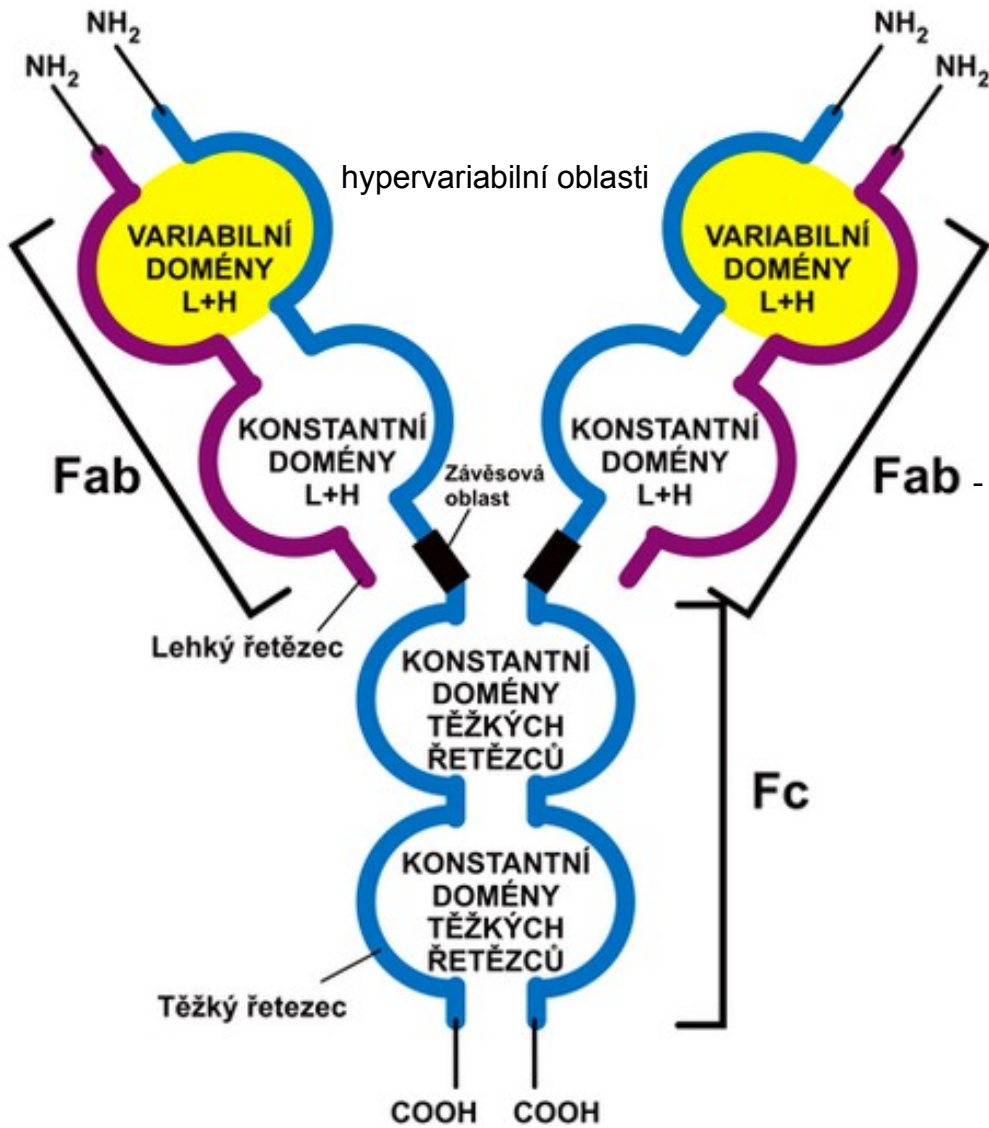


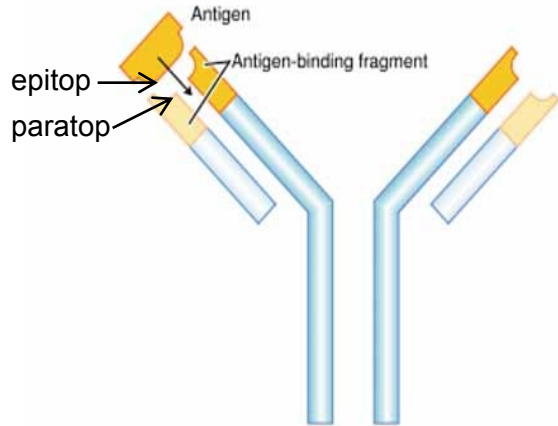
Precipitace, radioimunodifúze (RID), nefelometrie, turbidimetrie

