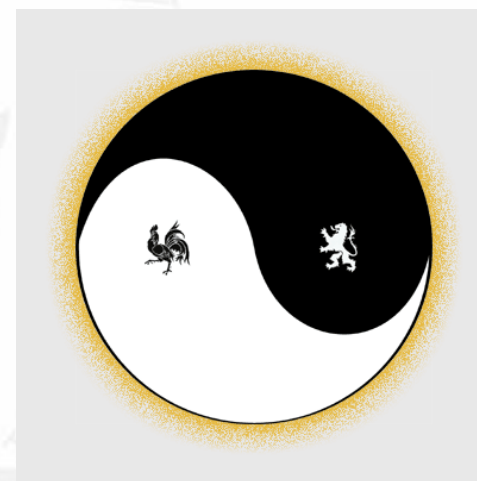


Ellenanyagok kimutatása diagnosztikai/prognosztikai célból



Dr. Prohászka Zoltán
Az MTA doktora
Semmelweis Egyetem
III. Sz. Belgyógyászati Klinika
2012-03-27
prohoz@kut.sote.hu



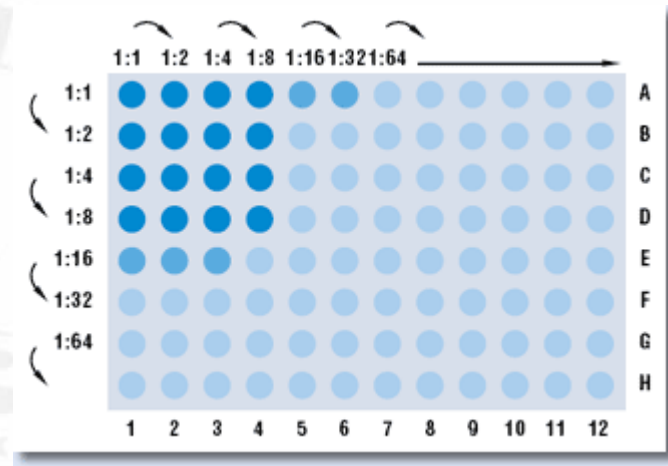




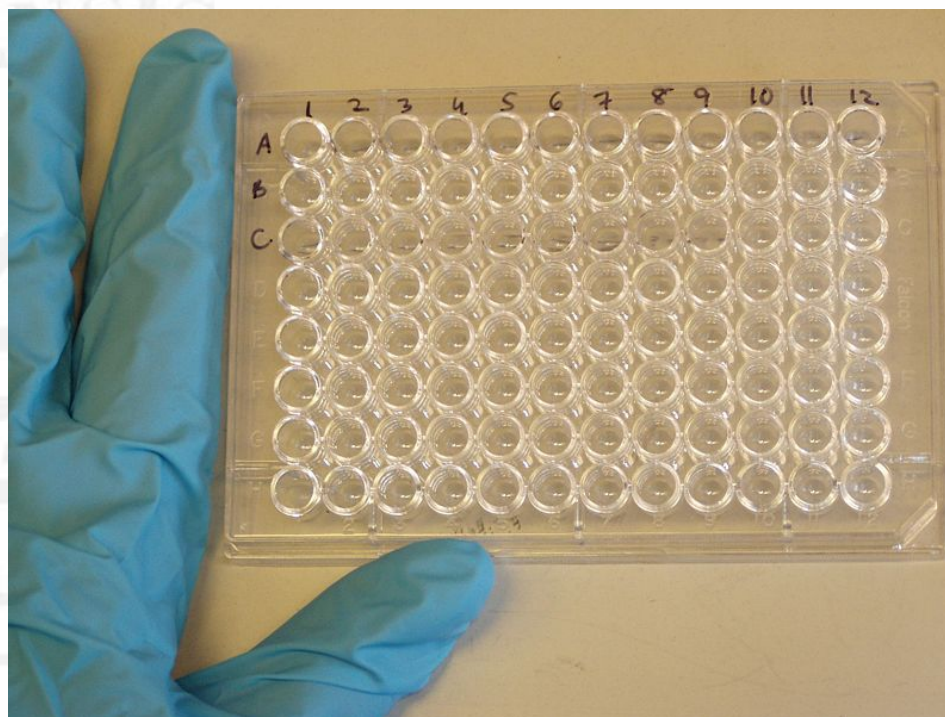
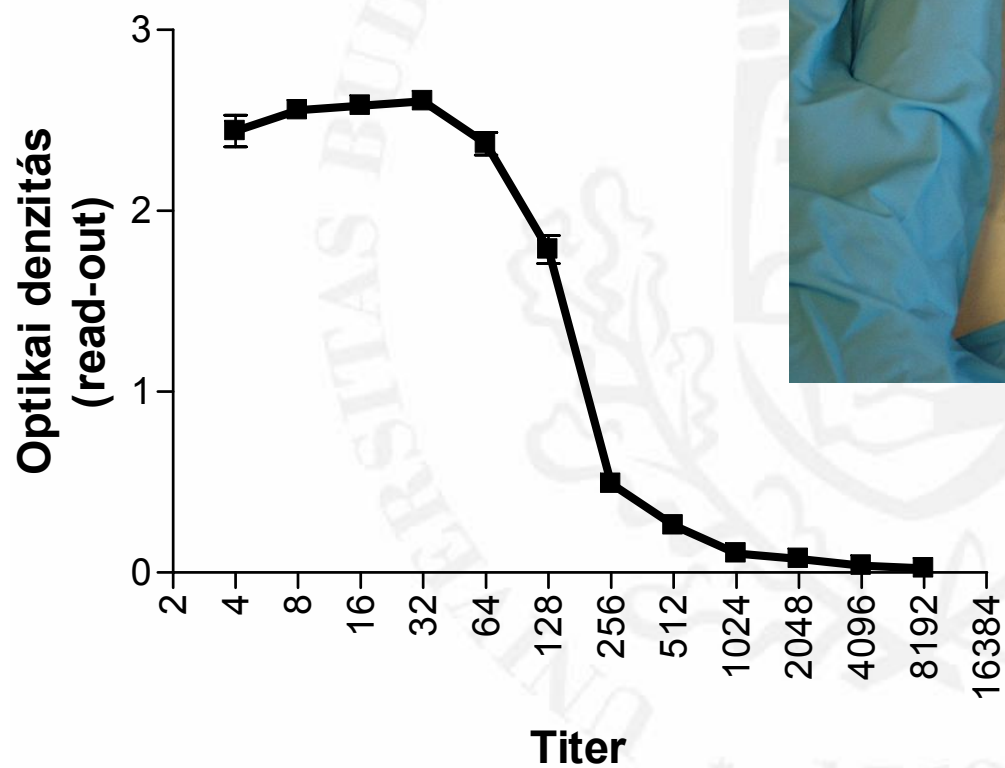
Vázlat

- Az antitestek alaptulajdonságainak meghatározása:
 - mennyiség,
 - epitóp specificitás,
 - izotípus,
 - affinitás, aviditás
- Antitestek kimutatása:
 - az antitest az antigén (immuno-staining, western [immuno]-blot, szilárd fázisú assayk)
- Antitestek kimutatása hatásaik és/vagy fizikai tulajdonságaik által
 - Hemagglutináció
 - Precipitáció
 - Komplement fixációs eljárás,
 - Vírus neutralizáció
 - Specifikus gátló hatás,
 - Lizáló hatás (komplement vagy ADCC által)
- Nem cél ebben az előadásban áttekinteni az antitestekkel végezhető módszereket, amelyekben az antitest csak eszköz!

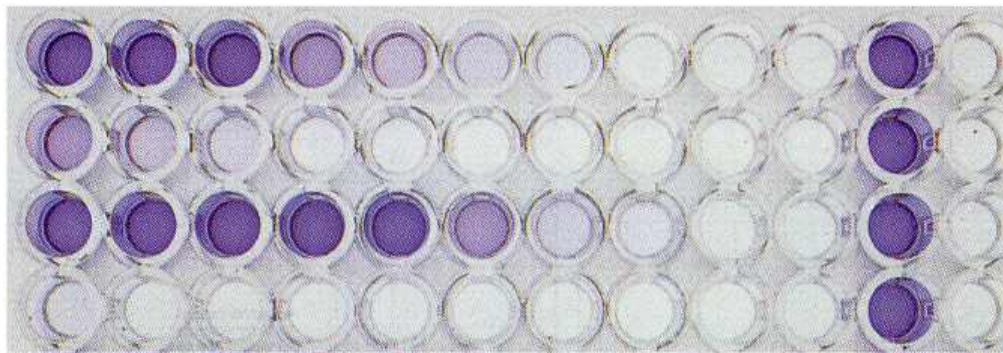
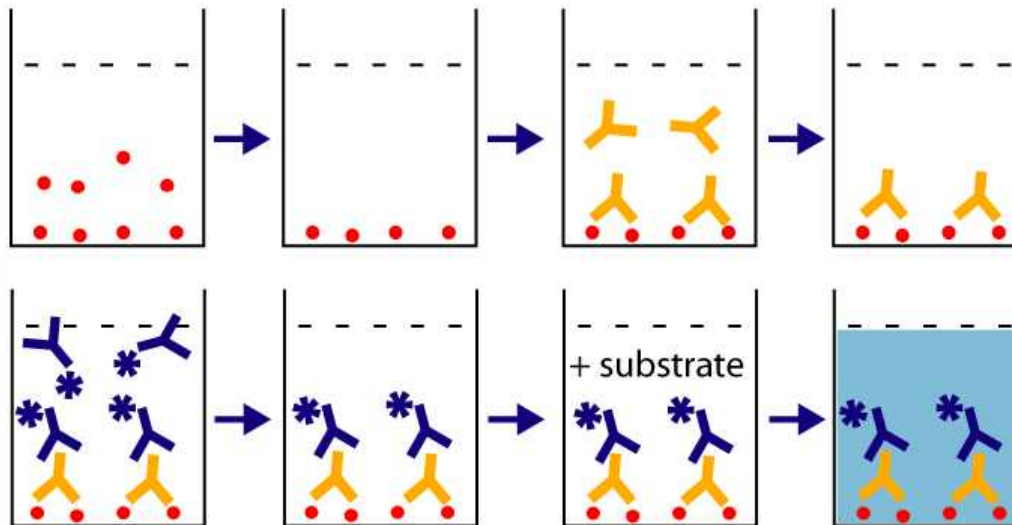
Mikro-titrálás, titer



- Mikrotiter lemez
 - Eredetileg a kémcsőben végzett hígítási sorozatok kivitelezésének gyorsítására történt, igazi elterjedése akkor következett be, amikor a 60-as években a virológiai munka fellendült (vírus-titer meghatározás, mikro-titrátor).
 - Manapság hihetetlen fejlődésen ment keresztül a technológia, mind a lemezekben végrehajtott reakciók, mind a lemezek kémiájának kiterjedése miatt
 - Manapság már ritkábban használják valódi titrálásra a lemezt, inkább sok mérés parallel elvégzését segíti.



