

Lékařská mikrobiologie pro ZDRL

Týden 11:

Neutralizační reakce, reakce se
značenými složkami

Ondřej Zahradníček
zahradnicek@fnusa.cz

Co nás dnes čeká

- Budeme pokračovat v diagnostice, založené na interakci **antigenu** (v případě mikrobiálních antigenů jde o povrchovou část těla mikroba) s **protilátkou** (imunoglobulinem, který je tvořen makroorganismem).
- Přitom můžeme prokazovat **zvířecí protilátkou antigen** (přímý průkaz) nebo **antigenem protilátku v séru** (nepřímý průkaz)

Průkaz antigenu a antigenní analýza (pro připomenutí)

- **V rámci průkazu antigenu** (tedy přímého průkazu) lze ještě dále rozlišit dva podtypy:
 - **Přímý průkaz antigenu ve vzorku**, například ve vzorku mozkomíšního moku
 - **Antigenní analýza (identifikace) kmene**, izolovaného ze vzorku (například kmene meningokoka)
- U **nepřímého průkazu** naopak vždy pracujeme se vzorkem, a to **se vzorkem séra**, kde hledáme protilátky

A ještě trochu opakování: Interpretace

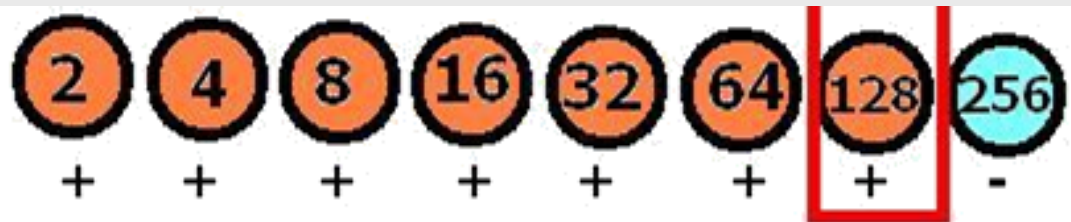
- **Průkaz antigenu** (včetně antigenní analýzy) je přímá metoda. Pozitivní výsledek znamená přítomnost mikroba v těle pacienta
- **Průkaz protilátek:** je to nepřímá metoda. Nicméně jsou způsoby, jak alespoň odhadnout, kdy přibližně se mikrob s tělem pacienta setkal:
 - **Množství protilátek** (**titr**) a hlavně **jeho změna**
 - **Třída protilátek:** IgM/IgG
 - **Avidita protilátek** – *síla vazby na antigen*

Jak tyto informace zjistit

- **Čerstvá infekce:** velké množství protilátek, převážně třídy IgM,¹ případně i IgA
- **Pacient po prodělané infekci:** malá množství protilátek, hlavně IgG² (imunologická paměť)



Vzestupy a poklesy titru

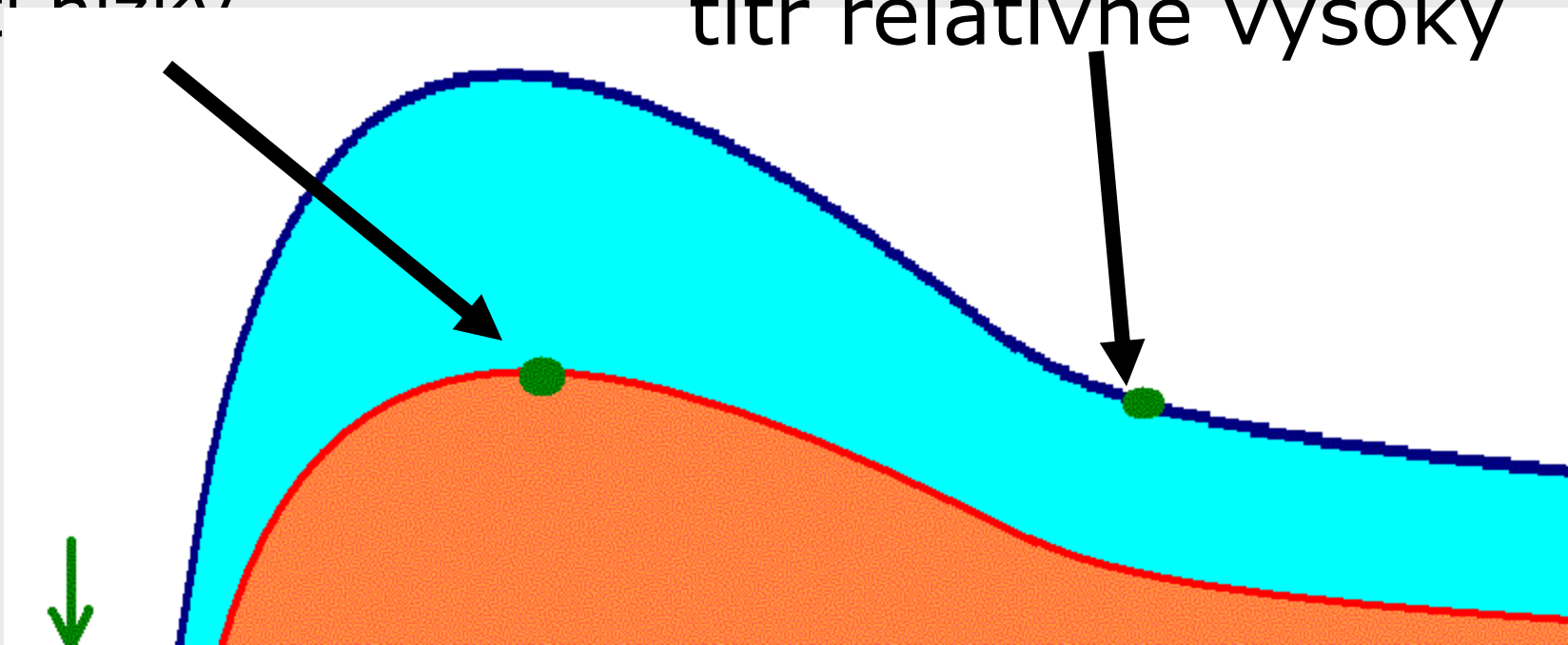


- **Titr** – nejvyšší ředění, kde je pozitivní reakce.
- Máme-li **dvě řady**, je titrem nejvyšší ředění z obou řad dohromady.
- Při použití geometrické řady znamená
 - vzestup/pokles titru **o jeden důlek dvojnásobný vzestup pokles**.
 - vzestup/pokles **o n důlků je pak vzestup/pokles 2^n násobný**.

Proč nestačí samotný titr

Někdy se stane, že málo reaktivní pacient má i v akutní fázi titr dosti nízký

Velmi reaktivní pacient má naopak i dlouho po infekci titr relativně vysoký



Párová a nepárová séra

- **Párová séra** = první vzorek je uchováván v ledničce, dokud nepřijde i druhý. Pak jsou oba hodnoceny naráz. **Čtyřnásobný vzestup** se v tom případě má za signifikantní pro akutní infekci. Bohužel párová séra nejsou běžná.
- **Séra nejsou párová** (druhý vzorek je vyšetřen zvlášť): zvětšuje se riziko náhodné chyby, proto zpravidla vyžadujeme **osminásobný vzestup** titru. Tyto údaje jsou však pouze orientační a liší se případ od případu.

Pořád musíte mít na paměti:

- Veškeré „srandičky“ typu titry, třídy protilátek, zjišťování avidity, slouží k odlišení akutní infekce, chronické infekce a stavu po dávno prodělané infekci. Týkají se ovšem pouze **nepřímého průkazu!**
- **Přímý průkaz** totiž přímo prokazuje v těle pacienta část patogenova organismu. Není tedy nutné žádné další upřesnění

Typy serologických reakcí a jejich způsoby využití

| | Průkaz antigenu | Antigenní analýza | Nepřímý průkaz |
|-----------------------|------------------------|--------------------------|-----------------------|
| Aglutinace | občas | často | někdy |
| Precipitace | málokdy | málokdy | občas |
| KFR | často (viry) | ne | často (viry) |
| Neutralizace | občas | ne | často |
| Značené složky | velmi často | výjimečně | velmi často |

Neutralizace

- Klasické, ale stále používané reakce
- Napodobují přirozenou funkci protilátek (protilátky blokují cytopatický či „erythrocytopatický“ efekt viru či toxinu)
- Hodí se jen u některých infekcí (virové infekce, infekce toxickými bakteriemi)
- Princip je jednodušší než u KFR

Neutralizační reakce: obecný princip

- Protilátky fungují několika způsoby. Jeden z nich je přímá neutralizace.
- Tento způsob se zřídka vidí u celých bakterií. Pozorujeme ho u virů nebo bakteriálních toxinů

*Nicméně někdy protilátky neutralizují i určitou charakteristiku celé bakterie, např. pohyblivost *Treponema pallidum* u tzv. Nelsonova testu (TPIT).*

