

# **Lékařská mikrobiologie pro ZDRL**

**Týden 12**

**Neutralizační reakce, reakce se  
značenými složkami**

# 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

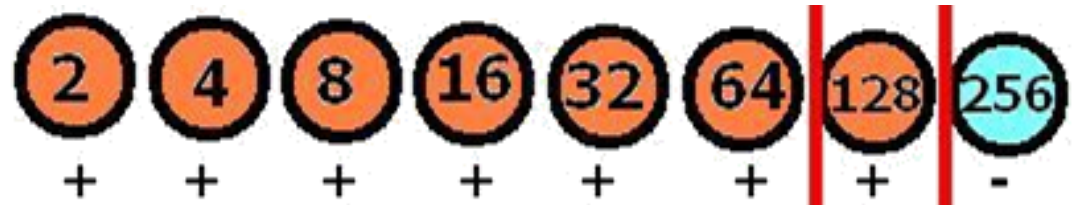
- **Průkaz antigenu** (včetně antigenní analýzy) je přímá metoda. Pozitivní výsledek znamená přítomnost mikroba v těle pacienta
- **Průkaz protilátek:** je to nepřímá metoda. Nicméně jsou způsoby, jak alespoň odhadnout, kdy přibližně se mikrob s tělem pacienta setkal:
  - **Množství protilátek (titr)**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



# Vzestupy a poklesy titru

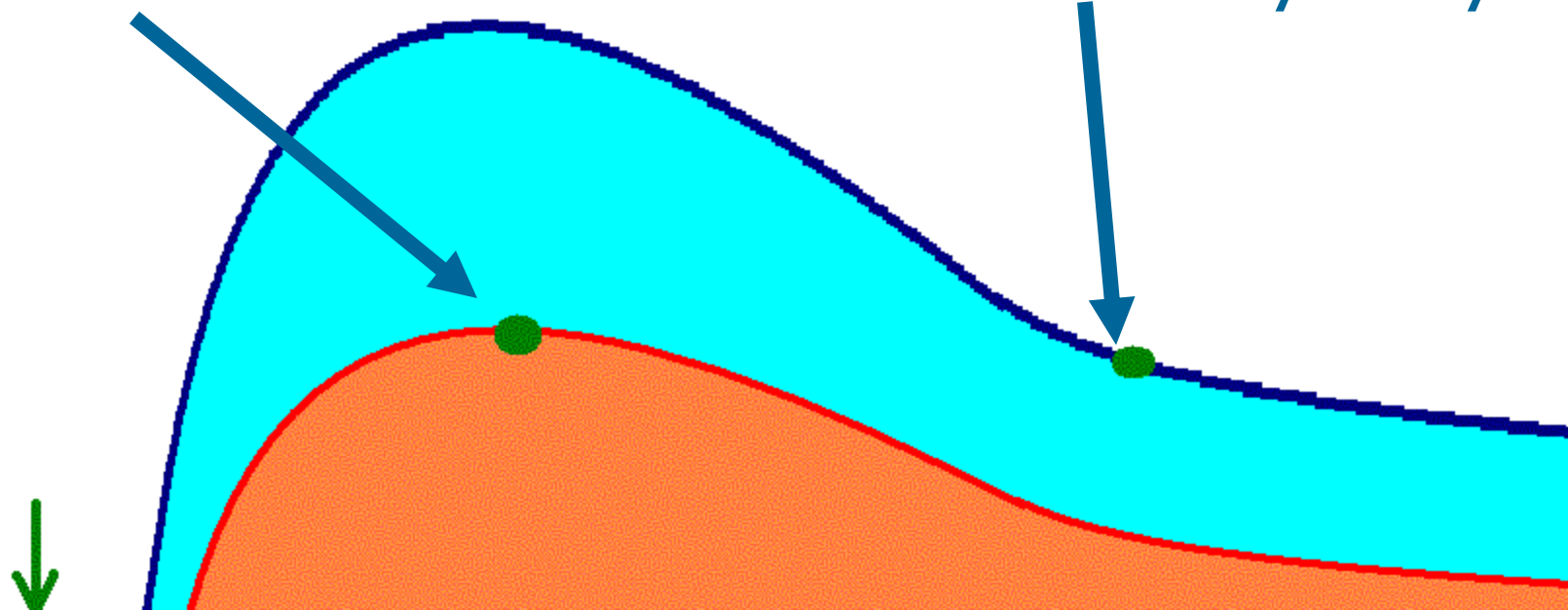


- **Titr** – nejvyšší ředění, kde je pozitivní reakce.
- Máme-li **dvě řady**, je titrem nejvyšší ředění z obou řad dohromady.
- Při použití geometrické řady znamená
  - vzestup/pokles titru o **jeden důlek dvojnásobný vzestup pokles**.
  - vzestup/pokles o **n důlků** je pak **vzestup/pokles  $2^n$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

	<b>Průkaz antigenu</b>	<b>Antigenní analýza</b>	<b>Nepřímý průkaz</b>
<b>Aglutinace</b>	občas	často	někdy
<b>Precipitace</b>	málokdy	málokdy	občas
<b>KFR</b>	často (viry)	ne	často (viry)
<b>Neutralizace</b>	občas	ne	často
<b>Značené složky</b>	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

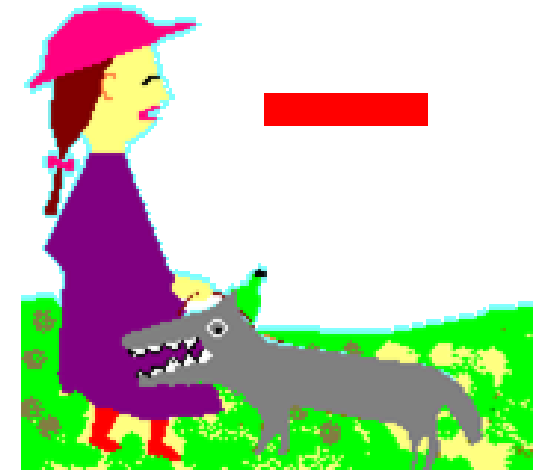
- Protilátka (Ig) brání efektu toxinu/viru na buňku / krvinku



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 mezinárodních jednotek znamená možnost autoimunitní odpovědi

