

**IMUNOESEJE**

# IMUNOESEJE

- tyto metody využívají vazebné reakce mezi protilátkou a ligandem (antigenem), informace o vazbě je zprostředkována pomocí značek
- množství značené komponenty v imunokomplexu je závislé na koncentracích výchozích neznačených komponent.

# IMUNOESEJE



- Přímé

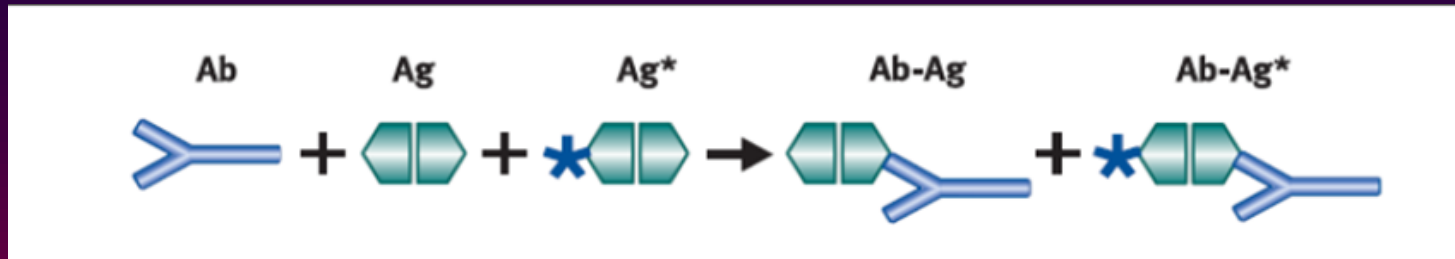
- kvalitativní metodika k průkazu antigenu
- **Ag – Ab\***

- Nepřímé

- průkaz protilátek v séru
- **Ag – Ab – Ab\***

## • Kompetitivní

- limitované množství reaktantu (protilátka), aby mohlo docházet ke kompetici
- značený i neznačený ligand soutěží o vazebná místa protilátky
- neznačený antigen blokuje vazbu značeného antigenu, množství vzniklého produktu je nepřímo úm. konc. neznačeného ligandu v testovaném vzorku
- čím víc se naváže značeného ligandu, tím méně neznačeného



[http://imunologie.lf2.cuni.cz/soubory\\_vyuka/imunoreakce.pdf](http://imunologie.lf2.cuni.cz/soubory_vyuka/imunoreakce.pdf)

## • Nekompetitivní (sendvičová)

- protilátka je v nadbytku, všechn analyt je vyvázán
- analyt je vázán mezi dvěma specifickými protilátkami
- množství vzniklého produktu je přímo úm. konc. neznačeného ligandu v testovaném vzorku