Neutralizace schématicky

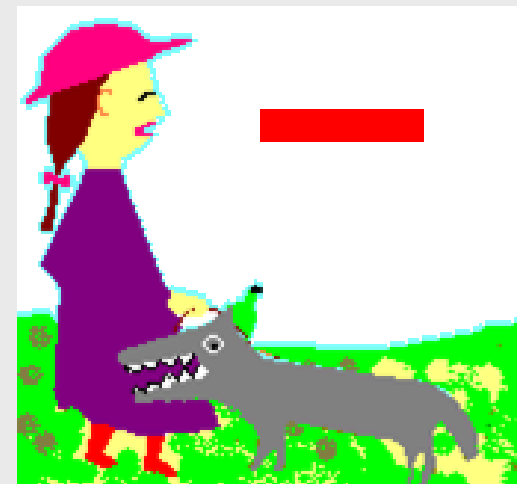
- Protilátka (Ig) brání efektu toxinu/viru na buňku / krvinku



Buňka ve tkáňové kultuře či červená krvinka

Protilátka

Toxin či virus



Buňka ve tkáňové kultuře či červená krvinka

Toxin či virus

Příklady neutralizačních reakcí

| Úkol | Neutralizován | Objekt | Reakce |
|------|-------------------------------|----------------------------|--------|
| 1 | Toxin bakterie (hemolyzin) | Erytrocyt hemolýza | ASLO |
| 2 | Virus | Erytrocyt shlukování | HIT |
| 3 | Virus | Buňka efekt metabolický | VNT |

Příklad 1: ASLO

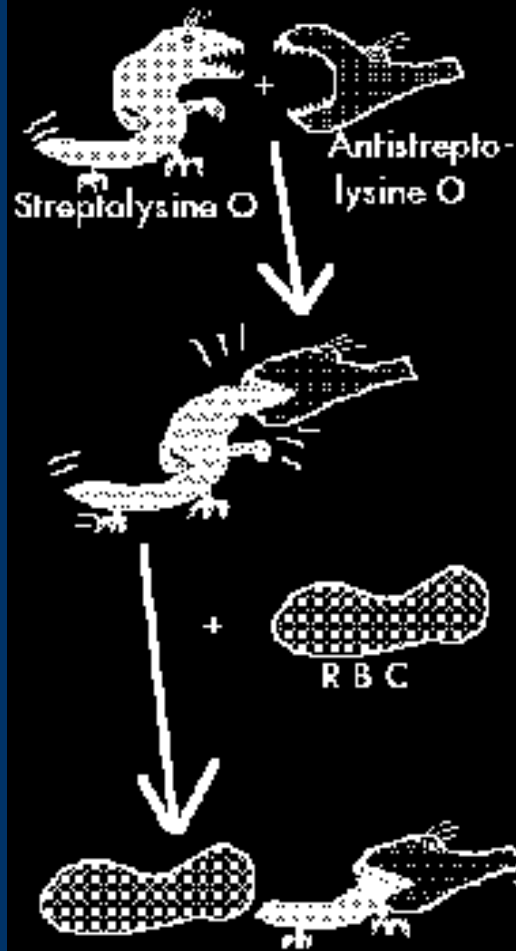
- **Protilátka (ANTISTREPTOLYZIN O) blokuje hemolytický efekt toxinu (streptolyzinu O) na krvinku.**
- **ASLO není nepřímý průkaz, přestože hledáme protilátky.** Nepátráme tu po patogenovi, určujeme samotné protilátky, jež mohou být nebezpečné
- U ASLO neužíváme geometrickou řadu. Hodnoty ředění jsou speciální.
- Titr nad cca 250 znamená možnost autoimunitní odpovědi

Proč se dělá ASLO

- Pomocí testu ASLO zjistíme, zda je přítomna **normální protilátková odpověď**, nebo **přemrštěná automimunita** s rizikem vývoje glomerulonefritidy nebo revmatické horečky
- **Test ASLO se provádí zpravidla po prodělané streptokokové infekci.** Průkazem protilátky se nesnažíme prokázat infekci (o té víme), ale zjistit, zda dochází k vývoji autoimunity. Je to tedy zvláštní případ, kdy vlastně nejde o nepřímý průkaz infekce, přestože prokazujeme protilátky.

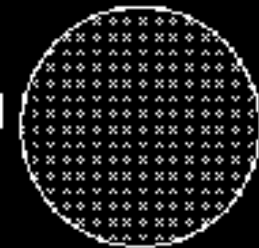
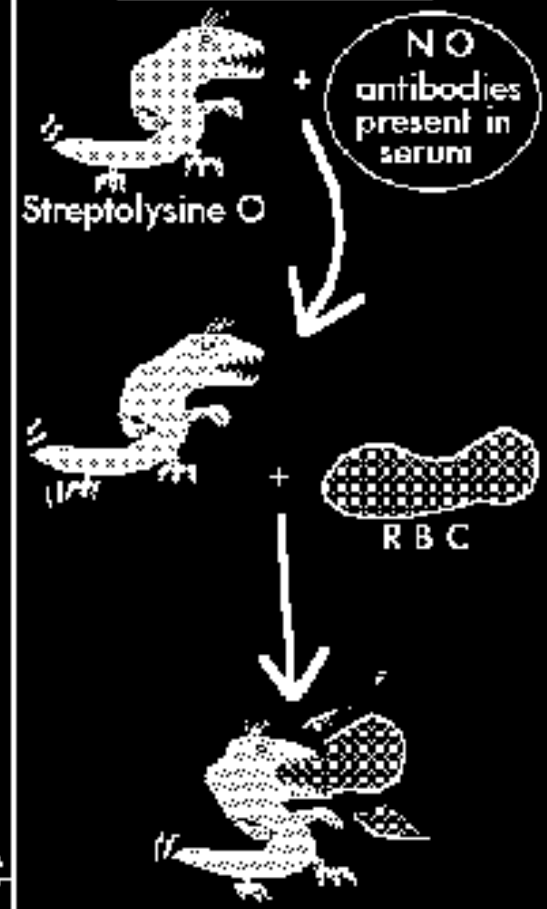
ASLO: princip

Positive reaction:



NO HAEMOLYSIS

Negative reaction:



HAEMOLYSIS

Hodnocení ASLO

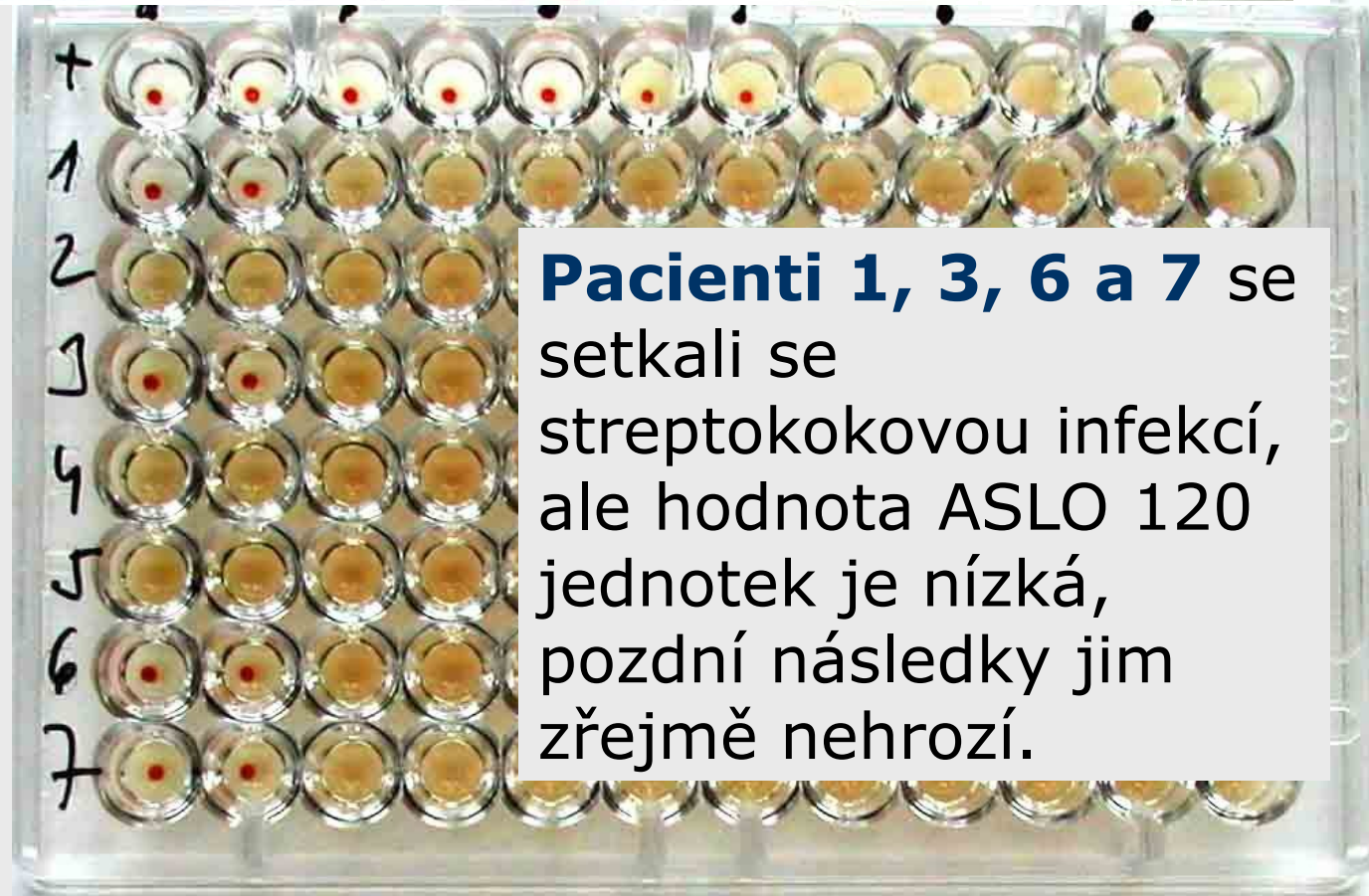
- Panel se odečítá naležato. První řádek prvního panelu je pozitivní kontrola, dále má každý pacient jeden řádek
- Nejvyšší ředění se zábranou hemolýzy (pozitivní reakce, projeví se sedimentací erytrocytů) je titer
- Titr 200 je hraniční, vyšší jsou pozitivní, nižší jsou negativní. Úplná absence protilátek znamená, že se pacient se streptokokovou infekcí nasetkal

