

Klasické serologické metody

aglutinace / precipitace, RID, nefelometrie / turbidimetrie

Vyšetření funkce komplementu

Peter Slanina (peter.slanina@fnusa.cz)

Ústav klinické imunologie a alergologie

FN u sv. Anny a Lékařská fakulta MU

Laboratórne vyšetrenie IN VITRO

- **Preanalytická fáza**

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

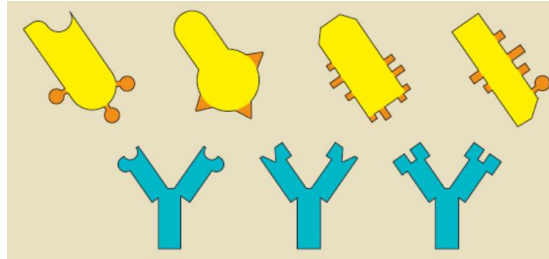
- **Analytická fáza**

- kalibrácia a justovanie zariadení (analýza kontrol- IKK, EHK)
- prevedenie lab. vyšetrenia + kontrol
- spracovanie výsledkov, LIS

- **Postanalytická fáza**

- skladovanie, likvidácia materiálu
- preskúmanie výsledkov, uvoľnenie, uchovávanie LIS - NIS

Rozdelenie imunologických laboratórnych metód



Metódy $\left\{ \begin{array}{l} \text{serologické (humorálne)- detekcia antigénov a protilátok,} \\ \text{preukázanie tvorby protilátok proti infekčnému agens} \\ \text{bunečné- počty a funkcie jednotlivých typov leukocytov} \end{array} \right.$



Monocyte



Lymphocyte



Neutrophil



Eosinophil



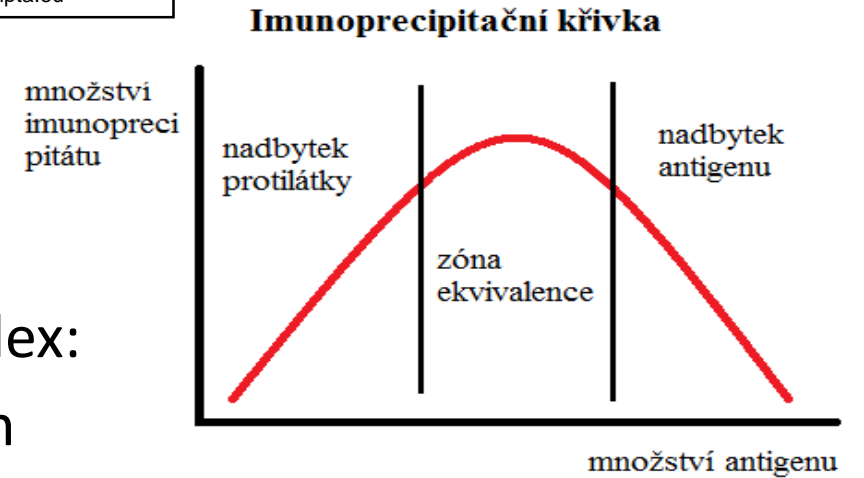
Basophil

Serologické metódy

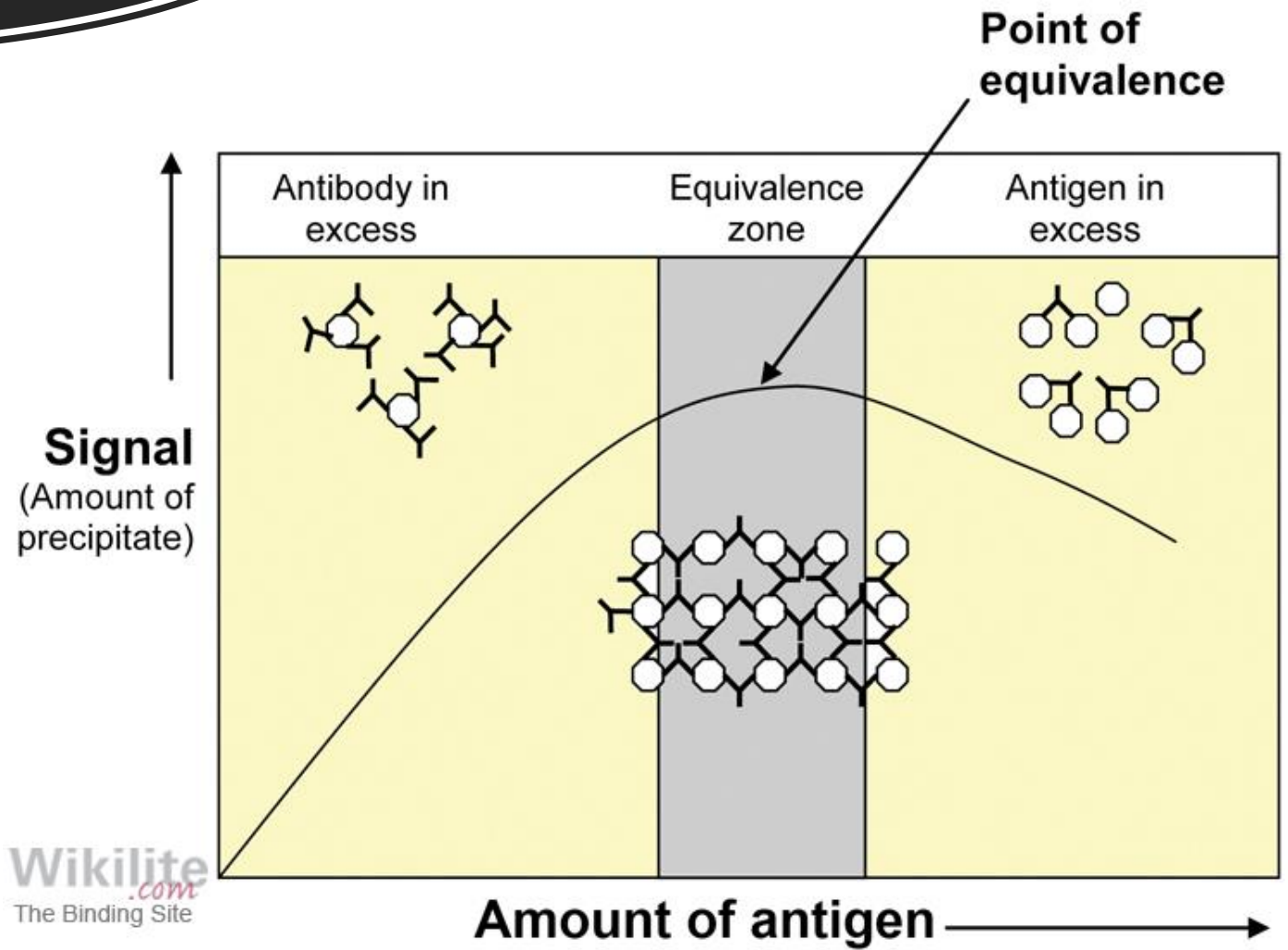
Reakcia antigénu (Ag) s protilátkou (Ab) = imunokomplex:

- 1. Primárna fáza** – rýchla, nepozorovateľná voľným okom
 - tvorba imunokomplexov Ag + Ab
 - vznik väzby jednotlivých epitopov s väzbovými miestami protilátok
- 2. Sekundárna fáza** – pomalá, pozorovateľná voľným okom
 - uplatňuje sa multivalencia Ag a polyvalencia Ab
 - vznik priestorového komplexu

Pokiaľ nedochádza k sekundárnej fáze reakcie, je nutné imunokomplexy vzniknuté v primárnej fáze vizualizovať – imunochemické metódy



