Takýto postup výrazne zvyšuje senzitivitu. Falošne pozitívne reakcie je možné zaznamenať u pacientov s autoimunitnými reakciami, hypergamaglobulínémiou a boreliózou kvôli skríženej reaktivite antigénnych epitopov spoločných pre Spirochetales. V súčasnosti je fluorescencia významným prínosom pre

stanovovanie antinukleárných protilátok a ďalších typov protilátok súvisiacich s autoimunitnými ochoreniami.



© 2013 Pearson Education, Inc.

Amplifikácia –zvyšovanie senzitivity.

U imunofluorescenčných metód je senzitivita obmedzená intenzitou fluorescencie, ktorá je detekovateľná ľudským okom. Optimálny pomer fluoresceínu a proteínu v konjugáte je 2,5. To predstavuje 2-3 molekuly fluoresceínu na každej molekule imunoglobulínu, čo je dosažiteľné pri bakteriálnych alebo parazitárnych povrchových antigénoch. Priamo konjugujúce protilátky s vyšším pomerom fluoresceínu a proteínu môžu zvyšovať nešpecifické zafarbenie. Detekcia nízko denzitných antigénov alebo použitie monoklonálnych protilátok si niekedy vyžiada vyšší pomer fluoresceínu a proteínu, aby sa dosiahla dostatočná senzitivita. Nepriama imunofluorescencia alebo dvojité nepriama imunofluorescencia sa používa na zosílnenie fluorescenčného signálu a zlepšenie senzitivity.

Ak môžu byť antigény detekovateľné priamou fluorescenciou, nepriama fluorescencia zvyšuje senzitivitu testu. Ak je ťažké detekovať protilátky nepriamou fluorescenciou, dvojité nepriama fluorescencia zlepši detekovateľnosť zvýšením citlivosti testu. Ak organizmus nie je viditeľný pri priamej imunofluorescencii, je možné ho zopakovať s nekonjugovanými protilátkami (napríklad králičími). Všetky nenaviazané protilátky by mohli byť odplavené pri premývaní a naviazané králičie protilátky je možné detekovať za použitia s fluoresceínom konjugovanými kozími anti králičími IgG protilátkami. Každá králičia IgG molekula obsahuje mnoho antigénnych miest, ktoré budú rozpoznané kozími anti králičími IgG protilátkami. Ak štyri kozie molekuly proti králičím IgG molekulám sa viažu na králičie IgG, intenzita fluorescencie sa zvýši štyrikrát. Ďalšie kontrolky je potrebné pridať na skontrolovanie či ďalší krok zvyšujúci senzitivitu neznižuje špecificitu.

Komplementom amplifikovaná fluorescencia, tiež nazývaná antikomplementová fluorescencia sa používala na detekciu herpesvírusov. Tkanivo infikované herpetickými vírusmi (bunky tkanivových kultúr) majú zvýšenú expresiu Fc receptorov pre IgG, ktoré

nešpecificky viažu molekuly protilátky IgG. Antikomplementová nepriama fluorescencia využíva komplement ako tretiu zo štyroch vrstiev. Antigén je substrátom na sklíčku, pacientovo sérum je pridané tak ako pri nepriamej imunoflorescencii. Zdroj aktívneho komplementu (morčacie) sa pridá v ďalšom kroku. IgG molekuly viazané na Fc receptory nemôžu viazať C1q. IgG alebo IgM viazané na antigén Fab fragmentom neviaže C1q a aktivizuje klasickú cestu komplementu. Po odstránení nenaviazaného komplementu a ostatných proteínov premývaním sa aplikuje Fab2 fluorescenčný konjugát proti morčaciemu C3. Antikomplementová nepriama imunofluorescencia eliminuje potrebu kontroly nešpecifickej IgG väzby pretože súčasť komplementu sa detekuje namiesto IgG. Tento typ testu sa využíva na diagnostiku protilátok proti niektorým herpetickým antigénom (EBNA EBV).

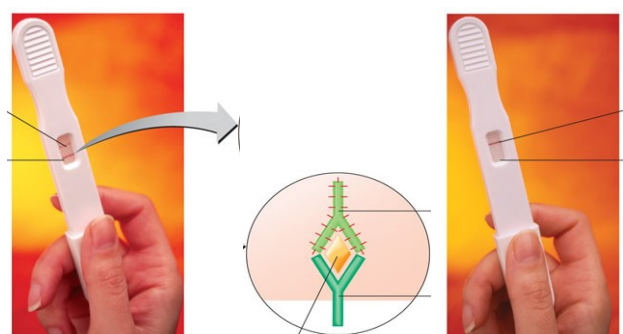
Veľmi účinnou amplifikačnou metódou je **komplex avidín biotín**. Biotín sa kovalentne viaže na protilátky, konjugovaný avidín je ďalším stupňom. Avidín má výraznú väzobnú afinitu pre biotín a každá molekula biotínu viaže štyri molekuly avidínu. Avidín môže byť konjugovaný s molekulami fluoresceínu bez straty schopnosti viazať sa na biotín. Toto má za následok veľmi jasné špecifické farbenie s minimálnymi nešpecifickými reakciami. Ako kontrolky sa používajú konjugovaný avidín a nešpecifické protilátky viazané z biotínom. Výhodou avidín-biotínového komplexu je, že tá istá protilátka s naviazaným biotínom môže byť použitá pri viacerých rôznych konjugovaných avidínoch napr. fluoresceín (zelená fluorescencia), fykoerytrín (červená fluorescencia), peroxidáza (svetelný mikroskop), feritín (elektrónová mikroskopia). Avidín biotínový komplex je výhodný pri práci s monoklonálnymi protilátkami, pretože väzba na biotín je rýchla, laboratórne nenáročná a účinná (nenarúša schopnosti viazať antigén).

6. 4. 6 Imunoenzýmové techniky

Rýchlotesty

Rýchle diagnostické testy na detekciu antigénu alebo protilátok v klinickej vzorke sú zaujímavé pre lekárov prvého kontaktu, pretože na ich základe je možné skrátiť diagnostické rozhodovanie a bez dlhého odkladu aplikovať kauzálnu terapiu alebo vylúčiť podozrenie. Niekedy to je laboratórium v krabici, lebo jediný krok stanoví diagnózu. Základnými kvalitatívnymi požiadavkami sú technické parametre a manipulácia (jednoduchosť metodiky, nenákladnosť vybavenia, krátky časový interval do získania výsledku - MX 10-15 minút). Na diagnostiku antigénu sa používajú koloidné zlatom značené protilátky, pričom sa využíva

kapilárny tok antigénu proti detekčným protilátkam. Tie sú imobilizované na papierovom stripe a migrujú po namočení stripu vo vzorke. Kontrolné činidlo označené zlatom (anti ľudské imunoglobulíny) je fixované na strip horizontálne (-). Vertikálna čiara vznikne po vychytaní koloidného zlatom značeného roztoku s imobilizovanými antiľudskými protilátkami. Rýchlotesty na stanovenie protilátok sú citlivejšie ako testy na stanovenie antigénu. Ich citlivosť sa približuje klasickým imunoenzymovým technikám.



Pozitívny **komplex Ag vo vzorke** **Negatívny**
s imobilizovanou protilátkou
v teste

Rýchla enzýmová imunoanalýza na detekciu antigénov (EIA) je metóda, ktorá v posledných rokoch oslovuje ani nie tak klinické laboratóriá ako skôr ambulancie prvého kontaktu, malé nešpecializované laboratóriá zamerané na rýchlu a automatizovanú diagnostiku a v niektorých prípadoch všeobecnú populáciu. K dispozícii sú techniky využívajúce EIA na detekciu proteínových antigénov. Väčšina metód je určená na kvalitatívne stanovenie prítomnosti alebo neprítomnosti antigénov na základe farebnej zmeny. Väčšina týchto metód bola vyvinutá s cieľom rýchlej diagnostiky. Sú veľmi jednoduché a nevyžadujú špeciálne technické či laboratórne vybavenie ani zaškolený personál. Je možné ich vykonať v ambulancii lekára. Napriek vysokej cene sú výhodné pre lekára aj pacienta. Potvrdením napr. streptokokovej angíny je možné aplikovať kauzálnu liečbu penicilínom, čím sa znižuje frekvencia používania širokospektrálnych antibiotík. Klinické laboratóriá nepoužívajú často tieto techniky nielen kvôli ich vysokej cene, ale predovšetkým kvôli často neadekvátnej senzitivite či špecifícite, respektíve dôležitosti presnej identifikácie a následných testov (napríklad stanovenie citlivosti). Aj rýchlotesty majú svoje presné určenie a vymedzenie, kedy sú prvou voľbou.

Novšie techniky rýchlej diagnostiky využívajú lipozómy, umelé lipidové sférické častice na detekciu niektorých antigénov (streptokoky skupiny A). V tomto teste špecifická protilátka je adsorbovaná na porézny materiál. Vzorka pacienta sa aplikuje na jeho povrch a ak obsahuje antigén, tento sa naviaže na protilátky. Lipozómy pokryté protilátkami proti tomu istému antigénu a obsahujúce farbičku vo vnútri koncentrických vrstiev sa následne priejdu miestom prebiehajúceho testu. Ak nebol naviazaný žiaden antigén zo vzorky na protilátky na poréznom materiáli, lipozómy prejdú cez porézny materiál. Ak sa lipozómy naviažu, farbička sa uvoľní premývacím roztokom, ktorý lýzuje lipozómy a deponuje farbičku do matrix.

Problémom týchto postupov môže byť aj nesprávny odber. Napríklad pri teste dôkazu antigénu *Chlamydia trachomatis* môže negatívny výsledok znamenať „neprítomný antigén“ alebo aj „nevhodne odobratá vzorka“. Rýchle detekčné EIA metódy pre sexuálne prenosné ochorenia môžu byť k dispozícii v ambulanciách lekára, ale aj pre všeobecnú populáciu – podobne ako Baby testy. Tieto testy však neposkytujú ďalší postup vrátane stanovenia citlivostí na ATB a epidemiologického šetrenia. Ako odpoveď na tieto problémy by si klinický mikrobiológ a každý, kto ich používa, mal byť vedomý ich obmedzení.

ELISA – enzyme linked immunosorbent assay

ELISA metódy predstavujú zlatý štandard v diagnostike infekčných ochorení a vzhľadom na ich variabilitu a jednoduchosť prípravy home-made setov sú vhodné pre výskum a vývoj nových diagnostických nástrojov. Prvýkrát bola enzýmová imunoanalýza popísaná v roku 1971 Engvallom a Perlmanom. Použili metódu Nakana a Piercea, keď konjugovali enzým chrenovú peroxidázu na imunoglobulín a tento konjugát použili na detekciu špecifického imunoglobulínu v mikrotitračnej platničke. Túto metódu nazvali ELISA – enzyme linked immunosorbent analysis. V začiatkoch bola ELISA menej citlivá ako RIA, ale postupne so zavedením viac krokových metodík sa zvýšila citlivosť obidvoch metód a zmenami v systéme konjugovania enzýmov sa stali obidve metódy odborne rovnocenné. Väčšie rozšírenie ELISA metódy spočíva v nižšej cene a v nižších nákladoch na bezpečnosť.

Na pevný podklad (polyetylénová jamka) je naviazaný antigén na detekciu protilátky. Následne sa aplikuje pacientovo sérum, v ktorom sa hľadá špecifická protilátka. Ak je prítomná, v priebehu inkubácie dôjde k jej naviazaniu sa na antigén absorbovaný na pevnú fázu. Následné premývanie odstráni nenaviazané sérum s nešpecifickými protilátkami. Potom sa aplikuje konjugát (protilátka proti naviazanému komplexu – anti human enzyme conjugated antibody - protilátka proti ľudskému imunoglobulínu konjugovaná s enzýmom). Premývaním sa odplaví nenaviazaný konjugát. Následne sa aplikuje substrát, ktorý rozloží

prítomný enzým konjugátu, čo sa prejaví farebnou zmenou. Intenzita farebnej zmeny je merateľná fotometricky a umožňuje kvantitatívne nastavenie testu.

Technické súčasti metodiky ELISA

Pevná fáza

ELISA je najrozšírenejšou imunoenzýmovou metódou na pevnej fáze. Používajú sa umelohmotné, polyetylénové, PVC, nitrocelulóзовé, agarózové, sklené, celulóзовé, polyakrylové, dextranové povrchy. Klasická 96 jamková umelohmotná platnička je asi najrozšírenejší pevný povrch využívaný na enzýmovú imunoanalýzu. Dnes sú využívané v podobe 8 jamkových stripov alebo samostaných jamiek, aby bolo možné vyšetriť menší počet vzoriek. Používajú sa aj umelohmotné guľičky, ktoré sú adoptovné niektorými spoločnosťami a vytvárajú tak zatvorený systém diagnostiky (analýzátor využívajúci len jeden typ diagnostík). Na tento povrch sa pasívne, alebo s použitím metód na kovalentnú väzbu absorbuje známa protilátka (ak chceme dokázať antigén) alebo známy antigén, ak sa dokazuje protilátka. Príprava diagnostických platničiek s jamkami pokrytými špecifickými antigénmi je možná aj v laboratóriu (home-made). Metodiky nevyžadujú špeciálne vybavenie, sú však náročné na presnosť, štandardizáciu a vyhľadanie najlepších koncentrácií jednotlivých súčastí. Najdôležitejším krokom je presné a úzkostlivé premývanie všetkých jamiek platničky za účelom odstránenia prebytkov reagensii, ktoré by mohli blokovať nasledujúce kroky alebo byť zdrojom falošnej positivity. Dostupnosť ELISA metód pre rutinnú prax bola umožnená komerčnou ponukou špecifických mikrotitračných platničiek v sete so všetkými potrebnými diagnostikami pre úplný test.

