

Základy imunohematologie

Imunohematologie

- Immunologie aplikovaná na krevní buňky (erytrocyty, granulocyty, lymfocyty, trombocyty)
- Nauka o antigenech, protilátkách, imunitních reakcích
- Multioborová věda, klinicky využitelná při přípravě a podání transfuze a u některých jiných stavů
- Řeší specifickou imunologickou problematiku /patologie hemolytického onemocnění novorozence a autoimunitní hemolytické anemie
- Uplatnění v transplantologii (hematopoetické bb., solidní orgány)

Imunita

- Obecná definice: odolnost proti nemocem/antigenům
- Zajišťuje ji systém buněk, tkání a molekul, tzv. imunitní systém
- Jeho funkce: prevence a eradikace infekcí, rozpoznání a odpověď na cizí tkáně a nové antigeny, obrana proti tumorům
- Dva typy: **imunita přirozená** (iniciální protekce proti infekcím) a **imunita získaná** (pomalejší, ale více efektivní **specifická** obrana proti infekci)

Přirozená/nespecifická/naivní

- Stále přítomná u hostitele, brání vstupu antigenů do organismu a rychle je eliminuje
 - Neporušená bariéra **epitelu**, jeho enzymy a nepatogenní flora
 - **Humorální složky** (plazmatické = komplement, cytokiny, interferony)
 - **Buněčné složky** (fagocyty, NK lymfocyty)
 - Efektem je uniformní typ reakce
 - Tyto mechanismy **reagují s některými mikroby, ale ne s neinfekčními antigeny**

Získaná/specifická/adaptivní

- Stimulují ji antigeny, které byly **invazivní** a již vstoupily do tkání
 - Buňky-**lymfocyty** exprimují **specifické receptory**, které rozpoznávají cizorodé substance
 - Má dvě specializované funkce
 - **Humorální složku**: **protilátky** tvořené **B lymfocyty** eliminují mikroby z *extracelulárních* tekutin
 - **Buněčnou (celulární) složku**: **T lymfocyty** CD4+ a CD8+ eliminují mikroby z *buněk*
- Lymfocyty působí spolu s nespecifickými mechanizmy (protilátky se navážou na mikroby, to vede k jejich snadnější fagocytoze)

Specifická imunita

- Startuje rozpoznáním antigenu v lymfatických orgánech
- **Proliferace a klonální expanze** (rychlá proliferace buněk se stejnou antigenní specifitou) **B lymfocytů** zajistí rychlou protilátkovou odpověď
- Imunitní systém rozliší nejméně bilion různých Ag
- Klony lymfocytů se **liší jiným receptorem** pro Ag

- **Imunitní odpověď primární** (naivní lymfocyty) x **sekundární** (paměťové lymfocyty)

Specialization	Responses to distinct antigens for defense against these microbes
Nonreactivity to self antigens	Prevents injurious immune responses against host cells and tissues

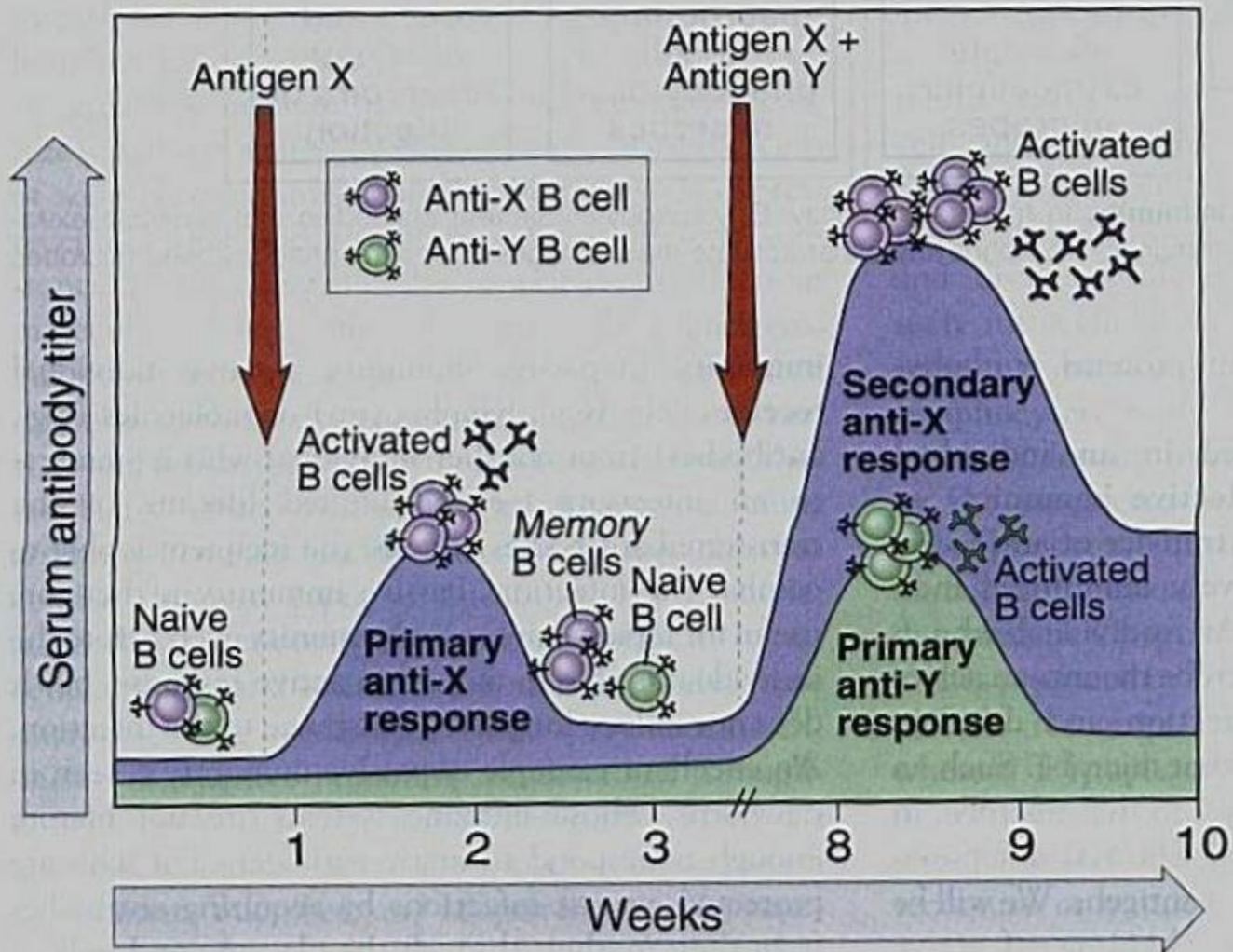


Figure 1-6 Specificity and memory in adaptive immunity. The primary response to antigen X is followed by a secondary response to antigen X. The secondary response is more rapid and larger than the primary response (memory). The primary response to antigen Y is different from the primary response to antigen X, reflecting specificity. Antibody levels decline with each immunization.

Buňky v imunitní reakci

Lymfocyty

- *Exprimují specifické receptory pro antigeny (BCR, TCR)*
- *Jsou to povrchové membránové proteiny (CD znaky)*
 - U B ly jsou to membránové Ig = protilátky. Reagují se solubilními Ag a s různými povrchovými Ag, na které se navazují
 - U T ly jsou receptory pro proteinové Ag: T_{helper} CD4+, T_{cytolytic} CD8+, T_{reg/suppressor}
- *Paměťové lymfocyty přežívají v klidu, po dalším kontaktu s původním antigenem navodí sekundární odpověď*

Imunohematologie = **protilátkový typ** specifické imunitní odpovědi

Protilátky /imunoglobuliny

- produkty B lymfocytů
- přítomné na membráně lymfocytů jako antigenní receptory BCR nebo rozpuštěné jako proteiny v krvi a v mukozních tekutinách
- neutralizují a eliminují antigeny z krve a z lumen mukozních orgánů
- nepůsobí uvnitř buněk
- rozeznávají jen určité typy mikrobiálních molekul (proteiny, sacharidy, lipidy) x T lymfo (proteiny)

Protilátky / imunoglobuliny

- 2 funkce: rozpoznání Ag + sekrece Ab
 - B receptor imunoglobulinu rozeznává tvar antigenu nebo jednoduché chemické skupiny antigenu
 - B receptor tvoří domény (3-dimenzní tvar), kterými se klony lymfocytů liší
-
- Dva typy řetězců: typ L (lehké) a typ H (těžké)
 - Lehké řetězce: kappa, lambda
 - Těžké řetězce: mí, delta, gamma, alfa, epsilon

