



Cvičení z klinické imunologie

Jarní semestr 2020

Mgr. Peter Slanina

Mgr. Julie Štíhová

Cvičení z klinické imunologie

- ▶ 13 cvičení, 100% účast povinná
- ▶ Výstup ze cvičení:
 - ▶ Protokoly (pc, ručně) – odevzdat následující cvičení
 - ▶ Každý protokol si student musí zpracovat sám
- ▶ Na konci semestru:
 - ▶ Zápočtový test – látka pouze ze cvičení

Protokol

- ▶ Hlavička:

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

- ▶ Protokol:

- ▶ Princip prováděného testu - stručně
- ▶ Pomůcky
- ▶ Postup
- ▶ Výsledky
- ▶ Závěr



Klasické serologické metody

aglutinace / precipitace, RID, nefelometrie / turbidimetrie

Protilátky

Peter Slanina (peter.slanina@fnusa.cz)
Ústav klinické imunologie a alergologie
FN u sv. Anny

Biologický materiál

- ▶ Žilní krev
- ▶ (Méně často bronchoalveolární laváž –BAL)
- ▶ Doručení materiálu:
 - ▶ V rámci nemocnice – ruční donáška
 - ▶ Externí materiál – svoz autem
- ▶ Odběry krve – uzavřené odběrové systémy

Biologický materiál

Plazma

- Z **nesrážlivé** krve
- EDTA – vyvazuje Ca_{2+}
- Heparin – anti IIa/Xa aktivita



Sérum

- Ze **srážlivé** krve
- Zkumavky s gelem – akcelerace koagulace
- Sérum **neobsahuje** fibrinogen



Biologický materiál

EDTA



Vyšetření
lymfocytárních
subpopulací

HEPARIN



Funkční testy
leukocytů

SERUM-GEL



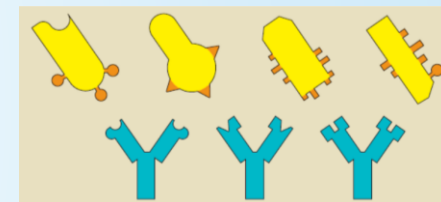
Serologie

Laboratórne vyšetrenie IN VITRO

- ▶ Preamalytická fáza
 - odber, príprava, spracovanie vzorky pred zahájením laboratórneho vyšetrenia
 - skladovanie, transport
- ▶ **Analytická fáza**
 - kalibrácia a justovanie zariadení (analýza kontrol- IKK, EHK)
 - Prevedenie kontrol + lab. vyšetrenia
 - spracovanie výsledkov, LIS
- ▶ Postanalytická fáza
 - skladovanie, likvidácia materiálu
 - preskúmanie výsledkov, uvoľnenie, uchovávanie LIS - NIS

Rozdelenie imunologických laboratórnych metód

serologické (humorálne)- detekcia antigénov a protilátok,
Metódy preukázanie tvorby protilátok proti infekčnému agens



bunečné - počty a funkcie jednotlivých typov leukocytov



Monocyte



Lymphocyte



Neutrophil

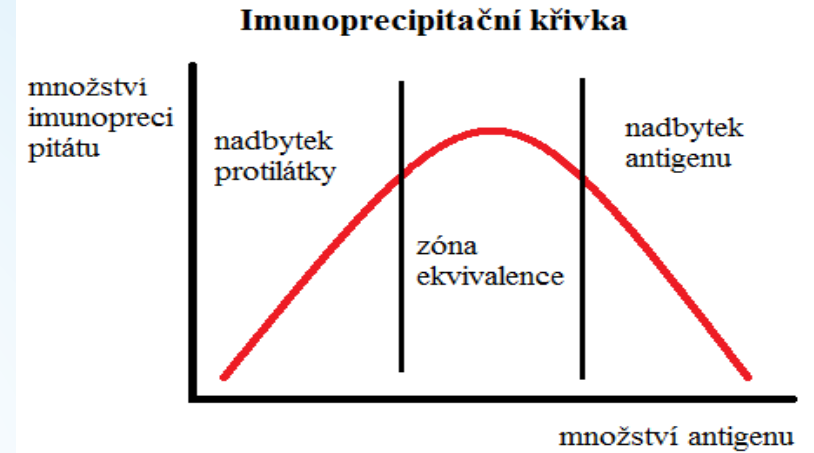


Eosinophil



Basophil

Serologické metódy

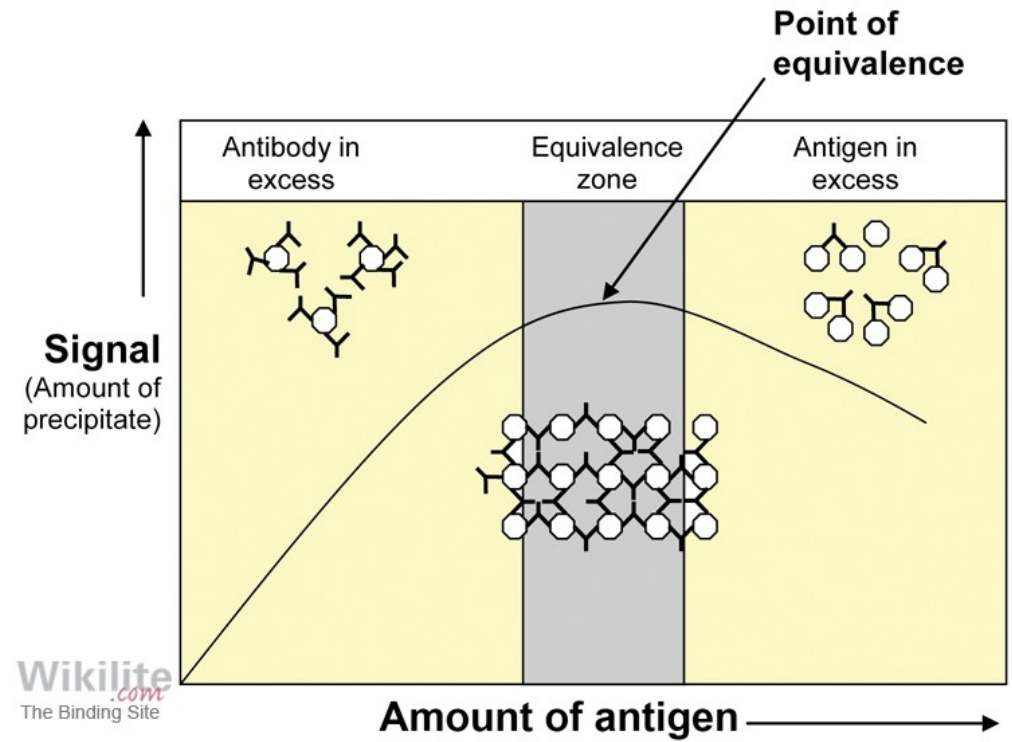
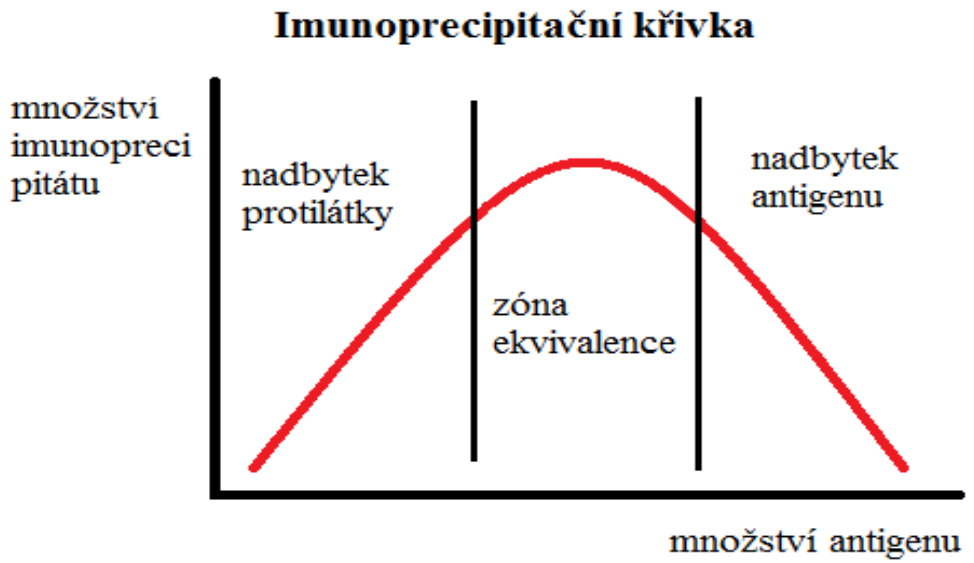


Reakcia antigénu (Ag) s protilátkou (Ab) = imunokomplex:

- 1. Primárna fáza**
 - rýchla, nepozorovateľná voľným okom
 - tvorba imunokomplexov Ag + Ab
 - vznik väzby jednotlivých epitopov s väzbovými miestami protilátok
- 1. 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

Imunoprecipitační křivka



Serologické metódy

1. Klasické serologické metódy

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

2. Imunochemické metódy s následnou detekciou

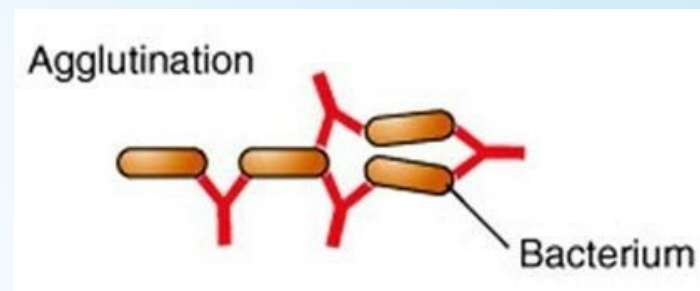
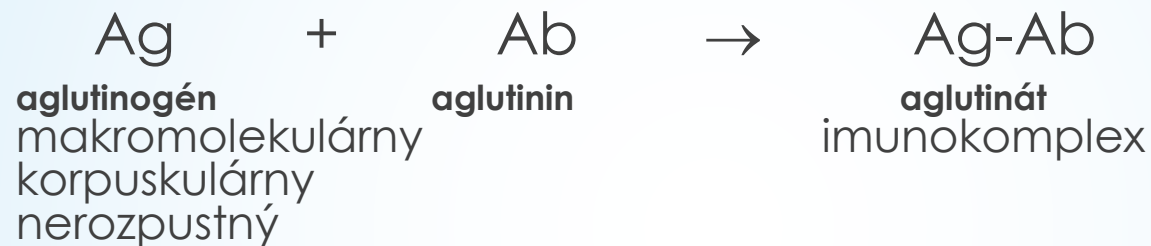
- Imunofluorescencie (priama / nepriama)
- Imunoanalýza (EIA-ELISA, RIA, FIA, LIA)
- Immunoblot, imunodot

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

- Komplement fixačné reakcie
- Inhibičné a neutralizačné testy

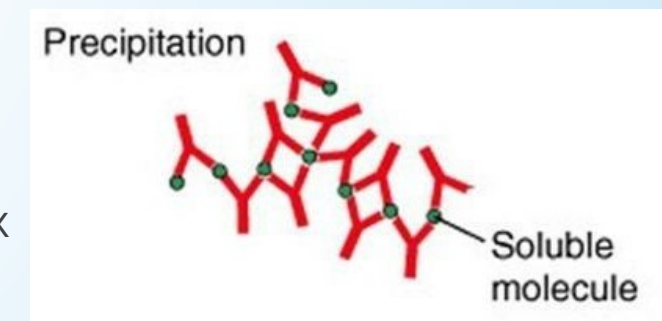
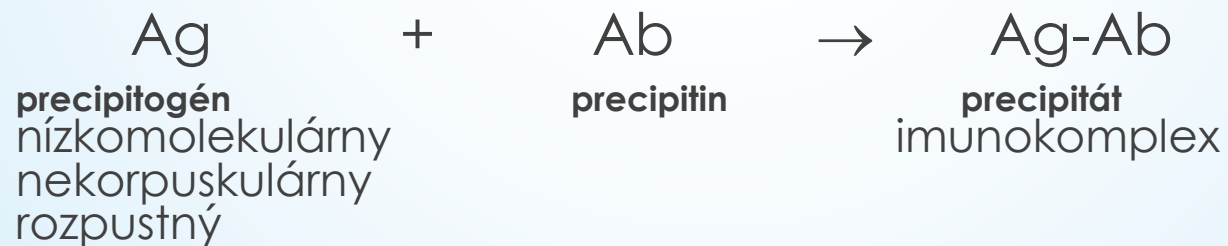
Aglutinácia vs Precipitácia

Aglutinácia (zhukovanie)



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

Precipitácia (zrážanie)



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

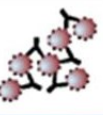

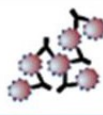

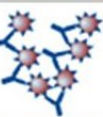



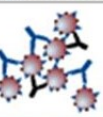

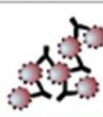
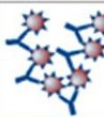




Aglutinácia

1. Priama

- korpuskulárny Ag prirodzene nesie cieľové epitopy
- identifikácia baktérií, hemaglutinácia – krevní skupiny

2. Nepriama

- rozpustný antigén naviazaný na povrchu vhodných makromolekulárných častíc (latex)
- stanovenie
 - revmatoidní faktor (RF)
 - antistreptolysin-O (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

Hodnotenie aglutinácie

► KVALITATÍVNE

- aglutinácii dochádza / nedochádza (pozitívna / negatívna)

► KVANTITATÍVNE

- stanovenie najvyššieho riedenia séra, kedy je ešte badateľná aglutinácia = **titer**
- 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))

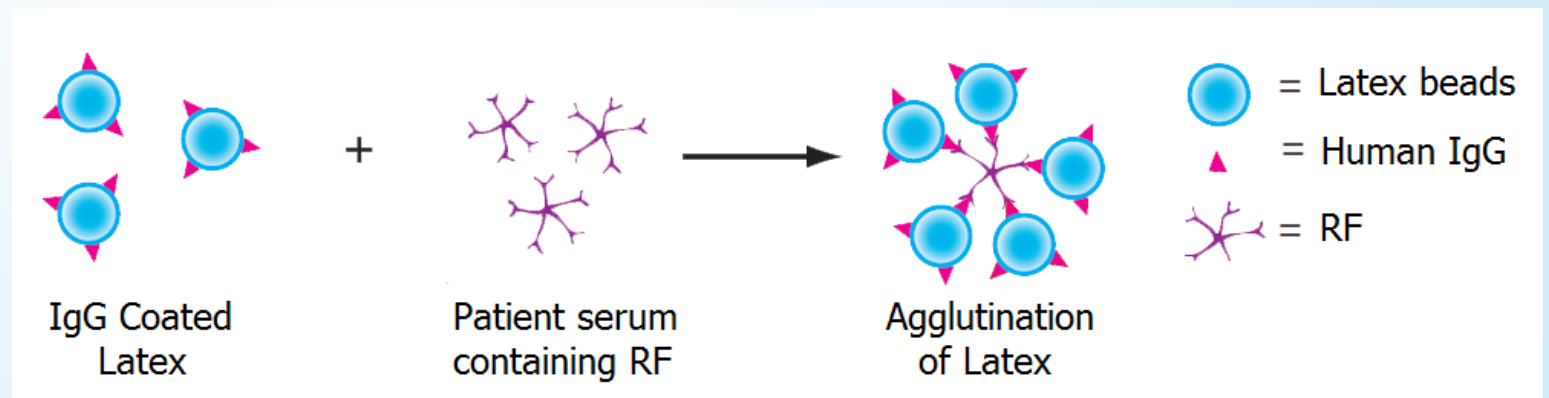
Latex-fixačný test



► Reumatoidný faktor (RF)

- **autoprotilátka** 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 Streptolysínu O (exotoxín baktérií z rodu Streptococcus)
- ▶ Diagnostika: retrospektívny príkaz proběhlé infekce, popř. sterilních následků onemocnění
- ▶ Princíp testu:
 - streptolysin O je naviazaný na povrchu latexových částíc
 - pokiaľ sú v sére pacienta prítomné protilátky proti streptolysínu, dôjde k ich naviazaniu na streptolysín na latexových časticiach, aglutinácia častíc, ktorá je okom pozorovateľná

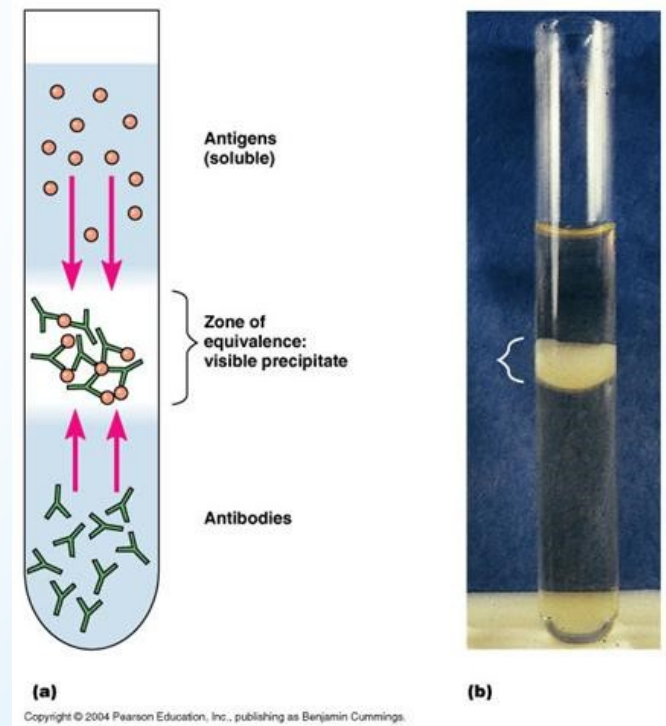


Úloha č. 1

Stanovení RF pomocí latexového kitu

Precipitácia

1. V géle
 - Jednoduchá RID (radiální imuno difuze)
 - Dvojitá RID
2. V tekutom prostredí
 - Nefelometria
 - Turbidimetria



Precipitácia v géle

- Prostredí - agaróza
- Je založená na pasívnej difúzii látok v prostredí koncentračného gradientu
- Ag aj Ab difundujú gélom a v mieste, kde koncentrácie Ag i Ab dosiahnu optimálneho (ekvimolárneho) pomeru vzniká precipitát

Radiálna imunodifúzia (RID)

- 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**



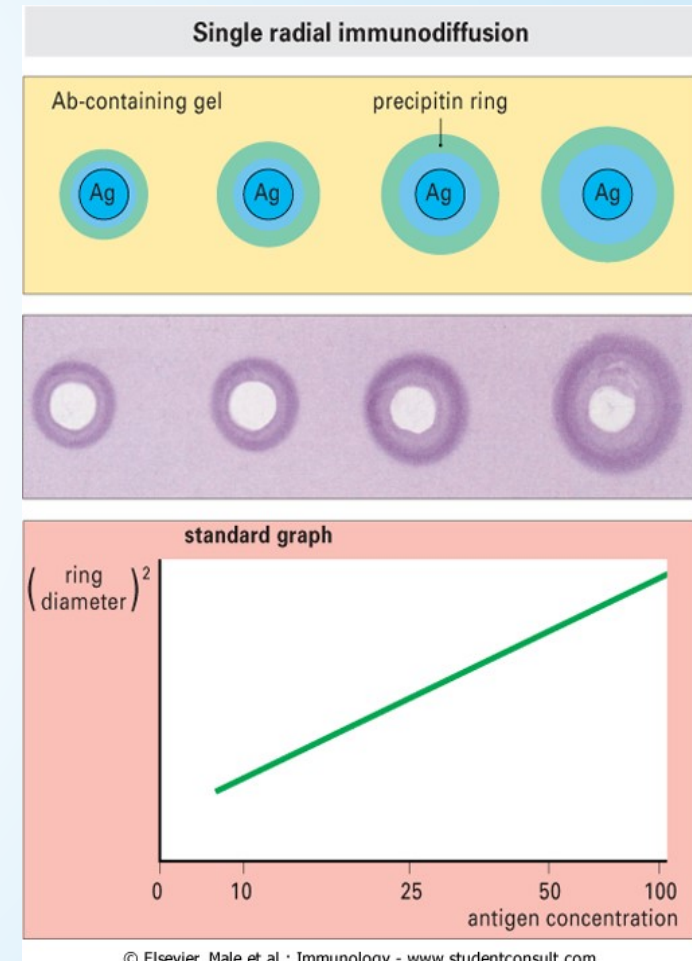
Podľa počtu difundujúcich reaktantov

► 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

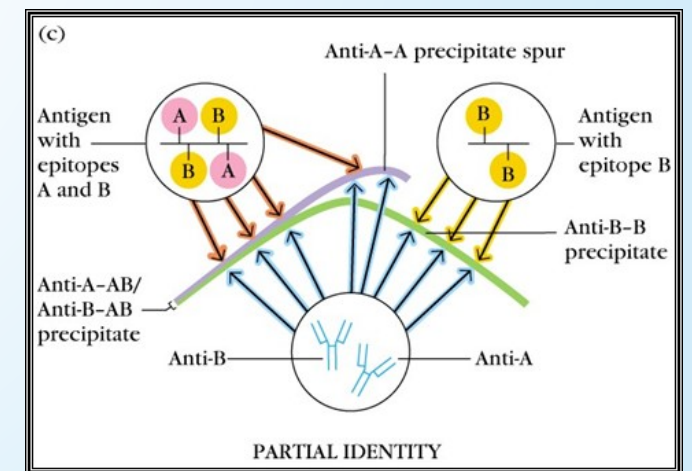
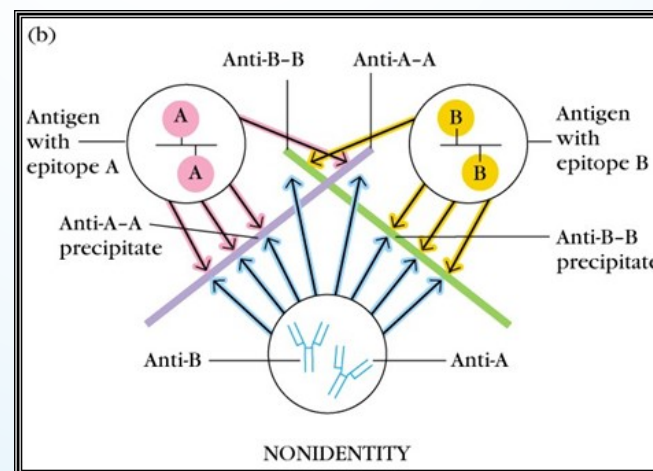
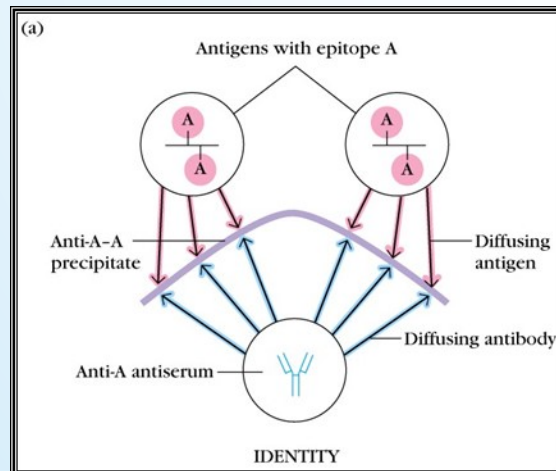
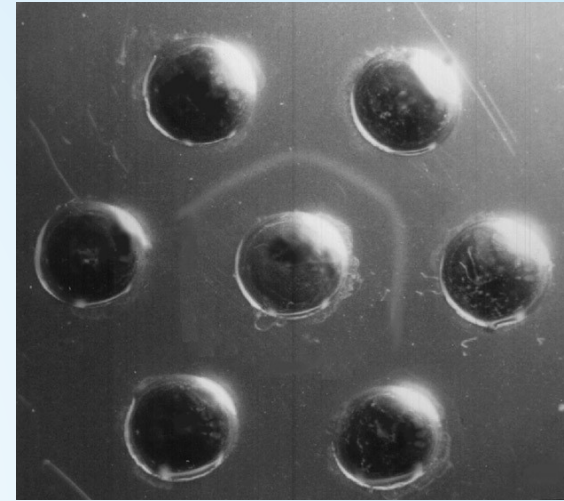
- kalibračná krivka:

- Charakterizuje vzťah medzi koncentráciou vyšetrovanej látky a 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 vyšetrovaného antigénu
- Meranie intenzity zákalu: nefelometria, turbidimetria
- Obe metodiky umožňujú **kvantitatívne** stanovenie obsahu proteínov vo vzorke odčítaním z kalibračnej krivky

Nefelometria a turbidimetria

- Metodiky 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

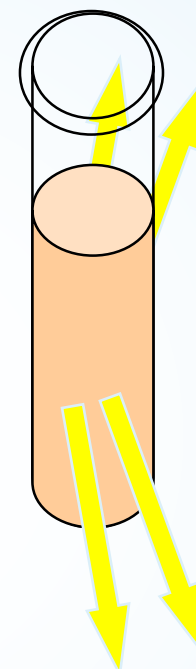
Precipitácia v tekutom prostredí

Nefelometria

- vhodná pre nižšie koncentrácie

**nefelometria je 5-10x
citlivejšia**

viditeľné svetlo



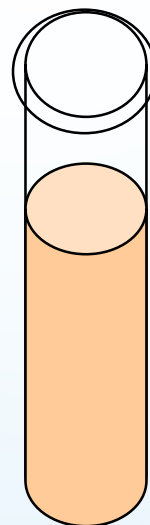
**detektor je v smere kolmom
na vstupujúci lúč**

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

Turbidimetria

- Vhodná pre koncentrovanejšie roztoky

viditeľné svetlo



detektor je v ose lúča

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

Beckman Coulter IMMAGE 800

➤ Stanovenie koncentrácie:

➤ Analyzátor I:

- imunoglobulíny: IgG, IgA, IgM (g/l)
- proteíny akútnej fáze: CRP (mg/l)
- (RF+ASLO)

➤ Analyzátor 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

► Stanovenie koncentrácie:

- imunoglobulíny: IgE (IU/ml), IgD, IgA1, IgA2, IgAp (nízke koncentrácie)
- zložky komplementu: C1 inhibitor, C3d

IgG 7-16 g/l

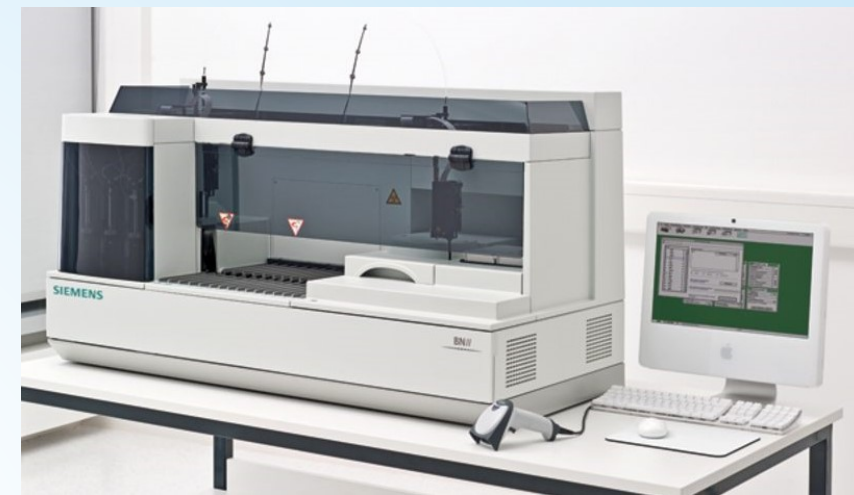
IgA 0,7-4 g/l

IgM 0,4-2,3 g/l

CRP <0,5 mg/l

C3 0,9-1,8 g/l

C4 0,1-0,4 g/l



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

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 = myelom; 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 (jaterní 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

Komplementový systém

-stanovenie C3 zložky-

- ▶ Humorálna zložka vrodenej imunity
- ▶ Evolučne „starobylý“ systém – primitívne živočíchy disponujú podobnými proteínmi
- ▶ produkované jaternými bunkami, makrofágmi, ...

9 základných zložiek: C1-C9

Regulátory

- **pozitívne**: properdin (faktor P)
- **negatívne** (inhibítory):
C1 INH, CR1, MCP, DAF, faktor H, faktor I, CD59, C4bp

klasická cesta
patogén + Ig / CRP
C1q,r,s

lektinová cesta
patogén + MBL
MASP 1, 2

alternativna cesta
patogén + C3b

C2, C4

C2, C4

C3 konvertáza = C2a+C4b / C3b+Bb

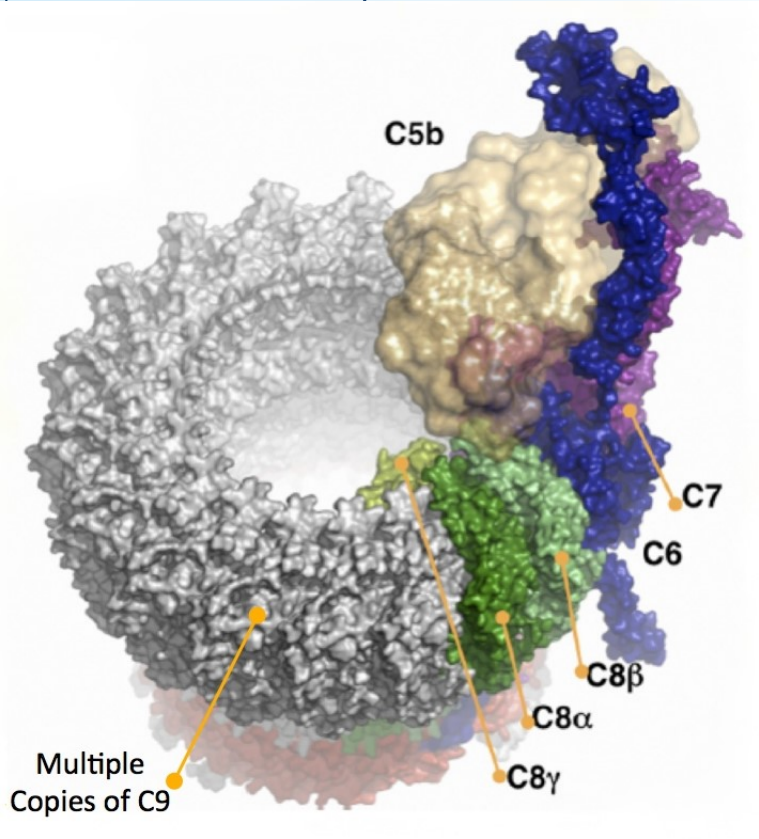
C3 → C3b

C5 konvertáza = C2a+C4b+C3b / C3b+Bb+C3b

C5 → C5b

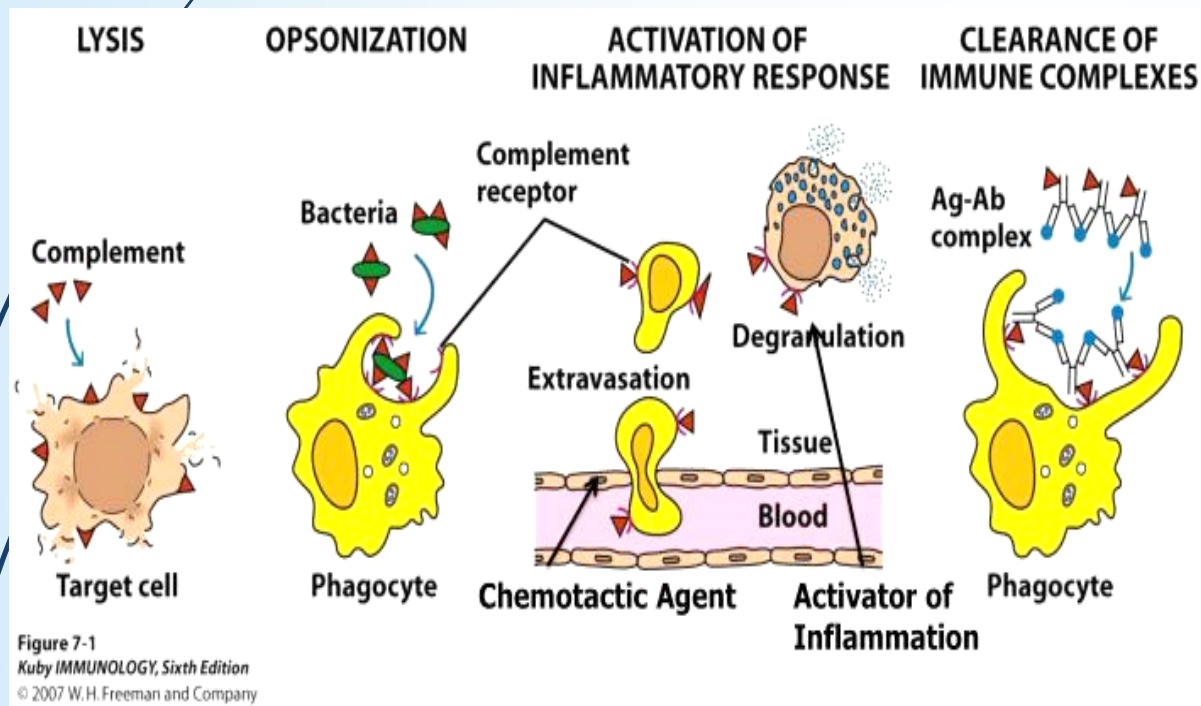
**membranolytický komplex
(MAC)**

C5b
C6, C7, C8
poly C9



Zdroj: Aleshin et al. JBC 287 p10210.

Funkcie komplementu



- **Lýza buniek**, mikroorganizmov (MAC)
- **Opsonizácia** – označenie cudzích buniek a častíc, podpora fagocytózy (C3b)
- **Chemotaxia** – privolanie ďalších zložiek imunitného systému (C3a, C5a)
- **Propagácia imunitnej reakcie** – prozánětlivá aktivita (C3a, C5a)
- **Immune clearance** – odstraňovanie imunokomplexov z cirkulácie (C3b, C4b)

Vyšetrovanie komplementu

Indikácia:

- **Deficit** niektorej zo zložiek?? → testujú sa hladiny jednotlivých zložiek, vyšetrí sa funkcie celého systému
- Podozrenie na hereditárny angioedém?? → vyšetrí sa hladina a funkcia C1 INH a hladiny jednotlivých zložiek
- Monitorovanie zápalového procesu – zložky komplementu sa chovajú ako proteíny akútnej fázy (ich hladina vzrastá pri zápale)
- **Zvýšená spotreba** zložiek?? → pri silnej aktivácii komplementu (diagnostika a monitorovanie imunokomplexových chorôb)

Deficity komplementového systému

- ▶ **C1-C4** – deficit spôsobuje častejší výskyt pneumonií, pyogénnych infekcií, častý vývoj, systémových imunokomplexových chorôb (SLE-like)
- ▶ **C3-C9** – najmä náchylnosť k pyogénnym infekciám, u deficitu C9 sú typické opakované meningokové meningitidy
- ▶ **C1 INH** – Hereditárny angioedém

Úloha č. 2

Stanovení C3 složky komplementu

- ▶ Kalibrátor – naředit diluentem:
 - ▶ Objem vzorku ve zkumavce: **300ul**
 - ▶ Koncentrace kalibrátoru: 100%, 80%, 50% a 25%
 - ▶ Vzorek ?? ul + diluent ?? ul

 - ▶ Pozor: Koncentrace kalibrátoru na zkumavce – opsat si!

- ▶ Vzorek A+B
 - ▶ Objem vzorku: **300ul**
 - ▶ Naředit na 50%
 - ▶ Koncentraci odečíst z kalibrační křivky (sestrojit)