

Pátráme po mikrobech Díl X.

Reakce se značenými složkami

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, komplementfixace a neutralizace**

Pohádka

- Byl jednou jeden námořník, a ten měl na palubě různé věci přivázané, aby mu neodplavaly. **Dalekohled měl přivázaný na záchranné kolo, to zase na záchranný člun, a ten byl připevněný k palubě.** A tak to vydrželo i největší vlny.
- Jednou se na palubě objevila jeho žena. Chtěla si vyzkoušet **záchranné kolo.** **Odvázala z něj dalekohled a odvázala ho z člunu.**
- **Přišla vlna – a dalekohled uplaval.**

Poučení z naší pohádky

- Reakce se značenými složkami jsou založeny na tom, že po každém kroku reakce probíhá promytí
- **Promytí odstraní vše, co není navázáno**
- Negativní reakce je taková, ve které chybí jeden článek řetězce postupně na sebe navázaných složek. **Další složky už pak nejsou spojeny s povrchem, a tak jsou při promytí odstraněny.**

Pro zopakování

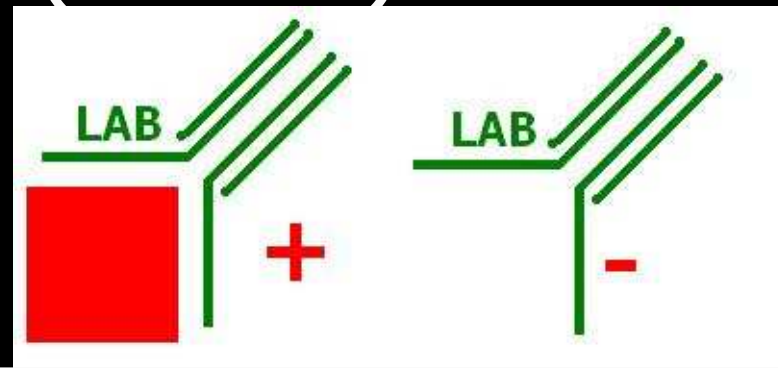
- Cílem mikrobiologických metod je zpravidla detekce patogena, popř. určení jeho citlivosti na antimikrobiální látky.
- Patogena určujeme
 - Přímými metodami
 - detekce **celého mikroba** (jako morfologické či fyziologické jednotky)
 - detekce **jeho části** (antigenu, DNA)
 - detekce **jeho produktu** (například toxinu)
 - Nepřímými metodami: detekce protilátek

Všechny sérologické metody

Můžeme využít k průkazu antigenu:

laboratorní protilátky (zvířecí)

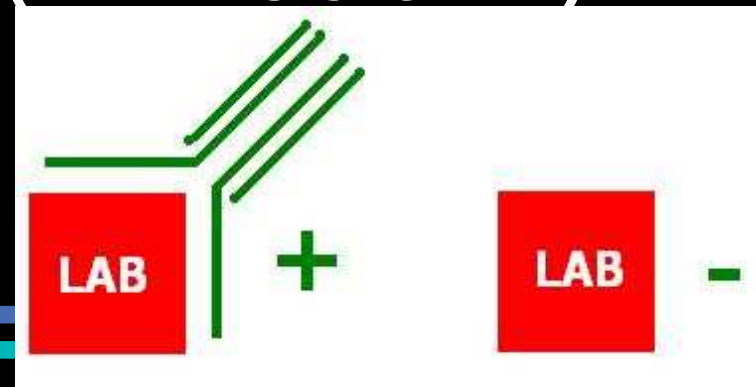
+ vzorek pacienta
nebo kmen mikroba.



