

# **Immunkémiai vizsgálatok - hibalehetőségek, ezek megelőzése**

**Dr. Imreh Éva**

**Semmelweis Egyetem  
Laboratóriumi Medicina Intézet  
Központi Laboratórium Buda**

# Fogalmak I

**Immuneszé** – két ligandum (Ag vagy haptén és a specifikus At) egyensúlyi reakciója során immunkomplexek (IC) keletkeznek, melyek mennyisége arányos a meghatározandó analit (Ag vagy At) mennyiségével

**Antigén, Ag** – immunreakciót, ellenanyagtermelést kiváltó molekula  
- **epitóp** – Ag része, mely ellen csak arra a molekularészre specifikus At termelődik

**Ellenanyag, At** – immunglobulin molekula, mely az antigénhez specifikusan kötődni képes

- monoklonális At
- poliklonális At

# Fogalmak II

**Affinitás** – egy At affinitása azt fejezi ki, hogy milyen erővel képes kötődni az antigenhez (Ag).

Ezt az antigen-antitest komplex (Ag-At) képződésének egyensúlyi állandójával tudjuk leírni

$$K = \frac{(Ag-At)}{Ag \times At}$$

**Aviditás** – poliklonális antiszérum összreaktivitása

**Specificitás** – az At kötődésének minősége a termelését kiváltó Ag-hez – elengedhetetlen feltétel az immunesszé használatához

Az antigén az ellenanyaghoz másodlagos kötőerőkkel kapcsolódik:

- Coulomb erők/H-híd
- van der Waals
- hidrofób kölcsönhatás

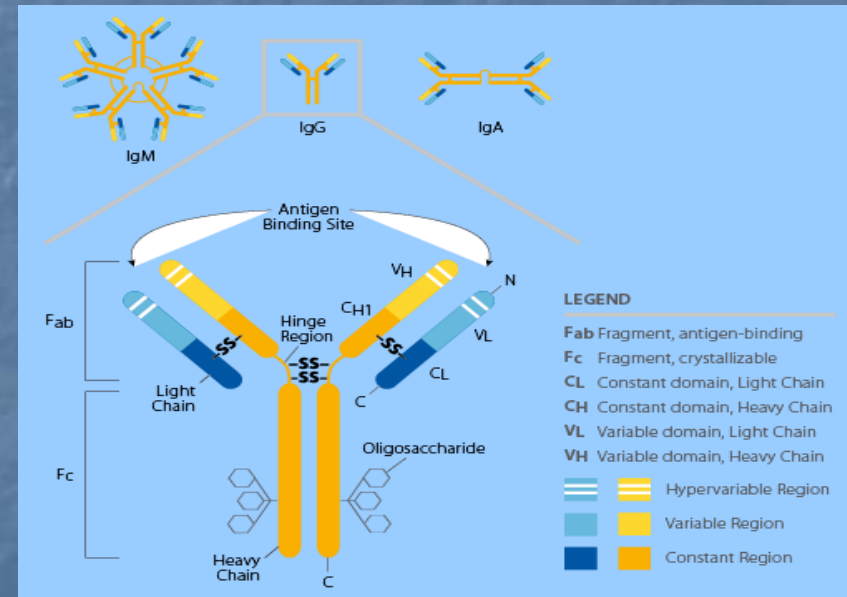
Csak rövid távon létrejövő gyenge kötőerők, reverzibilis kötések jönnek létre, sok ponton van kapcsolódás, de ehhez pontos térbeli komplementaritás (kulcs-zár illeszkedés) szükséges

# Immunglobulin felépítése

-**monoklonális At** – egyetlen plazma sejt klón termeli, a makromolekuláris Ag meghatározott epitópjával reagál

