

Aglutinace přímá a nepřímá, Coombsův test,  
„antiglobulinová séra“

Precipitační reakce v roztoku a v gelu  
Imunoelektroforéza, imunoelektrofixace,

Western-blot

Imunofluorescence

ELISA, RIA, LIA

## **Praktikum č. 3**

*MUDr. Zita Chovancová, Ph.D.*

# ZÁKLADNÍ DĚLENÍ IMUNOLOGICKÝCH LABORATORNÍCH VYŠETŘENÍ

- **serologická vyšetření**
  - *základním materiálem pro vyšetření*
    - **SÉRUM**
- **buněčná vyšetření**
  - *základním materiálem pro vyšetření*
    - **PERIFERNÍ ŽILNÍ KREV**
- **další zdroje materiálu pro imunologické vyšetření**
  - mozkomošní mok, lymfatické uzliny, bioptické vzorky orgánů, kostní dřev, bronchoalveolární laváž

# ODBĚR MATERIÁLU K IMUNOLOGICKÉMU VYŠETŘENÍ

## *SEROLOGICKÁ VYŠETŘENÍ – proces získávání séra*

- odběr **periferní venózní strážlivé krve**
- *samovolná koagulace krve v čase, při které dochází k oddělení krevního koagula od séra*
- *centrifugace*
- *přenesení séra do čisté zkumavky k dalšímu použití*
  
- uchování séra k dalšímu použití
  - 2 týdny při teplotě 4 °C (běžné použití v rutinní diagnostice)
  - měsíce při teplotě -20 °C
  - roky při teplotě -80 °C

# ODBĚR MATERIÁLU K IMUNOLOGICKÉMU VYŠETŘENÍ

## *BUNĚČNÁ VYŠETŘENÍ – proces získávání buněk*

- odběr **periferní venózní nestrážlivé krve**
  - nejčastěji používaná protisrážlivá činidla (EDTA, heparin)
- krev odebranou pro buněčná vyšetření není většinou možno skladovat delší dobu
- vyšetření buněčného počtu a funkce lymfocytů
  - nutné provést do několika hodin od odběru
- vyšetření fagocytárních funkcí
  - nutné provést do několika desítek minut od odběru

# INAKTIVACE SÉRA

***Zahřátí séra na 56 C po dobu 30 minut.***



*Dochází k funkční inaktivaci proteinů komplementové kaskády, proto již nelze vyšetřit aktivitu komplementové kaskády. Dochází také k inaktivaci viru HIV.*



***Je ale možné měřit koncentraci většiny sérových bílkovin včetně složek komplementové kaskády.***

# REAKCE ANTIGENU S PROTILÁTKOU IN VITRO

- **EPITOP**

- *oblast antigenu, která reaguje s vazebným místem příslušné protilátky*

- **PARATOP**

- *vazebné místo protilátky (oblast N-terminálních částí variabilních částí lehkého a těžkého řetězce)*

- **AFINITA**

- *síla vazby mezi epitopem a paratopem*

- **AVIDITA**

- *síla interakce polyvalentní protilátky s polyvalentním antigenem*

# PRIMÁRNÍ A SEKUNDÁRNÍ FÁZE SEROLOGICKÉ REAKCE

## Primární fáze serologické reakce

- *pokud je zkoumaná protilátka v séru přítomna, dochází k vazbě protilátky na antigen*
- ***není patrná pouhým okem***

## Sekundární fáze serologické reakce

- *uplatňuje se multivalence antigenu a polyvalence protilátek*
- *vzniká prostorový komplex velkého počtu molekul antigenu a protilátek o vysoké molekulové hmotnosti*

# PRIMÁRNÍ A SEKUNDÁRNÍ FÁZE SEROLOGICKÉ REAKCE

**... vzniklé komplexy jsou**

- ***viditelné pouhým okem***  
(AGLUTINACE, PRECIPITACE)
  - ***mění roztok pravý na nepravý (kolloidní)***  
(TURBIDIMETRIE, NEFELOMETRIE)
- 
- *pokud uspořádání reakce umožňuje průběh jen primární fáze reakce nebo průběh sekundární fáze jen ve velmi omezeném rozsahu, je nutné vizualizovat reakci imunochemicky následnou detekcí*  
(IMUNOESEJE)



