

Téma 2. Přehled mikrobiologických vyšetřovacích metod

Metody přímého a nepřímého průkazu mikrobů

Mikrobiologická diagnostika směřuje k odhalení původce nemoci. Skutečného původce je přitom často potřeba odlišit od běžné flóry - tedy mikrobů (hlavně bakterií), které se v některých tělních dutinách vyskytují normálně, od náhodného nálezu, který se např. do úst zatoulal s potravou, a také od kontaminace, tedy od mikrobů, které se do vzorku přilepily omylem cestou. Toto odlišení probíhá částečně v laboratoři a částečně na klinickém pracovišti.

V některých případech (u většiny bakterií a kvasinek, ne však u ostatních mikrobů) existuje vedle určení původce další úkol - určení "in vitro" citlivosti na antimikrobiální látky. "In vitro" citlivost (určená v laboratoři) ovšem o skutečné "in vivo" citlivosti u pacienta vypovídá jen částečně. Je to dáno mimo jiné tím, že v laboratoři se mikroby chovají poněkud jinak než ve tkáních.

Metody, kterými určujeme mikroby, si můžeme rozdělit na:

METODY PŘÍMÉ, pomocí kterých **hledáme mikroba jako takového, jeho součást nebo jeho produkt** ve vzorku pacienta; vzorkem v takovém případě bývá např. moč, stolice, hnis, mozkomíšni mok, výtěry z nejrůznějších tělních povrchů a otvorů.

Metody přímé si můžeme dále rozdělit:

- A. Pokud hledáme mikroba bezprostředně ve vzorku, používá se zpravidla pojem přímý průkaz. Je potřeba vzít v úvahu, že vzorek zpravidla obsahuje buňky makroorganismu a že předem nevíme, kolik různých druhů mikrobů je ve vzorku obsaženo (pokud nějaké)
- B. Kvůli nevýhodám přímého vyšetřování vzorku často potřebujeme získat **kmen**. Kmen získáme kultivací mikroba na pevné půdě. Práce s kmenem mikrobiologům nahrazuje práci s jedincem, tak jak ji znají zoologové či botanici. Pokud máme k dispozici kmen a určujeme jeho vlastnosti, hovoříme o identifikaci mikroba. Některé metody identifikace jsou tytéž, které se používají i k přímému průkazu (například lze mikroskopovat vzorek – přímý průkaz – i kmen – identifikace)

METODY NEPŘÍMÉ, kterými **hledáme protilátky**. Rozdíl je v tom, že protilátka není součástí ani produktem mikroba - je produktem makroorganismu, i když by bez podráždění daným mikroblem (resp. jeho antigenem) nevznikla. Nevýhodou nepřímých metod je, že nejsou důkazem toho, že je mikrob v těle právě přítomen – svědčí jen o tom, že se s ním tělo někdy setkalo (anebo se setkalo s očkovací látkou, která obsahovala části těla toho mikroba).

Přehled přímých metod

Název metody	K přímému průkazu	K identifikaci
Mikroskopie)	ano	ano
Kultivace (pěstování na půdách)	ano	ano
Biochemické a podobné identifikační metody	ne	ano
Pokus na zvířeti	ano	lze použít, ale nedělá se to
Průkaz antigenu/antigenní analýza	ano	ano
Průkaz nukleové kyseliny	ano	lze použít, ale nedělá se to

MIKROSKOPIE

Nativní preparát

Nejjednodušší druh mikroskopie: mikroby se pozorují neobarvené, jen rozmíchané v kapce fyziologického roztoku a přikryté krycím sklíčkem. Nepoužívá se imerze. Nativní preparát se hodí
a) na mikroby (baktérie, prvoky), kteří se pohybují
b) na velké mikroby - především tedy parazity a houby

Mikroskopie v zástínu

Je to zvláštní druh nativního preparátu. V důsledku jiného směrování paprsků je výsledkem světlý objekt na tmavém pozadí. Používá se především u spirochet.

Barvené preparáty

Preparáty, které mají být nějak obarvené, musí být nejprve vysušeny a poté zfixovány - obvykle protažením plamenem. Poté proběhne vlastní barvení. Preparát se vysuší (např. filtračním papírem) a pozoruje se tzv. imerzním objektivem bez krycího sklíčka; mezi objektiv a preparát se kápne kapka imerzního oleje.

