

Klasické serologické metody

aglutinace / precipitace, RID, nefelometrie / turbidimetrie

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**

- odber, príprava, spracovanie vzorky pred zahájením laboratórneho vyšetrenia
- skladovanie, transport

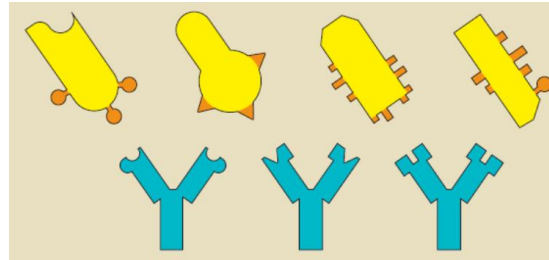
- **Analytická fáza**

- 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



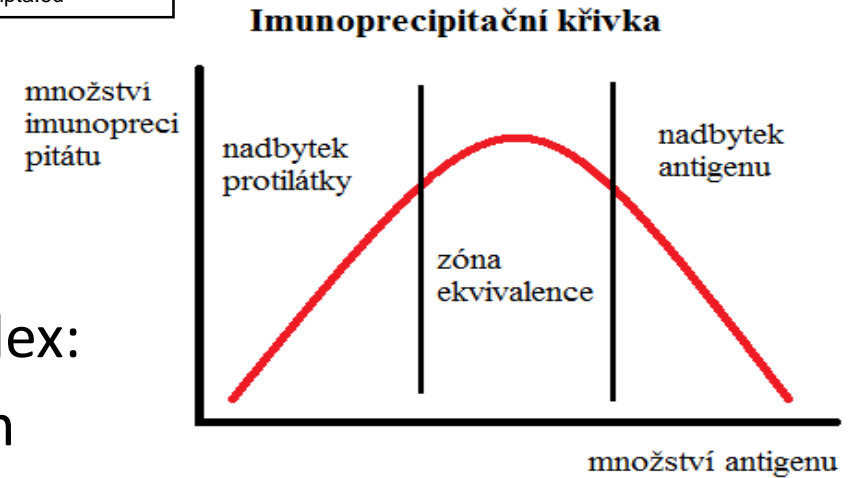
Basophil

Serologické metódy

