

Klasické serologické metody

aglutinace / precipitace, RID, nefelometrie / turbidimetrie

Vyšetření funkce komplementu

Peter Slanina (peter.slanina@fnusa.cz)

Ústav klinické imunologie a alergologie

FN u sv. Anny a Lékařská fakulta MU

Laboratórne vyšetrenie IN VITRO

- **Preanalytická fáza**

- Príprava pacienta, odber, spracovanie vzorky pred zahájením laboratórneho vyšetrenia
- skladovanie, transport

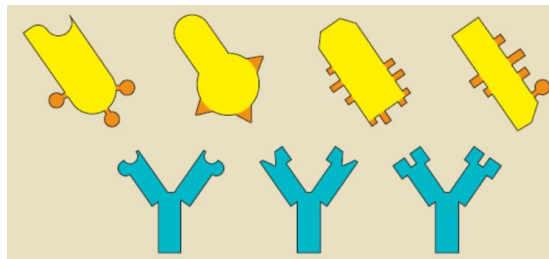
- **Analytická fáza**

- kalibrácia a justovanie zariadení (analýza kontrol- IKK, EHK)
- prevedenie lab. vyšetrenia + kontrol
- spracovanie výsledkov, LIS

- **Postanalytická fáza**

- skladovanie, likvidácia materiálu
- preskúmanie výsledkov, uvoľnenie, uchovávanie LIS - NIS

Rozdelenie imunologických laboratórnych metód



Metódy $\left\{ \begin{array}{l} \text{serologické (humorálne)- detekcia antigénov a protilátok,} \\ \text{preukázanie tvorby protilátok proti infekčnému agens} \\ \text{bunečné- počty a funkcie jednotlivých typov leukocytov} \end{array} \right.$



Monocyte



Lymphocyte



Neutrophil



Eosinophil



Basophil

Serologické metódy

1. Klasické serologické metódy

- Aglutinácia (priama / nepriama)
- Precipitácia (v kvapaline, v géle)

2. Imunochemické metódy s následnou detekciou

- Imunofluorescencie (priama / nepriama)
- Imunoanalýza (EIA-ELISA, RIA, FIA, LIA)
- Immunoblot, imunodot

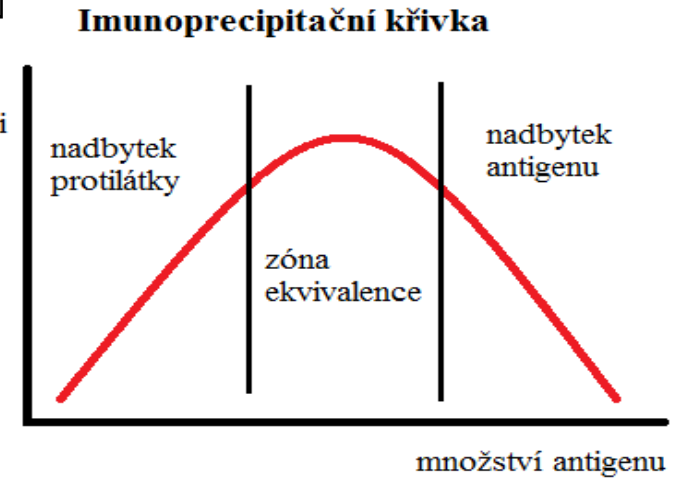
3. Metódy založené na efektorovom účinku protilátok (využívané v klinickej mikrobiológii)

- Komplement fixačné reakcie
- Inhibičné a neutralizačné testy

Serologické metódy

Reakcia antigénu (Ag) s protilátkou (Ab) = imunokomplex:

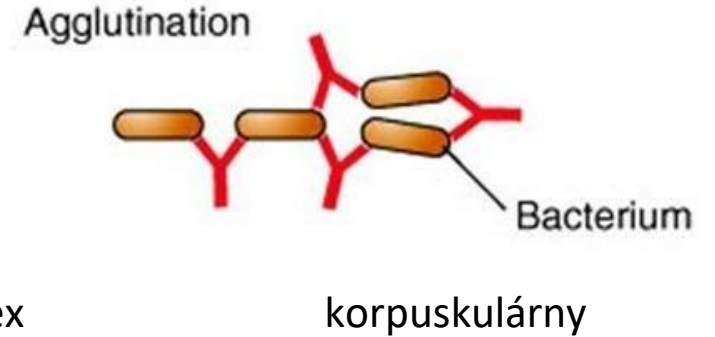
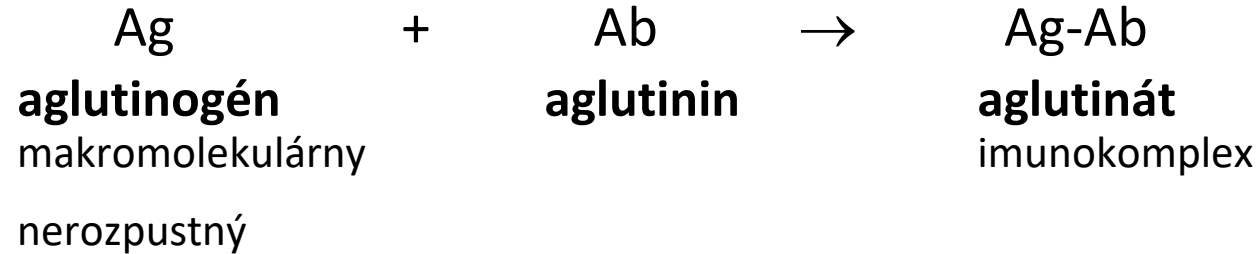
- 1. Primárna fáza** – rýchla, nepozorovateľná voľným okom
– tvorba imunokomplexov Ag + Ab
– vznik väzby jednotlivých epitopov s väzbovými miestami protilátok
- 2. Sekundárna fáza** – pomalá, pozorovateľná voľným okom
– uplatňuje sa multivalencia Ag a polyvalencia Ab
– vznik priestorového komplexu



Pokiaľ nedochádza k sekundárnej fáze reakcie, je nutné imunokomplexy vzniknuté v primárnej fáze vizualizovať – imunochemické metódy

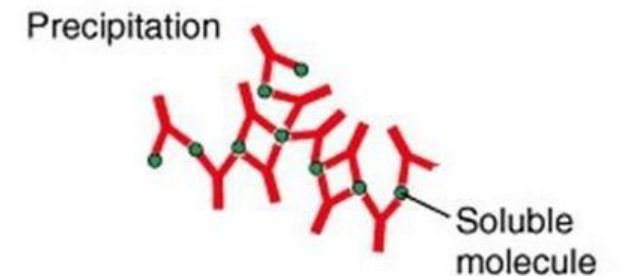
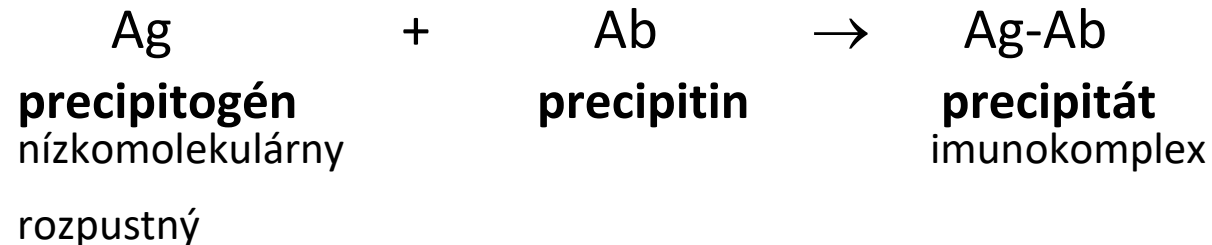
Aglutinácia vs Precipitácia

Aglutinácia (zhlukovanie)



Protilátky namierené proti epitopom antigénnych častíc vytvárajú medzi korpuskulami mostíky, ktoré vedú k vzniku zhlukov (aglutinátov)

Precipitácia (zrážanie)



Reakcia medzi solubilným antigénom a protilátkou s následným vznikom precipitátu (hydrofóbne väzby – nerozpustný komplex)

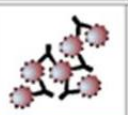

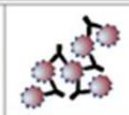

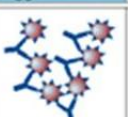


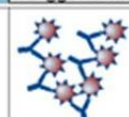
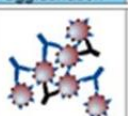
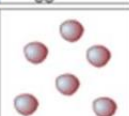
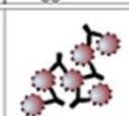
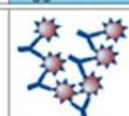

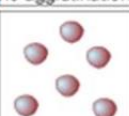


Aglutinácia

1. Priama

- korpuskulárny Ag prirodzene nesie cieľové epitopy
- identifikácia baktérií, hemaglutinácia

2. Nepriama

- rozpustný antigén naviazaný na povrchu vhodných makromolekulárnych častíc (latex)
- stanovenie RF, ASLO

		red blood cells from individuals of type			
serum from individuals of type		AB	O	B	A
A Anti B antibodies					agglutination no agglutination agglutination no agglutination
B Anti A antibodies					agglutination no agglutination no agglutination agglutination
O Anti A + B antibodies					agglutination no agglutination agglutination agglutination
AB no antibodies to A or B					no agglutination no agglutination no agglutination no agglutination

Krvné skupiny
Systém AB0

Hodnotenie aglutinácie

- **KVALITATÍVNE**

- aglutinácii dochádza / nedochádza (pozitívna / negatívna)