- *Jednoduché barvení* - používá se například metylénová modř. Dá se provádět i přímo v klinickém pracovišti jako nouzové orientační vyšetření.
- Mikrobiologové provádějí většinou *Gramovo barvení*. Je to nejdůležitější barvení v mikrobiologii. Rozliší baktérie podle typu bučkové stěny. Má čtyři kroky, po každém z nich se preparát oplachuje vodovodní vodou. Po posledním oplachu se vysuší.
- Různá *speciální barvení* se používají např. na tuberkulózu, na plísně, některé parazity apod.
- Ke speciálním účelům se používá *fluorescenční barvení*.

Interpretace mikroskopie. Použijeme-li mikroskopii jako přímý průkaz, nevidíme jenom mikroby samotné, ale také různé jiné věci, například epitelie a leukocyty makroorganismu. Jejich přítomnost a vzájemný poměr má velký význam při hodnocení nálezu. Například velké množství neutrofilů svědčí o bakteriální hnisavé záněti.

Množství jednotlivých elementů (baktérií, epitelí, leukocytů apod.) se hodnotí zpravidla semikvantitativně na jeden až tři (nebo čtyři) křížky.

Samozřejmě, je-li mikroskopie použita k identifikaci, vidíme už jednom příslušného mikroba.

Elektronová mikroskopie se používá u virů, ale nehodí se k rutinní diagnostice, spíše k výzkumu.

KULTIVACE (u virů se používá pojem IZOLACE)

Kultivace je pěstování mikrobů, zpravidla na umělých půdách. Mikroskopie je sice nejklasičtější mikrobiologickou metodou, avšak kultivace je zdaleka nejdůležitější (alespoň v případě bakterií a kvasinkovitých hub). Její význam spočívá především v tom, že umožňuje ze **vzorku** (obsahujícího často směs mikrobů a téměř vždy buňky pacienta) izolovaný čistý **kmén** ve formě tzv. **kolonií**. To ovšem platí jen pro tzv. **pevné půdy**. Důležité jsou ale i **půdy tekuté**, sloužící zejména k pomnožení mikrobů tam, kde jich bylo získáno málo.

KMEN je populace mikrobů, vzešlá z jedné buňky, bez ohledu na formu. Všichni jedinci v rámci kmene mají stejné vlastnosti.

KOLONIE je označení konkrétního útvaru, který bakterie a kvasinky vytvářejí při kultivaci na pevných půdách. U většiny mikrobusů vyroste za den. Pokud odtud mikroba přemístíme, přestává být kolonií, zůstává však kmenem.

KULTIVAČNÍ PODMÍNKY zahrnují teplotu, vlhkost, složení atmosféry a podobně. Zpravidla se laboratoř snaží vytvořit mikrobusům podmínky blízké těm, které jsou v organismu.

Tekuté půdy (pomnožovací). Nejdůležitější je:

- Peptonová voda - obsahuje bílkovinný hydrolyzát (to jest: produkt rozkladu bílkoviny na aminokyseliny a polypeptidy). Samotná se používá zřídka, je však mezistupněm k další:
- Bujón (masopeptonový bujón) je peptonová voda s vývarem. Je to základní pomnožovací půda, běžně používaná v laboratoři hlavně tam, kde předpokládáme malé množství mikrobusů, jež chceme namnožit.
- VL-bujón je bujón s přísadkou kvasnic (francouzsky *viande-levure* = maso-kvasnice). Hodí se pro anaeroby. Aby se mikroby při kultivaci nedostaly do styku se vzdušným kyslíkem, přelévá se VL-bujón při kultivaci vrstvou parafinového oleje.
- Selenitový bujón je příkladem půdy selektivně pomnožovací. Taková pomnoží jen některé mikroby - v případě selenitového bujónu salmonely (a několik dalších rodů).

Pevné (většinou agarové) půdy. Jsou to půdy, jejichž základem je zpravidla živý agar - to je bujón, do kterého je přidán výtazek agarové řasy. Tím se stane, že z tekutiny se stane hmota připomínající pudink nebo želatinu. Fyzikálně vzato je to ovšem pořád tekutina: jakákoli chemická látka, kterou umístíme na povrch agarové půdy, začne touto půdou poměrně rychle pronikat (difundovat).

