

Jak laboratorní metody pomáhají v pátrání po původcích nemocí: Vybrané metody diagnostiky infekčních onemocnění

Diagnostika slouží k rozpoznávání patologického jevu. Z medicínského hlediska pak rozumíme diagnostikou proces zaměřený na hledání příčiny onemocnění. Na konci by mělo být odhalení (rozpoznání) nemoci, tedy diagnóza. Základem diagnostiky onemocnění je soubor různých vyšetření, pomocí nichž se postupně získávají a zjišťují nové informace zpřesňující cestu hledání a ve výsledku vedou k určení onemocnění. Mezi tato vyšetření patří klinický obraz – souhrn subjektivních a objektivních příznaků nemoci, anamnéza – soubor informací o pacientovi a jeho předchozích onemocněních, chorobách v rodině, ale také typ práce, chov zvířat, cestování aj. (anamnéza osobní, rodinná, cestovatelská atd.); fyzikální vyšetřovací metody hodnotící objektivní příznaky, poslech, kterým se sleduje činnost srdce a plic, poklep a pohmat hodnotící např. změny velikosti orgánů; zobrazovací metody jako radiodiagnostika, ultrazvuk, nukleární magnetická rezonance, endoskopie aj.; funkční vyšetřovací metody sledující především činnost orgánů; a v neposlední řadě laboratorní metody zahrnující biochemická, hematologická, imunologická, mikrobiologická, cytologická a histologická vyšetření. Jak se rozvíjejí vědecké metody, tak dochází, ovšem pomaleji a postupně, k využití některých z nich v laboratorní diagnostice. Příkladem může být metoda MALDI-TOF, o které se dozvíte více v článku V. Dvořáka na str. 169 tohoto čísla *Živy*.

Níže uvedený stručný a pouze rámcový přehled nemůže pokrýt celé spektrum metod laboratorních vyšetření. Proto se soustředíme pouze na ta, která se používají při laboratorní diagnostice infekčních onemocnění a slouží tedy k rozpoznání původců infekcí, průkazu různých patogenů.

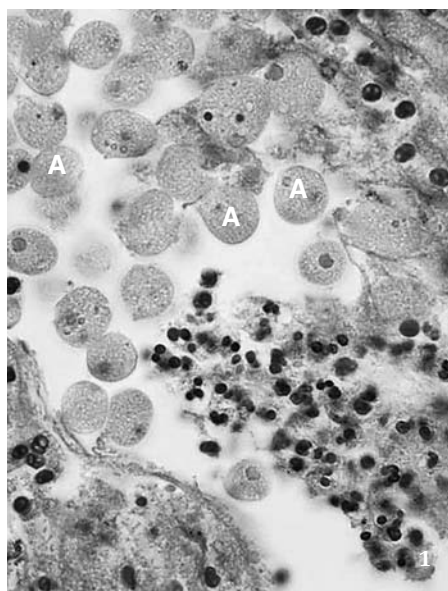
Jak můžeme prokázat původce nákazy? ● Metody přímého průkazu

Přímým průkazem rozumíme nález (záchyt) původce onemocnění (prionu, viru, bakterie, houby, parazita) nebo jeho složek (antigenů či nukleových kyselin) v klinickém materiálu. Klinickým materiálem pro přímý průkaz může být cokoli, v čem je šance patogen (nebo třeba jeho RNA/DNA) nalézt, např. tělní tekutiny (krev, lymfa, mozkomíšni mok), sekrety, vzorky tkání odebrané za živa (*intra vitam*) obvykle invazivní technikou (seškrabem, biopsií, punkcí, laváží), dále exsudáty (zánětlivé výpotky z krevních a mízních cest), výměšky (stolice, moč, sputum – sekret vykašlávaný z dýchacích cest) aj. Pátrat po původci lze i ve vzorcích tkání odebraných posmrtně (*post mortem*) při pitvě. Pro přímý průkaz je zásadní nejen odběr, ale i co nejrychlejší transport materiálu za vhodných podmínek do diagnostické laboratoře.

K metodám přímého průkazu patří především mikroskopie, kultivace, metody

průkazu RNA/DNA a metody průkazu antigenu.

Mikroskopie využívaná v diagnostice je především optická, ale stále častěji se používá i fluorescenční, konfokální a elektronová (mikroskopii se budeme věnovat v jednom z příštích čísel *Živy*). Při zpracování vzorku se uplatňují různé metody jako např. nativní preparát, koncentrační



metody, trvalý barvený preparát nebo zástin.