Anebo k průkazu protilátky:

laboratorní antigen (mikrobiální)

+ sérum pacienta
(popř. sliny, likvor)



Interpretace – doplněné opakování

- **Průkaz antigenu** je přímá metoda (P). Pozitivní výsledek znamená přítomnost mikroba v těle pacienta.
- **Průkaz protilátek** je nepřímá metoda (N). Jak u ní ale odhadnout, kdy se mikrob s tělem pacienta setkal:
 - Zjištění titru a určení jeho dynamiky (*klasické metody*)
 - **Třída protilátek: IgM/IgG, popř. IgA**
 - Avidita protilátek

Mějte stále na paměti

- Tam, kde prokazujeme antigen, je nesmyslné hovořit o titrech, jejich dynamice, o třídách protilátek apod. Pokud kvantifikujeme, tak jen pro odlišení případné falešné, nespecifické positivity
- U průkazu protilátek klasickými metodami sledujeme titr a jeho dynamiku
- U reakcí se značenými složkami zpravidla titr neurčujeme. Místo toho zjišťujeme pozitivitu v třídách protilátek

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 **načázané** 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

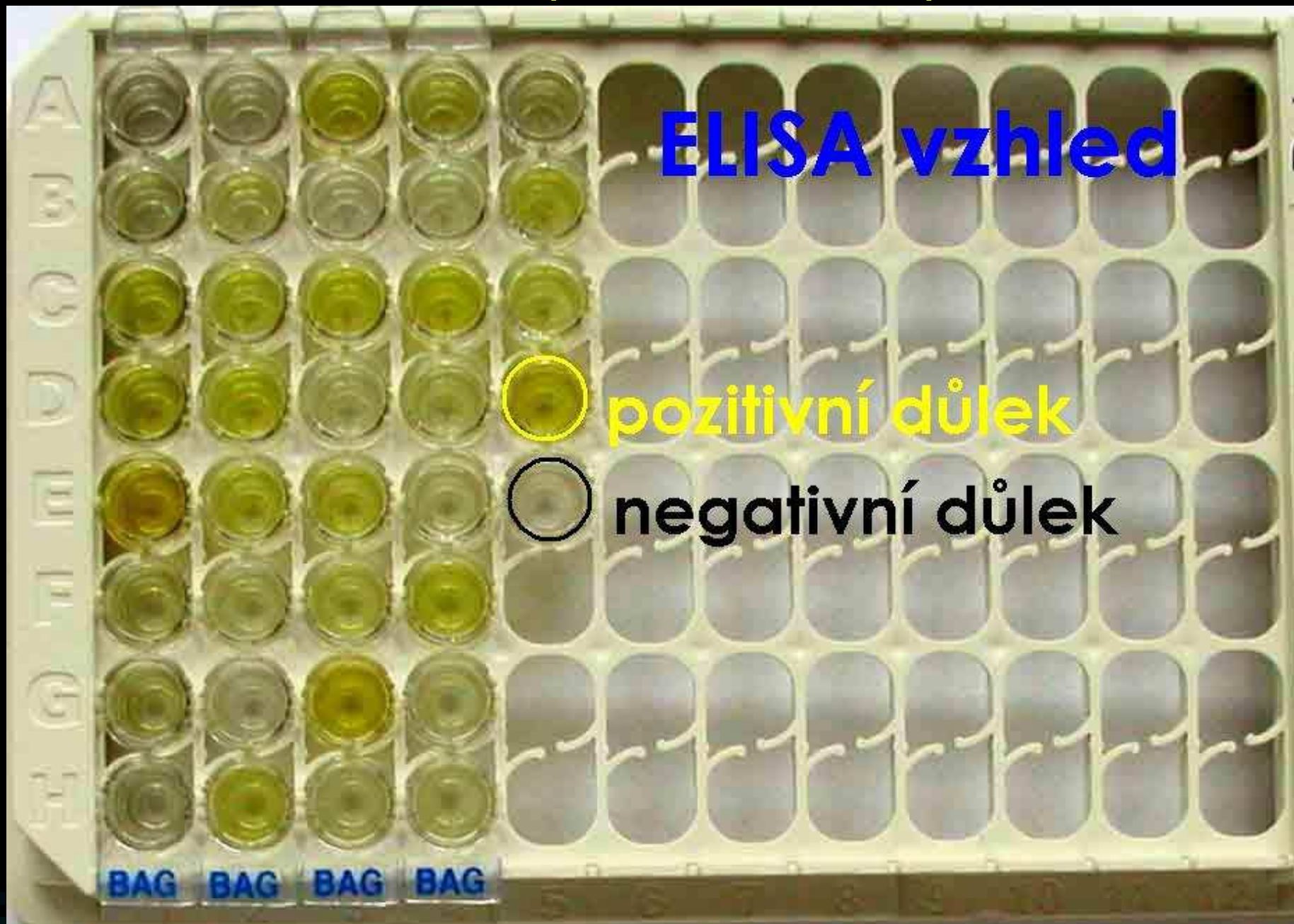
- U reakce ELISA je na konci celého procesu **enzymatická reakce**. Její intenzita se projeví jednoduše: intenzitou zbarvení v důlku, kde reakce probíhá. **Sytá barva = vysoce pozitivní.**
- Nenáročnost z hlediska **nákladů a nulové radiační nebezpečí** je výhodou oproti radioimunoassayím
- Možnost **automatizace**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

