



Imunoanalýza ELISA

Mgr. Julie Štíhová

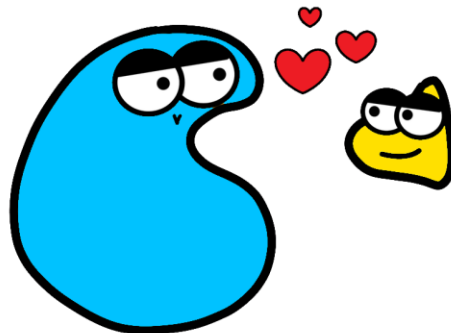
Fakultní nemocnice u Sv. Anny v Brně
Ústav klinické imunologie a alergologie

Imunoanalytické metody

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

Rozdělení metod dle typu
značky:

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



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

Rozdělení metod dle
uspořádání:

- Homogenní – bez promývání
- Heterogenní – s promýváním
 - Kompetitivní
 - Nekompetitivní

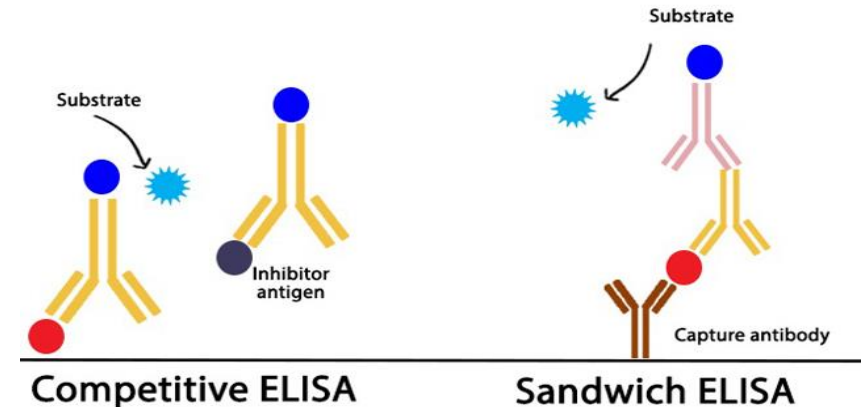
Imunoanalytické metody

Heterogenní **kompetitivní**:

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

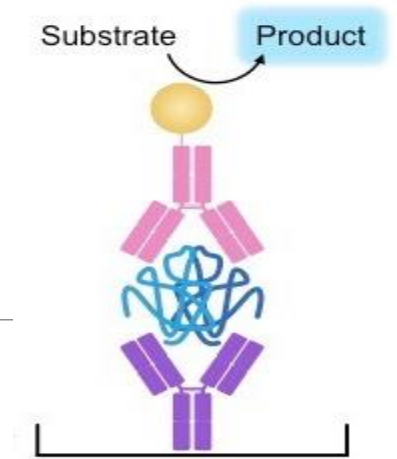
Heterogenní **nekompetitivní**:

- 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 pomocí promývání
- Zahrnuje jednotlivé kroky
 - Vazba antigenu / protilátky na pevnou fázi (stěna destičky)
 - Na navázaný Ag se váže zkoumaná protilátka z přidaného séra
 - Na navázaný komplex se váže sekundární protilátka s konjugovaným enzymem
 - Pro vizualizaci se do reakce přidá substrát pro daný enzym - enzymatická přeměna substrátu na barevný produkt – měření na spektrofotometru
 - **Používané enzymy:**
 - **Křenová peroxidáza** (tetrametylbenzidín → tetrametylbenzimidín → 450 nm)
 - **Alkalická fosfatáza** (p-nitrofenylfosfát → nitrofenol → 405 nm)
 - Mezi výše uvedenými jednotlivými kroky je vždy tzv. promýváním, při kterém se nadbytek reaktantu odstraní přidávkem pufru do jamky, který je pak také z jamky odstraněn – separace nezreagovaných složek
- Vysoká citlivost – **pg/ml**

Kautování ELISA desky

○ Imobilizace Ag nebo Ab na plastový povrch desky

1. Povrchová aktivace desky

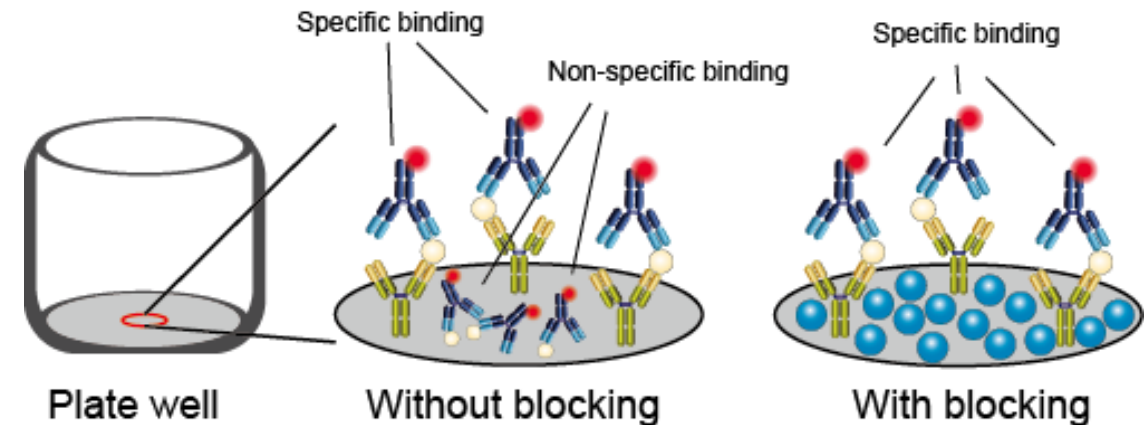
- vazba NH_2 nebo COOH skupin – tvorba kovalentních vazeb s protilátkou nebo antigenem
- Vhodné pro stanovení malých molekul – např. peptidy

2. Pasivní adsorpce

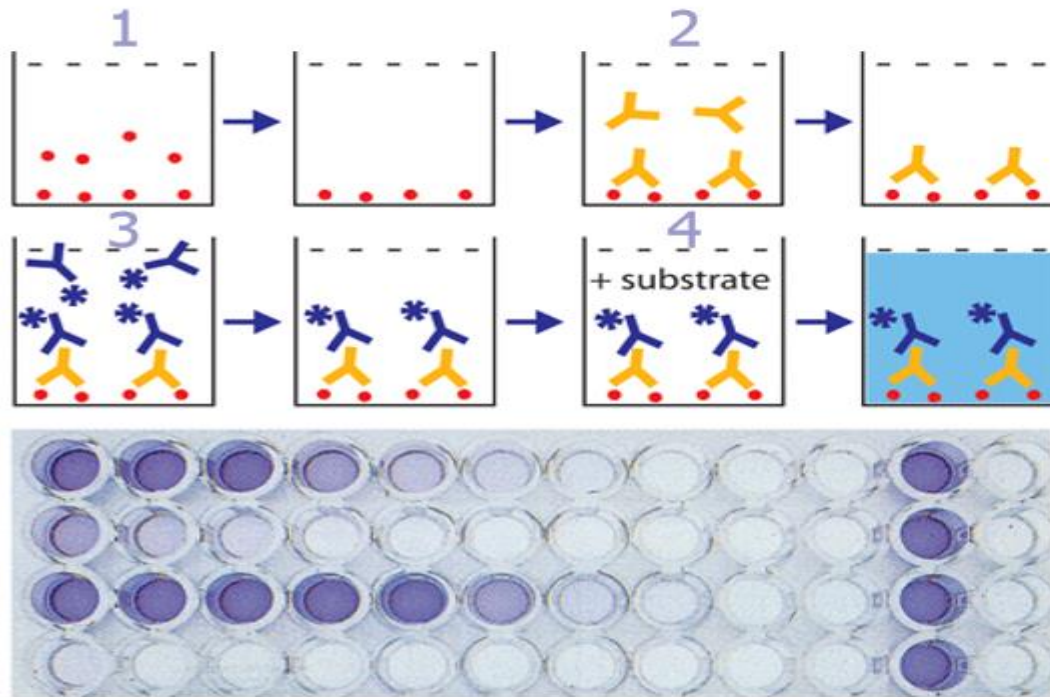
- Hydrofobní interakce mezi nepolárními strukturami proteinu a plastovým povrchem desky
- Protein určený k adsorpci je rozpuštěn v alkalickém **kautovacím pufru** (pH 9,5) – naleptává plastový povrch a usnadňuje adsorpci Ag nebo Ab

○ 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



Vlastní průběh ELISY



1. Potažení jamek antigenem
2. Přidání vzorku séra
3. Přidání enzymem značené protilátky (anti-human IgG)
4. Přidání substrátu
5. Odečtení barevné reakce

Za každým krokem následuje tzv. promývací krok, kde se obsah jamky odsaje, do jamky se přidá nejčastěji fosfátový pufr a následně se obsah jamky odsaje. Toto promytí se opakuje zpravidla 3x za sebou, aby byl odstraněn veškerý nezreagovaný materiál.

System záchytná + detekční Ab

- Detekční (sekundární) protilátka proti hledanému Ag je konjugovaná s enzymem,
- Proč je každá protilátka od jiného živočišného druhu?

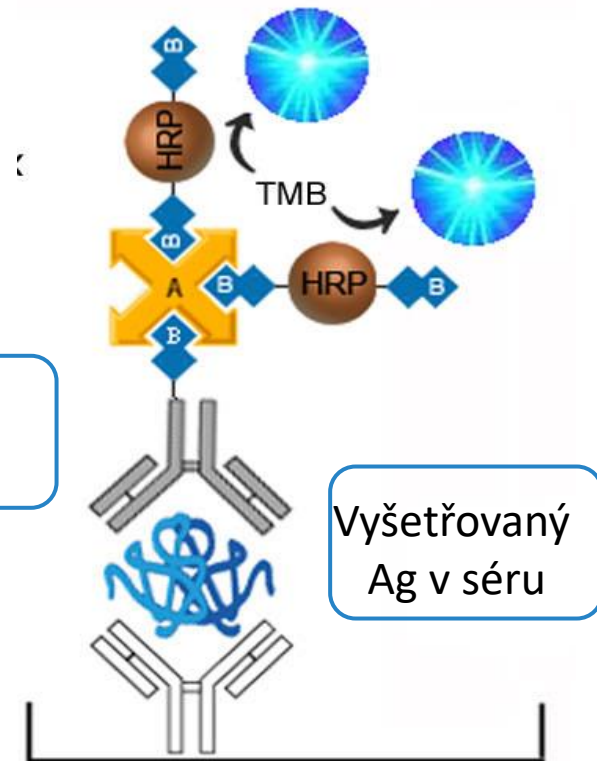
Tato kombinace významně snižuje riziko zkřížené reaktivity, která by mohla způsobit vznik nespecifických imunokomplexů (zdroj falešné positivity)!!!

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

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

Detekční protilátka
humánní, monoklonální

Záchytná protilátka
myší, polyklonální



Vyšetřovaný
Ag v séru

Enzymatická detekce – přidání substrátu

Nejčastěji používané enzymy detekčních nebo-li sekundárních protilátek:

- Křenová peroxidáza
- Alkalická fosfatáza

Pro křenovou peroxidázu jsou používány tyto substráty:

- 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidin
- 2, 2'-azinobis(3-ethylbenzthiazol-6sulfonát)
- o-fenylendiamin
- o-dianisidin
- o-toulidin

Pro alkalickou fosfatázu se používá substrát

- 4-nitrofenylfosfát

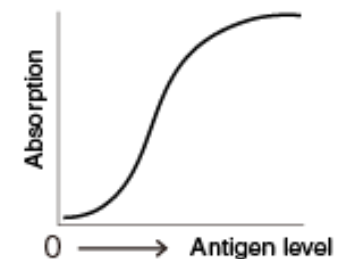
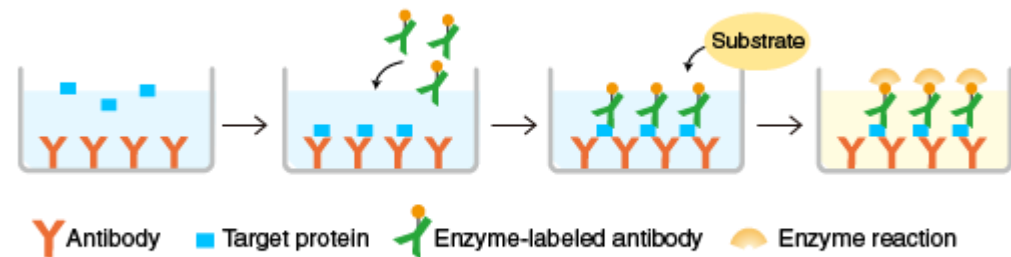
Luminescenční Immunoassay

- Chemiluminescenční substráty – detekce záblesků luminiscence
 - SuperSignal
 - ECL

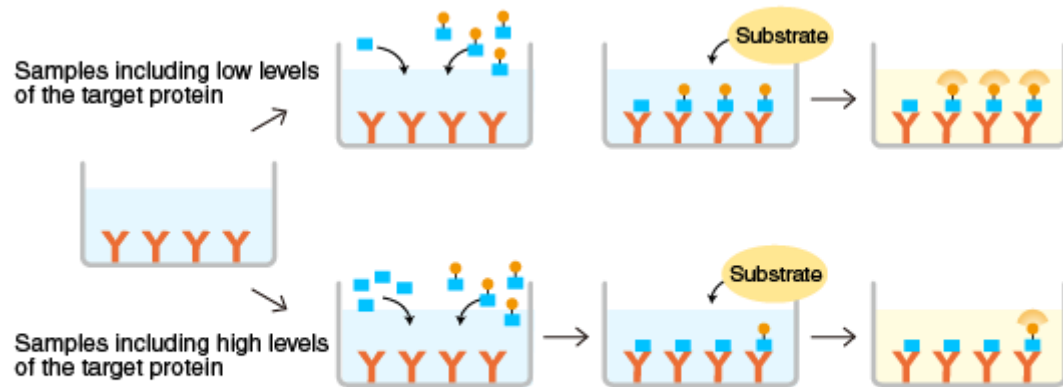
Sendvičová ELISA - uspořádání

- Použití dvou protilátek specifických na různé epitopy jednoho antigenu.
- Jedna z protilátek je navázána na povrch jamky destičky a vychytává antigen ze vzorku.
- Druhá protilátka značená enzymem slouží k detekci tohoto antigenu.
- Antigen je tedy mezi protilátkami jako plátek masa mezi houskami v sendviči.

