

# Reakce se značenými protilátkami (J10)



- Autor prezentace: Ondřej Zahradníček
- Praktika z lékařské mikrobiologie (VLLM0421c)
- Kontakt
- 777 031 969 [zahradnicek@fnusa.cz](mailto:zahradnicek@fnusa.cz)
- ICQ 242-234-100





# Pro zopakování

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



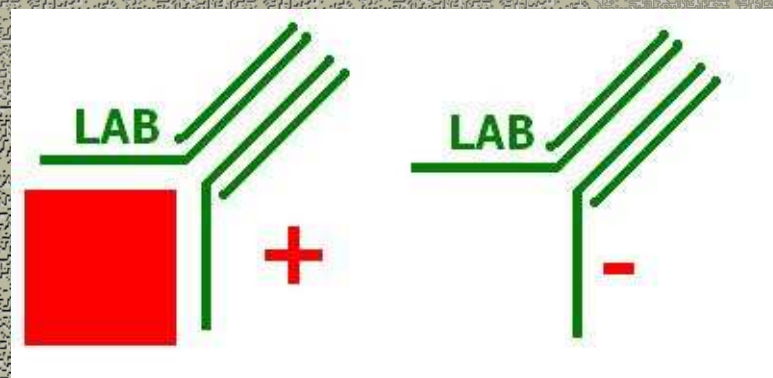


# Všechny sérologické metody

Můžeme využít k průkazu antigenu:

laboratorní protilátky (zvířecí)

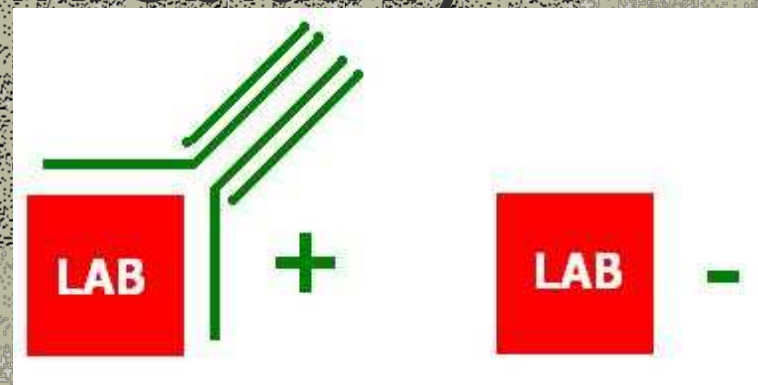
+ vzorek pacienta  
nebo kmen mikroba.



Anebo k průkazu protilátky:

laboratorní antigen (mikrobiální)

+ sérum pacienta  
(popř. sliny, likvor)







# Interpretace – doplněné opakování

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





# Mějte stále na paměti

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



# Průběh protilátkové odpovědi

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







# Protilátky ostatních tříd

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





# Reakce se značenými složkami

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





# Promytí a jeho význam

- Pokud by v reakci zůstalo přítomno i to, co se na nic nenačázalo, nedokázali bychom odlišit pozitivní reakci od negativní
- Proto po každém kroku reakce následuje **promytí**, po kterém zůstanou přítomny pouze složky navázané na pevný povrch
- Je-li řetězec přerušen, odplaví promytí vše za místem přerušení





# Průběh pozitivní reakce (možnost se třemi složkami – mohou být jen dvě)

Značidlo,  
které je  
nakonec  
detekováno

**Třetí složka**

**Druhá složka**

**První složka**

povrch





# Průběh negativní reakce

(možnost se třemi složkami)

Značidlo,  
které by bylo  
detekováno

**Třetí složka**

**Chybí druhá složka (vzorek negativní)**

**První složka**

**Důležité je promytí  
po každém kroku.  
Odstraní vše, co  
není navázáno, tedy  
nakonec i značidlo.**

---

povrch





# Typy značidel

- **Fluorescenční barvivo** je značidlem u imunofluorescence
- **Radioizotop** je značidlem u reakce RIA
- **Enzym** je značidlem u reakce ELISA
  - **Western blotting** je zvláštním případem reakce ELISA, kde jednotlivé antigeny jsou elektroforeticky rozděleny