Mgr. Jana Nechvátalová
Ústav klinické imunologie a alergologie
FN u sv. Anny

Ag - Ab



Fab - antigen vazebná aktivita



Antibody

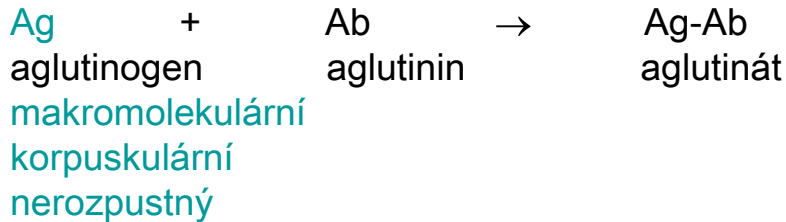
STRUKTURA MONOMERU IMUNOGLOBULINU

afinita \neq avidita

- afinita - síla interakce mezi jedním paratopem a jedním epitopem
- avidita - závislá na afinitě
 - vazebná energie mezi komplexním antigenem a protilátkou
 - bere v úvahu valenci Ag a Ab

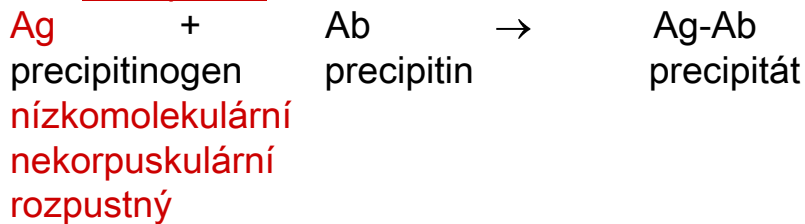
Aglutinace x precipitace

- Aglutinace



Protilátky namířené proti epitopům antigeních částic vytváří mezi korpuskulami můstky, které vedou ke vzniku shluků – aglutinátů.
jako Ag slouží např. těla bakterií

- Precipitace



Reakce mezi solubilním antigenem a protilátkou s následným vznikem precipitátu (hydrofobní vazby – nerozpustný komplex).

Aglutinace

Přímá

Ag jsou přirozeně součástí povrch. struktur reagujících částic

Př. hemaglutinace

Hemagglutination

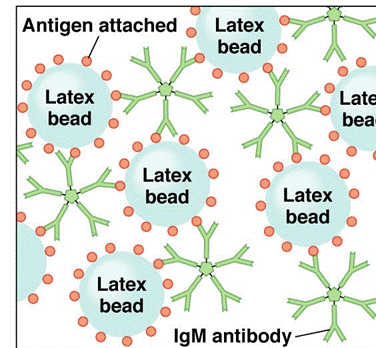
serum from individuals of type	red blood cells from individuals of type			
	AB	O	B	A
A Anti B antibodies	agglutination	no agglutination	agglutination	no agglutination
B Anti A antibodies	agglutination	no agglutination	no agglutination	agglutination
O Anti A + B antibodies	agglutination	no agglutination	agglutination	agglutination
AB no antibodies to A or B	no agglutination	no agglutination	no agglutination	no agglutination

Nepřímá

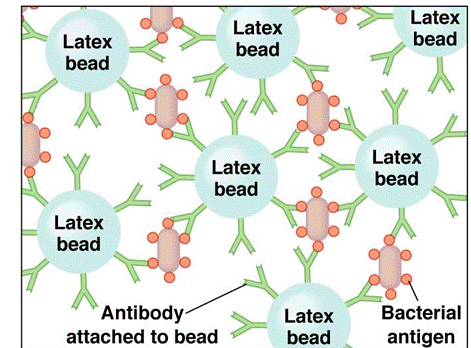
Ag navazujeme na povrch částice uměle

Př. latex-fixační test – Ag nebo Ab navázaný na latex. částici, pokud dojde k aglutinaci, dokazujeme přítomnost Ab nebo Ag

Revmatoidní faktor (Rf) je protilátka proti lidskému gamaglobulinu běžně vyskytující se v séru ve vysokých koncentracích za určitých podmínek, zejména u pacientů trpících revmatoidní artritidou
 Latexové částice potažené lidským gamaglobulinem. Při zvýšené konc. Rf dojde k aglutinaci (pozitivní výsledek)



(a) Reaction in a positive indirect test for antibodies. When particles are coated with antigens, agglutination indicates the presence of antibodies, such as the IgM shown here.



(b) Reaction in a positive indirect test for antigens. When particles are coated with monoclonal antibodies, agglutination indicates the presence of antigens.

