

Lékařská mikrobiologie pro ZDRL

Týden 12

Neutralizační reakce, reakce se značenými složkami

Upraveno podle
Ondřeje Zahradníčka

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

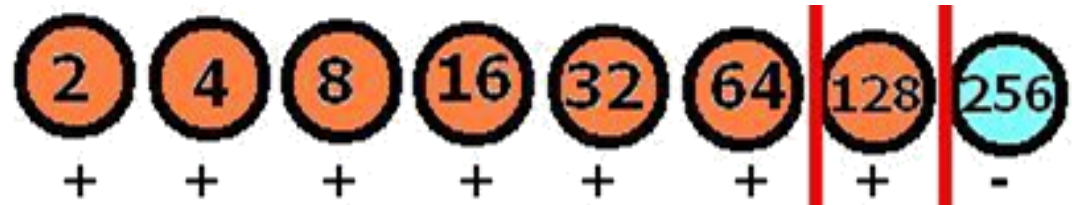
- **Průkaz antigenu** (včetně antigenní analýzy) je přímá metoda. Pozitivní výsledek znamená přítomnost mikroba v těle pacienta
- **Průkaz protilátek:** je to nepřímá metoda. Nicméně jsou způsoby, jak alespoň odhadnout, kdy přibližně se mikrob s tělem pacienta setkal:
 - **Množství protilátek (titr)**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

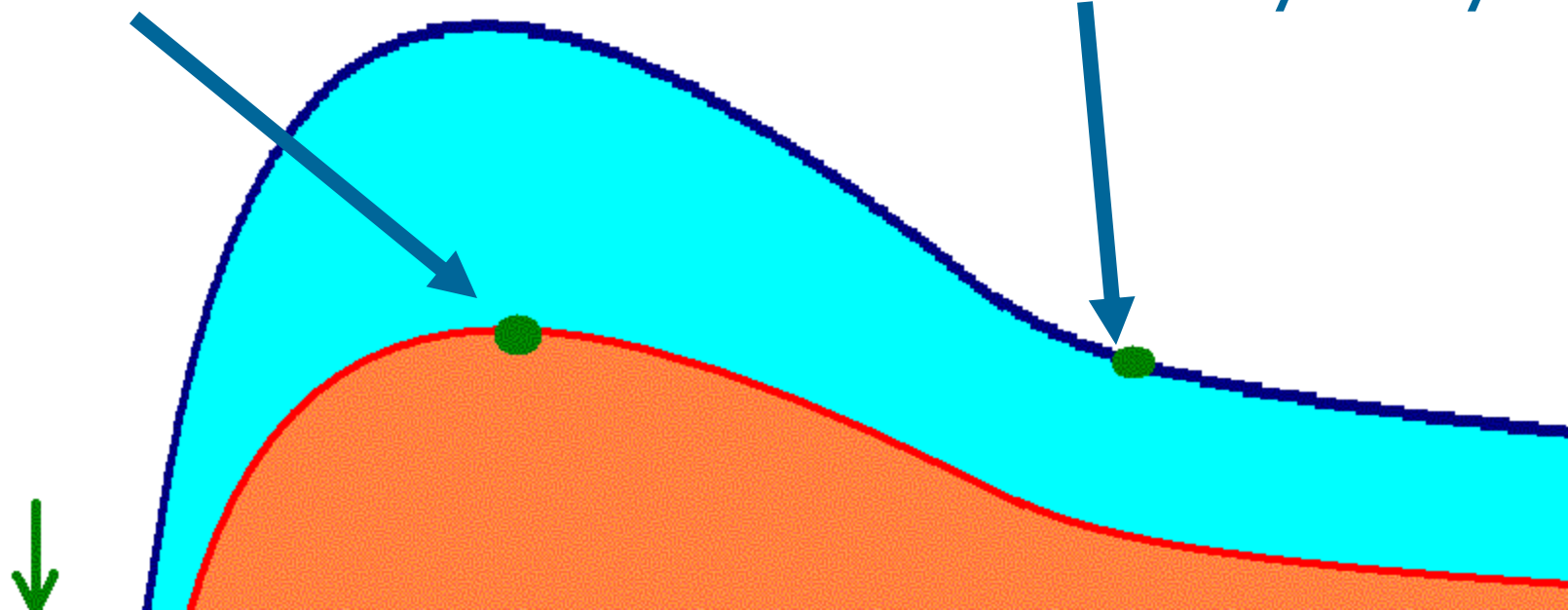


- **Titr** – nejvyšší ředění, kde je pozitivní reakce.
- Máme-li **dvě řady**, je titrem nejvyšší ředění z obou řad dohromady.
- Při použití geometrické řady znamená
 - vzestup/pokles titru o **jeden důlek dvojnásobný vzestup pokles**.
 - vzestup/pokles o **n důlků** je pak **vzestup/pokles 2^n násobný**.

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

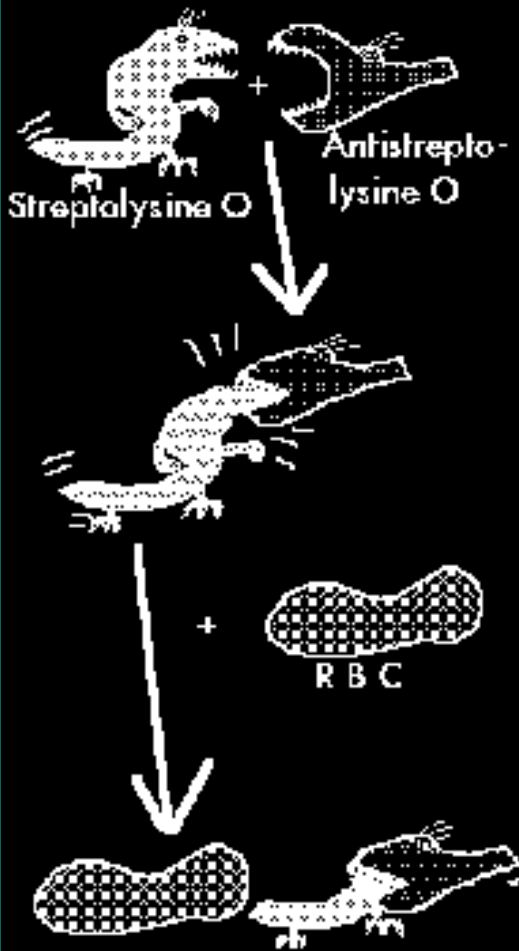
- Protilátka (**ANTISTREPTOLYZIN O**) blokuje hemolytický efekt toxinu (streptolyzinu O) na krvinku.
- ASLO není nepřímý průkaz, přestože hledáme protilátky. Nepátráme tu po patogenovi, určujeme samotné protilátky, jež mohou být nebezpečné
- U ASLO neužíváme geometrickou řadu. Hodnoty ředění jsou speciální.
- Titr nad cca 200 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. ¹⁶