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





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

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

*Konjugát je protilátka namířená proti lidské protilátce*





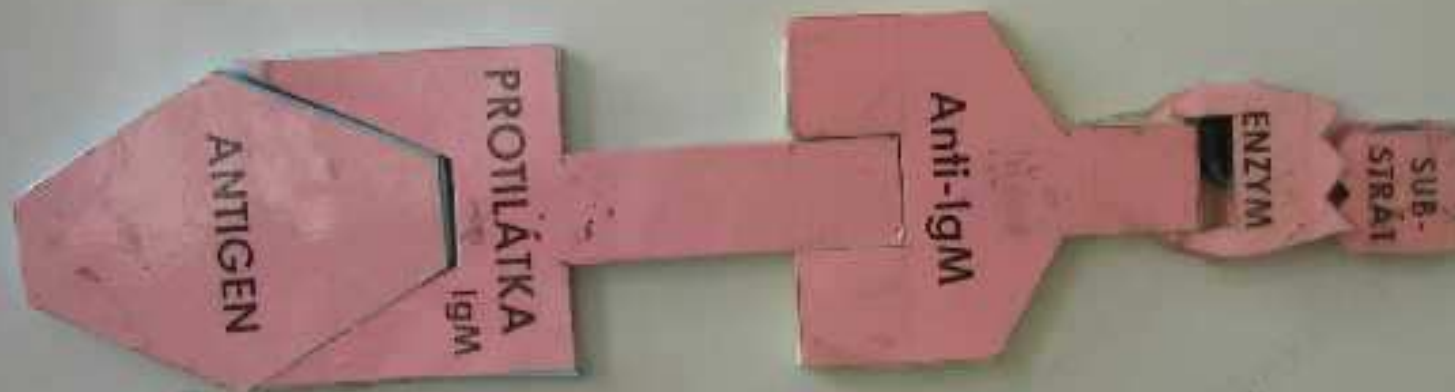
# Význam konjugátu

- **Konjugát** se používá zpravidla u reakcí nepřímého průkazu (průkaz protilátek)
- Je to protilátka, pro kterou je **antigenem lidská protilátka** např. IgM nebo IgG
- Dokáže být **selektivní** proti určité třídě lidské protilátky
- Použití konjugátu je tedy podstatou možnosti selektivního průkazu jednotlivých **tříd protilátek**



