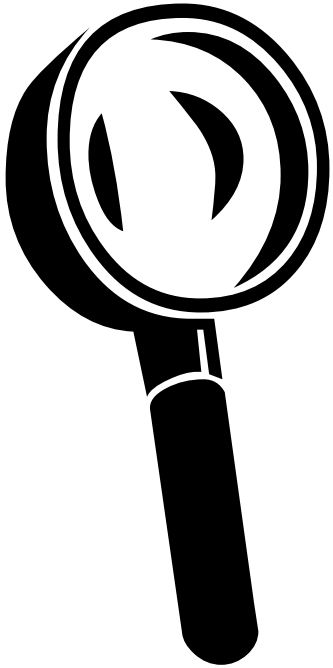


Mikrobiologický ústav uvádí

NA STOPĚ PACHATELE

Díl sedmý A: Nepřímý průkaz mikrobů



Autor prezentace: Ondřej Zahradníček (kontakt: zahradnicek@fnusa.cz). K praktickému cvičení pro Bi7170c

Hlavní obsah

Úvod do serologie, precipitace a aglutinace

Dynamika titru, KFR a neutralizace

Reakce se značenými složkami

ÚVOD

PRECIPITACE

AGLUTINACE

Obsah této části prezentace

Úvod – pohádka

Antigen a protilátka

Interpretace průkazů protilátek

Geometrická řada a počítání titrů

Aglutinace a precipitace: přehled

Aglutinace – příklady reakcí

Precipitace – příklady reakcí

Kontrolní otázky

Pohádka

- Bylo jednou jedno malé dítě, a tomu maminka koupila hračku, aby se naučilo poznávat tvary.
- Hračka byla plastová destička s **dírami různých tvarů**, a k tomu **tvary, co patřily do těch děr**.
- Jednou dítě řvalo, protože mu cosi nešlo. Maminka přiběhla: „Ale, dítě, nemůžeš rvát čtvereček do díry pro kolečko!“ Podívej, **kolečko patří sem, čtvereček tam**.

Jenže o pár dní později...

- ...přišla maminka k dítěti do pokoje, a viděla, že se dítěti podařilo narvat kolečko do díry pro šestiúhelníček.
- I uvědomila si maminka, že pravidla sice platí, ovšem existují z nich občas i výjimky
- I v přírodě přece platí – pokud má určitý **tvar** svůj **protitvar**, stane se občas, že se dá dohromady i dvojice, která k sobě původně neměla patřit.

Poučení z naší pohádky

- Mikroby (ale i třeba rostliny a živočichové) mají **na povrchu** svých buněk **antigeny**. Když se setkají s naším tělem, začne naše tělo tvořit **protilátky**, které jsou vůči těmto antigenům **specifické**.
- Specifičnost má ovšem své meze. Někdy existuje **zkřížená reaktivita**, kdy protilátka reaguje i s antigenem, který je jen podobný tomu, který vyvolal její tvorbu

Někdy se také tvoří protilátka proti určité látce, která není součástí mikroba, ale při infekci se uvolňuje například ze stěny cév. Nicméně většinou prokazujeme protilátky proti určitému mikrobu.

Antigen a
protilátka

Antigen a protilátka

Antigen = makromolekula pocházející z cizího organismu: rostliny, mikroba, jiného živočicha. (Anebo sice z organismu vlastního, ale v tom případě je na povrchu buněk přestárlých či vadných.)

V mikrobiologii nás zajímají **mikrobiální antigeny** = části nebo produkty* mikrobiálního těla, které vzbuzují v hostiteli antigenní odpověď

Protilátka = imunoglobulin, tvořený v těle hostitele (člověka, ale také zvířete) jako odpověď na antigenní výzvu

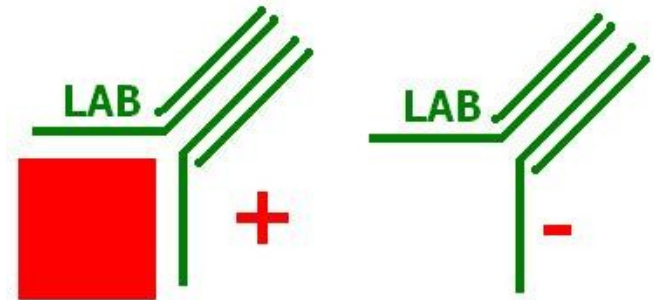
*například toxiny bakterií

Metody lékařské mikrobiologie a jejich interpretace

- **Přímé metody:** detekce mikroba, jeho části nebo produktu. Příklady: 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)

Dva způsoby, jak využít interakci mezi antigenem a protilátkou:

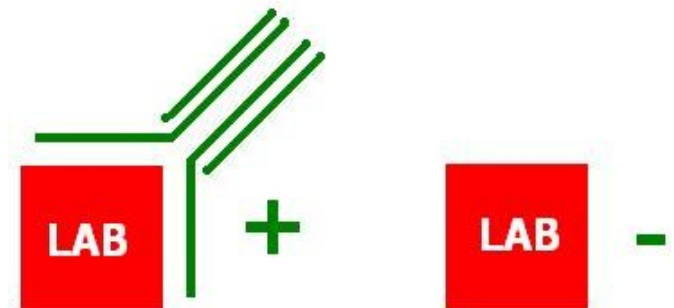
- **Průkaz antigenu:** laboratorní protilátky (zvířecího původu či ze speciální buněčné linie) + vzorek pacienta nebo kmen mikroba.



- **Přímá metoda**

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

- **Nepřímá metoda**



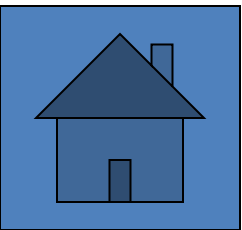
Ještě máme dva podtypy průkazu antigenu:

Přímý průkaz antigenu ve vzorku: pracujeme s celým vzorkem a hledáme antigen.

Příklad: pracujeme s mozkomíšním mokem a hledáme v něm typické původce zánětů mozkových blan (resp. jejich antigeny)

Antigenní analýza: ze vzorku jsme už izolovali kmen a zkoumáme jeho antigen(y).

Příklad: máme již vypěstovaný kmen meningokoka a chceme vědět, ke které seroskupině (B či C) patří.
(Zpravidla se používá uvnitř bakteriálního druhu.)



Interpretace průkazů protilátek

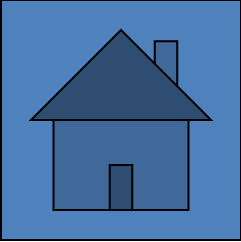
Interpretace

- **Průkaz antigenu** 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** (relativní – **titr**) a jeho změny v čase (dynamika titru – viz J07)
 - **Třída protilátek:** IgM/IgG (více v J08)
 - (***Avidita protilátek***)

Jak interpretovat nepřímý průkaz

- **Akutní infekce:** velké množství protilátek, převážně 1 třídy IgM, případně IgM i IgG
- **Pacient po prodělané infekci:** malé množství protilátek, pouze IgG (imunologická paměť) 2
- **Chronická infekce:** různé možnosti podle aktivity infekce, mikrobiálního druhu apod.





Jak provést reakci „kvantitativně“

- Je **velmi těžké zjistit koncentraci protilátek** proti konkrétnímu antigenu (*ne tedy celkové množství imunoglobulinů*) v **jednotkách mol/l, mg/l** apod.
- Ale dá se dělat jiná věc: mnohonásobně **ředit pacientovo sérum**.
 - Reaguje-li **i po mnohonásobném ředění** →
→ v séru je velké množství protilátky
 - Reaguje **jen při nevelkém zředění séra** →
→ v séru je jen malé množství protilátky

Geometrická řada a počítání titrů

Geometrická řada

- Technicky nejjednodušší způsob, jak ředit sérum pacienta, je použití **geometrické řady s koeficientem dva**.
- Vycházíme **z neřaděného séra**, nebo **ze séra o určitém předředění** (např. 1 : 5, 1 : 10, 1 : 50 nebo podobně)
- V každém případě platí, že v každém dalším důlku je **dvojnásobné ředění** oproti předchozímu, například tedy řada 1 : 10, 1 : 20, 1 : 40, 1 : 80, 1 : 160...

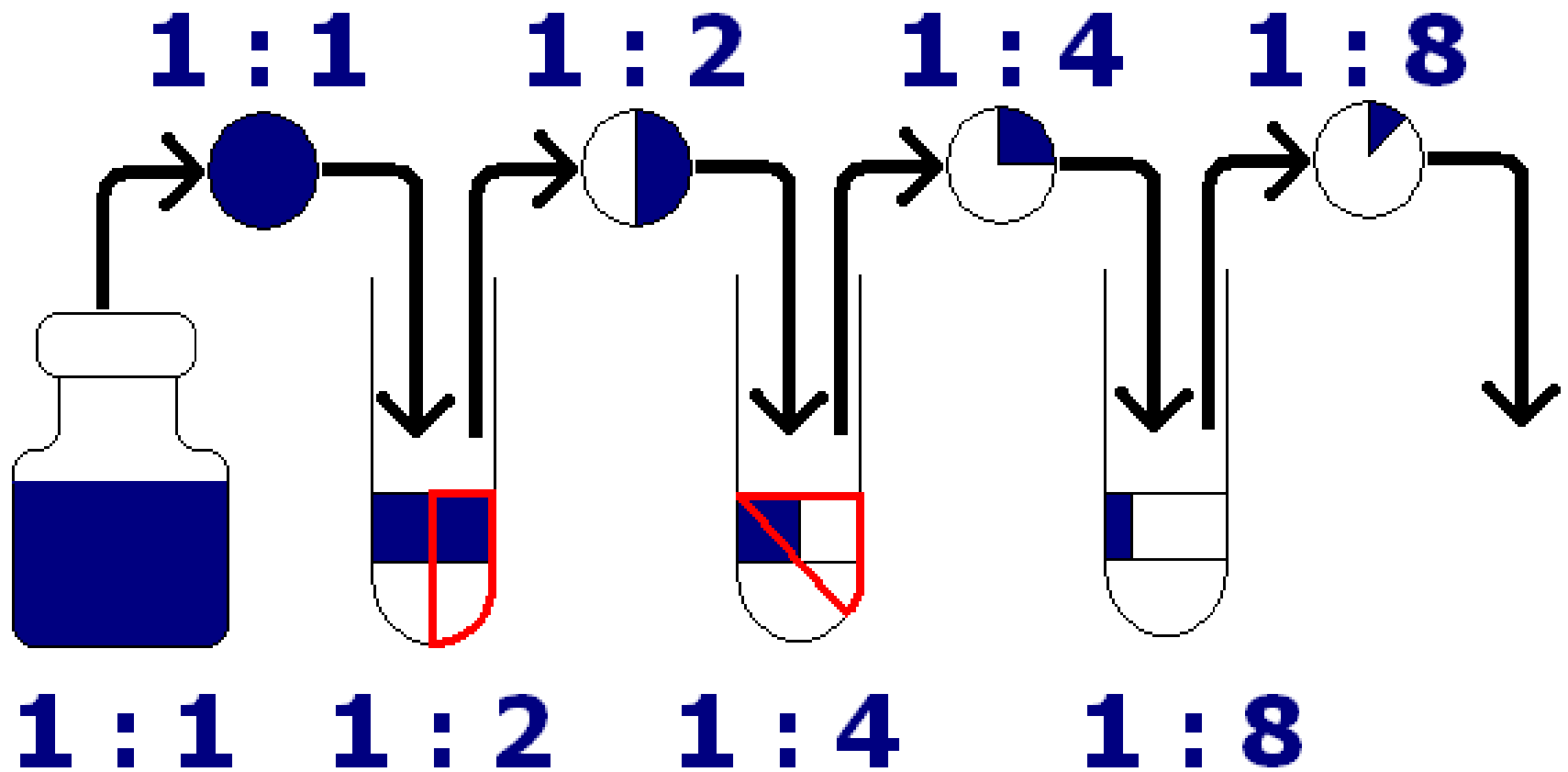
Počítání ředění v serologii

Pozor, **v serologii** např. ředění 1 : 4 znamená jeden díl séra a **tři** díly fyziologického roztoku (tj. čtyři díly celkem)!

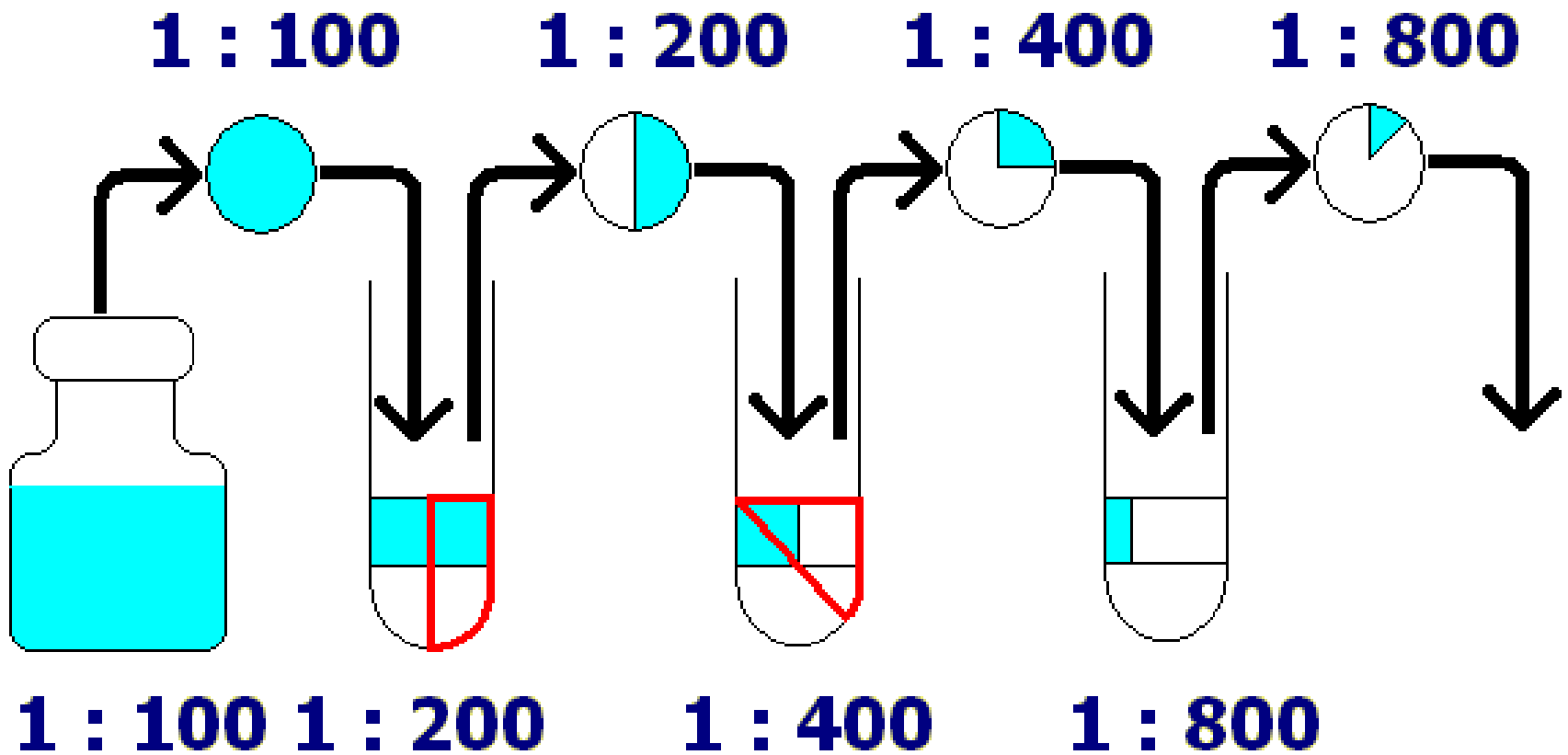
Při „**biochemickém**“ **počítání** (počet dílů séra ku počtu dílů diluentu) bychom naše geometrické řady museli značit např. 1 : 9, 1 : 19, 1 : 39, 1 : 79 (***namísto 1 : 10, 1 : 20, 1 : 40, 1 : 80***). To by bylo značně nepraktické.

Geometrická řada: jak ji udělat

a) bez předředění původního séra



b) s předředěním původního séra (zde například 1 : 100)



Samozřejmě, předředění nemusí být zrovna 1 : 100, může to být třeba 1 : 5, 1 : 10, 1 : 20 či jakékoli jiné.

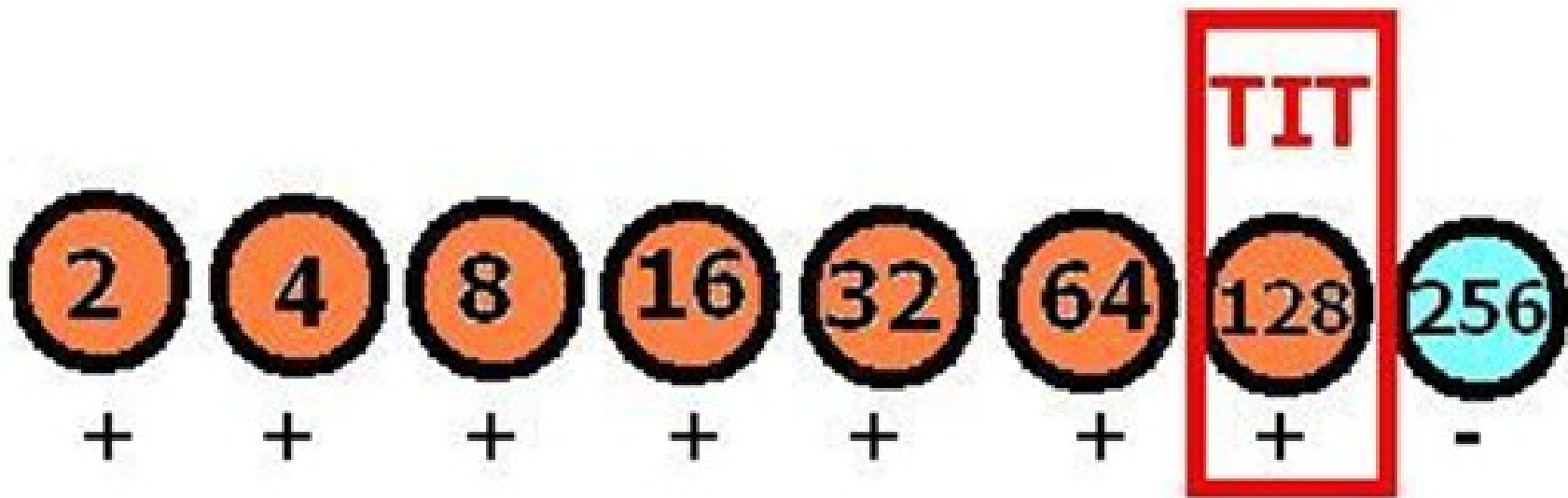
Příprava geometrické řady

- Předpokládejme pro jednoduchost, že vycházíme z neřaděného vzorku séra
- V první zkumavce **smícháme se stejným objemem diluentu (fyziologický roztok)**, → ředění 1 : 2
- **Polovina směsi** z ředění 1 : 2 je **přemístěna do další zkumavky** a **smíchána s opět stejným množstvím diluentu** → 1 : 4
- Jedna polovina z 1 : 4 → 1 : 8
- Atd., atd.

Titration

- Po naředění séra pacienta přidáme **antigen**
- V závislosti na konkrétním typu reakce **bud' přímo vidíme výsledek reakce** (aglutinát, precipitát), **nebo ho musíme znázornit** přidáním dalších složek (např. komplementu, červených krvinek apod).
- V každém případě lze nakonec nějak odlišit **pozitivní a negativní výsledky reakce**
- **Nejvyšší ředění, kde ještě vidíme pozitivní reakci, se nazývá titr.**

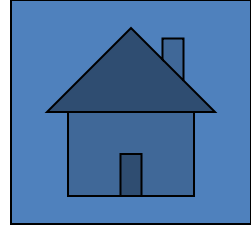
Určení titru



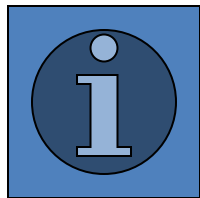
Tit – nejvyšší ředění, kde je pozitivní reakce.

Máme-li dvě řady, je titrem nejvyšší ředění z obou řad dohromady.

Ne vždy potřebujeme titry!



- Titry nikdy neurčujeme, **pokud jde o průkaz antigenu**
- Někdy ale neurčujeme titry, **přestože půjde o průkaz protilátek**: jde totiž o screeningové reakce
- ***Příklad: Každá těhotná žena se vyšetřuje, nemá-li náhodou syfilis. První testy jsou screeningové a provádějí se jen jako kvalitativní. Všechny pozitivní nebo i pouze podezřelé reakce se ověřují specifitějšími, tzv. konfirmačními reakcemi.***



Aglutinace a precipitace: přehled

Precipitace a aglutinace – společné

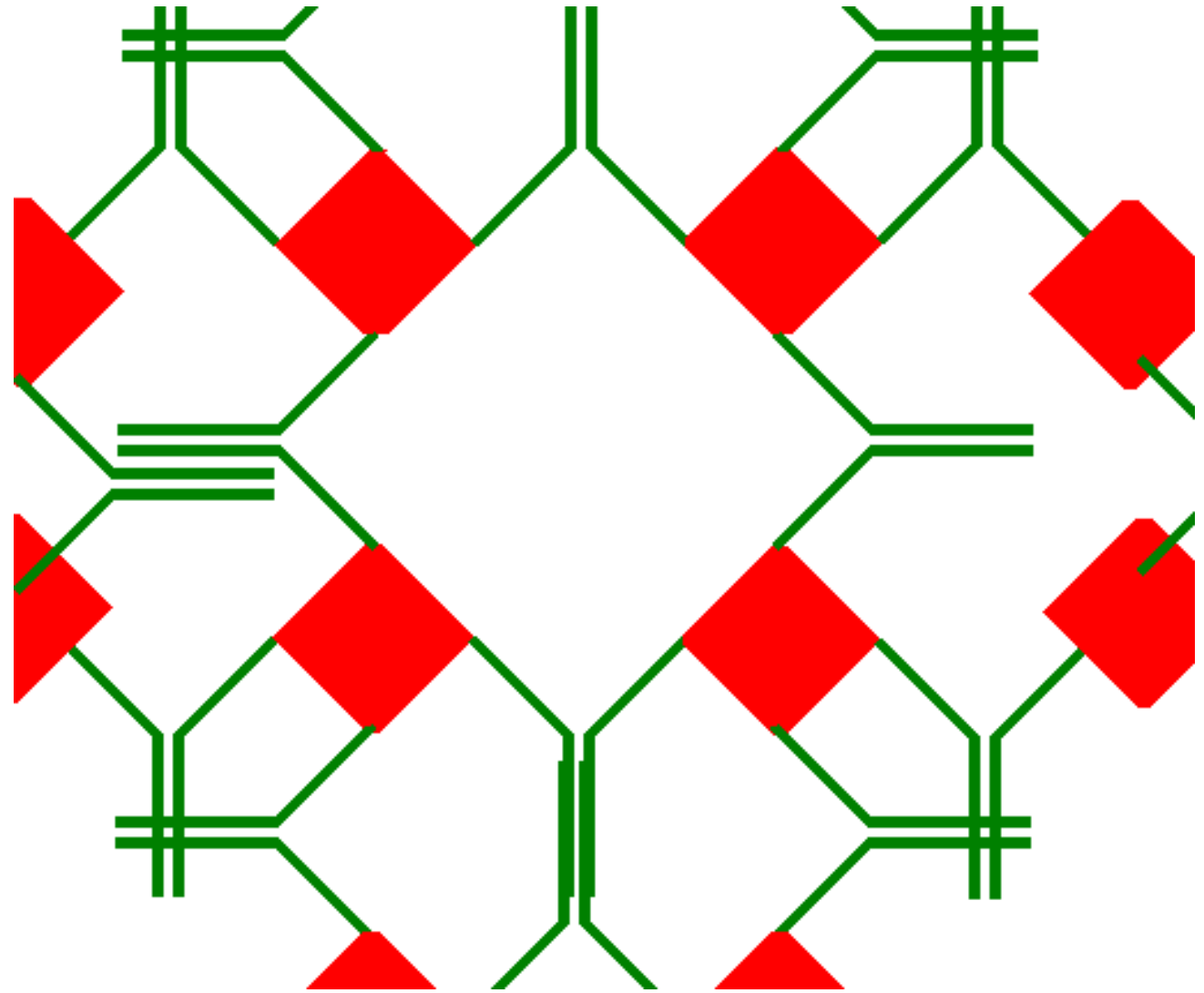
- Precipitace a aglutinace jsou dvě **nejjednodušší serologické reakce**, kde pracujeme opravdu jen s antigenem a protilátkou bez dalších složek
- Buďto tedy dokazujeme **antigen zvířecí (či monoklonální*) protilátkou**, nebo **protilátku laboratorním antigenem**
- **Pouze ve druhém případě zjišťujeme titry!**

