

# Imunoelektroforéza

## Imunofixace

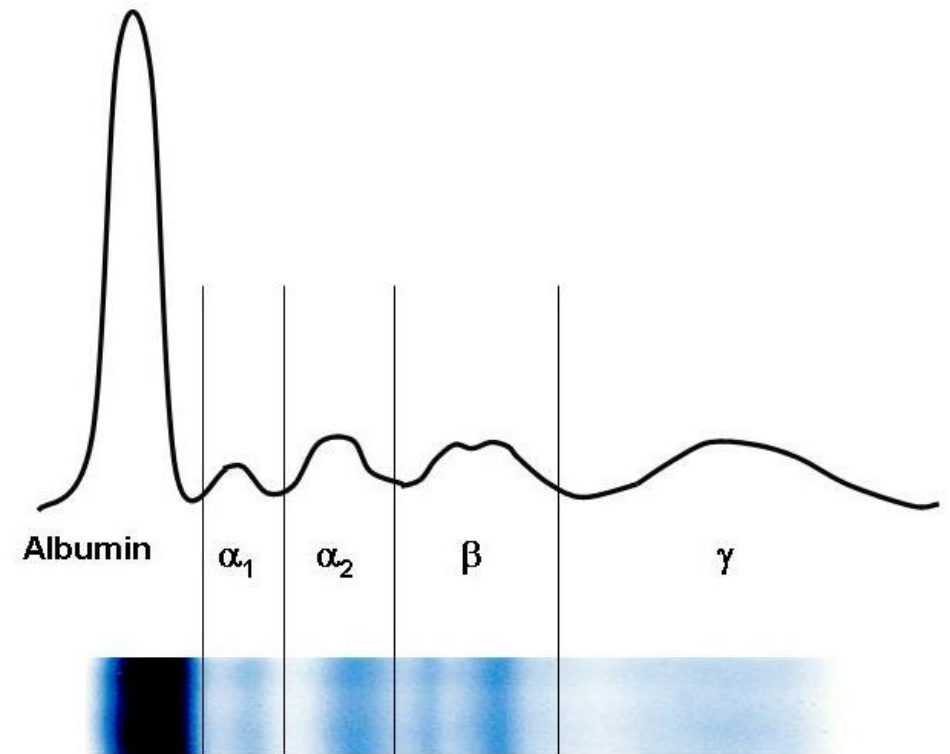
Mgr. Julie Štíhová

ÚKIA-FNUSA



# Klasická elektroforéza - screening

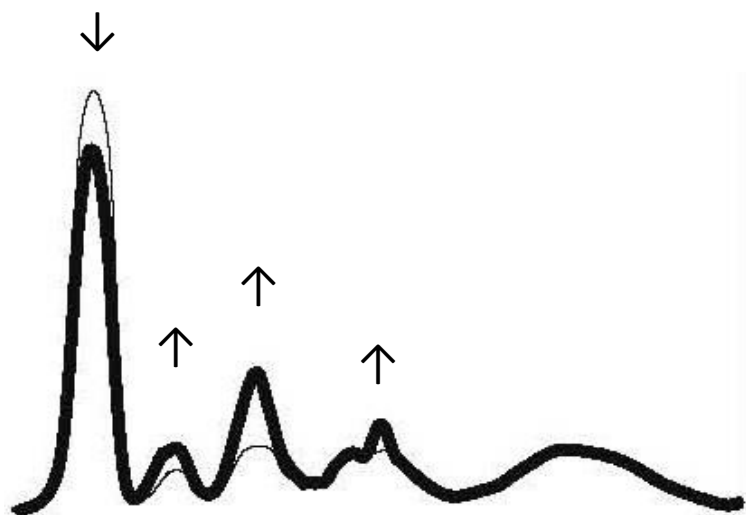
- Separace proteinů na základě rozdílné pohyblivosti v el. poli
- Médium – agarózový gel
- pH = 8,6 → anodická pohyblivost  
(většina proteinů izoel. bod kolem pH 5 - 6)
- Rozdělení do 5 základních frakcí
- Odečítání – většinou denzitometrie
- Imunologie – zájem o gamafrakci



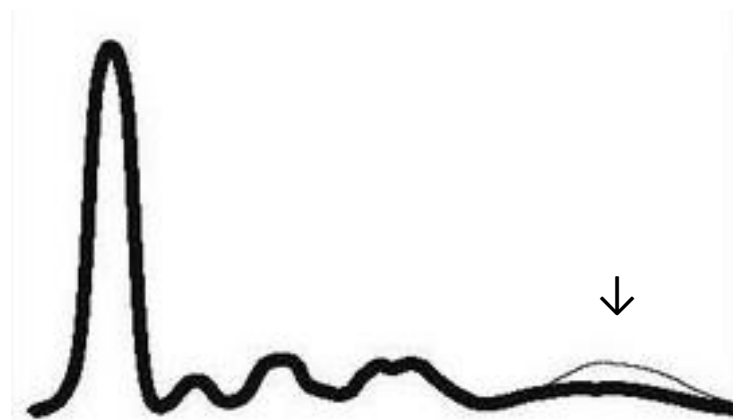
Pozn. Detailní princip elektroforézy lze najít v učebnicích klinické biochemie nebo instrumentální techniky

# Klasická elektroforéza - screening

Nevýhoda – detekce pouze velkých změn v proteinových frakcích



Zánět



Hypogamaglobulinemie



Hypergamaglobulinemie  
(monoklonální gamapatie)

# Využití elektroforézy v klinické praxi screening chorobných stavů

- Vyšetřovaný materiál: sérum, moč, likvor

## Hyperproteinémie:

- Záněť
- **monoklonální gamapatie** (v moči – Bence-Jonesova bílkovina)
- chronické dlouhotrvající infekce (zvýšená syntéza imunoglobulinů)

## Hypoproteinémie - většina chorobných stavů:

- porucha syntézy bílkovin v játrech
- nadměrné ztráty – nefrotický syndrom (vyšetření moči – zvýšené koncentrace bílkovin)
- poruchy výživy – malnutrice
- poruchy trávicího traktu – maldigestce a malabsorpce – nespecifické střevní záněty (Crohnova choroba, ulcerózní kolitida)
- Rozsáhlé popáleniny
- Hyperhydratace – dochází k naředění bílkovin séra – těhotenství (fyziologicky), nevhodně podaná infuze

# Využití elektroforézy v klinické praxi screening chorobných stavů

Likvor (CSF) + sérum (S) současně

- Izoelektrická fokusace: kvalitativní průkaz intratékální syntézy imunoglobulinů
- Intratékální syntéza protilátek v centrálním nervovém systému pochází z perivaskulárních infiltrátů B lymfocytů, které lokálně proliferují, dozrávají v plazmocyty a produkují příslušné protilátky
- Diagnostika **roztroušené sklerózy – průkaz oligoklonálních pásů v likvoru (pozitivita až v 98% případů)**
- Obrázek vpravo: oligoklonální pásy jsou přítomny pouze v likvoru (CSF), zatímco v séru chybí – jedná se o intratékální syntézu Ig – tento nález je pro roztroušenou sklerózu poměrně typický



# Modifikace elektroforézy

- Zvýšenou (i sniženou) koncentraci gamaglobulinů je nutno vždy dále došetřit
- Metody kvalitativní
  - Immunoelektroforéza (dle Graba a Williamse)
  - Protisměrná elektroforéza
- Metody kvantitativní
  - Raketková immunoelektroforéza (dle Laurella)
  - Dvourozměrná elektroforéza

Tyto metody jsou v dnešní době zastaralé a využívají se pouze výzkumně (pocházejí z dob, kdy nebyl znám proces výroby monoklonálních protilátek a používala se tedy pouze polyklonální směsná antiséra)

Pozn. Pro účely zkoušky je třeba důkladně znát **klasickou elektroforézu, imunofixaci a imunoblot**, ostatní metody jsou pouze rozšířením znalostí.

# Imunoelektroforéza

- 2 fáze:
  - 1) Rozdělení proteinů klasickou ELFO
  - 2) Aplikace antiséra do podélně vykrojeného žlábků → difuze do gelu
- V místě ekvivalentní koncentrace obou složek se vytvoří obloukovitá precipitační linie

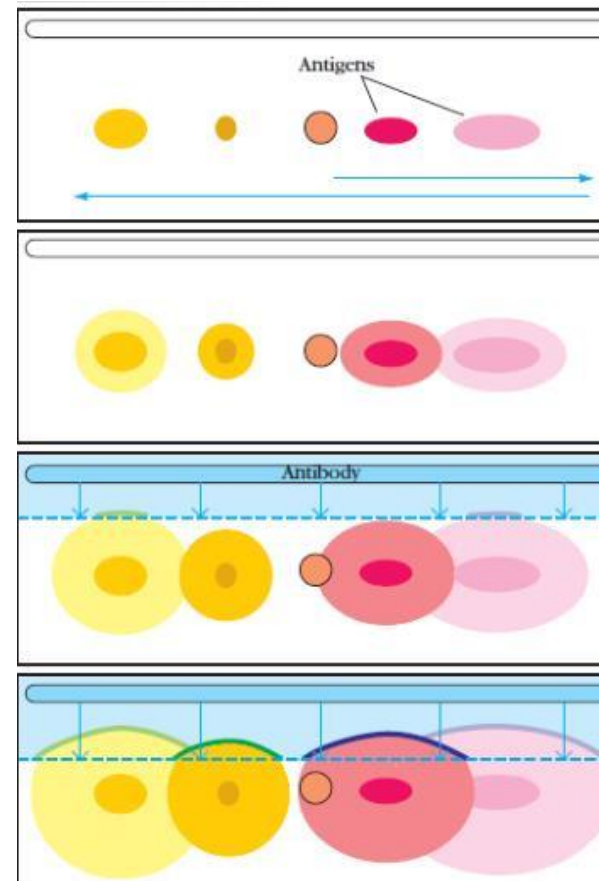


Figure:  
Immunoelectrophoresis of an antigen mixture.

