

# **SEROLOGICKÉ METODY**

# Serologické reakce

## Reakce mezi antigenem a protilátkou *in vitro*

**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 (člověka, ale také zvířete) jako odpověď na antigenní výzvu

# 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)

# 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)

# Titr

- **Nejvyšší ředění, kde ještě vidíme pozitivní reakci, se nazývá titr.**
- **Změna titru** vypovídá více. Jde-li o čerstvou záležitost, titr se vždy vyvíjí, nejprve stoupá, později zvolna klesá.

# 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)

**1.**

**PRECIPITACE, AGLUTINACE,  
AGLUTINACE NA NOSIČÍCH**



## Precipitace:

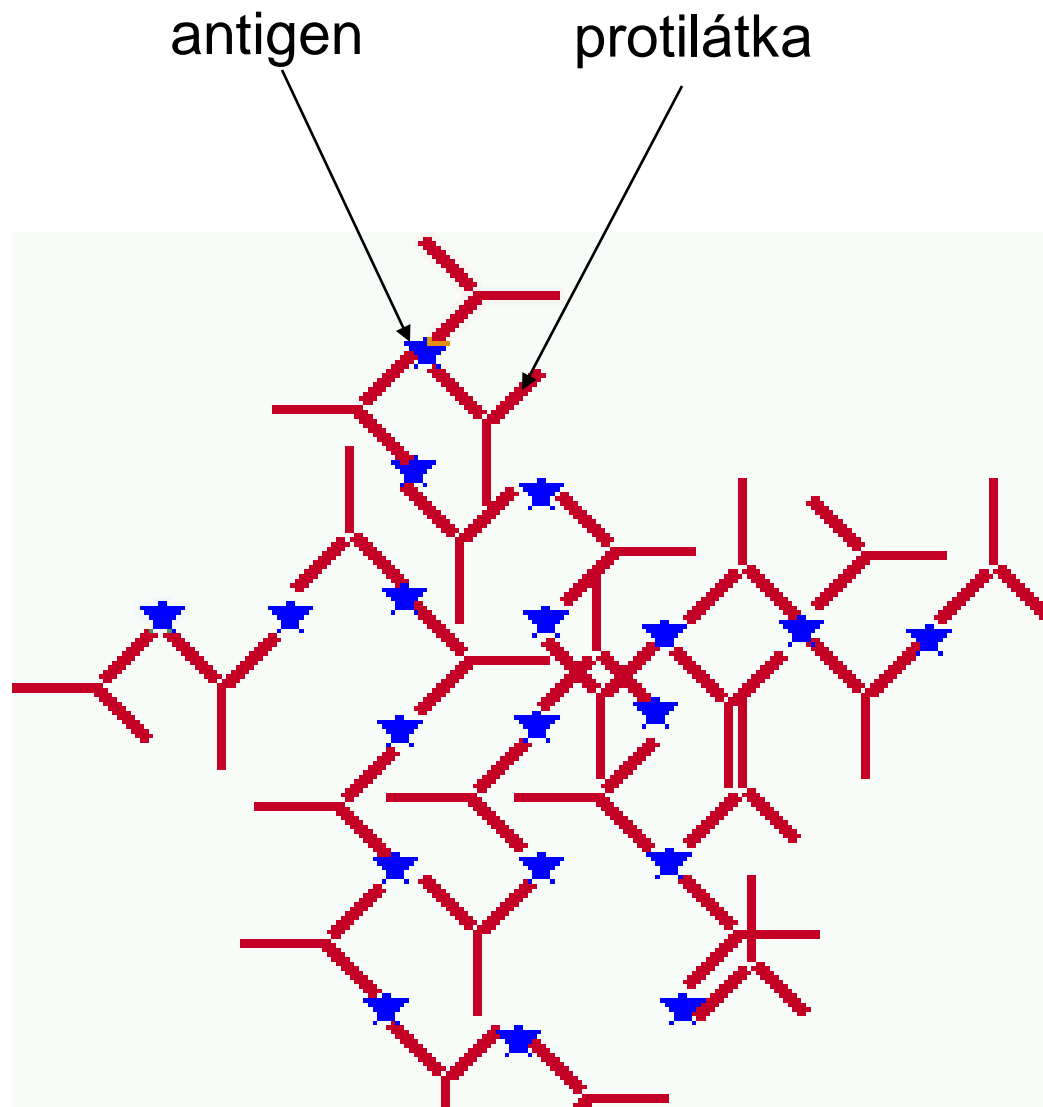
Antigeny jsou ve formě

izolovaných

makromolekulu

I (jde tedy o

**koloidní antigen)**

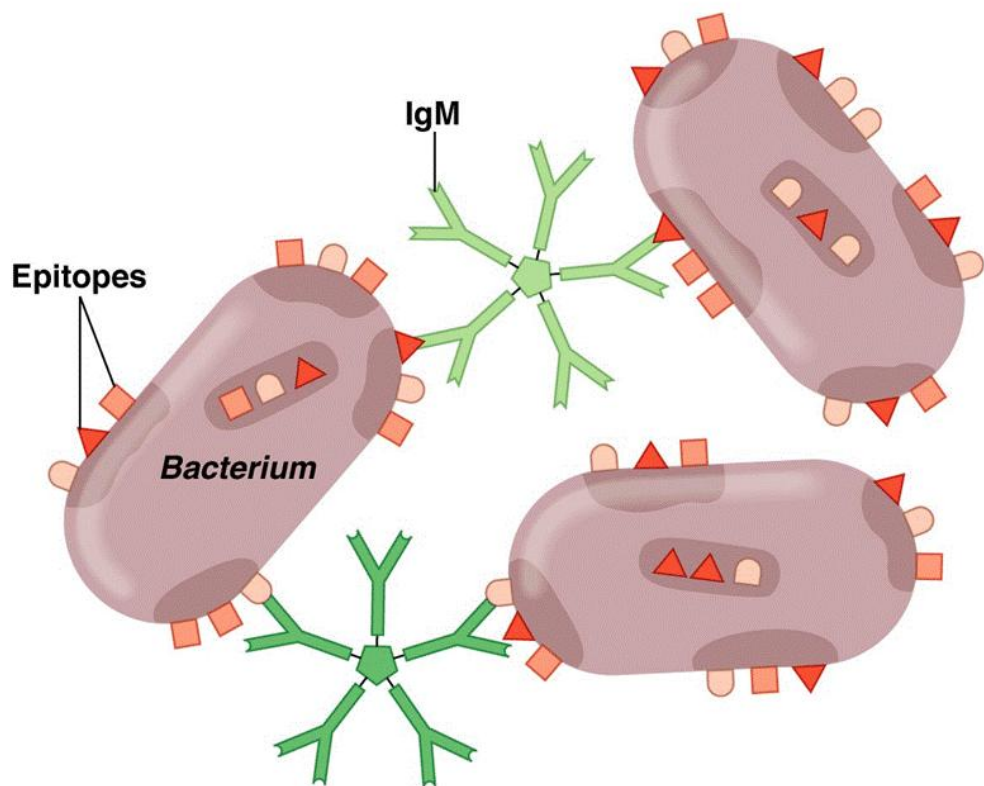


## Aglutinace:

Antigen je  
součástí buňky  
mikroba

(pracujeme  
tedy s celými  
mikroby,  
říkáme, že