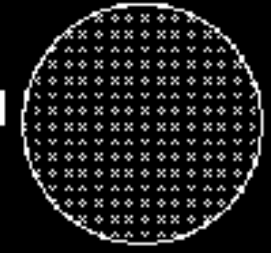
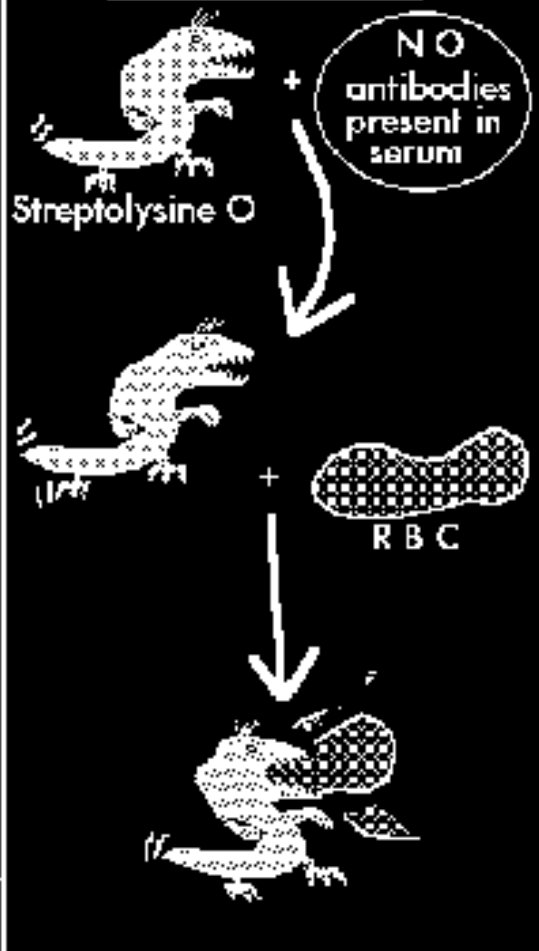
ASLO: princip

Positive reaction:



NO HAEMOLYSIS

Negative reaction:



HAEMOLYSIS

Hodnocení ASLO

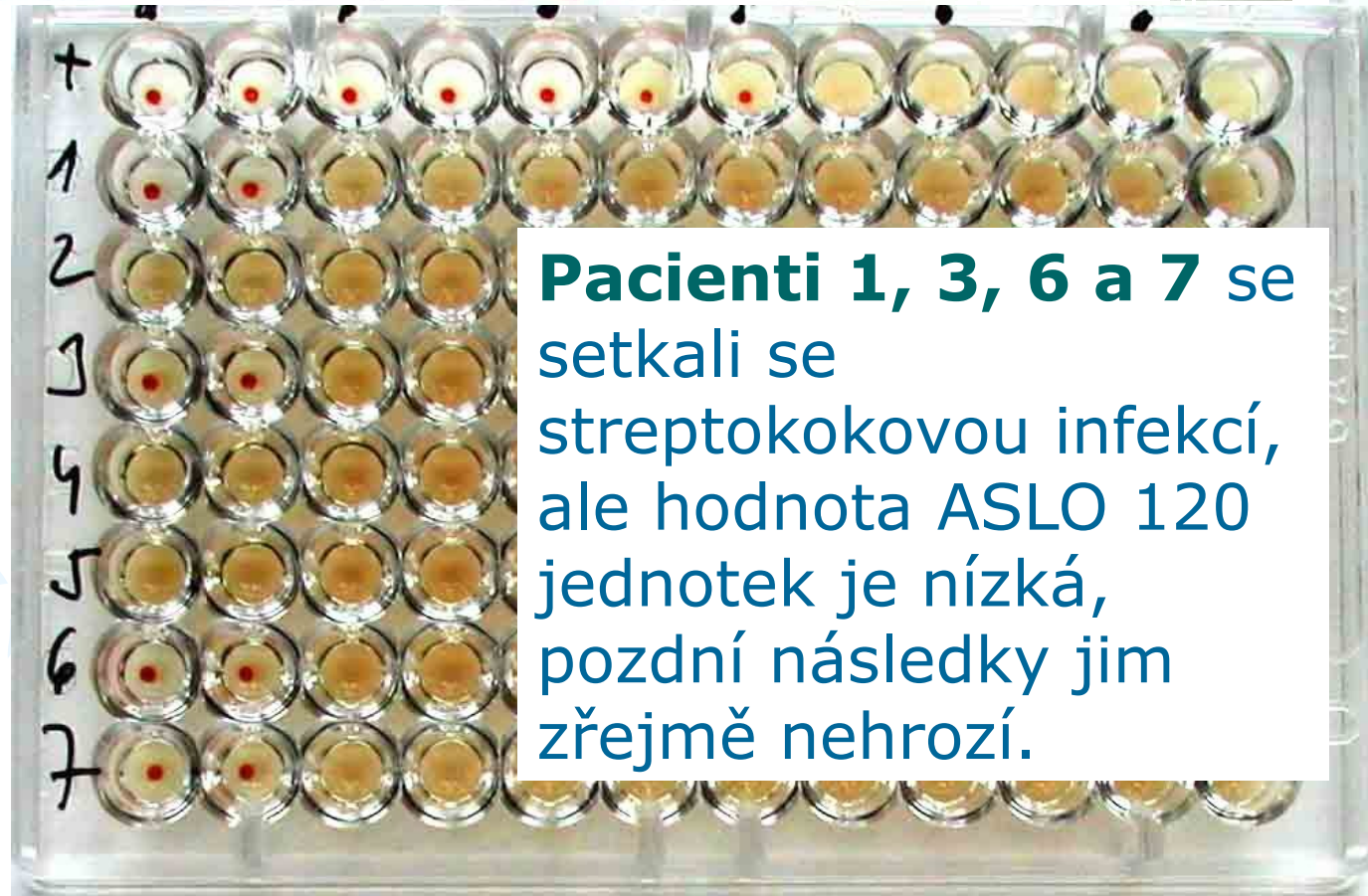
- Panel se odečítá naležato. První řádek prvního panelu je pozitivní kontrola, dále má každý pacient jeden řádek
- Nejvyšší ředění se zábranou hemolýzy (pozitivní reakce, projeví se sedimentací erytrocytů) je titr
- Titry cca 225–270 jsou hraniční, vyšší jsou pozitivní, nižší jsou negativní. Úplná absence protilátek znamená, že se pacient se streptokokovou infekcí neseťkal

Jamka č.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Hodnota m. j.	100	120	150	180	220	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 mlj	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 shlknou
- **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)

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 😊)

- **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

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

+

Laboratorní
protilátka

Pacientův vzorek

Hledaný
antigen

Značená laboratorní
protilátka (→ detekce)

-

Laboratorní
protilátka

*Antigen
chybí*

Značená laboratorní
protilátka

Není navázaná →

je odplavena →

nemůže být detekována

POVRCH

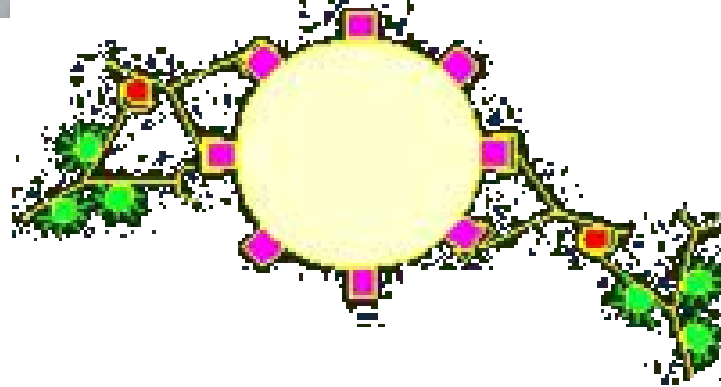
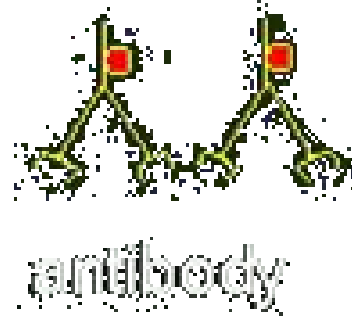
(sklíčko nebo dno
důlku v destičce
pro serologii)

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.

