

Lékařská mikrobiologie pro ZDRL

Týden 13:

Reakce se značenými složkami



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

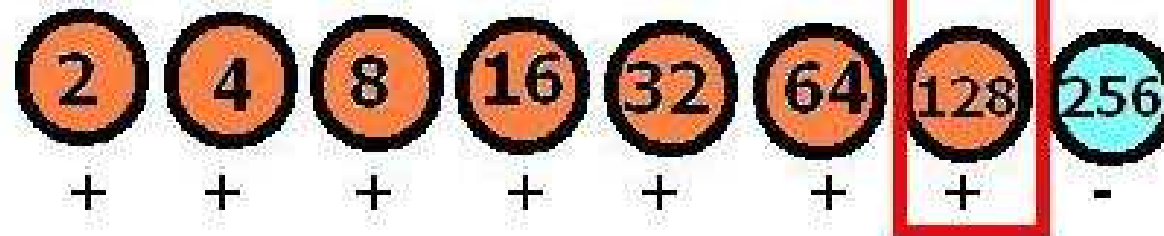
- **Průkaz antigenu** (včetně antigenní analýzy) je přímá metoda. Pozitivní výsledek znamená přítomnost mikroba v těle pacienta
- **Průkaz protilátek:** je to nepřímá metoda. Nicméně jsou způsoby, jak alespoň odhadnout, kdy přibližně se mikrob s tělem pacienta setkal:
 - **Množství protilátek** (**titr**)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