Immunoglobuliny

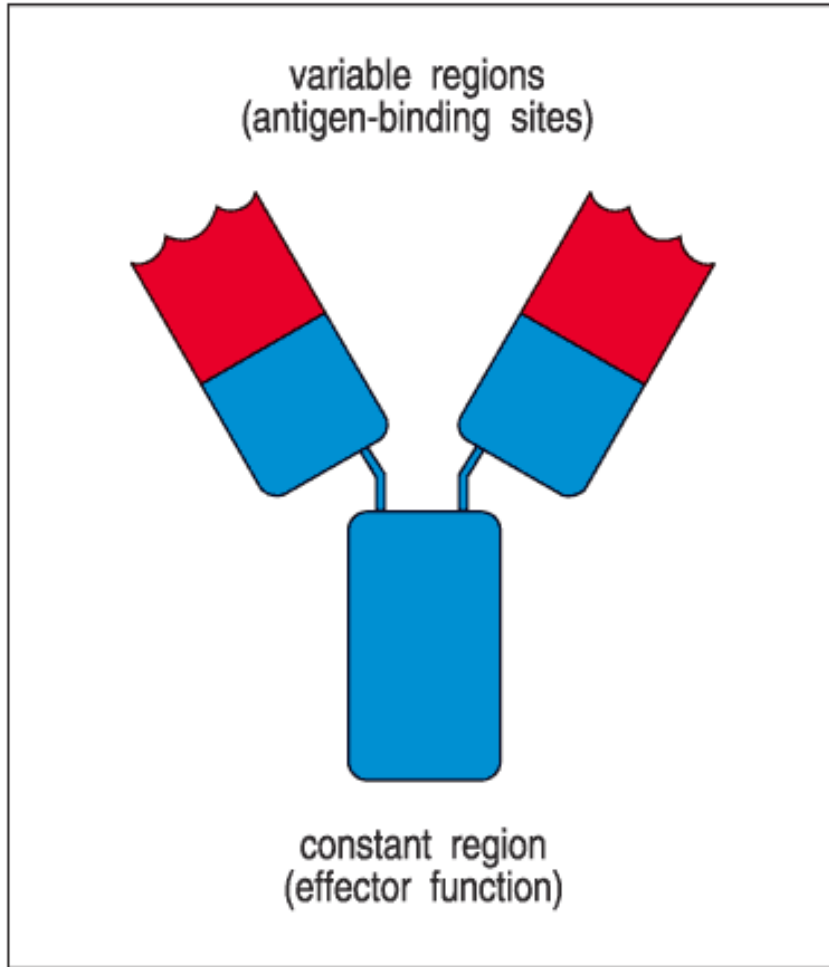


Fig 1.16 © 2001 Garland Science

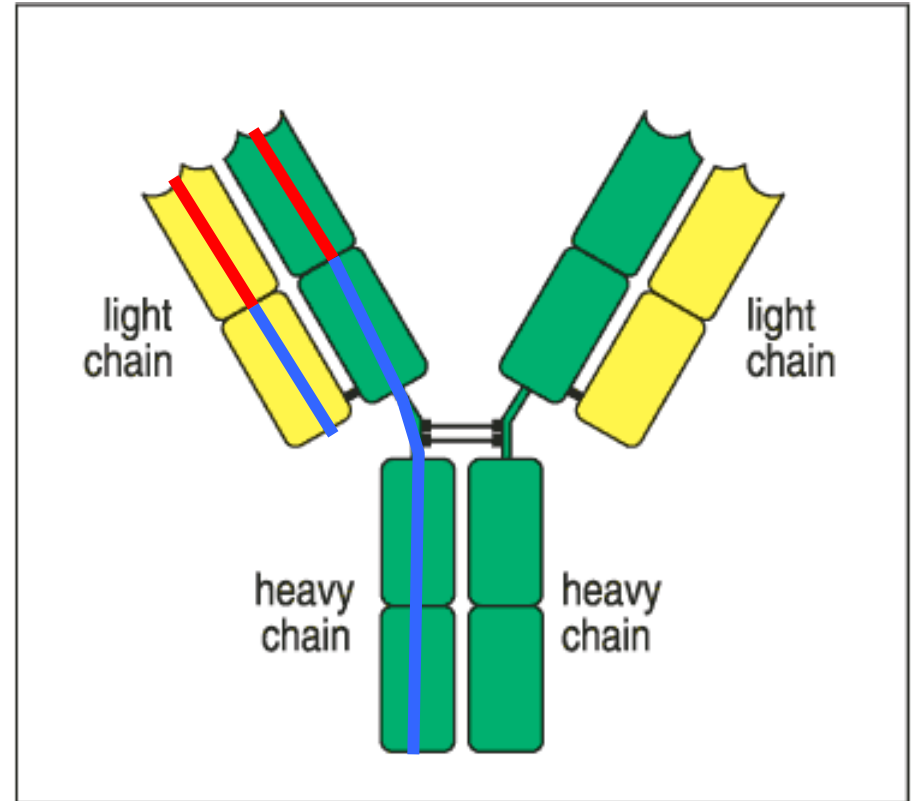


Fig 1.17 © 2001 Garland Science

Struktura protilátky

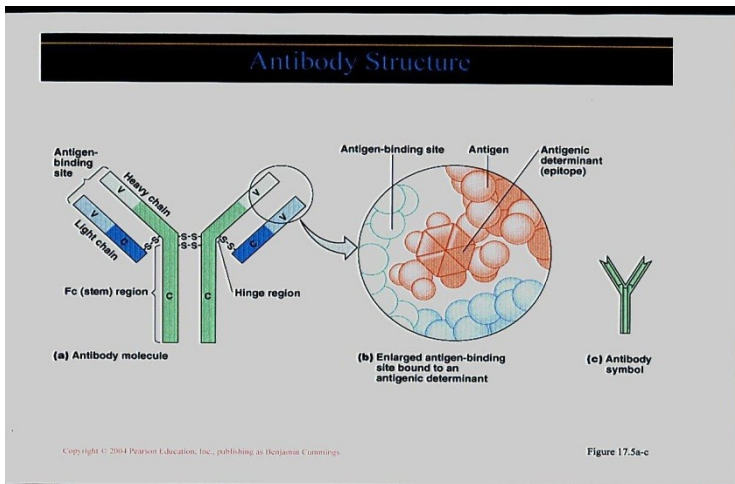
- 4 polypeptidové řetězce protilátky H₂L₂
- Každý obsahuje dva identické H a identické L řetězce
- Tvoří tvar písmene Y, vzájemně spojené L a H řetězce
- Dva fragmenty Fab + jeden fragment Fc, mezi nimi flexibilní pantová oblast
- Variabilní část obsahuje oblast (paratop) pro vazbu antigenu

Struktura protilátky

Monomery IgG, IgD, IgE = dvě vazebná místa pro Ag

Dimer IgA = čtyři vazebná místa pro Ag

Pentamer IgM (hexamer) = deset (dvanáct) míst pro Ag



IgM antibodies

- Pentamer
- 5-10% of serum antibodies
- Fix complement
- In blood, lymph, on B cells
- Agglutinates microbes; first Ab produced in response to infection
- Half-life = 5 days

The diagram shows a pentamer of IgM antibodies, consisting of five Y-shaped units arranged in a circle and connected by a central J chain and disulfide bonds.

Disulfide bond

J chain

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

IgA antibodies

- Dimer
- 10-15% of serum antibodies
- In secretions
- Mucosal protection
- Half-life = 6 days

The diagram shows a dimer of IgA antibodies, consisting of two Y-shaped units connected by a J chain and a secretory component.

J chain

Secretory component

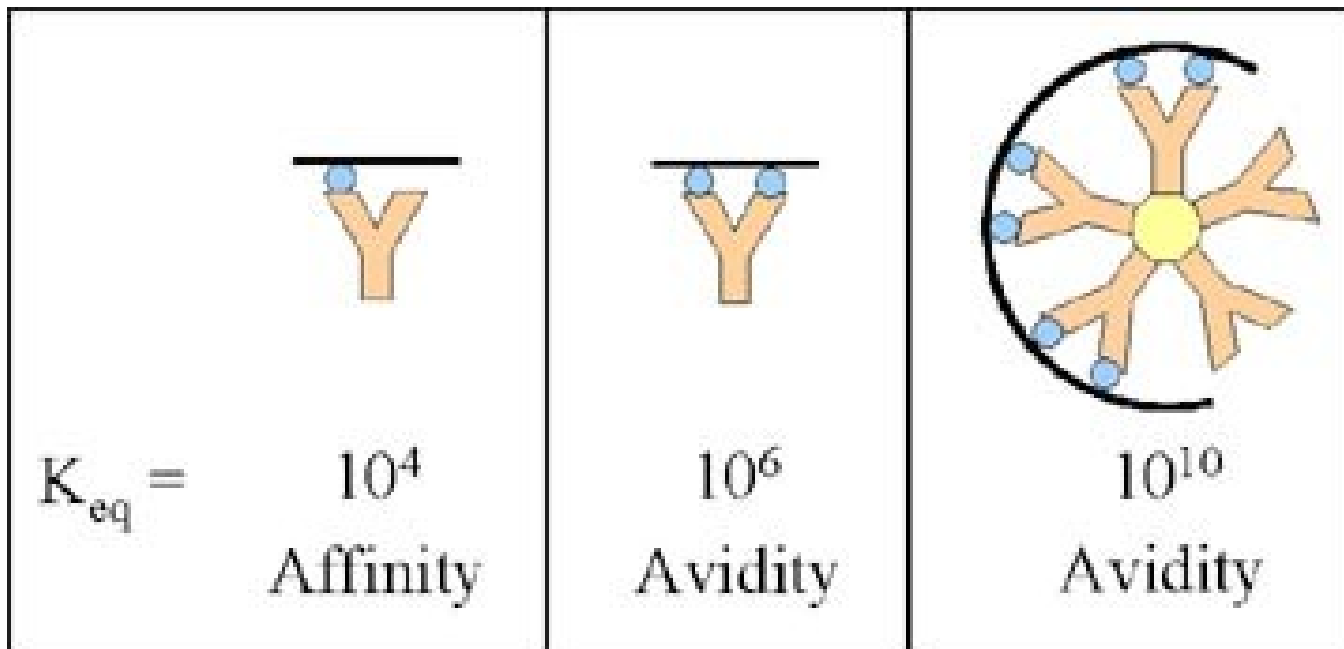
Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Afinita: Síla reakce mezi 1 antigenní determinantou a 1 vazebným místem Ab

Avidita: síla vazby mezi multivalentními Abs a Ag s různými antigenními determinantami