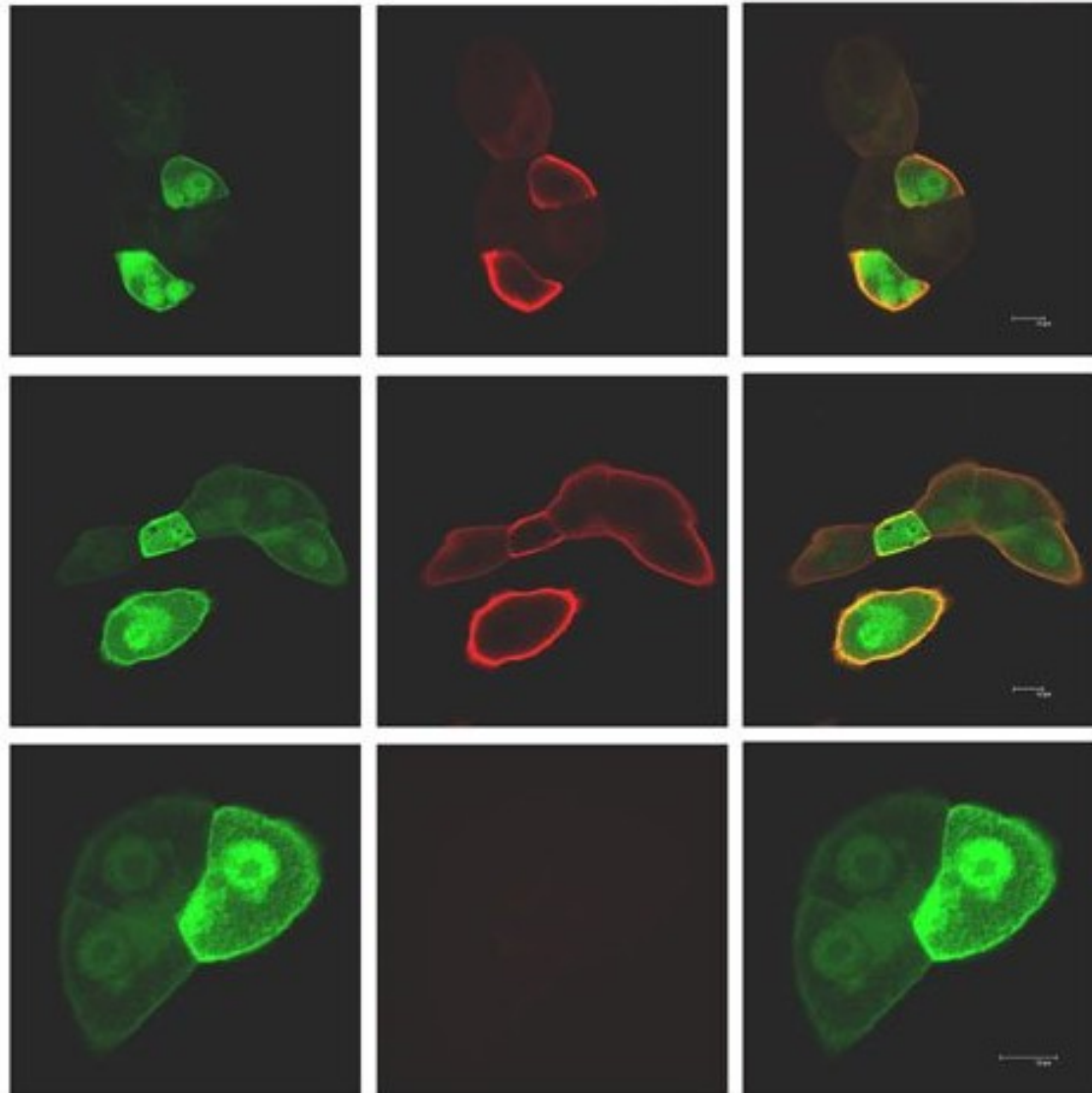
Imunofluorescence



complex between antigen / antibodies
and anti - antibodies

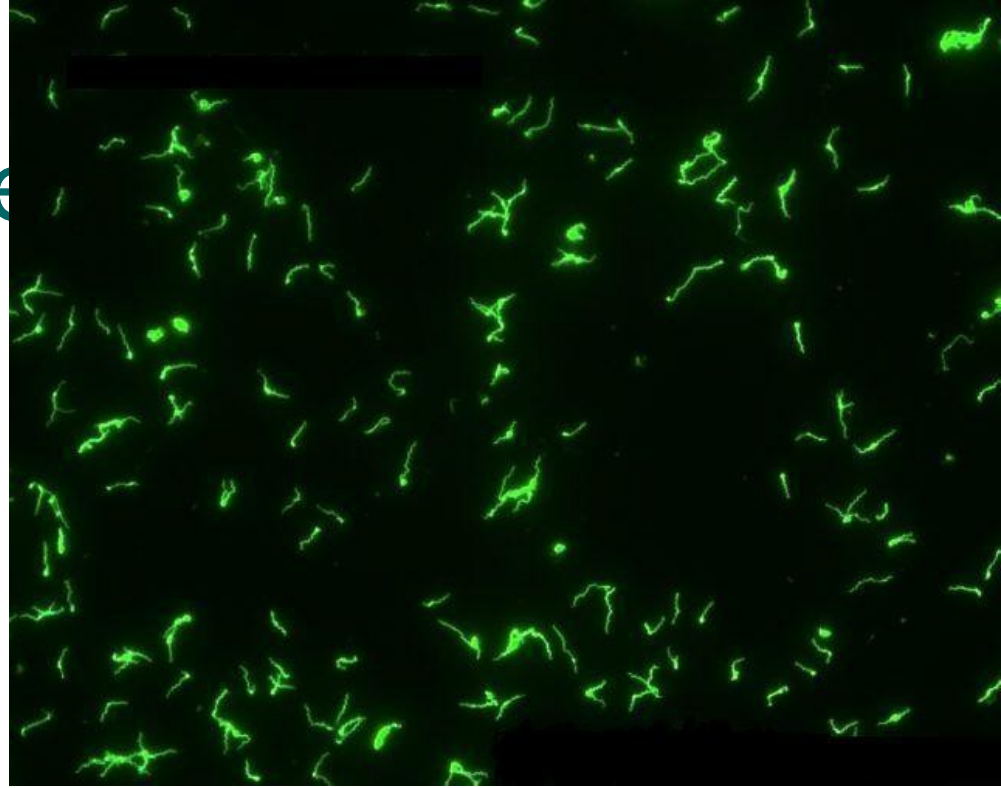
Imunofluorescence

www.amsbio.com



Imunofluorescence

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



Přímá imunofluorescence

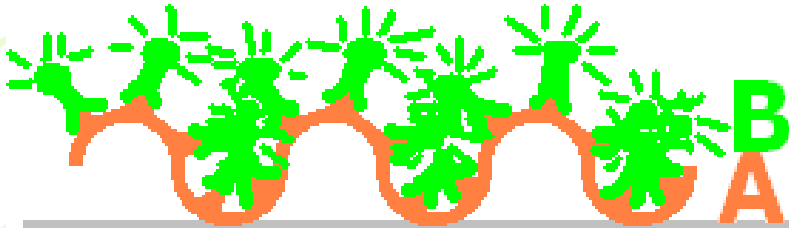
- (Povrch)-(antigen)-(značená protilátka)

