

# **SEROLOGICKÉ METODY**

# Metody lékařské mikrobiologie

- **Přímé metody:** detekce mikroba, jeho části nebo produktu. Příklady: 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)

# Přehled metod přímého průkazu

| Metoda                   | Průkaz ve vzorku | Identifikace |
|--------------------------|------------------|--------------|
| Mikroskopie              | ano              | ano          |
| Kultivace                | ano              | ano          |
| Biochemická identifikace | ne               | ano          |
| Průkaz antigenu          | ano              | ano          |
| Pokus na zvířeti         | ano              | v praxi ne   |
| Molekulární metody       | ano              | v praxi ne*  |

\*netýká se molekulární epidemiologie – sledování příbuznosti kmenů

# Serologické reakce

## Reakce mezi antigenem a protilátkou *in vitro*

**Antigen** = makromolekula pocházející z cizího organismu: rostliny, mikroba, jiného živočicha. (Anebo sice z organismu vlastního, ale v tom případě jde o přestárlé či vadné, popř. zvrhlé buňky.)

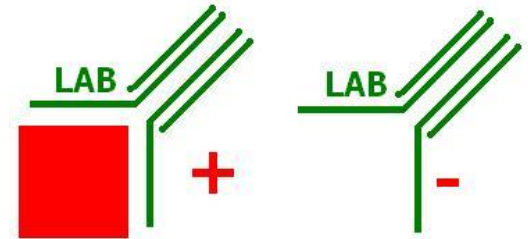
V mikrobiologii nás zajímají **mikrobiální antigeny** = části mikrobiálního těla, které vzbuzují v hostiteli antigenní odpověď

**Protilátka** = imunoglobulin, tvořený v těle hostitele (člověka, ale také zvířete) jako odpověď na antigenní výzvu

# Dva způsoby, jak využít interakci mezi antigenem a protilátkou:

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

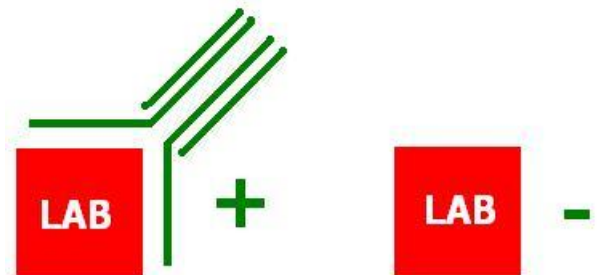
## Přímá metoda



---

**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)
  - **Třída protilátek**: IgM/IgG

# Jak interpretovat nepřímý průkaz

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



# Průběh protilátkové odpovědi

- **Protilátky IgM** se tvoří jako první, ale také jako první mizí. Neprocházejí placentou, jejich průkaz u novorozence je svědectvím jeho infekce
- **Protilátky IgG** se tvoří později a zůstávají jako paměťové přítomny dlouhodobě. Procházejí placentou

(novorozenec je tedy může mít od matky)



# Protilátky ostatních tříd

- Protilátky třídy **IgA** se u některých infekcí vyšetřují místo protilátek IgM. Tato třída se uplatňuje hlavně u slizniční imunity, a tedy u infekcí, kde branou vstupu je sliznice (například gastrointestinální)
- Protilátky třídy **IgE** se vyskytují u alergií a infestací červy. Zpravidla se však nestanovují specifické IgE proti nějakému patogenovi
- S protilátkami **IgD** se v mikrobiologii nepracuje

# Titř

- Nejvyšší ředění, kde ještě vidíme pozitivní reakci, se nazývá titř.

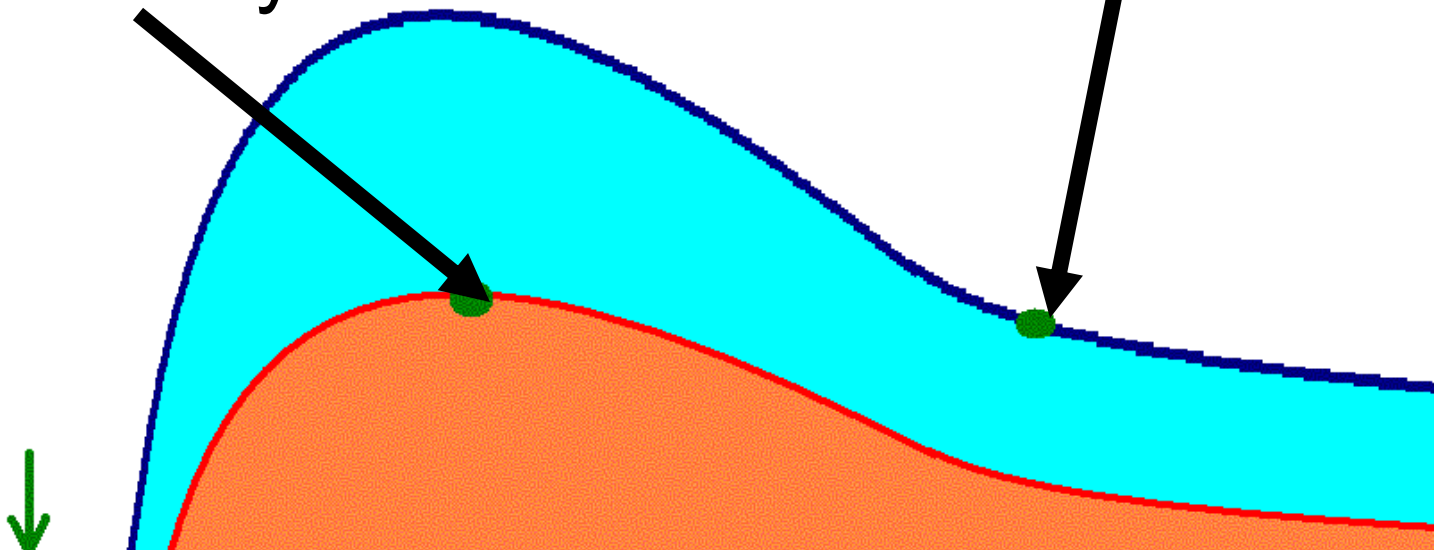
# Dynamika titru

- **Průšvih je, že** každý má jinou úroveň protilátkové odpovědi. Proto samotná hodnota titru mnoho neříká
- **Změna titru** vypovídá více. Jde-li o čerstvou záležitost, titer se vždy vyvíjí, nejprve stoupá, později zvolna klesá.

# Proč nestačí samotný titr

Někdy se stane, že málo reaktivní pacient má i v akutní fázi titr dosti nízký

Velmi reaktivní pacient naopak i dlouho po infekci titr relativně vysoký



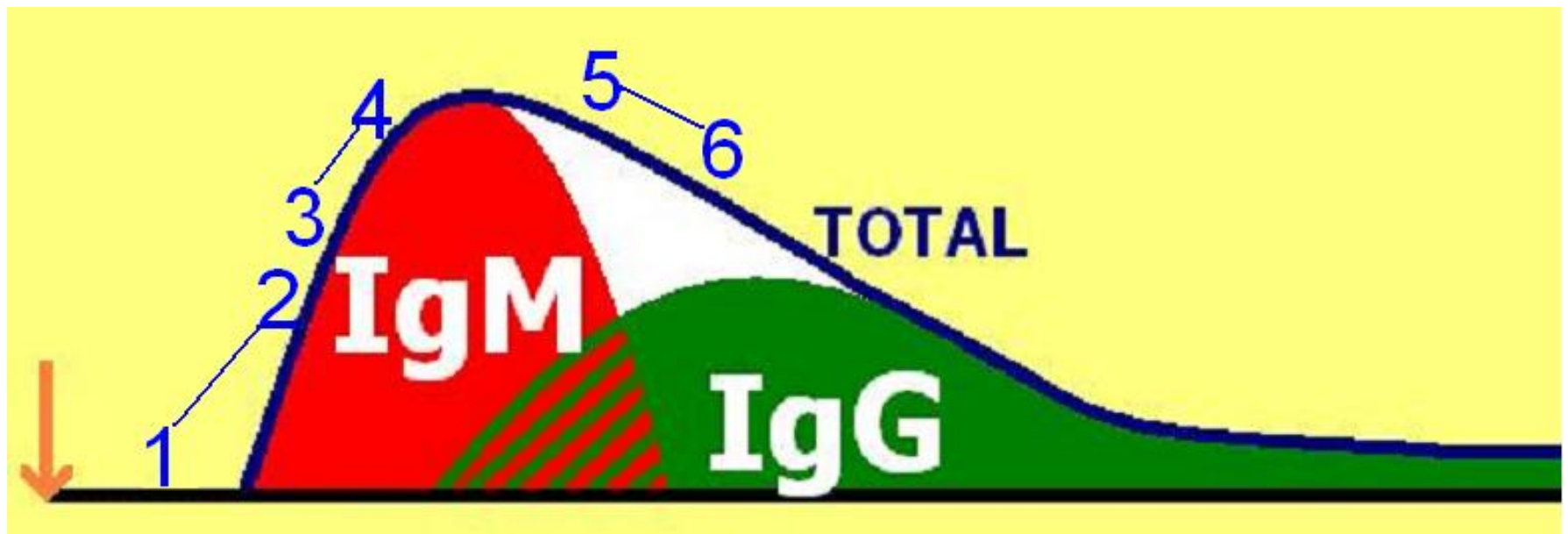
# Párová a nepárová séra

- **Párová séra** = první vzorek je uchováván v ledničce, dokud nepřijde i druhý (10–14 dní). Pak jsou oba hodnoceny naráz. **čtyřnásobný vzestup** se v tom případě má za signifikantní pro akutní infekci.
- **Séra nejsou párová** (druhý vzorek je vyšetřen zvlášť): zvětšuje se riziko náhodné chyby, proto zpravidla vyžadujeme **osminásobný vzestup** titru

- Zvláštním případem je tzv. **serokonverze** – v prvním vzorku protilátky nejsou (ještě se nestihly vytvořit), v druhém už jsou. Takový důkaz je cennější než „důkaz čtyřnásobkem“
- **V některých případech místo vzestupu prokážeme pokles** (subakutní infekce)
- ***Velikost titru rozhodně neodpovídá vývoji klinických příznaků. Množství protilátek často vrcholí, až příznaky zmizí.***

# Příklady různých projevů dynamiky titru

- **1 – 2:** sérokonverze
- **3 – 4:** vzestup titru
- **5 – 6:** pokles titru



**1.**

**PRECIPITACE, AGLUTINACE,  
AGLUTINACE NA NOSIČÍCH**



# Precipitace a aglutinace

- 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**)
- **Aglutinace:** Antigen je součástí buňky mikroba (pracujeme tedy s celými mikroby, říkáme, že **antigen je korpuskulární**)
- **Aglutinace na nosičích:** Původně izolované antigeny jsou navázány na cizí částici – nosič (latex, erytrocyt, polycelulóza)

