

Szerológiai reakciók

Készítette:
Dr. Szereday László

2015

AZ ÉLETTUDOMÁNYI- KLINIKAI FELSŐOKTATÁS GYAKORLATORIENTÁLT ÉS
HALLGATÓBARÁT KORSZERŰSÍTÉSE A VIDÉKI KÉPZŐHELYEK NEMZETKÖZI
VERSENYKÉPESSÉGÉNEK ERŐSÍTÉSÉRE
TÁMOP-4.1.1.C-13/1/KONV-2014-0001

Tartalomjegyzék

1. Alapfogalmak

2. Az immunrendszer felépítése

3. Szerológiai reakció

4. Friss fertőzés diagnózisa

5. Affinitás és aviditás

6. Szenzitivitás és specificitás

7. AGGLUTINÁCIÓ

7.1. Tárgylemez agglutináció

7.2.a. Hemagglutináció

7.2.b. Hemagglutináció gátlás

7.2.c. Passzív Hemagglutináció

7.2.d. Passzív Reverz Hemagglutináció

7.3. Latex agglutináció

7.4. Csőagglutináció

Tartalomjegyzék

8. PRECIPITÁCIÓ

8.1. Gyűrű precipitáció

8.2. Gélprecipitáció

Mancini próba (radiális immundiffúzió)

Ouchterlony féle két-dimenziós kettős gélprecipitáció

8.3. Immunelektroforézis

9. NEUTRALIZÁCIÓ

10. KOMPLEMENTKÖTÉSI REAKCIÓ

11. IMMUNFLUORESCENCIA (Direkt)

12. IMMUNFLUORESCENCIA (Indirekt)

13. Direkt ELISA

14. Indirekt ELISA

15. Kompetitív ELISA

16. WESTERN-BLOT

17. LINE IMMUNOASSAY (LIA)

1. Alapfogalmak



1. **Antigén:** Antigénnek nevezzük (tágabb értelemben) mindazokat a struktúrákat (sejteket, molekulákat), amelyeket az érett immunrendszer felismer.

2. **Immunogén:** Az antigén immunválaszt kiváltó képessége, azaz az a tulajdonsága, hogy megindítja az antigénnel fajlagosan reagálni képes effektor sejtek és ellenanyagok képződését. A szervezetben ellenanyagtermelést kiváltó anyag (pl. vírus, baktérium, pollen, idegen egyedből származó ellenanyag, sejt, szövet)

3. **Epitóp:** Az antigén azon része, amellyel az ellenanyaghoz kötődik.

4. **Ellenanyag:** Az immunválasz egyik alkotója, poliklonális v. monoklonális

5. **Monoklonális ellenanyag:**

Azonos specificitású ellenanyag molekulák

Egyetlen B-sejtből származó sejtvonal (sejtklón) termeli

Egyetlen epitóp felismerésére képes

1. Alapfogalmak



6. Poliklonális ellenanyag:

Több eltérő specificitású ellenanyag keveréke

Több B-sejt klón termeli

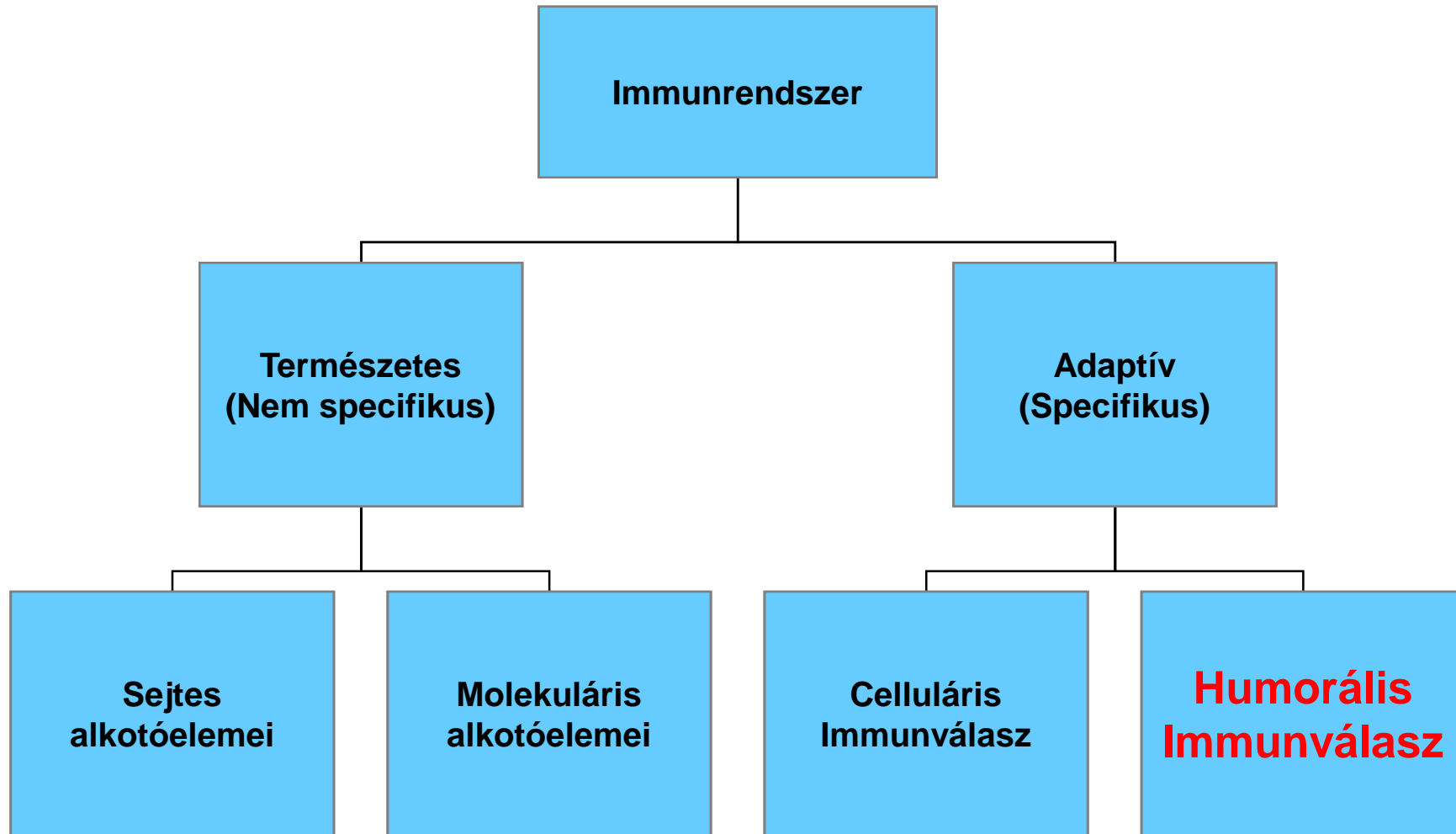
Egy adott antigén eltérő epitópjait ismerik fel

7. **Specificitás:** A diagnosztikai tesztek hatékonyságának méréséhez kapcsolódó fogalom. A teszt azon képességére utal, hogy mennyire képes egyetlen antigént v. antitestet felismerni.

8. **Szenzitivitás** (érzékenység): A diagnosztikai tesztek hatékonyságának méréséhez kapcsolódó fogalom. Az adott teszt mennyire képes az antigén v. antitest kis mennyiségét detektálni.

9. **Kereszt reaktivitás:** A kérdéses antitest nemcsak egy, hanem több antigénhez is kötődik, ennek az a feltétele, hogy az antigének közös epitóppal rendelkezzenek.

2. Az immunrendszer felépítése

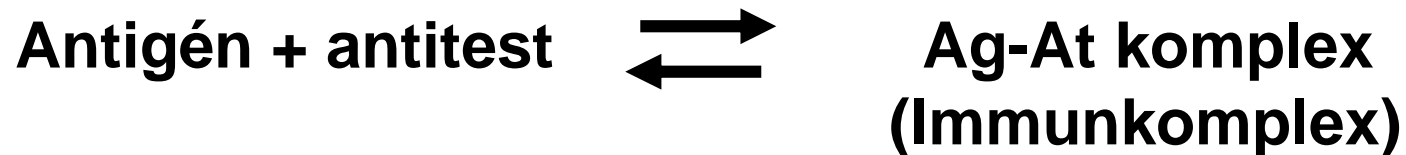


3. Szerológiai reakció

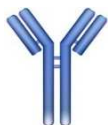


A szerológiai módszerek olyan indirekt diagnosztikai eljárások, amikor a kórokozó antigénjét vagy a szervezetben ellene termelt antitestet mutatjuk ki.

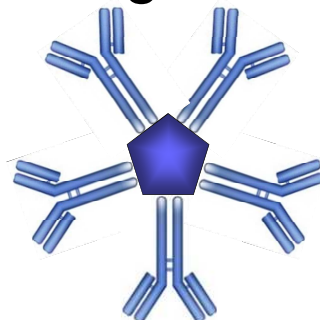
Minden szerológiai reakció alapja:



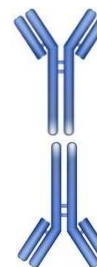
IgG



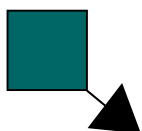
IgM



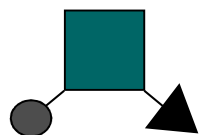
IgA



Antigén

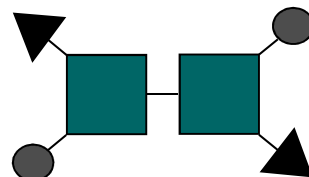


1 epitóp



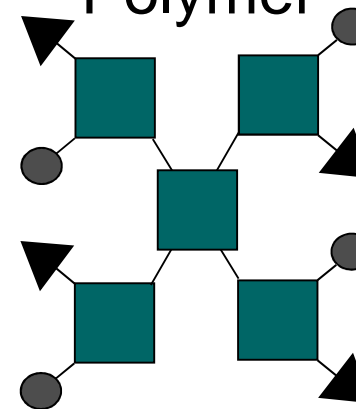
2 epitóp

Dimer



minden epitóp 2x

Polymer



sok epitóp kópia

4. Friss fertőzés diagnózisa



N.B.

4x IgG titeremelkedés

v.

IgM jelenléte

5. Affinitás és aviditás



Affinitás:

Az antitest affinitása kifejezi, hogy milyen erővel képes kötődni az antigénhez. (**egyetlen antitest és antigén között** kialakult kötése erősség)

Aviditás:

Az aviditás utal a több kötőhellyel rendelkező antigének és a több kötőhellyel rendelkező antitestek között kialakuló **kötések együttes erősségére.**

6. Szenzitivitás és specificitás



Szenzitivitás:

Antigén v. antitest **kis mennyiség**ének kimutatása

Alacsony szenzitivitás: **álnegatív eredmény.**

Az antigén v. antitest ott van, de nincs detektálva.

Specificitás:

Az a képesség, hogy megkülönböztesse a különféle molekulákat.

