

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)

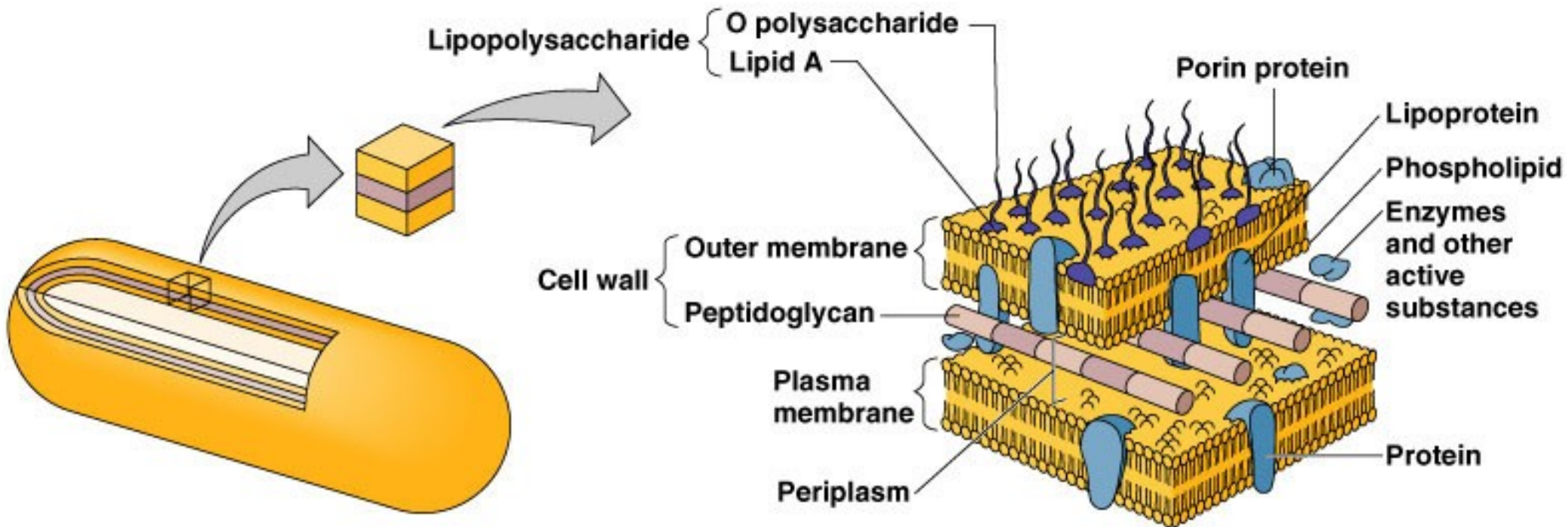
Nepřímé metody - přehled

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

Antigeny

- **látka navozující produkci protilátek**
- **vázán** do vazebného místa **protilátky**
- **proteiny a sacharidy jsou imunogenní** (stimulují specifickou imunitu)
- **lipidy a nukleové kyseliny jsou neimunogenní** hapteny (imunogenní pouze jako konjugát 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

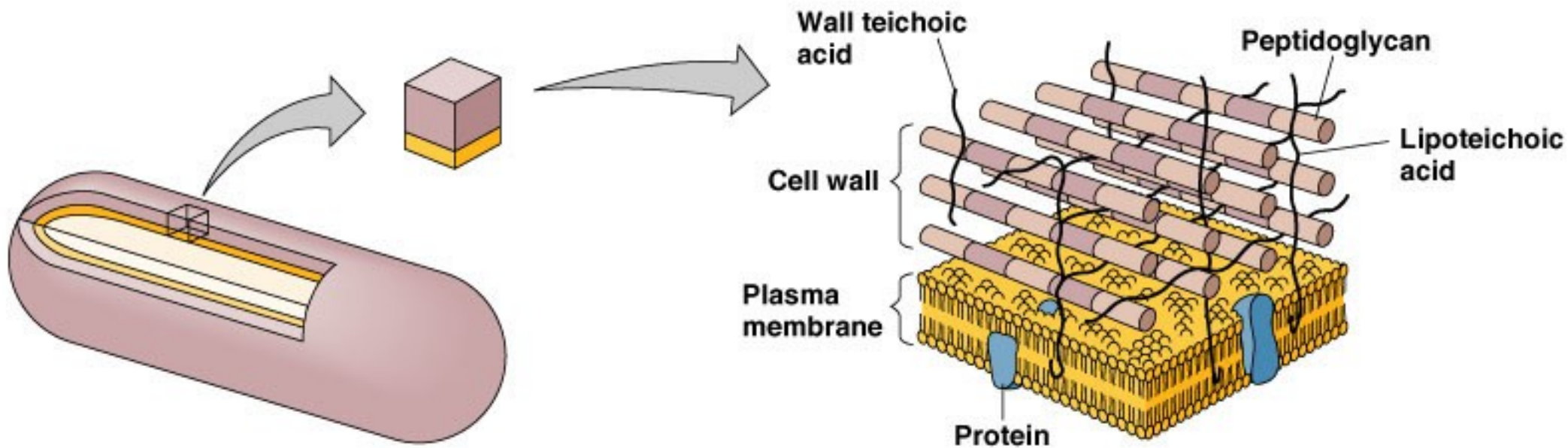
Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

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

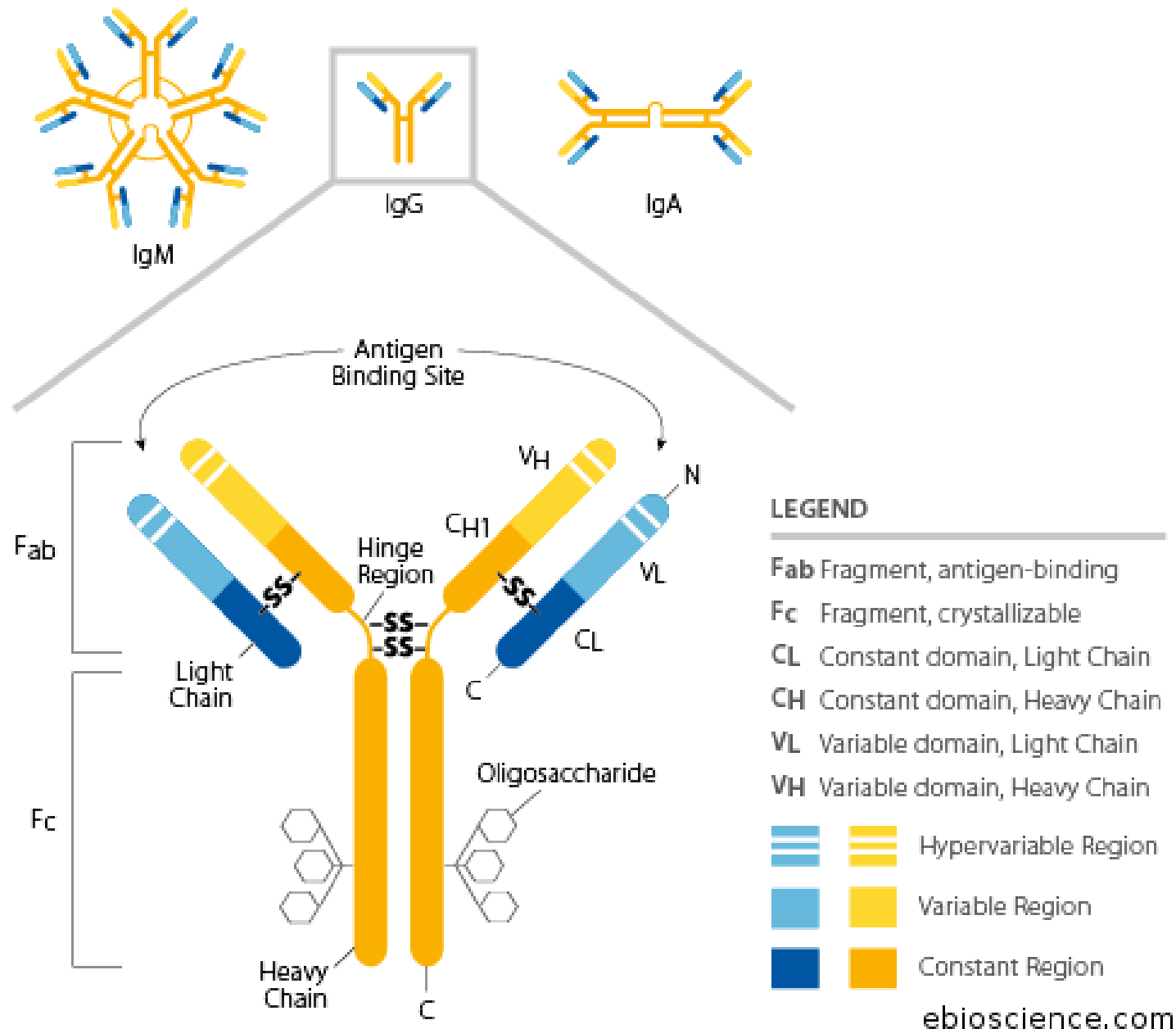
Lipoteichoové kyseliny

- **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 časné 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

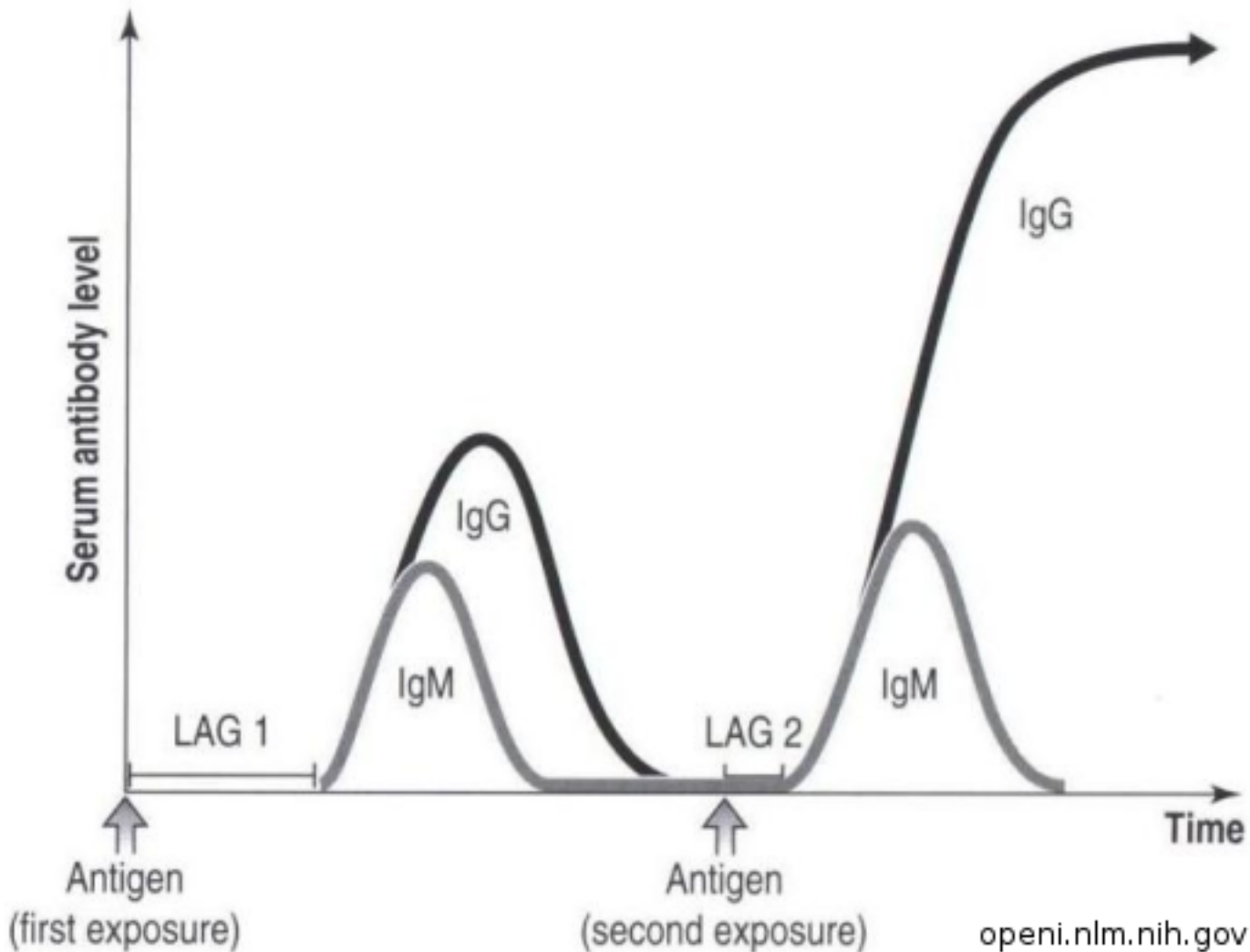
- všechny pracují s **vazbou antigenu a protilátky**, které spolu **tvoří komplex**
- liší se pouze způsob detekce komplexu Ag-Ab
- **průkaz antigenu** laboratorní protilátkou:
 - **přímý průkaz**
 - **detekce antigenu ve vzorku od pacienta, identifikace/antigenní analýza kmene mikroba**
 - laboratorní 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

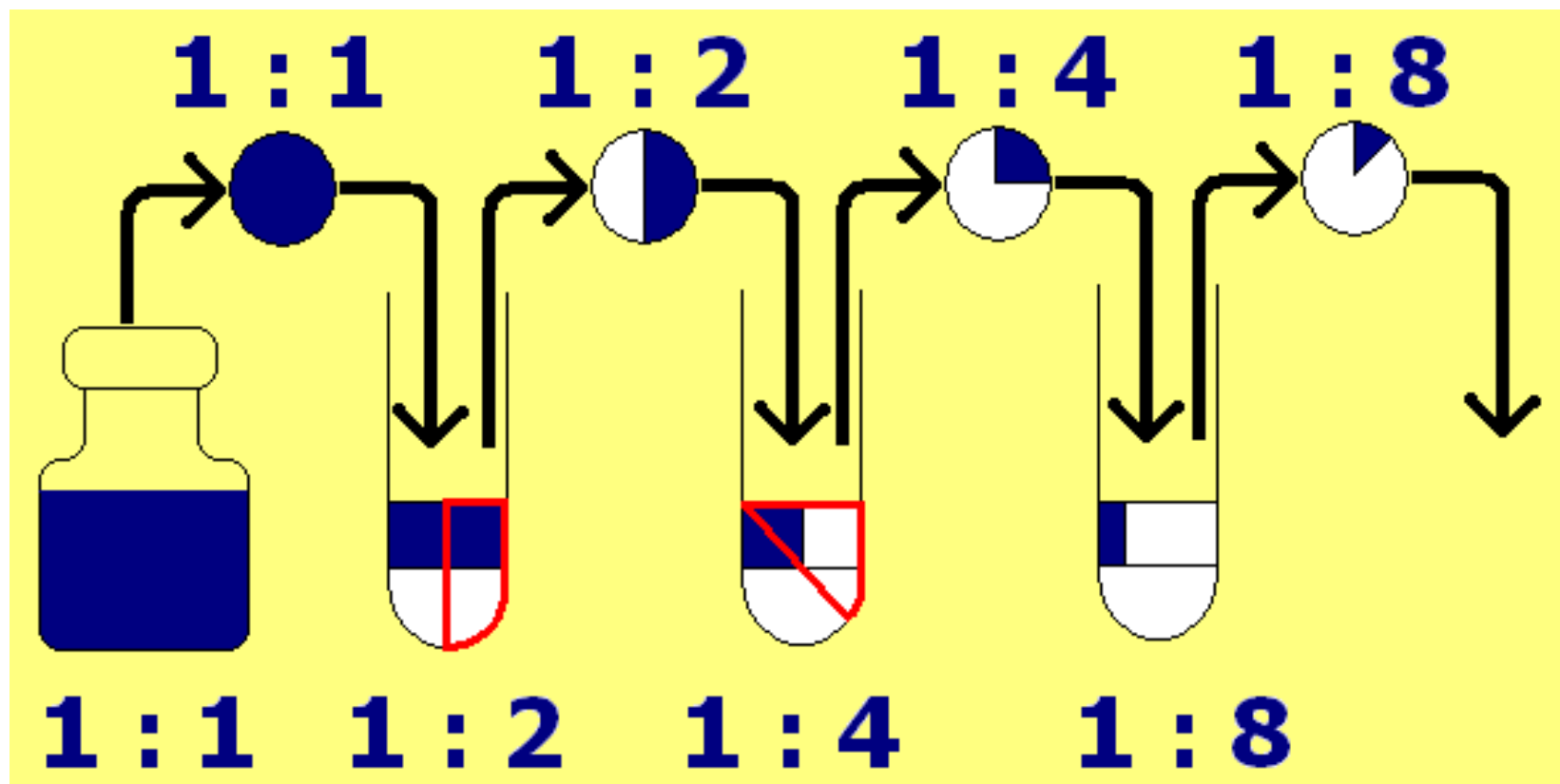
- **technicky nejjednodušší způsob**, jak ředit sérum pacienta
- nejčastěji použití **geometrické řady s koeficientem 2**
- vycházíme z neředěného séra, nebo ze séra o určitém předředění (např. 1:5, 1:10, 1:50 apod.)
- **v každém z dalších důlků je sérum dvojnásobně zředěno oproti předchozímu: neředěné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