Konjugát

Podľa typu imunoenzýmovej analýzy pri ďalšom kroku sa používa konjugát antigénu alebo protilátky s enzýmom. Naviazaným enzýmom je buď chrenová peroxidáza alebo alkalická fosfatáza alebo niektorý z ďalších enzýmov. Najdôležitejšími vlastnosťami enzýmu používaného na konjugáciu sú stabilita, nízka cena, jednoduchá konjugácia, neprítomnosť v ľudskom sére a ľahká detekovateľnosť. Enzým sa môže konjugovať s rôznymi vychytávacími molekulami (polyklonálne protilátky, IgG frakcie, Fab fragmenty polyklonálnych protilátok, purifikované protilátky, monoklonálne protilátky). U home-made testu je potrebný kompromis medzi optimálnym výsledkom a najnižšou cenou. Relatívne najdostupnejšie polyklonálne protilátky sú lacné, ale nie sú purifikované, a tak sú zaťažené rizikom nešpecifických reakcií. Najlepšie výsledky poskytujú purifikované afinitné protilátky, ktoré je možné získať aj komerčne pripravené. Konjugáty s chrenovou peroxidázou sú

lacnejšie. Najdrahšie ale aj najšpecifickejšie sú konjugáty monoklonálnych protilátok. Pri home made technike je dôležité stanoviť vhodné riedenie tak, aby absorbanca pozitívneho testu bola vyššia ako 1,0. Existuje celá škála najrôznejších konjugátov. Pre špeciálne účely je niekedy potrebné vytvoriť konjugát v laboratóriu. Dôležitými bodmi je koncentrovanie protilátok a odstránenie iných proteínov, tak aby neboli označené enzýmom. Uskutočňuje sa to ionovou výmenou alebo chromatograficky alebo sulfátom amónnym. Ďalším krokom je konjugácia. Na blokovanie miest, ktoré neboli konjugované alebo na saturovanie suboptimálne pokrytého povrchu jamky sa používa pufer obsahujúci albumín z bovinného séra alebo želatína. Aby sa zabránilo prípadným neimúnnym interakciám v jamke platničky, všetky následné reagencie obsahujú pufer s detergentom (0,1% Tween 20) Aj premývacie roztoky sú pripravované tiež s pufrom obsahujúcim Tween 20.

Substrát

Pri výbere substrátu, ktorý má byť použitý na zviditeľnenie reakcie s protilátkou je potrebné brať do úvahy jeho vlastností. Substrát po expozícii enzýmu musí vytvoriť rozpustný merateľný produkt s nízkou vlastnou absorbancom, stabilný, netoxický, lacný. Ak sa meria farebná zmena spektrofotometricky je potrebné vybrať substrát z ktorého vznikne produkt s farbou merateľnou dostupnými filtrami. Pre chrenovú peroxidázu sa používa peroxid vodíka, orthofenyléndiamín, 5 aminosalicyllová kyselina, 3,3',5,5' tetrametylbenzidín (TMB). Pre alkalickú fosfatázu je najvýhodnejším p-nitrofenylfosfát. Použitie PBS ako premývacieho roztoku môže pôsobiť inhibične. Je možné použiť TRIS pufer, ktorý zvyšuje aktivitu alkalickú fosfatázu.

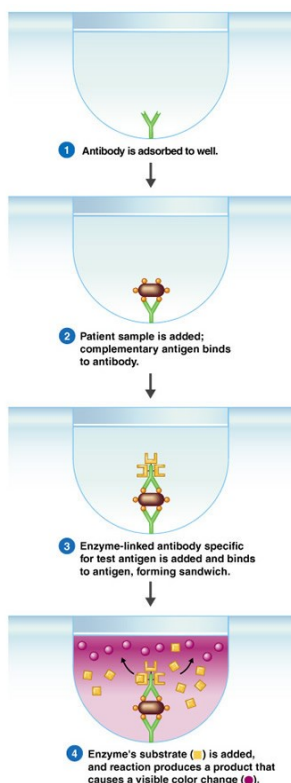
Odčítavanie

Každá metodika využívajúca pevnú fázu má charakteristickú metódu na meranie a interpretáciu reakcie. Meranie sa uskutočňuje spektrofotometricky porovnaním optickej denzity vzorky a kalibrátora alebo hraničnej hodnoty. Prístroj je potrebné vynulovať proti vzduchu alebo substrátu, pri niektorých testoch substrátu s konjugátom. Na vytvorenie kalibračnej krivky sa použijú riedenia štandardnej koncentrácie a k nim patriace absorbancom. Obvykle sa používa absorbanca a zodpovedajúci logarytmus koncentrácie. Tiež existujú počítačové programy predovšetkým pri experimentálnom použití home-made metodík. Jednou z potrebných úloh pri zavádzaní nových metód a testov je určenie priemernej hodnoty absorbancom vzoriek u normálnej populácie a pozitivitu stanoviť ako 2 až 3 násobok štandardnej odchýlky nad túto hodnotu. Hoci táto metóda vyžaduje testovanie len jedného riedenia vzorky pacienta nie je bez obmedzení. Takýto štatistický prístup nie je použiteľný pre parametre, ktoré nemajú normalálnu distribúciu a môže byť málo vzoriek pre neparametrické

štatistiky. Naväčším problémom ale je pravdepodobne slabá reprodukovateľnosť absolútnych hodnôt. Aby bolo možné vyriešiť tento problém používa sa tzv. upravená hodnota absorbancie, kedy sa absorbancia pacienta vyjadruje ako pomer alebo percento pozitívnej kontrolky. Aj tak je potrebné sledovať hodnoty absolútnych absorbancií, čím sa sleduje relatívna stálosť medzi jednotlivými testami. Tiež je možné použiť poolované sérum s danou hodnotou arbitrárnych jednotiek a vytvoriť kalibračnú krivku podľa riedenia, z ktorej sa odčíta hodnota pacienta. Navrhuje sa tiež určenie pomeru oblasti pod krivkou pre testované sérum a pre referenčné sérum. Táto technika zlepšuje reproducibilitu a kvantitatívne hodnotenie, ale vyžaduje komplikované výpočty a viacero riedení séra pacienta, aby bolo možné získať hodnoty v lineárnej časti krivky.

Kontrola a štandardizácia

Kontrolky pre každý test zahŕňajú pufer, negatívna kontrolka, nízko a vysoko pozitívne séra a absorbanciu všetkých reagensí. Pri home made teste je dôležité stanoviť väzbu pacientovho séra na nepokrytú platničku, pretože u niektorých testoch sa sérum nešpecificky viaže aj ak je pevná fáza pokrytá nešpecifickým proteínom. Môže to byť problém pri testoch určených na testovanie IgM a niekedy je potrebné vyšetriť vzorky dvakrát – na naviazanej aj nenaviazanej platničke, a potom výsledky odčítať. Kedykoľvek sa používajú nové diagnostika je vhodné urobiť kontrolné meranie, pretože nie existujú významné rozdiely medzi platničkami a konjugátmi a nikdy sa nezabezpečia rovnaké laboratórne podmienky. Preto použitie štandardnej krivky poskytuje reprodukovateľnejšie výsledky. Heterofilné protilátky môžu interferovať pri sendvičových testoch. Tieto protilátky môžu byť smerované voči viacerým rôznym živočíšnym druhom s ovplyvniť výskyt falošne pozitívnych výsledkov, ktoré sú spôsobené skríženou reaktivitou dvoch protilátok v sendviči. Použitie monoklonálnych protilátok alebo neimúnne imunoglobulíny zodpovedajúceho zvieracieho druhu eliminujú interferenciu.



Priama ELISA metóda

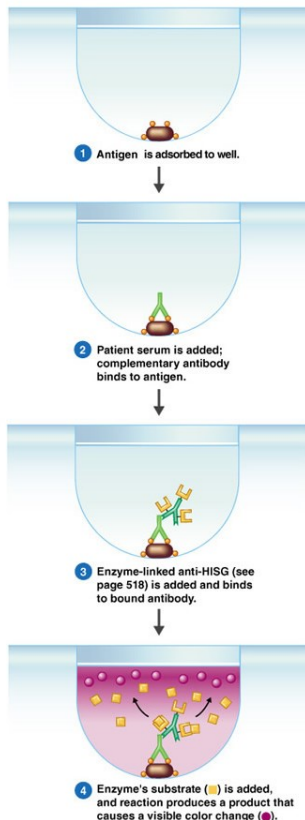
Protilátka naviazaná na pevnú fázu jamky ELISA setu

Antigén vo vzorke je naviazaný na špecifickú protilátku v jamke

Sekundárna protilátka značená enzýmom sa naviaže na prítomný naviazaný antigén

Pridaný chromogén substrát je rozložený enzýmom detekčnej protilátky a zmena farby a jej intenzita ukazuje na prítomný antigén vo vzorke a jeho koncentráciu.

© 2013 Pearson Education, Inc.



Nepriama ELISA metóda

Antigén naviazaný na pevnú fázu ELISA doštičky setu

Protilátka v sére pacienta sa špecificky naviaže na antigén viazaný v jamke

Enzýmom značená protilátka proti ľudskému imunoglobulínu indentifikuje naviazanú ľudskú protilátku a obvykle aj izotyp

Pridaný chromogén substrát je rozložený enzýmom detekčnej protilátky a zmena farby a jej intenzita ukazuje na prítomnú špecifickú protilátku vo vzorke a jej koncentráciu

© 2013 Pearson Education, Inc.

Capture metódy sú ďalšou možnosťou technológie pevnej fázy, ktorú je možné použiť na detekciu antigénu alebo protilátky. Používajú buď polyklonálne alebo monoklonálne protilátky absorbované na pevnú fázu k väzbe (capture) antigénu, ktorý má byť detekovaný. Enzýmom značené protilátky na detekciu môžu byť monoklonálne alebo polyklonálne. Polyklonálne protilátky sú vhodnejšie na detekciu rôznych antigénov. Monoklonálne protilátky sa viažu len na jediný epitop. Capture metódy sú do určitej miery citlivejšie pri použití polyklonálnych protilátok, ktoré viažu viaceré antigénne epitopy. Capture metódy na detekciu IgM protilátok proti rôznym vírusovým antigénom využívajú zvieracie protilátky proti Fc fragmentu ľudských IgM naviazaných na pevnú fázu. Existuje možnosť, že všetky IgM molekuly v pacientovom sére sa môžu naviazať na anti IgM protilátky bez ohľadu na ich špecificitu. Antigén, ktorý sa má naviazať na IgM je konjugovaný s enzýmom alebo biotínom, ak je potrebná amplifikácia, a inkubovaná s captured IgM. Ak IgM špecifické k enzýmom konjugovaným antigénom sú prítomné, antigén je vychytaný pacientovým IgM a enzým - substrát reakcia prebehne. Intenzita farebnej reakcie je priamo úmerná hladine špecifických IgM protilátok v sére pacienta. Capture testy majú veľký potenciál na detekciu IgM protilátok. Je to účinná metóda na stanovenie protilátok (napr. pri detekcii intrauterinných kongenitálnych infekcií). Capture metódy nie sú použiteľné na detekciu špecifických IgG protilátok. Počas akútnej fázy infekcie, zvlášť pri kongenitálnych vírusových infekciách je väčšina IgM protilátok vírus špecifických.

6. 4. 7 IgM a IgG separačné metódy

Falošne pozitívne a falošne negatívne reakcie pri imunoserologických testoch na stanovenie IgM sú relatívne častým problémom. Stanovenie IgM protilátok môže byť falošne pozitívne, čo sa pripisuje prítomnosti reumotoidného faktoru (RF) v testovanom sére alebo polyklonálnej aktivácii plazmatických buniek. Reumotoidný faktor je molekula IgM schopná naviazať sa na Fc fragment IgG a deje sa tak obvykle potom, čo sa IgG naviazal na špecifický antigén. Proces viazania na antigén spôsobí konformačné zmeny v IgG, ktoré exponujú nové antigény na Fc oblasti IgG molekúl. RF – IgM sa viaže na tieto novo exponované IgG determinanty. Pokiaľ nedôjde k separácii, IgM RF nie je možné odlíšiť od špecifických IgM. Takéto odlíšenie je ale nutné predovšetkým pri testovaní novorodeneckých sér na špecifické IgM protilátky proti vyvolávateľom intrauterinných infekcií. Falošne pozitívne IgM môžu byť spôsobené nešpecifickými protilátkami medzi jednotlivými herpesvírusmi (EBV, CMV, VZV). Stanovenie IgM protilátok môže byť aj falošne negatívne, ak IgG protilátky inhibujú alebo súťažia s IgM o väzobné miesta na antigénoch. Aby bolo možné vyhnúť sa falošne

pozitívnym alebo falošné negatívnym reakciám je potrebné separovať IgG a IgM. Je tiež dôležité si uvedomiť, že produkcia IgM protilátok je zachovaná u pacientov so supresiou bunkovej imunity (cytostatická liečba, imunosupresívna liečba, biologická liečba, u HIV pacientov, pacientov s AIDS), pretože ich produkcia je nezávislá na funkcii T lymfocytov a môže byť preto indikátorom akútnej infekcie, ale aj reinfekcie.

Na to, aby bolo možné vylúčiť falošne pozitívne a falošne negatívne výsledky u špecifických IgM a IgG testoch, existujú viaceré separačné metódy založené na odlišnej veľkosti týchto molekúl. Fyzikálna separácia sa uskutočňuje stĺpcovou chromatografiou, alebo ultracentrifugáciou na báze cukrového gradientu. Nie sú to ale praktické systémy pre klinické laboratória. Účinnými metódami bežne používanými je ionová stĺpcová výmena. IgG prejde cez stĺpec a IgM sa zachytí a je vyplavený puframi s nižším pH a vyššou ionovou silou ako bol aplikačný pufer. Množstvo aplikovaného séra a vymývacieho pufru sa kontroluje, aby bolo možné zaistiť konečné riedenie ekvivalentné riedeniu séra. Preto sú výsledky semikvantitatívne. Pri niektorých metódach je sérum absorbované stafylokokovým proteínom A na nerozpustnú hmotu. Stafylokokový proteín A vyvážuje a imobilizuje IgG molekulu v mieste Fc fragmentu. Absorpcia proteínom A odstraňuje IgG 1, 2 a 4 zo séra a pravdepodobne aj vírus špecifické IgM. Prevenciou interferencie IgG pri komerčných EIA súpravách na testovanie IgM je ich absorpcia s anti humánnym IgG alebo agregovaným ľudským gama globulínom. Anti IgG sa viaže s IgG vo vzorke a odstraňuje IgG reaktivitu na antigén. Pokiaľ vo vzorke nie je žiadna molekula IgG, na ktorú sa naviazal antigén, RF sa nenaviaže. Agregovaný ľudský gama globulín (AHGG) neutralizuje RF, ale neeliminuje potenciál pre falošne negatívny výsledok kompetíciou s IgM o väzbové miesta pre antigén. Anti IgG opracovanie je účinnejšie ako AHGG pokiaľ ide o eliminovanie nešpecifických IgM protilátok bez ovplyvnenia špecificity. Obidve metódy sú však účinnejšie ako iónové výmenné separačné metódy. Nemusia byť však dostatočné na odstránenie IgG protilátok od pacientov s hypergammaglobulínémiou.