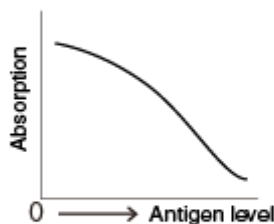
- Detekce analytů s vysokou Mr (proteiny)
- Vysoká přesnost



Kompetitivní ELISA - uspořádání



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



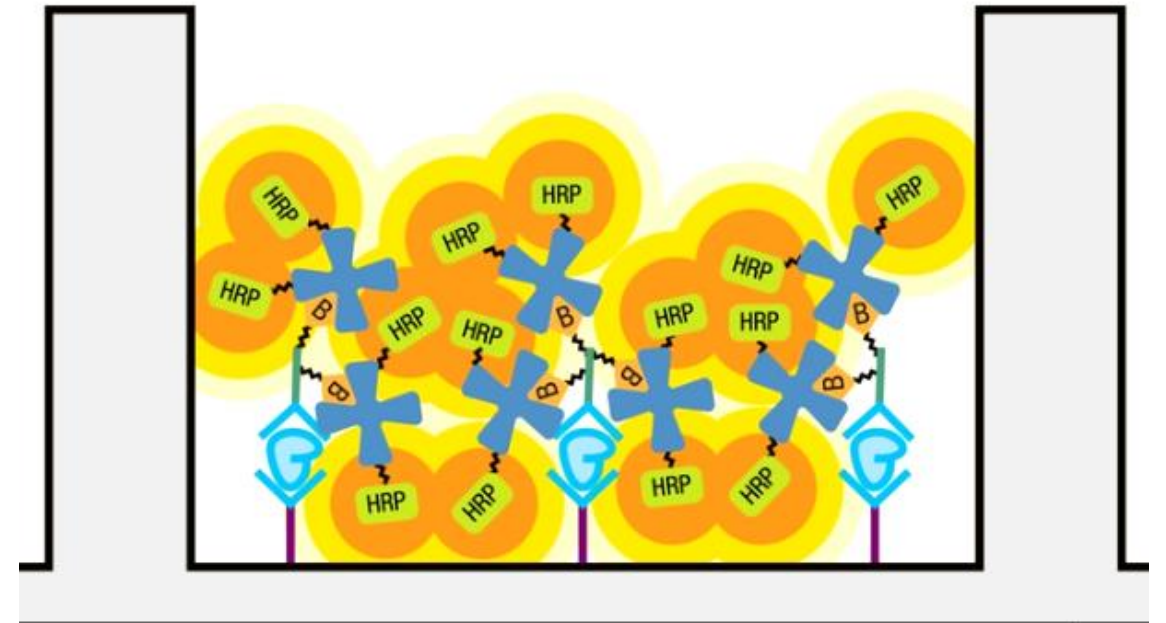
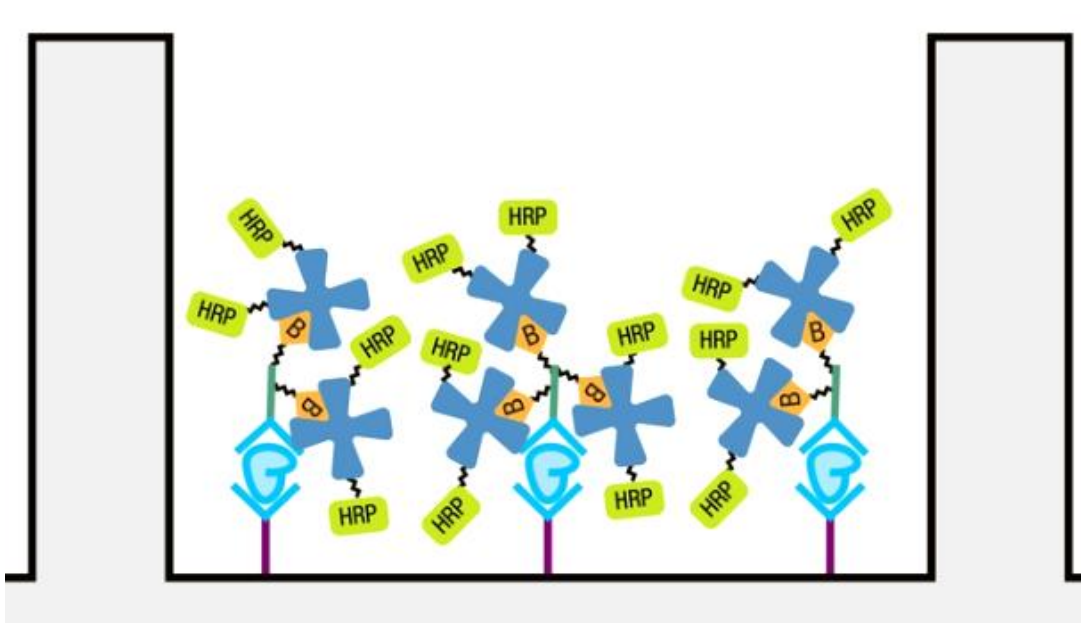
<http://ruo.mbl.co.jp/bio/e/support/method/elisa.html>

- Na rozdíl od nekompetitivní ELISY se navíc přidává enzymem značený Ag.
- Přidaný enzymem značený antigen kompetuje – soutěží - s hledaným Ag v séru o vazebné místo zkoumaného Ag.
- Čím více je zkoumaného Ag v séru, tím méně se naváže enzymem značeného Ag a tím nižší je pak měřená absorbance.

- Detekce analytů s malou Mr

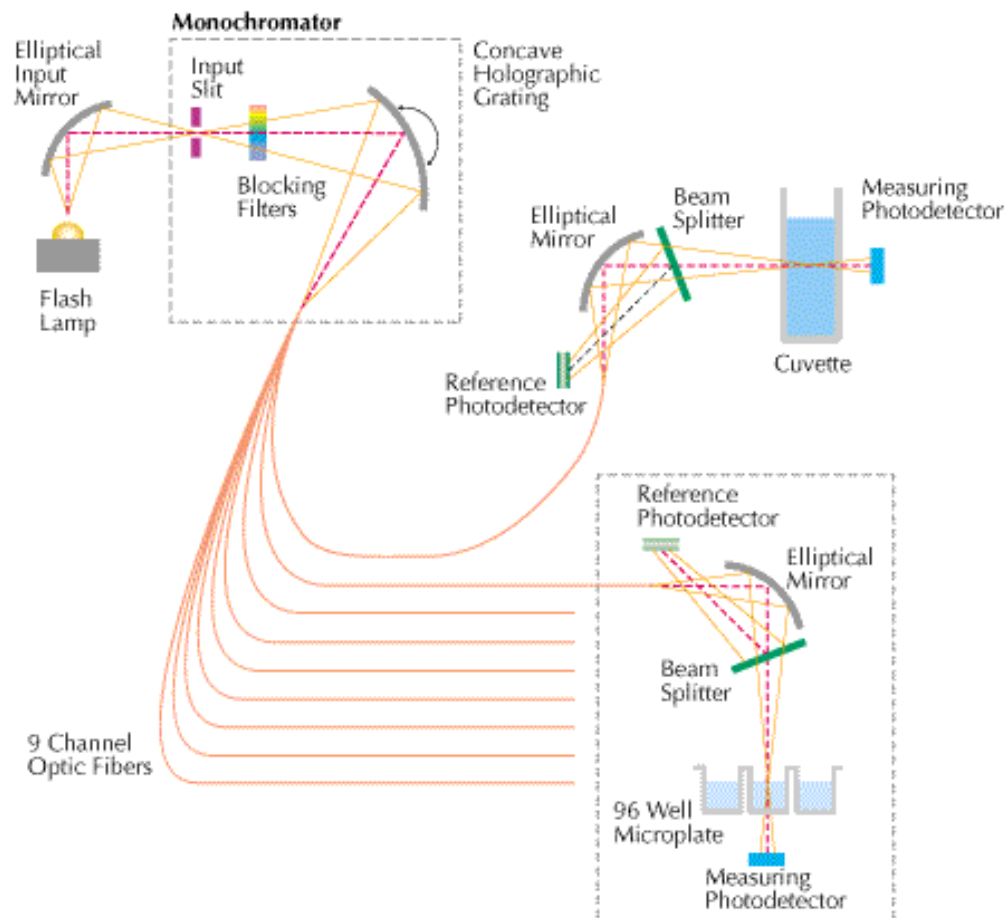
Sendvičová ELISA – vyšší senzitivita

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



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



Výsledky

1. Kvalitativní

- Hodnotíme vizuálně přítomnost / nepřítomnost reakce → ano / ne
– výsledek je pak pozitivní či negativní, použití cut-off kalibrátoru, hodnoty s absorbancí nad tuto hodnotu jsou hodnoceny jako pozitivní

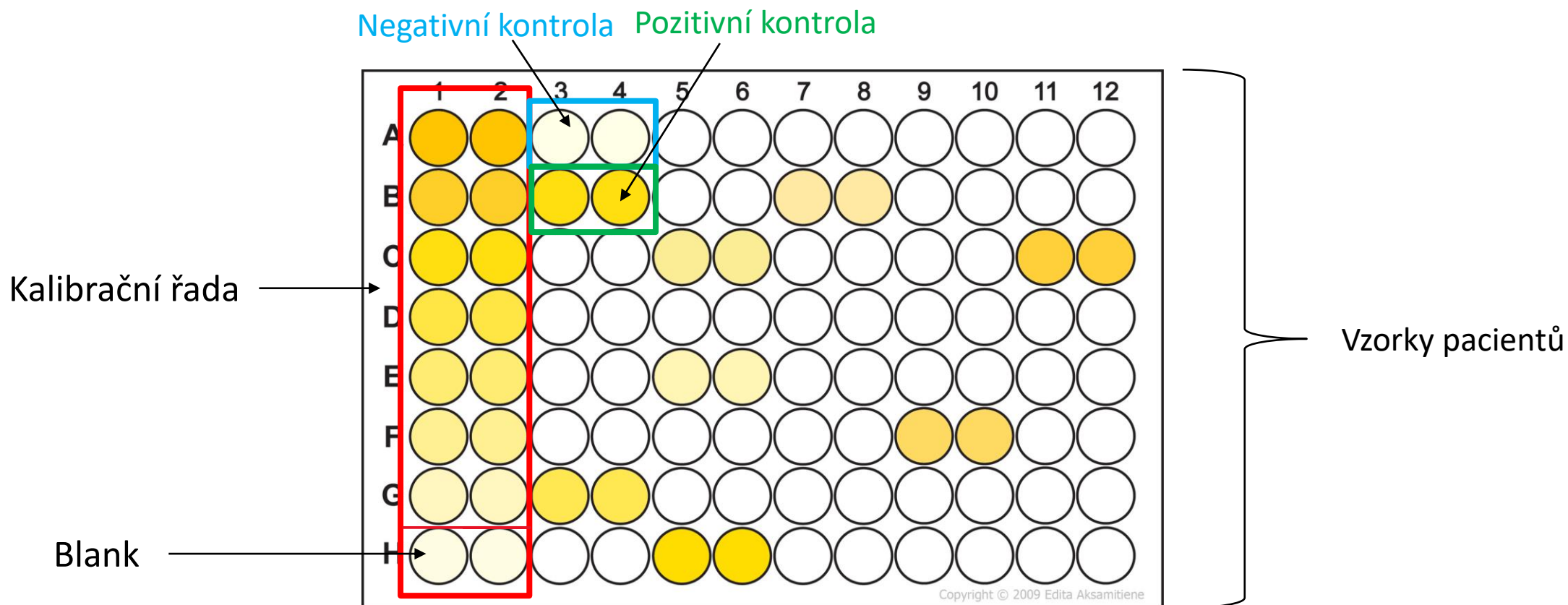
2. Semi-kvantitativní

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

3. Kvantitativní

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

Hodnocení výsledků - kvantitativní



Využití ELISA v imunologii

- V imunologii jsou nejčastěji hledaným antigenem protilátky → deska je pak kautovaná Ag, na který se protilátky váží
- Antiinfekční imunita
 - Stanovení protilátek proti některým infekčním agens
- **Autoimunitní onemocnění**
 - Stanovení autoprotiátek

ELISA a antiinfekční imunita

- Protilátky proti tetanickému toxoidu
- Protilátky proti difterickému anatoxinu
- Protilátky proti kapsul. antigenu Haemophilus Influenzae
- Protilátky proti specifickému pneumokokovému kapsulárnímu polysacharidu (anti-PCP)



Sledování odpovědi na vakcinaci, sledování stavu imunitního systému (zájem především o snížené hladiny – imunodeficience)

ELISA stanovení autoprotilátek u autoimunitních onemocnění

- Celá škála autoprotilátek (orgánově nespecifické, orgánově specifické)
 - ANA – proti jaderným antigenům (anti-nuclear antibody; Systémový lupus erythematosus - 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
 - ASMA - proti hladkým svalům (anti – smooth muscle antibodies)
 - LKM - proti mikrosomům jater a ledvin (LKM – liver kidney microsomes autoantibodies)
 - LC - proti antigenu jaterního cytosolu typu 1
 - ANCA – proti cytoplazmě neutrofilů (vaskulitid a glomerulonefritidy)
 - Anti-TTG –proti tkáňové transglutamináza (celiakie)
 - Anti-TG-tyreoglobulin, anti-TPO-tyreoidální peroxidáza (tyreoiditidy)
 - RF – proti Fc molekule IgG (revmatoidní artritida)
 - EMA –proti endomysiu (celiakie)
 - ASCA – proti *Sacharomyces cerevisiae* (Crohnova choroba)

