

# Lékařská mikrobiologie pro ZDRL

---

Týden 10:

Úvod do sérologie, aglutinace,  
precipitace a komplementfixace;  
ředění séra

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.

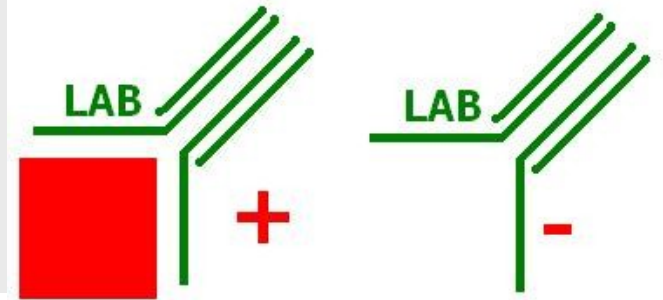
V mikrobiologii nás zajímají mikrobiální antigeny = části mikrobiálního těla, které vzbuzují v hostiteli antigenní odpověď

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

# Dva způsoby, jak to využít:

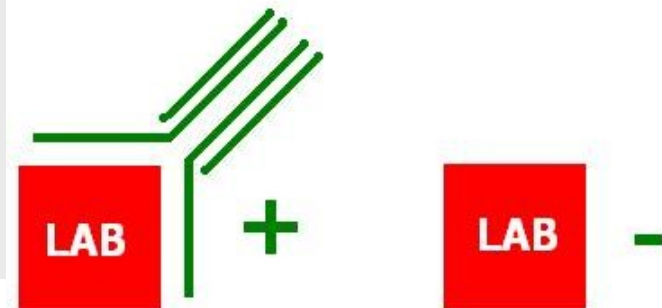
**Průkaz antigenu:** laboratorní protilátky (zvířecího původu) + vzorek pacienta nebo kmen mikroba.

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<sup>1</sup>
- Pacient po prodělané infekci: malá množství protilátek, hlavně IgG<sup>2</sup> (imunologická paměť)
- *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

# Geometrická řada

---

- Technicky nejjednodušší způsob, jak ředit sérum pacienta, je použití **geometrické řady s koeficientem dva**.
- Vycházíme **z neředěného séra**, nebo **ze séra o určitém předředění** (např. 1 : 5, 1 : 10, 1 : 20 a podobně)
- V každém dalším dílku je **dvojnásobné ředění** oproti předchozímu, například tedy řada 1 : 10, 1 : 20, 1 : 40, 1 : 80, 1 : 160...

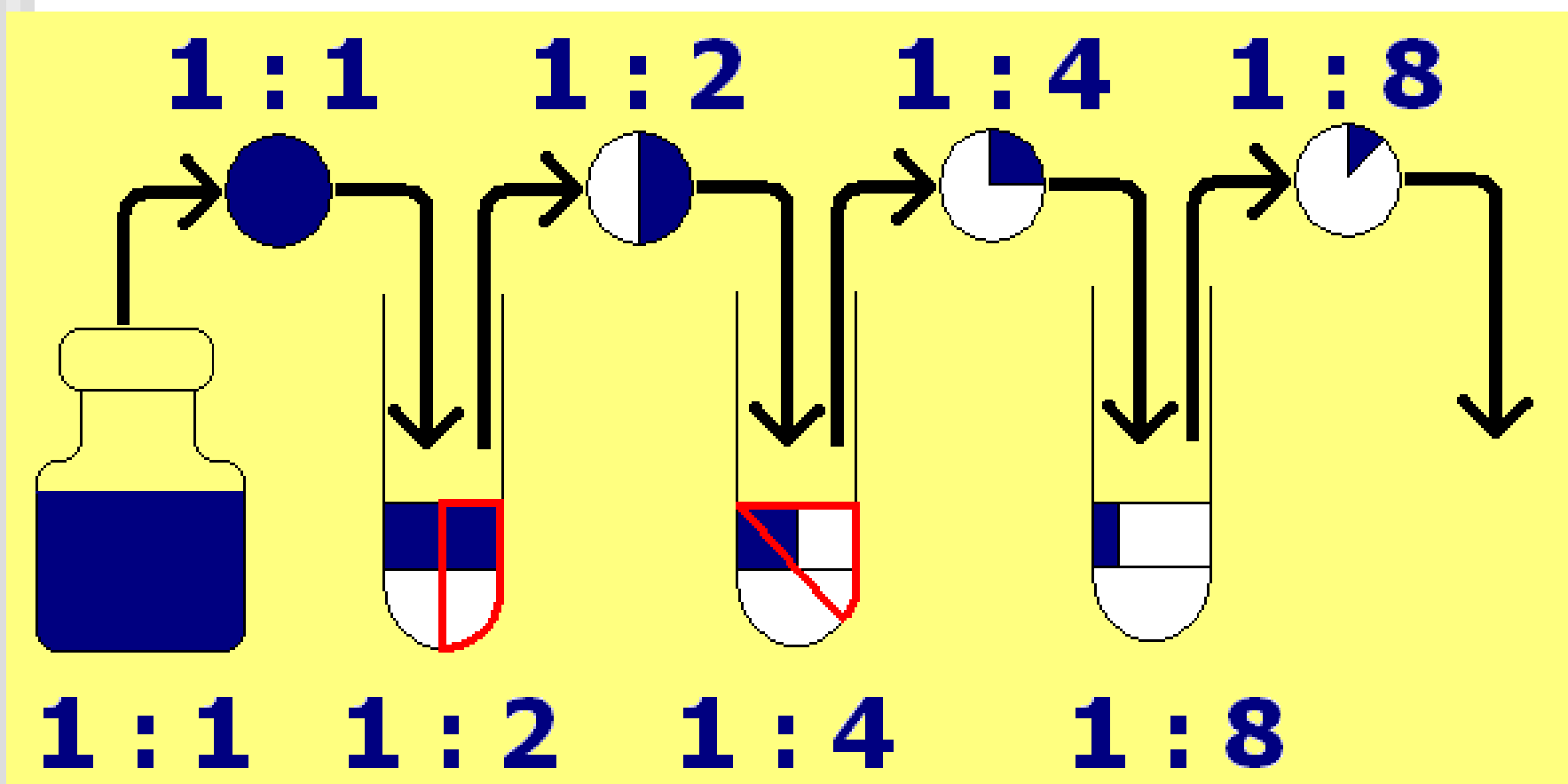
# Počítání ředění v serologii

Pozor, v serologii např. ředění 1 : 4 znamená jeden díl séra a tři díly fyziologického roztoku (tj. čtyři díly celkem)!