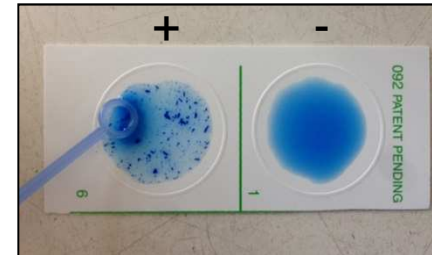
Álpozitív eredmény: a teszt valami mást detektál.

7. AGGLUTINÁCIÓ

Agglutináció alatt a **körpuszkuális antigének** ellenanyagokkal történő kapcsolódásakor létrejövő összecsapódást értjük.



AZ ÉLETTUDOMÁNYI- KLINIKAI FELSŐOKTATÁS GYAKORLATORIENTÁLT ÉS HALLGATÓBARÁT KORSZERŰSÍTÉSE A VIDÉKI KÉPZŐHELYEK NEMZETKÖZI VERSENYKÉPESSÉGÉNEK ERŐSÍTÉSÉRE
TÁMOP-4.1.1.C-13/1/KONV-2014-0001



1. Tárgylemez agglutináció

2. Hemagglutináció

3. Latex agglutináció

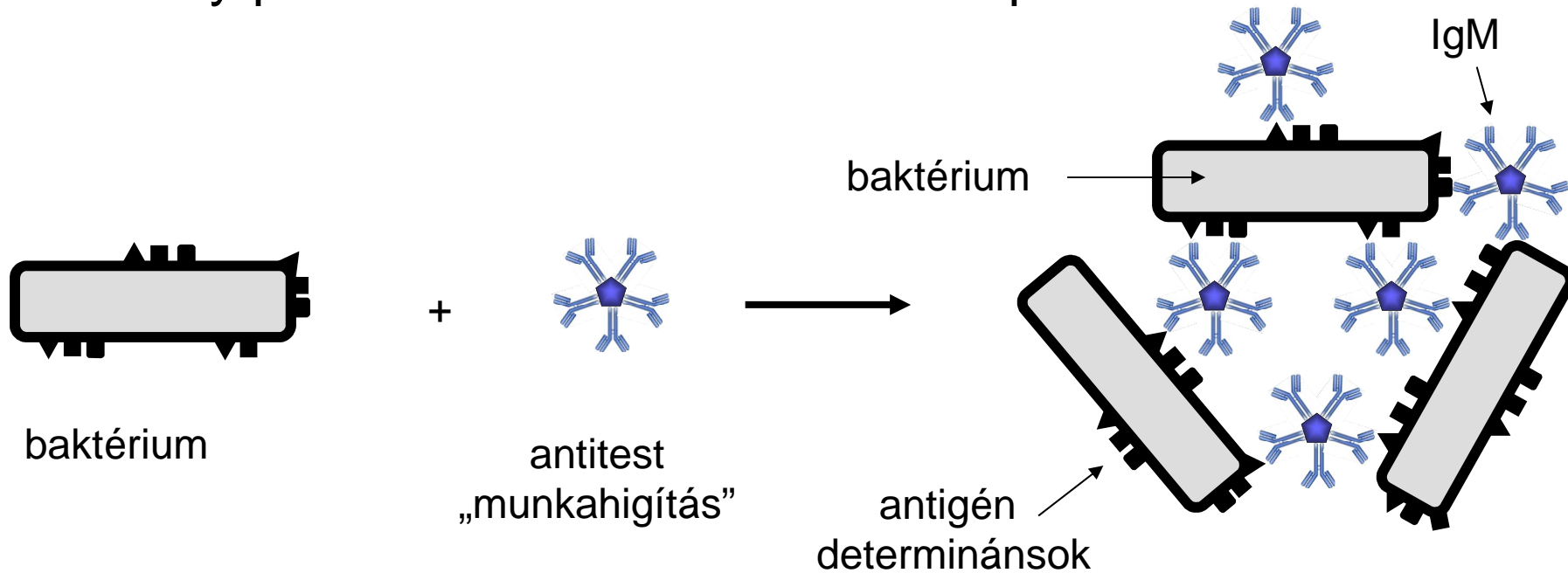
4. Cső agglutináció : antitest titer

kvalitatív

kvantitatív

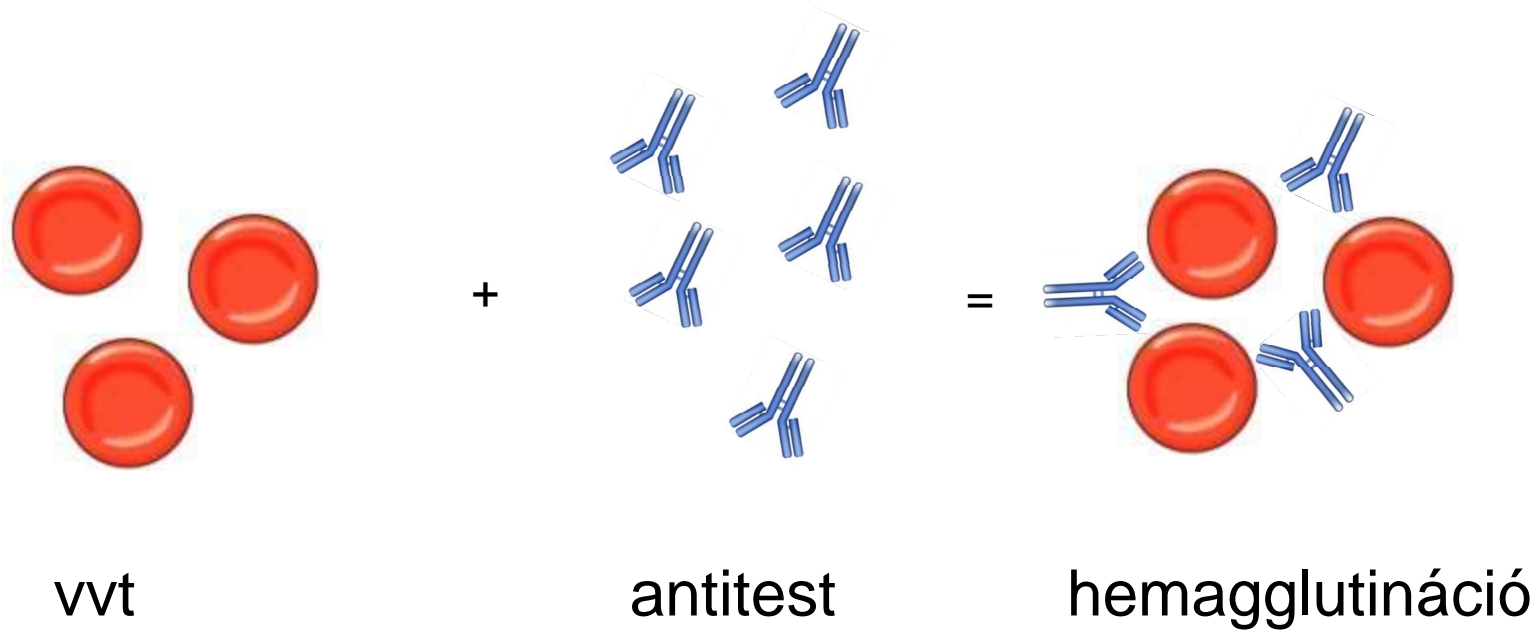
7.1. Tárgylemez agglutináció

A baktériumok identifikálása során használt immunológiai próba a tárgylemez agglutináció, amelynek során ismert típusavóban szuszpendáljuk a vizsgálandó baktériumtelepet. Pozitív reakció esetén a tárgylemezen néhány perc alatt kialakul az összecsapódás.



7.2.a. Hemagglutináció

Hemagglutináció : vvt-k agglutinációja

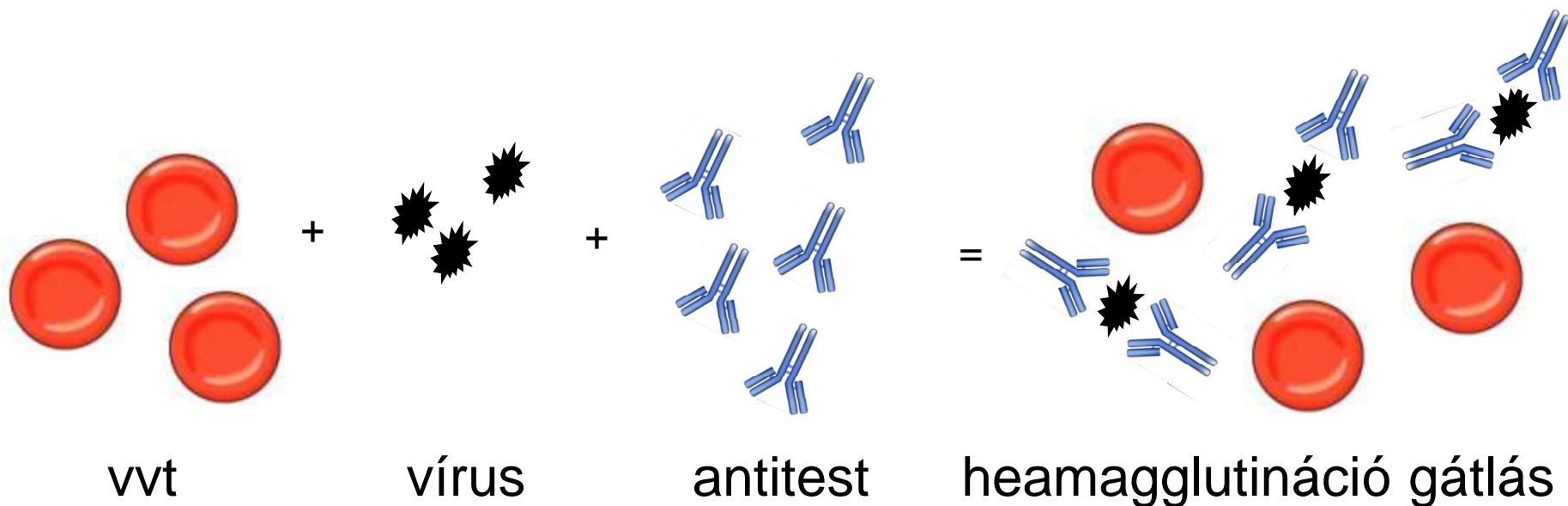
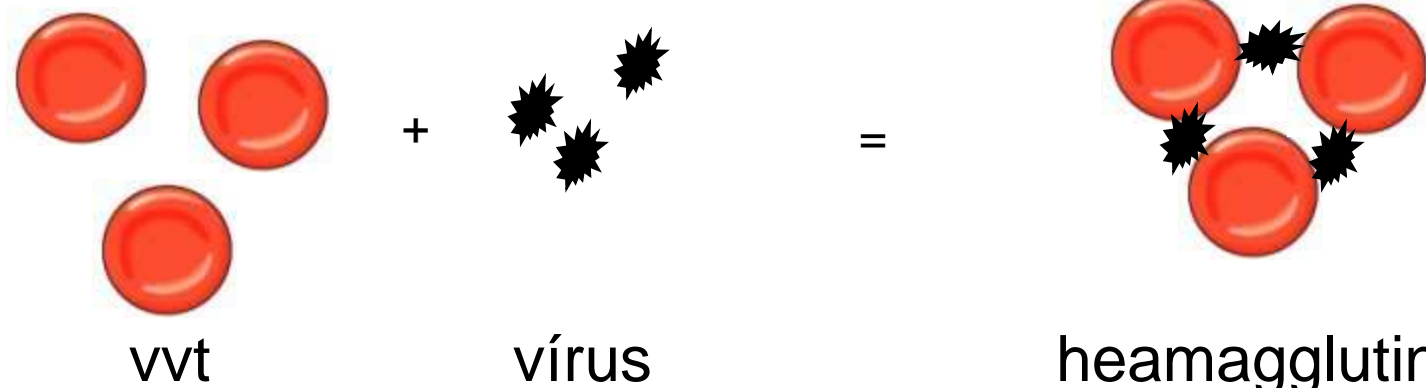