Kultivací se rozumí záchyt a pomnožení původce onemocnění na umělých živých půdách, v podmínkách *in vitro* (mimo tělo „ve zkumavce“, i když zkumavka může být nahrazena jiným systémem). Kultivační podmínky musejí co nejvíce odpovídat nárokům hledaného patogenu, a to jak fyzikálně-chemickým (atmosféra, pH, osmolarita, teplota), tak metabolickým (vhodné živiny aj.). Aerobní mikroorganismy se pěstují při normální atmosféře. Mikroaerofilní mikroorganismy, které tolerují určitou koncentraci kyslíku, se kultivují v plynných směsích obsahujících definovaný podíl kyslíku. Striktní anaerobové vyžadují kultivaci za zcela anaerobních podmínek, tj. bez kyslíku. K tomu slouží speciální nádoby a systémy na vyvíjení plynných směsí zajišťující optimální složení atmosféry (nejjednodušší může být např. vložení zapálené svíčky, která spotřebuje v nádobě kyslík).

Kultivace se využívá hlavně ve virologické a bakteriologické diagnostice, dále v diagnostice mykóz (zjišťování plísni a hub) a v omezené míře také při průkazu parazitů, zejména těch jednobuněčných, jako jsou např. trypanozomy. Výhodou kultivačních metod je získání příslušného patogenu v dostatečném množství pro případné další zpracování a studium, někdy i cena, jež může být nižší než u jiných metod. Naopak hlavní nevýhodou je delší doba, kterou kultivace většinou vyžaduje, a rovněž nebezpečí kontaminace kultivačních médií případně znehodnocujících získané výsledky.

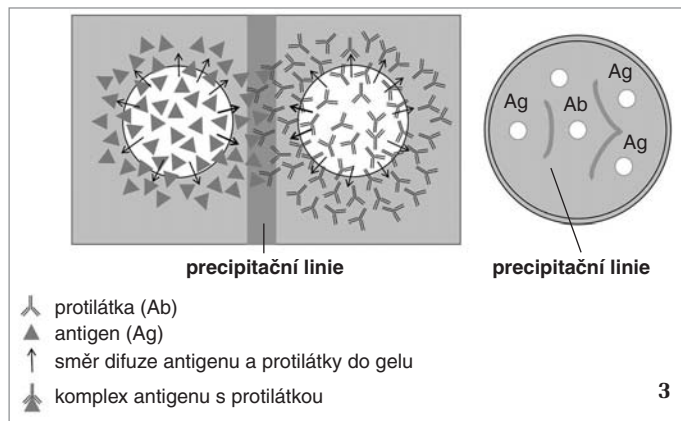
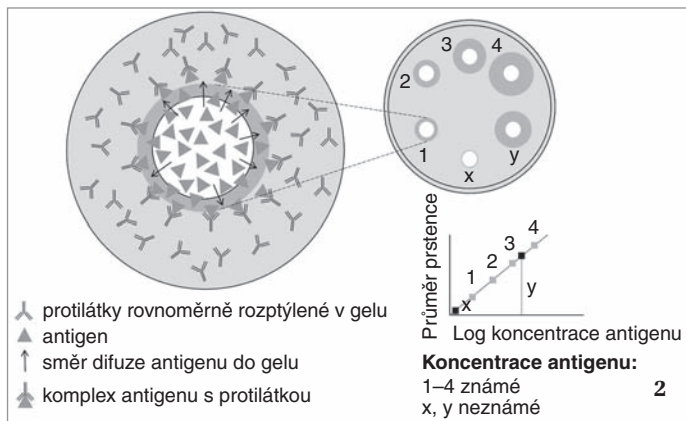
I když se zdá, že přímý průkaz jednoznačně prokáže, nebo neprokáže původce onemocnění, nemusí tomu tak být vždy. Kultivační metody mohou být citlivé na nesterilní odběr testovaného materiálu, v případě testů prokazujících přítomnost DNA patogenu může jít o zbytkovou (reziduální) DNA, která v těle pacienta nějakou dobu koluje, ačkoli patogen již v těle přítomen není apod. Právě z tohoto důvodu se někdy volí průkaz patogenu prostřednictvím jeho RNA, protože poločas rozpadu RNA je mnohem kratší, a tak přítomnost RNA většinou značí i přítomnost jejího majitele.