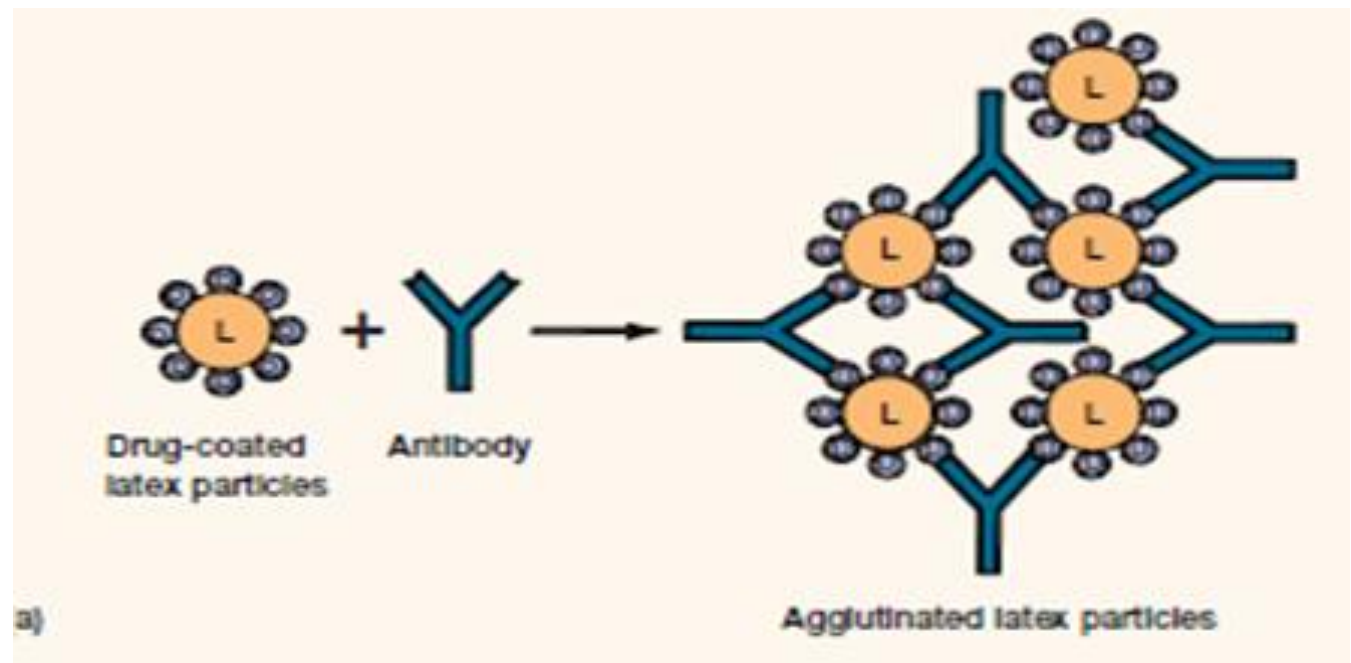
**antigen je  
korpuskulární)**



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

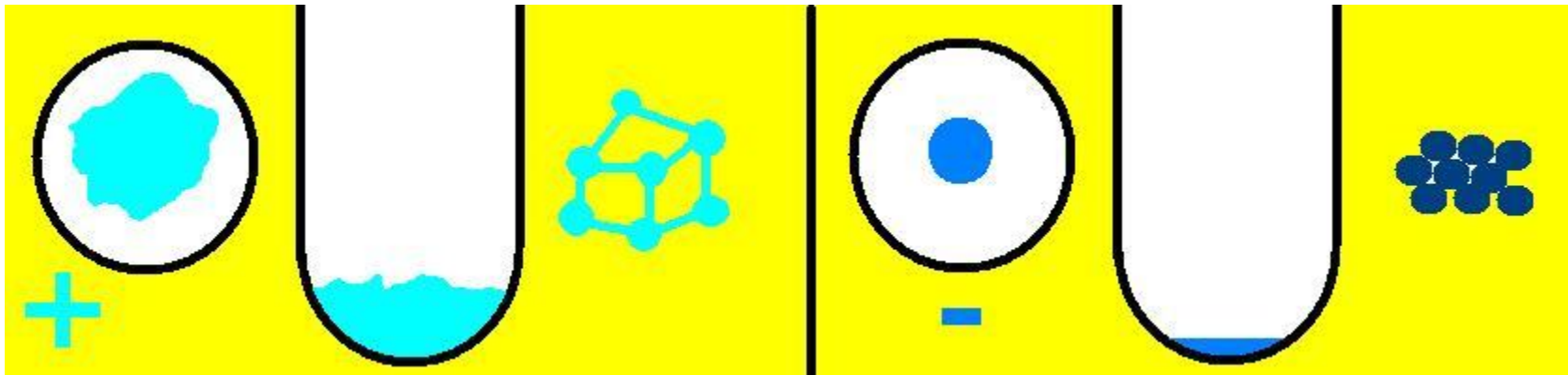
Figure 18.5

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



# Aglutinace (k průkazu protilátek)

- Pozitivní – nepravidelný chuchvalec
- Negativní – malé pravidelné kolečko



**2.**

**KOMPLEMENTFIXAČNÍ  
REAKCE**

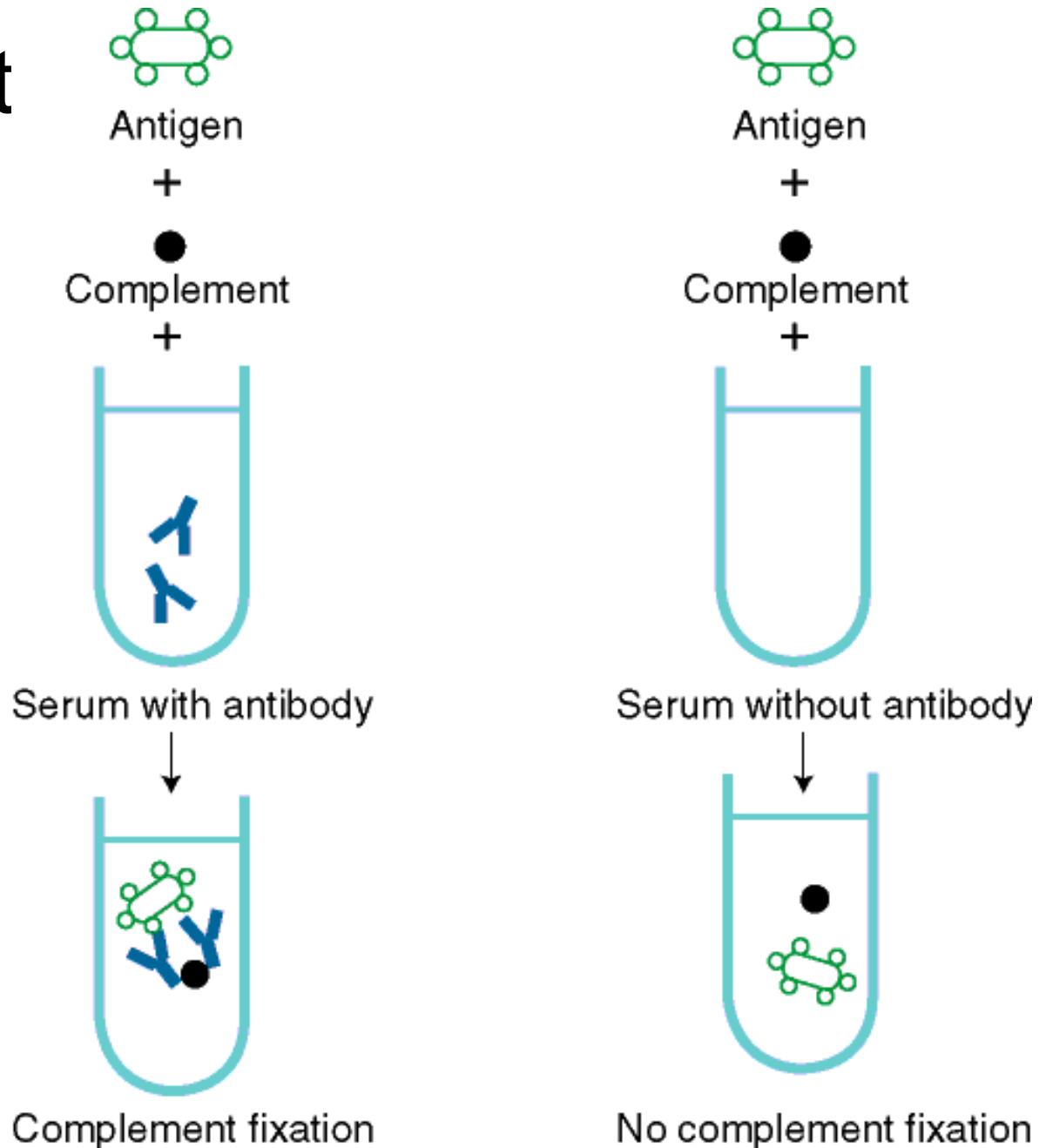
# Komplementfixace (KFR)

- 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**

# Princip KFR

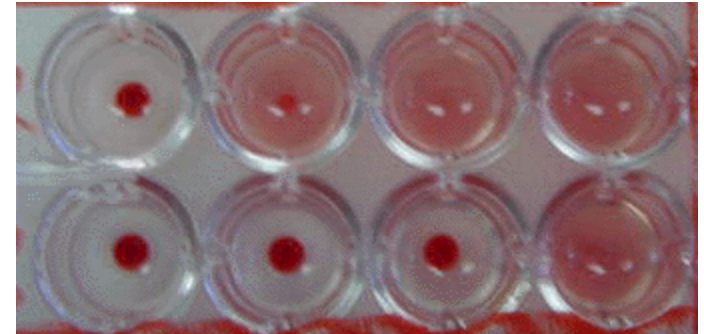
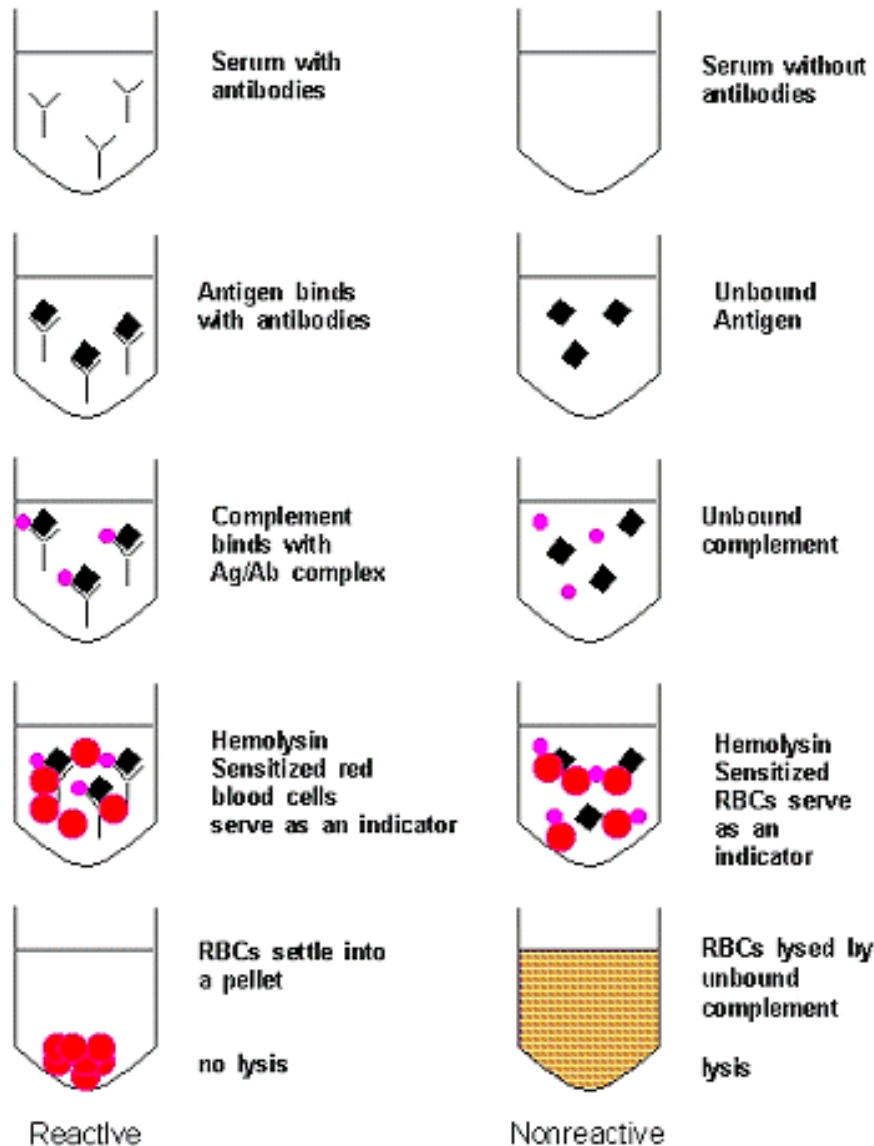
- Sérum pacienta se smíchá s laboratorním antigenem
- Přidá se **komplement**. V pozitivním případě se naváže (komplex Ag-Ab)
- Ve druhé fázi přidáme **indikátorový systém**-beraní ery + amboceptor (králičí Ab proti beraním erytrocytům)
- U pozitivní reakce zůstává indikátor nedotčen, v opačném případě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