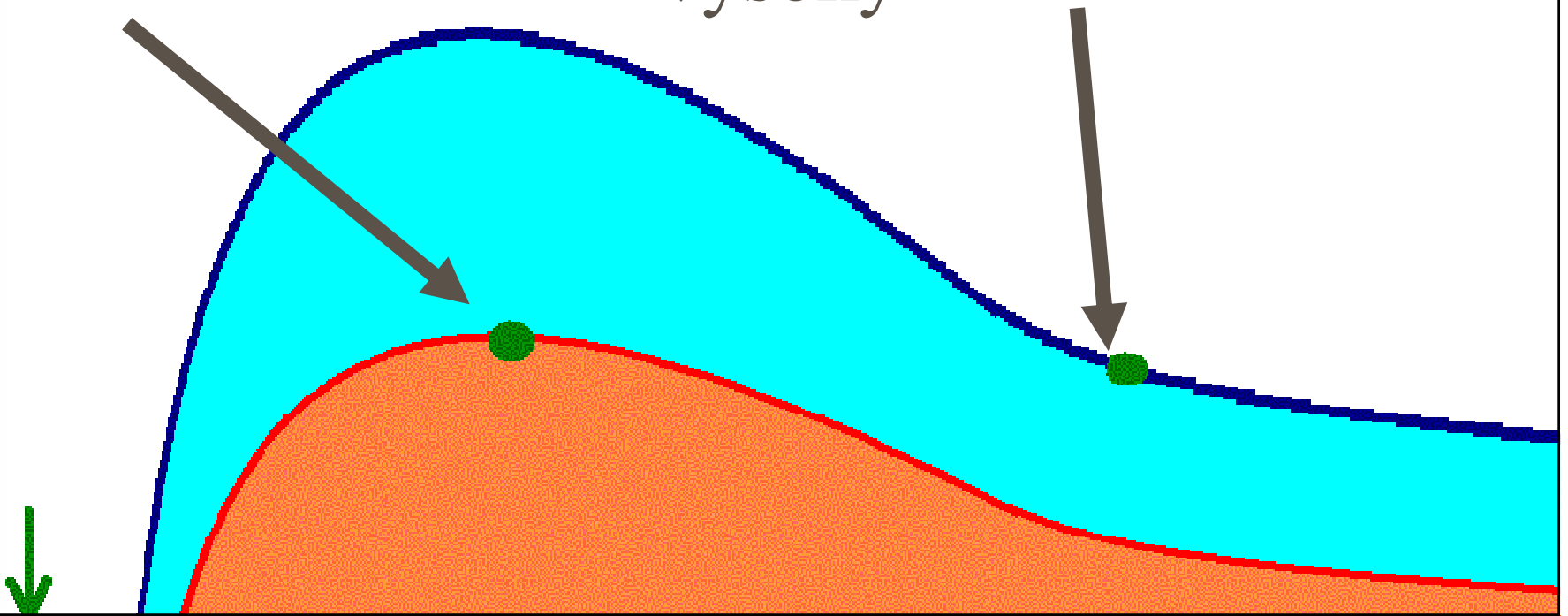


- **Titr** – nejvyšší ředění, kde je pozitivní reakce.
- Máme-li **dvě řady**, je titrem nejvyšší ředění z obou řad dohromady.
- Při použití geometrické řady znamená
 - vzestup/pokles titru **o jeden důlek dvojnásobný vzestup pokles.**
 - vzestup/pokles **o n důlků je pak vzestup/pokles 2^n násobný.**

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

Průběh protilátkové odpovědi

- **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

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

Značidlo, které je nakonec detekováno

Třetí složka

Druhá složka

První složka

povrch

Průběh negativní reakce (možnost se třemi složkami)



Značidlo, které
by bylo
detekováno

Třetí složka

Chybí druhá složka (vzorek negativní)

První složka

povrch

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



Průběh negativní reakce (možnost se třemi složkami)

Po promytí zůstává navázána pouze první složka.



První složka

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.



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:
 - **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“ pozitivní výsledky buď ostře, nebo s rozmezím plus mínus 10 %)