● Metody nepřímého průkazu

Jako nepřímý průkaz označujeme vyšetření, které neodhalí přímo původce onemocnění, ale specifickou odpověď organismu (tedy hostitele – pacienta) na infekci. V naprosté většině případů je touto odpovědí tvorba specifických protilátek, tedy obranná reakce těla ve snaze odstranit původce nákazy. Ke zjištění specifických protilátek se přistupuje především tehdy, když nelze prokázat původce přímo. Důvodů nemožnosti nebo obtížnosti přímého průkazu je hned několik:

- není známo, kde se patogen v organismu nachází a nedá se tedy cíleně odebrat a vyšetřit příslušný materiál/vzorek;

1 Parazitické améby (A) druhu *Entamoeba histolytica* na histologickém preparátu zhotoveném z biopsie stěny tlustého střeva při onemocnění zvaném amébová kolitida. Preparát je obarven metodou hematoxylin a eozin.



● stav pacienta nedovolí odebrat optimální materiál;

● přímý průkaz může být komplikovanější, dražší nebo méně spolehlivý než průkaz nepřímý atd. Nepřímý průkaz se běžně používá pro virové hepatitidy (žloutenku) A, B a C, klíšťovou encefalitidu, HIV, syfilis, mononukleózu apod.

Specifické protilátky, které se nejčastěji v metodách nepřímého průkazu používají, jsou bílkoviny produkované imunitními buňkami po rozpoznání přítomnosti cizího antigenu (zjednodušeně řečeno rozpoznání něčeho, co do našeho těla nepatří). Protilátky vytvářejí tzv. plazmatické buňky, na které se diferencují B-lymfocyty po stimulaci antigenem. Protože strukturně jde o globulární typ proteinů, konkrétně o globuliny, a protože je produkují buňky imunitního systému, jsou protilátky rovněž nazývány imunoglobuliny (Ig). Rozlišuje se pět tříd, lišících se velikostí molekuly i funkcí v organismu: IgA, IgD, IgE, IgG a IgM. Jedině imunoglobulin třídy IgG procházejí placentou, což je důležité při posuzování transplacentárních nákaz, infekce plodu v děloze (*in utero*).

Nejčastěji se specifické protilátky prokazují v krevním séru (tzv. sérové protilátky). Avšak infikuje-li původce onemocnění např. mozkovou tkáň či oko, lze protilátky nalézt v mozkomíšním moku nebo ve sklivci; při nálezích močového ústrojí zase stanovujeme protilátky v moči apod.

Metody průkazu protilátek

Principem všech metod prokazujících protilátky je tvorba komplexu známého antigenu (který je součástí nebo je produkován příslušným patogenem) a hledané protilátky (produkované hostitelem) a jeho následná detekce (vizualizace, případně měření). Proto je vždy nutné rozhodnout (např. na základě klinického obrazu nebo anamnézy), na přítomnost jakého patogenu budeme pacienta testovat.

Podle principu detekce se metody průkazu protilátek dělí na metody s přímou nebo nepřímou detekcí a na ty, které využívají značené protilátky.

● Metody s přímou detekcí

Byly vyvinuty již na konci 19. a během první poloviny 20. stol. a některé z nich se v diagnostice používají dodnes. Důvodem je především to, že jsou jednoduché, laciné, ověřené a výsledky lze tudíž z dlouhodobého hlediska vzájemně porovnávat. Jejich nevýhodou je nízká citlivost a z dnešního pohledu poněkud náročnost na manuální

provedení. Tyto metody jsou založené na precipitaci a aglutinaci. Při precipitaci dochází k vysrážení známých kolooidních antigenů (volných makromolekul) hledanou protilátkou. Při aglutinaci, která je obecně citlivější než precipitace, jsou hledanou protilátkou shlukovány celé částice, na jejichž povrchu se nachází známý antigen (tzv. korpuskulární antigen). V případě přímé detekce jsou těmito částicemi celé buňky a antigen tvoří přímo součást buněčné stěny/membrány mikroorganismu.

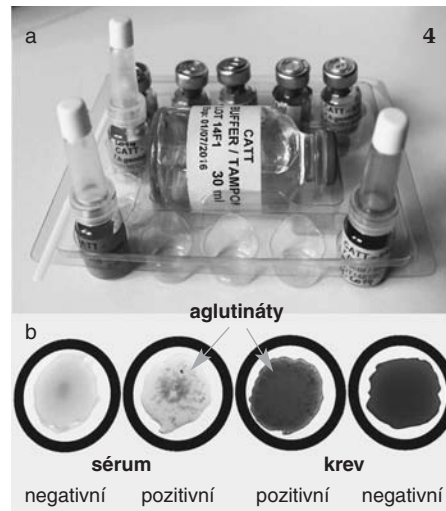
Precipitační metody

Tyto metody pro stanovení protilátek se provádějí buď v roztoku, nebo v gelu. Vzniklé sraženiny lze hodnotit vizuálně či metodami, které měří změny intenzity světla v závislosti na stupni zákalu roztoku (nefelometricky nebo turbidimetricky).

