

Komplementfixace (KFR, téma J08)



- Autor prezentace: Ondřej Zahradníček
- Praktika z lékařské mikrobiologie
(VLLM0421c)
- Kontakt
- 777 031 969 zahradnicek@fnusa.cz
- ICQ 242-234-100



Typy metod – opakování

- **Přímé metody:** detekce mikroba, jeho části nebo produktu. Mikroskopie, kultivace, biochemická identifikace, průkaz antigenu. **Pozitivita** = je jisté, že agens je NYNÍ přítomno.
- **Nepřímé metody:** detekce protilátek proti mikrobovi. **Pozitivita** = mikrob potkal hostitele v minulosti (nevíme, zda před týdny / měsíci / roky)



Antigen a protilátka – opakování

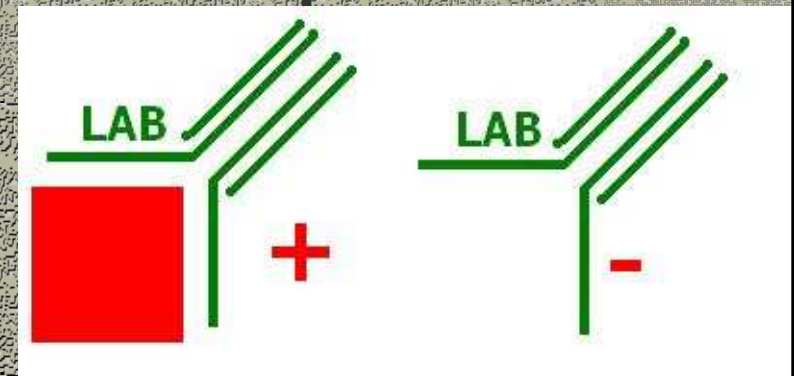
Antigen = makromolekula pocházející z cizího organismu: rostliny, mikroba, jiného živočicha. V mikrobiologii nás zajímají mikrobiální antigeny = části mikrobiálního těla, které vzbuzují v hostiteli antigenní odpověď

Protilátka = imunoglobulin, tvořený v těle hostitele jako odpověď na antigenní výzvu (samozřejmě nejen u člověka, ale i u zvířat)

Jak interakci využít – opakování

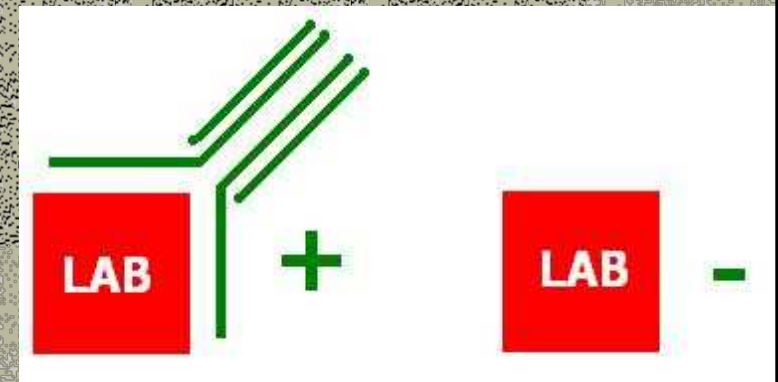
Průkaz antigenu: laboratorní protilátky (zvířecího původu) + vzorek pacienta nebo kmen mikroba.

Přímá metoda



Průkaz protilátky: laboratorní antigen (mikrobiální) + sérum (výjimečně sliny, likvor) pacienta

Nepřímá metoda





Interpretace – doplněné opakování

- **Průkaz antigenu** je přímá metoda.
Pozitivní výsledek znamená přítomnost mikroba v těle pacienta
- **Průkaz protilátek** je nepřímá metoda.
Jak odhadnout, kdy se mikrob s tělem pacienta setkal:
 - **Množství protilátek (titr) a zejména změna tohoto množství (dynamika titru)**
 - **Třída protilátek: IgM/IgG (více v J10)**
 - **(Avidita protilátek)**

