

P07a

Úvod do serologie, precipitace a aglutinace

Dynamika titru, komplementfixační reakce a neutralizace

Reakce se značenými složkami

Osnova

- přímé a nepřímé metody
- antigen a protilátka
- titr, dynamika titru protilátek
- precipitace, aglutinace, aglutinace na nosičích
- komplement, komplement fixační reakce
- neutralizační reakce
- třídy protilátek, avidita
- princip metod se značenými složkami
- imunofluorescence, ELISA, Western blot
- imunochromatografické metody

Přímé vs. nepřímé metody

přímé

- **hledáme mikroba, jeho část či jeho produkt**
(produktem může být například nějaký bakteriální **antigen** či jed – toxin)
- **agens je přítomno nyní**

nepřímé

- **hledáme protilátky**
- protilátka není součástí ani produktem mikroba
(**produkt makroorganismu**, odezvou na činnost mikroba)
- **agens bylo přítomno** někdy v minulosti

Přímé metody – přehled

Metoda	Průkaz ve vzorku	Identifikace kmene
Mikroskopie	ano	ano
Kultivace	ano	ano
Biochemická identifikace	ne	ano
Průkaz antigenu, toxinu	ano	ano
Pokus na zvířeti	ano	v praxi ne
Molekulární metody	ano	v praxi ne*

*netýká se molekulární epidemiologie (sledování příbuznosti kmenů)

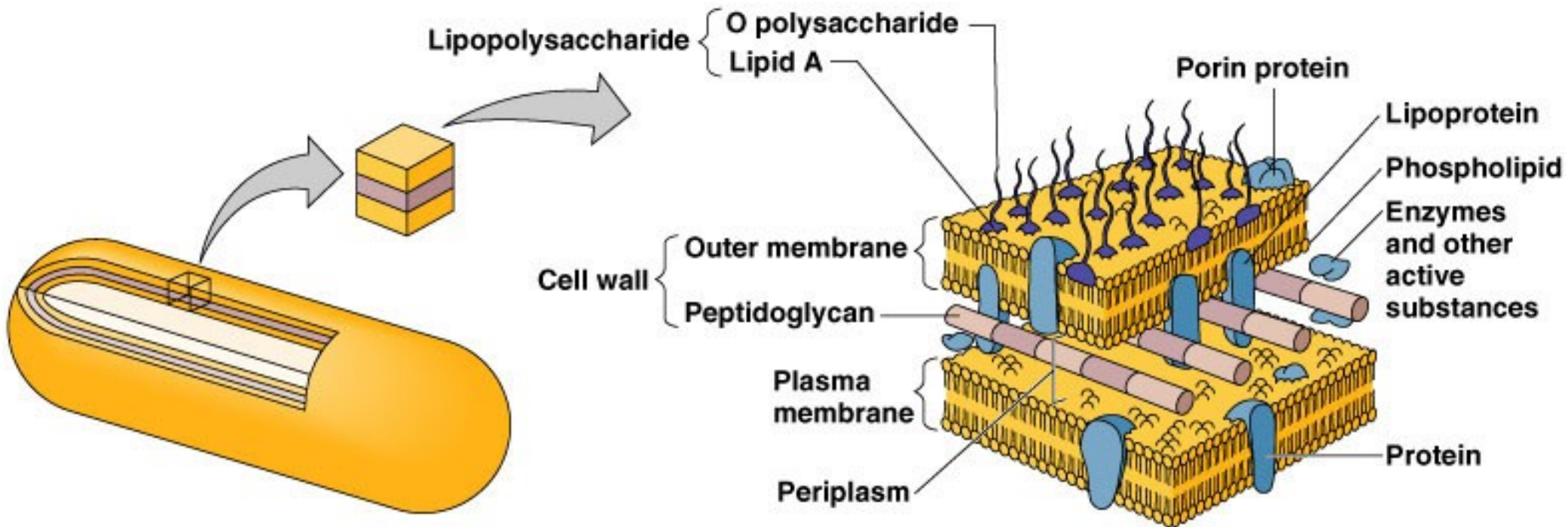
Nepřímé metody – přehled

- **precipitace**
- **aglutinace**
- **aglutinace na nosičích**
- **komplementfixační reakce (KFR)**
- **neutralizační reakce**
- **metody se značenými složkami:**
 - **imunofluorescence**
 - **ELISA**
 - **Western blot**

Antigeny

- **látka navozující produkci protilátek**
- **vázán** do vazebného místa **protilátky**
- **proteiny a (poly)sacharidy jsou imunogenní**
- lipidy a nukleové kyseliny jsou imunogenní pouze v kombinaci s proteiny nebo sacharidy
- příklady: **virové částice a jejich části, buněčné stěny a jejich části (lipoteichoové kyseliny, lipopolysacharidy), bičíky, fimbrie, toxiny bakterií**

Buněčná stěna bakterií: Gram negativní (G-)



(c) Gram-negative cell wall

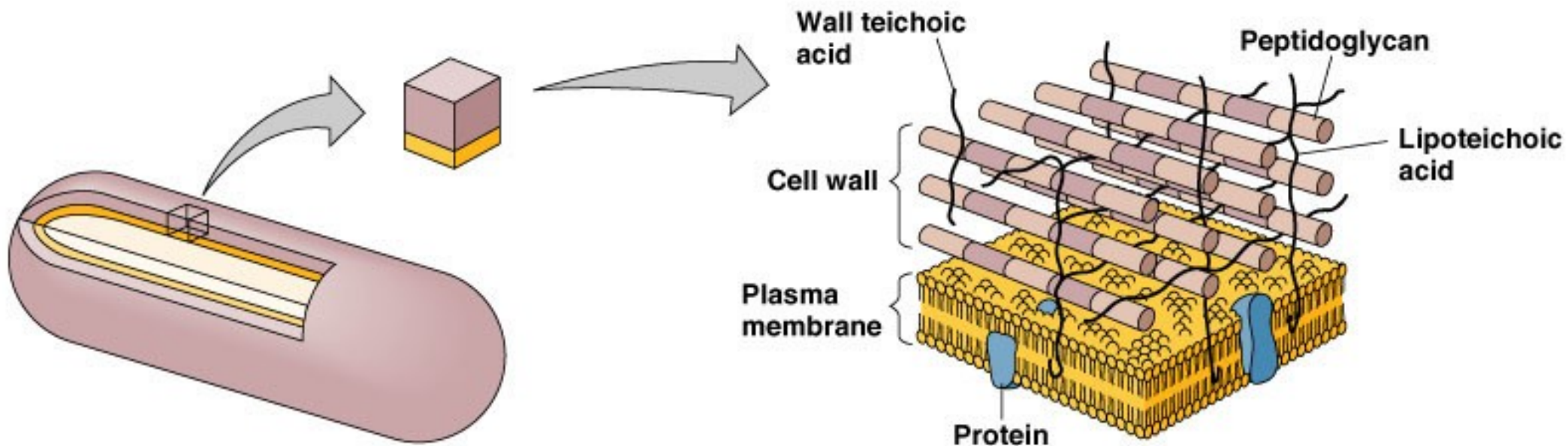
Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

classes.midlandstech.edu

Lipopolysacharidy

- **součást buněčné stěny G- bakterií**
- **imunogenní** vlastnosti (stimuluje specifickou imunitu)
- **Lipid A (endotoxin)**+ základní (core) polysacharid + **specifický polysacharid (O antigen)**
- **uvolňuje se z bakteriálních buněk po lýze** (např. imunitním systémem)
- v případě těžkých infekcí **může vést k septickému šoku**

Buněčná stěna bakterií: Gram pozitivní (G+)



(b) Gram-positive cell wall

Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

classes.midlandstech.edu

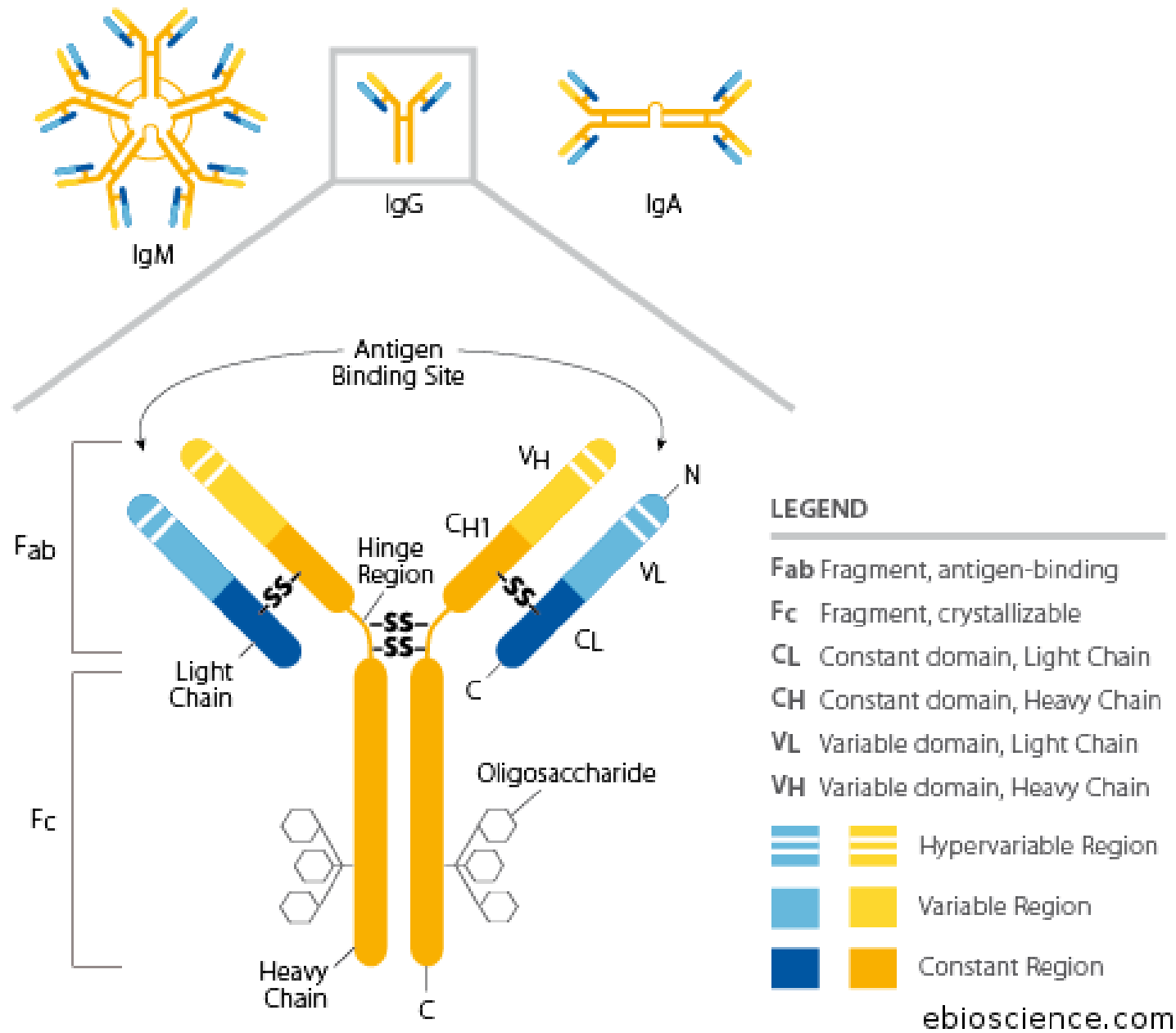
Lipoteichoové kyseliny

- **součást buněčné stěny G+ bakterií**
- **imunogenní** vlastnosti (stimuluje specifickou imunitu)
- **uvolňuje se z bakteriálních buněk po lýze** (např. lysozymem nebo β -laktamovými ATB)
- v případě těžkých infekcí **může vést k septickému šoku** (menší počet případů než LPS)

Protilátky

- **glykoproteiny tvořené jako odpověď na antigenní výzvu**
- z rodiny **imunoglobulinů**
- součást **humorální (látkové) imunity**
- **produkovány B-lymfocyty**
- proteiny a sacharidy jsou imunogenní → **samy protilátky jsou imunogenní struktury** → možné vytvořit **protilátky proti protilátkám**

Protilátky (2)



Třídy (izotypy) protilátek

- **IgG:**
 - **monomery** (2 vazebná místa), **proniká do tkání**
 - **opsonizace, aktivace komplementu** klasickou cestou, **imunologická paměť** (opakované setkání s antigenem), **neutralizace toxinů**
 - **tvoří se o něco později než IgM**
 - **jediné procházejí placentou** (novorozenci mají stejnou hladinu IgG protilátek jako dospělý)

Třídy (izotypy) protilátek (2)

- **IgM:**
 - **pentamer** → **neproniká to tkání**
 - **teoreticky 10 vazebných míst** (prakticky je jich 5 prostorově blokováno)
 - **aktivuje komplement, snadno aglutinuje**
 - **vytvářeny jako první** (jejich produkce nevyžaduje izotypový přesmyk)
 - pokud dojde k **infekci fétu**, jsou **IgM přítomny již při narození** (IgM musely být vytvořeny fětem nikoli matkou)

Třídy (izotypy) protilátek (3)

- **IgA:**
 - **slizniční protilátky** (tvořeny jen B-lymfocyty ve sliznicích)
 - poločas rozpadu asi 1 týden → **vyskytují se u čerstvých infekcí**
 - dimery
 - **blokáda adhezních molekul** (reagují s adhezními molekulami bakterií), **opsonizace**, nemá schopnost aktivovat komplement

Třídy (izotypy) protilátek (4)

- **IgE:**

- uvolňuje mediátory zánětu (histamin, serotonin, prostaglandiny, leukotrieny),
- zodpovědné za **reakce časně přecitlivělosti a alergické reakce**
- **úloha v antiparazitární obraně (červi)**
- **nestanovuje se jejich hladina**

- **IgD:**

- nízké koncentrace v séru, nízká afinita k Ag
- nachází se hlavně **na povrchu B-lymfocytů**, kde má funkci receptoru pro antigen → **v mikrobiologii se nevyužívá**

Afinita a avidita protilátek

- **afinita** = síla interakce **jednoho** vazebného místa s **jedním** antigenem
- **avidita** = (celková) síla, kterou **polyvalentní** protilátka interaguje s **polyvalentním** antigenem
- avidita vzrůstá s afinitou jednoho vazebného místa pro jeden antigen a s počtem simultánně se uplatňujících vazebných míst
- **časné IgG protilátky jsou nízkoavidní, pozdní IgG protilátky jsou vysokoavidní**
- **pentamer IgM, protilátky s více** (prakticky až pěti) **vazebnými místy**, vázat antigeny s velmi **velkou aviditou**, ačkoliv **afinita** jednotlivých vazebných míst **bývá malá**

Serologické metody

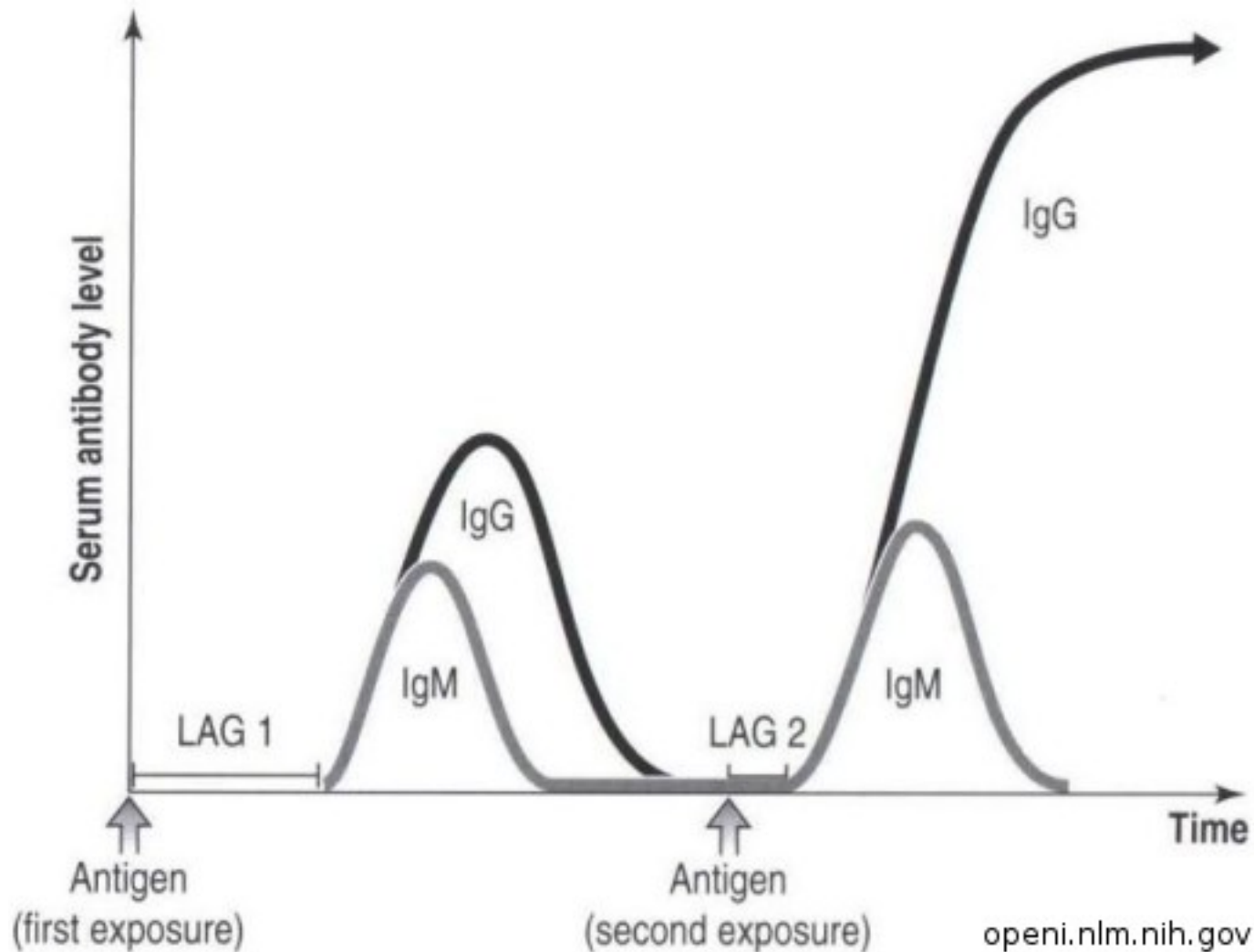
- všechny pracují s **vazbou antigenu a protilátky**, které spolu **tvoří komplex**
- liší se pouze způsob detekce komplexu Ag-Ab
- **průkaz antigenu** laboratorní protilátkou:
 - **přímý průkaz**
 - **detekce antigenu ve vzorku od pacienta, identifikace/antigenní analýza kmene mikroba**
 - laboratorní protilátka získána ze zvířete
- **průkaz protilátky** laboratorním antigenem:
 - **nepřímý průkaz**
 - použije se **pacientovo sérum** (v němž hledáme protilátky)

Interpretace

- **průkaz antigenu:**
 - **pozitivní výsledek** znamená **přítomnost mikroba** v těle pacienta
- **průkaz protilátek:**
 - pozitivní výsledek znamená, že **mikrob byl přítomen** v těle pacienta (nevíme kdy v minulosti)
 - **odhad času**, kdy se mikrob setkal s pacientem:
 - **relativní množství protilátek (titr)** a jeho změny v čase (**dynamika titru**)
 - **třída protilátek:** IgM/IgG
 - **avidita protilátek** (na počátku infekce jsou přítomny nízkoavidní Ab)

Interpretace nepřímého průkazu

- primární a sekundární imunitní odpověď



Interpretace nepřímého průkazu (2)

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



Interpretace nepřímého průkazu (3)

- **obtížné zjistit absolutní koncentraci protilátek proti konkrétnímu antigenu** (ne celkové množství imunoglobulinů) v jednotkách mol/l, mg/l apod.
- **zjišťuje se relativní množství** konkrétních protilátek **postupným ředěním** pacientova séra:
 - **pozitivní** reakce i po **vysokém zředění** → v séru je **velké množství protilátky**
 - **pozitivní** reakce **jen při nízkém zředění** → v séru je **malé množství protilátky**

