

Úvod do sérologie, aglutinace a precipitace, ředění (téma J07)



- Autor prezentace: Ondřej Zahradníček
- K praktickému cvičení pro VLLM0421c
- Kontakty na mne (mohou se na mne obracet i studenti z jiných skupin):
- 777 031 969 zahradnicek@fnusa.cz
- ICQ 242-234-100



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

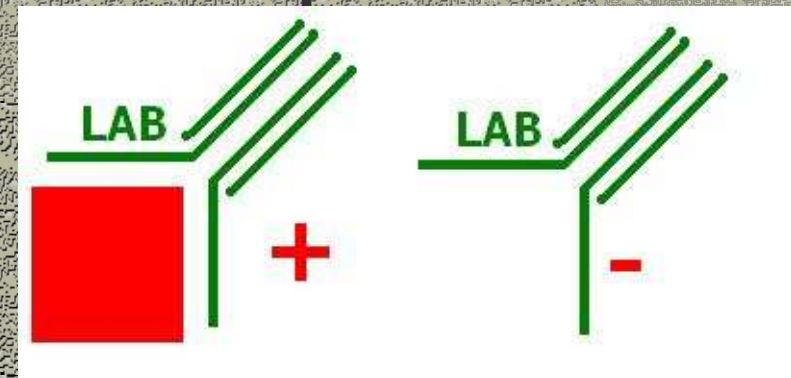
Antigen = makromolekula pocházející z cizího organismu: rostliny, mikroba, jiného živočicha. V mikrobiologii nás zajímají mikrobiální antigeny = části mikrobiálního těla, které vzbuzují v hostiteli antigenní odpověď

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

Dva způsoby, jak to využít:

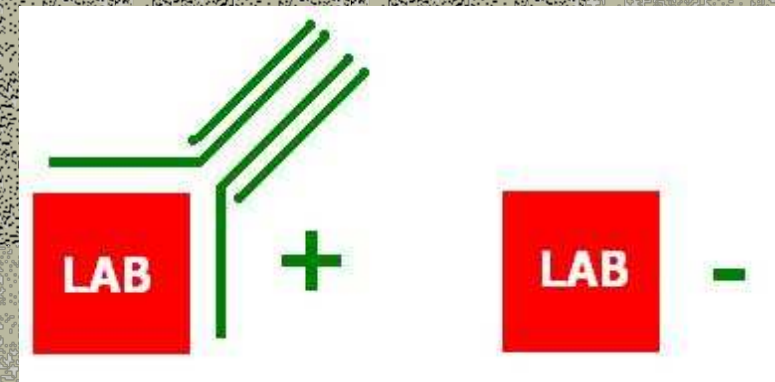
Průkaz antigenu: laboratorní protilátky (zvířecího původu) + vzorek pacienta nebo kmen mikroba.


Přímá metoda



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

Nepřímá metoda





Interpretace

- **Průkaz antigenu** 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 J10)
 - (*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



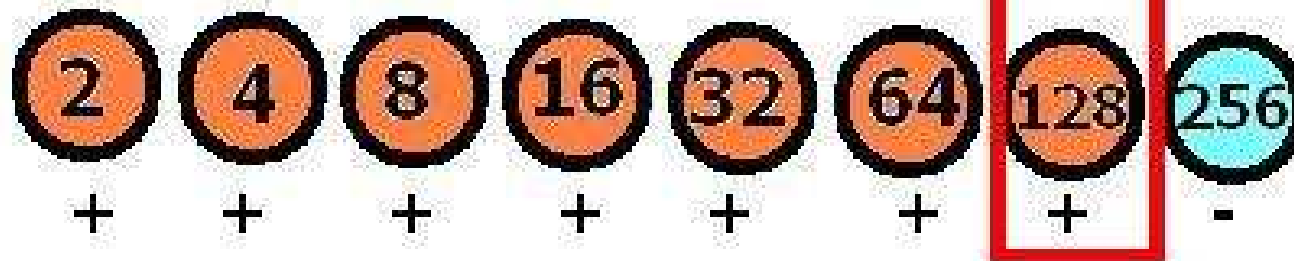
Úkol 1: Geometrická řada

- Vycházíme z neřaděného 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.



