

Diagnostika infekčných chorôb: detekcia patogénu alebo protilátok?



Zdroj obrázka: Shutterstock

Veterinári majú prístup k širokému spektru laboratórnych testov na dôkaz infekčných chorôb. Dôležitý je výber vyšetrovacej metódy. Je zmyslupnnejšia detekcia protilátok alebo priama detekcia patogénu? Ako sa tieto testy líšia a kedy je ktorá metóda detekcie vhodnejšia? Cieľom tohto článku je poskytnúť čitateľovi základný prehľad a umožniť tak lepšie rozhodovanie pri jednotlivých prípadoch.

Laboratórne testy na diagnostiku infekčných patogénov sa v každodennej veterinárnej praxi vykonávajú predovšetkým z troch dôvodov:

- Dôkaz infekčnej etiológie pri akútnom alebo chronickom klinickom ochorení
- Dôkaz o vylučovaní patogénu pri subklinickej infekcii (potenciálna infekčnosť?)
- Dôkaz o neprítomnosti infekcie (napr. pred chovom alebo na dovoz/vývoz)

Zatiaľ čo **priamy dôkaz pôvodcu** deteguje samotný patogén alebo napr. časti genómu alebo antigény, stanovenie protilátok dokazuje

predchádzajúci kontakt a s ním spojenú imunitnú reakciu tela na patogén (**nepriamy dôkaz** infekcie). K dispozícii je široká škála laboratórnych postupov, ktoré sa v závislosti od princípu testu a dizajnu testu používajú na detekciu protilátok a/alebo patogénov (tabuľka 1).

Metóda	Dôkaz pôvodcu	Dôkaz protilátok
Mikroskopia/ elektrónová mikroskopia	x	
Kultivácia	x	
Polymerázová reťazová reakcia (PCR)	x	
Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	x	x
Imunofluorescenčný test (IFT)	x	x
Vírus neutralizačný test		x
Western Blot (WB)		x
Lateral Flow Test	x	x
a ďalšie		

Tab 1: Testovacie metódy na diagnostiku infekčných pôvodcov a ich využitie

Zdroj: Laboklin

Rôzne testovacie metódy môžu priniesť rôzne výsledky. Niekedy sa veľmi líšia v senzitivite a špecifite. Žiadny testovací postup nemá 100 % senzitivitu a špecifitu. Kombinácia niekoľkých testov môže byť v mnohých prípadoch užitočná.

Dokaz pôvodcov

Spektrum metód **priamej detekcie patogénu** je široké: počnúc mikroskopiou cez rýchle testy, imunofluorescenčné a enzýmové imunotesty, ktoré detegujú antigény patogénu, až po polymerázovú reťazovú reakciu (detekcia sekvencií genómu) a kultiváciu. Rozlišujeme cieleňé a necieleňé metódy detekcie.

Výber materiálu vzorky má zásadný význam pre detekciu patogénu a závisí od toho, kde sa v čase odberu vzorky očakáva hľadaný patogén. V závislosti od infekčného ochorenia a testovacej metódy prichádzajú do úvahy rôzne materiály: krv, výtery, trus, moč, punkčáty, tkanivá, kožné zoškraby, chlpy atď. Ktorý materiál vzorky je v konkrétnom prípade vhodný, závisí od rôznych faktorov. Nevyhnutné sú poznatky o patogenéze ochorenia, predovšetkým cieľové orgány a vylučovanie pôvodcu. Ale úlohu môže zohrávať aj fáza infekcie, v ktorej sa pacient nachádza v čase odberu vzorky, ako aj vek pacienta, stav imunity a vakcinačný status.

Predanalytika

Pre predanalytiku je dôležitá otázka, či musia byť patogény schopné reprodukovať sa pre zvolenú metódu detekcie alebo nie. Od toho závisí napríklad, či je vykonanie testu časovo kritické, t. j. musí sa vykonať rýchlo, alebo či sú potrebné špeciálne transportné médiá. Toto je prípad napr. kultivačných metód. Pre získanie výsledkov s dobrou výpovednou hodnotou je potrebné dodržiavať odporúčania laboratória ohľadom predanalytiky. Na PCR vyšetrenia sú vhodné tampóny bez transportného média, EDTA krv, tekutiny v sterilných skúmavkách bez aditív a nefixované tkanivo.

