



IMMUNOLÓGIAI ÉS
BIOTECHNOLÓGIAI
INTÉZET



Immunszerológia 1. precipitáció, agglutináció

Az immunológia alapjai

PTE-KK, Immunológiai és Biotechnológiai Intézet

Pécs

A szerológia fogalma

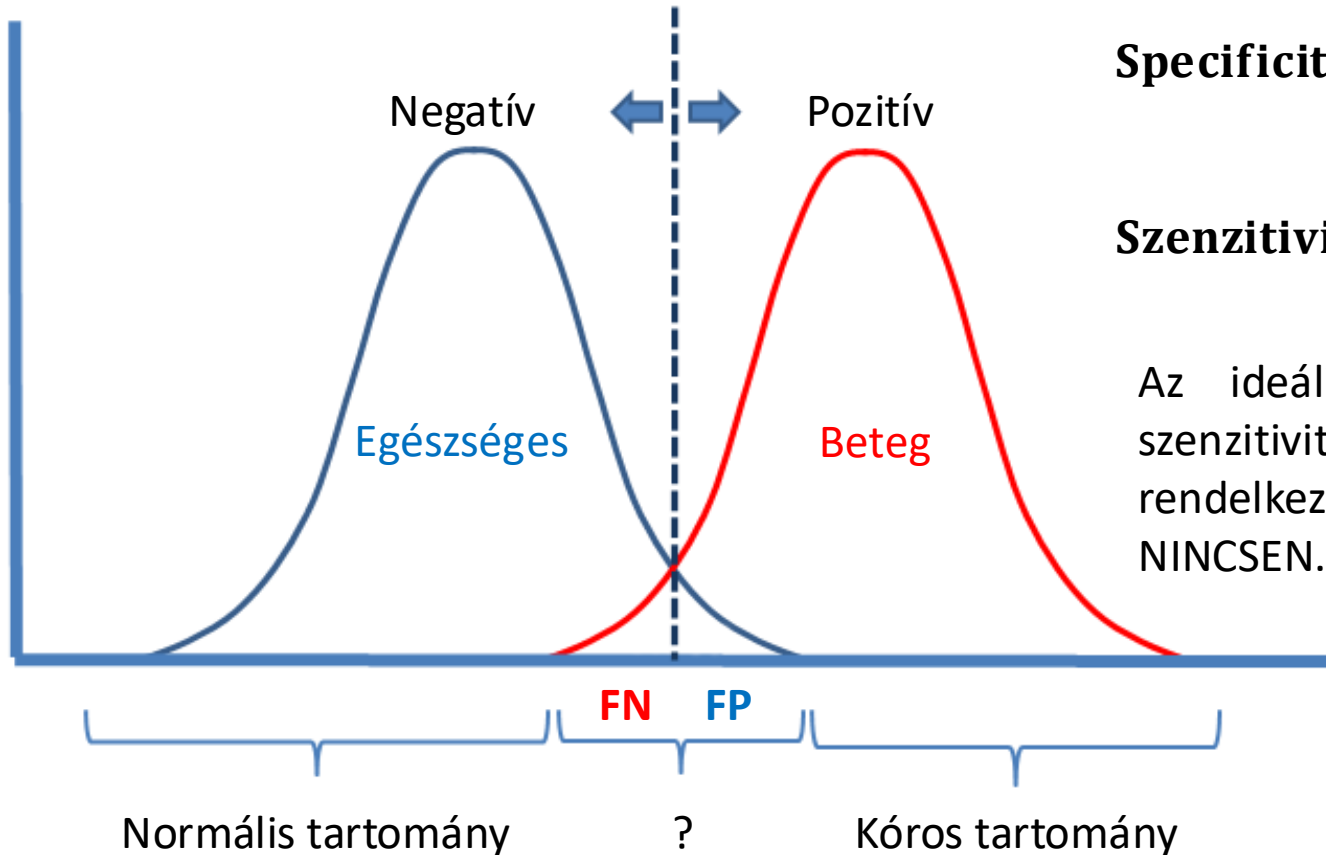
- A **vérszérum** és más testnedvek laboratóriumi vizsgálata, a gyakorlatban elsősorban az azokban található **antitestek** kimutatását értik alatta.
- Emlékeztek?
 - **Vérplazma**: alvadásgátolt vér felülúszója
 - **Vérszérum**: alvadt vér felülúszója
- Ezek is **antigén-antitest reakción** alapulnak (mindkettő kimutatható).
- Milyen módszerek tartoznak ide?
 - **Precipitáción** alapulók
 - **Agglutináción** alapulók
 - **Immunoassay vizsgálatok** (ELISA, ELISPOT, radioimmunoassay, stb., lásd jövő héten)
 - **Immunoblot technikák** (Western blot, Dot blot, lásd jövő héten)
 - **Indirekt immunfluoreszcens mikroszkópia**
- Főbb klinikai felhasználás:
 - **Fertőző betegségek** diagnosztikája (pl. a kórokozók ellen termelt antitestek kimutatása)
 - **Autoimmun betegségek** diagnosztikája (kóros autoantitestek kimutatása)
 - **Immunhiányos állapotok** diagnosztikája (antitestek szintjeinek mérése)
 - **Vércsoport meghatározás**

Specifititás, szenzitivitás

FN = Fals negatív

FP = Fals pozitív

Határérték



Fogalmak:^[1.]

$$\text{Specifititás} = \frac{\text{Valódi negatív}}{\text{Összes negatív}}$$

$$\text{Szenzitivitás} = \frac{\text{Valódi pozitív}}{\text{Összes pozitív}}$$

Az ideális vizsgálat 100%-os szenzitivitással és specifitással rendelkezik, de ilyen vizsgálat NINCSEN.

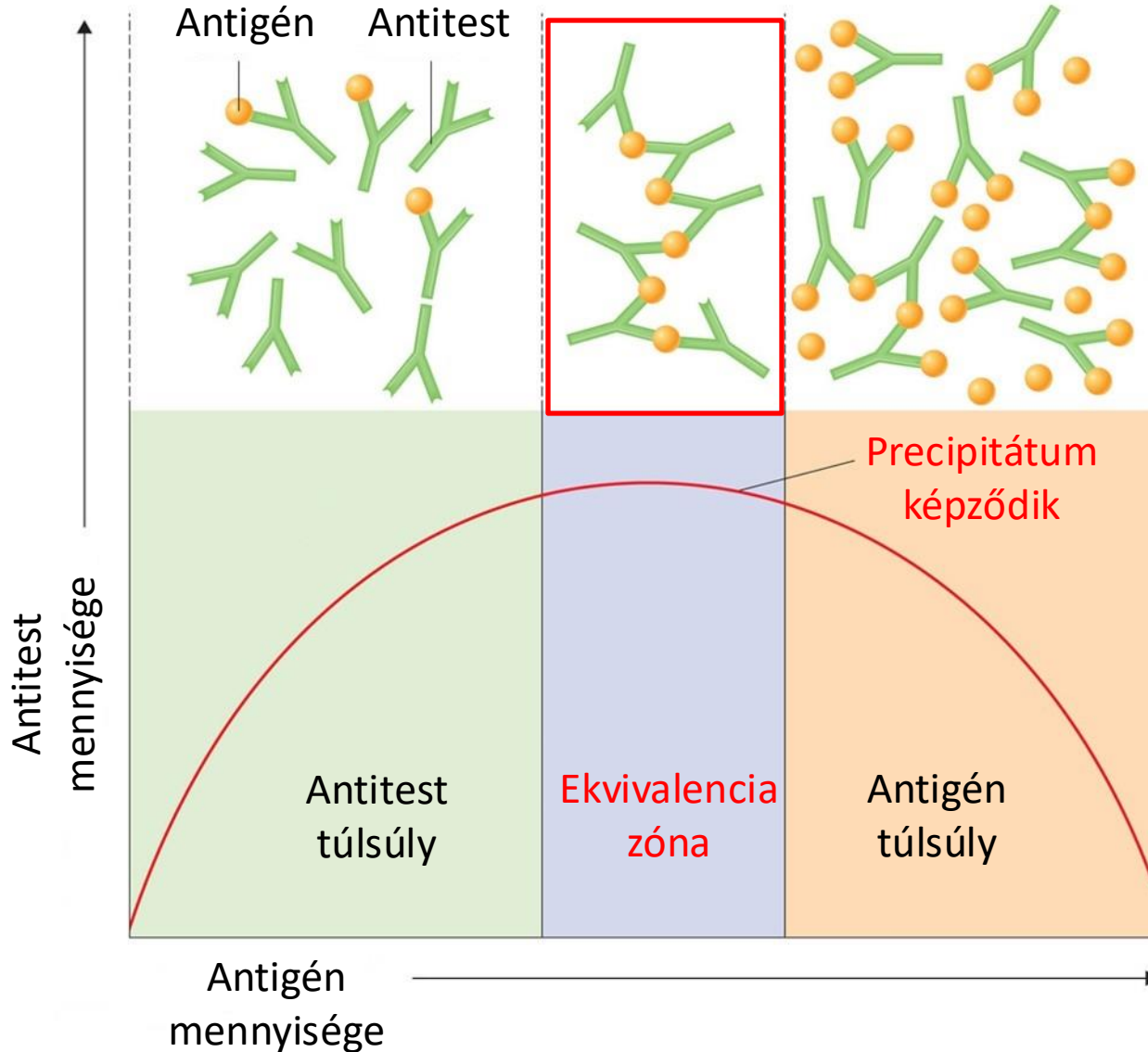
Fals pozitív
eredmény



Fals negatív
eredmény



Precipitáció



Ha az oldatban lévő antigén mellett megfelelő arányban van jelen az azt felismerő antitest is, akkor nagyobb fehérje komplexeket hoznak létre.



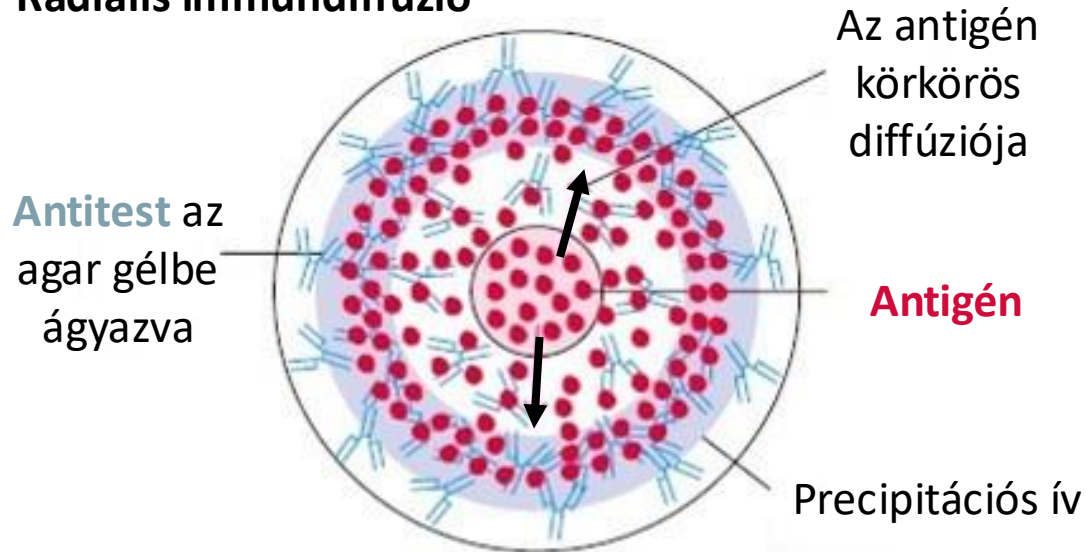
A nagyobb komplexeknek csökken az oldékonysága és kicsapódnak (precipitáció).