## Precipitace:

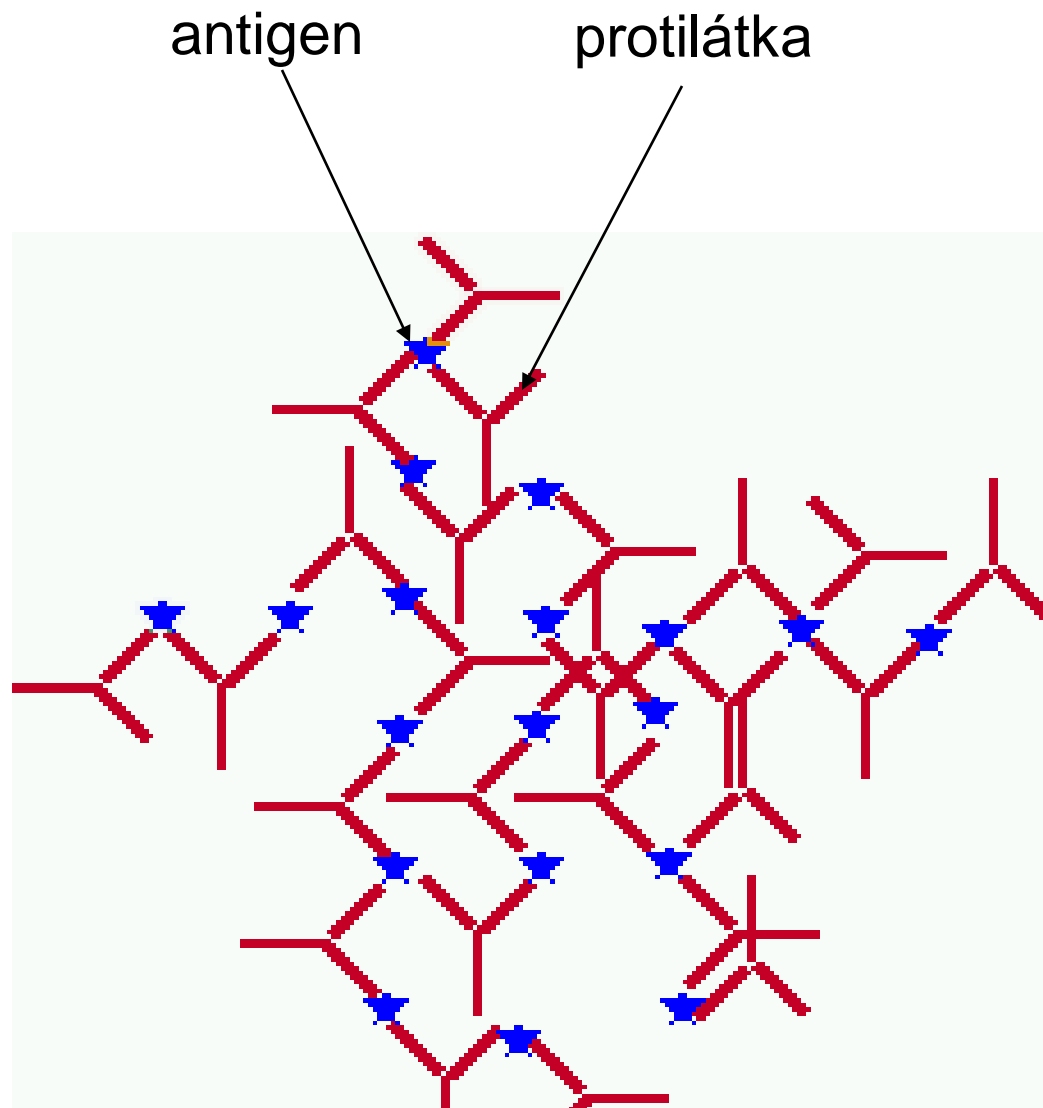
Antigeny jsou ve formě

izolovaných

makromolekulu

I (jde tedy o

**koloidní antigen)**



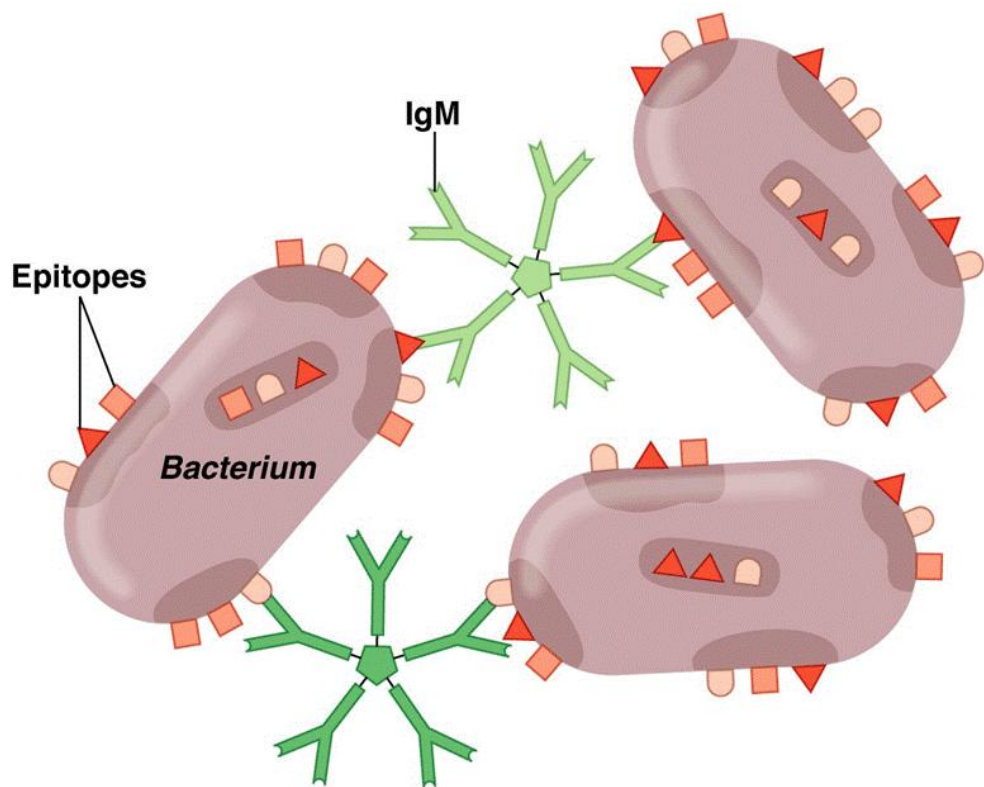
## Aglutinace:

Antigen je  
součástí buňky  
mikroba

(pracujeme  
tedy s celými  
mikroby,

říkáme, že

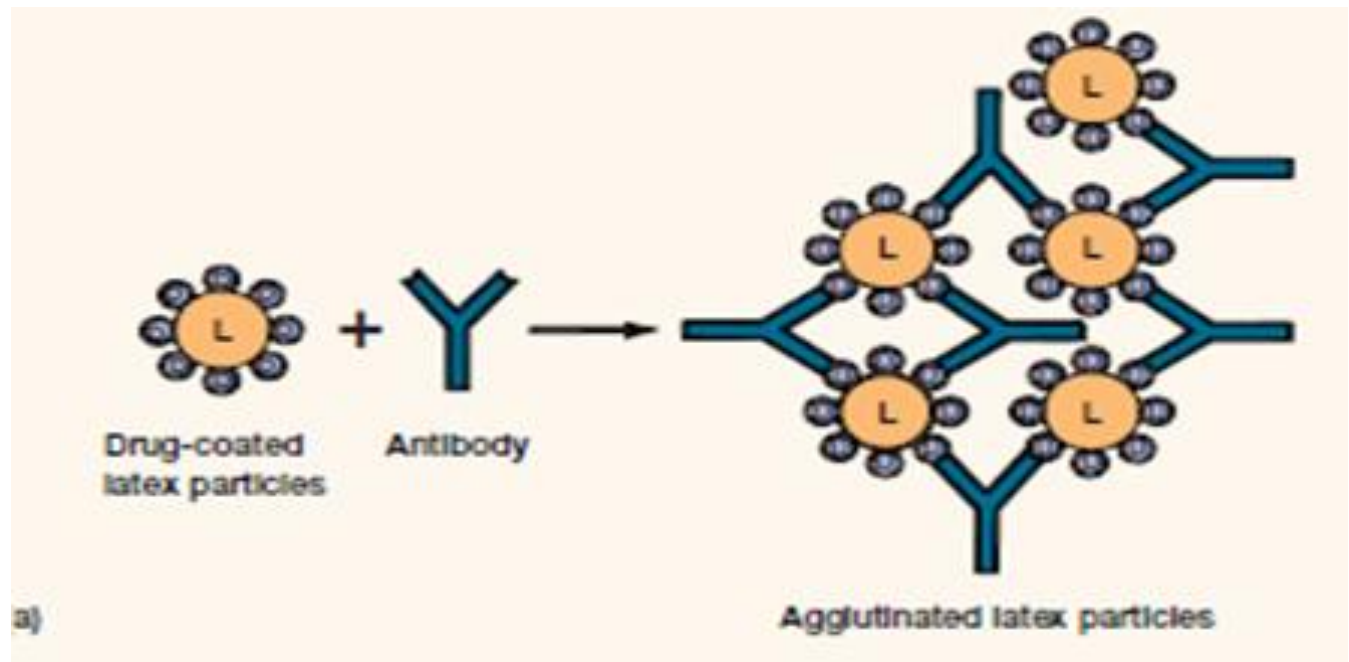
**antigen je  
korpuskulární)**



Copyright © 2007 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

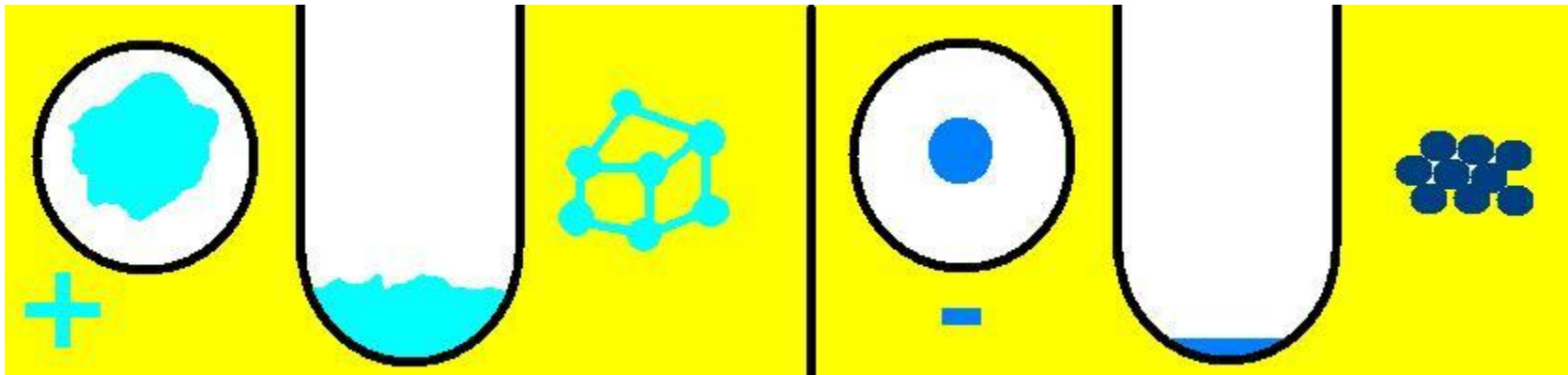
Figure 18.5

- **Aglutinace na nosičích:** Původně izolované antigeny jsou navázány na cizí částici – nosič (latex, erytrocyt, polycelulóza)



