

Imunoelektroforéza

Imunofixace

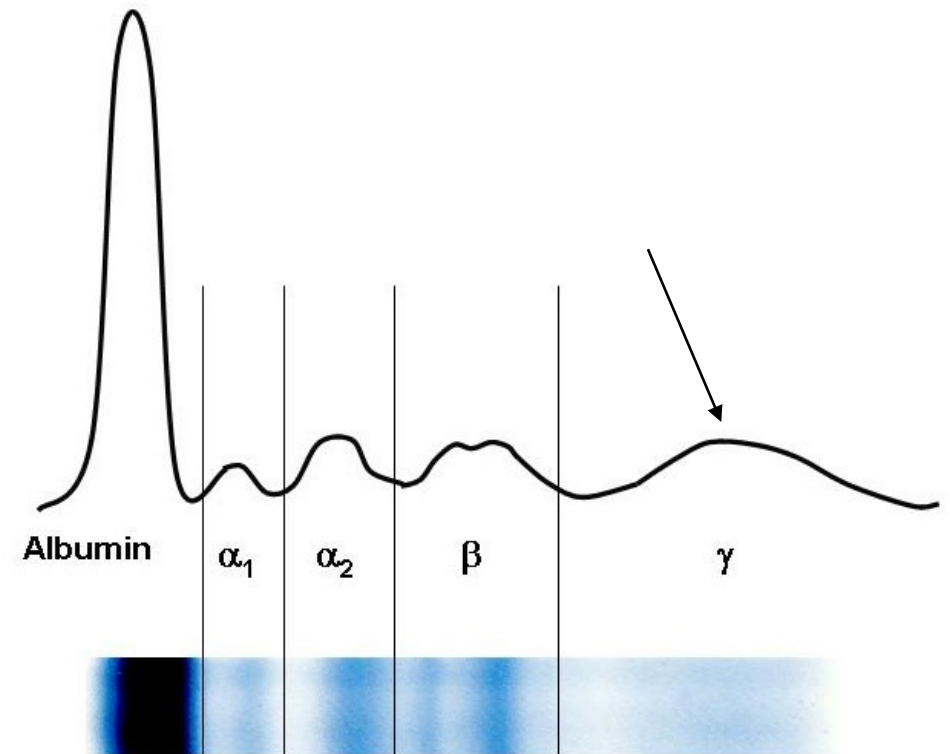
Mgr. Julie Štíhová

ÚKIA-FNUSA



Klasická agarózová elektroforéza

- Separace proteinů séra na základě rozdílné pohyblivosti v el. poli
- Médium – agarózový gel
- pH = 8,6 → anodická pohyblivost (většina proteinů izoel. bod kolem pH 5 - 6)
- Rozdělení do 5 základních frakcí
- Odečítání – většinou **denzitometrie**
 - Pokud známe koncentraci celkové bílkoviny (ref. meze 60-85g/l) → přepočet % zastoupení frakce na koncentraci
- Imunologie – zájem o gamafrakci



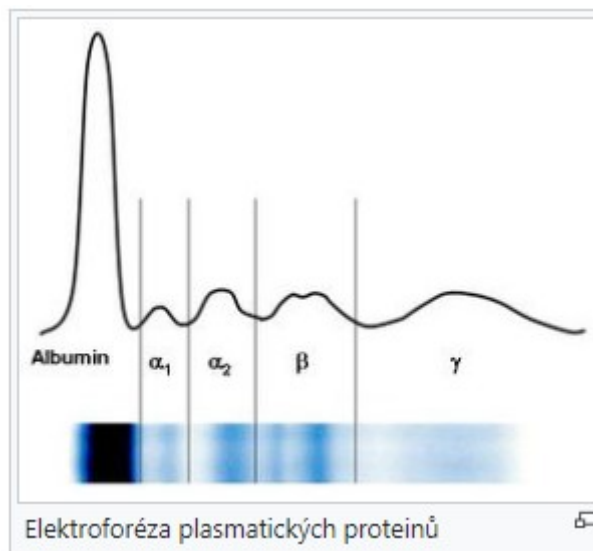
Pozn. Detailní princip elektroforézy a denzitometrie lze najít v učebnicích klinické biochemie nebo instrumentální techniky

Elektroforetické frakce obsahují tyto plazmatické proteiny

	Bílkovina <i>Relativní molekulová hmotnost</i>	Koncentrace v séru [g/l]	Poločas [dny]	Funkce	
	Prealbumin (Transthyretin) <i>54 000</i>	0,2–0,4	2	<ul style="list-style-type: none"> vazba hormonů štítné žlázy a retinol vázajícího proteinu 	↓ malnutrice
	Albumin <i>68 000</i>	35–53	15–19	<ul style="list-style-type: none"> nejvýznamnější transportní protein udržení koloidně-osmotického tlaku proteinová rezerva organismu 	↓ katabolismus ↓ hepatopatie ↓ ztráty bílkovin
α₁ oblast	α₁-lipoprotein <i>180 000–360 000</i>	1,0–1,6 (Apo A-I)		<ul style="list-style-type: none"> lipoprotein o vysoké hustotě (HDL) transport cholesterolu do jater 	
	α₁-antitrypsin (α ₁ -inhibitor proteáz) <i>54 000</i>	0,9–2,0	4	<ul style="list-style-type: none"> inhibitor lyzosomálních proteáz (hlavně elastázy z polymorfonukleárních leukocytů) vrozená deficience může být příčinou onemocnění plic (emfyzém) a jater (cirhóza) 	↑ akutní zánět
	α ₁ -kyselý glykoprotein (orosomukoid) <i>40 000</i>	0,5–1,2	5	<ul style="list-style-type: none"> vazba lipofilních látek (např. progesteronu a některých léků) podílí se na regulaci imunitní odpovědi 	↑ zánět
	α₁-fetoprotein <i>69 000</i>	< 7,5 μg/l	3,5	<ul style="list-style-type: none"> fyziologicky produkován fetálními játry a žloutkovým váčkem hlavní protein fetálního séra fyziologicky přítomen v séru těhotných žen 	↑ hepatom ↑ některé malignity GIT ↑ těhotenství

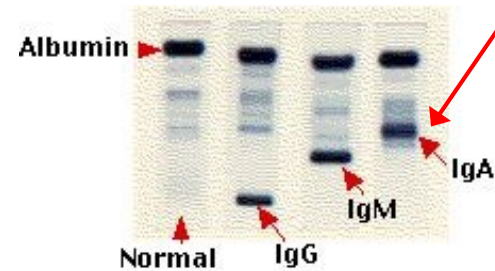
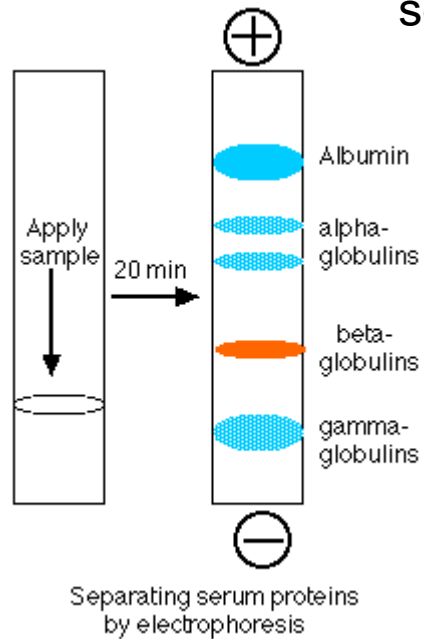
α₂ oblast	Haptoglobin ^[p 1] 85 000–1 000 000	0,3–2,0	2	<ul style="list-style-type: none"> vychytává volný hemoglobin 	↑ akutní zánět ↓ hepatopatie ↓ intravaskulární hemolýza (konzumpce haptoglobinu)
	α₂-makroglobulin 800 000	1,3–3,0	5	<ul style="list-style-type: none"> inhibitor proteáz (trombin, trypsin, chymotrypsin, pepsin) transport malých proteinů (cytokiny, růstové faktory) a dvojmocných iontů (např. Zn²⁺) díky velmi vysoké molekulové hmotnosti neprojde ani poškozenou glomerulární membránou 	↑ akutní zánět
	Ceruloplasmin 160 000	0,2–0,6	4,5	<ul style="list-style-type: none"> oxidoredukční aktivita (oxidace Fe²⁺ na Fe³⁺) vazba mědi (váže až 90 % Cu v séru) 	↓ Wilsonova choroba (hepatolentikulární degenerace)
β₁ oblast	Transferrin 77 000	2,0–3,6	7	<ul style="list-style-type: none"> transport a vychytávání volného železa 	↑ nedostatek železa ↓ malnutrice ↓ hepatopatie ↓ zánět
	Hemopexin 57 000	0,5–1,1	3–7	<ul style="list-style-type: none"> vazba hemu 	
	β-lipoprotein 2 750 000	0,7–0,9 (Apo B-100)	3	<ul style="list-style-type: none"> lipoprotein o nízké hustotě (LDL) transport cholesterolu k buňkám velmi vysoká molekulární hmotnost 	
	C4 složka komplementu 206 000	0,1–0,4	1	<ul style="list-style-type: none"> součást komplementu 	↑ zánět ↓ autoimunitní stavy
β₂ oblast	C3 složka komplementu 180 000	0,8–1,4	1	<ul style="list-style-type: none"> součást komplementu 	↑ zánět ↓ autoimunitní stavy
	β₂-mikroglobulin 11 800	0,001–0,002		<ul style="list-style-type: none"> součást leukocytárních antigenů 	↑ hematologické nádory ↓ porucha tubulární resorpce
	Fibrinogen 340 000	1,5–4,5		<ul style="list-style-type: none"> součást koagulační kaskády, prekurzor fibrinu fyziologicky jen v plazmě, není v séru 	↑ zánět
	C-reaktivní protein 111 000	1,5–5 mg/l	1	<ul style="list-style-type: none"> aktivace komplementu 	↑ akutní zánět (bakteriální)

γ oblast	IgG 150 000	8,0–18,0	24	<ul style="list-style-type: none"> ▪ pozdní protilátky 	↑ (chronický) zánět
	IgA ^[p 2] 160 000	0,9–3,0	6	<ul style="list-style-type: none"> ▪ protilátky slizniční imunity 	↑ záněty sliznic a jater
	IgM 900 000	0,6–2,5	5	<ul style="list-style-type: none"> ▪ časné protilátky 	↑ akutní zánět



Elektroforéza

sérové proteiny mohou být elektroforeticky separovány



imunoglobuliny

- lze zachytit pouze hrubé změny:
hypergamaglobulinémii,
hypogamaglobulinemii či monoklonální
gamapatie →

Využití elektroforézy v klinické praxi screening chorobných stavů

- Vyšetřovaný materiál: sérum, moč, likvor

Hyperproteinémie – hypergamaglobulinemie je vzácná:

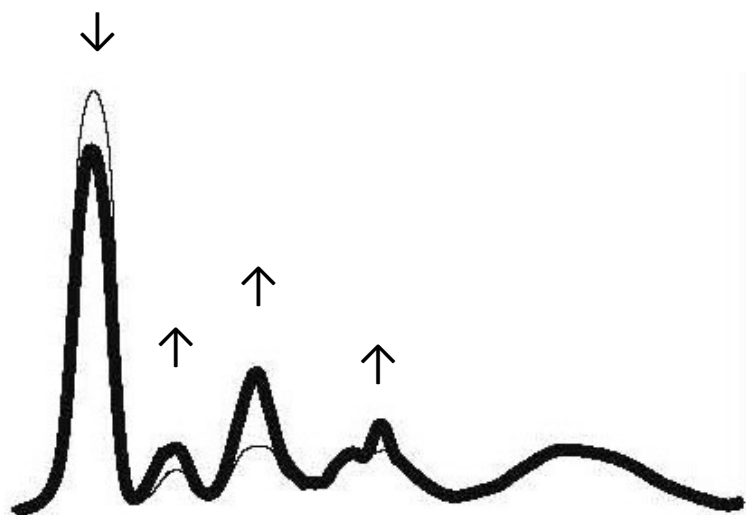
- Záněť
- **monoklonální gamapatie** (v moči – Bence-Jonesova bílkovina)
- chronické dlouhotrvající infekce, např. AIDS (zvýšená syntéza imunoglobulinů)
- Některé autoimunitní onemocnění – např. Sjögrenův syndrom

Hypoproteinémie - většina chorobných stavů:

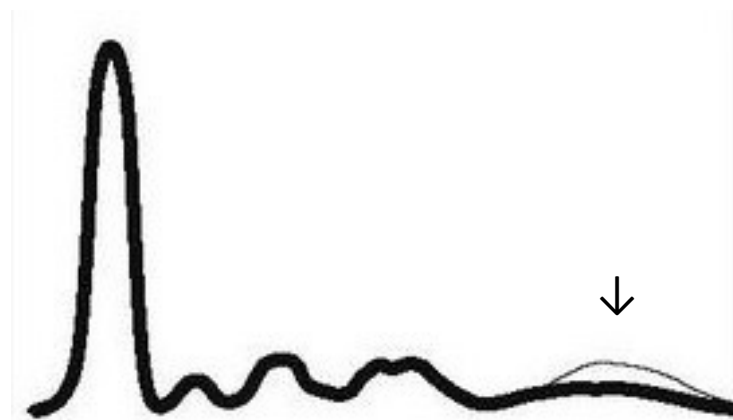
- porucha syntézy bílkovin v játrech
- nadměrné ztráty – nefrotický syndrom (vyšetření moči – zvýšené koncentrace bílkovin)
- poruchy výživy – malnutrice
- poruchy trávicího traktu – maldigestce a malabsorpce – nespecifické střevní záněty (Crohnova choroba, ulcerózní kolitida)
- Rozsáhlé popáleniny
- Hyperhydratace – dochází k naředění bílkovin séra – těhotenství (fyziologicky), nevhodně podaná infuze

Klasická elektroforéza - screening

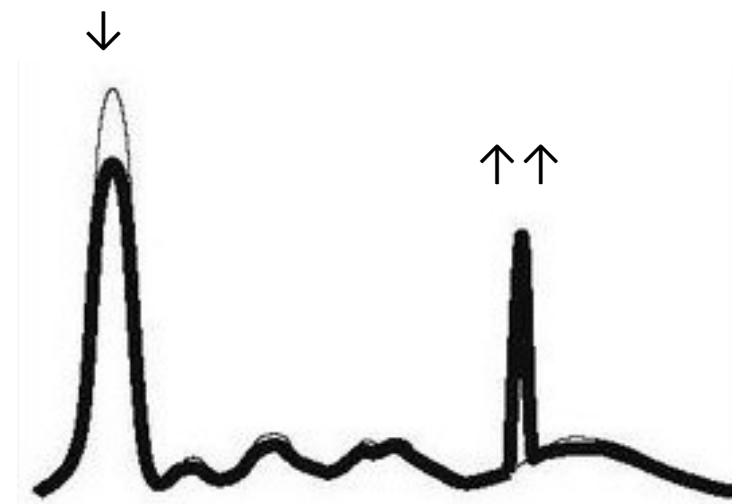
Nevýhoda – detekce pouze velkých změn v proteinových frakcích



Zánět



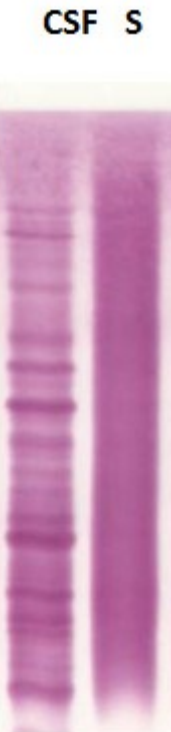
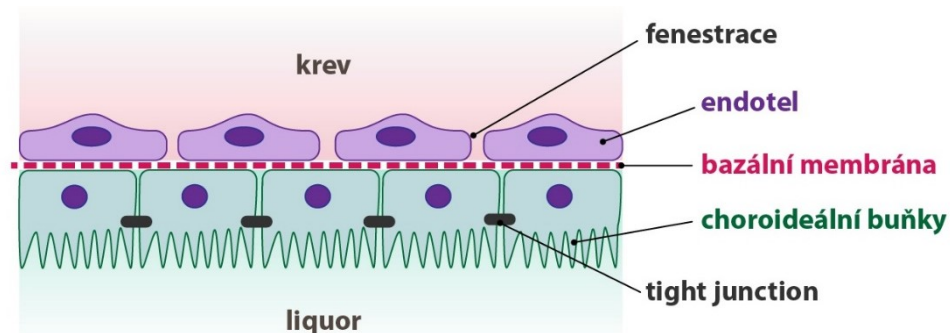
Hypogamaglobulinemie



Hypergamaglobulinemie
(monoklonální gamapatie)

Využití elektroforézy v klinické praxi screening chorobných stavů

- **Izoelektrická fokusace:** kvalitativní průkaz intratékální syntézy imunoglobulinů
- Vyšetřovaný materiál: Likvor (CSF) + sérum (S) současně
- Intratékální syntéza protilátek v centrálním nervovém systému pochází z perivaskulárních infiltrátů B lymfocytů, které lokálně proliferují, dozrávají v plazmocyty a produkují příslušné protilátky
- Diagnostika **roztroušené sklerózy – průkaz oligoklonálních pásů v likvoru (pozitivita až v 98% případů)**
- Obrázek vpravo: oligoklonální pásy jsou přítomny pouze v likvoru (CSF), zatímco v séru chybí – jedná se o intratékální syntézu Ig – tento nález je pro roztroušenou sklerózu poměrně typický
- **Hematolikvorová bariéra** – neumožňuje přestup imunoglobulinů z krve do likvoru

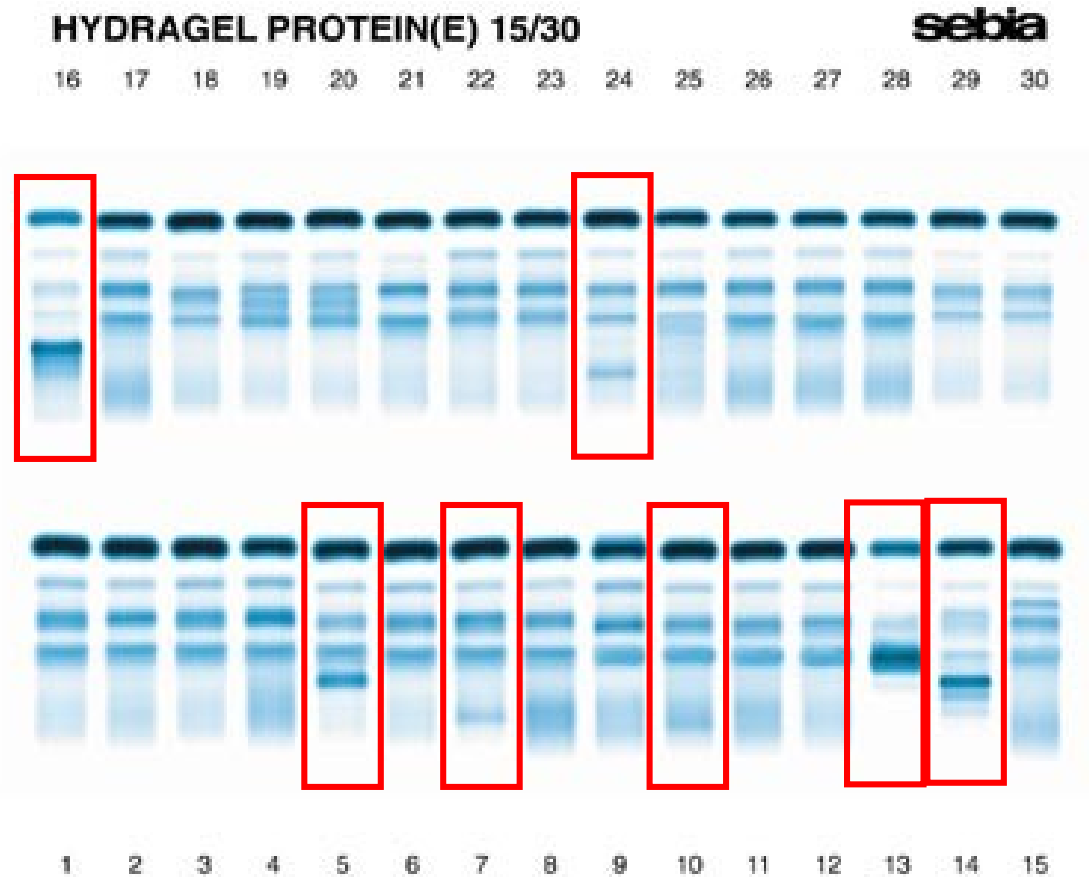


Typy intrathekální protilátkové odpovědi

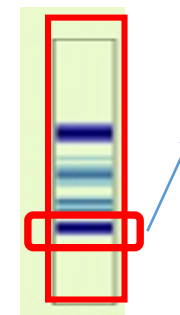
(DGLN, Editor Dr. M. Wick: Ausgewählte Methoden der Liquordiagnostik und Klinischen Neurochemie; 4. vydání, Mnichov 2020: str. 24-25)

Typ reakce	Onemocnění
Žádná ith. syntéza IgG, IgA, IgM	<ul style="list-style-type: none">- Časná fáze bakteriálních meningitid a virových meningoencefalitid- Syndrom Guillain-Barré
Dominance IgG	<ul style="list-style-type: none">- Roztroušená skleróza (IgM v 50%, IgA ve 20%)- Neurosyfilis (IgG + IgM, někdy dominance IgM; velmi vzácně IgA)- HIV encefalitida (jen IgG)- Infekce pomalými viry- Encefalitida asociovaná s protilátkami proti NMDA-receptoru
Dominance IgA	<ul style="list-style-type: none">- Neurotuberkulóza (IgA izolovaně nebo spolu s méně výraznou ith. syntézou IgG)- Mozkový absces- Někdy u HSV a VZV meningoencefalitidy
Dominance IgM	<ul style="list-style-type: none">- Lymeská neuroborrelióza (IgM > IgA > IgG)- Meningoencefalitida při příušnicích (IgM + IgA + IgG)- Klíšťová meningoencefalitida- Někdy u lymfomů s postižením CNS (monoklonální IgM)- Neurotrypanosomiáza (IgM + IgA + IgG, IgM v 95% případů)
IgG + IgA + IgM	<ul style="list-style-type: none">- Oportunní infekce při imunodeficitech (CMV, toxoplazmóza, mykotické infekce)- Neurocysticercóza a jiné parazitózy

Klasická elektroforéza - screening



Příklady elektroforetického rozdělení řady patientských sér



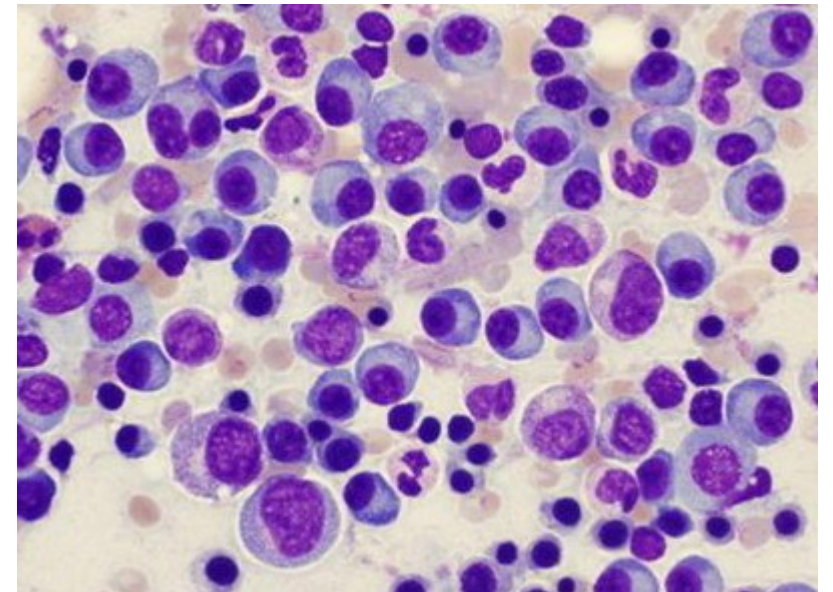
Ohraničený band v γ - globulinové oblasti (M gradient, M komponenta) = pacienti k dovyšetření imunofixací

Modifikace elektroforézy - Immunofixace

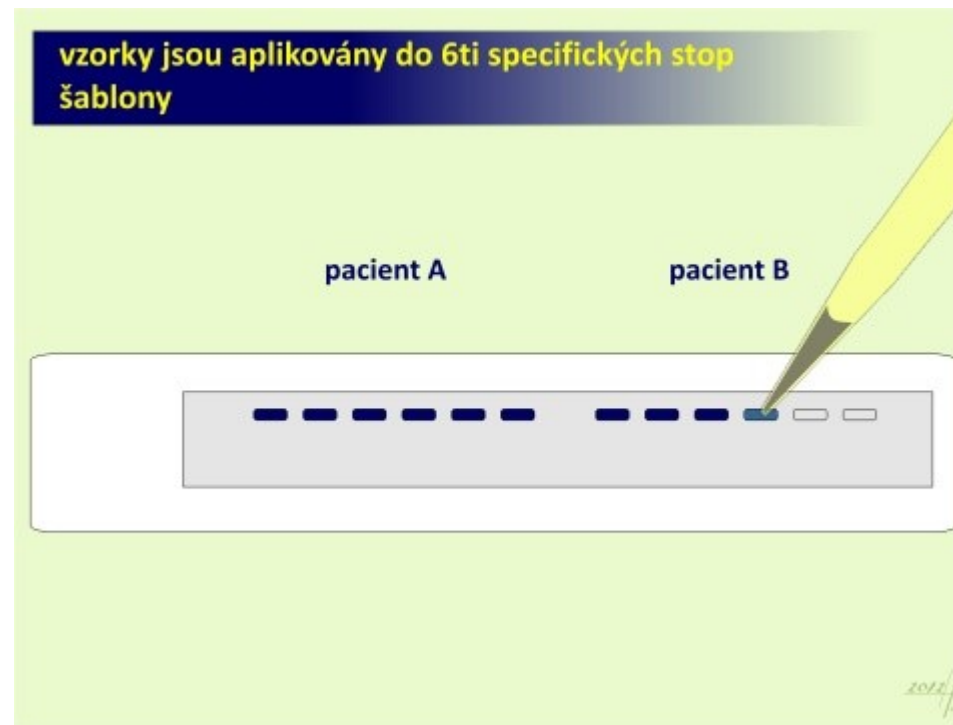
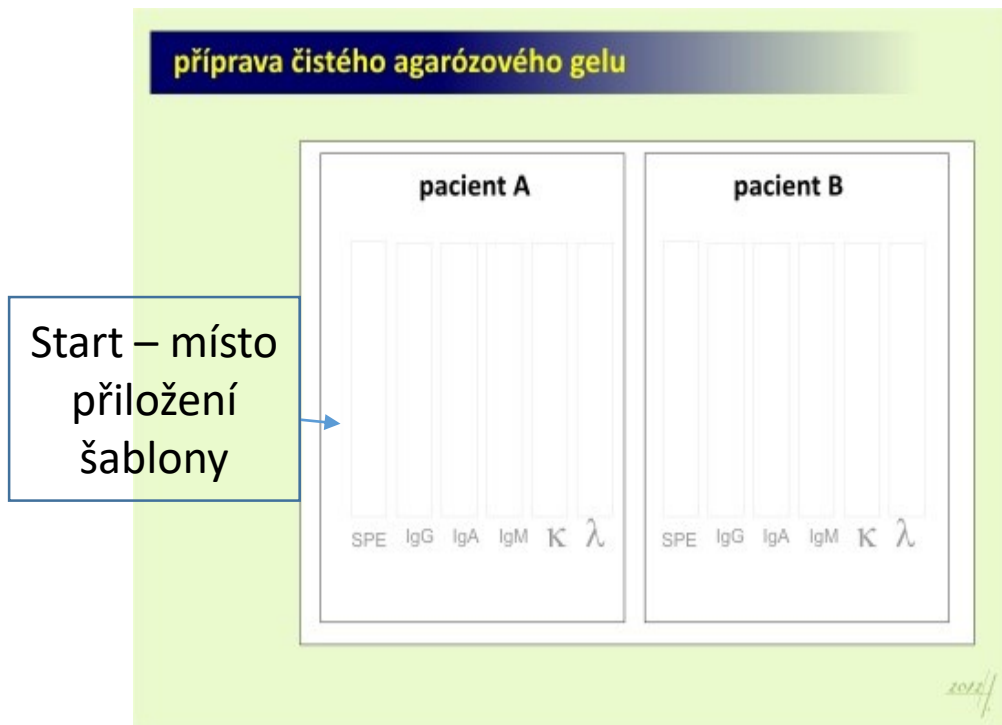
- Použití:
 - Identifikace paraproteinů- sérum, moč a likvor
- **paraprotein = monoklonální imunoglobulin**
 - produkován 1 klonem B-lymfocytů
- stav, kdy má pacient v séru paraprotein se nazývá **paraproteinémie** nebo též **monoklonální gamapatie**

Monoklonální gamapatie

- Onemocnění s výskytem monoklonálního imunoglobulinu v séru
 - Monoklonální gamapatie nejasného významu (MGUS)
 - Mnohočetný myelom
 - Plazmocytom
 - Waldenströмова makroglobulinemie
 - AL amyloidóza
 - Nemoci těžkých řetězců
- **Imunofixace slouží k:**
 - Diferenciální diagnostice gamapatie
 - Sledování vývoje onemocnění v čase
 - Sledování terapie
 - Vyšetření **séra + moči** současně!!

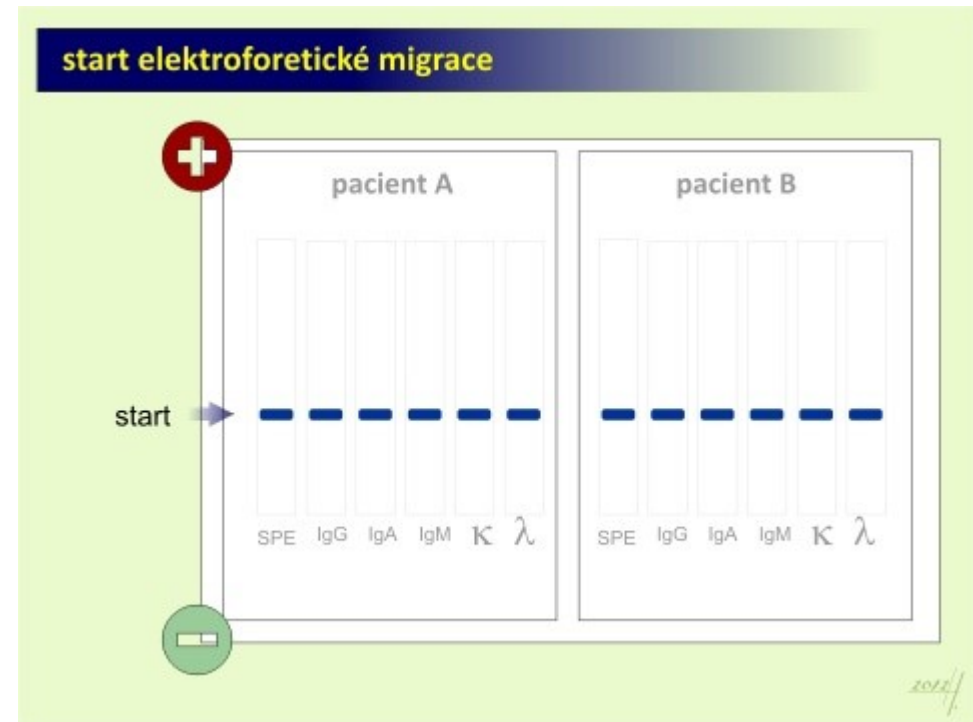
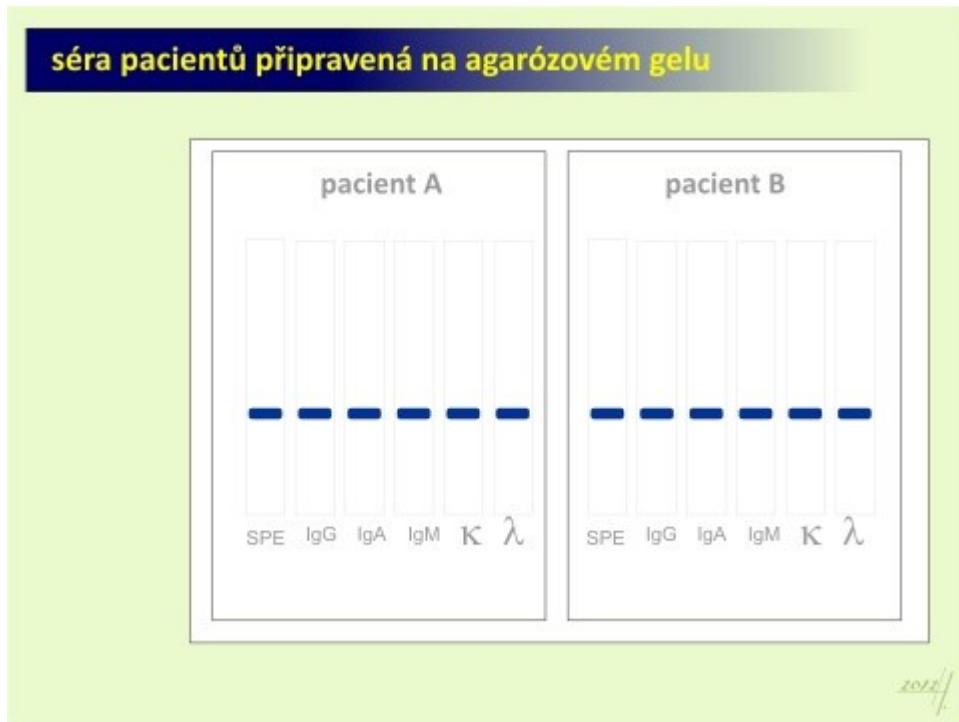


Imunofixace - zpracování



Na agarózový gel se na pozici start nanesou pomocí šablony séra pacientů (**1 pacient = 6 drah**)
Šablona = umělohmotný proužek s vyřezanými tvory který se přiloží na vyznačené místo na gelu pro start

Agarózový gel před elektroforetickým rozdělením



elektroforetická separace proteinů v alkalickém pH



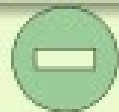
směr
pohybu



start



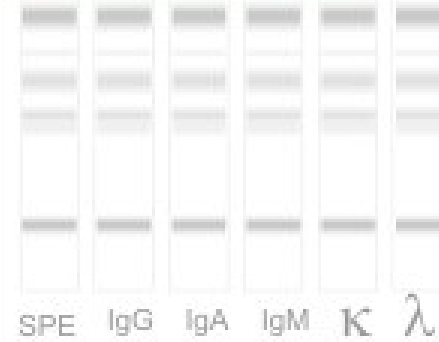
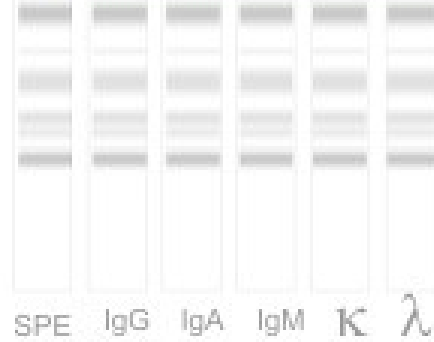
směr
pohybu



pacient A

pacient B

rychlost pohybu je závislá
na velikosti molekuly a síle náboje



2012/1

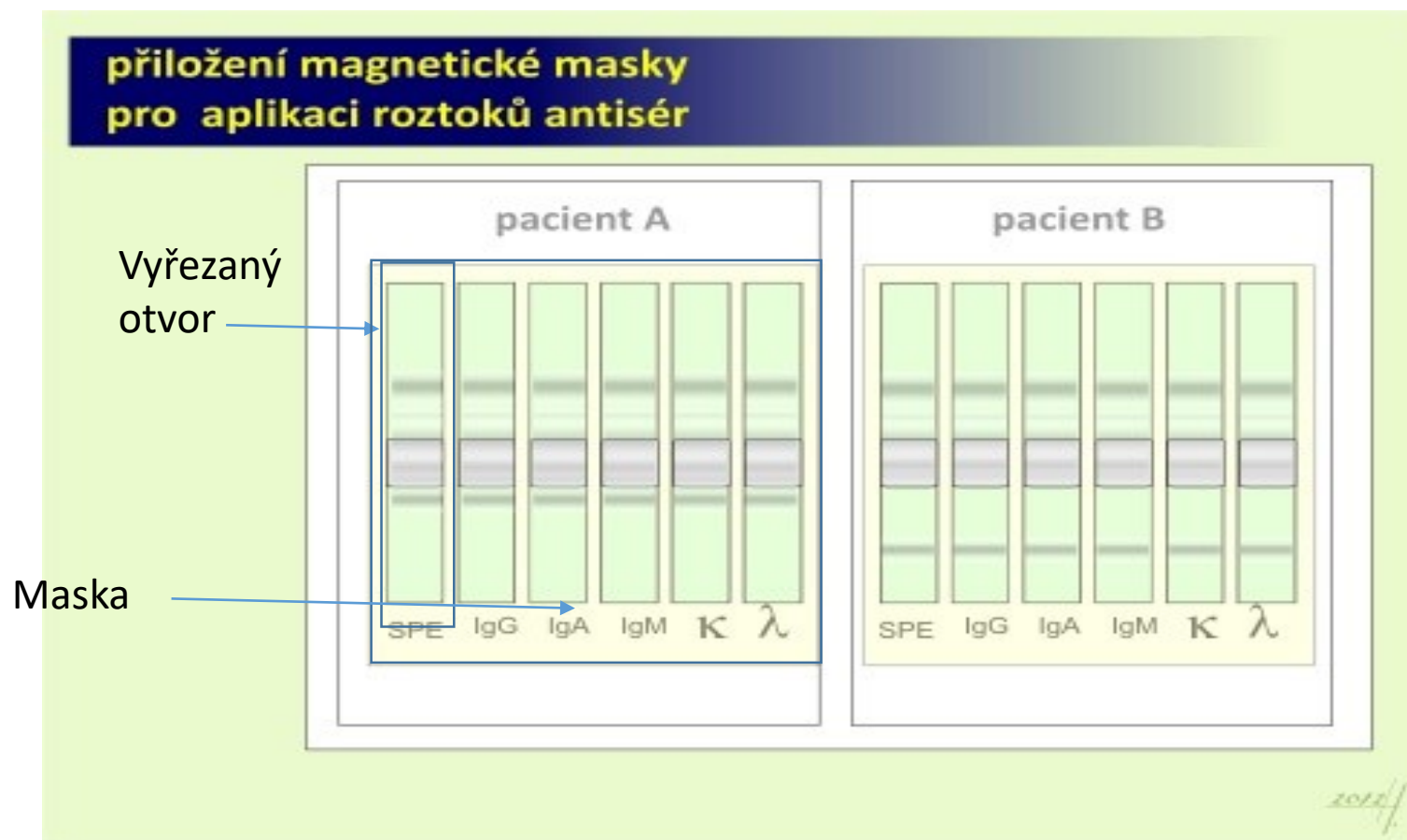
Agarózový gel po elektroforetickém rozdělení

separované imunoglobulinové molekuly

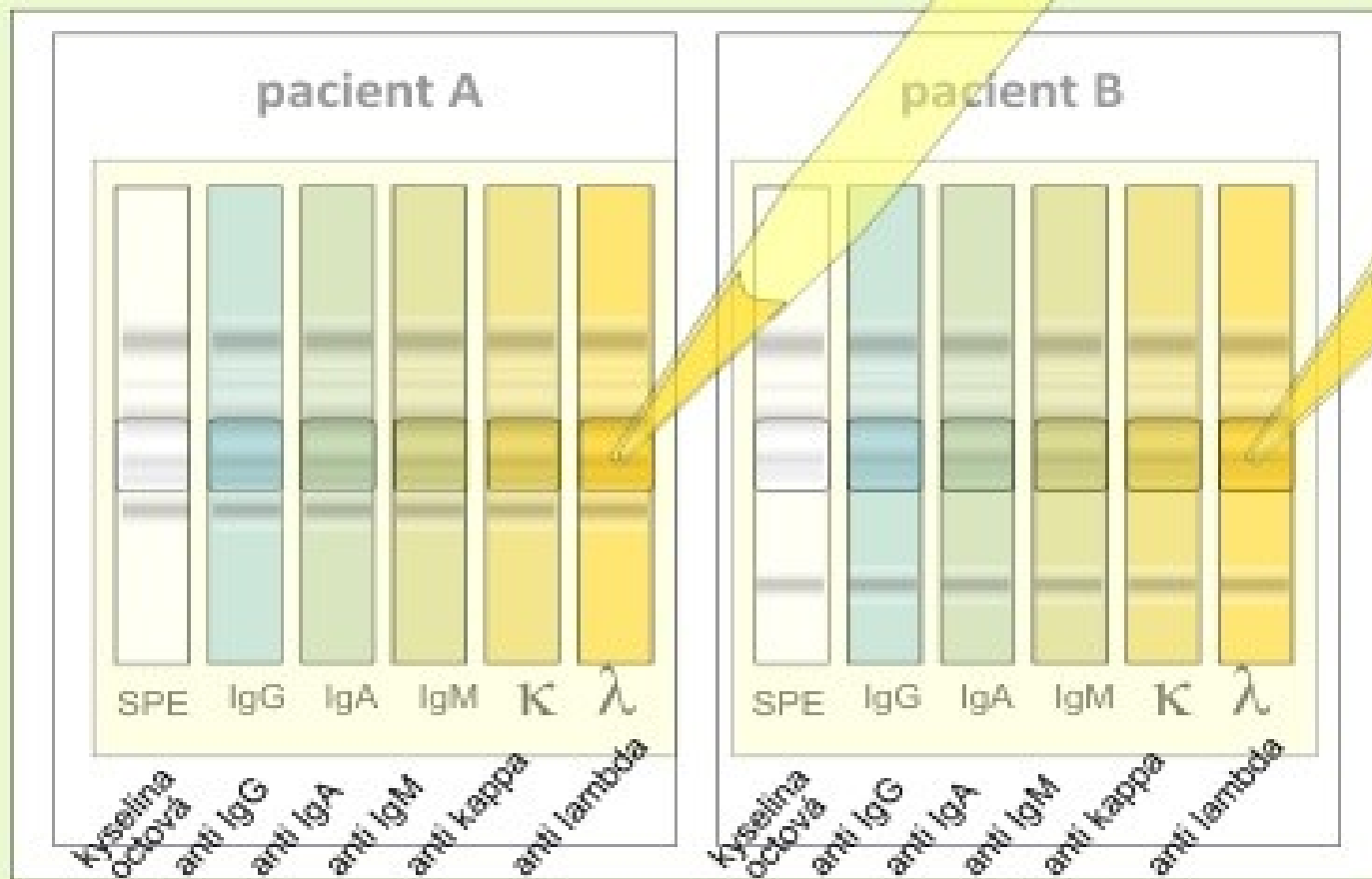


2024/

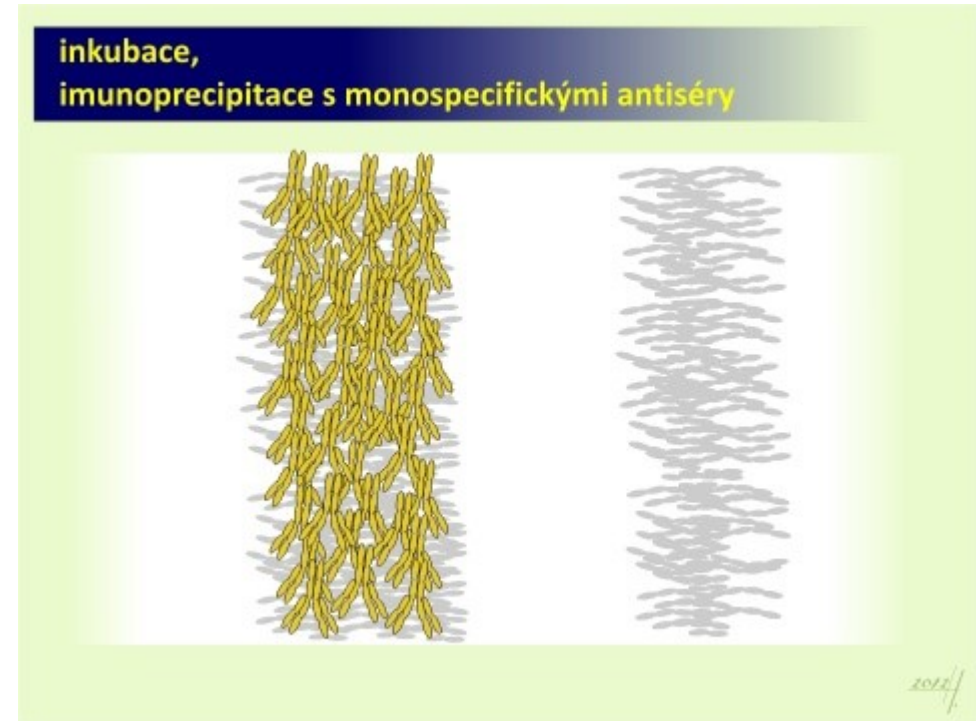
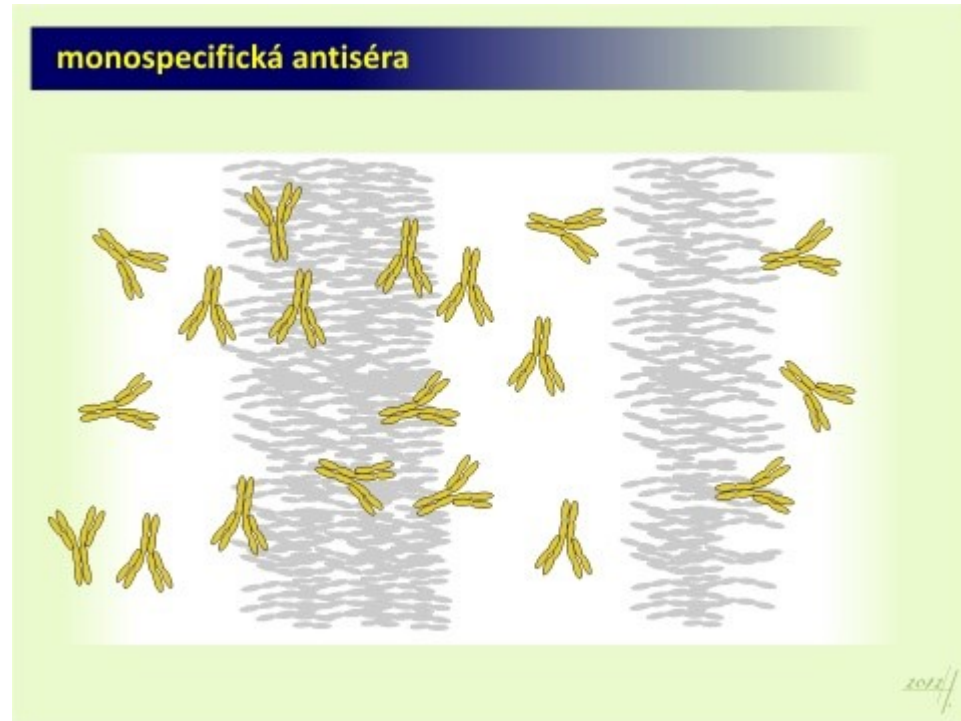
Na agarózový gel se po elektroforetickém rozdělení vzorků séra se přiloží maska
- umělohmotná fólie s vyřezanými otvory tak, aby se na jednotlivé linie dalo aplikovat příslušné antisérum



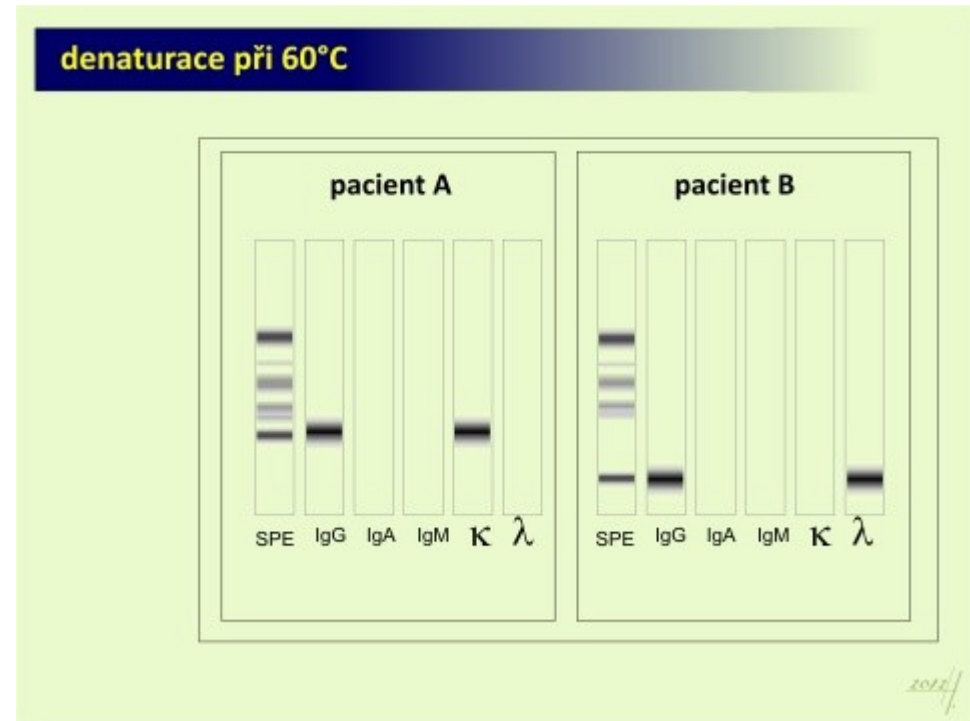
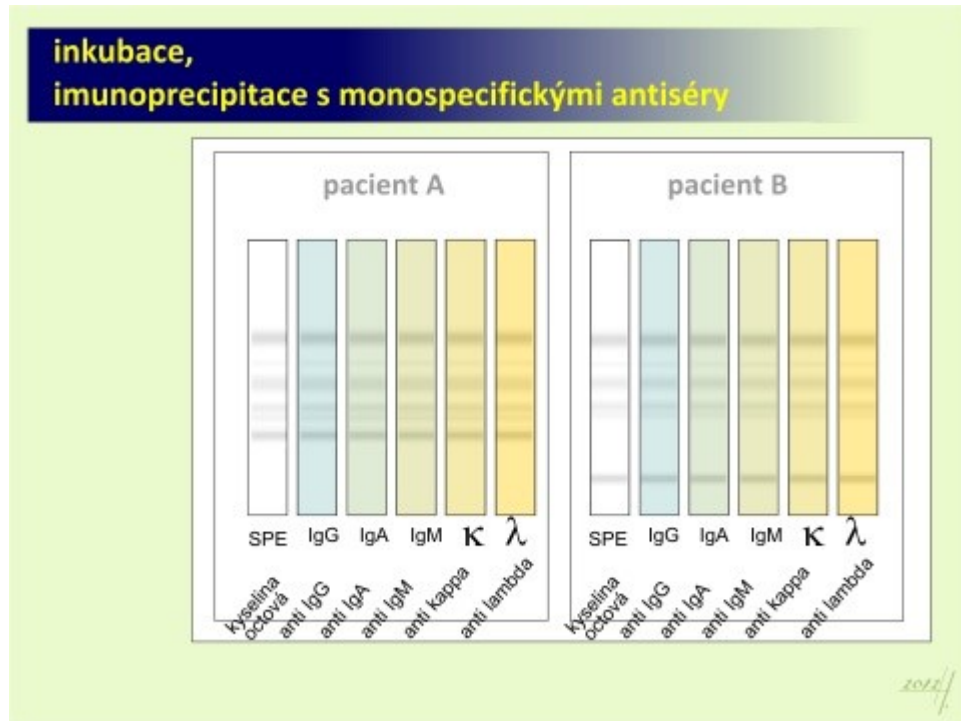
aplikace monospecifických antisér



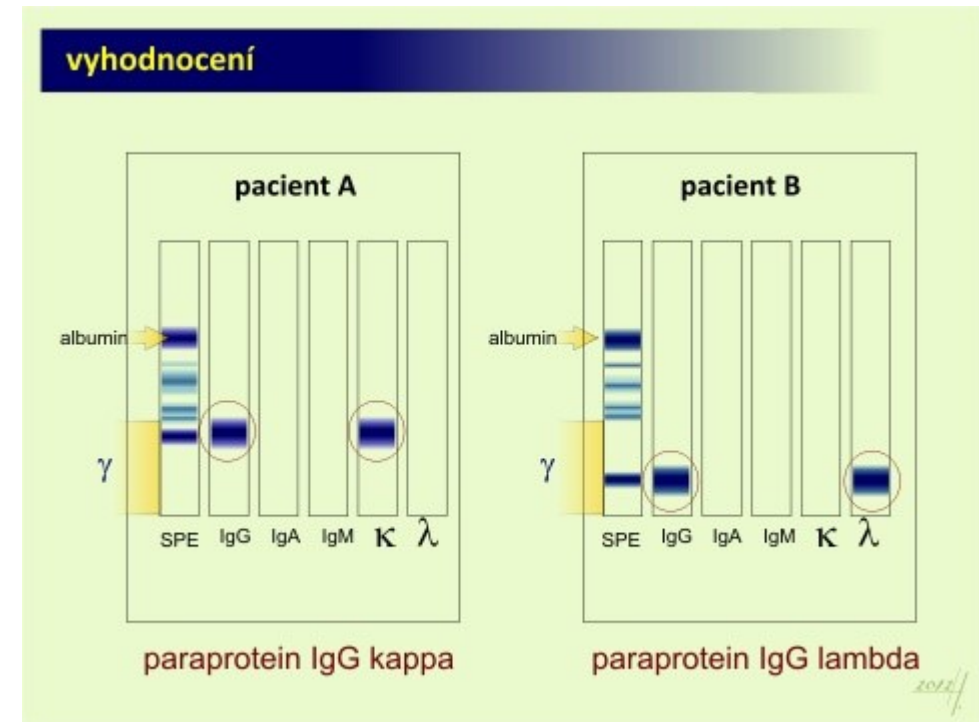
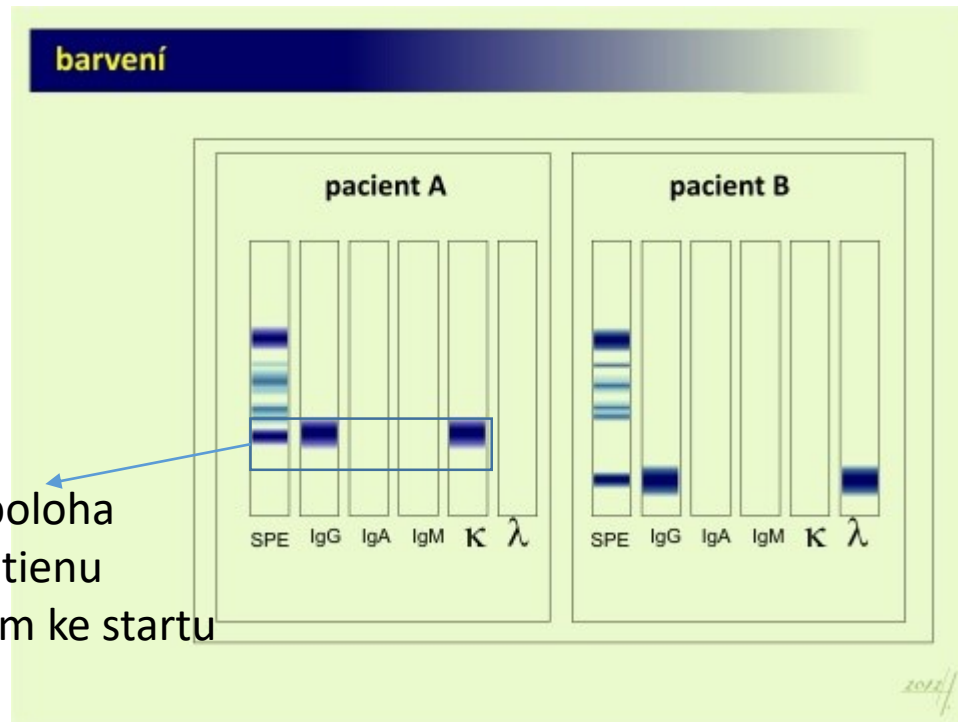
Při inkubaci s monospecifickými antiséry dochází k jejich vazbě na příslušné molekuly imunoglobulinů a dochází k precipitaci



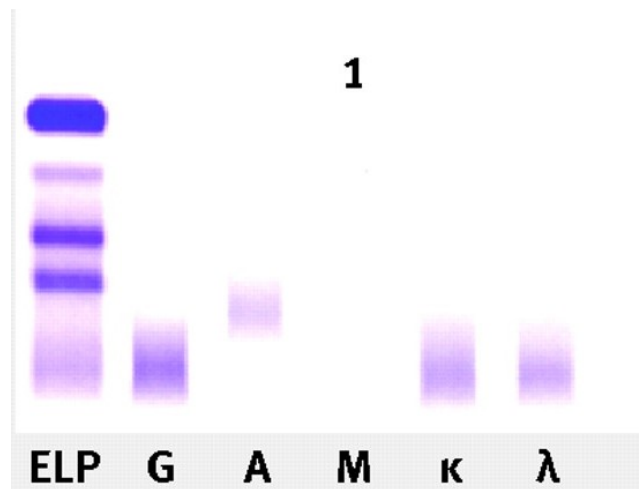
Po uplynutí inkubační doby se celý gel zahřeje na 60°C, čímž dojde k denaturaci vzniklých precipitátů a jejich přilnutí k podkladové membráně gelu.



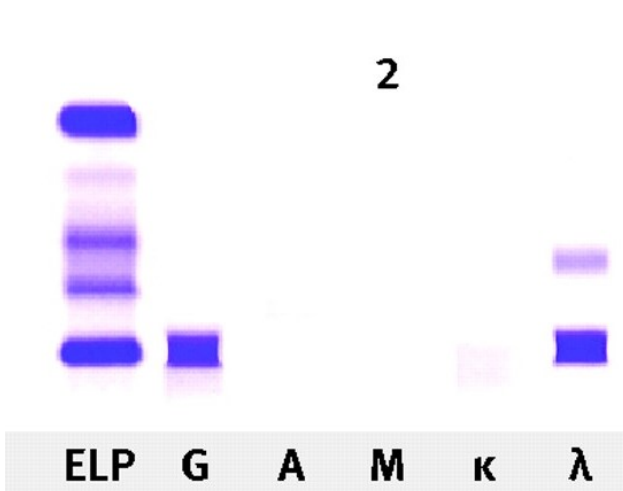
- Pro vyhodnocení se provádí barvení imunofixovaných vzorků a poté jejich vyhodnocení.
- Pokud vyšetřované sérum nebo moč pacienta obsahují zmnožený jeden klon imunoglobulinů nebo jen jejich část – κ nebo λ řetězce - vytvoří se ohraničený proužek tzv. band (paraprotein)
- Při vyhodnocování platí pravidlo, že band –paraprotein- v původním elektroforetickém rozdělení musí mít **ve všech pruzích stejnou polohu ve vzdálenosti od startu.**



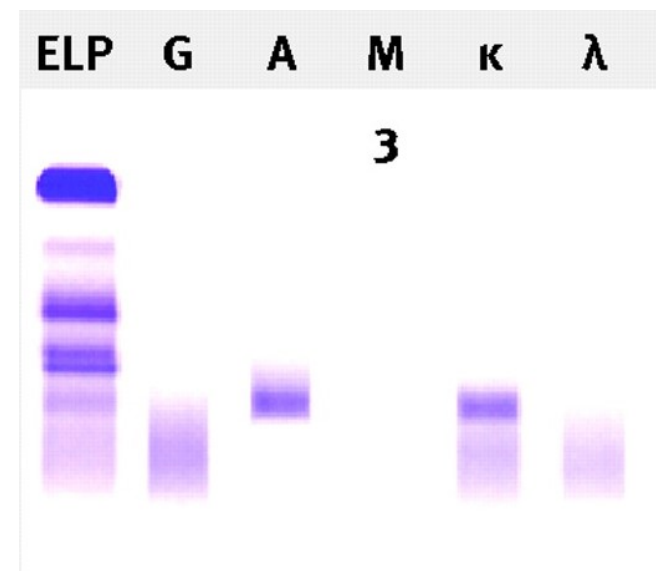
Imunofixace – odečítání výsledků



Polyklonální Ig – zdravý člověk

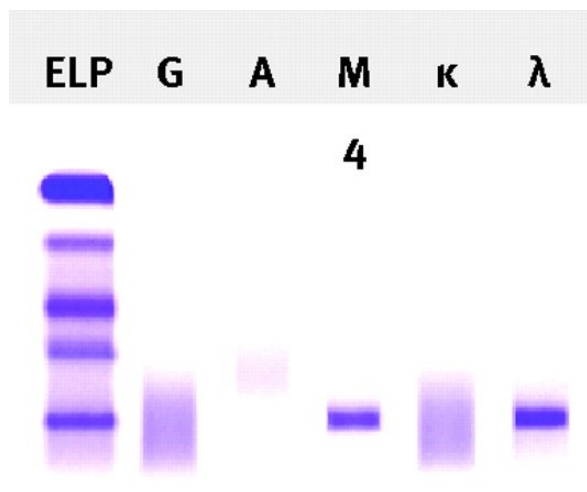


Pacient s paraproteinem IgG λ
a lehkými řetězci λ

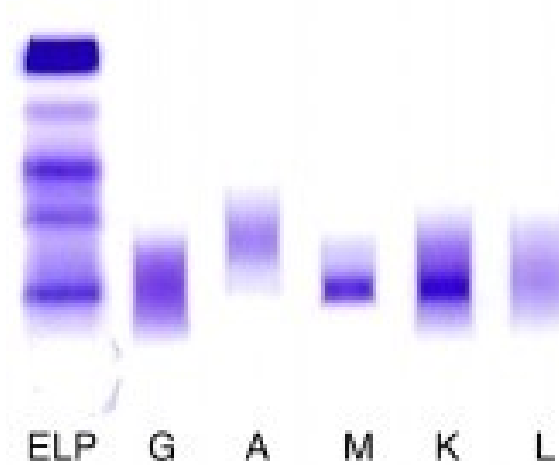


Pacient s paraproteinem IgA κ

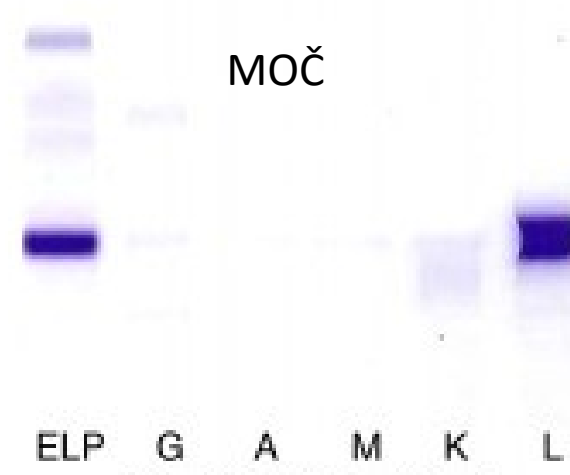
Imunofixace – odečítání výsledků



Pacient s paraproteinem IgM λ

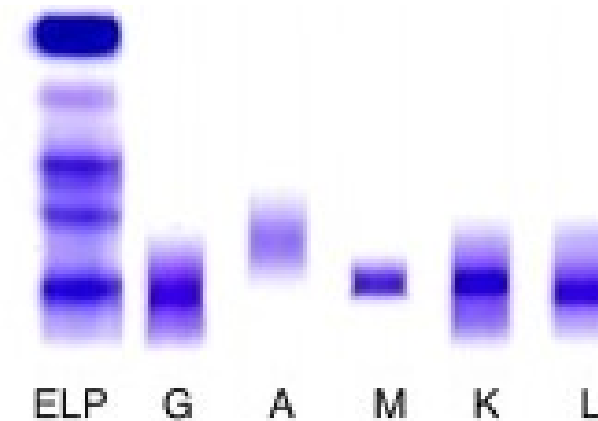


Pacient s paraproteinem IgM κ



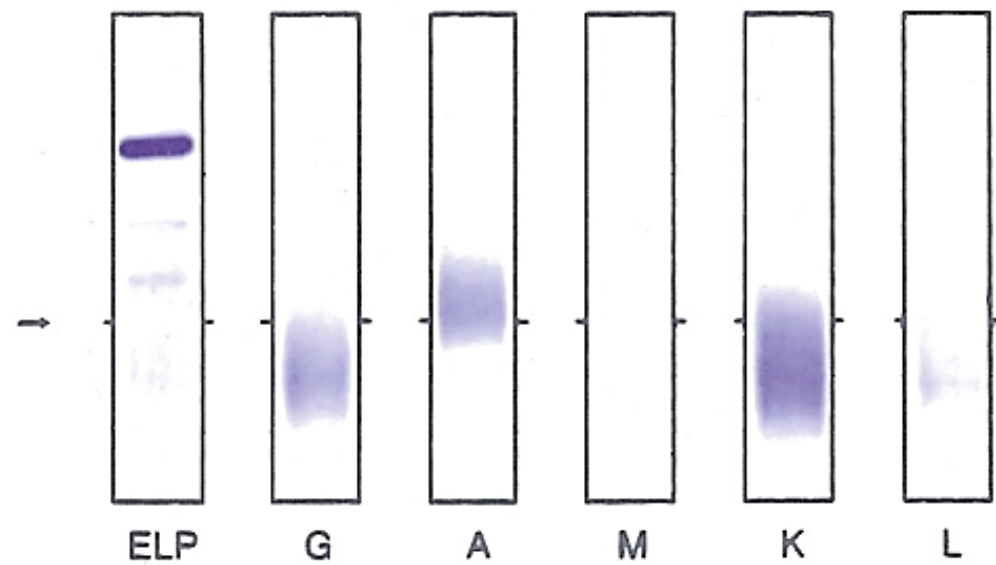
Volné lehké řetězce λ

Biklonální gamapatie
IgG κ + IgM λ



HYDRAGEL IF

⊕



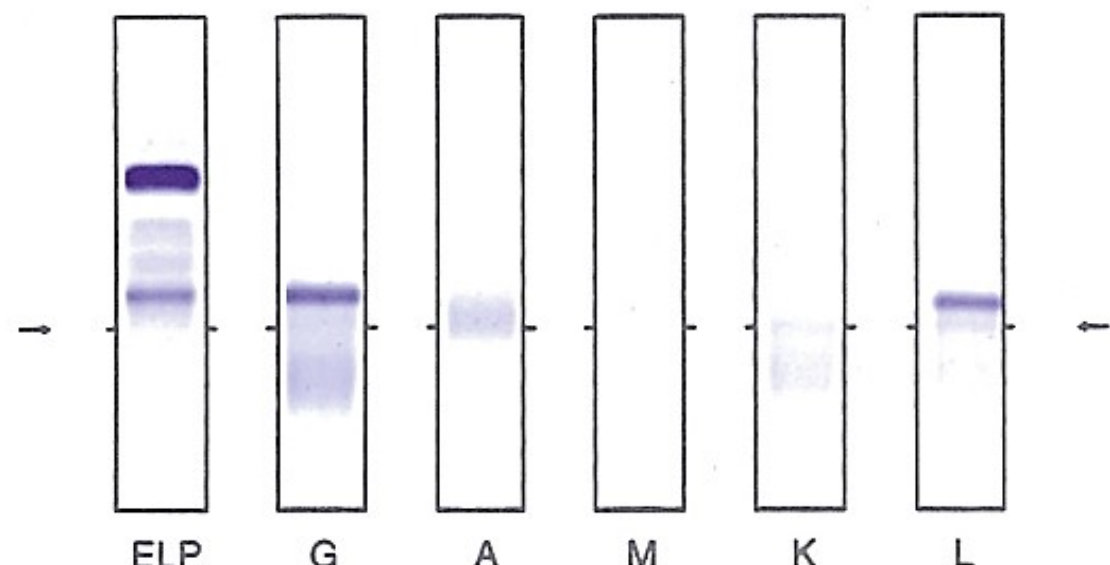
sebia

Normal IF, without any monoclonal gammopathy

HYDRAGEL IF

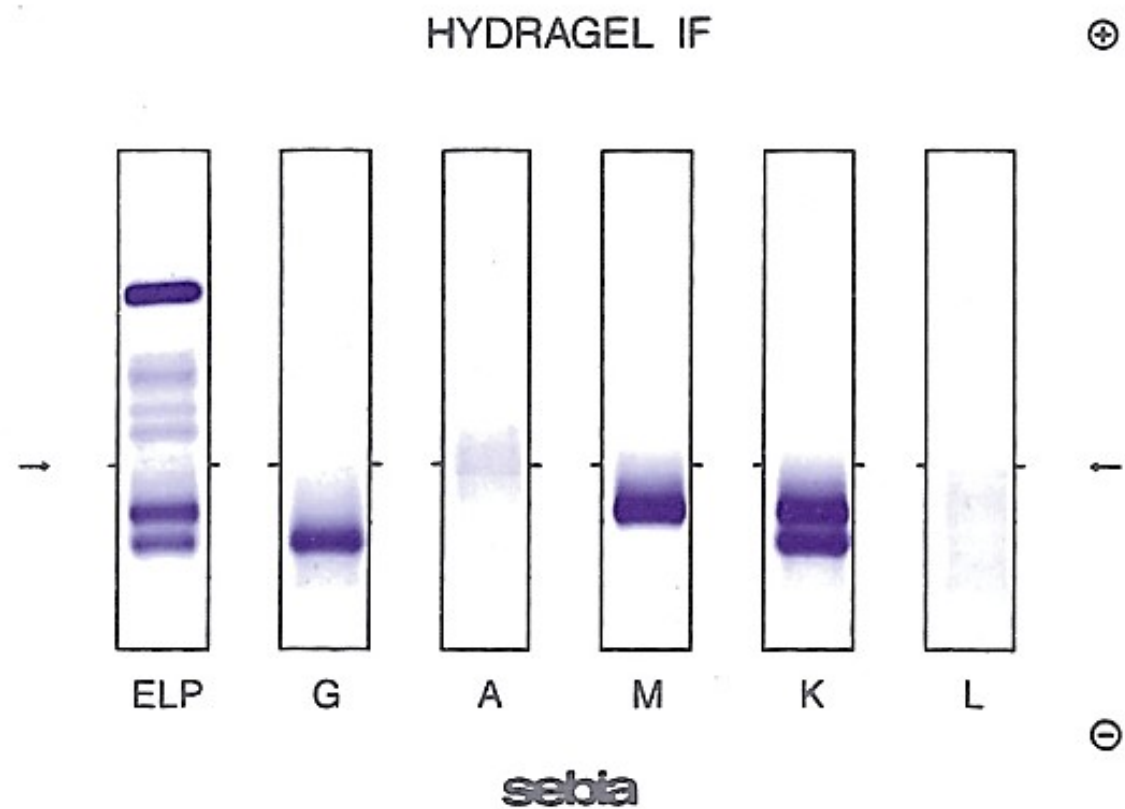
⊕

⊖

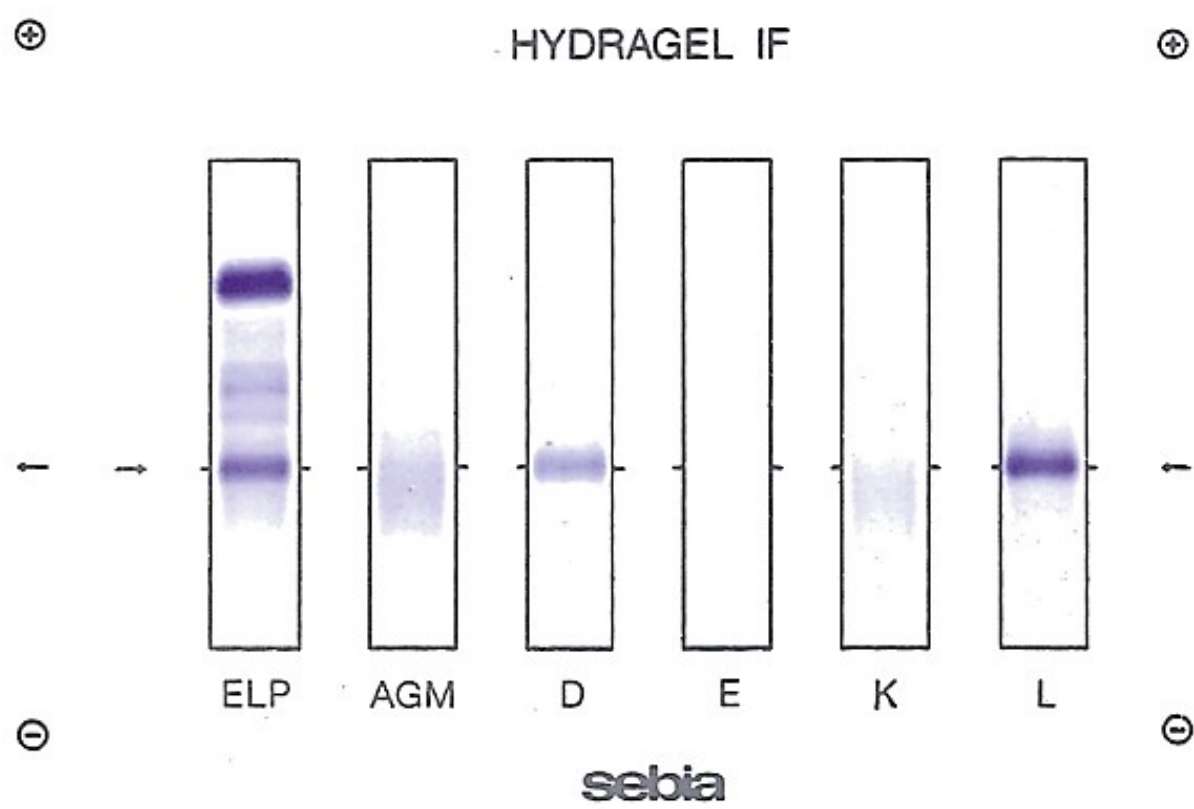


sebia

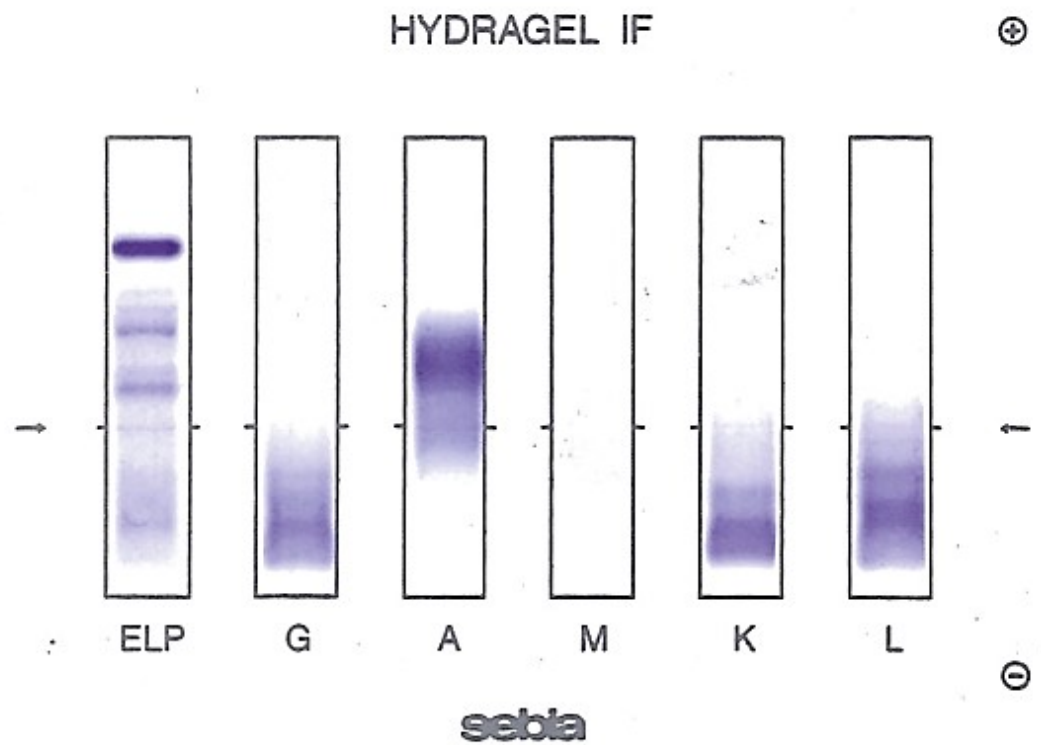
IgG Lambda monoclonal gammopathy



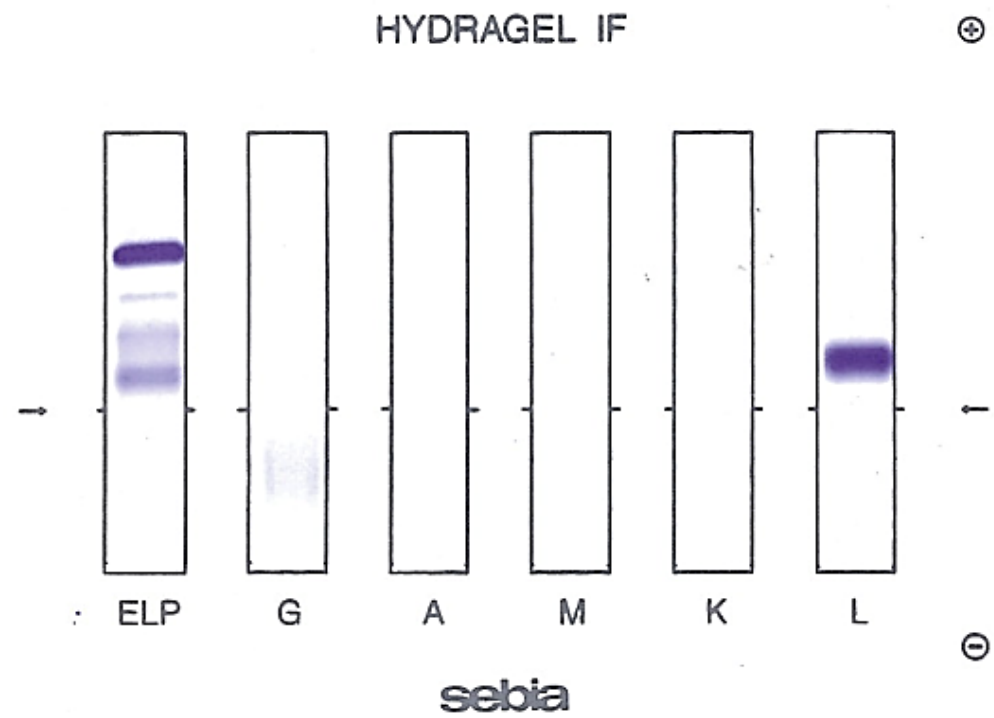
IgG Kappa + IgM Kappa biconal gammopathy.



IgD Lambda monoclonal gammopathy

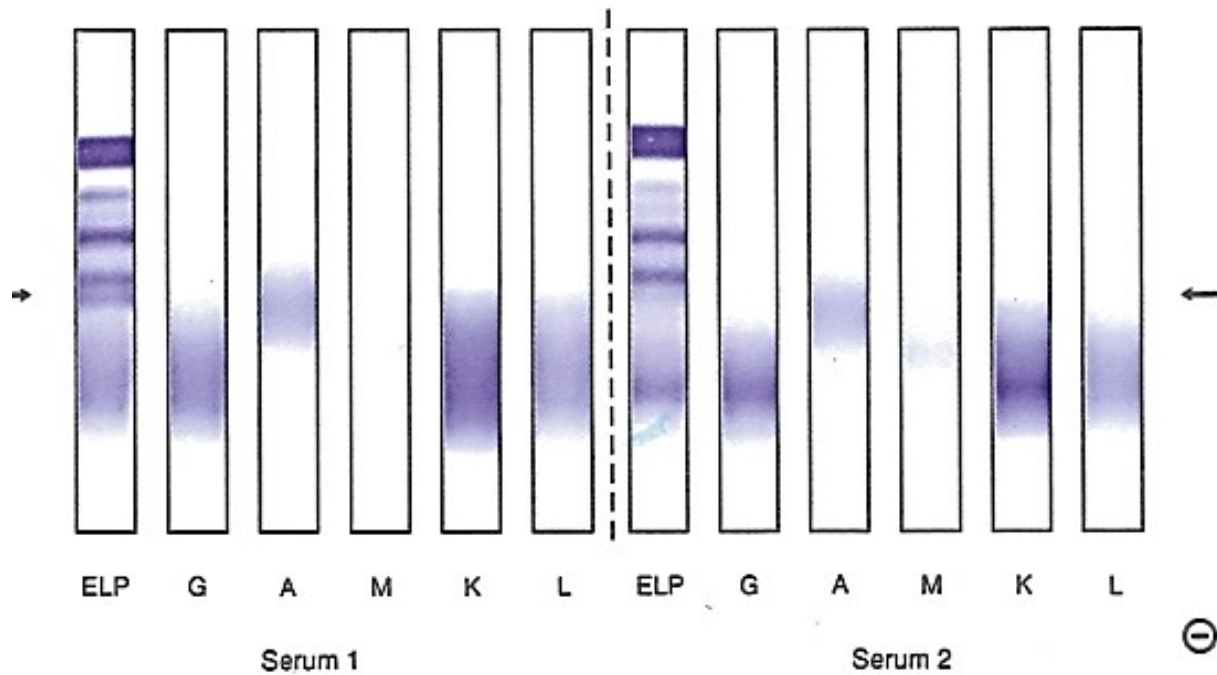


Alpha heavy chains disease, with oligoclonal profile (IgG (K+L)).



Lambda light chains disease, to be confirmed with Hydrigel Bence Jones Kit (cat. nbr: 4033)

HYDRAGEL 2 IF



⊕

Serum nbr 1

ELP : No monoclonal abnormality

Diffused zones corresponding to polyclonal Ig

Conclusion : Normal immunofixation

Serum nbr 2

ELP : Monoclonal band

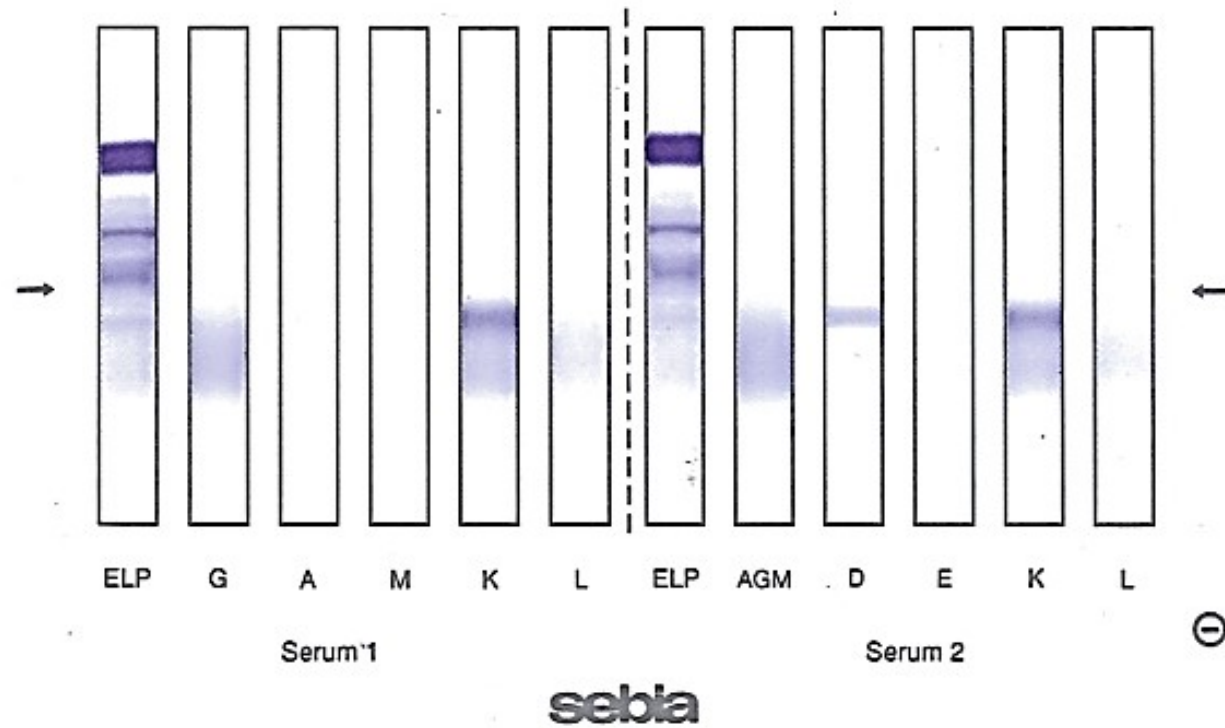
Detection of a monoclonal band with anti gamma heavy chains and anti Kappa light chains.

Conclusion : Monoclonal gammopathy of IgG Kappa type.

⊖

sebia

HYDRAGEL 2 IF



Serum nbr 1

ELP : Monoclonal band

- No abnormality with anti heavy chains sera (α , γ , μ)
- Presence of a monoclonal band with anti Kappa light chains.

Conclusion : Process to a complementary test with anti Kappa free light chains or IgD and IgE.

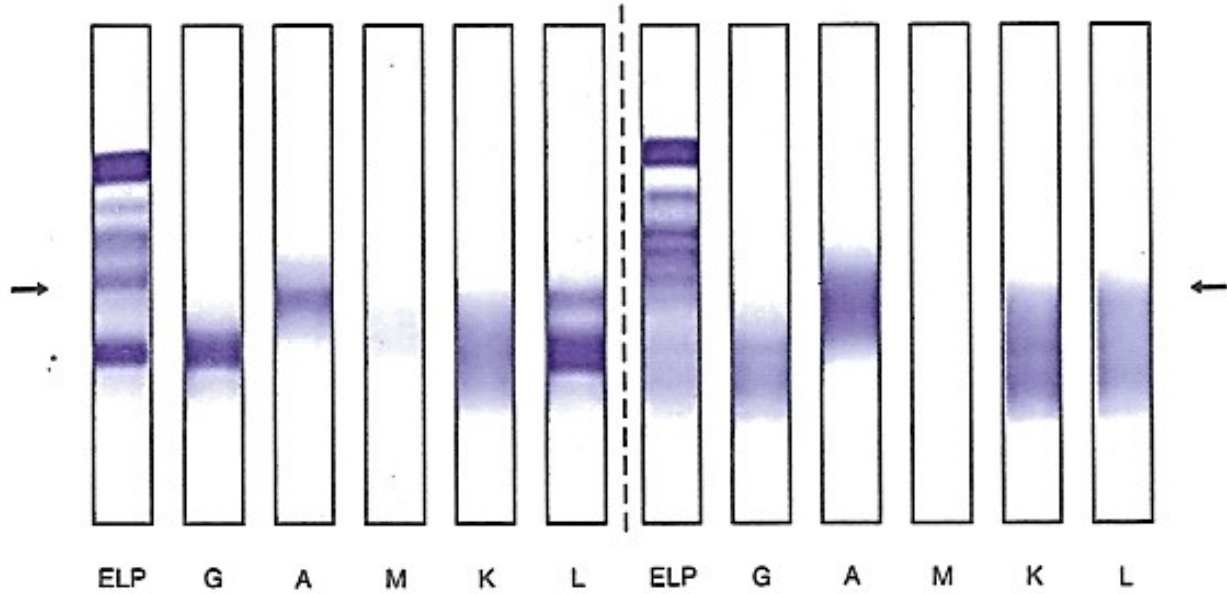
Serum nbr 2

ELP : Monoclonal band

- No abnormality with anti heavy chains sera (α , γ , μ)
- Presence of a monoclonal band with anti Kappa light chains.
- Presence of a monoclonal band with anti IgD.

Conclusion : Monoclonal gammopathy of IgD Kappa type.

HYDRAGEL 2 IF



Serum 1

Serum 2

sebia

⊕

Serum nbr 1

- ELP : Presence of 2 monoclonal bands
- Monoclonal band with anti gamma heavy chains
 - Monoclonal band with anti alpha heavy chains
 - 2 monoclonal bands with anti Lambda light chains

Conclusion : Biclonal gammopathy of IgG Lambda + IgA Lambda types.

Serum nbr 2

- ELP : Presence of multiple bands
- Multiple bands detected with anti gamma heavy chains anti Kappa and anti lambda light chains.

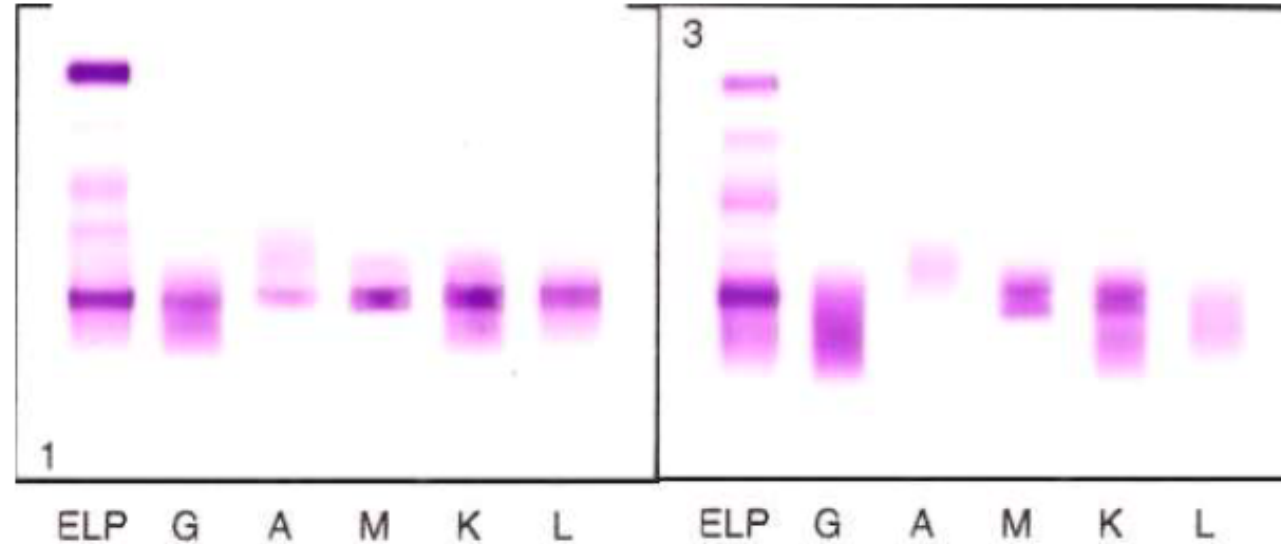
Conclusion : Oligoclonal profil of IgG (Kappa and Lambda) types.

⊖

IMUNOFIXACE

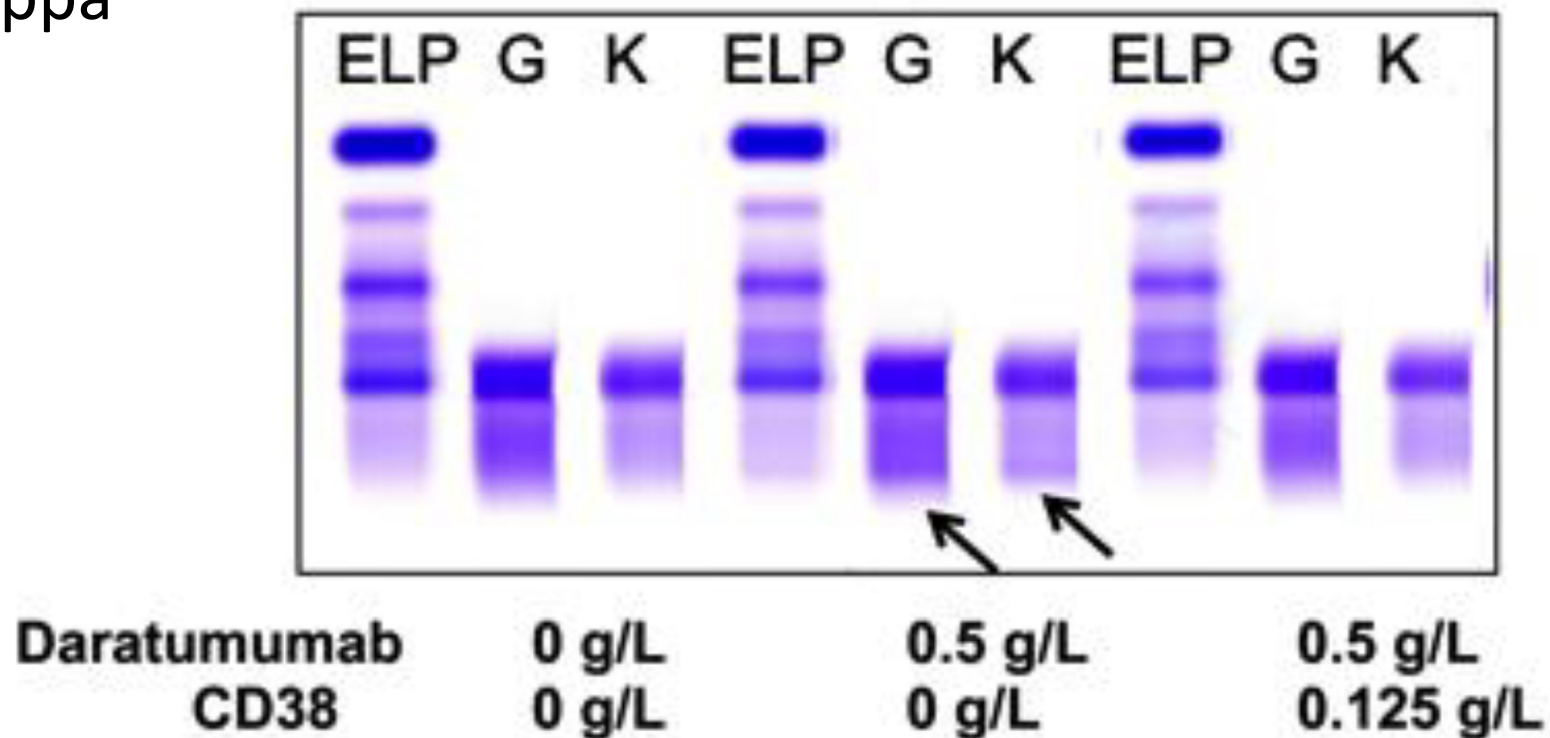
Někdy na sebe paraprotein (zejm. IgM) váže jiné bílkoviny (Ig) a nedaří se ho určit. Řešením je přidání malého množství merkaptoethanolu nebo dithiothreitolu.

Vlevo: vzorek bez DTT; vpravo: vzorek s přidavkem 10 mmol/l DTT



Mnohočetný myelom a biologická léčba

- Terapeutické monoklonální protilátky mimikují paraprotein (interference) – nutno brát ohled na léčbu u pacienta!
- Nejčastěji izotyp IgG kappa



Modifikace elektroforézy reakcí Ag-Ab – historické metody

Výroba polyklonálních protilátek

1975

Výroba monoklonálních protilátek

Metody kvalitativní

Imunoelektroforéza (dle Graba a Williamse)

Protisměrná elektroforéza

Metody kvantitativní

Raketková imunoelktroforéza (dle Laurella)

Dvourozměrná elektroforéza

Tyto metody jsou v dnešní době zastaralé a využívají se pouze výzkumně (pocházejí z dob, kdy nebyl znám proces výroby monoklonálních protilátek a používala se tedy pouze polyklonální směsná antiséra)

Imunoelektroforéza

- 2 fáze:
 - 1) Rozdělení proteinů klasickou ELFO
 - 2) Aplikace polyspecifického antiséra do podélně vykrojeného žlábků v gelu → difuze do gelu
- V místě ekvivalentní koncentrace obou složek se vytvoří obloukovitá precipitační linie

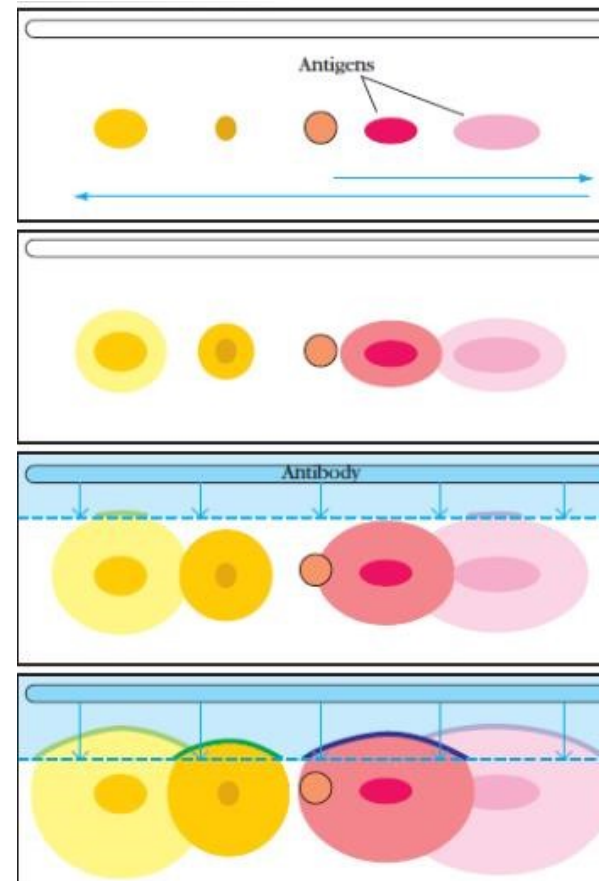


Figure:
Immunoelectrophoresis of an antigen mixture.

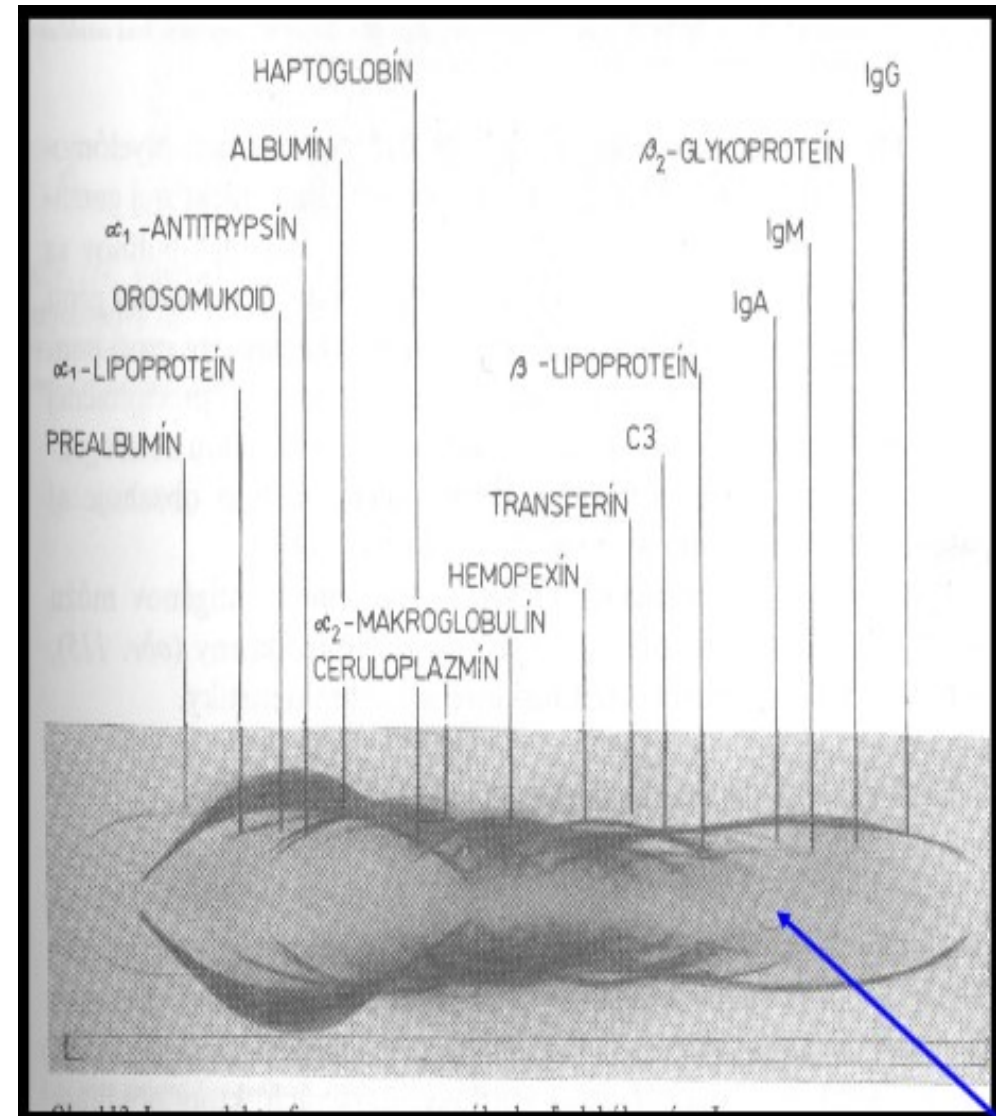
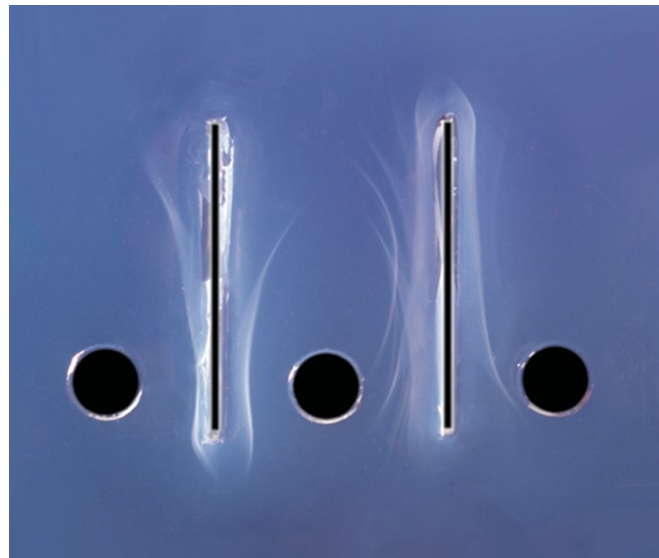
-An antigen preparation (orange) is first electrophoresed, which separates the component antigens on the basis of charge.

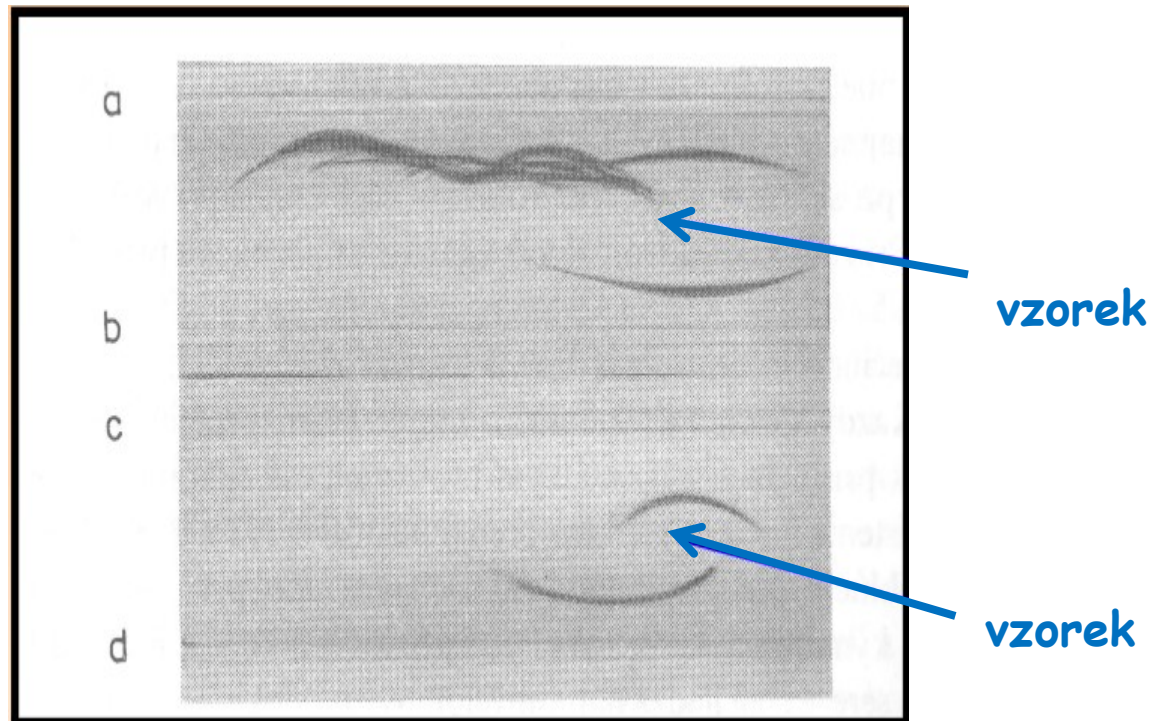
-Antiserum (blue) is then added to troughs on one or both sides of the separated antigens and allowed to diffuse.

-In time, lines of precipitation (colored arcs) form where specific antibody and antigen interact.

Imunoelektroforeogram normálního lidského séra

- Použito **polyspecifické antisérum** → až 35 precipitačních obloučků (každý oblouček = 1 protein)
- Obloučky mají charakteristický tvar a umístění na imunoelektroforeogramu





Nevýhody:

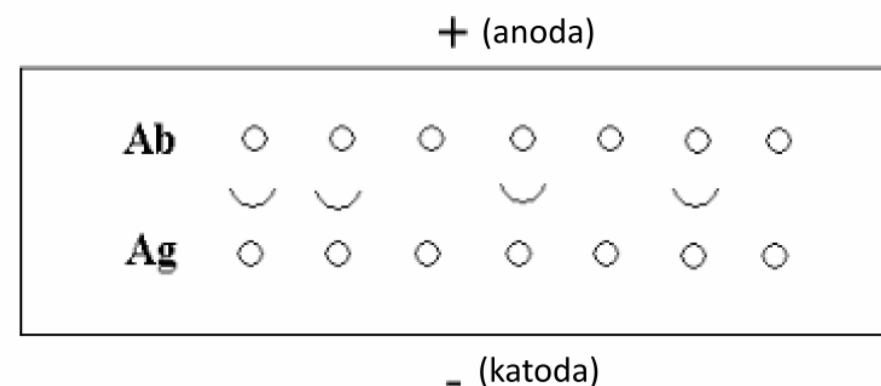
- Díky difuzi velmi zdlouhavé zpracování
- Okometrické odečítání
- Výsledky pouze kvalitativní
- Nutná zkušenost odečítajícího – různé monografie, atlasy

Imunoelektroforegram normálního lidského séra:

žlábek a	polyspecifické antisérum proti lidským sérovým proteinům
žlábek b	monospecifické antisérum anti - IgG
žlábek c	monospecifické antisérum anti - IgM
žlábek d	monospecifické antisérum anti - IgA

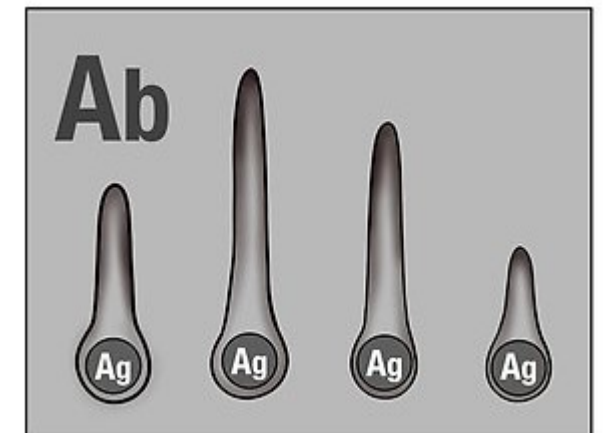
Protisměrná elektroforéza

- Imunodifuze urychlená el. polem (výsledek za 30 min)
- Využívá opačných pohybů Ag a Ab v el. poli
- 2 jamky
 - Jedna blíže anodě – pipetujeme protilátku
 - Druhá blíže katodě – pipetujeme antigen
- V el. poli se bude antigen pohybovat k anodě a protilátka ke katodě → v místě ekvivalentní koncentrace obou složek se tvoří precipitát
- Kvalitativní průkaz antigenů s anodickou pohyblivostí

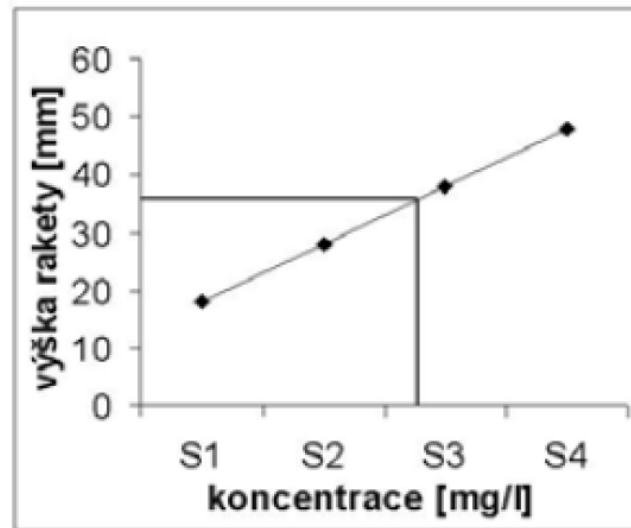
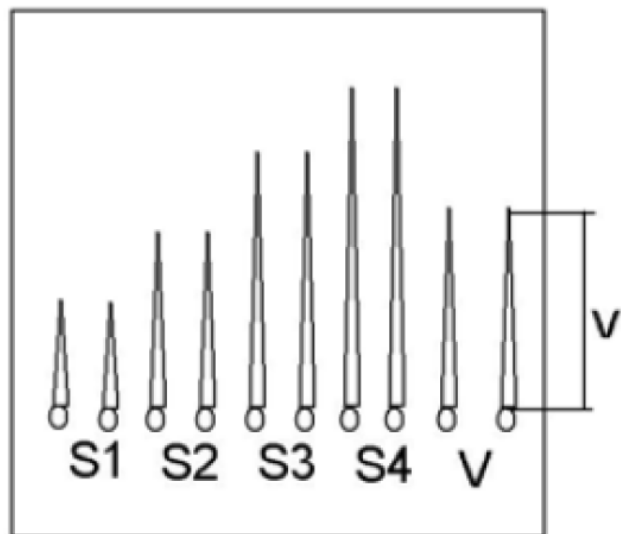


Raketková imunoelektroforéza

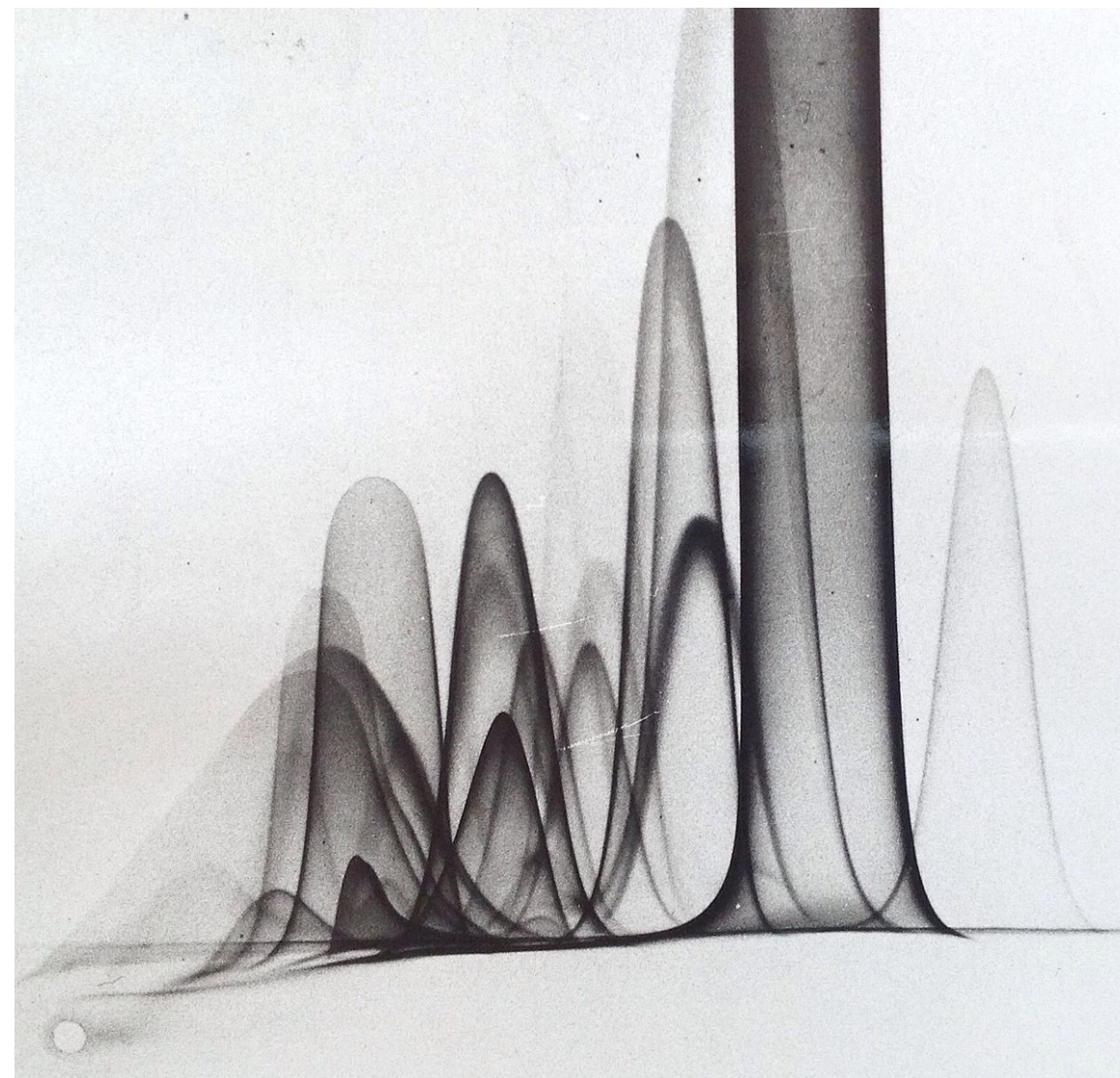
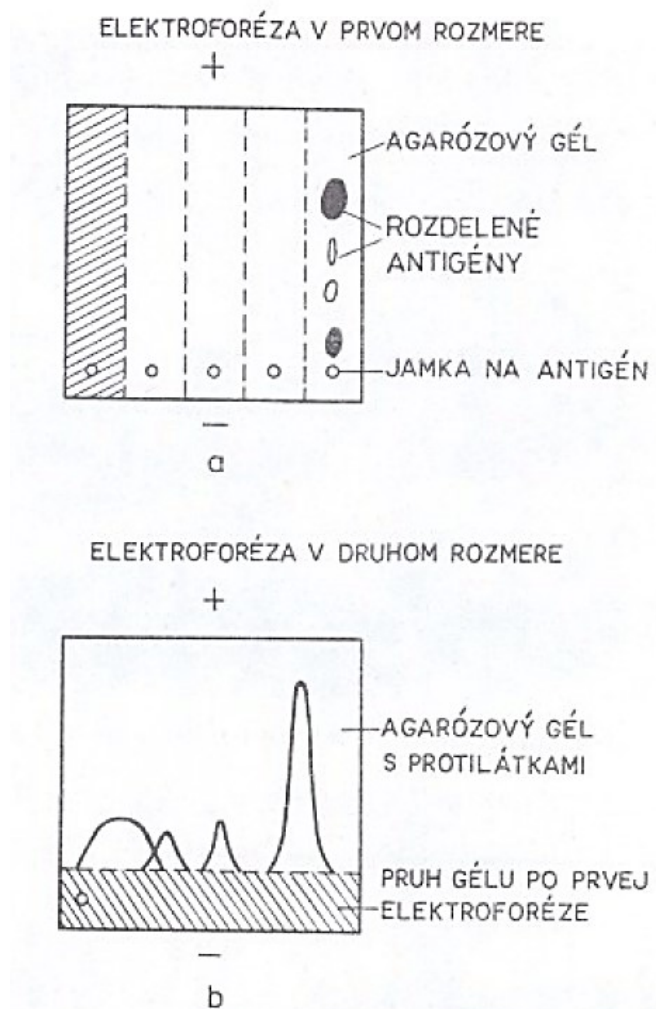
- Umožňuje kvantitativní hodnocení, citlivost od 0,1 mg/l
- Imunodifuze probíhající v el.poli
- Rozdíl od předchozí metody – protilátka (antisérum) se přimíchá do agarózového gelu
- Migrace proteinů – střetávají se s molekulami protilátky v gelu – v místě ekvivalentní koncentrace obou složek se tvoří precipitát
- Díky pohybu proteinů získává tvar píku – „raketky“



Raketková imunoelektroforéza



Dvourozměrná (2D) elektroforéza



Dvourozměrná (2D) elektroforéza

- Kombinace elektroforézy s raketkovou imunoelektroforézou
- Krok 1: klasická elektroforéza séra
- Krok 2: Po ELFO slouží gel s rozdělenými proteiny jako start elektroimunodifuze – gel se otočí kolmo a k němu se doplní nový gel (obsahující polyvalentní antisérum) → elektroimunodifuze probíhá ve směru kolmém na gel se separovanými proteiny
- Vznik píků, jejichž plocha / výška je úměrná koncentraci daného proteinu
- Poloha píku charakterizuje druh antigenu
- Lidské sérum – touto metodou lze stanovit až 50 různých proteinů