

INTERPRETACE SÉROLOGICKÝCH VYŠETŘENÍ U GRAVIDNÍCH ŽEN A NOVOROZENCŮ

MUDr. Pavel Žampach

Imunologické oddělení, Nemocnice České Budějovice

V článku jsou shrnuty zkušenosti a pravidla pro interpretaci výsledků sérologických vyšetření. Stručně jsou uvedeny laboratorní metodiky a rozebrány nejčastější příčiny falešně pozitivních a falešně negativních výsledků. Zvláštní pozornost je věnována skupině novorozenců a gravidních žen včetně zvláštností interpretace výsledků vyšetření. Na závěr jsou uvedeny typické situace použití sérologické metody diagnostiky infekčních chorob.

Klíčová slova: diagnostika infekčních chorob, sérologie, interpretace, gravidní ženy, novorozenci.

INTERPRETATION OF SEROLOGICAL INVESTIGATIONS IN PREGNANT WOMEN AND NEWBORNS

Article summarises experiences and rules for an interpretation of serological investigations. Laboratory methods are briefly mentioned and the most common reason for false positive and false negative results are analysed. Special attention is paid to groups of newborns and pregnant women including interpretations pitfalls of these investigation's results. Typical situations in use of serologic diagnosis of infection diseases are brought out at the end.

Key words: diagnosis of infection disease, interpretation, pregnant women, newborns.

V etiologické diagnostice infekčních chorob (tj. pátrání po původci onemocnění) existují dva základní, naprosto odlišné přístupy:

1. Průkaz původce choroby

Snažíme se ve vzorku materiálu odebraného od pacienta prokázat mikroba, který by mohl chorobu způsobit. Prokázat přítomnost původce můžeme různými metodami:

- kultivační průkaz mikroba s následnou identifikací
- imunochemický průkaz antigenů mikroorganismu
- průkaz genetického materiálu mikroorganismu.

Všechny tyto metody mají pro ošetřujícího lékaře řadu společných aspektů:

- prokážeme pouze přítomnost mikroba, vyšetření nic neříká o roli mikroba v etiopatogenetickém procesu
- imunochemické a genetické metody mohou dávat pozitivní výsledek i v případě mrtvých mikroorganismů. Zbytky mikrobu mohou být ve fagocytech prokázány i po měsících.
- je důležitá kvalita odběru. Proto při negativním výsledku má smysl odběr a vyšetření opakovat. Materiál mohl být snadno odebrán špatně nebo se mikroby mohou objevovat intermitentně (hemokultury).
- výsledek kultivačního vyšetření může být falešně negativní po předchozím podání antibiotika.

2. Nepřímý průkaz původce choroby

Ve vzorku krve odebraného pacientovi prokazujeme přítomnost specifických protilátek proti danému mikrobu. Z přítomnosti těchto protilátek, jejich množství a třídy protilátek usuzujeme na infekci organismu příslušným mikroben a někdy je možné odhadnout i stádium infekce.

Sérologická diagnostika infekčních chorob tvoří meritum tohoto článku a dále se budeme věnovat pouze jí.

Tvorba protilátek v organismu

Většina mikroorganismů je po vniknutí do hostitele identifikována imunitním systémem. Tzv. antigen prezentující buňky (APC) mikroba fagocytují a jeho antigeny nabídnou dalším buňkám imunitního systému. Pro proces tvorby protilátek jsou důležité T pomocné lymfocyty (T-helpery), které (zjednodušeně řečeno) stimulují B-lymfocyty. Část B-lymfocytů se transformuje v plazmatické buňky, které jsou vlastními producenty protilátek. Druhá část B-lymfocytů přetrvává ve formě tzv. paměťových lymfocytů.

Protilátky se dělí do pěti tříd, z nichž pro sérologickou diagnostiku mají význam třídy IgA, IgG a IgM. Kromě rozdílů v jejich chemické struktuře je pro diagnostiku podstatný rozdíl v síle jejich vazby na antigen, tj. v jejich afinitě k antigenu. Protilátky třídy IgM (fylogeneticky nejstarší) mají afinitu k antigenu nejnižší, afinita protilátek tříd IgA a IgG je několikanásobně vyšší.

Z výše uvedeného plyne několik praktických závěrů:

- při prvním setkání organismu s mikroben se protilátky tvoří po určité době latence.

Z podrobnějšího rozboru procesu tvorby protilátek vyplývá, že zpočátku se budou tvořit protilátky s nižší afinitou k antigenu, tj. protilátky třídy IgM, později protilátky s vyšší afinitou (tříd IgG a IgA). Toto pravidlo (často považované za dogma) však neplatí absolutně. V některých případech nastává tvorba protilátek IgG a IgA hned zpočátku protilátkové odpovědi.