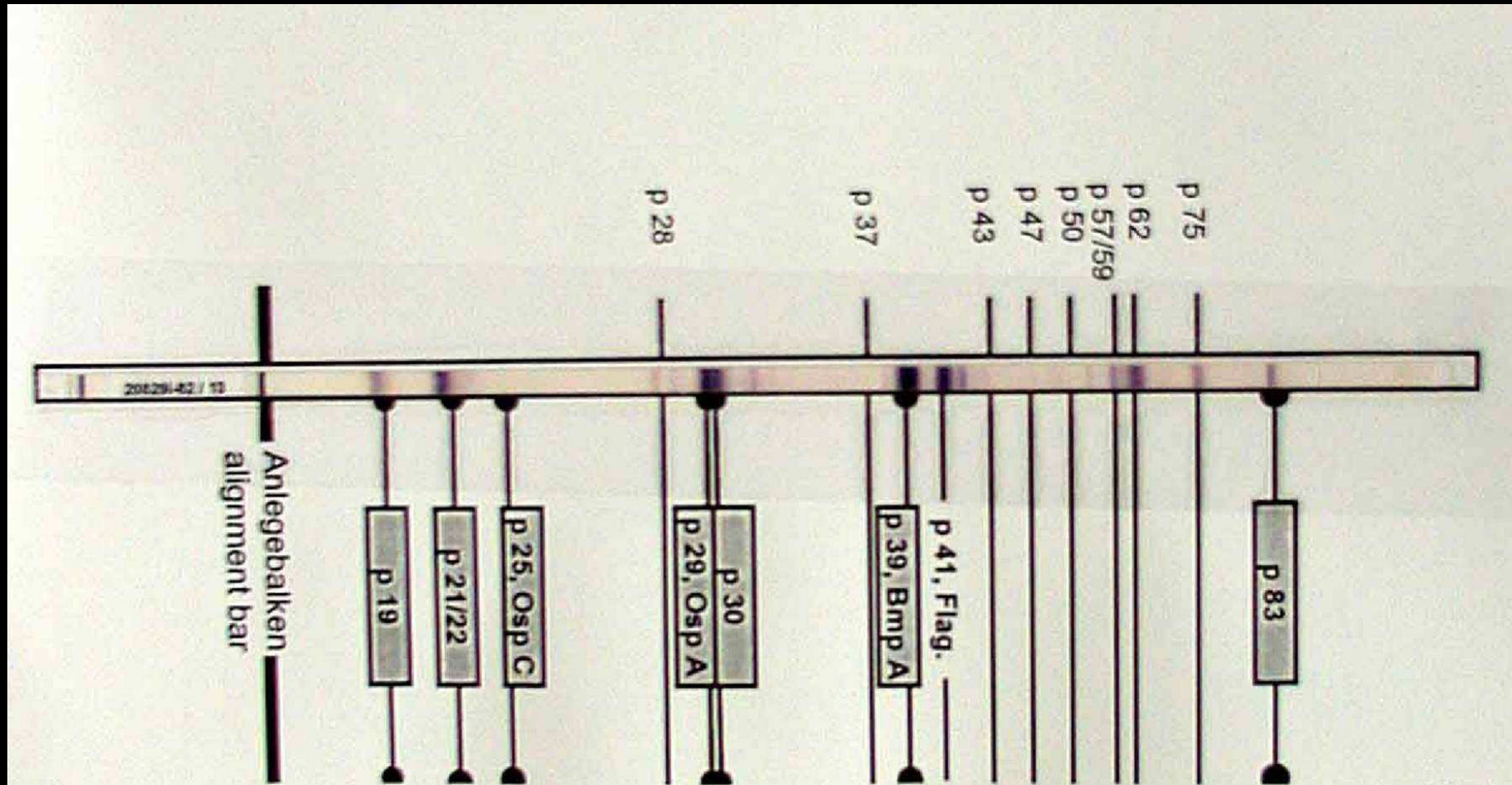


Western blotting

- *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 traskotá na zkřížené pozitivitě 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