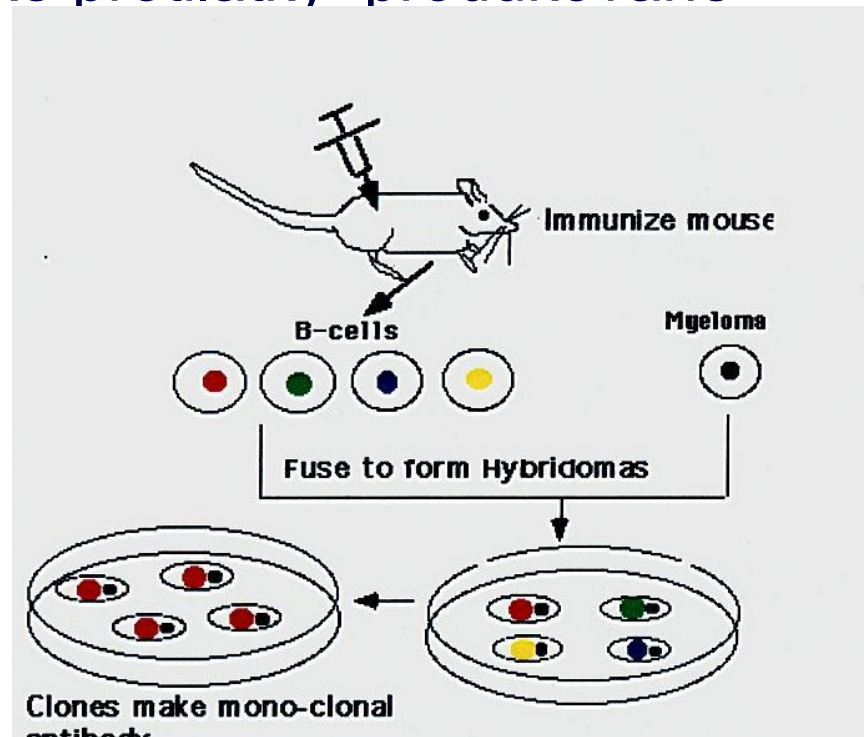
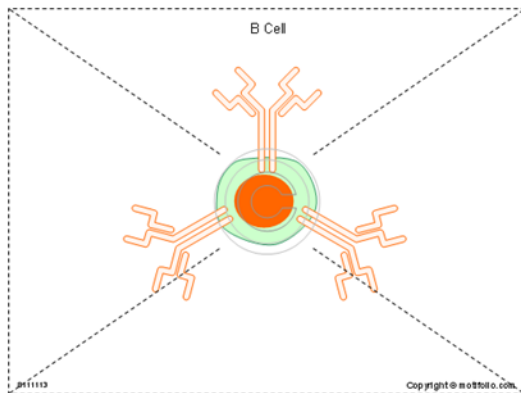
Specifita: schopnost Ab reagovat s jen 1 antigenní determinantou

Cross-reakce: schopnost protilátky reagovat s více antigenními determinantami



Typy protilátek dle způsobu výroby

- **Polyklonální Abs** (lidské): pocházejí z různých buněčných linií lymfocytů, rozeznávají různé typy stejně specifických epitopů
- **Monoklonální Abs**: identické protilátky produkované jedním klonem lymfocytu, rozeznávají jeden určitý epitop

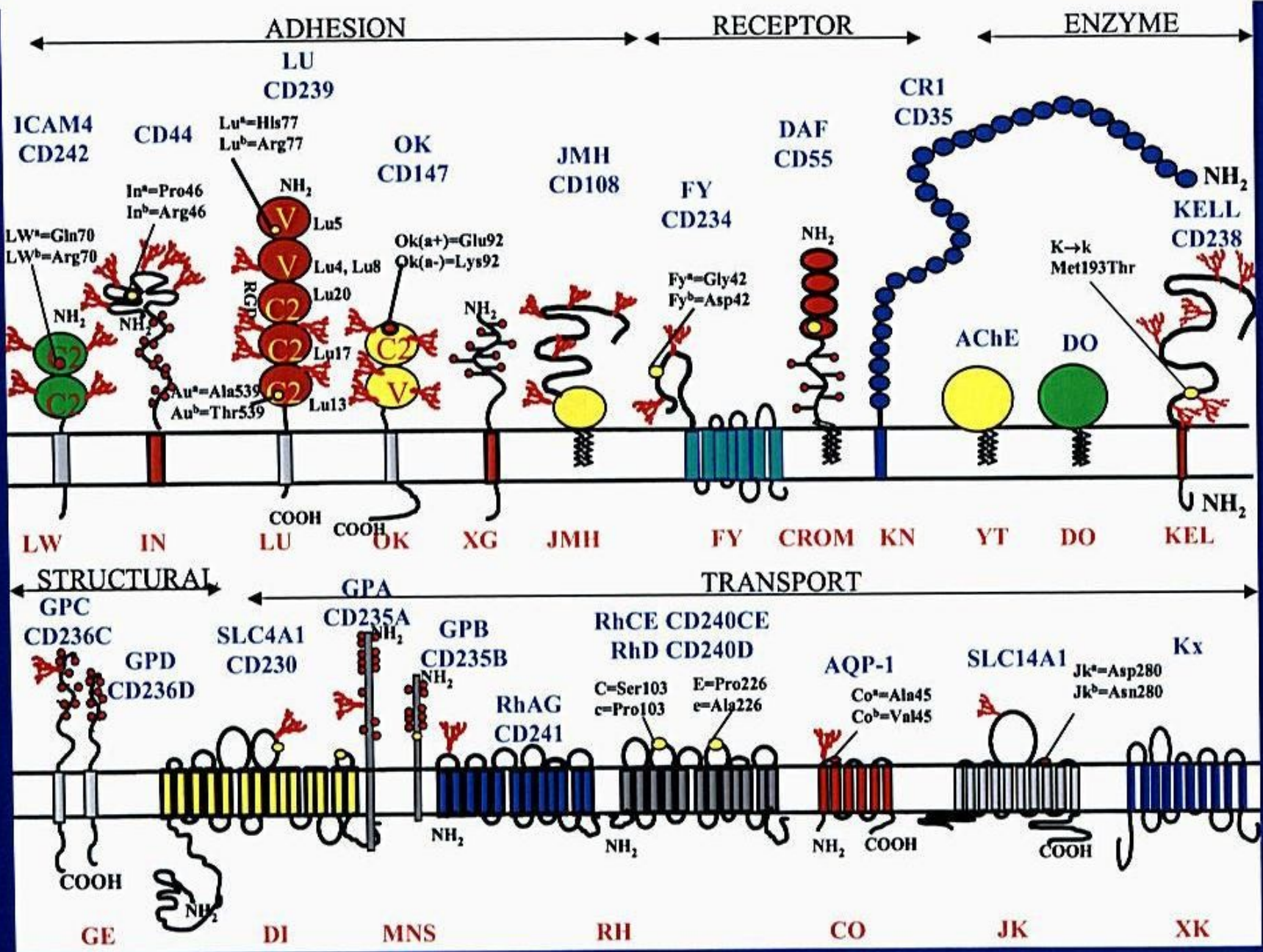


Antigeny

- Cizí substance navozující imunitní odpověď
- Cizí oblasti = **antigenní determinanty (epitopy)**
- Jeden antigen může mít různé epitopy
- Ne všechny oblasti antigenu jsou cizorodé = **imunodominantní**
- Antigeny v imunohematologii
 - HLA (histokompatibilní, transplantační) antigeny
 - Krevní skupiny erytrocytů

Krevní skupiny

- **Antigeny erytrocytů = krevní skupiny**
 - zajišťují transport vody, urey, iontů
 - jsou receptory pro mikroorganismy
 - mají adhesivní funkce
 - jsou enzymaticky aktivní
 - udržují morfologické a strukturální vlastnosti erys
- Antigenicita dle
 - Typu a hustoty antigenu na erys
 - Rozpustnosti antigenu v plazmě



Krevní skupiny

- Obvykle velké molekuly, složené sloučeniny (proteiny, polysacharidy, lipidy, NK)
- Větší molekuly a komplexy molekul = lepší imunogeny
- Imunogenicita závisí na stupni cizorodosti, strukturální stabilitě molekuly, dostatečném počtu Ag determinant, době expozice Ag, způsobu podání
- Autoantigeny vznikají při selhání autotolerance
- Hapten = malá molekula neimunogenní, spojuje se s větším nosičem

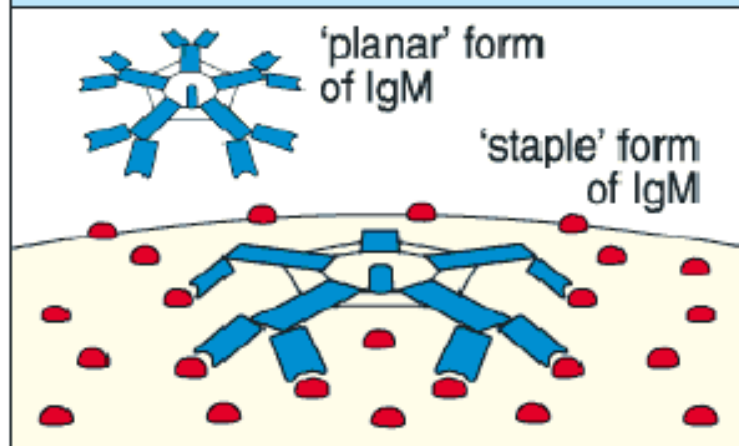
Komplementový systém

- Komplex proteinů v plazmě a proteiny vázané na povrchu různých buněk
- Převážně proteolytické enzymy
 - enzymatická kaskáda při aktivaci
 - aktivované proteiny štěpí další složky komplementu
 - vzniká velký počet efektorových molekul
- Funkce v obranyschopnosti

