

Pátráme po mikrobech
Díl VIII.

Komplemetfixační reakce

Ondřej Zahradníček

K praktickému cvičení pro VLLM0421c

Kontakty na mne:

777 031 969

zahradnicek@fnusa.cz

ICQ 242-234-100

Co už umíme

- Umíme používat **mikroskopii, kultivaci a biochemickou identifikaci**
- Víme, **jak bojovat s mikroby pomocí dekontaminačních metod a antimikrobiálních látek** a umíme otestovat účinnost těchto postupů
- Víme, jak diagnosticky využít reakci antigenu s protilátkou, a víme, čím se liší **precipitace, aglutinace a aglutinace na nosičích**

Pohádka

- Byl jednou jeden zvědavý hlídač v parku.
- Chtěl vědět, jestli mládenec, který chodívá do parku ve stejnou dobu jako jedna slečna, k té slečně patří
- Uvažoval následovně: v parku je jediná lavička. Pokud patří k sobě, tak si jistě na lavičku sednou a budou se objímat
- Umístil proto na lavičku kudlibabky a řekl si, že pokud ti dva k sobě patří, nachytají na sebe při objímání kudlibabky z lavičky.

Jak to ale poznat...

- ...když mládenec i dívka odešli jiným východem?
- Hlídač si uvědomil, že za chvíli přijde na návštěvu jeho neteř se svým přítelem. Jak je zná, určitě se cestou zastaví u lavičky a budou se objímat.
- Hlídač to vymyslel: pokud neteř s přítelem budou mít na sobě kudlibabky, pak je nevychytila ta první dvojice – žádná dvojice to nebyla. Pokud kudlibabky mít na sobě nebudou, tak k sobě první dvojice patří.

Poučení z naší pohádky

- Dnes máme na programu komplementfixaci, poměrně složitou reakci.
- Nejenže ke zviditelnění komplexu antigen-protilátka používáme **komplement**, ale navíc ještě přidáváme další dvě složky – tzv. **indikátorovou dvojici**.
- Tato dvojice je tvořena **indikátorovým antigenem (beraní erytrocyty)** a **indikátorovou protilátkou (amboceptor = králičí protilátky proti beraním erytrocytům)**.

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

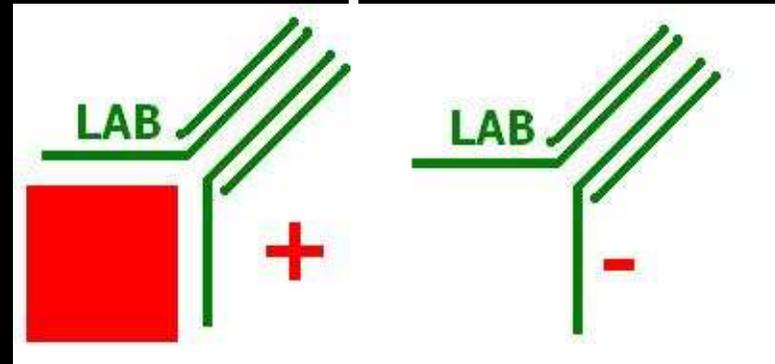
Antigen = makromolekula pocházející z cizího organismu: rostliny, mikroba, jiného živočicha. V mikrobiologii nás zajímají mikrobiální antigeny = části mikrobiálního těla, které vzbuzují v hostiteli antigenní odpověď

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

Jak interakci využít – opakování

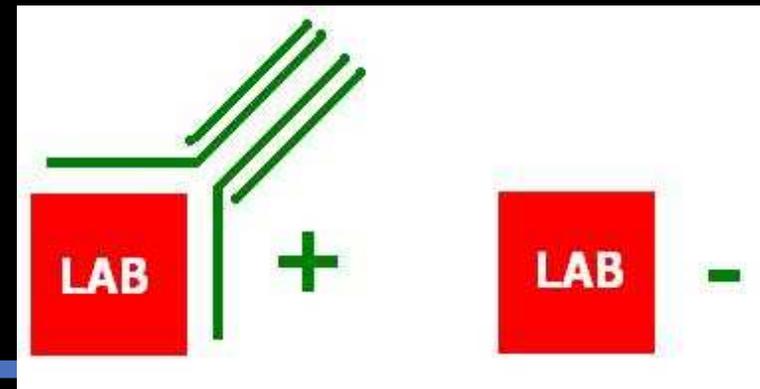
Průkaz antigenu: laboratorní protilátky (zvířecího původu) + vzorek pacienta nebo kmen mikroba.

