

Úvod do imunologie

Jiří Litzman

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU
Brno

Imunitní systém

- Jeden ze základních homeostatických mechanismů organismů.
- Jeho funkcí je udržení integrity organismu rozpoznáním cizorodého /škodlivého pro vlastní organismus.
- Imunitní systém má schopnost rozpoznat cizorodé/nebezpečné látky eliminovat.

Imunitní systém

- Reaguje s cizorodými/nebezpečnými substancemi z vnějšího prostředí (zejména antimikrobiální ochrana).
- Účastní se odstraňování starých a poškozených buněk vlastního těla.
- Napadá nádorové a viry infikované buňky vlastního těla.

Antigen

- Látka rozpoznaná imunitním systémem vyvolávající imunitní reakci – imunogennost (imunogen)
- Produkty imunitní reakce (protilátky, T-lymfocyty) mají schopnost s antigenem specificky reagovat.

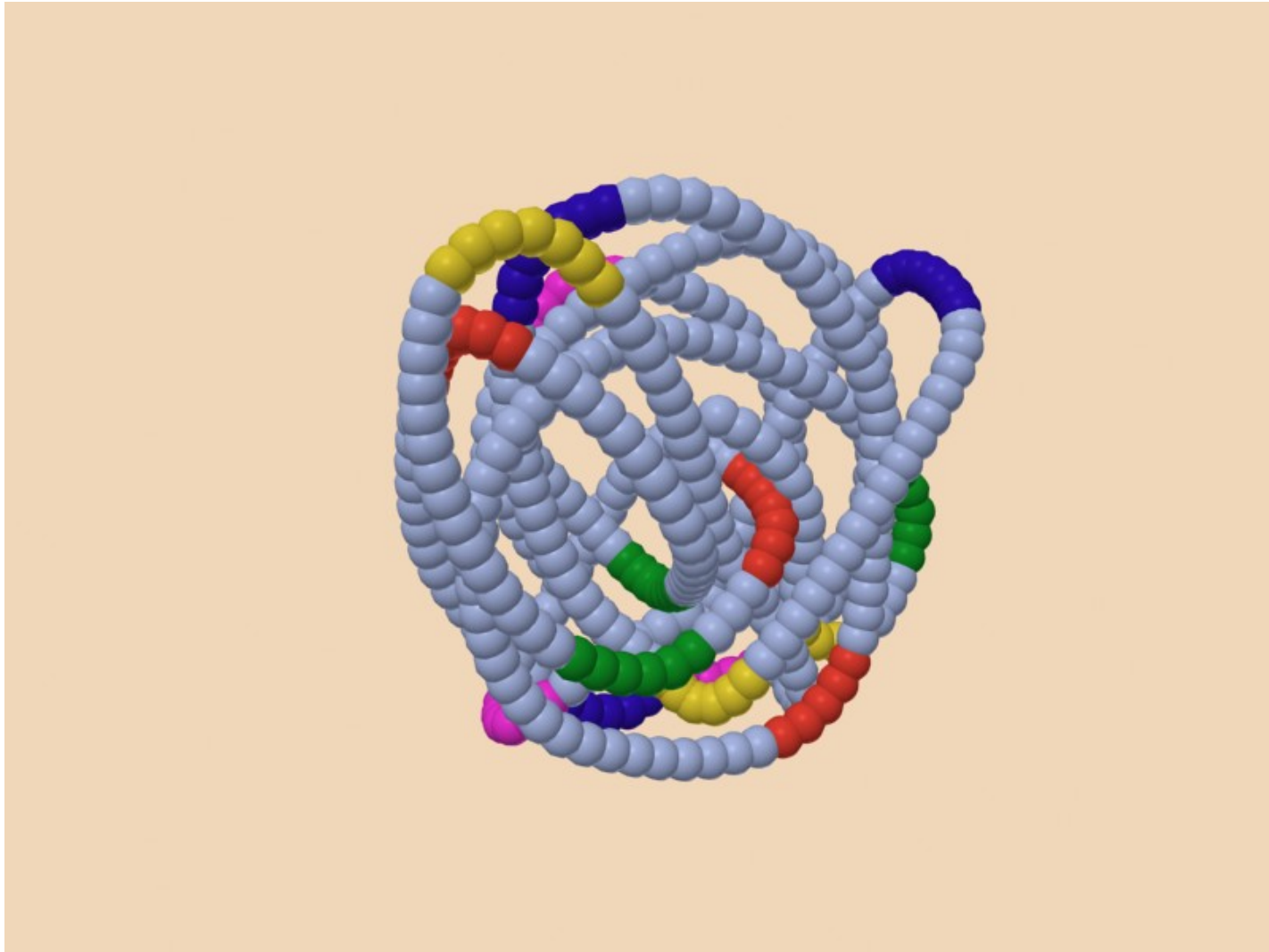
Podmínky imunogenicity

- Cizorodost
- Dostatečná molekulová hmotnost (> 6 kDa)
- Komplexní struktura

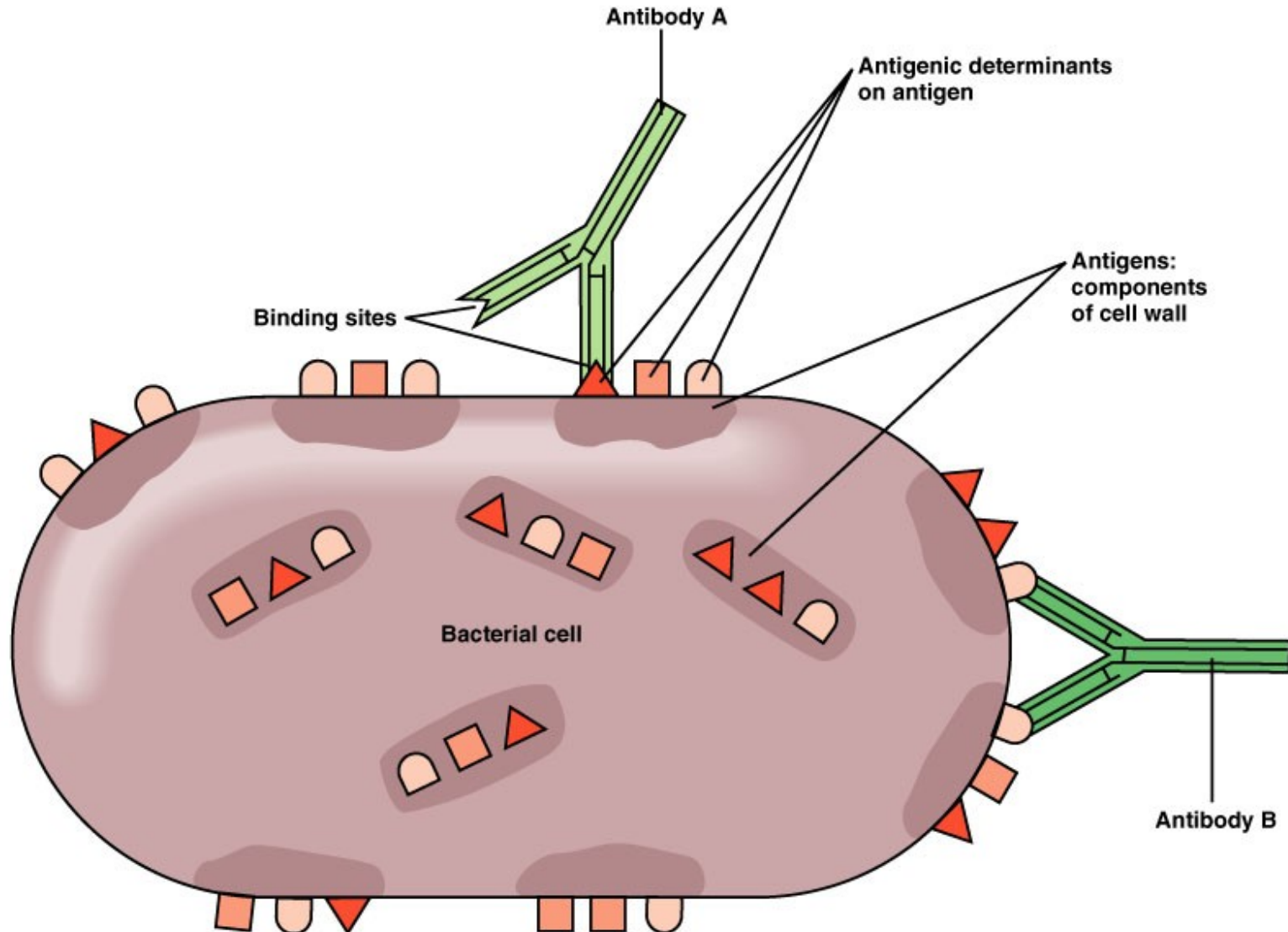
Antigen – základní složení

- Nosičská část molekuly
- Antigenní determinanty (epitopy)
(cca 5-7 aminokyselin!)

