

Pátráme po mikrobech
Díl IX.
Neutralizační reakce

Ondřej Zahradníček
K praktickému cvičení pro VLLM0421c

Kontakty na mne:

777 031 969

zahradnicek@fnusa.cz

ICQ 242-234-100

Co už umíme

- Umíme používat **mikroskopii, kultivaci a biochemickou identifikaci**
- Víme, **jak bojovat s mikroby pomocí dekontaminačních metod a antimikrobiálních látek** a umíme otestovat účinnost těchto postupů
- Víme, jak diagnosticky využít reakci antigenu s protilátkou, a víme, čím se liší **precipitace, aglutinace, aglutinace na nosičích a komplementfixace**

Pohádka

- Byl jednou jeden krvežíznivý toxin, a ten dostal chuť na červenou krvinku
- Tento toxin měl ovšem zároveň vlastnosti antigenu, proti kterému se tvoří protilátky
- A jak se tak ten **toxin chystal rozbít krvinku**, postavila se před něj **protilátka**, navázala se na něj a **nedovolila mu krvinku rozbít**
- Červená krvinka se radovala, a spolu se sestřičkami vesele sedimentovala na dno

Poučení z naší pohádky

- Dnes máme na programu **neutralizaci**
- Tato reakce se uplatní v případě **virů** nebo **bakteriálních toxinů**, které mohou být **přímo neutralizovány příslušnou protilátkou**
- Celá bakterie se zpravidla jen tak jednoduše neutralizovat nedá
- Většina aplikací neutralizace je tedy **ve virologii**. Výjimkou je však nejběžnější serologická reakce vůbec – **reakce ASLO**

Typy metod – opakování

- **Přímé metody:** detekce mikroba, jeho části nebo produktu. Mikroskopie, kultivace, biochemická identifikace, průkaz antigenu. **Pozitivita** = je jisté, že agens je NYNÍ přítomno.
- **Nepřímé metody:** detekce protilátek proti mikrobovi. **Pozitivita** = mikrob potkal hostitele v minulosti (nevíme, zda před týdny / měsíci / roky)

Antigen a protilátka – opakování

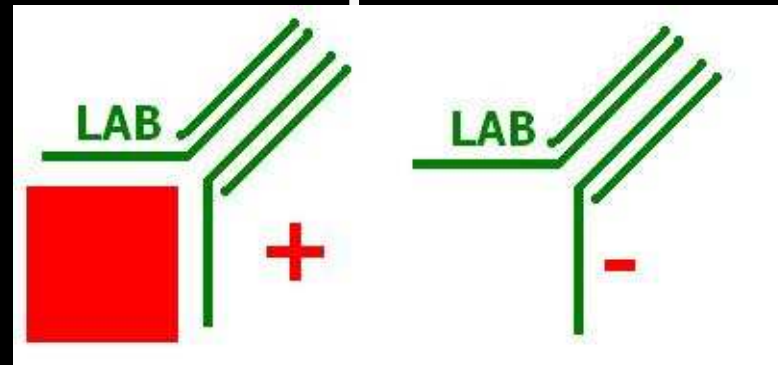
Antigen = makromolekula pocházející z cizího organismu: rostliny, mikroba, jiného živočicha. V mikrobiologii nás zajímají mikrobiální antigeny = části mikrobiálního těla, které vzbuzují v hostiteli antigenní odpověď

Protilátka = imunoglobulin, tvořený v těle hostitele jako odpověď na antigenní výzvu (samozřejmě nejen u člověka, ale i u zvířat)

Jak interakci využít – opakování

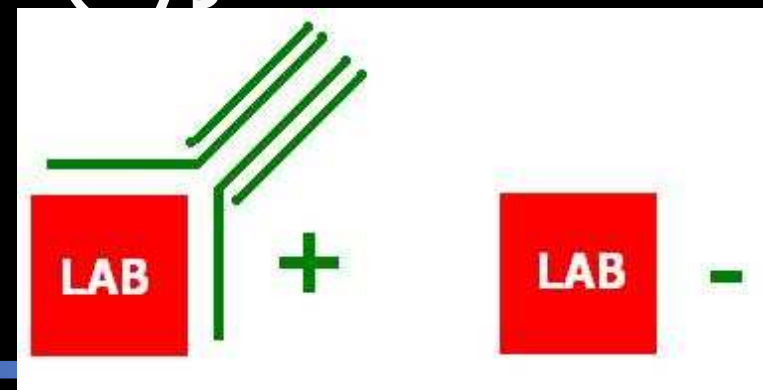
Průkaz antigenu: laboratorní protilátky (zvířecího původu) + vzorek pacienta nebo kmen mikroba.