Precipitační metody v gelu využívají tenkou gelovou vrstvu, která se vytvoří po nanesení rozpuštěného agarů nebo agarózy na nosič (obvykle podložní sklo, Petriho misku, skleněnou desku). Jejich principem je migrace antigenu, protilátky nebo obou (podle uspořádání reakce) v gelu prostou difuzí. Tím se zajišťuje ředění difundující složky a tvorba sraženiny v místě střetu antigenu s protilátkou (vznik komplexu antigen-protilátka).

Při jednoduché radiální difuzi (radiální imunodifuze) je v celé vrstvě gelu rovnoměrně rozptýlena (imobilizována) jedna složka reakce, většinou protilátka. Druhá složka (antigen) je aplikována (pipetována) do kruhové jamky vyřezané v gelu, odkud radiálně difunduje za vzniku komplexů s protilátkou v gelu a vzniklý precipitát se projeví jako bílý prstenec kolem jamky. Druhá mocnina průměru prstenice je přímo úměrná koncentraci antigenu (obr. 2). Tato metoda se používá např. k měření koncentrace proteinů v séru, ale v současnosti je nahrazována precipitací v roztoku měřenou nefelometricky nebo turbidimetricky.

Nefelometrie je kvantitativní metoda založená na měření intenzity rozptýleného světla při průchodu zákallem, zatímco turbidimetrie se zakládá na měření úbytku intenzity světla po jednosměrném průchodu zákallem. Nefelometrie je citlivější metoda, ale i dražší a vyžaduje speciální přístroj – nefelometr, zatímco při turbidimetrii lze použít běžný spektrofotometr. Precipitace v roztoku a stanovení množství komplexů nefelometricky nebo turbidimetricky patří k běžným laboratorním metodám analýzy řady látek včetně sérových proteinů akutní fáze systémové nákazy (např.

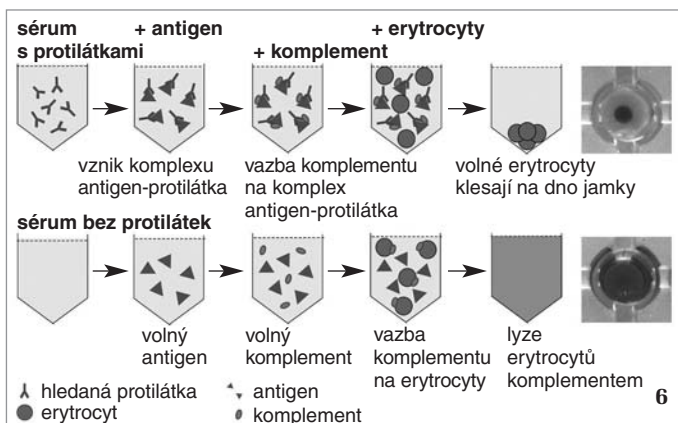
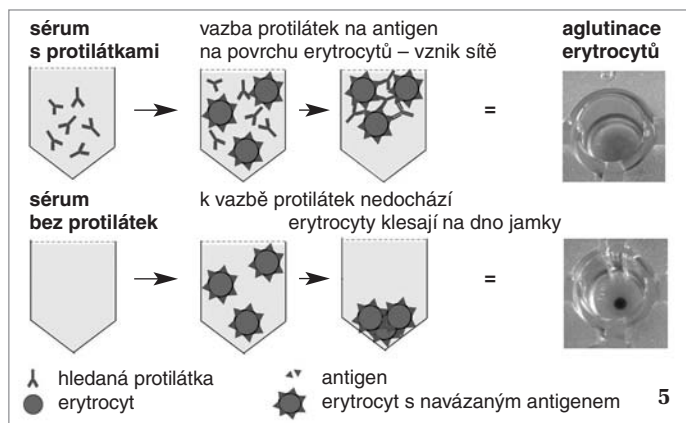


C-reaktivní protein), ale k průkazu specifických protilátek se nepoužívají.