# Komplement a jeho vlastnosti





# Complement Fixation Test



**Pozitivní reakce-  
zábrana hemolýzy**

**Negativní  
reakce- hemolýza**

**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    |

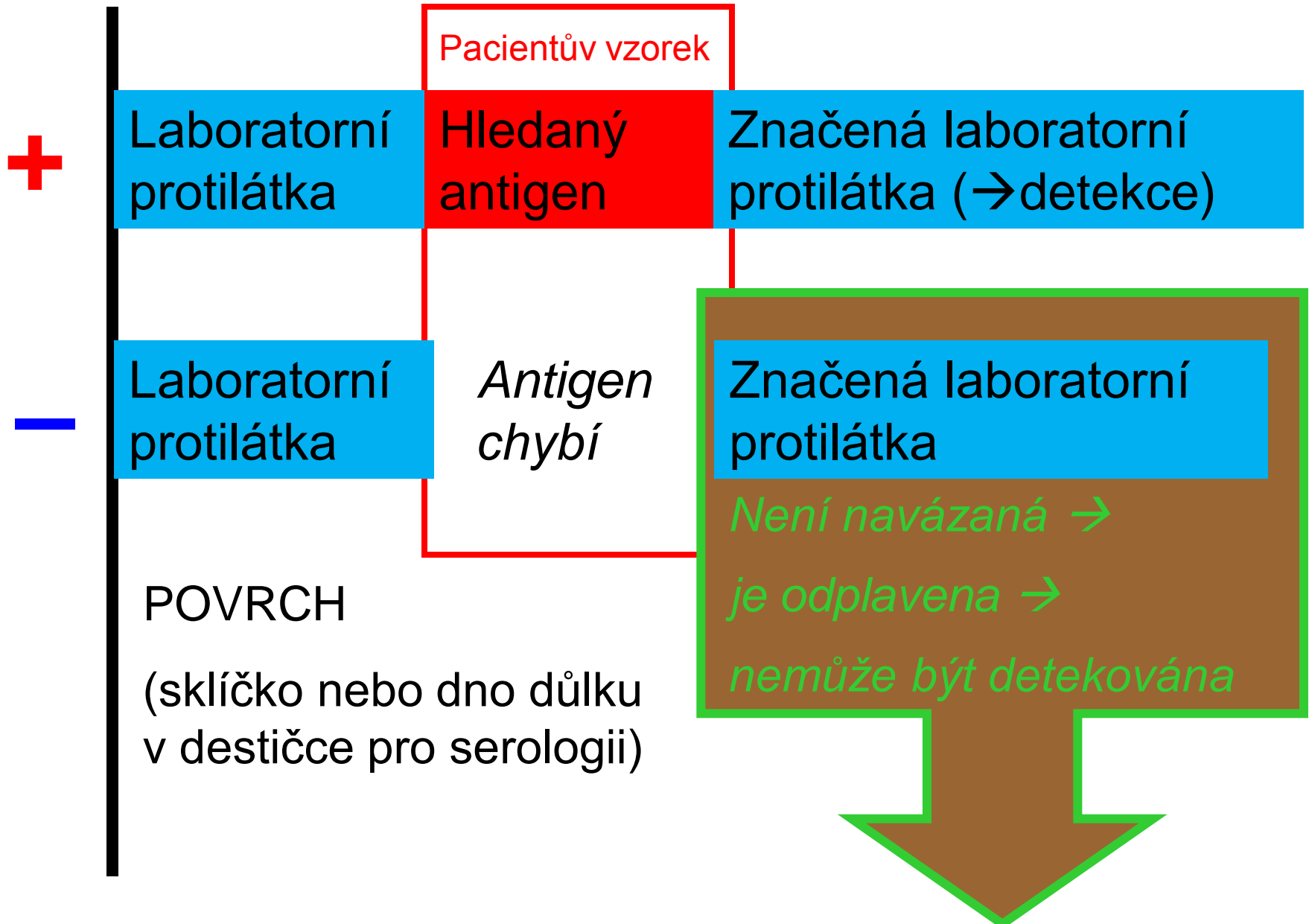
**4.**

**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**
- **Enzym** je značidlem u reakce **ELISA**

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

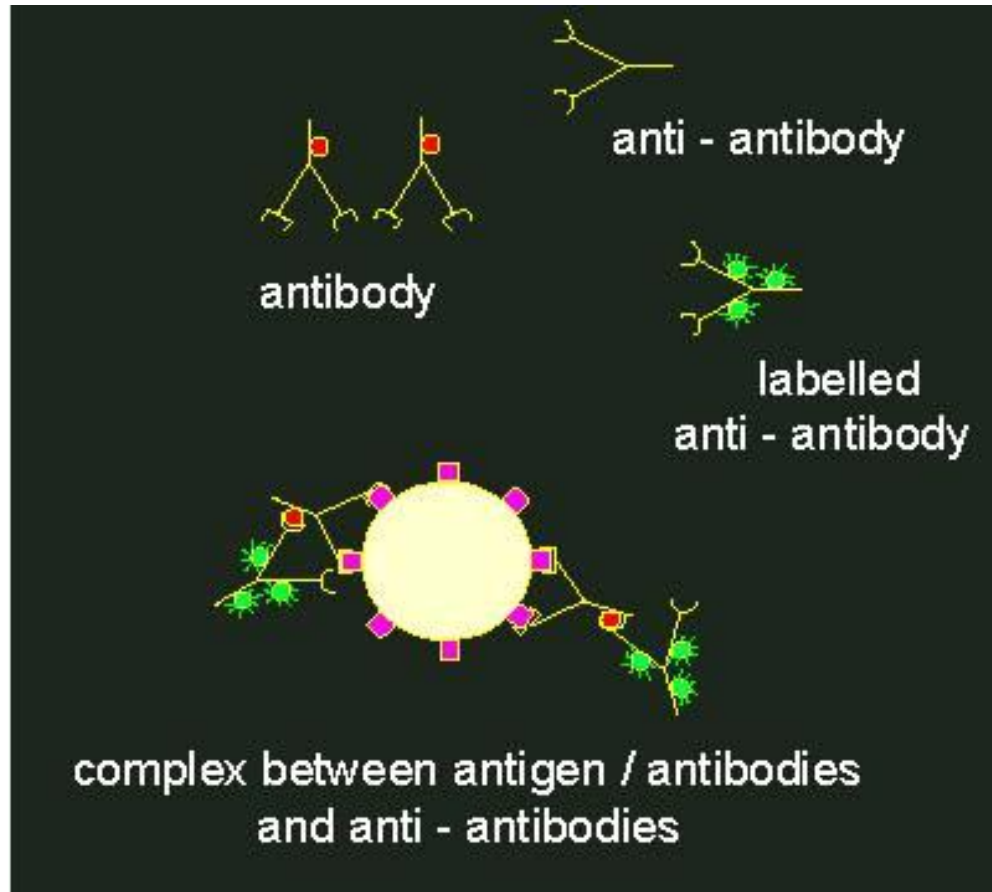


# Promytí a jeho význam

- 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

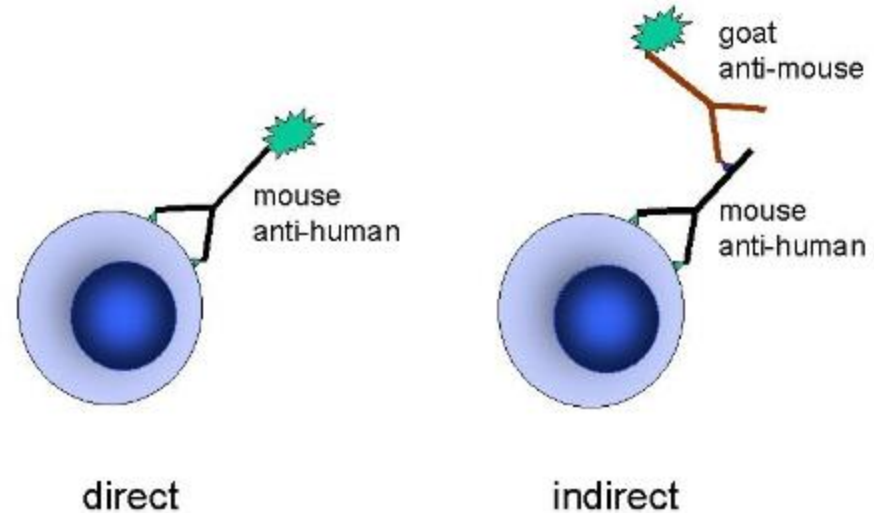
# I. Immunofluorescence

Odečítá se pomocí fluorescenčního mikroskopu



# přímá imuofluorescence

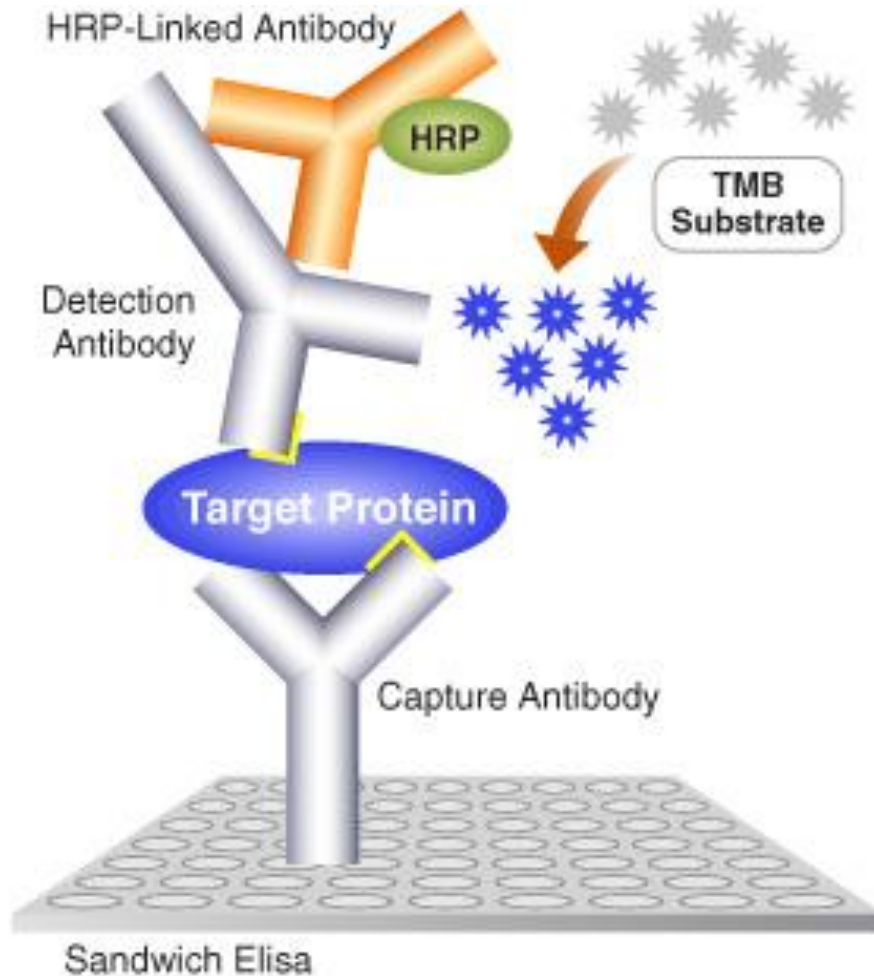
(Povrch)-(antigen)-(značená protilátka)