| jam ka C. Prost nosa ml. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 100 | 120 | 150 | 180 | 225 | 270 | 337 | 405 | 506 | 607 | 759 | 911 |

Ukázka výsledku ASLO

Pozitivní kontrola je pozitivní (337 jednotek). Kdyby měl takovou hodnotu pacient, bylo by u něj velké riziko pozdních následků infekce.

| jamka | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| hodnota | 100 | 120 | 150 | 180 | 225 | 270 | 337 | 405 | 506 | 607 | 759 | 911 |



Pacienti 1, 3, 6 a 7 se setkali se streptokokovou infekcí, ale hodnota ASLO 120 jednotek je nízká, pozdní následky jim zřejmě nehrozí.

Příklad 2: HIT

- **H**emaglutinačně **I**nhibiční **T**est
- Pozor, tohle NENÍ aglutinace, je to **druh neutralizace!**
- Protilátka **neutralizuje virové shlukování krvinek** (in vitro vlastnost většiny virů)
- **Pozitivní reakce** = zábrana virového shluknutí → erytrocyty klesají na dno důlku
- **Negativní reakce** = viry se shluknou
- **Vypadá to jako hemaglutinace naruby**

Zapamatujte si:

- HIT není aglutinace, ale neutralizace virového shlukování krvinek
- HIT se liší od reakce ASLO především tím, že krvinek nejsou hemolyzovány, ale shlukovány. Stejně je naopak to, že specifická protilátka dokáže příslušnému efektu zabránit
- HIT v našem příkladu je „už zase“ klasický nepřímý průkaz (na rozdíl od ASLO)

HIT – vyhodnocení výsledků

- HIT se hodnotí v mikrotitrační destičce podobně jako např. KFR či ASLO
- Titr je poslední důlek, ve kterém je ještě tečka (nedošlo ke shluknutí krvinek a ty sedimentovaly na dno)
- Je to tedy úplně naopak než třeba u TPHA: tečka tu znamená pozitivitu, „chuchvalec“ negativitu

Příklad 3: VNT (nepleťte si to s TNT 😊)

- **V**irus **N**eutralizační **T**est
- Viry lze pěstovat na **buněčných kulturách**. Jsou to buněčné linie většinou embryonálních či nádorových buněk
- **Buněčná kultura** bývá poškozena účinkem virů. Škodu můžeme pozorovat např. jako
 - **změnu morfologie** buněk v kultuře
 - **změnu metabolismu** → změna pH → změna zbarvení v důlku (při použití indikátoru)
- Jsou-li přítomny **protilátky**, mohou tomuto vlivu na buňky zabránit

Ukázka vyhodnocení VNT

V pravém sloupci jsou různé kontroly, jinak žluté důlky ukazují pozitivitu a červené negativitu.

V prvním dvojřádku máme pacienta se stálým, nízkým titrem. V dalším dvojřádku je pacient, jehož titer se čtyřikrát zvýšil. Další pacient se s infekcí nikdy neseťkal. Poslední dvojřádek ukazuje pacienta se sérokonverzí.



Průběh protilátkové odpovědi – opakování

- **Protilátky IgM** se tvoří jako první, ale také jako první mizí. Neprocházejí placentou, jejich průkaz u novorozence je svědectvím jeho infekce
- **Protilátky IgG** se tvoří později a zůstávají jako paměťové přítomny dlouhodobě. Procházejí placentou

(novorozenec je tedy může mít od matky)



Protilátky ostatních tříd

- Protilátky třídy **IgA** se u některých infekcí vyšetřují místo protilátek IgM. Tato třída se uplatňuje hlavně u slizniční imunity, a tedy u infekcí, kde branou vstupu je sliznice (například gastrointestinální)
- Protilátky třídy **IgE** se vyskytují u alergií a infestací červy. Zpravidla se však nestanovují specifické IgE proti nějakému patogenovi
- S protilátkami **IgD** se v mikrobiologii nepracuje

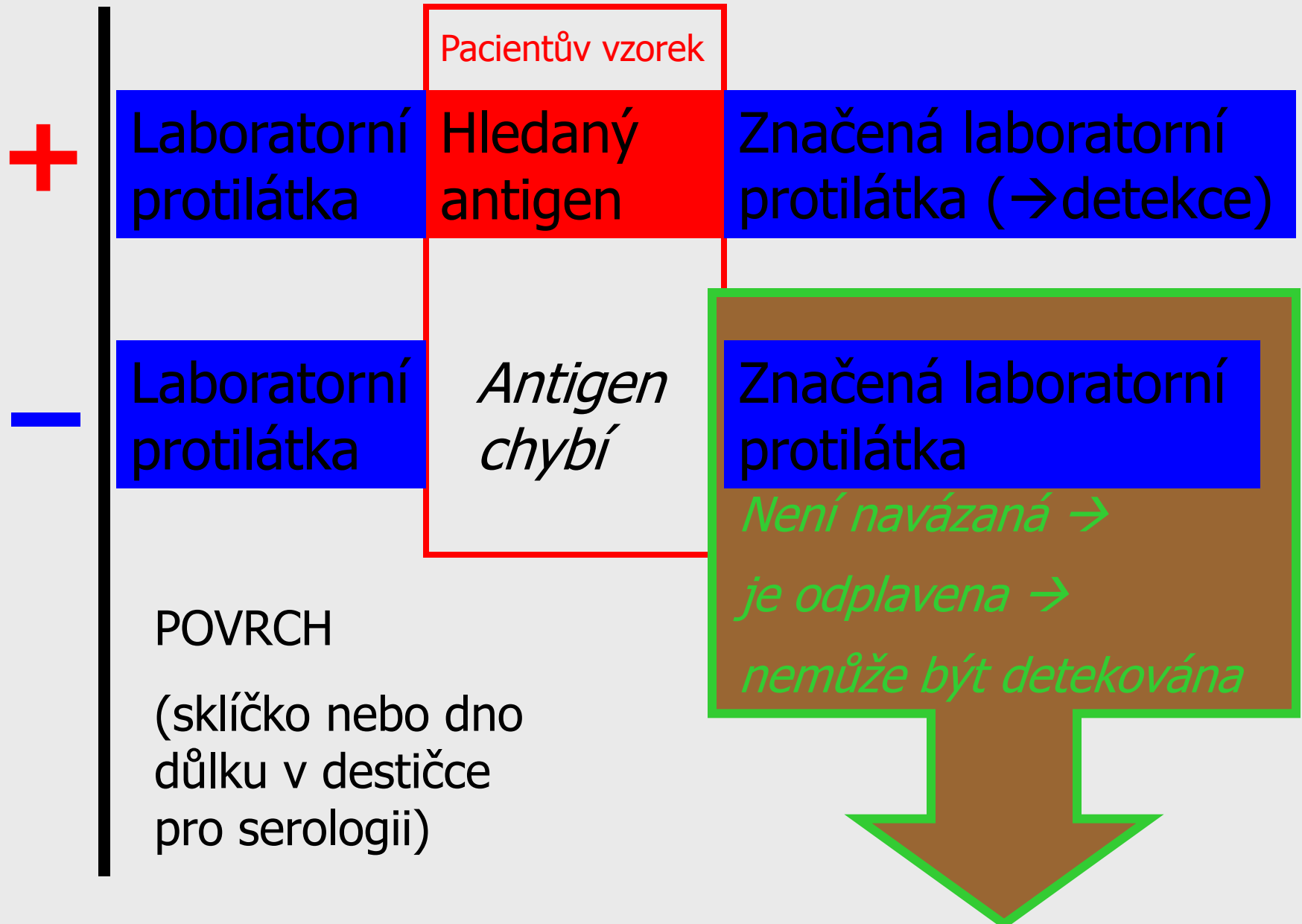
Reakce se značenými složkami

- Na povrch se postupně navazují jednotlivé složky
- Místo jedné ze složek se pokusíme navázat vzorek od pacienta, o kterém si myslíme, že danou složku možná obsahuje
- Je-li to pravda, složka se naváže
- Pokud se všechny složky postupně navážou, vznikne nepřerušovaný řetězec
- Na konci řetězce je vhodné značidlo

