

# Pátráme po mikrobech Díl VII.

## Úvod do serologie, precipitace a aglutinace

Ondřej Zahradníček

K praktickému cvičení pro VLLM0421c

Kontakty na mne:

777 031 969

[zahradnicek@fnusa.cz](mailto:zahradnicek@fnusa.cz)

ICQ 242-234-100

# Co už umíme

- Umíme používat **tři diagnostické metody**
  - **mikroskopii** jako nativní preparát, jednoduché a Gramovo barvení a barvení pouzder
  - **kultivaci** mikrobů na tekutých a pevných půdách (na pevných půdách získáme **kmen**)
  - **biochemickou** (a jinou) **identifikaci** vykultivovaných kmenů mikrobů
- Víme, **jak bojovat s mikroby pomocí dekontaminačních metod a antimikrobiálních látek** a umíme otestovat
  - účinnost desinfekce a sterilizace
  - citlivost mikrobů na antimikrobiální látky

# Pohádka

- Bylo jednou jedno malé dítě, a tomu maminka koupila hračku, aby se naučilo poznávat tvary.
- Hračka byla plastová destička s **dírami různých tvarů**, a k tomu **tvary, co patřily do těch děr**.
- Jednou dítě řvalo, protože mu cosi nešlo. Maminka přiběhla: „Ale, dítě, nemůžeš rvát čtvereček do díry pro kolečko!“ Podívej, **kolečko patří sem, čtvereček tam**.

## Jenže o pár dní později...

- ...přišla maminka k dítěti do pokoje, a viděla, že se dítěti podařilo narvat kolečko do díry pro šestiúhelníček.
- I uvědomila si maminka, že pravidla sice platí, ovšem existují z nich občas i výjimky
- I v přírodě přece platí – pokud má určitý **tvar** svůj **protitvar**, stane se občas, že se dá dohromdy i dvojice, která k sobě původně neměla patřit.

## Poučení z naší pohádky

- Mikroby (ale i třeba rostliny a živočichové) mají **na povrchu** svých buněk **antigeny**. Když se setkají s naším tělem, začne naše tělo tvořit **protilátky**, které jsou vůči těmto antigenům **specifické**.
- Specifičnost má ovšem své meze. Někdy existuje **zkřížená reaktivita**, kdy protilátka reaguje i s antigenem, který je jen podobný tomu, který vyvolal její tvorbu
- *Někdy také vzniká protilátka proti antigenu, který vzniká při infekci ve tkáni.*

# 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)

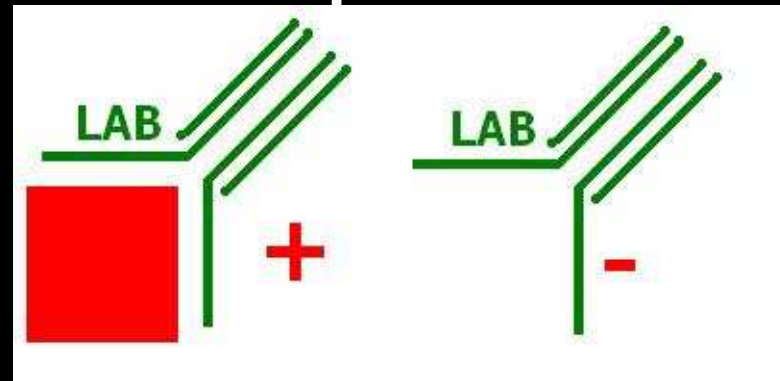
# Metody lékařské mikrobiologie

- **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)

## Dva způsoby, jak to využít:

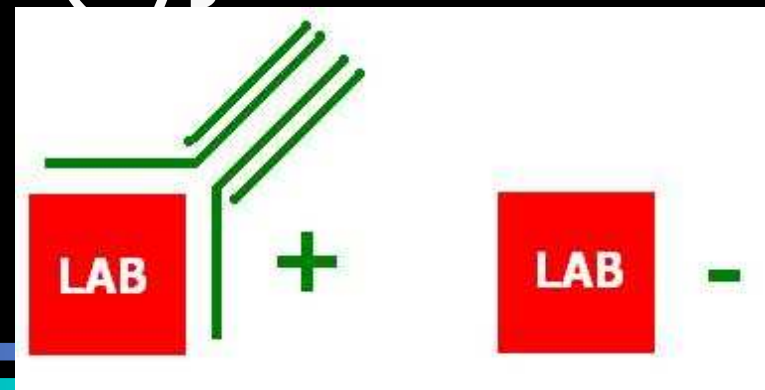
**Průkaz antigenu:** laboratorní protilátky (zvířecího původu) + vzorek pacienta nebo kmen mikroba.

**Přímá metoda**



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

**Nepřímá metoda**





# 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**) a jeho změny v čase (dynamika titru – viz J08)
  - **Třída protilátek:** IgM/IgG (více v J10)
  - (*Avidita protilátek*)

# Co nalézáme v jakých případech

- **Akutní infekce:** velké množství protilátek, **1** převážně třídy IgM, případně IgM i IgG
- **Pacient po prodělané infekci:** malé množství **2** protilátek, pouze IgG (imunologická paměť)
- *Chronická infekce: různé možnosti podle aktivity infekce, mikrobiálního druhu apod.*



# Jak provést reakci „kvantitativně“

- Je **velmi těžké zjistit koncentraci protilátek** proti konkrétnímu antigenu (ne tedy celkové množství imunoglobulinů) 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** →  
→ v séru je jen malé množství protilátky

# Geometrická řada

- Technicky 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 a podobně)
- V každém dalším důlku je **dvojnásobné ředění** oproti předchozímu, například tedy řada 1 : 10, 1 : 20, 1 : 40, 1 : 80, 1 : 160...