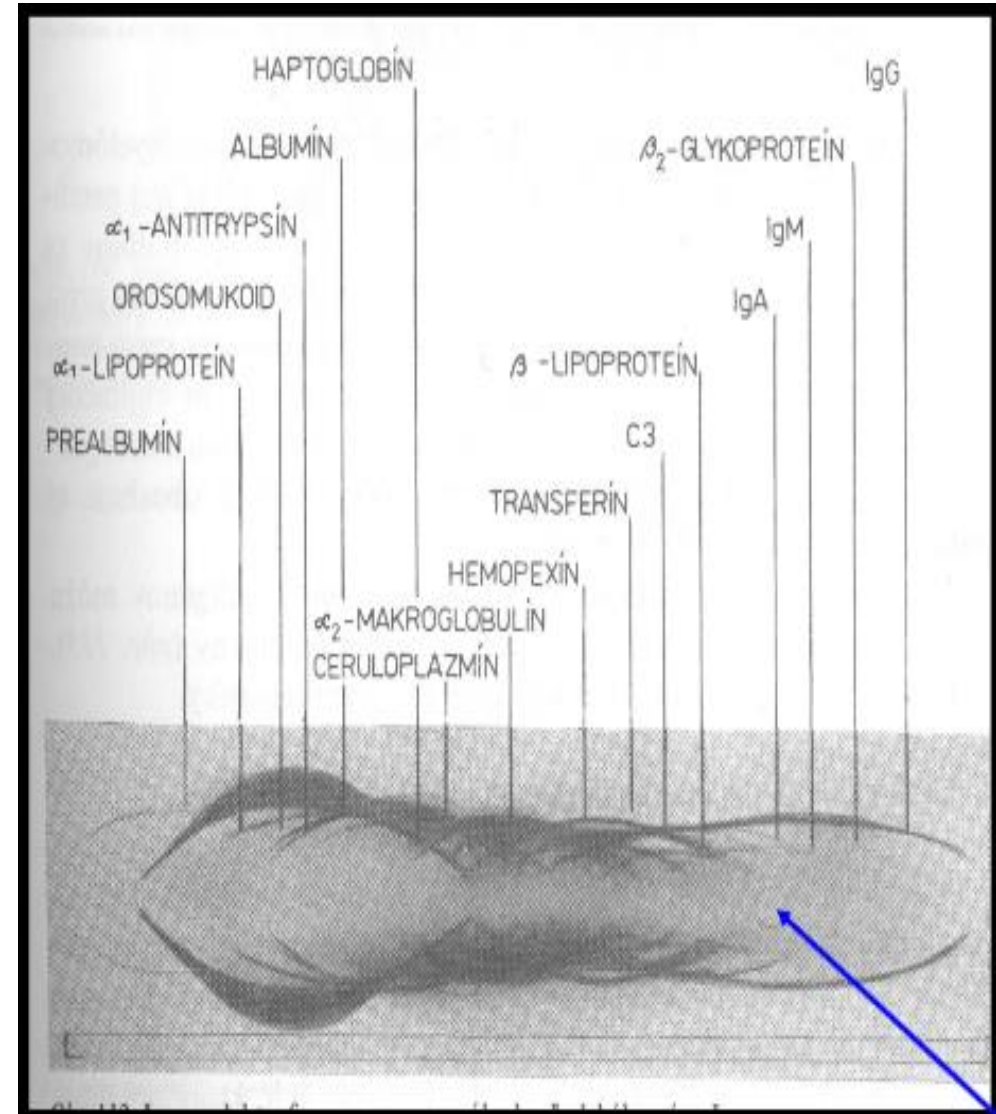
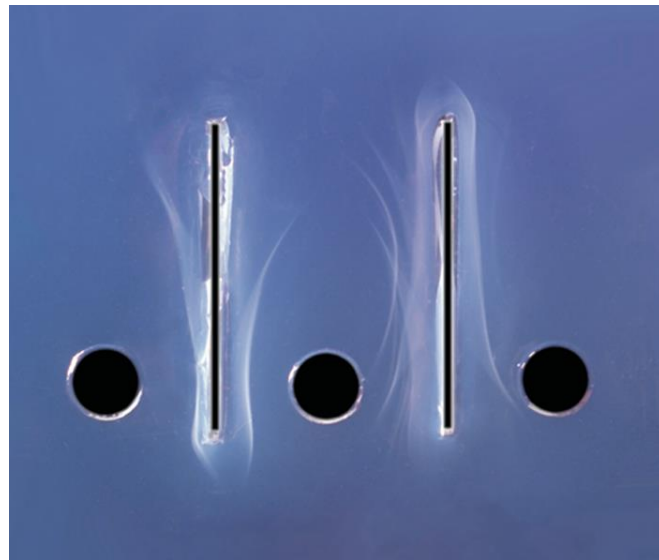
-An antigen preparation (orange) is first electrophoresed, which separates the component antigens on the basis of charge.

-Antiserum (blue) is then added to troughs on one or both sides of the separated antigens and allowed to diffuse.

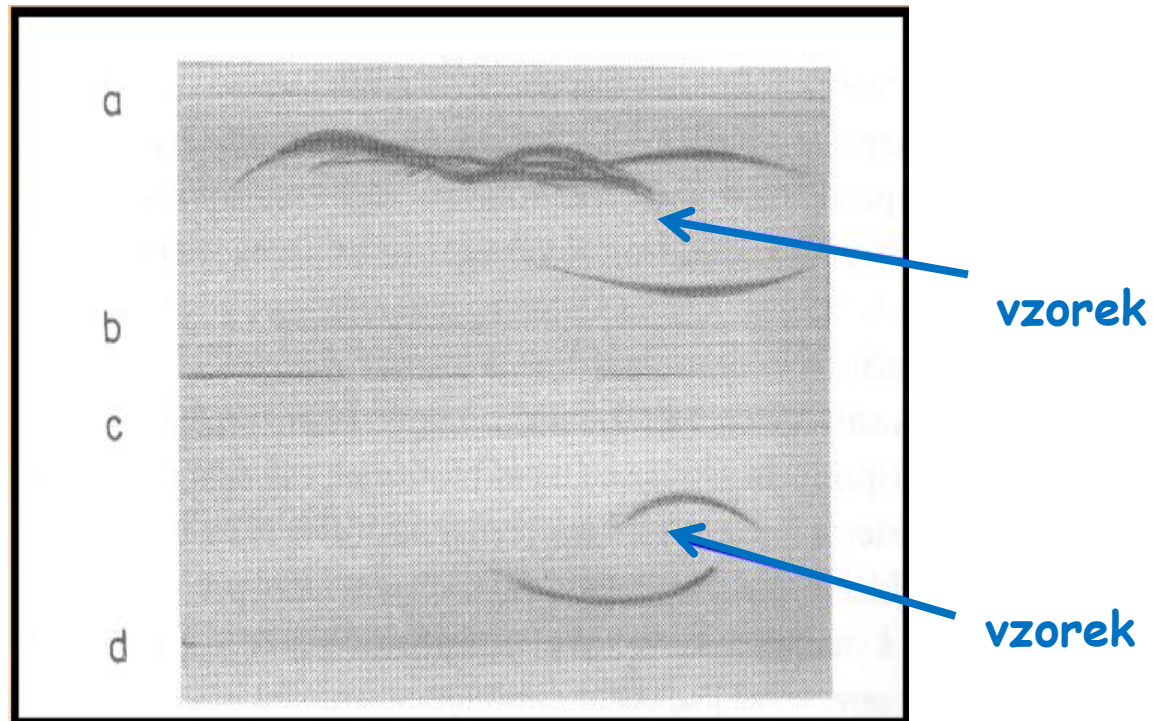
-In time, lines of precipitation (colored arcs) form where specific antibody and antigen interact.