Imunoprecipitačná krivka



Serologické metódy

1. Klasické serologické metódy

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

2. Imunochemické metódy s následnou detekciou

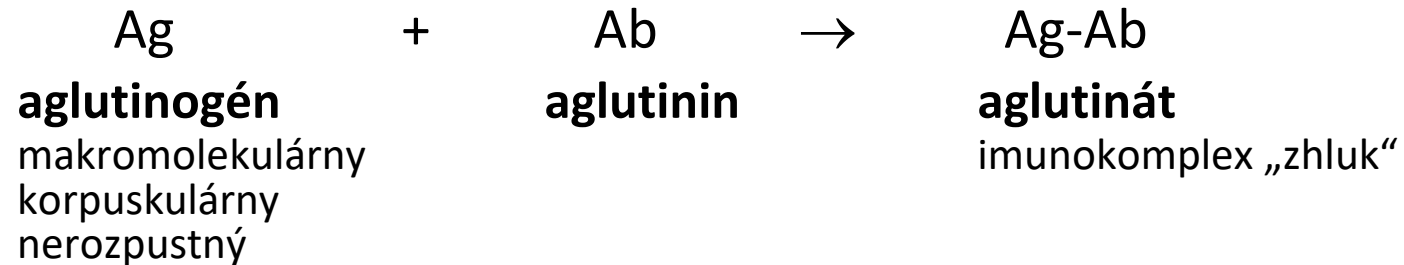
- Imunofluorescencie (priama / nepriama)
- Imunoanalýza (EIA-ELISA, RIA, FIA, LIA)
- Immunoblot, imunodot

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

- Komplement fixačné reakcie
- Inhibičné a neutralizačné testy

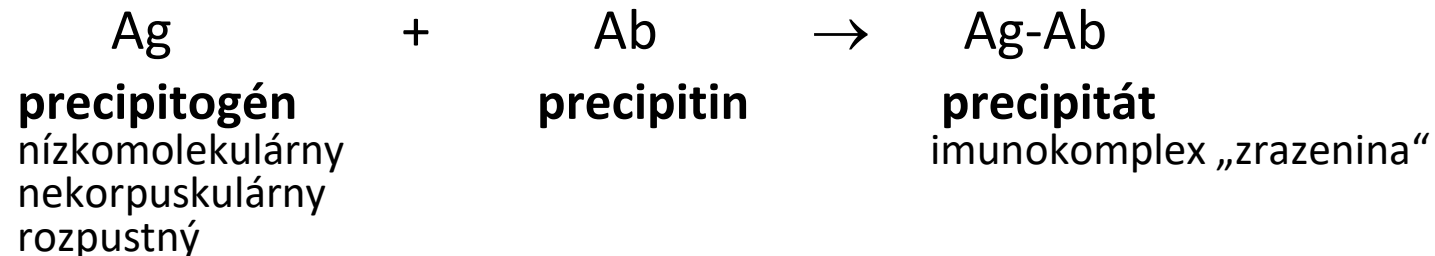
Aglutinácia vs Precipitácia

Aglutinácia (zhlukovanie)



Protilátky namierené proti epitopom antigénnych častíc vytvárajú medzi korpuskulami mostíky, ktoré vedú k vzniku zhlukov (aglutinátov)

Precipitácia (zrážanie)



Reakcia medzi solubilným antigénom a protilátkou s následným vznikom precipitátu (hydrofóbne väzby – nerozpustný komplex)

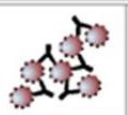

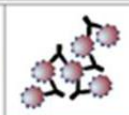

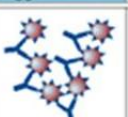


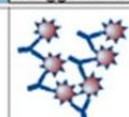
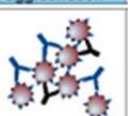
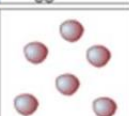
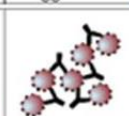
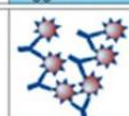

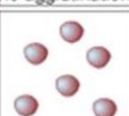


Aglutinácia

1. Priama

- korpuskulárny Ag prirodzene nesie cieľové epitopy
- identifikácia baktérií, hemaglutinácia

2. Nepriama

- rozpustný antigén naviazaný na povrchu vhodných makromolekulárnych častíc (latex)
- stanovenie RF, ASLO

	red blood cells from individuals of type			
serum from individuals of type	AB	O	B	A
A Anti B antibodies	 agglutination	 no agglutination	 agglutination	 no agglutination
B Anti A antibodies	 agglutination	 no agglutination	 no agglutination	 agglutination
O Anti A + B antibodies	 agglutination	 no agglutination	 agglutination	 agglutination
AB no antibodies to A or B	 no agglutination	 no agglutination	 no agglutination	 no agglutination

Krvné skupiny
Systém AB0

Hodnotenie aglutinácie

- **KVALITATÍVNE**

- aglutinácii dochádza / nedochádza (pozitívna / negatívna)

- **KVANTITATÍVNE**

- stanovenie najvyššieho riedenia séra, kedy je ešte badateľná aglutinácia

- titer (titr) = prevrátená hodnota riedenia séra

(riedenie 1:32 → titer 32)

Latex-fixačný test

- Reumatoidný faktor (RF)
 - autoproti látka namierená proti Fc časti IgG molekuly
 - prítomný asi u 80% pacientov s reumatoidnou artritídou
 - pozitívny je tiež u asi 5-10% chorých s inými systémovými autoimunitnými ochoreniami, autoimunitné hepatitídy, endocarditis lenta
 - môže byť pozitívny i u zdravých osôb
 - diagnosticky najdôležitejší je RF v triede IgM

Princíp testu:

- Na latexových časticiach je naviazaný ľudský IgG, pokiaľ je vo vyšetrovanom sére prítomný RF, viaže sa na IgG na latexových časticiach a vyvolá ich aglutináciu

Reumatoidná artritída

- Symetrické zápalové ochorenie kĺbov
- Infiltrácia sinoviálneho tkaniva plazmocytmi, makrofágmi, T a B lymfocytmi
- Produkujú zápalové mediátory, ktoré indukujú tvorbu enzýmov degradujúcich bielkoviny, deštrukcia kĺbu
- muži : ženy 1 : 2-3
- 1 % populácie
- Špecifickejší diagnostický test ako RF je stanovenie CCP (cyklické citrulinové proteíny)

Stanovenie ASLO nepriamou aglutináciou

- Slúži k stanoveniu protilátok v sére proti Streptolysinu O (exotoxín bakterií z rodu Streptococcus)
- ASLO- anti streptolysin O antibodies
- Princíp testu:
 - streptolysin O je naviazaný na povrchu latexových častíc
 - pokiaľ sú v sére pacienta prítomné protilátky proti streptolysínu, dôjde k ich naviazaniu na streptolysín na latexových časticiach, aglutinácia častíc, ktorá je okom pozorovateľná

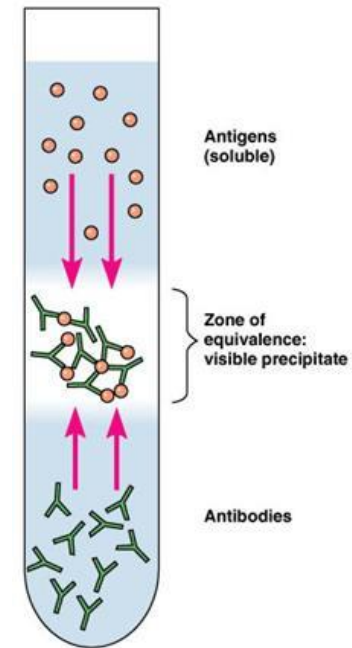
Precipitácia

1. V géle

- Jednoduchá RID
- Dvojitá RID

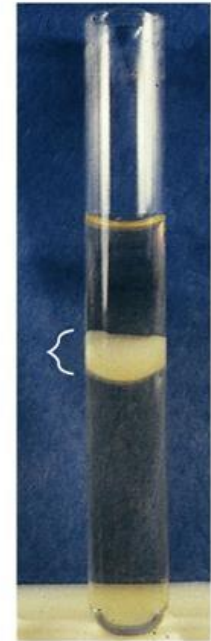
2. V tekutom prostredí

- Nefelometria
- Turbidimetria



(a)