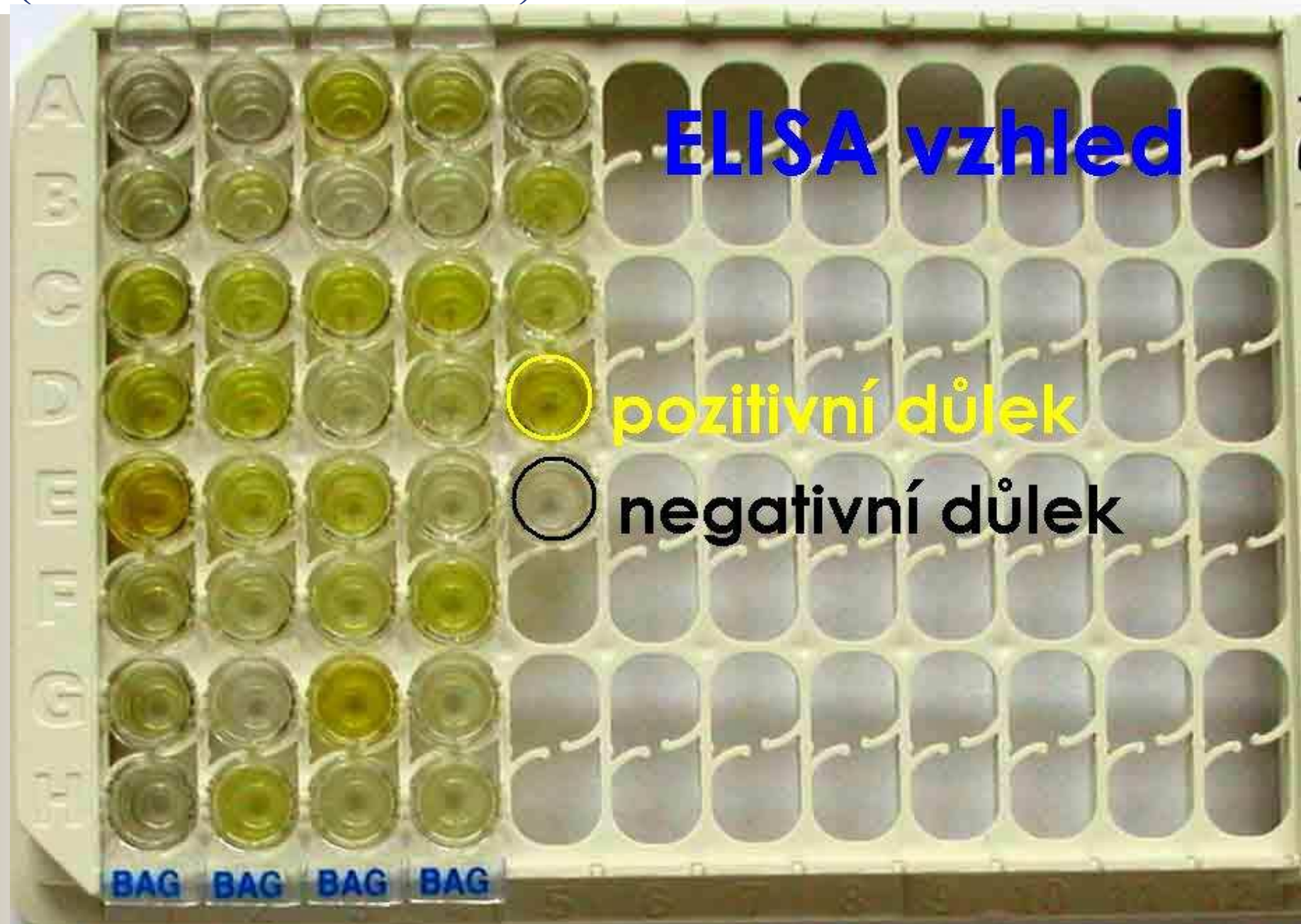
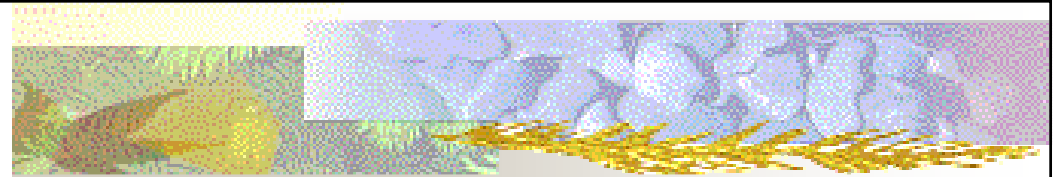
Vždy záleží na konkrétní reakci ELISA a jejím provedení.

Někdy chybí blank, někdy není cut off přímo obsažen

v destičce, ale počítá se jako průměr negativních kontrol + konstanta.

ELISA – ukázka

(www.medmicro.info)



