



Imunoanalýza ELISA

Mgr. Julie Štíhová

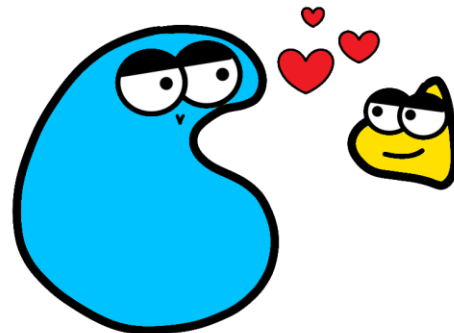
Fakultní nemocnice u Sv. Anny v Brně
Ústav klinické imunologie a alergologie

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

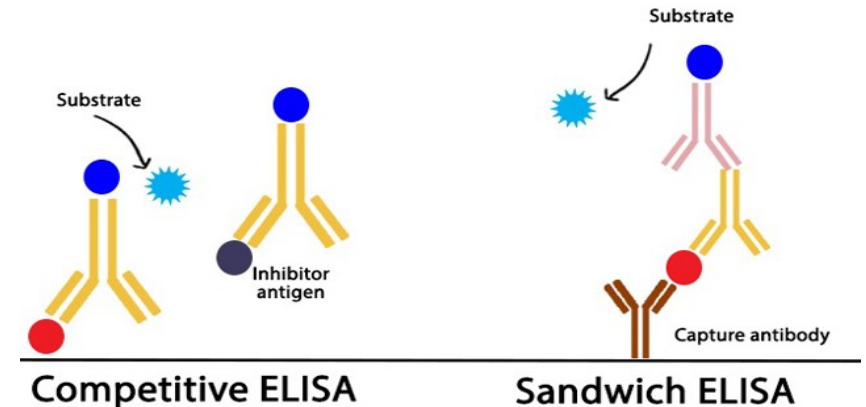
Imunoanalytické metody

Heterogenní **kompetitivní**:

- Analyt ze vzorku + značený analyt od výrobce – soutěž o vazbu na omezené množství antigenu/protilátky
- Měřený signál není **úměrný** množství analytu

Heterogenní **nekompetitivní**:

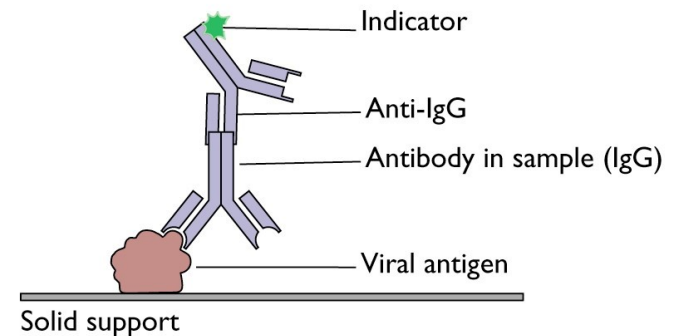
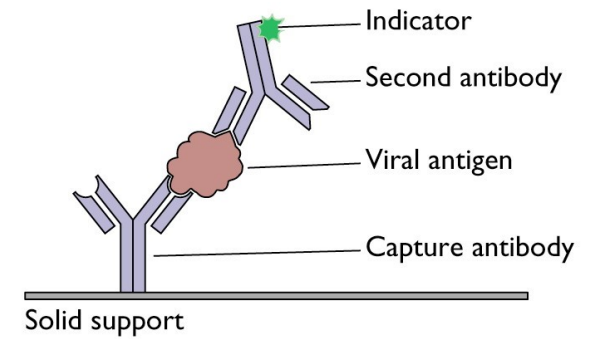
- Záchytná protilátka / antigen v nadbytku – veškerý analyt ze vzorku vyvázn
- Měřený signál je **úměrný** množství analytu



ELISA

Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

- Heterogenní imunoanalýza
- Zahrnuje jednotlivé kroky
 - Vazba antigenu / protilátky na pevnou fázi (stěna destičky)
 - Na 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 – nárůst absorbance → měření na spektrofotometru
- 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

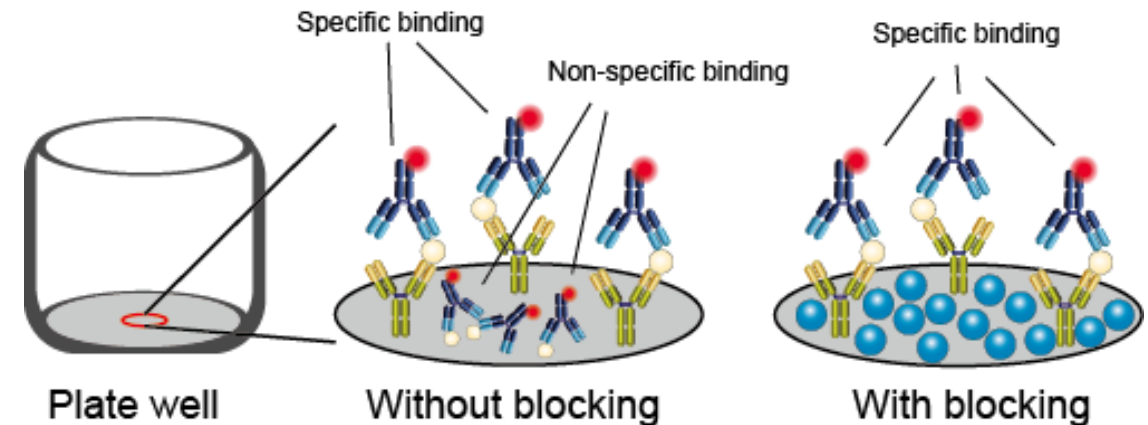
- Vazba NH_2 nebo COOH skupin – tvorba kovalentních vazeb s protilátkou nebo antigenem
- Vhodné pro stanovení malých molekul – např. peptidy

2. Pasivní adsorpce

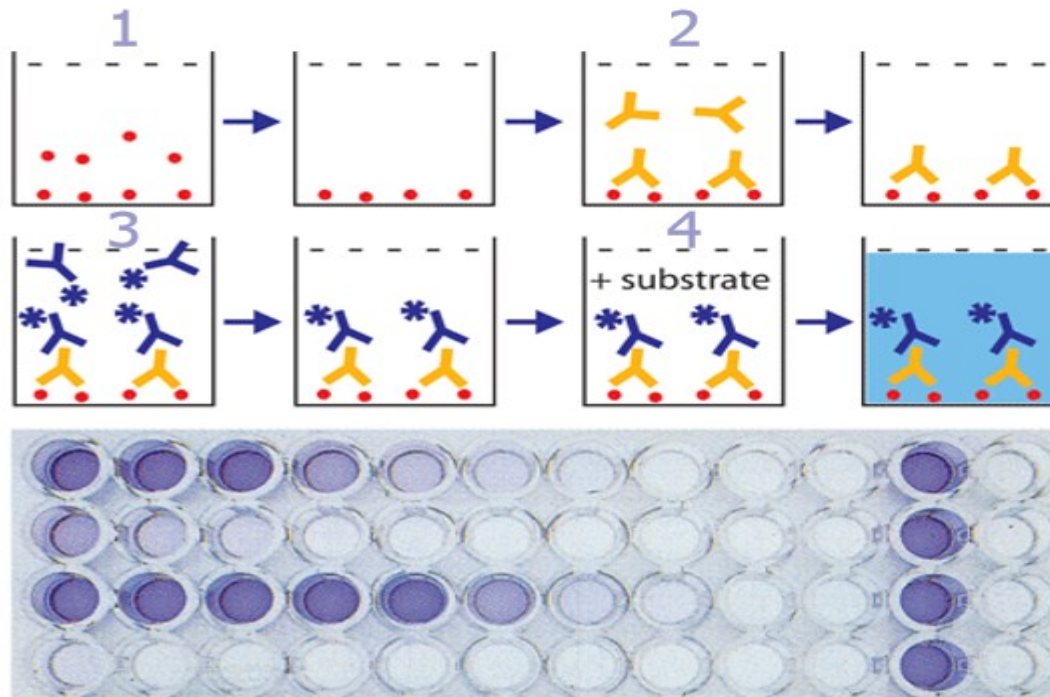
- Hydrofobní interakce mezi nepolárními strukturami proteinu a plastovým povrchem desky
- Protein určený k adsorpci je rozpuštěn v alkalickém **kautovacím pufru** (pH 9,5) – naleptává plastový povrch a usnadňuje adsorpci Ag nebo Ab