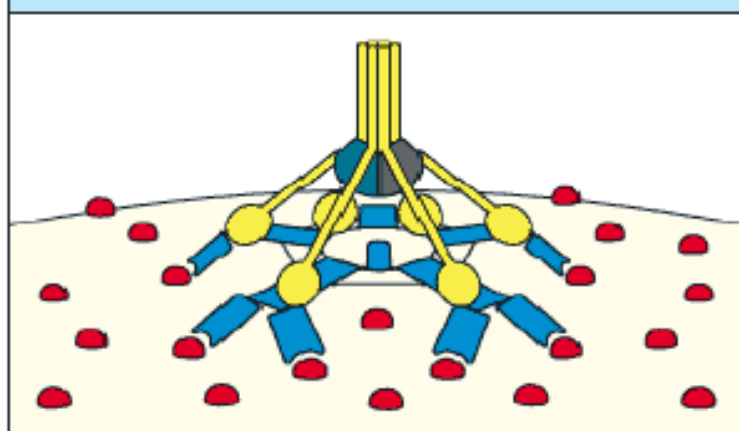
Aktivace komplementu

- Mikrobiální nebo protilátkami navázanými na antigenech
- 3 aktivační cesty: **klasická/protilátková**
lektinová
alternativní
- Odlišné spouštěcí mechanismy aktivace
- V imunohematologii aktivace protilátkami: *1 molekula IgM* stačí pro vazbu C1q, ale pro stejnou vazbu musí být *2 molekuly IgG*

Pentameric IgM molecules bind to antigens on the bacterial surface and adopt 'staple' form

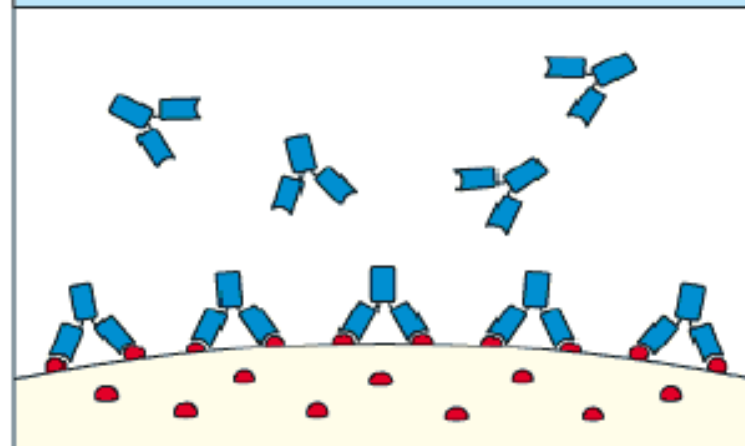


C1q binds to one bound IgM molecule

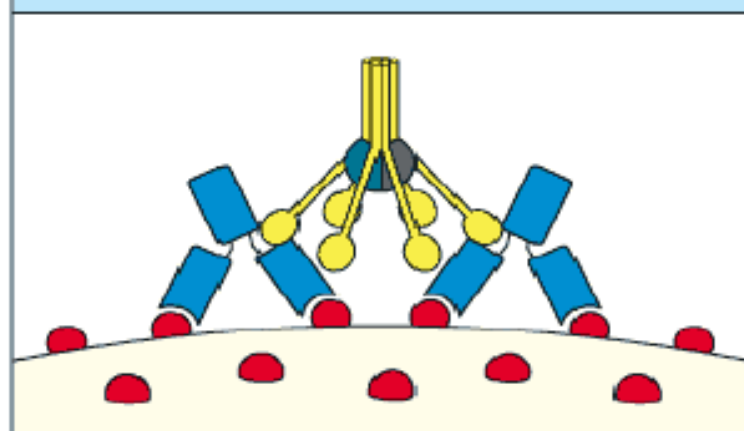


Binding of C1q to Ig activates C1r, which cleaves and activates the serine protease C1s

IgG molecules bind to antigens on the bacterial surface



C1q binds to at least two IgG molecules

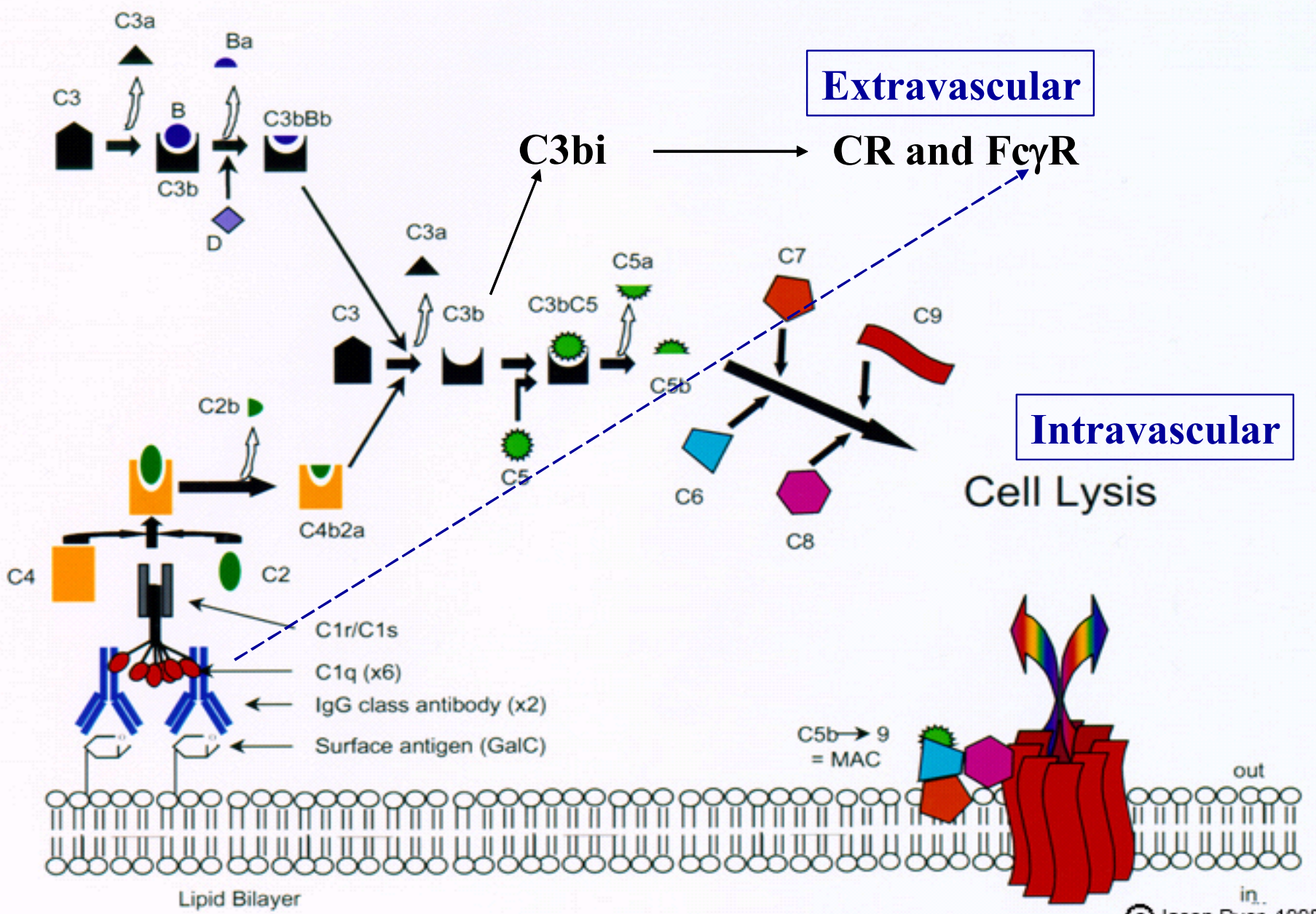


Působení komplementu na erytrocyty

- Velké množství = intravaskulární hemolýza erytrocytů
- Malé množství = extravaskulární hemolýza v RES = fagocytóza erytrocytů

např. pozdní HTR, HON, warm AIHAfagocytoza

např. akutní HTR při AB0 neshodě, cold AIHA.....i.v.lýza



Komplementové inhibiční mechanismy

Regulace na úrovni:

- C1qC1 INH
- C3konvertáza.....DAF, C4BP, CR1
- C5 konvertáza.....CR1, H
- MAC.....CD59

Imunologická tolerance, autoimunita

- Imunologická **tolerance**: intaktní imunitní systém **rozezná vlastní tkáň od cizích**
- Vlastní antigeny toleruje = lymfocyty na ně nereagují
- Selhání zabezpečovacích mechanismů vede k poruše autotolerance, ke vzniku autoimunitních onemocnění

Autoimunita

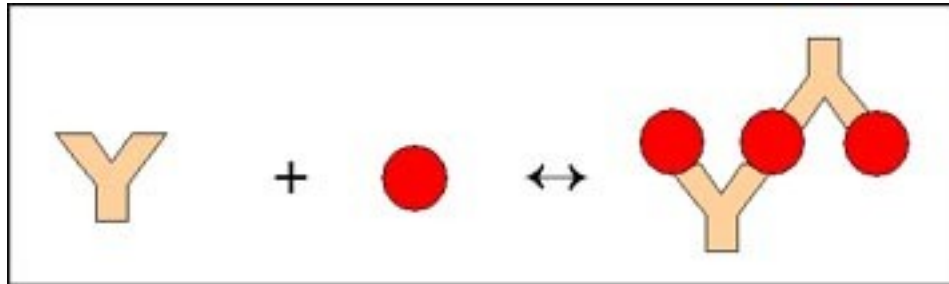
- Reakce proti vlastním antigenům v důsledku selhání fyziologické regulace imunitních procesů = selhání regulačních procesů lymfocytů – unikají kontrole
- Nadměrná produkce protilátek nebo cytotoxických lymfocytů vede k poškození tkání
- Dědičná dispozice (MHC geny i non-HLA geny) + spouštěcí faktory z okolí (infekce, záněty)
- U 1-2% jedinců je manifestní porucha autoimunity
- Různé orgánové projevy – revmatoidní artritida, lupus erytematodes, autoimunní hemolytická anemie

Laboratorní techniky používané v imunohematologii

Cíl: detekce imunních komplexů Ag+Ab

- **Aglutinační reakce** (antigen = partikule ery, trc, leu)
- Vzácně jiné metody (ELISA, imunofluorescence, PCR, FCM, chipové..)
- Různé aglutinační techniky - testy sklíčkové, zkumavkové, pevná fáze, **sloupcová aglutinace v gelu**
- Testy při teplotě 20-23°C (RT), 4°C, **37°C**