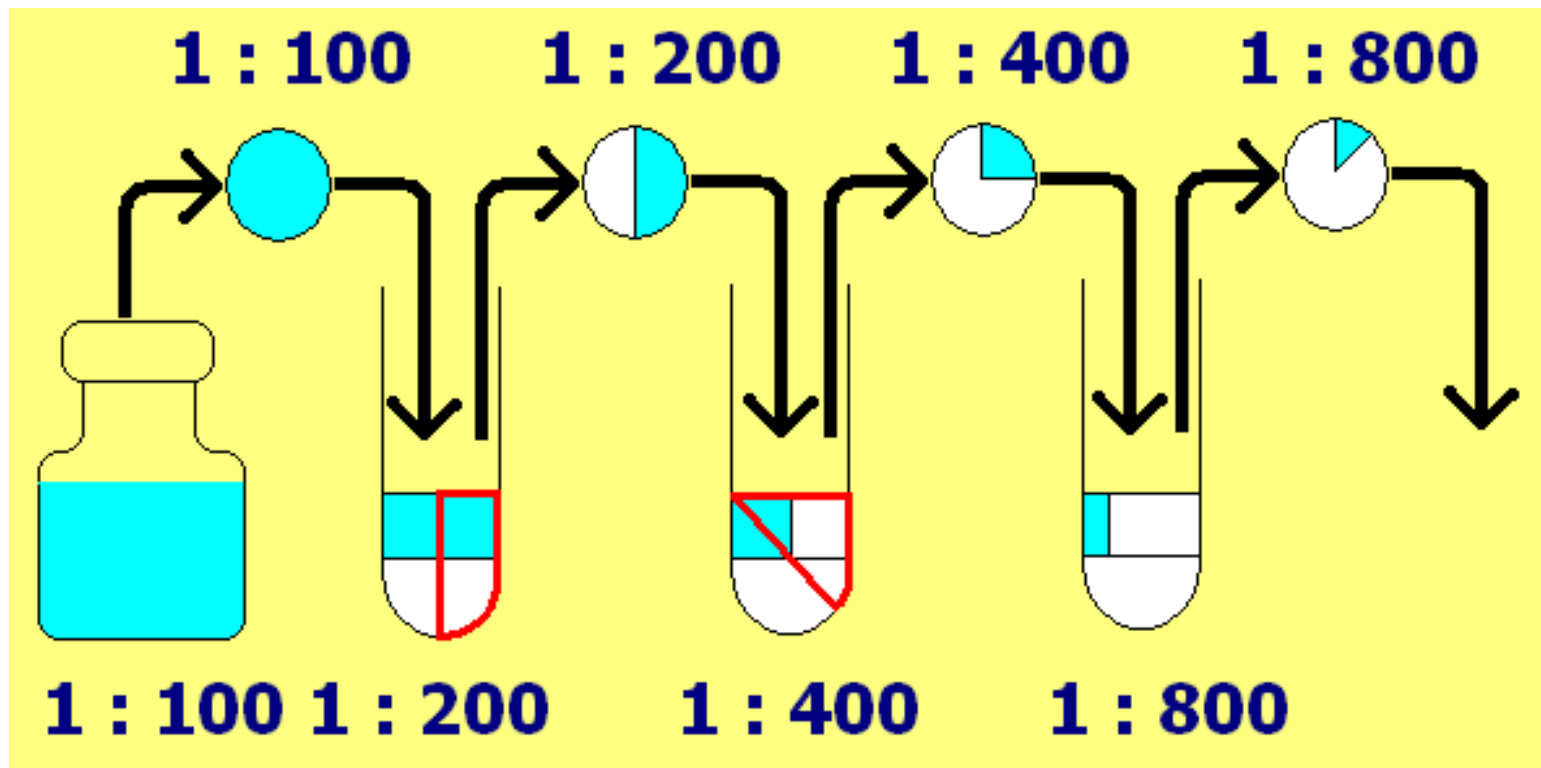
Geometrická řada

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



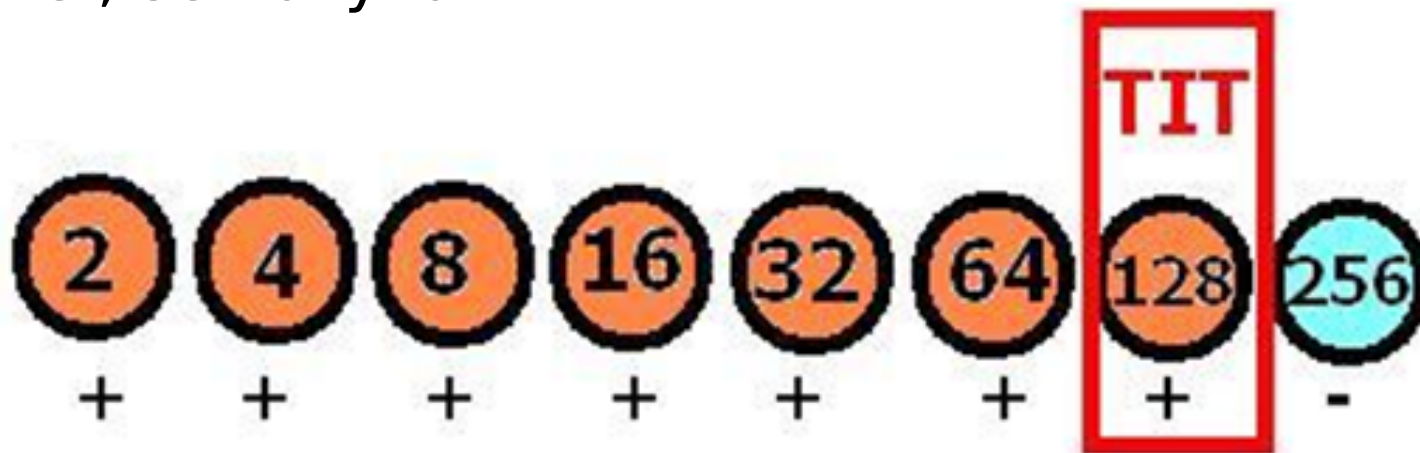
Geometrická řada (2)

- **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

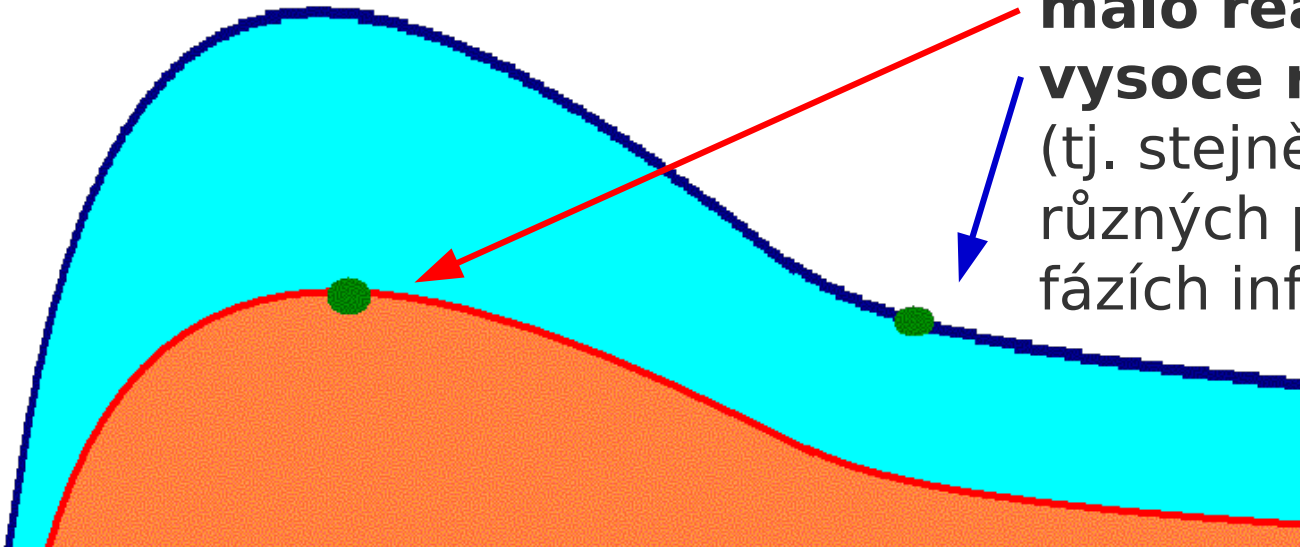
- **po naředění séra** pacienta podobně jako v úkolu 1 **přidáme antigen**
- v závislosti na konkrétním typu reakce buď přímo **vidíme výsledek reakce** (aglutinát, precipitát), **nebo** ho **musíme znázornit** přidáním dalších složek (např. komplementu, červených krvinek apod.)
- **nejvyšší ředění séra**,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

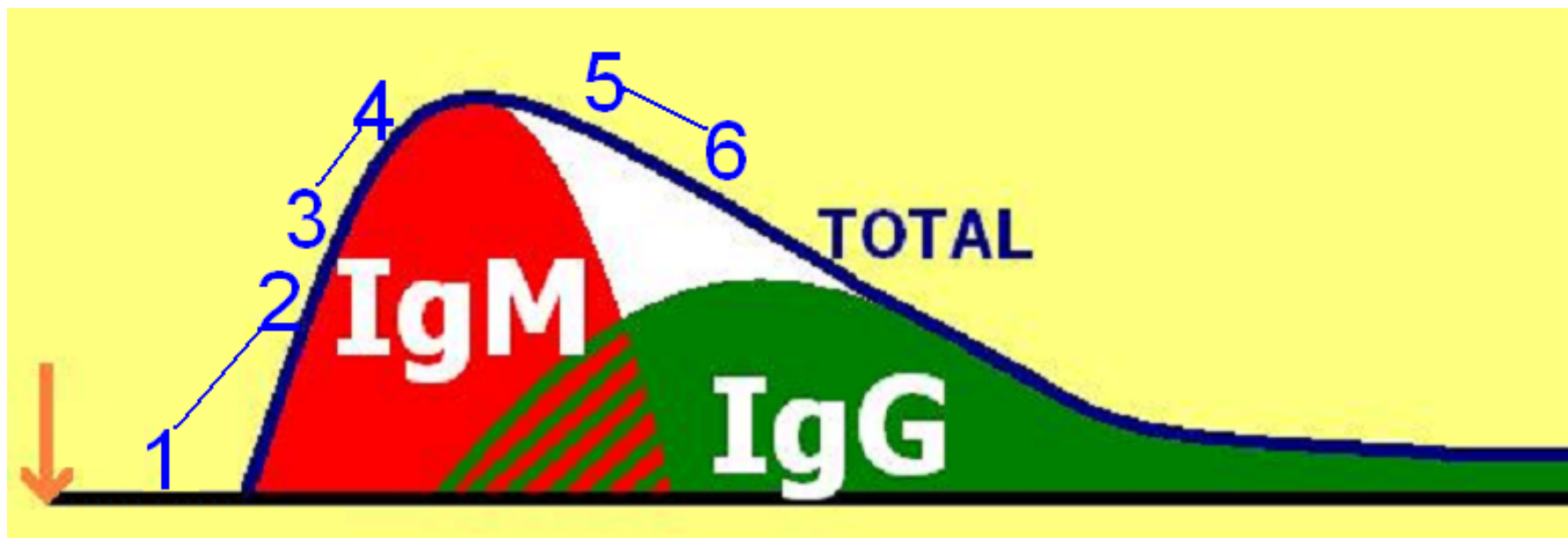


Titř protilátek: dynamika titru

- 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**

Titr 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 nález ve druhém vzorku byl o jedno ředění vyšší než základní ředění (např. základní ředění 1:4, pozitivní nález ve 2. vzorku alespoň 1:8)

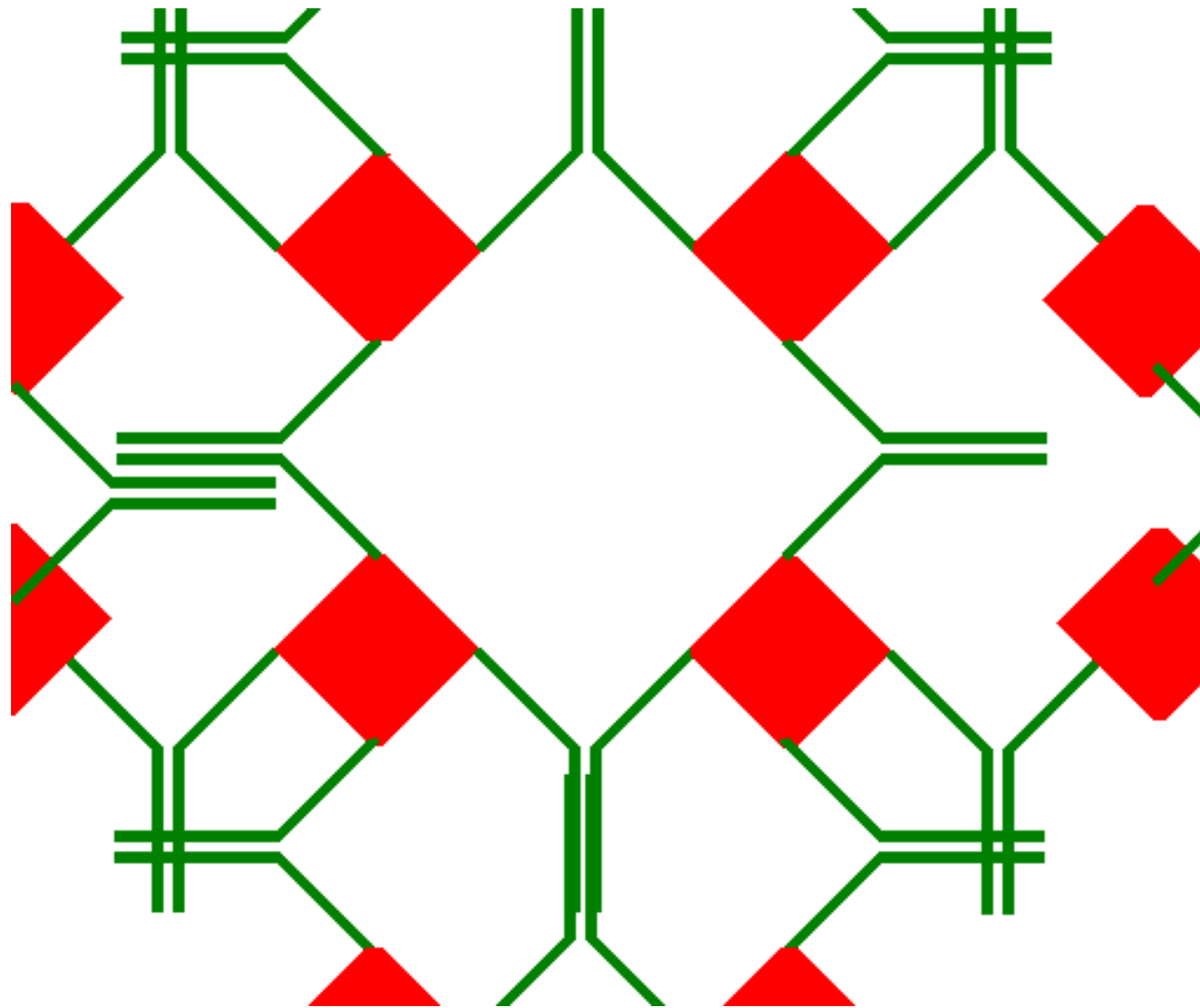
Společné vlastnosti precipitace a aglutinace

- 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 (!)** (relativní množství protilátek)

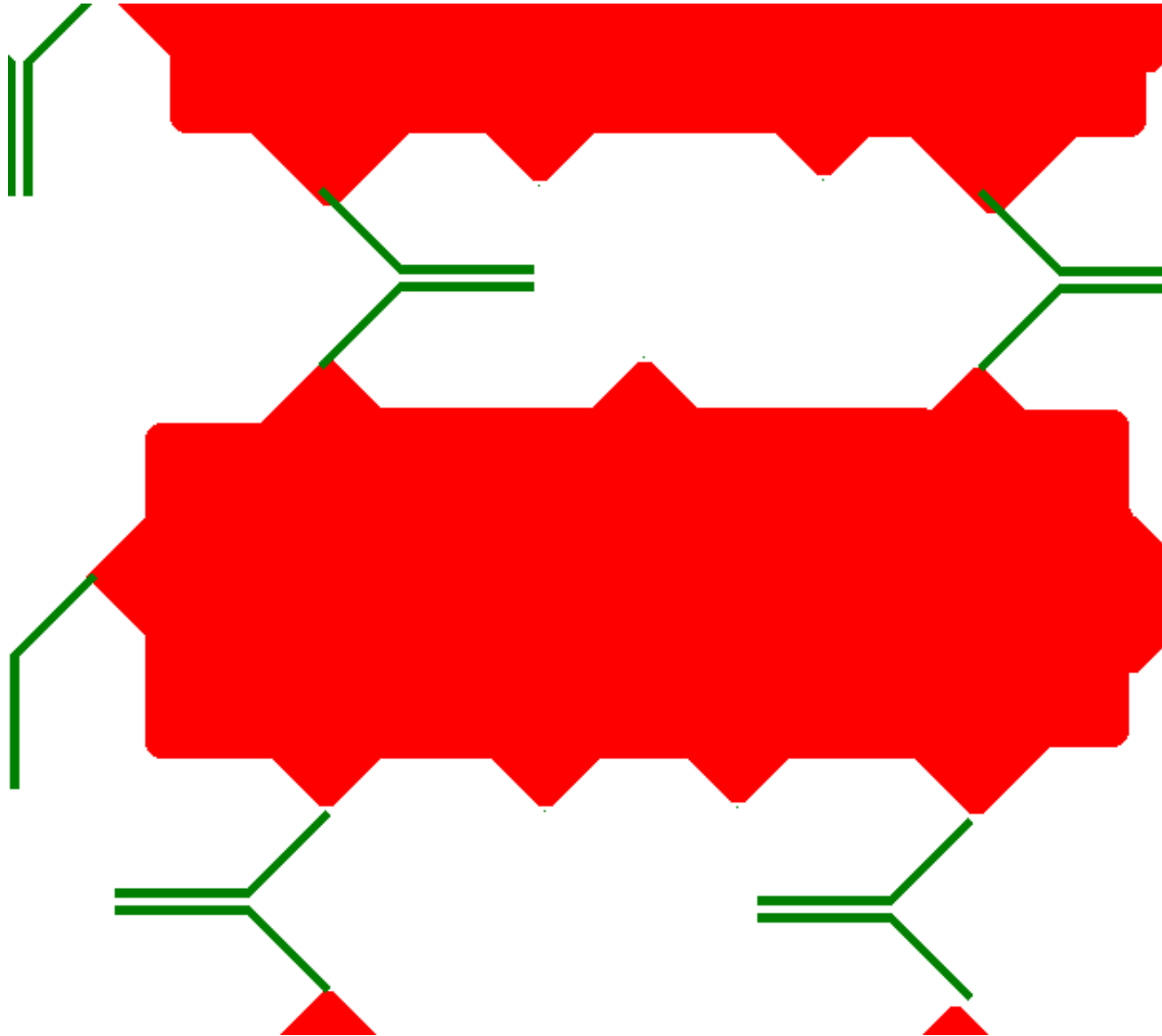
Precipitace, aglutinace, aglutinace na nosičích

- **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.)

