

# Lékařská mikrobiologie pro ZDRL



Týden 10:

Úvod do sérologie, aglutinace a precipitace, ředění

Ondřej Zahradníček 777 031 969

[zahradnicek@fnusa.cz](mailto:zahradnicek@fnusa.cz) ICQ 242-234-100

# Úvodem

- V této přednášce se už zase budeme zabývat mikrobiologickou diagnostikou, přičemž využijeme to, co jsme se dozvěděli v minulé přednášce. Nejvíc si pamatujme to, co jsme se dozvěděli o specifické humorální imunitě: je založena na interakci **antigenu** (v případě mikrobiálních antigenů jde o povrchovou část těla mikroba) s **protilátkou** (imunoglobulinem, který je tvořen makroorganismem).



Pro zopakování:

## Metody lékařské mikrobiologie

- **Přímé metody:** detekce mikroba, jeho části nebo produktu. Mikroskopie, kultivace, biochemická identifikace, **průkaz antigenu**.  
**Pozitivita** = je jisté, že agens je NYNÍ přítomno.
- **Nepřímé metody:** **detekce protilátek** proti mikrobovi. **Pozitivita** = mikrob potkal hostitele v minulosti (nevíme, zda před týdny / měsíci / roky)

# Antigen a protilátka - opakování

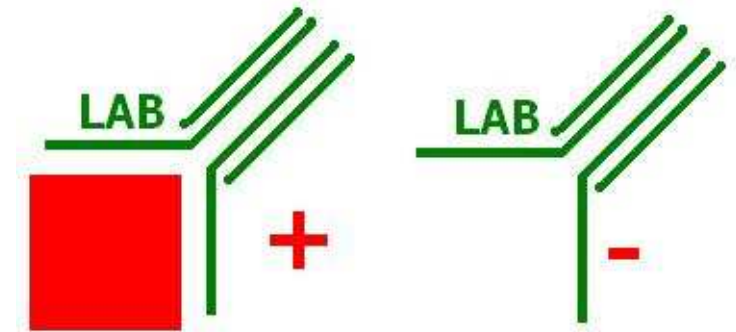
**Antigen** = makromolekula pocházející z cizího organismu: rostliny, mikroba, jiného živočicha. V mikrobiologii nás zajímají mikrobiální antigeny = části mikrobiálního těla, které vzbuzují v hostiteli antigenní odpověď

**Protilátka** = imunoglobulin, tvořený v těle hostitele jako odpověď na antigenní výzvu (samozřejmě nejen u člověka, ale i u zvířat)

# Dva způsoby, jak to využít:

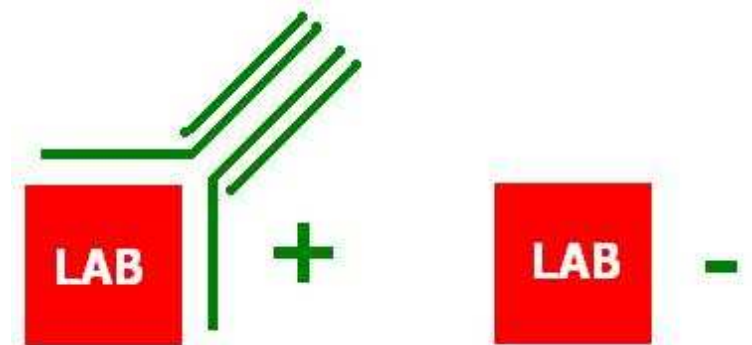
**Průkaz antigenu:** laboratorní protilátky (zvířecího původu) + vzorek pacienta nebo kmen mikroba.