Ezen alapul:

- **Immundiffúzió**
- **Immunelektroforézis**

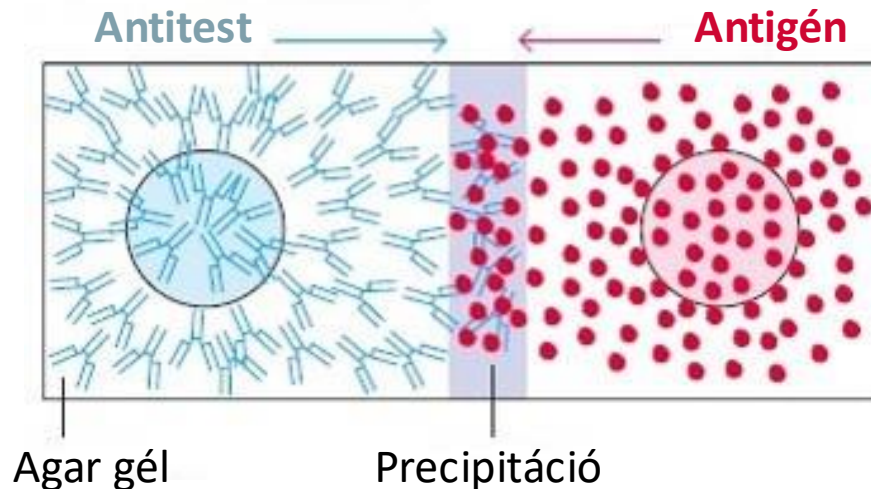
Immundiffúzió I.

Radiális immundiffúzió



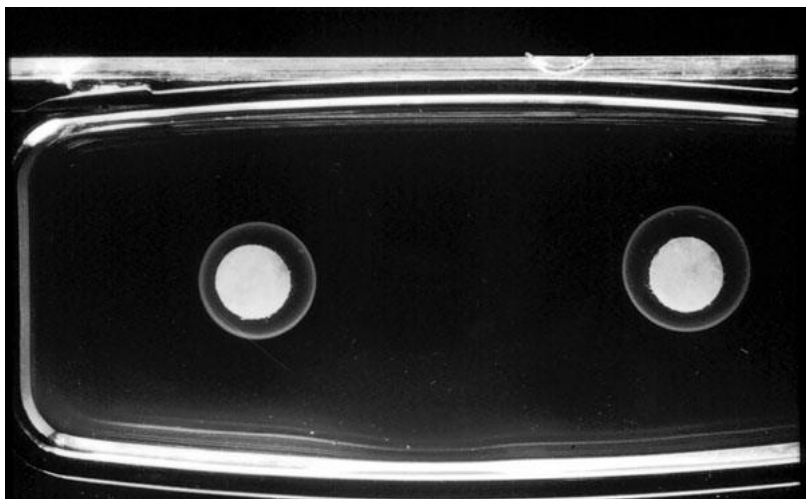
Egyszerűen kivitelezhető, de ma már **elavult** technikák.

Kettős immundiffúzió



Immundiffúzió II.

Mancini-féle^[2.] radiális immundiffúzió:



Az agar gél **egyenletes koncentrációban** tartalmaz antigént. Hozzáadják a vizsgált szérumot, az abban található antitest kör irányba elkezdi diffundálni. Amint az antigén-antitest arány eléri az ideális tartományt, kicsapódnak.

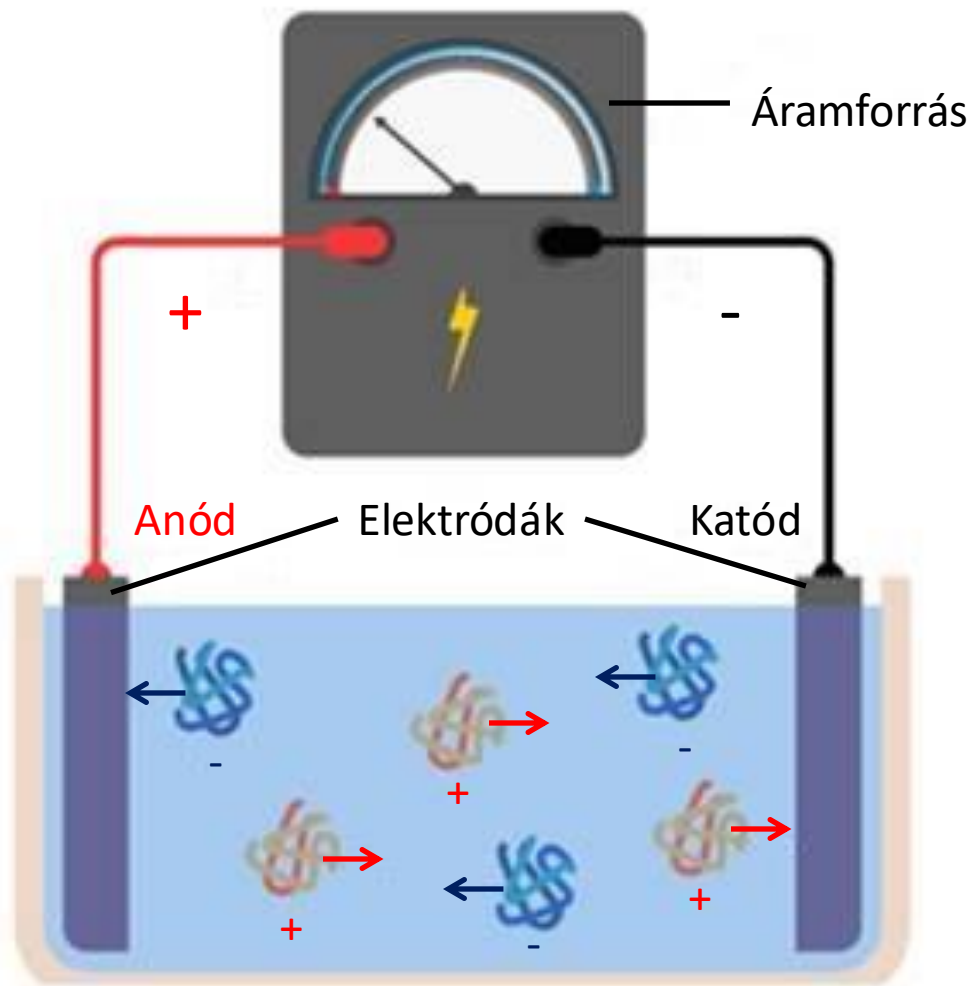
Szemikvantitatív módszer.

Ouchterlony-féle^[3.] kettős immundiffúzió:



A gél középső rése az antigént, a körülötte található rések pedig a különböző szérumokat tartalmazzák. Ahogy az antigén és a szérumokban található antitest **egymás felé diffundál**, precipitációs íveket hoznak létre. **Szemikvantitatív** módszer.

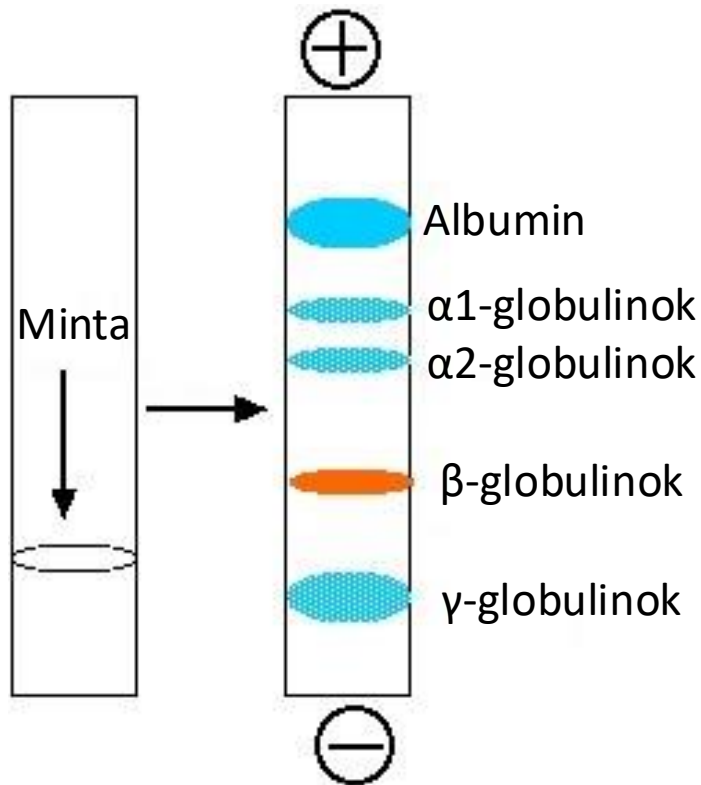
Fehérje elektroforézis



- Az elektromos töltéssel bíró molekulák, köztük a fehérjék is, elektromos erőter hatására a töltésükkel ellentétes pólus irányába vándorolnak.
- A vándorlási sebességük függ:
 - A közeg ellenállásától (standardizálható)
 - Az alkalmazott feszültségtől (standardizálható)
 - A **fehérjék méretétől** és **töltésétől** (utóbbi pH-függő)
- Az eltérő sebességgel futó fehérjék így fizikailag **elválaszthatók**.
- A közeg lehet:
 - Szilárd (pl. papír, nitrocellulóz)
 - Fél-folyékony (pl. agaróz vagy poliakrilamid gél)
 - Folyékony

Szérum protein elektroforézis

- A vészérumot enyhén alkalikus közegben futtatják, ilyen körülmények között a szérum fehérjék többsége a pozitív elektróda felé mozdul el, láthatóvá pedig nem-specifikus fehérje festékekkel tehető.^[4.]