Copyright © 2007 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Coombsův test

(antiglobulinový test, AGT)

- umožňuje detekci červených krvinek, pokrytých imunoglobuliny (antierytrocytární protilátky) nebo složkami komplementu

přímý

umožňuje detekci červených krvinek senzibilizovaných imunoglobuliny a složkami komplementu „in vivo“

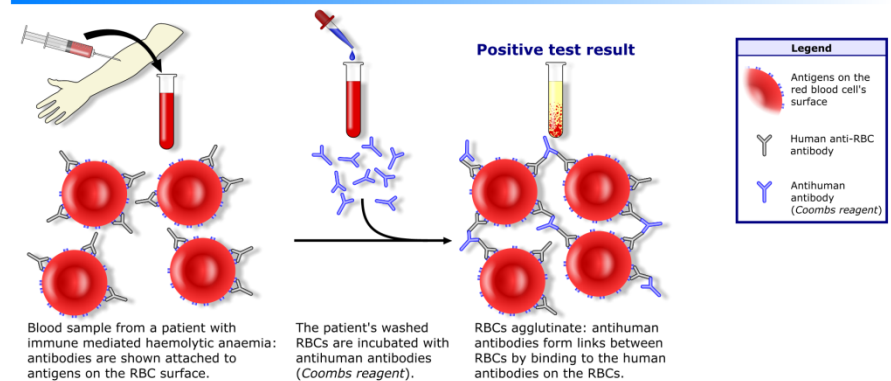
přímý Coombsův test se užívá k detekci protilátek či proteinů komplementu, které jsou navázány na povrch červených krvinek. Odebraný vzorek krve je zpracován tak, že přítomné červené krvinky jsou promyty (čímž se odstraní pacientova plazma) a následně se inkubují s protilátkami proti lidským imunoglobulinům (Coombsovo reagens). Pokud dojde k viditelné aglutinaci červených krvinek, přímý Coombsův test je považován za pozitivní, což je důkazem, že protilátky či proteiny komplementu jsou navázány na povrch erytrocytů.

nepřímý

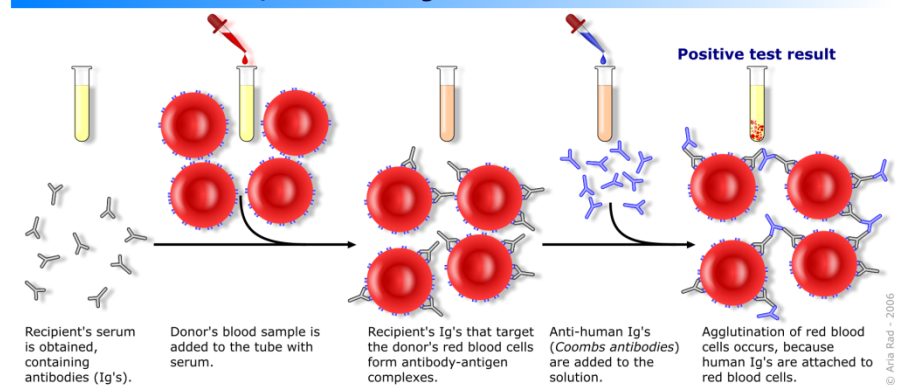
umožňuje detekci antierytrocytárních protilátek přítomných v pacientově séru či plazmě z důvodu „in vitro“ senzibilizace červených krvinek

nepřímý Coombsův test je užíván k prenatálnímu testování těhotných žen a k testování krve před krevní transfúzí. Slouží k detekci protilátek proti červeným krvinkám, které jsou přítomny volně nenavázané v séru pacienta. V tomto případě je sérum extrahováno z krve a následně inkubováno s erytrocyty se známou antigenicitou a s protilátkami proti lidským imunoglobulinům. Pokud dojde k aglutinaci, je nepřímý Coombsův test pozitivní.

Direct Coombs test / Direct antiglobulin test



Indirect Coombs test / Indirect antiglobulin test



Precipitace

v tekutém prostředí

- využívá se efekt, že při reakci Ag-Ab vzniká zákal – precipitát, jehož intenzita je při konstantním množství přidané protilátky úměrná přidané koncentraci vyšetřovaného antigenu
- měření intenzity zákalu – nefelometrie, turbidimetrie
- obě metodiky umožňují kvantitativní stanovení obsahu proteinů ve vzorku odečtem z kalibrační křivky

Nefelometrie a turbidimetrie

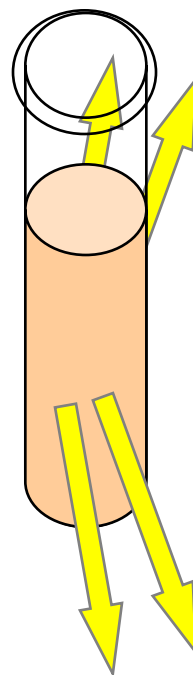
- reakce založené na měření množství imunitních komplexů vytvořených interakcí specifických protilátek s antigenem
- koncentrace příslušného Ag je úměrná rychlosti tvorby zákalu nebo hustotě zákalu
- stanovení sérových bílkovin
- měření probíhá v tekutém prostředí v měřicí kyvetě (pufr, látka urychlující reakci, Ag, Ab)
- množství vytvořených komplexů je p.ú.konc. Ag

