

Sérologie

Prezentace pro obor:
Všeobecná sestra
Jan Smíšek © ÚLM 3. LF UK 2008

1

Základní pojmy

- Antigen – specifická povrchová struktura schopná vyvolat imunitní reakci
 - Často proteinová, ale i polysacharidová, glykoproteinová, lipoproteinová atd.
- Epitop – prostorová část molekuly antigenu, která vyvolává imunitní reakci (jeden antigen může mít víc epitopů)

2

Základní pojmy

- Hapten a semihapten – antigenní struktura schopná vyvolat imunitní reakci jen po vazbě na větší molekulu (protein)
- Specifická protilátka – protilátka (obvykle vyrobená hybridomovou technikou) určená proti konkrétnímu antigenu (antigenům)
 - Monovalentní – váže epitop 1 antigenu
 - Polyvalentní – váže epitopy více antigenů

3

Základní pojmy

- Hybridomová technika
 - Metodika tvorby specifických protilátek
 - Hlodavci se podá antigen proti němuž chceme vytvořit specifickou protilátku

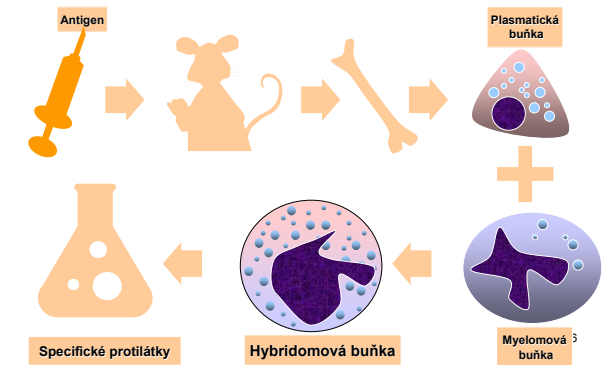
4

Základní pojmy

- Hybridomová technika
 - Po uběhnutí doby nezbytné pro aktivaci hlodavcovy imunity se hlodavec usmrtí a z jeho sleziny nebo kostní dřeně se izolují aktivované plasmatické buňky
 - Jejich jádra injikují do nesmrtelné buňky lidského myelomu (nádor tvořící imunoglobuliny)
 - Fúzní buňka (hybridom) produkuje protilátky

5

Hybridomová technika



Základní pojmy

- Aglutinace – shlukování antigenu specifickou protilátkou
- Precipitace – totéž v gelovém prostředí
- Titr – převrácená hodnota ředění
- Konjugát – protilátka značená markerem
- Marker – obvykle enzym, který dokáže po přidání specifické směsi obsahující substrát vyvíjet konkrétní zbarvení jehož intenzita je přímo úměrná koncentraci markeru

7

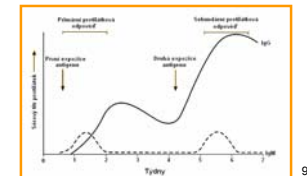
Přímá aglutinace

- Princip:
 - Protilátky, které se vytvoří v séru pacienta v průběhu onemocnění se dají prokázat pomocí přímé aglutinace
 - Dochází k vazbě komplexu antigen-protilátka a jeho následné aglutinaci, kterou lze pozorovat pouhým okem nebo hodnotit speciálními přístroji

8

Přímá aglutinace

- Protilátky IgM se tvoří přibližně po 1 týdnu přítomnosti mikroba organismu vrcholu jejich množství dosahuje v polovině druhého týdne poté jejich koncentrace v séru klesá. IgG naproti tomu dosahují vrcholu až v polovině třetího týdne (viz. graf).



9

Přímá aglutinace

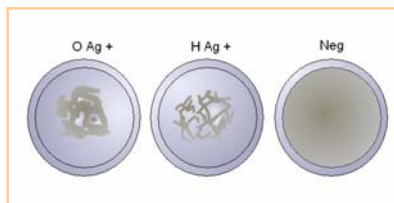
- Sérum naředíme až na titer 2560 podle tabulky. Přidáme antigen mikroba (konkrétní antigen proti danému sérotypu) a po 2 – 24 hodinách hodnotíme poslední zkumavku, kde došlo k aglutinaci. Převertaná hodnota ředění séra v ní představuje titer protilátek (kvantifikaci jejich množství v séru).

