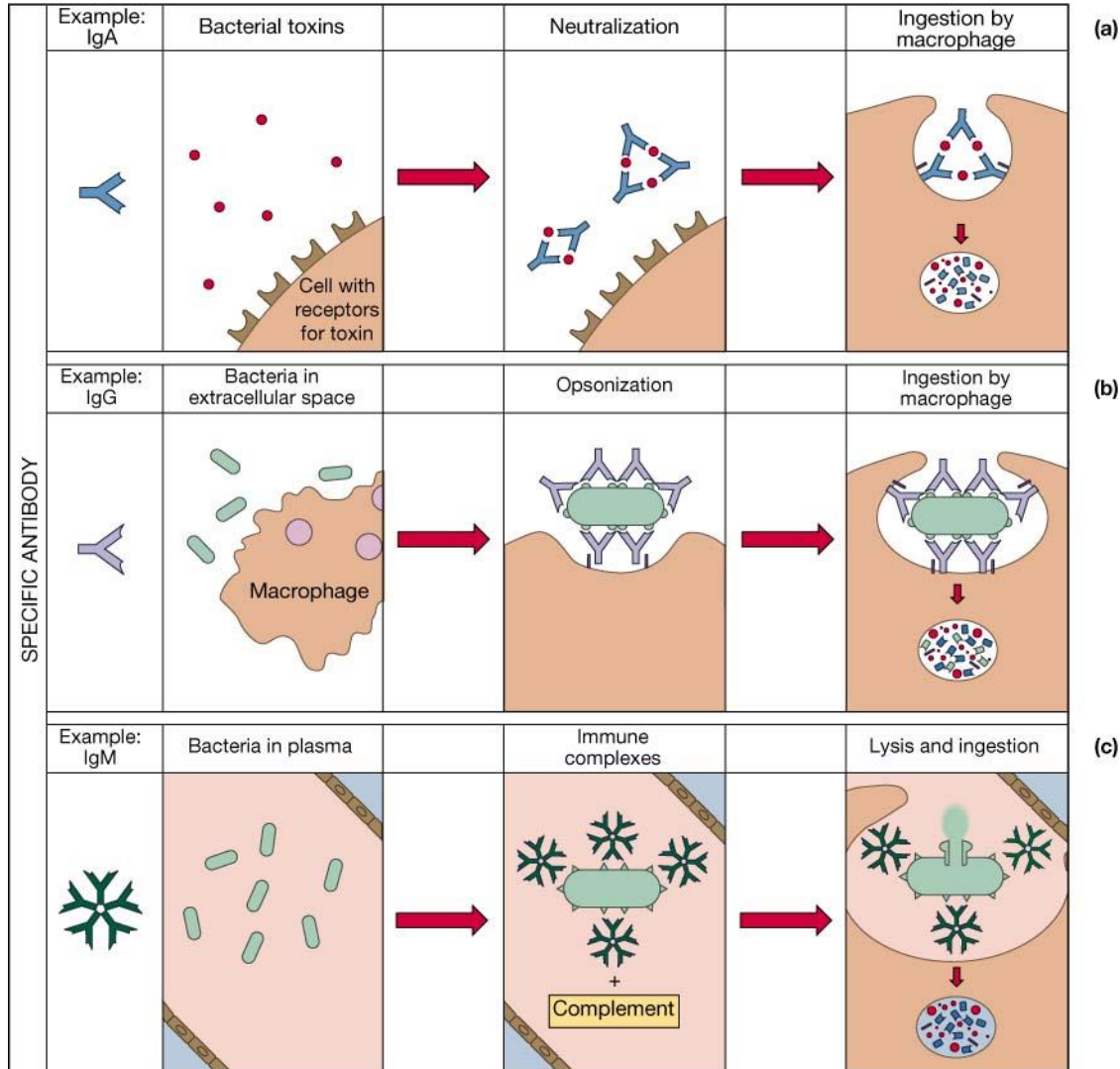


Infekciószerológia

Antigén	+	antitest	kapcsolódása <i>in vivo</i>	→	Immunválasz
↓		↓			- humorális
baktérium		Immunglobulinok			- celluláris
(sejtfal, csilló, tok, fimbria)		IgA: secretoros			
vírus, gomba, protozoon stb.		IgG: felismerés, opszonizálás, (placentán átmegy)			
		IgE: allergia, féregellenes immunitás			
		IgM: elsődleges immunválasz			

Antitestek funkciója

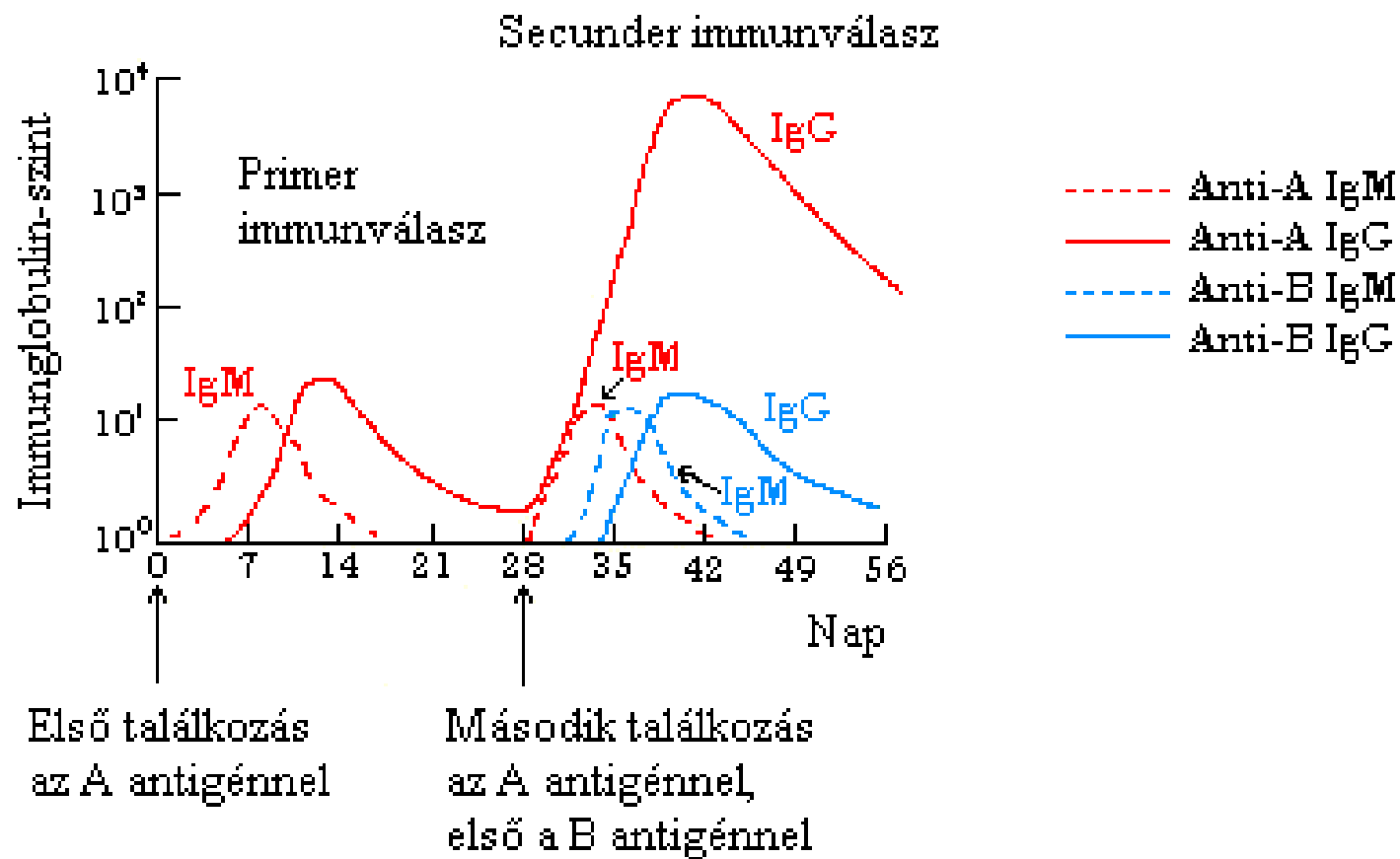


Elsődleges immunválasz:

- az antigénnel való első találkozáskor alakul ki
- latenciaidő után
- először az **IgM** szintje emelkedik
- antigén-specifikus memóriasejtek alakulnak ki

Szekunder immunválasz:

- antigénnel való ismételt találkozáskor
- a válasz gyorsabb és hosszabb ideig marad fenn
- az Ig-ok szintje magasabb, fő típusa az IgG

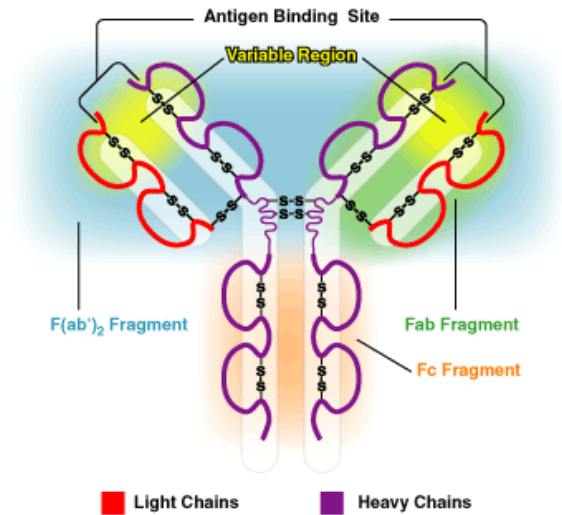


IMMUNSZEROLÓGIAI MÓDSZEREK

Szerológiai reakció = antigén + antitest kapcsolódás *in vitro*

Az **antigén (Ag)** - **antitest (Ab)** kapcsolódás specifikus $\Rightarrow$

- ismeretlen antigéneket azonosíthatunk ismert specifikus ellenanyagok segítségével (pl. fertőzések diagnózisa)
- ismeretlen ellenanyagok jelenlétét mutathatjuk ki ismert specifikus antigénekkal (pl. fogékonyság, védőoltás hatékonysága, szerokonverzió)
- a szerológiai reakciók Ag és Ab qualitativ és quantitativ kimutatására is alkalmasak