# **ANTIGLOBULINOVÉ PROTILÁTKY**

## **sekundární antisérum**

- *xenogenní protilátky (např. králičí nebo myší ), získané hyperimunizací, purifikované afinitní chromatografií, případně značené (fluorochromy, enzymy a podobně)*
- *váží se na konzervované struktury imunoglobulinových molekul, nikoliv jejich vazebné místo!*
- **Příklady sekundárních antisér:**
- *RaHuIgG (rabbit anti-human IgG) reaguje s lidskými IgG různých specifit (proti Rh, proti antigenům mikrobů ...)*

# CITLIVOST METOD K PRŮKAZU PROTILÁTEK

***precipitace***

**30  $\mu\text{g/ml}$**

***aglutinace***

**1  $\mu\text{g/ml}$**

***radioimunoassay a ELISA***

**1  $\text{pg/ml}$**

# INTERPRETACE LABORATORNÍCH TESTŮ

- **SPECIFICITA**

- *pravděpodobnost, že test bude **negativní u zdravých osob***

- **SENZITIVITA**

- *pravděpodobnost, že test bude **pozitivní u nemocných***

# POLYKLONÁLNÍ a MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY

- **POLYKLONÁLNÍ PROTILÁTKY**

- *směs imunoglobulinových molekul, jejichž vazebná místa nesou specifitu vůči různým epitopům na celé molekule antigenu*
- ***získávají se obvykle imunizací zvířat***

- **MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY**

- *produkt jednoho klonu B-lymfocytů, vykazují jedinečnou specifitu proti jednomu epitopu na molekule antigenu*
- ***získávají se obvykle metodikami in vitro***

# KOMPLETNÍ A INKOMPLETNÍ PROTILÁTKY

- **Tzv. INKOMPLETNÍ PROTILÁTKY**
  - *přestože dojde k jejich vazbě na antigen, nedojde k sekundární fázi reakce a tím k vizualizaci serologické reakce*

## Příčiny

- **na straně antigenu**
  - *nízká antigenicita (málo epitopů, jejich špatná dostupnost), velké elektrické odpuzivé síly mezi částicemi*
- **na straně protilátky**
  - *ne všechny protilátky se uplatňují v aglutinačních reakcích stejně (IgM x IgG)*

# PŘEHLED METOD PRO STANOVENÍ ANTIGENU NEBO PROTILÁTKY

- ***vizualizace pomocí sekundární fáze reakce***
  - **AGLUTINACE** (*přímá, nepřímá*)
  - **PRECIPITACE** (*jednoduchá, v kombinaci s elektroforézou, imunofixace*)
  
- ***vizualizace pomocí následné detekce***
  - **IMUNOFLUORESCENCE**
  - **IMUNOANALÝZA** (*RIA, EIA, řada modifikací*)
  - **IMUNOBLLOT, IMUNODOT**

***a g l u t i n a c e***

# ***a g l u t i n a c e***

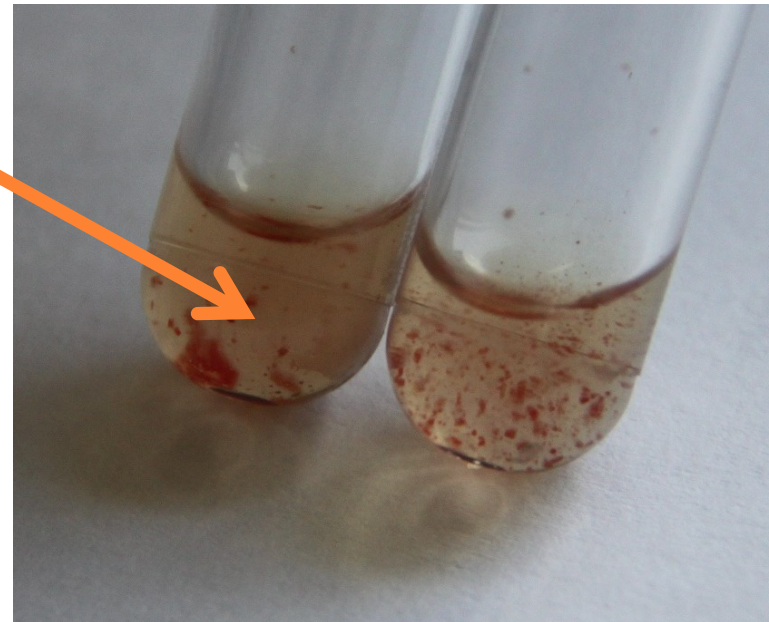
## ***princíp reakce***

### ***antigen KORPUSKULÁRNÍ POVAHY***

*Vazbou dvoj a vícevazebných protilátek na povrch antigenu dojde k překonání odpudivých, způsobených negativním nábojem na povrchu částic (zeta potenciál), a vytvoří se mezi nimi můstky ...*