-**poliklonális At** – az Ag több epitópjára ellen termelődött At-k keveréke

-**REKOMBINÁNS ELLENANYAG**



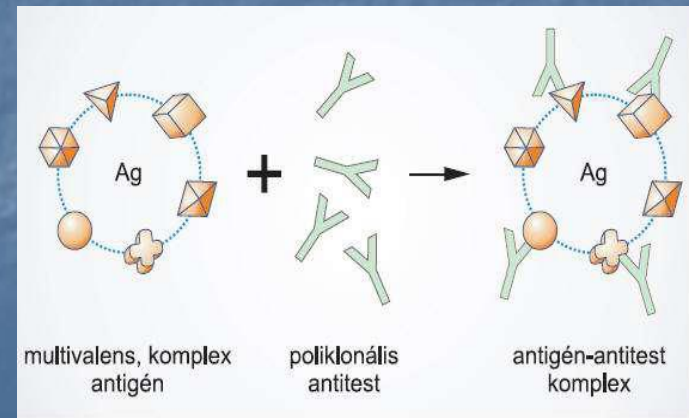
# Ellenanyagok I

## Poliklonális ellenanyag

Állatok immunizációja

### Jellemzők

- több klónból (sejtből) származnak
- egyetlen antigén több epitópjához kötődnek - gyakori a keresztreakció
- erős komplex (nagyon alacsony a kimutatási határ)
- véges mennyiségben állítható elő



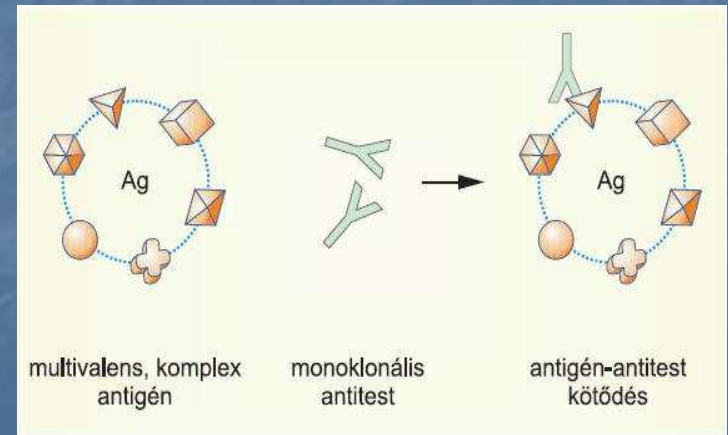
# Ellenanyagok II

## Monoklonális ellenanyag

Hibridóma

### Jellemzők

- egyetlen klónból származnak
- egyetlen antigén egyetlen epitópjához kötődnek - ritka keresztreakció (nagyon szelektív)
- gyakorlatilag végtelenségig termeltethető
- Előnye: jól definiálható, állandó affinitású reagensek
- Korláta: heterogén epitópokkal rendelkező antigént nehéz egyetlen epitópjára specifikus monoklonális antitesttel jellemezni



# Ag-At detektálás elvei

## Direkt módszer

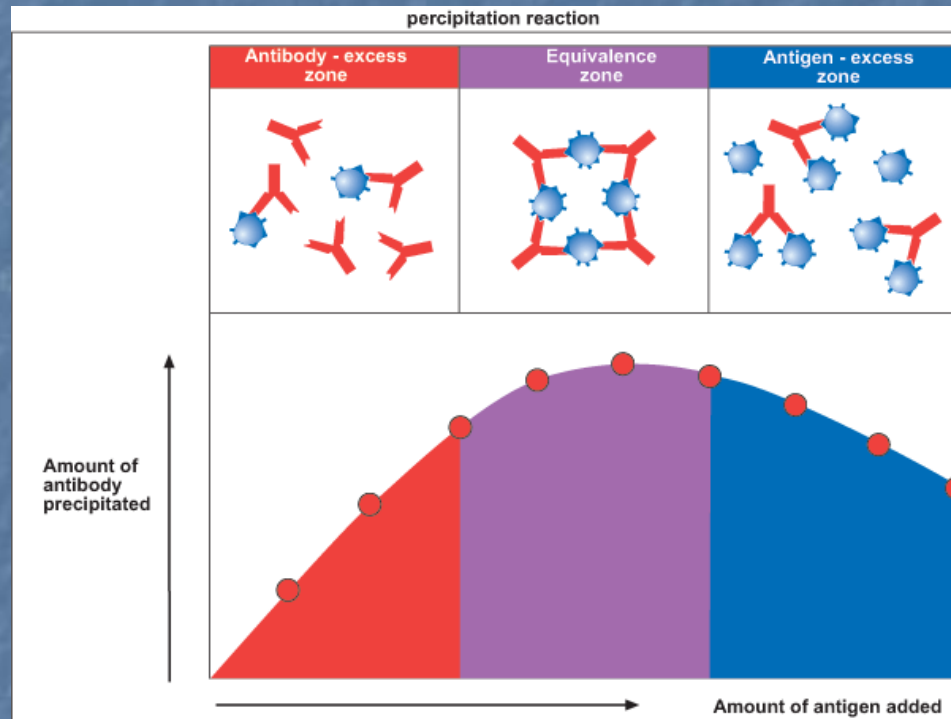
- direkt agglutináció
- precipitáció
- szolubilis immunkomplex analízis
  - immunnefelometria
  - immunturbidimetria

