

Lékařská mikrobiologie pro ZDRL

Týden 10:

Úvod do sérologie, aglutinace,
precipitace a komplementfixace;
ředění séra

Ondřej Zahradníček

Úvodem

- V této přednášce se už zase budeme zabývat mikrobiologickou diagnostikou, přičemž využijeme to, co jsme se dozvěděli v minulé přednášce. Nejvíc si pamatujme to, co jsme se dozvěděli o specifické humorální imunitě: je založena na interakci **antigenu** (v případě mikrobiálních antigenů jde o povrchovou část těla mikroba) s **protilátkou** (imunoglobulinem, který je tvořen makroorganismem).

Pro zopakování: Metody lékařské mikrobiologie

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

Antigen a protilátka - opakování

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

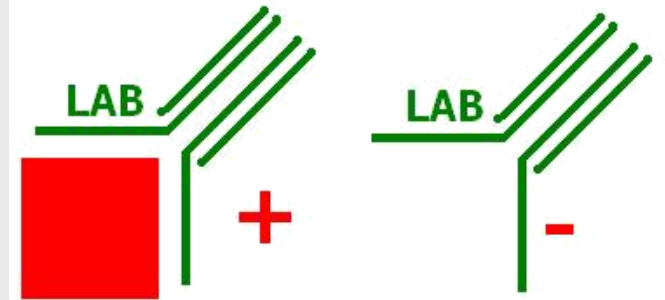
V mikrobiologii nás zajímají mikrobiální antigeny = části mikrobiálního těla, které vzbuzují v hostiteli antigenní odpověď

Protilátka = imunoglobulin, tvořený v těle hostitele jako odpověď na antigenní výzvu (samozřejmě nejen u člověka, ale i u zvířat)

Dva způsoby, jak to využít:

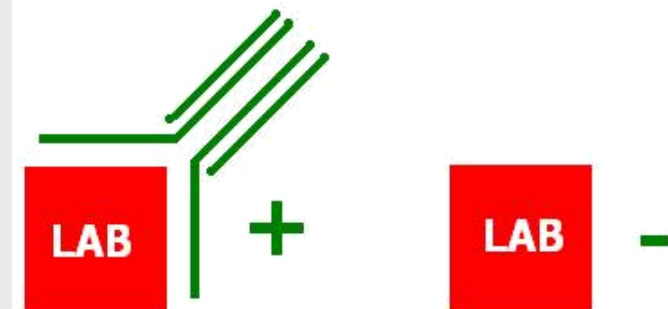
Průkaz antigenu: laboratorní protilátky (zvířecího původu) + vzorek pacienta nebo kmen mikroba.

Přímá metoda



Průkaz protilátky: laboratorní antigen (mikrobiální) + sérum (výjimečně sliny, likvor) pacienta

Nepřímá metoda



Průkaz antigenu a antigenní analýza

- **V rámci průkazu antigenu** (tedy přímého průkazu) lze ještě dále rozlišit dva podtypy:
 - **Přímý průkaz antigenu ve vzorku**, například ve vzorku mozkomíšního moku
 - **Antigenní analýza (identifikace) kmene**, izolovaného ze vzorku (například kmene meningokoka)
- U **nepřímého průkazu** naopak vždy pracujeme se vzorkem, a to **se vzorkem séra**, kde hledáme protilátky

Interpretace

- **Průkaz antigenu** (včetně antigenní analýzy) 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**)
 - **Třída protilátek:** IgM/IgG (více v další přednášce)
 - (*Avidita protilátek*)

Jak tyto informace zjistit

- **Akutní infekce:** velké množství protilátek, převážně třídy IgM¹
- **Pacient po prodělané infekci:** malá množství protilátek, hlavně IgG² (imunologická paměť)
- *Chronická infekce: různé možnosti*



Jak provést reakci „kvantitativně“

- Je velmi těžké zjistit koncentraci protilátek v jednotkách mol/l, mg/l apod.
- Ale dá se dělat jiná věc: mnohonásobně ředit pacientovo sérum.
 - Reaguje-li i po mnohonásobném ředění → → v séru je velké množství protilátky
 - Reaguje jen při nevelkém zředění séra → → jen malé množství protilátky

Geometrická řada

- Technicky nejjednodušší způsob, jak ředit sérum pacienta, je použití **geometrické řady s koeficientem dva**.
- Vycházíme **z neředěného séra**, nebo **ze séra o určitém předředění** (např. 1 : 5, 1 : 10, 1 : 20 a podobně)
- V každém dalším důlku je **dvojnásobné ředění** oproti předchozímu, například tedy řada 1 : 10, 1 : 20, 1 : 40, 1 : 80, 1 : 160...

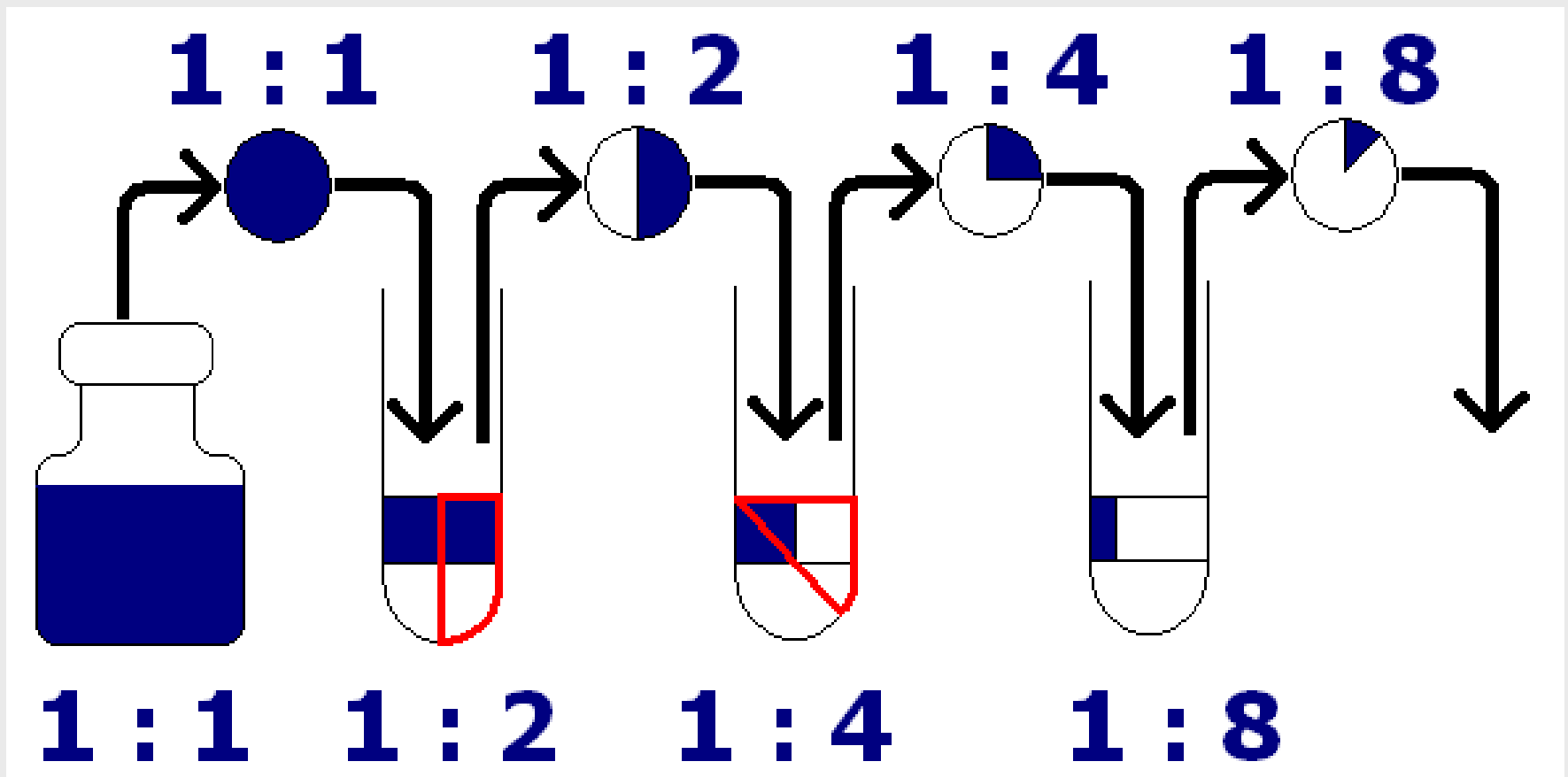
Počítání ředění v serologii

Pozor, v serologii např. ředění 1 : 4 znamená jeden díl séra a tři díly fyziologického roztoku (tj. čtyři díly celkem)!