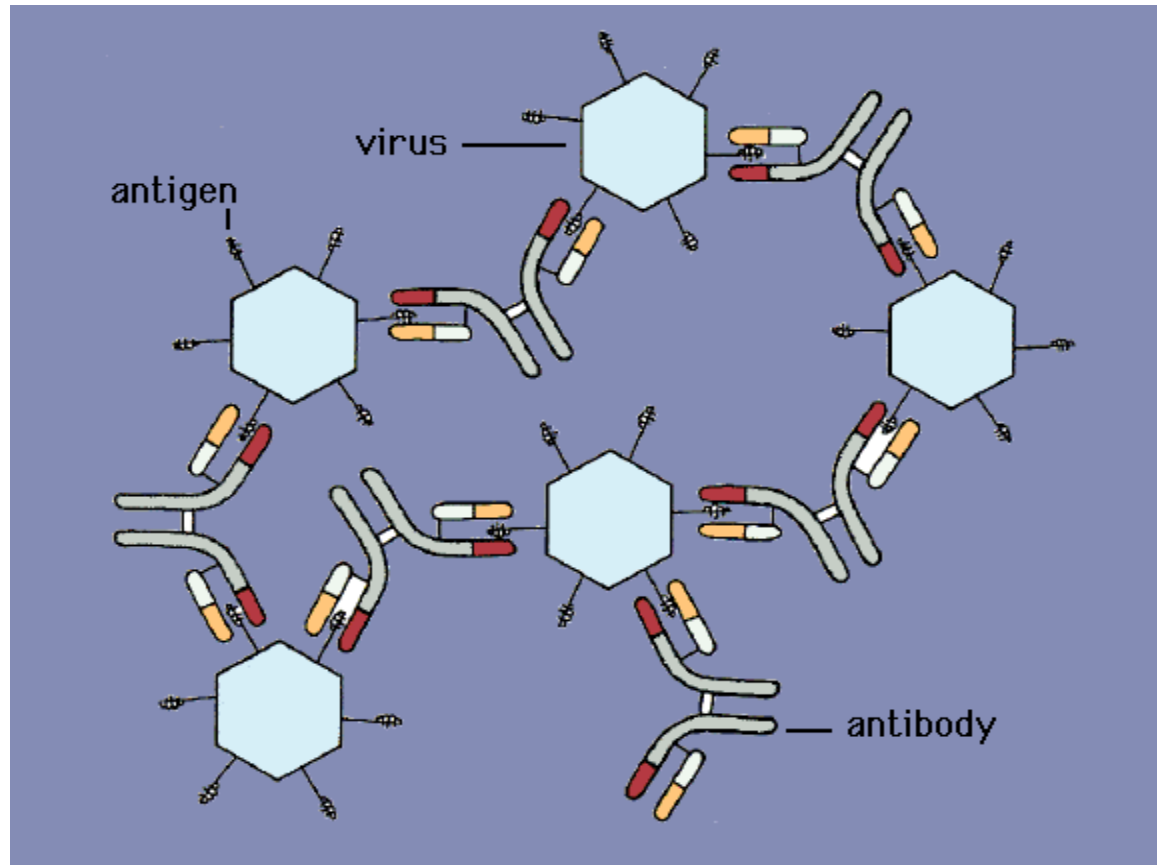


I. Ag-Ab kapcsolódás látható végeredménnyel

1. Agglutináció:

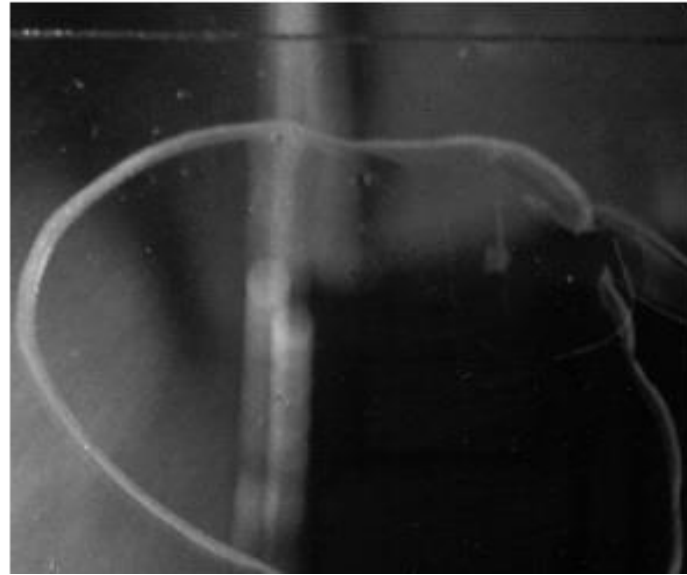
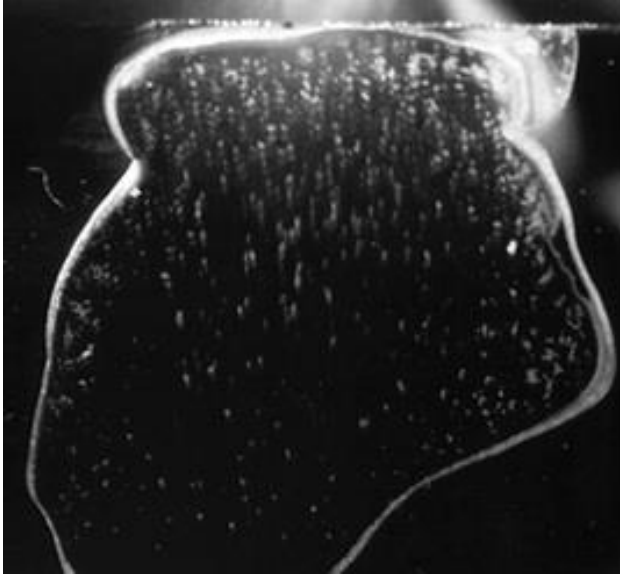
= sejtes állapotú antigén és specifikus ellenanyag kapcsolódása $\Rightarrow$ a sejtek összezsapzódása, agglutinációja

* qualitatív: Tárgylemez-agglutináció
pl. E.coli szerotipizálás

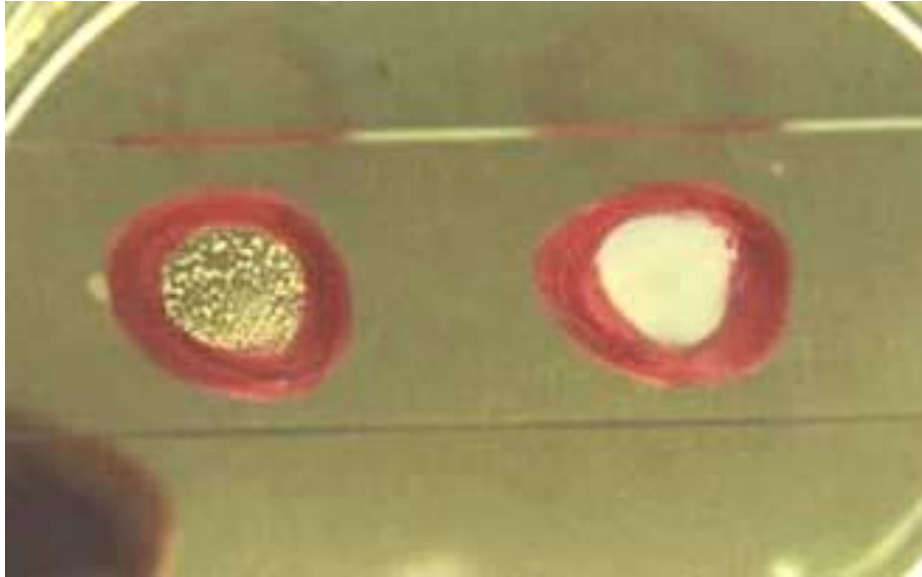


qualitatív: tárgylemez agglutináció

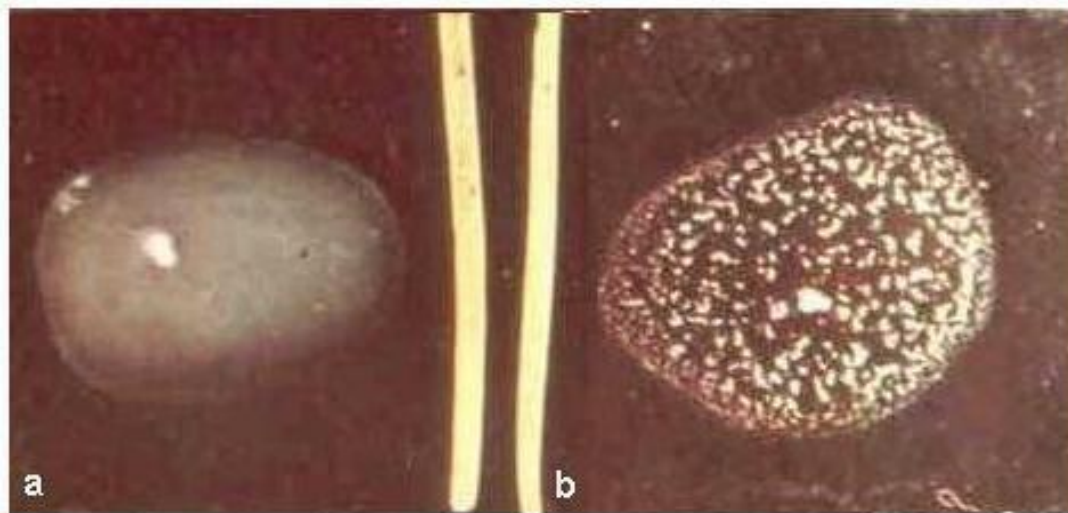
⇒ **baktérium (Ag) + teszt szérum (Ab)** tárgylemezen (pl.: *E. coli* szerotipizálása)



pozitív



negatív

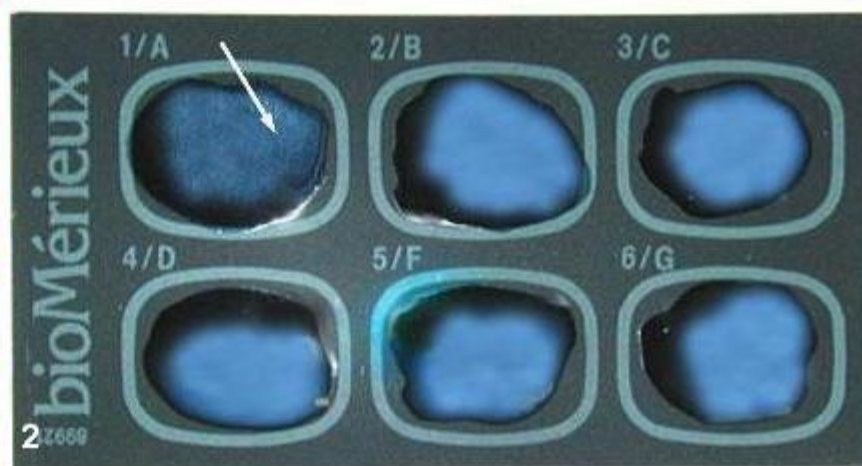
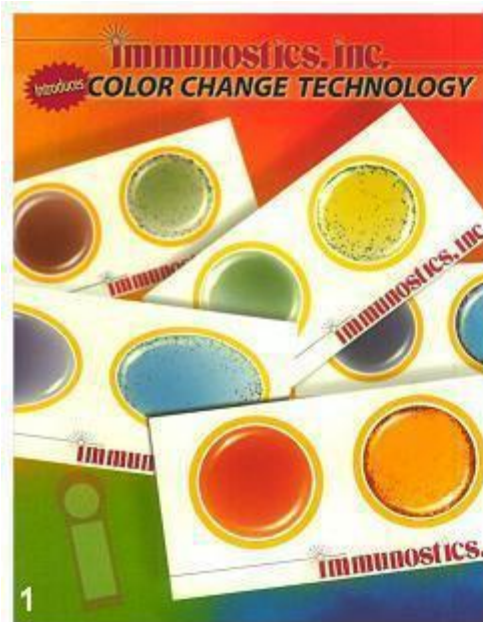


Tárgylemez agglutináció (szerotipizálás (a: negatív, b:pozitív, rögs kicsapódás)



Latex agglutináció (koagglutináció) 2.és 4. pozitív, 1. és 5. negatív

1. és 5. negatív



Tárgylemez agglutináció (1. színes csapadékot adó diagnosztikus kit-ek, 2. szerotipizálás, *S. pyogenes*)



* quantitatív: Cső-agglutináció, Widal típusú reakció

szérum (Ab) hígítási sora + ismert, adott mennyiségű Ag $\Rightarrow$
a beteg savója milyen mennyiségben tartalmaz ellenanyagokat bizonyos
baktériumokkal szemben

Titer: a legmagasabb hígítás (legkisebb koncentráció), ahol még
bekövetkezik az agglutináció

**$\rightarrow$ savópár jelentősége: 2-4 hét különbséggel levett savók közül
a 2.-ban 4x magasabb az Ab szintje $\Rightarrow$ a fertőzés bizonyított
(szerokonverzió)**

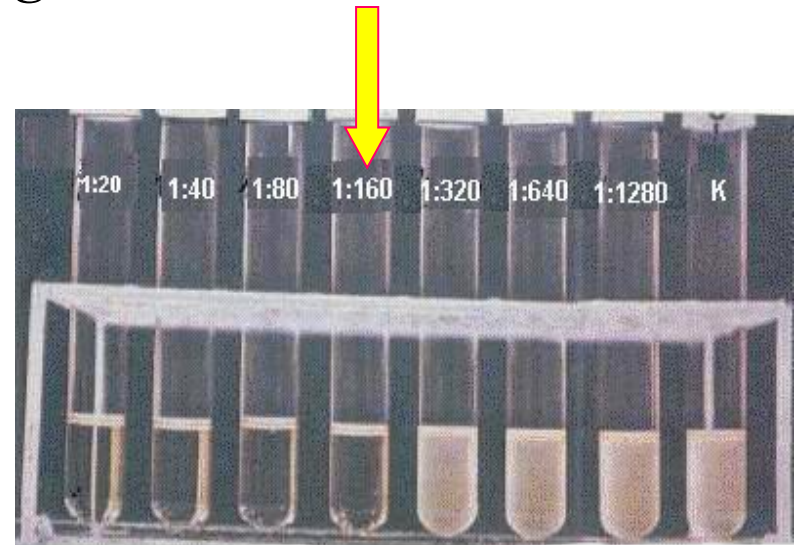
Gruber-Widal: *Salmonella typhi* kimutatása

Weil-Felix reakció: *Rickettsia*

Wright-reakció: *Brucella*

Widal-típusú reakciók (Csőagglutinációs vizsgálatok)

- **Gruber-Widal:** hastífusz diagnosztizálása
 - Ag: *Salmonella typhi*, paratyphi A,B,C; **O, H** antigén
 - At: beteg széruma
 - Titer: 1:200
- **Weil-Felix:** *Rickettsiás betegségek diagnosztizálására*
 - Ag: *Proteus* OX19, OX2, OXK
 - At: beteg széruma
 - Titer: 1:800
- **Wright:** *Brucella / Francisella*
 - Ag: *Brucella*
 - At: beteg széruma
 - Titer: 1:80

