

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, synoviální tekutina

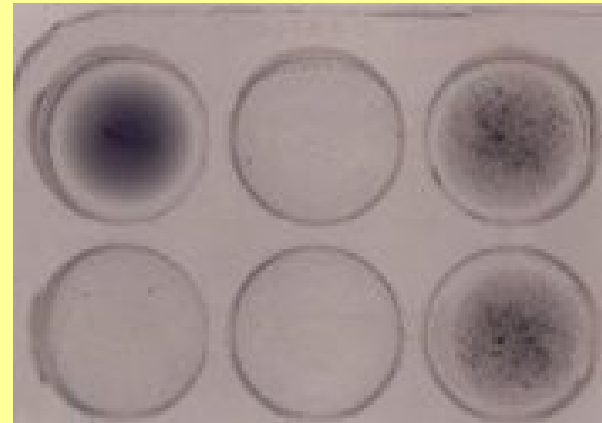
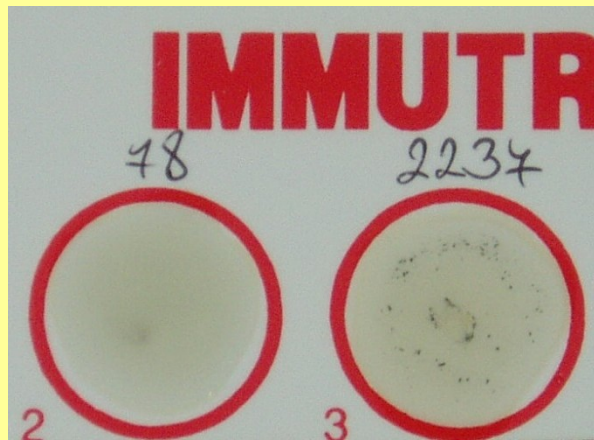
Přehled serologických metod

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 vložkovací testy na lues
- VDRL, RRR, RPR

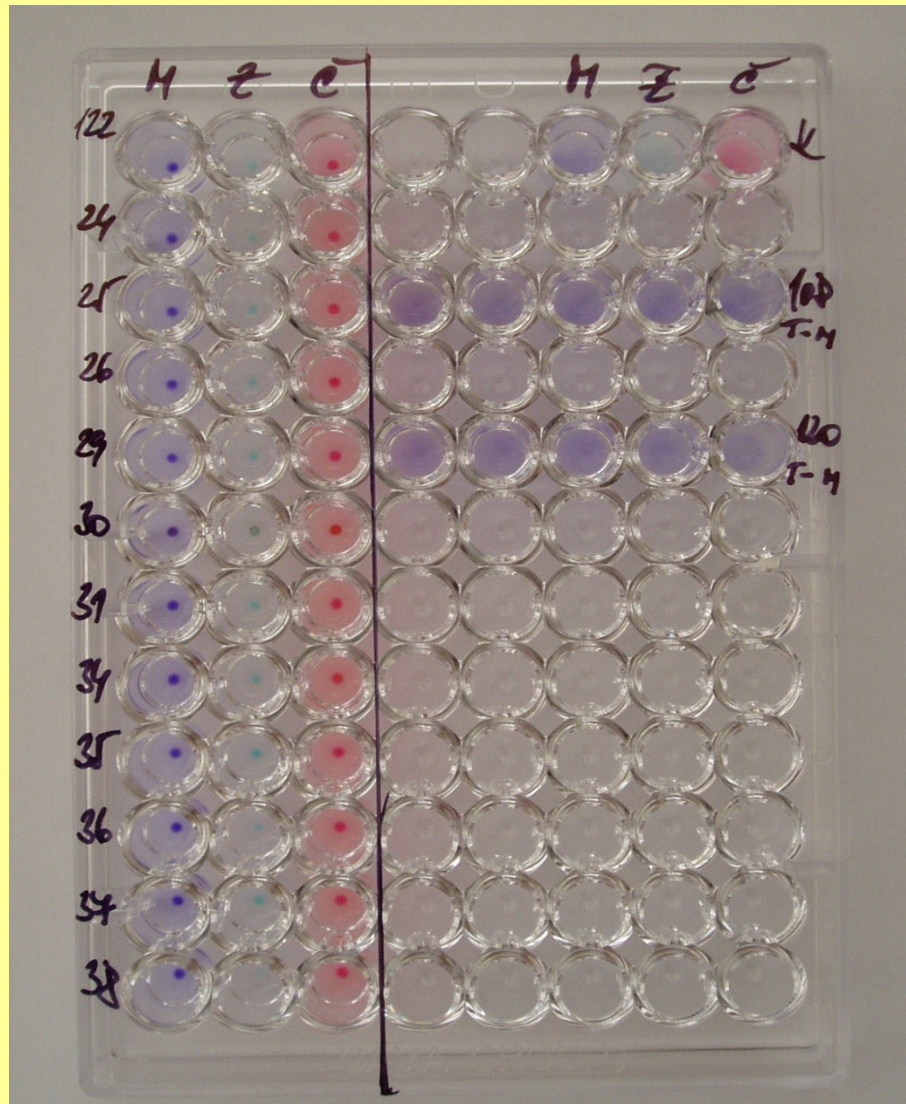
kardiolipin + protilátky v séru → precipitace