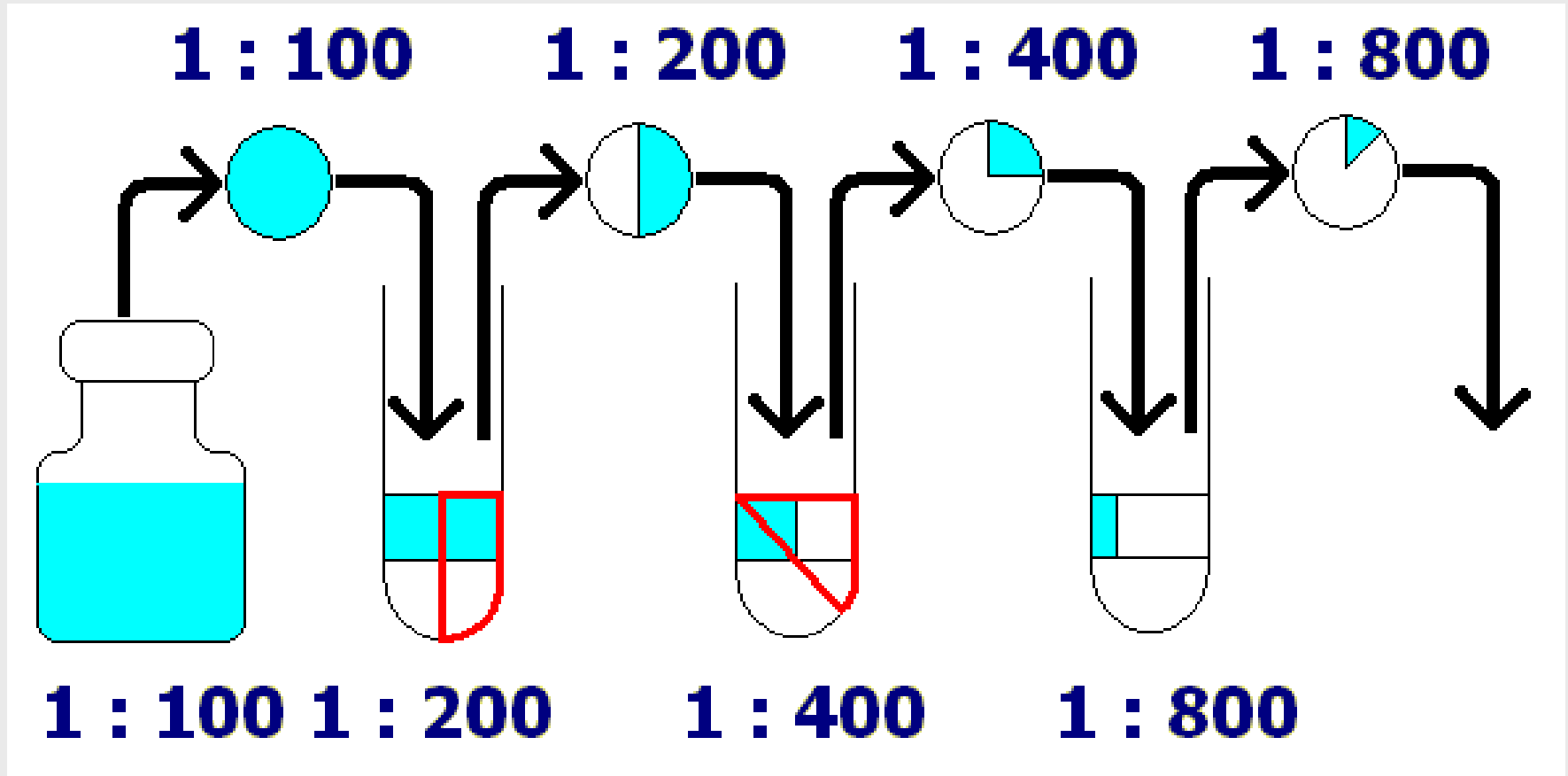
Při „biochemickém“ počítání (počet dílů séra ku počtu dílů diluentu) bychom naše geometrické řady museli značit např. 1 : 9, 1 : 19, 1 : 39, 1 : 79. To by bylo značně nepraktické

Geometrická řada: jak ji udělat

a) bez předředění původního séra



b) s předředěním původního séra



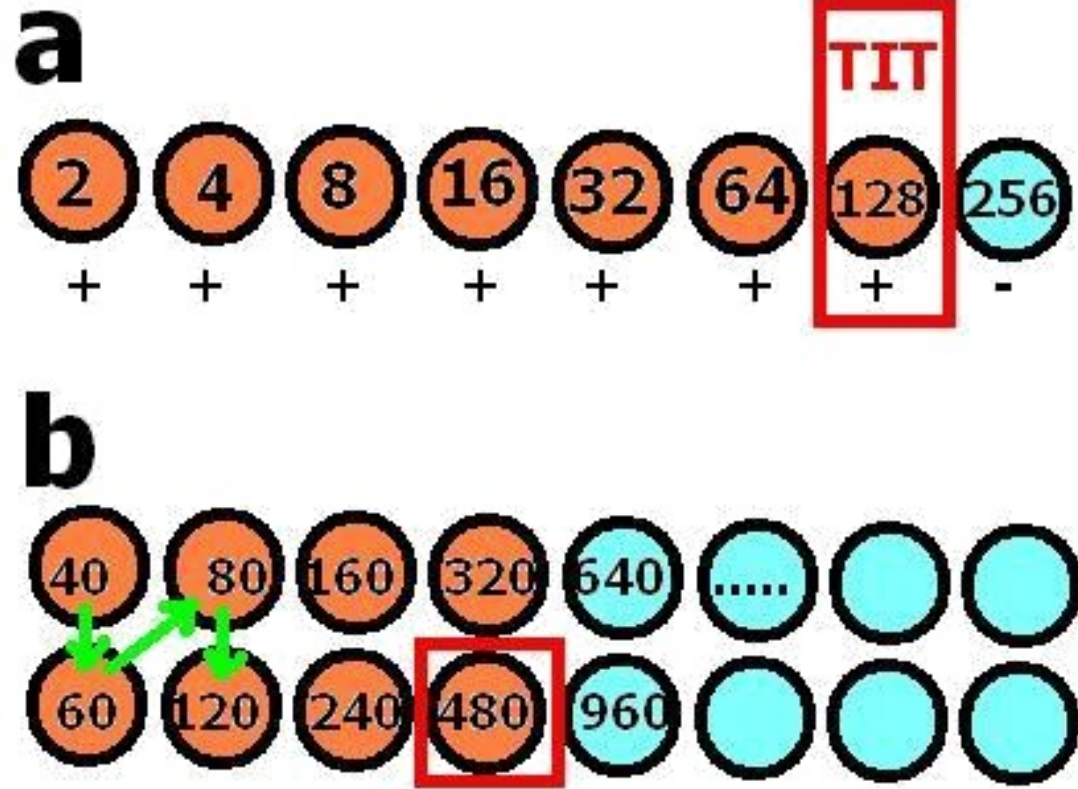
Samozřejmě, předředění nemusí být zrovna 1 : 100, může to být třeba 1 : 5, 1 : 10, 1 : 20 či jakékoli jiné.

Poté, co se provede naředění...

Po naředění séra geometrickou řadou se do všech zkumavek nebo důlků **přidá antigen**. Nyní v každém důlku buď dojde, nebo nedojde k reakci; to může být vidět, nebo se to musí zviditelnit přidáním další složky

Sledujeme, **jak moc můžeme sérum naředit**, aby ještě byla viditelná (respektive „zviditelnitelná“) pozitivní reakce

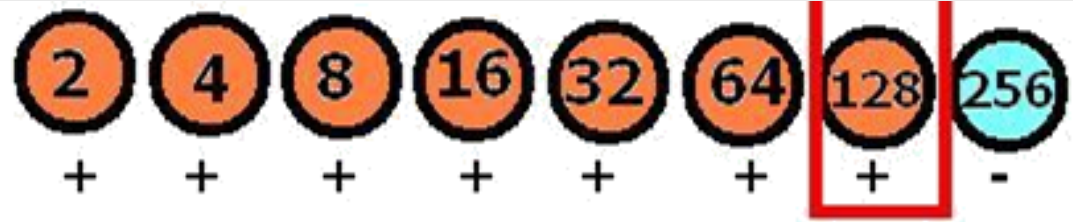
Pojem TITR



Titr – nejvyšší ředění, kde je ještě viditelná pozitivní reakce.

I pokud jsme reakci pro zpřesnění provedli ve dvou řádcích místo jednoho (s různým počátečním předředěním), určí se jen jeden titr.

Vzestupy a poklesy titru

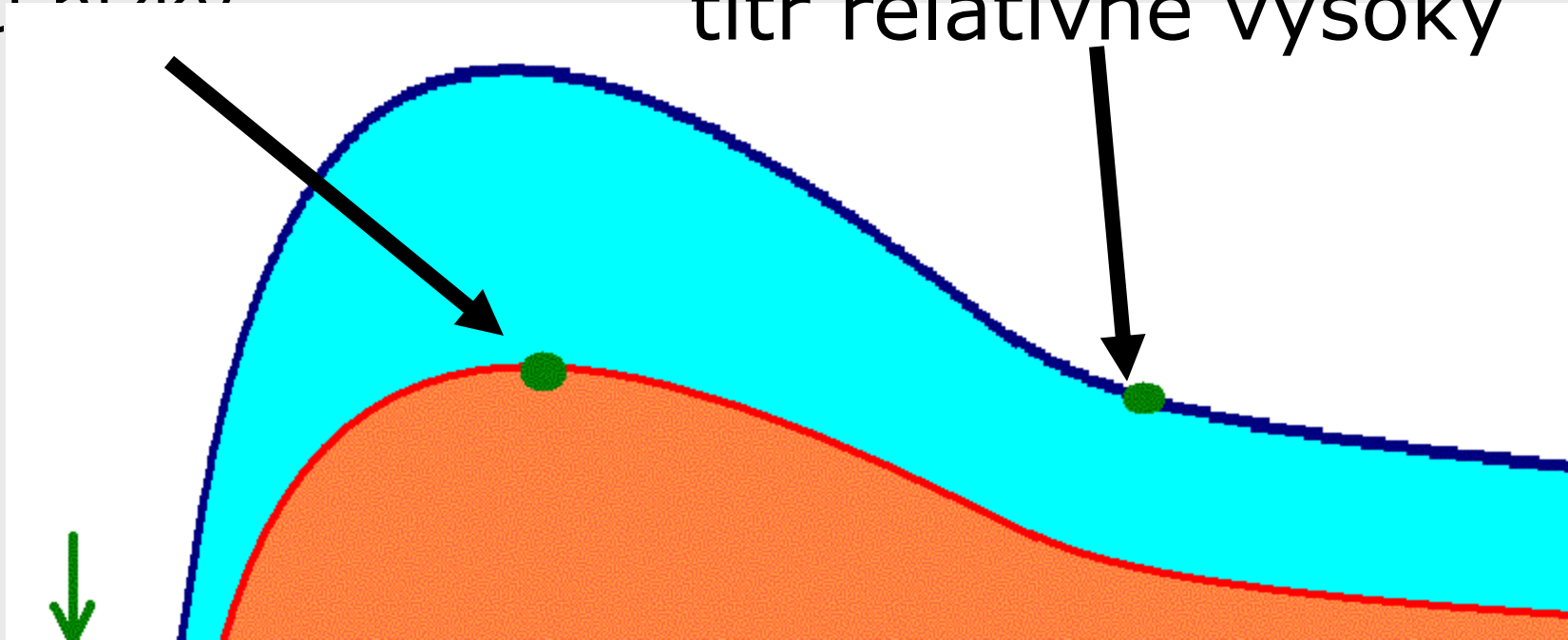


- Při použití geometrické řady znamená
 - vzestup/pokles titru **o jeden důlek dvojnásobný vzestup pokles.**
 - vzestup/pokles **o n důlků je pak vzestup/pokles 2^n násobný.**