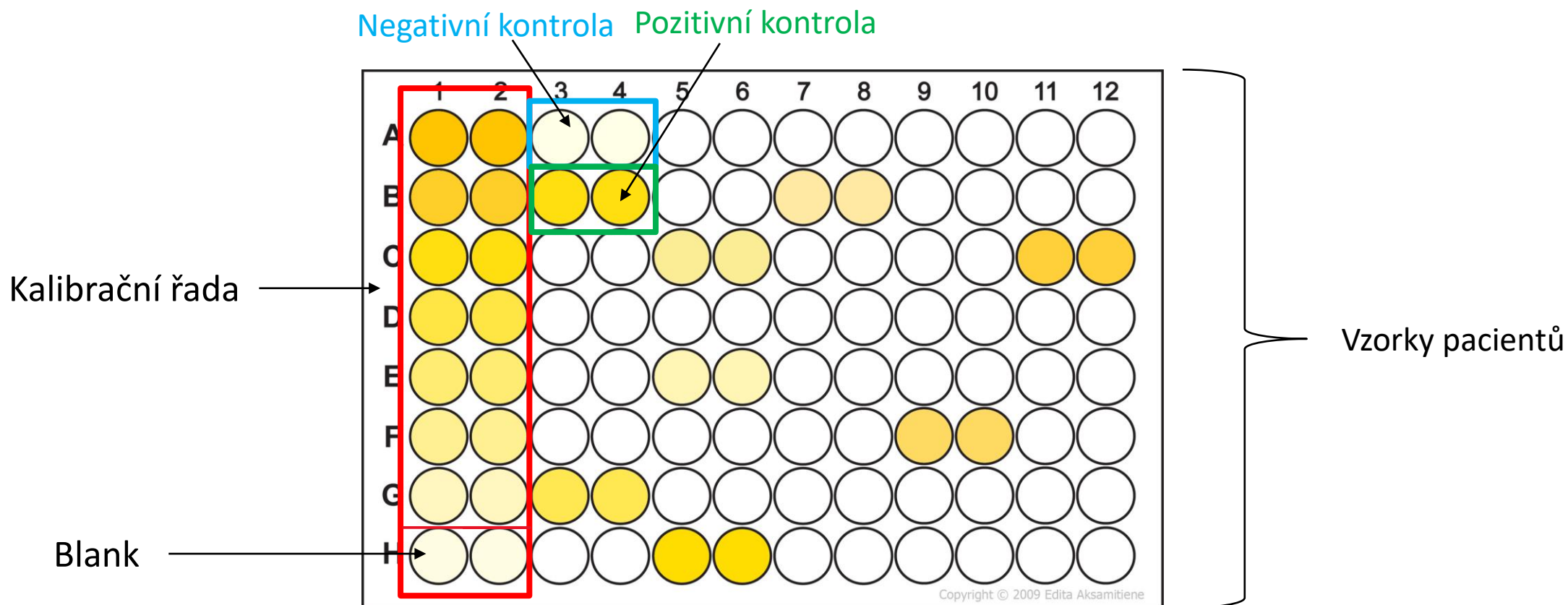
Hodnocení výsledků

- V klinické laboratoři existuje určitá hierarchie hodnocení výsledků
- Podílí se na něm laborant i VŠ
- **Vždy se hodnotí zároveň papírový výsledek s ELISA deskou**

1. fáze kontroly – zdravotní laborant

- Vizuální kontrola desky –zbarvení
- Vizuálně hodnotí, zda se naměřená absorbance (barva jamek) shoduje s výsledky na papíře (pozitivní pacienti – shodují se souřadnice jamek na desce se souřadnicemi v tištěných výsledcích?)
 - ANO – kontrola pokračuje do další fáze
 - NE – hledáme příčinu (záměna desky)

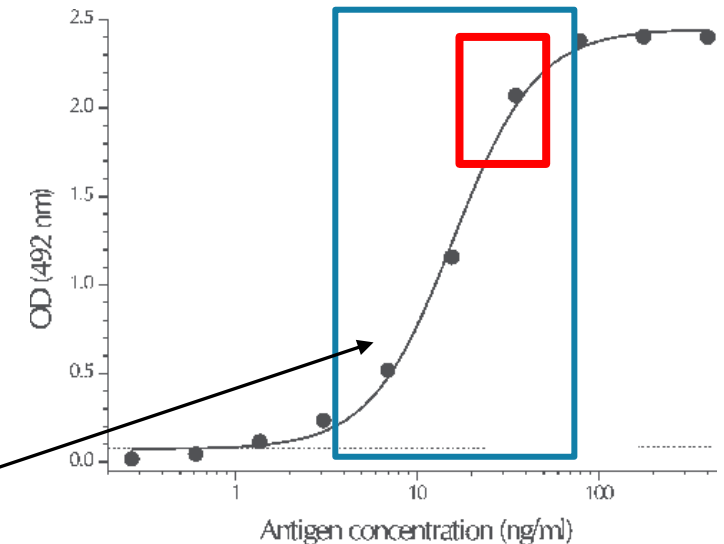
Hodnocení výsledků - kvantitativní



Hodnocení výsledků

2. fáze kontroly – VŠ pracovník

- Vizuální kontrola desky
 - Není zbarvení celé desky moc tmavé nebo světlé? – uměle zvýšené či snížené naměřené hodnoty vzhledem ke kalibrační křivce
 - Není v některých jamkách sraženina / nečistota – uměle pozitivní výsledky?
- Hodnocení s tištěnými výsledky – kontrola kalibrace:
 - Kontrola průběhu kalibrační křivky
 - Kontrola jednotlivých bodů – není některý výrazně mimo?
 - **Pozitivní kontrola – leží v rozmezí, které udává výrobce?**
 - Pozitivní vzorek pacienta – souhlasí poloha na desce s papírovým výsledkem?



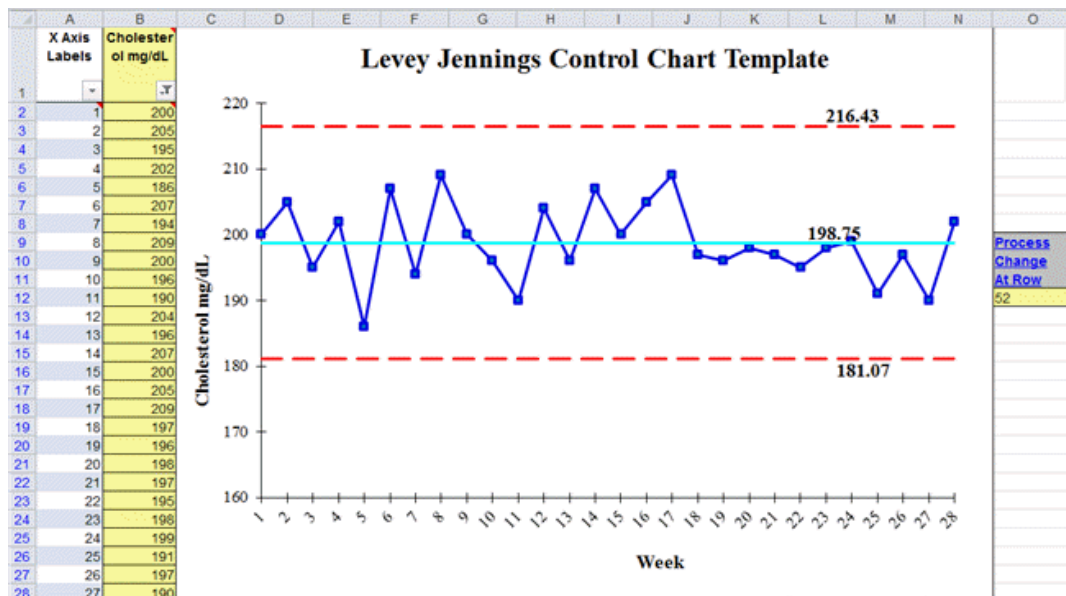
Ideální reálná kalibrační křivka – zploštění u nízkých koncentrací a vysokých koncentrací – koncentrace zkoumaného analytu v séru by měla ležet ve vyznačené přímkovém úseku

Hodnocení výsledků

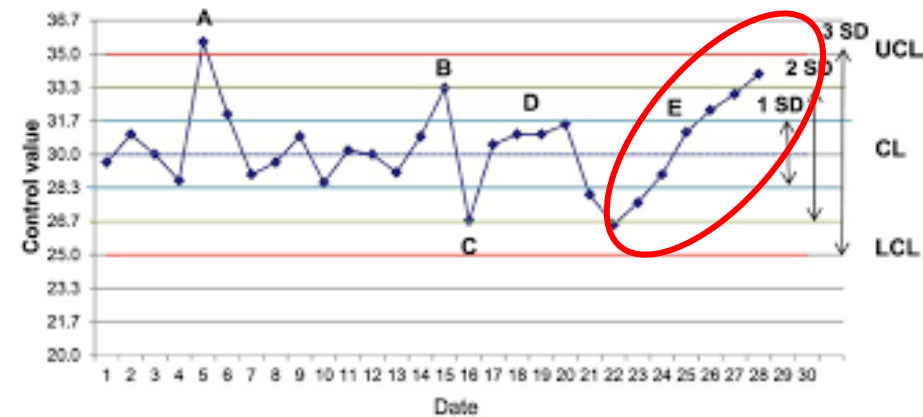
- Pokud nevyšly kontroly, musí se hledat příčina:
 - Máme tu správnou desku? Na jakém programu byla změřena? Jaká je šarže kontrol (mohlo nedávno dojít ke změně)
- Pokud pozitivní kontrola vyšla příliš vysoká/nízká:
 - Všímáme si rozsahu kalibrace – měla by být co nejširší – od velmi nízkých hodnot absorbance až po vysokou
 - Zjišťujeme, jak vypadala předchozí měřená kalibrace u minulého zpracování testu
 - Kontrola pozitivních pacientů se záznamy v LISu (pokud již pacient byl dříve vyšetřen a aktuálně změřený výsledek se shoduje s jeho historií, je pravděpodobně špatně pouze kontrola):
 - Možná chyba ředění laborantky
 - Kontrola lahvičky – set, šarže

Hodnocení výsledků

- Výsledky měření kontrol se dlouhodobě zaznamenávají v čase – interní kontrola kvality
 - Levey-Jenningsův diagram → Westgardova pravidla
 - Varovné a regulační meze



Stoupající nebo klesající trend může například značit expiraci setu, „zahušťování“ pozitivní kontroly, vadu spektrofotometru....



Hodnocení výsledků

- Pokud nevyjde kalibrace a kontroly – nutno vyšetření opakovat
- Pokud je vše v pořádku – VŠ výsledek ELISY podepíše (přebírá za ně odpovědnost)

3. Fáze kontroly

- Přepis výsledků ELISA do pracovního listu
- Přepisování výsledků z pracovního listu do systému (POZOR na překlepy)

4. Fáze kontroly - VŠ

- Ve chvíli, kdy má pacient všechna požadovaná vyšetření hotová, provádí se validace výsledků
- VŠ v počítači kontroluje, zda výsledky dávají logický smysl
- Seznam výsledků, které je nutno okamžitě hlásit lékaři abnormální hodnoty– VŠ mu vysvětluje, co to znamená – možnost ovlivnění léčby pacienta
- Uvolnění výsledků – tzn. propuštění výsledků počítačovým systémem pro tisk

Hodnocení výsledků

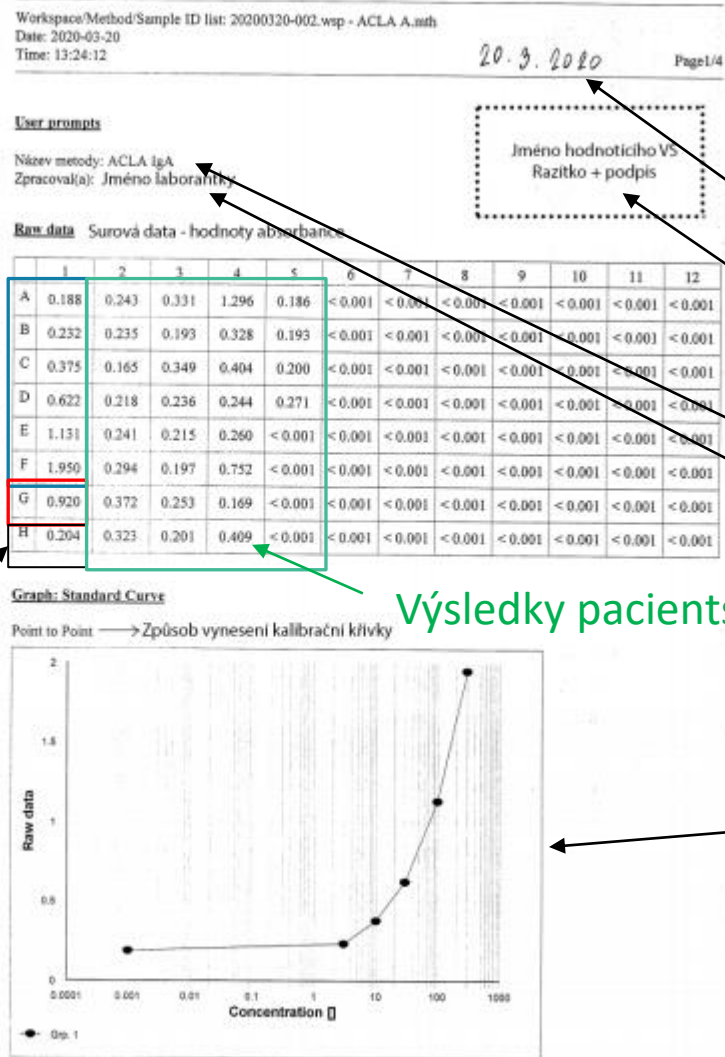
5. Fáze kontroly – VŠ

- Zvalidované a uvolněné výsledky pacienta se tisknou v papírové podobě
- Expedice výsledků – VŠ, který výsledky uvolnil opět kontroluje tyto výsledky pacienta v papírové podobě →
 - Není ve výsledcích něco podezřelého?
 - Nezapomnělo se na žádné vyšetření?
- Po expedici výsledků do nich může přes počítačový systém nahlédnou ošetřující lékař dané nemocnice - před tímto krokem mohou výsledky“ vidět pouze pracovníci laboratoře
- Tištěné výsledky opouštějí pracoviště a putují k ošetřujícímu lékaři

Hodnocení výsledků

- VŠ svým podpisem odpovídá za výsledky!
- O každé fázi zpracování vzorků a kontrol musí existovat záznam – kdo, kdy
 - Razítka, podpisy
 - V PC – laboratorní pracovník zapisuje pod svým jménem
- VŠ také ovlivňuje laboratorní pracovníky – měl by si všímat nálady na pracovišti, motivovat lidi, aby se nebáli přiznat chybu
- Jde o zdraví lidí, zatajování chyb nepřichází v úvahu

Příklad ELISA ACLA - kvantitativně



Kalibrace

Pozitivní k.