Na agarových půdách je báječná jedna věc: bakterie (a také kvasinky) na nich tvoří kopečky, kterým říkáme **kolonie**. Každý druh bakterie tvoří na konkrétní půdě specifické kolonie charakteristické velikosti, barvy, tvaru apod., což velmi usnadňuje diagnostiku.

Jedna kolonie zpravidla vyrůstá z jedné bakterie (nanejvýš z jedné dvojice, jednoho řetězku, jednoho shluku - používá se tu anglický termín CFU = colony forming unit = jednotka tvořící kolonii). Z toho také logicky vyplývá, že pokud na agarovou půdu naočkujeme směs dvou bakterií, a pokud tato směs není příliš hustá, vytvoří každý z těchto druhů své vlastní charakteristické kolonie. Ty pak můžeme přeočkovat (= odebrat a nechat znovu kultivovat) a různými metodami identifikovat.

Živý agar se v praxi nepoužívá. Když už se totiž v laboratoři vaří agarová půda, vždycky se do ní něco přidává, co usnadňuje rozpoznání jednotlivých druhů.

U kolonií se dají popisovat různé znaky - velikost, barva, tvar, zápach a podobně.

Pevné půdy rozlišujeme podle účelu.

Diagnostické půdy jsou takové, na kterých "roste kdeco, ale každé jinak". Jinak řečeno - určitá vlastnost bakterie se projeví na vzhledu kolonie. Do této skupiny patří i půda, která je mezi klinikomikrobiologickými půdami úplně nejdůležitější:

- Krevní agar je živý agar s přísadkou ovčích červených krvinek. Využívá se toho, že patogenní druhy bakterií většinou rozkládají červené krvinky (úplná nebo neúplná beta-hemolýza) nebo aspoň mění červený hemoglobin na zelené barvivo (viridace, někdy také alfa-hemolýza). Méně patogenní druhy krvinek nemění (žádná hemolýza, také "gamma-hemolýza").
- VL-agar je pozměněný krevní agar pro anaerobní bakterie.

Selektivní půdy jsou takové, na kterých "roste jenom něco". (Podobně jako u tekutých, selektivně pomnožovacích půd). Patří sem např.:

- Krevní agar s 10 % NaCl - je selektivní pro stafylokoky. Ostatní klinicky významné bakterie tak vysokou koncentrací NaCl nesnášejí. Je to logické - stafylokoky žijí na (zpotené) kůži.

Selektivně diagnostické půdy v sobě spojují vlastnosti obou předchozích. Jinak řečeno, jedny bakterie na nich nerostou, druhé bakterie rostou v určitých koloniích další zase v koloniích jiného vzhledu.

- Endova půda má svoji selektivní vlastnost. Ta spočívá v tom, že na ní rostou pouze gramnegativní (G-) bakterie. Má ale také diagnostickou vlastnost. Bakterie, které štěpí

laktózu, na ní mají tmavočervené kolonie a tmavočervená je i půda v okolí kolonií. Laktózu neštěpící bakterie tvoří kolonie bledé. Příčinou je indikátor – Schiffovo činidlo

- Půdy XLD a MAL se používají k diagnostice salmonel.

Obohacené půdy jsou bohaté na živiny. Jsou určeny k pěstování náročných bakterií, které hned tak na něčem nevyrostou - například hemofily nebo původce kapavky.

- Čokoládový agar je vlastně krevní agar zahřátý asi na 80 °C. Přestože se do něj oproti krevnímu agaru nic nepřidává, je obohacený tím, že různé látky z krve v něm volně plavou a jsou tedy pro bakterie mnohem lépe dostupné.
- Levinthalův agar je přefiltrovaný čokoládový agar. Je téměř bezbarvý, přesto je funkčně hodně podobný předchozímu.

Speciální půdy mají své zvláštní určení.

- Müllerův-Hintonové agar je určen k testování citlivosti bakterií in vitro na antibiotika.

