



# ÚVOD DO SEROLOGIE PRECIPITACE, AGLUTINACE

Lékařská mikrobiologie – cvičení, jarní semestr 2017  
Mikrobiologický ústav LF MU

# Osnova

---

- ▶ Přímé vs. nepřímé metody detekce
- ▶ Antigeny, protilátky
- ▶ Precipitace
- ▶ Aglutinace
- ▶ Aglutinace na nosičích



# Přímé vs. nepřímé metody detekce

---

- ▶ **Přímé metody:** hledáme mikroba, jeho části nebo produkty (antigeny, toxiny,...). Infekční agens je přítomno nyní.
- ▶ **Nepřímé metody:** hledáme protilátky vytvořené makroorganismem, které vznikly jako odezva na činnost mikroba. Infekční agens bylo přítomno někdy v minulosti.



# Přehled přímých metod

---

Metoda	Průkaz ve vzorku	Identifikace kmene
Mikroskopie	ano	ano
Kultivace	ano	ano
Biochemická identifikace	ne	ano
Průkaz antigenu, toxinu	ano	ano
Pokud na zvířeti	ano	v praxi ne
Molekulární metody	ano	v praxi ne (pouze u molekulární epidemiologie)



# Přehled nepřímých metod

---

- ▶ precipitace
- ▶ aglutinace
- ▶ aglutinace na nosičích
- ▶ komplementfixační reakce (KFR)
- ▶ neutralizační reakce
- ▶ metody se značenými složkami:
  - ❑ Imunofluorescence
  - ❑ ELISA
  - ❑ Western blot



# Antigeny

---

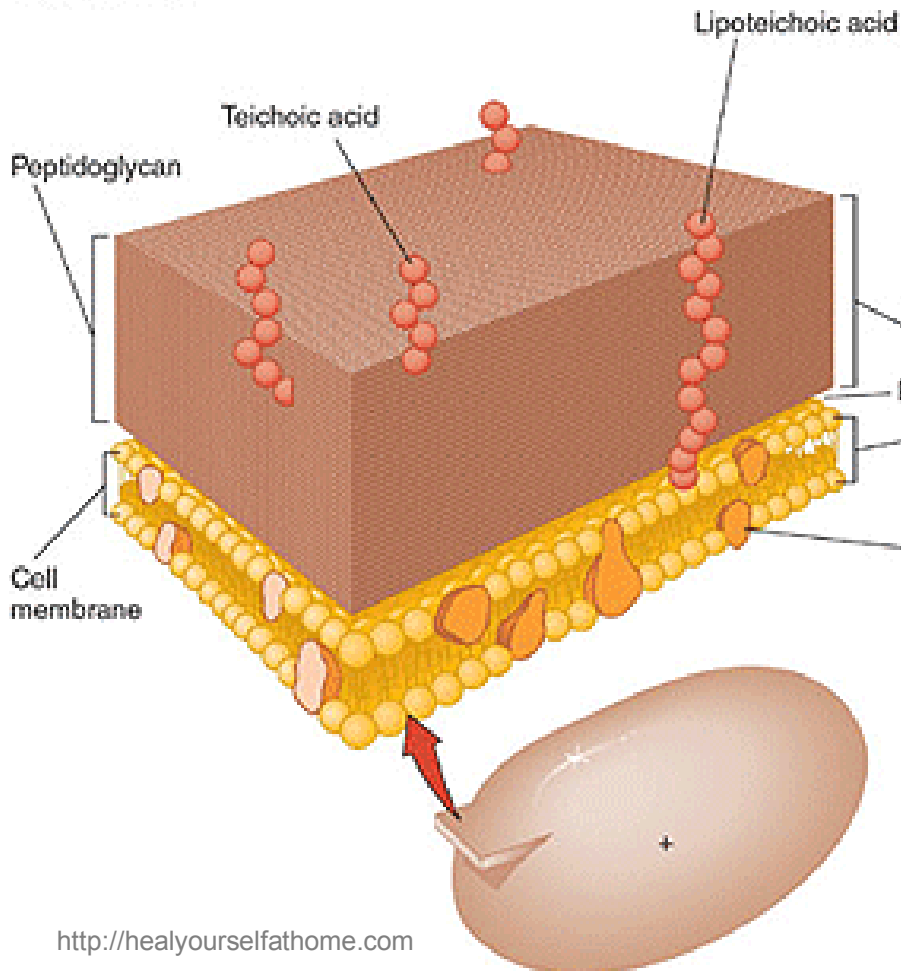
- ▶ **Makromolekula pocházející z jiného, cizího organismu indukující tvorbu protilátek.**
- ▶ **Antigenní jsou sacharidy a proteiny**, lipidy a nukleové kyseliny pouze v kombinaci s proteiny a sacharidy.
- ▶ Je vázán do vazebného místa protilátky.
- ▶ V mikrobiologii jsou důležité **mikrobiální antigeny**, tedy části nebo produkty mikroorganismů, které vyvolají v hostiteli antigenní odpověď. Např. virové částice, buněčné stěny a jejich složky (lipopolysacharidy, lipoteichoové kyseliny...) bičíky, fimbrie, toxiny.



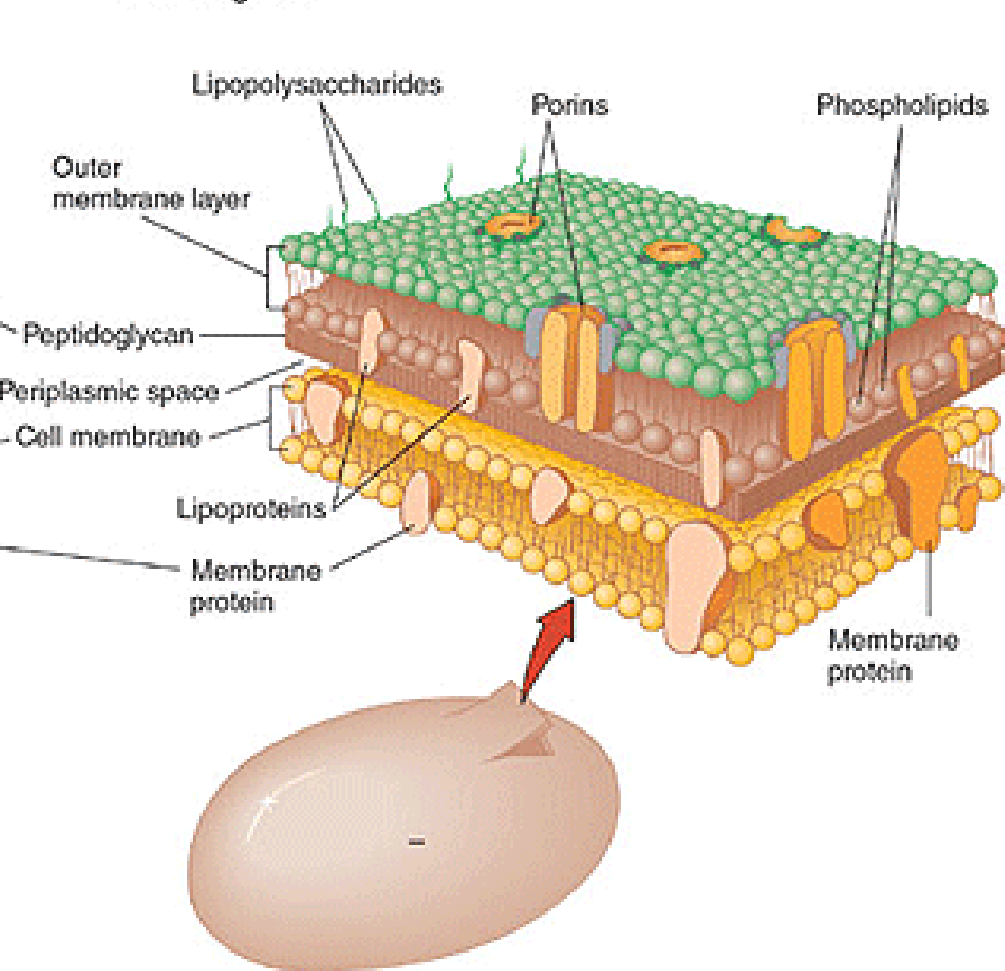
# Buněčná stěna G<sup>+</sup> a G<sup>-</sup>

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.