Precipitace v tekutém prostředí:

Nefelometrie

-hodí se pro nižší koncentrace

viditelné světlo 




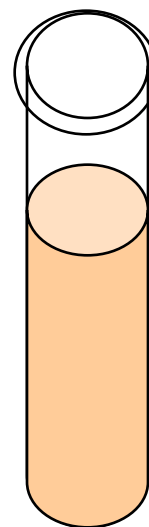
detektor je ve směru kolmém na vstupující paprsek

měří množství světla rozptýleného při průchodu paprsku (množství světla odraženého od vznikajících komplexů)

Turbidimetrie

- hodí se pro koncentrovanější roztoky

viditelné světlo 



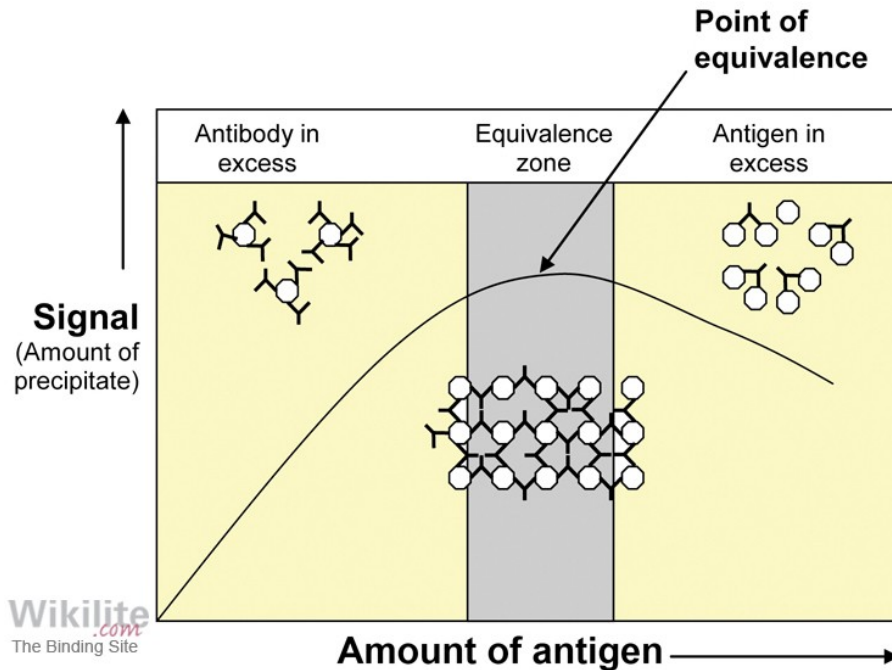
detektor je v ose paprsku

měří množství procházejícího světla (úbytek intenzity světla, které prošlo roztokem v kvetě)

nefelometrie je 5-10x citlivější a nákladnější než turbidimetrie

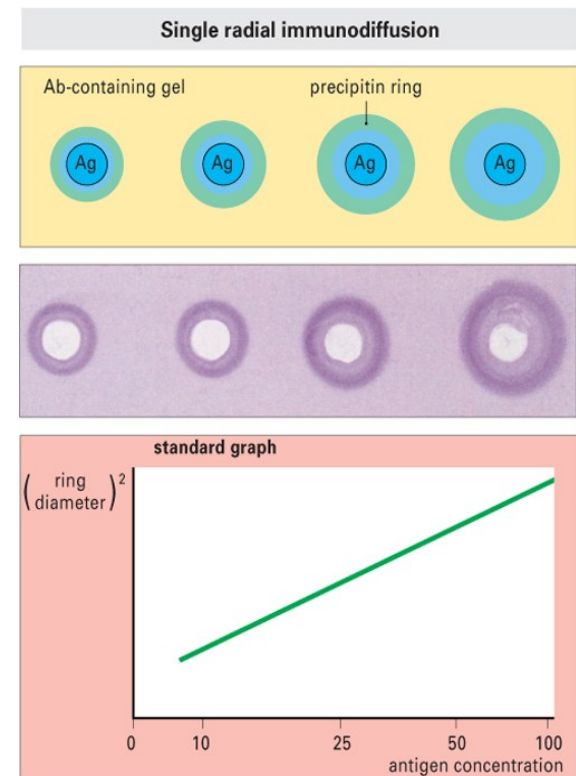
Precipitace v gelu

- agaróza, agar
 - umožňují detekci precipitačních linií
 - je založena na **pasivní difuzi látek v prostředí koncentračního gradientu**
- Ag i Ab difundují v prostředí gelu a v místě, kde konc. Ag i Ab dosáhnou optimálního (ekvimolárního) poměru vzniká precipitát

