

Precipitace, radioimunodifúze (RID), nefelometrie, turbidimetrie

Mgr. Jana Nechvátalová
Ústav klinické imunologie a alergologie
FN u sv. Anny v Brně

REAKCE Ag a Ab

Reakce Ag - Ab

- primární fáze – rychlá; vznik vazby jednotlivých epitopů s vazebnými místy protilátek; není patrná okem
- sekundární fáze – vznik prostorového komplexu; uplatňuje se multivalence Ag a polyvalence Ab (IgM-pentamer=10 vazeb.míst, ovšem reálně je k dispozici 5-6); patrné okem nebo koloidní roztok → analyzátory

Klasické serologické reakce

Aglutinace – reakce mezi korpuskulárním Ag a Ab s následnou aglutinací částic; proběhne 1.+ 2.fáze interakce Ag a Ab

Precipitace – reakce mezi solubilním Ag (nízkomolekulární) a Ab s následným vznikem precipitátu proběhne 1.+ 2.fáze interakce Ag a Ab

Imunoeseje – reakce mezi Ag a Ab vizualizována enzymem, fluorochromem n. radioaktivním zářičem (EIA, RIA n. FIA) ; většinou proběhne jen 1. fáze inter. Ag a Ab

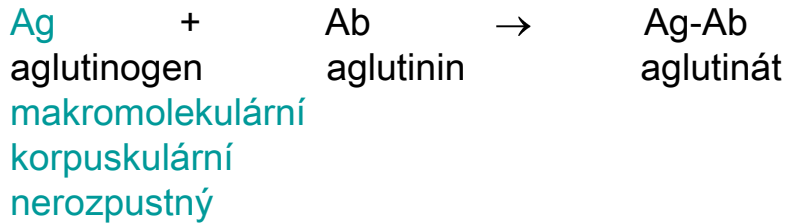
Metodiky využívající efektorového účinku Ab:

Metodiky s aktivací komplementového systému komplexem Ag – Ab, např. komplement-fixační reakce (KFR)

Metodiky s inhibicí biologických účinků některých Ag, např. neutralizační test, hemaglutinačně inhibiční test (HIT)

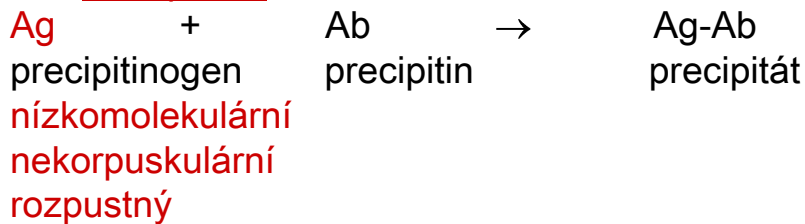
Aglutinace x precipitace

- Aglutinace



Protilátky namířené proti epitopům antigenních částic vytváří mezi korpuskulami můstky, které vedou ke vzniku shluků – aglutinátů.
jako Ag slouží např. těla bakterií

- Precipitace



Reakce mezi solubilním antigenem a protilátkou s následným vznikem precipitátu (hydrofobní vazby – nerozpustný komplex).

Precipitace

v tekutém prostředí

- využívá se efekt, že při reakci Ag-Ab vzniká zákal – precipitát, jehož intenzita je při konstantním množství přidané protilátky úměrná přidané koncentraci vyšetřovaného antigenu
- měření intenzity zákalu – nefelometrie, turbidimetrie
- obě metodiky umožňují kvantitativní stanovení obsahu proteinů ve vzorku odečtem z kalibrační křivky

Nefelometrie a turbidimetrie

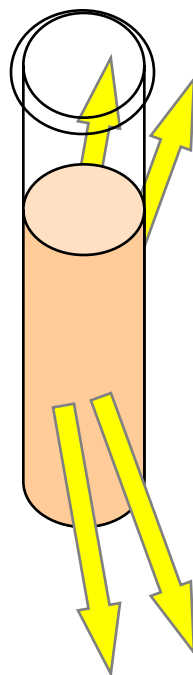
- reakce založené na měření množství imunitních komplexů vytvořených interakcí specifických protilátek s antigenem
- koncentrace příslušného Ag je úměrná rychlosti tvorby zákalu nebo hustotě zákalu
- stanovení sérových bílkovin
- měření probíhá v tekutém prostředí v měřící kyvetě (pufr, látka urychlující reakci, Ag, Ab)
- množství vytvořených komplexů je p.ú.konc. Ag

