



# Sérologie



Prezentace pro obor:

**Všeobecná sestra**

*Jan Smíšek © ÚLM 3. LF UK 2008*

# 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)

# 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

# Základní pojmy



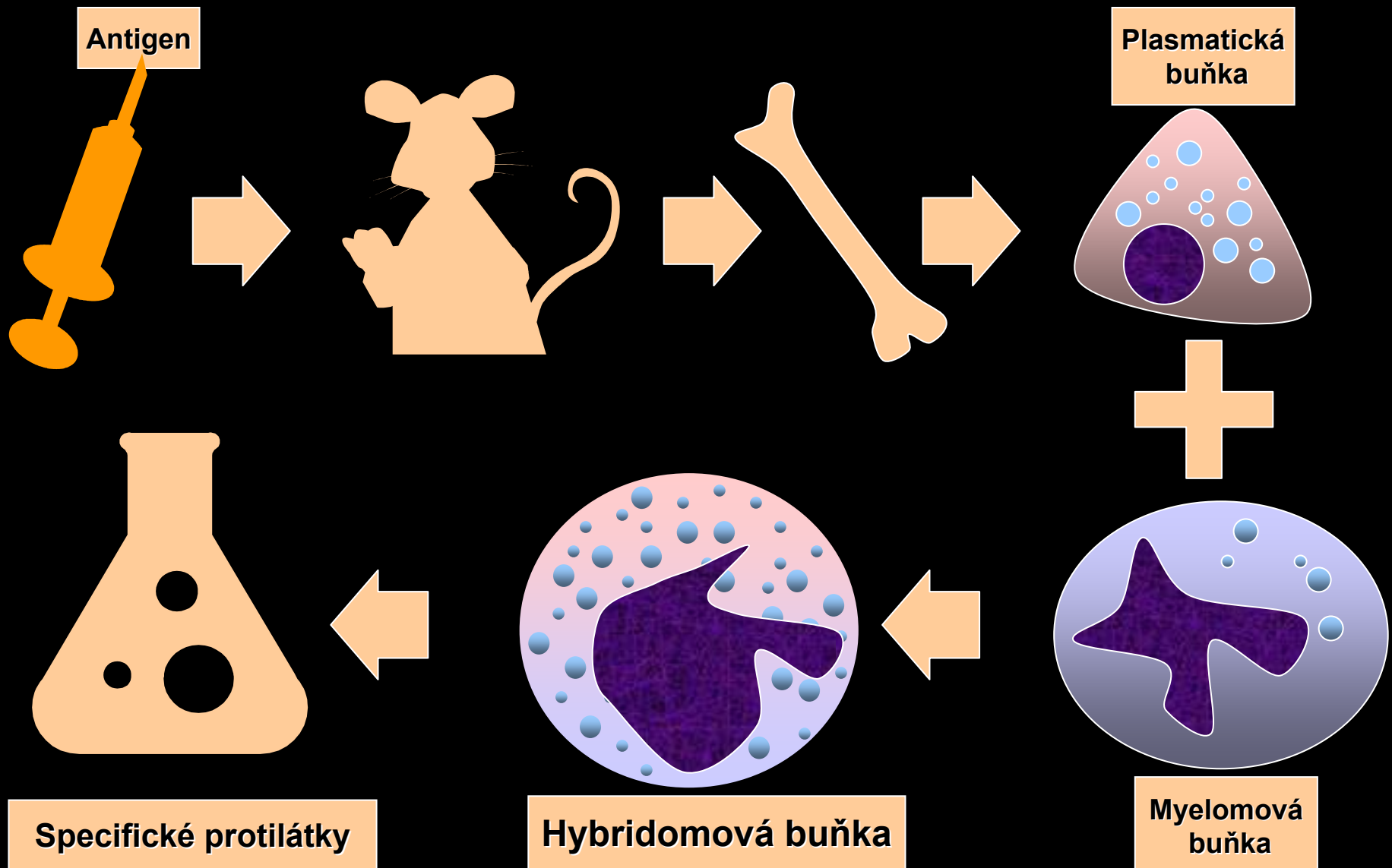
- Hybridomová technika
  - Metodika tvorby specifických protilátek
  - Hlodavci se podá antigen proti němuž chceme vytvořit specifickou protilátku

