



## Imunologija v laboratorijski diagnostiki:

### Radialna imunodifuzija – komponente komplementa

### Lateksna aglutinacija – revmatoidni faktor

Jasna Omersel

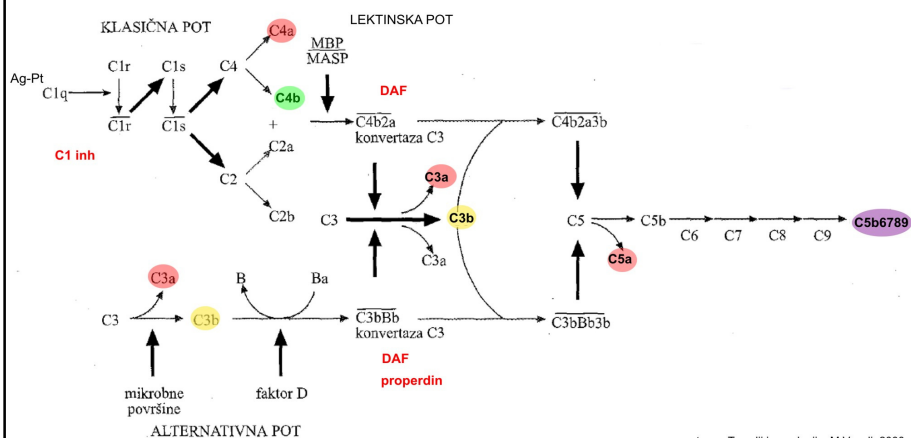
Magistrski študijski program Laboratorijska  
biomedicina

Ljubljana, 2009/2010

## 1. Komplement – biokemija in fiziologija

- 1870; 1899 (P.Ehrlich); 1919 nobelova nagrada (Buchner)
- 1950 APH, 1990 lektinska pot

FUNKCIJE



## Komplement – merjenje aktivnosti in koncentracije komponent

### Kdaj?

- sum na boleznj IK: SLE, generalizirani vaskulitis, glomerulonefritis, krioglobulinemija
- določitev in spremljanje aktivnosti boleznj IK
- sum na izčrpanost komplementnega sistema zaradi preobsežne porabe pri okužbah in drugih vnetjih
- genetske pomanjkljivosti C sistema

### Kako?

- hemolitični testi – CH50 test, AP50 test
- encimsko imunski test aktivacije - ELISA
- imunokemična določitev – RID, imunonefelometrija, imunoturbidimetrija
- določitev receptorjev komplementa na celicah – IIF, pretočna citometrija

## Potek testiranja

### Osnovno testiranje

- klasična pot CH50 funkcijska testa
- alternativna pot APH50
- C3d/dg

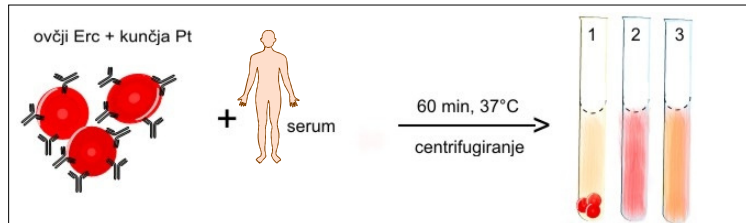
### Nadaljevalno testiranje

- C3, C4, C1-Inh., C1q, C2...
- faktor B, H, I
- properdin
- litični kompleks SC5b-9

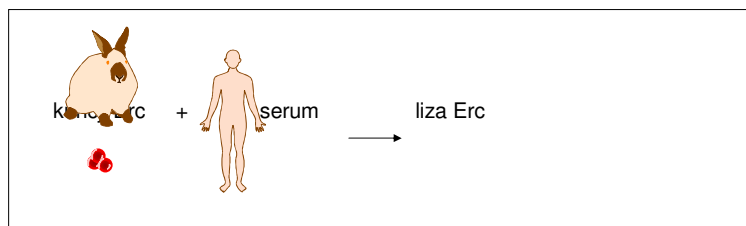
### Vzorci

- CH<sub>50</sub>, APH<sub>50</sub>: 3-7 ml epruveta – kri (venska) z EDTA poslano na ledu ali 4-8 °C do 24h; ali 2 ml plazme (priprava v 1h po odvzemu!) na 4-8 °C, če analiza isti dan; sicer -20 °C za nekaj dni
- za konc. C3, C4, C1-Inh : serum 1 mL, max. 8 dni 2-8 °C