# nepřímá imunofluorescence

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

# II. ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

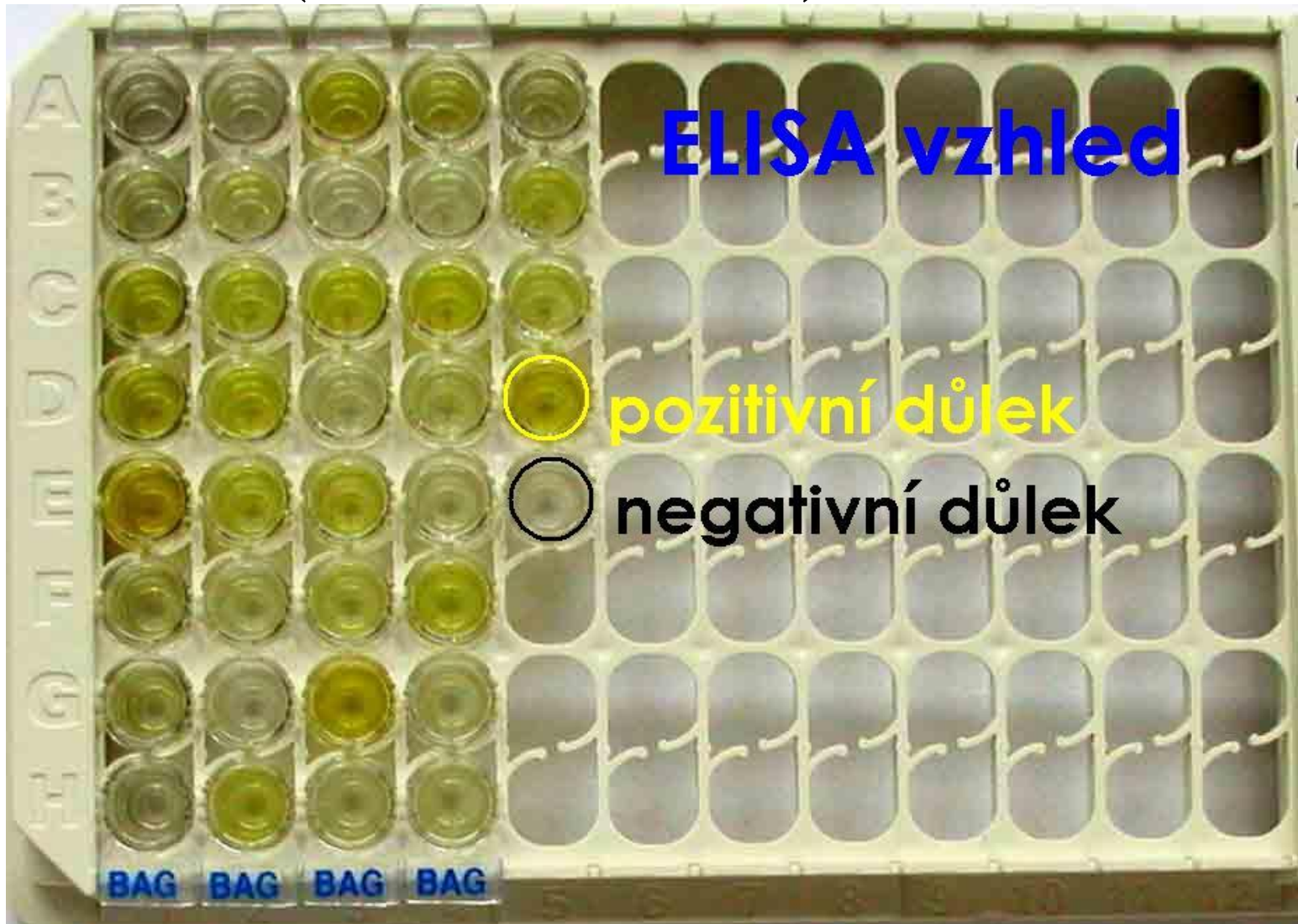


# ELISA – praktické provedení

- 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 %)
- 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.**

# ELISA – ukázka

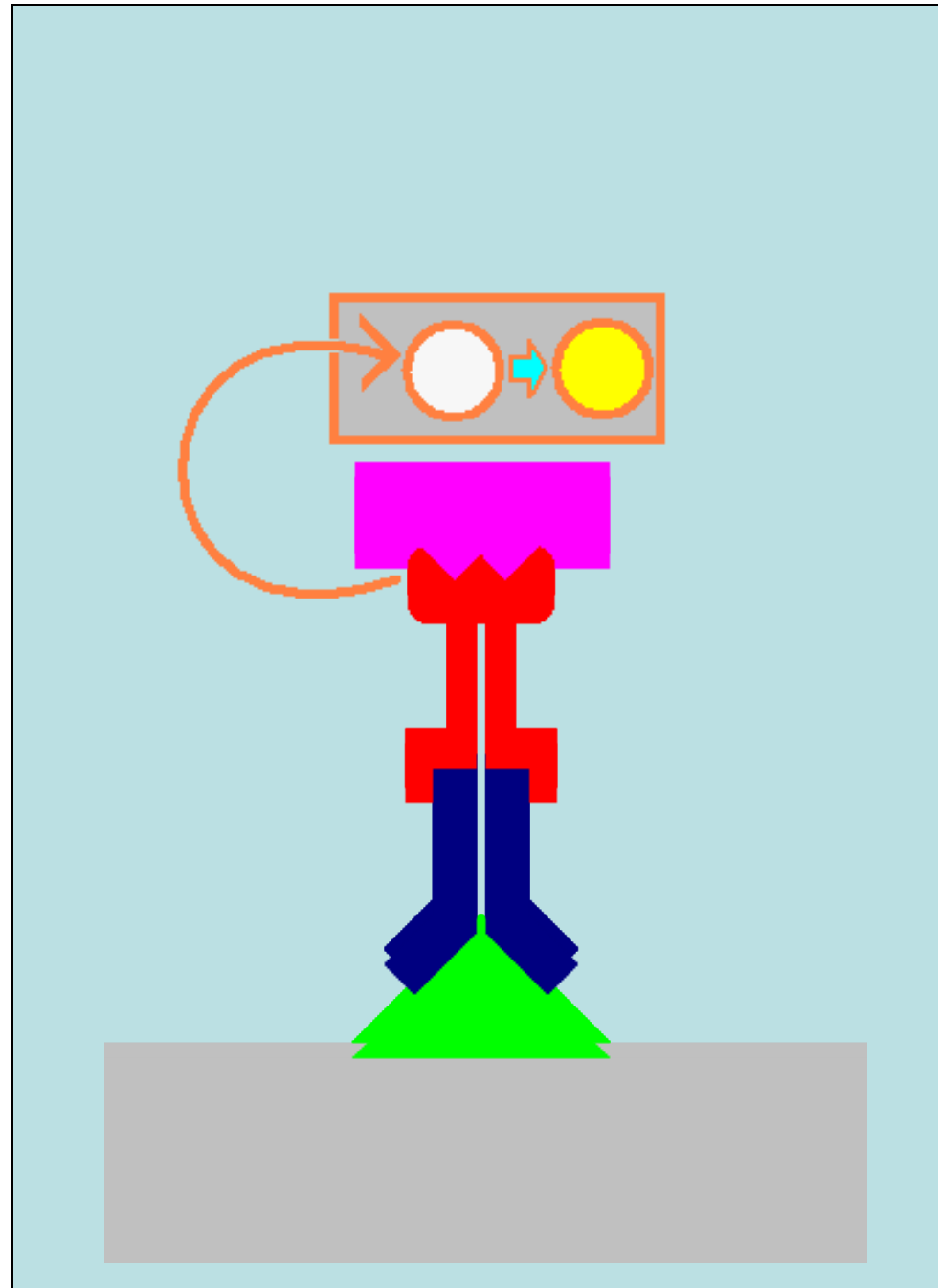
([www.medmicro.info](http://www.medmicro.info))



# ELISA k detekci protilátky:

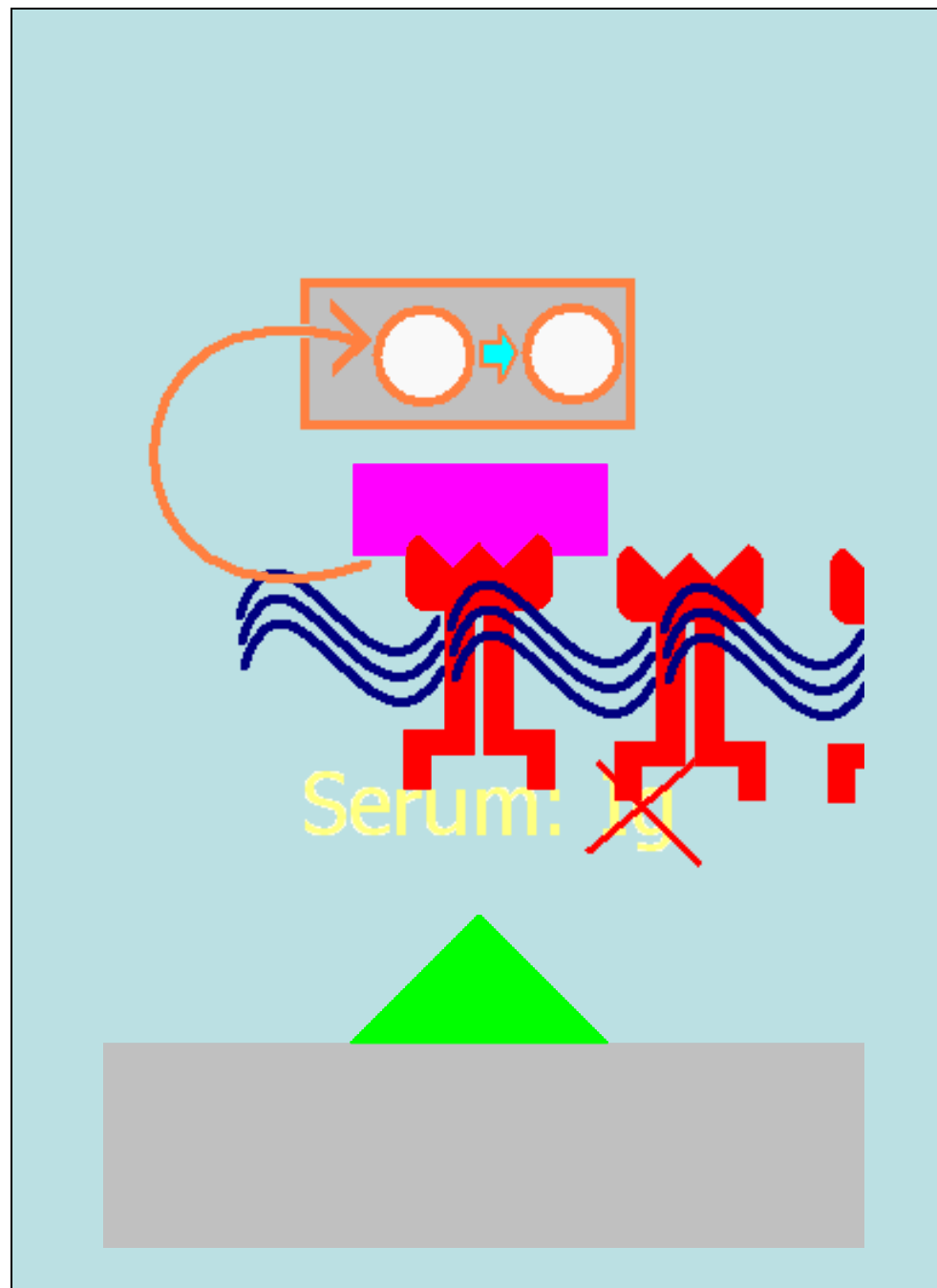
1. Pozitivní (hledá  
se IgM, IgM  
přítomna)

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.