Ředění séra geometrickou řadou

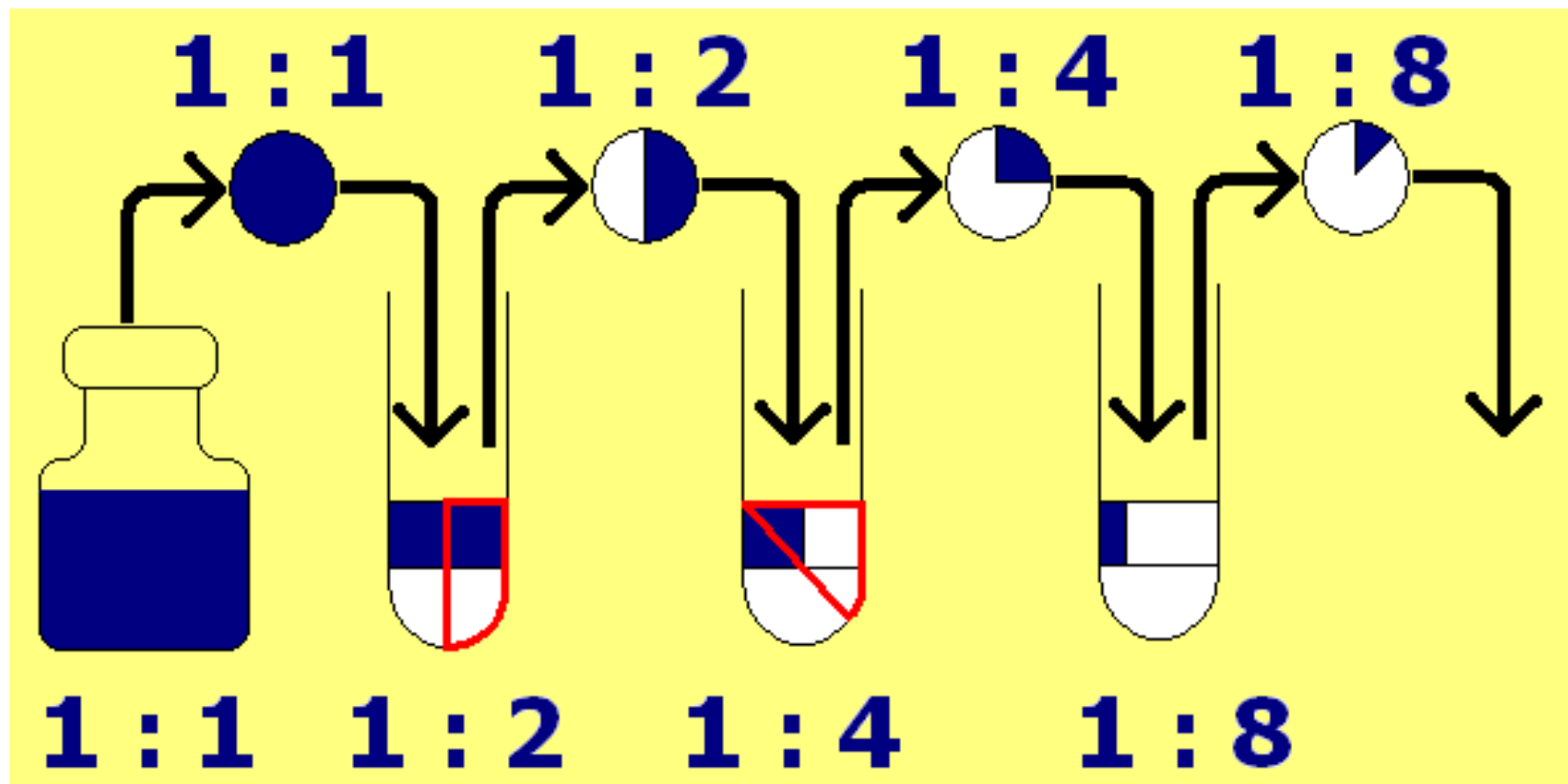
- **technicky nejjednodušší způsob**, jak ředit sérum pacienta
- nejčastěji použití **geometrické řady s koeficientem 2**
- vycházíme z neředěného séra, nebo ze séra o určitém předředění (např. 1:5, 1:10, 1:50 apod.)
- **v každém z dalších důlků je sérum dvojnásobně zředěno** oproti předchozímu: **neředěné** → zředěné **2x** → zředěné **4x** → zředěné **8x** → zředěné **16x** → zředěné **32x** → zředěné **64x** → zředěné **128x** → zředěné **256x** →→ →

Ředění v serologii

- **desetinásobné zředění:**
 - **v biochemii: 1 díl séra : 9 dílů** fyziol. roztoku
(**psáno** ředění **1:9**)
 - **v serologii: 1 díl séra : 9 dílů** fyziol. roztoku
(**psáno** ředění **1:10**)
- **provedení stejné, ale zápis je jiný (!)**
- jde jen o praktickou stránku zápisu (srovnejte:
1:9, 1:19, 1:39, 1:79, 1:159, ...
1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, ...)

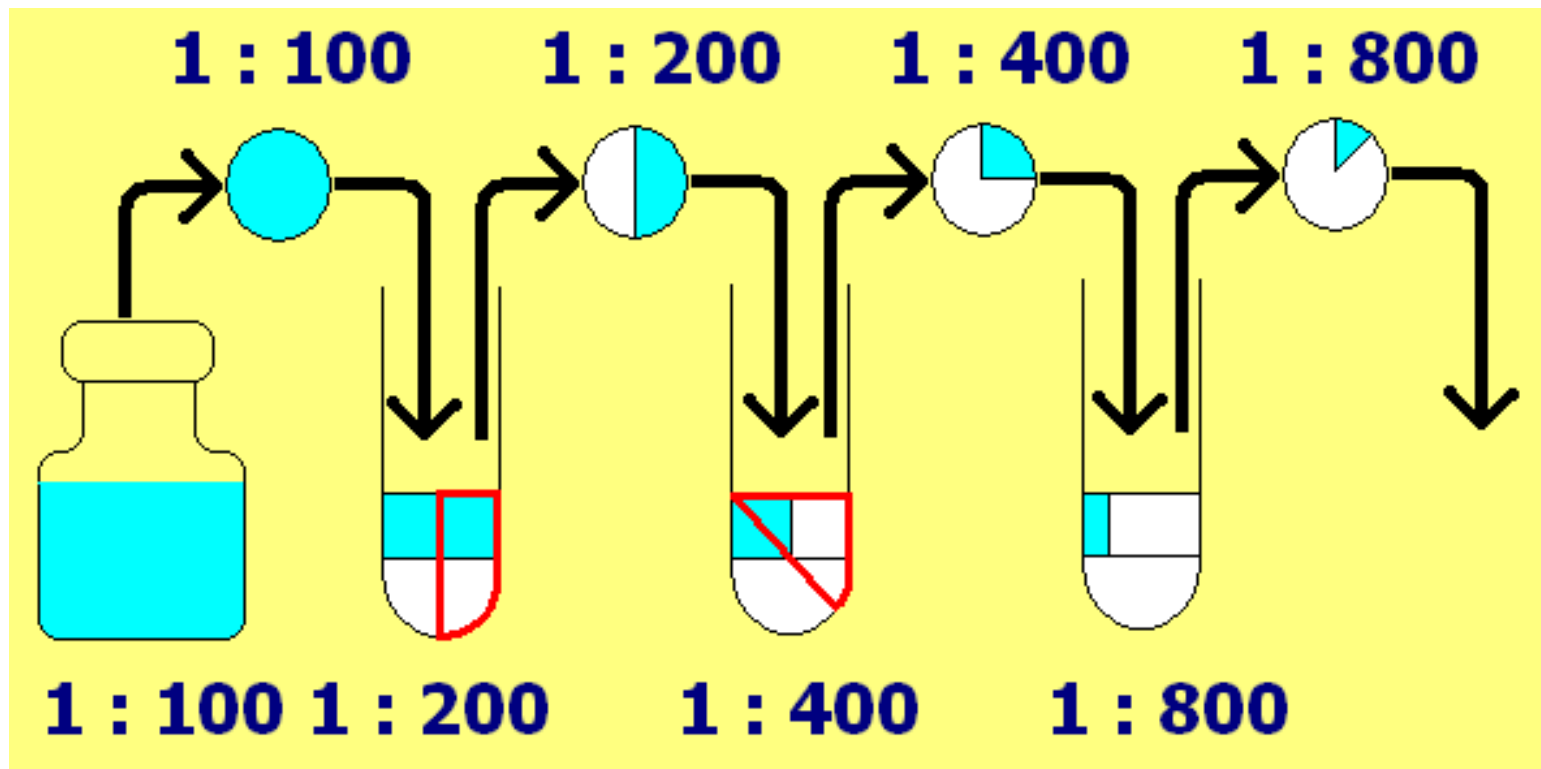
Geometrická řada

- **bez předředění** původního séra (na začátku máme původní sérum, ve zkumavkách máme připraveno stejné množství fyziologického roztoku, jaké odebereme z původního séra)



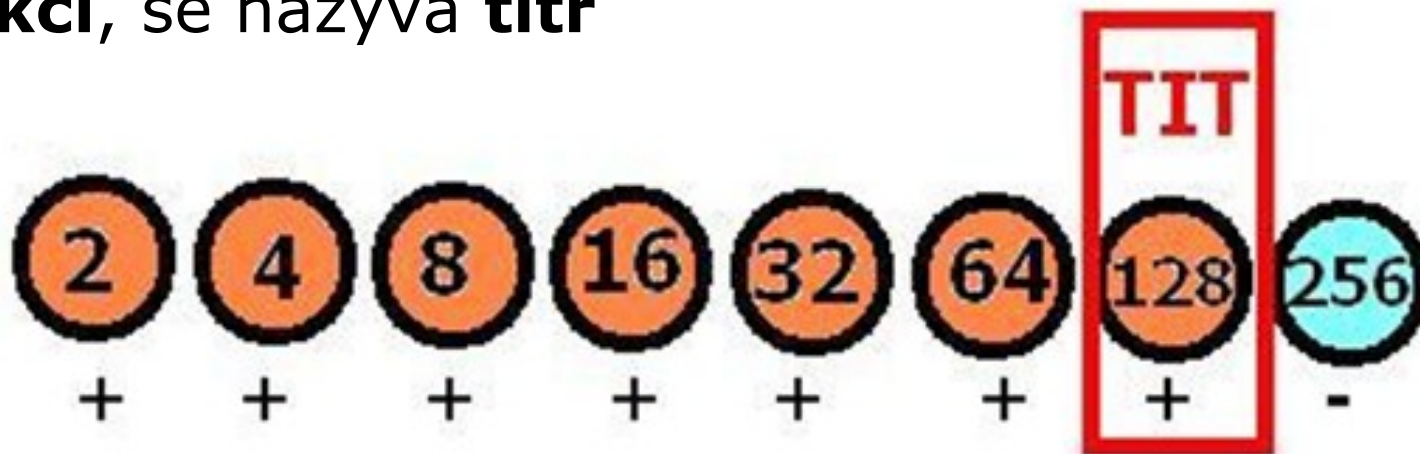
Geometrická řada (2)

- **s předředěním** původního séra, zde např. 1:100 (na začátku máme zředěné sérum, ve zkumavkách máme připraveno stejné množství fyziologického roztoku, jaké odebereme z původního zředěného séra)



Titř protilátek

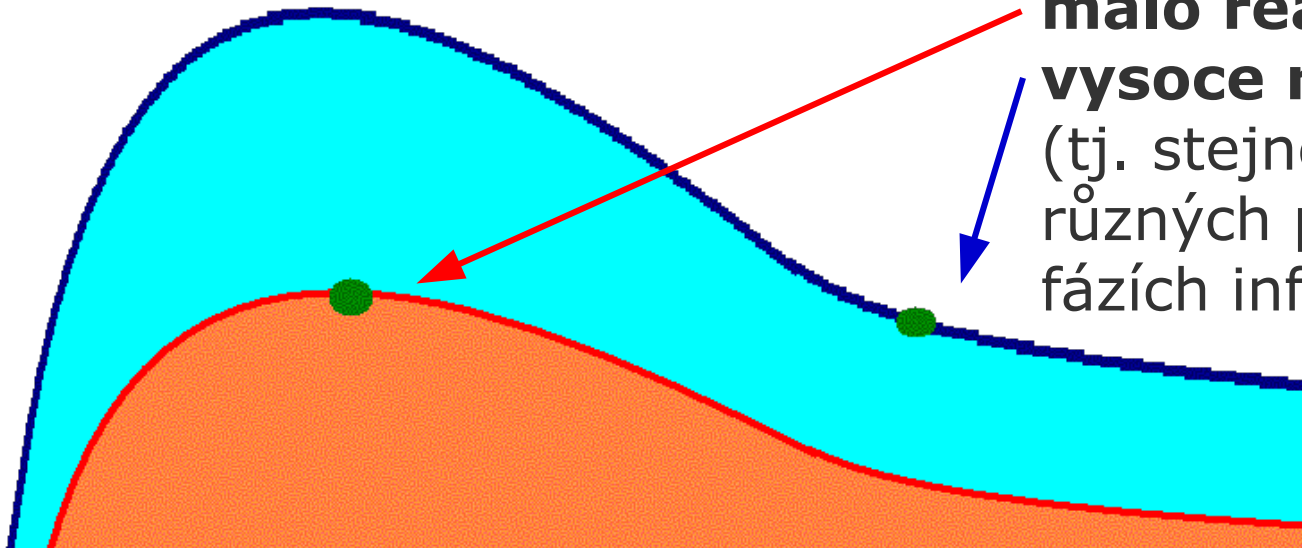
- **po naředění séra** pacienta podobně jako v úkolu 1 **přidáme antigen**
- v závislosti na konkrétním typu reakce buď přímo **vidíme výsledek reakce** (aglutinát, precipitát), **nebo** ho **musíme znázornit** přidáním dalších složek (např. komplementu, červených krvinek apod.)
- **nejvyšší ředění séra**, kde ještě **vidíme pozitivní reakci**, se nazývá **titř**



Titř protilátek

- **nejvyšší ředění séra, kde ještě vidíme pozitivní reakci, se nazývá titř**
- **neprokazujeme přítomnost původce choroby, ale pouze reakci části imunitního systému (!) → značná individuální variabilita imunitní odpovědi mezi jednotlivými pacienty**

individuální variabilita mezi **málo reaktivním** a **vysoce reaktivním** pacientem (tj. stejně vysoký titř dvou různých pacientů v různých fázích infekce)

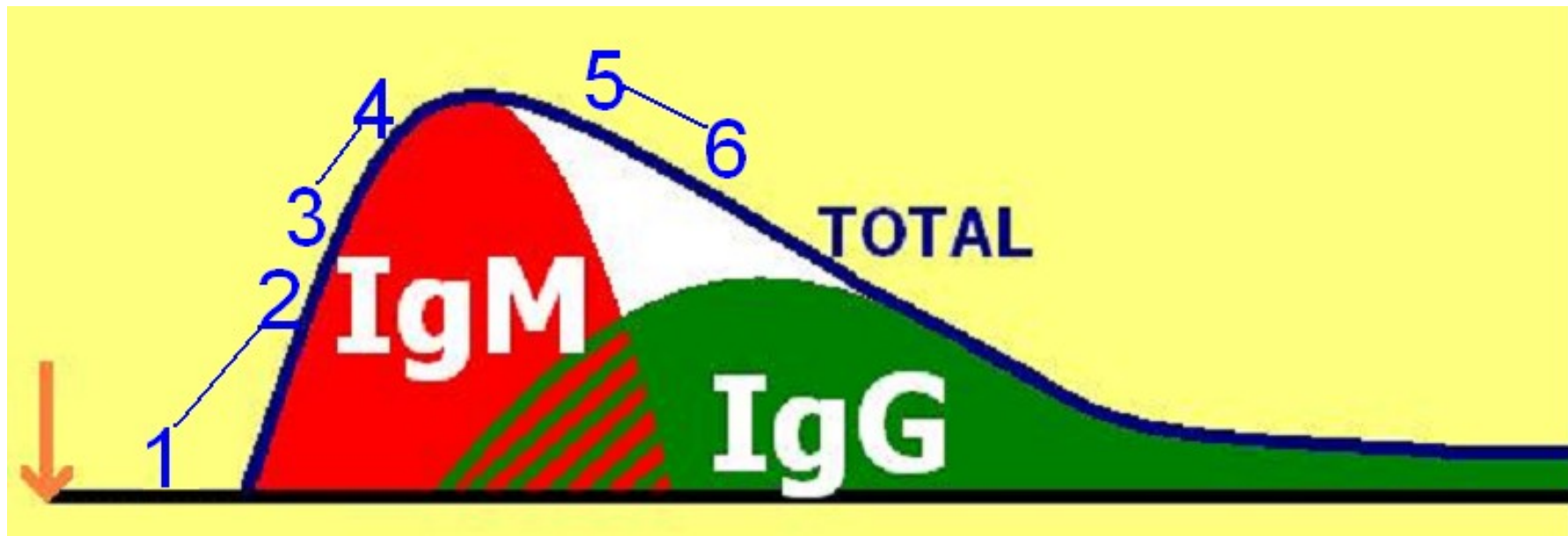


Titř protilátek: dynamika titru

- nelze se spolehnout na samotnou výši titru
- **vycházíme z dynamiky výše titru**
- při prvním styku s Ag trvá až 10 dní, než je možné je běžnými serologickými metodami prokázat → **v prvních dnech infekce jsou serologické reakce často negativní**
- **prokázat můžeme** nejen vzestup titru protilátek, ale i **pokles (subakutní infekce)**
- **velikost titru a dynamika titru neodpovídá vývoji klinických příznaků (!)**
- **množství protilátek často vrcholí až po vymizení příznaků**

Titri protilátek: dynamika titru (2)

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



Diagnostika čerstvé infekce

- **vyšetřují se dva vzorky séra**
- **první (akutní) vzorek** odebrán **co nejdříve na začátku onemocnění**, popř. ihned při podezření na určitou infekci
- **druhý (rekonvalescentní) vzorek** odebírán **po 10 a více dnech** od prvního vzorku
- **párová séra:**
 - **první vzorek je uchováván** v ledničce dokud není odebrán i druhý vzorek; poté jsou **oba hodnoceny současně**
 - signifikantní je alespoň **čtyrnásobný vzestup titru** protilátek mezi prvním a druhým vzorkem nebo **serokonverze** (1. vzorek negativní, 2. pozitivní)

Diagnostika čerstvé infekce (2)

- **nepárová séra:**
 - **druhý vzorek je vyšetřen zvlášť**
 - **signifikantní je osminásobný rozdíl** (kvůli možné laboratorní chybě; běžná laboratorní chyba u serologických reakcí je jedno ředění)
 - serokonverze vyžaduje, aby pozitivní nálezy ve druhém vzorku byly o jedno ředění vyšší než základní ředění (např. základní ředění 1:4, pozitivní nálezy ve 2. vzorku alespoň 1:8)