○ 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 zachytná + detekční Ab

- Detekční (sekundární) protilátka proti hledanému Ag je konjugovaná s enzymem
- Proč jsou zachytné a detekční protilátky od jiného živočišného druhu?

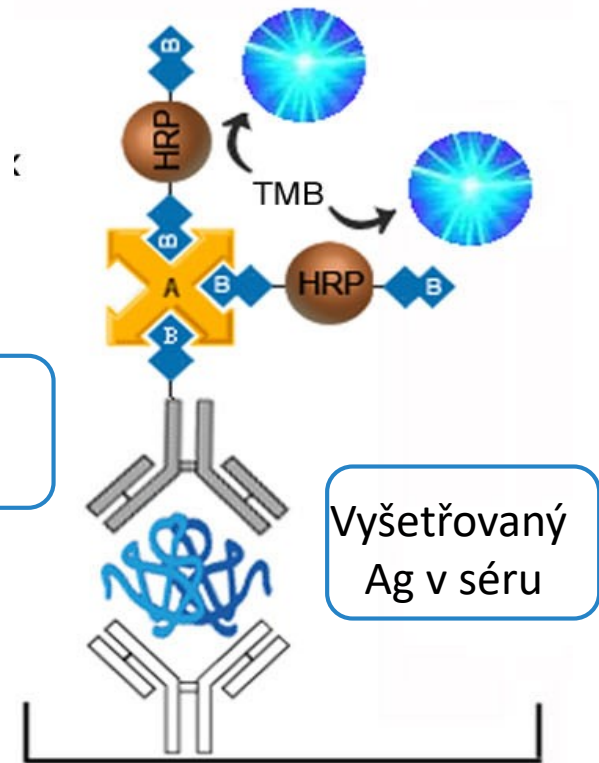
Tato kombinace významně snižuje riziko zkřížené reaktivity, která by mohla způsobit vznik nespecifických imunokomplexů (zdroj falešné positivity)!!!

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

Detekční protilátka
humánní, monoklonální

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

Zachytná protilátka
myší, polyklonální



Substráty

Nejčastěji používané enzymy detekčních, neboli 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

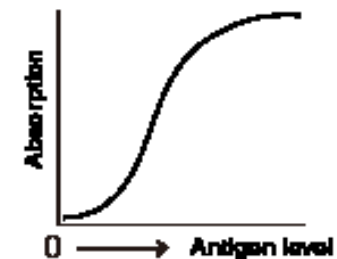
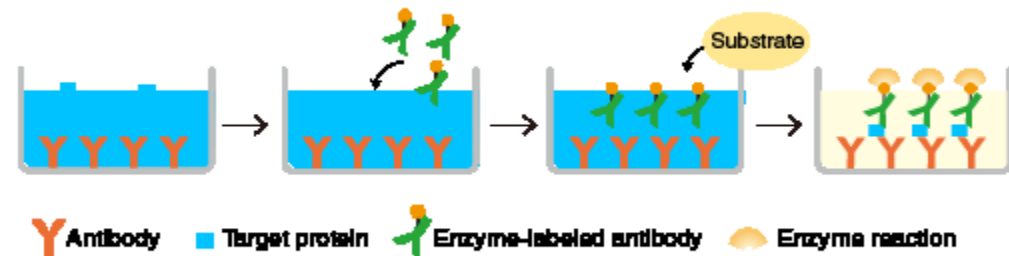
- 4-nitrofenylfosfát

Luminescenční Immunoassay

- Chemiluminescenční substráty – detekce záblesků luminiscence
 - SuperSignal
 - ECL

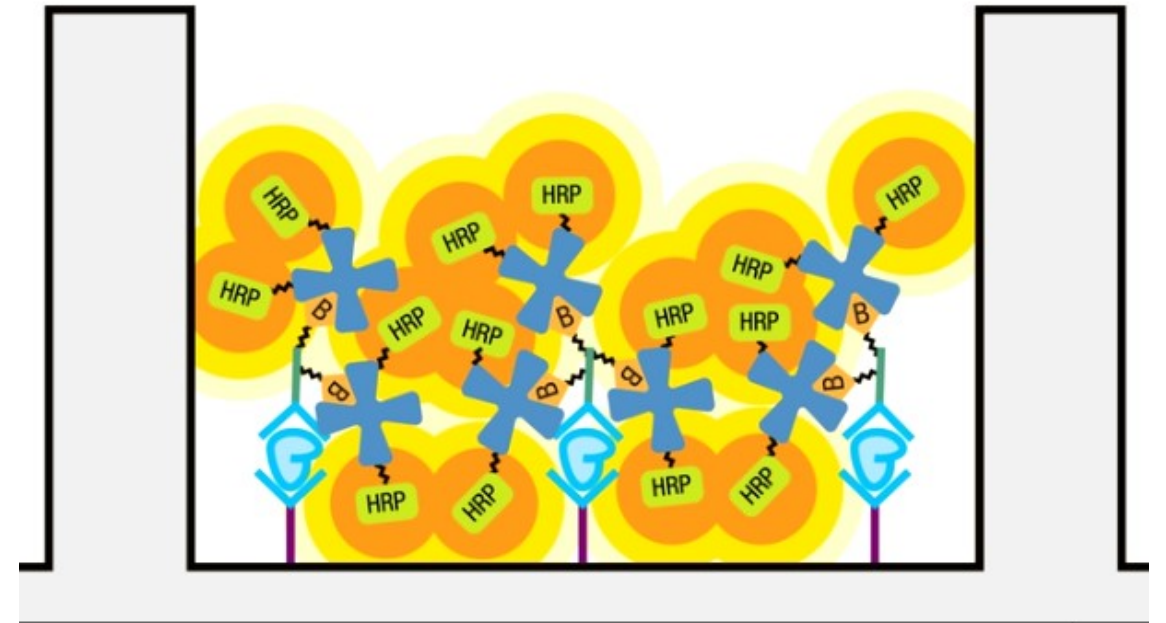
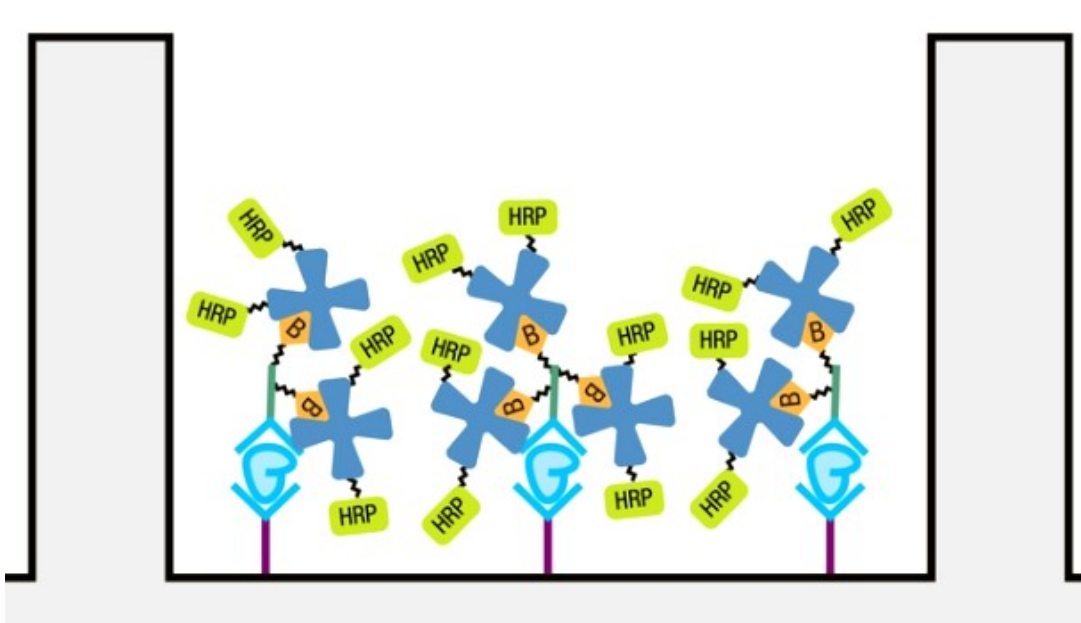
Sendvičová ELISA - uspořádání