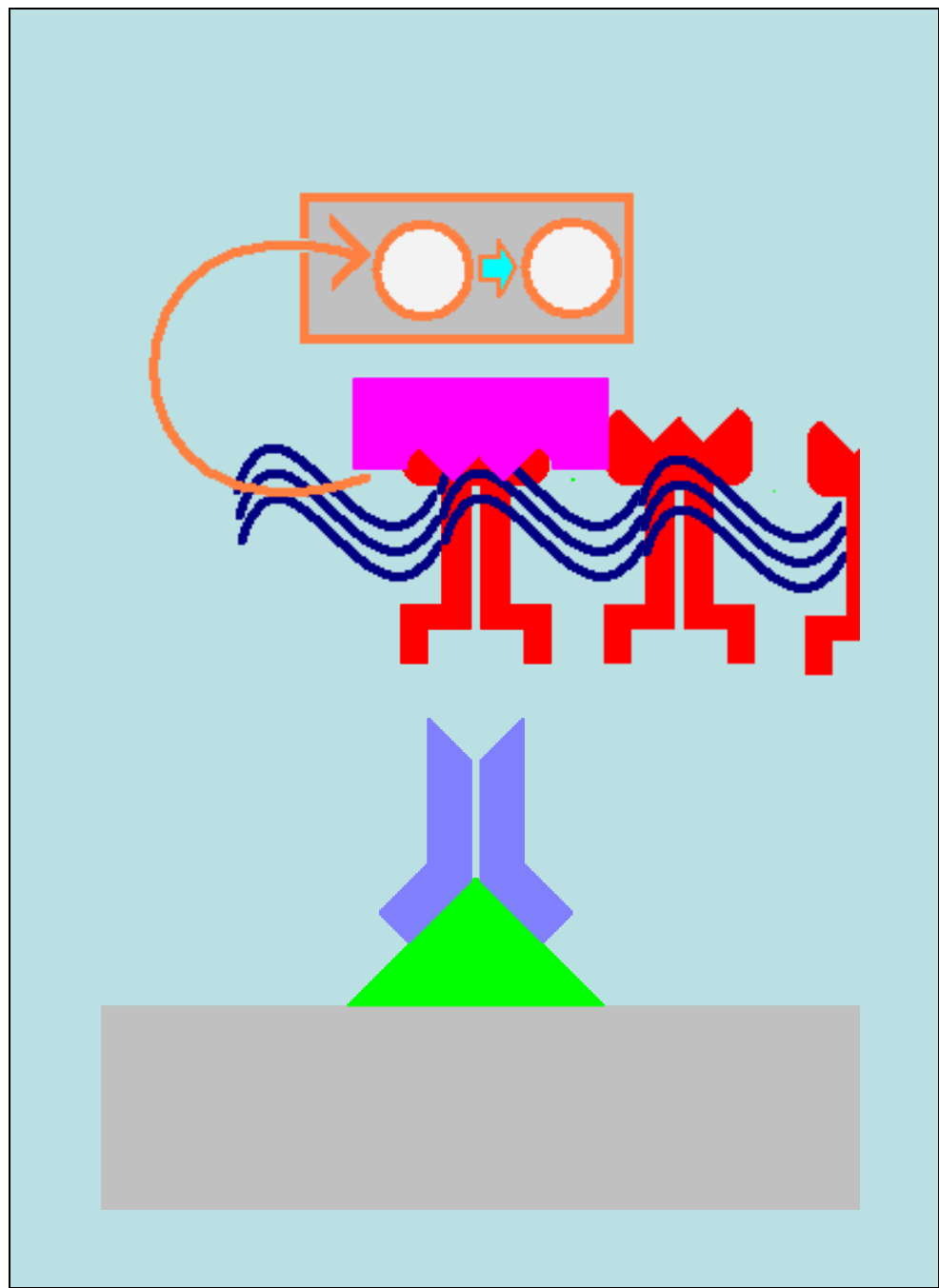




# ELISA k detekci protilátky:

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

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



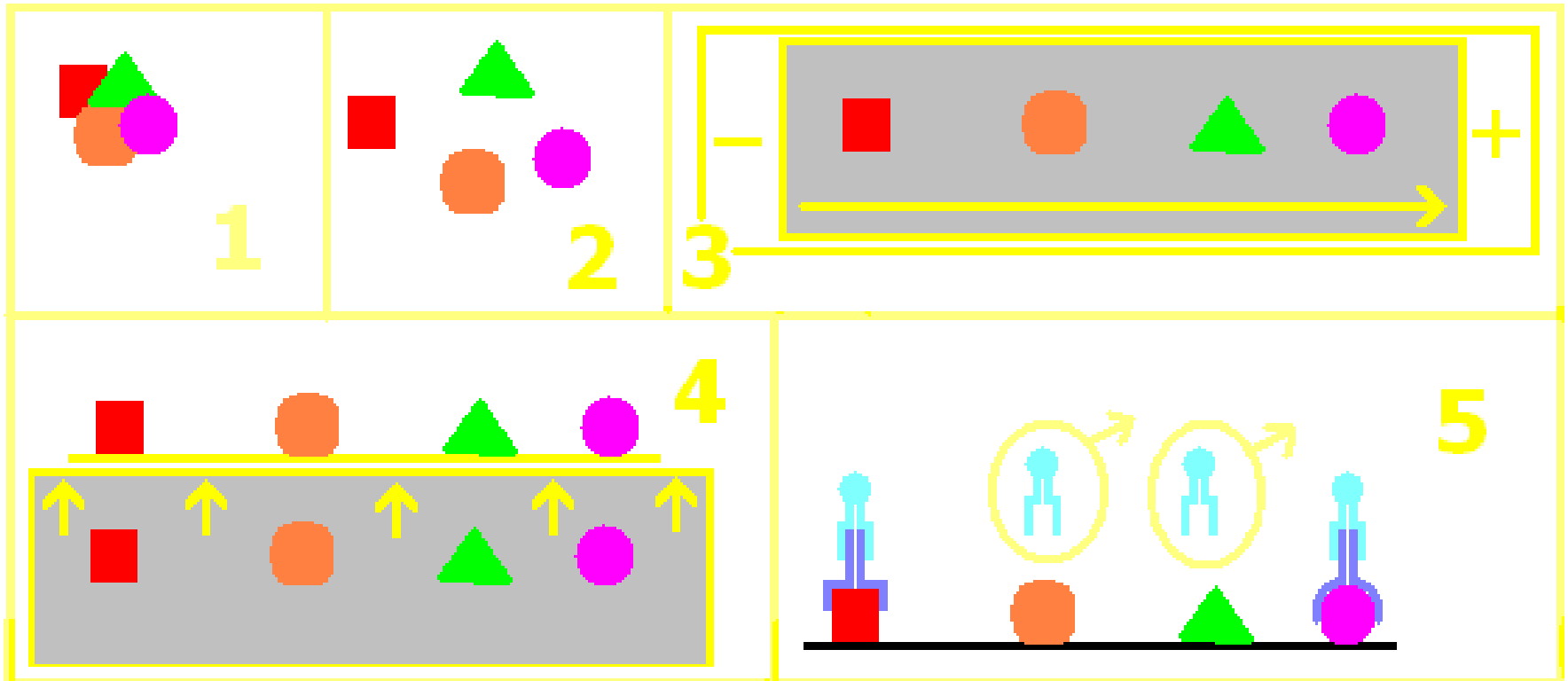
# 3. Western blotting

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

# Western blotting – princip

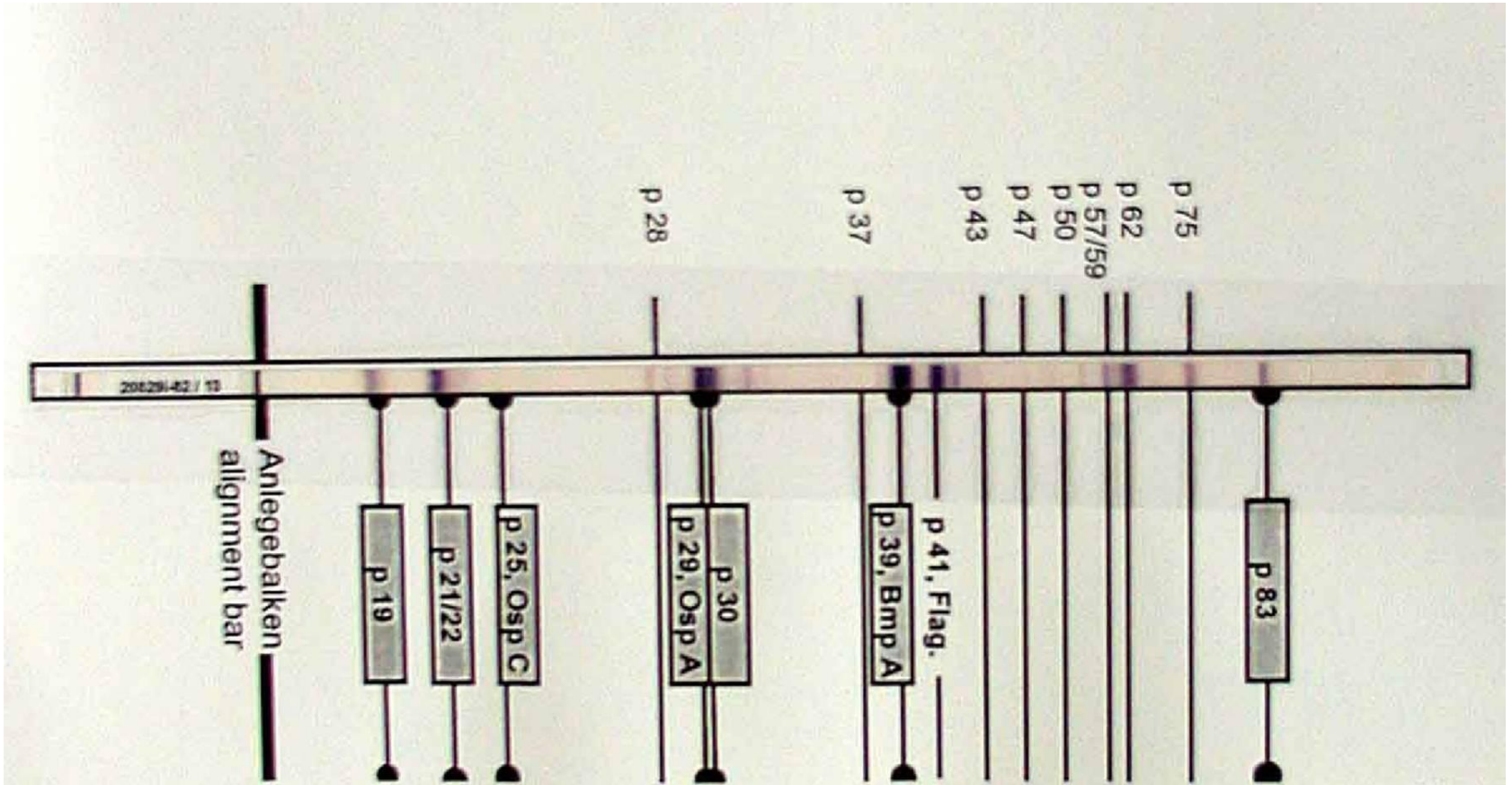
- 1: původní antigen (směs)
- 2: uvolnění jednotlivých antigenů detergentem
- 3: elektroforetické rozdělení antigenů

- 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*

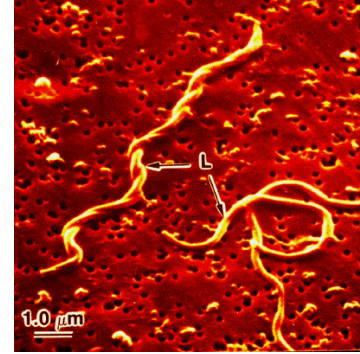
# Význam konjugátu

- **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**

P09

Spirochety

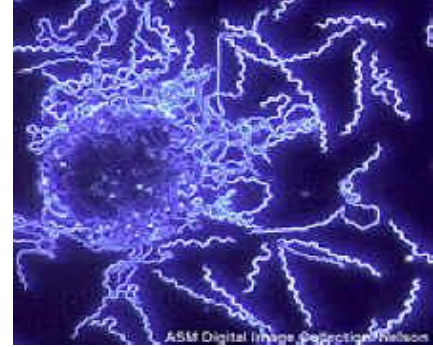
# Spirochety



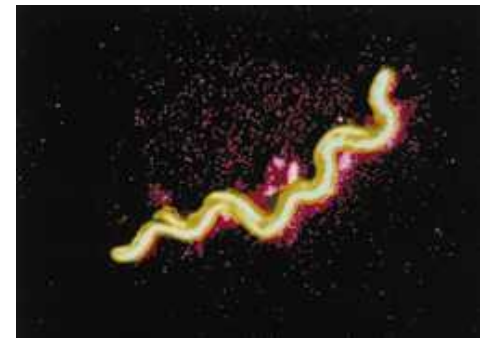
- Rod *Borrelia*, *Treponema*, *Leptospira*
- Spirální bakterie, pohyblivé pomocí intracelulárních bičíků
- Jejich buněčná stěna je blízká gramnegativní, ale podle Grama se nebarví
- Mikroskopovat je lze pouze pomocí zástinu, fluorescence anebo imunofluorescence
- Spirochety se obecně prakticky nedají kultivovat