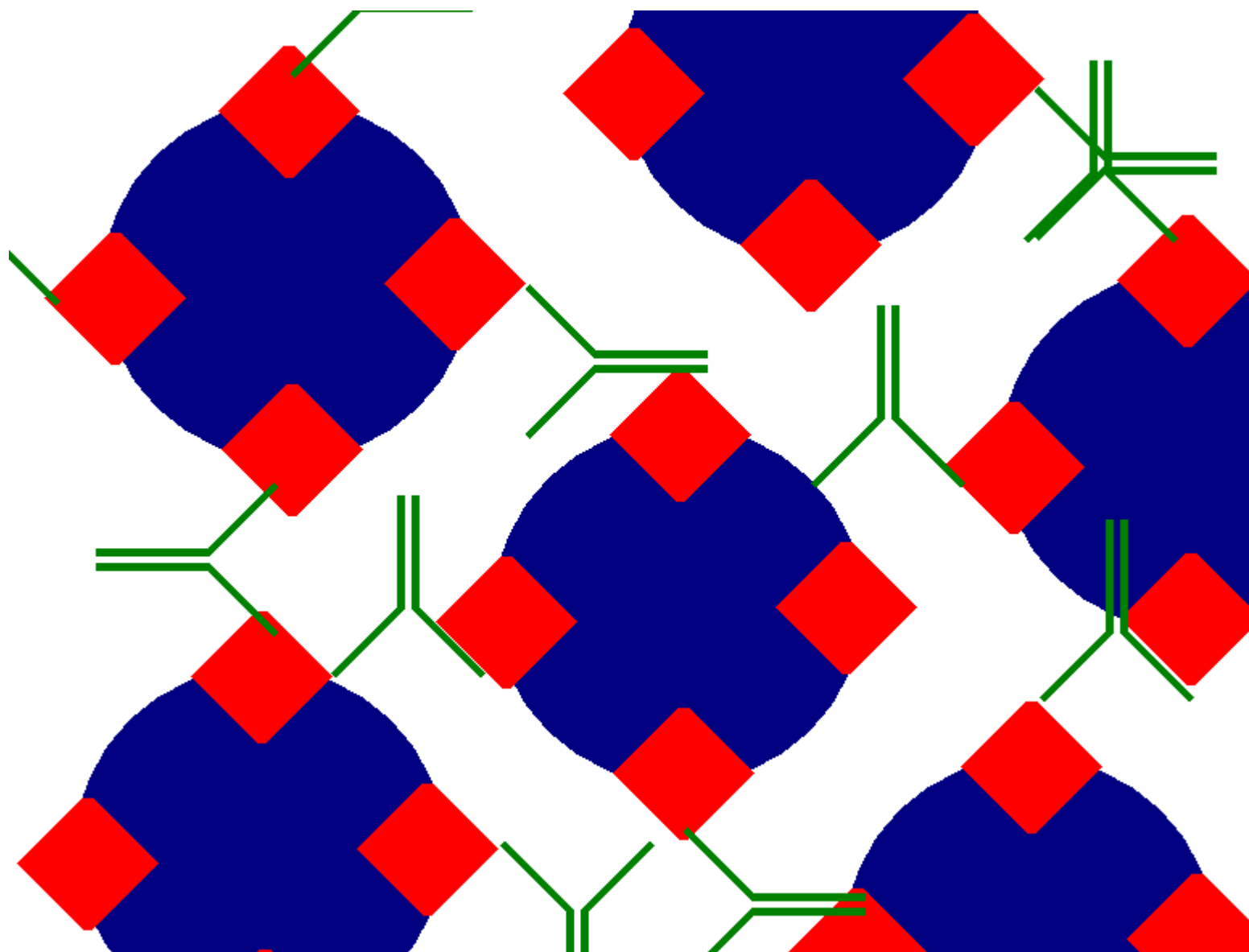
Precipitace



Aglutinace

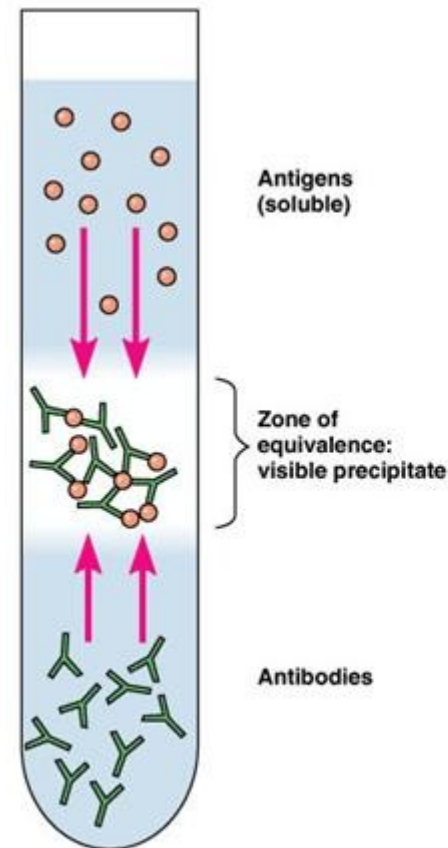


Aglutinace na nosičích



Prstencová precipitace k detekci antigenu *S. pyogenes*

- umožňuje zjistit, který z extraktů streptokoka obsahuje antigen *S. pyogenes*:
 - zvířecí **sérum s protilátkami**
 - **různé extrakty kmenů**
- **POZ: prstenec na styku tekutin**



(a)

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



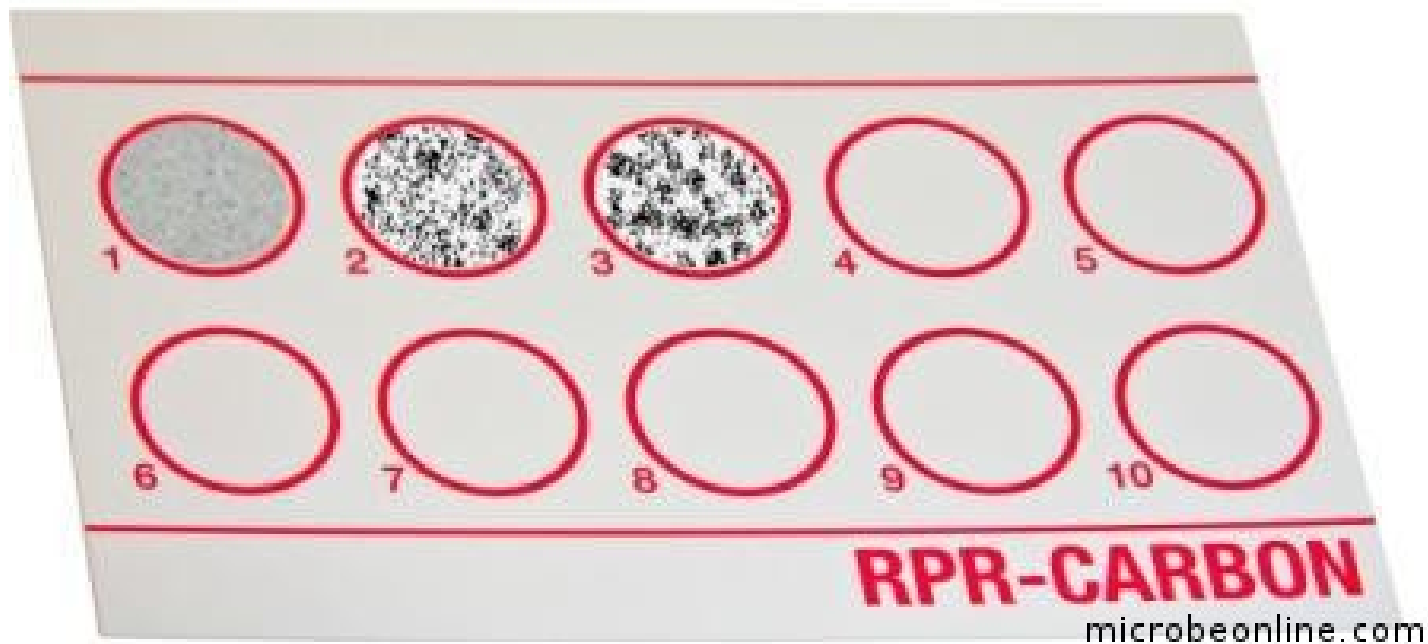
(b)

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

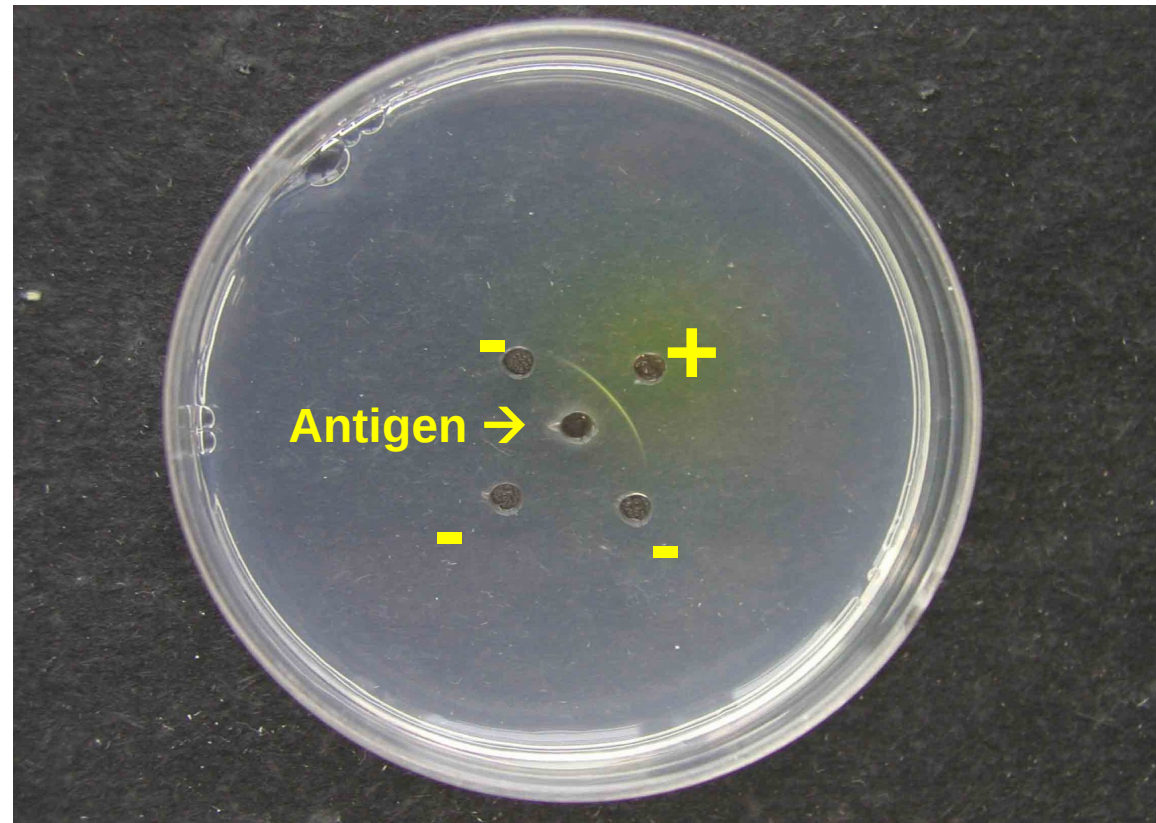


Precipitace v průkazu protilátek - RRR

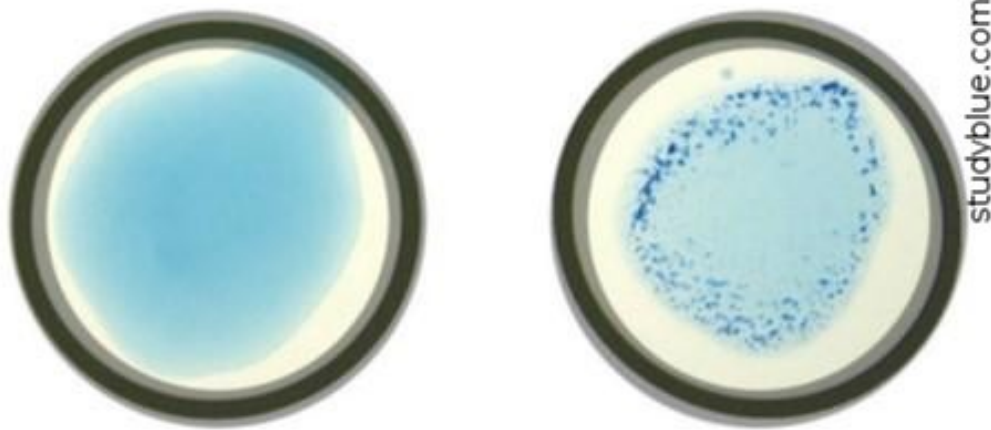
- detekujeme protilátky, které jsou pozitivní u syfilis, ačkoli **to nejsou protilátky proti *Treponema pallidum***
- protilátky proti kardiolipinu
- reakci provádíme **pouze kvalitativně**
- **první** důlek je **pozitivní** kontrola, **druhý negativní**, pak má **každý pacient jen jeden důlek**
- smíchá se vždy 0,05 ml séra + 0,05 ml kardiolipinu
- **RRR** může být **falešně pozitivní**, proto je **pozitivitu potřeba potvrdit** např. testem TPHA

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
- např. nepřímá diagnostika plicní aspergilózy



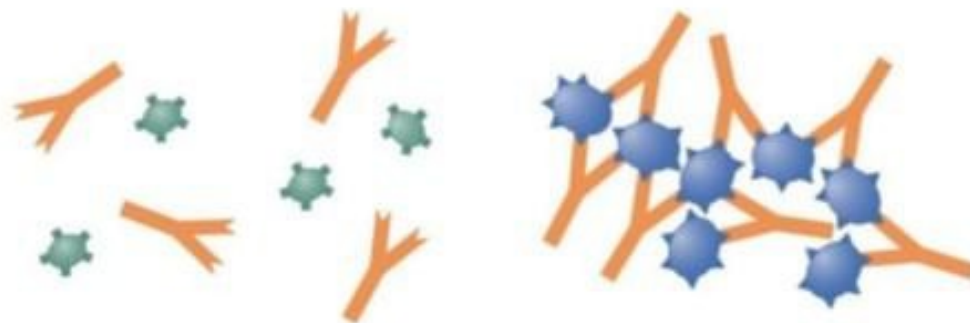
Aglutinace: demonstrace různých možností provedení



Negative result

Positive result

(a)

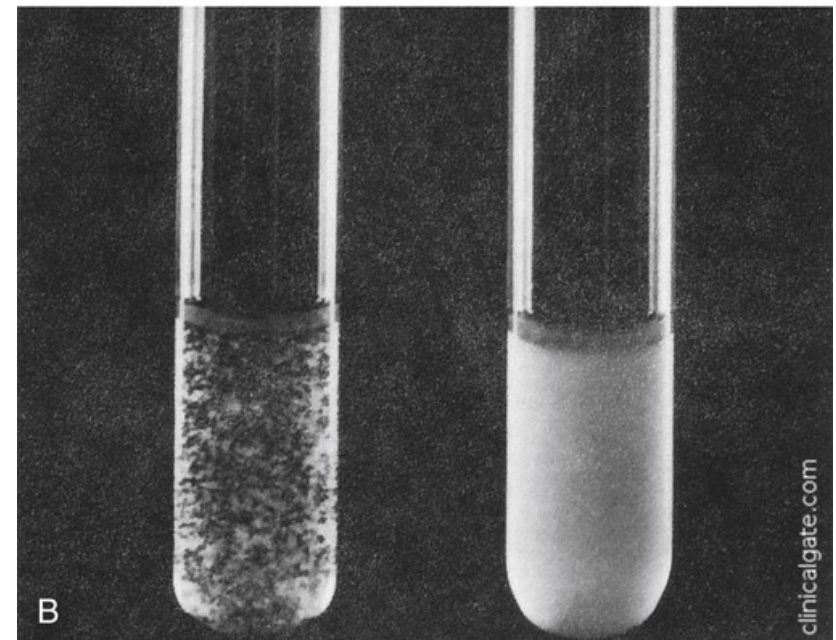
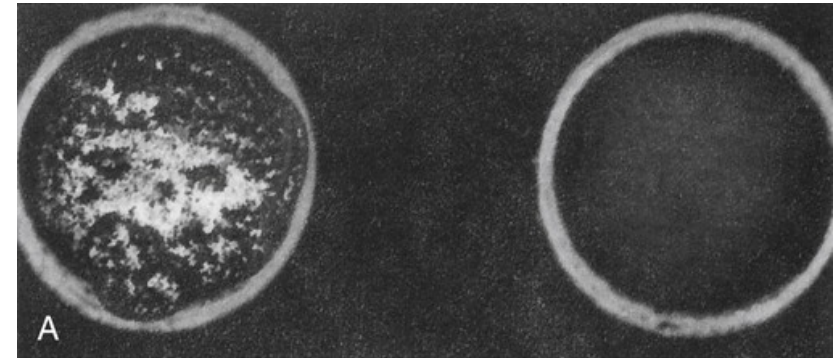


Negative result

Positive result

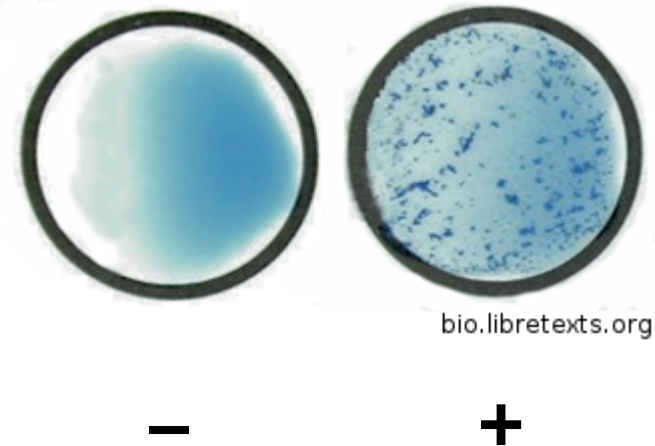
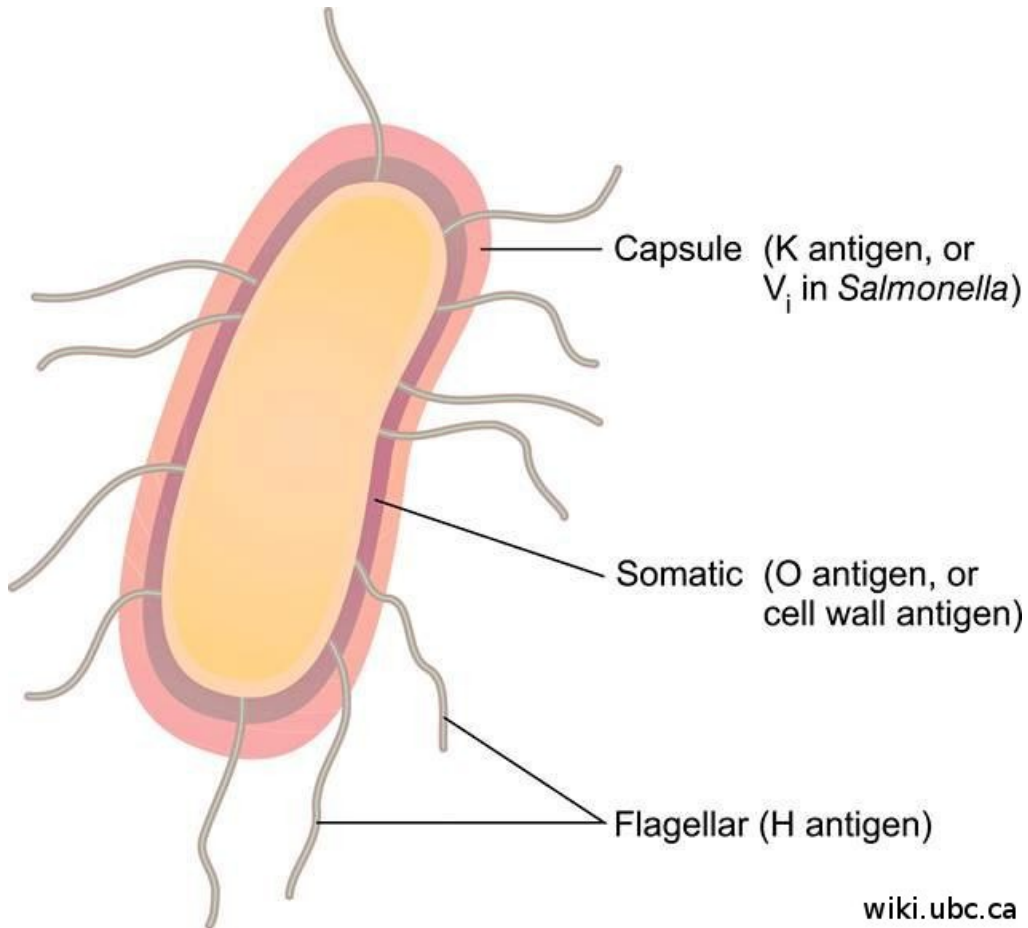
(b)