*... vzniká **AGLUTINÁT***

- ***snadná vizualizace proběhlé reakce***
  - díky velikosti antigenu
  - díky průběhu reakce v tekutině





# ***a g l u t i n a c e***

## ***faktory ovlivňující kvalitu aglutinační reakce***

- ***dostatek protilátek***
  - příliš velké ředění protilátek → aglutinace neproběhne
- ***přítomnost protilátek proti různým epitopům***
  - rozdíl v aglutinaci mezi monoklonálními a polyklonálními protilátkami
- ***vzdálenost mezi jednotlivými antigenními částicemi***
  - odpuzivé elektrické síly na povrchu částic klesají se čtvercem vzdálenosti

# ***a g l u t i n a c e***

## ***přímá a nepřímá***

### ***přímá aglutinace***

**antigeny se nacházejí přímo na zkoumané částici**

*průkaz krevních skupin, přímý Coombsův test, určování izolovaných bakteriálních kmenů (zejména ze skupiny enterobaktérií), Widalova reakce, Weil-Felixova reakce, průkaz některých zoonóz, ...*

### ***nepřímá aglutinace***

**zkoumaný antigen je navázán na povrchu vhodných makromolekulárních částic**

*latex-fixační test, nepřímý Coombsův test, rychlé testy pro ambulantní vyšetření (ASLO), ...*