# Imunoelektroforeogram normálního lidského séra

- Použito **polyspecifické antisérum** → až 35 precipitačních obloučků (každý oblouček = 1 protein)
- Obloučky mají charakteristický tvar a umístění na imunoelektroforeogramu







Nevýhody:

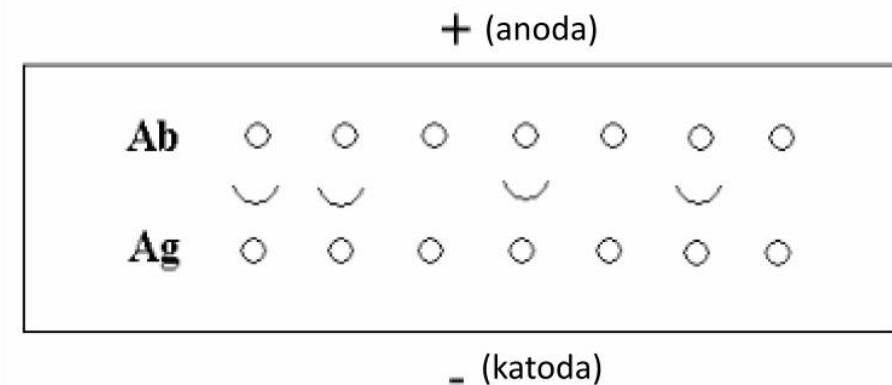
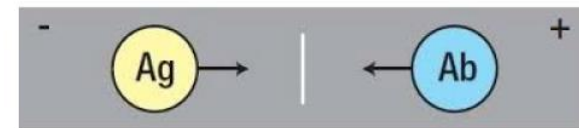
- Okometrické odečítání
- Výsledky pouze kvalitativní
- Nutná zkušenost odečítajícího – různé monografie, atlasy

### Imunoelektroforegram normálního lidského séra:

žlábek a	polyspecifické antisérum proti lidským sérovým proteinům
žlábek b	<b>monospecifické</b> antisérum proti IgG
žlábek c	monospecifické antisérum proti IgM
žlábek d	monospecifické antisérum proti IgA

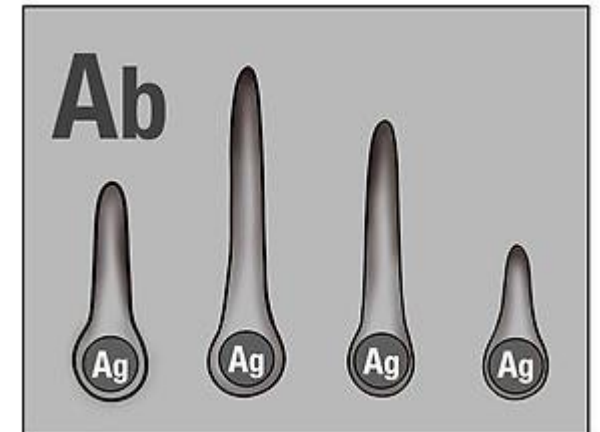
# Protisměrná elektroforéza

- Immunodifuze urychlená el. polem (výsledek za 30 min)
- Využívá opačných pohybů Ag a Ab v el. poli
- 2 jamky
  - Jedna blíže anodě – pipetujeme protilátku
  - Druhá blíže katodě – pipetujeme antigen
- V el. poli se bude antigen pohybovat k anodě a protilátka ke katodě → v místě ekvivalentní koncentrace obou složek se tvoří precipitát
- Kvalitativní průkaz antigenů s anodickou pohyblivostí

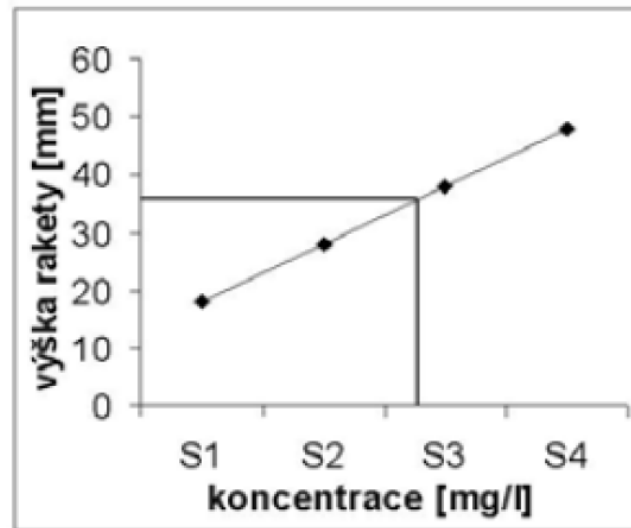
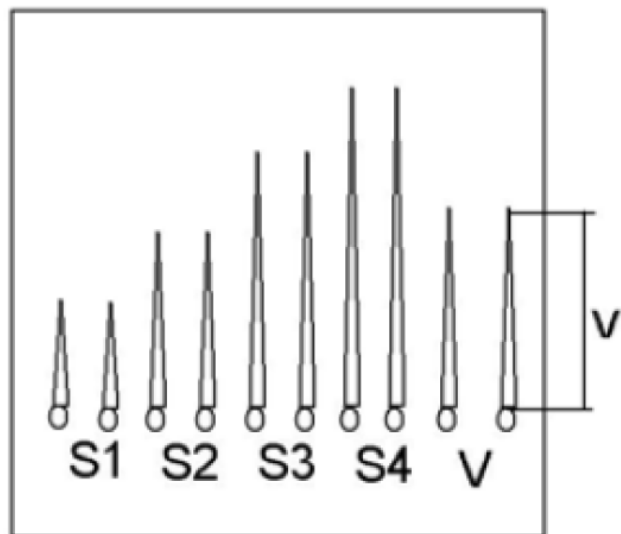


# Raketková imunoelektroforéza

- Umožňuje kvantitativní hodnocení, citlivost od 0,1 mg/l
- Immunodifuze probíhající v el.poli
- Rozdíl od předchozí metody – protilátka (antisérum) se přimíchá do agarózového gelu
- Migrace proteinů – střetávají se s molekulami protilátky v gelu – v místě ekvivalentní koncentrace obou složek se tvoří precipitát
- Díky pohybu proteinů získává tvar píku – „raketky“



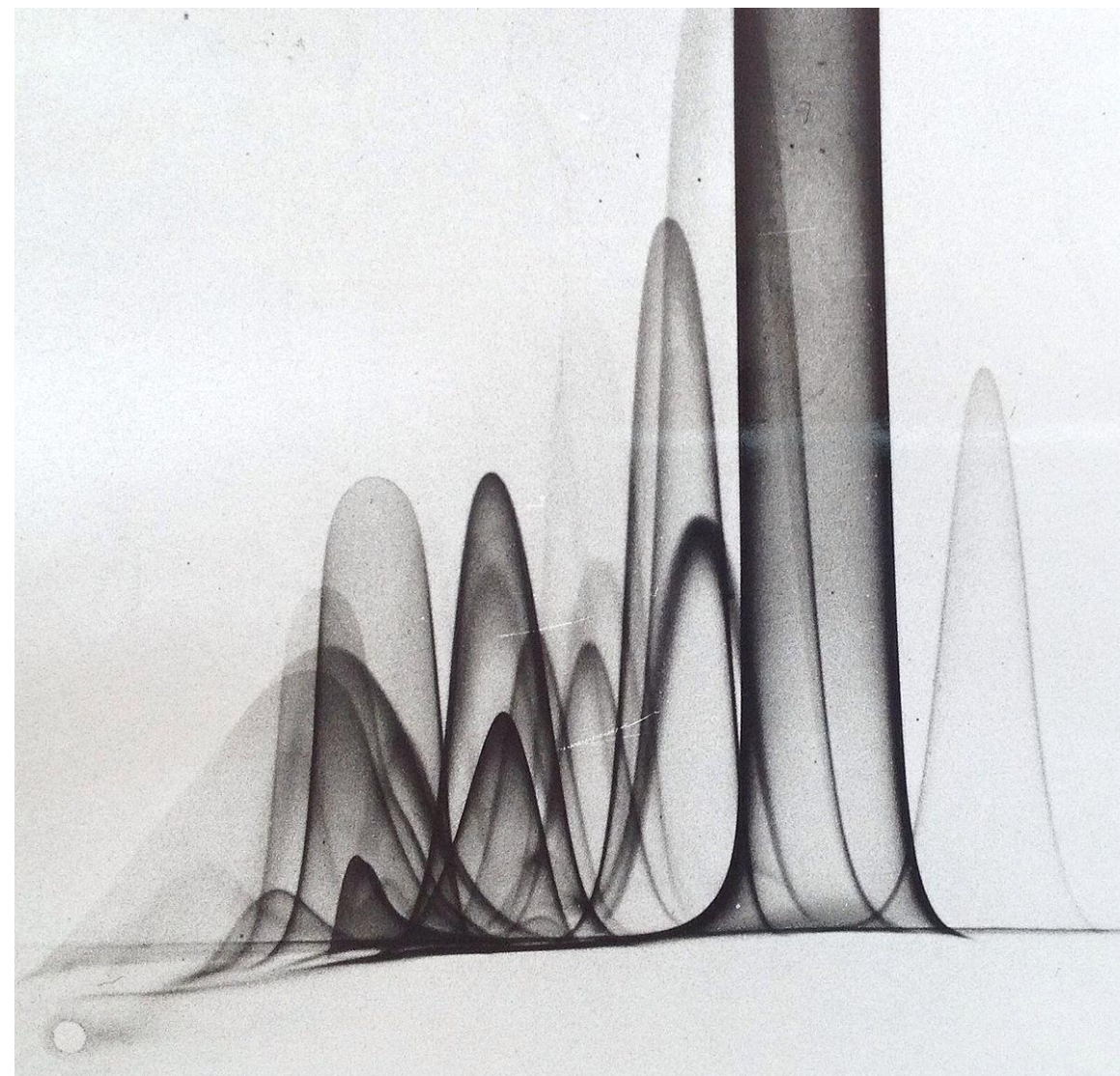
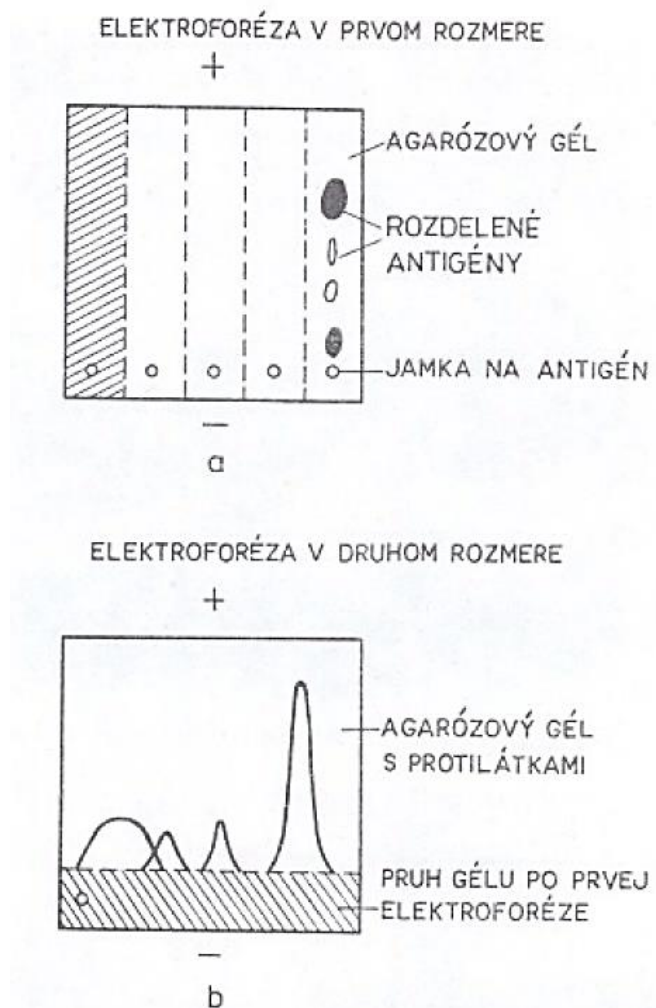
# Raketková imunoelektroforéza