Jak se kultivuje na pevných půdách

1. Na povrch půdy naneseme část vzorku nebo několik kolonií z předchozí kultivace.
2. Bakteriologickou kličkou toto místo "roztaháme" (rozředíme) po celé misce.
3. Nyní misku umístíme do termostatu, většinou při 37 °C. Většinou kultivujeme 16 - 28 hodin (tedy do druhého dne), někdy ale déle (dva, tři i více dní). Po vyjmutí vidíme na misce kolonie, které můžeme popisovat nebo s nimi provádět další identifikační pokusy.

BIOCHEMICKÁ IDENTIFIKACE

je založena na skutečnosti, že každý druh bakterie produkuje jinou sestavu enzymů. A tak třeba máme bakterii, která třeba umí rozštěpit (pomocí příslušných enzymů) maltózu a sacharózu, ale ne trehalózu, a jinou, která umí štěpit sacharózu a trehalózu, ale ne maltózu. Kombinace vhodného počtu znaků může určit bakterii nejen na úroveň rodu, ale často i druhu.

PRINCIP těchto reakcí je takový, že bakterii je předložen substrát (substráty). Pokud bakterie produkuje enzym(y), dojde k přeměně substrátu (substrátů) na produkt (produkty). V případě, že se produkt(y) liší od substrátu(-ů) barvou, skupenstvím apod., můžeme změnu přímo pozorovat. Pokud změna není viditelná, musí být v reakci přítomen indikátor. Nelze-li indikátor mít v reakci od začátku, přidává se až po proběhlé reakci ve formě činidla.

Katalázová reakce je velmi jednoduchá biochemická reakce, založená na průkazu enzymu katalázy (štěpí peroxid vodíku). Používá se k rozlišování rodů bakterií, např. stafylokoky jsou kataláza pozitivní, streptokoky kataláza negativní. **Provedení:** kolonie bakterie je smíchána s kapkou peroxidu vodíku. V případě positivity kapka šumí - vznikají bublinky kyslíku. Výhodou je, že výsledek je viditelný během několika vteřin. Indikátor není třeba (bublinky jsou viditelné).

Reakce na diagnostických proužcích (stripech). Tyto reakce se také dají odečíst velmi rychle - během vteřin či nejpozději minut. Používá se plastových diagnostických proužků, jejichž reakční ploška se zvlhčí a přitiskne na kolonie testované bakterie. Po určité době (a někdy ještě po přikápnutí činidla) se pak sleduje, jestli na reakční plošce dojde k vývoji typického zbarvení (např. modrého, modrozeleného, červeného).

Testy ve zkumavkách. Jednoduché testy obsahují substrát (např. cukr) a indikátor. Do substrátu se vmíchá suspenze bakterie a inkubuje se přes noc. Když je reakce pozitivní, dojde k barevné změně; když je negativní, ke změně nedojde. Složitější testy využívají vícesubstrátových směsí. Barevná změna pak může být např. jiná u hladiny (prsteneček určité barvy) a jiná v hloubce.

Testy v plastové mikrotitrační destičce („panelu“)

V podstatě jde o sérii miniaturizovaných jednoduchých zkumavkových testů. Bez ohledu na konkrétní podobu jednotlivých destičkových testů (liší se podle výrobce, nové výrobky od starších apod.) je princip prakticky vždy stejný: na dně důlků jsou lyofilizované substráty (případně substráty s indikátorem), do důlků se přikápnou suspenze bakterie a destička se nechá inkubovat (obvykle přes noc). Poté se hodnotí, u kterých testů došlo ke změně barvy. Hodnotí se to pouhým okem nebo automaticky - čtecím zařízením na principu spektrofotometru. Hodnotí se zpravidla najednou 8 – 30 různých biochemických reakcí.

POKUS NA ZVÍŘETI

Pokus na zvířeti býval důležitou součástí diagnostiky v začátcích mikrobiologie. Šlo tehdy i o to, prokázat, zda příslušný mikrob vůbec je původcem nemoci – naočkoval se tedy pokusnému zvířeti a čekalo se, zda také u zvířete propuknou příznaky podobné těm u pacienta.

V některých případech se podobně postupuje dodnes. Nejčastěji se používají myši, morčata, potkani, králíci. Význam pokusu na zvířeti klesá s rozvojem modernějších metod i s tím, jak si lidé stále více uvědomují, jak je jeho využívání eticky problematické.