# 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

# 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

# Přímá aglutinace



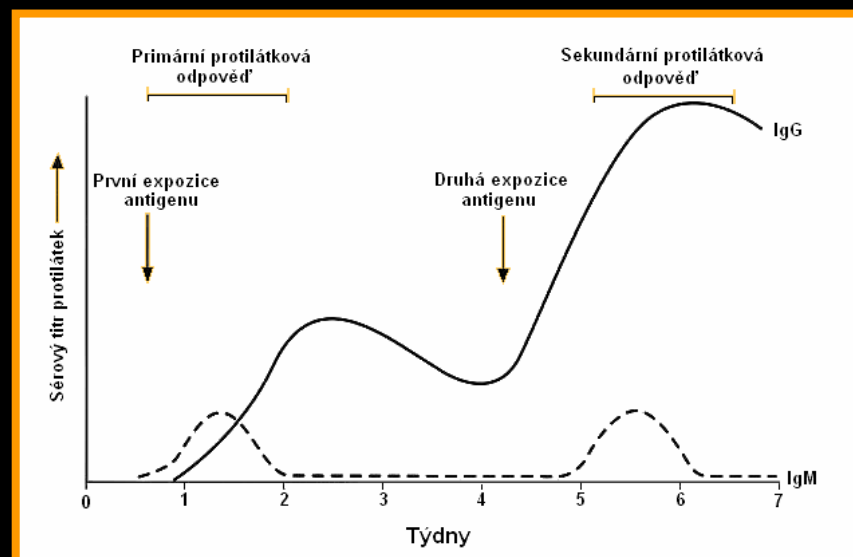
- Princip:
  - Protilátky, které se vytvoří v séru pacienta v průběhu onemocnění se dají prokázat pomocí přímé aglutinace
  - Dochází k vazbě komplexu antigen-protilátka a jeho následné aglutinaci, kterou lze pozorovat pouhým okem nebo hodnotit speciálními přístroji



# 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).



# Přímá aglutinace

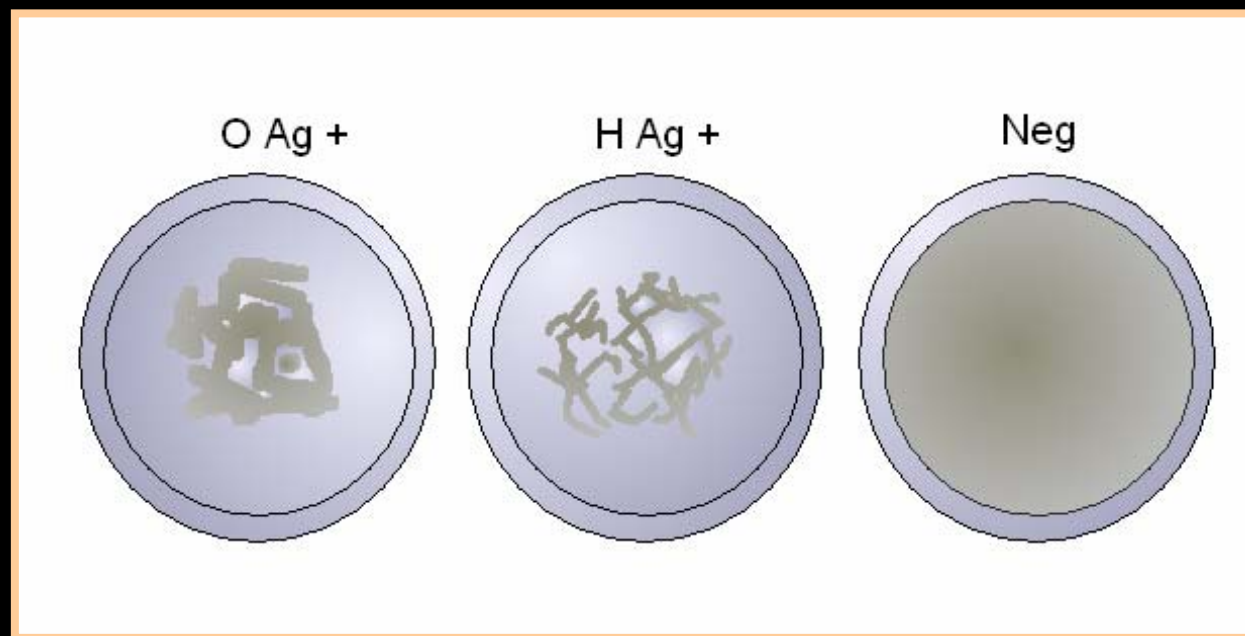


- Sérum naředíme až na titr 2560 podle tabulky. Přidáme antigen mikroba (konkrétní antigen proti danému sérotypu) a po 2 – 24 hodinách hodnotíme poslední zkumavku, kde došlo k aglutinaci. Převrácená hodnota ředění séra v ní představuje titr protilátek (kvantifikaci jejich množství v séru).