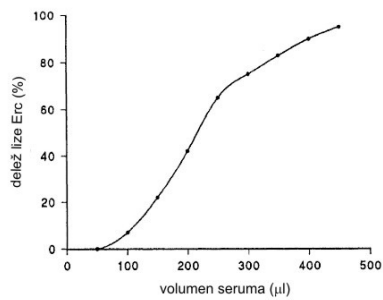
- CH50 test



- APH50 test



### izračun CH50 testa

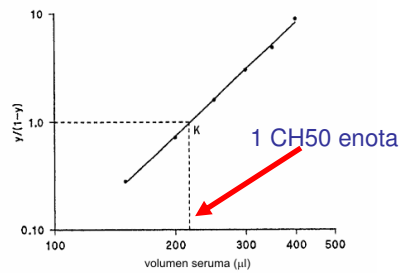


$$y = \frac{A_{vz} - A_{st}}{A_{100} - A_{st}} \times 100\%$$

A = absorbanca,  $\lambda = 541 \text{ nm}$

$$x = k \left( \frac{y}{1-y} \right)^{\frac{1}{n}} \quad \text{von Krogh-ova enačba}$$

x .....volumen seruma v epruveti  
 $1/n = 0,2 \pm 10\%$   
 k ..... konst. 50% hemolize ( $y=0,5$ )



## • C3/C4 – RID (radialna imunodifuzija)

### Precipitacija:

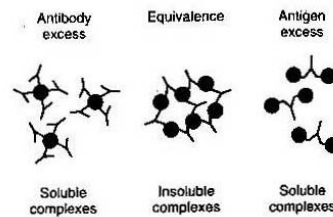
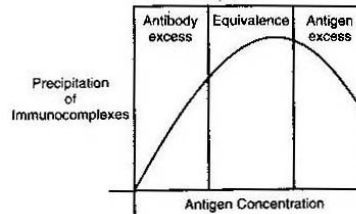
Reakcija med protitelesi in topnimi antigeni (makromolekule) z mnogimi antigenskimi determinantami.

Heidelberger-Kendallove krivulje

Marrackova teorija mreže "lattice theory"

### Vpliv na precipitacijo:

- eksperimentalni pogoji
- razred protiteles
- št. Ag determinant, topnost, velikost Ag (40-160 kDa)
- značilnost Pt: afiniteta, specifičnost za Ag
- naboj in oblika kompleksa
- T, pH, ionska moč



## Priprava RID plošč (osnovni princip)

- "the Mancini Technique", 1963-1964; kvantitativna
- 1-3 % agaroz, v PBS pH~ 7.4, EDTA, protimikrobno sredstvo (tiomersal,  $\text{NaN}_3$ )
- segrevamo do vrenja, ohladimo do  $55^\circ\text{C}$ , dodamo antiserum ali IgG frakcijo
- vlijemo na stekleno ploščo 1-1.5 mm, pustimo, da se strdi in ohladi na sobni T
- shranimo v hladilnik ( $4-10^\circ\text{C}$ )
- izrežemo enakomerno velike in oddaljene luknje



- $Obč = f(\text{velikost Ag})$  večji Ag  $\longrightarrow$  manjša difuzija

površina precipitata je sorazmerna s koncentracijo Ag  
 motnost in površina precipitata sta odvisna od:

- conc. Ag in Mr Ag
- conc. Pt
- V vzorca
- velikost luknjice

Fickov zakon

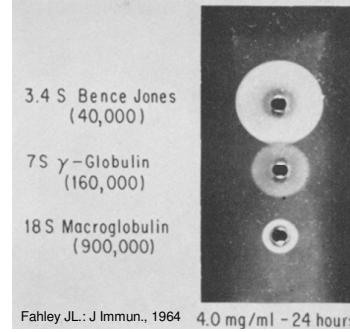
$$\frac{dQ}{dt} = -DA \frac{dC}{dx}$$

Občutljivost ~ 50 µg/mL

Uporaba RID:

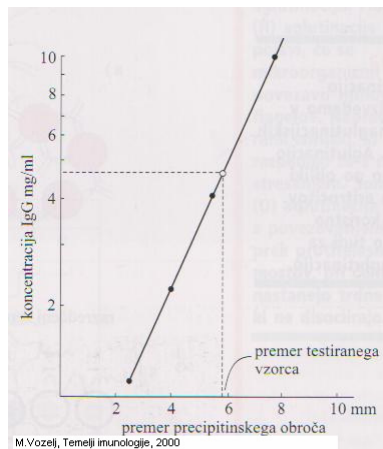
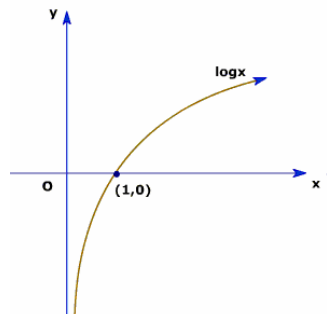
- merjenje konc. IgG, IgM, IgA in komponent C
- dolgotrajna, glede na ostale metode kvantifikacije Ag; nadomeščeno z imunonefelometrijo in imunometričnimi testi

**Tehnike, ki temeljijo na precipitaciji:** kvali/kvanti

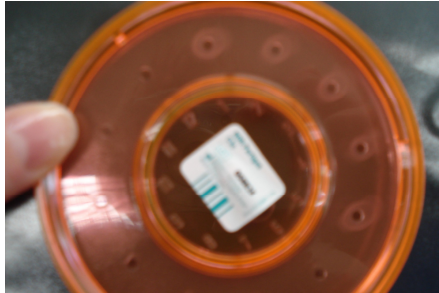


## izračun, merjenje

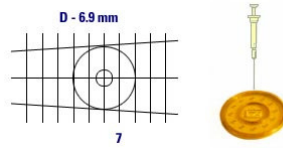
- nanos vzorca (5µl), inkubacija 18-48 h, RT
- inkubacija: difundiranje komponent C3 oz. C4 iz vdolbinice v agarozni gel (kunjči antiserum proti C3 oz. C4)



## izračun, merjenje



kalibrirno ravnilo



## Komplement – klinični pomen določanja

- Komplement je vpleten v mnoga stanja povezana z vnetjem – akutne infekcije, sepsa, bolezni imunskih kompleksov.

pričakujemo: ~~↑ vnetje → ↑ aktivnost C !~~

- Klinično pomembno je samo znižanje komponent C ali znižanje funkcije C sistema

aktivacija C ali genetske pomanjkljivosti C

- stalno prisotni mikrobi
- aAb
- odlaganje IK v tkivih

- pomanjkanje komponent klasične poti
- pomanjkanje komponent alternativne poti
- mutacije gena, ki kodira MBL
- pomanjkanje terminalnih komponent
- pomanjkljivosti v regulatornih proteinih
- pomanjkanje receptorjev za C

- **Vnetje**

- hiperkomplementemija: C3, C4, C1-Inh= reaktanti akutne faze vnetja (jetra, makrofagi)
- bakterijska okužba: aktivacija alternativne poti; običajno v laboratoriju zaznamo povišane vrednosti C (kompenzacija!)
- CRP zvišan → rezultati testov C so posledica akutne faze vnetja in ne indikator bolezni IK