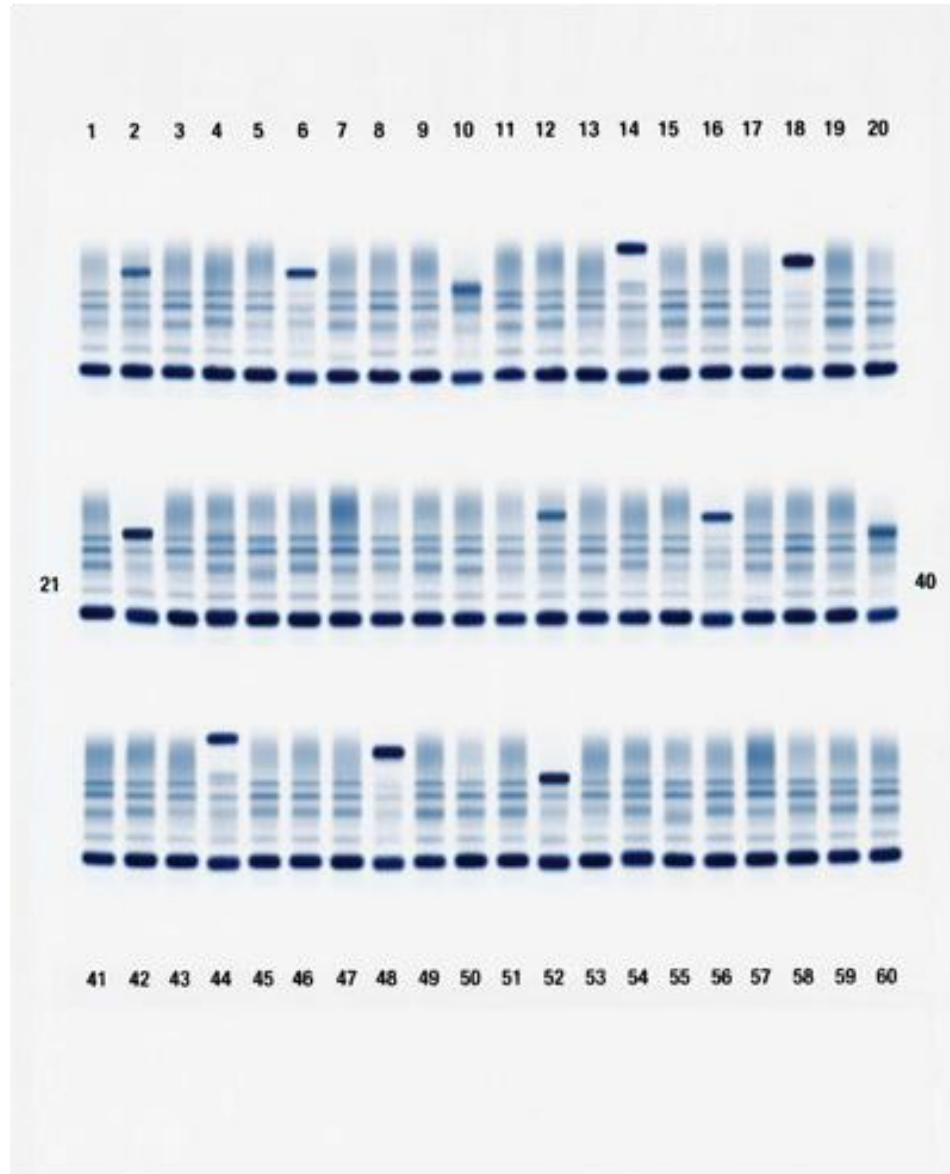


Arne Tiselius

1948-as Kémiai Nobel-díj:

„Az elektroforézis és az adszorpciós analízis terén végzett kutatásaiért, különös tekintettel a szérum fehérjék komplex természetét feltáró eredményeiért.”^[5.]

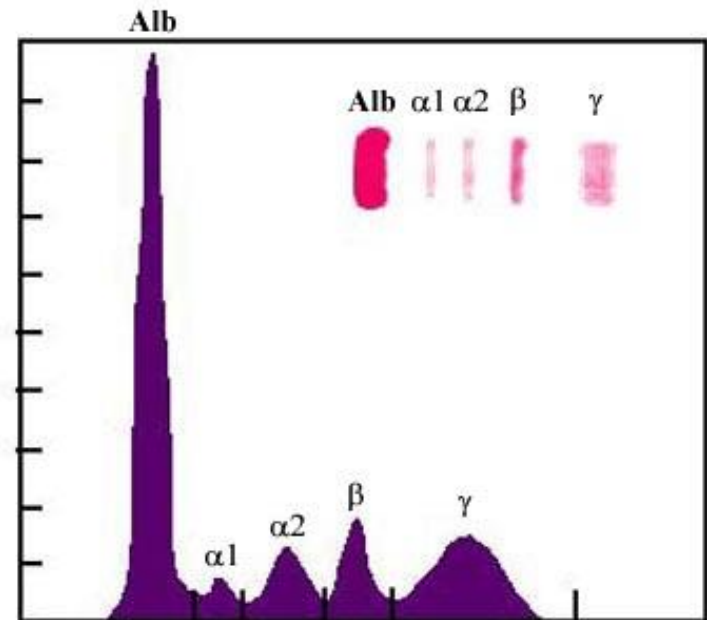
Agarose gél elektroforézis



Szérum elektroforézis analízise

Néhány példa az egyes frakciókban futó fehérjékre:^[6.]

- Legnagyobb frakció az **albumin**. ↓
- α 1-globulinok:
 - **α 1-antitripszin** ↑
 - **Szérum amiloid A** ↑
 - **Retinol-kötő fehérje** ↓
 - **Transzkortin** ↓
- α 2-globulinok:
 - **Cöruoplazmin** ↑
 - **Angiotenzinogén**
 - **Haptoglobin** ↑
- β -globulinok:
 - **β 2-mikroglobulin** ↑
 - **Transzferrin** ↓
 - **Plazminogén**
- γ -globulinok:
 - **Immunglobulinok**



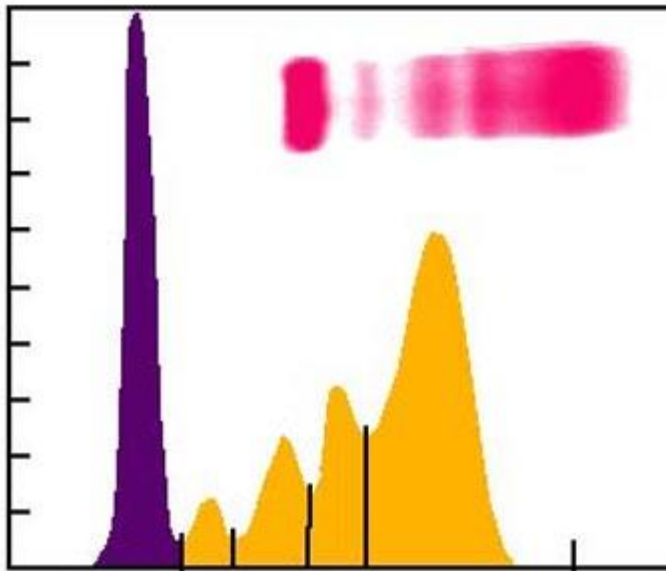
Szérum elektroforézis normális mintázata és az abból készült **denzitometriás diagram**.

Gyulladásos citokinek hatására (pl. $\text{TNF}\alpha$, IL-1, IL-6) az **akut fázis reakció** során a termelésük:

- **Növekszik** (pozitív akut fázis fehérjék, legfőbb képviselőjük a **CRP**, ami a β - és a γ -frakció között fut^[7.])
- **Csökken**

Példák kóros szérumszéklet elektrofórezisére I.

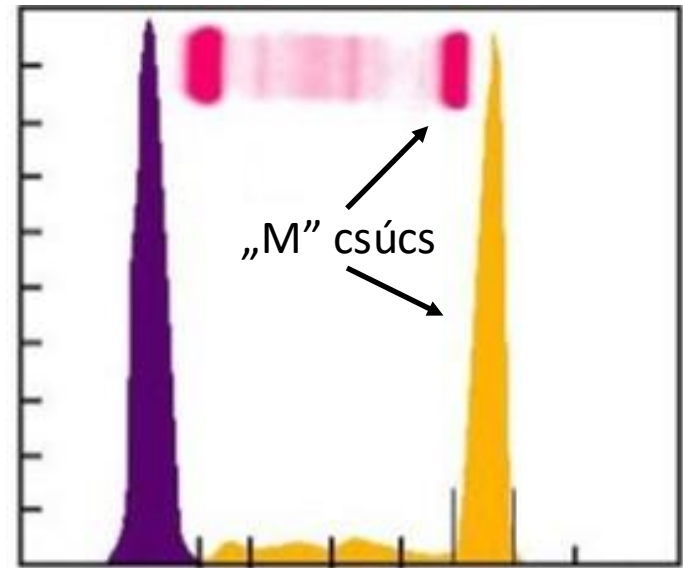
Poliklonális gammopathia



Több B-sejt klón által termelt immunoglobulin többlet, valamilyen **gyulladásos folyamat** áll mögötte:^[7.]

- Fertőzés
- Autoimmun betegség
- Daganat
- Májbetegség (pl. hepatitis, cirrhosis)

Monoklonális gammopathia

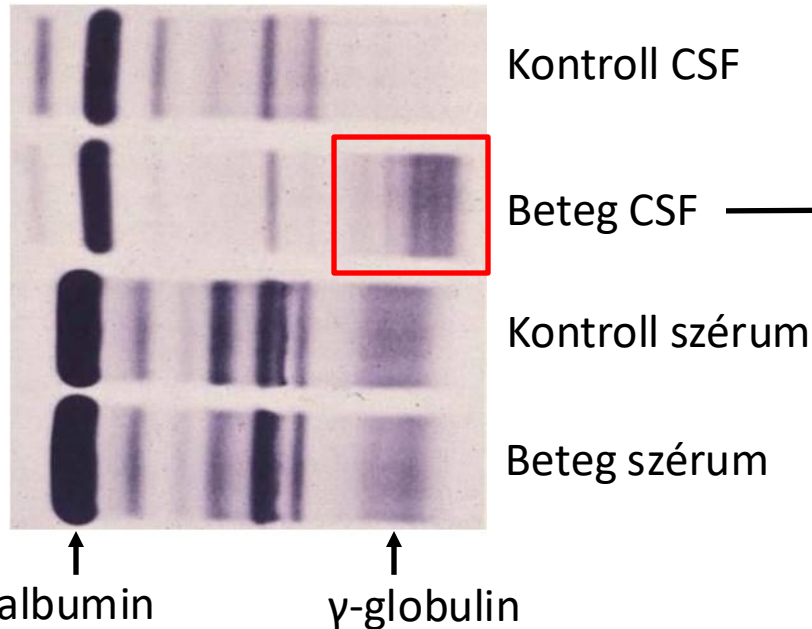


Egyetlen B-sejt klón által termelt immunoglobulin többlet, **plazmasejtes daganat** áll mögötte:^[7.]