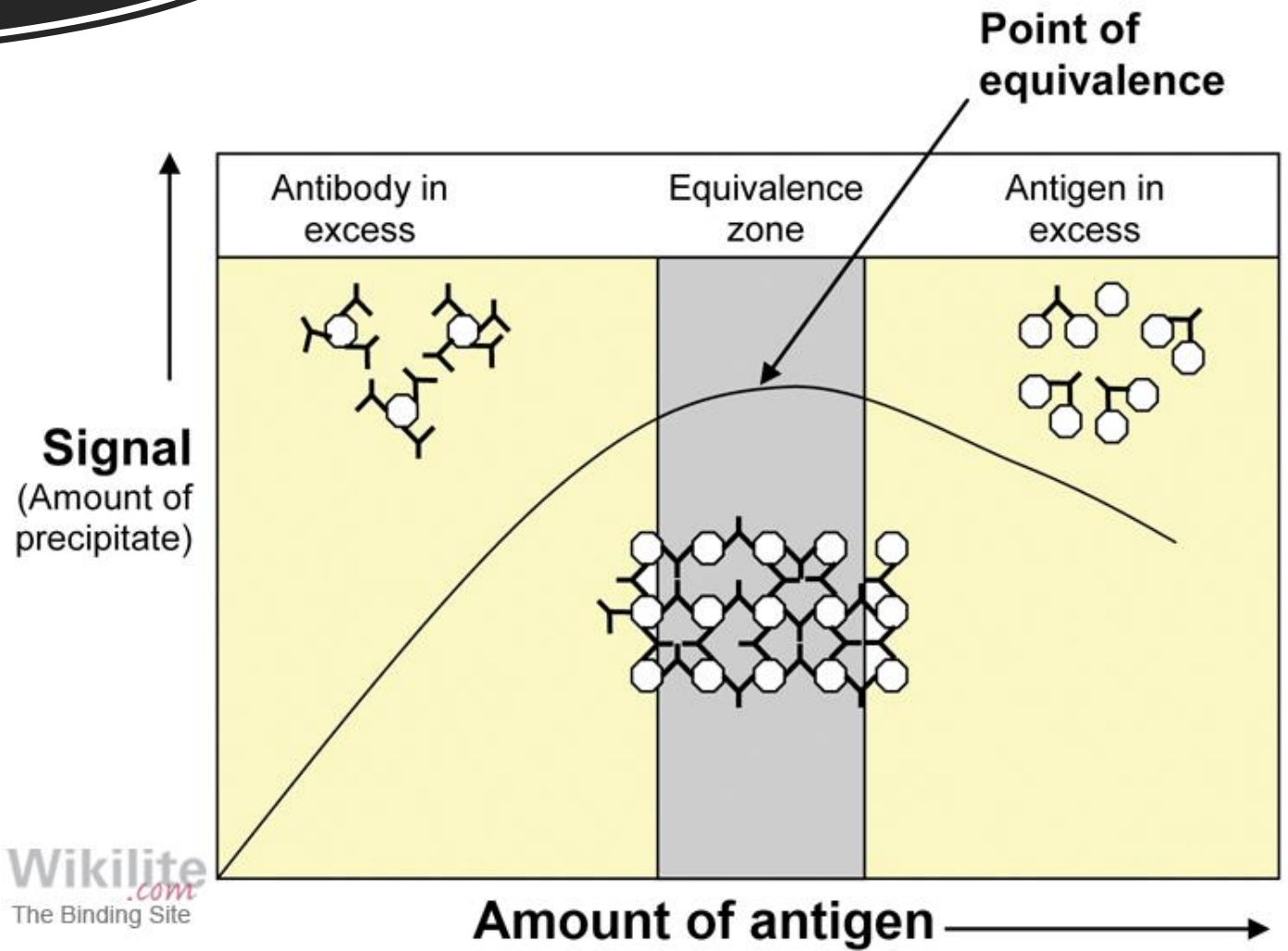
Reakcia antigénu (Ag) s protilátkou (Ab) = imunokomplex:

- 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



Imunoprecipitačná krivka



Serologické metódy

1. Klasické serologické metódy

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

2. Imunochemické metódy s následnou detekciou

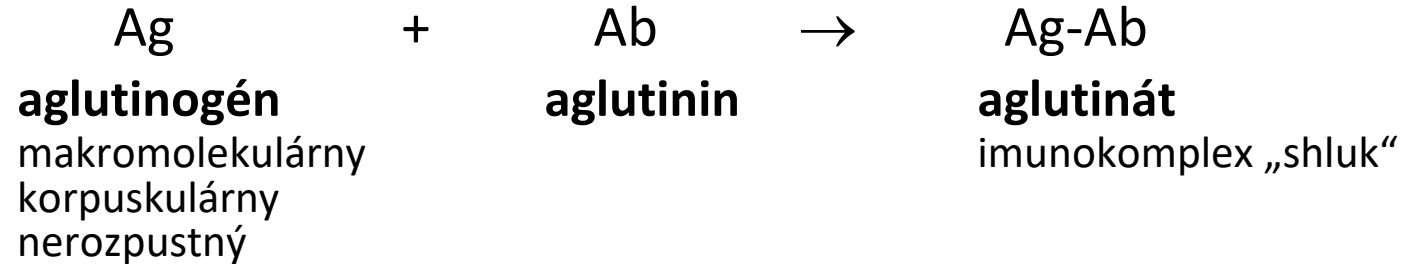
- Imunofluorescencie (priama / nepriama)
- Imunoanalýza (EIA-ELISA, RIA, FIA, LIA)
- Immunoblot, imunodot