Proč nestačí samotný titr

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

Velmi reaktivní pacient má naopak i dlouho po infekci titr relativně vysoký



Párová a nepárová séra

- **Párová séra** = první vzorek je uchováván v ledničce, dokud nepřijde i druhý. Pak jsou oba hodnoceny naráz. **Čtyřnásobný vzestup** se v tom případě má za signifikantní pro akutní infekci. Bohužel párová séra nejsou běžná.
- **Séra nejsou párová** (druhý vzorek je vyšetřen zvlášť): zvětšuje se riziko náhodné chyby, proto zpravidla vyžadujeme **osminásobný vzestup** titru. Tyto údaje jsou však pouze orientační a liší se případ od případu.

Pořád musíte mít na paměti:

- Veškeré „srandičky“ typu titry, třídy protilátek, zjišťování avidity, slouží k odlišení akutní infekce, chronické infekce a stavu po dávno prodělané infekci. Týkají se ovšem pouze **nepřímého průkazu!**
- **Přímý průkaz** totiž přímo prokazuje v těle pacienta část patogenova organismu. Není tedy nutné žádné další upřesnění

Jednotlivé serologické reakce

- Existuje několik **typů serologických reakcí**. Některé jsou jednoduché, výsledek reakce antigenu s protilátkou je přímo viditelný, jiné jsou složité, je nutné přidání dalších složek
- Téměř všechny mohou být použity **k průkazu antigenu, k antigenní analýze i k průkazu protilátky**; ne všechny se ale ke všem těmto účelům doopravdy používají
- V rámci reakcí existují ještě často **různé možnosti technického provedení**

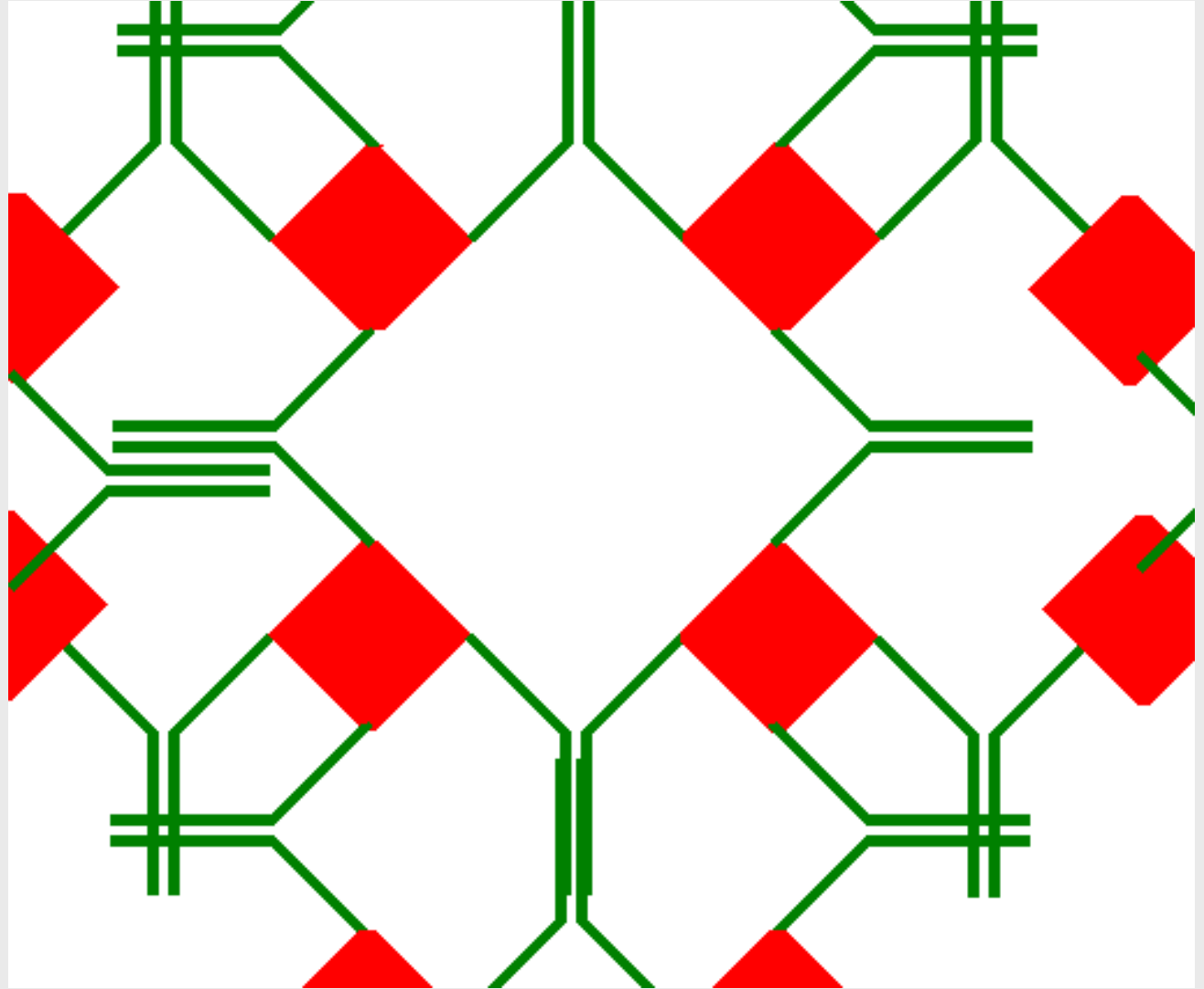
Typy serologických reakcí a jejich způsoby využití

	Průkaz antigenu	Antigenní analýza	Nepřímý průkaz
Aglutinace	občas	často	někdy
Precipitace	málokdy	málokdy	občas
KFR	často (viry)	ne	často (viry)
Neutralizace	občas	ne	často
Značené složky	velmi často	výjimečně	velmi často

Precipitace, aglutinace, aglutinace na nosičích

- **Precipitace:** Antigeny jsou ve formě izolovaných makromolekul (koloidní antigen)
- **Agglutinace:** Antigen je součástí buňky mikroba (pracujeme tedy s celými mikroby)
- **Agglutinace na nosičích:** Původně izolované antigeny jsou navázány na nosič (latex, erytrocyt, polycelulóza)

Precipitate



Využití precipitace

Precipitace je stará reakce, která už se dnes využívá poměrně málo. Několik případů využití však zůstává:

V nepřímém průkazu:

Reakce RRR u syfilis (zvláštní je tím, že je to reakce s tzv. heterofilním antigenem, tedy že antigen nepochází z mikroba)

Mikroprecipitace v agaru dle

Ouchterlonyho (u aspergilózy, dříve i u toxoplasmózy)

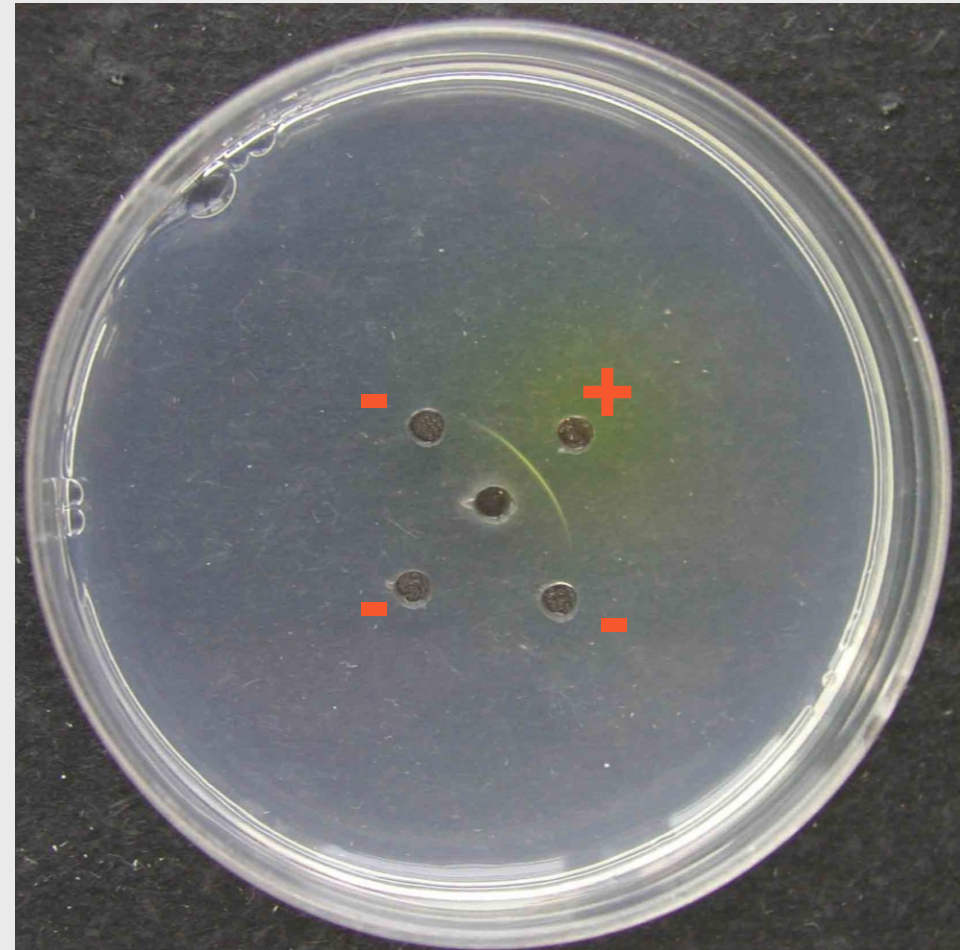
V přímém průkazu se kdysi používala prstencová precipitace u streptokoků

