

Lékařská mikrobiologie pro ZDRL

Týden 11 - 13:

Komplementfixace, neutralizace

Reakce se značenými protilátkami (včetně WB)



Ondřej Zahradníček 777 031 969

zahradnicek@fnusa.cz ICQ 242-234-100

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

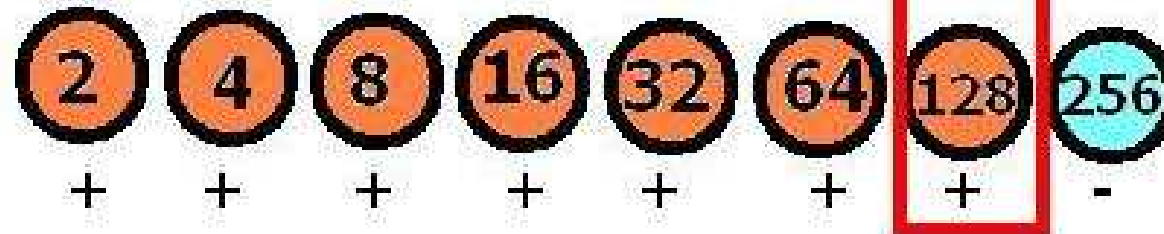
- **Průkaz antigenu** (včetně antigenní analýzy) je přímá metoda. Pozitivní výsledek znamená přítomnost mikroba v těle pacienta
- **Průkaz protilátek:** je to nepřímá metoda. Nicméně jsou způsoby, jak alespoň odhadnout, kdy přibližně se mikrob s tělem pacienta setkal:
 - **Množství protilátek** (**titr**) 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, případně i IgA 1
- **Pacient po prodělané infekci:** malá množství protilátek, hlavně IgG (imunologická paměť) 2



Vzestupy a poklesy titru

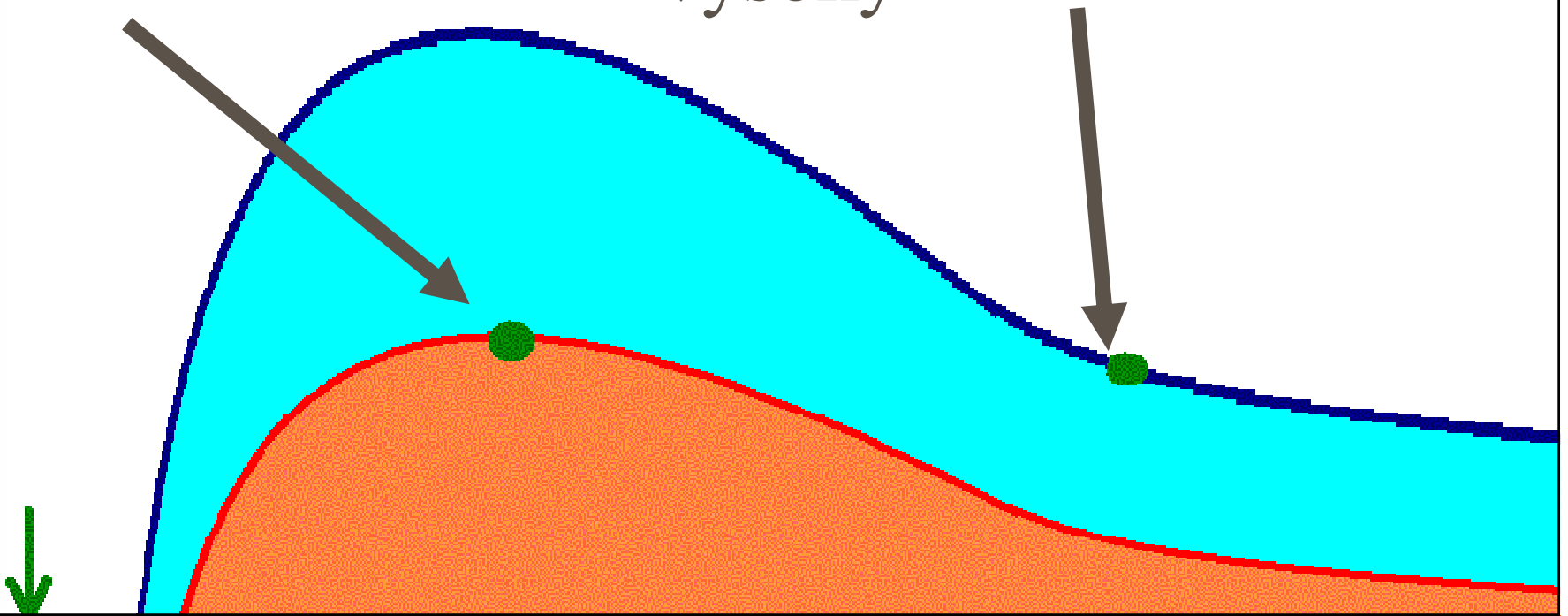


- **Titr** – nejvyšší ředění, kde je pozitivní reakce.
- Máme-li **dvě řady**, je titrem nejvyšší ředění z obou řad dohromady.
- Při použití geometrické řady znamená
 - vzestup/pokles titru **o jeden důlek dvojnásobný vzestup pokles.**
 - vzestup/pokles **o n důlků je pak vzestup/pokles 2^n násobný.**