Při dvojité difuzi (dvojitá radiální imunodifuze), kterou vyvinul v r. 1948 švédský bakteriolog a imunolog Örjan Ouchterlony, gel neobsahuje ani antigen, ani protilátku. Jak antigen, tak protilátka jsou aplikovány do vyřezaných jamek a postupují gelem proti sobě. Po střetu obou složek (po hodinách až dnech, což je hlavní nevýhoda) vzniká v gelu charakteristická precipitační linie (obr. 3). Její tvar (oblouček, jeho zakřivení) závisí na relativní molekulové hmotnosti antigenu a protilátky. V diagnostice infekčních nemocí se používá např. pro kvalitativní průkaz protilátek.

Agglutinační metody

Při přímé aglutinaci je antigen přirozenou povrchovou složkou buňky mikroorganismu. Princip spočívá ve shlukování celých buněk hledanou protilátkou, která se přímo váže na povrchové antigeny mikroorganismu. Vznikají tak komplexy antigen-protilátka, jejichž vzájemné provázání vede k viditelnému shlukování (aglutinaci) buněk mikroorganismu. Nejsou-li v séru protilátky proti příslušnému patogenu přítomny (a pacient tedy není tímto patogenem nakažen), žádné shluky se nevytvoří. Přímou aglutinaci lze provést na podložním skle nebo ve zkumavce smícháním vyšetřovaného séra se suspenzí usmrceného, zpravidla obarveného mikroorganismu, proti kterému se hledají protilátky v séru pacienta. Vzniklé shluky lze pozorovat pouhým okem. Tato metoda se používá především v bakteriologii. Příkladem je Widalova reakce, kterou vyvinul francouzský lékař a bakteriolog Georges Fernand Widal v r. 1896,



2 Průběh jednoduché radiální imunodifuze a odečet koncentrace neznámé protilátky (x, y) z grafu

3 Schematické znázornění děje, k němuž dochází při dvojitě radiální imunodifuzi. Blíže v textu

4 Příklad přímé aglutinace – CATT test (Card Agglutination Test for *Trypanosoma gambiense*) pro průkaz protilátek při spavé nemoci. Sada potřeb pro test (a) a výsledek testu (b) – vznik aglutinátů trypanozom v přítomnosti protilátek označují šipky.

5 Nepřímá hemaglutinace (IHA). Horní řada znázorňuje tvorbu sítě v přítomnosti protilátek, snímek vpravo ukazuje výsledek reakce viditelný okem. V dolní řadě průběh reakce bez přítomnosti protilátek a fotografie výsledné viditelné pelety červených krvinek

6 Schematické znázornění komplement fixační reakce (KFR), které objasňuje její průběh v přítomnosti (nahore) a v nepřítomnosti (dole) protilátky v séru pacienta. Snímek na konci každé řady demonstruje okem viditelný výsledek reakce.

na průkaz protilátek proti původci břišního tyfu *Salmonella typhi* a původci paratyfu *S. paratyphi*, nebo při tularémii (původce *Francisella tularensis*). Přímá aglutinace tvoří rovněž základ testu, který se od 80. let 20. stol. používá v parazitologii při podezření na západoafrickou spavou nemoc (Card Agglutination Test for *Trypanosoma gambiense* – CATT; obr. 4).

● Metody s nepřímou detekcí

Bohužel ve většině případů není antigen, proti kterému v těle infikovaného hostitele vznikají protilátky, přítomen na povrchu mikroorganismu (nebo nelze příslušný mikroorganismus z nějakého důvodu využít), a tak musíme přistoupit k metodám s nepřímou detekcí, které zahrnují nepřímou hemaglutinaci, vazbu komplementu, latex fixační test a aglutinační inhibiční test. Antigen je v rozpustné formě uměle navázán na povrch jiné buňky (obvykle červené krvinky) nebo latexové částice, případně se k průkazu vzniklého imunokomplexu využívá komplement (viz dále).

Nepřímá hemaglutinace (IHA – Indirect Hemagglutination Assay) je založena na vazbě protilátek přítomných v séru na antigeny původce, „uměle“ navázané na povrch červených krvinek. Jsou-li ve vyšetřovaném séru přítomny protilátky specifické pro dané antigeny, navážou se na antigeny na povrchu erytrocytů. Tím se vytvoří vzá-

