

Lékařská mikrobiologie pro ZDRL

Týden 11:

Komplementfixace



Ondřej Zahradníček 777 031 969

zahradnicek@fnusa.cz ICQ 242-234-100

Co nás dnes čeká

- Budeme pokračovat v diagnostice, založené na interakci **antigenu** (v případě mikrobiálních antigenů jde o povrchovou část těla mikroba) s **protilátkou** (imunoglobulinem, který je tvořen makroorganismem).
- Přitom můžeme prokazovat **zvířecí protilátkou antigen** (přímý průkaz) nebo **antigenem protilátku v séru** (nepřímý průkaz)
- Projdeme si reakci zvanou **komplementfixace**

Průkaz antigenu a antigenní analýza (pro připomenutí)

- **V rámci průkazu antigenu** (tedy přímého průkazu) lze ještě dále rozlišit dva podtypy:
 - **Přímý průkaz antigenu ve vzorku**, například ve vzorku mozkomíšního moku
 - **Antigenní analýza (identifikace) kmene**, izolovaného ze vzorku (například kmene meningokoka)
- U **nepřímého průkazu** naopak vždy pracujeme se vzorkem, a to **se vzorkem séra**, kde hledáme protilátky

A ještě trochu opakování: Interpretace

- **Průkaz antigenu** (včetně antigenní analýzy) je přímá metoda. Pozitivní výsledek znamená přítomnost mikroba v těle pacienta
- **Průkaz protilátek:** je to nepřímá metoda. Nicméně jsou způsoby, jak alespoň odhadnout, kdy přibližně se mikrob s tělem pacienta setkal:
 - **Množství protilátek** (**titr**) a hlavně **jeho změna**
 - **Třída protilátek:** IgM/IgG
 - *Avidita protilátek – síla vazby na antigen*

Jak tyto informace zjistit

- **Čerstvá infekce:** velké množství protilátek, převážně třídy IgM, případně i IgA 1
- **Pacient po prodělané infekci:** malá množství protilátek, hlavně IgG (imunologická paměť) 2