Promytí a jeho význam

- Pokud by v reakci zůstalo přítomno i to, co se na nic nenačázalo, nedokázali bychom odlišit pozitivní reakci od negativní
- Proto po každém kroku reakce následuje **promytí**, po kterém zůstanou přítomny pouze složky **navázané** na pevný povrch
- Je-li řetězec přerušen, odplaví promytí vše za místem přerušení

Příklad pozitivního a negativního průběhu

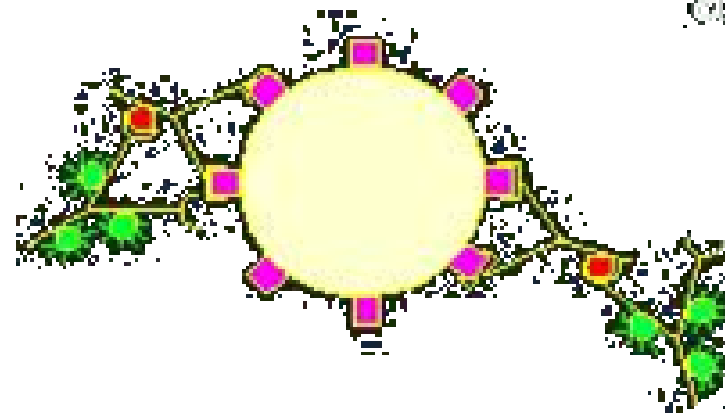
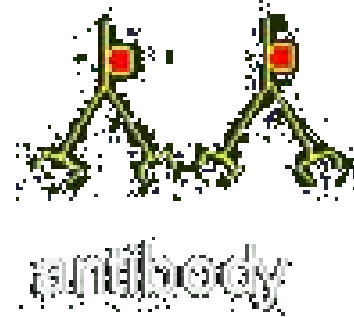


Typy značidel

- **Fluorescenční barvivo** je značidlem u imunofluorescence
- **Radioizotop** je značidlem u reakce RIA
- **Enzym** je značidlem u reakce ELISA
 - **Western blotting** je zvláštním případem reakce ELISA, kde jednotlivé antigeny jsou elektroforeticky rozděleny

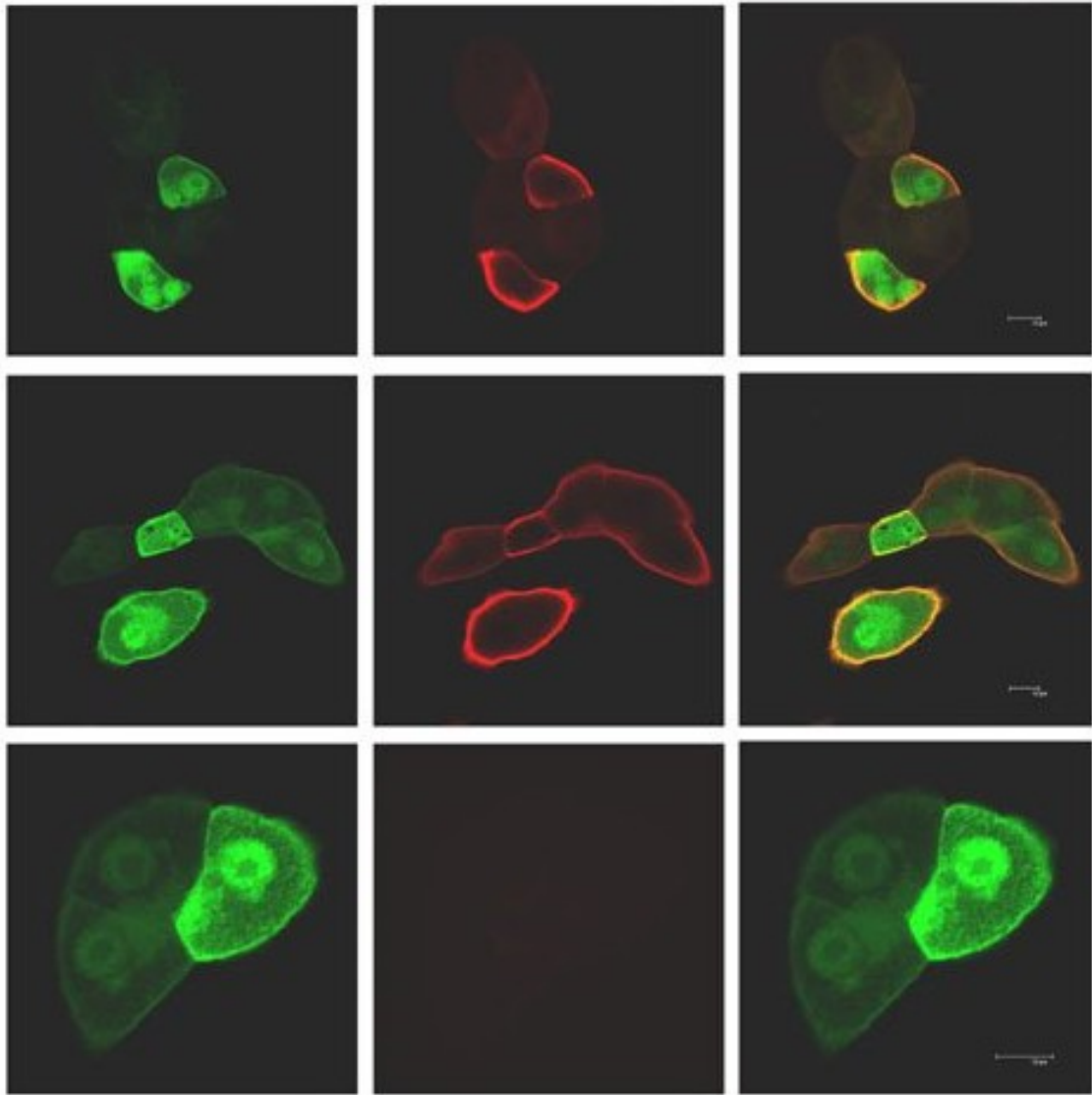
Používáme-li jako značidlo enzym, je poslední složkou přidanou do reakce ještě příslušný substrát – tedy jeden krok navíc.

Imunofluorescence



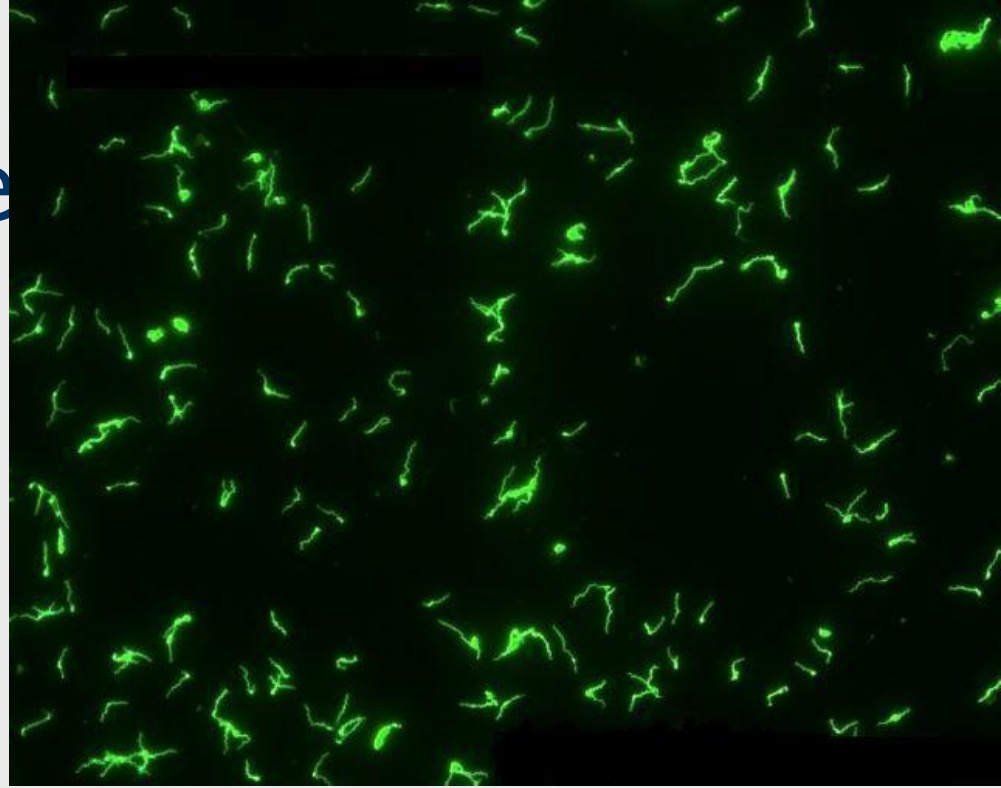
Imunofluorescence

www.amsbio.com



Imunofluorescence

Výhoda: Povrchem je tu podložní sklíčko. To nám umožňuje vidět tvar mikroorganismů.