Negativní k.

Výsledky patientských vzorků

- Výsledky ELISY z readru
- **Metoda ACLA** - protilátky proti kardiolipidům při vyšetření **antifosfolipidového syndromu**
- Výtisk obsahuje:
 - hodnoty absorbance
 - musí být uvedeno datum provedení testu
 - musí být uvedeno, kdo test hodnotil – jméno VŠ
 - musí být uveden název testu
 - musí být uvedeno, kdo daný test zpracovával = jméno laborantky
 - Kalibrační křivka

Příklad ELISA ACLA – kvantitativně, pokračování

Výsledek z readeru dále obsahuje:

- Naměřené hodnoty absorbancí jednotlivých vzorků, kalibrací a kontrol
- Přiřazené hodnoty koncentrací
- Označení jednotlivých jamek
- Záznam mezí koncentrací ve kterých by se měla pohybovat pozitivní kontrola

Workspace/Method/Sample ID list: 20200320-002.wsp - ACLA A.mth
Date: 2020-03-20
Time: 13:24:12
Page 2/4

1 Raw data

2 Single conc. (1	2
A1	0.188	< 0.001
B1	0.232	3.000
C1	0.375	10.000
D1	0.622	30.000
E1	1.131	100.000
F1	1.950	300.000
G1	0.920	60.705
H1	0.204	0.018
A2	0.245	3.291
B2	0.235	3.077
C2	0.165	<Min
D2	0.218	0.235
E2	0.241	3.236
F2	0.294	5.056
G2	0.372	9.751
H2	0.323	6.454
A3	0.331	6.904
B3	0.193	0.002
C3	0.349	8.034
D3	0.236	3.103
E3	0.215	0.136
F3	0.197	0.005
G3	0.253	3.580
H3	0.201	0.011
A4	1.296	124.774
B4	0.328	6.732
C4	0.404	11.377
D4	0.244	3.319
E4	0.260	3.798
F4	0.752	40.801
G4	0.169	<Min
H4	0.409	11.633
A5	0.186	<Min
B5	0.193	0.002
C5	0.200	0.009

Mageflan V 6.5

Hodnoty kalibrace

Sloupec 1
Hodnoty
absorbance

Sloupec 2
Hodnoty
koncentrací

Výsledky kontrol

Označení
jednotlivých
jamek

$k + 4s (30 - 70)$
 $k -$

Příklad ELISA ACLA – kvantitativně, pokračování

Na záznam z ELISA readeru navazuje
výsledková listina, kde musí být
uvedeno:

Název testu

Datum provedení

Kdo zpracoval – jméno laborantky

Souřadnice kalibrátorů, kontrol a vzorků
pacientů

Např. Sérum pacienta č.9 bylo v jamce
A9 a zjištění koncentrace ACLA
protilátek byla 6 APL/ml

Strana 1 z 2 20.03.2020 9:57:41

Pracovní list I_ACLAA Ústav klinické imunologie a alergologie
Oddělení laboratorní imunologie

Datum provedení: 20.3.2020 Vyhodnotil:
Zpracoval: Jméno laborantky (razítko + podpis) Jméno hodnotícího VS

Souřadnice kalibrátorů → A1 - F1 40.
Souřadnice + kontroly → G1 - H1 +
Souřadnice - kontroly → H1 - K1

Sarže: 19290 Sarže: _____
Exp: 6/2021 Exp: _____
Datum dodávky: 11.3.2020 Datum dodávky: _____

Jednotky: APL/ml

Údaje o použitém ELISA kitu

Pacient	Výsledek vyšetření (jednotky APL/ml)
1 PAC 1	[18.11.19] 3
2 PAC 2	[18.03.19] 3
3 PAC 3	[18.11.19] 0
4 PAC 4	[05.02.19] 0
5 PAC 5	[18.11.18] 3
6 PAC 6	[18.11.18] 5
7 PAC 7	[20.09.19] 9
8 PAC 8	[28.01.20] 6
3/4 9 PAC 9	[13.02.17] 6
5 10 PAC 10	[18.11.19] 0
6 11 PAC 11	[18.11.19] 1
3 12 PAC 12	[18.11.19] 3
6 13 PAC 13	[18.11.19] 0
7 14 PAC 14	[18.11.19] 0
6 15 PAC 15	[18.11.19] 3
4 16 PAC 16	[18.11.19] 0
4/4 17 PAC 17	[18.11.19] 124
3 18 PAC 18	[18.11.19] 6

Souřadnice vzorků pacientů

Příklad ELISA ACLA – kvantitativně, pokračování

Strana 1 z 2 20.03.2020 9:57:41

Pracovní list L_ACLAA	Ústav klinické imunologie a alergologie Oddělení laboratorní imunologie
Datum provedení: 20.3.2020	Vyhodnotil: Jméno hodnotícího VS
Zpracoval: Jméno laborantky (razítko + podpis)	Jednotky: APL/ml

Souřadnice kalibrátorů → H₁-F₁ 200
 Souřadnice + kontroly → G₁-K₁
 Souřadnice - kontroly → H₁-K₁

Sarže: 19290 Sarže: _____
 Exp: 6/2021 Exp: _____
 Datum dodávky: 11.3.2020 Datum dodávky: _____

Údaje o použitém ELISA kitu

Pacient	Výsledek vyšetření (jednotky APL/ml)
2/ A 1 PAC 1	(18.11.19 01) 3
B 2 PAC 2	(18.03.19 01) 3
C 3 PAC 3	_____ 0
D 4 PAC 4	(05.02.19 01) 0
E 5 PAC 5	(18.11.19 01) 3
F 6 PAC 6	_____ 5
G 7 PAC 7	(30.09.19 21) 9
H 8 PAC 8	(28.01.20 01) 6
3/ A 9 PAC 9	(13.02.17 31) 6
B 10 PAC 10	_____ 0
C 11 PAC 11	_____ 1
D 12 PAC 12	_____ 3
E 13 PAC 13	_____ 0
F 14 PAC 14	_____ 0
G 15 PAC 15	_____ 3
H 16 PAC 16	_____ 0
4/ A 17 PAC 17	_____ 124
B 18 PAC 18	_____ 6

Souřadnice vzorků pacientů

Na záznam z ELISA readeru navazuje výsledková listina, kde musí být uvedeno:

Kde byl výsledek zpracován

Kdo hodnotil

Údaje o použité ELISA kitu

Vyhodnocení koncentrací pro jednotlivé pacienty

Příklad č. 2 LKM

autoprotilátky proti mikrozomům jater a ledvin

Semikvantitativní hodnocení – index positivity

Negativní k.

Pozitivní k.

Cut-off kalibrátory

Výsledky patientských vzorků

Workspace/Method/Sample ID list: 20200219-002.wsp - 450_IP.mth
 Date: 2020-02-19
 Time: 11:44:17
 Page 1/1

User prompts

Název metody: LKM
 Zpracoval(a): Jméno laborantky

Jméno hodnotícího VŠ
 Razítko + podpis

Raw data Surová data - absorbance

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.069	0.115	0.118	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
B	0.857	0.118	0.144	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
C	0.442	0.129	0.158	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
D	0.294	0.092	0.093	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
E	0.591	0.096	0.126	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
F	0.104	0.116	0.128	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
G	0.109	0.100	0.113	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
H	0.091	0.124	0.112	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

IP Index positivity - přepočten z hodnot absorbance

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.156	0.260	0.267	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
B	1.939	0.267	0.326	< 0.001	< 0.001	0.002	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
C		0.292	0.357	< 0.001	< 0.001	0.002	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
D	0.665	0.208	0.210	< 0.001	< 0.001	0.002	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
E	1.337	0.217	0.285	< 0.001	< 0.001	0.002	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
F	0.235	0.262	0.290	< 0.001	< 0.001	0.002	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
G	0.247	0.226	0.256	< 0.001	< 0.001	0.002	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
H	0.206	0.281	0.253	< 0.001	< 0.001	0.002	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

vzorky jednotlivých pacientů

Výsledky ELISY z readeru

- **Metoda LKM** - autoprotilátky proti mikrozomům jater a ledvin při vyšetření **autoimunitních hepatitid**
- Výtisk obsahuje:
- Název metody
- Jméno laborantky, která metodu zpracovala
- Jméno VŠ pracovníka, který hodnotil výsledky
- Naměřená surová data (absorbance) kontrol, kalibrátorů a vzorků pacientů
- Vypočtené indexy positivity na základě poměru absorbací vzorků a kalibrátoru

Pracovní list	I_LKM	Ústav klinické imunologie a alergologie Oddělení laboratorní imunologie
Datum provedení:	19.2.20	Vyhodnotil:
Zpracoval:	Jméno odpovědné laborantky Razítko + vlastnoruční podpis	Jméno odpovědného VŠ

1A: K- Negat. kontrola
 B: K+ Pozit. kontrola
 C: CO Kalibrátor 0
 D: CAL 10 Kal. 10
 E: CAL 30

Sarže: 18500
 Exp: 12/20
 Datum dodávky: 12.11.19

Jednotky: IP
 Jednotky - zde
 Index Pozitivity (IP)

Pacient (Jméno, RC, laboratorní číslo)	Index pozitivity	Údaje o použitém ELISA kitu
F 1 PAC 1	0,255	
G 2 PAC 2	0,247	
H 3 PAC 3	0,206	
2A 4 PAC 4	0,260	
B 5 PAC 5	0,267	
C 6 PAC 6	0,292	
D 7 PAC 7	0,208	
E 8 PAC 8	0,217	
F 9 PAC 9	0,262	
G 10 PAC 10	0,226	
H 11 PAC 11	0,281	
3A 12 PAC 12	(23,01,18 0,272) 0,267	
B 13 PAC 13	0,326	
C 14 PAC 14	0,357	
D 15 PAC 15	0,210	
E 16 PAC 16	0,285	
F 17 PAC 17	0,290	
G 18 PAC 18	0,256	

Příklad č. 2 LKM

autoprotilátky proti mikrozomům jater a ledvin

Semikvantitativní hodnocení – index pozitivity

Na záznam z ELISA readeru navazuje výsledková listina, kde musí být uvedeno:

- Kde byl výsledek zpracován
- Kdo hodnotil
- Údaje o použité ELISA kitu
- Souřadnice kontrol a kalibrátorů
- Vyhodnocení koncentrací pro jednotlivé pacienty

System vyšetření autoprotilátek

- ELISA kity velice drahé – cca 10 tisíc
- Např. stanovení ENA – obsáhlá skupina autoprotilátek proti extrahovatelným nukleárním antigenům
- Vyšetření probíhá ve dvou fázích:
 1. ELISA screening ENA: je pacient pozitivní na ENA? → ANO / NE
 2. Pokud ANO – teprve se nasazuje na ELISU, která určí podtyp ENA (SS-A, SS-B, Jo1, Scl-70, SM, ...)

Imunoblot

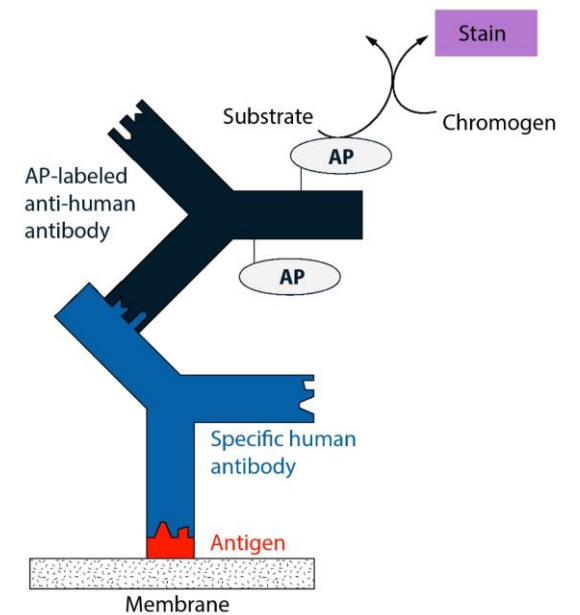
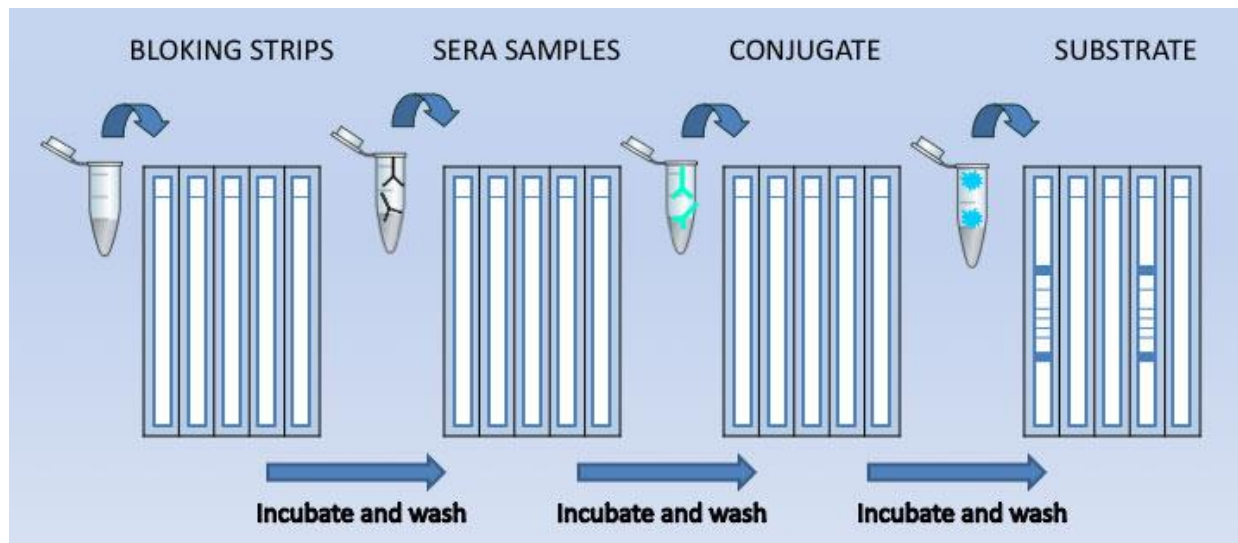
- Slouží k diagnostice autoantilát
- Příprava blotů (výrobce):
 - Proteiny elektroforeticky rozděleny v gelu – přenos (otisk) na nitrocelulózovou membránu (blotting)
 - Membrána je rozstříhána na jednotlivé diagnostické proužky
 - každý protein má na proužku definovanou poloh
 - Při vazbě konkrétní autoantilátky ze séra se vytvoří band, který má charakteristickou polohu
 - Odečítá se podle přiložené šablony