7.2.b. Hemagglutináció gátlás



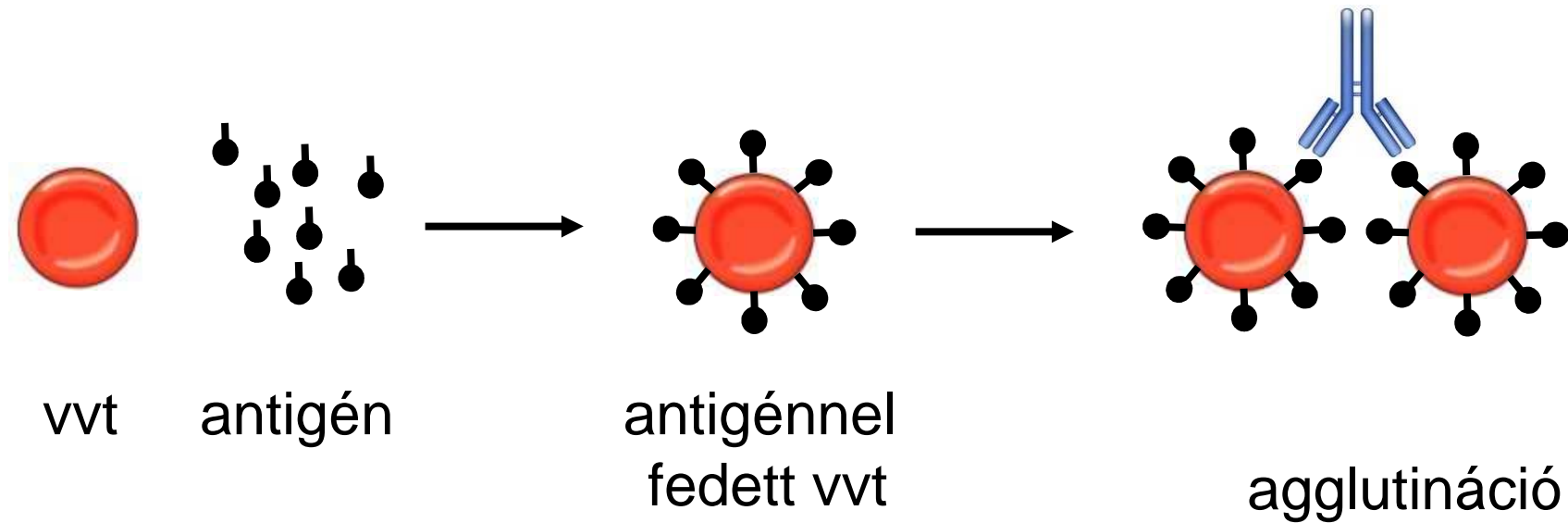
Elsősorban a **virológiában** használt módszer, melynek során egyes vírusok (pl. influenza) direkt hemagglutináló hatásának gátlását használják. A próba csak olyan vírusok esetében alkalmazható, amelyek felületükön hemagglutináló fehérjéket hordoznak. Ezekre a fehérjemolekulákra jellemző, hogy a vírus ezek segítségével meghatározott állatfaj vörösvérsejtjeinek receptormolekuláihoz kötődni képes és többszörös kapcsolódások révén aggregátumok jönnek létre, amelyek leülnek a testcső aljára. Amennyiben a rendszerhez a hemagglutináló fehérjére nézve specifikus ellenanyagot adunk, az hozzákapcsolódik a vírus felületéhez, így nem alakul ki a hemagglutináció.

7.2.b. Hemagglutináció gátlás



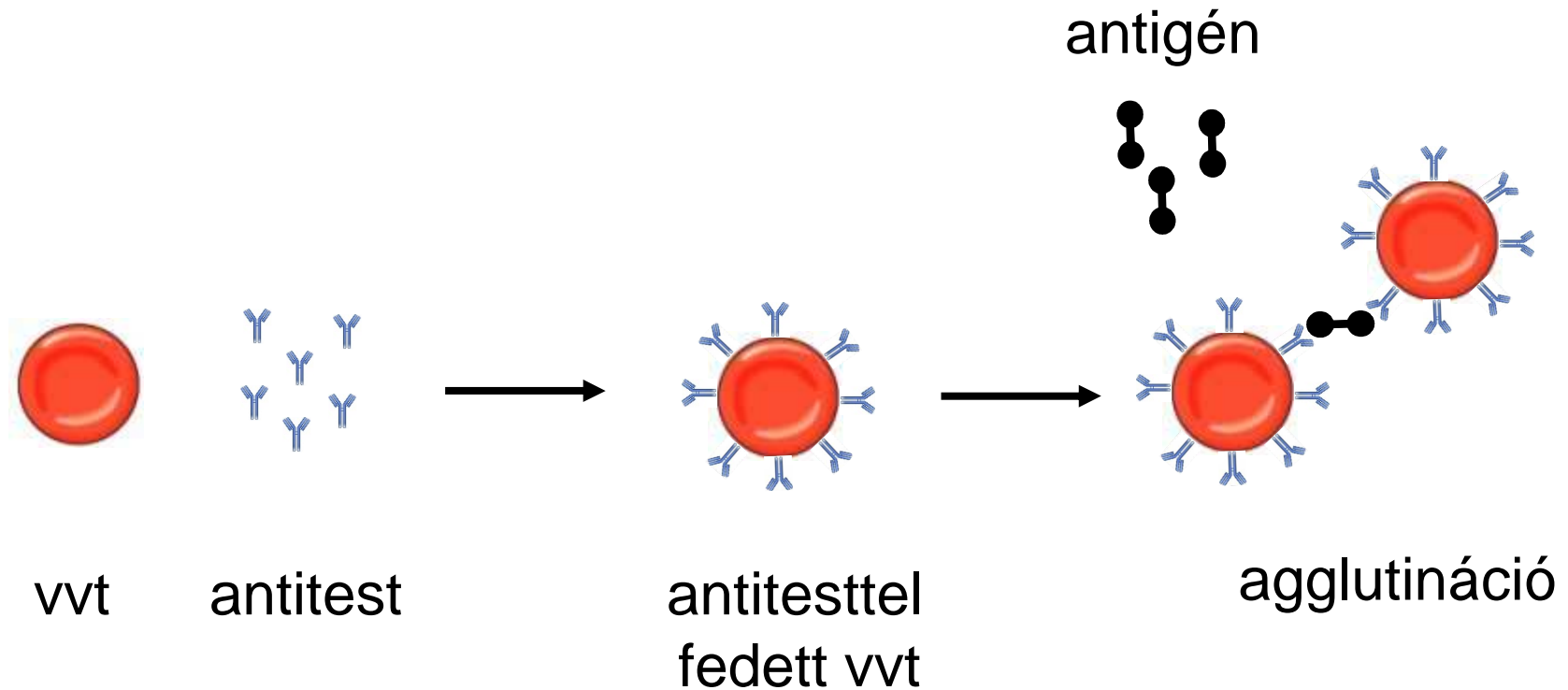
7.2.c. Passzív Hemagglutináció

Vvt felszínére antigént kötünk ki.



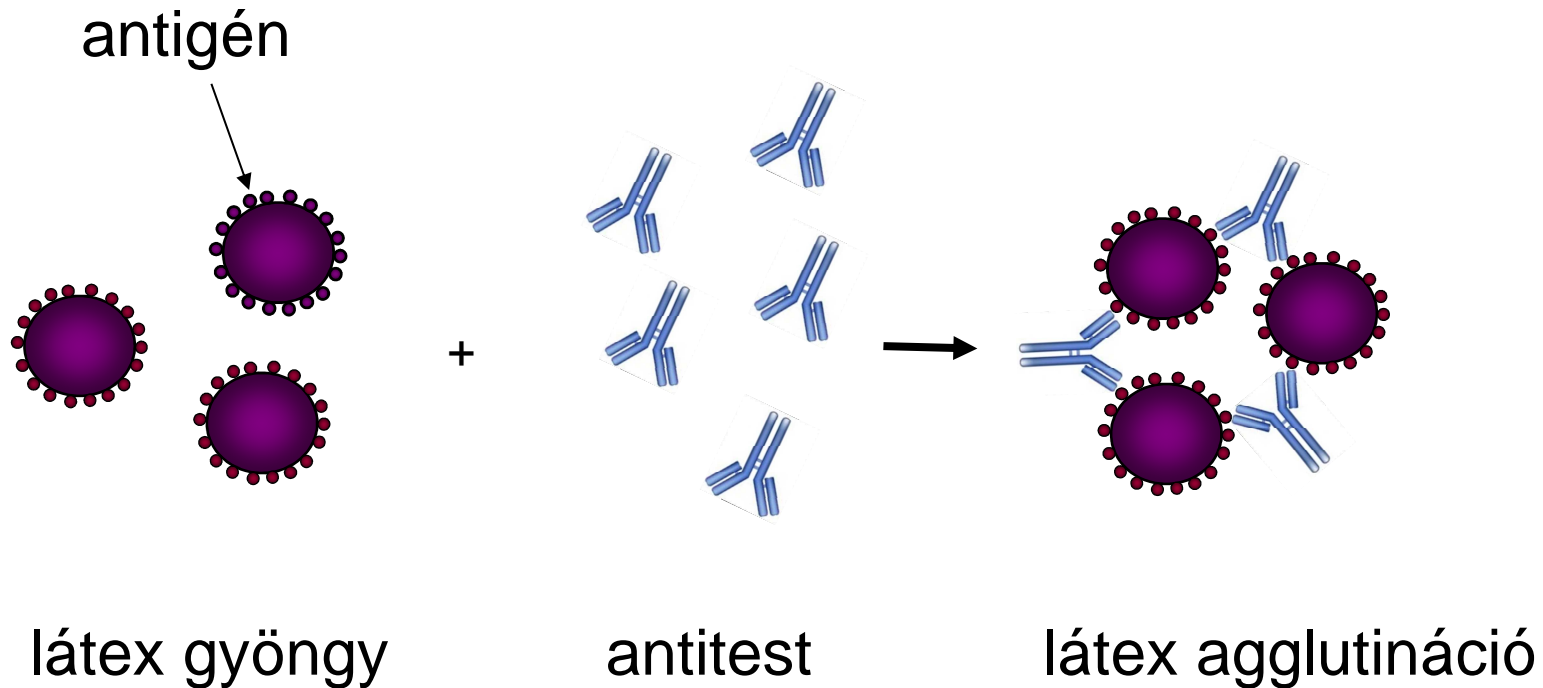
7.2.d. Passzív Reverz Hemagglutináció

Vvt felszínére antitestet kötünk ki.