Přímá metoda



Průkaz protilátky: laboratorní antigen (mikrobiální) + sérum (výjimečně sliny, likvor) pacienta

Nepřímá metoda



Interpretace – opakování

- Průkaz antigenu je přímá metoda. Pozitivní výsledek znamená přítomnost mikroba v těle pacienta
- Průkaz protilátek je nepřímá metoda. Jak odhadnout, kdy se mikrob s tělem pacienta setkal:
 - Množství protilátek (titr) a zejména změna tohoto množství (*dynamika titru*)
 - Třída protilátek: IgM/IgG (více v J10)
 - Avidita protilátek (v praxi se neprobírá)

Dynamika titru - interpretace

změněné opakování



- **Serokonverze** je ideální případ, kdy první („akutní“) vzorek je odebrán ještě před nástupem protilátkové odpovědi. V tom případě stačí, když je druhý je pozitivní, bez ohledu na výši titru
- **Změna titru** se týká ostatních případů. U párových sér se za signifikantní považuje zpravidla čtyřnásobná změna (vzestup i pokles titru)

Párová a nepárová séra opakování

- **Párová séra** = první vzorek je uchováván v ledničce, dokud nepřijde i druhý. Pak jsou oba hodnoceny naráz. **4násobný vzestup** se v tom případě má za signifikantní pro akutní infekci.
- **Séra nejsou párová** (druhý vzorek je vyšetřen zvlášť): zvětšuje se riziko náhodné chyby, proto zpravidla vyžadujeme **8násobný vzestup** titru

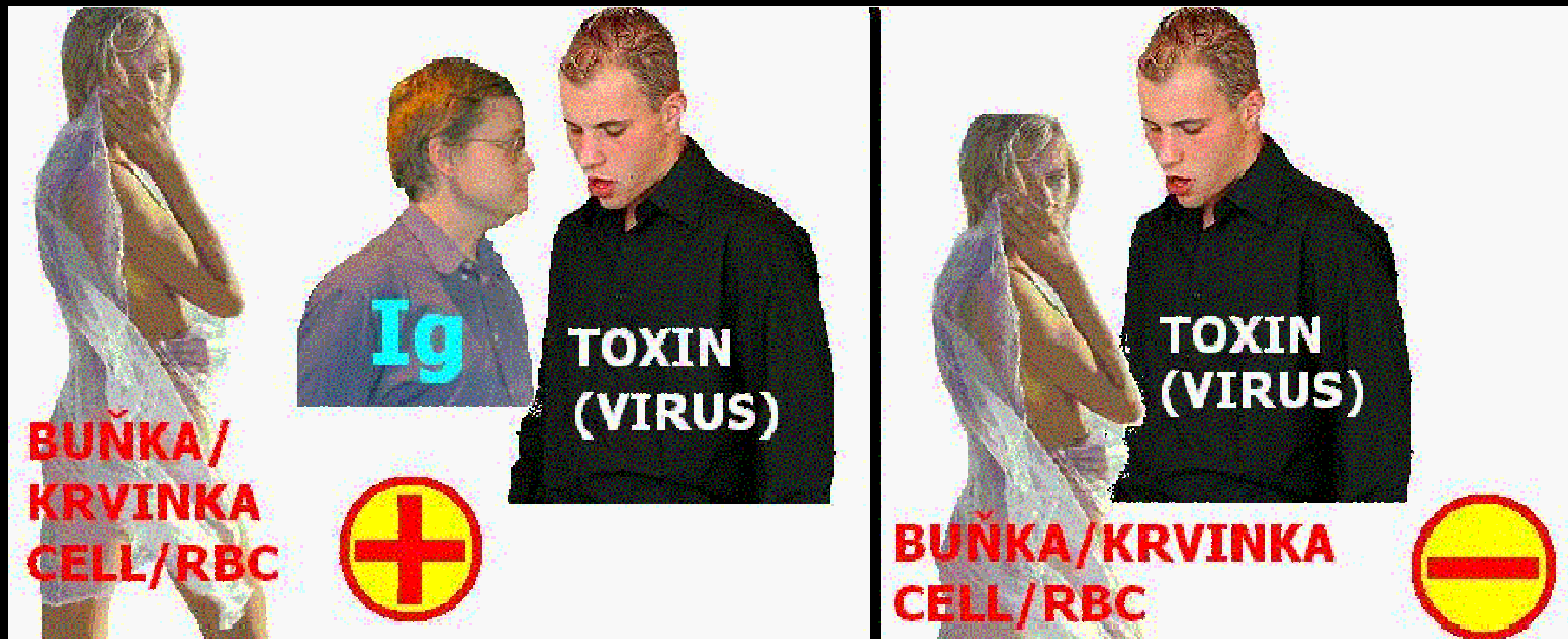
Neutralizační reakce: obecný princip

- 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 = streptolyzín O, Ig = antistreptolyzín O, krvinka)