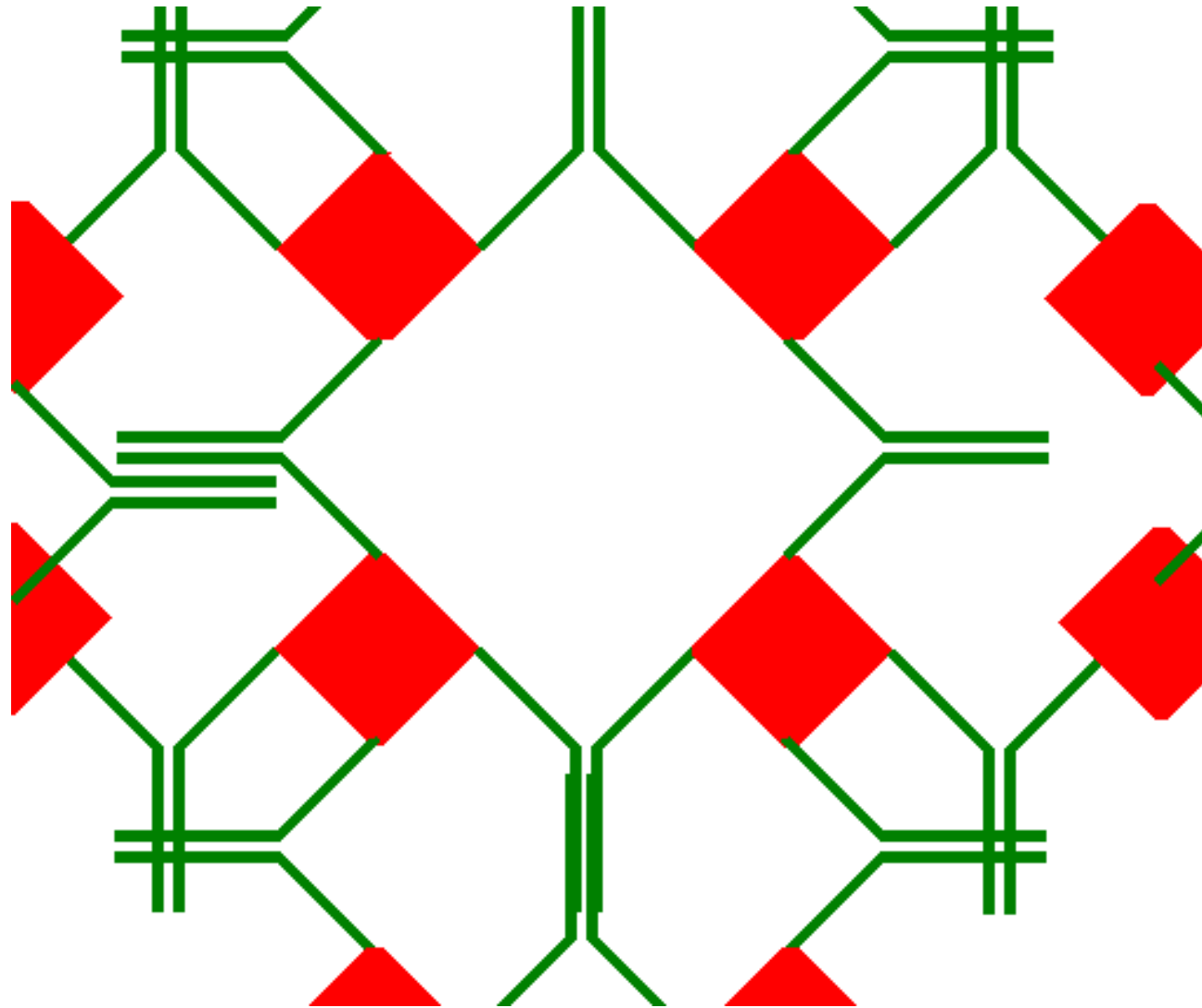
Společné vlastnosti precipitace a aglutinace

- dvě **nejjednodušší** serologické reakce
- **pracujeme jen s antigenem a protilátkou** bez dalších složek
- **dokazujeme antigen**: použijeme zvířecí (či monoklonální) protilátku, **titr není relevantní informace**
- **dokazujeme protilátku**: použijeme laboratorní antigen, **zajímá nás titr protilátek (!)**

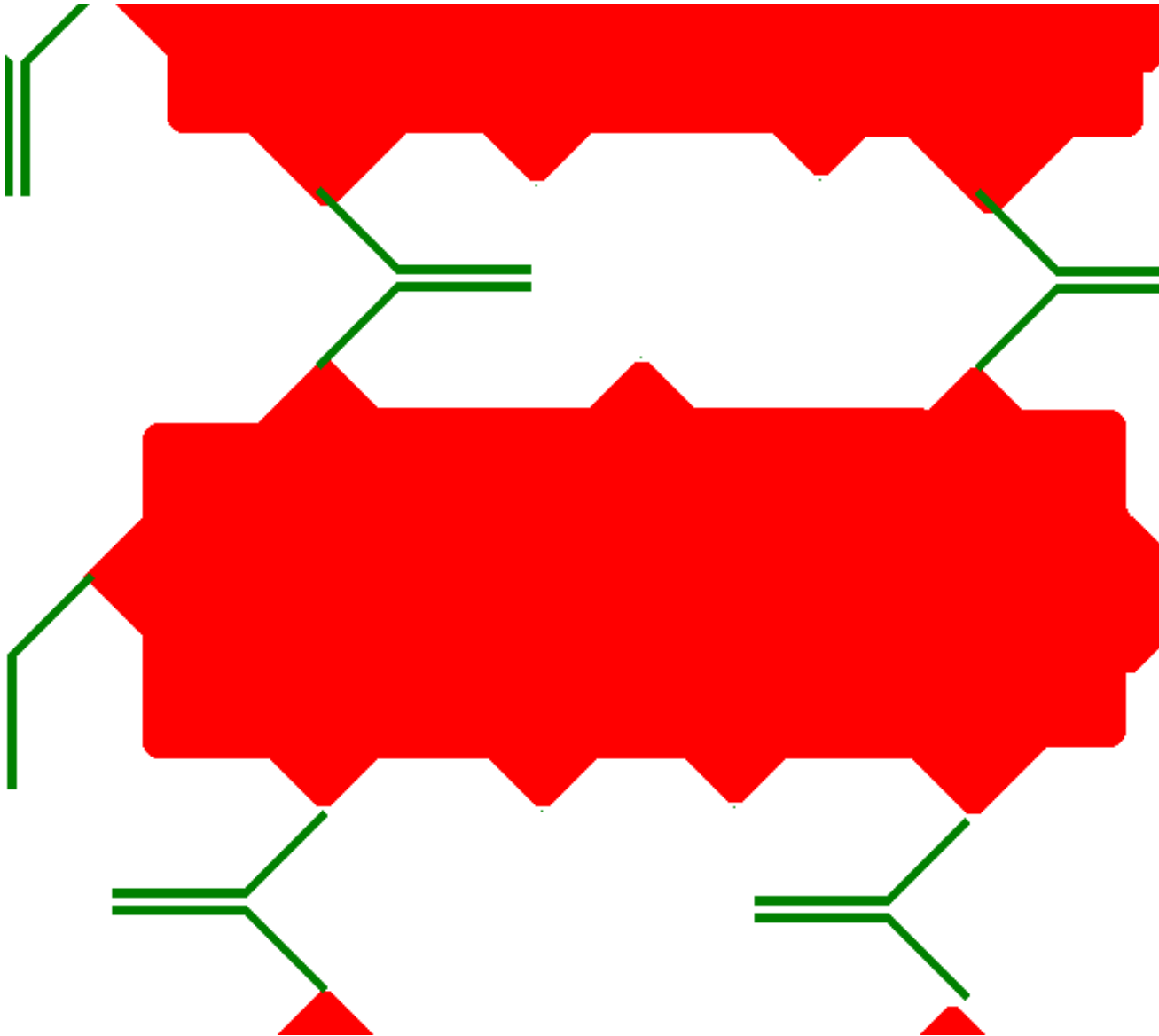
Precipitace, aglutinace, aglutinace na nosičích

- **precipitace**: antigeny jsou ve formě izolovaných makromolekul (**rozpustné koloidní antigeny**)
- **aglutinace**: antigen je součástí buňky mikroba (pracujeme s celými mikroby, **antigen je korpuskulární**)
- **aglutinace na nosičích**: precipitace převedená na **aglutinaci**; původně izolované **koloidní antigeny jsou navázány na cizí částici** – nosič (latex, erytrocyt, polycelulóza atp.)

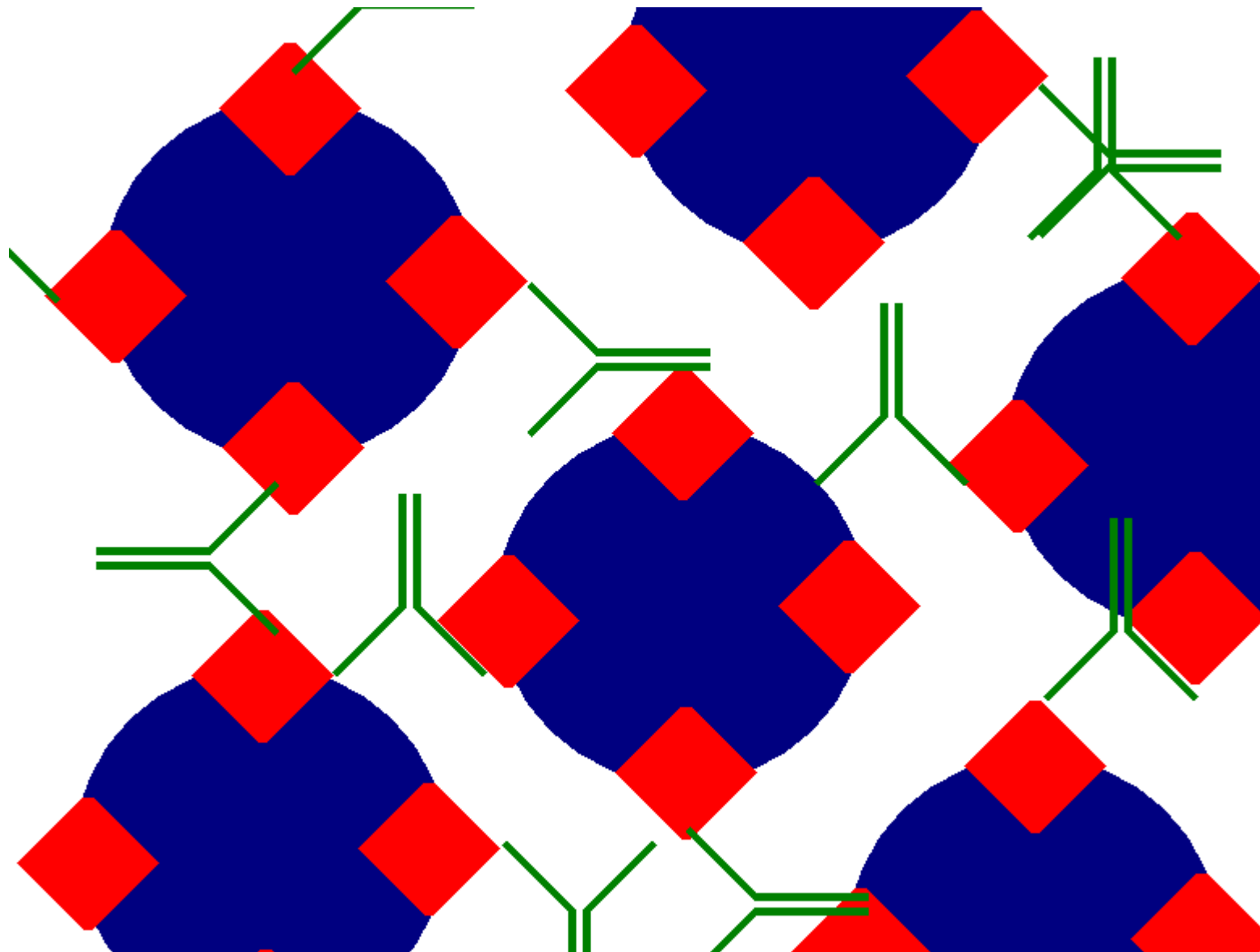
Precipitace



Aglutinace



Aglutinace na nosičích

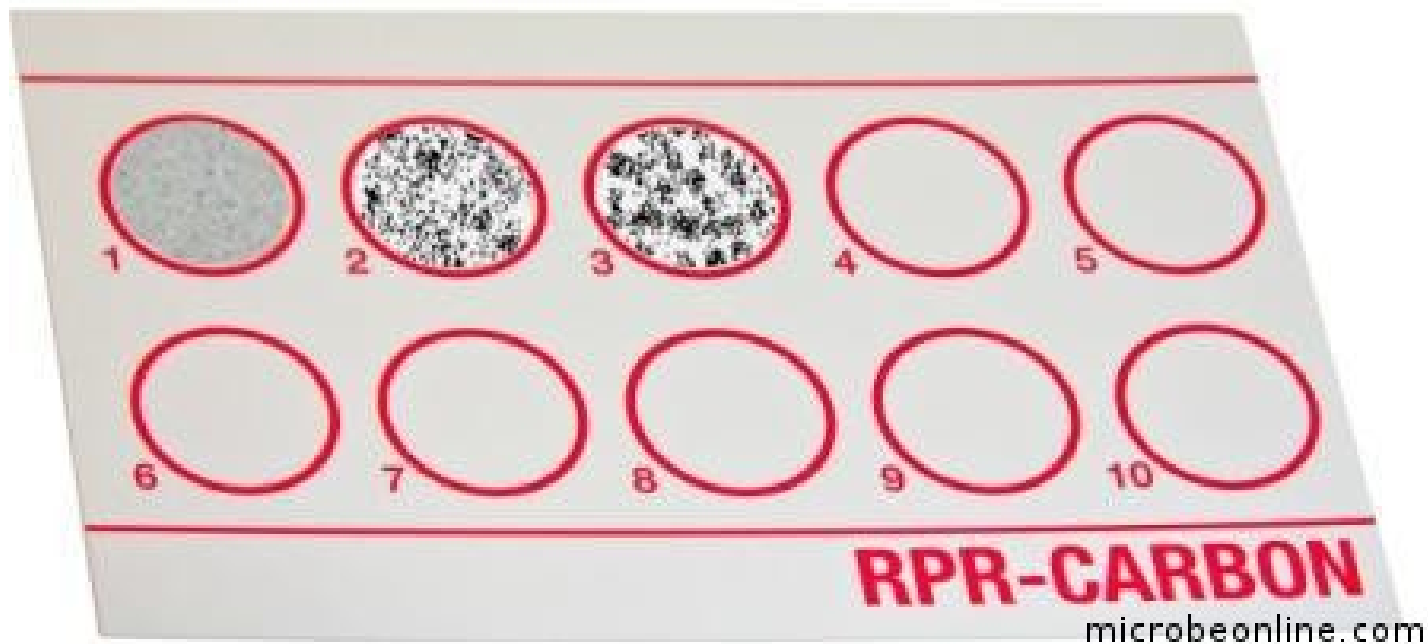


Precipitace: reakce RRR, RPR, VDRL

- **netreponemové testy**
- průkaz **nespecifických protilátek** proti **kardiolipinu**
- 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**
 - reakce **RPR** (rapid plasma reagin), kde je odečítání reakce vylepšeno o makroskopickou **vizualizaci pomocí karbonových částic**, nebo pigmentů.

Precipitace: reakce RRR, RPR, VDRL (2)

- odečet **RPR**, znázornění karbonovými částicemi

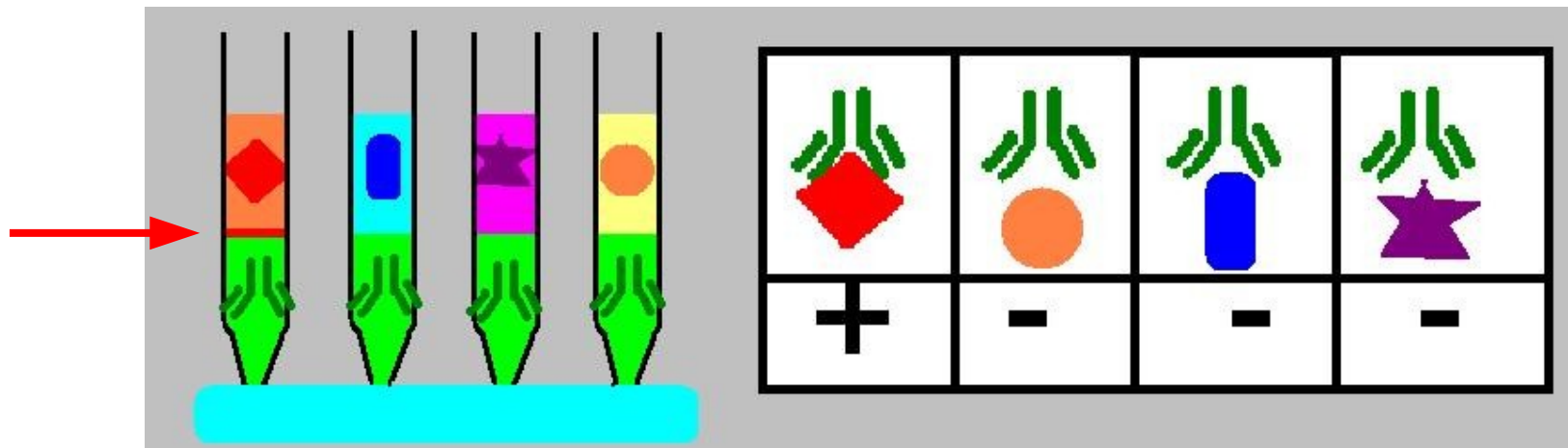


Precipitace v průkazu protilátek – RRR

- detekujeme protilátky, které jsou pozitivní u syfilis, ačkoli **to nejsou protilátky proti *Treponema pallidum***
- protilátky proti kardiolipinu
- reakci 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** může být **falešně pozitivní**, proto je **pozitivitu potřeba potvrdit** např. testem TPHA

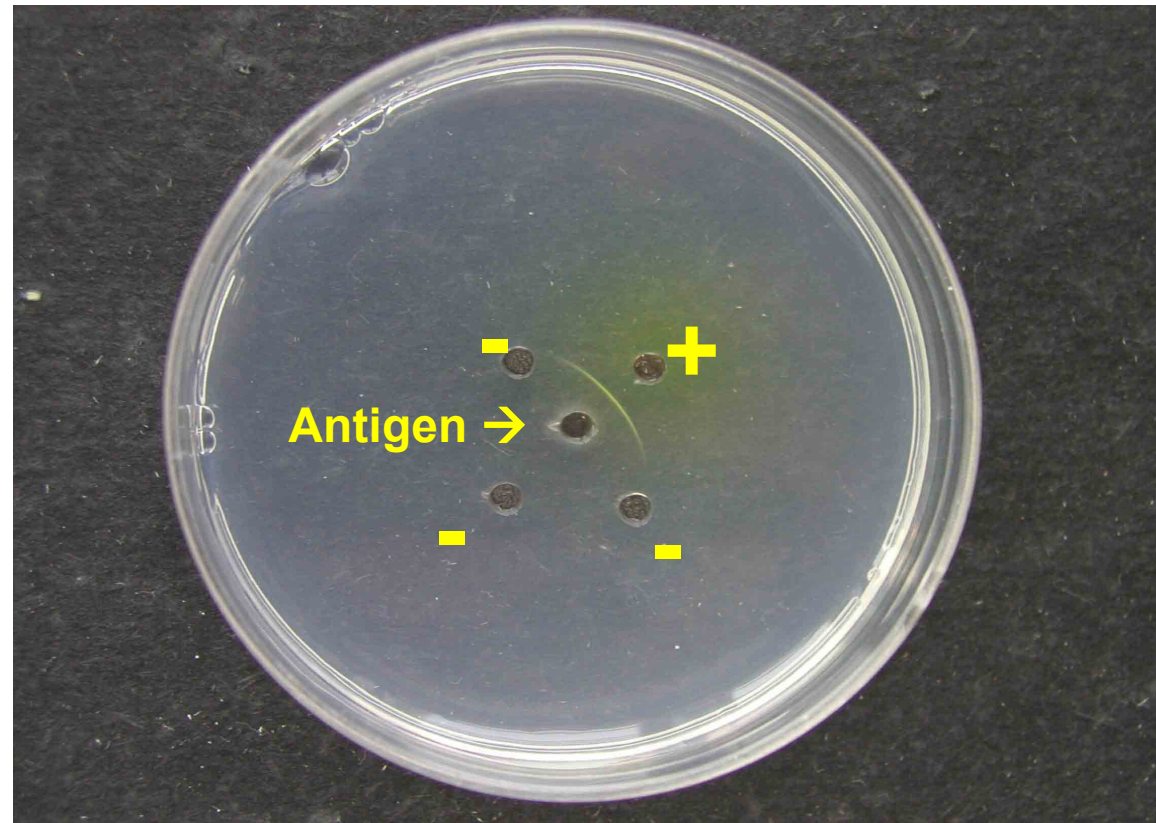
Prstencová precipitace k detekci antigenu *S. pyogenes*

