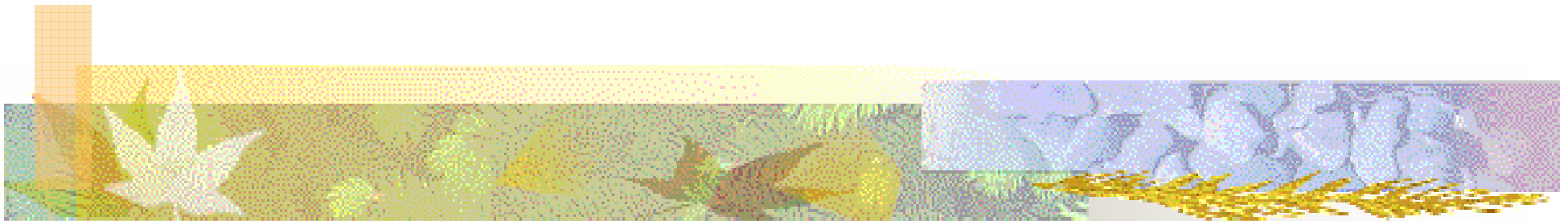


Lékařská mikrobiologie pro ZDRL

Týden 12:

Neutralizační reakce



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

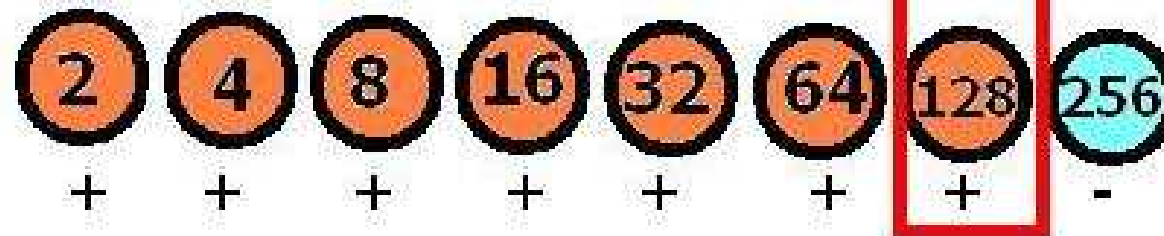
- **Průkaz antigenu** (včetně antigenní analýzy) je přímá metoda. Pozitivní výsledek znamená přítomnost mikroba v těle pacienta
- **Průkaz protilátek:** je to nepřímá metoda. Nicméně jsou způsoby, jak alespoň odhadnout, kdy přibližně se mikrob s tělem pacienta setkal:
 - **Množství protilátek** (**titr**) 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