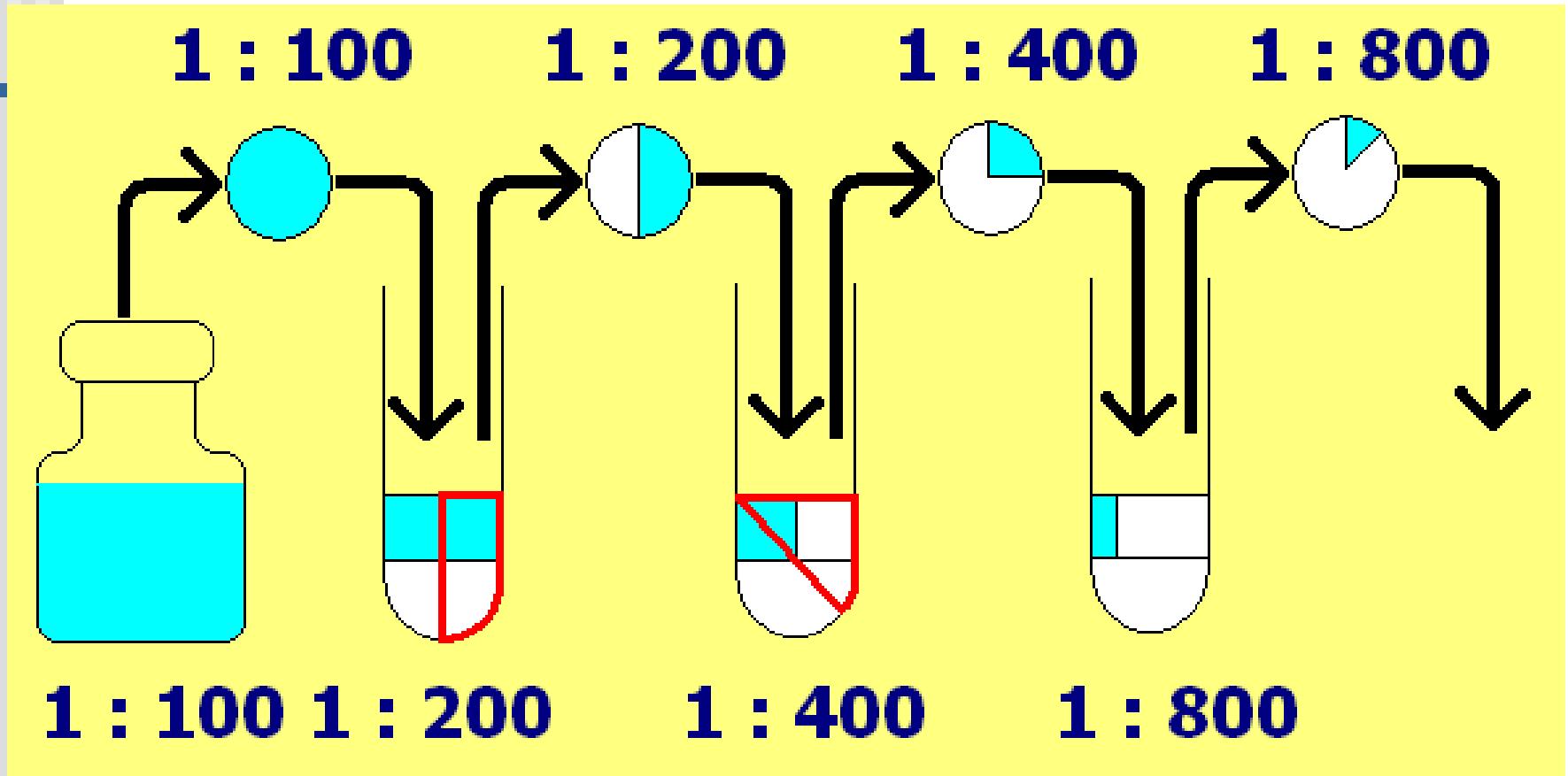
Při „biochemickém“ počítání (počet dílů séra ku počtu dílů diluentu) bychom naše geometrické řady museli značit např. 1 : 9, 1 : 19, 1 : 39, 1 : 79. To by bylo značně nepraktické

# Geometrická řada: jak ji udělat

a) bez předředění původního séra

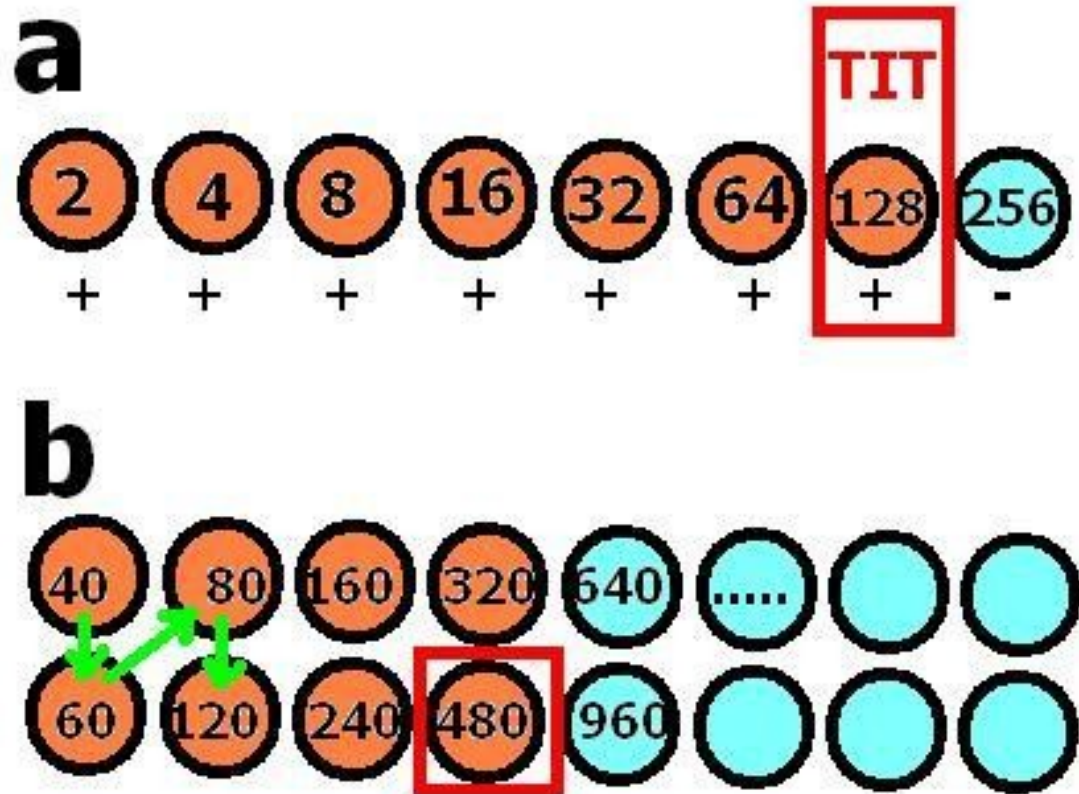


## b) s předředěním původního séra



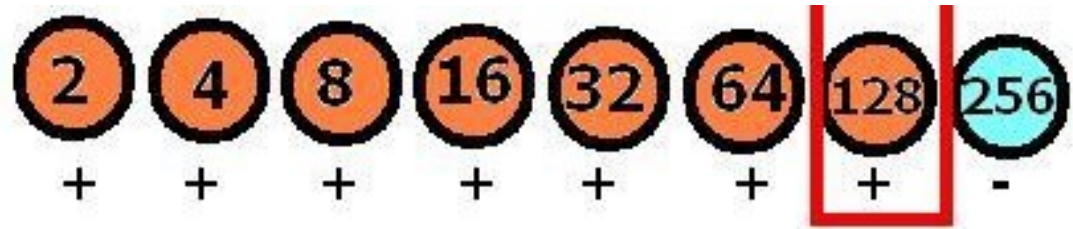
Samozřejmě, předředění nemusí být zrovna 1 : 100, může to být třeba 1 : 5, 1 : 10, 1 : 20 či jakékoli jiné.

