

Serologické vyšetřovací metody

Serologické reakce

Přímý průkaz

- ✓ průkaz antigenu
- ✓ průkaz nukleové kyseliny

Nepřímý průkaz

- ✓ průkaz protilátek

Nepřímý průkaz

= průkaz specifických protilátek neboli průkaz serologický

- serologické reakce – reakce mezi antigeny a protilátkami *in vitro*
- Materiál: 5 - 7 ml srážlivé krve, likvor, punktát

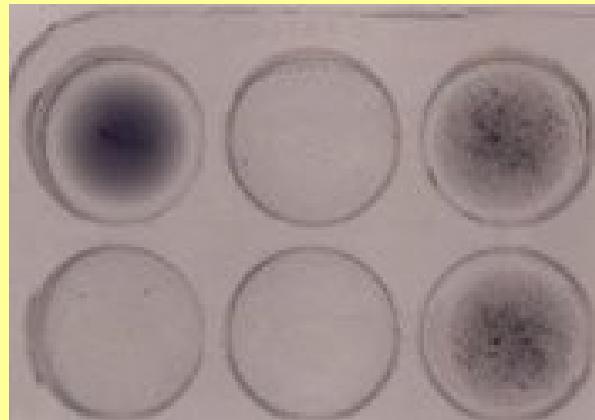
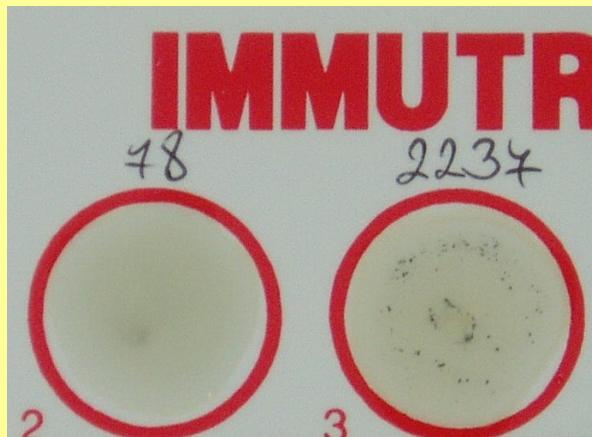
Přehled serologických metod

1. Precipitace
2. Aglutinace
3. Komplement fixační reakce (KFR)
4. Neutralizace
5. Reakce se značenými složkami:
 - imunofluorescence
 - enzymová imunoanalýza
 - Western blot (imunoblot)

Precipitace

- antigen koloidní povahy
- precipitační neboli vločkovací testy na lues
- VDRL, RRR, RPR