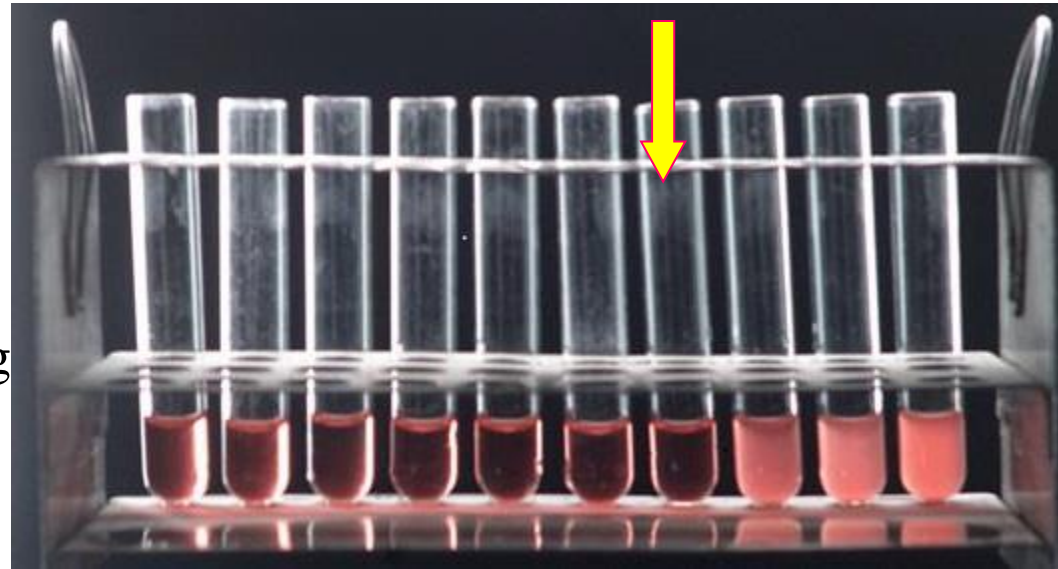


Paul-Bunnel: EBV fertőzés

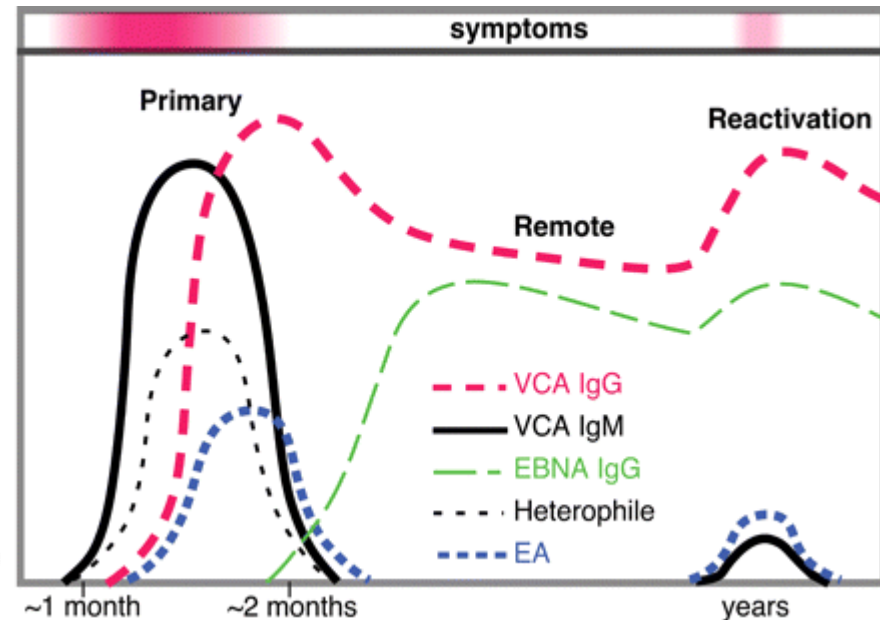
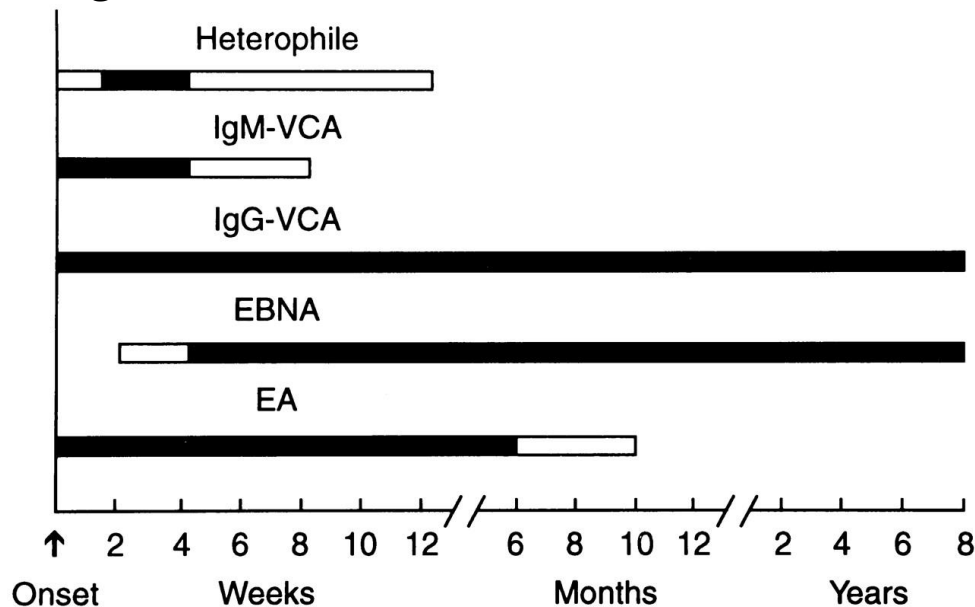
Ag: birka vvt

At: beteg széruma:heterofil At

Titer:a szérum legnagyobb hígítása
ahol még agglutináció figyelhető meg



Ma **ELISA** (és PCR, WB) alapú
diagnosztika



2. Precipitáció:

= oldott állapotú antigén és specifikus ellenanyag kapcsolódása $\Rightarrow$
csapadék, precipitátum képződik

a, Precipitáció folyékony közegben

- qualitativ: Korong (gyűrűs) precipitáció

az Ag és az Ab egymás felé diffundál, ahol egyenlő mennyiségben vannak, ott létrejön a precipitáció

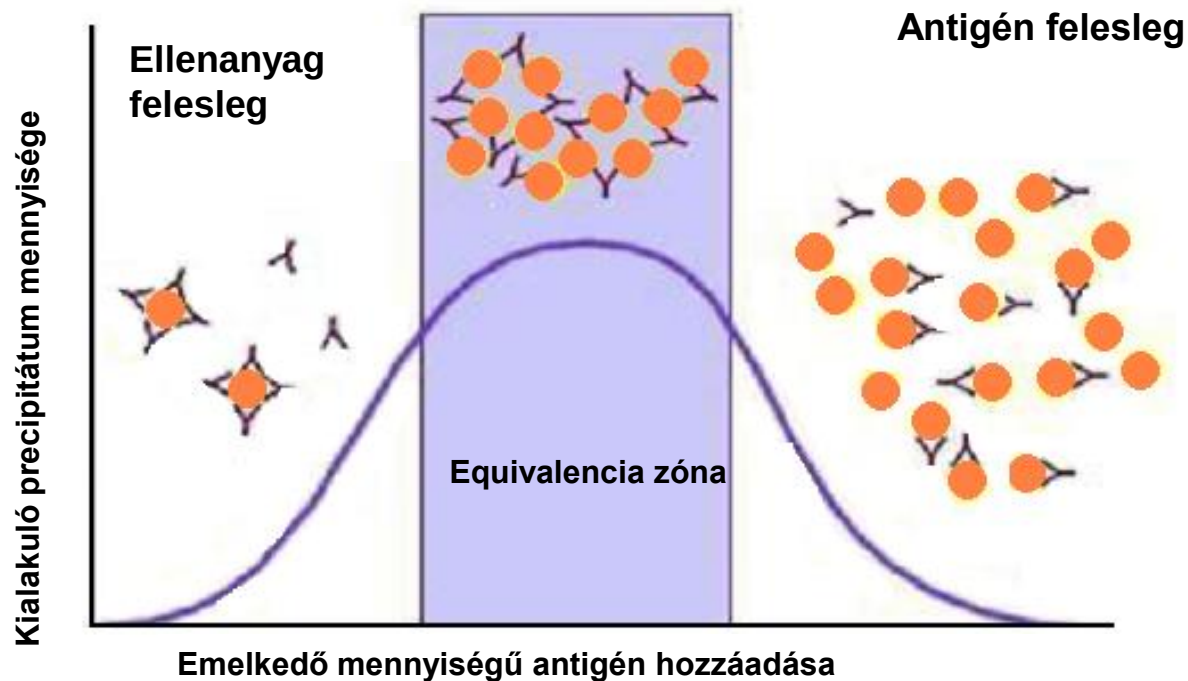
néhány csepp Ag



Immunsavó



Precipitációs
gyűrű



A szolubilis antigén a specifikus ellenanyaggal az equivalencia zónában (az antigén és az ellenanyag mennyisége megfelel egymásnak) precipitátumot képez.

A precipitátum sem antigén, sem ellenanyag feleslegben nem alakul ki (feloldódik).

b, Precipitáció agar-gélben

. Immundiffúzió

- * Elek-próba → diphtheria toxin kimutatására
- antitoxinnal (Ab) átitatott szűrőpapírcsíkra agart (ló szérum tartalmú) öntenek
- rá merőlegesen szélesztik a baktériumot, inkubálják
- ha termel toxint (Ag), az az agarba diffundál ⇒ precipitációs vonal

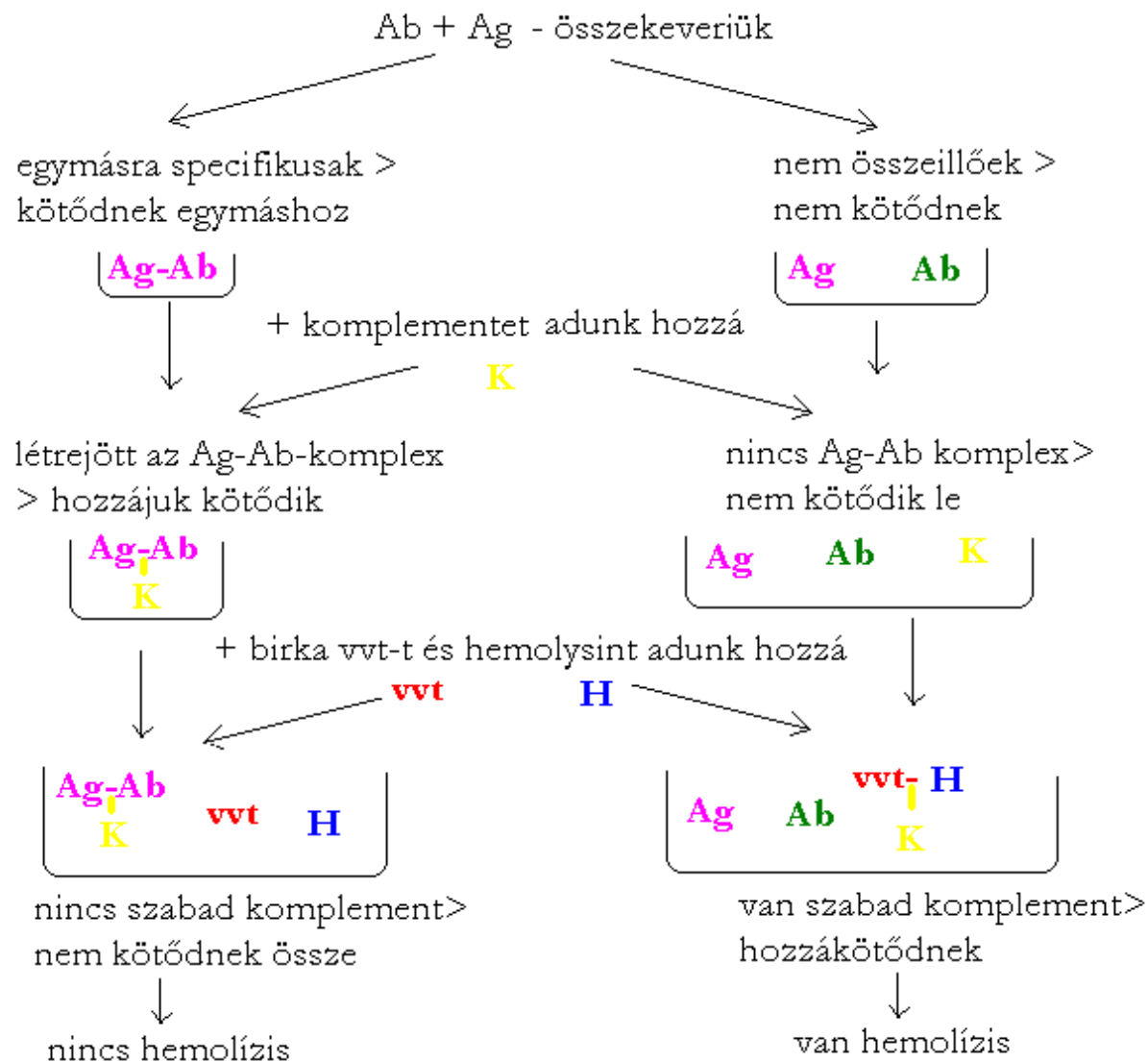


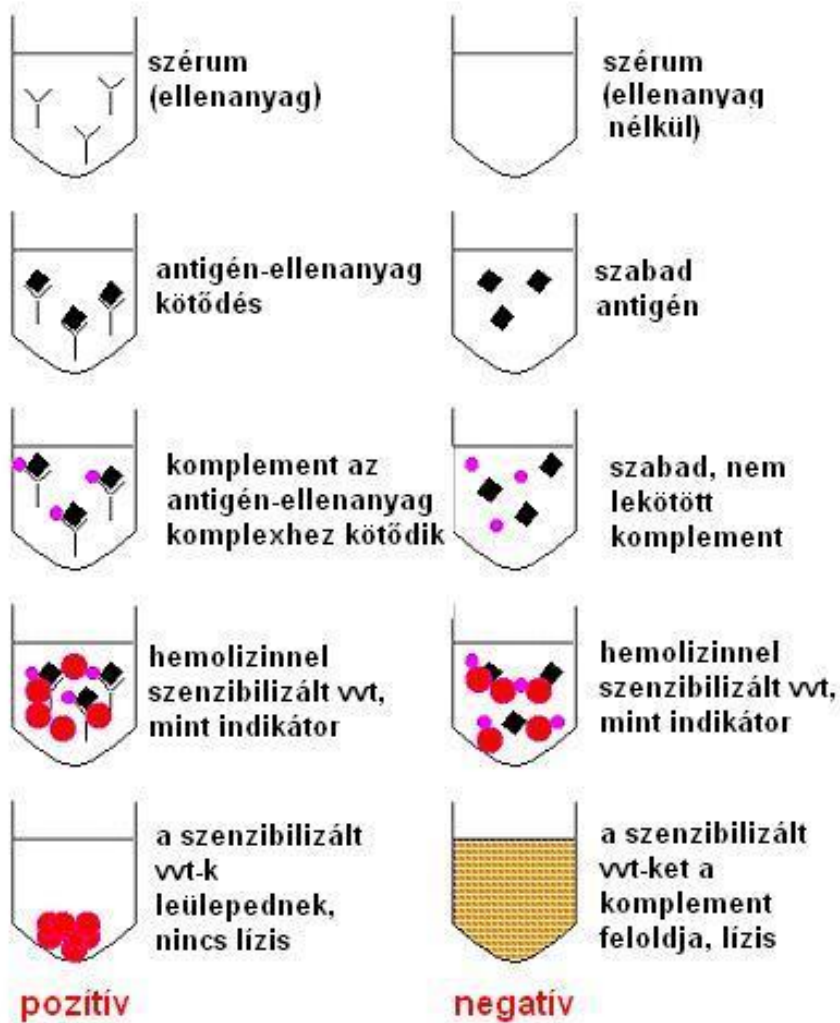
II. Ag-Ab kapcsolódás indirekt kimutatása

1. Komplementkötési reakció

A reakció elemei:

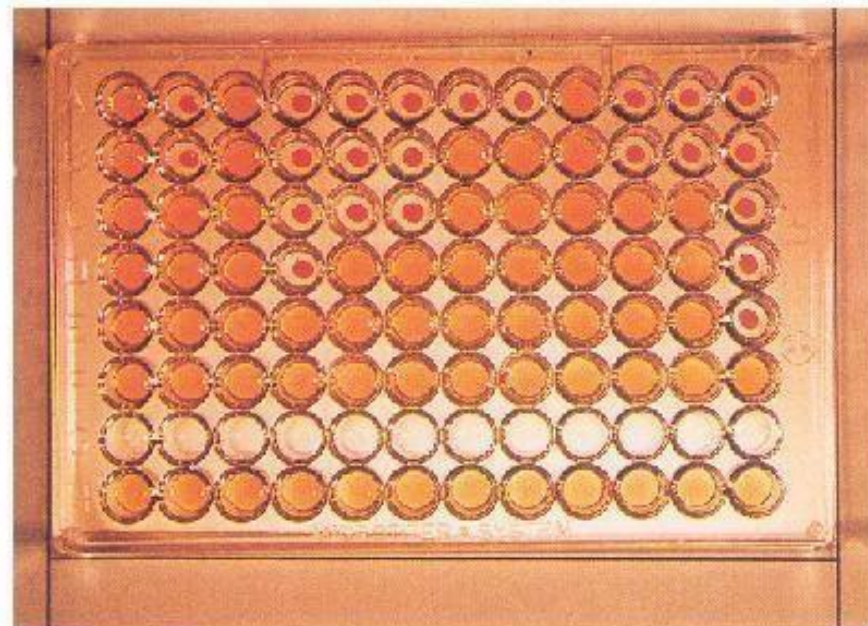
- Antigen: vizsgálni kívánt baktérium/vírus/gomba stb.
- Antitest: vizsgálandó egyén savója (saját komplementjét melegítéssel inaktiváltuk)
- Komplement: tengerimalac savója, hígítása titrálással beállítva
- Birka vvt: szuszpenzió, defibrinált
- Hemolysin: birka vvt-vel immunizált nyúl savója





Vizsgálati rendszer

Indikátor rendszer



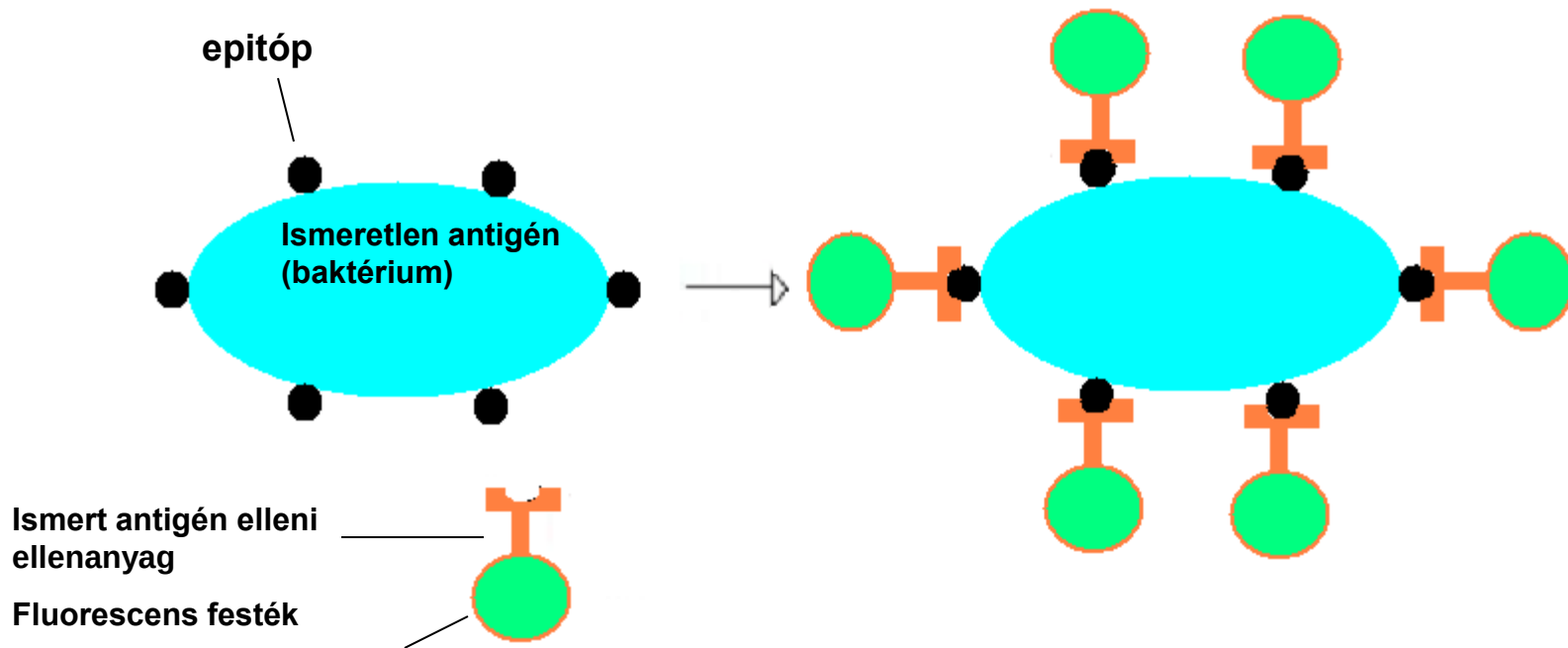
Pozitív esetben a vvt-k a vájulat aljára ülepednek, a negatív eredményt a vvt-k feloldódása jelzi

Komplementkötési reakció

2. Jelölt antigénen/antitesten alapuló módszerek

a, Immunfluoreszcens módszer

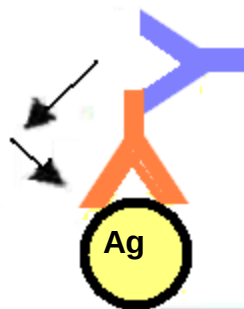
Fluoreszkáló festékekkel (fluoreszcein-izotiocianát) jelzett immunglobulin a homológ antigénnel való kapcsolódás után ultraibolya fényben lumineszkáló komplexet képez
→ antigének kimutatása pl. baktériumok felszínén vagy szövettani metszetek sejtjeiben



Direkt immunfluoreszcencia (antigén kimutatása fluoreszkáló festékkel jelzett specifikus ellenanyaggal)

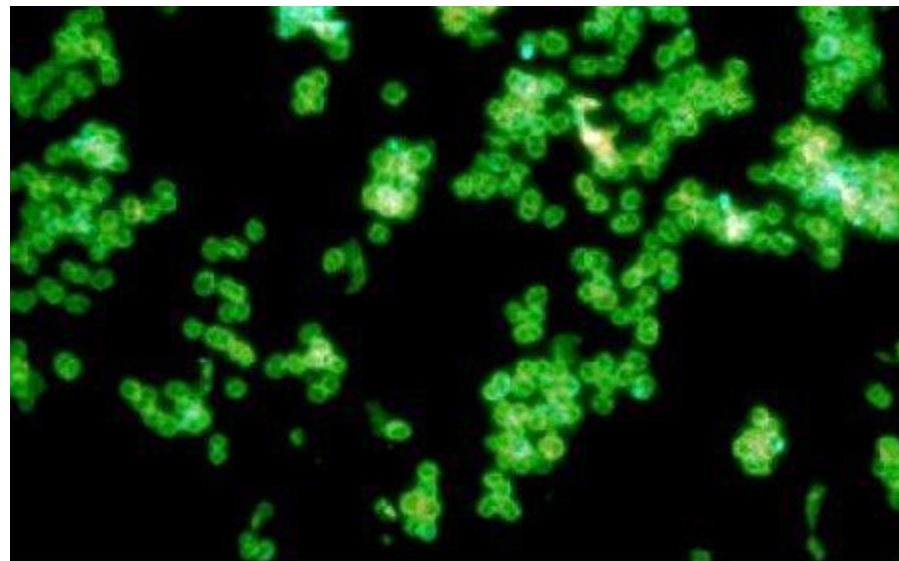
Jelöletlen
ellenanyag

Fluorescens festékekkel
jelölt antihumán
immunglobulin

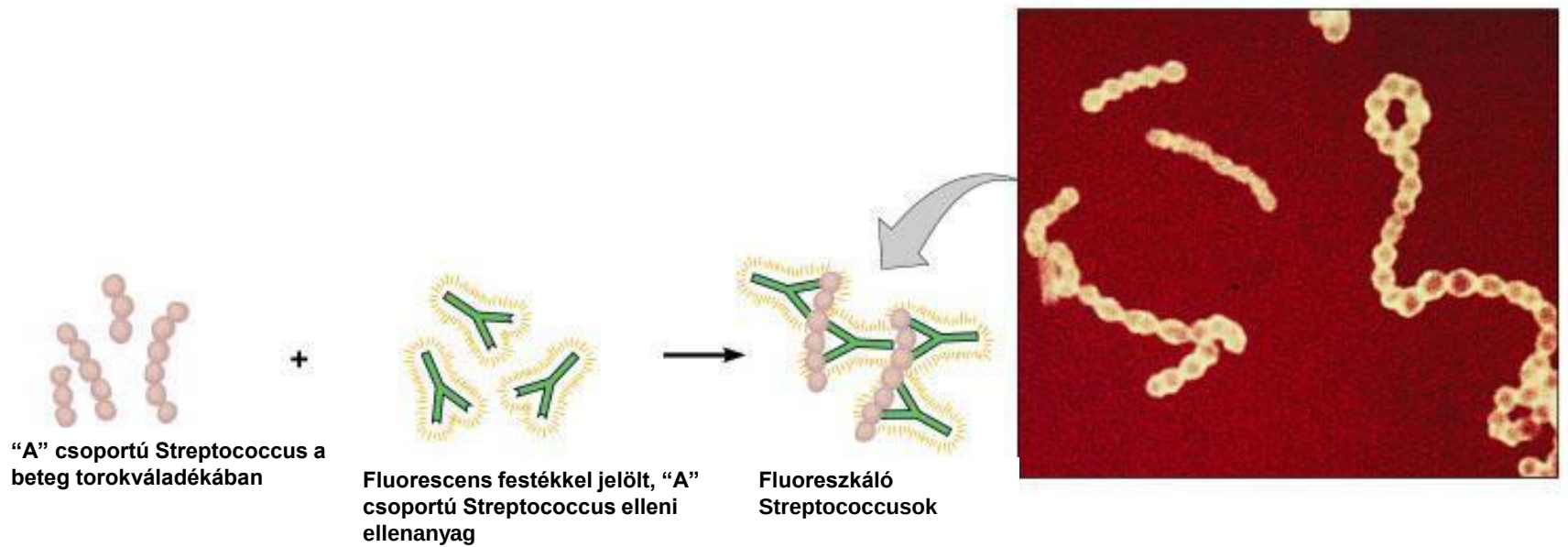


Szilárd fázis

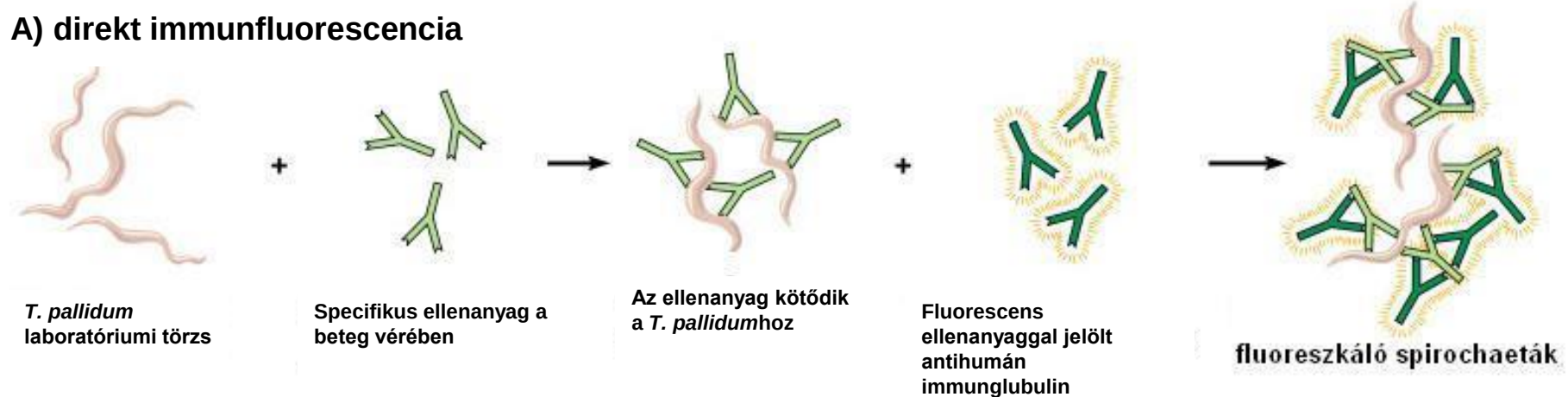
Indirekt immunfluoreszcencia ellenanyag
meghatározására



Immunfluoreszcencia



A) direkt immunfluoreszcencia



B) indirekt immunfluoreszcencia

b, Radioimmunoassay (RIA)