RRR jako příklad precipitace

- Detekce protilátek, které jsou pozitivní u syfilis, ačkoli to nejsou protilátky proti *Treponema pallidum*, nýbrž proti kardiolipinu (látko, která se objevuje u syfilitiků v těle, ale může se objevovat i při některých jiných stavech)
- Takovým reakcím říkáme **průkaz heterofilních protilátek** – jsou to tedy protilátky, které nejsou zaměřené proti antigenu mikroba, ale proti jinému antigenu, který je v době výskytu mikroba přítomen v těle pacienta.
- Reakce je poměrně dost citlivá, ale **velmi málo specifická** (pozitivita se musí ověřit jinými, spolehlivějšími metodami)

Mikroprecipitace v agaru dle Ouchterlonyho

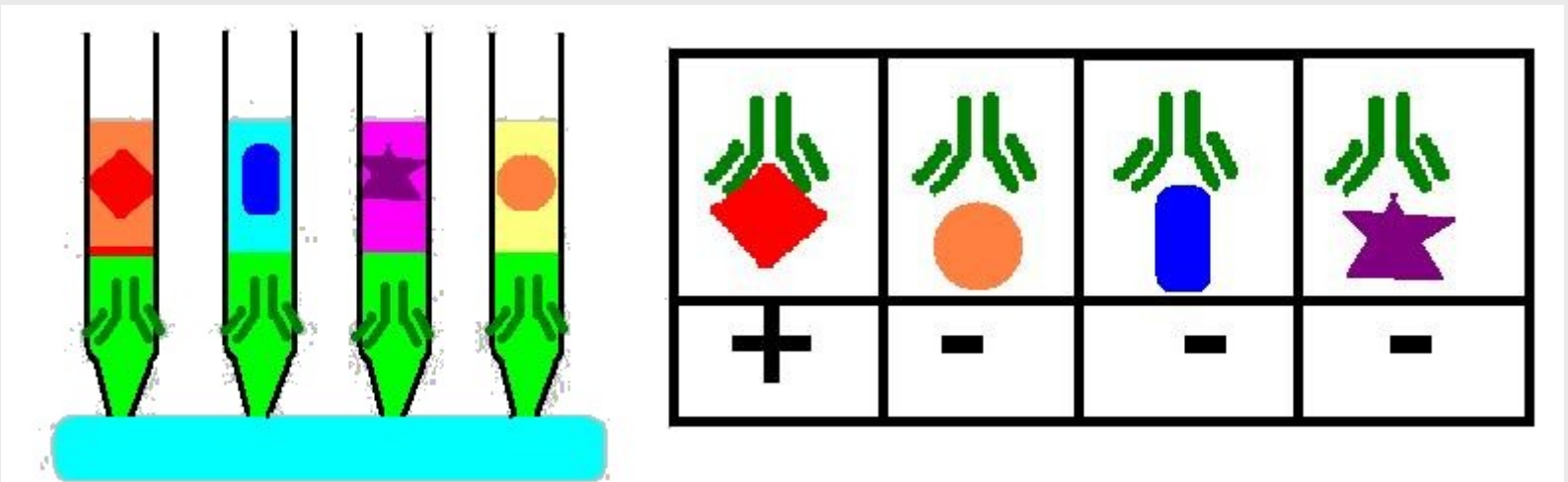
V prostředním důlku je suspenze antigenu. Do čtyř ostatních důlku se dají séra pacientů. Antigen difunduje ze svého prostředního důlku do okolí. Je-li sérum pozitivní, difundují z něj protilátka. Uprostřed cesty se antigen s protilátkou setká a vznikne precipitační linie.



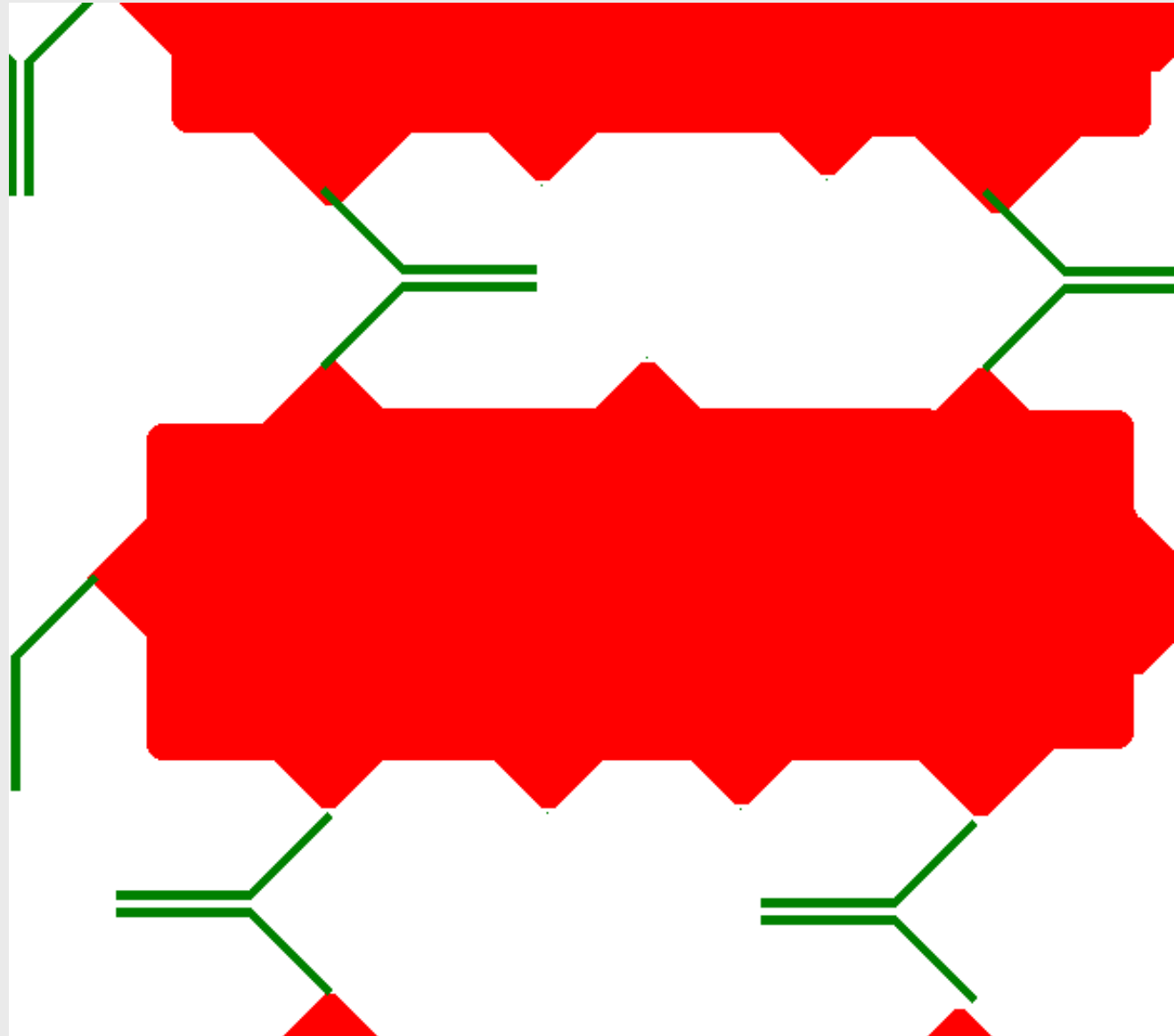
Prstencová precipitace

Precipitace k detekci antigenu:

- 1) zvířecí sérum s protilátkami se napipetuje do pipetky zabodnuté do plastelíny
- 2) čtyři různé extrakty kmenů se opatrně převrství na séra (aby se nesmíchaly)
- 3) při pozitivitě se na styku tekutin objeví prstenec – důkaz precipitace



Aglutinace



Aglutinace: příklady použití

K antigenní analýze:

- určení serotypu u střevních patogenů, zejména salmonel, shigel a yersinií
- určení některých serotypů *Escherichia coli*

technické provedení: smíchání kmene (nebo jeho suspenze ve fyziologickém roztoku) s příslušným sérem

K přímému průkazu ve vzorku se používá spíše aglutinace na nosičích (viz dále)

K nepřímému průkazu různých bakterií (u yersinií, tularémie

technické provedení: v mikrotitrační destičce s využitím ředěných sér pacienta

Příklad **antigenní analýzy** pomocí aglutinace: Průkaz Enteropatogenní *Escherichia coli*