6. 5 Požiadavky na kvalitu vyšetrovacej metódy

Hodnota testov

Zavedenie určitého testu alebo metodiky by malo byť v laboratóriu uskutočnené na základe určitých kritérií. Základným kritériom použitia každého postupu je využiteľnosť jeho výsledkov t.j. či je jeho použitie klinicky relevantné a optimálne. Ďalšími významnými odbornými charakteristikami každého testu je špecificita, senzitivita, prediktívna hodnota

Technickými charakteristikami výsledku sú reprodukovateľnosť, správnosť a presnosť. Senzitivita testu (klinická alebo diagnostická) hovorí o percente ľudí, ktorí majú určitú chorobu a u ktorých sa získa pozitívny výsledok testu. Negatívny výsledok u osôb, ktoré majú ochorenie sa označuje falošne negatívny a znižuje senzitivitu testu. Špecificita testu udáva percento osôb, ktorí nemajú ochorenie a u ktorých sa zistí negatívny výsledok. Pozitívny výsledok u nich sa označuje ako falošná pozitivita a znižuje špecificitu testu. Senzitivita sa používa aj vo vzťahu k najmešiemu množstvu detekovanej látky, ktorý daný test identifikuje. Je to tzv. analytická senzitivita. Špecificita testu vo vzťahu k protilátkam hovorí o schopnosti testu odlíšiť určitý cieľový antigén od ostatných. (Podobne špecificita antigénu vychytať len cieľové špecifické protilátky, ktorých produkcia bola vyvolaná identickým antigénom). Predpovedná hodnota testu ukazuje na pravdepodobnosť, že test správne odhalí prítomnosť alebo neprítomnosť určitej choroby. Prediktívna hodnota pozitívneho testu alebo pozitívna prediktívna hodnota, je pomer osôb s pozitívnym testom, ktorí sú skutočne pozitívni alebo majú danú chorobu. Prediktívna hodnota negatívneho testu alebo negatívna prediktívna hodnota je pomer osôb, ktorí mali negatívny výsledok a ktorí sú skutočne negatívni alebo nemajú danú chorobu. Prediktívne hodnoty sú ovplyvnené prevalenciou infekcie v populácii.

Výpočet senzitivity

$$\% \text{ senzitivity} = \frac{\text{skutočne pozitívni}}{\text{skutočná pozitivita} + \text{falošná negativita}} \times 100$$

Výpočet špecificity

$$\% \text{ špecificity} = \frac{\text{skutočne negatívni}}{\text{falošne pozitívni} + \text{skutočne negatívni}} \times 100$$

Výpočet prediktívnej hodnoty

$$\% \text{ pozitívnej predpovede} = \frac{\text{skutočne pozitívni}}{\text{skutočne pozitívni} + \text{falošne pozitívni}} \times 100$$

$$\% \text{ negatívnej predpovede} = \frac{\text{skutočne negatívne}}{\text{skutočne negatívni} + \text{falošne negatívni}} \times 100$$

Klinické hodnotenie nového diagnostického testu je založené na určení skutočného stavu pacienta na základe klinických kritérií alebo aj výsledkoch referenčných diagnostických testov. Štandardy voči ktorým sa hodnotí nový test sa nazývajú zlatý štandard alebo referenčný test.

Falošné pozitívne výsledky

Imunoenzymatické testy na stanovenie protilátok môžu byť falošne pozitívne z rôznych dôvodov. Reumatoidný faktor je tvorený IgM anti imunoglobulínovými protilátkami a spôsobuje falošne pozitívne výsledky v sérach ktoré obsahujú IgG protilátky v imunoanalýzach s antigénom viazaným na pevnú fázu. Napríklad séra obsahujúce RF a protilátky typu IgG proti vírusu rubeolly môžu dať falošne pozitívne výsledky v testoch na vychytanie IgM protilátok proti vírusu rubeolly. Dôvodom je to, že RF(IgM) sa viaže na IgG protilátky proti rubeole naviazané na antigén na pevnej fáze a tie sa viažu na IgM konjugát. Túto interferenciu je možné odstrániť odstránením IgG protilátok zo vzorky alebo IgM capture analýzou. Skrížene reagujúce protilátky sú najdôležitejšou príčinou falošne pozitívnych výsledkov imunoanalýz s antigénom na pevnej fáze. Skrížene reagujúce protilátky je možné odstrániť adsorbciou špecifickými antigénmi. Ďalšou možnosťou ako odstrániť skrížene reagujúce protilátky je purifikácia na stĺpci obsahujúcom antigén. Ak test dáva falošne pozitívne výsledky zvlášť v oblasti s nízkou prevalenciou je potrebné urobiť konfirmačné testy alebo doplnujúce testy. Tento problém je častý pri rekombinantných antigénoch, kedy napriek purifikácii perzistujú antigénne zbytky *E.coli*, protilátky proti ktorým sú bežné v sérach pacientov. Rovnako pri niektorých testoch na stanovenie protilátok proti boréliám nie je možné považovať protilátky proti flagelínu - bičíkovému antigénu p41 za výpovedné, pretože protilátky proti bičíkovým antigénom iných gram-negatívnych paličiek môžu nešpecificky reagovať s flagelínom. (Na to upozorní napríklad aj izolovaný nález len protilátok proti flagelínu pri vyšetrení séra pacientov metódou western blot).

Falošne negatívne výsledky

Imunoanalýzy na stanovenie protilátok môžu poskytnúť aj falošne negatívny výsledok. Súťaženie medzi IgG a IgM protilátkami môže spôsobiť falošne negatívny výsledok pre IgM, ak je obsah antigénu v pevnej fáze obmedzený a IgG je úspešnejšie v ako IgM v obsadzovaní väzbových miest. Tiež séra obsahujúce veľké množstvo špecifických protilátok môžu spôsobiť fenomén prozóny, kedy výsledky sú negatívne pri nízkych riedeniach, ale sú pozitívne pri vyšších riedeniach. Táto situácia môže byť problémom pri skríningových

testoch, kedy je potrebné na skrining viac ako jedno riedenie. Klinicky falošné negatívne výsledky sa môžu vyskytnúť aj ak je vzorka odobratá príliš skoro vo vzťahu k nástupu infekcie. Znalosť prirodzeného priebehu infekcie a imunitnej odpovede je dôležitá na načasovanie odberu konkrétnej vzorky v konkrétnom čase, aby bolo možné vyhnúť sa falošne negatívnym výsledkom.

Laboratórne výsledky môžu byť nesprávne z dôvodu rôznych omylov a chýb, objektívnych aj subjektívnych na jednotlivých úrovniach spracovania vzorky: od odberu a označenia pri odbere, spôsobe transportu a spracovania v laboratóriu. V každom momente práce so vzorkou existuje možnosť zámeny, každý prístroj a pomôcka použitá pri spracovaní môže znehodnotiť vzorku kvalitatívne alebo kvantitatívne, každý pracovník môže ovplyvniť kvalitu výsledku alebo jeho zaznamenanie, či hlásenie. Z tohto dôvodu je potrebné každý laboratórny výsledok hodnotiť na základe klinických nálezov a anamnézy. Každý laboratórny nález, ktorý sa nezhoduje s klinickým nálezom alebo lekárovým predpokladom (dôvod prečo lekár dal vyšetriť parameter) je potrebné hodnotiť opatrne a v spolupráci s laboratórnym pracovníkom.

Kontrola kvality

Kontrola kvality je dôležitá na zabezpečenie presných a správnych výsledkov a predovšetkým interlaboratórnej a intralaboratórnej porovnateľnosti. Kritickými bodmi kontroly kvality je štandardizácia, stály monitoring, vnútorná a vonkajšia kontrola testov a vzoriek. Je podstatou a mala by byť cieľom akreditačných procesov. Stanovenie optimálnej koncentrácie antigénu a protilátky sa robí blokovou titráciou s referenčnou vzorkou. Na základe jej výsledkov je možné určiť koncentráciu reagensov pre maximálnu špecifickú reaktivitu a minimálnu nešpecifickú reaktivitu. Procedúra zahŕňa hodnotenie testovacieho protokolu vyšetrením známych pozitívnych a predpokladaných normálnych vzoriek z cieľovej populácie. Na základe týchto štúdií je možné stanoviť rozdiel medzi reaktívnou pozitívnou vzorkou od nereaktívnej negatívnej vzorky.

Cut off hodnota - hranica medzi pozitívnym a negatívnym výsledkom - vyjadruje absorbanciu určenú na základe

- udania výrobcu testu, alebo
- výpočtu hodnoty, ktorá je určitým násobkom štandardnej odchýlky pripočítaným k priemernej absorbancii negatívnej populácie, alebo
- ako časť alebo percento pozitívnej referenčnej hodnoty alebo
- ako kombinácia všetkých zmienovaných postupov.

V každom prípade vzorky, ktoré majú absorbanciu vyššiu ako cut off sú pozitívne alebo reaktívne, ktoré majú absorbanciu nižšiu ako cut ff sú negatívne. Niektorí výrobcovia stanovujú aj tzv. šedú zónu. Tento prístup komplikuje interpretáciu testu a menežovanie pacienta, a preto sa neodporúča. Manuál prístrojov poskytnutý výrobcom je potrebné vždy preštudovať, prístroj kalibrovať, podrobne monitorovať denne (denná údržba) a v pravidelných intervaloch absolvovať technické prehliadky. Všetko monitorovanie a kontroly je potrebné zaznamenať. Každé vyšetrenie (každý cyklus) má zahŕňať kontrolky od výrobcu, vlastné kontrolky a referenčné vzorky. Variácie kvality alebo aktivity reagensov medzi setmi alebo šaržami sa monitorujú externým kontrolným setom, ktorý by mal obsahovať vysoko reaktívne, stredne reaktívne, nereaktívne vzorky a pool vzoriek. Takáto externá kontrola slúži na detekciu okamžitých problémov, ale aj monitorovanie variácií medzi jednotlivými testami a dlhodobý trend. Hodnoty získané pri každom jednotlivom teste by sa mali monitorovať graficky, ktoré ukazujú trendy a kvalitu a poskytujú informácie pre riešenie problémov.

Veľmi významnú úlohu pre kvalitu laboratória zohráva porovnateľnosť výsledkov. Interlaboratórna a intralaboratórna, ale aj priebežná u individuálneho pacienta. V súčasnosti je možné sa stretnúť s neuváženými zmenami metodík, výmenou analyzátorov a diagnostických setov - predovšetkým v rámci ekonomiky medicínskych laboratórií a lobingu spoločností. Rovnako inflácia laboratórií, nezmyselný a kontraproduktívny konkurenčný boj, ktorý zaviedol prax zväžania biologických vzoriek stovky kilometrov do laboratórií v iných regiónoch vedie k znehodnocovaniu vzorky, zvyšovaniu nákladov na vyšetrenie. Prakticky neexistujúca možnosť porovnávania niektorých markerov a sérologických parametrov u pacienta, ktorého vyšetrenie pred hospitalizáciou a počas nej bola urobená v inom laboratóriu, nehovoriac o vývoji sérologického profilu pri zmene diagnostických laboratórnych postupov.

6. 6 Význam a použitie detekcie špecifických protilátok

6. 6. 1 Detekcia protilátok ako indikátora imunity

- Profesionálny skrining

Pred zamestnaním pracovníka požadujú niektoré organizácie dobrovoľne alebo majú zákonom stanovené verifikovať stav imunity proti niektorým mikroorganizmom. V zdravotníckych zariadeniach niektorých krajín je to imunita proti vírusu rubeolly a varicella zoster. Tieto vírusové infekcie sa môžu nekontrolovateľne šíriť v neimúnnej populácii v čase medzi expozíciou vírusu a erupciou exantému a mohli by byť fatálne u imunosuprimovaných pacientov a neimúnnych dospelých. Stanovenie špecifickej imunity proti vírusu hepatitídy B

je požadované u zdravotníckych pracovníkov aj študentov zdravotníckych odborov. Napriek tomu, že je ochranou proti najčastejšej profesionálnej nákaze v zdravotníckom prostredí, nie je dôvodom zanedbávania protiepidemických ochorení z dôvodu šírenia ostatných krvou prenosných ochorení (infekcia VHC, HIV, CMV, EBV a i.). V súčasnom období by zdravotnícki pracovníci mali byť imunizovaní voči všetkým prenosným ochoreniam, ktorými môžu byť infikovaní, ktoré neprekonali a proti ktorým je možné očkovať.

(Pracovníci lesných závodov, poľovníci – Kliešťová encefalitída, besnota; Veterinári – besnota; Vojaci, špertovci – tetanus a podľa krajiny pôsobenia; Pracovníci v zahraničí – podľa epidemiologickej situácii v krajine pôsobenia, podľa požiadavok prijímajúcej krajiny a profesie).

- Predoperačný skrining

Podľa v súčasnosti zaužívaných postupov sa v rámci predoperačného vyšetrenia požaduje stanovenie prítomnosti protilátok proti *Treponem pallidum*, HIV a určenie prítomnosti HbsAg. Stanovenie HbsAg je užitočné pre vyhľadanie nosičov, aj keď nie je určujúcim pre infekčnosť pacienta. Stanovenie protilátok proti *Treponem pallidum* má význam pre vyhľadávanie infikovaných rovnako ako stanovenie pozitivity protilátok proti HIV. Pre ochranu personálu je užitočné stanovovať HIV antigén a HIV protilátky súčasne.