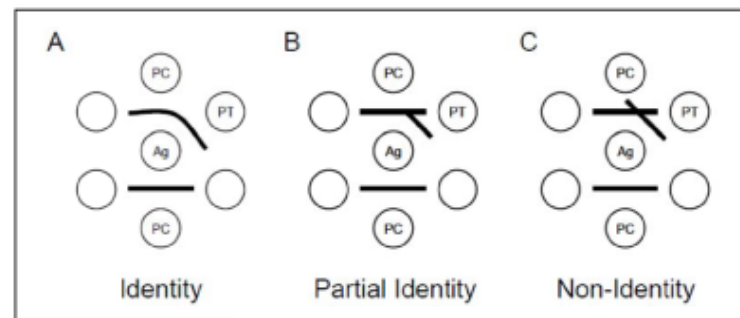
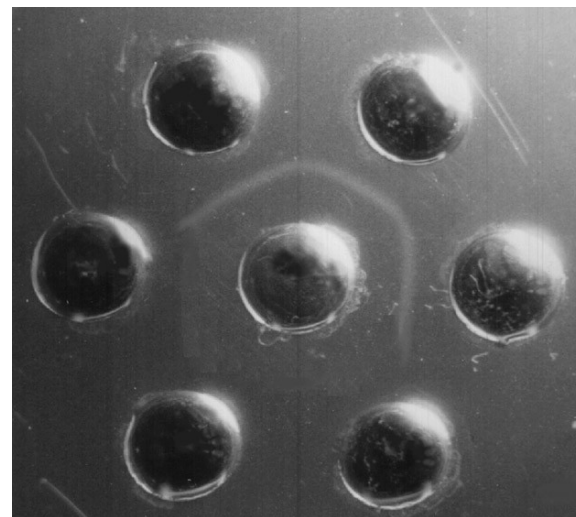


Podle počtu difundujících reaktantů:

- jednoduchá radiální imunodifúze
 - koncentrační gradient jednoho z reaktantů (většinou Ag)
 - druhý reaktant (většinou Ab) - rovnoměrně rozptýlen ve struktuře gelu
 - výsledkem jsou ostře ohraničené kroužky precipitátu
 - plocha prstence - p.ú. konc. vyšetřovaného Ag
 - podle konc. standardu – kalibr. křivka

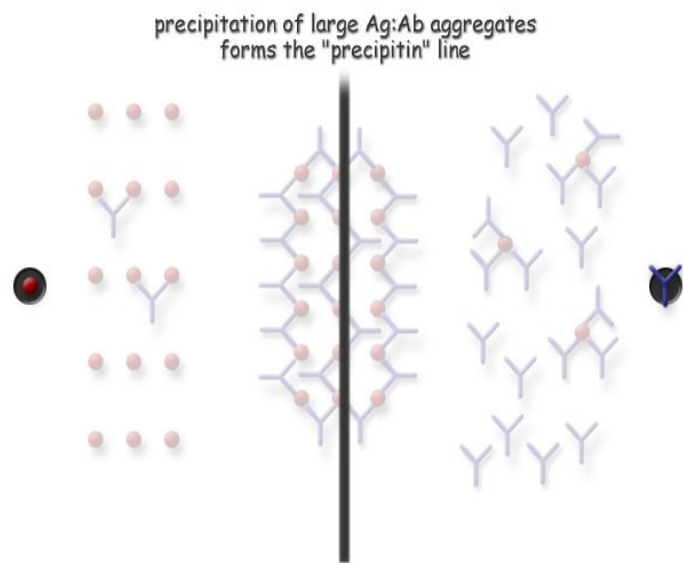
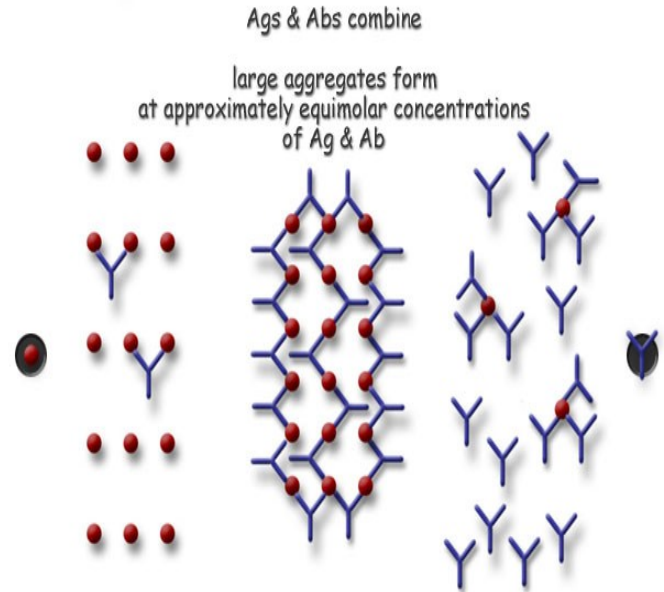
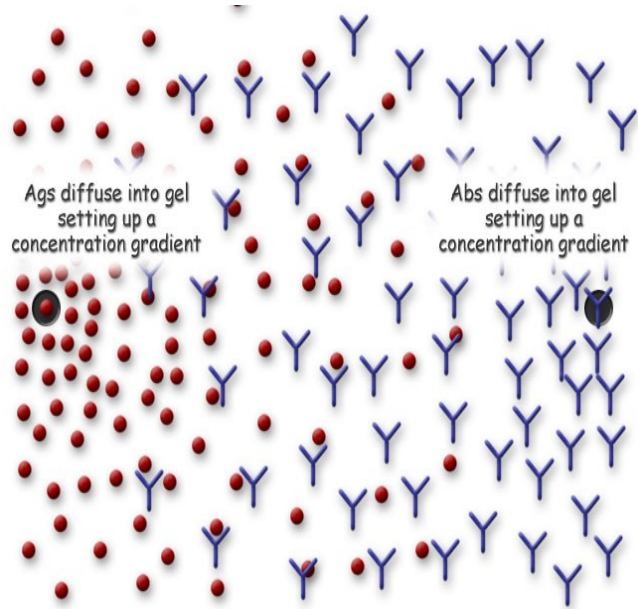