# ***a g l u t i n a c e***

***určování krevních skupin***

## **ANTIGENY NA POVRCHU ERYTROCYTŮ**

### ***polysacharidové***

***skupinový systém ABO (antigen A, antigen B)***

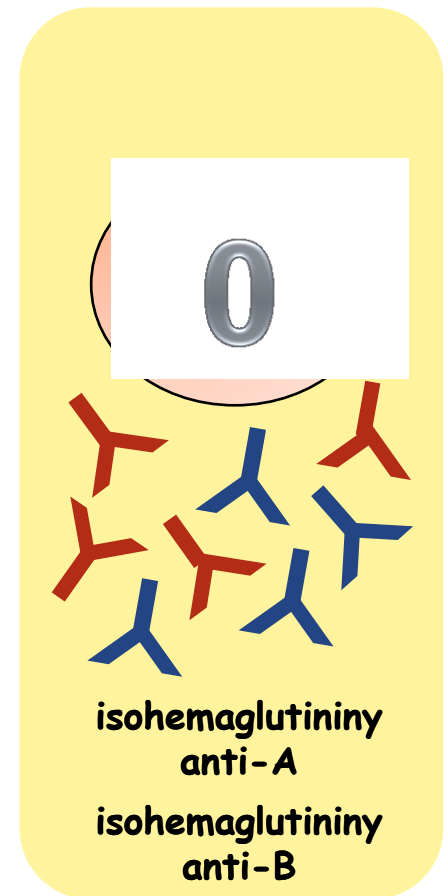
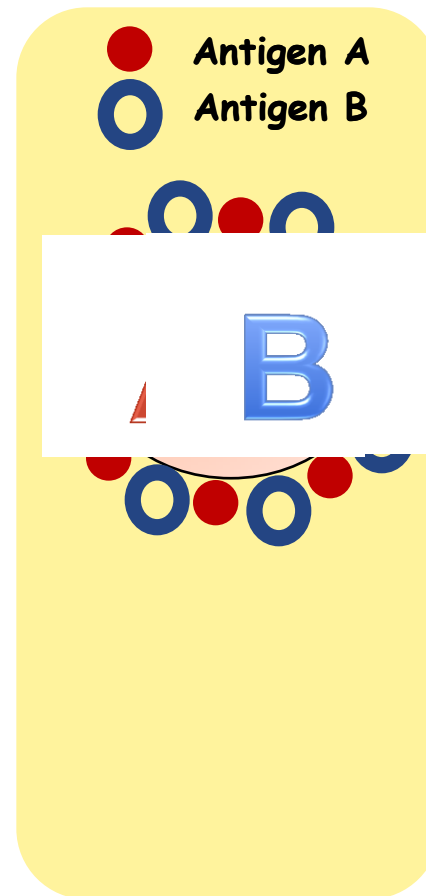
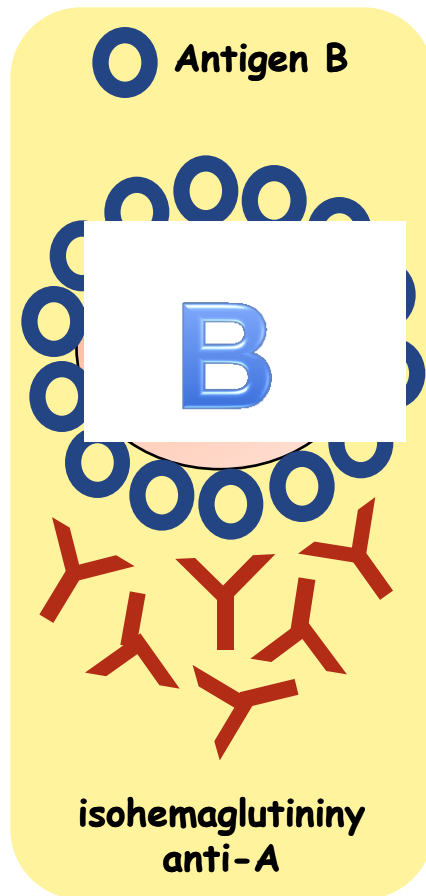
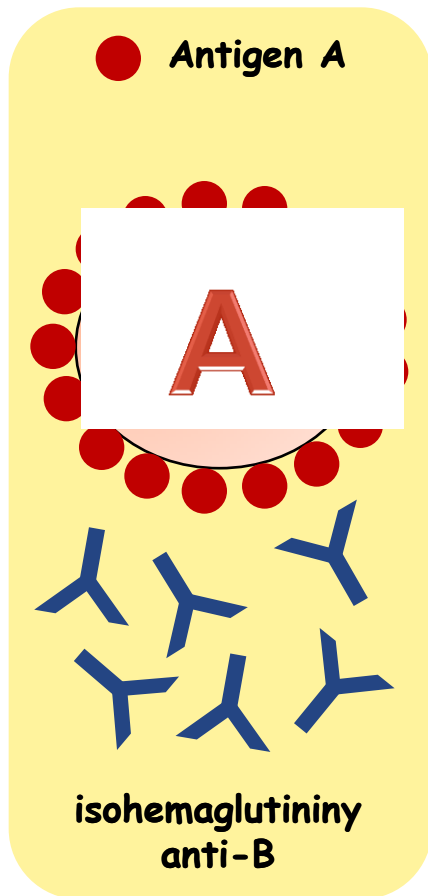
***skupinový systém Lewis, P a li***

### ***glykoproteinové***

***skupinový systém Rh (antigen D)***

***skupinový systém MNSs, Lutheran, Kell, Duffy, Diego***

# ***aglutinace*** ***určování krevních skupin*** ***skupinový systém ABO***



# ***a g l u t i n a c e***

## ***skupinový systém Rh***

### ***COOMBSŮV TEST***

*Průkaz inkompletních protilátek proti antigenům Rh*

#### ***PŘÍMÝ Coombsův test***

*Průkaz in vivo navázaných antierytrocytárních  
protilátek*

#### ***NEPŘÍMÝ Coombsův test***

*Průkaz cirkulujících antierytrocytárních protilátek*

#### ***Coombsovo antisérum***

*protilátky proti lidským sérovým globulinům  
(polyspecifické antisérum obsahující protilátky proti IgG, komplementu, těžkým  
i lehkým řetězcům imunoglobulinů)*

# ***a g l u t i n a c e***

## ***latex-fixační test***

### ***k průkazu revmatoidního faktoru (RF)***

*Autoprotilátka namířená proti Fc části  
imunoglobulinu ve třídě IgG*

### ***Princip metody:***

- na částice latexové suspenze jsou navázány modifikované lidské imunoglobuliny (agregované IgG)*
- v případě přítomnosti IgM protilátek proti Fc části lidského IgG v séru pacienta jsou takto připravené částice tímto sérem aglutinovány*