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

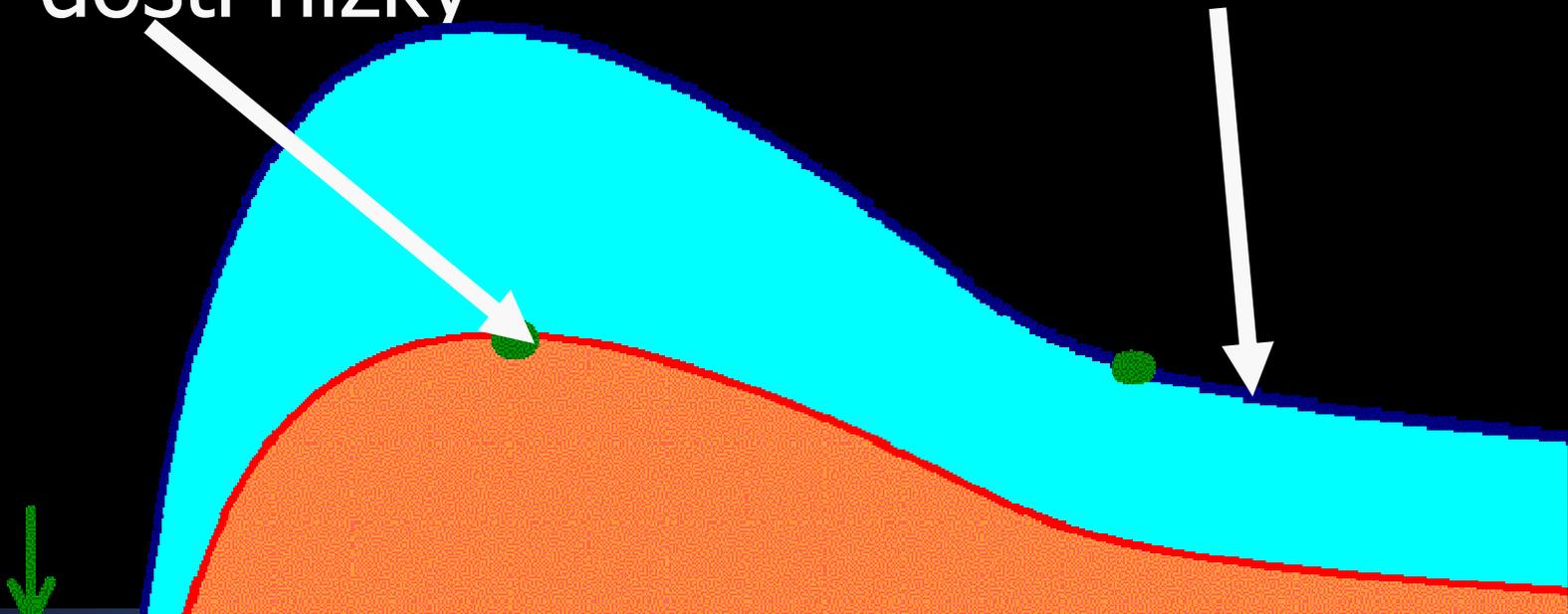
2 - rekonvalescentní

- 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. **čtyřnásobný 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 **osminásobný vzestup** titru