- Prenatálny skrining

V laboratórnej praxi je možné sa stretnúť s rozpakmi pri interpretácii výsledkov sérologických vyšetrení na odhalenie intrauterinných infekcií. Na základe zákona o ochrane zdravia má byť u každej tehotnej ženy vykonané skriningové vyšetrenie na diagnostiku intrauterinných infekcií s rizikom postihnutia plodu. Dôležité je správne interpretovať získané výsledky vyšetrení. Prenatálny skrining je možné uskutočňovať aj selektívne na základe anamnézy a rizikových faktorov počas tehotenstva. Riziko intrauterínneho postihnutia novorodenca je kontrolované vyšetrením protilátok proti toxoplazmóze, rubeolle, CMV a baktérii *Treponema pallidum*.

Spolu so stanovením prítomnosti HIV resp. protilátok proti HIV indikuje potvrdenie toxoplazmózy a syfilisu použitie účinnej antimikrobiálnej terapie na zníženie rizika postihnutia novorodenca.

Stanovenie prítomnosti HbsAg u matky umožňuje profylaktické použitie imunizácie novorodenca.

Riziko toxoplazmózy je vyššie, ak je v okolí mačka, rubeolly pri kontakte s neimunizovanými deťmi školského veku, CMV infekcie pri kontakte s imunosuprimovaným pacientom a HIV v rizikových skupinách.

Metódy, ktoré sa pri diagnostike používajú sú IFA alebo ELISA. V niektorých krajinách sú k dispozícii aj v ambulancii použiteľné rýchlotesty s možnými falošne negatívnymi výsledkami. Pre IFA testy môžu nešpecifické väzby fluorescenčných konjugátov spôsobovať falošne pozitívne výsledky. Falošne pozitívne reakcie spôsobené prítomnými antinukleárnymi protilátkami alebo autoprotiálkami musia byť oddiferencované od skutočnej pozitivity špecifických testov. Silne pozitívne antinukleárne protilátky môžu maskovať schopnosť detekovať špecifické protilátky proti niektorým organizmom. Ak je známa špecificita antinukleárných protilátok u tehotnej pacientky, je možné použiť nerozpustné antigény na absorbciu reagujúcich antinukleárných protilátok. Pri použití EIA a ELISA metód musí byť maximálna pozornosť venovaná kvalite antigénu, ktorý je naviazaný na pevnú fázu, teda kvalite testu.

Skríningové testy sú obvykle viac citlivé a menej špecifické. Každý reaktívny výsledok je potrebné následne potvrdiť opakovaným vyšetrením tej istej vzorky a vyšetrením ďalšej vzorky s následným použitím metódy vyššej kategórie (konfirmačný test).

Toxoplazmóza

Interpretácia laboratórnych testov na toxoplazmózu je vzhľadom na závažnosť poškodenia plodu pri intrauterinnej primoinfekcii, chronický priebeh a dostupnosť viacerých sérologických metód a charakter infekcie (tkanivová parazitóza) niekedy veľmi náročná. Patrí do rúk skúseného diagnostika. Pri vyšetrovaní sa používajú testy komplementfixačné (KFR), u ktorých je obvykle potrebné vyšetrenie 2 a viac vzoriek na stanovenie štádia. Diagnostika sa opiera o titre protilátok v sére a ich dynamiku (vzostup a pokles v období akútnej infekcie, zotrvalý stav v postakútnom období a opakovaný vzostup v období reaktivácie ochorenia). V súčasnosti sa na prenatálny skríning používajú imunoenzýmové metódy – ELISA a stanovujú sa IgM protilátky, pri ich pozitivite aj IgA prípadne aj IgG protilátky. Izolovaná pozitivita IgM protilátok, bez dynamiky a pozitivity IgA alebo IgG je neočakávaný nález a svedčí pre nešpecifickú reaktivitu testu. Pozitivita IgM a IgA svedčí pre akútne ochorenie s rizikom intrauterinného poškodenia plodu pri primoinfekcii v prvom trimestri. Pozitivita IgM aj IgG protilátok svedčí pre odznievajúcu akútnu infekciu a porovnanie s týždňom gravidity a ďalšie špecifické testy môžu odhadnúť mieru rizika pre tehotnú. Pozitivita IgG protilátok, pri negativite IgM hovorí jednoznačne o postinfekčných protilátkach. Tehotná žena

prekonala primoinfekciu a s veľkou pravdepodobnosťou *Toxoplasma gondii* parazituje v jej tkanivách s možnosťou prechodu infekcie do chronicity, čo sa prejaví v budúcnosti klinickými príznakmi. V období tehotenstva však nie je riziko pre plod a takto by mal byť nález izolovaných pozitívnych IgG protilátok interpretovaný aj matke.

Hepatitída B

U tehotných žien je vyšetrenie HBsAg indikované na začiatku tehotenstva a pred pôrodom. V prvom trimestri je výskyt pozitivity HBsAg u tehotnej matky buď znakom akútnej infekcie (pri súčasnej pozitívite HBcIgM a HBeAg alebo anti HBe) alebo znakom chronickej perzistentnej infekcie (pozitivita HBsAg a HBeAg) alebo chronického nosičstva HBsAg a nemá až do pôrodu vplyv na ďalšie tehotenstvo alebo plod. Testovanie HBsAg v období pred pôrodom je významné z hľadiska zabezpečenia pôrodu a popôrodného ošetrovania dieťaťa. Novorodenec HBsAg pozitívnej matky je imunizovaný proti hepatitíde B z dôvodu veľkého rizika prenosu infekcie perinatálne, postnatálne a v priebehu dojčenia. Infekcia novorodenca je častejšie spojená s prechodom do chronicity a vývojom hepatocelulárneho karcinomu pečene v neskoršom období.

Rubeolla

Sérologické vyšetrovanie tehotných žien na vylúčenie intrauterinnej infekcie plodu vírusom rubeolly vyžaduje presný algoritmus a správnu interpretáciu. V našej populácii je povinné očkovanie proti vírusu rubeoly už od roku 1977. Existuje len minimálny počet žien vo fertilnom veku, ktoré neboli očkované proti rubeole, prípadne, ktoré neprekonali infekciu rubeolly v detstve. Nemôžeme však vylúčiť možnosť, že v našej populácii existujú tehotné ženy, ktoré nemajú protektívne protilátky (ženy z krajín, kde sa neočkuje, individuálne chýbajúce očkovanie, imunodeficit ženy, non-responders). Tieto ženy sú v riziku primoinfekcie vírusom rubeolly, i keď vzhľadom na kolektívnu imunitu a veľmi nepravdepodobnú možnosť kolovania vírusu v populácii je toto riziko minimálne a v podstate len teoretické. V takejto epidemiologickej situácii je rozumné vyšetriť tehotnú ženu najskôr na prítomnosť IgG protilátok (testovanie protektívnej imunity) a len pri negativite tohoto testu testovať tú istú vzorku aj na IgM protilátky – skríning akútnej infekcie vírusom rubeolly u matky. Pozitivita IgM protilátok proti rubeolle u matky, musí byť ale interpretovaná veľmi opatrne, v súvislosti s klinickým obrazom, epidemiologickou anamnézou a dynamikou protilátok a možnosťou nešpecifických protilátok.

Pri interpretácii sérologických testov je potrebné brať do úvahy aj dosiahnutú koncentráciu protilátok v medzinárodných jednotkách, alebo aspoň na základe indexov, ktoré sa vypočítavajú z pomeru extinkcie hraničnej hodnoty testu a extinkcie séra pacienta. Každý komerčný alebo v laboratóriu pripravený test má určitú hraničnú hodnotu - (cut off) - koncentráciu testovaných protilátok alebo dosiahnutú extinkciu - na odlíšenie pozitívneho a negatívneho výsledku. Obvykle hodnoty v rozmedzí 10% vyššie a nižšie ako hodnota cut off udávajú tzv. šedú zónu charakterizujúcu nejasný výsledok. Hraničná hodnota je štatisticky určená z najčastejších hodnôt získaných pri vyšetrovaní veľkých súborov. Je preto potrebné citlivo zvažovať a hodnotiť aj výsledky v blízkosti šedej zóny. Pri akútnych ochoreniach sú koncentrácie vysoké a jasne ukazujú na ochorenie. Hraničné hodnoty nasvedčujú tomu, že je potrebná konzultácia alebo ďalšie vyšetrenie na sledovanie dynamiky. Sérologické testy majú určité objektívne aj subjektívne obmedzenia, ktoré je potrebné brať do úvahy. Falošne pozitívny výsledok môže byť spôsobený skrížene reagujúcimi protilátkami. Pri niektorých ochoreniach a zvlášť často u tehotných dochádza k tzv. polyklonálnej aktivácii buniek, následkom čoho môže vzniknúť situácia, že pri testovaní na viaceré antigény, dostaneme niekoľko pozitívnych výsledkov (napr. IgM na morbilli, parotitídu, rubeollu), obvykle v oblasti šedej zóny alebo nízkych hladín.

Interpretácia výsledkov sérologických vyšetrení prenatálneho skríningu je náročná a vyžaduje dobré znalosti o tvorbe a dynamike protilátok v sére pacienta v jednotlivých štádiách infekcie s ohľadom na špecifiká v období tehotenstva. Škála indikovaných vyšetrení je daná skúsenosťami gynekológa, klinickým obrazom pacientky a legislatívnymi úpravami. Jednotlivé parametre, ktoré lekár dostane z laboratória často s časovým oneskorením vytvárajú objektívny nález, na základe ktorého je potrebné sa rozhodnúť a informovať tehotnú ženu o ďalšom postupe. Len dobrá znalosť výskytu jednotlivých markerov v určitých fázach ochorenia poskytne gynekológovi istotu, na základe ktorej môže informovať tehotnú ženu o tom, že všetko je v poriadku alebo si je istý rizikom možného poškodenia a informuje o ňom budúcu matku. Pričom si je vedomý základného pravidla *nihil nocere*, a to nielen v oblasti fyzického, ale aj psychického zdravia a pohody.

- Predtransplantačný skríning

Transplantovaní pacienti sú v riziku fatálnej CMV infekcie, ktorá môže byť náhodne prenesená s darovaným orgánom, kostnou dreňou alebo krvnou transfúziou, pretože vírus je umiestnený v bunkách darcu. CMV infekcia u týchto pacientov môže byť spôsobená primárnou infekciou, reaktiváciou latentnej infekcie alebo reinfekciou exogénnou infekciou.

Imunitný stav darcu a príjemcu transplantátu musí byť určený pred transplantáciou tak, aby bolo možné uskutočniť opatrenia u séroneгатívnych pacientov. CMV negatívni pacienti sú transplantovaní tkanivami CMV negatívnymi darcami. Krvné produkty, ktoré sú podávané CMV negatívnym pacientom by mali byť CMV negatívne.

- Vakcinačný skrining

V praxi je možné monitorovať špecifickú imunitu jednotlivca stanovením hladín špecifických protilátok v sére alebo kožnými testami. Medzi novšie pre výskumné účely používané metódy patrí vychytávanie subpopulácii špecifických B lymfocytov značenými protilátkami, aktivácia B lymfocytov k produkcii špecifických protilátok, meranie vplyvu T lymfocytov na vývoj protilátkovej odpovede (napríklad ELISPOT).

ELISPOT

Enzyme linked immunosorbent spot je adaptácia enzýmovej imunoanalytickej metódy na detekciu a počítanie B lymfocytov produkujúcich protilátky proti špecifickému antigénu. Bunky periférnej krvi sú spočítané a umiestnené do jamiek mikrotitračnej platničky pokrytých antigénom. Platnička je inkubovaná 4h pri 37st.C, premytá a sú pridané antiimmunoglobulínové protilátky a IgG protilátky proti ľudským imunoglobulínom značené alkalicou fosfatázou a následne substrát (5 bromo, 4 chloro 3 indlylfosfat). Táto metóda sa používa pri testovaní schopnosti imunitne odpovedať na antigén.

V praxi je bežne dostupné stanovenie špecifickej imunity po očkovaní proti:

- TBC kožným testom – tuberkulínová reakcia. Na odlíšenie postvakcinačnej a postinfekčnej reakcie sa stanovuje veľkosť indurácie.
- Diftérii stanovením antitoxických protilátok neutralizačným testom alebo imunoanalýzou. Je možný aj kožný intradermálny Shickov test.
- Tetanu stanovením antitoxických protilátok neutralizačným testom alebo imunoanalýzou
- Pertussis stanovujú sa celkové aglutinujúce protilátky alebo jednotlivé triedy imonoanalýzou. Tu je potrebné odlíšiť protilátky proti antigénom vakcíny a antigénom infekčného agnesu. Niektoré vakcíny – acelulárne neobsahujú všetky antigény baktérie ako to bolo u celobunkovej vakcíny. Takýmto spôsobom je možné odlíšiť postinfekčnú a postvakcinačnú imunitu.

- Poliomyelitíde na stanovenie antiinfekčnej imunity sa stanovujú vírus neutralizačné protilátky, na monitorovanie ochorenia sa využívalo stanovenie komplement fixačných protilátok.
- Hemofilovým inváznym ochoreniam imunoanalýzou sa stanovujú protilátky proti PRP antigénu.
- Osýpkam sa stanovujú postvákcináčnej protilátky triedy IgG imunoanalýzou
- Ružienke sa stanovujú postvákcináčnej protilátky triedy IgG imunoanalýzou
- Parotitíde sa stanovujú postvákcináčnej protilátky triedy IgG imunoanalýzou
- Vírusovej hepatitíde typu B sa stanovujú kvantitatívne postvákcináčnej protilátky proti HbsAg imunoanalýzou. Odlíšenie postvákcináčnej a postinfekčnej protilátok je možné.
- Vírusovej hepatitíde typu A sa stanovujú postvákcináčnej protilátky triedy IgG imunoanalýzou
- Kliešťovej encefalitíde sa stanovujú postvákcináčnej protilátky triedy IgG imunoanalýzou
- Chrápke A a B sa stanovujú postvákcináčnej protilátky triedy IgG imunoanalýzou
- Pneumokokovým antigénom je možné v špecializovaných pracoviskách stanoviť skupinovú protilátku triedy IgG imunoanalýzou

Pri hodnotení individuálnej imunity je potrebné postupovať opatrne a zvážiť význam koncentrácie protilátok v sére spolu s vakcinačnou anamnézou, typom očkovania a podaného antigénu. Po každom styku s proteínovým antigénom sa tvoria protilátky aj pamäťové bunky. Pamäťové bunky sú podstatou imunitnej odpovede aj pri nemerateľných sérových hladinách protilátok. Toto tvrdenie neplatí pre antitoxickú imunitu. V súvislosti s antitoxickými protilátkami navodenými očkovaním proti tetanu a diftérii je potrebné zdôrazniť nutnosť preočkovnia dospelých a osôb starších vekových kategórií. Na rozdiel od mechanizmu udržiavania špecifickej antitoxikálnej imunity v súvislosti s existenciou pamäťových buniek, kedy expozícia antigénu, či už prirodzenou formou (divoký kmeň) alebo umelou (vakcinačný antigén) vyvolá zvýšenú produkciu protilátok, antitoxická špecifická imunita musí byť udržiavaná trvalo na účinnej úrovni, lebo len prítomné antitoxické protilátky sú schopné zabrániť vzniku ochorenia vyvolaného toxínom okamžite. (Toxínom aktivizované pamäťové bunky v spolupráci s ostatnými súčasťami imunitného systému by mohli vytvoriť zvýšené hladiny protilátok až v čase, keď voľný toxín už môže byť naviazaný na cieľové receptory a spôsobuje klinické príznaky). Pri ochorení tetanom je antigénny stimul vzhľadom na minimálne koncentrácie toxínu v sére obvykle nedostatočný a ochorenie nevytvára špecifickú

protektívnu imunitu. Preto je po ochorení na tetanus potrebné vždy pacienta aktívne imunizovať.

