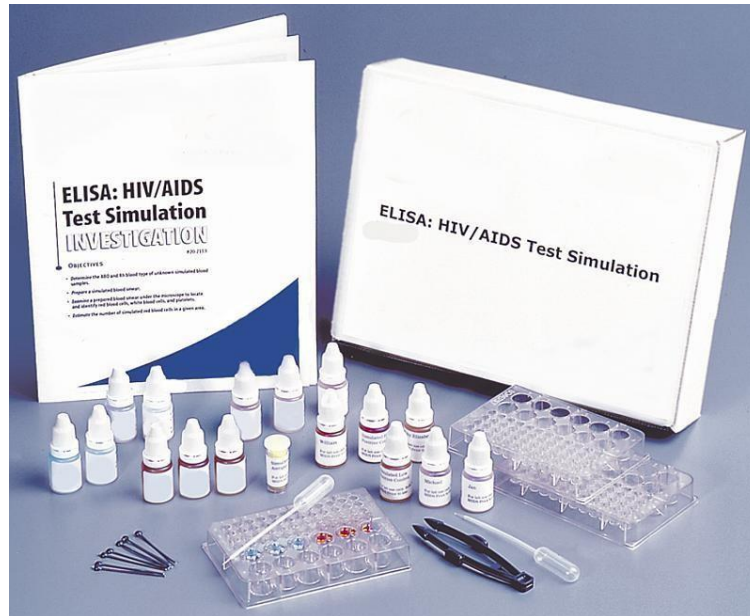


HIV testy pomocí ELISA II

Kat. číslo 1093049



AIDS – čísla a fakta



AIDS je globální katastrofa. Po celém světě je, podle korigovaných odhadů programu UNAIDS, virem HIV nakaženo přibližně 33 milionů lidí. V porovnání s tím jsou počty v Německu relativně příznivé. Zde žije s HIV cca 63 500 osob. Zdá se však, že ostražitost obyvatelstva trochu polevila, protože od roku 2000 počet nových pacientů s diagnostikovaným virem HIV opět roste, institut RKI například hlásí v Německu za rok 2008 cca 3 000 případů.

V Německu jsou zhruba tři čtvrtiny nakažených osob muži a jedna čtvrtina ženy. 90 % infekcí HIV bylo přeneseno při pohlavním styku. Necelé dvě třetiny všech případů nákazy v Německu jsou způsobeny nechráněným sexem mezi muži.

Nové léky výrazně prodloužily život a zlepšily u lidí s HIV a AIDS jeho kvalitu. Avšak oproti stále rozšířenějším názorům, kterým mnozí tak rádi věří, lék proti HIV neexistuje! Pacienti nakažení virem HIV, kteří jsou léčeni léky, žijí s rizikem velmi závažných vedlejších účinků a nebezpečí vyčlenění ze společnosti a zhoršení životních podmínek.

Proto jsou neúčinnějšími a nejdůležitějšími nástroji při boji s HIV stejně jako předtím osvěta, ochrana a solidarita. Německá opatření a kampaně přitom neustále reagují na nový vývoj, stav potřeb a možnosti prevence. Přitom se průběžně opírají o zajištěné poznatky a ukazatele národních a mezinárodních institucí.

Přenos viru HIV

Virus HIV je původce nemoci AIDS. V porovnání s jinými původci nemocí je považován za obtížně přenosný. Proto se virus HIV nepřenáší při běžných sociálních kontaktech, ani při kašlání nebo kýchání, ani při ošetřování pacienta nebo v sauně či bazénu. Virus HIV se však může přenést, pokud se tělesná tekutina, která obsahuje dostatečné množství virů HIV, dostane do těla jiného člověka. Významnými tělesnými tekutinami pro nákazu virem HIV je sperma nebo poševní sekret, krev nebo stopy krve.

K přenosu HIV může dojít především v následujících situacích:
Nechráněný pohlavní styk. Sem patří:

- * vaginální sex (kontakt s poševní sliznicí),
- * anální sex (kontakt se střevní sliznicí) a
- * orální sex (kontakt s ústní sliznicí).

Během menstruace hrozí v důsledku menstruačního krvácení zvýšené riziko nákazy HIV. Při orálním sexu hrozí nebezpečí přenosu HIV především tehdy, pokud se do úst dostane ejakulát nebo poševní sekret.