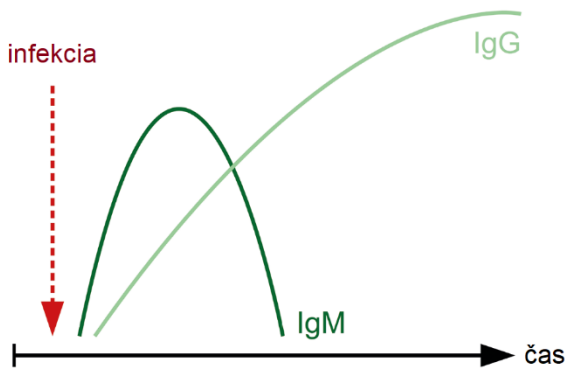
Vo väčšine prípadov by sa vzorky mali odobrať včas a vždy, keď je to možné, pred začatím liečby.

Zatiaľ čo negatívny výsledok testu nemôže nikdy s úplnou istotou vylúčiť infekciu, pozitívny výsledok potvrdzuje prítomnosť patogénu v materiáli vzorky, ale nemusí nevyhnutne potvrdiť etiologickú súvislosť s klinickým ochorením. Nález je potrebné interpretovať opatrne, najmä pri veľmi citlivých metódach testovania. Schopnosť rozmnožovania a v konečnom dôsledku aj infekčnosť patogénu sa dá dokázať len pomocou kultivačných metód.

Dôkaz protilátok

- Protilátky v sére môžu byť rôzneho pôvodu:
- Materské protilátky: Môžu byť prítomné u žriebäť do veku okolo 6 – 8 týždňov (zriedkavo až do 6 mesiacov). Je potrebné to vziať do úvahy pri interpretácii pozitívnych výsledkov protilátok v tejto vekovej skupine.
- Očkovanie: Spravidla nie je možné priamo odlíšiť vakcinačné a infekčné protilátky (výnimka: tzv. markerové vakcíny).
- Infekcia: Hladiny protilátok zvyčajne pretrvávajú dlhú dobu po infekcii.

Imunitnému systému po kontakte s patogénom (očkovanie alebo infekcia) trvá určitý čas, kým si vytvorí špecifické protilátky. **Protilátky IgM** sa objavujú ako prvá podskupina imunoglobulínov v krvi a v závislosti od patogénu a imunitného stavu pacienta môžu byť detegované približne 1 - 2 týždne po infekcii. **Protilátky IgG** možno u koní nájsť približne po 3 týždňoch a zvyčajne pretrvávajú dlhší čas (obrázok 1). Pre určité patogény sa tieto časy môžu líšiť, niektoré patogény indukujú tvorbu protilátok len vo veľmi malej miere (napr. mykoplazmy). Pozitívny test na protilátky možno teda očakávať až po určitom čase. Pri akútnom alebo perakútnom priebehu ochorenia protilátky často ešte nie sú merateľné. Najmä v prípade vírusových infekcií je zvyčajne možný iba retrospektívny dôkaz.

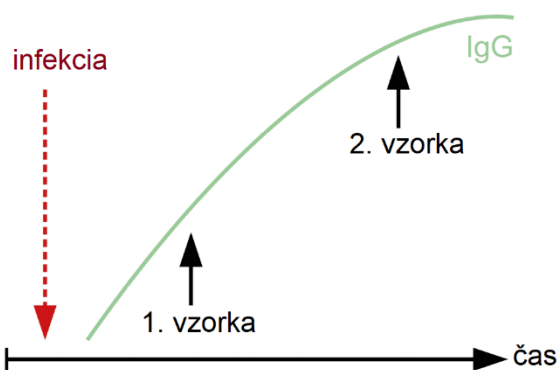


Obr. 1: Koncentrácie protilátok IgM a IgG v sére po infekcii
Zdroj obrázka: Laboklin

Pre niektoré patogény (napr. West Nile Virus, vírus kliešťovej encefalítidy (FSME) a borélie) je možné merať protilátky IgM aj IgG. Keďže sú prítomné v rôznych časoch priebehu infekcie, ich súčasné stanovenie umožňuje odhadnúť, či ide o čerstvú infekciu (IgM protilátky ↑) alebo či infekcia existuje už dlhší čas (IgG protilátky ↑).