# Aglutinace

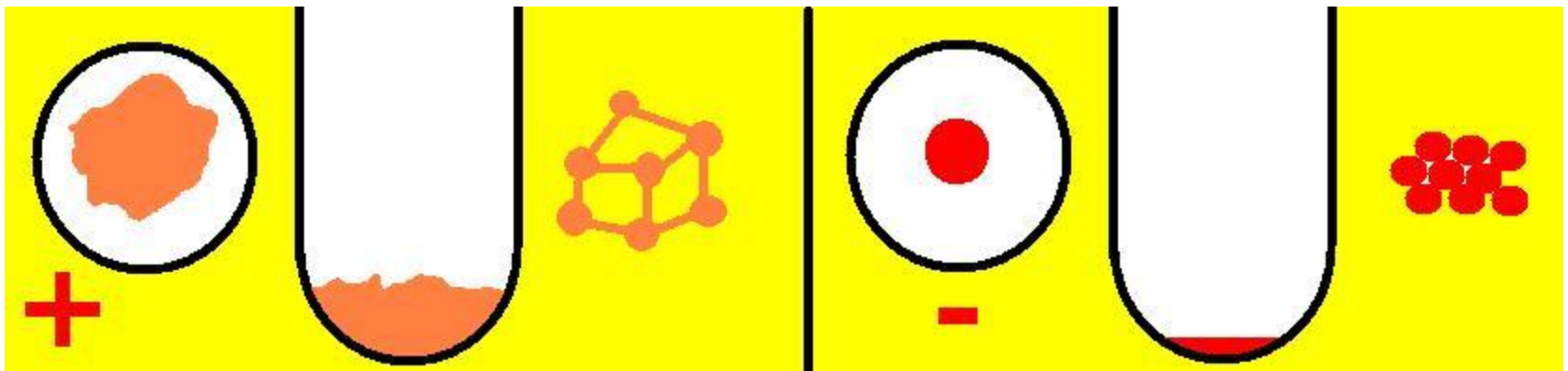
- Pozitivní – nepravidelný chuchvalec
- Negativní – malé pravidelné kolečko



# *Treponema pallidum* pasivní hemaglutinace (TPHA)

Pozitivní reakce je vznik „chuchvalce“, negativní sedimentace částic na dno důlku. Je to červené, jedná se totiž o aglutinace na nosiči, nosičem je erytrocyt

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



# TPHA

Pozitivní kontrola (různá míra positivity)

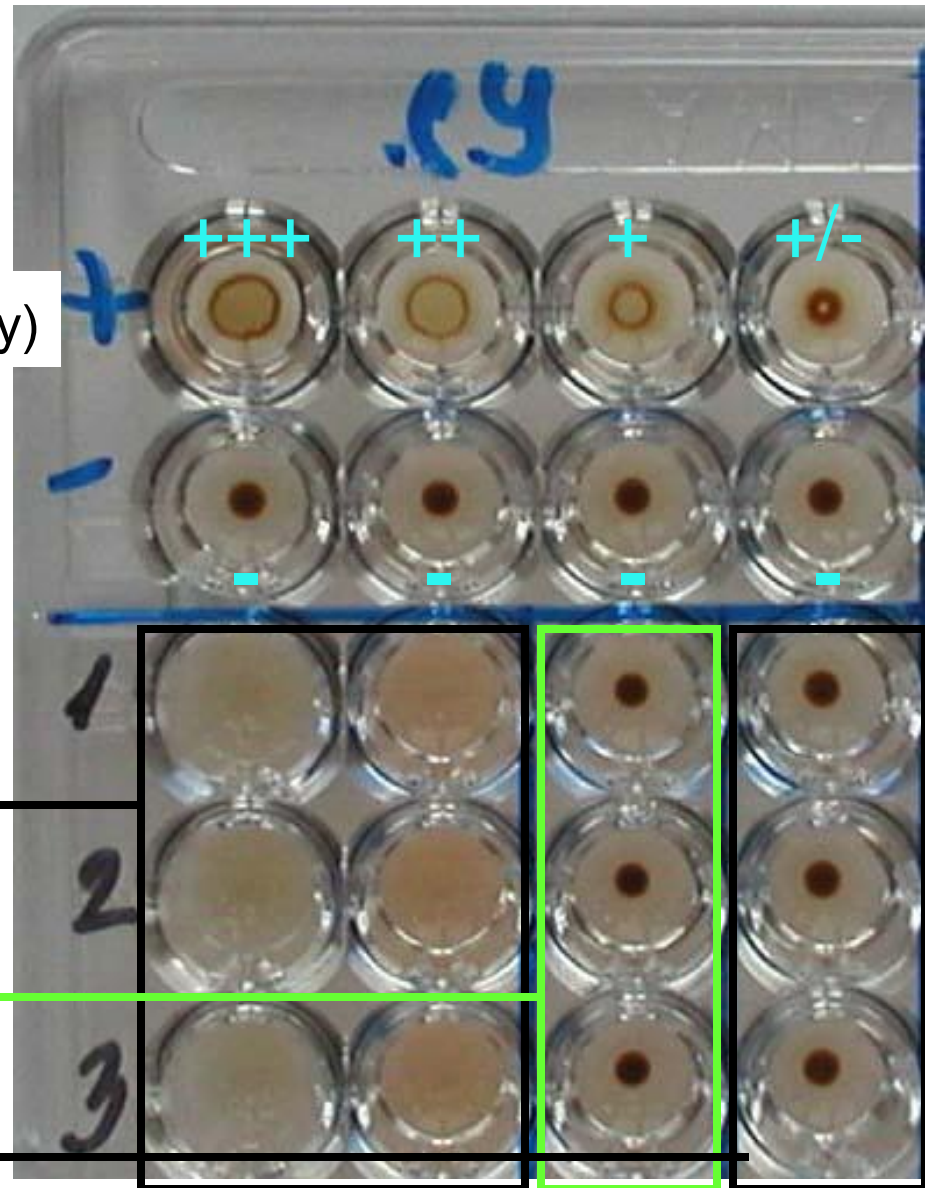
Negativní kontrola

Pacienti (1, 2, 3)

Technické důlky

Kontrola

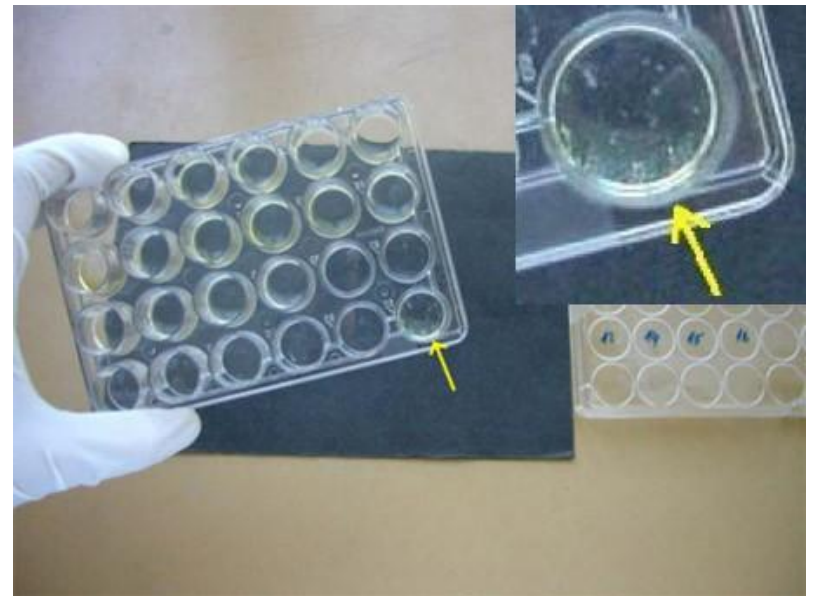
Vlastní reakce





# Protilátky precipitací – RRR (rychlá reaginová reakce)

- Detekujeme protilátky, které jsou pozitivní u syfilis, ačkoli to nejsou protilátky proti *Treponema pallidum*, nýbrž proti kardiolipinu (látka, která se objevuje u syfilitiků)
- Pouze kvalitativně.  
Sledujeme vznik precipitátů



**2.**

**KOMPLEMENTFIXAČNÍ  
REAKCE**



# Komplementfixace (KFR)

- Komplement = jedna ze složek imunitní reakce
- Pro KFR používáme **morčecí komplement**.  
Pacientův komplement je před reakcí inaktivován teplem
- Komplement **není schopen vázat se na samotný antigen**
- Komplement **není schopen vázat se na samotnou protilátku**
- Komplement **je schopen vázat se pouze na KOMPLEX obou**

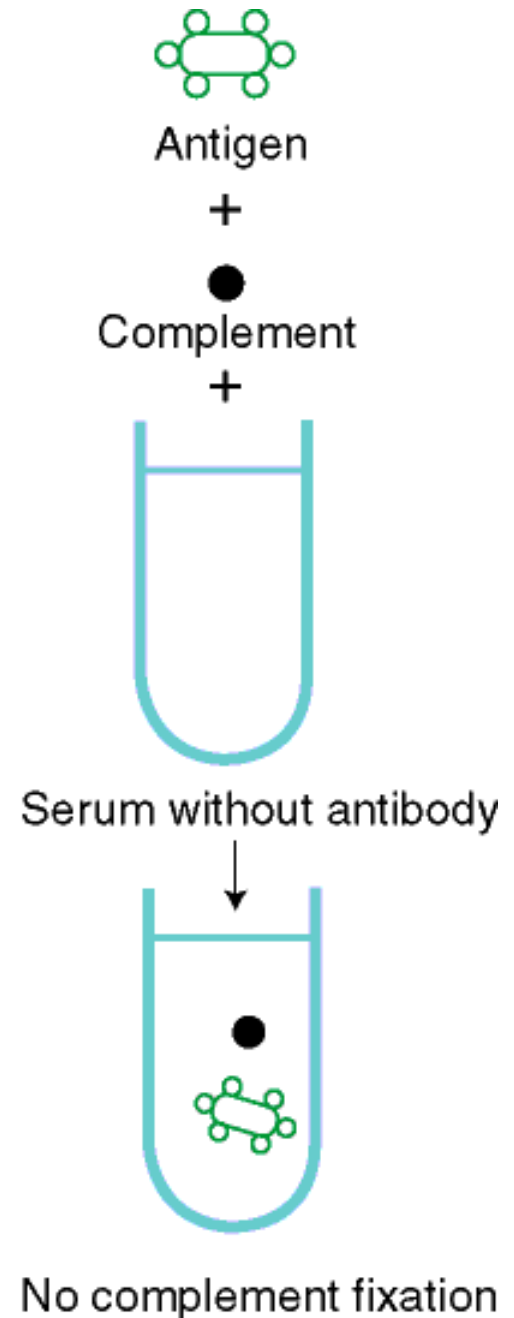
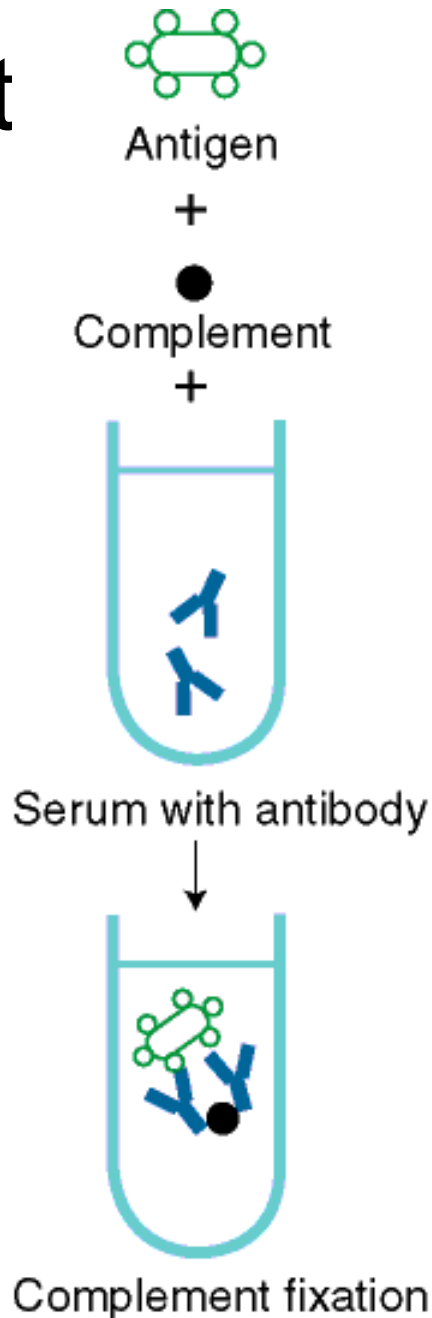
# Použití KFR