	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

# Přímá aglutinace

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



# Přímá aglutinace



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

# 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

# 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

# Zpětná aglutinace – serotypizace



- Výsledek – viditelná aglutinace



# 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)



# Hemaglutinace



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

# Hemaglutinace



- **Postup**

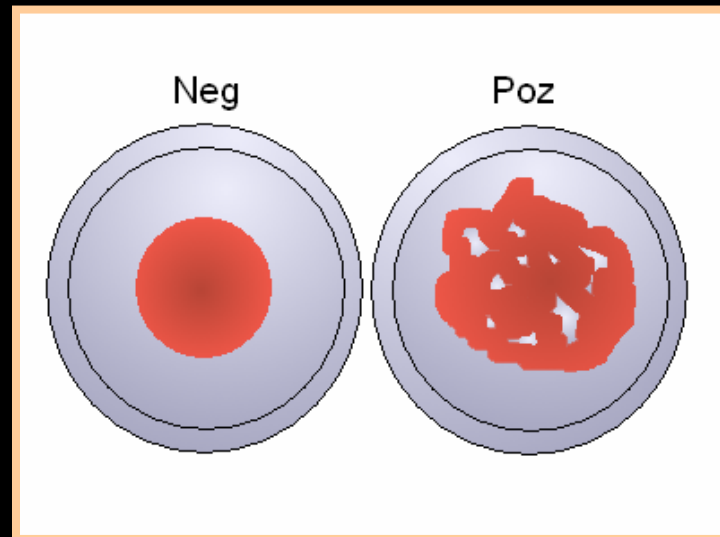
- **V mikrotitrační destičce naředíme sérum pacienta podle tabulky tak aby došlo k vytvoření známého titru a přidáme roztok beraných erytrocytů**
- **Necháme reagovat 18-24 hodin v chladu a pozorujeme poslední jamku, kde došlo k aglutinaci**
- **Její titr představuje titr hledaných protilátek**

	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												
Berání 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		

# Hemaglutinace



- Výsledek
  - Aglutinované erythrocyty pokryjí v hrudkách dno zkumavky, neaglutinované pokryjí dno v normálním jasně ohraničeném sedimentu