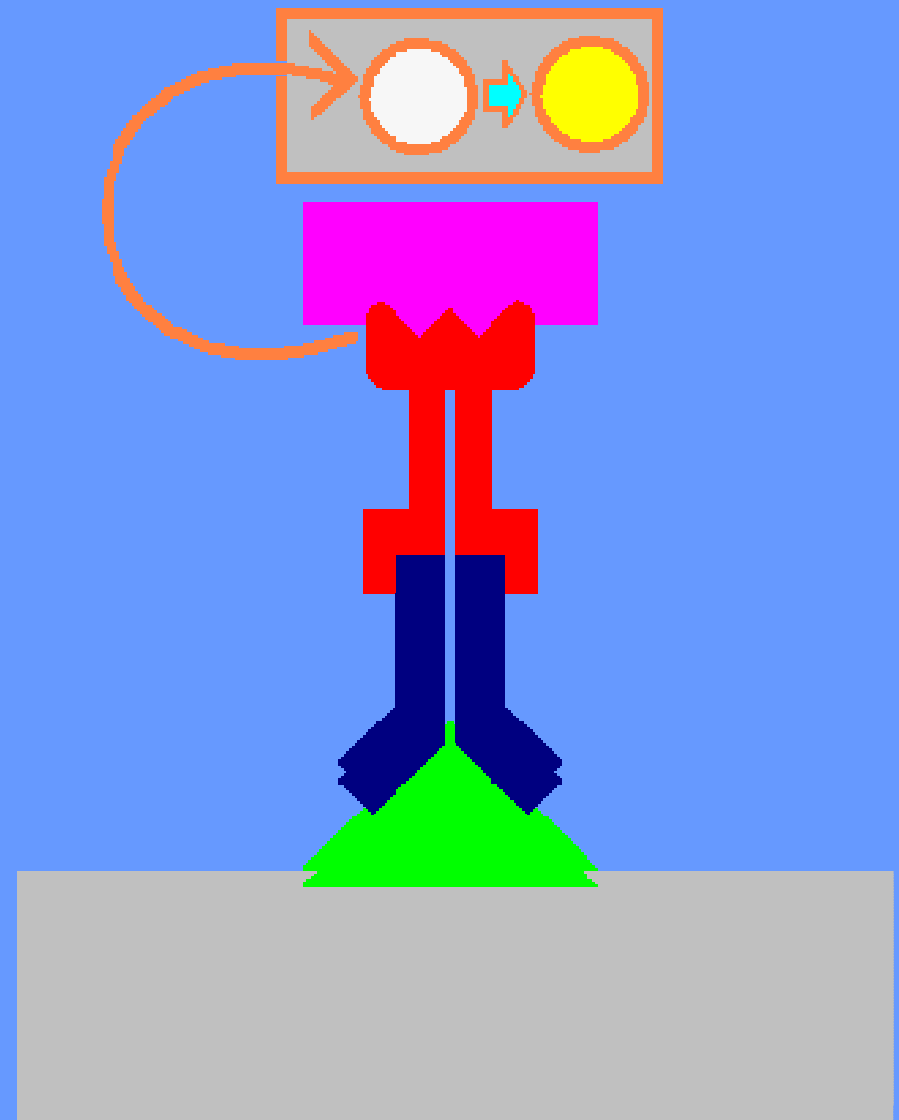
Význam konjugátu

- **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:

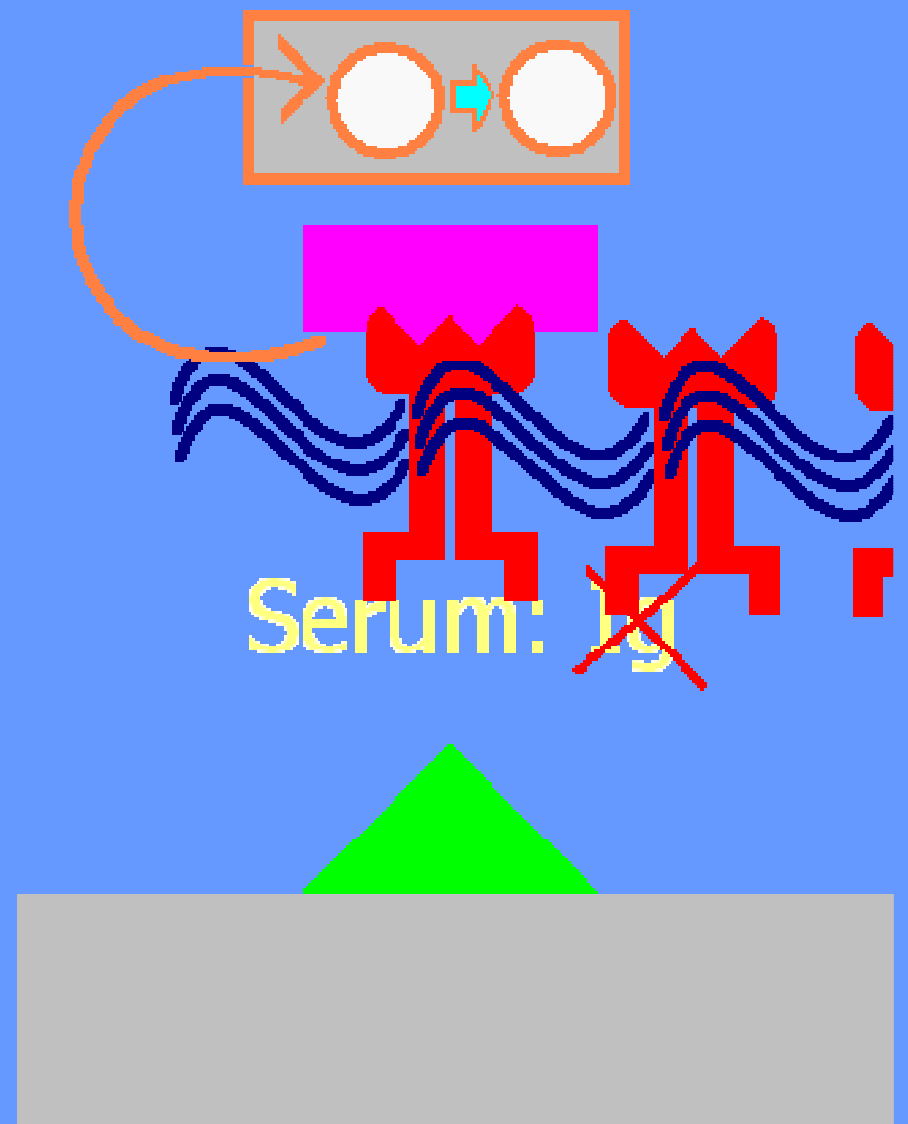
1. Pozitivní
(hledá se IgM,
IgM přítomna)

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)