Proč nestačí samotný titer

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

Velmi reaktivní pacient má naopak i dlouho po infekci titer 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

1. Komplementfixace (KFR)

- Komplement = složka imunitní reakce
- Pro KFR používáme morčecí komplement. Pacientův komplement je před reakcí inaktivován
- Komplement není schopen vázat se na samotný antigen
- Komplement není schopen vázat se na samotnou protilátku
- Komplement je schopen vázat se pouze na KOMPLEX obou

Komplement – na co se váže:

- **KOMPLEMENT + POUHÝ ANTIGEN:
neváže se**
- **KOMPLEMENT + PROTILÁTKA:
neváže se**
- **KOMPLEMENT + KOMPLEX
ANTIGENU S PROTILÁTKOU:
vazba**



Princip komplementfixace

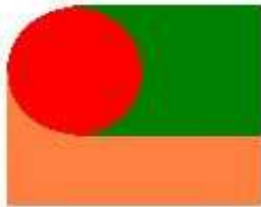





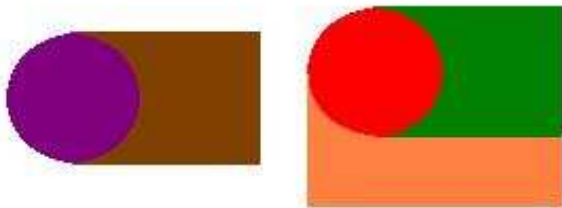
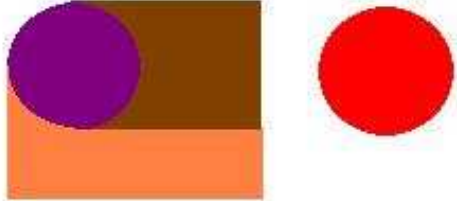





- Komplement se tedy **váže na komplex antigen-protilátka** (nezůstává žádný volný komplement) To ale samo o sobě není vidět.
- Proto používáme ještě tzv. **indikátorový komplex** – beraní erythrocyty + králičí protilátky proti nim. V případě, že se na zbyl volný komplement, naváže se na indikátorový systém a dojde k hemolýze

Pokus k ověření funkce komplementu

Amboceptor = králičí protilátka proti beraním erytrocytům

1. Beraní ery + amboceptor bez komplementu
→ není hemolýza (chybí komplement)
2. Beraní ery + komplement bez amboceptoru
→ není hemolýza (chybí protilátky)
3. **Beraní ery + komplement + amboceptor → hemolýza (všechny složky přítomné)**
4. Králičí ery + komplement + amboceptor →
není hemolýza (chybí „ten správný“ antigen)

Princip KFR (negativní, pozitivní)

+	-	
1 	1 	 antigen  antibody protilátka
 vázaný - bound	 volný - free	
2 	2 	 complement  beraní ery sheep RBC
NO HEMOLYSIS NENÍ HEMOLÝZA	HEMOLYSIS HEMOLÝZA	 amboceptor
		



Problémy s KFR

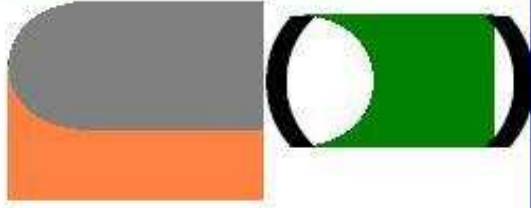
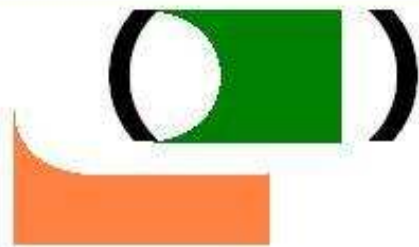




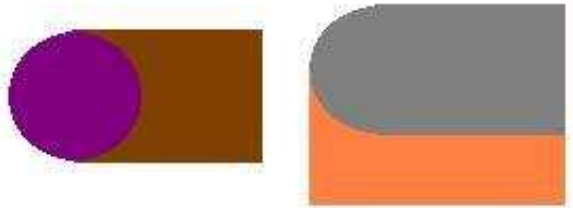
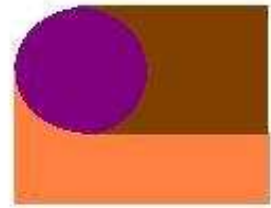





- Příliš mnoho komplementu → falešná negativita. **Co dělat?** Titrovat komplement (viz další obrazovka)
- Některá složka séra sama o sobě vyvazuje komplement (složka antikomplementarity): falešně pozitivní výsledky. **Co dělat?** Provést test antikomplementarity. Je to vlastně „skoro normálně“ provedená reakce, ovšem bez antigenu



Titrace komplementu

- Pro reakci potřebujeme množství morčecího komplementu, které není moc velké ani malé.
- Proto zjišťujeme, jaké množství komplementu hemolyzuje pracovní jednotku krvinek s amboceptorem (hemolytická jednotka)

