

# **Serologické vyšetřovací metody**

# Serologické reakce

## Přímý průkaz

- ✓ průkaz antigenu
- ✓ průkaz nukleové kyseliny

## Nepřímý průkaz

- ✓ průkaz protilátek

# Nepřímý průkaz

= průkaz specifických protilátek neboli průkaz serologický

- serologické reakce – reakce mezi antigeny a protilátkami *in vitro*
- Materiál: 5 - 7 ml srážlivé krve, likvor, punktát

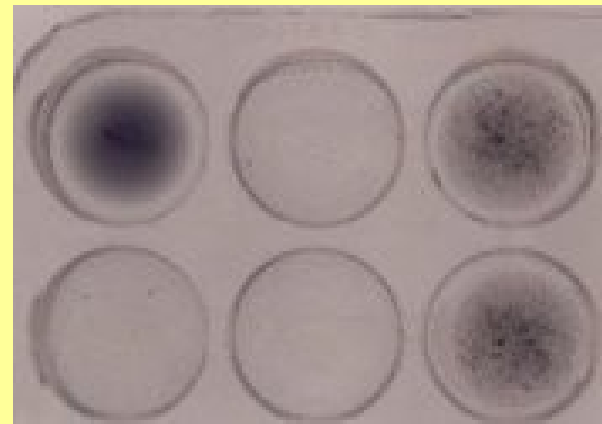
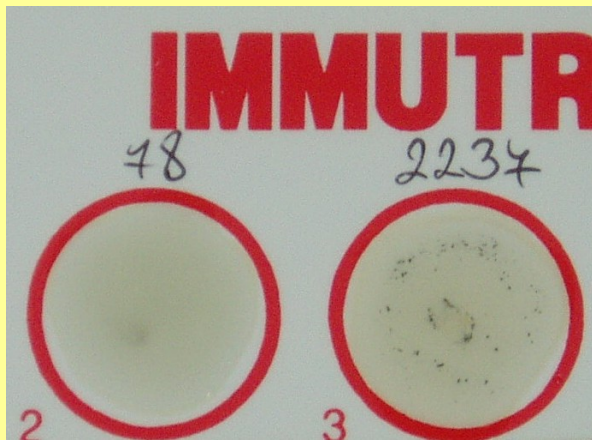
# Přehled serologických metod

1. Precipitace
2. Aglutinace
3. Komplement fixační reakce (KFR)
4. Neutralizace
5. Reakce se značenými složkami:
  - imunofluorescence
  - enzymová imunoanalýza
  - Western blot (imunoblot)

# Precipitace

- antigen koloidní povahy
- precipitační neboli vložkovací testy na lues
- VDRL, RRR, RPR