# Pojem TITR



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

# Vzestupy a poklesy titru

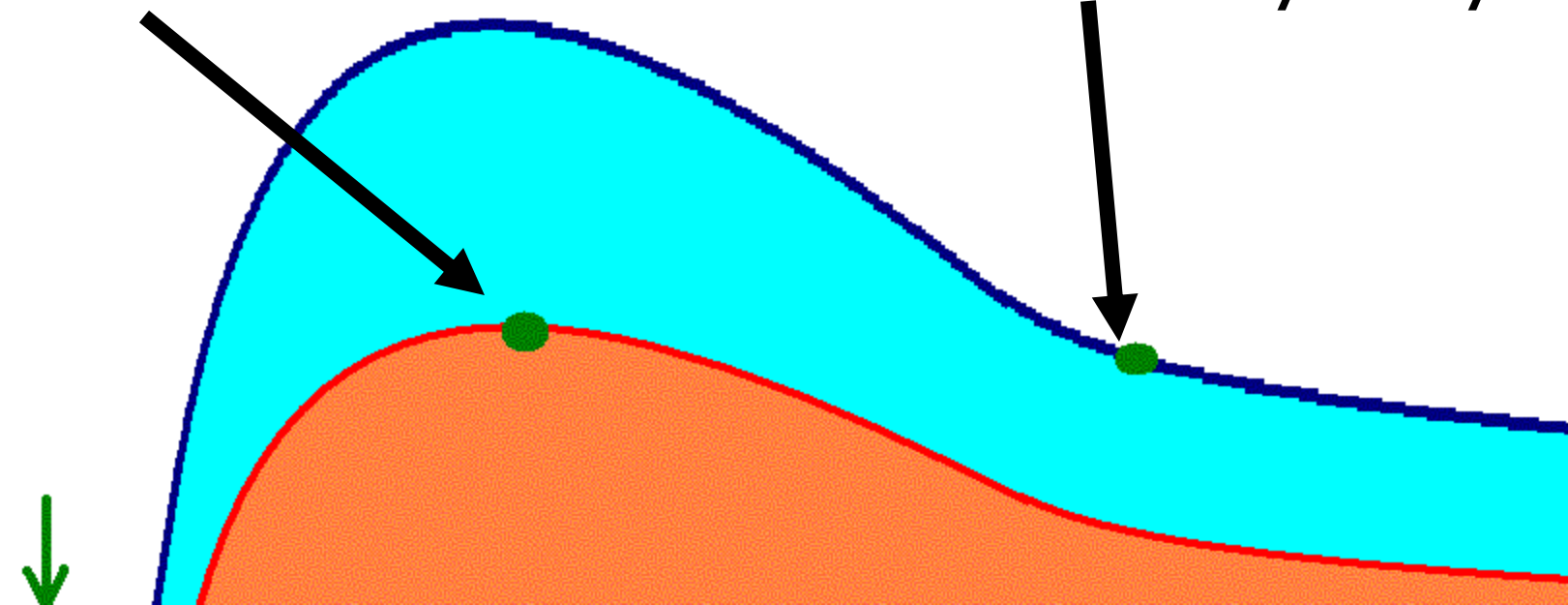


- Při použití geometrické řady znamená
  - vzestup/pokles titru **o jeden důlek dvojnásobný vzestup pokles.**
  - vzestup/pokles **o n důlků je pak vzestup/pokles  $2^n$  násobný.**

# Proč nestačí samotný titr

Někdy se stane, že málo reaktivní pacient má i v akutní fázi titr dosti nízký

Velmi reaktivní pacient má naopak i dlouho po infekci titr relativně vysoký





# Párová a nepárová séra

- **Párová séra** = první vzorek je uchováván v ledničce, dokud nepřijde i druhý. Pak jsou oba hodnoceny naráz. **Čtyřnásobný vzestup** se v tom případě má za signifikantní pro akutní infekci. Bohužel párová séra nejsou běžná.
- **Séra nejsou párová** (druhý vzorek je vyšetřen zvlášť): zvětšuje se riziko náhodné chyby, proto zpravidla vyžadujeme **osminásobný vzestup** titru. Tyto údaje jsou však pouze orientační a liší se případ od případu.

# Pořád musíte mít na paměti:

---

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

# 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

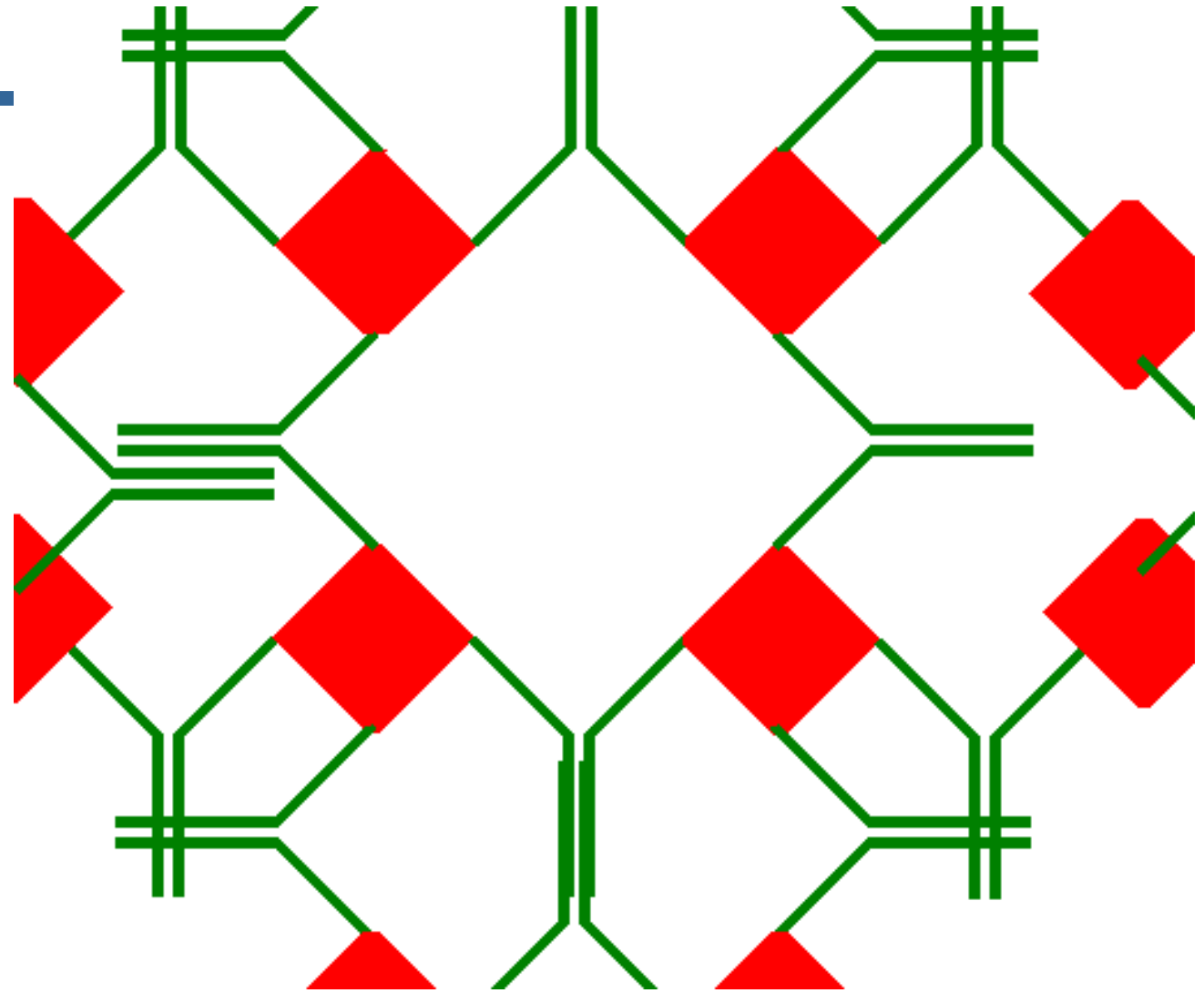
	<b>Průkaz antigenu</b>	<b>Antigenní analýza</b>	<b>Nepřímý průkaz</b>
<b>Aglutinace</b>	občas	často	někdy
<b>Precipitace</b>	málokdy	málokdy	občas
<b>KFR</b>	často (viry)	ne	často (viry)
<b>Neutralizace</b>	občas	ne	často
<b>Značené složky</b>	velmi často	výjimečně	velmi často