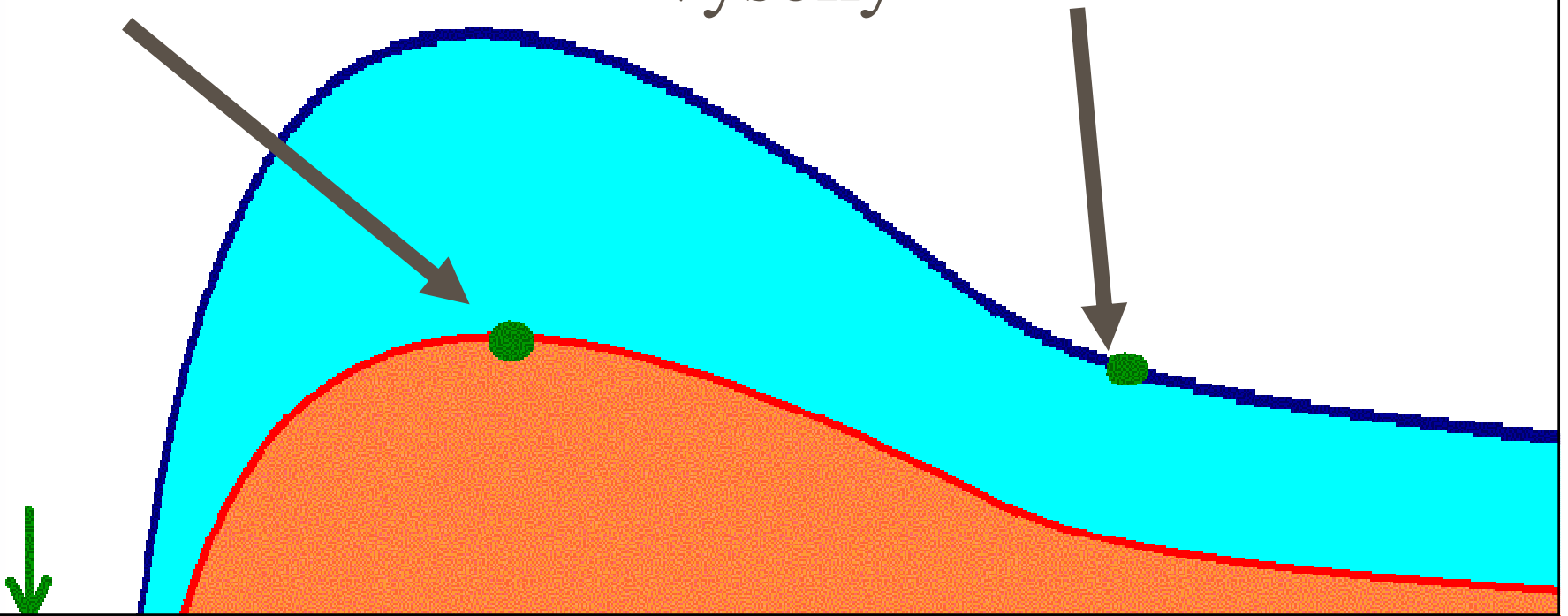


- **Titr** – nejvyšší ředění, kde je pozitivní reakce.
- Máme-li **dvě řady**, je titrem nejvyšší ředění z obou řad dohromady.
- Při použití geometrické řady znamená
 - vzestup/pokles titru **o jeden důlek dvojnásobný vzestup pokles.**
 - vzestup/pokles **o n důlků je pak vzestup/pokles 2^n násobný.**