Aglutinace

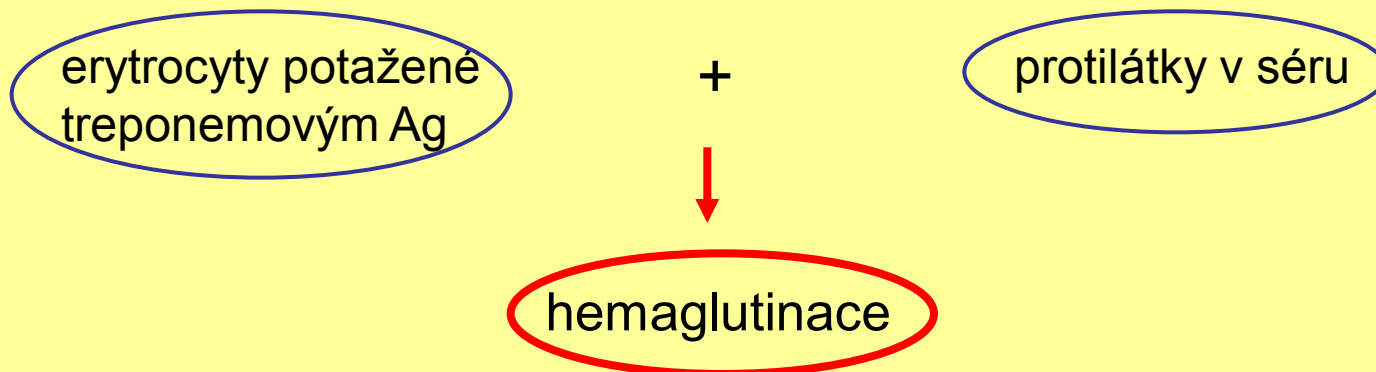
- antigen korpuskulární povahy
- antigen + hledaná protilátka → viditelný shluk (aglutinát)
- přímá, nepřímá (na nosičích)
- průkaz protilátek u salmonelózy (Widalova reakce), yersiniózy, listeriózy, tularémie