Zvířata (hl. hospodářská) se ovšem v mikrobiologické diagnostice uplatňují i jinak, např. jejich séra jsou zdrojem protilátek, z jejich krvinek se připravují krevní agary (nejčastěji s ovčími, ale i např. s hovězími či koňskými erytrocyty) apod.

PRŮKAZ ANTIGENU

Jedná se o metodu přímého průkazu, avšak způsob provedení je shodný s nepřímým průkazem (průkazem protilátek) - v obou případech se hovoří o tzv. sérologických reakcích. Ty budou proto probrány v další části diagnostiky.

PRŮKAZ NUKLEOVÉ KYSELINY

Průkaz nukleové kyseliny (většinou průkaz DNA, občas i RNA) je moderní metoda, která umožňuje identifikovat i malá množství mikrobů, mikroby usmrcené, nebo dokonce mikroby, u kterých se nezachovala kompletní buňka či virová částice. Někdy je ovšem tento zvýšený záchyt spíše na škodu. Navíc je to metoda pořád ještě hodně drahá a náročná. Používá se proto jen u mikrobů, u kterých klasické metody nelze použít, nebo jsou příliš pomalé.

Průkaz NA se dělí na **metody bez amplifikace** (klasické genové sondy) a **metody s amplifikací (namnožením) určité sekvence nukleové kyseliny**. Nejpoužívanější je dnes POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR). Podrobnější popis zde neuvádíme, neboť metoda se široce využívá i mimo mikrobiologii.

METODY NEPŘÍMÉHO PRŮKAZU (průkazu protilátek) A PRŮKAZU ANTIGENU

Tyto takzvané sérologické metody jsou metody pracující s reakcí ANTIGEN - PROTILÁTKA (za vzniku komplexu). V užším slova smyslu se někdy za sérologické považují pouze ty reakce, kde se jako vzorek používá sérum, popřípadě reakce, kde se hledá protilátka.

Jednotlivé sérologické metody se od sebe liší pouze způsobem, jak je detekován komplex antigenu s protilátkou. Všechny se však dají použít ke všem účelům, dále uvedeným:

- **Průkaz antigenu pomocí protilátky** - použije se laboratorní protilátka (ze séra pokusného zvířete) a smíchá se
 - buďto se vzorkem pacienta, ve kterém hledáme antigen – jde o **přímý průkaz antigenu**
 - nebo s kmenem, vypěstovaným z pacientova vzorku – jde o **identifikaci, antigenní analýzu**
- **Průkaz protilátky pomocí antigenu** - použije se laboratorní antigen a smíchá se s pacientovým sérem

VE VŠECH PŘÍPADECH PLATÍ, ŽE:

- pokud vznikl komplex antigen-protilátka, je reakce pozitivní
- pokud komplex nevznikl, je reakce negativní, něco v ní chybí

Přehled sérologických metod

- Precipitace
- Aglutinace
- Komplementfixační reakce
- Neutralizace
- Reakce se značenými složkami:
 - Imunofluorescence (IMF)
 - Radioimunoanalýza (RIA)
 - Enzymová imunoanalýza (EIA, ELISA)
 - Imunobloty

Nespecifické antigeny a heterofilní protilátky. U většiny serologických reakcí se pracuje se specifickými antigeny - například s antigenem spalniček u protilátek proti spalničkám, se stafylokokovým antigenem u protilátek proti stafylokokům apod. Někdy je ale výhodné při nepřímém průkazu použít místo skutečného mikrobiálního antigenu nějakou levnější a bezpečnější látku, o které je známo, že je také schopna vázat příslušnou protilátku: používají se např. červené krvinky všelijakých zvířat při průkazu infakční mononukleózy (Paul-Bunnellova reakce). Hovoří se pak o nespecifickém antigenu.

Někdy se také prokazují protilátky, které nejsou namířeny přímo proti mikrobu, ale proti nějaké molekule, která se uvolňuje z tkání změněných infekcí. Takovou látkou může být například kardiolipin - extrakt z hovězích srdcí při průkazu syfilis. Protilátky, které se s takovým nemikrobiálním antigenem spojují, se označují jako heterofilní protilátky.