Pasivní /přímá aglutinace kvalitativní

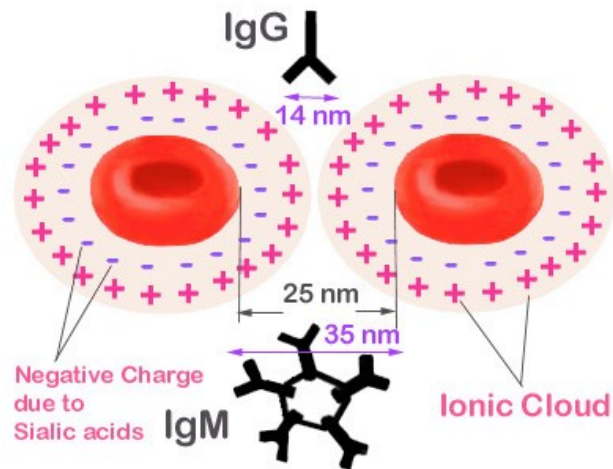


Titr / prozona - aglutinace kvantitativní

Patient	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	Pos.	Neg.	Titer
1	●	●	●	●	●	●	○	○	○	○	●	○	64
2	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	●	○	8
3	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	●	○	512
4	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	●	○	<2
5	●	●	●	●	●	○	○	○	○	○	●	○	32
6	○	○	●	●	●	●	●	○	○	○	●	○	128
7	●	●	●	●	●	○	○	○	○	○	●	○	32
8	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○	●	○	4

Zeta potenciál – elektronegativní pole brání autoagregaci erytrocytů

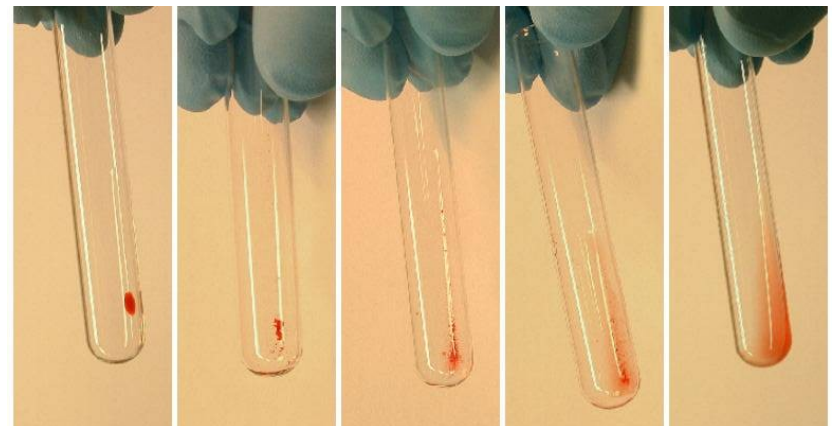
Mechanism of Red Cell Agglutination



Aglutinace

- Použití při vyšetření krevních skupin, při vyšetření protilátek proti erytrocytům, v předtransfuzních testech
- **Přímá a nepřímá (vyžaduje pomoc) aglutinace**
- Vliv komplementu na výsledek reakce/ hemolýza – falešně negativní výsledek- prevence antikoagulací

	Anti-A	Anti-B	Anti-AB		A cells	B cells	O cells
A							
B							
AB							
O							



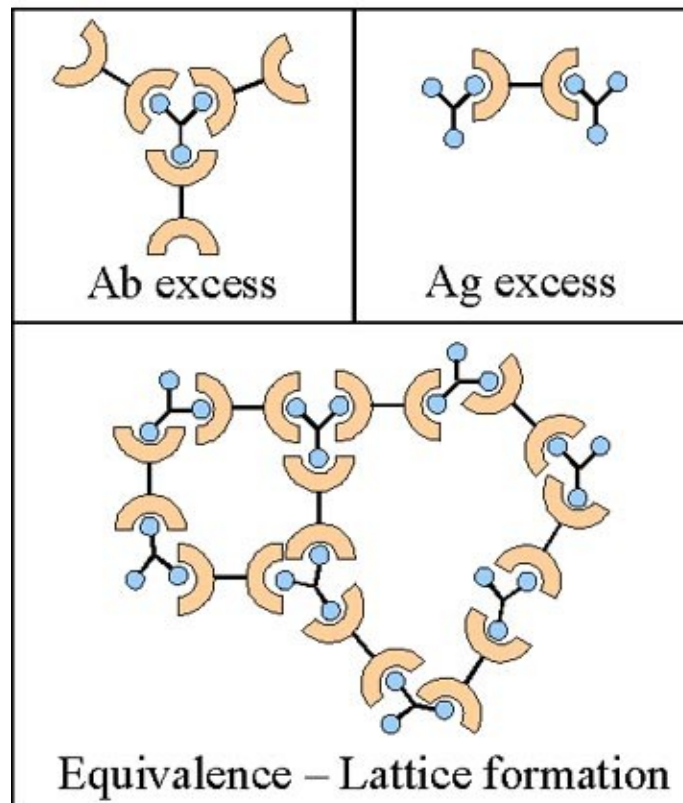
Aglutinace přímá

- 1. fáze **senzibilizace**

Vytvoření **slabé vazby mezi Ag a Ab** závisí na

- Izotypu Ig (IgM, IgG, vzácně IgA)
- Teplotě (klinický význam 37°C, při vyšší teplotě disociace molekul Ab z vazby, při nižší teplotě prodloužení inkubace)
- Iontové síle prostředí (obsah iontů Na a Cl = izotonický roztok PBS, neutralizující efekt. Při použití LISS rychlejší vznik imunních komplexů)

- pH prostředí (přijatelné cca 7. Pro některé Ab individuální. PBS zajišťuje alkalizaci. V nižším pH disociace Ab)
- Počtu antigenních míst /densitě (nadbytek Ag x nadbytek Ab), poměr sérum/erys (snížení vede k vyšší senzitivě testu)



- 2. fáze **aglutinace**

Vytvoření **pevného spojení mezi Ag a Ab**

- Vznik pevných chemických vazeb mezi senzibilizovanými erys (protilátky spolehlivě přemostí a vzájemně spojí erythrocyty)
- **To lze ovlivnit** (vzdálenosti mezi erys) centrifugací, proteolytickými fermenty, koloidy, polymery, additivy testů , chemickými úpravami diagnostických protilátek

Aglutinace nepřímá

- Zásadní test v imunohematologii
- Hlavně pro IgG protilátky, které nejsou schopné přímé aglutinace
- Detekuje i jiné typy protilátek podle použitého AGH
- Nepřímá aglutinace vyžaduje modifikovat 2. fázi a nějakým způsobem **vizualizovat vzniklé imunní komplexy**:
 1. úprava erytrocytů pomocí enzymů
 2. **použití testu s AGH sérem** (antiglobulin human)

Nepřímá aglutinace

1. Enzymové testy:

- Bromelin, ficin, papain, trypsin
 - štěpí kyselinu sialovou (neuraminovou) na membráně erys, odkrývá antigenní místa a membránové antigeny se tak stávají dostupnější pro protilátky
 - snižují elektronegativní povrchový náboj erys a vzájemně je přibližují, umožňují tím navázání protilátky
 - v prostředí s enzymem získává protilátka vyšší schopnost aglutinovat erys (nevýhoda:mohou se demaskovat nežádoucí antigeny/kryptantigen)
- Obtížná standardizace enzymových testů (nespecifické reakce)
- Jednofázový (přidání enzymu do reakce) x dvoufázový (enzymované erys) test

Nepřímá aglutinace

2. AGH testy:

- Pro vyšetření protilátek v séru a navázaných na erys, zkoušku kompatibility, vyšetření některých krevních skupin
- Používají **protilátky proti lidským proteinům (antiglobulin = AGH sérum)**
- Senzitivní technika cca (až 150 molekul Ab/ery)
- Různé metody: testy zkumavkové, pevná fáze, sloupcová aglutinace
- Modifikace testů se zkrácením doby inkubace v LISS, užití PEG
- Velké riziko chyb a falešných výsledků

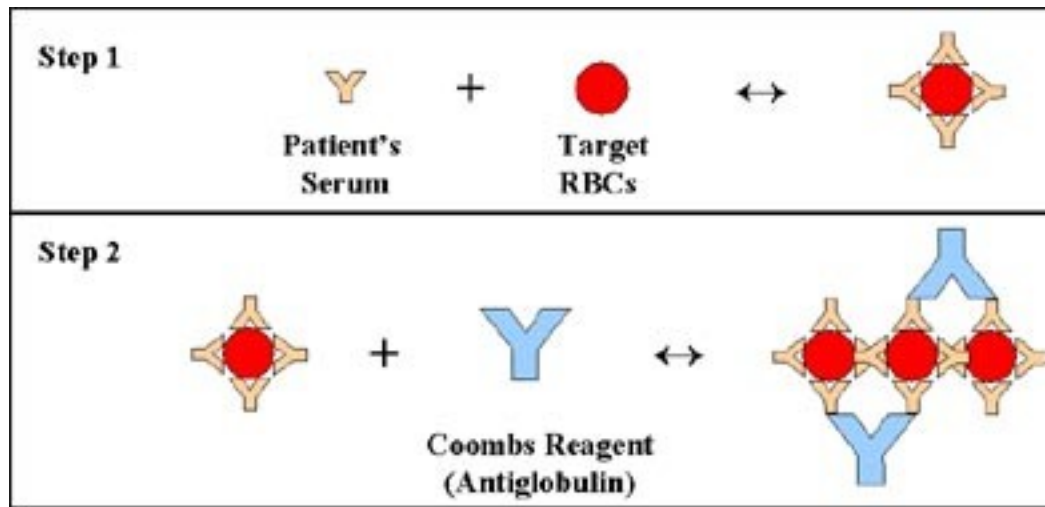
AGH testy

- AGH detekuje lidské proteiny: protilátky a komplement
- Reaktivita AGH s různými lidskými globuliny (anti-IgG,-IgM,-IgA,-C3d..)
- AGH reaguje s navázanými nebo volnými protilátkami za vzniku aglutinace