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

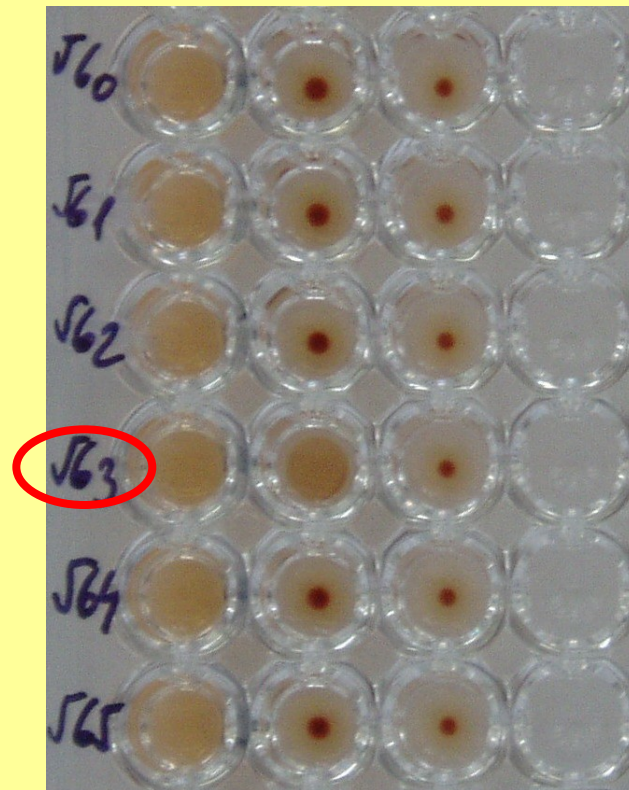


Aglutinace na nosičích

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

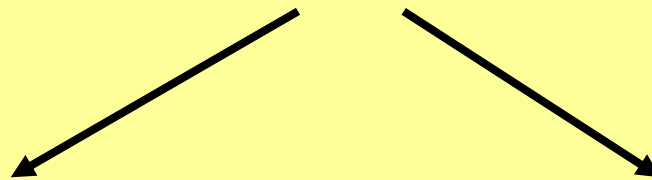


TPHA – průkaz protilátek proti *T.pallidum*
pasivní hemaglutinací



Komplement fixační reakce

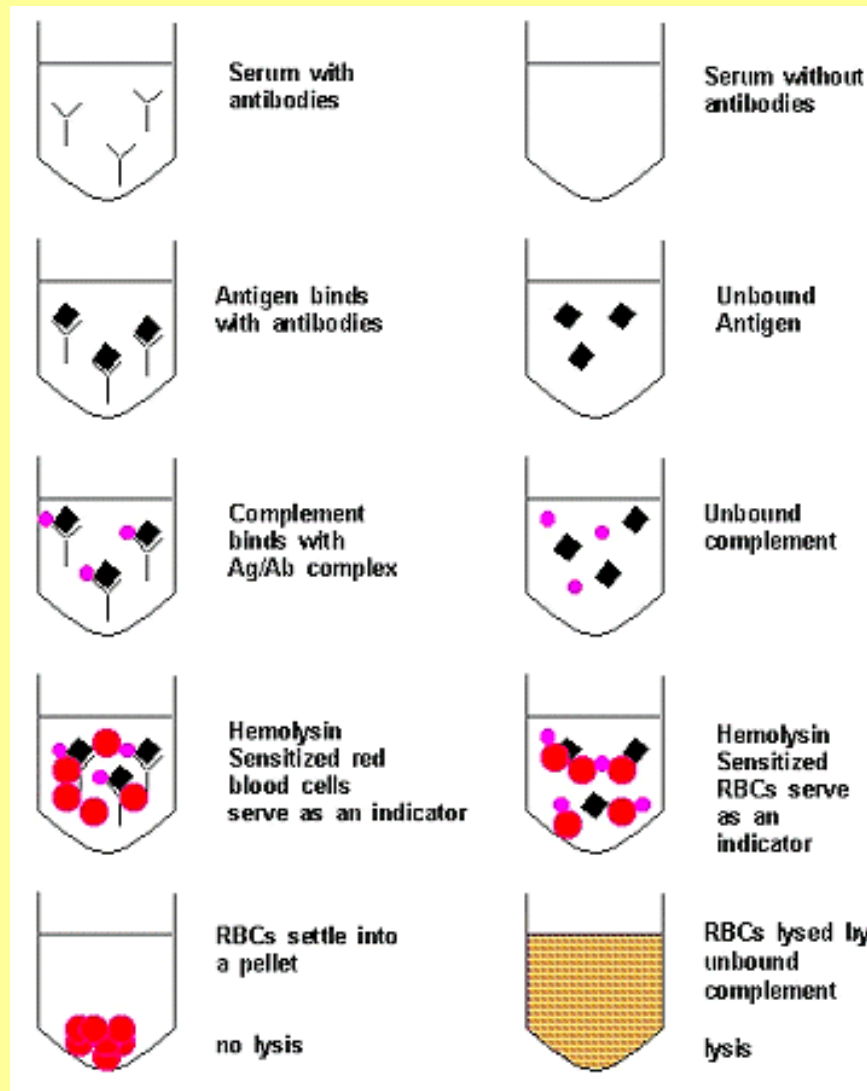
- ✓ komplex antigen + hledaná protilátka
- ✓ komplement
- ✓ indikátorový neboli hemolytický systém (beraní erythrocyty senzibilizované králičí protilátkou)