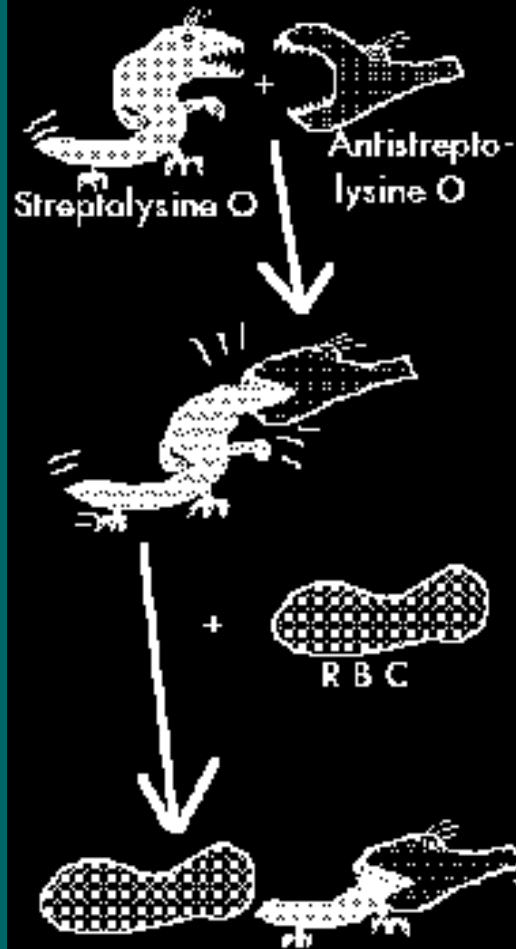
# Proč se dělá ASLO

- 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



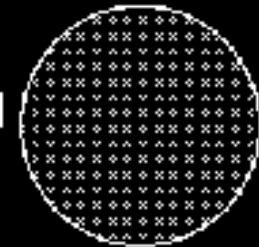
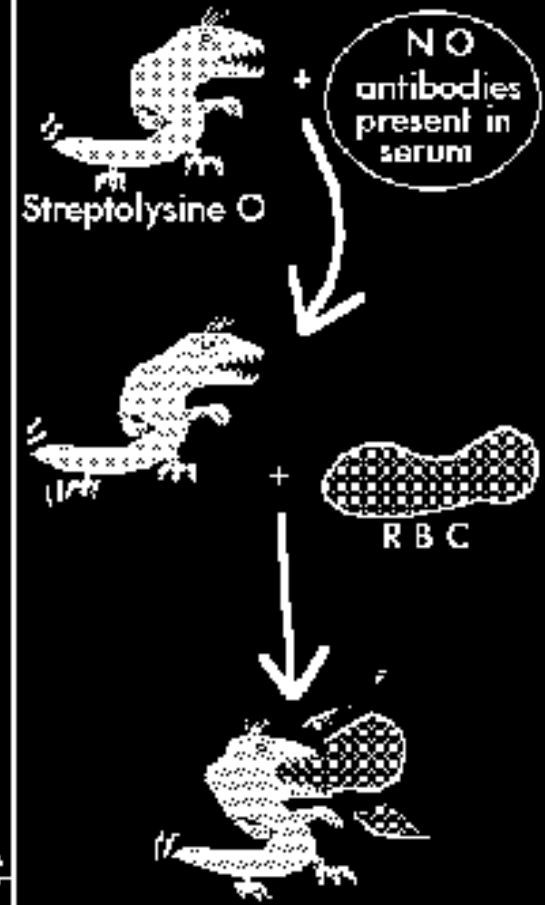
# ASLO: princip

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

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

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



# 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)

# 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 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

# 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

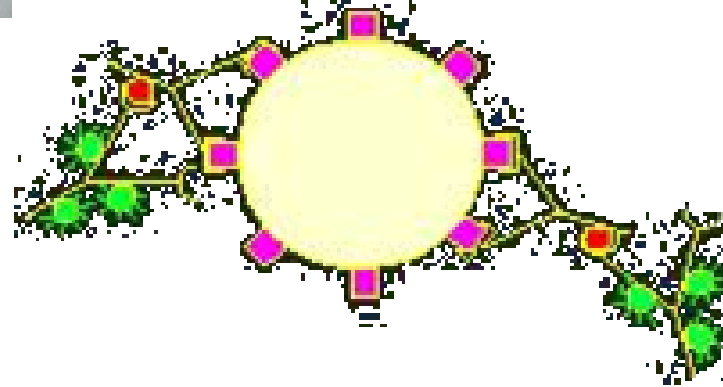
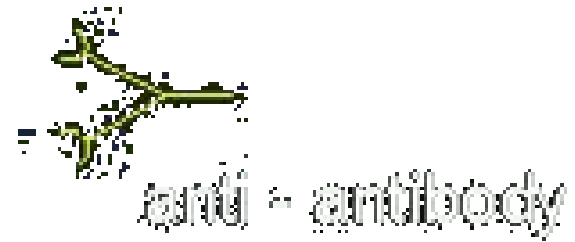
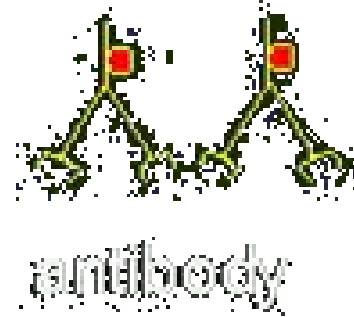
(sklíčko nebo dno  
důlku v destičce  
pro serologii)

