

IMUNOCHEMICKÉ TESTY

přehled a principy metod

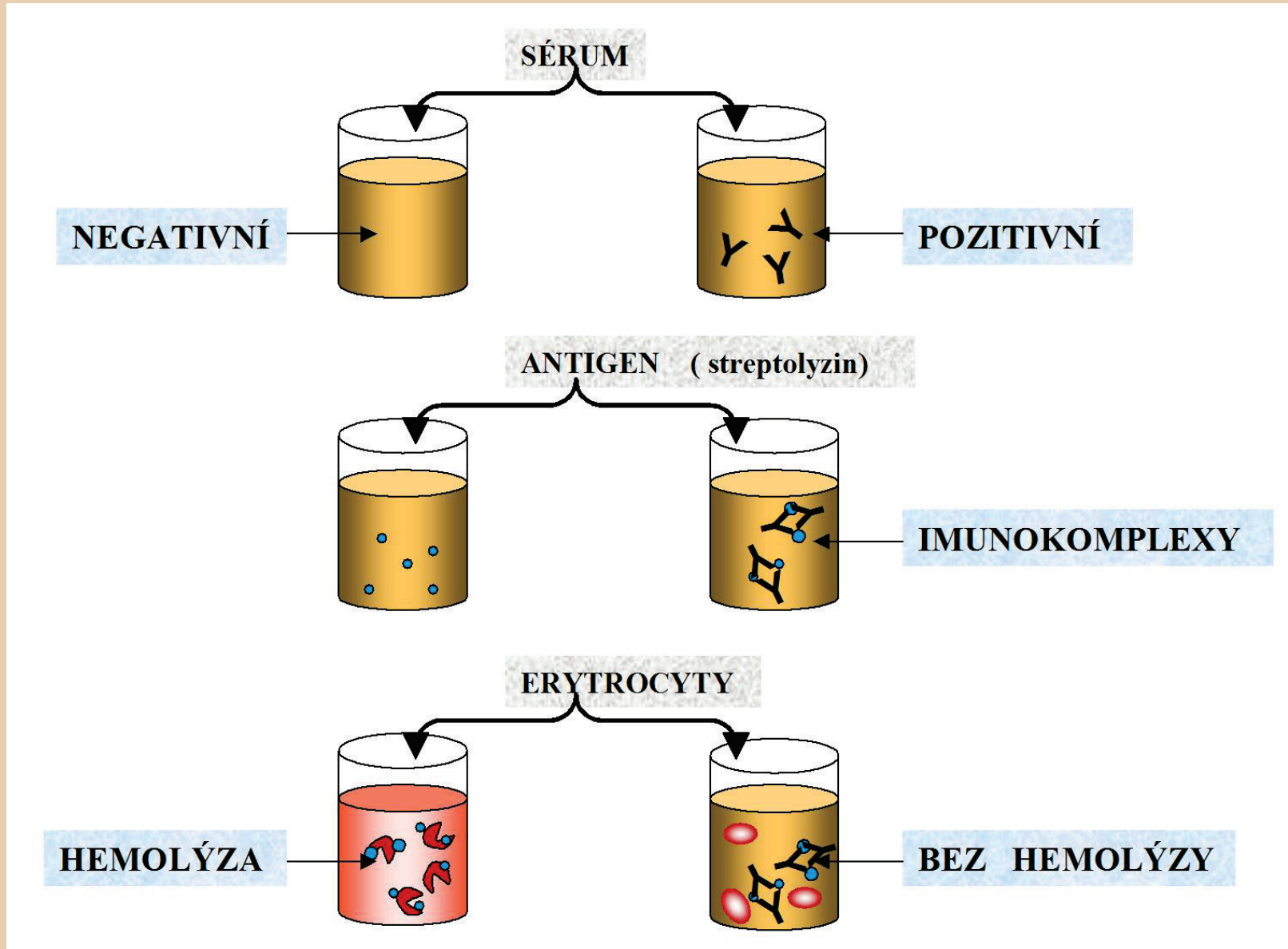
2. část hemolytické testy

3. ročník Klinická biologie a chemie

TEST INHIBICE HEMOLÝZY (*NEUTRALIZAČNÍ TEST*)