- **KVANTITATÍVNE**

- stanovenie najvyššieho riedenia séra, kedy je ešte badateľná aglutinácia

- titer (titr) = prevrátená hodnota riedenia séra

(riedenie 1:32 → titer 32)

Reumatoidná artritída

- Symetrické zápalové ochorenie kĺbov
- Infiltrácia sinoviálneho tkaniva plazmocytmi, makrofágmi, T a B lymfocytmi
- Produkujú zápalové mediátory, ktoré indukujú tvorbu enzýmov degradujúcich bielkoviny, deštrukcia kĺbu
- muži : ženy 1 : 2-3
- 1 % populácie
- (Špecifickejší diagnostický test ako **RF** je stanovenie CCP (cyklické citrulinové proteíny))



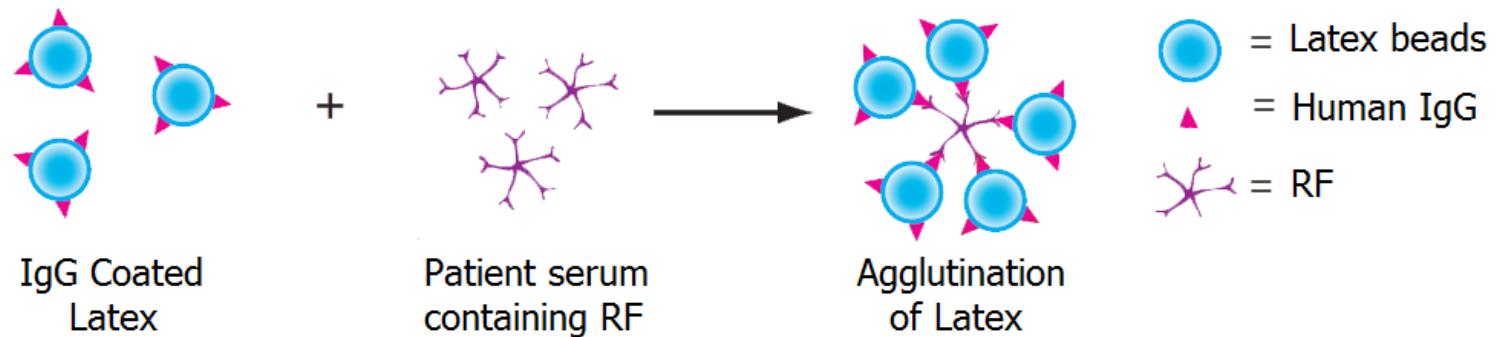
Latex-fixačný test

Reumatoidný faktor (RF)

- **autoproti látka** namierená proti Fc časti IgG molekuly
- prítomný asi u 80% pacientov s reumatoidnou artritídou
- pozitívny je tiež u asi 5-10% chorých s inými systémovými autoimunitnými ochoreniami (autoimunitné hepatitídy, endocarditis lenta)
- môže byť pozitívny i u osôb bez príznakov onemocnenia (vyšší vek)
- diagnosticky najdôležitejší je RF v triede IgM



Princíp testu:



Stanovenie ASLO nepriamou aglutináciou

- ASLO - **A**nti **S**trepto**L**ysin **O** antibodies
- Slúži k stanoveniu protilátok v sére proti Streptolysinu O (exotoxín bakterií z rodu Streptococcus)
- Diagnostika: retrospektivní průkaz proběhlé infekce, popř. sterilních následků onemocnění
- Princíp testu:
 - streptolysin O je naviazaný na povrchu latexových častíc
 - pokiaľ sú v sére pacienta prítomné protilátky proti streptolysínu, dôjde k ich naviazaniu na streptolysín na latexových časticiach, aglutinácia častíc, ktorá je okom pozorovateľná

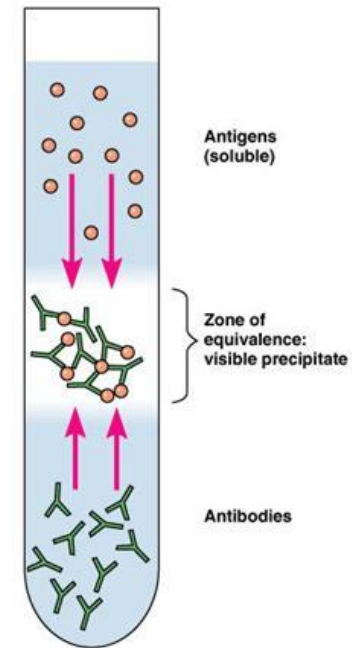
Precipitácia

1. V géle

- Jednoduchá RID
- Dvojitá RID

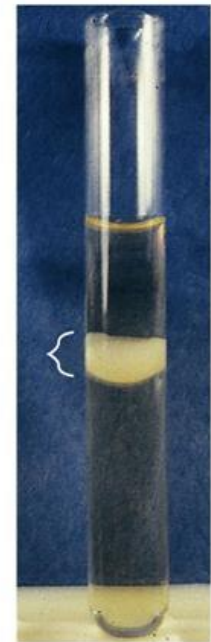
2. V tekutom prostredí

- Nefelometria
- Turbidimetria



(a)

Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.



(b)

Precipitácia v géle

- Prostredie – agaróza gel
- Je založená na pasívnej difúzii látok v prostredí - koncentračný gradient
- Ag aj Ab difundujú gélom a v mieste, kde koncentrácie Ag i Ab dosiahnu optimálneho (ekvimolárneho) pomeru vzniká precipitát



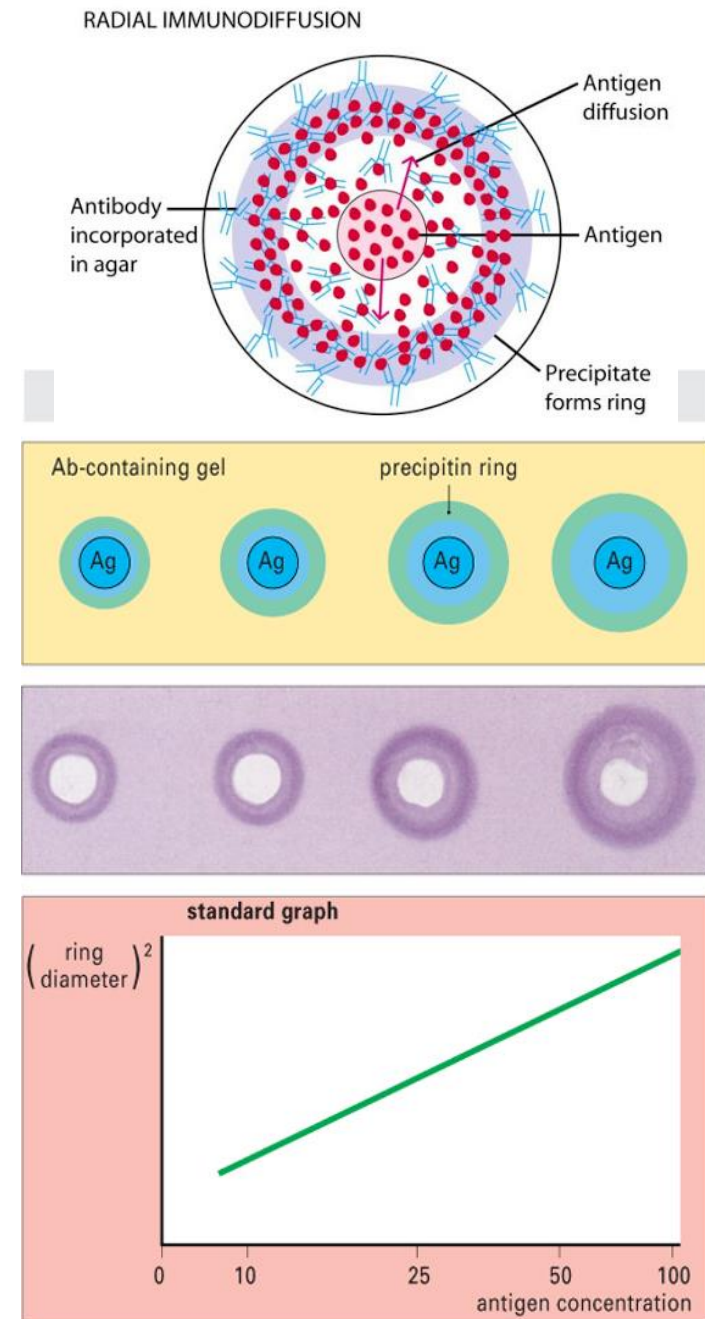
Radiálna imunodifúzia

- Pomocou RID je možné stanoviť koncentrácie mnohých bielkovinových súčastí séra
- Metodika sa v minulosti používala pri meraní hladín celkového IgG, IgA, IgM, zložiek komplementu alebo rôznych proteínov akútnej fáze- väčšina týchto vyšetrení je dnes automatizovaná a prevádzaná na princípe **nefelometrie**
- Stanovenie **C2 a C5** zložiek komplementu