- při dalším setkání organismu s mikroben je nástup tvorby protilátek podstatně rychlejší (přítomnost paměťových B-lymfocytů) a tvoří se převážně vysoce afinní protilátky tříd IgG a IgA. Opět je však možné, že za určitých podmínek (velké množství mikrobu aj.) se mohou tvořit protilátky třídy IgM.
- protilátková odpověď u mikrobu, které samy napadají buňky imunitního systému (cytomegalovirus, EB virus, virus hepatitidy C), vybočuje z uvedeného schématu a je značně variabilní.
- pro diagnostiku vrozených infekcí je podstatné, že protilátky třídy IgG mohou procházet placentou a v oběhu novorozence lze prokázat i mateřské protilátky. Protilátky třídy IgM placentou procházet nemohou, pokud je u novorozence prokážeme, jedná se vždy o jeho vlastní protilátky.

Metody sérologické diagnostiky

Metod sérologické diagnostiky je celá řada, jejich podrobná znalost však nemá pro běžného klinického pracovníka zásadní důležitost. Přesto si zde uvedeme stručný přehled nejdůležitějších metod.

a) aglutinační reakce

Princípem je aglutinace těl bakterií či antigenu navázaného na erytrocyty (hemaglutinace) nebo latexové částice (latexaglutinace). Metoda je jednoduchá a levná, není příliš citlivá a nelze rozlišit jednotlivé třídy protilátek. Aglutinaci způsobují protilátky tříd IgG a IgM.

b) komplement-fixační reakce (reakce konsumpcí komplementu)

Princípem je vazba komplementu na komplexy antigen-protilátka. Metoda je náročná na přesnost provedení. Je středně citlivá a nelze rozlišit jednotlivé třídy protilátek. Reakci způsobují protilátky tříd IgM a některé podtřídy IgG (IgG1 a IgG3).

c) reakce se značenou protilátkou

Do této skupiny patří reakce typu ELISA (různé modifikace) a tzv. nepřímá imunofluorescence. Princípem je vazba značené protilátky na protilátku ze séra pacienta již dříve navázanou na antigen. Metoda je v principu jednoduchá, je však dražší a vyžaduje odpovídající vybavení laboratoře včetně techniky pro vyhodnocování. Je vysoce citlivá a specifická, lze rozlišit jednotlivé třídy protilátek.

d) reakce inhibiční

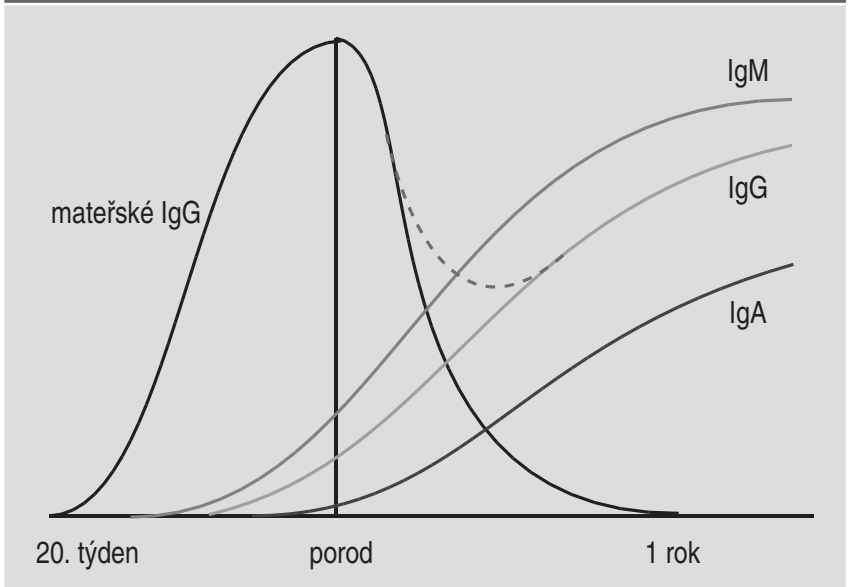
Princípem je blokování některých vlastností antigenu (hemolýza, hemaglutinace, cytopatický efekt) protilátkami ze séra pacienta. Tato skupina je nesourodá a nelze ji proto jednoduše zhodnotit.