Vztah antigenu a epitopu, nosičská část



Vztah antigenu a epitopu



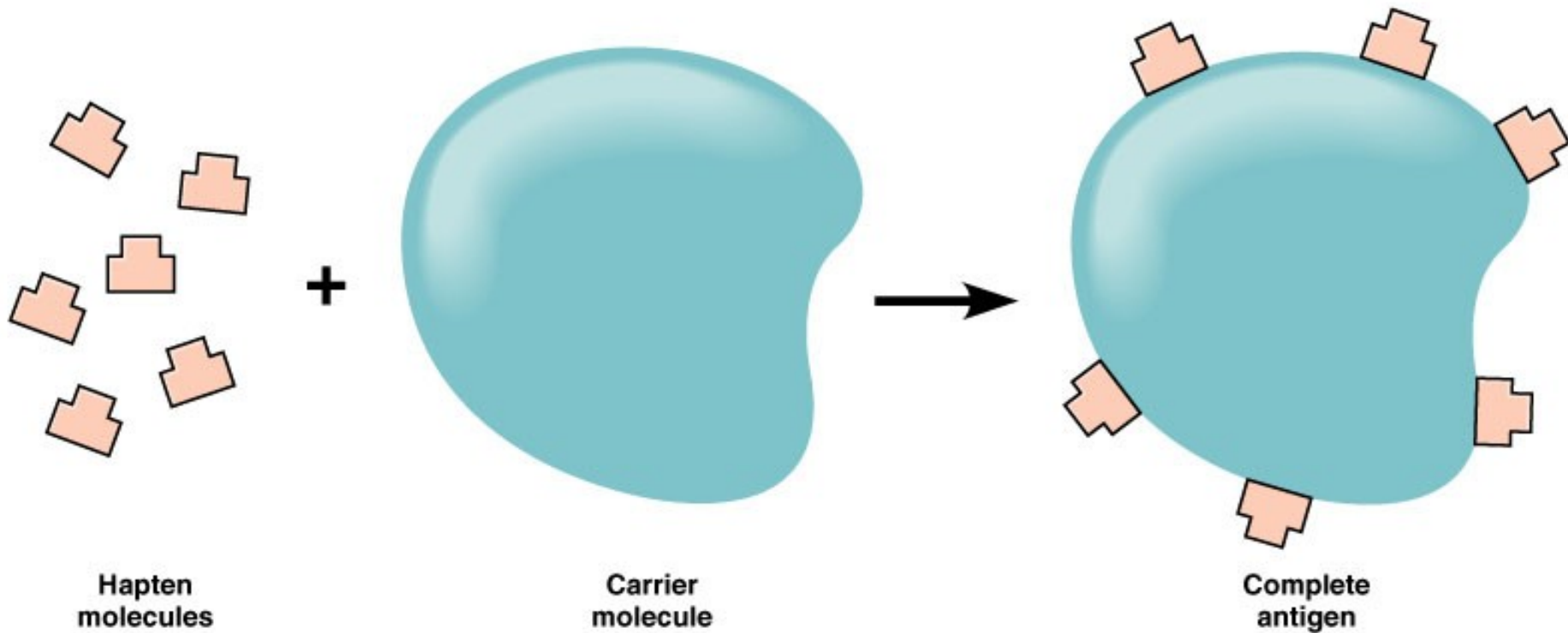
Chemické složení antigenů

- Proteiny – obvykle výborné imunogeny.
- Polysacharidy- jsou dobrými imunogeny zejména jako součást glykoproteinů.
- Nukleové kyseliny- špatná imunogenicitá, vázána zejména na komplexy nukleových kyselin a proteinů.
- Tuky – velmi zřídka se uplatňují jako imunogeny. Nejznámější jsou sfingolipidy.

Hapten

- Nízkomolekulární látky které vyvolávají imunitní reakci po vazbě na jiné vysokomolekulární látky.
- Mají schopnost s produkty imunitní reakce reagovat.
- Typickými hapteny jsou některé kovy, vyvolávají IV. (buněčný) typ přecitlivělosti, nebo léky způsobující I. (atopický) typ přecitlivělosti.