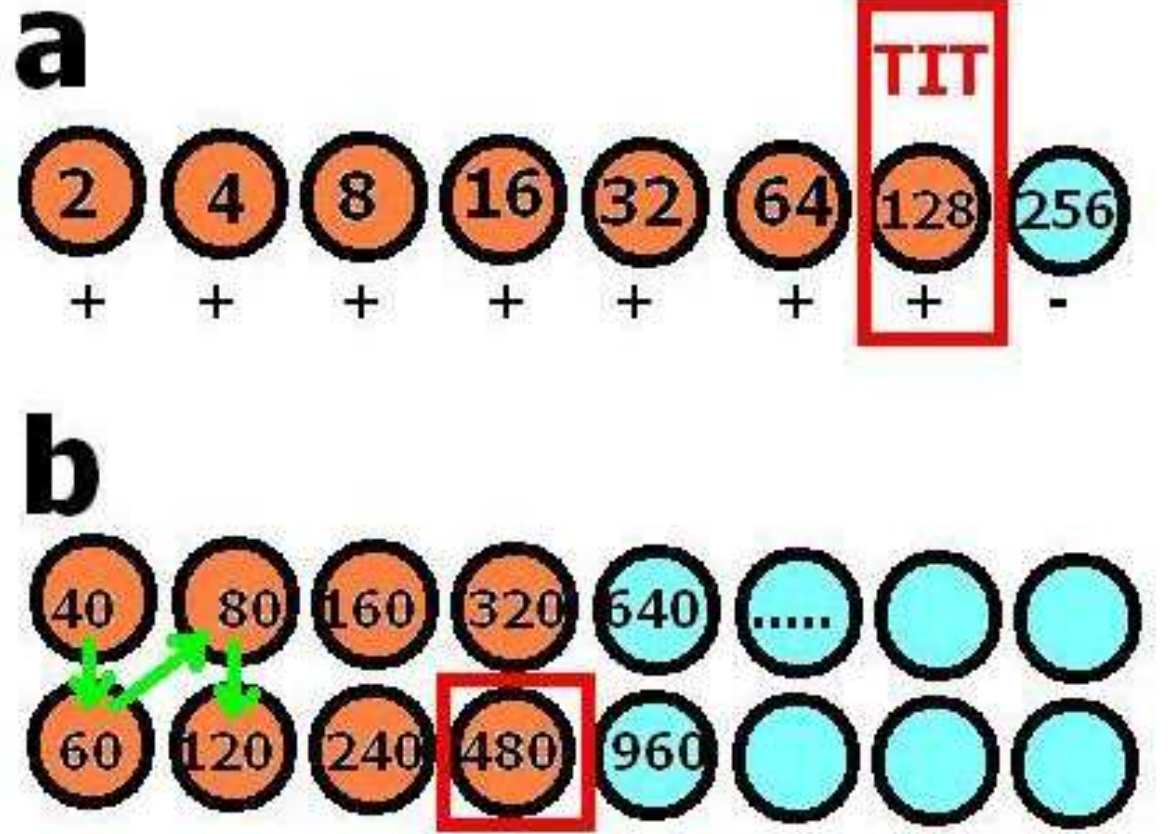
# Úkol 1: Příprava geometrické řady

- **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.

# Titř

- Po naředění séra pacienta přidáme **antigen**
- V závislosti na konkrétním typu reakce **bud' přímo vidíme výsledek reakce** (aglutinát, precipitát), **nebo ho musíme znázornit** přidáním dalších složek (např. komplementu, červených krvinek apod.
- V každém případě lze nějak pozorovat **pozitivní a negativní výsledky reakce**
- **Nejvyšší ředění, kde ještě vidíme pozitivní reakci, se nazývá titř.**

## Úkol 2 Určení titru



**Tit** – nejvyšší ředění, kde je pozitivní reakce. Máme-li dvě řady, je titrem nejvyšší ředění z obou řad dohromady. V případě b) je tedy jen jeden titr (480), nikoli dva (320 a 480), jak se mnozí studenti mylně domnívají.