*vyrobenou klonální populací plazmatických buněk

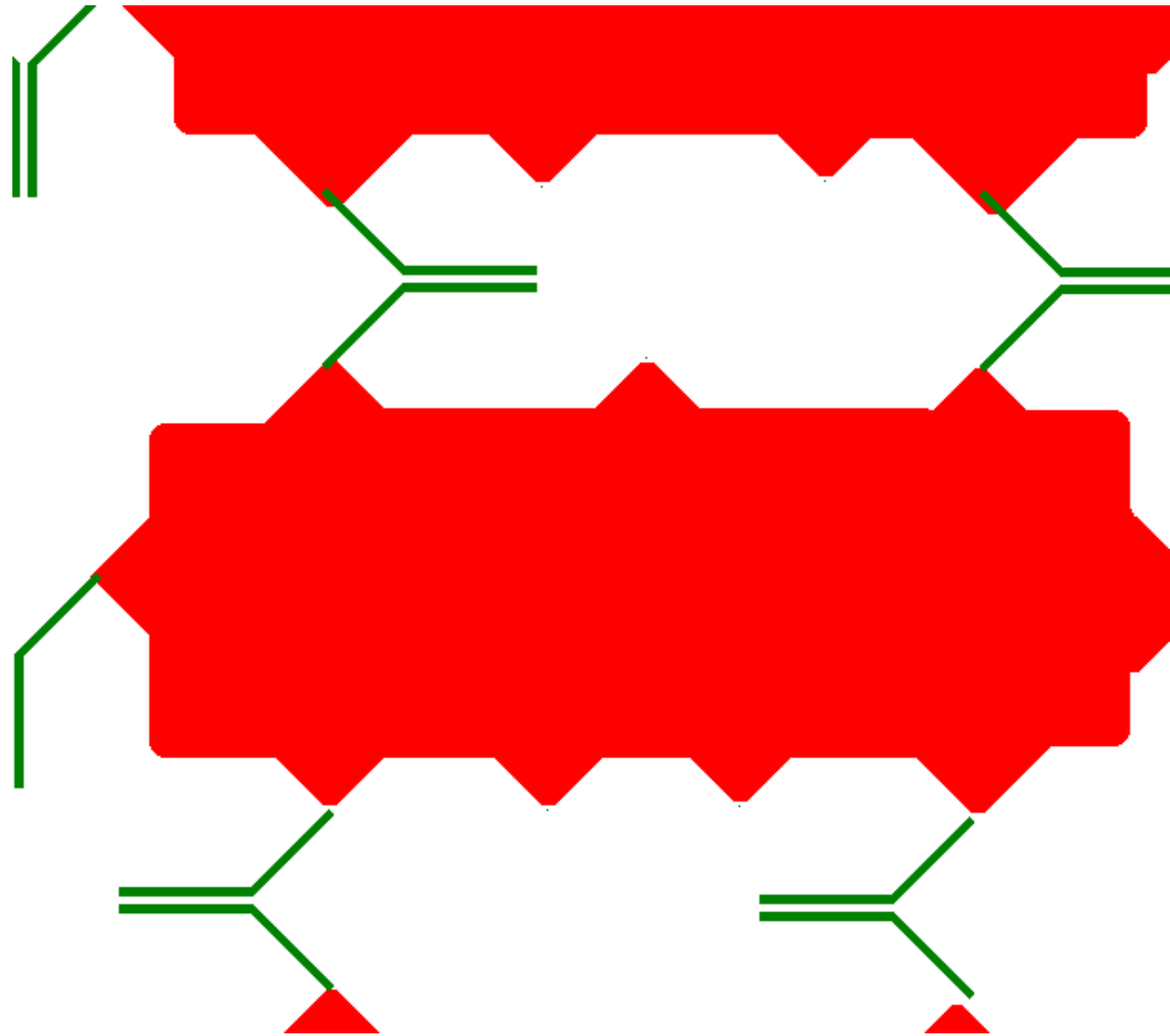
Precipitace, aglutinace, aglutinace na nosičích

- **Precipitace:** Antigeny jsou ve formě izolovaných makromolekul (jde tedy o **koloidní antigen**)
- **Aglutinace:** Antigen je součástí buňky mikroba (pracujeme tedy s celými mikroby, říkáme, že **antigen je korpuskulární**)
- **Aglutinace na nosičích:** Původně izolované antigeny jsou **navázány na cizí částici – nosič** (latex, erytrocyt, polycelulóza)

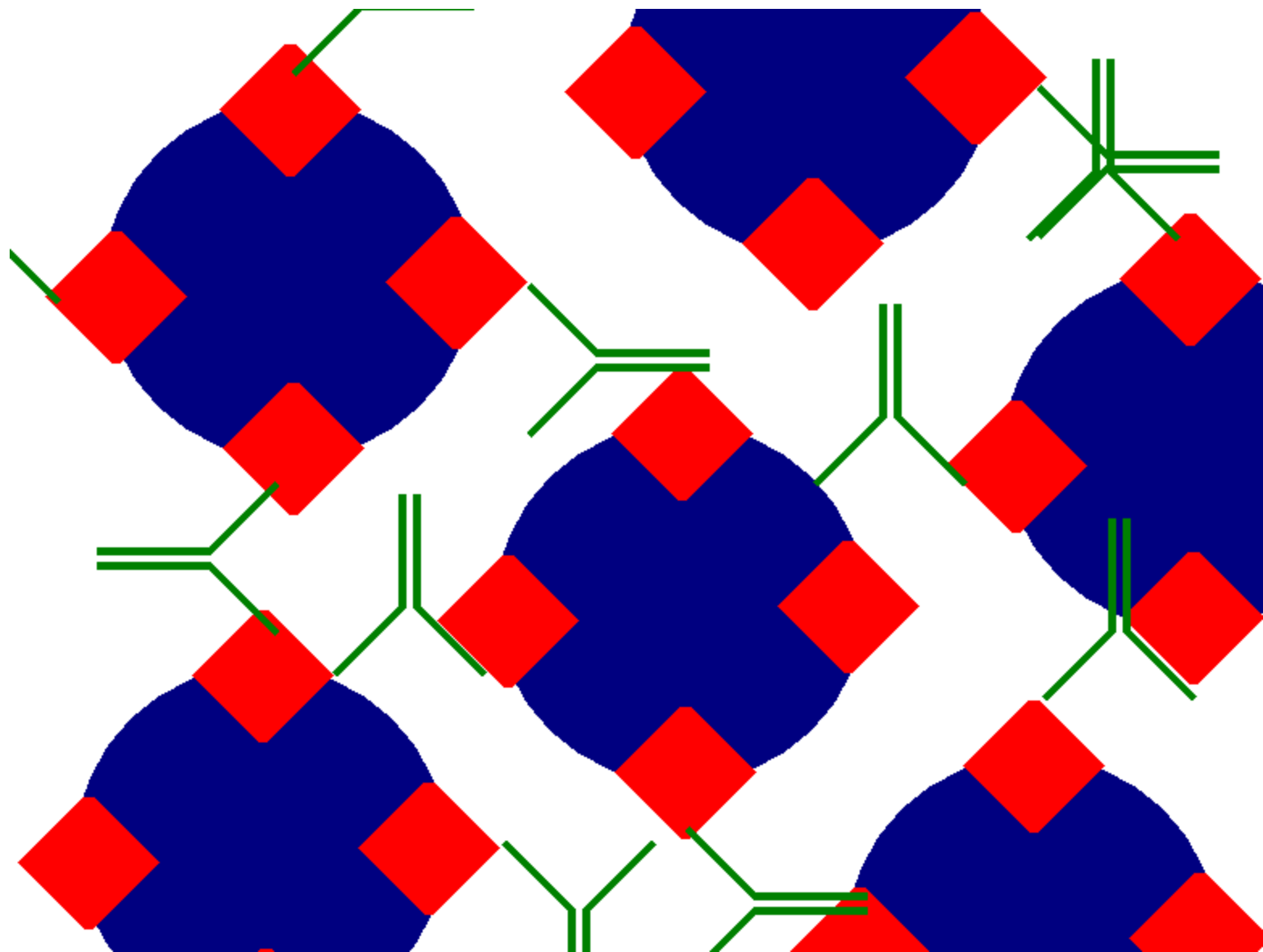
Precipitace



Aglutinace



Aglutinace na nosičích

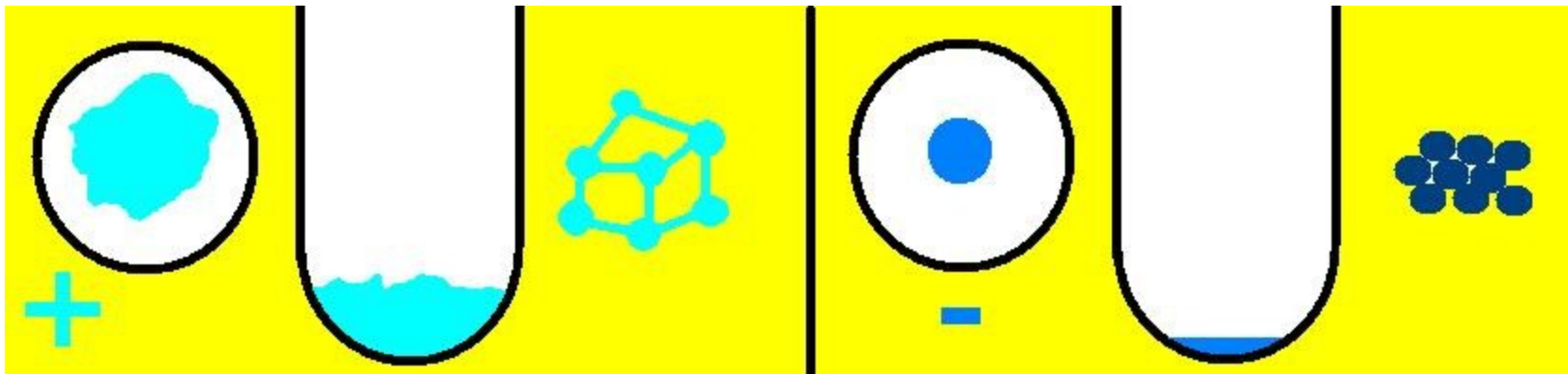


Aglutinace: příklady reakcí

Průkaz protilátek aglutinací v mikrotitrační destičce

Určete aglutinační titry u protilátek proti yersiniím

- **Pozitivní – nepravidelný chuchvalec**
- **Negativní – malé pravidelné kolečko**

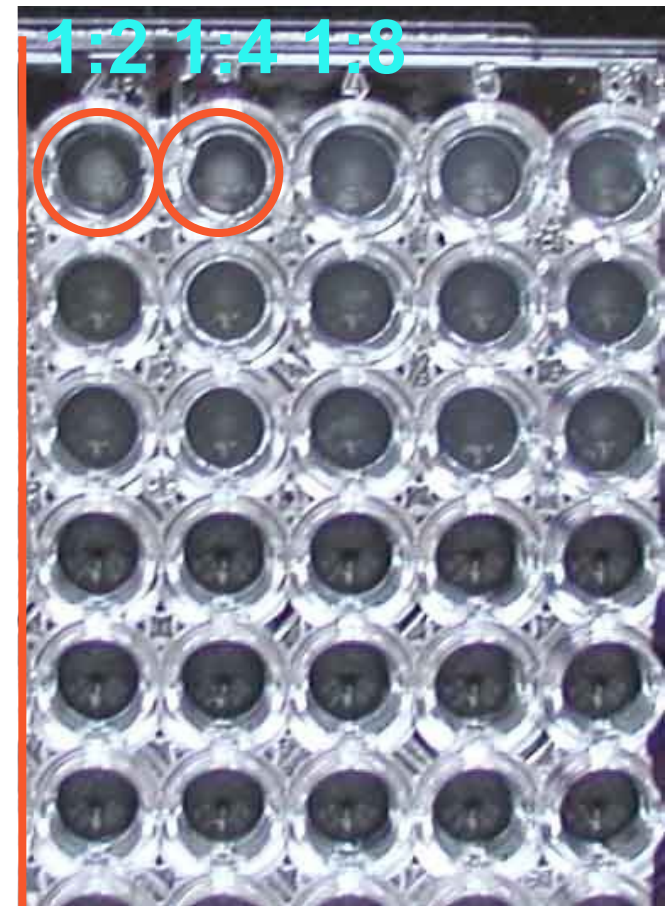


- Nezapomeňte, že titer = nejvyšší ředění s pozitivní reakcí. První důlek je ředěn 1 : 100, druhý 1 : 200 atd.

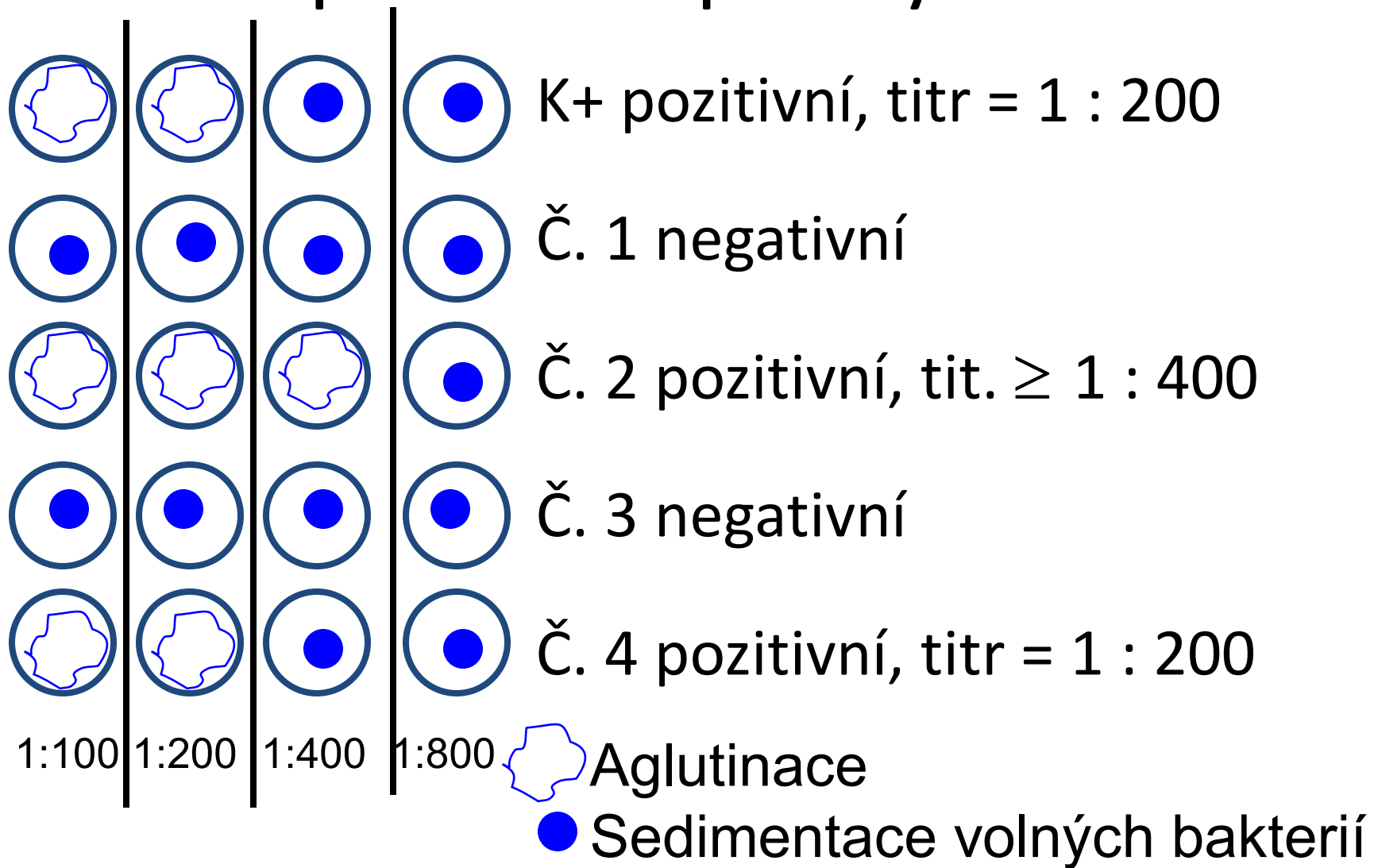
Demonstrace aglutinační reakce u tularémie (z foto MiÚ LF MU a FN

USA):

- **První řada:** Aglutinát je viditelný v ředění 1:2 a 1:4, nikoli však již 1:8 a vyšším → **titr je 1:4**
- **Druhá řada:** V žádném důlku není aglutinace → žádný titr, negativní reakce



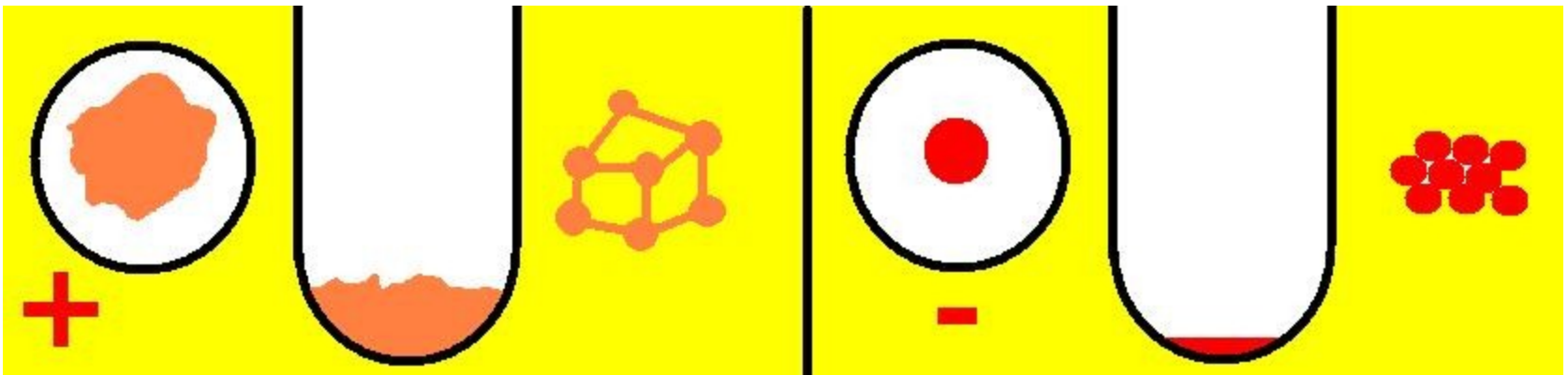
Aglutinace na detekci protilátek proti yersiniím



Příklad aglutinace na nosičích: *Treponema pallidum* pasivní hemaglutinace (TPHA)

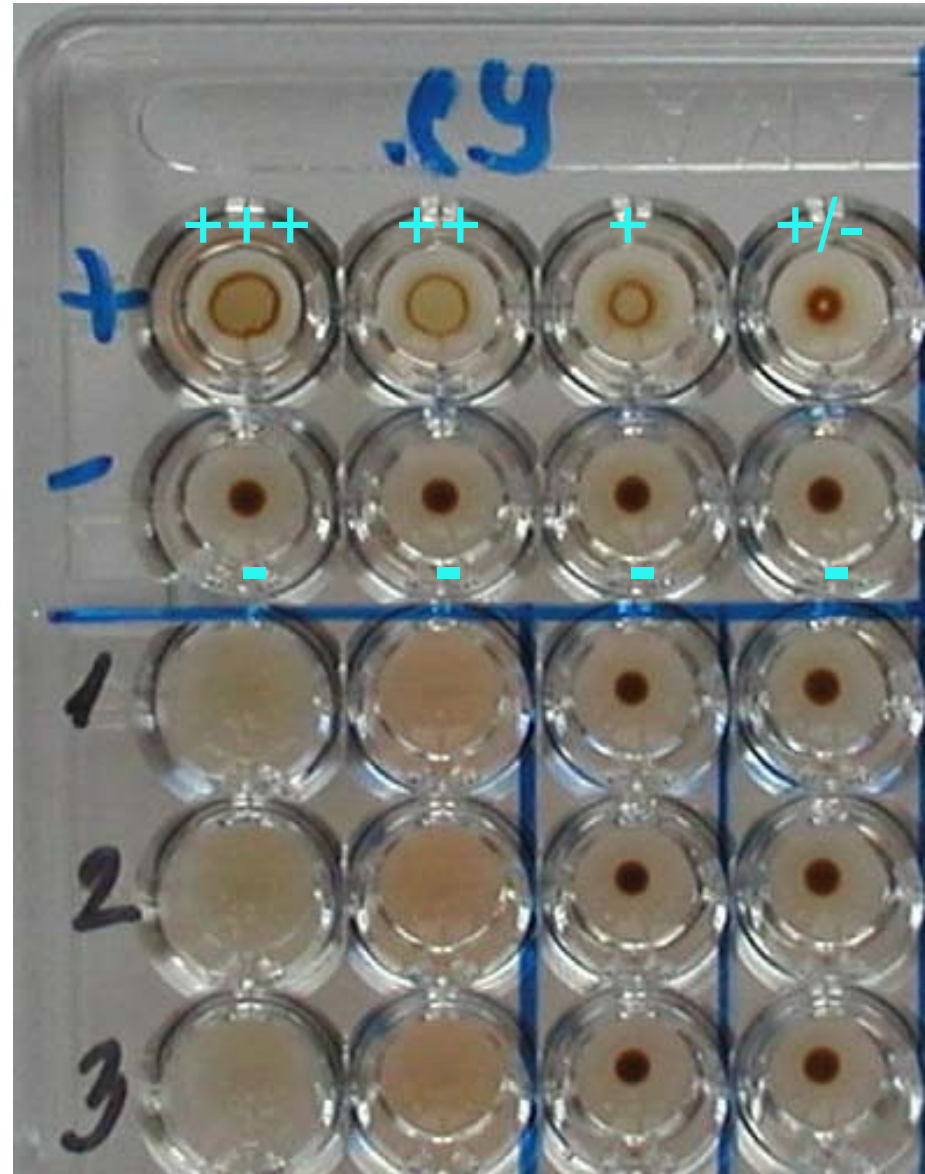
Také zde je pozitivní reakce vznik „chuchvalce“, negativní sedimentace částic na dno důlku. Avšak **je to červené**: je to totiž aglutinace na nosiči, nosičem je erytrocyt

Dnes se v tomto testu červené krvinky nahrazují polycelulózovými částicemi – můžete se pak setkat se zkratkou TPPA



Demonstrace TPHA

(foto MiÚ LF MU a FN USA)



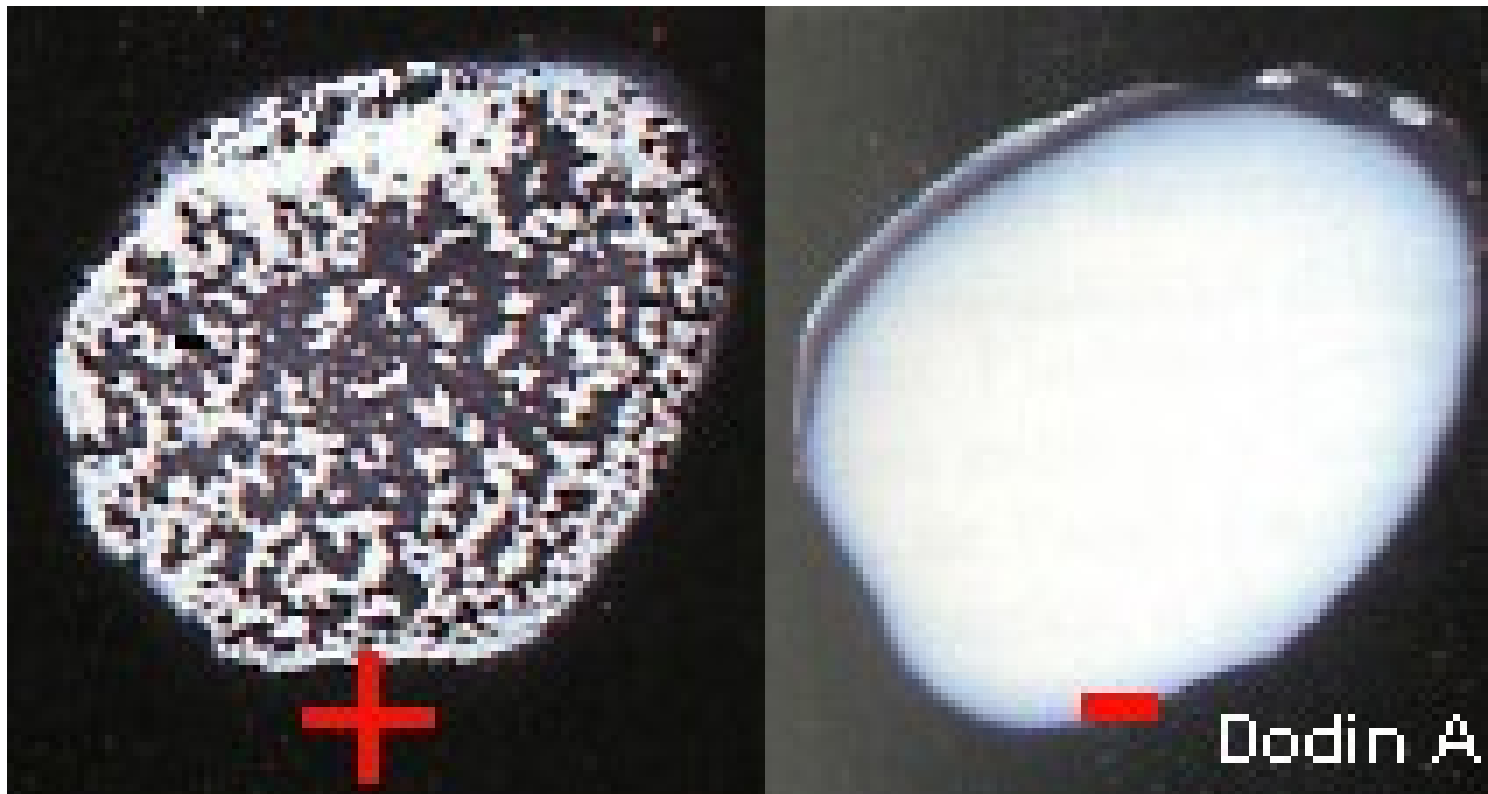
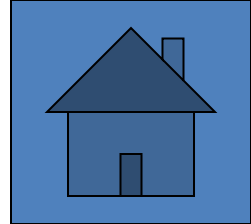
Příklad sklíčkové aglutinace k antigenní analýze: Testování kmene *E. coli*, zda není

