

Základy imunohematologie

Imunohematologie

- Nauka o antigenech, protilátkách, imunitních reakcích aplikovaná na krevní buňky (erytrocyty, granulocyty, lymfocyty, trombocyty)
- Multioborová věda klinicky využívaná při přípravě a podání transfuze a při některých jiných stavech
- Řeší specifickou problematiku, např. hemolytické onemocnění novorozence, autoimunitní hemolytické anemie, potransfuzní reakce
- Uplatnění v transplantologii (hematopoetické buňky, solidní orgány)

Základní pojmy

- Imunita
- Protilátky
- Antigeny
- Komplement
- Imunitní reakce

- Imunohematologické vyšetření

Imunita

- Obecná definice: odolnost proti nemocem/antigenům
- Zajišťuje ji systém buněk, tkání a molekul, tzv. imunitní systém
 - prevence a eradikace infekcí, rozpoznání a odpověď na cizí tkáně a nové antigeny, obrana proti tumorům
- Dva typy: **imunita přirozená** (iniciální protekce proti infekcím) a **imunita získaná** (více efektivní **specifická** obrana proti infekci)

Přirozená/nespecifická/naivní

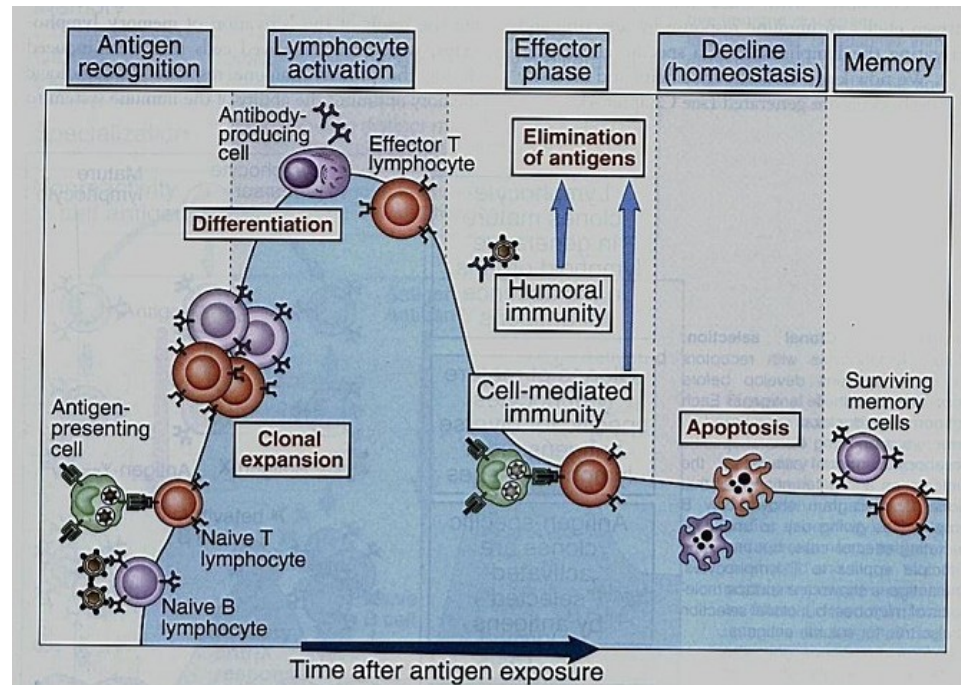
- Okamžitá reakce, brání vstupu aloantigenů do organismu, rychle je eliminuje
- Efektem je uniformní typ reakce proti mikrobům, nereaguje s neinfekčními antigeny
 - Neporušený **epitel**, jeho enzymy a mikroflora
 - **Humorální složka** (plazmatické = komplement, cytokiny, interferony)
 - **Buněčné složka** (fagocyty, NK lymfocyty)

Získaná/specifická/adaptivní

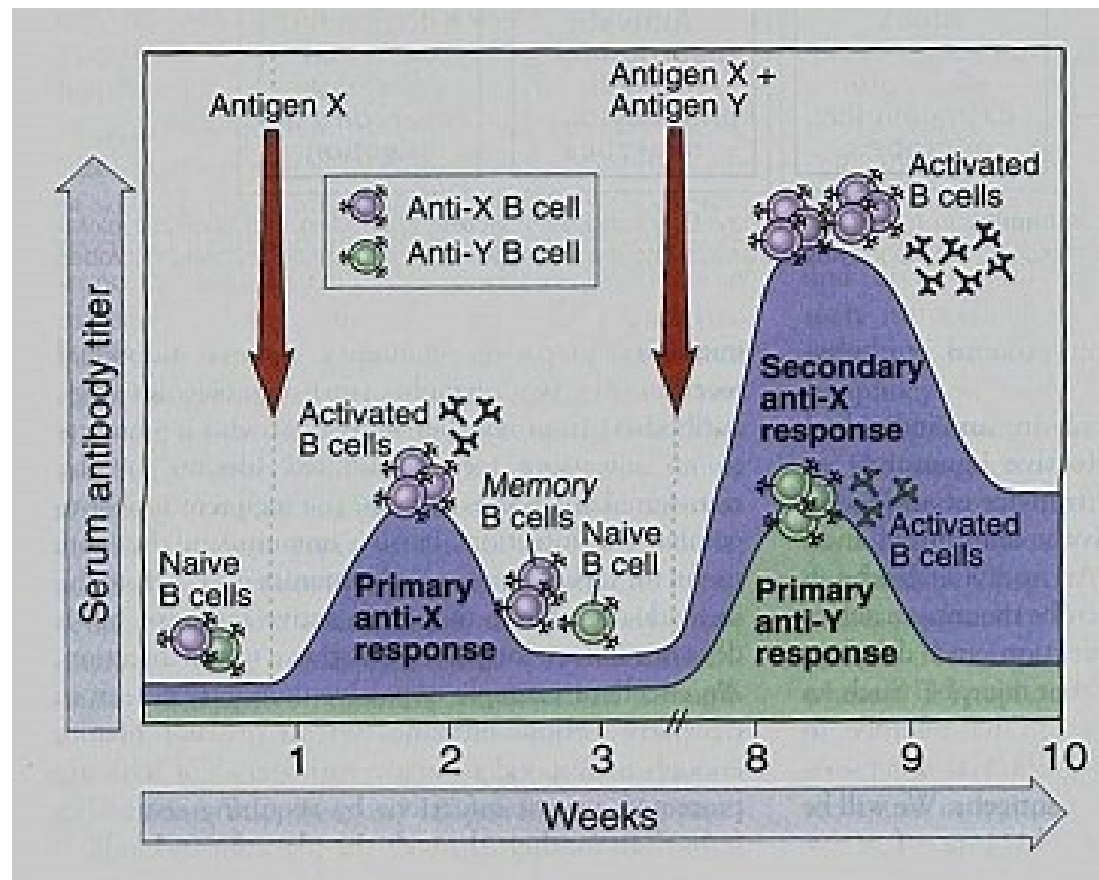
- Pomalejší, ale specifická a více efektivní obrana (stimulují ji antigeny, které pronikly do tkání; rozpoznání antigenu v lymfatických orgánech)
- Buňky **lymfocyty** exprimují **specifické receptory**, které rozpoznávají cizorodé substance
- Má dvě specializované funkce
 - **Humorální složku: protilátky tvořené B lymfocyty** eliminují mikroby z *extracelulárních* tekutin
 - **Buněčnou (celulární) složku: T lymfocyty CD4+ a CD8+** eliminují mikroby z *buněk*
- Lymfocyty působí spolu s nescifickými mechanizmy (protilátky se navážou na mikroby, to vede k jejich snadnější fagocytóze)

Specifická humorální imunita

- Rozpoznání antigenu v lymfatických orgánech
 - Imunitní systém rozliší více jak bilion různých Ag
- **Proliferace a klonální expanze B lymfocytů** (rychlá protilátková odpověď buněk se stejným receptorem pro antigen)



Imunitní odpověď primární x sekundární



Buňky v imunitní reakci

Lymfocyty

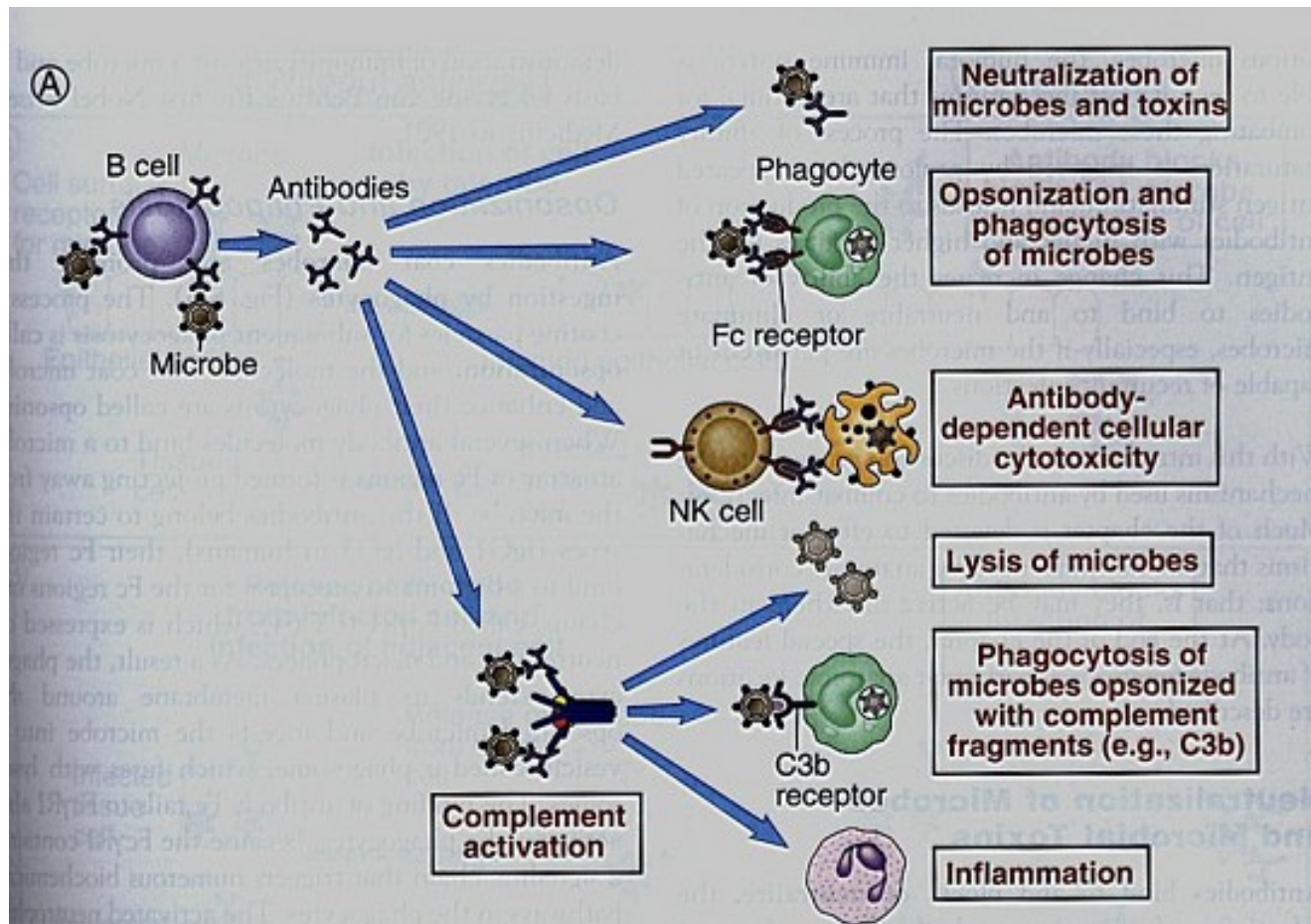
- *Exprimují specifické receptory pro antigeny /CD znaky*
 - *BCR pro B lymfocyty: reagují se solubilními Ag a s různými povrchovými antigeny, na které se navazují*
 - *TCR pro T lymfocyty: rozpoznává antigenní peptidy prezentované pomocí HLA*
(T_{helper} , $T_{\text{cytolytic}}$, T_{reg})
- *Paměťové lymfocyty přežívají v klidu, po dalším kontaktu s původním antigenem navodí sekundární odpověď*

Imunohematologie = **protilátkový typ** specifické imunitní odpovědi

Protilátky /imunoglobuliny

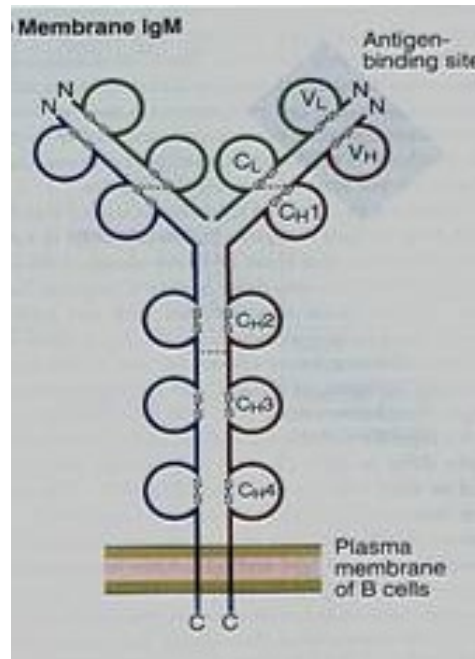
- produkty B lymfocytů
- přítomné na povrchu membrány lymfocytů jako antigenní receptory nebo rozpuštěné jako proteiny v plazmě a v mukózních tekutinách
- neutralizují a eliminují antigeny z krve a sliznic (nepůsobí uvnitř buněk)

Funkce protilátek



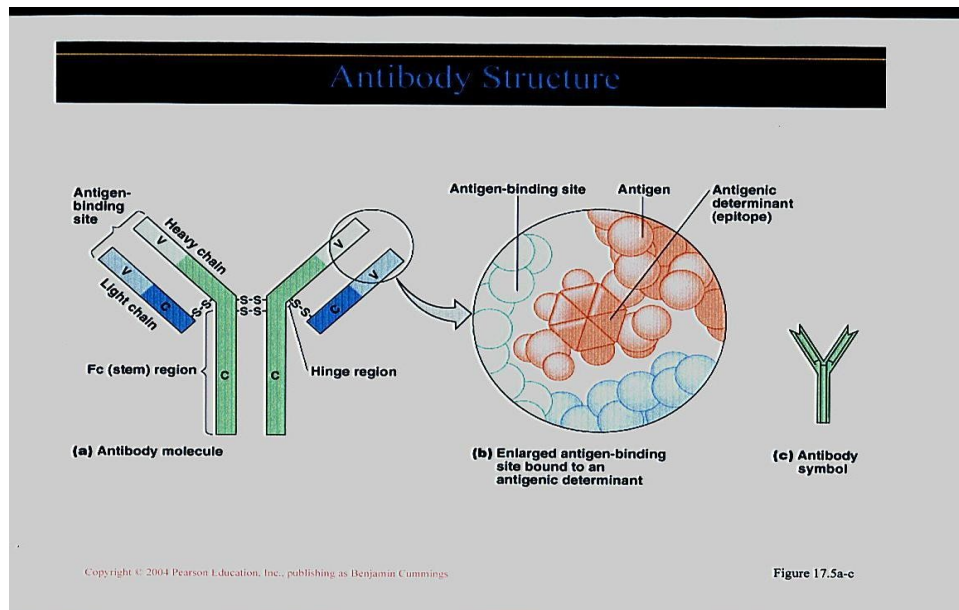
Struktura protilátek

- BCR
 - tvoří monomer IgM (příp. IgD) zakotvený Fc fragmentem v membráně + signalizační molekuly
 - klony lymfocytů se vzájemně liší vazebným místem



Struktura protilátek

- Řetězce těžké H a lehké L (H2L2)
 - Lehké řetězce: kappa, lambda
 - Těžké řetězce: alfa, gamma, delta, epsilon, mí
- Fragment F_{ab} + fragment F_c , pantová oblast
- Variabilní část obsahuje oblast pro vazbu antigenu
- Konstantní část pro jiné funkce (komplement, fagocytóza)



Immunoglobulins (i.e., antibodies)

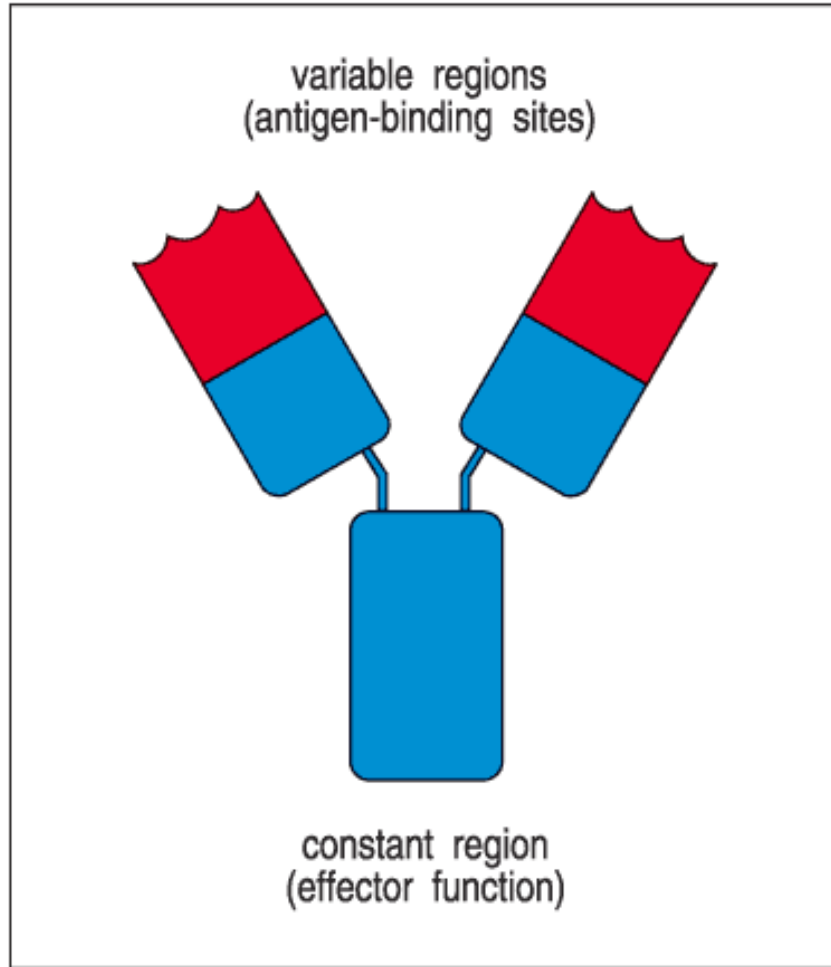


Fig 1.16 © 2001 Garland Science

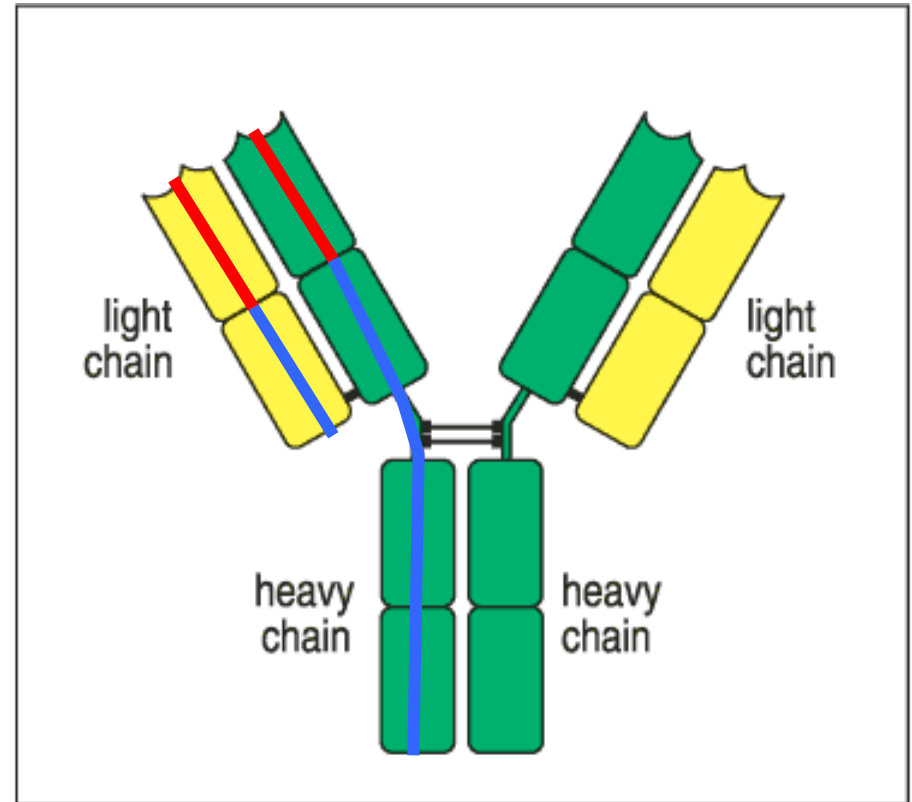


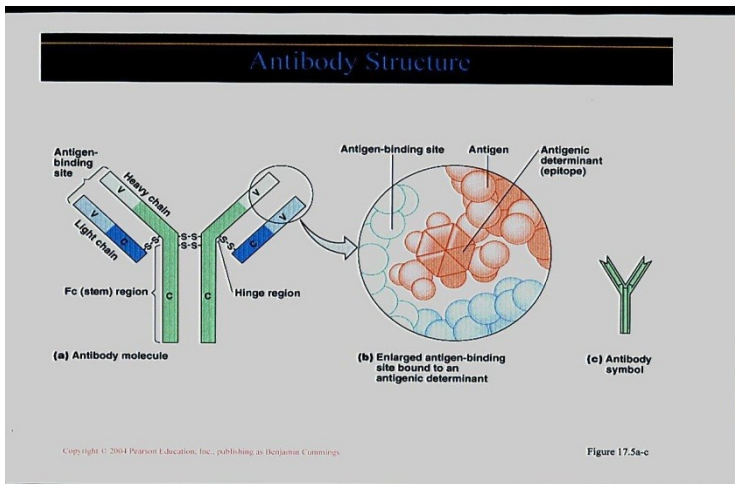
Fig 1.17 © 2001 Garland Science

Struktura protilátky

Monomery IgG, IgD, IgE = dvě vazebná místa pro Ag

Dimer IgA = čtyři vazebná místa pro Ag

Pentamer IgM (hexamer) = deset (dvanáct) míst pro Ag



IgM antibodies

- Pentamer
- 5-10% of serum antibodies
- Fix complement
- In blood, lymph, on B cells
- Agglutinates microbes; first Ab produced in response to infection
- Half-life = 5 days

The diagram shows a pentamer of IgM antibodies. Five Y-shaped antibody units are arranged in a circle, connected to each other by disulfide bonds (S-S). A central J chain is also present, connecting the units.

Disulfide bond

J chain

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

IgA antibodies

- Dimer
- 10-15% of serum antibodies
- In secretions
- Mucosal protection
- Half-life = 6 days

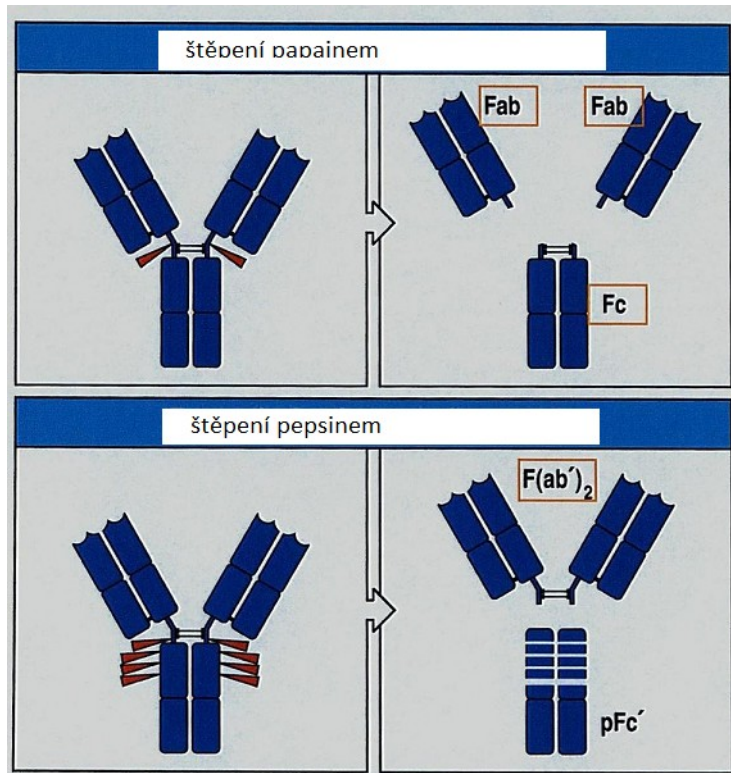
The diagram shows a dimer of IgA antibodies. Two Y-shaped antibody units are connected to each other by a J chain. A secretory component is also shown, which is attached to the J chain.

J chain

Secretory component

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

Proteolytické štěpení protilátek



- Štěpení papainem
 - 2 monovalentní F_{ab} fragmenty
 - Fc fragment
- Štěpení pepsinem
 - 1 bivalentní Fab fragment
 - Fc fragment (štěpné produkty)

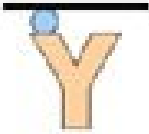
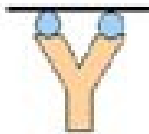
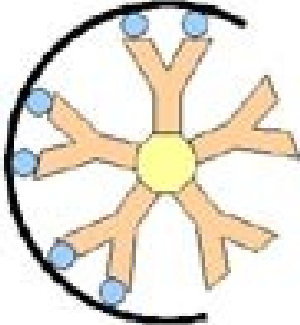
Pojmy

Afinita: Síla reakce mezi 1 antigenní determinantou a 1 vazebným místem protilátky

Avidita: síla vazby mezi multivalentní protilátkou a antigenem s různými determinantami

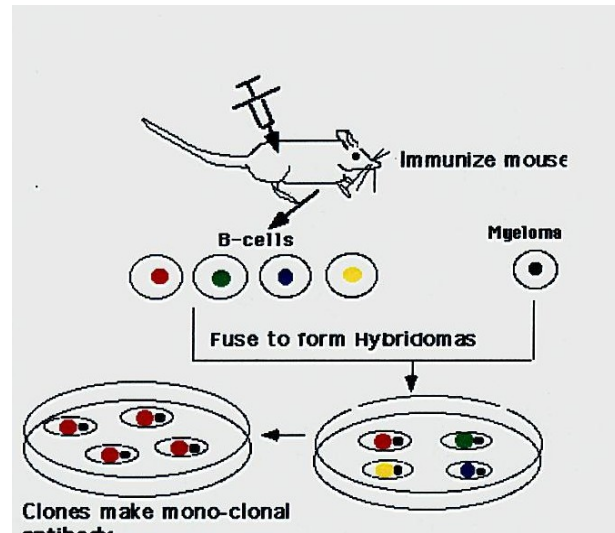
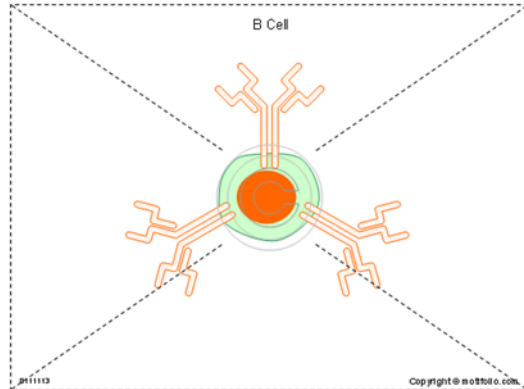
Specifita: schopnost protilátky reagovat s 1 antigenní determinantou

Cross-reakce: schopnost protilátky reagovat s více antigenními determinantami

| | | |
|--|---|--|
|  |  |  |
| $K_{eq} = 10^4$ Affinity | 10^6 Avidity | 10^{10} Avidity |

Typy protilátek dle vzniku

- **Polyklonální** (lidské): z různých buněčných linií lymfocytů, rozeznávají různé epitopy stejného antigenu
- **Monoklonální Abs**: identické protilátky jednoho klonu lymfocytů, rozeznávají jeden konkrétní epitop

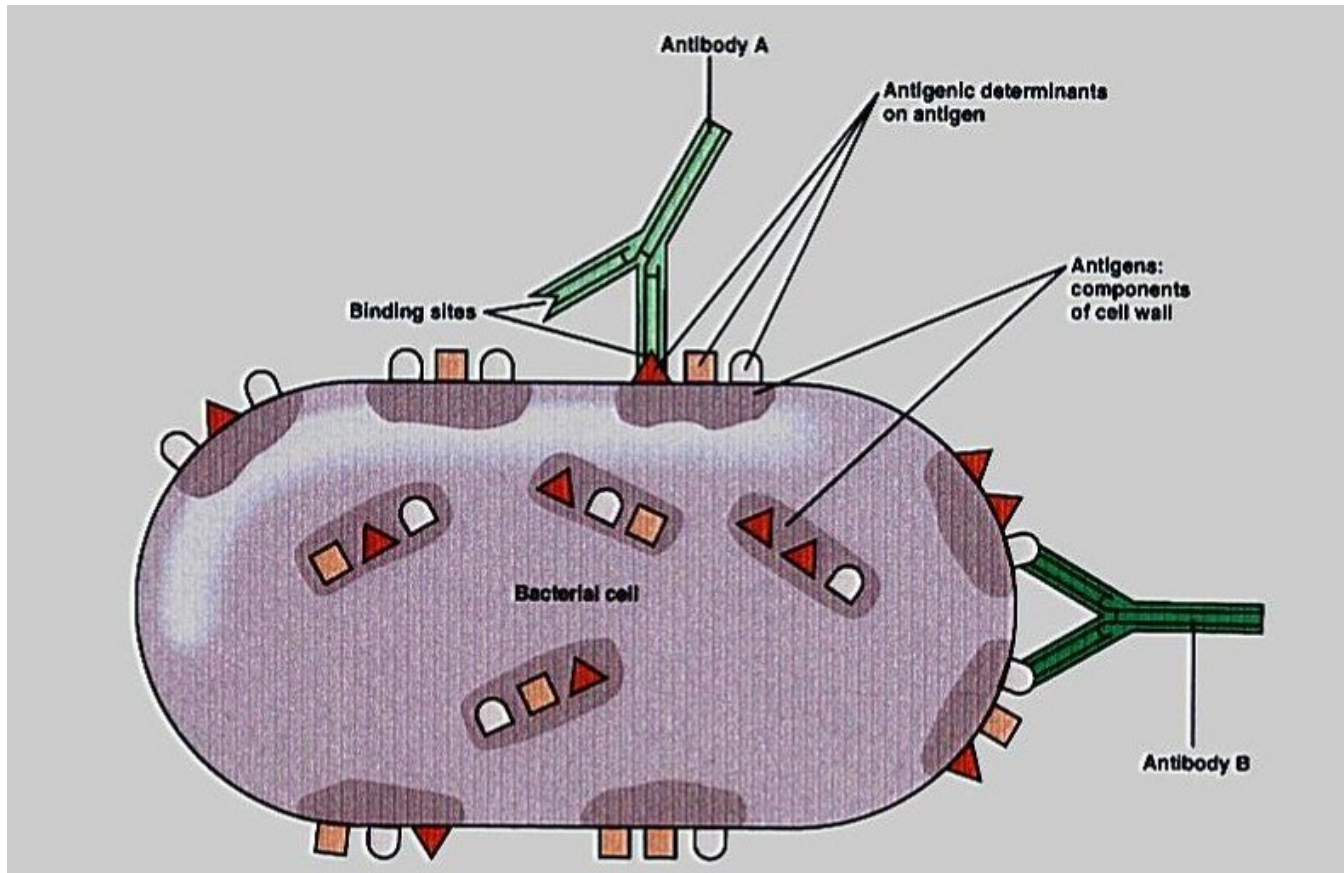


- Diagnostické použití (dg. séra) pro vyšetření krevních skupin

Antigeny

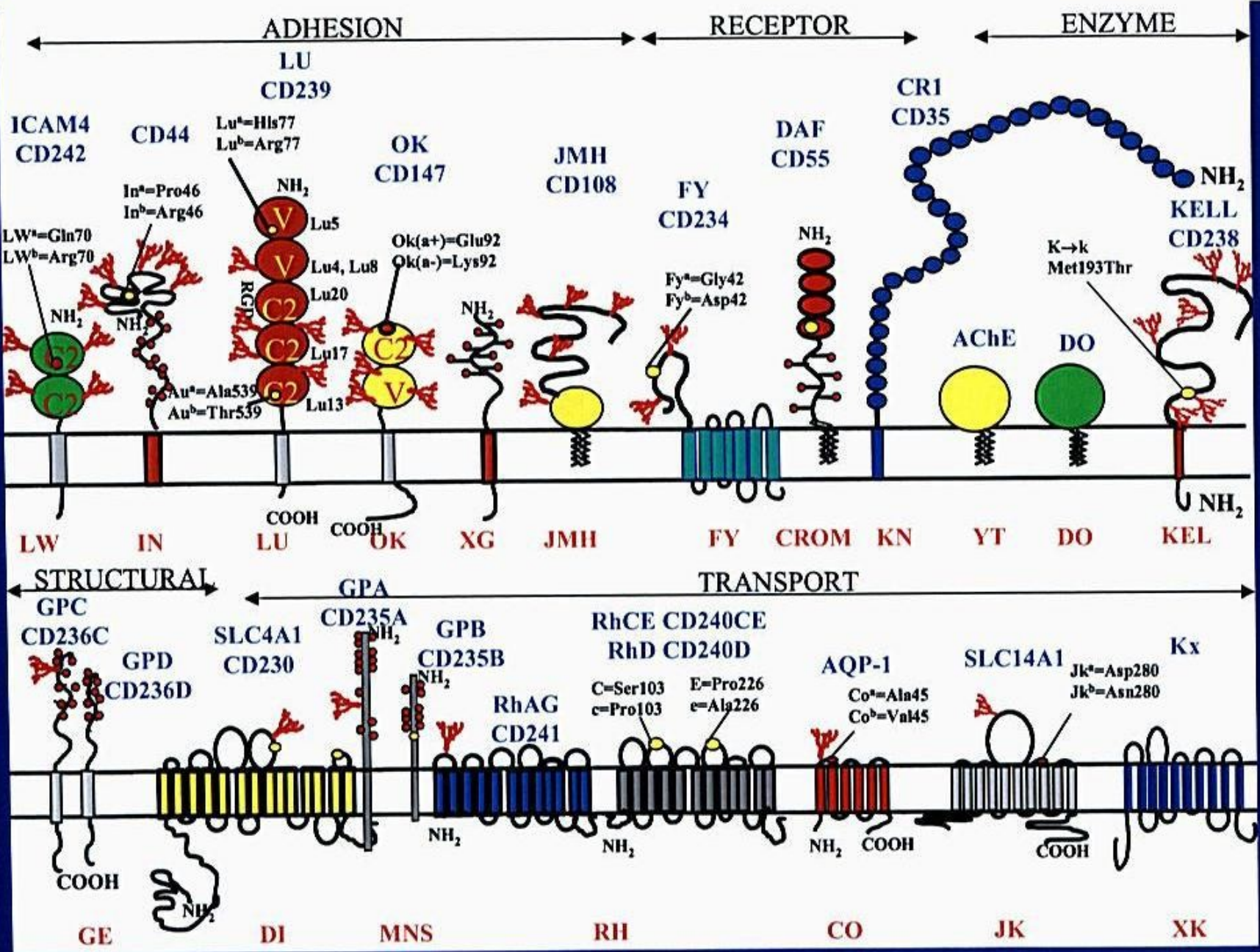
- Cizí substance navozující imunitní odpověď
- **antigenní determinanty (epitopy)** = část antigenu, na kterou se váže protilátka
 - Jeden antigen může mít různé epitopy
- Obvykle proteiny, polysacharidy, lipidy, NK
- Antigeny v imunohematologii
 - Krevní skupiny erytrocytů
 - HLA (histokompatibilní,transplantační) antigeny

Vazba antigen - protilátka



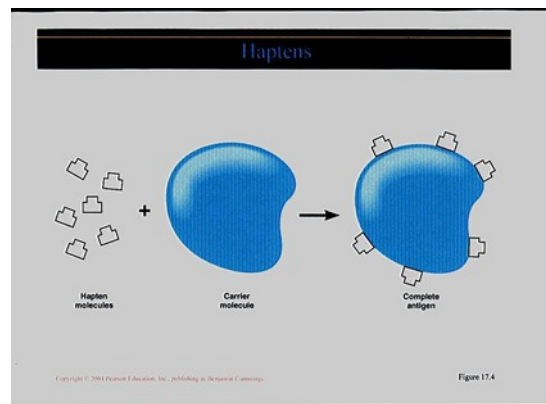
Krevní skupiny

- Antigeny na buněčné membráně erytrocytů
 - zajišťují transport látek
 - receptory pro mikroorganizmy
 - adhesivní funkce
 - jsou enzymaticky aktivní
 - udržují morfologické a strukturální vlastnosti erytrocytu



Krevní skupiny

- Obvykle velké molekuly, složené sloučeniny (proteiny, polysacharidy, lipidy)
- Větší molekuly a komplexy molekul = lepší imunogeny
- Imunogenicita závisí na stupni cizorodosti, strukturální stabilitě molekuly, dostatečném počtu Ag determinant, době expozice, způsobu podání
- Autoprotilátky vznikají při selhání autotolerance
- Hapten = malá molekula neimunogenní, spojuje se s větším nosičem



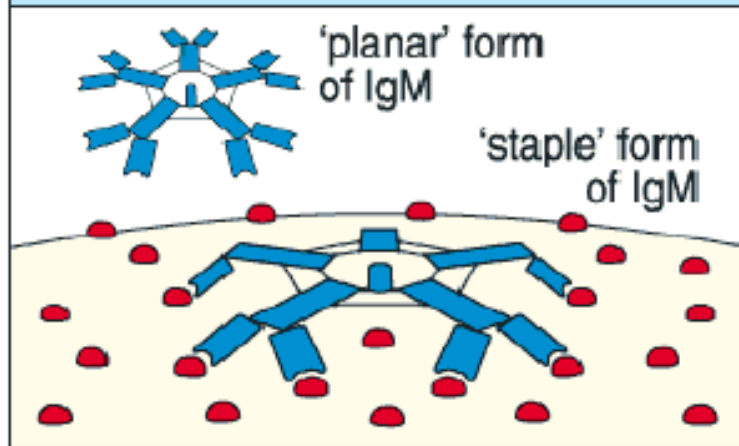
Komplementový systém

- Komplex proteinů v plazmě a proteinů vázaných na povrchu různých buněk
- Převážně proteolytické enzymy
 - enzymatická kaskáda při aktivaci
 - aktivované proteiny štěpí další složky komplementu (nejdůležitější proteiny C1-C9)
 - vzniká velký počet efektorových molekul
- Funkce v obranyschopnosti
 - Oponizace při fagocytóze
 - Chemotaxe fagocytů
 - Zánětlivá reakce
 - Lýza buněk (tvorba membránolytického komplexu)

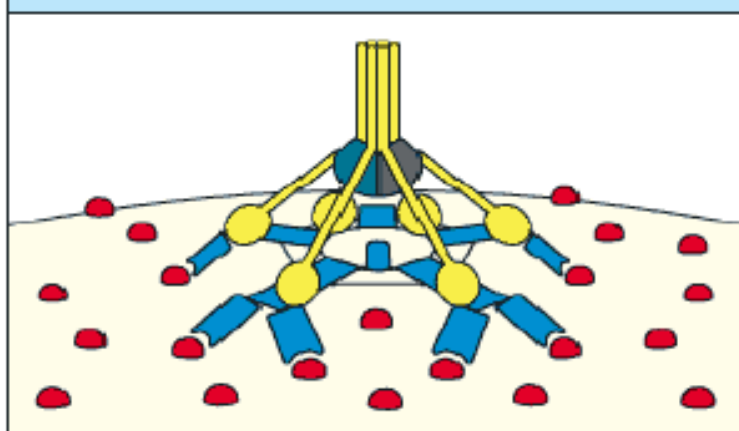
Aktivace komplementu

- Mikrobiální nebo protilátkami navázanými na antigenech
- 3 cesty aktivace komplementové kaskády:
 - **Klasická (kontakt s protilátkou)** – uplatňuje se v imunohematologii
 - **Lektinová** (vazba lektinu na bakteriální povrchy)
 - **Alternativní** (s endotoxinem)
- Odlišné spouštěcí mechanismy aktivace
- **V imunohematologii aktivace protilátkami: 1 molekula IgM** stačí pro vazbu C1q, ale pro stejnou vazbu musí být **2 molekuly IgG**

Pentameric IgM molecules bind to antigens on the bacterial surface and adopt 'staple' form

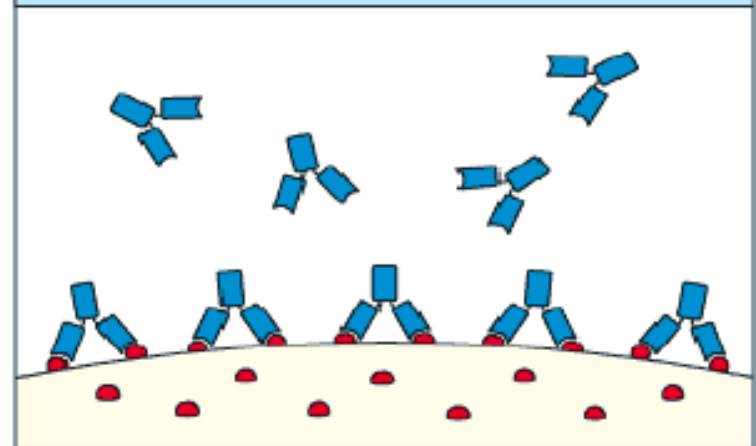


C1q binds to one bound IgM molecule

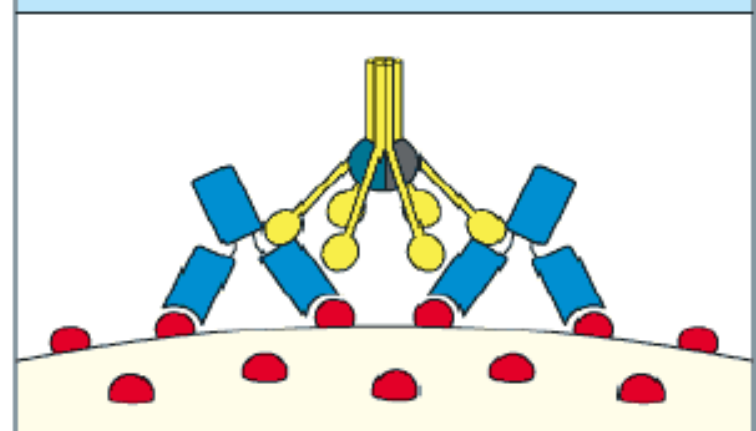


Binding of C1q to Ig activates C1r, which cleaves and activates the serine protease C1s

IgG molecules bind to antigens on the bacterial surface



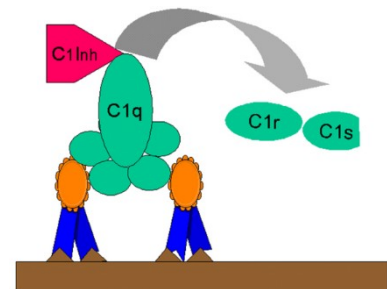
C1q binds to at least two IgG molecules

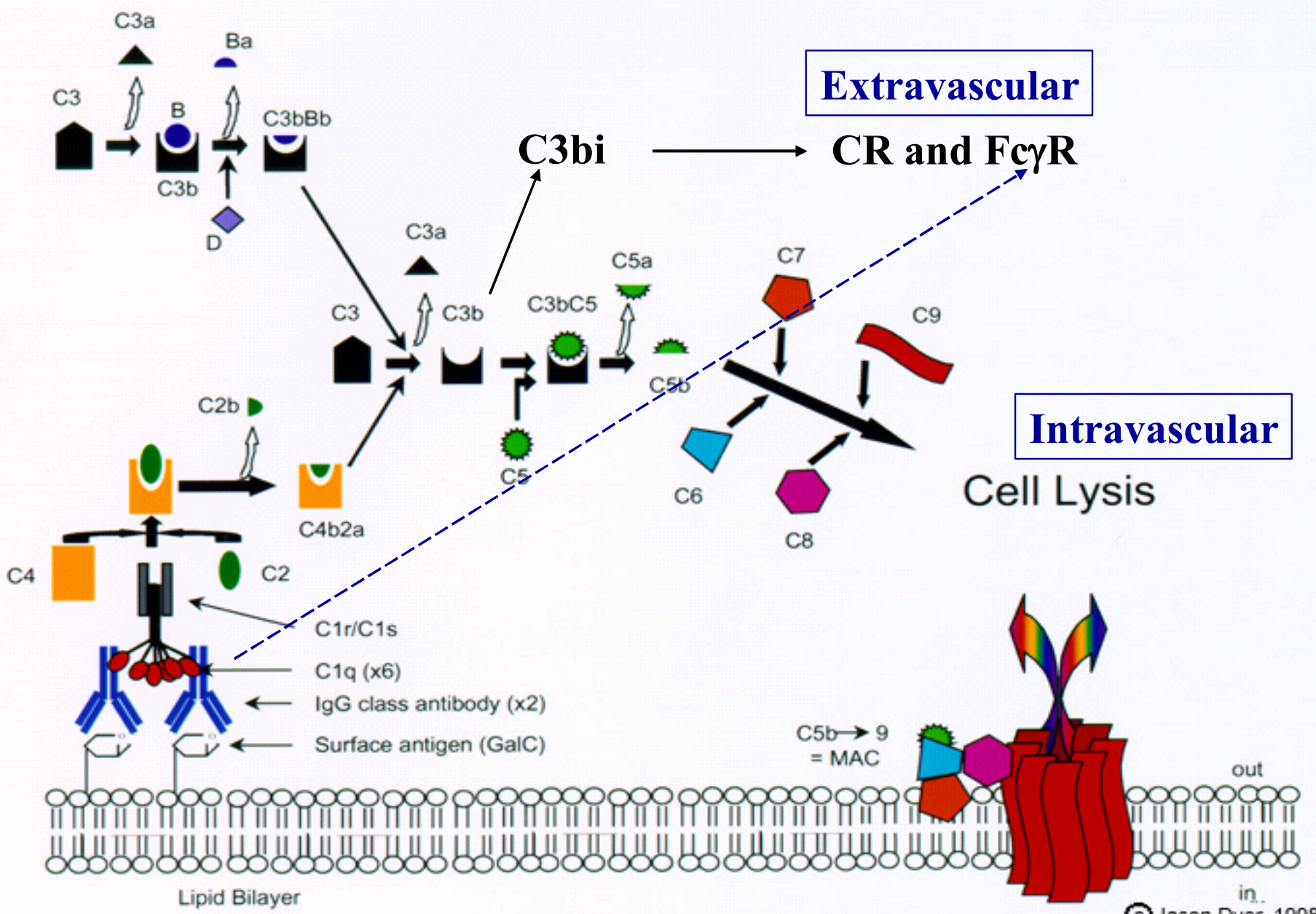


Působení komplementu na erytrocyty

- **intravaskulární hemolýza erytrocytů**
např. akutní HTR při AB0 neshodě, cold AIHA
- **extravaskulární hemolýza v RES = fagocytóza**
např. pozdní HTR, HON, warm AIHA

Inhibiční mechanismy působí na různých úrovních regulace (C1 INH, DAF, C4BP, CD59...)





Extravascular

CR and FcγR

Intravascular

Cell Lysis

C5b → 9 = MAC

Lipid Bilayer

Imunologická tolerance, autoimunita

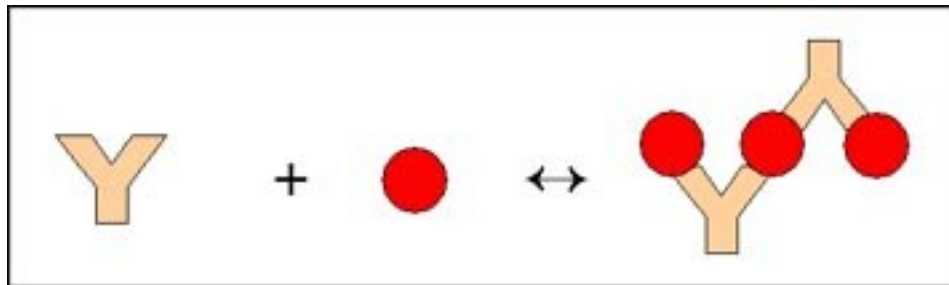
- Intaktní imunitní systém **rozezná vlastní tkáň od cizích**
- Selhání autoregulačních mechanismů vede k poruše autotolerance
- Reakce lymfocytů uniklých fyziologické regulaci s vlastními antigeny
- Různé orgánové projevy – revmatoidní artritida, lupus erytematodes, autoimunní hemolytická anemie
- Dědičná dispozice (MHC geny i non-HLA geny) + spouštěcí faktory z okolí (infekce, záněty)

Laboratorní techniky používané v imuno hematologii

Cíl: detekce imunních komplexů Ag+Ab

- **Aglutinační reakce** (antigen = partikule erytrocytů)
- Vzácně jiné metody (ELISA, imunofluorescence, FCM, DNA analýza...)
- Různé aglutinační techniky - testy sklíčkové, zkumavkové, pevná fáze, **sloupcová aglutinace v gelu**
- Testy při teplotě 20-23°C (RT), 4°C, **37°C**

Princip přímé aglutinace

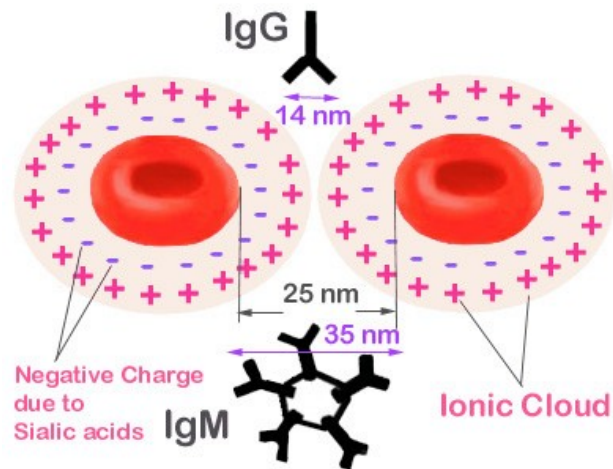


Titr / prozona - aglutinace kvantitativní

| Patient | 1/2 | 1/4 | 1/8 | 1/16 | 1/32 | 1/64 | 1/128 | 1/256 | 1/512 | 1/1024 | Pos. | Neg. | Titer |
|---------|-----|-----|-----|------|------|------|-------|-------|-------|--------|------|------|-------|
| 1 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ○ | ○ | ○ | ○ | ● | ○ | 64 |
| 2 | ● | ● | ● | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ● | ○ | 8 |
| 3 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ○ | ● | ○ | 512 |
| 4 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ● | ○ | <2 |
| 5 | ● | ● | ● | ● | ● | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ● | ○ | 32 |
| 6 | ○ | ○ | ● | ● | ● | ● | ● | ○ | ○ | ○ | ● | ○ | 128 |
| 7 | ● | ● | ● | ● | ● | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ● | ○ | 32 |
| 8 | ● | ● | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ● | ○ | 4 |

Zeta potenciál – elektronegativní pole brání autoagregaci erytrocytů

Mechanism of Red Cell Agglutination



Antigen-antibody complexes are held together by non-covalent forces
 (therefore, antigen binding by antibody is reversible)

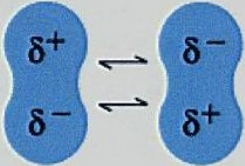
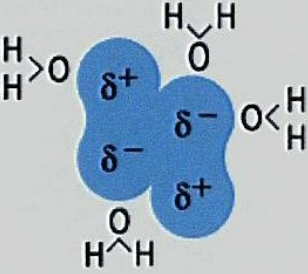
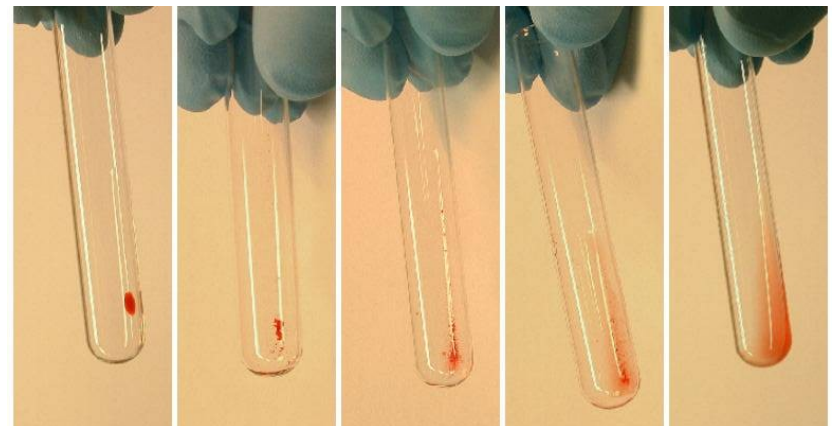
| Noncovalent forces | Origin | |
|----------------------|--|--|
| Electrostatic forces | Attraction between opposite charges | $-\overset{\oplus}{\text{N}}\text{H}_3 \quad \overset{\ominus}{\text{O}}\text{OC}-$ |
| Hydrogen bonds | Hydrogen shared between electronegative atoms (N,O) | $\begin{array}{c} \diagup \text{N} - \text{H} - - \text{O} = \text{C} \diagdown \\ \delta^- \quad \delta^+ \quad \delta^- \end{array}$ |
| Van der Waals forces | Fluctuations in electron clouds around molecules oppositely polarize neighboring atoms |  |
| Hydrophobic forces | Hydrophobic groups interact unfavorably with water and tend to pack together to exclude water molecules. The attraction also involves van der Waals forces |  |

Fig 3.9 © 2001 Garland Science

Aglutinace

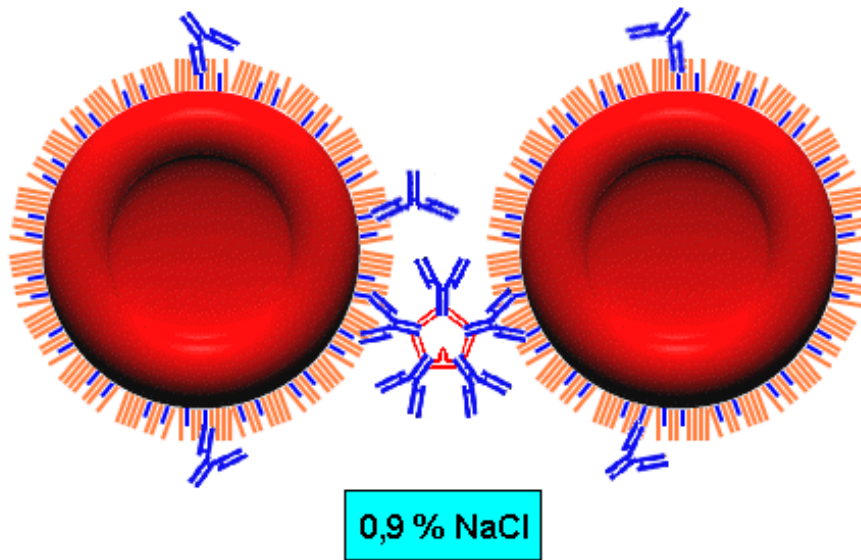
- Použití při vyšetření krevních skupin, při vyšetření protilátek proti erytrocytům, v předtransfuzních testech
- Vliv komplementu na výsledek reakce/ hemolýza – falešně negativní výsledek- prevence antikoagulací

| | Anti-A | Anti-B | Anti-AB | | A cells | B cells | O cells |
|----|--------|--------|---------|--|---------|---------|---------|
| A | | | | | | | |
| B | | | | | | | |
| AB | | | | | | | |
| O | | | | | | | |



Aglutinace přímá

- Solné prostředí = fyziologický roztok
- **IgM** molekula překlene vzdálenost mezi 2 ery
 - IgM = kompletní protilátky



Přímá aglutinace

- 1. fáze **senzibilizace erytrocytu protilátkou**

Vytvoření **slabé vazby mezi Ag a Ab** závisí na:

- Izotypu Ig (IgM, IgG, vzácně IgA)
- Teplotě (klinický význam 37°C, při vyšší teplotě disociace molekul Ab z vazby, při nižší teplotě prodloužení inkubace)
- Iontové síle prostředí (obsah iontů Na a Cl = izotonický roztok PBS, neutralizující efekt. Při použití LISS rychlejší vznik imunních komplexů)
- pH prostředí (přijatelné cca 7. Pro některé Ab individuální. PBS zajišťuje alkalizaci. V nižším pH disociace Ab)
- Počtu antigenních míst /densitě (nadbytek Ag x nadbytek Ab), poměr sérum/erys (snížení vede k vyšší senzitivě testu)

- 2. fáze vytvoření **pevného spojení mezi Ag a Ab (mezi erys)**

- Vznik pevných chemických vazeb mezi senzibilizovanými erys (protilátky spolehlivě přemostí a vzájemně spojí erytrocyty)
- **Lze ovlivnit** (vzdálenosti mezi erys) – centrifugací, koloidy, polymery, aditivy testů, chemickými úpravami diagnostik

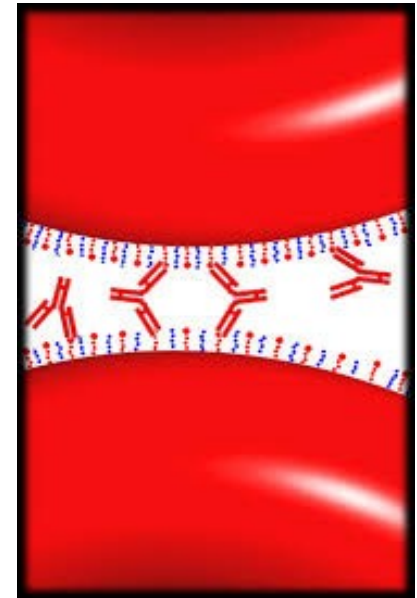
Aglutinace nepřímá

- Zásadní test v imunohematologii
- Hlavně pro **IgG** protilátky, které nejsou schopné přímé aglutinace
- Detekuje i jiné typy protilátek podle použitého AGH
- Nepřímá aglutinace vyžaduje modifikovat 2. fázi a nějakým způsobem **vizualizovat vzniklé imunní komplexy**:
 1. úprava erytrocytů pomocí **enzymů**
 2. **použití testu s AGH sérem** (antiglobulin human)

Nepřímá aglutinace

1. Enzymové testy:

- Bromelin, ficin, papain, trypsin
 - štěpí kyselinu sialovou (neuraminovou) na membráně erys, odkrývá antigenní místa a membránové antigeny se tak stávají dostupnější pro protilátky
 - snižují elektronegativní povrchový náboj erys a vzájemně je přibližují, umožňují tím navázání protilátky
 - v prostředí s enzymem získává protilátka vyšší schopnost aglutinovat erys (nevýhoda: mohou se demaskovat nežádoucí antigeny/kryptantigen)
 - Obtížná standardizace enzymových testů (nespecifické reakce)
- Jednofázový test (přidání enzymu do reakce)
- Dvoufázový test (enzymované erys)



Nepřímá aglutinace

2. Antiglobulinové (Coombsovy) testy:

- Pro vyšetření protilátek v séru a navázaných na erys, zkoušku kompatibility, vyšetření některých krevních skupin
- Používají **protilátky proti lidským proteinům (antiglobulin = AGH sérum)**
- Senzitivní technika cca (až 150 molekul Ab/ery)
- Různé metody: testy zkumavkové, pevná fáze, sloupcová aglutinace
- Modifikace testů se zkrácením doby inkubace v LISS, užití PEG
- Riziko chyb a falešných výsledků

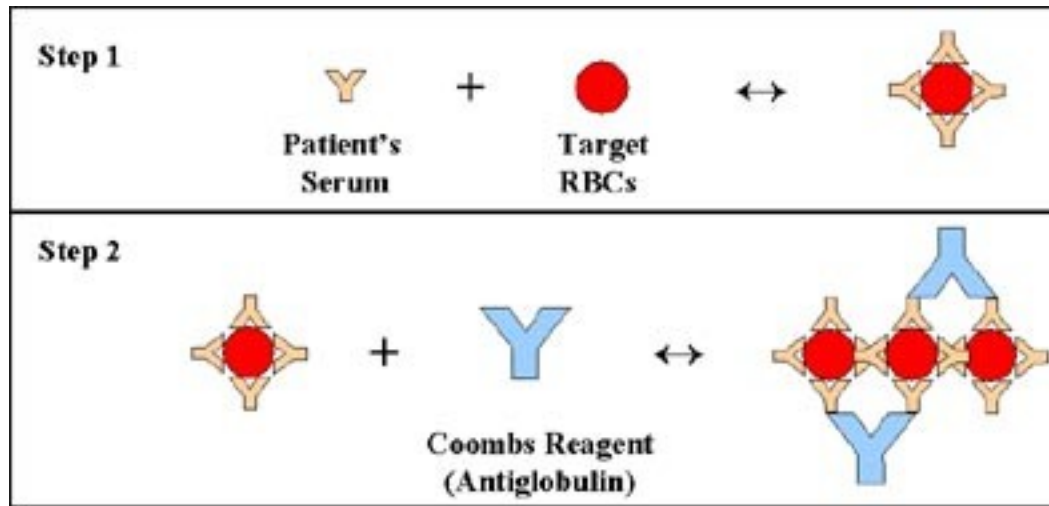
AGH testy

- AGH detekuje lidské proteiny: protilátky a komplement
- Reaktivita AGH s různými lidskými globuliny (anti-IgG,-IgM,-IgA,-C3d..)
- AGH reaguje s navázanými nebo volnými protilátkami za vzniku aglutinace

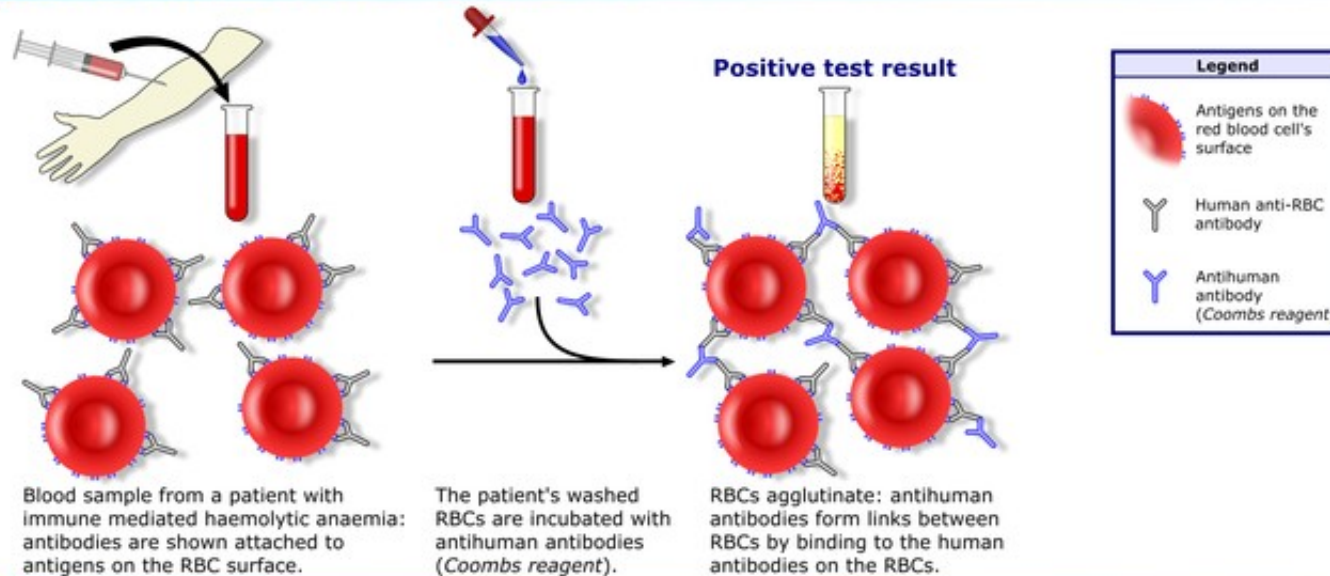
Dva typy AGH testů:

1. **Přímý AGH test (PAT)** pro detekci protilátek navázaných na erys (*při in vivo senzibilizaci*)
1. **Nepřímý AHG test (NAT)** pro detekci protilátek v plazmě/séru (*po in vitro inkubaci s erys*)

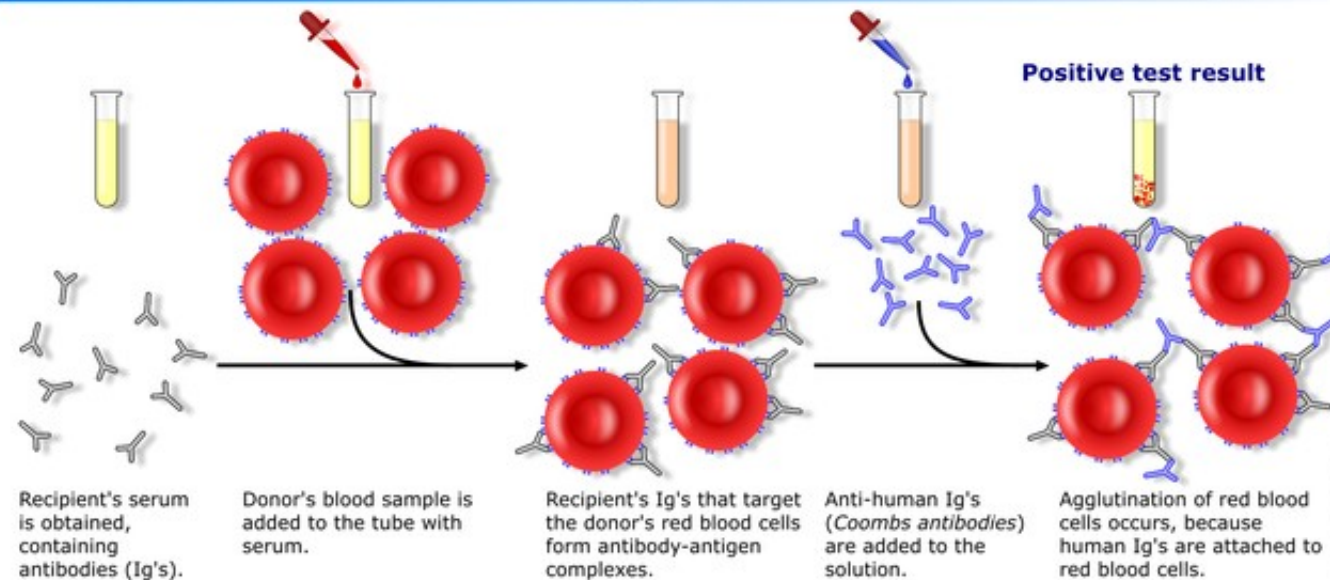
Princip AGH reakce



Direct Coombs test / Direct antiglobulin test



Indirect Coombs test / Indirect antiglobulin test



AGH reagencie/séra

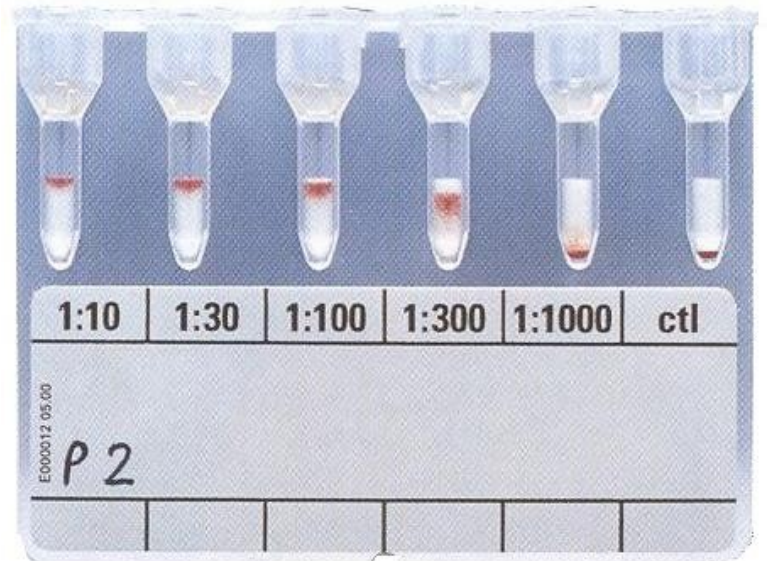
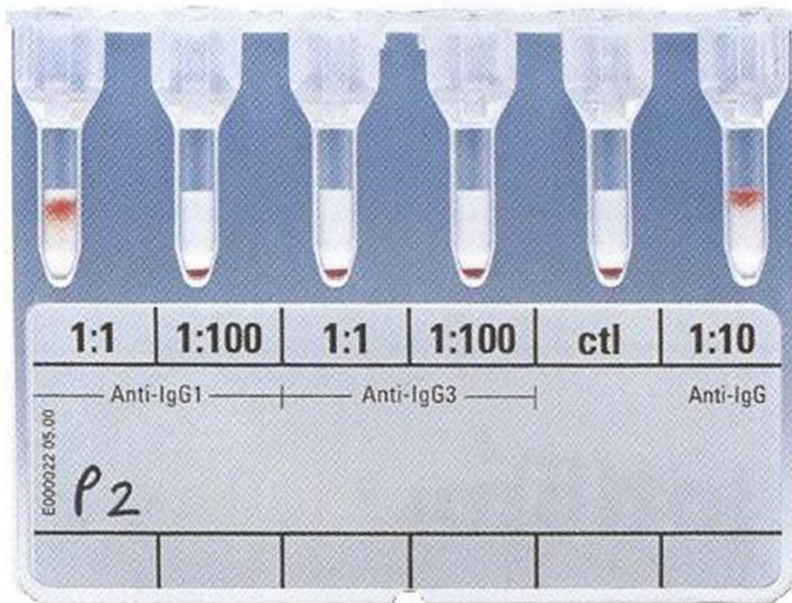
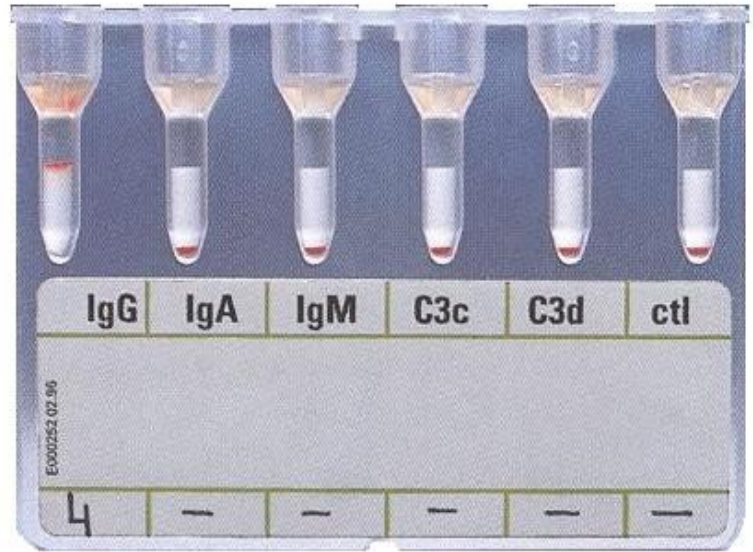
Polyspecifické AGH (-IgG, -C3d):

- Zásadní důležitost: detekuje IgG protilátky navázané (senzibilizující) na erys i protilátky volně přítomné v séru
- Detekuje všechny klinicky významné protilátky

Monospecifická AGH:

Anti-IgG sérum: detekuje pouze protilátky IgG na erys
(lze použít)

Anti-C3 sérum: detekuje komplement na erys (jen pro některé situace)



Co ovlivní senzitivitu AGH testu?

- Teplota prostředí
- Ionty v prostředí
- Poměr séra/erytrocytů (2kp séra : 1kp ery)
- Doba inkubace (pro IgG 15min při 37°C v LISS)

Aktuální doporučení: AGH test s použitím roztoku o nízké iontové síle (LISS), optimální je použití metody sloupcové aglutinace v gelovém mediu

Nevýhody AGH testů souvisí s promýváním erytrocytů (zkumavkové testy)

Výsledky falešně pozitivní

Spontánní aglutinace (silné aglutininy - aglut. již před promytím), autoprotilátky, kryptantigeny, hypercentrifugace, silikonové zkumavky, volumexpandery, kontaminovaný materiál aj.

Výsledky falešně negativní

Chyba promytí s neutralizací přidaného AGH volnými protilátkami, časové prodlení, nedodržení teploty, kvalita AGH, podcentrifugování, prozora, technické chyby

Kontrola přidáním erytrocytů s navázanou slabou protilátkou k negativnímu test = vznikne aglutinace

Pevná fáze, sloupcová aglutinace

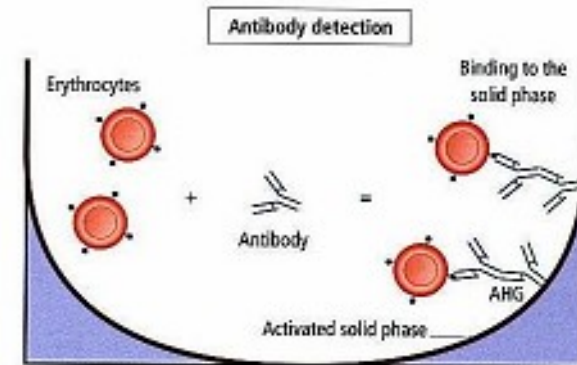
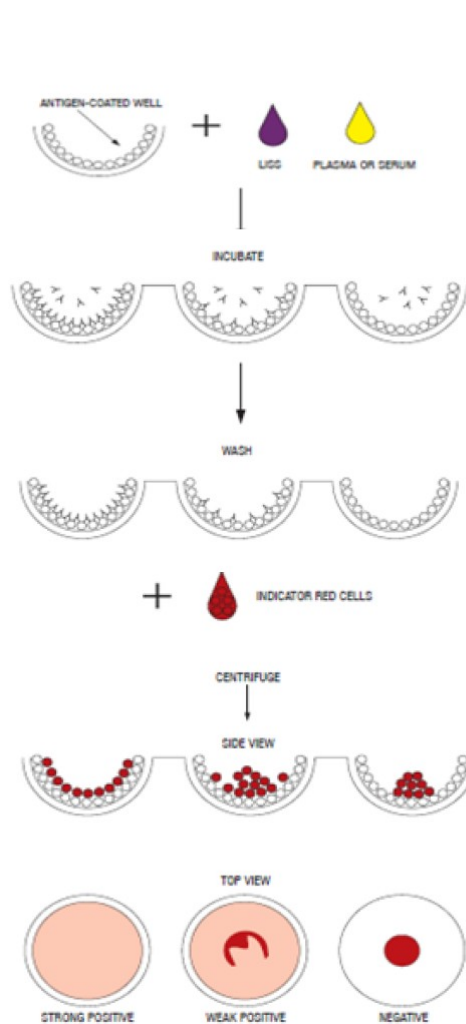


Fig. 2.5 Solid phase technique for IAT. The Solid Phase Microplate method for the IAT has the AHG bound to the well of the microplate. Antibody bound to red cells bind to the solid phase AHG and haemagglutination is observed after unbound globulins are washed free.

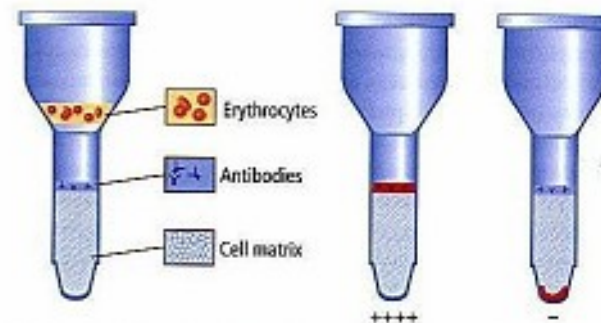


Fig. 2.6 Principle of the gel test. The 'No-wash' ID-System (gel column) for the IAT incorporates the AHG within the gel matrix. Sensitised cells react with the AHG on centrifugation, leaving the liquid reactants, including any unbound globulins in the reaction chamber. Cells free from IgG and/or complement components are centrifuged to the bottom of the microtube. No control of negative results is necessary as no washing is required.

Automatizace v imunohematologické laboratoři

Automatizace vyšetření:

- Očekávaný technologický vývoj - trend všech laboratoří
- Splňuje požadavky na kvalitu procesů/akreditace
- Standardizace vyšetření
- Zvýšení efektivity a produktivity
- Omezení možnosti lidské chyby
- Úplná automatizace od příjmu vzorku přes preanalýzu ke konečnému výsledku a vystavení nálezu
- Propojení laboratorních modulů/informačních technologií

Automatizace v imunohematologické laboratoři

- PRO

- Zkrácení doby odezvy
- Eliminace chyb
- Redukce materiálových nákladů
- Úspora mzdových nákladů / lidských zdrojů
- Využití biologického materiálu
- Možnost změn systému

- PROTI

- Průchodnost/centrifugace
- Prostorová náročnost
- Menší flexibilita



Speciální testy v imunohematologii

- Eluční testy k disociaci IgG protilátky z vazby na erys
- Adsorpční testy k průkazu protilátky/autoprottilátky, k separaci protilátky ze směsi, k průkazu imunních komplexů a léků na erys, k potvrzení slabých antigenů
- Určení tříd Ig – odlišení Ig - disociace aglutinátů tvořených IgM protilátkami
- Neutralizace (inhibice) protilátky překrývající jinou protilátku (substance)
- Stanovení rozpustných krevních skupin – vylučovatelství
- Kombinace technik