- Použití dvou protilátek specifických pro odlišné epitopy jednoho antigenu.
- Jedna z protilátek je navázána na povrch jamky destičky a vycytává antigen ze vzorku.
- Druhá protilátka značená enzymem slouží k detekci tohoto antigenu.
- Měřený signál narůstá s koncentrací hledaného analytu
- Detekce analytů s vysokou Mr (proteiny – mají více epitopů ve své struktuře)
- Vysoká přesnost



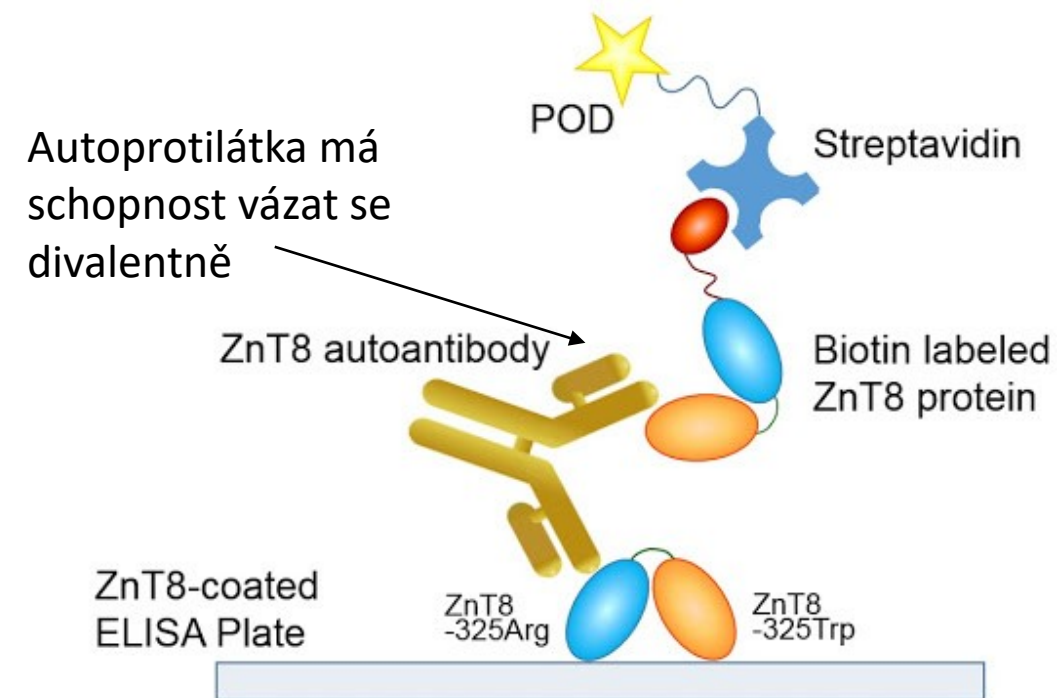
Sendvičová ELISA – vyšší senzitivita

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

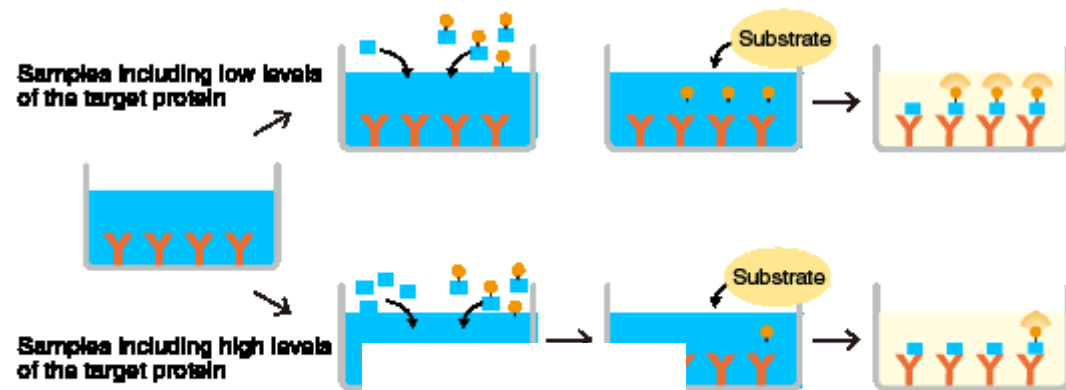


Sendvičová ELISA využívající divalentní vazby některých autoprotilátek

- **Stanovení některých autoprotilátek u diabetu mellitu I. typu**
 - Autoprotilátky proti dekarboxyláze kyseliny glutamové (anti-GAD)
 - Autoprotilátky proti zinkovému transportéru ZnT8 (anti-ZnT8)
- Destička pokryta Ag
- Vazba auto-Ab jedním Fab fragmentem na Ag
- Druhý Fab fragment váže biotinem značený antigen ze setu
- Přídavek streptavidinem značeného enzymu
- Přídavek substrátu → zbarvení