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



(b)

Precipitácia v géle

- Agaróza, agar umožňuje detekciu precipitačných línií
- Je založená na pasívnej difúzii látok v prostredí koncentračného gradientu
- Ag a Ab difundujú gélom a v mieste, kde koncentrácie Ag i Ab dosiahnu optimálneho (ekvimolárneho) pomeru vzniká precipitát

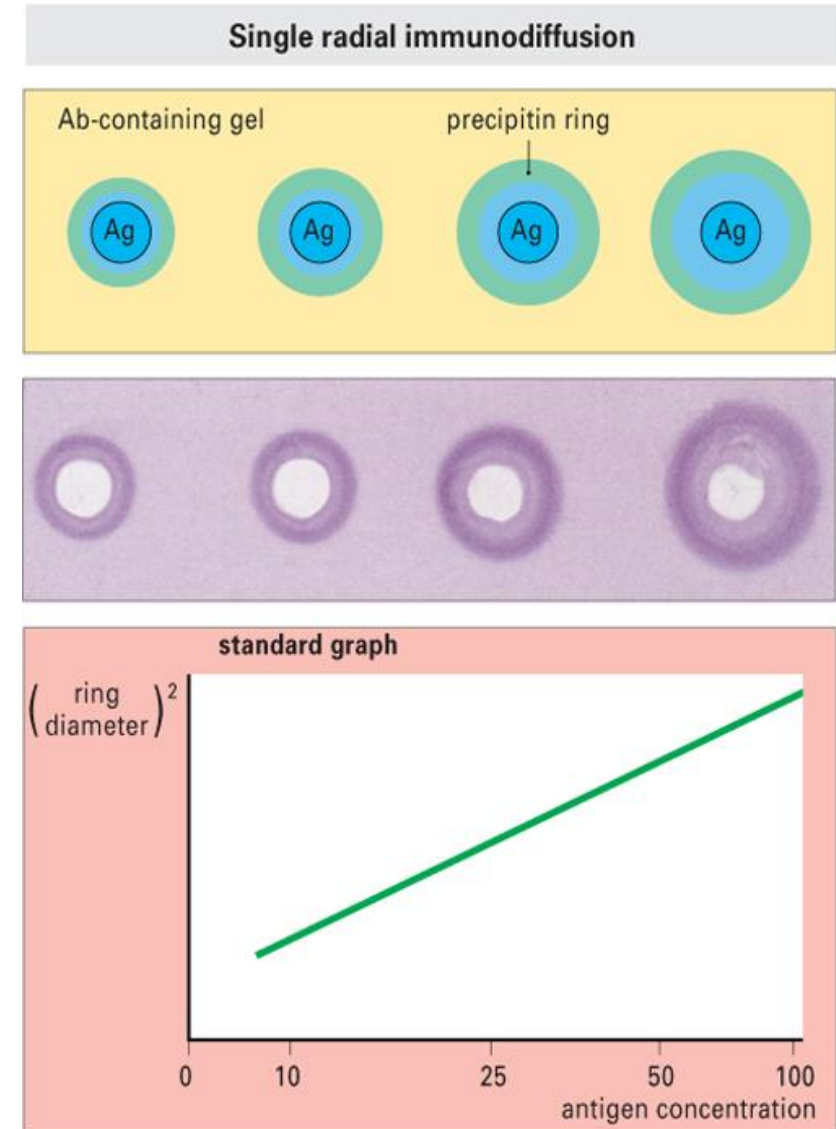
Radiálna imunodifúzia

- Pomocou RID je možné stanoviť koncentrácie mnohých bielkovinových súčastí séra
- Metodika sa v minulosti používala pri meraní hladín celkového IgG, IgA, IgM, zložiek komplementu alebo rôznych proteínov akútnej fáze- väčšina týchto vyšetrení je dnes automatizovaná a prevádzaná na princípe nefelometrie
- Stanovenie C2 a C5 zložiek komplementu

Podľa počtu difundujúcich reaktantov

- Jednoduchá RID

- koncentračný gradient jedného z reaktantov (väčšinou Ag)
- druhý reaktant (väčšinou Ab)- rovnomerne rozptýlený v štruktúre gélu
- výsledkom sú ostro ohraničené krúžka precipitátu
- plocha prstenca = úmerná koncentrácii vyšetrovaného Ag
- podľa konc. štandardu – kalibračná krivka

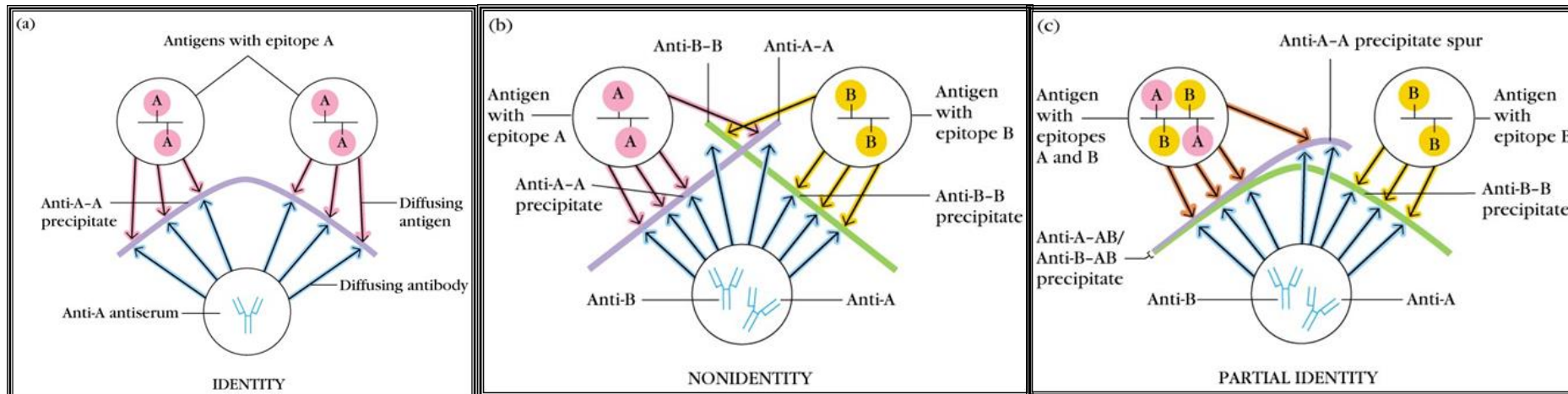
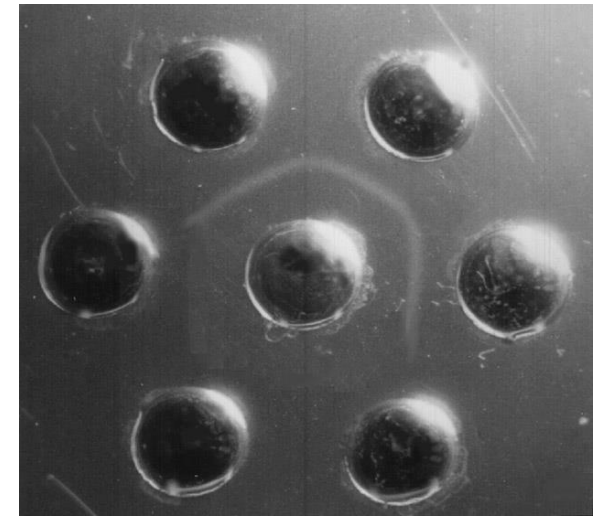


