



Imunoanalýza ELISA

Mgr. Julie Štíhová

Fakultní nemocnice u Sv. Anny v Brně
Ústav klinické imunologie a alergologie

Imunoanalytické metody

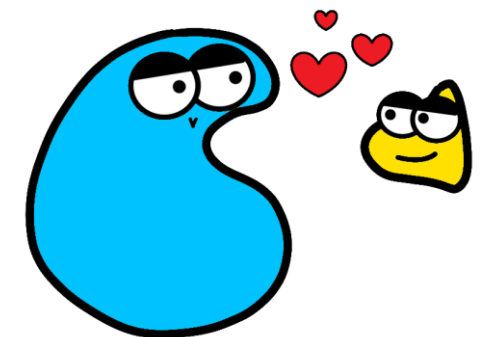
Vizualizace reakce **antigen-protilátka** pomocí **značky**

Rozdělení metod dle typu
značky:

- EIA – značkou je enzym
- RIA - radioizotop
- LIA - luminofor
- FIA - fluorofor

Rozdělení metod dle
uspořádání:

- Homogenní
- Heterogenní
 - Kompetitivní
 - Nekompetitivní



You are the substrate to my enzyme
and nothing could ever denature us.

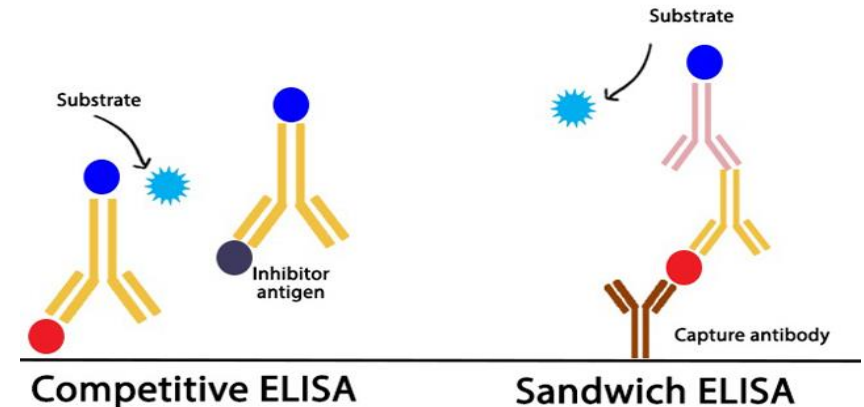
Imunoanalytické metody

Heterogenní kompetitivní:

- Analyt ze vzorku + značený analyt od výrobce – soutěž o omezené množství antigenu
- Měřený signál je **nepřímo úměrný** množství analytu

Heterogenní nekompetitivní:

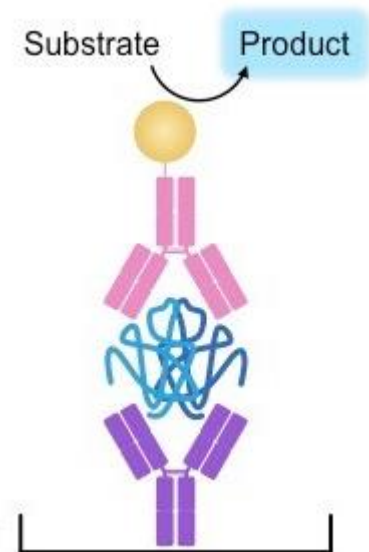
- Detekční protilátka / antigen v nadbytku – analyt ze vzorku vyvázán
- Měřený signál je **přímo úměrný** množství analytu