- Myeloma multiplex
- Waldenström macroglobulinaemia
- MGUS (Monoclonal gammopathy of undetermined significance)

Egyéb testfolyadékok elektroforézise

Liquor cerebrospinalis (CSF)



A beteg esetében több, különböző csík látszik a gamma-globulin frakcióban, ami azonban eltér a szérumban található mintázattól.

↓

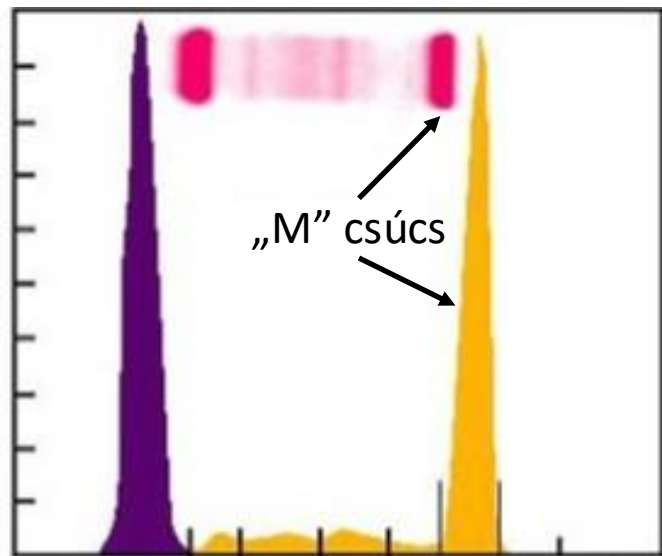
Kóros immunglobulin termelődik helyileg a központi idegrendszerben. (oligoklonális gammopathia, pl. sclerosis multiplex esetén^[9.])

Vizelet elektroforézis:

Myeloma multiplex gyanúja esetén, szérum elektroforézissel egy időben végzik, a vesében kórosan filtrálódó immunglobulin könnyű láncot (Bence Jones fehérje^[11.]) keresik.

Háttér információ: Az immunglobulinok normálisan **nem jutnak át a vér-agy gáton.**^[10.]

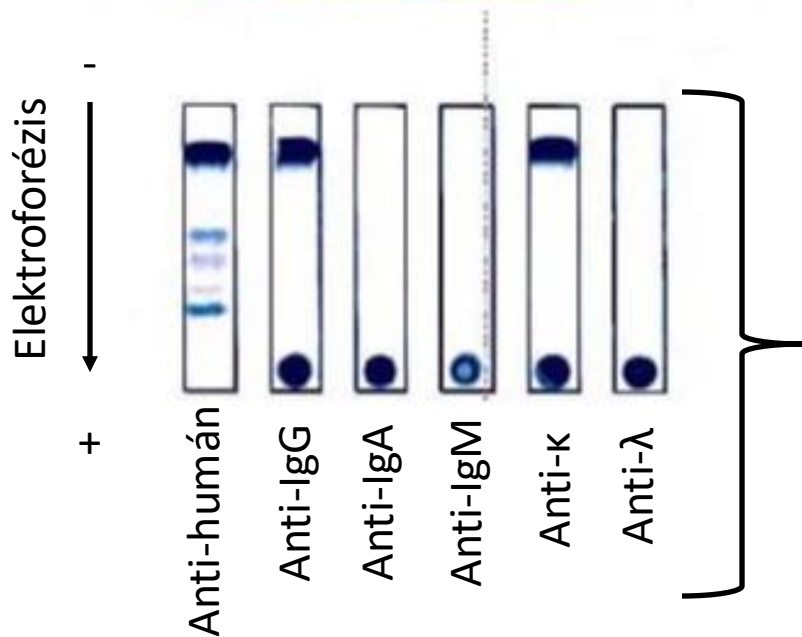
Immunfixáció



1. Több párhuzamos szérumszérum elektroforézist végeznek ugyanabból a betegmintából.^[13.]
2. Ezt követően az egyes megfuttatott géleken antitestekkel mutatnak ki meghatározott fehérjéket. (A hozzáadott antitest az antigénnel precipitátumot képez, mely vagy szabad szemmel, vagy valamilyen festék hozzáadásával látható. Az antigének az esetek többségében maguk a humán immunglobulinok.)

Felhasználás:

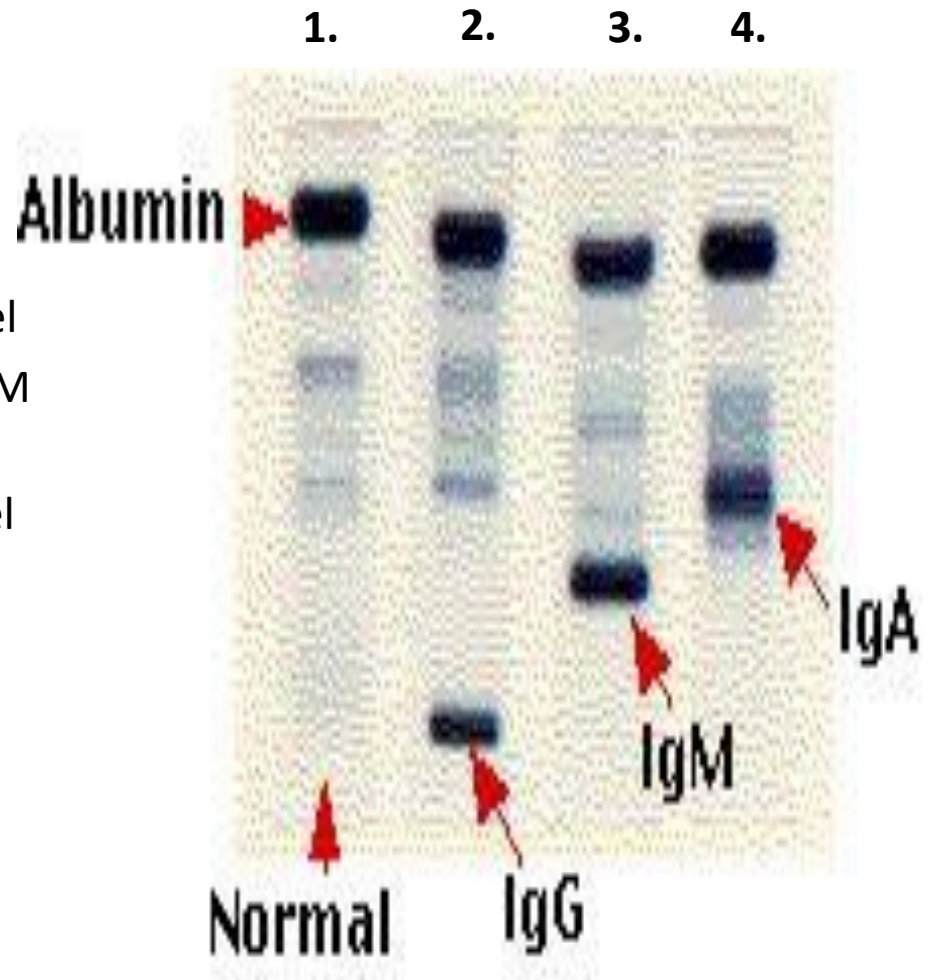
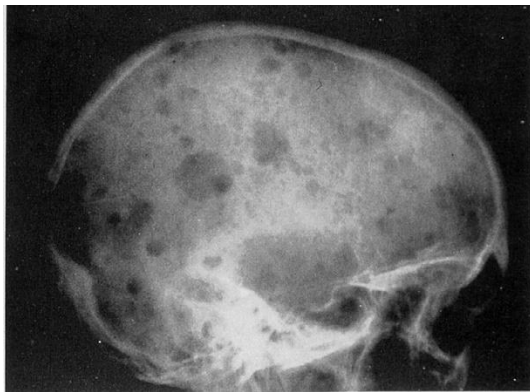
- Általában **plazmasejtes daganatok** diagnosztikája a rájuk jellemző kóros monoklonális antitestek („**paraprotein**”) kimutatásán keresztül a szérumban.^[14.]



IgG κ izotípusú monoklonális ellenanyagot termelő myeloma multiplex

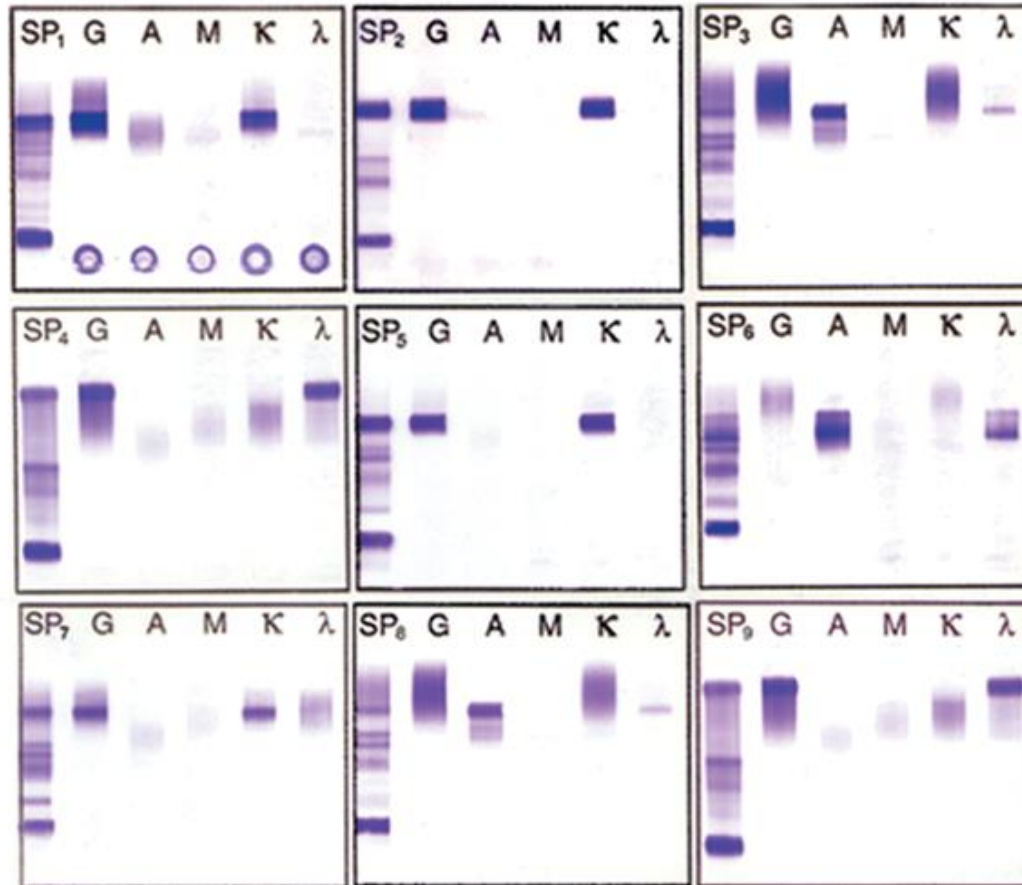
Immunfixáció II.