	Zkumavka								
	1	2	3	4	5	6	7	8	K
Fyz. roztok (ml)	0,9	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Sérum (ml)	0,1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0
0,5 ml se přenáší z předchozí zkumavky do následující									
Antigen (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Ředění	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	0

10

Přímá aglutinace

- Výsledek
 - Aglutinace H antigenu (bičik) je jemnější
 - Aglutinace O antigenu (bakt.stěna) je hrubší



11

Přímá aglutinace

- Použití
 - Widalova reakce
 - Průkaz protilátek proti Salmonelám
 - Wrightova reakce
 - Průkaz protilátek proti Franciselám a Brucelám
 - Weilova-Felixova reakce
 - Průkaz protilátek proti Listeriím

12

Zpětná aglutinace – serotypizace

- Princip
 - Pokud k suspenzi mikroba obsahující známý antigen přidáme protilátky proti známému antigenu dojde k aglutinaci
 - Tímto způsobem můžeme určit konkrétní antigenní složení stěny neznámého mikroba a tím ho podle známých schémat (pro Salmonelly jde o Kaufmann-Whiteovo schéma) druhově či dokonce kmenově určit

13

Zpětná aglutinace – serotypizace

- Postup
 - Na první podložní sklíčko kápneme kapku protilátek proti O antigenu 9 a 12 a na druhé podložní sklíčko protilátky proti H antigenu g,m.
 - V kapce rozmícháme bakteriologickou kličkou kolonii mikroba sebranou z pevné kultivační půdy až vznikne homogenní suspenze
 - Poté se kývavým pohybem snažíme vyvolat aglutinaci kterou odečítáme proti tmavému pozadí. Pokud k ní dojde kompletuje se známý antigen mikroba se známou protilátkou

14

Zpětná aglutinace – serotypizace

- Použití:
 - Serotypizace kmenů *Salmonella typhi*
 - +
 - Určení povrchových antigenů většiny lékařsky významných bakterií, které dosahují diagnosticky významného polymorfismu (Streptokoky, Stafylokoky, Hemofily a mnoho dalších)

15

Hemaglutinace

- Princip
 - Heterofilní protilátky (protilátky, které dokážou aglutinovat i některé antigeny na nehumánních erythrocytech) přímo aglutinují beraní erythrocyty v závislosti na svém titru

16

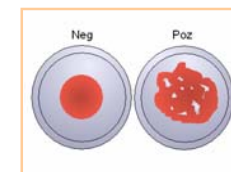
Hemaglutinace

- Postup
 - V mikrotitrační destičce naředíme sérum pacienta podle tabulky tak aby došlo k vytvoření známého titru a přidáme roztok beraních erythrocytů
 - Necháme reagovat 18-24 hodin v chladu a pozorujeme poslední jamku, kde došlo k aglutinaci
 - Její titer představuje titer hledaných protilátek

	Jamka číslo											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Fyz. roztok (ul)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	0
Sérum (ul)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	0	0
50 ul se přenáší z předchozí jamky												
Beraní ery	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Ředění	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024		

- Výsledek

- Aglutinované erythrocyty pokryjí v hrudkách dno zkumavky, neaglutinované pokryjí dno normálním jasně ohraničeným sedimentem



18

Hemaglutinace

- Použití
 - Paul Bunnellova reakce
 - Stanovení heterofilních protilátek proti EBV (Virus Epstein Barrové – původce infekční mononukleózy) pomocí aglutinace 2 % roztoku beraních erytrocytů

19

Latexová aglutinace

- Princip:
 - Některé mikroby uvolňují v tekutém růstovém prostředí antigeny (tzv. solubilní Ag) ze svého povrchu
 - Tyto antigeny lze prokazovat pomocí specifických protilátek navázaných na latexových částicích