# Hemaglutinace



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

# 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

# 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

# Latexová aglutinace

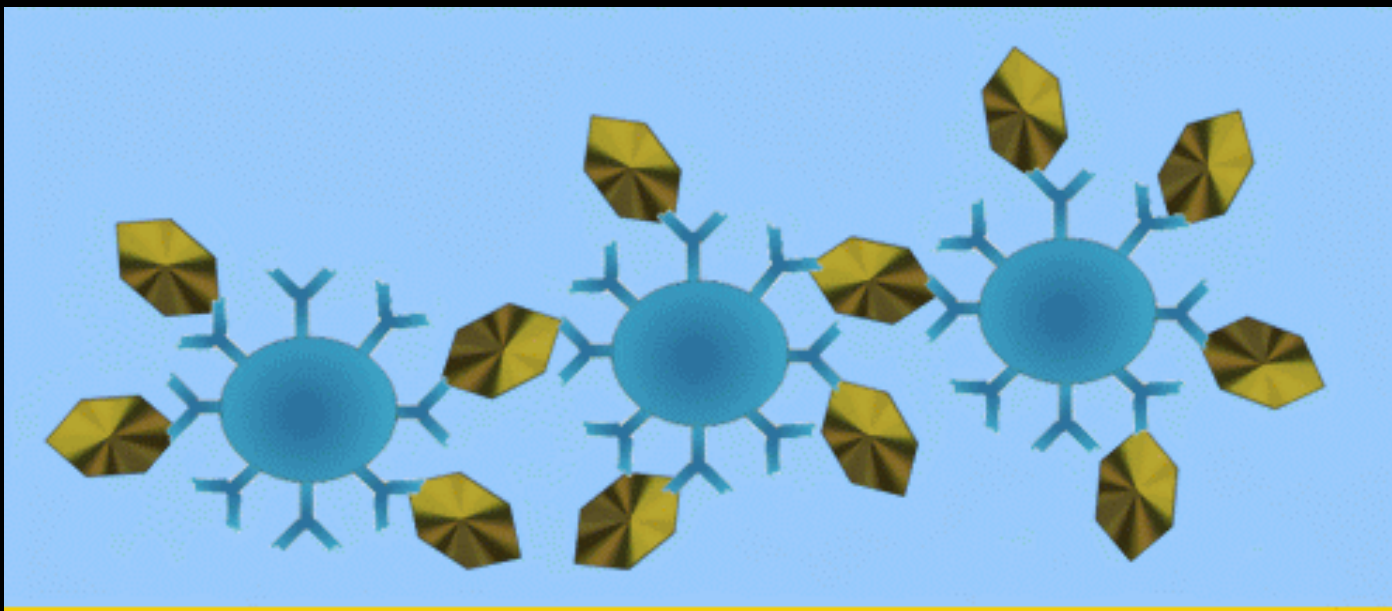


- Použití:
  - Zejména k průkazu solubilních antigenů *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pneumoniae*
  - Vzhledem k tomu, že se jedná o 3 nejčastější původce bakteriálních meningitid, používá se latexová aglutinace jako bedside test k rychlému průkazu meningitidy z likvoru

# Latexová aglutinace



- Výsledek – zřetelná aglutinace



**Protilátky a antigeny vzájemně váží latexové částice a dochází k makroskopicky pozorovatelnému shlukování – aglutinaci.**





# Průkaz značenými protilátkami

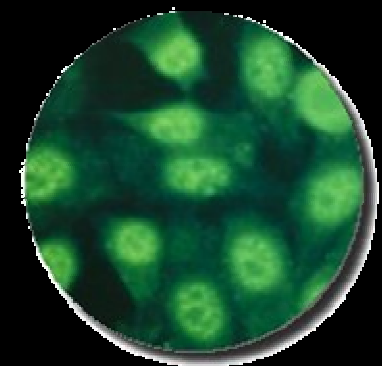


- Protilátka může být značena
  - Radionuklidem
    - Reakci označujeme jako RIA (Radio immuno assay) – prokazujeme denzitometricky
  - Enzymem
    - Reakce EIA (Enzyme immuno assay) – prokazujeme barevnou reakcí se specifickým barvivo obsahujícím substrátem enzymu
  - Fluorescenčním barvivem
    - Reakce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