Nepřímá imunofluorescence

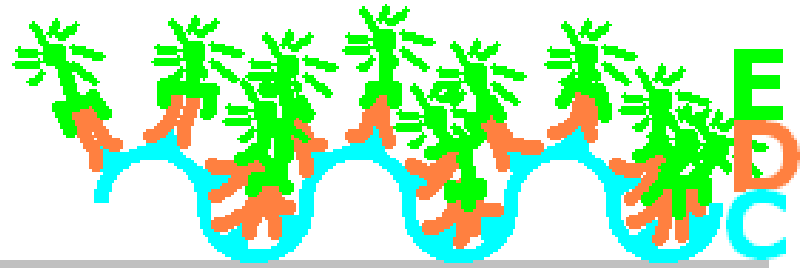
- (Povrch)-(antigen)-(protilátka)-(značená protilátka proti lidské protilátce)

Imunofluorescence schematicky

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

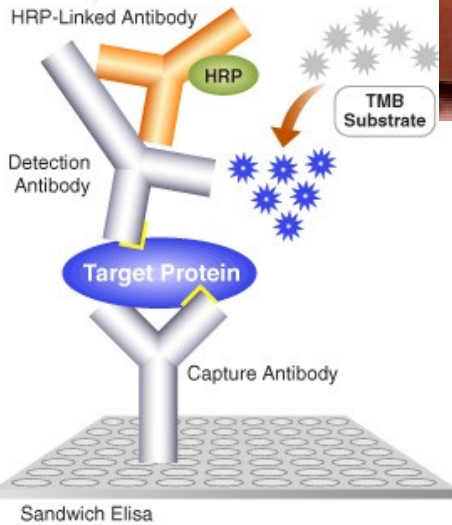
ELISA



ELISA



www.cellsignal.com



virology-online.com

ELISA – proč je tak oblíbená

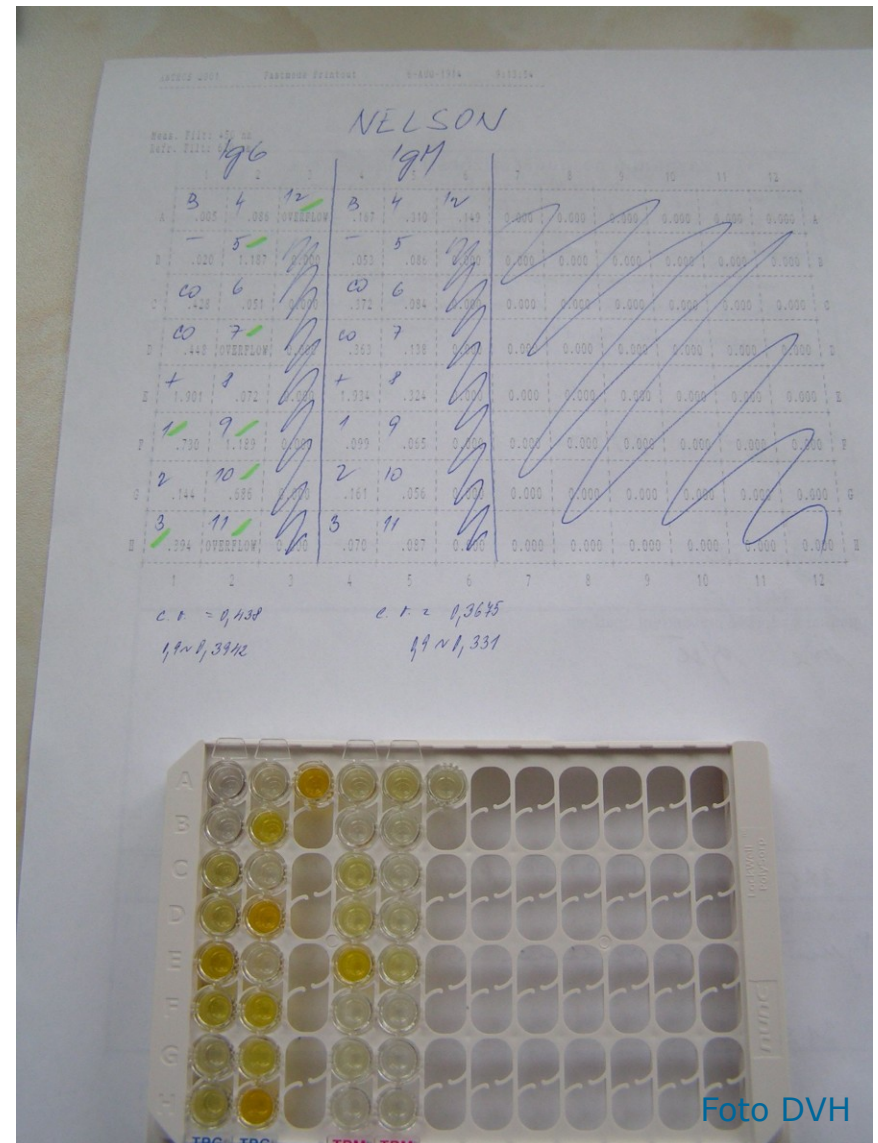
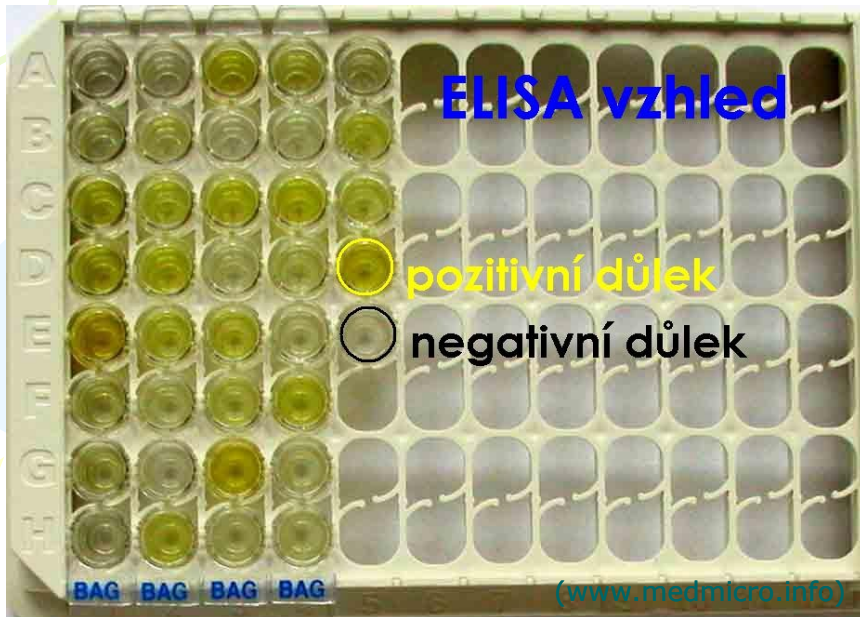
- U reakce ELISA je na konci celého procesu **enzymatická reakce**. Její intenzita se projeví jednoduše: intenzitou zbarvení v důlku, kde reakce probíhá. **Sytá barva = vysoce pozitivní.**
- Nenáročnost z hlediska **nákladů a nulové radiační nebezpečí** je výhodou oproti radioimunoassayím
- Možnost **automatizace**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