7.3. Latex agglutináció

Legelterjedtebb agglutinációs módszer.
Antitest és antigén is kiköthető a latex gyöngy felszínére.



7.4. Csőagglutináció – Antitest titer



A csőagglutinációt általában a vérsavó ellenanyag koncentrációjának meghatározásához használják. Ehhez a vérsavó kettes alapú hígításaihoz ismert sűrűségű baktériumszuszpenziót adunk. Az **antitestek mennyiségi meghatározására** szolgáló paraméter a **titer**. A titer a még reagáló határhígítást jelenti; pl. a titer 64-es akkor, ha a 64-szeres hígításban még ki lehet mutatni az antitestet, de a 128-szorosban már nem.

Cső:	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Hígítás:	1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
Agglutináció:	●	●	●	●	●	●	●	○	○

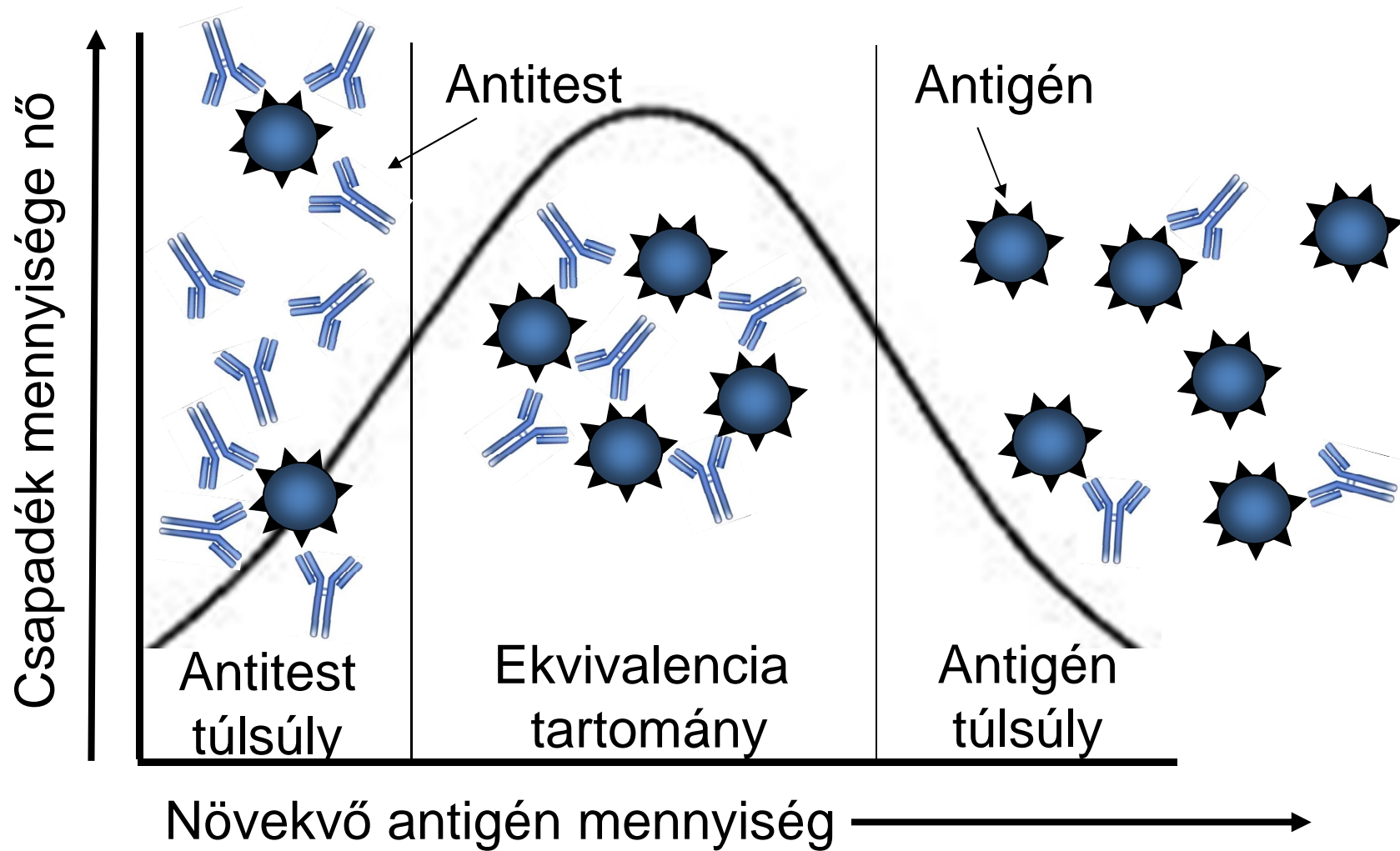
Titer = 1:64

8. PRECIPITÁCIÓ

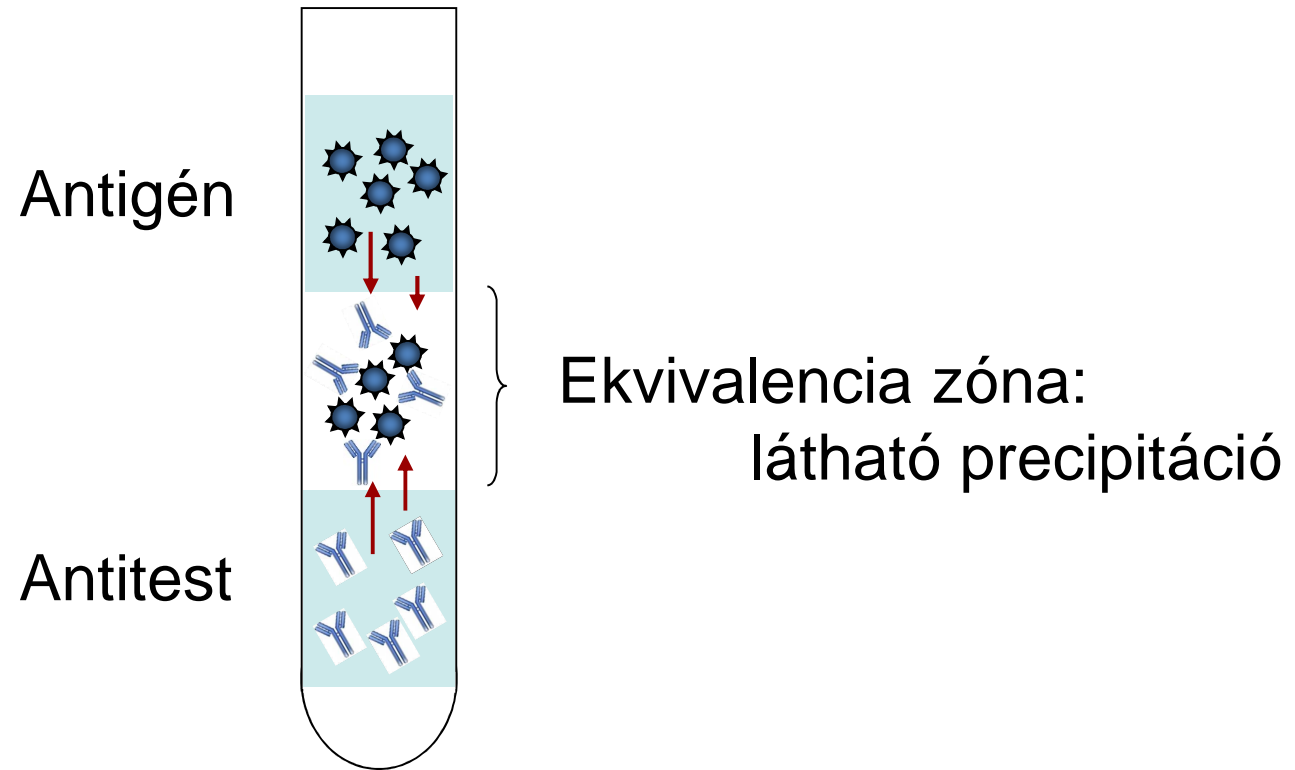


Precipitációról beszélünk abban az esetben, ha az **oldott (szolubilis)** ellenanyag oldott antigénnel képez immunkomplexet, amely az oldatból csapadék formájában kiválik. Akár az agglutinációs próbák esetében, itt is fontos az antigén és ellenanyag mennyiségének ekvivalenciája. A precipitációs próbáknak is több változata ismert, de a legelterjedtebben a csőprecipitációs próbákat és az agargélprecipitációt használják.

Precipitáció



8.1. Gyűrű precipitáció

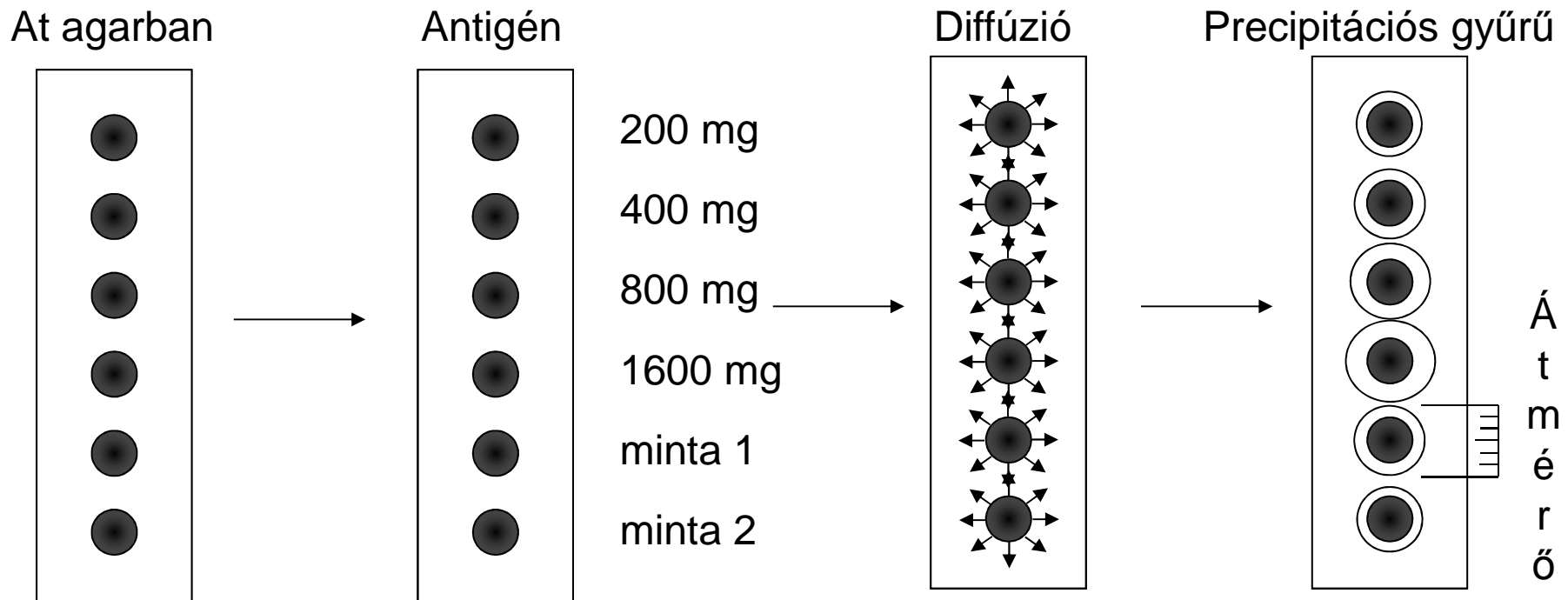


pl., igazságügyi orvostan (vér eredete), élelmiszeripar (húsok eredete)