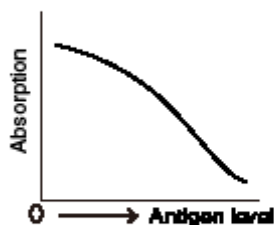


Kompetitivní ELISA - uspořádání



Y Antibody ■ Target pro

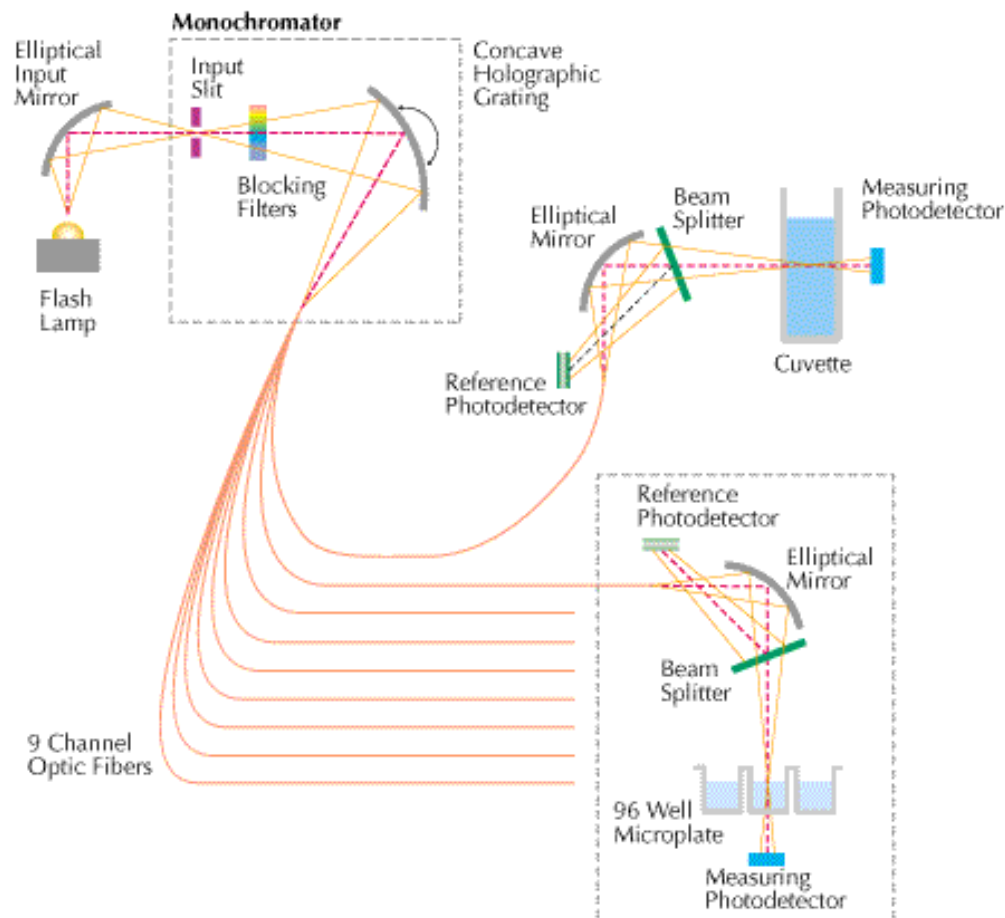
Igen Enzyme reaction



- 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 na protilátce.
- 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 – mají jen jeden epitop ve své struktuře – není možná vazba dvou odlišných protilátek.

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



Využití ELISA v imunologii

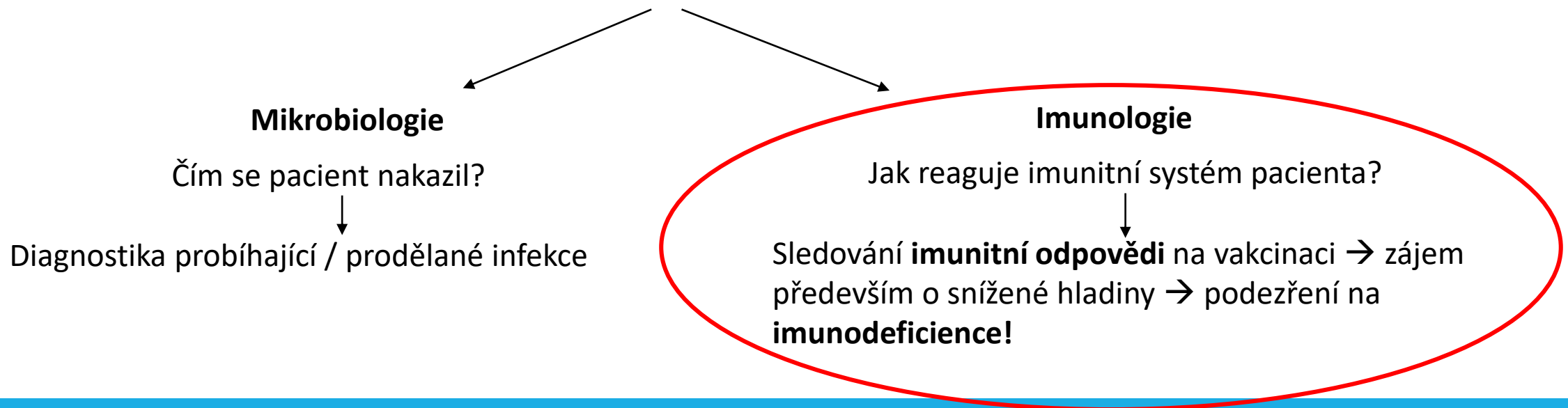
- **Antiinfekční imunita**
 - Stanovení protilátek proti vybraným infekčním agens
- **Autoimunitní onemocnění**
 - Stanovení autoprotilátek

ELISA a antiinfekční imunita

- Stanovení přítomnosti protilátek proti vybraným infekčním agens

- Protilátky proti tetanickému toxoidu
- Protilátky proti difterickému anatoxinu
- Protilátky proti kapsul. antigenu *Haemophilus influenzae typ b*
- Protilátky proti specifickému pneumokokovému kapsulárnímu polysacharidu (anti-PCP)

Očkování



ELISA stanovení autoprotilátek u autoimunitních onemocnění

- Anti-dsDNA - Systémový lupus erythematosus -SLE
- **ENA** – proti extrahovatelným nukleárním antigenům (SS-A, SS-B, Jo1)
- Proti bazální membráně glomerulů – autoimunitní glomerulonefritidy
- Proti cyklickým citrulinovaným peptidům – Revmatoidní artritida
- Proti tkáňové transglutamináze – celiakie
- Proti tyrosin fosfatáze, dekarboxyláze kys. Glutamové – Diabetes mellitus I.
- Anti-LC - proti antigenu jaterního cytosolu typu 1 (autoimunitní hepatitidy)
- Anti-TTG –proti tkáňové transglutamináza (celiakie)
- Anti-TG-tyreoglobulin, anti-TPO-tyreoidální peroxidáza (autoimunitní tyreoiditida)
- RF – proti Fc molekule IgG (revmatoidní artritida, Sjogrenův sy.)
- ASCA – proti *Sacharomyces cerevisiae* (Crohnova choroba) – pozor, **není** to auto-Ab!