Úkol 2

a



b



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



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)

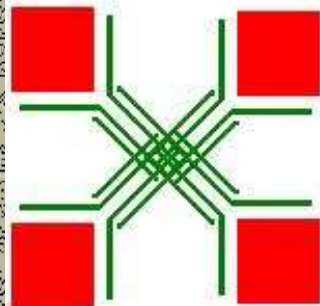


Schematické rozdíly

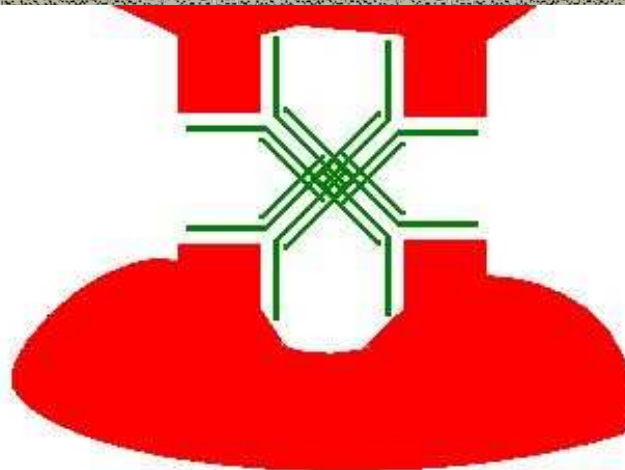
- 1 – precipitace
- 2 – aglutinace
- 3 – aglutinace na nosiči