# Příklad reakce ELISA použité k detekci protilátky

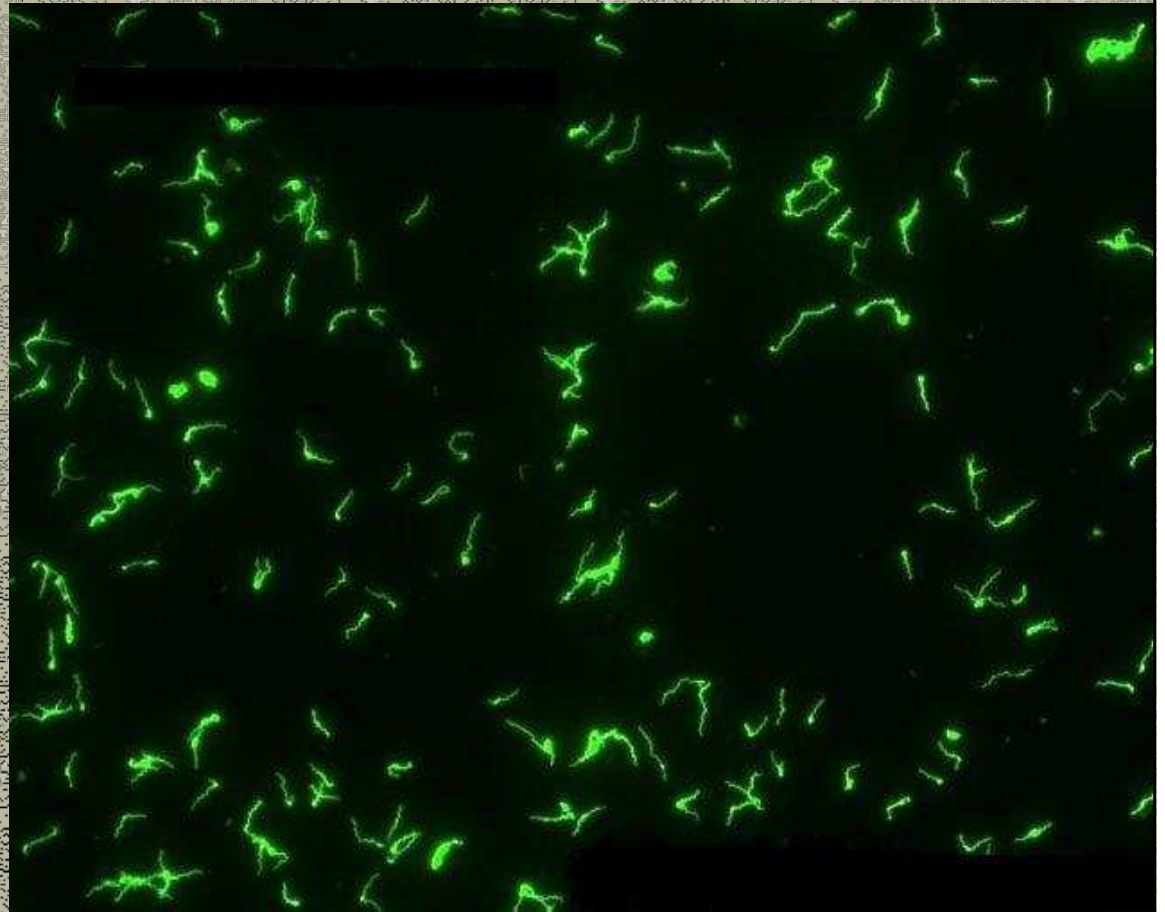
Všimněte si použitého konjugátu anti-IgM. Ten bude reagovat vždy jen s protilátkou IgM. Bude-li přítomna protilátka proti příslušnému antigenu, avšak třídy IgG, nebude s ní konjugát reagovat.