- KFR lze použít pro diagnostiku mnoha, zejména virových infekcí
- Jako i jiné serologické reakce se KFR používá k průkazu antigenu či protilátky
- Pro zjednodušení uvádíme pouze průkaz protilátky- máme laboratorní antigen, který konfrontujeme se sérem pacienta (kde hledáme protilátky)

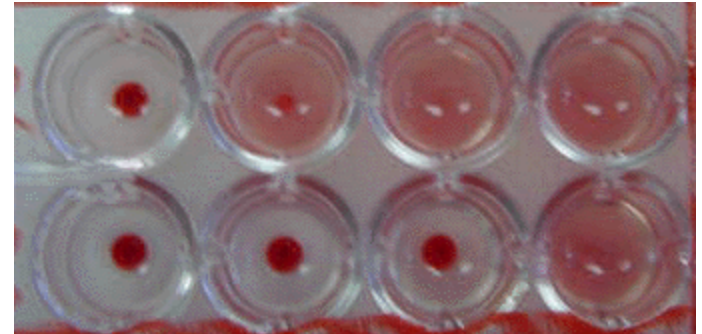
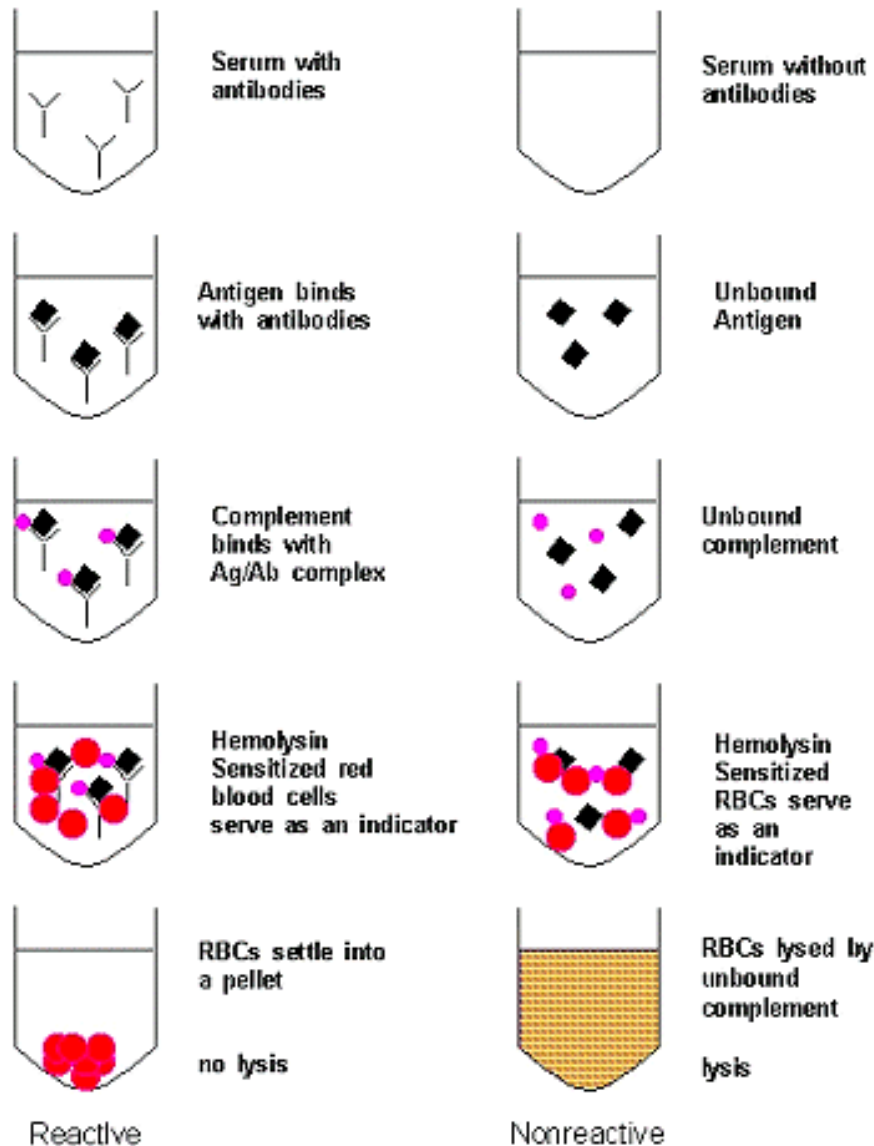
# Princip KFR

- Sérum pacienta se smíchá s laboratorním antigenem
- Přidá se **komplement**. V pozitivním případě se naváže (komplex Ag-Ab)
- Ve druhé fázi přidáme **indikátorový systém**-beraní ery + amboceptor (králičí Ab proti beraním erytrocytům)
- U pozitivní reakce zůstává indikátor nedotčen, v opačném případě dojde k jeho hemolýze

# Komplement a jeho vlastnosti



# Complement Fixation Test



**Pozitivní reakce-  
zábrana hemolýzy**

**Negativní  
reakce- hemolýza**



# Co dělá komplement s indikátorovým systémem

- K hemolýze je nutná přítomnost **beraních ery**, **amboceptoru** a **komplementu**. Jinak k hemolýze nedochází!!
- Beraní ery + amboceptor NENÍ HEMOLÝZA
- Beraní ery + komplement NENÍ HEMOLÝZA
- Králičí ery + komplement + amboceptor NENÍ HEMOLÝZA
- **Beraní ery + komplement + amboceptor**  
**HEMOLÝZA**

# Problémy s KFR

- Příliš mnoho komplementu → falešná negativita. **Co dělat?** Titrovat komplement
- Některá složka séra sama o sobě vyvazuje komplement (složka **antikomplementarity**): falešně pozitivní výsledky. **Co dělat?**  
Provést test antikomplementarity **bez antigenu**

**3.**

# **NEUTRALIZAČNÍ REAKCE**

# Neutralizační reakce

- Protilátka často dovede neutralizovat či inhibovat určitou biologickou vlastnost antigenu
- Tento způsob se zřídka vidí u celých bakterií. Pozorujeme ho u virů nebo bakteriálních toxinů

# Příklady neutralizačních reakcí

| Neutralizován                 | Objekt                     | Reakce |
|-------------------------------|----------------------------|--------|
| Toxin bakterie<br>(hemolyzin) | Erytrocyt<br>hemolýza      | ASLO   |
| Virus                         | Erytrocyt<br>shlukování    | HIT    |
| Virus                         | Buňka efekt<br>metabolický | VNT    |

# ASLO

- Po každé streptokokové infekci se objevují protilátky, včetně protilátek proti streptokokovému toxinu-  
streptolyzinu O
- Někdy se stane, že množství těchto protilátek po infekci neklesá, ale naopak stoupá.
- V takovém případě jsou tedy nebezpečnější protilátky než samotný patogen
- ASLO není přímý průkaz, nepátráme po patogenovi, určujeme samotné protilátky
- Indikací k vyšetření je podezření na tzv. pozdní následky streptokokových infekcí (akutní glomerulonefritida a revmatická horečka)

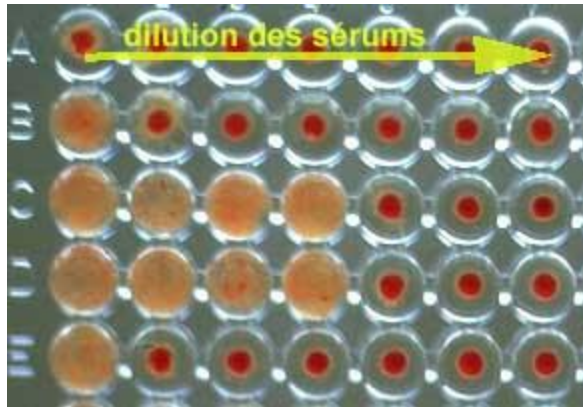
# ASLO- princip

- Protilátka blokuje hemolytický efekt toxinu (streptolyzin O) na krvinku. **Pozitivní** je tedy **zábrana hemolýzy** se sedimentací krvinek (podobně jako u KFR, ale ze zcela jiného důvodu)
- **Panel** s pozitivní kontrolou a sedmi pacienty, ředění s koeficientem pouze 1,2
- **Titř** nad cca 200 znamená riziko, že pacient je ohrožen pozdním následky streptokokové infekce

Hodnocení výsledků ASLO

|                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|---------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| jam<br>ka<br>č.     | 1   | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   | 10  | 11  | 12  |
| hod<br>nota<br>m.l. | 100 | 120 | 150 | 180 | 225 | 270 | 337 | 405 | 506 | 607 | 759 | 911 |

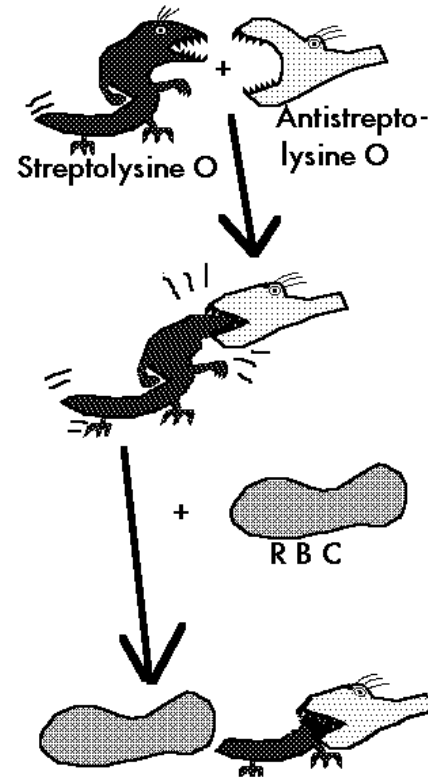
# Princip vyšetření ASLO: neutralizace hemolýzy



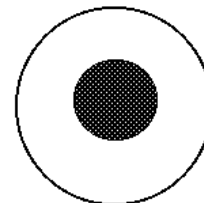
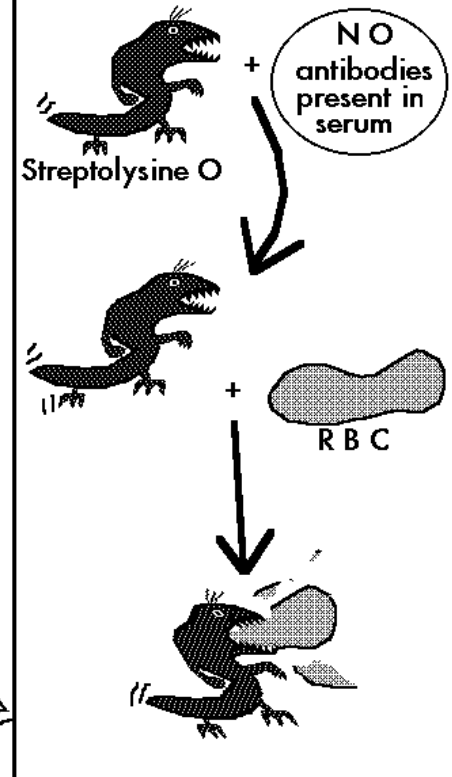
## Detection of ASO