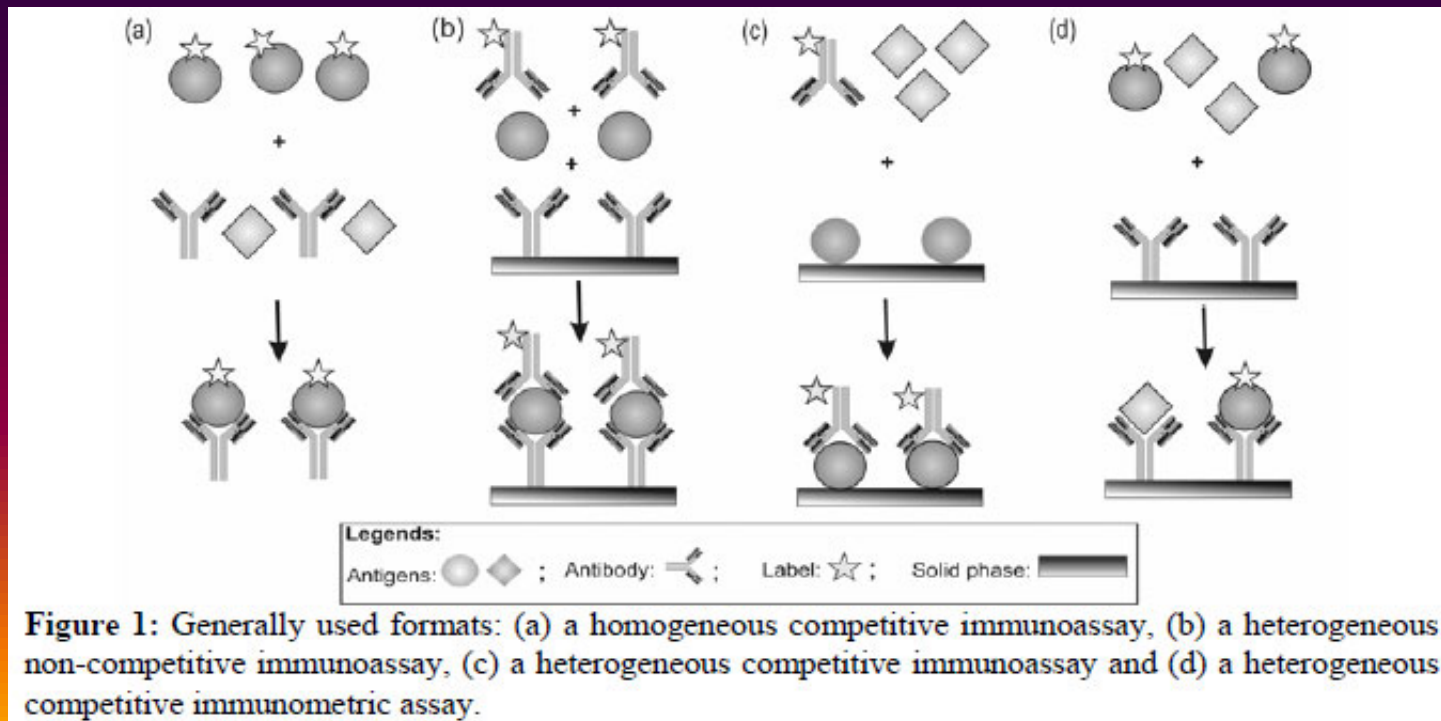
- Homogenní

- není potřeba oddělovat Ab-Ag od volného Ag\*

- Heterogenní

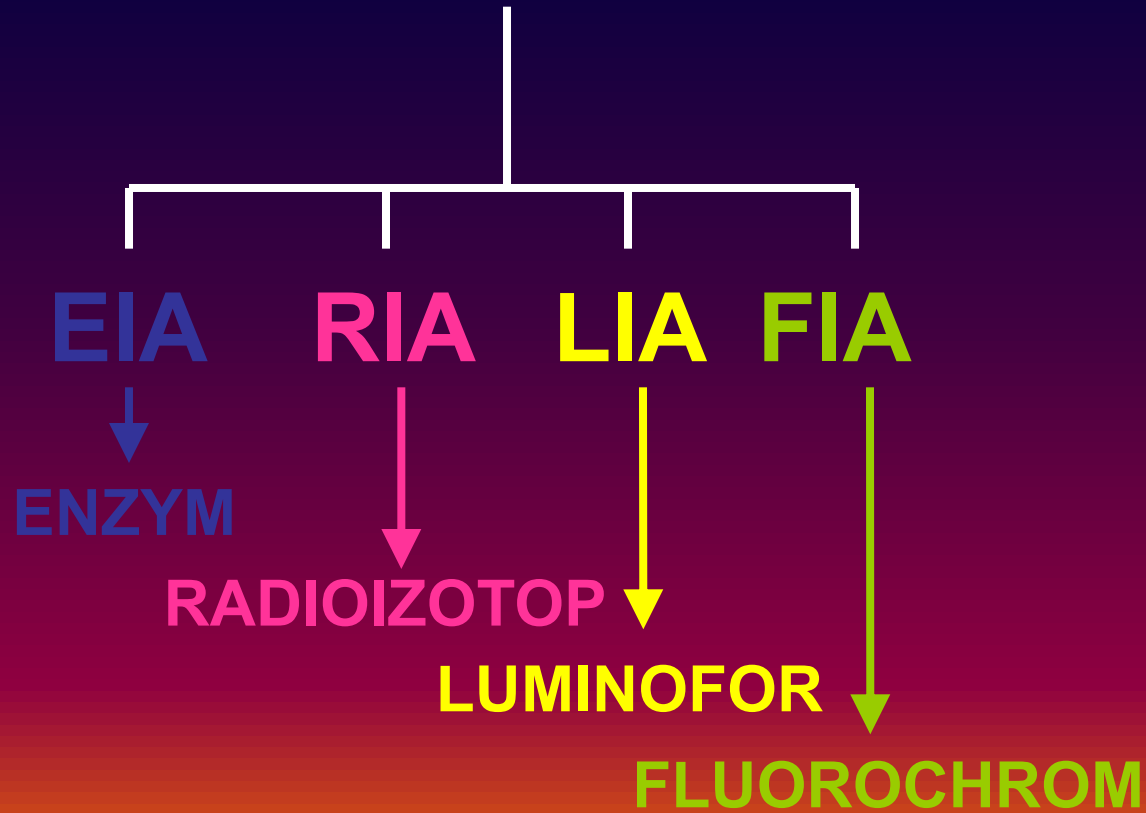
- jedna z komponent je navázána na pevnou fázi