zábrana hemolýzy
pozitivní reakce

hemolýza
negativní reakce

Komplement fixační reakce



pozitivní

negativní

Neutralizační reakce

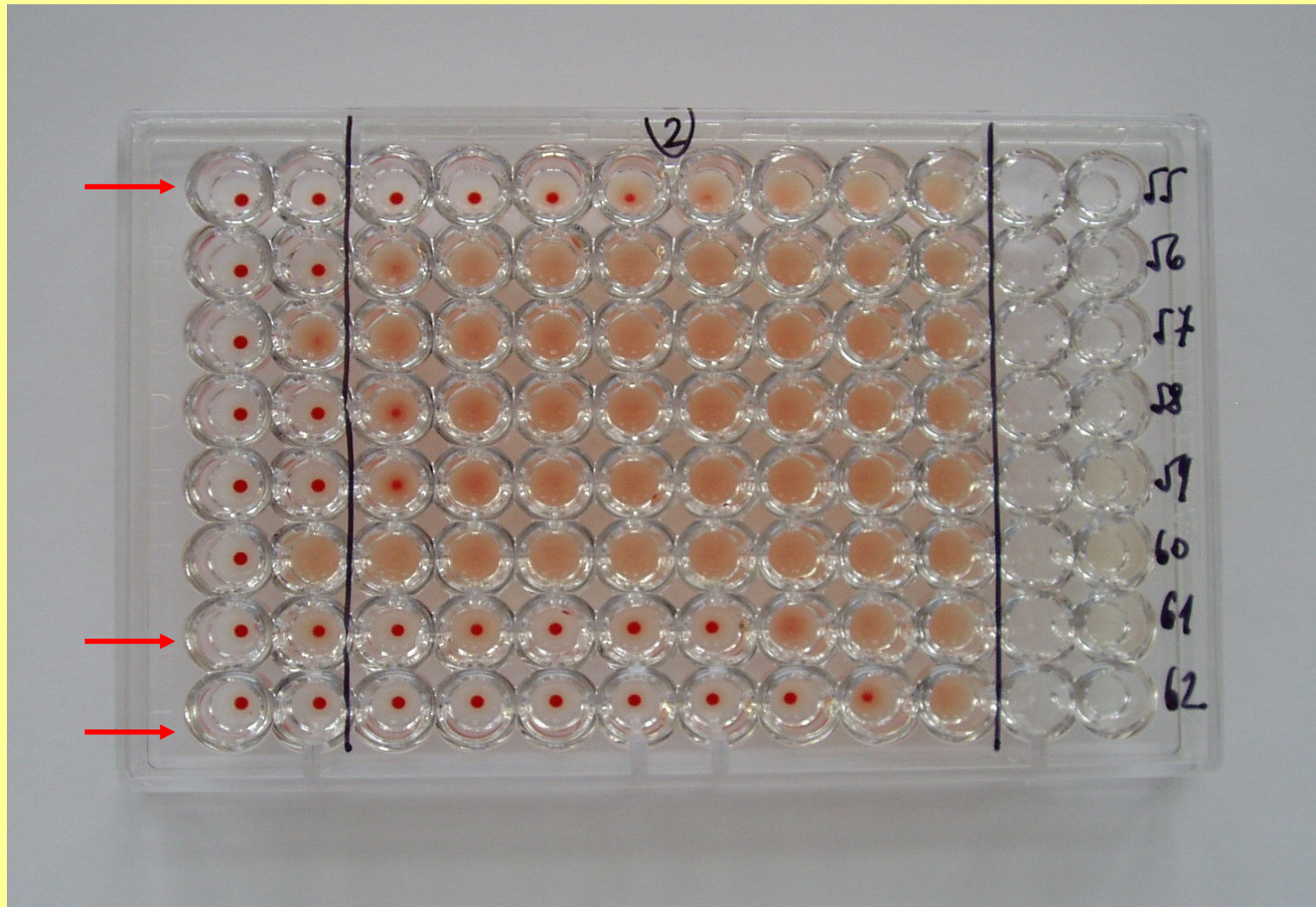
- protilátka brání biologickým účinkům antigenu
- ASLO – průkaz antistreptolyzinu O

přítomnost ASLO ve vyšetřovaném séru



zábrana hemolýzy
pozitivní reakce

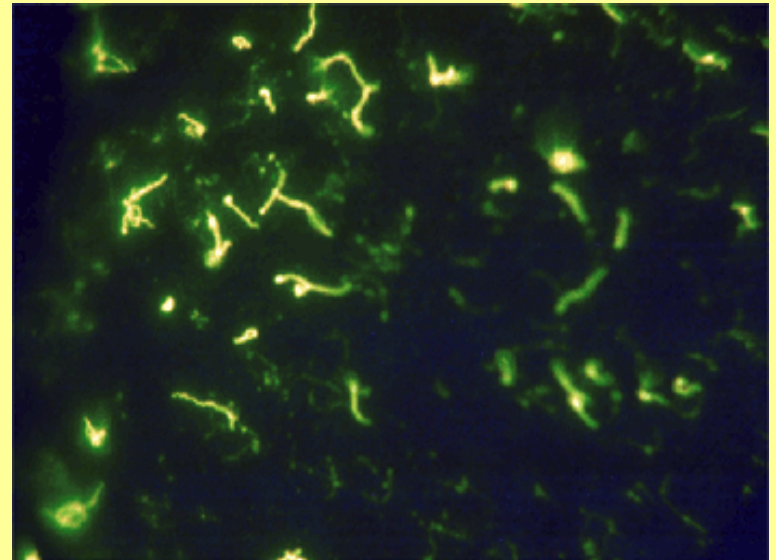
Neutralizační reakce - průkaz ASLO



Imunofluorescence

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

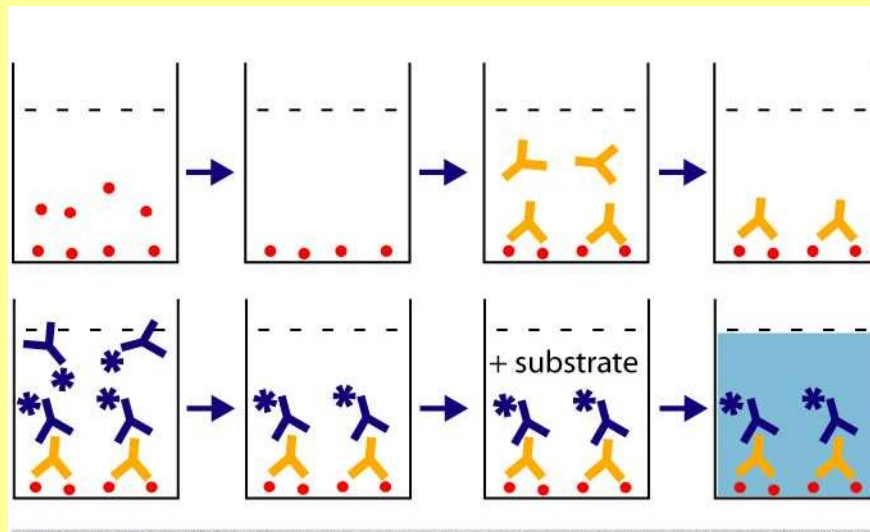
Nepřímá imunofluorescence
- protilátky proti *T.pallidum*

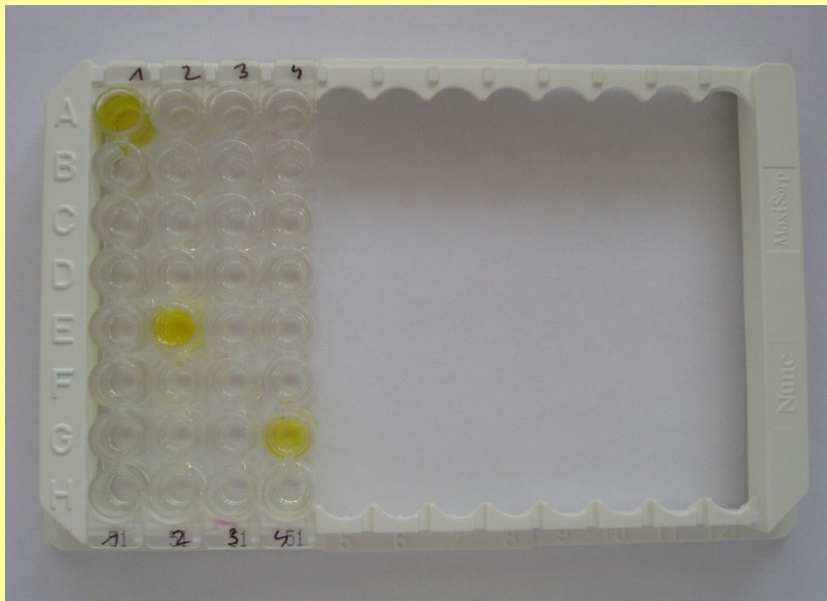


Enzymová imunoanalýza

- 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





ELISA – průkaz HBsAg

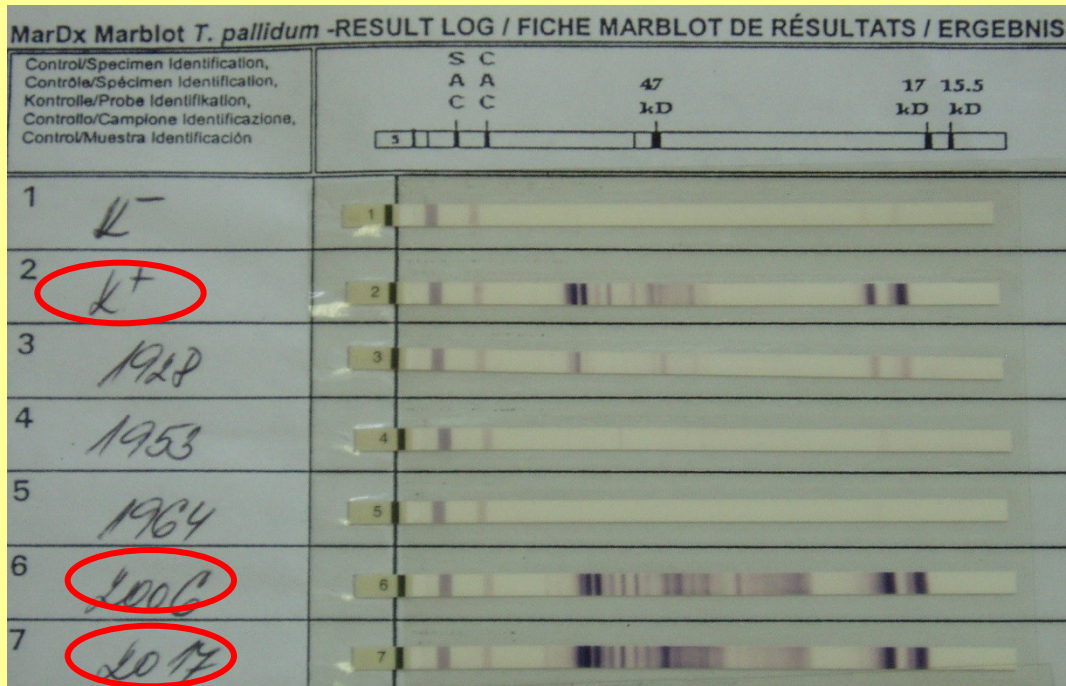
Souprava pro vyšetření
metodou ELISA



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

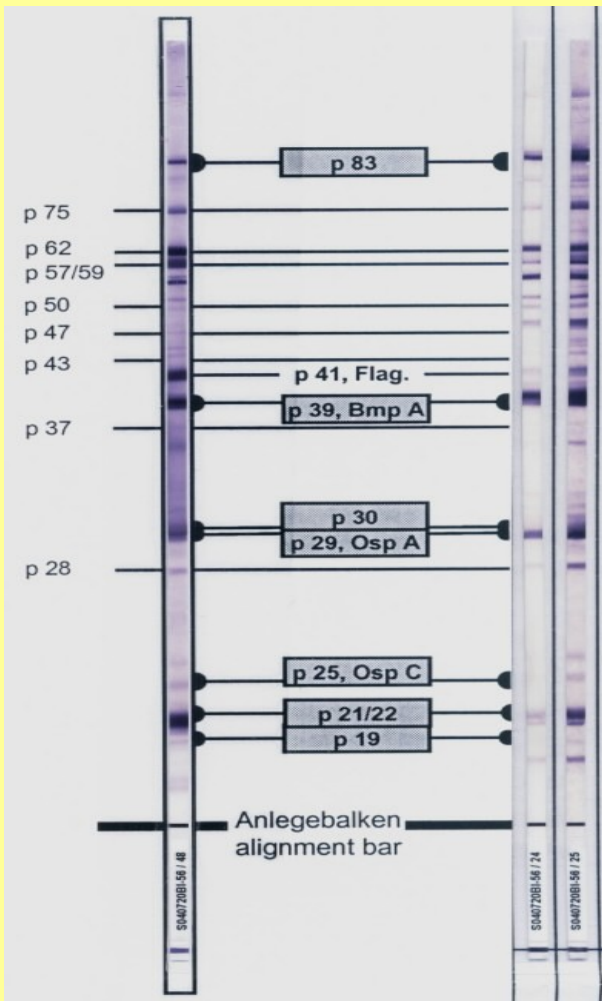


Western blot *T.pallidum* IgG

Autoblot 2000, Medtec, USA



Western blot *B.garinii* IgG



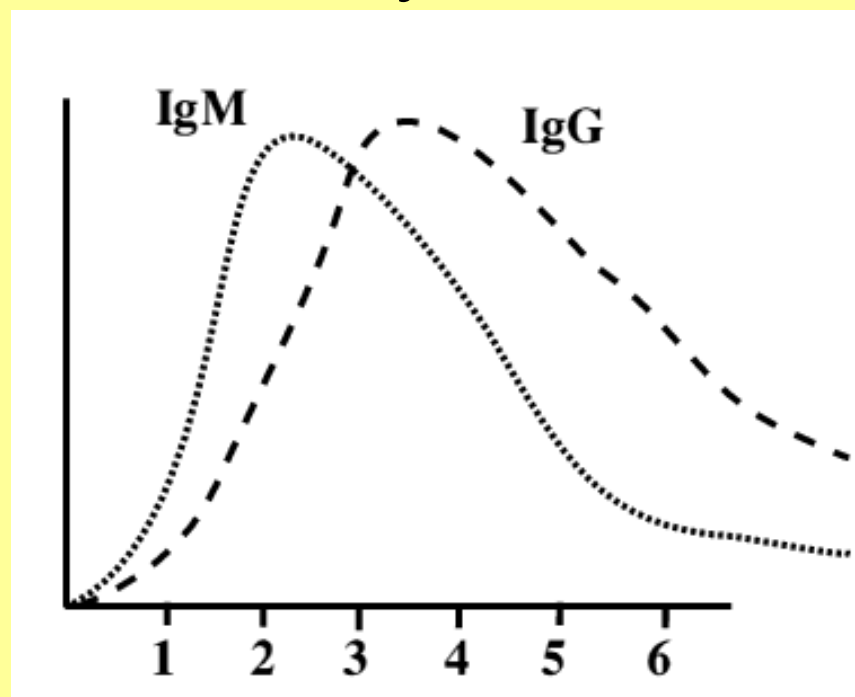
Autoblot 6000, Medtec, USA

Interpretace serologických výsledků

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

setkání s antigenem $\xrightarrow{10 \text{ dní}}$ 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, rychlost, 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