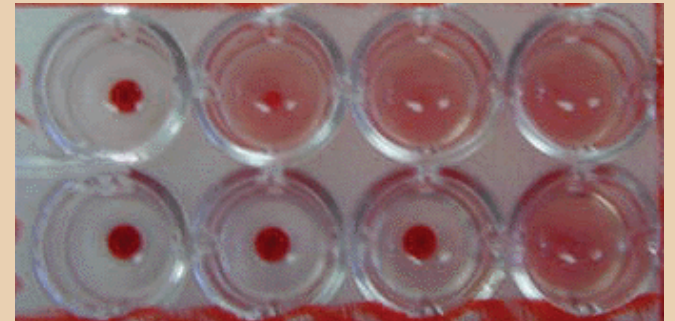
- **ASLO** (*antistreptolysin O, ASLO*) – destičky typu **U**
- **infekce *Streptococcus pyogenes***
(*β hemolytický streptokok skupiny A*)
- **sterilní následky streptokokových nákaz**
(*revmatická horečka, glomerulonefritida*)
- **provedení:**
SLO (*streptolysin O*) hemolyzuje erytrocyty in vitro,
v přítomnosti protilátek dochází k zábraně hemolýzy
- **test inhibice hemolýzy** (*neutralizační test*)
- **kvantitativní test** (*U/ml*)
- **hodnocení: >200, dynamika** (*párové vzorky*)
- **alternativa – stanovení ASLO nefelometricky**

STREPTOLYZIN (ASLO) - inhibice hemolýzy



Komplement fixační test

Komplement-fixační reakce je serologická metoda, při které se přítomnost protilátek proti příslušnému antigenu prokazuje vyvazováním komplementu na komplexy Ag-Ab.



Princip reakce lze popsat ve 4 krocích

1. vyšetřované sérum inaktivované se smíchá se specifickým antigenem

Poz.: vzniknou komplexy antigen-protilátka

Neg.: komplexy antigen-protilátka nevzniknou

2. přidá se morčecí komplement (tradičně nazývaný **ALEXIN**)

Poz.: komplement se vyváže na komplexy antigen-protilátka

Neg.: komplement se nevyváže a je nadále aktivní

3. mimo reakci se připraví tzv. **Hemolytický systém**, t.j. ovčí krvinky s navázavými protilátkami proti těmto (zdrojem protilátek je obvykle králičí antisérum proti ovčím krvinkám tradičně nazývané **amboceptor**) – tzv. **senzibilizované ERY**

4. do reakce se přidá hemolytický systém

Poz.: komplement je vyvážen a neaktivní a nedojde k hemolýze

Neg.: komplement se vyváže na hemolytický systém (vlastně komplexy antigen-protilátka) a dojde k hemolýze