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 blotting – princip

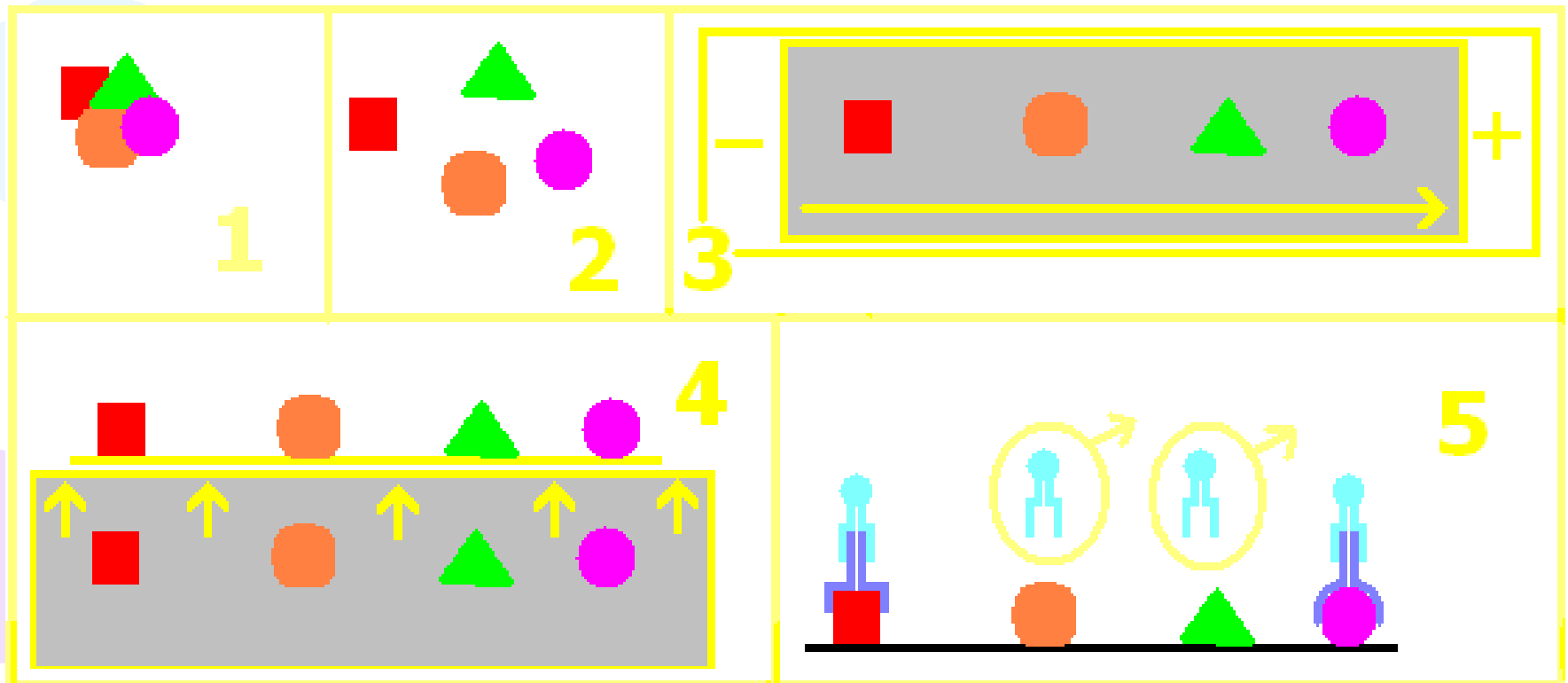
1: původní antigen (směs)

2: uvolnění jednotlivých antigenů detergentem

3: elektroforetické rozdělení antigenů

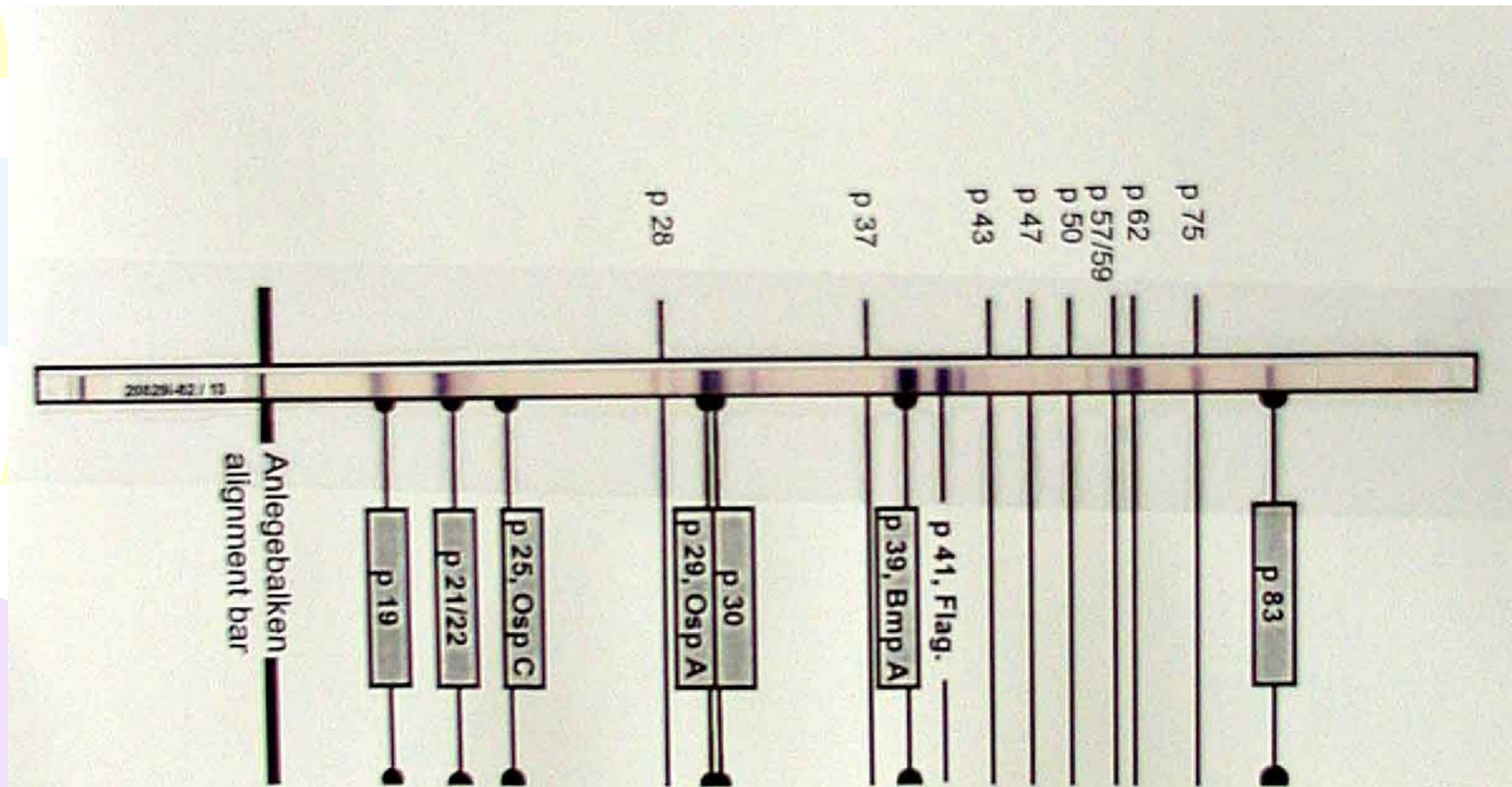
4: „přesátí“ rozdělených antigenů na nitrocelulózu