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

- Komplement fixačné reakcie
- Inhibičné a neutralizačné testy

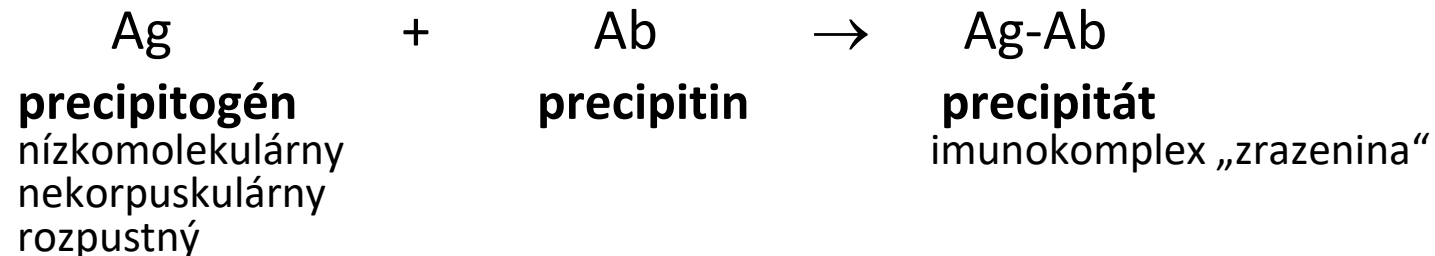
Aglutinácia vs Precipitácia

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)

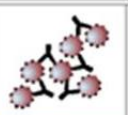

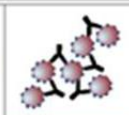

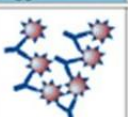


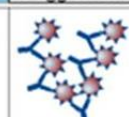
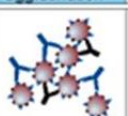
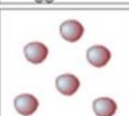
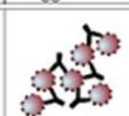
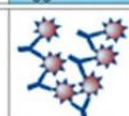

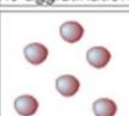


Aglutinácia

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)

Latex-fixačný test

- Reumatoidný faktor (RF)
 - autoprotílátka 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 zdravých osôb
 - diagnosticky najdôležitejší je RF v triede IgM

Princíp testu:

- Na latexových časticiach je naviazaný ľudský IgG, pokiaľ je vo vyšetrovanom sére prítomný RF, viaže sa na IgG na latexových časticiach a vyvolá ich aglutináciu

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)

Stanovenie ASLO nepriamou aglutináciou

- Slúži k stanoveniu protilátok v sére proti Streptolysinu O (exotoxín bakterií z rodu Streptococcus)
- ASLO- anti streptolysin O antibodies
- 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

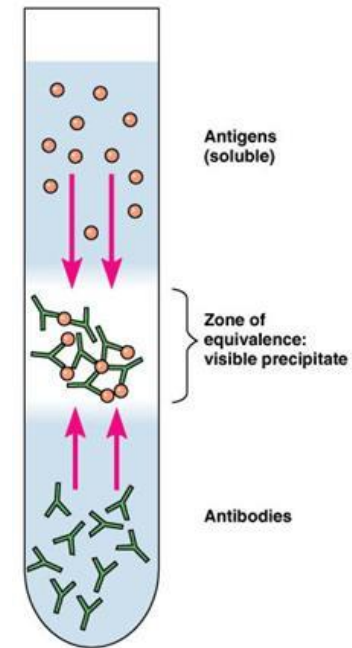
Precipitácia

1. V géle

- Jednoduchá RID
- Dvojitá RID

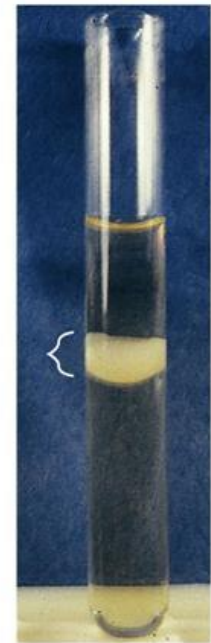
2. V tekutom prostredí

- Nefelometria
- Turbidimetria



(a)

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



(b)