# Dvourozměrná (2D) elektroforéza

- Kombinace elektroforézy s raketkovou imunoelektroforézou
- Krok 1: klasická elektroforéza séra
- Krok 2: Po ELFO slouží gel s rozdělenými proteiny jako start elektroimunodifuze – gel se otočí kolmo a k němu se doplní nový gel (obsahující polyvalentní antisérum) → elektroimunodifuze probíhá ve směru kolmém na gel se separovanými proteiny
- Vznik píků, jejichž plocha / výška je úměrná koncentraci daného proteinu
- Poloha píku charakterizuje druh antigenu
- Lidské sérum – touto metodou lze stanovit až 50 různých proteinů

# Dvourozměrná (2D) elektroforéza

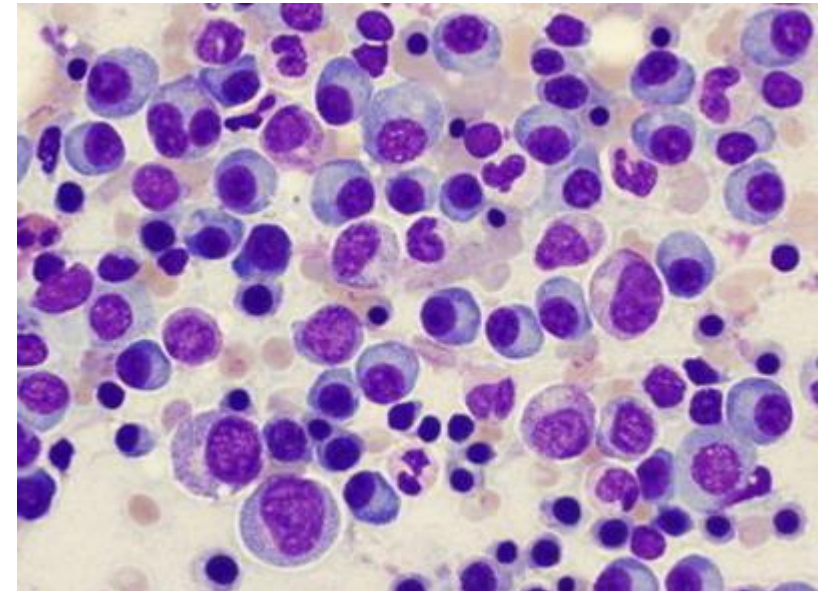


# Imunofixace

- Použití:
  - Identifikace paraproteinu- sérum, moč a likvor
- **paraprotein = monoklonální imunoglobulin**
  - produkován 1 klonem B-lymfocytů
- stav, kdy má pacient v séru paraprotein se nazývá **paraproteinémie** nebo **monoklonální gamapatie**

# Monoklonální gamapatie

- Onemocnění s výskytem monoklonálního imunoglobulinu v séru
  - Monoklonální gamapatie nejasného významu (MGUS)
  - Mnohočetný myelom
  - Plazmocytom
  - Waldenströмова makroglobulinemie
  - AL amyloidóza
  - Nemoci těžkých řetězců
- **Imunofixace slouží k:**
  - Diferenciální diagnostice gamapatie
  - Sledování vývoje onemocnění v čase
  - Sledování terapie
  - Vyšetření **séra + moči** současně!!



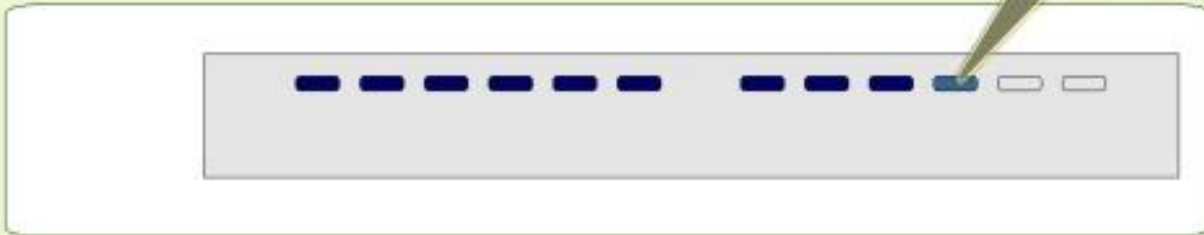


# Imunofixace - postup

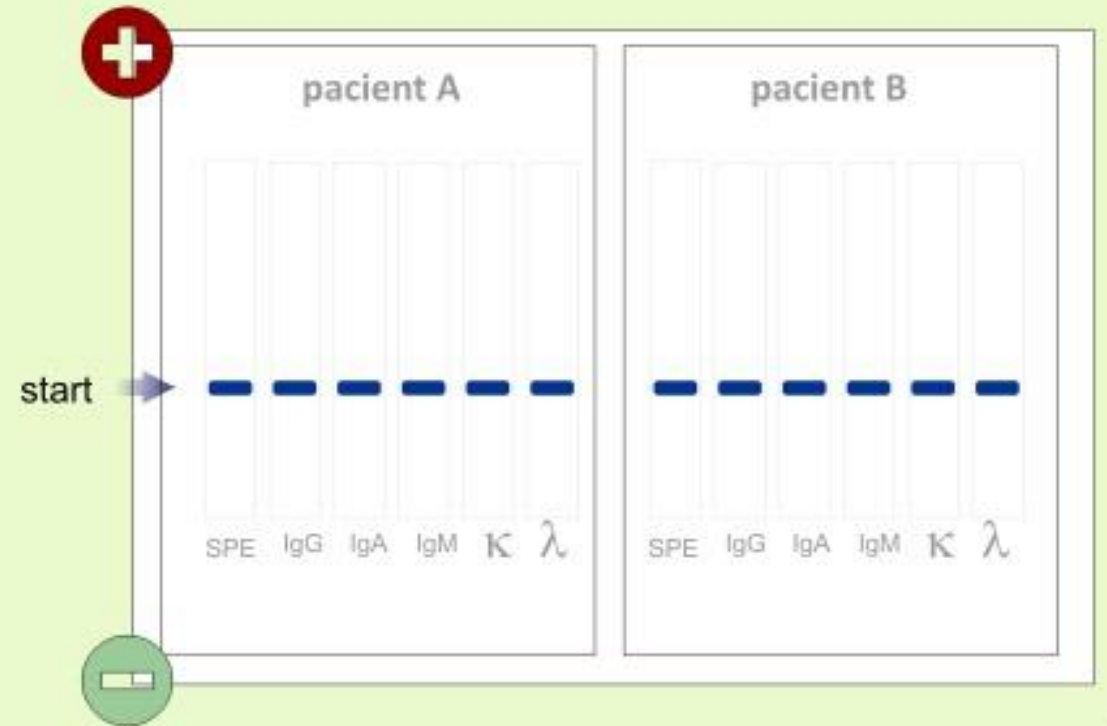
vzorky jsou aplikovány do 6ti specifických stop šablony