- Většina kmenů *Escherichia coli* je „hodných“
- Ze všech antigenních typů *E. coli* je asi 12, které jsou „enteropatogenní“ (EPEC) – mohou dělat novorozenecké průjmy. Neliší se nijak jinak než svými antigeny. Máme-li tedy kmen *E. coli* ze stolice novorozence, je vhodné ověřit antigenní analýzou, zda nejde o kmen EPEC.
- Test probíhá jako **smíchání suspenze podezřelého kmene s protilátkami**. Dvě kapky se smíchají na sklíčku. Pozitivita se projeví jako vznik vloček v kapce

Použití polyvalentních sér

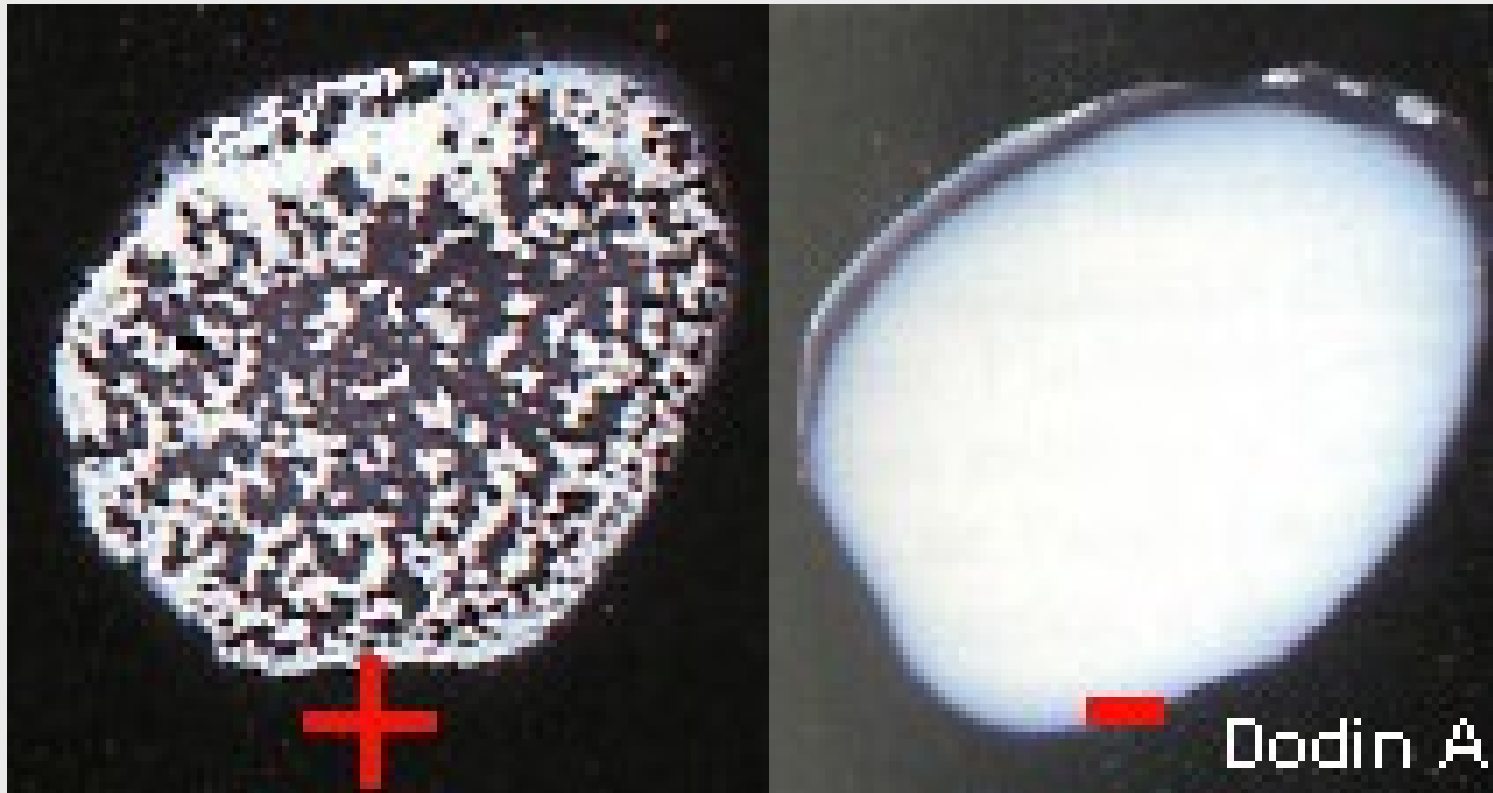
Příklad průkazu EPEC je zároveň ukázkou využití tzv. polyvalentních sér.

Vzhledem k tomu, že antigenních typů *E. coli* řazených k EPEC je asi 12, **bylo by normálně nutno provést 12 testů s různými protilátkami.**

V praxi ale použijeme **polyvalentní séra:** nonavalentní obsahuje protilátky proti devíti typům EPEC, trivalentní proti dalším třem.

*Je vám jasné, proč tu neurčujeme titry?
(Je to samozřejmě proto, že jde o antigenní analýzu a ne průkaz protilátek)*

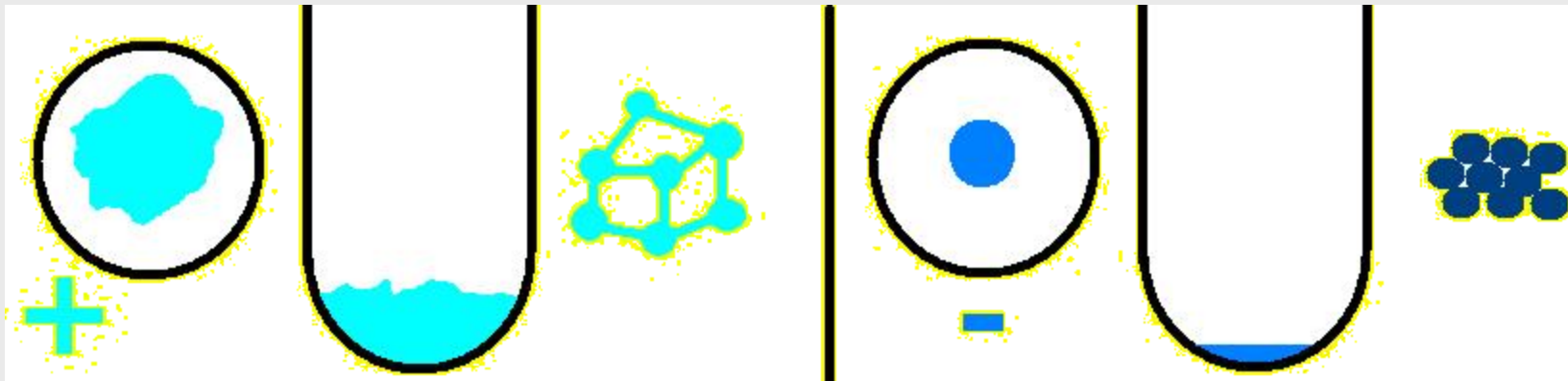
Průkaz EPEC – výsledek



Aglutinace na průkaz protilátek se obvykle provádí v mikrotitrační destičce. Jak vypadají pozitivní a negativní výsledky?

Pozitivní – nepravidelný chuchvalec (aglutinát)

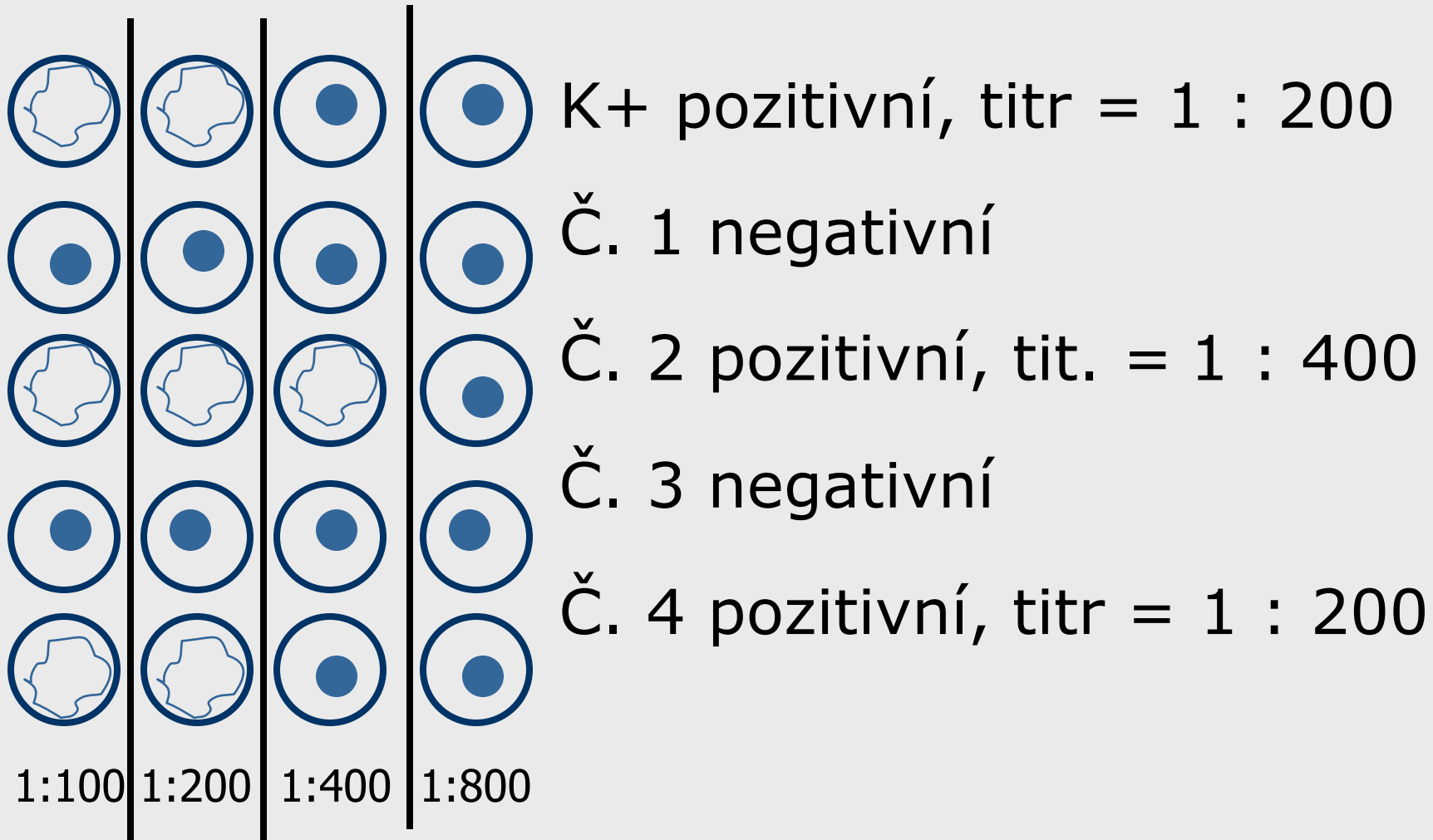
negativní – malé pravidelné kolečko (neaglutinované bakterie sedimentují na dno)