# Borrelie

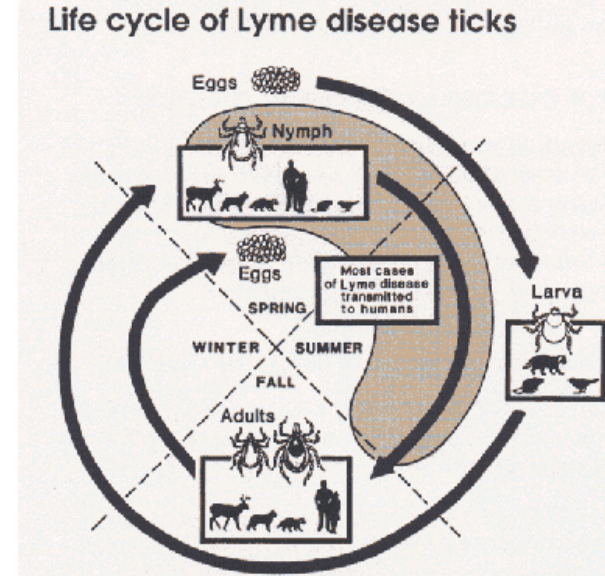


- Původci lymfské boreliózy (*Borrelia burgdorferi* sensu lato)
  - *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (postižení kloubů a myokardu)
  - *B. afzelii* (kožní příznaky)
  - *B. garinii* (neuroborelióza)
  - *B. lusitaniae*, *B. japonica*, *B. bissetti*
- Původci návratných horeček (*B. recurrentis*, *B. duttoni*, *B. hermsii*)



# Lymeská borelióza

- Zoonóza
- Přenos členovci, především klíšťaty (u nás *Ixodes ricinus*)
- Vakcína není k dispozici
- Protilátky nalézáme u 10 % zdravých osob
- Lék volby: peniciliny, tetracykliny



# Infekce probíhá ve 3 fázích:

## ➤ Časně lokalizované st.

- *erythema migrans*
- nespecifické příznaky

## ➤ Časně disseminované st.

- borreliový lymfocytom
- neurologické, revmatologické či kardiální projevy

## ➤ Pozdní st.

- *acrodermatitis chronica atrophicans*  
(končetiny, trup, obličej)

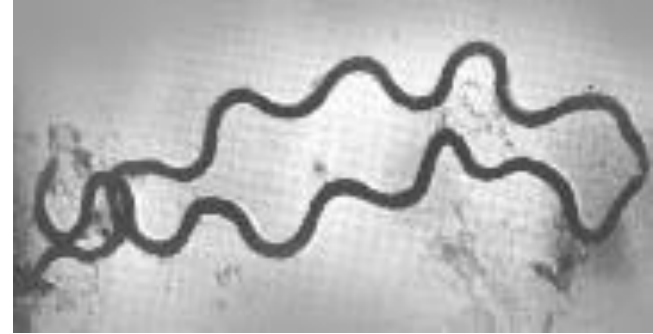


# Průkaz

## ➤ Borrelie:

- Především sérologie, popř. PCR
- Sérologii se stanovují IgM (svědčí pro časnou infekci) a IgG protilátky metodou ELISA
- Pozitivní nálezy se ověřuje Western blotem, ten je specifičtější metodou

# *Treponema pallidum*



- Původce syfilis (poddruh *T. pallidum* subsp. *pallidum*)
- Syfilis je klasická pohlavní nemoc, přenáší se výhradně sexuálně. Jde ovšem o systémové onemocnění – v pokročilých stádiích postihuje celé tělo postiženého člověka
- Některé poddruhy *T. pallidum* a některá jiná treponemata způsobují jiné choroby (framboesie – yaws, *T. pallidum* subsp. *pertenue*)
- Některá treponemata jsou i nepatogenní- na sliznicích dutiny ústní a genitálu

# Průběh syfilis

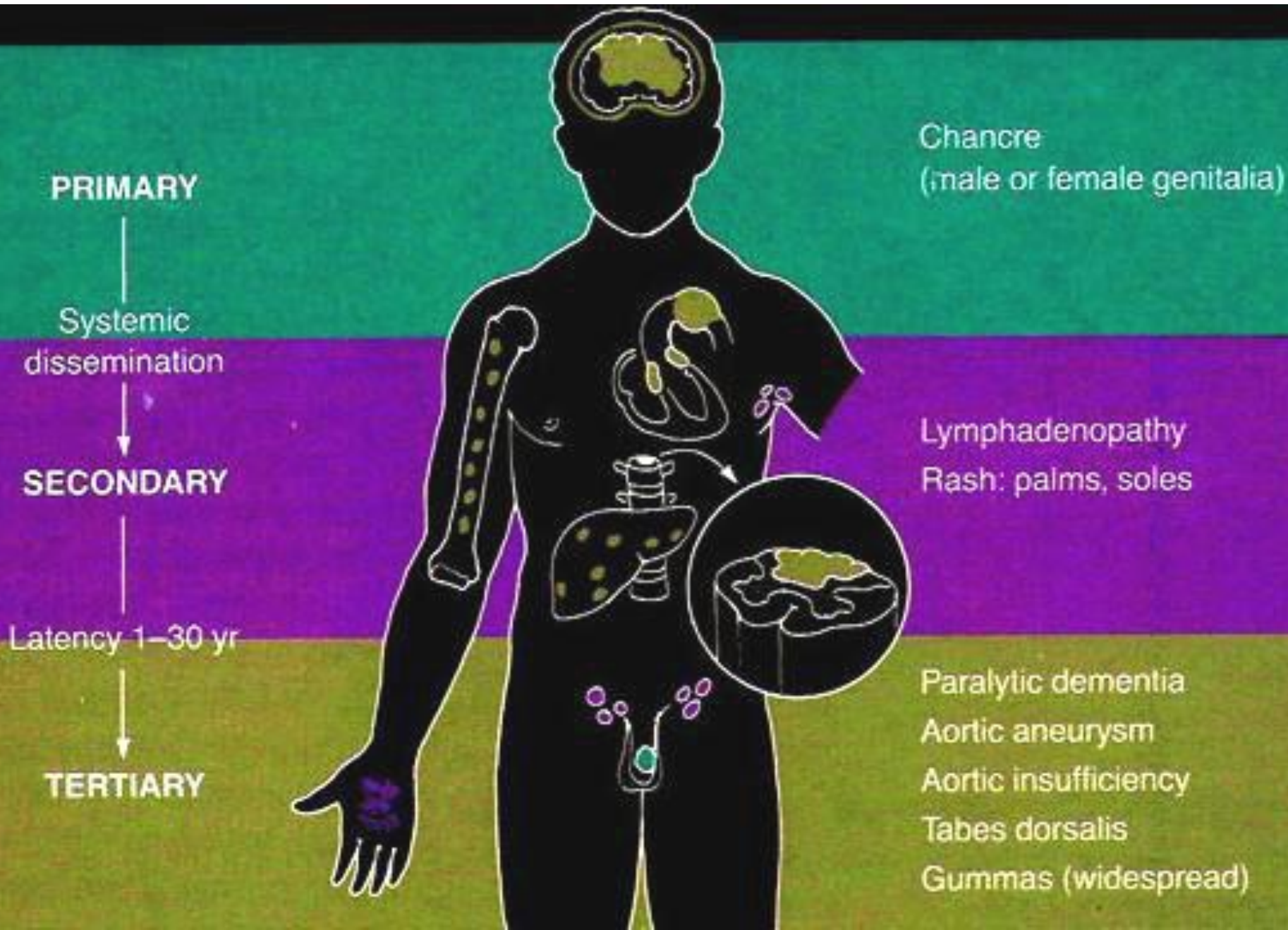
## ➤ Časná syfilis

- Primární syfilis (ulcerace na genitálu- tvrdý vřed)
- Sekundární syfilis (diseminace, nespecifické symptomy, generalizovaná vyrážka, condylomata lata)
- Časná latentní syfilis (asymptomatická, relapsy sekundární fáze)

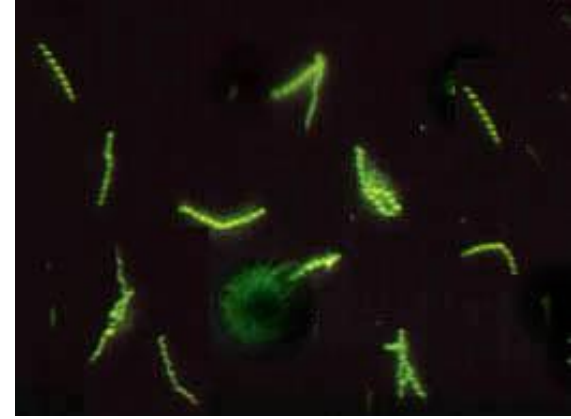
## ➤ Pozdní syfilis

- Latentní syfilis (cca 10-20 let)
- Terciární syfilis (gummata, kardiovaskulární lues, neurosyfilis)

## ➤ Vrozená syfilis



# Treponemata: přímý průkaz



- Přímý průkaz se dělá zřídka
- Mikroskopie: Používá se nativní preparát – zástin, mimo to lze provést fluorescenční barvení
- Kultivace ani biochemická identifikace se nepoužívají
- Průkaz antigenu lze provést přímou IMF
- Pokus na zvířeti: Existuje tzv. RIT – Rabbit infectivity test (test infekčnosti na králíkovi)
- PCR diagnostika se stává čím dál důležitější



# Treponemata: nepřímý průkaz

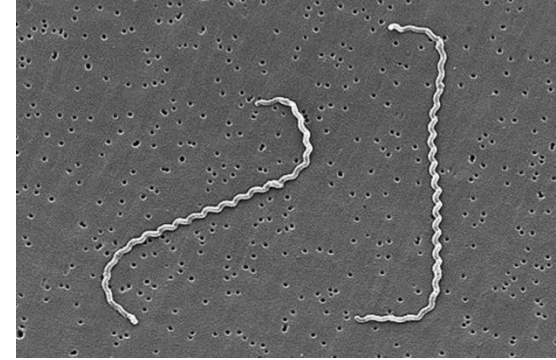
- Používají se **netreponemové testy**, kde antigenem je zpravidla kardiolipin a **treponemové testy**, kde antigen je získán opravdu z *Treponema pallidum*
- Diagnostika se skládá ze **screeningu a konfirmace**.  
Konfirmuje se vše, co ve screeningu vyšlo pozitivní či aspoň hraniční, a dokonce i to, co bylo negativní, je-li důvod
- Screeningově se zpravidla použije jeden netreponemový a jeden treponemový test, konfirmace se provádí pomocí velmi spolehlivých treponemových testů
- Indikací ke konfirmaci je:
  - jakýkoli pozitivní či alespoň hraniční výsledek screeningových testů
  - přítomnost suspektních lézí na těle, nebo anamnéza rizikového sexuálního styku – zde i v případě negativity obou reakcí