# Precipitace a aglutinace – společné

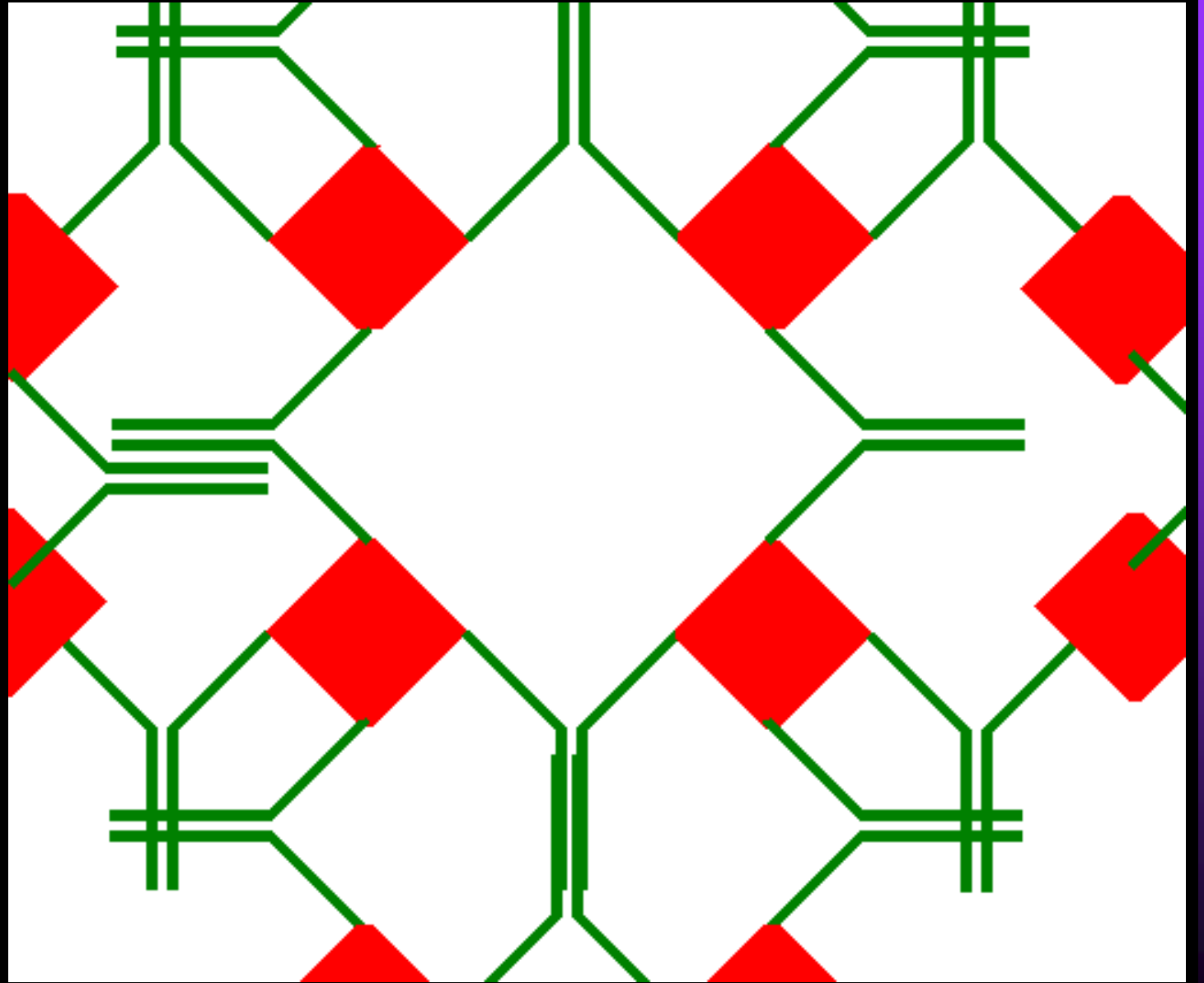
- Precipitace a aglutinace jsou dvě **nejjednodušší serologické reakce**, kde pracujeme opravdu jen s antigenem a protilátkou bez dalších složek
- Buďto tedy dokazujeme **antigen zvířecí protilátkou**, nebo **protilátku laboratorním antigenem**
- **Pouze ve druhém případě zjišťujeme titry!**



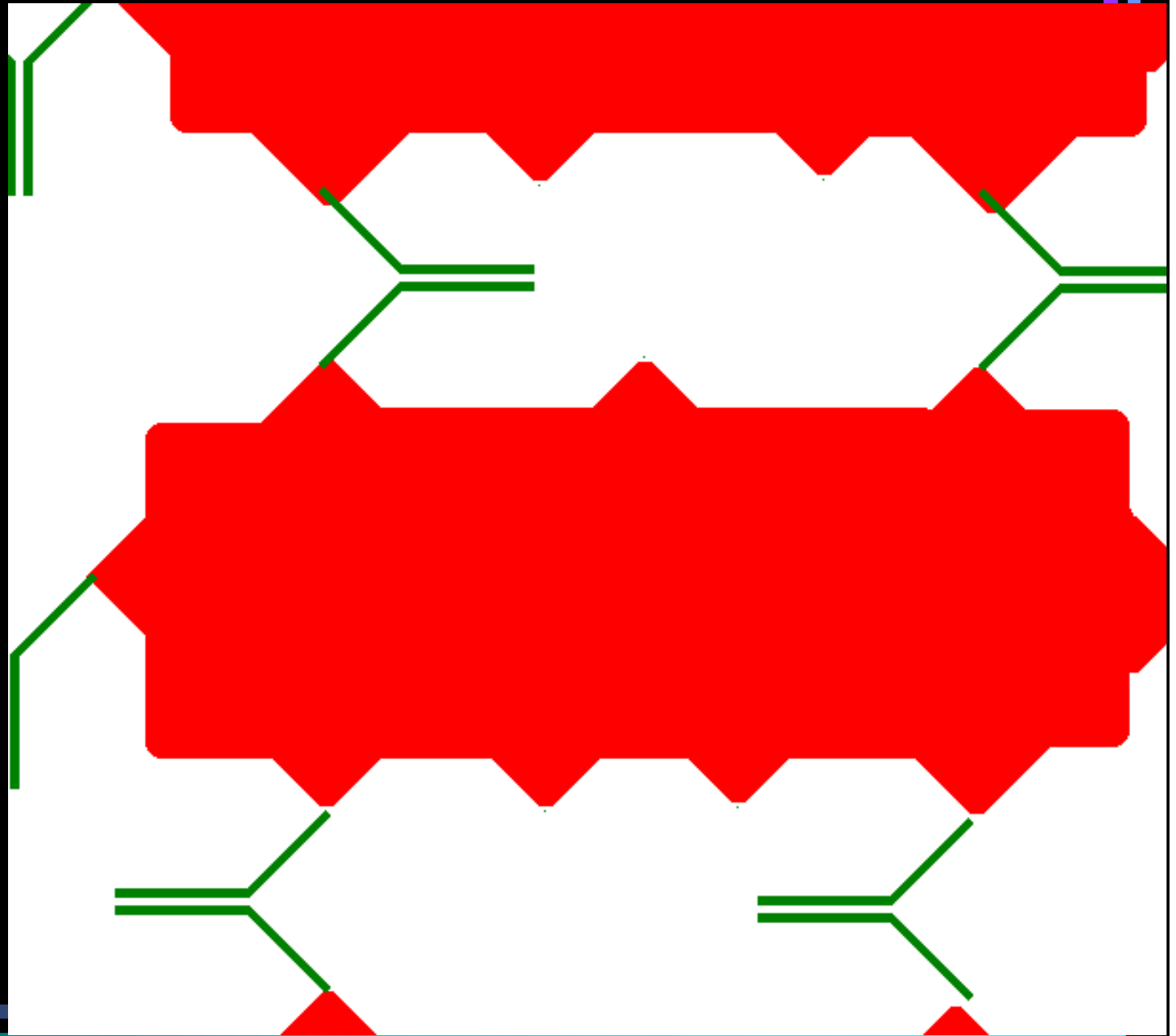
# Precipitace, aglutinace, aglutinace na nosičích