Enteropatogenní *Escherichia coli*

- Člověk je tvor zdravě líný. Nikomu by se nechtělo zkoušet míchat testovaný kmen *E. coli* postupně se dvanácti séry. Proto
 - Použijeme nejprve **polyvalentní séra**: **nonavalentní sérum** obsahuje protilátky proti devíti typům EPEC, **trivalentní sérum IV** proti zbývajícím třem. Tak je „pokryto“ všech dvanáct serotypů. Pozitivita = vločky
 - Pouze pokud jedno ze sér je „+“, pokračujeme s (*trivalentními*
a) **monovalentními séry**
- **Pozitivita se projeví jako vločky v kapce**
- *Je to průkaz antigenu (přesněji antigenní analýza) → neurčují se tu žádné titry!*



Průkaz EPEC – výsledek



Precipitace: příklady reakcí

Příklad průkazu protilátek precipitací – vyvložkovací reakce na syfilis – RRR

- Detekujeme protilátky, které **jsou pozitivní u syfilis, ačkoli to nejsou protilátky proti *Treponema pallidum*, nýbrž proti kardiolipinu** (látka, která se objevuje u syfilitiků)
- **Opět provádíme pouze kvalitativně.** První důlek je pozitivní kontrola, druhý negativní, pak má každý pacient (jen!) jeden důlek
- Smíchá se vždy 0,05 ml séra + 0,05 ml kardiolipinu

RRR, RPR, VDRL

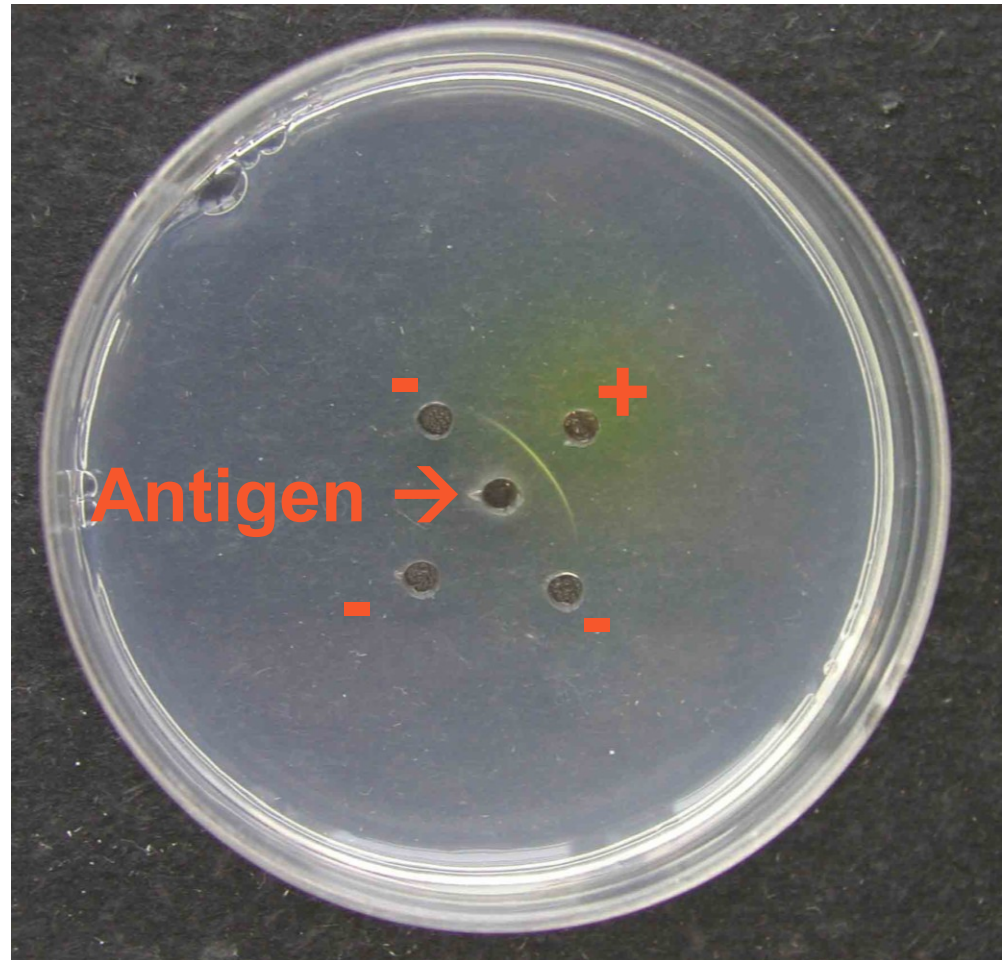
Netreponemové testy, tedy průkaz **nespecifických antikardiolipinových protilátek** mohou být provedeny **v různých formátech**

- **VDRL** (Venereal Disease Research Laboratory) je flokulační (precipitační) test na sklíčku.
- **RRR** (rychlá reaginová reakce), je obdobou (úpravou) reakce VDRL, používají se jamky
- Podobná je také reakce **RPR** (rapid plasma reagin), kde je odečítání reakce vylepšeno o makroskopickou vizualizaci pomocí karbonových částic, nebo pigmentů.

Precipitace – mikroprecipitace v agaru

Tzv. mikroprecipitace v agaru dle Ouchterlonyho

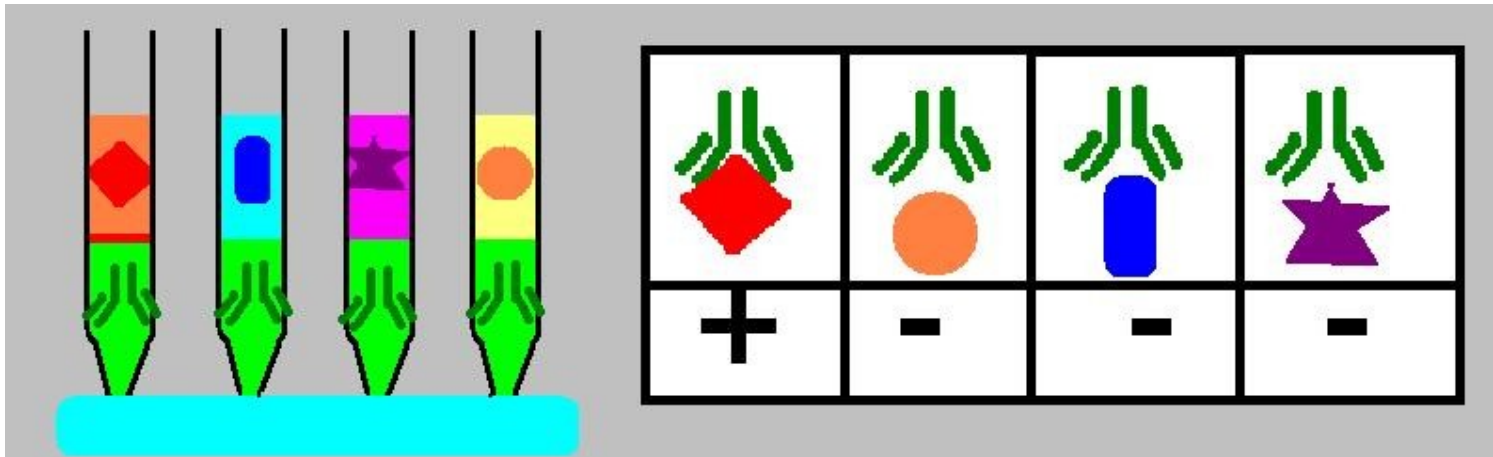
Do důlku uprostřed je nalita tekutina obsahující antigen. Ten difunduje agarem. Obsahuje-li sérum protilátky, difundují proti němu a na jejich styku vznikne precipitační linie.



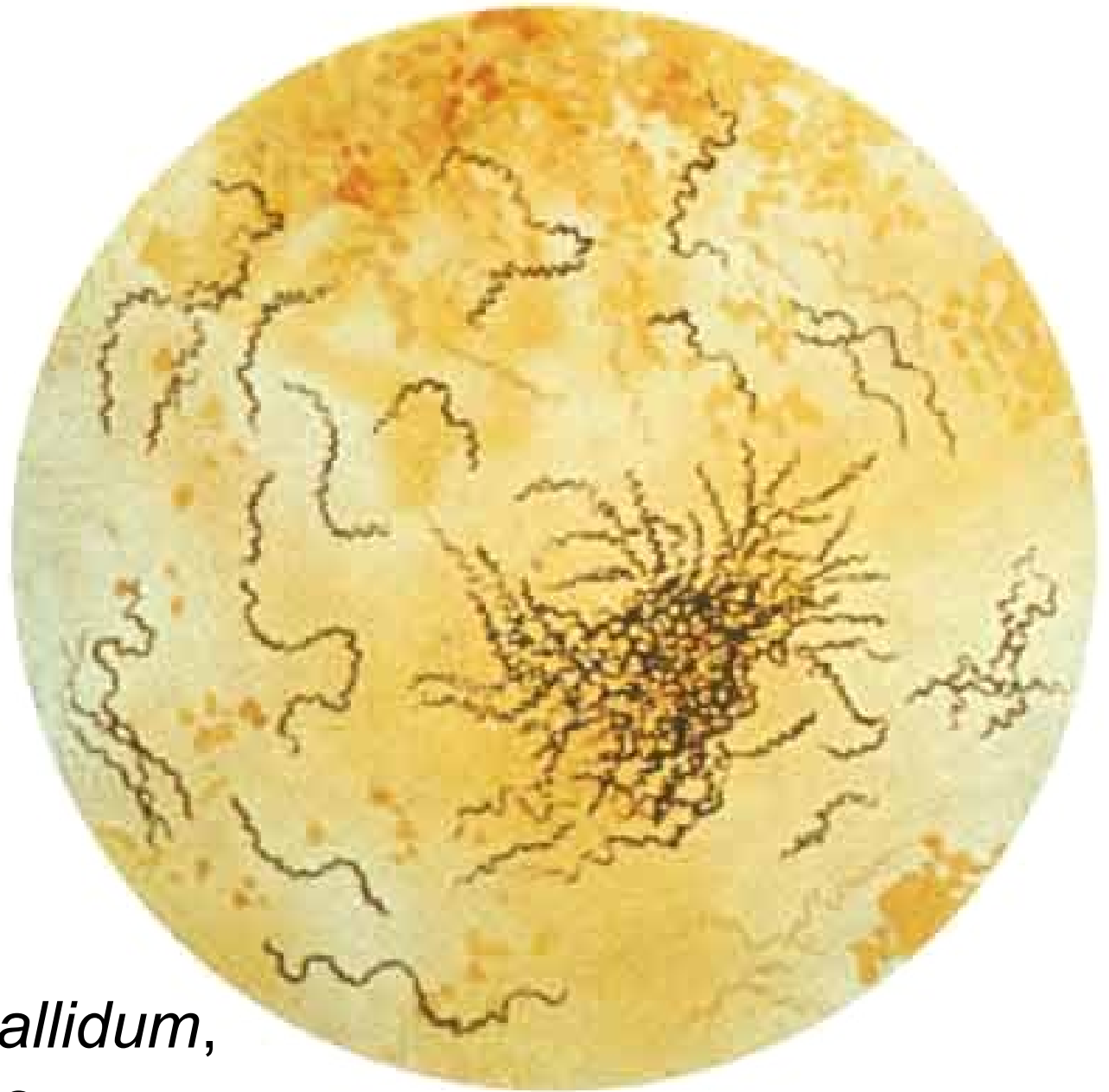
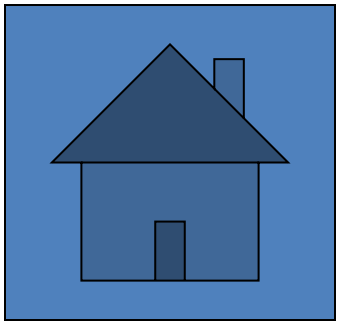
Precipitace – prstencová precipitace k detekci antigenu

- Do Pasteurových pipet zabodnutých v plastelíně postupně naléváme:
 - 1) zvířecí sérum s protilátkami
 - 2) čtyři různé extrakty kmenů
- **Pozitivita: prstenec na styku tekutin**

Obrázek je jen ilustrační! V praxi nevyjde pozitivní první, ale jedno z dalších sér!

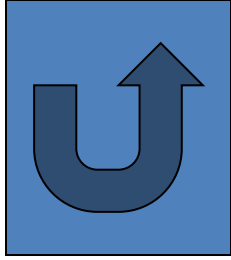


Konec



Treponema pallidum,
původce syfilis

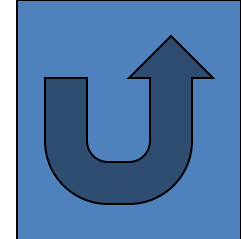
Poznámka k *E. coli*



- *Escherichia coli* je bakterie, která je normální složkou střevní mikroflóry.
- Na svém povrchu má kromě jiných typů antigenů také takzvané **tělové O-antigeny**. (Jsou to koncové části polycharidických řetězců lipopolisachidů vnější membrány G– bakterií)
- Tyto O-antigeny nejsou u všech kmenů *E. coli* stejné. Naopak, existují stovky takzvaných **serotypů** v rámci druhu *E. coli*
- Ze všech těchto serotypů jen přibližně **dvanáct** vykazuje **vyšší patogenitu u novorozenců a kojenců**. Těmto serotypům se souhrnně říká **EPEC** – enteropatogenní *Escherichia coli*

Nepřímý průkaz syfilis – přehled

TPHA – Tr. pasivní
hemaglutinační test
TPPA – dtto, místo krvinek
polycelulóza



Historický	BWR – Bordet Wassermann	Netr.
Screeningové	RRR – Rapid Reagin Test	
		TPHA/TPPA*
Konfirmační	ELISA	
	FTA-ABS (nepř. imunofluor.)	
	Western Blotting	
<i>Historický, popř. superkonfirmace</i>	TPIT (<i>Treponema Pallidum Imobilizační Test</i>) = Nelson	

Kontrolní otázky

1. V jakém typu vzorku se hledají protilátky?
2. V jakých typech vzorků se dají hledat antigeny?
3. Vysvětlete pojem „antigenní analýza“.
4. Znamená přítomnost protilátek vždy akutní infekci?
5. V jakých situacích se měří titry?
6. Jaký je rozdíl mezi precipitační a aglutinační reakcí?
7. Proč je nutno v případě positivity RRR reakce konfirmovat?
8. Lze aglutinační reakcí vyšetřit i protilátky proti koloidnímu antigenu?
9. Co znamená pojem "screeningová reakce"?
10. A ještě jedna 😊

Hlavní obsah



KOMPLE-
MENTFIXACE
NEUTRA-
LIZACE

Obsah této části prezentace

Dynamika titru

Komplement a jeho vlastnosti

Komplementfixační reakce (KFR), její princip

Řešení problémů s KFR

Příklady použití KFR v praxi

Neutralizační reakce – princip

Jednotlivé neutralizační reakce

ASLO a jeho význam

Kontrolní otázky

Dynamika titru

Interpretace serologických reakcí

- **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 J08)
 - (***Avidita protilátek***)

Dynamika titru

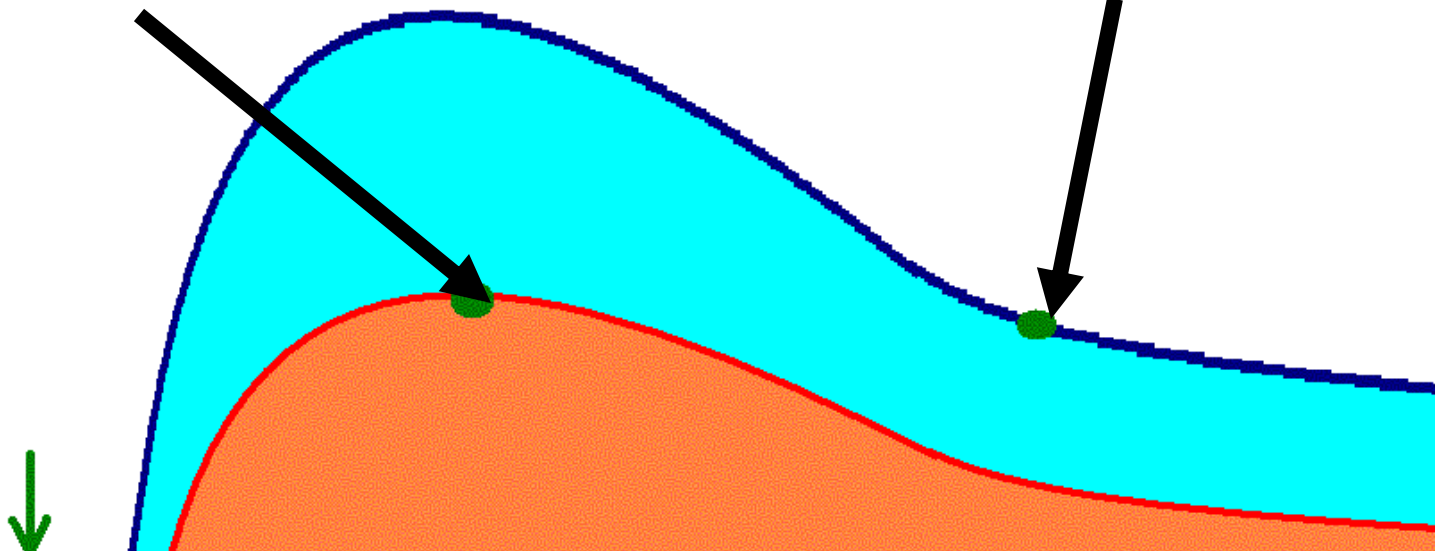
1- akutní sérum
2 - rekonvalescentní

- **Průšvih je, že** každý má jinou úroveň protilátkové odpovědi. Proto samotná hodnota titru mnoho neříká
- **Změna titru** vypovídá více. Jde-li o čerstvou záležitost, titer se vždy vyvíjí, nejprve stoupá, později zvolna klesá.



Proč nestačí samotný titr

- Někdy se stane, že málo reaktivní pacient má i v akutní fázi titr
 - Velmi reaktivní pacient naopak i dlouho po infekci titr relativně vysoký



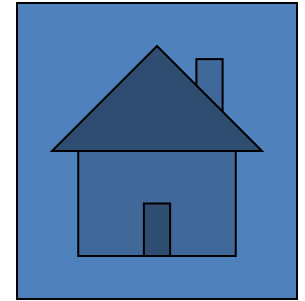
Párová a nepárová séra

- **Párová séra** = první vzorek je uchováván v ledničce, dokud nepřijde i druhý (10–21 dní). Pak jsou oba hodnoceny naráz. **čtyřnásobný 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 se zpravidla vyžaduje ještě jednoznačnější důkaz než čtyřnásobný titr

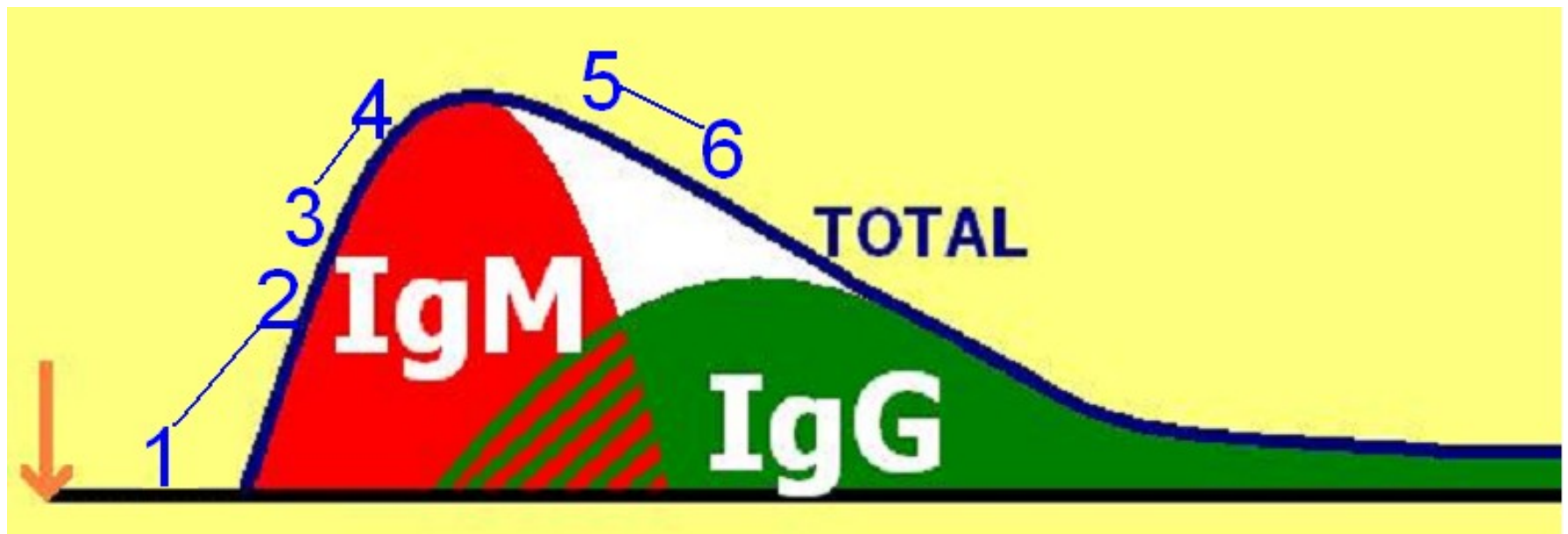
Dynamika titru – další aspekty

- Zvláštním případem je tzv. **serokonverze** – v prvním vzorku protilátky nejsou (ještě se nestihly vytvořit), v druhém už jsou. Takový důkaz je cennější než „důkaz čtyřnásobkem“
- **V některých případech místo vzestupu prokážeme pokles** (subakutní infekce)
- ***Velikost titru rozhodně neodpovídá vývoji klinických příznaků. Množství protilátek často vrcholí, až příznaky zmizí.***

Příklady různých projevů dynamiky titru



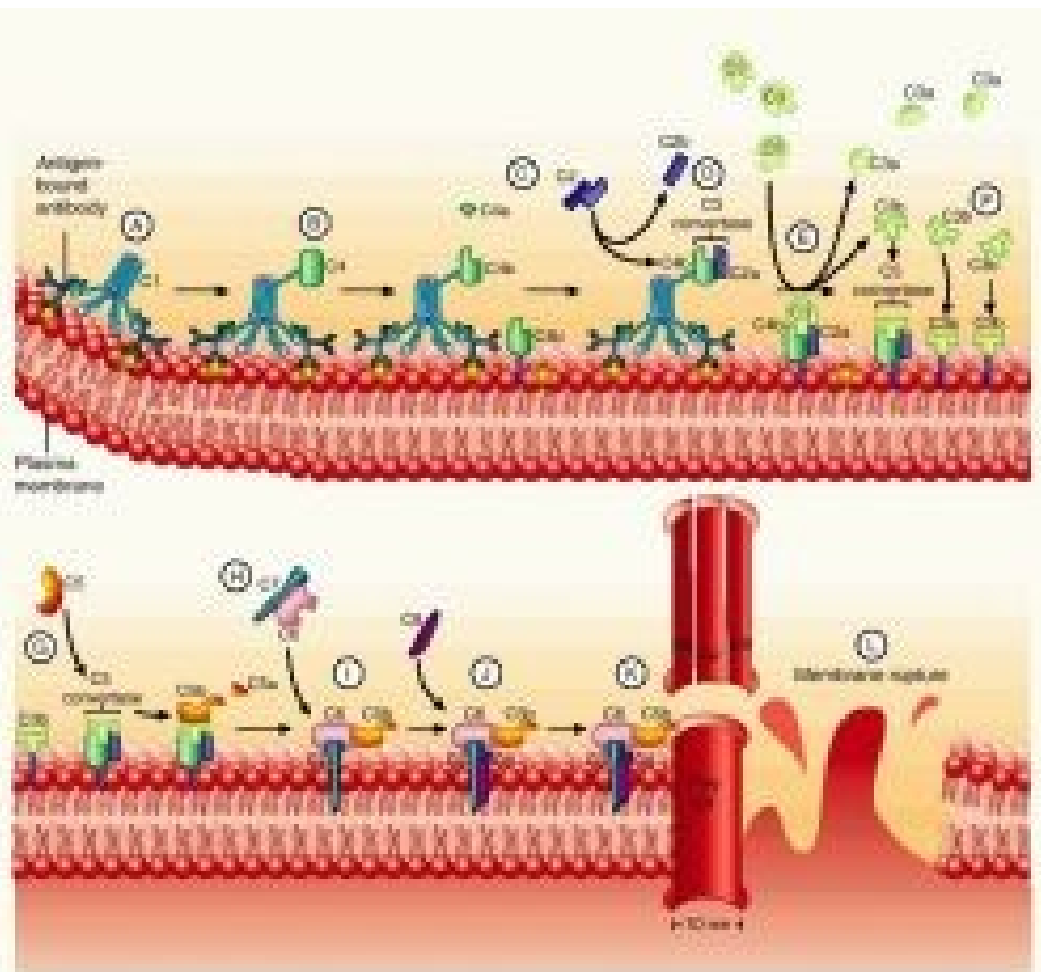
- **1 – 2:** sérokonverze
- **3 – 4:** vzestup titru
- **5 – 6:** pokles titru



Komplement a
jeho vlastnosti

Komplement

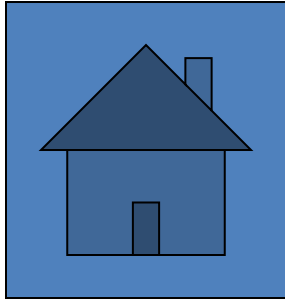
- součást nespecifické humorální imunity
- složitý kaskádový systém



Komplementfixace (KFR)

- Komplement = jedna ze složek imunitní reakce
- Pro KFR používáme morčecí komplement. Pacientův komplement je před reakcí inaktivován teplem
- Komplement **není schopen vázat se na samotný antigen**
- Komplement **není schopen vázat se na samotnou protilátku**
- Komplement **je schopen vázat se pouze na KOMPLEX obou**
- *Jsou-li antigenem beraní erythrocyty a protilátkou králičí protilátky proti nim, dojde po navázání komplementu k hemolýze. Lze se o tom přesvědčit v jednoduchém úkolu, který je obsažen v praktickém cvičení.*

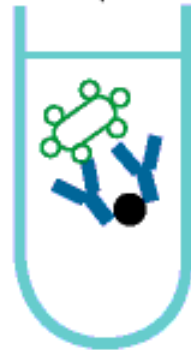
Komplement a jeho vlastnosti



Antigen
+
●
Complement
+



Serum with antibody



Complement fixation

Antigen
+
●
Complement
+



Serum without antibody



No complement fixation

Komplement
fixační reakce
(KFR), její
princip

Pohádka 1

- Byl jednou jeden zvědavý hlídač v parku.
- Chtěl vědět, **jestli mládenec, který chodívá do parku ve stejnou dobu jako jedna slečna, k té slečně patří**
- Uvažoval následovně: v parku je **jediná lavička**. Pokud patří k sobě, tak si jistě na lavičku sednou a budou se objímat
- Umístil proto na lavičku kudlibabky a řekl si, že pokud ti dva k sobě patří, nachytají na sebe při objímání kudlibabky z lavičky.