Kalibračná krivka

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

- Dvojitá RID (podľa Ouchterlonyho)

- sledujeme antigennú príbuznosť antigénov
- gradient vytvára ako Ag, tak Ab a dochádza k protismernej difúzii oboch reaktantov (radiálne)
- v zóne ekvivalencie – precipitačná línia, ktorá ukazuje na pozitivitu reakcie
- hodnotenie: kvalitatívne



Precipitácia- v tekutom prostredí

- Využíva sa efekt, že pri reakcii Ag-Ab vzniká zákal- precipitát, ktorého intenzita je pri konštantnom množstve pridanej protilátky úmerná pridanej koncentrácii vyšetřovaného antigénu
- Meranie intenzity zákalu: nefelometria, turbidimetria
- Obe metodiky umožňujú kvantitatívne stanovenie obsahu proteínov vo vzorke odčítaním z kalibračnej krivky

Nefelometria a turbidimetria

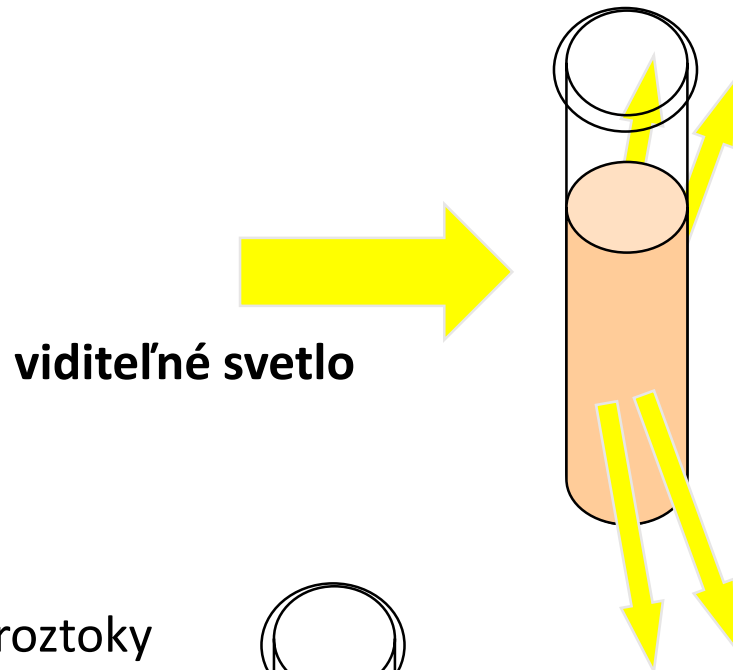
- Reakcie založené na meraní množstva imunitných komplexov vytvorených interakciou špecifických protilátok s antigénom
- Stanovenie sérových bielkovín
- Meranie prebieha v tekutom prostredí v meracej kyvete (pufr, látka urýchľujúca reakciu, Ag, Ab)
- Množstvo vytvorených komplexov je úmerné koncentrácii Ag

Precipitácia v tekutom prostredí

nefelometria je 5-10x citlivejšia
a nákladnejšia ako turbidimetria

Nefelometria

- vhodná pre nižšie koncentrácie

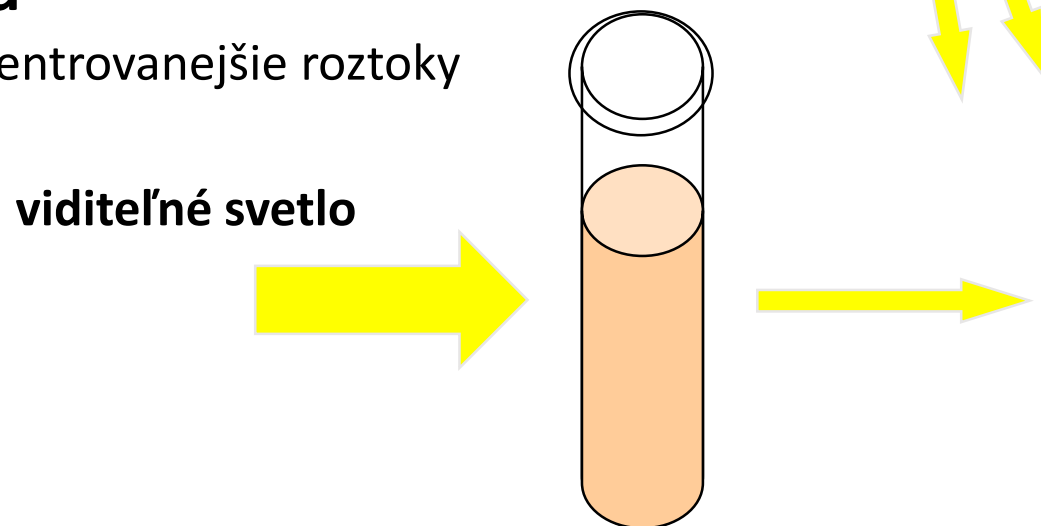


detektor je v smere kolmom na vstupujúci lúč

Meria množstvo svetla rozptýleného pri prechode lúča (množstvo svetla odrazeného od vznikajúcich komplexov)

Turbidimetria

- Vhodná pre koncentrovanejšie roztoky



detektor je v ose lúča

Meria množstvo prechádzajúceho svetla (úbytok intenzity svetla, ktoré prešlo roztokom v kyvete)

Beckman Coulter IMMAGE 800

- Stanovenie koncentrácie:
- I:
 - imunoglobulíny: IgG, IgA, IgM (g/l)
 - proteíny akútnej fáze: CRP (mg/l)
 - (RF+ASLO)
- II:
 - imunoglobulíny: IgM, IgG1,2,3,4
 - zložky komplementu: C3, C4, C1q
 - proteíny akútnej fáze: A1AT (alfa 1 antitr OROSO (orosomukoid), A2M (alfa 2 makroglobulin), CPL (ceruloplasmin), TRF (transferin), PREA (prealbumin)



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

Siemens BNII



www.healthcare.siemens.com/plasma-protein/systems/bn-ii-system

- Stanovenie koncentrácie:
 - imunoglobulíny: IgE (IU/ml), IgD, IgA1, IgA2, IgAp (nízke koncentrácie)
 - zložky komplementu: C1 inhibitor

Denná prax na analyzátore

- Provozní denník
- Údržba analyzátorov:
 - denná/týždenná/mesačná
- Kalibrácie:
 - 1 krát do mesiaca / pri zmene šarže reagensí
 - kalibračná krivka
- Kontroly IKK:
 - každý deň, pred zahájením merania patientskych vzoriek
 - viazané na metódu, jedno-/viac-úrovňové
 - referenčné medze
- Kontroly EHK (SEKK- systém externí kontroly kvality):
 - podľa časového plánu
 - zasielané z externého laboratória (nie je známa výsledná koncentrácia)
 - prevedie sa meranie → Výsledky sa vo forme protokolu odošlú späť organizátorovi
 - organizátor porovná výsledky meraní jednotlivých laboratórií a spätne ich informuje o úspešnosti
 - medzi-laboratórne porovnávacie skúšky