Test antikomplementarity

SERUM NOT OK	SERUM OK	
1 	1 	 složka zodpovědná za antikomplementaritu anticomplementarity component
 vázaný - bound	 volný - free	 antibody protilátka
2 	2 	 complement
NO HEMOLYSIS NENÍ HEMOLÝZA	HEMOLYSIS HEMOLÝZA	 beraní ery sheep RBC
		 amboceptor

Použití KFR

- KFR lze použít pro diagnostiku **mnoha, zejména virových infekcí**
- Jako i jiné serologické reakce se KFR používá k **průkazu antigenu či protilátky**
- Častější je ale průkaz protilátky, proto se jím budeme zabývat víc
- Berme to tedy tak, že máme **laboratorní antigen**, který konfrontujeme se **sérem pacienta** (kde hledáme protilátky)

2. 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



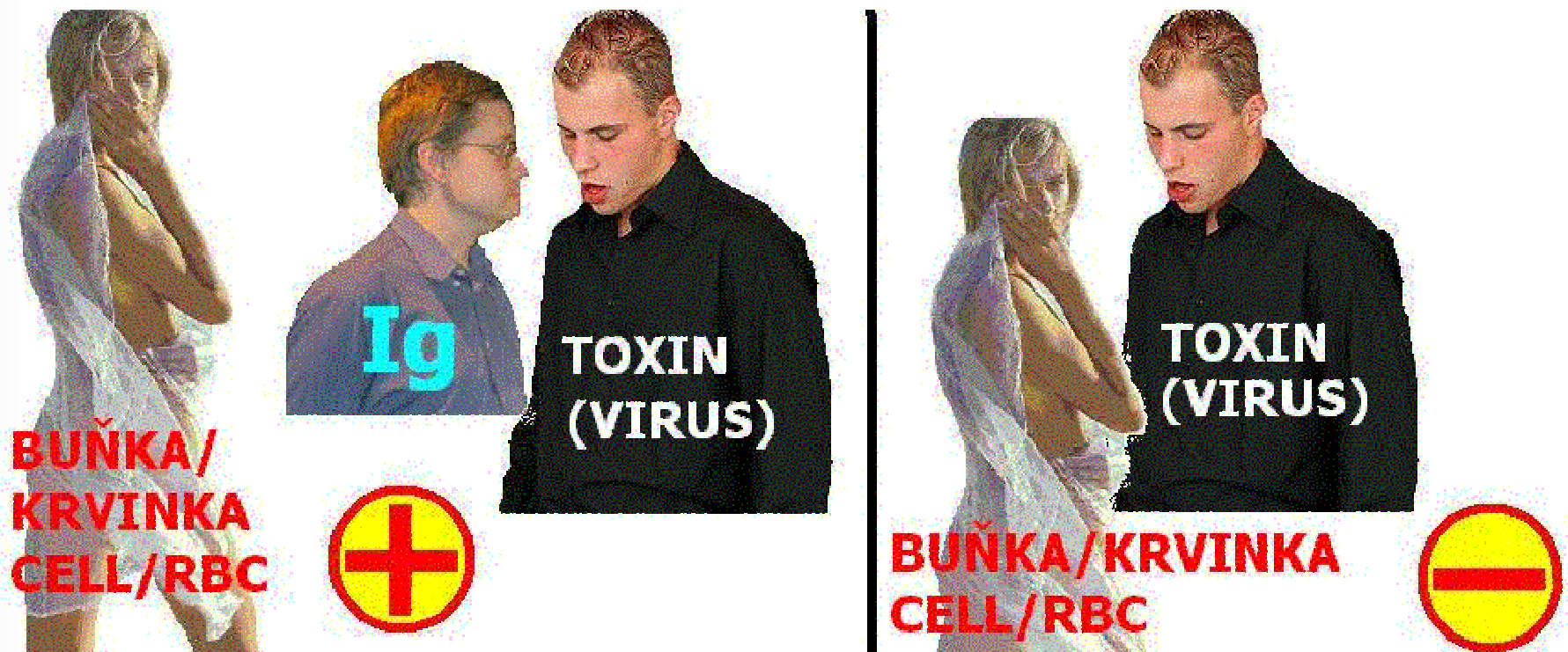
Neutralizační reakce: obecný princip

- 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
- Příklad: ASLO (Toxin = streptolyzin O, Ig = antistreptolyzin O, krvinka)



