Lékařská mikrobiologie pro ZDRL

Týden 12
Neutralizační reakce, reakce se značenými složkami

A ještě trochu opakování: Interpretace

- **Průkaz antigenu** (včetně antigenní analýzy) 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** (**titr**) a hlavně **jeho změna**
  - **Třída protilátek:** IgM/IgG
  - ***Avidita protilátek*** *– síla vazby na antigen*

Jak tyto informace zjistit

- **Čerstvá infekce:** velké množství protilátek, převážně třídy IgM,[1] případně i IgA
- **Pacient po prodělané infekci:** malá množství protilátek, hlavně IgG[2] (imunologická paměť)

Typy serologických reakcí a jejich způsoby využití

	Průkaz antigenu	Antigenní analýza	Nepřímý průkaz
Aglutinace	občas	často	někdy
Precipitace	málokdy	málokdy	občas
KFR	často (viry)	ne	často (viry)
Neutralizace	občas	ne	často
Značené složky	velmi často	výjimečně	velmi často

Neutralizace

- Klasické, ale stále používané reakce
- Napodobují přirozenou funkci protilátek (protilátky blokují cytopatický či „erytrocytopatický“ efekt viru či toxinu)
- Hodí se jen u některých infekcí (virové infekce, infekce toxickými bakteriemi)
- Princip je jednodušší než u KFR

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).

Příklady neutralizačních reakcí

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

Příklad 1: ASLO

- **Protilátka (ANTISTREPTOLYZIN O) blokuje hemolytický efekt toxinu (streptolyzinu O) na krvinku.**
- **ASLO není nepřímý průkaz, přestože hledáme protilátky.** Nepátráme tu po patogenovi, určujeme samotné protilátky, jež mohou být nebezpečné
- U ASLO neužíváme geometrickou řadu. Hodnoty ředění jsou speciální.
- Titr nad cca 200 mezinárodních jednotek znamená možnost autoimunitní odpovědi

Proč se dělá ASLO

- Pomocí testu ASLO zjistíme, zda je přítomna **normální protilátková odpověď**, nebo **přemrštěná automimunita** s rizikem vývoje glomerulonefritidy nebo revmatické horečky
- **Test ASLO se provádí zpravidla po prodělané streptokokové infekci.** Průkazem protilátky se nesnažíme prokázat infekci (o té víme), ale zjistit, zda dochází k vývoji autoimunity. Je to tedy zvláštní případ, kdy vlastně nejde o nepřímý průkaz infekce, přestože prokazujeme protilátky.

Hodnocení ASLO

- Panel se odečítá naležato. První řádek prvního panelu je pozitivní kontrola, dále má každý pacient jeden řádek
- Nejvyšší ředění se zábranou hemolýzy (pozitivní reakce, projeví se sedimentací erytrocytů) je titr
- Titry cca 225–270 jsou hraniční, vyšší jsou pozitivní, nižší jsou negativní. Úplná absence protilátek znamená, že se pacient se streptokokovou infekcí nesetkal

Jamka č.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Hodnota m. j.	100	120	150	180	220	270	337	405	506	607	759	911

Příklad 2: HIT

- **H**emaglutinačně **I**nhibiční **T**est
- Pozor, tohle NENÍ aglutinace, je to **druh neutralizace!**
- Protilátka **neutralizuje virové shlukování krvinek** (in vitro vlastnost většiny virů)
- **Pozitivní reakce** = zábrana virového shluknutí → erytrocyty klesají na dno důlku
- **Negativní reakce** = viry se shluknou
- **Vypadá to jako hemaglutinace naruby**

Příklad 3: VNT (nepleťte si to s TNT ☺)

- **V**irus **N**eutralizační **T**est
- Viry lze pěstovat na **buněčných kulturách**. Jsou to buněčné linie většinou embryonálních či nádorových buněk
- **Buněčná kultura** bývá poškozena účinkem virů. Škodu můžeme pozorovat např. jako
  - **změnu morfologie** buněk v kultuře
  - **změnu metabolismu** → změna pH → změna zbarvení v důlku (při použití indikátoru)
- Jsou-li přítomny **protilátky**, mohou tomuto vlivu na buňky zabránit

Ukázka vyhodnocení VNT

V pravém sloupci jsou různé kontroly, jinak žluté důlky ukazují pozitivitu a červené negativitu.
V prvním dvojřádku máme pacienta se stálým, nízkým titrem. V dalším dvojřádku je pacient, jehož titr se čtyřikrát zvýšil. Další pacient se s infekcí nikdy nesetkal. Poslední dvojřádek ukazuje pacienta se sérokonverzí.

Průběh protilátkové odpovědi – opakování

- Protilátky IgM se tvoří jako první, ale také jako první mizí. Neprocházejí placentou, jejich průkaz u novorozence je svědectvím jeho infekce
- Protilátky IgG se tvoří později a zůstávají jako paměťové přítomny dlouhodobě. Procházejí placentou

(novorozenec je tedy může mít od matky)

Protilátky ostatních tříd

- Protilátky třídy IgA se u některých infekcí vyšetřují místo protilátek IgM. Tato třída se uplatňuje hlavně u slizniční imunity, a tedy u infekcí, kde branou vstupu je sliznice (například gastrointestinální)
- Protilátky třídy IgE se vyskytují u alergií a infestací červy. Zpravidla se však nestanovují specifické IgE proti nějakému patogenovi
- S protilátkami IgD se v mikrobiologii nepracuje