- nutnost separace navázaných složek reakce od volných složek reakce (detekční protilátka, konjugát)



vizualizace sekundární fáze interakce AgxAb navázanou značkou:

# IMUNOESEJE



# RIA

- kompetitivní heterogenní metoda
- oddělení nukleární medicíny
- detekce reakce Ag-Ab pomocí radioaktivního izotopu jako značky navázané na jednu ze složek reakce , nejčastěji  $^{125}\text{I}$
- měří se intenzita radioaktivního zářiče – není třeba přidávat substrát
- vyšetřování hladin různých hormonů a jejich metabolitů, vitamínů a jejich metabolitů, specifického IgE, některých autoprotilátek – např. vyšetření Ab proti acetylcholinovému rec. při myastenia gravis

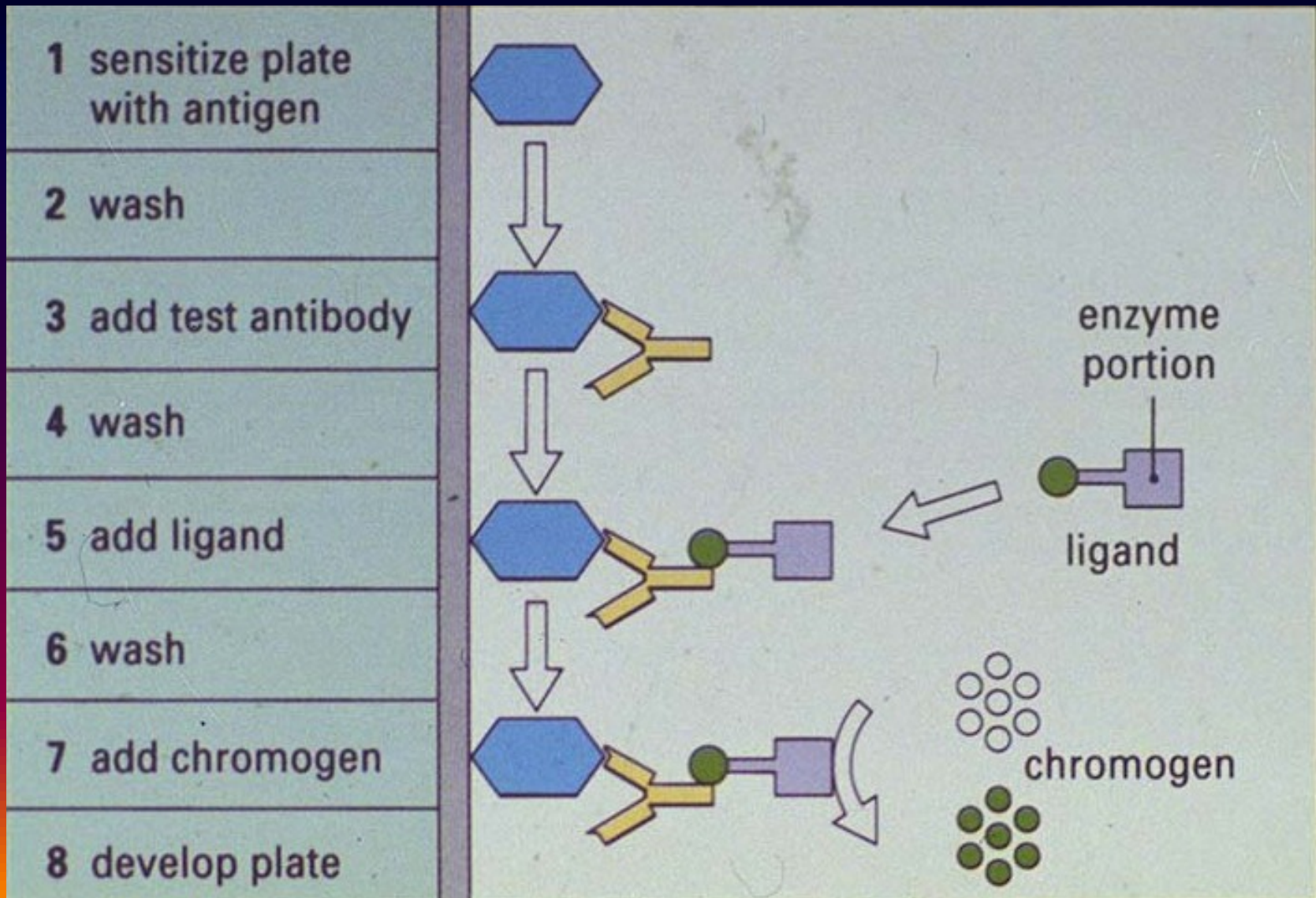


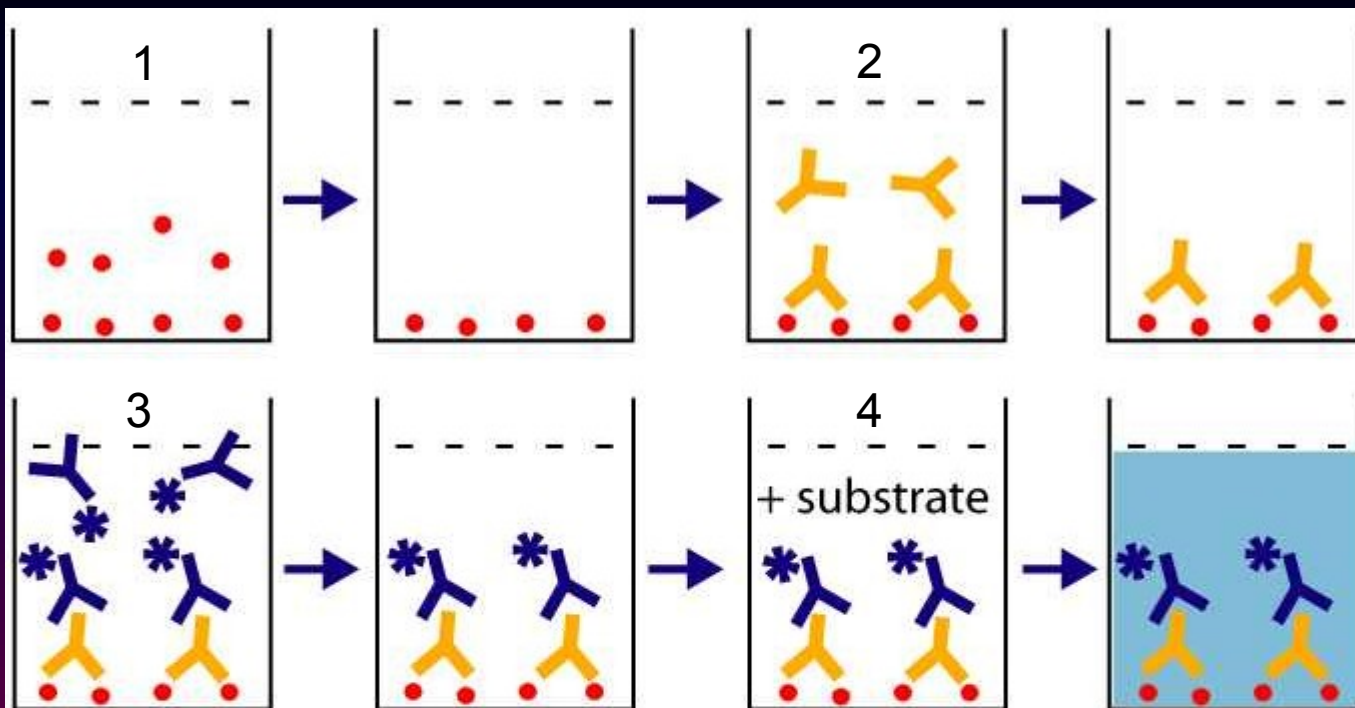
- **FIA** – jako značka se používá molekula fluorochromu, detekce signálu se provádí fluorimetricky
- **LIA** – značka – luminofory (při oxidaci vyzařují světlo), detekce na luminometru  
př. bioluminiscence - oxidace luciferinu (enzym luciferáza) –  
světélkování světlušek