## Indirekt immuneszé

(jelzett Ag) v. immunometriás esszé(jelzett At)

- homogén
- heterogén
  - kompetitív
  - nem kompetitív

# Heidelberger görbe



Y tengely: Precipitátum mennyisége

X tengely: Antigén mennyisége



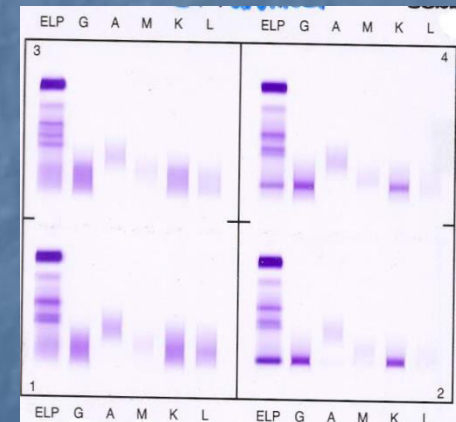
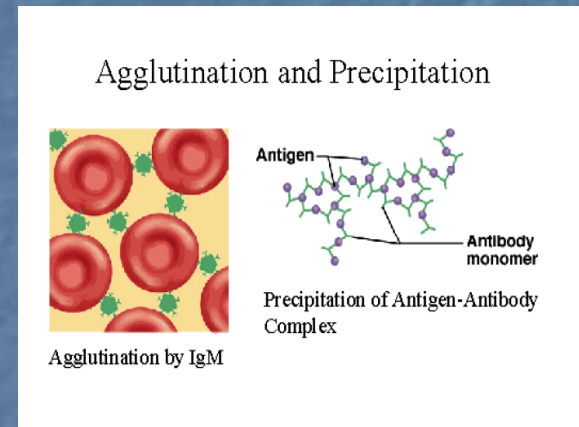
# Direkt módszerek I

- szerológia, bakteriológia

**1. Direkt agglutináció** –  
sejtek felületén elhelyezkedő  
Ag-k – az Ag-At reakció  
szabad szemmel látható  
összecsapzódást eredményez  
pl. vércsoport Ag , Widal  
reakció