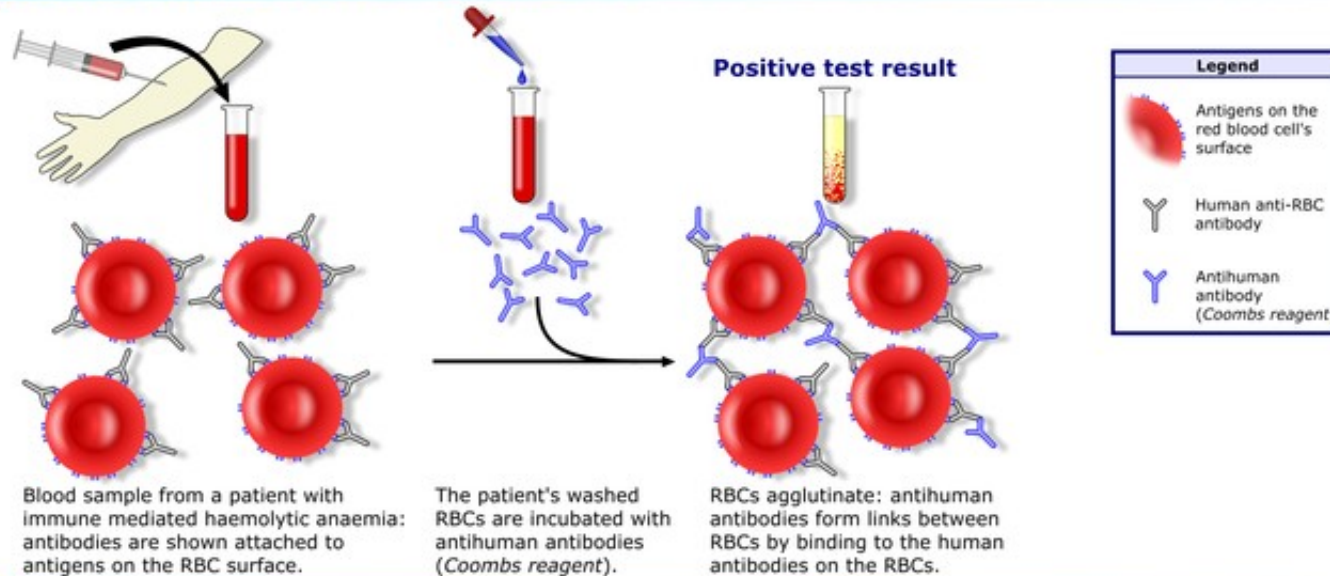
Dva typy AGH testů:

1. **Přímý AGH test (PAT)** pro detekci protilátek navázaných na erys
1. **Nepřímý AHG test (NAT)** pro detekci protilátek v séru

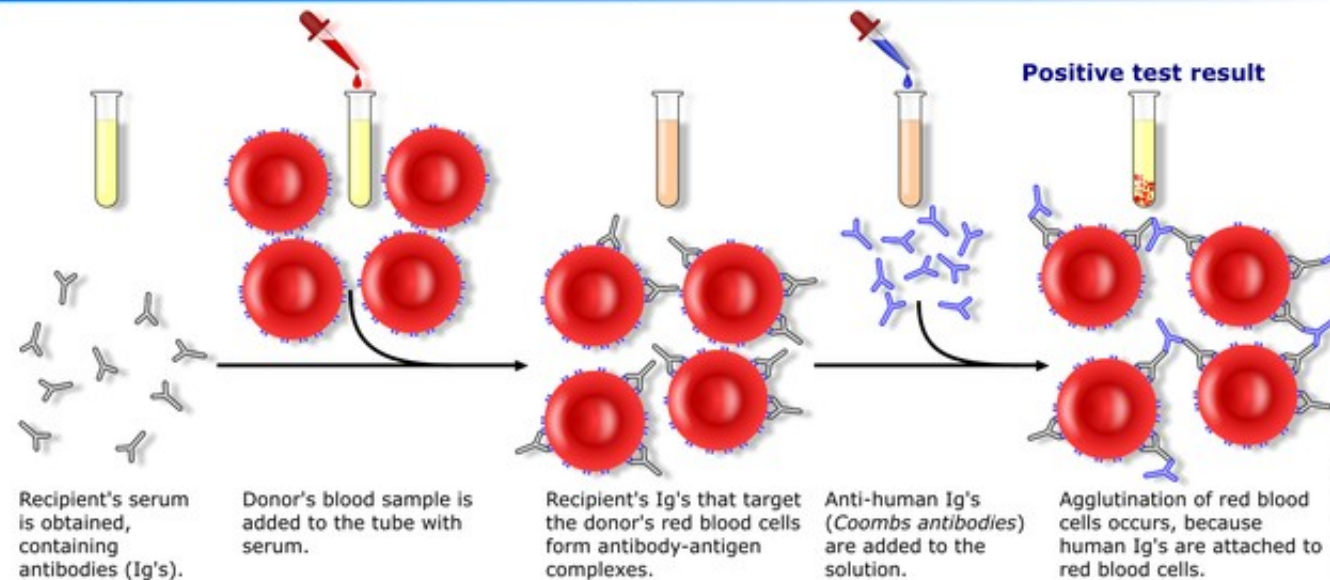
Princip AGH reakce



Direct Coombs test / Direct antiglobulin test



Indirect Coombs test / Indirect antiglobulin test



AGH reagencie/séra

Polyspecifické AGH (-IgG, -C3d):

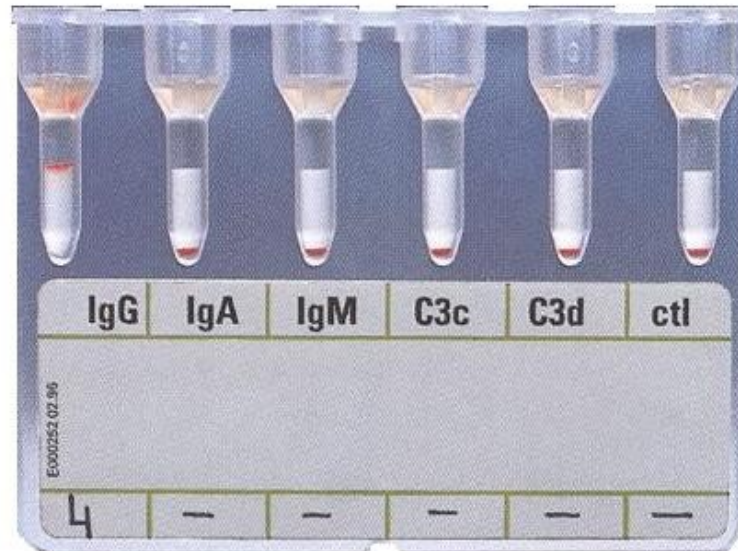
- Zásadní důležitost: detekuje IgG protilátky navázané (senzibilizující) na erys i protilátky volně přítomné v séru
- Detekuje všechny klinicky významné protilátky

Monospecifická AGH:

Anti-IgG sérum: detekuje pouze protilátky IgG na erys
(lze použít)

Anti-C3 sérum: detekuje komplement na erys (jen pro některé situace)