Anti Streptolysine O

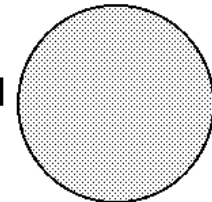
Positive reaction:



Negative reaction:



NO HAEMOLYSIS



HAEMOLYSIS



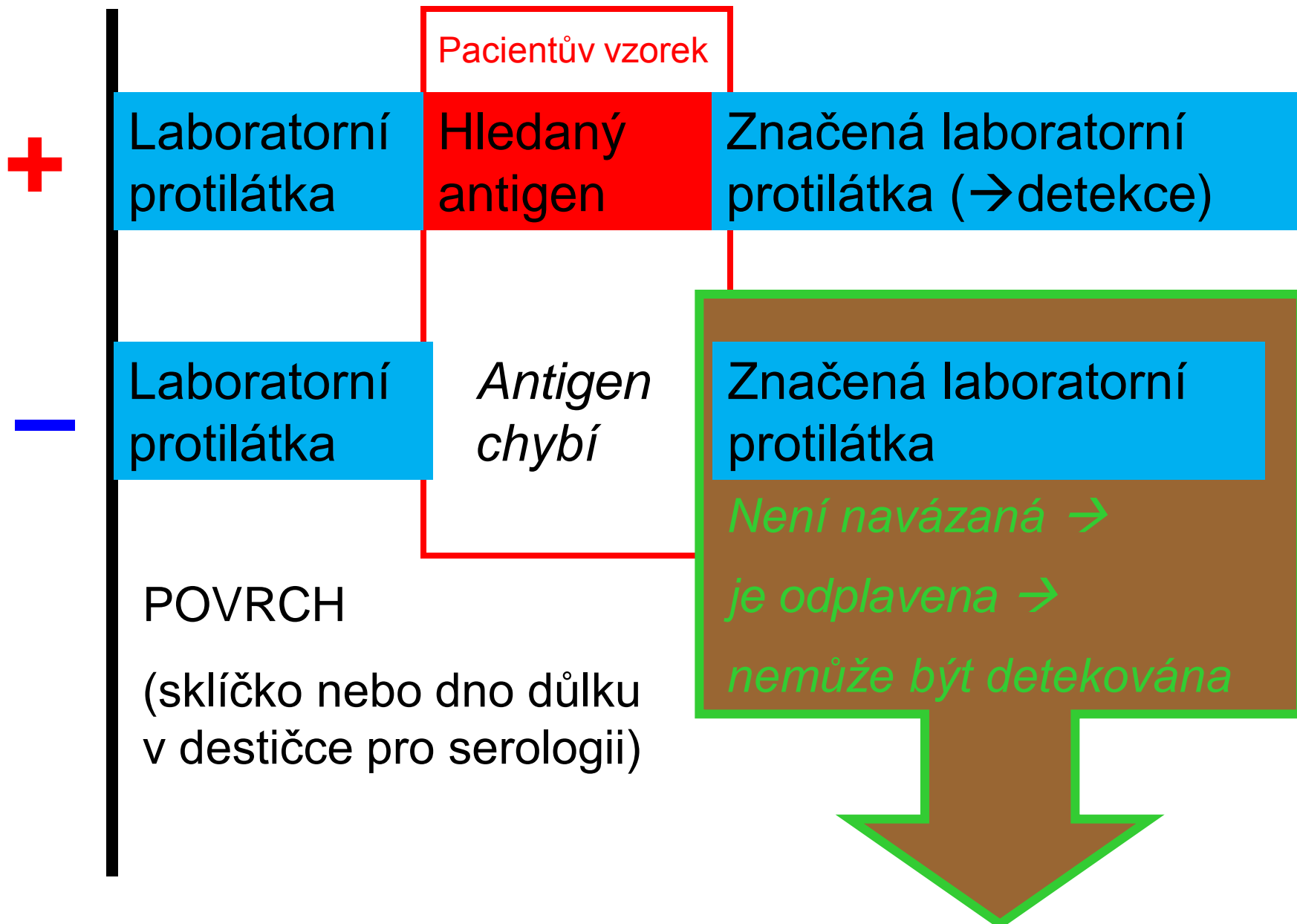
**4.**

**REAKCE SE ZNAČENÝMI  
SLOŽKAMI**

# Reakce se značenými složkami

- **Na povrch** (sklíčko, důlek mikrotitrační destičky,...) se postupně navazují jednotlivé složky
- **Místo jedné ze složek** se pokusíme navázat vzorek od pacienta, o kterém si myslíme, že danou složku možná obsahuje
- **Je-li to pravda**, složka se naváže
- **Pokud se všechny složky postupně navážou**, vznikne nepřerušovaný řetězec
- **Na konci řetězce** je vhodné **značidlo**

# Příklad pozitivního a negativního průběhu



# Typy značidel

- **Fluorescenční barvivo** je značidlem u **imunofluorescence**
- **Radioizotop** je značidlem u reakce **RIA**
- **Enzym** je značidlem u reakce **ELISA**

**Western blotting** je zvláštním případem reakce ELISA, kde jednotlivé antigeny jsou elektroforeticky rozděleny

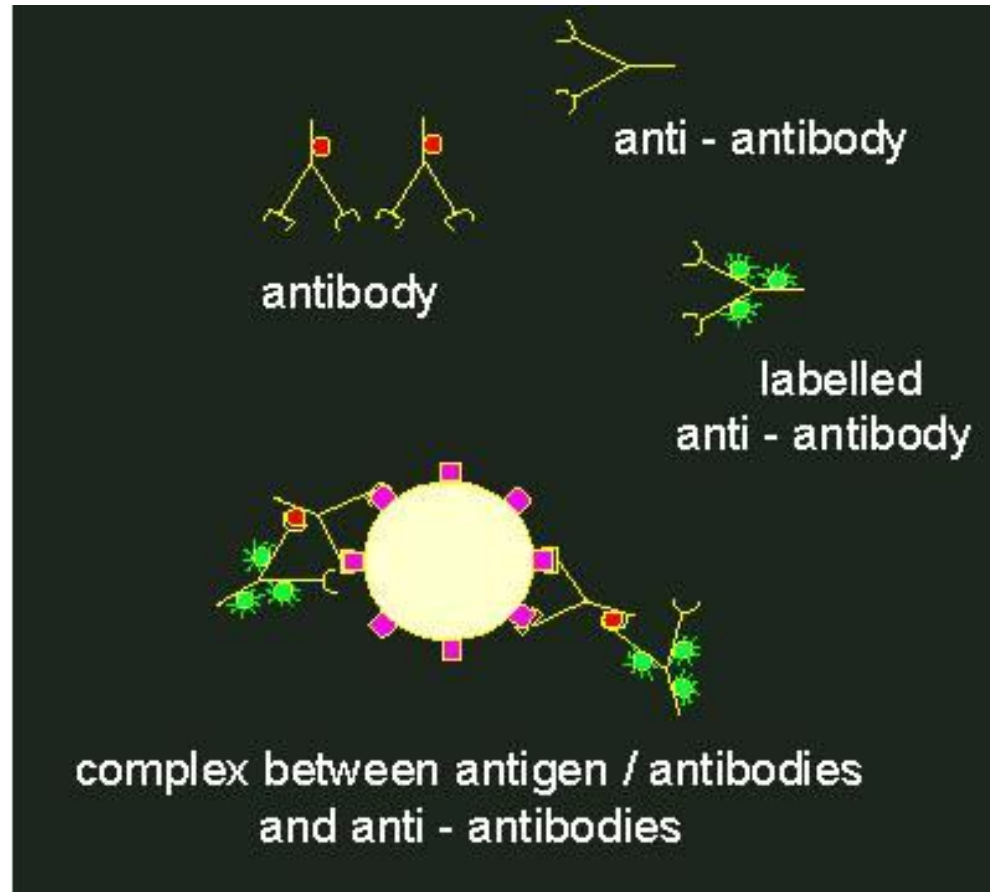
*Používáme-li jako značidlo enzym, je poslední složkou přidanou do reakce ještě příslušný substrát – tedy jeden krok navíc.*

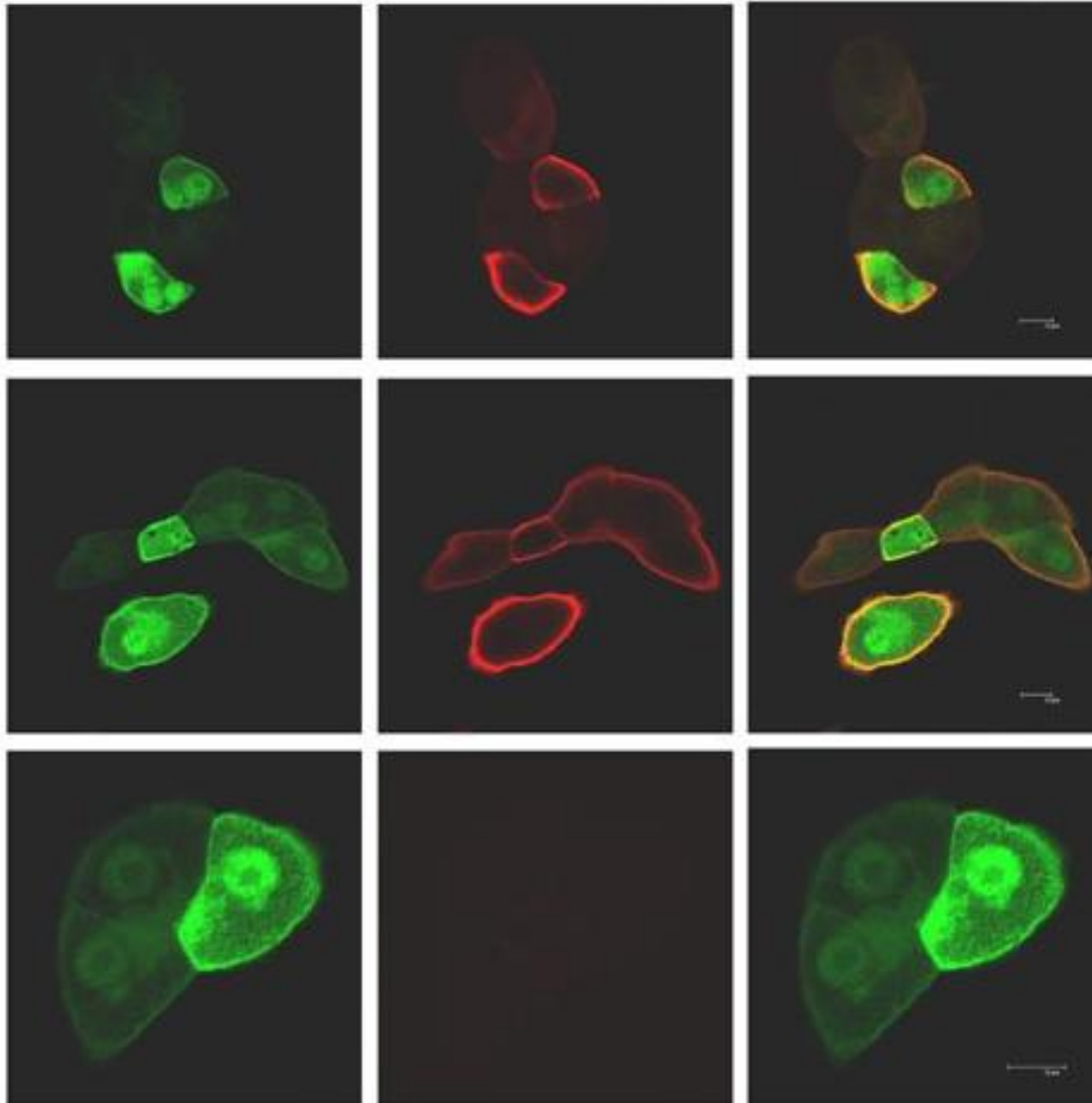
# Promytí a jeho význam

- Pokud by v reakci zůstalo přítomno i to, co se na nic nenačázalo, nedokázali bychom odlišit pozitivní reakci od negativní
- Proto po každém kroku reakce následuje **promytí**, po kterém zůstanou přítomny pouze složky **navázané** na pevný povrch
- Je-li řetězec přerušen, odplaví promytí vše za místem přerušení