Pro ty, kdo
nevědí, jak
vypadají
kudlibabky



<http://www.ordinace.cz/clanek/opuch-vetsi-lopuch-plstnaty/>

Jak to ale poznat...

- ...když mládenec i dívka odešli jiným východem?
- Hlídač si uvědomil, že za chvíli přijde na návštěvu jeho **neteř se svým přítelem**. Jak je zná, **určitě se cestou zastaví u lavičky a budou se objímat**.
- Hlídač to vymyslel: **pokud neteř s přítelem budou mít na sobě kudlibabky, pak je nevychytila ta první dvojice – žádná dvojice to nebyla. Pokud kudlibabky mít na sobě nebudou, tak k sobě první dvojice patří.**








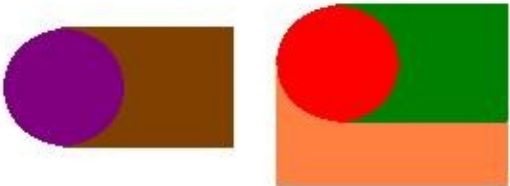
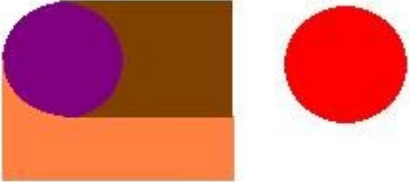






Poučení z naší pohádky

- Dnes máme na programu komplementfixaci, poměrně složitou reakci.
- Nejenže ke zviditelnění komplexu antigen-protilátka používáme **komplement**, ale navíc ještě přidáváme další dvě složky – tzv. **indikátorovou dvojici**.
- Tato dvojice je tvořena **indikátorovým antigenem (beraní erytrocyty)** a **indikátorovou protilátkou (amboceptor = králičí protilátky proti beraním erytrocytům)**.

Princip KFR

- **Sérum pacienta se smíchá s laboratorním antigenem** (*nebo, u přímé KFR, se smíchá pacientův vzorek se zvířecími protilátkami*).
- **Přidá se komplement.** V pozitivním případě se naváže (je schopen se navázat jen pokud se vytvořil komplex Ag-Ig)
- **Ve druhé fázi přidáme indikátorový systém (beraní erytrocyty + amboceptor).** U pozitivní reakce indikátor zůstává nedotčen. U negativní reakce dojde k jeho hemolýze.

Princip KFR

+	-	
1 	1 	 antigen  protilátka
 vázaný	 volný	 complement
2 	2 	 beraní ery
 NENÍ HEMOLÝZA	 HEMOLÝZA	 amboceptor
		

Co dělá komplement s indikátorovým systémem

K hemolýze je nutná přítomnost beraních (ne králičích) erytrocytů, amboceptoru a komplementu. Chybí-li byť jediná složka, nebo je nahrazena jinou, k hemolýze nedojde.

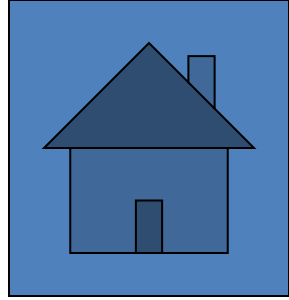
Beraní ery + amboceptor **bez komplementu** → není hemolýza

Beraní ery + komplement **bez amboceptoru** → není hemolýza

Králičí ery + komplement + amboceptor → není hemolýza

Beraní ery + komplement + amboceptor → hemolýza

Použití KFR



- KFR lze použít pro diagnostiku **mnoha, zejména virových infekcí**
- Jako i jiné serologické reakce se KFR používá k **průkazu antigenu či protilátky**
- Pro zjednodušení uvádíme v tomto praktiku pouze průkaz protilátky
- Berme to tedy tak, že máme **laboratorní antigen**, který konfrontujeme se **sérem pacienta** (kde hledáme protilátky)

Řešení KFRůserů

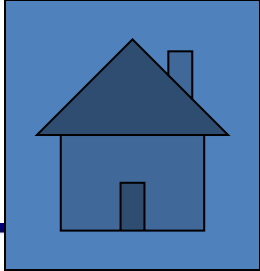
Problémy s KFR

- Příliš mnoho komplementu → falešná negativita.
Co dělat? Titrovat komplement
- Některá složka séra sama o sobě vyvazuje komplement (složka antikomplementarity): falešně pozitivní výsledky. **Co dělat? Provést test antikomplementarity, tj. vše jako v normální reakci, ale bez antigenu** (*V pohádkovém příběhu odpovídá bezdomovci, který zvalí lavičku a sám na sebe nachytá všechny kudlibabky, a to i tehdy, když je chlapec nemocný a do parku vůbec nepřijde*)

Titrace komplementu

- Pro reakci potřebujeme množství morčecího komplementu, které není moc velké ani malé.
- Proto zjišťujeme, **jaké množství komplementu hemolyzuje pracovní jednotku krvinek s amboceptorem (hemolytická jednotka)**
- *Příliš mnoho komplementu → falešná negativita (příliš mnoho kudlibabek → zbude i na neteř a jejího přítele)*

Test antikomplementarity



SERUM NE OK	SERUM OK	
<p>1</p>	<p>1</p>	<p>složka zodpovědná za antikomplementaritu</p>
<p>vázaný</p>	<p>volný</p>	<p>protilátka</p>
<p>2</p>	<p>2</p>	<p>complement</p>
<p>NENÍ HEMOLÝZA</p>	<p>HEMOLÝZA</p>	<p>beraní ery</p>
		<p>amboceptor</p>

Příklady
použití KFR
v praxi

Klinická situace A

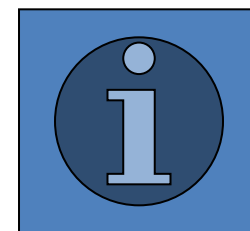
- Pacient s dlouhotrvajícími respiračními problémy, málo klinických projevů, nejpravděpodobnější diagnóza **atypické pneumonie**
- Atypická pneumonie může být způsobena mnoha **respiračními viry, avšak také některými bakteriemi** (*Mycoplasma, Chlamydia*)
- Případná **mykoplasmová/chlamydiová etiologie by znamenala účinek antibiotik**. U virů by antibiotika smysl neměla.

Respirační patogeny

- Celá serologická destička patří **jednomu pacientovi**.
- Máme **šest respiračních patogenů**, každý je ve dvou řádcích (akutní vzorek a rekonvalescentní).
- **První sloupec je test antikomplementarity**
- Následuje **sedm ředění séra** – ve druhém sloupci 1 : 5 a pak geometrickou řadou s koeficientem dva. Kromě virů je ve škále i bakterie *Mycoplasma pneumoniae*

Klinická situace B

- Máme tři pacienty s **podezřením na klíšťovou encefalitidu**, všichni mají **neurologické potíže a anamnézu přisátí klíštěte**
- Klíšťová encefalitida je **nemoc poměrně běžná ve střední Evropě**. Ačkoli má horší průběh u dospělých (zejména seniorů), lidé pohříchu nechávají očkovat spíše své děti než své rodiče.



Klíšťová encefalitida – příklad průkazu

- **Opět testujeme protilátky**, tentokrát proti klíšťové encefalitidě.
 - v prvním řádku je pozitivní kontrola
 - ve 2. a 3. řádku první pacient
 - ve 4. a 5. řádku druhý pacient
 - v 6. a 7. řádku třetí pacient
- **První z obou řádků vždy odpovídá akutnímu, druhý rekonvalescentnímu vzorku séra.**
- **V prvním sloupci jsou opět testy antikomplementarity**, následuje ředění geometrickou řadou od ředění 1 : 4

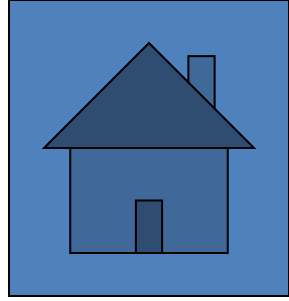
Klinická situace C

- Máme několik pacientů, kteří mají být **prověřeni na protilátky proti toxoplasmose** (*Toxoplasma gondii* je tkáňový parazit, jeho definitivním hostitelem je kočka)
- **Seronegativita znamená, že se pacient nikdy s infekcí nasetkal***. Seropozitivita vyžaduje bližší zkoumání (další odběr, event. ELISA pro ověření třídy protilátek)



**nebo to bylo tak nedávno, že se ještě nestihly vytvořit protilátky.*

Toxoplasmosa – příklad průkazu protilátek



- Destička patří **pozitivní kontrole (první řádek)** a **šesti pacientům (druhý až sedmý řádek)**. Hledáme protilátky proti toxoplasmose. **V prvním sloupci jsou opět testy antikomplementarity**, následuje ředění geometrickou řadou od ředění 1 : 8. V tomto případě nesledujeme dynamiku titru (každý pacient má jen jeden řádek).

Neutralizační reakce – princip

Pohádka 2

- Byl jednou jeden krvežiznivý 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 též **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**

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

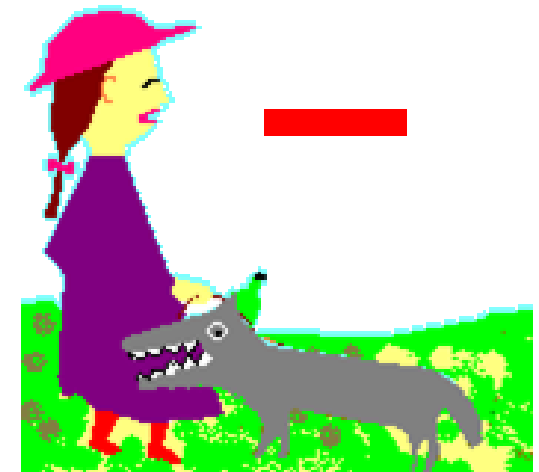
- Protilátka (Ig) brání efektu toxinu/viru na buňku / krvinku



Buňka ve tkáňové kultuře či červená krvinka

Protilátka

Toxin či virus

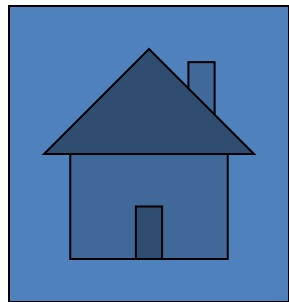


Buňka ve tkáňové kultuře či červená krvinka

Toxin či virus

Příklady neutralizačních reakcí

Neutralizován	Objekt	Reakce
Toxin bakterie (hemolyzin)	Erytrocyt hemolýza	ASLO
Virus	Erytrocyt shlukování	HIT
Virus	Buňka efekt metabolický	VNT



Jednotlivé neutralizační reakce

ASLO

- **Princip:** Protilátka blokuje hemolytický efekt toxinu (streptolysin O) na krvinku. Pozitivní je tedy zábrana hemolýzy se sedimentací krvinek (podobně, jako u KFR, ale ze zcela jiného důvodu)
- **Panel se odečítá naležato.** Obsahuje pozitivní kontrolu a sedm pacientů.
- **Titř nad cca 200** 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 (a to ještě přibližně)

Hodnocení výsledků ASLO

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

HIT

- **H**emaglutinačně **I**nhibiční **T**est
- Protilátka neutralizuje virové shlukování krvinek (in vitro vlastnost většiny virů)
- **Shluk krvinek („bramboroid“)** = **negativní výsledek.**
Sedimentace = pozitivní
- **Příklad použití:** Můžeme odečíst HIT u klíšťové encefalitidy – u každého pacienta akutní a rekonvalescentní sérum.

Interpretace výsledků párových sér je u neutralizace samozřejmě stejná jako u kterékoli jiné reakce

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
- Průkaz protilátek proti klíšťové encefalitidě pomocí HIT je „už zase“ klasický nepřímý průkaz (na rozdíl od ASLO)


HIT u klíšťové encefalidity: příklad klinické situace

- Máme několik pacientů s **podezřením na klíšťovou encefalidu**, již testovaných pomocí komplementfixace. Nyní jsme se rozhodli k ověření výsledků provést **nezávislý test**.

VNT (nepleťte si to s TNT 😊)

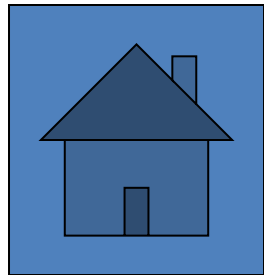
- **V**irus **N**eutralizační **T**est
- **Buněčná kultura** bývá poškozena virem.
- Poškození virem → změna pH → změna barvy ze žluté na červenou (*pro zapamatování: buňky, zprzněné virem, se rdí, ač svému neštěstí nemohly zabránit*)
- Jsou-li přítomny **protilátky**, mohou tomuto zprznění buněk zabránit.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

VNT – klinická situace

- Pacient R. S., 35 let, má **chronickou hrudní bolest**. Kardiologické vyšetření ukázalo podezření na zánět srdečního svalu (myokarditidu)
- Jelikož **coxackieviry**  jsou častými původci myokarditid, bylo rozhodnuto prověřit přítomnost protilátek proti těmto virům

VNT – příklad použití u coxsackievirů

- Celý panel patří vyšetření jednoho pacienta. Liché řádky = akutní sérum, sudé = rekonvalescentní. Co dva řádky, to jeden coxsackievirus (B_1 až B_6)
- V prvním sloupci je ředění 1 : 5, dále opět 1 : 10 atd.
- 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**



ASLO a jeho význam

Co je to antistreptolysin O a proč ho prokazujeme

- **Po každé streptokokové infekci se objevují protilátky**, často 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), roztáčejíce „bludný kruh“.**
- V takovém případě **jsou tedy paradoxně nebezpečnější protilátky než patogen**, proti kterému nás měly chránit.

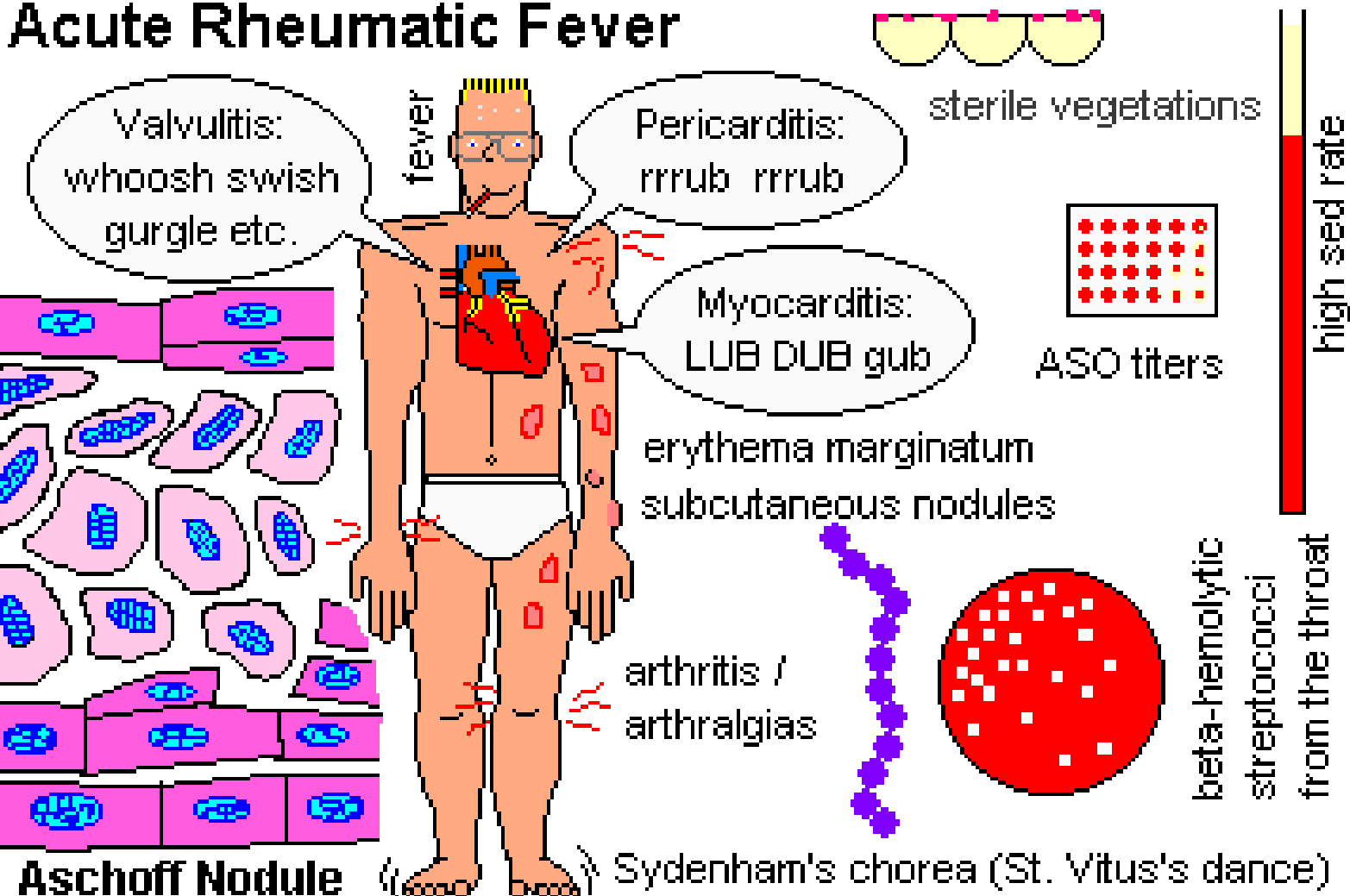
Pamatujte:

- **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**

Revmatická horečka

<http://mednote.co.kr>

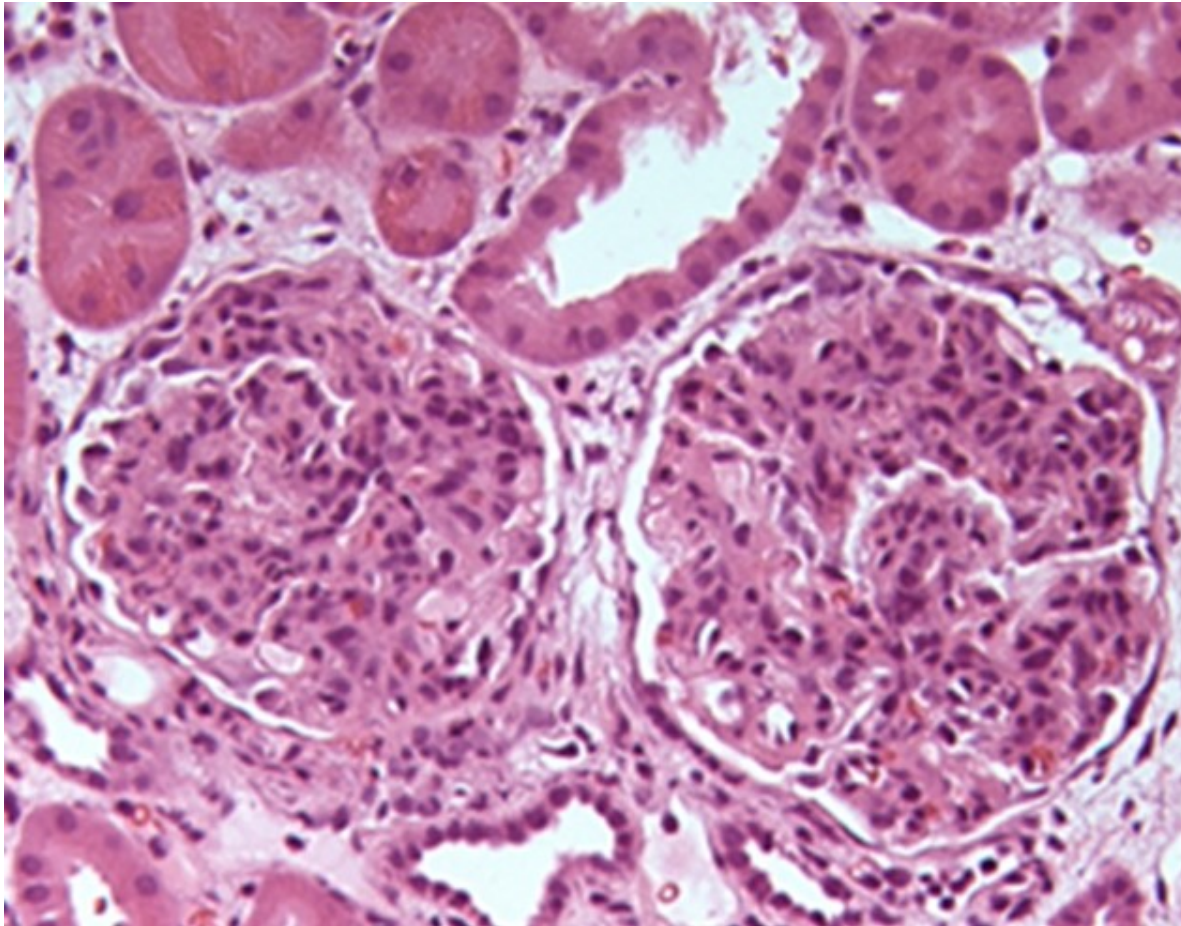
Acute Rheumatic Fever



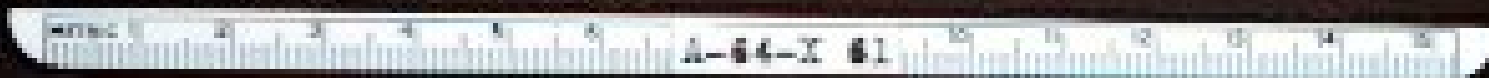
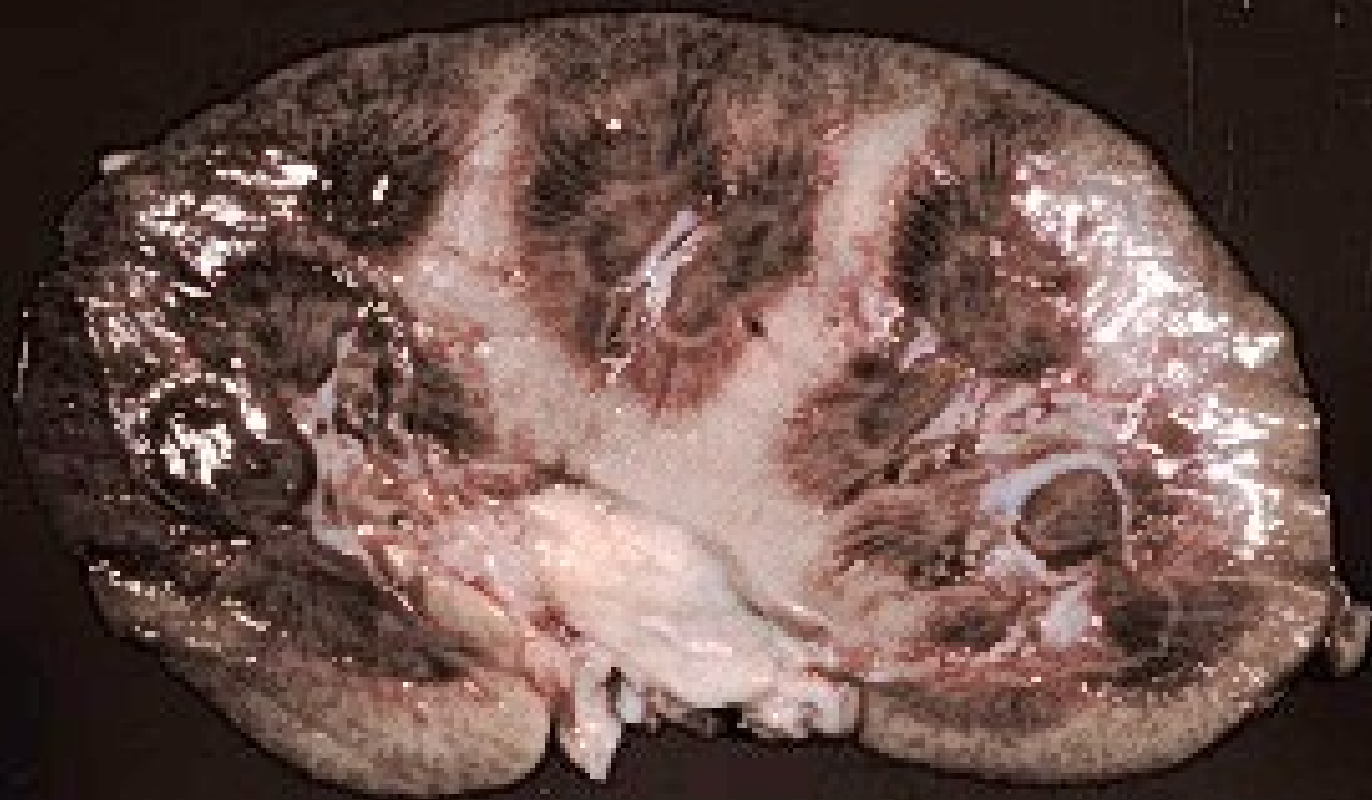
Akutní glomerulonefritida

