

# Lékařská mikrobiologie

## ZDRL

Týden 10:

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

Lenka Černohorská dle původních  
prezentací O. Zahradníčka

# Úvod

- **Antigen** = makromolekula pocházející z cizího organismu: rostliny, mikroba, jiného živočicha. Mikrobiální antigeny = části mikrobiálního těla, které vzbuzují v hostiteli antigenní odpověď
- **Protilátka** = imunoglobulin, tvořený v těle hostitele jako odpověď na antigenní výzvu (nejen u člověka, ale i u zvířat)

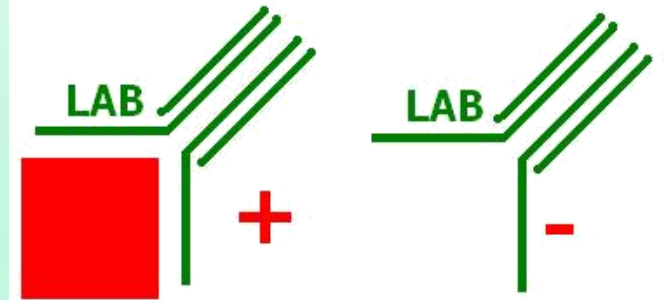
# Metody lékařské mikrobiologie

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

# Dva způsoby využití:

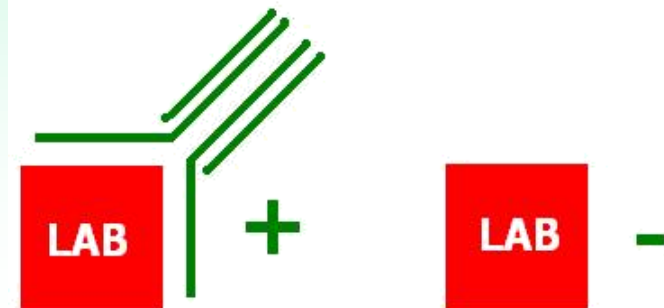
**Průkaz antigenu:** laboratorní protilátky + vzorek pacienta nebo kmen mikroba.

Přímá metoda



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

Nepřímá metoda



U přímého průkazu rozlišujeme:

- **Průkaz antigenu ve vzorku**, např. v mozkomíšním moku. Pozitivní výsledek znamená přítomnost mikroba v těle pacienta
- **Antigenní analýza (identifikace) kmene** izolovaného ze vzorku (např. meningokoka)

U **nepřímého průkazu** pracujeme se **vzorkem séra**, kde hledáme protilátky. Odhadujeme, kdy se pacient s mikroblem setkal:

- Množství protilátek (relativní – **titr**)
- Třída protilátek: IgM/IgG (více v další přednášce)
- (*Avidita protilátek*)

# Průběh infekce

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



# Jak provést reakci „kvantitativně“

Je těžké zjistit koncentraci protilátek v jednotkách mol/l, mg/l apod. Ale dá se 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

- Nejjednodušší způsob, jak ředit sérum pacienta, je použití **geometrické řady s koeficientem dva**.
- Vycházíme **z neřaděného séra**, nebo **ze séra o určitém předředění** (např. 1:5, 1:10, 1:20 atd.)
- V každém dalším důlku je **dvojnásobné ředění** oproti předchozímu, např. řada 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160...



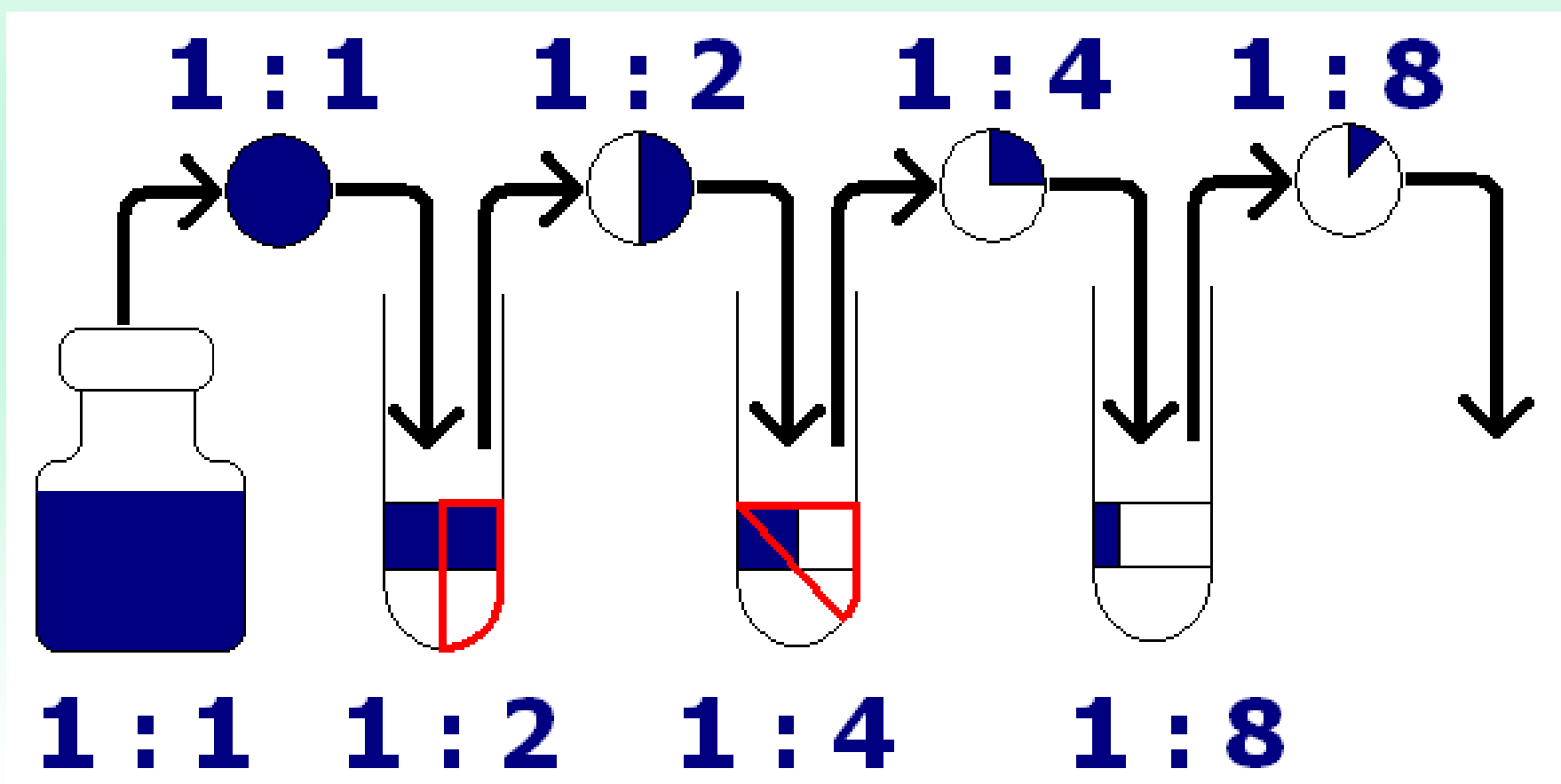
# Počítání ředění v serologii

Pozor, v serologii např. ředění 1 : 4 znamená 1 díl séra a 3 díly fyziologického roztoku (tj. 4 díly celkem)!