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

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



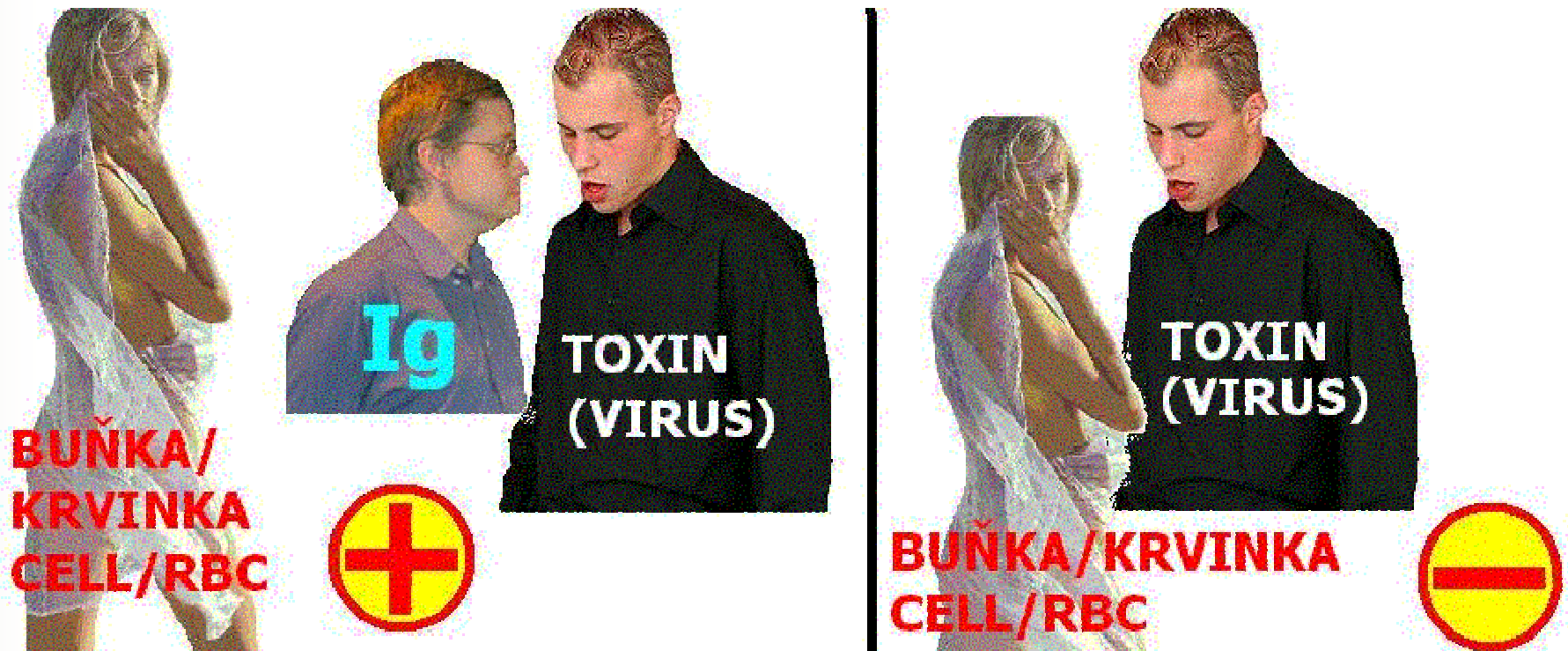
Neutralizační reakce: obecný princip

- 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

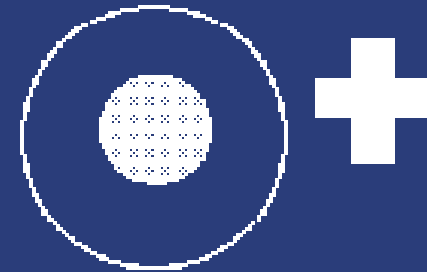
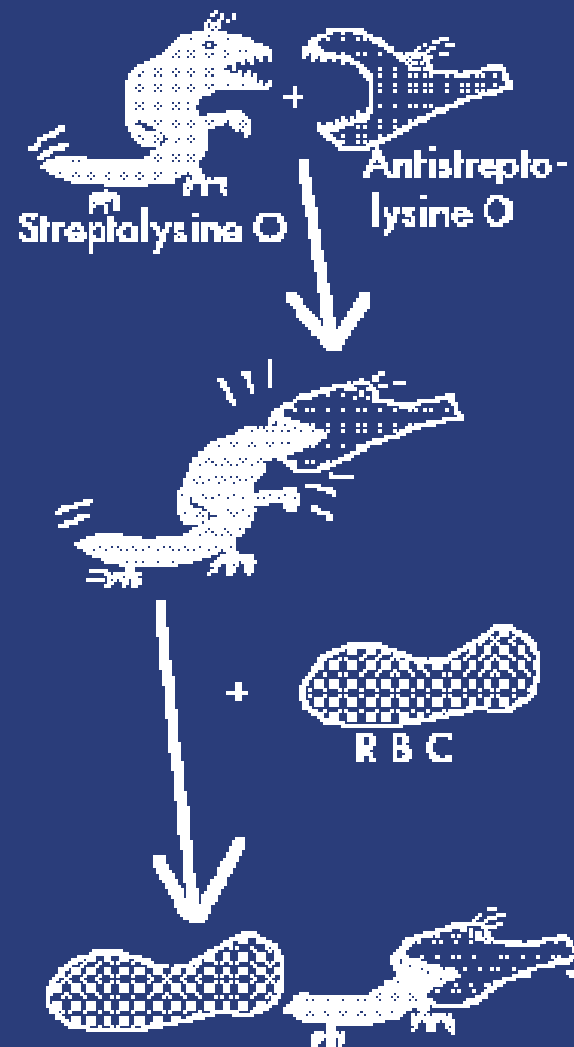
- **Protilátka (ANTISTREPTOLYZIN O)** blokuje hemolytický efekt toxinu (streptolyzinu O) na krvinku.
- **ASLO není nepřímý průkaz, přestože hledáme protilátky.** Nepátráme tu po patogenovi, určíme samotné protilátky, jež mohou být nebezpečné
- U ASLO nežíváme geometrickou řadu. Hodnoty ředění jsou speciální.
- 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.

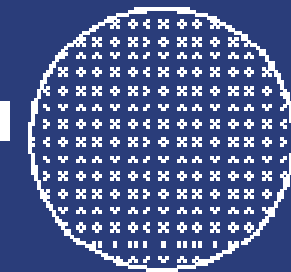
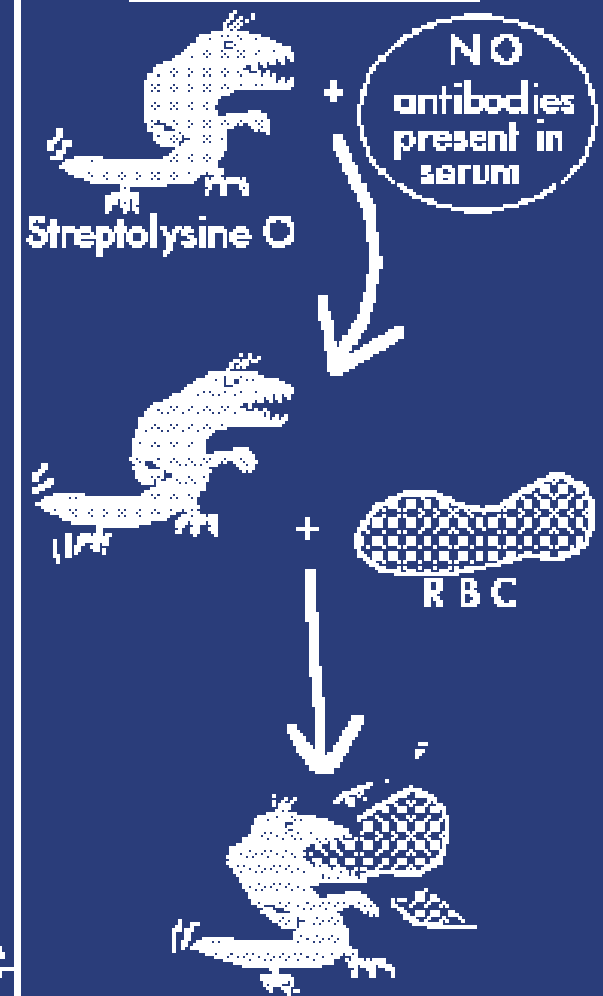
ASLO: princip

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**



Zapamatujte si:

- HIT není aglutinace, ale neutralizace virového shlukování krvinek
- HIT se liší od reakce ASLO především tím, že krevinky 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)

Příklad 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

Pro dnešek děkuji za pozornost

Plyšový
streptokok

www.plysovimikrobi.cz