Vzestupy a poklesy titru

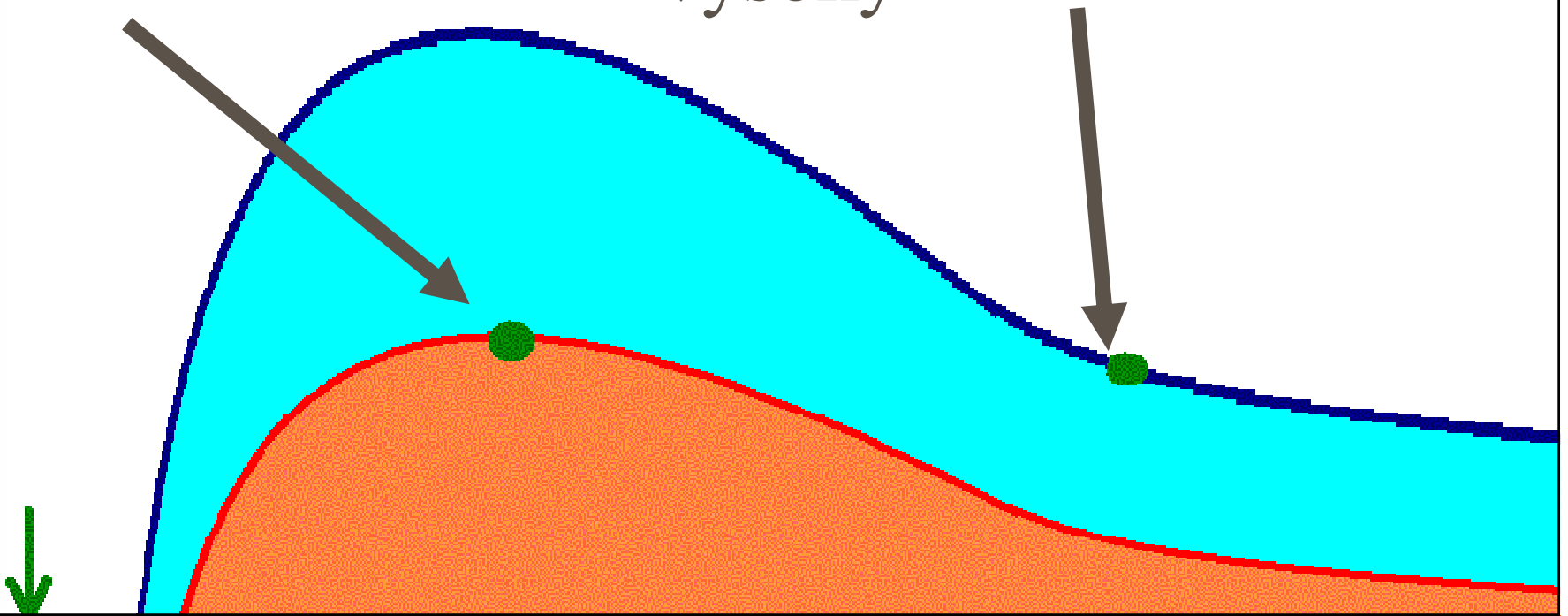


- **Titr** – nejvyšší ředění, kde je pozitivní reakce.
- Máme-li **dvě řady**, je titrem nejvyšší ředění z obou řad dohromady.
- Při použití geometrické řady znamená
 - vzestup/pokles titru **o jeden důlek dvojnásobný vzestup pokles.**
 - vzestup/pokles **o n důlků je pak vzestup/pokles 2^n násobný.**

Proč nestačí samotný titer

Někdy se stane, že málo reaktivní pacient má i v akutní fázi titer dosti nízký

Velmi reaktivní pacient má naopak i dlouho po infekci titer relativně vysoký



Párová a nepárová séra

- **Párová séra** = první vzorek je uchováván v ledničce, dokud nepřijde i druhý. Pak jsou oba hodnoceny naráz. **Čtyřnásobný vzestup** se v tom případě má za signifikantní pro akutní infekci. Bohužel párová séra nejsou běžná.
- **Séra nejsou párová** (druhý vzorek je vyšetřen zvlášť): zvětšuje se riziko náhodné chyby, proto zpravidla vyžadujeme **osminásobný vzestup** titru. Tyto údaje jsou však pouze orientační a liší se případ od případu.

Pořád musíte mít na paměti:

- Veškeré „srandičky“ typu titry, třídy protilátek, zjišťování avidity, slouží k odlišení akutní infekce, chronické infekce a stavu po dávno prodělané infekci. Týkají se ovšem pouze **nepřímého průkazu!**
- **Přímý průkaz** totiž přímo prokazuje v těle pacienta část patogenova organismu. Není tedy nutné žádné další upřesnění

Typy serologických reakcí a jejich způsoby využití

	Průkaz antigenu	Antigenní analýza	Nepřímý průkaz
Aglutinace	občas	často	někdy
Precipitace	málokdy	málokdy	občas
KFR	často (viry)	ne	často (viry)
Neutralizace	občas	ne	často
Značené složky	velmi často	výjimečně	velmi často

Komplementfixace (KFR)

- Komplement = složka imunitní reakce
- Pro KFR používáme morčecí komplement. Pacientův komplement je před reakcí inaktivován
- Komplement není schopen vázat se na samotný antigen
- Komplement není schopen vázat se na samotnou protilátku
- Komplement je schopen vázat se pouze na KOMPLEX obou

Komplement – na co se váže:

- **KOMPLEMENT + POUHÝ ANTIGEN:
neváže se**
- **KOMPLEMENT + PROTILÁTKA:
neváže se**
- **KOMPLEMENT + KOMPLEX
ANTIGENU S PROTILÁTKOU:
vazba**

Princip komplementfixace

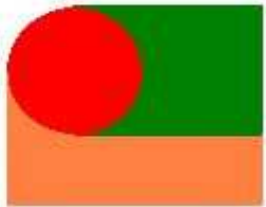





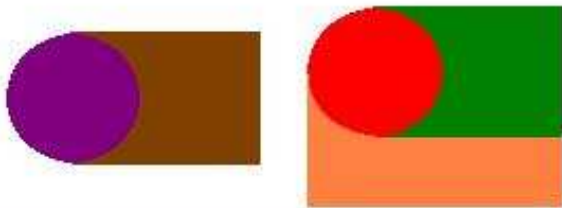
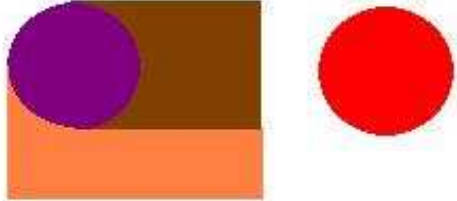