Imunoblot

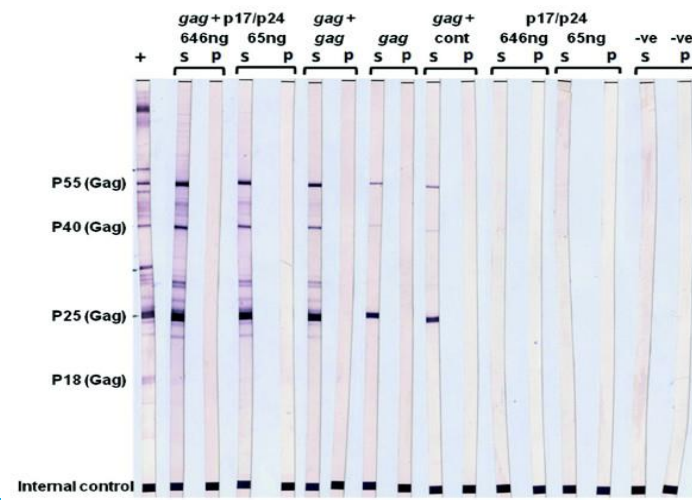
○ Princip stanovení:

- Pokud je autoprotilátka proti určitému proteinu přítomna v séru, naváže se na tento protein immobilizovaný na stripu, dochází k imunoprecipitaci
- Detekce vazby autoprotilátky pomocí detekčních protilátek značených enzymem
- Po přidavku substrátu jej enzym přemění na barevný produkt – podobné s ELSOU
- Výsledkem je vznik barevného proužku na stripu



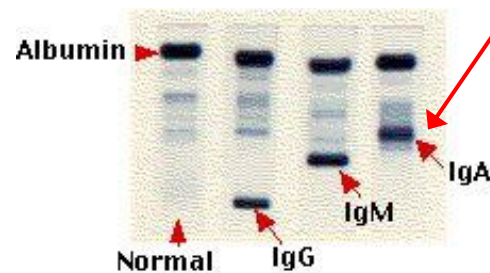
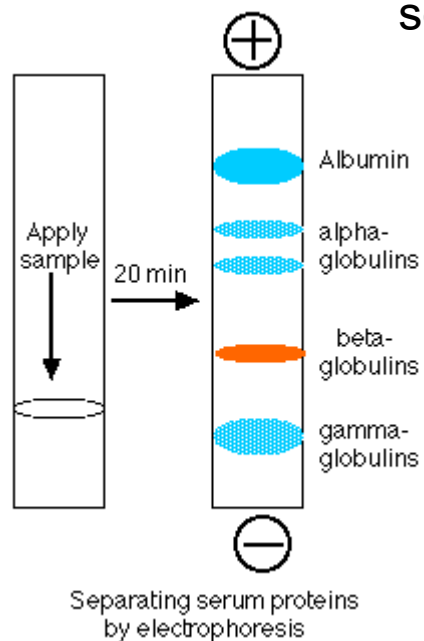
Imunoblot

- Jednotlivé barevné proužky se porovnávají s kontrolní šablonou
- Odečet vizuálně nebo denzitometricky (% positivity)
- Imunoblotem se vyšetřují pacienti, u kterých nebyly detekovány imunofluorescenčně či ELISOU autoprotiilátky při přetrvávajících klinických příznacích
 - Poznámka: Ag jsou poutány na desku – při ELISA a při blotech, či na tkáni – při imunofluorescenčním stanovení jinými metodami, možnost konformačních změn proteinů – znemožnění vazby x umožnění vazby některých typů protilátek
- Diagnostika – například roztroušená skleróza



Elektroforéza

sérové proteiny mohou být elektroforeticky separovány



- lze zachytit pouze hrubé změny:
hypergamaglobulinémii,
hypogamaglobulinemii či monoklonální →
gamapatie

elektroforetická separace proteinů v alkalickém pH



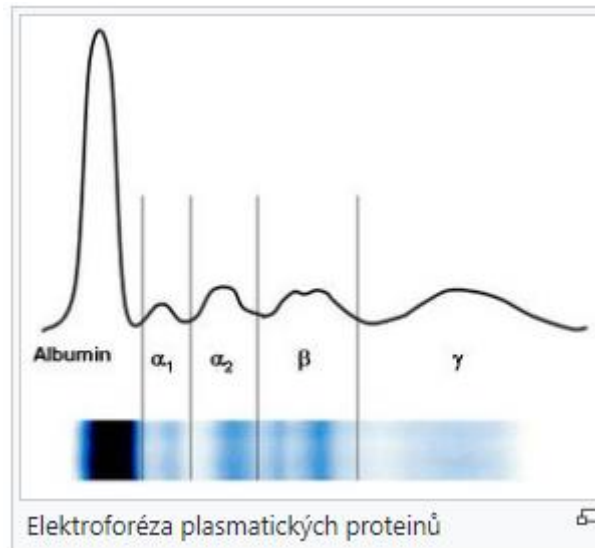
Elektroforetické frakce obsahují tyto plazmatické proteiny

	Bílkovina <i>Relativní molekulová hmotnost</i>	Koncentrace v séru [g/l]	Poločas [dny]	Funkce	
	Prealbumin (Transthyretin) <i>54 000</i>	0,2–0,4	2	<ul style="list-style-type: none"> vazba hormonů štítné žlázy a retinol vázajícího proteinu 	↓ malnutrice
	Albumin <i>68 000</i>	35–53	15–19	<ul style="list-style-type: none"> nejvýznamnější transportní protein udržení koloidně-osmotického tlaku proteinová rezerva organismu 	↓ katabolismus ↓ hepatopatie ↓ ztráty bílkovin
α₁ oblast	α₁-lipoprotein <i>180 000–360 000</i>	1,0–1,6 (Apo A-I)		<ul style="list-style-type: none"> lipoprotein o vysoké hustotě (HDL) transport cholesterolu do jater 	
	α₁-antitrypsin (α ₁ -inhibitor proteáz) <i>54 000</i>	0,9–2,0	4	<ul style="list-style-type: none"> inhibitor lyzosomálních proteáz (hlavně elastázy z polymorfonukleárních leukocytů) vrozená deficience může být příčinou onemocnění plic (emfyzém) a jater (cirhóza) 	↑ akutní zánět
	α ₁ -kyselý glykoprotein (orosomukoid) <i>40 000</i>	0,5–1,2	5	<ul style="list-style-type: none"> vazba lipofilních látek (např. progesteronu a některých léků) podílí se na regulaci imunitní odpovědi 	↑ zánět
	α₁-fetoprotein <i>69 000</i>	< 7,5 μg/l	3,5	<ul style="list-style-type: none"> fyziologicky produkován fetálními játry a žloutkovým váčkem hlavní protein fetálního séra fyziologicky přítomen v séru těhotných žen 	↑ hepatom ↑ některé malignity GIT ↑ těhotenství

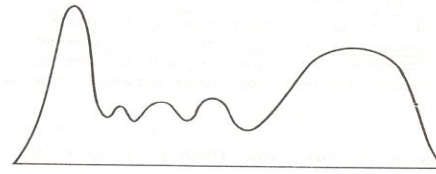
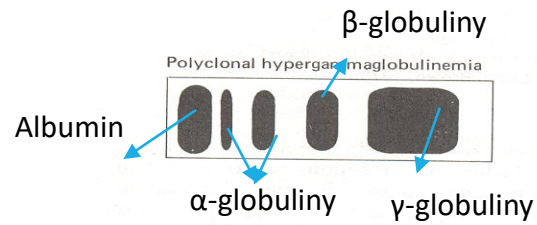
α₂ oblast	Haptoglobin ^[p 1] 85 000–1 000 000	0,3–2,0	2	<ul style="list-style-type: none"> vychytává volný hemoglobin 	↑ akutní zánět ↓ hepatopatie ↓ intravaskulární hemolýza (konzumpce haptoglobinu)
	α₂-makroglobulin 800 000	1,3–3,0	5	<ul style="list-style-type: none"> inhibitor proteáz (trombin, trypsin, chymotrypsin, pepsin) transport malých proteinů (cytokiny, růstové faktory) a dvojmocných iontů (např. Zn²⁺) díky velmi vysoké molekulové hmotnosti neprojde ani poškozenou glomerulární membránou 	↑ akutní zánět
	Ceruloplasmin 160 000	0,2–0,6	4,5	<ul style="list-style-type: none"> oxidoredukční aktivita (oxidace Fe²⁺ na Fe³⁺) vazba mědi (váže až 90 % Cu v séru) 	↓ Wilsonova choroba (hepatolentikulární degenerace)
β₁ oblast	Transferrin 77 000	2,0–3,6	7	<ul style="list-style-type: none"> transport a vychytávání volného železa 	↑ nedostatek železa ↓ malnutrice ↓ hepatopatie ↓ zánět
	Hemopexin 57 000	0,5–1,1	3–7	<ul style="list-style-type: none"> vazba hemu 	
	β-lipoprotein 2 750 000	0,7–0,9 (Apo B-100)	3	<ul style="list-style-type: none"> lipoprotein o nízké hustotě (LDL) transport cholesterolu k buňkám velmi vysoká molekulární hmotnost 	
	C4 složka komplementu 206 000	0,1–0,4	1	<ul style="list-style-type: none"> součást komplementu 	↑ zánět ↓ autoimunitní stavy
β₂ oblast	C3 složka komplementu 180 000	0,8–1,4	1	<ul style="list-style-type: none"> součást komplementu 	↑ zánět ↓ autoimunitní stavy
	β₂-mikroglobulin 11 800	0,001–0,002		<ul style="list-style-type: none"> součást leukocytárních antigenů 	↑ hematologické nádory ↓ porucha tubulární resorpce
	Fibrinogen 340 000	1,5–4,5		<ul style="list-style-type: none"> součást koagulační kaskády, prekurzor fibrinu fyziologicky jen v plazmě, není v séru 	↑ zánět
	C-reaktivní protein 111 000	1,5–5 mg/l	1	<ul style="list-style-type: none"> aktivace komplementu 	↑ akutní zánět (bakteriální)

Elektroforetické frakce obsahují tyto plazmatické proteiny

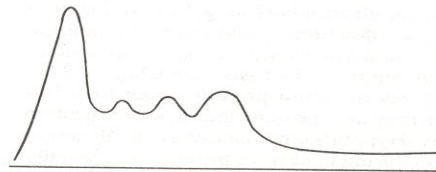
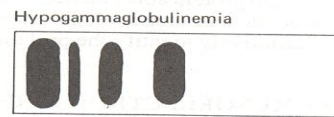
γ oblast	IgG 150 000	8,0–18,0	24	▪ pozdní protilátky	↑ (chronický) zánět
	IgA ^[p 2] 160 000	0,9–3,0	6	▪ protilátky slizniční imunity	↑ záněty sliznic a jater
	IgM 900 000	0,6–2,5	5	▪ časně protilátky	↑ akutní zánět



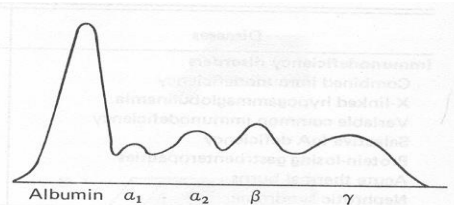
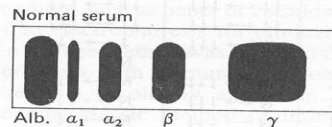
Použití elektroforézy v klinické praxi – čtení elektroforetogramů