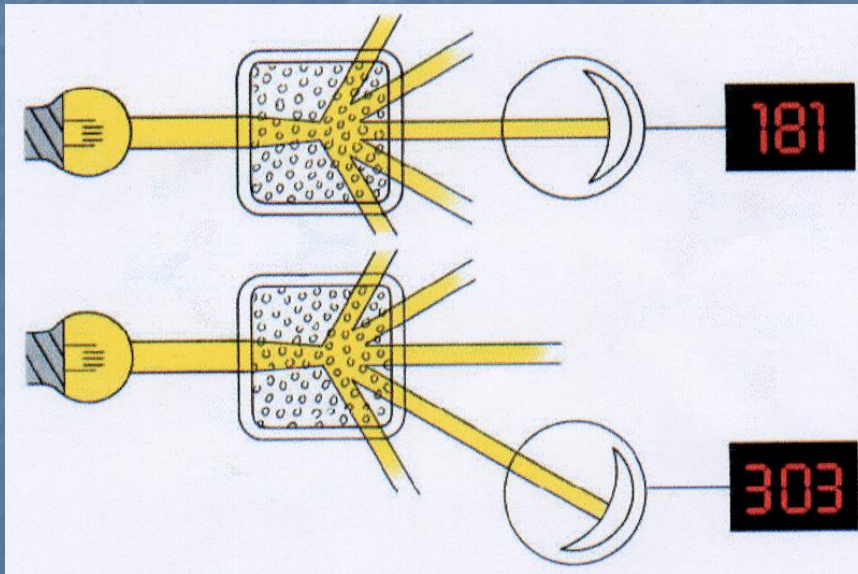
## 2. Precipitáció

- radiális immundiffúzió
- immunelektroforézis,  
immunfixációs elektroforézis  
stb



# Direkt módszerek II

## 3. Szolubilis, kolloidálisan oldott immunkomplex mérés - mg/L, g/L analit koncentráció



**Turbidimetria:** A koncentrációval arányos fényintenzitás csökkenését méri.

**Nefelometria:** A koncentrációval arányos szórt fény intenzitását méri

# Indirekt immulesszék

- $\mu\text{g/L}$ - $\text{pg/L}$  analit koncentráció
- Érzékenyen mérhető nyomjelző anyag kovalens hozzákötése az Ag vagy At-hez
- Az IC (Ag\*At vagy AgAt\*) mennyiségének meghatározása közvetve, a nyomjelző anyag(\*) mennyiségének mérésével történik
- Jelzett Ag-immulesszék – RIA(radioimmulesszék), EIA(enzimimmulesszék), FIA, LIA
- Jelzett At-immulesszék eljárás:IRMA,IEMA(immun enzimetriás esszék), IFMA,ILMA
- Kivitelezése alapján – homogén vagy heterogén immulesszék – a nem kötött jelzett anyagok elválasztása nem szükséges, ill. szükséges
  - Heterogén módszer:
    - kompetitív
    - nem kompetitív

# Jelölő anyag

- ▶ radioaktív izotóp
- ▶ enzim
- ▶ fluoreszcens molekula
- ▶ kemilumineszcens molekula
- ▶ mágneses nanorészecske

Könnyen kapcsolható az antigenhez vagy az antitesthez

Könnyen mérhető

Nem interferál az antigén/antitest reakcióval

Gazdaságos

Környezet kímélő

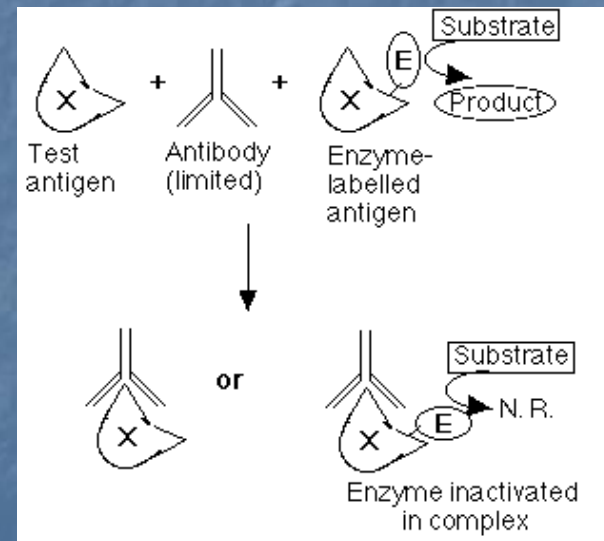
	Radioaktív Radioaktivitás	Enzim Abszorbancia	Fluoreszcens Fluoreszcencia	Kemilumineszcens Kemilumineszcencia
Kimutatási határ	$10^{-8}$ - $10^{-12}$ M	$10^{-5}$ M	$10^{-8}$ M	$10^{-8}$ - $10^{-12}$ M
Zaj	Nagyon kicsi	Mátrix zavar	Mátrix erősen zavar	Nagyon kicsi
Műszer	Bonyolult, drága	Közepes	Közepes	Egyszerű
Lineáris tartomány		102	103-104	106-107