1. Normális szérum
2. Myeloma multiplex IgG paraproteinnel
3. Waldenström macroglobulinaemia IgM paraproteinnel
4. Myeloma multiplex IgA paraproteinnel



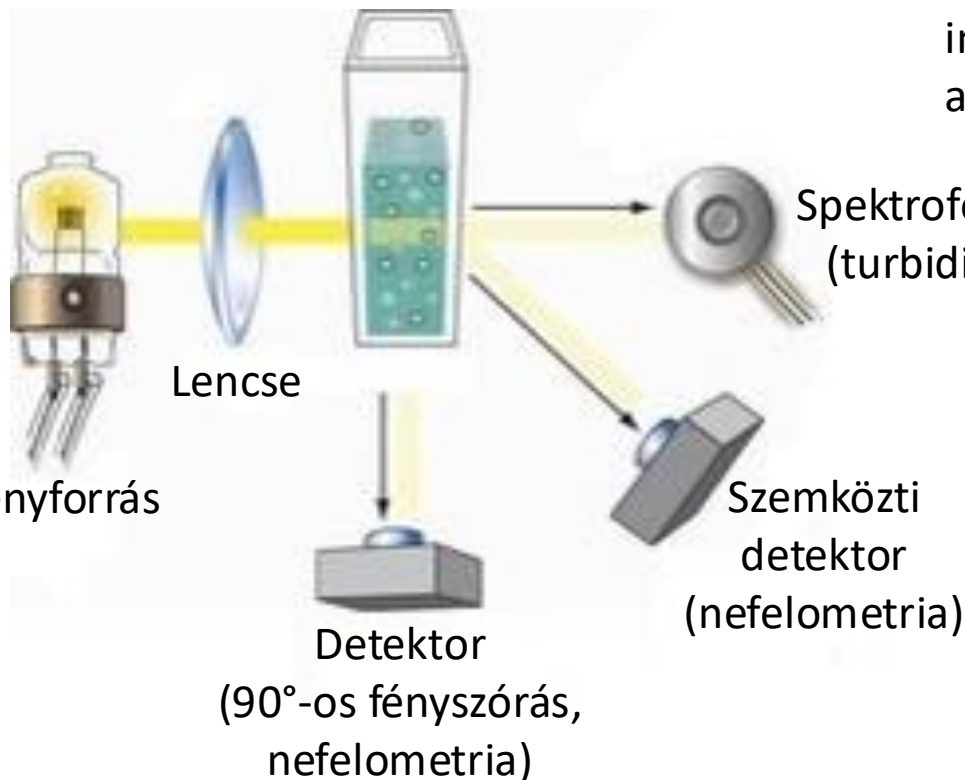
Körülírt csontiányos gócek a koponyáról készült röntgenfelvételen myeloma multiplexben.^[15.]

Immunfixáció



1. ELFO
2. + Anti-IgG anti-IgA, anti-IgM anti-kappa (K) anti-lambda (λ)

Nefelometria, turbidimetria



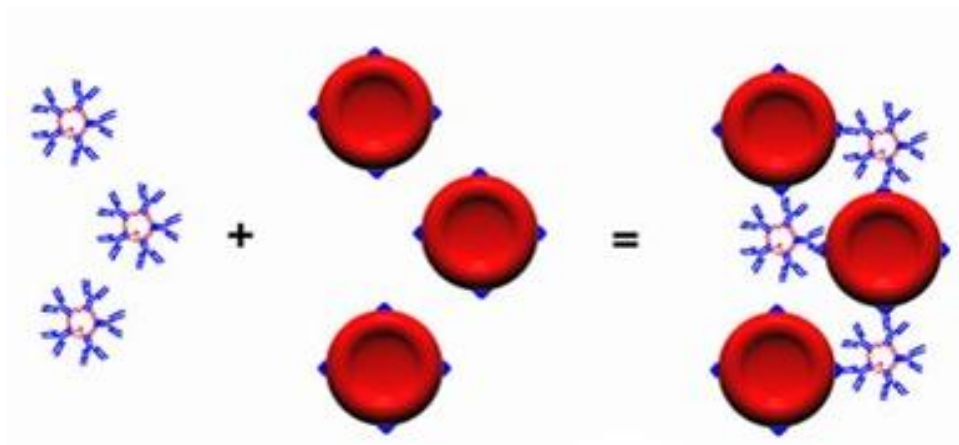
Az **oldatban** található **makromolekulák** (pl. immunkomplexek) a molekulatömegükkel arányosan **szórják a fényt**.

Nefelométer segítségével a **fényszórás alapján** azonosítható a vizsgált komplex, turbidimetria esetén pedig a követően átjutott **fény intenzitásának csökkenését** mérik.^[18.]

Felhasználásuk: Immunkomplexek mérése, pl. össz IgA, IgM, IgG szintek meghatározása, könnyű lánc szint mérése (pl. myeloma multiplexben)

Agglutináció

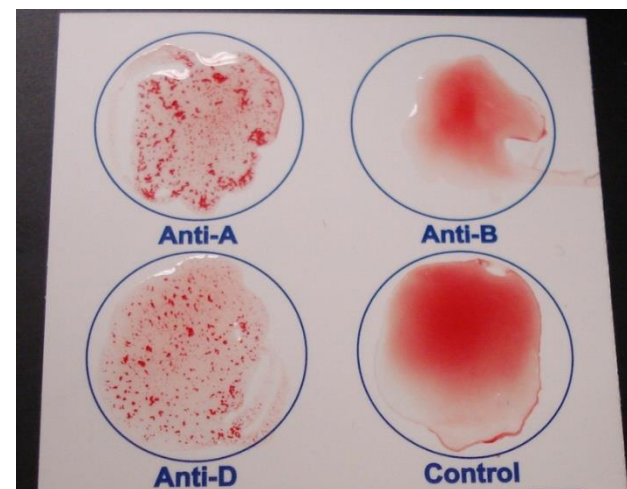
- Ha az antitestek **nagyobb partikulumokat** (pl. sejteket, latex gyöngyöket) kötnek keresztbe, azok **összecsapzódnak**. = **agglutináció** (ha vörösvérsejtek csapzódnak össze, akkor **hemagglutináció**)
- Az agglutináció az **antitestek egyik élettani funkciója** is, a kórokozók agglutinációja hátráltatja a fertőzések terjedését.^[19.]
- Lehet **direkt** vagy **indirekt**, illetve **aktív** vagy **passzív**.
- Számos laboratóriumi teszt agglutináción alapul, melyek szabad szemmel is láthatók.



Anti-„A” IgM

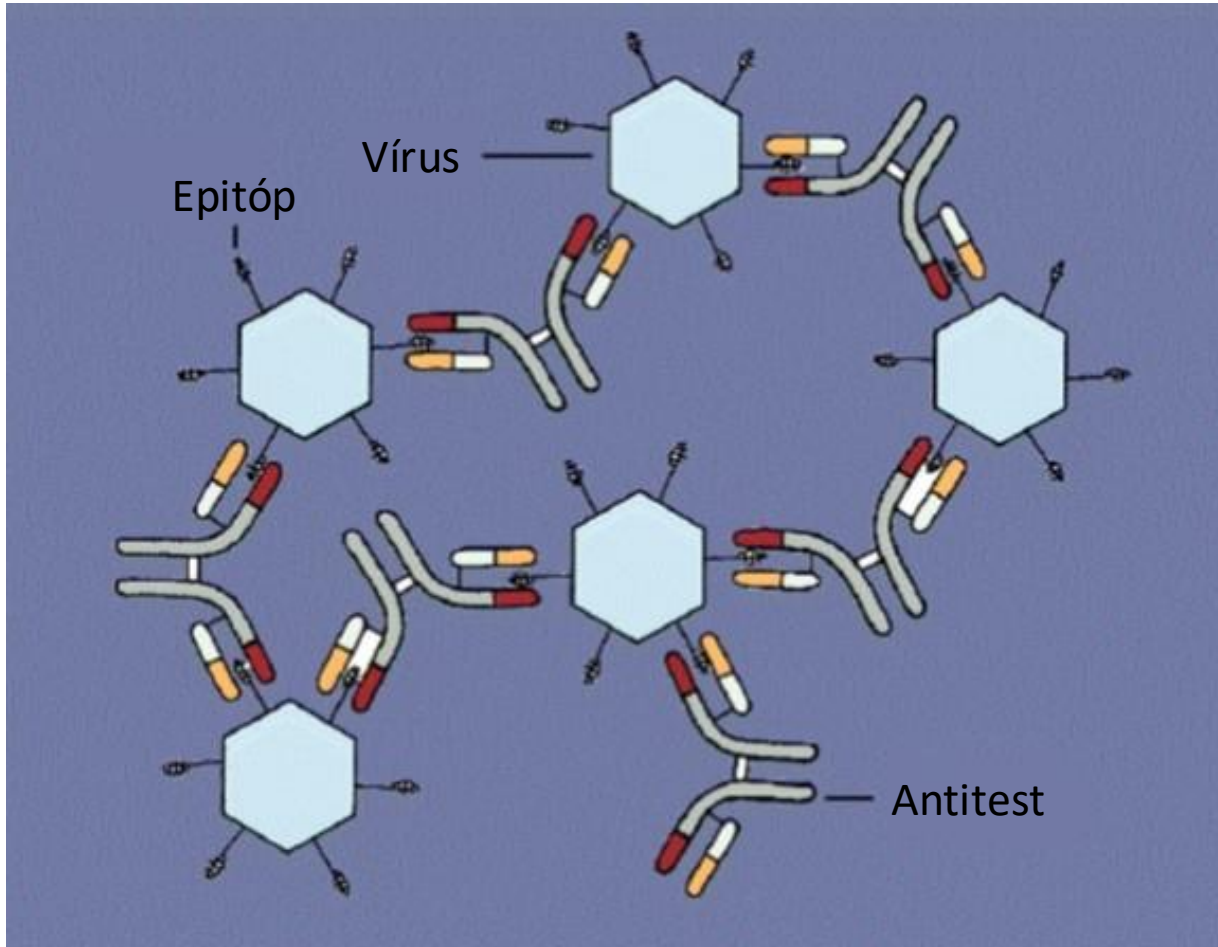
Vörösvérsejt
„A” antigénnel

Hemagglutináció



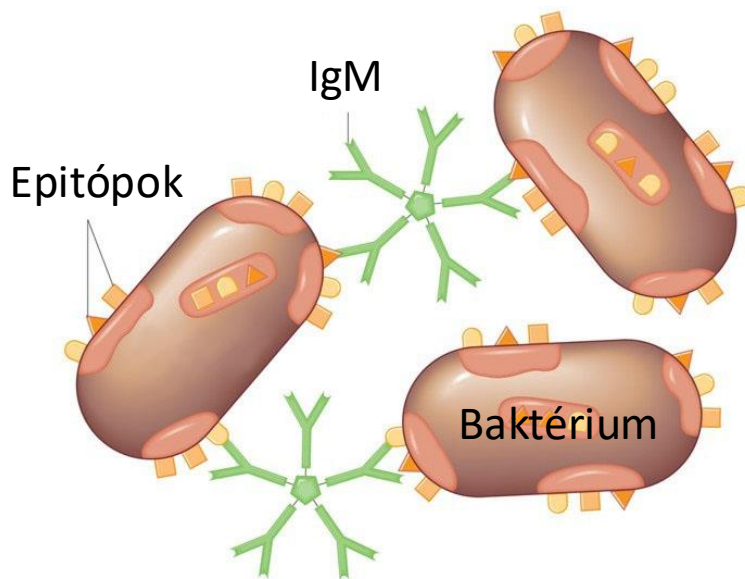
Vércsoport meghatározás:
A, Rh(D) pozitív