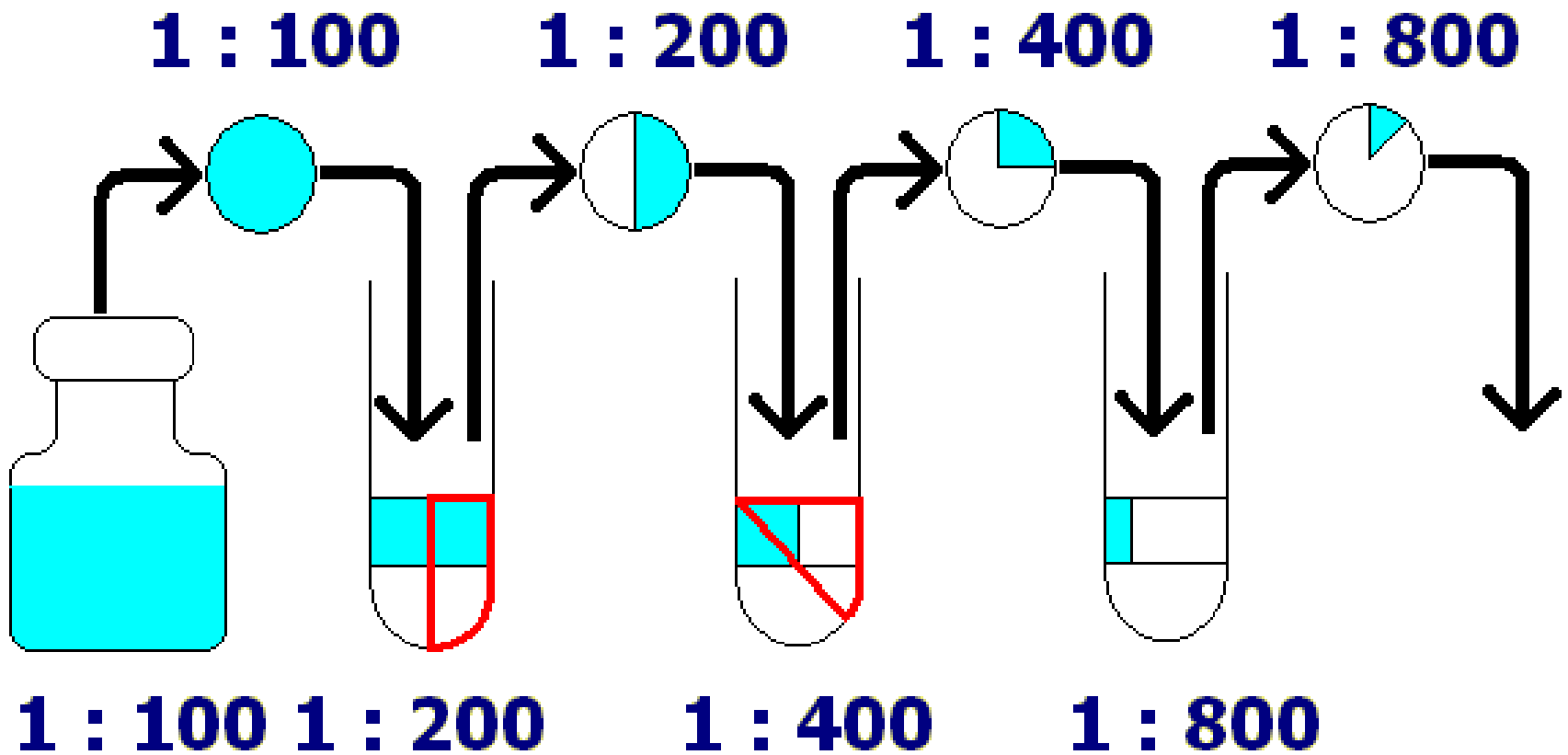
Při „biochemickém“ počítání (počet dílů séra ku počtu dílů diluentu) bychom naše geometrické řady museli značit např. 1:9, 1:19, 1:39, 1:79. To by bylo nepraktické

# Geometrická řada:

a) bez předředění původního séra



## b) s předředěním původního séra



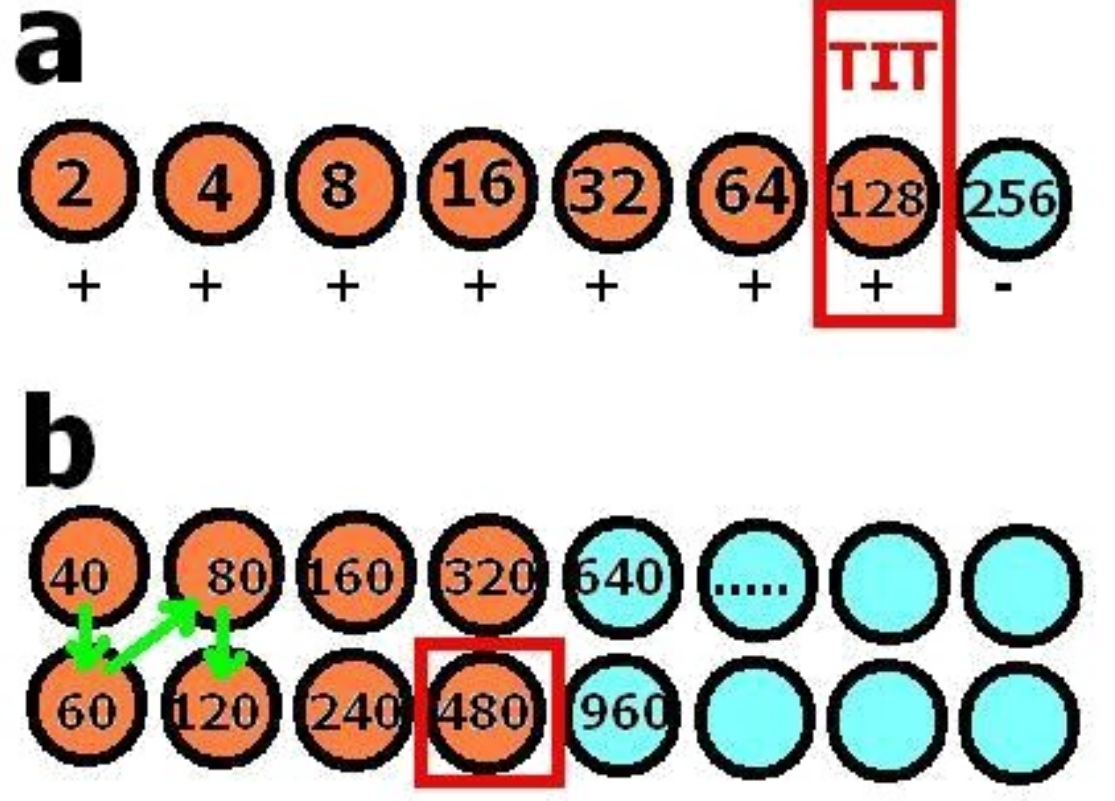
Předředění nemusí být zrovna 1 : 100, může být třeba 1 : 5, 1 : 10, 1 : 20 či jiné.