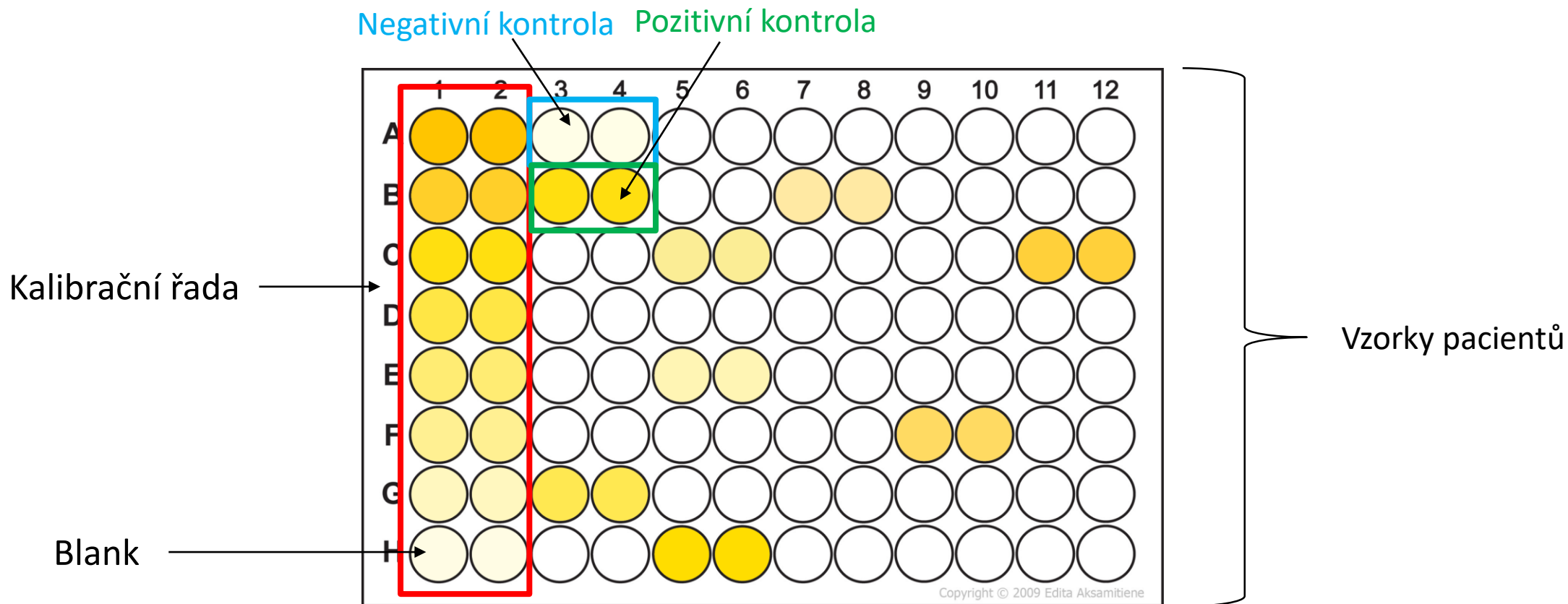
Hodnocení výsledků

- V klinické laboratoři existuje určitá hierarchie hodnocení výsledků
- Podílí se na něm laborant i VŠ pracovník
- **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



Hodnocení výsledků

2. fáze kontroly – VŠ pracovník

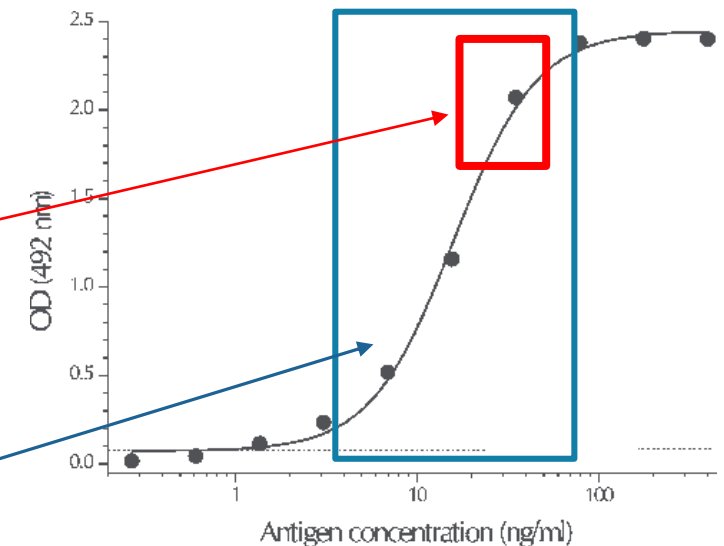
○ Vizuální kontrola desky

- Není zbarvení celé desky moc tmavé nebo světlé? – falešně zvýšené či snížené naměřené hodnoty vzhledem ke kalibrační křivce
- Není v některých jamkách sraženina / nečistota – falešně pozitivní výsledky?

○ Hodnocení s tištěnými výsledky – kontrola kalibrace:

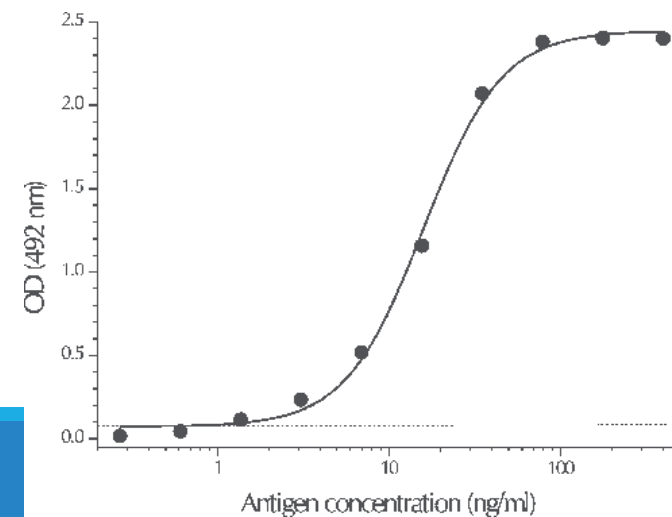
- Kontrola průběhu kalibrační křivky
- Kontrola jednotlivých bodů – není některý výrazně mimo?
- **Pozitivní kontrola – leží v rozmezí, které udává výrobce?**
- Pozitivní vzorek pacienta – souhlasí poloha na desce s papírovým výsledkem?