- do Pasteurových pipet zabodnutých v plastelíně postupně naléváme:
 - zvířecí **sérum s protilátkami**
 - **čtyři různé extrakty kmenů (každý v jiné pipetě!)**
- **pozitivita: prstenec na styku tekutin** (nemusí být v první pipetě jako na obrázku)

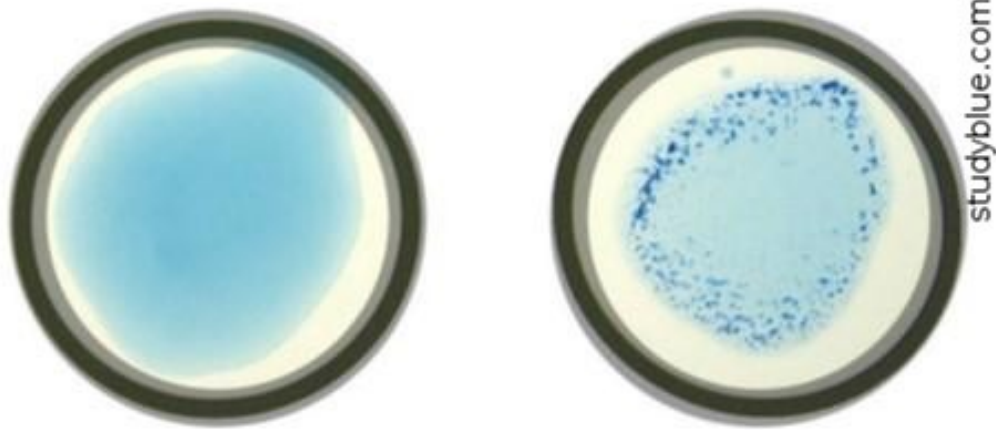


Precipitace – mikroprecipitace v agaru

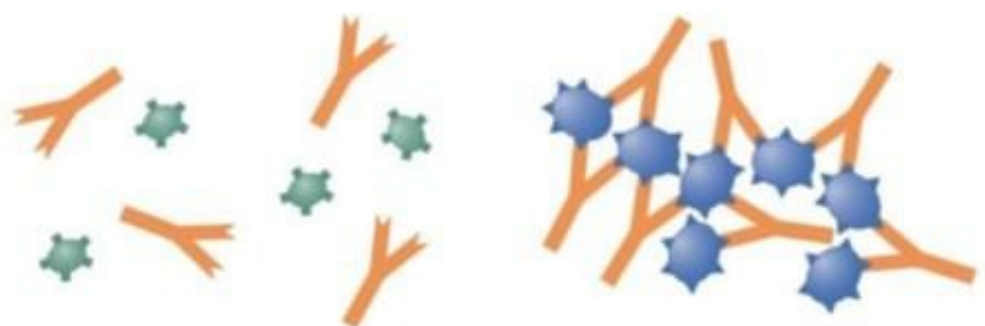
- **mikroprecipitace v agaru dle Ouchterlonyho** (tato reakce není v dnešních úkolech)
- do důlku uprostřed je nalita tekutina obsahující antigen
- Ag difunduje agarem
- obsahuje-li sérum Ab, difundují proti němu a na jejich styku vznikne precipitační linie



Aglutinace: demonstrace různých možností provedení

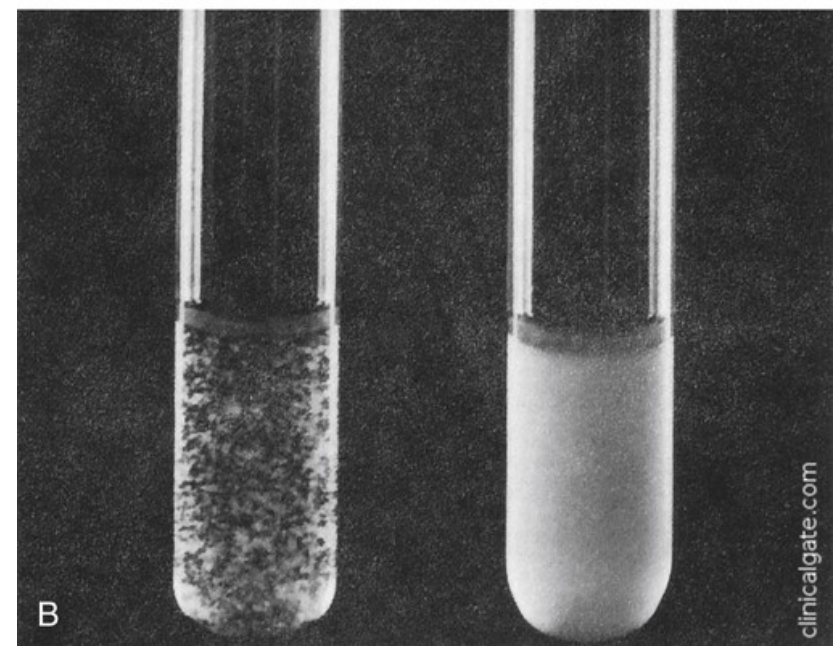
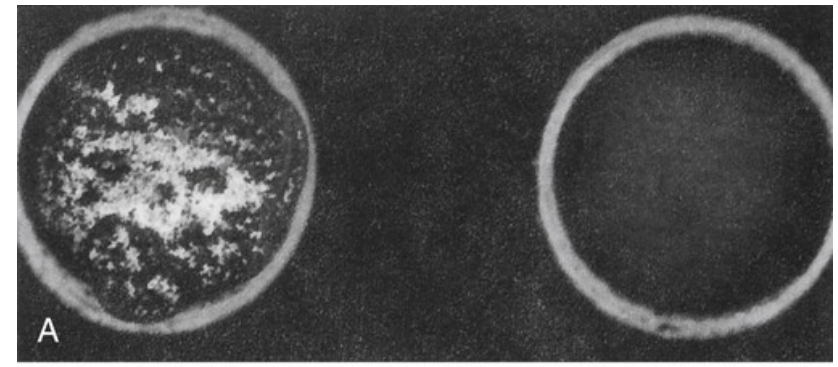


(a) Negative result Positive result



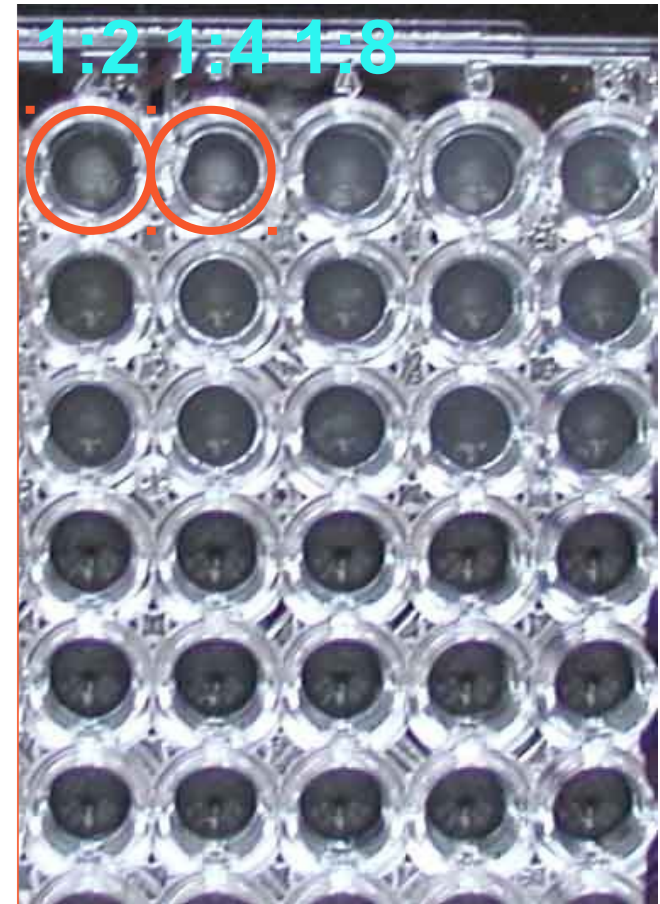
(b) Negative result Positive result

Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.



Demonstrace aglutinační reakce u tularémie:

- 1. řada:
aglutinát je viditelný v ředění 1:2 a 1:4,
nikoli však již 1:8 a vyšším
titr je 1:4
- 2. řada:
v žádném důlku není aglutinace → žádný titr,
negativní reakce

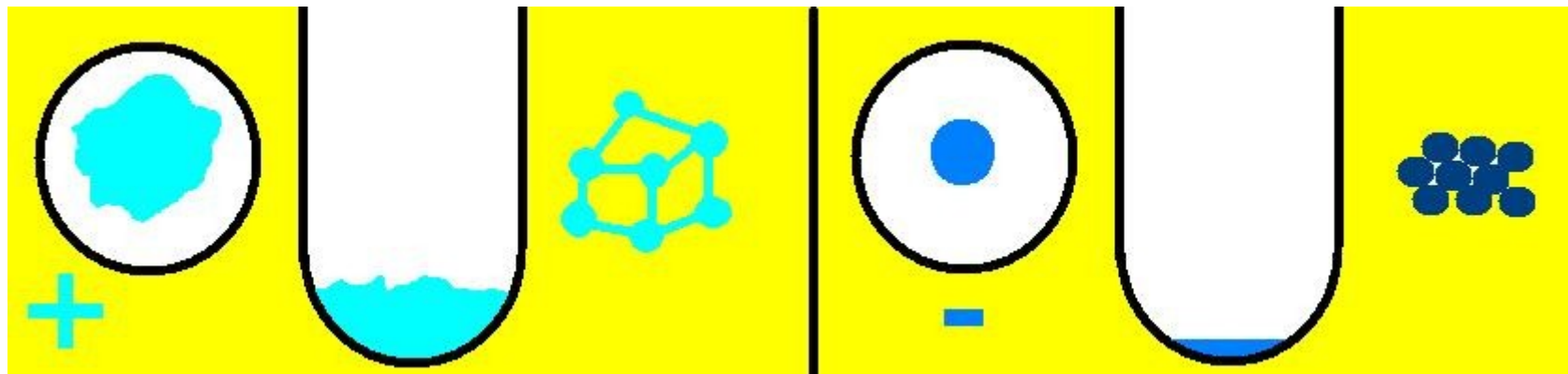


Úkol 2: Aglutinace – průkaz Ab

- prohlédněte si mikrotitrační destičku se séry, u nichž aglutinačně hledáme protilátky proti *Yersinia enterocolitica*
- v **1. důlku je sérum naředěno 1:100** a dále s **koeficientem 2**
- jako **antigen** zde slouží **samotná bakteriální buňka**
- **aglutinace je mapovitý povláček** na dně důlku (buňky jsou provázány protilátkami)
- **negativní reakce je kompaktní pravidelná tečka (sedimentované bakteriální buňky)**
- **stanovte a запиšte titr protilátek (pokud jsou přítomny)**, zakreslete výsledek

Úkol 2: Aglutinace – průkaz Ab (2)

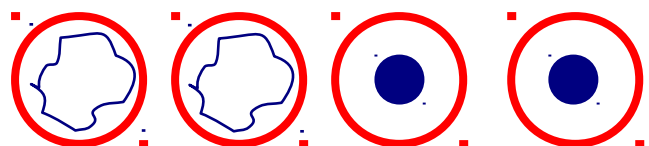
- **titr je nejvyšší ředění s pozitivní reakcí**
- **aglutinace je mapovitý povláček** na dně důlku (buňky jsou provázány protilátkami)
- **negativní reakce je kompaktní pravidelná tečka** (sedimentované bakteriální buňky)



pozitivní

negativní

Úkol 2: Aglutinace – detekce protilátek proti yersiniím



1:100 1:200 1:400 1:800

K+ pozitivní, titr = 1 : 200

Č. 1 negativní

Č. 2 pozitivní, titr = 1 : 800

Č. 3 negativní

Č. 4 pozitivní, titr = 1 : 200

 Aglutinace

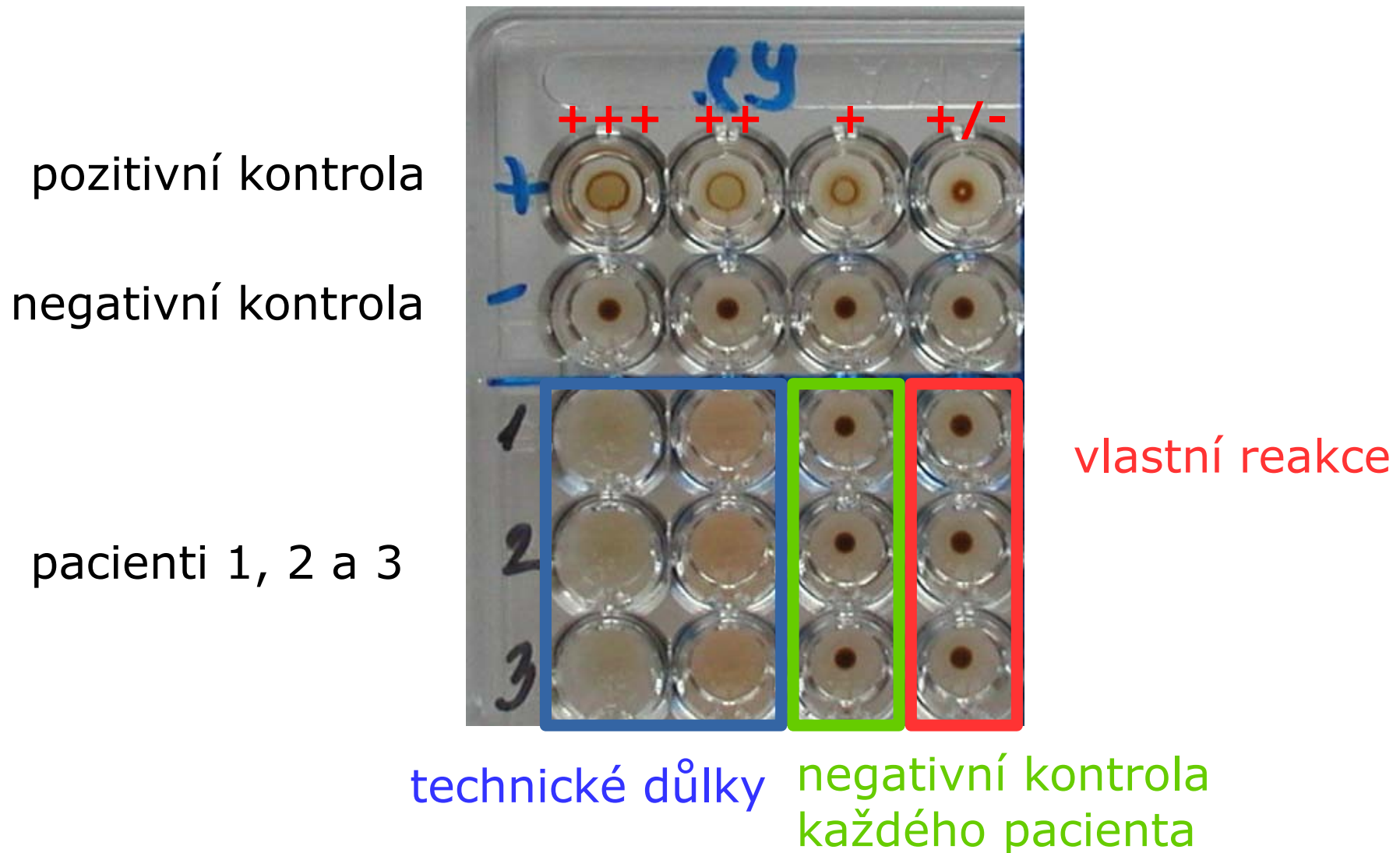
 Sedimentace volných bakterií

Treponema pallidum pasivní hemaglutinace (TPHA)

- aglutinace na nosiči, nosičem je erytrocyt (odtud červená barva)
- vyhodnoťte TPHA jako v úkolu 3a
- **pozitivní reakce vznik mapovitého povlášku**
- **negativní reakce sedimentace** částic na dno důlku
- dnes se v tomto testu červené krvinky nahrazují polycelulózovými částicemi – zkratka TPPA



Treponema pallidum pasivní hemaglutinace (TPHA)



Komplement

- **humorální složka imunity**
- soubor sérových a membránových glykoproteinů
 - **nejdůležitější jsou C1–C9**
- **fungují v kaskádě**, základem je **štěpení neaktivní složky na menší biologicky aktivní část** (mediátory zánětu C3a, C4a, C5a) a větší **část s proteolytickou aktivitou** (fragmenty b)
- konečný produkt kaskády je **membránu atakující komplex** (C5b, C6, C7, C8, 13-18 C9) tvořící pór v membráně → **lyze buňky**

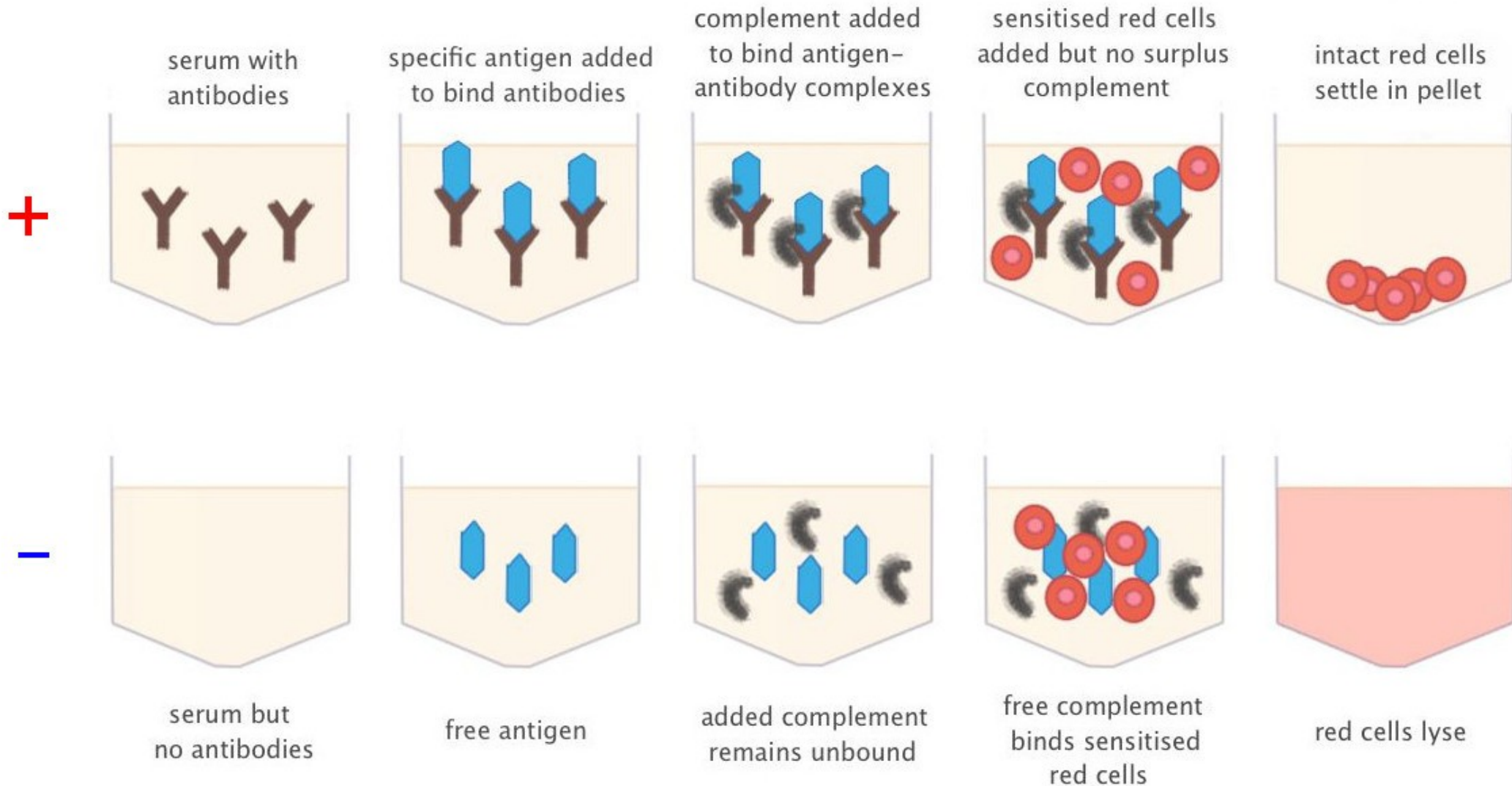
Komplement (2)