8.2. Gélprecipitáció

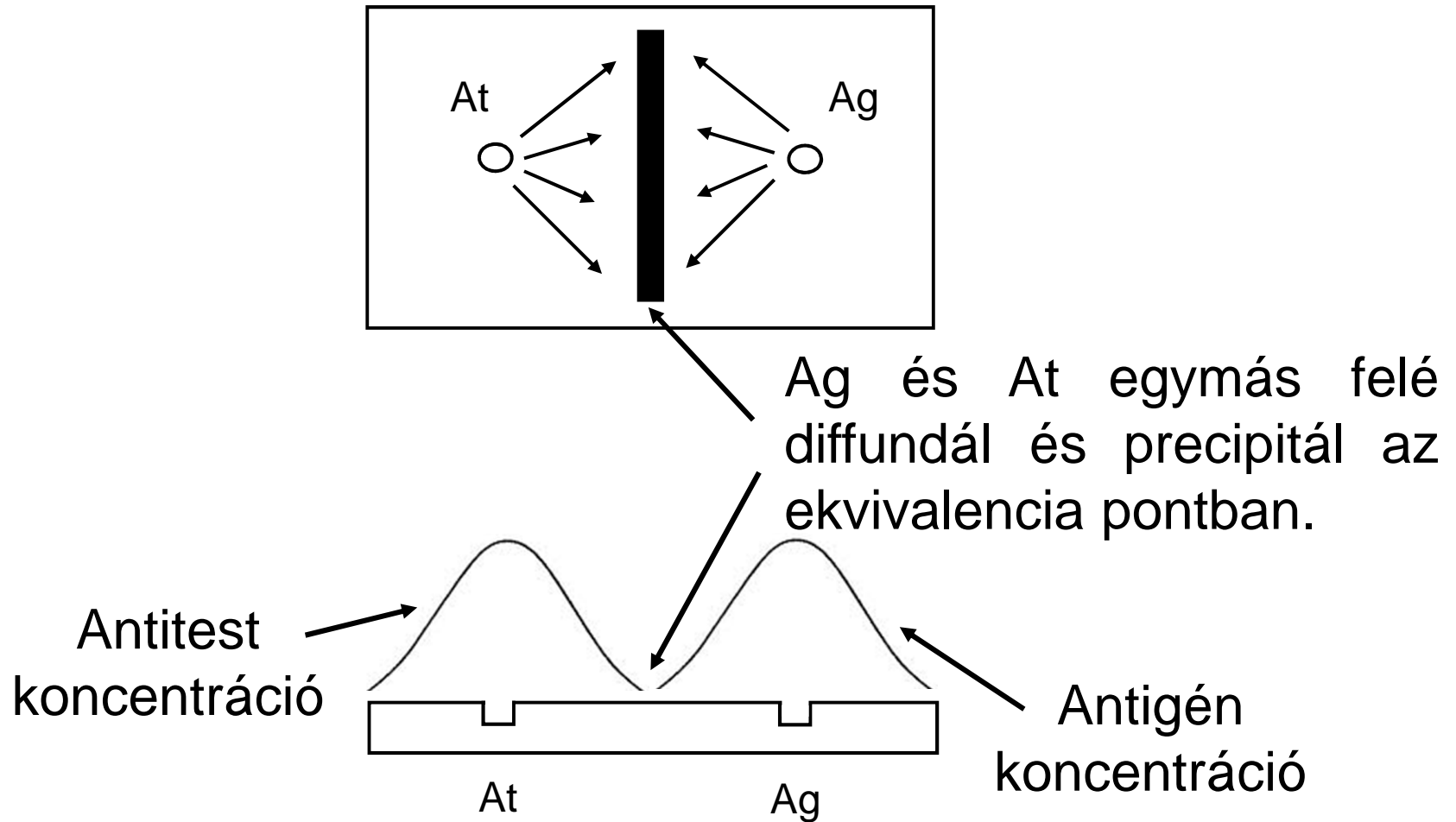
Mancini próba (radiális immundiffúzió)

Az ellenanyag-oldatot az agarba keverjük, csak az antigén-oldatot mérjük az agarlemezbe fúrt lyukakba. A radiális immundiffúzió eredményeként a lyuk körül gyűrű alakú precipitáció alakul ki. A gyűrű átmérője arányos az antigén koncentrációjával.

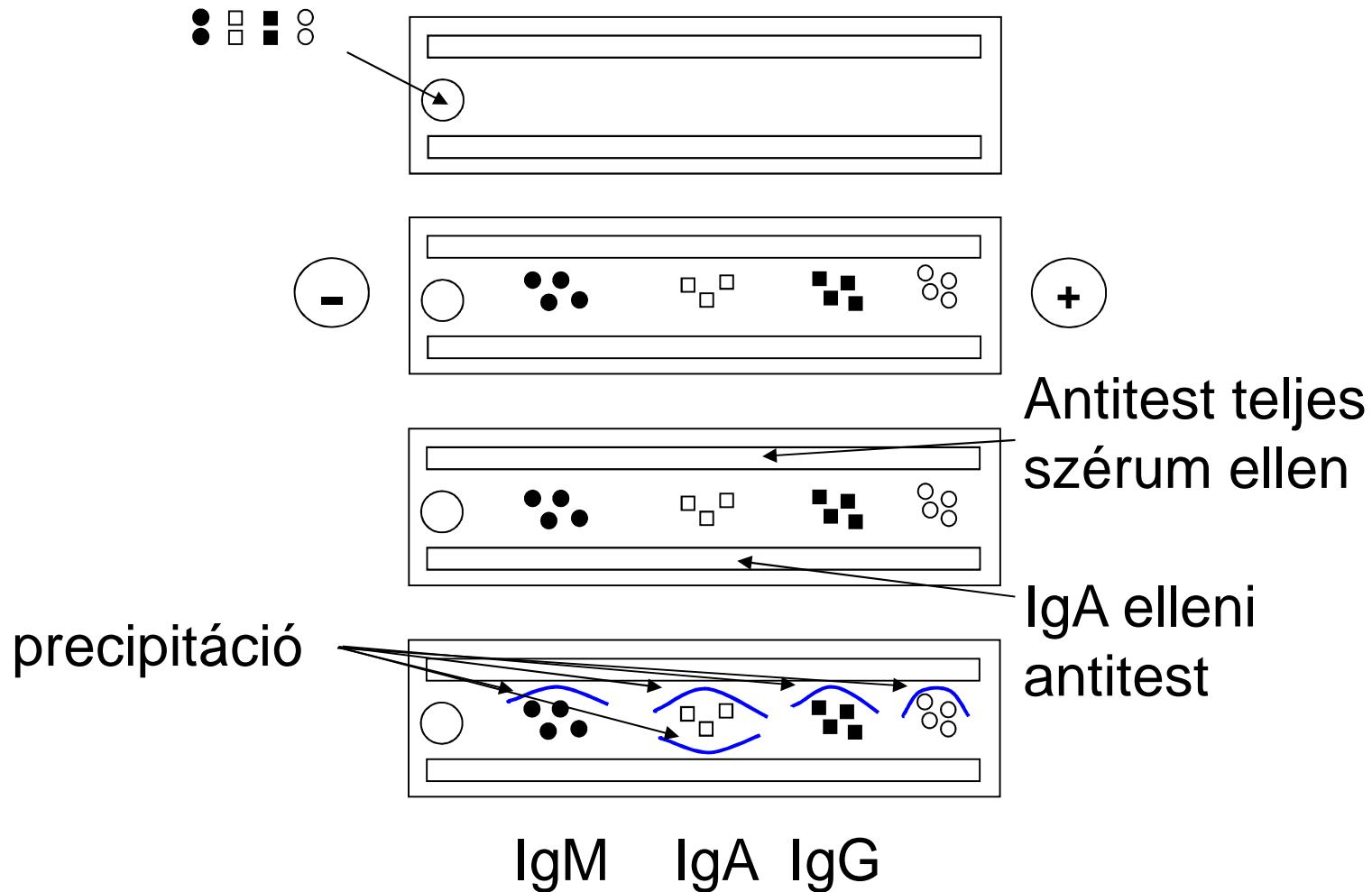


8.2. Gélprecipitáció

Ouchterlony féle két-dimenziós kettős gélprecipitáció

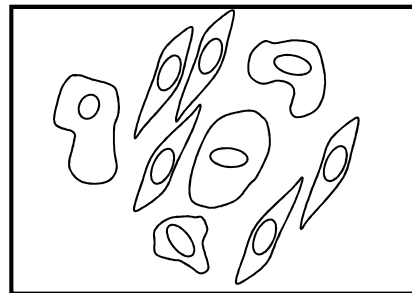


8.3. Immunelektroforézis

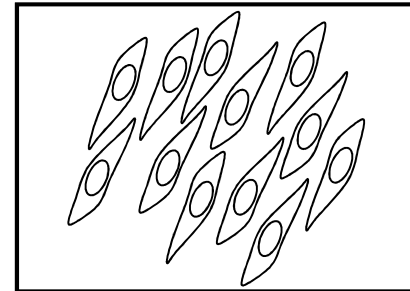


9. VÍRUS NEUTRALIZÁCIÓ

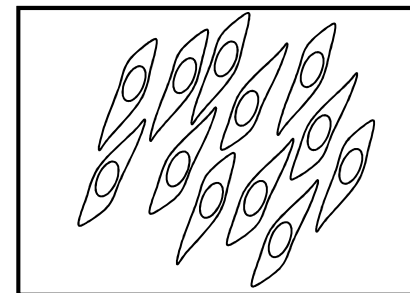
Vírusok hatásának neutralizálása.