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



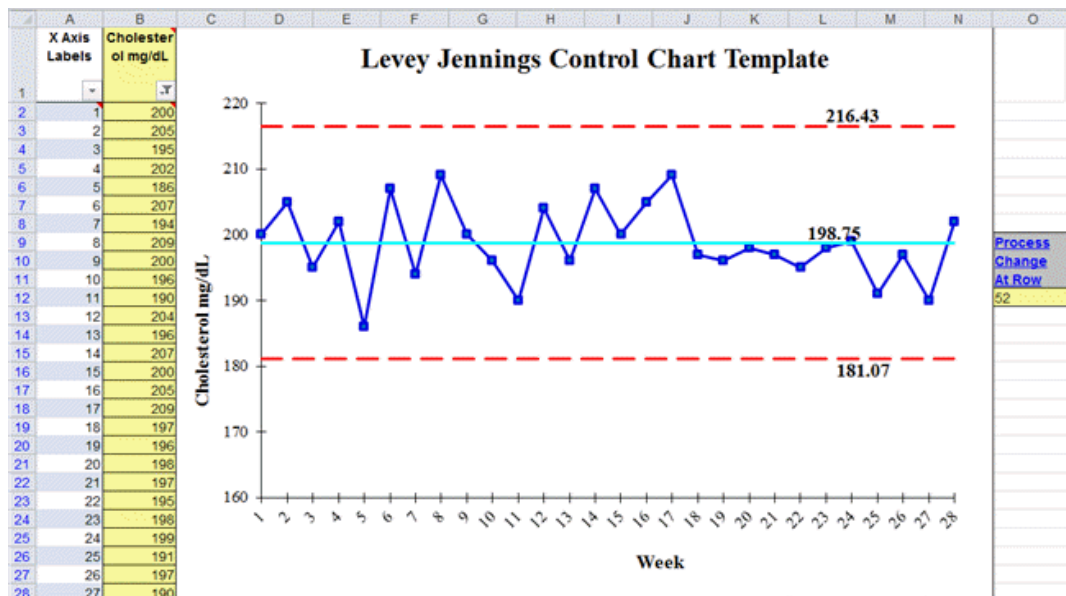
Hodnocení výsledků

- 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

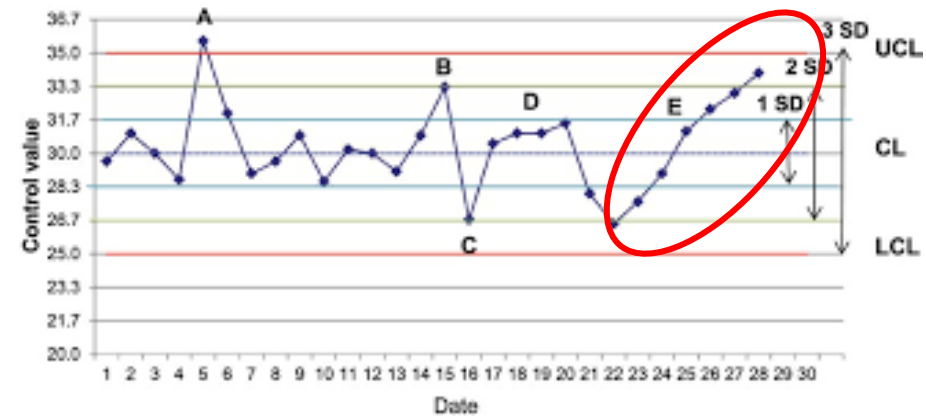


Hodnocení výsledků

- 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 vysvětlí význam – 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 nahlédnout 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

Hodnocení výsledků - příklady

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)

ELISA ACLA – kvantitativně - protilátky proti kardiolipidům při vyšetření **antifosfolipidového syndromu**

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
3A a zjištěná koncentrace ACLA
protilátek byla 6 APL/ml

Strana 1 z 2 20.03.2020 9:57:41

Ústav klinické imunologie a alergologie
Oddělení laboratorní imunologie

Pracovní list **I_ACLAA**

Datum provedení: 20.3.2020

Zpracoval: Jméno laborantky (razítko + podpis)

Vyhodnotil: Jméno hodnotícího VS

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

Sarže: Exp: 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	[] 0
4 PAC 4	[05.02.19] 0
5 PAC 5	[18.11.19] 3
6 PAC 6	[] 5
7 PAC 7	[30.09.19] 9
8 PAC 8	[28.01.20] 6
3/4 9 PAC 9	[13.02.17] 6
10 PAC 10	[] 0
11 PAC 11	[] 1
12 PAC 12	[] 3
13 PAC 13	[] 0
14 PAC 14	[] 0
15 PAC 15	[] 3
16 PAC 16	[] 0
4/4 17 PAC 17	[] 124
18 PAC 18	[] 6

Souřadnice kalibrátorů: 41-71 42-43
Souřadnice + kontroly: G1-44
Souřadnice - kontroly: 41-42

Souřadnice vzorků pacientů: 3/4

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

Souřadnice kalibrátorů

Souřadnice + kontroly

Souřadnice - kontroly

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 0] 3
B 2 PAC 2	[18.03.19 0] 3
C 3 PAC 3	[...] 0
D 4 PAC 4	[05.02.19 0] 0
E 5 PAC 5	[18.11.19 0] 3
F 6 PAC 6	[...] 5
G 7 PAC 7	[30.09.19 2] 9
H 8 PAC 8	[28.01.20 0] 6
3/A 9 PAC 9	[13.02.17 3] 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

Příklad ELISA ACLA– kvantitativně

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

Kde byl výsledek zpracován

Kdo hodnotil

Jednotky

Údaje o použitém ELISA kitu

Vyhodnocení koncentrací pro jednotlivé pacienty

Příklad ELISA ACLA - kvantitativně

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

20.3.2020

Page 1/4

User prompts

Název metody: ACLA IgA
Zpracoval(a): Jméno laborantky

Jméno hodnotičiho VŠ
Razítko + podpis

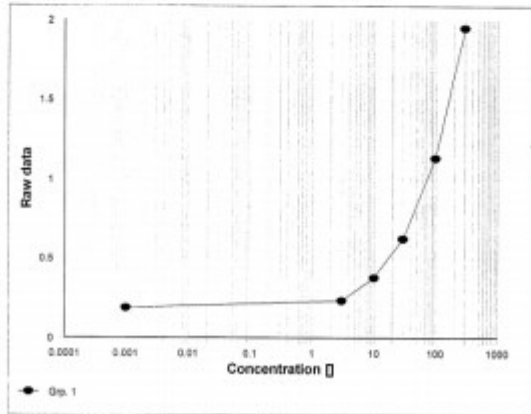
Raw data

Surová data - hodnoty absorbance

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.188	0.243	0.331	1.296	0.186	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
B	0.232	0.235	0.193	0.328	0.193	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
C	0.375	0.165	0.349	0.404	0.200	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
D	0.622	0.218	0.236	0.244	0.271	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
E	1.131	0.241	0.215	0.260	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
F	1.950	0.294	0.197	0.752	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
G	0.920	0.372	0.253	0.169	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
H	0.204	0.323	0.201	0.409	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

Graph: Standard Curve

Point to Point → Způsob vynesení kalibrační křivky



Magellan V 6.5

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

Hodnoty kalibrace

Sloupec 1
Hodnoty
absorbance

Sloupec 2
Hodnoty
koncentrací

Výsledky kontrol

Označení
jednotlivých
jamek

Workspace/Method/Sample ID list: 20200120-002.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	60.700
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

Magellan V 6.5

Příklad č. 2 LKM

autoprotilátky proti mikrozomům jater a ledvin

Semikvantitativní hodnocení – index positivity

Onemocnění – autoimunitní hepatitidy

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

Handwritten notes:
K
K
CO
Cal 10
Cal 30

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 absorbancí 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		Jednotky: IP Jednotky - zde Index Pozitivity (IP)
Sarže: 18500	Exp: 12/20	Sarže: _____
Datum dodávky: 12.11.19	Exp: _____	Datum dodávky: _____
Údaje o použitém ELISA kitu		
Pacient (Jméno, RC, laboratorní číslo)	Index pozitivity	
F 1 PAC 1	0,235	
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	0,212	
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	0,215	
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 positivity

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

- Kde byl výsledek zpracován
- Kdo hodnotil
- Uvedené jednotky
- Údaje o použitém ELISA kitu
- Souřadnice kontrol a cut-off kalibrátorů
- Vyhodnocení indexů positivity pro jednotlivé pacienty

System vyšetření autoprotilátek

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

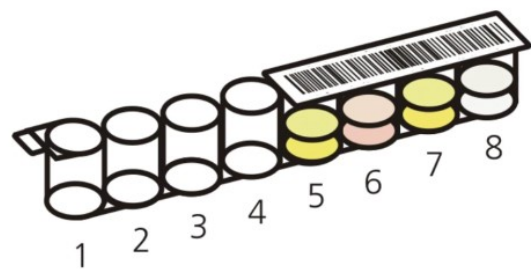
Další metody vyšetření autoprotilátek

1. Imunofluorescence – samostatná přednáška
2. **Přístrojová ELISA – analyzátor Alegria**
3. **Chemiluminiscence – analyzátor Isys**
4. **Imunoblot**