Difusní zánětlivá buněčná infiltrace a mesangiální hypercelularita (barvení hematoxylin-eosin, původní zvětšení 200×)

www.ispub.com



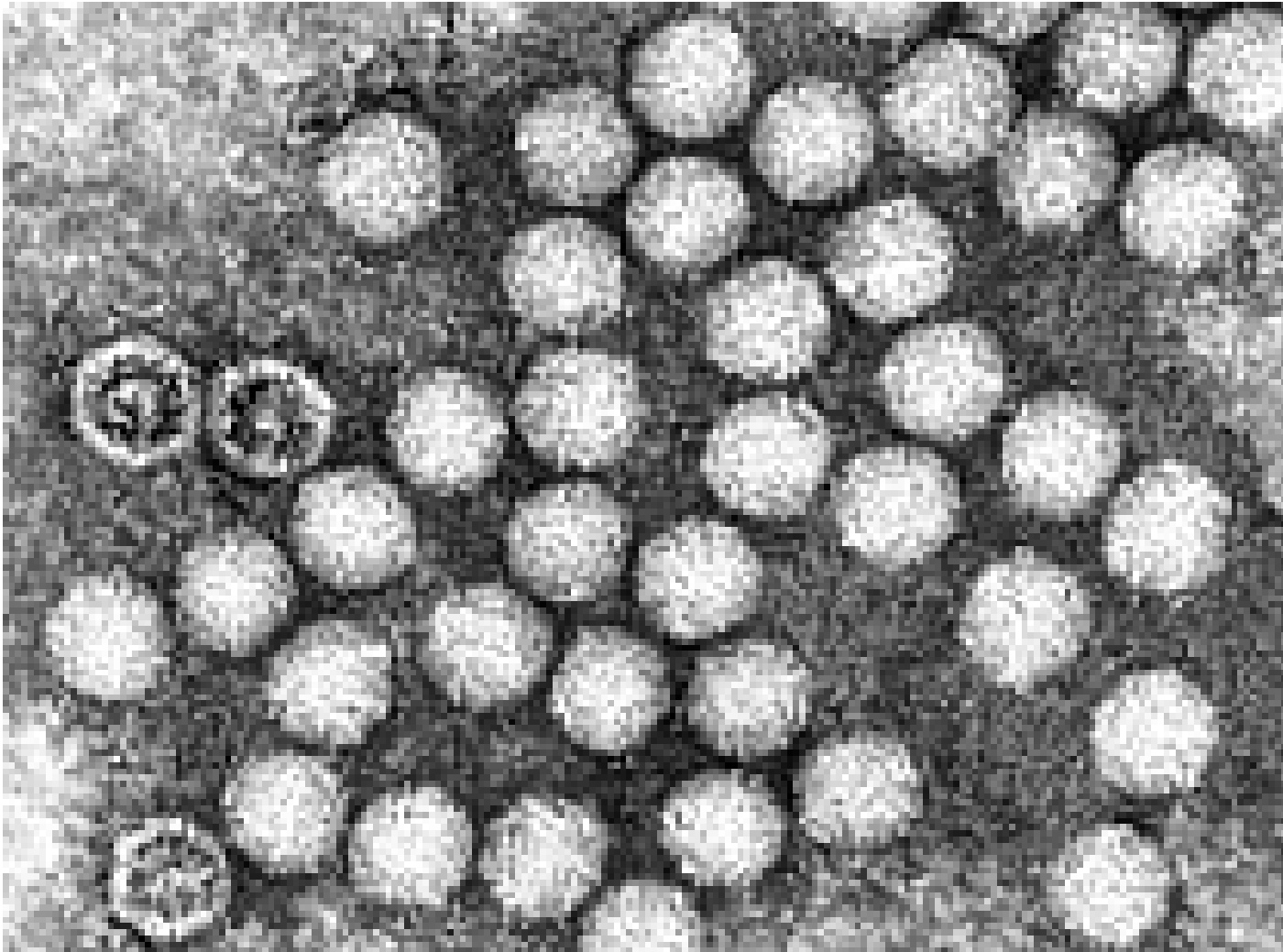
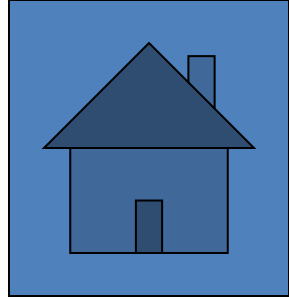
Akutní glomerulonefritida II



Princip vyšetření ASLO: neutralizace hemolýzy

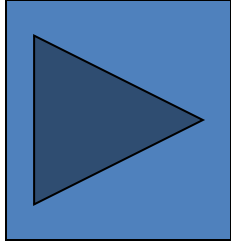
Všimněte si, že
v angličtině se
ASLO označuje
jako ASO. Zrada
je, že zkratka
ASLO přitom také
existuje a označuje
stafylolysin.

Konec



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

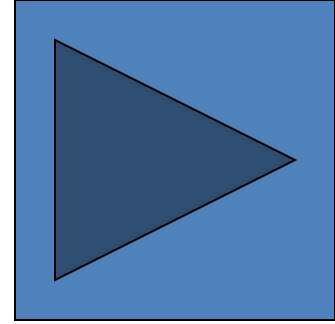
Virus klíšťové encefalitidy



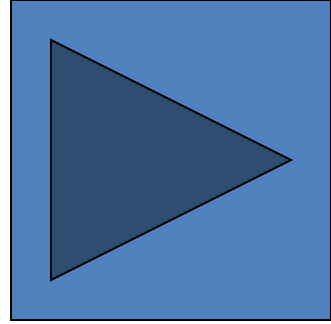
- **Klíšťová encefalitida** sice postihuje často děti, závažné příznaky má však spíše u dospělých. Přesto se dospělí málokdy nechají **očkovat**. V první fázi připomíná chřipku, ve druhé příznaky meningeální či mozkové. Smrtnost infekce je 1–5 %.
- Jde o typický **arbovirus**, zdrojem jsou hlodavci
- **Diagnostika** je nejčastěji nepřímý průkaz



Další flavivirové encefalitidy a horečky

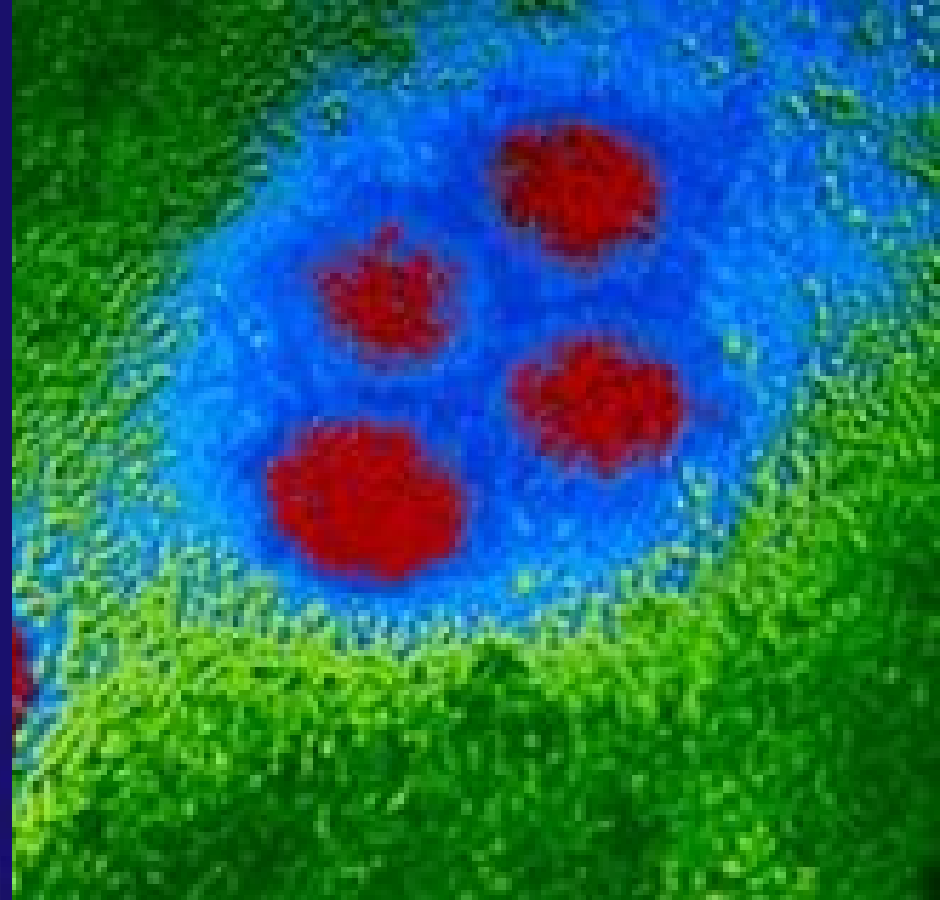
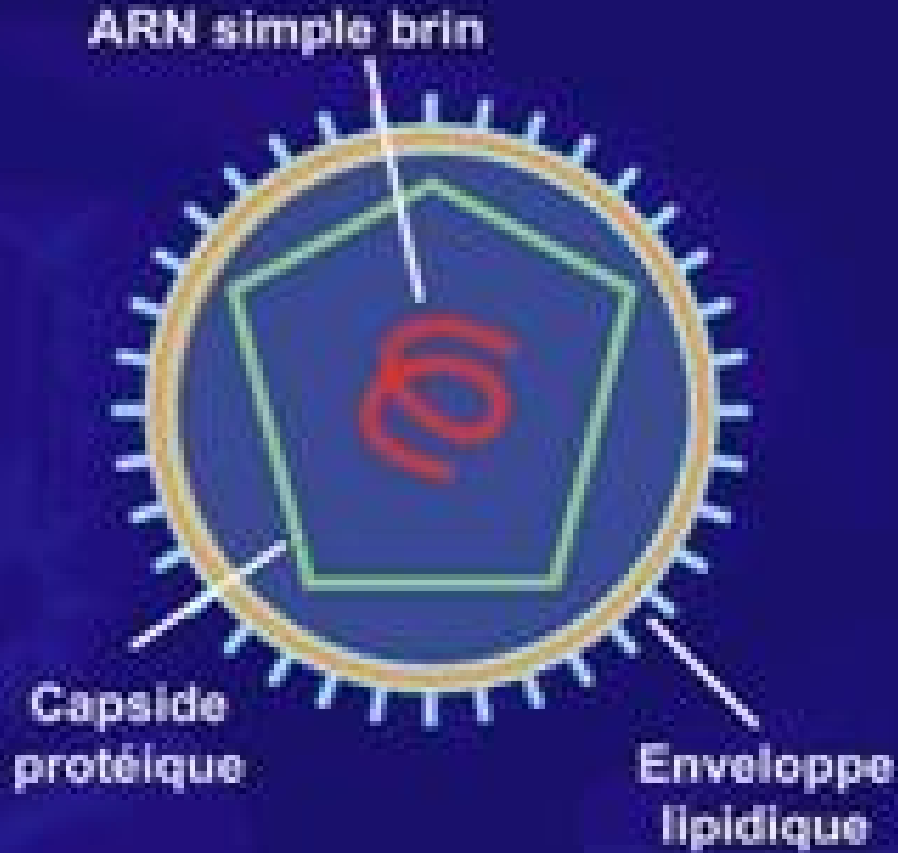
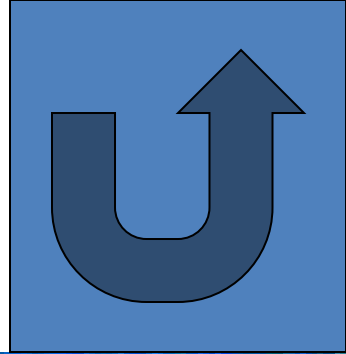


- Kromě středoevropské **klíšťové encefalitidy** existují ještě další klíšťové encefalitidy. Ruská jaroletní je druhým podtypem k té naší, trochu méně příbuzná je skotská „louping ill“ a omská hemorrhagická horečka.
- Dále existuje **japonská encefalitida**, kterou přenáší komáři rodu *Culex*. S ní je příbuzná také **západonilská horečka**, kterou rovněž přenáší komáři. Zřejmě se vyskytuje i jako domácí onemocnění v okolí Lanžhota.

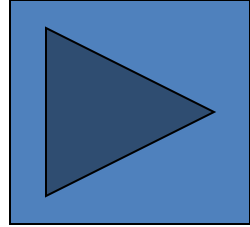


<http://www.presse.uni-wuppertal.de/archiv/output/okt98>

Virus klíčtové encefalitidy

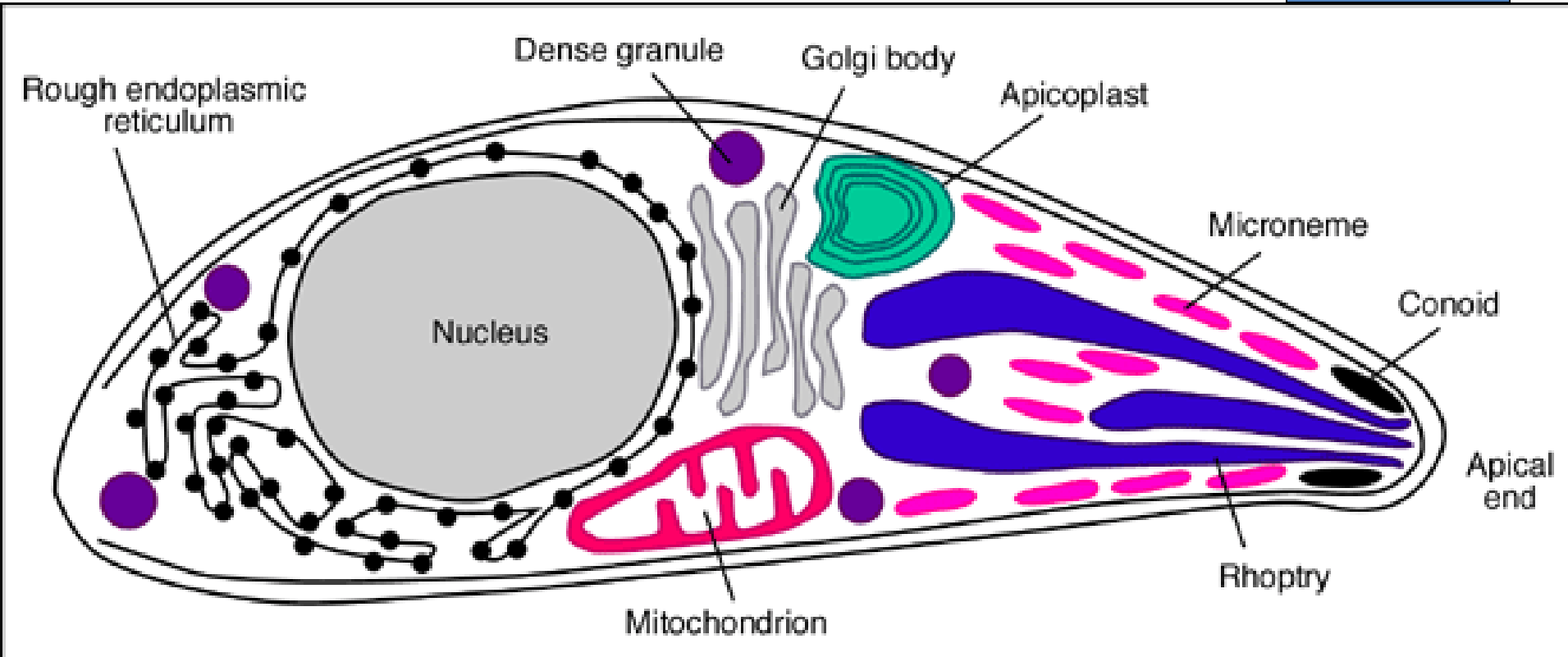
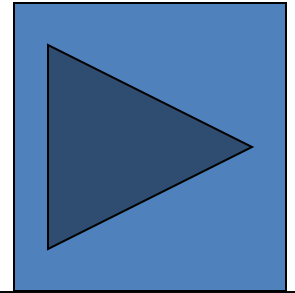


Toxoplasma gondii



- Je to **prvok, který je přenášen kočkami**, i když chovatelé psů jsou ve větším riziku (protože na srsti donesou domů částičky kočičího trusu)
- **Většina infekcí u imunokompetentních osob je bez příznaků** nebo se projeví jen zvětšenými uzlinami, které zase odezní
- Nebezpečná je **oční forma**
- Nebezpečná je také **infekce plodu**, zejména v prvním trimestru

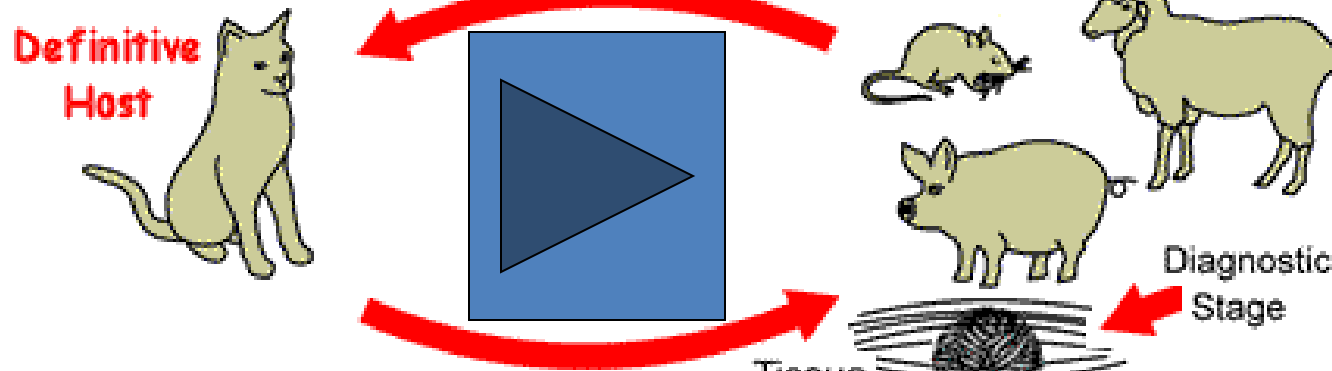
Toxoplasma gondii



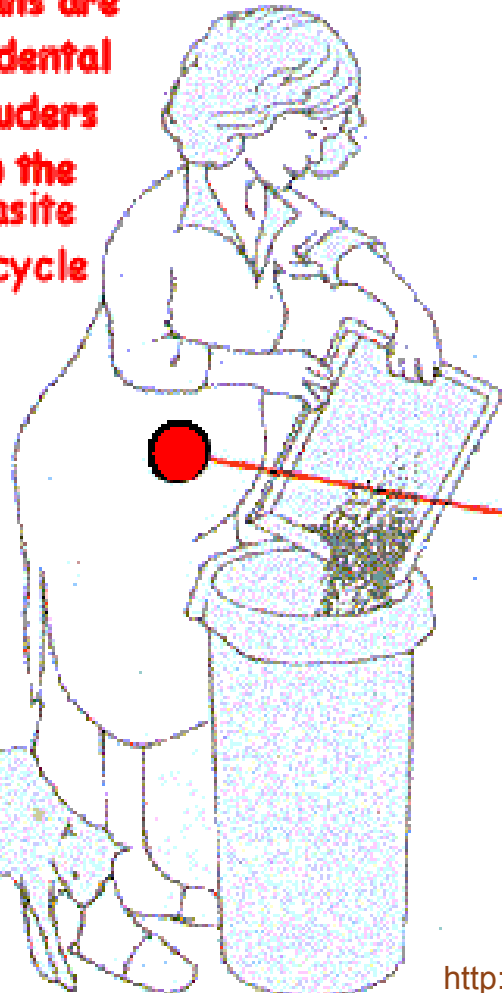
Ultrastructure of a *Toxoplasma gondii* tachyzoite

Expert Reviews in Molecular Medicine ©2001 Cambridge University Press

Životní cyklus toxoplasem

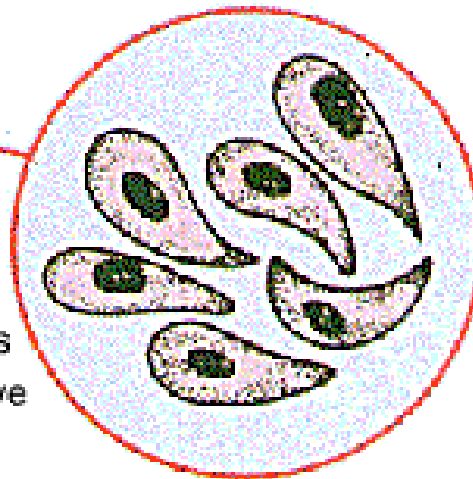


Humans are accidental intruders into the parasite life cycle



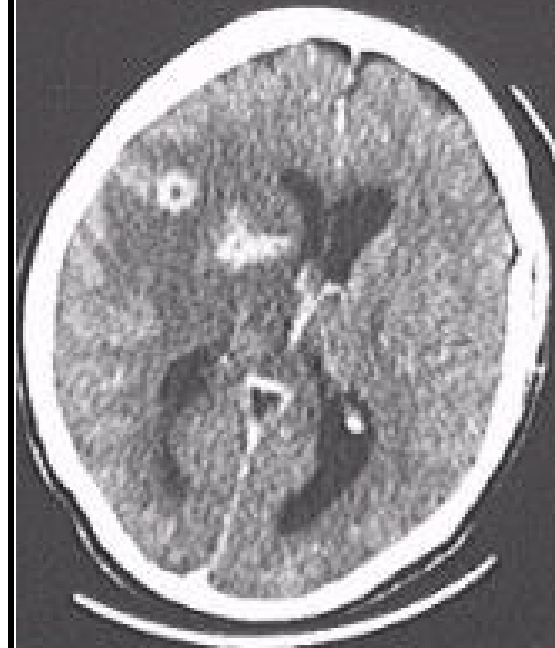
Both oocysts and tissue cysts transform into tachyzoites shortly after ingestion. Tachyzoites localize in neural and muscle tissue and develop into tissue cyst bradyzoites. If a pregnant woman becomes infected, tachyzoites can infect the fetus via the bloodstream.