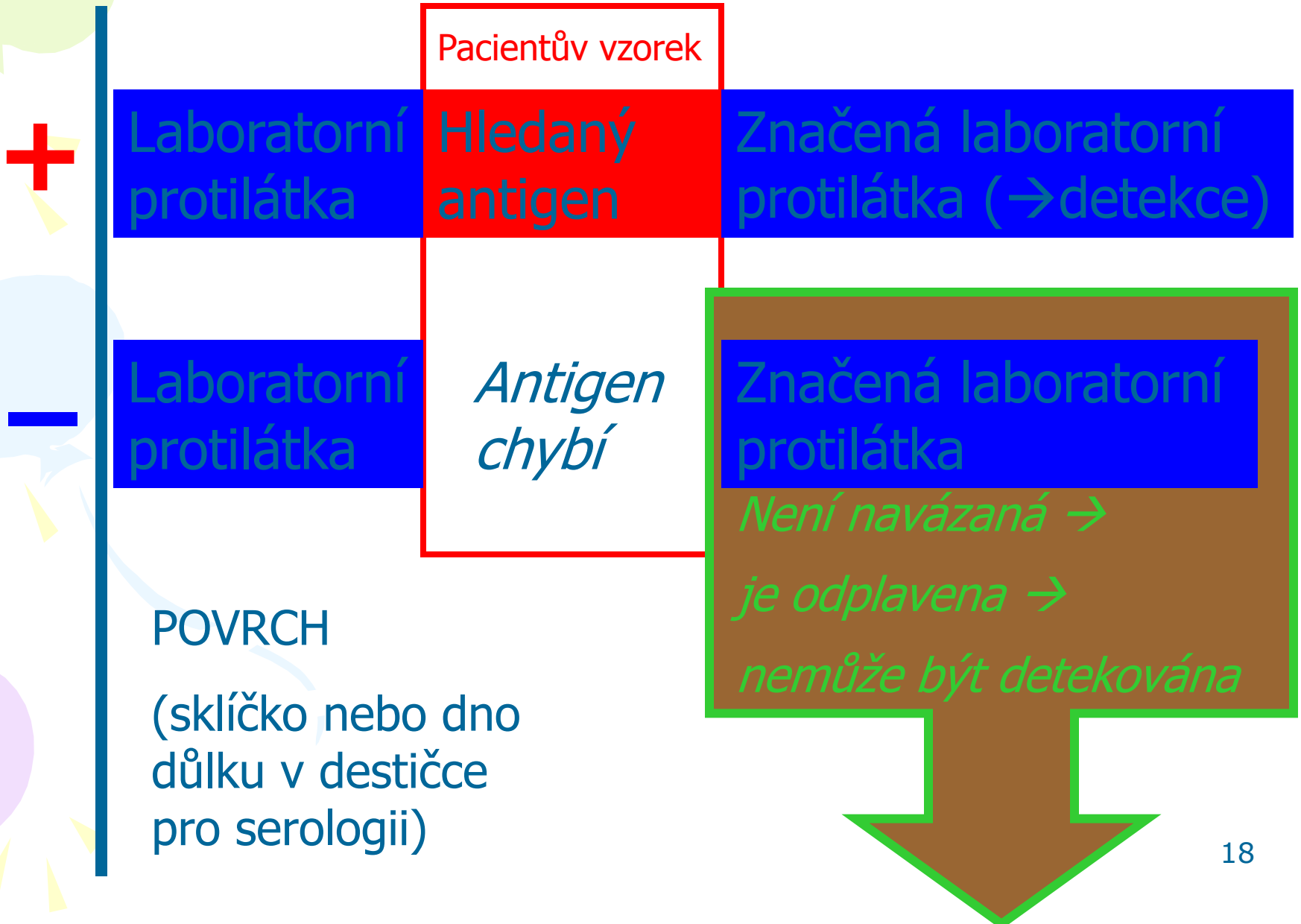
Reakce se značenými složkami

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



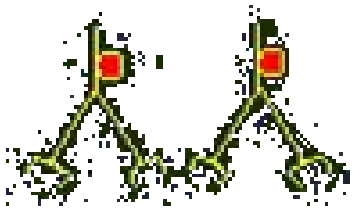
Typy značidel

- Fluorescenční barvivo je značidlem u imunofluorescence
- Radioizotop je značidlem u reakce RIA
- Enzym je značidlem u reakce EIA/ELISA
  - Western blotting je zvláštním případem reakce ELISA, kde jednotlivé antigeny jsou elektroforeticky rozděleny
- Chemiluminofor chemiluminiscenční reakce CLIA/CMIA v analyzátoru

Používáme-li jako značidlo enzym, je poslední složkou přidanou do reakce ještě příslušný substrát – tedy jeden krok navíc.