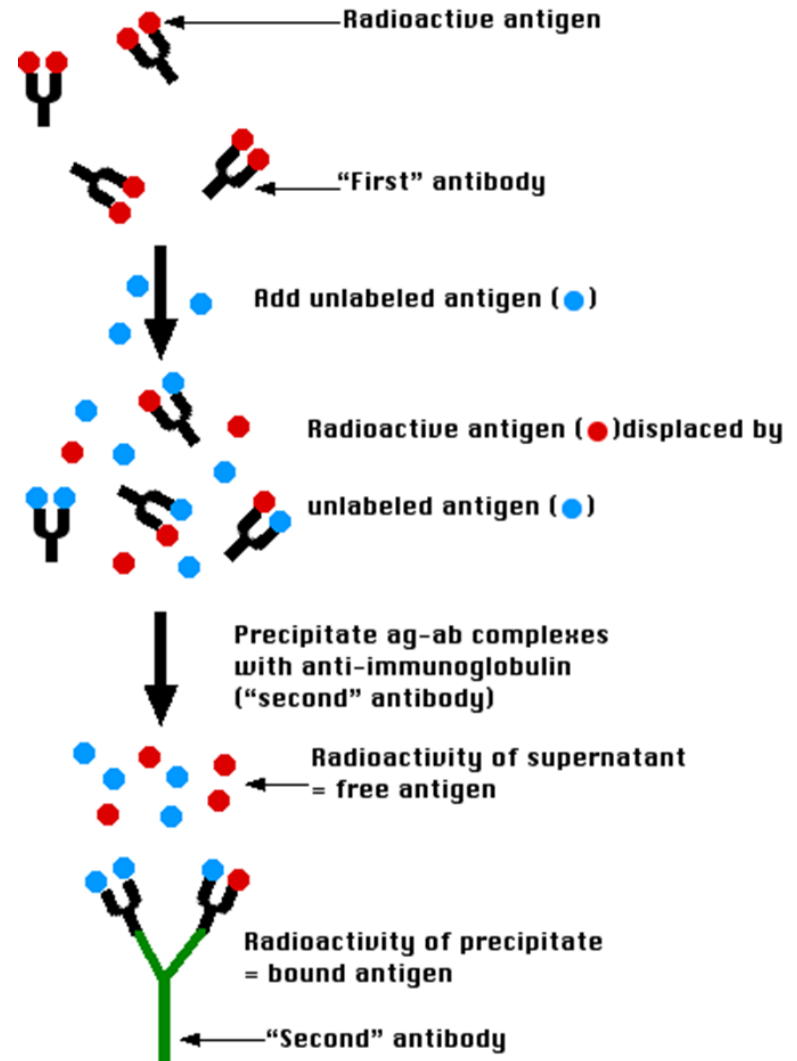
- antitestkimutatás: szilárd fázis immunoassay
izotóppal jelölt antigén + vizsgálandó savó

→
a savó antitesttartalma az általa kicsapott radioaktív Ag mennyisége alapján meghatározható

- antigénkimutatás: kompetitív RIA
a beteg szérumában található jelöletlen Ag verseng a hozzáadott, ugyanolyan típusú, de jelölt Ag-nel az adott mennyiségű specifikus antitestért ⇒ a jelölt Ag kötött mennyisége fordítottan arányos a mérendő jelöletlen anyag koncentrációjával

RIA előnye: nagyon specifikus és érzékeny

hátránya: sugárveszély, a jelölt reagensek labilisak

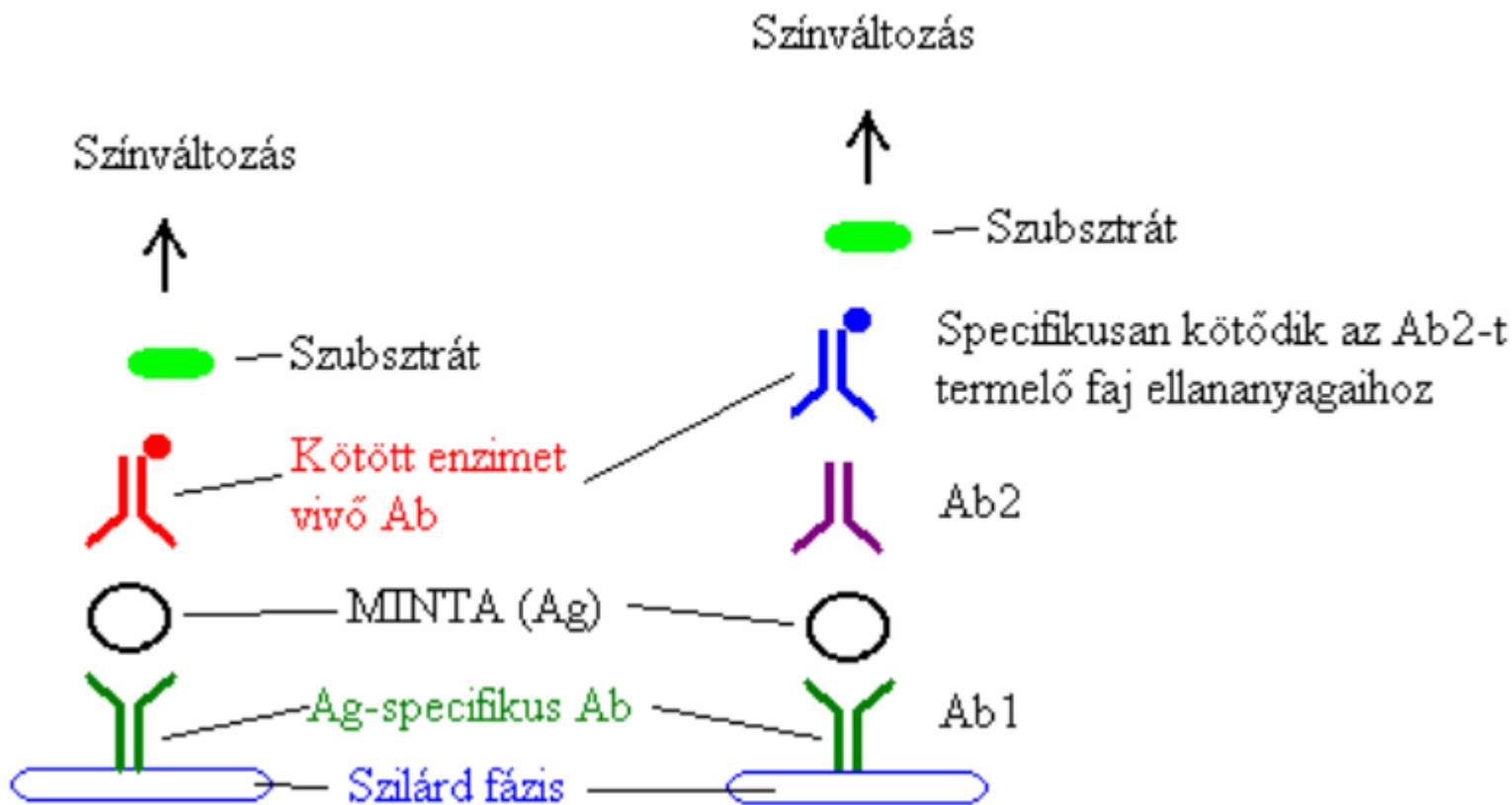


c, ELISA

az antitestek vagy antigének jelölése enzimmal történik, kimutatás alapja az enzim-szubsztrát reakció lezajlásakor kialakuló színváltozás

Direkt ELISA

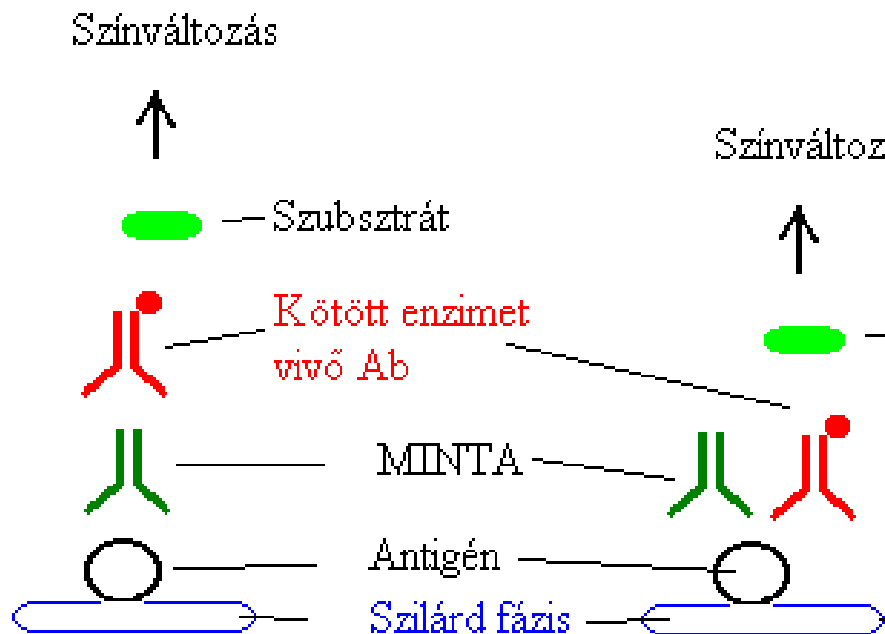
Indirekt ELISA



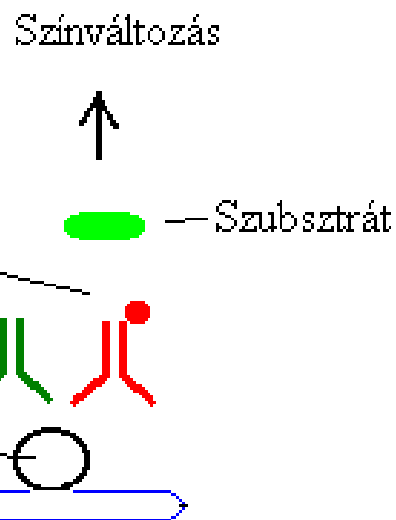


Kompetitív ELISA módszer

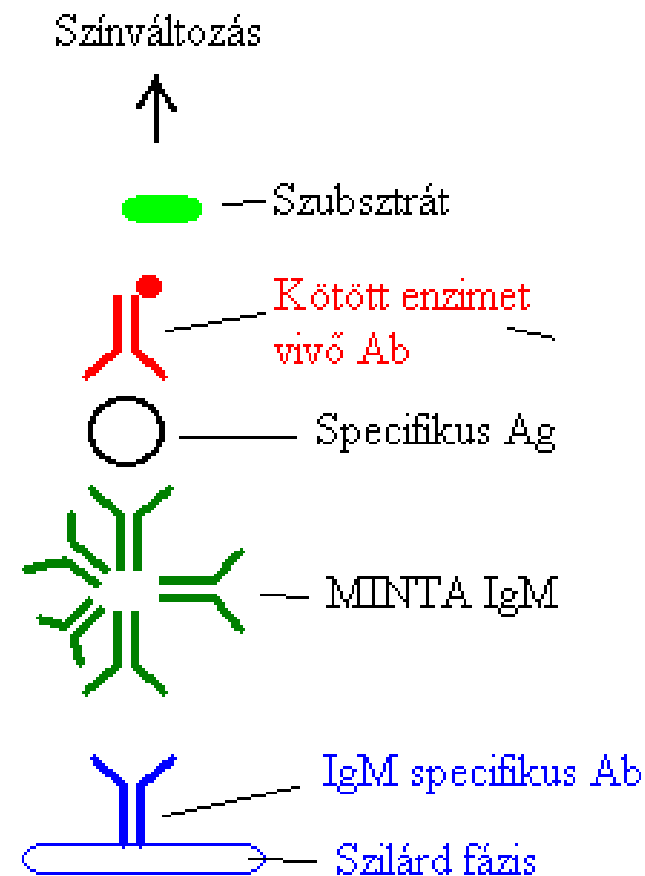
Nem-kompetitív



Kompetitív



Capture

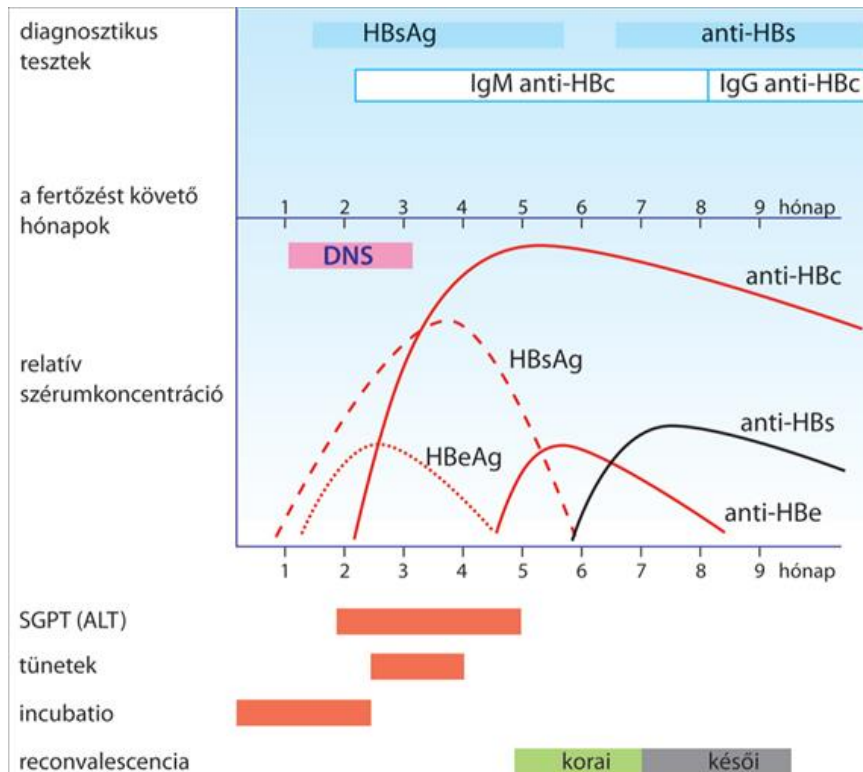




ELISA módszer (a sárga szín megjelenése jelenti a pozitív reakciót)

HBV Serological Tests

Hepatitis B Surface Antigen (<u>HBsAg</u>):	Marker of current infection
Hepatitis B e Antigen (<u>HBeAg</u>):	Marker of active infection
Hepatitis B Surface Antibody (<u>HBsAb</u>):	Marker of recovery of immunity
Hepatitis B e Antibody (<u>HBeAb</u>):	Marker of inactive virus
Hepatitis B Core Antibody (<u>HBcAb</u>):	Marker of present or past infection
Hepatitis B virus DNA (HBVDNA):	Measures virus activity