Podľa počtu difundujúcich reaktantov

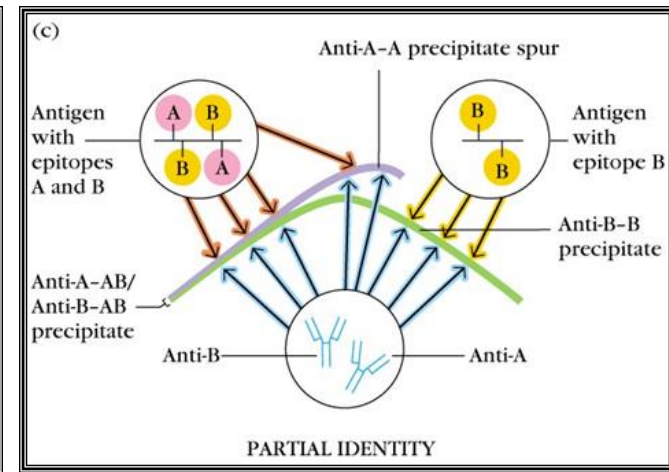
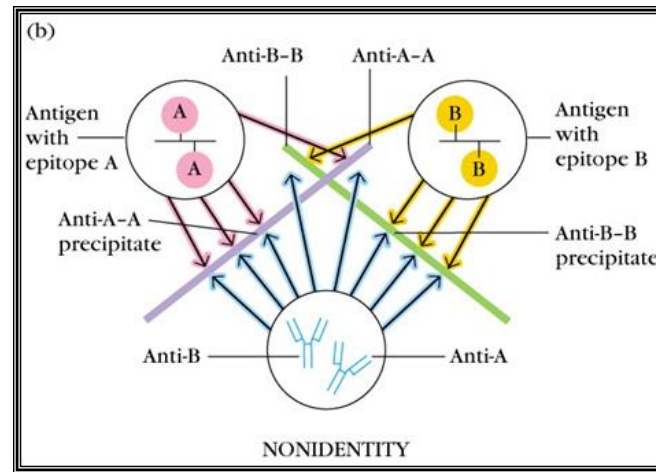
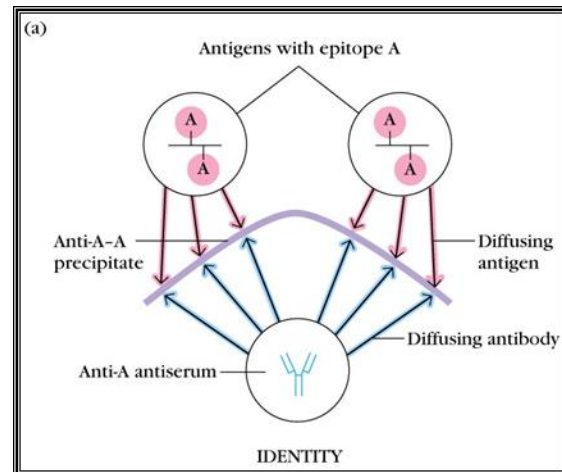
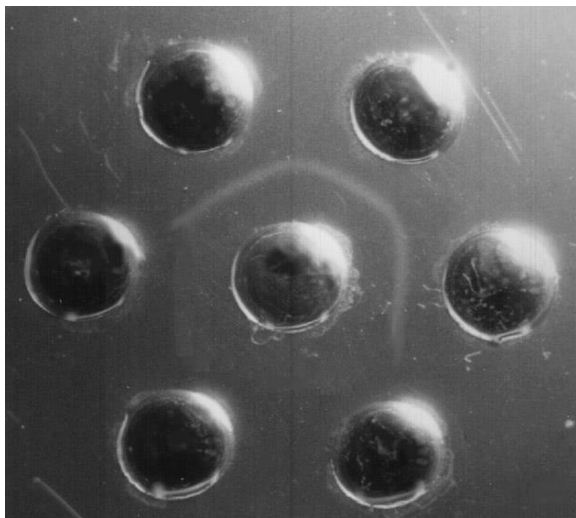
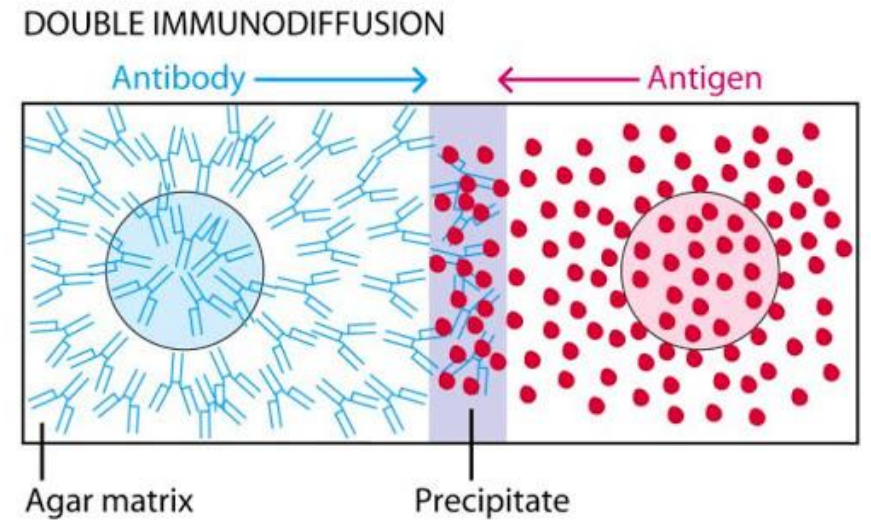
- Jednoduchá RID

- koncentračný gradient jedného z reaktantov (väčšinou Ag)
- druhý reaktant (väčšinou Ab)- rovnomerne rozptýlený v štruktúre gélu
- výsledkom sú ostro ohraničené krúžka precipitátu
- plocha prstenca = úmerná koncentrácii vyšetrovaného Ag
- podľa konc. štandardu – kalibračná krivka



- Dvojitá RID (podľa Ouchterlonyho)

- sledujeme antigennú príbuznosť antigénov
- gradient vytvára ako Ag, tak Ab a dochádza k protismernej difúzii oboch reaktantov
- v zóne ekvivalencie – precipitačná línia, ktorá ukazuje na pozitivitu reakcie
- hodnotenie: kvalitatívne



Precipitácia- v tekutom prostredí

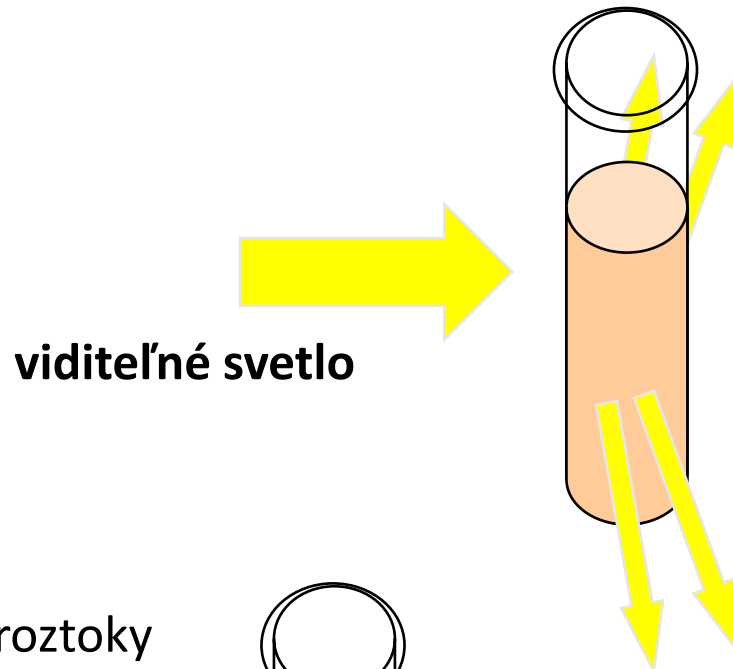
- Využíva sa efekt, že pri reakcii Ag-Ab vzniká zákal- precipitát, ktorého intenzita je pri konštantnom množstve pridanej protilátky úmerná pridanej koncentrácii vyšetřovaného antigénu
- Meranie intenzity zákalu: nefelometria, turbidimetria
- Obe metodiky umožňujú kvantitatívne stanovenie obsahu proteínov vo vzorke odčítaním z kalibračnej krivky

Precipitácia v tekutom prostredí

nefelometria je 5-10x citlivejšia
a nákladnejšia ako turbidimetria

Nefelometria

- vhodná pre nižšie koncentrácie

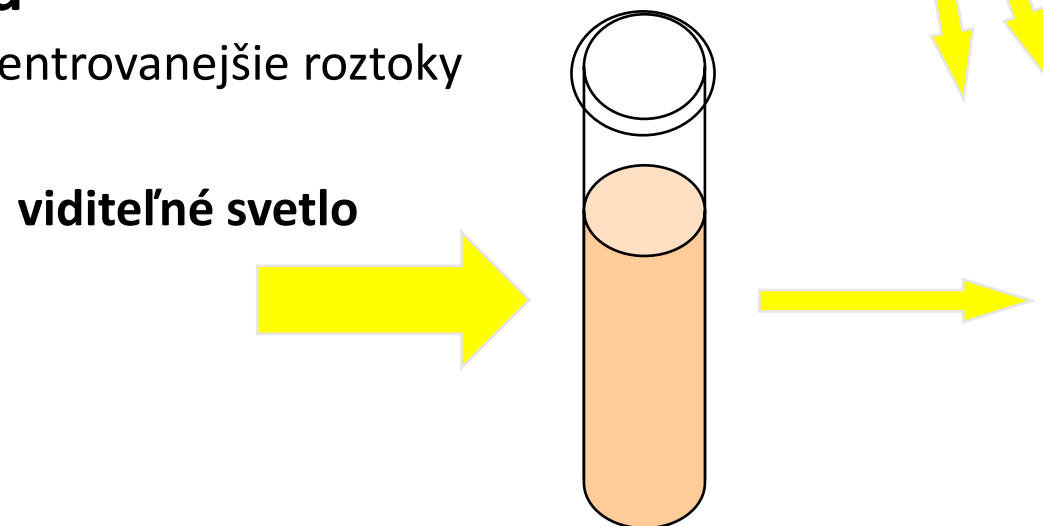


detektor je v smere kolmom na vstupujúci lúč

Meria množstvo svetla rozptýleného pri prechode lúča (množstvo svetla odrazeného od vznikajúcich komplexov)