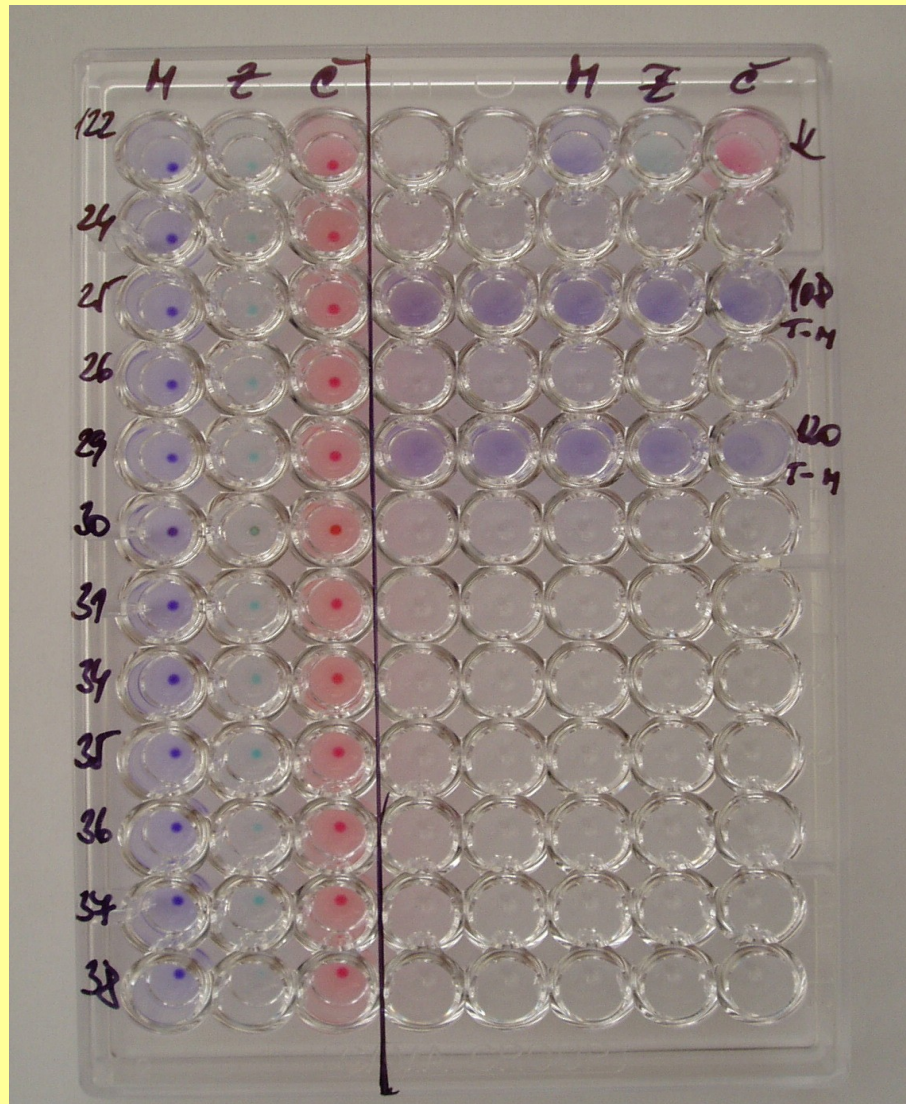
kardiolipin + protilátky v séru → precipitace



# Aglutinace

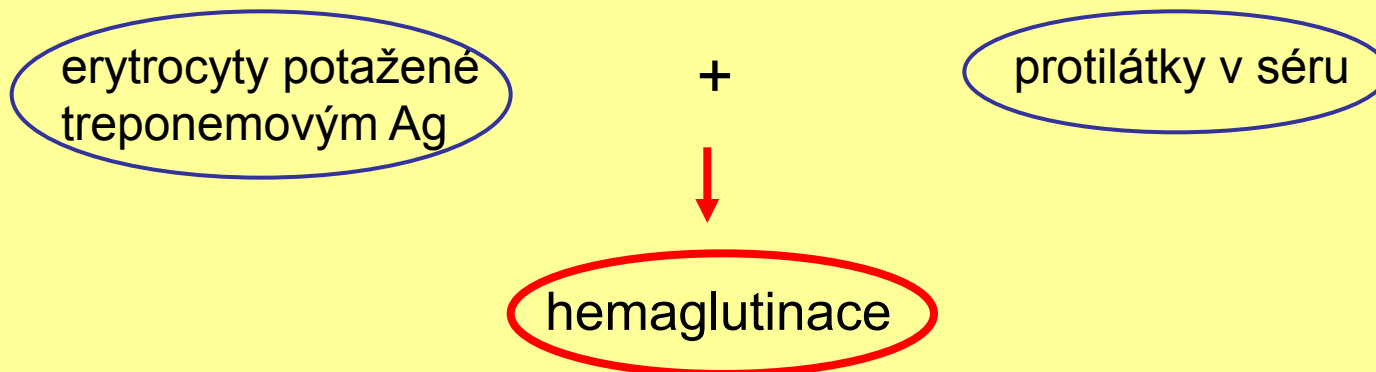
- antigen korpuskulární povahy
- antigen + hledaná protilátka → viditelný shluk (aglutinát)
- přímá, nepřímá (na nosičích)
- průkaz protilátek u salmonelózy (Widalova reakce), yersiniózy, listeriózy, tularémie