Příklady neutralizačních reakcí

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

Příklad 1: ASLO

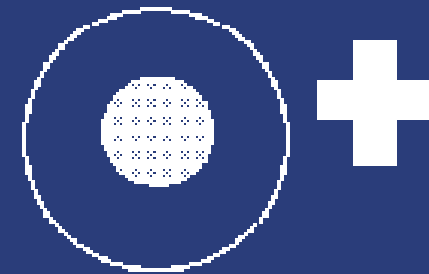
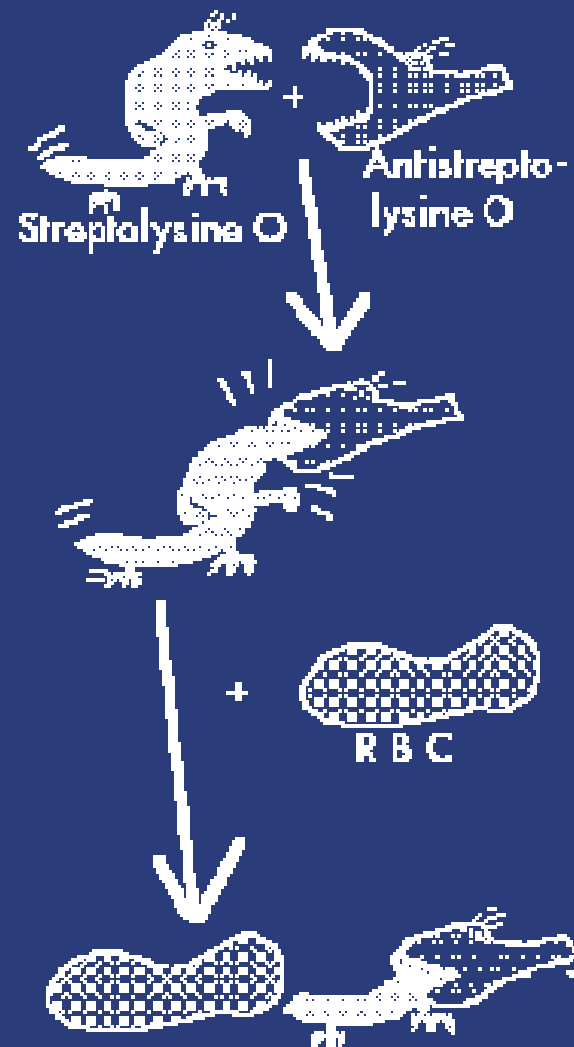
- Protilátka (**ANTISTREPTOLYZIN O**) blokuje hemolytický efekt toxinu (streptolyzinu O) na krvinku.
- ASLO není nepřímý průkaz, přestože hledáme protilátky. Nepátráme tu po patogenovi, určujeme samotné protilátky, jež mohou být nebezpečné
- U ASLO neužíváme geometrickou řadu. Hodnoty ředění jsou speciální.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

Proč se dělá ASLO

- Pomocí testu ASLO zjistíte, 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. Nejde tedy vlastně o nepřímý průkaz, přestože prokazujeme protilátky.

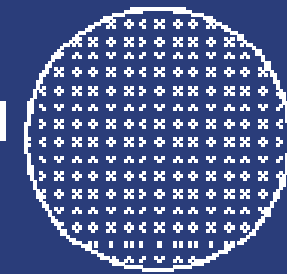
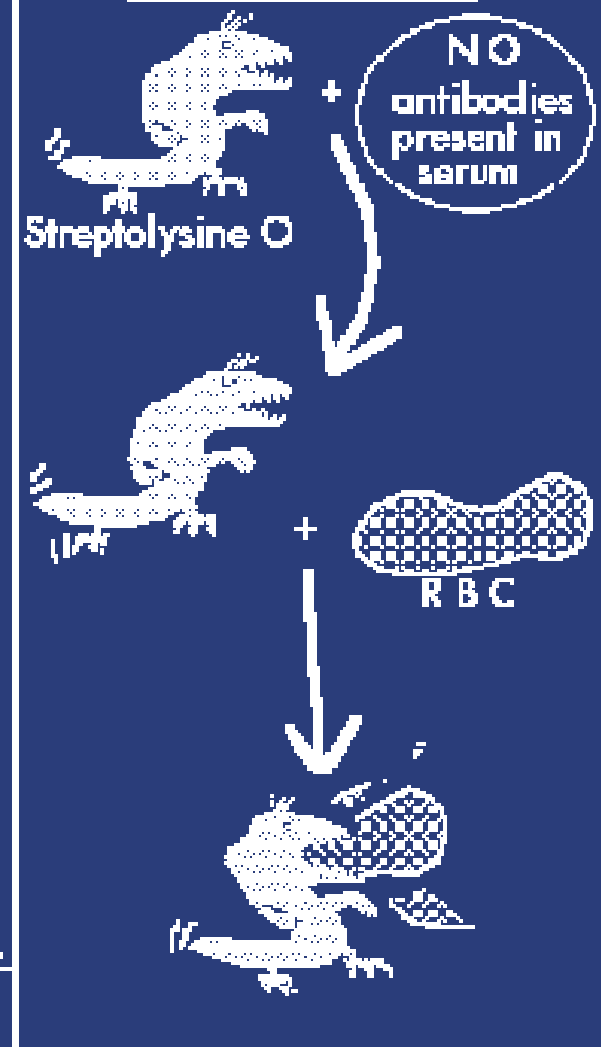
ASLO: princip

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 titr
- Titry cca 225 – 270 jsou hraniční, vyšší jsou pozitivní, nižší jsou negativní. Úplná absence protilátek znamená, že se pacient se streptokokovou infekcí neseťkal

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

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**

Úkol 3: VNT (nepleťte si to s TNT ☺)

- **Virus Neutralizační Test**
- 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