Fecal Oocysts = Infective Stage

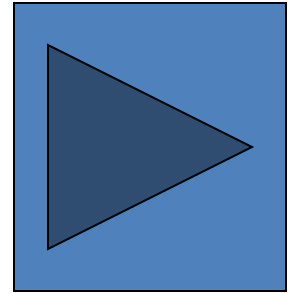


Dole: toxoplasmová cysta v mozku

http://www.antoranz.net/CURIO/SA/ZBIOR3/C0311/03-QZC08043-3_Toxoplasma.jpg



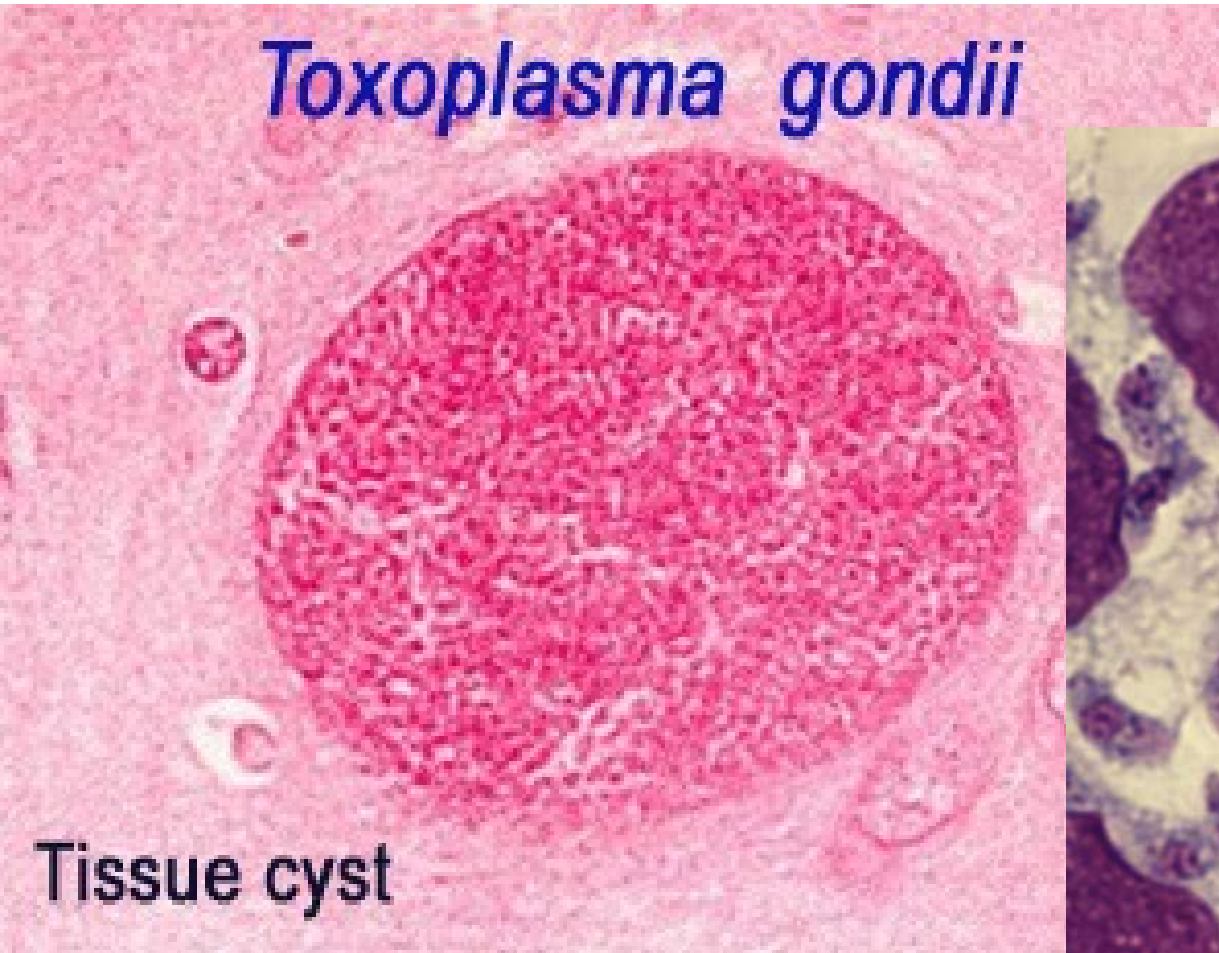
Toxoplasma gondii



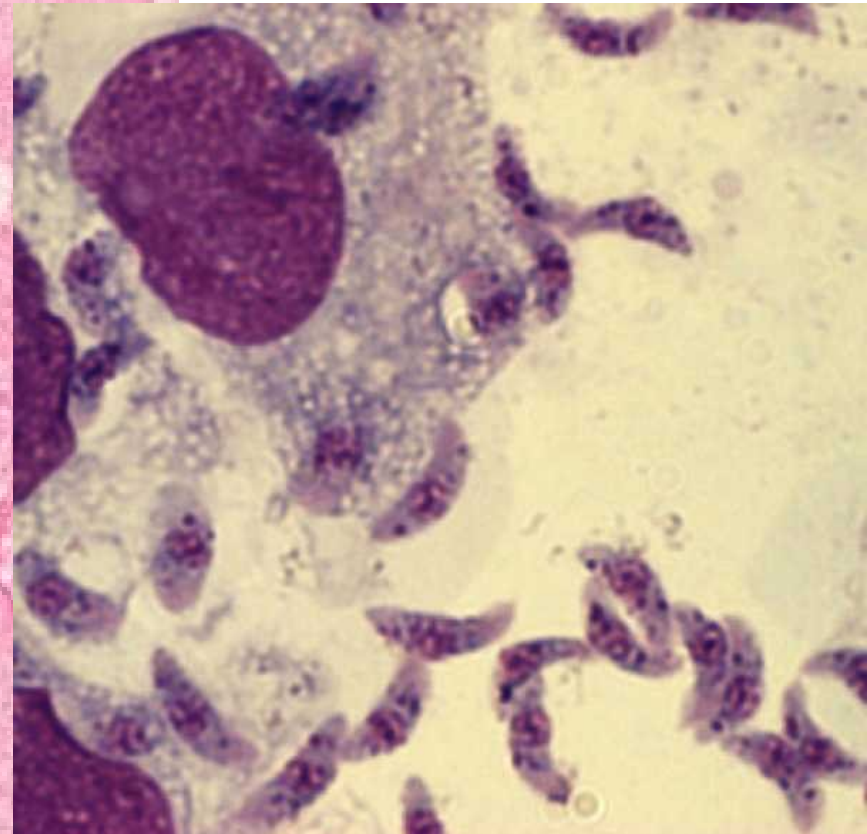
http://webdb.dmsc.moph.gov.th/ifc_nih/applications/pics/Toxoplasma.jpg

<http://www.smittskyddsinstitutet.se/upload/Analyser/ToxoplasmaSB.jpg>

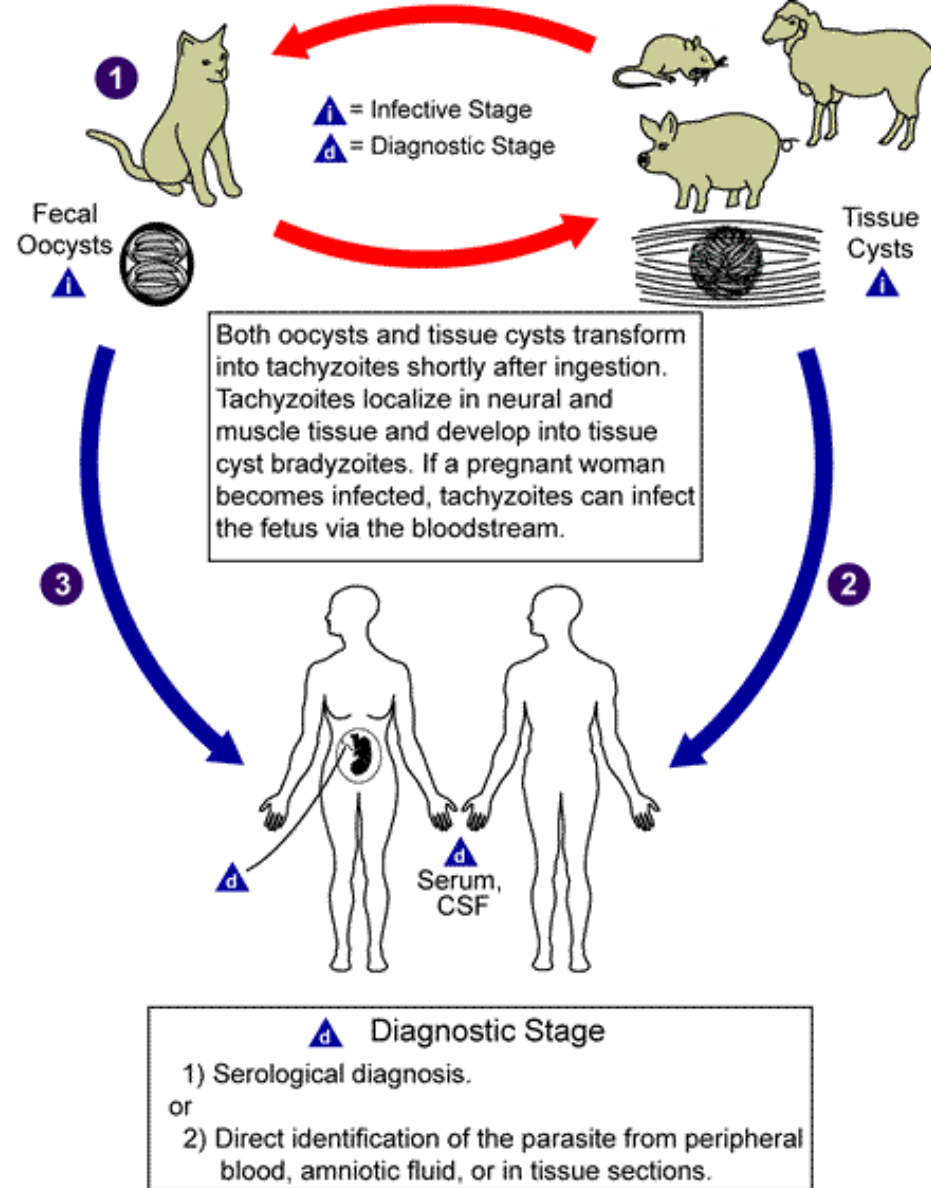
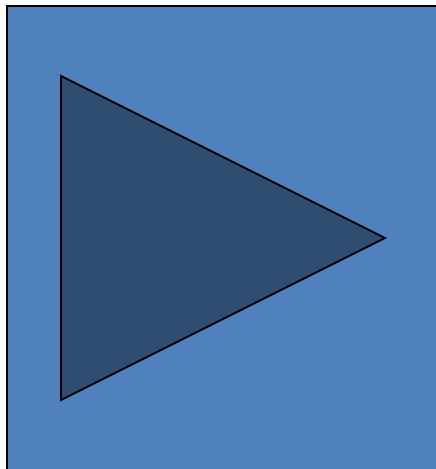
Toxoplasma gondii



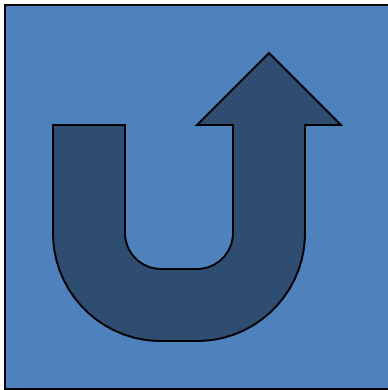
Tissue cyst



Toxoplasma – životní cyklus

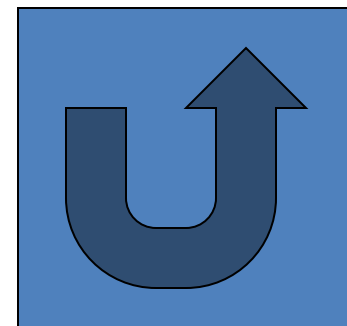


U některých osob ovšem může vzniknout například toxoplasmová retinitida...

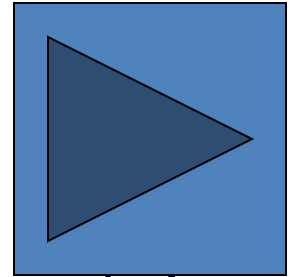


Smrtnost (letalita) a úmrtnost (mortalita)

- **Smrtnost čili letalita** je podíl osob, které umřou na určitou nemoc, k celkovému počtu nakažených touto nemocí
- **Úmrtnost čili mortalita** je naopak průměrný počet osob, které zemřou na tuto nemoc (obvykle vyjádřený na 100 000 obyvatel a jeden rok)

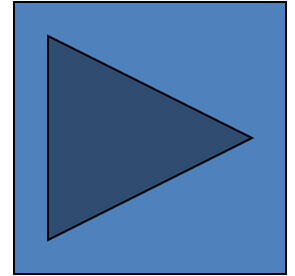


Coxsackieviry: přehled čeledi *Picornaviridae*



- Do čeledi *Picornaviridae* patří z virů významných pro člověka patří do této čeledi především
- **enteroviry**, (název ukazuje na fekálně-orální přenos většiny z nich, ale vlastní infekce probíhají spíše mimo střevo!) dále se dělí na
 - **polioviry** – viry dětské obrny
 - **coxsackieviry** a **echoviry**
 - **novější enteroviry 68, 69, 70 a 71**
- **rhinoviry** – viry rýmy
- **virus hepatitidy A**

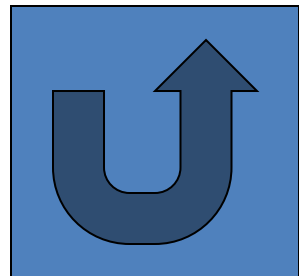
Coxsackieviry – více o nich



- Existují coxsackieviry A1–A22, A24 a B1–B6
- **Diagnostika** spočívá v izolaci viru na novorozených myšatech či tkáňových kulturách
- **Nepřímá diagnostika** je obtížná kvůli zkříženým reakcím; používá se vlastně jen u skupiny B při podezření na myokarditidu

Coxsackieviry – patogenita

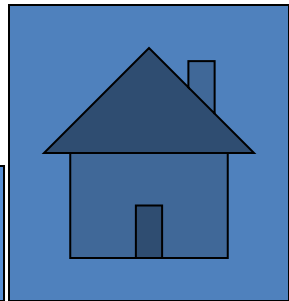
- **CNS:** aseptické meningitidy (většina typů)
- **herpangina** (A typy, hlavně A4)
- **tzv. hand-foot-mouth disease** (A16)
- **dýchací infekce** (všechny typy)
- **myokarditida a jiné svalové choroby** (B typy)
- **lymfadenitida** (všechny typy)
- souvislost s některými typy **diabetes mellitus** (skupina B)?



Kontrolní otázky

1. Proč se pro KFR nepoužívá pacientův vlastní komplement a používá se místo toho morčecí?
2. Jaké typy chyb vyvolává antikomplementarita séra?
3. Jaké typy chyb vyvolává příliš velké množství komplementu?
4. Proč nelze dvojnásobný vzestup titru považovat za signifikantní? (Uvažujte o chybě měření)
5. Proč je u reakcí, jako je KFR, doporučeníhodné používat párová séra?
6. Co znamená termín „serokonverze“?
7. V jakých klinických situacích má význam vyšetřovat ASLO?
8. Proč není vhodné hovořit o ASLO jako o „nepřímé metodě detekce mikroba“ navzdory faktu, že jde o průkaz protilátek?
9. Každý virus nemá schopnost aglutinovat erythrocyty – jak to ovlivní možnost použití HIT v diagnostice?
10. Jaká je anglická zkratka reakce ASLO ?
11. Proč se neutralizační reakce jen zřídka používají v bakteriologii?
12. A ještě jedna 😊

Hlavní obsah



REAKCE SE
ZNAČENÝMI
SLOŽKAMI

Obsah této části prezentace

Úvod (pohádka)

Třídy protilátek

Reakce se značenými protilátkami: přehled

Imunofluorescence a RIA

ELISA: princip

ELISA: praktické odečítání

Imunoblotty (Western blotting)

Imunochromatografické testy

Kontrolní otázky

Pohádka

- Byla jednou jedna námořnice*, a ta měla na palubě různé věci přivázané, aby jí neodplavaly. **Dalekohled měla 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 objevil její muž. Chtěl si vyzkoušet **záchranné kolo. Odvázal z něj dalekohled a odvázal ho z člunu.**
- **Přišla vlna – a dalekohled uplaval.**

**Původní pohádka o námořníkovi a jeho ženě byla upravena v rámci boje s genderovými stereotypy.*

Poučení z naší pohádky



- Reakce se značenými složkami jsou založeny na tom, že postupně navazujeme jednotlivé složky reakce 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.**

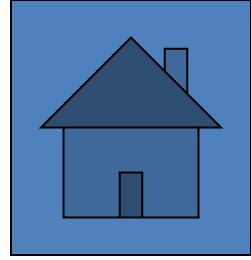
Třída protilátek

Průběh protilátkové odpovědi

- **Protilátky IgM** se tvoří jako první, ale také jako první mizí. Neprocházejí placentou → jejich nálezn u novorozence je svědectvím jeho infekce
- **Protilátky IgG** se tvoří později a zůstávají jako imunologická paměť přítomny dlouhodobě. Procházejí placentou (novorozenec je tedy může mít od matky)



Protilátky ostatních tříd



- Protilátky třídy **IgA** se uplatňují hlavně u slizniční imunity, a tedy u infekcí, kde branou vstupu je sliznice (například gastrointestinální). U některých infekcí se vyšetřují místo protilátek IgM (například u toxoplasmózy)
- 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
protilátkami:
přehled

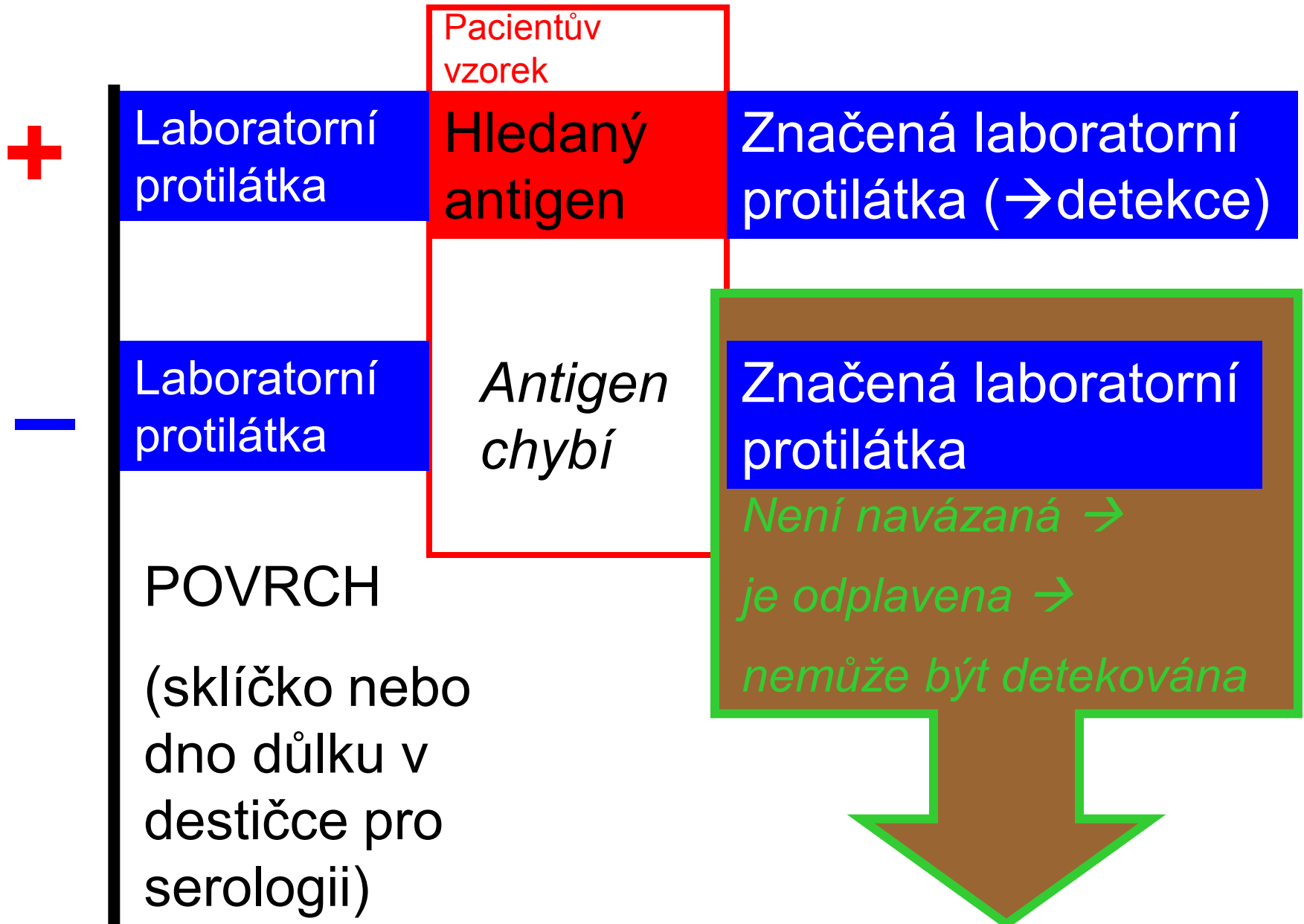
Reakce se značenými složkami

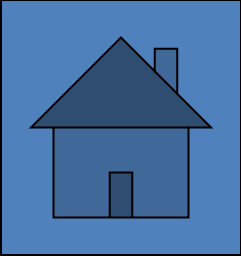
- **Na povrch** se postupně navazují jednotlivé složky
- **Místo jedné ze složek** se pokusíme navázat vzorek od pacienta, o kterém si myslíme, že danou složku možná obsahuje
- **Je-li to pravda**, složka se naváže
- **Pokud se všechny složky postupně navážou**, vznikne nepřerušovaný řetězec
- **Na konci 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





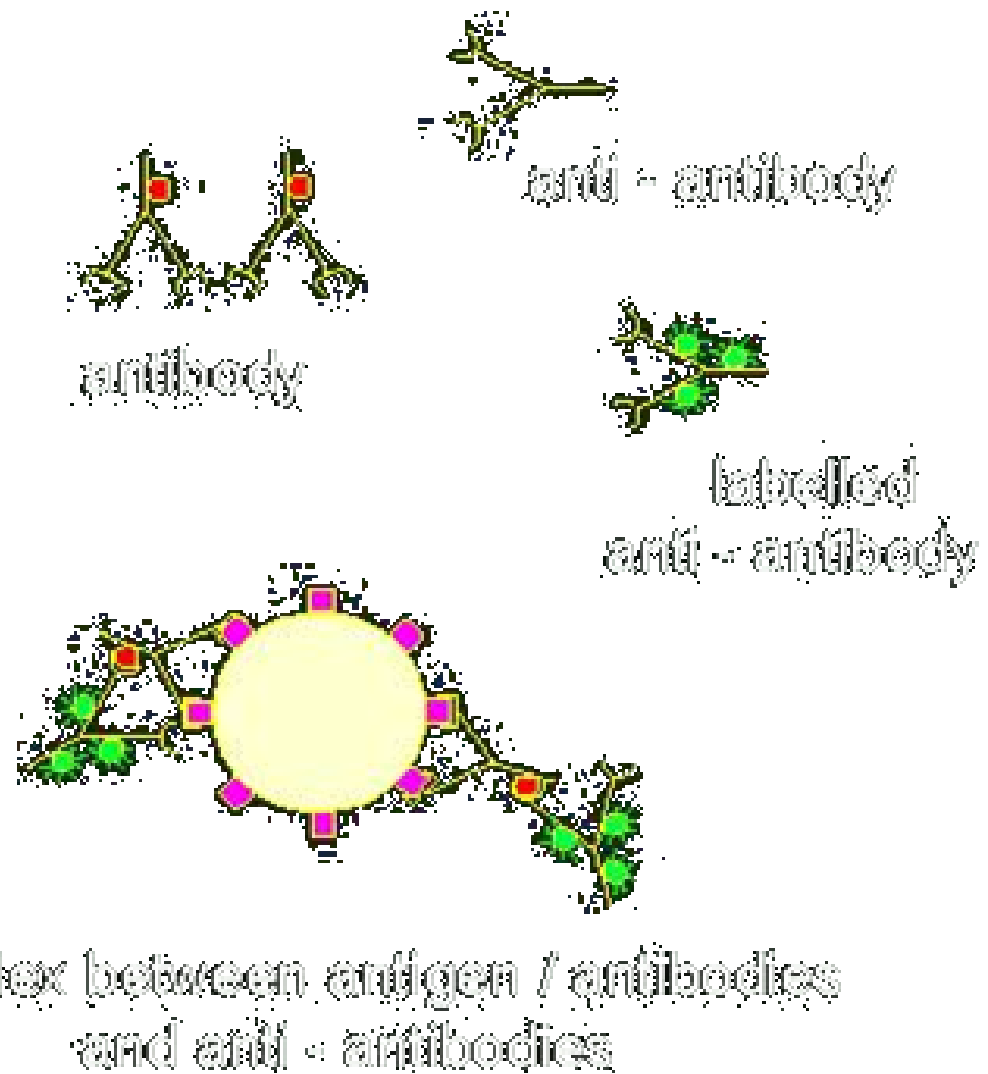
Typy značidel

- **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.

