

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)

Serologické reakce

Reakce mezi antigenem a protilátkou *in vitro*

Antigen = makromolekula pocházející z cizího organismu: rostliny, mikroba, jiného živočicha.

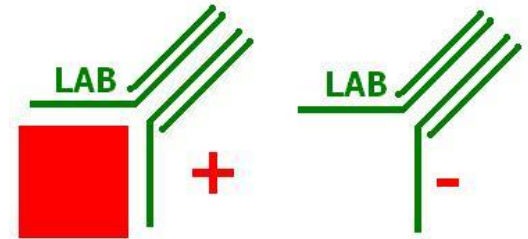
V mikrobiologii nás zajímají **mikrobiální antigeny** = části mikrobiálního těla, které vzbuzují v hostiteli antigenní odpověď

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

Dva způsoby, jak využít interakci mezi antigenem a protilátkou:

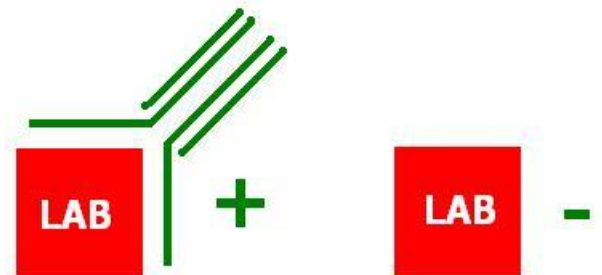
Průkaz antigenu: laboratorní protilátky (zvířecího původu) + vzorek pacienta nebo kmen mikroba.

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



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

Titr

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

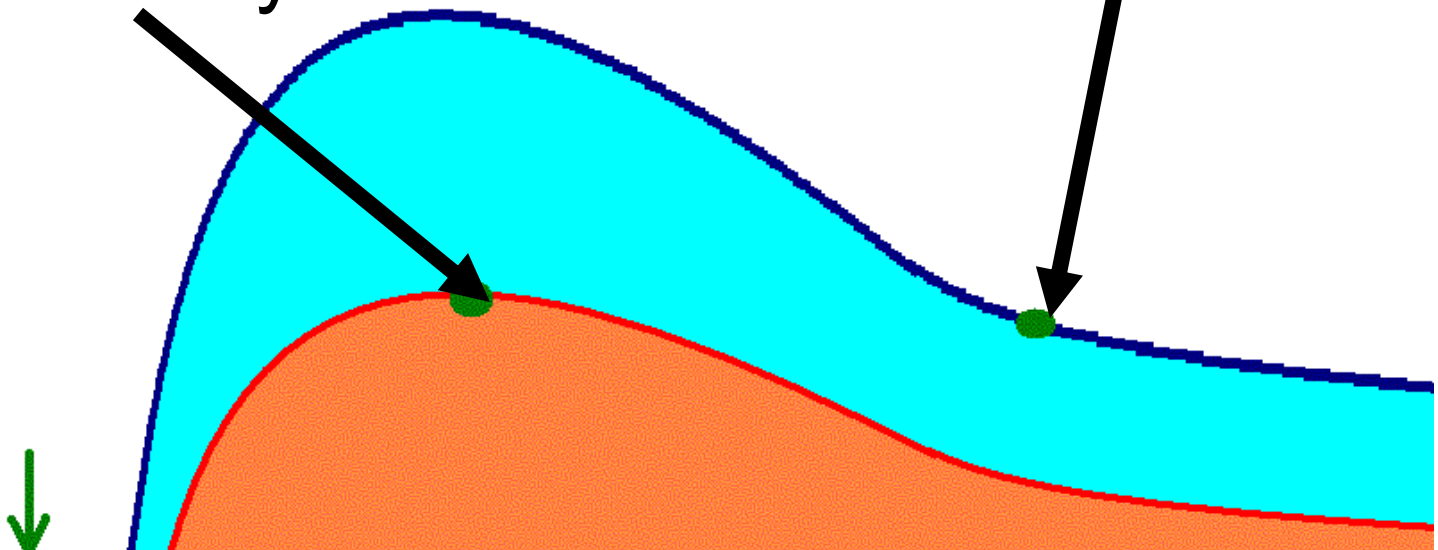
Dynamika titru

- 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.*

1.

**PRECIPITACE, AGLUTINACE,
AGLUTINACE NA NOSIČÍCH**

Precipitace a aglutinace

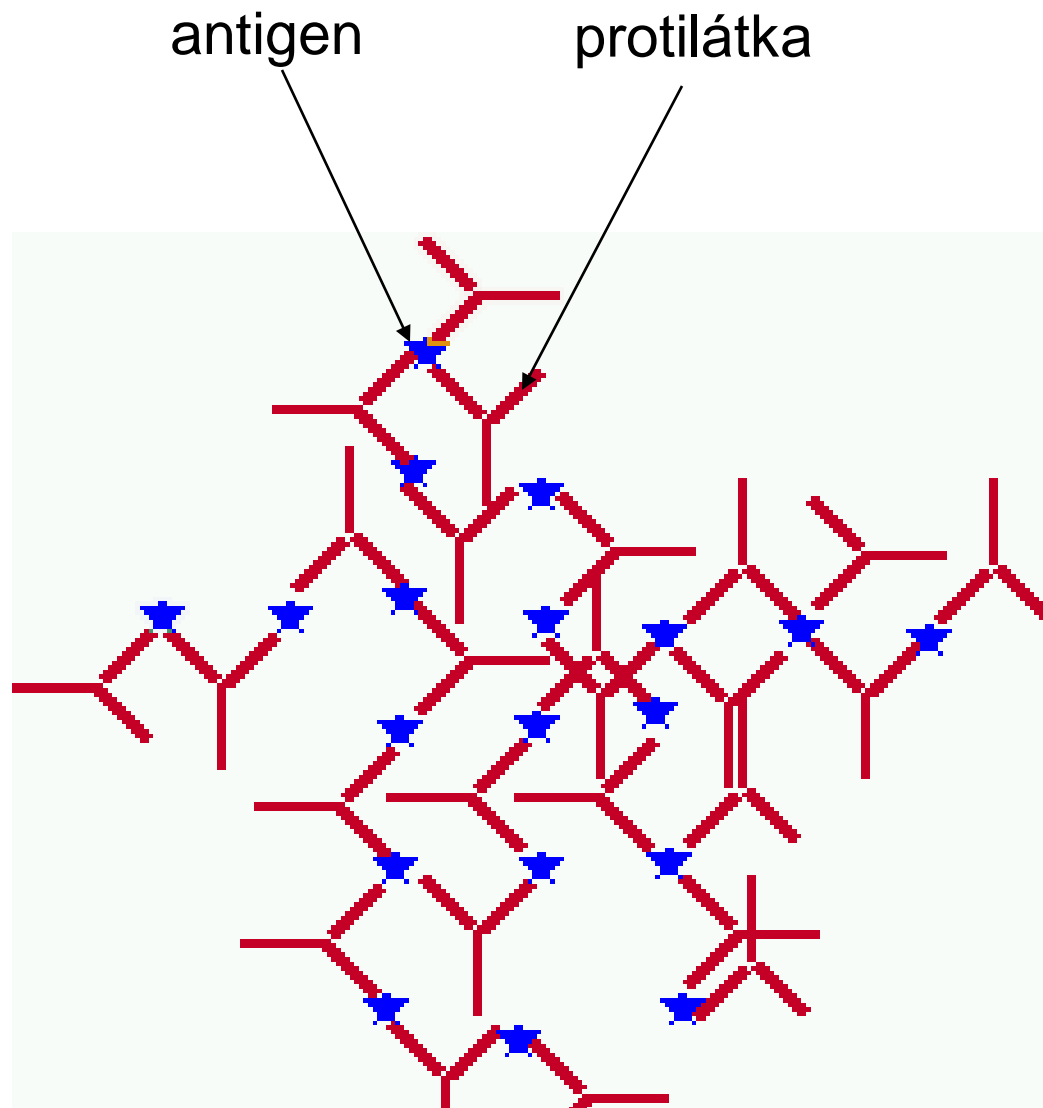
- Precipitace a aglutinace jsou dvě **nejjednodušší serologické reakce**, kde pracujeme opravdu jen s antigenem a protilátkou bez dalších složek
- Buďto tedy dokazujeme **antigen** zvířecí protilátkou, nebo **protilátku** laboratorním antigenem
- **Pouze ve druhém případě zjišťujeme titry!**

Precipitace:

Antigeny jsou
ve formě

izolovaných
makromolekulu
I (jde tedy o

**koloidní
antigen)**

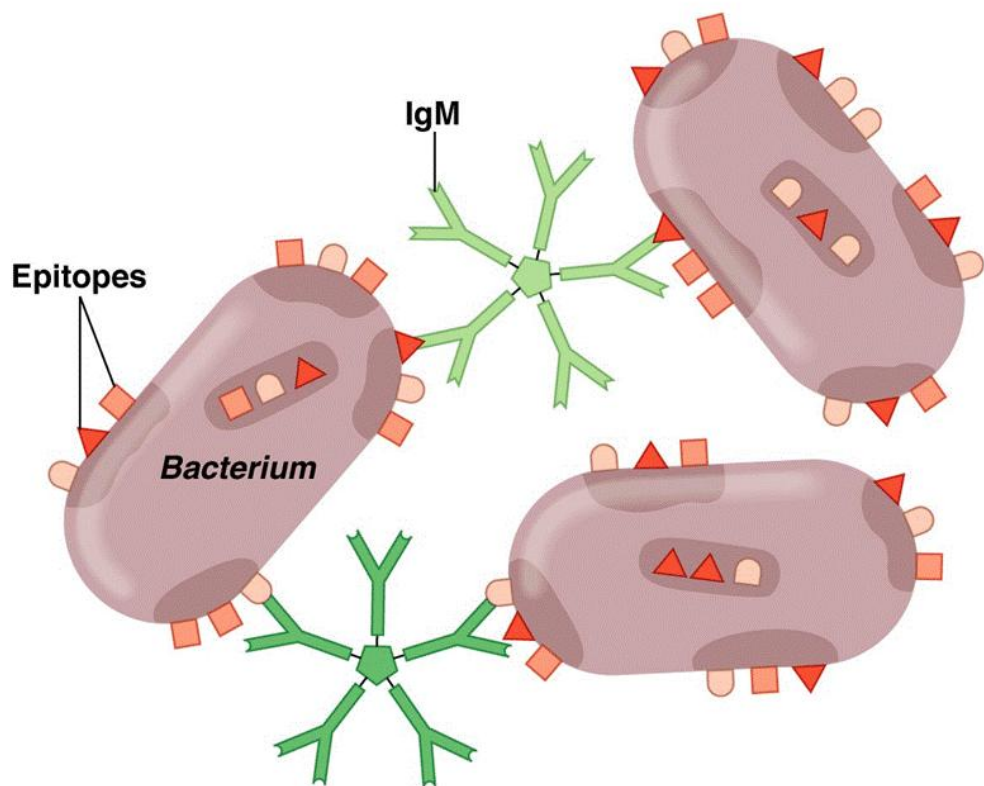


Aglutinace:

Antigen je
součástí buňky
mikroba

(pracujeme
tedy s celými
mikroby,
říkáme, že

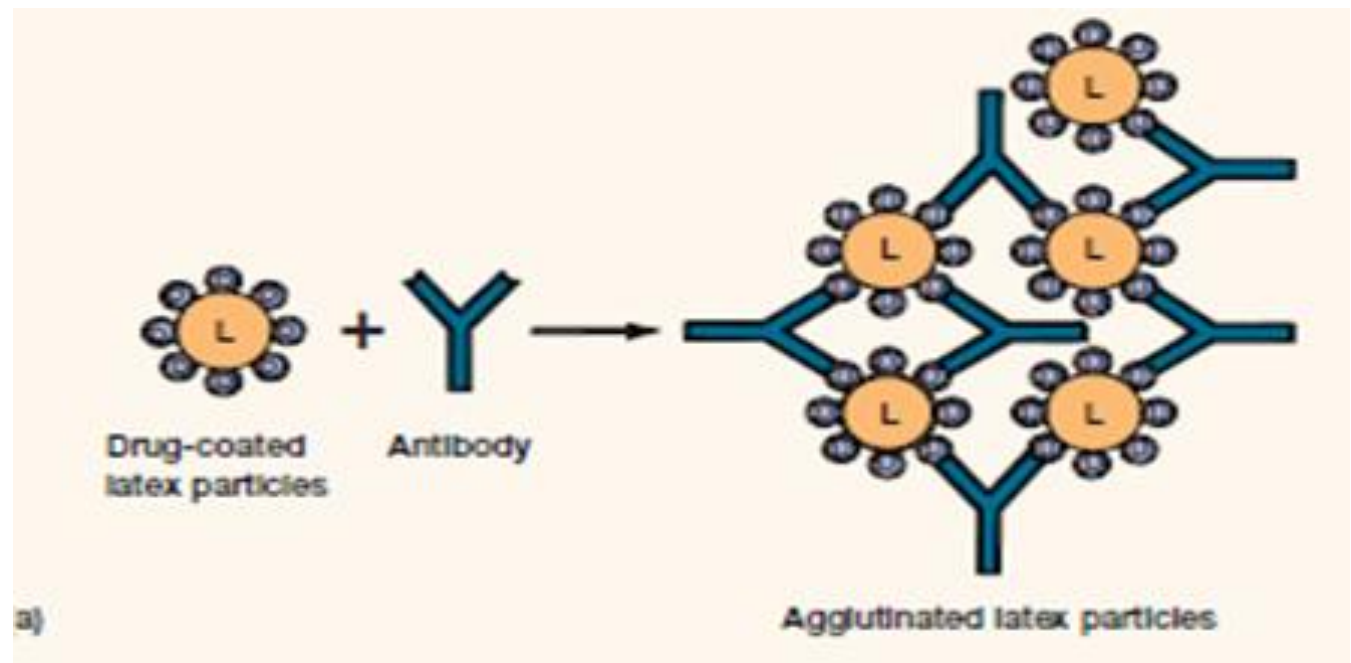
**antigen je
korpuskulární)**



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

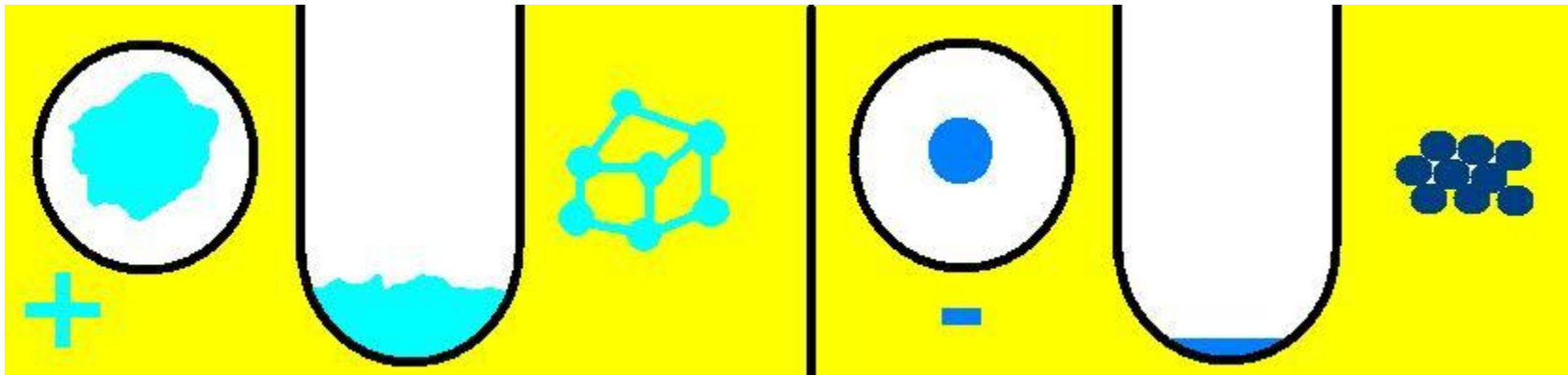
Figure 18.5

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



Aglutinace

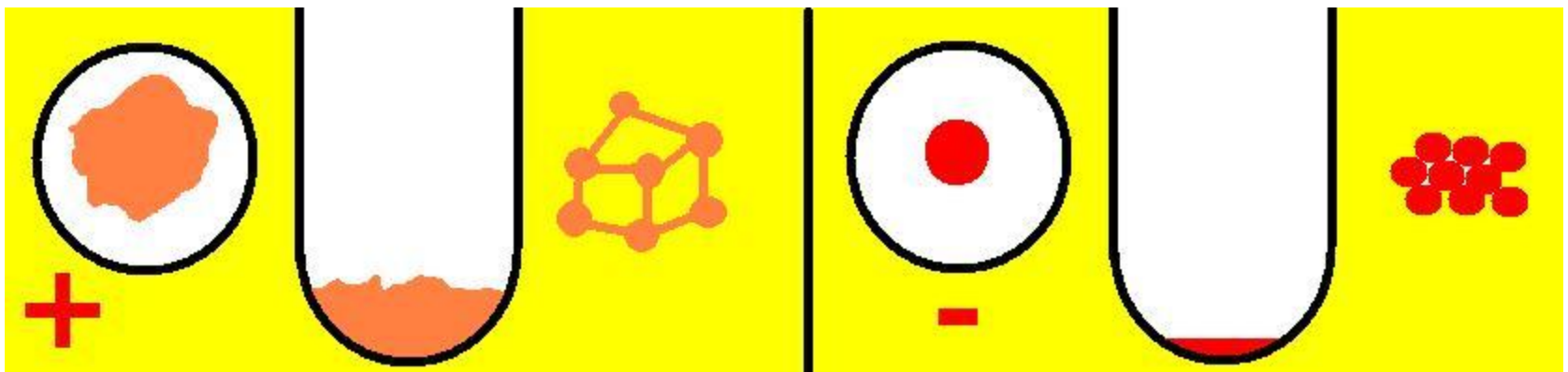
- Pozitivní – nepravidelný chuchvalec
- Negativní – malé pravidelné kolečko



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



TPHA

Pozitivní kontrola (různá míra positivity)