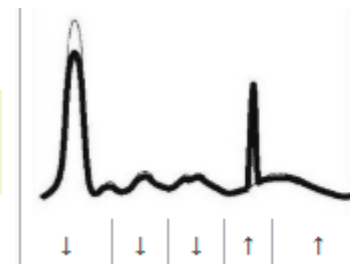
Normální sérum



Hypogammaglobulinemie

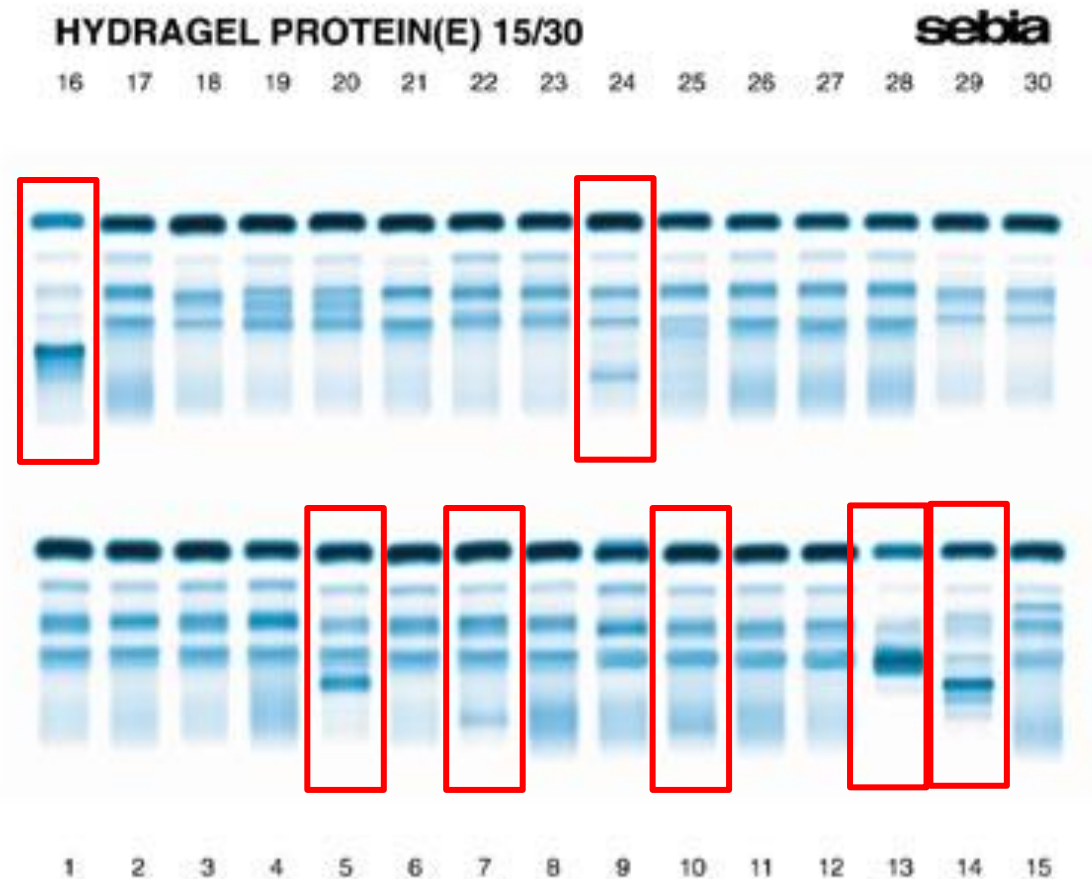


Hypergammaglobulinemie

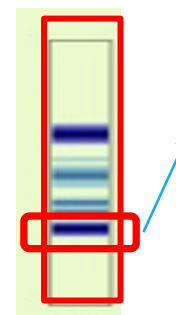


- benigní monoklonální gamapatie
- maligní monoklonální gamapatie (myelom)

Elektroforéza



Příklady elektroforetického
rozdělení řady patientských sér



Ohraničený band v γ - či α -
globulinové oblasti =
pacienti k dovyšetření
imunofixací

Imunofixace

- Diagnostika monoklonálních gamapatií (stanovení paraproteinů v séru a moči)
 - Podezření na monoklonální gamapatie – zvýšená celková bílkovina > 90 g/l)
 - Monoklonální gamapatie neznámého významu - MGUS (monitoring – řada pacientů po čase přechází do mnohočetného myelomu, makroglobulinémie či primární amyloidózy)
 - Maligní monoklonální gamapatie – mnohočetný myelom, plazmocytom
- Maligní lymfoproliferativní onemocnění
 - Waldenstromova makroglobulinemie
 - Maligní lymfomy
 - Chronická lymfatická leukemie
- Nemoc těžkých řetězců
- Primární AL amyloidóza

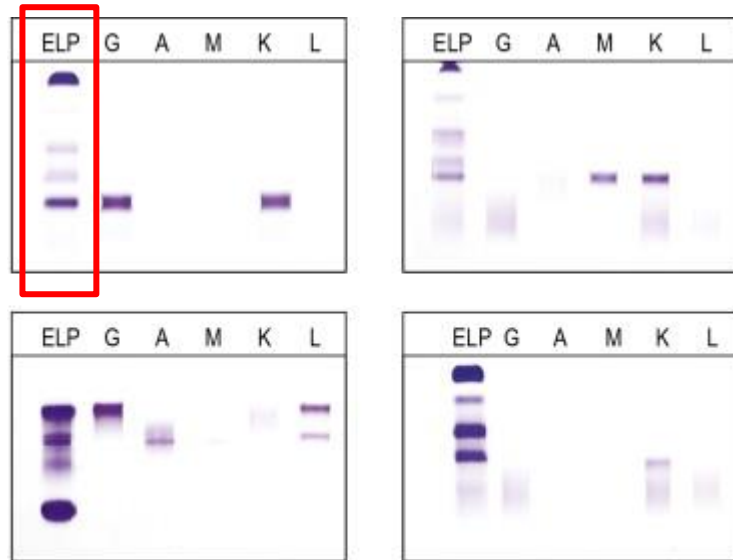
Imunofixace

Princip:

- Proteiny (sérum pacienta) rozdělné alkalickou elektroforézou jsou inkubovány se specifickými antiséry (anti IgG, IgA, IgM, řetězce kappa a lambda):
- V případě pozitivní reakce vzniká precipitát, který zůstává v gelu imobilizován
- Ostatní proteiny jsou vymyty
- Precipitáty jsou obarveny kyselou violetí nebo amidočerní
- Hodnocení – vizuální

Imunofixace

Referenční stopa – veškeré proteiny fixovány fixačním roztokem

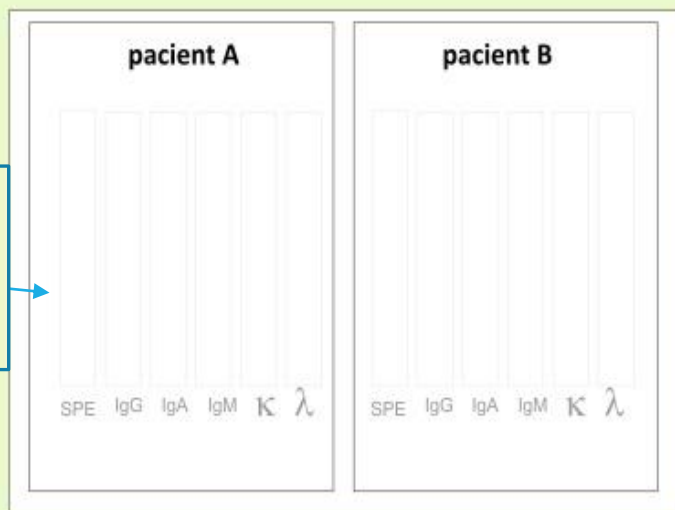


Zbývajících 5 drah – na každou naneseno jiné specifické antisérum

Imunofixační proužky jsou porovnávány s odpovídajícími frakcemi referenčního vzorku – proužek by měl mít stejnou migrační pozici

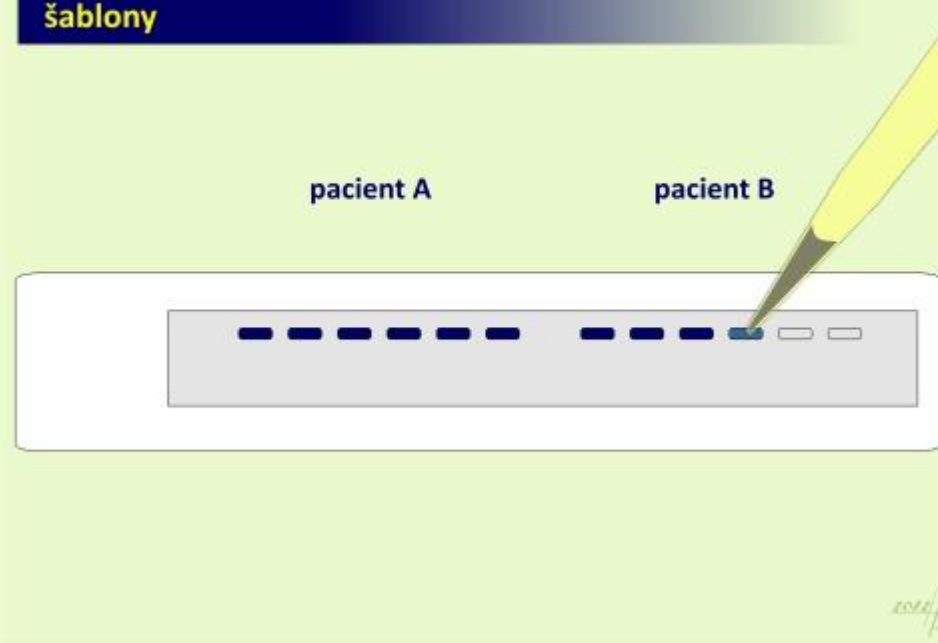
Imunofixace - zpracování

příprava čistého agarózového gelu



Start – místo
přiložení
šablony

vzorky jsou aplikovány do 6ti specifických stop
šablony



Na agarózový gel se na pozici start nanesou pomocí šablony séra pacientů
Šablona = umělohmotný proužek s vyřezanými tvory který se přiloží na vyznačené místo na gelu pro start

Agarózový gel před elektroforetickým rozdělením

séra pacientů připravená na agarózovém gelu



2024/

start elektroforetické migrace



2024/

elektroforetická separace proteinů v alkalickém pH



směr
pohybu



start



směr
pohybu



pacient A

pacient B

rychlost pohybu je závislá
na velikosti molekuly a síle náboje

SPE IgG IgA IgM K λ

SPE IgG IgA IgM K λ

2014/1

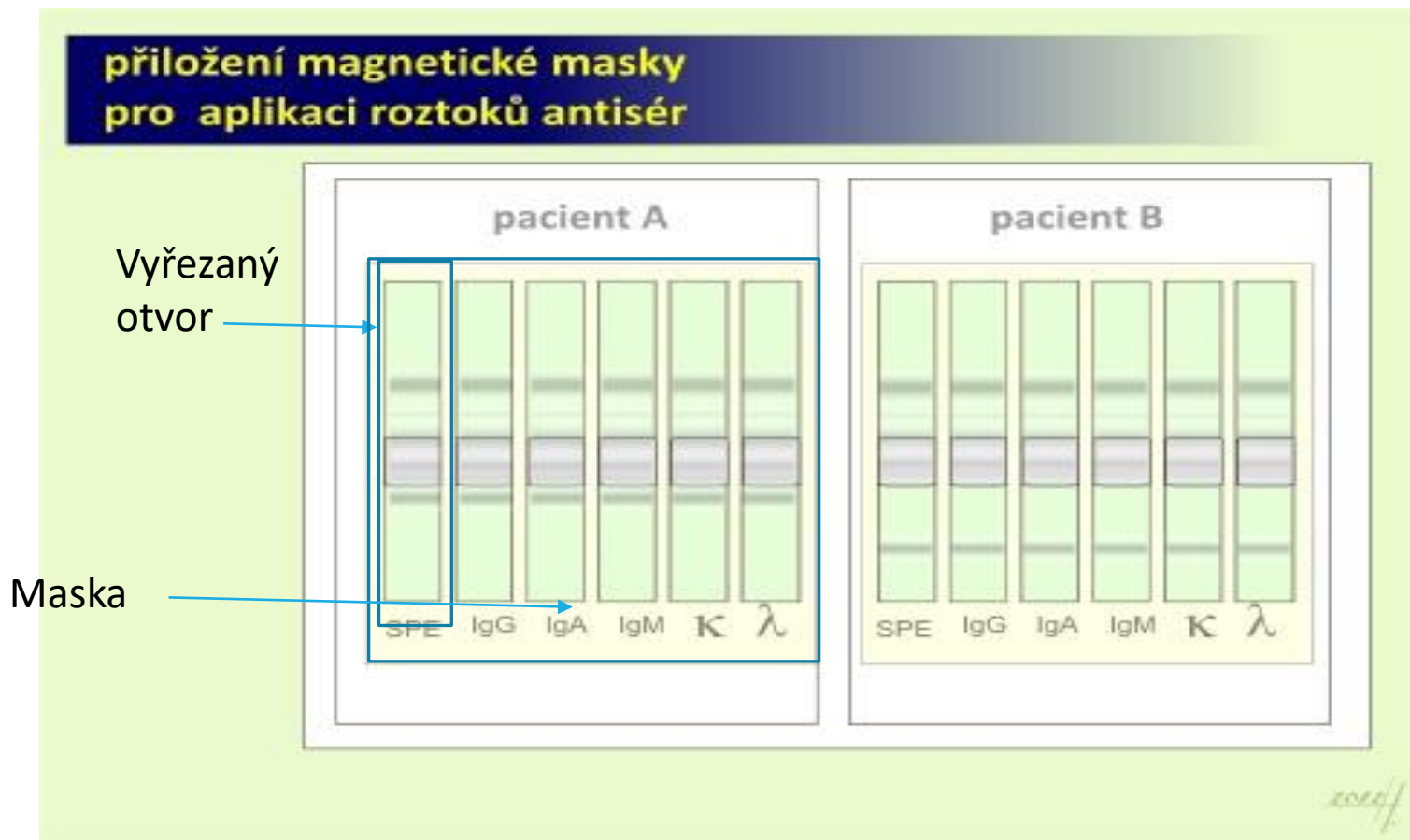
Agarózový gel po elektroforetickém rozdělení