O množství viru v preejakulátu, takzvané kapce touhy, nelze činit spolehlivé závěry. Riziko nákazy virem HIV samotným preejakulátem (aniž by se tedy do těla dostalo sperma) je podle současných znalostí klasifikováno jako velmi malé.

Společné používání injekčních stříkaček

Společné používání injekčních stříkaček (jehel, kanyl, stříkaček) při intravenózním užívání drog. Podrobné informace k této možnosti přenosu viru HIV najdete na webových stránkách Deutsche Aidshilfe.

Těhotenství, porod a kojení

Těhotenství, porod a kojení mohou u HIV pozitivních matek vést k nákaze dítěte. Pomocí preventivních lékařských opatření však lze riziko silně snížit. Proto se v rámci prevence těhotným ženám nabízí a doporučuje také test HIV.

Lékařské zacházení s krví a krevními produkty

U produktů z krevní plazmy je v Německu díky výrobě zajištěno, že neobsahují virus HIV. U dárců krve se v SRN plošně velmi přesně kontroluje absence viru HIV, takže hrozí jen velmi malé riziko HIV z důvodu časového okna mezi případnou nákazou dárce a detekovatelností protilátek proti viru HIV nebo složek viru.

Průběh nemoci

Nákaza virem HIV probíhá ve čtyřech fázích:

Fáze 1: akutní fáze

Dva až šest týdnů po nákaze se mohou vyskytnout symptomy podobné chřipce jako horečka, noční pocení, zduřelé lymfatické uzliny, nevolnost atd. – u některých pacientů probíhá tato fáze zcela bez příznaků.

Fáze 2 : latentní fáze

Doba latence trvá v průměru devět až jedenáct let a probíhá bez příznaků. U některých pacientů (především pokud vědí o své nemoci) se rozvinou psychické symptomy. Existují pacienti, u nichž se AIDS rozvine během několika měsíců po nákaze, ale také pacienti, u nichž i přes nákazu v 80. letech a bez antivirální terapie nemoc dosud nepostoupila do další fáze.

Fáze 3 : (A)ids (R)elated (C)omplex

Vyskytují se stejné obtíže jako v akutní fázi. Tyto příznaky však již neustoupí.

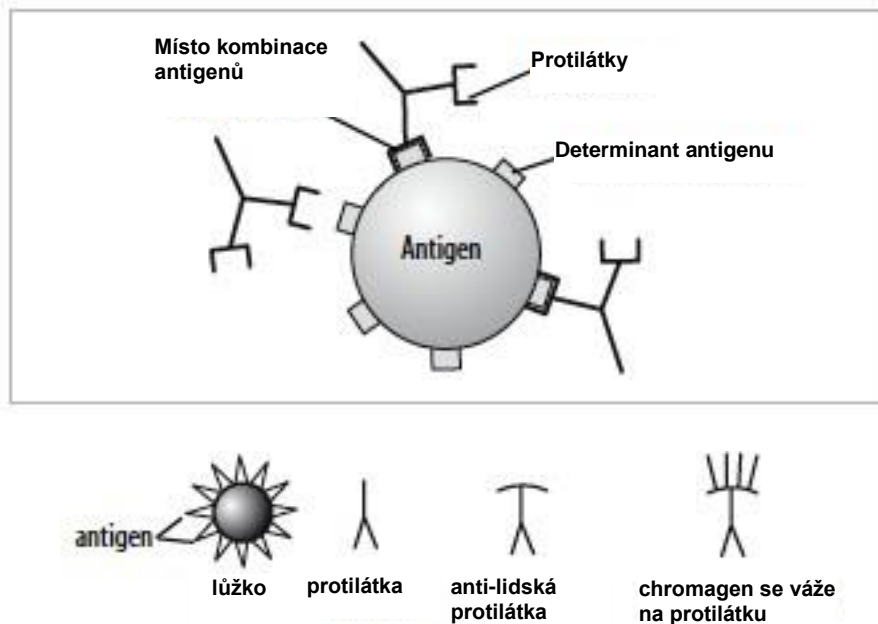
Fáze 4 : fáze nemoci

O diagnózu AIDS se jedná, pokud jsou u HIV pozitivního pacienta zjištěny určité infekce nebo maligní tumory, takzvané choroby definující AIDS. Infekce jsou označeny jako oportunistické infekce.

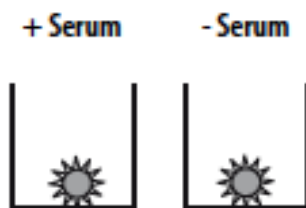
Technika ELISA

Test ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) je velmi rozšířená a velmi citlivá imunologická metoda, s jejíž pomocí lze prokázat určité molekuly (především proteiny).