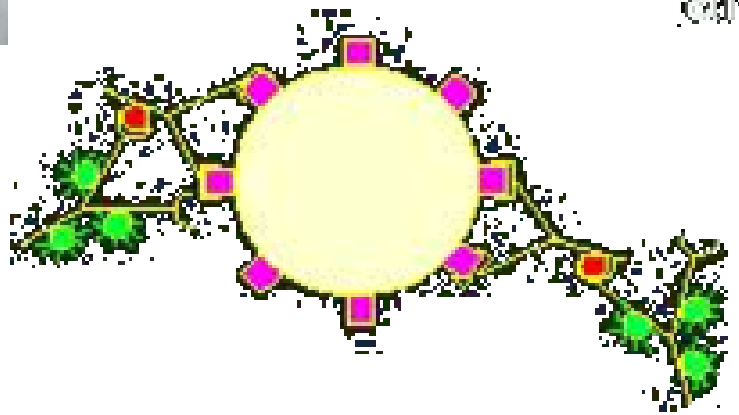
Imunofluorescence

Foto DVH



antibody

labelled
anti – antibody

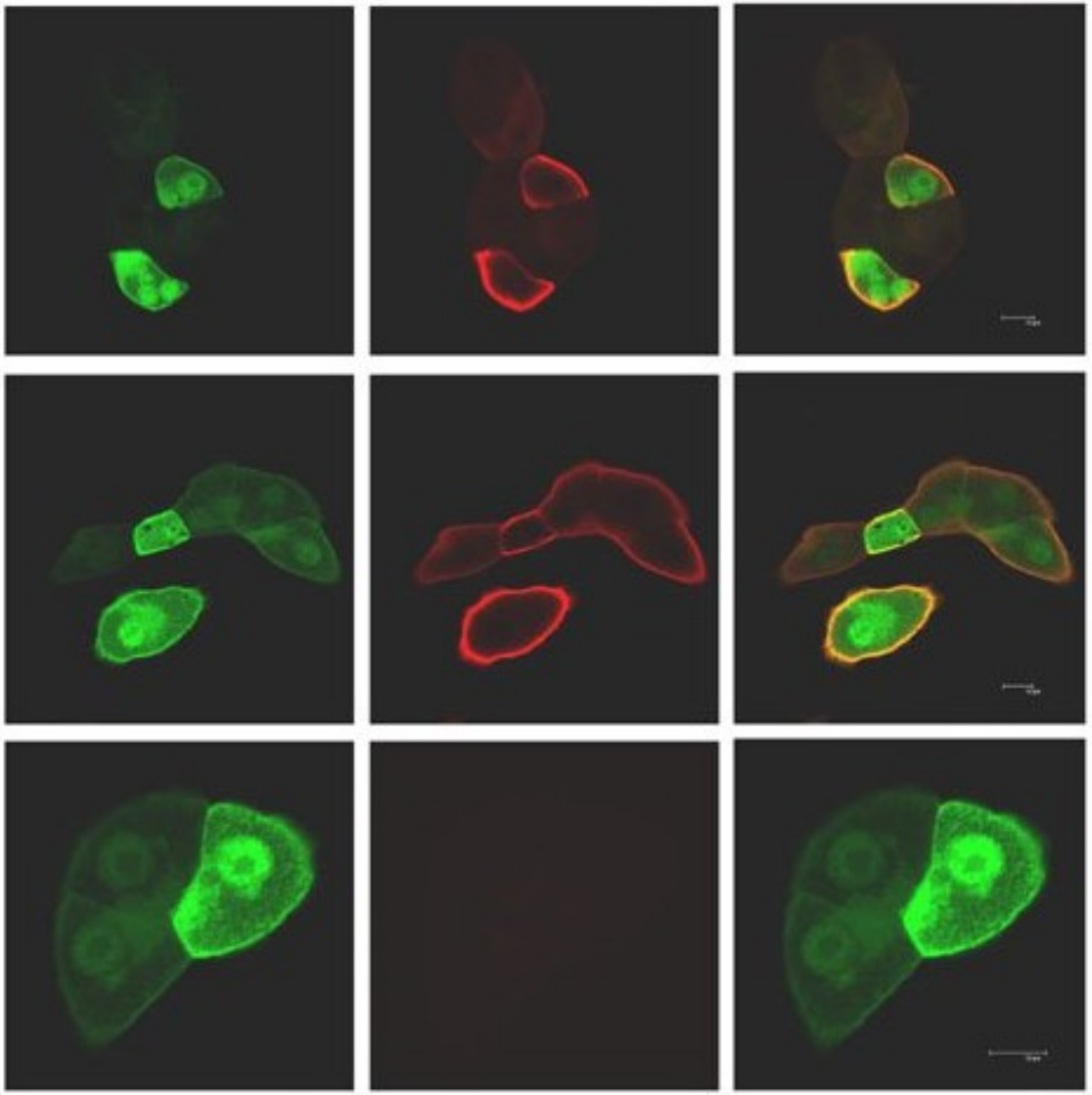


complex between antigen / antibodies
and anti – antibodies

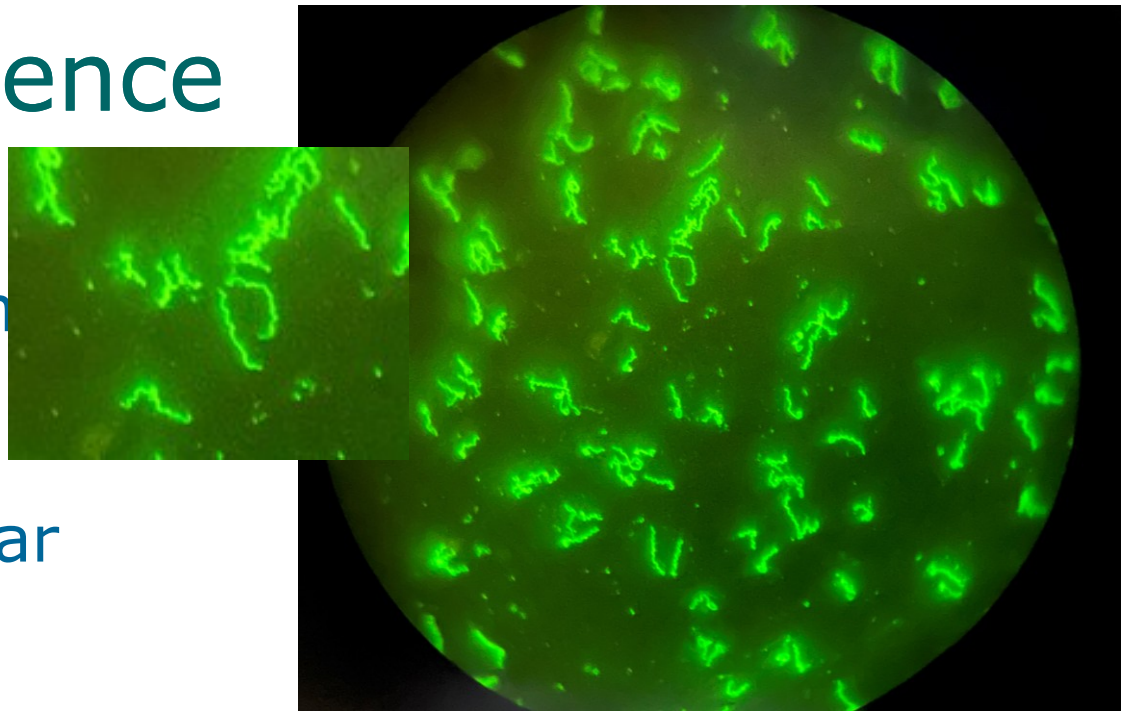
www.biologie.uni-hamburg.de

Imunofluorescence

www.amsbio.com



Imunofluorescence



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

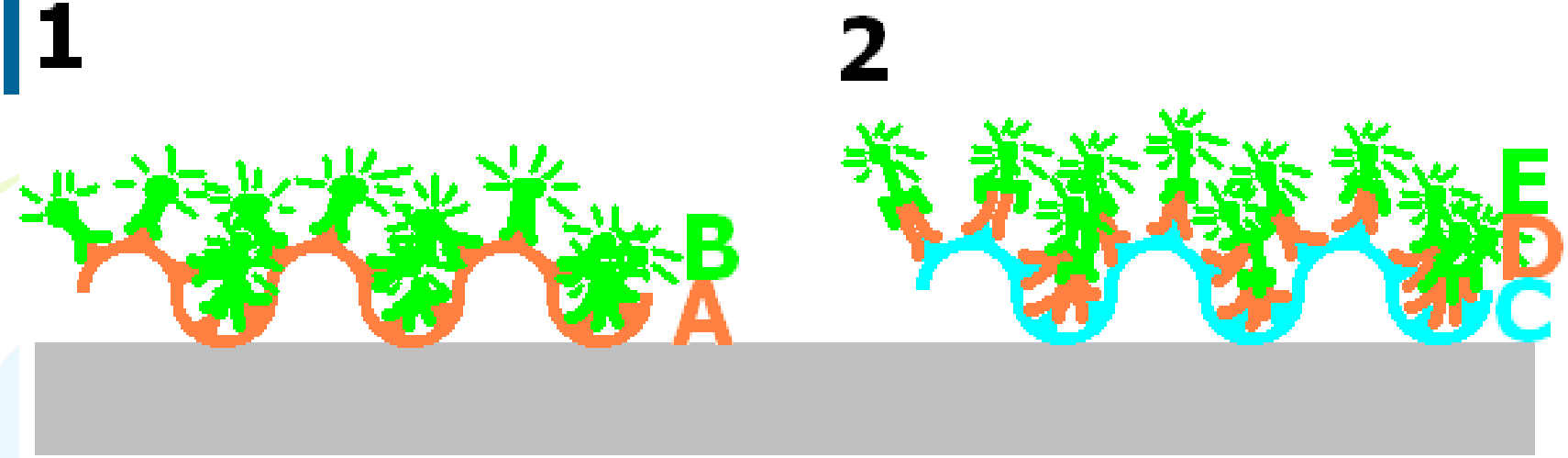
Přímá imunofluorescence

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

Nepřímá imunofluorescence

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

Imunofluorescence schematicky



A: *Treponema pallidum* – od pacienta

B: Značená protilátka proti *Treponema pallidum*

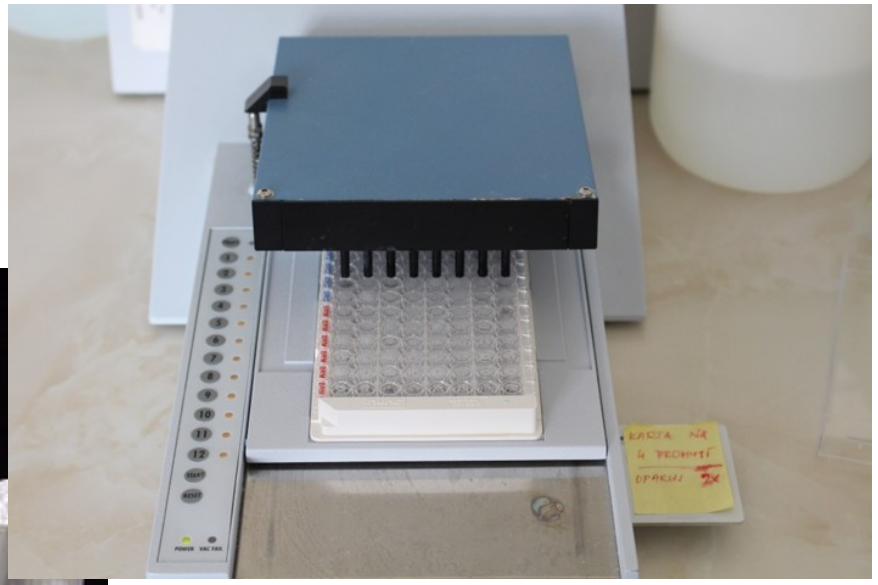