# Precipitace, aglutinace, aglutinace na nosičích

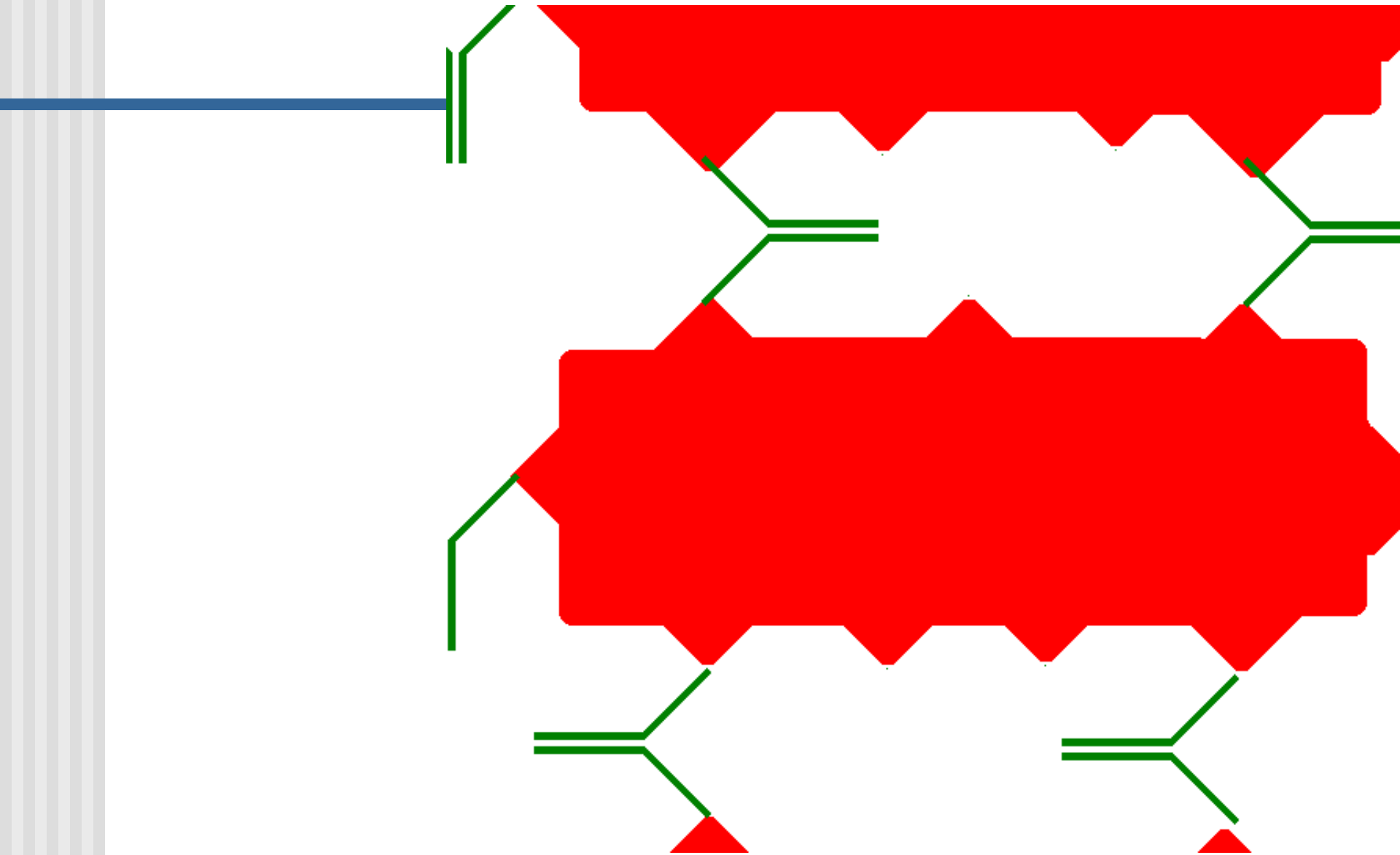
---

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

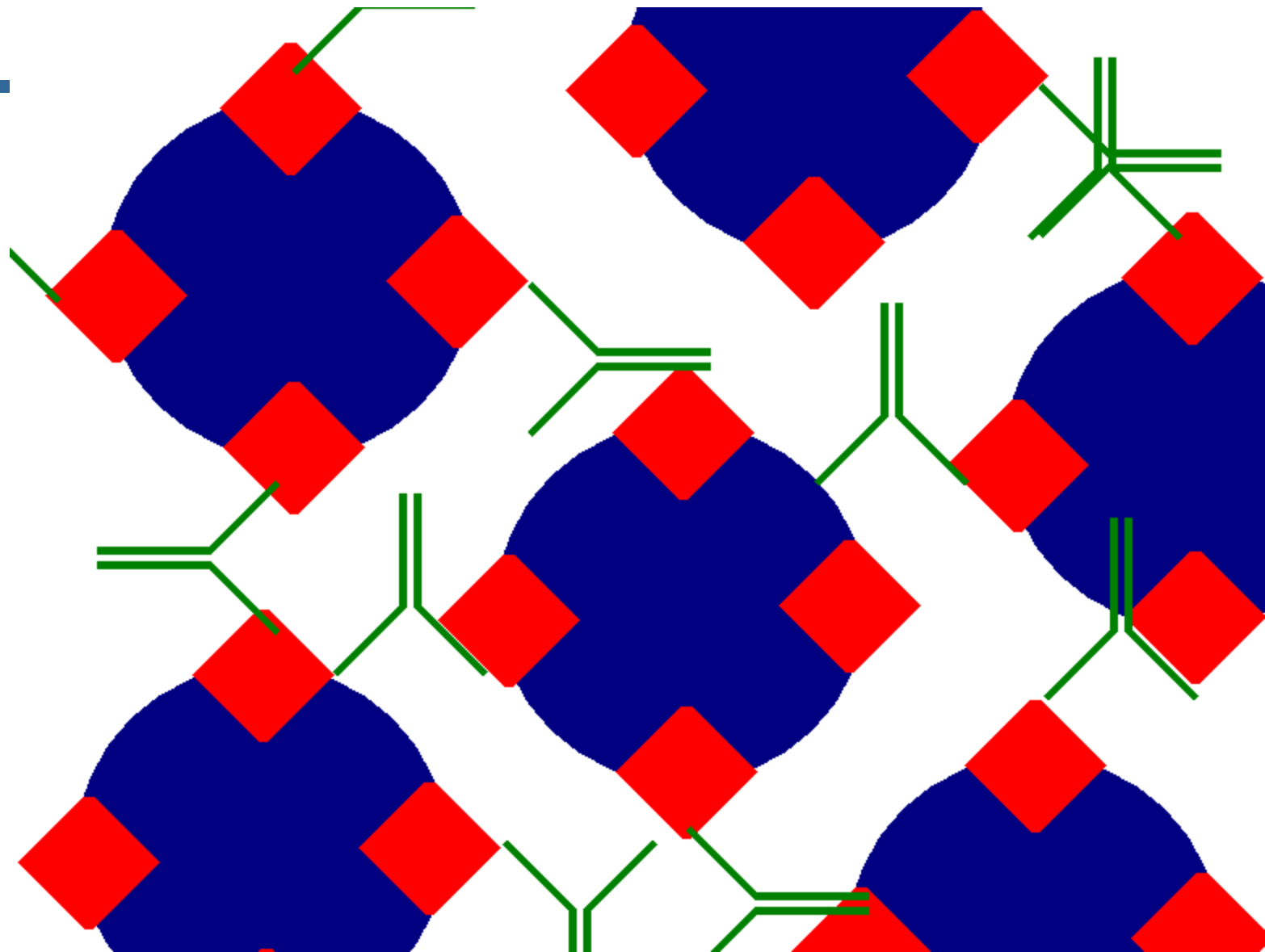
# Precipitace



# Aglutinace



# Aglutinace na nosičích





# 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: nonavalentní obsahuje protilátky proti devíti typům EPEC, trivalentní proti dalším třem. Zákal = pozitivita
  - Pokud jedno ze sér je „+“, musíme pokračovat s dalšími tri- a monovalentními séry
- *Je vám jasné, proč tu neurčujeme titry?*