ELISA

Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

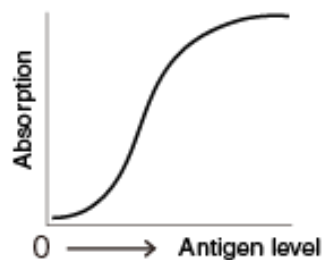
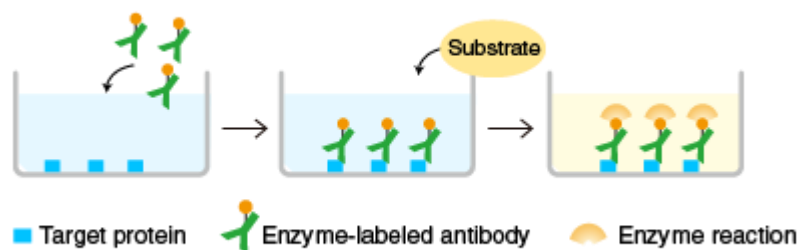
- Heterogenní imunoanalýza – nutná separace nezreagovaných složek
- Vazba antigenu / protilátky na pevnou fázi (stěna destičky)
- Vizualizace - enzymatická přeměna substrátu na barevný produkt
 - **Křenová peroxidáza** (tetrametylbenzidin → tetrametylbenzimidin → 450 nm)
 - Alkalická fosfatáza (p-nitrofenylfosfát → nitrofenol → 405 nm)
- Vysoká citlivost – **pg/ml**



ELISA - uspořádání

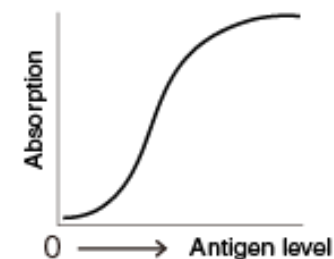
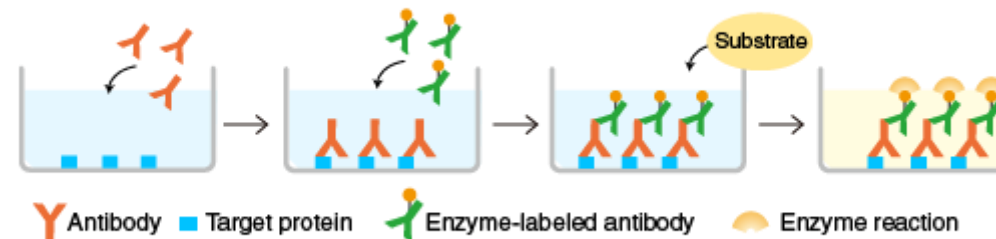
Přímá ELISA

- Analyt (Ab/Ag) imobilizován
- Detekce pomocí značené protilátky



Nepřímá ELISA

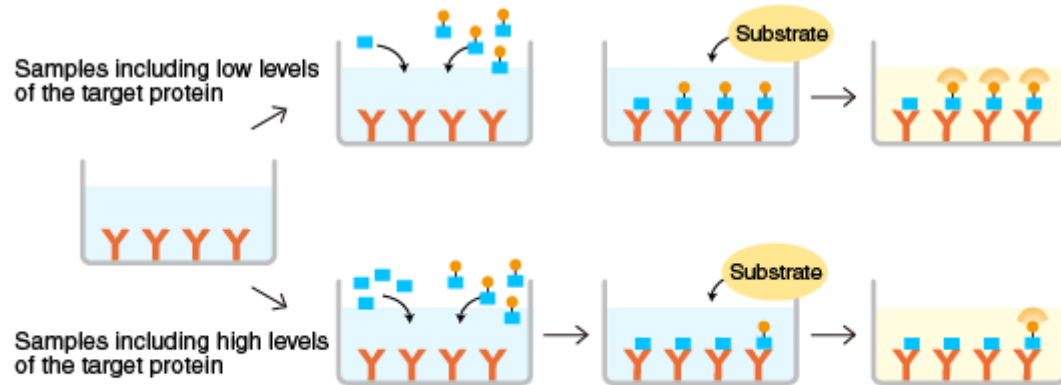
- Na analyt se váže primární neznačená protilátka
- Na primární protilátku se váže sekundární značená protilátka