# 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



# ELISA



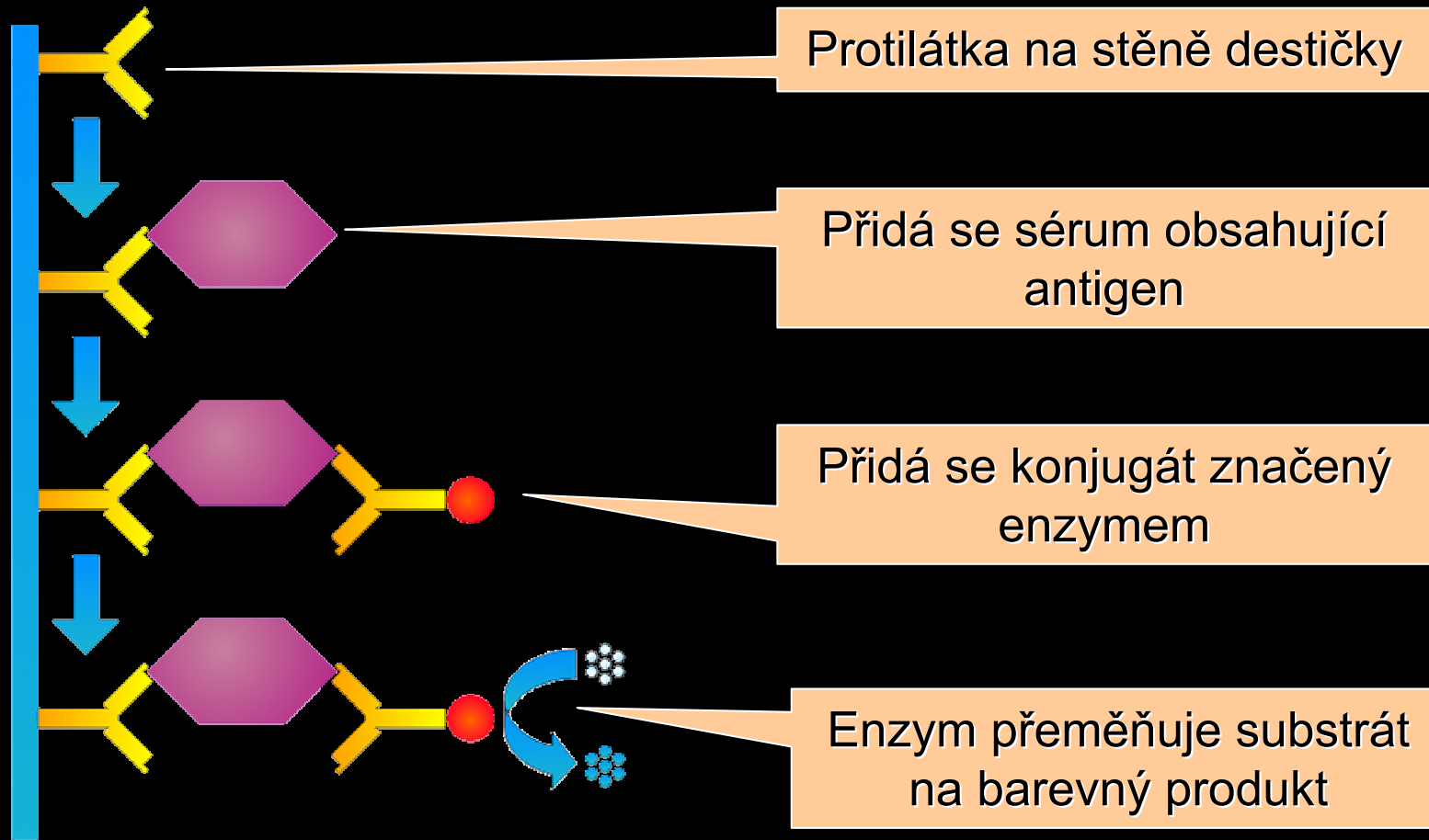
- Enzym Linked Immuno Sorbent Assay
- Je v současné době společně s Westernblotem nejsofistikovanější sérologickou reakcí
- Je modifikací metodiky EIA
- Používá se ve 3 variantách
  - Sandwichový průkaz Ag
  - Sandwichový průkaz Ig
  - Kompetitivní průkaz Ig