Priebeh vzorky

- Sérum = odběr srážlivé krve
- Alikvotácia vzorky
- Vytvorenie pracovného listu pre jednotlivé analyzátory = zoznam vzoriek
- Analyzátor = vzorka + špecifické antisérum + pufr (stabilizácia a urýchlenie reakcie)
- Analyzátor prepojený s LIS (laboratórny informačný systém)= získa informácie o potrebnom meraní + výsledok automaticky odošle

Interpretácia výsledkov

- Výsledky sú pred vydaním viacnásobne kontrolované
- Pozor:
 - falošná pozitivita (malá špecificita testu)
 - falošná negativita (malá senzitivita testu)
- *Hladina imunoglobulínov IgG, IgA, IgM (g/l):*
 - ↑ - zápalové procesy infekčného pôvodu
 - jedna trieda = myelóm; monoklonálna gamapatia
 - zvyšovanie s vekom
 - ↓ - poruchy tvorby = imunodeficity
 - lymfomy, leukémie, myelomy, následkom liečby

Interpretácia výsledkov

- *Hladina IgE (IU/ml):*

- ↑ - alergické stavy prvého typu precitlivenosti

- parazitárne choroby

- autoimunity, imunodeficiencie

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

- ↑ - zápalová aktivita (zriedka)

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

Interpretácia výsledkov

- *Reaktanty akútnej fázy*

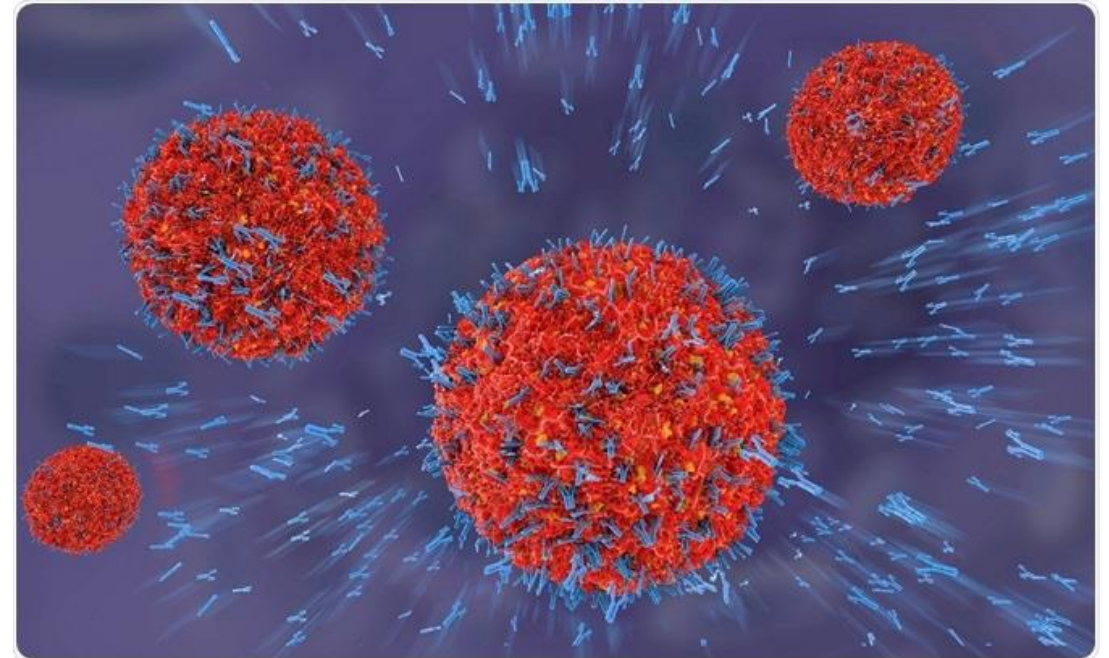
- ↑ - akútna zápalová reakcia = opsonizační a prozánětlivý efekt
 - regulačná funkcia; prenášače iontov; hemokoagulácia

CRP (mg/l)

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

Komplement, Komplementový systém

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



Zdroj: Christoph Burgstedt/Shutterstock.com

System plazmatických bielkovín

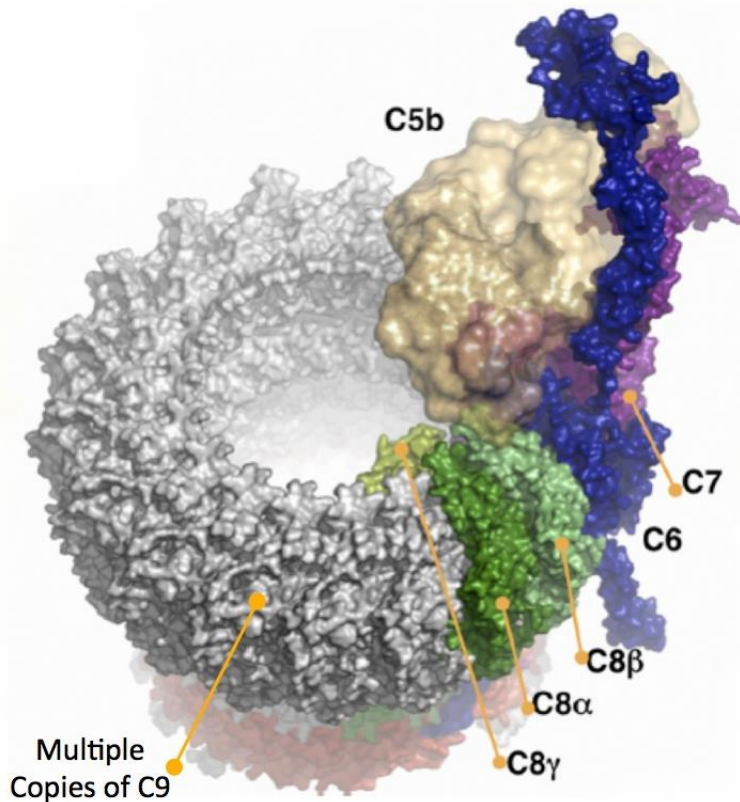
- produkované jaternými bunkami, makrofágmi, ...