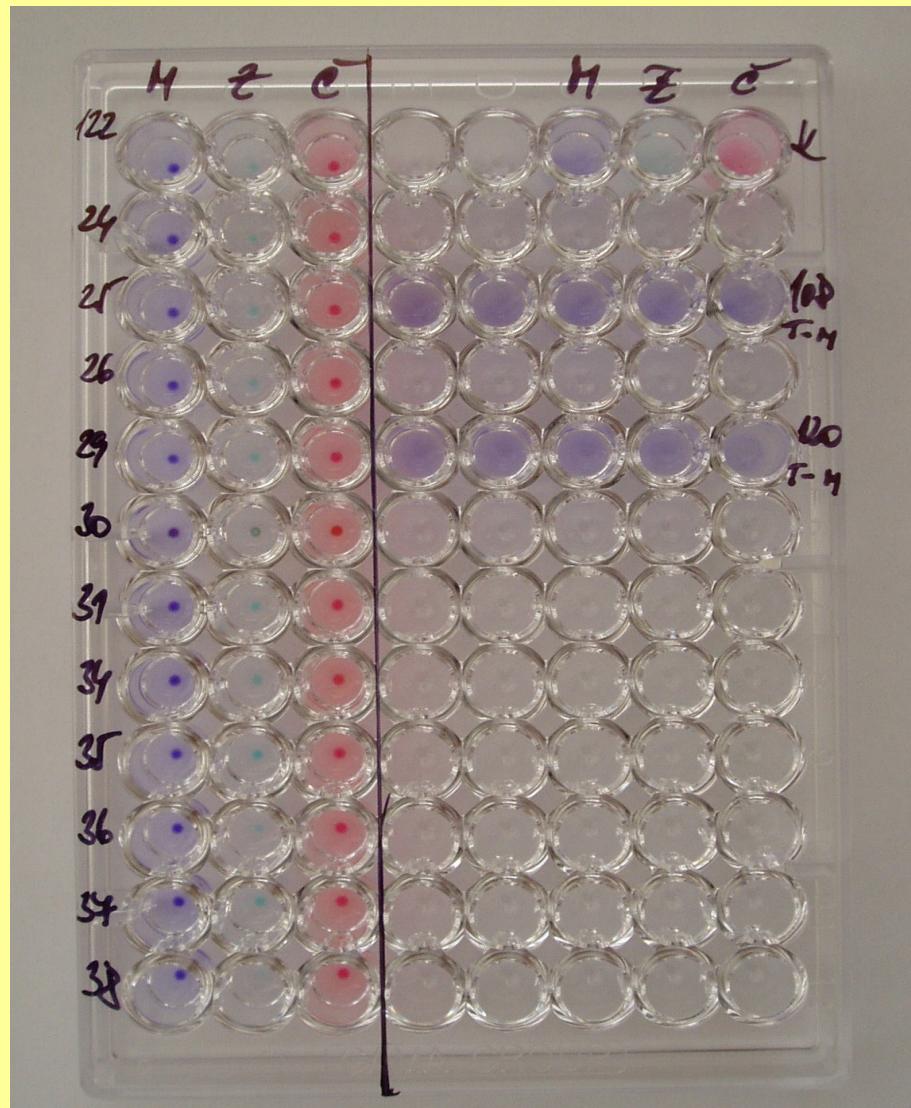
kardiolipin + protilátky v séru → precipitace



Aglutinace

- antigen korpuskulární povahy
- antigen + hledaná protilátka → viditelný shluk (aglutinát)
- přímá, nepřímá (na nosičích)
- průkaz protilátek u salmonelózy (Widalova reakce), yersiniózy, listeriózy, tularémie

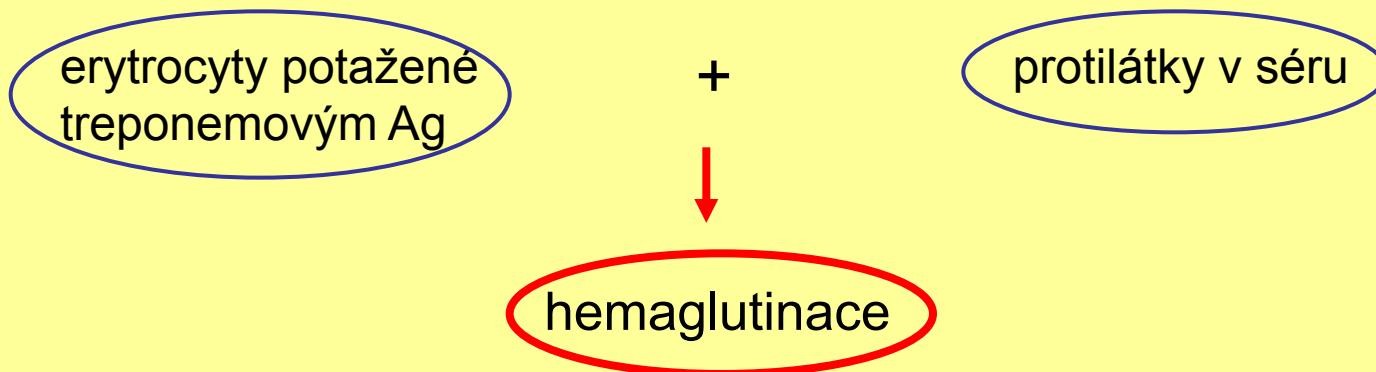
Aglutinace – průkaz protilátek proti *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*



