

# Mikrobiológiai diagnosztika: szerológiai eljárások

## 1.5. Szerológiai vizsgálómódszerek

Szerológiai reakcióknak az **antitest-antigén specifikus kapcsolódáson** alapuló ***in vitro*** diagnosztikai módszereket nevezzük.

A szerológia elnevezés a szérum szóból ered, hiszen a specifikus ellenanyagok, melyek a reakcióban szerepelnek, a szérumban találhatóak meg. Vizsgálati anyagainkban kereshetjük a **kórokozó antigénjét** vagy az ez ellen termelődött specifikus antitestet. Direkt antigén kimutatás történhet a beteg váladékaiból, vagy egy kitenyésztett mikroba sejtfelszíni antigénjeinek azonosítása is lehet a diagnosztika része. Számos olyan mikrobák által okozott megbetegedés létezik, ahol magának a kórokozónak a kimutatása nem megoldott (komplikált mintavétel, nem vagy nehezen tenyészthető kórokozó), ahol a diagnosztikában a **mikroba ellen termelődött specifikus ellenanyagot** keressük vérből vagy liquorból, jelenlétével igazoljuk az adott fertőzést.

## 1.5.1. Szabad szemmel látható szerológiai reakciók

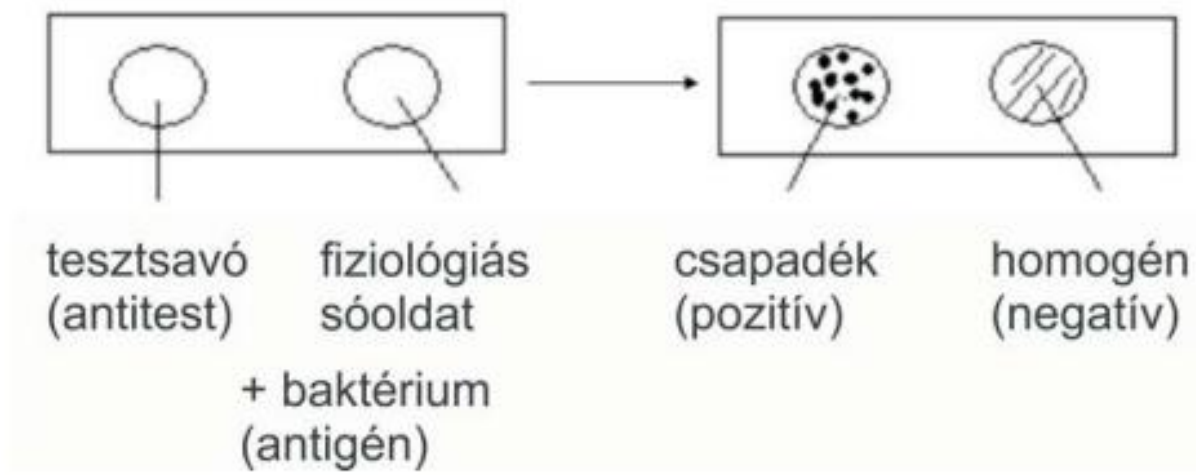
Ezekben a reakciókban az összekapcsolódó antigének és antitestek egy térhálós szerkezetet alakítanak ki, mely szabad szemmel is látható. A résztvevő antitestek legalább bivalens (tehát több azonos szerkezetű antigén megkötésére képes), az antigének polivalens szerkezetűek. Az antigén (antigént hordozó részecske) mérete alapján három típust különböztetünk meg; agglutinációt, flokkulációt és precipitációt.

### 1.5.1.1. Agglutináció

Az antigén-antitest kapcsolódásban résztvevő felek egyike vagy mindkettő sejt felszínén vagy sejt méretű szemcse felszínén helyezkedik el.

#### Tárgylemez agglutináció

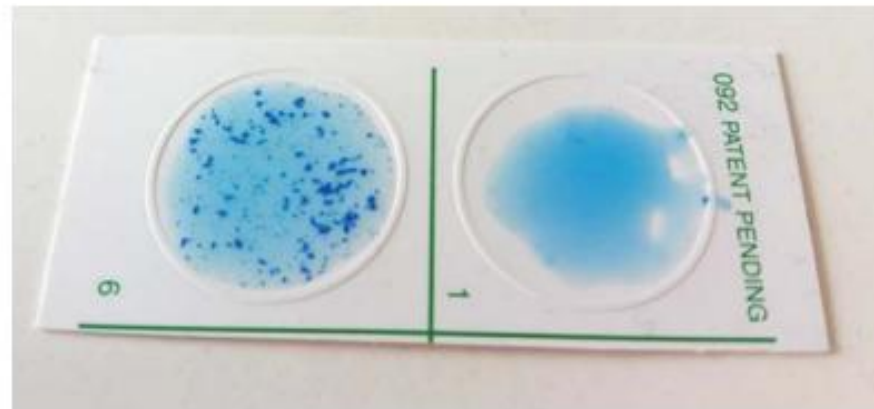
Ezzel a módszerrel specifikus antigének jelenlétét igazoljuk. A specifikus kötődés kialakulásával a tárgylemezen rögzösen összecsapódott sejteket, részecskéket láthatunk a feltisztult háttér mellett. A reakció kvalitatív (1.16. ábra).