3. Reakce se značenými složkami

- Moderní reakce, čím dál více používané
- Používají se k průkazu protilátek i antigenů
- Na rozdíl od všech ostatních umožňují selektivní detekci různých tříd protilátek proti danému antigenu
- Patří sem imunofluorescence, reakce RIA, reakce ELISA a Western blotting

Průběh protilátkové odpovědi z hlediska tříd Ig

- **Protilátky IgM** se tvoří jako první, ale také jako první mizí. Neprocházejí placentou, jejich průkaz u novorozence je tedy 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. Zpravidla se však nestanovují specifické IgE proti nějakému patogenovi
- S protilátkami **IgD** se v mikrobiologii nepracuje



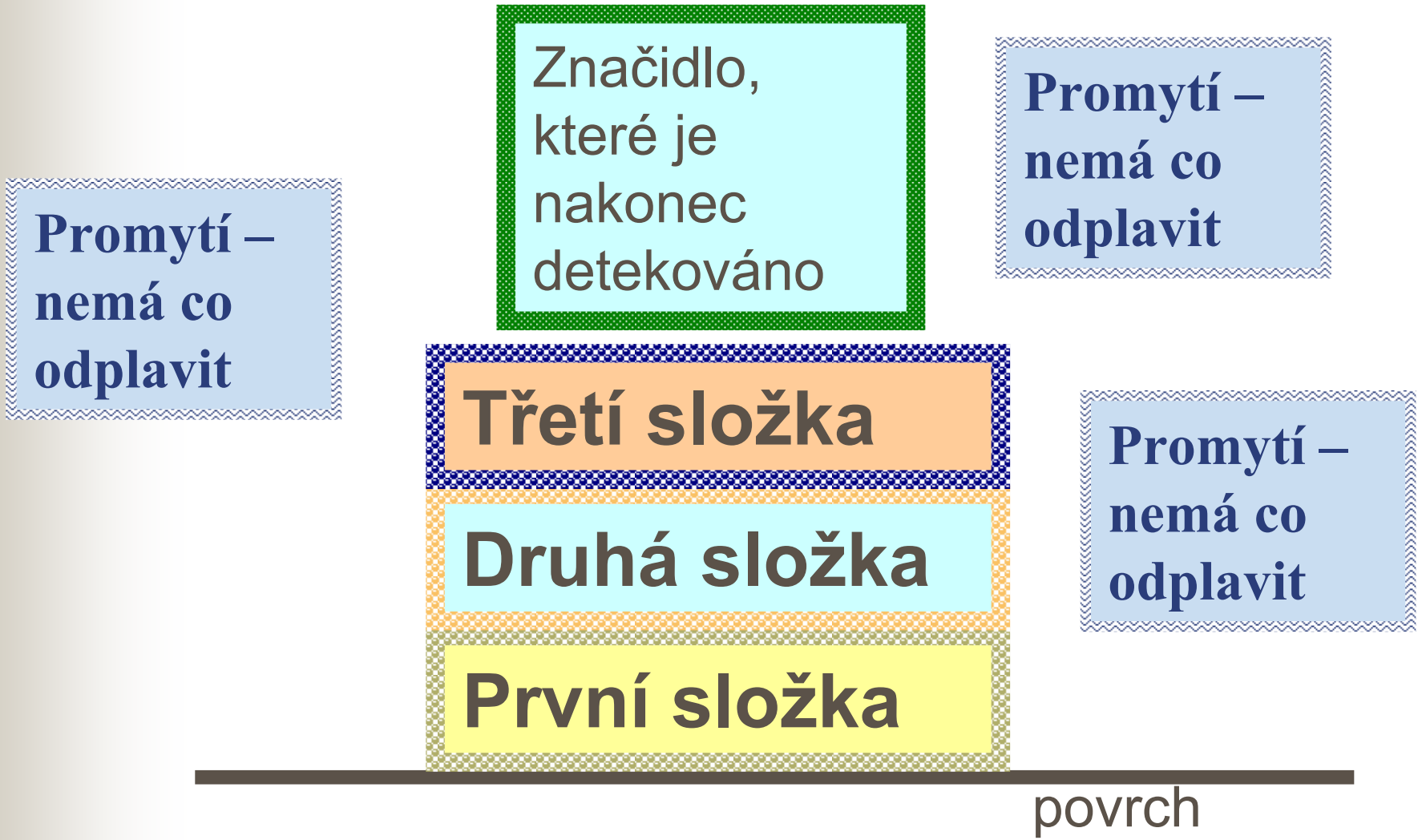
Reakce se značenými složkami

- **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 nenavázalo, 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

Průběh pozitivní reakce (zde možnost se třemi složkami – mohou ale také být jen dvě)



Průběh negativní reakce (možnost se třemi složkami)

Důležité je promytí po každém kroku. Odstraní vše, co není navázáno, tedy nakonec i značidlo.

Promytí –
nemá co
odplavit
nemá co
odplavit

Značidlo,
které by bylo
detekováno

Třetí složka

Chybí druhá složka (vzorek negativní)

První složka

Promytí –
odplaví třetí
složku i se
značidlem

povrch

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.