jemně provázaná síť, která zachytí erythrocyty a zabráni jejich přirozenému klesání na dno jamky (zkumavky). Počet zachycených krvinek je přímo úměrný množství protilátek ve vyšetřovaném séru. Čím víc protilátek sérum pacienta obsahuje, tím je síť hustší a tím víc krvinek zachytí (tím méně jich klesne na dno). Nejsou-li v séru žádné protilátky, všechny krvinky gravitační silou klesnou na dno jamky, kde vytvoří dobře viditelnou peletu (tečku). IHA je semikvantitativní metoda. Postupným ředěním vyšetřovaného séra izotonickým pufrům (který brání poškození krvinek) lze zjistit tzv. titer protilátek, kterým se vyjadřuje množství protilátek v krvi pacienta. Reakce se provádí na mikrotitračních desičkách s jamkami typu „V“, kde je pokles krvinek snadno viditelný a hodnotitelný pouhým okem (obr. 5). IHA se hojně používá pro průkaz antimikrobiálních protilátek. Příkladem je v bakteriologii je průkaz protilátek proti *Burkholderia pseudomallei* při melioidóze (onemocnění vyvolané půdní saprofytickou bakterií, vyskytuje se v jihovýchodní Asii a severní Austrálii) nebo proti původci syfilis *Treponema pallidum* atd.

Vazba komplementu (KFR – komplement fixační reakce) využívá skutečnosti, že komplement, který je součástí našeho imunitního systému a zjednodušeně řečeno způsobí po své aktivaci „provrtání“ buněk patogenu, se přirozeně váže na jakékoli komplexy antigenů s protilátkou (klasická dráha aktivace komplementu). Tvorba komplexu testovaného antigenu s hledanou protilátkou se prokazuje nepřímo prostřednictvím indikátorového komplexu tvořeného ovčímí erythrocyty s navázanou králičí protilátkou proti ovčímí krvinekám. KFR probíhá ve dvou krocích. Nejprve se smísí antigen s vyšetřovaným sérem pacienta, které je však tepelně inaktivováno (vystaveno teplotě 56 °C po dobu 30 minut), aby se tak inaktivoval lidský komplement (jenž by mohl nevhodně interagovat), a místo něj se přidá komplement morčete. Je-li ve vyšetřovaném séru přítomna hledaná protilátka, vytvoří s antigenem komplex, na který se následně naváže přítomný komplement. Ve druhém kroku se do reakce přidá indikátorový komplex. Pokud se v první fázi veškerý přidaný komplement naváže na komplex antigenu s hledanou protilátkou (jinými slovy, jsou-li ve vyšetřovaném séru hledané protilátky přítomny), krvinky, které tvoří indikátorový systém, zůstanou neporušené a sedají na dno jamky. Nejsou-li však ve vyšetřovaném séru hle-

dané protilátky, komplement zůstává volný a po přidání indikátoru se na něj naváže, způsobí hemolýzu červených krvinek a neumožní jejich sedimentaci na dno jamky (obr. 6). Ředěním vyšetřovaného séra lze opět stanovit titer (množství) protilátek v séru pacienta. KFR se v praxi používá jako kvalitativní metoda průkazu protilátek proti virům (např. virus Epstein-Barrové, cytomegalovirus), bakteriím (*Campylobacter jejuni* aj.), v diagnostice toxoplazmózy (původce *Toxoplasma gondii*).

Latex fixační test (latex aglutinační test) je nepřímá aglutinační metoda založená na vazbě rozpustného antigenu na povrch latexových částic a na jejich shlukování protilátkou a je tedy do značné míry podobná s IHA. V praxi se používá např. jako rychlý test pro průkaz protilátek proti streptolyzinu O při nákaze streptokoky.

Aglutinační inhibiční test představuje velmi citlivou metodu, která umožňuje průkaz i velice malých množství antigenů. V jejím případě nehledáme v krvi pacienta specifické protilátky, ale v odebraném materiálu naopak pátráme po přítomnosti příslušného antigenu. Princip spočívá v kompetitivní inhibici aglutinace hledaným antigenem. Tímto testem se např. stanovuje lidský choriový gonadotropin (hCG) k průkazu těhotenství. V současnosti jsou aglutinační metody často nahrazovány metodou ELISA.