pacient A

pacient B



start elektroforetické migrace



2014/f

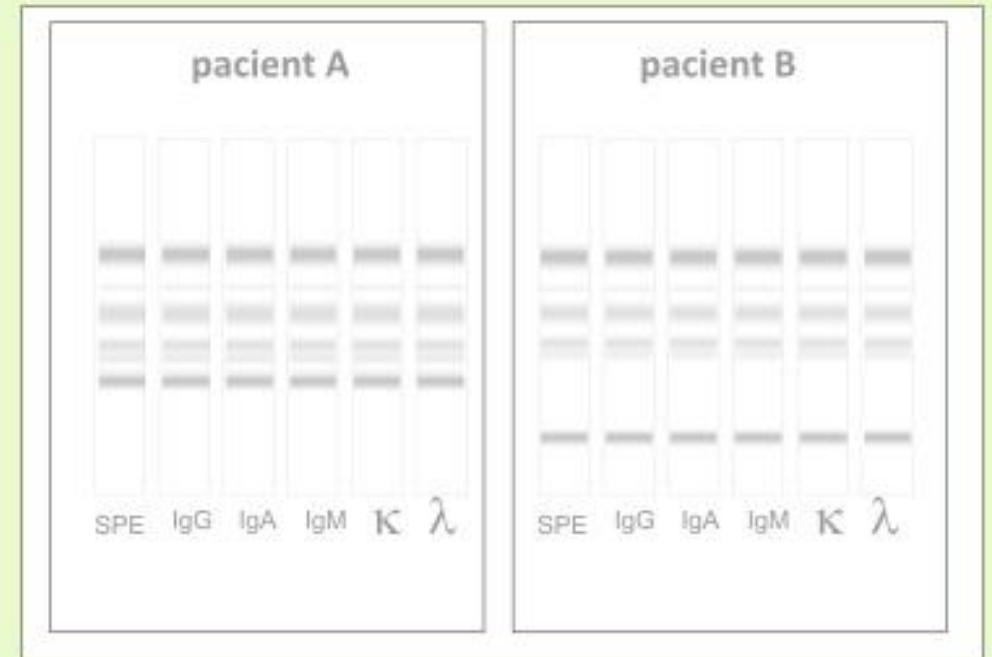
2014/f

# Imunofixace - postup

## elektroforetická separace proteinů v alkalickém pH



## separované imunoglobulinové molekuly

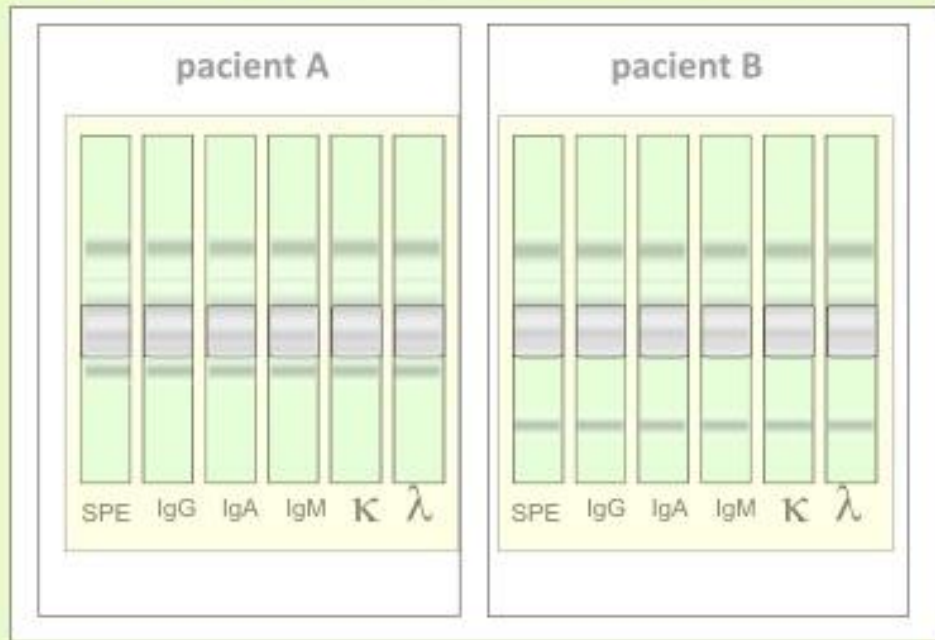


2011/

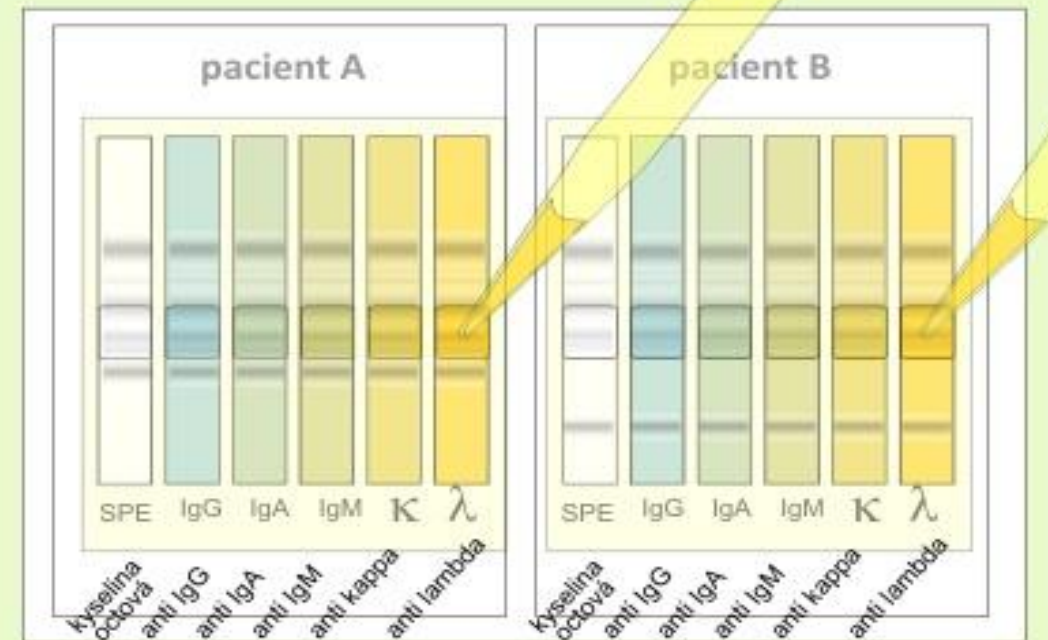
2011/

# Imunofixace - postup

přiložení magnetické masky  
pro aplikaci roztoků antisér



aplikace monospecifických antisér

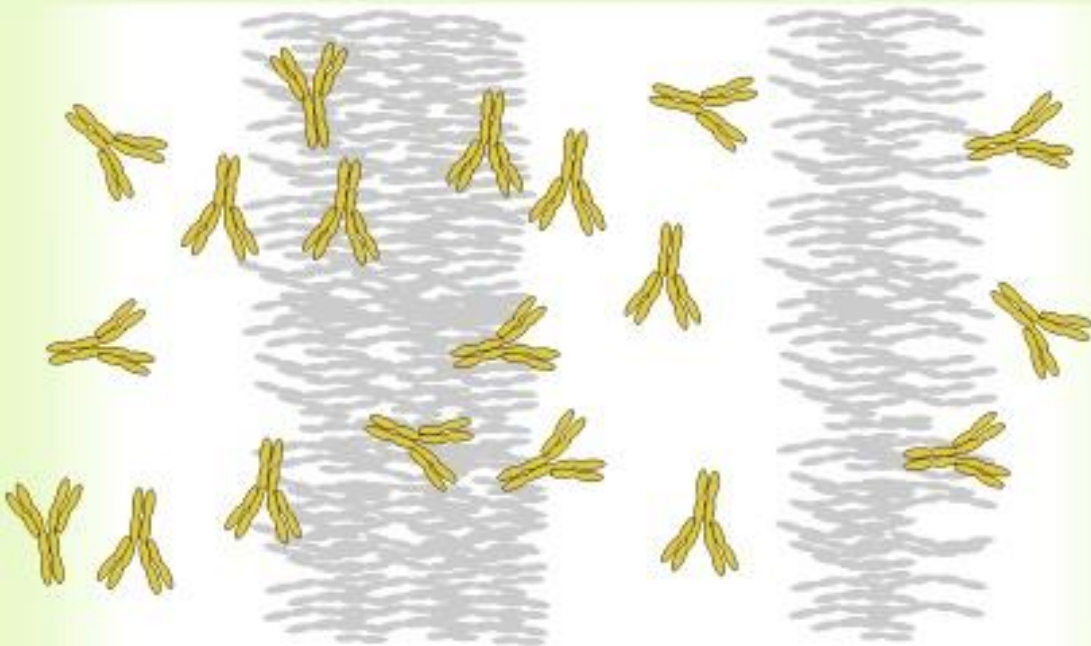


2014/

2014/

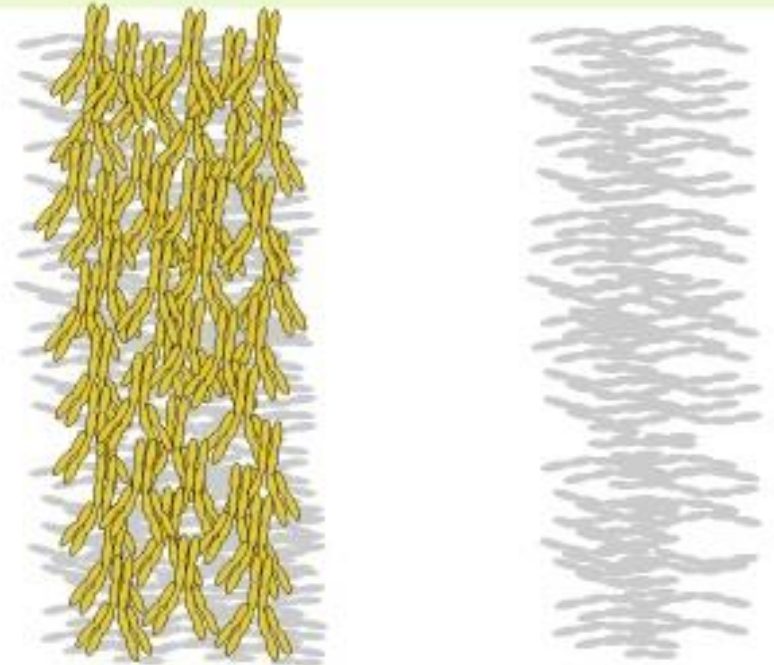
# Imunofixace - postup

monospecifická antiséra



2014/

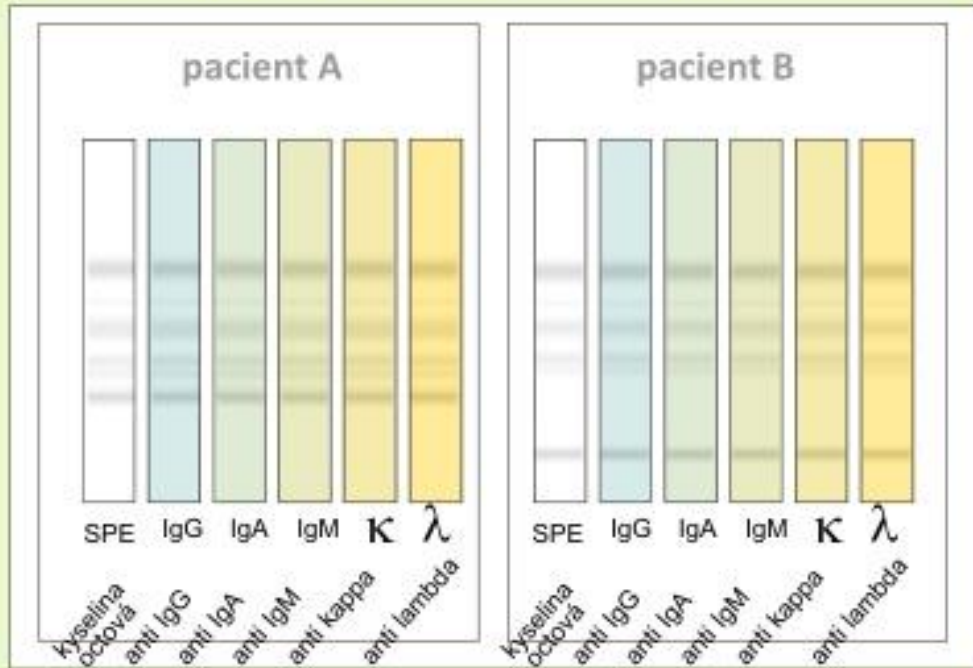
inkubace,  
imunoprecipitace s monospecifickými antiséry