Precipitace v tekutém prostředí:

Nefelometrie

-hodí se pro nižší koncentrace

viditelné světlo 




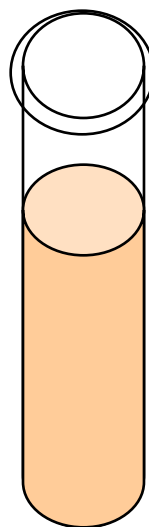
detektor je ve směru kolmém na vstupující paprsek

měří množství světla rozptýleného při průchodu paprsku (množství světla odraženého od vznikajících komplexů)

Turbidimetrie

- hodí se pro koncentrovanější roztoky

viditelné světlo 



detektor je v ose paprsku

měří množství procházejícího světla (úbytek intenzity světla, které prošlo roztokem v kyvetě)

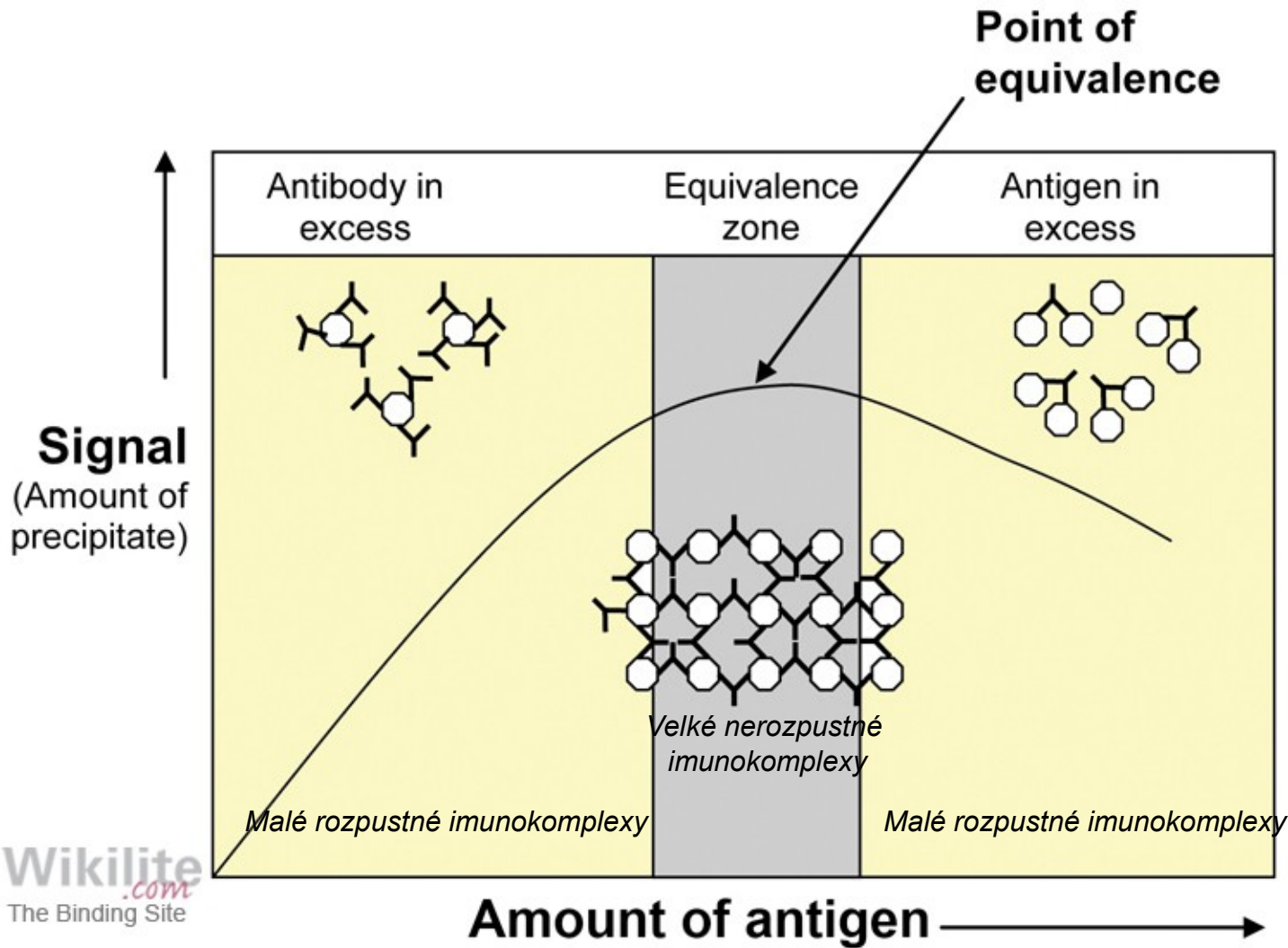
nefelometrie je 5-10x citlivější a nákladnější než turbidimetrie