# Aglutinace – průkaz protilátek proti *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*



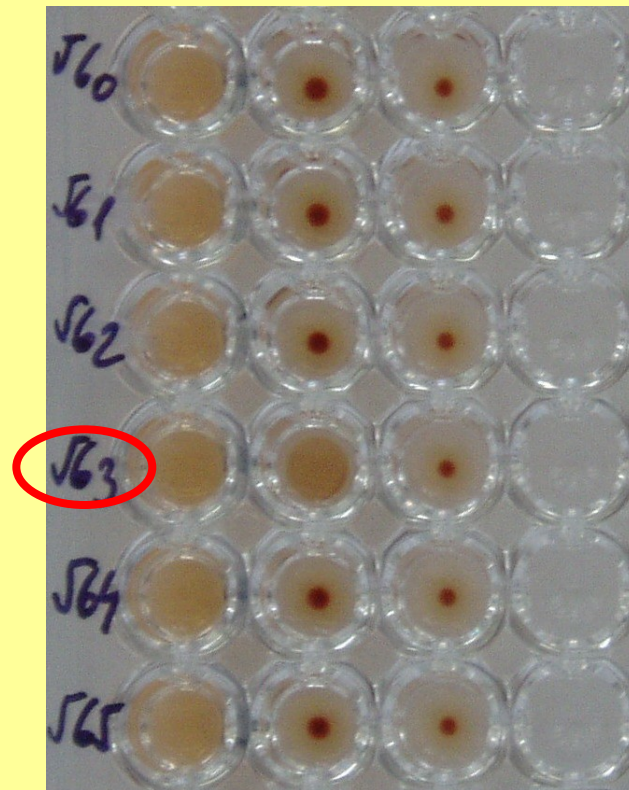
# Aglutinace na nosičích

- antigen navázaný na vhodnou částici:
  - ✓ latex – latexová aglutinace
  - ✓ erytrocyt – pasivní hemaglutinace
- TPHA – *T. pallidum* hemagglutination



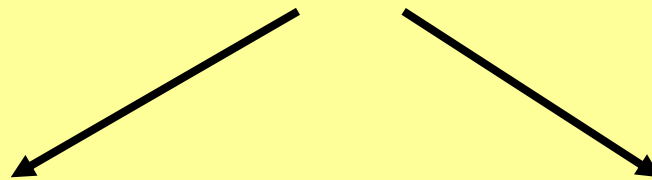


TPHA – průkaz protilátek proti *T.pallidum*  
pasivní hemaglutinací



# Komplement fixační reakce

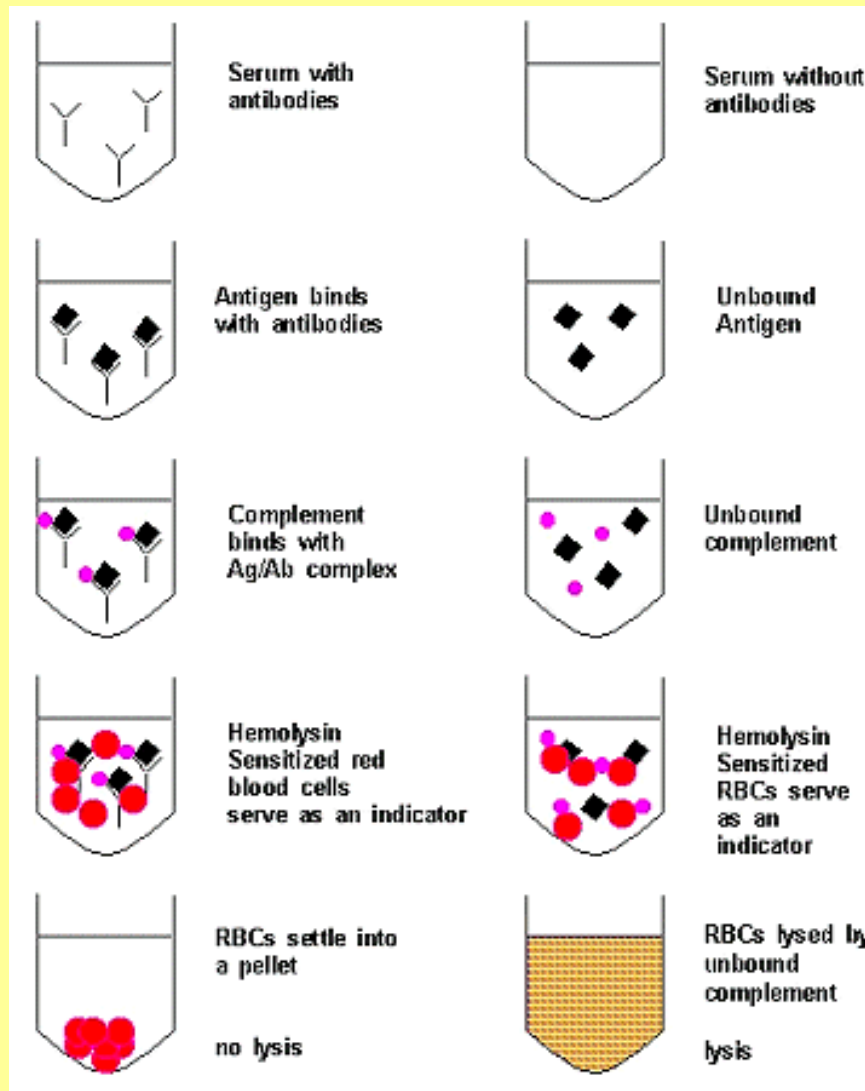
- ✓ komplex antigen + hledaná protilátka
- ✓ komplement
- ✓ indikátorový neboli hemolytický systém (beraní erythrocyty senzibilizované králičí protilátkou)