Az agglutináció élettani szerepe



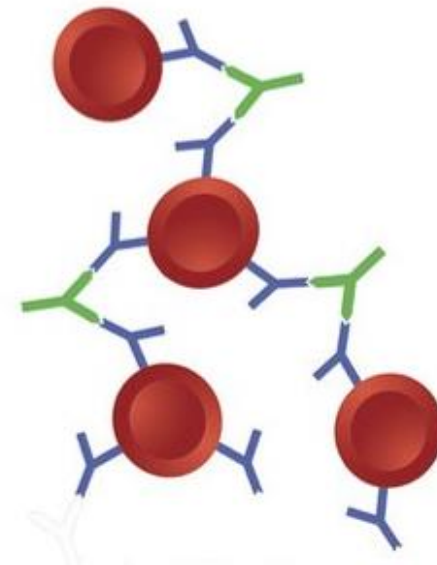
Direkt vagy indirekt

Direkt agglutináció:



- Ugyanaz az antitest képes keresztbe kötni a partikulumokat.
- Az **IgM** izotípusú antitestekre jellemző.

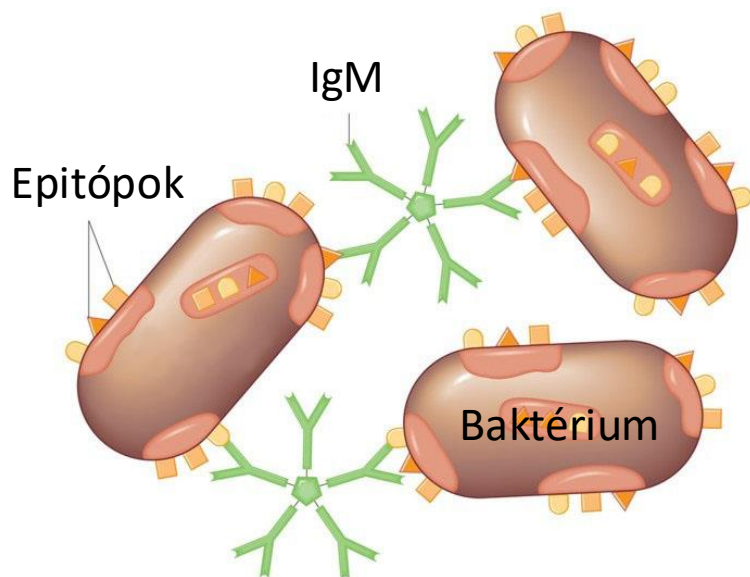
Indirekt agglutináció:



- Egy másodlagos antitest köti keresztbe a részecskéket.

Aktív vagy passzív

Aktív agglutináció:



- A sejt a **saját**, sejtfelszíni **antigénjével** vesz részt a reakcióban.
- Példa:
 - Vércsoport meghatározás
 - Bakteriális sejtfelszíni antigén kimutatása

Passzív agglutináció:

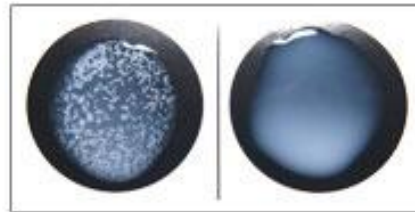


- A reakcióban résztvevő hordozó részecskére **mesterségesen van rákötve az antigén.**
- Példa:
 - Latex agglutinációs tesztek (lásd következő diákon)

Az agglutináció orvosi jelentősége

- Az antitestek egyik élettani funkciója, a kórokozók elleni védelem része.
- Bizonyos kórállapotokban (pl. autoimmun haemolyticus anaemia, AIHA) *in vivo* is létrejöhet hemagglutináció.
- Diagnosztikai tesztek:
 - **Latex agglutinációs tesztek:**
 - **Autoimmun kórképek** (autoantitestek kimutatása)
 - **Fertőzések** (kórokozó antigénjét vagy az ellene termelt antitestet mutatják ki)
 - Egyéb fehérjék (pl. CRP, hCG, D-dimer) kimutatása
 - **Hemagglutinációs tesztek:**
 - **Vércsoport meghatározás**
 - **Coombs-teszt**
 - Hemagglutinációs assay
 - Hemagglutináció-gátláson alapuló vizsgálatok:
 - Vírus hemagglutininek azonosítása
 - Vírus hemagglutininek neutralizáló antitestek tesztelése

Latex agglutinációs teszt



Pozitív Negatív

Latex gyöngyök felszínére van kötve a reakcióban résztvevő antigén/antitest.

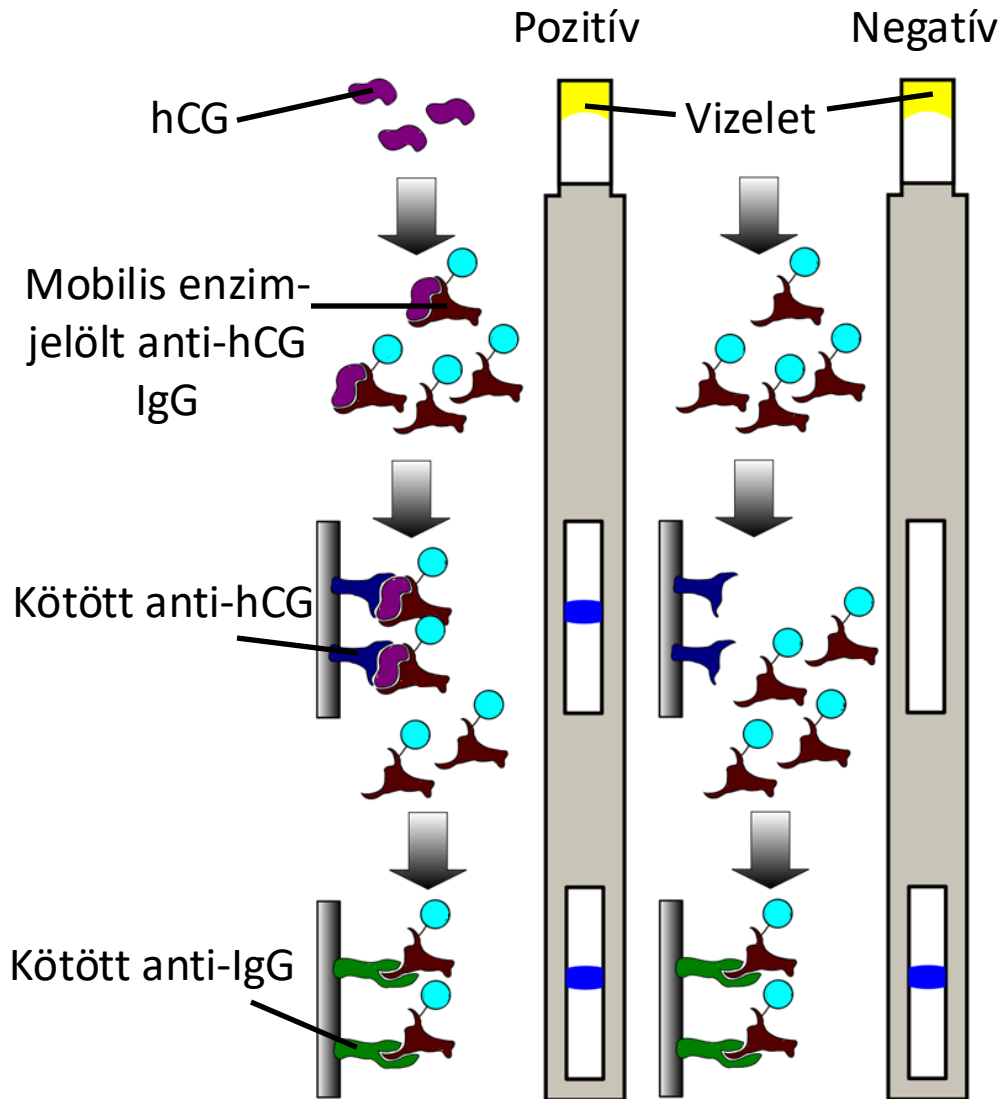


Ha a hozzáadott mintában jelen van a vizsgált antitest/antigén, akkor az a gyöngyök összezsugorodását idézi elő.

Felhasználás:

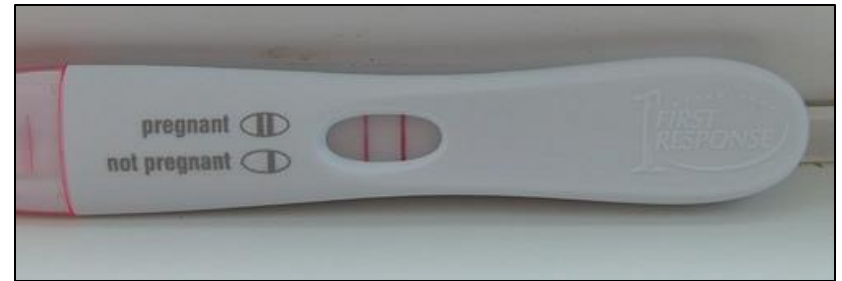
- **Autoimmun kórképek diagnosztikája**, pl.:
 - Rheumatoid arthritis (rheumatoid faktor, RF^[20.]), SLE (különböző autoantitestek)
- **Fertőző betegségek diagnosztikája**
 - Kórokozó elleni antitestek kimutatása (pl. anti-streptolizin O antitest, ASO/AST^[21.])
 - Bakteriális antigének kimutatása
- Egyéb fehérjék kimutatása, pl.:
 - **C-reaktív protein** (CRP, akut fázis fehérje^[22.]), D-dimer^[23.] (vérrögképződés jele lehet), **humán choriogonadotropin** (hCG, terhességben)

Terhességi gyorssteszt



A megtermékenyülést követően az embrió által termelt hCG megjelenik a vizeletben.

A hCG számos immunológiai módszerrel (ELISA, agglutináció) kimutatható, a gyors tesztek **kromatográfián** alapulnak.^[24.]