A szilárd fázisú technikák: pontos módszer az antitestek mennyiségének meghatározására



- Az ebben a körben csoportosított mérések lényege, hogy a mérendő tényező (analit) egy hordozóhoz van kötve a reakció során.
- A lényegi fejlesztés a mosási és szeparálási lépések fizikai alapon történő megvalósítása, automatizálható módon.
- Az egyes méréseket a felépítés és a mérési jelet szolgáltató rendszer különbözteti meg



ELISA beállítási kisokos

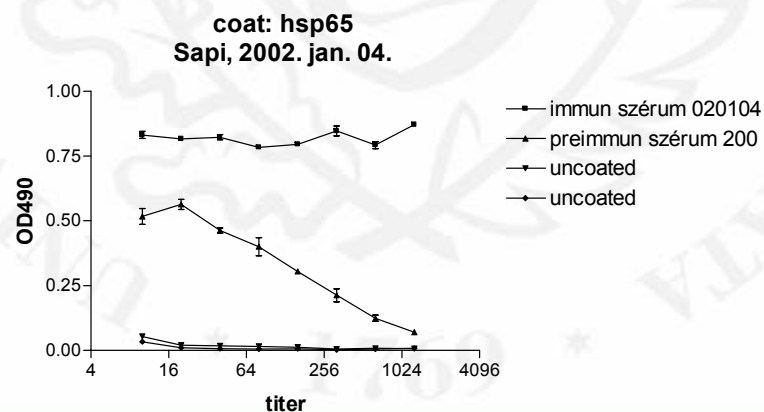
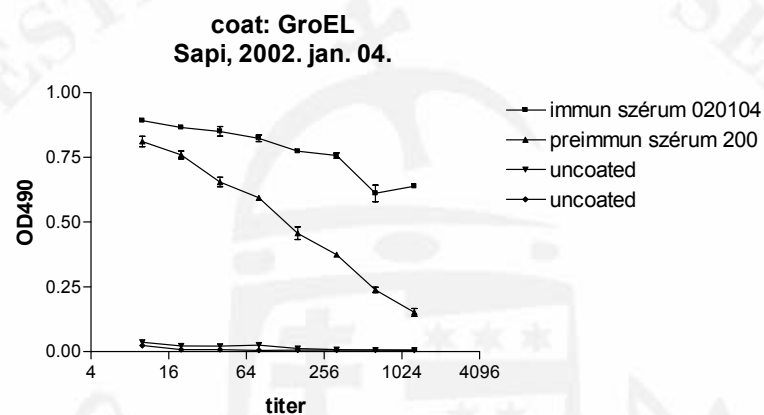
- Fedés: fehérje minősége, puffer összetétele, lemez előkezelése, inkubációs idő
- Reakció és mosási fázis
- Jelölés kiválasztása: kémiai cross-linking lehetősége, elérhetőség, olcsóság, stabil konjugátumok lehetősége, ne legyen jelen a mérendő mintákban
 - Gyakori válsztások: alkalikus foszfatáz, torma peroxidáz, b-galaktozidáz
- Szubsztrát reakció: mérhetőség, stabilitás, veszélyesség

- RIA: Radio; a jelölés izotóp. Előnye elsősorban analitikai, hátránya a sugárzással járó veszély. Egyre inkább visszaszorul
- ELISA: Enzim; előnye az egyszerűség és olcsóság, hátránya elsősorban analitikai (mérés határ).
- FIA: Fluorochrome; Előnye analitikai, hátránya a különleges műszer és az ár.
- Chemiluminescens: Előnye analitikai, hátránya a luminométer szükséglet, és az ár.
- Bioszenzor technológia
- Macro- és microarray technológia

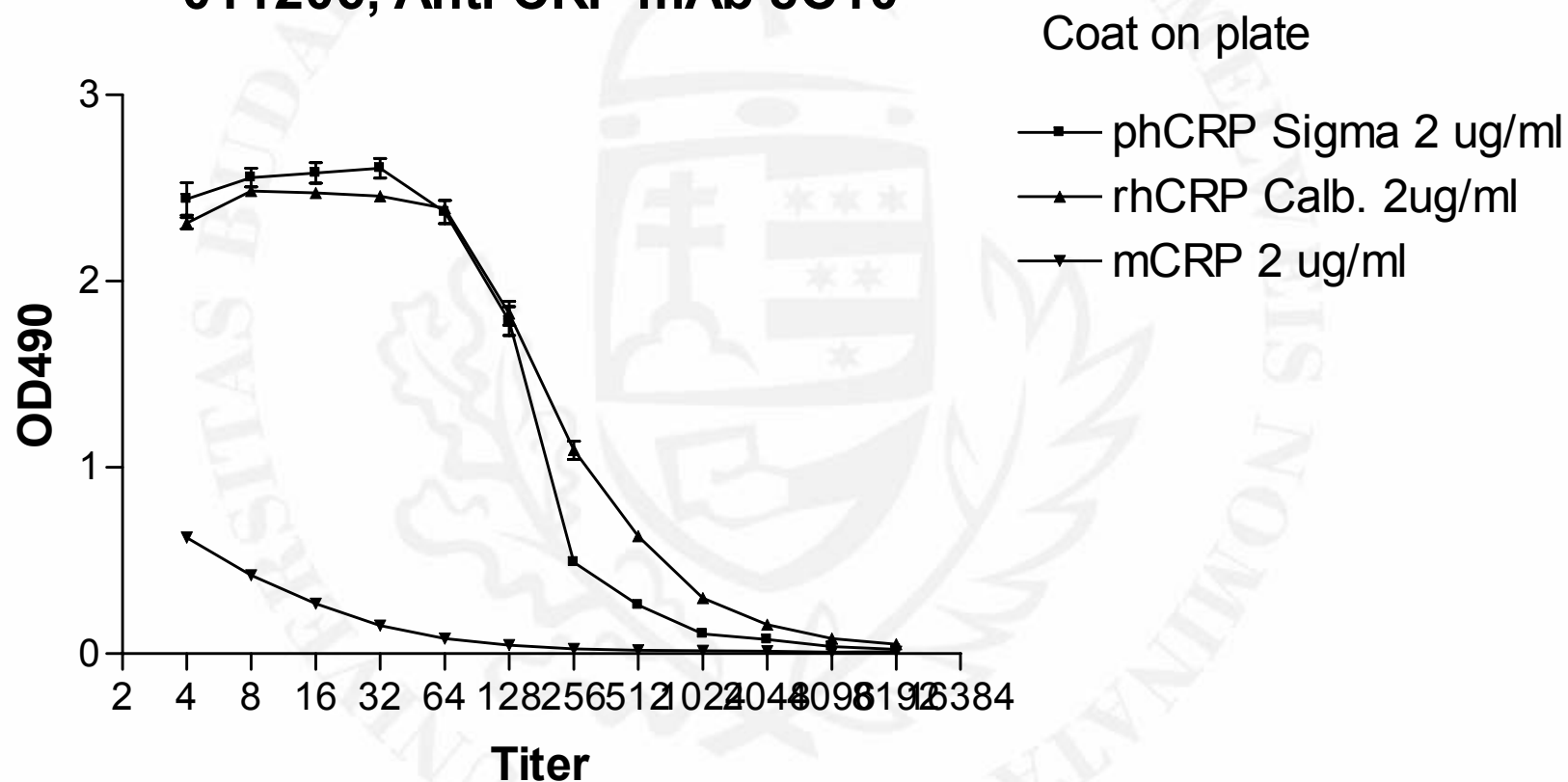
Direkt „ELISA”

- A szilárd fázisú immunoassay-k direkt felépítésű módoszatai alkalmasak a biológiai minta antitesttartalmának és az antitestek jellemzőinek meghatározására.
- Felhasználási területei:
 - Antitest szűrés (hibridóma technika), immunizálás hatékonyságának ellenőrzése, affinitás és vizsgálat, izotípus eloszlás meghatározása
 - Szerológiai reakciók, autoantitest kimutatás
- A mérés kulcsa a lemezhez kötött antigén. Az eljárás finomodásának és sokoldalú fejlődésének alapját a fehérje kémiai (tisztítás, előállítás) eljárások fejlődése tette lehetővé.