# Poté, co se provede naředění...

Po naředění séra geometrickou řadou se do všech zkumavek/důlků **přidá antigen**. Buď dojde, nebo nedojde k reakci; to může být vidět, nebo se zviditelňuje přidáním další složky

Sledujeme, **jak moc můžeme sérum naředit**, aby ještě byla viditelná pozitivní reakce

# Pojem TITR



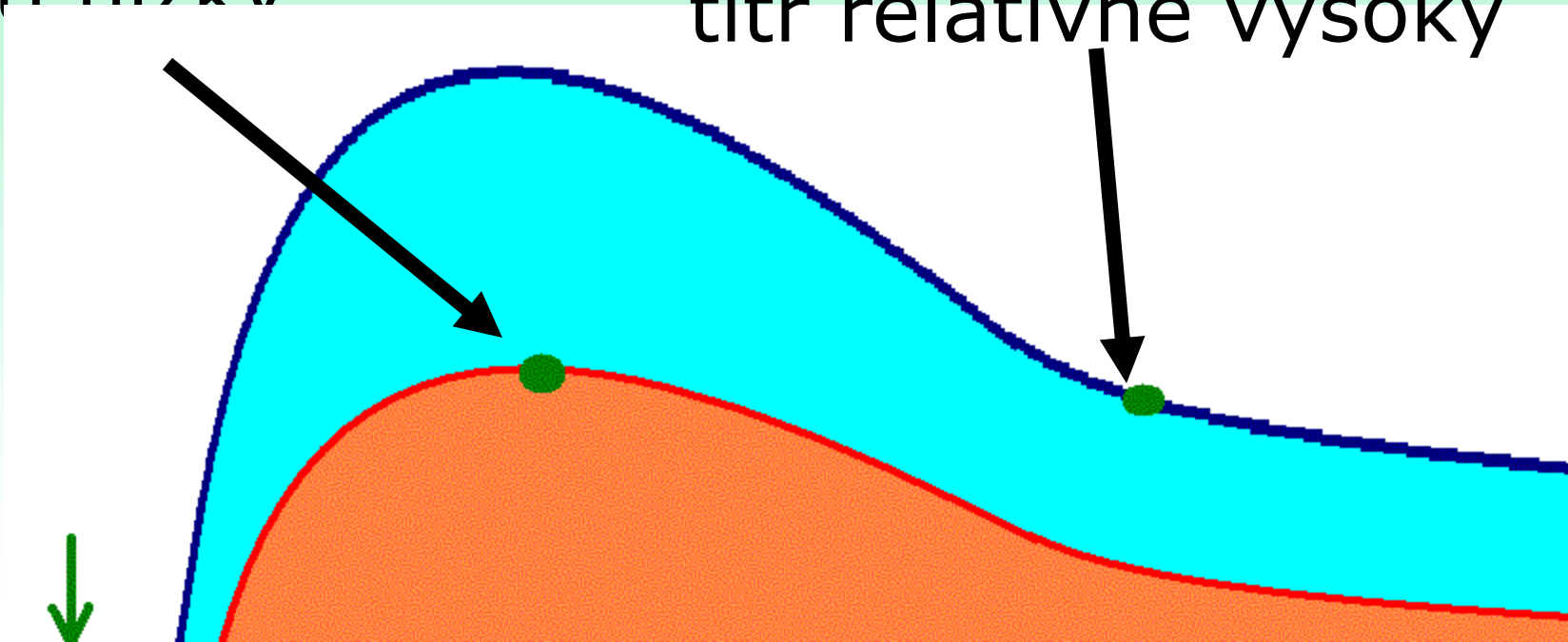
**Titř** – nejvyšší ředění, kde je ještě viditelná pozitivní reakce. *I pokud jsme reakci provedli ve 2 řádcích místo 1 (s různým počátečním předředěním), určí se jen 1 titř.*

Vzestup/pokles titru o 1 důlek znamená dvojnásobný vzestup/pokles.

# Proč nestačí samotný titr

Málo reaktivní pacient může mít v akutní fázi titr dosti nízký

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



# Párová a nepárová séra

- **Párová séra** = 1 vzorek je uchováván v ledničce, dokud nepřijde i druhý. Pak jsou oba hodnoceny naráz. **4-násobný 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 **8-násobný vzestup** titru. Tyto údaje se liší případ od případu.

# Serologické reakce

- Existuje několik **typů reakcí**. Některé jsou jednoduché, výsledek reakce antigenu s protilátkou je přímo viditelný, jiné jsou složité, je nutné přidání dalších složek
- Téměř všechny mohou být použity **k průkazu antigenu, k antigenní analýze i k průkazu protilátky**; ne všechny se ale ke všem těmto účelům doopravdy používají
- V rámci reakcí existují **různé možnosti technického provedení**



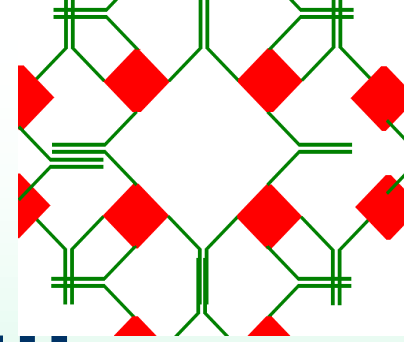
# Typy reakcí a jejich využití

	<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)

# Precipitace



Se využívá v **nepřímém průkazu**:

**Reakce RRR u syfilis** (je to reakce s tzv. heterofilním antigenem, t.j. antigen nepochází z mikroba)

**Mikroprecipitace v agaru dle**

**Ouchterlonyho** (u aspergilózy, dříve i u toxoplasmózy)

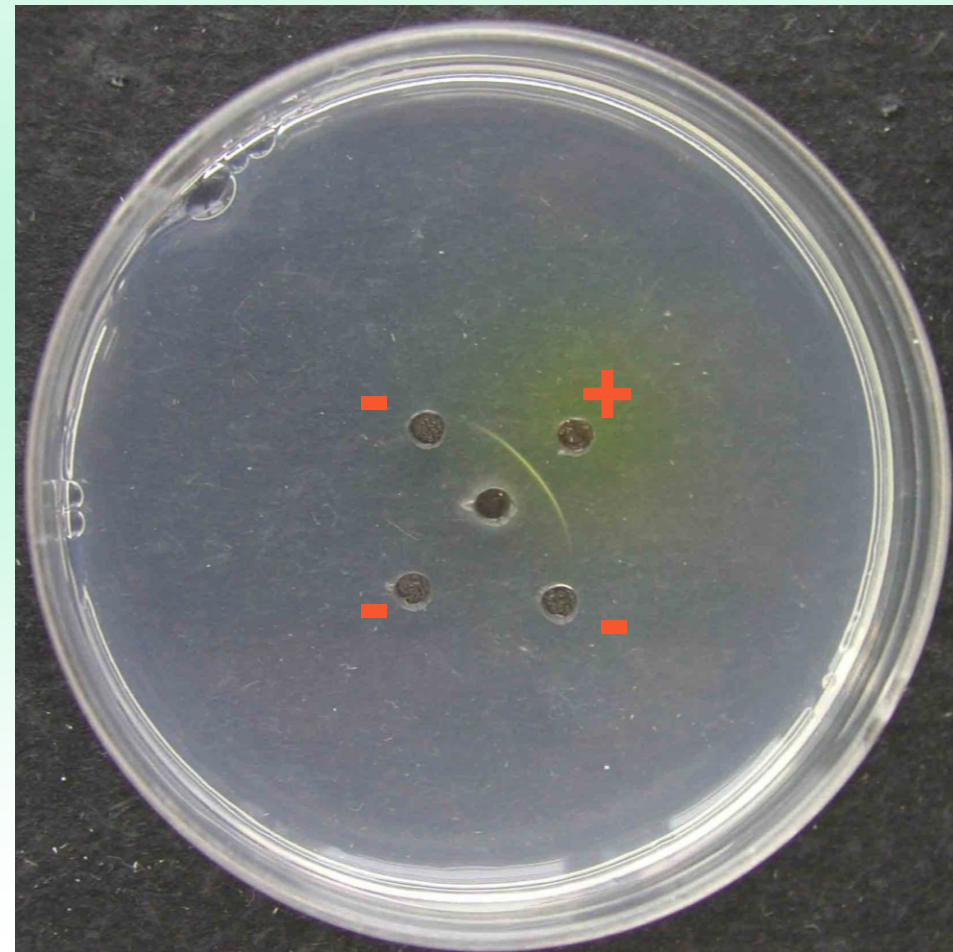
**V přímém průkazu** se používala prstencová precipitace u streptokoků