## Gram Positive

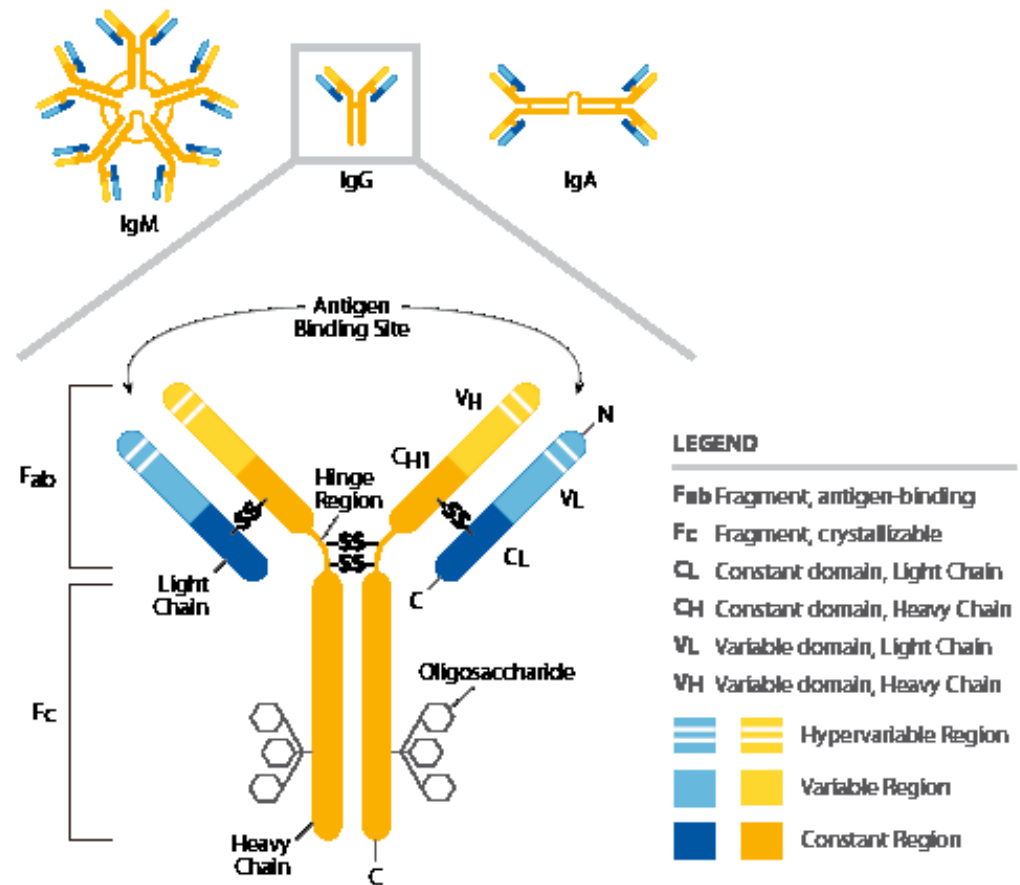


## Gram Negative



# Protilátka

- ▶ **Imunoglobulin**, tvořený v těle hostitele (člověka, ale také zvířete) jako odpověď na antigenní výzvu.
- ▶ Součást **humorální (látkové) imunity**.
- ▶ Produkovány **B-lymfocyty**.





# Serologické metody

---

- ▶ Detekce **komplexu protilátka-antigen.**
- ▶ **Průkaz antigenu pomocí laboratorní protilátky:**
  - ❑ Přímý průkaz
  - ❑ Protilátka získaná od zvířete – pomocí ní detekce Ag ve vzorku pacienta nebo antigenní analýza kmene mikroba
- ▶ **Průkaz protilátky laboratorním antigenem:**
  - ❑ Nepřímý průkaz
  - ❑ V pacientově séru hledáme protilátky reagující s laboratorním antigenem



# Interpretace

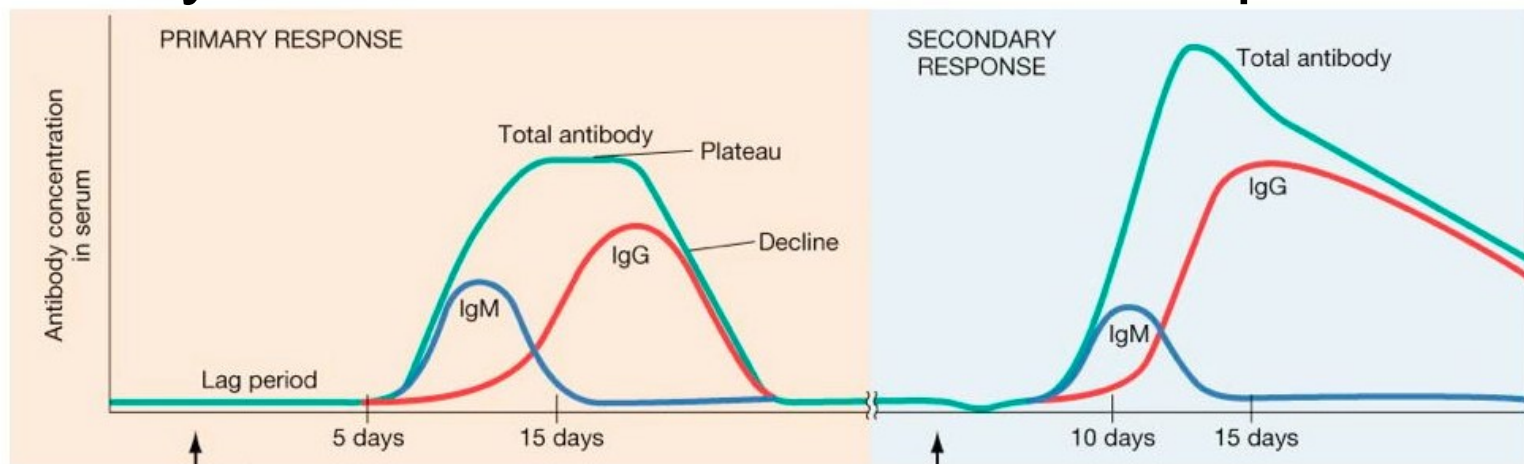
---

- ▶ **Průkaz antigenu:** pozitivita = přítomnost mikroba v těle pacienta
- ▶ **Průkaz protilátek:** pozitivita = pacient se s mikrobem setkal. Kdy? Nutno odhadnout dle:
  - ❑ Relativní množství protilátek (titr) a jeho změny v čase (dynamika titru)
  - ❑ Třídy protilátek – IgM/IgG
- ▶ Avidita protilátek (na počátku infekce jsou přítomny nízkoavidní Ab)



# Interpretace – primární a sekundární imunitní odpověď

- ▶ **Akutní infekce:** velké množství protilátek, převážně třídy IgM, případně IgM i IgG
- ▶ Pacient po prodělané infekci: malé množství protilátek, pouze IgG (imunologická paměť)
- ▶ **Chronická infekce:** různé možnosti podle aktivity infekce, mikrobiálního druhu apod.