HBsAg anti-HBc anti-HBs	negative negative negative	Susceptible
HBsAg anti-HBc anti-HBs	negative positive positive	Immune due to natural infection
HBsAg anti-HBc anti-HBs	negative negative positive	Immune due to hepatitis B vaccination
HBsAg anti-HBc IgM anti-HBc anti-HBs	positive positive positive negative	Acutely infected
HBsAg anti-HBc IgM anti-HBc anti-HBs	positive positive negative negative	Chronically infected
HBsAg anti-HBc anti-HBs	negative positive negative	Interpretation unclear; four possibilities: 1. Resolved infection (most common) 2. False-positive anti-HBc, thus susceptible 3. "Low level" chronic infection 4. Resolving acute infection

d, Western blot → antitestkimutatás

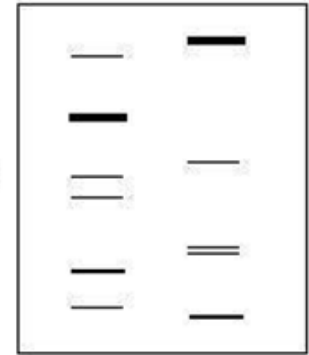
- az antigéneket elektroforézissel szeparálják a molekulanagyságuk és töltésük szerint
- nitrocellulóz papírra blottolják
- hozzáadják a beteg szérumát → a benne lévő antitestek kötődnek a megfelelő antitestekhez
- a kötődést enzimmel jelölt antihumán immunglobulinok és szubsztrátjuk hozzáadásával mutatják ki → színreakció

használata: ELISA eredmények verifikálása

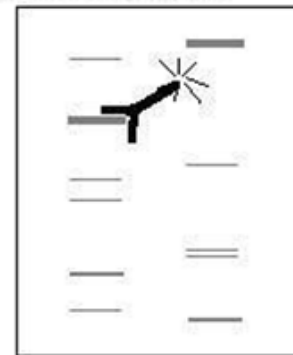
fehérje átvitele a
nitrocellulóz filterre
("blot")



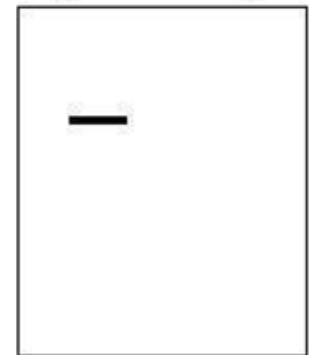
SDS poliakrilamid
gélelektroforézis



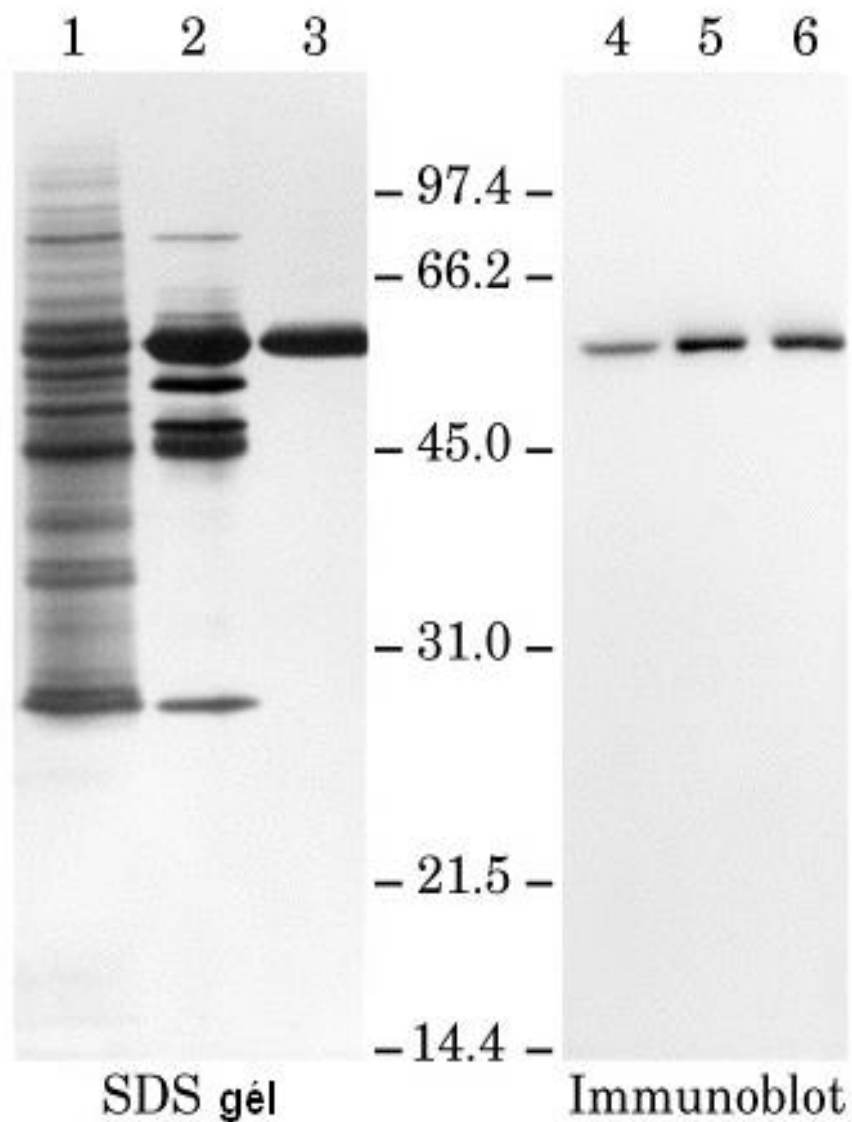
jelölés specifikus
ellenanyaggal



ellenanyag kötődése a
megfelelő fehérjéhez



Western blot eljárás lépései



Immunoblot módszer

Különböző antigének szétválasztva



Neg.
kontroll



Poz.
kontroll



Beteg savója

Szifilisz szerológiai diagnosztikája

Aspecifikus reakció

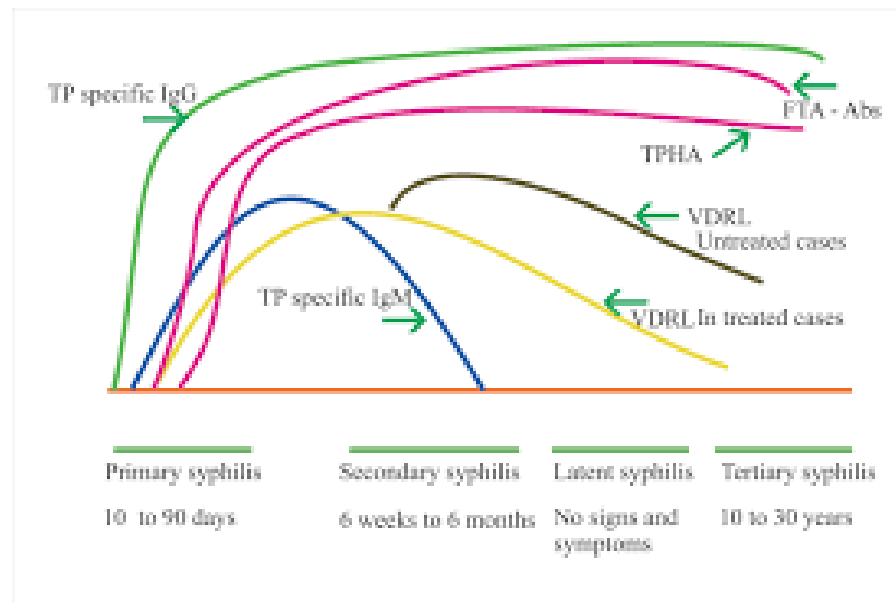
(= Reagin típusú antitestek kimutatása;
Nem-treponemális antigének alkalmazása)

KKR, Wassermann

VDRL

RPR

Reakcióban: Cardiolipin, lecitin, cholesterol



Specifikus reakció

(= Immobilizin típusú antitestek kimutatása;
Treponema pallidum fehérjék alkalmazása)

TPIT

FTA-Abs

TPHA, TPPA

TP-ELISA

WB, immunoblot

Serological tests for syphilis by stage of infection

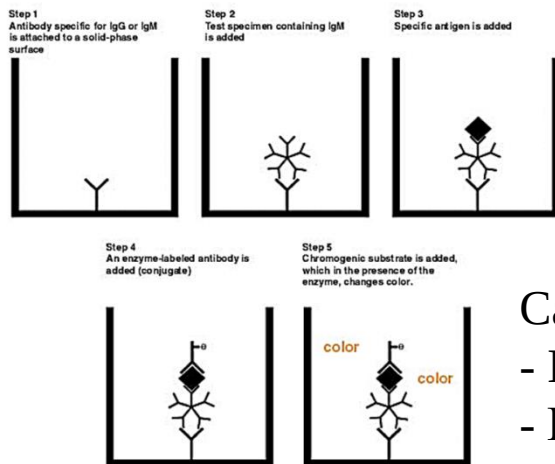
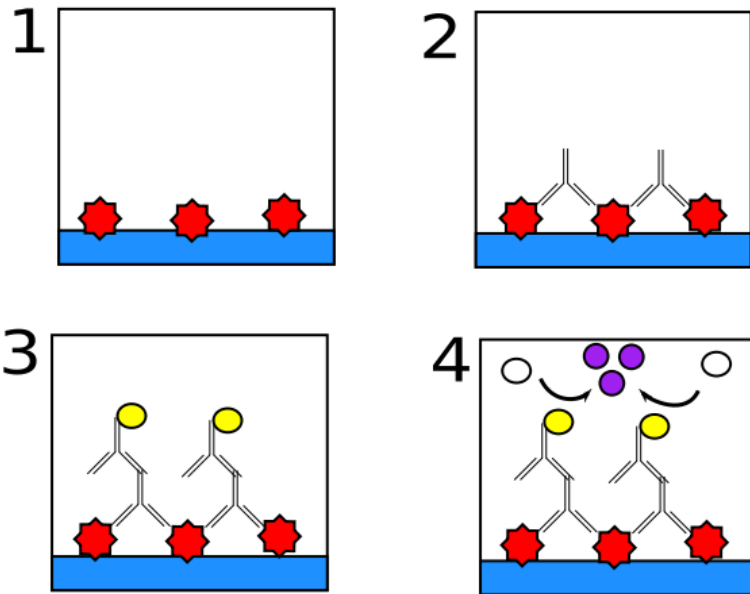
Table 10.1: Performance characteristics of selected serological tests for syphilis by stage of disease

Test	Sensitivity (%)				Specificity (%)
	Stage of syphilis infection				
	Primary	Secondary	Latent	Tertiary	
FTA-Abs	98 (93–100)	100	100	96	99
TPHA/PA	82 (69–90)	100	100	94	99
RPR	86 (81–100)	100	80 (53–100)	73 (36–96)	98
VDRL	80 (74–87)	100	80 (71–100)	71 (37–94)	98

FTA-Abs, fluorescent treponemal antibody absorption; RPR, rapid plasma reagin; TPHA, *T. pallidum* haemagglutination assay; TPPA, *T. pallidum* passive particle agglutination assay; VDRL, Venereal Disease Research Laboratory.

ELISA

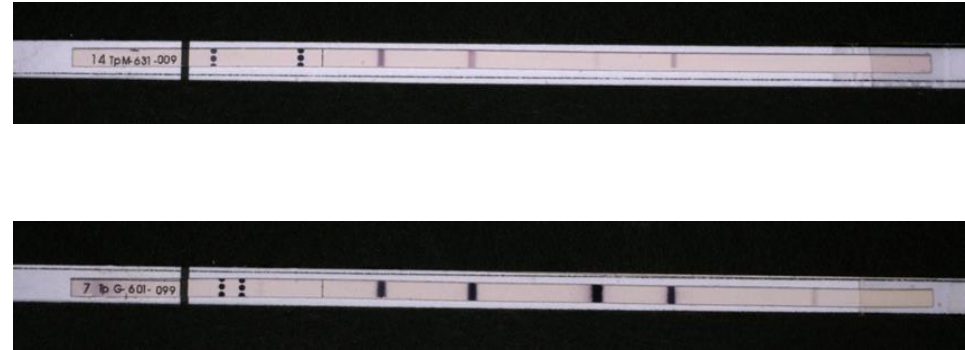
Rekombináns Ag-ek *Tp15*, *Tp17*, *Tp47*