Monospecifická AGH séra



Monospecifická AGH IgG a C3d



Hodnocení

negativní

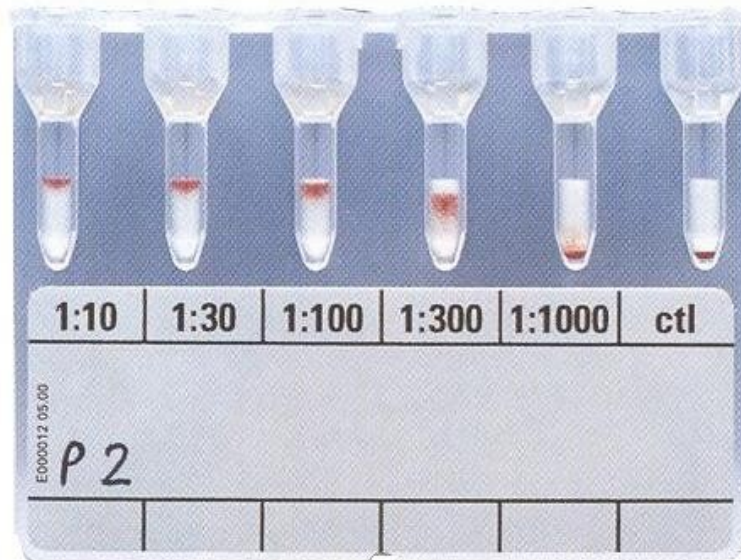
pozitivní do ředění 30

pozitivní vyšší než 30

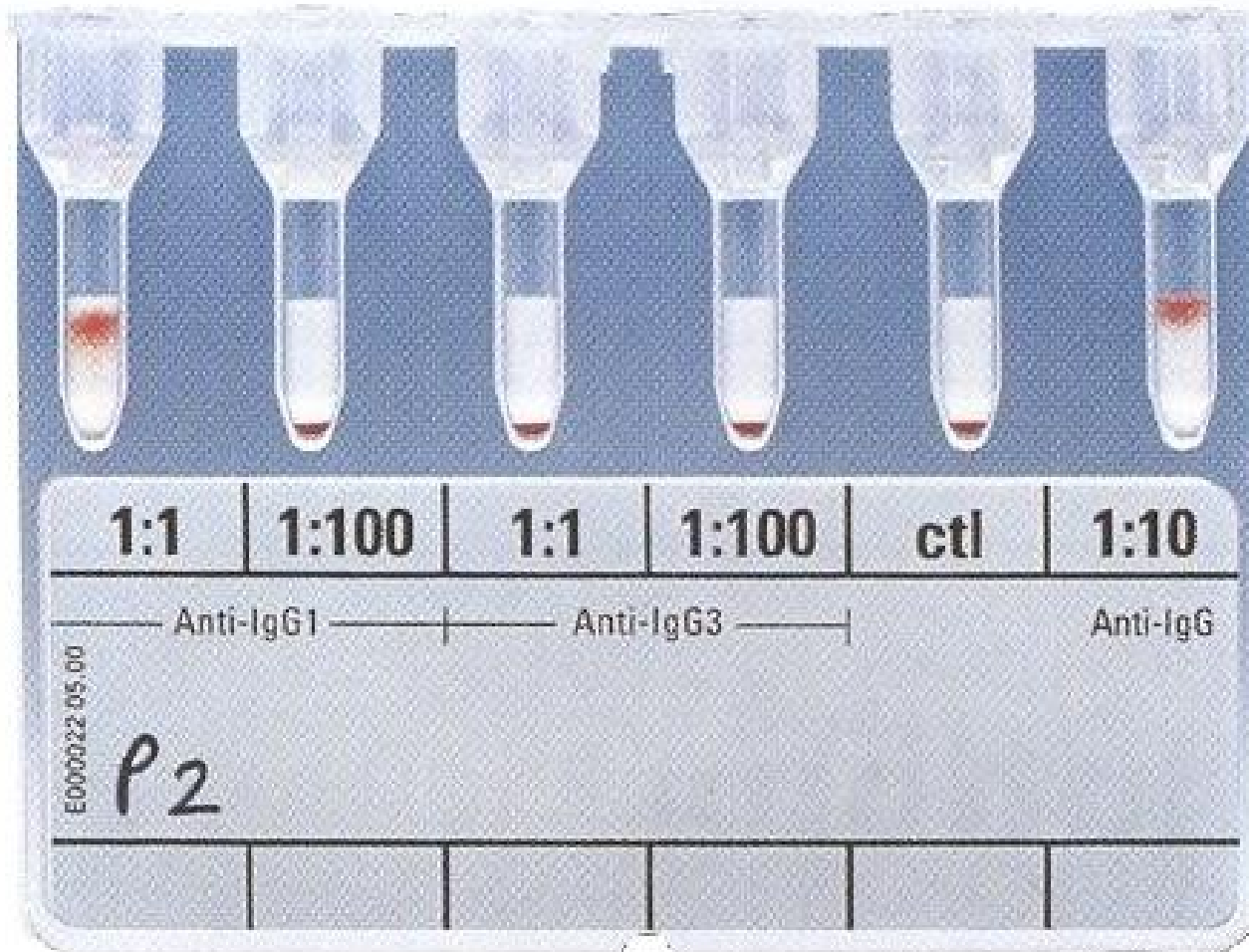
bez rizika hemolýzy

malé riziko hemolýzy

velké riziko hemolýzy



IgG1 a IgG3



Co ovlivní senzitivitu AGH testu?

- Teplota prostředí
- Ionty v prostředí
- Poměr séra/erytrocytů (2kp séra : 1kp ery)
- Doba inkubace (pro IgG 15min při 37°C v LISS)
- Variabilní senzitivita testu (slabý test při méně než 200 molekulách navázané protilátky)

Aktuální doporučení: AGH test s použitím roztoku o nízké iontové síle (LISS), optimální je použití metody sloupcové aglutinace v gelovém mediu

Nevýhody AGH testů souvisí s promýváním erytrocytů (zkumavkové testy)

Výsledky falešně pozitivní

Spontánní aglutinace, autoprotilátky, kryptantigeny, hypercentrifugace, silikonové zkumavky, volumexpandery, kontaminovaný materiál aj.

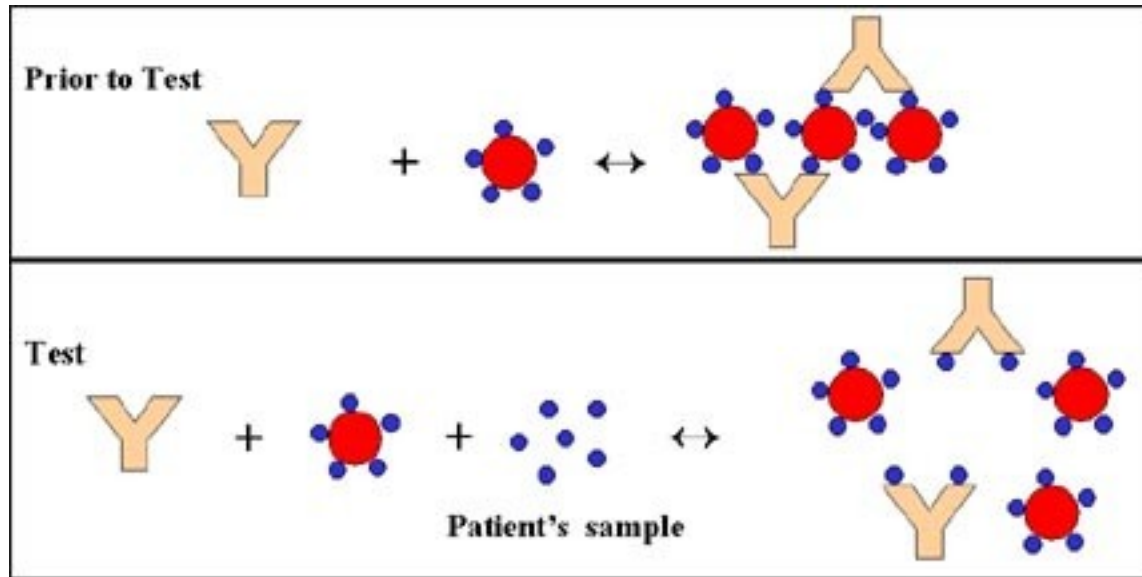
Výsledky falešně negativní

Chyba promytí s neutralizací přidaného AGH volnými protilátkami, časové prodlení, nedodržení teploty, kvalita AGH, podcentrifugování, prozora, technické chyby

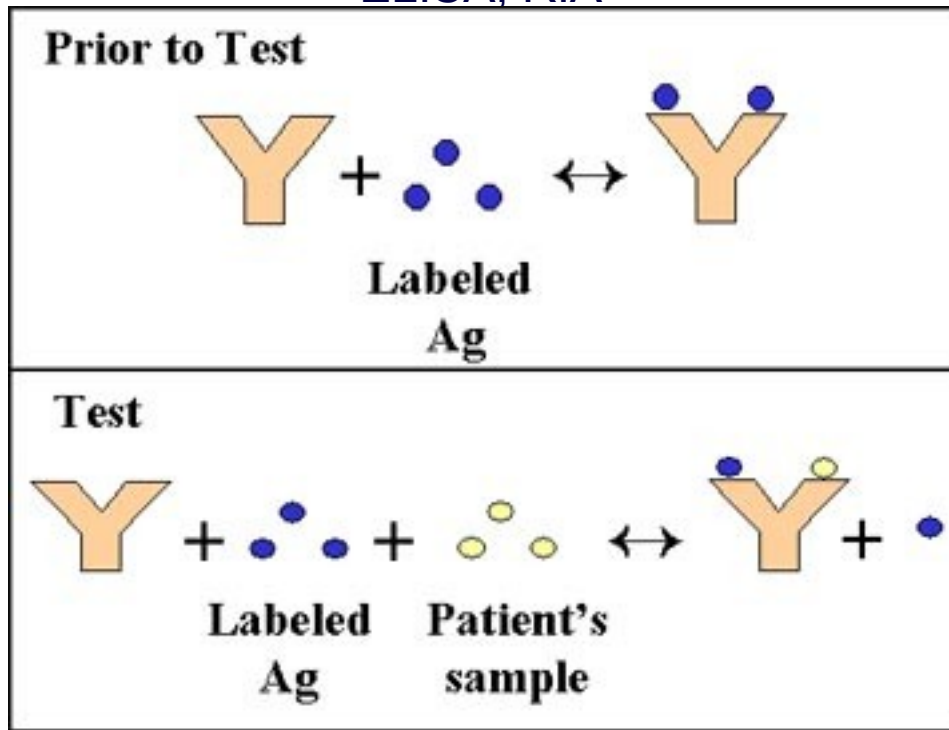
Kontrola přidáním erytrocytů s navázanou slabou protilátkou k negativnímu test = vznikne aglutinace