Sejt + vírus



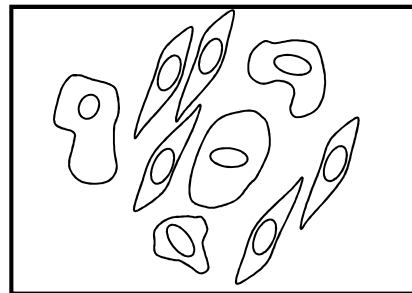
Kontroll sejt



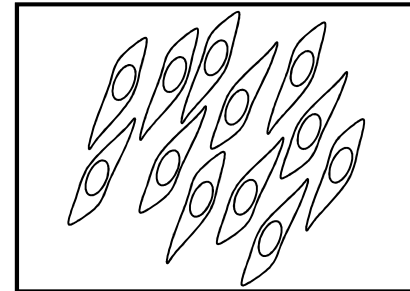
Sejt + vírus + antitest

9. NEUTRALIZÁCIÓ

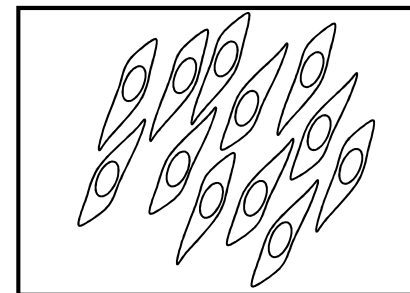
Toxin-antitoxin teszt: exotoxinok hatásának neutralizálása.



Sejt + toxin



Kontroll sejt



Sejt + toxin + antitest

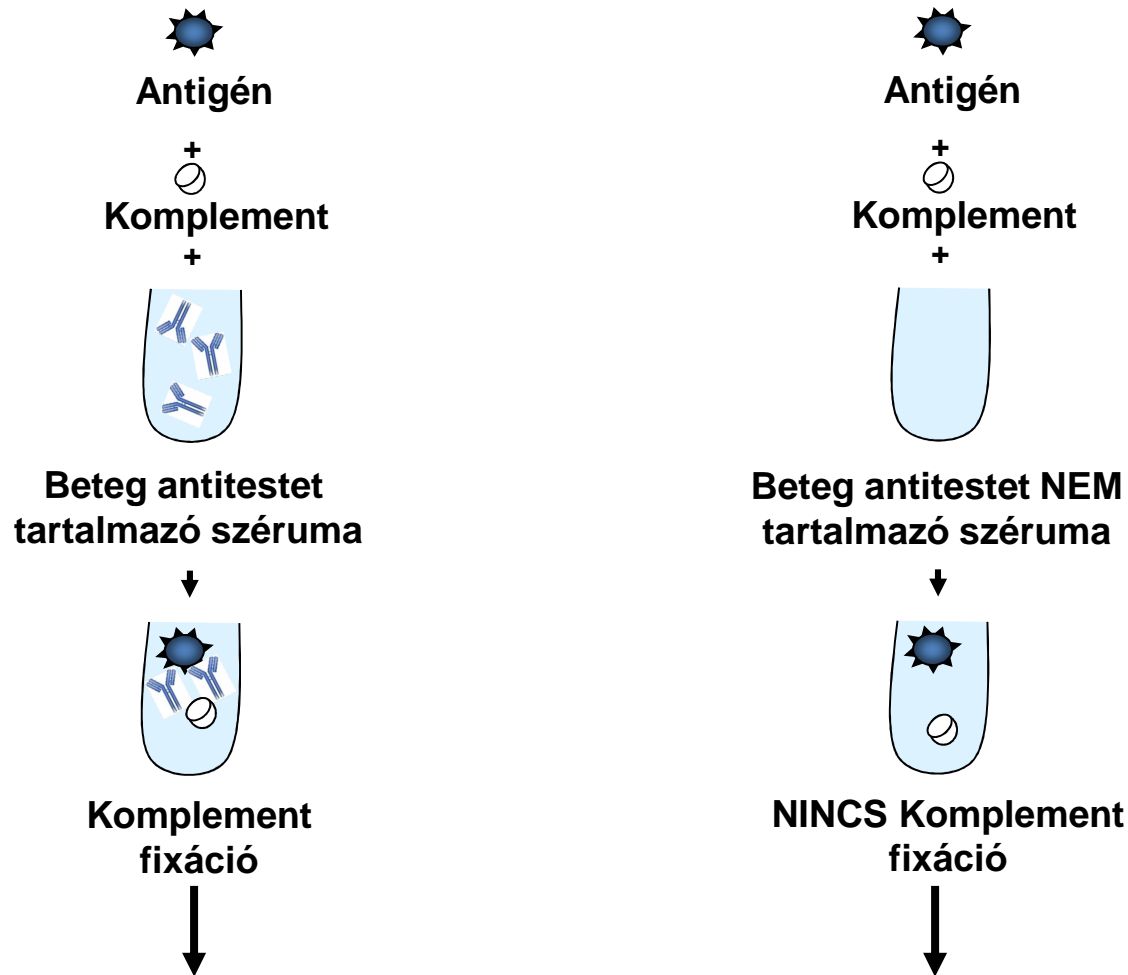
10. KOMPLEMENTKÖTÉSI REAKCIÓ



A próbát általában olyan antigének esetében alkalmazzuk, amelyek nem hoznak létre szemmel látható szerológiai reakciót. Ehhez egy ún. **hemolitikus jelzőrendszerre** van szükség, amely komplementrendszerből, hemolizinből és birka vörösvérsejtekből áll.

Ha a mintában lévő antigén kötődni képes a savóban lévő ellenanyagokkal, megkötik a komplementrendszert, így nincs hemolízis, a vörösvérsejtek leülepednek. Ha nem alakul ki specifikus kapcsolat az antigén és az ellenanyagok között, akkor a komplement szabadon marad, és feloldja a hemolizinnel kapcsolt vörösvérsejteket.

10. KOMPLEMENTKÖTÉSI REAKCIÓ



Komplement fixációs lépés



Indikátor lépés

pl., Chlamydia, Mycoplasma at kimutatás, Wassermann reakció, Lues

11. IMMUNFLUORESCENCIA (IF)

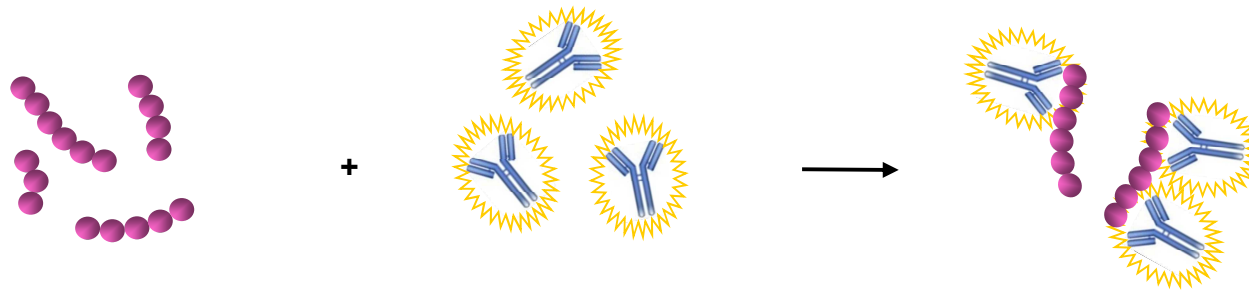


Az immunhisztokémiai és az immunfluoreszcencia módszer szövettani, immunológiai és biokémiai technikák kombinációja, amelynek során szöveti vagy sejthez kötött komponenseket mutathatunk ki specifikus antigén-ellenanyag reakció alapján.

Ennél a módszernél az antitestet **fluoreszcens festékkel** (pl. FITC) konjugáljuk. Ha a betegből származó minta tartalmazta a kérdéses kórokozót, akkor az immunsavó hozzáadása után UV-fénnyel átvilágítva azt, a kórokozó világítani fog (FITC esetén zöld színnel). Számos baktérium esetében (pl. *Chlamydia trachomatis*, *Borrelia burgdorferi*, *Bacillus anthracis*, *Legionella pneumophila*) gyakran alkalmazott eljárás az IF.

11. IMMUNFLUORESCENCIA (Direkt)

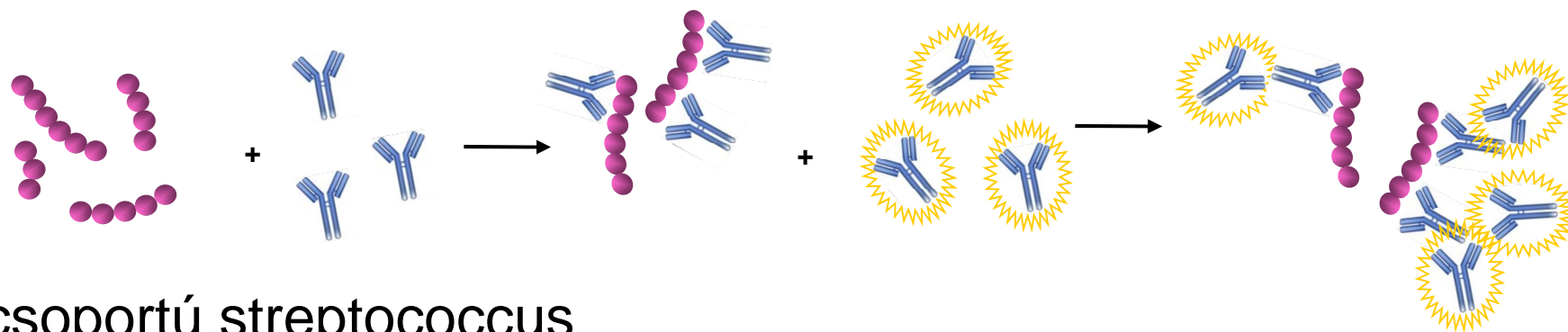
Fluorescens jelölt
antitest



A csoportú streptococcus
beteg garatmintájából

12. IMMUNFLUORESCENCIA (Indirekt)

Fluorescens jelölt
antitest



A csoportú streptococcus
beteg garatmintájából

13. ELISA



Enzyme linked immunosorbent assay

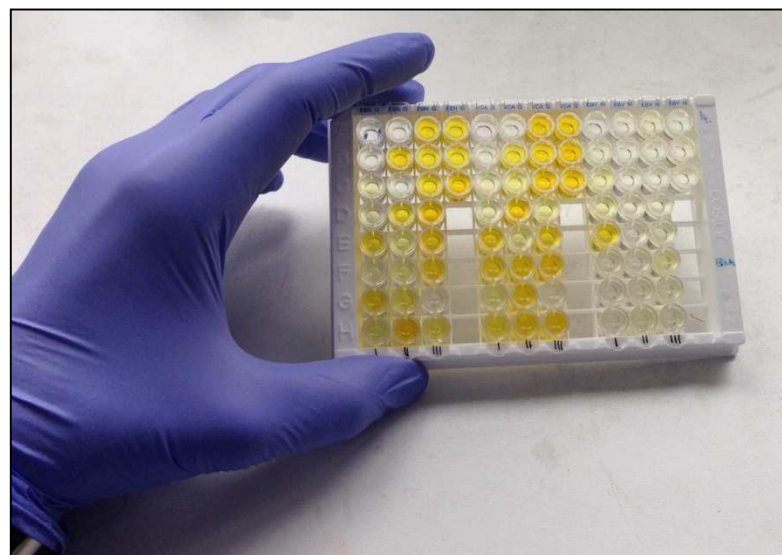
Az ELISA, az antigén-ellenanyag kötésen alapuló jelzéses technikák közül ma a legelterjedtebben alkalmazott módszer. Az enzimreakció során olyan kromogén vagy fluorogén szubsztrátot alkalmazunk, amelynek a színe megváltozik a folyamat során. Így az átalakított szubsztrát mennyisége az abszorpciós maximummal mért optikai denzitás mérésével követhető, és arányos az enzimaktivitással. Az enzim kovalens kapcsolása révén a szilárd fázison mért enzimaktivitás mértékéből a megkötött **antigén** vagy **ellenanyag mennyisége meghatározható.**