Dynamika titru

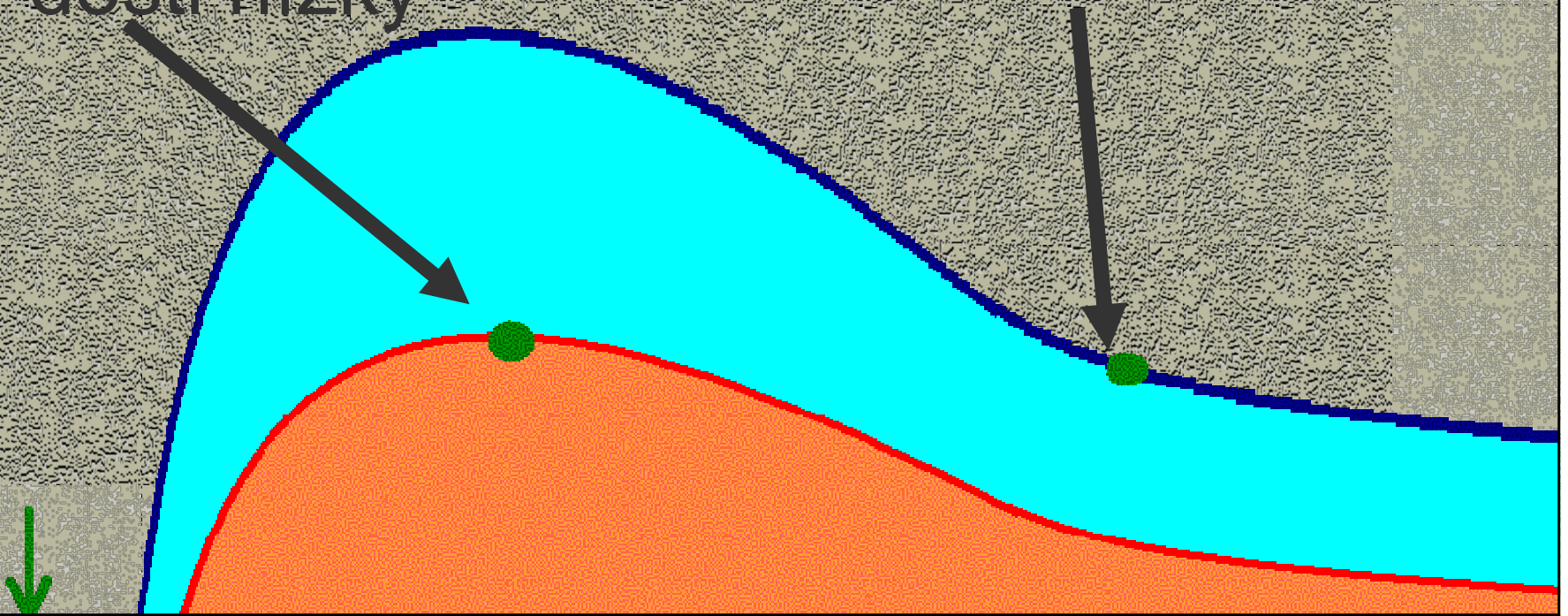
- 1- akutní sérum
- 2 - rekonvalescentní

- Průšvih je, že každý má jinou úroveň protilátkové odpovědi. Proto samotná hodnota titru mnoho neříká
- Změna titru vypovídá více. Jde-li o čerstvou záležitost, titr se vždy vyvíjí, nejprve stoupá, později zvolna klesá.



Proč nestačí samotný titer

- Někdy se stane, že málo reaktivní pacient má i v akutní fázi titer dosti nízký
- Velmi reaktivní pacient 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. **4násobný vzestup** se v tom případě má za signifikantní pro akutní infekci.
- **Séra nejsou párová** (druhý vzorek je vyšetřen zvlášť): zvětšuje se riziko náhodné chyby, proto zpravidla vyžadujeme **8násobný vzestup** titru



Komplementfixace (KFR)

- Komplement = jedna ze složek 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



Použití KFR

- KFR lze použít pro diagnostiku **mnoha, zejména virových infekcí**
- Jako i jiné serologické reakce se KFR používá k **průkazu antigenu či protilátky**
- Pro zjednodušení uvádíme v tomto praktiku pouze průkaz protilátky
- Berme to tedy tak, že máme **laboratorní antigen**, který konfrontujeme se **sérem pacienta** (kde hledáme protilátky)



Jak funguje komplement (Úkol 1)

Amboceptor = králičí protilátka proti beraním erytrocytům

1. Beraní ery + amboceptor bez komplementu → není hemolýza
2. Beraní ery + komplement bez amboceptoru → není hemolýza
3. Beraní ery + komplement + amboceptor → hemolýza
4. Králičí ery + komplement + amboceptor → není hemolýza



Titrace komplementu (Úkol 2)

- 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)