- **dráhy aktivace komplementu:**
 - liší se od sebe způsobem **aktivace klíčové složky C3**
 - **nejdůležitější moment při aktivaci komplementu je tvorba C3b z C3**
 - **klasická (aktivace komplexem Ag-Ab,** fylogeneticky nejmladší, musí se nejdříve vytvořit protilátky pro boj s infekcí)
 - **lektinová** (varianta klasické dráhy, **mannose-binding lectin**; lektiny jsou proteiny schopné specificky rozpoznávat a vázat cukry volné i vázané)
 - alternativní (**aktivace povrchem patogenu,** fylogeneticky nejstarší, **C3b slouží k opsonizaci patogenu**)

Komplement fixační reakce (KFR)

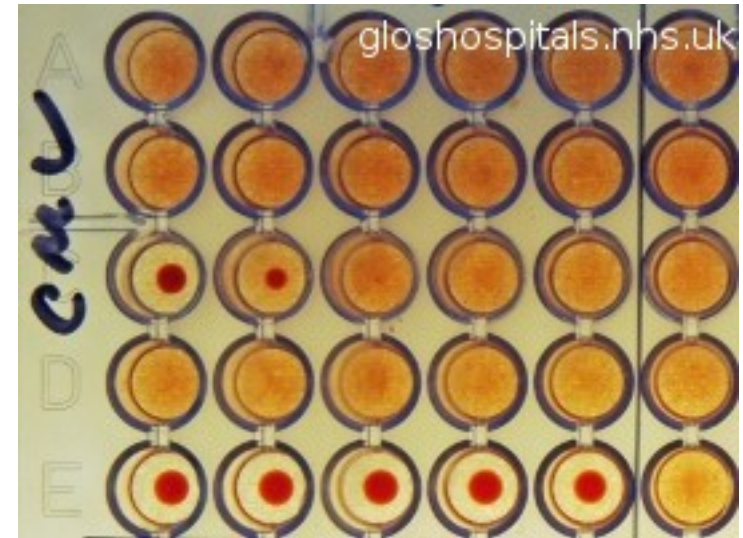
- **využívá vlastností komplementu:**
 - **schopnost vázat se jen na komplex Ag-Ab (neváže se na samotný antigen ani na samotnou protilátku)**
 - **vede k lyzi buňky**
- **navázání komplementu** na komplex Ag-Ab **není** samo o sobě **viditelné** → **přidáváme indikátorový systém**
- **indikátorový systém** (tvořen Ag a Ab, aby se na něj mohl komplement také vázat)
 - antigen = **beraní erytrocyty**; protilátka = **králičí Ab** proti beraním erytrocytům (**amboceptor**)

KFR: princip pozitivní a negativní reakce



KFR: princip pozitivní a negativní reakce (2)

- **POZ = erytrocyty sedimentují (komplement byl vyvázn komplexem hledaného Ag a Ab)**
- **NEG = hemolýza (komplement nebyl vyvázn komplexem hledaného Ag a Ab, zbyl a mohl lyzovat erytrocyty)**
- **nevyžívá se pacientův komplement** (variabilita mezi pacienty); inaktivuje se zahřátím tak, aby nebyly poškozeny pacientovy protilátky (30 min/56 °C)
- **vyžívají se 2 hemolytické jednotky morčecího komplementu** (hemolytická jednotka = množství, které právě stačí hemolyzovat jednu pracovní dávku senzibilizovaných erytrocytů)



Falešná pozitivita a negativita KFR

- **falešná negativita:**

- **příliš mnoho komplementu** hemolyzuje erythrocyty i v přítomnosti hledaného komplexu Ag-Ab
- **předcházíme mu kontrolou** (titrováním) komplementu (např. ředění 2, 1, 0,5, 0,25 hemolytické jednotky)

- **falešná pozitivita:**

- některá **složka séra vyvazuje komplement sama o sobě** (nebo je sérum chylózní či kontaminované)
- **test antikomplementarity** = běžně provedený test, ale bez přidání antigenu → pokud je i tak vyvážen komplement, výsledek se nehodnotí a krev je nutné odebrat znovu

Úkol 3: Schematická analýza KFR vč. testování antikomplementarity

- v následujících schématech rozhodněte, ve kterých případech zůstává **po první fázi volný komplement** (zakroužkujte co platí)
- připojte slovní popis výsledku (**hemolýza, sedimentace erytrocytů**)

Úkol 4: Stanovení protilátek (respirační nákazy)

- 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 možný účinek ATB**
- u virů by ATB smysl neměla

Úkol 4: Stanovení protilátek (respirační nákazy) (2)

- **celá 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 2
- kromě virů (**chřipka A, chřipka B, parainfluenza, adenovirus, RS virus**), je ve škále i bakterie ***Mycoplasma pneumoniae***

Úkol 4: Stanovení protilátek (respirační nákazy) (3)

- **odečtěte titry KFR** u jednotlivých pacientů
- **věnujte pozornost kontrolám antikomplementarity séra v prvním důlku**
- výsledek zakreslete, zapište titr a pokuste se o interpretaci nálezu

Úkol 4: Stanovení protilátek (respirační nákazy) (4)

- **chřipka A**: oba titry 1:5 (pacient se s onemocněním dříve setkal, ale **nejedná se o akutní onemocnění**)
 - **chřipka B**
 - **parainfluenza**
 - **adenovirus**
 - **RS virus**
- žádné protilátky, tzn., že se pacient s **infekcí nikdy neseťkal**
- ***Mycoplasma pneumoniae***:
 - **vzestup titru** v 1:10 na 1:160 (**16 násobný vzestup**, alespoň čtyřnásobný vzestup je signifikantní)
 - silné podezření na **právě probíhající infekci *Mycoplasma pneumoniae***

Neutralizační reakce

- serologické metody, při nichž **protilátka brání běžným projevům antigenu** (nejčastěji viru)
 - **virus neutralizační test:**
 - **Ab neutralizuje infekčnost viru**
 - buněčná (tkáňová) kultura naočkovaná směsí viru s Ab zůstane beze změny (metabolický efekt, pH, fenolová červeň)
 - **hemaglutinačně inhibiční test**
 - **v přítomnosti Ab není virus schopen aglutinovat erythrocyty (nikoli hemolyzovat!)**
 - **ASLO = průkaz antisteptolyzinu O** (protilátky schopné vyvolat autoimunitní reakci), není to nepřímý průkaz

ASLO (dg. pozdních následků streptokokových infekcí)

- po každé streptokokové infekci tvorba Ab, vč. **Ab proti streptolyzinu O (streptokokový toxin)**
- v případě, že množství těchto protilátek po infekci stoupá, **zkříženě reagují** s některými strukturami organismu → **pozdní následky streptokokových infekcí**
- **revmatická horečka, akutní glomerulonefritida**
- **ASLO: zjištění míry protilátkové odpovědi** po prodělané streptokokové infekci (**neprokazujeme tedy infekci** – ta už proběhla – **ale zda nedochází k vývoji autoimunitní reakce**)
- hledáme přímo protilátky (ne patogen) → ASLO tedy není nepřímý průkaz (patogenu)

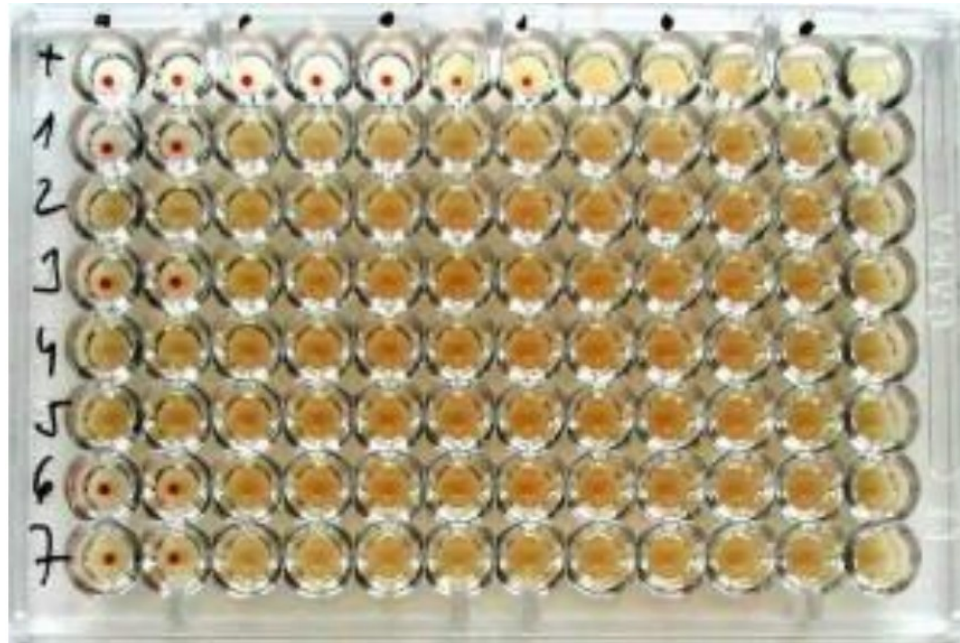
ASLO (2)

- **neutralizace hemolýzy**
- **streptolyzin O** za běžných okolností (nepřítomnost protilátek) **hemolyzuje červené krvinky**
NEG = hemolýza
- **v přítomnosti** protilátky **antistreptolyzinu O** dochází k zábraně hemolýzy a krvinky mohou **sedimentovat**
POZ = zábrana hemolýzy
- **titr nad cca 200 m.j. riziko pozdních následků**

Jamka	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Hodnota m.j.	100	120	150	180	225	270	337	405	506	607	759	911
Pozdní následky	nehrozí			hraniční			hrozí					

ASLO (3)

- **destička se odečítá naležato, první řádek je pozitivní kontrola**
- další řádky jsou jednotliví pacienti
- hodnoty ředění jsou uvedeny v protokolu



Úkol 5: HIT – hemaglutinačně inhibiční test

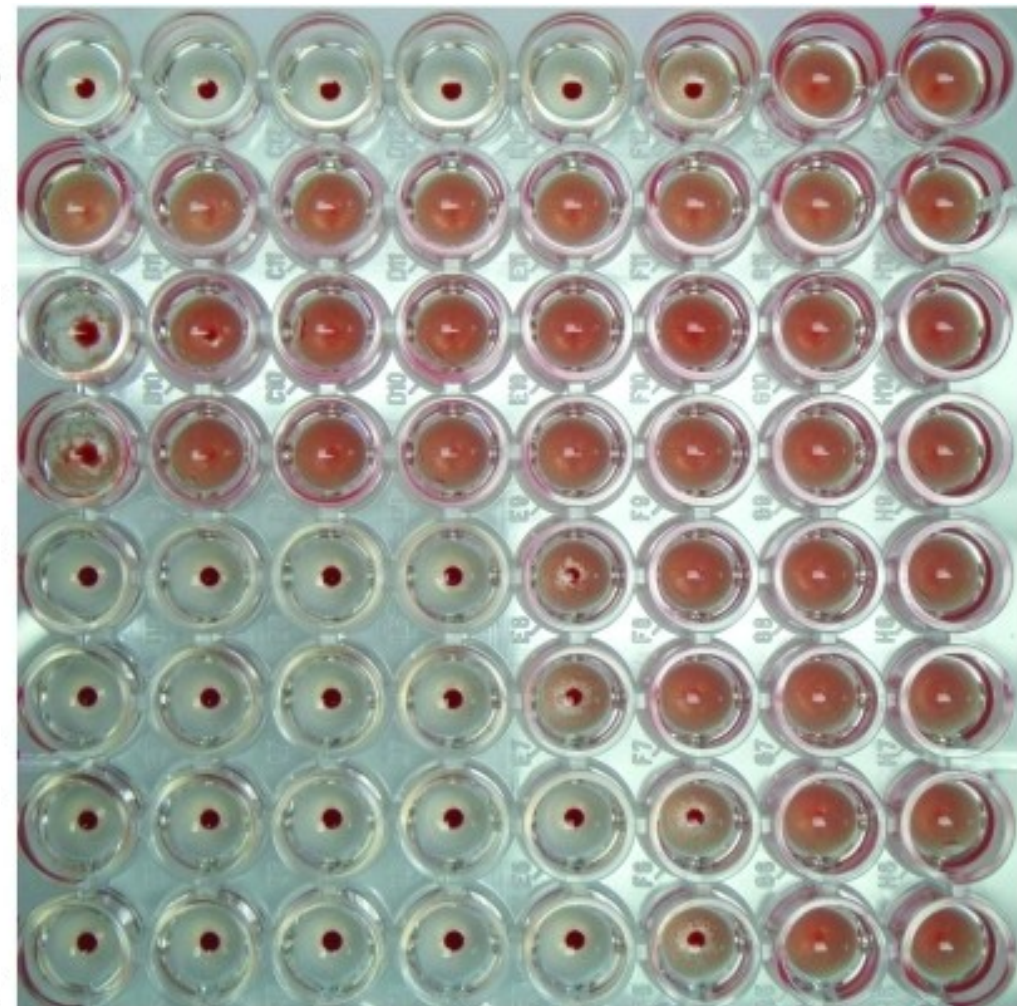
- máme několik pacientů s podezřením na klíšťovou encefalitidu, již testovaných pomocí KFR (viz úkol 4)
- **HIT jako nezávislý test k ověření výsledků KFR** (pozor jedná se o jiné pacienty než v úkolu 4)
- **v přítomnosti Ab není virus schopen aglutinovat erythrocyty (nikoli hemolyzovat!)**
 - **POZ = sedimentace erythrocytů** (protilátka zabránila shlukování, erythrocyty sedimentují)
 - **NEG = shluk krvinek** (protilátka nebyla přítomna nebo jí byla příliš málo, nedokázala zabránit viru ve shlukování krvinek)

Úkol 5: HIT – hemaglutinačně inhibiční test (2)

	Components	Interaction	Microtiter Results
A	RBCs		No Reaction
B	Virus + RBCs		Hemagglutination
C	Virus + Antibody + RBCs		Hemagglutination Inhibition

microbeonline.com

HI titer



10 20 40 80 160 320 640 1,280

openi.nlm.nih.gov

Úkol 5: HIT – hemaglutinačně inhibiční test (3)

- odečtete výsledky HIT u klíšťové encefalitidy – čtyři pacienti (K, L, M, N), u každého akutní a rekonvalescentní sérum
- **v prvním řádku je pozitivní kontrola**
- **v prvním sloupci ředění 1 : 5** a dále geometrická řada s koeficientem 2 (1 : 10, 1 : 20 atd.)
- **učiňte pravděpodobný závěr** (akutní infekce/pouze paměťové protilátky/...)
- **kontrola antigenu** – kontroluje, že antigen (virus) bez protilátky je schopen shlukovat
- **kontrola erytrocytů** – kontroluje, že erytrocyty neshlukují samy od sebe

Úkol 5: HIT – hemaglutinačně inhibiční test (4)

- správně mělo vyjít:
 - jeden z pacientů je zřejmě akutně nemocen
 - dva se s infekcí setkali
 - jeden se neseťkal

Princip metod se značenými složkami

- základem jsou **imunochemické reakce Ag-Ab** *in vitro*
- **vysoce citlivé metody** (citlivější než KFR, neutralizace nebo aglutinace na nosičích; ty jsou zase citlivější než obyčejná precipitace nebo aglutinace)
- **vlastnosti protilátek využívané v reakci:**
 - schopnost **vázat** se na **široké množství Ag**
 - schopnost **vázat se na povrch plastů** (polystyren)
 - **specifita** (i pro jednotlivé třídy Ab)
 - **síla vazby** (komplex Ag-Ab je **stabilní při** použití různých **separačních metod** nebo **promývání**)
- **pro detekci a kvantitativní vyjádření výsledku** jsou Ag nebo Ab značeny indikátorem

Princip metod se značenými složkami (2)

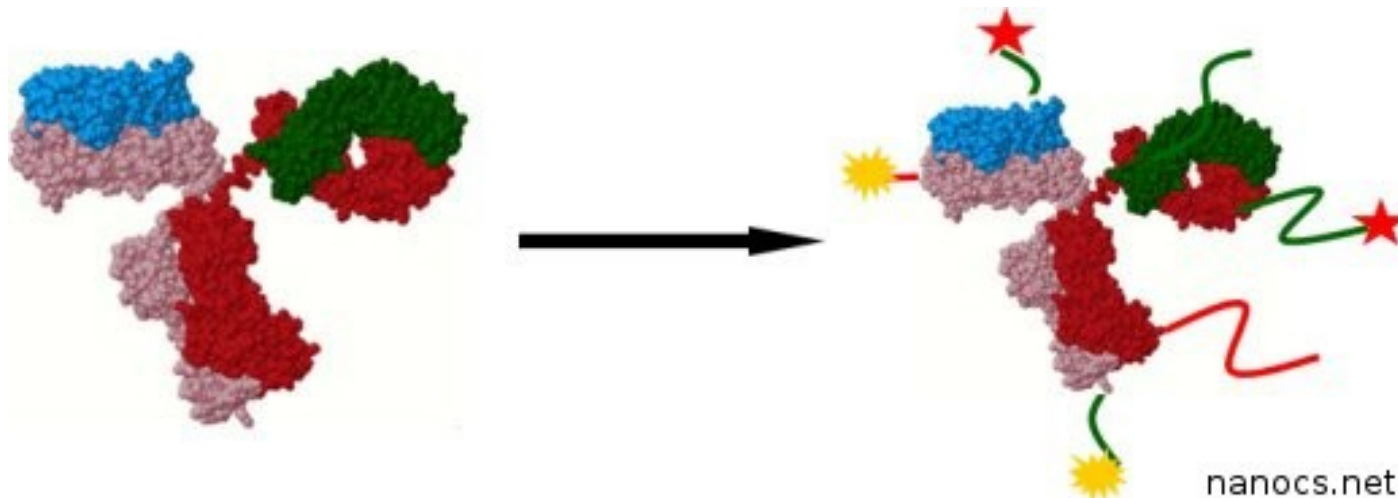
- **indikátor:**
 - lze měřit s vysokou přesností a reprodukovatelností
 - **radioizotopové metody:** radioaktivní **izotopy** (^{125}I)
 - **neradioizotopové metody:** **enzym, fluorescenční látka**, koloidní částice apod.
- **vícesložkové reakce** fungující jako řetězec (řetězec různých Ag a Ab, poslední v řadě značen indikátorem)
- **první složka se váže na povrch, dále se postupně navazují další jednotlivé složky**
- **jeden z kroků je použití vzorku od pacienta** (pokud hledanou **složku obsahuje**, v dalších krocích se naváží další složky a **reakce bude pozitivní**)

Princip metod se značenými složkami (3)