1.16. ábra. Tárgylemez-agglutináció

## Baktérium sejtfelszíni antigénjeinek kimutatása szintenyészetből

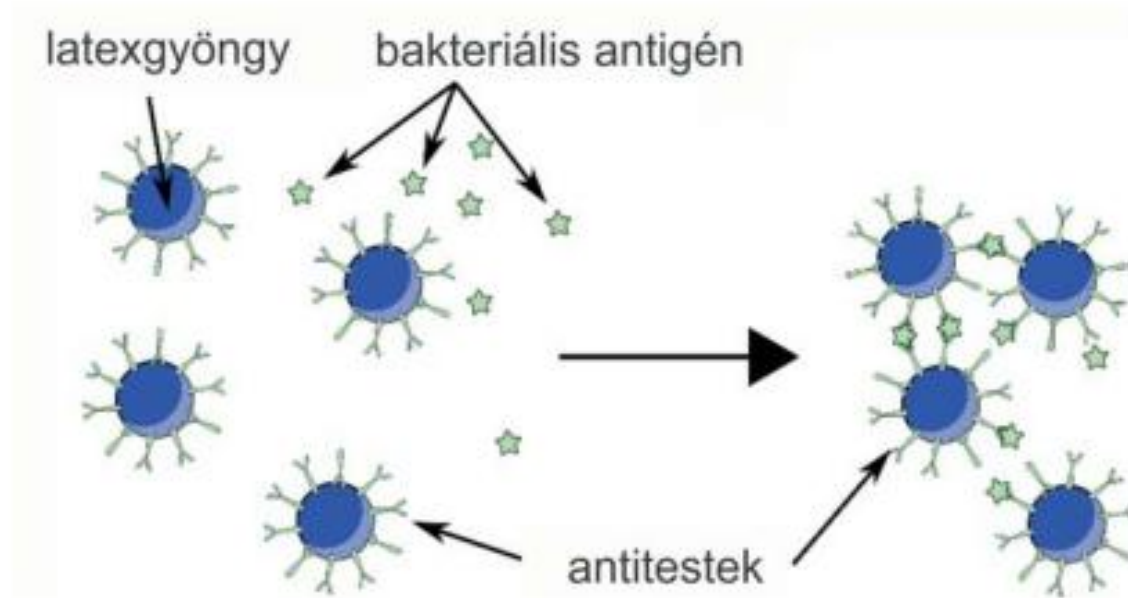
- Escherichia coli O, H, K antigének alapján történő beazonosítása (szerotipizálása) a tenyészet baktériumsejtjei specifikus szérum antitestekkel összecsapódást mutatnak a tárgylemezen. Ezt a reakciót az *E. coli* különböző virulenciájú csoportjainak elkülönítésében használhatjuk, amelyek az O: sejtfa, H: csilló, K: tok antigénjeikben térnek el egymástól.
- Streptococcusok Lancefield-féle tipizálásakor, a baktérium felszínén található Lancefield (C poliszacharid) antigének latexszemcsén kötött csoportspecifikus antitestekkel kötődnek, ez okozza az összecsapzódást.
- Staphylococcus aureus latex-koagglutináció: A baktérium sejtfelszínén található clumping faktor a latex szemcséken rögzített fibrinhez kötődik, az *S. aureus* felszínén elhelyezkedő protein-A a latex felszínhez rögzített antitestek Fc-részával reagál (1.17. ábra).



1.17. ábra. Staphylococcus aureus latex-koagglutináció

## Baktérium felszíni antigéneinek kimutatása közvetlen vizsgálati anyagból

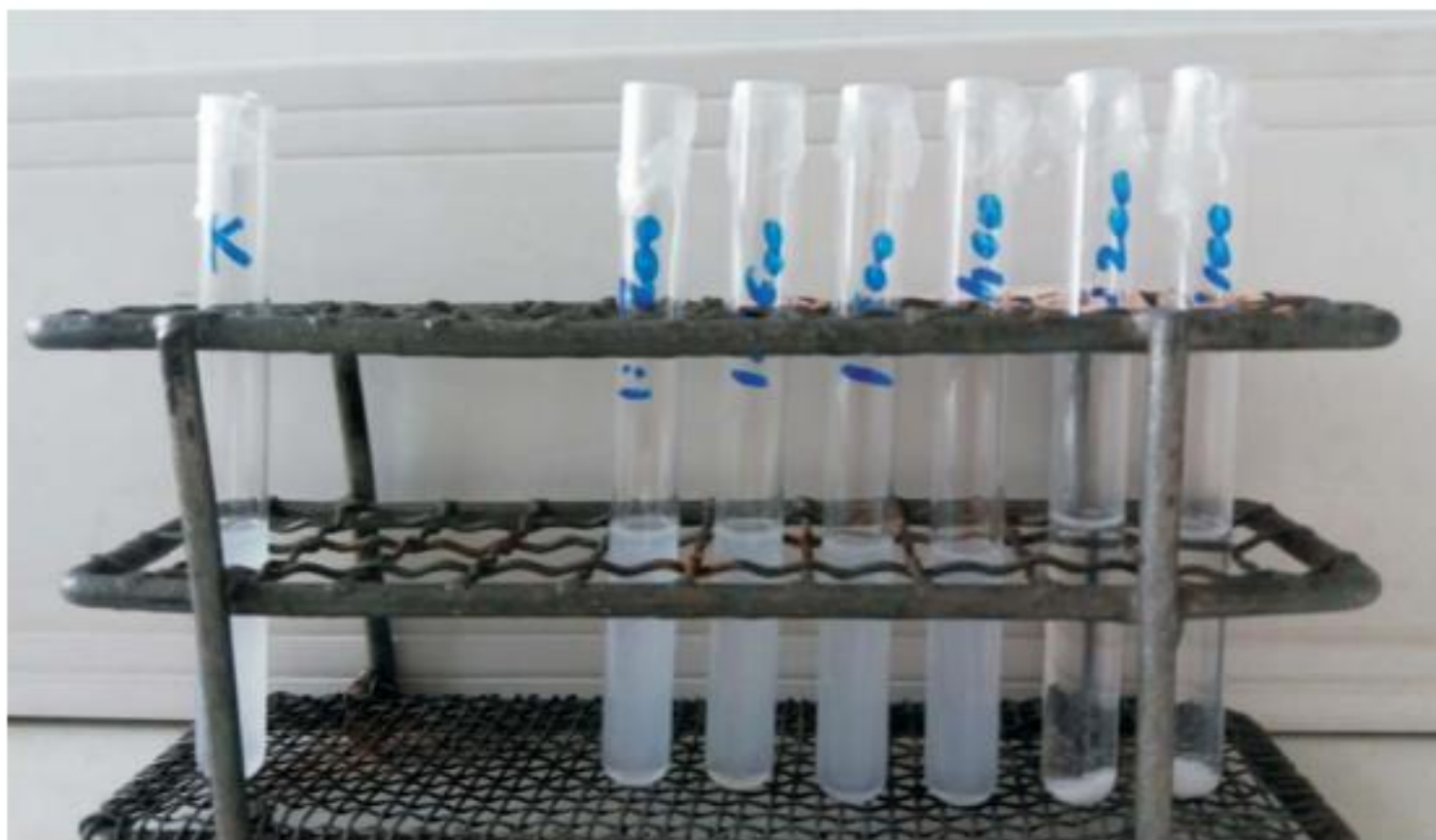
Meningitis gyorsdiagnosztikai módszer a leggyakoribb lehetséges kórokozók jelenlévő tokantigénjének kimutatása specifikus antitestet hordozó latex szemcsék segítségével liquorból (1.18. ábra).