Immunizálás ellenőrzése

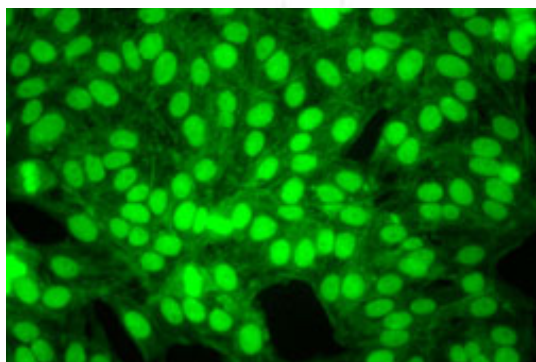


011206, Anti-CRP mAb 8C10



Autoantitest kimutatás: Immunfluoreszcencia

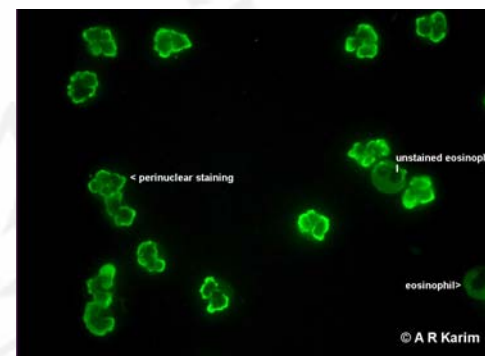
- Anti-nukleáris antitestek, anti-neutrofil citoplazma antitestek...stb



ANA (Hep2G)

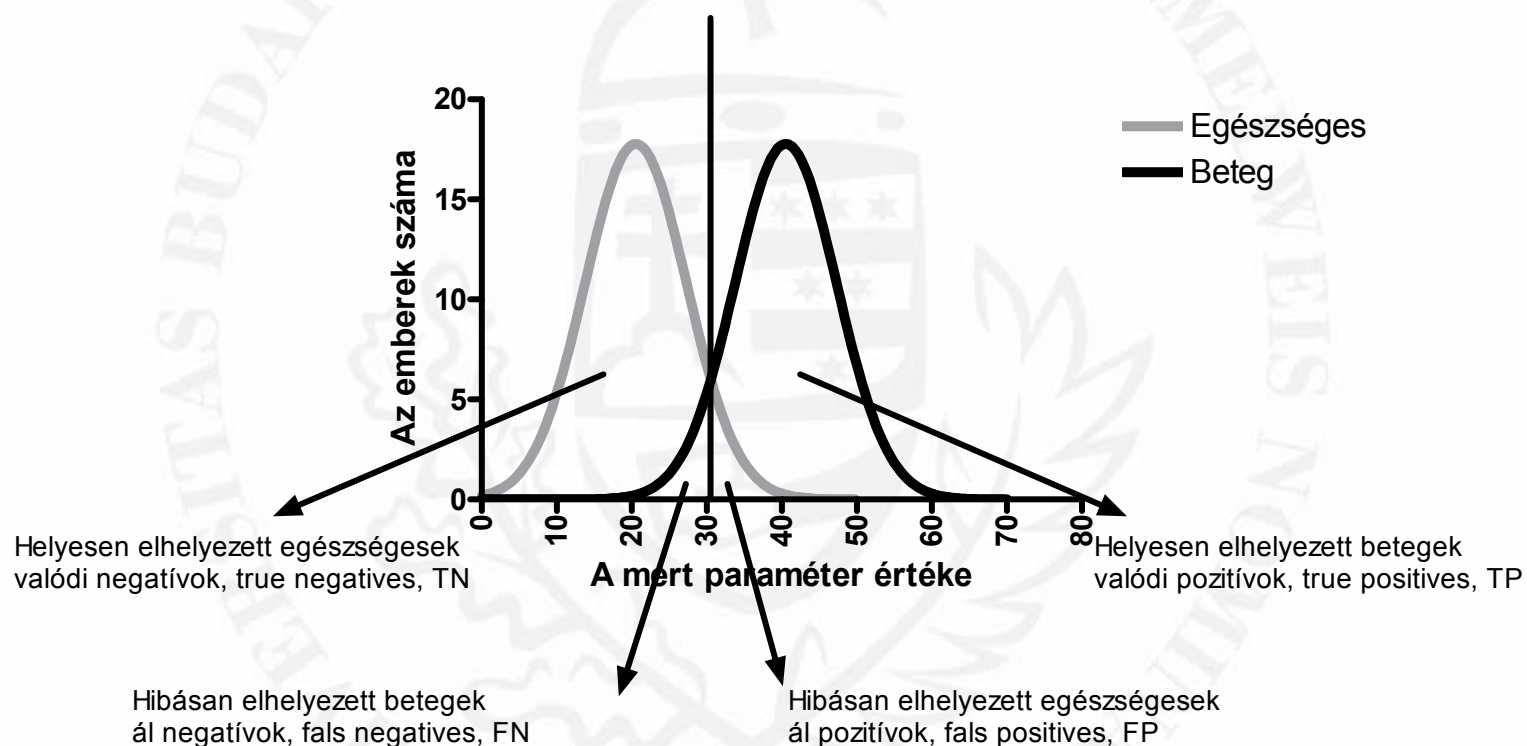


cANCA
(granuláris, citoplazmatikus)



pANCA
(homogén, perinukleáris)

A laboratóriumi tesztek alkalmazhatóságának gyakorlati korlátai: a szenzitivitás és a specificitás





A laboratóriumi tesztek alkalmazhatóságának gyakorlati korlátai: a szenzitivitás és a specificitás

- A szenzitív mérés: eredménye olyan, ami sok ember esetében „pozitív”, köztük minden beteg (sok esetben egyszerű, olcsó teszt)
- A specifikus mérés: eredménye olyan, hogy csak keves emberre „pozitív”, de nincs köztük egészséges (sok esetben speciális jártasságot/készüléket igénylő, korlátozottan elérhető teszt, vagy tesztek kombinációja)
- A két tényező összefügg, értékük a metodika molekuláris jellegzetességein, a vizsgált mintán (populáció), és az alkalmazott vágóponton múlik



Az összefüggést megvilágító példa Direkt antitest kimutatás, infektív szerológia 1:

- A HIV-antitest kimutatási kitek a legjobb specificitású és szenzitivitású tesztek közé tartoznak, mindkét érték 0,99 körül van. (Direkt ELISA, melynek során rekombináns HIV antigéneket alkalmaznak)
- Ha feltételezzük az ismert adatok alapján, hogy Magyarországon 5000 HIV fertőzött él, akkor a HIV-infekció PR-ja $5000/10\ 000\ 000 = 0,0005$.
- Tételezzük fel (nem igaz!), hogy a véradók között is ugyanekkora PR (valójában kisebb...ezért van a kérdőív!).
- Kérdés: hány ál-pozitív és ál-negatív HIV-teszt várható a véradók között?
- Sens:0,99, Spec:0,99, PR:0,0005,



$$\text{A módosított PPV} = \frac{0.99 \times 0.0005}{(0.99 \times 0.0005) + (0.01 \times 0.9995)} = \frac{0.000495}{0.01049} = 0.0472$$

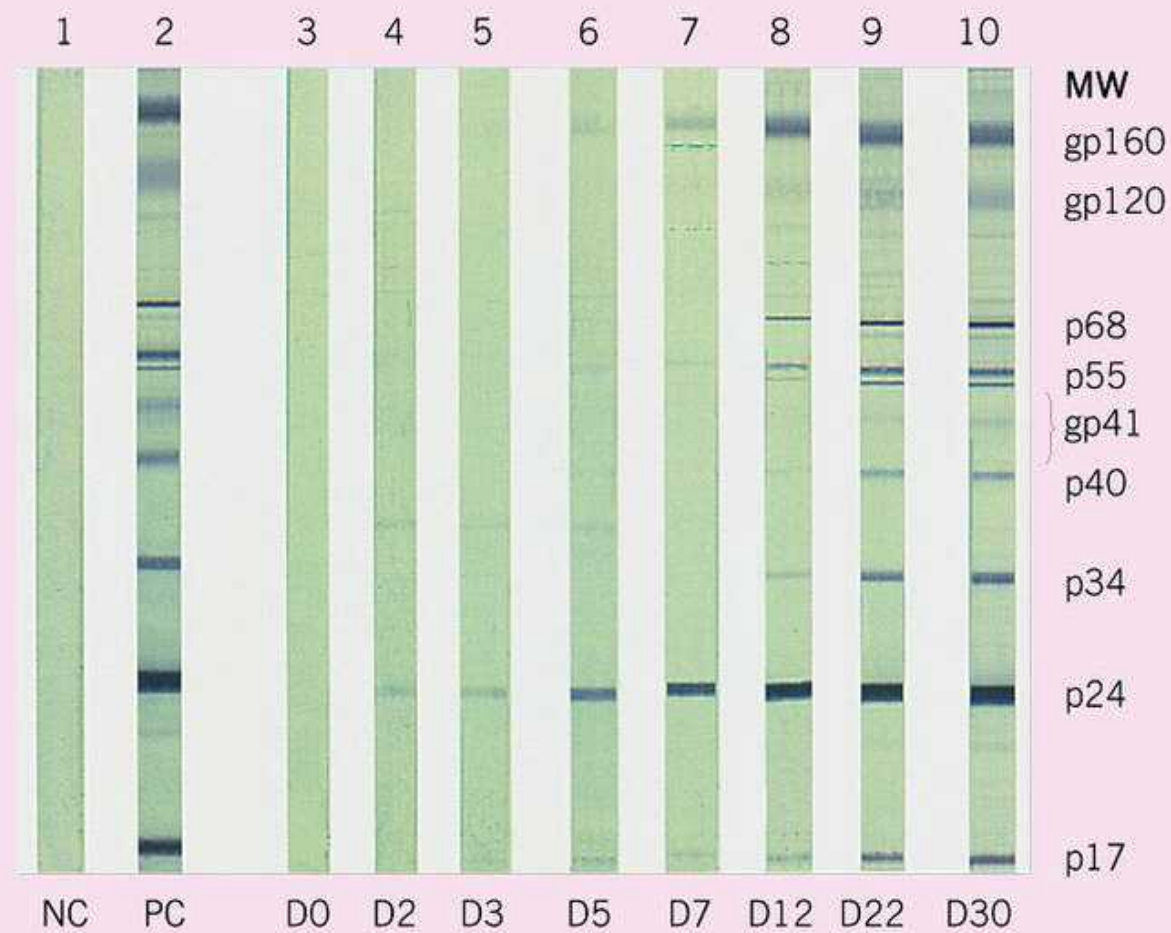
Ez azt jelenti, hogy a szűrővizsgálat során a véradó állomásokon kiszűrt 100 pozitív (reaktív) minta közül csak 5 (minden 20.) származik HIV szeropozitív véradótól, 95 ál-pozitív (Valójában még nagyobb az ÁP %). Verifikálás!!!

$$\text{A módosított NPV} = \frac{0.99 \times 0.9995}{(0.99 \times 0.0005) + (0.99 \times 0.9995)} = \frac{0.9895}{0.9900} = 0.9995$$

Tehát igen alacsony, 1/2000 (a valóságban még alacsonyabb) annak a valószínűsége, hogy egy szűrővizsgálatnál negatívnak talált minta ál-negatív lenne, vagyis HIV-fertőzöttől származott volna.