# I. Immunofluorescence

Odečítá se pomocí fluorescenčního mikroskopu

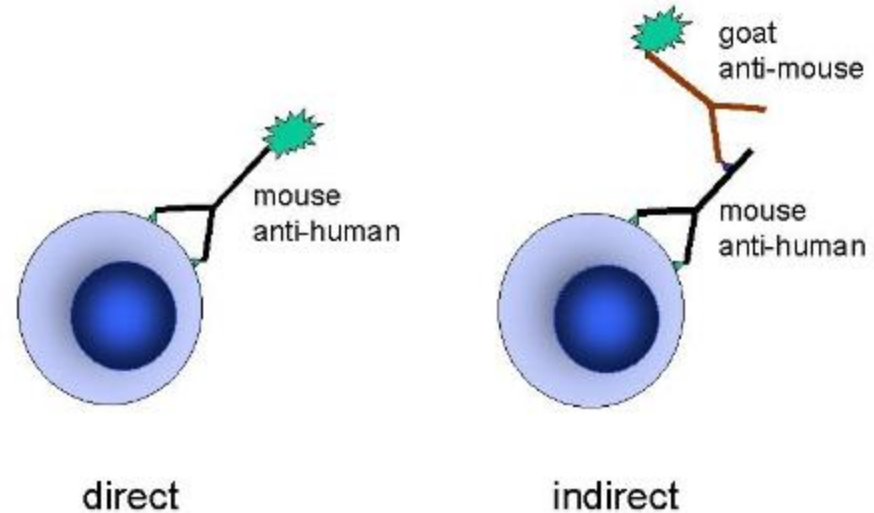




[www.amsbio.com](http://www.amsbio.com)

# přímá imuofluorescence

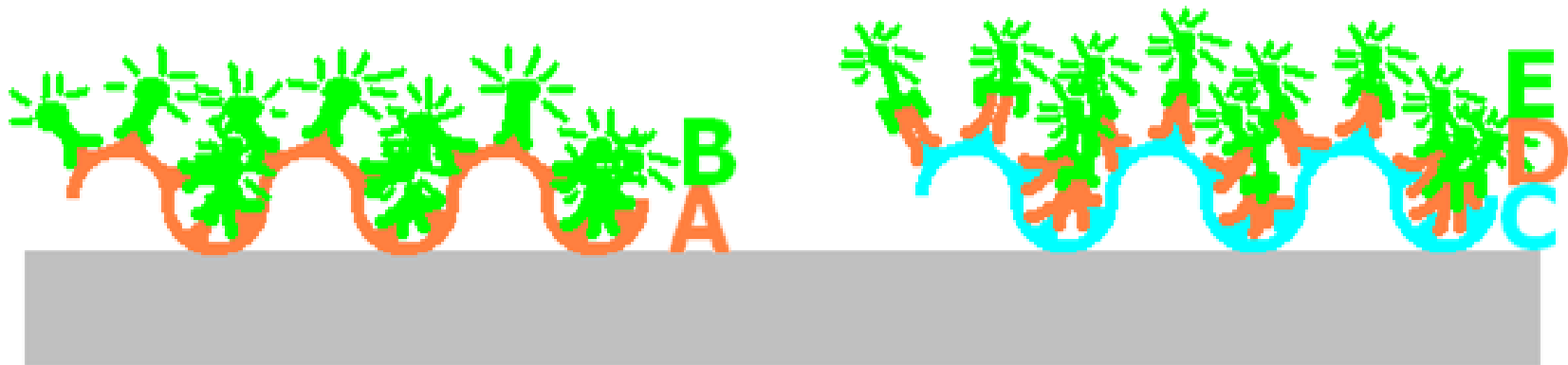
(Povrch)-(antigen)-(značená protilátka)



# nepřímá imunofluorescence

(Povrch)-(antigen)-(protilátka)-(značená protilátka proti lidské protilátce)





**A:** *Treponema pallidum* – od pacienta

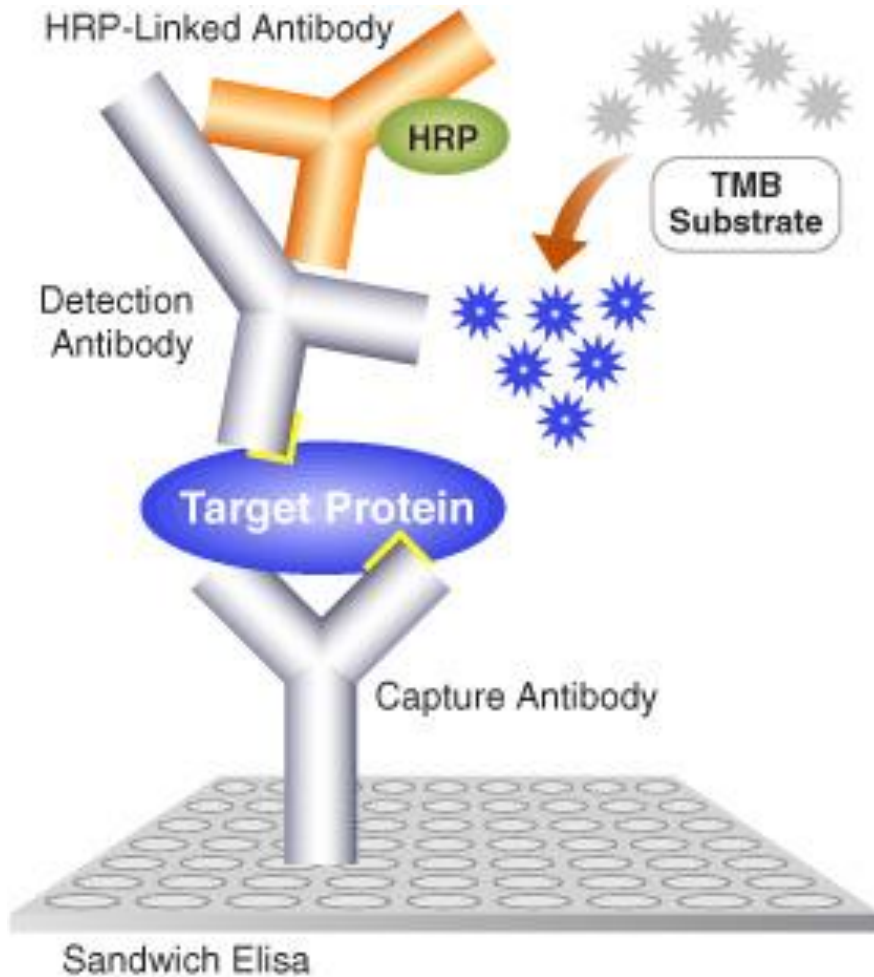
**B:** Značená protilátka proti *Treponema pallidum* (laboratorní)

**C:** *Treponema pallidum* – z laboratoře

**D:** Protilátka proti *Treponema pallidum* – od pacienta

**E:** Značená labor. protilátka proti lidské protilátce (konjugát)

# II. ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

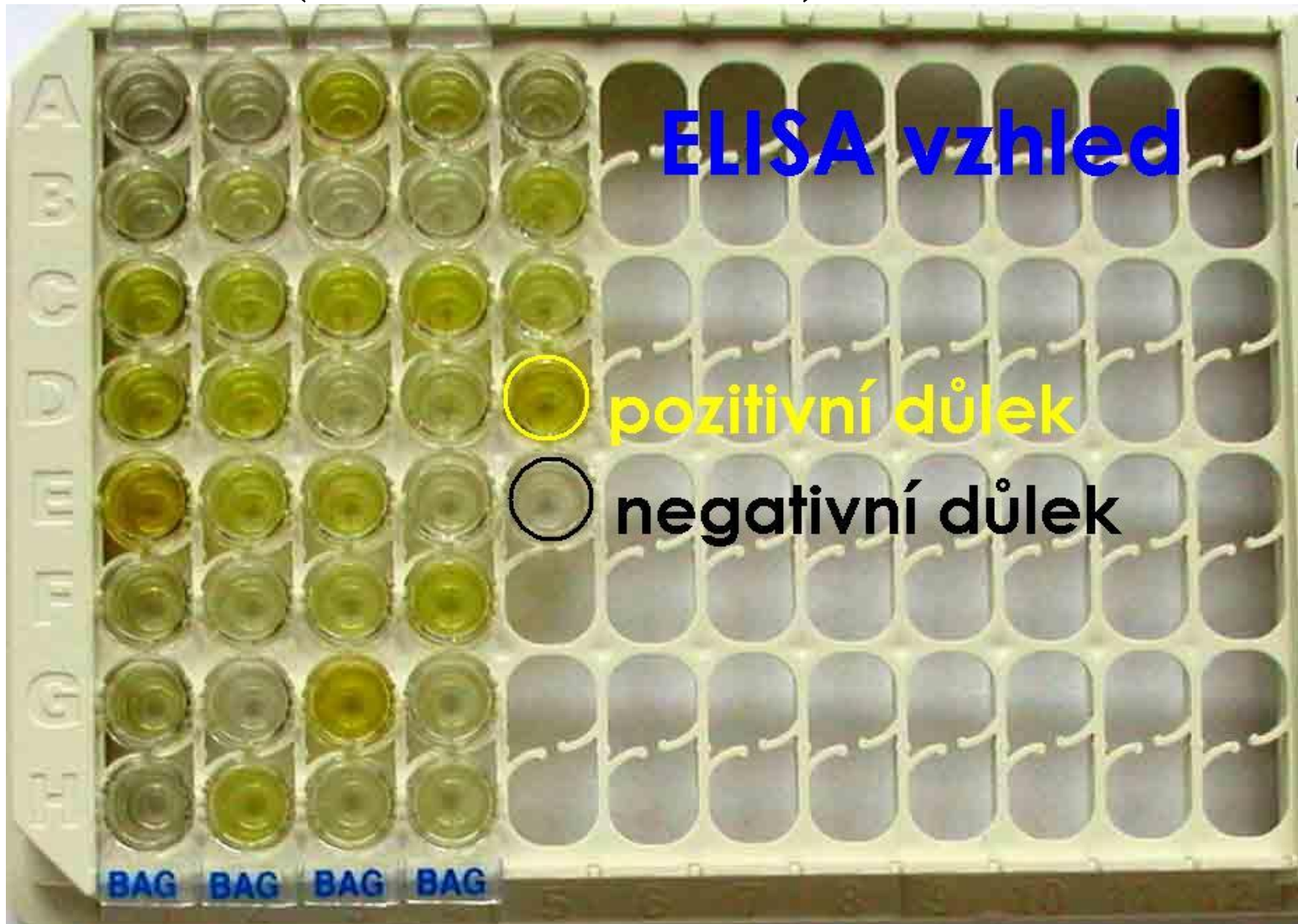


# ELISA – praktické provedení

- Zpravidla máme k dispozici **destičku s jamkami**. Na rozdíl od klasických serologických reakcí má každý pacient nikoli celý řádek, ale jen jeden důlek. To proto, že nezjišťujeme titry
- Před vlastními důlky pacientů mohou být důlky:
  - **BI** – blank (pro kalibraci spektrofotometru)
  - **K-** a **K+** – pozitivní a negativní kontrola
  - **Cut off** (dva či tři důlky) – výrobcem dodané „vzorky“ s právě hraniční hodnotou absorbance („odsekávají“ pozitivní výsledky buď ostře, nebo s rozmezím plus minus 10 %)