Precipitace

v gelu

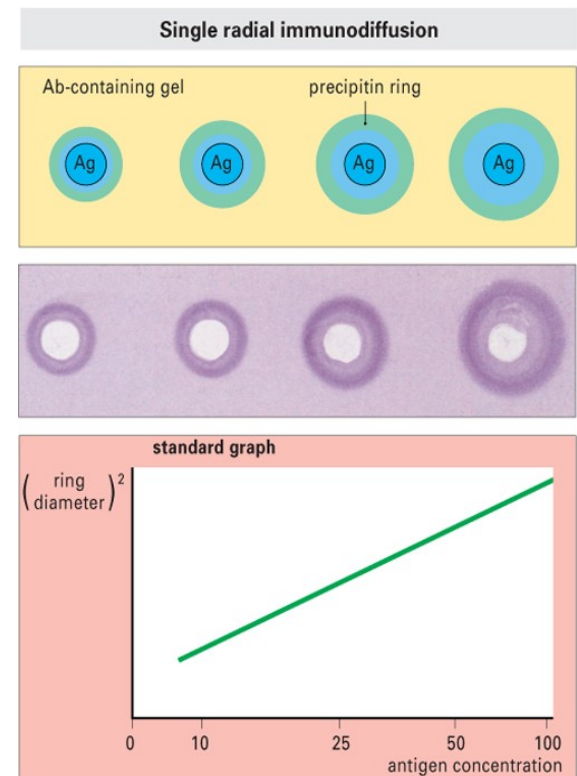
- agaróza, agar
- umožňují detekci precipitačních linií
- je založena na **pasivní difuzi látek v prostředí koncentračního gradientu**
- Ag i Ab difundují v prostředí gelu a v místě, kde konc. Ag i Ab dosáhnou optimálního (ekvimolárního) poměru vzniká precipitát

Dynamika tvorby imunokomplexů

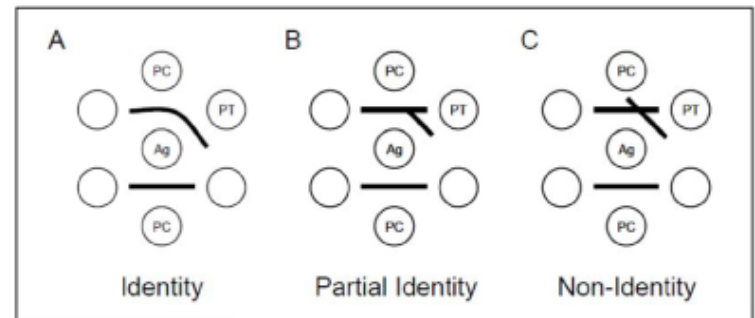
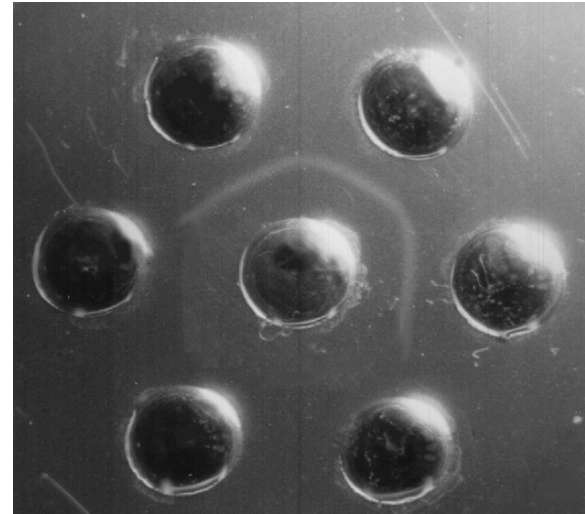