Pre väčšinu patogénov sú však dostupné len testy, ktoré zisťujú IgG protilátky. Vyšetrenie jednej vzorky vedie v niektorých prípadoch k výsledku s malou výpovednou hodnotou. Pozitívny výsledok možno pripísať napr. infekcii v minulosti alebo očkovaniu. Falošne negatívny výsledok je možný, ak sa vzorka odoberie príliš skoro.

Na druhej strane, vyšetrenie dvojice vzoriek séra odoberatých s odstupom približne 2 - 4 týždňov môže pomôcť pri stanovení diagnózy a uľahčiť interpretáciu výsledkov testov – aj keď v niektorých prípadoch len spätne. 4-násobné zvýšenie titra alebo významné zvýšenie nameranej hodnoty indikuje nedávnu expozíciu (očkovanie alebo akútna infekcia) (obrázok 2).



Obr. 2: Vzostup titra v sérovom páre pri čerstvej infekcii
Zdroj obrázka: Laboklin

V nejasných prípadoch alebo ak sa má na začiatku vykonať iba priamy dôkaz patogénu, môže byť užitočné odobrať krv na začiatku ochorenia a skladovať sérum pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Táto „akútna vzorka“ sa potom môže neskôr vyšetriť spolu s „rekonvalescentnou vzorkou“ ako takzvaný sérový pár.

Pretože hodnoty rôznych laboratórií spravidla nie sú v dôsledku rôznych testovacích postupov porovnateľné, párové vzorky by sa mali vždy vyšetřovať rovnakou metódou a v rovnakom laboratóriu.

Na dôkaz protilátok v sére sa používajú predovšetkým Enzyme Linked Immunosorbent Assays alebo imunofluorescenčné testy. Vo veterinárnej praxi sa používajú aj rýchlotesty, väčšinou vo forme Lateral Flow testov. Pre konkrétne klinické otázky je pre niekoľko patogénov k dispozícii Western Blot. V niektorých prípadoch slúži ako potvrdzujúci test. Vírus neutralizačný test (VNT) je najšpecifickejším sérologickým testom, možno ho však použiť len pre vírusy s cytopatickým účinkom. Zisťujú sa protilátky, ktoré skutočne neutralizujú vírus, t. j. eliminujú infekčnosť vírusu. Pomocou tohto testu je možné urobiť zhodnotenie protektivity. Na druhej strane detekcia protilátok napr. pomocou ELISA neznamená automaticky imunitnú ochranu. V závislosti od patogénu zohráva dôležitú úlohu nielen humorálna imunitná odpoveď, ale aj bunková imunitná odpoveď.

Ako materiál vzorky sa bežne používa sérum alebo plazma. V ideálnom prípade by sa malo/mala včas odpipetovať, aby sa predišlo rušivému faktoru hemolýzy. Pri špeciálnych klinických problémoch je možná detekcia protilátok aj napr. v mozgovomiechovom moku alebo komorovej vode. Protilátky sú relatívne stabilné, takže ich dôkaz zvyčajne nie je časovo kritický. Vzorky možno uchovávať v chladničke alebo zmrazené dlhší čas.

Prítomnosť hladiny protilátok proti špecifickému patogénu nie je dôkazom jeho etiologickej úlohy v chorobnom procese. K tomu je potrebné dať pozitívny nález do súvislosti s existujúcimi klinickými príznakmi a v prípade potreby aj epidemiologickými údajmi.

Najmä pri patogénoch, ktoré sú napr. v periférnej krvi prítomné len sezónne alebo cyklicky alebo sa ťažko zisťujú vzhľadom na ich tkanivovú distribúciu, sérológia môže byť lepšia ako priama detekcia.