9 základných zložiek: C1-C9

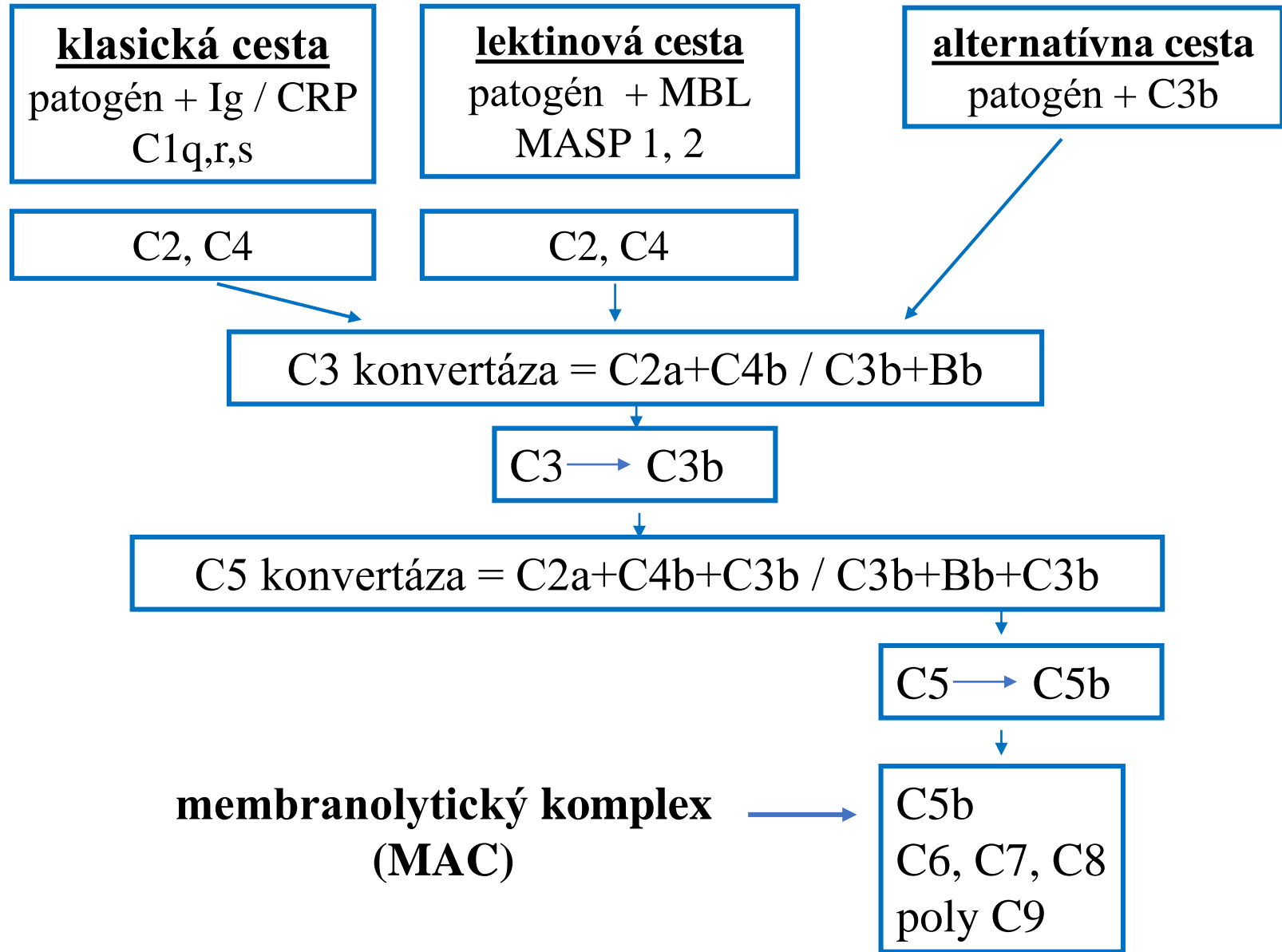
Regulátory

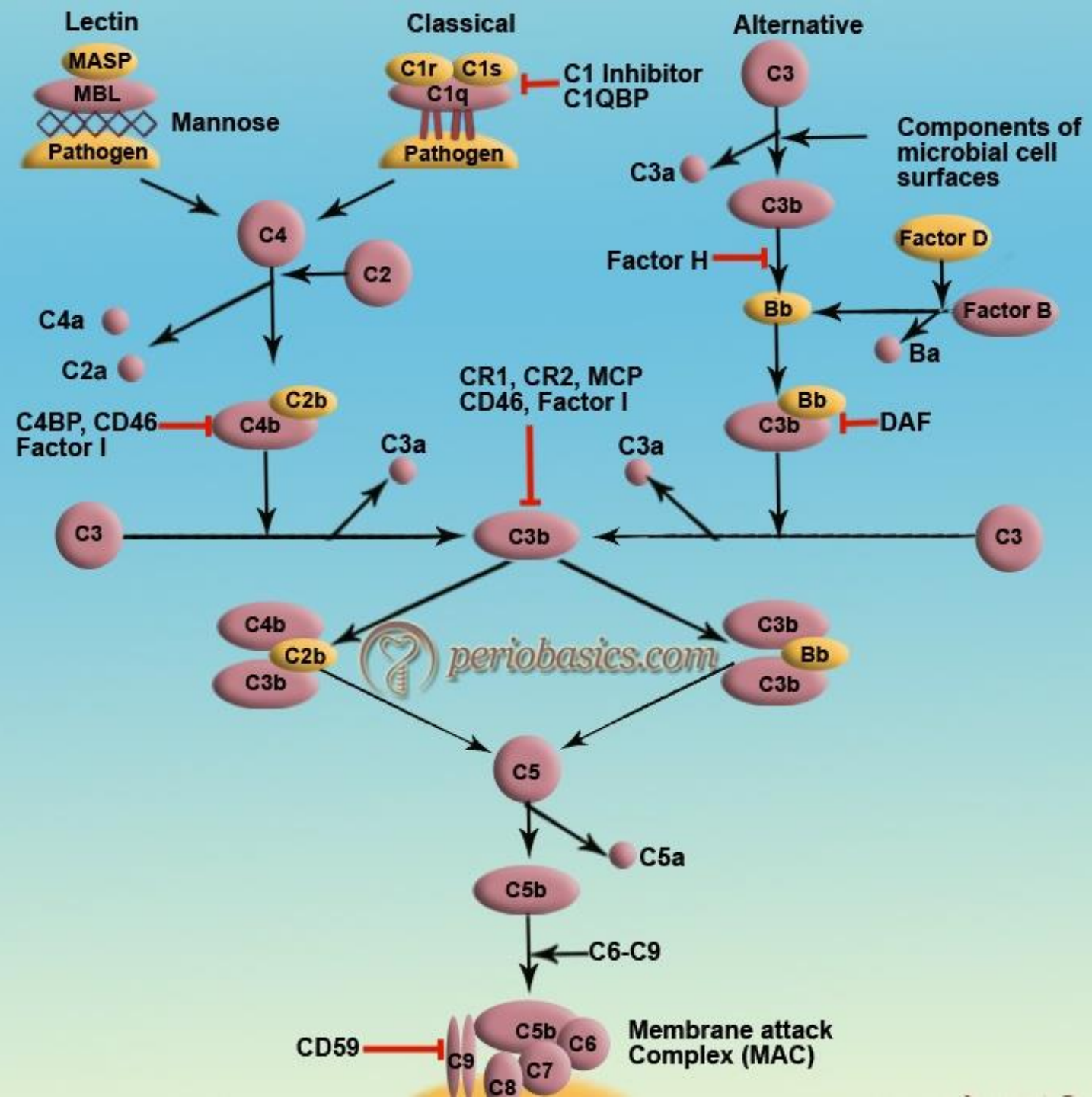
- **pozitívne**: properdin (faktor P)
- **negatívne** (inhibítory):
 - C1 INH, CR1, MCP, DAF, faktor H, faktor I, CD59, C4bp

Aktivácia komplementu



Zdroj: Aleshin et al. JBC 287 p10210.





Funkcie komplementu

- **Lýza buniek**, mikroorganizmov (MAC)
- **Oponizácia** – označenie cudzích buniek a častíc, podpora fagocytózy (C3b)
- **Chemotaxia** – privolanie ďalších zložiek imunitného systému (C3a, C5a)
- **Propagácia imunitnej reakcie** – prozánětlivá aktivita (C3a, C5a)
- **Immune clearance** – odstraňovanie imunokomplexov z cirkulácie (C3b, C4b)