Turbidimetria

- Vhodná pre koncentrovanejšie roztoky

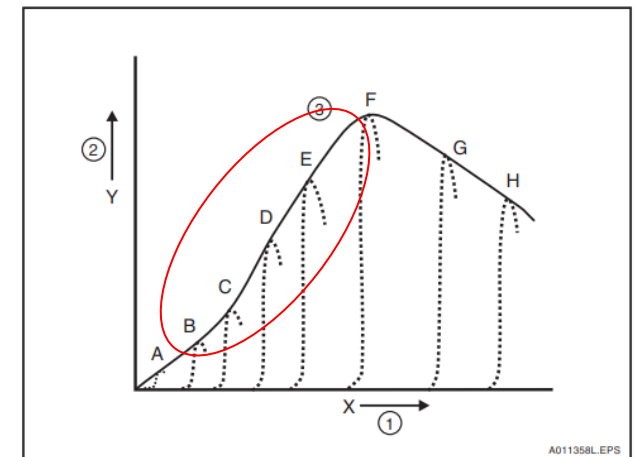


detektor je v ose lúča

Meria množstvo prechádzajúceho svetla (úbytok intenzity svetla, ktoré prešlo roztokom v kyvete)

Nefelometria a turbidimetria

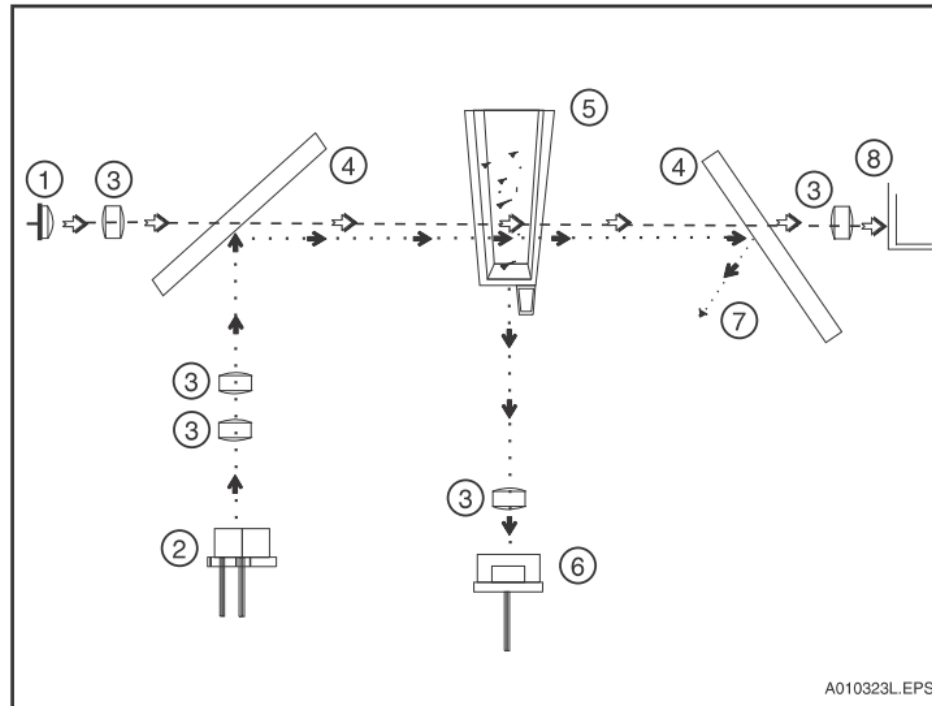
- Reakcie založené na meraní množstva imunitných komplexov vytvorených interakciou špecifických protilátok s antigénom
- Stanovenie sérových bielkovín
- Meranie prebieha v tekutom prostredí v meracej kyvete (pufr, látka urýchľujúca reakciu, Ag, Ab)
- Množstvo vytvorených komplexov je úmerné koncentrácii Ag



Konstrukce nefelometru Immage 800

Nefelometr – zdrojem světla je laser - vlnová délka 670nm

Turbidimetr – zdrojem světla je LED dioda o vlnové délce 940nm



Turbidimetr – měří úbytek prošlého světla - turbiditu

Nefelometr – měří přírůstek odraženého světla od imunokomplexů pod úhlem 90° (Tyndalův jev)

1. LED light source (turbidimetric)
2. Laser light source (nephelometric)
3. Focus lens
4. Beam splitter
5. Reaction cuvette
6. Nephelometric detector (90° angle to incident laser beam)
7. Laser light bounces into light trap
8. Turbidimetric detector (0° angle to the incident LED beam)

Beckman Coulter IMMAGE 800

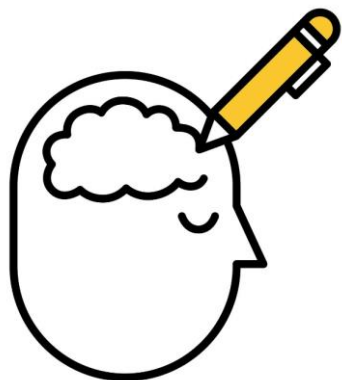
- Stanovenie koncentrácie:
- Stroj I:
 - imunoglobulíny: IgG, IgA, IgM (g/l)
 - proteíny akútnej fáze: CRP (mg/l)
 - (RF+ASLO)
- Stroj II:
 - imunoglobulíny: IgM, IgG1,2,3,4
 - zložky komplementu: C3, C4, C1q
 - proteíny akútnej fáze: A1AT (alfa 1 antitr OROSO (orosomukoid), A2M (alfa 2 makroglobulin), CPL (ceruloplasmin), TRF (transferin), PREA (prealbumin)



www.beckmancoulter.com/en/products/protein-chemistry/immune-800

Siemens BNII

- Stanovenie koncentrácie:
 - imunoglobulíny: IgE (IU/ml), IgD, IgA1, IgA2, IgAp (nízke koncentrácie)
 - zložky komplementu: C1 inhibitor
- IgG: 7,5-15,6 g/l
- IgA: 0,82-4,53 g/l
- IgM: 0,46-3 g/l
- IgE: 0-100 kU/l
- CRP: 0-8mg/l



www.healthcare.siemens.com/plasma-protein/systems/bn-ii-system

Dynamika precipitačních reakcí

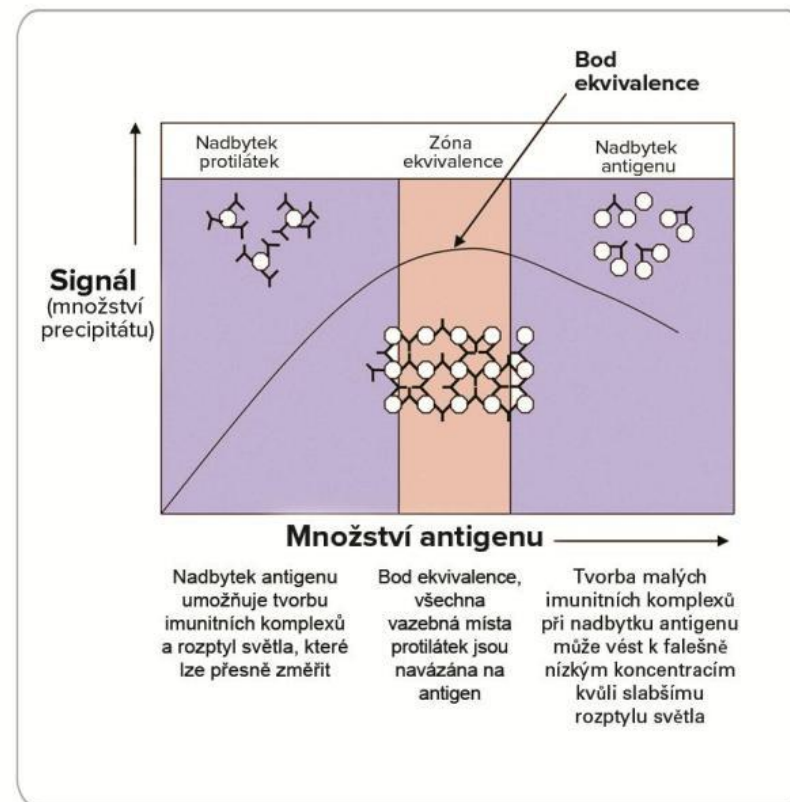
Imunoprecipitační křivka (Heidelberger-Kendallová)

- 1) oblast nadbytku protilátky – měření přístrojem
- 2) Zóna ekvivalence
- 3) Oblast nadbytku antigenu – protilátka spotřebována, imunokomplexy se rozpadají - Hook efekt →

