

Komplement fixační reakce, titrace komplementu

U *KFR* neboli *vazby komplementu* na fyzikální povaze antigenu nezáleží. Nezbytnou součástí reakce je komplement, který se váže až na vznikající komplex antigen-protilátka. Protože vazba komplementu na tento komplex se viditelně neprojeví, je třeba ji nějak ozřejmit. Do reakce se proto v další fázi přidává *indikátorový* neboli *hemolytický systém*: beraní erytrocyty sensibilizované *amboceptorem*, což je obvykle králičí protilátka (*hemolysin*) proti beraním krvinkám.

Pokud se komplement navázal v první fázi reakce, zůstanou přidané erytrocyty beze změny. Tento výsledek se projeví jako tzv. *zábrana hemolýzy*. Jestliže hledaná složka (většinou protilátka) přítomna nebyla, komplex antigen-protilátka nevznikne, komplement zůstane volný, naváže se na indikátorový systém a výsledkem bude *hemolýza* krvinek.

Vlastní reakce vazby komplementu probíhá ve dvou fázích. V první se nechá komplement vázat 30 min/42°C. Ve druhé fázi, po přidání hemolytického systému, se reakce inkubuje 40 min/42°C.

Při odečítání výsledků KFR se hemolýza považuje za negativní. Na rozdíl od aglutinace se u KFR počítá jen se základním ředěním séra a má se za to, že přídavek antigenu, komplementu ani hemolytického systému už vyšší ředění neovlivní.

Jako zdroje komplementu se v laboratoři užívá morčecího séra. Protože komplement je termolabilní, uchováváme morčecí sérum hluboko zmražené. Během práce ukládáme pracovní ředění komplementu v chladničce.

Sérum do KFR nesmí být chylózní nebo hemolytické a je nutno jej vždy inaktivovat zahřátím na 30 min/56°C, aby se odstranil lidský komplement. Reakce je náročná na přesné množství všech složek, zejména komplementu. To se vyjadřuje v *hemolytických jednotkách*, kdy jedna hemolytická jednotka komplementu je takové množství, které právě stačí rozpustit pracovní dávku sensibilizovaných krvinek. Do reakce se v rutinním provozu berou 2 hemolytické jednotky komplementu.

Indikátorový (hemolytický) systém se připravuje smícháním stejných objemů řádně propraných beraních erytrocytů s ředěným amboceptorem.

Jako ředidla se ve vazbě komplementu používá roztoku označovaného termínem *veronal*. Jedná se o fyziologický roztok s barbitolovým nárazníkem a přídavkem iontů Ca a Mg.

Všechny složky KFR je nutno podrobovat kontrole. *Kontrola séra* obsahuje místo antigenu ředící roztok a musí v ní vyjít dokonalá hemolýza. I stopa zábrany hemolýzy v kontrole séra svědčí o tom, že sérum je *antikomplementární*, tj. vychytává komplement i v nepřítomnosti přidaného antigenu.

KFR se používá k důkazu protilátek. V bakteriologii k průkazu protilátek u brucelózy, listeriózy a u infekce *Mycoplasma pneumoniae*, v parazitologii především u toxoplazmózy. KFR s kardiolipinovými antigeny je klasická reakce Bordetova-Wassermannova, dříve často používaná k diagnóze a sledování syfilidy.

KFR

průprava: SÉRUM ŘEDIT 1:5 (100μl SÉRA + 400μl VERONALLI)
INAKTIVOVAT 30' 56°C

POSTUP:

1) NAKAPAT PANEL : a' 1 kapka (25μl) VERONALLI
DRUHÝ DŮLEK VYNECHAT

25		25	25	25	25	25	25	VERONAL
----	--	----	----	----	----	----	----	---------

2) NAKAPAT SÉRUM : ředění 1:5, inaktivování
do 1. a 2. a 3. důlku a' 1 kapka (25μl)

25	25	25						SÉRUM
----	----	----	--	--	--	--	--	-------

3) NĚDIT : od 3. důlku do konce panelu

KONTROLA SÉRA	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	→ DO DESINF. ☉
		→	→	→	→	→	→	

4) NAKAPAT TOXO ANTIGEN : od 2. důlku a' 1 kapka (25μl)

	25	25	25	25	25	25	25	ANTIGEN
--	----	----	----	----	----	----	----	---------

5) NAKAPAT TOXO KOMPLEMENT : řádek a' 2 kapky (± 50μl)

25	25	25	25	25	25	25	25	KOMPLEMENT
25	25	25	25	25	25	25	25	

6) PROTŘEPAT ; INKUBOVAT 50' 42°C V TERMOSTATU

7) NAKAPAT KRVINKY SENZIBILIZOVANÉ : a' 1 kapka řádek (25μl)
3% BER. ERY + AMBOCEPTOR

25	25	25	25	25	25	25	25	KRVINKY
----	----	----	----	----	----	----	----	---------

8) PROTŘPAT; INKUBOVAT 10' 42°C / TERMOSTATU

9) CENTRIFUGOVAT

10) HODNOTIT

1. důlek = kontrola ANTIKOMPLEMENTARITY SÉRA

MUSÍ BÝT HEMOLÝZA!

POKUS JE ZÁBRNA - AK = ANTIKOMPLEMENTÁRNÍ S.

(nupl. nle podstat)

2. důlek = pír 1:5, dále geometrickou řadou

POZITIVNÍ = ZÁBRNA HEMOLÝZY (zakalony' důlek)

NEGATIVNÍ = HEMOLÝZA (průsvitný, ružový důlek)

1:40 = suspekt!

1:80 = pozitiv!