# Interpretace – nepřímý průkaz

---

- ▶ Obtížné zjistit koncentraci protilátek proti konkrétnímu antigenu v jednotkách mol/l, mg/l. Apod.
- ▶ „Kvantitativní“ metoda = ředění séra pacienta:
  - ❑ Reaguje-li i po mnohonásobném ředění → v séru je velké množství protilátky
  - ❑ Reaguje pouze při nevelkém ředění séra → v séru je pouze malé množství protilátky



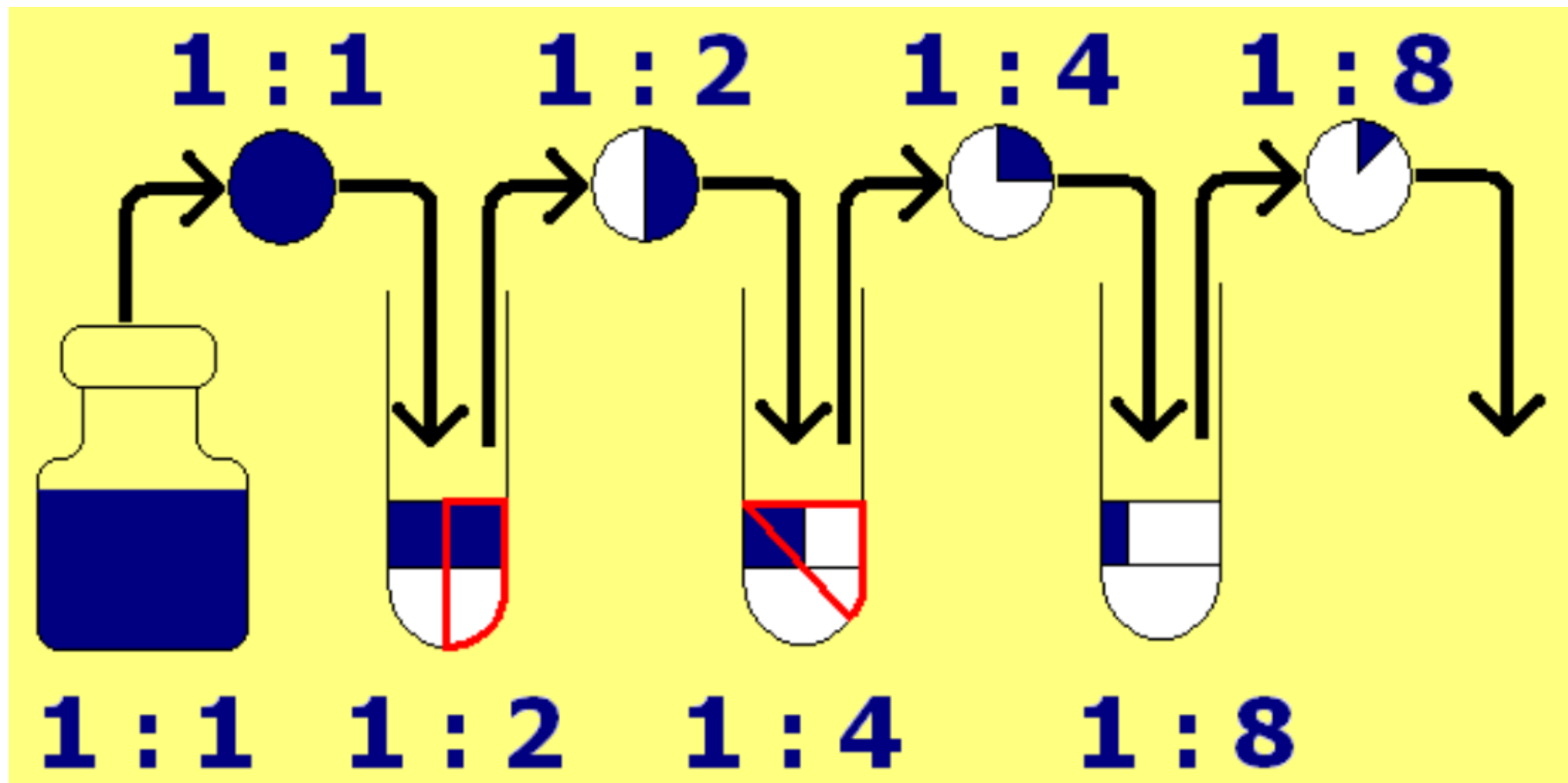
# Ředění séra geometrickou řadou

---

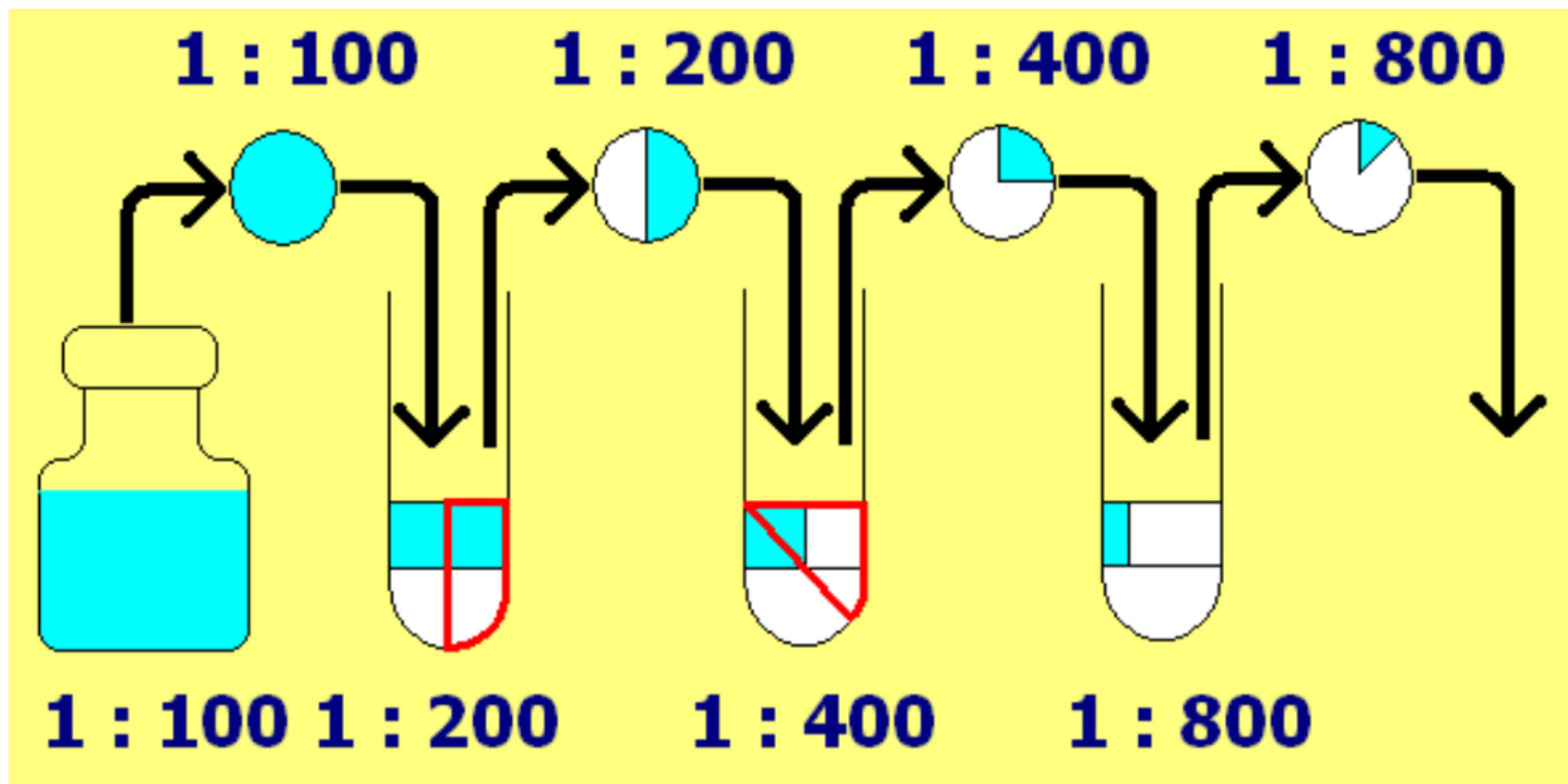
- ▶ Nejjednodušší = použití ředění pomocí **geometrické řady s koeficientem 2**.
- ▶ Na vstupu je neředěné sérum nebo sérum o známém předředění.
- ▶ Každý další důlek je **dvojnásobně ředěný oproti důlku předchozímu**, například tedy 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, ...
- ▶ **Pozor! Stejně provedení, ale odlišný zápis:**
  - ❑ **V biochemii:** 1 díl séra : 9 dílů fyziologického roztoku (psáno 1:9).
  - ❑ **V serologii:** 1 díl séra : 9 dílů fyziologického roztoku (psáno 1:10)