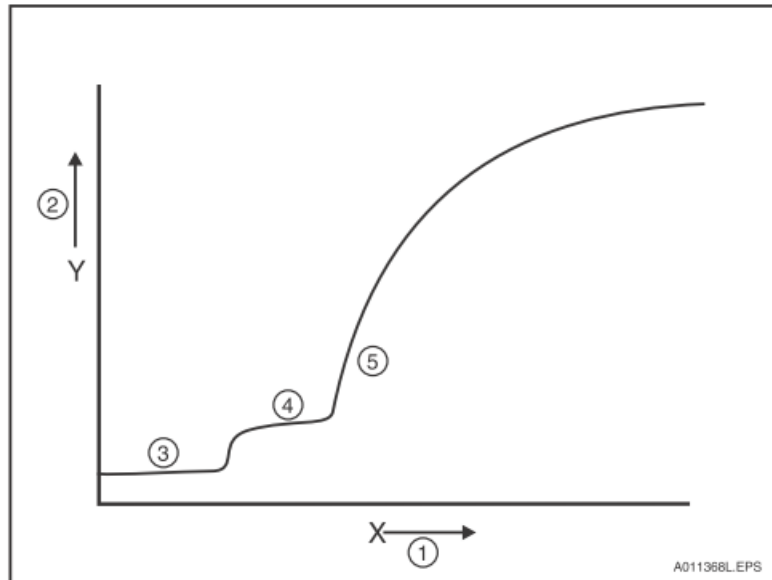


Pro 2 rozdílné koncentrace antigenu lze získat jednu hodnotu absorbance – **riziko falešně nízkých hodnot**

přístroje mají různé postupy, jak Hook efekt rozpoznat

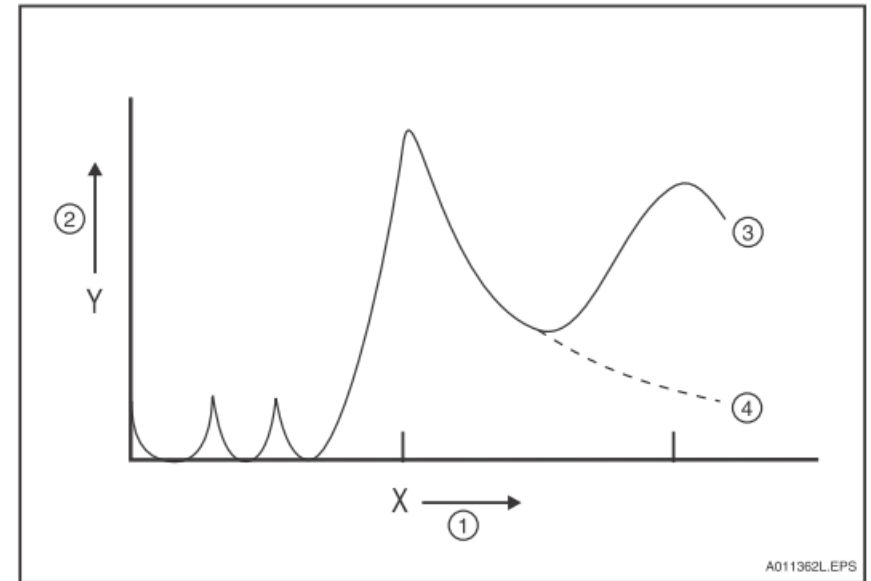


Při nefelometrickém i turbidimetrickém měření musí zůstat zachována podmínka nadbytku protilátky v reakční směsi



- | | |
|----------------------------------|----------------------|
| 1. X = Increasing time | 4. Sample Addition |
| 2. Y = Increasing scatter signal | 5. Antibody Addition |
| 3. Buffer Addition | |

Měření zákalu je relevantní pouze ve vzestupné části křivky – probíhá kinetickým proměřováním vzorku s intervalem 5 vteřin



- | | |
|-----------------------------------|--------------------------------|
| 1. X = Reaction time (in seconds) | 3. Response if antibody excess |
| 2. Y = Rate response | 4. Response if antigen excess |

Po proběhlé reakci přístroj do vzorku přidá opět antigen

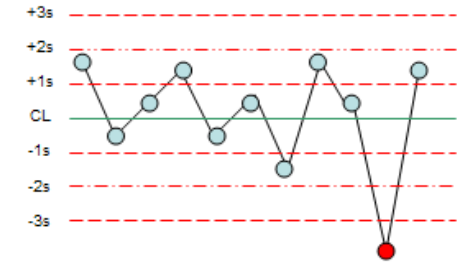
1. Pokud absorbance opět stoupne (3) → měření proběhlo v oblasti nadbytku protilátky (tvoří se nové imunokomplexy) a pro výpočet koncentrace analytu lze použít naměřené hodnoty absorbance a původní ředění
2. Pokud po přidavku antigenu k nárůstu signálu nedojde (4), → protilátka byla spotřebována (mnoho antigenu) – analýza musí být opakována s vyšším ředěním vzorku

Denná prax na analyzátoch

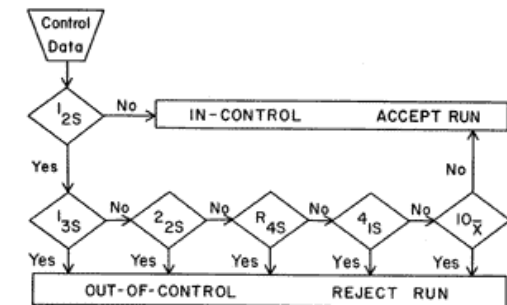
- Provozný denník
- Údržba analyzátorov:
 - denná/týždenná/mesačná
- Kalibrácie:
 - 1 krát do mesiaca / pri zmene šarže reagensí
 - kalibračná krivka
- Kontroly IKK:
 - každý deň, pred zahájením merania patientskych vzoriek
 - viazané na metódu, jedno-/viac-úrovňové (hladina normálna a patologická)
 - referenčné medze
- Kontroly EHK (SEKK- systém externí kontroly kvality):
 - podľa časového plánu
 - zasielané z externého laboratória (nie je známa výsledná koncentrácia)
 - prevedie sa meranie → Výsledky sa vo forme protokolu odošlú späť organizátorovi
 - organizátor porovná výsledky meraní jednotlivých laboratórií a spätne ich informuje o úspešnosti
 - medzi-laboratórne porovnávacie skúšky

IKK:

Levey-Jenningsův diagram – sledování kontrol v čase



Westgardova pravidla – detekce chyb v analytické proceduře (schválení x zamítnutí analytické série)



Priebeh vzorky

- Sérum = odběr srážlivé krve
- Alikvotácia vzorky
- Vytvorenie pracovného listu pre jednotlivé analyzátory = zoznam vzoriek
- Analyzátor = vzorka + špecifické antisérum + pufr (stabilizácia a urýchlenie reakcie)
- Analyzátor prepojený s LIS (laboratórny informačný systém)= získa informácie o potrebnom meraní + výsledok automaticky odošle

Interpretácia výsledkov

- Výsledky sú pred vydaním viacnásobne kontrolované
- Pozor:
 - falošná pozitivita (malá špecificita testu)
 - falošná negativita (malá senzitivita testu)
- *Hladina imunoglobulínov IgG, IgA, IgM (g/l):*
 - ↑ - zápalové procesy infekčného pôvodu
 - jedna trieda = myelóm; monoklonálna gamapatia
 - zvyšovanie s vekom
 - ↓ - poruchy tvorby = imunodeficity
 - lymfomy, leukémie, myelomy, následkom liečby

Interpretácia výsledkov

- *Hladina IgE (IU/ml):*
 - ↑ - alergické stavy prvého typu precitlivenosti
 - parazitárne choroby
 - autoimunity, imunodeficiencie
- *Vyšetrenie komplementového systému (sérová hladina C3 a C4 (g/l), C1-INH)*
 - ↑ - zápalová aktivita (zriedka)
 - ↓ - vrodená / získaná porucha tvorby (jaterné selhání; zvýšená spotreba- tvorba imunokomplexov; hereditárny angioedém)

Interpretácia výsledkov

- *Reaktanty akútnej fázy*

- ↑ - akútna zápalová reakcia = opsonizační a prozánětlivý efekt
 - regulačná funkcia; prenášače iontov; hemokoagulácia

CRP (mg/l)

- ↑ - bakteriálne infekcie
 - infarkt myokardu, pooperačné obdobie
 - reumatické choroby