**1.18. ábra.** Latex-agglutinációs gyorssteszt elve

## Csőagglutináció

A beteg vérsavójából készített hígítási sorban egyrészt a specifikus antitestek jelenlétét igazoló kvalitatív módszer, másrészt a szérum antitest mennyiségét is meghatározó (kvantitatív) eljárás (1.19. ábra).



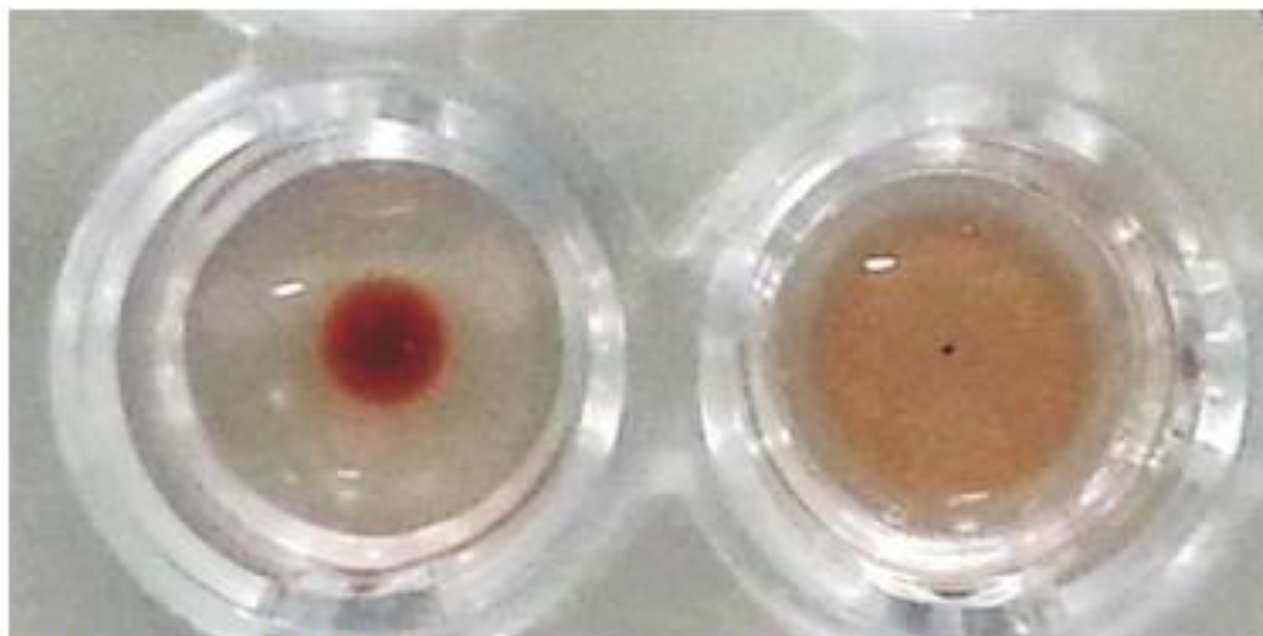
1.19. ábra. Csőagglutináció

**Titer**nek nevezzük azt a legnagyobb hígítási fok (legkisebb antitest koncentráció), ahol az antigén-antitest összekapcsolódás még látható reakciót eredményez. Egy fertőző betegség pontos diagnosztikájában nemcsak egy kvantitatív mérést végzünk, hanem az adott fertőzés által meghatározott időpontokban ismételt titer meghatározást végzünk, **savópárok** eredményeit hasonlítjuk össze.

- **Gruber–Widal reakció:** hastífusz diagnosztikája, felhasznált antigének: *Salmonella typhi* O és H antigénjei
- **Weil–Felix-reakció:** kiütéses tífusz ma már ritkán használt diagnosztikai módszere, felhasznált antigének: a kórokozó *Rickettsia* fajok antigénjeivel keresztreakciót eredményező *Proteus* antigén (pl. OX19).
- **Wright-reakció:** akut brucellózis diagnosztikája, felhasznált antigének: *Brucella* antigén szuszpenzió.

## Agglutináció mikrotitrátor lemezben

A 96 lyukú mikrotitrátor lemez mélyedéseiben az agglutináció után egy-séges térháló folt látható, míg a nem agglutinálódott sejtek vagy részecskék a lemez alján egy pontban leülepednek (1.20. ábra).