# Homogén immuneszék

-Ha a szabad jelzett ligandum és IC-ben kötött jelzett ligandum aktivitása eltérő, az analitikai reakcióban elválasztás nélkül mérhető a jelzett IC mennyisége

EMIT, FPIA – elsősorban haptének mérésére (szteroid hormonok, gyógyszerek, kábítószer)

feltétele: a jelölő anyag jele megváltozzon, ha a jelölt anyag bekötődik az immunkomplexbe  
Nem kötött jelzett anyagok elválasztása nem szükséges

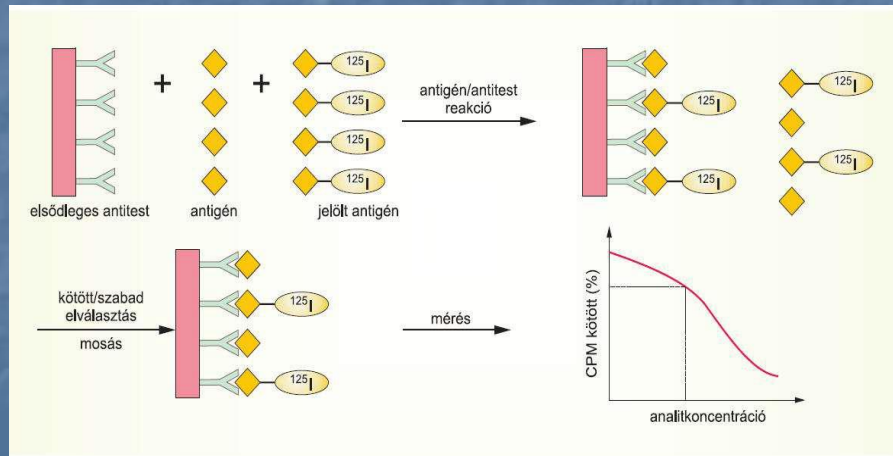


# Heterogén immuneszék I

- A nyomjelző anyagot tartalmazó Ag vagy At szilárd fázishoz kötve, a nem kötött jelzett anyagot eltávolítjuk

## 1.Kompetitív- haptének

- ekvivalensnél kisebb mennyiségű, immobilizált At kötőhelyeiért verseng az analit Ag és ismert mennyiségű Ag\* - mosás – immobilizált fázisban az Ag és Ag\* arányától függően fordított arányban van jelen az AgAt és Ag\*At –pl.kompetitív ELISA,RIA



# Heterogén immuneszék II

## 2. Nem kompetitív eljárások - háromligandos „szendvics” technikák

-Ag-k meghatározása :proteinek, peptidek, glikoproteinek(szérumfeh, hormon,tumormarker,mikroorganizmusok), de At meghatározásra is

### A. Ag meghatározás két (immobilizált és jelzett) antitesttel

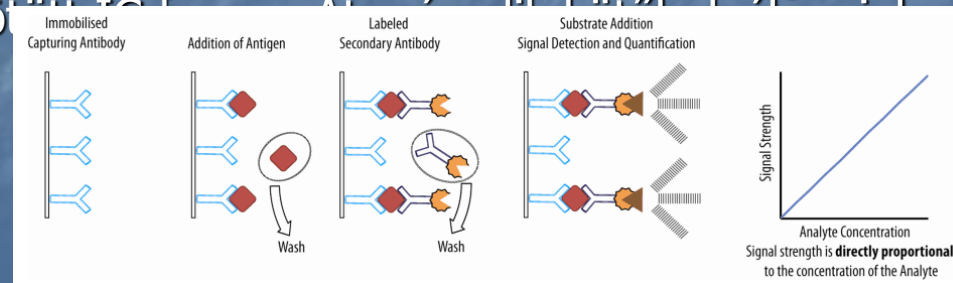
-feleslegben a fogó At – +minta - mosás + második At\* az Ag másik epitópjához – IC-ben jelzett anyag mérése pl. „szendvics” ELISA