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



Aglutinace: antigenní analýza

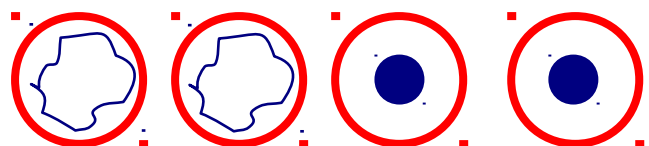
- **obyčejně u obligátních patogenů** (salmonely, shigely, yersinie) a u střevních izolátů *E. coli* při podezření na EPEC (děti do 3 let) nebo EHEC



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 zapište titer protilátek (pokud jsou přítomny)**, zakreslete výsledek

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

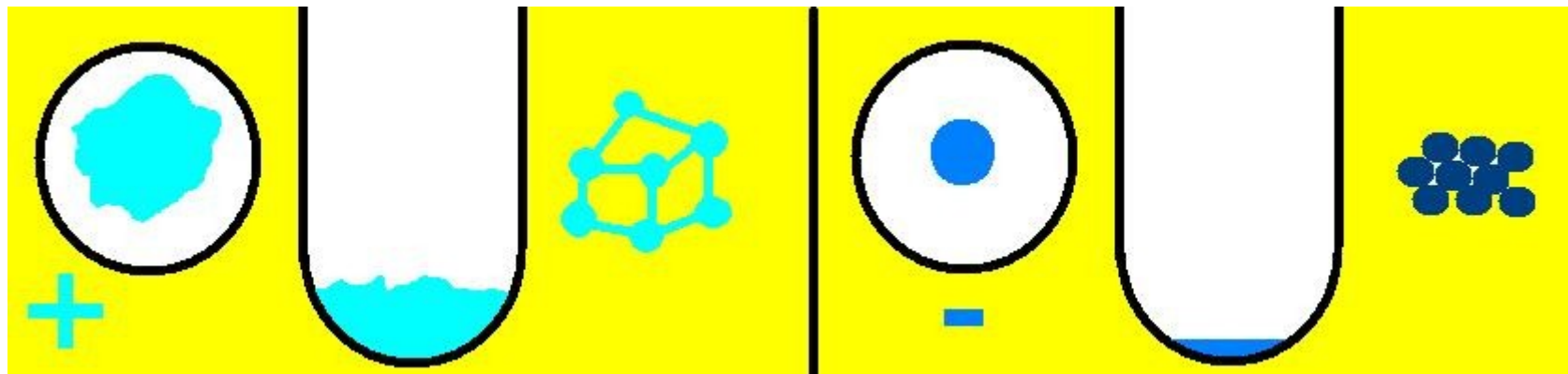
Č. 4 pozitivní, titr = 1 : 200

 Aglutinace

 Sedimentace volných bakterií

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)

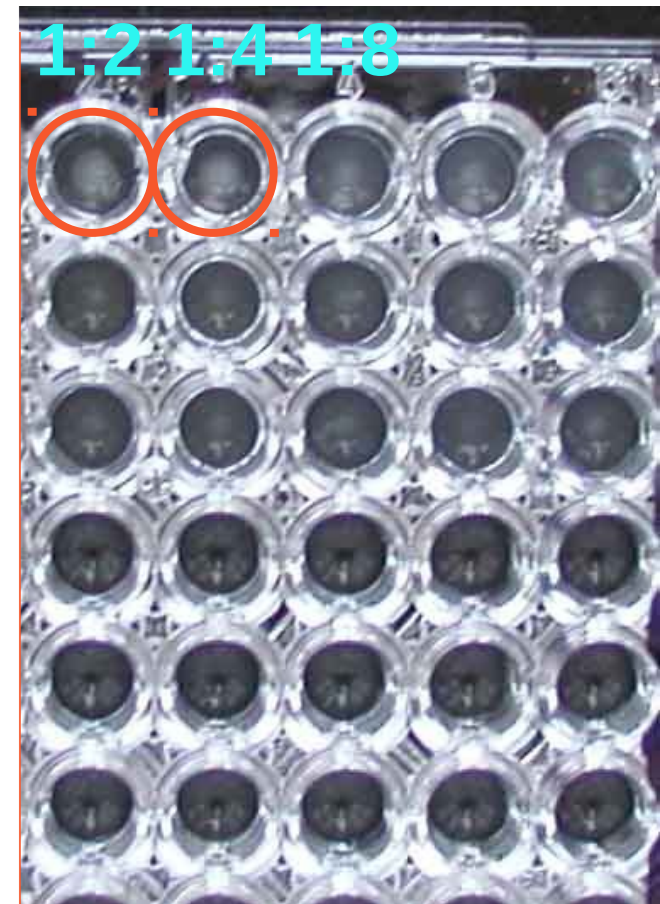


pozitivní

negativní

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

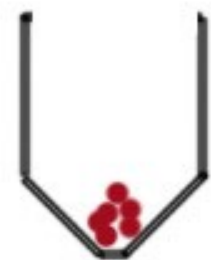


Treponema pallidum pasivní hemaglutinace (TPHA)

- **screeningový test syfilis**
- antigen *T. pallidum ssp. pallidum* Nichols (tzv. Nicholsův kmen) vázán na kuřecí erytrocyty → **aglutinace na nosiči**, nosičem je erytrocyt (odtud červená barva)
- **pozitivní reakce vznik mapovitého povlášku**
- **negativní reakce sedimentace** částic na dno důlku
- dnes se v tomto testu červené krvinky nahrazují polycelulózovými částicemi – zkratka TPPA

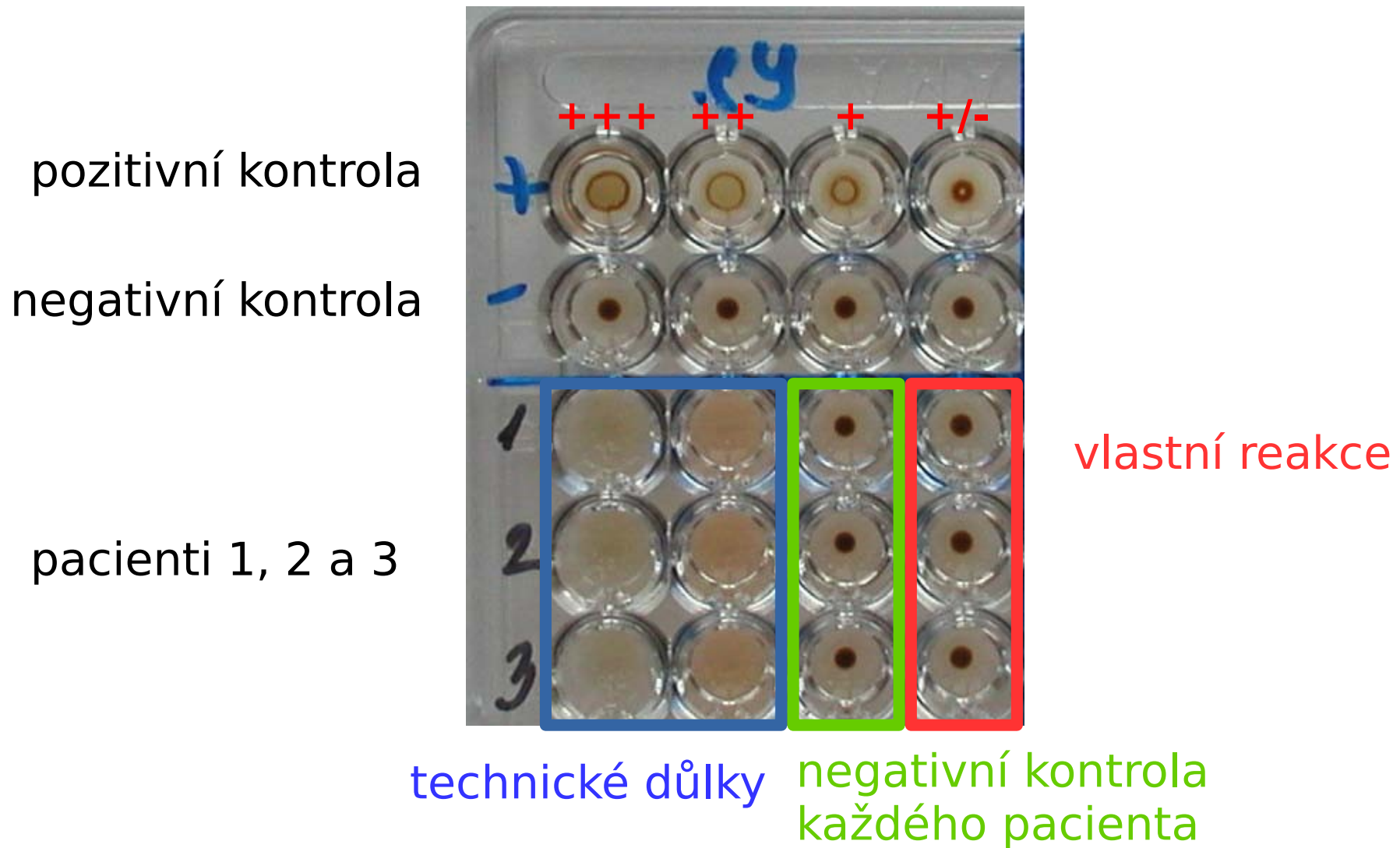


+



-

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**

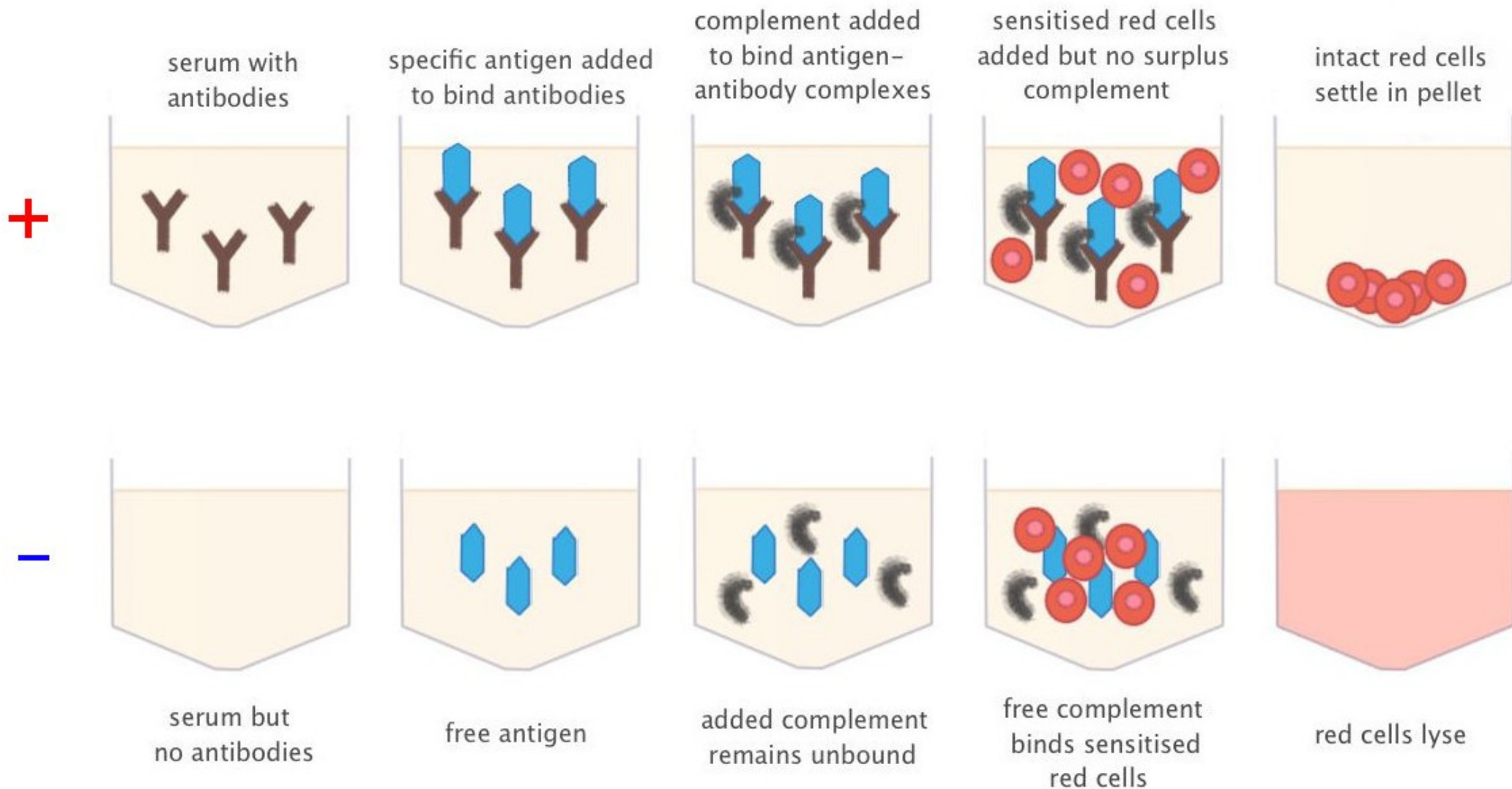
Komplement (2)

- **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)

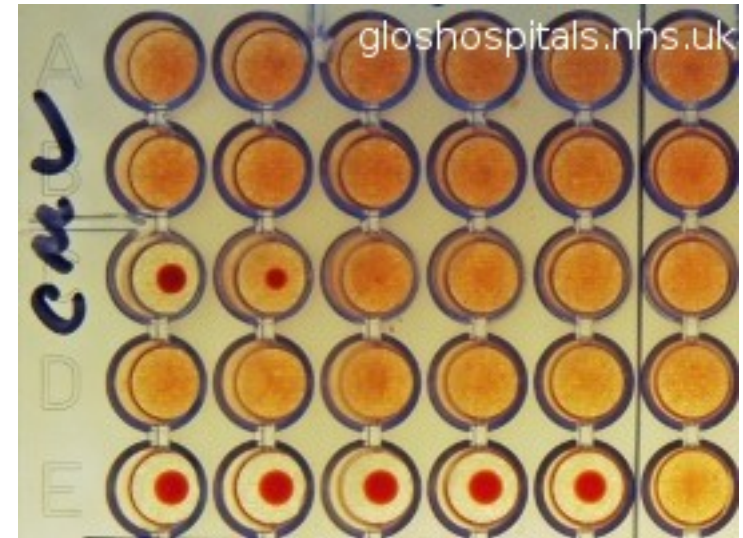
- **využívá vlastností komplementu:**
 - **schopnost vázat se jen na komplex Ag-Ab (neváže se na samotný antigen ani na samotnou protilátku)**
 - **vede k lyzi buňky**
- **navázání komplementu** na komplex Ag-Ab **není** samo o sobě **viditelné** → **přidáváme indikátorový systém**
- **indikátorový systém** (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)

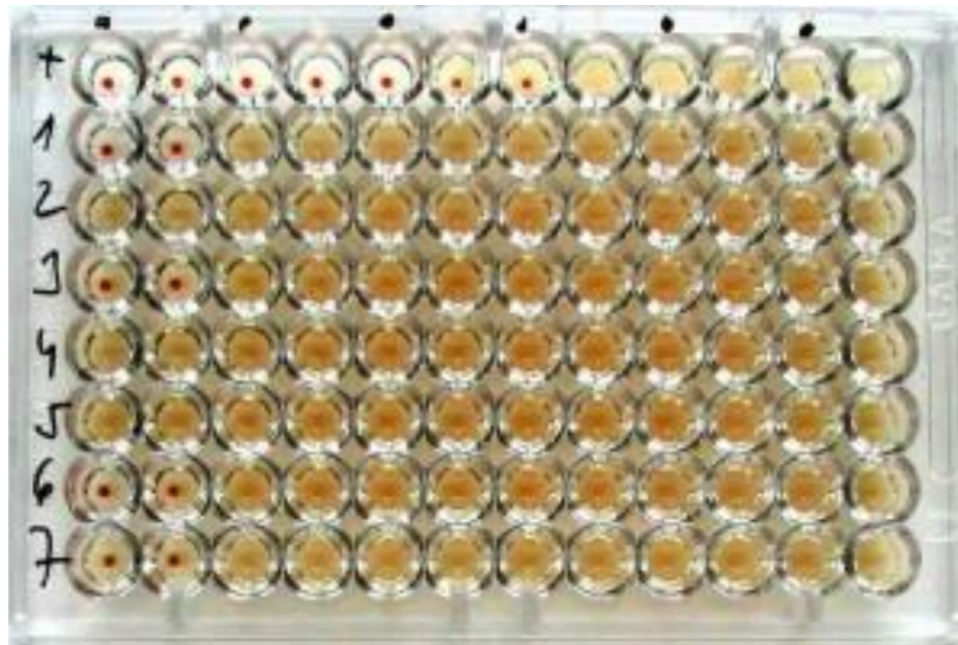
ASLO (2)

- **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)

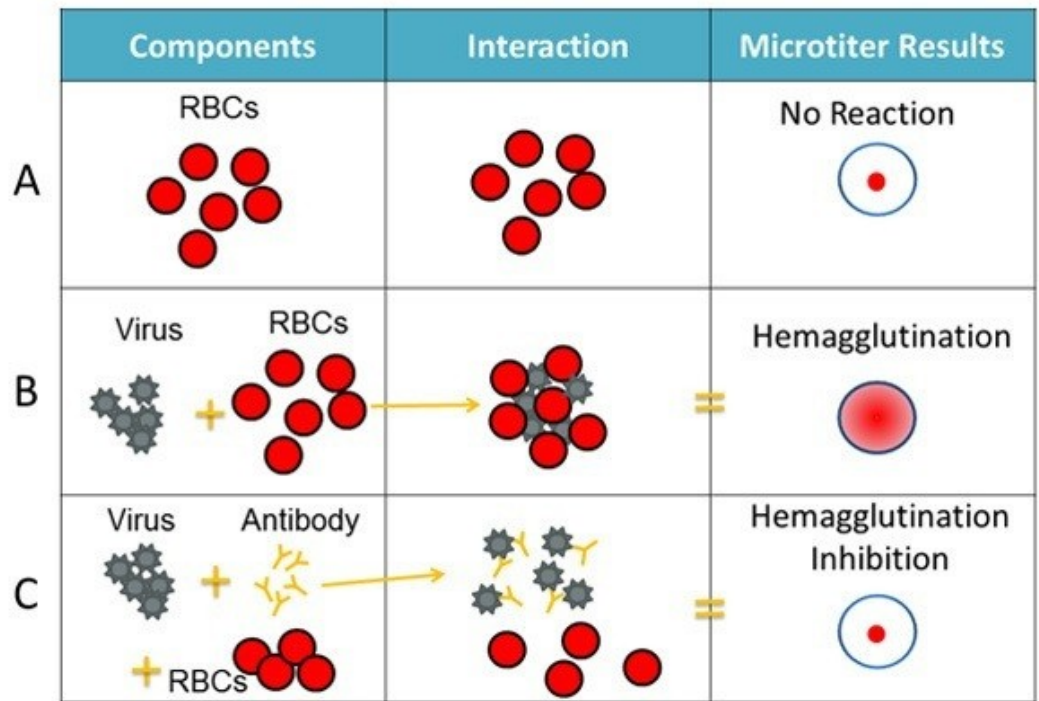
- **destička se odečítá naležato, první řádek je pozitivní kontrola**
- další řádky jsou jednotliví pacienti
- hodnoty ředění jsou uvedeny v protokolu