# Geometrická řada – bez předředění séra

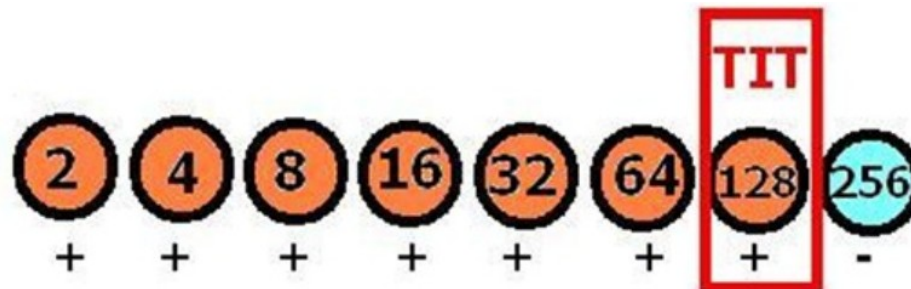


# Geometrická řada – s předředěním séra



# Titration

- ▶ Po naředění séra → přidáme antigen.
- ▶ Dle typu reakce buďto hned vidíme výsledek (aglutinát, precipitát) nebo je nezbytné výsledek znázornit přidáním dalších složek (např. komplementu, erytrocytů,...).
- ▶ **Titration = nejvyšší ředění, kde ještě vidíme pozitivní reakci.** (Máme-li dvě řady, je titrem nejvyšší ředění z obou řad dohromady.)





# Aglutinace, precipitace (1)

---

- ▶ Nejjednodušší serologické reakce.
- ▶ Pouze antigen a protilátka, žádné další složky.
- ▶ **Průkaz antigenu** – pracuje se se zvířecí či monoklonální (= vyrobenou klonální populací plazmatických buněk) protilátkou, **titr není relevantní informace.**
- ▶ **Průkaz protilátky** – pracuje se s laboratorním antigenem, **titr protilátek nás zajímá!**



## Aglutinace, precipitace (2)

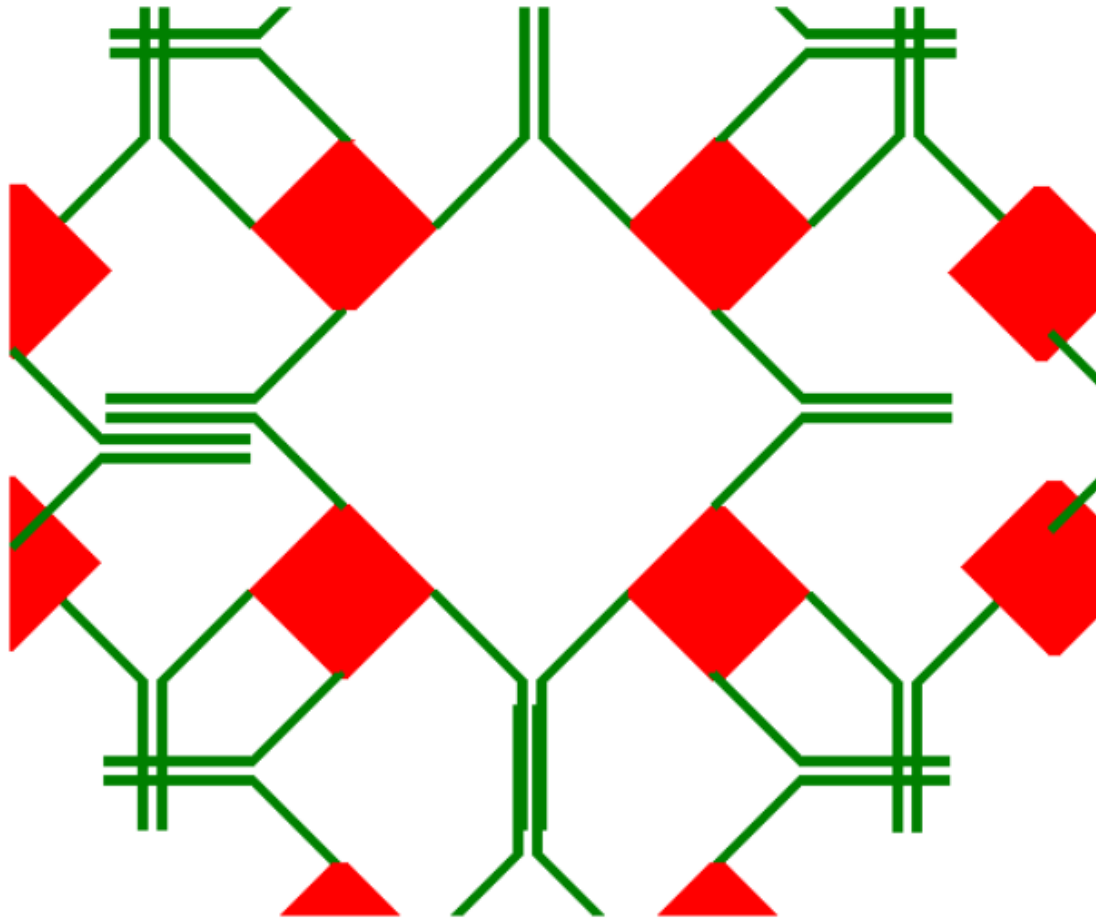
---

- ▶ **Precipitace:** antigeny ve formě izolovaných makromolekul (=rozpuštěné koloidní antigeny).
- ▶ **Aglutinace:** antigen je součástí buňky mikroba (=antigen je korpuskulární, pracuje se s celými mikroby).
- ▶ **Aglutinace na nosičích:** „precipitace převedená na aglutinaci“. Původně izolované koloidní antigeny jsou navázány na cizí částici = nosič (latex, erytrocyt, celulóza, ...).