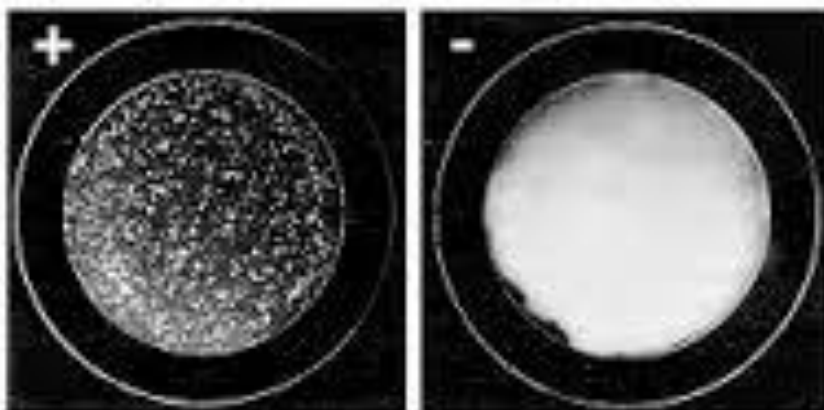


Csík akkor jön létre, ha megkötődik az enzim-jelölt antitest. Ha nincs hCG a vizeletben, akkor ez csak a kontroll esetében következik be és egy csík látható.

Agglutináció gyakorlat

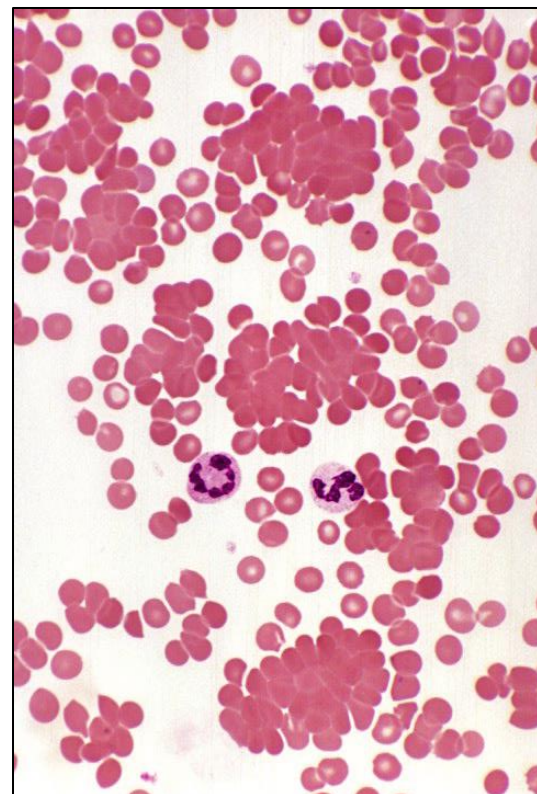
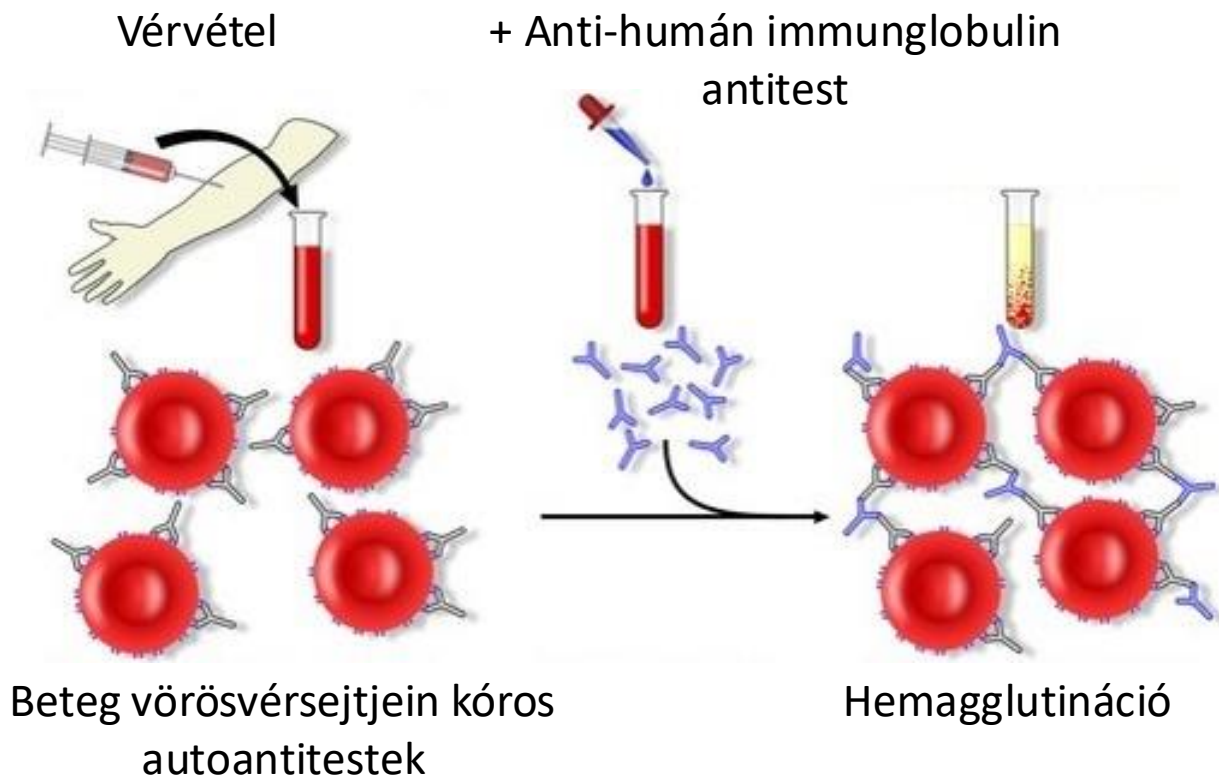
Gyakorlat menete:

1. Az asztalokon különböző latex agglutinációs kitek vannak kihelyezve.
2. Szérumminta nincsen, csak a kithez adott negatív és pozitív kontrollt vizsgáljátok.
3. A kit leírása szerint külön karikákba cseppentsetek egy-egy cseppet a negatív és a pozitív kontrollból is.
4. Keverjétek össze a mellékelt pálcikákkal vagy döntögessétek.
5. Kis idő elteltével a pozitív kontrollban szemmel látható agglutináció megy végbe.



HÚZZATOK KESZTYŰT!

Direkt Coombs-teszt (DAT^[25.])

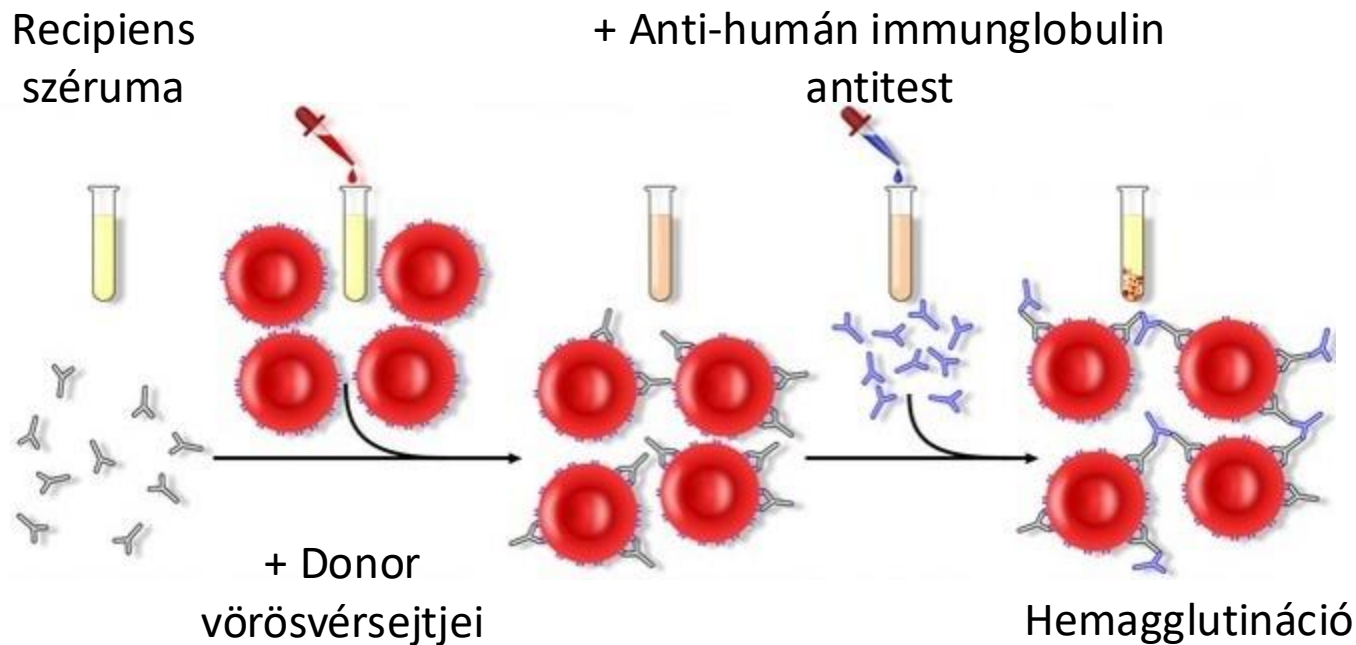


In vivo hemagglutináció

Felhasználása: **Immun-mediált haemolysisek** diagnosztikája,^[26.] pl.: AIHA-s betegben.

- AIHA (autoimmun haemolyticus anaemia, anaemia=vérszegénység)
- Erythroblastosis foetalis (Alloimmun magzati haemolyticus vérszegénység)

Indirekt Coombs-teszt (IAT)

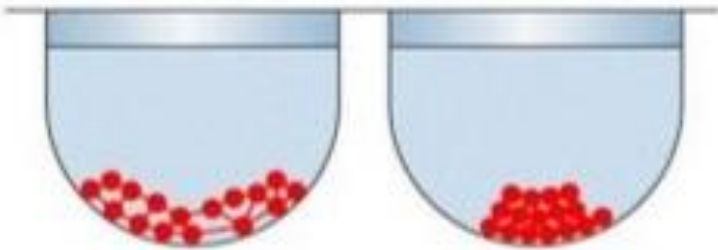
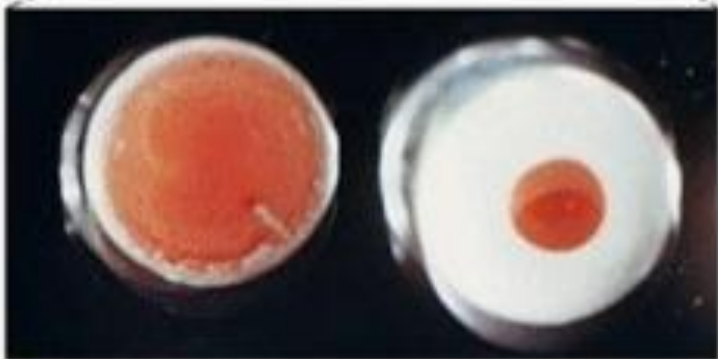


Felhasználás:

- **Vérátömlesztések** előtti antitest szűrés^[27.] (ABO és Rh mellett egyéb antitestek jelenlétét keresik a recipiens szérumában.)
- **Terhesgondozás** során a placentán átjutó, erythroblastosist okozó Rh(D)-ellenes antitestek szűrése.^[28.]