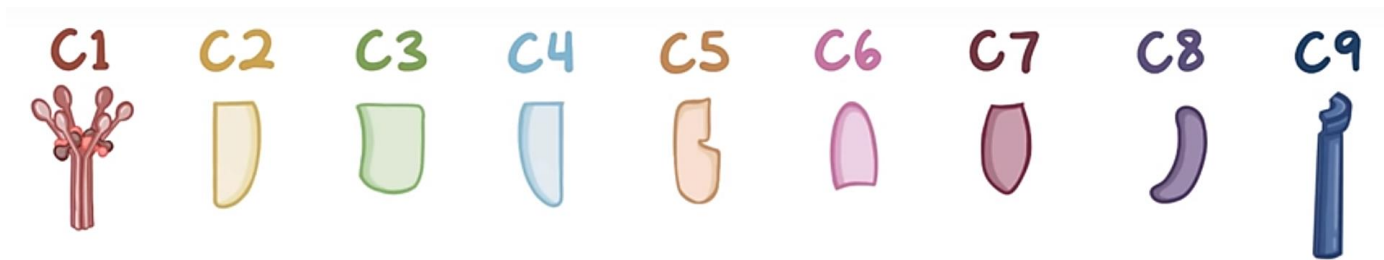


Vyšetření funkce komplementu

Mgr. Julie Štíhová
FN u Sv. Anny v Brně

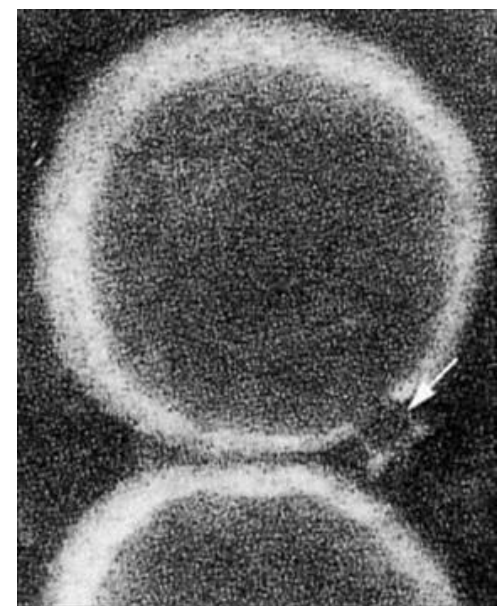
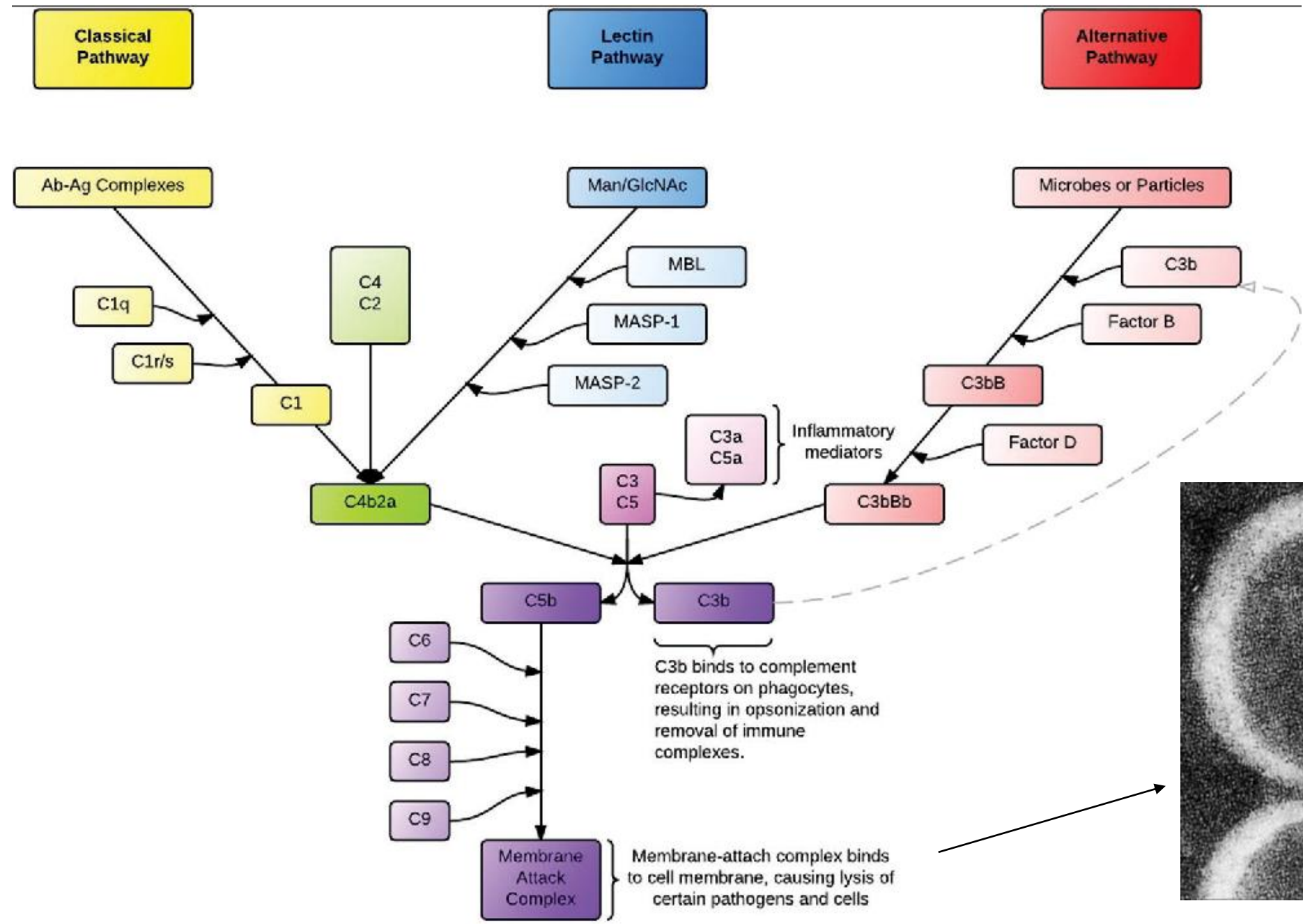
Komplement

- Složka nespecifické humorální imunity - humorální
- Systém několika desítek proteinů, většina tvořena v játrech
- Velmi rychlá aktivace
- Silné zánětotvorné a lytické účinky



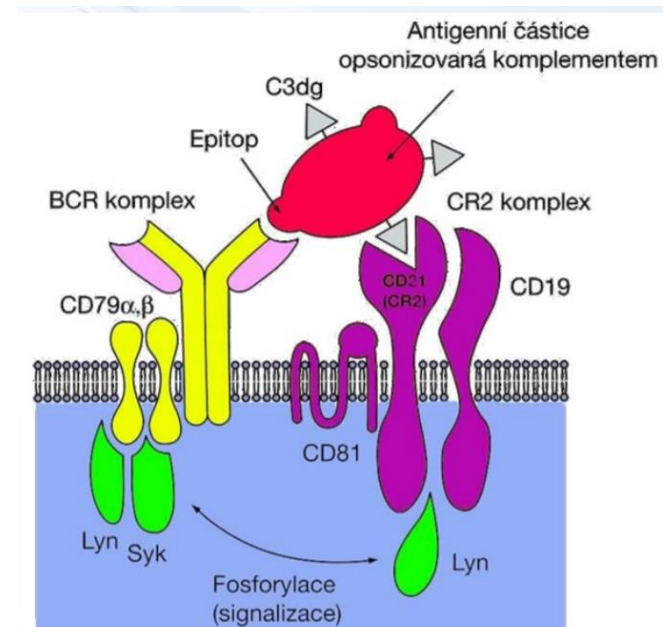
Komplementový systém tvoří:

- Centrální proteiny C1-C9
- Komplementové receptory na buňkách
- Stabilizátory komplementu
- Inhibitory komplementu
 - Solubilní
 - Membránově vázané



Komplement

- Aktivovaný komplement podporuje:
 - Rozvoj zánětlivé reakce (anafylatoxiny – C3a, C4a, C5a)
 - Oponizace antigenních částic – podpora fagocytózy (C3b, C4b)
 - Chemotaxe (C3a, C5a, komplex C5,6,7)
 - Lýza buněčných membrán (C5b-C9 – MAC)
- Odstraňování imunokomplexů z cirkulace (C3b, C4b)
- Adaptivní imunita – Zesílení signalizace na B lymfocytech → imunokomplexy s C3dg – přemostění CD21 a BCR



Regulace komplementu

○ Aktivovaný komplement má silný amplifikační potenciál, nutná důsledná regulace

1) Regulátory pozitivní:

- Properdin (faktor P) – stabilizace alternativní C3 konvertázy

2) Regulátory negativní

a) Solubilní:

- **C1 inhibitor (C1INH)**
- Faktor H
- Faktor I

b) Membránově vázané:

- Decay accelerating factor – DAF (CD55)
- Membrane cofactor protein – MCP (CD46)
- Protektin (CD59)

Když ochrana chybí...

- Za normálních okolností jsou RBC chráněny inhibitory komplementu, které exprimují na svém povrchu
- Mutace genu pro GPI kotvu v hematopoetické kmenové buňce → na povrchu RBC deficit proteinů, které jsou normálně pomocí GPI kotvy vázány
 - DAF (CD55) – inhibice aktivace C3 a C5
 - Protektin (CD59) – inhibice aktivity MAC (C5b-C6-C7-C8-C9)
- RBC citlivé ke stopovým množstvím aktivovaného komplementu

Paroxysmální noční hemoglobinurie



PNH RBC²
PNH RBC's lack a specific component that is essential in protecting RBC's from destruction



Complement Attack²
Without this protein, some RBCs can be destroyed by complement, that is part of the body's immune system



PNH RBC Lysis (haemolysis)²
PNH RBCs are destroyed, and the contents are released into surrounding plasma (yellow-coloured liquid component of blood).

Hereditární angioedém

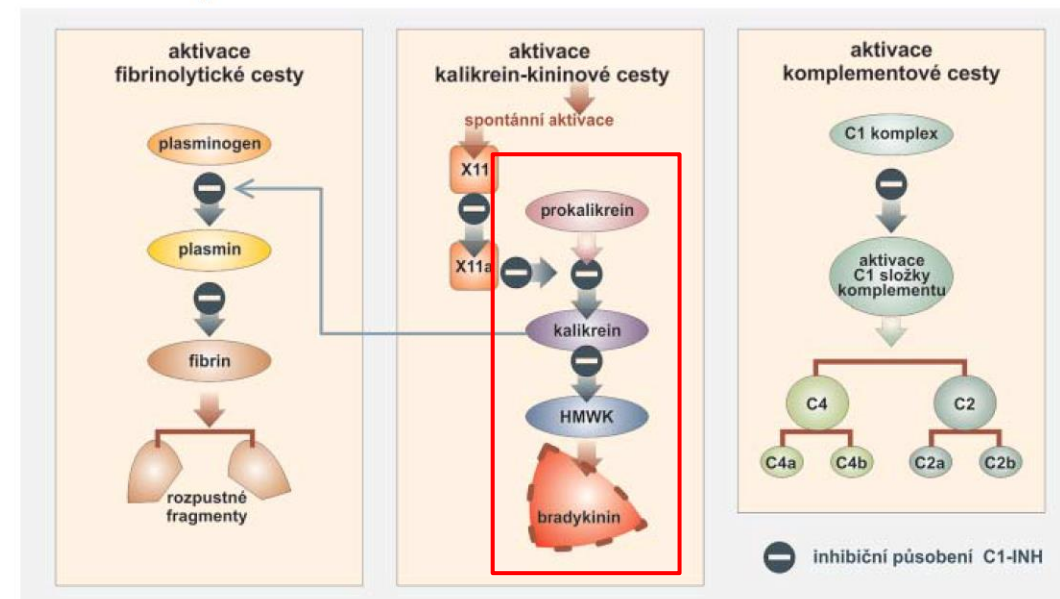
- Způsoben deficitem C1 inhibitoru (C1 INH) – který inhibuje serinové proteázy C1r, C1s, C1q
- **Důsledek:**
 - 1)** aktivace klasické cesty komplementu – provokující faktor (menstruace, stomatologické zákroky, infekce...)
 - 2)** nedostatečná regulace kininového systému (C1 INH inhibuje i kalikrein)