Podle počtu difundujících reaktantů:

- jednoduchá radiální imunodifúze
 - koncentrační gradient jednoho z reaktantů (většinou Ag)
 - druhý reaktant (většinou Ab) - rovnoměrně rozptýlen ve struktuře gelu
 - výsledkem jsou ostře ohraničené kroužky precipitátu
 - plocha prstence - p.ú. konc. vyšetřovaného Ag
 - podle konc. standardu – kalibr. křivka

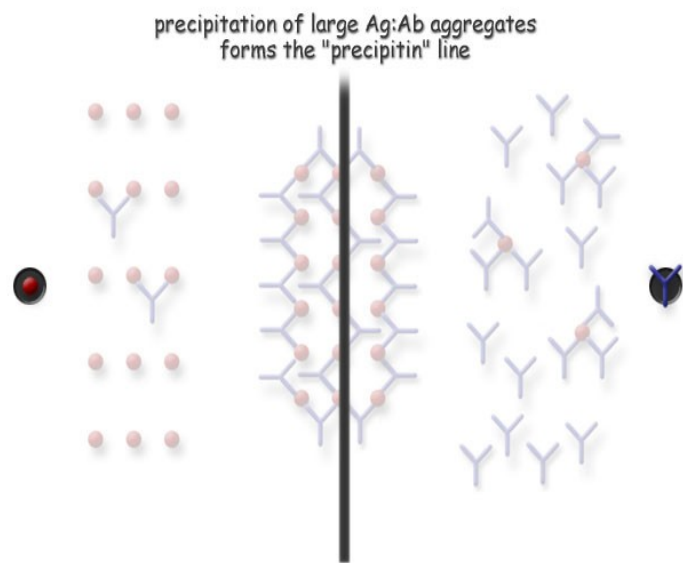
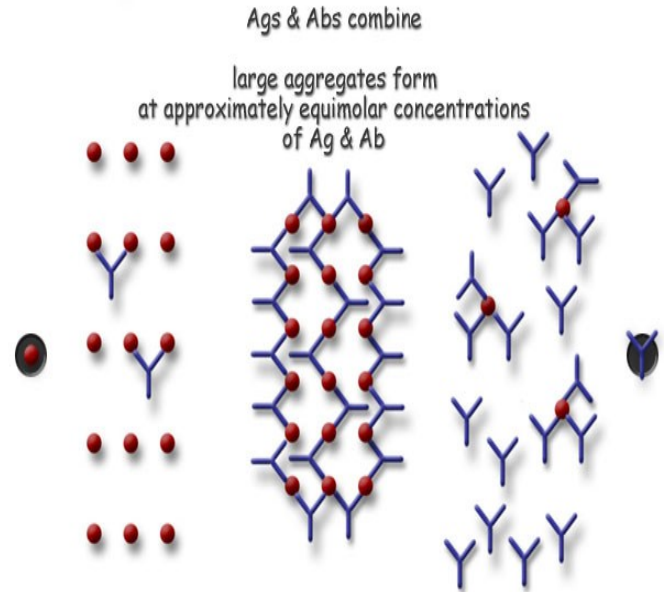
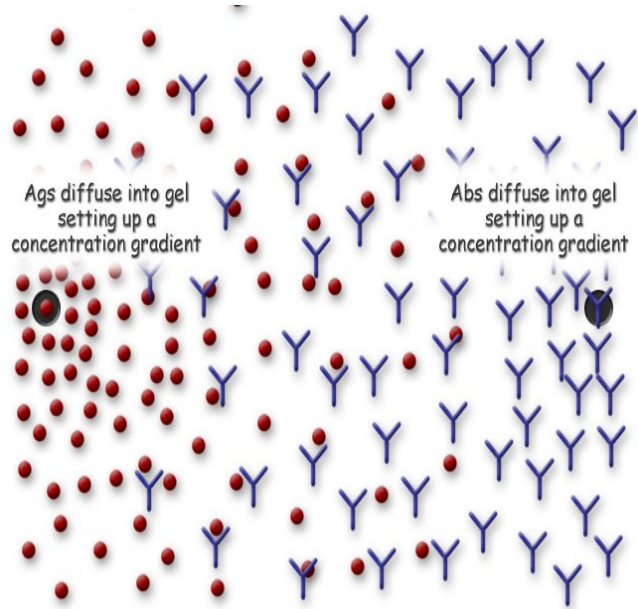