Úkol 5: HIT - hemaglutinačně inhibiční test

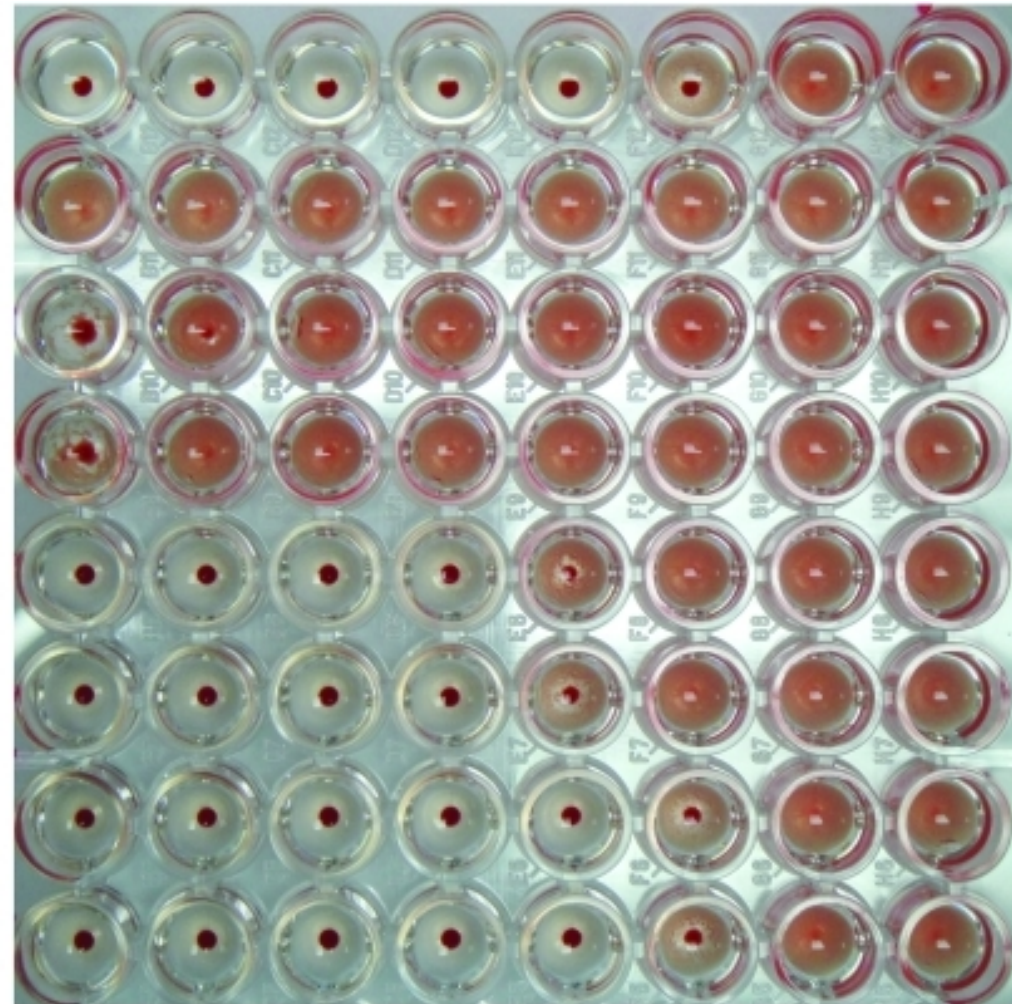
- máme několik pacientů s podezřením na klíšťovou encefalitidu, již testovaných pomocí KFR (viz úkol 4)
- **HIT jako nezávislý test k ověření** výsledků KFR (pozor jedná se o jiné pacienty než v úkolu 4)
- **v přítomnosti Ab není virus schopen aglutinovat erythrocyty (nikoli hemolyzovat!)**
 - **POZ = 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)



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)

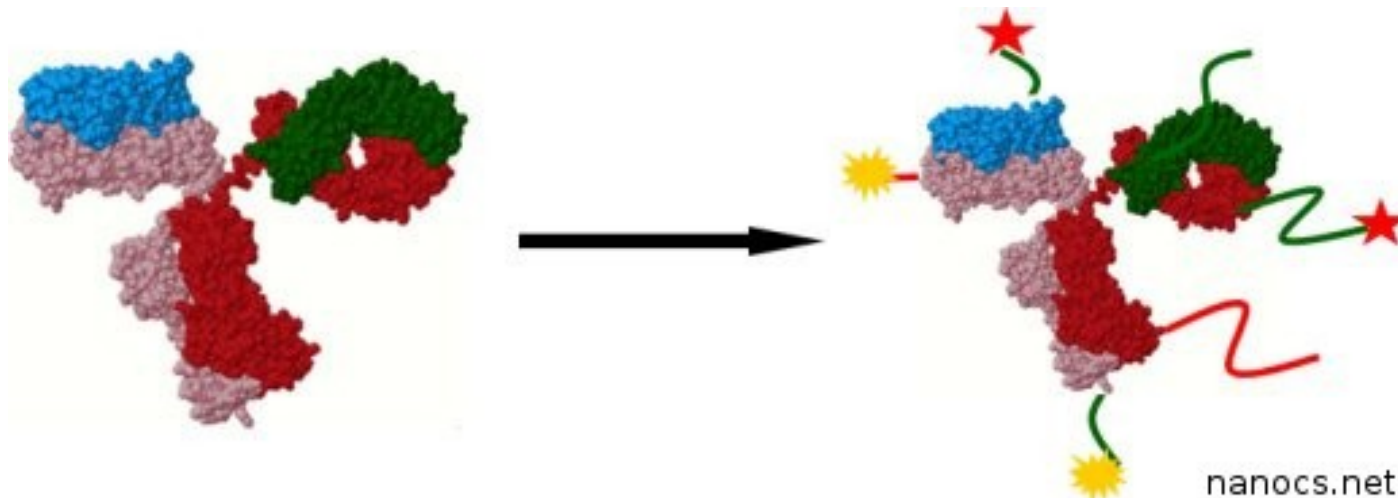
- **indikátor:**
 - lze měřit s vysokou přesností a reprodukovatelností
 - **radioizotopové metody:** radioaktivní **izotopy** (^{125}I)
 - **neradioizotopové metody:** **enzym, fluorescenční látka**, koloidní částice apod.
- **vícesložkové reakce** fungující jako řetězec (řetězec různých Ag a Ab, poslední 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

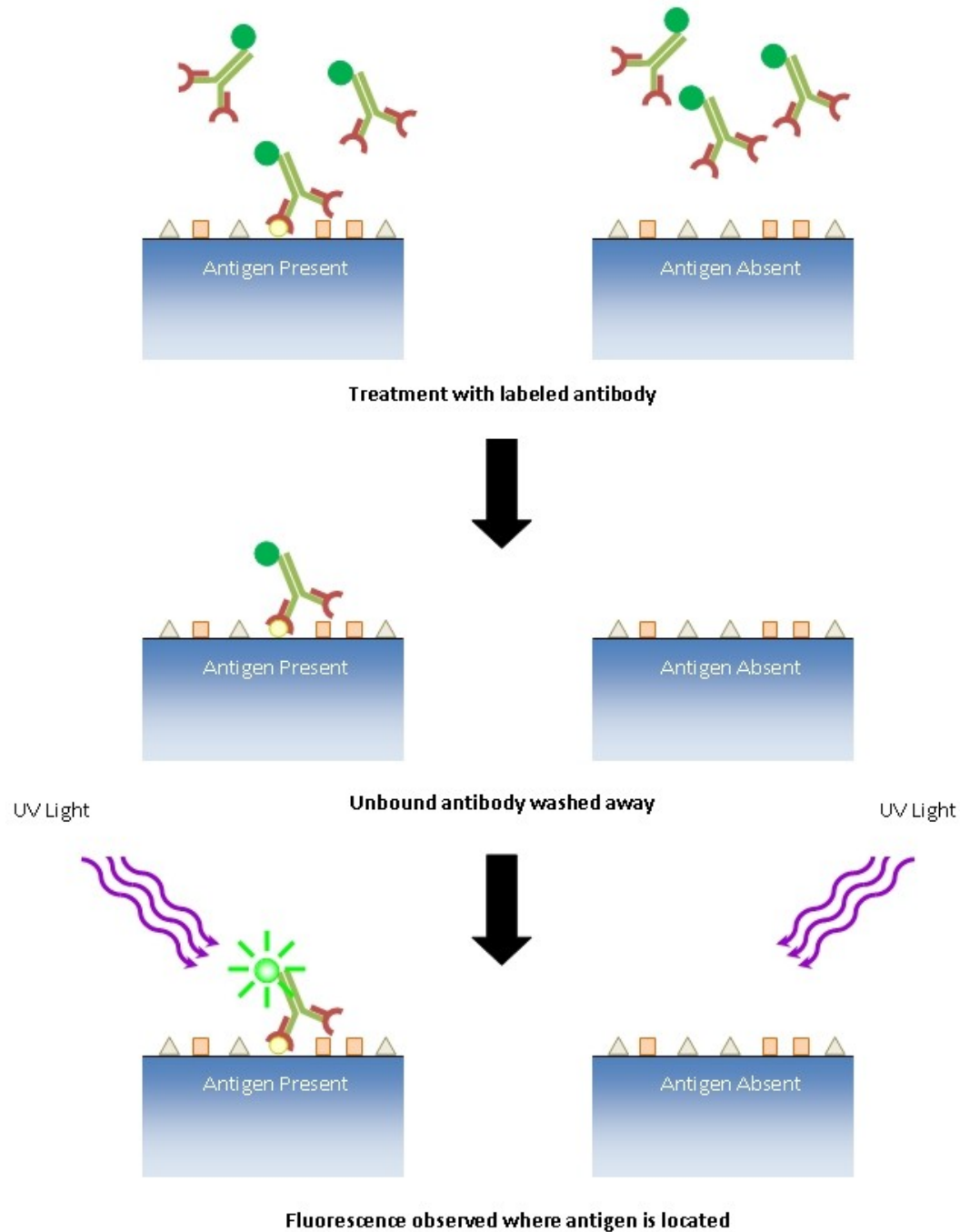
- chemická metoda **vytvářející stabilní kovalentní vazby mezi dvěma molekulami**, z nichž alespoň jedna je biomolekula (např. **imunoglobulin**)
- druhá molekula může být např. **fluorescenční barva, enzym, léčivo, ...**
- obě molekuly jsou spojeny linkerem



Konjugát

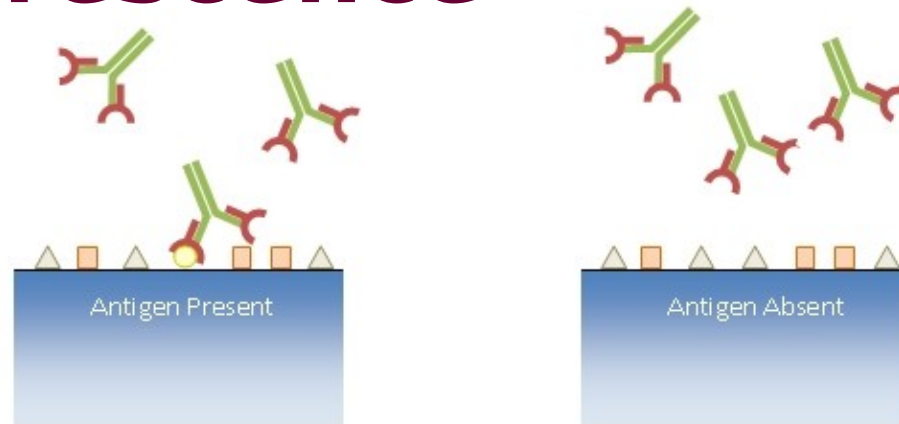
- jedná se o **protilátku proti protilátce**
- **protilátka proti druhově specifickým Ig** příslušného izotypu (proti IgG, IgM, IgA)
- biokonjugací je **na protilátku navázán**
 - **fluorofor (imunofluorescence)**
 - **enzym**, nejčastěji alkalická fosfatáza a křenová peroxidáza (**ELISA**)
 - **částice**, nejčastěji latexová, uhlíková, koloidní zlato (**imunochoomatografie**)