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 |

Před úkolem 1: Co je to antistreptolysin O a proč ho prokazujeme

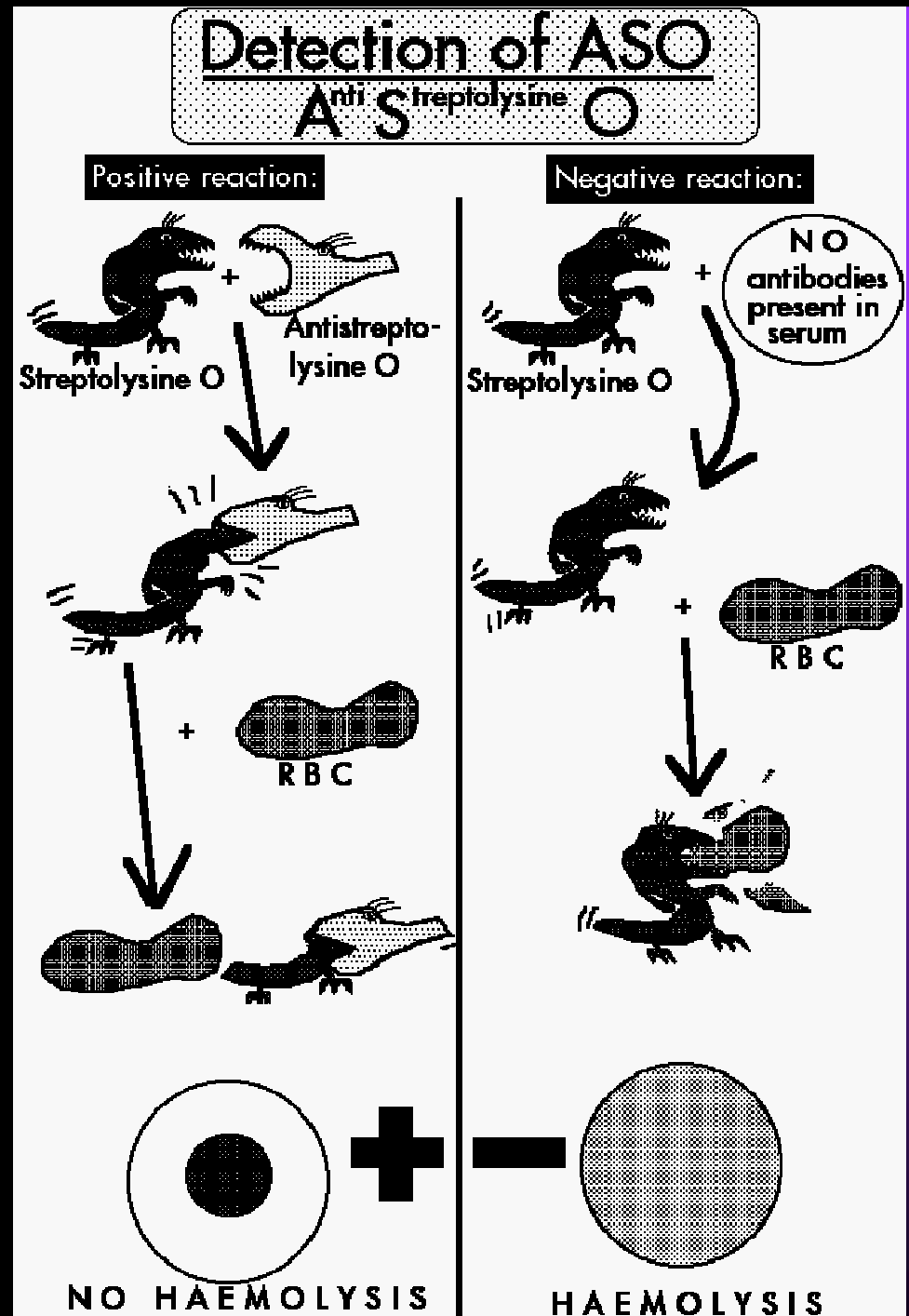
- Po každé streptokokové infekci se objevují **protilátky**, včetně protilátek proti streptokokovému toxinu – streptolysinu O.
- Někdy se však stane, že množství těchto protilátek po infekci neklesá, naopak stoupá. **Protilátky se totiž vážou na některé struktury hostitelského organismu (autoimunita), roztácejíce „bludný kruh“.**
- V takovém případě jsou tedy **paradoxně nebezpečnější protilátky než patogen**, proti kterému nás měly chránit.