Možnosti uspořádání složek

modře 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)

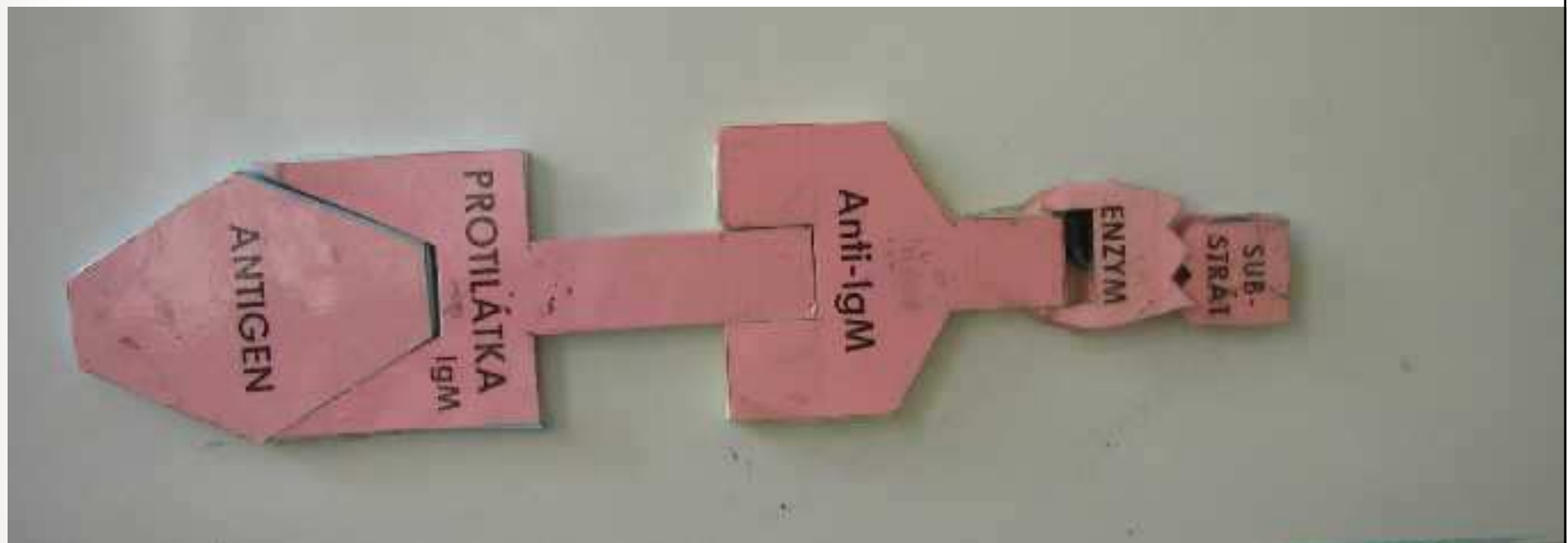
Konjugát je protilátka namířená proti lidské protilátce

Význam konjugátu

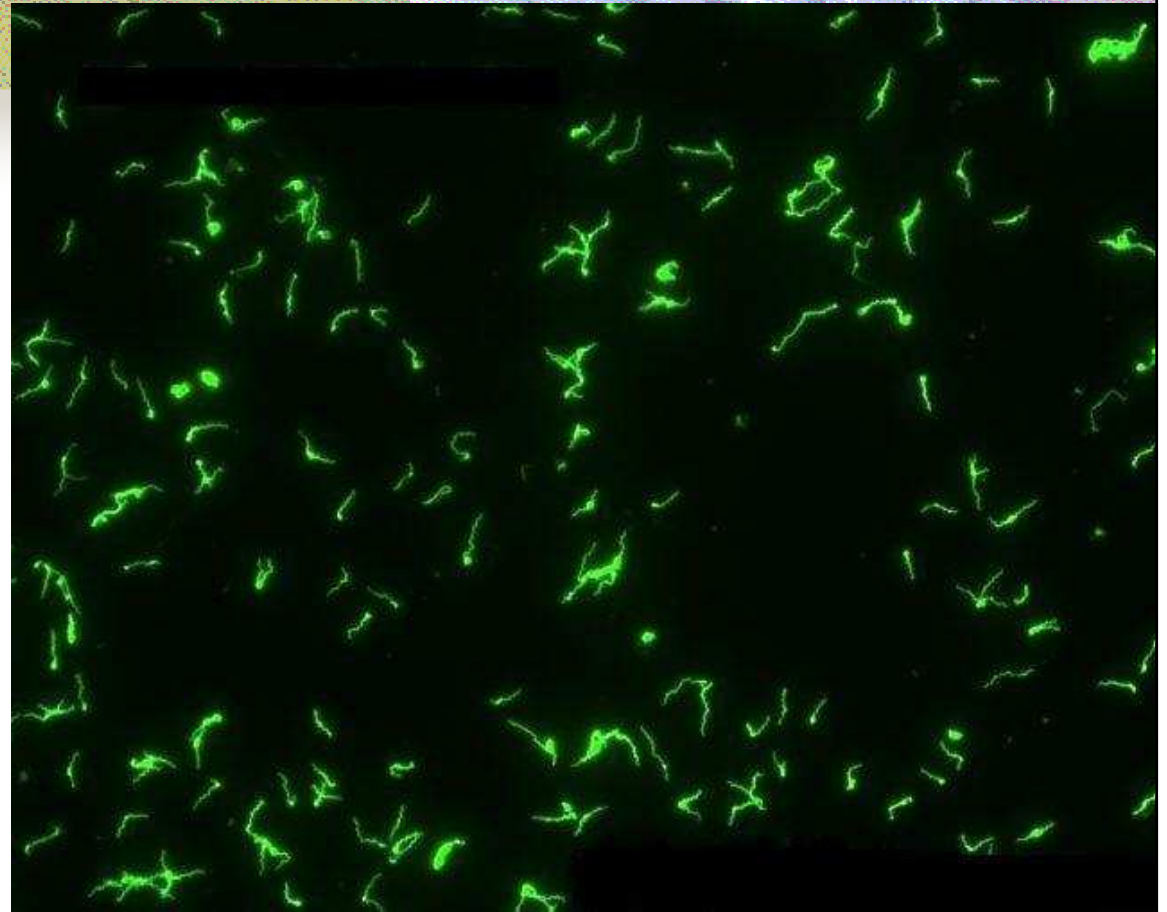
- **Konjugát** se používá zpravidla u reakcí nepřímého průkazu (průkaz protilátek)
- Je to **protilátka, pro kterou je antigenem lidská protilátka** např. IgM nebo IgG
- Dokáže být **selektivní** proti určité třídě lidské protilátky
- **Použití konjugátu je tedy podstatou možnosti selektivního průkazu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