# RRR precipitace

- Detekce protilátek, které jsou pozitivní u syfilis, i když nejde o protilátky proti *Treponema pallidum*, nýbrž proti kardiolipinu (látka, která se objevuje u syfilitiků v těle)
- Takovým reakcím říkáme **průkaz heterofilních protilátek** – jsou to protilátky, které nejsou zaměřené proti antigenu mikroba, ale proti jinému antigenu, který je v době výskytu mikroba přítomen v těle pacienta.
- Reakce je dost citlivá, ale **málo specifická** (pozitivita se ověřuje jinými, spolehlivějšími metodami)

# Mikroprecipitace v agaru dle Ouchterlonyho

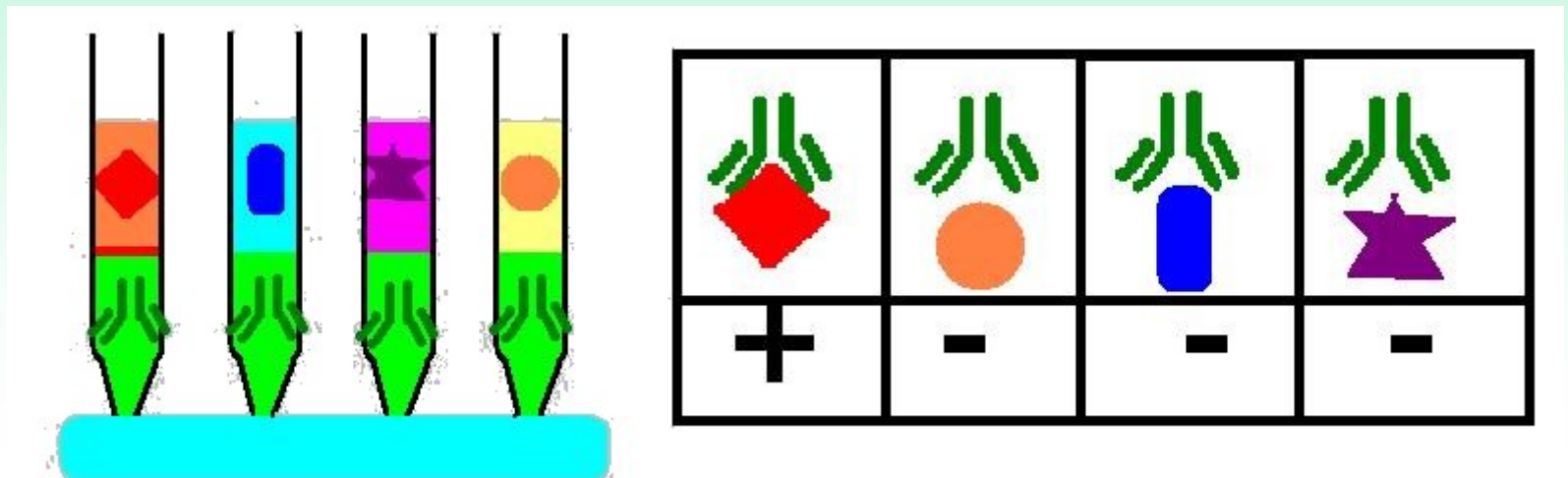
V prostředním důlku je suspenze antigenu. Do 4 ostatních důlků se dají séra pacientů. Antigen difunduje z prostředního důlku do okolí. Je-li sérum pozitivní, difundují z něj protilátky. Uprostřed cesty se antigen s protilátkou setká a vznikne precipitační linie.



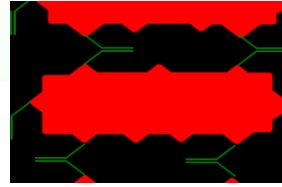
# Prstencová precipitace

Precipitace k detekci antigenu:

- 1) zvířecí sérum s protilátkami se napipetuje do pipetky zabodnuté do plastelíny
- 2) čtyři různé extrakty kmenů se opatrně převrství na séra (aby se nesmíchaly)
- 3) při pozitivitě se na styku tekutin objeví prstenec – důkaz precipitace



# Aglutinace: příklady použití



## K antigenní analýze:

- určení serotypu u střevních patogenů, zejména salmonel, shigel a yersinií, určení některých serotypů *Escherichia coli*