Pamatujte:

- ASLO není nepřímý průkaz, přestože hledáme protilátky. Nepátráme tu po patogenovi, určujeme samotné protilátky, jež mohou být nebezpečné
- Indikací k vyšetření ASLO je podezření na tzv. pozdní následky streptokokových infekcí – akutní glomerulonefritida či revmatická horečka

Princip vyšetření ASLO: neutralizace hemolýzy

Všimněte si, že v angličtině se ASLO označuje jako ASO. Zrada je, že zkratka ASLO přitom také existuje a označuje stafylolysin.



Úkol 1: ASLO

- **Princip:** Protilátka blokuje hemolytický efekt toxinu (streptolyzinu O) na krvinku. Pozitivní je tedy zábrana hemolýzy se sedimentací krvinek (podobně, jako u KFR, ale ze zcela jiného důvodu)
- **Pozor! Věta z protokolu o dvou řádcích a počátečním ředění 1 : 40 a 1 : 60 NEPLATÍ.** Ve skutečnosti má každý pacient jen jeden řádek. **Taktéž neplatí věta o tom, že v prvním sloupci jsou kontroly.**
- **Panel se odečítá naležato.** Obsahuje pozitivní kontrolu a sedm pacientů.
- **Titř nad cca 250** znamená riziko, že pacient je ohrožen pozdními následky streptokokové infekce.

Postup ředění séra – ASLO

Jinak obvyklý postup (ředění geometrickou řadou s koeficientem 2) by byl v tomto případě příliš hrubý, potřebujeme jemnější ředění. Jde sice o geometrickou řadu, avšak s koeficientem pouze 1,2.

Hodnocení výsledků ASLO

| řad. ka. čís. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| hod. nosa. ml.j. | 100 | 120 | 150 | 180 | 225 | 270 | 337 | 405 | 506 | 607 | 759 | 911 |

ASLO – vyhodnocení úkolu

- **Pozitivní kontrola** je opravdu pozitivní
- **Vysoké riziko** pozdních následků je u pacientů číslo 3 a 4 (506, resp. 337 m. j.)
- **Hraniční riziko** je u pacienta č. 1 (225 m. j.) a u pacienta č. 7 (180 m. j.)
- **U ostatních pacientů** riziko prakticky není. Pacient číslo 5 se dokonce vůbec neseťkal s příslušným antigenem. Je-li vyšetřován pro „prodělanou angínu“, šlo nejspíše o angínu virového či jiného nestreptokokového původu.

Úkol 2: HIT

- Hemaglutinačně Inhibiční Test
- Protilátka neutralizuje virové shlukování krvinek (in vitro vlastnost většiny virů)
- Shluk krvinek („bramboroid“) = negativní výsledek. Sedimentace = pozitivní
- Úkol: Odečtěte výsledky HIT u klíšťové encefalitidy – čtyři pacienti (K, L, M, N), u každého akutní a rekonvalescentní sérum.
- Učiňte pravděpodobný závěr (akutní infekce? Pouze paměťové protilátky? a podobně)
- V prvním sloupci ředění 1 : 10

Zapamatujte si:

- HIT není aglutinace, ale neutralizace virového shlukování krvinek
- HIT se liší od reakce ASLO především tím, že **krvinky nejsou hemolyzovány, ale shlukovány**. Stejně je naopak to, že specifická protilátka dokáže příslušnému efektu zabránit
- HIT v úkolu 2 je „už zase“ klasický nepřímý průkaz (na rozdíl od ASLO)

Správně mělo vyjít: jeden z pacientů je zřejmě akutně nemocen, dva se s infekcí setkali, jeden se neseťkal. Víte, o které pacienty jde?