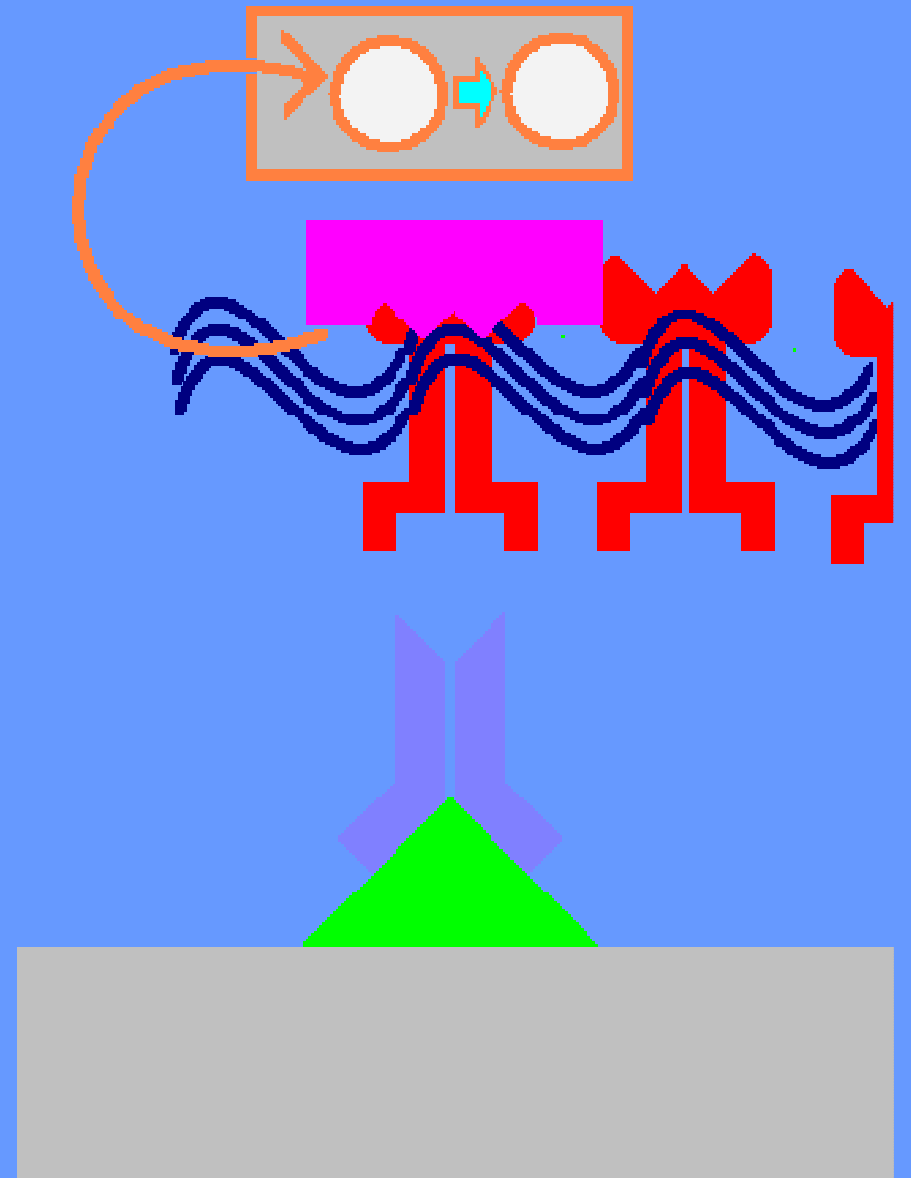
V séru pacienta
nejsou protilátky.
Konjugát je
odplaven, v důlku
není žádná změna.



ELISA k detekci
protilátky:

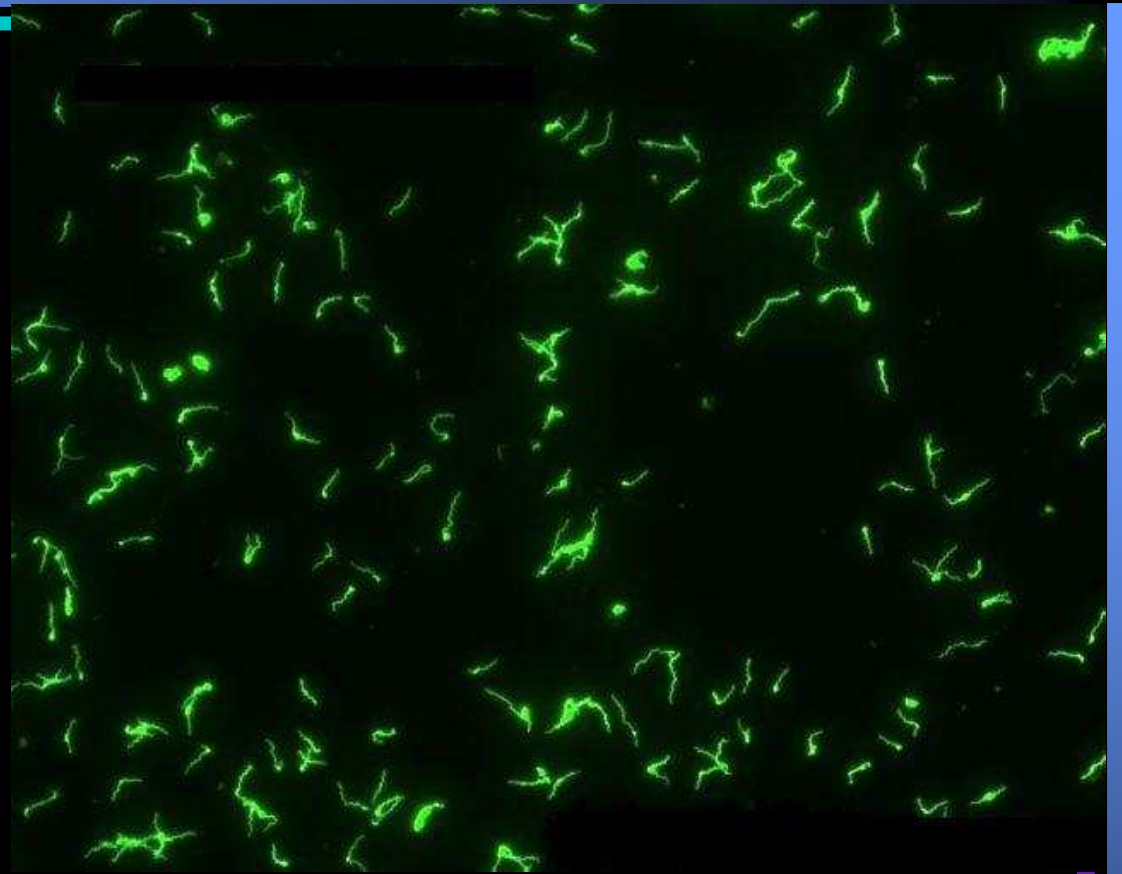
3. Negativní II
(hledá se IgM,
přítomny IgG)