13. Direkt ELISA

Antigén kimutatás (beteg mintájából)

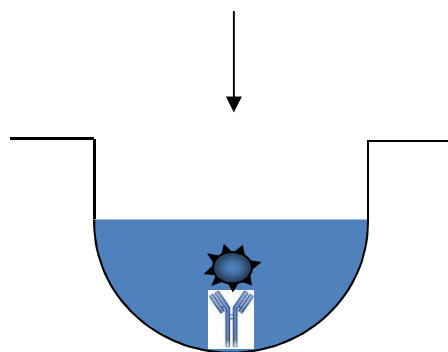


1. Érzékenyítés





1. Érzékenyítés

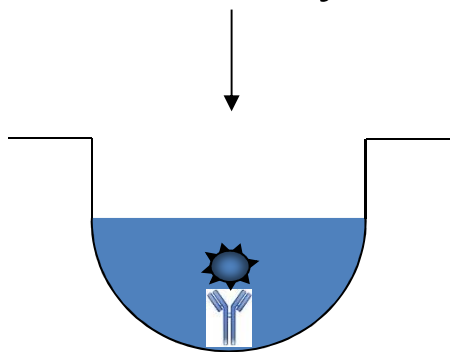


2. Antigént tartalmazó minta

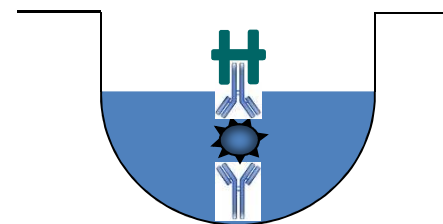
AZ ÉLETTUDOMÁNYI- KLINIKAI FELSŐOKTATÁS GYAKORLATORIENTÁLT ÉS HALLGATÓBARÁT KORSZERŰSÍTÉSE A VIDÉKI KÉPZŐHELYEK NEMZETKÖZI VERSENYKÉPESSÉGÉNEK ERŐSÍTÉSÉRE
TÁMOP-4.1.1.C-13/1/KONV-2014-0001



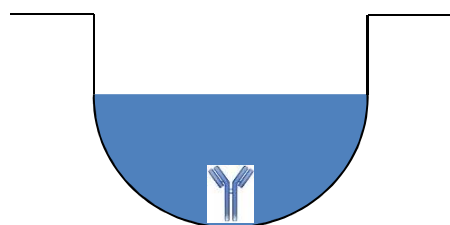
1. Érzékenyítés



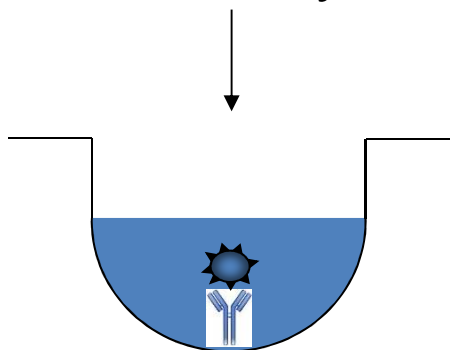
2. Antigént tartalmazó minta



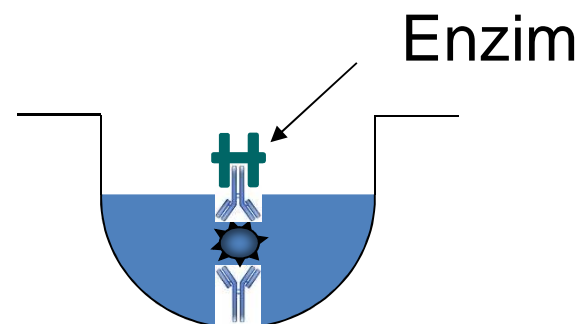
3. Enzimmel konjugált antitest



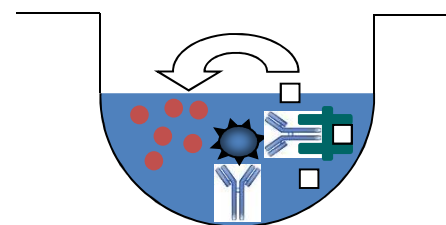
1. Érzékenyítés



2. Antigént tartalmazó minta



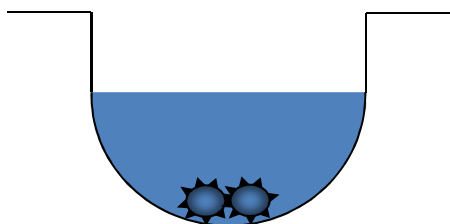
3. Enzimmel kojnugált antitest



4. Szubsztrátot (□) hozzáadva színreakció

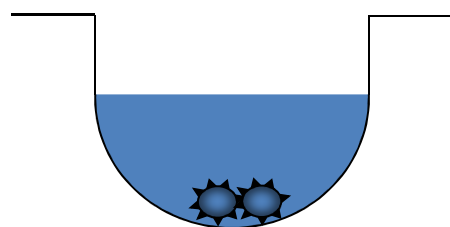
14. Indirekt ELISA

Antitest kimutatás (beteg szérumából)

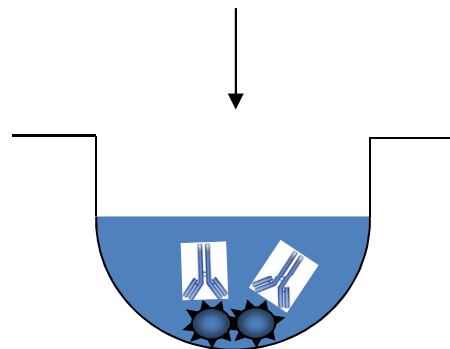


1. Érzékenyítés antigénnel



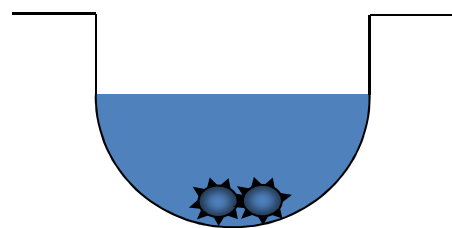


1. Érzékenyítés

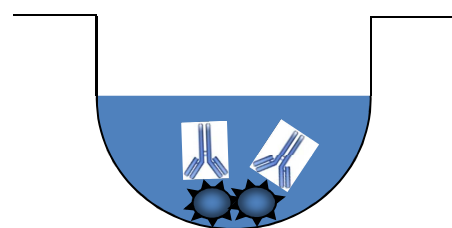


2. Antitestet tartalmazó minta (szérum)

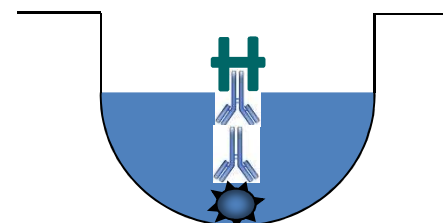
AZ ÉLETTUDOMÁNYI- KLINIKAI FELSŐOKTATÁS GYAKORLATORIENTÁLT ÉS
HALLGATÓBARÁT KORSZERŰSÍTÉSE A VIDÉKI KÉPZŐHELYEK NEMZETKÖZI
VERSENYKÉPESSÉGÉNEK ERŐSÍTÉSÉRE
TÁMOP-4.1.1.C-13/1/KONV-2014-0001



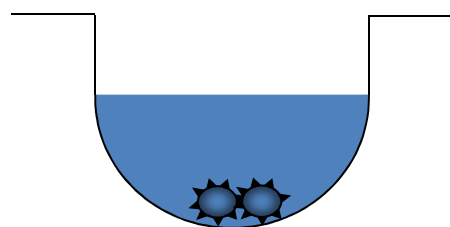
1. Érzékenyítés



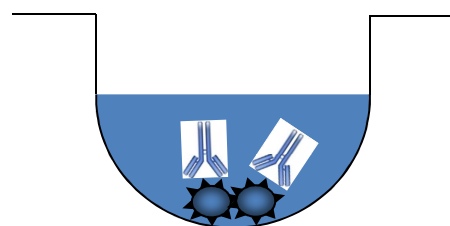
2. Antitestet tartalmazó minta (szérum)