6. 6. 2 Detekcia protilátok pri diagnostike ochorenia

Akútne a rekonvalescentné vzorky - Sérologické štúdie významne prispeli k diagnostike mikrobiálnych predovšetkým vírusových infekcií u pacienta. Učebnice špecifikujú, že sérologické potvrdenie suspektného ochorenia nie je možné bez vyšetrenia párových vzoriek. Prvá vzorka sa odoberá čo najskôr po začatí ochorenia, druhá o 1 až 2 týždne neskôr. Tieto párové vzorky sa nazývajú akútna a rekonvalescentná. Pre presnú interpretáciu testu sa tieto vzorky vyšetrujú simultánne (tá istá metóda v tom istom teste). Viac ako štvornásobný vzostup geometrického titra protilátok alebo sérokonverzia – zmena z negatívneho na pozitívny výsledok - sa považujú za diagnostický pre akútne ochorenie,. Nevýhodou je potreba dvoch vzoriek a s ňou súvisjúci časový odstup stanovenia diagnózy a prípadnej terapie.

IgM a IgG špecifické testy - Novšie imunoenzýmové metódy, v súčasnosti prístupné v bežnej praxi, umožňujú použitie jednej vzorky na stanovenie IgG a IgM špecifických protilátok. Negatívny výsledok IgG aj IgM je v prípade, ak pacient nebol infikovaný alebo bolo testovanie uskutočnené príliš skoro. Pri nutnom skorom stanovení IgM sa citlivejšími javia testy zachytávajúce tzv Ig total protilátky ako bolo konštatované vyššie. Komerčne dostupné sety sú obvykle určené na testovanie jednotlivých tried. Pri interpretácii je potrebné brať do úvahy niektoré vlastnosti imunoglobulínov. IgG protilátky sú špecifické len v oblasti ťažkých reťazcov. Celkové protilátky sú protilátky proti IgG ťažkým a ľahkým reťazcom, ktoré budú tiež reagovať s ľahkými reťazcami IgA a IgM. IgM protilátky sú špecifické v oblasti ťažkých reťazcov.

Ak sú detekovateľné IgM protilátky a súčasne IgG je negatívne, pacient bol exponovaný infekčnému agens. U niektorých infekcií (toxoplazmóza) je možné včasnú infekciu potvrdiť vyšetrením IgA protilátok z tej istej vzorky. Pri podozrení na nešpecifickú reakciu IgM (z dôvodu prítomnosti RF alebo pri niektorých autoimunitných ochoreniach, či tehotenstve) je možné toho potvrdiť alebo vyvrátiť opakovaným vyšetrením neskoršie odobratej vzorky na IgM a IgG. Ak sa potvrdí rovnaký výsledok IgM pozitívny a IgG negatívny je veľmi pravdepodobné že je to nešpecifická reaktivita. V opačnom prípade by bola detekovaná sérokonverzia v triede IgG. (Toto nemusí platiť u pacienta s deficitom T bunkovej imunity). Ak sú prítomné IgM aj IgG protilátky, svedčí to o infekcii v období pred 3. –12. mesiacmi.

Ak IgM protilátky nie sú prítomné, ale IgG áno, je to znakom špecifickej imunity voči testovanému mikroorganizmu. Z časového hľadiska došlo k infekcii pred viac ako 6-12 mesiacmi. Použitie jedinej vzorky na diagnostiku akútnej infekcie je vhodné, ak je použitý testovací systém špecifický a senzitívny a ak bola vzorka odobratá v čase, keď boli IgM protilátky detekovateľné (pre niektoré testy detekujúce IgM alebo celkové protilátky už 7. – 10. deň po infekcii). Pri interpretácii výsledkov testov je treba zvážiť aj možné predchádzajúce očkovanie. (Po prvej dávke očkovacej látky sa tvoria IgM protilátky a ich vznik môže očkovaním znamenať diagnostické rozpaky medzi začínajúcou infekciou a nástupom imunity – napr. pri postexpozíčnom očkovaní proti hepatitíde A).

Porovnanie metód - Prechod od KFR k IFA pri detekcii vírusových protilátok bol možný bez reedukácie zdravotníckeho personálu v oblasti významnosti výsledku, pretože výsledky obidvoch testov sa udávajú v titroch. Prechod od klasických metód používajúcich titre na kvantifikáciu výsledku (KFR, IFA, HIT) na ELISA metódy používajúce elisa jednotky EU alebo IU si vyžaduje zo strany laboratória dostatočne dlhé prechodné obdobie, kedy sa vzorky vyšetrujú obidvoma testami súčasne a zvlášť a získa sa reprezentatívne porovnanie obidvoch metód. Dôležitá je v každom prípade komunikácia medzi laboratóriom a klinickým alebo ambulantným pracovníkom. Rovnako je potrebné vytvoriť konverznú tabuľku.

Vyšetrenie matky pri kongenitálnej infekcii dieťaťa

Ak nebola matka skriningovo vyšetrená v tehotenstve testovanie jej séra po pôrode infikovaného dieťaťa je zbytočné. Len ak príznaky ochorenia u matky boli dokumentované maximálne v predchádzajúcich 4 týždňoch, má význam vyšetrovať IgM protilátky. Inak nebude toto vyšetrenie výpovedné, pretože IgM protilátky dosahujú vrchol už v prvom mesiaci a nemusia pretrvávajú viac ako 28 dní. Stanovenie IgG protilátok neprispieje k stanoveniu diagnózy, pretože IgG začínajú byť detekovateľné v 2. týždni po infekcii a môžu pretrvávajú celý život. Závažnosť kongenitálnych infekcií súvisí s dobou expozície plodu infekcii. Kongenitálne infekcia sa môže prejaviť ako potrat, smrť novorodenca, hydrocefalus, mentálna retardácia, slepota, postihnutie srdca, kostí. Niektoré infekcie sa prejavujú súborom príznakov (Greggov syndróm pri i.u. infekcie vírusom rubeolly). Vysoké percento detí s kongenitálnou infekciou vírusom rubeolly, prvokom *Toxoplasma gondii*, ale aj *Treponema pallidum* nemá príznaky pri narodení, ale vyvinú sa im postupne v priebehu prvých 5 rokov. Rovnako sérologická pozitivita resp. negativita u HIV infekcii dieťaťa môže byť oddialená až na 2 roky. Ak je u matky potvrdená imunita proti TORCH v čase gravidity, IgG protilátky

prechádzajú cez placentu a chránia plod, ak by bol exponovaný mikroorganizmu počas i.u. vývoja. Ak matka nie je imúnna, mikroorganizmus prejde cez placentu a môže spôsobiť poškodenie plodu skôr ako sa u matky vyvinú protektívne IgG. Fetus odpovedá tvorbou IgM protilátok, táto odpoveď je však pomalšia ako u dospelých. Tento oneskorený nástup tvorby protilátok umožňuje mikroorganizmu nekontrolovateľne sa pomnožovať a sérologickú detekciu po narodení. IgM protilátky v pupočníkovej krvi sú vždy patriace plodu, materské IgM na rozdiel od IgG neprechádzajú transplacentárne, pretože molekula pentaméru IgM je veľká. Metódy priamej diagnostiky kongenitálnych infekcií sú kultivácia fetálneho tkaniva alebo placenty, demonštrácia charakteristických lézií alebo IgM neonatálnych špecifických protilátok a v súčasnosti metódy založené na detekcii genetickej informácie – PCR. Kultivácia môže trvať 2-4 týždne, histologické zmeny nemusia byť detekovateľné alebo nie je možné vzorku odobrať. Detekcia IgM môže byť rýchlou a špecifickou diagnostickou metódou. Kvantitatívne stanovenie celkových IgM môže byť zvýšené, ale špecifické protilátky sú výpovednejšie. Základné vyšetrenie zahŕňa stanovenie celkových IgM, CRP a špecifických IgM proti TORCH. Odporúča sa pri skríningovom vyšetrení na intrauterinnú infekciu aj test na RF. Je rovnako senzitívny a špecifickejší ako stanovenie celkových imunoglobulínov pri detekovaní kongenitálnej infekcie. Pri kongenitálnej infekcii špecifické materské protilátky prechádzajú cez placentu a sú prítomné v sére novorodenca. Pretože materské protilátky viažu antigén prítomný v testovacom systéme, falošne negatívne reakcie môžu zabrániť väzbe špecifických IgM protilátok. Falošne pozitívny výsledok sa môže vyskytnúť, ak je prítomný RF IgM a viaže sa na komplexy IgG. Neonatálne špecifické IgM nie je možné odlíšiť od novorodeneckého RF IgM. Väzbe RF je možné zabrániť, ak sa vyviažu materské IgG pred testom. Používajú sa na to rovnaké postupy, ako hore uvedené metódy na separáciu IgG a IgM protilátok

Sérologické vyšetrenie tehotnej ženy na protilátky proti *Treponema pallidum* má opodstatnenie v prvom trimestri. Prvý odber má odhaliť akútnu alebo chronickú infekciu u ženy. Syfilis je azda jediná infekcia tehotnej ženy, ktorá ohrozuje plod aj v prípade, že matka neprekonáva primoinfekciu v prvom trimestri, ale akvirovala infekciu v minulosti. U infekcii *Treponema pallidum* môže dôjsť k opakovanej reaktivácii infekcii s prestupom na plod. V praxi to znamená, že jedna matka, môže mať aj niekoľko postihnutých detí infekciou *Treponema pallidum* – kongenitálny syfilis. Prítomné protilátky nie sú protektívne. Pri prenatálnom skríningu sa vyšetrujú nešpecifické protilátky kardiolípinové (BWR, VDRL, RRR) a vždy aj špecifické protilátky (najčastejšie TPFA). Kardiolípinové protilátky sú skríningové a nešpecifické (falošná pozitivita je častá u pacientov s ochorením srdca,

reumatickým ochorením, boreliovou infekciou, pri užívaní niektorých liekov). Ich význam spočíva v možnosti sledovania úspešnosti terapie, pretože tieto protilátky vymiznú tak, ako dochádza k reparácii tkanivového poškodenia pri liečbe infekcii. Protilátky typu TPHA sú špecifické a sú celoživotným znakom infekcii. Pozitivita TPHA protilátok v prvom trimestri je indikáciou na liečbu tehotnej ženy pre vysoké riziko intrauterinného postihnutia plodu.

Syfilis

Netreponémové testy na syfilis sú najčastejšie aplikovaný skriningový test. Na detekciu Wassermanových protilátok alebo anti kardiolipinových protilátok sa používa RPR (rapid plasma reagin) test alebo VDRL (venereal disease research laboratory) test. Tieto protilátky – reagíny sú produkované ako odpoveď na lipidný materiál uvoľnený vo veľkom množstve z poškodených buniek v skorých štádiách infekcie ako aj na lipid prítomný na bunkovom povrchu treponém. Hoci sú tieto testy veľmi citlivé, nie sú špecifické. Reaktívne vzorky musia byť potvrdené špecifickými treponémovými testami (TPHA). Prenatálny skrining na syfilis a HIV a v niektorých krajinách aj predmanželský skrining je vyžadovaný. Syfilis je možné liečiť v každom štádiu a liečba je úspešnejšia vo včasných štádiách. Prenatálny skrining je zameraný na kongenitálny prenos tohto ochorenia. Biologicky falošne pozitívne netreponémové testy sa vyskytujú aj pri autoimunitných ochoreniach. Ich význam spočíva predovšetkým v tom, že sú účinnou skriningovou metódou, monitorujú účinnosť terapie (ich titre klesajú pri liečbe a úplne vymiznú po vyliečení, na rozdiel od treponémových testov, ktoré zostávajú pozitívne celý život) a odlišia treponémovú infekciu od boréliovej pri nešpecifickej pozitivite TPHA testu.

Transplantácia a imunosupresia

Po zavedení imunosupresívnej liečby, ktorá selektívne potláča bunkovú imunitu, bolo možné úspešnejšie zvýšiť počet orgánových transplantácií a transplantácií kostnej drene. Imunosuprimovaní pacienti podstupujú riziko vzniku oportúnnych infekcií. Bakteriálne infekcie je možné liečiť antibiotikami, odlíšenie vírusovej infekcie od chronického odvrhnutia allotransplantátu môže byť náročnejšie. Recipienti, ktorí sú séronegatívni na CMV a HSV pred transplantáciou podstupujú riziko. IgM CMV je potrebné testovať pred transplantáciou aj po transplantácii takmer denne, aby bolo možné rýchlo detekovať infekciu pred transplantáciou alebo pred objavením sa symptómov a potvrdiť prebiehajúcu aktívnu infekciu. Hoci špecifické IgM obvykle neperzistujú dlhšie ako 8 týždňov, vírusové IgM proti CMV sú detekovateľné niekoľko mesiacov aj rokov po dokumentovanej infekcii vzhľadom na kontinuálnu intracelulárnu perzistenciu. Detekcia CMV IgM je vhodná na diagnostiku

infekcie u transplantovaných pacientov. Najlepšou metodikou klinicky významnej infekcie je detekcia CMV virémie. Neprítomnosť špecifických IgM môže byť zavádzajúca. Načasovanie odberu vzorky je veľmi dôležité pre diagnostiku. Ak je odber vzorky veľmi zavčasu, IgM nemusia byť prítomné v detekovateľnej koncentrácii. Ak je odber neskoro, IgM už nemusia byť prítomné. U niektorých vírusových infekcií špecifické IgM perzistujú a sú detekovateľné 12 – 18 mesiacov po začiatku infekcie, takže detekcia IgG aj IgM by mala byť indikovaná simultánne na stanovenie akútnej infekcie. Preto u pacientov pred transplantáciou je potrebné tiež stanoviť IgG aj IgM špecifické protilátky na stanovenie východiskového stavu, na porovnávanie s posttransplantačnými výsledkami.