C: *Treponema pallidum* – z laboratoře

D: Protilátka proti *Treponema pallidum* – od pacienta

E: Značená protilátka proti lidské protilátce

ELISA

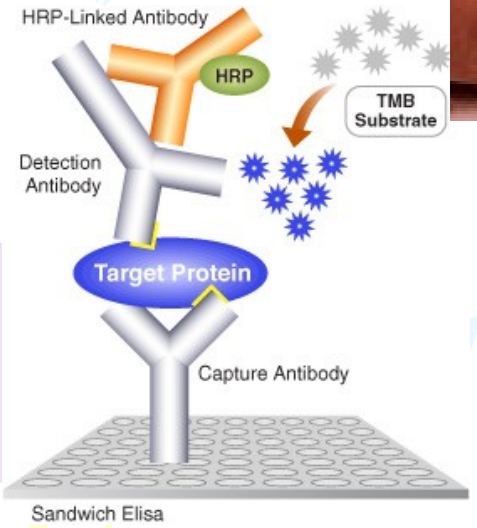
www.genprice.com



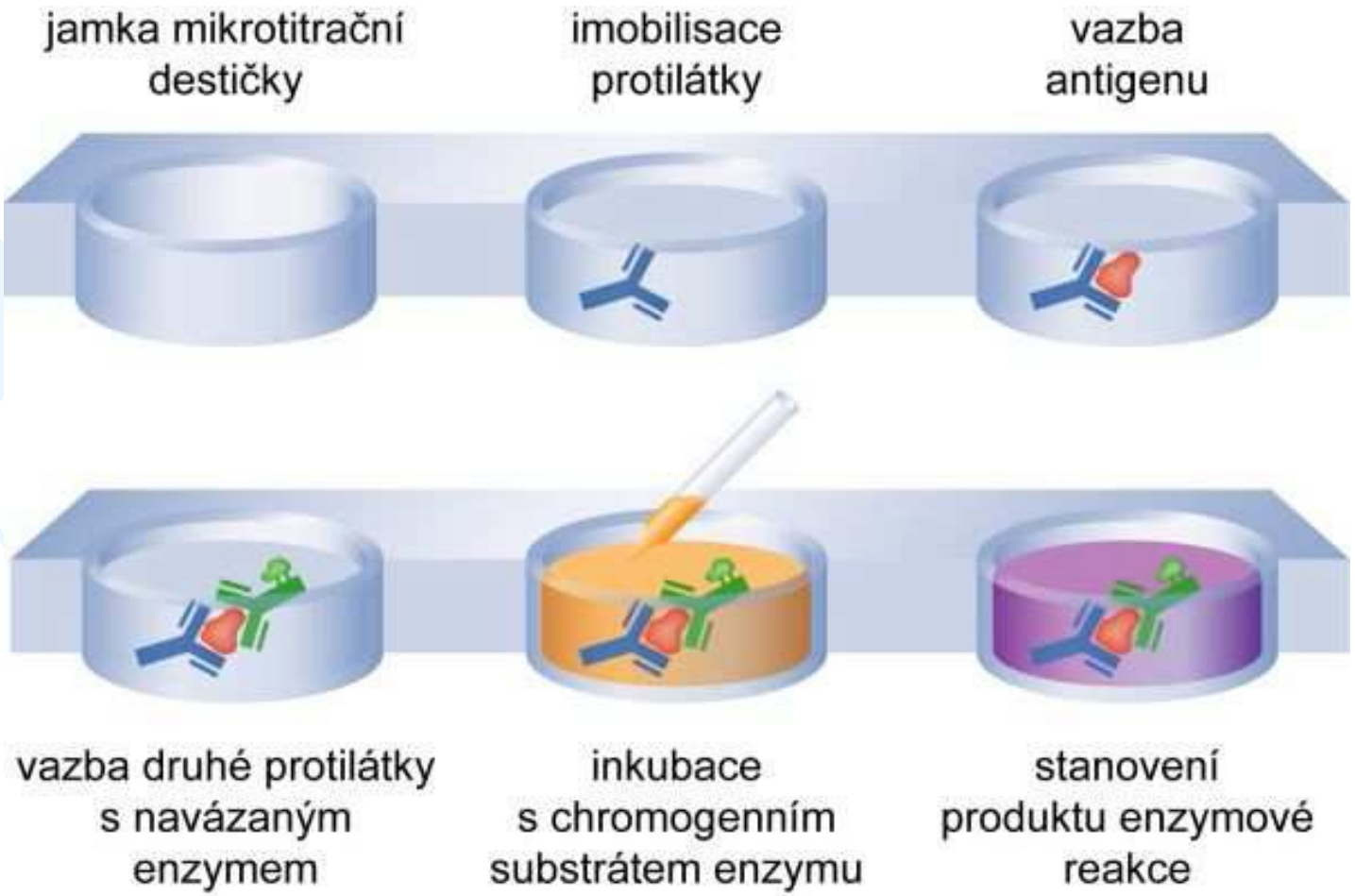
ELISA

virology-online.com

www.cellsignal.com



ELISA



https://vydavatelstvi-old.vscht.cz/knihy/uid_es-002_v1/hesla/elisa.html

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

Možnosti uspořádání složek bleděmodře vždy složka pocházející ze vzorku získaného od pacienta

- Povrch-antigen-protilátka-značidlo (P)
- Povrch-protilátka-antigen-protilátka-značidlo (P, např. průkaz HBsAg)
- Povrch-antigen-protilátka-antigen-značidlo (N)
- Povrch-antigen-protilátka-konjugát-značidlo (N)