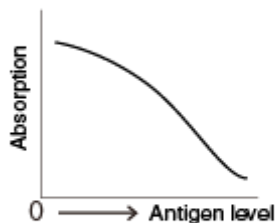
ELISA - uspořádání

Kompetitivní ELISA

- Detekce analytů s malou Mr

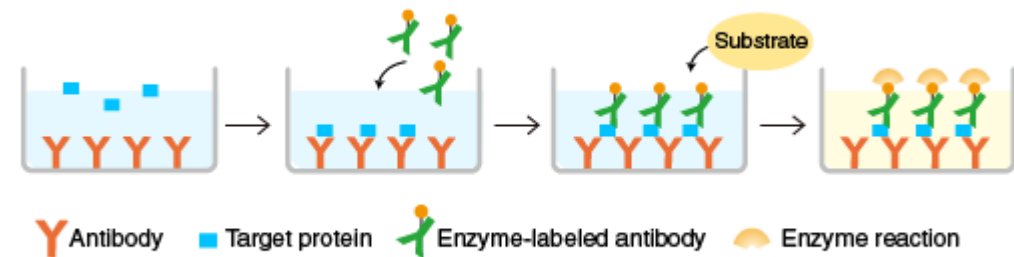


Y Antibody ■ Target protein ■ Enzyme-labeled antigen ● Enzyme reaction

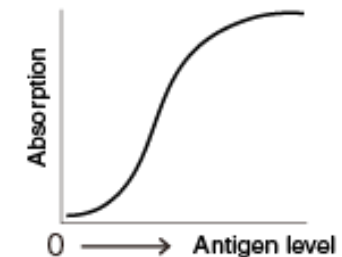


Sendvičová ELISA

- Detekce analytů s vysokou Mr (proteiny)
- Vysoká přesnost



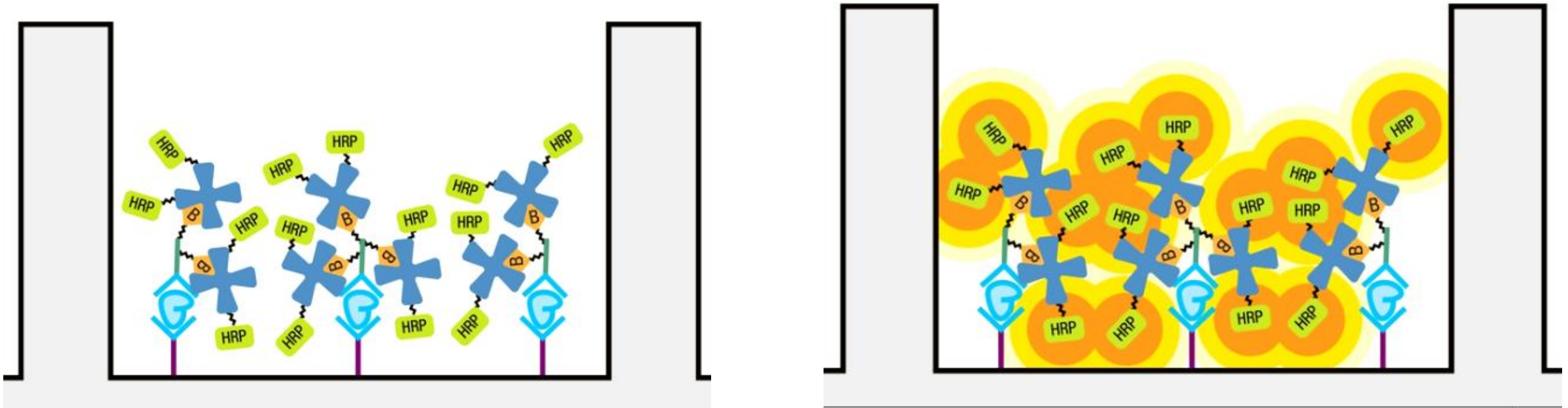
Y Antibody ■ Target protein ■ Enzyme-labeled antibody ● Enzyme reaction