Protilátky proti niektorým baktériálnym infekciám

HSA

Streptococcus pyogenes - Napriek účinnej a dostupnej terapii, zostávajú streptokokoky skupiny A významnými patogénmi s imunologickými následkami. Pozitívny test ASLO je užitočným nástrojom pri diagnostike inváznej infekcií spôsobených týmto mikroorganizmom a pri potvrdení diagnózy akútnej reumatickej horúčky (po faryngitíde) alebo poststreptokokovej glomerulonefritídy (po faryngitíde aj pyodermii). SLO je produkováný niektorými kmeňmi baktérie *Streptococcus pyogenes* a vyvolá silnú protilátkovú odozvu počas faryngitídy (85% infekcií) a kožných infekcií (25%). Na diagnostiku ASLO sa používa neutralizačný test, latex aglutinácia alebo turbidimetria. Rovnako titer ASLO 200 je hraničnou hodnotou pre pozitivitu u klasického neutralizačného testu. Hraničná hodnota pre ostatné metodiky by mala byť stanovená inter a intralaboratórnym porovaním v období zavádzania testu. Výsledky rôznych metodík nie sú porovnateľné a každý z testov má svoje kvality. Napriek pracnosti je neutralizačný test pri dodržaní laboratórnych postupov špecifickou a citlivou metódou merajúcou neutralizačné protilátky metódou kopírujúcou ich pôsobenie v ľudskom organizme a umožňujúcou inter a intralaboratórne porovnatelnosť. Anti DN-áza test najlepšie monitoruje poststreptokokové následky po kožných infekciách (glomerulonefritída). DN-áza je produkováaná väčšinou kmeňov HSA, ale protilátková odpoveď sa objavuje neskôr ako u SLO a pretrváva dlhšie. Protilátky proti DN-áze sú hodnotnejšie ako ASLO pri detekcii poststreptokokovej chorey minor, kvôli dobe latencie do vývoja klinických príznakov. Ďalším enzýmom je hyaluronidáza. Protilátky proti hyaluronidáze sú detekované po pyodermii. U pacientov so pozdnými následkami streptokokových infekcií sú pri negatívnom ASLO teste indikované anti DN-ázové a antihyaluronidázové testy. Interpretácia týchto testov by mala byť súčasťou ostatných

klinických a laboratórnych hodnotení. Pri vysokých titroch v týchto testoch je možné potvrdiť streptokokovú infekciu. Ak je podozrenie na glomerulonefritídu, C3 a C4 hladiny môžu byť diagnostické, pretože streptokoková glomerulonefritída poskytuje impulz na aktiváciu alternatívnej cesty komplementu, takže koncentrácia C3 je znížená a C4 zostáva normálna

HSB

Streptococcus agalactiae – gram pozitívna baktéria prítomná na sliznici genitálneho traktu žien, môže byť príčinou perinatálnej infekcie (sepsa, meningitída). Význam nosičstva, klinických príznakov lokálnej infekcie a prítomnosť špecifických protilátok u matky sú predmetom štúdia. Neprítomnosť špecifických protilátok u matky a novorodenca sú pravdepodobnejšie väčším rizikom ako samotná prítomnosť HSB na sliznici genitálneho traktu, či už s klinickými príznakmi matky alebo bez nich.

Legionella pneumophila

Protilátky proti vyvolávateľovi legionárskej choroby môžu poskytnúť akútny a retrospektívny dôkaz infekcie touto baktériou. IgM protilátky je možné detekovať už v prvom týždni po nástupe klinických príznakov pneumónie. Celkové alebo IgG protilátky sú detekovateľné v 3. až 6. týždni. V niektorých oblastiach môže byť výskyt legionel endemický (vyvolávateľ Pontiackej horúčky) jediná pozitívna IgG vzorky u obyvateľov z endemických oblastí je nedostatočná. V tom prípade je potrebný priamy dôkaz antigénu fluorescenčne zo spúta alebo IgM pozitivita alebo porovnanie koncentrácie IgG protilátok v akútnej a rekonvalescentnej vzorke – signifikantný vzostup titra alebo koncentrácie protilátok – nevhnutné na stanovenie akútnej infekcie.

Rickettsia species

Manipulácia s rickettsiami je biologicky nebezpečná a náročná a priamy dôkaz je obmedzený na výskumné pracoviská v oblasti endemického výskytu. Sérologické testy sú preto vhodnou metódou na detekciu infekcie. Weil Felixov test využívajúci baktériu *Proteus vulgaris* na detekciu skrížene reagujúcich protilátok sa v súčasnosti už používa len zriedkavo. V našich podmienkach prichádza do úvahy diagnostika škvrnitej horúčky u prichádzajúcich z endemických oblastí alebo potvrdenie Brill Zinserovej choroby (reaktivácia infekcie u ľudí infikovaných v koncentračných táboroch alebo väzniciach) detekciou špecifických protilátok

proti antigénom niektorým z viacerých rickettsií. Je možné ju uskutočniť nepriamou fluorescenciou, latex aglutináciou alebo ELISA testami.

Sérologické vyšetrenie pri borelióze

Lymfická borelióza (LB) je ochorenie diagnostikované v roku 1981 po nahromadení viacerých artritíd u detí v meste Lyme v Connecticute v roku 1975 s anamnézou poštípania kliešťom je spôsobená *Borrelia burgdorferi*. Manifestácia ochorenia odzrkadľuje imunitné reakcie na mikroorganizmus. V akútnom štádiu sa LB prejavuje charakteristickými kožnými léziami erytéma chronicum migrans (ECM). Neskôr nasleduje artritída veľkých kĺbov. Neskôr sa môžu objaviť neurologické a kardiálne príznaky, ktoré sa už nemusia dávať do súvislosti s infekciou. U niektorých pacientov s sclerosis multiplex boli demonštrované vysoké titre protilátok proti *B. burgdorferi* nešpecifického pôvodu. Diagnostické kritéria LB zahŕňajú ECM reakciu po poštípaní kliešťom asi u 50% infikovaných. Na stanovenie diagnózy je často sérologické vyšetrenie nevyhnutné, pretože kultivačné vyšetrenie nie je dostupné v bežných laboratóriách. Napriek tomu je sérologická diagnostika komplikovaná. Pacienti môžu mať skrížene reagujúce protilátky pri neprítomnosti charakteristických symptómov alebo dokumentovanej expozície boréliám. Negatívny test je obvykle odzrkadením skutočnosti. Pozitívna sérologia na borélie musí byť interpretovaná opatrne. Vzostup koncentrácie po akútne sa objavených symptómoch by mal byť diagnostický. Avšak rýchle podanie razantnej atb terapie po kontakte s kliešťom často pred objavením sa ostatných príznakov, vedie k rýchlej eliminácii antigénneho stimulu v podobe množiacich sa borélií a tým k vytvoreniu len nedostatočnej a obvykle nedetekovateľnej špecifickej imunity predstavovanej nízkymi hladinami IgM protilátok. Takýto typ imunity nezabráni reinfekciám. Problematická diagnostika a interpretácia je u chronických pacientov s príznakmi, ktoré môžu byť prítomné pri LB. Skrížene reagujúce protilátky proti ostatným spirochétam môžu spôsobiť zlú interpretáciu. Špecifický test na *Treponema pallidum* (TPHA) môže byť falošne pozitívny, ale VDRL bude negatívny rovnako ako WB.

Widalova reakcia

Widalova reakcia je pôvodne test na stanovenie protilátok proti vyvolávateľovi brušného týfusu *Salmonella typhi*, konkrétne proti Vi (bičíkovému antigénu). Táto reakcia bola a stále je využívaná na vyhľadávanie nosičov, vzhľadom na nízku záchytnosť bežných odberov a nepravidelné vylučovanie salmonelly v chronických štádiách ochorenia alebo u nosičov. Termín Widalova reakcia sa v súčasnosti používa na stanovenie aglutinačných protilátok proti

d'alším salmonelám prípadne *Yersinia enterocolitica* ako súčasť objasnenia etiológie možných extraintestinálnych prejavov (yersiniová artritída, salmonelová artritída ap). Stanovenie špecifických IgM, IgG a IgA protilátok proti *Yersinia enterocolitica* je tiež dostupné pri tejto indikácii.

Chlamýdiové infekcie

Protilátky proti chlamýdiám je možné detekovať u veľkého počtu osôb bez príznakov, čo limituje výpovednú hodnotu sérologického vyšetrenia. Detekcia IgM protilátok u detí sa však ukázala relevantnejšou a špecifickejšou ako stanovenia antigénu vo vzorke spúta pri chlamýdiovej pneumonitíde. Stanovenie antigénu *Chlamydia trachomatis* a *Chlamydia pneumoniae* je možné zo zodpovedajúcich vzoriek a ich odlišnie sa uskutoční na ich základe. Protilátky proti *Chlamydia trachomatis* korelujú s incidenciou gynekologického zápalu u žien vo fertilnom období. Odlišnie infekcie *Chlamydia trachomatis* a *pneumoniae* je možné špecifickými IgM a IgG protilátkami proti obom vyvolávateľom a lokalizáciou infekcie. (Na jednej strane pneumónia, na druhej strane genitálne a extragenitálne prejavy infekcie *Chl.trachomatis*)

Helicobacter pylori

Napriek dostupným metódami priameho dôkazu *H. pylori* (dychová skúška, dôkaz antigénu zo stolice – skriningové testy a ureázový test z biopsie, mikroskopia bioptického materiálu a analýza metabolických vlastností vzorky stanovením ureázy) zostáva sérologické vyšetrenie veľmi vhodnou a relevantnou metódou pri správnej interpretácii. Jej výhodou je neinváznosť odberu, odstránenie rizika nozokomiálnej nákazy prostredníctvom endoskopu, falošnej pozitivity pri kontaminovanom endoskope, falošnej negativity pri použití agresívnych dezinfekčných prostriedkov a nesprávnej vzorky. Existencia skrížene reagujúcich protilátok u nedostatočne špecifického testu núti k opatrnému výberu diagnostickej súpravy a jej intralaboratórnej kontroly. Prítomnosť IgA protilátok odzrkadľuje výskyt akútneho ochorenia a exacerbácie. Koncentrácia však neodzrkadľuje klinickú aktivitu. Protilátky IgG sú perzistentné a ich dynamika nesúvisí s klinickými prejavmi.

Mykoplazmy a ureaplazmy

Klasické vyšetrenie chladových aglutinínov bolo v minulosti dostupnou metódou na stanovenie sérologickej odpovede na infekciu *Mycoplasma pneumoniae*, hoci tento test bol pozitívny len v 50% dokumentovaných prípadov. Testy na špecifické IgG a IgM protilátky sú

v súčasnosti dostupné. V období pravidelne sa opakujúcich epidémií atypických pneumónií s typickým klinickým obrazom je dostatočným potvrdením etiologického agens stanovenie IgM špecifických protilátok. K dispozícii sú aj latex aglutinačné súpravy na skriningové stanovenie protilátok. Ich nevýhodou je cena a potreba konfirmácie ELIS-ou, výhodou je použiteľnosť v ambulancii za účelom správnej terapie (nepodanie primárne neúčinných penicilínových a cefalosporínových antibiotík).

Protilátky proti niektorým vírusovým ochoreniam

Stanovenie špecifických IgG a IgM, prípadne IgA protilátok je k dispozícii voči mnohým vírusovým antigénom. Najviac sa testujú protilátky proti hepatitídam, CMV, EBV, RSV, HIV, Parvovírusu, Chrípke a preventabilným vírusom z dôvodu diagnostického a epidemiologického. U niektorých menej častých alebo klinicky menej zjavne asociovaných vírusov (enterovírusy, poliovírusy, adenovírusy, ECHO, Coxackie) sa používali klasické metódy KFT, VNT a HIT. Dnes s výhodou nahradené imunfluorescenčnými metódami. Prípadne priamym dôkazom pomocou PCR metód. Tieto sa využívajú aj na konfirmáciu výsledkov iných testov prípadne na identifikáciu vírusového antigénu získaného pri izolácii vírusov na tkanivových kultúrach, kuracom embryu alebo inom živom modeli.