# Precipitate

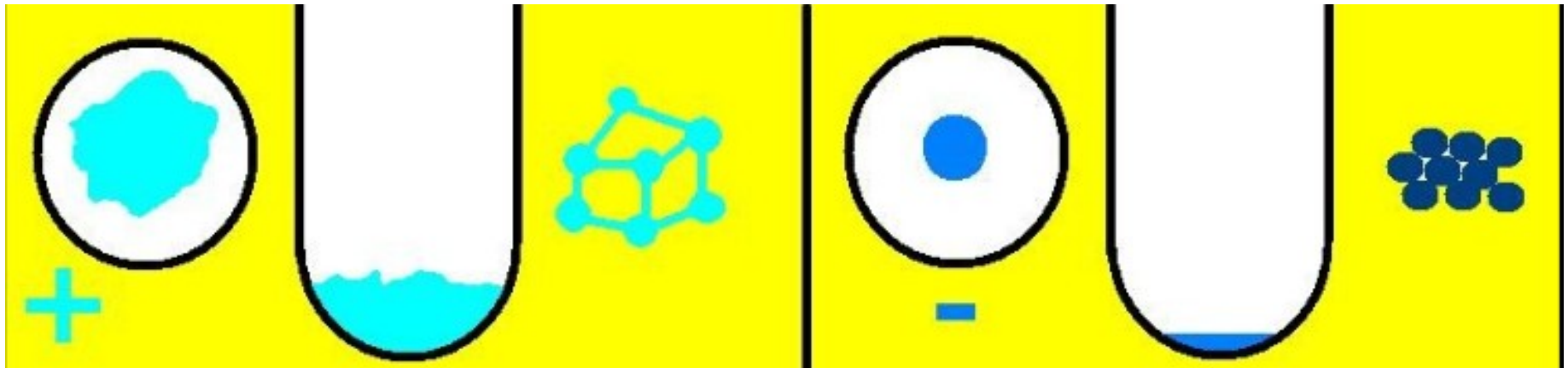
---



# Aglutination (1)

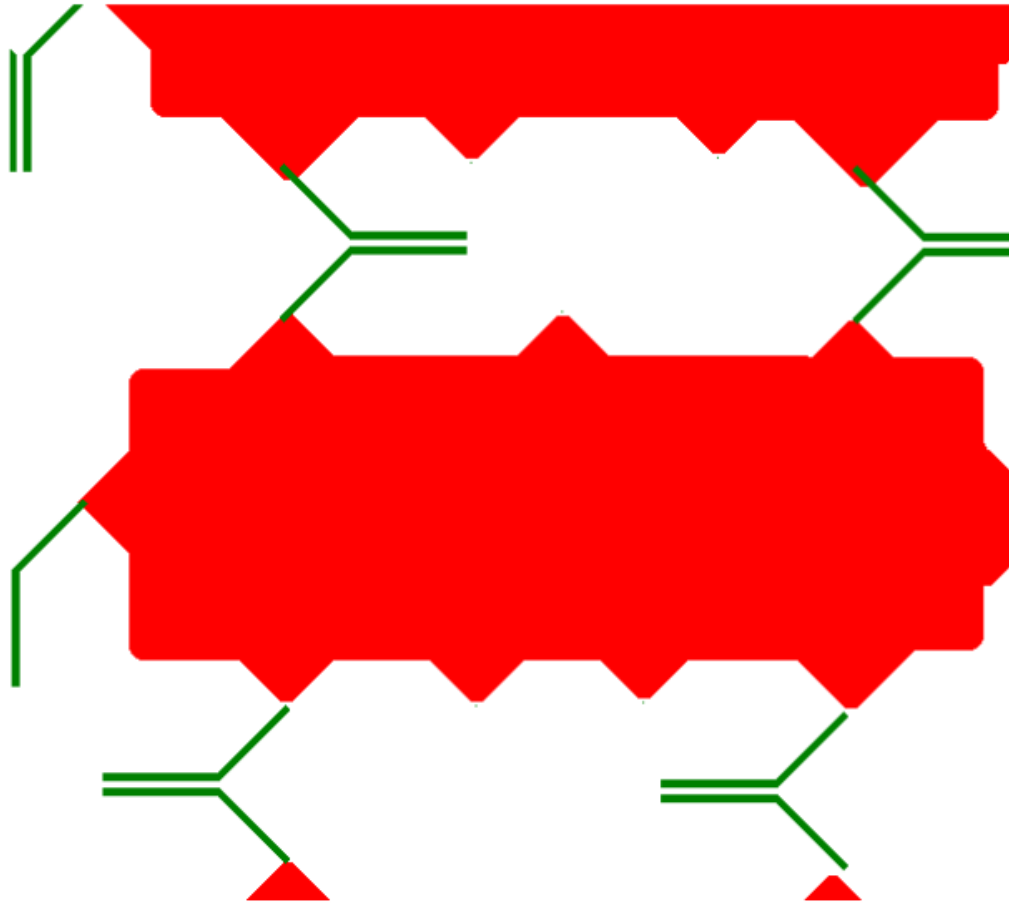
---

- ▶ Pozitivní – nepravidelný chuchvalec
- ▶ Negativní – malé pravidelné kolečko



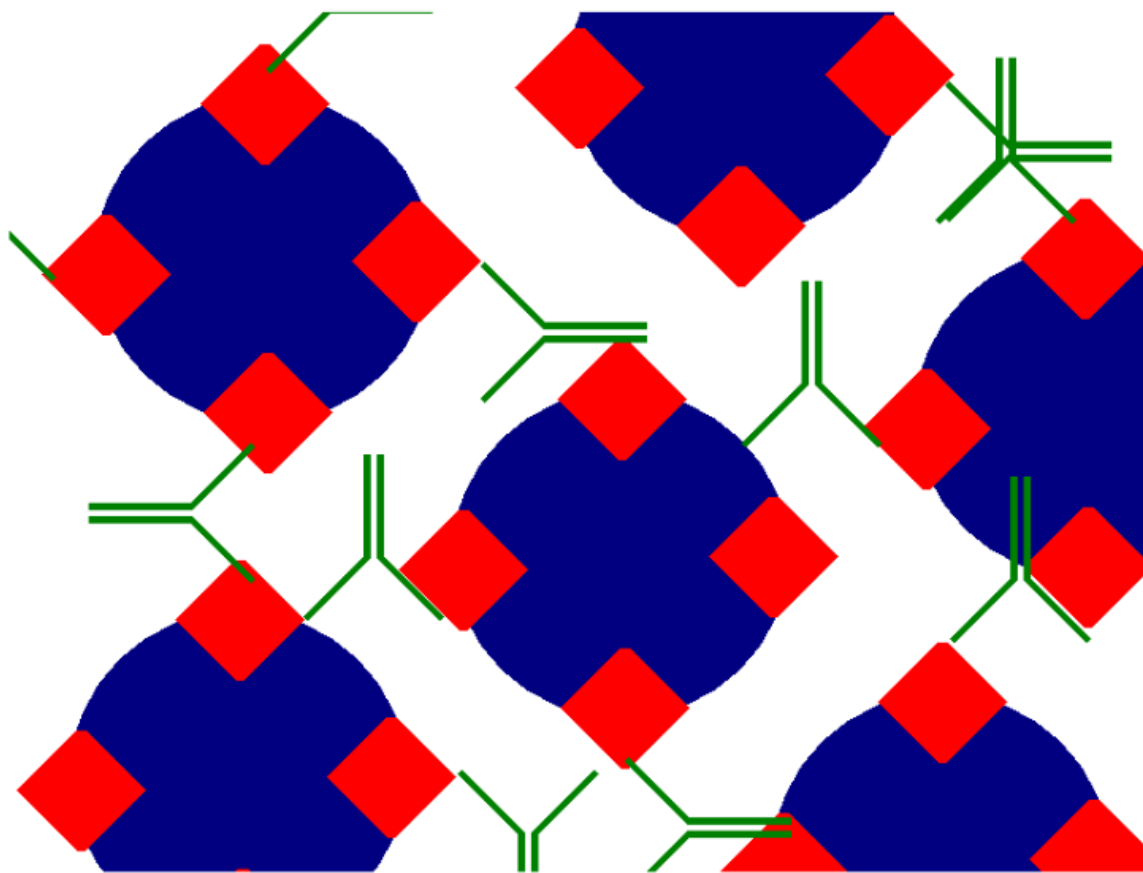
## Aglutinace (2)