- **Mechanismus:**

C1 INH není schopen dostatečně tlumit přeměnu prekalikreinu na kalikrein →

Kalikrein štěpí vysokomolekulární kininogen na bradykinin → vazodilatace, zvýšená permeabilita cév (lokálně) → vznik **nezánětlivého edému**

Obr. 1. Inhibiční působení C1 inhibitoru



Hereditární angioedém

- **Klinický obraz:**

- Epizodické otoky, edémy – podkoží, pod sliznicí
- Bledá barva, nesvědivé, bez lokální zvýšené teploty
- Mohou být bolestivé – napětí ve tkáních
- Většinou se vyvíjejí postupně – 12-36h
- Otoky nereagují na antihistaminika/kortikosteroidy
- Potenciálně smrtící onemocnění – otok v oblasti krku (udušení)



Hereditární angioedém

- **Typ 1:** porucha tvorby C1INH, 85% nemocných
 - Snížení C1INH na 12-50%, C3 v normě, snížené C2 a C4
- **Typ 2:** Funkční porucha C1INH
 - C1INH může být snížený, v normě i zvýšený, ale je funkčně neaktivní, snížené C2 a C4
- **Typ 3:** estrogen dependentní – mutace FXII:
 - bez abnormalit v množství a funkčnosti C1INH

Obr. 4. Složky komplementu u angioedémů indukovaných bradykininem

komplement	HAE - ↓ koncentrace C1-INH	HAE - dysfunkce C1-INH	HAE s mutací genu pro f. XII	získaný angioedém / AAE
C1-INH kvantitativně	↓↓	↑ / N	N	N / ↓
C1-INH funkční	↓↓	↓↓	N	↓
C4	↓↓	↓↓	N	↓↓
C2	↓↓	↓↓	N	↓↓
C1q	N	N	N	↓

*Existuje i **získaný angioedém**, na který je třeba v diferenciální diagnostice myslet – **snížení C1q**:

- 1) Zvýšený katabolismus C1 INH – některá lymfoproliferativní onemocněními
- 2) Autoimunitní onemocnění – vznik autoprotilátek, které blokují aktivní místo C1 INH – ztráta funkce

Deficity složek komplementu

- 1) Deficit C1-C4: častější výskyt pneumonií, pyogenních infekcí, systémové imunokomplexové choroby (SLE-like)
- 2) Deficit C3-C9: Zejména náchylnost k pyogenním infekcím
Deficit C9: Typické opakované meningokokové meningitidy (Neisserie)

Indikace k vyšetření komplementu

- **Deficit některé složky**

- testují se hladiny složek (nefelotmetrie), dále funkční aktivita celého systému (CH50, AH50)

- **Monitorování zánětu**

- Složky komplementu se chovají jako pozitivní reaktanty akutní fáze – ↑↑ koncentrace

- **Monitorování imunokomplexových chorob**

- Silná aktivace komplementu – dochází ke konzumpci jeho složek – ↓↓ koncentrace

- **Podezření na hereditární angioedém:**

- Vyšetření C1 INH + funkční aktivita, složky C2 a C4

Biologický materiál a vyšetření komplementu

- Speciální odběrové zkumavky (bez separátorů)
- Zpracovat krev do 60 min
- Sérum zamrazit (-20°C max. týden, -70°C libovolně beze ztráty aktivity)
- Sérum nesmí být opakovaně rozmražováno a zamražováno

1. Kvantitativní stanovení složek komplementu

○ Vyjádření výsledků – koncentrace g/l, mg/l

1) Nefelometrie – složky C3, C4, C1Q, C1-INH, MBL

2) (ELISA)

3) (Radiální imunodifuze (RID))

- Stanovení C2 a C5 složky komplementu
- V gelu přítomna protilátka proti C2 nebo C5 složce
- Sérum pacienta difunduje do gelu
- V zóně ekvivalence se vytvoří precipitační prstenec
- Čím vyšší koncentrace C2/C5, tím větší průměr prstence



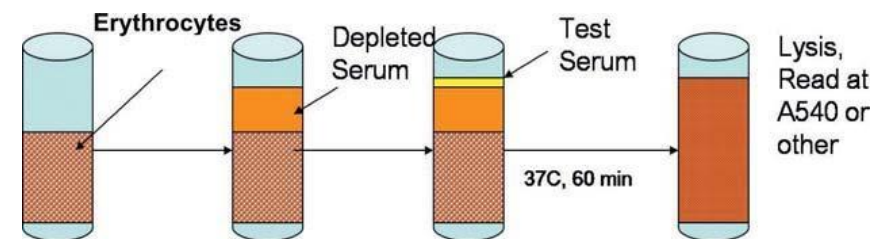
1. Kvantitativní stanovení složek komplementu

- C1q (100-250mg/l)
- C2 (10 – 30 mg/l)
- **C3 (0,7 – 1,5 g/l)**
- **C4 (0,1 – 0,4 g/l)**
- C5 (80 – 170 mg/l)
- MBL (> 0,3mg/l)

- **C1 inhibitor (210 – 390 mg/l)**

2. Funkční vyšetření komplementu

- Funkční hemolytické testy – **CH50** (CH100), AH50
 - Zjištění funkčnosti klasické (CH50) nebo alternativní (AH50) cesty komplementu – formace MAC
 - Projeví se lýzou definované směsi RBC → nárůst absorbance v supernatantu – zbarvení dané HGB
 - Výsledky se vyjadřují v % **aktivace**
- **Pozor:** Se vzorkem pacienta nutno zpracovat i zdravou kontrolu !! (aby bylo pacienta s čím srovnat)



2. Funkční vyšetření komplementu - Hemolytický test CH50

- Screeningová metoda
- Zjištění funkčnosti klasické cesty aktivace komplementu – formace MAC
- Detekce **snížené** funkce komplementu
- Výsledky se vyjadřují v **% aktivace**
- Sérum zpracovat do 1 hodiny

- Proč CH50?

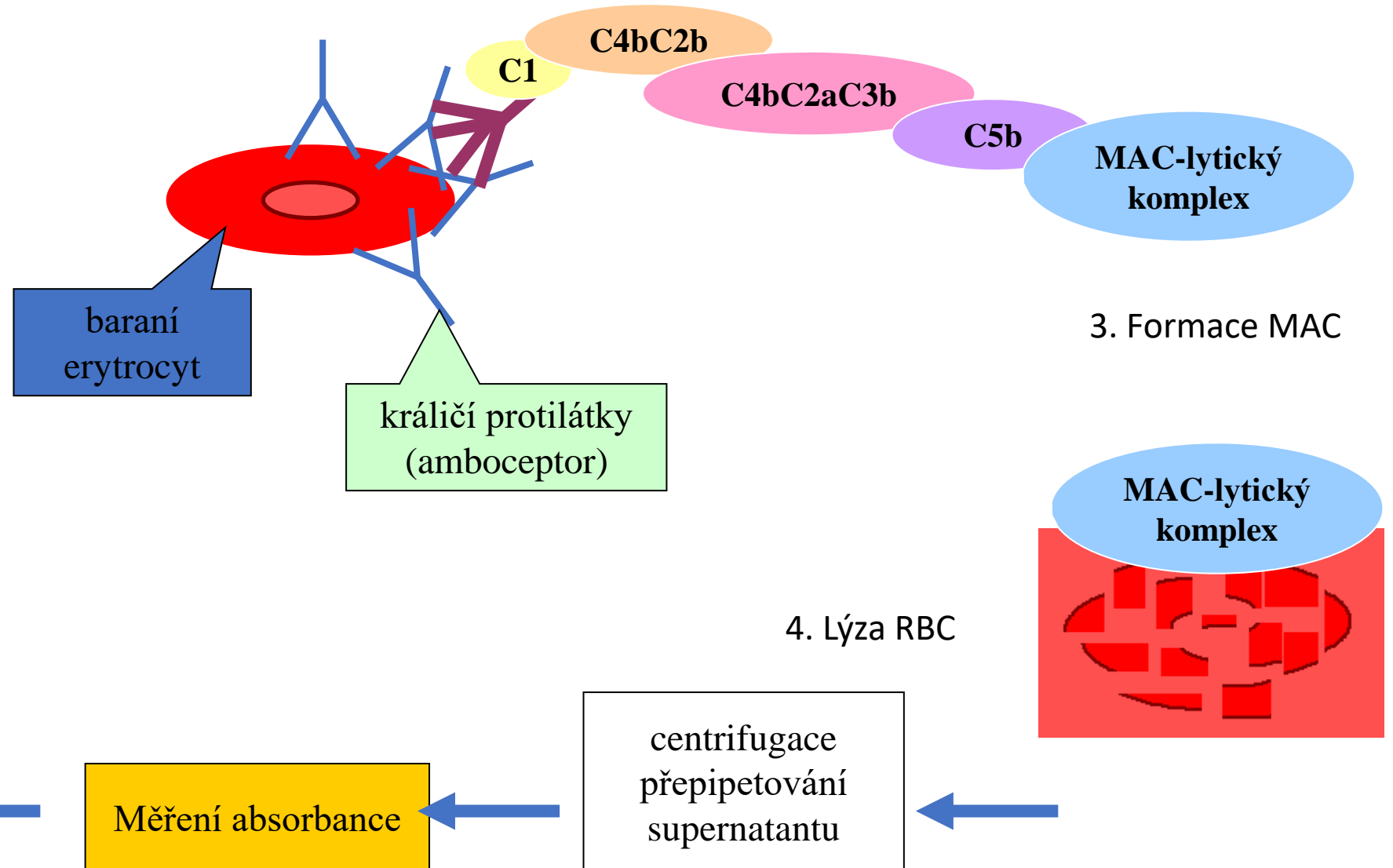
Jednotka CH50

Množství séra, které za standardních podmínek způsobí 50% lýzu definované suspenze beraních erytrocytů - 30 min, 37 stupňů