Capture ELISA

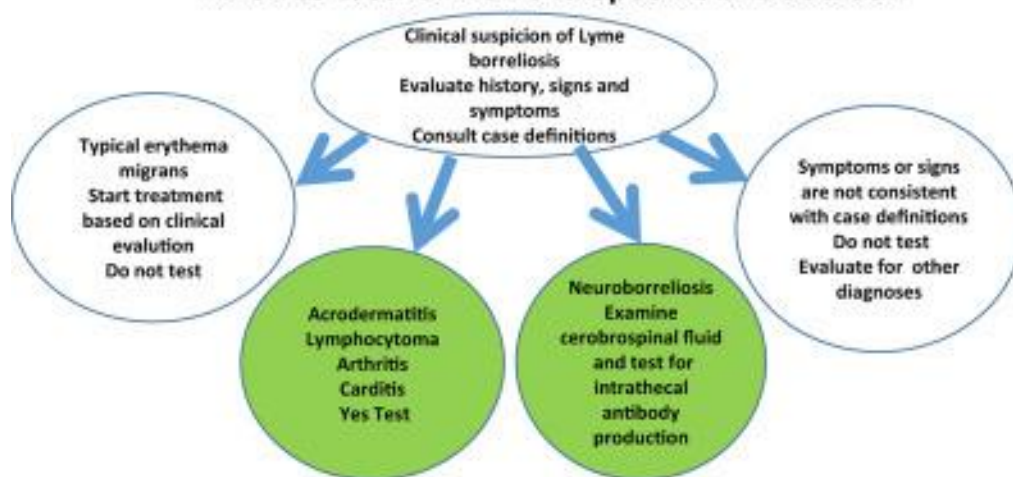
- IgM vagy IgG
- Rekombináns Ag-ek

Western blot vizsgálat



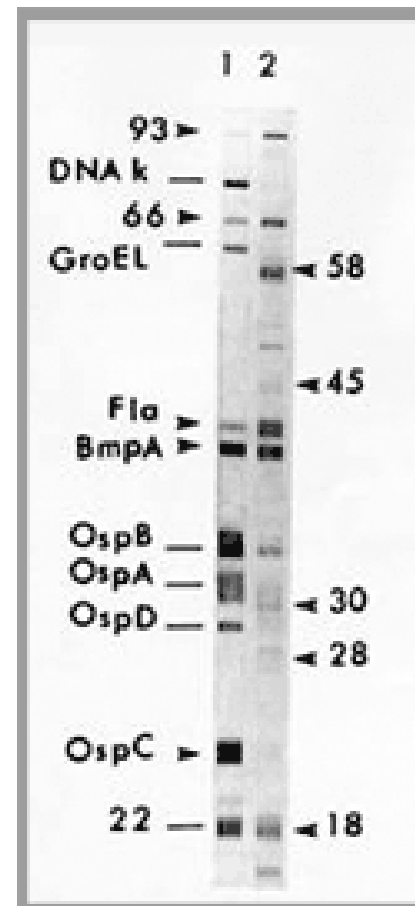
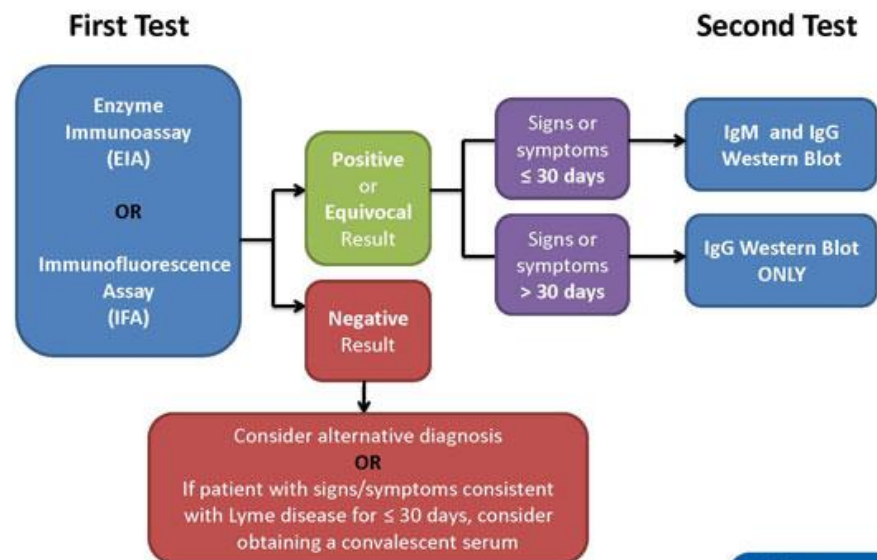
Immunoblot csík
IgG és IgM csíkok
TpN47, *TmpA*, *TpN17*, *TpN15*

When to test for Borrelia specific antibodies?



ELISA tesztek magas fals pozitivitása => WB verifikálás

Two-Tiered Testing for Lyme Disease



IgM: p24, 39, 41 – 2

IgG: p18, 21, 28, 30, 39, 41, 45, 58, 66, 93 - 5

Mikróba, mint „antigén” kimutatásán alapuló tesztek - **POCT vizsgálatok**

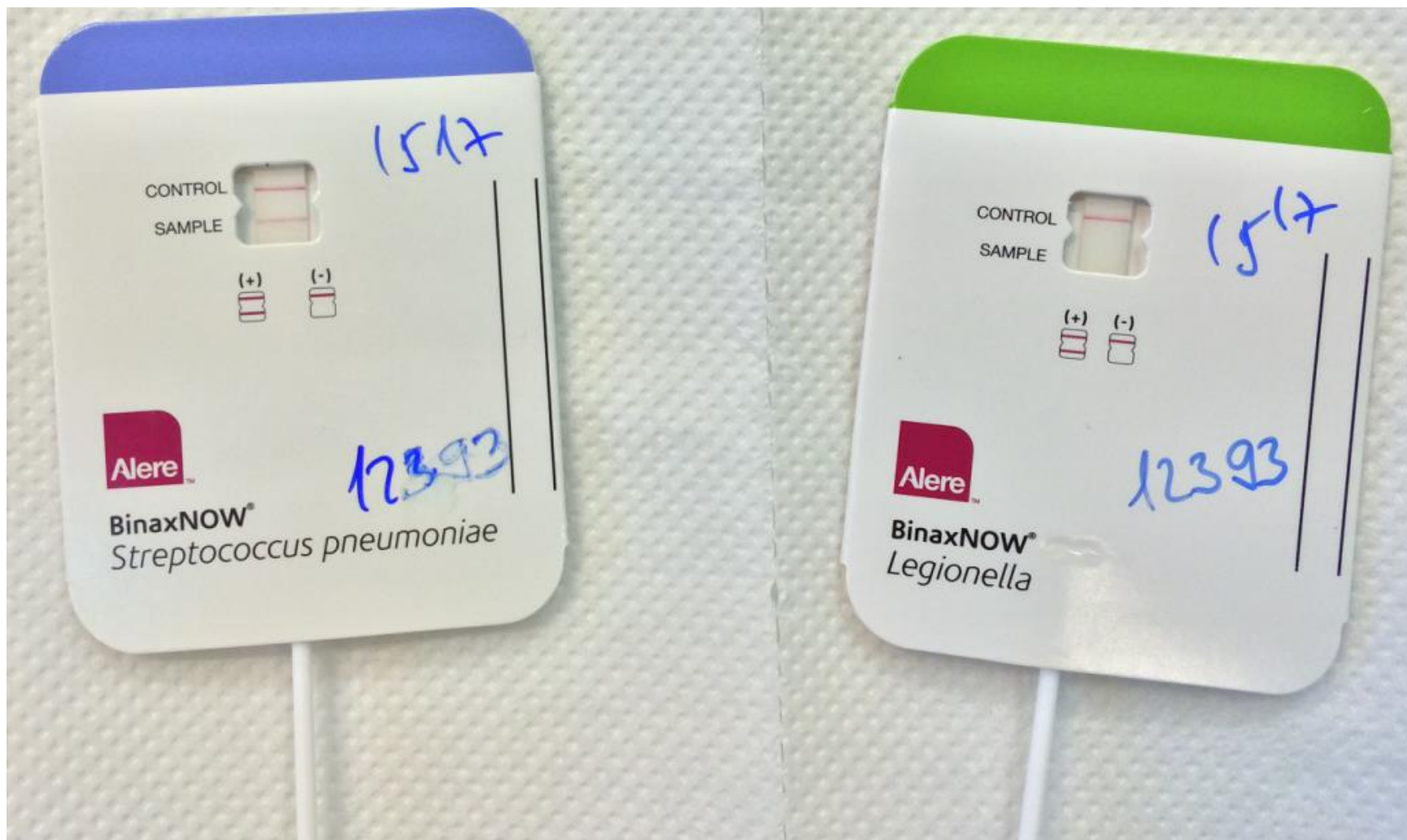
Módszer: agglutináció, immunkromatográfia (szerológiai vizsgálatok)

Példák:

- Légúti minták: *Adenovírus*, *Influenza A,B*, *RSV*, *S. pyogenes*
- **Liquor** (fiz. steril testfolyadékok) : *N. meningitidis*/*E.coli*, *H. influenzae B*, *S. agalactiae*, *S. pneumoniae*, *Cryptococcus neoformans*
- Széklet: *C. difficile*, *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Helicobacter*, *Rotavírus*, *Adenovírus*, *Calicivírus*
- Vizelet: PNEUMÓNIA vizsgálata: *L. pneumophila 1*, *S. pneumoniae*
- Vér: *Plasmodium spp*,
- **Eredményt befolyásolja**
 - mintavétel (tünetek megjelenéséhez képest mikor történik, milyen mennyiségű)
 - a teszt szenzitivitása
 - a beteg életkora



Gyorsteszték vizeletből



Streptococcus pneumoniae „gyorsteszt” – vizeletből (20 perc)

- *S. pneumoniae* (minden szerotípus) sejtfalában lévő C poliszaccharidot mutatja ki
- **Szenzitivitás: 36-86%** (szeptikémiában magasabb)
 - (szenzitivitás növelhető: fagyasztott, centrifugált minta?)
- **Specifitás: 89-95 %**
- Negatív eredmény nem zárja ki a fertőzést
- < 5 év nem javasolt (hordozó)
- Vakcina után 2 napig pozitív (>5 nap)
- Atb.kezeltekre nem validáltak a tesztek (3 napig +?)



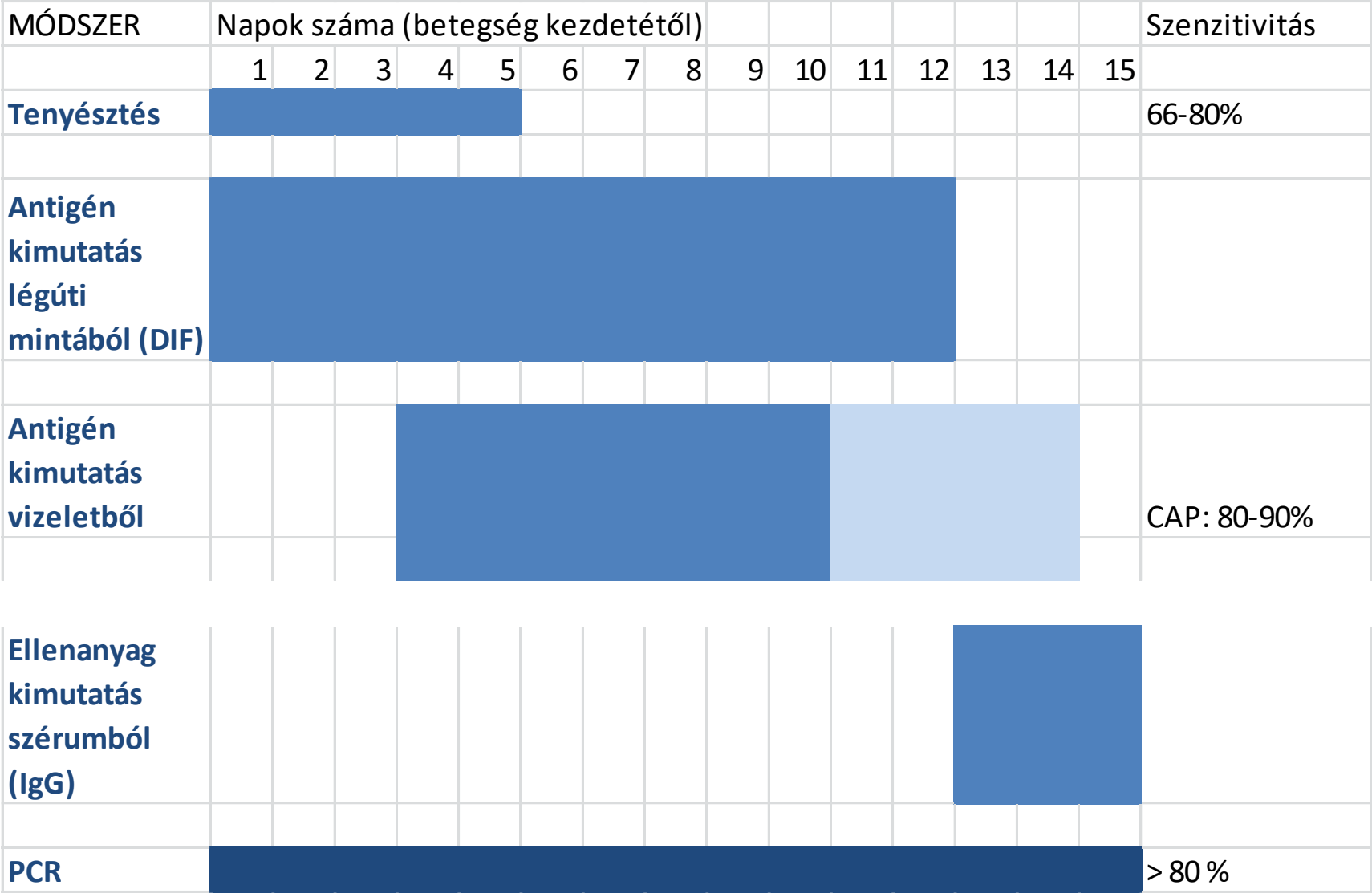
Legionella pneumophila

„gyorsteszt” – vizeletből



- **1. szerotípust** mutatja ki (80-95%)
(némi keresztreakció van a többi szerotípussal is, ill. más Legionella fajjal)
- A betegek 80 %-ánál lesz a vizeletben excretált Ag
- **Szenzitivitás: 55.5-66.6% - 86.6-91.6% (cf. vizelet)**
 - Minél súlyosabb állapotú a beteg, annál magasabb
- **Specifitás: > 99 %**
- Negatív eredmény nem zárja ki a fertőzést
 - Első 5 nap negatív lehet! – ismételts harmadik napon a szenzitivitást 10%-al növeli
- Adekvát terápia mellett/után is napokig/hetekig pozitív lehet (~ 2hét)
- Pozitív eredmény = jelenlegi fertőzés (nem biztosan akut)

Legionella pneumophila okozta pneumónia diagnosztikai lehetőségei



Rutin diagnosztika: *Mycoplasma pneumoniae* elleni specifikus antitestek mérése

IgM

- Első héten (hét végén) jelenik meg
- 5-20 év: + 80 %-ban; >40 év: 40 %-ban
- Hónapokig, akár egy évig (évekig) is perzisztálhat (COPD)
- Reinfekcióban gyakran nem jelenik meg

IgG

- ~ 2 héttel IgM után jelenik meg
- **Savópár: 2-3 hét elteltével titer-emelkedés jelzi az akut/aktuális fertőzést**

IgA

- Betegség korai szakaszában jelenik meg, hamarabb csökken, mint IgM és IgG
- 20 éves kor felett szükséges, akut vagy reinfekció igazolásához

Problémák a „szerológiával”

Alkalmazott tesztek **szenzitivitása**

különböző – nincs standardizálva

- Jellemzően IgM kimutatására „élesítettek”
- IgG detektálására alacsonyabb
 - Különösen gond: ha kismértékű a szerokonverzió (>65 év; alkalmazott terápia miatt)

Specifitás

- Fals pozitív IgM/aspecifikus IgM:
 - Poliklonális stimuláció
 - *S. pyogenes* fertőzés
- Influenza/parainfluenzavírus fertőzés, RSV, adenovírus, CMV, **EBV**, Bordetella...