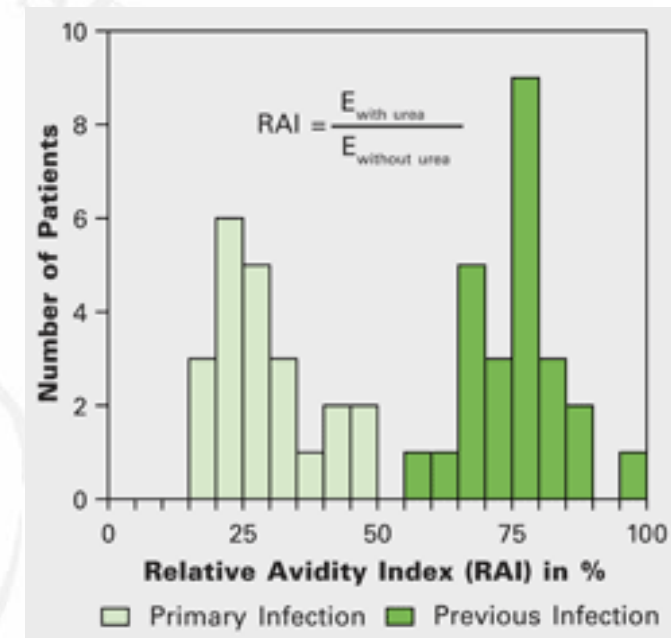
A teszt igen nagy szenzitivitásának árán (ál-pozitívak nagyobb aránya) „vesszük meg” a biztonságot, vagyis az ál-negatívak arányának csökkentését. Ál-pozitivitás esetén egy specifikus teszt segítségével tisztázható a kérdés, míg ál-negativitás esetén nincs mit tenni, ha a vért már felhasználták.

WESTERN BLOT REACTIVITY IN ONE HIV-1 SEROCONVERTER



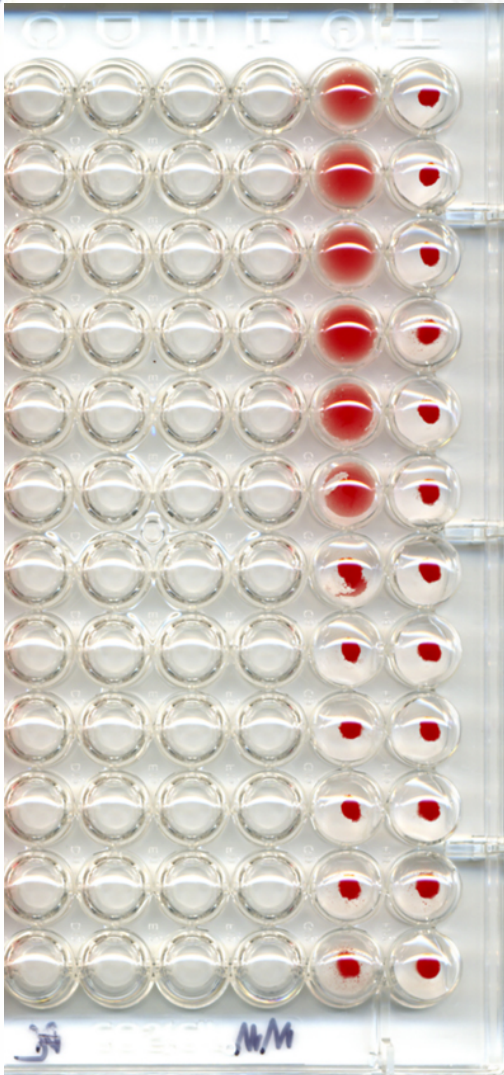
Direkt At meghatározás: Infektív szerológia 2.

- Az antitestek izotípusmegoszlásának értéke a Chlamydia pneumoniae fertőzés dinamikája példáján
- Akut infekció: IgM
- Perzisztáló infekció: IgA, IgG bármikor, ha >1:128, IgG titernövekedés
- Reinfekció: IgM+IgG
- Akut infekció vizsgálata: az aviditás vizsgálata segíthet
- Az alacsony aviditású antitestek urea kezeléssel eltávolíthatók, míg a magas aviditásúak nem.
- Chlamydia diagnosztikában pl. ki lehet használni.

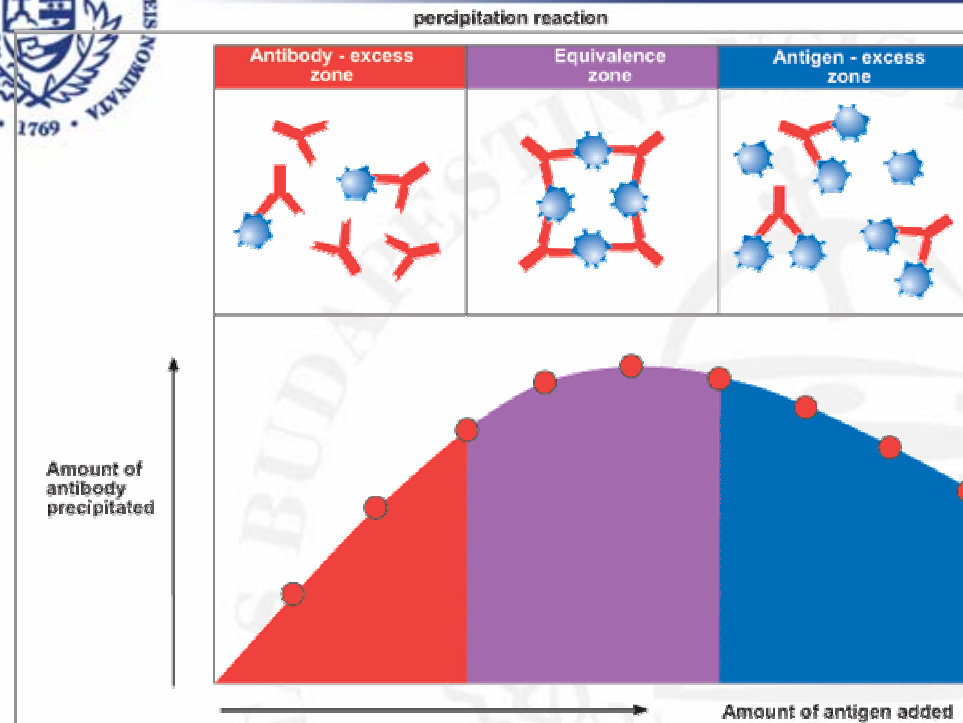


- Az antitestek alaptulajdonságainak meghatározása:
 - mennyiség,
 - epitóp specificitás,
 - izotípus,
 - affinitás, aviditás
- Antitestek kimutatása:
 - az antitest az antigén (immuno-staining, western [immuno]-blot, szilárd fázisú assayk)
- Antitestek kimutatása hatásaik és/vagy fizikai tulajdonságaik által
 - Hemagglutináció
 - Precipitáció
 - Komplement fixációs eljárás,
 - Vírus neutralizáció
 - Specifikus gátló hatás,
 - Lizáló hatás (komplement vagy ADCC által)
- Nem cél ebben az előadásban áttekinteni az antitestekkel végezhető módszereket, amelyekben az antitest csak eszköz!

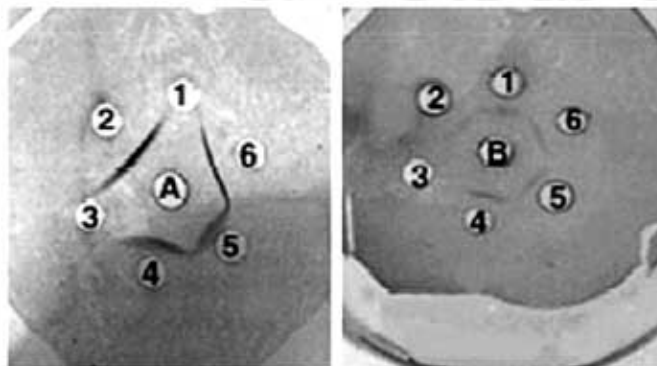
Hemagglutináció és annak gátlása



- Elsősorban a virológiában használt módszer, melynek során egyes vírusok (pl. influenza) direkt hemagglutináló hatásának gátlását használják fel vírus-specifikus antitestek kimutatására (HA-gátlás)
- Hemagglutinációt használjuk ki a vércsoport szerológiában is



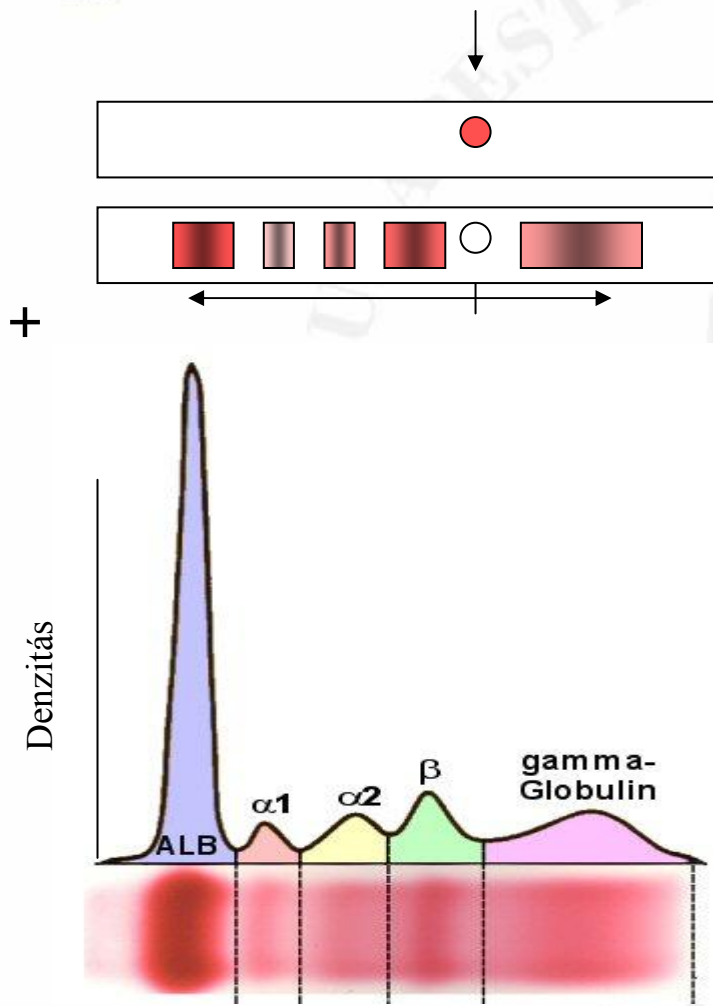
Ouchterlony:



A precipitáció

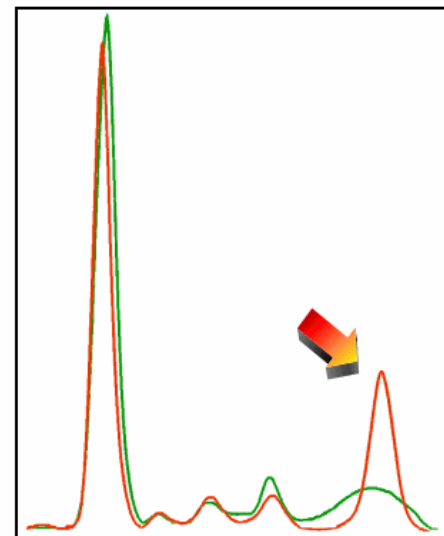
- Érzékeny az antigén és antitest mennyiségére, pontos beállítást igényel, lényege az antitest-antigén kapcsolódási reakció után keletkező komplex
- Lehet kvalitatív vagy kvantitatív
- Megfelelő diffúziós közeg megválasztása után egyes esetekben szabad szemmel is látható a precipitin (Ouchterlony analízis)
- Fehérje festéssel, egyéb detektálási módszerekkel, standardok alkalmazásával érzékenysége növelhető: immunprecipitáció
- Elektroforézissel kombinálható (Immun-elfo, rakéta immunelfo, keresztezett immunelfo)
- Nem antitest kimutatási módszerek, de ide tartoznak a precipitáció elvén működő antigénmeghatározási módszerek is: nefelometria, particle-enhanced-immunoturbidimetry, radiális immundifúzió)

Szérum elektroforézis



A szérum összfehérje tartalma és az egyes frakciók egymáshoz viszonyított aránya alapján kiszámolható az ALB- α_1 - α_2 - β - γ frakció mennyisége.

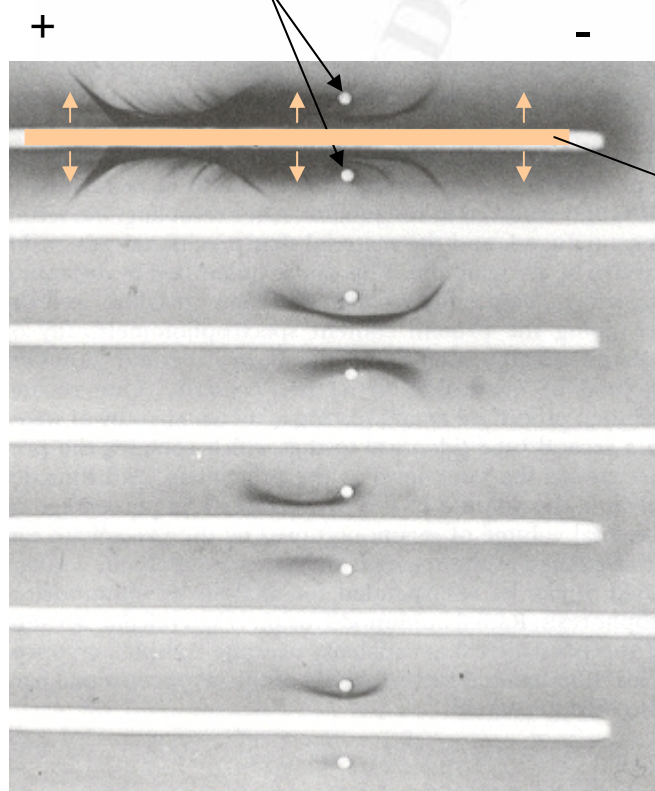
Paraprotein (kóros immunglobulin) elektroforetikus képe



Immun-elektroforézis

Szemikvantitatív változat
(leolvasás szemmel):

Betegek szérumai (elfo)



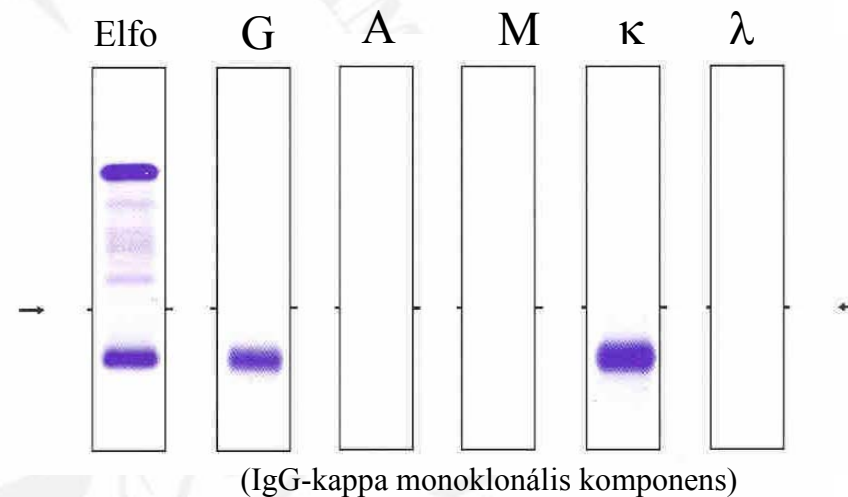
Anti-humán szérum

Anti-humán IgG

Anti-humán IgM

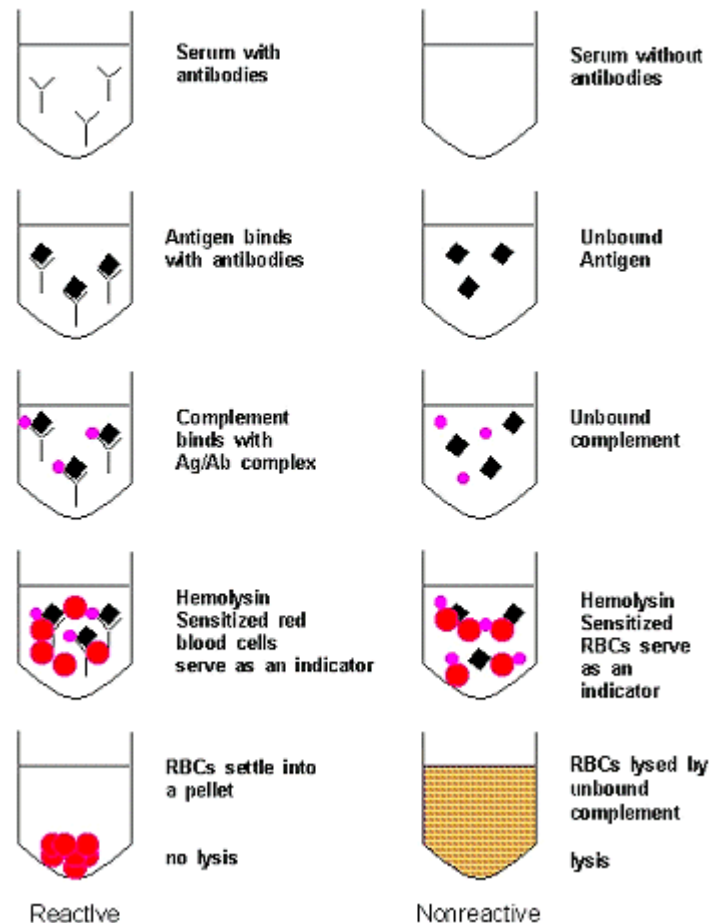
Anti-humán IgD

Kvantitatív változat
(leolvasás denzitométerrel):



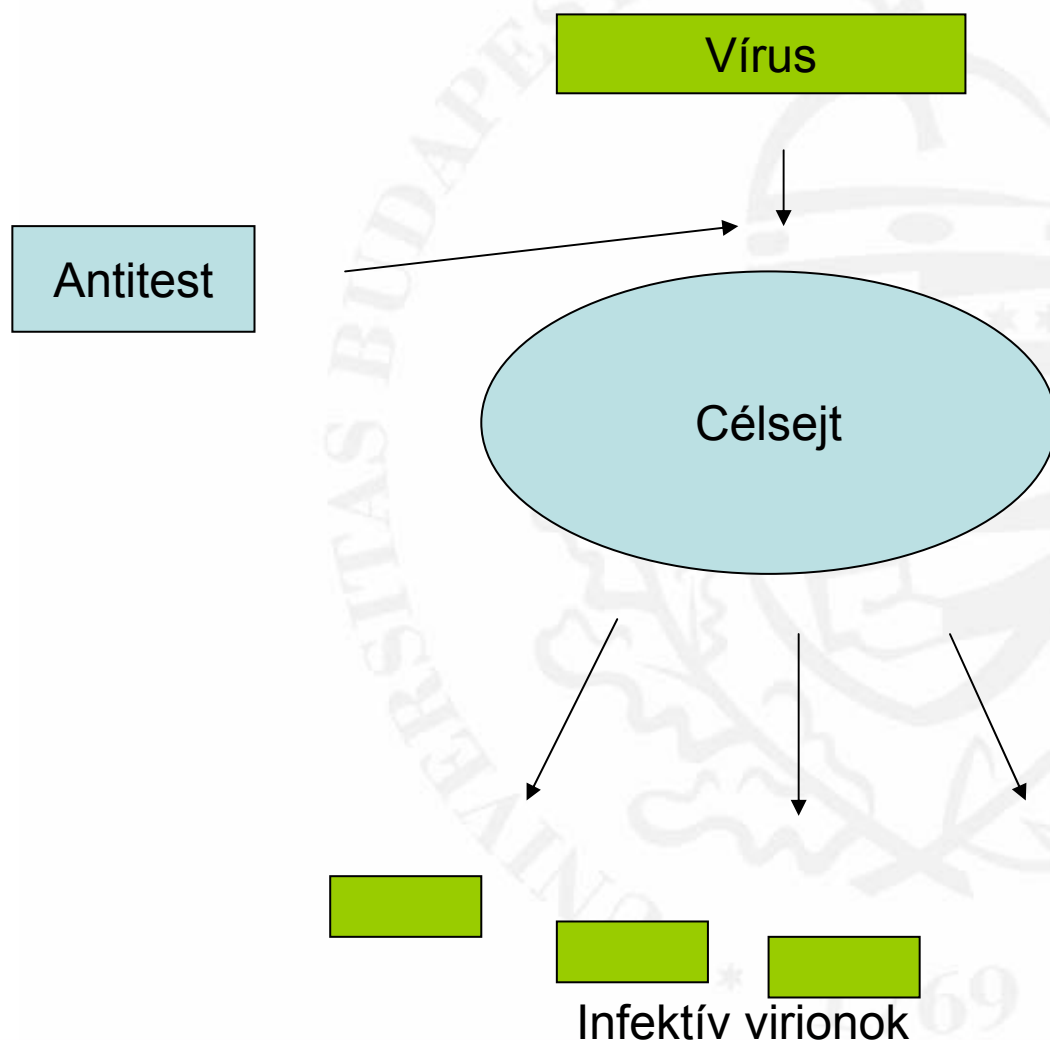
Korszerű eljárás: a szabad könnyű-
és nehézlánc meghatározása
nefelometriával