***p r e c i p i t a c e***

# *precipitace*

## *princip reakce*

### ***antigen NEKORPUSKULÁRNÍ POVAHY o nízké molekulové hmotnosti***

*Antigen o nízké molekulové hmotnosti je rozpustný v kapalině a tvoří pravý roztok a při optimálním poměru antigenu a protilátky dochází ke vzniku makroskopicky zřetelné prostorové mřížky tvořené imunokomplexy.*

*... vzniká **PRECIPITÁT*** →

#### ***PRECIPITACE PROBÍHÁ ...***

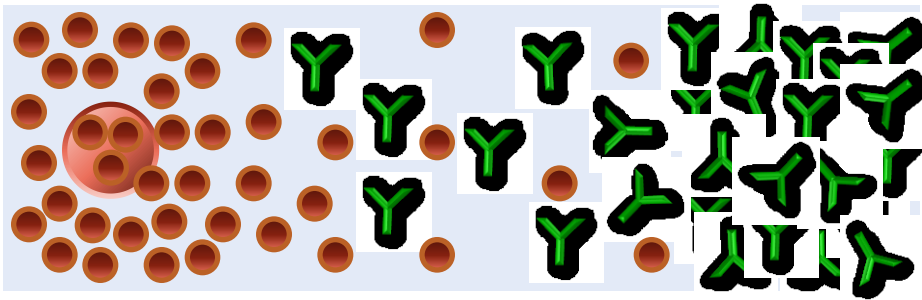
- v kapalinách (nefelometrie, turbidimetrie)*
- v gelech (vstříčná a radiální imunodifuze)*