# 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.*

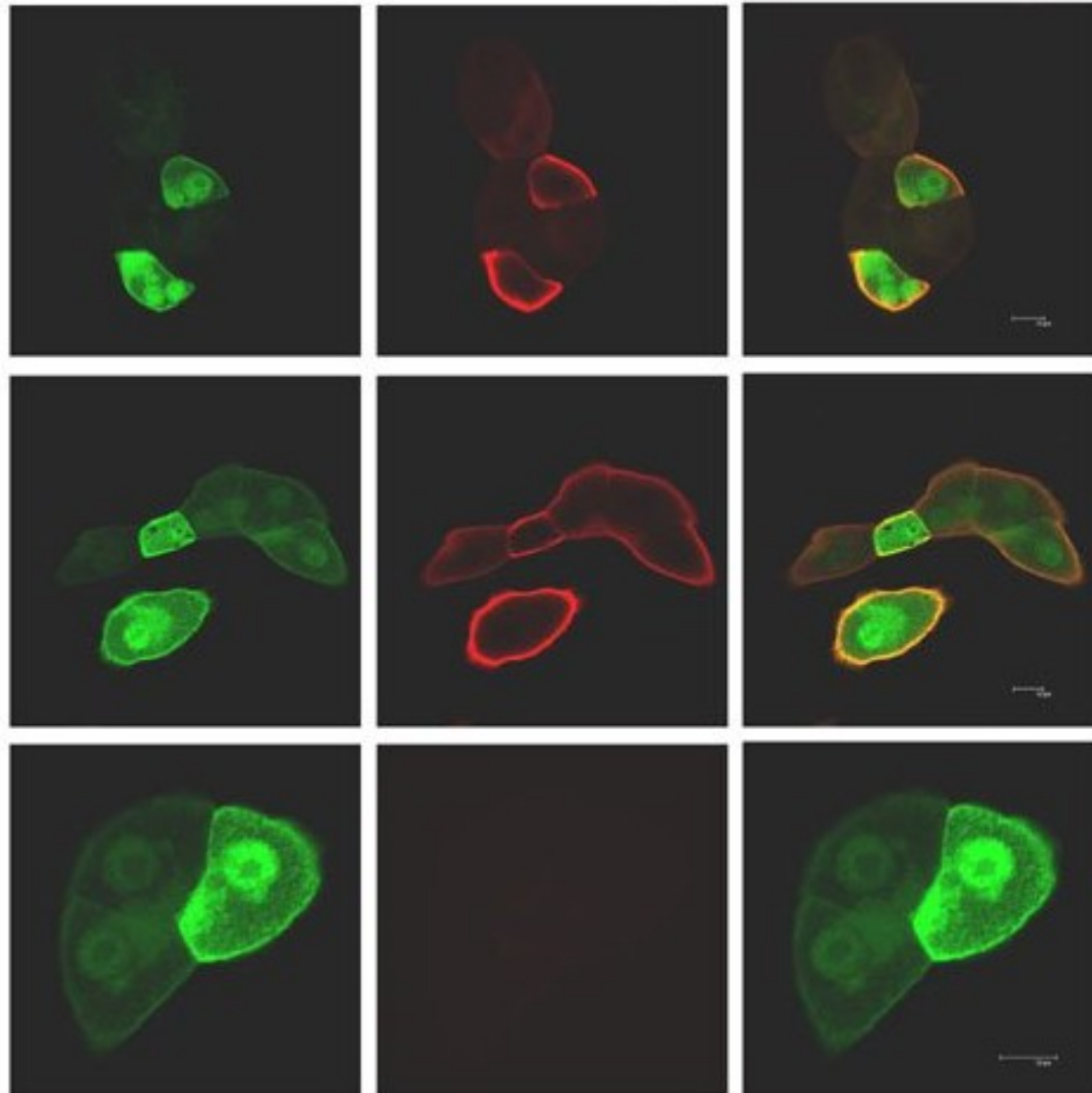
# Imunofluorescence



complex between antigen / antibodies  
and anti - antibodies

# Imunofluorescence

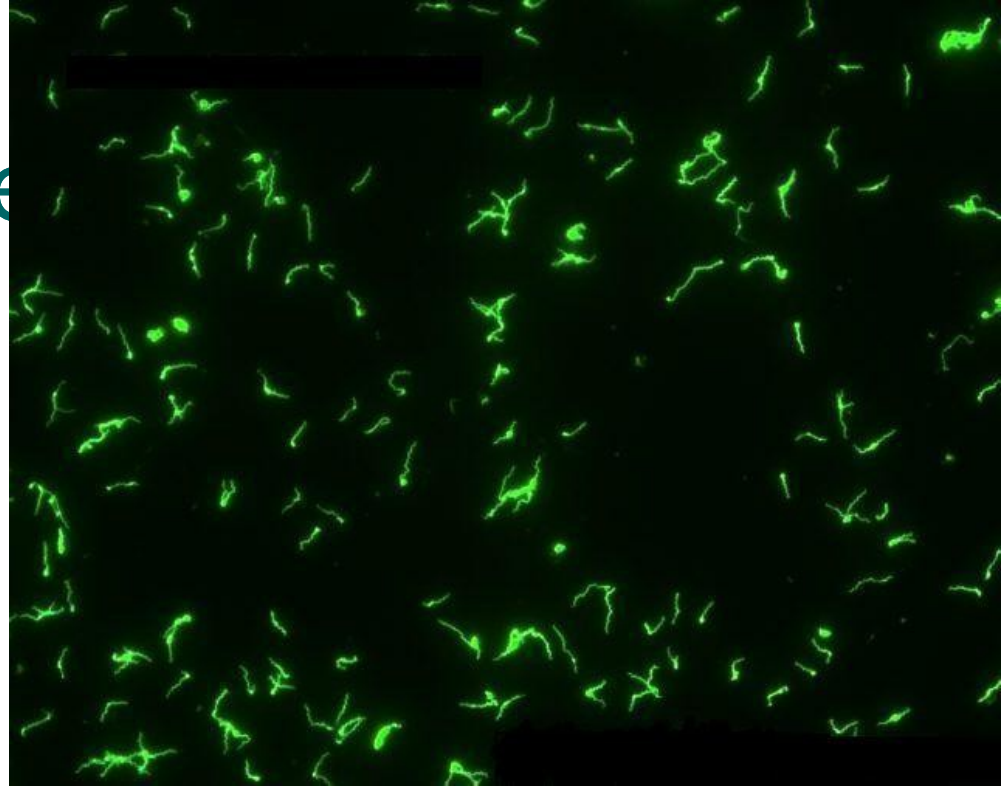
[www.amsbio.com](http://www.amsbio.com)





# Imunofluorescence

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



## Přímá imunofluorescence

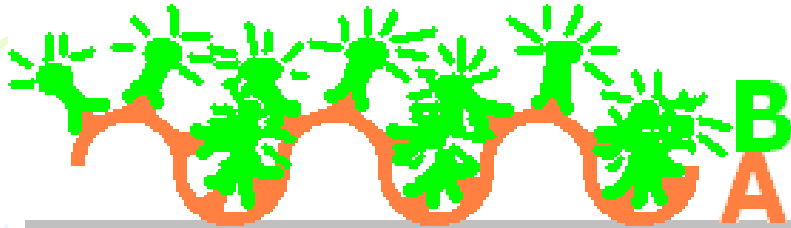
- (Povrch)-(antigen)-(značená protilátka)

## Nepřímá imunofluorescence

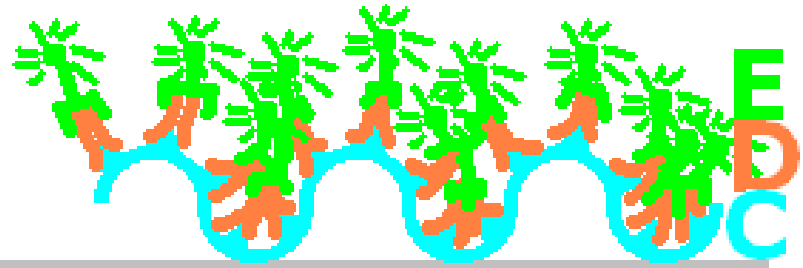
- (Povrch)-(antigen)-(protilátka)-(značená protilátka proti lidské protilátce)

# 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

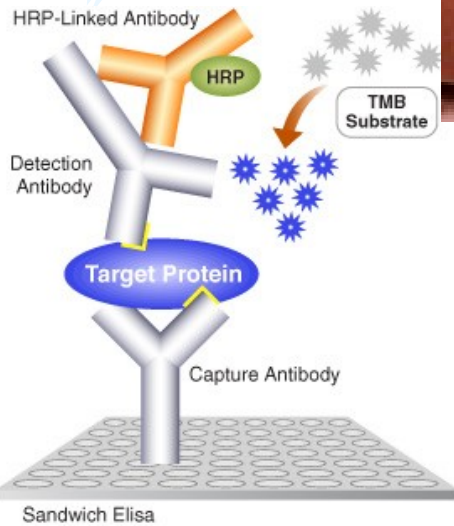
# ELISA



# ELISA

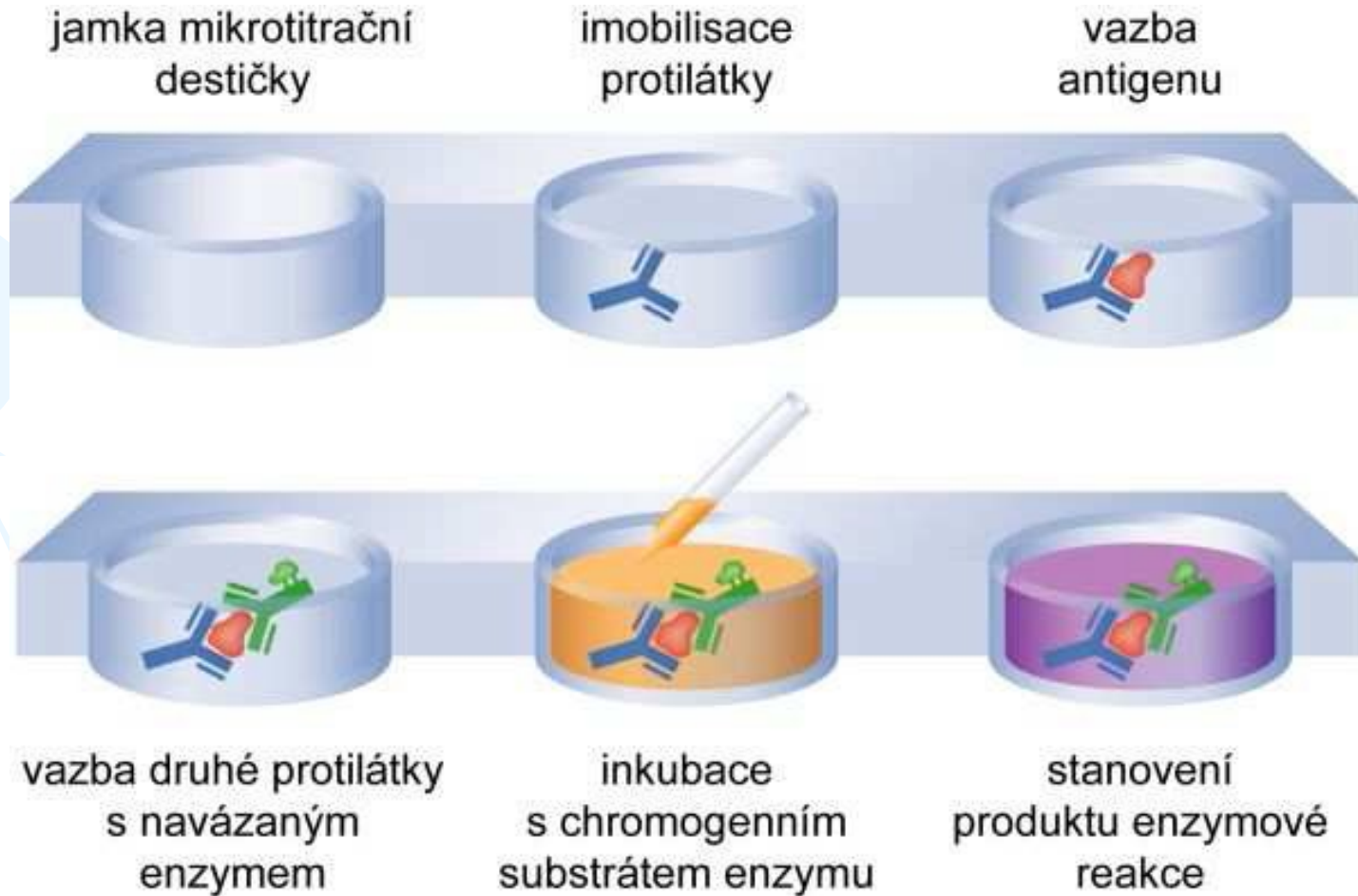


[www.cellsignal.com](http://www.cellsignal.com)