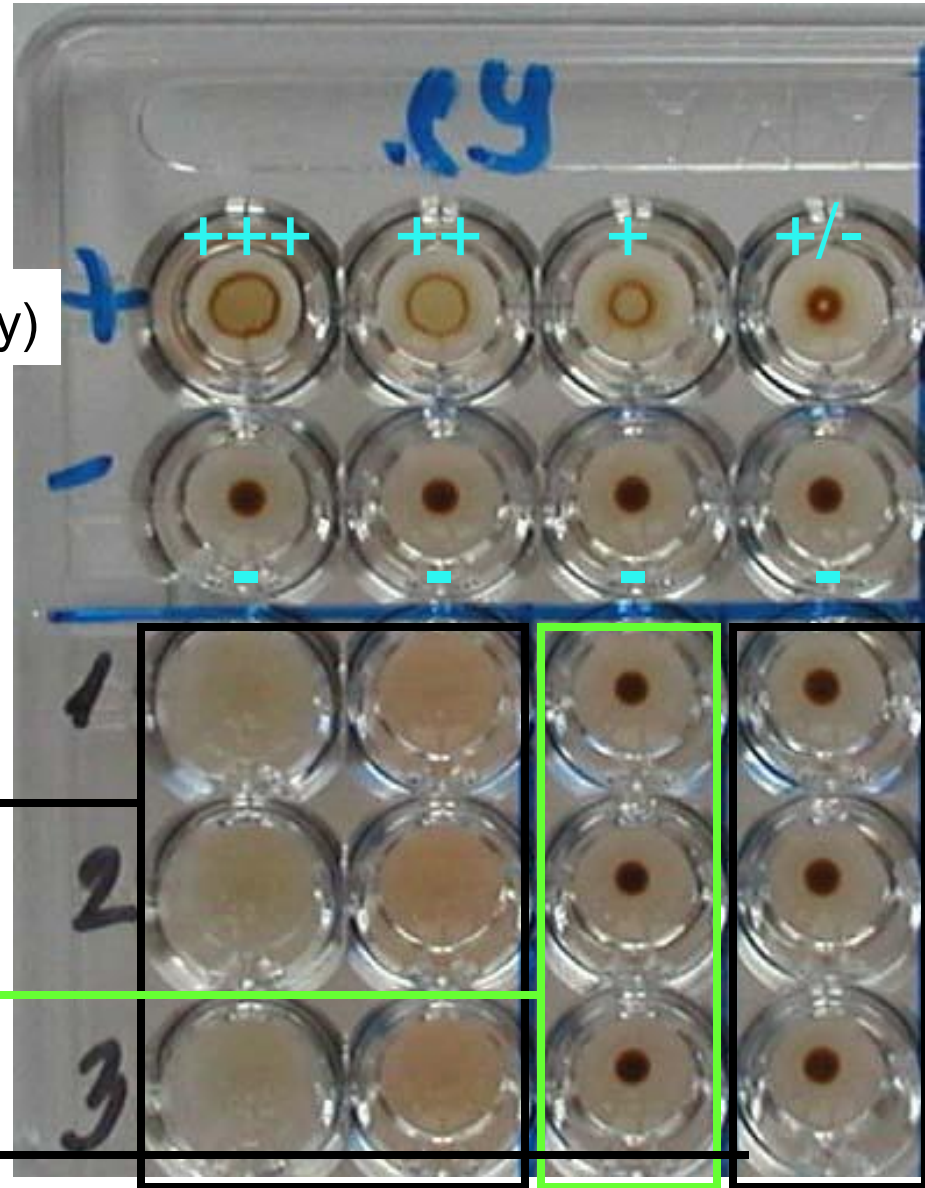
Negativní kontrola

Pacienti (1, 2, 3)

Technické důlky

Kontrola

Vlastní reakce



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**

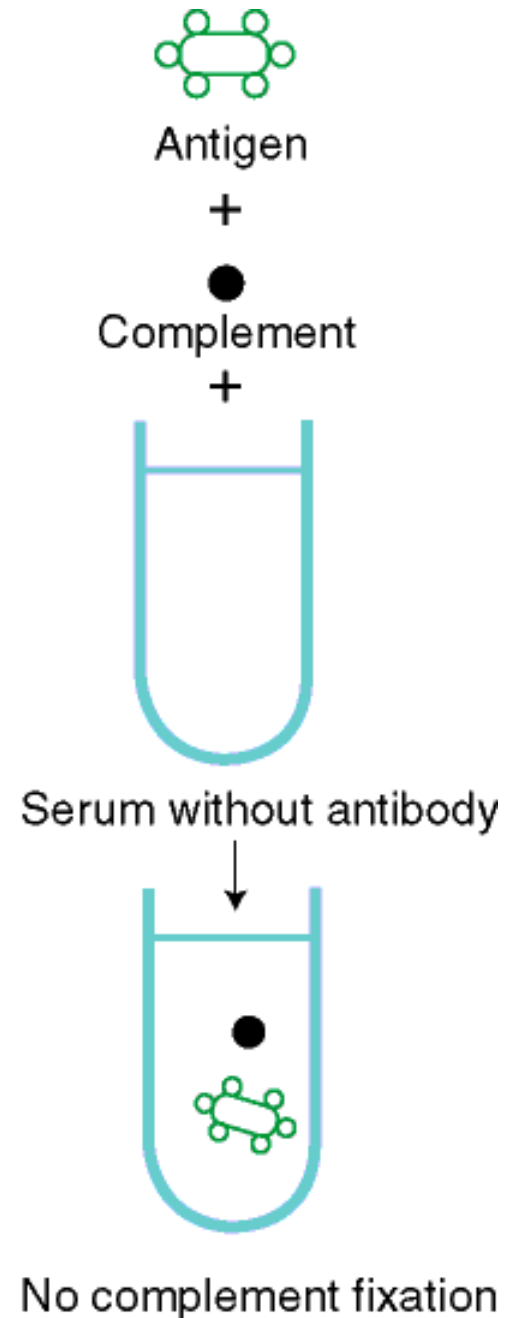
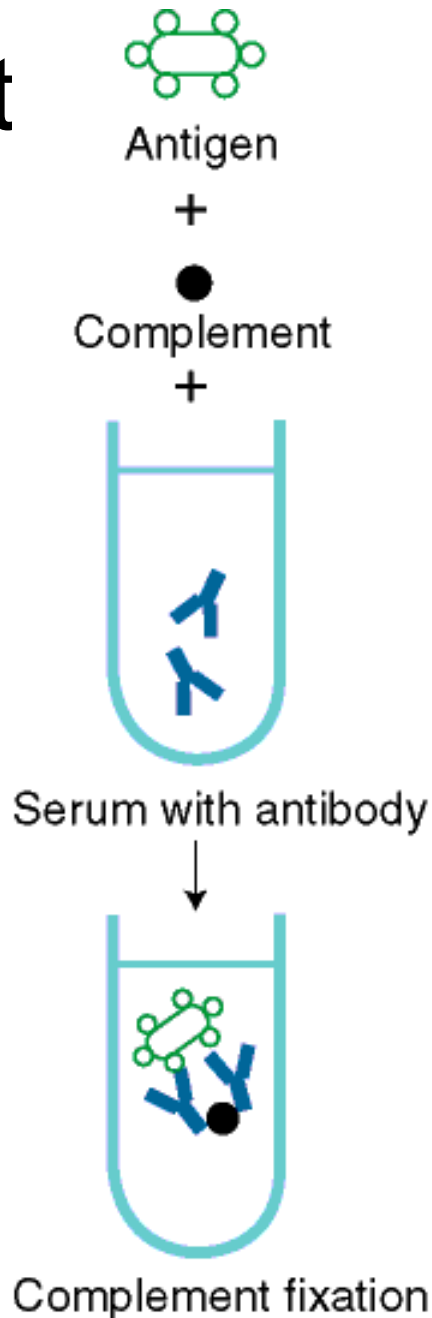
Použití KFR

- 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)