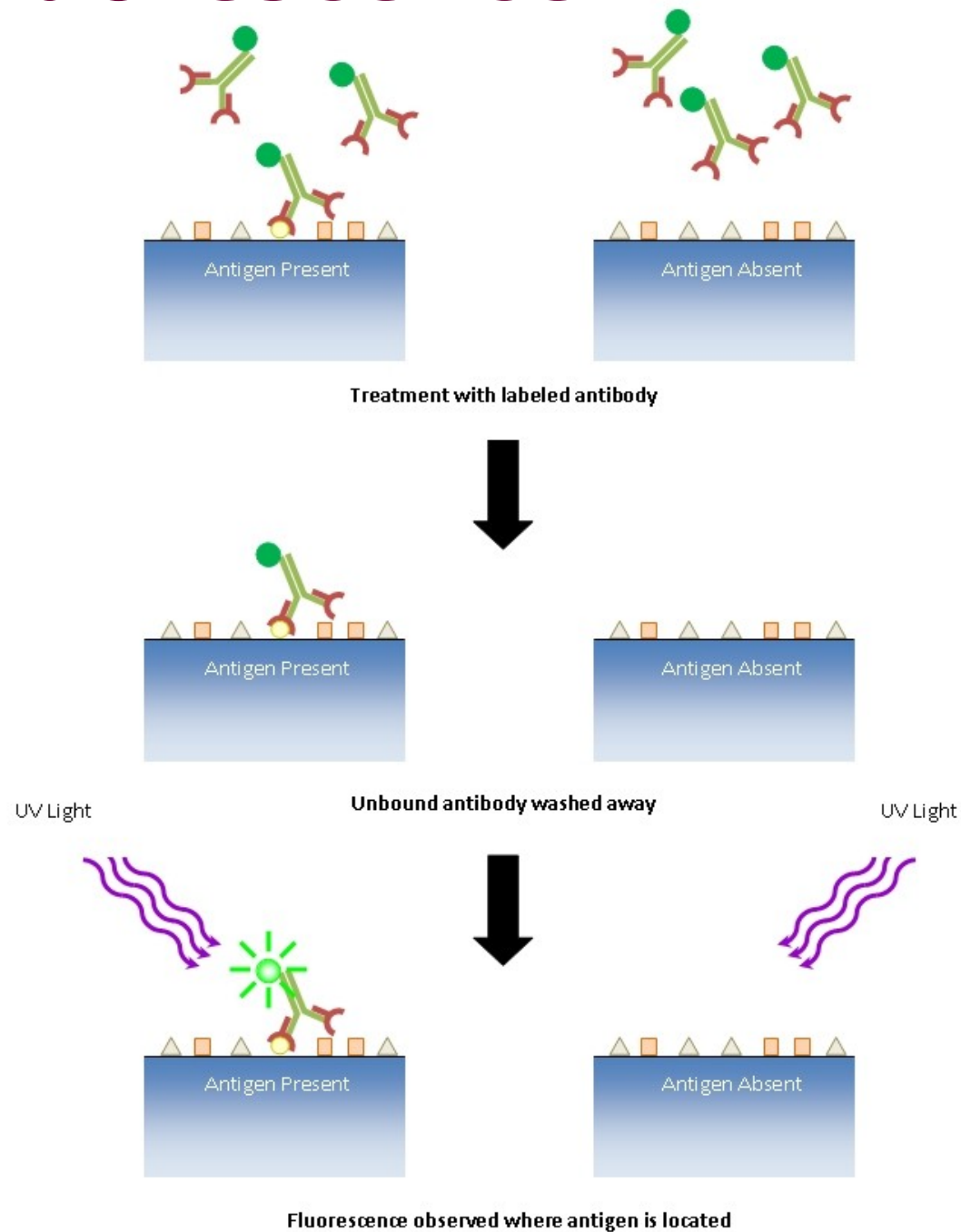
- **promývání:**
 - pokud by v reakci zůstaly i nenavázané složky, nedokázali bychom odlišit pozitivní a negativní reakci
 - **po každém kroku reakce následuje promytí → zůstanou přítomny pouze složky navázané na pevný povrch, resp. poslední článek řetězce**
 - je-li řetězec přerušen, **promytí odplaví vše za místem přerušení**

Biokonjugace

- chemická metoda **vytvářející stabilní kovalentní vazby mezi dvěma molekulami**, z nichž alespoň jedna je biomolekula (např. **imunoglobulin**)
- druhá molekula může být např. **fluorescenční barva, enzym, léčivo, ...**
- obě molekuly jsou spojeny linkerem

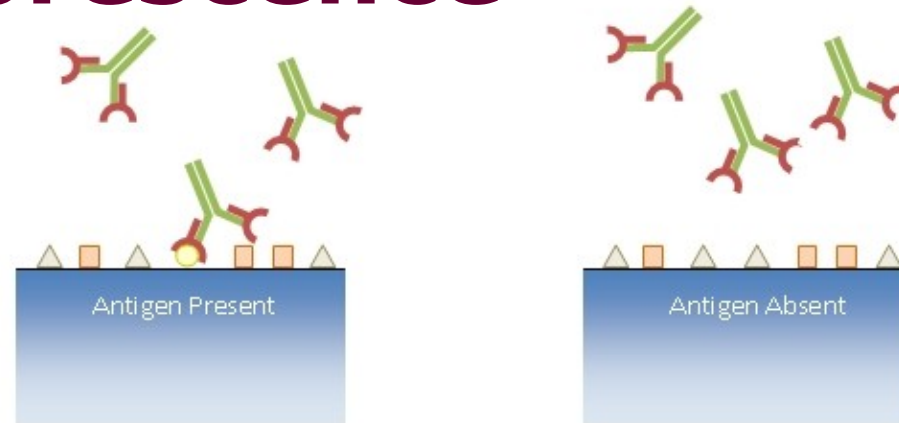


Imunofluorescence přímá



Fluorescence observed where antigen is located

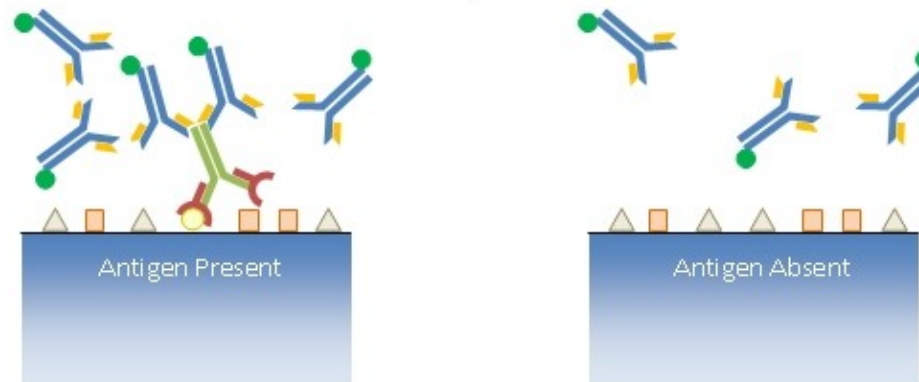
Imunofluorescence nepřímá



Treatment with unlabelled primary antibody

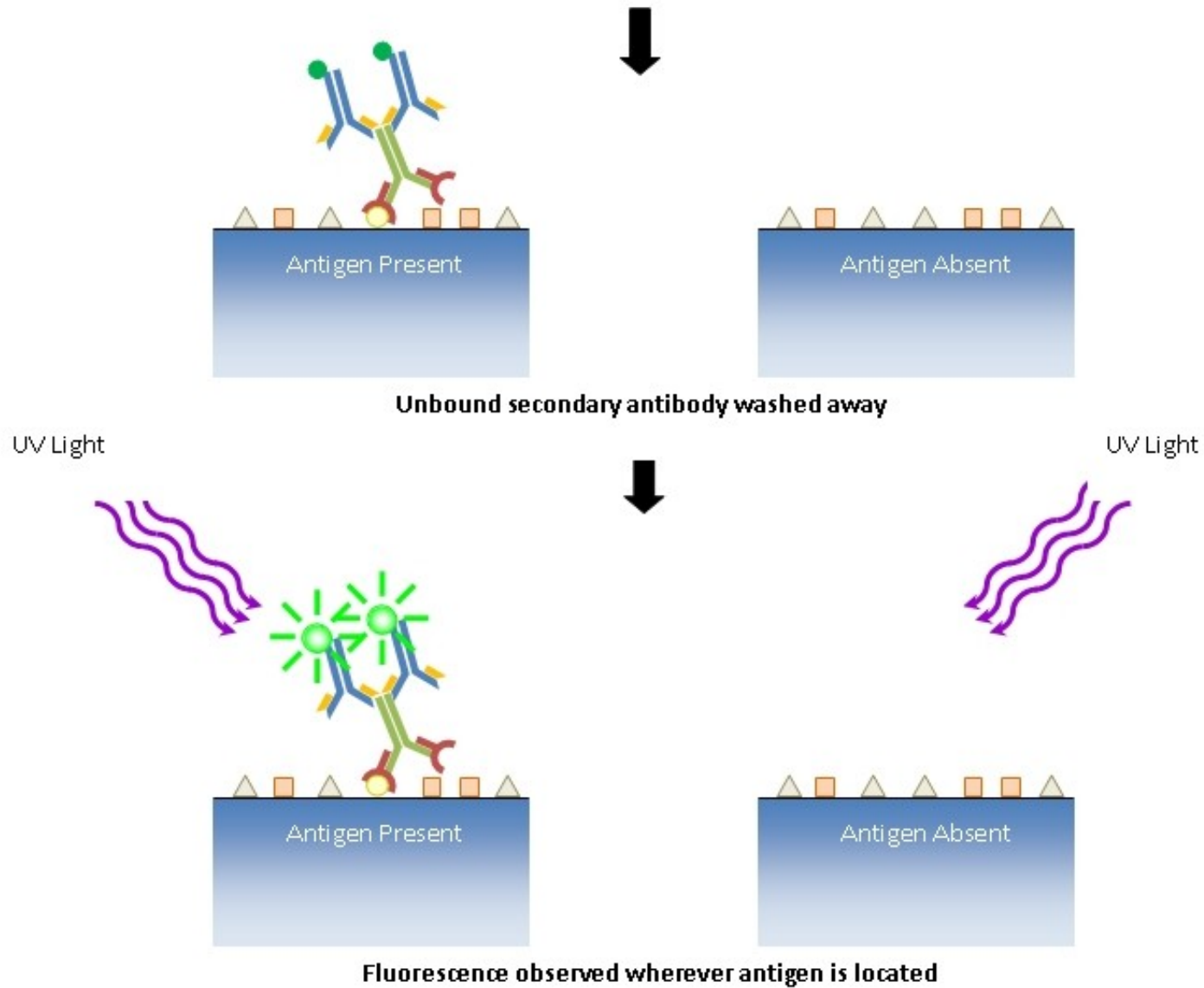


Unbound antibody washed away

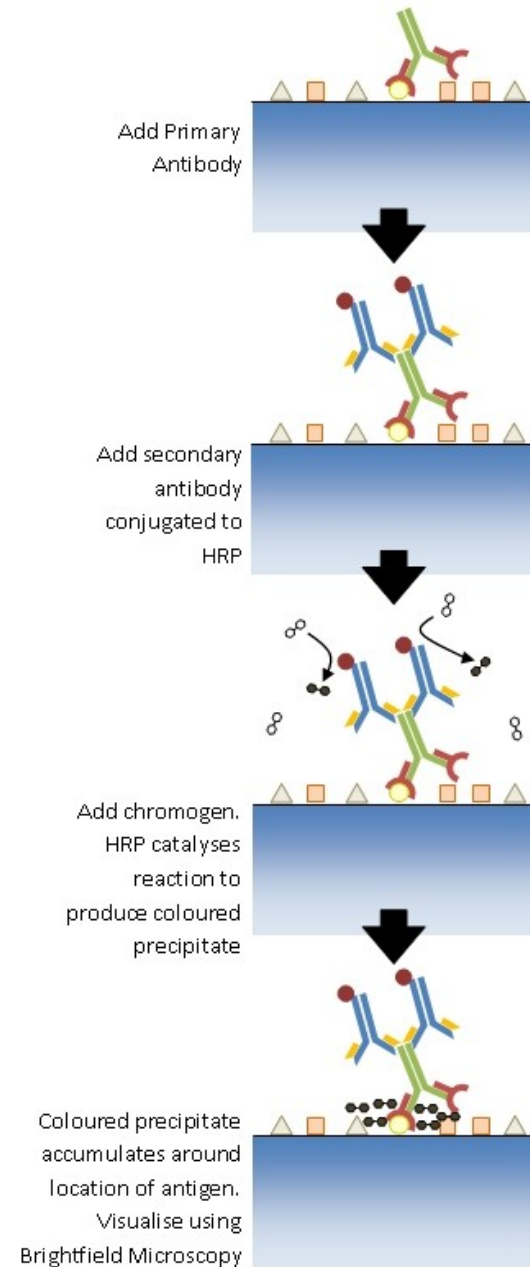
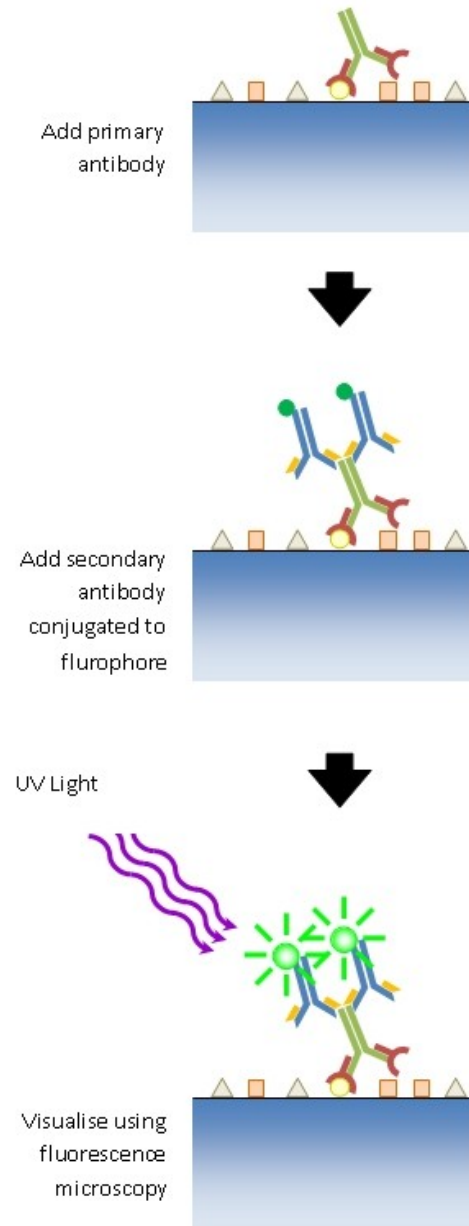


Treatment with unlabelled secondary antibody

Imunofluorescence nepřímá (2)

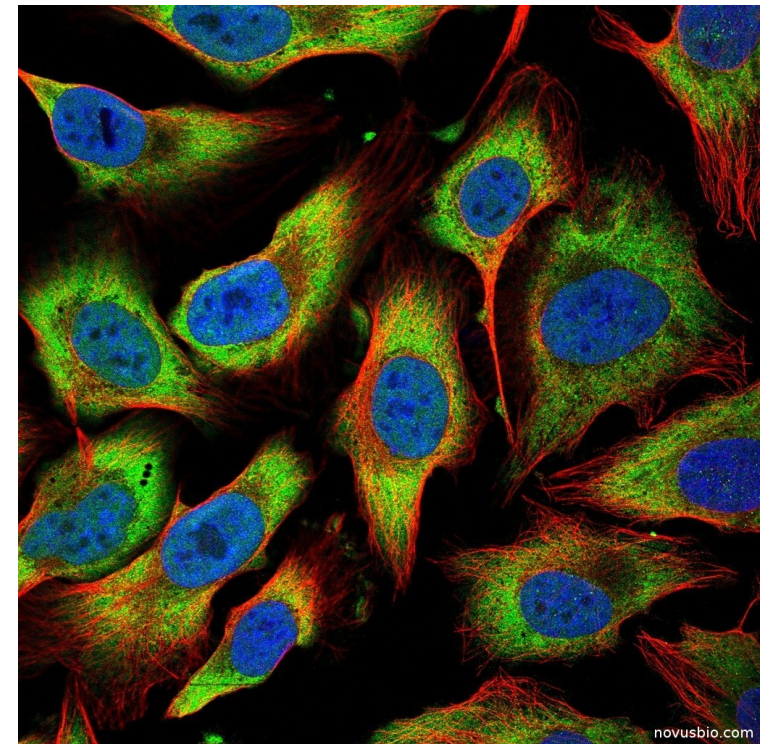
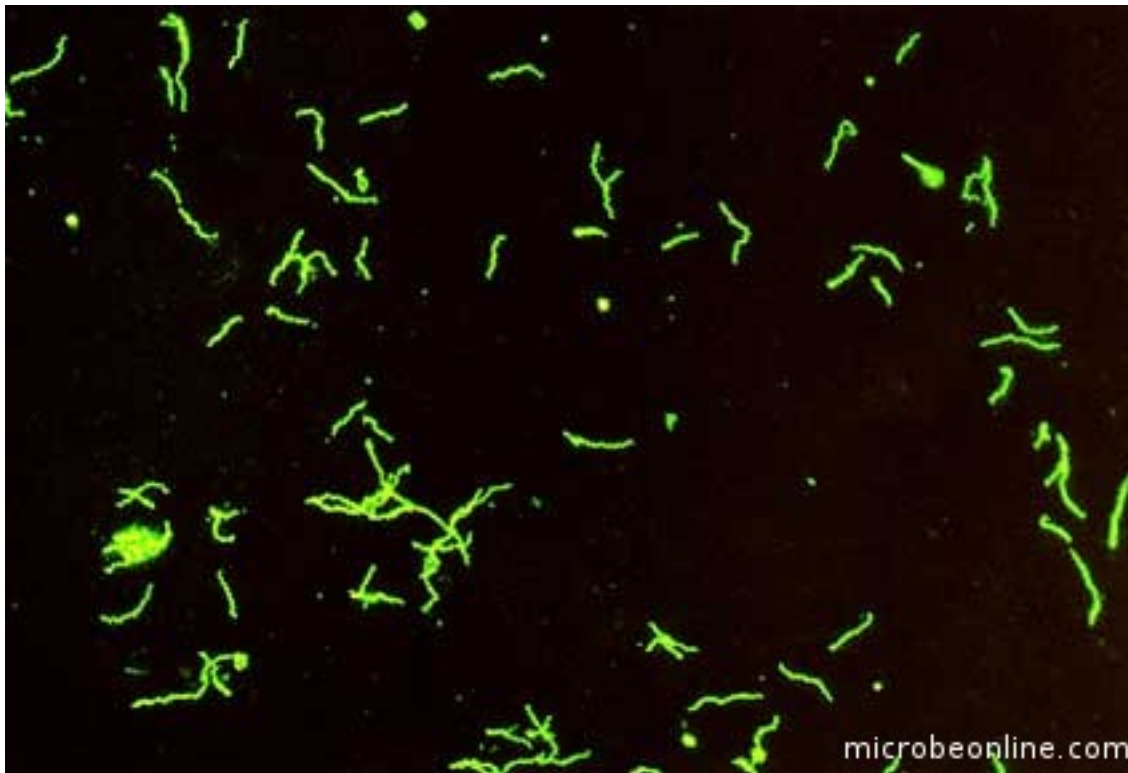


IMF vs. immunohistochemie



Výsledek přímé a nepřímé IMF

- z podstaty nemůžeme odlišit přímou a nepřímou metodu
- nepřímé metody jsou citlivější (zesílení signálu)