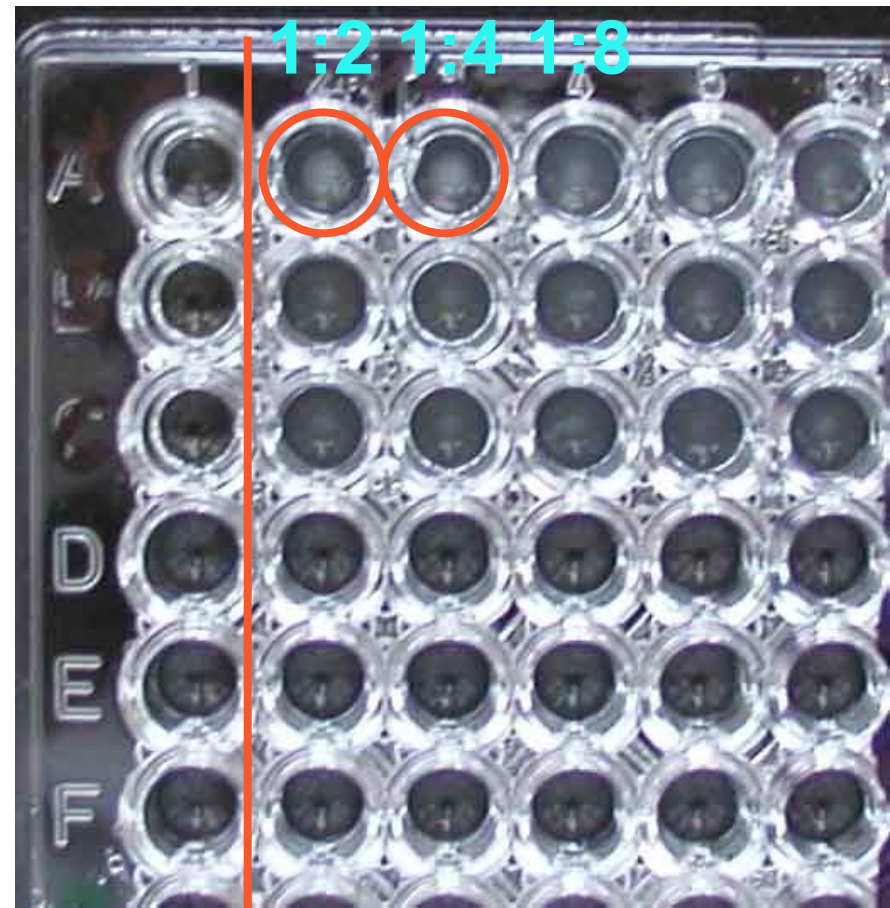
# Průkaz EPEC – výsledek

---

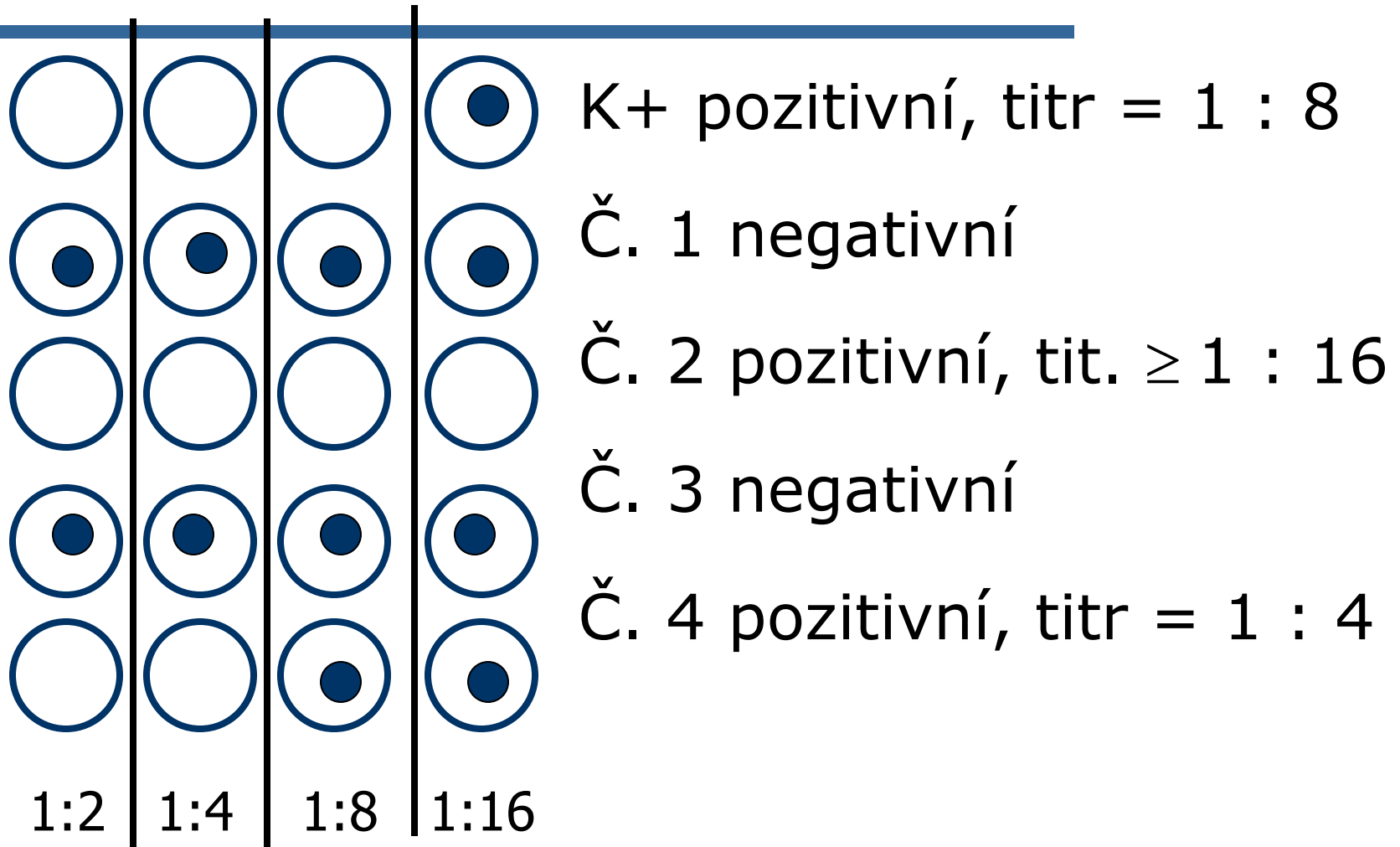


# Příklad 2: aglutinační reakce na průkaz protilátek u tularemie (ze stránky [www.medmicro.info](http://www.medmicro.info)):