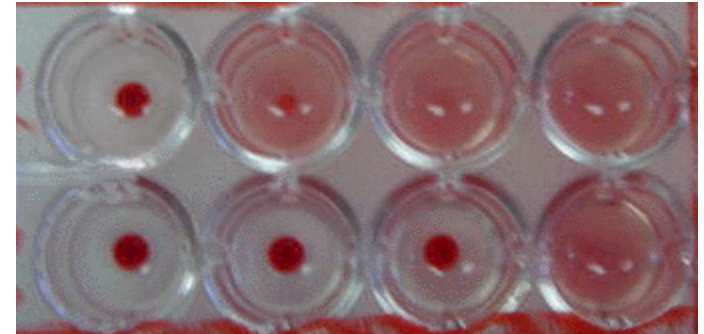
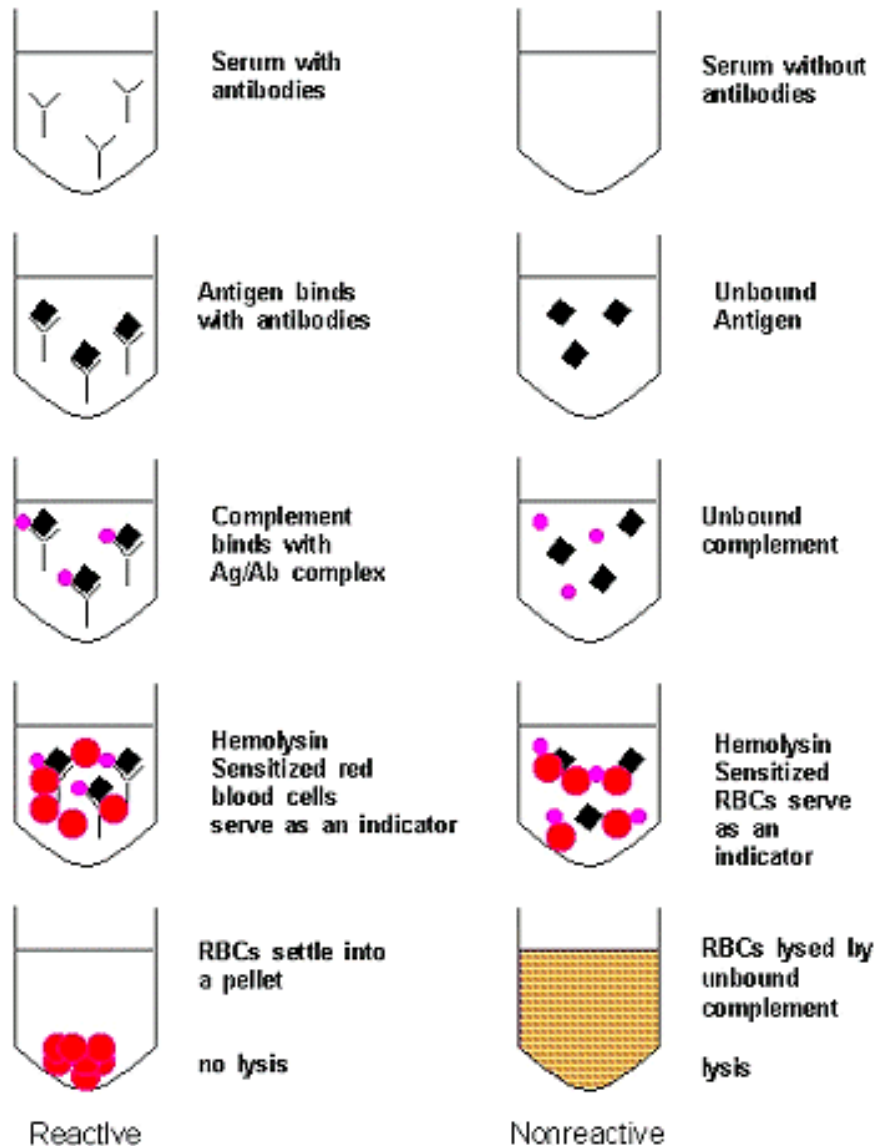
Princip KFR

- 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**

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

ASLO (antistreptolyzin O)

- 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 patogenu, určujeme samotné protilátky
- Indikací k vyšetření je podezření na tzv. pozdní následky streptokokových infekcí (akutní glomerulonefritida a revmatická horečka)

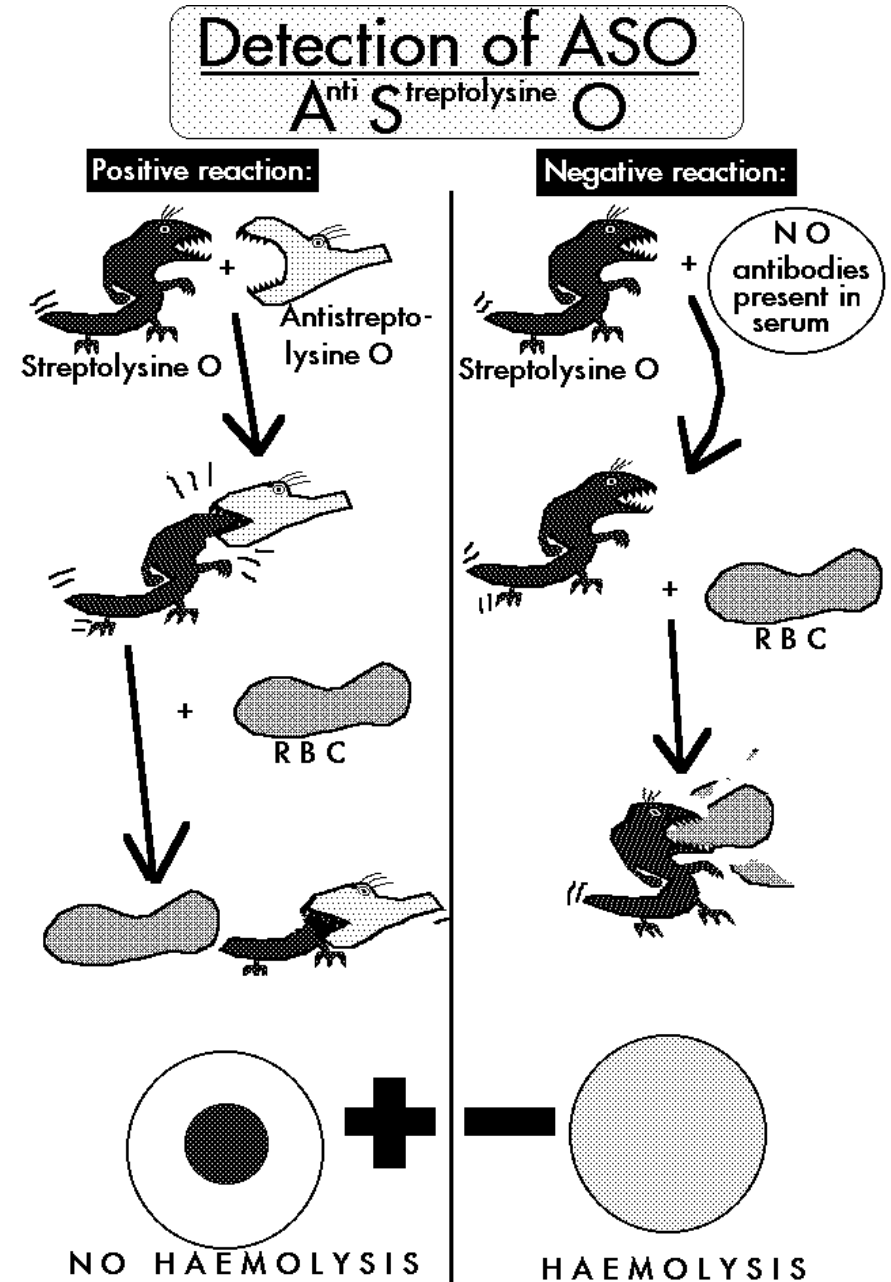
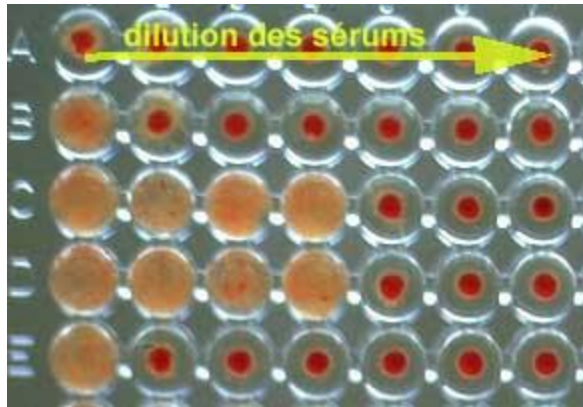
ASLO- princip