**Provedení:** smíchání kmene (nebo jeho suspenze ve fyziologickém roztoku) s příslušným sérem

**K přímému průkazu ve vzorku** se používá spíše aglutinace na nosičích (viz dále)

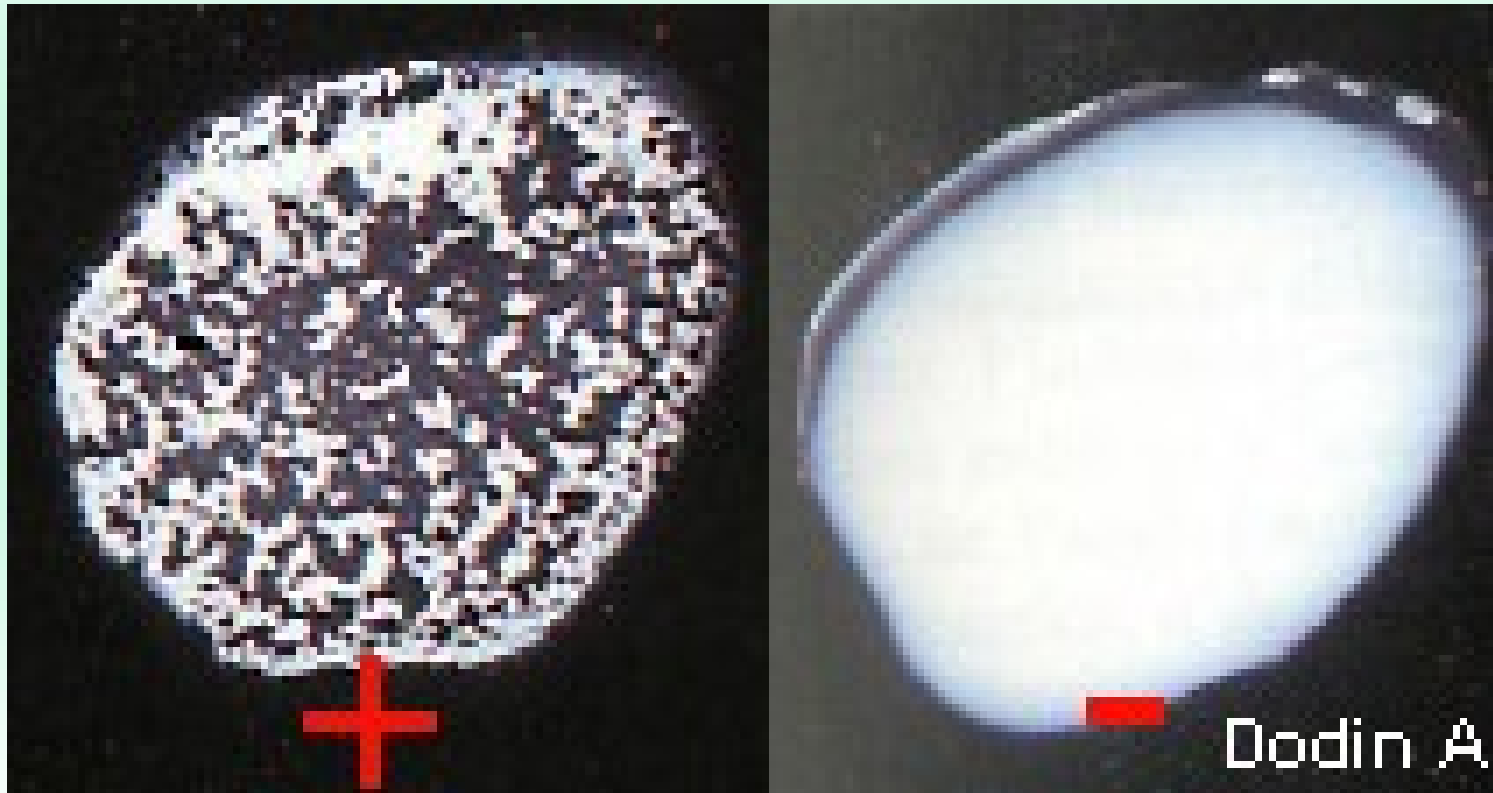
**Nepřímý průkaz** různých bakterií (yersinií, tularémie). **Provedení:** v mikrotitrační destičce s využitím ředěných sér pacienta

# Antigenní analýza pomocí aglutinace: Průkaz Enteropatogenní *Escherichia coli*

- Většina kmenů *E.coli* je „hodných“. Ze všech antigenních typů *E. coli* je 12 „enteropatogenních“ (EPEC) – způsobují novorozenecké průjmy.
- Při testu **smícháme suspenzi podezřelého kmene s protilátkami** na sklíčku. Pozitivita se projeví jako vznik vloček. Bylo by nutno provést 12 testů s různými protilátkami. V praxi ale použijeme **polyvalentní séra**: nonavalentní obsahuje protilátky proti 9 typům EPEC, trivalentní proti dalším 3.



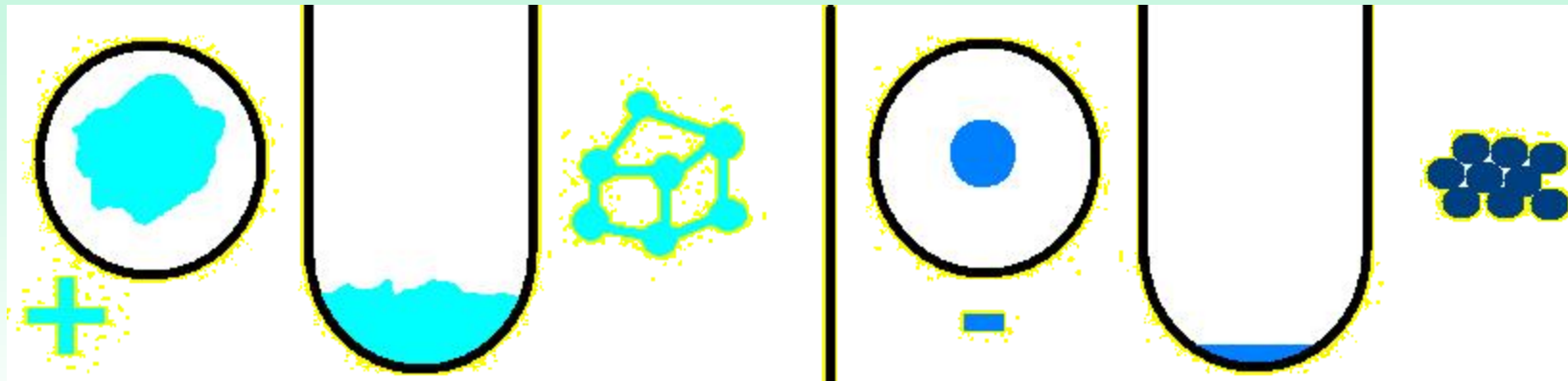
# Průkaz EPEC – výsledek



# Aglutinace k průkazu protilátek v mikrotitrační destičce

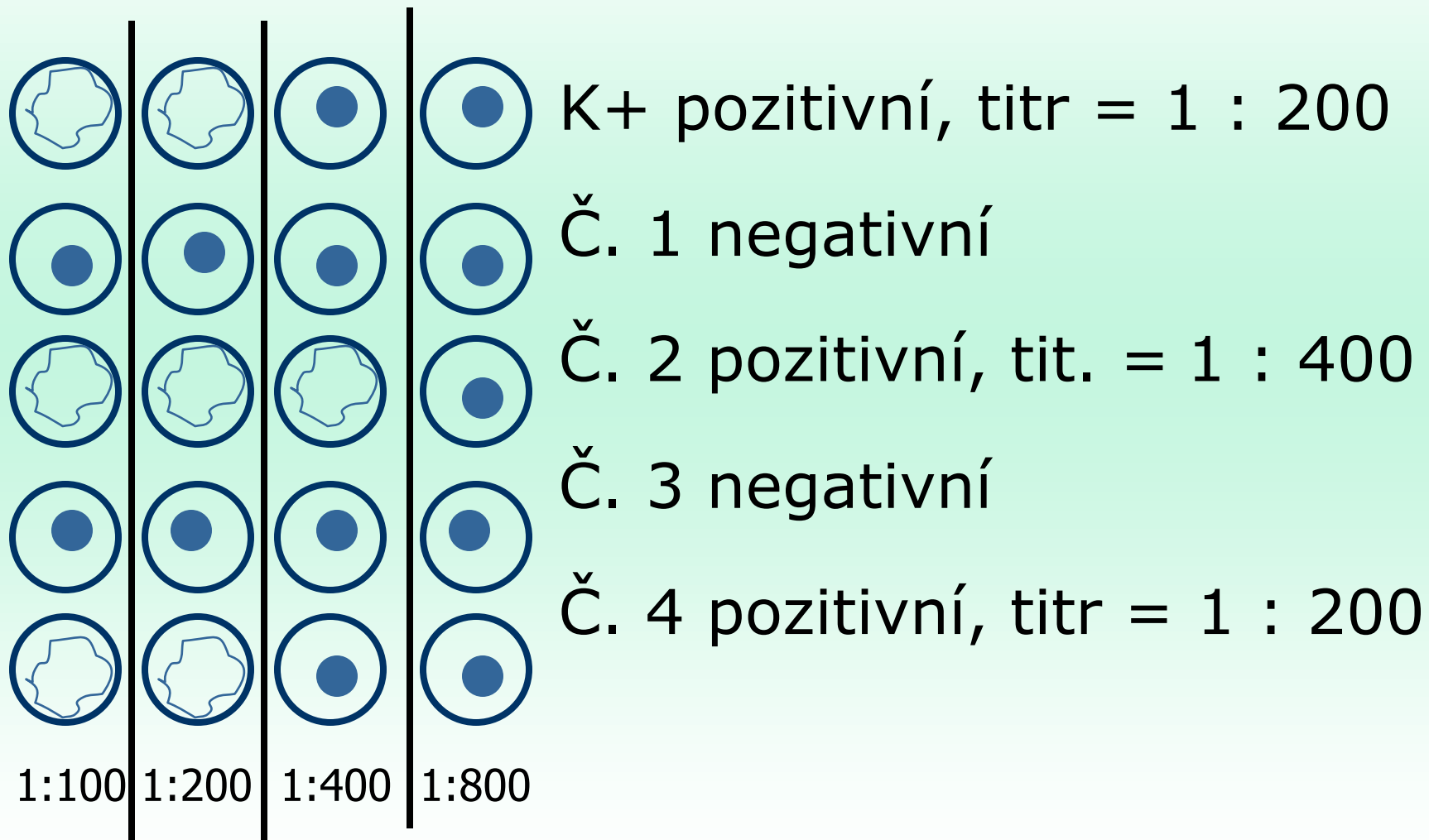
**Pozitivní** – nepravidelný chuchvalec (aglutinát)