Konjugát je protilátka namířená proti lidské protilátce

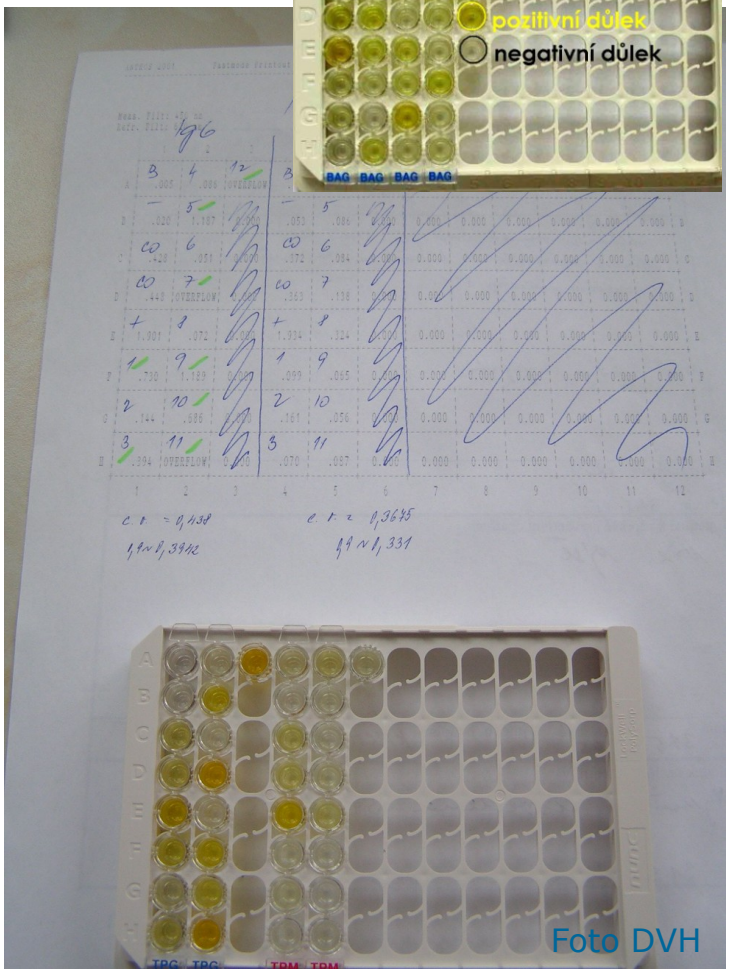
ELISA – praktické provedení

- 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 (dva či tři důlky) – výrobcem dodané „vzorky" s právě hraniční hodnotou absorbance („odsekávají" pozitivní výsledky buď ostře, nebo s rozmezím plus mínus 10 %)

Vždy záleží na konkrétní reakci ELISA a jejím provedení. Někdy chybí blank, někdy není cut off přímo obsažen v destičce, ale počítá se jako průměr negativních kontrol + konstanta.

ELISA – ukázka

(www.medmicro.info)



ELISA, průkaz protilátek

- U nepřímého průkazu reakcí ELISA se zpravidla hodnotí zvlášť protilátky IgM, IgA a IgG