1.20. ábra. Hemagglutináció mikrotiterlemezben

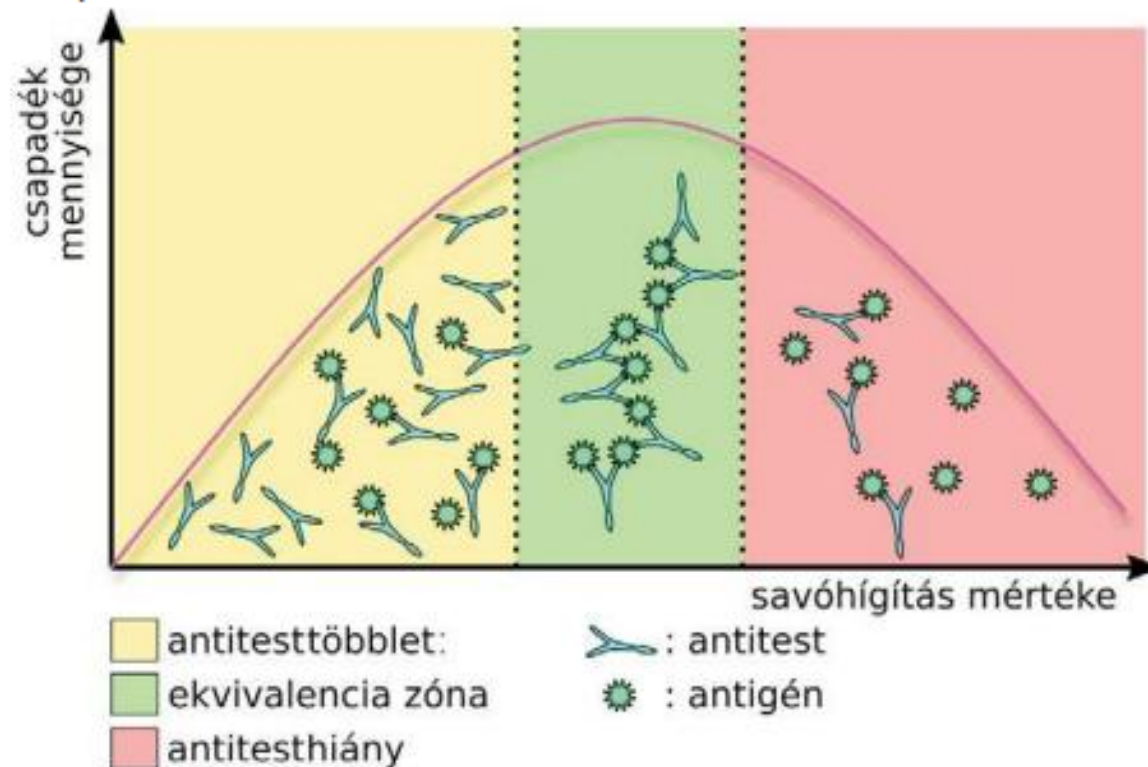
TPHA (*Treponema pallidum* hemagglutináció) és TPPA (*T. pallidum* partikula agglutináció) reakciók esetén a *T. pallidum*ra jellemző rekombináns antigének vörösvértest illetve zselatin szemcsék felületén vannak rögzítve. Ezeket az antigén hordozó részecskéket agglutinálja a beteg savójában jelenlévő antitreponemalis ellenanyag. Mindkettő kvalitatív és kvantitatív reakció is.

## Haemagglutináció, hemagglutinációgátlás

Számos vírus képes meghatározott állatfaj vörösvértestjeinek felszínéhez kötődni, ezáltal azok agglutinációját kiváltani. Amennyiben a vizsgált beteg savója az adott vírus ellenes ellenanyagot tartalmazza, a reakcióban a hozzáadott savó a vírus–vörösvértest térháló kialakulását gátolja. Mindkettő kvalitatív és kvantitatív reakció is. (Lásd → *vírusdiagnosztika* fejezet.)

### 1.5.1.2. Flokkuláció

A szó eredeti jelentése pelyhesedés. Ebben a reakcióban folyékony közegben oldott állapotban találkoznak a közel azonos méretű antigén és antitest résztvevők. Az antigén-antitest kapcsolat létrejöttével képződő nagyobb komplexek már nem tudnak oldatban maradni, kicsapódó pelyheket képeznek.

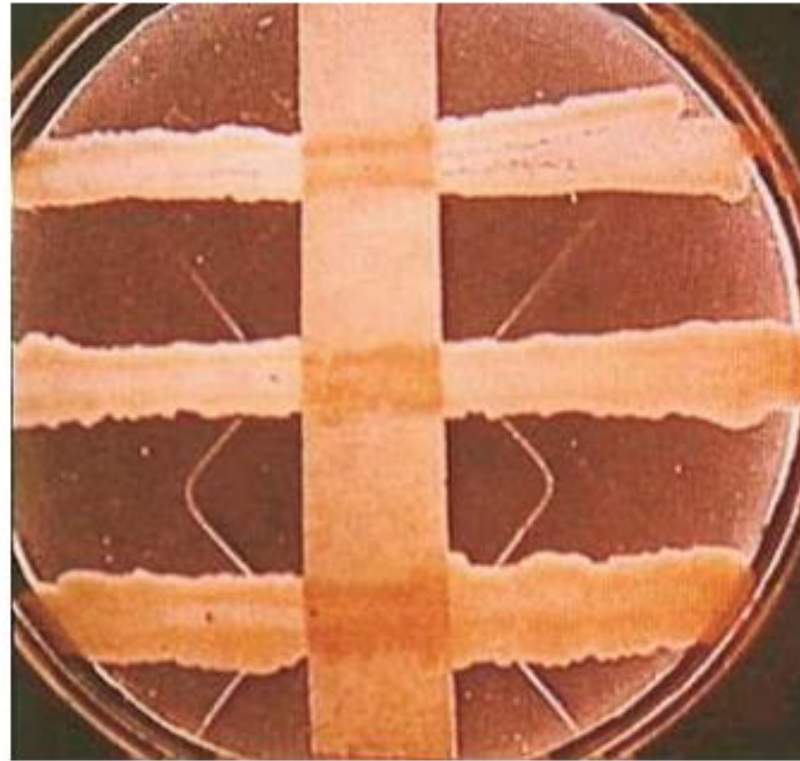


**1.21. ábra.** Csapadék keletkezése az ekvivalencia zónában

a képződő pelyhek mérete a résztvevő kapcsolódó felek egymáshoz viszonyított mennyiségétől függ. Közel azonos mennyiség esetén (ekvivalencia zóna) lehet a legerősebb pelyképződést tapasztalni (1.21. ábra). Flokkulációs reakció a syphilis diagnosztika RPR és VDRL reakciói, lásd →3.7.1. fejezet.

### 1.5.1.3. Precipitáció

Az antitestek kolloid állapotban oldott antigéneket kötnek meg, így okoznak kicsapódást. Főként toxinkimutatásnál használják. A *Corynebacterium diphtheriae* törzsek toxintermelő képességének kimutatására szolgál az **Elek-teszt**, amely agargél-precipitációs reakcióval történik. Az agargélbe helyezett szűrőpapírcsíkból az agarba diffundáló antitoxin (toxin ellen termelt ellenanyag) és a rá merőlegesen a táptalajra csík alakban leoltott kérdéses baktériumból a táptalajba diffundáló toxin egymáshoz kötődik **(1.22. ábra)**. Ahol a toxin és az antitoxin egymásnak megfelelő mennyiségben van jelen, precipitációs ív jelenik meg. Lásd →3.4.2. fejezet.