ELISA vzhled

pozitivní důlek

negativní důlek

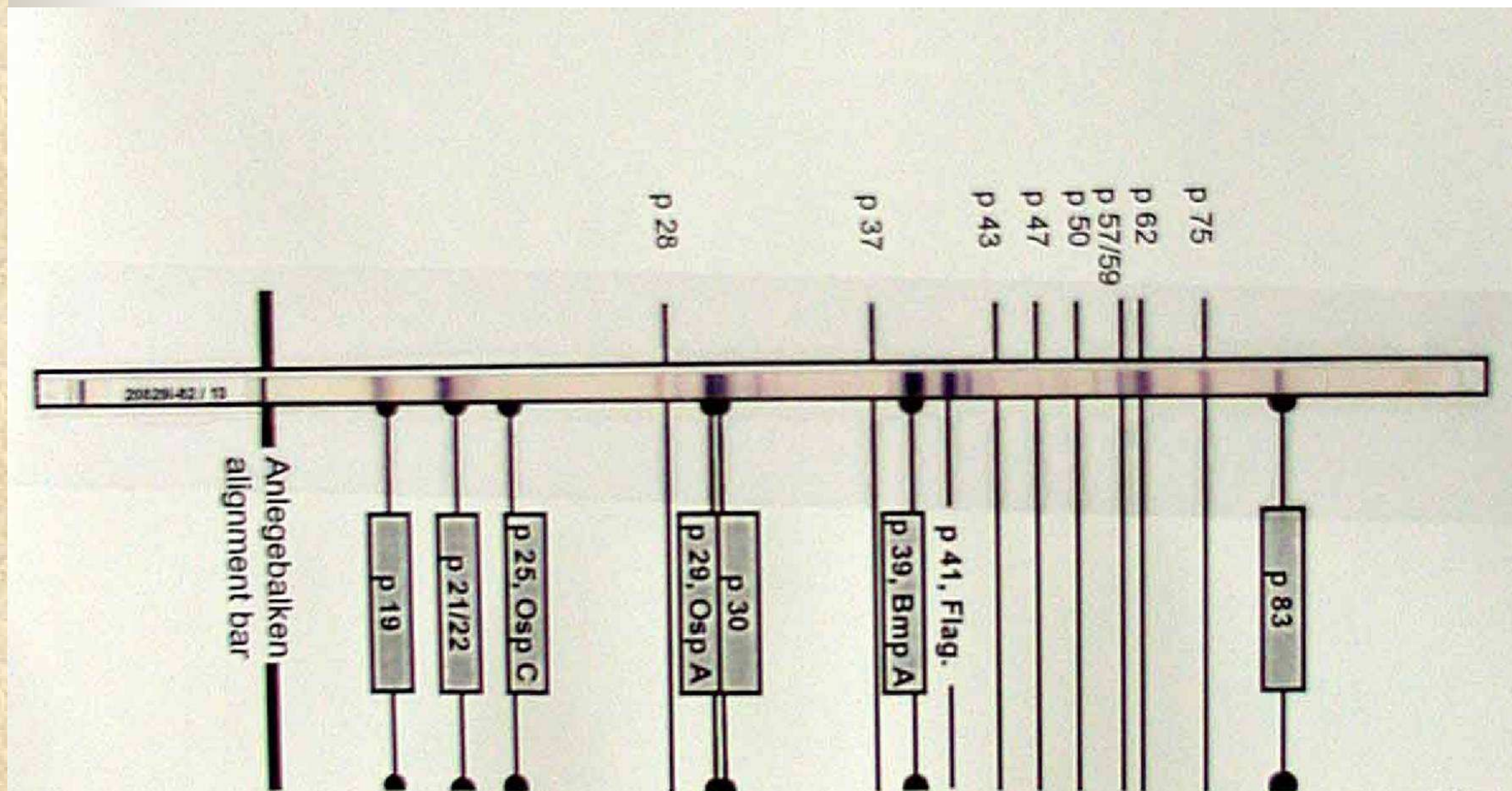
BAG BAG BAG BAG

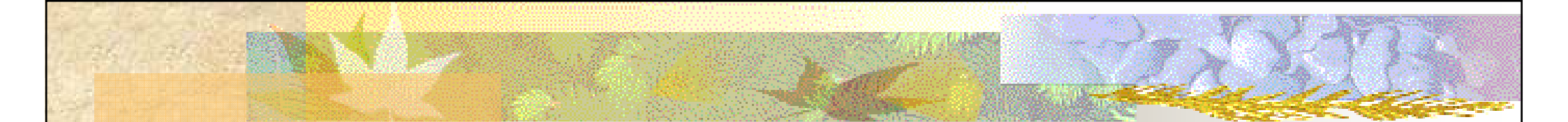
Western blotting

- *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 pozitivě např. příbuzných mikroorganismů