**Negativní** – malé pravidelné kolečko (neaglutinované bakterie sedimentují na dno)



!!Titr = nejvyšší ředění s pozitivní reakcí. První důlek je ředěn 1 : 2, druhý 1 : 4 atd.

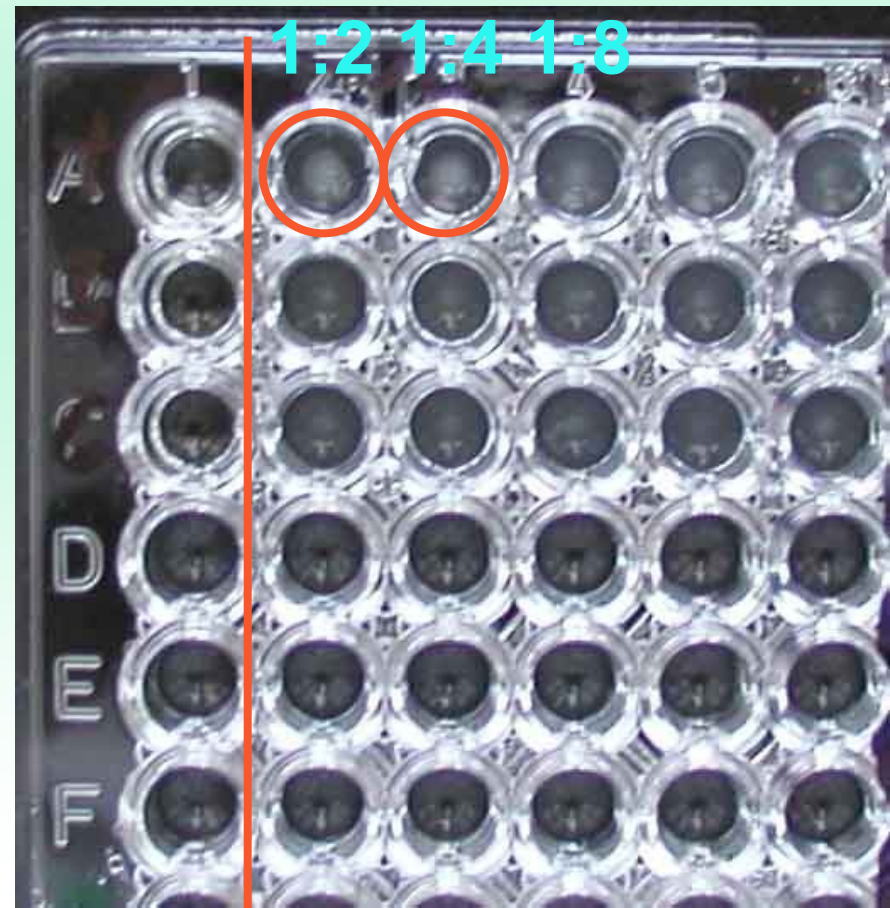
# Příklad výsledku: aglutinace k detekci protilátek proti yersiniím



# Konkrétní ukázka

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

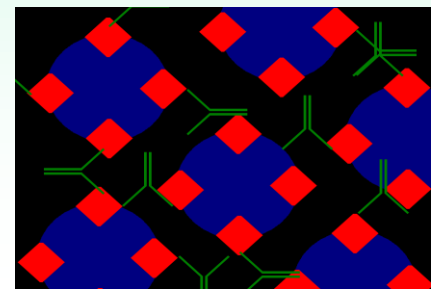
[www.medmicro.info](http://www.medmicro.info)



# Aglutinace na nosičích

Je to vlastně **precipitace převedená na aglutinaci použitím nosiče** (červená krvinka, latexová či polycelulózová částice).

Používáme ji tam, kde pracujeme s **koloidním (makromolekulárním) antigenem**



# Aglutinace na nosičích – využití

## Přímý průkaz ve vzorku

- průkaz antigenů bakterií, které způsobují záněty mozkových blan, přímo ve vzorku mozkomíšního moku

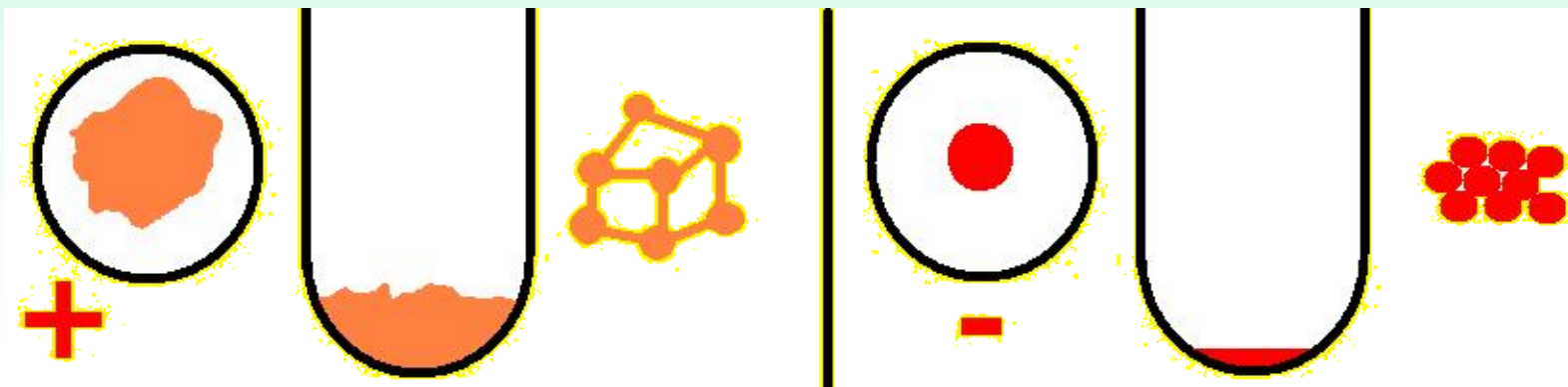
## Antigenní analýza s kmeny bakterií

- skupinové určení streptokoků
- určení antigenního typu u *Haemophilus influenzae*
- určení seroskupiny meningokoků aj.