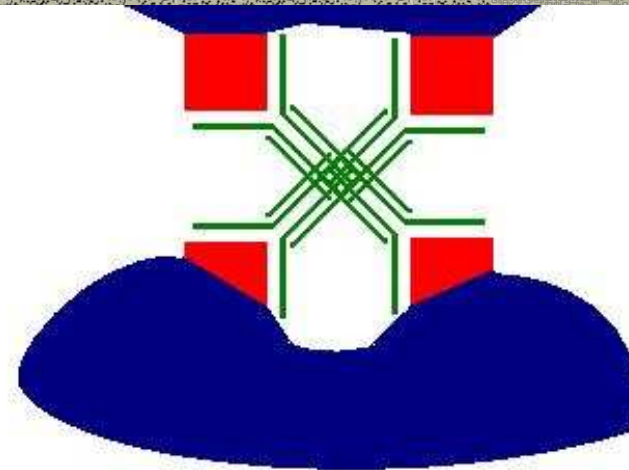
1



2

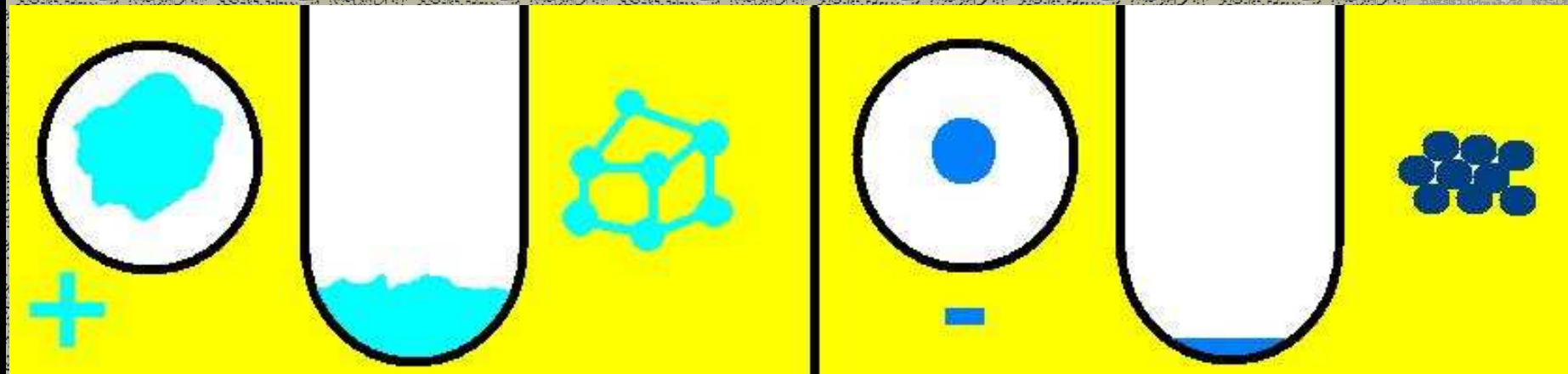


3



Úkol 3a: Protilátky aglutinací

- 3a: Určete aglutinační titry u protilátek proti tularemii (z technických důvodů místo yersinií)
- Pozitivní – nepravidelný chuchvalec, negativní – malé pravidelné kolečko

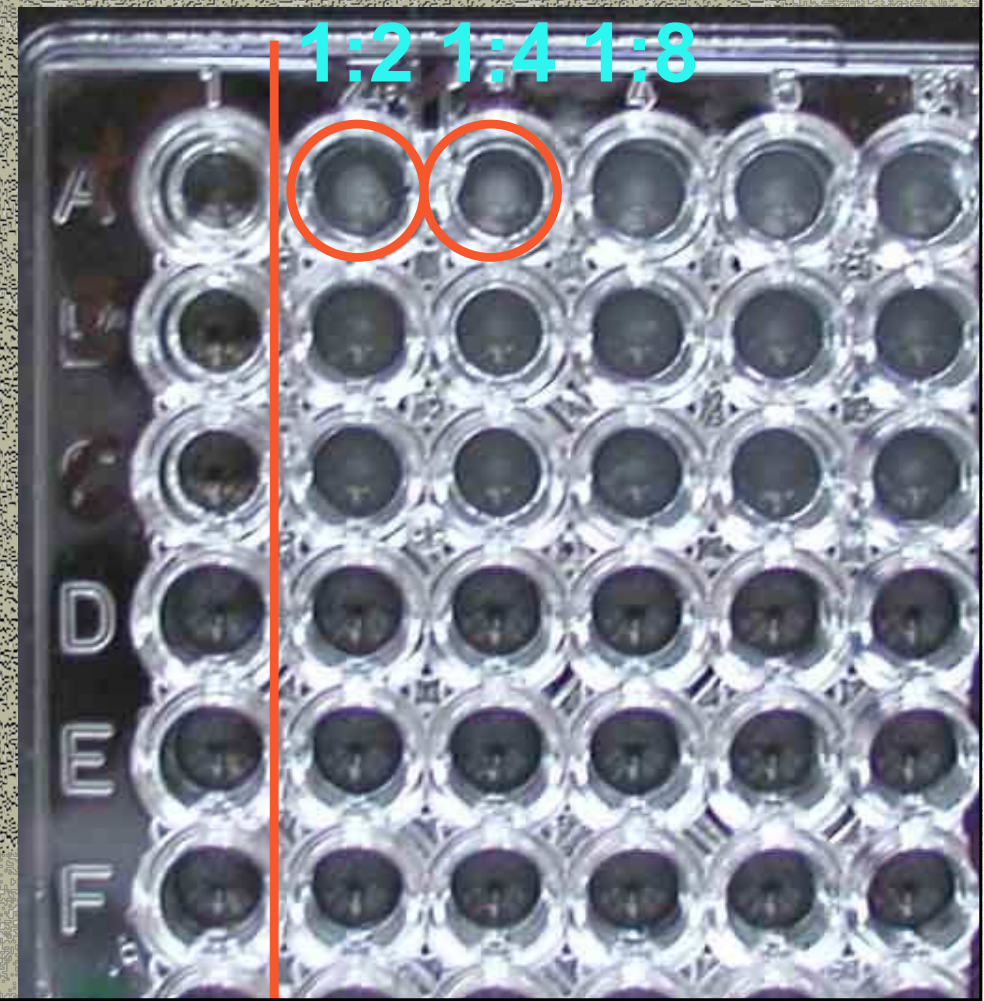


- Nezapomeňte, že titr = nejvyšší ředění s pozitivní reakcí. První důlek je ředěn 1 : 2, druhý 1 : 4 atd.