Princip testu CH50

2. Aktivace komplementu (C1)

1. Hemolytický systém:
Beraní RBC+ králičí protiláka



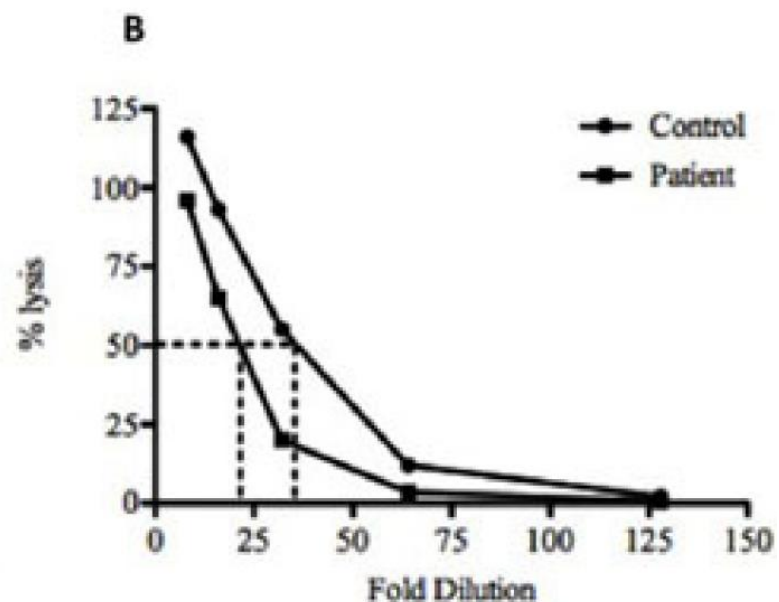
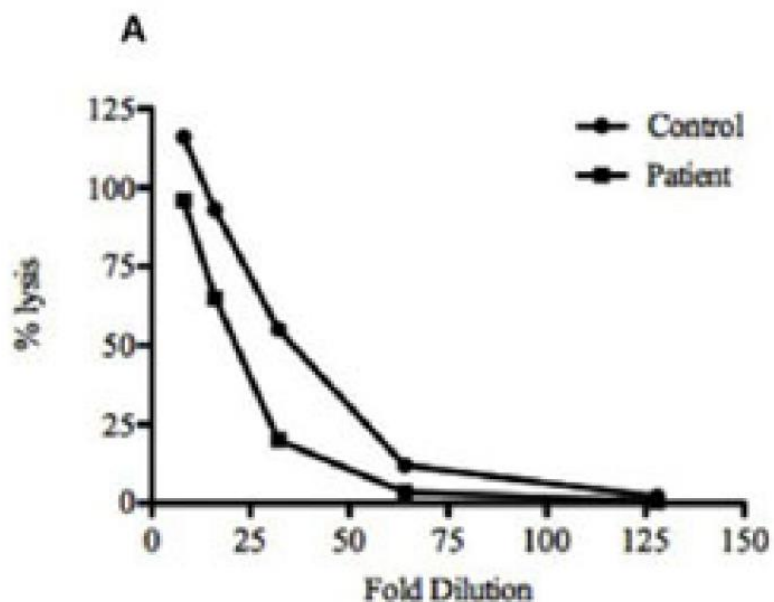
CH50 - hodnocení

Lýza v PBS = 0% - blank

Lýza v H₂O = 100%

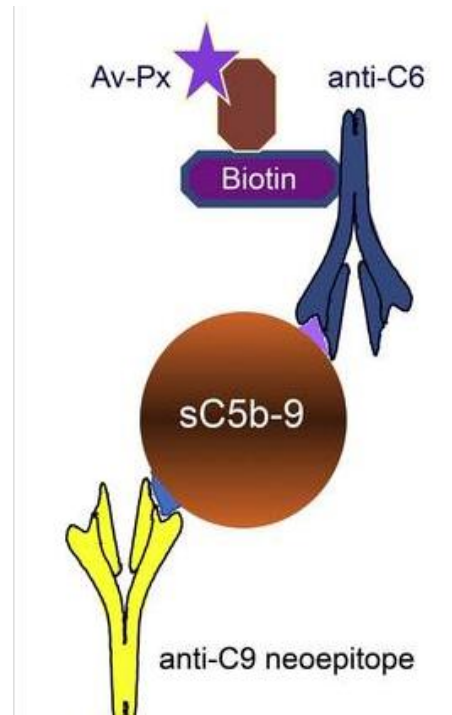
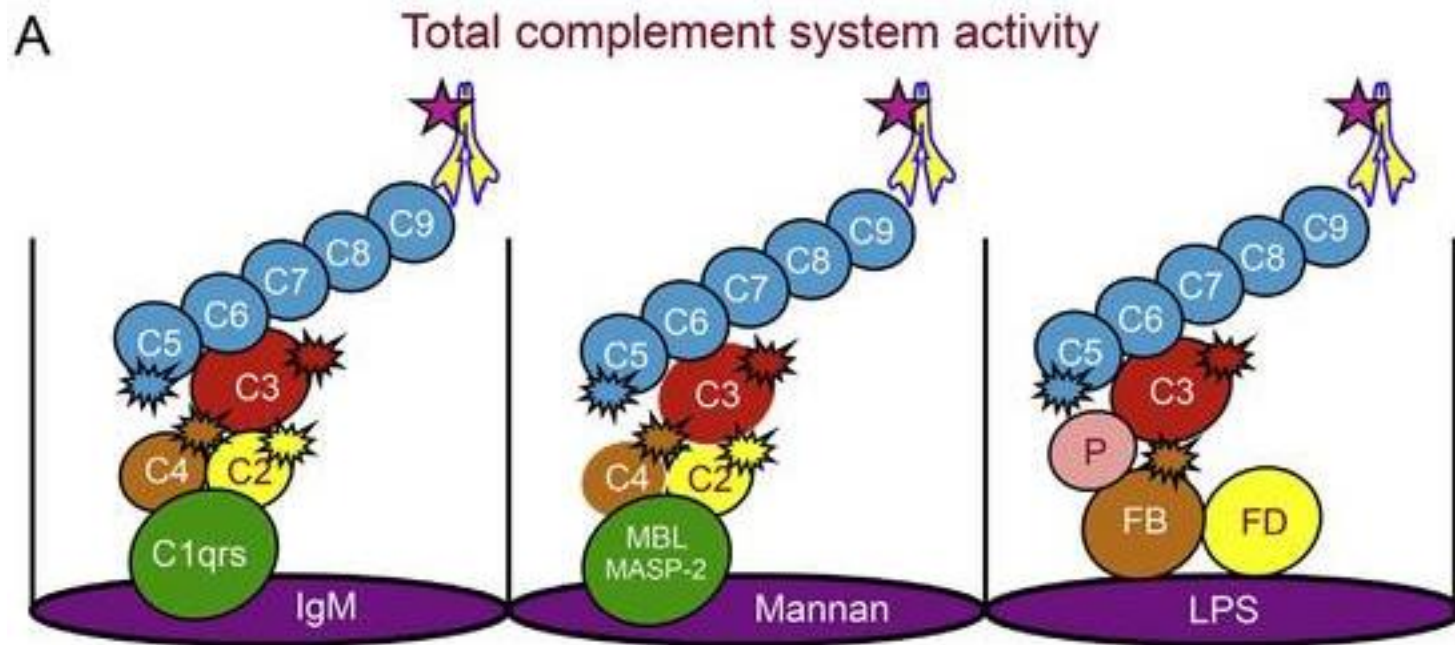
A = absorbance

$$\frac{A \text{ daného ředění} - A \text{ blanku}}{A \text{ 100\% lýzy} - A \text{ blanku}} \times 100 = \% \text{ lýzy pro dané ředění}$$



2. Funkční vyšetření komplementu - ELISA

- V některých laboratořích CH50/AH50 nahrazeno ELISA metodou
- Princip – na dně jamky aktivátor určité cesty komplementu → detekce neoepitopu při formaci MAC



C1-INH funkční test

- Sérum nebo plazma se inkubuje s reaktantem - aktivovanou exogenní složkou C1s (je součástí setu), která je vazebným místem pro C1-INH
- Pokud je C1INH funkční, naváže se na C1s
- Následuje odmytí nenavázaných složek
- Do jamky se následně přidá konjugát - kozí protilátka proti lidskému C1-INH - značená křenovou peroxidázou (přeměna substrátu na barevný produkt)
- Spektrofotometrie - určí množství navázaného C1-INH (↑ zbarvení)
- Nefunkční C1INH – ke zbarvení nedojde, protože se neutvořily detekovatelné komplexy C1s-C1INH