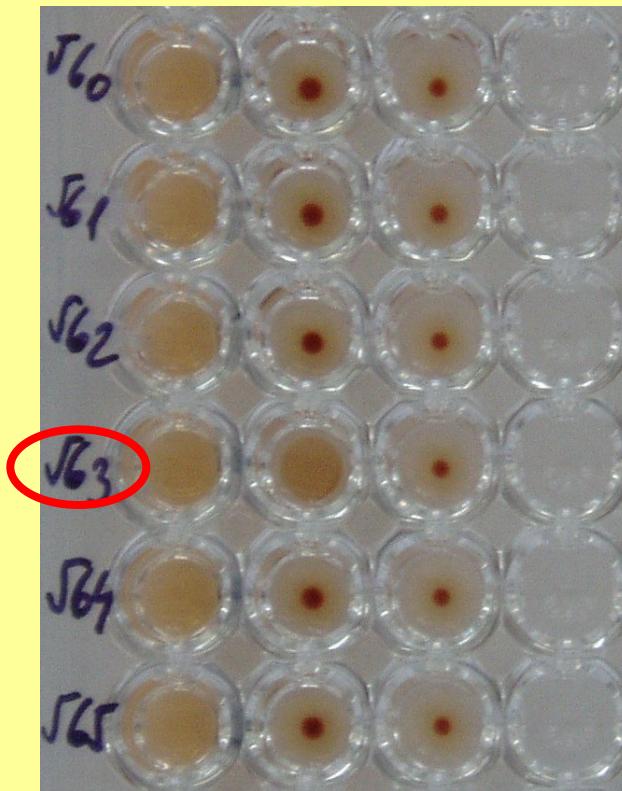
←
←

Aglutinace na nosičích

- antigen navázaný na vhodnou částici:
 - ✓ latex – latexová aglutinace
 - ✓ erytrocyt – pasivní hemaglutinace
- TPHA – *T. pallidum* hemagglutination