Infekcia vírusom Epsteina Barrovej

Infekcia EBV - je primárnou príčinou infekčnej mononukleózy. Súvisí tiež s Burkittovým lymfómom a nasofaryngeálnym karcinómom a syndrómom chronickej únavy. Vírus je všeobecne rozšírený a väčšina ľudí sa premorí v období dospievania. IM má významný vrchol výskytu u mladých ľudí v puberty (choroba z bozkávania). IM je vírusová tonzilitída s postihnutím pečene a typickým nálezom špecificky zmenených monocytov v krvi. Vyšetrenie CRP jednoznačne vylúči bakteriálny pôvod infekcie. Tonzilitída, aktivita hepatálnych enzýmov, negatívne CRP a krvný obraz sú dostatočnými diagnostickými kritériami pre stanovenie akútnej IM. Podanie niektorých skupín antibiotík (ampicilín) môže mať za následok výskyt hypersenzitívnej reakcie na koži (exantém), ktorý nie je prejavom alergie na tento liek. Väčšina dospelaj populácie má špecifické protilátky proti EBV v triede IgG pozitívne, preto je ako skriningové vyšetrenie IM dostačujúci test na heterofilné protilátky. Kombinácia Paull Bunnell, OCH a IM test odhalí väčšinu infekcií bez ohľadu na štádium. Klasické aglutinačné testy heterofilných protilátok sú špecifickejšie ako latex aglutinačné komerčne dostupné testy na skrining, vzhľadom na neprítomnosť absorpčného kroku, ktorý minimalizuje reakciu Forsmannových protilátok, ktoré môžu byť príčinou falošne

pozitívnych reakcií. Sérologická odpoveď na infekciu EBV je charakterizovaná prinajmenšom tvorbou 6 v súčasnom období detekovateľných typov protilátok. EBV VCA IgG a IgM, EBV - EA IgG a IgM a EBV EBNA IgG a IgM. Určením ich dynamiky je možné pomerne presne stanoviť štádium a prognózu infekcie EBV. EBNA IgM je citlivejšie ako vyšetrenie heterofilných protilátok pre akútnu infekciu IM. EBNA IgG nie je prítomné v akútnom štádiu infekcie a je detekovateľný po dobu niekoľko týždňov až mesiacov po infekcii a perzistujú po celý život. Detekcia IgM EBNA je diagnostická pre reinfekciu u zdravých jedincov. Imunosuprimovaní pacienti si často nevytvárajú protilátky proti EBNA (Epstein Barrovej nukleárny antigén). Ďalším antigénom je vírusový kapsulárny antigén (VCA). Protilátky typu VCA IgM má vysokú výpovednú hodnotu pre stanovenie primoinfekcie predovšetkým u malých detí a pre stanovenie atypického priebehu ochorenia u dospelých. Niektoré prejavy primoinfekcie CMV môžu byť podobné s príznakmi primoinfekcie EBV. Pri negatívnom výsledku EBV IgM je potrebné vyšetriť aj CMV IgM. V prípade pacientov s IM s negatívnym nálezom EBV VCA IgM, CMV IgM, alebo u pacientov s malignitou navodenou EBV infekciou alebo pri stanovení reaktívácie EBV infekcie u imonokompromitovaných pacientov je možné použiť sérologické vyšetrenie na stanovenie protilátok proti EA EBV (early antigén, skorý antigén), či už reštrikčného alebo difúzneho.

HIV

Sérologické vyšetrenie protilátok proti HIV 1,2,0 sa využíva v rámci skrínového prenatálneho a predoperačného vyšetrenia. Diagnostické stanovenie má svoje obmedzenie v rámci dynamiky tvorby protilátok a výskytu antigénu v sére pacienta v priebehu ochorenia. Samostatné vyšetrenia protilátok má obmedzenú výpovednú hodnotu, keďže doba sérokonverzie od infikovania môže trvať aj 3 mesiace, u novorodencov HIV pozitívnych matiek aj 6 – 18 mesiacov. Neprítomnosť protilátok u infikovaného priamo koreluje s výskytom HIV vírusu v sére, a preto negatívny výsledok je pri infekcii možný v čase virémie na začiatku ochorenia, prípadne v období rozvinutých príznakov AIDS. V tejto súvislosti je opodstatnené zavádzanie tzv. combo testov – súčasné stanovenie anti HIV protilátok a HIV vírusového antigénu minimálne u rizikových skupín. Vzhľadom na závažnosť diagnózy je u nás úpravené konečné stanovenie positivity anti HIV na potvrdenie z NRC. Potom čo bola vzorka opakovane testovaná v lokálnom laboratóriu ako reaktívna, je vyžiadaná nová vzorka. Ak aj táto je reaktívna, zasielajú sa obe do NRC na konfirmačný test a v prípade potreby sa vyšetruje aj nová vzorka plnej krvi na stanovenie virémie.

Protilátky proti mikroorganizmom spájaným s nádorovými ochoreniami

Stanovenie protilátok proti HTLV v súvislosti s transfúziou preneseným vírusom T cell leukémie a lymfómu sa začalo používať. Stanovenie sérologickej odpovede a jej interpretácia proti ďalším možným vyvolávateľom nádorových ochorení (EBV) bolo diskutované vyššie.

Stanovenie protilátok proti HPV v súvislosti s očkovaním proti tomuto vyvolávateľovi Ca krčka maternice je v súčasnosti súčasťou diskusie. Testovanie HPV DNA zachytáva súčasné infekcie a možno časť latentných., negatívny výsledok nehovorí nič o kvalite odoberu vzorky ani o dočasnej či intermitentnej prítomnosti vírusu v bunkách krčku. Nie je jasné, či prítomnosť vírusu spustí kancerogenézu alebo je potrebná jeho dlhodobá prítomnosť vo všetkých štádiách vývoja infekcie. V prvom prípade by požiadavka na vytvorenie tyovošpecifického a citlivého testu na detekciu protilátok bola rovnako dôležitá ako testovanie DNA HPV. Potom ako sa testovala pripravovaná vakcína a zistila sa existencia vhodných epitopov L1 a L2 je možné očakávať širšie zavedenie sérologických testov na detekciu protilátok. Interpretácia ich nálezov v súvislosti s odlišením postvakcinačných a postinfekčných protilátok, rovnako ako s ich hodnotou diagnostickou a protektívnou je otázkou vyhodnotenia v súčasnosti prebiehajúcich štúdií. Zdá sa že vývoj typovo špecifických protilátok môže byť detekovaný u väčšiny žien počas 12 – 15 mesiacov po infekcii HPV. Vzťah medzi vývojom protilátok a prognózou infekcie nie je jasný. Markery postvakcinačného testovania imunity, prípadne sérologické markery identifikujúce ženy rizikové na vznik invázie v oblasti krčka maternice je potrebné identifikovať.

6. 6. 3 Detekcia voľných antigénov vo vzťahu k aktivite ochorenia

V priebehu infekcie sa v sére a v závislosti na veľkosti molekuly prípadne iných vlastnostiach aj v iných tekutinách alebo materiáloch nachádzajú voľné antigény. Ich detekcia je dôležitým diagnostickým krokom pre priamy dôkaz vyvolávateľa infekcie. Dôkaz antigénu je možné uskutočniť na základe rovnakého princípu ako dôkaz protilátok, v podstate sérologickou reakciou antigénu (neznámeho) s protilátkou. Prítomnosť rozpustných antigénov v sére koreluje s aktivitou ochorenia.

Bakteriálne antigény (kapsulárne polysacharidy, súčasti bunkovej steny) je možné detekovať rôznymi metódami – dvojité difúzia, protismerná elektroforéza, aglutinácia, ELISA, precipitácia. Telesné tekutiny – sérum, CSM, moč sa bežne používajú na ich stanovenie. Zvlášť moč sa s výhodou používa, pretože jeho odber je neinvázny, moč je v obličkách koncentrovaný a preto aj množstvo antigénu je vyššie. Výhodou detekcie antigénu je, že sa

vizualizuje prítomnosť aj usmrtených alebo života neschopných baktérií. Predchádzajúca liečba antibiotikami inhibujúca rast mikroorganizmov pri kultivácii neovplyvní výsledok tejto rýchlej metódy detekcie antigénu, ale môže skôr urýchliť podanie vhodnej liečby. Nie je možné je však použiť na hodnotenie terapie, pretože antigény sú schopné perzistovať dlhodobo aj pri vhodnej terapii.

Neonatálne infekcie

Pokiaľ nedošlo ku kongenitálnej infekcii prostredie in utero je sterilné. Novorodenci a zvlášť predčasne narodené deti sú náchylné na vývoj infekcie pokiaľ sa nevyvinie ich dostatočná imunita. Sú chránené materskou imunitou, ktorá má kritický význam pre obranyschopnosť novorodenca. Novorodenci sú zvlášť vystavení riziku infekcie *Str. agalactiae* (HSB) v priebehu prvých 2 mesiacov života. Detekcia antigénu v moči, CSM a iných tekutinách môže byť rýchlym spôsobom stanovenia diagnózy. V rámci diferenciálnej diagnostiky je možné uvažovať o *Listeria monocytogenes*, *E. coli*. Novorodenec nemá prakticky možnosť obrany pred infekciou, pokiaľ mu neboli transplacentárne prenesené protilátky od matky. Preto prítomnosť protilátok u matky je má výpovednejšiu hodnotu ako nosičstvo alebo tranzitná prítomnosť mikroorganizmov na sliznici. Vírusové infekcie sa môžu vyskytnúť pri expozícii v priebehu pôrodu u asymptomatických žien s infekciou HSV, CMV. Ak je známa alebo diagnostikovaná infekcia HSV na sliznici genitálneho traktu u ženy pred pôrodom je riziko novorodeneckej herpetickej infekcie veľké. Aj väčšina CMV cervikálnych infekcií je asymptomatická, a preto existuje požiadavka na rýchle latexové diagnostické testy pre skriningové vyšetrenie. Matka môže tiež preniesť vírus prostredníctvom mlieka alebo kolostra, preto primoinfekcia herpetickými vírusmi u dojčiacej matky, prípadne virémia HIV, CMV, HSV, VZV by mohla byť indikáciou k prerušeniu dojčenia.

Bakteriálne meningitídy detského veku

Deti vo veku 3 mesiacov až 2 rokov života sú zvlášť náchylné na inváznu infekciu mikroorganizmami s polysacharidovými antigénmi, predovšetkým *N. meningitidis*, *Str.pneumoniae*, *Haemophilus influenzae typ b*. Rýchla diagnostika latexovou aglutináciou umožňuje včasnú identifikáciu bakteriálneho agens, špecifickú terapiu a potvrdenie vyvolávateľa aj pri negatívnom kultivačnom výsledku napríklad z dôvodu zlého transportu a uchovania vzorky po odbere (uloženie do chladničky), alebo predliečenia antibiotikami v predchádzajúcich dňoch. Úspešnosť latexovej aglutinácie rovnako ako svetelnej mikroskopie pri bakteriálnej meningitíde si je ovplyvnená stupňom rozvoja infekcie. Obidve

dávajú jednoznačný výsledok až pri zjavných a dobre vyvinutých klinických príznakoch. Predčasný odber je negatívny. Napriek výrazne zlepšenej diagnostike je stále bakteriologicky negatívnych 30% meningitíd, určených na základe kritéria WHO ako iste alebo pravdepodobne bakteriálnych



Diagnostika infekcie *Str. pyogenes* u detí

Rýchla diagnostika *Str. pyogenes* – HSA – vyvolávateľa bakteriálnych tonsilitíd je rýchlou a vhodnou metódou umožňujúcou jednoznačnú kauzálnu liečbu indikovanú z dôvodu možných poststreptokokových následkov a 100% citlivosťou HSA na PNC. Antigén musí byť uvoľnený z baktérie a zápalových buniek antiinfekčnej imunity v miest zápalu. Antigén sa potom detekuje enzýmovou imunoanalýzou (EIA) alebo aglutináciou. Špecifita testu prevyšuje senzitivitu a negatívne výsledky v ambulancii testovanej vzorky je potrebné potvrdiť kultiváciou odobratou pred terapiou.

Rýchla diagnostika na stanovenie vírusových antigénov môže mať veľké terapeutické použitie. V súčasnosti sú k dispozícii imunofluorescenčné alebo latex aglutinačné, výnimočne ELISA alebo EIA metódy na diagnostiku antigénu v biologickej vzorke (rotavírusy a adenovírusy v stolici, HSV a VZV z eflorescencií na oddelení imunosuprimovaných pacientov, CMV z biopsie alebo BAL, HbsAg v sére. Stanovenie antigénúrie napríklad pri legionelovej pneumónii môže byť diagnostické v súvislosti so zodpovedajúcim klinickým obrazom. Tento spôsob detekcie antigénu nie je vhodný na monitorovanie ochorenia a prognózy pacienta, pretože antigénúria môže perzistovať aj niekoľko mesiacov po zlikvidovaní infekčného procesu.

7. ZÁVER

Skriptá v teoretickej časti rozpracovávajú predmet štúdia odboru mikrobiológia. Sú definované základné pojmy, ako je mikrobiológia, klinická, laboratórna a lekárska mikrobiológia. Prezentuje sa úloha mikrobiológa v oblasti diagnostiky v rámci liečebnej a preventívnej činnosti. Tú vykonávajú oddelenia klinickej mikrobiológie, ktoré sú spravidla začlenené do systému poskytovania zdravotnej starostlivosti. Vedecký výskum sa v našich podmienkach realizuje predovšetkým na úrovni vedeckých inštitúcií, ale aj na akademickej pôde. Vedecká práca v mikrobiológii je tak súčasťou pedagogickej činnosti. Charakterizujeme sa význam a možnosti odboru pre výskum a diagnostiku v iných medicínskych odboroch v rámci spolupráce a vytváraní laboratórnej základne surveillance. Informujeme o postavení mikrobiológie (laboratórnej aj klinickej) v súčasnom systéme poskytovania zdravotnej starostlivosti.

Lekárska mikrobiológia opierajúca sa o laboratórnu činnosť oddelenia klinickej mikrobiológie a vedecký potenciál fakultného pracoviska je odborom so širokým záberom v oblasti vedy, diagnostiky, surveillance a spolupráce. Táto charakteristika robí z odboru mikrobiológie jeden z najzaujímavejších odborov medicíny s možnosťami uplatnenia sa na poli vedy, rutinej diagnostiky a interdisciplinárnej spolupráce v oblasti klinickej medicíny aj verejného zdravia.

- V oblasti vedeckej činnosti treba dlhodobo a kontinuálne udržať vysokú úroveň odborných vedomostí a materiálno-technického zabezpečenia laboratórnych pracovísk v zhode s podmienkami správnej laboratórnej praxe a akreditácie.

- Možnosti financovania vedeckých činností, ktorých výsledkom sú kvalitné publikácie, sú obmedzené v podmienkach školstva a zdravotníctva a grantové zdroje sú nepravidelné. Viaczdrojové financovanie laboratórnych výskumných činností špičkových pracovísk by mohlo byť jedným z riešení, a to v spolupráci s fakultnými nemocnicami, poisťovňami a ziskovými súkromnými laboratóriami či výrobnými spoločnosťami z oblasti diagnostík.