- dvojitá radiální imunodifúze (podle Ouchterlonyho)
- testování více materiálů
- gradient vytváří jak Ag, tak Ab a dochází k protisměrné difúzi obou reaktantů (radiálně)
- v zóně ekvivalence – precipitační linie, která ukazuje na pozitivitu reakce
- hodnocení - kvalitativní



PC = Positive Control
 Ag = Antigen
 PT = Patient Serum

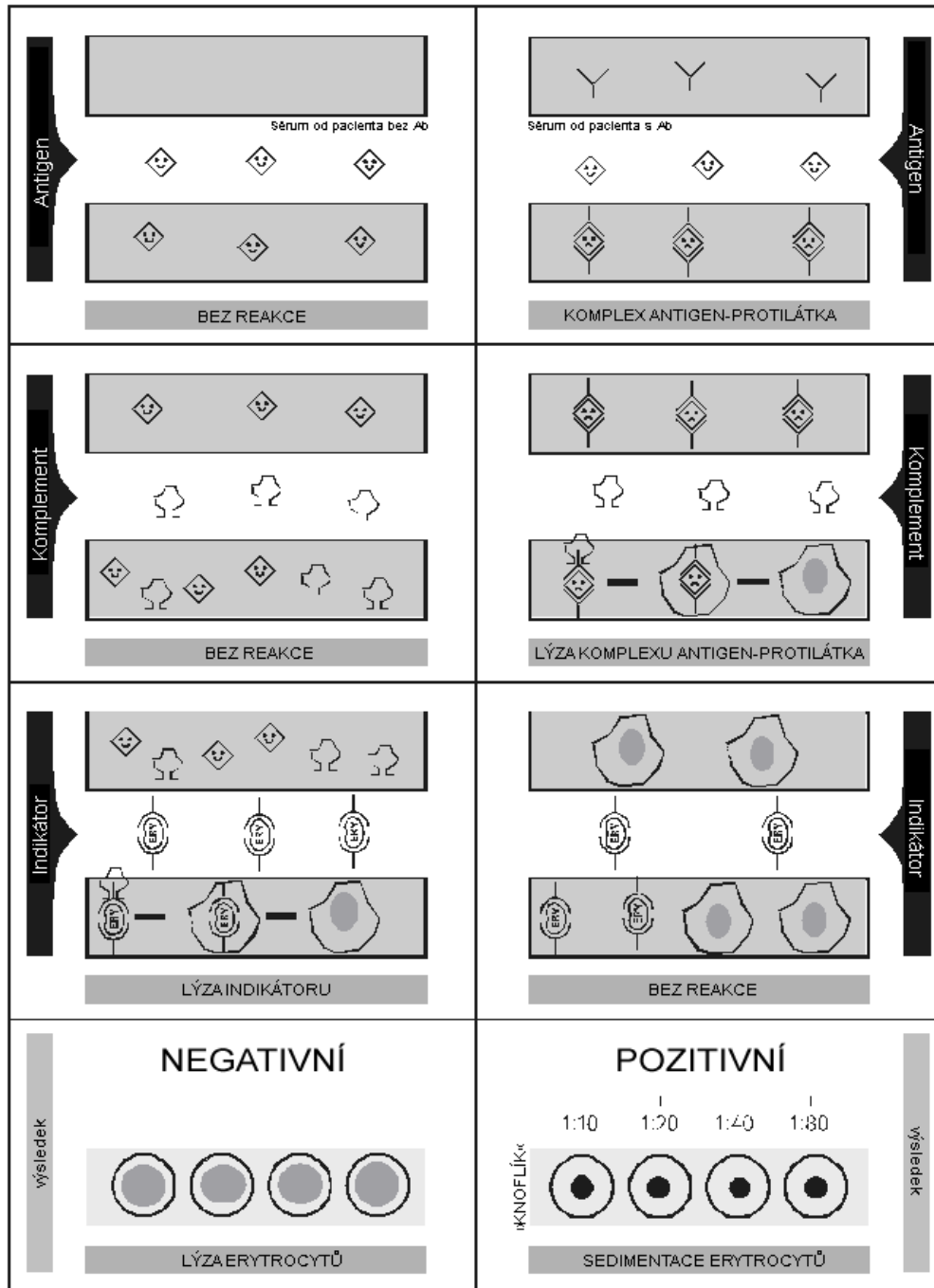
<http://www.immy.com/products/immunodiffusion/>