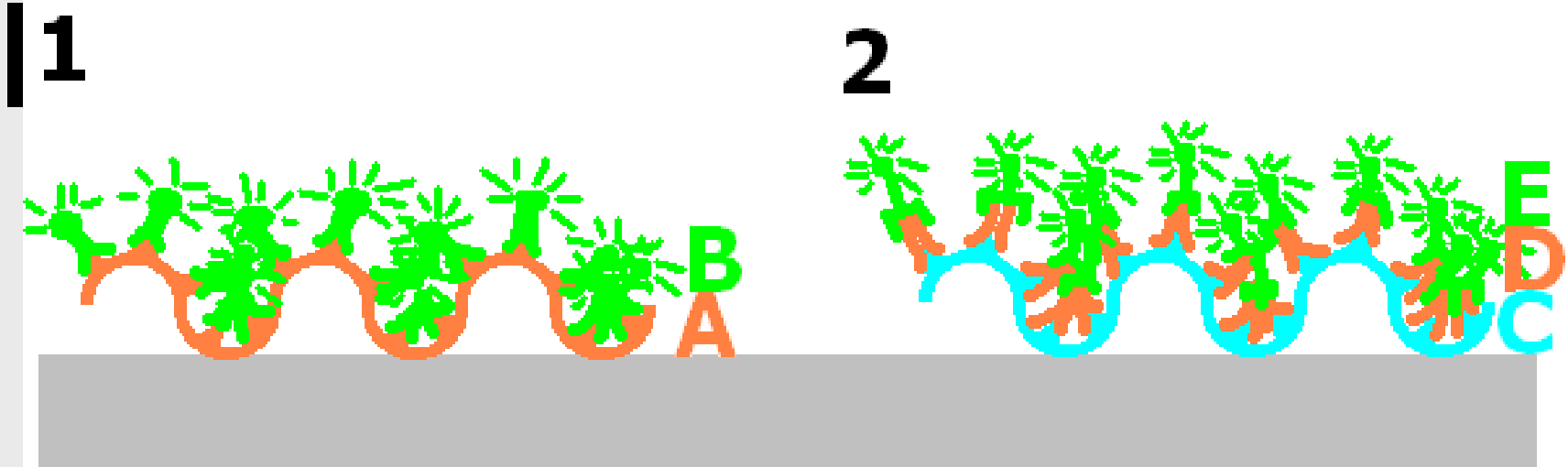
Přímá imunofluorescence

- (Povrch)-(antigen)-(značená protilátka)

Nepřímá imunofluorescence

- (Povrch)-(antigen)-(protilátka)-(značená protilátka proti lidské protilátce)

Imunofluorescence schematicky



A: *Treponema pallidum* – od pacienta

B: Značená protilátka proti *Treponema pallidum*

C: *Treponema pallidum* – z laboratoře

D: Protilátka proti *Treponema pallidum* – od pacienta

E: Značená protilátka proti lidské protilátce

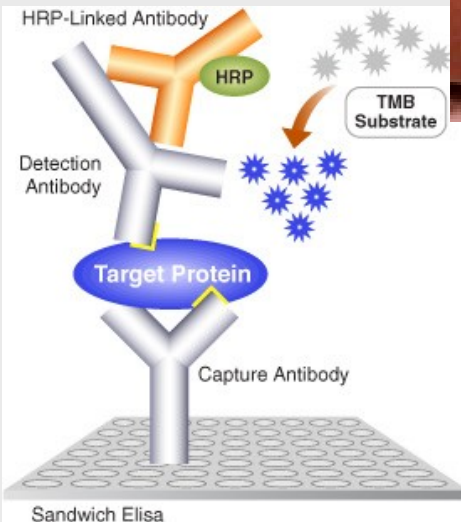
ELISA



ELISA



www.cellsignal.com



virology-online.com

ELISA – proč je tak oblíbená

- U reakce ELISA je na konci celého procesu **enzymatická reakce**. Její intenzita se projeví jednoduše: intenzitou zbarvení v důlku, kde reakce probíhá. **Sytá barva = vysoce pozitivní.**
- Nenáročnost z hlediska **nákladů a nulové radiační nebezpečí** je výhodou oproti radioimunoassayím
- Možnost **automatizace** je velkou výhodou oproti imunofluorescenci

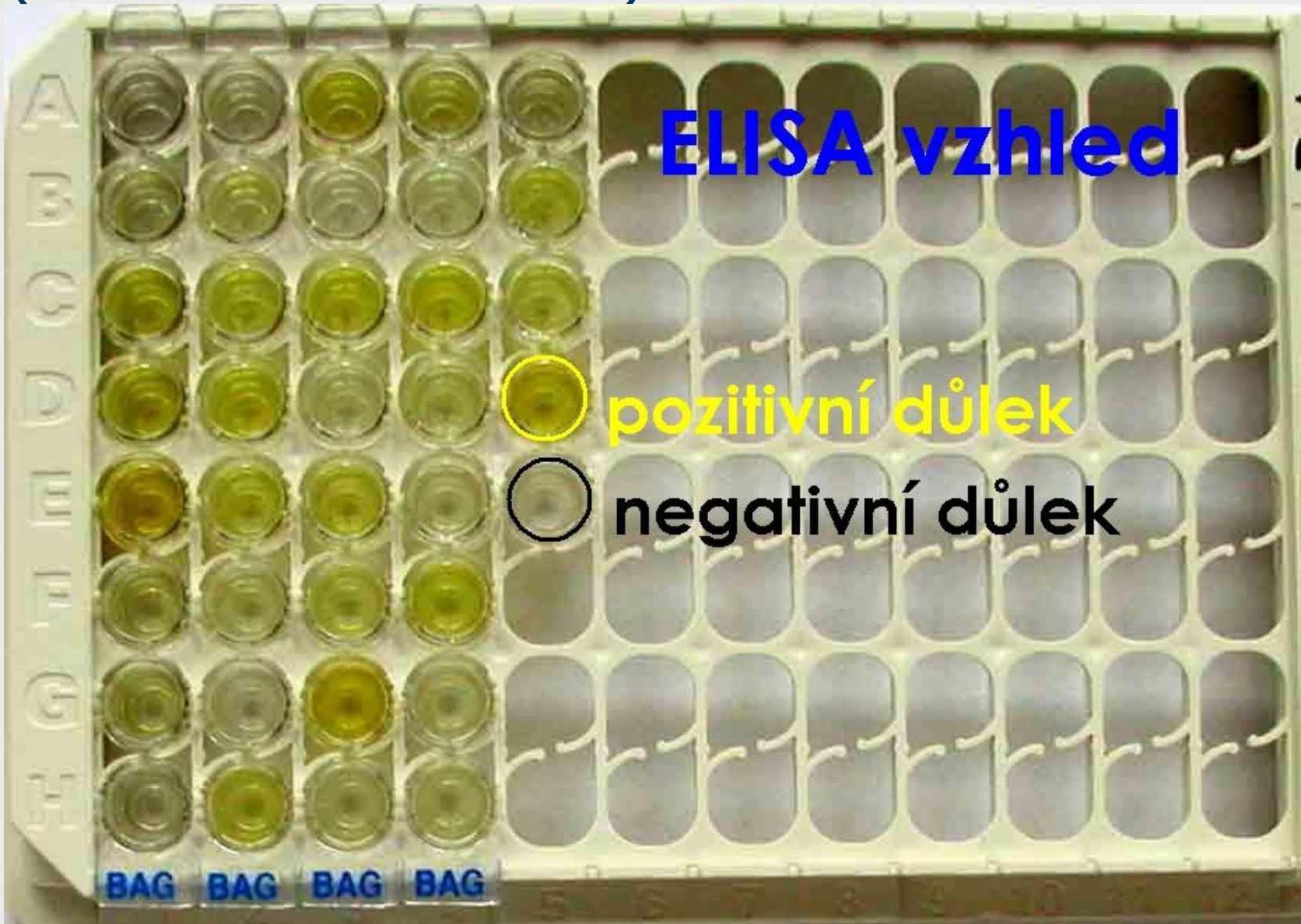
ELISA – praktické provedení

- Zpravidla máme k dispozici destičku s jamkami. Na rozdíl od klasických serologických reakcí má každý pacient nikoli celý řádek, ale jen jeden důlek. To proto, že nezjišťujeme titry
- Před vlastními důlky pacientů mohou být důlky:
 - BI – blank (pro kalibraci spektrofotometru)
 - K- a K+ – pozitivní a negativní kontrola
 - Cut off (dva či tři důlky) – výrobcem dodané „vzorky“ s právě hraniční hodnotou absorbance („odsekávají“ pozitivní výsledky buď ostře, nebo s rozmezím plus minus 10 %)

Vždy záleží na konkrétní reakci ELISA a jejím provedení. Někdy chybí blank, někdy není cut off přímo obsažen v destičce, ale počítá se jako průměr negativních kontrol + konstanta.