---



# Aglutinace na nosičích

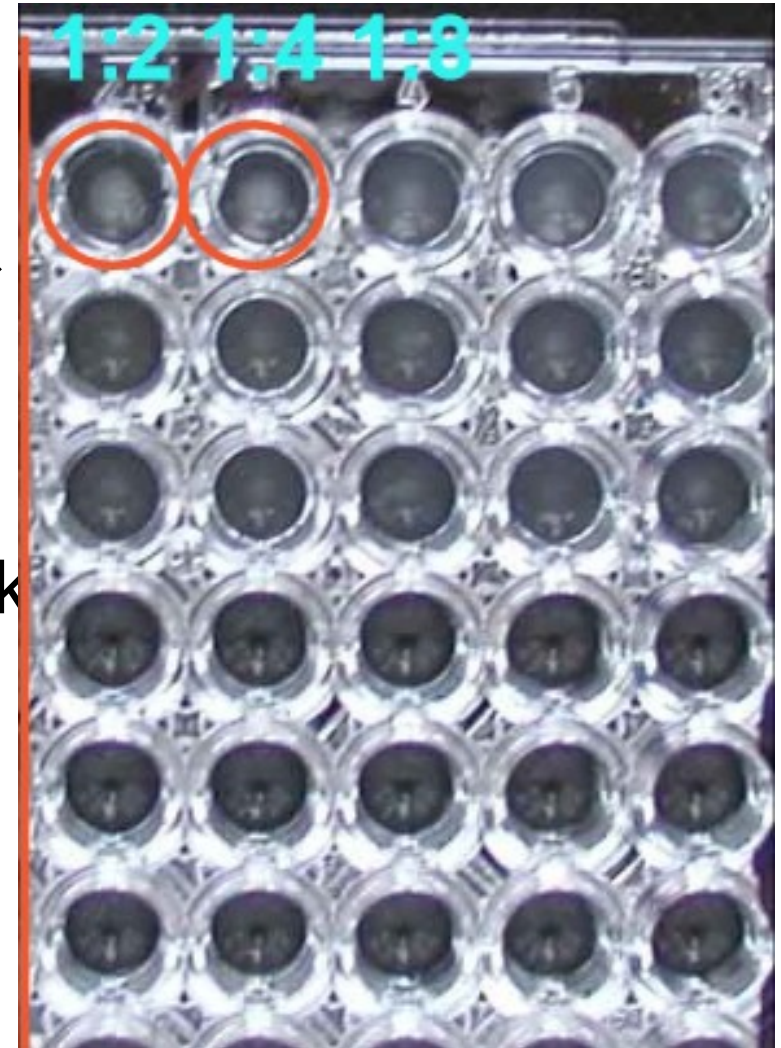
---



# Demonstrace aglutinační reakce u tularémií

► **První řada:** Aglutinát je viditelný v ředění 1:2 a 1:4, nikoli však již 1:8 a vyšším → titr je 1:4

► **Druhá řada:** V žádném důlku není aglutinace → žádný titr, negativní reakce



# Precipitace: reakce RRR, RPR, VDRL

---

- ▶ **Netrepomenové testy, testování syfyilis**
- ▶ Průkaz **nespecifických protilátek proti kardiolipinu**
- ▶ Různé formy provedení:
  - ❑ **VDRL** (Venereal Disease Research Laboratory) – flokulační (precipitační) test na sklíčku
  - ❑ **RRR** (rychlá reaginová reakce) – obdoba VDRL, použití jamek
  - ❑ **RPR** (rapid plasma reagin) – odečítání reakce vylepšeno o makroskopickou vizualizaci pomocí karbonových částic nebo pigmentů.

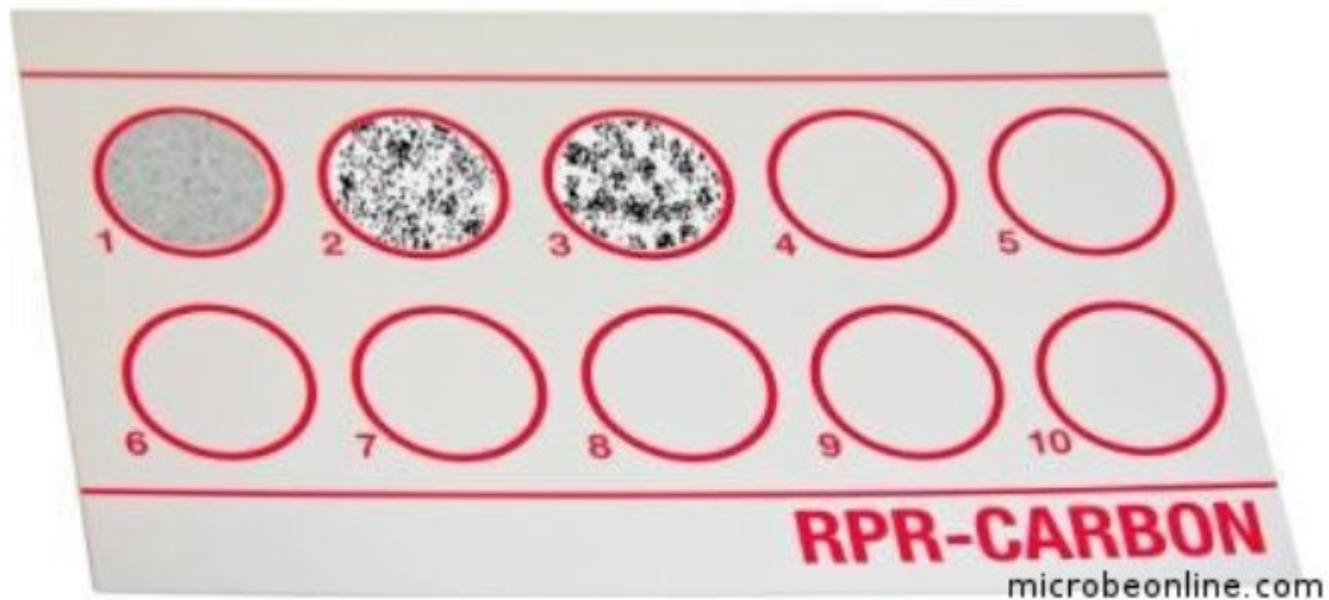




# RRR test

---

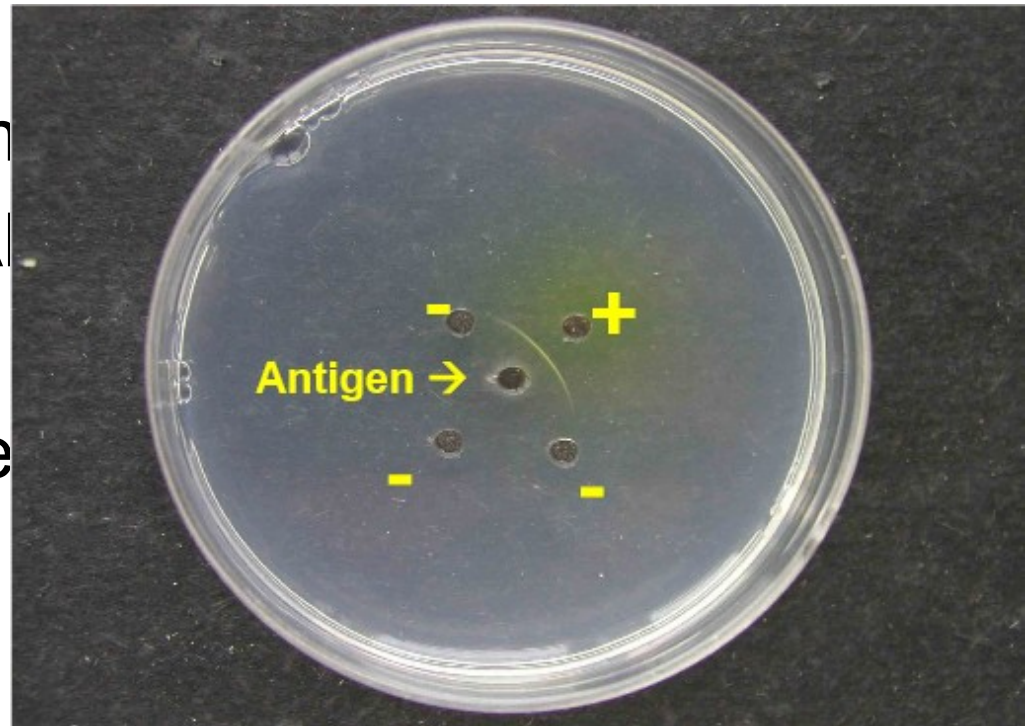
- ▶ Znázornění karbonovými částicemi



# Precipitace: mikroprecipitace v agaru

---

- ▶ Mikroprecipitace v agaru dle Ouchterlonyho (tato reakce není v dnešních úkolech)
- ▶ Do důlku uprostřed je nalita tekutina obsahující antigen
- ▶ Ag difunduje agarem
- ▶ Obsahuje-li sérum A difundují proti němu a na jejich styku vznikne precipitační linie