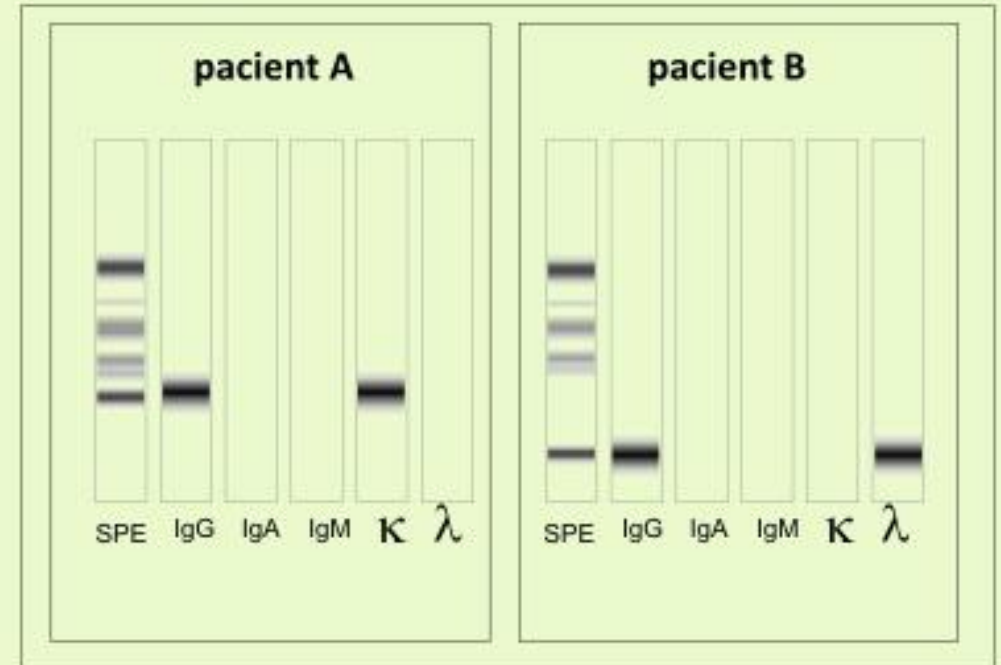
2014/

# Imunofixace - postup

inkubace,  
imunoprecipitace s monospecifickými antiséry



denaturace při 60°C

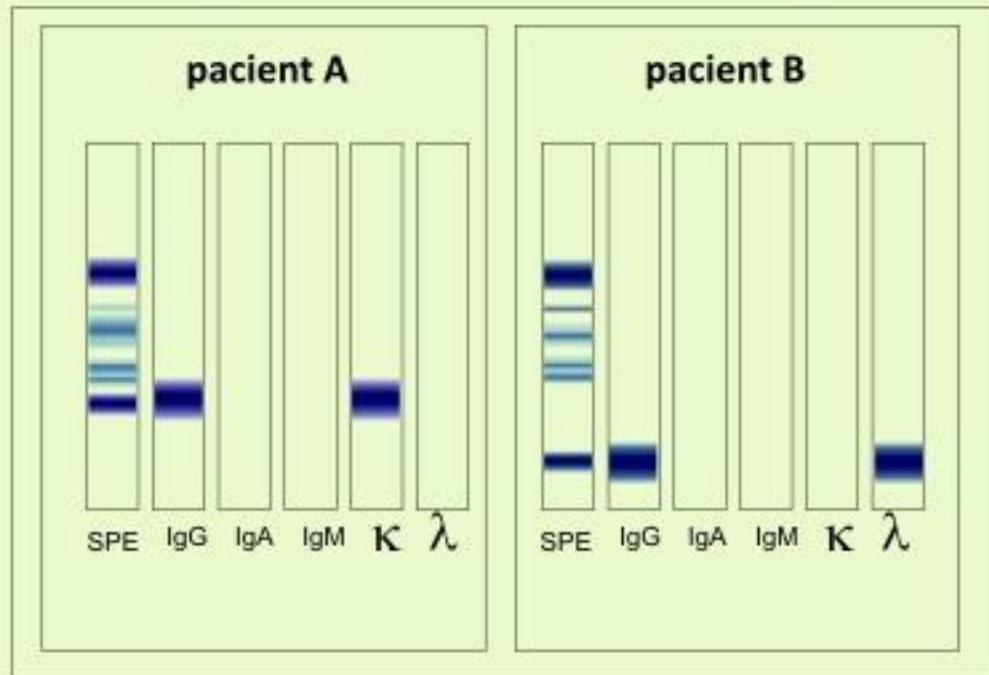


2016/

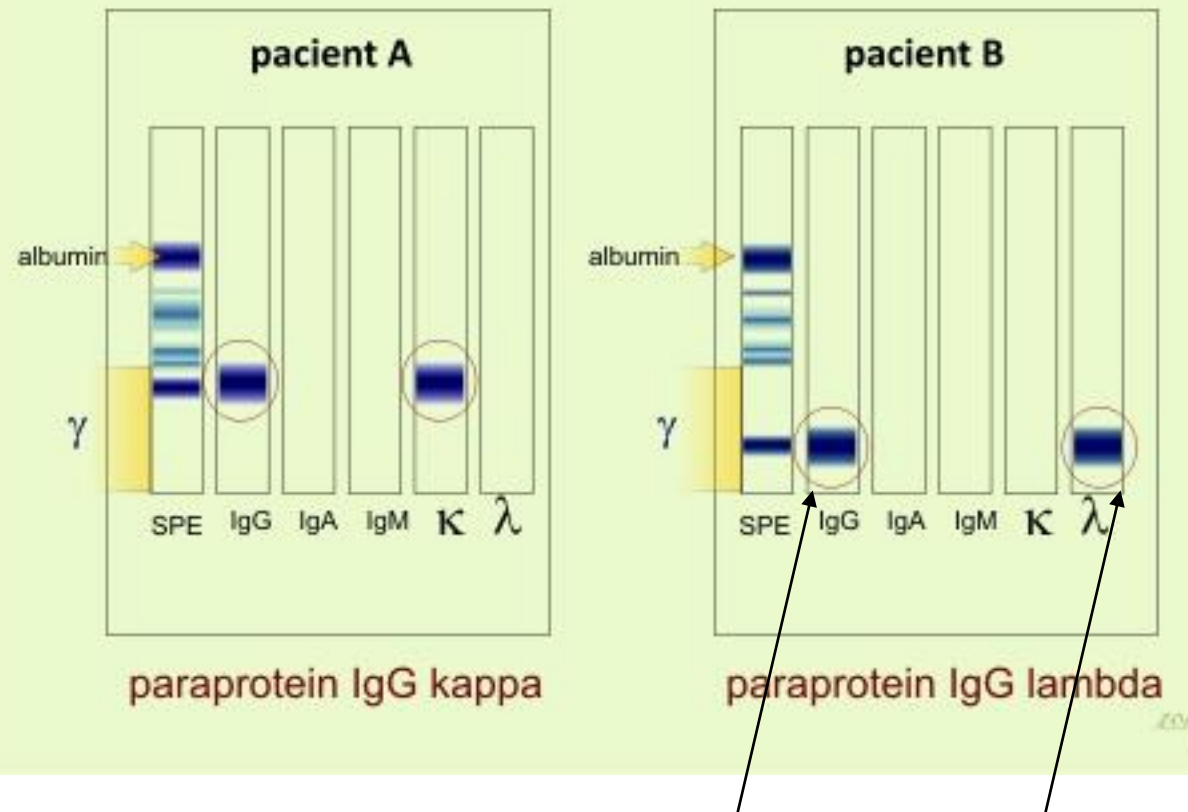
2016/

# Imunofixace - postup

## barvení

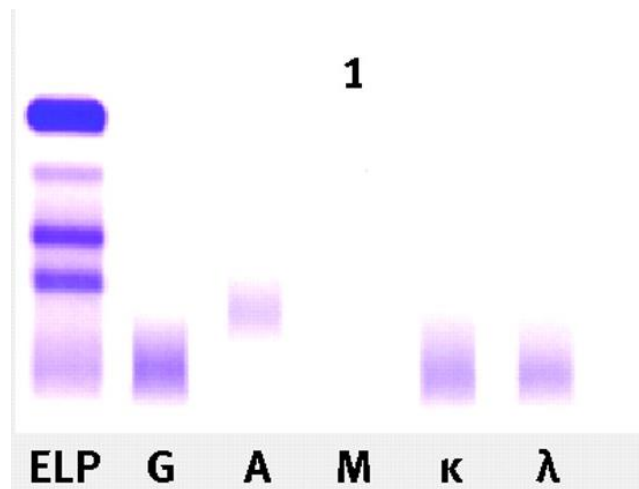


## vyhodnocení

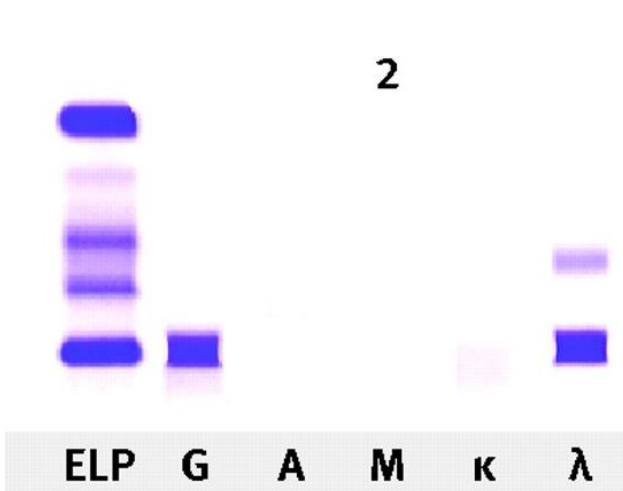


Odečítáme typ monoklonálního Ig – v jednotlivých drahách pátráme po proučcích se **shodnou polohou na elektroforeogramu**