<http://ruo.mbl.co.jp/bio/e/support/method/elisa.html>

Sendvičová ELISA – vyšší senzitivita

- Systém biotin – avidin/streptavidin – na jeden imunokomplex se váže více molekul enzymu – silnější zbarvení (pro analyty s nízkou koncentrací)



Kautování ELISA desky

○ Imobilizace Ag nebo Ab na plastový povrch desky

1. Povrchová aktivace desky

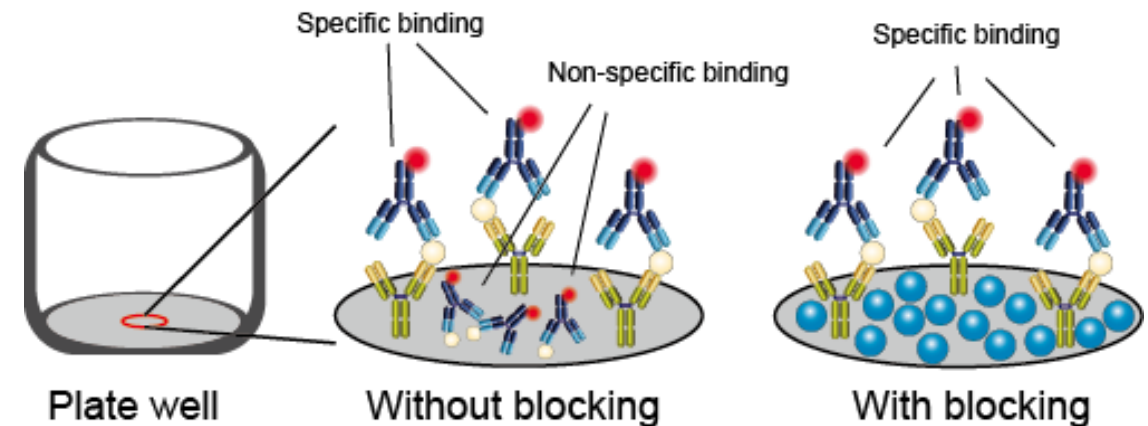
- vazba NH_2 nebo COOH skupin – tvorba kovalentních vazeb s protilátkou nebo antigenem
- Vhodné pro stanovení malých molekul – např. peptidy

2. Pasivní adsorpce

- Hydrofóbní interakce mezi nepolárními strukturami proteinu a plastovým povrchem desky
- Protein určený k adsorpci je rozpuštěn v alkalickém **kautovacím pufru** (pH 9,5) – naleptává plastový povrch a usnadňuje adsorpci Ag nebo Ab

○ Blokování desky

- Po navázání Ab/Ag zůstává část plastového povrchu volná. Aby bylo zabráněno nespecifickým vazbám, je nutno tato místa zablokovat inertní bílkovinou BSA – bovinní sérový albumin



System zachytná + detekční Ab

Proč je každá protilátka od jiného živočišného druhu?

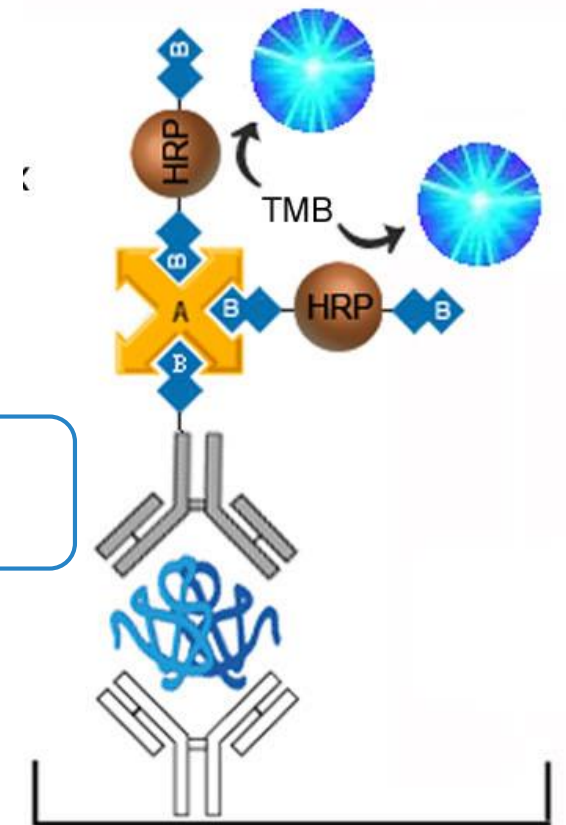
Tato kombinace významně snižuje riziko zkřížené reaktivity, která by mohla způsobit vznik nespecifických imunokomplexů (zdroj falešné positivity)!!!