ELISA – ukázka

(www.medmicro.info)



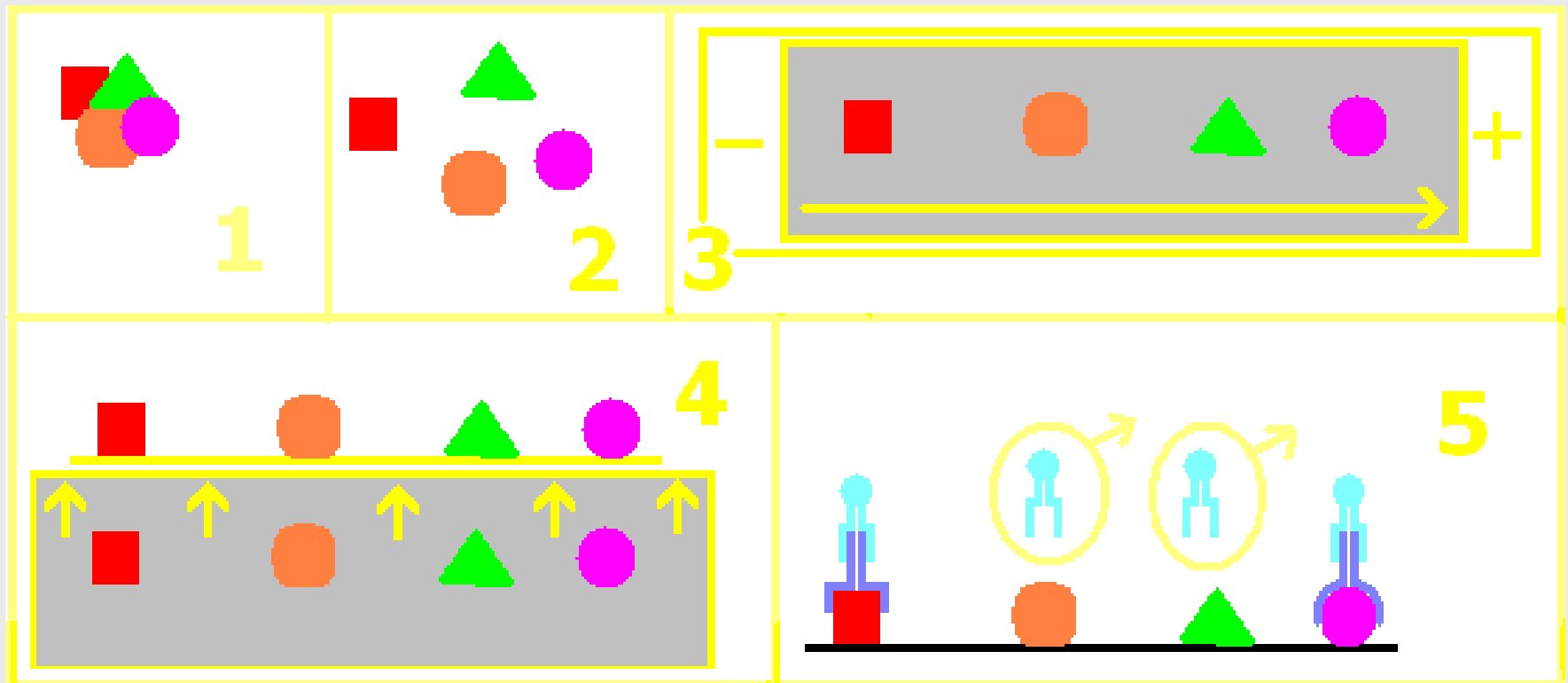
Western blotting

- *Název – slovní hříčka (badatel Southern)*
- Prakticky je to ELISA, ale směs antigenů je **rozdělena elektroforeticky** na jednotlivé antigenní determinanty
- Je tedy **přesnější** a pomáhá zejména tam, kde klasická ELISA traskotá na zkřížené pozitivitě např. příbuzných mikroorganismů

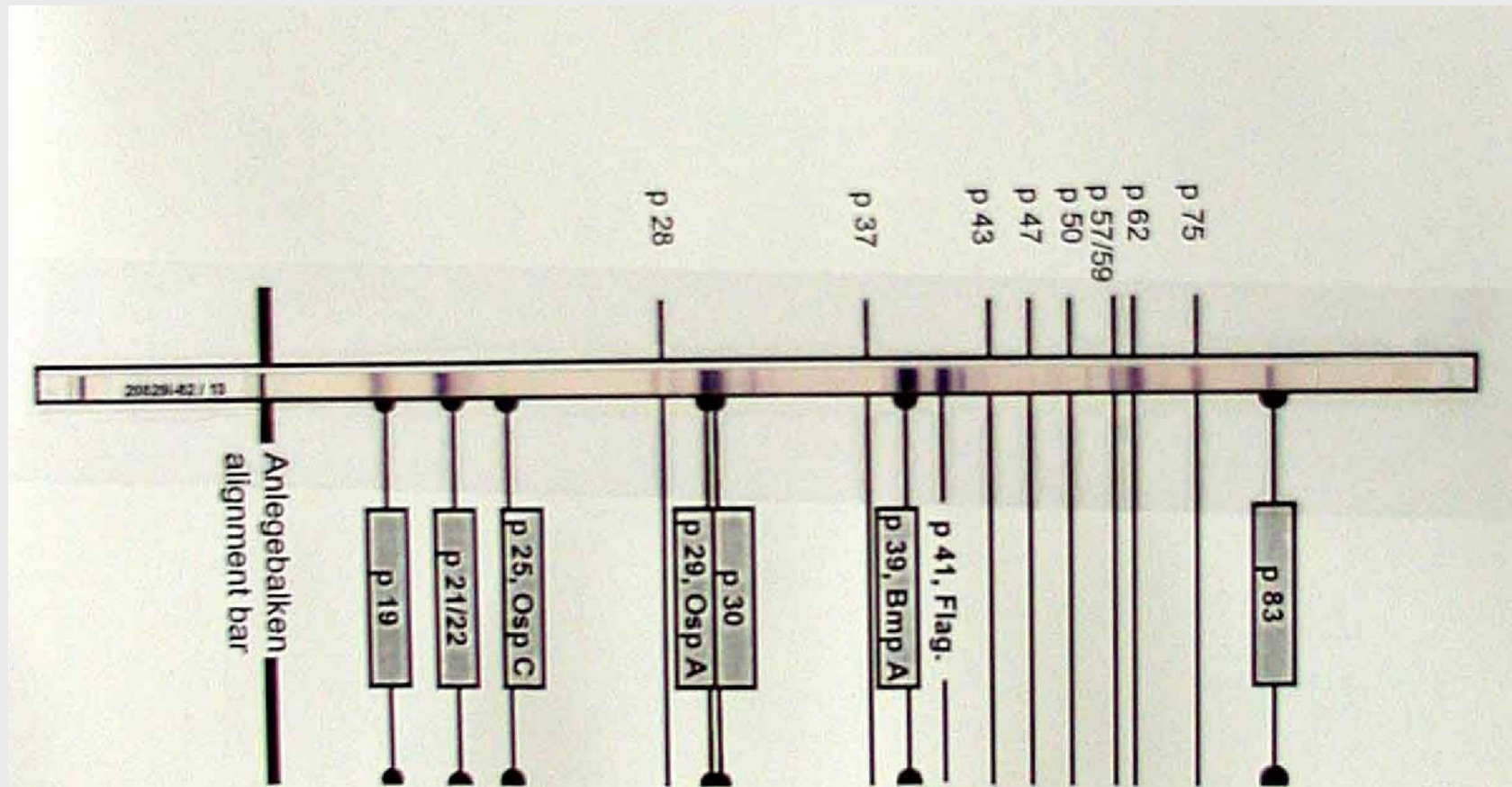
Western blotting – princip

- 1: původní antigen (směs)
- 2: uvolnění jednotlivých antigenů detergentem
- 3: elektroforetické rozdělení antigenů