**1.22. ábra.** Elek teszt - gélprecipitáció

## 1.5.2. Szabad szemmel nem látható szerológiai reakciók

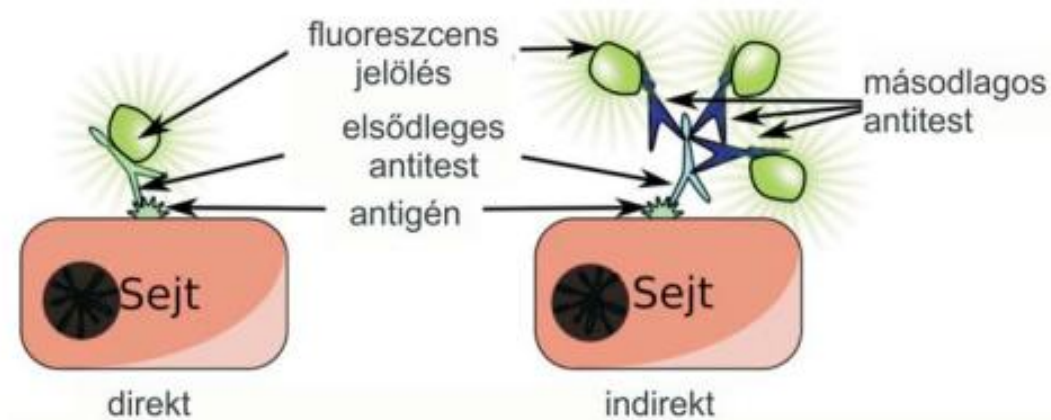
Ezekben a reakciókban jelölt antitestek használatával detektáljuk a specifikus antigén-antitest kapcsolódást. A specificitás megőrzése érdekében a be nem kötött komponensek mosással eltávolításra kerülnek.

### 1.5.2.1. Immunfluoreszcencia (IF)

A reakciókban fluoreszcens festékkel jelölt ellenanyagot használnak fel.

**Direkt IF:** Vizsgálati anyagból a fertőzés igazolható a sejtek felszínén megjelenő specifikus antigénekhez kötődött, fluoreszcensen jelölt antitestekkel, fluoreszcens mikroszkóp felhasználásával (1.23. ábra). Ezt a reakciót használják például *Chlamydia trachomatis* direkt kimutatására húgycsőváladékból.

**Indirekt IF:** A beteg savójában keringő ellenanyag kimutatása történhet antigéneket tartalmazó sejt kultúra segítségével. Első lépésként ezekhez az antigénekhez kötődik a keresett ellenanyag, majd a második, fluoreszcensen jelölt antihumán ellenanyag bekötődése fluoreszcens mikroszkópban láthatóvá teszi a specifikus kötődéseket. Ilyen módszert használnak például coronavírusok elleni ellenanyagok kimutatására szérumból (1.23. ábra).



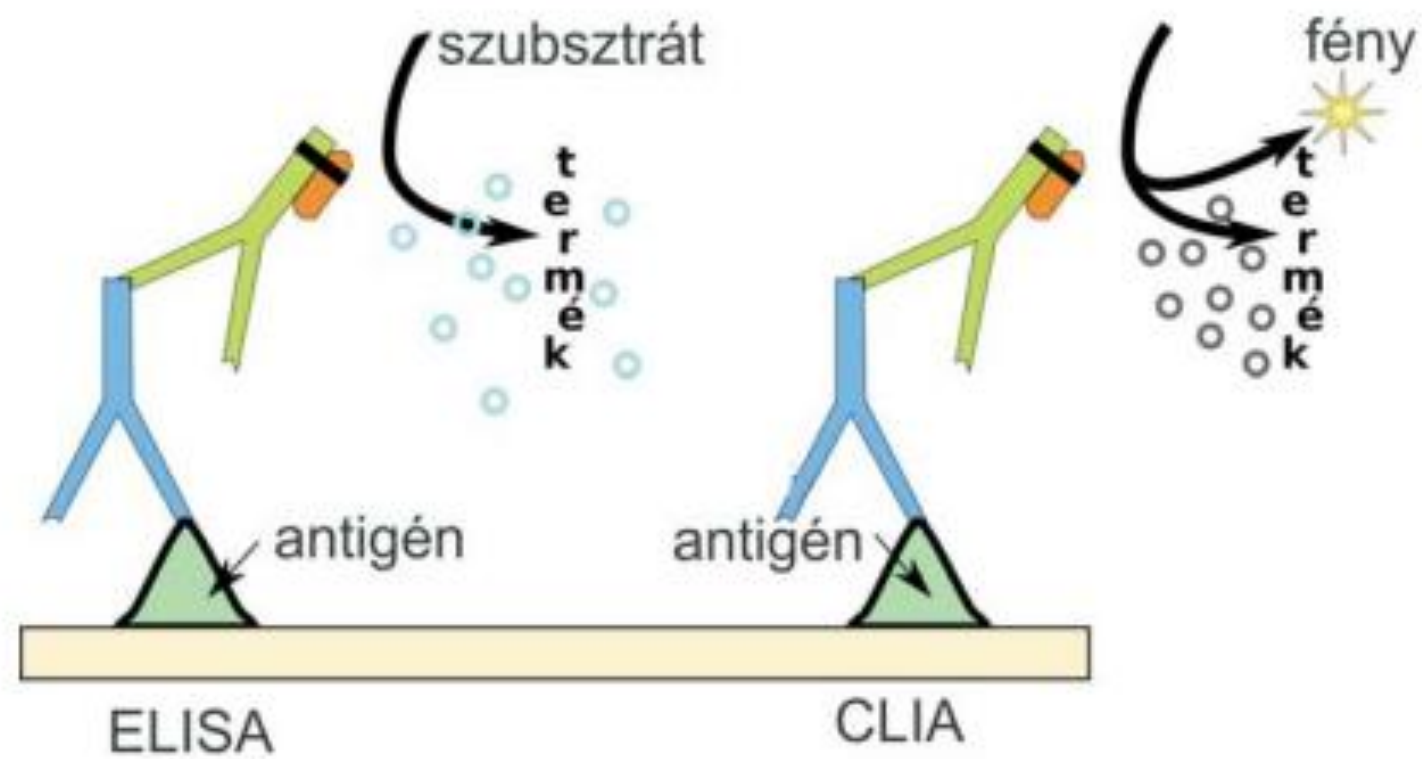
1.23. ábra. Direkt és indirekt immunfluoreszcens módszer elve