### B. At meghatározás immobilizált Ag-vel

#### B1 -második jelzett At alkalmazása feleslegben

- immobilizált Ag-hez kötődik az analit At – mosás + kötött IC-hez jelzett második At (pl.humán Ig elleni)

B2 -második jelzett Ag alkalmazása- immobilizált Aghez kötődik az analit At – mosás – kötött IC-hez jelzett második Ag





# Immunanalitikai vizsgálatokat befolyásoló tényezők

## 1. Preanalitika

- a beteg
- vérvétel
- mintavételi csövek
- minta minősége
- szállítás, tárolás, előkészítés

## 3. Posztanalitika

- eredmény validálása
- lelet értékelése

## 2. Analitika

- interferenciát okozó antitestek
  - specifikus antitestek az analit ellen
  - heterofil At
  - specifikus HAAA
  - rheuma faktor (Rf)
- keresztreakciók – endogén immunglobulinok
- carryover
- transzport proteinek
- szérum-mátrix hatása
- hook effektusok

# Preanalitikai hibalehetőségek I

## 1.A beteg – in vivo körülmények

- általános állapot, terhesség, alimentáris állapot, stressz
- vérvételi körülmények
- radioaktív vagy fluoreszcens anyagok, gyógyszerek, gyógynövények, étrendkiegészítők
- a mérendő analit szintjének fiziológias fluktuációja

## 2.Mintavétel

## 3.Mintavételi cső

- műanyag vérvételi csőből kis molekulák pl.IRMA a vízdékony szilikon polimer az avidin-biotin kötést gátolja
- szérum – géles szeparáló csövek
- antikoagulánsok

# Preanalitikai hibalehetőségek II

## 4. A minta minősége

- hemolízis – proteolitikus enzimek – néhány labilis paraméter(pl.inzulin,glukagon,calcitonin,PTH,ACTH)
  - jelzavarás
- lipémia – immunturbidimetria, nefelometria
  - szabad zsírsavak a fehérjekötő helyekről leszorítják az analitot
- bilirubinémia – immunturbidimetria

## 5. Szállítás, tárolás

- minták stabilitása
- fagyasztott minták

# Analitikai hibalehetőségek I

## 1. Interferenciát okozó antitestek

- specifikus antitestek az analit ellen
- heterofil At
- specifikus HAAA
- rheuma faktor (Rf)

## 2. Keresztreakciók – endogén immunglobulinok

pl. immunometrikus immuneszékben tévesen alacsony értéket mérünk

## 3. Carryover – pl hCG, tumormarkerek

## 4. Transzport proteinek – specifikus, albumin

- pl. szabad hormon meghatározások – nem teljesen függetlenek a kötőfehérjéktől (nephrosis, cirrhosis, terhesség)

## 5. Szérum-mátrix hatása

-hiperproteinémia, paraproteinek, alacsony albumin szint

## 6. High-dose hook effektus

# Analitikai hibalehetőségek II

## Interferenciát okozó antitestek

### 1. Specifikus antitestek az analit ellen

- izotípus – főként IgG, de leírtak IgM, IgA típusút is
- gyakoriságuk eltérő  
pl. Prolaktin – normál populáció: 2%, hiperprolaktinémia: 21-46%, Tg – DTC-ben 26%

### 2. Heterofil antitestek

- multispecifikusak – több faj immunglobulinjával mutat aktivitást
- anamnézisben állati fehérje expozíció nem igazolható
- prevalencia: 05-12%

### 3. Specifikus HAAA (human anti-animal-antibody) HAMA, HARA stb

- izotípus. IgG, IgM, IgA, IgE-
- anamnézisben igazolható az expozíció az állati fehérjével
- szérumkoncentráció ug/L-g/L is lehet, akár évekig
- tesztben blokkoló ágensek