# Úkol 1 a úkol 2



## Přímá imunofluorescence

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

## Nepřímá imunofluorescence

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





# ELISA – proč je tak oblíbená

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





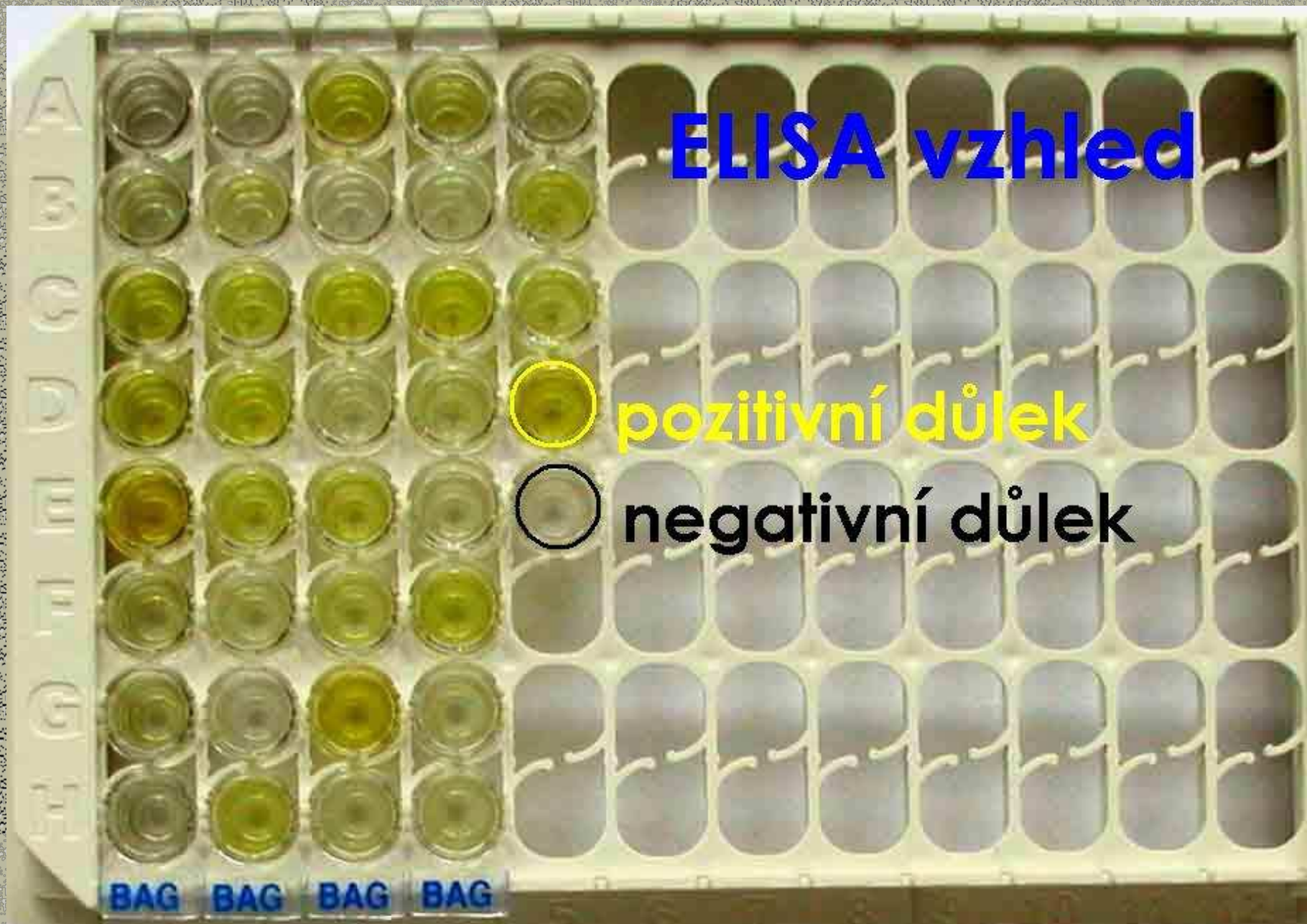
# ELISA – praktické provedení

- Zpravidla máme k dispozici **destičku s jamkami**. Na rozdíl od klasických serologických reakcí má každý pacient nikoli celý řádek, ale jen jeden důlek. To proto, že nezjišťujeme titry
- Před vlastními důlky pacientů bývá:
  - **BI** – blank (pro kalibraci spektrofotometru)
  - **K- a K+** – pozitivní a negativní kontrola
  - **Cut off** (dva či tři důlky) – výrobcem dodané „vzorky“ s právě hraniční hodnotou absorbance („odsekávají“ pozitiv. výsledky)





# ELISA – ukázka ([www.medmicro.info](http://www.medmicro.info))







# Úkol 3: ELISA, průkaz antigenu

- U reakce ELISA je na konci celého procesu **enzymatická reakce**. Její intenzita se projeví intenzitou zbarvení v důlku, kde reakce probíhá
- Intenzitu zbarvení lze měřit **spektrofotometricky**
- Za **pozitivní** se považují hodnoty vyšší než referenčně daný tzv. „cut off“
- V našem případě se cut off počítá jako
- $(A1 + B1 + C1)/3 + 0,050$





## Úkol 4: ELISA, průkaz protilátek

- U nepřímého průkazu reakcí ELISA se zpravidla hodnotí zvláště protilátky IgM a IgA
- Za **pozitivní** se opět považují hodnoty vyšší než referenčně daný tzv. „cut off“
- V našem případě se cut off počítá jako  
$$(B1 + C1)/2 + 0,320$$
- Výsledky mezi 90 % a 110 % cut off se hodnotí jako „**hraniční**“, pod 90 % jako „**negativní**“, nad 110 % jako „**pozitivní**“