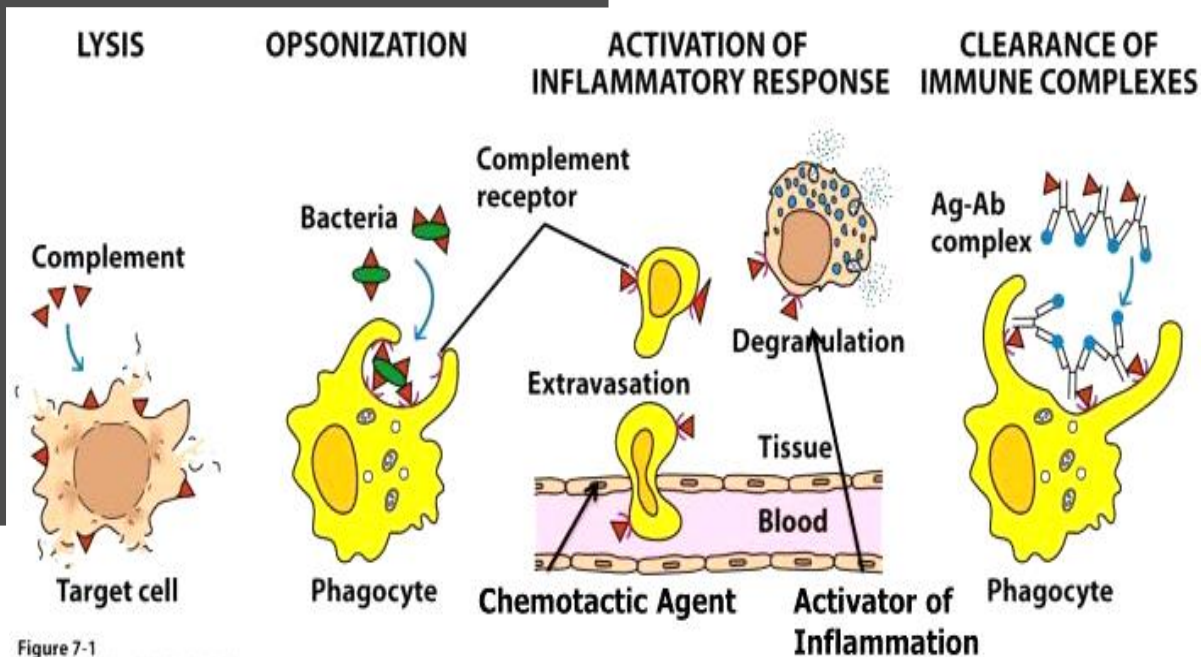


Figure 7-1
Kuby IMMUNOLOGY, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

Vyšetrovanie komplementu

Indikácia:

- **Deficit** niektorej zo zložiek?? → testujú sa hladiny jednotlivých zložiek, vyšetrí sa funkcie celého systému
- Podozrenie na hereditárny angioedém?? → vyšetrí sa hladina a funkcia C1 INH a hladiny jednotlivých zložiek
- Monitorovanie zápalového procesu – zložky komplementu sa chovajú ako proteíny akútnej fázy (ich hladina vzrastá pri zápale)
- **Zvýšená spotreba** zložiek?? → pri silnej aktivácii komplementu (diagnostika a monitorovanie imunokomplexových chorôb)

Deficity komplementového systému

- **C1-C4** – deficit spôsobuje častejší výskyt pneumónií, pyogénnych infekcií, častý vývoj, systémových imunokomplexových chorôb (SLE-like)
- **C3-C9** – najmä náchylnosť k pyogénnym infekciám, u deficitu C9 sú typické opakované meningokové meningitidy
- **C1 INH** – Hereditárny angioedém

Hereditárny angioedém HAE

- Spôsobený deficitom inhibítora C1 INH – inhibuje serinové proteázy C1r a C1s
- Dochádza k nekontrolovanej aktivácii komplementového systému pri traume, stomatologických výkonoch, infekciách, menštruácii
- Vazoaktívne peptidy (bradykinin atď.) spôsobujú zvýšenú cievnu permeabilitu so vznikom edému
- *Klinické príznaky:* kožné opuchy, dýchacie ťažkosti, prújem, kŕče v bruchu
- *Laboratórny obraz:* väčšinou znížená hladina alebo funkcia C1 INH, niekedy znížené hladiny C2, C4
- Niekoľko typov
- Dominantná dedičnosť – mutácia v géne pre C1 INH

Vyšetrovanie komplementu (odber)

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

Vyšetrovanie komplementu (laboratórne metódy)

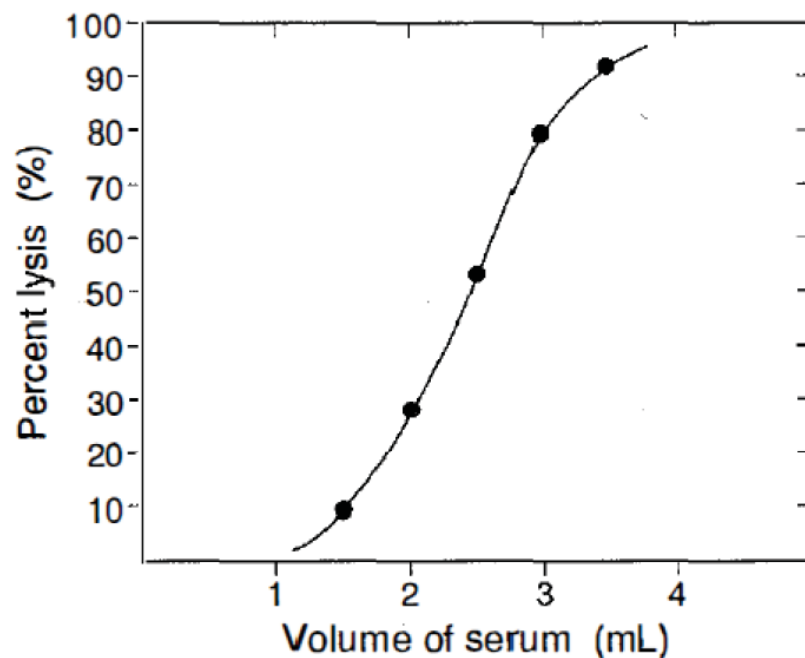
- *Stanovenie koncentrácie jednotlivých zložiek*
 - Nefelometria (*sérová hladina C3 a C4 (g/l), C1-INH*); turbidimetria; radiálna imunodifúzia (C2 a C5); ELISA
- *Funkčné vyšetrenie celého systému (jednotlivých aktivačných ciest)*
 - Založené na hemolytickej funkcii komplementu (CH50, AH50)
 - Detekcia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

TEST CH50 (hemolytické stanovenie)

- Funkčný test klasickej cesty aktivácie komplementu
- Sérum sa zmrazí čo najskôr po odbere, rozmrazí tesne pred vyšetrením – *zložky komplementu sú termolabilné*
- **Princíp testu:**
 - baranie erytrocyty + amboceptor (antierytrocytárne králičie protilátky) + sérum pacienta
 - amboceptorom označené erytrocyty sú cieľom pre komplement v sére → hemolýza → meranie absorbancie hemoglobínu spektrofotometricky
- Týmto testom sa overí funkčnosť kaskády ako celku
- Pre vyšetrenie hladiny a funkcie jednotlivých zložiek – iné testy