separované imunoglobulinové molekuly

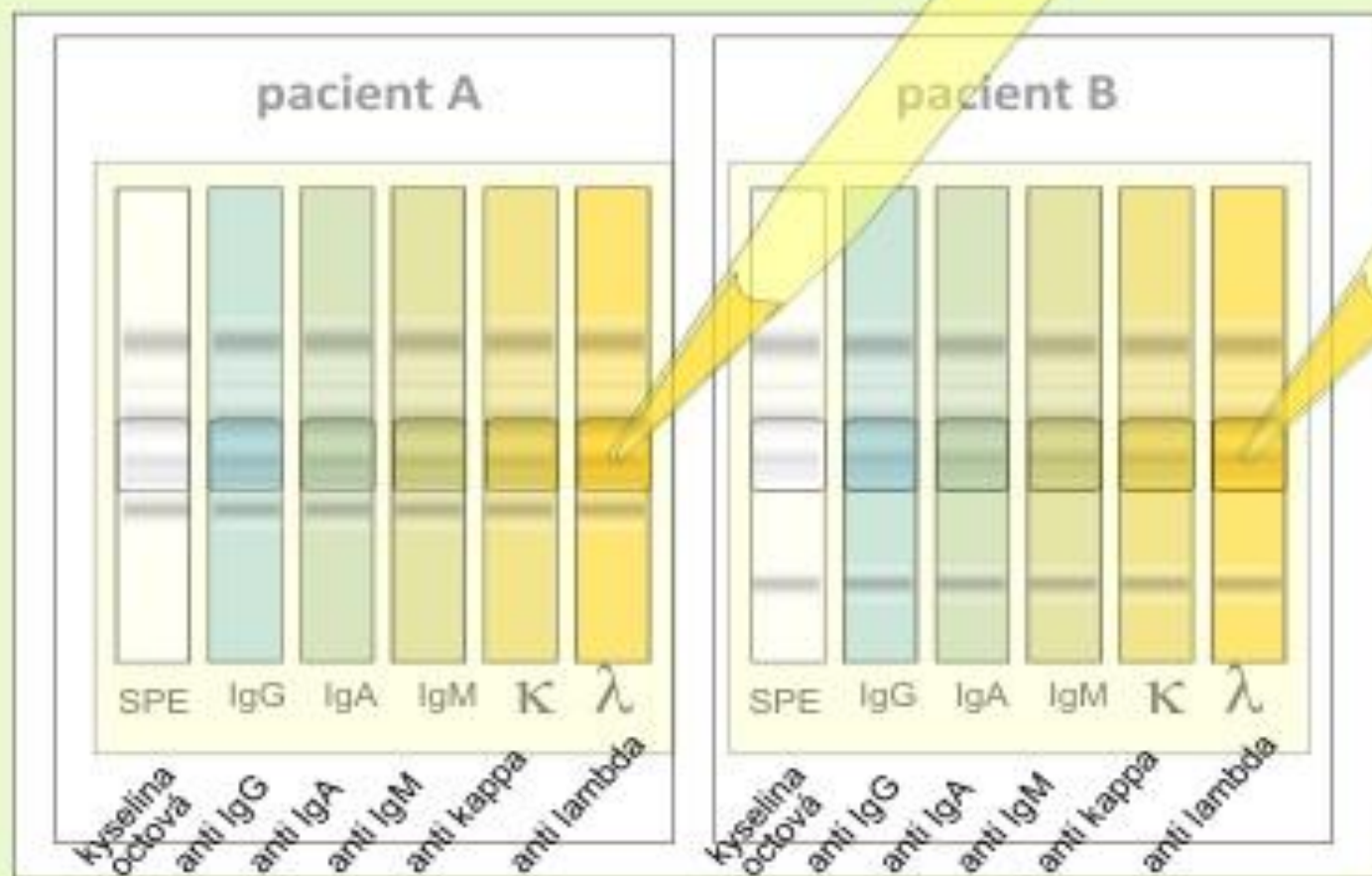


2024/11

Na agarózový gel se po elektroforetickém rozdělení vzorků séra se přiloží maska
- umělohmotná fólie s vyřezanými otvory tak, aby se na jednotlivé linie dalo aplikovat příslušné antisérum

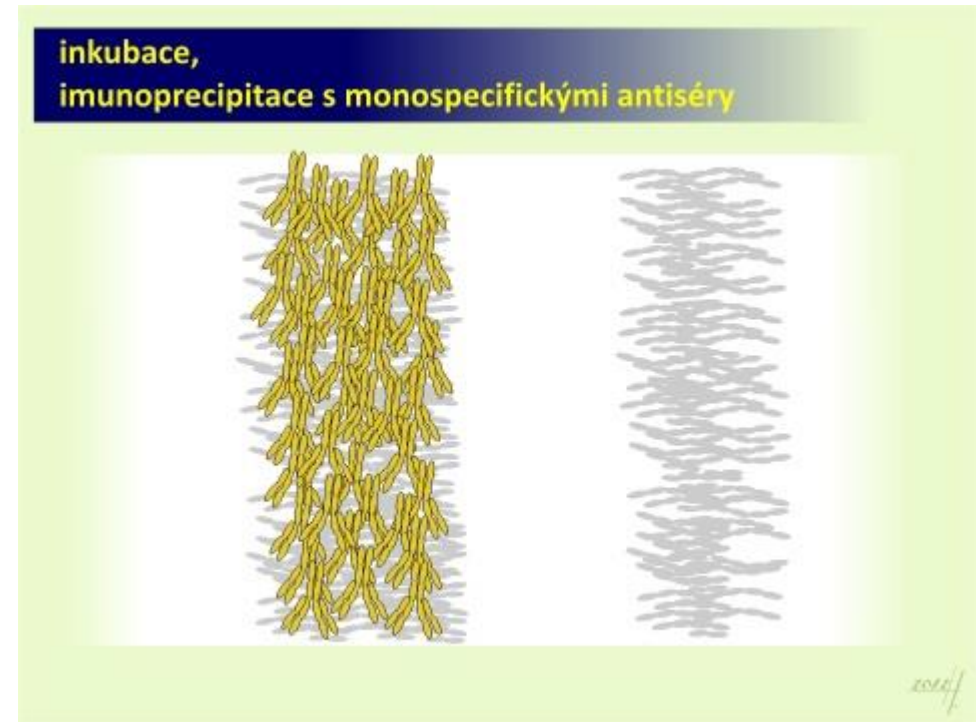
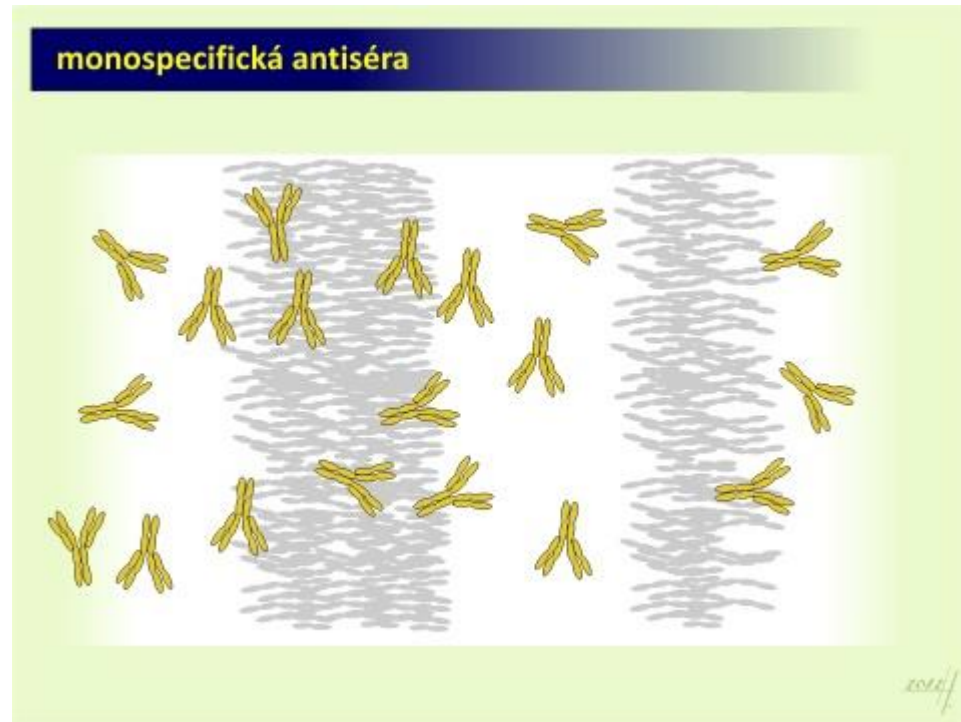


aplikace monospecifických antisér



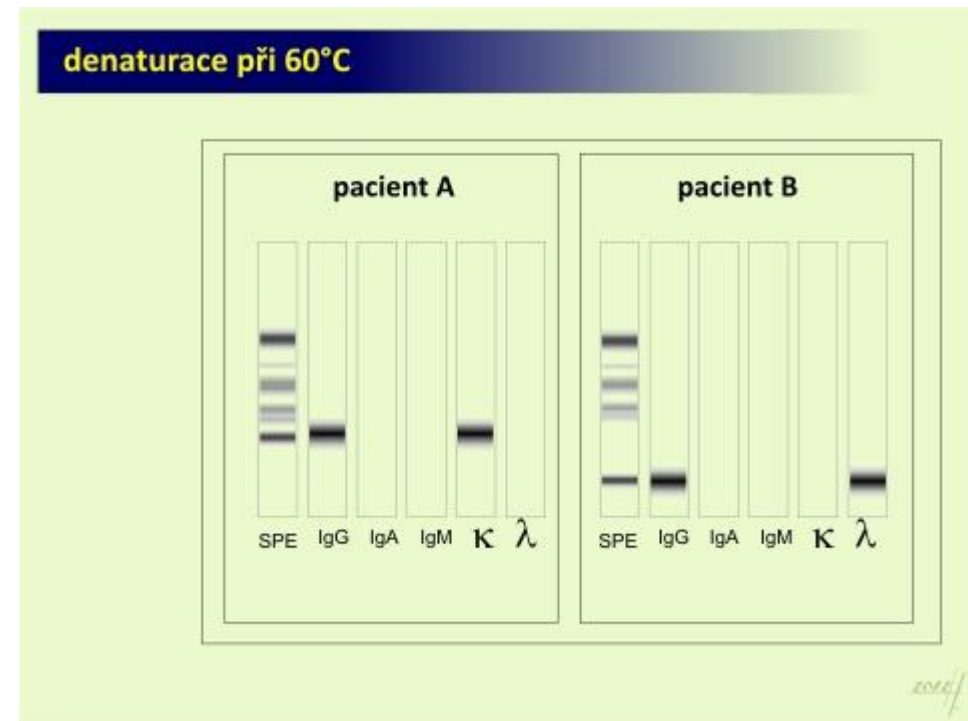
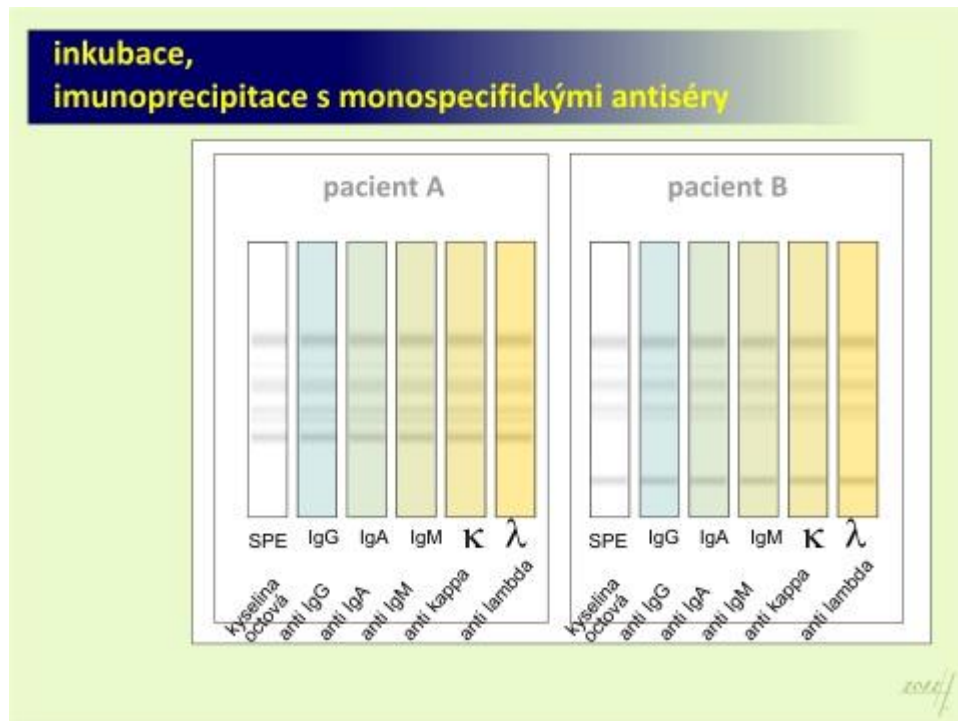
2014/

Při inkubaci s monospecifickými antiséry dochází k jejich vazbě na příslušné molekuly imunoglobulinů a dochází k precipitaci