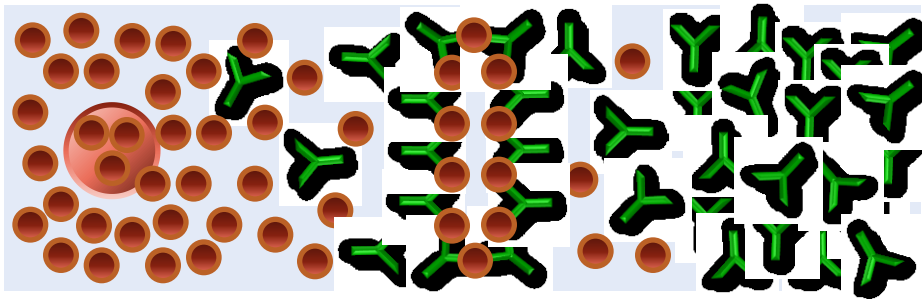


# *precipitace*

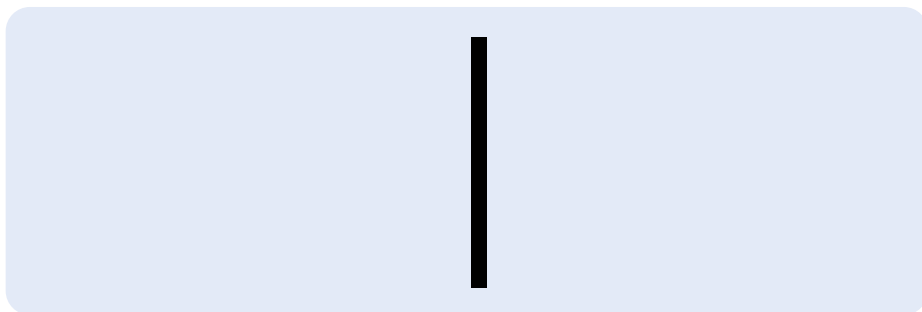
*... v gelech*



*antigen a protilátka difundují  
gelem na podkladě koncentračního  
gradientu*



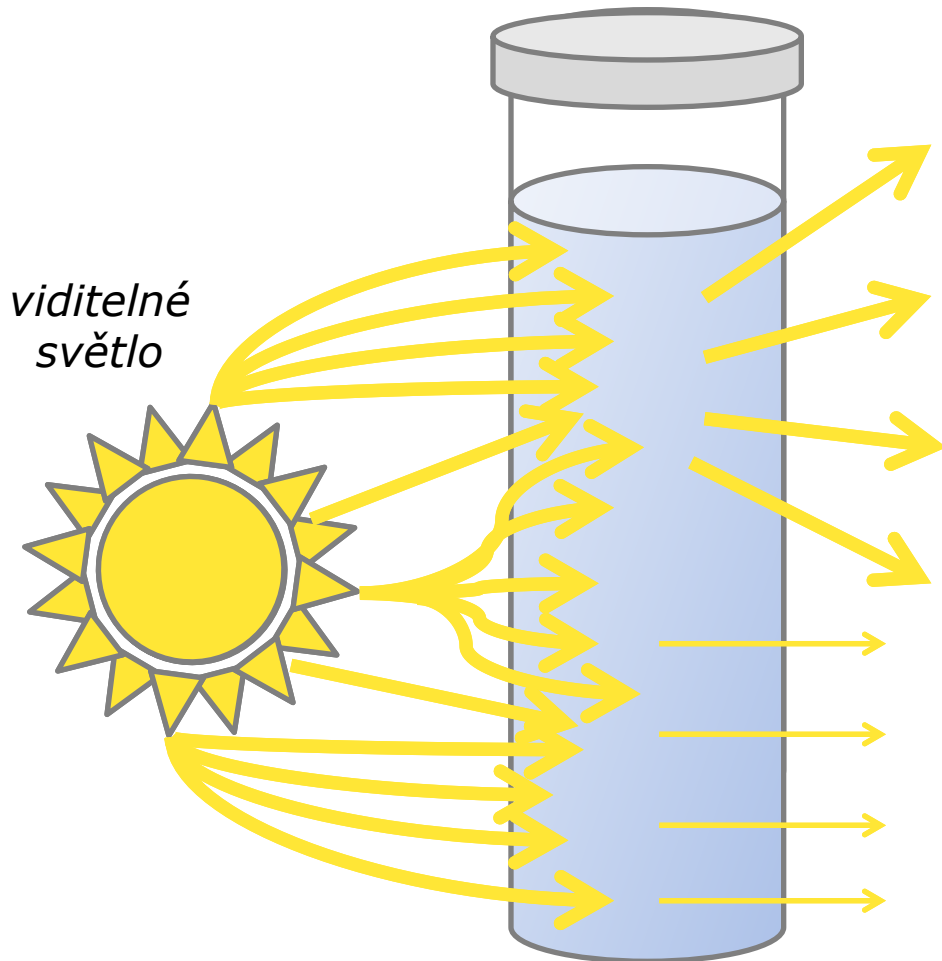
*v místě ekvimolární koncentrace  
antigenu a protilátky ...*



*... vzniká **precipitační linie***

# *precipitace*

*... v kapalinách*



## **NEFELOMETRIE**

*měření rozptylu  
viditelného světla*

## **TURBIDIMETRIE**

*měření úbytku prošlého světla*

***ELISA***

# ELISA

*enzyme-linked immunosorbent assay*

## **princip reakce**

### **ke zjištění koncentrace antigenu nebo protilátky**

*k detekci reakce mezi antigenem a protilátkou se používá **enzym**  
(konjugát zvířecí protilátky proti lidské protilátce IgG, IgA nebo IgM značené enzymem)*

#### **Použití v klinické praxi:**

- *v současnosti zřejmě nejvíce používaná laboratorní metoda v imunologických a klinických laboratořích*
- *průkaz protilátek (antibakteriálních, antivirových, autoproti látek) nebo antigenů*
- **vysoká citlivost testu umožňuje průkaz analytů o nízké koncentraci**
- *ELISA není vhodná k detekci analytů o vyšší koncentraci (např. koncentrace sérových imunoglobulinů) – vzhledem k nutnosti vysokého ředění vzorků možnost velké chyby stanovení!*

# **ELISA**

## **enzyme-linked immunosorbent assay princip reakce**

### **ke zjištění koncentrace antigenu nebo protilátky**

- vazba **antigenu** na pevnou fázi (jamka mikrotitrační destičky)
  - inkubace a následné promytí destičky
- aplikace **séra s předpokládaným výskytem protilátek** proti vyšetřovanému antigenu (dojde k vazbě protilátky na antigen)
  - inkubace a následné promytí destičky
- aplikace **konjugátu** zvířecí (myší, králíčí, ...) protilátky proti lidskému IgG, IgA nebo IgM konjugované s enzymem
  - inkubace a následné promytí destičky
- aplikace **substrátu** (bezbarvý substrát → enzym → barevný produkt)
  - inkubace
- zastavení probíhající enzymatické reakce
- změření absorbance jamek spektrofotometricky (intenzita výsledného zbarvení je v určitém rozmezí koncentrací přímo úměrná množství navázané protilátky)