Imunofluorescence přímá

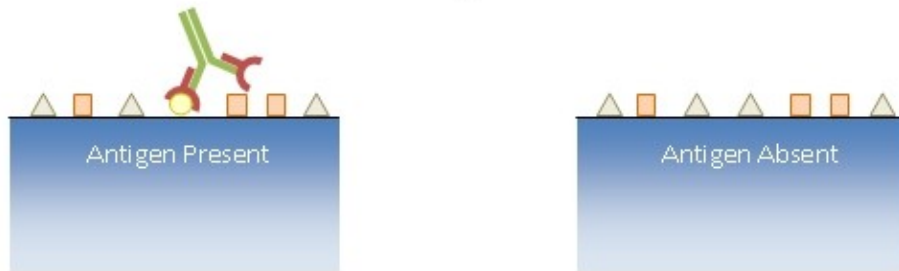


Fluorescence observed where antigen is located

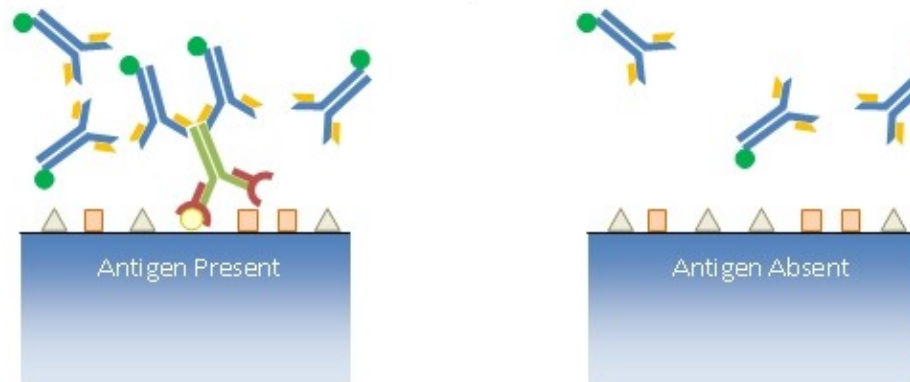
Imunofluorescence nepřímá



Treatment with unlabelled primary antibody

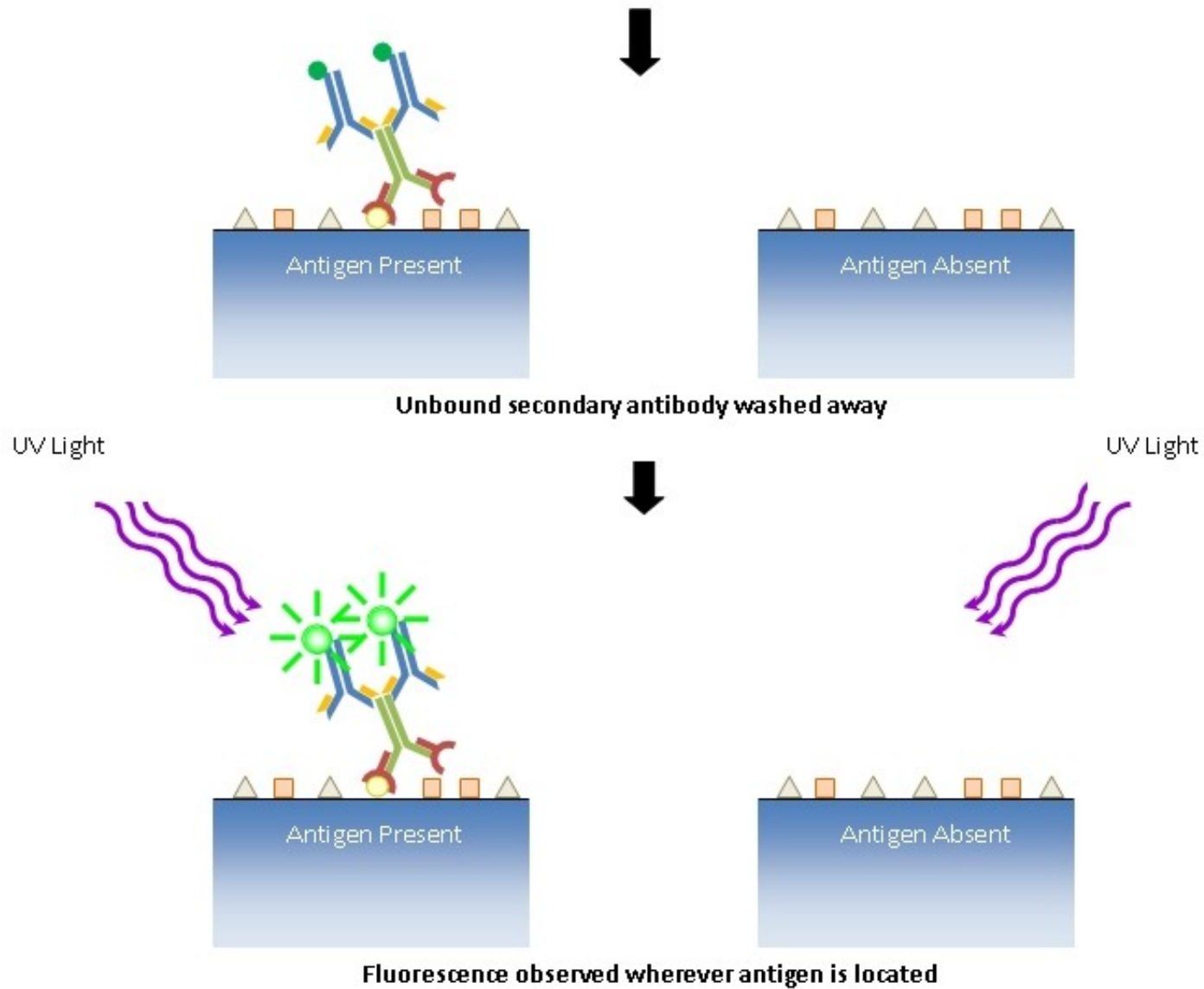


Unbound antibody washed away



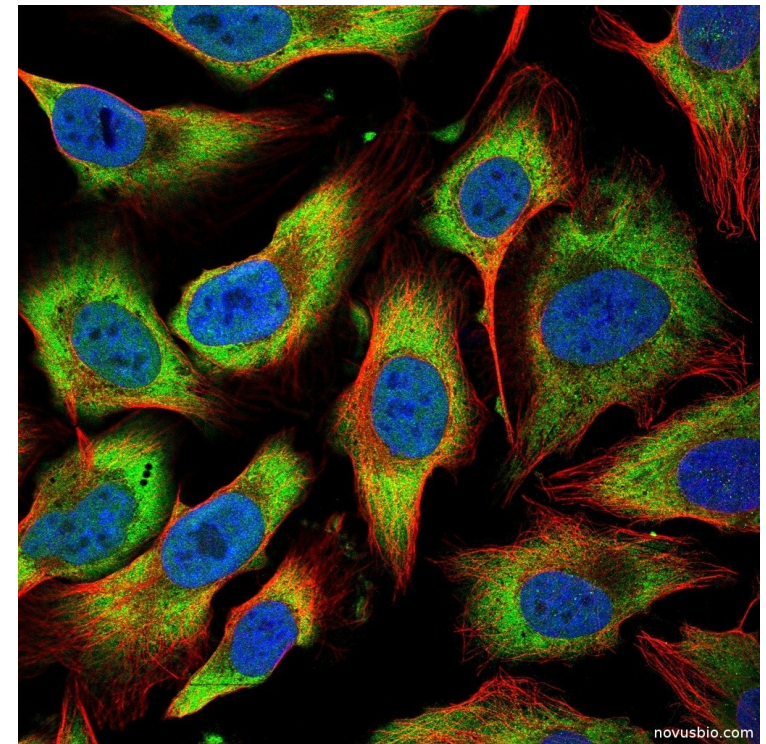
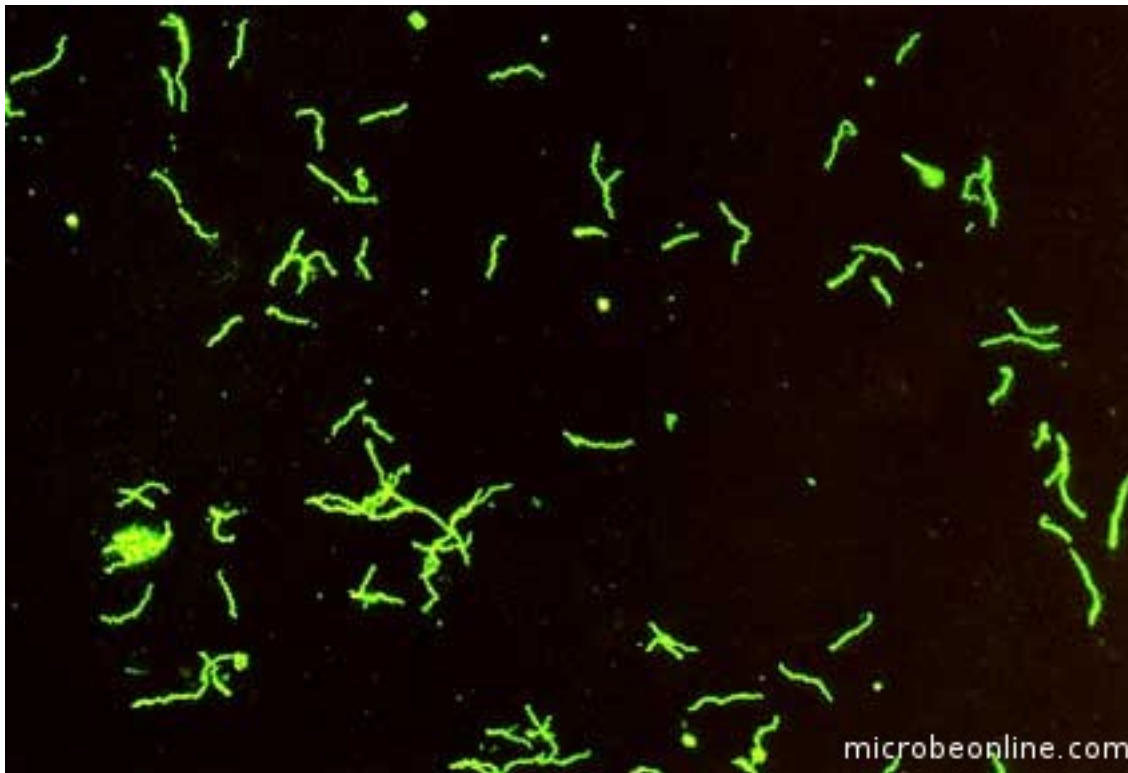
Treatment with unlabelled secondary antibody

Imunofluorescence nepřímá (2)



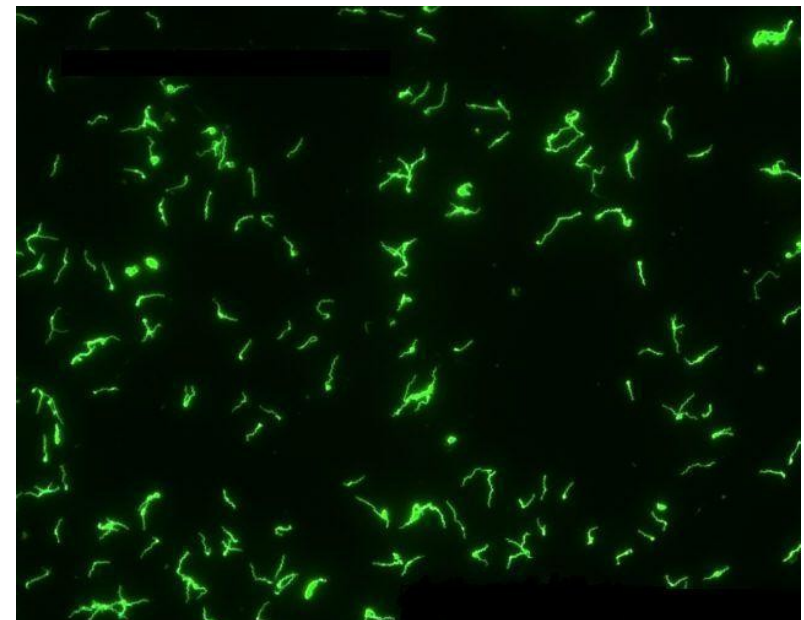
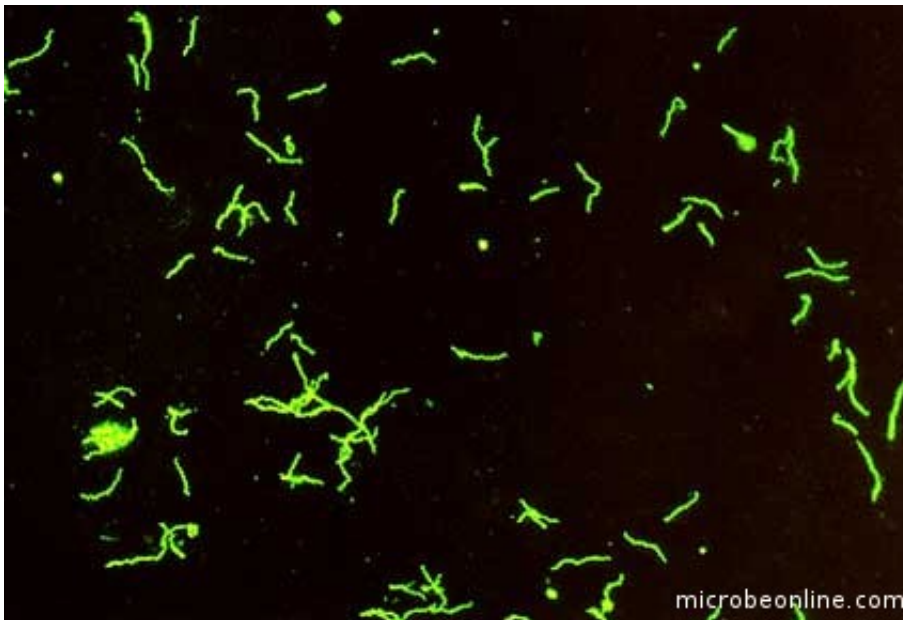
Výsledek přímé a nepřímé IMF

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



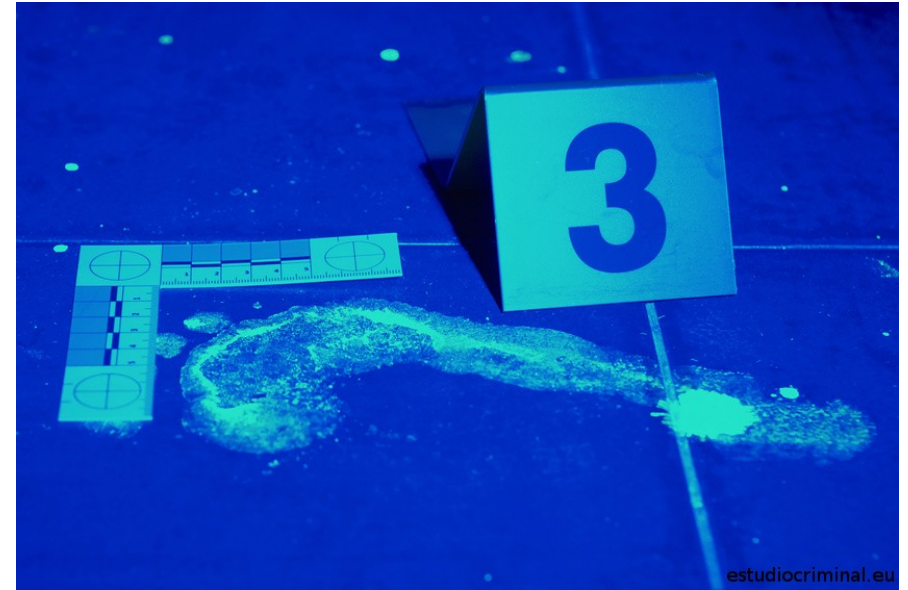
Úkoly 6 a 7: Přímá a nepřímá IMF

- **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**



Chemiluminescence

- **chemiluminescence** je **emise světla** (luminescence) jako **výsledek chemické reakce**
- při reakci **vzniká excitovaný meziprodukt**, který přechází zpět do základního stavu vyzářením **světelného kvanta**
- **luminol** (modře září po přidání vhodného oxidačního činidla; využití např. při detekci stopových množství krve v kriminalistice – železo katalyzuje reakci)
- **deriváty akridinu**
- **difenyl oxalát (Cyalum; svítící tyčinky ...)**

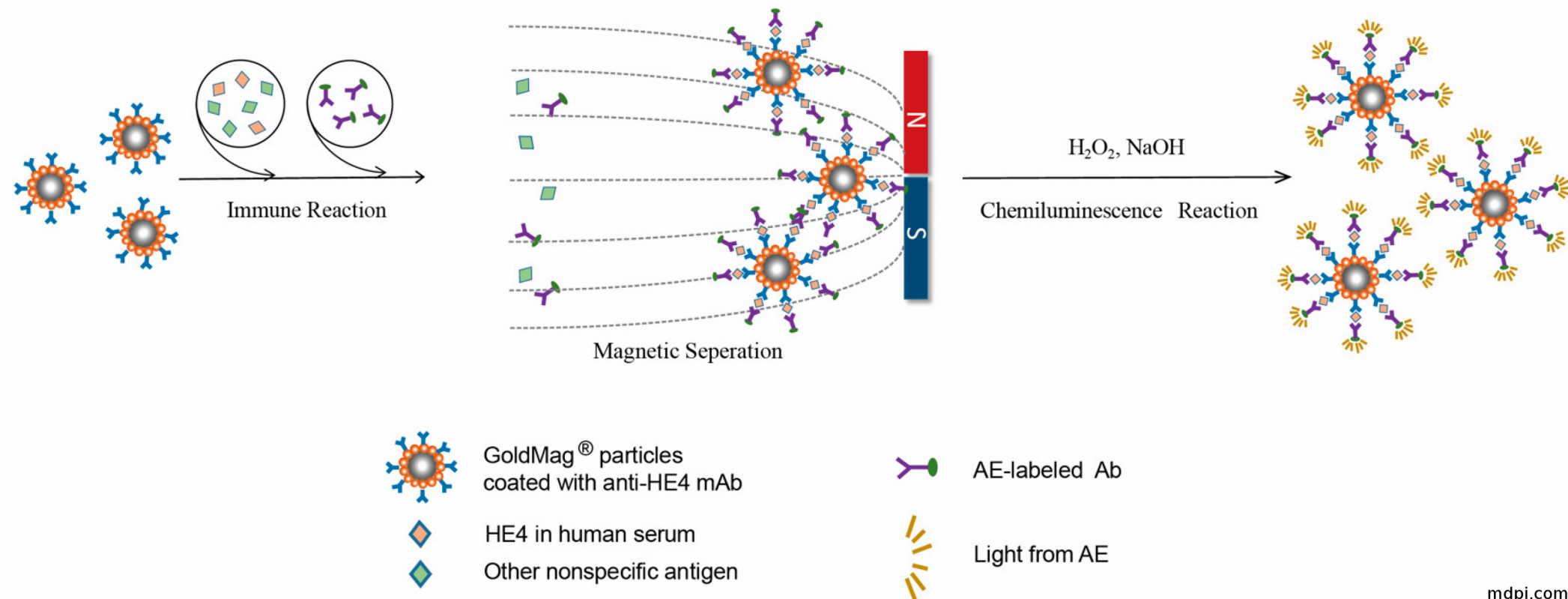


Chemiluminiscenční imunoanalýza na mikročasticích (CMIA)

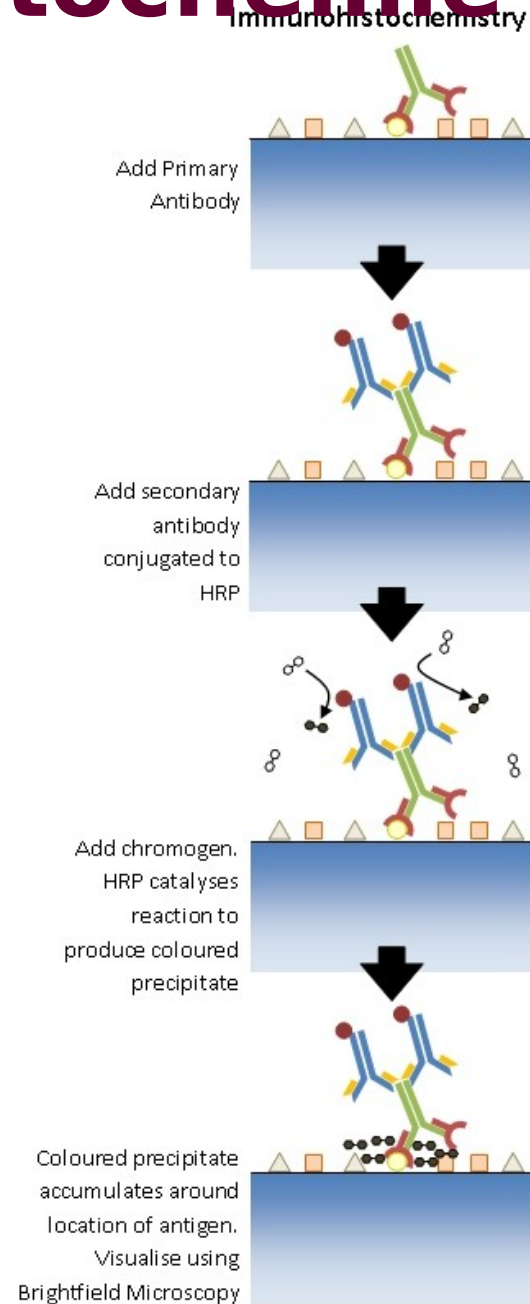
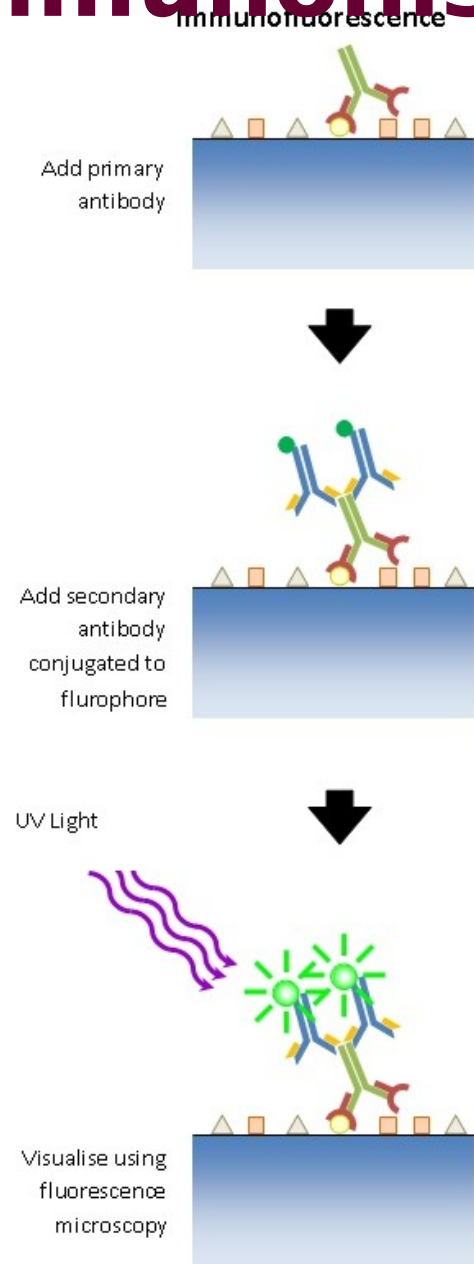
- **varianta CLIA** (chemiluminiscenční imunoanalýza)
- v prvním kroku se přidá **vzorek k paramagnetickým mikročasticím**, které jsou **potažené protilátkami**
- **analyzovaná látka** ve vzorku **se naváže** na protilátky na mikročasticích → **promytí** → v druhém kroku se **přidá konjugát (např. s akridinem)** → **promytí**
- přidají se roztoky peroxidu vodíku a hydroxidu sodného
- **vznik excitovaného meziproduktu** → při přechodu do základního stavu **emise fotonu**
- výsledná **chemiluminiscenční reakce je přímo úměrná koncentraci analyzované látky** (měří se v RLU, relative light units)

Chemiluminiscenční imunoanalýza na mikročásticích (2)

- reakce se vyhodnocuje na základě **porovnání naměřené hodnoty s hodnotou cut off** (kalibrační roztoky)