- Činnosť klinického mikrobiológa pri identifikovaní diagnostických postupov na riešenie nových ochorení, ako aj aktívna konzultačná činnosť podložená spracovaním a analýzou informačných zdrojov o etiologických agensoch podľa požiadaviek klinického pracovníka sú najdôležitejším prínosom mikrobiológie v procese liečby pacienta. Túto činnosť treba etablovať a koncepčne vyčleniť v rámci odboru s určením odborných kritérií pre činnosť tak, aby klinická mikrobiológia nebola len laboratórnym pracoviskom.

- Dlhodobo sú mikrobiologické pracoviská zdrojom informácií vo forme výsledkov vyšetrení. Možnosti ich využitia pre surveillance a spoluprácu sú veľké. Potrebné je však

zodpovedajúce technické vybavenie, časový priestor a stanovený algoritmus zverejňovania prehľadov, a to dlhodobu a široko porovnateľným a použiteľným spôsobom.

- Vytváranie podmienok (vrátane výučbových základní, konzultačných pracovísk, telefónnych liniek, online prístupov a študijných portálov) na osvojenie odborných vedomostí, udržiavanie medzinárodných a domácich kontaktov, uvoľnenie klinického mikrobiológa na konzultačné činnosti je krokom k získaniu spolupracovníkov, potenciálnych spoluautorov, riešeniu nových úloh, zaujímavých problémov a získaniu podnetov na zlepšovanie sa prostredníctvom práce.

Automatizácia sérológie infekčných ochorení je skutočnosťou. Techniky na detekciu špecifických antigénov a protilátok sú k dispozícii takmer okamžite po identifikácii nového mikroorganizmu a stále prebieha proces identifikácie nových postupov využívajúcich špecifickejšie antigény, detailnejšie epitopy a protilátky proti nim. Problematickejšie je z pohľadu nových postupov definovanie „zlatého štandardu“. Štandardy, ktoré boli roky používané, sú dnes nahradzované novými laboratórnymi postupmi spolu so zavedením nových diagnostických kritérií, ktoré sú stále sofistikovanejšie. Nové metódy enzýmovej analýzy alebo amplifikačné techniky detekcie nukleovej kyseliny a použitie monoklonálnych protilátok majú potenciál byť dostupné a využiteľné v rutinej praxi. Nie je problém detekovať rôzne typy antigénov, protilátok, dynamiku ich tvorby. Dôležité je stanoviť kritéria pre indikáciu vyšetrení a interpretačné kritéria. Stanovenie baktérie *Clostridium difficile* bude pri použití metódy PCR pozitívne asi u každého človeka. Quod bono? Rovnako potrebné je splnenie podmienok šandardizácie a kvality laboratórií ako základnej podmienky interlaboratórnej porovnateľnosti výsledkov testov. Súčasná kauzálna identifikácia infekčných ochorení je založená na vizualizácii, kultivácii, detekcii antigénov, nukleovej kyseliny alebo metabolizmu a biochemických vlastností vyvolávajúceho mikroorganizmu, alebo na detekcii zodpovedajúcich tried špecifických protilátok, dynamike tvorby celkových protilátok proti samotnému vyvolávateľovi alebo proti niektorej z jeho štrukturálnych či metabolických súčastí. Všetky testy, ktoré sú k dispozícii by mali mať nielen potvrdenie zodpovedajúcich autorít pokiaľ ide o ich použitie. Mali by existovať pravidlá pre použitie určitých metód vo vzťahu ku klinickej korelácii a diagnostickej hodnote testu. Každé laboratórium by si malo stanoviť kvalitu typu testu aj testovacej súpravy. Nemalo by stačiť spoľahnúť sa na vyjadrenie výrobcu. Zachovanie dobrého mena laboratórií nie je možné len zvyšovaním kvantity vyšetrených sér alebo zavedených nových vyšetrovaných parametrov. Kvalitu je možné zachovať len existenciou profesionálnej ctižiadosti vzdelaných, skúsených a oddaných

pracovníkov, ktorým je umožnené odborne rásť. V období, keď „cost – effectiveness“ a „cost – benefit“ sú termíny skloňované na každej úrovni organizácie zdravotníctva, sa stáva kvalifikovaný mikrobiológ a imunológ nedostatkovou špecializáciou. Snáď sa nestane aj nežiadanou. Urobme z automatov dobrých sluhov a nie zlých pánov. Bolo by účelné a pre lekára i pacienta prospešné, keby aj v rámci SVLZ zostal zachovaný duch klinických laboratórií – laboratórií pre kliniku, kde je možné získať kompletnú službu s navrhnutím relevantného vyšetrenia, s výberom najvhodnejšieho testovacieho postupu, s reprodukovateľným, presným a správnym výsledkom, s interpretáciou, ktorá je čo najviac jednoznačná. U jednotlivých infekčných ochorení existuje celá škála vyšetrovacích postupov, parametrov a metodík, ktorých výber je presne indikovaný podľa vyvolávateľa ochorenia, štádia nemoci, skúseností indikujúceho lekára, možností laboratória, výpovednej hodnoty. Nie je možné použiť vždy len jednu metodiku alebo jeden princíp na vyšetrenie mnohých parametrov. Turbidimetria je presná a výborná metodika, ale na stanovenie ASLO nie je najvhodnejšia. Rovnako cytometrické analyzátory sú veľkou pomocou pri stanovení signifikantnej bakteriúrie tým, že potvrdia alebo vyvrátia prítomnosť infekcie. Nikdy ale nemôžu nahradiť požadované vyšetrenie na kultiváciu moču, a to ani v prípade negatívneho výsledku. Tak ako nie je možné zbaviť klinickú medicínu individuálneho prístupu a ľudskosti, nie je možné prenechať laboratórnu medicínu len automatom a analyzátorom.

8. LITERATÚRA

Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev.* 1995;59(1):143-169.

Bhattacharya S. Clinical microbiology: should microbiology be a clinical or a laboratory specialty? *Indian J Pathol Microbiol.* 2010;53:217-221.

Burkovski A. *Corynebacteria: Genomics and Molecular Biology*. Caister Academic Press. 2008. ISBN 978-1-904455-30-1. Dostupné na <http://www.horizonpress.com/cory>. 22.7.2010

Dessau RB, Steinberg P. Computerized surveillance in clinical microbiology with time series analysis. *J Clin Microbiol.* 1993;31(4):857-860

Diaz E . *Microbial Biodegradation: Genomics and Molecular Biology*. Norfolk: Caister Academic Press. 2008. ISBN 978-1-904455-17-2. Dostupné na <http://www.horizonpress.com/biod>. 22.7.2011.

Doan T, Melvold R, Viselli S et al. Immunology: In Lippincott's illustrated reviews. Philadelphia Wolters Kluwer, 2008; 335, ISBN 0-7817-9543-5.

Doczeová A, Líšková A, Krčmery V et al. Antimikrobiálna rezistencia a etiológia izolátov z respiračného traktu populácie v presídlenej oblasti južného Sudánu - porovnanie s populáciou zo slumov v Nairobi Keňa. *Acta Chemotherapeutica.* 2004;13:16-20.

Gavan TL. The laboratory microbiologist in clinical medicine. *Ann Intern Med.* 1978;89 (Suppl.2):789-790.

Gest H. The remarkable vision of Robert Hooke (1635-1703): first observer of the microbial world. *Perspect Bio Med.* 2005;2:266-272.

Hausen H. Papillomaviruses and cancer:from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer.* 2002;342

Hoza J, Jindrák V, Marešová V et al. Konsenzus používání antibiotík 1. Penicilínová antibiotika. *Prak Léč.* 2005;82:247-306.

Hupkova H, Gežo M, Hroncova D et al. Slovenský medicínsky dialóg. Občianske združenie Zdravé mesto. 2010; ISBN 978-80-224-1139-4.

James K, Immunoserology of infectious diseases. *Cin Microb Rev.* 1990;3:132-152.

Kafetzis DA, Liapi G, Tsolia M. Failure to eradicate Group A beta-hemolytic streptococci (GABGS) from the upper respiratory tract after antibiotic treatment. *Int J Antimicrob Agents.* 2004;23:67-71.

Madigan M, Martinko J. Brock Biology of Microorganisms. Illinois: Prentice Hall. 2006; ISBN 0-13-144329-1.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing. Approved standard M2-A8. NCCLS, 2003.

Rehm BHA. Microbial production of biopolymers and polymer precursors: applications and perspectives. Norfolk: Caister Academic Press, 2008; ISBN 978-1-904455-36-3. Dostupné na <http://www.horizonpress.com/biopolymers>. 22.7.2011.

Riordan TK, Cartwright M, Logan R et al. How do microbiology consultants undertake their jobs? A survey of consultant time and tasks in South West England. J Clin Pathol. 2002;55:735-740.

Steinman AM. Use of broad spectrum antibiotics increasing. Ann Intern Med. 2003;138:525-533.

Tannock GW. Probiotics and Prebiotics: Scientific Aspects. Norfolk: Caister Academic Press, 2005; ISBN 978-1-904455-01-1. Dostupné na <http://www.horizonpress.com/pro3>. 22.7.2011.

Thomson RB. The changing role of the clinical microbiology laboratory director results of a survey. Diagn Microbiol Infect Dis. 1995;23:45-51.

Vandepitte, J. Verhaegen J, Engbaek K et al. Basic laboratory procedures in clinical bacteriology. Geneva: WHO, 2003; 167, ISBN 92 4 154545 3.

Weinberg J. Surveillance and control of infectious diseases at local, national and international levels. Clin Microbiol Infect 2005; 11(Suppl. 1): 12–14.

WHO: Expert Committee on Biological Standardization. Twenty-eight report. Geneva: WHO, 1977;610.

WHO: Expert Committee on Biological Standardization: Pneumococcal Conjugate Vaccines. Recommendations for production and quality control of pneumococcal conjugate vaccines Geneva: WHO, 2003.

Winkelstein JA, Childs B. Why do some individuals have more infections than others? J Amer Med Assoc. 2001;285:1348-1349.

Obrázky upravené podľa: **Doan T,** Melvold R, Viselli S et al. Immunology: In Lippincott's illustrated reviews. Philadelphia Wolters Kluwer, 2008; 335, ISBN 0-7817-9543-5

9. ZOZNAM SKRATIEK

ADCC – antibody dependent cell cytotoxicity (na protilátkach závislá bunková cytotoxicita)

AHGG - agregovaný ľudský gama globulín

AIDS – acquired immunodeficiency syndrome

AKAS – akademická knižnica a audiovizuálne stredisko

ASLO – antistreptolysin O

ATB – antibiotiká

BAL – bronchoalveolárna laváž

BWR - Bordette Wassermanova reakcia

CD – cluster of differentiation

CDC – Center for Disease Control (centrum pre kontrolu chorôb)

CFU – colony forming unite (kolóniu tvoriaca jednotka)

CIE – contreimmunoelectrophoresis (protismerná imunoelektroforóza)

CMV - cytomegalovírus

CNS – centálny nervový systém

CRP – C reaktívny proteín

CSM – cerebrospinálny mok

DC – dýchacie cesty

DIC – diseminovaná intravaskulárna koagulopatia

dl - deciliter

DM – diabetes mellitus

DNA – deoxyribonucleic acid (kyselina deoxyribonukleová)

DTP – diftéria, tetanus, pertussis

EA - early antigen

EBNA - Epstein Barr nuclear antigen

EBV – vírus Epsteina Barrovej

EIA – enzýmová imoanalýza

ELISPOT – enzyme linked immuno spot

EPIS – epidemický informačný systém

ESCMID – European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases (európska spoločnosť pre klinickú mikrobiológiu a infekčné choroby)

EU – Európska únia

GLP – good laboratory practice (správna laboratórna prax)

HBc – c antigén vírusu hepatitídy B
HBe – e antigén vírusu hepatitídy B
HBs – s antigén vírusu hepatitídy B
HBsAg – s antigén vírusu hepatitídy B
HIT – hemaglutinačne inhibičný test
HIV – human immunodeficiency virus
HPV – human papillomavirus (ľudský papilomavírus)
HSA – hemolytický streptokok zo skupiny A
HSB – hemolytický streptokok zo skupiny B
HTLV – Human T lymphocyte virus
IEQASM – International External Quality Assessment Scheme for Microbiology
(medzinárodná schema externej kontroly kvality pre mikrobiológiu)
IDA – immunodot analysis
IEM – immunoelektrónová mikroskopia
IFA – imunofluorescenčná analýza
IgA – imunoglobulín A
IgE – imunoglobulín E
IgG – imunoglobulín G
IgM – imunoglobulín M
IL - interleukín
IM - infekčná mononukleóza
IU/l – medzinárodná jednotka v jednom litri
JLF UK – Jesseniova lekárska fakulta Univerzity Komenského
KFR – komplement fixačná reakcia
LIS – laboratórny informačný systém
Mab – monoklonálne protilátky
MD – medical doctor (doktor medicíny)
mg – miligram
MHC – major histocompatibility complex (hlavný histokompatibilný komplex)
MIC – minimal inhibition concentration (minimálna inhibičná koncentrácia)
ml – mililiter
mm³ - milimeter kubický
MZ SR – ministerstvo zdravotníctva Slovenskej republiky
NRC - národné referenčné centrum

OCH - ex cell hemolysis test

OKM – oddelenie klinickej mikrobiológie

PBP – penicilin binding protein (penicilín viažúci proteín)

PCR – polymerase chain reaction (polymerázová reťazová reakcia)

resp. – respektíve

RIA – radioimunoanalýza

RNA – ribonucleic acid (kyselilna ribonukleová)

RR – relatívne riziko

RRR - rapid reagent reaction

RSV – respiračný synciciálny vírus

SLO – stoptolyzín O

SR – Slovenská republika

SVLZ – spoločné vyšetrovacie a laboratórne zložky

TPHA - treponema pallidum hemagglutination

TNF – tumor necrosis factor

UK – Univerzita Komenského

ÚMI JLF UK – Ústav mikrobiológie a imunológie Jesseniovej lekárskej fakulty Univerzity Komenského

ÚVZ – úrad verejného zdravotníctva

VCA viral capsid antigen

VDRL - venereal disease research laboratory

VHA – vírus hepatitídy A

VHB – vírus hepatitídy B

VHC – vírus hepatitídy C

VNT – vírus neutralizačný test

VZV – varicella zoster vírus

WHO – World Health Organisation (svetová zdravotnícka organizácia)