Precipitácia v géle

- Agaróza, agar umožňuje detekciu precipitačných línií
- Je založená na pasívnej difúzii látok v prostredí koncentračného gradientu
- Ag a Ab difundujú gélom a v mieste, kde koncentrácie Ag i Ab dosiahnu optimálneho (ekvimolárneho) pomeru vzniká precipitát

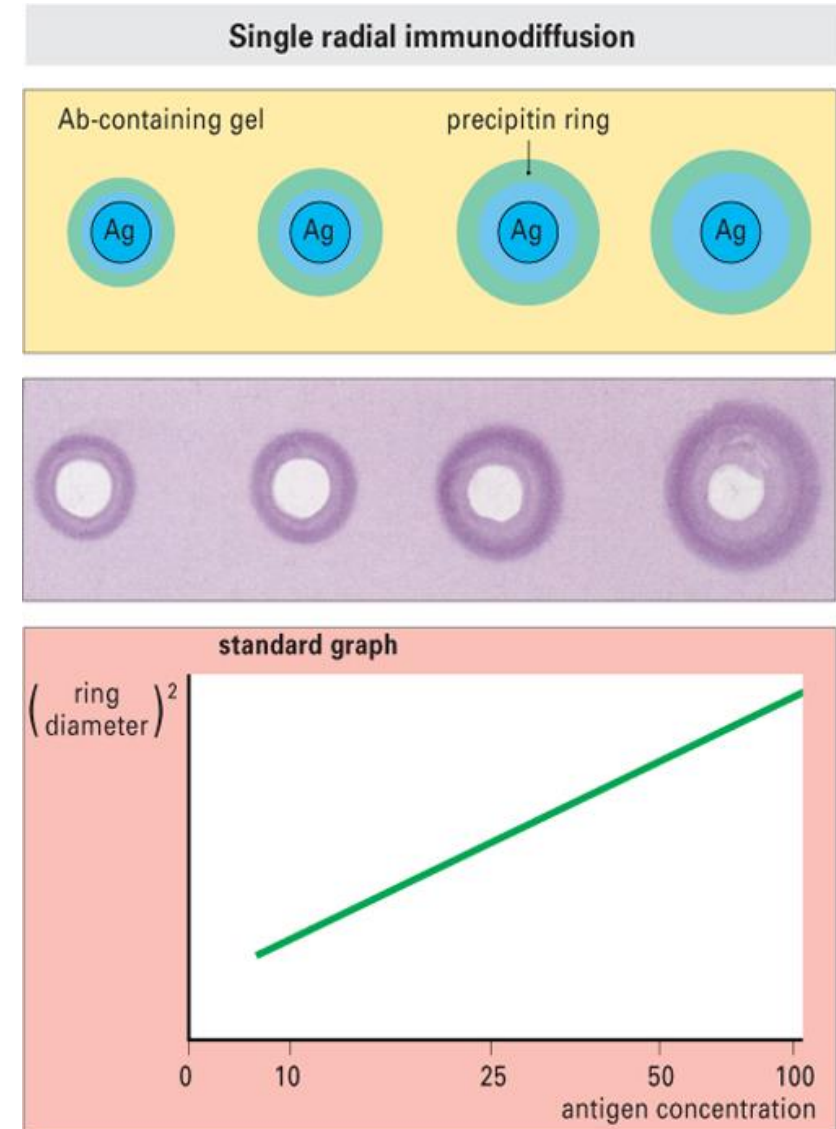
Radiálna imunodifúzia

- 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

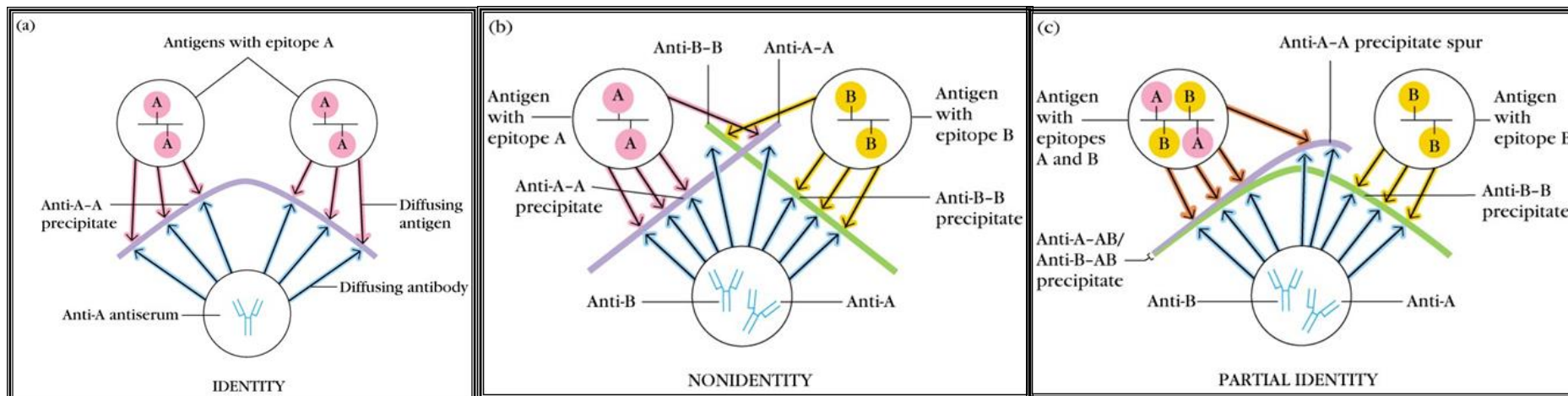
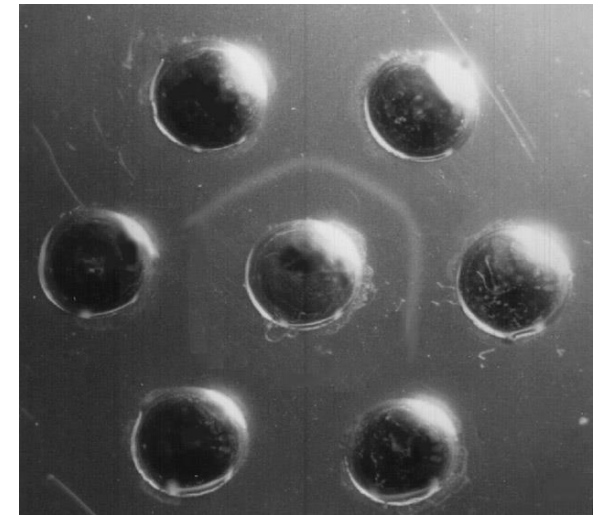


Kalibračná krivka

- Charakterizuje vzťah medzi koncentráciou vyšetrovanej látky a napr. priemerom kruhov na príslušnej vyšetrovacej doske

- Dvojitá RID (podľa Ouchterlonyho)

- sledujeme antigennú príbuznosť antigénov
- gradient vytvára ako Ag, tak Ab a dochádza k protismernej difúzii oboch reaktantov (radiálne)
- 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

Nefelometria a turbidimetria

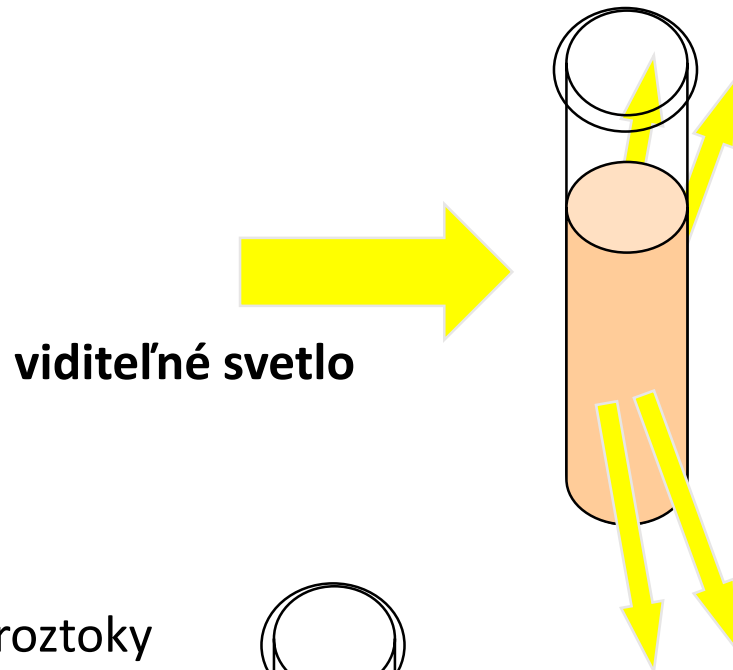
- Reakcie založené na meraní množstva imunitných komplexov vytvorených interakciou špecifických protilátok s antigénom
- Stanovenie sérových bielkovín
- Meranie prebieha v tekutom prostredí v meracej kyvete (pufr, látka urýchľujúca reakciu, Ag, Ab)
- Množstvo vytvorených komplexov je úmerné koncentrácii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

Precipitácia v tekutom prostredí

nefelometria je 5-10x citlivejšia
a nákladnejšia ako turbidimetria

Nefelometria

- vhodná pre nižšie koncentrácie

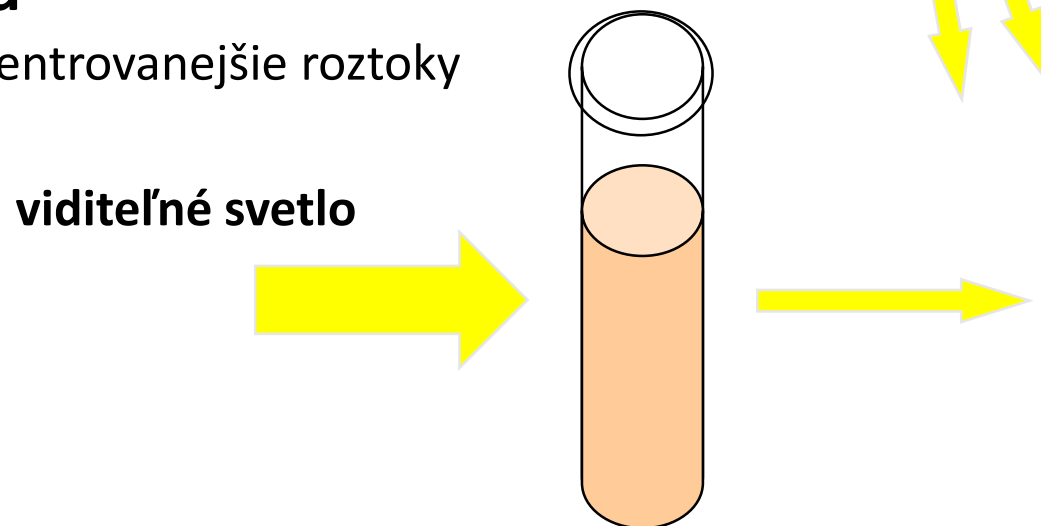


detektor je v smere kolmom na vstupujúci lúč

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)

Beckman Coulter IMMAGE 800

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



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

Siemens BNII



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

- Stanovenie koncentrácie:
 - imunoglobulíny: IgE (IU/ml), IgD, IgA1, IgA2, IgAp (nízke koncentrácie)
 - zložky komplementu: C1 inhibitor

Denná prax na analyzátore

- Provozní 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
 - 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

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, C1-INH)*

- ↑ - zápalová aktivita (zriedka)

- ↓ - vrodená / získaná porucha tvorby (jaterné selhání; zvýšená spotreba- tvorba imunokomplexov; hereditárny angioedém)

Interpretácia výsledkov

- *Reaktanty akútnej fáze*

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

CRP (mg/l)

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

Protokol

- Hlavička:

- Jméno
- Datum
- Úloha č. ...
- Název úlohy

- Protokol:

- Princip
- Pomůcky
- Postup
- Výsledky
- Závěr

- Zpracování na PC nebo ručně
- Tisk → odevzdání při dalším cvičení