*1.5.2.2. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA),  
Chemiluminescence Immunoassay (CLIA)*

A két hasonló elven működő módszer, mind antigén, mind ellenanyag kimutatására alkalmas, automatizálható eljárások. A jelölt ellenanyaghoz kötött enzim szubsztrátjából színes terméket készít, ennek mennyisége optikai denzitás (OD) formájában fotométerrel mérhető (ELISA, **1.24.**

**ábra**), vagy a jelölő enzim kemilumineszcens vegyületet hasít, detektálható fényjelenséget eredményezve (CLIA, **1.24. ábra**).

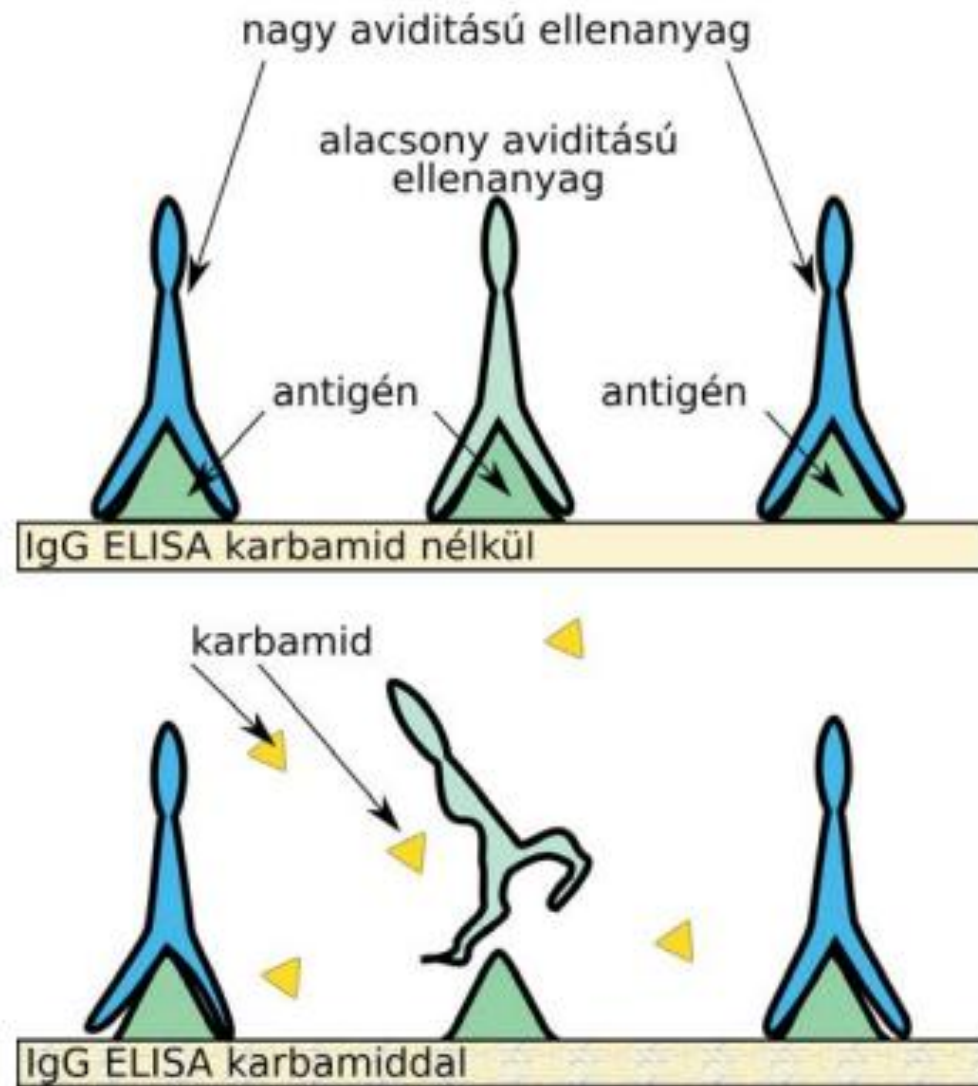
Az ELISA az egyik legelterjedtebb, mind kvalitatív, mind kvantitatív meghatározásra alkalmas szerológiai módszer. Antigén kimutatására használatos ELISA pl. a hepatitis-B-vírus HBsAg-jének kimutatása, antitest kimutatására használják pl. a hepatitis-A-vírus diagnosztikájában.