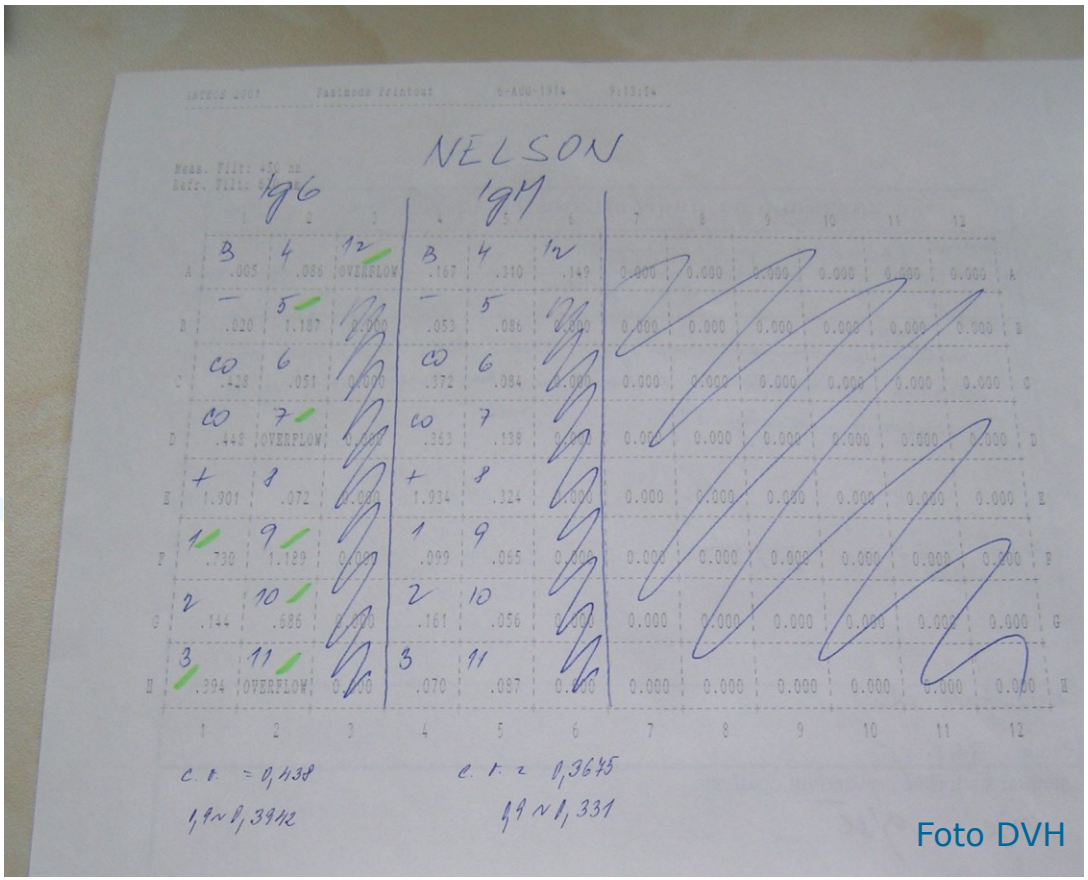


Foto DVH

ELISA

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

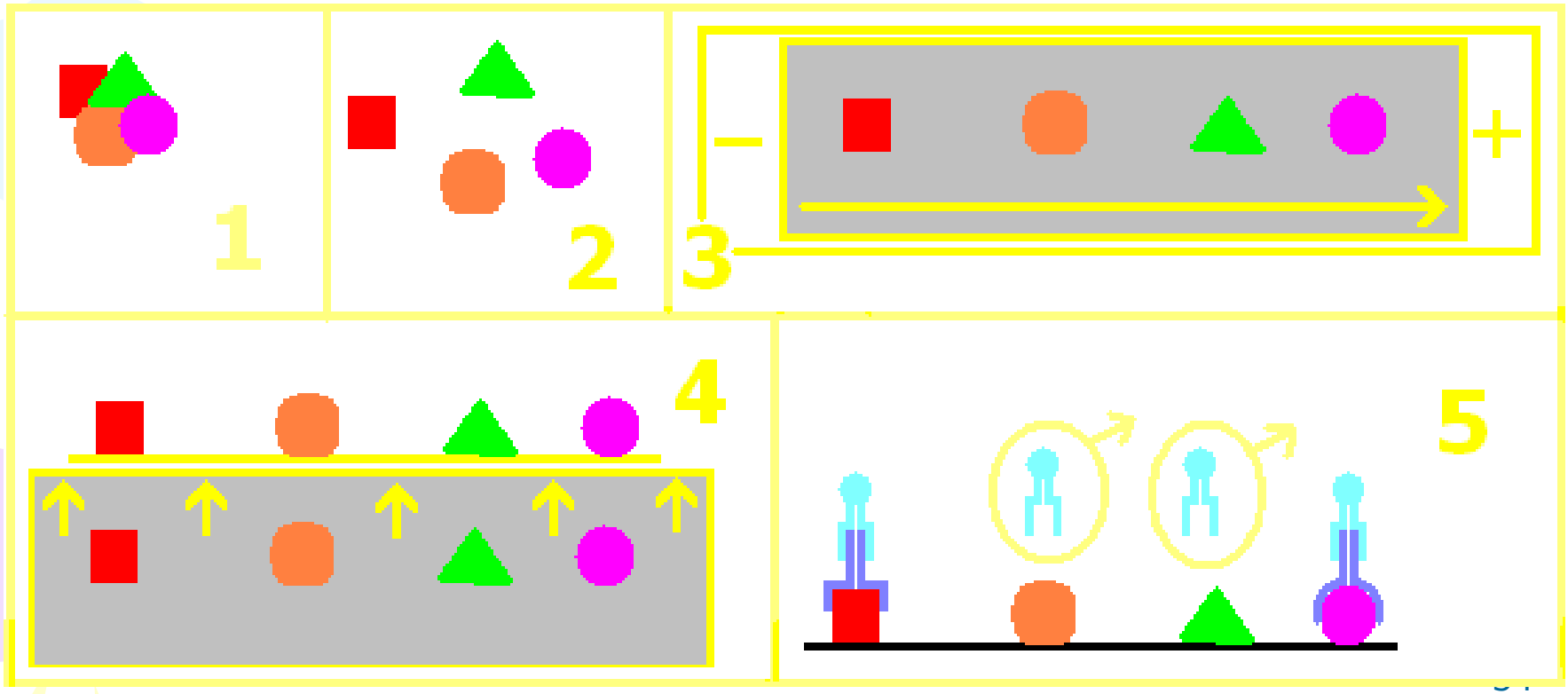
Western blotting

- *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

Western blotting – princip

1: původní antigen (směs)
2: uvolnění jednotlivých antigenů detergentem
3: elektroforetické rozdělení antigenů

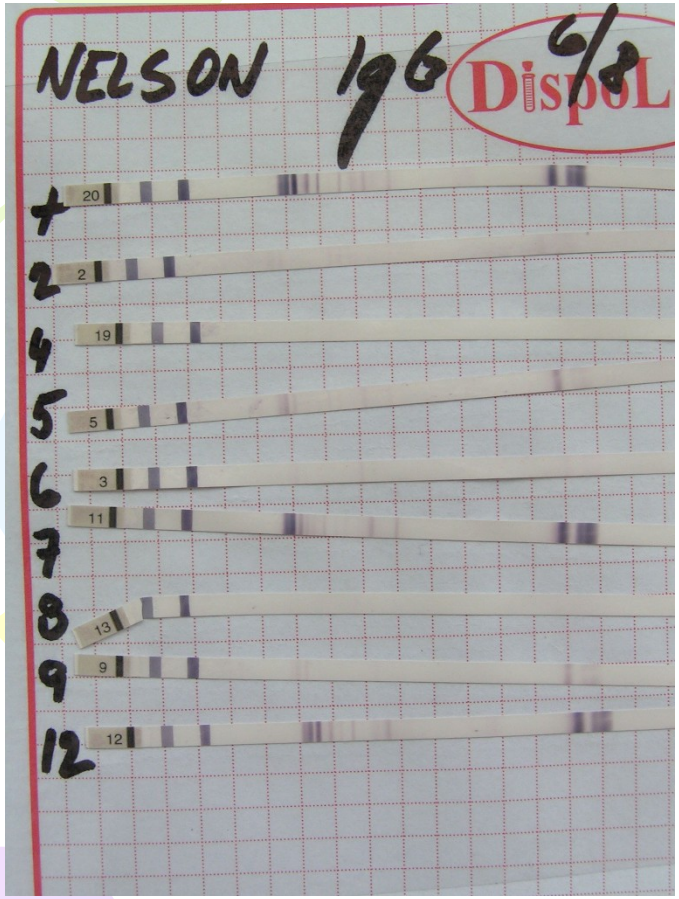
4: „přesátí“ rozdělených antigenů na nitrocelulózu
5: reakce ELISA (přítomny jsou jen některé protilátky)