# ELISA – ukázka

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



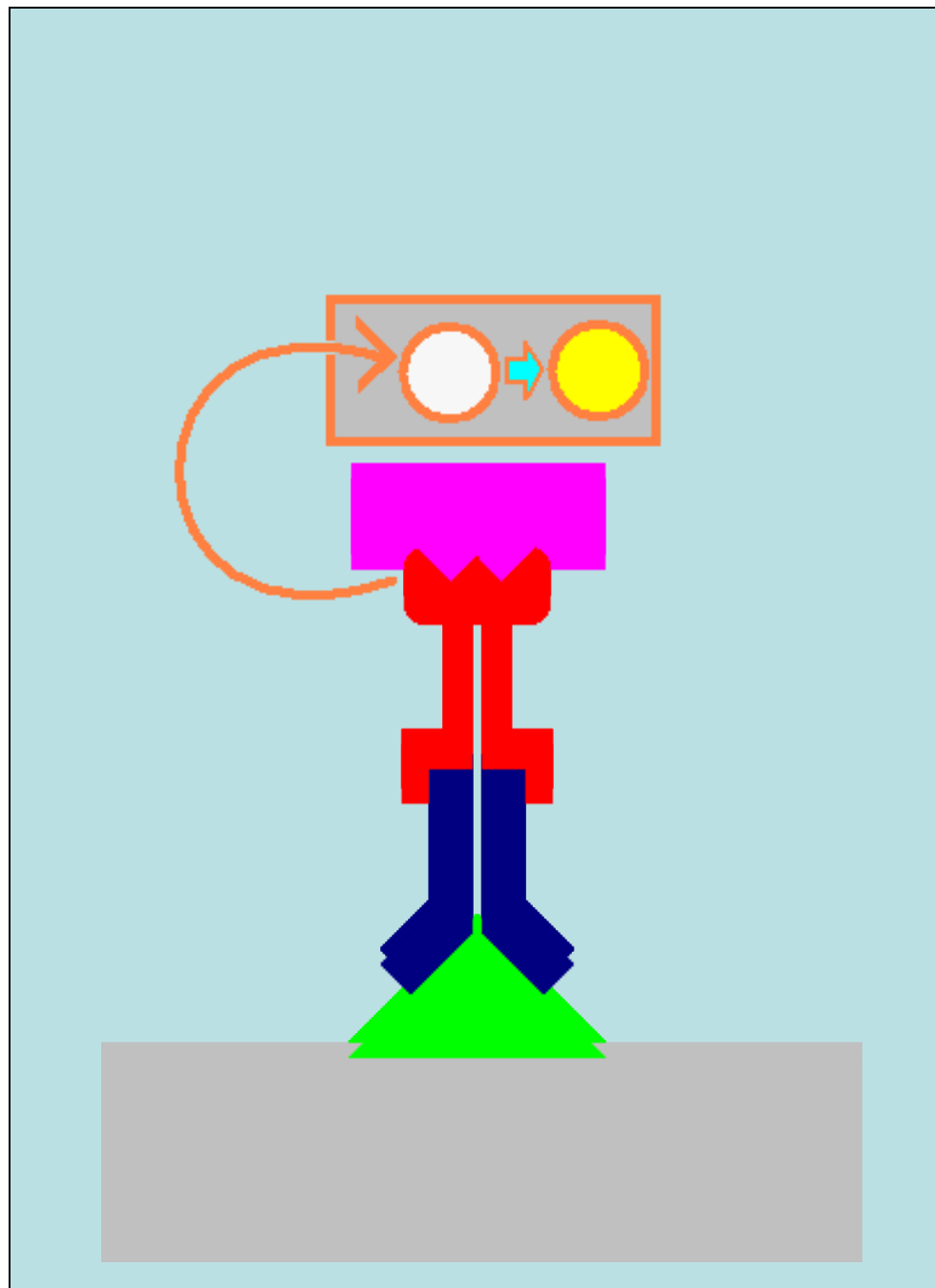
# ELISA – proč je tak oblíbená

- U reakce ELISA je na konci celého procesu **enzymatická reakce**. Její intenzita se projeví jednoduše: intenzitou zbarvení v důlku, kde reakce probíhá. **Sytá barva = vysoce pozitivní**.
- Nenáročnost z hlediska **nákladů a nulové radiační nebezpečí** je výhodou oproti radioimunoassayím
- Možnost **automatizace** je velkou výhodou oproti imunofluorescenci

# ELISA k detekci protilátky:

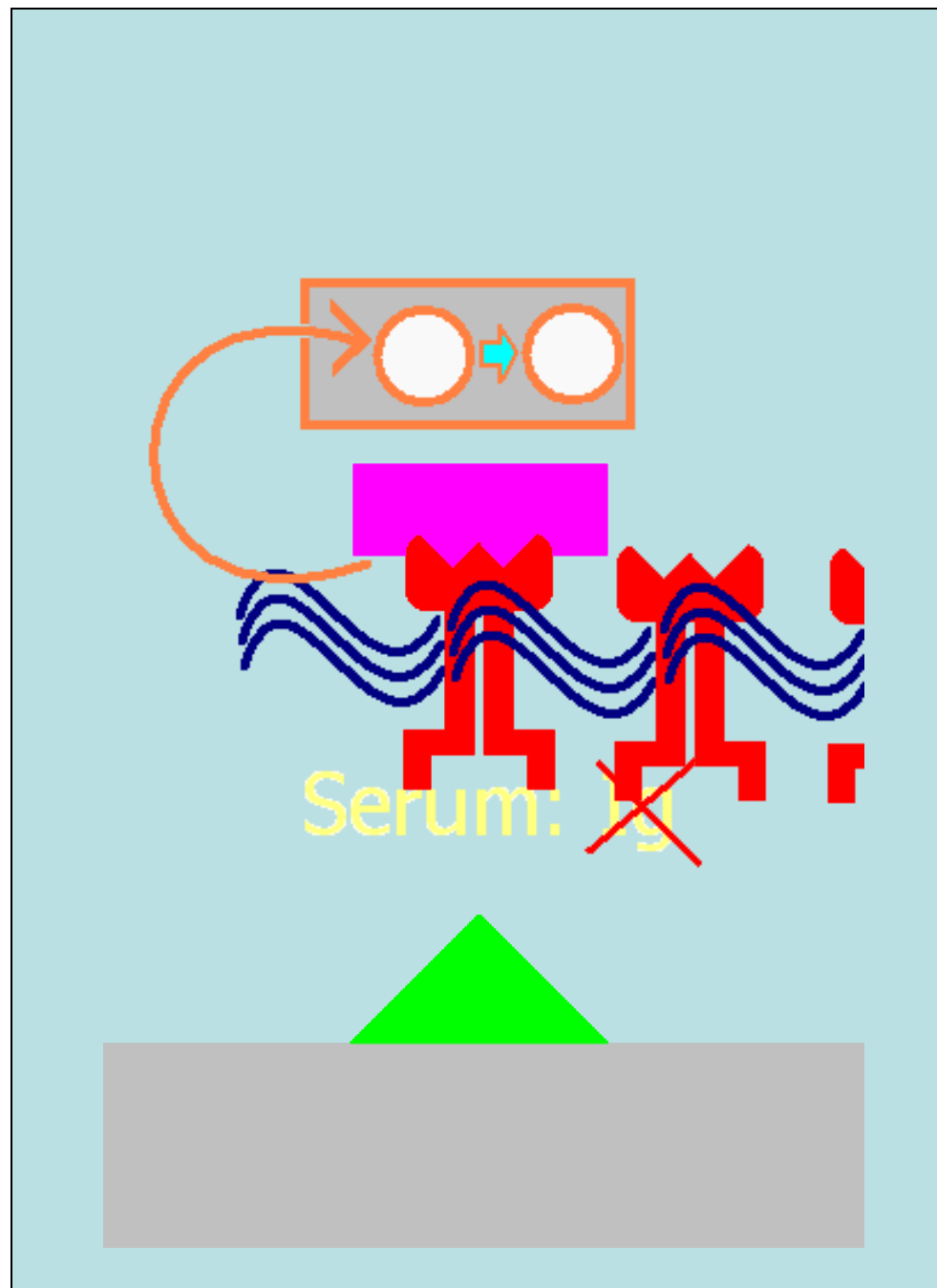
1. Pozitivní (hledá  
se IgM, IgM  
přítomna)

Všechny složky se  
postupně navazují.  
Dojde k enzymatické  
reakci – změně barvy  
v důlku