● Metody s detekcí značenými protilátkami

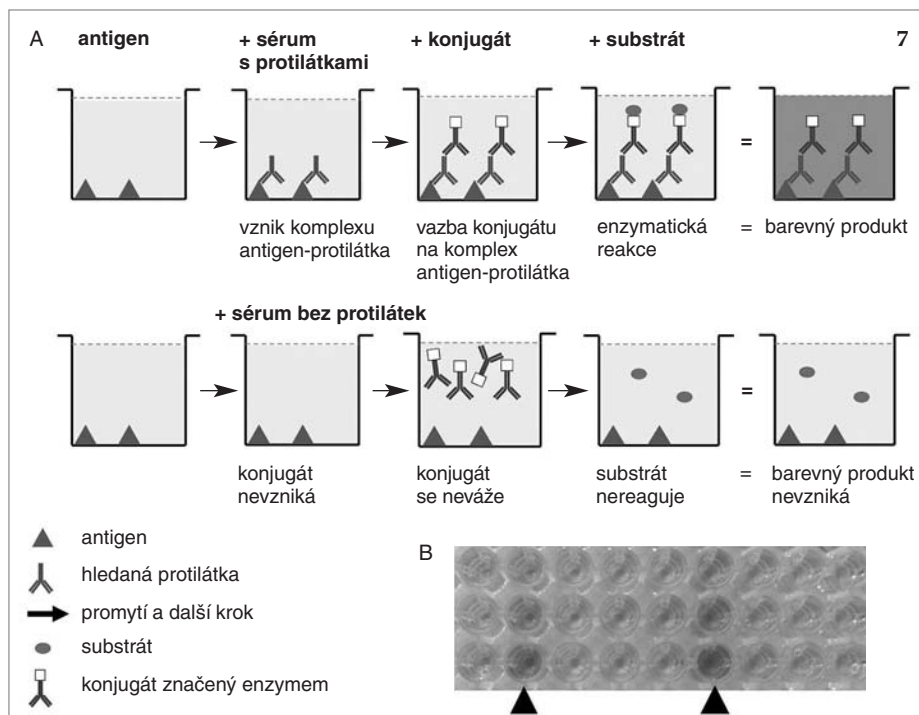
Základním problémem při detekci vzniklého komplexu antigen-protilátka je nedostatečná citlivost, a proto byly vyvinuty metody, které pomocí různého značení použitých protilátek/antigenů výrazně zvyšují citlivost imunanalytických přístupů. RIA (z anglického radioimmunoassay) využívá k detekci imunokomplexu komponenty značené radioizotopy, FIA (fluoroimmunoassay) barevné fluorochromy a EIA (enzyme immunoassay) enzymy. Tyto sekundární značené komponenty se také označují jako konjugáty, protože značka (radioizotop, fluorochrom nebo enzym) je s antigenem nebo protilátkou sloučena chemicky tak, aby nedošlo ke ztrátě příslušných vlastností (např. v případě enzymu k potlačení jeho aktivity).

Principem metody RIA, zavedené do praxe v r. 1959, je kompetice mezi stanovovaným antigenem (jehož přítomnost ve vzorku zjišťujeme) a známým množstvím téhož antigenu značeného radionuklidem o omezený počet vazebných míst specifické

protilátky při tvorbě imunokomplexu. Pro svou vysokou citlivost a přesnost se RIA využívá pro průkaz velice malých množství nízk- i vysokomolekulárních látek, např. cytostatik, hormonů nebo vitamínů, v soudním lékařství ke stanovení toxických látek, dále protilátek proti alergenům apod. Hlavní nevýhodou je však práce s radioaktivním materiálem, a to včetně jeho likvidace. Při detekci protilátek proti mikrobiálním patogenům je význam RIA značně omezený.

FIA používaná od 50. let 20. stol. je založena na detekci imunokomplexu pomocí antigenu či protilátky značené fluorescenčním barvivem (fluorochromem), jež po excitaci světlem určité vlnové délky vyzáří viditelné světlo, které prokazujeme. energii pro excitaci dodává lampa přístroje (fluorescenčního mikroskopu, spektrofluorometru nebo průtokového cytometru). K tradičně používaným fluorochromům patří fluorescein izothiokyanát (FITC) a tetrametylodamin izothiokyanát (TRITC), v současnosti je však škála využitelných fluorochromů výrazně širší. Metody FIA lze použít jak pro průkaz specifických protilátek (mikroskopicky vůči antigenům prokazovaným na celých buňkách nebo na tkáňových řezech fixovaných na mikroskopických sklech), tak antigenů (pomocí vazby fluorescenčně značené protilátky).