Při tomto testu se využívají mechanismy imunitního systému: Pokud imunitní systém detekuje cizí látku (antigen), vytvoří „protilátky“, které cizí molekulu zachytí, a tím ji označí. Tato takzvaná reakce antigenu s protilátkou se používá pro test ELISA. Pokud se prokáže určitý protein (antigen), musí být k dispozici vhodná protilátka, které se nejprve vytvoří pomocí různých genetických nebo buněčných biologických procesů.



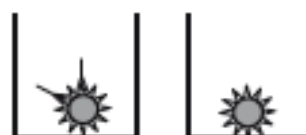
Test se provádí pomocí mikrotitračních destiček a probíhá takto: Nejprve se na dno každé jamky na mikrotitrační destičce připevní očištěný nebo také geneticky vytvořený virus HIV.



Poté se do každé jamky přidá trochu pacientova séra, které by mělo v případě pozitivního vzorku obsahovat protilátky proti viru HIV a umožní tak jeho vázání s již fixovaným antigenem HIV.



Poté se odstraní tekutý obsah mikrotitrační destičky, a tím se vyhodí také nevázané sérum. Jamky se několikrát vypláchnou, aby se skutečně odstranily všechny stopy nevázaného materiálu. Vázané protilátky proti viru HIV zůstanou přichycené na dně jamky na antigenu.



V tomto okamžiku vlastně nelze vidět, zda je vzorek pozitivní nebo negativní. Komplex je „neviditelný“ – v práci se pokračuje s vizuálně prázdnými jamkami!

+ Serum - Serum

Jamky se ošetří konjugátem, který obsahuje druhou protilátku a váže se na lidské protilátky proti viru HIV.



Poté se jamky znovu vypláchnou, čímž se odstraní nevázaný materiál – antigen HIV // protilátka proti HIV // konjugát zůstanou přichycené na dně jamky.



Druhá protilátka obsažená v konjugátu je přímo nebo nepřímo vázaná na enzym, který vyvolá reakci, jež vede k měřitelné nebo viditelné změně barvy.



Laboratorní experiment – scénář pacientů**Jan**

Janovi je 21 let a má vztah s Jerryem. Jerry byl k Janovi vždy upřímný a také mu řekl, že je HIV pozitivní. Oba se při styku chrání, aby se Jan nenakazil. Přesto si chce Jan nechat udělat test HIV.

Lynn

Lynn je vdaná matka tří synů. Před nedávnem byla svědkem nehody a pomáhala na místě ošetřit raněné. Neměla však žádné rukavice a na místě nehody byla spousta krve. Lynn se nyní bojí, že zraněný mohl být případně HIV pozitivní a že se nakazila.

Malá Elizabeth

Elizabeth je devítiměsíční kojeneček. Její matka Jennifer zjistila, že její manžel je HIV pozitivní a i ona sama je pozitivní, chtěla by teď vědět, jestli je její miminko také pozitivní – protože ji nikdo neodrazoval od kojení.

Roger

Roger je mladý student medicíny a zároveň hemofilik – již dlouhá léta dostává spoustu transfúzí a rád by věděl, zda některá z transfúzí neobsahovala virus HIV.

Bob

Bobovi je 35 let, je otcem čtyř dětí, je ženatý a byl řidičem kamionu. Nyní je nezaměstnaný, protože bývá často nemocný a má velmi silný kašel. Jeho lékař jej chce otestovat na TBC a HIV a žádá jej o souhlas s provedením testu.

Tony

Je to mladý muž, který se právě vrátil z Jižní Afriky a který si přečetl, že 25 milionů lidí tam dostalo nemoc v důsledku štípnutí komára – i když lékař tuto cestu přenosu vylučuje, chce test.

Richard

Richard je 25letý muž, závislý na heroinu. Je hubený, nemocný a slabý – lékař se domnívá, že má AIDS. Jeho přítelkyně Katie je zdravotní sestra a ujišťuje ho, že se o něj budou moci lépe postarat, když budou znát diagnózu.

Tania

Tania má 25 let a byla znásilněna. Její lékař jí již bezprostředně po znásilnění podal antiretrovirální léky po prevenci proti nákaze – přesto jí však doporučuje podstoupit ve 2 následujících měsících testy HIV.