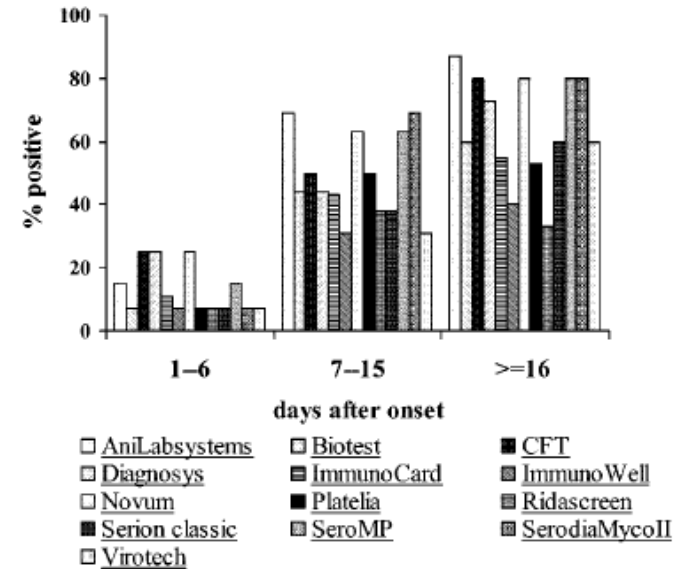
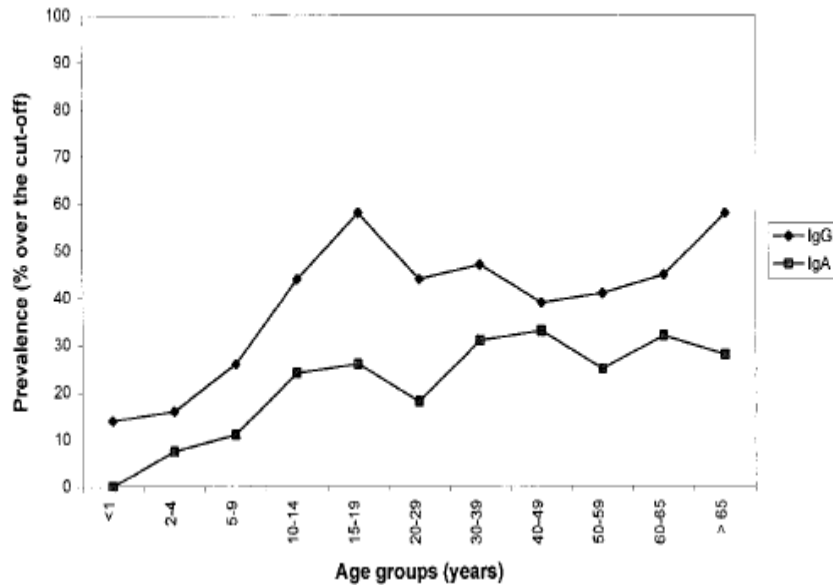


FIG. 2. Analytical sensitivities (percent) of IgM assays in relation to the duration of illness: 1 to 6 days, $n = 15$; 7 to 15 days, $n = 16$; ≥ 16 days, $n = 15$.

Beersma et al. J Clin Microbiol

Problémák a „szerológiával”



„Aszimptomatikus” hordozó állapot :

0-13,5 % (5-15 éves)

Tünetmentesek MP ellenes IgG és IgA antitestek prevalenciája korcsoportonként
(T.Tuuminen, Clin.Diagn.Lab.Immun.)

Összegezve

Savópár vizsgálata javasolt

Azonos módszerrel mérve (a laboratórium egyszerre mérheti az akut és konvaleszcens savót)

2-3 hét elteltével vett minta IgG titeremelkedése (4X) jelzi az akut/aktuális fertőzést

Szerológiai eredmények interpretálása

Első minta					Második minta (2-3 héttel később)			
	IgM	IgA	IgG	Interpretáció	IgM	IgA	IgG	Interpretáció
1	-	-	-	Negatív szerológia. Akut fertőzés lehetséges, ha a minta túl korán lett levéve	-	-	-	Akut fertőzés nem igazolható
					+/-	+/-	+	Akut fertőzés igazolható
2	-	+	-	Aspecifikus IgA pozitivitás lehetséges	-	+/-	-	Aspecifikus IgA
3	+	-	-	Akut fertőzés lehetséges	+/-	-	-	Valószínűleg aspecifikus IgM
					+/-	+/-	+	Akut fertőzés igazolható
4	+	+	-	Akut fertőzés lehetséges	+/-	+/-	-	Valószínűleg aspecifikus IgM és IgA
					+/-	+/-	+	Akut fertőzés igazolható
5	-	-	+	Régi fertőzés, vagy reinfekció lehetséges	-	-	=	Régi fertőzés
					+/-	+/-	+	Reinfekció igazolható
6	-	+	+	Reinfekció lehetséges	-	+/-	=	Régi fertőzés, aspecifikus IgA
					+/-	+/-	⊠	Reinfekció igazolható
7	+	-	+	Akut fertőzés vagy reinfekció lehetséges	+/-	-	=	Régi fertőzés, aspecifikus IgM
					+/-	+/-	⊠	Reinfekció igazolható
8	+	+	+	Akut fertőzés vagy reinfekció lehetséges	+/-	+/-	=	Régi fertőzés, aspecifikus IgM, IgA
					+/-	+/-	⊠	Reinfekció igazolható

Szerológiai vizsgálat első héten/akut fázisban alacsony szenzitivitású

Hogyan lehet a jövőben *Mycoplasma pneumoniae* okozta akut fertőzés diagnosztizálását mikrobiológiai vizsgálatokkal segíteni?

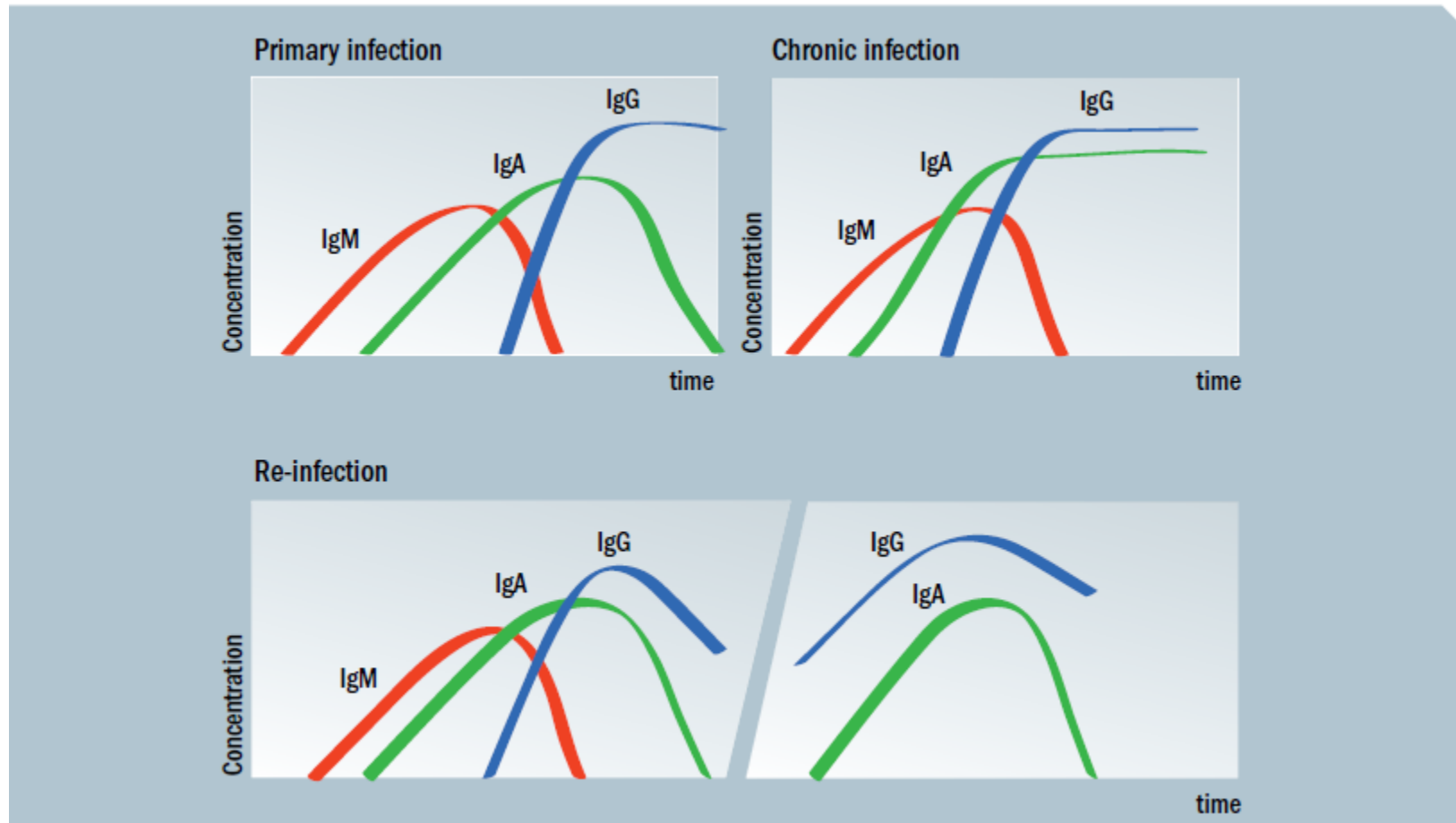
- Önmagában egy vizsgálat nem elegendő
 - Kombináltan szerológia és molekuláris vizsgálat
- Első héten
- PCR szenzitivitás: 40,7-66,7%; specificitás:88,8-98,5%
 - IgM szenzitivitás: 7,4-77%; specificitás:49-100%

Szenzitivitás:

	PCR	Szerológia
1 hét	100	21
2 hét	96	56
3 hét	90	100

Minden betegnél egyedi vizsgálat/elbírálás/értékelés

Chlamydomphila pneumoniae okozta CAP diagnosztikája – specifikus antitestek vizsgálata



IgM : Betegség kezdete után 2., 3. héten jelenik meg
IgA, IgG: 6-8. héttől kezdődően jelenik meg

Chlamydomphila pneumoniae okozta CAP diagnosztikája

IgM

- Reinfekcióban általában nem termelődik
- IgA/IgG hiányában akut fertőzést valószínűsít

IgG

- **Savópár: 2-3 hét elteltével titer-emelkedése jelzi az aktív fertőzést**
- Hónapokig, akár évekig perzisztálhat (klinikai tünetek nélkül nem jelent aktív fertőzést)
- Izolált IgG klinikai tünetek nélkül jellemzően korábbi, lezajlott fertőzés jele

IgA

- Később jelenik meg, mint IgM
- Szintje jellemzően reinfekcióban emelkedik
- Aktív fertőzés jele

Chlamydophila pneumoniae okozta CAP szerológiai diagnosztikája

IgM	IgA	IgG	Interpretáció
-	-	-	Negatív szerológia
+	+/-	-	Akut fertőzés lehetséges Megerősítésére savópár vizsgálata javasolt
-	-	+	Régi fertőzés, maradványantitestek
-	+/-	+	Régi fertőzés, vagy reinfekció lehetséges Megerősítésére savópár vizsgálata javasolt
-	++	+	Akut fertőzés vagy reinfekció vagy krónikus fertőzés lehetséges Megerősítésére savópár vizsgálata javasolt Krónikus fertőzés: savópár vizsgálata:1 hónap és 3. hónap után
+	+	+	Akut/aktuális fertőzés lehetséges

Összegezve

Általában savópár vizsgálata javasolt

Azonos módszerrel mérve (a laboratórium egyszerre mérheti az akut és konvaleszcens savót)

Rezisztencia gének (termékeinek) kimutatása

- *mecA* – PBP2a latex-agglutináció
- Immunkromatográfiás tesztek
 - OXA48, KPC



For research use only
Simultaneous detection of AAC(6')-Iae (Aminoglycoside drug resistance factor) and IMP-type MBL (β -lactam drug resistance factor)

Quick Chaser Iae•IMP

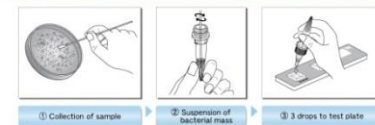
Product No. 79401 Package 30 tests

Features

- ◆ Detection of drug resistance factors by immunochromatographic assay
- ◆ Use of colonies of *Pseudomonas aeruginosa*, isolated and cultured in agar plate media as sample
- ◆ Detection items are two kinds of drug resistance factors¹⁾
 - ① Aminoglycoside drug resistance factor
 - ▶ AAC(6')-Iae
 - ② β -lactam drug resistance factor
 - ▶ IMP-type Metallo- β -lactamase (IMP-type MBL)²⁾
- ◆ It's possible to interpret drug resistance factors simultaneously and respectively by one-step procedure.
- ◆ Easy-to-use test procedure – No special procedure and instrument required
- ◆ Interpretation after 15 minutes

¹⁾ This product cannot detect other drug resistance factors besides these two drug resistance factors.
²⁾ This product is reactive to all subtypes of MBL including IMP-1 and IMP-2 regarding IMP-type MBL.

Test procedure



Interpretation of results

It's possible to detect drug resistance factors by existence or non-existence of lines.