# 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

# ELISA

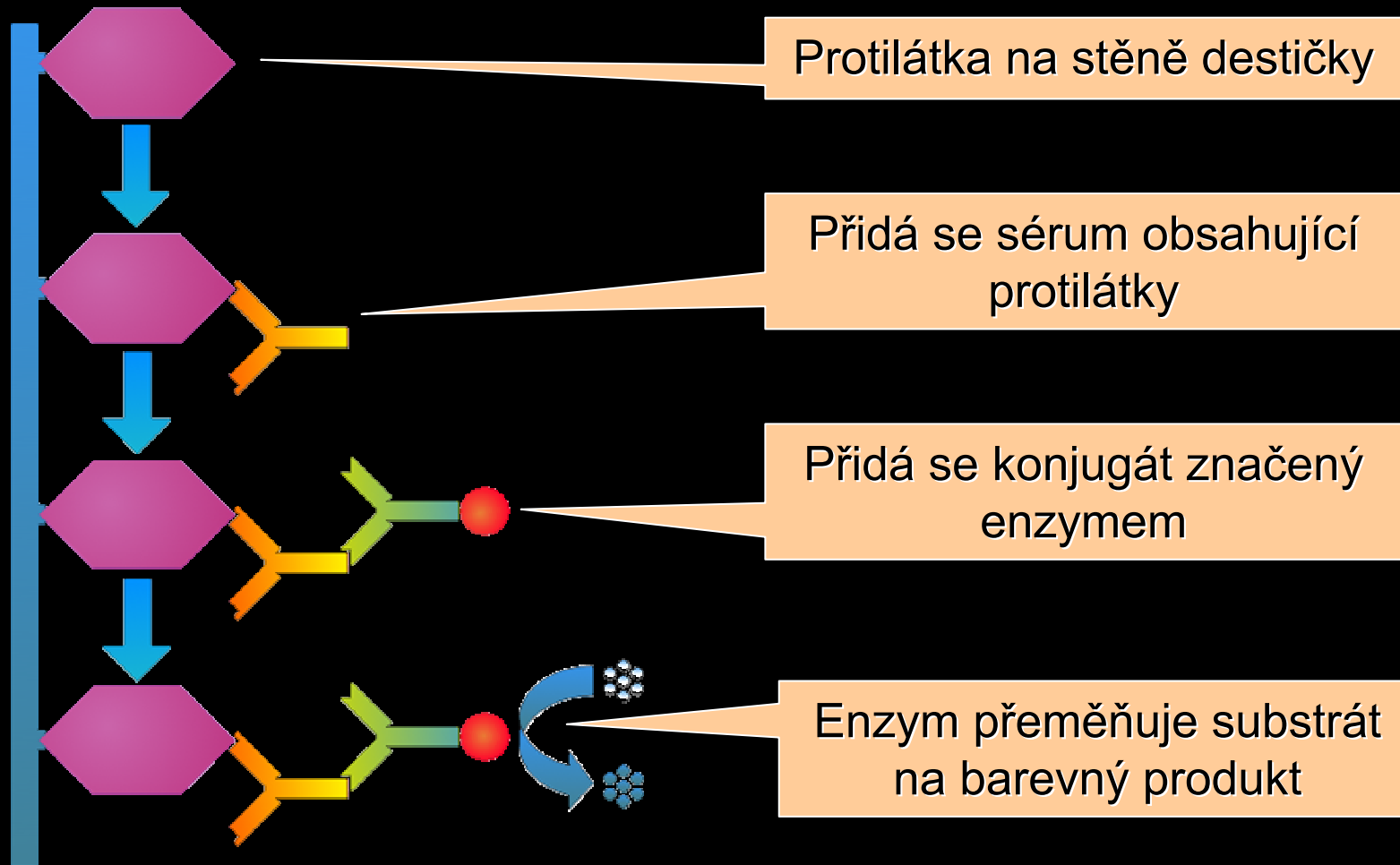


# ELISA



- 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

# ELISA



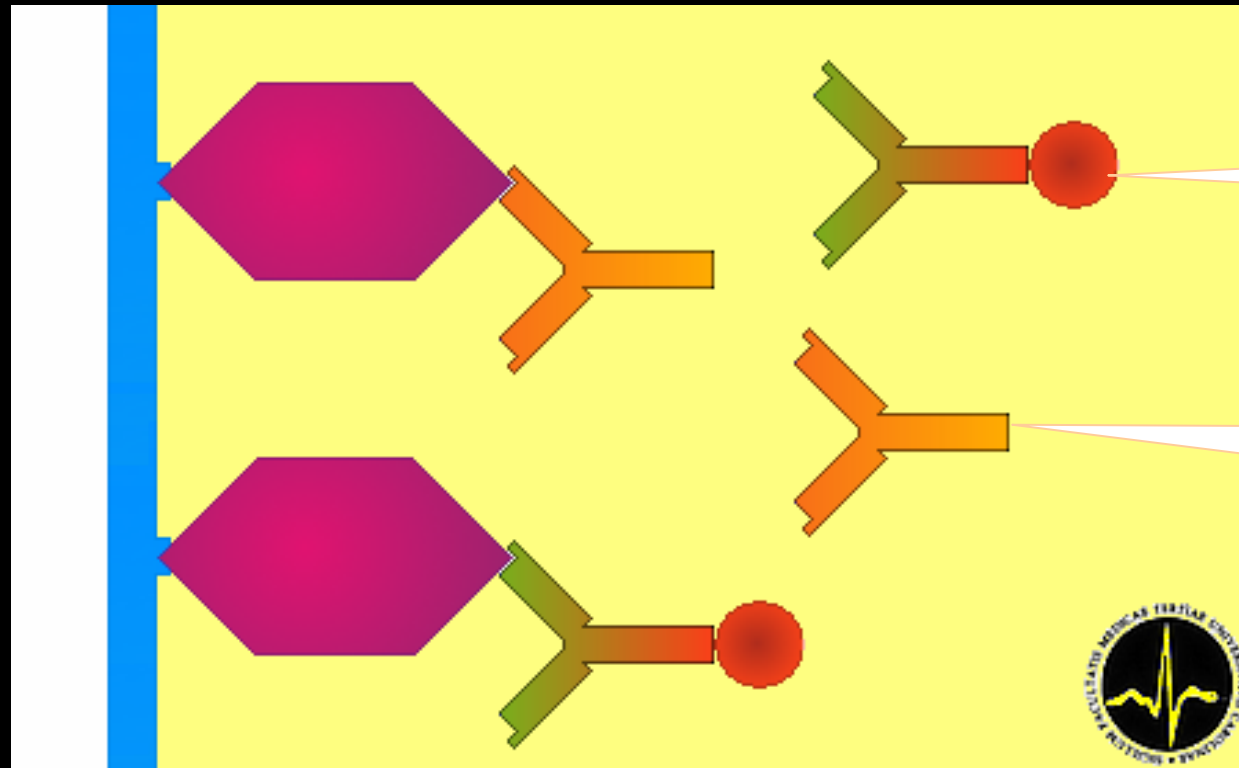
# ELISA



- 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



# ELISA



Konjugát

Hledaná  
protilátka

Dochází ke kompetici o vazebná místa mezi oběma protilátkami v závislosti na jejich vzájemném poměru.

# 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

# 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

# Western blot



- Postup:
  - Směs antigenů původce se elektroforeticky rozdělí a poté se aplikuje na celulósový 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 obsahující substrátem enzymu dochází k místní barevné reakci v oblastech komplexů

# Komplement fixační reakce



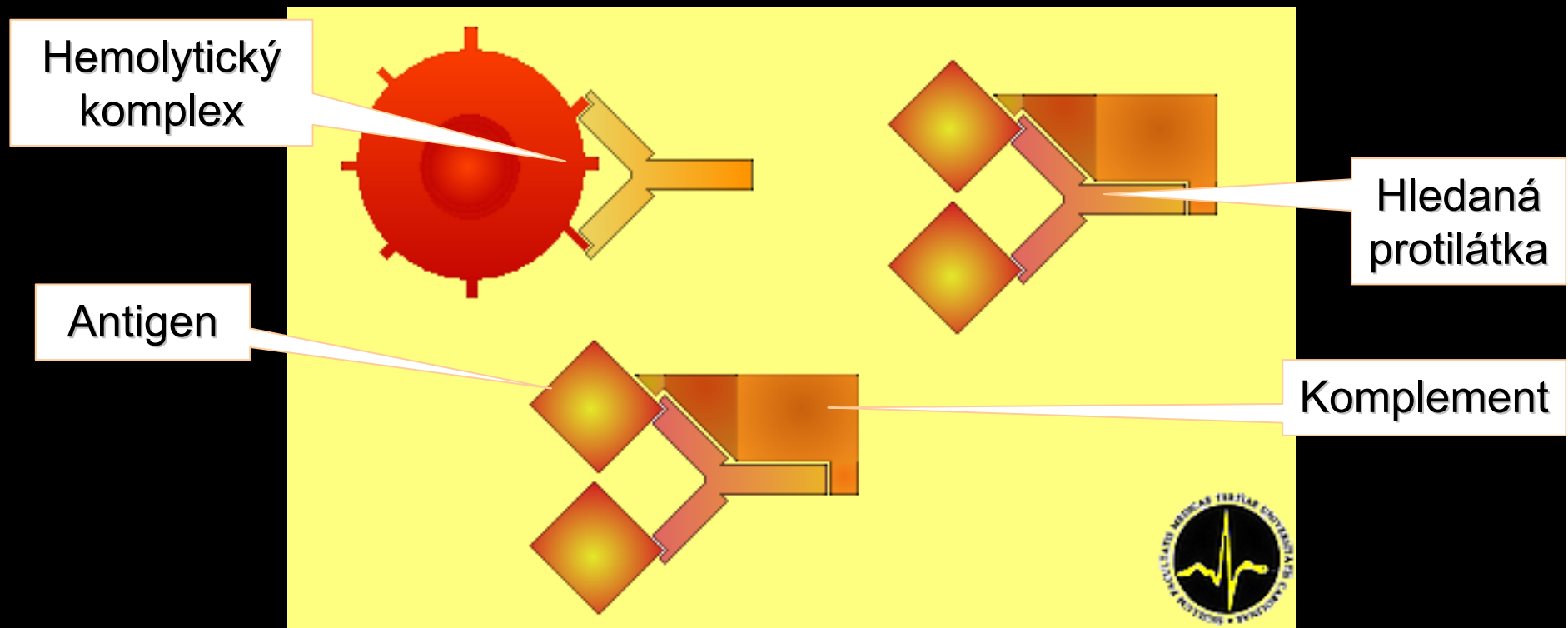
- Princip
- 3 kroky
  - 1) přidá se sérum s antigenem komplementárním k hledaným protilátkám
  - 2) přidá se komplement
  - 3) přidá se hemolytický komplex (beraní erythrocyty a králičí protilátky proti nim)