- **SLE**

- kronična sistemska avtoimunska bolezen
- aktivacija C (klasična pot) zaradi povečane tvorbe imunskih kompleksov
- vzrok: slabo odstranjevanje IK; odsotnost CR1 na Erc in C4; odlaganje v tkivih
- hipokomplementemija (celokupna aktivnost, C3, C4)
- določanje C3, C3c priporočeno za spremljanje bolezni: aktivna vs neaktivna faza bolezni; večje znižanje C3c kot pa C4.
- z ustrezno terapijo se nivo C3 in C4 normalizira

## Genetske pomanjkljivosti komplementnega sistema

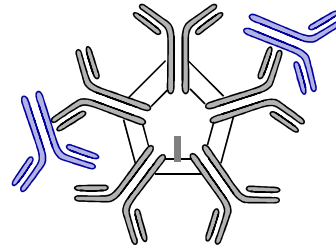
- hereditarni angionevrotični edem (pomanjkanje C1-INH)
- ponavljajoče infekcije (pomanjkanje C3, C5, C6-9) - *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*
- paroksizmalna nočna hemoglobinurija (znižano izražanje DAF in/ali CD59; Erc dovzetni za lizo)
- pomanjkljivost levkocitne adhezije (pomanjkanje receptorjev CR3, CR4- ponavljajoče piogene okužbe)
- SLE (pomanjkanje C4 in C2, C1-INH)

## 2. Revmatoidni faktor

- **revmatoidni faktor:**  
heterogena avtoprotitelesa, ki se vežejo na predel Fc molekule IgG (CH2, CH3).

- IgM, IgG, IgA

- **nastanek:** limf. B, limf. T, monociti, citokini, sprememba glikozilacije IgG, vplivi okolja, nAbs (CD5 B limf),... ?



- **metode določanja:**  
aglutinacija, nefelometrija, turbidimetirja, ELISA, mikromreže, pretočna citometrija

## RF- klinični pomen določanja

RF prisotnost pri različnih:

- **sistemskih avtoimunskih boleznih** (RA, SLE, SjS, MCTD, polimiozitis)
- **infekcijah** (sifilis, tuberkuloza, borelioza, hepatitis, herpes, AIDS, rdečke, ošpice, malarija,...)
- prisotnost RF pri ~ 5% zdravih
- prisotnost 30-90% pri RA

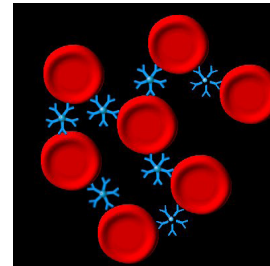


- RA



- kronična, vnetna revmatska bolezen, ki lahko prizadene vse sklepe in tudi obsklepne dele
- pri približno 1 % prebivalstva; razmerje ženske : moški je 3 : 1
- Občutljivost RF testov: do 90%
- nizka PPV, visoka NPV za RA
- pojav RF lahko že nekaj let pred začetkom bolezni
- RF+: hitrejše napredovanje bolezni (izguba funkcije / uničenje sklepov), težja oblika
- nihanja v titru IgA korelirajo z aktivnostjo bolezni
- titri IgG so povezani s spremembo hitrosti sedimentacije Erc
- visoki titri IgM korelirajo z aktivnostjo bolezni in ekstra-artikularnimi zapleti (npr. vaskulitis)
- RF, aCCP, CRP; rentgen, pregled pacienta

### Aglutinacija



- zlepljanje delcev (antigenov), ki imajo na svoji površini Ag determinante, s specifičnimi protitelesi
- Marrackova teorija mreže
- reakcije aglutinacije so odvisne od prečnih povezav med bivalentnimi ali multivalentnimi Pt in številnimi Ag determinantami
- Ag z eno antigensko determinanto ne omogočajo prečne povezave in zato ne aglutinirajo!
- rezultat odčitamo s prostim očesom, z lupo in ovrednotimo