Jak zjistit u nepřímého průkazu, jestli se jedná o akutní infekci?

Zatímco přímý průkaz (včetně průkazu antigenu a antigenní analýzy!!!) vždy dokazuje přítomnost mikroba, u nepřímého průkazu tomu tak není. Přítomnost protilátek pouze svědčí o tom, že se organismus někdy s mikroblem setkal. Přesto je možné aspoň s určitou pravděpodobností říci, jestli se o akutní infekci jedná, nebo jestli jsou protilátky nalezené v séru pacienta jen následkem infekce překonané dříve. Je potřeba využít některého z následujících tří způsobů:

- **Zjišťujeme, jaké je množství protilátek v séru a jestli se mění.** Využívá se toho, že v akutní fázi infekce množství protilátek prudce stoupá, pak zase klesá, a nakonec se udržuje na stálé, nízké hladině. Je ovšem těžké zjistit množství protilátek v séru absolutně (v gramech, v molech). Logicky ale - pokud je v séru hodně protilátek, můžeme takové sérum mnohonásobně zředit a pořád ještě bude reagovat s antigenem. Pokud je protilátek málo, bude reagovat jenom neředěné či málo ředěné sérum. Proto se připravují různá ředění séra (většinou geometrickou řadou: 1 : 10, 1 : 20, 1 : 40, 1 : 80 atd.) a všechna se míchají s antigenem. Tím získáme číslo zvané TITR, které udává, kolikrát se dá sérum zředit, aby ještě reagovalo s antigenem. Důležitý ale nebývá samotný titr, ale jeho změna během dvou či tří týdnů. Pokud během se během této doby titr zvýší aspoň čtyřikrát (= o dvě ředění, například z 20 na 80), jde velmi pravděpodobně o akutní infekci. Pouhé dvojnásobné zvýšení (= o jedno ředění) může být náhodné.
- **Zjišťujeme, k jaké třídě patří nalezené protilátky** - to ovšem umožňují pouze reakce se značenými složkami. Převaha IgM nad IgG svědčí pro akutní infekci
- **Zjišťujeme tzv. aviditu**, to je síla vazby protilátky na antigen. Čerstvé protilátky (u akutní infekce) bývají nízkavidní. Tato metoda je poměrně nová a zatím se příliš nepoužívá.

Precipitace a aglutinace jsou nejjednodušší metody, protože kromě antigenu a protilátky už v systému nemusí být nic jiného. Bývají ale méně přesné a dají se použít jen v některých případech. Komplex se projeví sám jako sraženina (precipitát nebo aglutinát).

Rozdíl mezi precipitací a aglutinací spočívá v tom, že u **precipitace** je antigen povahy koloidní (jako antigen vystupují jednotlivé makromolekuly), kdežto u **aglutinace** je povahy částicové - korpuskulární (jako antigen vystupují větší částičky, například celé bakterie). **Aglutinace na nosičích** je zvláštní případ, vlastně precipitace převedená na aglutinaci. Používá se tam, kde máme koloidní antigen, ale potřebovali bychom korpuskulární. Řeší se to tak, že antigen navážeme na vhodnou částici. Jako částice se používají latexové částice - pak se jedná o latexaglutinaci nebo červené krvinky - pak se jedná o hemaglutinaci (např. TPHA na syfilis).

Komplementfixační reakce je mnohem složitější než předchozí dvě. Používá se při ní komplement, což je **přirozená složka humorální nespecifické, ale vlastně i specifické imunitní reakci**. Každé sérum obsahuje komplement. Pro komplementfixační reakci se ovšem nedá použít vlastní komplement pacienta, protože jeho množství je nejisté. Proto se vlastní pacientův komplement před reakcí inaktivuje, a do reakce se přidává komplement morčecí.