Hemagglutinációs assay

1:20 1:40 1:80 1:160 1:320 1:640 Kontroll



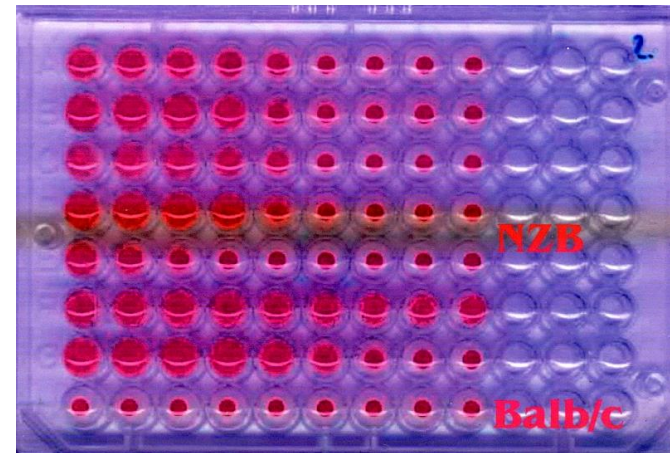
Hemagglutináció

Negatív

Minden részbe ugyannyi **vörösvérsejtet** helyeznek, majd a mintát sorozatos feles hígításokban adják hozzájuk.




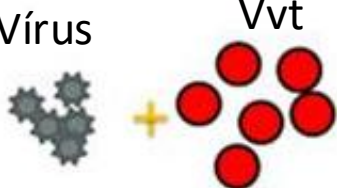


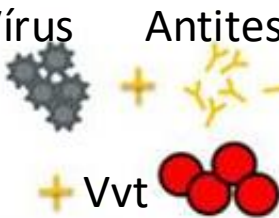




Pozitív reakció esetén a vörösvérsejtek összezsapzódnak és **nem tudnak lesülyedni a rés aljára**. (HA titer: a legkisebb hígítás, ami még agglutinációt okoz)



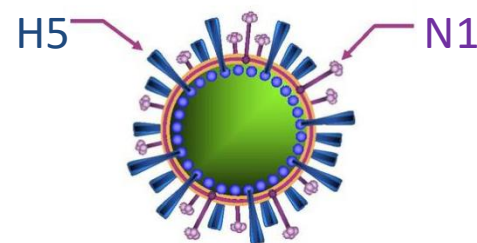
- NZB: New Zealand Black egértörzs^[29.] (autoimmun állatmodell)
- BALB/c: albínó házi egér (kontroll)

Hemagglutináció-inhibíciós assay

Összetevők	Reakció	Értékelés
Vvt 		Nincs reakció 
Vírus + Vvt 		Hemagglutináció 
Vírus + Antitest + Vvt 		Nincs reakció 

Egyes vírusok olyan fehérjékkel rendelkeznek, melyek segítségével in vitro hemagglutinációt tudnak létrehozni („hemagglutininek”).
Pl.:

- Influenza hemagglutinin
- Kanyaró hemagglutinin
- Mumpsz hemagglutinin



- Az egyes hemagglutininek azonosítására használható módszer, gyakorlati jelentősége a **vírusok antigén-szerinti besorolása**,^[30.] pl.: H5N1 = 5-ös típusú hemagglutinin (és 1-es típusú neuraminidáz) hordozó influenza vírus.
- Védőoltások hatására a hemagglutininek ellen termelt ellenanyagok vizsgálata az oltott egyéneknél.^[30.]

Hivatkozások 1.

1. Akobeng AK¹: **Understanding diagnostic tests 1: sensitivity, specificity and predictive values.** *Acta Paediatr.* 2007 Mar;96(3):338-41.
2. Mancini G, Carbonara AO, Heremans JF: **Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion.** *Immunochemistry.* 1965 Sep;2(3):235-54.
3. Ouchterlony O: **In vitro method for testing the toxin-producing capacity of diphtheria bacteria.** *Acta Pathol Microbiol Scand.* 1948;25(1-2):186-91.
4. Tiselius A¹: **Electrophoresis of serum globulin: Electrophoretic analysis of normal and immune sera.** *Biochem J.* 1937 Sep;31(9):1464-77.
5. Nobelprize.org: **The Nobel Prize in Chemistry 1948**
(http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1948/)
6. Jain S¹, Gautam V, Naseem S: **Acute-phase proteins: As diagnostic tool.** *J Pharm Bioallied Sci.* 2011 Jan;3(1):118-27. doi: 10.4103/0975-7406.76489.
7. O'Connell TX¹, Horita TJ, Kasravi B: **Understanding and interpreting serum protein electrophoresis.** *Am Fam Physician.* 2005 Jan 1;71(1):105-12.
8. Stoller JK¹, Aboussouan LS: **Alpha1-antitrypsin deficiency.** *Lancet.* 2005 Jun 25-Jul 1;365(9478):2225-36.
9. Link H¹, Huang YM: **Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: an update on methodology and clinical usefulness.** *J Neuroimmunol.* 2006 Nov;180(1-2):17-28. Epub 2006 Sep 1.
10. Abbott NJ¹, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ: **Structure and function of the blood-brain barrier.** *Neurobiol Dis.* 2010 Jan;37(1):13-25. doi: 10.1016/j.nbd.2009.07.030. Epub 2009 Aug 5.
11. Marshall T¹, Williams KM: **Electrophoretic analysis of Bence Jones proteinuria.** *Electrophoresis.* 1999 Jun;20(7):1307-24.

Hivatkozások 2.

12. Csako G¹: **Immunoelectrophoresis: a method with many faces.** *Methods Mol Biol.* 2012;869:339-59. doi: 10.1007/978-1-61779-821-4_28.
13. Csako G¹: **Immunofixation electrophoresis for identification of proteins and specific antibodies.** *Methods Mol Biol.* 2012;869:147-71. doi: 10.1007/978-1-61779-821-4_13.
14. Rajkumar SV¹, Kyle RA¹: **Protein electrophoresis and immunofixation for the diagnosis of monoclonal gammopathies.** *JAMA.* 2014 Nov 26;312(20):2160-1. doi: 10.1001/jama.2014.8237.
15. Vincent Rajkumar S¹: **Multiple myeloma: 2014 Update on diagnosis, risk-stratification, and management.** *Am J Hematol.* 2014 Oct;89(10):999-1009. doi: 10.1002/ajh.23810.
16. Walker JM¹: **Rocket immunoelectrophoresis.** *Methods Mol Biol.* 1984;1:317-23. doi: 10.1385/0-89603-062-8:317.
17. Walker JM¹: **Two-dimensional (crossed) immunoelectrophoresis.** *Methods Mol Biol.* 1988;3:299-310. doi: 10.1385/0-89603-126-8:299.
18. Mali B¹, Armbruster D, Serediak E, Ottenbreit T: **Comparison of immunoturbidimetric and immunonephelometric assays for specific proteins.** *Clin Biochem.* 2009 Oct;42(15):1568-71. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2009.06.016. Epub 2009 Jun 26.
19. Cooper NR, Nemerow GR: **The role of antibody and complement in the control of viral infections.** *J Invest Dermatol.* 1984 Jul;83(1 Suppl):121s-127s.
20. Anuradha V¹, Chopra A: **In the era of nephelometry, latex agglutination is still good enough to detect rheumatoid factor.** *J Rheumatol.* 2005 Dec;32(12):2343-4.
21. Kodama T¹, Ichiyama S, Morishita Y, Fukatsu T, Shimokata K, Nakashima N: **Determination of anti-streptolysin O antibody titer by a new passive agglutination method using sensitized toraysphere particles.** *J Clin Microbiol.* 1997 Apr;35(4):839-42.
22. Komoriya T¹, Terashima Y, Ogawa M, Moriyama M, Kohno H: **Development of a high-sensitivity latex reagent for the detection of C-reactive protein.** *J Immunol Methods.* 2011 Oct 28;373(1-2):63-6. doi: 10.1016/j.jim.2011.08.001. Epub 2011 Aug 26.

Hivatkozások 3.

23. Froehling DA¹, Elkin PL, Swensen SJ, Heit JA, Pankratz VS, Ryu JH: **Sensitivity and specificity of the semiquantitative latex agglutination D-dimer assay for the diagnosis of acute pulmonary embolism as defined by computed tomographic angiography.** *Mayo Clin Proc.* 2004 Feb;79(2):164-8.
24. Braunstein GD¹: **The long gestation of the modern home pregnancy test.** *Clin Chem.* 2014 Jan;60(1):18-21. doi: 10.1373/clinchem.2013.202655. Epub 2013 Sep 11.
25. Zantek ND¹, Koepsell SA, Tharp DR Jr, Cohn CS: **The direct antiglobulin test: a critical step in the evaluation of hemolysis.** *Am J Hematol.* 2012 Jul;87(7):707-9. doi: 10.1002/ajh.23218. Epub 2012 May 6.
26. Barcellini W¹: **Immune Hemolysis: Diagnosis and Treatment Recommendations.** *Semin Hematol.* 2015 Oct;52(4):304-12. doi: 10.1053/j.seminhematol.2015.05.001. Epub 2015 May 19.
27. British Committee for Standards in Haematology¹, Milkins C, Berryman J, Cantwell C, Elliott C, Haggas R, Jones J, Rowley M, Williams M, Win N: **Guidelines for pre-transfusion compatibility procedures in blood transfusion laboratories. British Committee for Standards in Haematology.** *Transfus Med.* 2013 Feb;23(1):3-35. doi: 10.1111/j.1365-3148.2012.01199.x. Epub 2012 Dec 6.
28. Abbey R¹, Dunsmoor-Su R: **Cost-benefit analysis of indirect antiglobulin screening in Rh(D)-negative women at 28 weeks of gestation.** *Obstet Gynecol.* 2014 May;123(5):938-45. doi: 10.1097/AOG.0000000000000224.
29. Yoshida S¹, Castles JJ, Gershwin ME: **The pathogenesis of autoimmunity in New Zealand mice.** *Semin Arthritis Rheum.* 1990 Feb;19(4):224-42.
30. Pedersen JC¹: **Hemagglutination-inhibition assay for influenza virus subtype identification and the detection and quantitation of serum antibodies to influenza virus.** *Methods Mol Biol.* 2014;1161:11-25. doi: 10.1007/978-1-4939-0758-8_2.