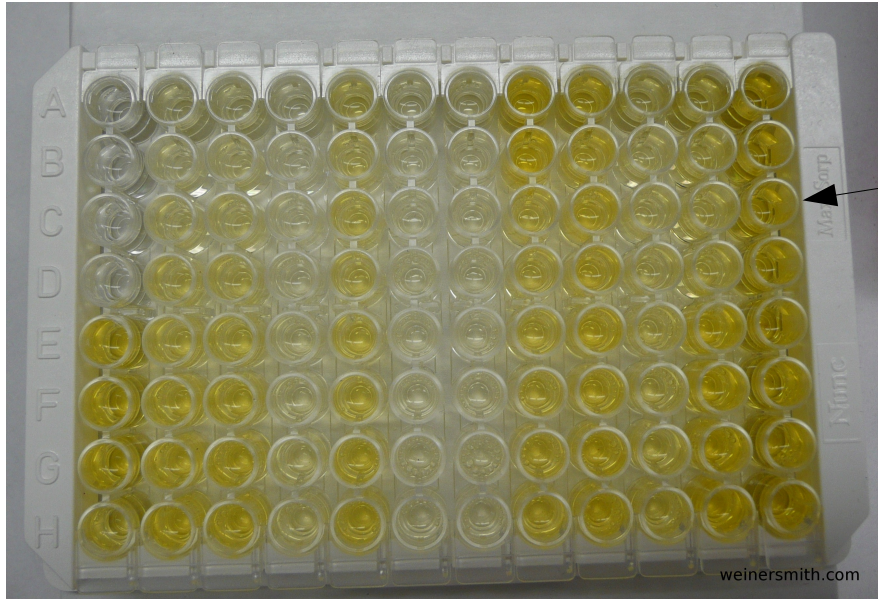
ELISA

- Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
- **jedna z nejpoužívanějších metod k detekci antigenů i protilátek**
- **možnost automatizace a vyšetření velkého počtu vzorků** naráz (obvyčně 96-jamkové destičky, jeden pacient má jeden důlek)
- k dispozici **soupravy k průkazu Ag a Ab skoro proti všem mikrobům** v jednotlivých třídách Ig
- **nulové radiační nebezpečí** oproti radioizotopovým metodám → **malé nároky** na laboratoř a personál
- dnes již poměrně levná metoda

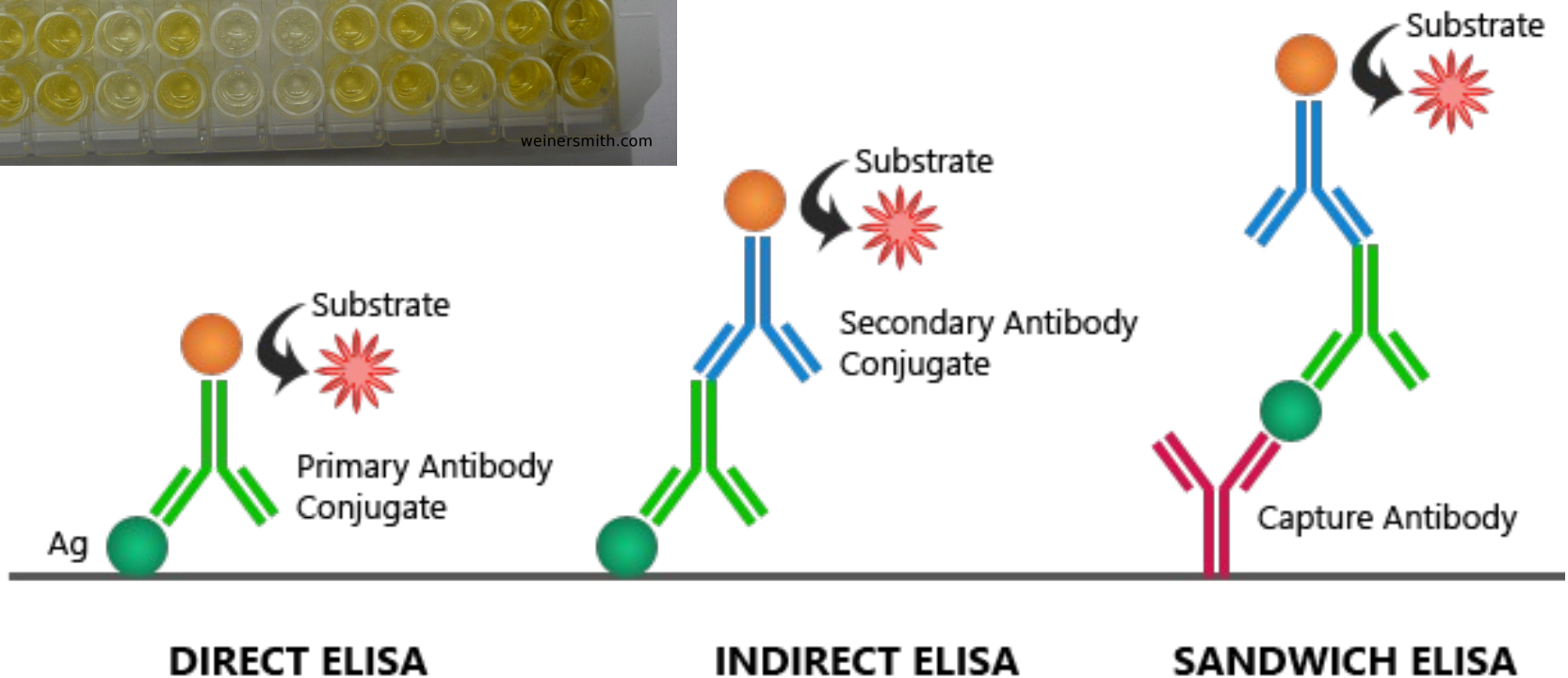
Konjugát

- jedná se o **protilátku proti protilátce**
- **protilátka proti druhově specifickým Ig** příslušného izotypu (proti IgG, IgM, IgA)
- biokonjugací je **na protilátku navázán enzym** (nejčastěji alkalická fosfatáza a křenová peroxidáza)

ELISA (2)

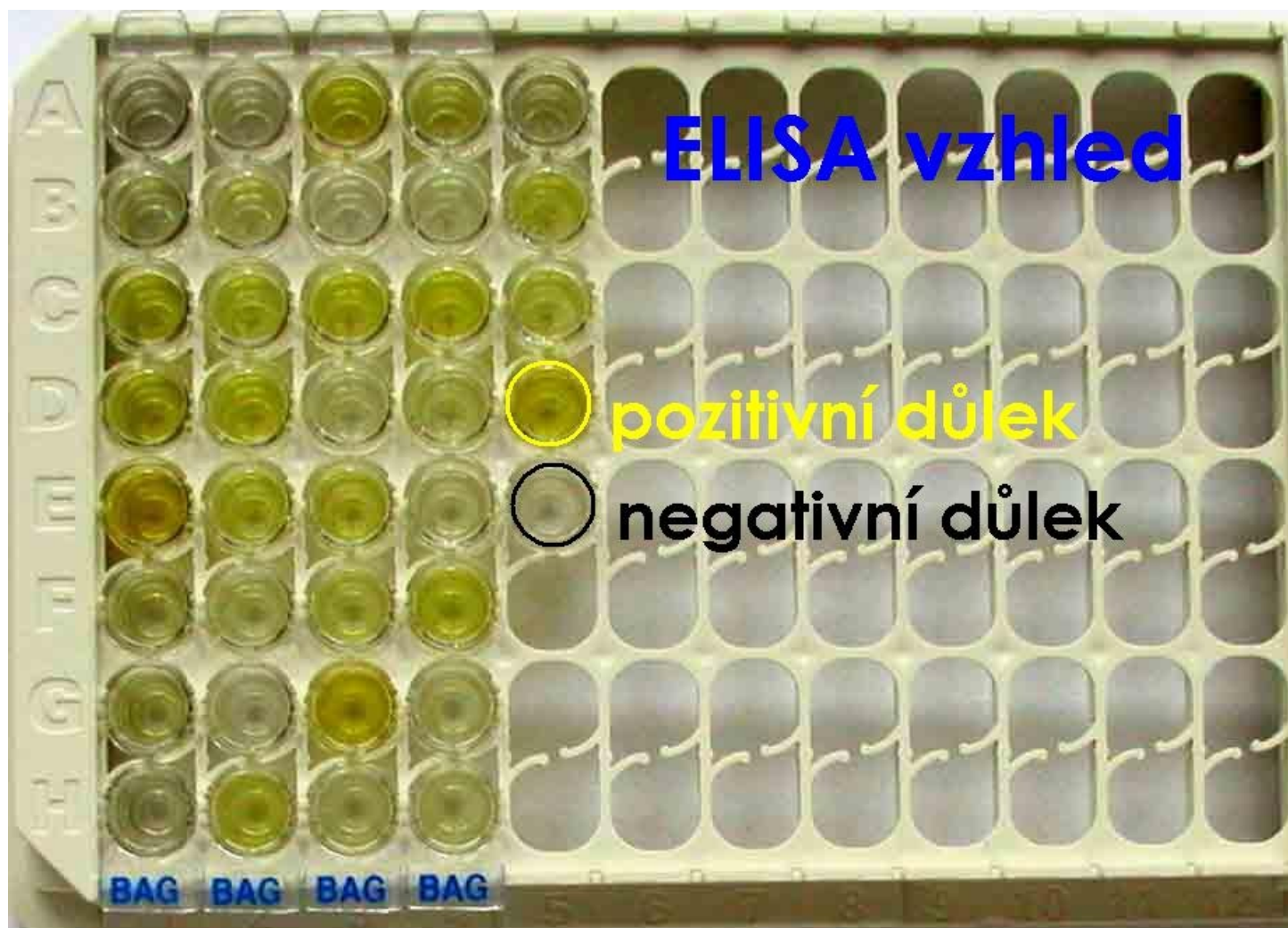


alkalická fosfatáza



ELISA (3)

- popište pozitivní a negativní reakci



Ověření avidity proilátek u pozitivního pacienta

- **avidní roztok = roztok urey**, který **rozrušuje vazbu Ag-Ab** (nízkoavidní Ab podléhají rozrušení vazby více → mohou být odstraněny v promývacím kroku)
- **možné vypočítat aviditu pomocí hodnot absorbance** v „normálním“ důlku (N) a důlku s avidním roztokem (Av)

index avidity: $Av/N \times 100$

- poté nalezneme index avidity

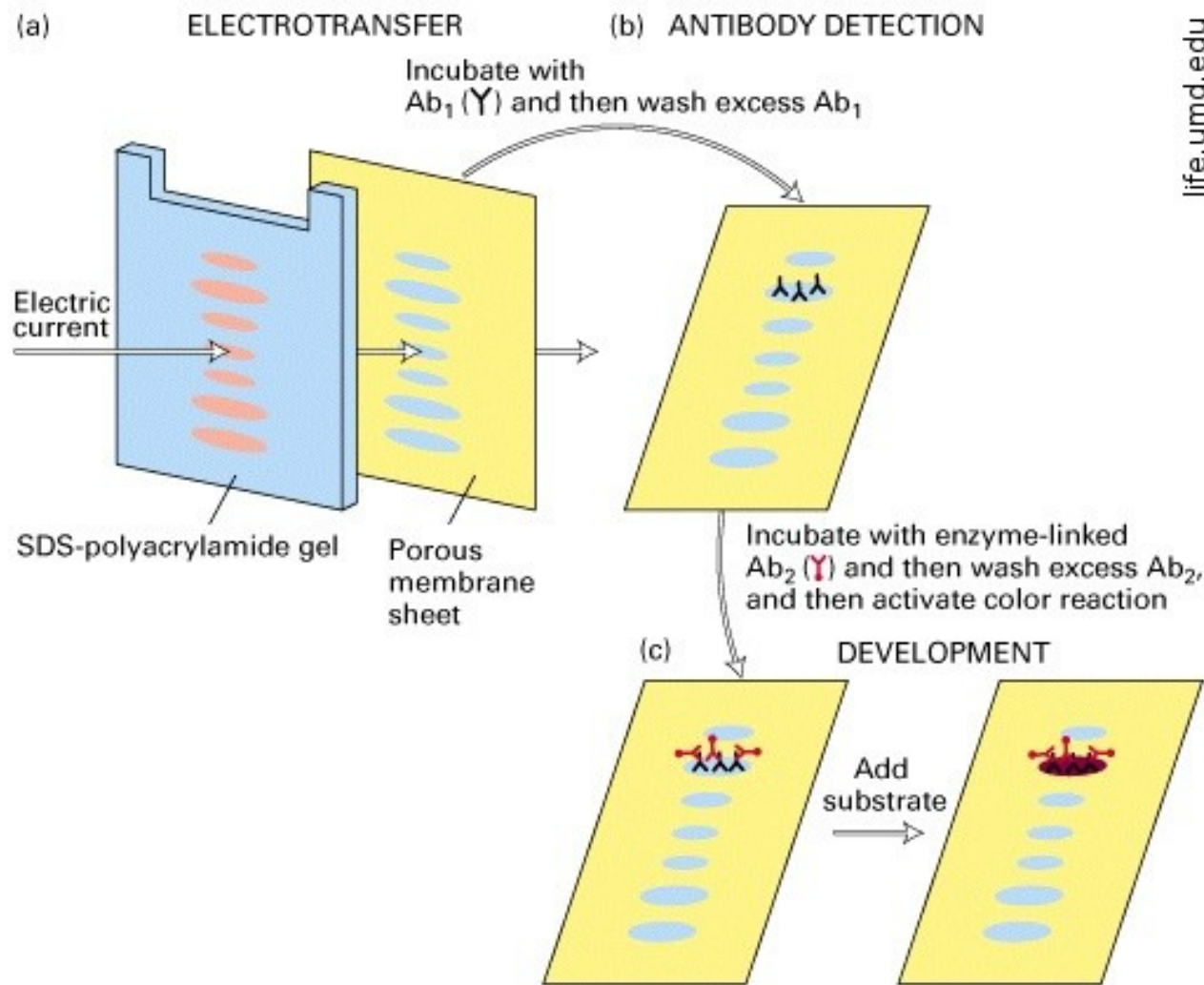
Western blot (imunoblot)

- **to blot = přesát (z agaru na nitrocelulózovou membránu)**
- slovní hříčka:
 - Southern blot = analýza DNA (Edwin Southern)
 - Northern blot = analýza RNA
 - **Western blot = analýza proteinů**
 - Eastern blot = detekce posttranslačních modifikací
- technika přípravy hrubé směsi antigenů
- **elektroforetické rozdělení (SDS-PAGE): antigeny** jsou nejdříve za pomoci detergentu (SDS) **rozděleny** v polyakrylamidovém gelu (PAGE) podle mol. hmotnosti

Western blot (2)

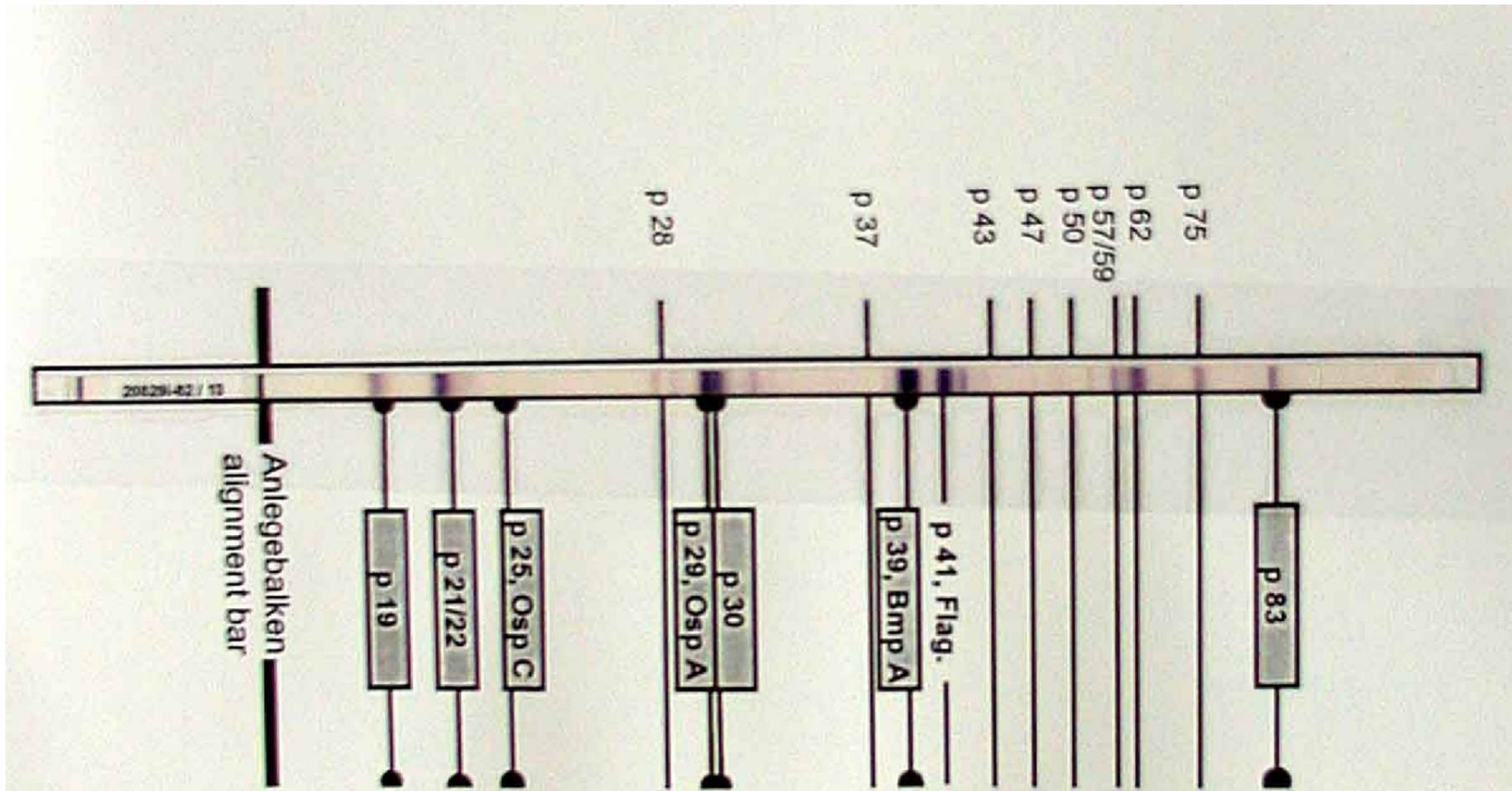
- po rozdělení elektroforézou SDS-PAGE získáme **gel s jednotlivými frakcemi** (polypeptidové proužky)
- **přesátí**: z gelu můžeme přesát proužky buď opět **elektroforeticky** nebo prostou **kapilaritou** (starší již málo používaná metoda, časově náročná)
- **blokování**: zbylá místa na membráně je třeba **vyblokovat** (membrána váže proteiny!) levným **proteinem** (BSA, kasein → zředěné odstředěné mléko)
- **detekce**:
 - na membráně jsou **rozdělené Ag** → **metoda slouží jen k detekci protilátek**
 - **postupujeme jako při reakci ELISA**

Western blot (3)



Western blot (4)

- vzhled proužku s přiloženou šablonou



Imunoblotty (vyhodnocení)

- jsou-li přítomny **alespoň dva specifické pruhy** (zvýrazněné na šabloně) hodnotí se jako pozitivní
 - výjimky např. u borreliových infekcí:
 - 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)

Imunoblotty (vyhodnocení) (2)

- u moderního typu blotů se používají **rekombinantní antigeny**, který jsou umístěny na povrch proužků speciální technologií (místo SDS-PAGE)
- **imunoblot se umístí do skeneru** a vyhodnotí se stupeň „tmavosti“ pomocí speciálního **software**
- možnost klasického vizuálního hodnocení
- vyhodnoťte pozitivní kontrolu (předpokládá se, že bude pozitivní pro borreliózu, ne nutně anaplasmózu), negativní kontrolu a vzorky číslo 1 až 7

Imunoblotty (vyhodnocení) (3)

TestLine s.r.o. Křížkova 68, Brno 612 00, tel./fax. 541 243 390 IMUNOBLOT II V.3

PROTOKOL S VYOBRAZENÍM VALIDAČNÍHO STRIPU
PROTOCOL WITH VALIDATION STRIP

BLOT-LINE Borrelia/HGA IgM

Kontrolní linie
co
Start

p41

p39

OspC Ba
OspC Bg
OspC Bs

p44,
Anaplasma

Strip č./ No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
Vzorek Sample																					
p41 Ba																					
p39 Ba																					
OspC Ba																					
OspC Bg																					
OspC Bs																					
Hodnocení Interpretation Borrelia																					
p44 - A. phagocytophila																					
Hodnocení Interpretation Anaplasma																					