Complement Fixation Test



- A következő kórokozók elleni antitestek kimutatására kerül elsősorban alkalmazásra:
- Adenovirus
- Fungal Panel (Blastomyces, Coccidioides, & Histoplasma)
- Influenza A & B
- Parainfluenza 1, 2, & 3
- Poliovirus 1, 2, & 3
- Respiratory Syncytial Virus (RSV)

Vírusneutralizáció



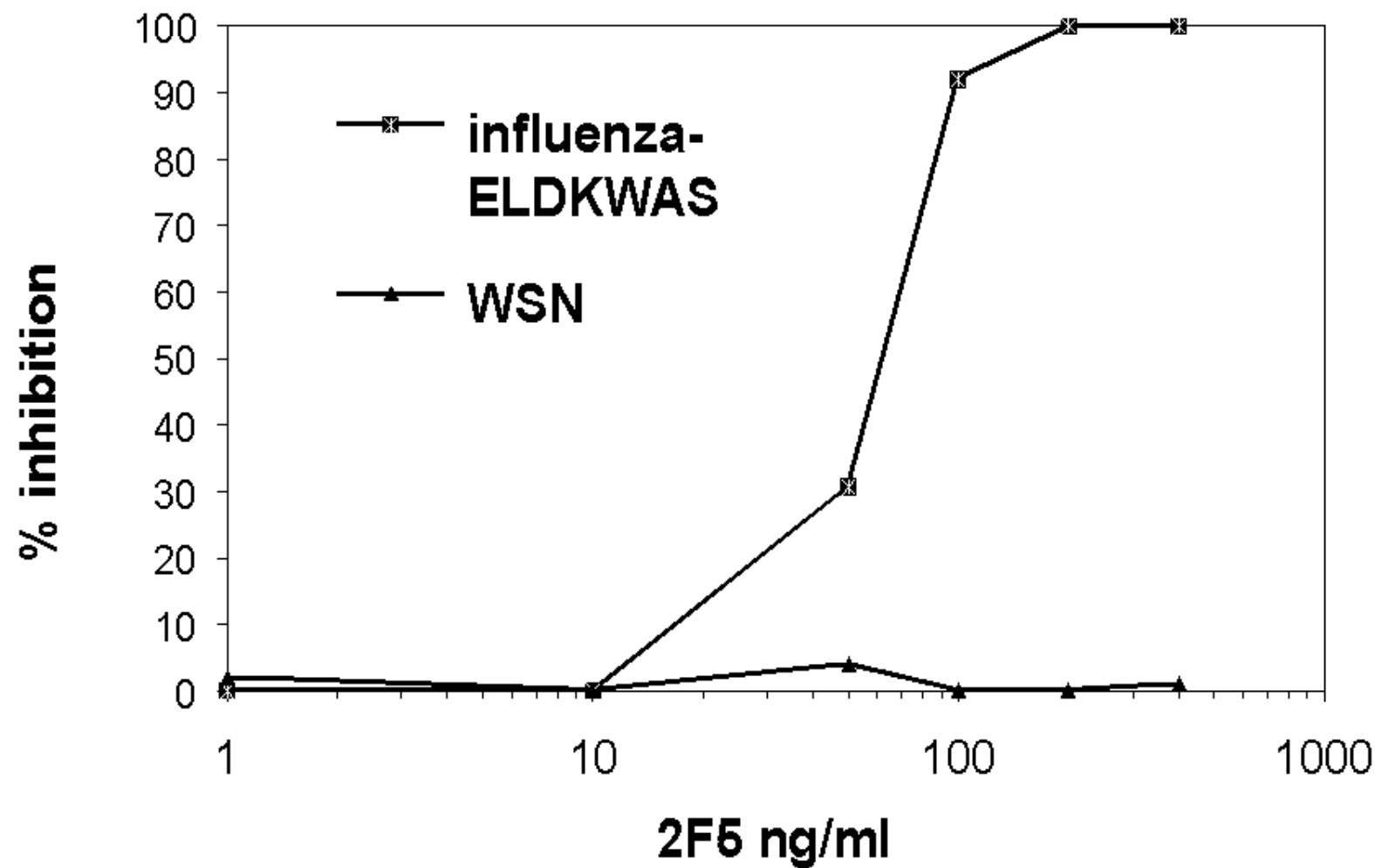
- Az eljárás mérésének read-outja kezdetben a vírus citopátiás hatás detektálása volt, manapság a vírusantigének vagy nukleinsav kimutatása

- RSV



+ RSV





Vírus neutralizáció mérése pl. HIV esetében

- Tényezői:
 - az antitest (monoklonális vagy betegszérum, antitest izotípusa, specificitása, affinitása)
 - a vírus (primér vagy CD4+ T-sejtekhez adaptált)
 - a célsejt (típus, aktiváltság)
 - a readout (szincícium, p24 vagy vírusnukleinsav)

Az antitestek kimutatása hatásaik által 1: Lízis

HLA-ellenes antitestek kimutatása

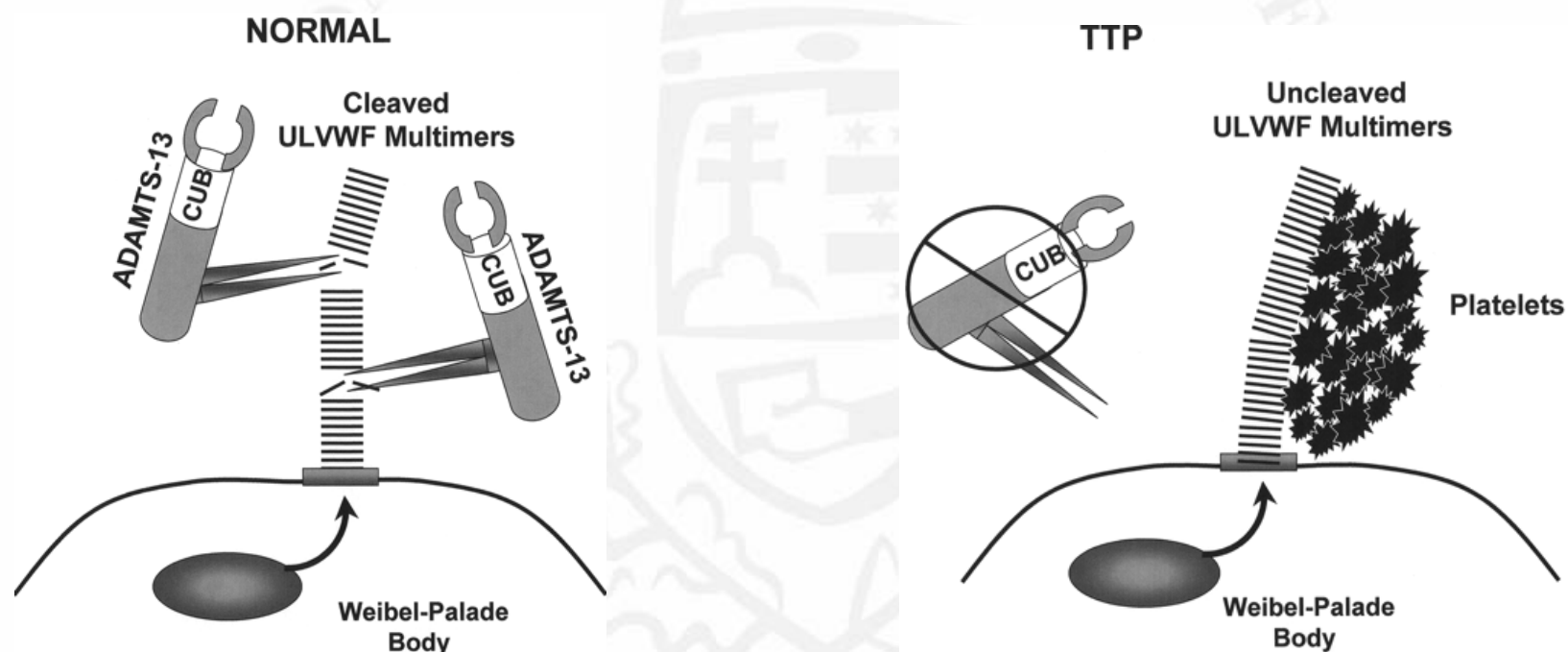
(1960-as évek óta, mióta tx bevezetésre került)

- Indikáció: transzplantáció előtti szűrővizsgálat a hiperakut rejekció megelőzésére. Tx után a krónikus rejekció folyamatának monitorozása.
- *Complement-Dependent Cytotoxic (CDC) Assay*
 - A donor limfocitáit komplement jelenlétében hozzák össze a recipiens szérumával. Kevésbé érzékeny, de funkcionális mérés. Nem feltétlen a valódi targetet (endothel) célozza.
- *Flow Cytometry Crossmatch (FCXM)*
 - A donor limfocitáinak inkubációját a recipiens szérumával anti-humán IgG-FITC detektálás követi. Érzékeny, de nem funkcionális mérés.
- *Purified HLA Antigen-Based Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay (HLA-Ag-ELISA)*
 - Tisztított kevert (HLA I és II) később rekombináns (jól definiált) antigének segítségével beállított szilárd fázisú mérés. Újabban igen érzékeny és specifikus.
- *HLA Antigen Bead Flow Cytometry (HLA-ABFC)*
 - Kevert, majd később rekombináns úton előállított class I és II antigének (>100) mikrogöngyökhöz való kötése, antitestek detektálása fluoreszcens jelölés által egylépésben. Gyors, érzékeny, költség hatékony.