Pro stanovení správné taktiky sérologického vyšetřování a pro interpretaci výsledků vyšetření je nutné si uvědomit základní skutečnost: **neprokazujeme přítomnost původce choroby, ale pouze reakci částí (!) imunitního systému.** Vztah mezi infekcí a tvorbou příslušných protilátek není úplně jednoznačný a základní pravidlo interpretace výsledků sérologických vyšetření zní: **protilátky nejsou nemoc, výsledek je nutné hodnotit v kontextu klinického stavu pacienta a ostatních laboratorních vyšetření!**

Jako každé jiné vyšetření, může i stanovení specifických protilátek poskytovat falešné výsledky. Pokud vyloučíme laboratorní chybu, hrubé závady během transportu vzorku do laboratoře apod. jsou nejčastější příčiny selhání následujících:

Falešně negativní výsledky

- vyšetření je provedeno v začátcích rozvoje choroby, kdy ještě nedošlo k tvorbě protilátek
- pro imunitu k danému mikrobu nejsou protilátky podstatné. Protilátky se tvoří jako "vedlejší produkt" a jejich tvorba není konstantní (např. vyšetření protilátek proti *M. tuberculosis*).

Obrázek 1. Vývoj produkce imunoglobulinů

- mikrob napadá buňky imunitního systému zodpovědné za tvorbu protilátek. Tvorba protilátek může být utlumena, případně oddálena (EB virus, CMV, virus hepatitidy C).
- pacient trpí poruchou tvorby protilátek. Toto je důležité hlavně při vyšetřování jednotlivých tříd protilátek; imunodeficience je nejčastější u protilátek třídy IgA.
- při masivním vyplavení mikrobů do krevního oběhu (hlavně u virů) se mohou protilátky vázat na mikroby. Vzniklé imunokomplexy jsou pak vychytávány fagocytujícími buňkami. Tak může při akutní exacerbaci choroby dojít k paradoxnímu snížení hladiny protilátek.
- některé laboratorní metody nejsou schopné prokázat specifické protilátky třídy IgM při vyšších hladinách protilátek třídy IgG (proti témuž mikrobu). Je to způsobeno nižší afinitou protilátek třídy IgM, které jsou protilátkami třídy IgG vytěšňovány z vazby na antigen. Tento jev nastává u metod typu ELISA (nejsou-li speciálně upraveny pro selektivní průkaz protilátek třídy IgM – tzv. „capture IgM“) a u nepřímé imunofluorescence a může vést ke špatnému odhadu stádia choroby.

Falešně pozitivní výsledky

- tvorba protilátek proti některým mikrobům přetrvává roky či až celoživotně.
- protilátky proti mikrobům, které perzistují v organizmu (typicky např. proti herpetickým virům, CMV, EB-viru, *Toxoplasma gondii*), se mohou začít tvořit i při reakci imunitního systému na jinou infekci (tzv. nepřímá neboli „bystander“ aktivace B-lymfocytů)
- vzácně se mohou objevit falešně pozitivní sérologické výsledky u gravidních žen (viz dále) a z dosud neznámých důvodů u pa-

cientů s postižením jater či s celkovým metabolickým rozvratem

- někdy se v literatuře diskutuje problematika tzv. revmatoidního faktoru (to jsou autoprotilátky namířené proti vlastním imunoglobulinům), který může za určitých okolností způsobit falešnou pozitivitu sérologického vyšetření. Pravděpodobnost tohoto jevu je však dosti nízká (pod 1%) a objevuje se zejména u pacientů s nějakou autoimunní chorobou. V praxi stačí u neočekávaného pozitivního sérologického průkazu IgM protilátek provést vyhledávací vyšetření na přítomnost revmatoidního faktoru.

Zvláštnosti u gravidních žen

Během těhotenství je reaktivita imunitního systému poměrně výrazně změněna, protože úzký kontakt matčina imunitního systému s buňkami plodu vyžaduje navození určitého stupně imunologické tolerance. Tyto změny zasahují celý imunitní systém, ovšem pro potřeby hodnocení sérologických vyšetření je podstatný tzv. Th1-Th2 přesmyk. Co to je? Pomocné (helper) T-lymfocyty se dělí na dvě skupiny, z nichž subpopulace Th1 udržuje závažnou imunitní odpověď (aktivace makrofágů) a Th2 udržuje protilátkovou odpověď. Obě skupiny jsou (zjednodušeně řečeno) v protikladném vztahu. Během gravidity se tlumí aktivita Th1 lymfocytů (závažná) a narůstá aktivita Th2 lymfocytů, což vede k zvýšené tvorbě protilátek.