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



Úkol 1 a úkol 2

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



Přímá imunofluorescence

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

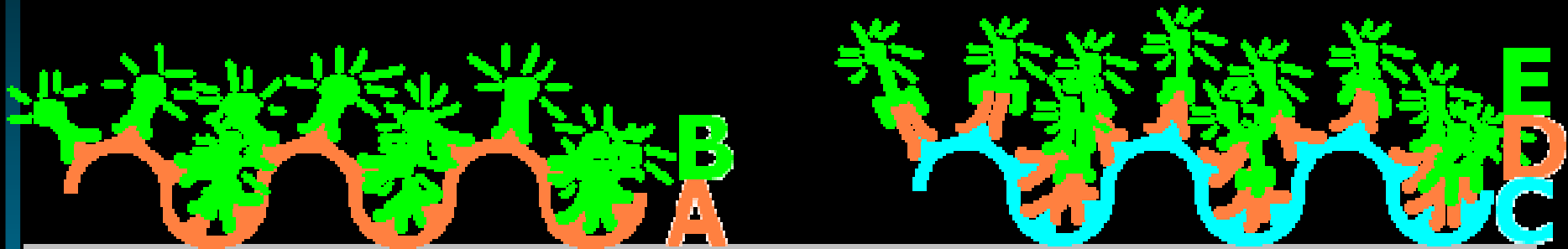
Nepřímá imunofluorescence

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

Úkoly 1 a 2 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

Úkol 3: 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“
- V našem případě se cut off počítá jako
- **$(A1 + B1 + C1)/3 + 0,050$**

Úkol 4: ELISA, průkaz protilátek

- U nepřímého průkazu reakcí ELISA se zpravidla hodnotí zvláště 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“
- V našem případě se cut off počítá jako **$(B1 + C1)/2 + 0,320$ v případě IgA, resp. $(B3 + C3)/2 + 0,320$ v případě IgG**
- Výsledky mezi 90 % a 110 % cut off se hodnotí jako „**hraniční**“, pod 90 % jako „**negativní**“, nad 110 % jako „**pozitivní**“

Úkol 5 – Western blotting

- Jsou-li přítomny alespoň dva specifické pruhy (zvýrazněné na šabloně) → hodnotí se jako pozitivní
- Výjimky:
 - u IgG stačí, je-li pozitivní jen *vlsE* (je vysoce specifický)
 - u IgM stačí, je-li pozitivní jen *ospC* (je vysoce specifický)

Přeji Vám hezký
zbytek dne...

*(Obraz s názvem
Protilátka)*