V **první fázi** ke dvěma složkám (laboratorní antigen plus sérum od pacienta - nebo laboratorní protilátka plus vzorek, ve kterém předpokládáme antigen) přidáme komplement. Pokud je reakce pozitivní, komplement se naváže na komplex antigenu s protilátkou. Pokud je reakce negativní, komplement je volný. Na komplementu je zajímavé to, že se neváže ani na samotnou protilátku, ani na samotný antigen - pouze na komplex, který z antigenu a protilátky vznikl. Právě proto se používá v rámci diagnostiky - pokud se komplement naváže, je jisté, že došlo ke vzniku komplexu. Problém je ale v

tom, že navázání komplementu na komplex antigen-protilátka není samo o sobě vidět. Proto musí mít komplementfixační reakce ještě **druhou fázi**.

Nyní přidáme do reakce tzv. indikátorový systém. Je to soustava známého antigenu (beraní erytrocyty) a známé protilátky (takzvaný amboceptor - králičí protilátka proti beraním erytrocytům). Tato soustava má jednu zajímavost: když se na ni naváže komplement, dojde k hemolýze erytrocytů. No a v tom je právě onen vtip: pokud se v první fázi všechny komplement vyváží na soustavu antigen - protilátka, nezbyl žádný volný komplement a indikátorový systém zůstane nedotčen. Pokud ale byla reakce negativní, zůstal komplement volný, váže se na indikátorový systém a hemolyzuje ho. Znamená to, že hemolýza svědčí o negativitě reakce, nepřítomnost hemolýzy o pozitivitě.

KFR je běžně používaná zejména ve virologii, případě též v diagnostice hub a parazitů, méně často i bakterií. Ve virologii je to jedna z nejběžnějších metod u většiny běžných virů.

Neutralizační reakce. V případě VIRŮ, které jsou malé, protilátka kromě různých dalších mechanismů účinku působí i přímo: virus má zásluku na nějakou buňku či krvinku, které by rád provedl nějakou neplechu (u krviněk např. hemolýzu nebo hemaglutinaci), ale protilátka mu v tom zabrání. BAKTERIE jsou příliš velké na to, aby je mohla protilátka přímo inaktivovat. Co však protilátka nezmůže s bakteriemi, zmůže s jejich toxiny.

Neutralizační reakce se tedy používají nejčastěji ve VIROLOGII. Dají se použít také v BAKTERIOLOGII, ale většinou jenom v případě, že bakterie produkuje nějaký toxin; neutralizováno je působení toxinu, nikoli působení samotné bakterie. Výjimkou může být např. neutralizace pohyblivosti bakterie (u jedné ze starších diagnostických reakcí u syfilis).

Antigenem v neutralizační reakci je tedy zpravidla virus nebo bakteriální toxin.

Některé příklady:

- **ASLO - antistreptolysin O.** Prokazujeme protilátku proti streptokokovému toxinu. V tomto výjimečném případě nám nejde ani tak o toxin, ale o protilátku jako takovou - ona totiž často nespecificky reaguje s endokardem či ledvinnými glomeruly, vedouc tak k revmatické horečce či glomerulonefritidě. Antistreptolysin O neutralizuje lýzu červených krvinek, kterou by normálně provedl streptolysin O: to znamená, že v případě pozitivity (protilátka JE přítomna) nedojde k hemolýze, v případě negativity (protilátka NENÍ přítomna) k hemolýze dojde.
- **Hemaglutinačně inhibiční test a virusneutralizační test** se používají ve virologii, i když jejich význam klesá s rozvojem jiných metod.

Reakce se značenými složkami. Principem těchto reakcí je nepřerušovaný řetězec, jehož články jsou antigeny a protilátky; ne vždy je to jen jeden antigen a jedna protilátka. Řetězec začíná nějakým pevným povrchem (sklíčko, dno důlku) na který se naváže některá složka reakce, a končí - v pozitivním případě - nějakým "značidlem", které pak může být detekováno. Poslední složka, na kterou je "značidlo" navázáno (nakonjugováno - bývá to obvykle protilátka), se zpravidla označuje jako **konjugát**. V případě negativním jeden článek řetězku chybí, a proto všechny další, nejsou pevně svázané s povrchem, mohou být - a také jsou - vyplaveny při takzvaném "promývání". Promývání se dělá po každém novém kroku. Tímto způsobem nakonec skončí ve výlevce i to "značidlo". Jako „značidla“ se používají:

- Fluorescenční barvivo. V takovém případě je povrchem zpravidla podložní sklíčko a výsledný efekt je detekován prostřednictvím fluorescenčního mikroskopu. Výhodou je, že vidíme např. tvar bakterie. Hovoříme o imunofluorescenci.
- Radioizotop. V tom případě se efekt pozoruje pomocí vhodného přístroje k detekci radioaktivity. Metoda je náročná, vyžaduje laboratoř vybavenou pro práci s radioaktivním materiálem. Používá se dnes poměrně málo. Metoda se nazývá radioimunoassay či radioimunoesej, zkráceně RIA
- Enzym. V tom případě musí následovat ještě další fáze, ve které se přidá substrát reakce. Pokud je "značidlo" v podobě enzymu přítomno, dojde k rozštěpení substrátu na produkt, který se buďto liší barvou, nebo jej lze identifikovat s využitím indikátoru. Povrchem tu bývá dno důlku v panelu a celá reakce se dá snadno automatizovat: čím silněji reakce proběhla, tím intenzivnější je barevná změna, a tato intenzita barevné změny je měřitelná jako absorbance ve spektrofotometru. Nejběžnější variantou této reakce je reakce ELISA - je to zkratka a znamená enzym linked immuno sorbent assay.

ELISy se postupně staly standardními vyšetřovacími metodami u velkého množství mikrobů, nahradily starší a méně přesné metody.

Imunobloty jsou vlastně speciálním případem reakce ELISA. Od klasické ELISy se výrazně liší metodou přípravy antigenu.

U klasické ELISy se prostě použije celý mikrob, a s ním pak mají možnost reagovat všechny protilátky, které jsou kompatibilní s kterýmkoli z antigenů, který se na povrchu mikroba nalézá. Takových antigenů tam může být mnoho.

Někdy je ale výhodné pracovat se skutečnými jednotlivými antigeny. Je to především tehdy, kdy máme několik příbuzných mikrobů, které mají některé antigeny shodné a jiné odlišné.

Imunoblotová technika nám umožní antigeny navzájem oddělit a dopídit se zjištění, který z nich vlastně reagoval.

Antigeny jsou uvolněny z povrchu mikroba, rozděleny elektroforézou podle své hmotnosti a pak, opět elektroforeticky, přeneseny na speciální fólii. V tu chvíli pak začnou fungovat jako "běžný" antigen v reakci ELISA, dále už je to tedy všechno stejné.

Metoda se používá například u borrelií - existuje jich několik druhů, které jsou antigenně příbuzné, ale ne totožné.

Automatizace u serologických metod. Velkou výhodou zejména moderních metod, jako jsou ELISy a Western bloty, je možnost automatizace. Dnes již existují automaty, které jsou schopny celou reakci provést samy - hlídají potřebné časy reakcí, přidávají činidla, promývají apod. *Takto funguje např. přístroj "Elisamat", kterému se na mikrobiologii u sv. Anny začalo říkat "Kryštofek", protože jedna jeho část je od firmy Columbus. Ze začátku s ním byly jisté problémy, např. do reakce omylem přidal etanol namísto kyseliny sírové. Toto dokumentuje následující píseň s názvem "Kryštofek".*

1. Ten den všechno chystalo se na velikou slávu
jako kdyby měli přivést posvátnou nám krávu
Chyběly jen prapory a duo Lábus - Kaiser
když měl přijít na serolku slavný minilyzer
Škatulata hejbala se v nebyvalé míře
neboť místo dělalo se pro posvátné zvíře
Od těch dob co dorazilo to památné ráno
Všichni se s ním spřátelili, Kryštofek je zváno.

**R. Kryštofek nám denně mění všední chvíle v svátky
neobjeví Ameriku, zato protilátky.**

**/:Bez Kryštofa byli bychom ubožáci málem
Kryštofek je našim velkým elisovým králem!:/**

2. Bohužel se naše zvíře z kovu skla a plastu
oddávati začalo nám z ničeho nic chlastu.

Zkrátka místo vitriolu líh mu lépe chutná
Serolka i virolka je z toho celá smutná.

Kryštofek je náročný a ošidit se nedá
a ta jeho obsluha je učiněná věda

Ti co máme rodiny to celkem dobře chápem

S Kryštofkem je stejná práce jak má žena s chlapem **Refrén**