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

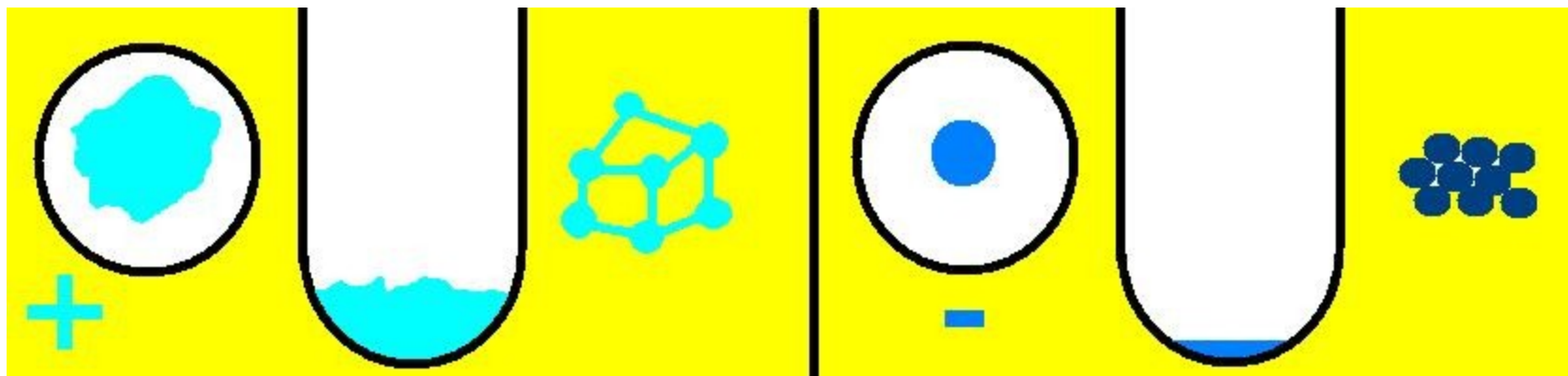


# Příklad výsledku: aglutinace k detekci protilátek proti yersiniím



# Vzhled pozitivních a negativních jamek u tohoto typu aglutinace

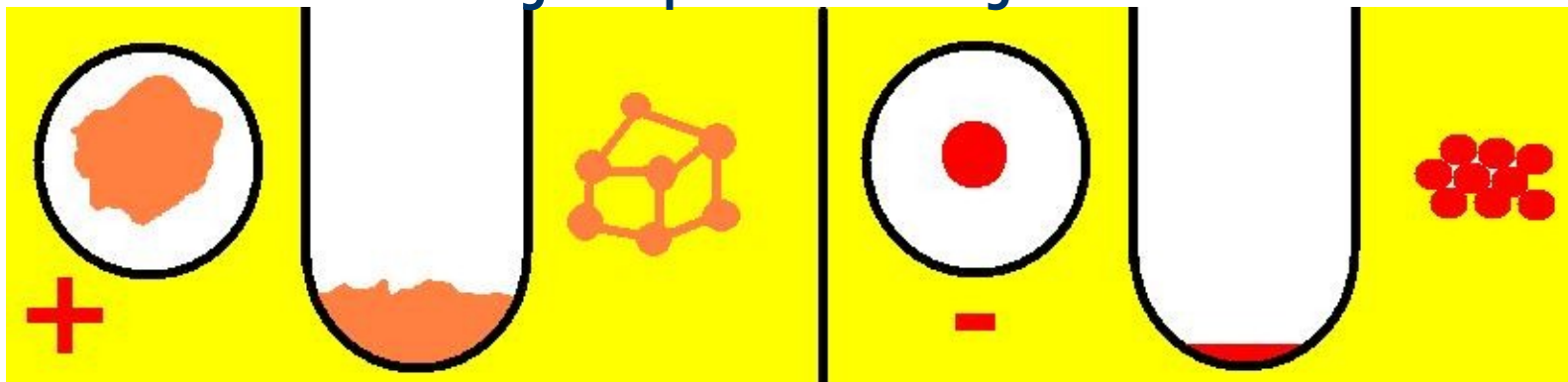
- Pozitivní – nepravidelný chuchvalec, negativní – malé pravidelné kolečko



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

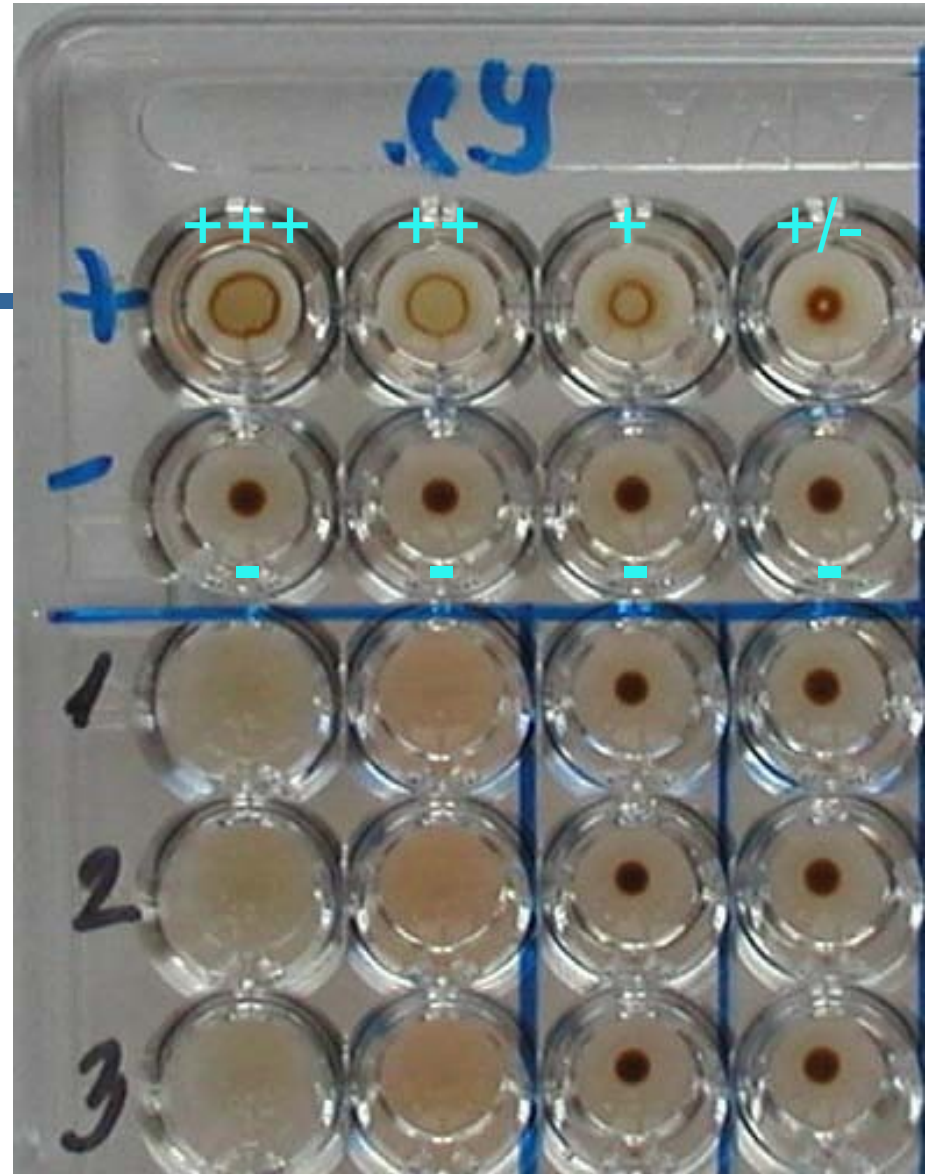
# Příklad 3: *Treponema pallidum* hemaglutinace (TPHA)

- 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. polycelulózová aglutinace)*)
- 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