[virology-online.com](http://virology-online.com)

# ELISA



# 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

# 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*

# ELISA – praktické provedení

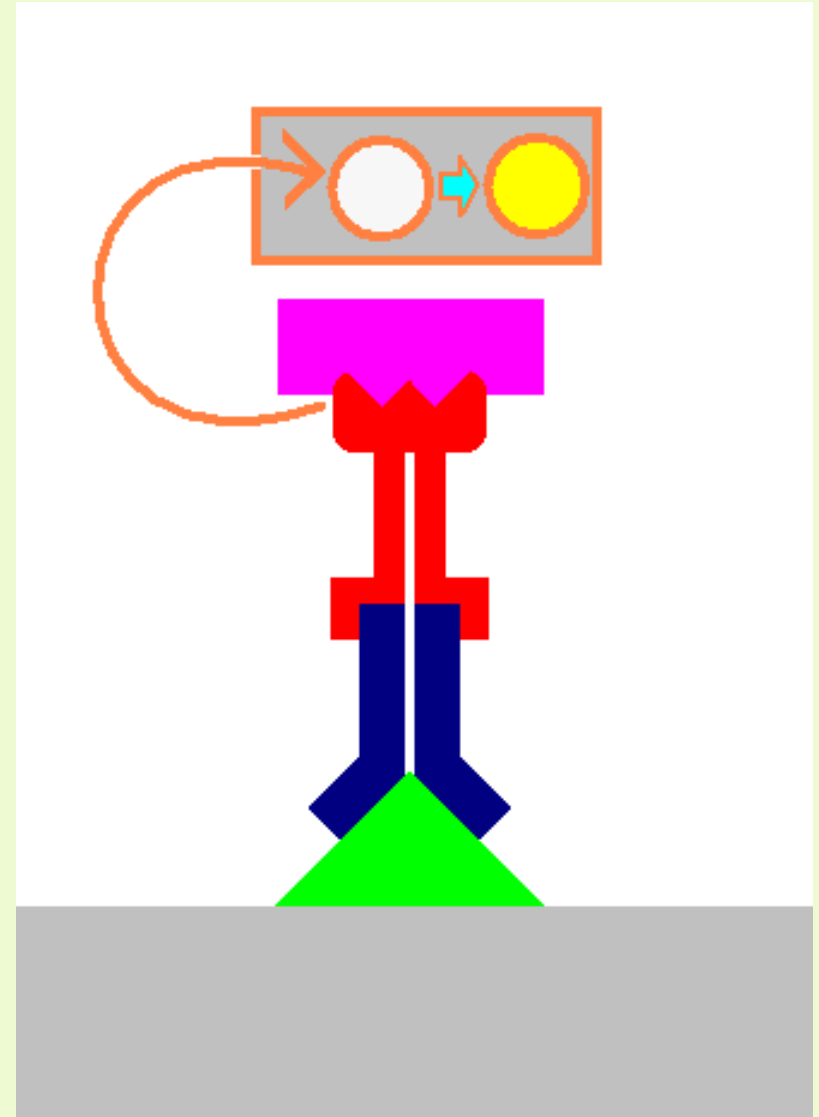
- Zpravidla máme k dispozici **destičku s jamkami**. Na rozdíl od klasických serologických reakcí má každý pacient nikoli celý řádek, ale jen jeden důlek. To proto, že nezjišťujeme titry
- Před vlastními důlky pacientů mohou být důlky:
  - **BI** – blank (pro kalibraci spektrofotometru)
  - **K-** a **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.*



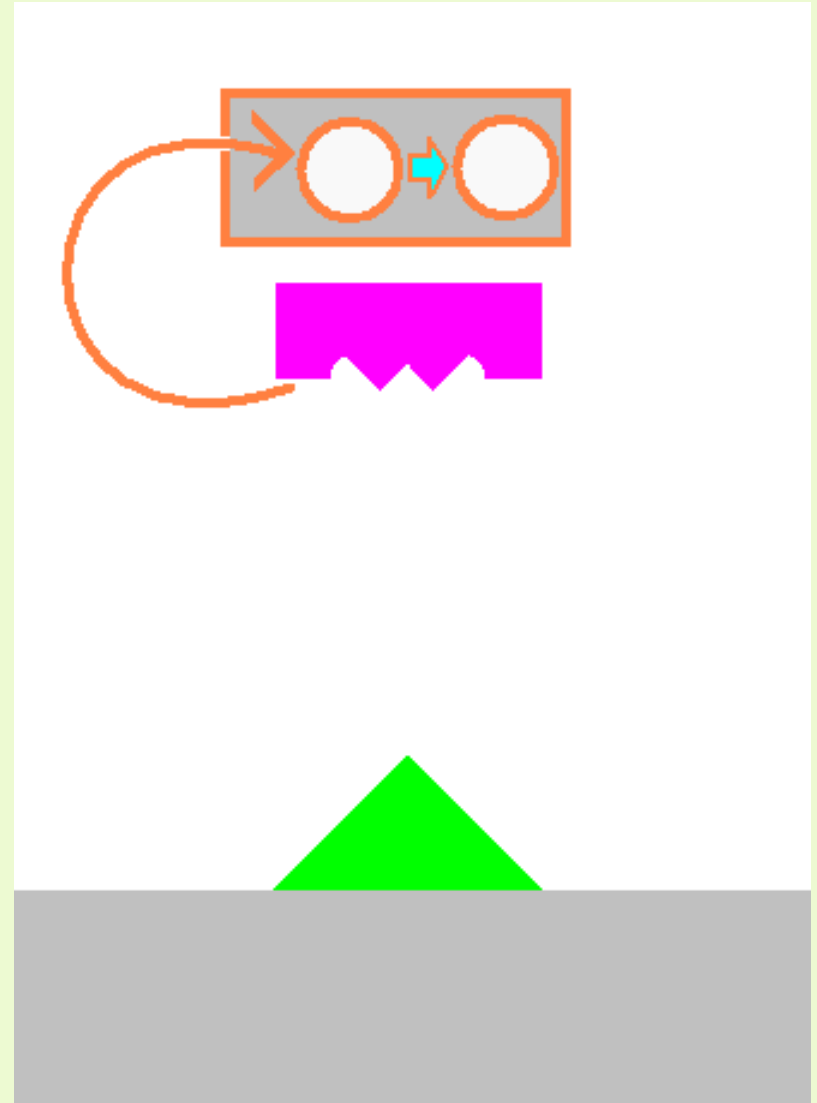
ELISA k detekci  
protilátky:  
1. Pozitivní  
(hledá se IgM,  
IgM přítomna)

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)