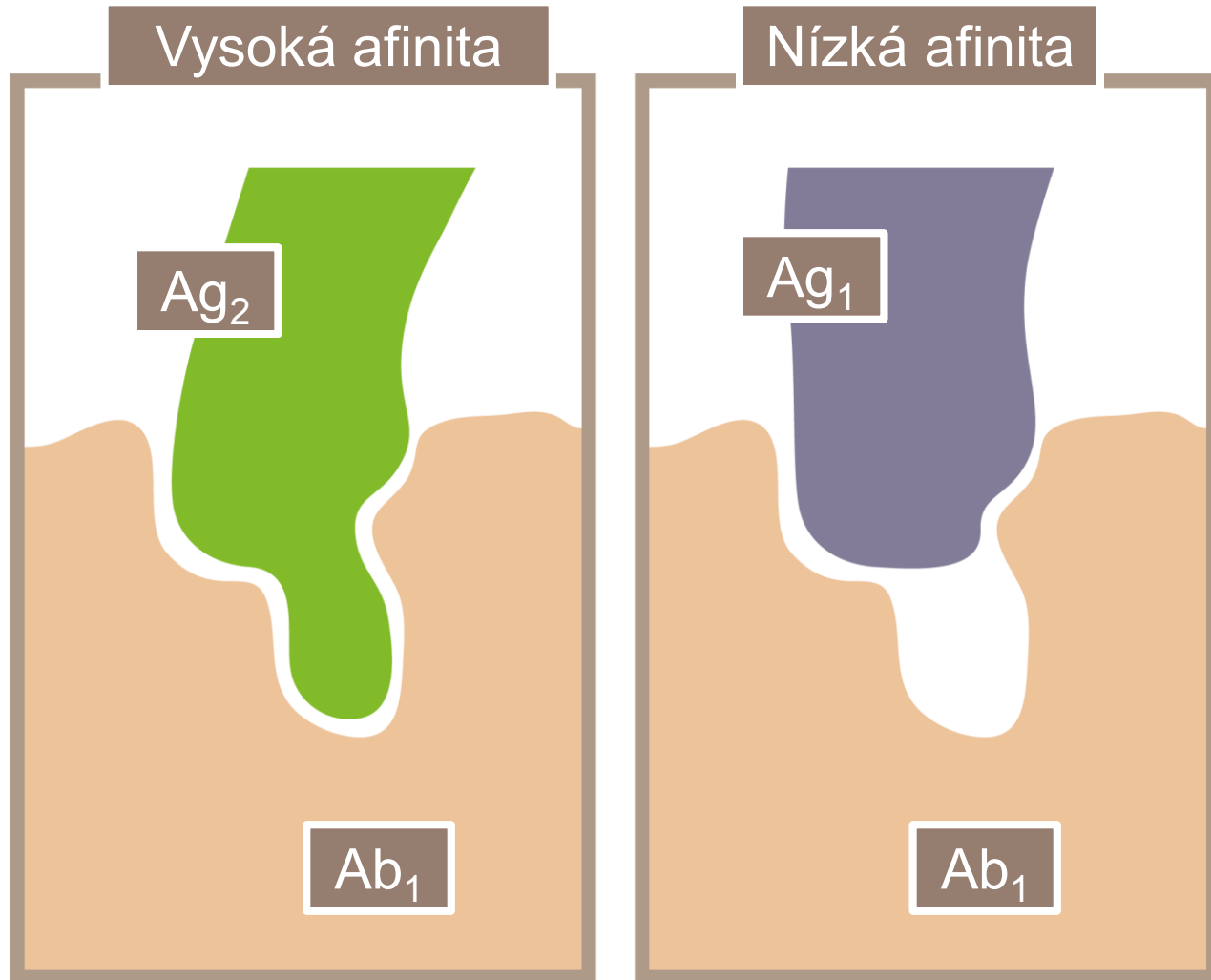
Imunogenicitata haptenu



Zkřížená reaktivita antigenů

- Produkty imunitní reakce mohou někdy reagovat se substancemi odlišnými než byly spouštěče vlastní reakce.
- Immunologická „podobnost“ nemusí vyjadřovat „podobnost“ chemickou.
- Stupeň zkřížené reaktivity může být různý.
- Zkřížená reaktivita se uplatňuje při patogenezi některých autoimunitních chorob (např. revmatická horečka).

Zkřížená reaktivita antigenů



Vztahy imunitního systému k nervové soustavě

- Ovlivnění nervového systému – například vliv IL-1, IL-6, TNF- α na hypotalamická termoregulační centra.
- Ovlivnění funkcí imunitního systému nervovou soustavou: inervace lymfatických tkání, receptory neurohormonů na buňkách imunitního systému. Je možné vypěstovat podmíněné reflexní reakce.

Vztahy imunitního systému k endokrinní soustavě

- Na buňkách imunitního systému jsou receptory pro řadu hormonů. Nejvýrazněji imunitní systém ovlivňují glukokortikoidy.
- Buňky imunitního systému produkují řadu endokrinně aktivních působků (endorfiny, TSH...). Některé cytokiny přímo nebo nepřímo působí na endokrinní systém.

Imunitní systém člověka

SYSTEM VROZENÉ IMUNITY



SYSTEM ADAPTIVNÍ IMUNITY

Imunitní mechanismy zajišťující vrozenou a adaptivní imunitu

tvorí funkční celek

jsou integrovány,

doplňují se a jsou na sobě závislé

Vrozená (nespecifická) imunita

- Stále připravena rozpoznat eliminovat mikroby. Nerozpoznává nemikrobiální antigeny.
- Většinou eliminuje mikroby dříve než se rozvinou mechanismy specifické imunity.
- Receptory jsou přímo geneticky determinovány, nejsou produkty rekombinace genů.

Vrozená (přirozená, nespecifická) imunita

- Přetrvává ve fylogenéze
- Poznávací receptory jsou fixovány v genomu
- