

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**

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

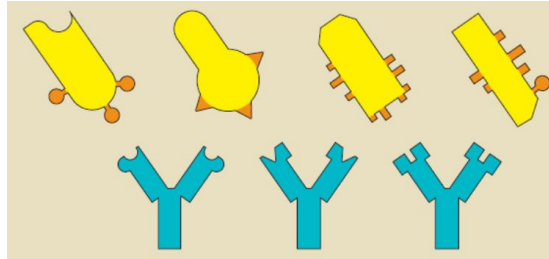
- **Analytická fáza**

- 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

1. Klasické serologické metódy

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

2. Imunochemické metódy s následnou detekciou

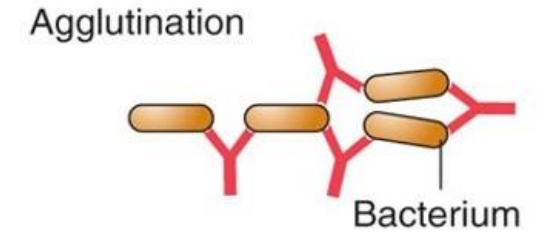
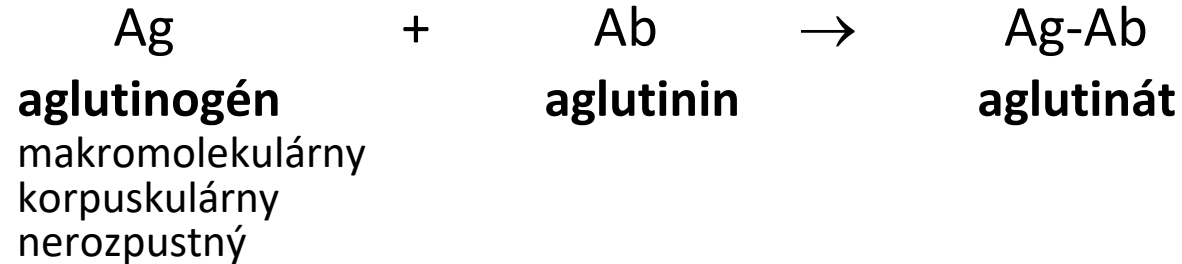
- Imunofluorescencie (priama / nepriama)
- Imunoanalýza (EIA-ELISA, RIA, FIA, LIA)
- Immunoblot, imunodot

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

- Komplement fixačné reakcie
- Inhibičné a neutralizačné testy

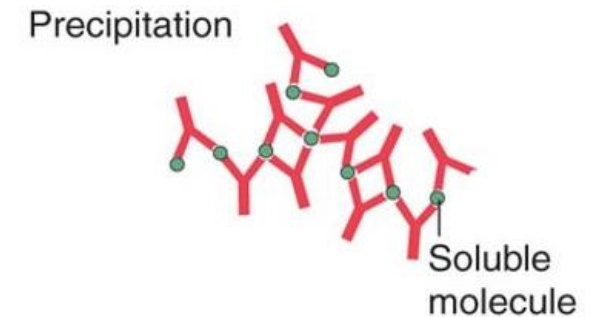
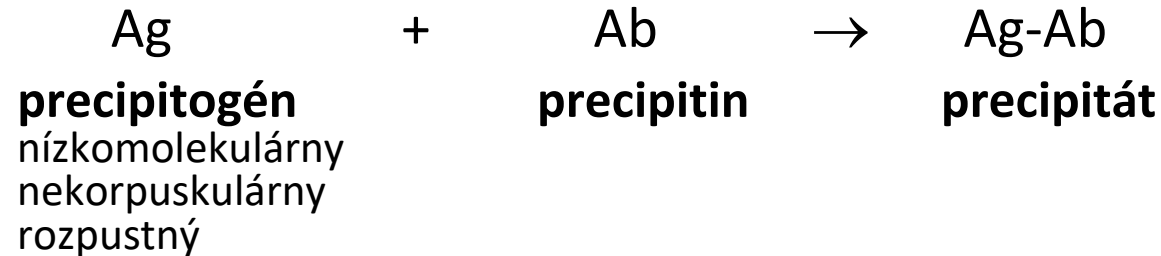
Aglutinácia vs Precipitácia

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

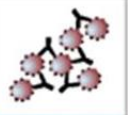
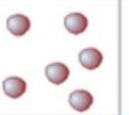
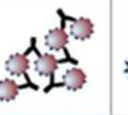

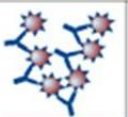
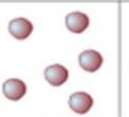

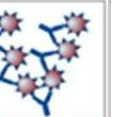
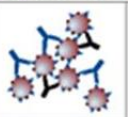
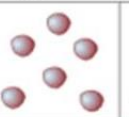
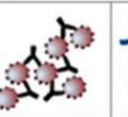
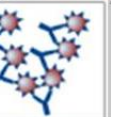

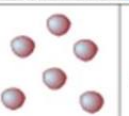


Aglutinácia

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

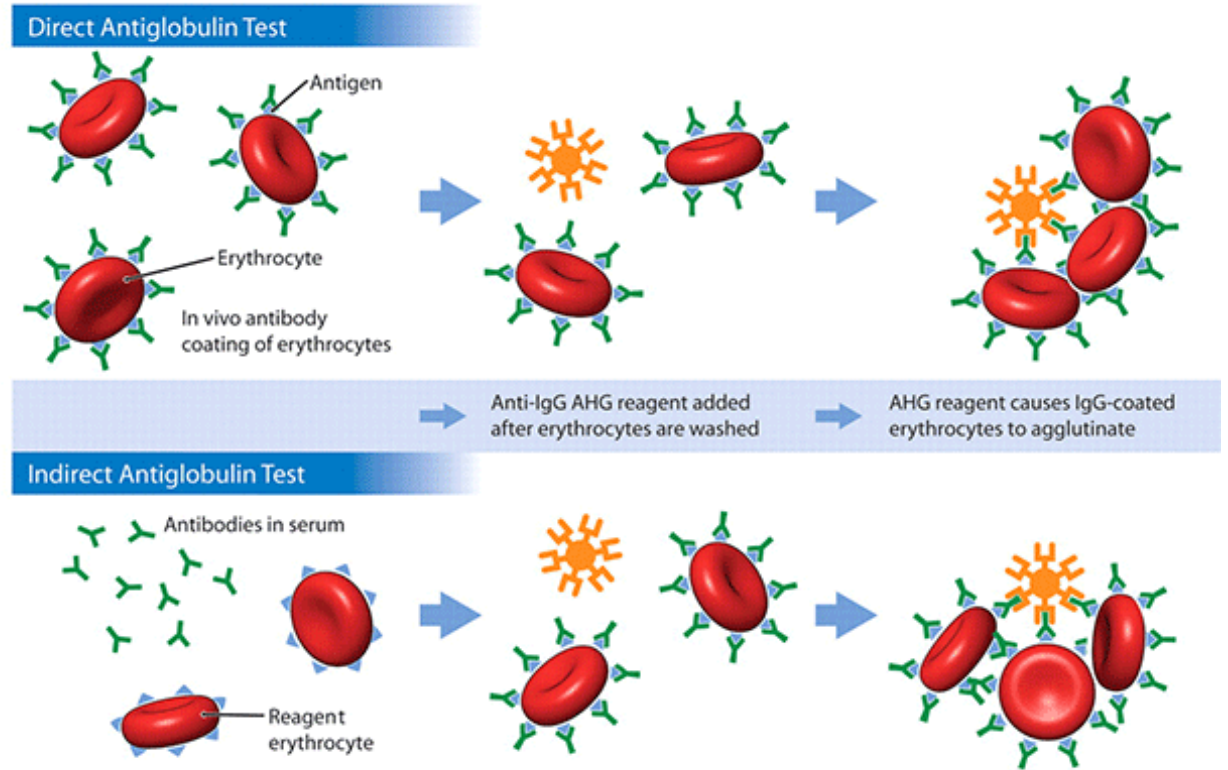
Detekce protilátek
vázaných na erythrocyty *in vivo*

Direct Coomb's Test

VS

Detekce volných protilátek
proti erythrocytům v séru

Indirect Coomb's Test



Hodnotenie aglutinácie

- **KVALITATÍVNE**

- aglutinácii dochádza / nedochádza (pozitívna / negatívna)

- **KVANTITATÍVNE**

- stanovenie najvyššieho riedenia séra, kedy je ešte badateľná aglutinácia

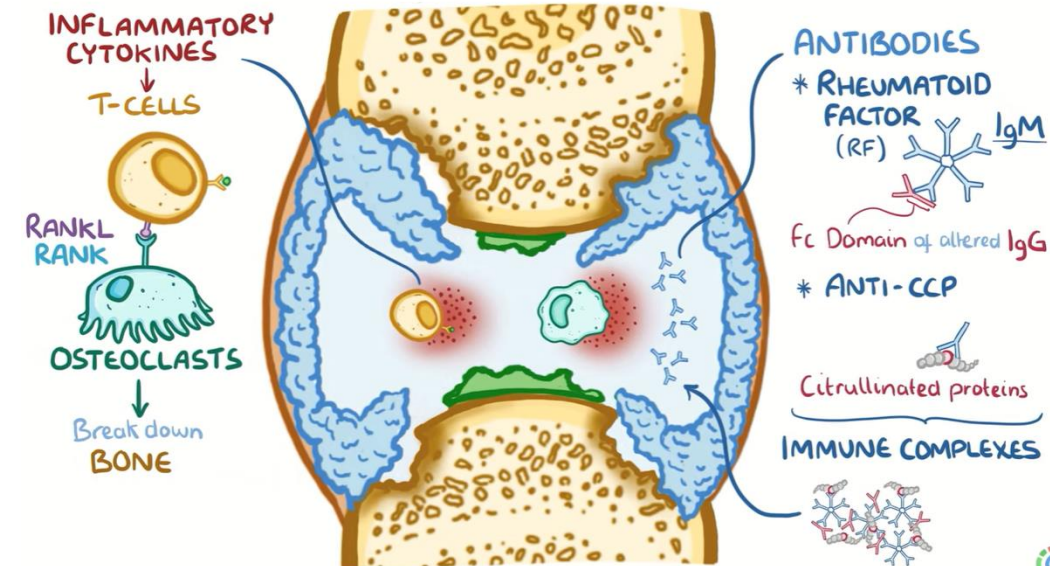
- titer (titr) = prevrátená hodnota riedenia séra

(riedenie 1:32 → titer 32)

Revmatoidní artritida



- Systémové autoimunitní onemocnění – poškození kloubů
- Příčiny – genetika + faktory vnějšího prostředí
- Patologická **citrulinace proteinů** – imunitní systém rozpozná imunodominantní epitopy → imunitní reakce, produkce autoprotilátek
- V kloubu se tvoří zánětlivá tkáň – **pannus** – narušení chrupavky
- Osteoklasty – degradace kosti
- muži : ženy 1 : 2-3
- 1 % populace
- Stanovení: revmatoidní faktor (**RF**) + protilátky proti citrulinovaným peptidům (**anti-CCP**)



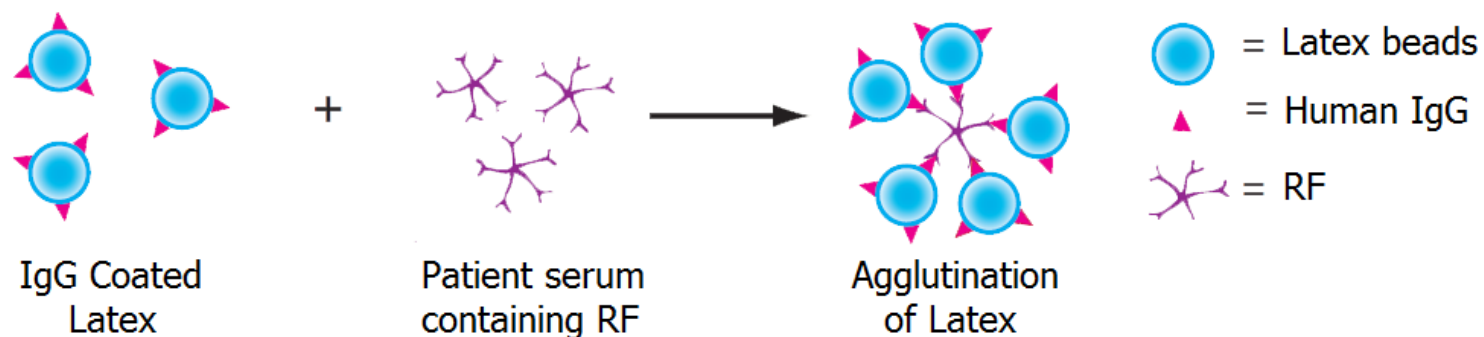
Latex-fixačný test

• 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, SLE, Sjogrenův syndrom
- môže byť pozitívny i u zdravých osôb
- diagnosticky najdôležitejší je RF v triede **IgM** (rutinně se měří nefelometricky!)

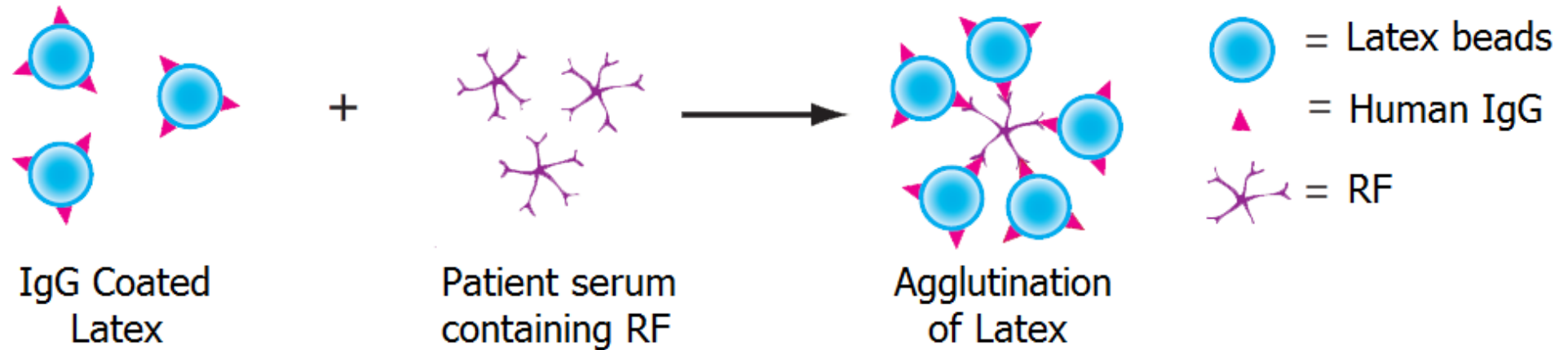


Princíp testu aglutinace na nosičích:



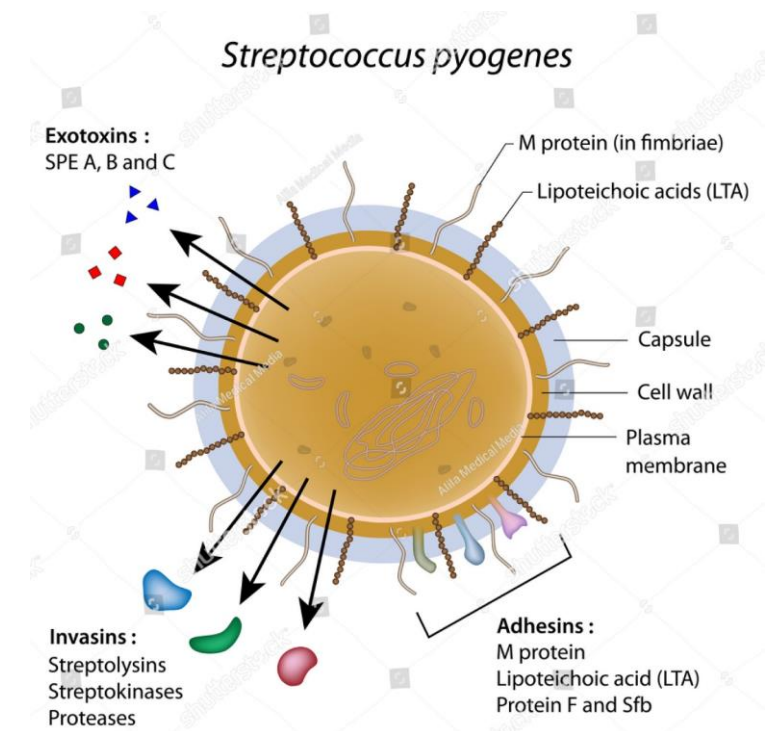
Úkol č. 1

Stanovení RF pomocí latexové aglutinace

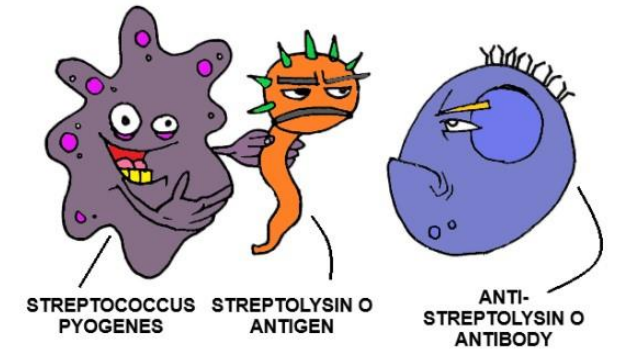


Streptokoková infekce a pozdní následky

- Streptokoky skupiny C mají **M protein** - jeho struktura je podobná strukturám srdce nebo ledvin – molekulární mimikry
- Protilátky proti M proteinu **zkříženě reagují** s těmito strukturami →
- Poststreptokoková sterilní kardiitida, glomerulonefritida
- Během streptokokové infekce se také tvoří **ASLO** – anti-streptolysin O antibodies
- Stanovuje se při podezření na poststreptokokové sterilní následky



Stanovenie ASLO (ASO) nepriamou aglutináciou



- ASLO- anti streptolysin O antibodies
- Slúži k stanoveniu protilátok v sére proti Streptolysinu O (exotoxín baktérií z rodu Streptococcus)
- Princíp testu:
 - Stejný jako u RF – latexová aglutinace (na latexových částicích vázán streptolysin O)

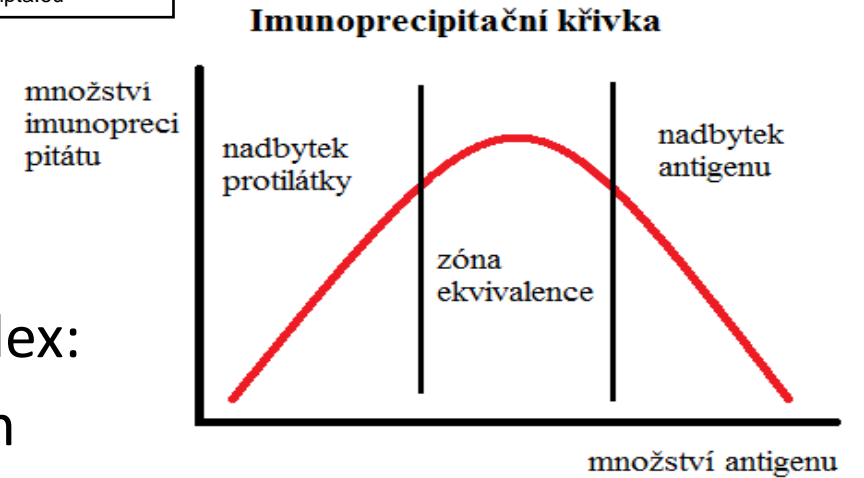


Serologické metódy

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



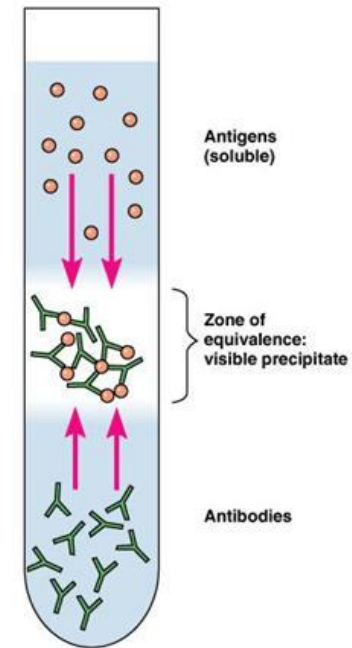
Precipitácia

1. V géle

- Jednoduchá RID
- Dvojitá RID

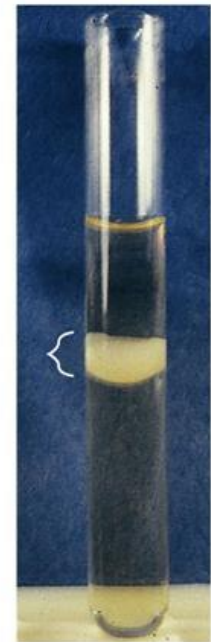
2. V tekutom prostredí

- Nefelometria
- Turbidimetria



(a)

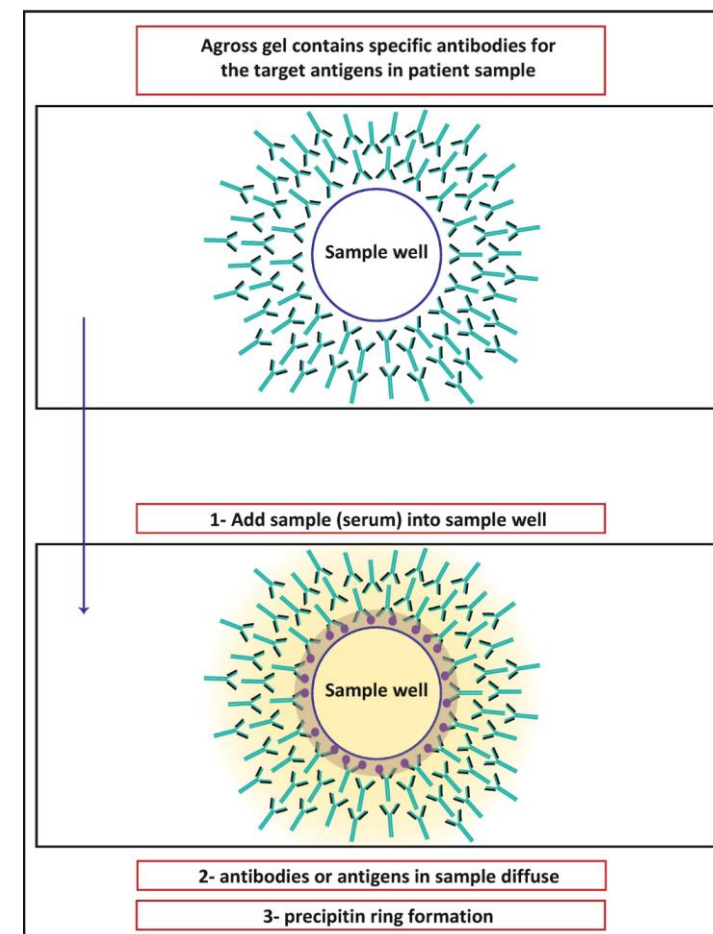
Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.



(b)

Precipitácia v géle – jednoduchá RID

- Prostředí – agarózový gel
- Princip
 1. Do gelu je při teplotě těsně před tuhnutím přidána protilátka proti hledanému antigenu (např. chceme stanovit C5 → v gelu protilátka proti C5)
 2. Ztuhnutí gelu
 3. Vykrojení jamek do gelu
 4. Pipetujeme kalibrátory a vzorky
 5. Antigen difunduje do gelu – v místě ekvimolární koncentrace Ag-Ab se vytvoří kruhový precipitát
 6. Průměr a plocha kruhu je úměrná množství antigenu ve vzorku

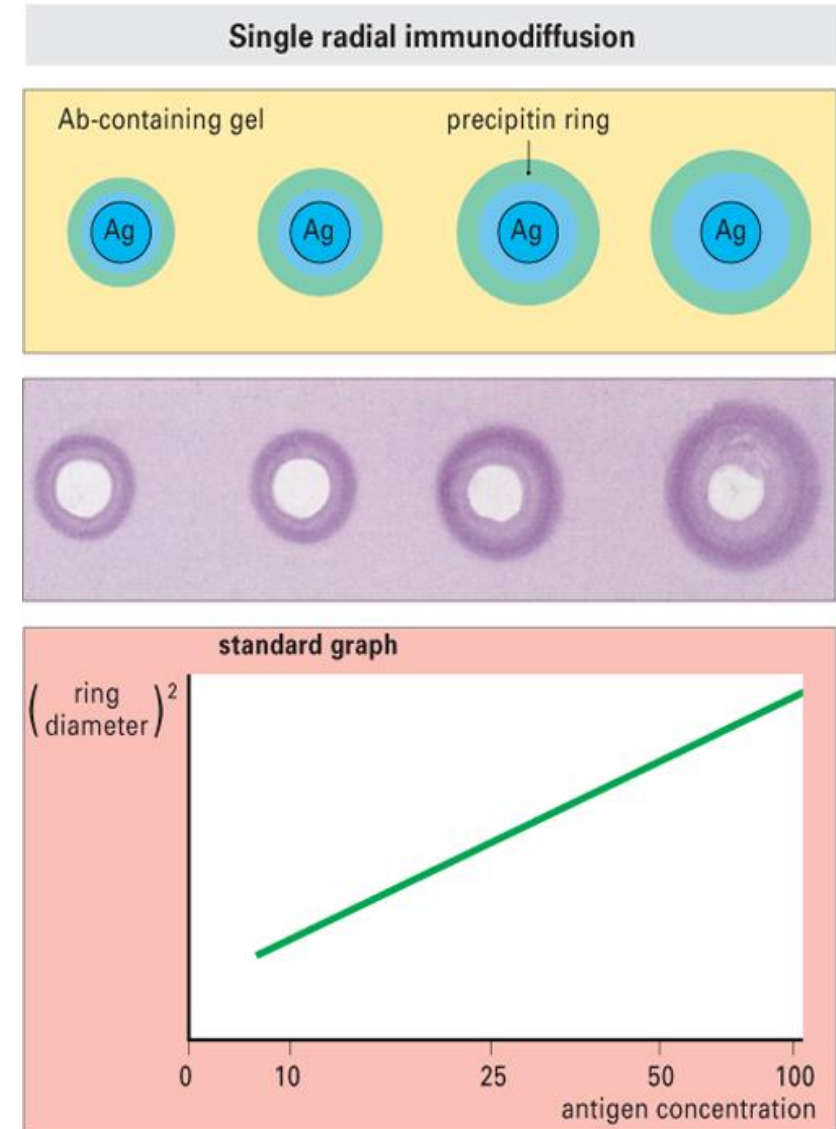


Radiálna imunodifúzia

- 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!**

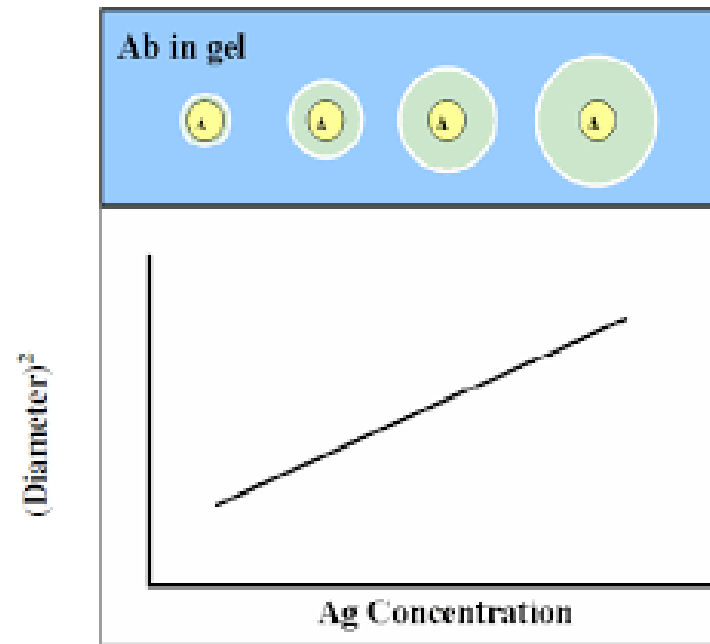
- Jednoduchá RID

- 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



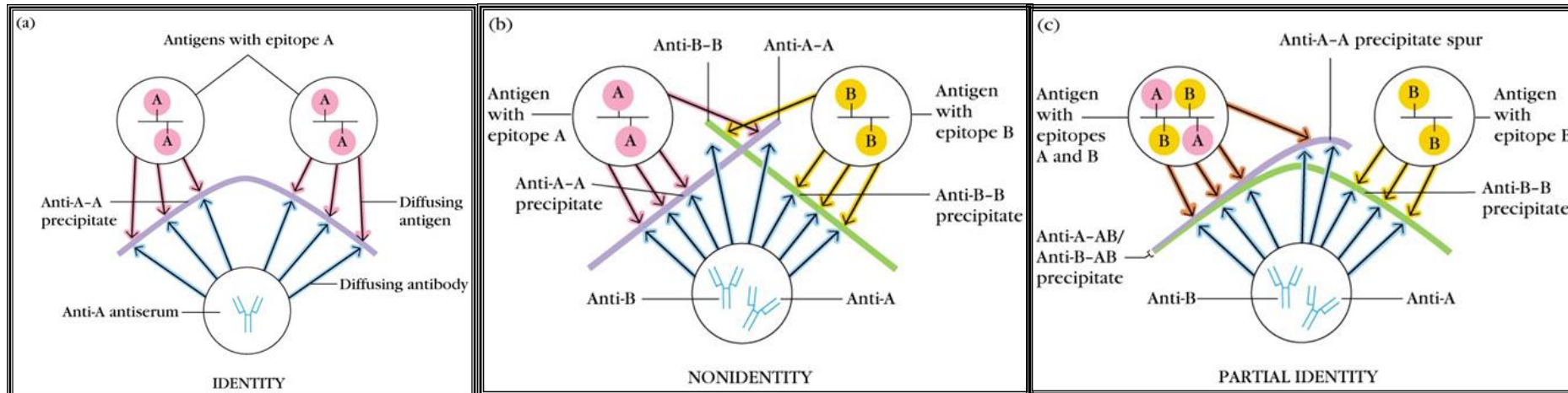
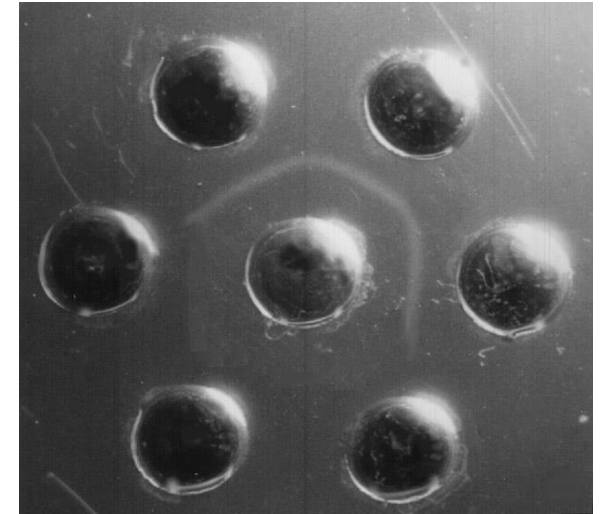
Kalibračná krivka

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



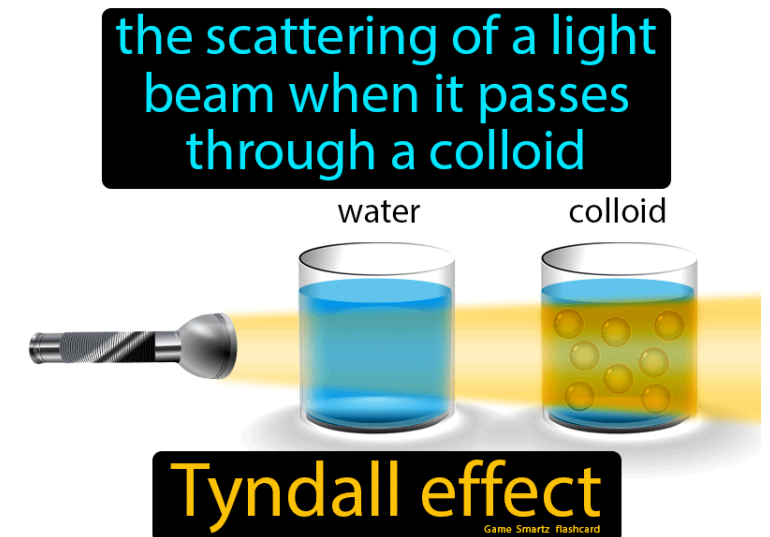
- Dvojitá RID (podľa Ouchterlonyho)

- sledujeme antigennú príbuznosť antigénov
- Prostředí – čistý gel – do jamiek pipetujeme antigen i protilátku
- 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 – Tyndalův jev
- Obe metodiky umožňujú kvantitatívne stanovenie obsahu proteínov vo vzorke odčítaním z kalibračnej krivky

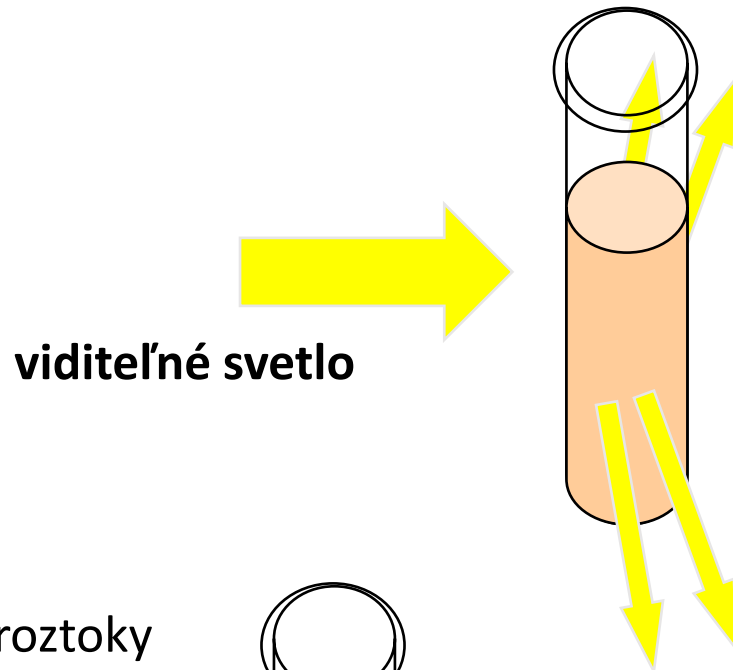


Precipitácia v tekutom prostredí

nefelometria je 5-10x citlivejšia
a nákladnejšia ako turbidimetria

Nefelometria

- vhodná pre nižšie koncentrácie

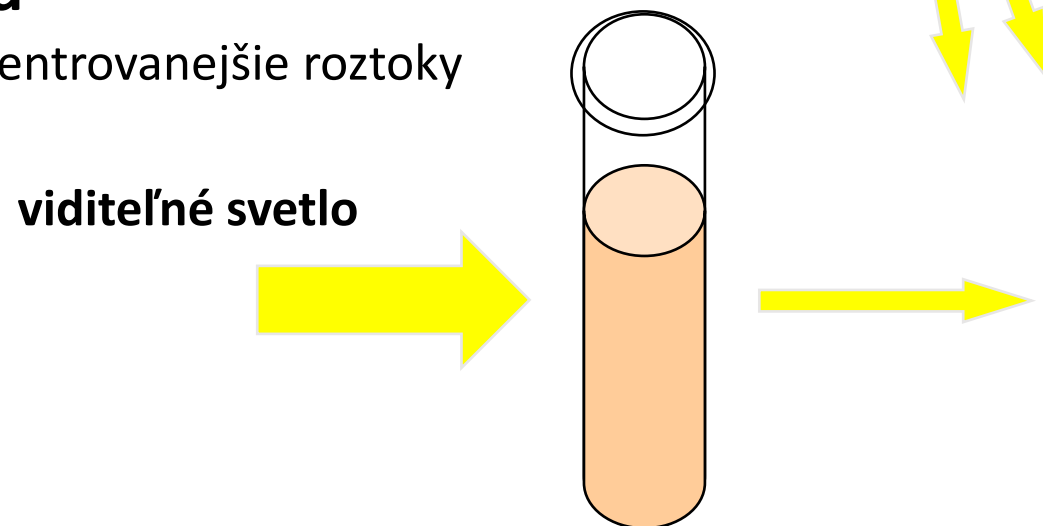


detektor je v smere kolmom na vstupujúci lúč

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
- Meranie prebieha v tekutom prostredí v meracej kyvete (pufr, látka urýchľujúca reakciu, Ag, Ab)
- Množstvo vytvorených komplexov je úmerné koncentrácii Ag

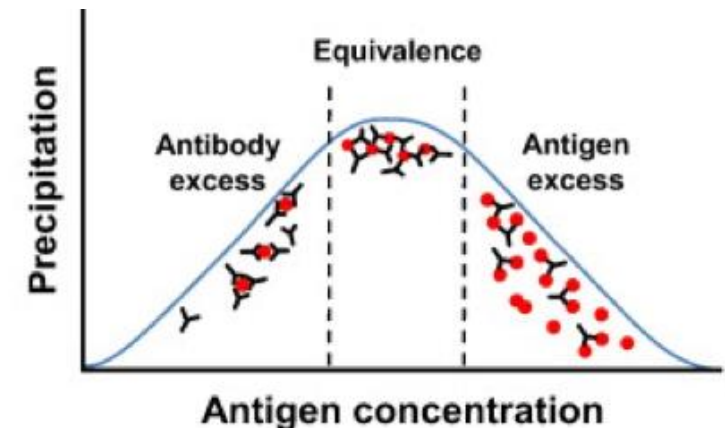
Dynamika precipitačních reakcí

Imunoprecipitační křivka (Heidelberger-Kendallová)

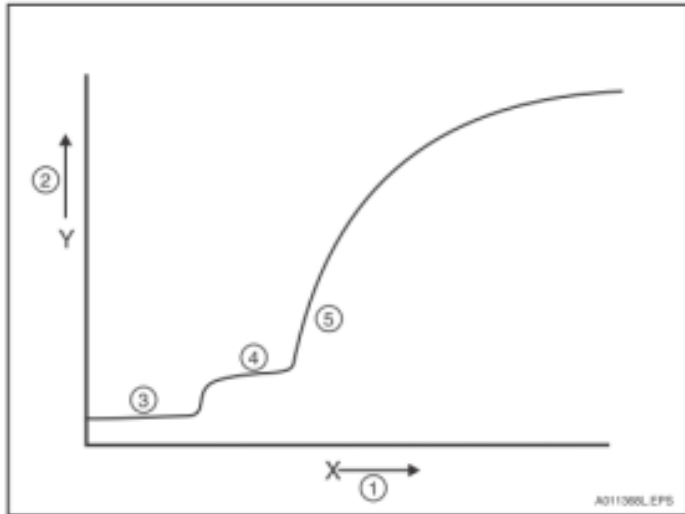
- 1) Oblast nadbytku protilátky – měření přístrojem
- 2) Zóna ekvivalence
- 3) Oblast nadbytku antigenu – protilátka spotřebována, imunokomplexy se rozpadají → **Hook efekt**

Závěr: Pro 2 rozdílné koncentrace antigenu lze získat jednu hodnotu absorbance → **riziko falešně nízkých hodnot**

Přístroje mají různé postupy, jak Hook efekt rozpoznat

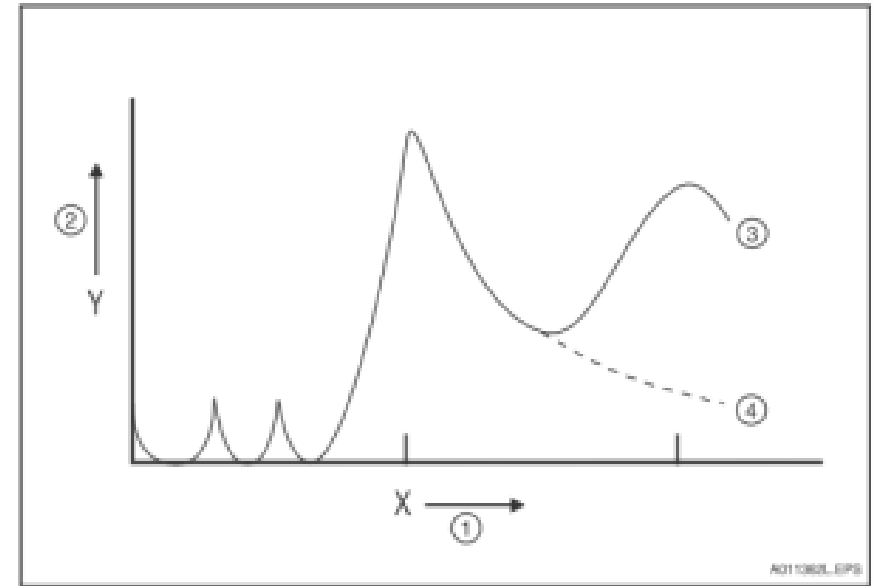


Při nefelometrickém i turbidimetrickém měření musí zůstat zachována podmínka nadbytku protilátky v reakční směsi



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

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



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

Po proběhlé reakci přístroj do reakční směsi přidá antigen:

- 1) Pokud absorbance odpět stoupne (3) měření proběhlo v oblasti nadbytku protilátky (tvoří se nové imunokomplexy) a pro výpočet koncentrace analytu tedy může být použita naměřená hodnota absorbance původního ředění
- 2) Pokud po přidavku antigenu k nárůstu signálu nedojde (4) → protilátka byla spotřebována (příliš mnoho antigenu) → analýza musí být opakována znovu s vyšším ředěním vzorku

Beckman Coulter IMMAGE 800

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

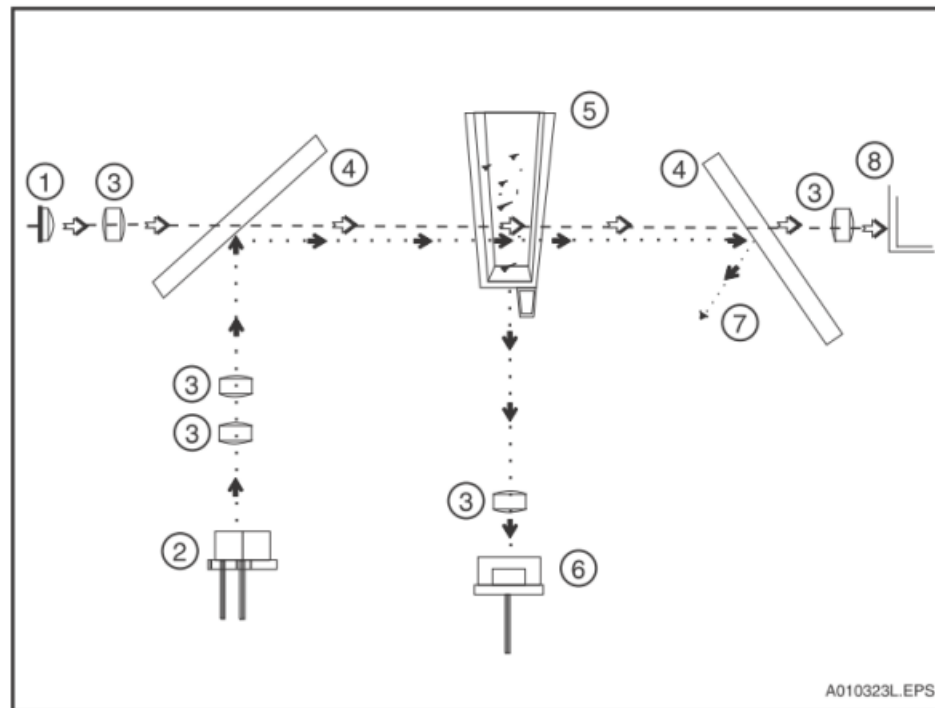


www.beckmancoulter.com/en/products/protein-chemistry/immune-800

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)

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

Vyšetření cirkulujících imunokomplexů – CIK turbidimetrie

- Při onemocněních (např. chřipka) se tvoří imunokomplexy – bolesti svalů a kloubů
- Pouze přechodné obtíže –fyziologické → odstranění ve slezině (makrofágy)
- Autoimunitní onemocnění – tvorba imunokomplexů → ukládání do tkání → zánět
- V určité fázi onemocnění lze imunokomplexy detekovat v krvi – **CIK-PEG** (precipitace imunokomplexů polyethylenglykolem) → zákal

- Měření turbidity – úbytku prošlého světla
- Přístroj – ELISA reader (spektrofotometr)



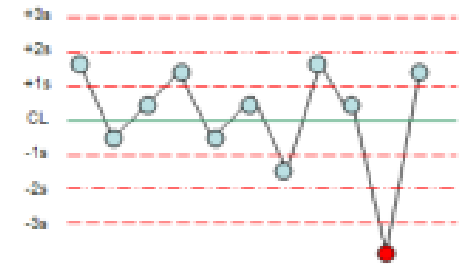
CIK –PEG – pouze orientační vyšetření

- Nevýhoda:
- Detekují se jakékoli imunokomplexy – pozitivní u jakékoli akutní fáze infekce kde se tvoří Ab-Ag → přítomnost imunokomplexů nemusí pro pacienta znamenat zdravotní problém
- Negativní výsledek neznamena, že je pacient zdravý → imunokomplexy už se uložily do tkání a v krvi nejsou
- Typicky pozitivní u **imunokomplexových systémových autoimunit** – RA, SLE
- Malá výpovědní hodnota
- Pozn. alternativou je stanovení vazby imunokomplexů na **C1q** – **ELISA** – stanoví se pouze imunokomplexy které mají schopnost aktivovat komplement

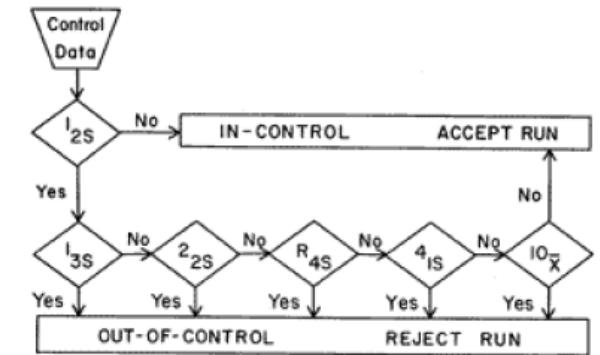
Denná prax na analyzátoch

- 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 patientských 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

Lewey-Jenningsův diagram – sledování kontrol v čase



Westgardova pravidla – detekce chyb v analytické proceduře (rozhoduje o schválení či 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, nefropatie

Interpretácia výsledkov

- ***Hladina IgE (IU/ml):***

- ↑ - alergické stavy prvého typu precitlivenosti

- parazitárne choroby

- autoimunity (Hyper IgE sy.)

- imunodeficiencie (Omenův sy., Wiskot-Aldrichův sy.)

- ***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***

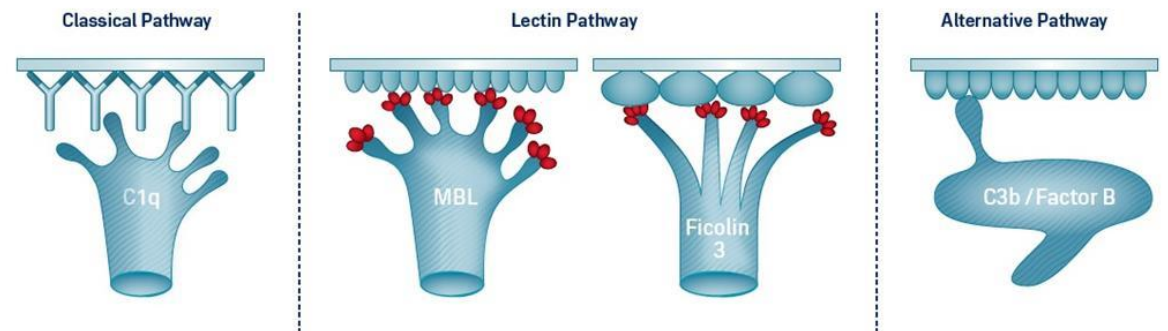
- ↑ - akútna zápalová reakcia = opsonizační a prozánětlivý efekt
 - regulačná funkcia; prenášače iontov; hemokoagulácia

CRP (mg/l)

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

Komplementový systém

- Humorálna zložka vrodenej imunity
- Evolučne „starobylý“ systém – primitívne živočíchy disponujú podobnými proteínmi
- Tvorený desiatkami zložiek (prítomné v sére alebo viazané na povrchu buniek)
- Kaskáda po sebe nasledujúcich krokov spojená s proteolytickým štiepením jednotlivých zložiek
- Amplifikácia pôvodného signálu



Komplement

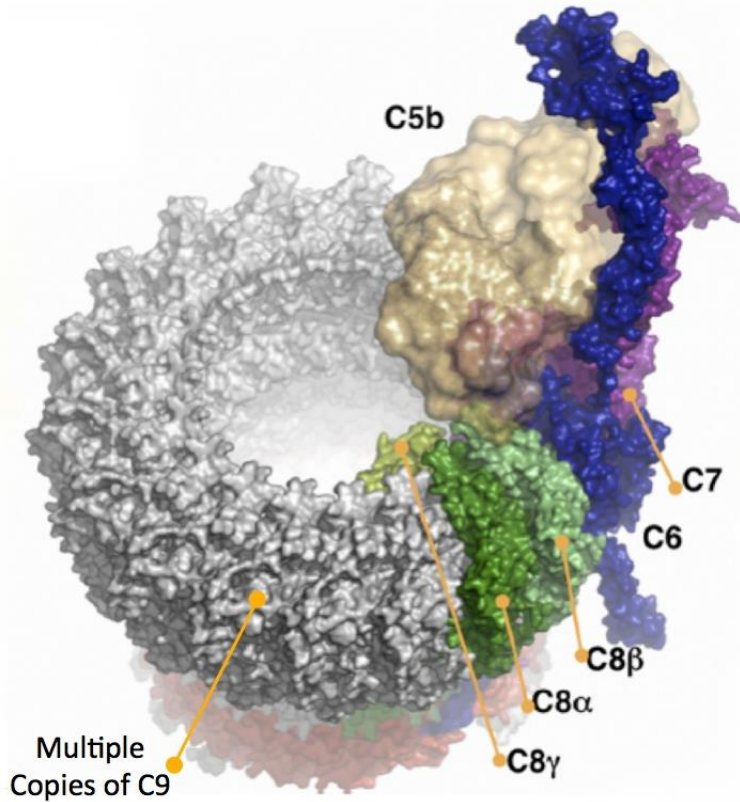
- produkované **jaterními bunkami**, makrofágy, ...

9 základných zložiek: C1-C9

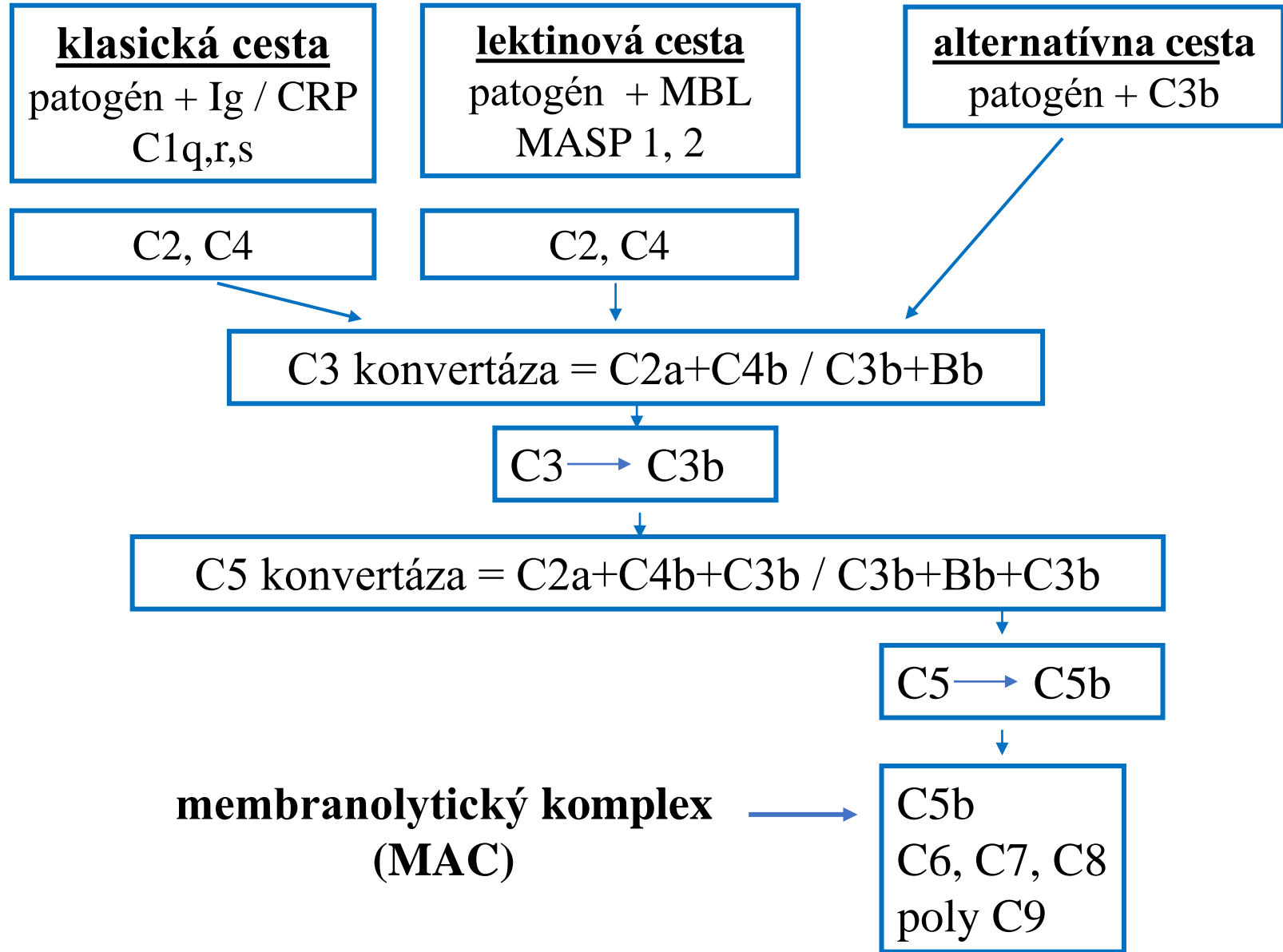
Regulátory

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

Aktivácia komplementu



Zdroj: Aleshin et al. JBC 287 p10210.



Funkcie komplementu

- **Lýza buniek**, mikroorganizmov (MAC)
- **Oponizácia** – 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)

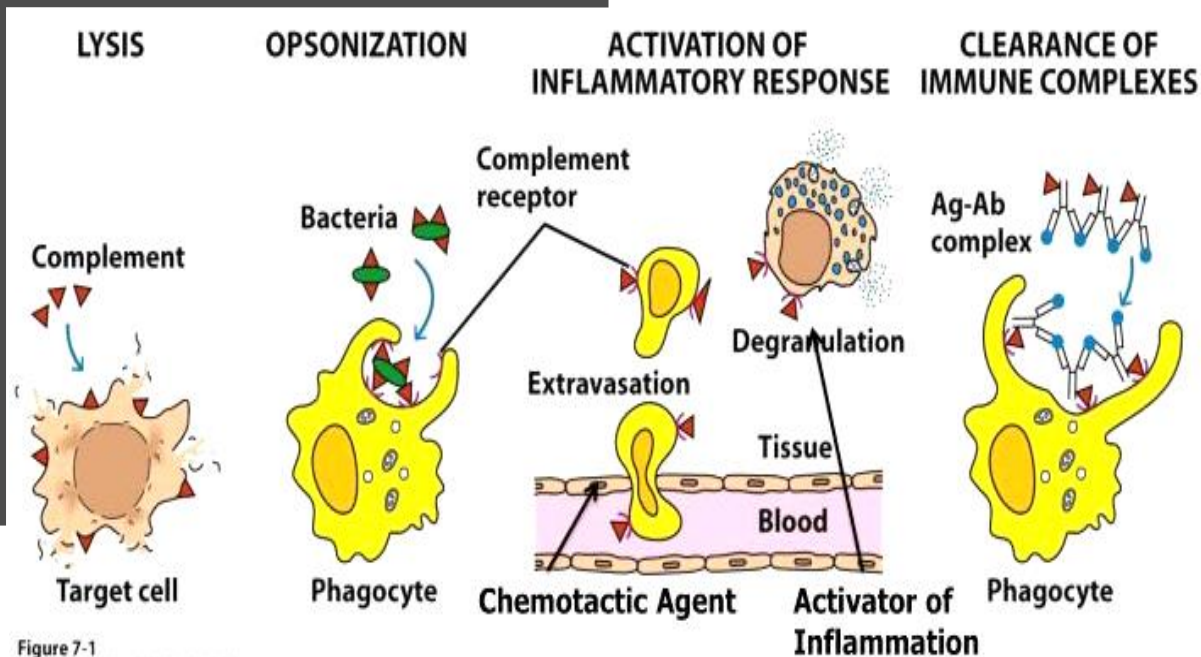


Figure 7-1
Kuby IMMUNOLOGY, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

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

Vyšetrovanie komplementu (odber)

- Špeciálne odberové skúmavky (bez separátorov)
- Spracovanie krvi do 60 min.
- Sérum zamrazené v -20°C (max. týždeň); ľubovoľne bez straty aktivity pri -70°C
- Nesmie byť opakovane zmrazované a rozmrazované

Vyšetrenie komplementu (laboratórne metódy)

- *Stanovenie koncentrácie jednotlivých zložiek*
 - Nefelometria (*sérová hladina C3 a C4 (g/l), C1-INH*); turbidimetria; radiálna imunodifúzia (C2 a C5); ELISA
- *Funkčné vyšetrenie celého systému (jednotlivých aktivačných ciest)*
 - Založené na hemolytickej funkcii komplementu (CH50, AH50)
 - Detekcia konečných zložiek kaskády (MAC) pomocou špecifických protilátok (ELISA)
 - Funkčné vyšetrenie C1 INH
 - ELISA, RIA, LIA

- *Vyšetrenie komplementového systému (sérová hladina C3 a C4 (g/l), C1-INH, MBL, C2 a C5)*

↑ - zápalová aktivita (zriedka)

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

Protokol

- Hlavička:
 - Jméno
 - Datum
 - Úloha č. ...
 - Název úlohy
 - Protokol:
 - **Princip** – základní popis na pár vět (možno doplnit obrázkem, kresbou) ne sloh na celou stranu
 - Pomůcky
 - Postup
 - Výsledky
 - Závěr
- Kreslení obrázků, vkládání fotek
výsledků ze cvičení vítáno
- Rozsah – 1 až 2 strany A4 + přílohy
 - Zpracování na PC nebo ručně
 - Tisk → odevzdání při dalším cvičení
 - Listy secvaknuté, popř. kancelářská sponka