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

Princip vyšetření ASLO: neutralizace hemolýzy



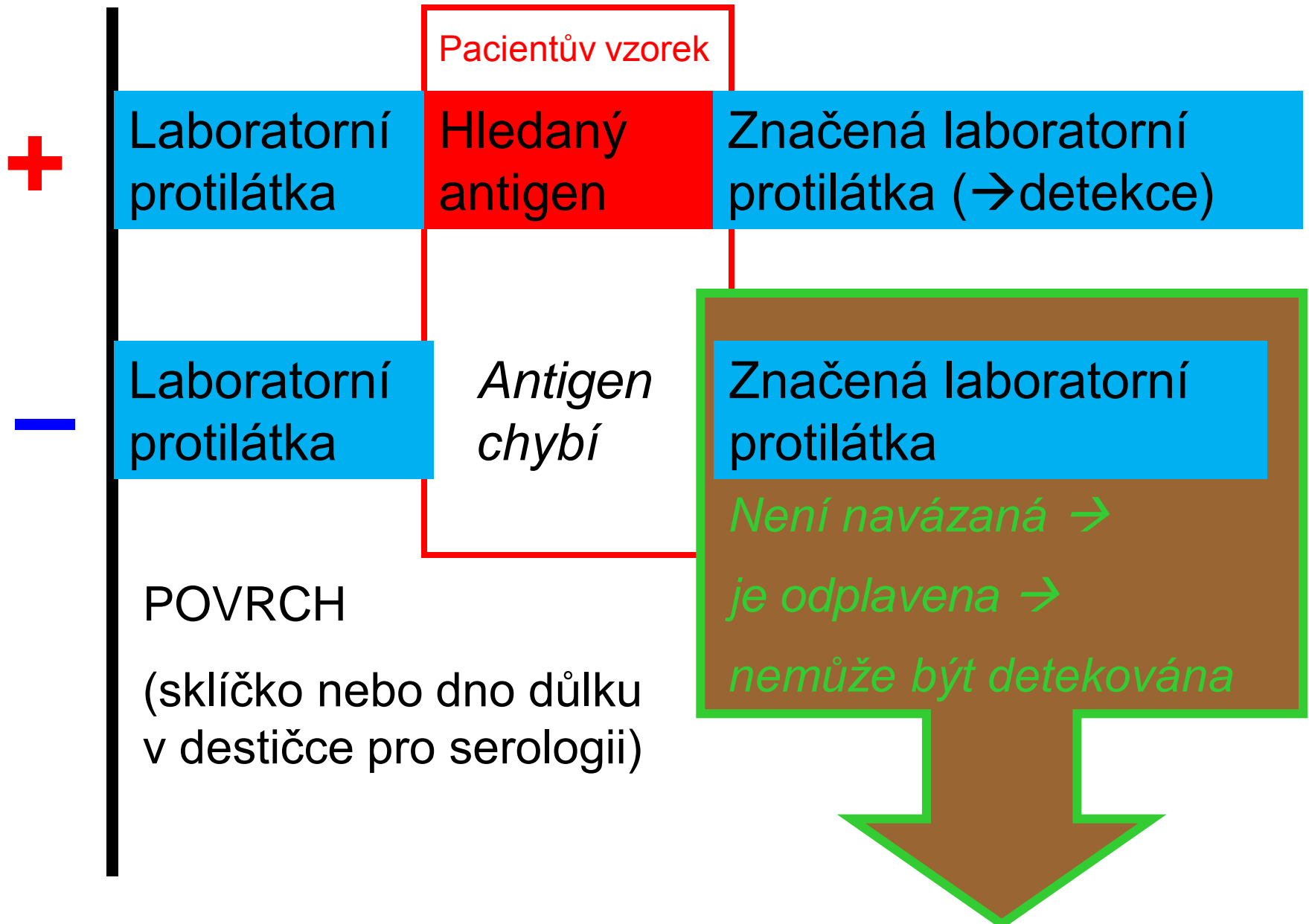
4.

**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

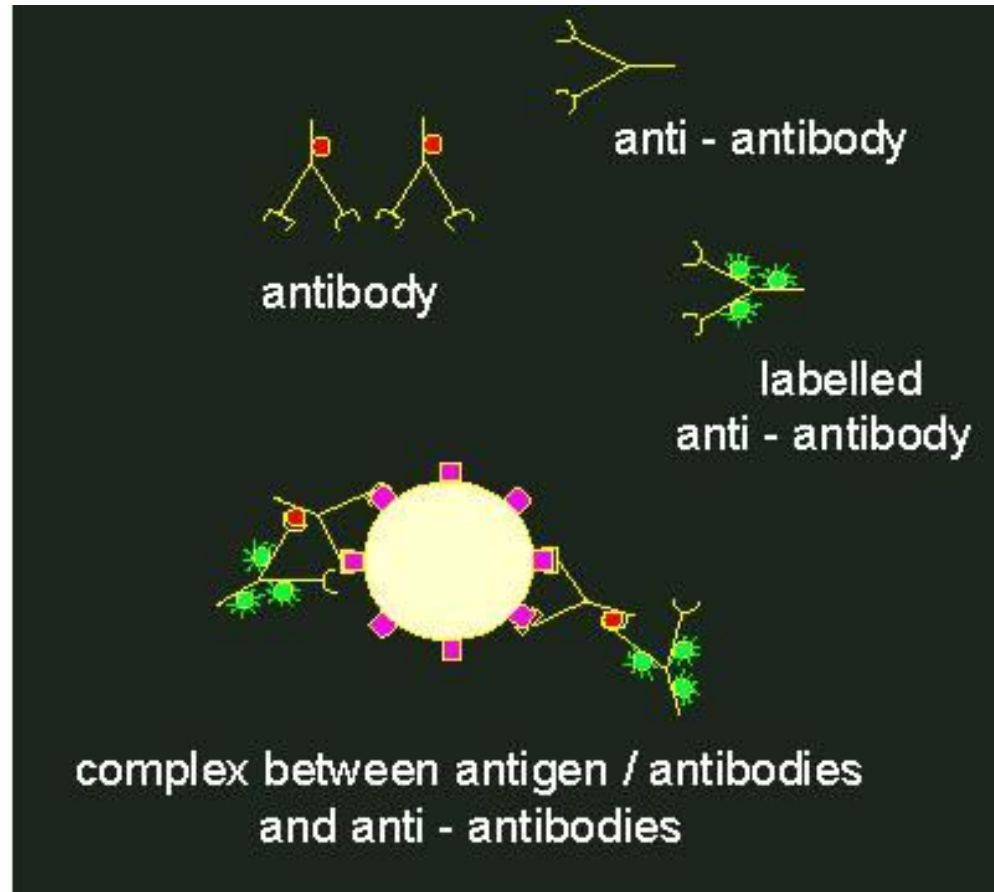
Používáme-li jako značidlo enzym, je poslední složkou přidanou do reakce ještě příslušný substrát – tedy jeden krok navíc.

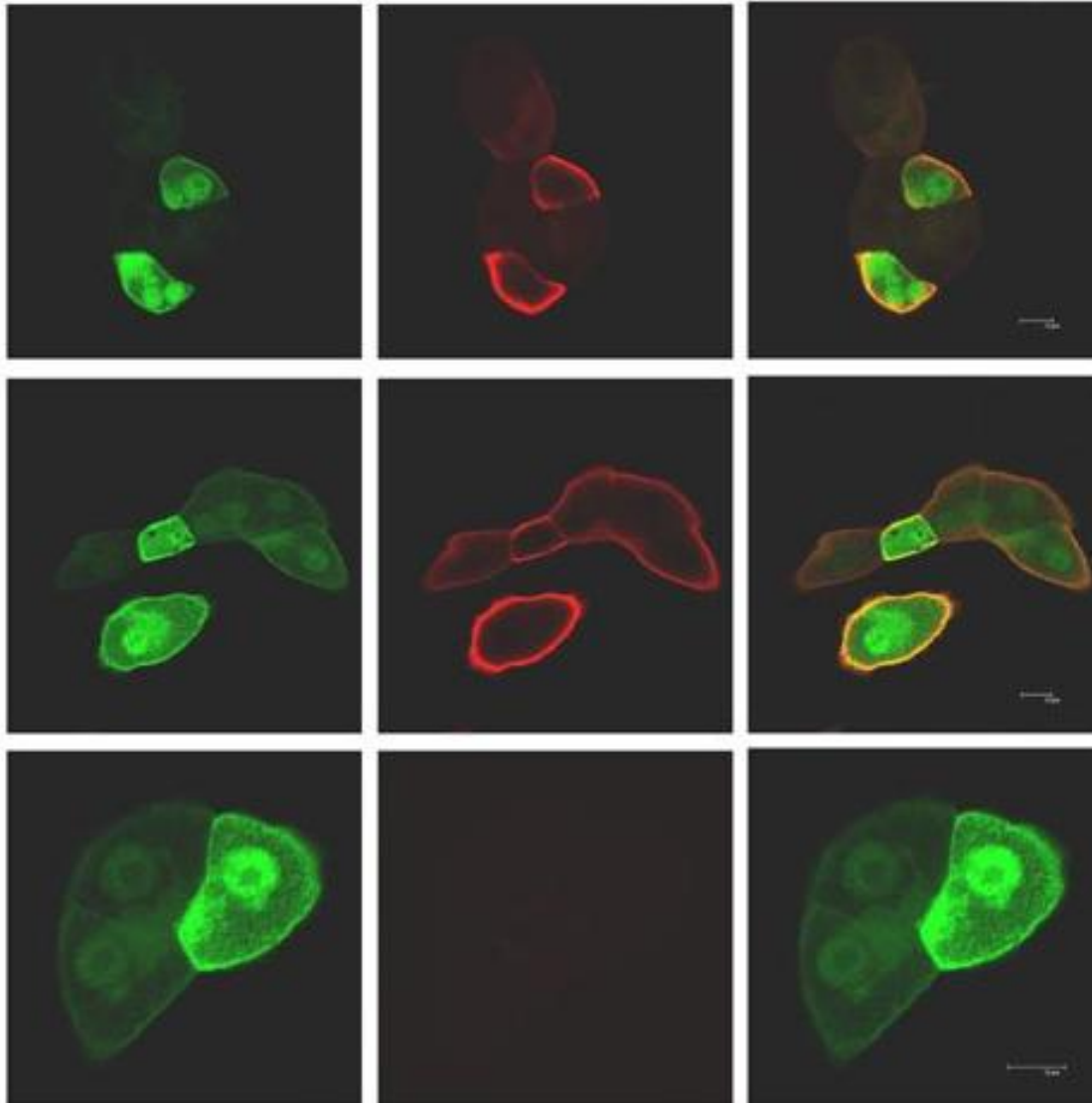
Promytí a jeho význam

- Pokud by v reakci zůstalo přítomno i to, co se na nic nenavázalo, 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