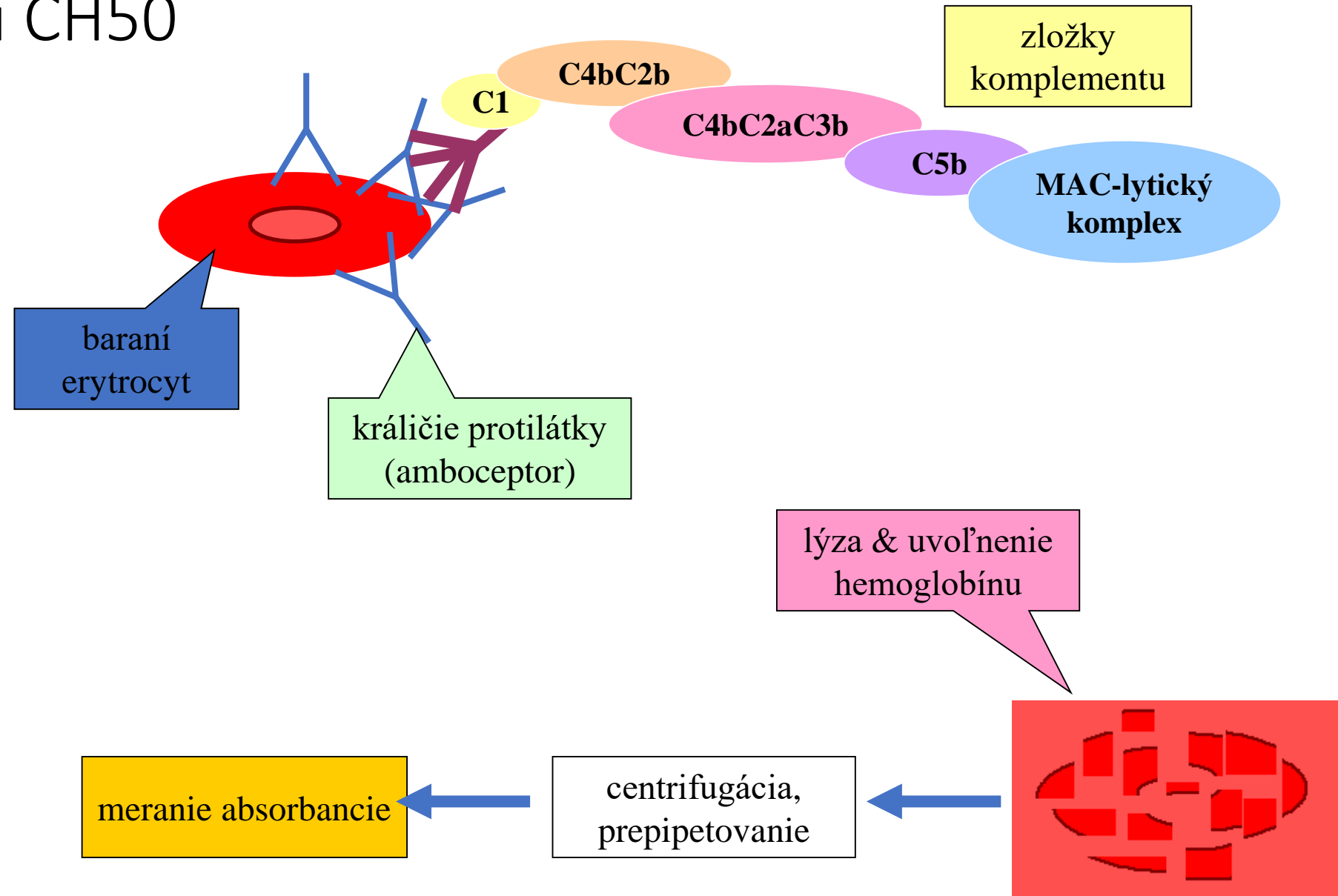
Jednotka CH50 (hemolytická jednotka)

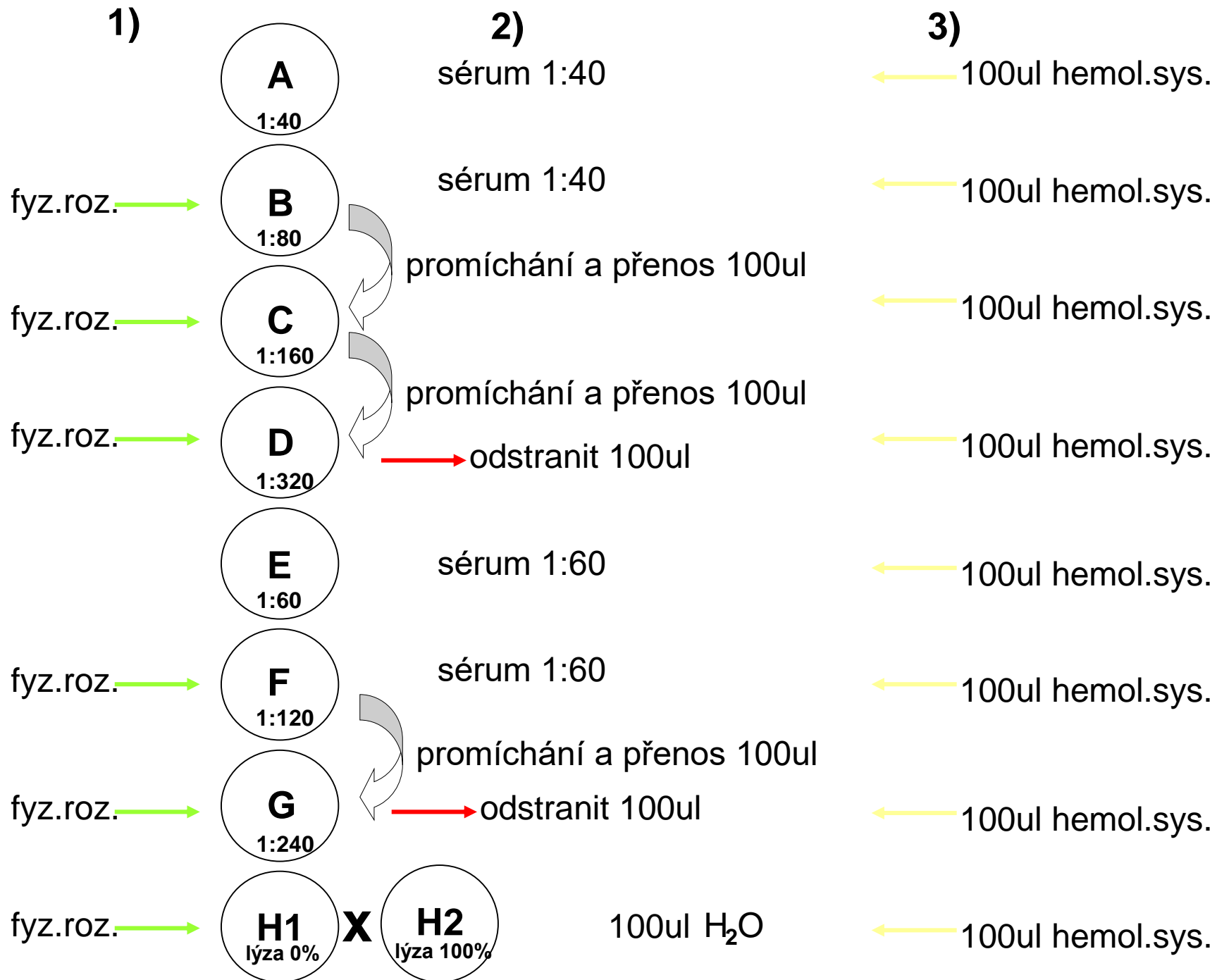
- Aktivita komplementu je vyjadrená v jednotkách CH50
- *Množstvo komplementu v 1 ml séra, ktoré za štandardných podmienok spôsobí 50% lýzu definovanej suspenzie baraních erytrocytov*



CH50 Technical Bulletin,
Wako Pure Chemical
Industries, Ltd.

Schéma testu CH50





Vyšetrenie komplementu (test ELISA)

- Sérum pacienta nariadené riediacim roztokom → obsahuje blokátory dvoch ciest aktivácie, ktoré nebudú vyšetrované
- Na povrchu jamky aktivátor príslušnej cesty komplementu
 - po pridaní séra dôjde k aktivácii danej cesty komplementu
- Po premytí jamky zistujeme prítomnosť komplexu C5b-9 (MAC) špecifickou protilátkou (značená alkalickou fosfatázou)
- Pridaním substrátu dôjde k spusteniu farebnej reakcie
- Zafarbenie jamky = množstvo C5b-9 = priamo úmerné funkčnej aktivite jednotlivcej cesty komplementu

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

↑ - zápalová aktivita (zriedka)

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