Demonstrace aglutinační reakce (z www.medmicro.info):

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



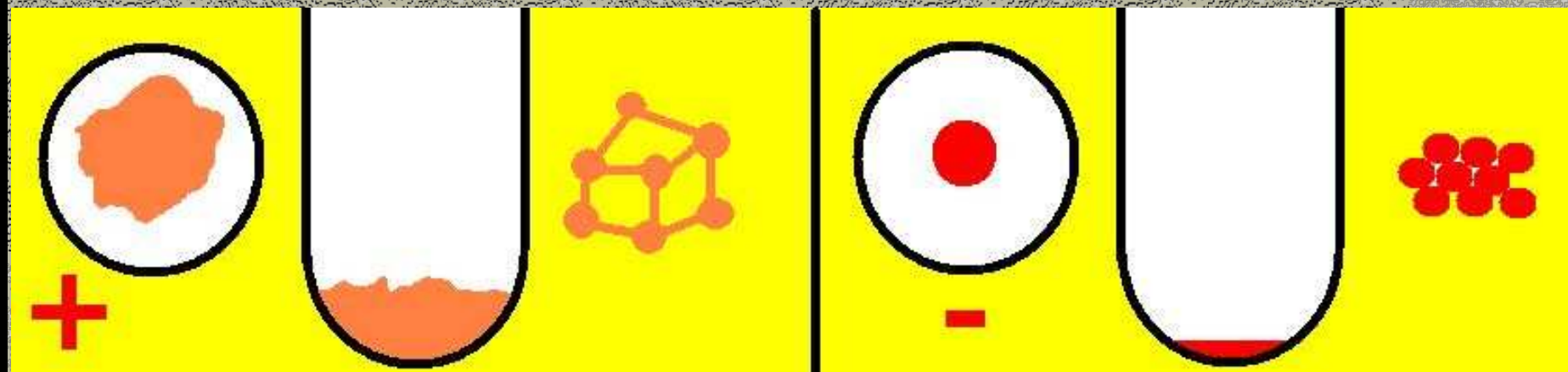


Úkol 3b: Enteropatogenní *Escherichia coli*

- Existuje cca 12 antigenních typů patřících mezi EPEC
 - Použijeme polyvalentní séra: sérum A obsahuje protilátky proti některým typům EPEC, sérum B proti zbývajícím. Zákal = pozitivita
 - Pokud jedno ze sér (A či B) je „+“, musíme pokračovat s monovalentními séry
- *Je vám jasné, proč tu neurčujeme titry?*

Ukol 4: **T**reponema **p**allidum **h**aema**g**lutinace (TPHA)