20

Latexová aglutinace

- Postup:
 - Na podložní sklíčko kápneme kapku latexových částic obalených protilátkami
 - V kapce rozmícháme bakteriologickou kličkou kapku tekutiny obsahující solubilní antigeny
 - Poté se kývavým pohybem snažíme vyvolat aglutinaci kterou odečítáme proti tmavému pozadí

21

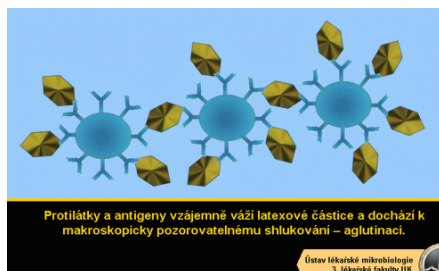
Latexová aglutinace

- Použití:
 - Zejména k průkazu solubilních antigenů *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pneumoniae*
 - Vzhledem k tomu, že se jedná o 3 nejčastější původce bakteriálních meningitid, používá se latexová aglutinace jako bed side test k rychlému průkazu meningitidy z likvoru

22

Latexová aglutinace

- Výsledek – zřetelná aglutinace



23

Průkaz značenými protilátkami

- Protilátka může být značena
 - Radionuklidem
 - Reakci označujeme jako RIA (Radio immuno assay) – prokazujeme denzitometricky
 - Enzymem
 - Reakce EIA (Enzyme immuno assay) – prokazujeme barevnou reakcí se specifickým barvivo obsahujícím substrátem enzymu
 - Fluorescenčním barvivem
 - Reakce FIA (Fluorescent immuno assay) – prokazujeme pomocí fluorescenčního záření

24

Průkaz značenými protilátkami

- Použití
 - Průkaz libovolných antigenů
 - Používá se nejen v sérologii, ale například v biochemii k průkazu antigenů např. konkrétních proteinů krevního séra atd.
 - FIA se používá často ve virologii k průkazu antigenů virů přímo ve tkáňovém vzorku

25

ELISA

- Enzym Linked Immuno Sorbent Assay
- Je v současné době společně s Westernblotem nejosofistikovanější sérologickou reakcí
- Je modifikací metodiky EIA
- Používá se ve 3 variantách
 - Sandwichový průkaz Ag
 - Sandwichový průkaz Ig
 - Kompetitivní průkaz Ig

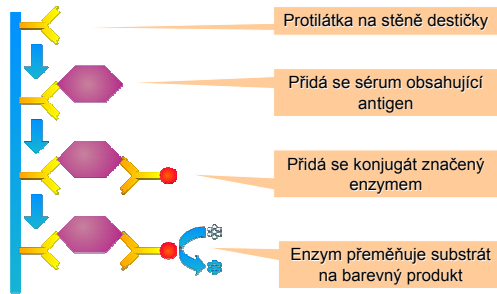
26

ELISA

- Sandwichový typ reakce průkaz Ag
- Princip
 - Na stěně mikrotitrační destičky navázána protilátka
 - Přidá se sérum s antigenem
 - Přidá se značený konjugát
 - Vytvoří se sandwichový komplex

27

ELISA



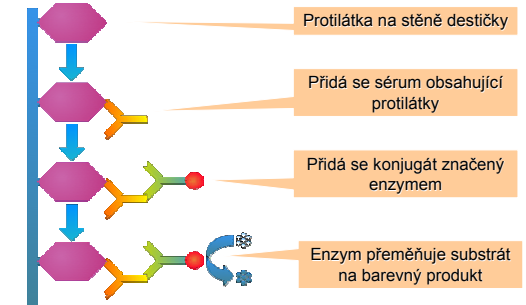
28

ELISA

- Sandwichový typ reakce průkaz Ig
- Princip
 - Na stěně mikrotitrační destičky navázán antigen
 - Přidá se sérum s protilátkami
 - Přidá se značený konjugát
 - Vytvoří se sandwichový komplex