Přímá metoda



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

Nepřímá metoda



# Průkaz antigenu a antigenní analýza

- **V rámci průkazu antigenu** (tedy přímého průkazu) lze ještě dále rozlišit dva podtypy:
  - **Přímý průkaz antigenu ve vzorku**, například ve vzorku mozkomíšního moku
  - **Antigenní analýza (identifikace) kmene**, izolovaného ze vzorku (například kmene meningokoka)
- U **nepřímého průkazu** naopak vždy pracujeme se vzorkem, a to **se vzorkem séra**, kde hledáme protilátky

# 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 (relativní – **titr**)
  - Třída protilátek: IgM/IgG (více v dalších př.)
  - (*Avidita protilátek*)

# Jak tyto informace zjistit

- **Akutní infekce:** velké množství protilátek, převážně třídy IgM 1
- **Pacient po prodělané infekci:** malá množství protilátek, hlavně IgG (imunologická paměť) 2
- *Chronická infekce: různé možnosti*





# Jak provést reakci „kvantitativně“

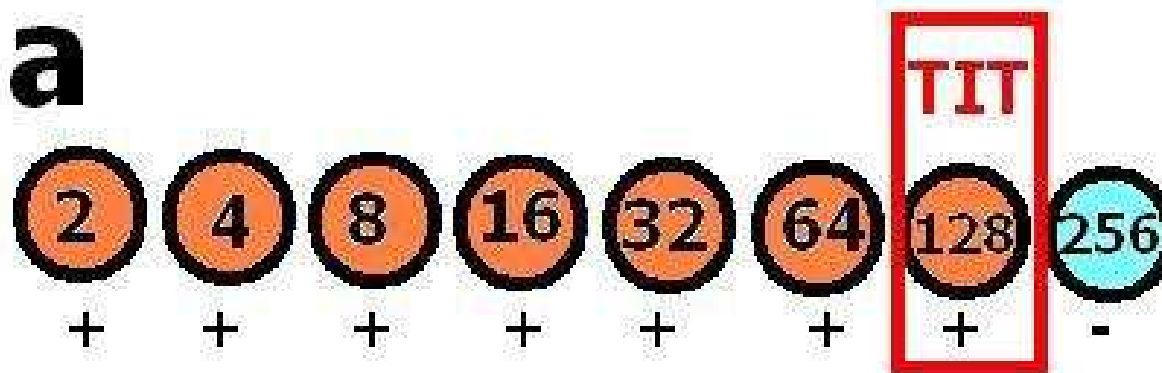
- Je velmi těžké zjistit koncentraci protilátek v jednotkách mol/l, mg/l apod.
- Ale dá se dělat jiná věc: mnohonásobně ředit pacientovo sérum.
  - Reaguje-li i po mnohonásobném ředění → → v séru je velké množství protilátky
  - Reaguje jen při nevelkém zředění séra → → jen malé množství protilátky

# Obvyklý způsob ředění: Geometrická řada

- Vycházíme z neředěného vzorku séra
- V první zkumavce smícháme se stejným objemem diluentu (FR),  $\rightarrow$  ředění 1 : 2
- Polovina ředění 1 : 2 je přemístěna do další zkumavky a smíchána s opět stejným množstvím diluentu  $\rightarrow$  1 : 4
- Jedna polovina z 1 : 4 .....  $\rightarrow$  1 : 8
- Atd., atd.

# Pojem Titr

**a**



**b**



**Titr** – nejvyšší ředění, kde je pozitivní reakce. Máme-li dvě řady, je titrem nejvyšší ředění z obou řad dohromady.

# Zapamatujte si:

- Veškeré „srandičky“ typu titry, třídy protilátek, zjišťování avidity, slouží k odlišení akutní infekce, chronické infekce a stavu po dávno prodělané infekci. Týkají se pouze **nepřímého průkazu!**
- **Přímý průkaz** totiž přímo prokazuje v těle pacienta část patogenova organismu. Není tedy nutné žádné další upřesnění

# Typy serologických reakcí a jejich způsoby využití

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



# Precipitace, aglutinace, aglutinace na nosičích

- **Precipitace:** Antigeny jsou ve formě izolovaných makromolekul (koloidní antigen)
- **Agglutinace:** Antigen je součástí buňky mikroba (pracujeme tedy s celými mikroby)
- **Agglutinace na nosičích:** Původně izolované antigeny jsou navázány na nosič (latex, erytrocyt, polycelulóza)