Jiné typy imunohematologických vyšetření

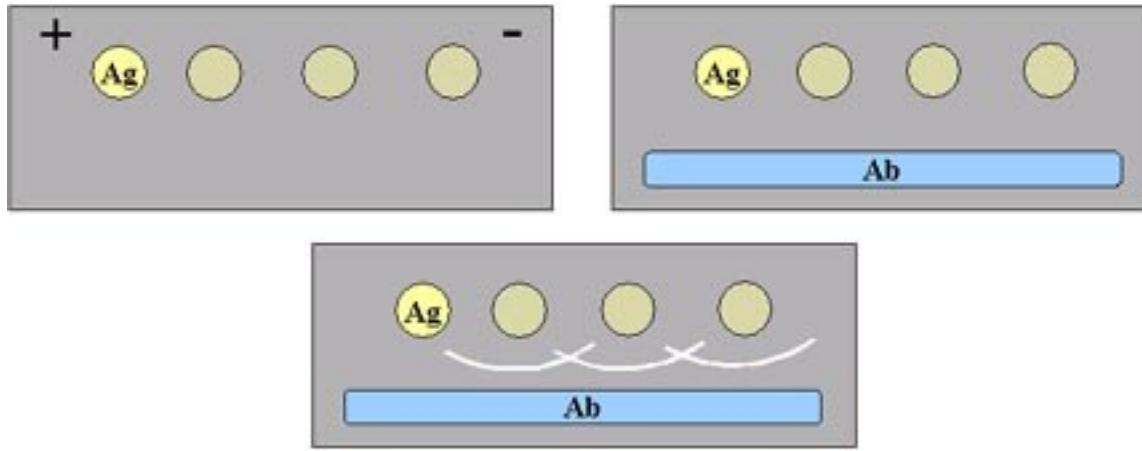
Inhibice hemaglutinace/solubilní Ag



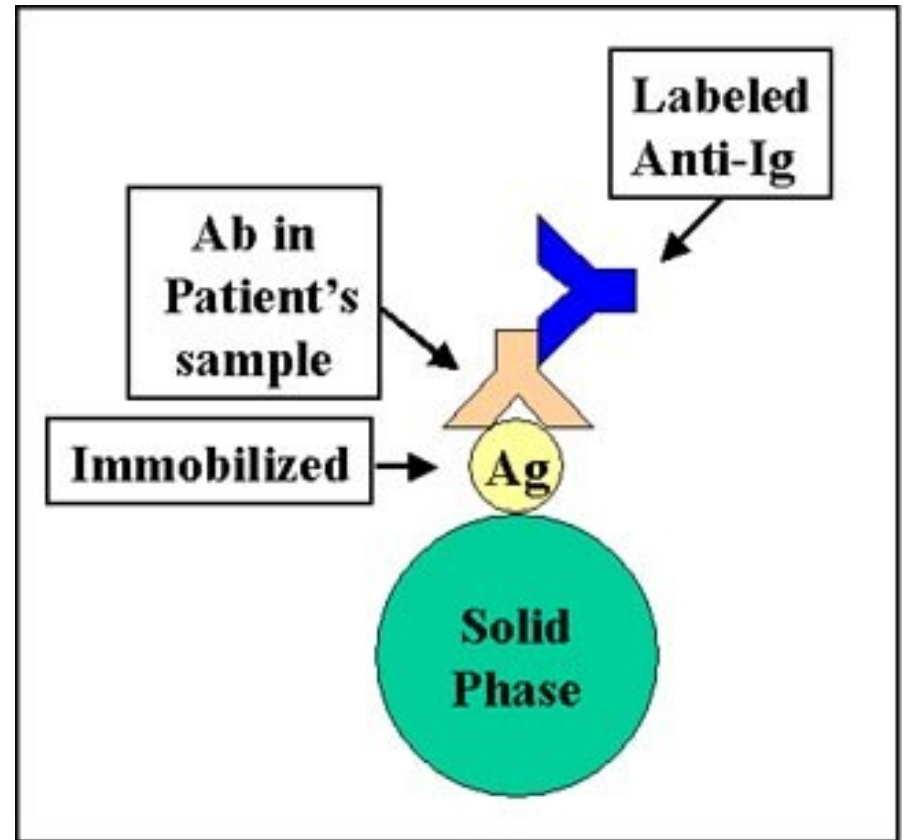
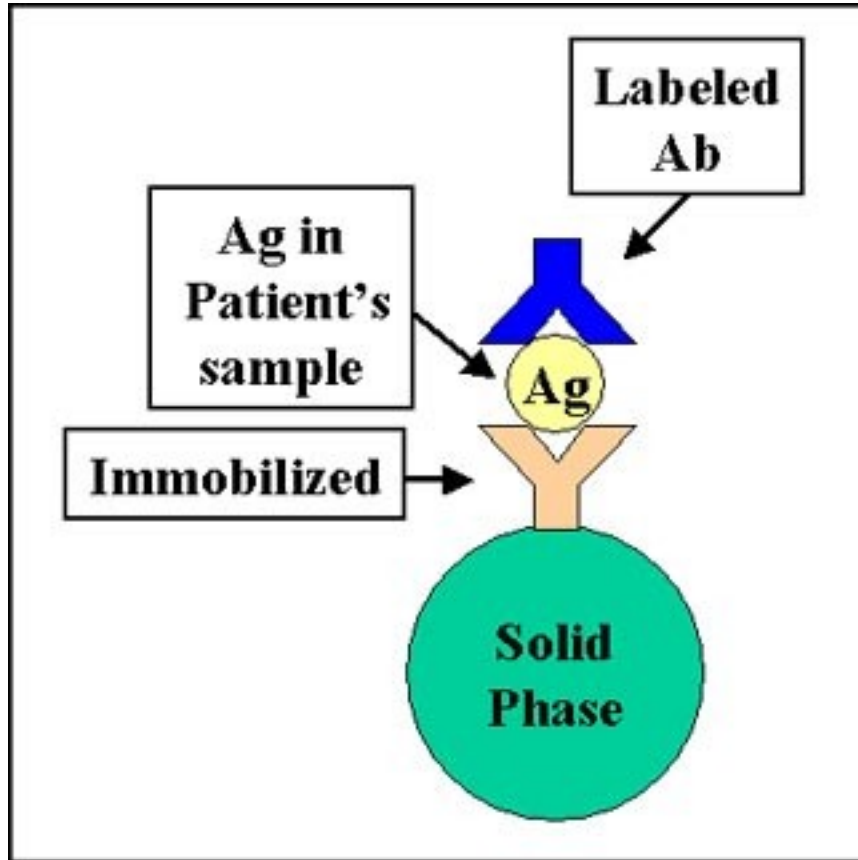
ELISA, RIA



Imunoelektroforeza

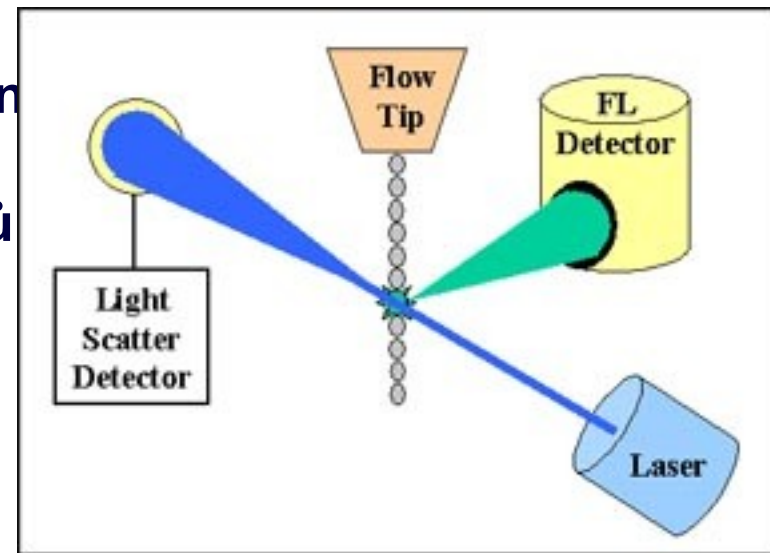


Pevná fáze



Flowcytometrie

- Měření imunofluorescence bb. suspen
- Individuálně prováděné vyšetření
- Určení slabě exprimovaných antigenů
- Odlišení dvojí populace erys (FMH)



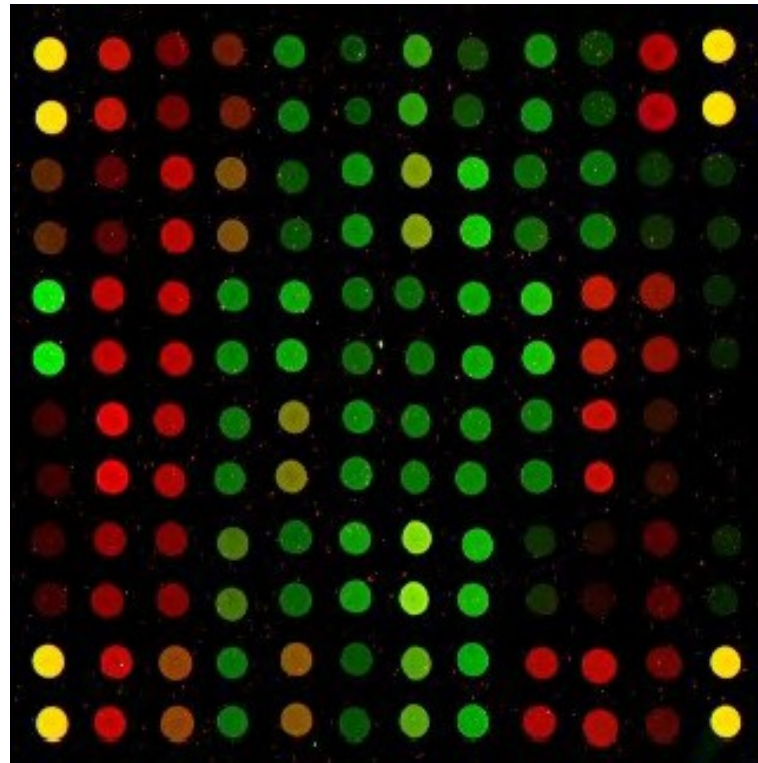
Molekulárně genetické metody

- Určení polymorfizmů krevních skupin při genotypizaci dárce/pacienta/plodu, pacienta po transfuzi apod.

- **BloodChip**

DNA microarray hybridization

**Stanovení genotypů: 33 AB0, 87 RhD, 9 RHCE, 8 KEL, 4 JK,
4 Fy, 9 MNS, 2 DI, 2 DO, 2 CO**



Speciální testy v imunohematologii

- Eluční testy k disociaci IgG protilátky z vazby na erys
- Adsorpční testy k průkazu protilátky/autoprottilátky, k separaci protilátky ze směsi, k průkazu imunních komplexů a léků na erys, k potvrzení slabých antigenů
- Určení tříd Ig – odlišení Ig - disociace aglutinátů tvořených IgM protilátkami
- Neutralizace (inhibice) protilátky překrývající jinou protilátku (substance)
- Stanovení rozpustných krevních skupin – vylučovatelství
- Kombinace technik