Imunoblot

Foto DVH

Western blot - ukázky



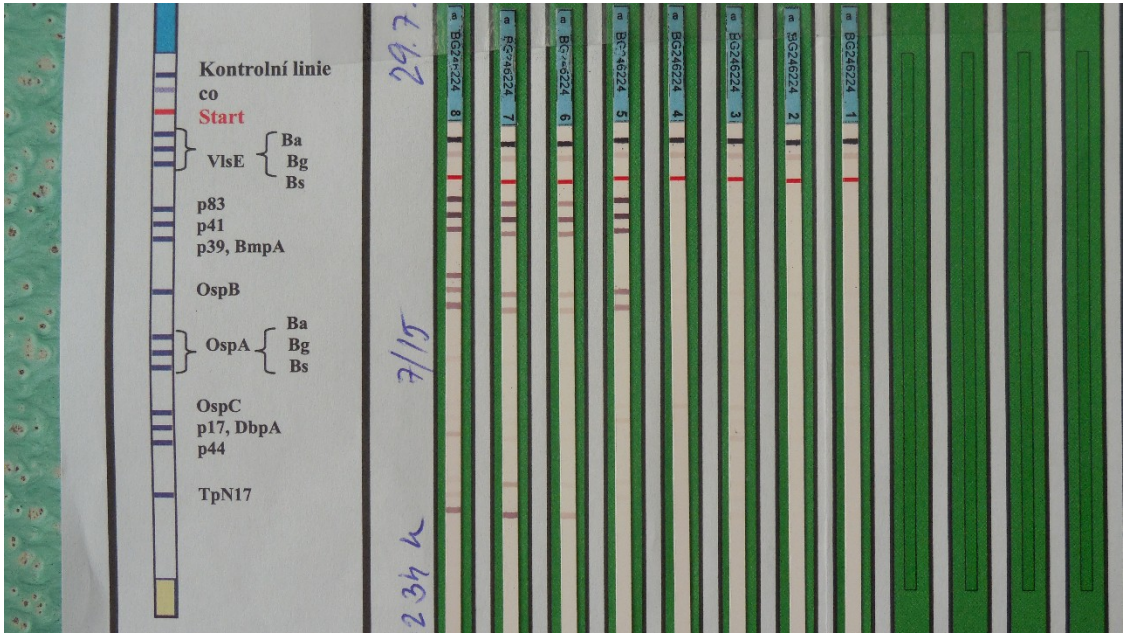


Foto DVH

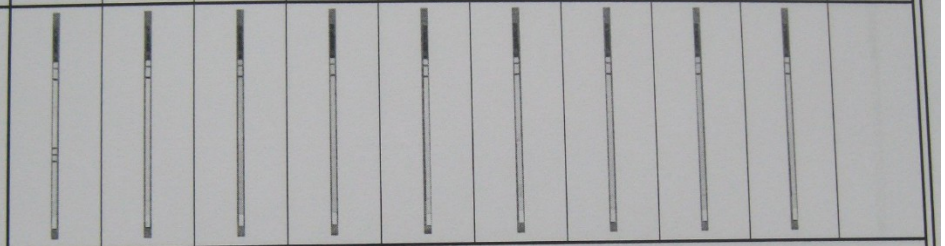
Western blot výsledný protokol

Souhrnné vyhodnocení

BLOT-LINE Borrelia/HGA IgM

Šarže: 834307Z
Vyhotovil: Dvořáková
Čas vyhodnocení: 11.11.2013 13:56:06

Snímek skenu(1 - 9):

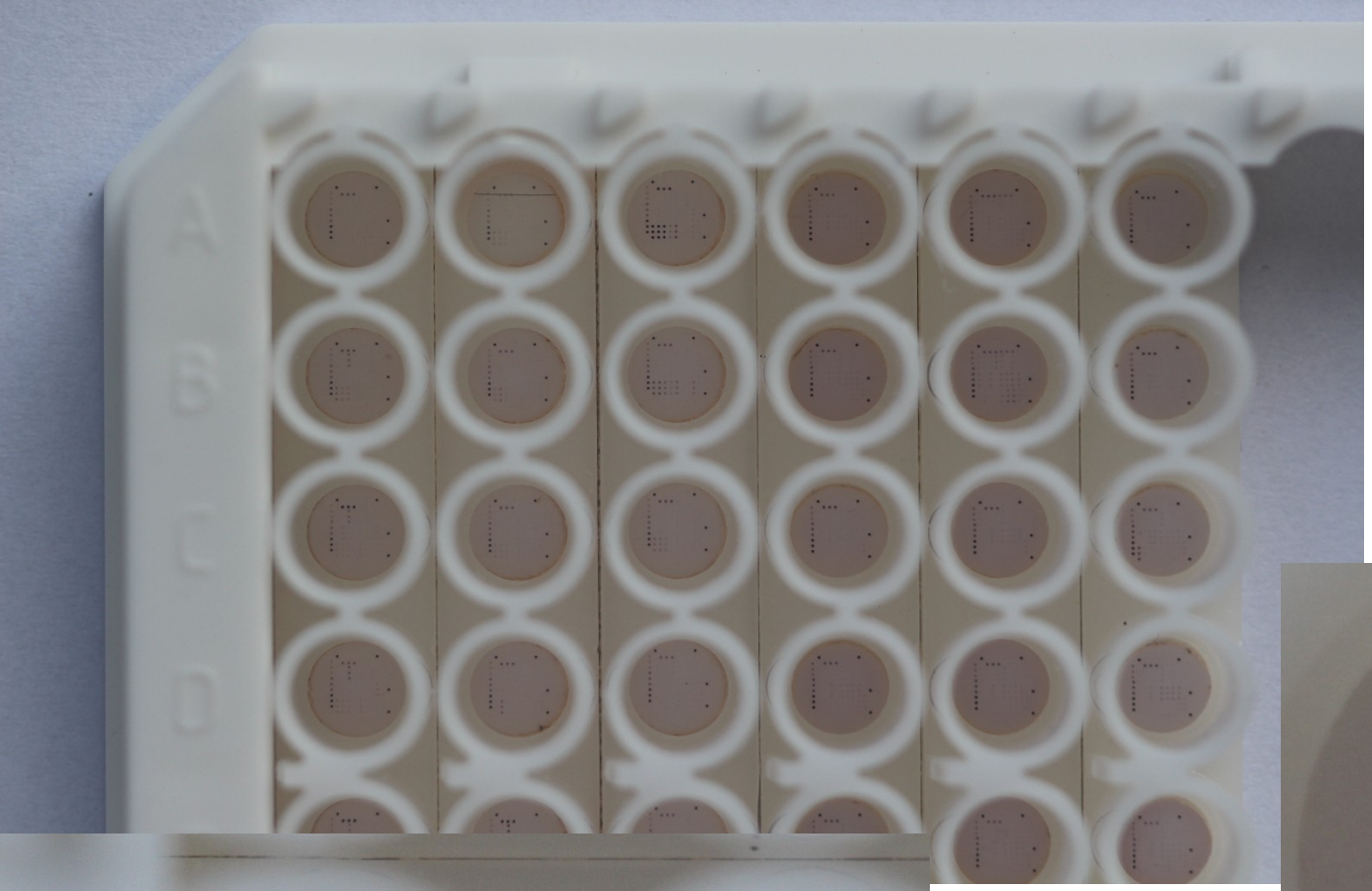


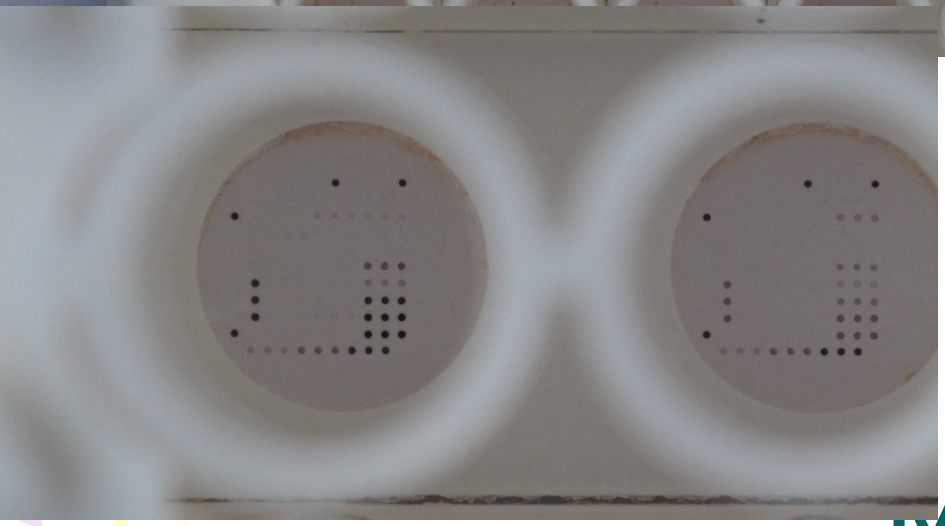
Výsledky(1 - 9):