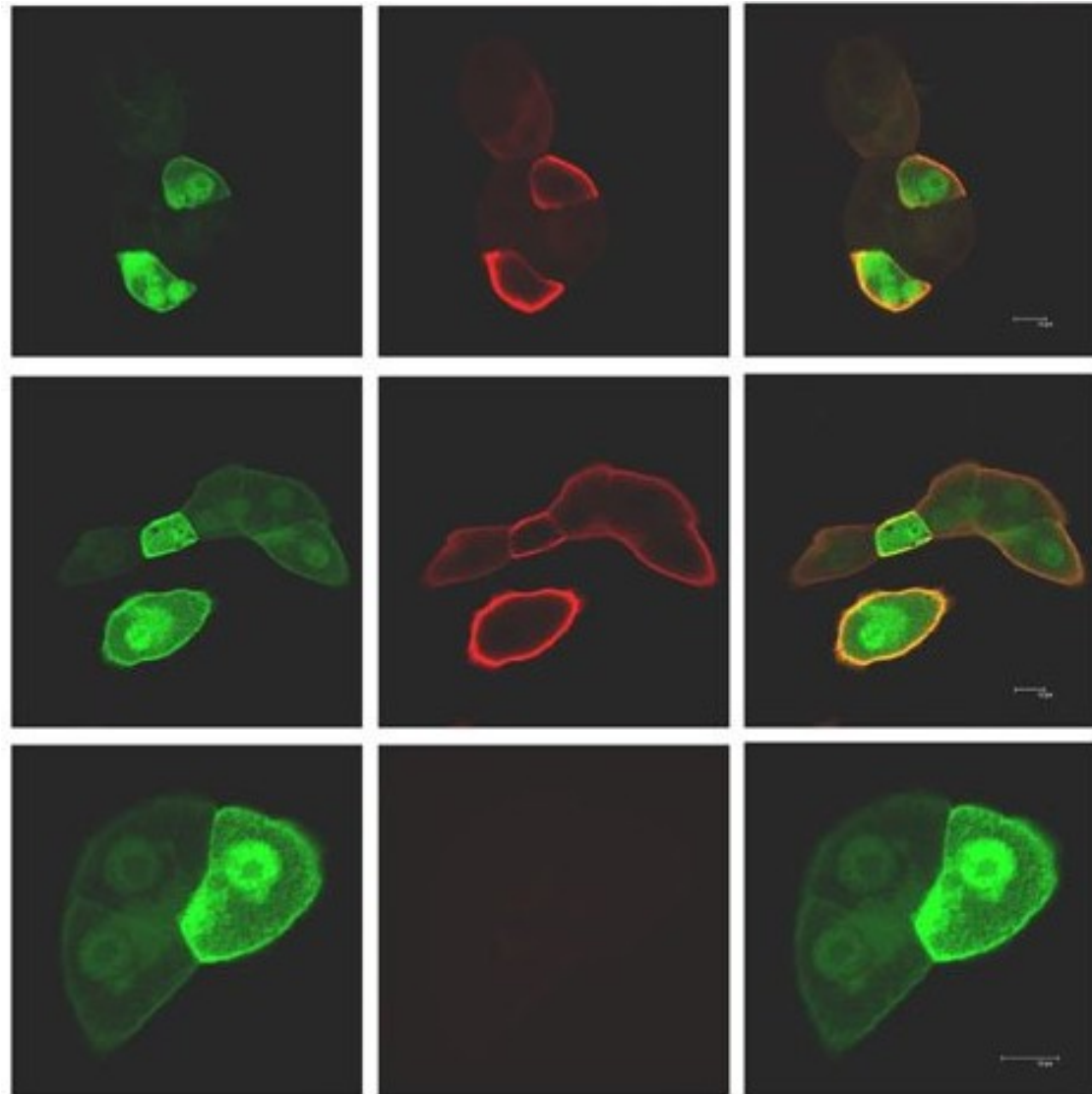
Imuno-
fluorescence a
RIA

Imunofluorescence

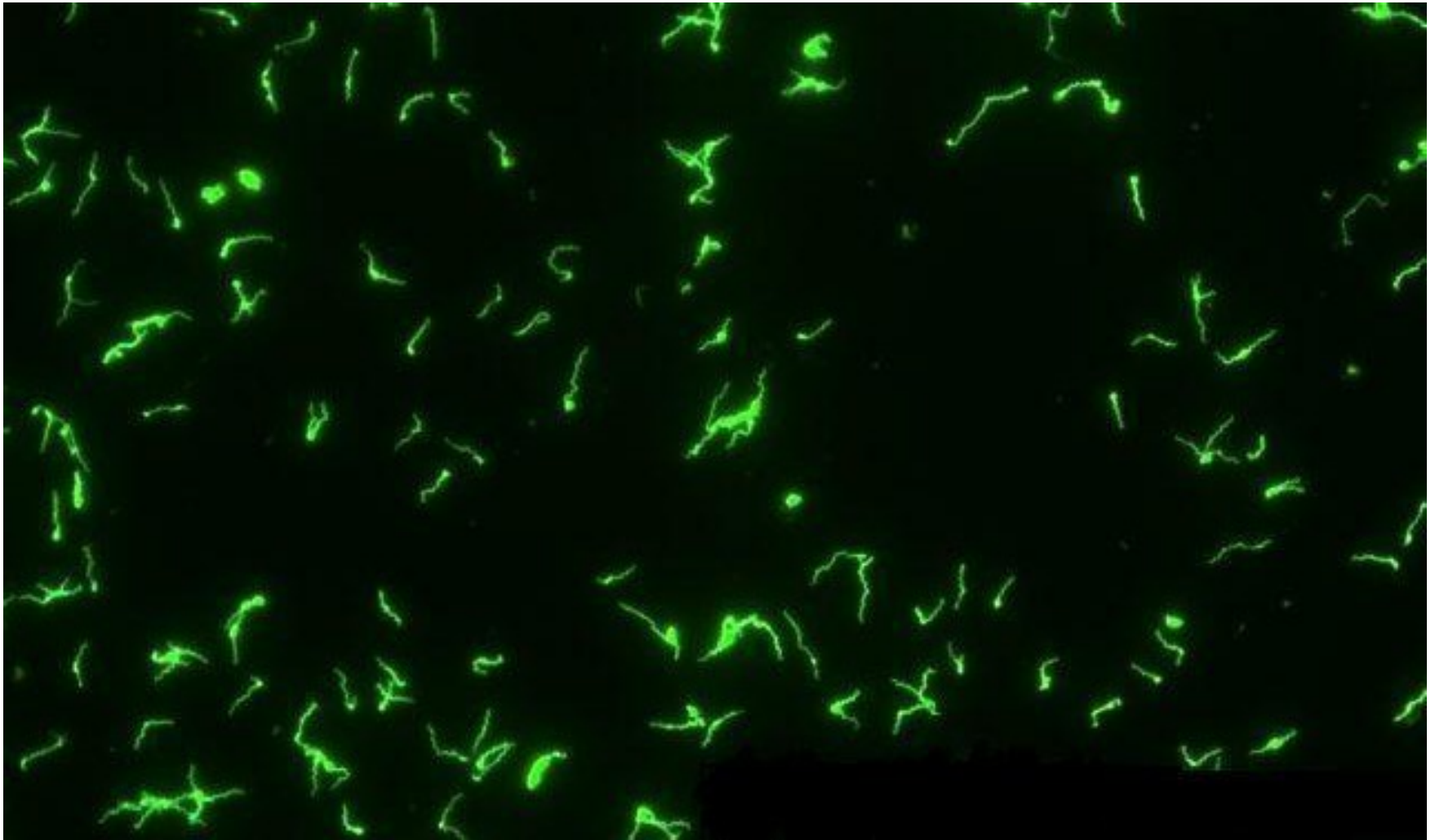


Imunofluorescence

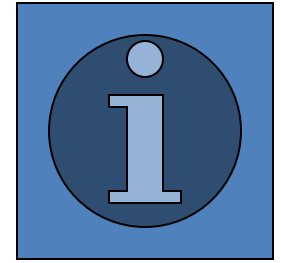
www.amsbio.com



Pozitivní výsledek u přímé i nepřímé
imunofluorescence vypadá stejně



Příklady imunofluorescence (diagnostika *Treponema pallidum*)



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

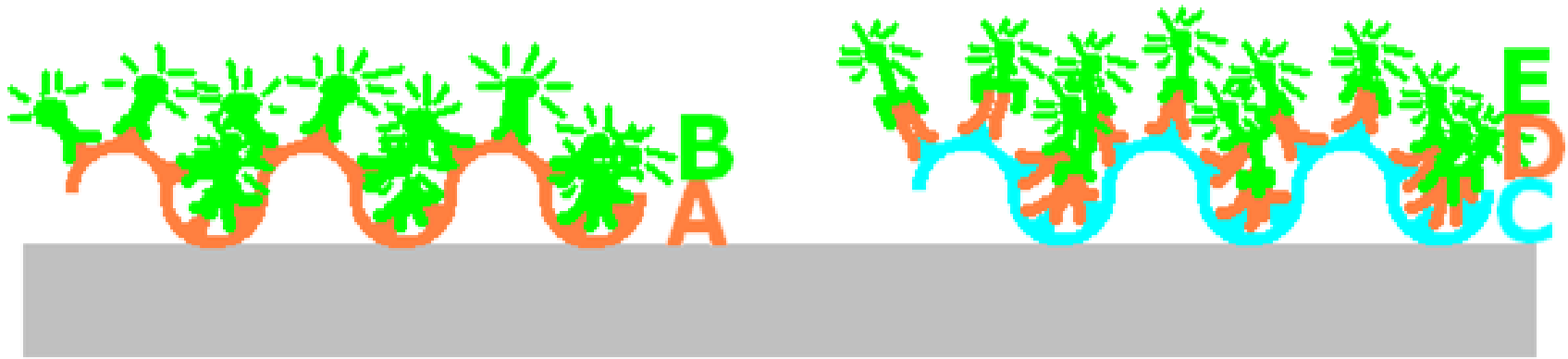
Přímá imunofluorescence

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

Nepřímá imunofluorescence

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

Reakční schémata u imunofluorescence



A: *Treponema pallidum* – od pacienta

B: Značená protilátka proti *Treponema pallidum* (laboratorní)

C: *Treponema pallidum* – z laboratoře

D: Protilátka proti *Treponema pallidum* – od pacienta

E: Značená labor. protilátka proti lidské protilátce (konjugát)

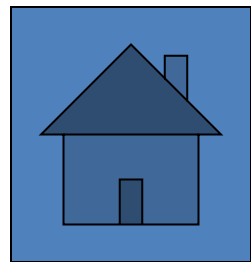
Radioimunoesej (RIA)



www.chbr.noaa.gov



darc.tbzmed.ac.ir



ELISA: princip

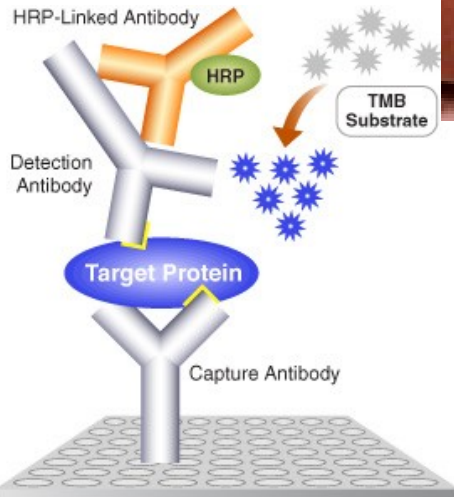
ELISA



ELISA



www.cellsignal.com



Sandwich Elisa

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 radiální nebezpečí** je výhodou oproti radioimunoassayím
- Možnost **automatizace** a menší požadavky na odečítacího jsou velkou výhodou oproti imunofluorescenci

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 značená protilátka namířená proti lidské protilátce

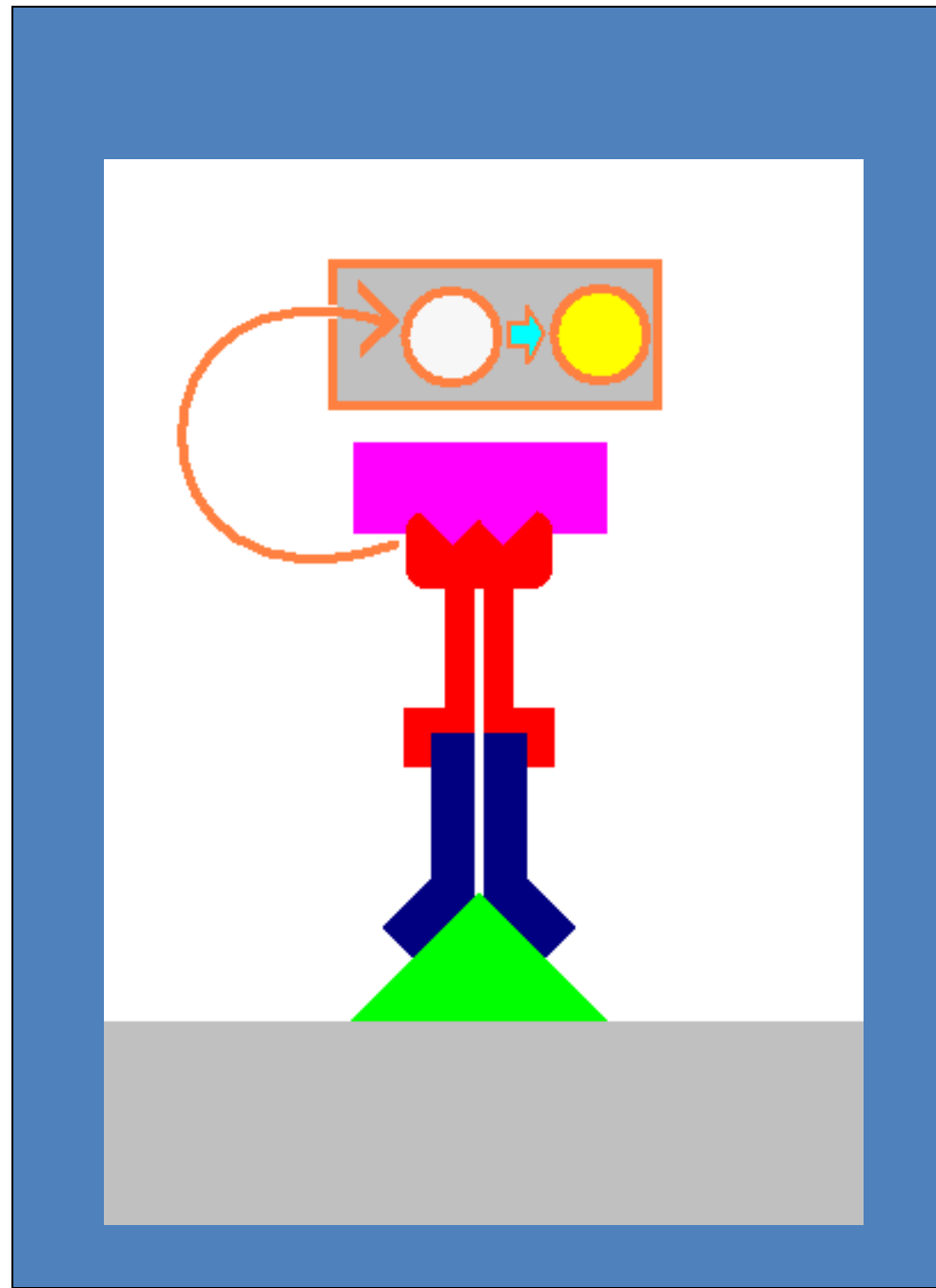
Význam konjugátu

- **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:

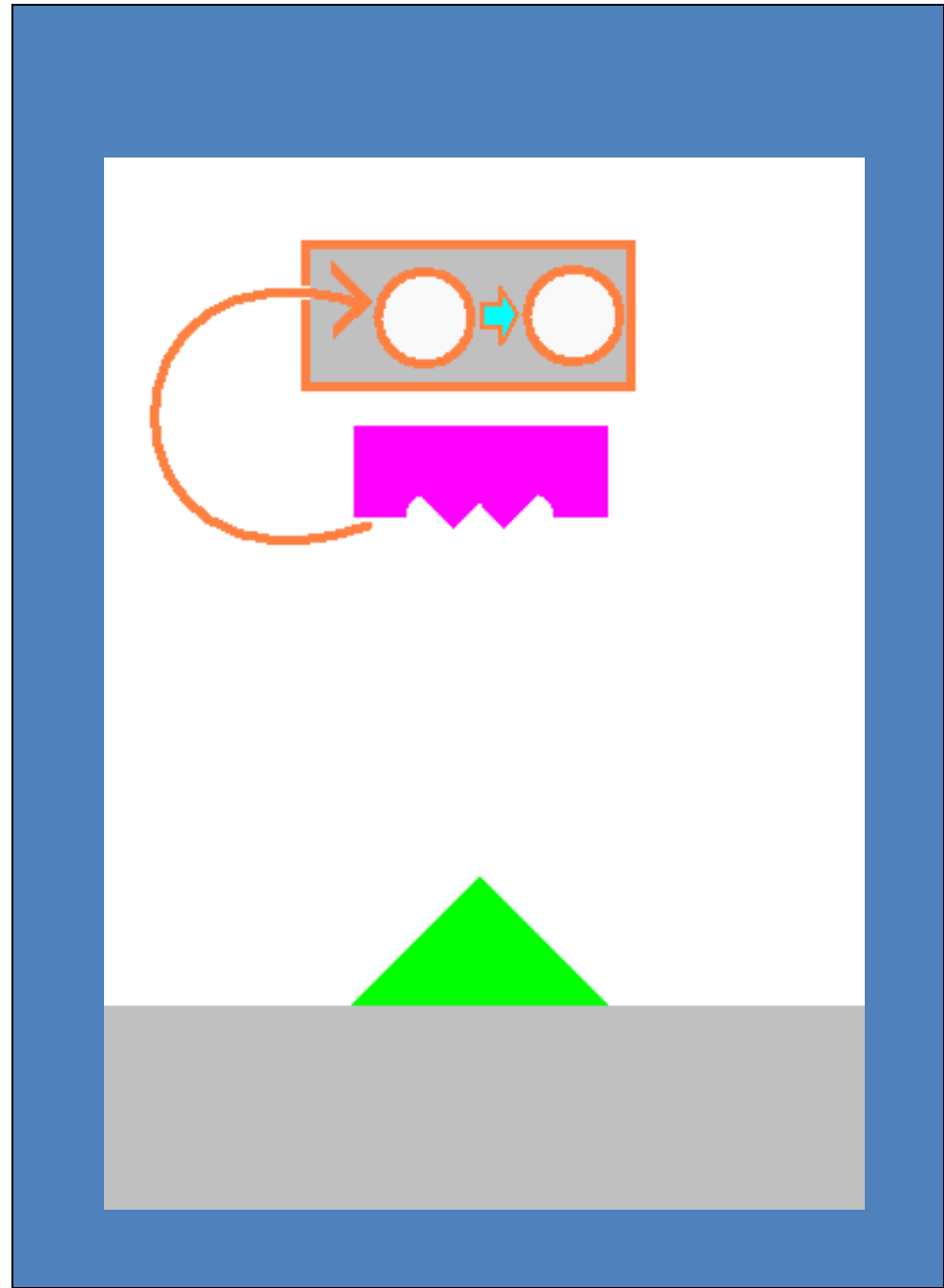
1. Pozitivní (hledá se IgM, IgM přítomna)

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.

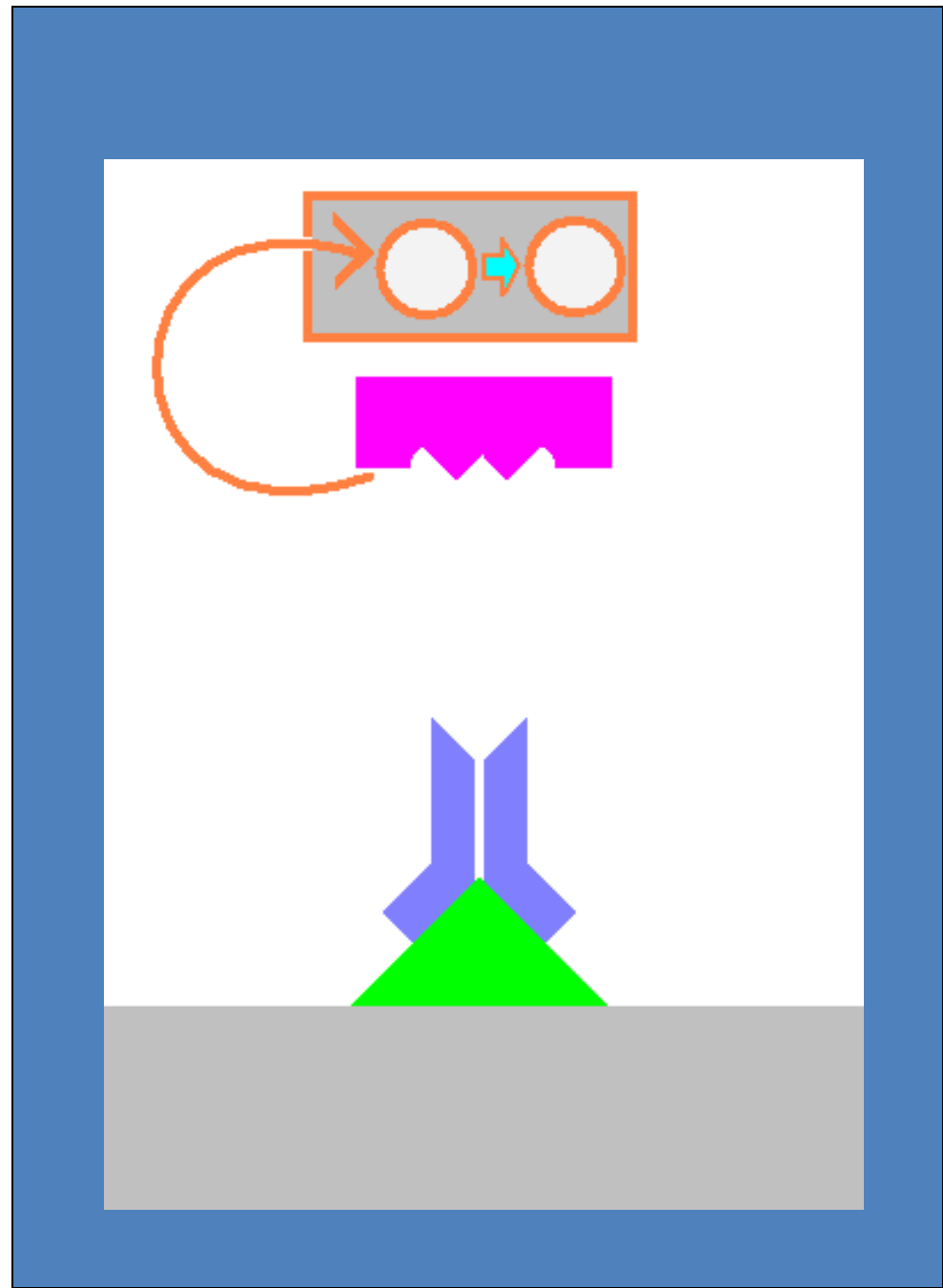
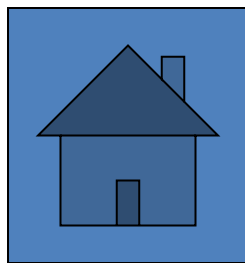


ELISA k detekci protilátky:

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

V séru pacienta jsou
jen IgG protilátky.

Konjugát je odplaven,
ke změně barvy důlku
nedojde



ELISA: praktické odečítání

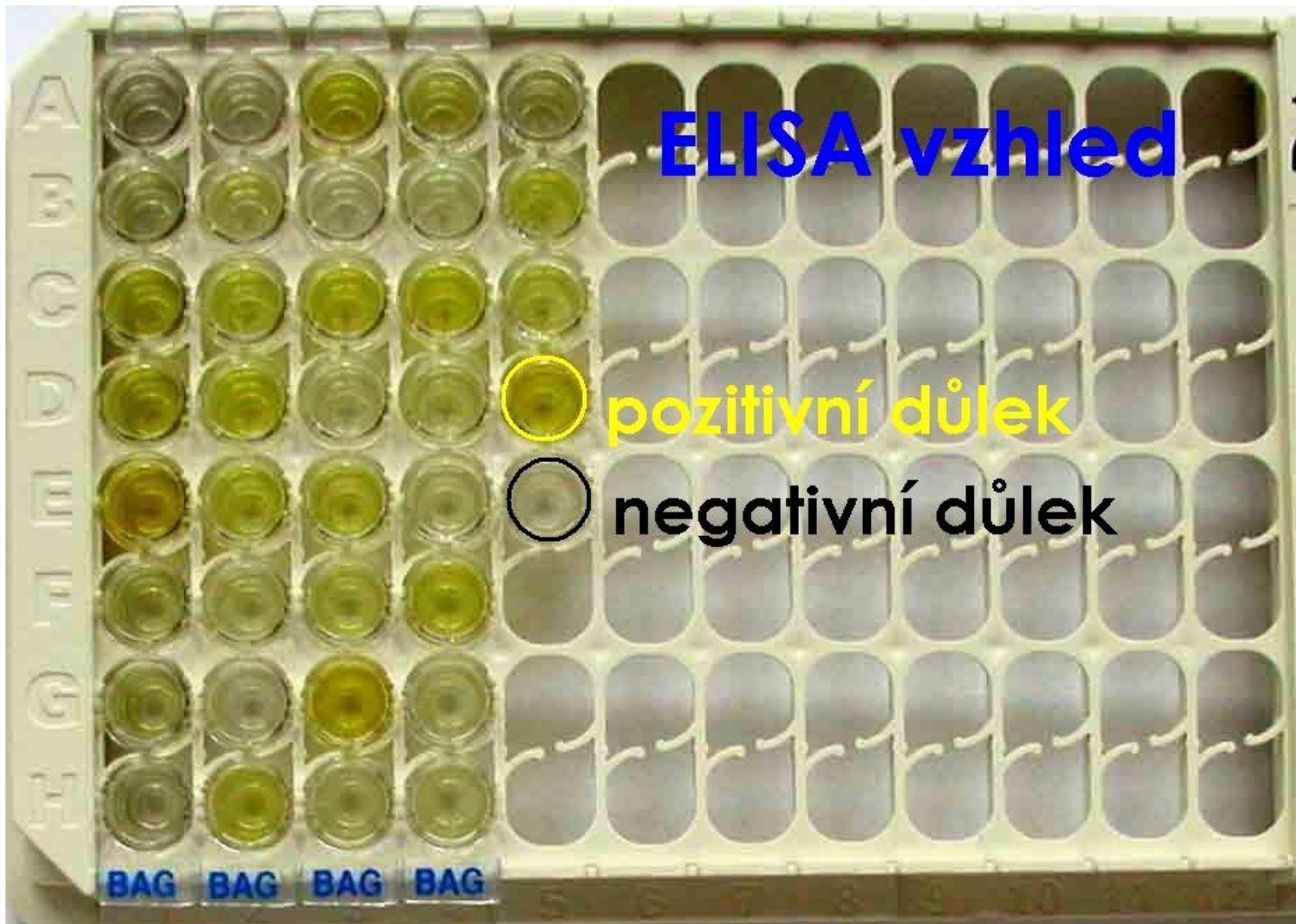
ELISA – praktické provedení

- 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:
 - **Bl** – blank (pro kalibraci spektrofotometru)
 - **K- a K+** – pozitivní a negativní kontrola
 - **Cut off** (c. o., dva či tři důlky) – „odsekávají“ pozitivní výsledky buď ostře, nebo s rozmezím plus mínus 10 %

Výrobce dodává „vzorky“ s negativní (K–), pozitivní (K+) a právě hraniční (c. o.) hodnotou absorbance

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 (foto MiÚ LF MU a FN USA)



Příklad reakce ELISA k průkazu antigenu (antigen *Helicobacter pylori*)