- 4: „přesátí“ rozdělených antigenů na nitrocelulózu
- 5: reakce ELISA (přítomny jsou jen některé protilátky)



Western blot – vzhled (obrázek z www.medmicro.info)



Možnosti uspořádání složek bleděmodře vždy složka pocházející ze vzorku získaného od pacienta

- Povrch-antigen-protilátka-značidlo (P)
- Povrch-protilátka-antigen-protilátka-značidlo (P, např. průkaz HBsAg)
- Povrch-antigen-protilátka-antigen-značidlo (N)
- Povrch-antigen-protilátka-konjugát-značidlo (N)

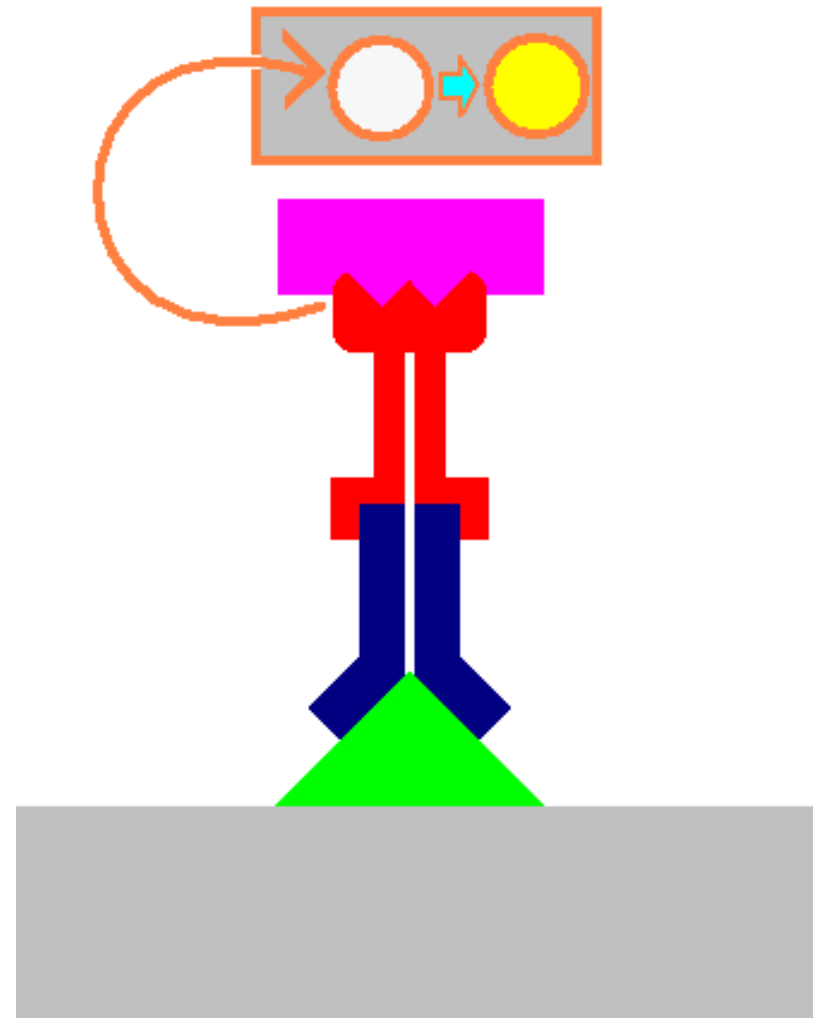
Konjugát je protilátka namířená proti lidské protilátce

Význam konjugátu

- Konjugát se používá zpravidla u reakcí nepřímého průkazu (průkaz protilátek)
- Je to protilátka, pro kterou je antigenem lidská protilátka např. IgM nebo IgG
- Dokáže být selektivní proti určité třídě lidské protilátky
- Použití konjugátu je tedy podstatou možnosti selektivního průkazu jednotlivých tříd protilátek

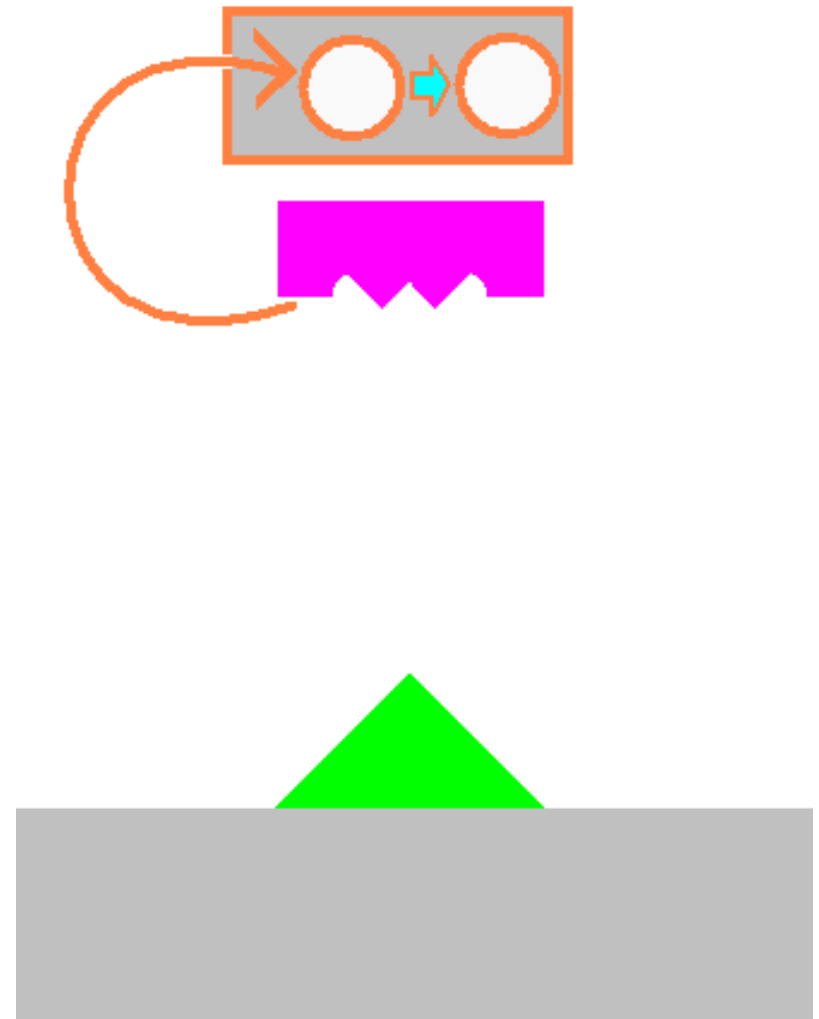
ELISA k detekci
protilátky:
1. Pozitivní
(hledá se IgM,
IgM přítomna)

Všechny složky se
postupně
navazují. Dojde
k enzymatické
reakci – změně
barvy v důlku