**K nepřímému průkazu** méně často, příkladem je reakce TPHA k průkazu protilátek u syfilis

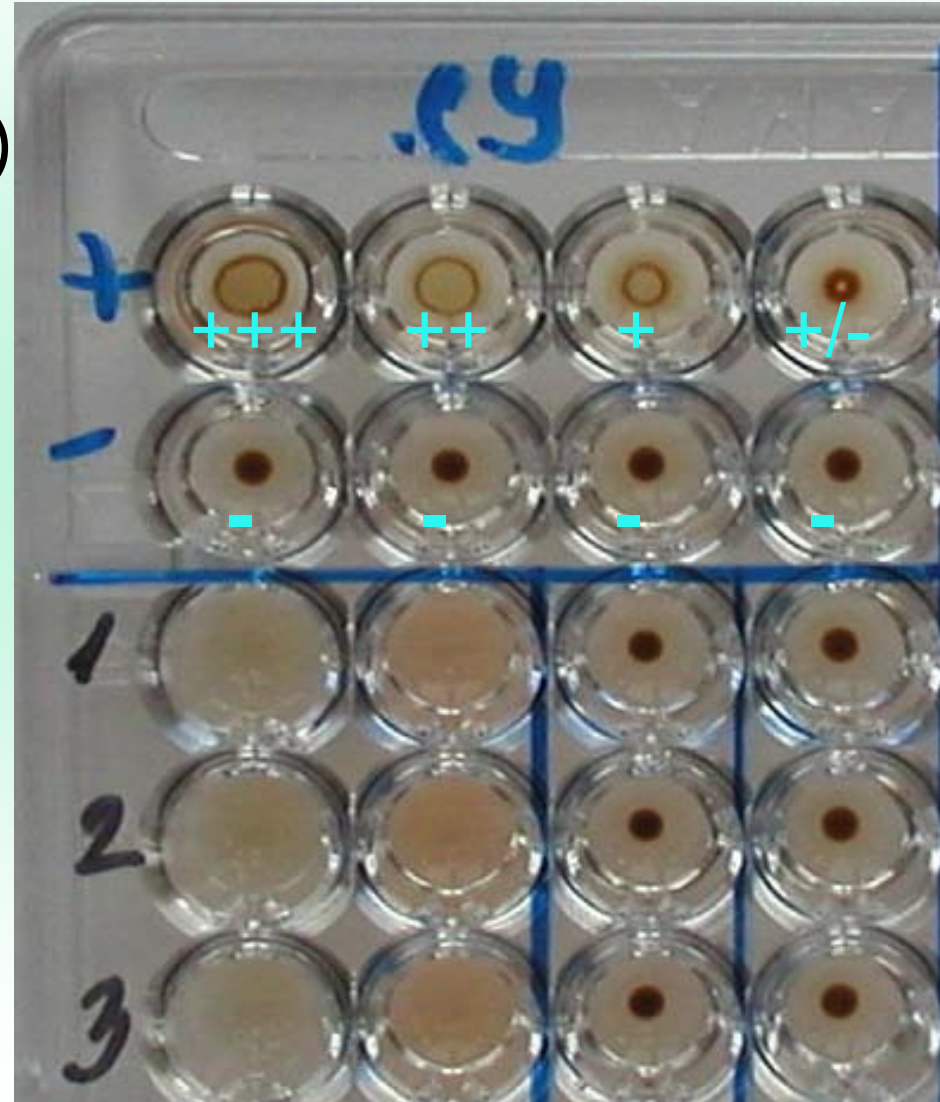
# *Treponema pallidum* hemaglutinace (TPHA) k průkazu syfilis

- Použijeme červené krvinky, na které je navázán antigen *T. pallidum* (*Dnes se v tomto testu červené krvinky nahrazují polycelulózovými částicemi – v tom případě jde o TPPA (T. p. polycelulózová aglutinace)*)
- Jde o nepřímý průkaz, ale nepoužívá se ředění a nezjišťují titry. Jde o tzv. screeningovou reakci a případná pozitivita se dále ověřuje spolehlivějšími metodami



# Ukázka výsledku TPHA

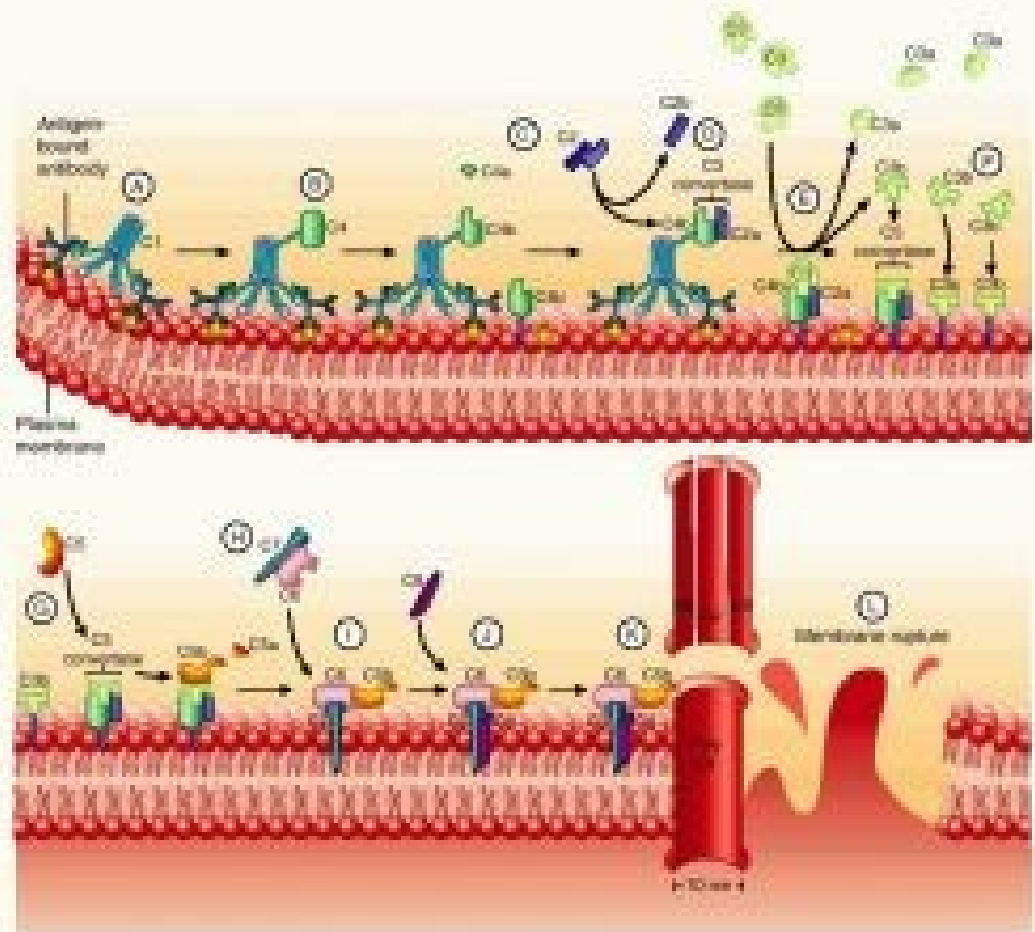
- V horním řádku jsou pozitivní kontroly od vysoce pozitivní (+++) po hraniční (+/-)
- Ve druhém řádku jsou negativní kontroly
- Výsledky se odečítají v dalších řádcích, vždy ve čtvrtém sloupci. Pacienti 1, 2 i 3 jsou negativní.