Lidská monoklonální protilátka – s **vysokou specifitou** váže pouze konkrétní antigen

Detekční protilátka
lidská, monoklonální

Zachytná protilátka – s **vysokou senzitivitou** váže všechny varianty daného antigenu

Zachytná protilátka
myší, polyklonální



ELISA v rutině

○ Výrobce dodává kity „ready to use“

+ Úspora času

+ Úspora práce

+ Standardizace metody

- Drahé



Co obsahuje ELISA kit pro rutinu?

- Kautovaná destička se stripy
- Plastová folie na zakrytí destičky
- Kalibrátory
- Pozit. a negat. kontrola
- Promývací roztok
- Ředící roztok (pufr)
- Detekční protilátka
- Substrát
- Stop činidlo (obvykle 1M H₂SO₄)

ELISA ve výzkumu

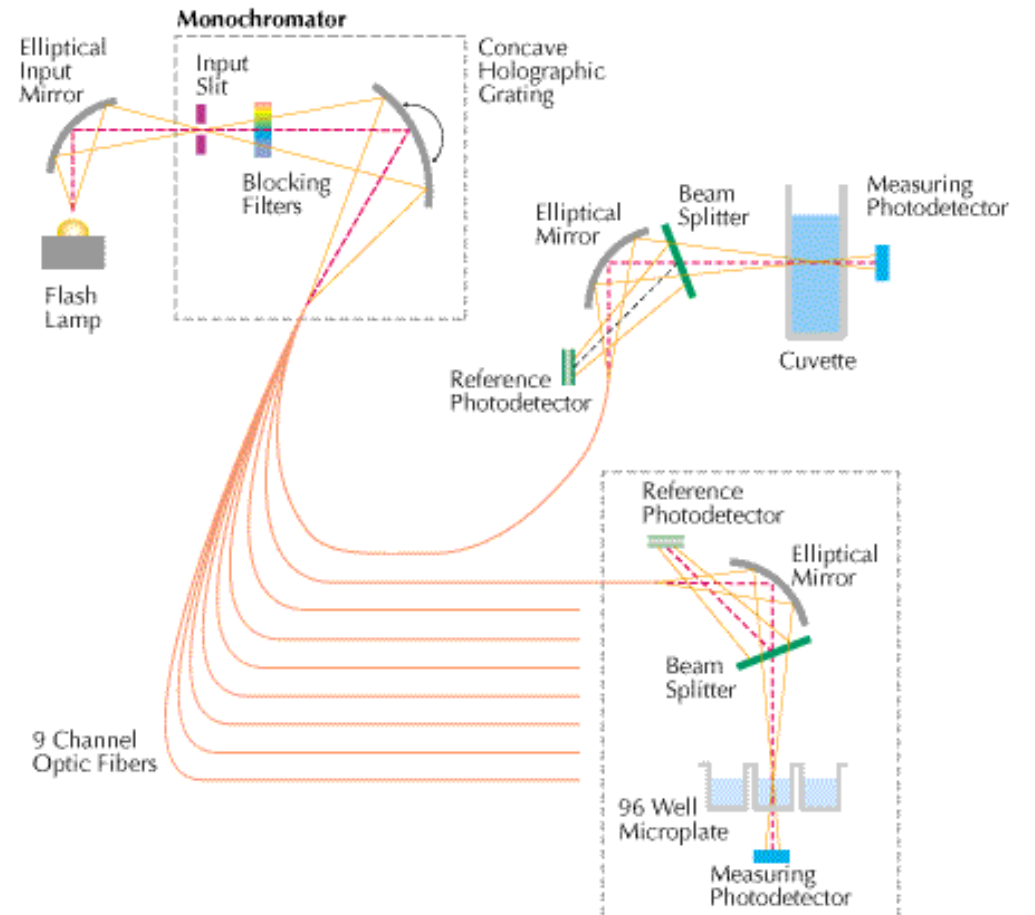
- Prázdné destičky – nutno ručně kautovat a blokovat
 - Kalibrátory nutné rozpouštět
 - Kit neobsahuje všechny reagensie
- ↓
- ELISA pro výzkum je pracnější a časově náročná