**zábrana hemolýzy**  
**pozitivní reakce**

**hemolýza**  
**negativní reakce**

# Komplement fixační reakce



pozitivní

negativní

# Neutralizační reakce

- protilátka brání biologickým účinkům antigenu
- ASLO – průkaz antistreptolyzinu O

přítomnost ASLO ve vyšetřovaném séru



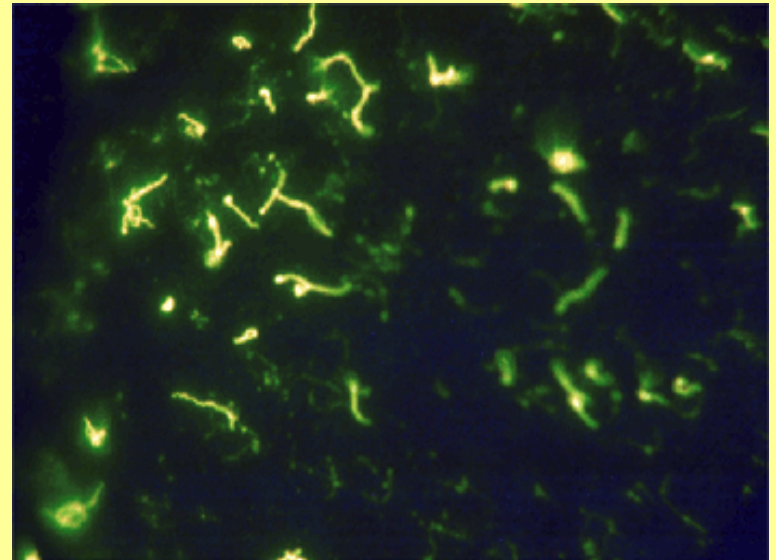
**zábrana hemolýzy**  
**pozitivní reakce**



# Imunofluorescence

- jedna složka značena fluorescenčním barvivem, průkaz pomocí fluorescenčního mikroskopu
- přímá – průkaz antigenu: *T.pallidum*
- nepřímá – průkaz protilátek: syfilis, ehrlichioza, HHV6