**1.24. ábra.** ELISA és CLIA módszer elve

## Aviditás vizsgálat

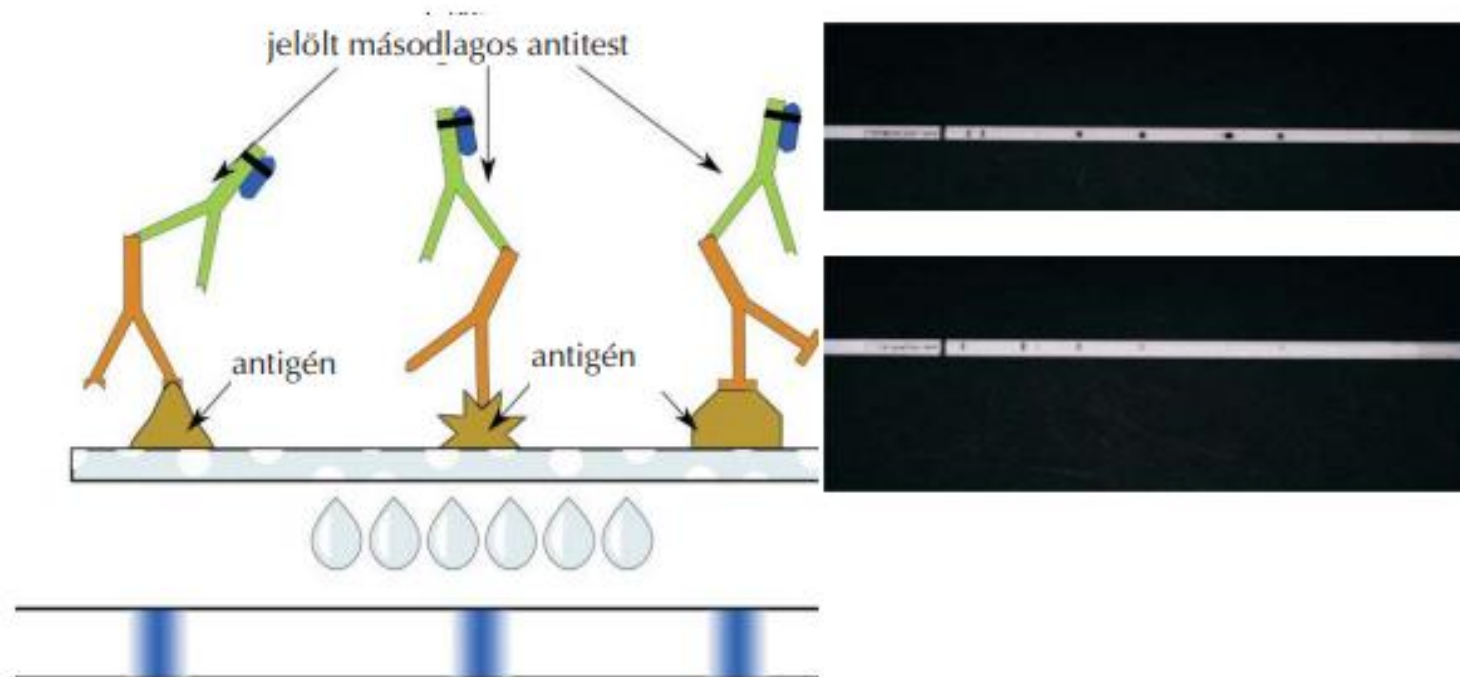
Egy akut fertőzés után nemcsak a specifikus IgG mennyisége nő, hanem az idő előrehaladásával az **ellenanyag érik**, és néhány hónap múlva az ellenanyag erősebben fog kötődni az antigénhez. Az aviditás az antigén-ellenanyag kötések affinitásának mértéke. Az IgG aviditási tesztet úgy végzik, hogy egy mintából két párhuzamos tesztet végeznek egyszerre. Az egyik beállítást a szokásos módszerrel (pl. ELISA, immunfluoreszcencia), a másikat pedig úgy, hogy az antigén-ellenanyag kötődés után ureával mossák a mintát. Az urea feloldja az IgG és az antigének közötti gyenge kötések, így csak az erősen kötődő IgG marad a rendszerben. A két vizsgálati minta eredménye közötti különbségből meg lehet állapítani, hogy milyen erősen kötődik az IgG az antigénhez, tehát akut vagy régi fertőzésről lehet-e szó. Az **alacsony aviditású IgG a megelőző 3-4 hónapban** lezajlott fertőzésre utal. Az aviditás mérésének nagy jelentősége van a várandósok fertőzéseinek (CMV, Toxoplasma) vizsgálatában, illetve a primer és szekunder fertőzések közötti differenciálásban **(1.25. ábra)**.



**1.25. ábra.** Az ellenanyagok aviditásának vizsgálata

### 1.5.2.3. Immunoblot

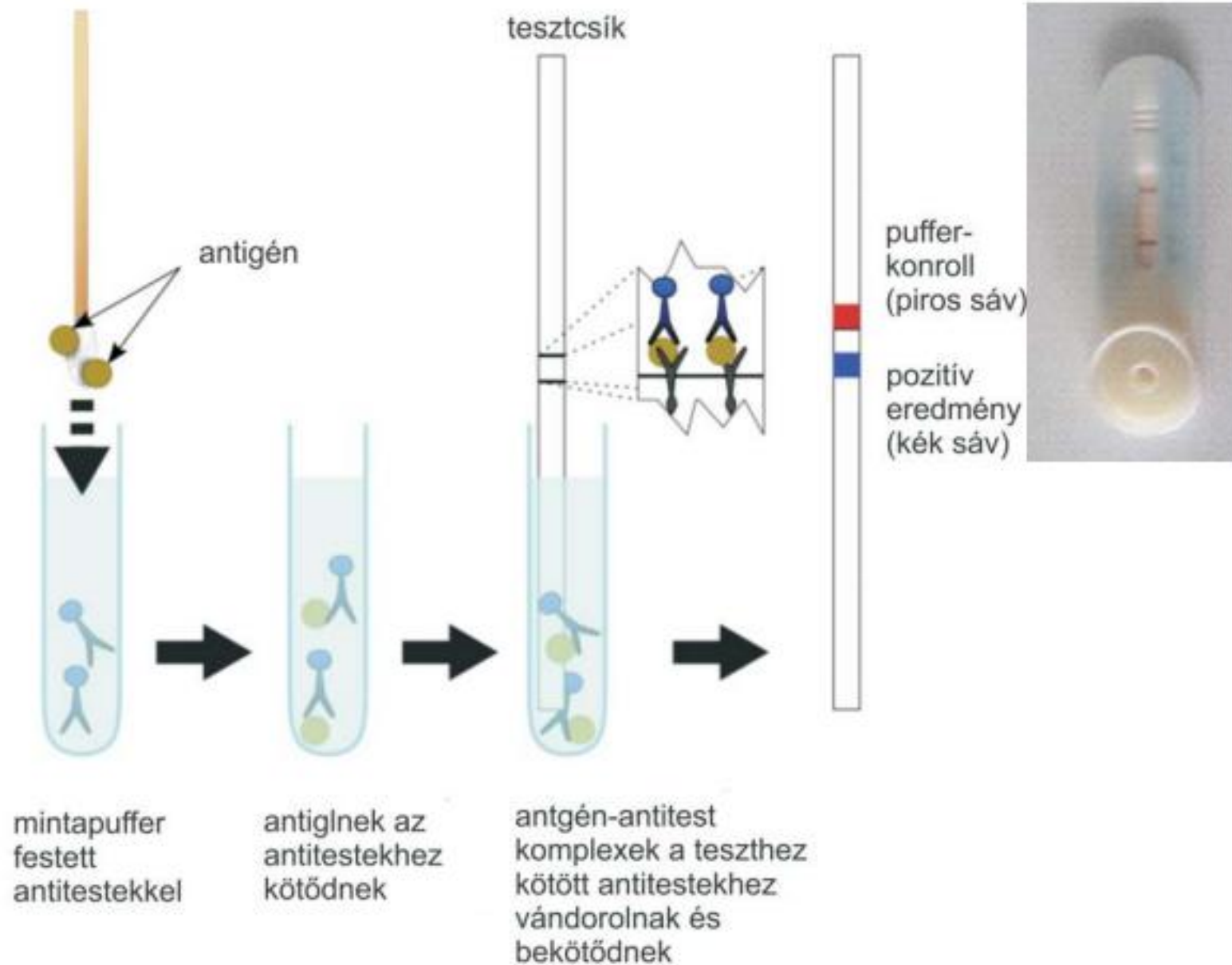
Egy adott kórokozó nitrocellulóz membránon rögzített rekombináns anti-génjeinek segítségével mutatjuk ki, hogy a vizsgált szérum mely antigén-ek ellen rendelkezik antitestekkel. Ennél a módszernél is második en-zimmal jelölt antihumán ellenanyag és az enzim szubsztrátjának hasadá-sával létrejövő színváltozás jelzi a specifikus kötődést (1.26. ábra). Példá-ul a HIV ELISA szűrővizsgálati eredmények megerősítésére használatos módszer.