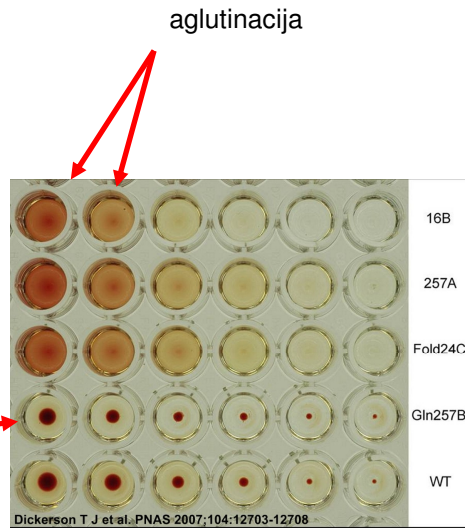
**titer:** recipročna vrednost razredčitve vzorca, ki še daje vidno aglutinacijo

## •direktna aglutinacija

•zlepljanje protiteles iz vzorca in antigenov, naravno prisotnih na površinah celic (eritrociti, levkociti idr.)

•diagnostika mikrobnih infekcij (*Treponema pallidum* -VDRL test, TPHA test)  
•določanje krvnih skupin

odsotnost aglutinacije

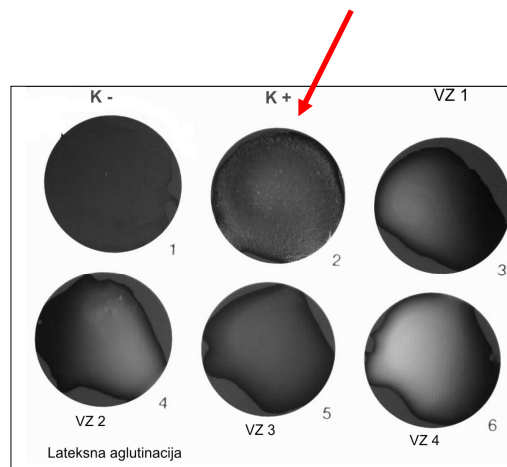


## •pasivna aglutinacija

antigeni so kemijsko vezani na Erc (pasivna hemaglutinacija) ali inertne delce (lateks; ~1mm) (pasivna aglutinacija)

- zelo hidrofilna površina
- lateks nima Ag lastnosti
- ↑ občutljivost
- podajanje rezultata: kvali ali semikvantitativno

zadnjo razredčino vzorca, pri kateri še opazimo aglutinate, pomnožimo z občutljivostjo reagenta in dobimo rezultat v ustreznih enotah



#### Aglutinacija:

enostavna, raznolika, kvali/semikvantitativna metoda

#### občutljivost tehnike:

~15  $\mu\text{g/mL}$  (aglutinacija Erc, bakterij)

x ng/mL (lateks in nefelometrično merjenje končnega produkta; oz. odvisno od specifikacije posameznega lateksnega reagenta)

uporaba: detekcija Pt proti specifičnim Ag, tipizacija antigenov AB0

#### Vzorci

- plasma, serum, CSF, urin (kisel!)
- vpliv komplementa (inaktivacija ali redčitev vzorca)

#### Vpliv na aglutinacijo

- naboj delca (neg. Zeta potencial)
- vrsta Pt (IgM je do 750x učinkovitejši pri aglutinaciji kot IgG)
- conc. elektrolita
- viskoznost medija
- Ag determinante (število, dostopnost)
- conc. Ag, conc. Pt (pojav procone!)
- t, T inkubacije (37°C, 4°C, RT), stresanje

## Literatura

- Cellular and Molecular Immunology; Abbas K; 2007
- Clinical Laboratory Diagnostics; Lothar T; 1998
- Henry's Clinical Diagnostics and Management by Laboratory Methods; McPherson R, Pincus MR, 2007
- Clinical Chemistry; Kaplan LA, Pesce AL; 2003
- Imunologija, priročnik za vaje; Kotnik V; 2010
- Merjenje imunosti od molekule do bolnika; FFA 2007

## Ocena vaje

- Oddana poročila z vaj so pogoj za pristop h kolokviju.