K průkazu specifických protilátek se nejčastěji používá EIA, a to metoda enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Stanovení pomocí metody ELISA představuje heterogenní nekompetitivní enzymovou imunoanalýzu – dvoustupňovou techniku, při níž je jedna složka reakce (antigen nebo protilátka) navázána na pevný nosič. V případě průkazu specifických protilátek ve vyšetřovaném materiálu (např. v krevním séru) je touto složkou příslušný antigen většinou navázaný na povrch jamky polystyrenové mikrotitrační destičky (obr. 7). Po přidání vyšetřovaného séra se případně specifické protilátky navážou na antigen (uchycený na povrchu jamky) za vzniku imunokomplexu. Nenavázané (nespecifické) protilátky se odstraní promytím. Vzniklé imunokomplexy (vázané na povrch jamky) se prokazují v dalším kroku pomocí sekundární protilátky, která je zaměřena obecně proti lidskému imunoglobulinu a je současně značená enzymem (obvykle křenovou peroxidázou nebo alkalickou fosfatázou). Po odstranění nenavázaných sekundárních značených protilátek (tzv. volného konjugátu) promytím se jako poslední krok přidá substrát, s nímž enzym reaguje za vzniku barevného produktu. Pro nejčastěji používanou křenovou peroxidázu se jako substrát používá peroxid vodíku a ortofenyldiamin (OPD) jako chromogen. Výsledná barevná reakce se odečítá buď vizuálně, nebo častěji fotometricky měřením absorbance, která je přímo úměrná množství hledané specifické protilátky. Značená protilátka (konjugát) dokáže rozeznat nejen obecně lidský imunoglobulin, ale dokonce i příslušnou třídu imunoglobulinů (IgG, IgA, IgM nebo IgE), na niž se v imunokomplexu váže. Právě tímto krokem, volbou značené protilátky proti konkrétní třídě lidského imunoglobulinu, lze metodou ELISA stanovit jednotlivé třídy imunoglobulinů ve vyšetřo-



vaném séru, což je velmi důležité pro sledování vývoje příslušného onemocnění, rozlišení chronické a akutní fáze infekce atd. (IgM je imunoglobulin rané fáze, IgG naopak chronické fáze infekce.)

Za variantu EIA lze rovněž považovat Western blotting (WB), jehož základem je elektroforetická separace proteinů (patogenu) v gelu a jejich následné přenesení na pevný nosič (obvykle nitrocelulósovou, nylonovou nebo PVDF – polyvinylidenfluoridovou membránu). K rozdělení proteinů se nejčastěji používá polyakrylamidový gel (PAGE) v kombinaci s detergentem, dodecylsíránem sodným (SDS), který se váže na jakoukoli bílkovinu a udílí jí negativní náboj. Linearizované molekuly proteinů putují v elektrickém poli a rozdělí se v gelu podle své molekulové velikosti. Po přenesení (blotting) proteinů na membránu se provádí enzymová imunoanalýza. V případě průkazu specifických protilátek se v gelu oddělují jednotlivé složky komplexního antigenu (lyzátu celých buněk patogenu), a jsou-li ve vyšetřovaném materiálu protilátky specifické pro dané antigeny, vázou se na ně. Vzniklé imunokomplexy

7 Schematické znázornění průběhu reakce ELISA (A). Výsledek reakce (B): šipky označují jamky, ve kterých došlo k barevné reakci prokazující přítomnost hledané protilátky v séru pacienta.

8 Cysty prvoků rodu *Acanthamoeba* na histologickém řezu kůží při nákaze pacienta s AIDS. Cysty (C) v podobě nápadných nepravidelných útvarů jsou zde zachyceny v hojném počtu. Řez je obarven metodou hematoxylin a eozin. Snímky a orig. E. Nohýnková

se zjišťují pomocí konjugátu značeného enzymem a následné substrátové reakce stejně jako v ELISA. WB umožňuje stanovit profil specifických protilátek (jednotlivých tříd) u daného jedince. Např. srovnáním profilu protilátek matky a novorozence při podezření na kongenitální toxoplazmózu lze určit, zda byl plod nakažen.

Závěrem

Ačkoliv výše uvedené metody jsou velmi sofistikované a používají se již desítky let, přesto nesou jistá omezení a ne vždy poskytují jednoznačné a dostatečně spolehlivé výsledky. Ideální možností je proto metody detekce patogenů vzájemně kombinovat a zvýšit tak spolehlivost diagnostiky. U kombinovaných metod přímého a nepřímého průkazu se tedy snažíme současně prokázat jak antigen původce v séru pacienta, tak i specifické protilátky proti němu. Bohužel zatím je tato metoda komerčně dostupná pouze pro průkaz nemoci HIV.

Je tedy zřejmé, že metody laboratorní diagnostiky bude třeba i v budoucnu stále vylepšovat a zpřesňovat. K tomu zajisté přispějí nové vědní poznatky, ale zejména nastupující generace biologů, kterou podobná témata zaujmou. Tím, že zařadíme do hodin biologie, ale i chemie, etické výchovy nebo zdravotní pedagogiky a účelu laboratorní diagnostiky a principů současných metod, máme šanci, že se mezi studenty zájemci najdou.

