

Klasické serologické metody

aglutinace / precipitace, RID, nefelometrie / turbidimetrie

Vyšetření funkce komplementu

Jana Nechvátalová (jana.nechvatalova@fnusa.cz)

Ústav klinické imunologie a alergologie

FN u sv. Anny a Lékařská fakulta MU

Laboratorní vyšetření IN VITRO

- **Preanalytická fáze**

- odběr, příprava, zpracování vzorku před zahájením laboratorního vyšetření
- skladování, transport

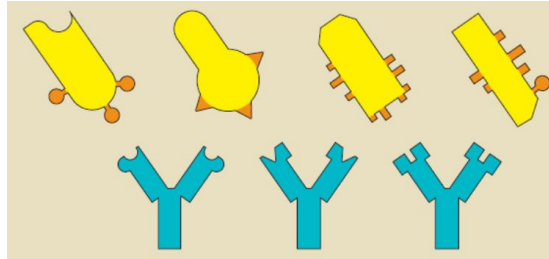
- **Analytická fáze**

- kalibrace a justování zařízení (analýza kontrol- IKK, EHK)
- provedení lab. vyšetření + kontrol
- zpracování výsledků, LIS

- **Postanalytická fáze**

- skladování, likvidace materiálu
- prozkoumání výsledků, uvolnění, LIS - NIS

Rozdělení imunologických laboratorních metod



- **serologické (humorální)**- detekce antigenů a protilátek, průkaz tvorby protilátek proti infekčnímu agens
- **bunečné** - počty a funkce jednotlivých typů leukocytů



Monocyte



Lymphocyte



Neutrophil



Eosinophil



Basophil

Serologické metody

1. Klasické serologické metody

- Aglutinace (přímá / nepřímá)
- Precipitace (v kapalině, v gelu)

2. Imunochemické metody s následnou detekcí

- Imunofluorescence (přímá / nepřímá)
- Imunoanalýza (EIA-ELISA, RIA, FIA, LIA)
- Immunoblot, imunodot

3. Metody založené na efektorovém účinku protilátek (využívané v klinické mikrobiologii)

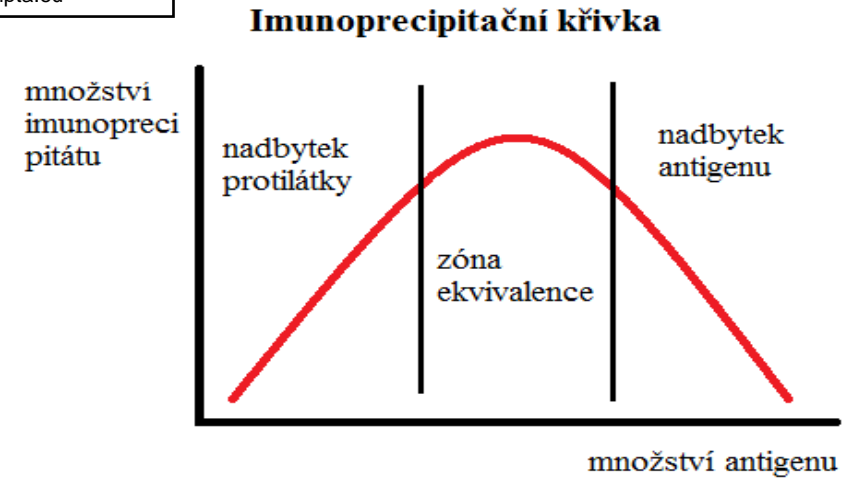
- Komplement fixační reakce
- Inhibiční a neutralizační testy

Serologické metody

Reakce antigenu (Ag) s protilátkou (Ab) = imunokomplex:

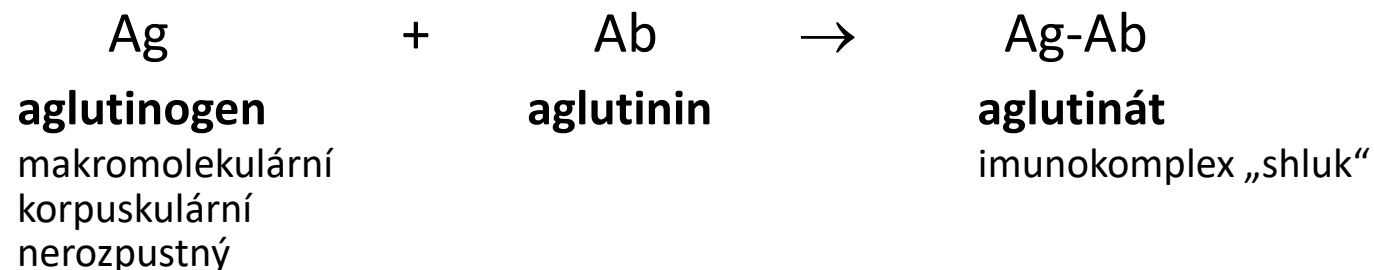
- **Primární fáze** – rychlá, nepozorovatelná okem
– tvorba imunokomplexů Ag + Ab
– vznik vazby jednotlivých epitopů s vazebnými místy protilátek
- **Sekundární fáze** – pomalá, pozorovatelná okem
– uplatňuje sa multivalence Ag a polyvalence Ab
– vznik prostorového komplexu

Pokud nedochází k sekundární fázi reakce, je nutné imunokomplexy vzniklé v primární fázi vizualizovat – imunochemické metody



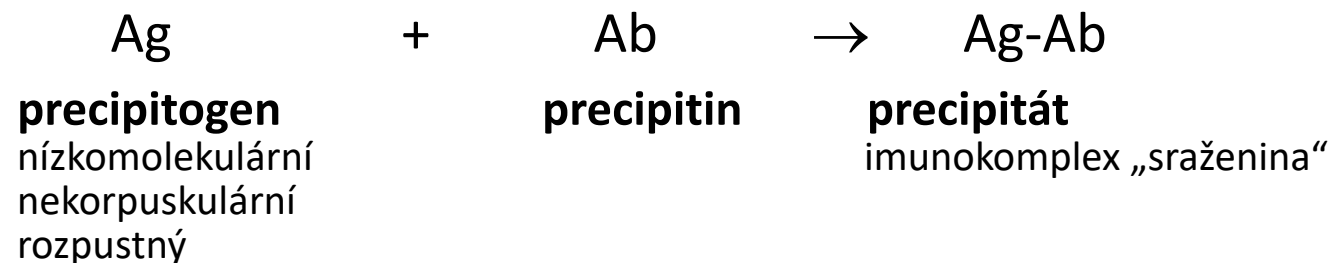
Aglutinace vs Precipitace

Aglutinace (shlukování)



Protilátky namířené proti epitopům antigeních částic. Mezi korpuskulami se tvoří můstky, které vedou ke vzniku shluků (aglutinátů)

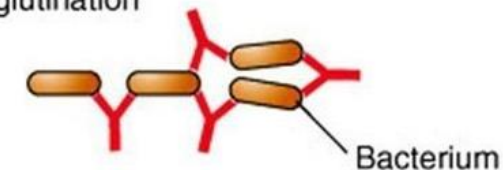
Precipitace (srážení)



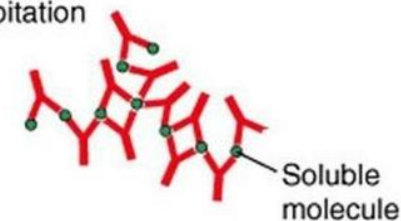
Reakce mezi solubilním antigenem a protilátkou s následným vznikem precipitátu (hydrofobní vazby – nerozpustný komplex)

Agglutination and Precipitation

Agglutination



Precipitation



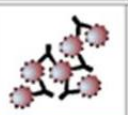

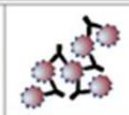

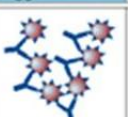


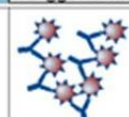
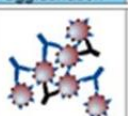
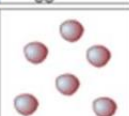
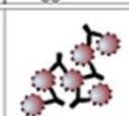
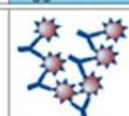

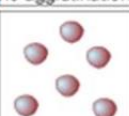


Aglutinace

1. Přímá

- korpuskulární Ag přirozeně nese cílové epitopy
- identifikace bakterií, hemaglutinace

2. Nepřímá

- rozpustný antigen navázaný na povrchu vhodných makromolekulárních částic (latex)
- stanovení protilátek 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

Krvní skupiny
Systém AB0

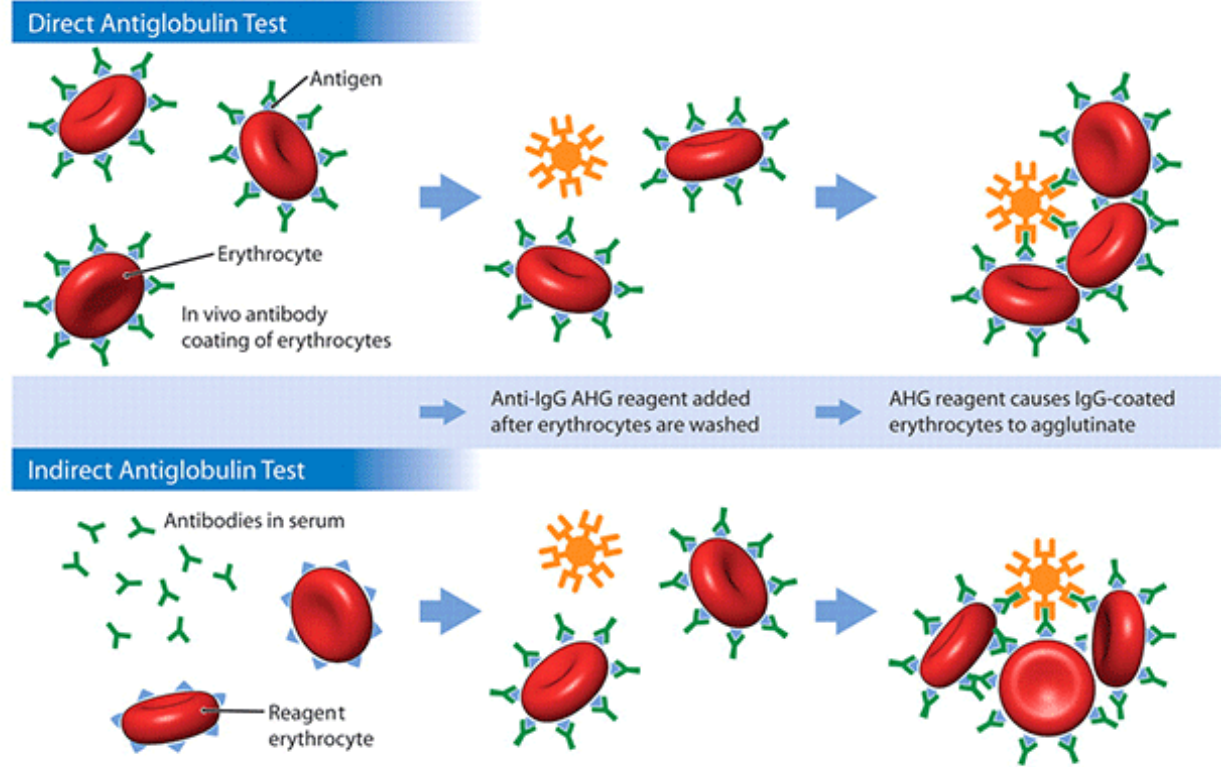
Detekce protilátek vázaných na erythrocyty *in vivo*
- autoimunitní hemolytická anémie

Direct Coomb's Test

VS

Detekce volných protilátek proti erythrocytům v séru
- těhotné Rh⁻ ženy

Indirect Coomb's Test



Hodnocení aglutinace

- **KVALITATIVNÍ**

- k aglutinaci dochází / nedochází (pozitivní / negativní)

- **KVANTITATIVNÍ**

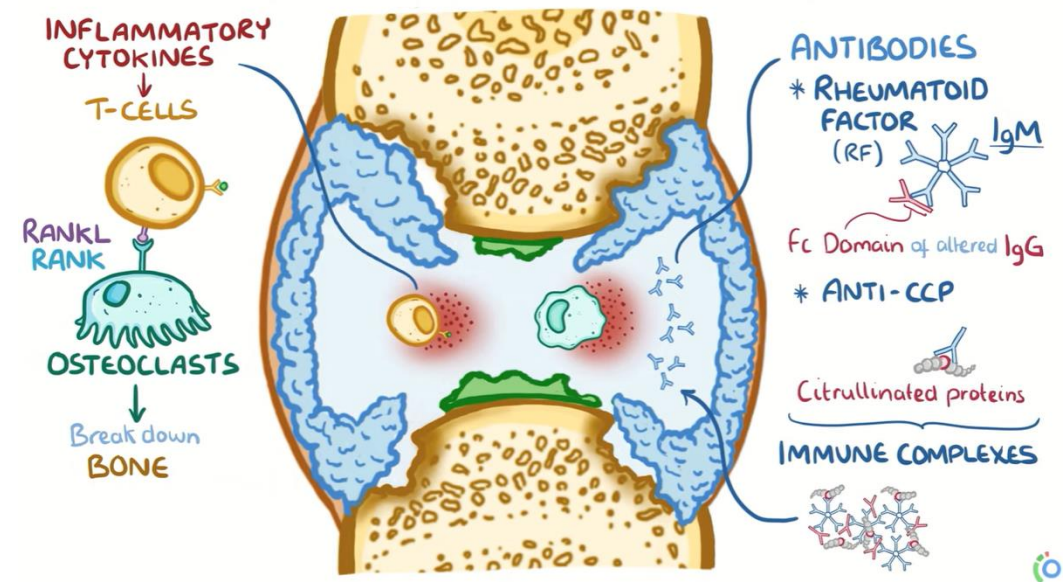
- stanovení nejvyššího ředění séra, kdy je ještě pozorovatelná aglutinace

- titr = převrácená hodnota ředění séra

- (ředění 1:32 → titr 32)

Revmatoidní artritida

- Systémové autoimunitní onemocnění – poškození kloubů
- Příčiny – genetik + faktory vnějšího prostředí
- **Citrulinace peptidů** – modifikace vedoucí k antigenicitě proteinů → imunitní reakce, produkce autoprotilátek
- V kloubu se tvoří zánětlivá tkáň – **pannus** – narušení chrupavky
- Osteoklasty – degradace kosti
- muži : ženy 1 : 2-3
- 1 % populace
- Vyšetřujeme koncentraci protilátek:
 - revmatodní faktor (**RF**)
 - protilátky proti cyklickým citrulinovaným peptidům (**anti-CCP**)
 - protilátky proti mutovanému citrulinovanému vimentinu (**anti-MCV**)

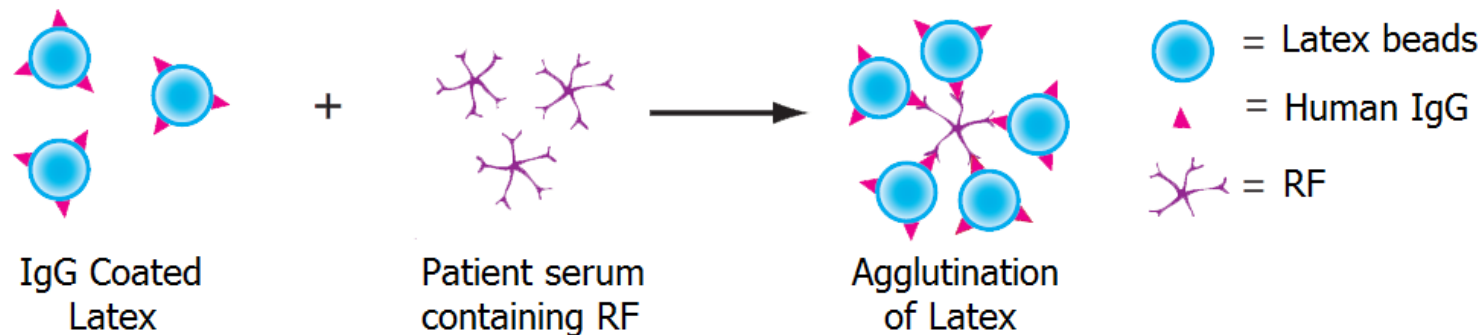


Latex-fixační test

• Revmatoidní faktor (RF)

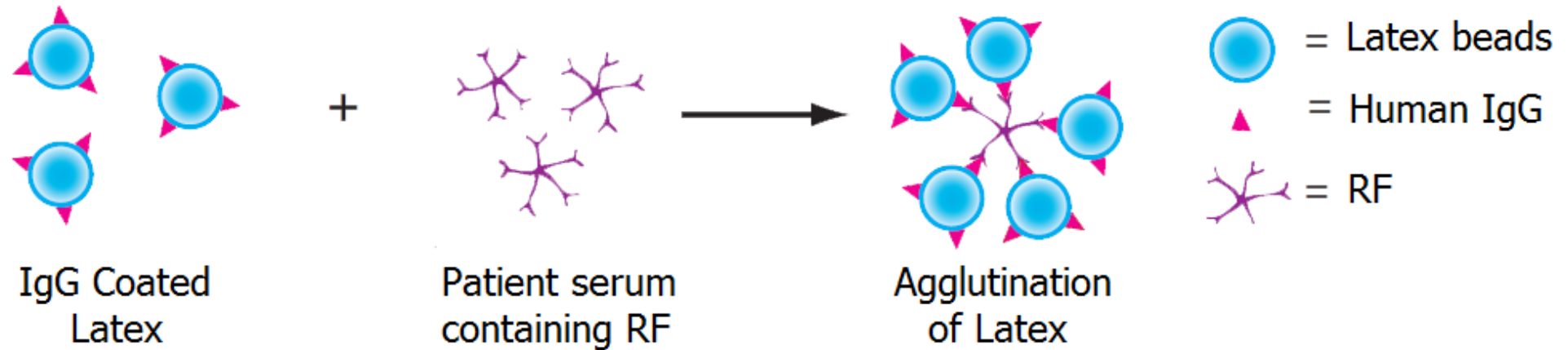
- autoproti látka namířená **proti Fc části IgG** molekuly
- přítomný asi u 80% pacientů s revmatoidní artritidou
- pozitivní je též u asi 5-10% nemocných s jinými systémovými autoimunitami - autoimunitní hepatitida, SLE, Sjogrenův syndrom
- může být pozitivní i u zdravých osob
- diagnosticky nejdůležitější je RF v třídě **IgM** (rutinně se měří nefelometricky!)

Princip testu aglutinace na nosičích:



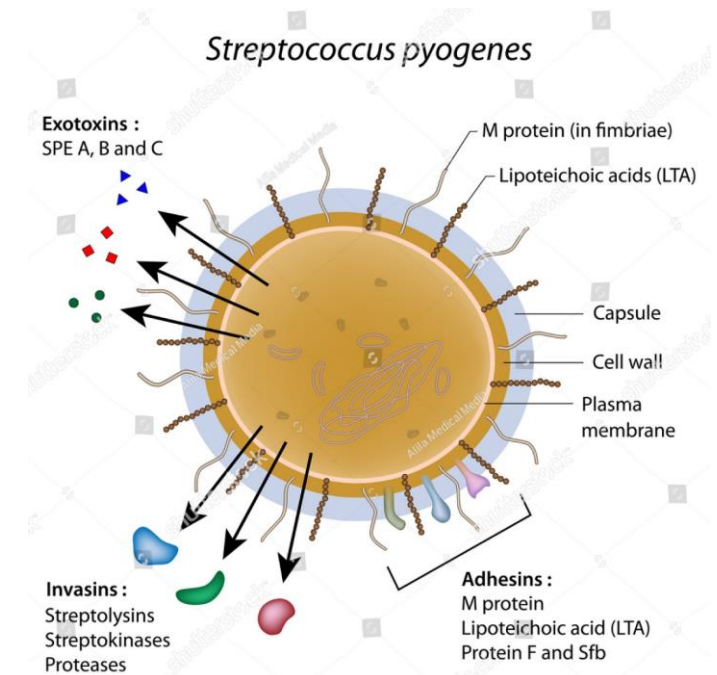
Úkol č. 1

Stanovení RF pomocí latexové aglutinace

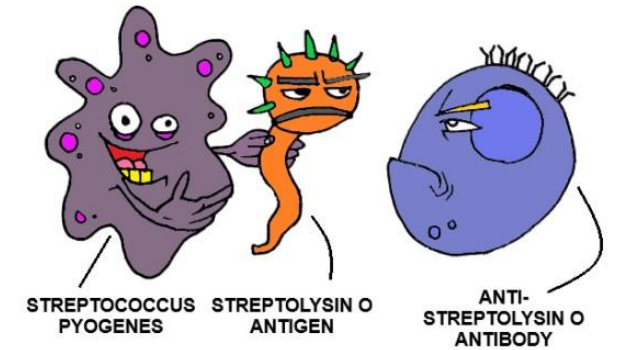


Streptokoková infekce a pozdní následky

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



Stanovení ASLO (ASO) nepřímou aglutinací



- ASLO - anti-streptolysin O antibodies
- Stanovení protilátek v séru proti Streptolysinu O (exotoxin bakterií z rodu Streptococcus)
- Princip testu:
 - stejný jako u RF – latexová aglutinace (na latexových částicích vázán streptolysin O)



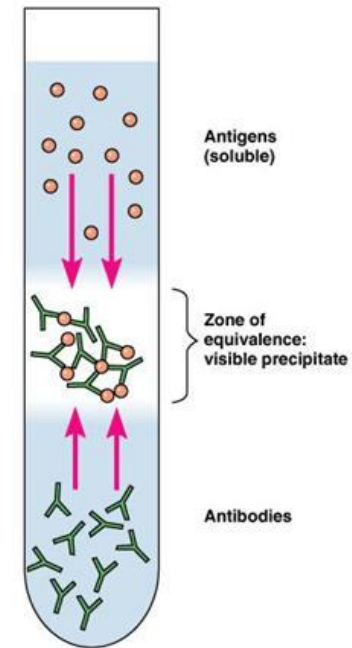
Precipitace

1. V gelu

- Jednoduchá RID
- Dvojitá RID

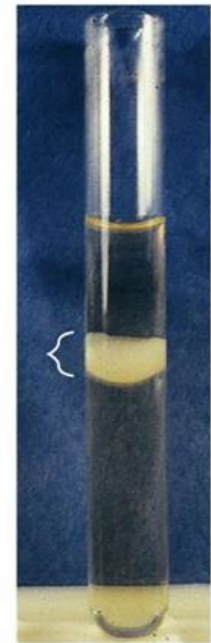
2. V tekutém prostředí

- Nefelometrie
- Turbidimetrie



(a)

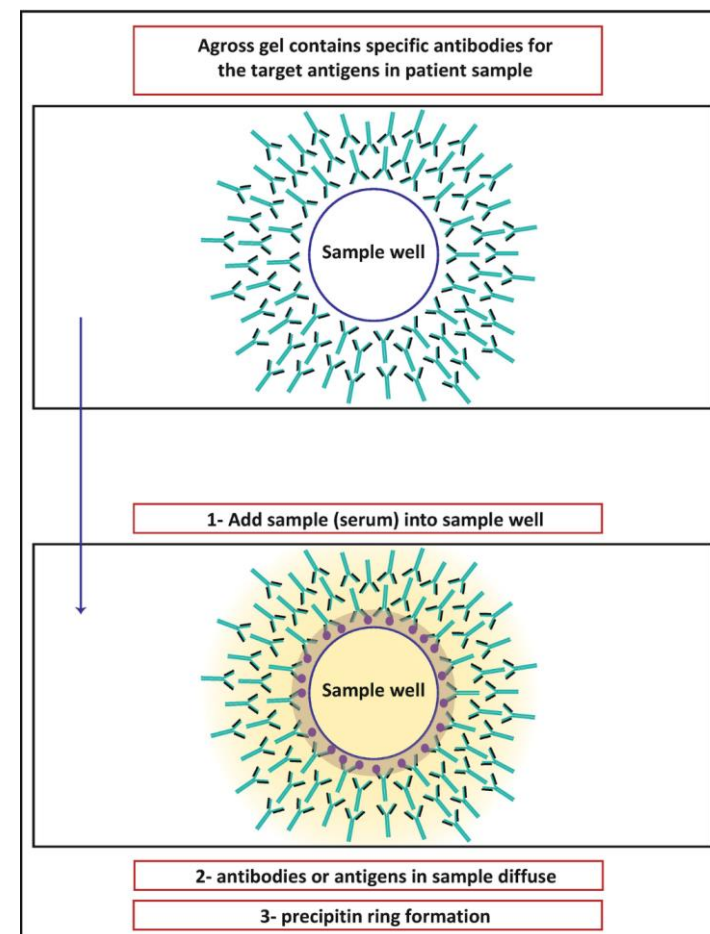
Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.



(b)

Precipitace v gelu – 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

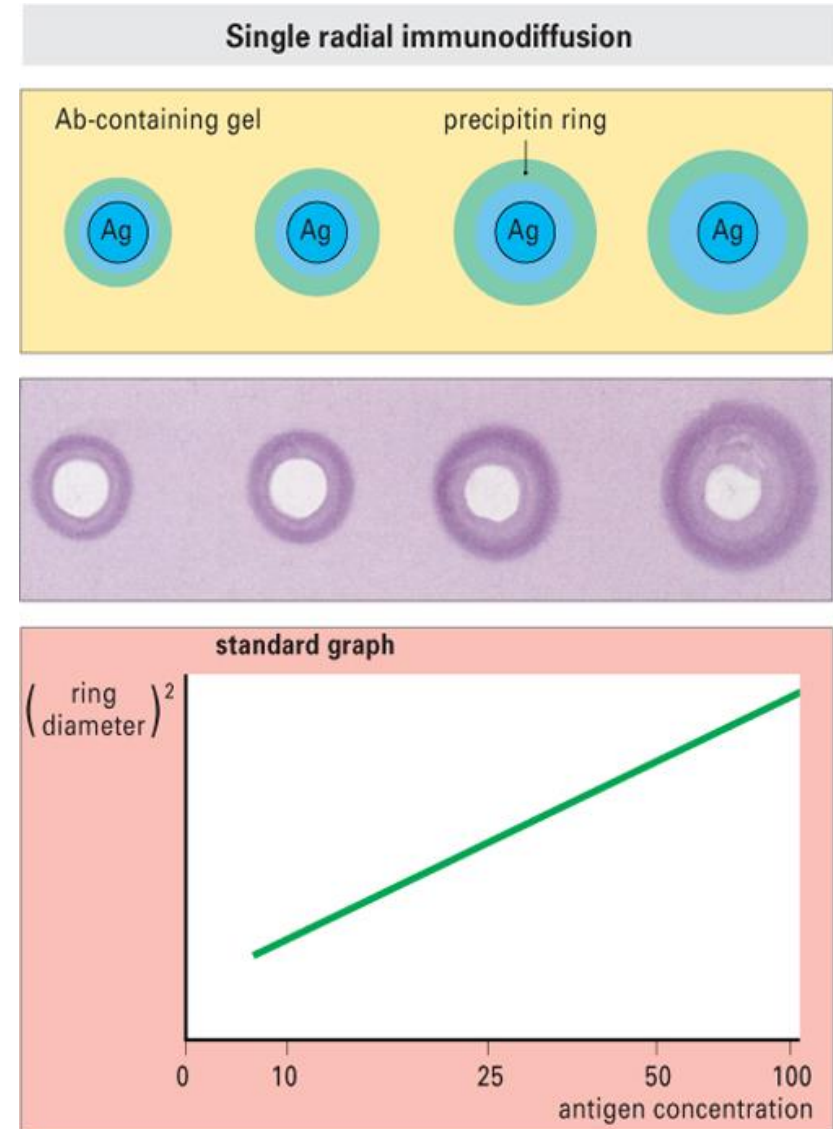


Radiální imunodifúze

- Pomocí RID je možné stanovit koncentrace mnohých bílkovinových součástí séra
- Metodika se v minulosti používala při měření hladin celkového IgG, IgA, IgM, složek komplementu anebo různých proteinů akutní fáze- většina těchto vyšetření je dnes automatizovaná (nefelometrie)
- **Stanovení C2 a C5 složek komplementu**

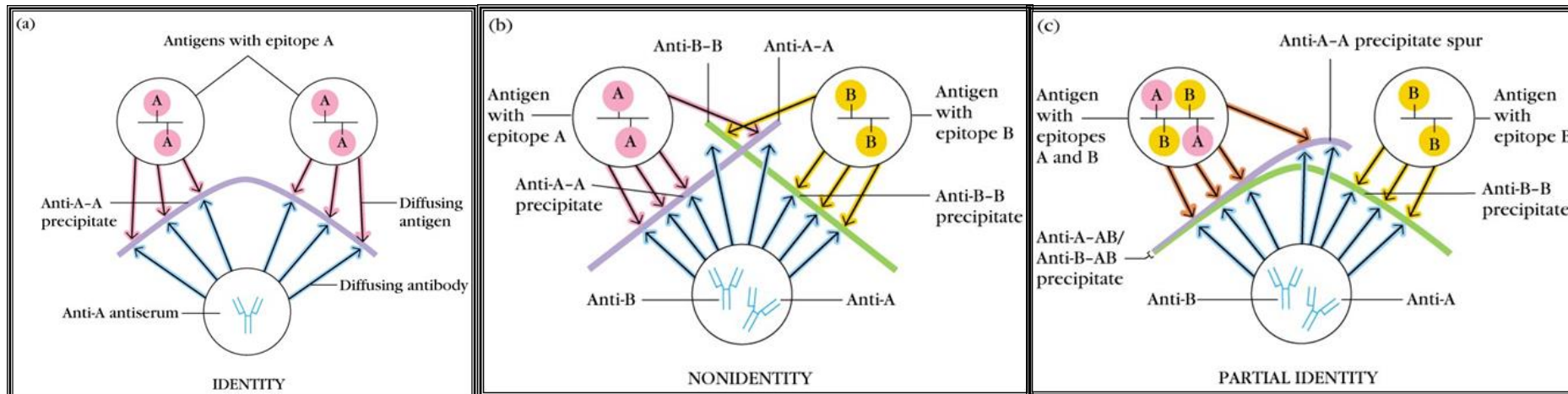
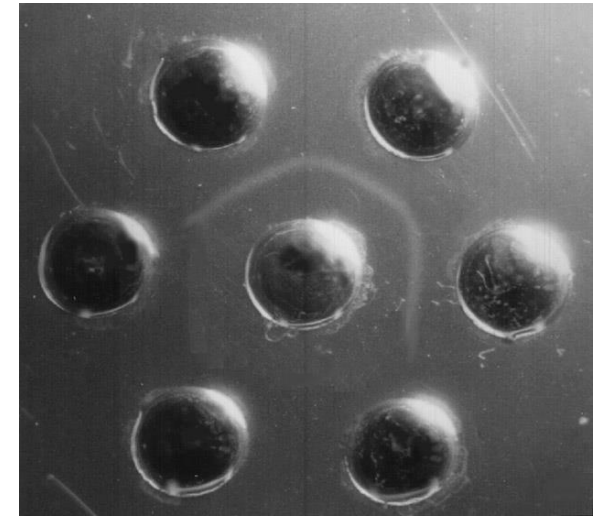
- Jednoduchá RID

- koncentrační gradient jednoho z reaktantů (většinou Ag)
- druhý reaktant (většinou Ab)- rovnoměrně rozptýlený v struktuře gelu
- výsledkem jsou ostře ohraničené kruhy precipitátu
- plocha prstence = úměrná koncentraci vyšetřovaného Ag
- podle konc. standardu – kalibrační křivka



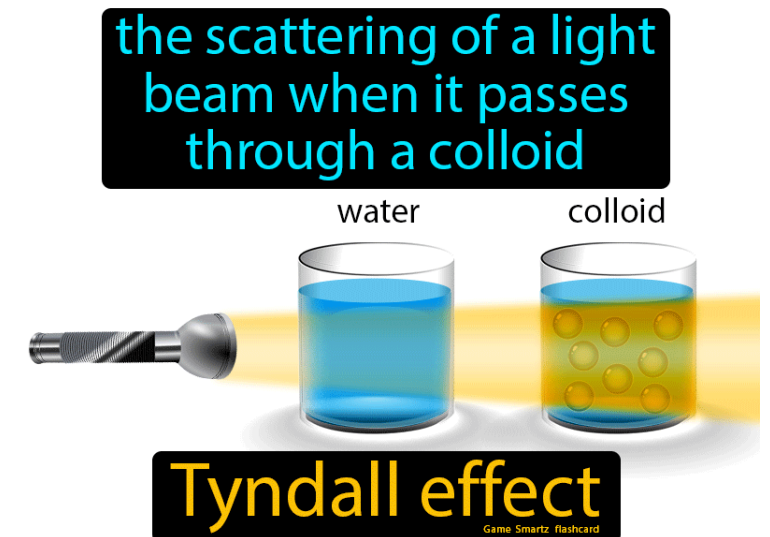
- Dvojitá RID (podľa Ouchterlonyho)

- sledujeme antigenní příbuznost antigenů
- Prostředí – čistý gel – do jamek pipetujeme antigen i protilátku
- gradient vytváří jak Ag tak Ab a dochází k protisměrné difuzi obou reaktantů (radiálně)
- v zóně ekvivalence – precipitační linie, která ukazuje na pozitivitu reakce
- hodnocení: kvalitativní



Precipitace - v tekutém prostředí

- Využívá se efekt, že při reakci Ag-Ab vzniká zákal - precipitát, jehož intenzita je při konstantním množství přidané protilátky úměrná koncentraci vyšetřovaného antigenu
- Měření intenzity zákalu: nefelometrie, turbidimetrie – Tyndalův jev
- Obě metodiky umožňují kvantitativní stanovení obsahu proteinů ve vzorku odečtením z kalibrační křivky



Nefelometrie a turbidimetrie

- Reakce založené na měření množství imunokomplexů vytvořených interakcí specifických protilátek s antigenem
- Stanovení sérových bílkovin
- Měření probíhá v tekutém prostředí v měřicí kyvetě (pufr, látka urychlující reakci, Ag, Ab)
- Množství vytvořených komplexů je úměrné koncentraci Ag

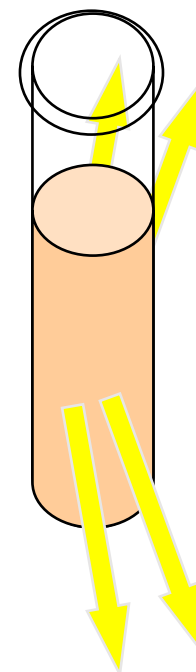
Precipitace v tekutém prostředí

nefelometrie je 5-10x citlivejší
a nákladnější než turbidimetrie

Nefelometrie

- vhodná pro nižší koncentrace

viditelné světlo



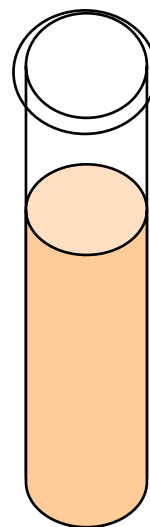
detektor je ve směru kolmém na
vstupující paprsek

Měří množství světla
rozptýleného při průchodu paprsku
(množství světla odraženého od
vznikajících komplexů)

Turbidimetrie

- Vhodná pro koncentrovanější roztoky

viditelné světlo



detektor je v ose paprsku

Měří množství procházejícího světla
(úbytek intenzity světla, které prošlo
roztokem v kyvetě)

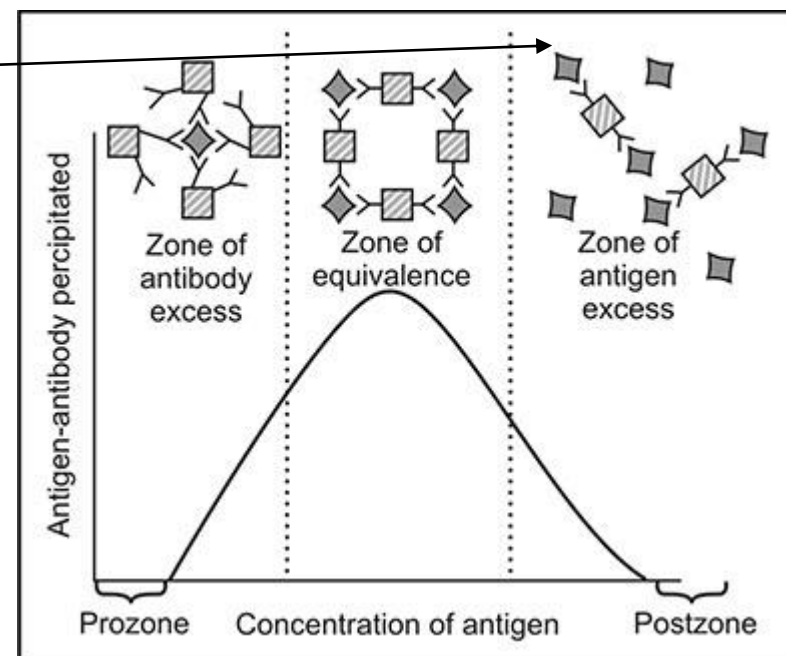
Dynamika precipitačních reakcí

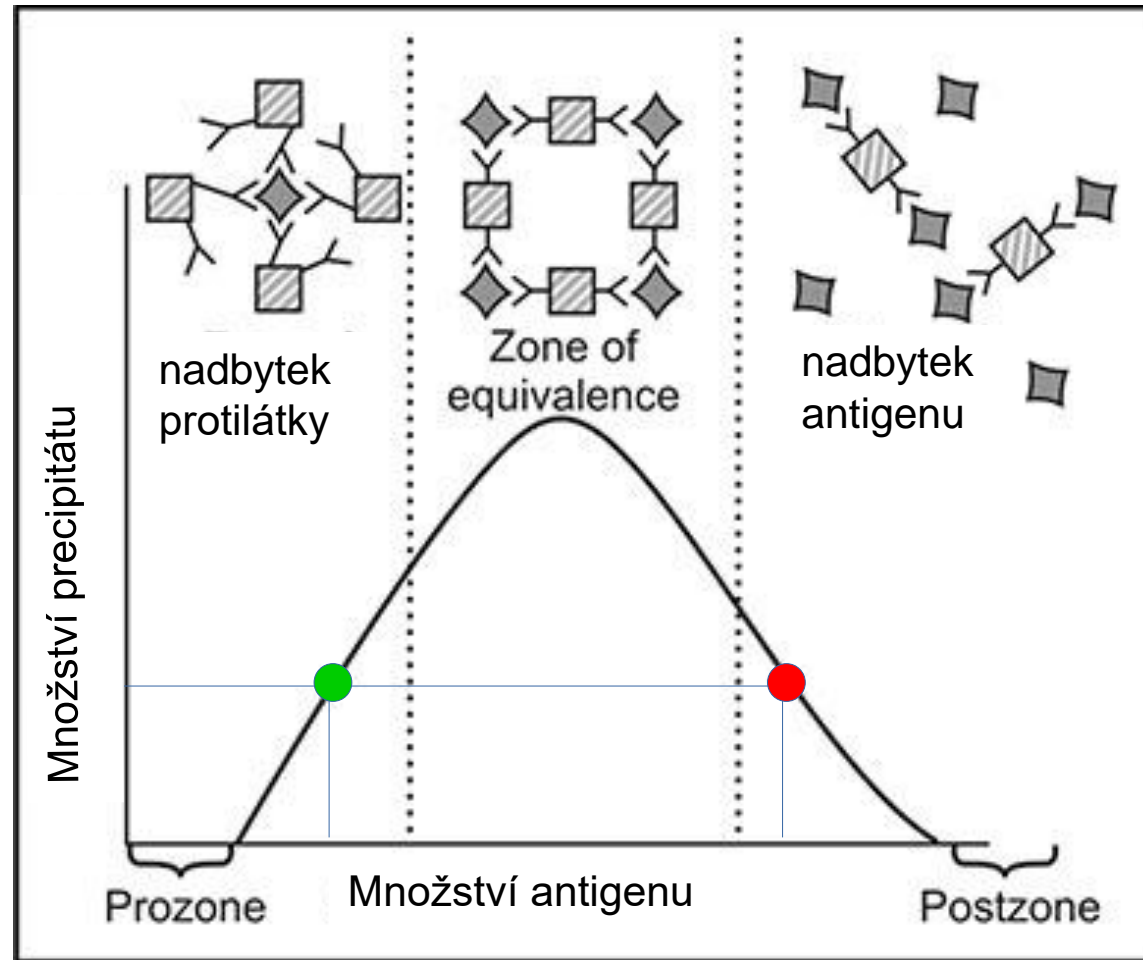
Imunoprecipitační křivka (Heidelberg-Kendallová)

- 1) Oblast nadbytku protilátky – měření přístrojem
- 2) Zóna ekvivalence
- 3) Oblast nadbytku antigenu – protilátka spotřebována, imunokomplexy se rozpadají a odezva na detektoru klesá → **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



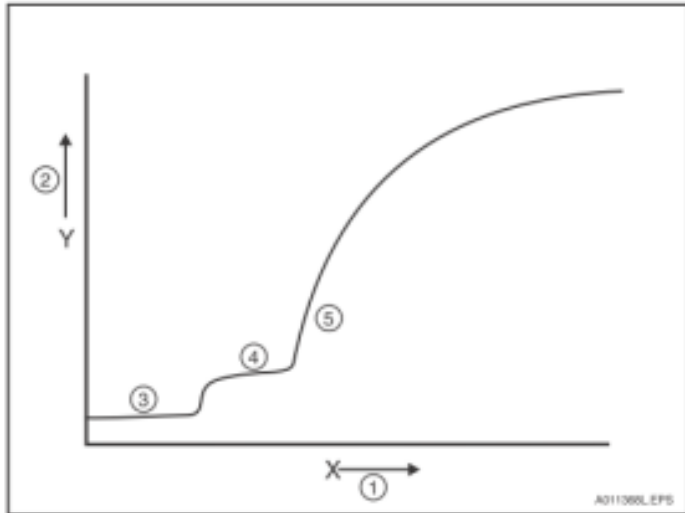


Různé množství antigenu - stejná hodnota absorbance

- Vzorek 1 - koncentrace stanovované látky leží v oblasti nadbytku protilátky
- Vzorek 2 – koncentrace stanovované látky leží v oblasti nadbytku antigenu (falešně nízká absorbance)

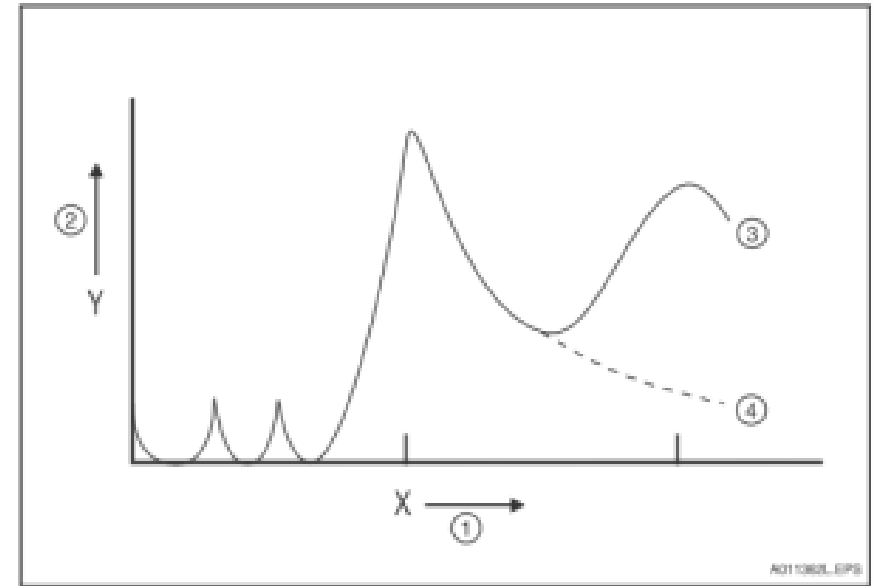
Pro stanovení koncentrace analytu metodou imunoprecipitace v roztoku musí být v reakční směsi nadbytek protilátky!

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 opět 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

- Stanovení koncentrace:
- I:
 - imunoglobuliny: IgG, IgA, IgM (g/l)
 - proteiny akutní fáze: CRP (mg/l)
 - (RF+ASLO)
- II:
 - Podtřídy Ig
 - složky komplementu: C3, C4, C1q
 - proteiny akutní fáze: A1AT (alfa 1 antitry OROSO (orosomukoid), A2M (alfa 2 makroglobulin), CPL (ceruloplasmin), TRF (transferin), PREA (prealbumin)



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

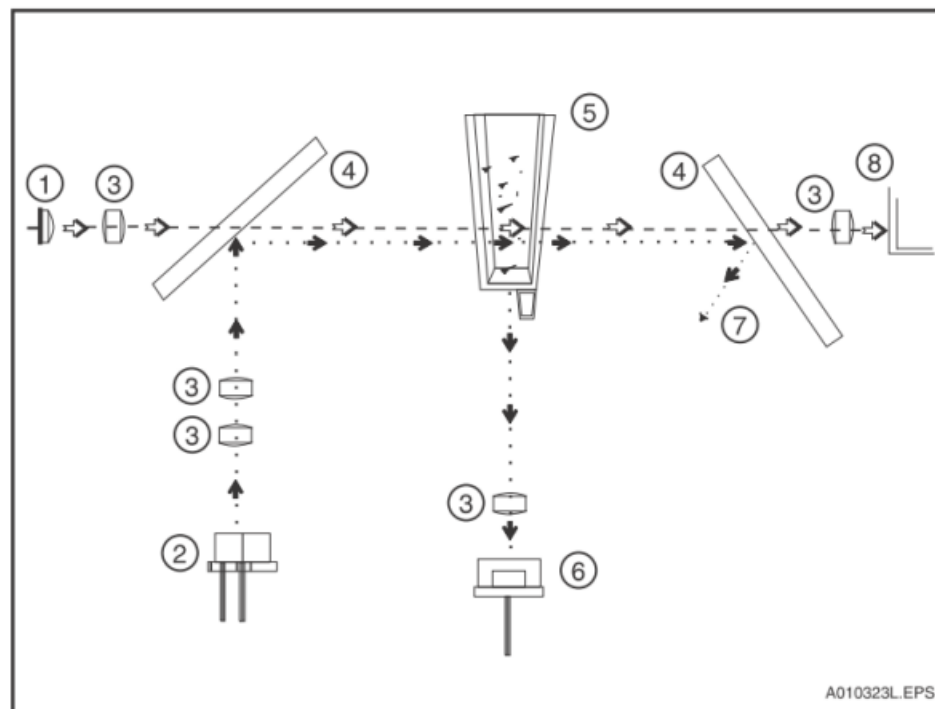
Referenční meze pro dospělého

- IgG – 7,5 - 15,5 g/l
 - IgG1 → IgG2 → IgG4 → IgG3
- IgA - 0,8 – 4,5 g/l
 - IgA1 → IgA2
- IgM – 0,5 – 3 g/l
- IgE < 100 kU/l
- IgD < 100 IU/ml
- CRP - 0-8 mg/l

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

- Stanovení koncentrace:
 - imunoglobuliny: IgE (IU/ml), IgD, IgA1, IgA2, IgA pediatrické (IgAp, nízké koncentrace)
 - složky komplementu: C1 inhibitor

Vyšetření cirkulujících imunokomplexů – CIK turbidimetrie

- Imunokomplexy vznikají při normální imunitní odpovědi organismu na antigenní podnět. Např. při každodenní obraně organismu vůči původcům infekčních chorob (jde tedy o jednu z fyziologicky probíhajících forem imunitní odpovědi)
- Porušena rovnováha mezi tvorbou a eliminací imunokomplexů
- Při onemocněních (např. chřipka) se tvoří imunokomplexy – bolest svalů a kloubů
- Pouze přechodné obtíže (fyziologické) → odstranění ve slezině (makrofágy)
- Autoimunitní onemocnění – tvorba imunokomplexů → ukládání do tkání → zánět
- V určité fázi onemocnění lze detekovat v krvi – **CIK-PEG** (precipitace imunokomplexů polyethylenglykolem) → zákal → měření turbidity (prošlého světla)

CIK –PEG – pouze orientační vyšetření

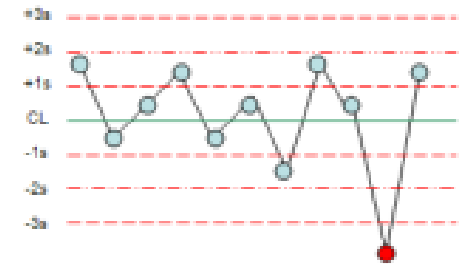
- Nevýhoda:
- Detekují se jakékoli imunokomplexy – pozitivní u jakékoli akutní fáze infekce kde se tvoří Ab-Ag → přítomnost imunokomplexů nemusí pro pacienta nutně znamenat zdravotní problém
- Ale zároveň: negativní výsledek neznamena, že je pacient zdravý → imunokomplexy se již mohly uložit do tkání a v krvi nejsou detekovatelné
- Typicky pozitivní u imunokomplexových systémových autoimunit – RA, SLE
- Malá výpovědní hodnota

- Alternativou je stanovení vazby imunokomplexů na **C1q (ELISA)** – stanoví se pouze ty imunokomplexy, které mají schopnost aktivovat komplement

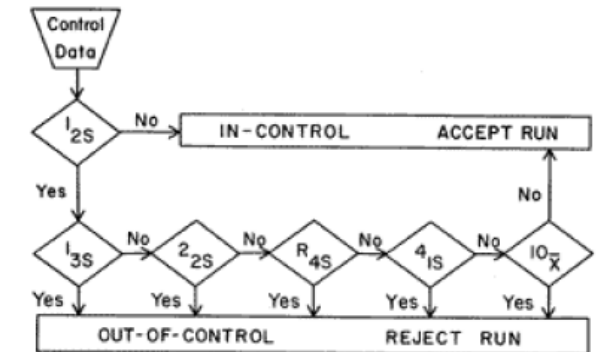
Denní praxe na analyzátoru

- Provozní denník
- Údržba analyzátorov:
 - denní/týdenní/měsíční
- Kalibrace:
 - 1x měsíčně / při změně šarže reagensů
 - kalibrační křivka
- Kontroly IKK:
 - každý den, před zahájením měření patientských vzorků
 - Podle metody – jedno-/více-úrovňové (nízká, vysoká kontrola)
 - referenční meze
- Kontroly EHK (SEKK- systém externí kontroly kvality):
 - podle časového plánu
 - z externí laboratře (není známá výsledná koncentrace)
 - výsledky se ve formě protokolu odošlou zpět organizátorovi
 - organizátor porovná výsledky měření jednotlivých laboratoří a zpětně informuje o úspěšnosti

Lewey-Jenningsův diagram – sledování kontrol v čase



Westgardova pravidla – detekce chyb v analytické proceduře (rozhoduje o schválení či zamítnutí analytické série)



Průchod vzorku laboratoří

- Sérum = odběr srážlivé krve
- Alikvotace vzorků
- Vytvoření pracovního listu pro jednotlivé analyzátory = seznam vzorků
- Analyzátor = vzorek + specifické antisérum + pufr (stabilizace a urychlení reakce)
- Analyzátor připojený s LIS (laboratorní informační systém)= získá informace o požadovaném měření + výsledek automaticky odešle

Interpretace výsledků

- Výsledky jsou před vydáním vícnásobně kontrolované
- Pozor:
 - falešná pozitivita (malá specificita testu)
 - falešná negativita (malá senzitivita testu)
- **Hladina imunoglobulínov IgG, IgA, IgM (g/l):**
 - ↑ - zánětlivé procesy infekčního původu
 - jedna třída = myelom; monoklonální gamapatia
 - zvyšování s věkem
 - ↓ - poruchy tvorby = imunodeficity
 - lymfomy, leukémie, myelomy, následkem léčby, nefropatie

Interpretace výsledků

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

- ↑ - alergické reakce -1. typ přecitlivělosti
 - parazitární infekce
 - autoimunity, imunodeficiencie

- ***Vyšetření komplementového systému (sérová hladina C3 a C4 (g/l), C1-INH)***

- ↑ - zánětlivá aktivita (proteiny akutní fáze)
- ↓ - vrozená / získaná porucha tvorby (jaterní selhání; zvýšená spotřeba- tvorba imunokomplexov; hereditární angioedém)

Interpretace výsledků

- *Proteiny akutní fáze*

- ↑ - akutní zánětlivá reakce = opsonizační a prozánětlivý efekt
 - regulační funkce; přenašeče iontů; hemokoagulace

CRP (mg/l)

- ↑ - bakteriální infekce
 - infarkt myokardu, pooperační období
 - revmatické choroby

Komplement

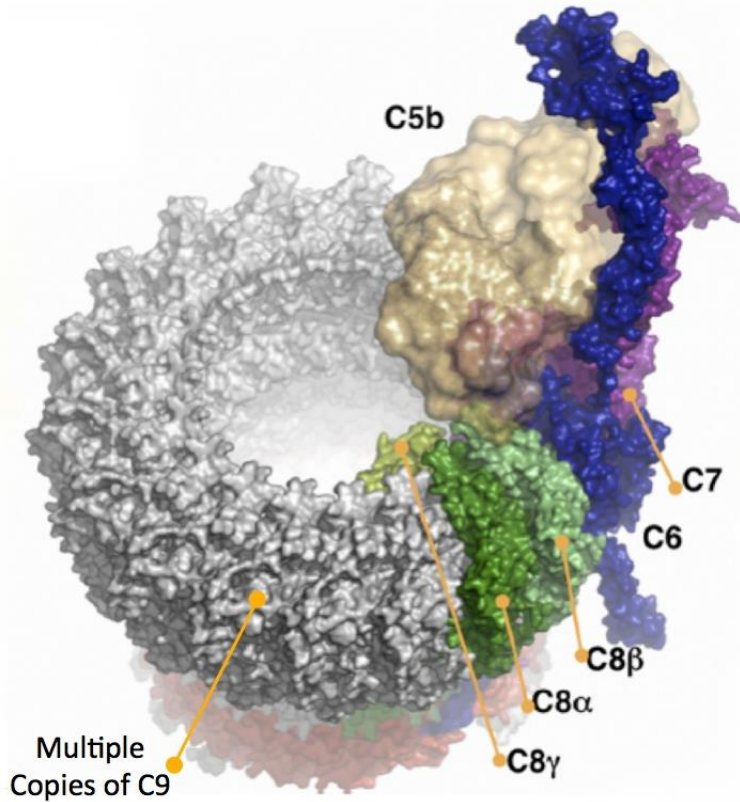
- produkované jaterními buňkami, makrofágy, ...

9 základných zložiek: C1-C9

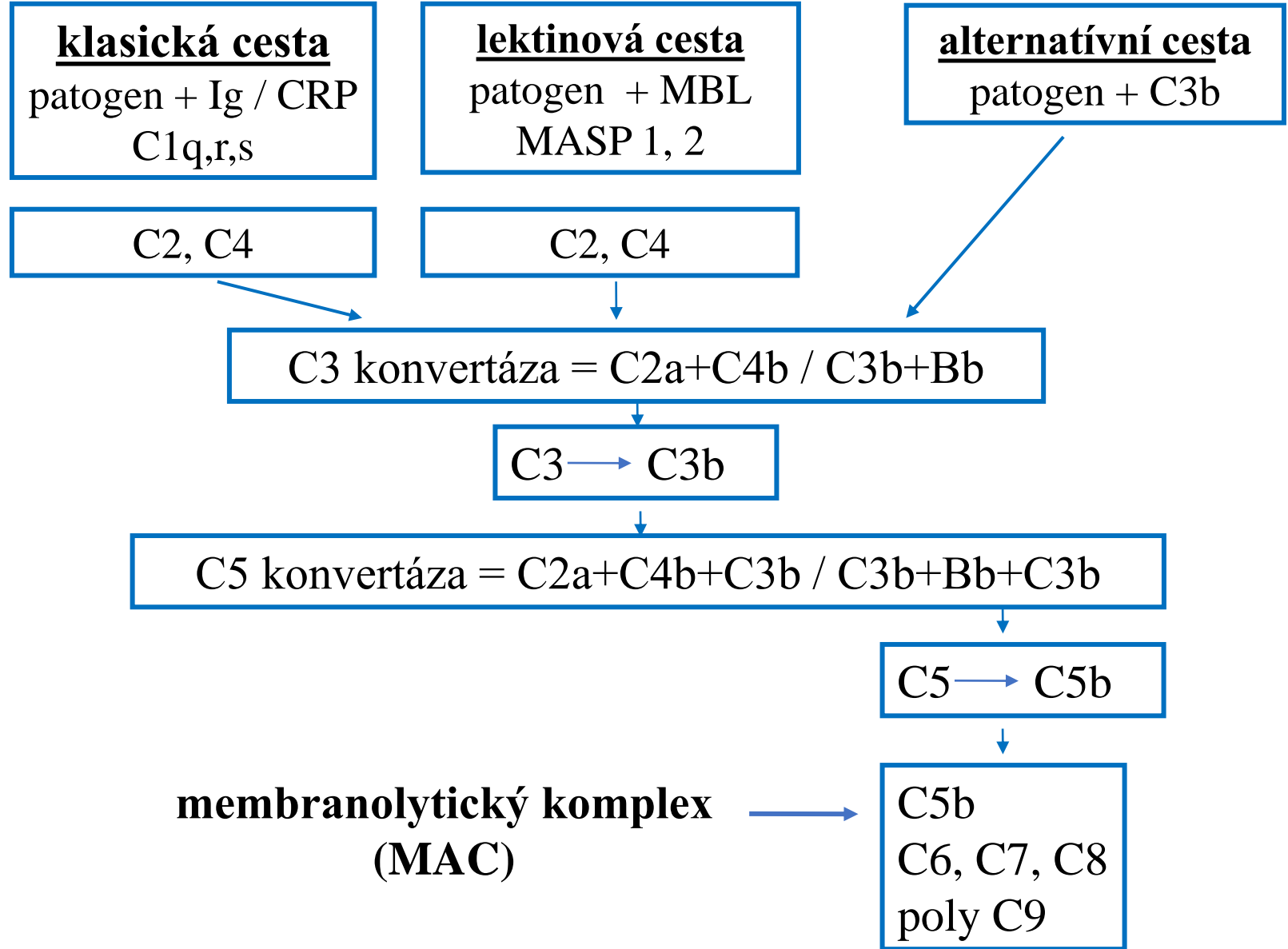
Regulátory

- **pozitívni**: properdin (faktor P)
- **negatívni** (inhibitory):
C1 INH, CR1, MCP, DAF, faktor H, faktor I, CD59, C4bp

Aktivace komplementu



Zdroj: Aleshin et al. JBC 287 p10210.



Funkcie komplementu

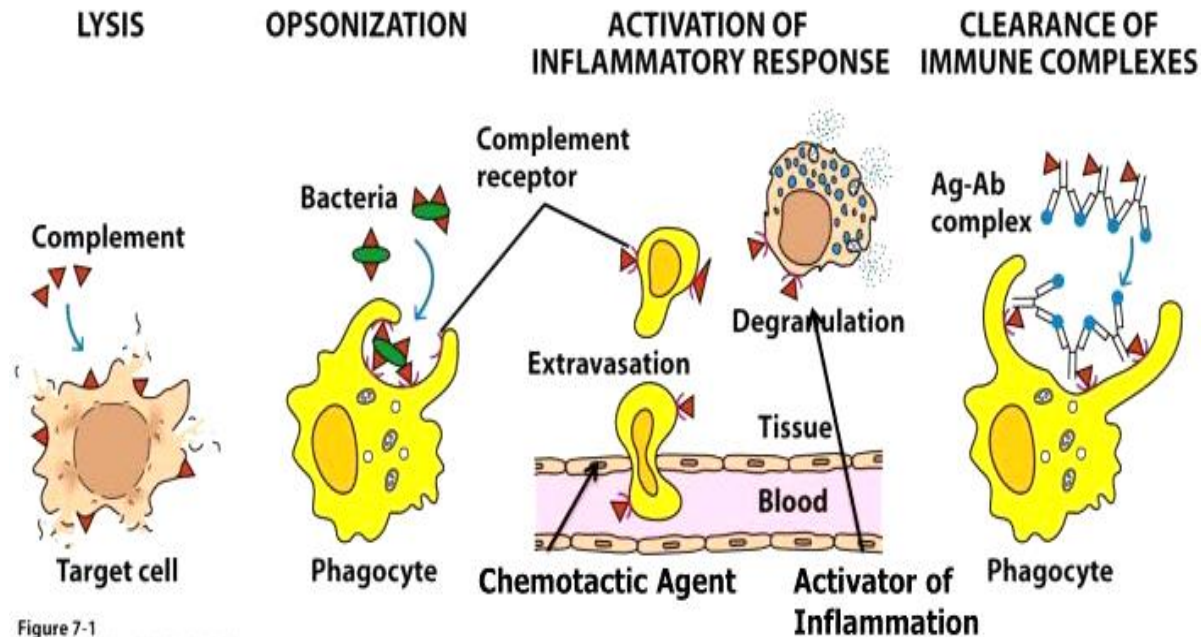


Figure 7-1
Kuby IMMUNOLOGY, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

- **Lýza buněk**, mikroorganizmů (MAC)
- **Opsonizace** – označení cizích buněk a částic, podpora fagocytózy (C3b)
- **Chemotaxe** – přivolání dalších složek imunitního systému (C3a, C5a)
- **Propagace imunitní reakce** – prozánětlivá aktivita (C3a, C5a)
- **Immune clearance** – odstraňování imunokomplexů z cirkulace (C3b, C4b)

Deficity komplementového systému

- **C1-C4** – deficit způsobuje častější výskyt pneumonií, pyogénných infekcí, systémových imunokomplexových chorob (SLE-like)
- **C3-C9** – náchylnost k pyogenním infekcím, u deficitu C9 jsou typické opakované meningokové meningitidy
- **C1 INH** – Hereditární angioedém

Úkol č. 2 – analyzátor BNII

Protokol

- Hlavička
 - Jméno, příjmení, UČO
 - Datum
 - Název cvičení
- Obsah protokolu (rozsah 1-2 strany, s obrázky/grafy max 3 strany)
 - Teorie – princip stanovení, využití v praxi
 - Pomůcky (pipety, zkumavky, reagenty...)
 - Vlastní provedení testu
 - Výsledky (fotografie, grafy), výpočty
 - Interpretace výsledků, porovnání s normálním rozmezím/zdravou kontrolou