Zhrnutie

Všeobecné odporúčanie týkajúce sa výberu diagnostického testu nemožno urobiť z dôvodu rôznorodosti infekčných ochorení. Dôkazy patogénu aj protilátok majú svoj význam. V závislosti od klinického problému môže byť jeden z nich zmyslupnnejší alebo sa môžu navzájom dopĺňať (tabuľka 2). Často je užitočné alebo potrebné vykonať niekoľko testov.

Suspektnú diagnózu je potrebné formulovať vopred pomocou vyhodnotenia anamnézy a vykonaním klinického vyšetrenia a odhadnutia štádia infekcie. Patogenéza ochorenia a dostupnosť vhodných testov potom určujú aj postup, ktorý je potrebné zvoliť.

Pre dosiahnutie výsledku s dobrou výpovednou hodnotou by sa mala osobitná pozornosť venovať týmto kritickým bodom:

- čas odberu vzorky
- typ, kvalita a kvantita vzorky
- prípadne potrebné stabilizátory alebo transportné médiá
- podmienky a trvanie prepravy

Infekčný pôvodca	Dôkaz pôvodcu	Dôkaz protilátok
Herpesvirus 1 (EHV-1)	PCR z EDTA krvi (len vo fáze horúčky!), hlboký výter z nosa, materiál abortu (hlavne placenta) alebo liquor cerebrospinalis, podľa klinických symptómov.	Ochorenie väčšinou perakútne až akútne, okrem toho vysoká séroprevencia v populácii koní kvôli veľkému rozšíreniu vírusu a očkovaniu, možný spätný dôkaz pomocou sérového páru.
<i>Borrelia burgdorferi</i>	Priamy dôkaz je ťažký, príp. je možné skúsiť PCR zo synovie, biopsií kože alebo kĺbov.	IgM a IgG protilátky ako skriningový test, Western Blot ako test na potvrdenie a na diferenciáciu infekčných a vakcinačných protilátok
West Nile Virus	PCR z EDTA-krvi spravidla nevedie k cieľu, pretože virémia už v čase nástupu klin. príznakov nie je prítomná. Je možné skúsiť PCR z liquoru alebo tkanív (post mortem).	Súčasný dôkaz IgM a IgG protilátok pomocou ELISA. Krížové reakcie s ostatnými flavivírusmi (napr. FSME, Usutu) sú možné! V pozitívnom prípade sa preto robí diferenciácia pomocou VNT.
<i>Dermatophilus congolensis</i>	Dôkaz v šupinách a chrastách pomocou cytológie (obmedzená senzitivita) alebo PCR	Nie je dostupný žiadny test
Vírus infekčnej anémie koní (EIA)	Vysoká genetická variabilita vírusu, dôkaz vírusu je ťažký	Infikované zvieratá ostávajú celoživotní nosiči (perzistentná infekcia) a sú séropozitívne. Diagnóza pomocou Coggings alebo c-ELISA testu. Ale: inkubačná doba do 3 mesiacov, príp. pretestovať! CAVE: žriebäť infikovaných matiek môžu byť kvôli materským protilátkam pozitívne až do veku 6 mesiacov.

Tab. 2: V skratke – niektoré príklady infekčných agensov a možné metódy detekcie (tučným písmom = metóda voľby)

Dr. Michaela Gentil

Blutarmut der Einhufer –der Status quo. Deutsches Tierarzteblatt. 2010. 10:1598-1605.

Ďalšia literatúra

Lunn DP, Davis-Poynter N, Flaminio MJ, Horohov DW, Osterrieder K, Pusterla N, Townsend HG. Equine herpesvirus-1 consensus statement. J Vet Intern Med. 2009 May-Jun;23(3):450-61. doi: 10.1111/j.1939-1676.2009.0304.x.

Quinn PJ, Markey BK, Leonard FC, Hartigan P, Fanning S, Fitzpatrick ES. Veterinary Microbiology and Microbial Disease. 2nd Edition: Wiley-Blackwell; 2011.

Probst C, König P, Gethmann J, Horeth-Bontgen D, Staubach C, Conraths FJ, Kramer M. Ansteckende