Komplement fixační test

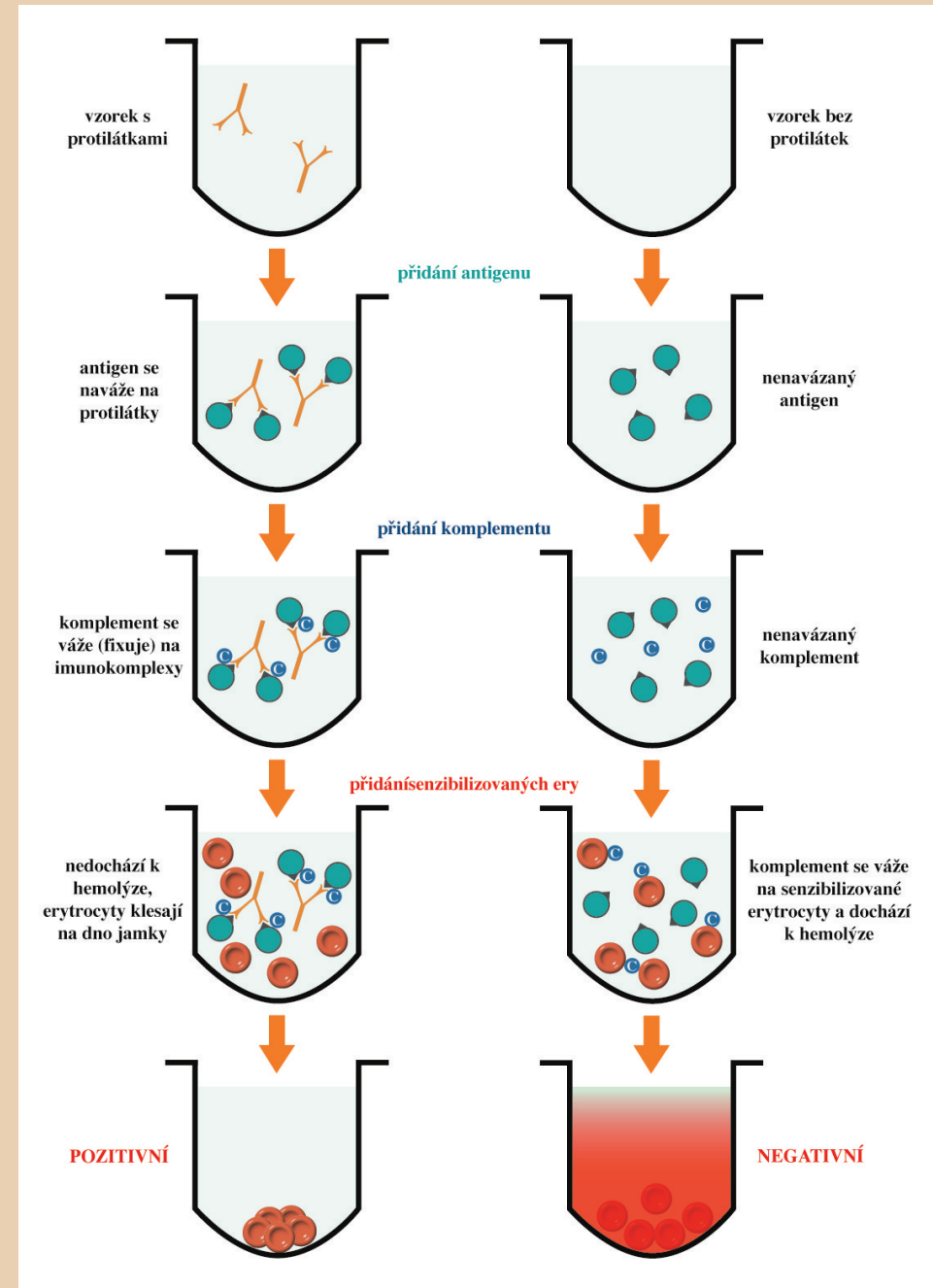
HODNOCENÍ

Většinou se reakce hodnotí pouze kvalitativně a provádí se v několika ředěních séra. Jako výsledek se udává nejvyšší ředění séra (tzv. titr, tradičně ve formě 1:xxx) při kterém **ještě nedošlo** k hemolýze.

Výhody - nízká cena a nenáročnost na vybavení laboratoře - vysoká citlivost (cca 0.1 ug)

Nevýhody - nemožnost rozlišit jednotlivé třídy protilátek - náročnost provedení a pracnost - používání nepřesně definovaných a nestandardních reagensí

Dnes metoda postupně nahrazována jinými metodami



CH50 a AH 50 testy funkce komplementu

Hemolytický test komplementu je test, kterým se zjišťuje aktivita komplementového systému v séru.

Hledá se ředění vyšetř. séra, které za definovaných podmínek způsobí určitý stupeň hemolýzy erytrocytů. Provedení v **jamkách mikrotitrační destičky** nebo **provedení v gelu s ERY.**

Aktivita komplementového systému může být testována **klasickou cestou (CH50)** a **alternativní cestou (AH 50).**

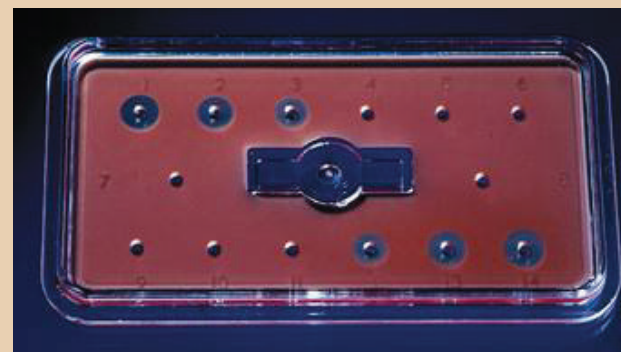
Klasická cesta předpokládá, že erytrocyty jsou senzibilizovány protilátkami proti erytrocytům a aktivace komplementu probíhá na takto vytvořených komplexech antigenů erytrocytární membrány s těmito protilátkami.

Nejčastěji je používán hemolytický systém skládající se z ovčích erytrocytů a králičího séra obsahujícího protilátky proti těmto erytrocytům (**amboceptoru**).

Nejčastěji se zjišťuje ředění séra, které za definovaných podmínek v definovaném systému způsobí přesně 50% hemolýzu a toto ředění odpovídající aktivitě komplementu se vyjadřuje v jednotkách CH50.

AH 50

test funkce komplementu



Při testování aktivity komplementu alternativní cestou se používají jako detekční systém čerstvé nesesenzibilizované králičí nebo morčecí erytrocyty.

Klasická cesta aktivace se **vyřazuje přidáním** triplexu **VI - EGTA** (kyselina ethylen glykol bis-(β -aminoethyl ether) N,N,N',N'-tetraciová), který vyvazuje Ca^{2+} ionty potřebné k aktivaci komplementu klasickou cestou, ale ne alternativní cestou, do reakčního media.

EGTA tedy na rozdíl od **EDTA** nevyvazuje **hořčnaté ionty, které jsou zapotřebí** pro klasickou i alternativní cestu a blokuje tak pouze klasickou cestu aktivace komplementu.

Aktivita komplementu měřená alternativní cestou se pak vyjadřuje v jednotkách AH50, zjišťuje-li se ředění séra potřebné pro 50% hemolýzu.