# ELISA k detekci protilátky: 2. Negativní I (hledá se IgM, žádné protilátky)

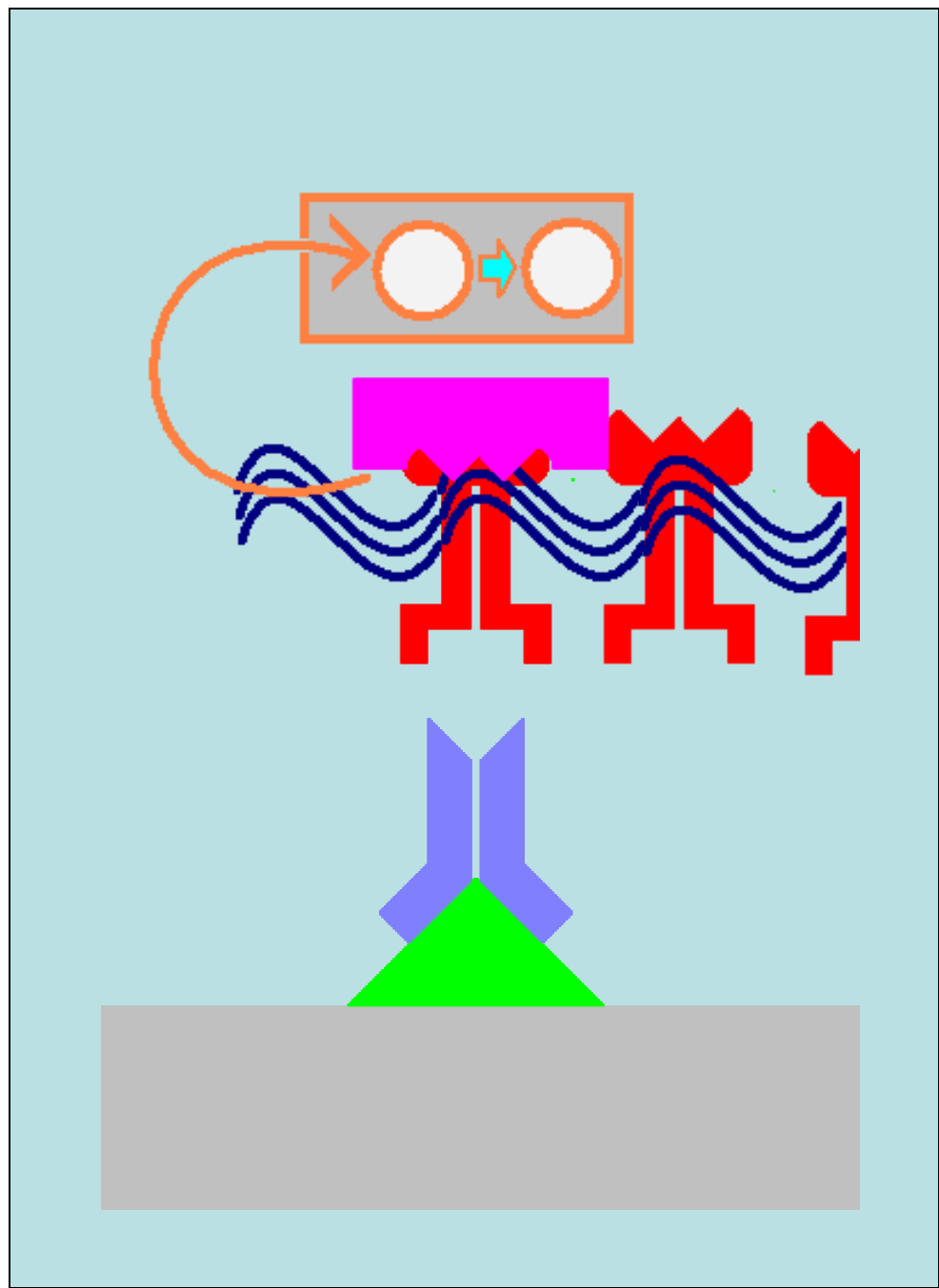
V séru pacienta  
nejsou protilátky.  
Konjugát je odplaven,  
v důlku není žádná  
změna.



# ELISA k detekci protilátky:

3. Negativní II  
(hledá se IgM,  
přítomny IgG)

V séru pacienta jsou  
jen IgG protilátky.  
Konjugát je odplaven,  
ke změně barvy důlku  
nedojde





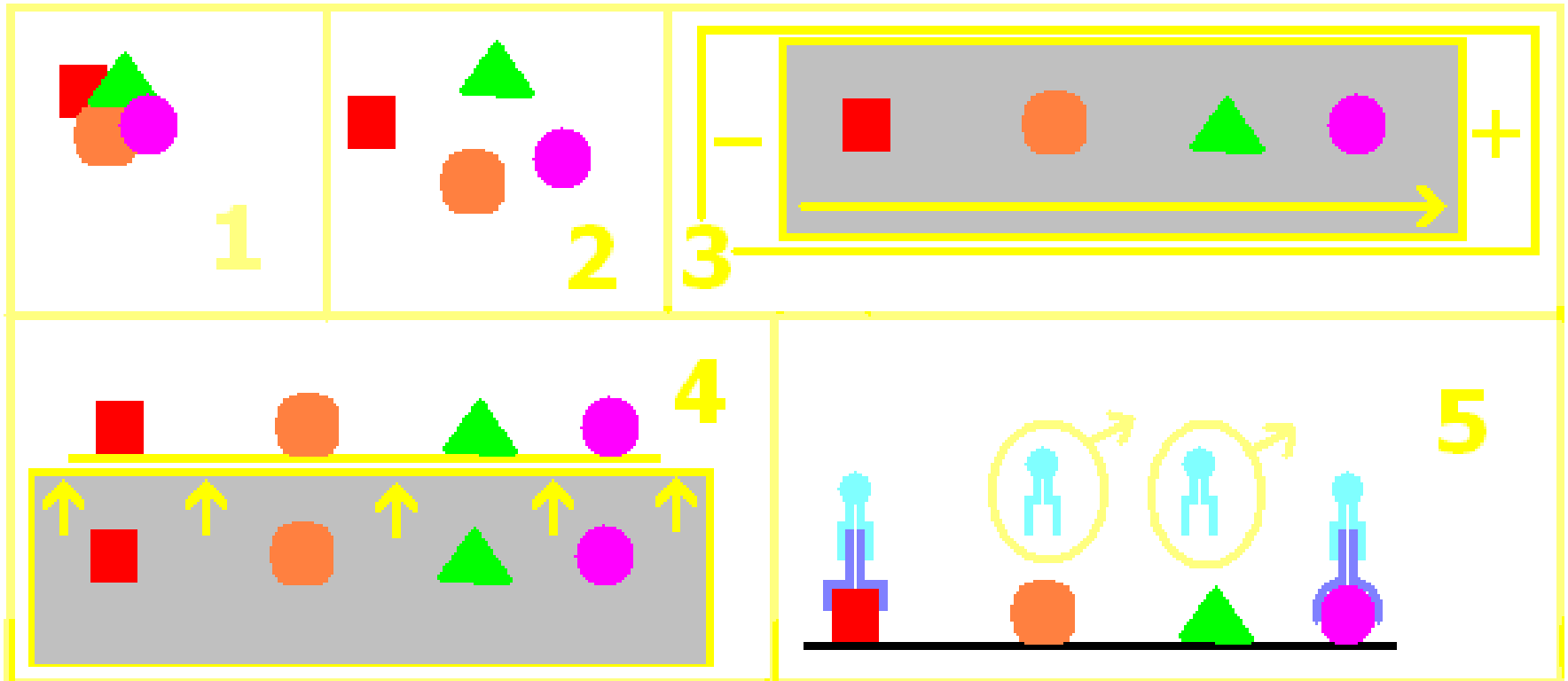
# 3. Western blotting

- Prakticky je to ELISA, ale směs antigenů je **rozdělena elektroforeticky** na jednotlivé antigenní determinanty
- Je tedy **přesnější** a pomáhá zejména tam, kde klasická ELISA traskotá na zkřížené pozitivitě např. příbuzných mikroorganismů

# Western blotting – princip

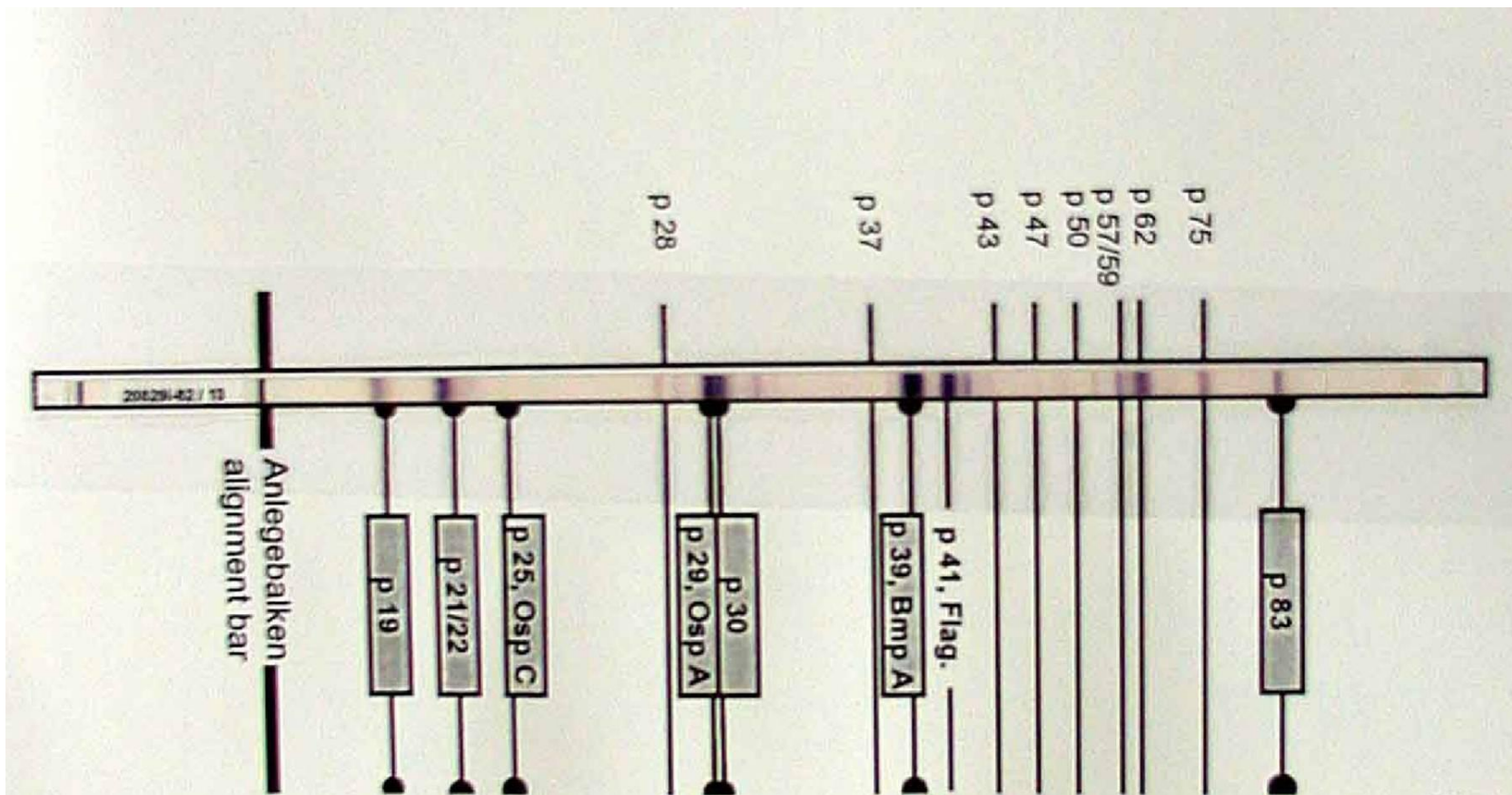
- 1: původní antigen (směs)
- 2: uvolnění jednotlivých antigenů detergentem
- 3: elektroforetické rozdělení antigenů

- 4: „přesátí“ rozdělených antigenů na nitrocelulózu
- 5: reakce ELISA (přítomny jsou jen některé protilátky)



# Western blot – vzhled

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



# Možnosti uspořádání složek

- Povrch-**antigen**-protilátka-značidlo (P)
- Povrch-protilátka-**antigen**-protilátka-značidlo (P, např. průkaz HBsAg)
- Povrch-antigen-**protilátka**-antigen-značidlo (N)
- Povrch-antigen-**protilátka**-konjugát-značidlo (N)

*Konjugát je značená protilátka namířená proti lidské protilátce*

# Význam konjugátu

- **Konjugát** se používá zpravidla u reakcí nepřímého průkazu (průkaz protilátek)
- Je to protilátka, pro kterou je **antigenem lidská protilátka** např. IgM nebo IgG
- Dokáže být **selektivní** proti určité třídě lidské protilátky
- Použití konjugátu je tedy podstatou možnosti selektivního průkazu jednotlivých **tříd protilátek**

# Přehled sérologických reakcí

| <b>Reakce</b>     | <b>Pozitivní výsledek</b> | <b>Negativní výsledek</b> |
|-------------------|---------------------------|---------------------------|
| <b>Aglutinace</b> | Nepravidelný chuchvalec   | Usazené ery               |
| <b>KFR</b>        | Zábrana hemolýzy          | hemolýza                  |
| <b>ASLO</b>       | Zábrana hemolýzy          | hemolýza                  |