5: reakce ELISA (přítomny jsou jen některé protilátky)

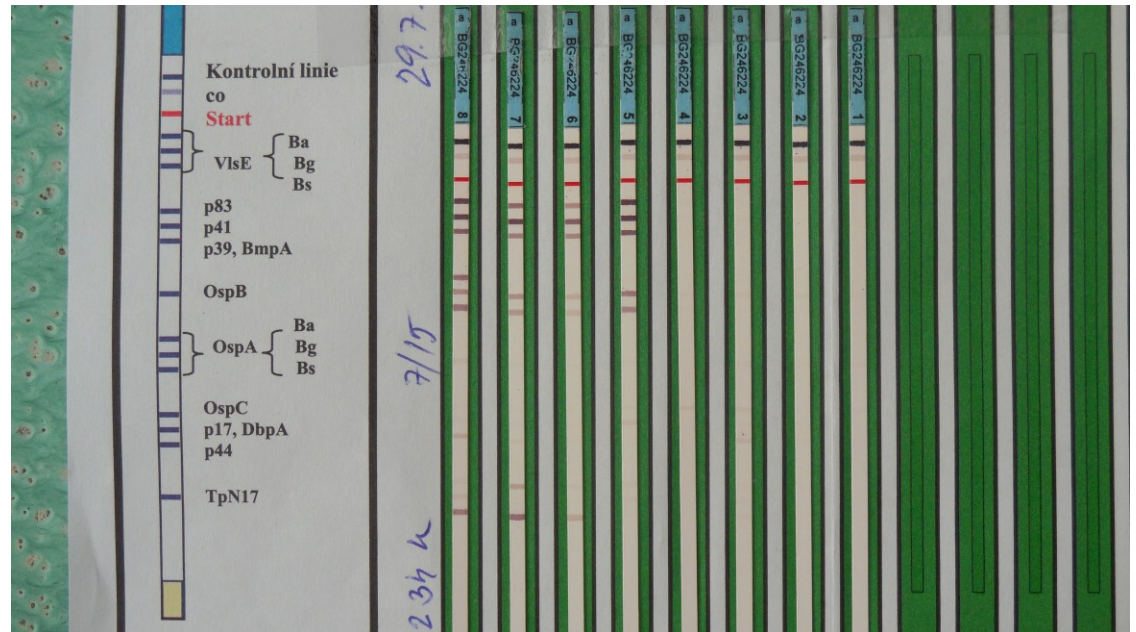


Western blot – vzhled

(obrázek z www.medmicro.info)



Western blot - ukázky



Western blot výsledný protokol

Souhrnné vyhodnocení

BLOT-LINE Borrelia/HGA IgM

Šarže: 834307Z
 Vyhotovil: Dvořáková
 Čas vyhodnocení: 11.11.2013 13:56:06

Snímek skenu(1 - 9):

	Vzorek č. 1	Vzorek č. 2	Vzorek č. 3	Vzorek č. 4	Vzorek č. 5	Vzorek č. 6	Vzorek č. 7	Vzorek č. 8	Vzorek č. 9

Výsledky(1 - 9):

	Vzorek č. 1	Vzorek č. 2	Vzorek č. 3	Vzorek č. 4	Vzorek č. 5	Vzorek č. 6	Vzorek č. 7	Vzorek č. 8	Vzorek č. 9
Označení	K+	K-	2	4	8	9	10	12	13
p41	12,42[H]	0,42[N]	0,75[N]	1,93[N]	4,13[N]	0,40[N]	0,00[N]	0,77[N]	1,22[N]
p39	5,80[H]!	0,00[N]	0,38[N]	1,17[N]	2,04[N]	0,00[N]	0,00[N]	0,39[N]	2,42[N]
OspC Ba	47,65[P]	0,00[N]	6,18[H]	6,16[H]	3,66[N]	9,74[H]!	1,58[N]	0,79[N]	3,15[N]
OspC Bg	43,56[P]	0,42[N]	4,11[N]	5,67[H]	2,35[N]	0,00[N]	1,94[N]	0,76[N]	2,33[N]
OspC Bs	45,87[P]	0,00[N]	4,41[N]	7,84[H]	0,39[N]	1,58[N]	2,33[N]	0,38[N]	2,72[N]
p44	8,00[H]	1,27[N]	1,11[N]	1,16[N]	1,63[N]	0,00[N]	1,20[N]	0,00[N]	1,61[N]
Borrelia	Pozitivní	Negativní	Hraniční	Hraniční	Negativní	Hraniční	Negativní	Negativní	Negativní
Anaplasma	Hraniční	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní

kontrolujte zařazení linií označených [!] z důvodu možné interference s pozadím, nebo nejasné interpretace linie

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)

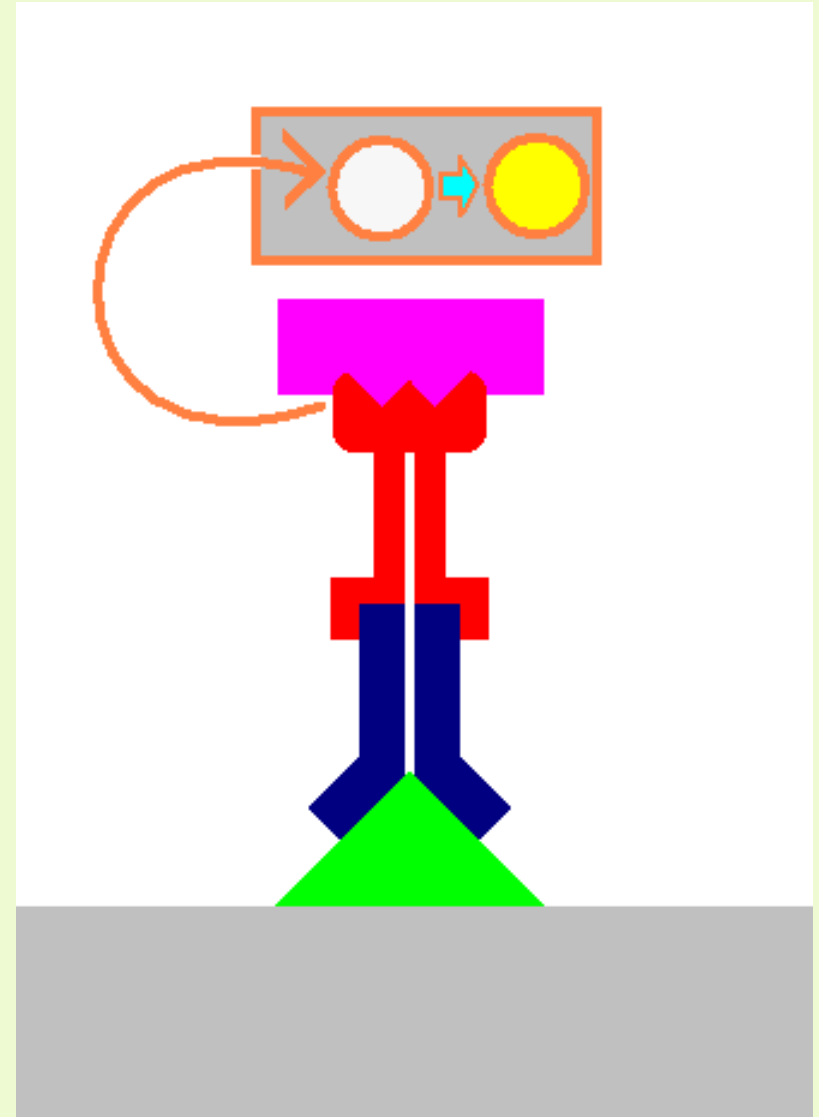
Konjugát je protilátka namířená proti lidské protilátce