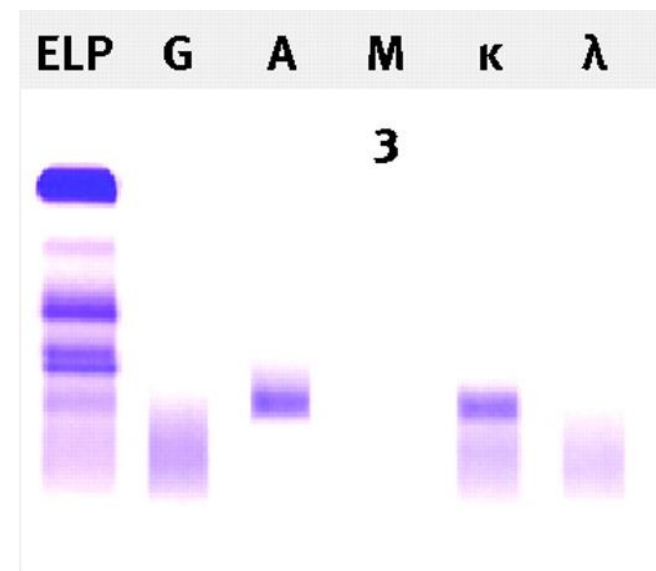
# Imunofixace – odečítání výsledků



Polyklonální Ig – zdravý člověk

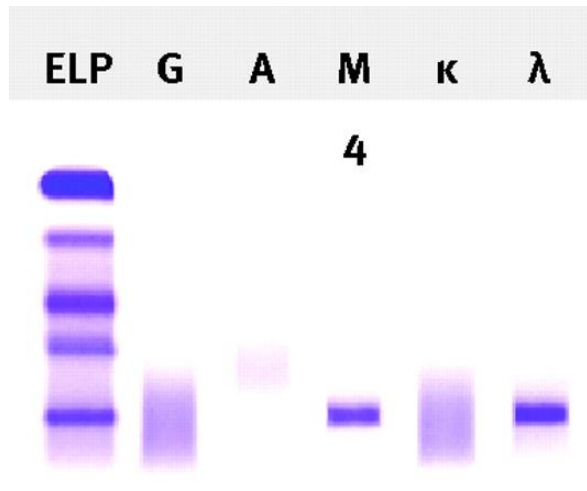


Pacient s paraproteinem IgG λ  
a lehkými řetězci λ

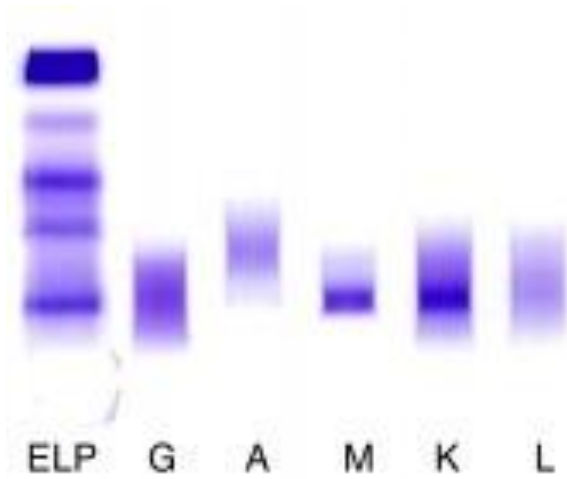


Pacient s paraproteinem IgA κ

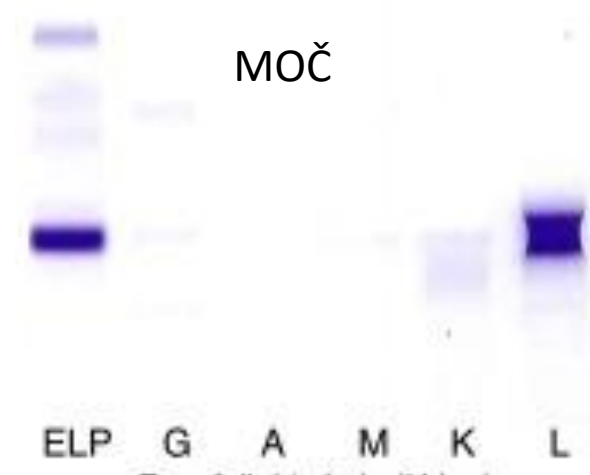
# Imunofixace – odečítání výsledků



Pacient s paraproteinem IgM λ

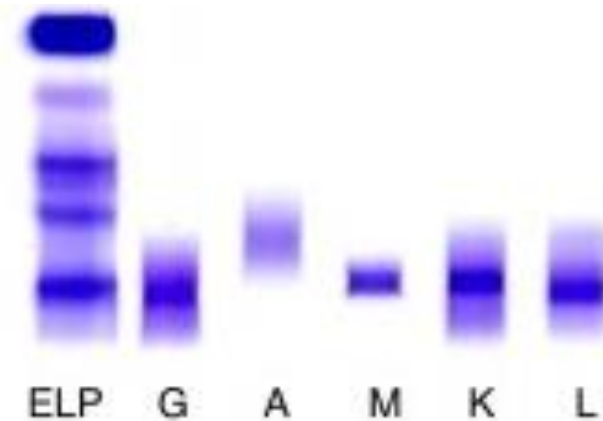


Pacient s paraproteinem IgM κ



Volné lehké řetězce λ

Biklonální gamapatie  
IgG κ + IgM λ

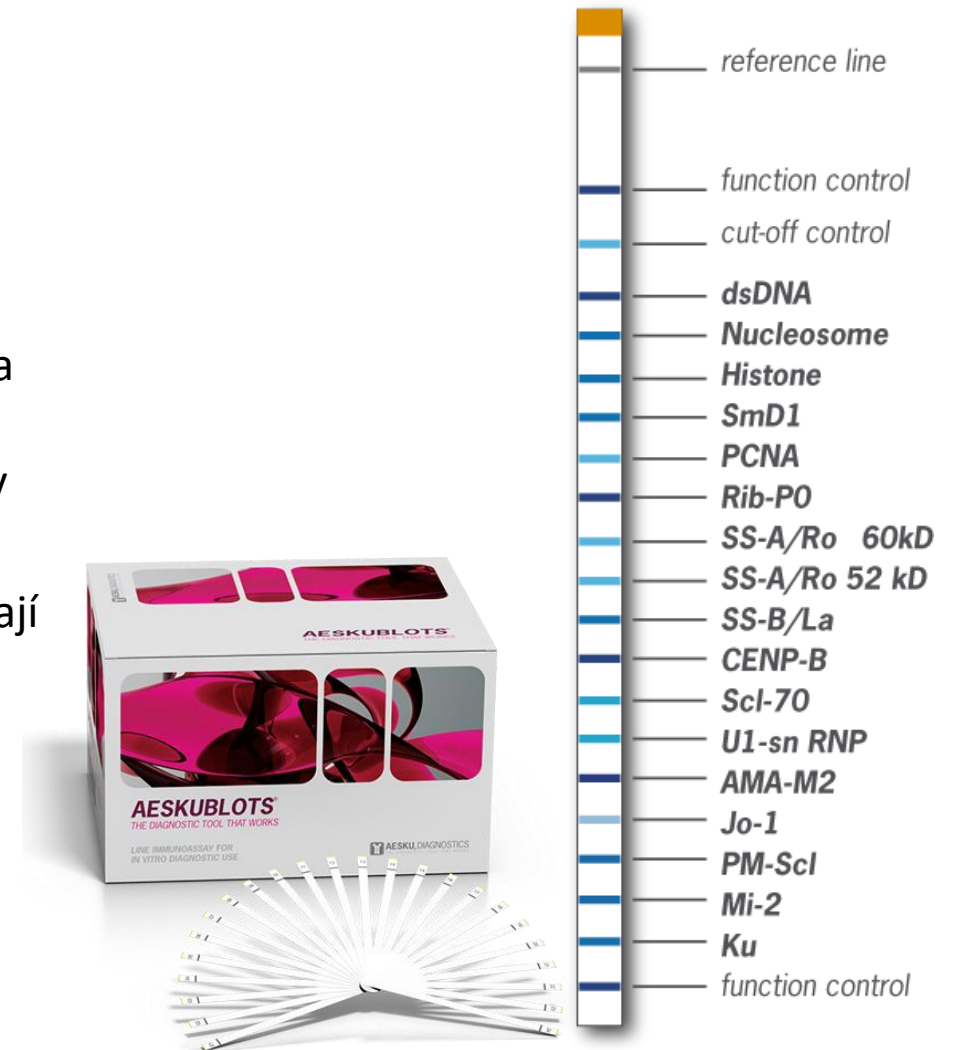




# Imunoblot

- Slouží k diagnostice autoantilátek
- Příprava blotů (výrobce):
  - Proteiny elektroforeticky rozděleny v gelu – přenos (otisk) na nitrocelulózovou membránu (blotting)
  - Membrána je rozstříhána na jednotlivé diagnostické proužky
  - každý protein má na proužku definovanou polohu