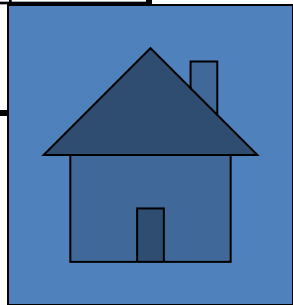
- U reakce ELISA je na konci celého procesu **enzymatická reakce**. Její intenzita se projeví intenzitou zbarvení v důlku, kde reakce probíhá
- Intenzitu zbarvení lze měřit **spektrofotometricky**
- Za **pozitivní** se považují hodnoty vyšší než referenčně daný tzv. „cut off“
- *Obvyklý princip: Povrch-protilátka-**antigen**-protilátka-enzym-substrát*

Příklad reakce ELISA k průkazu protilátek

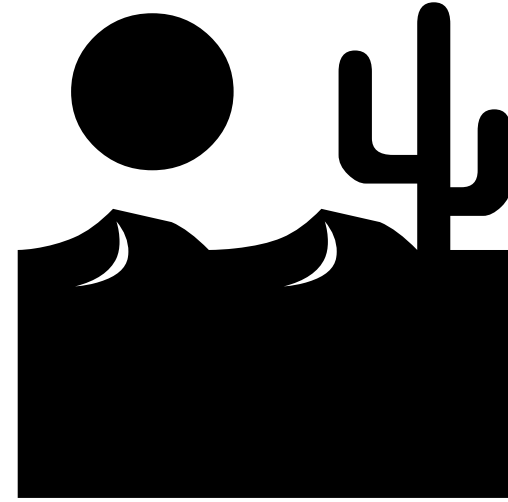
- U nepřímého průkazu reakcí ELISA se zpravidla hodnotí zvláště protilátky IgM a IgG
- V daném případě se místo IgA používá IgM
- Za **pozitivní** se opět považují hodnoty vyšší než referenčně daný tzv. „cut off“
- Často existuje pole hraničních hodnot, např. výsledky mezi 90 % a 110 % cut off se hodnotí jako „**hraniční**“, pod 90 % jako „**negativní**“, nad 110 % jako „**pozitivní**“
- *Princip zpravidla: Povrch-antigen-**protilátka**-konjugát-enzym-substrát*

Příklad uspořádání reakce ELISA při průkazu protilátek

BL	4	BL	4										
K-	5	K-	5										
K-	6	K-	6										
K+	7	K+	7										
K+	8	K+	8										
1	9	1	9										
2	10	2	10										
3	11	3	11										
IgA		IgG											



Western blotting



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
- **V rámci serologických reakcí je výjimečný tím, že se nepoužívá k průkazu antigenu (jen protilátky)**

Western blotting – princip

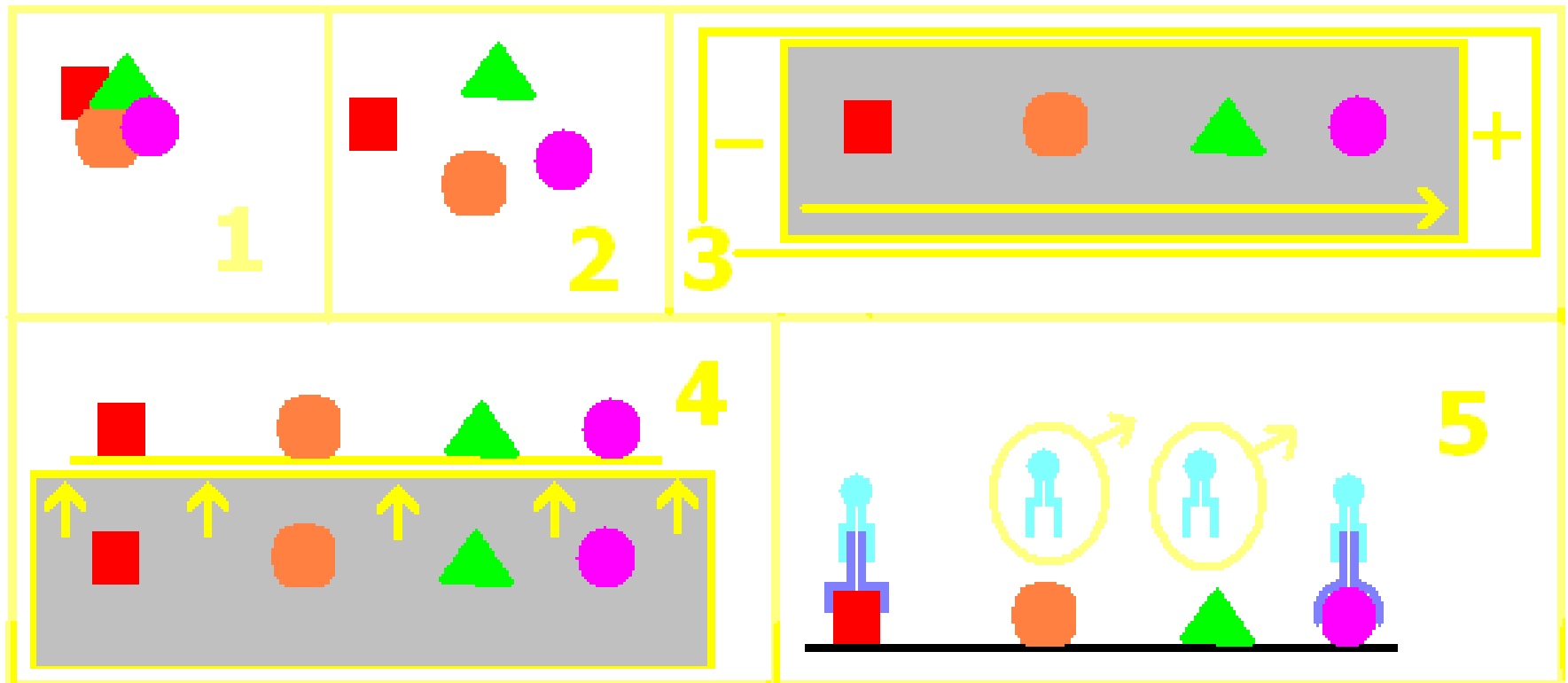
1: původní antigen (směs)

2: uvolnění jednotlivých antigenů detergentem

3: elektroforetické rozdělení antigenů

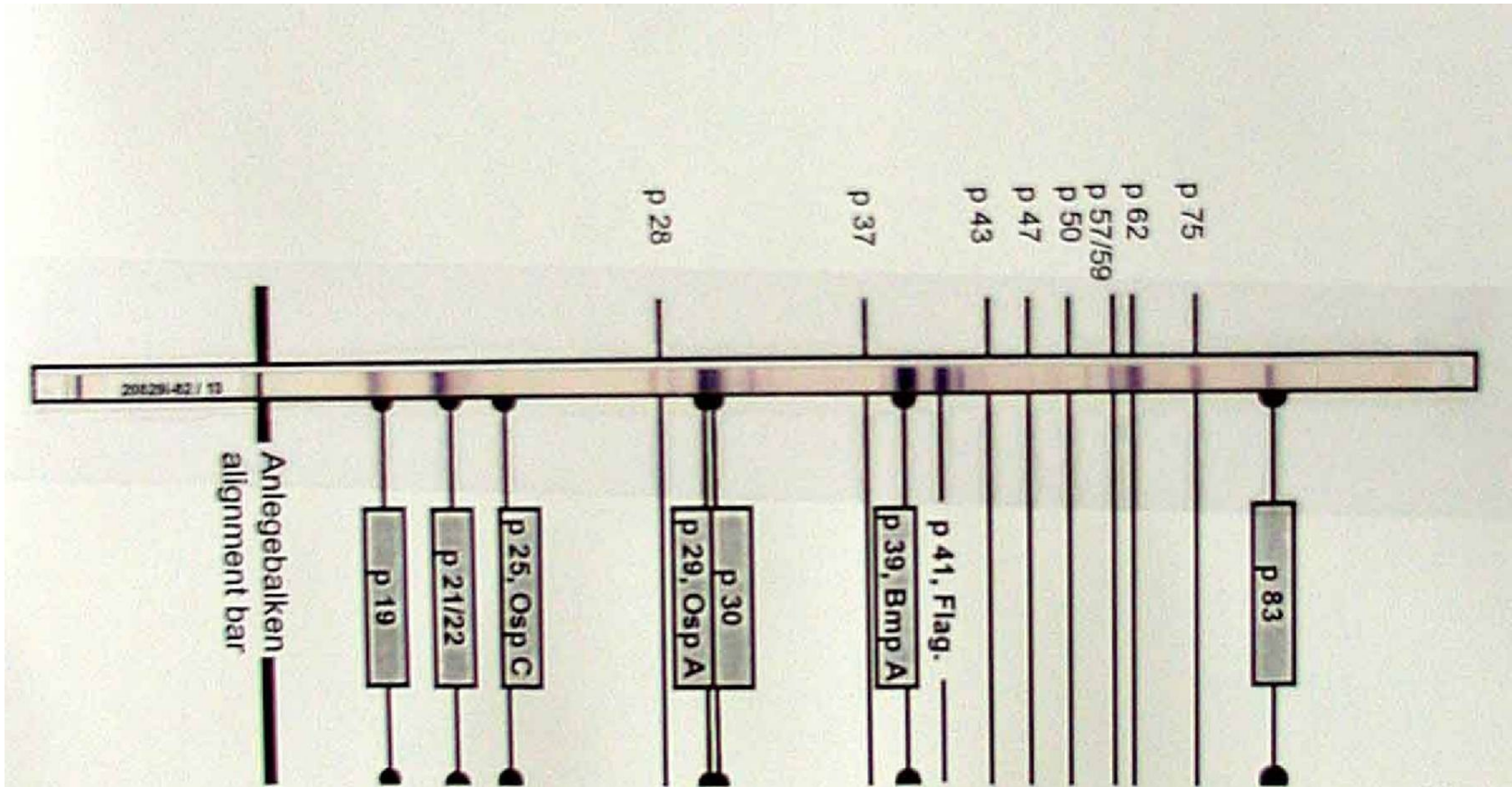
4: „přesátí“ rozdělených antigenů na nitrocelulózu

5: reakce ELISA (přítomny jsou jen některé protilátky)

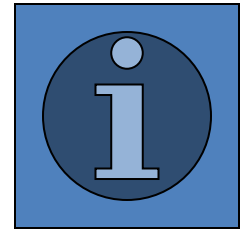


Western blot – vzhled

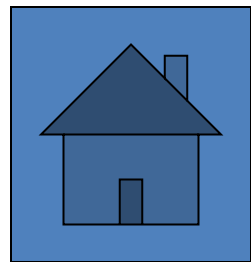
(obrázek z foto MiÚ LF MU a FN USA)



Příklad odečtení Western blotu (u lymeské boreliózy)



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



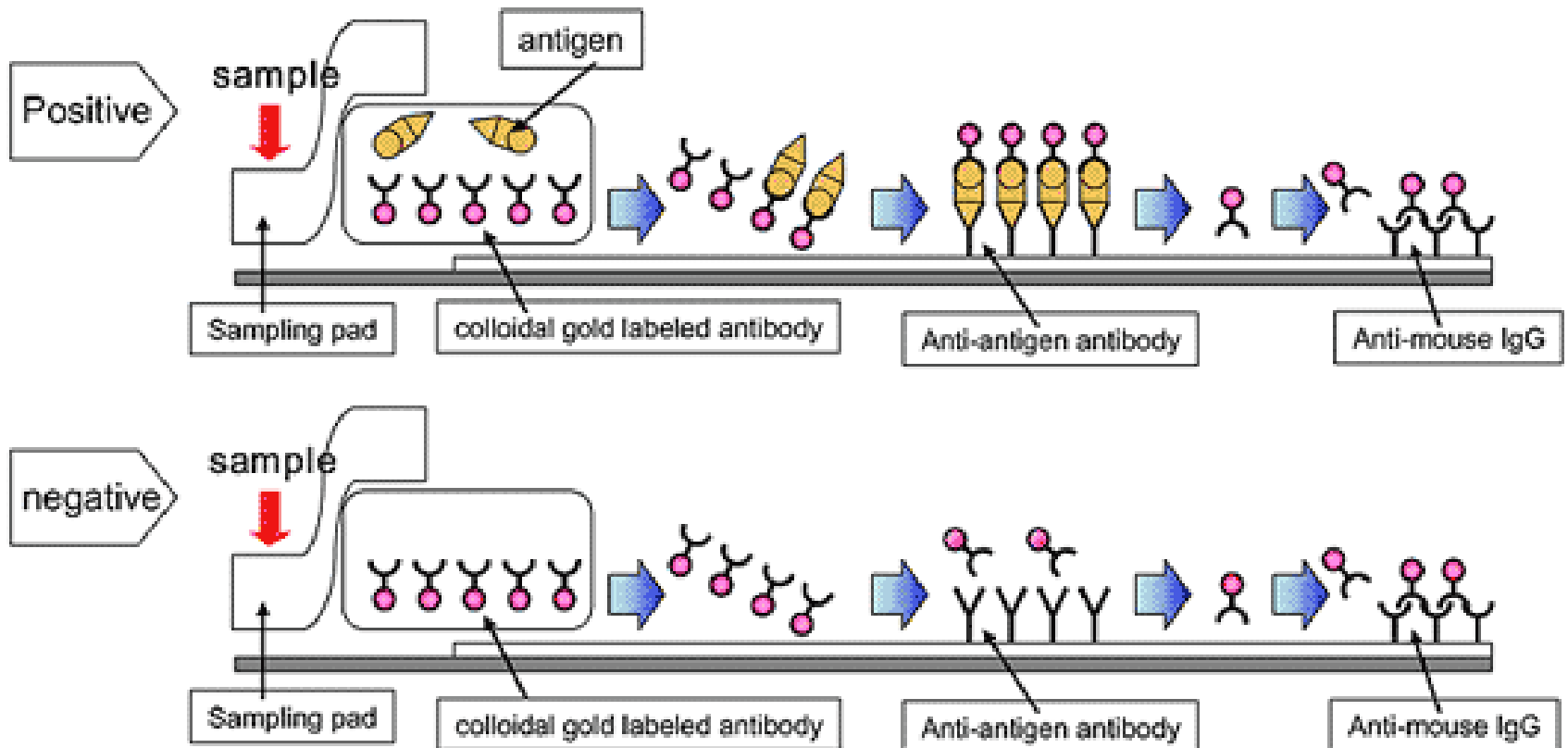
Imuno-
chromatografické
testy

Imunochromatografické testy

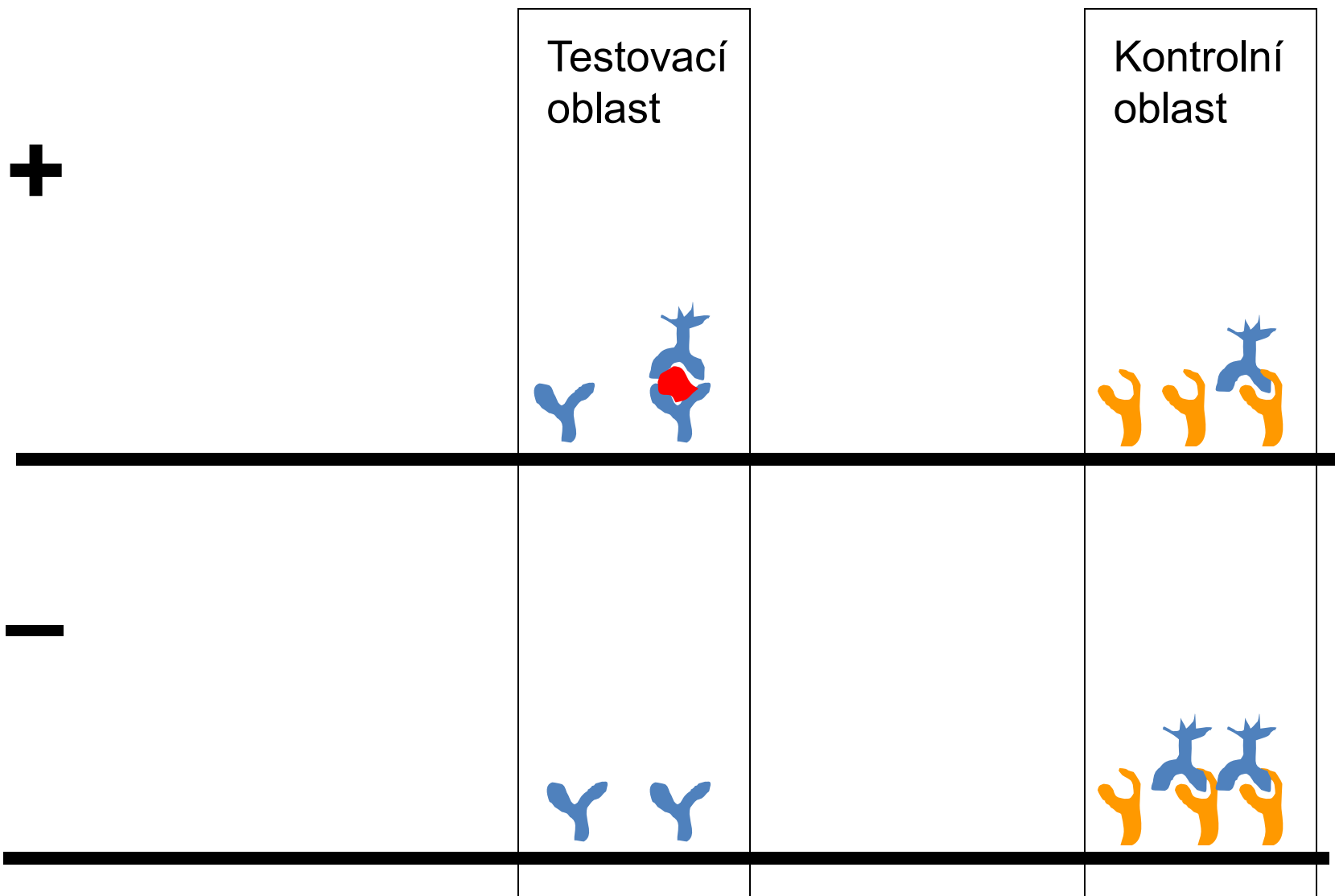
- Imunochromatografické testy jsou založeny na **navazování jednotlivých komponent** podobně jako předchozí
- Důležitým rozdílem je, že zde **není promytí**. Některé komponenty jsou navázány na povrch na určitých místech (testovací a kontrolní místo), další se hned naváží na testovanou složku a spolu 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)



Vysvětlení k předchozí animaci

- **V pozitivním případě** jsou některé značené protilátky navázány na antigen, a uchytí se v testovací oblasti. Některé další molekuly dojdou až do kontrolní oblasti
- **V negativním případě** všechny značené protilátky přicházejí do kontrolní oblasti



protilátka
fixovaná k
povrchu



značená
protilátka



značená protilátka
+ antigen



protilátka proti
značené
protilátce

Výhody imunochromatografických testů

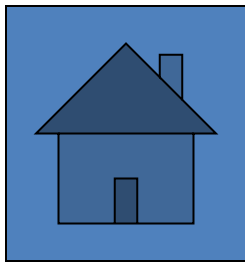
- Jsou velmi **rychlé** (desítky minut)
- Jsou velmi **jednoduché** → některé se nedělají v laboratoři, ale přímo u pacienta
- Jsou dostatečně **přesné**
- Mohou být použity pro **mnoho účelů** (včetně mimomikrobiologických, například těhotenský test)

Nevýhoda: jsou poměrně drahé ve srovnání s tradičními testy

Typický mikrobiologický příklad

- *Clostridium difficile* je **důležitý střevní patogen**. Je to anaerob, žijící i za normálních podmínek ve střevě.
- Za určitých okolností (zpravidla širokospektrných antibiotik, zejména linkosamidů) **C. d. se přemnoží a jeho toxiny jsou nadprodukovány**
- **Testy produkce obou toxinů (A/B)** ukazují pozitivitu obou modrých proužků (testovacího i kontrolního). Pozitivita pouze kontrolního proužku ukazuje, že test je v pořádku, je však negativní.

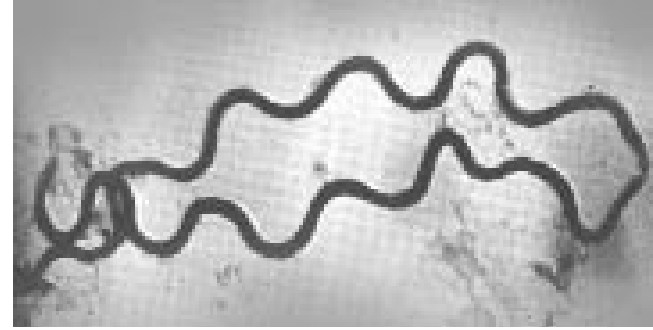
Konec



*(Obraz s názvem
Protilátka)*

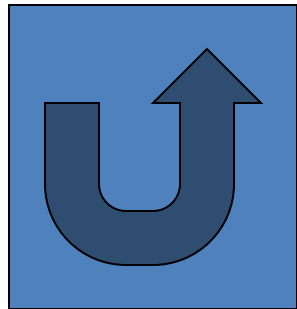


Treponema pallidum

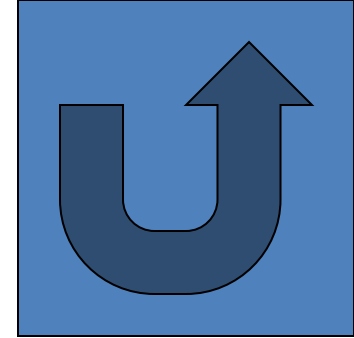


www.primer.ru

- **Spirocheta**, původce syfilis
- Syfilis je **klasická pohlavní nemoc**. Přenáší se výhradně sexuálně. Jde ovšem o systémové onemocnění – **v pokročilých stádiích postihuje celé tělo postiženého člověka (gummata, disekce aorty, neurolyues, psychické příznaky)**
- **Některé poddruhy *T. pallidum*** a některá jiná treponemata způsobují **jiné choroby** (framboesie – yaws, *T. pertenue*)
- Některá treponemata jsou i nepatogenní

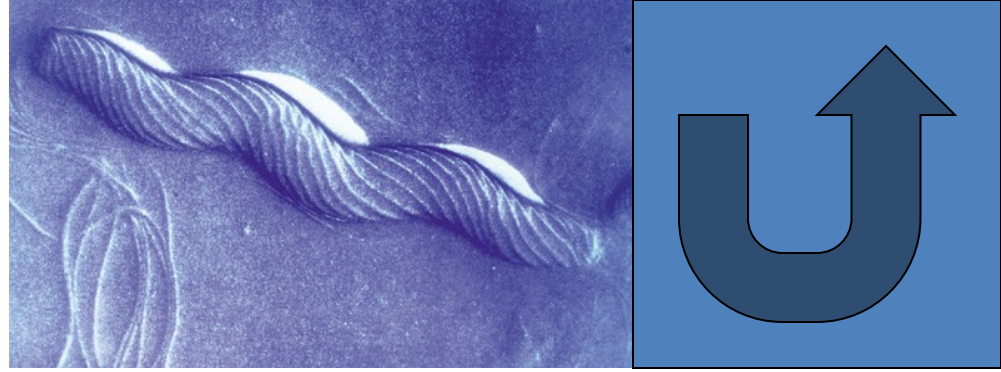


Borrelia burdorferi sensu lato



- **Jiná spirocheta**, způsobující **Lymeskou nemoc** (podle města Old Lyme v USA) a dále klasifikovaná na ***Borrelia burgdorferi sensu stricto*** (= „v užším slova smyslu“), ***Borrelia garinii***, ***Borrelia afzelii*** a další
- Nemoc je charakterizována tzv. erythema migrans, pak obvykle následují další příznaky
- Zatímco **v USA** se vyskytuje zejména *B. b. sensu stricto* a typické jsou **kloubní příznaky**, **v Evropě** jsou častější *B. garinii* a *B. afzelii* a typická je **neuroborrelióza**
- Kromě lymeské nemoci vyvolávají borrelie (jiné druhy) **návratnou horečku** (*B. duttoni*, *B. recurrentis*)

Helicobacter pylori



- **Peptické (tedy gastrické či duodenální) vředy** jsou onemocněním, které vzniká souhrou více příčin. Takovým onemocněním říkáme obvykle **multifaktoriální**.
- Dodnes se nejen mezi praktickými lékaři, ale i mezi specialisty liší názory na podíl spirálovité tyčinky (ne spirochety!) ***Helicobacter pylori*** na vředové onemocnění. Jisto je, že jsou i zdraví lidé s helikobakterem, stejně tak je ale jisto, že helikobakter svůj, nikoli nevýznamný, podíl na onemocnění má.

Kontrolní otázky

1. Jakou diagnostickou hodnotu přisuzujete nálezu antigenu metodou ELISA a nálezu protilátek stejnou metodou? Uvažujte obecně.
2. Jaký klinický materiál je vhodný pro průkaz antigenu a jaký pro průkaz protilátek?
3. V čem se liší a v čem jsou společné reakce ELISA a western blot?
4. Proč se u průkazu protilátek metodou ELISA zpravidla nepoužívá ředění séra geometrickou řadou ?
5. Jaký význam má (opět uvažujte obecně) průkaz protilátek tříd IgG, IgM a IgA?
6. Které protilátky procházejí placentou a které ne?
7. Proč není možno jednotlivé třídy protilátek prokazovat „klasickými“ sérologickými metodami (aglutinace, KFR, neutralizace)?
8. Existují i další mikrobiologické možnosti použití imunochromatografických testů kromě průkazu toxinu *Clostridium difficile*?
9. Co je to cut off?
10. Jak se nazývá přístroj, který se (kromě řady jiných využití) používá i k vyhodnocování výsledků reakcí ELISA?

Hlavní obsah