Az antitestek kimutatása hatásaik által 2: Specifikus funkció gátlás

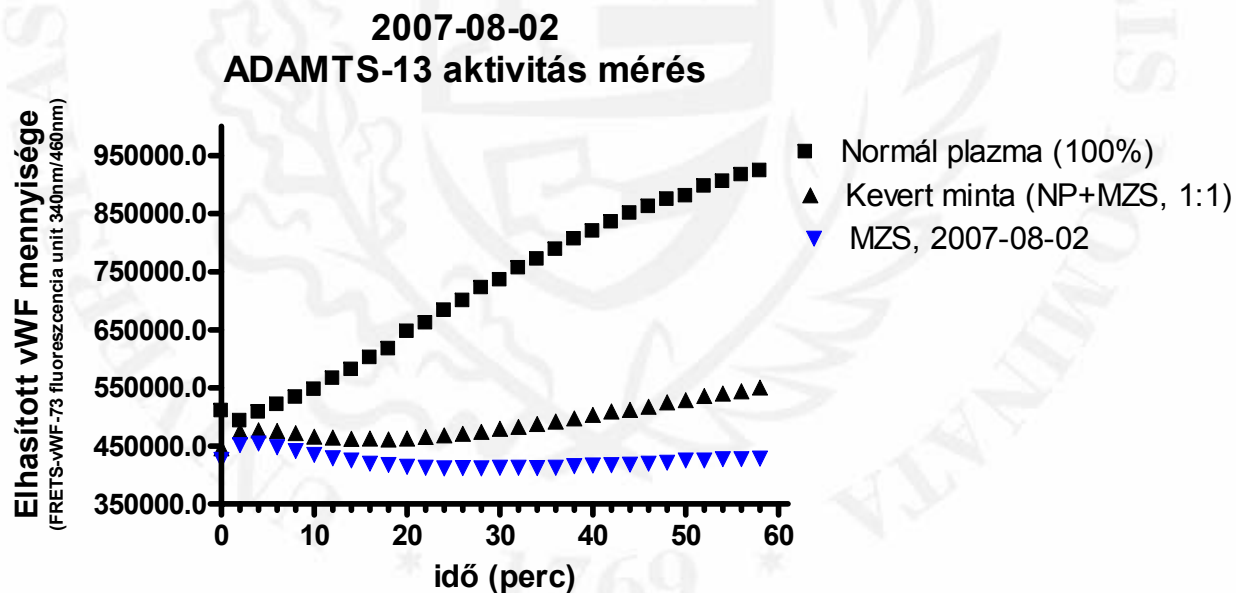
- Feltétele a jól mérhető alapfunkció (melynek hiánya jól körülírt betegséghez vezet)
 - Véralvadási faktor: fibrin dugó (pl VIII-as faktor hemofília)
 - Enzim: reakciósebesség, végtermék (pl. trombotikus trombocitopéniás purpura, TTP)
 - Komplement fehérje: molekuláris komplex kialakulása, neo-epitóp megjelenése vagy lízis (pl. hereditér angioneurotikus ödéma, HANO, vagy hemolitikus urémiás szindróma, HUS)
- A kimutatás módja a keveréses vizsgálat
- Titrálással meghatározható az 50%-os gátlást okozó koncentráció (hagyományosan Bethesda egység)

A TTP keletkezésének molekuláris oka az endothel felszín prokoaguláns átalakulása az éretlen vWF megjelenése miatt



ADAMTS13 aktivitás mérés egy beteg mintájában

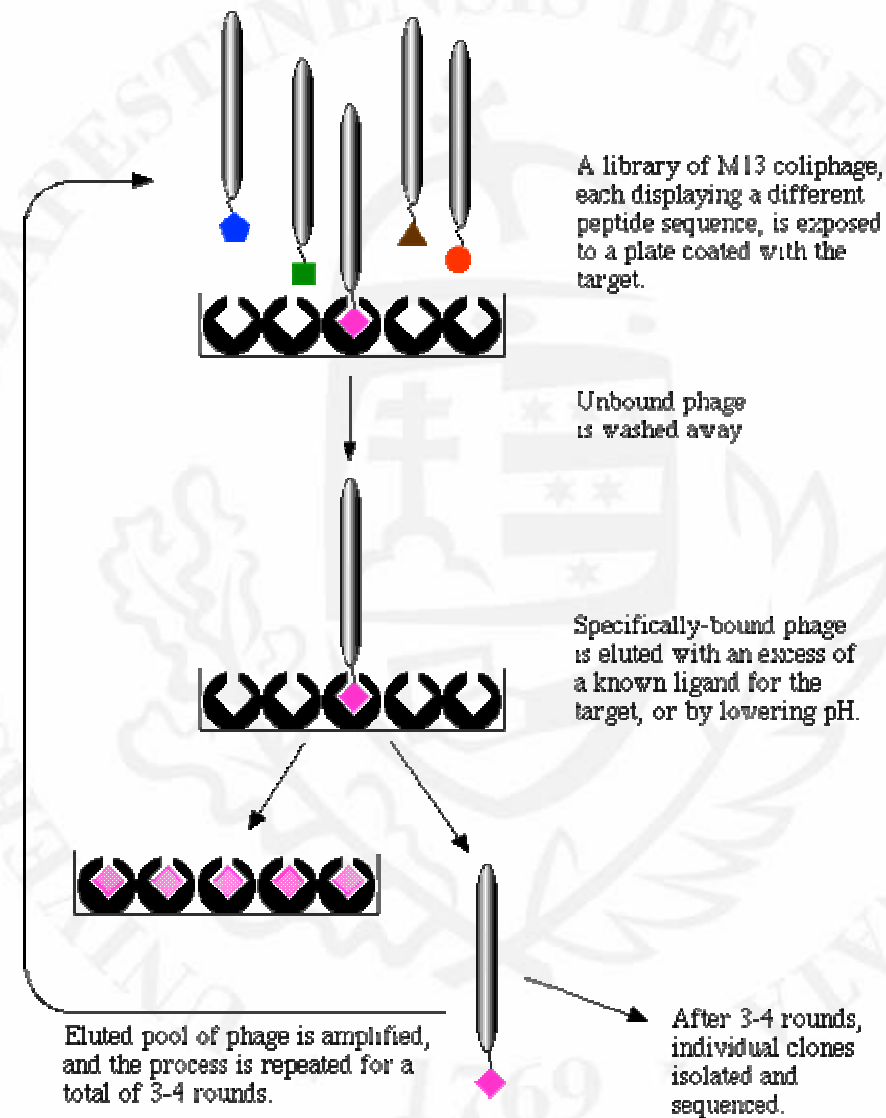
- A beteg plazmájában több plazmaferézis után is 0%-os aktivitást találtunk
- A keverékes vizsgálat anti-ADAMTS13 gátló antitestek jelenlétét igazolta (14 Bethesda egység)



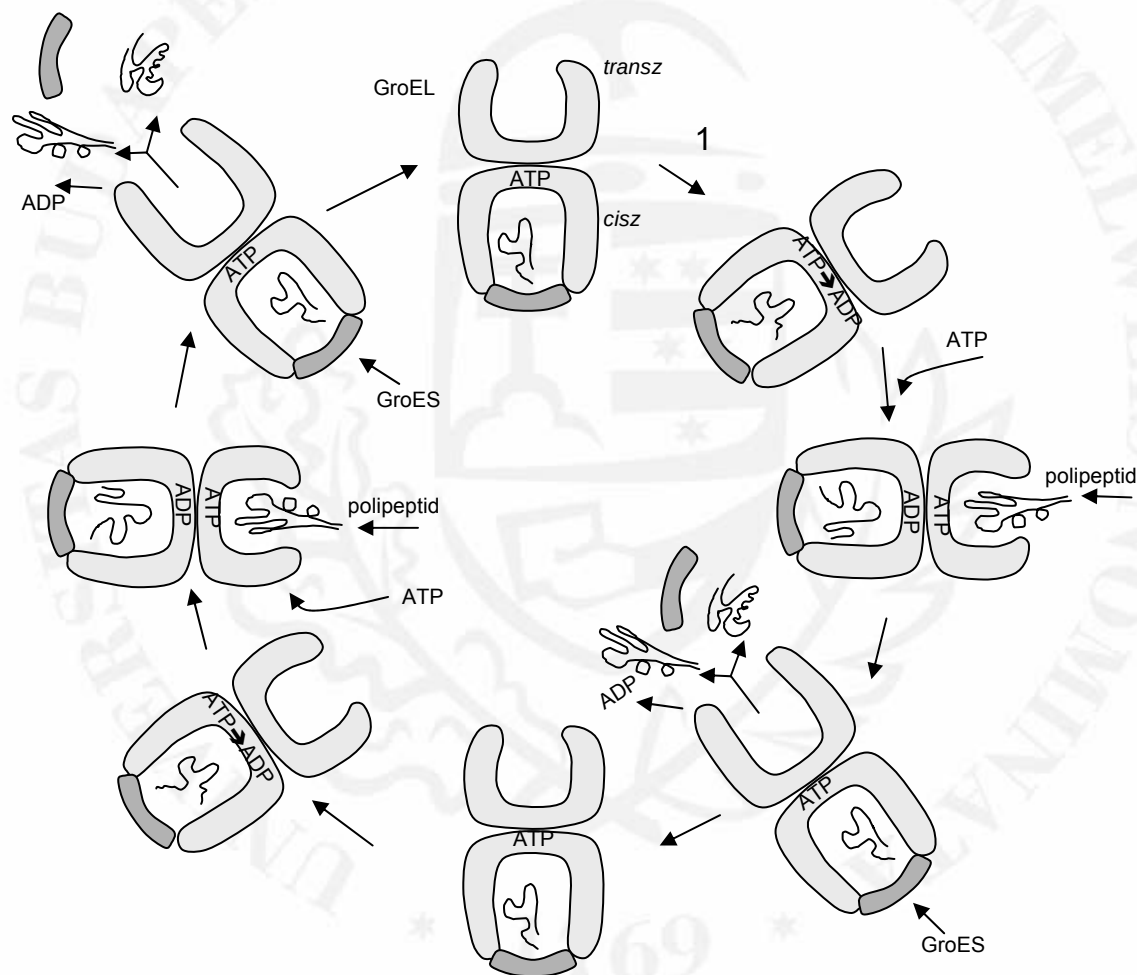


Epitóp analízis

- Phage-display library
- Átfedő peptidsorozatok
- Konformációs epitópok, discontinuous epitópok
- Poszt-transzlációs módosulatok