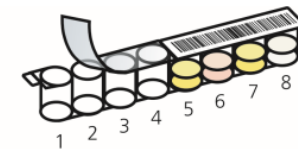
Analyzátor Alegria

Princip – ELISA na stripech – stanovení autoprotilátek

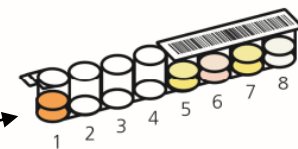


Stačí pouze odtrhnout alobal z prvních 4 jamek a do první z nich napipetovat pacientovo sérum (10ul) → analyzátor provede ELISU sám

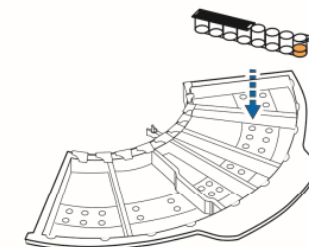
1



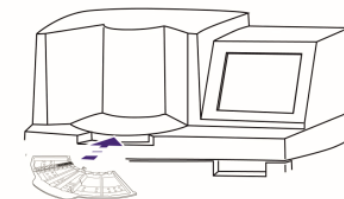
2



3



4



Jamka 1 a 2: prázdné, určené k ředění vzorku

Jamka 3 a 4: pokryté antigenem

Jamka 5: pozitivní kontrola (obsahuje hledanou autoprotilátku)

Jamka 6: křenovou peroxidázou označená anti-lidská IgM/G/A protilátka

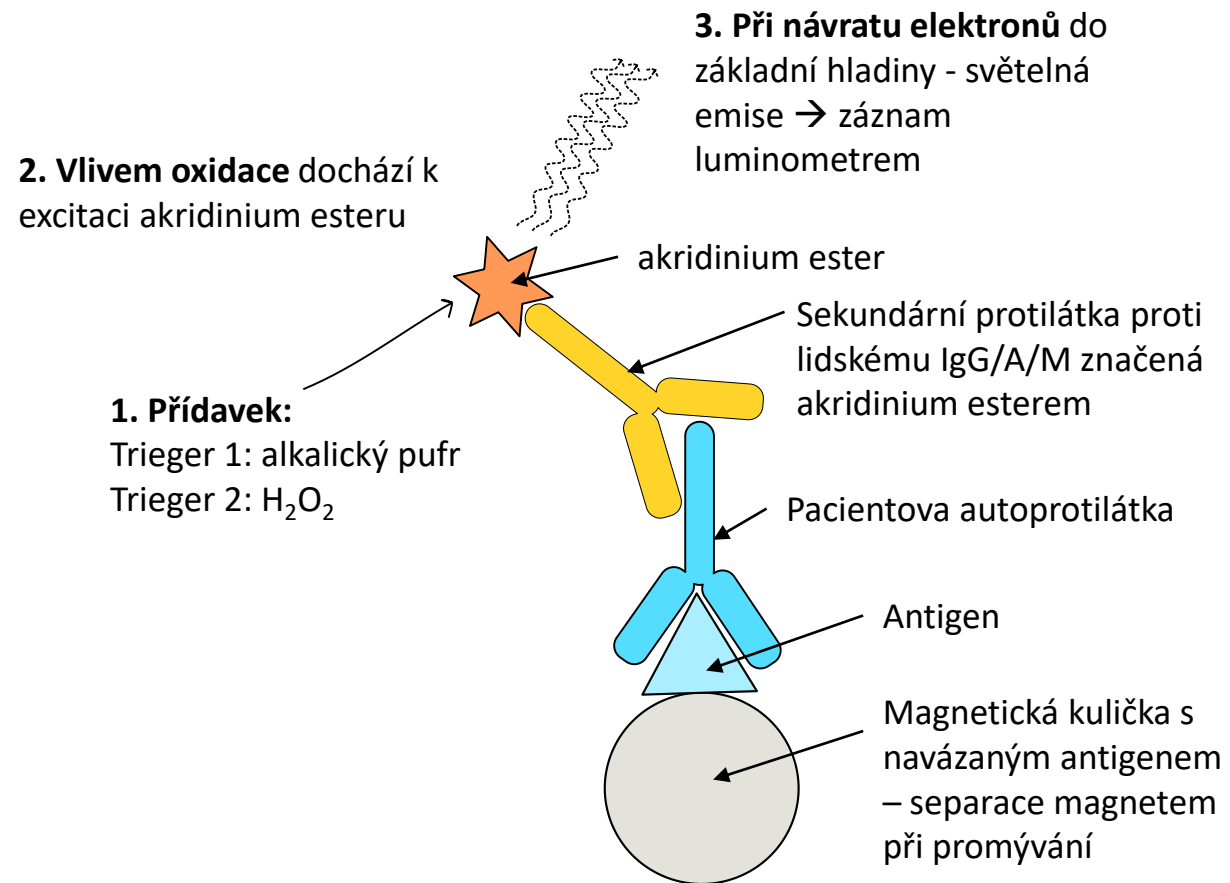
Jamka 7: ředící pufr

Jamka 8: TMB substrát (tetra-methylbenzidín)



Analyzátor Isys

- Princip – chemiluminiscence
- Pevná fáze – magnetické kuličky
- Měření světelné emise která vzniká chemickou reakcí
- Extrémní citlivost
- Signál úměrný koncentraci auto-Ab ve vzorku
- V naší laboratoři:
 - Stanovení ENA (screening + jednotlivé antigeny)



ENA

- Extrahovatelné nukleární (jaderné) antigeny
- Mají vyšší Mr – lze je extrahovat
 - 1) Screening – vytipují se ti pacienti, kteří jsou pozitivní na ENA (obecně)
 - 2) Nasazení pozitivních vzorků na podtypy ENA:
 - **Sci-70** (antigen je DNA topoizomeráza I) – systémová sklerodermie
 - **Smith (Sm)** – pozitivní anti-Sm u části pacientů se SLE (systémový lupus erythematoses)
 - **SSA/SSB** – Sjögrenův syndrom
 - **U1-snRNP** (ribonukleoprotein účastní se alternativního sestřihu mRNA) – smíšené onemocnění pojiva
 - **Jo-1** (antigenem je tRNA syntetáza) – polymyositida, dermatomyositida

Systémová sklerodermie

Vlivem autoimunitní zánětlivé reakce (Th2 + Th17) se nadměrně tvoří kolagen – sklerotizace pokožky i vnitřních orgánů



Sjögrenův syndrom

Vlivem autoimunitní zánětlivé reakce dochází k poškození slinných a slzných žláz → suchost očí, suchost v ústech