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



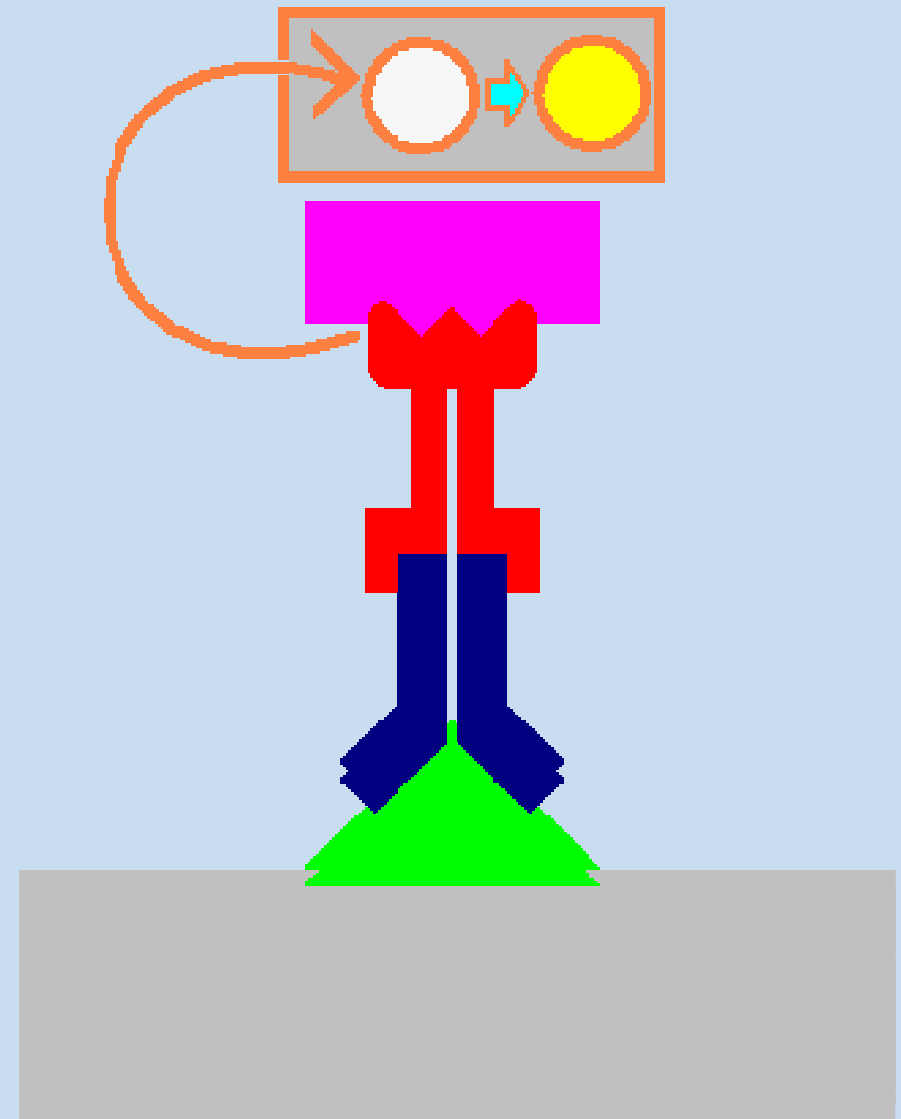
Význam konjugátu

- 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)