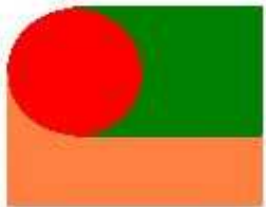





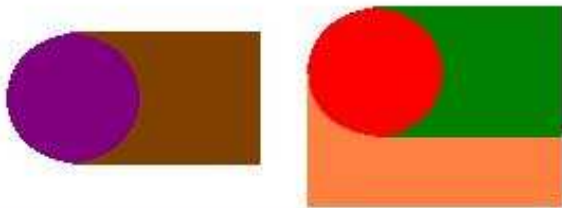
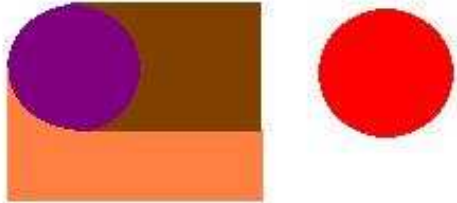







Titrace komplementu výsledky

- Ředění morčecího séra (pro nás je zdrojem komplementu):
 - 1 : 32 = hemolýza
 - 1 : 36 = hemolýza
 - 1 : 40 = hemolýza
 - 1 : 44 = není hemolýza
- Hemolytická jednotka odpovídá 1 : 40
- Abychom získali dvě jednotky, ředíme sérum 1 : 20



Princip KFR (Úkoly 3 a, b)

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

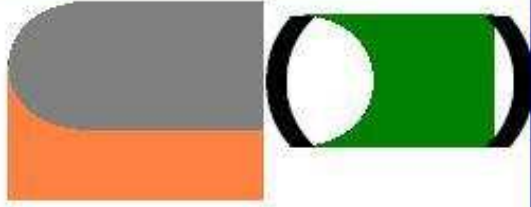
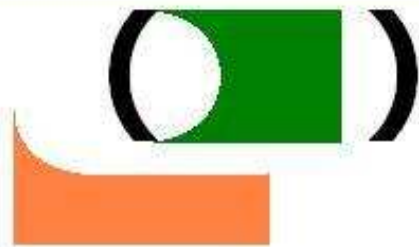




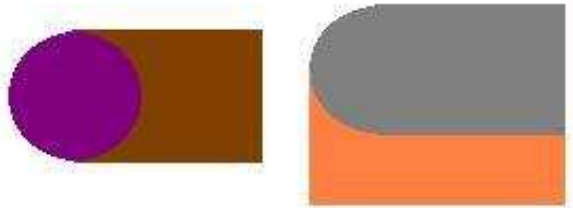
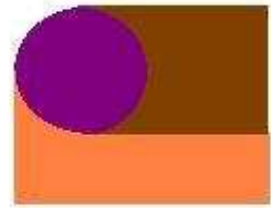







Problémy s KFR

- Příliš mnoho komplementu → falešná negativita. **Co dělat?** Titrovat komplement (viz Úkol 2)
- Některá složka séra sama o sobě vyvazuje komplement (složka antikomplementarity): falešně pozitivní výsledky. **Co dělat?** Provést test antikomplementarity bez antigenu



Test antikomplementarity (Úkoly 3 c, d)

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



Úkoly 4: Respirační patogeny

- **Úkol 4:** Celá serologická destička patří jednomu pacientovi. Máme šest respiračních patogenů, každý je ve dvou řádcích (akutní vzorek a rekonvalescentní). První sloupec je test antikomplementarity, následuje sedm ředění séra – ve druhém sloupci 1 : 5 a pak geometrickou řadou s koeficientem dva. Kromě virů je ve škále i bakterie *Mycoplasma pneumoniae*



Úkol 5: Toxoplasmosa

- **Úkol 5:** Destička patří pozitivní kontrole a šesti pacientům. Hledáme protilátky proti klíšťové encefalitidě. V tomto případě nesledujeme dynamiku titru, vypátráme pouze hodnotu titru.
- V prvním sloupci jsou opět testy antikomplementarity, následuje ředění geometrickou řadou od ředění 1 : 8



Úkol 6: Klíšťová encefalitida

- **Úkol 5:** Opět testujeme protilátky, tentokrát proti klíšťové encefalitidě a tentokrát opět jako párové.
- V prvním sloupci jsou opět testy antikomplementarity, následuje ředění geometrickou řadou od ředění 1 : 8





Hezký
den!



Rád bych vás pozval opět do kabaretu POKUK, nejbližší POKUK se koná 24. dubna 2006 v 19.30 ve vinotéce U Karla na Starobrněnské 12.

Téma „Havěť, aneb Na svatého Jíří“