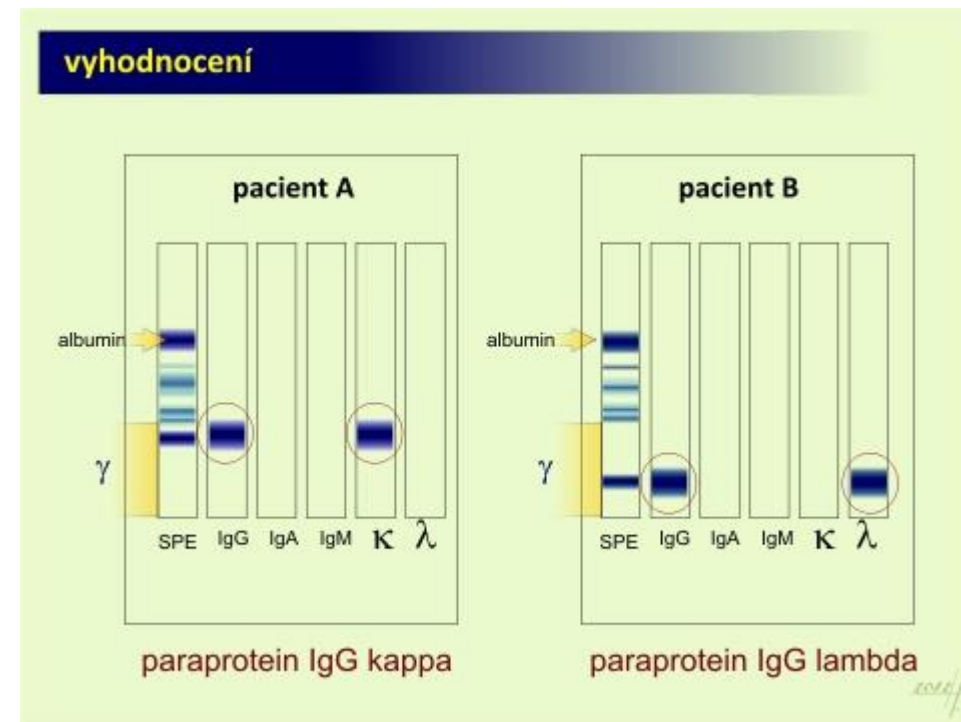
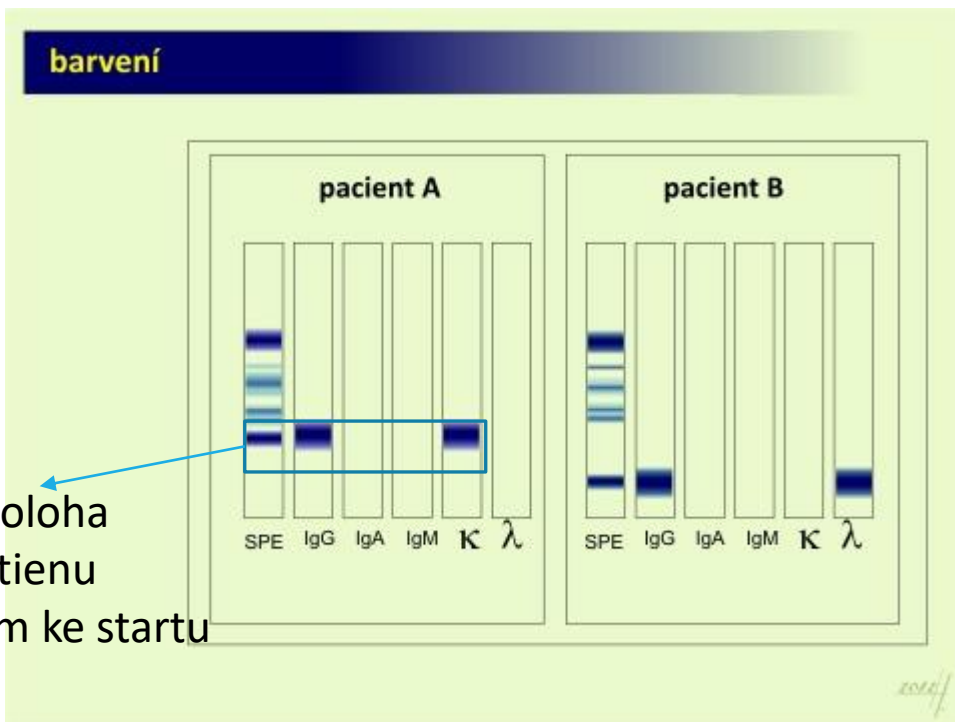
Po uplynutí inkubační doby se celý gel zahřeje na 60°C, čímž dojde k denaturaci vzniklých precipitátů a jejich přilnutí k podkladové membráně gelu.

Pokud vyšetřované sérum nebo moč pacienta obsahují zmnožený jeden klon imunoglobulinů nebo jen jejich část – κ nebo λ řetězce - vytvoří se ohraničený proužek tzv. band (paraprotein)



Pro vyhodnocení se provádí barvení imunofixovaných vzorků a poté jejich vyhodnocení.

Při vyhodnocování platí pravidlo, že band –paraprotein- v původním elektroforetickém rozdělení musí mít ve všech pruzích stejnou polohu ve vzdálenosti od startu.



Imunofixace

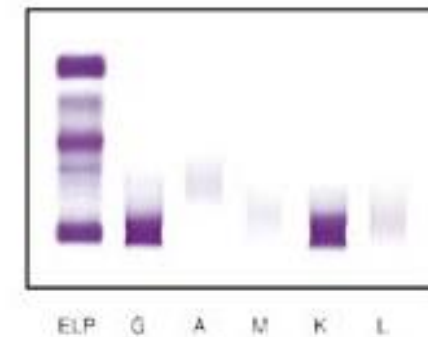
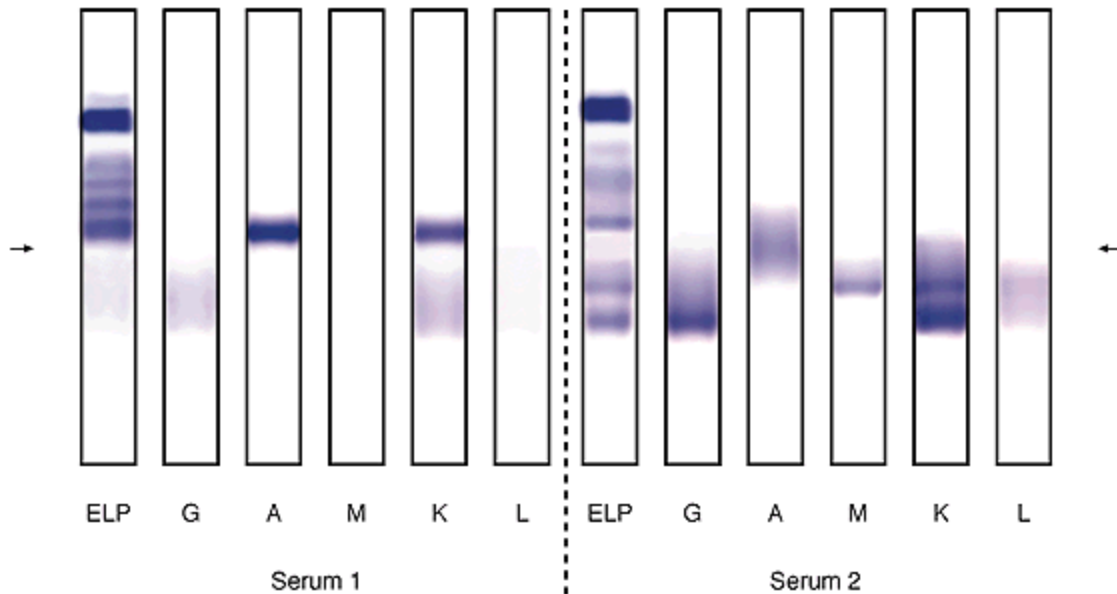
- určování typu paraproteinů (monoklonálního Ig)

HYDRAGEL DOUBLE IF

sebia ⊕

HYDRAGEL 1 IF

⊕



sebia

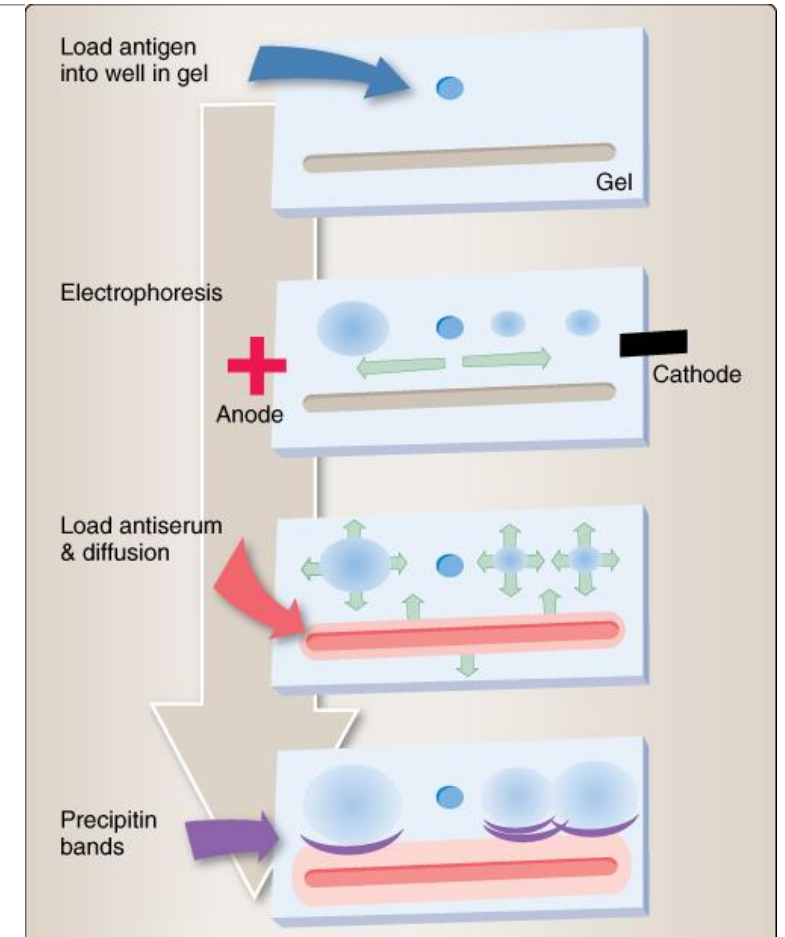
⊖

⊖

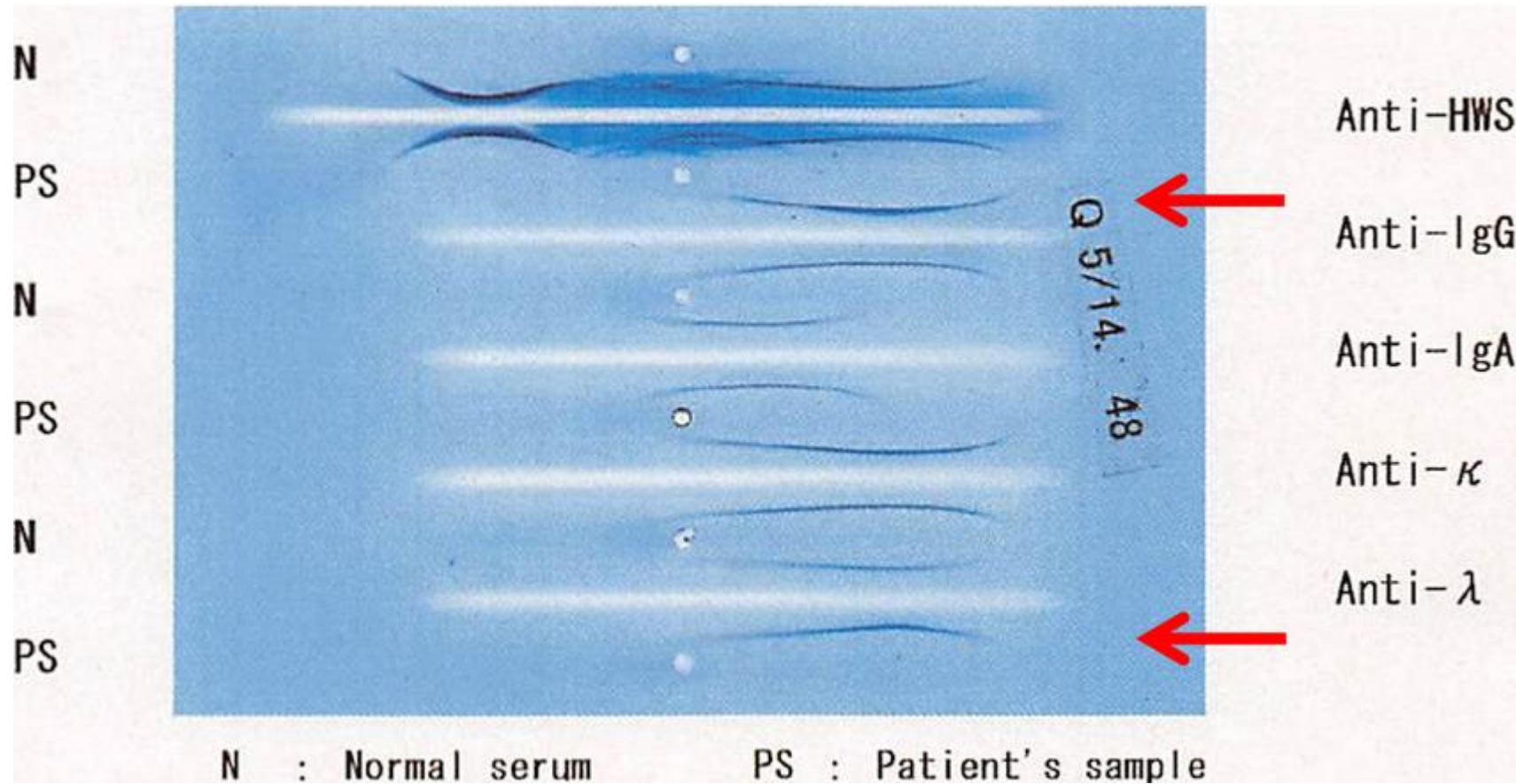
Pozn. 75 – 80% nemocných mnohočetným myelomem má v moči přítomny monoklonální lehké řetězce (Bence-Jonesova bílkovina/paraprotein). BJB poškozují buňky proximálních tubulů ledvin. MGUS monoklonální gamapatie nejasného původu

Imunoelektroforéza

- Kombinace elektroforézy s imunodifuzí:
 - Krok 1: elektroforetické rozdělení séra
 - Krok 2: Podél migrační dráhy se vyřízne žlábek – aplikace polyvalentního antiséra
- Antisérum difunduje do gelu – v zóně ekvivalence s antigenem (protein séra) vytvoří obloukovitou precipitační linii
- Při použití polyspecifického antiséra – až 35 precipitačních obloučků – mají charakteristický tvar a polohu (1 oblouček = 1 protein)



Imunoelektroforéza



Imunoelektroforéza

- Diagnostika monoklonálních gamapatií
- Hodnocení je kvalitativní
- Dnes spíše zastaralá metoda – nahrazena imunofixací

Raketová imunoelektroforéza

- Umožňuje kvantitativní stanovení proteinů (od 0,1 mg/l)
 - Gel obsahuje monospecifické antisérum
 - Proteiny séra elektroforeticky děleny (alkalické pH – anodická pohyblivost)
 - Při průchodu gelem vytváří cílový protein s monospecifickým antisérem precipitát v zóně ekvivalence → má tvar rakety
- S1-S4 – standardy o různé koncentraci
- V – vzorek pacienta
- Kvantitativní odečet z kalibrační křivky