Nezapomeňte, že titr = nejvyšší ředění s pozitivní reakcí.

První důlek je ředěn 1 : 2, druhý 1 : 4 atd.

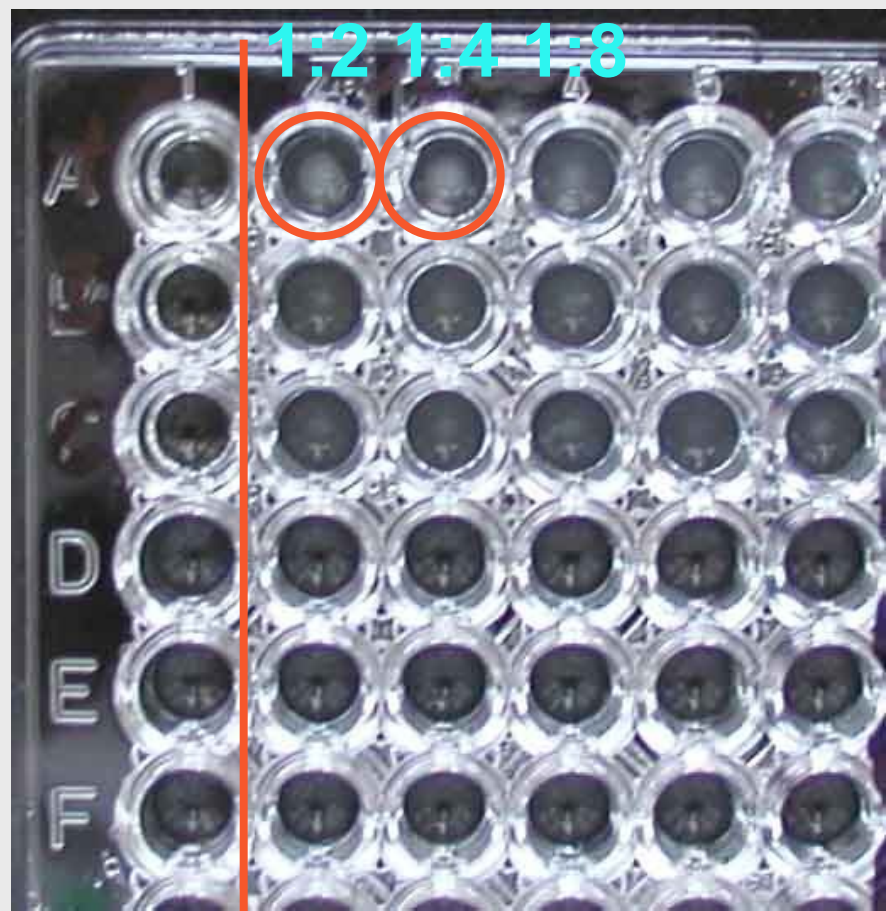
Příklad výsledku: aglutinace k detekci protilátek proti yersiniím



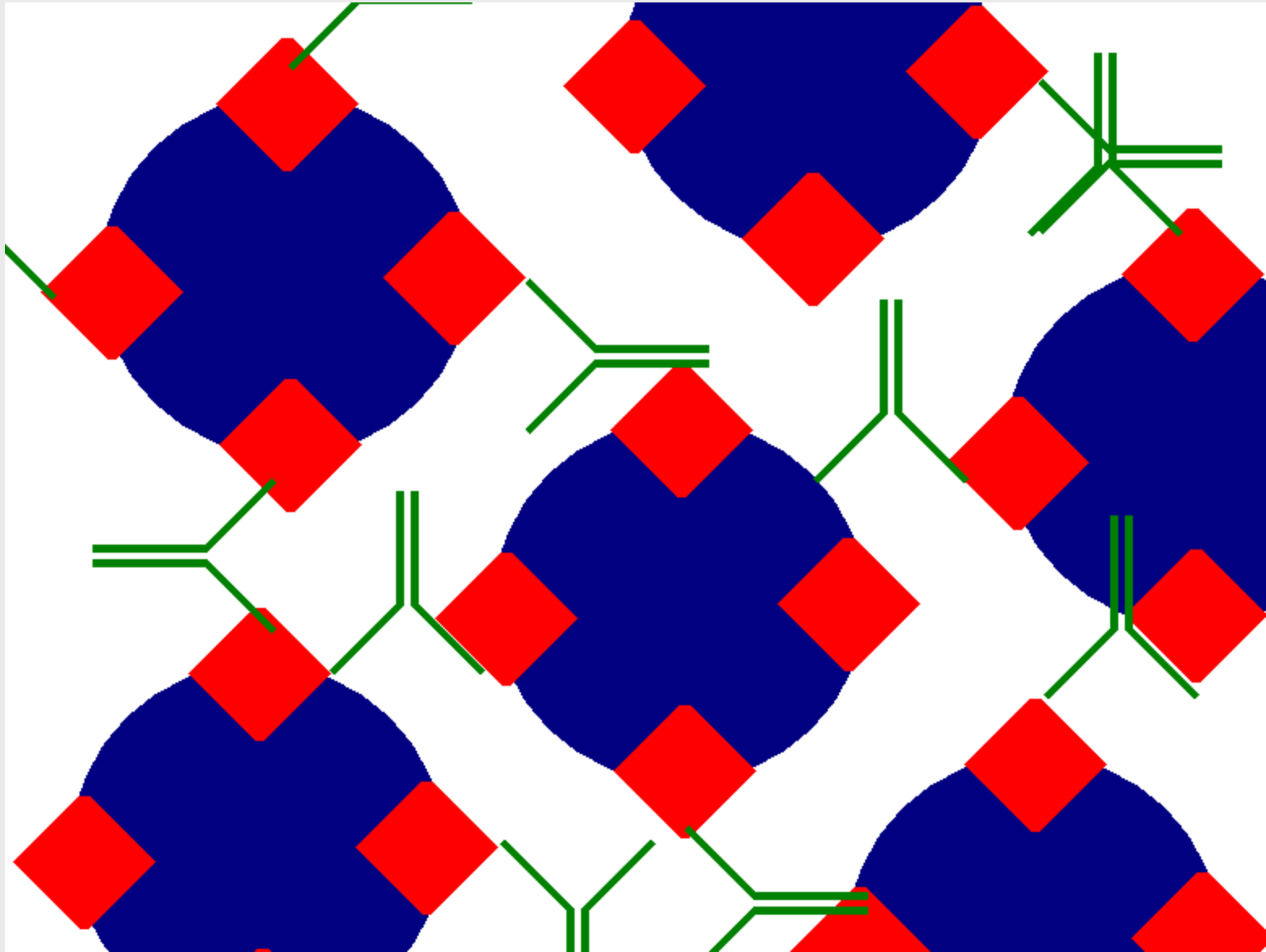
Konkrétní ukázka (*ono se to špatně fotografuje, lépe je to vidět při reálném pozorování, i tak je potřeba pozorovat proti černému pozadí*)

www.medmicro.info

V prvním sloupci jsou kontroly, vlastní reakce začíná od druhého sloupce



Aglutinace na nosičích



Aglutinace na nosičích

Jak již bylo řečeno, je to vlastně **precipitace převedená na aglutinaci použitím nosiče** (červená krvinka, latexová či polycelulózová částice).