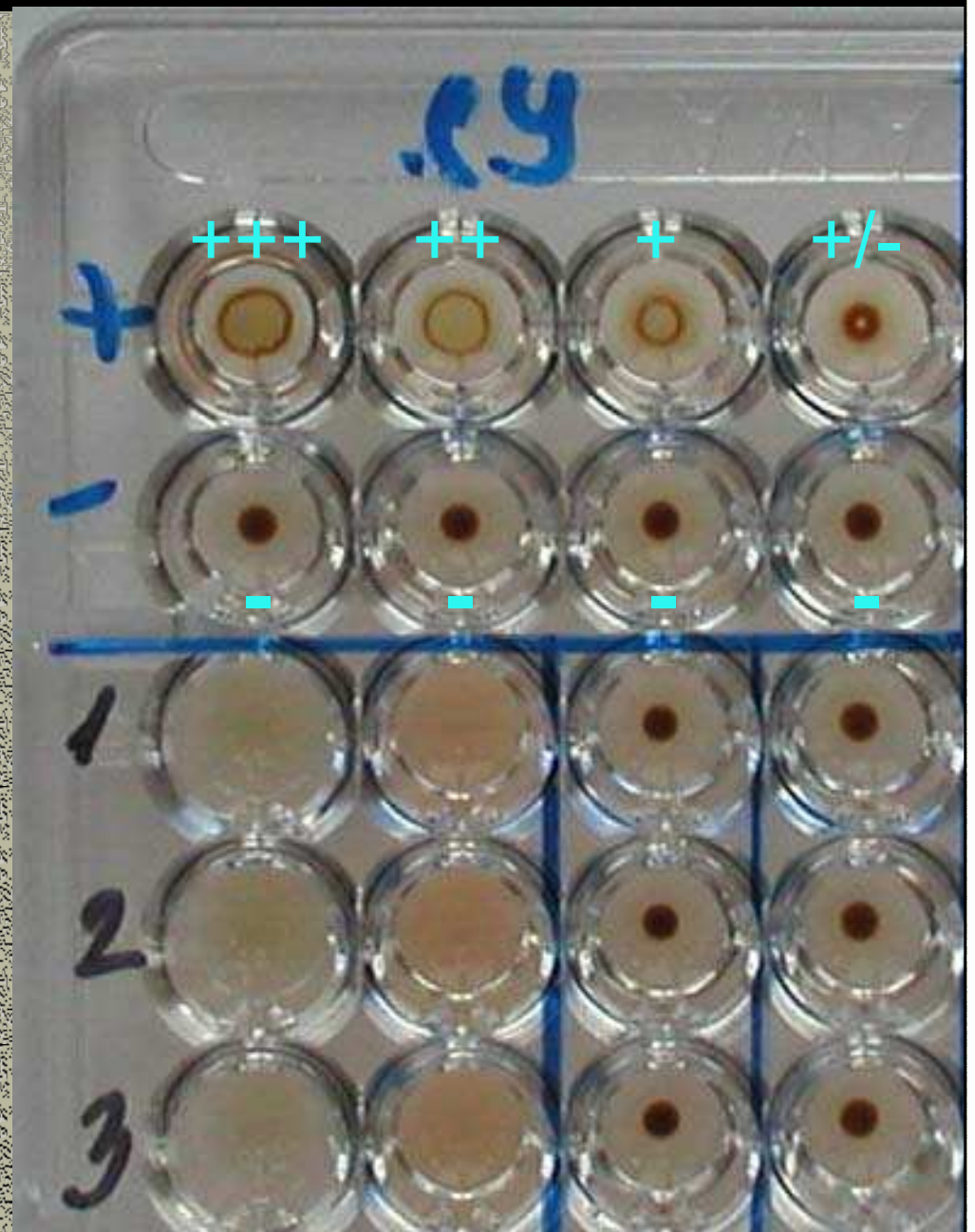
- Technicky totožné z úkolem 3a, avšak:
- **Rozdíl 1:** dělá se to jen kvalitativně (titry se neurčují)
- **Rozdíl 2:** je to červené (protože místo bakterií použijeme červené krvinky)





Demonstrace TPHA

(www.medmicro.info)