Příklad reakce ELISA použité k detekci protilátky

Všimněte si použitého konjugátu anti-IgM. Ten bude reagovat vždy jen s protilátkou IgM. Bude-li přítomna protilátka proti příslušnému antigenu, avšak třídy IgG, nebude s ní konjugát reagovat.



Přímá a
nepřímá
imunofluorescence
vypadají stejně



Přímá imunofluorescence

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

Nepřímá imunofluorescence

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

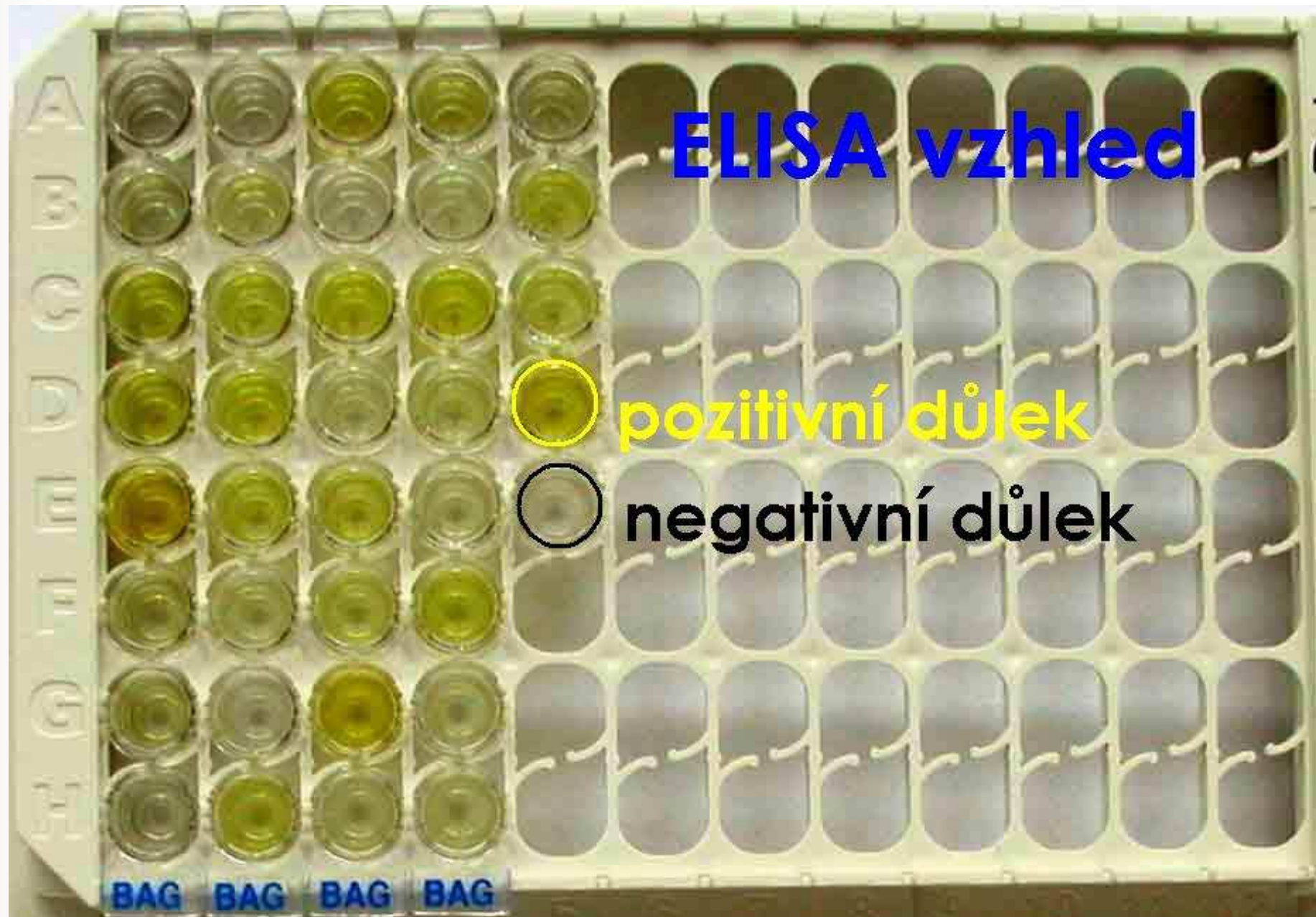