# Western blotting

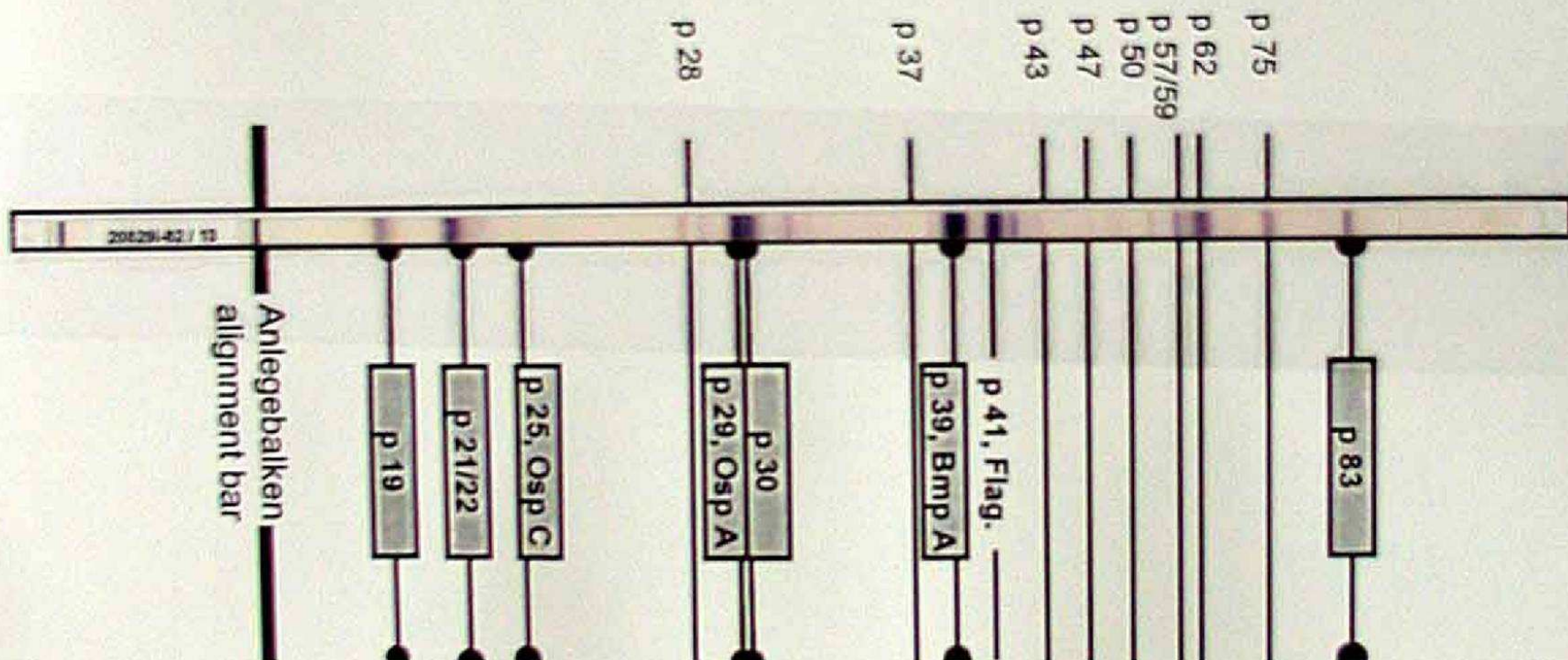
- *Název – slovní hříčka (badatel Southern)*
- Prakticky je to ELISA, ale směs antigenů je **rozdělena elektroforeticky** na jednotlivé antigenní determinanty
- Je tedy **přesnější** a pomáhá zejména tam, kde klasická ELISA traskotá na zkřížené pozitivě např. příbuzných mikroorganismů





# Western blot – vzhled

(obrázek z [www.medmicro.info](http://www.medmicro.info))







# Úkol 5 – Western blotting

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





Hezký  
den!