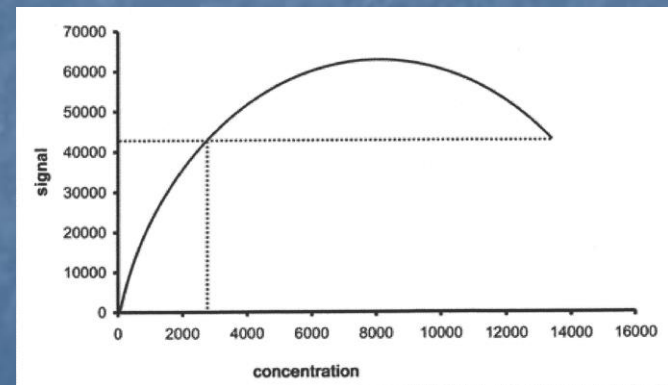
### 4. Rheuma faktor

- humán IgG Fc fragmentumok ellen képződnek
- izotípus főleg IgM
- előfordulás idősebb kor 5–10%, autoimmun betegekben gyakori, RA kezdeti stádium 40-60%, később 80%
- heterofil antitestként viselkednek
- megoldás lehet a minta előkezelése RF reagenssel (antihumán Ig) 15 g/L-ig és centrifugálás

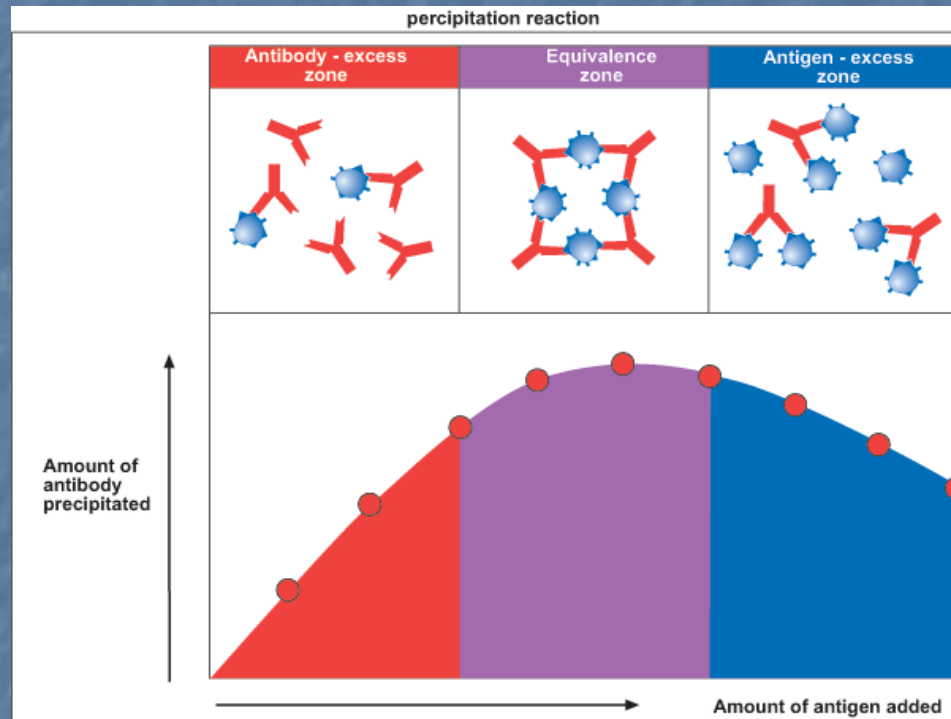
# Analitikai hibalehetőségek III

## 6. High-dose hook effektus

- a fogó At telítődik a magas Ag koncentráció miatt. A sok Ag a szabad jelzett At-hez is kötődik, a szendvics nem tud létrejönni.
- hígítással lehet igazolni, kiküszöbölni
- általában az egylépcsős szendvics-technikánál jelentkezhet, ahol az Ag, fogó At és jelzett At egyszerre van jelen