Používáme ji tam, kde pracujeme s **koloidním (makromolekulárním) antigenem**, případně když si **nejsme jisti, jestli budeme mít k dispozici celé bakterie** (zejména u přímého průkazu ve vzorku)

Aglutinace na nosičích – využití

Přímý průkaz ve vzorku

- průkaz antigenů bakterií, které mohou způsobovat záněty mozkových blan, přímo ve vzorku mozkomíšního moku

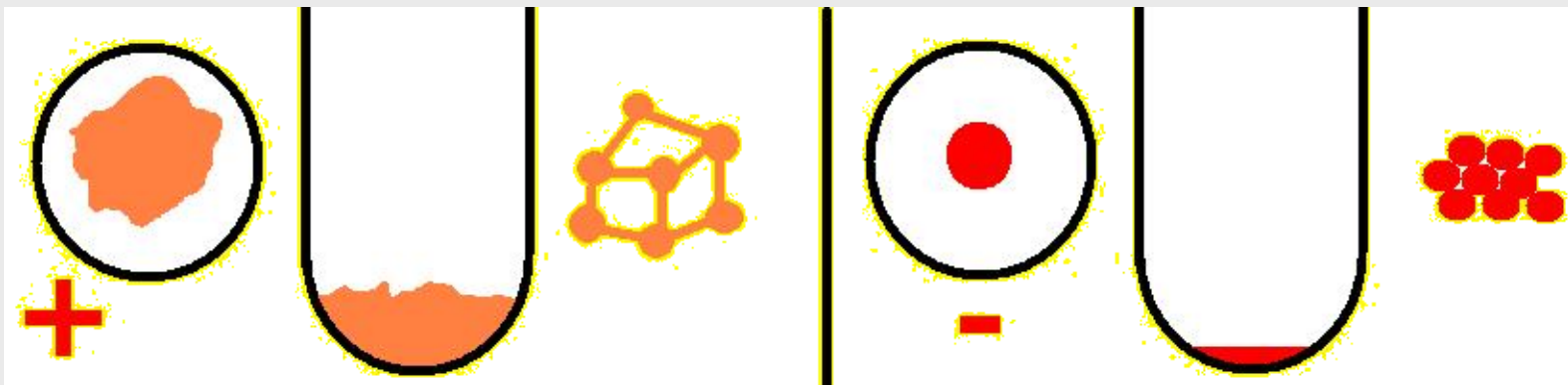
Antigenní analýza s kmeny bakterií

- skupinové určení streptokoků
- určení antigenního typu u *Haemophilus influenzae*
- určení seroskupiny meningokoků
- a spousta dalších podobných případů

K nepřímému průkazu méně často, příkladem je reakce TPHA k průkazu protilátek u syfilis

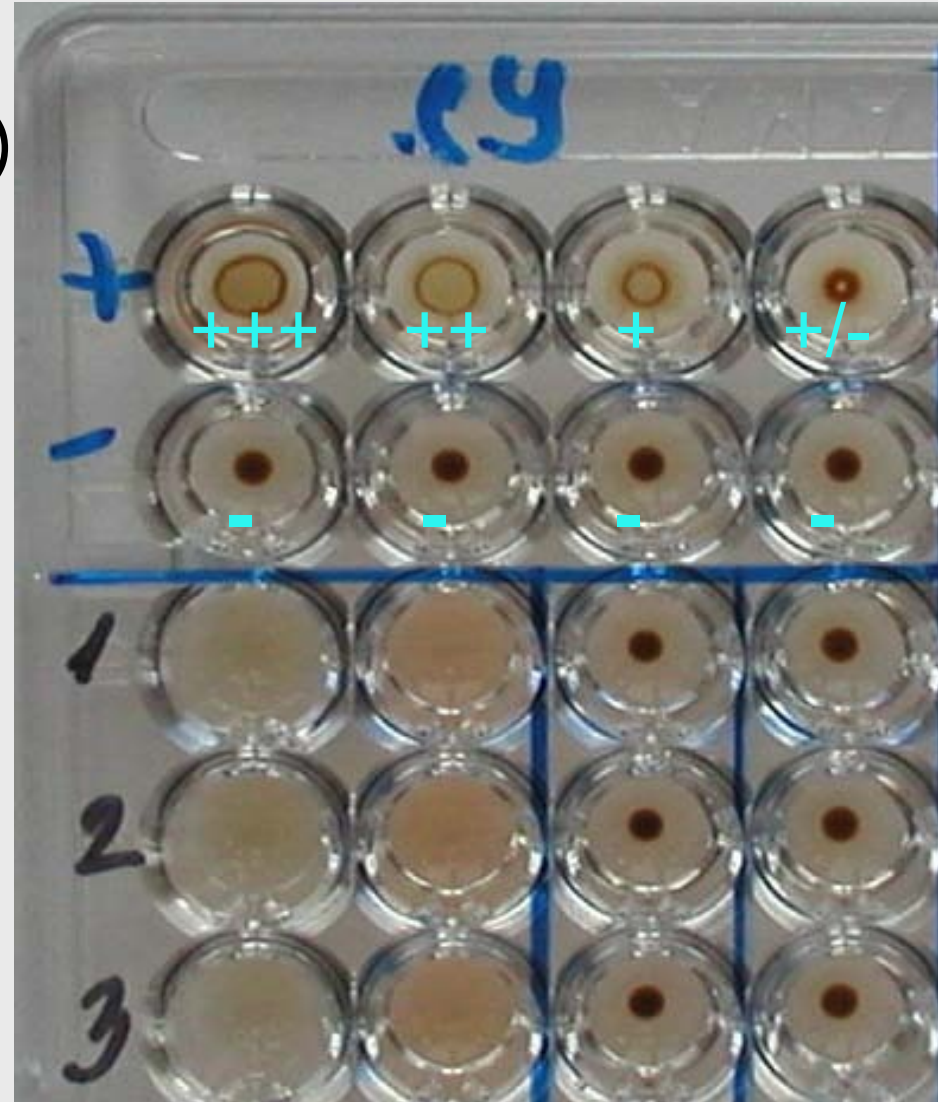
Treponema pallidum hemaglutinace (TPHA) k průkazu syfilis

- Použijeme červené krvinky, na které je teprve navázán vlastní antigen *T. pallidum* (*Dnes se v tomto testu červené krvinky nahrazují polycelulózovými částicemi – v tom případě jde o TPPA (T. p. polycelulózová aglutinace)*)
- Tato reakce je sice nepřímý průkaz, ale nepoužívá se ředění a nezjišťují titry. Je to totiž tzv. screeningová reakce a případná pozitivita se dále ověřuje spolehlivějšími metodami



Ukázka výsledku TPHA

- V horním řádku jsou pozitivní kontroly od vysoce pozitivní (+++) po hraniční (+/-)
- Ve druhém řádku jsou negativní kontroly
- Výsledky se odečítají v dalších řádcích, vždy ve čtvrtém sloupci. Pacienti 1, 2 i 3 jsou negativní.



Komplementfixace: srovnání s ostatními

- U **precipitace** potřebujeme do reakce jen samotný antigen (makromolekulu) a protilátku
- U **aglutinace** do reakce vstupuje zpravidla celá bakterie, antigen je její součástí
- U **aglutinace na nosičích** máme kromě antigenu a protilátky v reakci ještě nosič antigenu (krvinka, latex, polycelulóza)
- U **komplementfixace** máme v reakci navíc komplement a indikátorový systém (amboceptor a beraní erytrocyty)

Typy serologických reakcí a jejich způsoby využití

	Průkaz antigenu	Antigenní analýza	Nepřímý průkaz
Aglutinace	občas	často	někdy
Precipitace	málokdy	málokdy	občas
KFR	často (viry)	ne	často (viry)
Neutralizace	občas	ne	často
Značené složky	velmi často	výjimečně	velmi často

Komplementfixace (KFR)

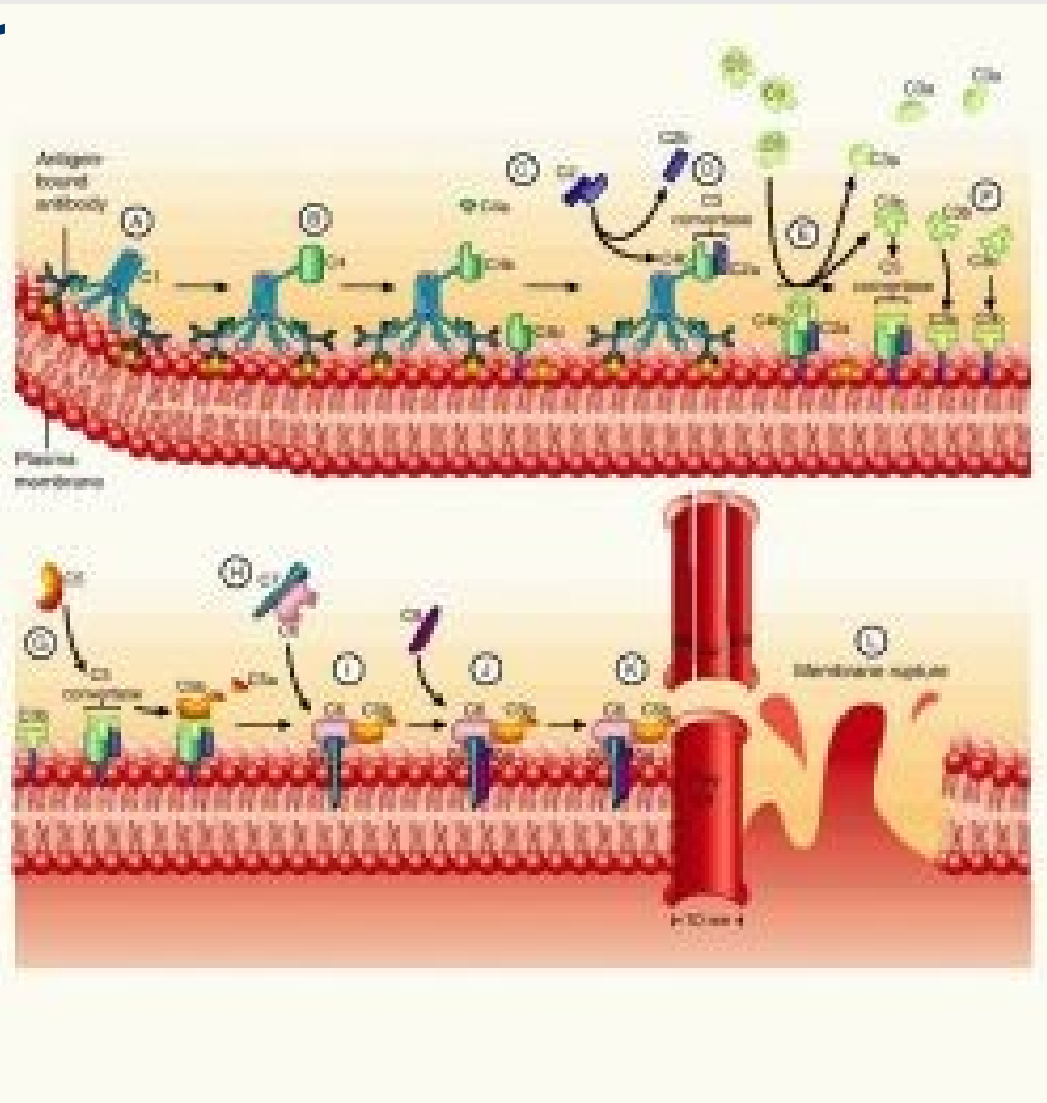
Komplement = složka imunitní reakce

Potřebujeme pracovat s přesně odměřeným množstvím komplementu, proto pacientův vlastní komplement před reakcí inaktivujeme a do reakce používáme komplement morčecí