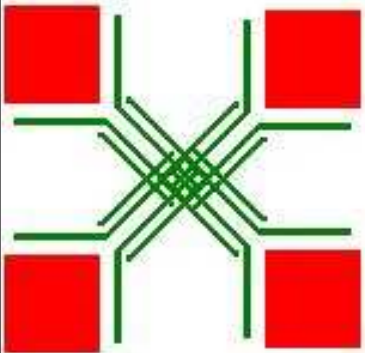
# Schematické rozdíly

1 – precipitace

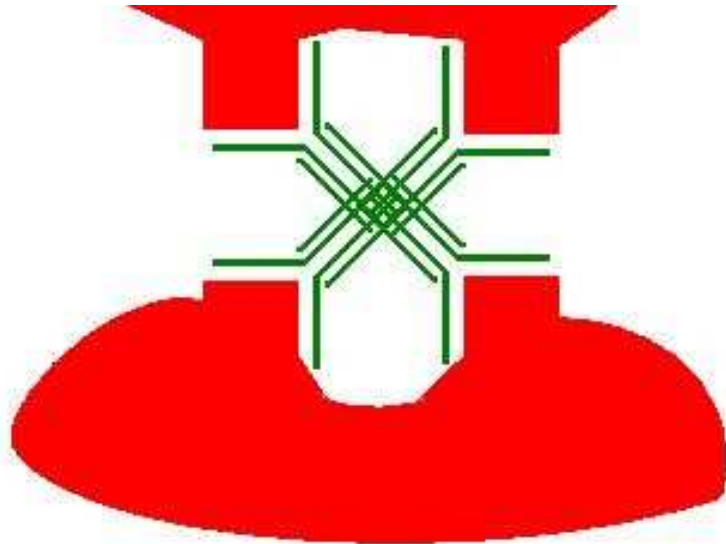
2 – aglutinace

3 – aglutinace na nosiči

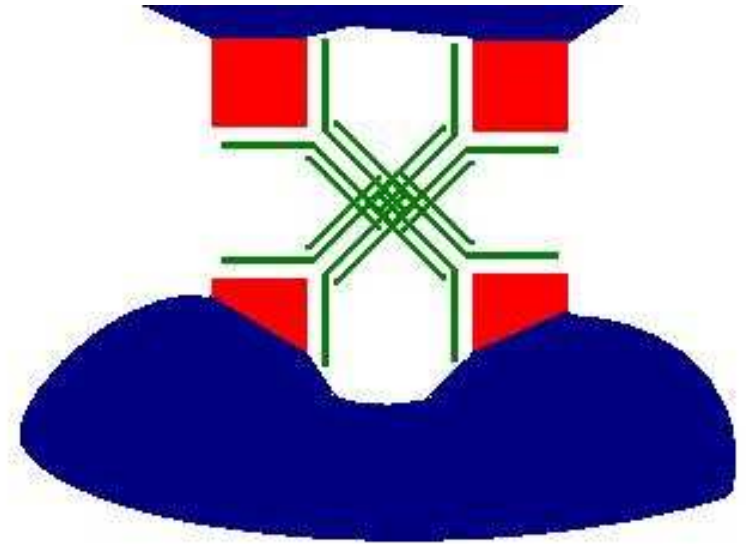
1



2



3



# Příklad 1: Antigenní analýza

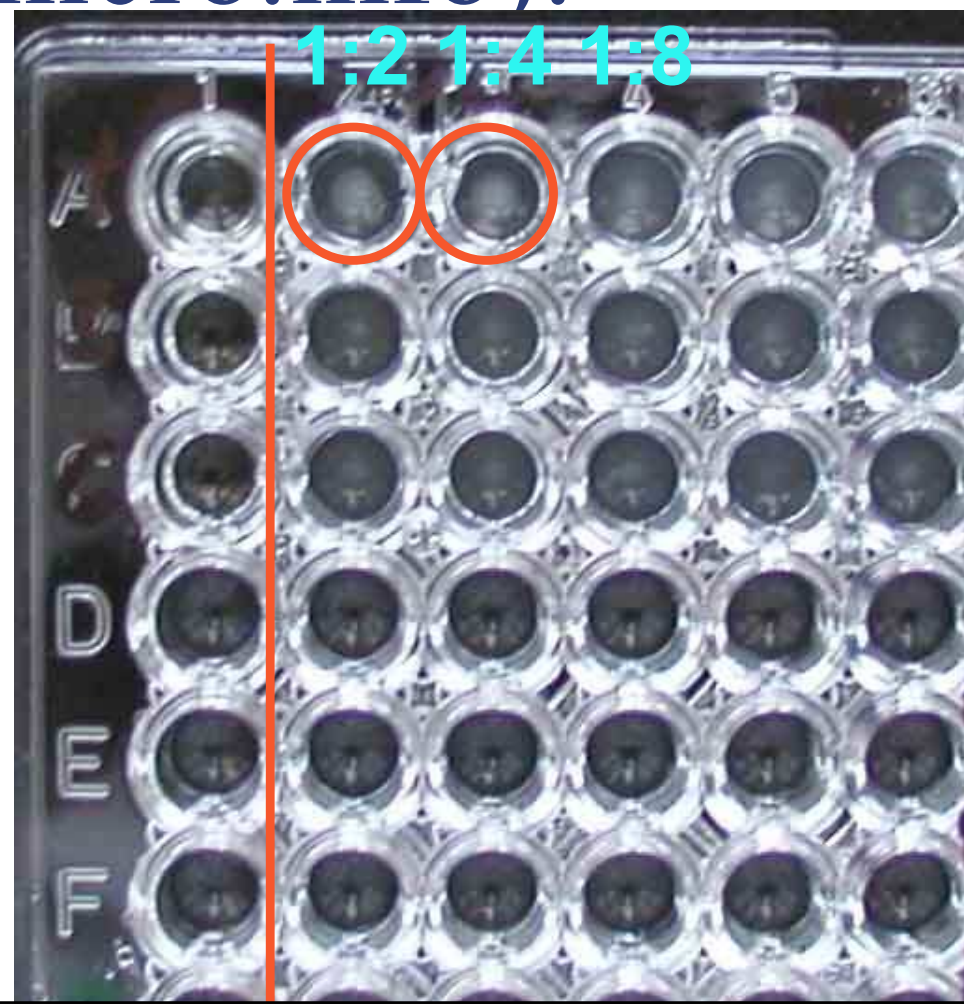
## Enteropatogenní *Escherichia coli*

- Většina kmenů *Escherichia coli* je „hodných“
- Ze všech antigenních typů *E. coli* je asi 12, které jsou „enteropatogenní“ – mohou dělat novorozenecké průjmy
  - Použijeme polyvalentní séra: nonovalentní obsahuje protilátky proti devíti typům EPEC, trivalentní proti dalším třem. Zákal = pozitivita
  - Pokud jedno ze sér (A či B) je „+“, musíme pokračovat s tri- a monovalentními séry
- *Je vám jasné, proč tu neurčujeme titry?*