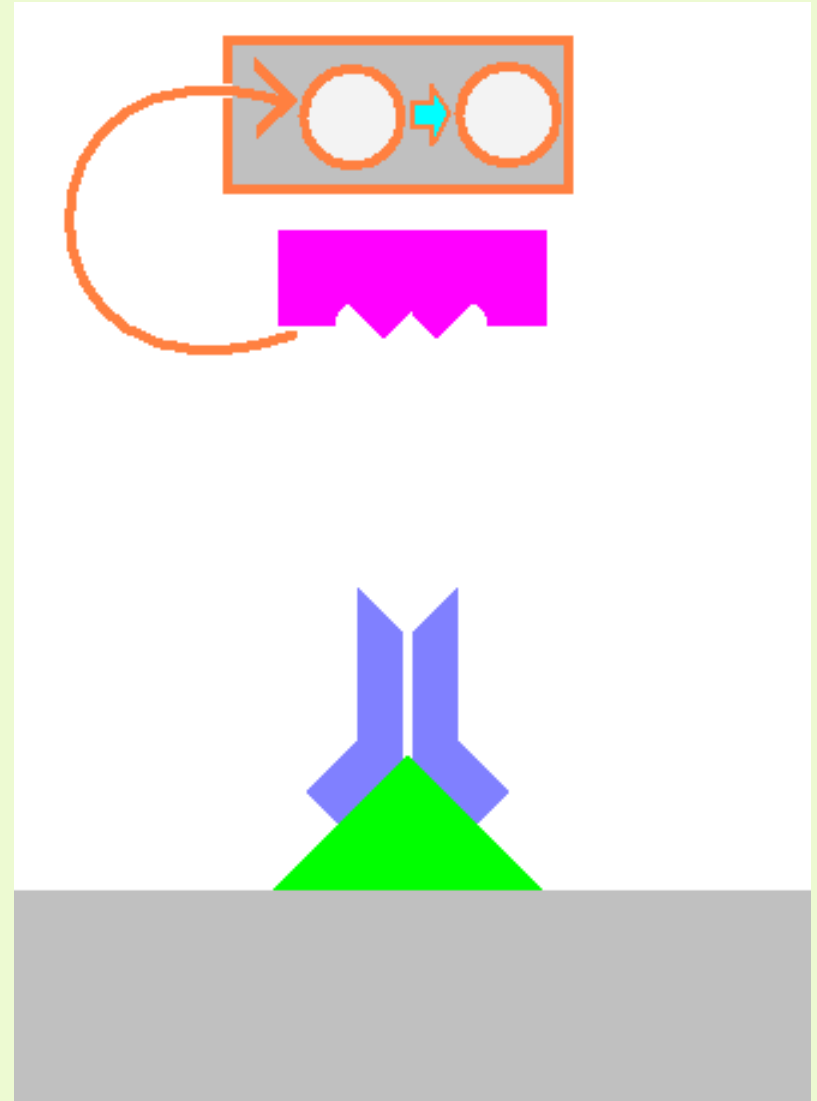
V séru pacienta  
nejsou protilátky.  
Konjugát je  
odplaven, v důlku  
není žádná změna.



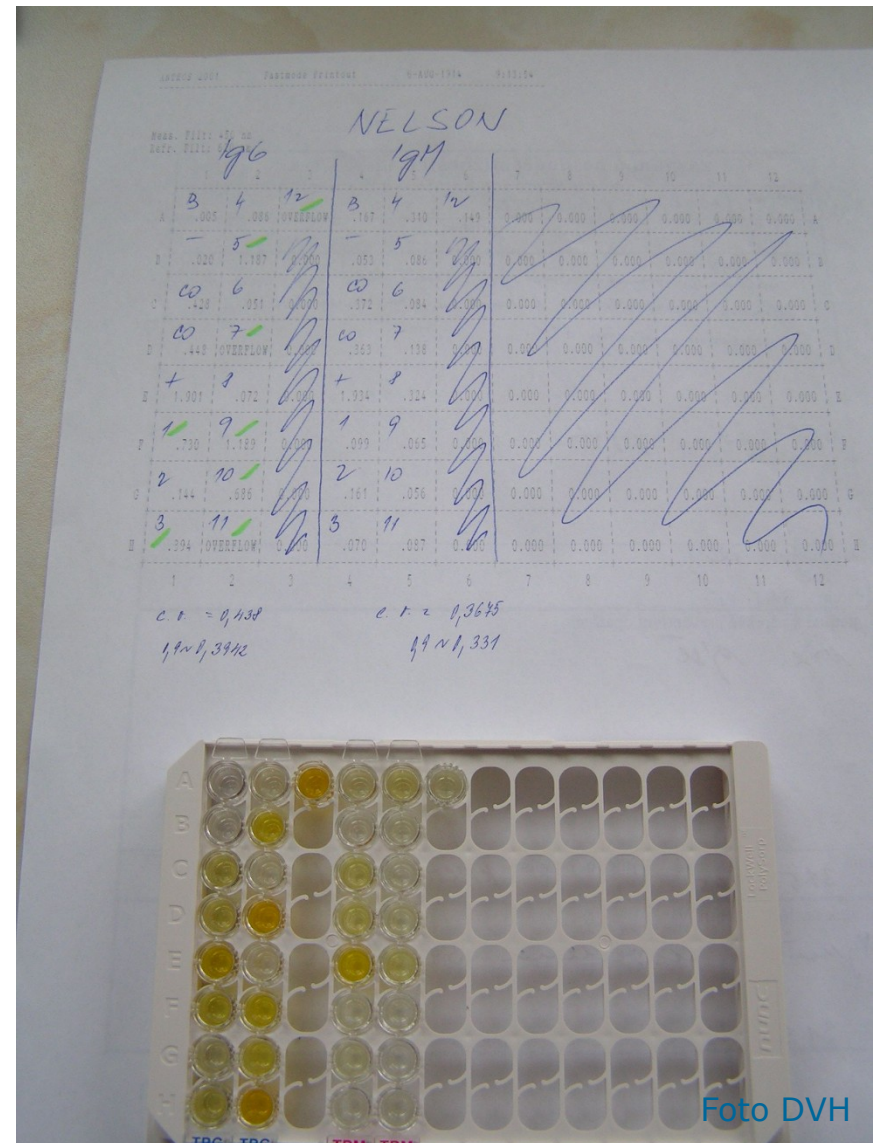
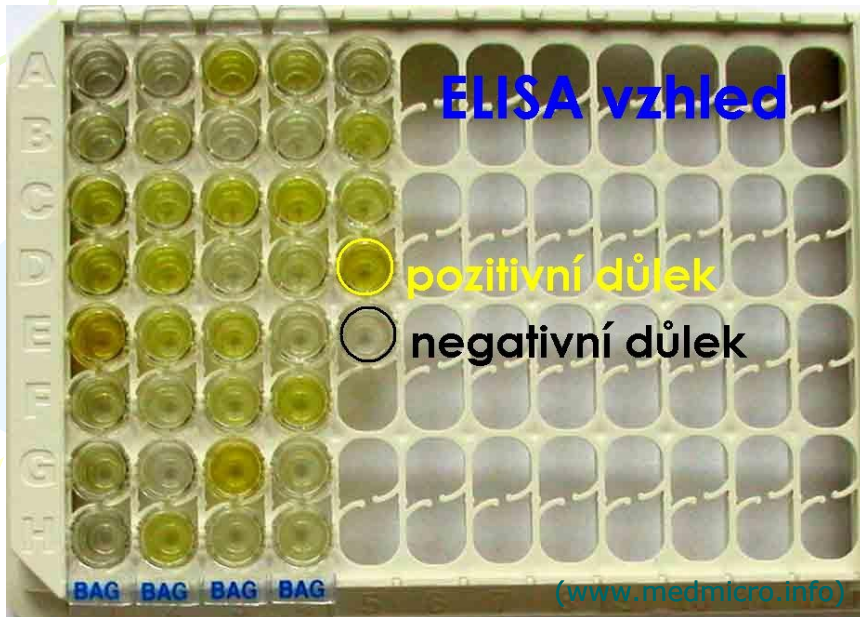
# ELISA k detekci protilátky:

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

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



# ELISA – ukázka



# ELISA, průkaz protilátek

- U nepřímého průkazu reakcí ELISA se zpravidla hodnotí zvlášť protilátky IgM, IgA a IgG