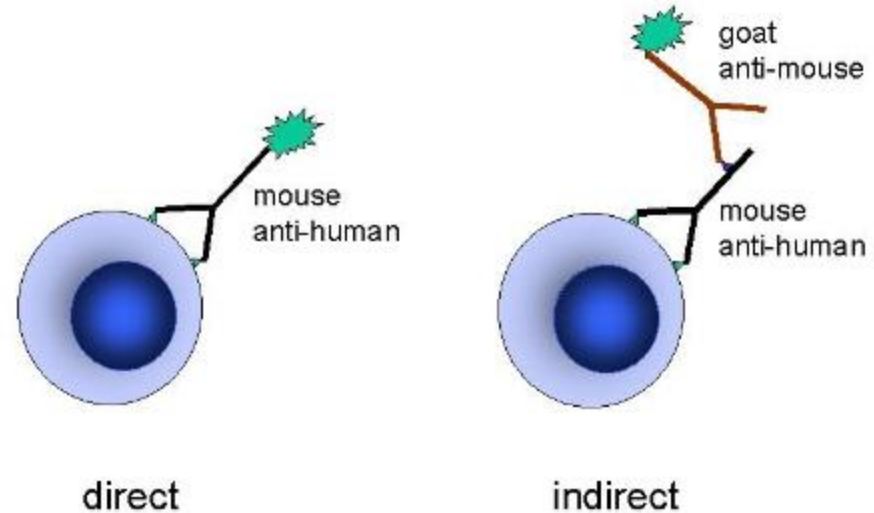




www.amsbio.com

přímá imuofluorescence

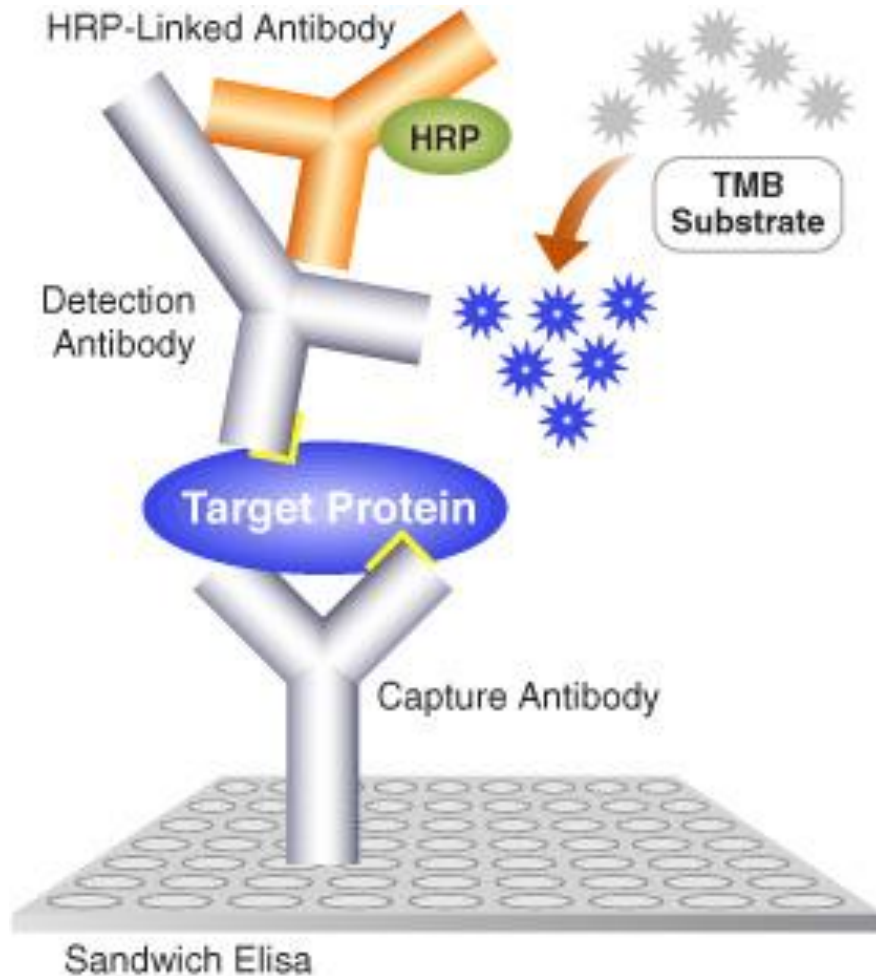
(Povrch)-(antigen)-(značená protilátka)



nepřímá imunofluorescence

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

II. ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

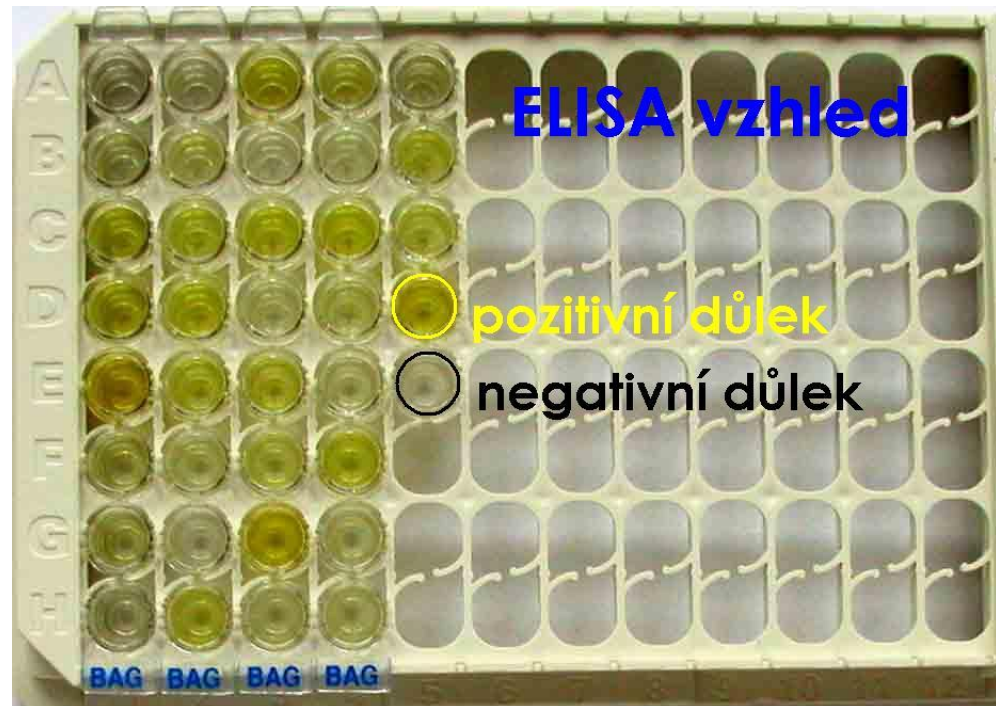


ELISA – praktické provedení

- 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 %)

ELISA – proč je tak oblíbená

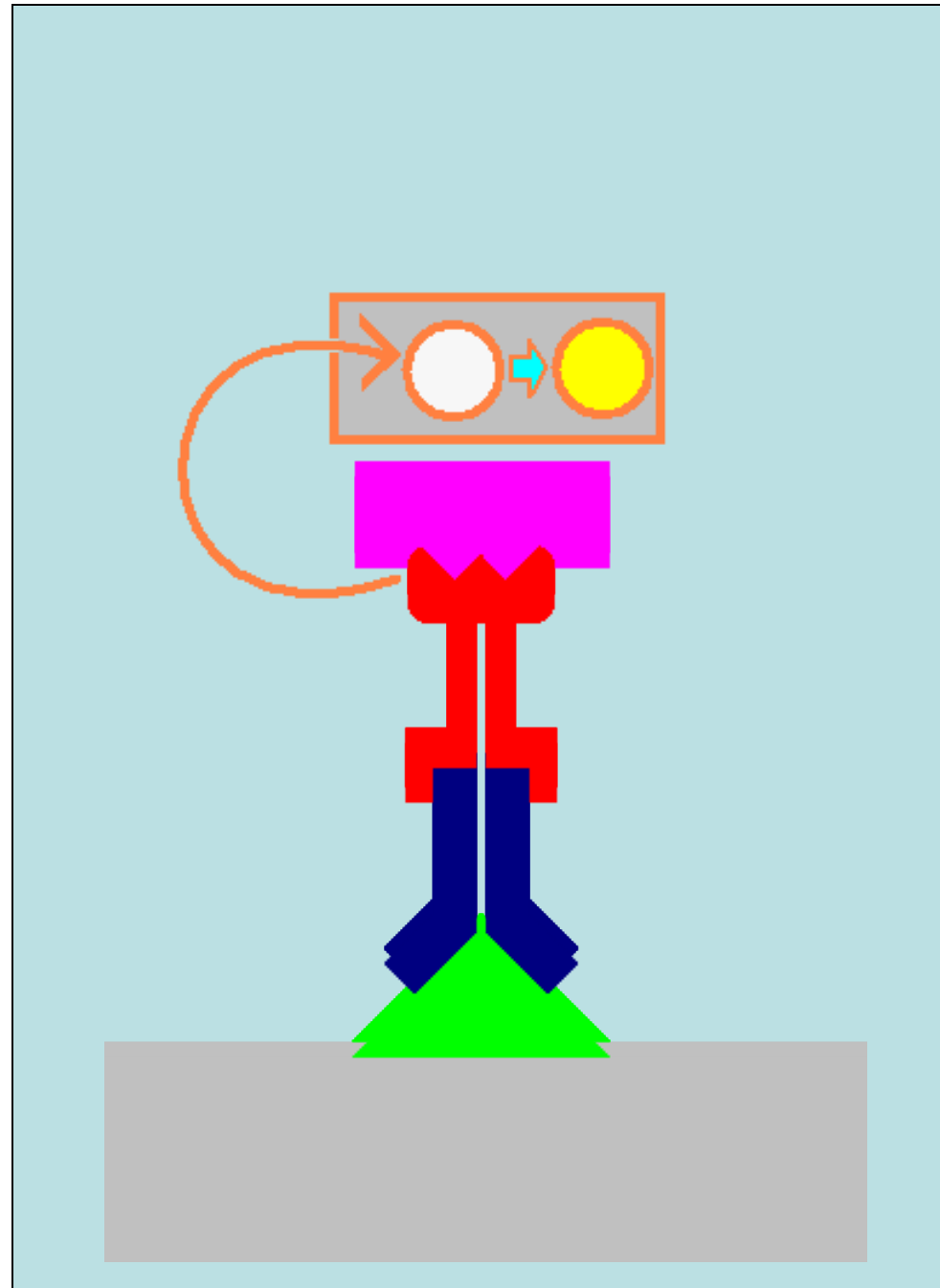
- U reakce ELISA je na konci celého procesu **enzymatická reakce**. Její intenzita se projeví jednoduše: intenzitou zbarvení v důlku, kde reakce probíhá. **Sytá barva = vysoce pozitivní.**



