

# 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

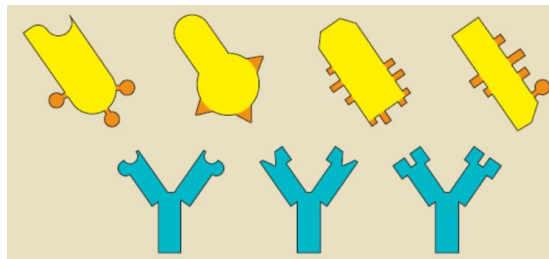
- **Analytická fáze**

- 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  
buněčné - 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

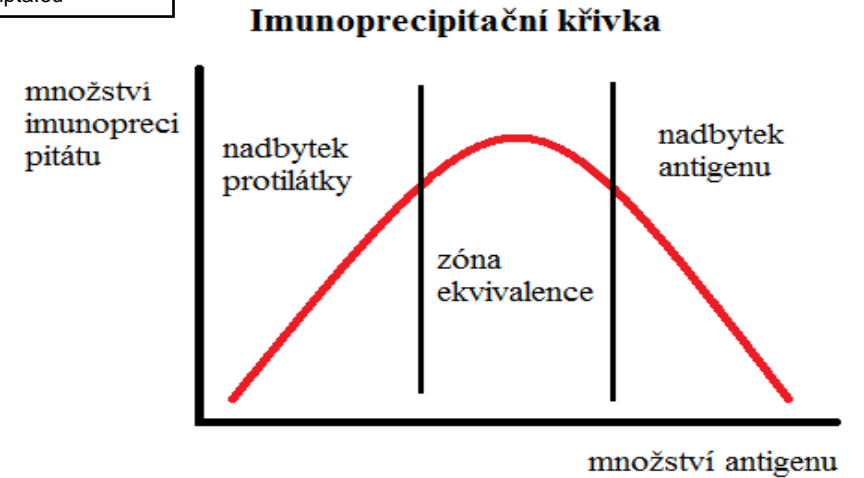
# Serologické metody

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

**Primární fáze** – rychlá, nepozorovatelná okem  
– tvorba imunokomplexů Ag + Ab  
– vznik vazby jednotlivých epitopů s vazebnými místy protilátek

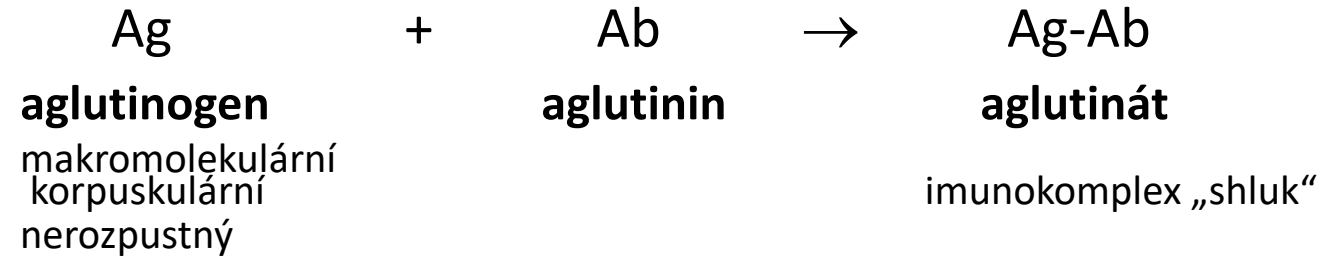
**Sekundární fáze** – pomalá, pozorovatelná okem  
– uplatňuje sa multivalence Ag a polyvalence Ab  
– vznik prostorového komplexu

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



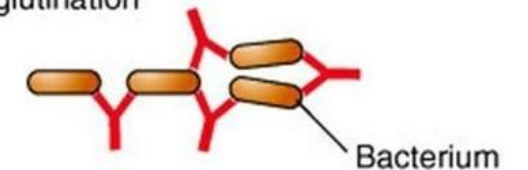
# Aglutinace vs Precipitace

## Aglutinace (shlukování)



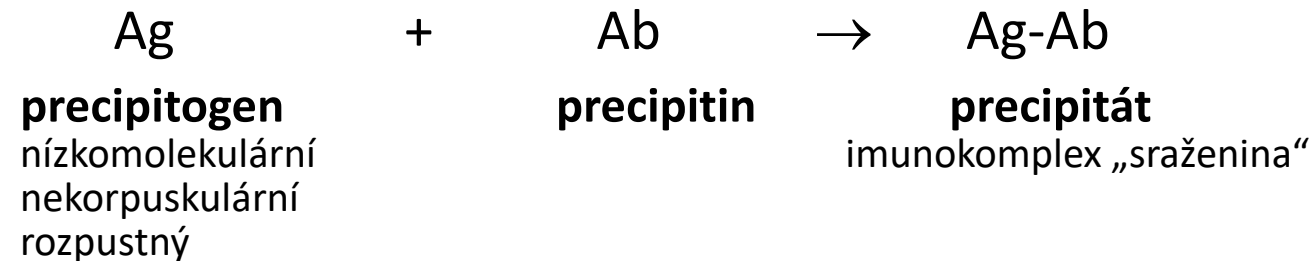
Agglutination and Precipitation

Agglutination

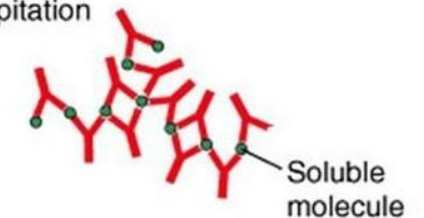


Protilátky namířené proti epitopům antigenních částic. Mezi korpuskulemi se tvoří můstky, které vedou ke vzniku shluků (aglutinátů)

## Precipitace (srážení)



Precipitation



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

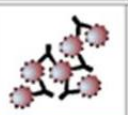

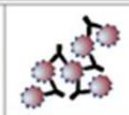

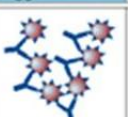


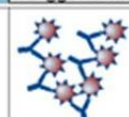
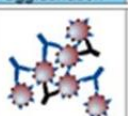
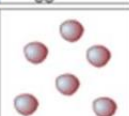
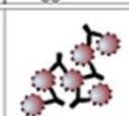
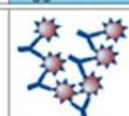

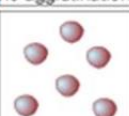


# Aglutinace

## 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

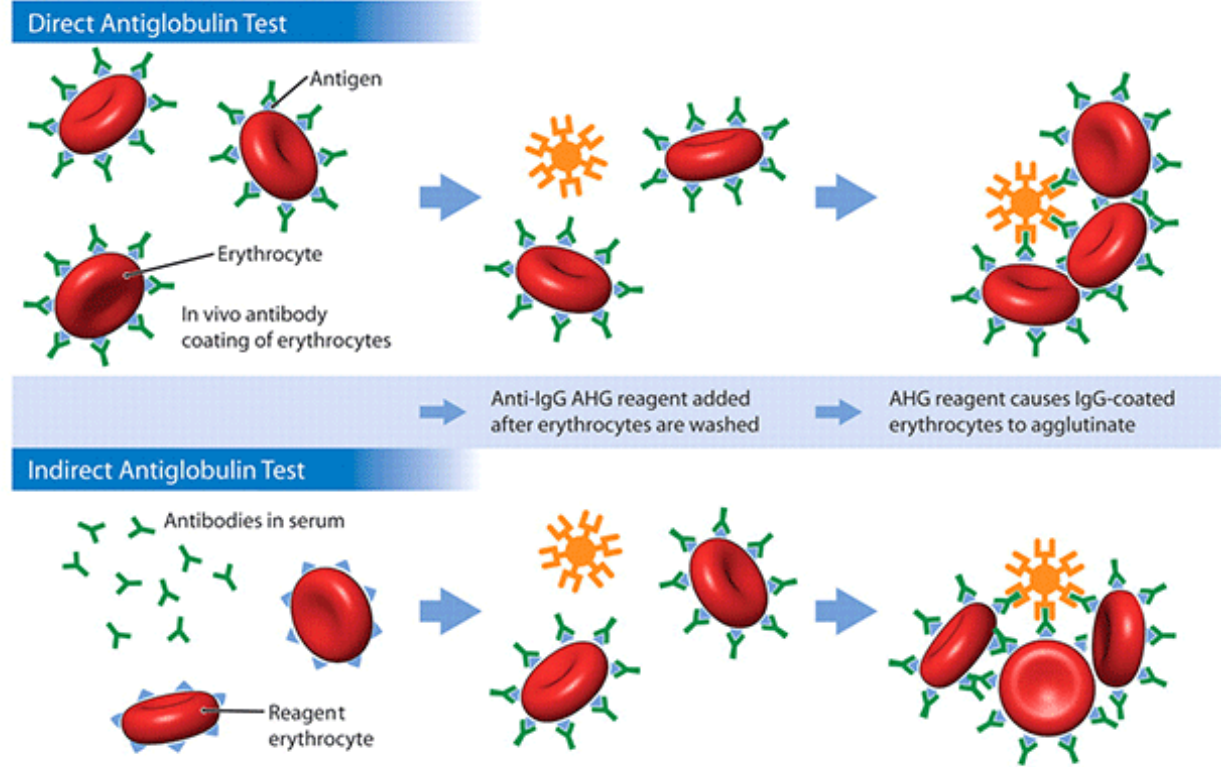
Detekce protilátek vázaných na erythrocyty *in vivo*  
- autoimunitní hemolytická anémie

## Direct Coomb's Test

VS

Detekce volných protilátek proti erythrocytům v séru  
- těhotné Rh<sup>-</sup> ženy

## Indirect Coomb's Test





# Hodnocení aglutinace

- **KVALITATIVNÍ**

- k aglutinaci dochází / nedochází (pozitivní / negativní)

- **KVANTITATIVNÍ**

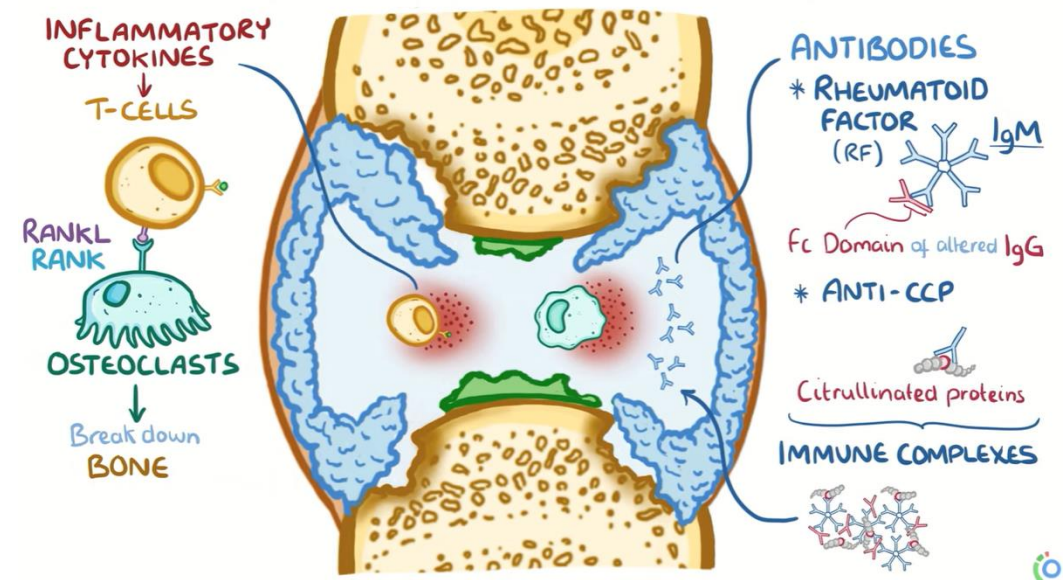
- stanovení nejvyššího ředění séra, kdy je ještě pozorovatelná aglutinace

- titr = převrácená hodnota ředění séra

- (ředění 1:32 → titr 32)

# Revmatoidní artritida

- Systémové autoimunitní onemocnění – poškození kloubů
- Příčiny – genetiky + 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:
  - revmatoidní faktor (**RF**)
  - protilátky proti cyklickým citrulinovaným peptidům (**anti-CCP**)
  - protilátky proti mutovanému citrulinovanému vimentinu (**anti-MCV**)

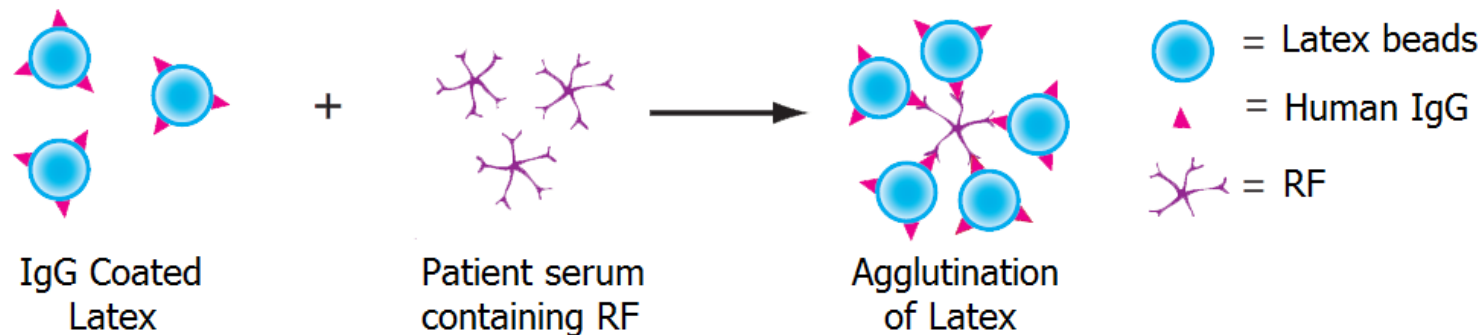


# Latex-fixační test

## • Revmatoidní faktor (RF)

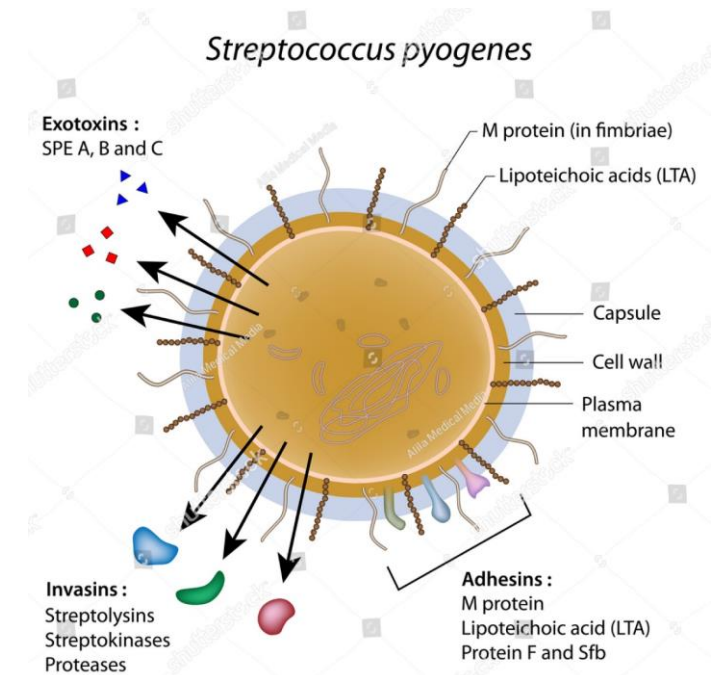
- autoprotlátka namířená **proti Fc části IgG** molekuly
- přítomný asi u 80% pacientů s revmatoidní artritidou
- pozitivní je též u asi 5-10% nemocných s jinými systémovými autoimunitami - autoimunitní hepatitida, SLE, Sjogrenův syndrom
- může být pozitivní i u zdravých osob
- diagnosticky nejdůležitější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

Princip testu aglutinace na nosičích:

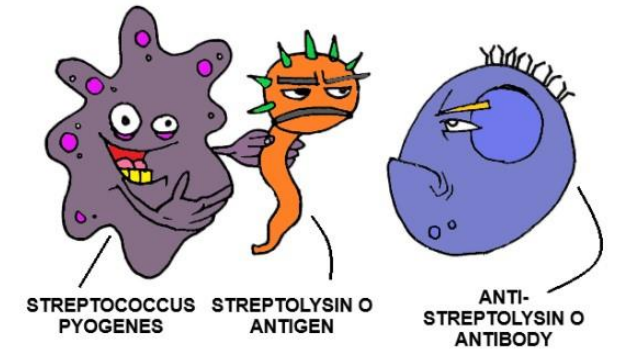


# Streptokoková infekce a pozdní následky

- 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)



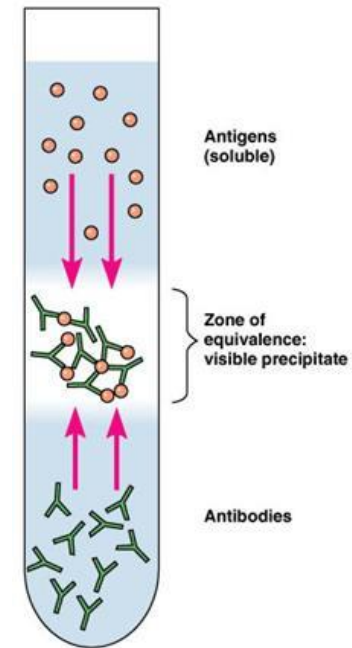
# Precipitace

## 1. V gelu

- Jednoduchá RID
- Dvojitá RID

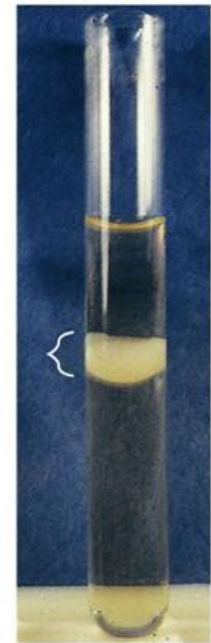
## 2. V tekutém prostředí

- Nefelometrie
- Turbidimetrie



(a)

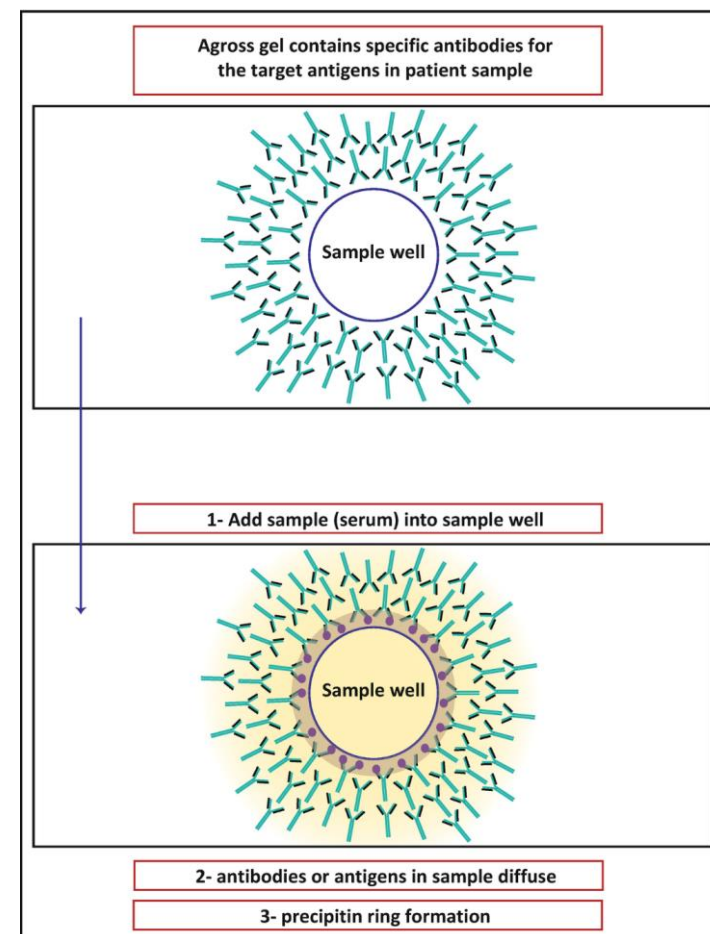
Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.



(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



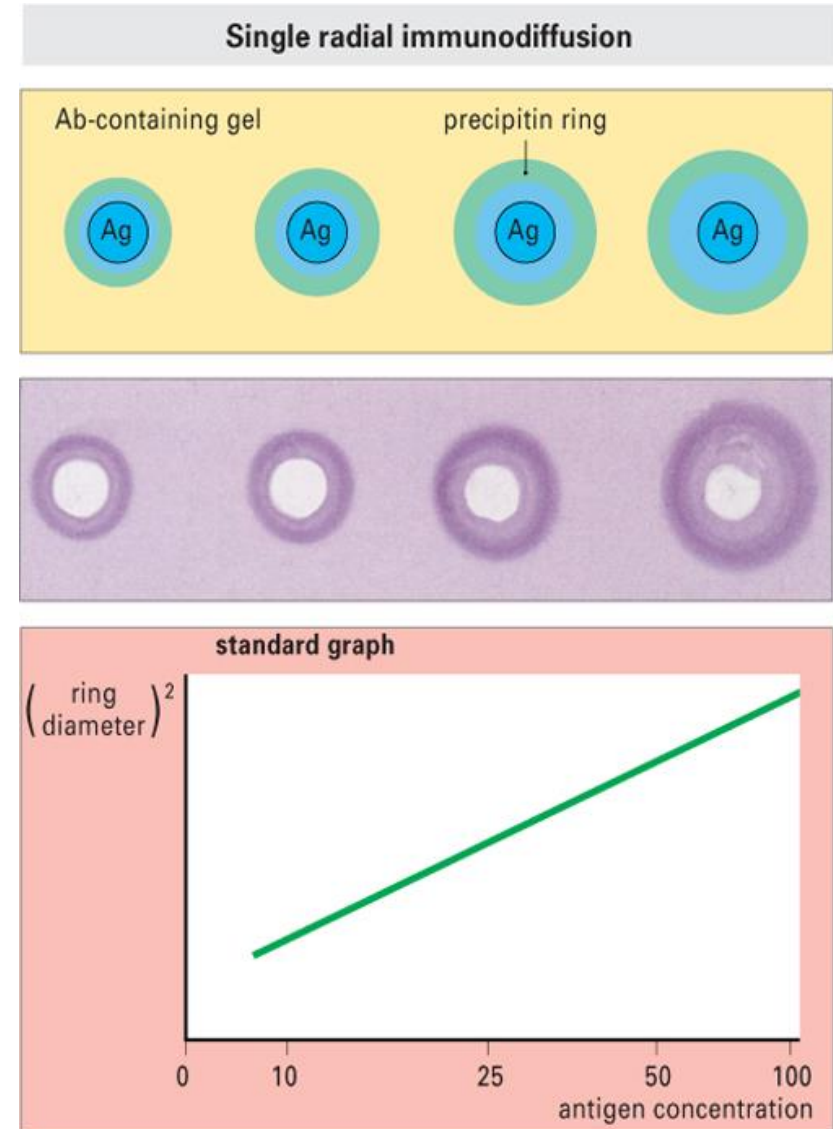
# Radiální imunodifúze

- 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**



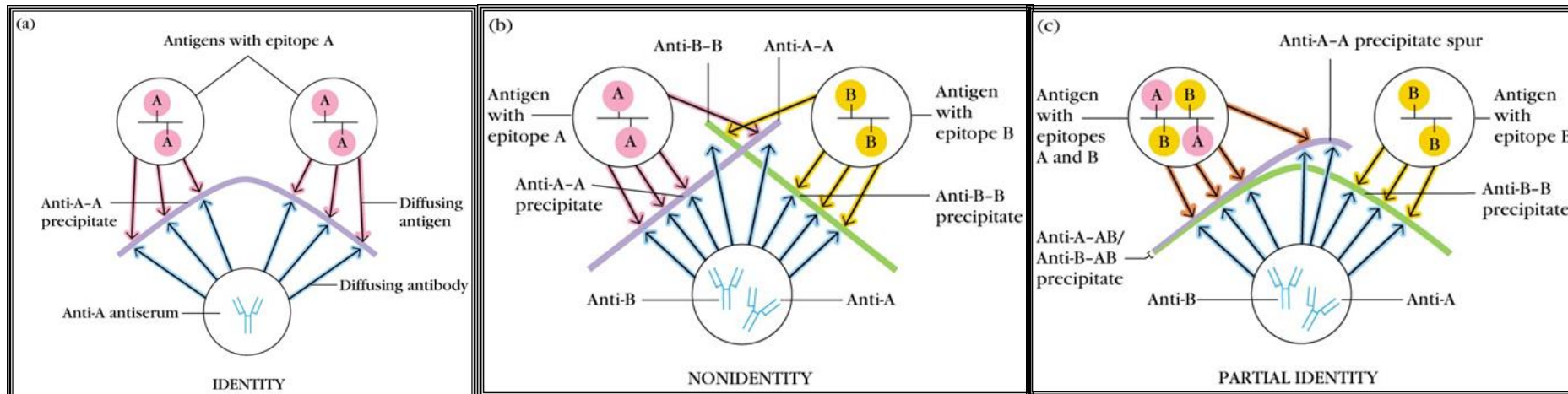
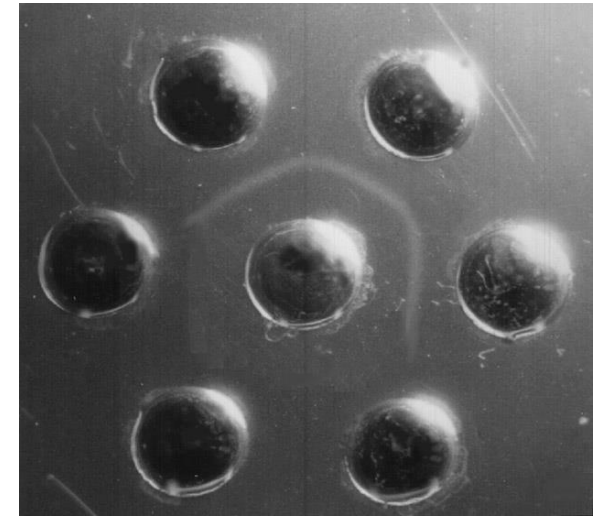
- Jednoduchá RID

- 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



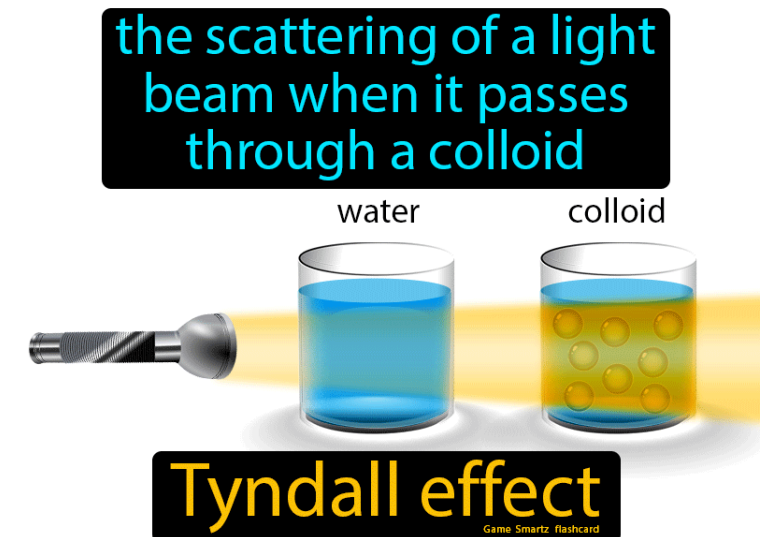
- Dvojitá RID (podľa Ouchterlonyho)

- 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 měřící kyvetě (pufr, látka urychlující reakci, Ag, Ab)
- Množství vytvořených komplexů je úměrné koncentraci Ag

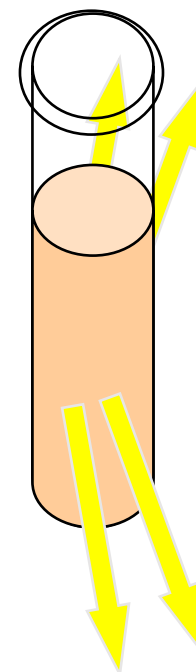
# Precipitace v tekutém prostředí

nefelometrie je 5-10x citlivejší  
a nákladnější než turbidimetrie

## Nefelometrie

- vhodná pro nižší koncentrace

viditelné světlo



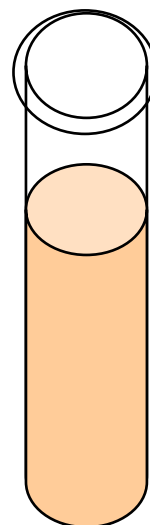
detektor je ve směru kolmém na  
vstupující paprsek

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)

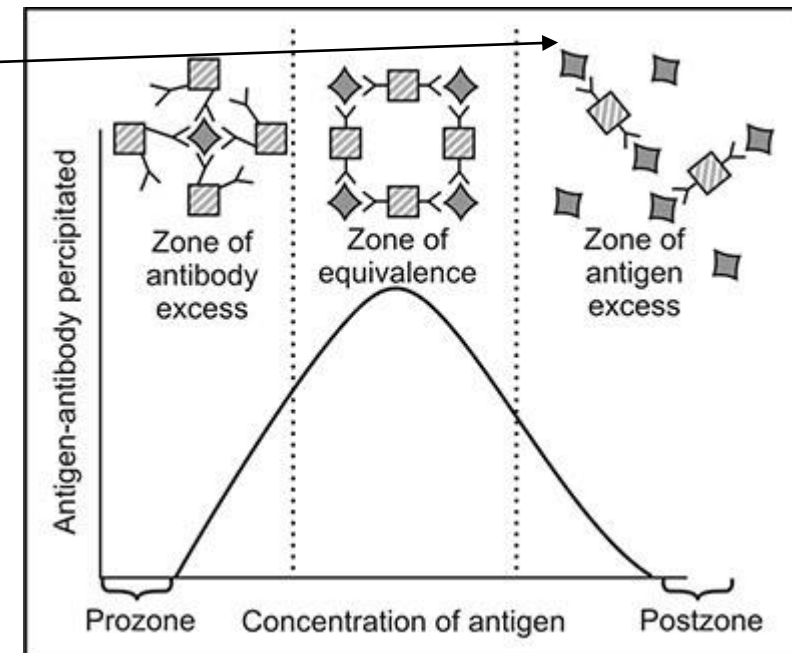
# Dynamika precipitačních reakcí

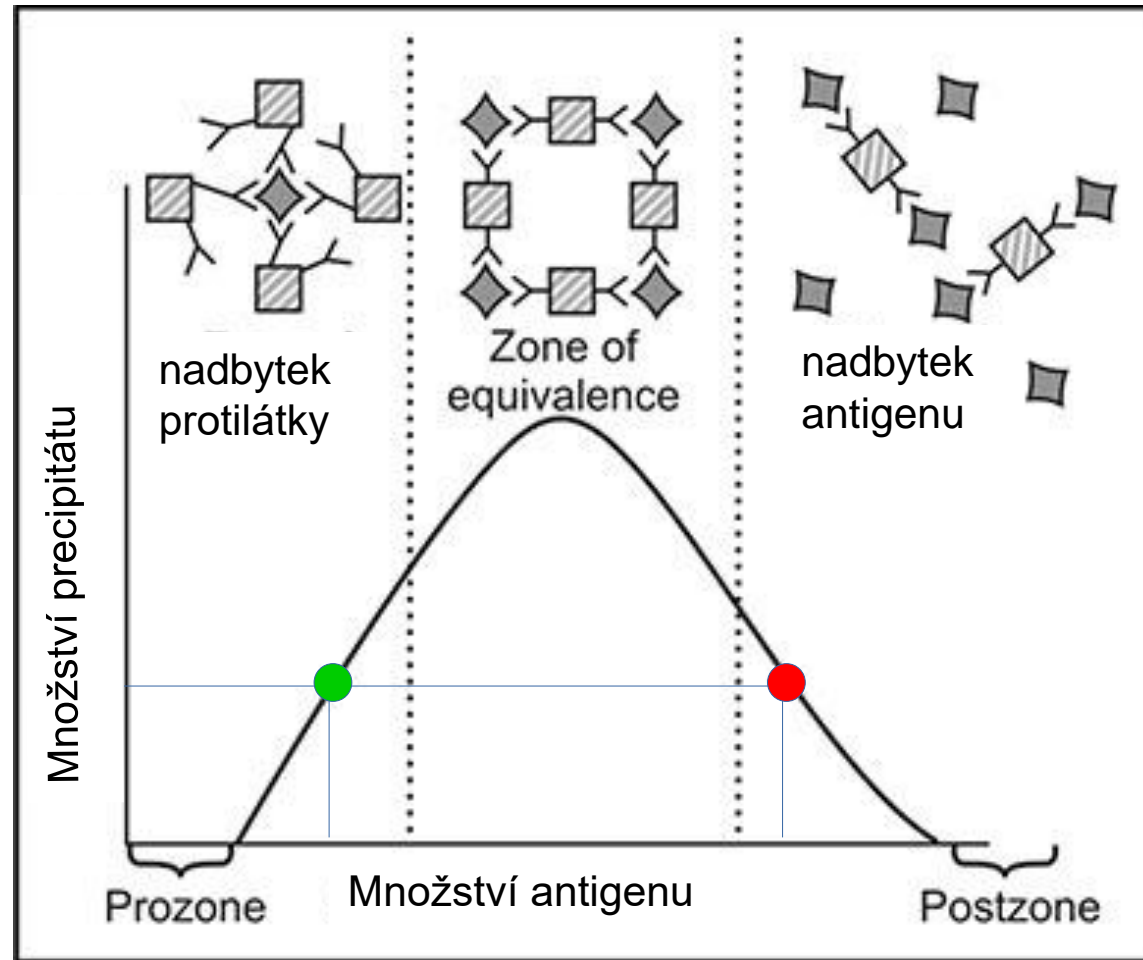
## Imunoprecipitační křivka (Heidelberg-Kendallová)

- 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



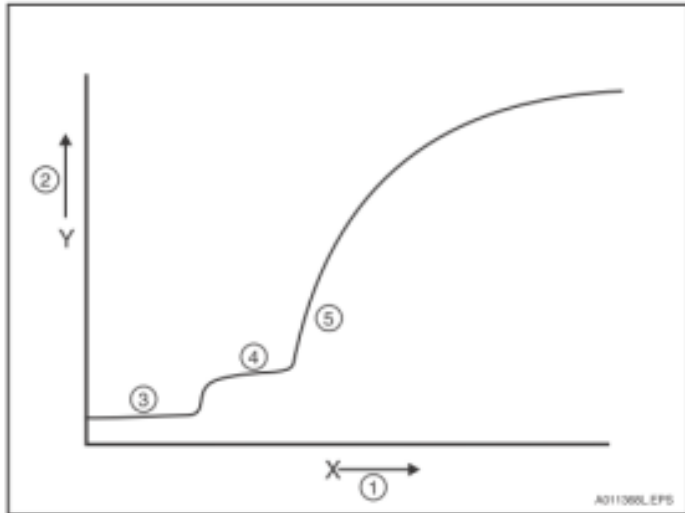


Různé množství antigenu - stejná hodnota absorbance

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

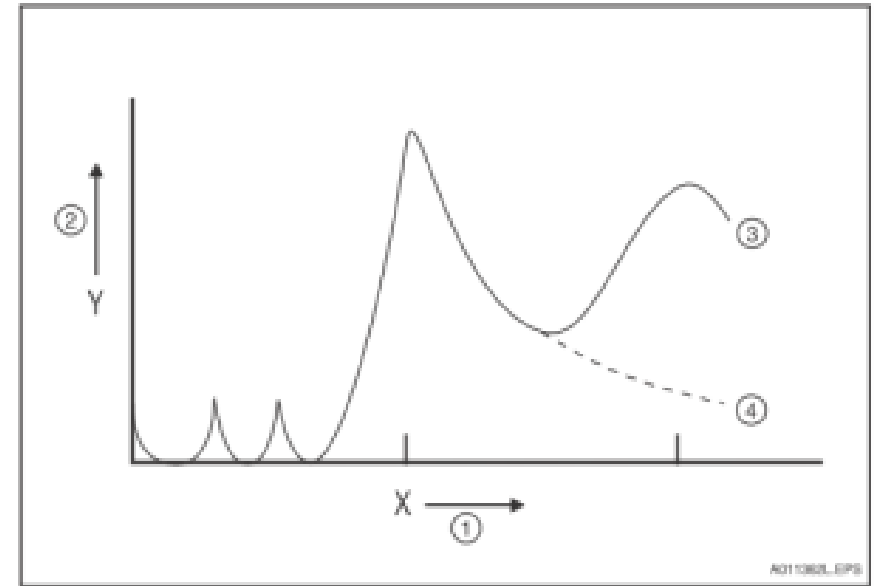
**Pro stanovení koncentrace analytu metodou imunoprecipitace v roztoku musí být v reakční směsi nadbytek protilátky!**

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](http://www.beckmancoulter.com/en/products/protein-chemistry/immune-800)

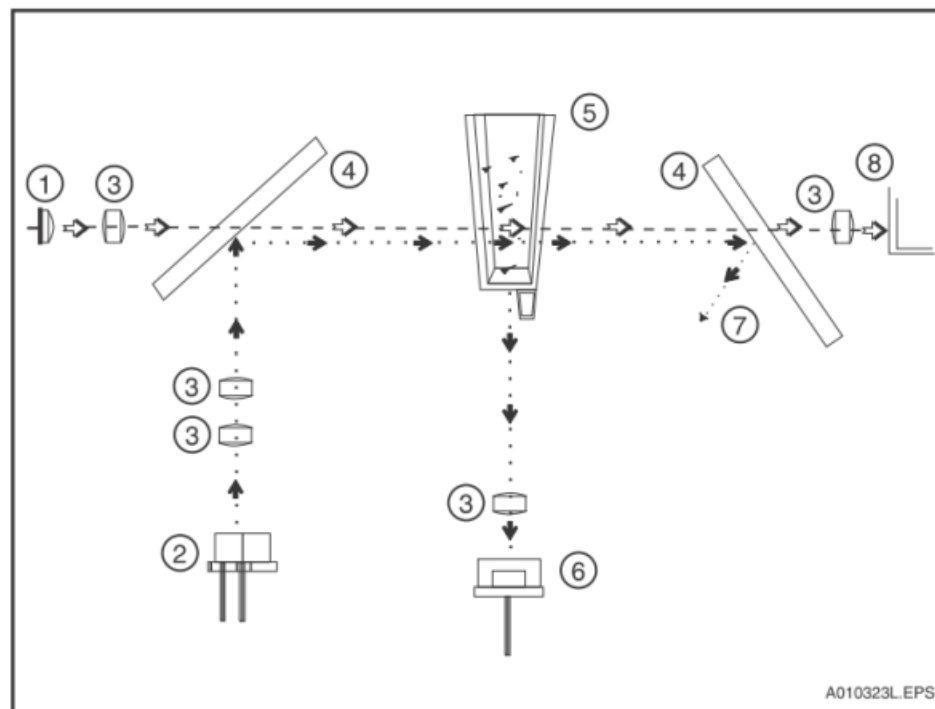
# Referenční meze pro dospělého

- 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](http://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 se tvoří při každodenní obraně organismu vůči původcům infekčních chorob (jedna 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 je lze detekovat v krvi – **CIK-PEG** (precipitace imunokomplexů polyethylenglykolem) → zákal → měření turbidity (prošlého světla)

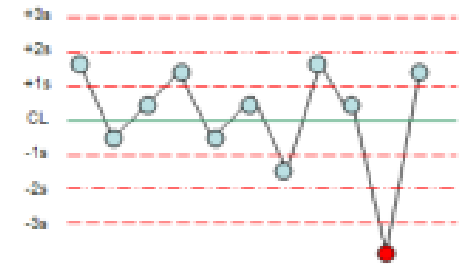
# CIK –PEG – pouze orientační vyšetření

- 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

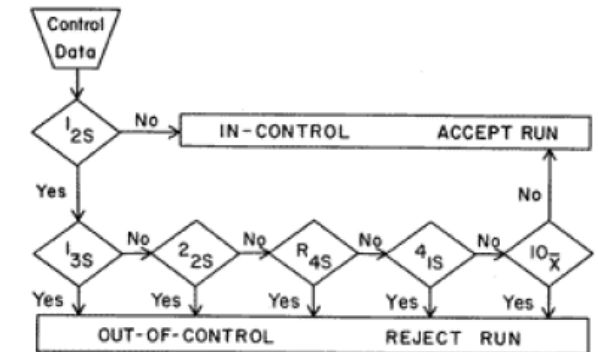
# Denní praxe na analyzátoru

- 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 analyzátoři = seznam vzorků
- Analyzátoři = vzorek + specifické antisérum + pufr (stabilizace a urychlení reakce)
- Analyzátoři 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