# 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

# 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

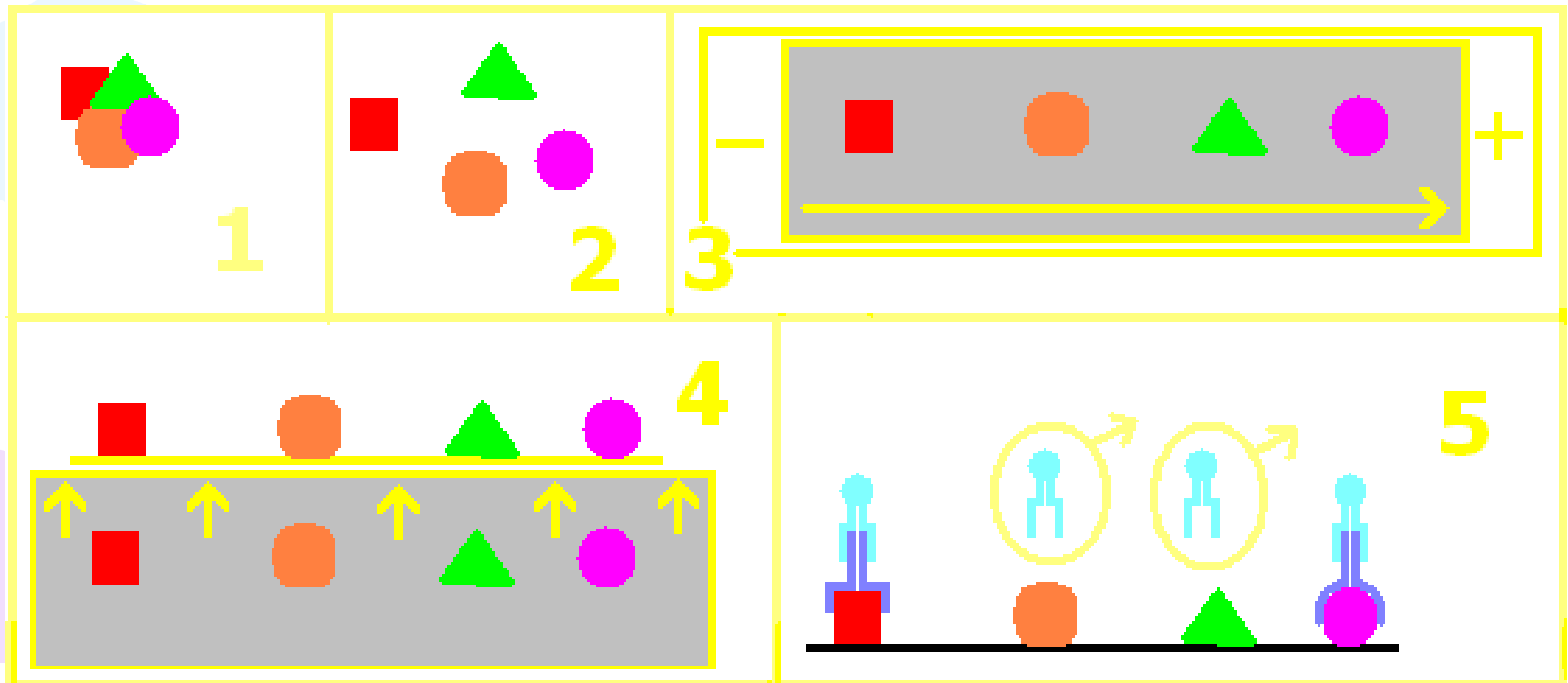
1: původní antigen (směs)

2: uvolnění jednotlivých antigenů detergentem

3: elektroforetické rozdělení antigenů

4: „přesátí“ rozdělených antigenů na nitrocelulózu

5: reakce ELISA (přítomny jsou jen některé protilátky)





# Souprava imunoblot

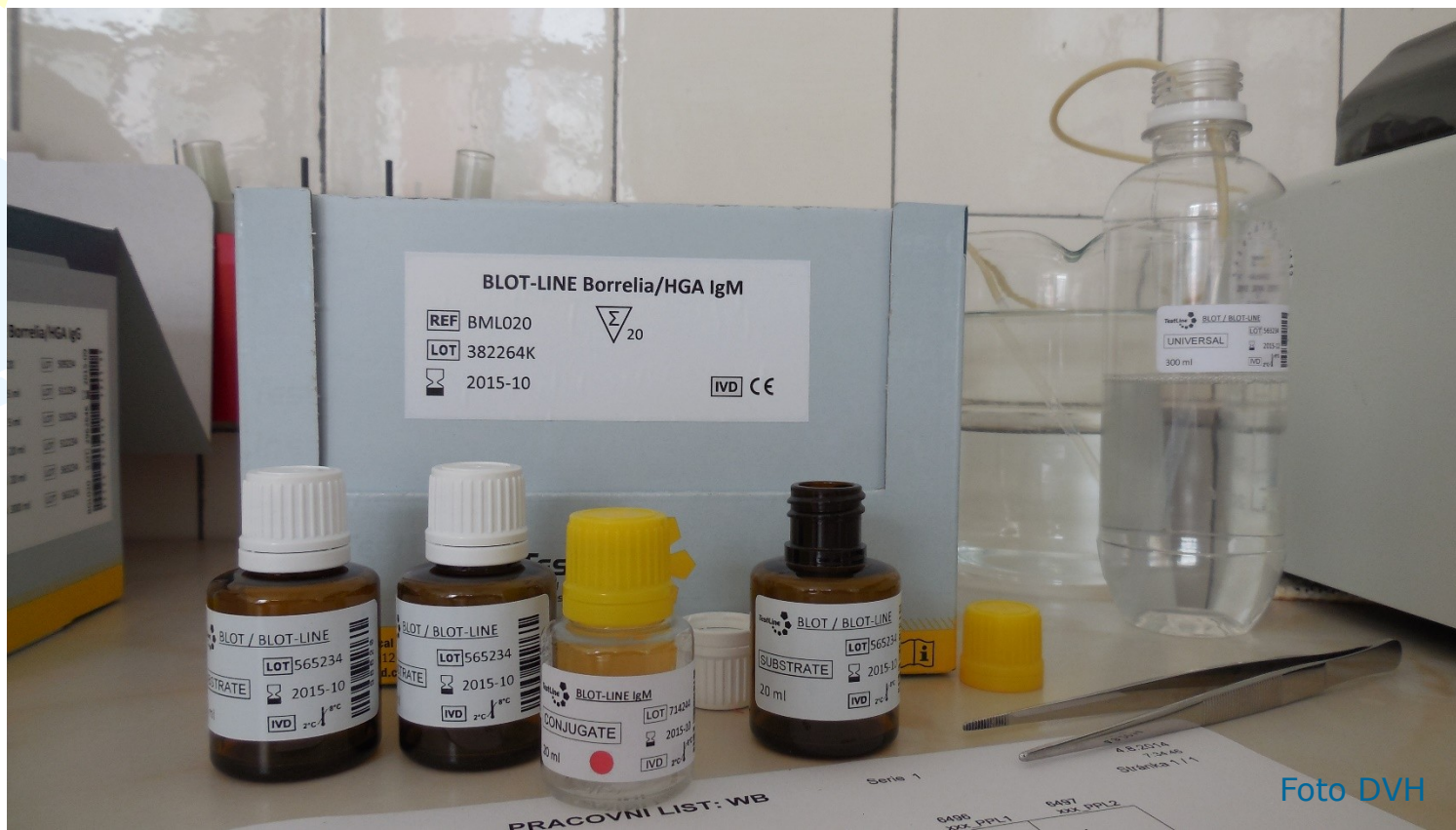
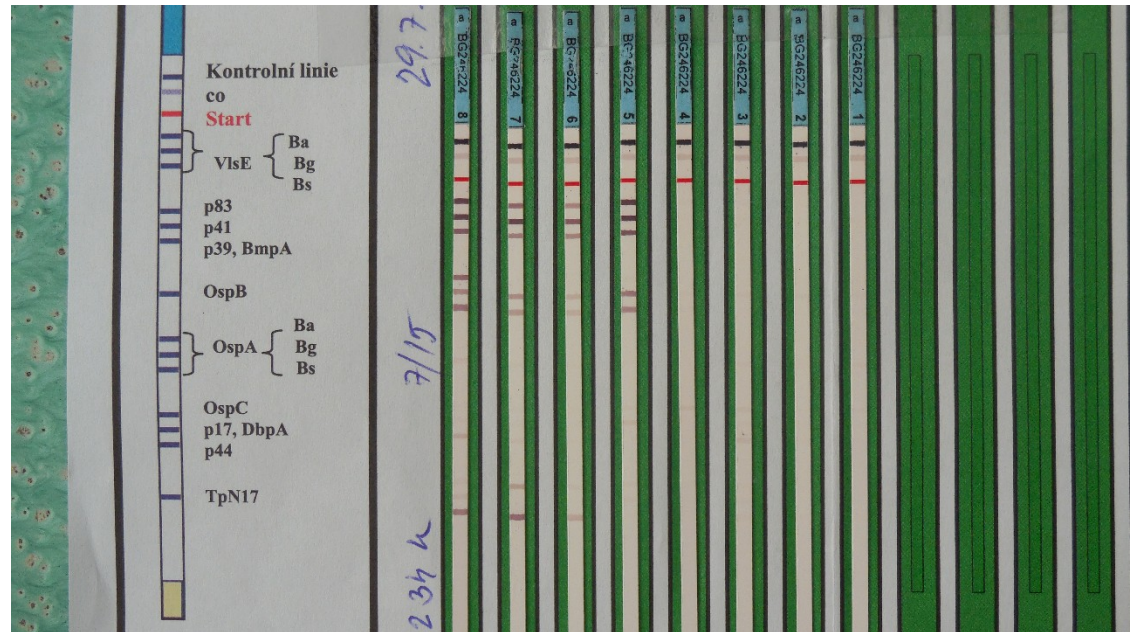
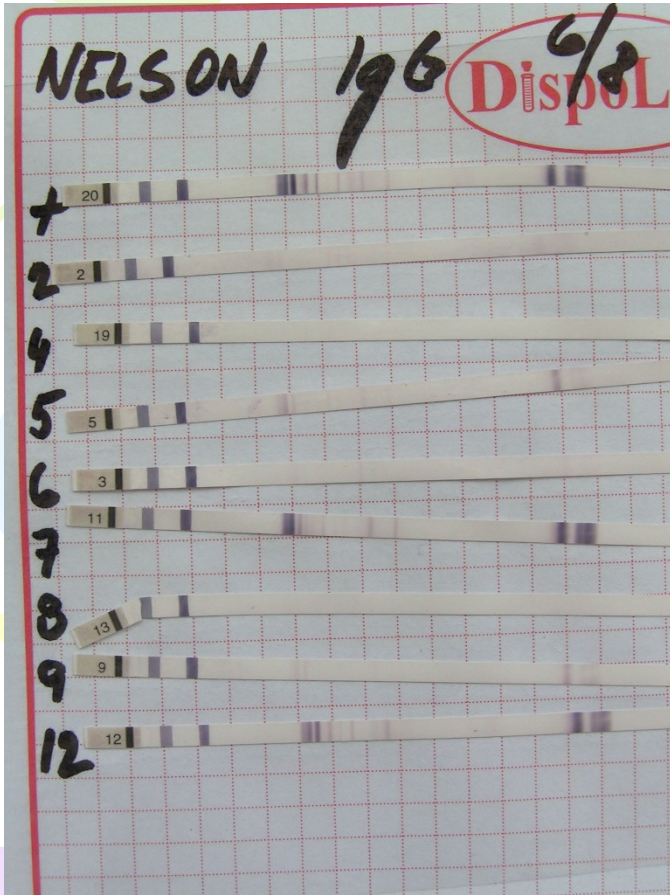