Dynamika titru – další aspekty

- Zvláštním případem je tzv. **serokonverze** – v prvním vzorku protilátky nejsou (ještě se nestihly vytvořit), v druhém už jsou. Takový důkaz je cennější než „důkaz čtyřnásobkem“
- **V některých případech místo vzestupu prokážeme pokles** (subakutní infekce)
- ***Velikost titru rozhodně neodpovídá vývoji klinických příznaků. Množství protilátek často vrcholí, až příznaky zmizí.***

Příklady různých projevů dynamiky titru

- **1 – 2:** sérokonverze
- **3 – 4:** vzestup titru
- **5 – 6:** pokles 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

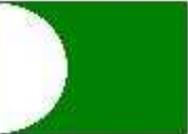
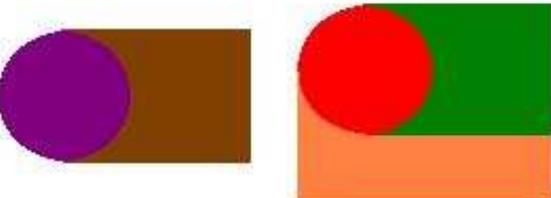
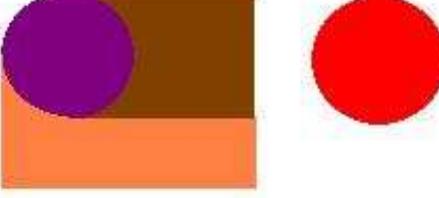
Titrace komplementu (Úkol 2)

- 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)**
- *Příliš mnoho komplementu → falešná negativita (příliš mnoho kudlibabek → zbude i na neteř a jejího přítele)*

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

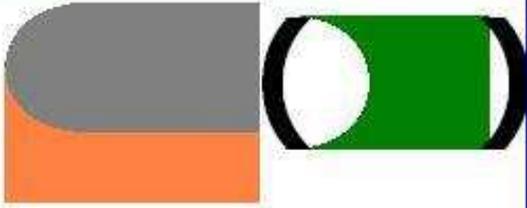
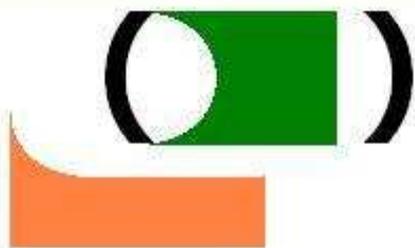
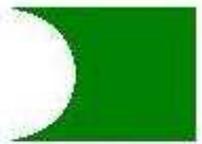
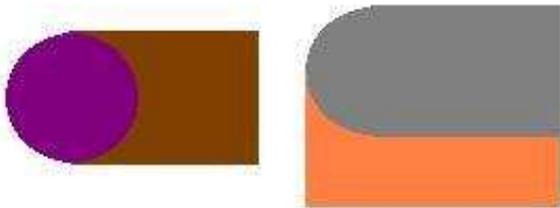
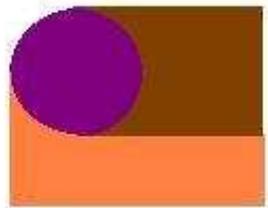
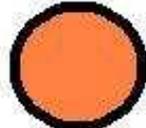
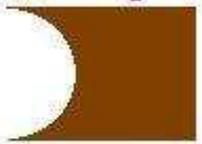
Princip KFR (Úkoly 3 a, b)

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

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 (*V pohádkovém příběhu odpovídá bezdomovci, který zvalí lavičku a sám na sebe nachytá všechny kudlibabky*)

Test antikomplementarity (Úkoly 3 c, d)

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

Úkoly 4: Respirační patogeny

- 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

- Destička patří **pozitivní kontrole a šesti pacientům**. Hledáme protilátky proti toxoplasmose. V tomto případě nesledujeme dynamiku titru, vypátráme pouze hodnotu titru (bez další interpretace)
- **V prvním sloupci jsou opět testy antikomplementarity**, následuje ředění geometrickou řadou od ředění 1 : 8

Úkol 6: Klíšťová encefalitida

- 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 : 4

Přeji Vám
hezký zbytek
dne...



<http://www.presse.uni-wuppertal.de/archiv/output/okt98>