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

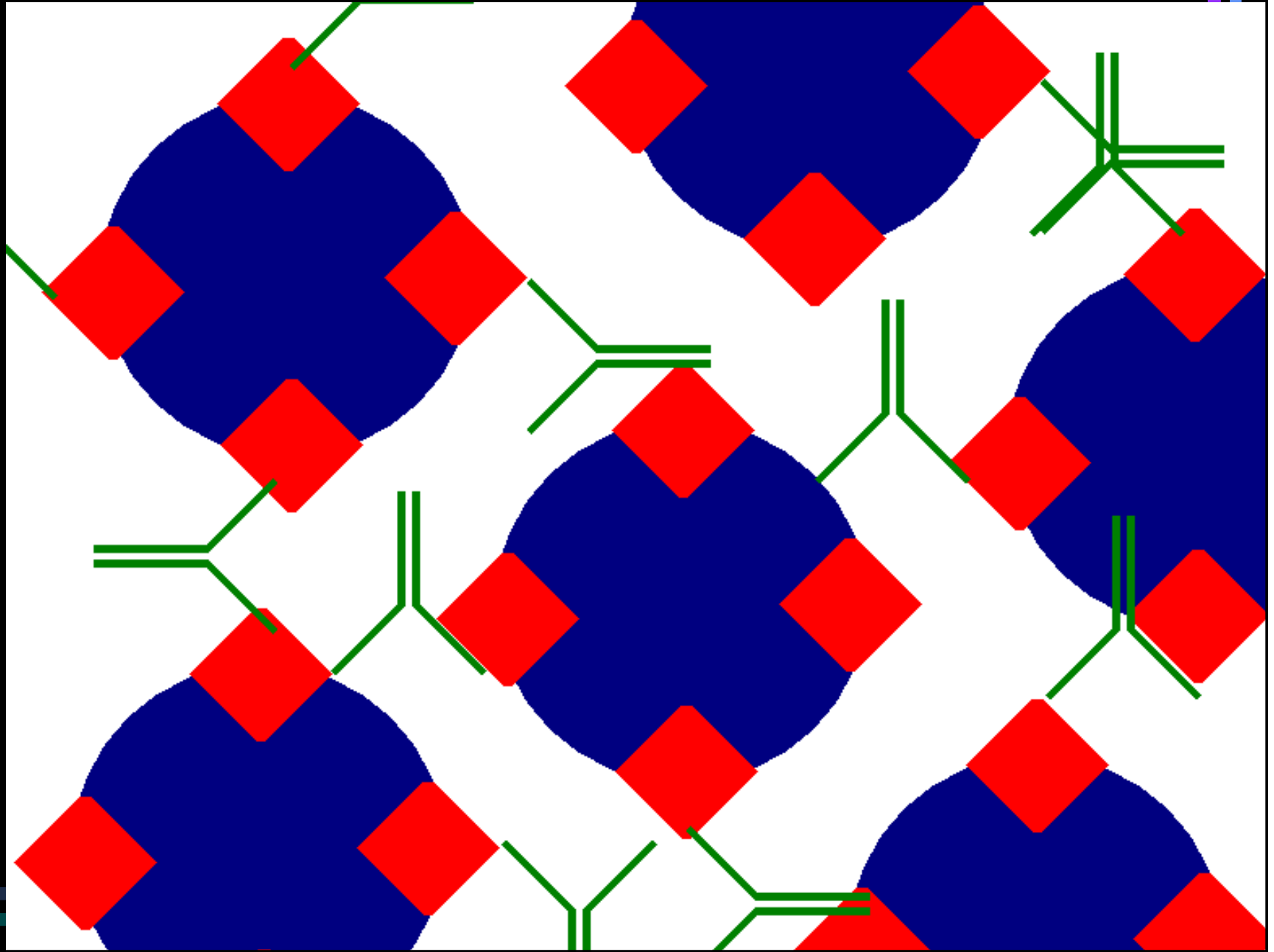
# Precipitate



# Aglutinace



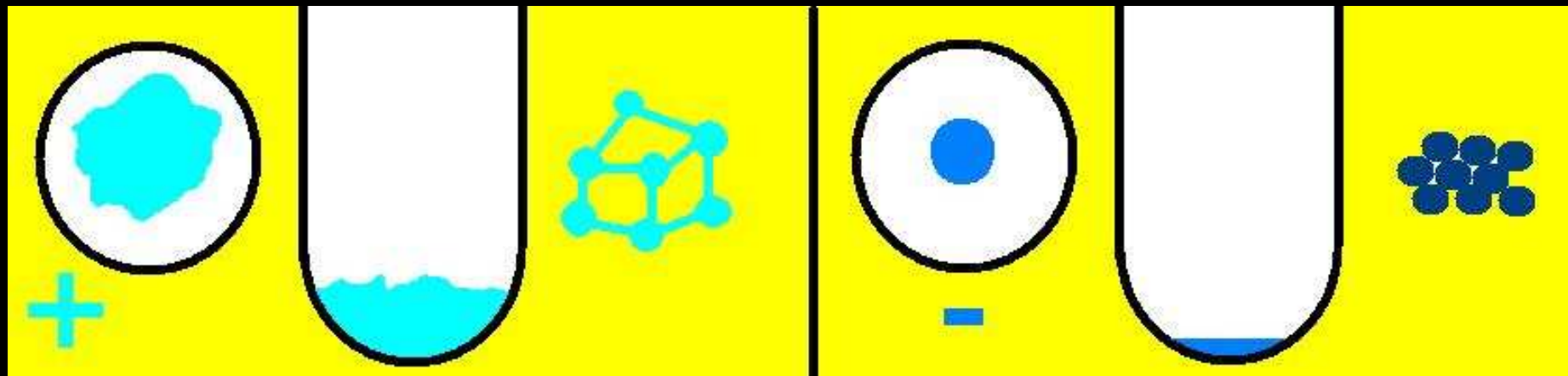
# Aglutinace na nosičích



# Úkol 3a: Protilátky aglutinací

Určete aglutinační titry u protilátek proti yersiniím

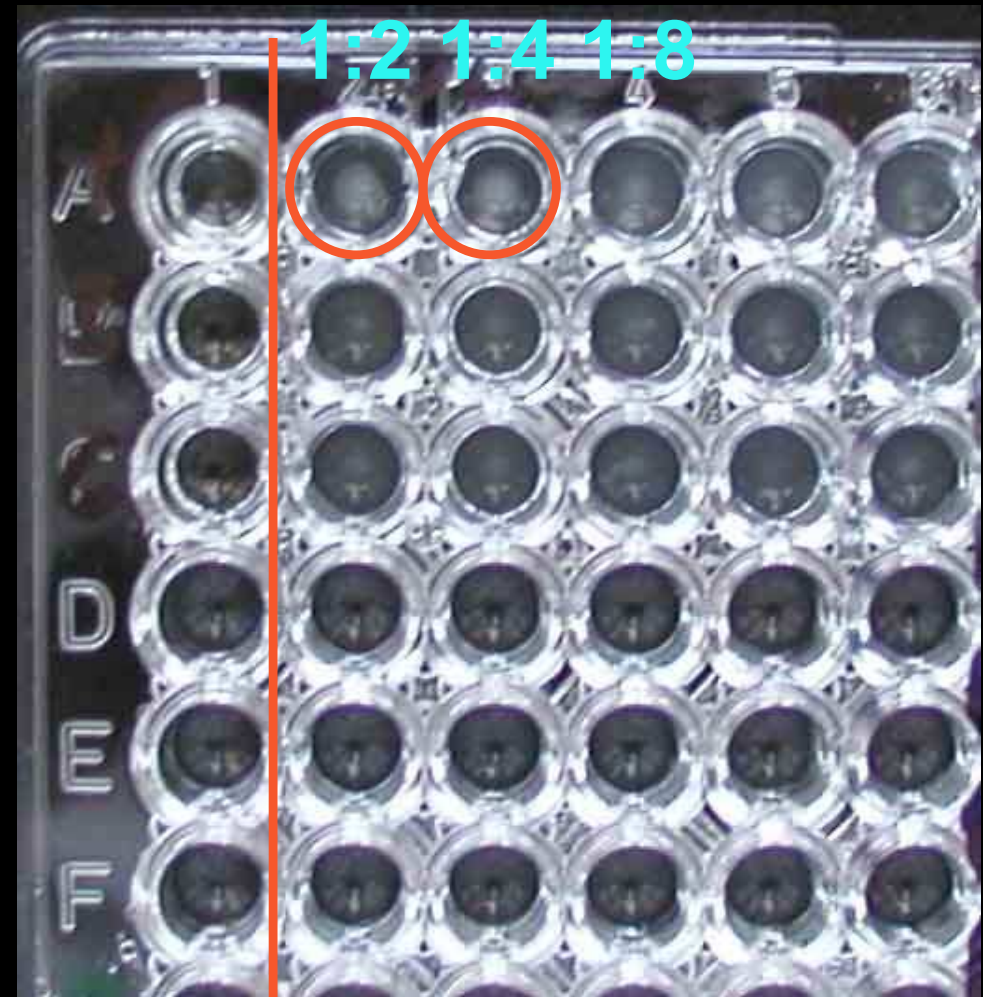
- **Pozitivní – nepravidelný chuchvalec**
- **Negativní – malé pravidelné kolečko**



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

# Demonstrace aglutinační reakce u tularémie (z [www.medmicro.info](http://www.medmicro.info)):

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



## Před úkolem 3b – poznámka k *E. coli*

- *Escherichia coli* je bakterie, která je normální složkou střevní mikroflóry.
- Na svém povrchu má kromě jiných typů antigenů také takzvané **tělové O-antigeny**.
- Tyto O-antigeny nejsou u všech kmenů *E. coli* stejné. Naopak, existují stovky takzvaných **serotypů** v rámci druhu *E. coli*
- Ze všech těchto serotypů jen přibližně **dvanáct** vykazuje **vyšší patogenitu u novorozenců a kojenců**. Těmto serotypům se souhrnně říká **EPEC** – enteropatogenní *Escherichia coli*

## Úkol 3b: Antigen aglutinací: Enteropatogenní *Escherichia coli*

- Člověk je tvor zdravě líný. Nikomu by se nechtělo zkoušet míchat testovaný kmen *E. coli* se dvanácti séry. Proto
  - Použijeme nejpreve **polyvalentní séra**: sérum A obsahuje protilátky proti šesti typům EPEC, sérum B proti zbývajícím šesti.
  - Pouze pokud jedno ze sér (A či B) je „+“, pokračujeme s **monovalentními séry**
- **Pozitivita se projeví jako vločky v kapce**
- *Je to průkaz antigenu – proto žádné titry*