Důsledkem těchto změn je větší počet nespecifických pozitivních výsledků sérologických vyšetření. Při hodnocení výsledků sérologických vyšetření je nutná vysoká obezřetnost a je rozhodně nutné opakovat výsledky všech pozitivních vyšetření, které jsou v rozporu s klinickým stavem pacientky či jinými laboratorními nálezy.

Zvláštnosti u novorozenců

Po narození jsou B-lymfocyty funkčně nezralé a reagují převážně tvorbou protilátek třídy IgM, tvorba jiných tříd je opožděna, což je dáno i sníženou funkcí T-helper lymfocytů. Tvorba protilátek se tak postupně zvyšuje a „dospělých“ hodnot nabývá až po několika letech života. Výjimkou jsou protilátky třídy IgG, které jsou aktivně transportovány přes placentu, takže novorozenec má hladiny IgG shodné s mateřskými. Tyto mateřské IgG jsou však během cca 6–8 měsíců zcela odbourány, což vede ke známému minimu hladin IgG v období 2.–3. měsíce věku (viz obrázek).

Důsledky pro interpretaci sérologických vyšetření:

- U novorozenců je nutné počítat s nižšími hladinami protilátek a zhoršenou tvorbou protilátek tříd IgA a IgG
- Pozitivní výsledek vyšetření specifických IgG do 8 měsíce by měl být hodnocen výhradně se souběžným vyšetřením matky!

Kdy a jak indikovat sérologické vyšetření

Sérologická vyšetření se používají v několika typických situacích

a) Pátrání po původci choroby

Situace: Máme silné podezření či jistotu, že onemocnění pacienta je infekční etiologie, a potřebujeme identifikovat původce choroby.

Řešení: Provedeme sérologická vyšetření na přítomnost protilátek proti všem mikroorganismům, které by připadaly v úvahu jako původci onemocnění. Pokud jsou výsledky vyšetření

negativní, opakujeme vyšetření nejdříve po 7 dnech. Opakovat vyšetření v kratším intervalu nemá vzhledem k procesu tvorby protilátek na prvořadí žádný smysl. Pokud jsou výsledky hraniční, zopakujeme je s odstupem cca 14 dnů a posoudíme dynamiku tvorby protilátek.

Sérologická vyšetření samozřejmě kombinujeme s metodami přímého průkazu původce choroby. Tam má smysl při negativním výsledku vyšetření opakovat co nejdříve.

b) Sledování průběhu choroby

Situace: Známe původce nemoci a chtěli bychom sledovat její průběh.

Řešení: V tomto případě není sérologické vyšetřování nutné. Z výše uvedených důvodů nemusí hladiny specifických protilátek korelovat s klinickým stavem pacienta. Kvalitnější informace často poskytnou klinická vyšetření, vyšetření proteinů akutní fáze apod.

c) Podezření na remisi choroby

Situace: Pacient prodělal před časem infekční chorobu, jejíž původce byl znám, a nyní je podezření na remisi choroby.

Řešení: Pro správnou volbu sérologických vyšetření je nutná detailní znalost sérologických odpovědí (zda první ataka onemocnění zanechává zvýšené hladiny protilátek dlouho-

době, jaká je dynamika tvorby protilátek proti různým antigenům mikroba apod.). V tomto případě je velice vhodná konzultace s laboratoří. Je nutno porovnávat současné výsledky vyšetření s výsledky při první atace onemocnění, sledovat dynamiku tvorby protilátek atd. V řadě případů nelze stanovit jednoznačný závěr.

d) Posouzení imunitního stavu před očkováním

Situace: Pacient byl očkovan proti danému infekčnímu onemocnění a je nutné posoudit nutnost přeočkování.

Řešení: Sérologické vyšetření poskytne odpověď jen v některých případech. Stanovení protilátek musí být kvantitativní a musí být známy hodnoty protilátek, zajišťující dostatečnou imunitu. Konzultace s laboratoří před vyšetřením je velmi vhodná.

Sérologická metoda diagnostiky infekčních chorob se pro své nesporné výhody široce používá a její význam bude v budoucnu spíše stoupat. Její interpretace však není zcela jednoduchá. Zvláštní a hraniční případy bude vždy nutno interpretovat ve spolupráci s laboratoří, běžné a standardní případy by však měl být schopen interpretovat odesílající lékař.

Literatura

1. Bartůňková J. Imunodeficiency, Grada 2002.
2. Hořejší V, Bartůňková J. Základy imunologie, 2. vydání, Triton 2002.
3. Procházková J, John C, a kol. Vybrané diagnostické metody lékařské imunologie, Avicenum 1986.
4. Žampach P. Taktika a strategie sérologického vyšetřování, Klin. mikrob. a inf. lék. 1997; 2: 221–223.