Smíšené onemocnění pojiva

Překryvný syndrom – SLE+RA+systémová sklerodermie+polymyositida

Na obrázku Raynaudův fenomén – záchvatovitá bledost prstů – porucha cirkulace

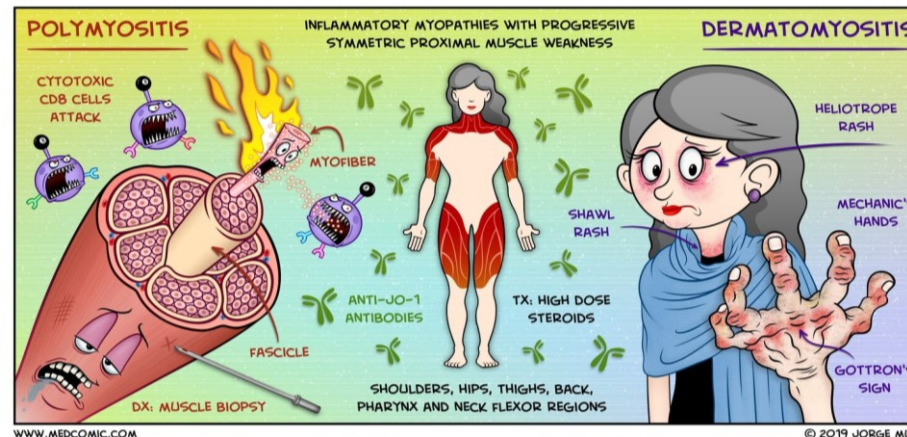


SLE

Alterovaná apoptóza – tvoří se autoprotilátky proti antigenům jádra → imunokomplexy → poškození tkání (na obrázku motýlí exantém v obličeji)



Polymyositida – poškození svalů CD8 T-lymfocyty - bolesti
Dermatomyositida – poškození svalových kapilár komplementem → mikroinfarkty svaloviny (klinika- exém nad klouby rukou a fialová vyrážka kolem očí)



Diagnostika autoimunitních onemocnění

Imunoblot

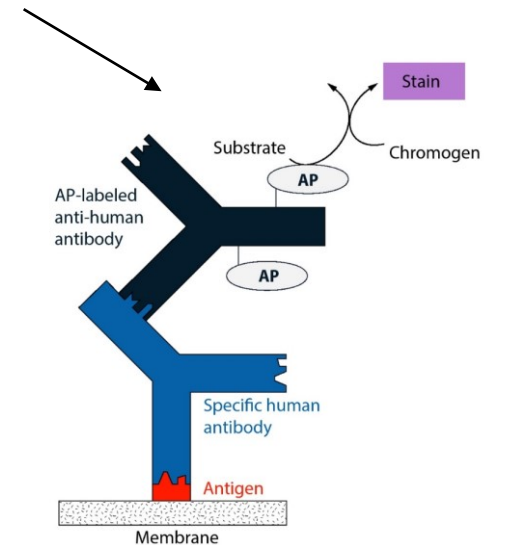
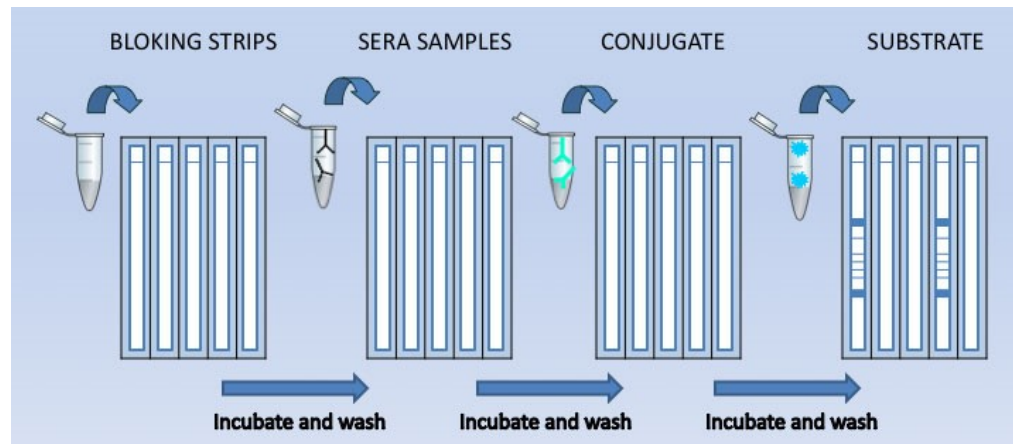
- Příprava blotů (probíhá u výrobce):
 - Proteiny (např. jaderné) elektroforeticky rozděleny v gelu – přenos (otisk) na nitrocelulózovou membránu - urychlení elektrickým proudem (elektroblotting)
 - Membrána je následně rozstříhána na jednotlivé diagnostické proužky
 - každý protein má na proužku definovanou polohu
 - Výrobce dodá i šablonu, kde jsou polohy jednotlivých proteinů zobrazeny
 - Výrobce tyto proužky společně se šablonou prodává laboratořím - kity



Imunoblot

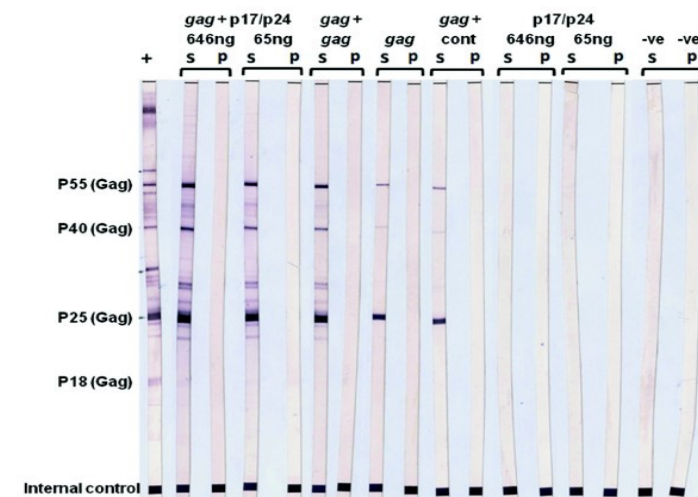
○ Princip stanovení:

- Nejprve se musí zablokovat strip inertní bílkovinou (hovězí albumin) – zabrání se nespecifické vazbě protilátek ze séra na strip!
- Pokud je autoprotilátka proti určitému proteinu přítomna v séru pacienta, naváže se na tento protein imobilizovaný na stripu, dochází k imunoprecipitaci
- Detekce vazby autoprotilátky pomocí detekčních sekundárních protilátek značených **enzymem**
- Po přidavku substrátu jej enzym přemění na **barevný produkt**
- Výsledkem je vznik barevného proužku na stripu = pozitivita



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 autoprotilátky při přetrvávajících klinických příznacích
- Diagnostika – například **roztroušená skleróza**



Problémy při stanovení autoprotilátek

- Při použití různých metodik stanovení mohou být někteří pacienti negativní i když onemocněním trpí, např.
 - Pacient je na určitou autoprotilátku negativní na imunofluorescenci, na ELISE, ale pozitivní na imunoblotu
 - Nebo
 - Pacient je pozitivní jen na imunofluorescenci ale negativní na ELISE i imunoblotu
- PROČ?
- Různé metody mají **různě ovlivněn cílový antigen** (vliv zpracování), na který se autoprotilátka má vázat, např:
 - Imunofluorescence – použití krysích tkání – antigen se nemusí plně shodovat s lidským – protilátka se nemusí vždy navázat
 - ELISA – vlivem zpracování antigenů na desku může být ovlivněna struktura antigenu
 - Imunoblot – vlivem elektroforézy a elektroblotu může dojít k pozměnění konformace molekuly antigenu která vyústí v neschopnost vazby autoprotilátky
 - Nutnost brát ohled na kliniku pacienta, pokud má typickou symptomatologii ale na určité metodice vyjde negativní, je třeba otestovat autoprotilátky jinou metodikou!!
 - Nikdy nelze vyvozovat závěry o autoimunitním onemocnění jen z laboratorních výsledků bez informací o klinických projevech u pacienta!