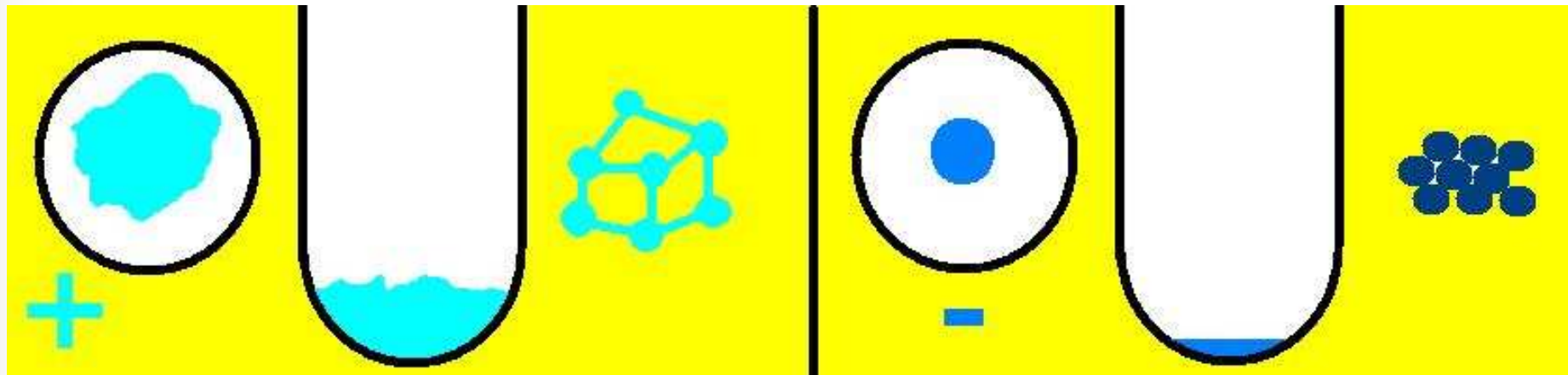
## Příklad 2: aglutinační reakce na průkaz protilátek u tularemie (ze stránky [www.medmicro.info](http://www.medmicro.info)):

V prvním sloupci jsou kontroly, vlastní reakce začíná od druhého sloupce



# Vzhled pozitivních a negativních jamek u tohoto typu aglutinace

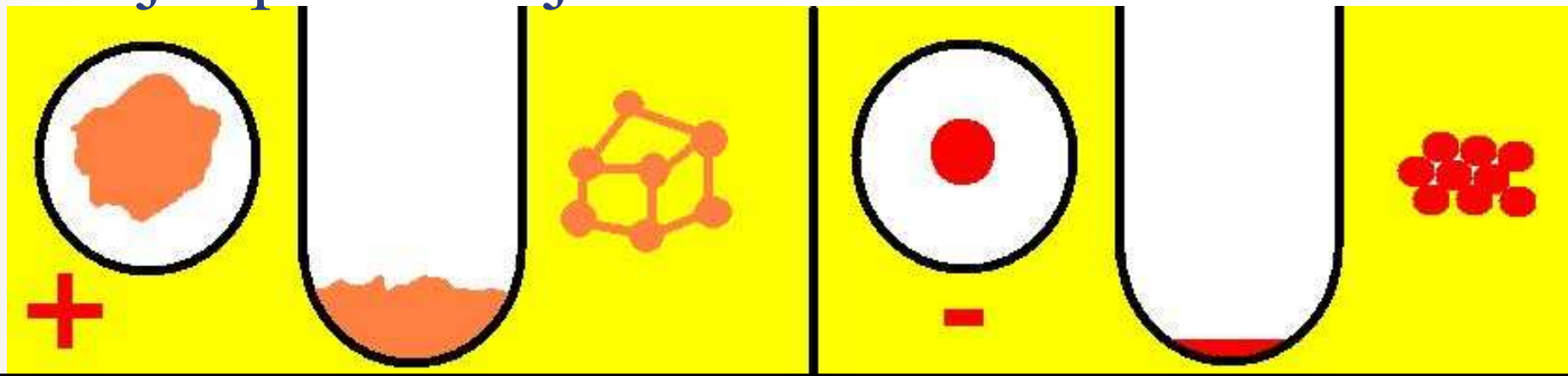
- Pozitivní – nepravidelný chuchvalec, negativní – malé pravidelné kolečko



- Nezapomeňte, že titer = nejvyšší ředění s pozitivní reakcí. První důlek je ředěn 1 : 2, druhý 1 : 4 atd.