- dvojitá radiální imunodifúze (podle Ouchterlonyho)
- testování více materiálů
- gradient vytváří jak Ag, tak Ab a dochází k protisměrné difúzi obou reaktantů (radiálně)
- v zóně ekvivalence – precipitační linie, která ukazuje na pozitivitu reakce
- hodnocení - kvalitativní



PC = Positive Control
 Ag = Antigen
 PT = Patient Serum

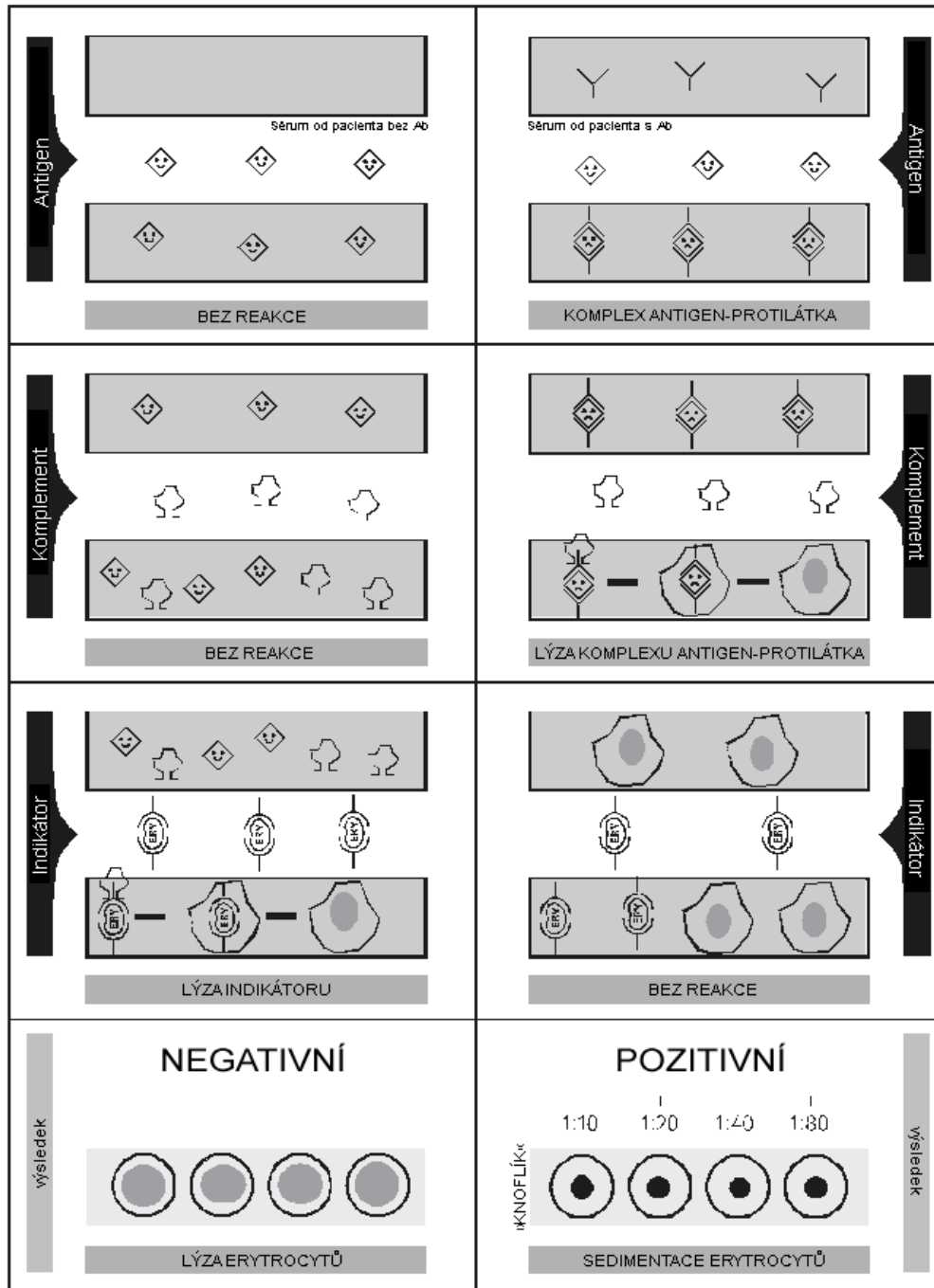
<http://www.immy.com/products/immunodiffusion/>