Co obsahuje ELISA kit pro výzkum?

- Prázdné destičky – nemají stripové uspořádání
- Kit s reagensiemi:
 - Lyofilizované kalibrátory
 - Primární protilátka
 - Sekundární protilátka
 - Substrát

Měření výsledků

- Přístroj ELISA reader
- Princip – vertikální spektrofotometrie
 - Zdroj světla – Xe výbojka
 - Výběr vlnové délky – interferenční filtry
 - Optická dráha – 9 optických vláken (8 měří vzorky, 9. vlákno kontrola intenzity záření)
 - 9 detektorů - fotodiody



Hodnocení výsledků

1. Kvalitativní hodnocení

- Hodnotíme vizuálně přítomnost / nepřítomnost reakce → ano / ne (např. srovnání vzorku s blankem)

2. Semi-kvantitativní hodnocení

- IP (index positivity) = absorbance vzorku / absorbance cut-off kalibrátoru

3. Kvantitativní hodnocení

- Kalibrační křivka – ředění kalibrátoru o známé koncentraci analytu
- Výsledek (absorbance) se odečítá z kalibrační křivky
- Přepočet absorbance na koncentraci (Lambert-Beerův zákon)
- Výsledek má číselnou hodnotu s udanými jednotkami (např. U/ml, ug/ml)

Využití ELISA v imunologii

- Antiinfekční imunita
 - Stanovení protilátek proti některým infekčním agens
- **Autoimunitní onemocnění**
 - Stanovení autoprotiátek

ELISA a antiinfekční imunita

- Protilátky proti tetanickému toxoidu
 - sledování odpovědi na vakcinaci (snížení u humorálních imunodeficiencí – CVID, AIDS)
- Protilátky proti difterickému anatoxinu
 - kontrola očkování (především u starých osob a pacientů s poruchou imunity)
- Protilátky proti kapsul. antigenu *Haemophilus Influenzae*
 - Sledování úspěšnosti vakcinace, humorální imunodeficience
- Protilátky proti specifickému pneumokokovému kapsulárnímu polysacharidu (anti-PCP)
 - Sledování úspěšnosti vakcinace (zejména děti), humorální imunodeficience

Autoimunitní onemocnění

- Celá škála autoprotiátok (orgánově nespecifické, orgánově specifické)
 - ANA – proti jaderným antigenům (SLE)
 - ENA – proti extrahovatelným nukleárním antigenům (SS-A, SS-B, Jo1 atd. – Sjogrenův sy.)
 - AMA – proti mitochondriím (primární biliární cirhóza)
 - ASMA, LKM, LC – autoimunitní hepatitidy
 - ANCA – proti cytoplazmě neutrofilů
 - Anti-TTG – tkáňová transglutamináza (celiakie)
 - Anti-TG-tyreoglobulin, anti-TPO-tyreoidální peroxidáza (tyreoitidy)
 - RF – revmatoidní artritida
 - EMA – proti endomysiu – celiakie
 - ASCA – proti *Sacharomyces cerevisiae* – Crohnova choroba