# Heidelberger görbe

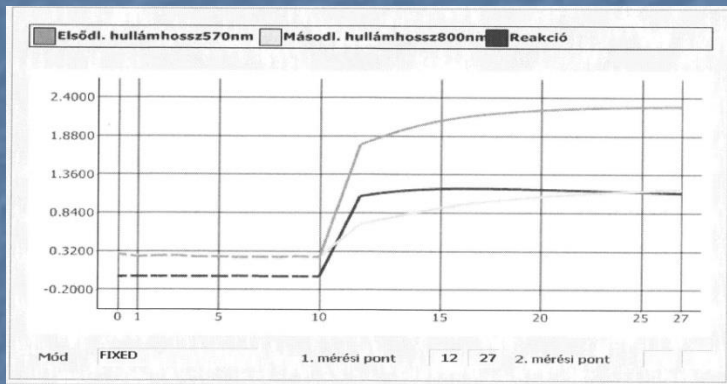


Y tengely: Precipitátum mennyisége

X tengely: Antigén mennyisége

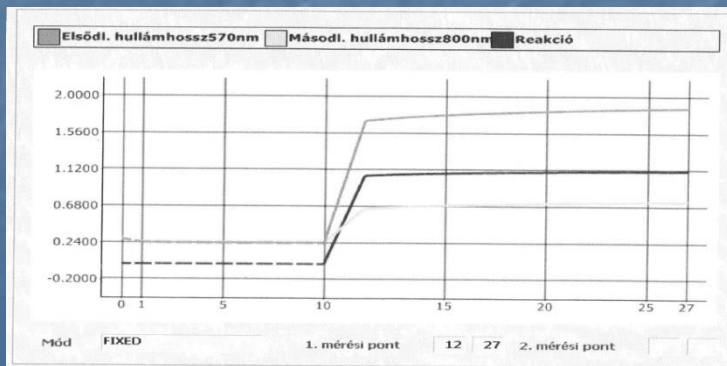
# Immunturbidimetria – példa

Magas koncentráció – prozóna effektus



	570nm	800nm	Reakció	Reagensvak
14	2.0402	0.8721	1.1681	1.0425
15	2.0987	0.9197	1.1790	1.0419
16	2.1432	0.9602	1.1830	1.0412
17	2.1781	0.9949	1.1832	1.0405
18	2.2050	1.0250	1.1800	1.0402
19	2.2263	1.0507	1.1756	1.0396
20	2.2424	1.0729	1.1695	1.0391
21	2.2557	1.0925	1.1632	1.0388
22	2.2659	1.1095	1.1564	1.0385
23	2.2736	1.1245	1.1491	1.0383
24	2.2796	1.1379	1.1417	1.0380
25	2.2839	1.1493	1.1346	1.0380
26	2.2868	1.1597	1.1271	1.0378
27	2.2896	1.1688	1.1208	1.0377
Max. OD	2.2896	1.1688	1.1832	1.0440
Min. OD	1.7728	0.6962	1.0766	1.0377
Reakció OD	0.0091			
Fotokalibráció	1.0176	0.7855		

Hígított minta – helyes reakciógörbe



	570nm	800nm	Reakció	Reagensvak
14	1.7711	0.6915	1.0796	1.0425
15	1.7846	0.6992	1.0854	1.0419
16	1.7961	0.7061	1.0900	1.0412
17	1.8061	0.7121	1.0940	1.0405
18	1.8150	0.7175	1.0975	1.0402
19	1.8229	0.7223	1.1006	1.0396
20	1.8308	0.7271	1.1037	1.0391
21	1.8380	0.7315	1.1065	1.0388
22	1.8446	0.7357	1.1089	1.0385
23	1.8508	0.7395	1.1113	1.0383
24	1.8563	0.7430	1.1133	1.0380
25	1.8613	0.7463	1.1150	1.0380
26	1.8663	0.7495	1.1168	1.0378
27	1.8711	0.7526	1.1185	1.0377
Max. OD	1.8711	0.7526	1.1185	1.0440
Min. OD	1.7141	0.6597	1.0544	1.0377
Reakció OD	0.0603			
Fotokalibráció	1.0219	0.7894		



**Köszönöm a figyelmet**