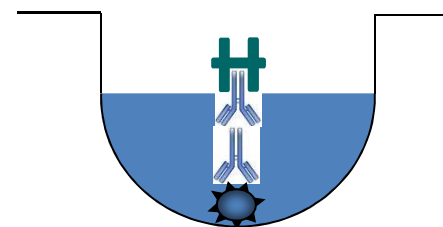
3. Enzimmel konjugált antitest



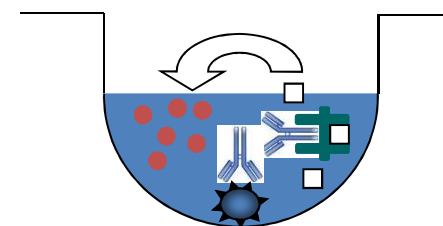
1. Érzékenyítés



2. Antitestet tartalmazó minta



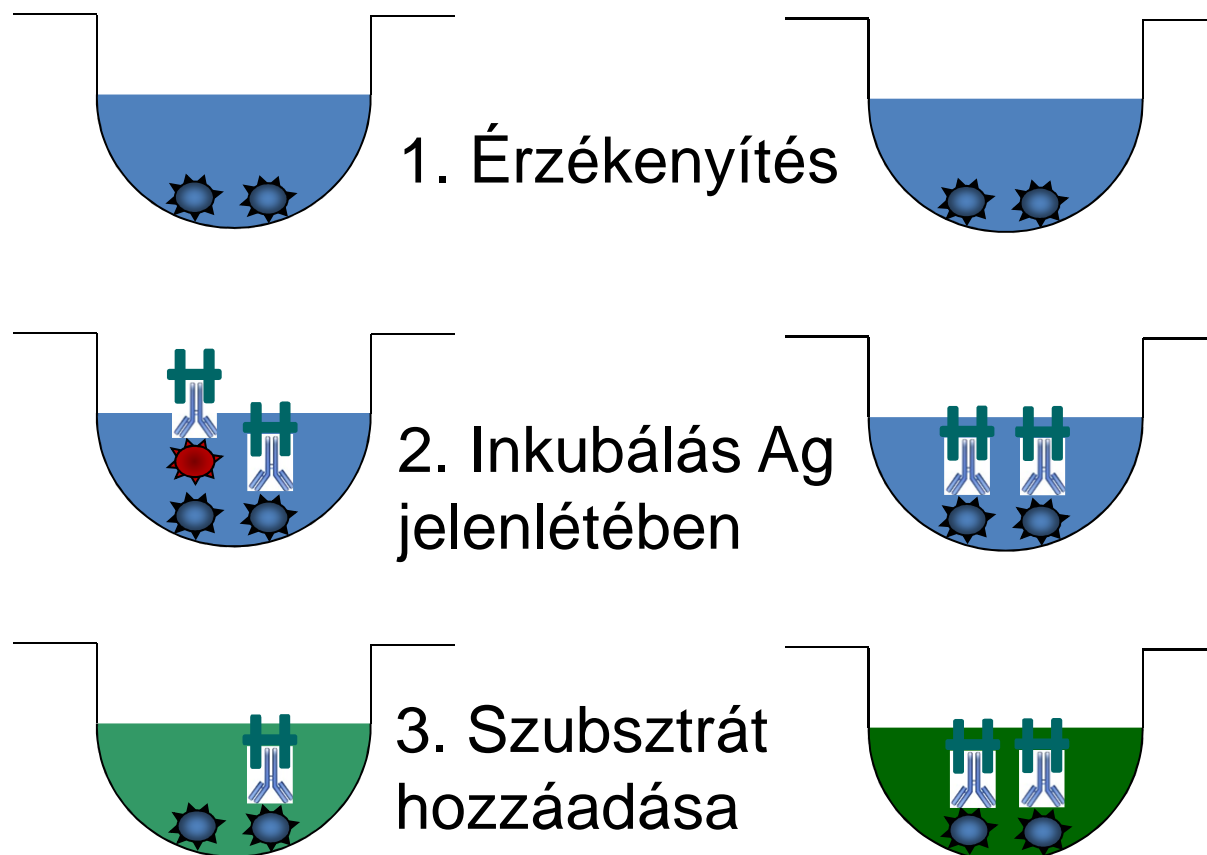
3. Enzimmel konjugált antitest



4. Szubsztrátot (□) hozzáadva színreakció

15. Kompetetív ELISA

 kimutatandó Ag



16. WESTERN-BLOT



A Western-blot, vagy másnéven immunoblot, specifikus fehérje antigének kimutatására használható molekuláris biológiai technika, amely során az adott fehérje specifikus ellenanyag segítségével azonosítható.

AZ ÉLETTUDOMÁNYI- KLINIKAI FELSŐOKTATÁS GYAKORLATORIENTÁLT ÉS
HALLGATÓBARÁT KORSZERŰSÍTÉSE A VIDÉKI KÉPZŐHELYEK NEMZETKÖZI
VERSENYKÉPESSÉGÉNEK ERŐSÍTÉSÉRE
TÁMOP-4.1.1.C-13/1/KONV-2014-0001

Nemzeti Fejlesztési Ügynökség
www.ujsechenyiterv.gov.hu
06 40 638 638



A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.

16. WESTERN-BLOT

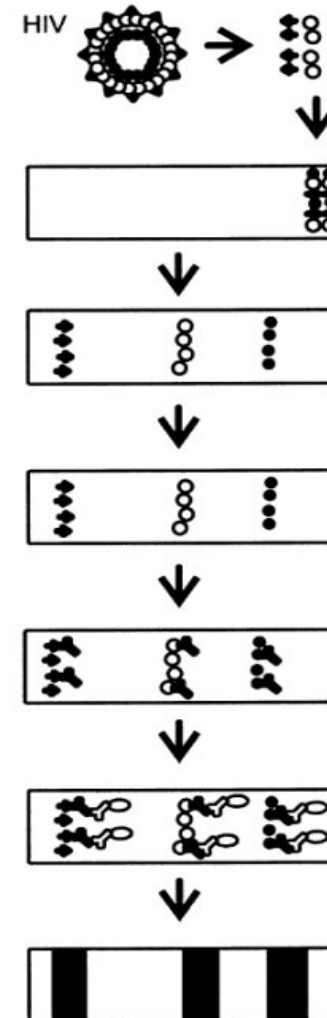
Virális antigének elválasztása ELFO-val

Antigének blottolása nitrocellulóz membránra

beteg szérumával inkubáljuk (at leköt ha jelen van)

Jelölt antitest hozzáadása

Szubsztrát hozzáadása, színváltozás

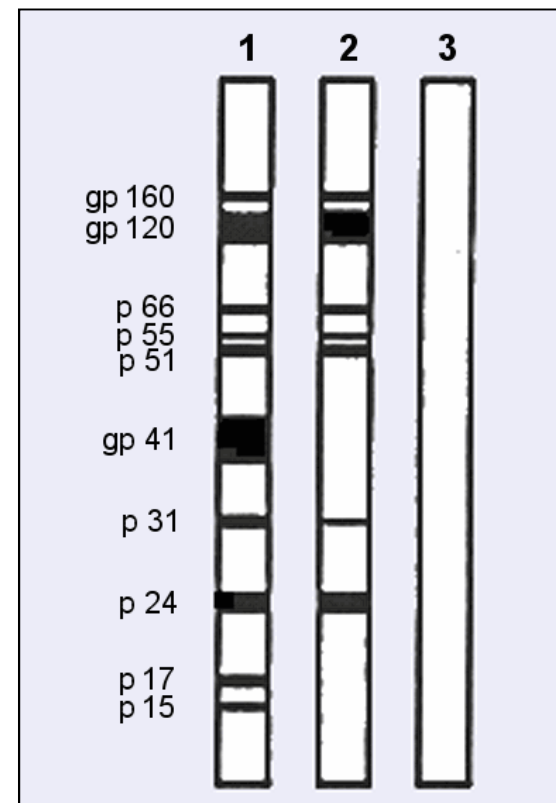


16. WESTERN-BLOT

Korábban a HIV megerősítő vizsgálatára használták

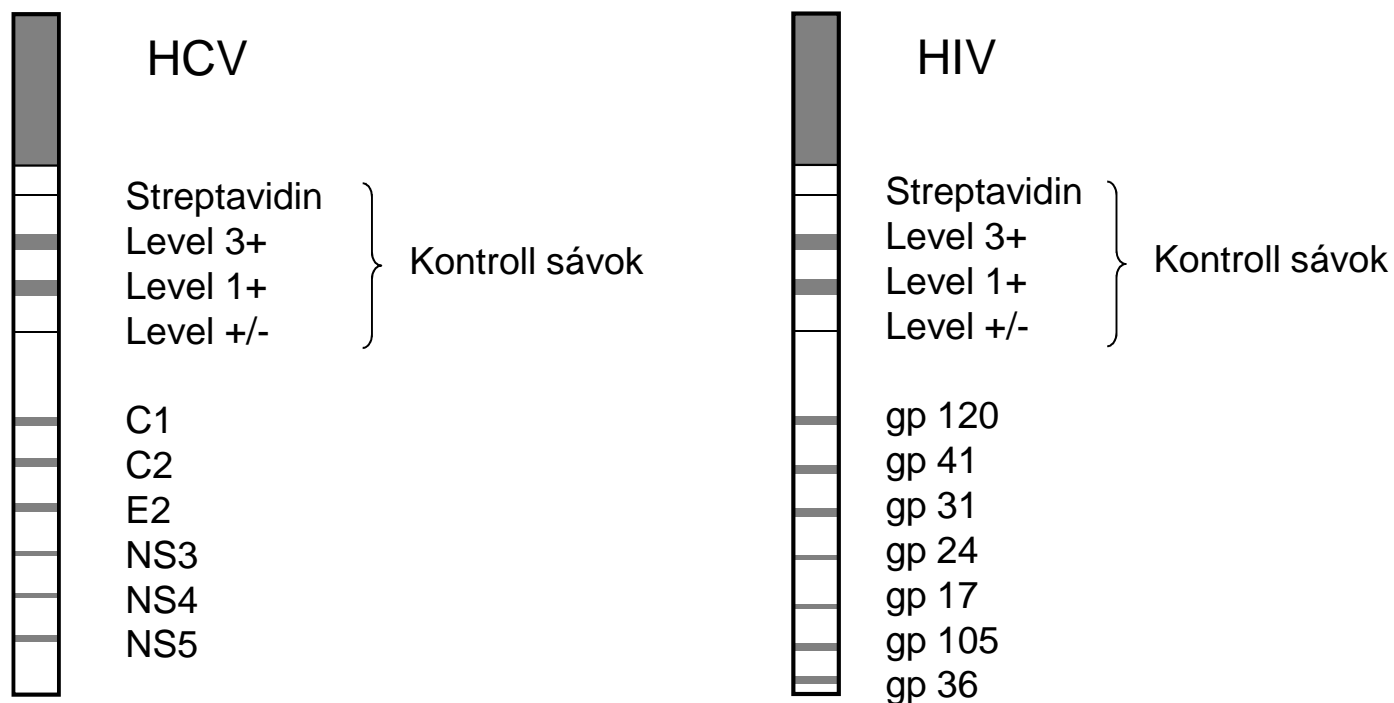
Kiértékelés:

HIV fertőzés esetén 2 v. 3 virális antigén elleni
antitest detektálása



17. LINE IMMUNOASSAY (LIA)

A LIA tesztcsíkjain az antigének párhuzamos sávok formájában úgynevezett „szendvicstechikával” már előre rögzítve vannak a membrán felületén, ami így nemcsak több antigénre specifikus ellenanyag egyidejű kimutatását teszi lehetővé, de lecsökkenti a kísérlet elvégzéséhez szükséges időt is.



18. IMMUNKROMATOGRÁFIA

Az immunkromatográfiás gyorseszteket a gyakorlatban gyakran alkalmazzák kórokozó mikroorganizmusok gyors és megbízható kimutatására.

A teszt a kimutatandó mikrobára specifikus, jelzett antitestet tartalmaz. Az antigén-antitest komplex a kromatográfiás közegben a tesztzónáig vándorol, ami újabb specifikus antitestet tartalmaz. Ez megköti a jelenlévő komplexet, így szabad szemmel látható színes csík jelenik meg (**pozitív** reakció).

Az antigént nem kötő, szabad antitestek tovább vándorolnak, és a kontroll zónában lévő antitest-specifikus antitesthez kötődnek, ahol szintén egy színes sáv lesz látható (**negatív** reakció esetén csak ez lesz látható).