# EIA

- kovalentní vazba enzymu na některý z reaktantů
- heterogenní uspořádání – skupina metod **ELISA**  
(**Enzyme-**Linked **Immuno**Sorbent **Assay****)******

# ELISA-schéma





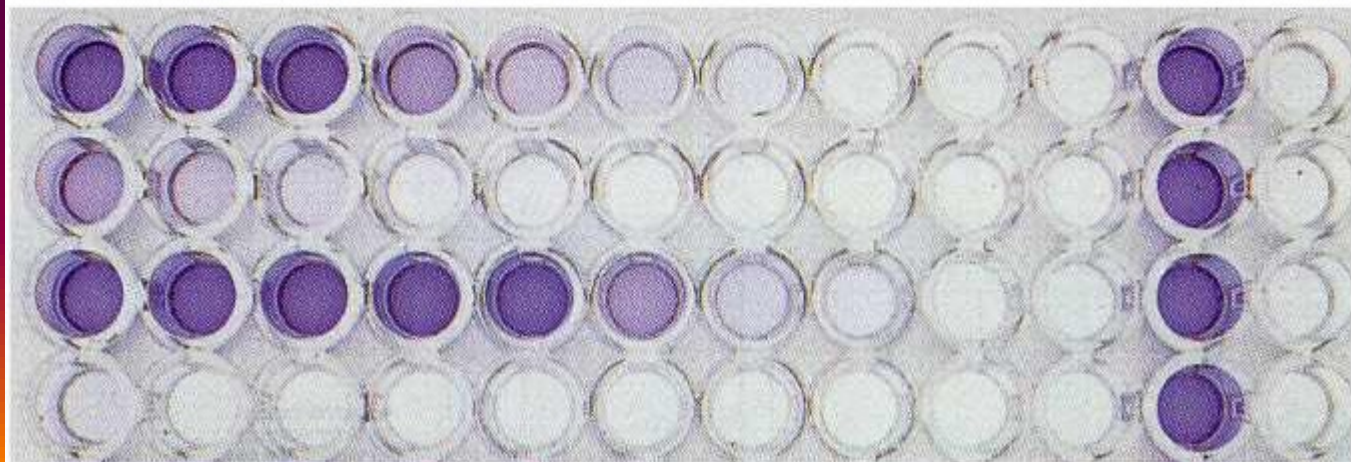
1. Potažení jamek antigenem

2. Přidání vzorku séra

3. Přidání enzymem značené protilátky (anti-human IgG)

4. Přidání substrátu

5. Odečtení barevné reakce



# EIA-ELISA I

- 1 reaktant imobilizován na povrch destičky
- detekovaný antigen musí mít 2 různé epitopy
- výsledkem je přeměna bezbarvého substrátu na barevný rozpustný produkt – tato přeměna pomocí enzymu na Ab
- čím ↑ intenzita zbarvení, tím ↑ koncentrace zjišťovaného Ag ve vzorku
- zbarvení se zjišťuje spektrofotometricky