# Průkaz EPEC - výsledek



## Poznámka před dalším úkolem

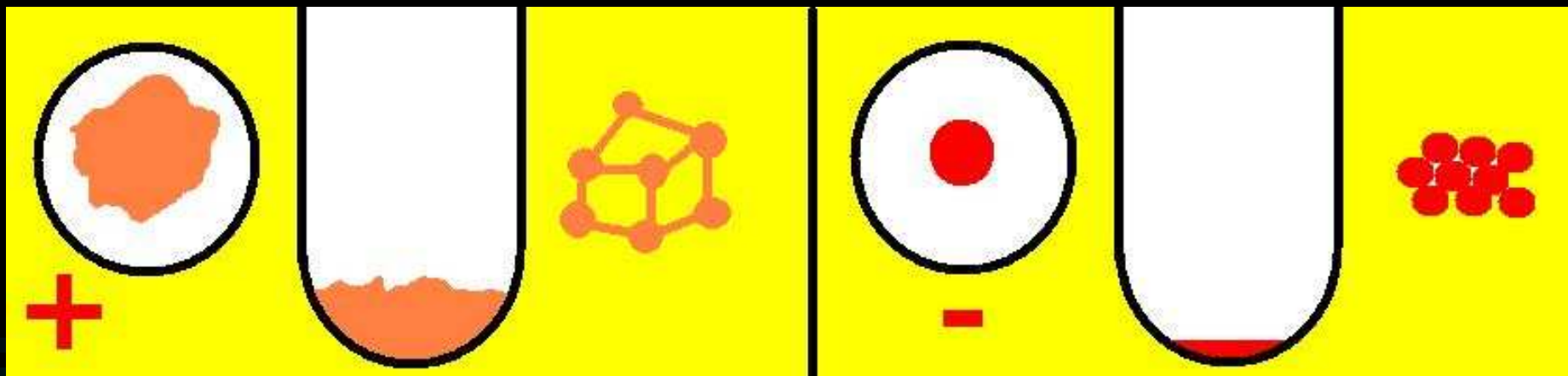
- V minulém úkolu jsme neurčovali titry, protože šlo o průkaz antigenu
- V následujících dvou úkolech nebudeme určovat titry, přestože půjde o průkaz protilátek: jde totiž o **screeningové reakce**
- Každá těhotná žena se vyšetřuje, nemá-li náhodou syfilis. První testy jsou screening, kvalitativní. Všechny pozitivní nebo i pouze podezřelé reakce se ověřují specifitějšími, tzv. konfirmačními reakcemi. Více v P09

## Úkol 4: *Treponema pallidum*

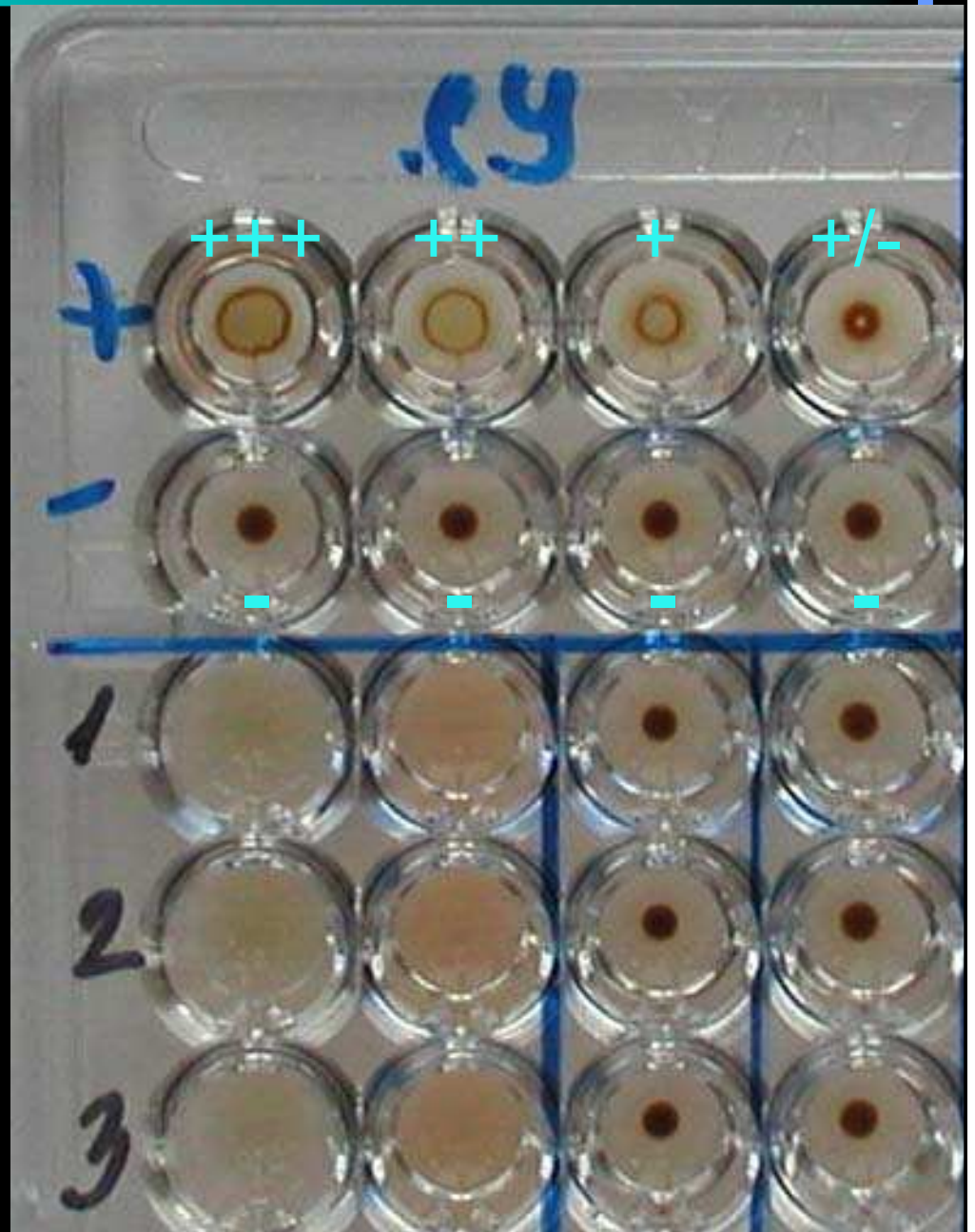
### pasivní haemaglutinace (TPHA)