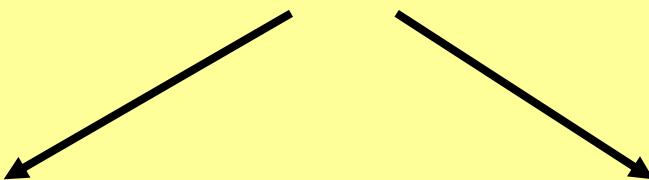


TPHA – průkaz protilátek proti *T.pallidum*
pasivní hemaglutinaci



Komplement fixační reakce

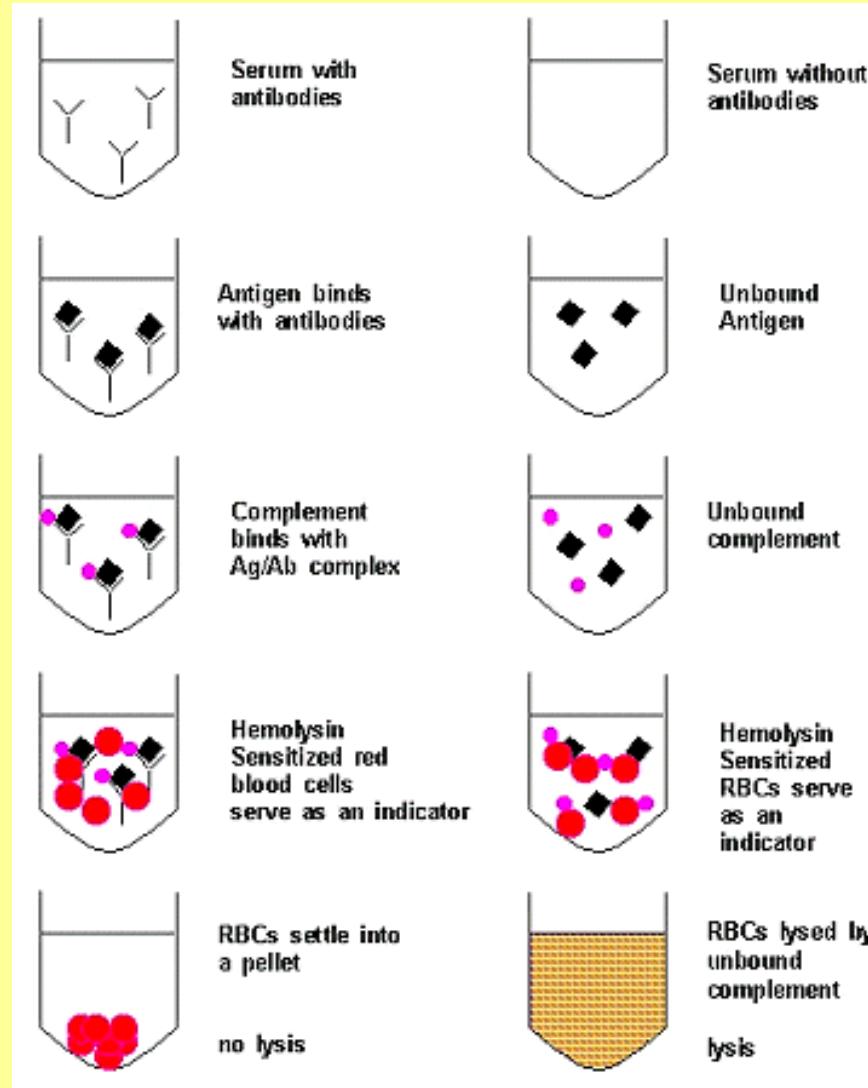
- ✓ komplex antigen + hledaná protilátká
- ✓ komplement
- ✓ indikátorový neboli hemolytický systém (beraní erytrocyty senzibilizované králičí protilátkou)



**zábrana hemolýzy
pozitivní reakce**

**hemolýza
negativní reakce**

Komplement fixační reakce



pozitivní

negativní

Neutralizační reakce

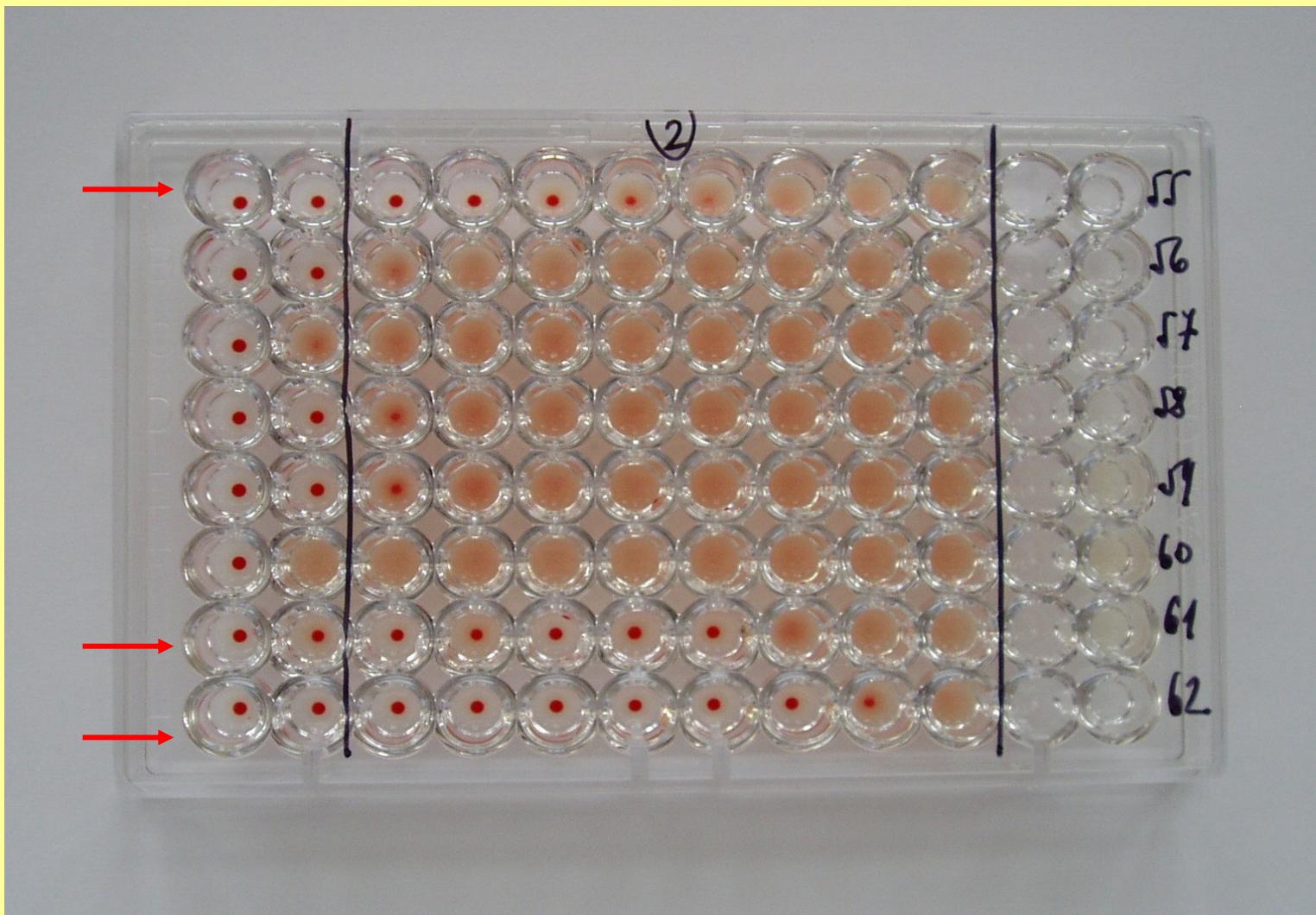
- protilátka brání biologickým účinkům antigenu
- ASLO – průkaz antistreptolyzinu O