***immunofluorescence***

# *immunofluorescence*

## *princip reakce*

### *zjištění přítomnosti antigenu nebo autoprotilátky*

*k detekci přítomnosti antigenu nebo protilátky se používá **fluorochrom** (konjugát zvířecí protilátky proti antigenu nebo proti lidské protilátce ve třídě IgG, IgA nebo IgM značené flourochromem)*

## **PŘÍMÁ IMUNOFLOURESCENCE**

- *detekce přítomnosti **antigenu nebo protilátky ve tkáních** pomocí protilátek značených flourochromem*
- *diagnostika puchýřnatých chorob, SLE, porfyrií, vaskulitid, glomerulonefritid a podobně*

## **NEPŘÍMÁ IMUNOFLOURESCENCE**

- *detekce přítomnosti specifických **protilátek v séru** tak, že protilátky přítomné v séru pacienta jsou po vazbě na antigen dárcovské tkáně označené zvířecí protilátkou proti lidským IgG, IgA a IgM imunoglobulinům značenou flourochromem*
- *detekce přítomnosti autoprotilátek*

***elektroforéza***



# ***e l e k t r o f o r é z a***

## ***princip metodiky***

- *nabité částice se pohybují v elektrickém poli*
- *rychlost pohybu částic je závislá na velikosti celkového povrchového náboje, velikosti a tvaru molekuly a její koncentraci v roztoku*

### ***NATIVNÍ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA BÍLKOVIN***

- *bez denaturačních činidel*
- *proteiny migrují gelem podle svého celkového náboje, velikosti a tvaru (citlivost elektroforézy je dána charakterem pórů gelu)*
- ***elektroforéza sérových bílkovin (rozdělení proteinů plazmy na 5-6 frakcí)***
- ***Využití elektroforézy v klinické praxi:***
- *analýza a dělení směsí bílkovin, charakterizace povrchů organismů (bakterií, virů a podobně), diagnostika monogenních chorob a podobně*

***imuno elektroforéza***

# *imuno*elektroforéza

## *princip metodiky*

*kombinace elektroforetického a imunodifuzního dělení*

### **1. fáze**

- *rozdělení séra elektroforézou na gelu*

### **2. fáze**

- *do gelové vrstvy se podélně na kraji vykrojí úzký žlábek*
- *do žlábků se napipetuje polyspecifické antisérum*
- *po inkubaci dojde k reakci mezi antigenem jednotlivých elektroforeticky rozdělených složek a antisérem → vytvoří se precipitační linie, která se zvýrazní obarvením*
- *každý oblouček (1 protein) a má charakteristický tvar a umístění na imunoэлектроforegramu*
- **Využití v klinické praxi:**
- *zjišťování některých gama patí a poruch v biosyntéze imunoglobulinů*

***immunofixace***

# ***imunofixace***

## ***princip metodiky***

*elektroforetická separace proteinů v gelu a jejich následná imunoprecipitace s monospecifickými antiséry*

### **1. fáze**

- *rozdělení séra pacienta elektroforézou na gelu do 6 drah*

### **2. fáze**

- *do drah se napipetuje monospecifické antisérum (anti- IgG, IgA, IgM, kappa, lambda).*
- *antiséra difundují do gelu a v místě reakce s příslušným antigenem vytváří imunokomplexy ve formě precipitátu*
- **Využití v klinické praxi:**
- *imunofixace bílkovin séra - určena k typizaci paraproteinu*
- *imunofixace bílkovin moče - určena k identifikaci paraproteinu, lehkých řetězců kappa a lambda v moči (Bence-Jonesova bílkovina)*

***Western blot***

# **Western blot**

## **immunoblot**

### **princip metodiky**

*elektroforetické dělení bílkovin a jejich následní přenesení na povrch membrány a typizace specifickými protilátkami*

#### **1. fáze**

- *rozdělení séra elektroforézou na gelu*

#### **2. fáze**

- *přenos rozdělených antigenů na vhodnou matici*
- *imobilizace antigenů a zablokování nespecifických vazebných míst*
- *vizualizace antigenů radiograficky, barevnou reakcí, fluorescenčně (specifické protilátky → immunoblotting)*
- **Využití v klinické praxi:**
- *testy na HIV pozitivitu, definitivní test pro BSE, konfirmační test pro hepatitidu B, diagnostika boreliových infekcí*