ELISA k detekci protilátky:

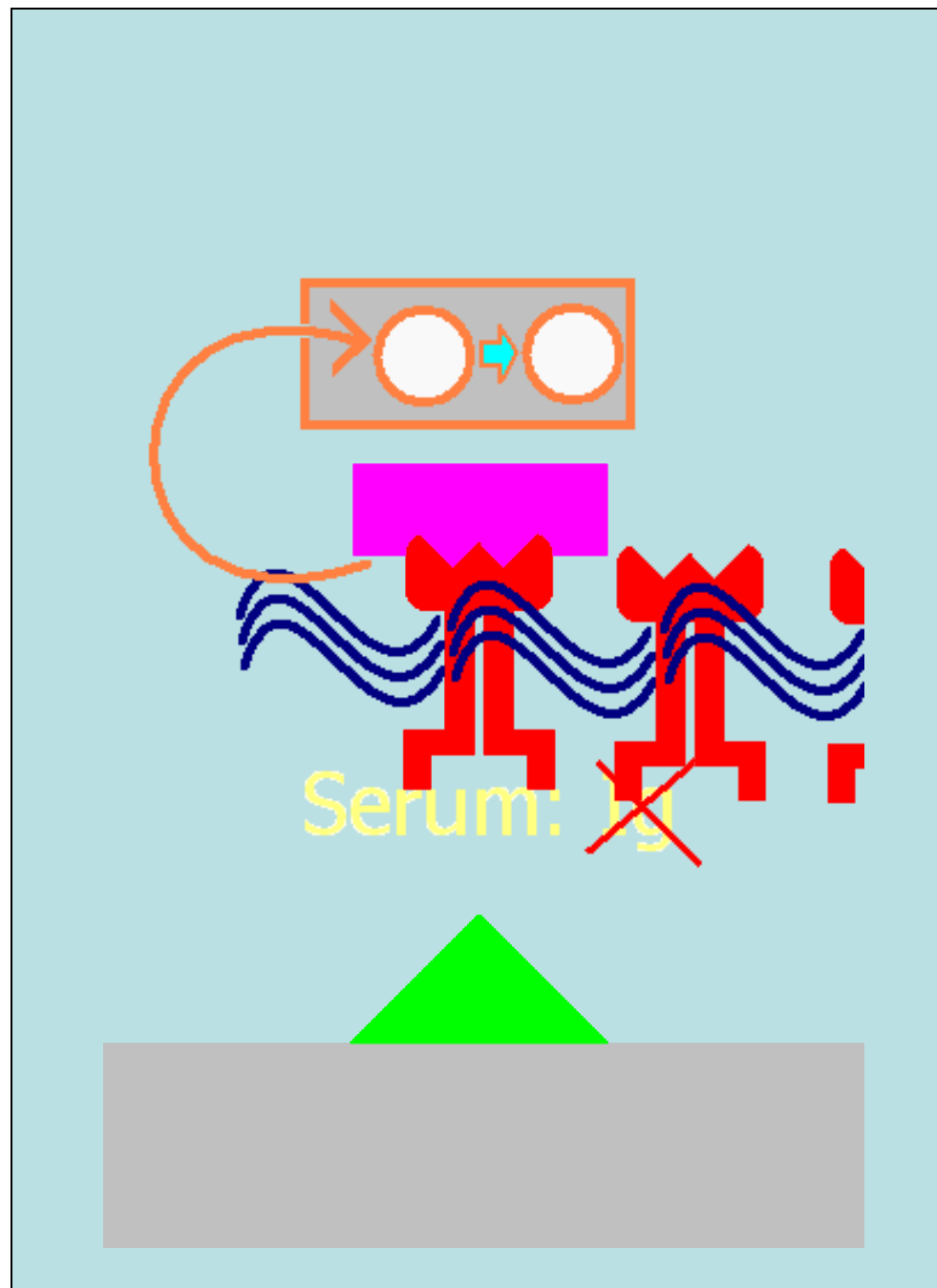
1. Pozitivní (hledá
se IgM, IgM
přítomna)

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)

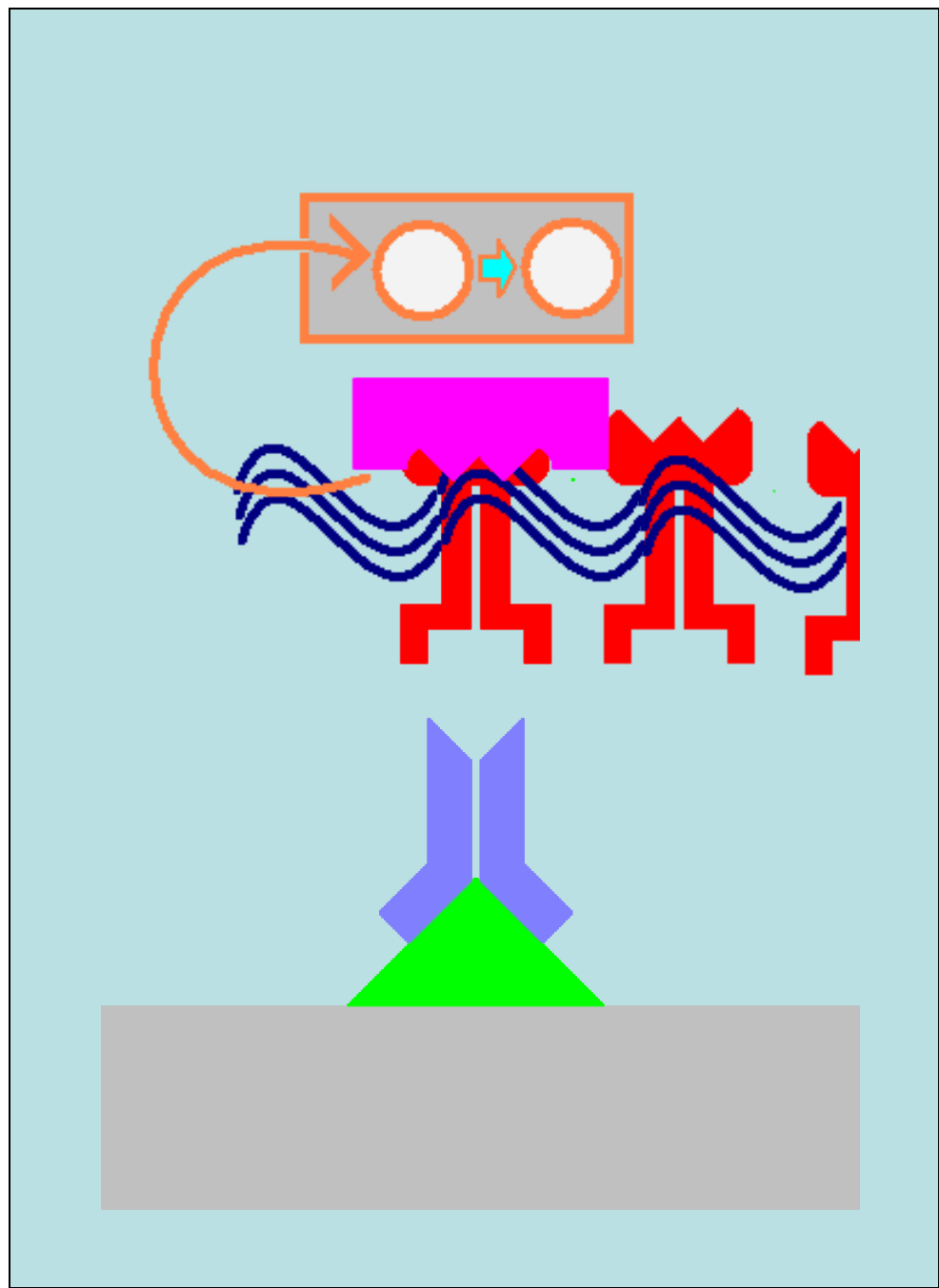
V séru pacienta
nejsou protilátky.
Konjugát je odplaven,
v důlku není žádná
změna.