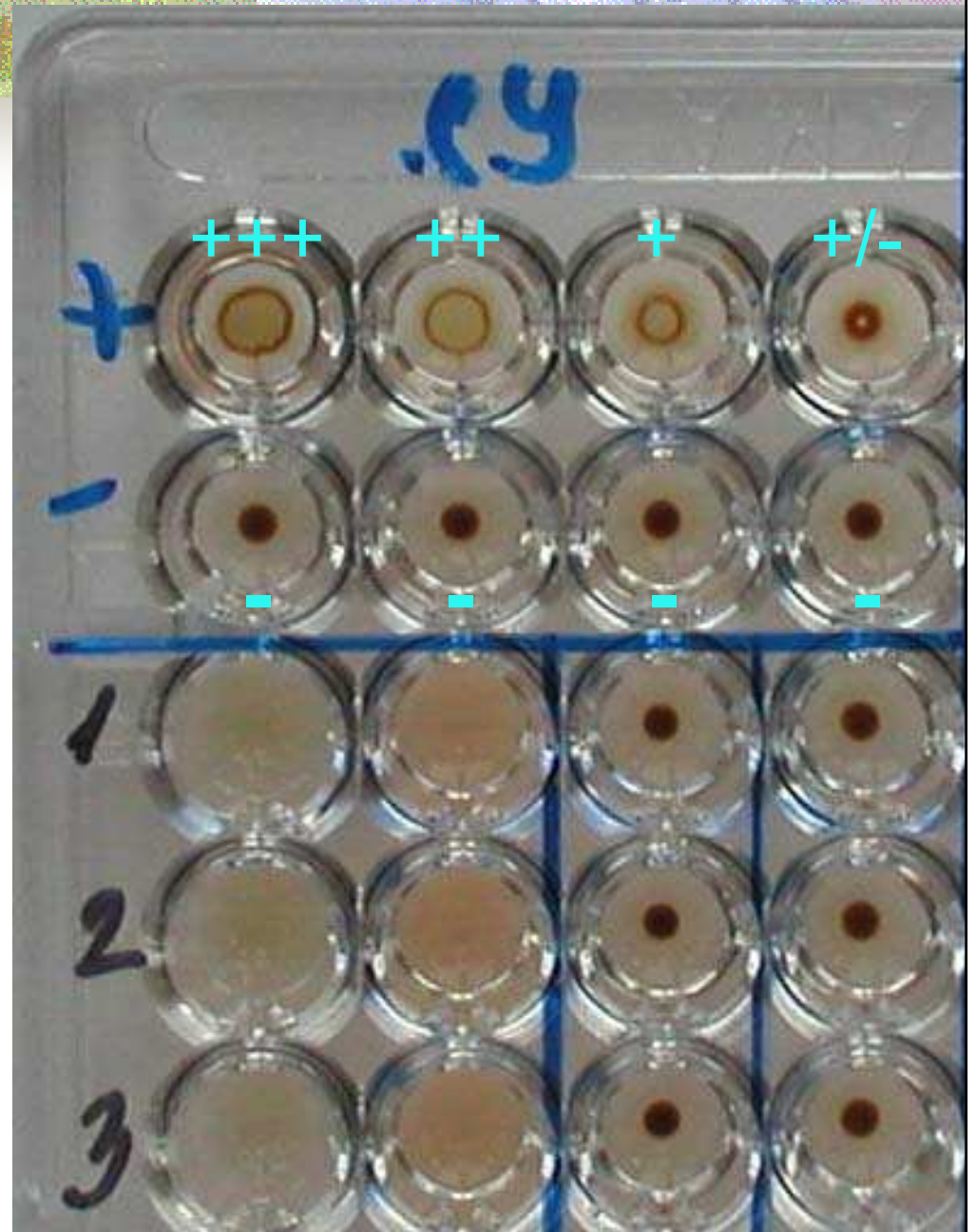
# Příklad 3: *Treponema pallidum* haemaglutinace (TPHA)