Kalibrační křivka –
charakterizuje vztah mezi
koncentrací vyšetřované látky
a např. průměrem kruhů na
příslušné vyšetřovací desce

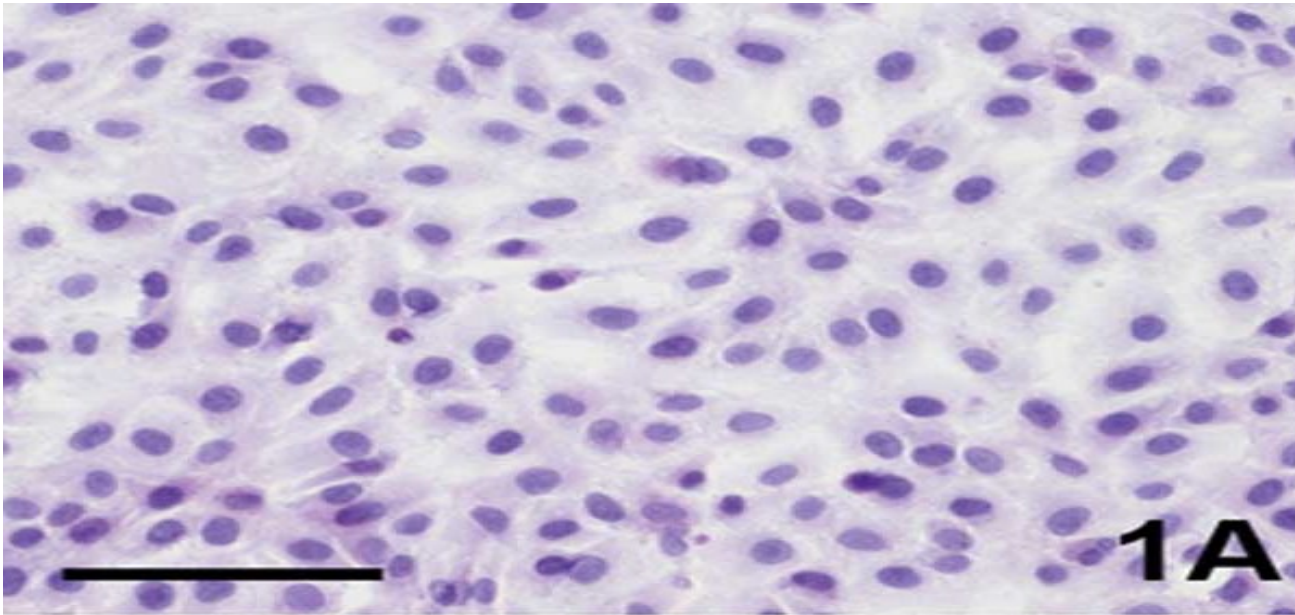
Komplementfixační reakce (KFR)