- 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**

Komplement

- součást nespecifické humorální imunity
- složitý kaskádový systém



Komplement – na co se váže:

- KOMPLEMENT + POUHÝ ANTIGEN:
neváže se
- KOPMLEMENT + PROTILÁTKA:
neváže se
- KOMPLEMENT + KOMPEX
ANTIGENU S PROTILÁTKOU:
vazba

Princip komplementfixace

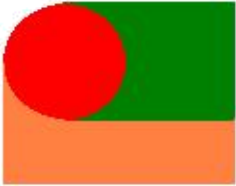





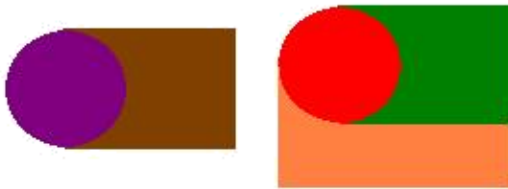






- Komplement se tedy **váže na komplex antigen-protilátka** (nezůstává žádný volný komplement) To ale samo o sobě není vidět.
- Proto používáme ještě tzv. **indikátorový komplex** – beraní erythrocyty + králičí protilátky proti nim (tzv. amboceptor). V případě, že se na zbyl volný komplement, naváže se na indikátorový systém a dojde k hemolýze

Pokus k ověření funkce komplementu (dělají medici v praktiku)

Amboceptor = králičí protilátka proti beraním erytrocytům

1. Beraní ery + amboceptor bez komplementu → není hemolýza (chybí komplement)
2. Beraní ery + komplement bez amboceptoru → není hemolýza (chybí protilátky)
3. **Beraní ery + komplement + amboceptor → hemolýza (všechny složky přítomné)**
4. Králičí ery + komplement + amboceptor → není hemolýza (chybí „ten správný“ antigen)

Princip KFR (negativní, pozitivní)

+	-	
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


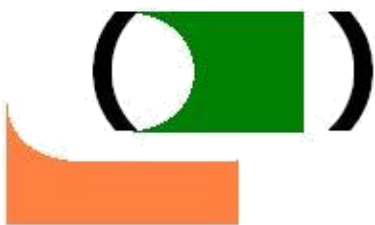




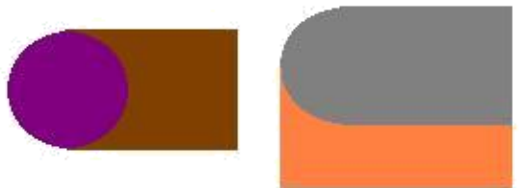
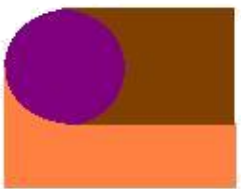





- Příliš mnoho komplementu → falešná negativita. **Co dělat?** Titrovat komplement (viz další obrazovka)
- Některá složka séra sama o sobě vyvazuje komplement (složka antikomplementarity): falešně pozitivní výsledky. **Co dělat?** Provést test antikomplementarity. Je to vlastně „skoro normálně“ provedená reakce, ovšem bez antigenu

Titrace komplementu

- Pro reakci potřebujeme množství morčecího komplementu, které není moc velké ani malé.
- Proto zjišťujeme, jaké množství komplementu hemolyzuje pracovní jednotku krvinek s amboceptorem (hemolytická jednotka)



Test antikomplementarity

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

Použití KFR

- KFR lze použít pro diagnostiku **mnoha, zejména virových infekcí**
- Jako i jiné serologické reakce se KFR používá k **průkazu antigenu či protilátky**
- Častější je ale průkaz protilátky, proto se jím budeme zabývat víc
- Berme to tedy tak, že máme **laboratorní antigen**, který konfrontujeme se **sérem pacienta** (kde hledáme protilátky)

Praktické provedení KFR

KFR se zpravidla provádí v mikrotitrační destičce.

U průkazu protilátek se zpravidla postupuje následovně:

- **pacient má celý řádek** (u párových sér dva řádky – jeden na první, druhý na druhý vzorek)
- **v prvním důlku** (nalevo od čáry) je test antikomplementarity (musí být hemolýza, jinak nutno opakovat)
- **v dalších důlcích** (napravo od čáry) je vlastní test s různě řaděnými séry
- U vlastních testů (napravo od čáry) platí:
tečka = pozitivita, hemolýza = negativní

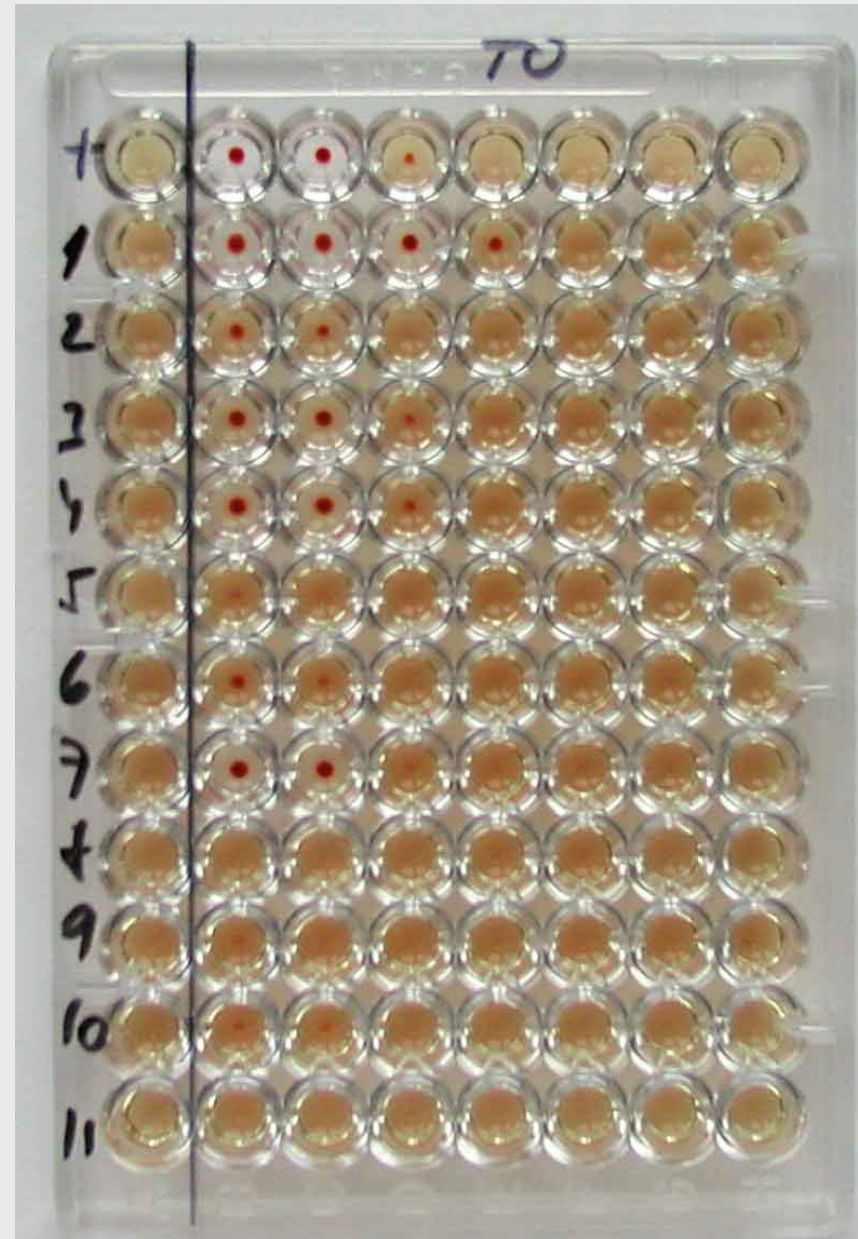
Ukázka výsledku KFR

Nalevo od čáry jsou testy antikomplementarity.

Předředění séra je 1:10, další důlky mají ředění 1:20, 1:40 atd.

Pozitivní je pacient 1 (titr 1 : 80), a pacienti 2, 3, 4, 6, 7 (titr 1 : 20, u 3 a 4 možná 1 : 40)

Ostatní pacienti jsou negativní (nemají protilátky proti toxoplasmóze)



Pro dnešek děkuji za pozornost

Prof. Tomášek, někdejší přednosta našeho ústavu, objevitel tzv. Tomáškova antigenu u syfilis