A Hsp60 felépítése



Hsp60

1: AA 52-81

2: AA 117-146

3: AA 162-186

4: AA 203-238

5: AA 239-262

6: AA 303-317

7: AA 368-387

8: AA 394-413

9: AA 436-455

10: AA 470-484

11: AA 485-509

12: AA 531-550

Kapcsoltság (LD)

A

R

Hsp65

1: AA 26-55

2: AA 91-120

3: AA 136-160

4: AA 176-211

5: AA 212-235

6: AA 276-290

7: AA 341-360

8: AA 366-385

9: AA 408-427

10: AA 441-455

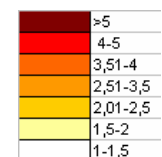
11: AA 456-580

12: AA 502-521

Kapcsoltság (LD)

C

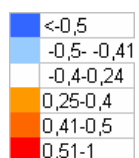
OD/OD háttér:



Kontroll, n=12

ISZB, n=14

Korrelációs
koefficiens:



E

F

Kontroll, n=12

ISZB, n=14

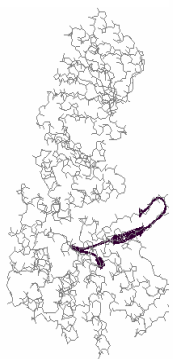
4 1011 6 12 5 9 8 7 2 3 1

4 1011 6 12 5 9 8 7 2 3 1

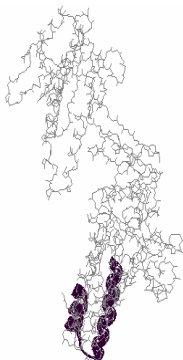
G

H

1



2



Ko

ISZB

ANOVA (p)	peptid #	Anti-Hsp60 IgG	Hsp60	Anti-Hsp60 IgG	ANOVA (p)
0,081	1		AVTMGPKGRT		<0,0001
	2		PKGRTVIEQ		
	3		VIEQSWGSP		
	4		SWGSPKVTKD		
	5		KVTIDGVTVA		
0,006	6		TVLARSIAKE		<0,0001
	7		SIAKEGFKEI		
	8		GFEKISKGAN		
	9		SKGANPVEIR		
	10		PVEIRRGVMI		
0,537	11		VITPEETIAQV		0,153
	12		EIAQVATISA		
	13		ATISANGDKE		
	14		NGDKEIGNII		
	15		DGKTLNDELE		
0,041	16		DNELEIIEGM		0,590
	17		IIEGMKFDGR		
	18		KFDRCYISPV		
	19		YISPVFINTS		
	20		FINTSGQKGC		
0,410	21		KGQKCEFDQA		0,430
	22		EFQDAYVLLS		
	23		YVLLSEKKIS		
	24		EKKISSISQSI		
	25		SIQSIVPALE		
0,607	26		PGFGDNRKNQ		0,150
	27		NRKNQLKDMA		
	28		EKRIQEIIEQ		
	29		EIIIEQLDVT		
	30		LDVTTSEYEK		
0,019	31		LAKISDGVAV		0,250
	32		DGVAVLKVGG		
	33		LKVGGTSDVE		
	34		IVLGGGCALL		
	35		GCALLRCIPA		
0,214	36		RCIPALDSL		0,025
	37		RTLKIPANTI		
	38		PAMTIKKNAG		
	39		AKNAGVEGSL		
	40		VEGSLIVEKI		
0,560	41		IVEKIMOSSS		0,210
	42		MQSSSEVGYD		
	43		EVGYDAHAGD		
	44		DAAGVASLLT		
	45		ASLLTTAEVV		
0,102	46		TAEVVVTEIF		0,063
0,960					0,043

1, Hélix, külső felszínen

2, Hélix loop helix érintkezési és külső felszínen

3, Hélix, külső felszínen

4, Hélix, belső felszínen

5, Loop, belső felszínen

6, Loop, belső felszínen

7, Loop, belső felszínen

8, Loop, külső felszínen

9, Loop, külső felszínen

10, Hélix, érintkezési felszínen

11, Loop, külső felszínen

12, Hélix, belső felszínen

Korrelációs
koefficiens:

<-0,5
-0,5- -0,41
-0,4- 0,24
0,25- 0,4
0,41- 0,5
0,51- 1

7

Ko

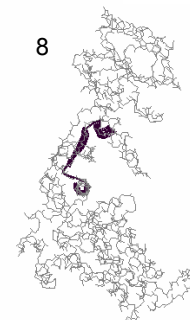
ISZB

ANOVA (p)	peptid #	Anti-Hsp65 IgG	Hsp65	Anti-Hsp65 IgG	ANOVA (p)
0,0003	1		KVTLGPVGRN		0,540
	2		PKGRNVVLEK		
	3		VVLEKKWGAP		
	4		KWGAPTITND		
	5		TITNDGVSLA		
0,018	6		TVLAQALVRE		0,340
	7		ALVREGLRNV		
	8		GLNRVAAGAN		
	9		AAGANPLGLK		
	10		PLGLKRGIEK		
0,236	11		VETKEQIAAT		0,880
	12		QIAATAAISA		
	13		AAISAGDOSI		
	14		GDOSIGDLIA		
	15		ESNTFGLQLE		
0,879	16		GLQLEITTEGM		0,800
	17		LTEGMRFDKG		
	18		RFDKGYISGV		
	19		VISGYFVTDP		
	20		FVTDFPERQEA		
0,490	21		ERQEAVIDEDF		0,011
	22		VLEDPYILLV		
	23		YILLVSSKVS		
	24		SSKVVSTVKDL		
	25		TVKDLLPLE		
0,021	26		PGFGDRRKAM		0,110
	27		RRKAMLDMA		
	28		GRVAQIRQEI		
	29		IRQEIENSDS		
	30		ENSDDVDRE		
0,005	31		LAKLAGGVAV		0,710
	32		GGVAVIKAGA		
	33		IKAGAAATEVE		
	34		IVAGGGVTLL		
	35		GVTLLQAAPT		
0,022	36		QAAPTLDLKL		0,680
	37		VALEAPLKQI		
	38		PLKQIAFNCS		
	39		AFNSGLEPGV		
	40		LEPGVVAEKV		
0,630	41		VAEKVRNLP		0,055
	42		RNLPAHGHLN		
	43		GHGLNAQTGV		
	44		NAASIAGLFL		
	45		AGLFLTTEAV		
0,440	46		TTEAVVADKF		0,013

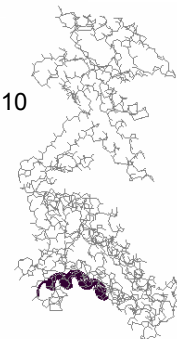
9



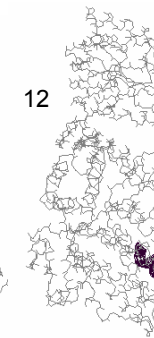
8



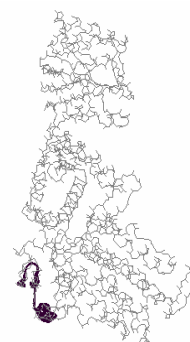
10



12



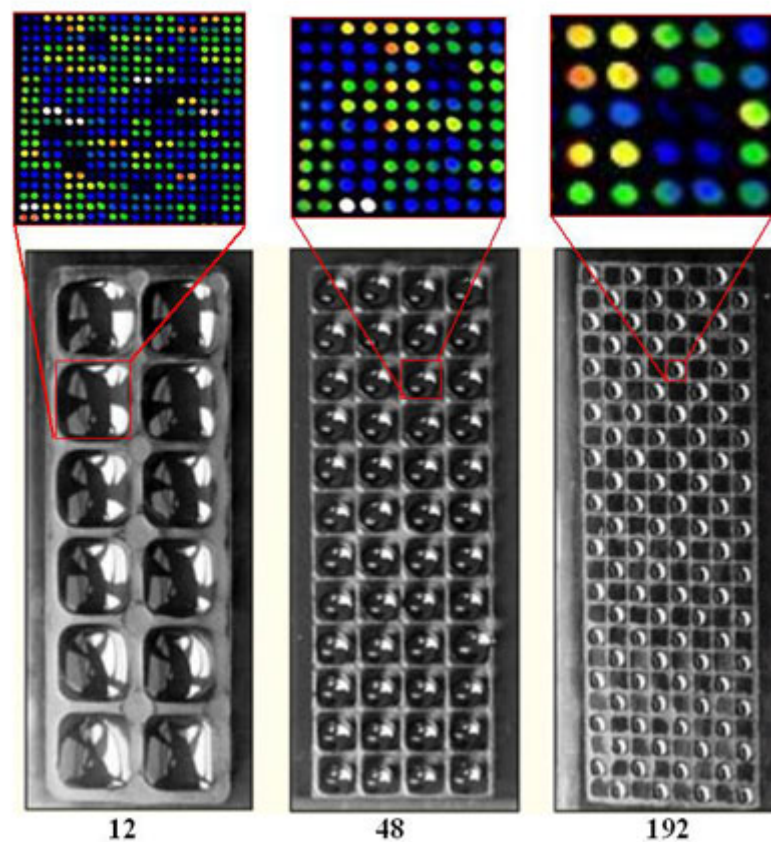
11



32

Peptid szintézis a mikrolemez egyes lyukaiban

Microarray-technology



Approaches ^a	Epitopes			
	Linear	Discontinuous	Disperse	Post-translational
Prediction from amino acid sequence	+	+/-	+/-	-
Prediction from protein structure calculations	++	+	+/-	+/-
Immunoassay of proteolytic fragments	+++	+	-	+
Immunoassay of partial clones	+++	+	-	- to ++ ^b
Mapping using synthetic peptides (Pepscan)	+++	-	-	-
Crystallography of antigen-antibody complex	+++	+++	+++	+++