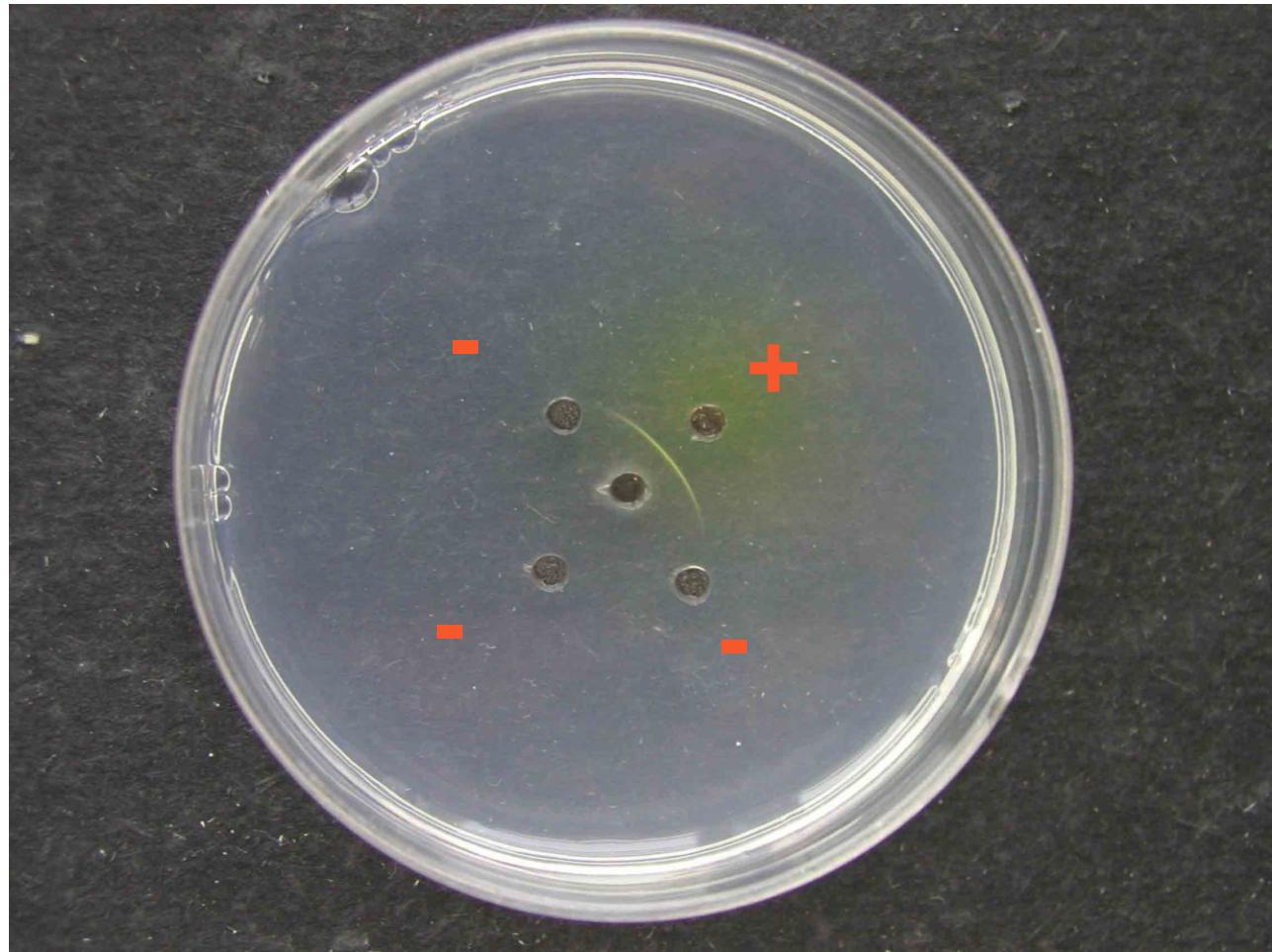
---

- Detekce protilátek, které jsou pozitivní u syfilis, ačkoli to nejsou protilátky proti *Treponema pallidum*, nýbrž proti kardiolipinu (látka, 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



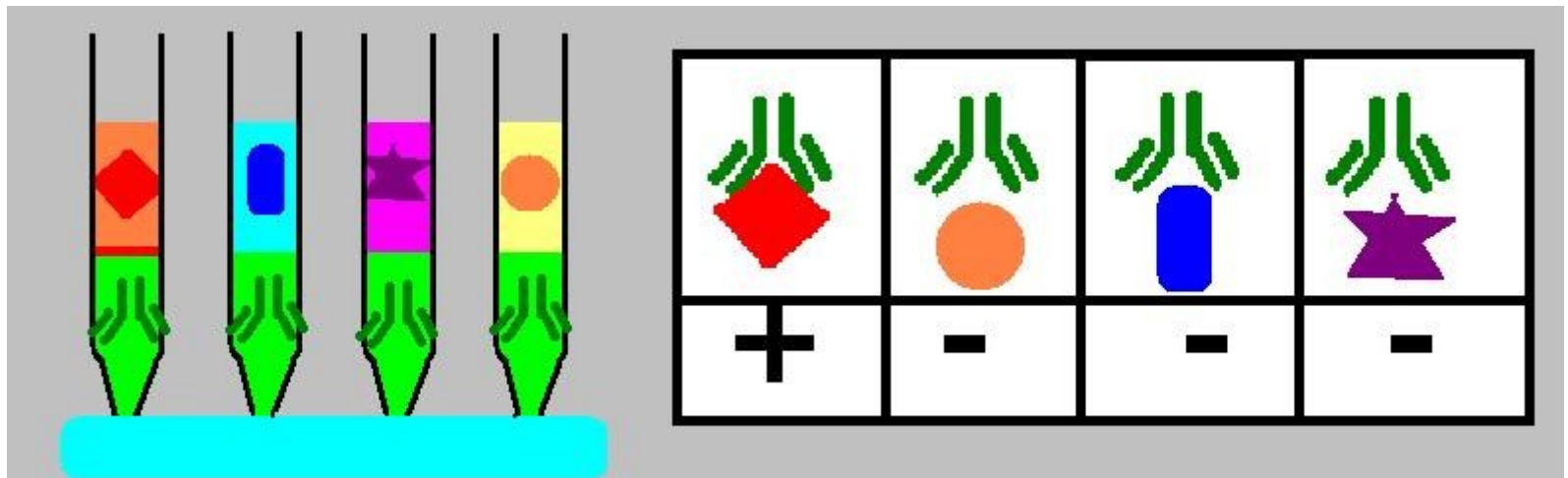
# 2. Demontrace jiného typu precipitace

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



# Komplementfixace: srovnání s ostatními

- U **precipitace** potřebujeme do reakce jen samotný antigen (makromolekulu) a protilátku
- U **aglutinace** do reakce vstupuje zpravidla celá bakterie, antigen je její součástí
- U **aglutinace na nosičích** máme kromě antigenu a protilátky v reakci ještě nosič antigenu (krvinka, latex, polycelulóza)
- U **komplementfixace** máme v reakci navíc komplement a indikátorový systém (amboceptor a beraní erytrocyty)