přítomnost ASLO ve vyšetřovaném séru



**zábrana hemolýzy
pozitivní reakce**

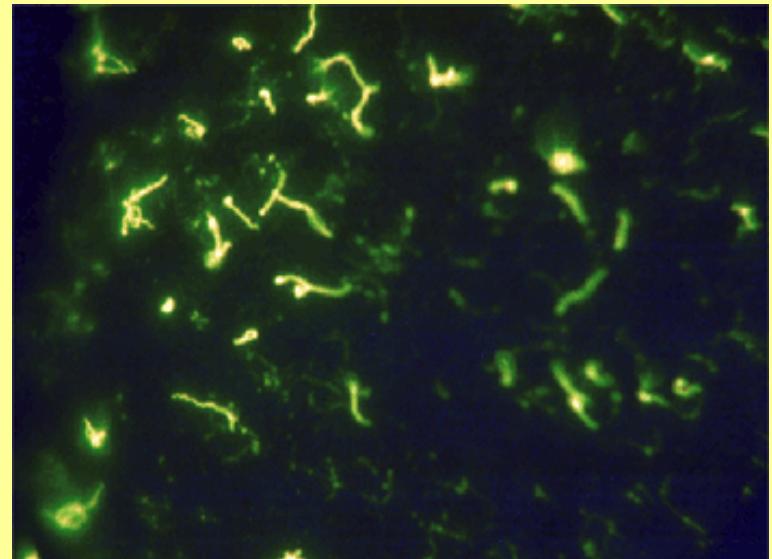
Neutralizační reakce - průkaz ASLO



Imunofluorescence

- jedna složka značena fluorescenčním barvivem, průkaz pomocí fluorescenčního mikroskopu
- přímá – průkaz antigenu: *T.pallidum*
- nepřímá – průkaz protilátek: syfilis, ehrlichioza, HHV6