# EIA-ELISA II

- nejen kvalitativní, ale i kvantitativní metoda
- lze stanovovat Ab i Ag (pozor na pojmy!!)
- k průkazu látek s nízkou koncentrací ve vyšetřovaných vzorcích v mikrobiologické serologii a imunologii:

## specifických Ab

- Antivirových
- Antibakteriálních
- Autoprotilátek

## nebo Ag



# ELISA-1. “kautování“



prázdná jamka

polystyrén



Ag

Ab



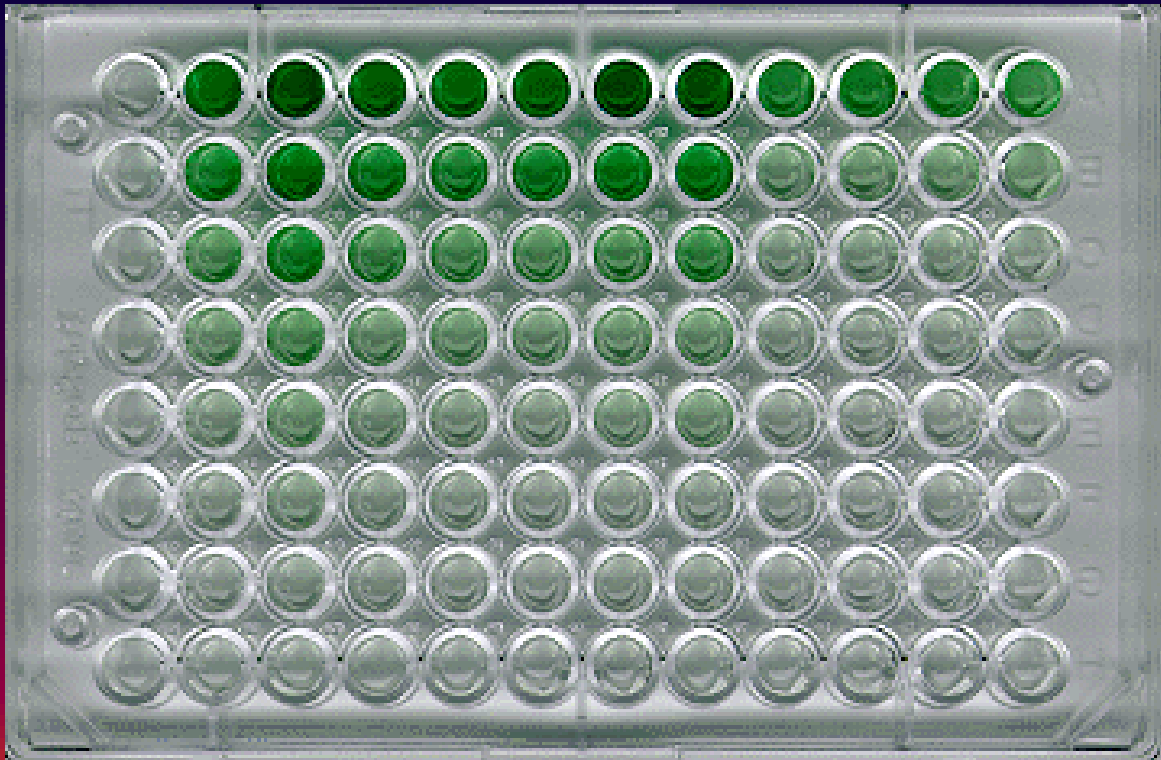
...následuje 2.blokování, 3. nanesení vzorků, atd...

**4. Ab s enzymem – křenová peroxidáza,  
alkalická fosfatáza,  
beta galaktozidáza,...**

**5. substrát – např. tetrametylbenzidin**



## 6. barevný výsledek



7. hodnocení... kalibrace, cut-off limity

# ELISA reader