# 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

# Komplement fixační reakce



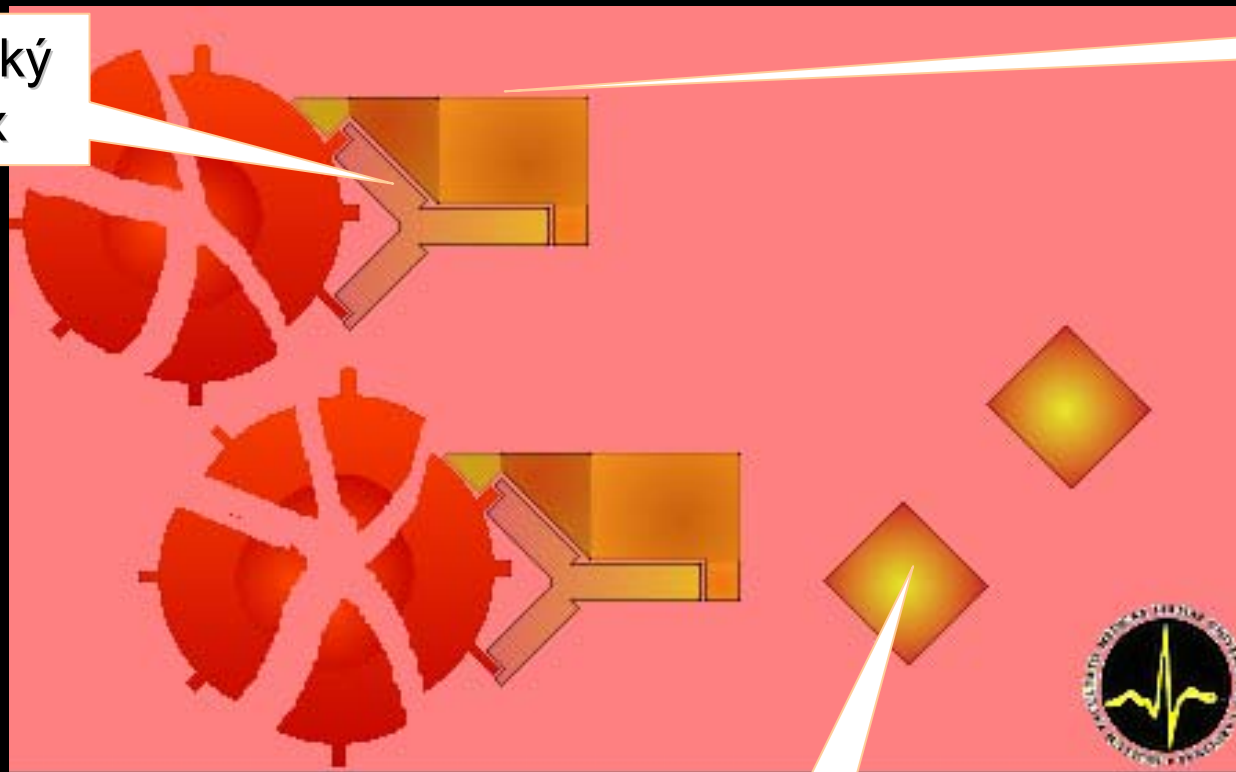
Nedochází však k hemolýze, protože všechny komplement je navázán na primární imunokomplex.

# Komplement fixační reakce



Hemolytický  
komplex

Komplement



Dochází k hemolýze.

Antigen



# Více informací o

Serotypizaci  
Latexové aglutinaci  
ELISA  
Westernblotu  
KFR

najdete na CD:

