

# Sérologické metody

**Sérologické metody** jsou souborem vyšetřovacích technik, které jsou založené na reakci mezi antigenem a protilátkou. **Jedna složka** reakce je **vždy známá**, druhou vyšetřujeme. Sérologie se využívá zejména v mikrobiologii **k diagnostice původců onemocnění**. Je většinou rychlejší než kultivace a umožňuje záchyt i špatně kultivovatelných původců (např. viry). Podle konkrétního diagnostického postupu lze sérologii řadit mezi **přímé i nepřímé** metody detekce patogenního agens.

## Základní princip

Pro sérologii se nejčastěji využívá **krevní sérum**, ale je možné použít i jiné biologické materiály (sputum, moč, sliny, likvor). Existují tři hlavní principy:

1. průkaz antigenu,
2. průkaz protilátek,
3. sledování buněčné imunity.

### Průkaz antigenu

Antigeny prokazujeme pomocí sady **známých protilátek**. Využívají se jak polyklonální protilátky, které se vážou s několika epitopy předpokládaného antigenu v našem vzorku, tak monoklonální protilátky, které umožňují přesnější určení typu patogenu. Přítomnost antigenních molekul značí přítomnost infekčního agens.

### Průkaz protilátek

Protilátky prokazujeme pomocí **známého antigenu**. Odpovědí na přítomnost antigenních molekul je zpravidla reakce imunitního systému. Vzhledem k různé dynamice tvorby protilátek jejich průkaz nemusí znamenat akutní onemocnění. V časných fázích infekce se objevují protilátky IgM (někdy IgA), později pak třída IgG, která může přetrvávat po prodělaném onemocnění. Pro testování je nutné udělat více odběrů a vyhodnotit je v čase. Vyšetření je problematické u **imunodeficitních pacientů**.

## Metody

### Zpětná (sklíčková) aglutinace

Zpětná aglutinace pomáhá určit **konkrétní antigenní složení** mikroba izolovaného od pacienta pomocí známých sérových protilátek. U *Escherichia coli* tato reakce umožňuje odlišit jednotlivé kmeny. Identifikace sérovaru O157:H7 je klíčová u závažných variant průjemových onemocnění nebo hemolyticko-uremického syndromu.<sup>[1]</sup>

### Přímá aglutinace

Přímá aglutinace je metoda, při níž se **stanovují protilátky v séru pacienta** přidáním suspenze známých bakterií. Antigeny se nachází na povrchu bakterie (bičíky, liposacharidy). Vazba protilátky na O-antigen, polysacharidový řetězec liposacharidu (endotoxin), způsobí **vznik kompaktní sraženiny**. H-antigeny bičíků vytváří sraženinu připomínající nadýchané obláčky nebo zamlžené sklo. Přímá aglutinace se využívá při průkazu bakterií rodu *Salmonella* (tzv. Widalova reakce) u břišního tyfu, dále bakterií rodu *Brucella* (Wrightova reakce), nebo rickettsií (Weilova-Felixova reakce).

### Přímá hemaglutinace

U přímé hemaglutinace jsou antigenní molekulou povrchové struktury erytrocytů. Pozitivní reakce, která se projeví aglutinací červených krvinek, je způsobena vazbou protilátek produkovaných cizorodými organismy na tyto struktury. Příkladem je **Paulova-Bunnelova reakce** na průkaz infekční mononukleózy.

### HIT

**HIT** neboli inhibice hemaglutinace se používá u chřipkových virů a jiných původců nesoucích hemaglutinin. Protilátky navázané na virus hemaglutinaci inhibují.

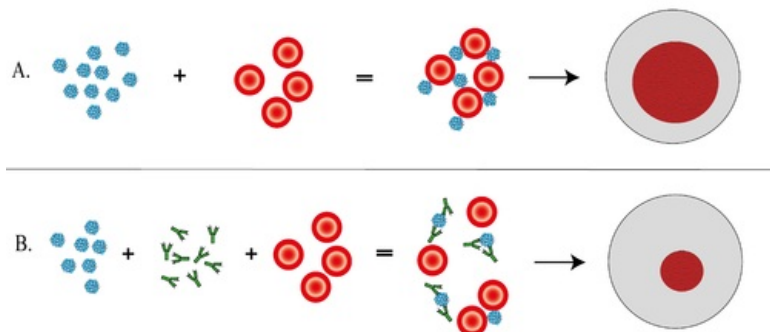


Schéma HIT

## Aglutinance na nosičích

Antigeny nebo protilátky jsou při této metodě umístěny na nosiči. Nosičem mohou být erytrocyty nebo latexová média. Při tzv. **pasivní aglutinaci** jsou antigeny (endotoxin, Vi faktor salmonel) umístěny na erytrocytech a po přidání séra se shlukují. Pasivně můžeme prokazovat též *Treponema pallidum* (**Dubosova-Hiddlebrokova reakce**). Latexové testy využívané při diagnostice revmatoidní artritidy mají jako antigen gama-globulin. Dále se latexových nosičů využívá při přímém průkazu streptokoků, meningokoků, pneumokoků.

## Precipitace

Při precipitaci vzniká **nerozpustný komplex** reakcí protilátky s rozpustným (koloidním) antigenem. Vhodným prostředím je vodný roztok nebo agarový či agarosový gel.

### Precipitace v roztoku

- Prstencová reakce: ve zkumavce se roztok protilátek převrství roztokem antigenu. Sraženina se objeví v podobě **prstence na rozhraní vrstev**.
- Flokulační reakce: smísením roztoku antigenu a protilátky dochází k vysrážení komplexu v podobě **vloček**. Tato reakce je základem VDRL screeningu syfilitidy.

### Precipitace v gelu

Do jamek vykrojených v gelu se nakapou roztoky antigenu a protilátek. Difúze roztoků skrz gel vytváří následně v zónách určité koncentrace tzv. **precipitační linie**. Linie vznikají v místě setkání antigenu a protilátek a jsou viditelné jako sraženiny. Příkladem této reakce je průkaz toxinu u *C. diphtheriae*.

### Dvojité uspořádání podle Ouchterlonyho

Do agaru je vykrojena centrální jamka, kam je nakapáno sérum pacienta. V okolí je následně vykrojeno několik jamek pro antigeny. Mezi centrální jamkou a jamkami s antigeny po difuzi vznikají precipitační linie odpovídající specifitě antigenu a protilátek:

- linie plynule splývají (antigeny jsou totožné),
- linie částečně splývají, jedna z nich dále pokračuje (antigeny jsou příbuzné),
- linie se nezávisle protínají (nepříbuzné antigeny).



Možné výsledky precipitace v gelu

## Komplementfixace

Komplementfixační reakce jsou založeny na vlastnostech komplementu. **Volný** komplement **lyzuje** erytrocyty a je schopen vazby na komplex antigen-protilátka (A-P). V okamžiku, kdy komplement naváže komplex A-P, nedokáže již dále erytrocyty porušovat. Ve vzorku krevního séra od pacienta musí být komplement inaktivován teplotou. Místo něj je dodáván komplement ze séra morčat. **Bordetova-Wassermanova reakce** je již méně používanou metodou pro diagnostiku syfilis. Antigenem je kardiolipin, který při kontaktu se sérovými protilátkami *Treponema pallidum* vytváří komplex. Při **pozitivní reakci** nevykazují erytrocyty lýzu (komplement je navázán na komplex A-P). Negativní reakce se projeví lýzou buněk (protilátky proti *T. pallidum* nejsou přítomné, kardiolipin nemá s čím vytvořit komplex, který by se mohl navázat na komplement). Na tomto principu dnes fungují například průkazy brucel, listeriózy, *Mycoplasma pneumoniae* a různých virových infekcí.

## Neutralizace

Při neutralizačních reakcích jsou **inhibované vlastnosti antigenů**. U virových infekcí (tzv. VNT = virus neutralizační testy) se přítomnost protilátek projeví například jejich neschopností infikovat pokusné zvíře. Mezi neutralizační reakce patří tedy i výše uvedený **HIT**. Další využití je při průkazu **antistreptolysinu O**, protilátek proti streptolysinu O u streptokoků typu A, C, G (např. *Streptococcus pyogenes*). K séru pacienta přidáme známou koncentraci streptolysinu. Pokud jsou přítomny protilátky, jeho účinky se neutralizují a nedochází k lýze přidaných erytrocytů. Koncentrace přidávaného streptolysinu nižší než 200 m. j. je norma, koncentrace vyšší než 200 m. j. jsou po nedávno prodělané infekci nebo při jejích následcích (např. glomerulonefritida).

## Metody značených protilátek

Při těchto metodách se využívají protilátky nebo antigeny značené různými indikátory (např. fluoescenční barviva, enzymy). Můžeme sem zahrnout:

- ELISA,
- RIA,
- Western blotting,
- imunofluorescence.

## Odkazy

### Související články

- Kultivace

### Externí odkazy

- Imunologické metody 2. LF ([http://imunologie.lf2.cuni.cz/soubory\\_vyuka/Imunologicke%20metody-precipitace.pdf](http://imunologie.lf2.cuni.cz/soubory_vyuka/Imunologicke%20metody-precipitace.pdf))

### Použitá literatura

- JULÁK, Jaroslav. *Praktická cvičení a semináře z lékařské mikrobiologie*. 2. vydání. Praha : Karolinum, 2009. 113 s. ISBN 978-80-246-1141-9.
- BEDNÁŘ, Marek, Andrej SOUČEK a Věra FRAŇKOVÁ, et al. *Lékařská mikrobiologie : Bakteriologie, virologie, parazitologie*. 1. vydání. Praha : Marvil, 1996. 558 s. ISBN 8023802976.
- JULÁK, Jaroslav. *Úvod do lékařské bakteriologie*. 1. vydání. Praha : Karolinum, 2006. 404 s. ISBN 8024612704.
- GOERING, Richard V a Hazel M DOCKRELL. *Mimsova lékařská mikrobiologie*. 5. vydání. Praha : Triton, 2016. 568 s. ISBN 978-80-7387-928-0.

### Reference

1. JULÁK, Jaroslav. *Praktická cvičení a semináře z lékařské mikrobiologie*. 2. vydání. Praha : Karolinum, 2009. 113 s. s. 37. ISBN 978-80-246-1141-9.