# Přehled nejdůležitějších nepřímých testů na lues

|              |                                   |                      |
|--------------|-----------------------------------|----------------------|
| Screeningové | RRR – Rapid Reagin Test           | Netr.<br>Treponemové |
|              | TPHA                              |                      |
| Konfirmační  | ELISA                             |                      |
|              | FTA-ABS (nepř. imunofluorescence) |                      |
|              | Western Blot                      |                      |

TPHA – *T. pallidum* pasivní hemaglutinační test

# Rod *Leptospira*

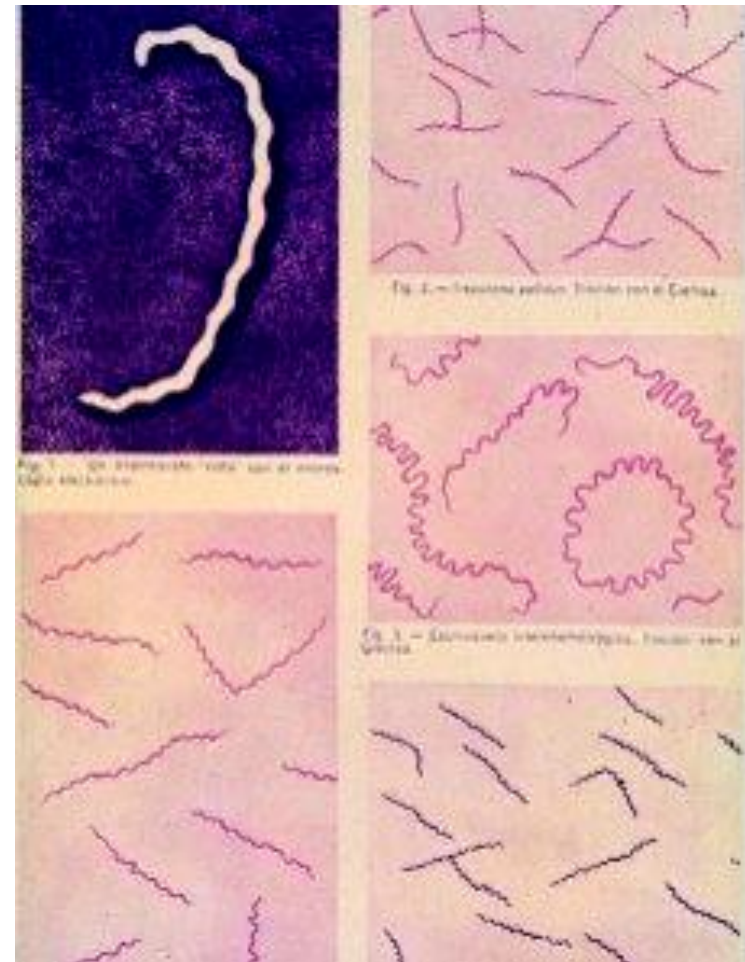


- Jemné pravidelné závity, na koncích háčkovitě ohnuté
- Způsobují zoonózy- tzv. leprospirózy, člověk se nakazí kontaktem s močí infikovaného zvířete (myšovití hlodavci, prase, skot)- koupání, konzumací kontaminované vody či potravy
- Příznaky mohou být různé, od „chřipkotyfových“ příznaků serovaru **Grippotyphosa (blat'ácká horečka)** až po žloutenku a krvácivé stavy (**Weilova choroba**) serovaru **Icterohemorrhagiae**

# Průkaz

## ➤ Leptospiry:

- Používá se zástinová mikroskopie a kultivace ve speciálním médiu



# Borreliie: úvod k úkolům 1 až 3

- Máme pět pacientů, kteří z různých důvodů přicházejí k vyšetření na borreliózu.
  - **Pacient J:** klinicky definované erythema migrans (jasný obraz, ne jen podezření)
  - **Pacient K:** cítí se ospalý, v létě měl klíště; jiné potíže nejsou přítomny
  - **Pacient L:** neurologové našli typické klinické příznaky neuroboreliózy
  - „**Pacient**“ **M:** zdravá osoba, ale v létě měl klíště, a cítí se ohrožen rizikem borreliózy, protože si přečetl o tomto riziku.
  - **Pacient N:** je u něj podezření na neuroboreliózu, avšak není to jasné

# Úkol 1: ELISA – Borrelia

- Průkaz protilátek proti *Borellia garinii*
- Máte k dispozici výsledky reakce ELISA ve formě hodnot absorbance
- Pozitivní jsou pacienti s hodnotami vyššími nežli hodnota v kalibračním důlku (CAL).  
Ten se nachází v pozici A1, B1 a C1 jsou kontroly
- Prověřte výsledky pacientů J, K, L, M, N ve třídách IgG i IgM

# Pacienti – ELISA, jak jdou po sobě jednotlivá čísla pacientů:

IgM

|         |    |    |    |    |
|---------|----|----|----|----|
| CA<br>L | 6  | J  | 22 | 30 |
| K+      | 7  | K  | 23 | 31 |
| K-      | 8  | L  | 24 | 32 |
| 1       | 9  | 17 | 25 | N  |
| 2       | 10 | 18 | 26 | 34 |
| 3       | 11 | 19 | 27 | 35 |
| 4       | 12 | 20 | 28 | 36 |
| 5       | 13 | M  | 29 | 37 |

IgG

|         |    |    |    |    |
|---------|----|----|----|----|
| CA<br>L | 6  | J  | 22 | 30 |
| K+      | 7  | K  | 23 | 31 |
| K-      | 8  | L  | 24 | 32 |
| 1       | 9  | 17 | 25 | N  |
| 2       | 10 | 18 | 26 | 34 |
| 3       | 11 | 19 | 27 | 35 |
| 4       | 12 | 20 | 28 | 36 |
| 5       | 13 | M  | 29 | 37 |

# Úkol 2: Borrelie – confirmace WB

- Konfirmují se pouze pacienti pozitivní v reakci ELISA, nebo indikovaní z klinických důvodů. V našem případě jsou to však všichni pacienti J, K, L, M, N (všichni byli v reakci ELISA pozitivní, s výjimkou pacienta J, který však má erythema migrans, takže je bez ohledu na negativitu ELISA indikován ke confirmaci).
- Pozitivita WB je definována následovně:
  - u IgM považuje pozitivita v pruhu p 25, OspC
  - u IgG považuje pozitivita v pruhu VlsE
- Odečtete tedy výsledky IgG i IgM u našich pacientů.



# Úkol 3: Borrelie – PCR

- PCR je reakce přímého průkazu, je tedy průkaznější než hledání protilátek, zvláště u čerstvé infekce
- K reakci PCR jsou indikováni z našich pacientů pouze pacienti L a N.
- Zjistěte, který pacient je pozitivní
- Interní kontroly tentokrát nebyly použity

# Závěr k úkolům 1 až 3

- **J:** Nutno léčit doxycyklinem (i přesto, že je seronegativní, klinické příznaky jsou dostatečně pádným důvodem k léčbě)
- **K:** Zřejmě jen paměťové protilátky, nutná další diferenciální diagnostika
- **L:** Skutečně jde o neuroboreliózu
- **M:** Pacient je v pořádku (kdysi možná prodělal bezpříznakovou borreliózu, 10 % populace má pozitivní IgG)
- **N:** pozitivní IgM v ELISA nepotvrdil WB ani PCR, zřejmě zkřížená reakce, nutno pátrat po jiných neuroinfekcích

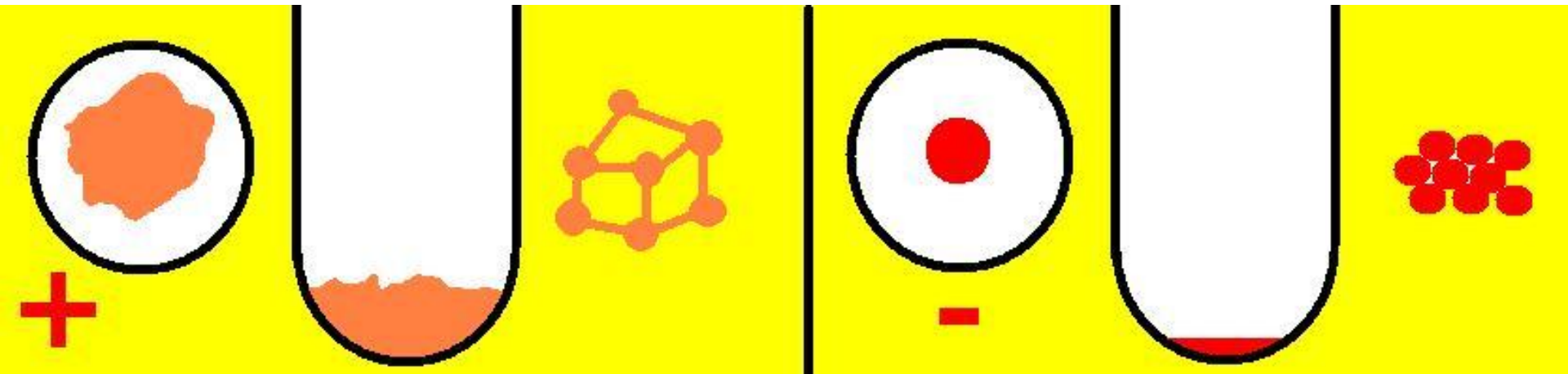
# Úkoly 5 a 6: Serologie syfilis (screening a konfirmace )

- V úkolu 5 vybereme ze screeningových pacientů ty, které je třeba konfirmovat
- V úkolu 6 potvrdíme jejich diagnózu a učiníme konečný závěr
- Pracujeme s pěticí pacientů:
  - A = těhotná žena (běžný screening, není zvýšené riziko syfilis)
  - B = pacient s dva dny trvající lézí, která vypadá jako ulcus durum
  - C = pacient se suspektní lues latens
  - D = dárce krve (pouhý screening)
  - E = dítě s pravděpodobnou vrozenou syfilis

# Úkol 5: RRR a TPHA

- U RRR je pozitivní důlek se zákallem (vypadá podobně jako pozitivní kontrola)
- TPHA: Prohlédněte si panel na bočním stole. Vyhodnocení pacientů A, B, C, D, E proved'te dle obrázku na následující obrazovce

# TPHA



- Pozitivní – vzniká aglutinát, při pohledu shora chuchvalec nepravidelného tvaru
- Negativní – klesají na dno a vytvářejí denzní pravidelnou kulatou tečku při pohledu shora

# TPHA

Pozitivní kontrola (různá míra positivity)