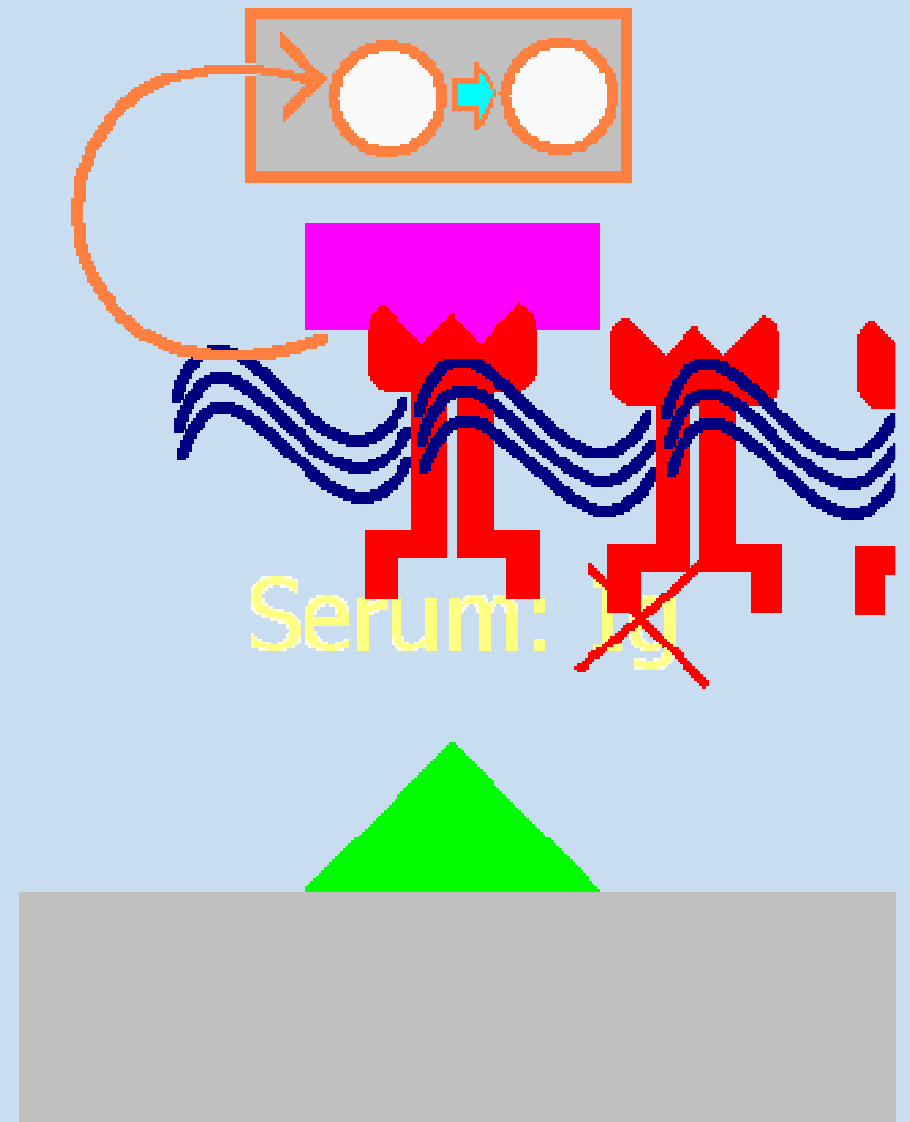
Všechny složky se
postupně navazují.
Dojde k enzymatické
reakci – změně barvy
v důlku



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.