# Úkol 1: Ředění geometrickou řadou

---

- ▶ Předpokládejme pro jednoduchost, že vycházíme z neředěného vzorku séra
- ▶ Připravte si 8 zkumavek a do každé napipetujte pomocí saviček 0,2 ml fyziologického roztoku
- ▶ Do první zkumavky přidejte 0,2 ml vzorku (pro účely tohoto úkolu nabarven na modro)
- ▶ Směs v první zkumavce promíchejte trojnásobným nasátím a vypuzením z pipety (nyní je vzorek zředěn 2x, tj. psáno 1:2)
- ▶ Z první do druhé zkumavky přeneste 0,2 ml séra ředěného 1:2 a promíchejte (nyní je vzorek zředěn 4x, tj. psáno 1:4)
- ▶ Pokračujte stejným způsobem dále

# Úkol 1: Ředění geometrickou řadou

---

- ▶ Odstraňte 0,2 ml z poslední zkumavky do dezinfekčního roztoku a vložte do něj i pipetu
- ▶ Zakreslete zkumavky a pod ně запиšte ředění
- ▶ Zkumavky najdete na bočním stole
- ▶ Zkumavky z prvního úkolu nedávejte do dezinfekce na Pasteurovy pipety, ponechejte je ve stojánku (!)
- ▶ Velké Pasteurovy pipety několikrát propláchněte fyziologickým roztokem, poté je odložte, budou sloužit zase dalším studentům



## Úkol 2: Mikrotitrační destičky

---

Určete, ke kterému testu patří správná mikrotitrační destička:

- ▶ biochemický test (ENTEROtest 16)
- ▶ mikrodiluční test (citlivost na ATB)
- ▶ určení titru protilátek



## Úkol 3a: Aglutinace – průkaz protilátek

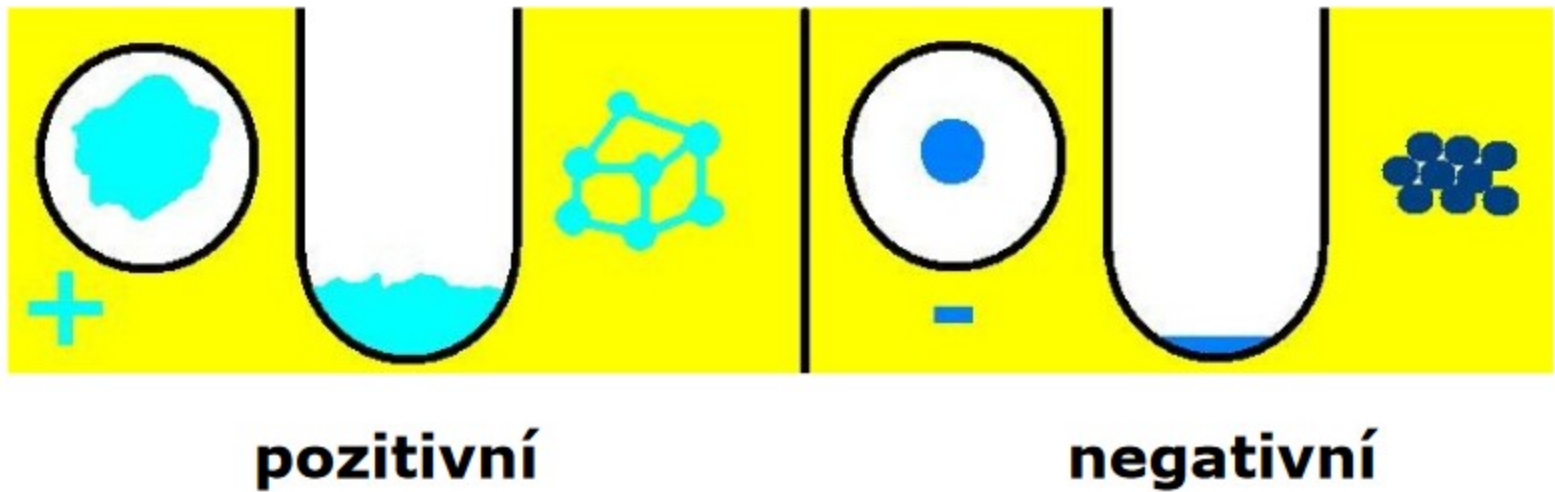
---

- ▶ Prohlédněte si mikrotitrační destičku se séry, u nichž aglutinačně hledáme protilátky proti *Yersinia enterocolitica*
  - ▶ V 1. důlku je sérum naředěno 1:100 a dále s koeficientem 2
  - ▶ Jako antigen zde slouží samotná bakteriální buňka
  - ▶ Aglutinace je mapovitý povláček na dně důlku (buňky jsou provázány protilátkami)
  - ▶ **Negativní reakce je kompaktní pravidelná tečka** (sedimentované bakteriální buňky)
  - ▶ Stanovte a запиšte titr protilátek (pokud jsou přítomny), zakreslete výsledek
- 



## Úkol 3a: Aglutinace – průkaz protilátek

---



# Úkol 3a: Aglutinace – detekce protilátek proti yersiniím



**K+ pozitivní, titr = 1 : 200**



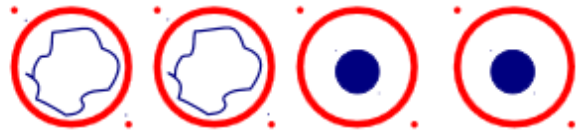
Č. 1 negativní



Č. 2 pozitivní, titr = 1 : 800



Č. 3 negativní



Č. 4 pozitivní, titr = 1 : 200

1:100 1:200 1:400 1:800



Aglutinace



Sedimentace volných bakterií



## Úkol 3b: Aglutinace – antigenní analýza *Escherichia coli* (1)

---

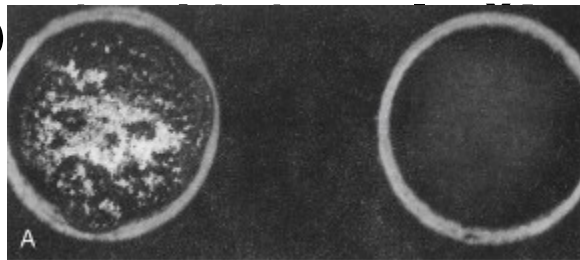
- ▶ *Escherichia coli* je G– tyčka, která je normální složkou střevní mikroflóry.
- ▶ Na povrchu má (kromě jiných typů antigenů) také takzvané tělové (somatické) **O-antigeny**.
- ▶ O-antigeny nejsou u všech kmenů stejné → stovky **serotypů** v rámci jednoho druhu *E.coli*.
- ▶ Pouze 12 serotypů vykazuje vyšší patogenitu u novorozenců a kojenců = **EPEC** = **enteropatogenní *E.coli***.