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

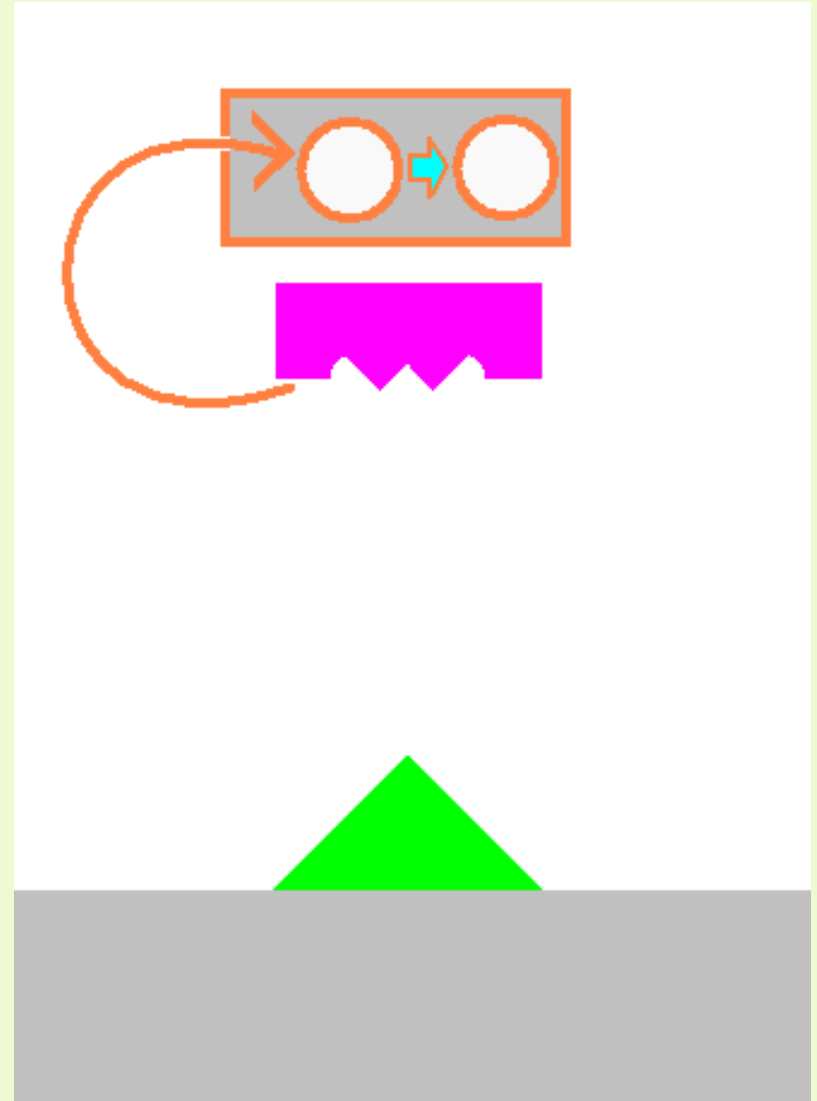
ELISA k detekci
protilátky:
1. Pozitivní
(hledá se IgM,
IgM přítomna)

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)

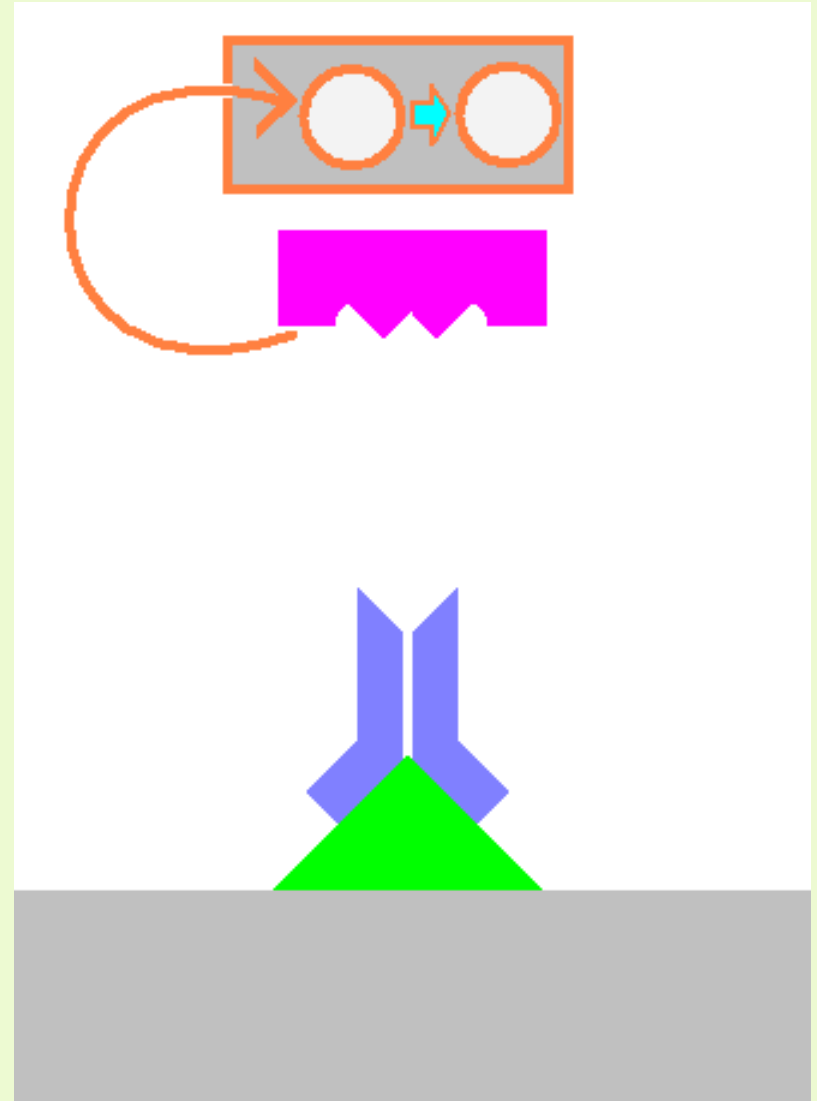
V séru pacienta
nejsou protilátky.
Konjugát je
odplaven, v důlku
není žádná změna.