**1.26. ábra.** Az Immunoblot módszer elve; IgG és IgM Immunoblot csíkok

#### 1.5.3.4. Immunkromatográfia

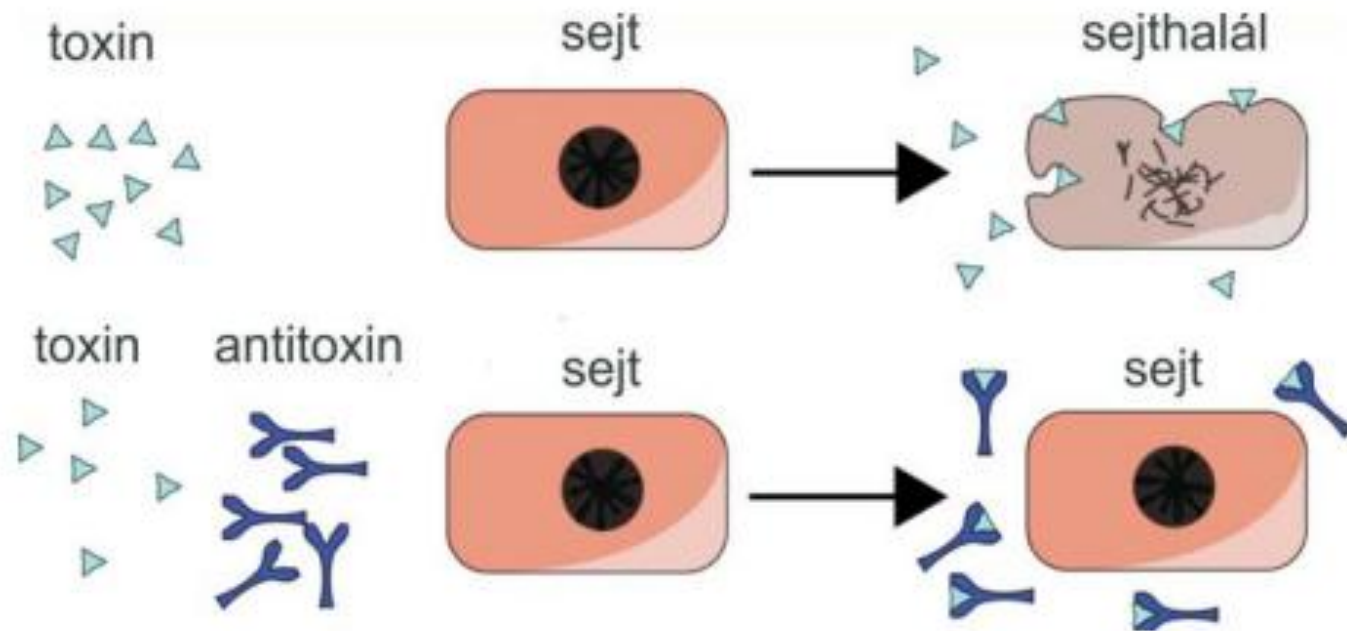
A vizsgálati mintából festékkel jelzett antitest felhasználásával, antigének direkt kimutatására szolgáló gyorseszteszt. A festett ellenanyaghoz kötődött folyadékban oldott antigén, a szilárd kromatográfia során rögzített antitesthez is kapcsolódik, a magával vitt festékszemcsék látható jelet adnak. Ezt az eljárást használjuk például a *Trichomonas vaginalis* antigén detektálásakor vagy *Clostridium difficile* toxin kimutatására (1.27. ábra).



**1.27. ábra.** Immunkromatográfia elve és eredménye

### 1.5.3.5. Vírus- és toxinneutralizáció

A szervezetben a vírusok vagy toxinok ellen termelődött ellenanyagok kimutatására használjuk, leggyakrabban megerősítő vizsgálatként, illetve a betegből izolált vírus pontos típusának meghatározására is alkalmazható. Az átvészelt fertőzés vagy oltás következtében keletkező neutralizáló ellenanyagok képesek a vírus vagy toxin antigénjeihez kötődve annak fogékony sejthez való adszorpcióját és így károsító hatását kivédeni. Ezt használjuk ki a vizsgálat során: a vizsgálni kívánt savó és a vírus vagy toxin megfelelő arányú keverékét inkubáció után a vírusra vagy toxinra fogékony szövettényészetre oltva vizsgáljuk a kialakult citopatogén hatás mértékét. Amennyiben a minta tartalmazott a vizsgált vírusra vagy toxinra specifikus neutralizáló ellenanyagokat, a szövetkárosodás nem/csökkent mértékben alakul ki (1.28. ábra).



**1.28. ábra.** Vírus- vagy toxinneutralizáció