ELISA – proč je tak oblíbená

- 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 bývá (jak kdy!)
 - **B1** – 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“ pozitiv. výsledky)

ELISA – ukázka (www.medmicro.info)



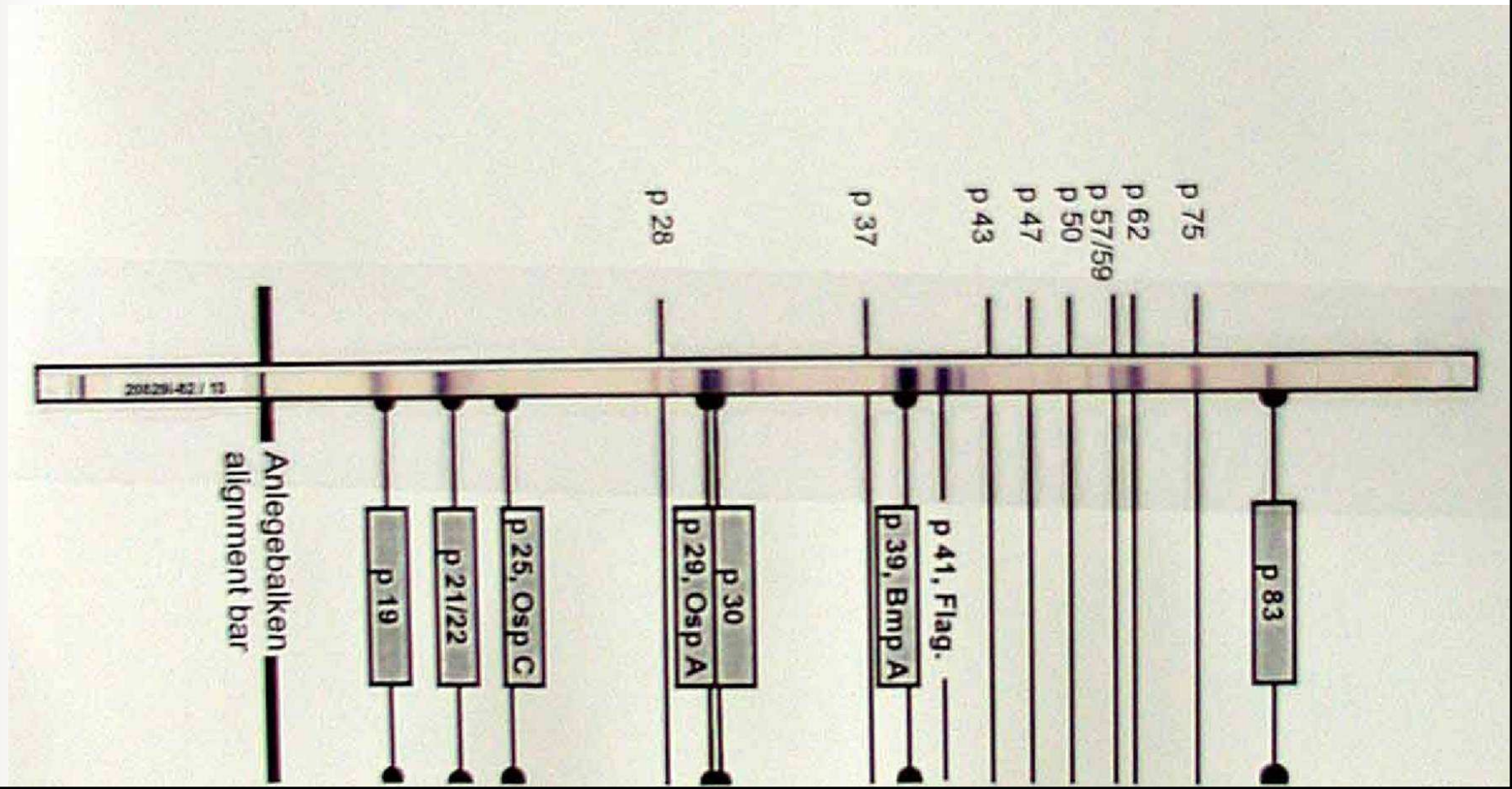


Western blotting

- *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 troskotá na zkřížené pozitivitě např. příbuzných mikroorganismů

Western blot – vzhled

(obrázek z www.medmicro.info)



Pro dnešek děkuji za pozornost

Plyšový
streptokok