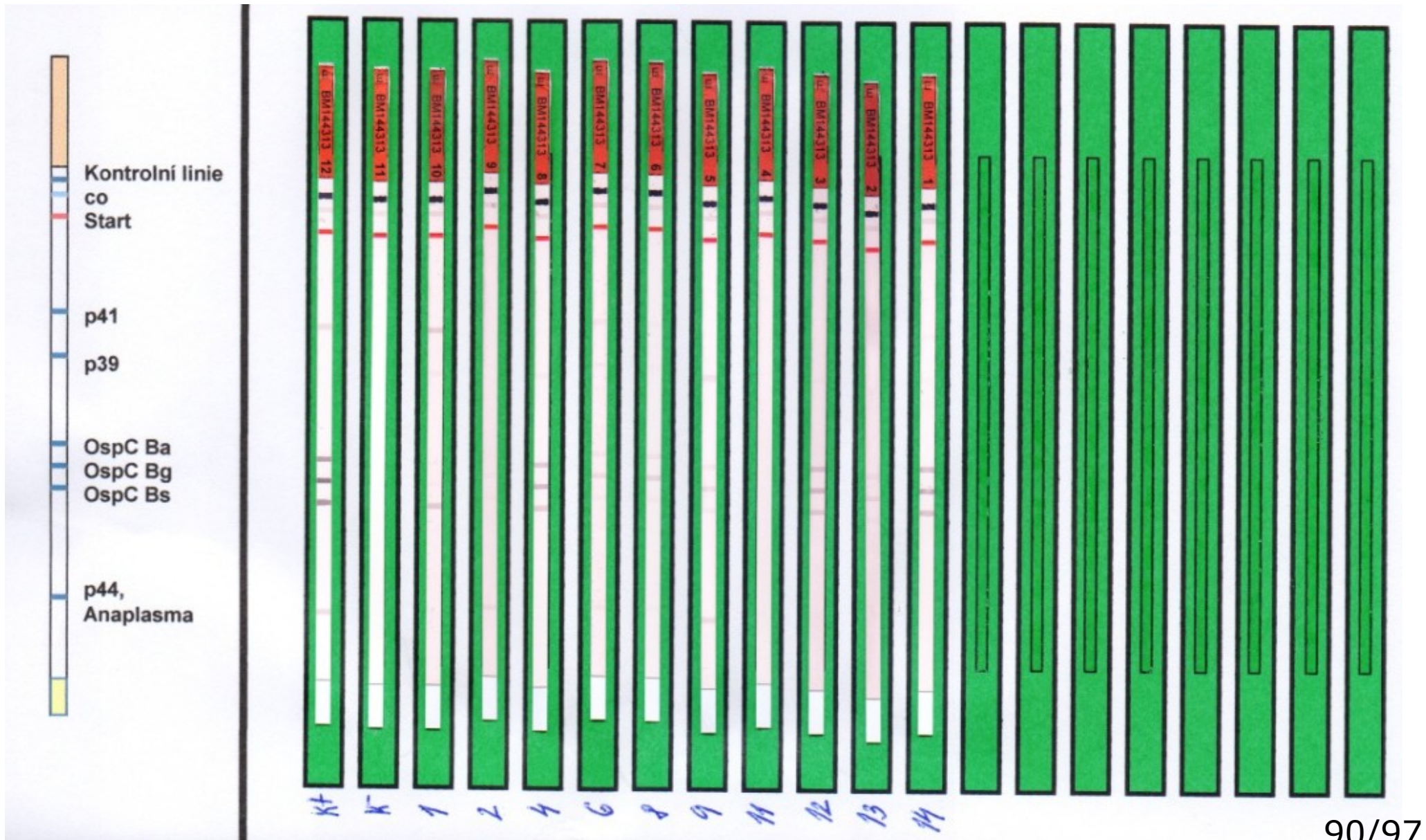
Hodnocení specifických linií Borrelia	Specifické Ag linie: p41 Ba, p39 Ba		
	2 pozitivní linie	1 pozitivní linie nebo 2 slabé	žádná linie nebo 1 slabá
OspC	výrazné pozitivní	pozitivní	pozitivní
	slabé pozitivní	pozitivní	hraniční
	bez linie	pozitivní	negativní

Použité komponenty Components	Sarže - Batch
Souprava / Kit	
BL stripy / BL Strips	
Univerzální roztok / Universal Solution	
Pozitivní kontrola / Positive Control	
Negativní kontrola / Negative Control	
Konjugát IgM/AP / Conjugate IgM/AP	
Substrátový roztok BCIP/NBT / Substrate Solution BCIP/NBT	

Datum provedení (Date of Performance): 21.3.2014

Test provedl (Performed by): *Jan*

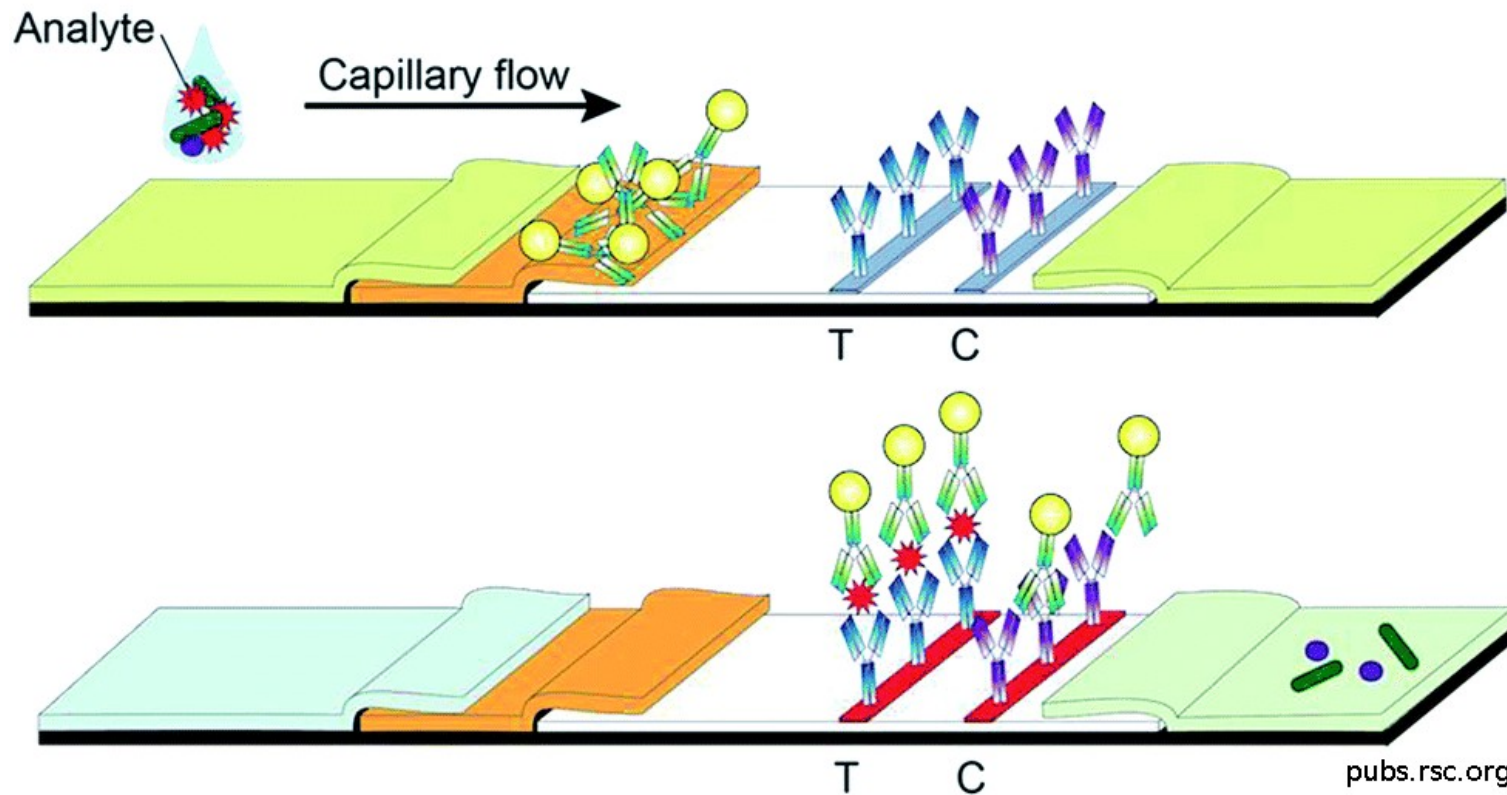
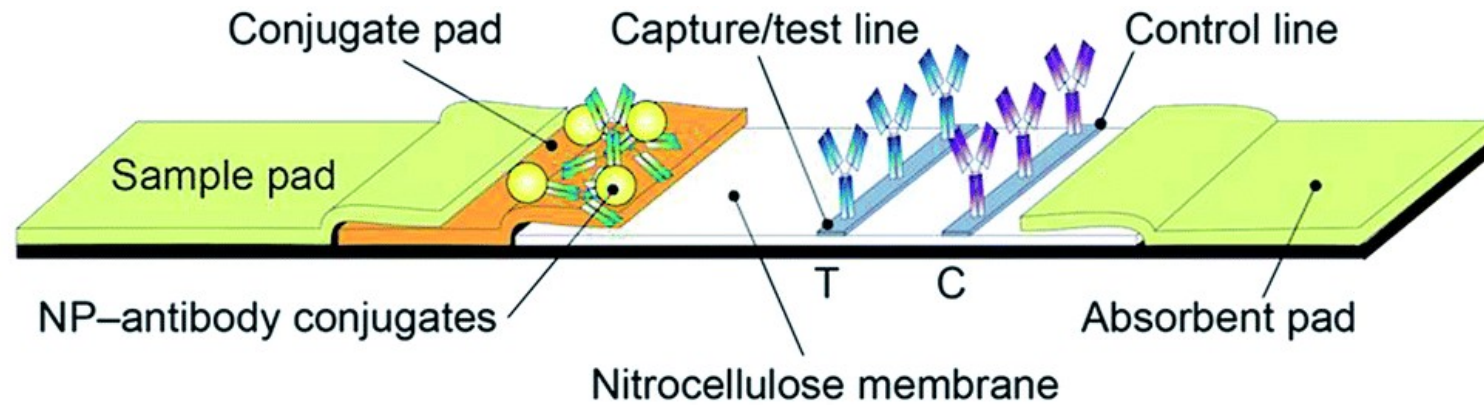
Imunoblotty (vyhodnocení) (4)



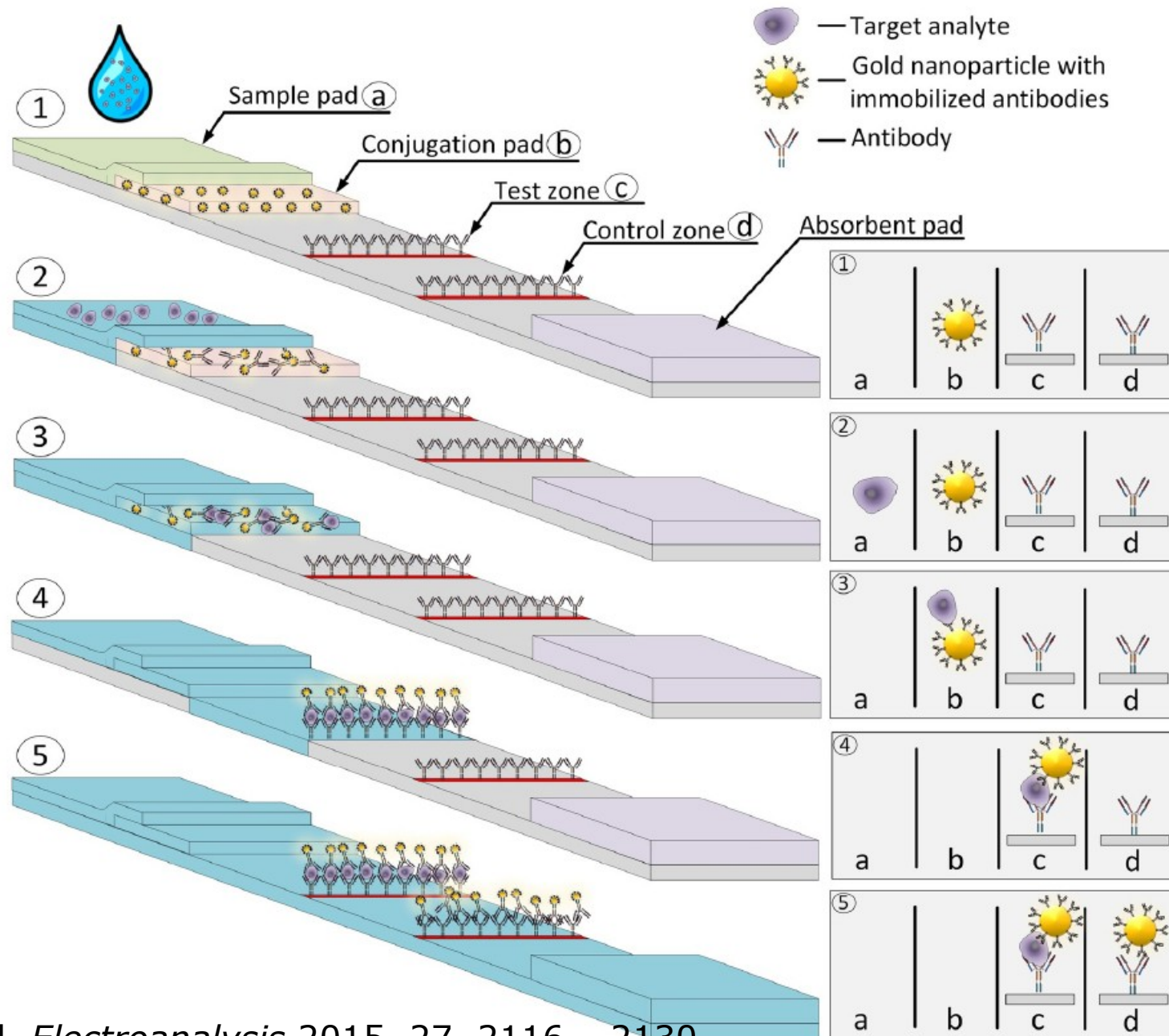
Imunochromatografické testy

- **jednoduše použitelná** „zařízení“ pro odhalení příslušného analytu (detekce patogenních mikroorganismů, jejich toxinů apod.)
- funguje na principu kapilarity (není potřeba promývat), kdy analyt cestuje porézní vrstvou, promíchá se s konjugátem a prochází přes testovací a kontrolní zónu
- **nitrocelulózová membrána**, na které jsou **imobilizovány Ab** tvořící **testovací a kontrolní zónu**
- dále jsou obsaženy **tři různé podložky**:
 - pro aplikaci vzorku
 - konjugát (Ab-částice; koloidní zlato, latex, uhlík, ...)
 - absorpční (napomáhá vzlínání vzorku)

Imunochromatografické testy (2)

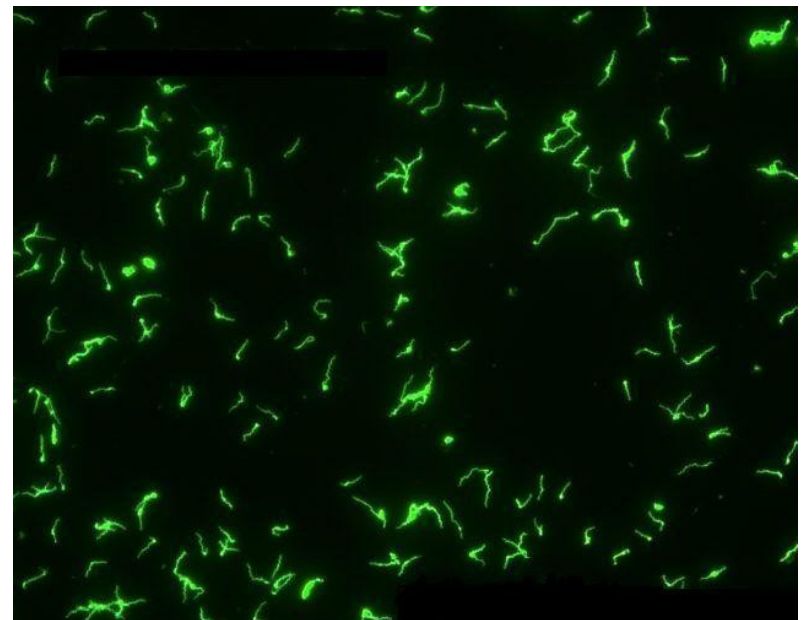
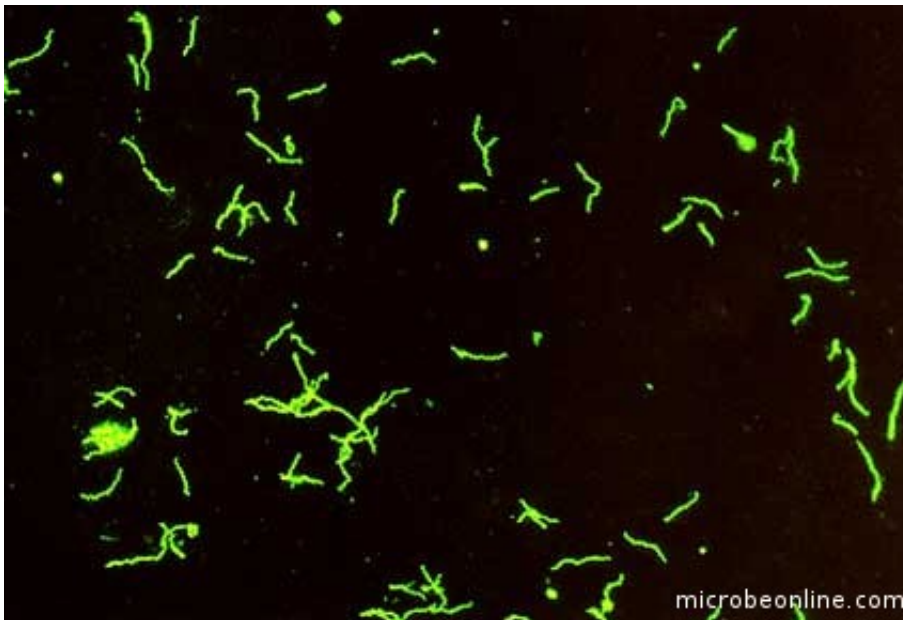


Imunochromatografické testy (3)



Úkoly 6 a 7: Přímá a nepřímá IMF

- **popište jak vypadá výsledek** přímé a nepřímé IMF
- doplňte do schématu, která část je **antigen, protilátka, sekundární protilátka a značka**
- **červeně** vybarvěte složku **získanou od pacienta**, **modře** vybarvěte složky **dodané laboratoří**



Po tomto cvičení byste měli umět:

- diskutovat rozdíl mezi přímými a nepřímými metodami
- popsat co je to antigen a co protilátka, včetně vhodných příkladů v oblasti mikrobiologie
- popsat obecný princip serologických reakcí
- popsat precipitaci, aglutinaci a aglutinaci na nosičích, včetně příkladů

Po tomto cvičení byste měli umět:

- vysvětlit, co je to titr a dynamika titru, včetně konkrétních případů, na kterých vysvětlíte o jaké stádium onemocnění se jedná
- vysvětlit, jakou roli má komplement v imunitních dějích a které vlastnosti komplementu využívá serologie ve svých metodách
- vysvětlit princip KFR, včetně objasnění možností vzniku falešné positivity a negativity a opatření, které laboratoř činí, aby jim zabránila
- vysvětlit rozdíl mezi aglutinací a neutralizací a uvést neutralizační metody používané s serologií
- diskutovat význam ASLO, včetně jeho provedení

Po tomto cvičení byste měli umět:

- vysvětlit úlohu jednotlivých tříd protilátek
- vysvětlit pojmy afinita a avidita včetně možností uplatnění v diagnostice
- vysvětlit principy metod se značenými složkami a jejich využití v diagnostice
- popsat rozdíly mezi přímým a nepřímým uspořádáním metod se značenými složkami