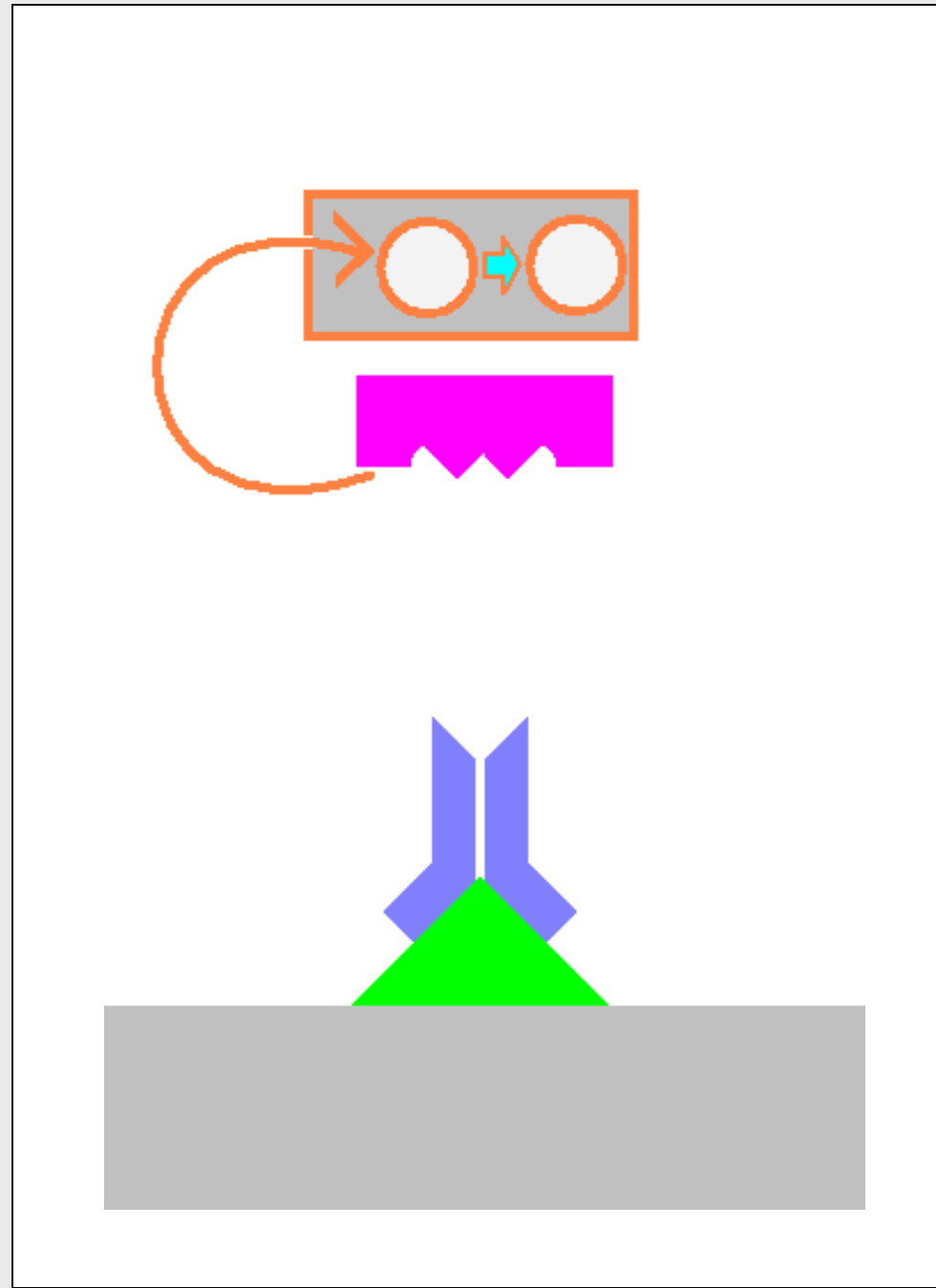
ELISA k detekci
protilátky:
2. Negativní I
(hledá se IgM,
žádné
protilátky)

V séru pacienta
nejsou protilátky.
Konjugát je
odplaven, v důlku
není žádná změna.



ELISA k detekci protilátky: 3. Negativní II (hledá se IgM, přítomny IgG)

V séru pacienta jsou
jen IgG protilátky.
Konjugát je
odplaven, ke změně
barvy důlku nedojde



ELISA, průkaz antigenu

- U reakce ELISA je na konci celého procesu **enzymatická reakce**. Její intenzita se projeví intenzitou zbarvení v důlku, kde reakce probíhá
- Intenzitu zbarvení lze měřit **spektrofotometricky**
- Za **pozitivní** se považují hodnoty vyšší než referenčně daný tzv. „cut off“
- Například se u konkrétní se cut off může počítat třeba jako
- $(A1 + B1 + C1)/3 + 0,050$

ELISA, průkaz protilátek

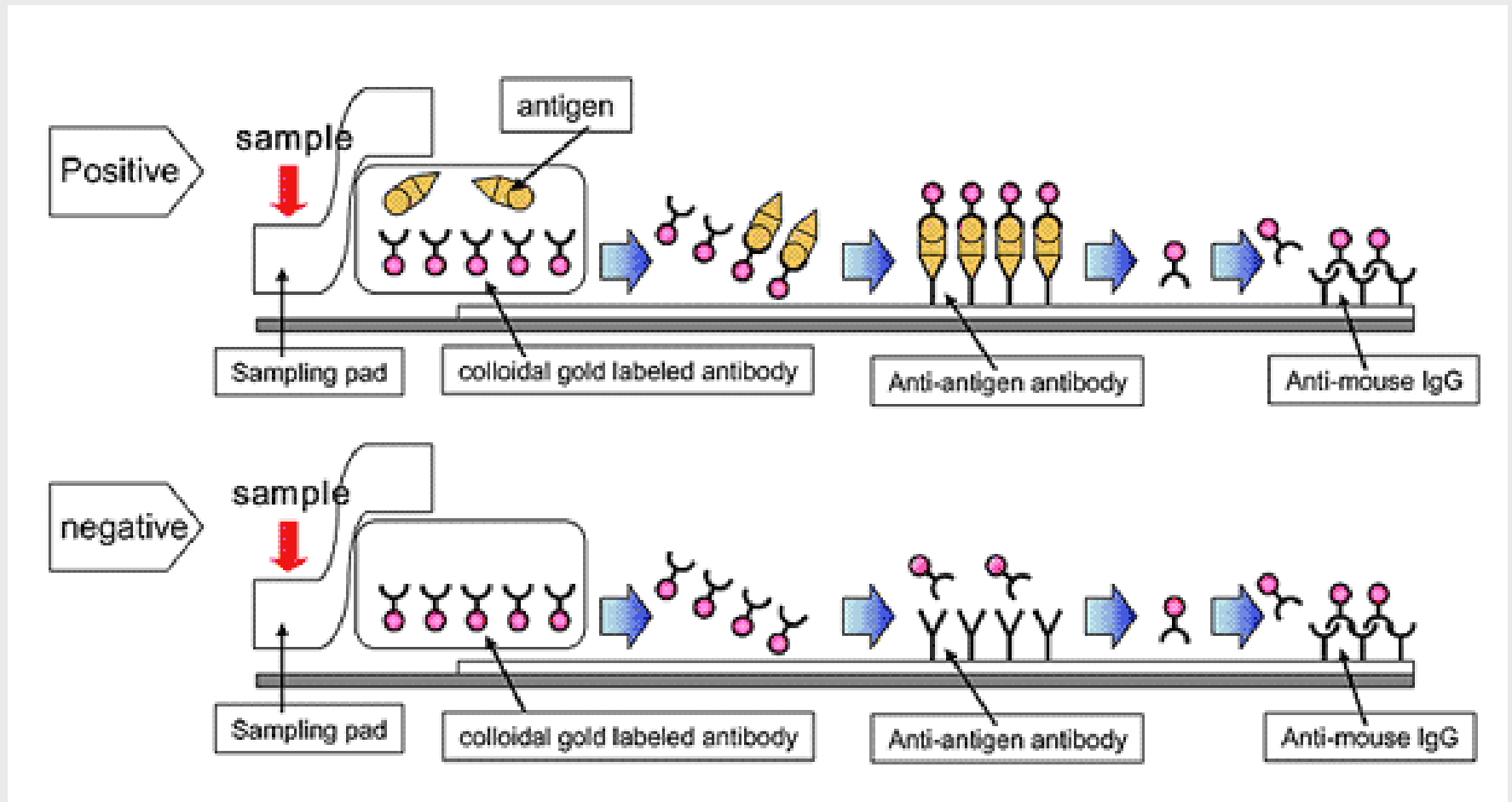
- U nepřímého průkazu reakcí ELISA se zpravidla hodnotí zvlášť protilátky IgM a IgG
- V daném případě se místo IgA používá IgM
- Za **pozitivní** se opět považují hodnoty vyšší než referenčně daný tzv. „cut off“
- Takže se například použije vzorec
 **$(B1 + C1)/2 + 0,320$ v případě IgA, resp.
 $(B3 + C3)/2 + 0,320$ v případě IgG**
- Výsledky mezi 90 % a 110 % cut off se často hodnotí jako „**hraniční**“, pod 90 % jako „**negativní**“, nad 110 % jako „**pozitivní**“

Imunochromatografické testy

- Imunochromatografické testy jsou založeny na **navazování jednotlivých komponent** podobně jako předchozí
- Důležitým rozdílem je, že zde **není promytí**. Některé komponenty jsou navázány na povrch na určitých místech (testovací a kontrolní místo), další se hned naváží na testovanou složku a spolu s ní **cestují porézní vrstvou**. V pozitivním případě je zpravidla pozorován proužek u testu i u kontroly, v negativním jen u kontroly.

Příklad principu imunochromatografického testu

http://www.bl-inc.jp/images/immuno_ge.gif

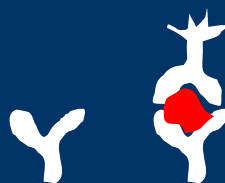


Princip (jen jedna z možností)

+

Testovací
oblast

Kontrolní
oblast



-



Imunochromatografické testy: výhody

- Jsou velmi **rychlé** (desítky minut)
- Jsou velmi **jednoduché** → některé se nedělají v laboratoři, ale přímo u pacienta
- Jsou dostatečně **přesné**
- Mohou být použity pro **mnoho účelů** (včetně mimomikrobiologických, například těhotenský test)

Nevýhoda: jsou poměrně drahé ve srovnání s tradičními testy

Přeji Vám hezký
zbytek dne...

*(Obraz s názvem
Protilátka)*



www.twitchfilm.net/archives/

003401.html