Kalibrační křivka –
charakterizuje vztah mezi
koncentrací vyšetřované látky
a např. průměrem kruhů na
příslušné vyšetřovací desce

Komplementfixační reakce (KFR)

- imunologická metoda patřící mezi základní serologické metody, jež fungují na principu reakce protilátky s antigenem, využívá schopnosti **komplementu vázat se na komplex antigenu s protilátkou**
- lze použít k identifikaci jak specifických protilátek tak antigenů
- využívá se např. k průkazu protilátek proti původcům respiračních infekcí a řady virových onemocnění
- reakce se hodnotí v několika ředěních séra, jako výsledek se udává nejvyšší ředění séra (titr), při kterém ještě nedošlo k hemolýze



Neutralizační reakce

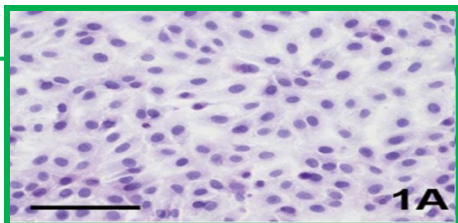
testované **sérum** se smíchá s **kulturou konkrétního viru** a nechá se inkubovat

obsahuje-li testované sérum protilátky proti tomuto viru, dojde k vazbě protilátek na receptory viru a jeho inaktivaci

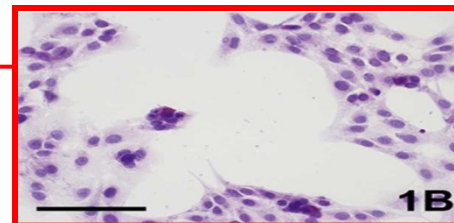
neobsahuje-li sérum protilátky virus zůstane aktivní

inkubovaným roztokem se poté naočkuje buněčná kultura

inaktivovaný virus není schopen napadnout buňky a nedojde k vytvoření cytopatického efektu



na buněčné kultuře je pod mikroskopem patrný cytopatický efekt



metoda se obvykle provádí v několika ředěních séra, jako výsledek se udává nejvyšší ředění séra (tzv. titr, tradičně ve formě 1:xxx) při kterém ještě nedošlo k cytopatickému efektu či onemocnění (uhnutí) zvířete

senzitivita a specifita

Pravdivě pozitivní: Nemocný je správně identifikován jako nemocný

Falešně pozitivní: Zdravý je nesprávně identifikován jako nemocný

Pravdivě negativní: Zdravý je správně identifikován jako zdravý

Falešně negativní: Nemocný je nesprávně identifikován jako zdravý.

- **Senzitivita** je definována jako pravděpodobnost, že test bude pozitivní u nemocných

$$\text{sensitivity} = \frac{\text{number of True Positives}}{\text{number of True Positives} + \text{number of False Negatives}}$$

- **Specifita** je definována jako pravděpodobnost, že test je negativní u osob bez nemoci

$$\text{specificity} = \frac{\text{number of True Negatives}}{\text{number of True Negatives} + \text{number of False Positives}}$$