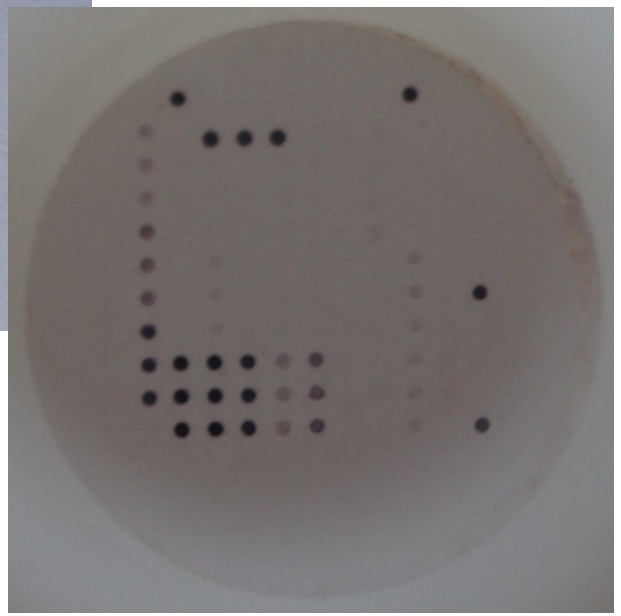
	Vzorek č. 1	Vzorek č. 2	Vzorek č. 3	Vzorek č. 4	Vzorek č. 5	Vzorek č. 6	Vzorek č. 7	Vzorek č. 8	Vzorek č. 9
Označení	K+	K-	2	4	8	9	10	12	13
p41	12,42[H]	0,42[N]	0,75[N]	1,93[N]	4,13[N]	0,40[N]	0,00[N]	0,77[N]	1,22[N]
p39	5,80[H]!	0,00[N]	0,38[N]	1,17[N]	2,04[N]	0,00[N]	0,00[N]	0,39[N]	2,42[N]
OspC Ba	**47,65[P]**	0,00[N]	6,18[H]	6,16[H]	3,66[N]	9,74[H]!	1,58[N]	0,79[N]	3,15[N]
OspC Bg	**43,56[P]**	0,42[N]	4,11[N]	5,67[H]	2,35[N]	0,00[N]	1,94[N]	0,76[N]	2,33[N]
OspC Bs	**45,87[P]**	0,00[N]	4,41[N]	7,84[H]	0,39[N]	1,58[N]	2,33[N]	0,38[N]	2,72[N]
p44	8,00[H]	1,27[N]	1,11[N]	1,16[N]	1,63[N]	0,00[N]	1,20[N]	0,00[N]	1,61[N]
Borrelia	**Pozitivní**	Negativní	Hraniční	Hraniční	Negativní	Hraniční	Negativní	Negativní	Negativní
Anaplasma	Hraniční	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní

ontrolujte zařazení linií označených [!] z důvodu možné interference s pozadím, nebo nejasné interpretece linie

Foto DVH







Microblotarray

Foto DVH

Chemiluminiscenční metody (imunoanalýza)

- Značidlem je chemiluminofor
- Dochází k vyzáření světla, které je následně detekováno
- Běžně se tato metoda užívá v modifikaci CMIA (Chemiluminiscent Microparticle Immunoassay)
- Antigen nebo protilátka jsou navázána na paramagnetické částice

- měří se vyzářené světelné kvantum v relativních světelných jednotkách (RLU)

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.

Ukázky imunochromatografických testů

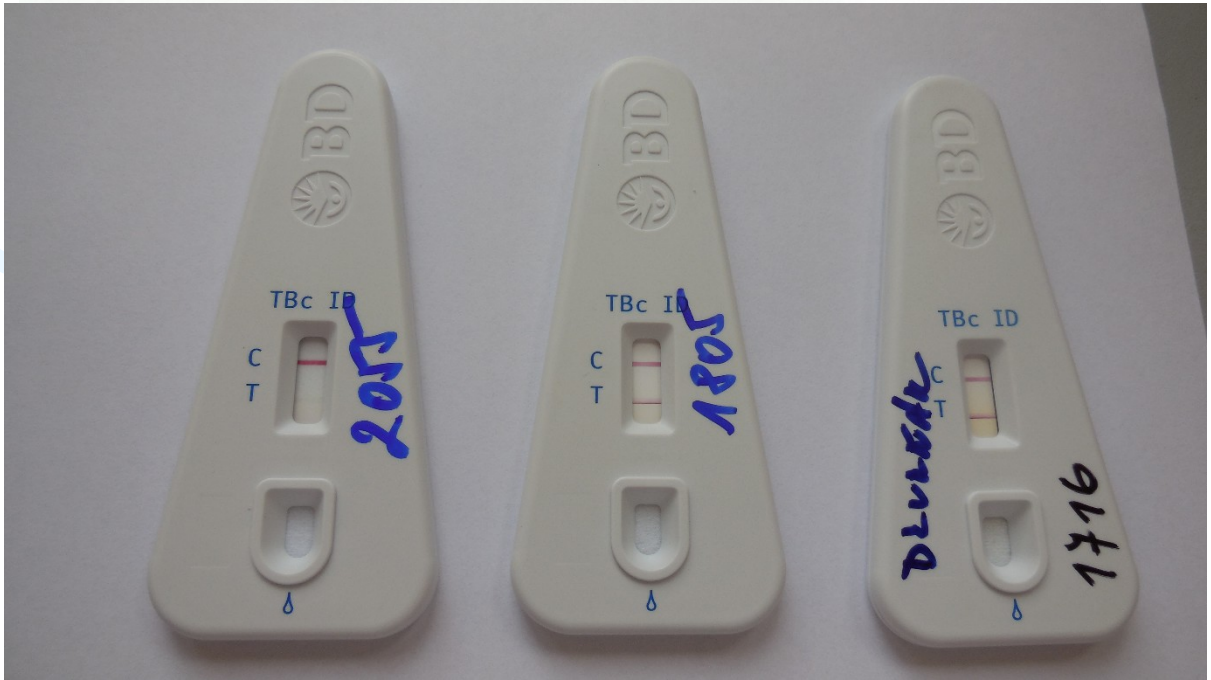


Foto DVH

Imunochromatografické testy: výhody

- 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)
- POCT

Nevýhoda: jsou poměrně drahé ve srovnání s tradičními testy

Přeji Vám hezký zbytek dne…