  - Výrobce v kitu dodává i šablonu, podle které se bloty odečítají

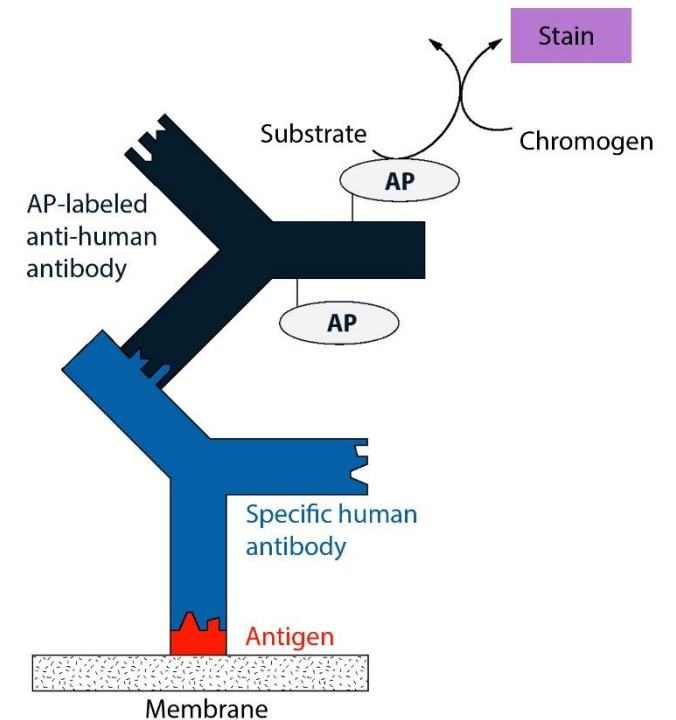
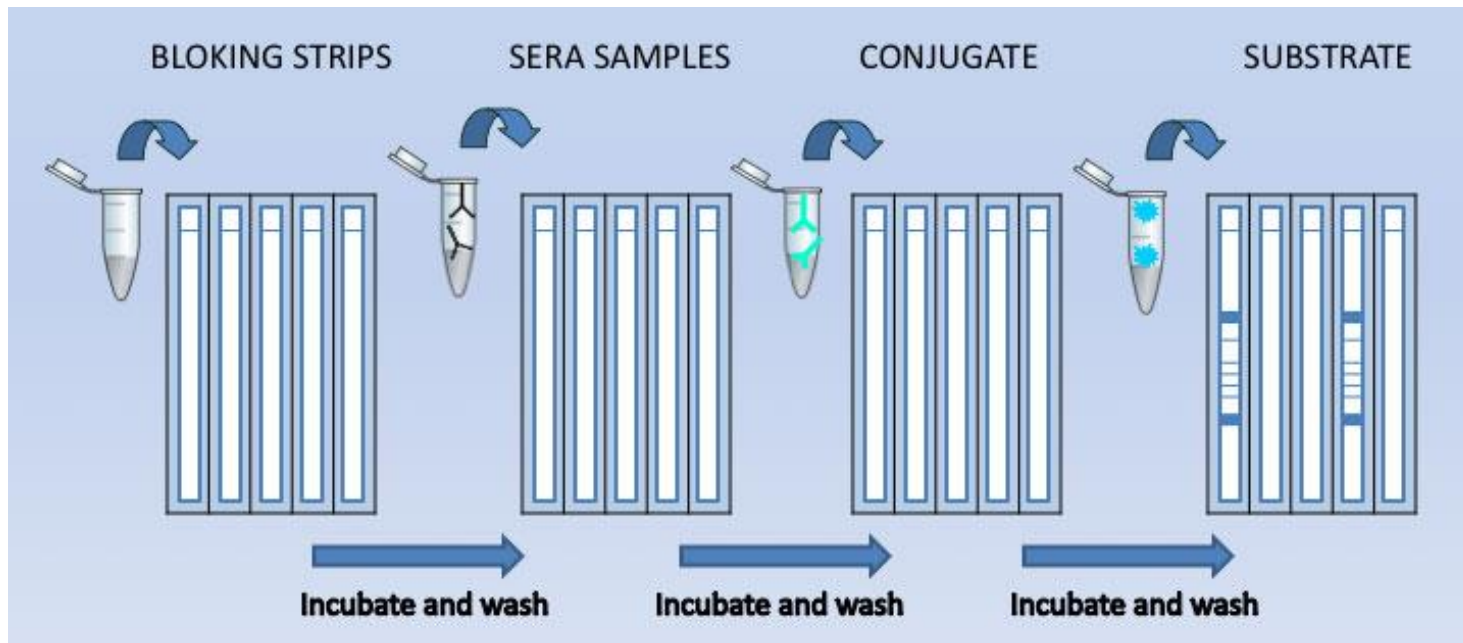
## ANA-17 Pro



# Imunoblot

## ○ Princip stanovení:

- Pokud je autoprotilátka proti určitému proteinu (antigenu) přítomna v séru, naváže se na tento protein (antigen) imobilizovaný na stripu
- Detekce vazby autoprotilátky pomocí diagnostických protilátek značených enzymem
- Enzym přemění substrát na barevný produkt
- Výsledkem je vznik barevného proužku na stripu



# Imunoblot

- Jednotlivé barevné proužky se porovnávají s kontrolní šablonou
- Hodnotí se přítomnost kontrolních proužků (interní kontrola)
- Odečet vizuálně nebo denzitometricky (% pozitivita – semikvantitativní stanovení)
- Imunoblotem se vyšetřují pacienti, které nelze vyšetřit jinou metodou (ELISA)
- Diagnostika – zejména **roztroušená skleróza**