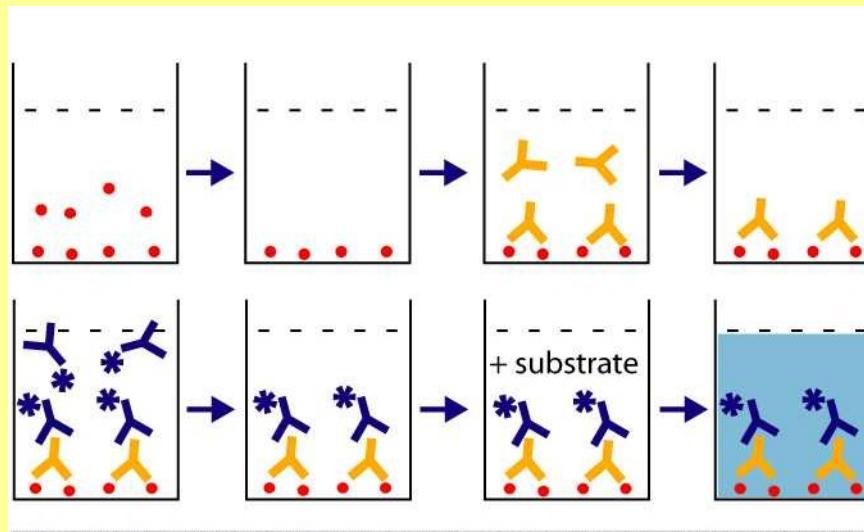
Nepřímá imunofluorescence
- protilátky proti *T.pallidum*

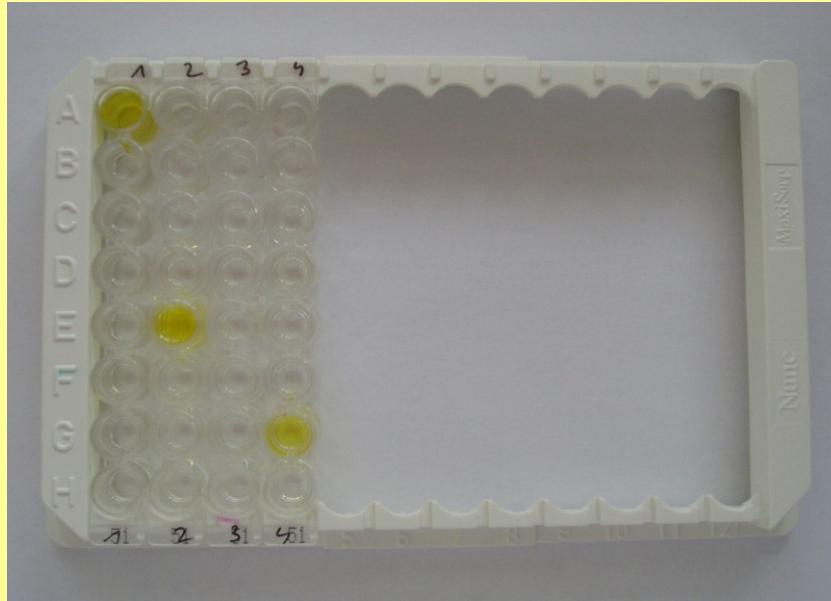


Enzymová imunoanalýza

- jedna složka značena enzymem, který rozloží přidaný substrát za vzniku barevného produktu
- Výsledek: barevná reakce
- Hodnocení: měření absorbance
- ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)
- průkaz antigenu: HBsAg, respirační viry, chlamydie
- **průkaz protilátek: univerzální použití**

Princip metody ELISA





Souprava pro vyšetření
metodou ELISA

ELISA – průkaz HBsAg

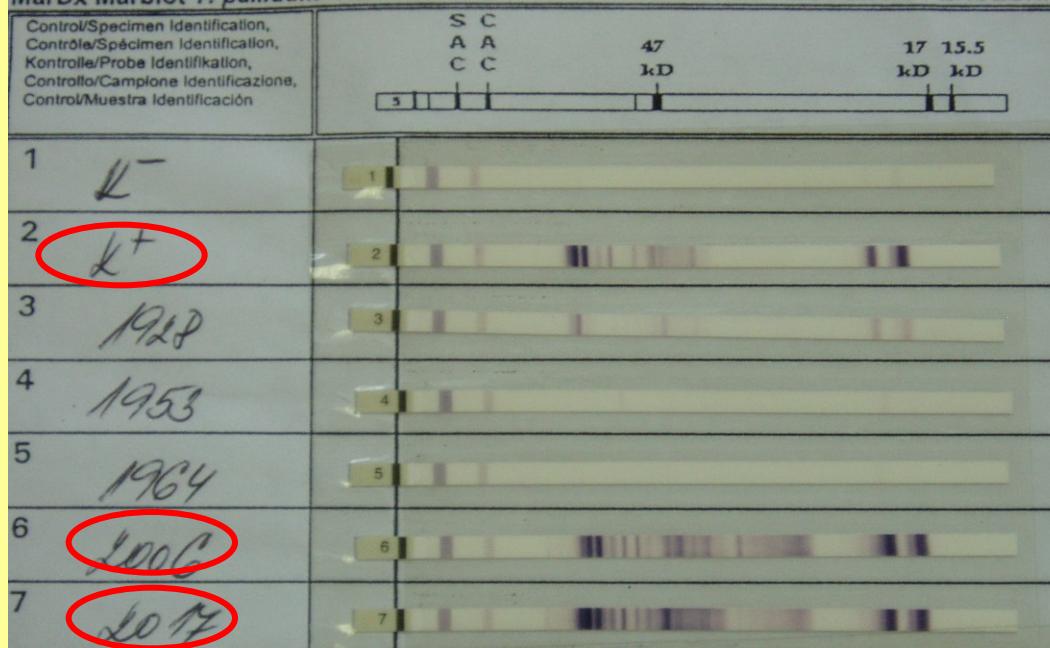


Western blot

Antigen rozdělený na jednotlivé polypeptidy dle molekulové hmotnosti na nitrocelulózovém pásku

1. vazba hledaných protilátek ze séra na příslušné antigenní frakce
2. přidání protilátky značené enzymem
3. přidání substrátu
4. výsledná reakce – barevný proužek

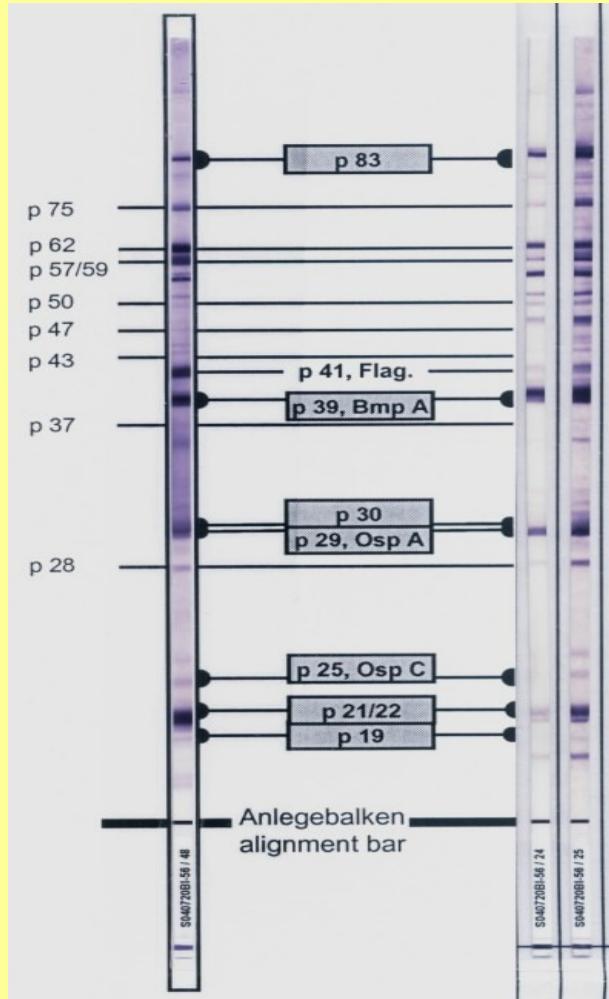
MarDx Marblot T. pallidum -RESULT LOG / FICHE MARBLOT DE RÉSULTATS / ERGEBNIS