# Komplement

- součást nespecifické humorální imunity
- složitý kaskádový systém



# Komplementfixace (KFR)

**Komplement = složka imunitní reakce**

Potřebujeme pracovat s přesně odměřeným množstvím komplementu, proto pacientův vlastní komplement před reakcí inaktivujeme a do reakce používáme komplement morčecí

- Komplement **není schopen vázat se na samotný antigen ani na samotnou protilátku**
- Komplement **je schopen vázat se pouze na KOMPLEX obou**

# Princip komplementfixace





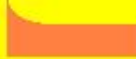

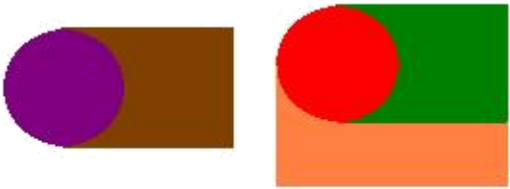






- Komplement se **váže na komplex antigen-protilátka** (nezůstává žádný volný komplement) To ale není vidět.
- Proto používáme tzv. **indikátorový komplex** – beraní erytrocyty + králičí protilátka proti nim (tzv. amboceptor). Pokud zbyl volný komplement, naváže se na indikátorový systém a dojde k hemolýze

# 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)


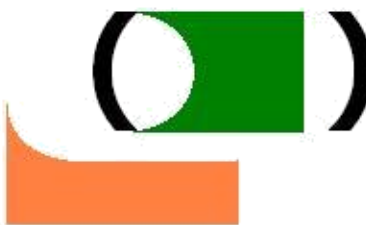




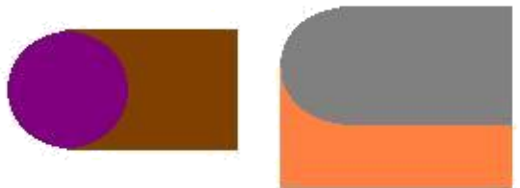
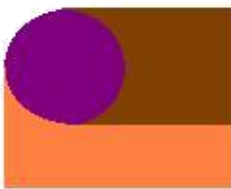





# Princip KFR (negativní, pozitivní)

+	-	
<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 „normálně“ provedená reakce, ale bez antigenu

# Test antikomplementarity

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

# 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)



# 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 průkaz protilátky.
- Berme to tak, že máme **laboratorní antigen**, který konfrontujeme se **sérem pacienta** (kde hledáme protilátky)

# Praktické provedení KFR

KFR se provádí v mikrotitrační destičce.

U průkazu protilátek se zpravidla postupuje následovně:

- **pacient má celý řádek** (u párových sér 2 řádky – jeden na první, druhý na druhý vzorek)
- **v prvním důlku** (nalevo od čáry) je test antikomplementarity (musí být hemolýza, jinak nutno opakovat)
- **v dalších důlcích** (napravo od čáry) je vlastní test s různě řaděnými séry
- U vlastních testů (napravo od čáry) platí:  
**tečka = pozitivita, hemolýza = negativní**

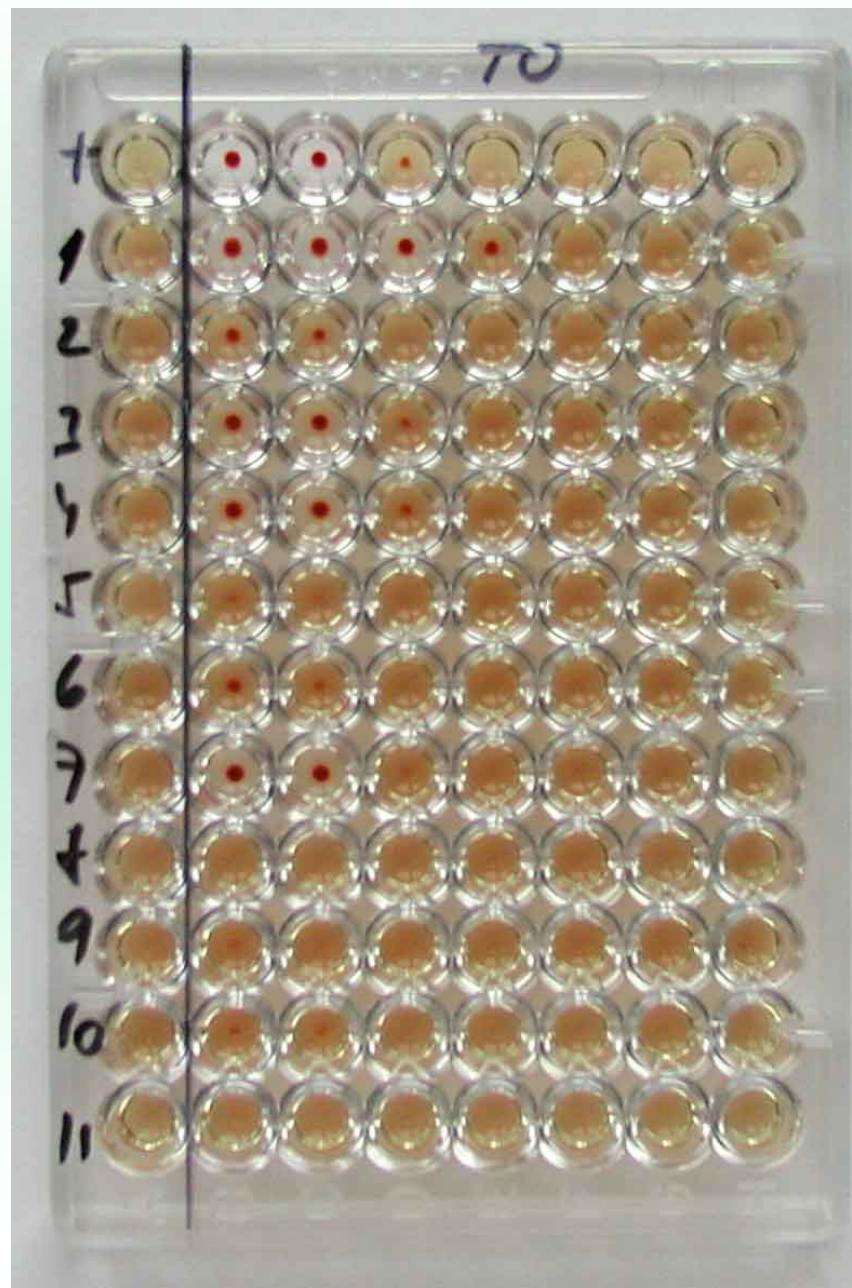
# Ukázka KFR toxoplasmózy

Vlevo od čáry jsou testy antikomplementarity.

Předředění séra je 1:10, další důlky mají ředění 1:20, 1:40 atd.

Pozitivní je pacient 1 (titr 1:80), a pacienti 2, 3, 4, 6, 7 (titr 1:20, u 3 a 4 možná 1:40).

Ostatní pacienti jsou negativní (nemají protilátky)



Děkuji za pozornost