Foto DVH

# Western blot - ukázky



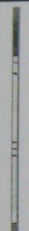
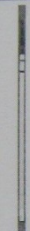
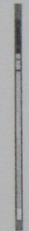


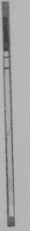
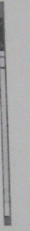
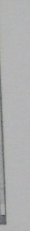
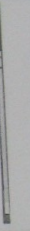
# Western blot výsledný protokol

## Souhrnné vyhodnocení

### BLOT-LINE Borrelia/HGA IgM

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

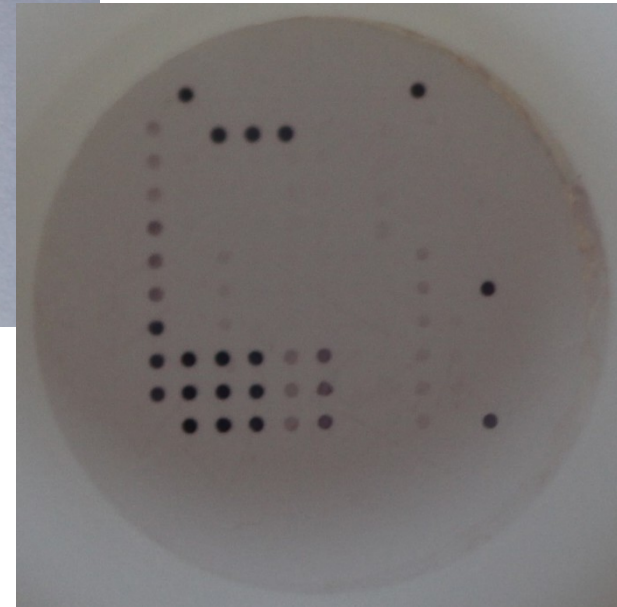
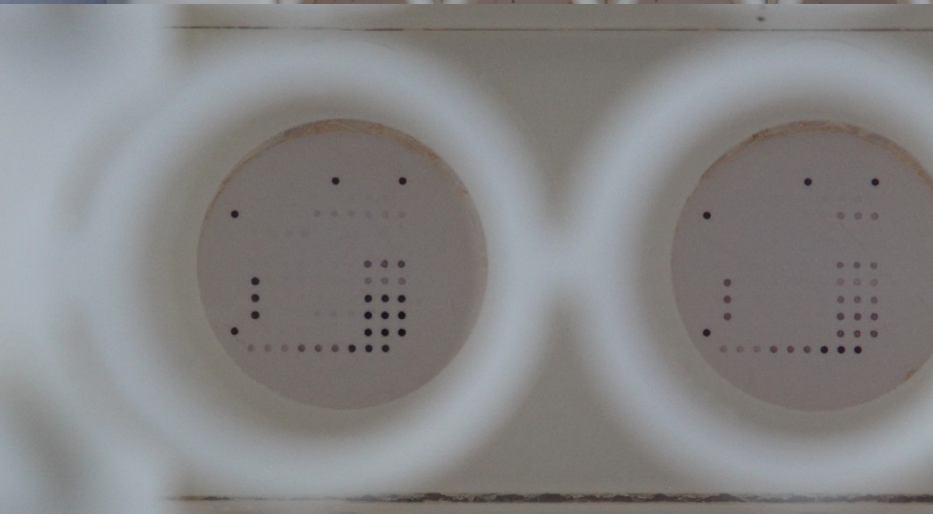
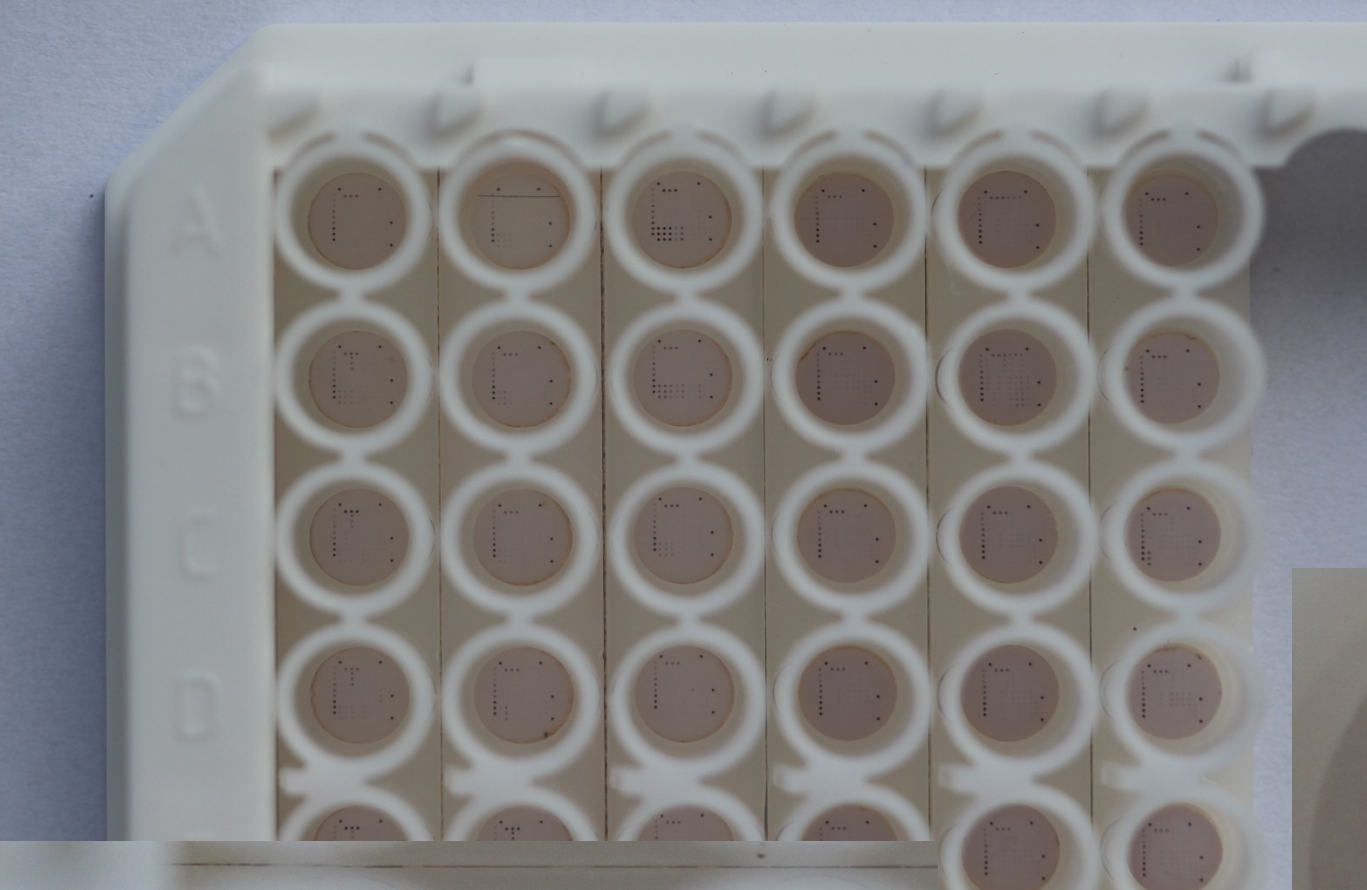
#### Snímek skenu (1 - 9):