Western blot *T.pallidum* IgG

Autoblot 2000, Medtec, USA





Western blot *B.garinii* IgG

Autoblot 6000, Medtec, USA

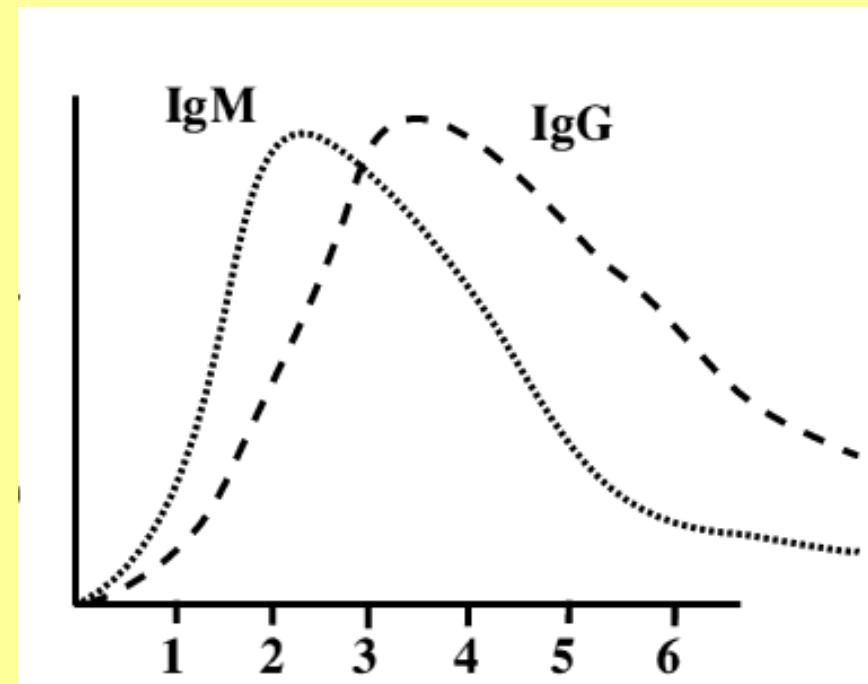


Interpretace serologických výsledků

- průkaz protilátek svědčí pro setkání s antigenem (kdy ?), k diagnóze infekce většinou nestačí
- vyjímkou: syfilis, infekce HIV
- dynamika imunitní reakce:

setkání s antigenem  10 dní průkaz protilátek

- **IgM** – první protilátky, přetrvávají týden až několik měsíců, svědčí pro čerstvou infekci
- **IgA** – přetrvávají o něco déle, svědčí pro čerstvou nebo nedávnou infekci
- **IgG** – nejvyšší hladina měsíc po začátku onemocnění, mohou přetrvávat roky



Serologický průkaz infekce

- vyšetření dvou vzorků séra: akutní na začátku onemocnění, rekonvalescentní za 10 až 14 dní
- průkazný nález: čtyřnásobný vzestup titru nebo serokonverze
- vzorky nutno vyšetřit zaráz !

titr protilátek = nejvyšší ředění, v němž ještě došlo k prokazatelné serologické reakci

PCR

- polymerázová řetězová reakce
- přímý průkaz NK bakterií, virů, kvasinek, parazitů
- různé modifikace
- výhody: vysoká specifita, rychlosť, ATB nejsou kontraindikací vyšetření
- nevýhody: vysoká cena, přístrojové vybavení, riziko kontaminace

PCR – LightCycler (Roche)



Princip PCR

- opakované cykly tří jednoduchých reakcí:
 - denaturace dvojšroubovice hledané DNA na dvě izolovaná vlákna (94 °C)
 - annealing - připojení dvou krátkých syntetických nukleotidů (primery) na tato vlákna (54 – 65 °C)
 - prodlužování primerů v přítomnosti vhodných reakčních složek a enzymu *Taq*-polymerasy za vzniku dvou kopií hledané DNA (72 °C)

PCR :

Denaturation 94°C