29

ELISA



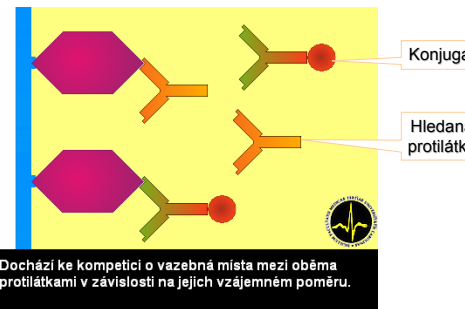
30

ELISA

- Kompetitivní typ reakce průkaz Ig
- Princip
 - Na stěně mikrotitrační destičky navázán antigen
 - Přidá se sérum s protilátkami a zároveň se přidá značený konjugát
 - Dochází ke kompetici o vazbu na antigen

31

ELISA



32

ELISA

- Kompetitivní typ reakce průkaz Ig
- Princip
 - Na stěně mikrotitrační destičky navázán antigen
 - Přidá se sérum s protilátkami a zároveň se přidá značený konjugát
 - Dochází ke kompetici o vazbu na antigen

33

Western blot

- Princip:
 - Celá řada mikrobů obsahuje na svém povrchu mnoho diagnosticky významných antigenů
 - Konkrétní kombinace antigenního složení je nejlepším znakem konkrétního kmene
 - Člověk při infekci obvykle tvoří protilátky proti většině antigenů mikroba
 - Průkaz všech konkrétních protilátek proti konkrétní kombinaci antigenů původce je diagnosticky velmi výhodný, protože určí konkrétní kmen původce

34

Western blot

- Postup:
 - Směs antigenů původce se elektroforeticky rozdělí a poté se aplikuje na celulózový papír
 - Z tohoto papíru se vytvoří tenké proužky (stripy)
 - Tyto proužky se inkubují se sérem pacienta
 - Při inkubaci dojde k navázání konkrétních protilátek na konkrétní antigeny
 - Strip se dále inkubuje s konjugátem značeným enzymem, který se naváže na všechny oblasti obsahující navázanou protilátku
 - Po inkubaci s barvivo obsahujícím substrátem enzymu dochází k místní barevné reakci v oblastech komplexů

35

Komplement fixační reakce

- Princip
- 3 kroky
 - 1) přidá se sérum s antigenem komplementárním k hledaným protilátkám
 - 2) přidá se komplement
 - 3) přidá se hemolytický komplex (beraní erythrocyty a králičí protilátky proti nim)

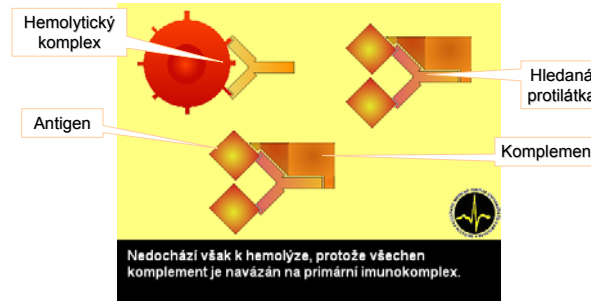
36

Komplement fixační reakce

- 2 možnosti
 - 1) Komplement se všechen váže na primární imunokomplex a nezbude žádný aby rozložil hemolytický komplex
 - 2) Sérum neobsahuje protilátky, primární imunokomplex nevznikne a všechen komplement se váže na hemolytický komplex, který rozloží → HEMOLÝZA

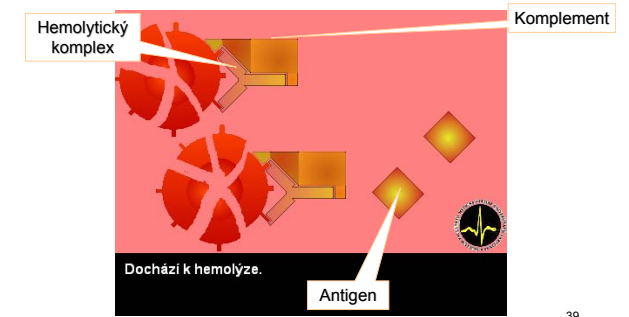
37

Komplement fixační reakce



38

Komplement fixační reakce



39

Více informací o

Serotypizaci
Latexové aglutinaci
ELISA
Westernblotu
KFR

najdete na CD:



40