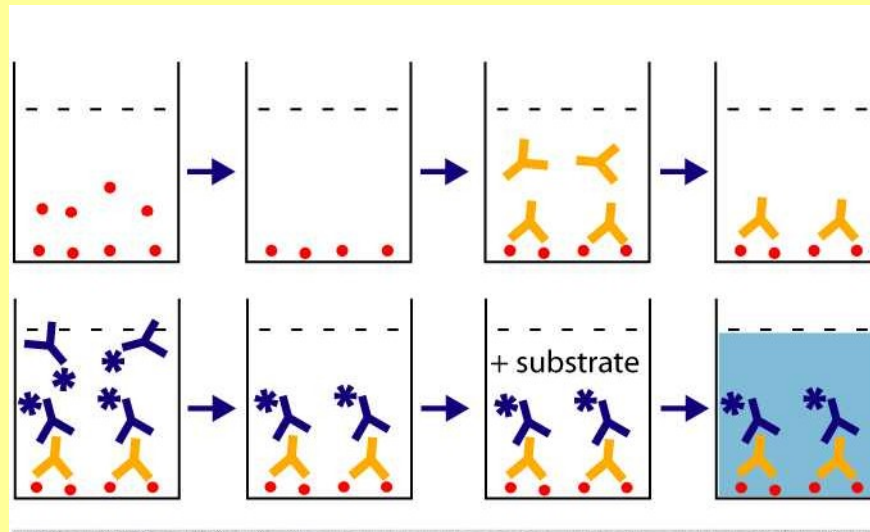
Nepřímá imunofluorescence  
- protilátky proti *T.pallidum*



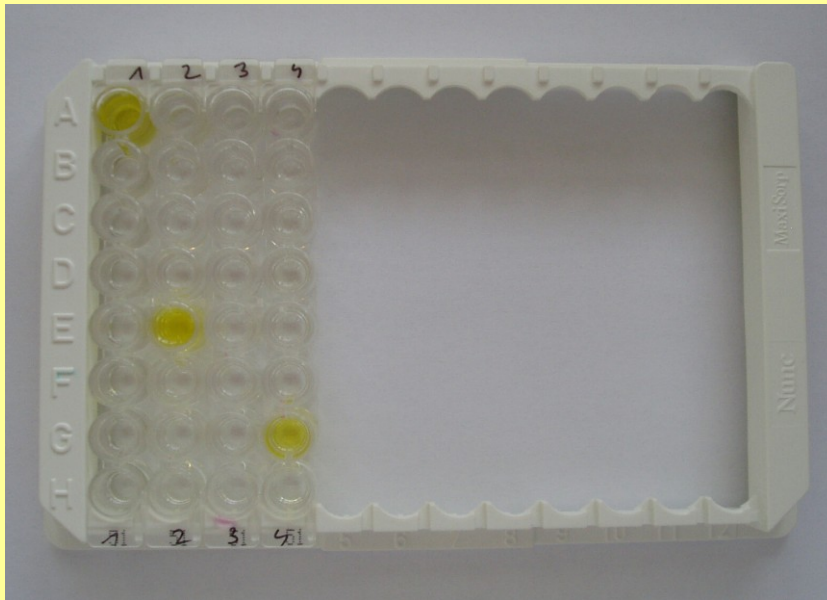
# Enzymová imunoanalýza

- jedna složka značena enzymem, který rozloží přidaný substrát za vzniku barevného produktu
- Výsledek: barevná reakce
- Hodnocení: měření absorbance
- ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)
- průkaz antigenu: HBsAg, respirační viry, chlamydie
- **průkaz protilátek: univerzální použití**