Jako v úkolu 3a, také zde je pozitivní reakce vznik „chuchvalce“, negativní sedimentace částic na dno důlku. Avšak **je to červené**: je to totiž aglutinace na nosiči, nosičem je erytrocyt

*Dnes se v tomto testu červené krvinky nahrazují polycelulózovými částicemi – můžete se pak setkat se zkratkou TPPA*



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



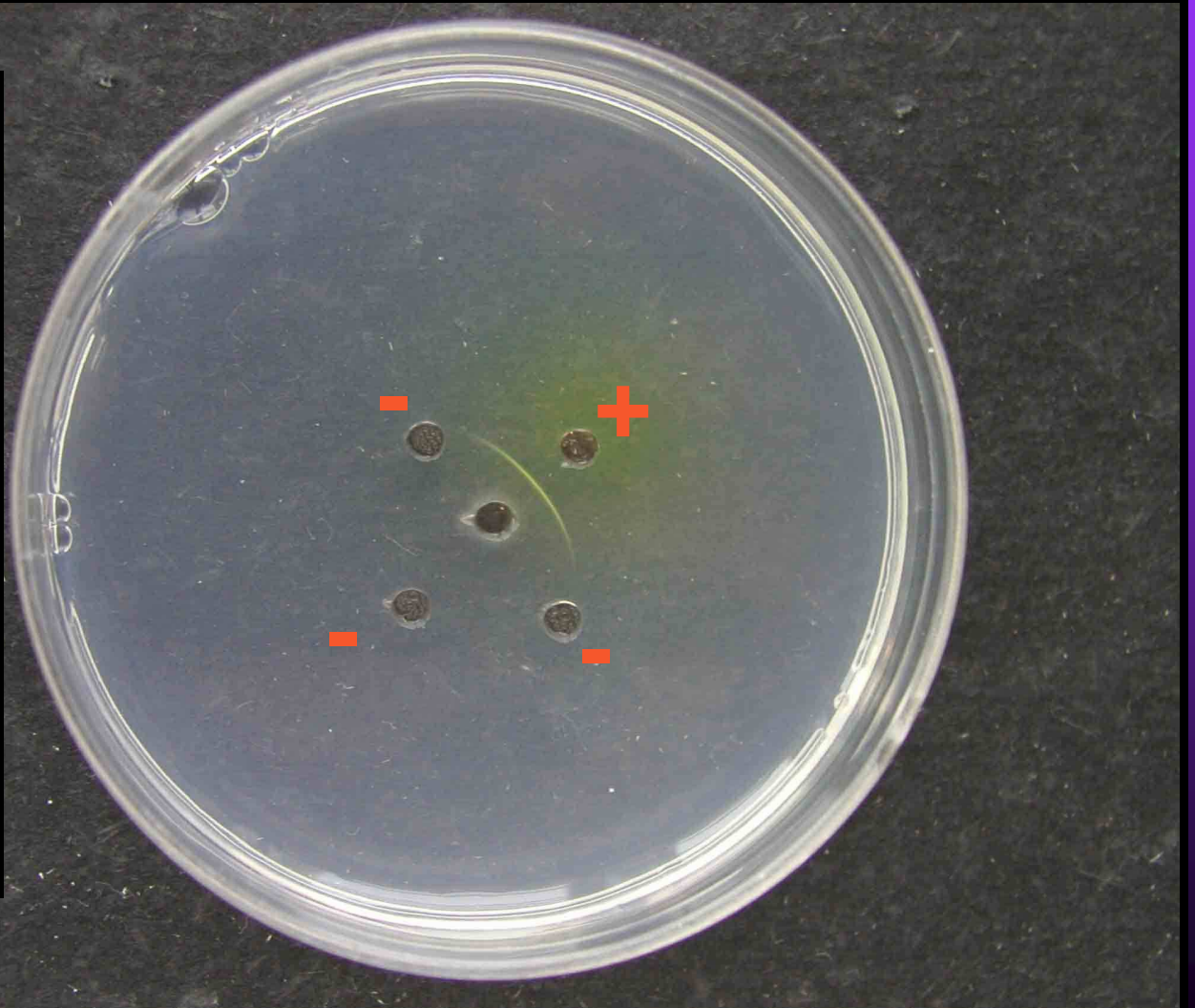
## Úkol 5a: protilátky precipitací – RRR

- Detekujeme protilátky, 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
- Smícháme vždy 0,05 ml séra + 0,05 ml kardiolipinu