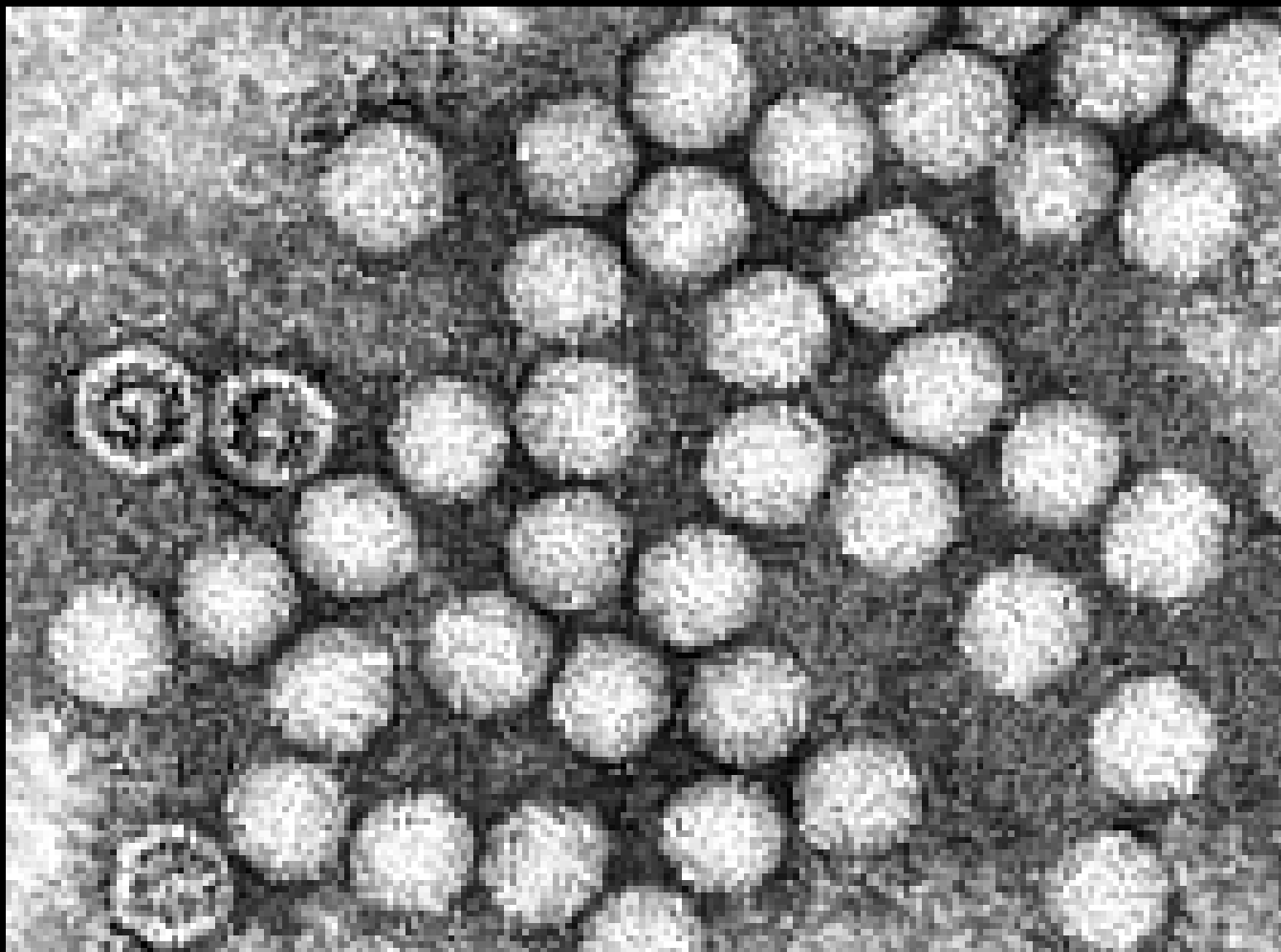
Úkol 3: VNT (nepleťte si to s TNT ☺)

- Virus Neutralizační Test
- Buněčná kultura bývá poškozena virem.
- Poškození virem → změna pH → změna barvy ze žluté na červenou (*pro zapamatování: buňky, zprzněné virem, se rdí, ač svému neštěstí nemohly zabránit*)
- Jsou-li přítomny **protilátky**, mohou tomuto zprznění buněk zabránit. Buňky tedy nemají důvod se rdít a zůstávají žluté

VNT – praktické poznámky

- Celý panel patří vyšetření jednoho pacienta. Liché řádky = akutní sérum, sudé = rekonvalescentní. Co dva řádky, to jeden coxsackievirus (B₁ až B₆)
- V prvním sloupci je ředění 1 : 10
- V posledním sloupci jsou kontroly. Je-li v tomto sloupci šest žlutých a šest červených důlků, je vše v pořádku
- Titr je určen posledním důlkem, který má nezměněnou (žlutou) barvu
- Vyjde-li u dvou coxsackievirů signifikantní (alespoň čtyřnásobný) vzestup titrů, může sice jít o koinfekci, pravděpodobnější je však zkřížená reaktivita u toho coxsackieviru, kde je nižší titr

Přeji Vám hezký zbytek dne...



<http://web.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/emimages.html>