- Komplement se tedy **váže na komplex antigen-protilátka** (nezůstává žádný volný komplement) To ale samo o sobě není vidět.
- Proto používáme ještě tzv. **indikátorový komplex** – beraní erythrocyty + králičí protilátky proti nim. V případě, že se na zbyl volný komplement, naváže se na indikátorový systém a dojde k hemolýze

Pokus k ověření funkce komplementu

Amboceptor = králičí protilátka proti beraním erytrocytům

1. Beraní ery + amboceptor bez komplementu
→ není hemolýza (chybí komplement)
2. Beraní ery + komplement bez amboceptoru
→ není hemolýza (chybí protilátky)
3. **Beraní ery + komplement + amboceptor → hemolýza (všechny složky přítomné)**
4. Králičí ery + komplement + amboceptor →
není hemolýza (chybí „ten správný“ antigen)

Princip KFR (negativní, pozitivní)

+	-	
1 	1 	 antigen  antibody protilátka
 vázaný - bound	 volný - free	
2 	2 	 complement  beraní ery sheep RBC
NO HEMOLYSIS NENÍ HEMOLÝZA	HEMOLYSIS HEMOLÝZA	 amboceptor
		



Problémy s KFR

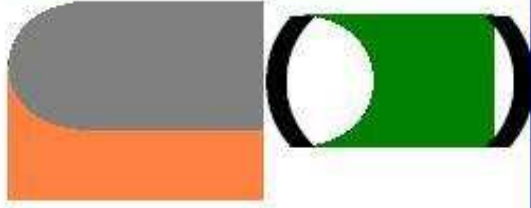
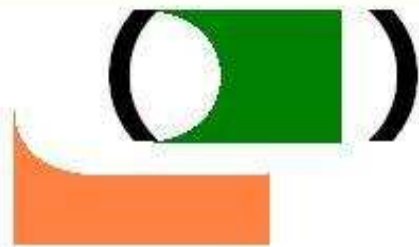




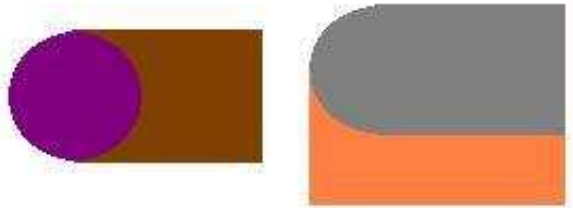
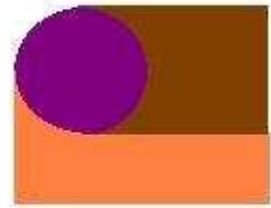





- Příliš mnoho komplementu → falešná negativita. **Co dělat?** Titrovat komplement (viz další obrazovka)
- Některá složka séra sama o sobě vyvazuje komplement (složka antikomplementarity): falešně pozitivní výsledky. **Co dělat?** Provést test antikomplementarity. Je to vlastně „skoro normálně“ provedená reakce, ovšem bez antigenu



Titrace komplementu

- Pro reakci potřebujeme množství morčecího komplementu, které není moc velké ani malé.
- Proto zjišťujeme, jaké množství komplementu hemolyzuje pracovní jednotku krvinek s amboceptorem (hemolytická jednotka)

Test antikomplementarity

SERUM NOT OK	SERUM OK	
1 	1 	 složka zodpovědná za antikomplementaritu anticomplementarity component
 vázaný - bound	 volný - free	 antibody protilátka
2 	2 	 complement
NO HEMOLYSIS NENÍ HEMOLÝZA	HEMOLYSIS HEMOLÝZA	 beraní ery sheep RBC
		 amboceptor

Použití KFR

- KFR lze použít pro diagnostiku **mnoha, zejména virových infekcí**
- Jako i jiné serologické reakce se KFR používá k **průkazu antigenu či protilátky**
- Častější je ale průkaz protilátky, proto se jím budeme zabývat víc
- Berme to tedy tak, že máme **laboratorní antigen**, který konfrontujeme se **sérem pacienta** (kde hledáme protilátky)

Pro dnešek děkuji za pozornost

Prof. Tomášek, někdejší
přednosta našeho ústavu,
objevitel tzv. Tomáškova
antigenu u syfilis