- Použijeme červené krvinky, na které je teprve navázán vlastní antigen *T. pallidum* (*Dnes se v tomto testu červené krvinky nahrazují polycelulózovými částicemi – v tom případě jde o TPPA (T. p. polycelul. aglut.)*)
- Tato reakce je sice nepřímý průkaz, ale nepoužívá se ředění a nezjišťují titry. Je to totiž screeningová reakce a případná pozitivita se ověřuje spolehlivějšími metodami



# Demonstrate TPHA

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

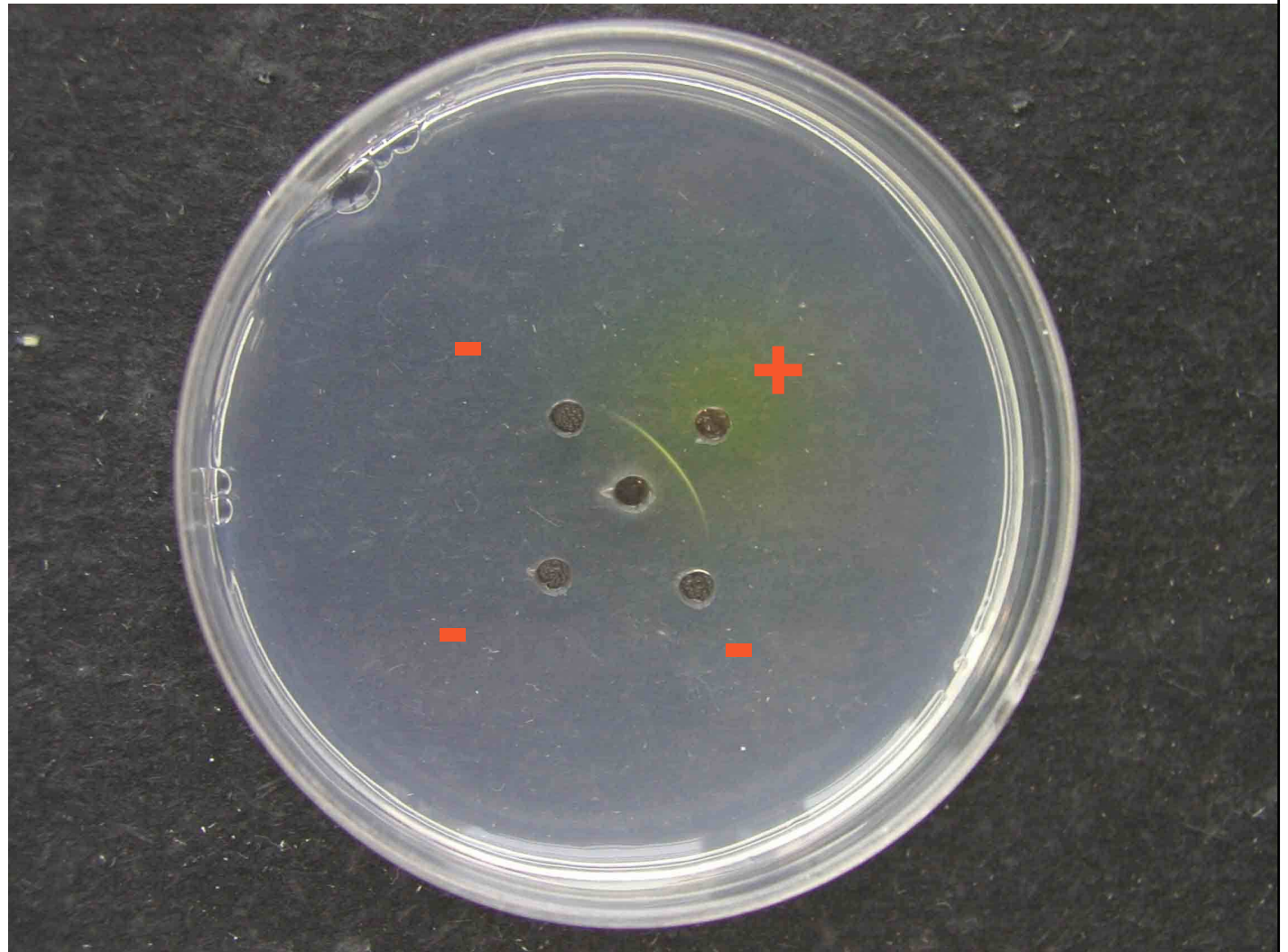


# Příklady precipitace: 1. RRR

- Detekce protilátek, které jsou pozitivní u syfilis, ačkoli to nejsou protilátky proti *Treponema pallidum*, nýbrž proti kardiolipinu (látko, která se objevuje u syfilitiků)