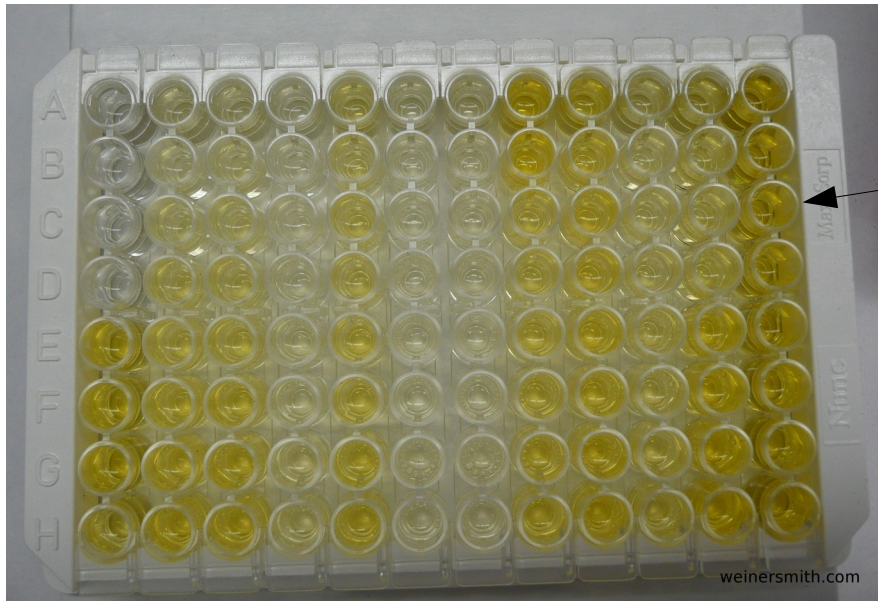
IMF vs. immunohistochemie



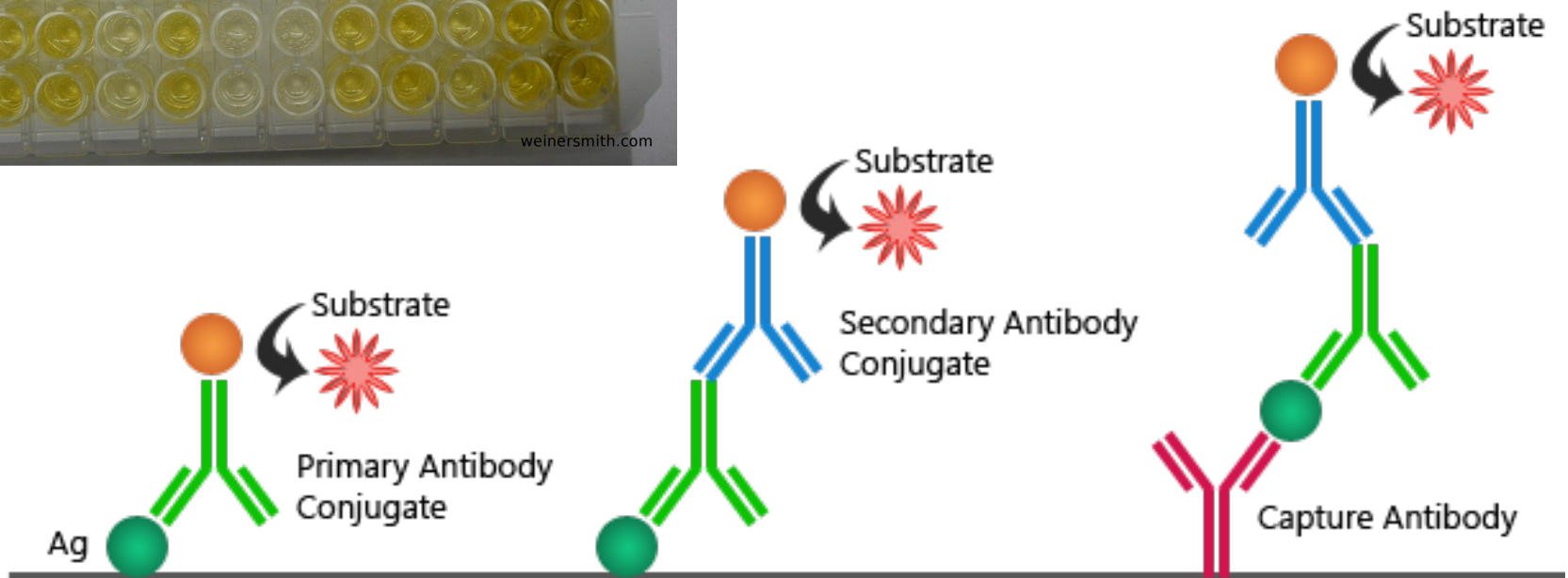
ELISA

- Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
- **jedna z nejpoužívanějších metod k detekci antigenů i protilátek**
- **možnost automatizace a vyšetření velkého počtu vzorků** naráz (obvyčejně 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

ELISA (2)



alkalická fosfatáza



DIRECT ELISA

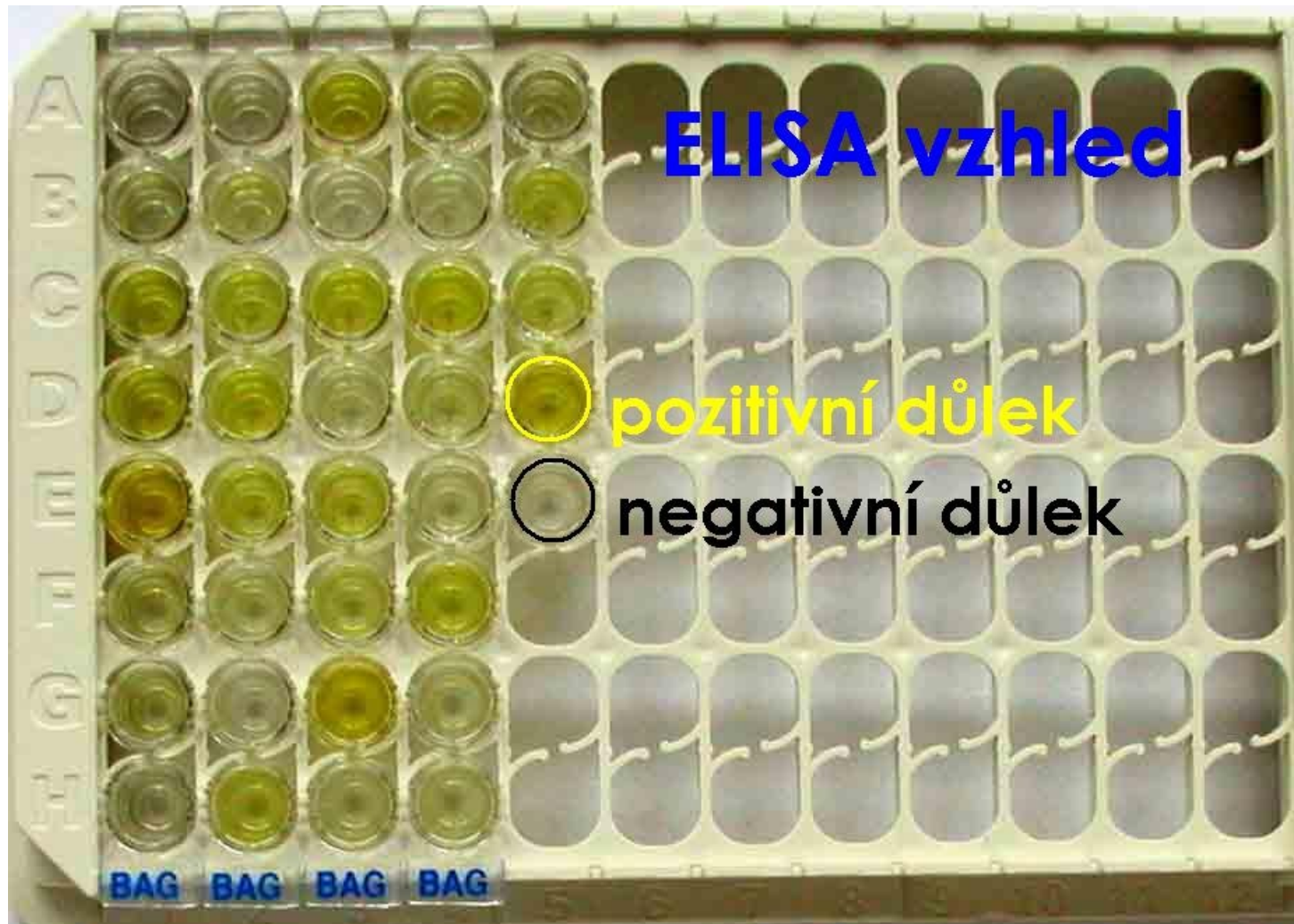
INDIRECT ELISA

SANDWICH ELISA

bosterbio.com

ELISA (3)

- popište pozitivní a negativní reakci



Ověření avidity protilátek 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: $A_v/N \times 100$

- poté nalezneme index avidity

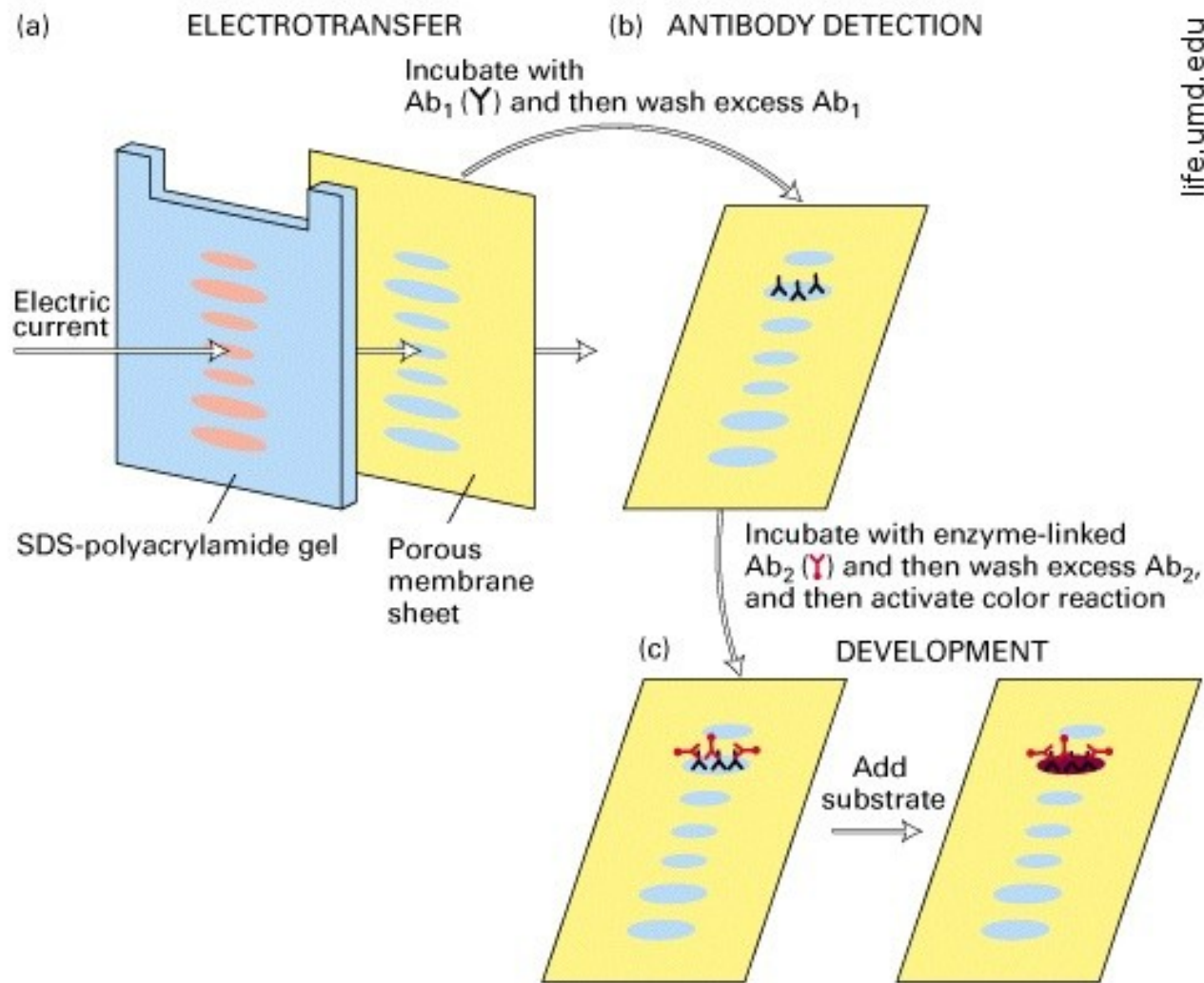
Western blot (imunoblot)

- **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)

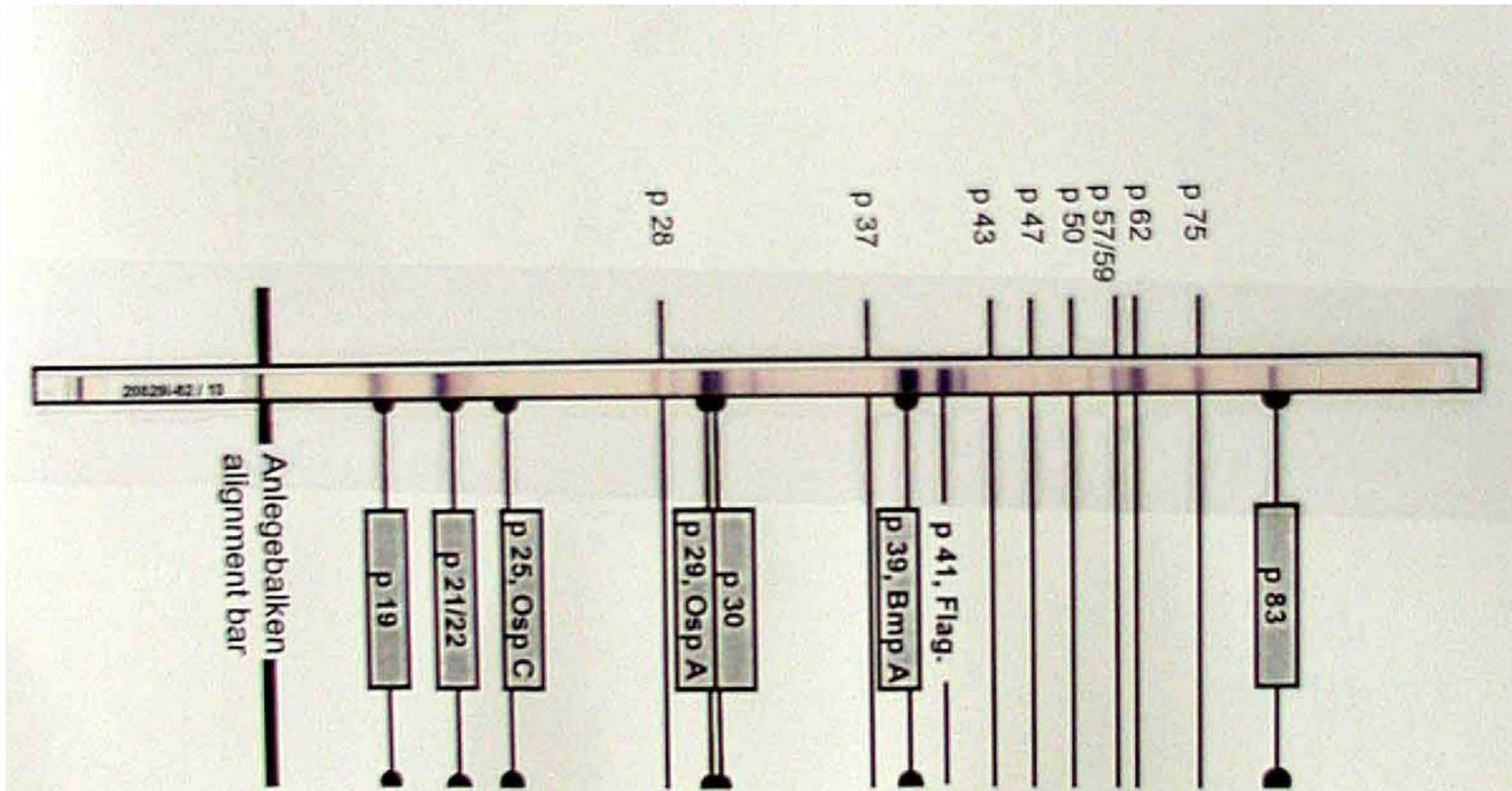
- po rozdělení elektroforézou SDS-PAGE získáme **gel s jednotlivými frakcemi** (polypeptidové proužky)
- **přesátí**: z gelu můžeme přesát proužky buď opět **elektroforeticky** nebo prostou **kapilaritou** (starší již málo používaná metoda, časově náročná)
- **blokování**: zbylá místa na membráně je 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



medmicro.info

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)

- 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

Imunoblotty (vyhodnocení) (2)

- 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) (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																					

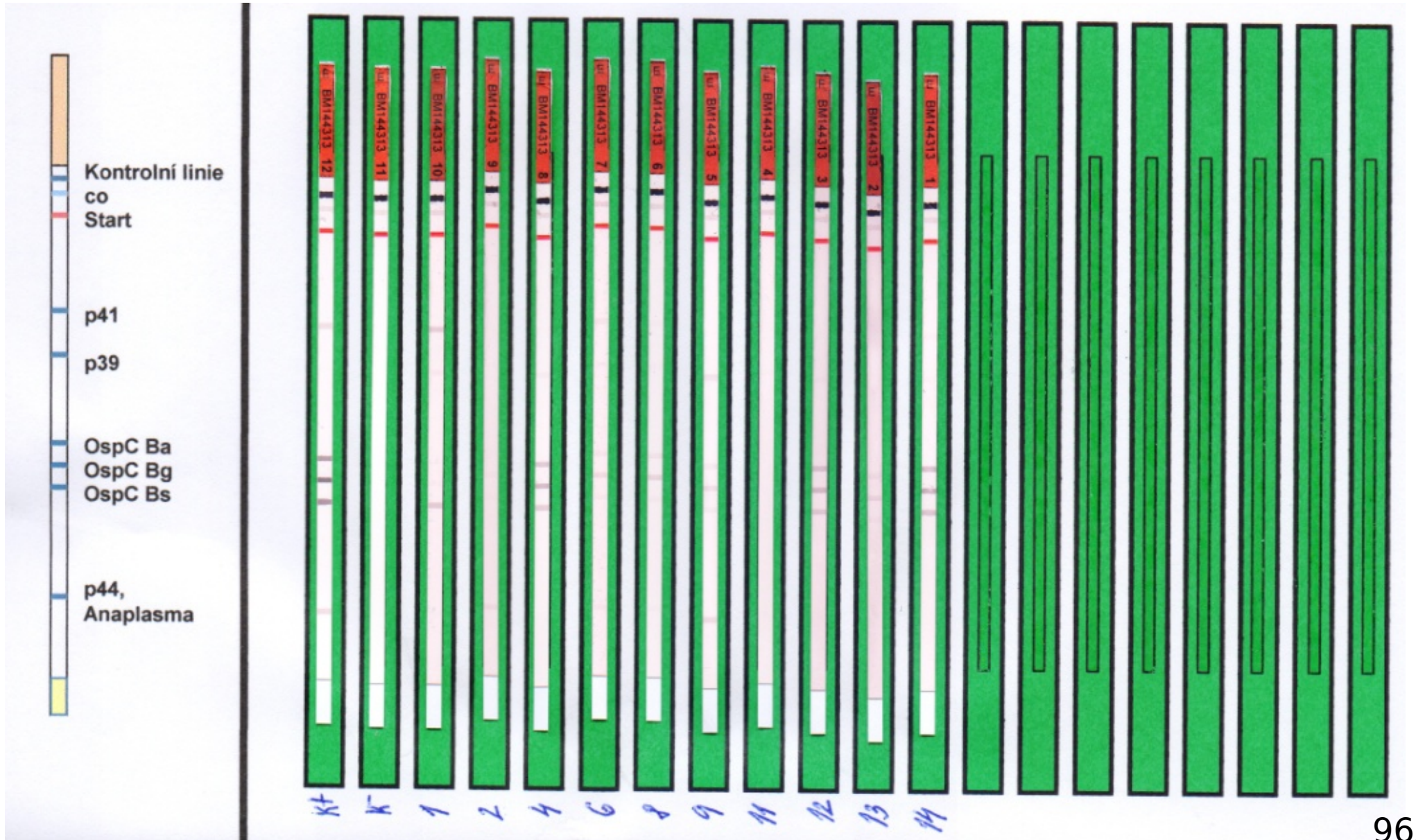
Hodnocení specifických linií Borrelia	Specifické Ag linie: p41 Ba, p39 Ba		
	2 pozitivní linie	1 pozitivní linie nebo 2 slabé	žádná linie nebo 1 slabá
OspC	výrazné	pozitivní	pozitivní
	slabé	pozitivní	hraniční
	bez linie	pozitivní	negativní