# Princip metody ELISA







ELISA – průkaz HBsAg

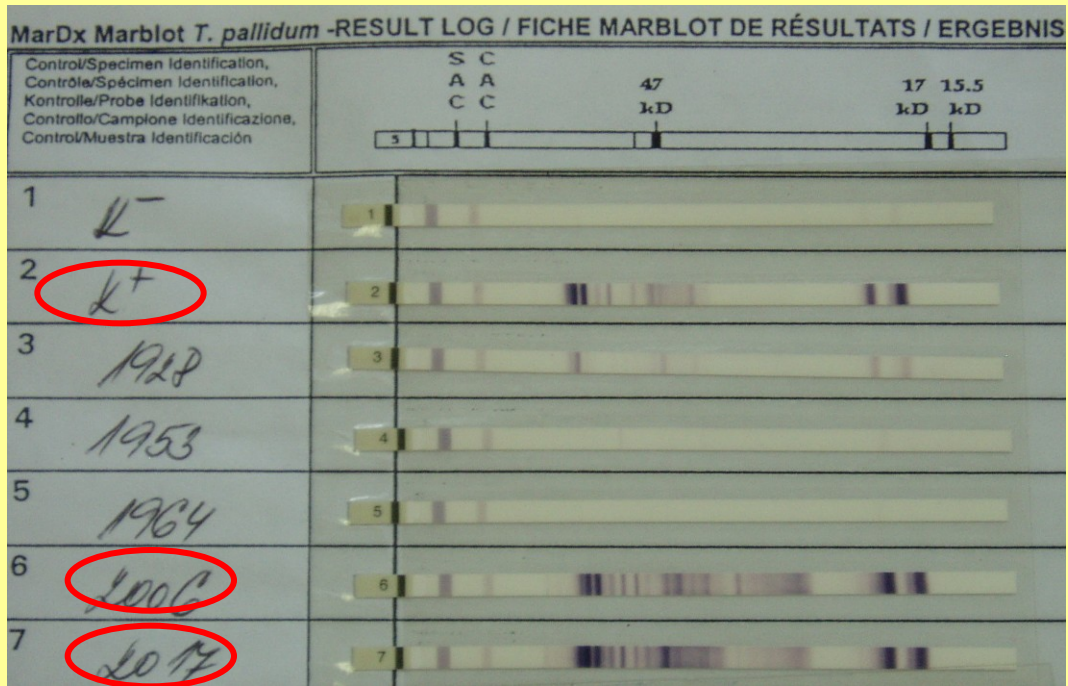
Souprava pro vyšetření  
metodou ELISA



# Western blot

Antigen rozdělený na jednotlivé polypeptidy dle molekulové hmotnosti na nitrocelulózovém pásku

1. vazba hledaných protilátek ze séra na příslušné antigenní frakce
2. přidání protilátky značené enzymem
3. přidání substrátu
4. výsledná reakce – barevný proužek