	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



# Microblotarray

# Chemiluminiscentní metody (imunoanalýza)

- Značidlem je chemiluminofor
- Dochází k vyzáření světla, které je následně detekováno
- Běžně se tato metoda užívá v modifikaci CMIA (Chemiluminiscent Microparticle Immunoassay)
- Antigen nebo protilátka jsou navázána na paramagnetické částice
- Přidává se vyšetřovaný vzorek pacienta (vše probíhá ve vodném prostředí)
- Po promytí se přidává konjugát značený akridinem
- Následuje promytí



# Chemiluminisceční metody (imunoanalýza)

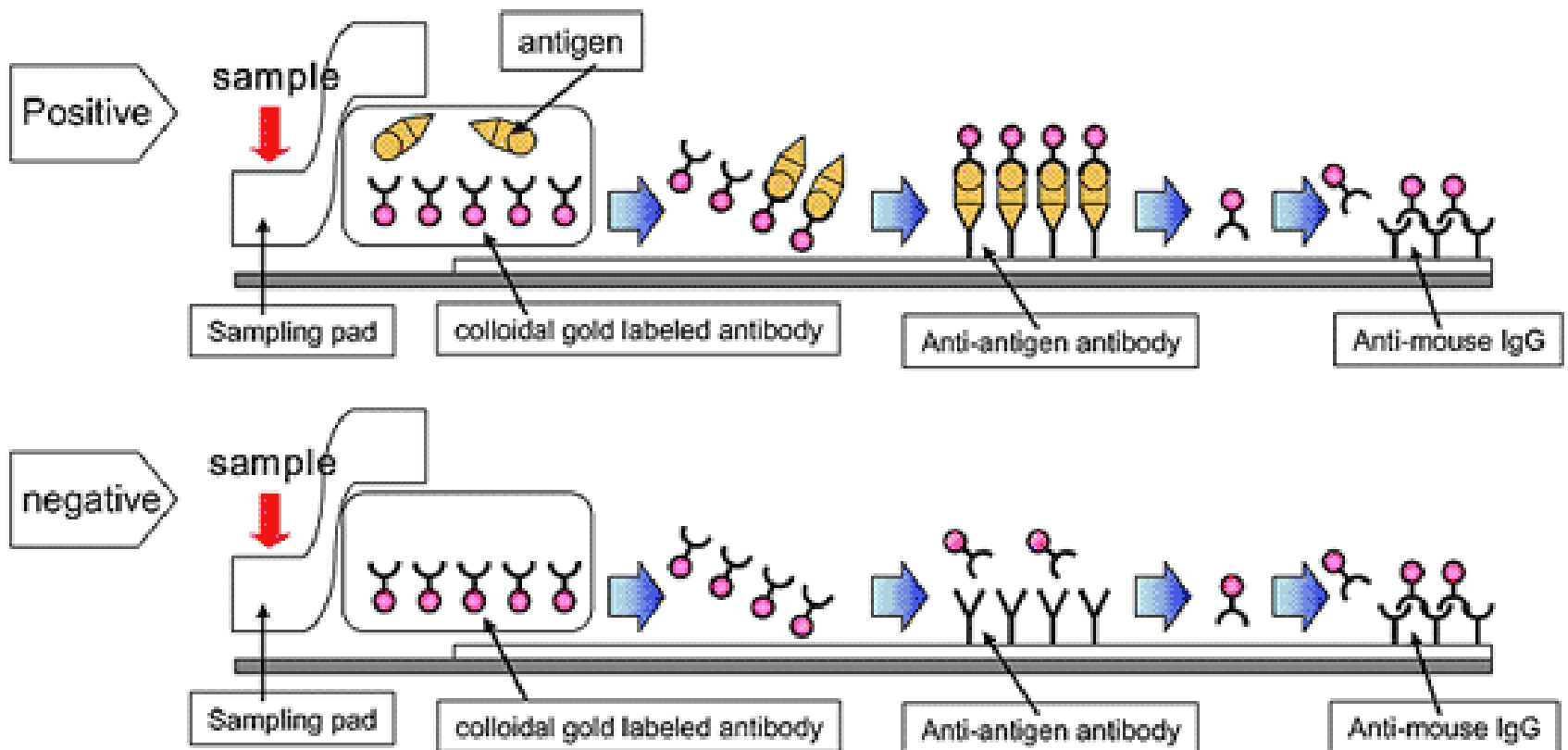
- Do reakční směsi se přidává  $H_2O_2$  a NaOH  
→ oxidace akridinu a vznik nestabilní formy v excitovaném stavu
- Při přechodu do stabilní formy dochází k uvolnění energie → emise světla, které je detekováno
- Výsledná chemiluminiscence se měří v relativních světelných jednotkách (RLU)
- Reakce se vyhodnocuje na základě porovnání naměřené hodnoty vzorku s hodnotou cut off (naměřené při kalibraci)

# 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](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)*