- Takovým reakcím říkáme **průkaz heterofilních protilátek** – jsou to tedy protilátky, které nejsou zaměřené proti antigenu mikroba, ale proti jinému antigenu, který je v době výskytu mikroba přítomen v těle pacienta

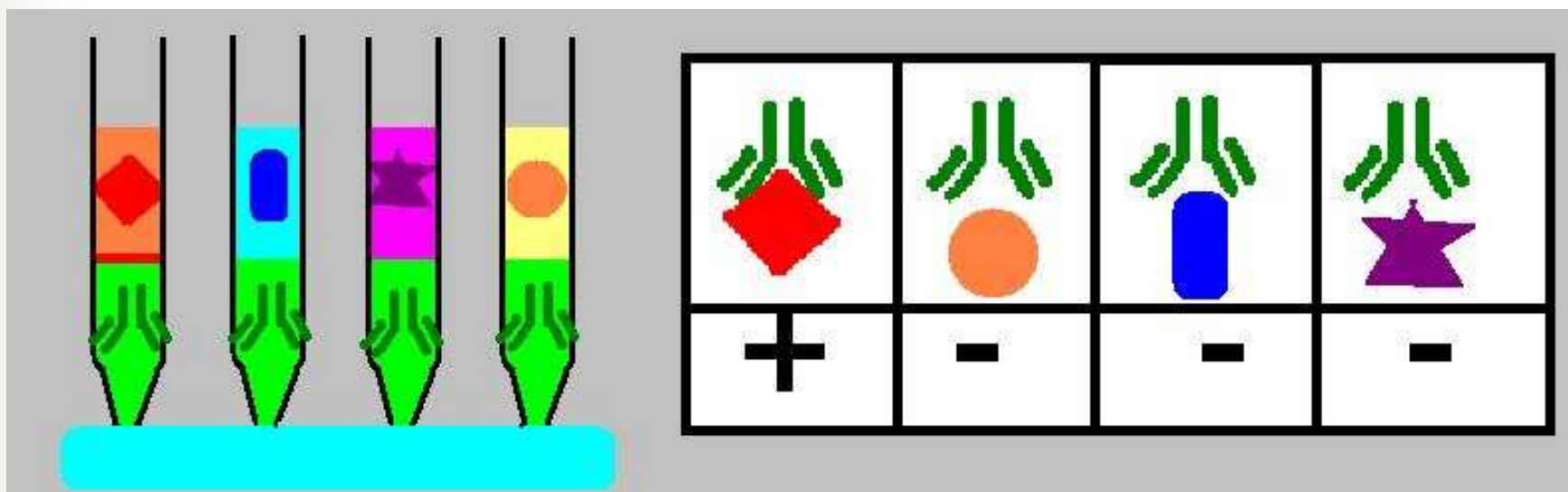
## 2. Demontrace jiného typu precipitace

Tzv. mikroprecipitace v agaru dle Ouchterlonyho



# Prstencová precipitace

- Precipitace k detekci antigenu:
  - 1) zvířecí sérum s protilátkami
  - 2) čtyři různé extrakty kmenů
  - 3) pozitivita: na styku tekutin prstenec





Děkuji za  
pozornost



Příště imunizace (očkování)