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

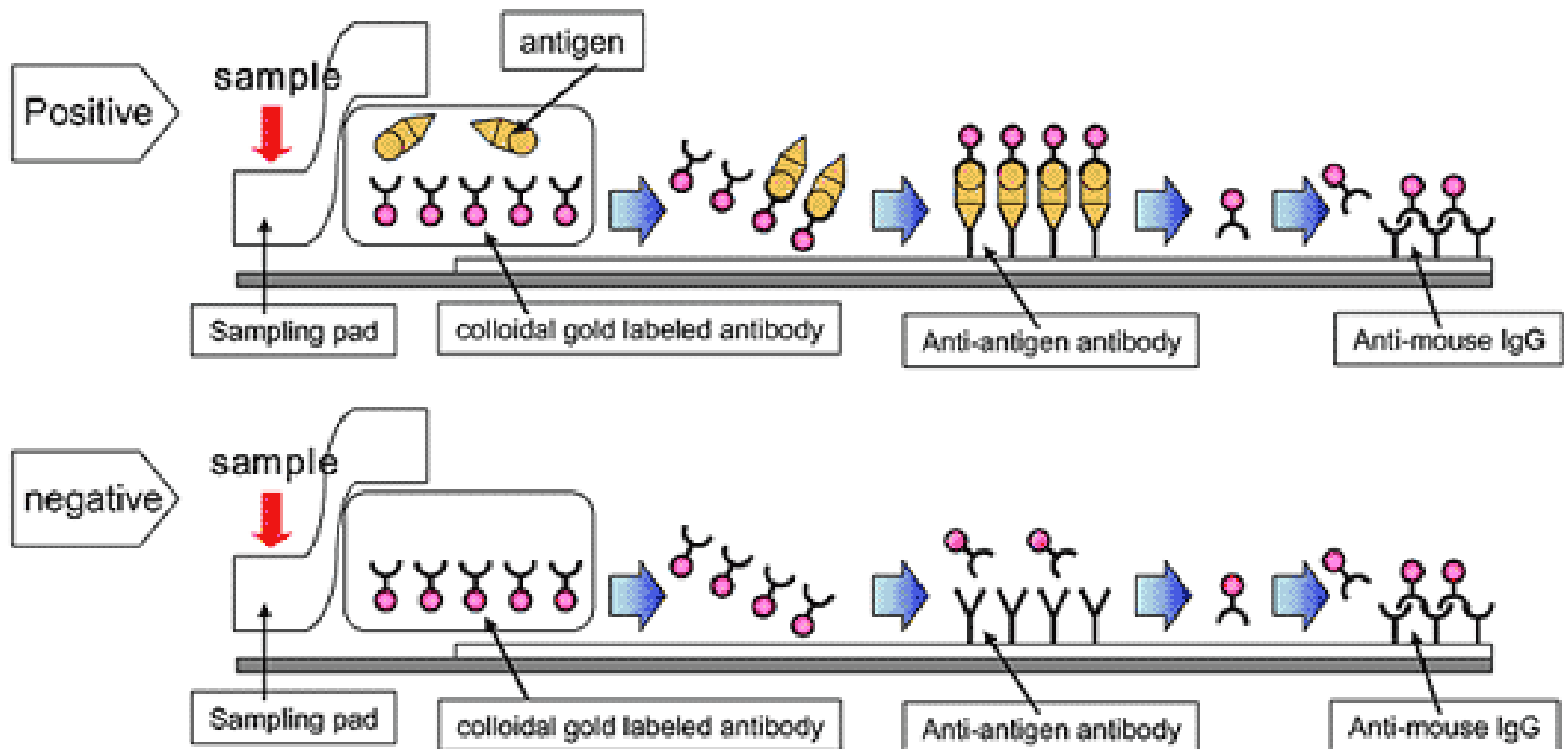
- U nepřímého průkazu reakcí ELISA se zpravidla hodnotí zvlášť protilátky IgM a IgG
- V daném případě se místo IgA používá IgM
- Za **pozitivní** se opět považují hodnoty vyšší než referenčně daný tzv. „cut off“
- Takže se například použije vzorec
 **$(B1 + C1)/2 + 0,320$ v případě IgA, resp.
 $(B3 +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



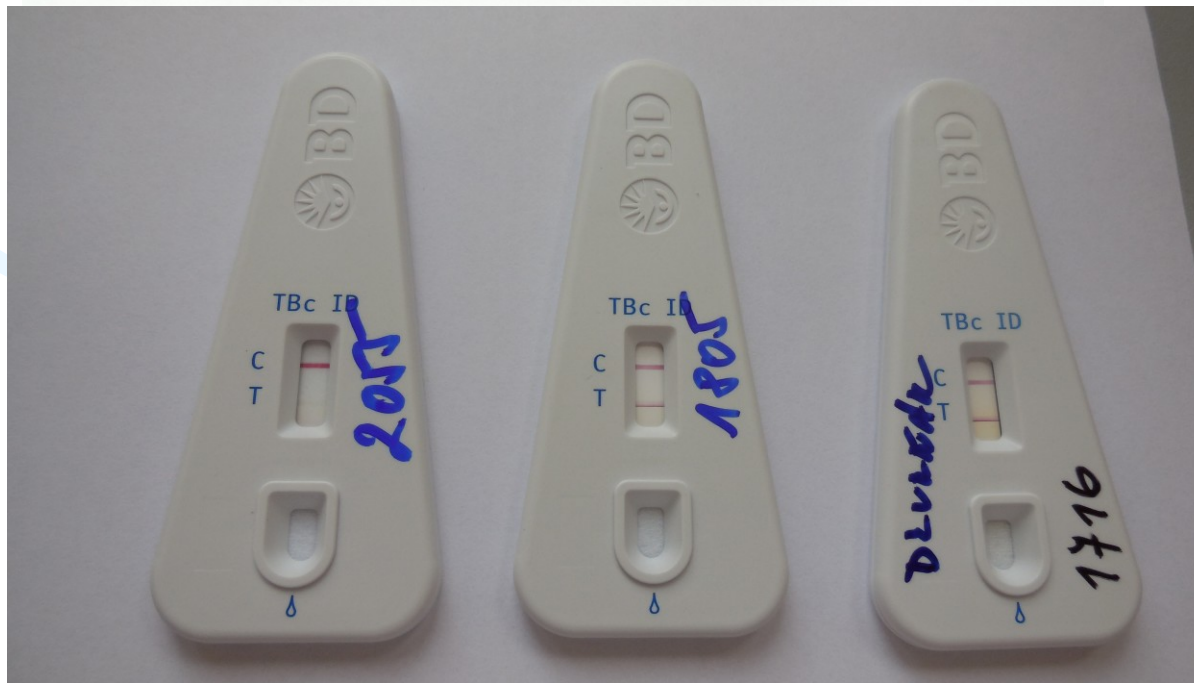
Kontrolní
oblast



-



Ukázky imunochromatografických testů



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)*