# 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

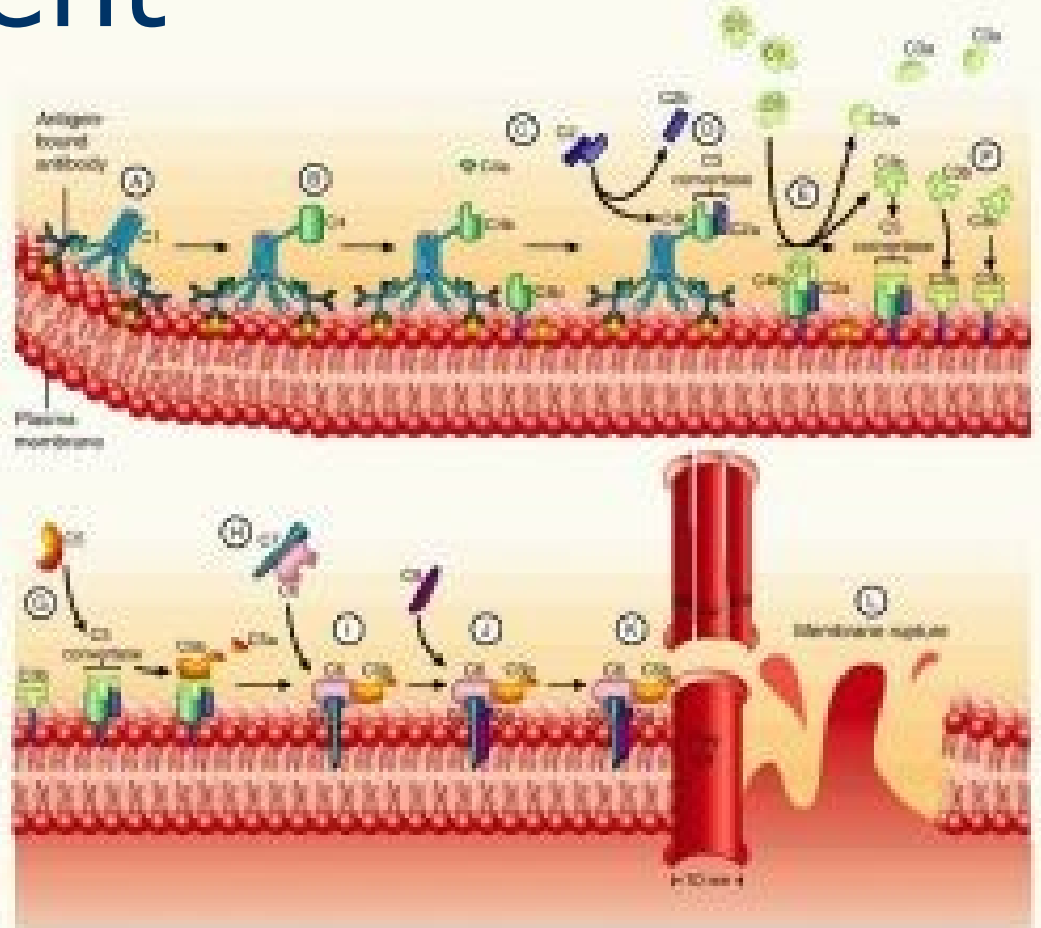
# Komplementfixace (KFR)

---

- Komplement = složka imunitní reakce
- Pro KFR používáme morčecí komplement. Pacientův komplement je před reakcí inaktivován
- Komplement není schopen vázat se na samotný antigen
- Komplement není schopen vázat se na samotnou protilátku
- Komplement je schopen vázat se pouze na KOMPLEX obou

# Komplement

- součást nespecifické humorální imunity
- složitý kaskádový systém



# Komplement – na co se váže:

---

- KOMPLEMENT + POUHÝ ANTIGEN:  
**neváže se**
- KOPMLEMENT + PROTILÁTKA:  
**neváže se**
- KOMPLEMENT + KOMPEX  
ANTIGENU S PROTILÁTKOU:  
**vazba**

# Princip komplementfixace

---

- Komplement se tedy **váže na komplex antigen-protilátka** (nezůstává žádný volný komplement) To ale samo o sobě není vidět.
- Proto používáme ještě tzv. **indikátorový komplex** – beraní erytrocyty + králičí protilátky proti nim. V případě, že se na zbyl volný komplement, naváže se na indikátorový systém a dojde k hemolýze







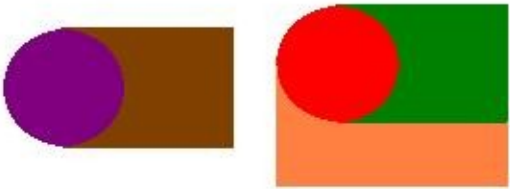
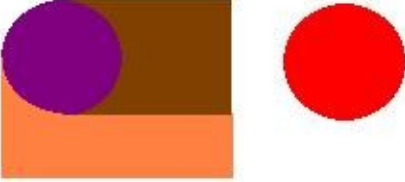







# Pokus k ověření funkce komplementu

*Amboceptor = králičí protilátka proti beraním erytrocytům*

1. Beraní ery + amboceptor bez komplementu → není hemolýza (chybí komplement)
2. Beraní ery + komplement bez amboceptoru → není hemolýza (chybí protilátky)
3. **Beraní ery + komplement + amboceptor → hemolýza (všechny složky přítomné)**
4. Králičí ery + komplement + amboceptor → není hemolýza (chybí „ten správný“ antigen)

# Princip KFR (negativní, pozitivní)

+	-	
<b>1</b> 	<b>1</b> 	 <b>antigen</b>  <b>antibody protilátka</b>
 <b>vázaný - bound</b>	 <b>volný - free</b>	
<b>2</b> 	<b>2</b> 	 <b>complement</b>  <b>beraní ery sheep RBC</b>
<b>NO HEMOLYSIS NENÍ HEMOLÝZA</b>	<b>HEMOLYSIS HEMOLÝZA</b>	 <b>amboceptor</b>
		

# Problémy s KFR

---

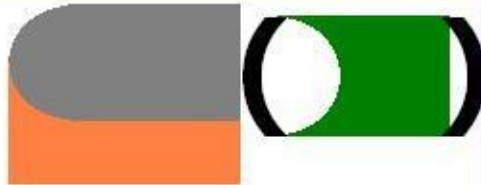
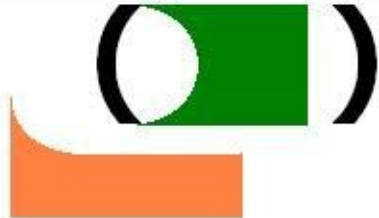




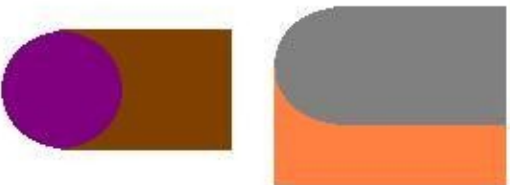






- Příliš mnoho komplementu → falešná negativita. **Co dělat?** Titrovat komplement (viz další obrazovka)
- Některá složka séra sama o sobě vyvazuje komplement (složka antikomplementarity): falešně pozitivní výsledky. **Co dělat?** Provést test antikomplementarity. Je to vlastně „skoro normálně“ provedená reakce, ovšem bez antigenu

# Titrace komplementu

---

- Pro reakci potřebujeme množství morčecího komplementu, které není moc velké ani malé.
- Proto zjišťujeme, jaké množství komplementu hemolyzuje pracovní jednotku krvinek s amboceptorem (hemolytická jednotka)

# Test antikomplementarity

SERUM NOT OK	SERUM OK	
<p><b>1</b></p> 	<p><b>1</b></p> 	 <p>složka zodpovědná za antikomplementaritu antikomplementarity component</p>
 <p>vázaný - bound</p>	 <p>volný - free</p>	 <p>antibody protilátka</p>
<p><b>2</b></p> 	<p><b>2</b></p> 	 <p>complement</p>
<p><b>NO HEMOLYSIS</b> <b>NENÍ HEMOLÝZA</b></p>	<p><b>HEMOLYSIS</b> <b>HEMOLÝZA</b></p>	 <p>beraní ery sheep RBC</p>
		 <p>amboceptor</p>

# Použití KFR

- KFR lze použít pro diagnostiku **mnoha, zejména virových infekcí**
- Jako i jiné serologické reakce se KFR používá k **průkazu antigenu či protilátky**
- Častější je ale průkaz protilátky, proto se jím budeme zabývat víc
- Berme to tedy tak, že máme **laboratorní antigen**, který konfrontujeme se **sérem pacienta** (kde hledáme protilátky)

# Pro dnešek děkuji za pozornost

Prof. Tomášek,  
někdejší přednosta  
našeho ústavu,  
objevitel tzv.  
Tomáškova antigenu  
u syfilis