William

William je student, který měl nechráněný pohlavní styk s dívkou. Nezná její jméno, ani ji už znovu neviděl... teď se bojí, že se mohl nakazit sexuálně přenosnou chorobou.

Provedení pokusu

Během celého pokusu byste měli nosit laboratorní plášť, rukavice a ochranné brýle!

Každá skupina žáků potřebuje následující pomůcky:

- 12 skleněných perel, které jsou potaženy simulovaným antigenem HIV
- 1 pásek s mikrojamkami
- 1 plastová pipeta
- 1 mikrošpachtle

Pro celou třídu jsou zapotřebí následující položky:

- 10 ml simulovaných antihumánních protilátek (vázaných na enzym)
- 10 ml simulovaného chromagenu
- 10 ml simulovaného pacientova séra
- 10 ml simulovaného kontrolního séra (negativní)
- 10 ml simulovaného kontrolního séra (nepatrně pozitivní)
- 10 ml simulovaného kontrolního séra (vysoce pozitivní)

Pust'te se do toho.....

Krok 1

Od vašeho učitele obdržíte dva pásy s 8 jamkami (Microstripe). Popište jamky #1-12 a do každé jamky přidejte mikrošpachtlí skleněnou perlu s vázaným (simulovaným) antigenem HIV.

Krok 2

Pipetou přidejte do každé jamky 2 kapky vody.

Krok 3

Do následujících jamek přidejte dvě kapky:

- negativní kontrolní sérum do #1
- nepatrně pozitivní kontrolní sérum do #2
- vysoce pozitivní kontrolní sérum do #3

Krok 4

Přidejte dvě kapky pacientova séra do následujících jamek:

4 Jan

5 Lynn

6 Elizabeth

7 Roger

8 Bob

9 Tony

#10 Richard

#11 Tania

#12 William

Krok 5

Inkubujte pásy po dobu 3 min. při pokojové teplotě.

Krok 6

Do každé z 12 jamek přidejte dvě kapky konjugátu.

Krok 7

Inkubujte pásy po dobu 3 min. při pokojové teplotě.

Krok 8

Přidejte do každé z 12 jamek dvě kapky chromagenu.

Krok 9

Vyhodnocení vizualizovaných výsledků:

Negativní: bezbarvý nebo světle žlutý

Nepatrně pozitivní: světle oranžový

Vysoce pozitivní: tmavě červený

→ Zapište výsledky do tabulky. Pozitivní jsou osoby, jejichž výsledek má tmavší nebo stejnou barvu jako jamky s pozitivním kontrolním sérem. Negativní jsou osoby, jejichž výsledky jsou bezbarvé nebo světlejší než jamky s pozitivním kontrolním sérem.

Krok 10

Zlikvidujte veškerý odpad a dobře opláchněte vaše pracovní materiály pod tekoucí vodou.

Well Number	Patient	Result	Observations/Comments
1	Negative Control		
2	Low positive Control		
3	High Positive Control		
4	Jan		
5	Lynn		
6	Baby Elizabeth		
7	Roger		
8	Bob		
9	Tony		
10	Richard		
11	Tania		
12	William		

Otázky:

1. Myslíte si, že se Jan a Jerry chovají odpovědně? Vysvětlete důvody.
2. Lynn: jaká bezpečnostní opatření měla Lynn učinit, než pomohla oběti nehody?
3. Pomohli byste krvácejícímu člověku? Pokud ano, provedete nějaká opatření? Jaká?
4. Elizabeth: Jak se může kojeneček nakazit od matky? Je pozitivní? Rozvine se u něj AIDS?
5. Je správné, aby Jenny kojila své dítě?
6. Roger: Co mohou krevní banky učinit, aby zajistily, že transfúze nejsou kontaminované?
7. Bob: Kolik dětí v USA / EU osiří, protože jejich rodiče zemřou na AIDS?
8. Richard: Může se Katie nechat očkovat? Existují léky, které Richarda uzdraví?
9. V jakém stádiu nemoci se Richard nachází? Vysvětlete důvody.
10. Tony: Lze se nakazit při štípnutí komára?
11. V jakých tělesných tekutinách se nachází virus HIV?
12. Tania: Může být druhý test pozitivní?
13. Myslíte si, že by se násilník měl podrobit testu na AIDS bez jeho souhlasu?
14. Mohl William zabránit nákaze? Co může udělat, aby měl po nákaze zdravý a aktivní život?