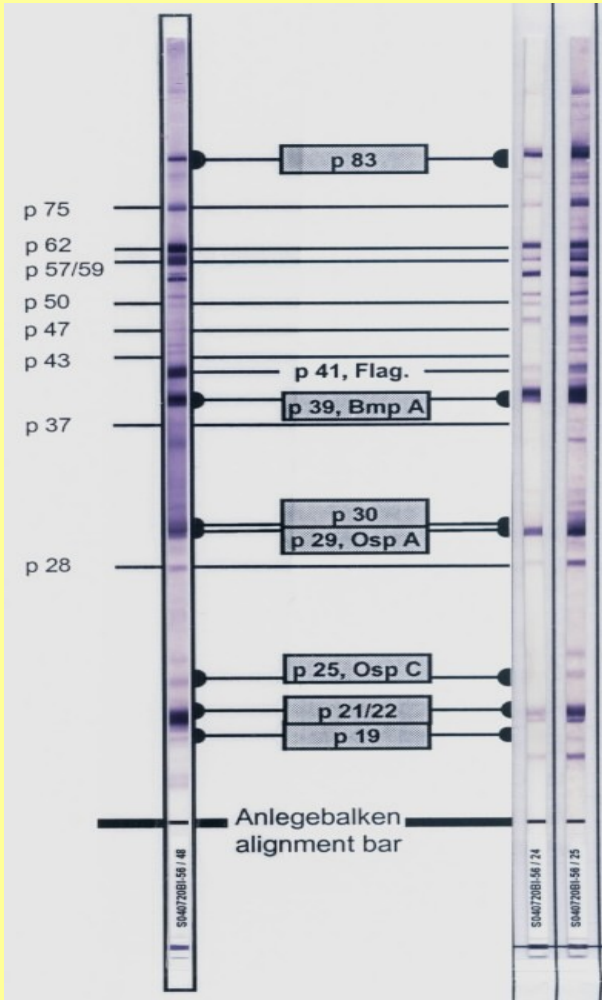


Western blot *T.pallidum* IgG

Autoblot 2000, Medtec, USA



# Western blot *B.garinii* IgG



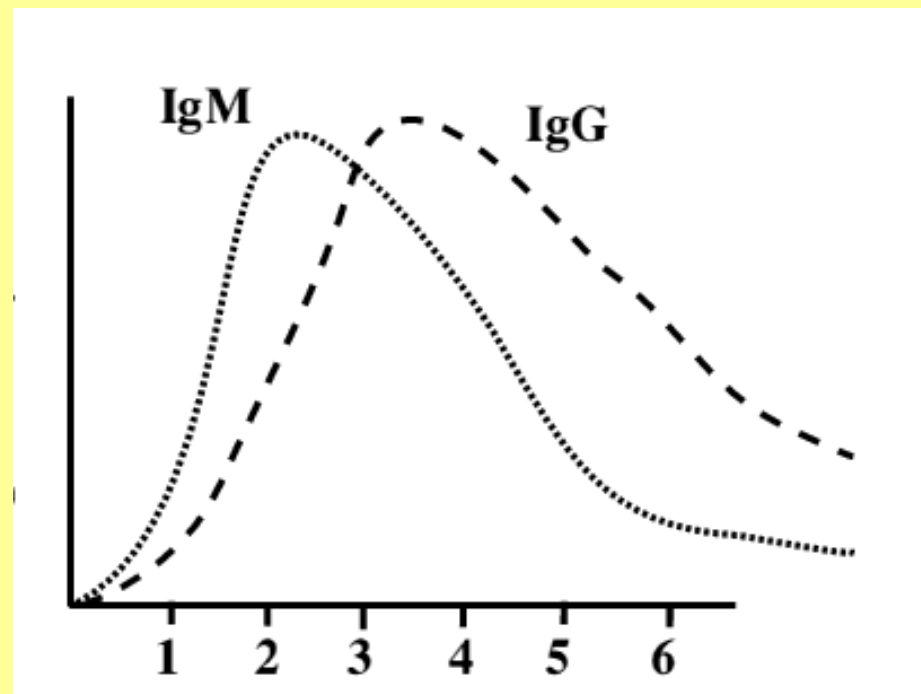
Autoblot 6000, Medtec, USA

# Interpretace serologických výsledků

- průkaz protilátek svědčí pro setkání s antigenem (kdy ?), k diagnóze infekce většinou nestačí
- výjimka: syfilis, infekce HIV
- dynamika imunitní reakce:

setkání s antigenem  $\xrightarrow{10 \text{ dní}}$  průkaz protilátek

- **IgM** – první protilátky, přetrvávají týden až několik měsíců, svědčí pro čerstvou infekci
- **IgA** – přetrvávají o něco déle, svědčí pro čerstvou nebo nedávnou infekci
- **IgG** – nejvyšší hladina měsíc po začátku onemocnění, mohou přetrvávat roky



# Serologický průkaz infekce

- vyšetření dvou vzorků séra: akutní na začátku onemocnění, rekonvalescentní za 10 až 14 dní
- průkazný nález: čtyřnásobný vzestup titru nebo serokonverze
- vzorky nutno vyšetřit zaráz !

titr protilátek = nejvyšší ředění, v němž ještě došlo k prokazatelné serologické reakci

# PCR

- polymerázová řetězová reakce
- přímý průkaz NK bakterií, virů, kvasinek, parazitů
- různé modifikace
- výhody: vysoká specifita, rychlost, ATB nejsou kontraindikací vyšetření
- nevýhody: vysoká cena, přístrojové vybavení, riziko kontaminace



## PCR – LightCycler (Roche)



# Princip PCR

- opakované cykly tří jednoduchých reakcí:
  - denaturace dvojšroubovice hledané DNA na dvě izolovaná vlákna (94 °C)
  - annealing - připojení dvou krátkých syntetických nukleotidů (primery) na tato vlákna (54 – 65 °C)
  - prodlužování primerů v přítomnosti vhodných reakčních složek a enzymu *Taq*-polymerasy za vzniku dvou kopií hledané DNA (72 °C)

PCR : Denaturation 94°C