## Úkol 3b: Aglutinace – antigenní analýza *Escherichia coli* (2)

---

- ▶ Kvůli snížení počtu prováděných reakcí se testují **nejdříve polyvalentní séra** (tj. séra obsahující Ab proti více typům EPEC) – použijeme **nejprve nonavalentní sérum** (Ab proti devíti typům EPEC) a **trivalentní sérum IV** (Ab proti zbývajícím třem)
- ▶ Pokud jedno ze sér je pozitivní, pokračujeme s **trivalentními a monovalentními séry**
- ▶ **Pozitivita se projevuje aglutinací v kapce.**



## Úkol 4a: Aglutinace na latexových částicích

---

- ▶ Prohlédněte si mikrotitrační destičku se séry, u nichž aglutinačně hledáme protilátky proti *Yersinia enterocolitica*
- ▶ Titr je nejvyšší ředění s pozitivní reakcí
- ▶ Aglutinace je mapovitý povláček na dně důlku (buňky jsou provázány protilátkami)
- ▶ Negativní reakce je kompaktní pravidelná tečka (sedimentované bakteriální buňky)



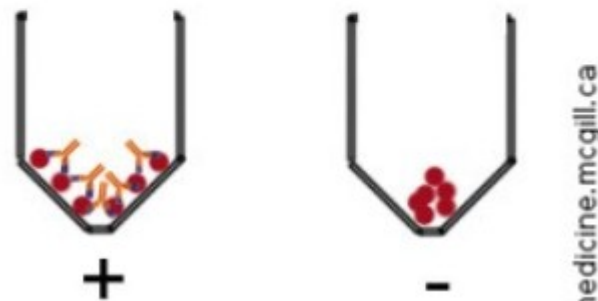
## Úkol 4b: *Treponema pallidum* a pasivní hemaglutinace (TPHA)

---

- ▶ Aglutinace na nosiči, nosičem je **erytrocyt** (červená barva)

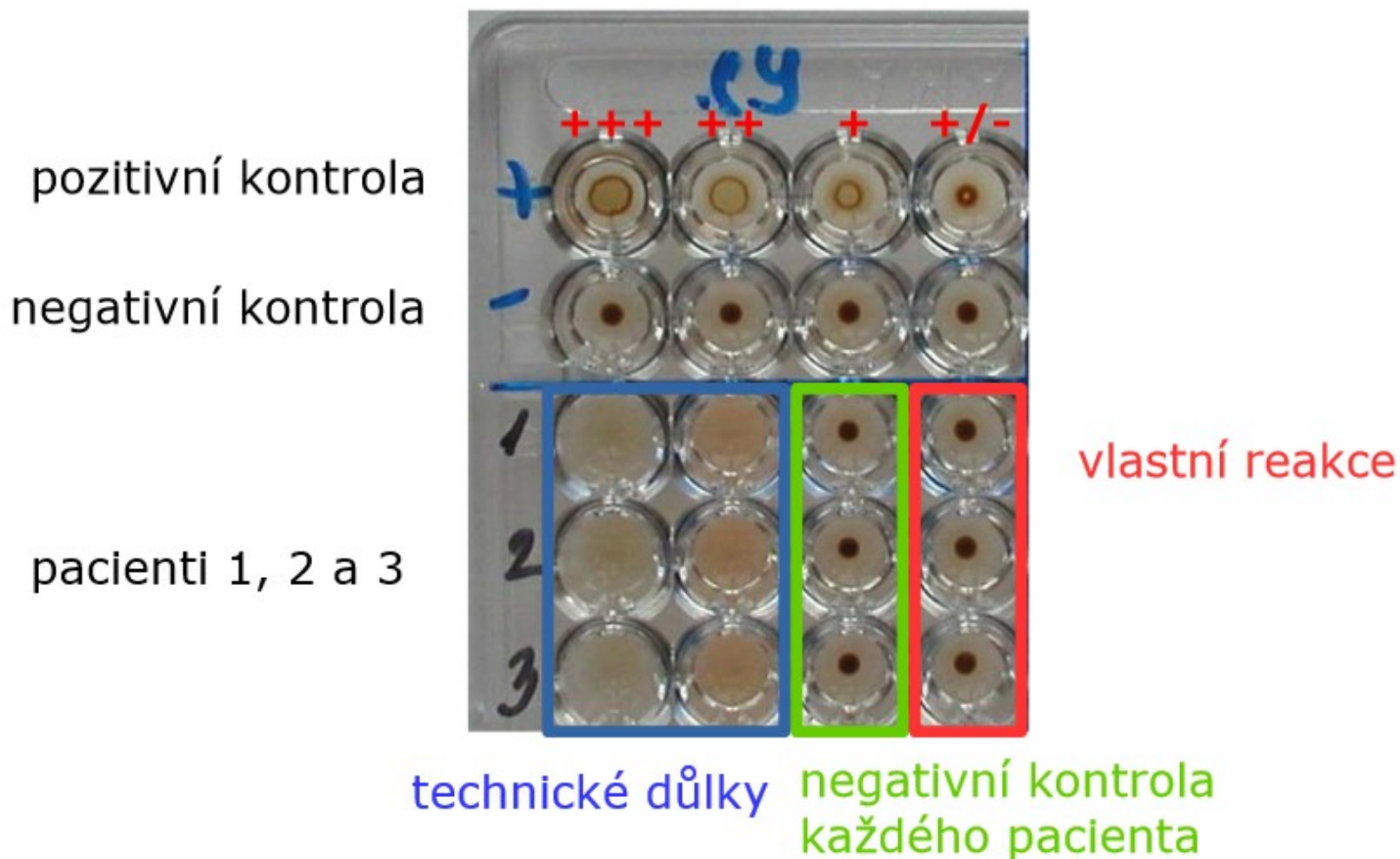


- ▶ **Pozitivní reakce vznik mapovitého povlášku**
- ▶ **Negativní reakce sedimentace částic na dno**



- ▶ Dnes se v tomto testu červené krvinky nahrazují polycelulózovými částicemi – zkratka TPPA

## Úkol 4b: *Treponema pallidum* a pasivní hemaglutinace (TPHA)



## Úkol 5a: Precipitace v průkazu protilátek – RRR

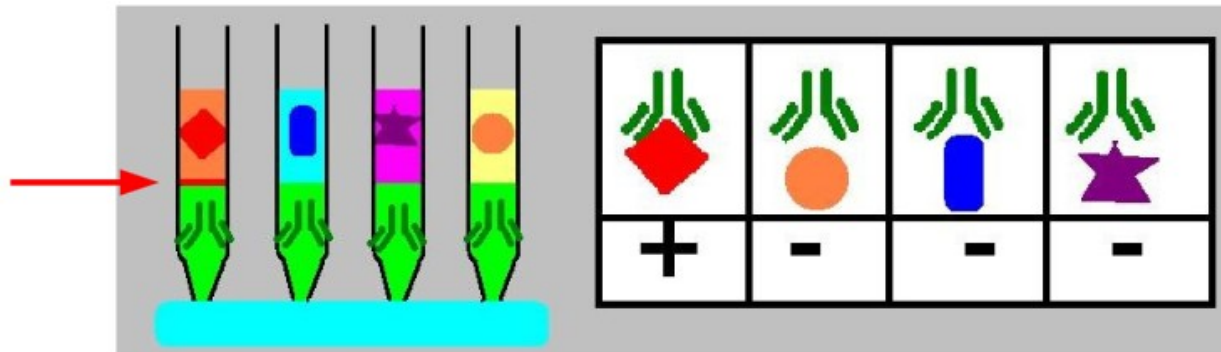
---

- ▶ Detekujeme protilátky, které jsou pozitivní u syfilis, ačkoli to nejsou protilátky proti *Treponema pallidum*
  - ▶ Detekujeme **protilátky proti kardiolipinu**
  - ▶ Reakci provádíme pouze kvalitativně
  - ▶ První důlek je pozitivní kontrola, druhý negativní. Pak má každý **pacient jen jeden důlek**.
  - ▶ Smíchá se 0,05 ml séra + 0,05 ml kardiolipinu.
  - ▶ RRR může být falešně pozitivní → pozitivitu je třeba ověřit např. TPHA testem
- 



## Úkol 5b: Prstencová precipitace k detekci antigenu *S. pyogenes*

- ▶ Do Pasteurových pipet zabodnutých v plastelíně postupně naléváme:
  - ❑ zvířecí
  - ❑ sérum s protilátkami
  - ❑ čtyři různé extrakty kmenů (každý v jiné pipetě!)
- ▶ Pozitivita = prstenec na styku tekutin (nemusí být v první)



## Po tomto cvičení byste měli umět

---

- ▶ Znát rozdíl mezi přímými a nepřímými metodami.
- ▶ Rozumět pojmům antigen a protilátka.
- ▶ Popsat obecný princip serologických reakcí.
- ▶ Vědět, co je titr.
- ▶ Popsat principy precipitace, aglutinace a aglutinace na nosičích včetně příkladů.