- imunologická metoda patřící mezi základní serologické metody, jež fungují na principu reakce protilátky s antigenem, využívá schopnosti komplementu vázat se na komplex antigenu s protilátkou
- využívá se např. k průkazu protilátek proti původcům respiračních infekcí a řady virových onemocnění
- lze použít k identifikaci jak specifických protilátek tak antigenů
- reakce se hodnotí v několika ředěních séra, jako výsledek se udává nejvyšší ředění séra (titr), při kterém ještě nedošlo k hemolýze

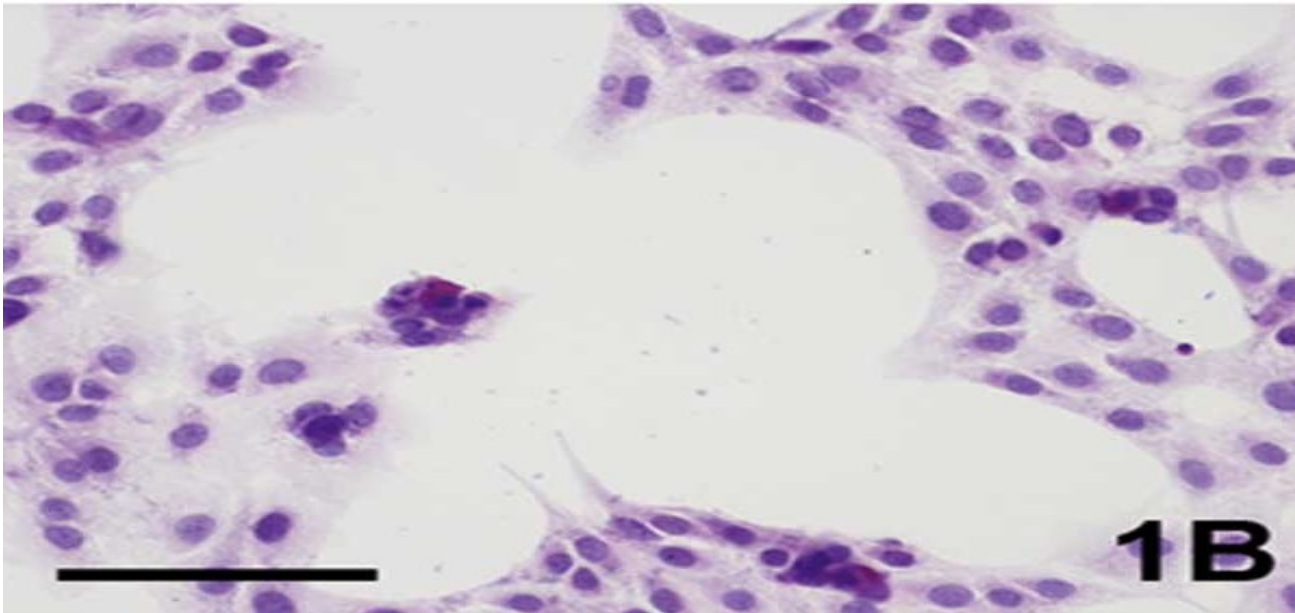


Neutralizační reakce

- testované sérum se smíchá s kulturou konkrétního viru a nechá se inkubovat
 - obsahuje-li testované sérum protilátky proti tomuto viru, dojde k vazbě protilátek na receptory viru a jeho inaktivaci
 - neobsahuje-li sérum protilátky virus zůstane aktivní
- inkubovaným roztokem se poté naočkuje buněčná kultura
 - v pozitivním případě (sérum obsahuje protilátky proti viru) inaktivovaný virus není schopen napadnout buňky a nedojde k vytvoření cytopatického efektu
 - je-li sérum negativní, na buněčné kultuře je pod mikroskopem patrný cytopatický efekt
- metoda se obvykle provádí v několika ředěních séra, jako výsledek se udává nejvyšší ředění séra (tzv. titer, tradičně ve formě 1:xxx) při kterém ještě nedošlo k cytopatickému efektu či onemocnění (uhynutí) zvířete



Neinfikováno virem



Infikováno virem

senzitivita a specifita

Pravdivě pozitivní: Nemocný je správně identifikován jako nemocný

Falešně pozitivní: Zdravý je nesprávně identifikován jako nemocný

Pravdivě negativní: Zdravý je správně identifikován jako zdravý

Falešně negativní: Nemocný je nesprávně identifikován jako zdravý.

- **Senzitivita** je definována jako pravděpodobnost, že test bude pozitivní u nemocných

$$\text{sensitivity} = \frac{\text{number of True Positives}}{\text{number of True Positives} + \text{number of False Negatives}}$$

- **Specifita** je definována jako pravděpodobnost, že test je negativní u osob bez nemoci

$$\text{specificity} = \frac{\text{number of True Negatives}}{\text{number of True Negatives} + \text{number of False Positives}}$$