Úkol 5: precipitace

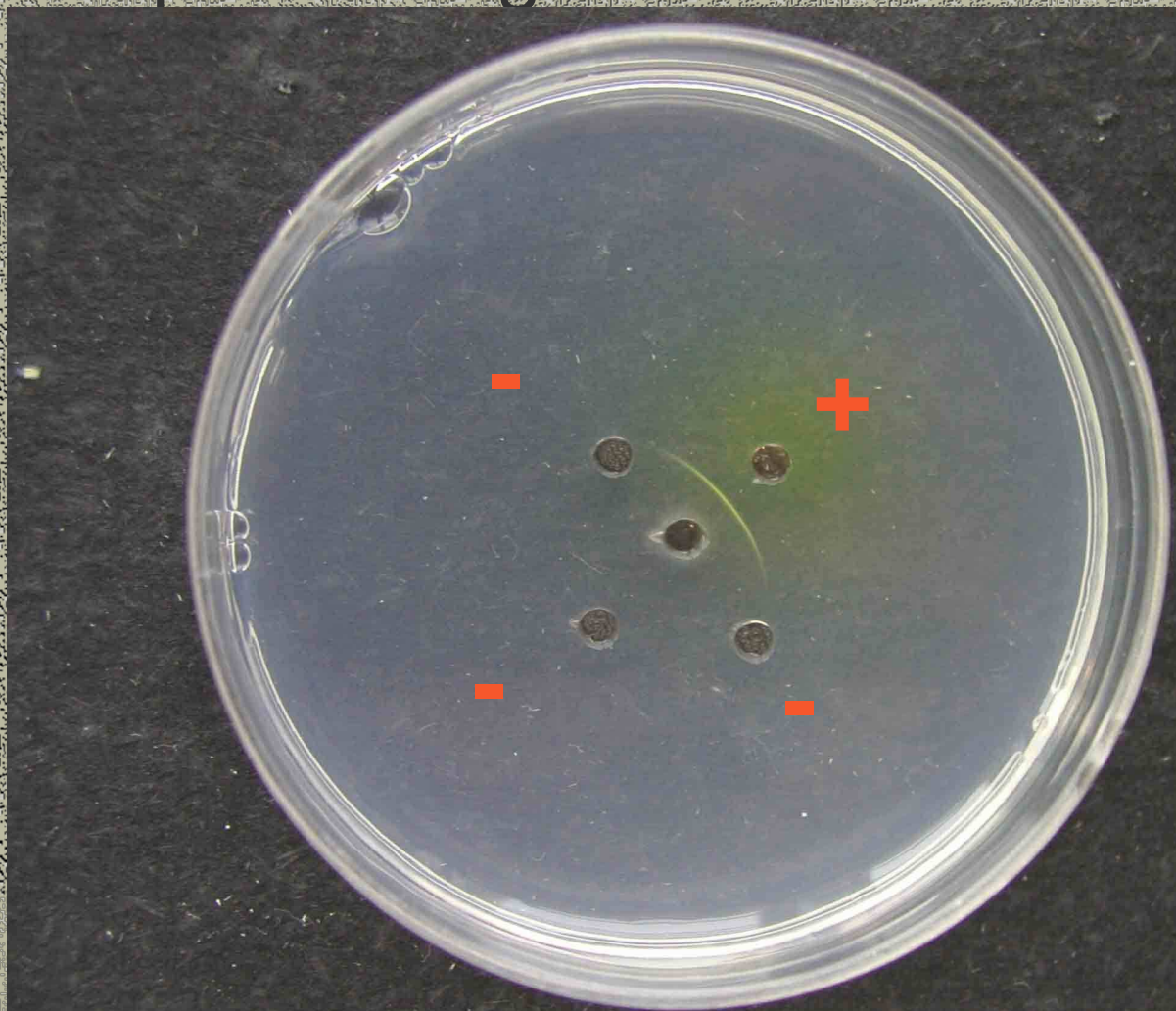
- **Úkol 5a:** Detekce protilátek, které jsou pozitivní u syfilis, ačkoli to nejsou protilátky proti *Treponema pallidum*, nýbrž proti kardiolipinu (látka, která se objevuje u syfilitiků)
- Opět pouze kvalitativně. První důlek je pozitivní kontrola, druhý negativní, pak má každý pacient (jen!) jeden důlek
- 0,05 ml séra + 0,05 ml kardiolipinu

Z technických důvodů není úkol k mání



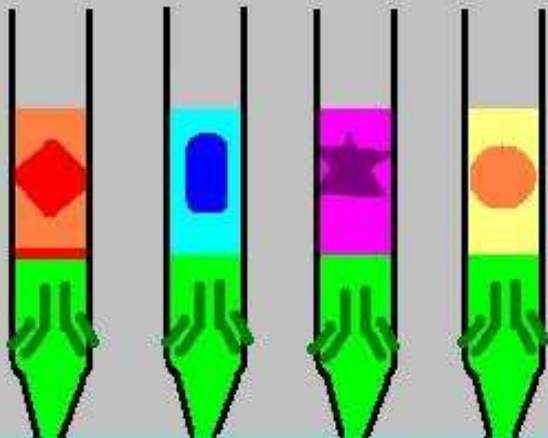
Demonstrace jiného typu precipitace

Tzv. mikroprecipitace v agaru dle Ouchterlonyho



5b – prstencová precipitace

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



+	-	-	-



U mikrobiologie zase za týden nashledanou!

Další kabaret
POKUK se koná 24.
dubna 2006 v 19.30
ve Vinotéce u Karla
na Starobrněnské 12
v Brně

Téma: „*Havět, aneb
Na svatého Jiří*“