# Demonstrace jiného typu precipitace

Tzv. mikroprecipitace v agaru dle Ouchterlonyho

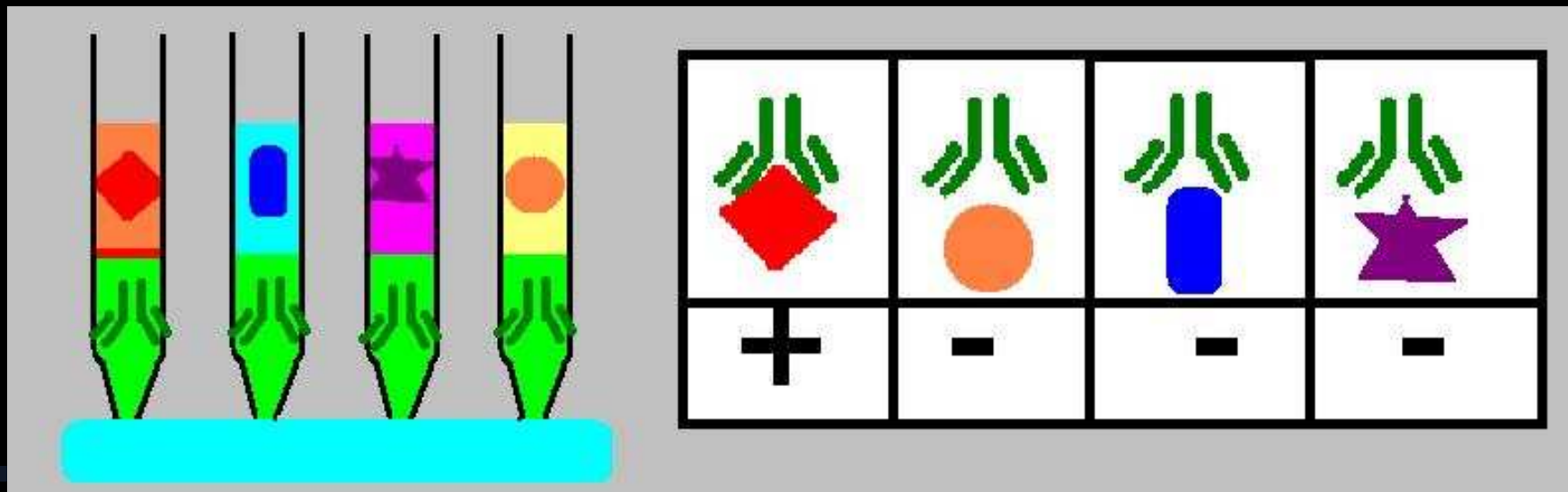
Do důlku uprostřed je nalita tekutina obsahující antigen. Ten difunduje agarem. Obsahuje-li sérum protilátky, difundují proti němu a na jejich styku vznikne precipitační linie.



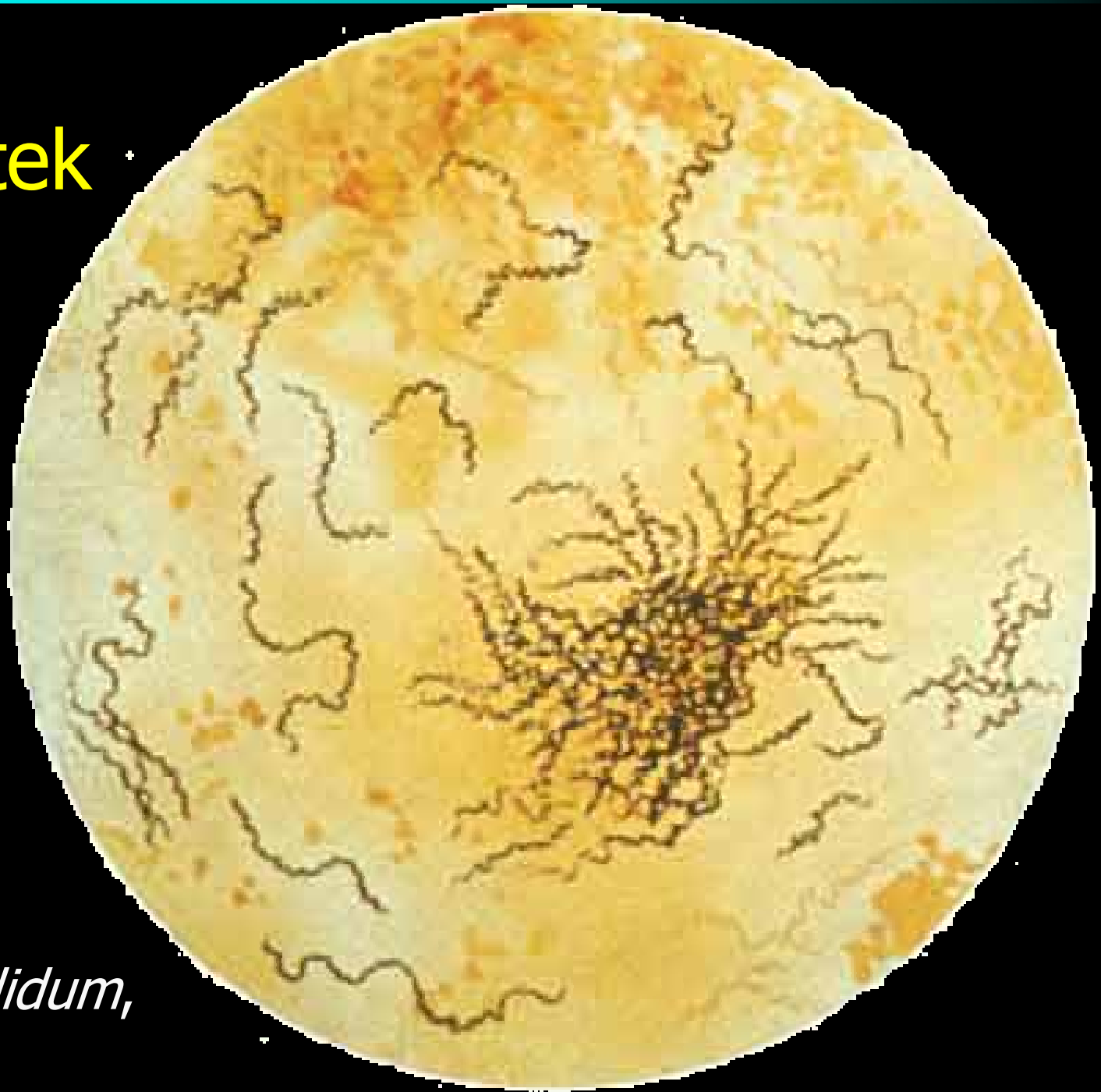


# Úkol 5b – prstencová precipitace k detekci antigenu

- Do pasteurových pipet zabodnutých v plastelině postupně naléváme:
  - 1) zvířecí sérum s protilátkami
  - 2) čtyři různé extrakty kmenů
- **Pozitivita: prstenec na styku tekutin**



Přeji Vám  
hezký zbytek  
dne...



*Treponema pallidum*,  
původce syfilis