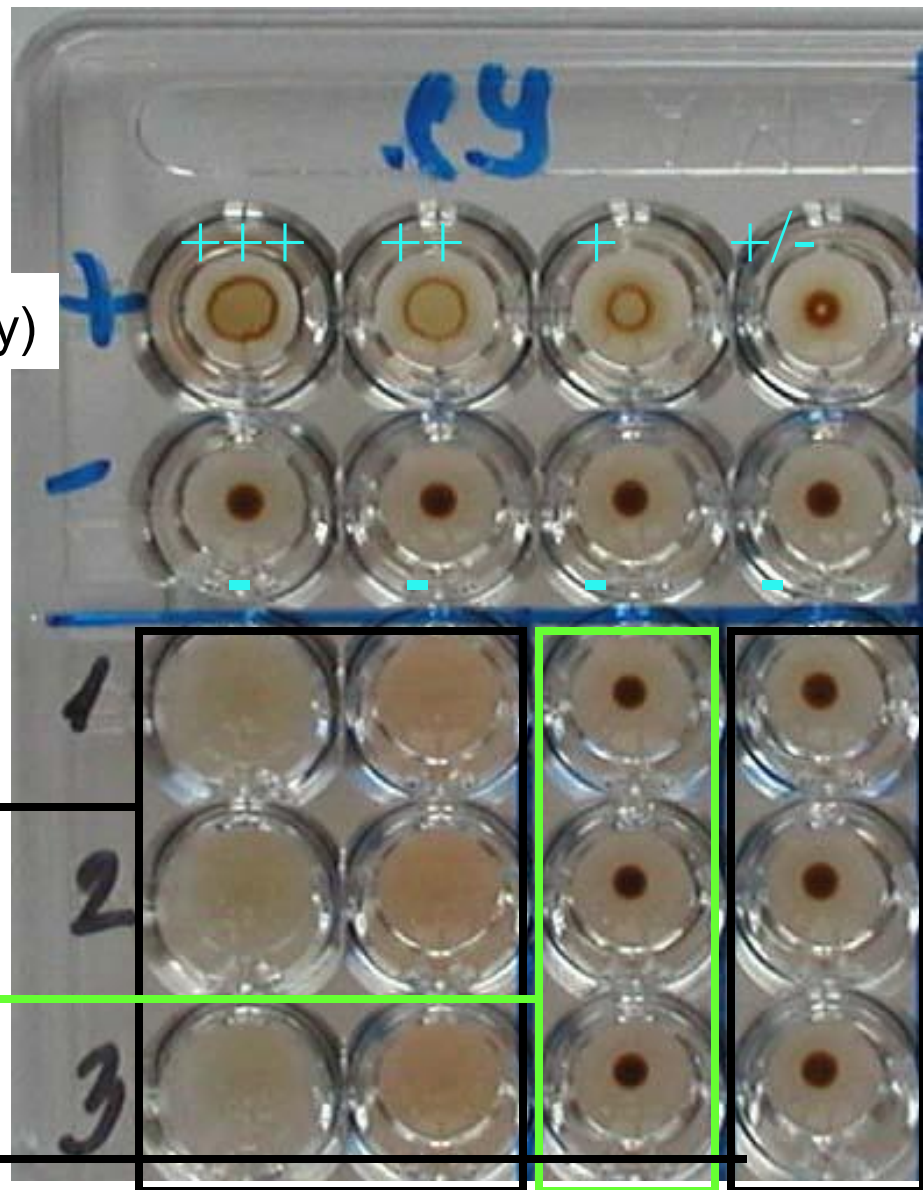
Negativní kontrola

Pacienti (1, 2, 3)

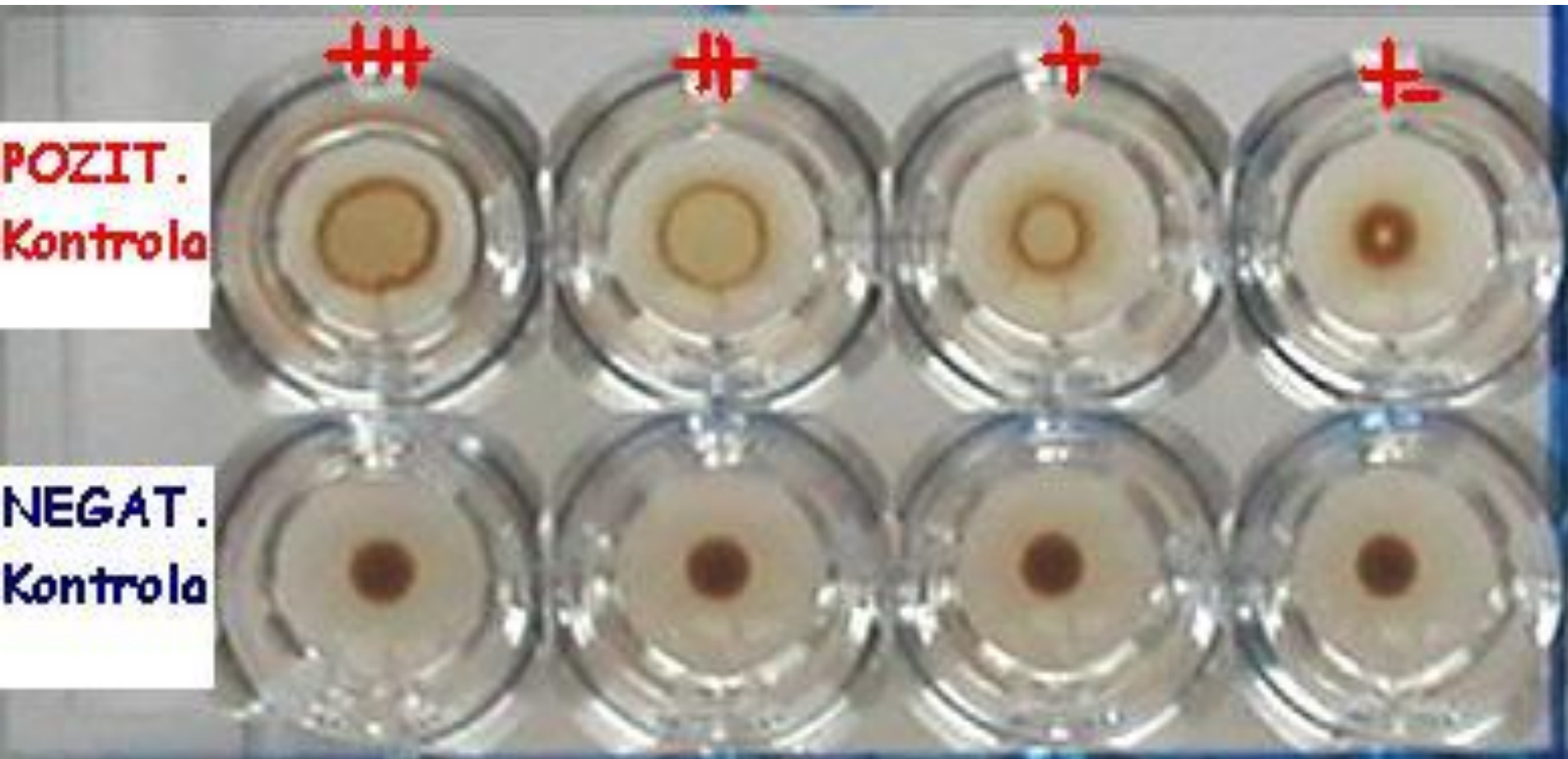
Technické důlky

**Kontrola**

Vlastní reakce



# TPHA – hodnocení:



# Výsledky – screening

|   | RRR | TPHA | závěr                    |
|---|-----|------|--------------------------|
| A | +   | 0    | konfirmasiace            |
| B | 0   | 0    | konfirmasiace*           |
| C | 0   | +++  | konfirmasiace            |
| D | 0   | 0    | konfirmasiace není nutná |
| E | +   | +++  | konfirmasiace            |

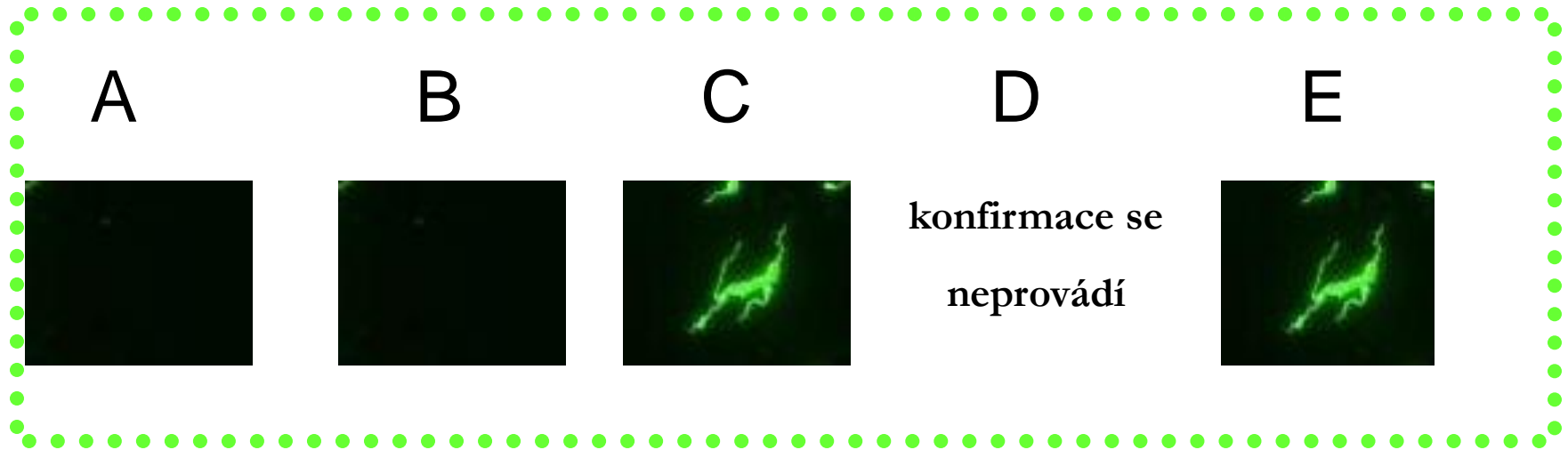
*\*Výsledek je sice negativní, ale konfirmační reakce budou provedeny s ohledem na klinickou situaci*



# Úkol 6: Konfirmace syfilis

## Konfirmační reakce I

Výsledky reakce FTA-ABS:



# Konfirmační reakce II

## ➤ **Hodnocení ELISA reakce:**

- Nejprve spočítejte cut off a nahrad'te otazníky
- **c. o. = (C1 + D1)/2**
- IgG: Hodnoty vyšší než ??? jsou pozitivní
- IgM: Hodnoty vyšší než ??? jsou pozitivní

## ➤ **Hodnocení Western blottu**

- Za pozitivní v IgG i v IgM považujte všechny pásy, na kterých umístění a uspořádání proužků zhruba odpovídá pozitivní kontrole

# Výsledky - confirmace

|   | FTA-ABS                   | IgM   |    | IgG   |    | Závěr  |
|---|---------------------------|-------|----|-------|----|--|
|   |                           | ELISA | WB | ELISA | WB |  |
| A | 0                         | 0     | 0  | 0     | 0  | Nejde o lues. Asi falešně + (např. po očkování)        |
| B | 0                         | 0     | 0  | 0     | 0  | PCR nutné. U čerstvé inf. je možná seronegativita      |
| C | +                         | 0     | 0  | +     | +  | Opravdu jde o lues latens, jak se přepokládalo.        |
| D | konfirmasiace neprovedena |       |    |       |    | Dárce je v pořádku                                     |
| E | +++                       | +     | +  | +     | +  | Jde o kongenitální syfilis. Vyšetříme také krev matky. |