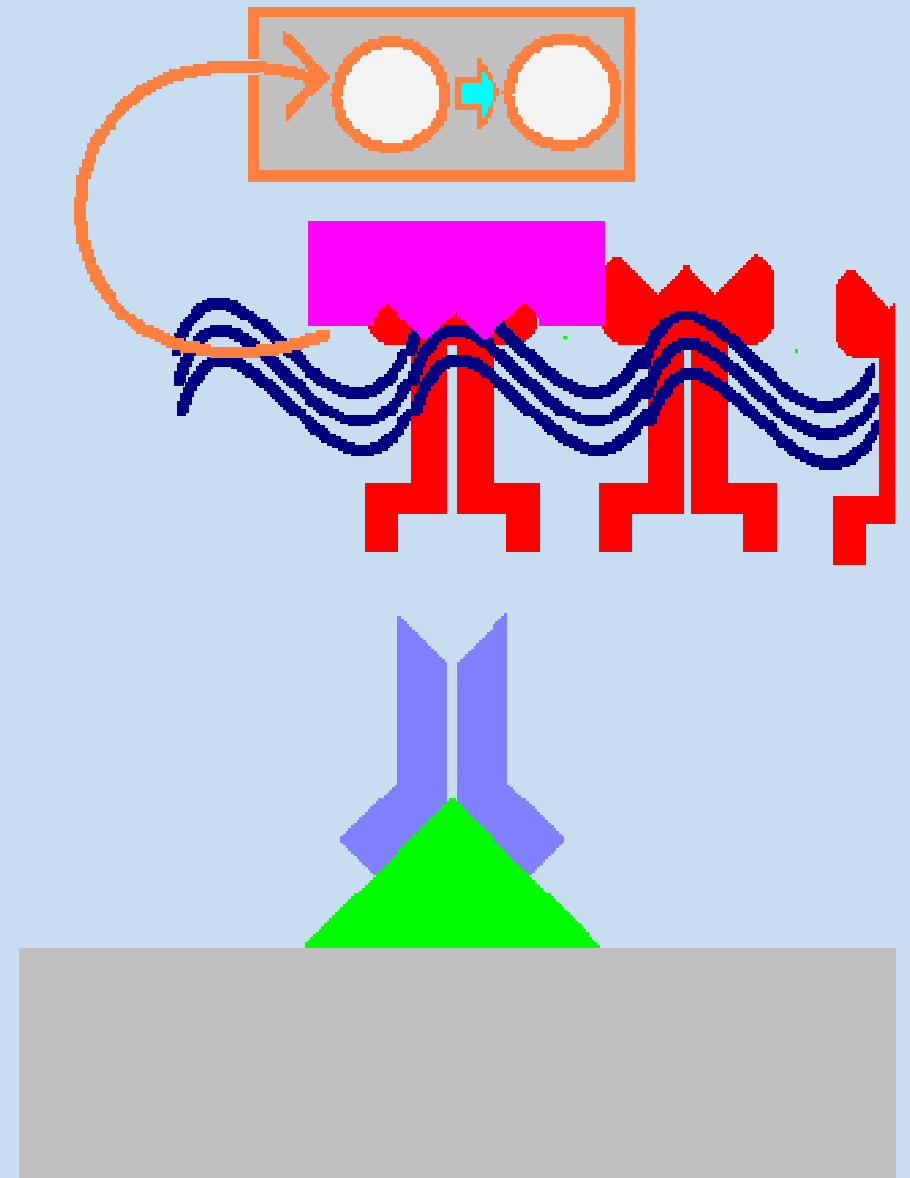


ELISA k detekci protilátky:

3. Negativní II (hledá se IgM, přítomny IgG)

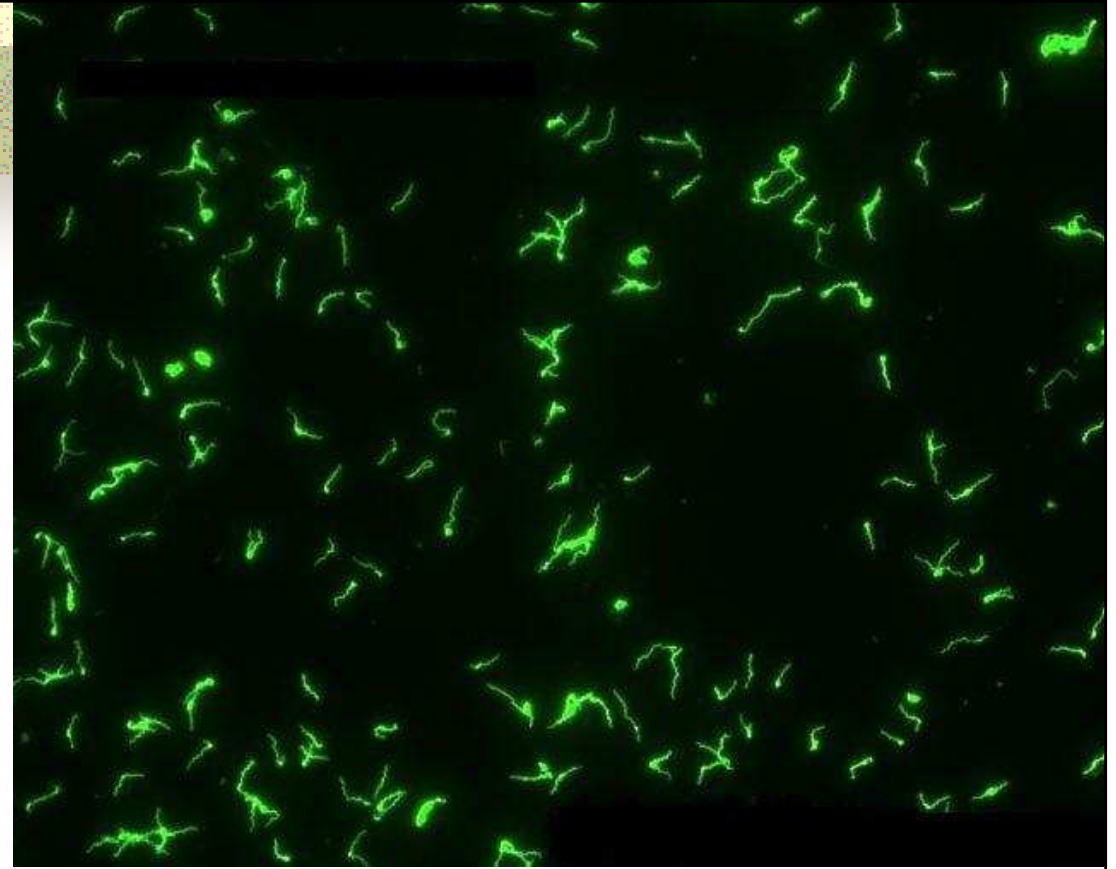
V séru pacienta jsou
jen IgG protilátky.

Konjugát je odplaven,
ke změně barvy důlku
nedojde



Imunofluorescence

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



Přímá imunofluorescence

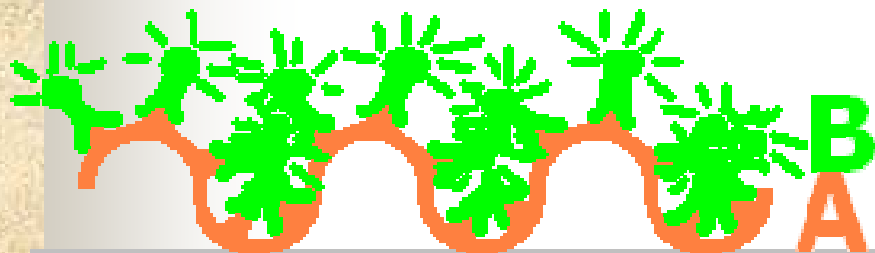
- (Povrch)-(antigen)-(značená protilátka)

Nepřímá imunofluorescence

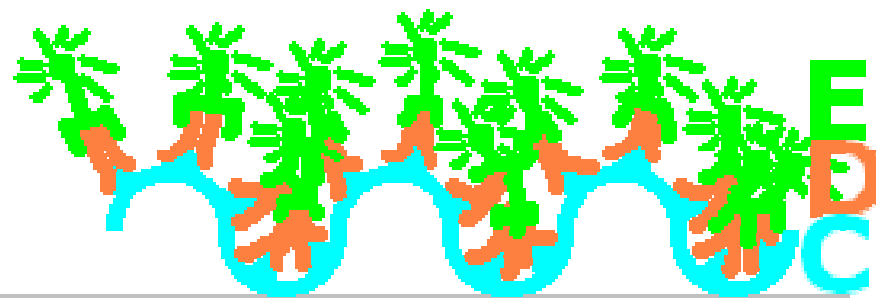
- (Povrch)-(antigen)-(protilátka)-(značená protilátka proti lidské protilátce)

Imunofluorescence schematicky

1



2



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, 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“

Přeji Vám hezký
zbytek dne...

*(Obraz s názvem
Protilátka)*

www.twitchfilm.net/archives/003401.html