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*

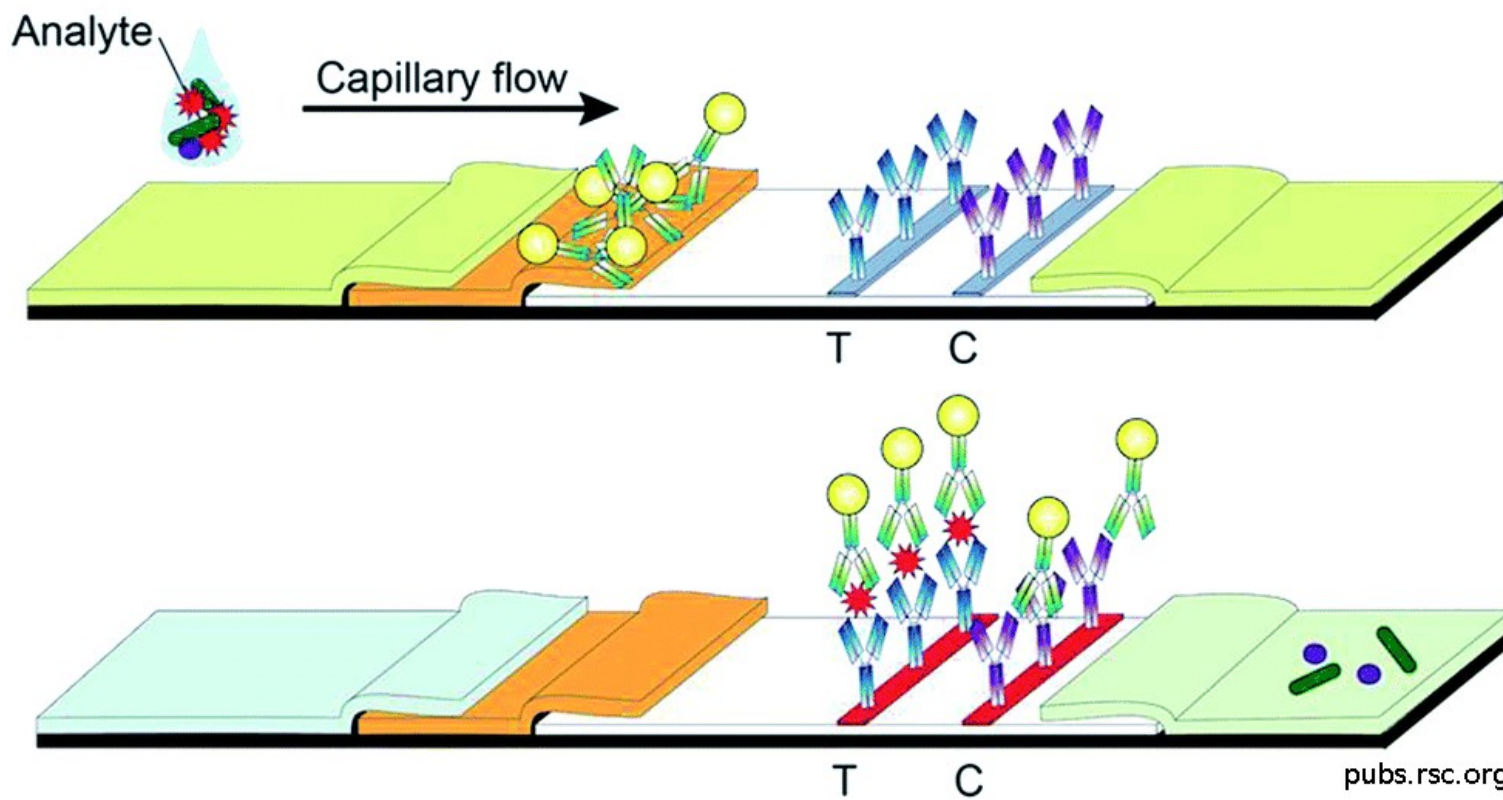
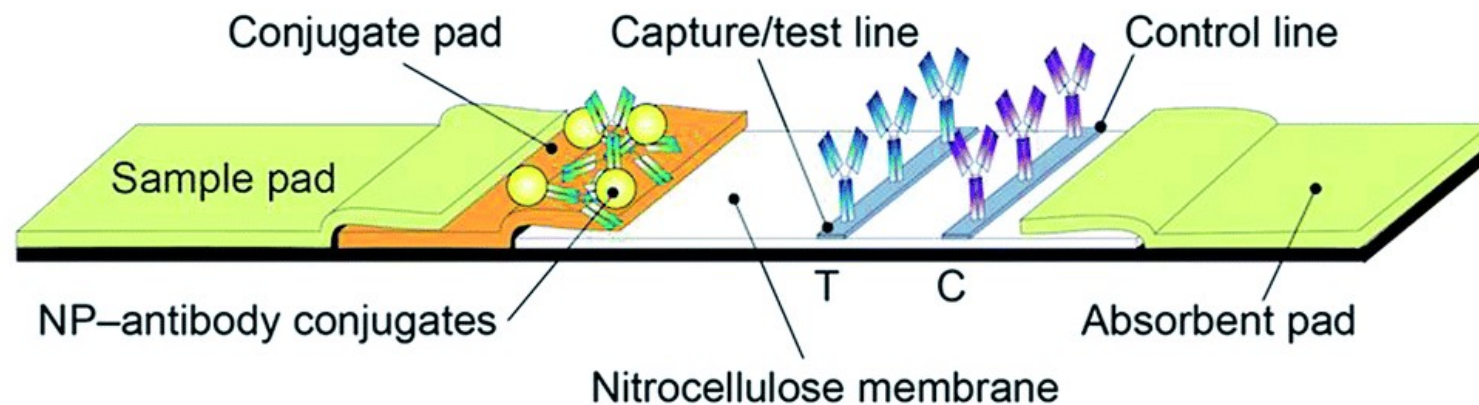
Imunoblotty (vyhodnocení) (4)



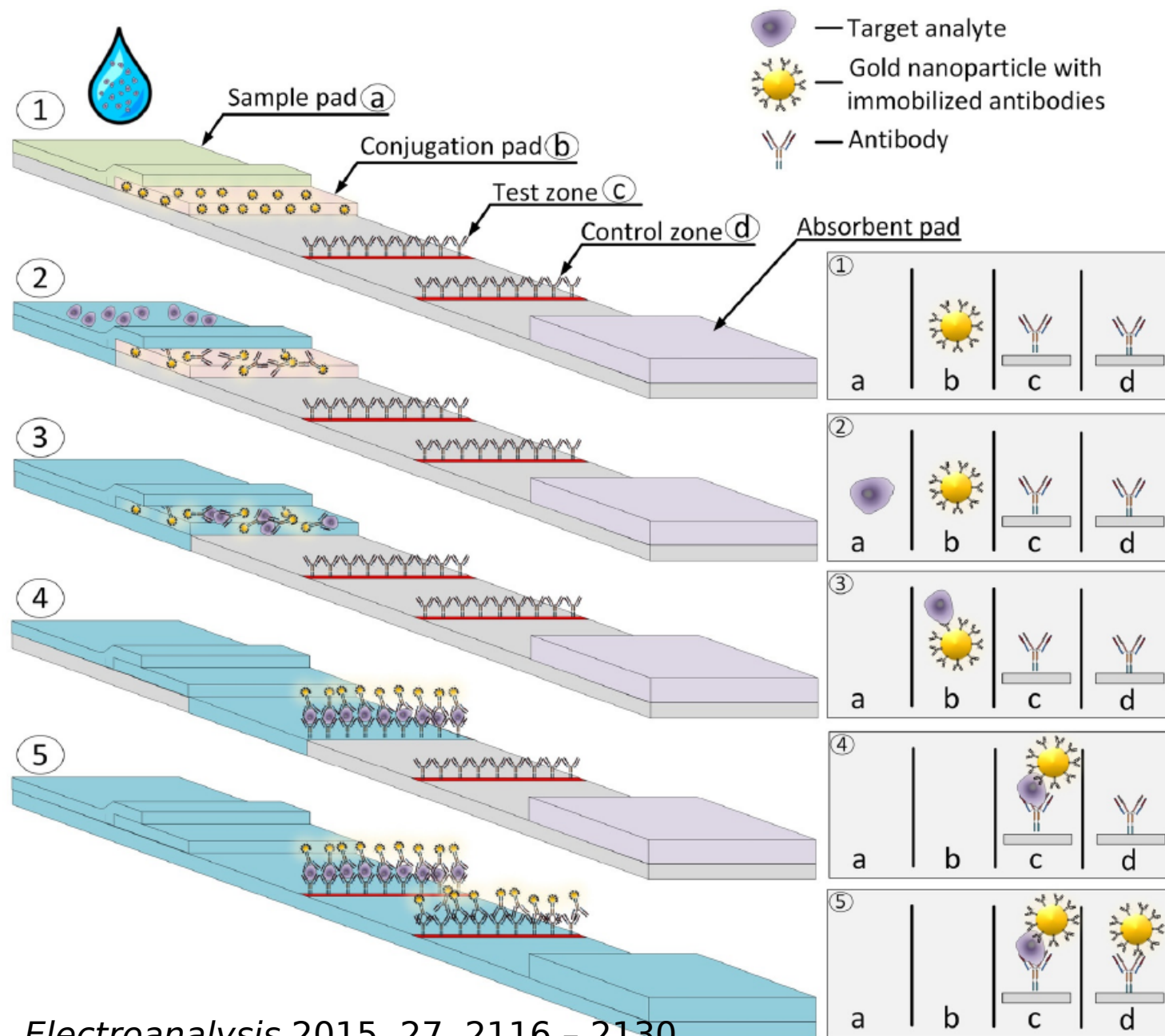
Imunochromatografické testy

- **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)

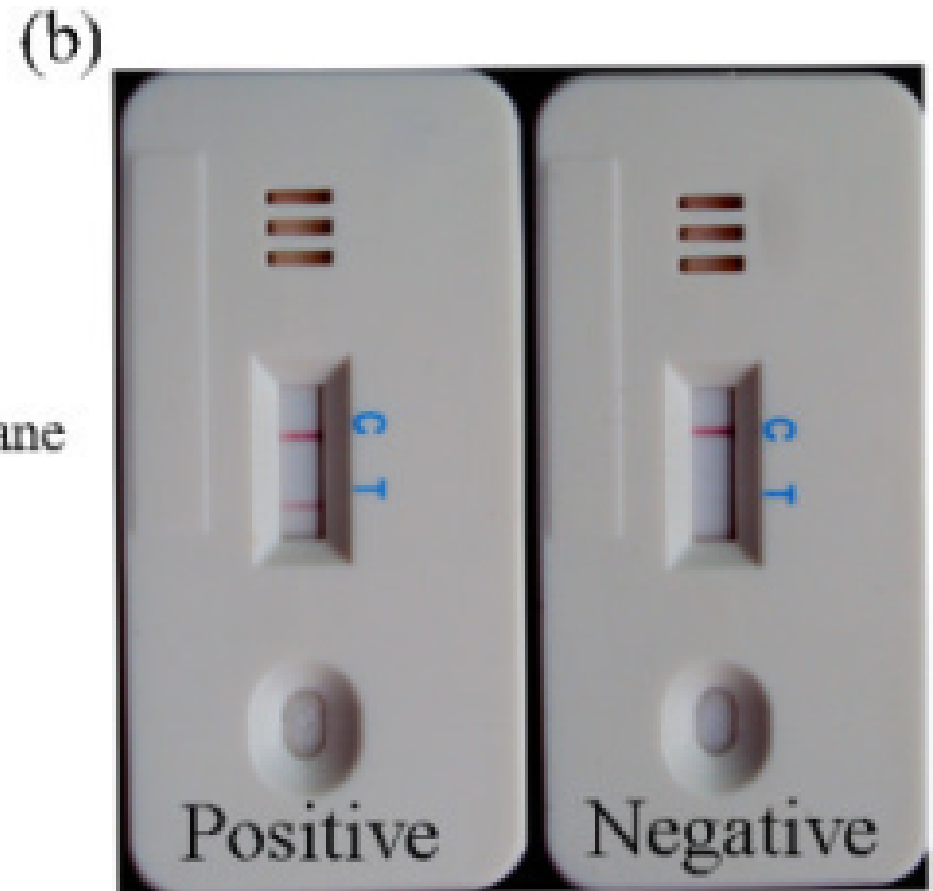
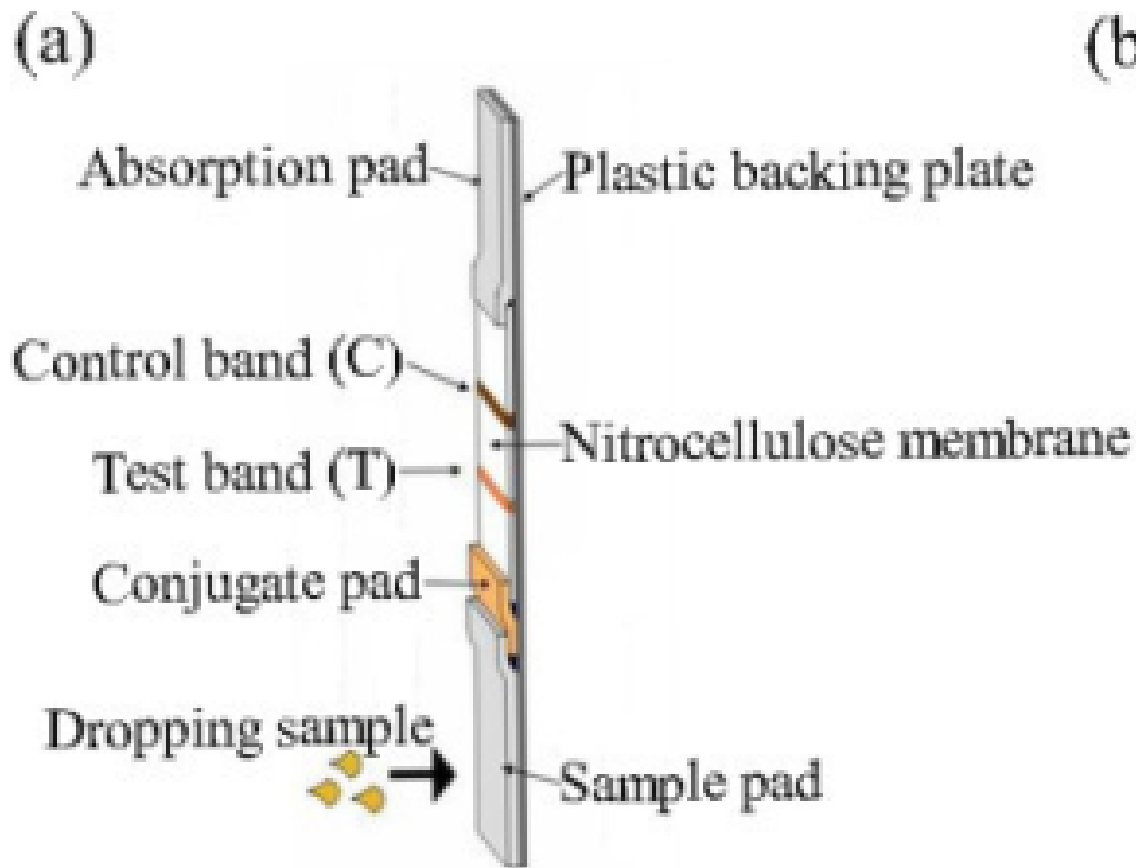
Imunochromatografické testy (2)



Imunochromatografické testy (3)

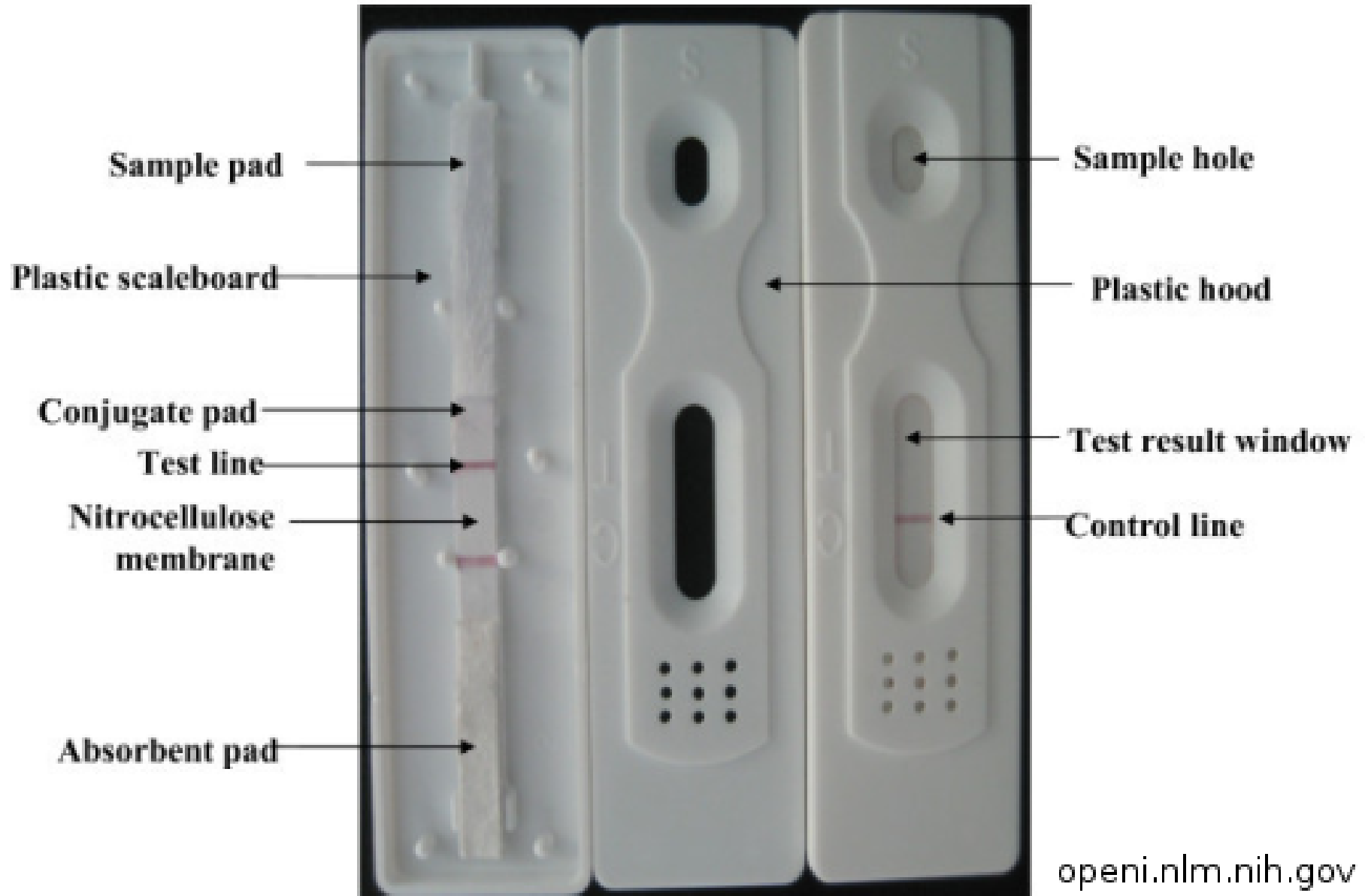


Imunochromatografické testy (4)



openi.nlm.nih.gov

Imunochromatografické testy (5)



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