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

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**

Úkoly

Aglutinace na nosičích- TPHA

Pozitivní kontrola (různá míra positivity)

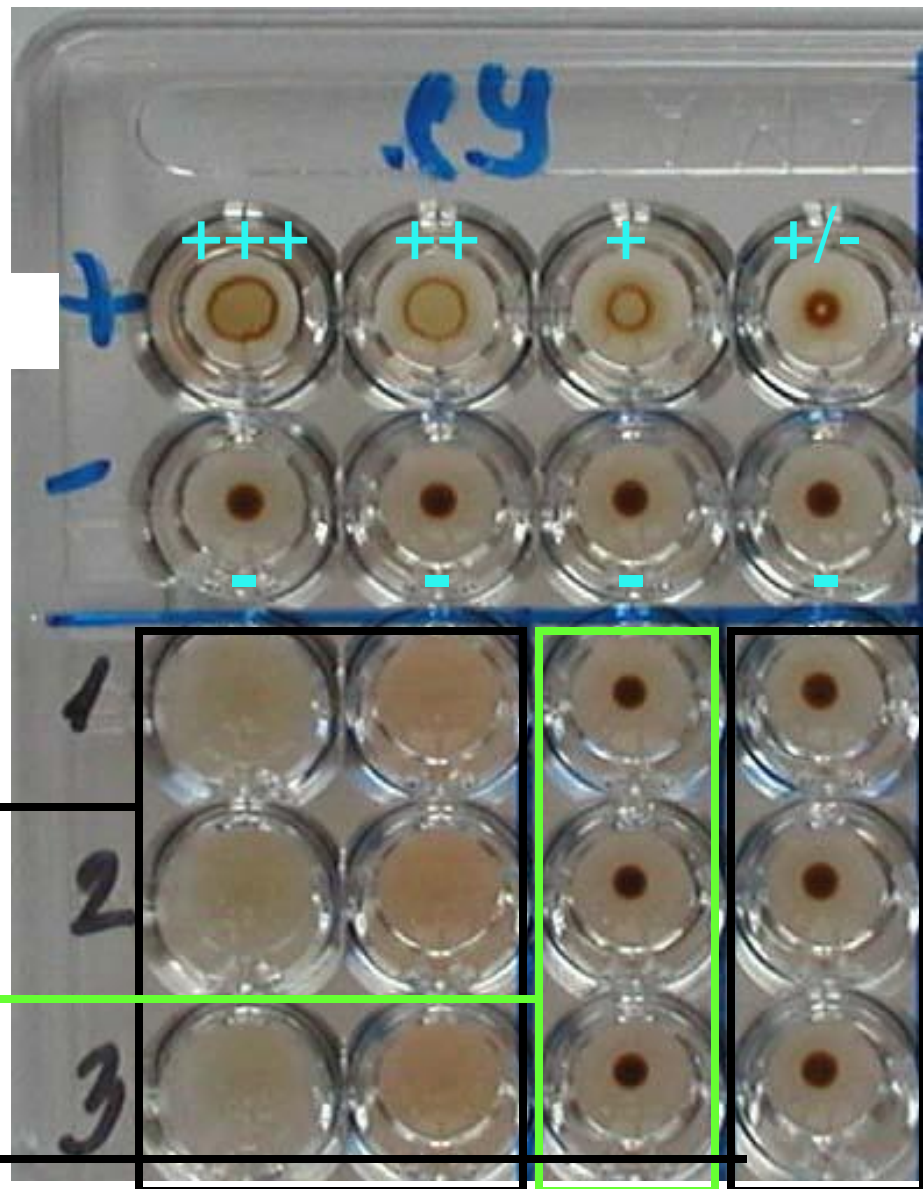
Negativní kontrola

Pacienti (1, 2, 3)

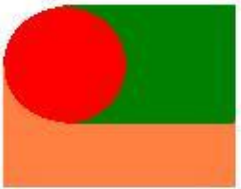


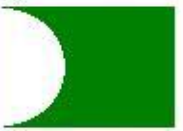


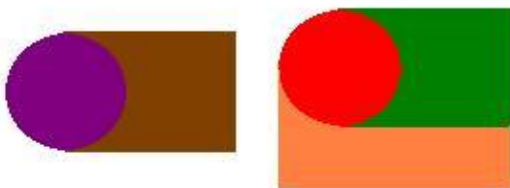
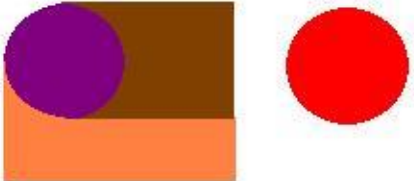





Technické důlky

Kontrola

Vlastní reakce





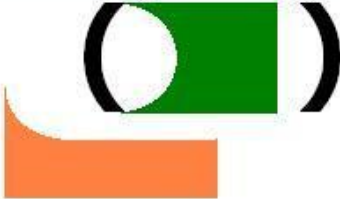


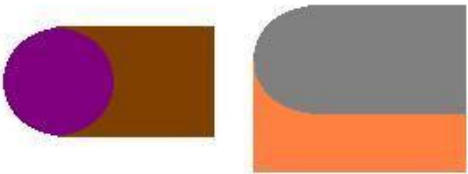
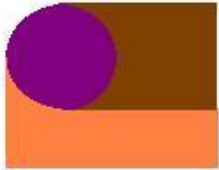


Princip KFR

+	-		
1 	1 	 antigen	 antibody protilátka
 vázaný - bound	 volný - free		
2 	2 	 complement	 beraní ery sheep RBC
NO HEMOLYSIS NENÍ HEMOLÝZA	HEMOLYSIS HEMOLÝZA		
		 amboceptor	

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**

Test antikomplementarity

SERUM NOT OK	SERUM OK	 <p>složka zodpovědná za antikomplementaritu anticomplementarity component</p> <p>antibody protilátka</p> <p>complement</p> <p>beraní ery sheep RBC</p> <p>amboceptor</p>
<p>1</p> 	<p>1</p> 	
 vázaný - bound	 volný - free	
<p>2</p> 	<p>2</p> 	
<p>NO HEMOLYSIS NENÍ HEMOLÝZA</p>	<p>HEMOLYSIS HEMOLÝZA</p>	
		

KFR: Respirační patogeny

- Celá serologická destička patří jednomu pacientovi.
- Máme šest respiračních patogenů, každý je ve dvou řádcích (akutní vzorek a rekonvalescentní).
- První sloupec je test antikomplementarity
- Následuje sedm ředění séra – ve druhém sloupci 1 : 5 a pak geometrickou řadou s koeficientem dva. Kromě virů je ve škále i bakterie *Mycoplasma pneumoniae*

Testovaná agens

- **Chřipka A** (řada 1 + 2)
- **Chřipka B** (řada 3 + 4)
- **Parachřipka** (řada 5 + 6)
- **RS virus** (řada 7 + 8)
- **Adenovirus** (řada 9 + 10)
- ***Mycoplasma pneumoniae*** (řada 11 + 12)
- **První vzorek séra** (když pacient přišel poprvé):
1, 3, 5, 7, 9, 11
- **Druhý vzorek séra** (po 10–14 dnech): řady 2, 4,
6, 8, 10, 12

Výsledky

- I: titr = 1 : 5
- II: titr = 1 : 5
- Interpretace: Protilátky jsou přítomné, ale titr je nízký a nemění se → náš pacient se s patogenem v životě setkal, ale není nakažený právě teď.
- vzorek I: titr = 1 : 5
- vzorek II: titr = 1 : 10
- Interpretace: Titr se zvýšil, ale dvojnásobný vzestup titru může být náhodný, není signifikantní pro akutní infekci.
- I: Titr = 1 : 10
- II: Titr = 1 : 160
- Interpretace: 16-násobný vzestup titru. **Náš pacient je vysoce podezřelý z infekce tímto patogenem.**

ASLO – vyhodnocení úkolu

- **Pozitivní kontrola** je opravdu pozitivní
- **Vysoké riziko** pozdních následků je u pacientů s titry 506, resp. 337 m. j.
- **Hraniční riziko** je u pacienta s titry 225 m. j. a 180 m. j.

ELISA, průkaz protilátek

- ▶ U nepřímého průkazu reakcí ELISA se zpravidla hodnotí zvláště protilátky IgM a IgG
- ▶ V daném případě se místo IgA používá IgM
- ▶ Za pozitivní se opět považují hodnoty vyšší než referenčně daný tzv. „cut off“
- ▶ V našem případě se cut off počítá jako **$(B1 + C1)/2 + 0,320$** v případě IgA, resp. **$(B3 + C3)/2 + 0,320$** v případě IgG
- ▶ Výsledky mezi 90 % a 110 % cut off se hodnotí jako „hraniční“, pod 90 % jako „negativní“, nad 110 % jako „pozitivní“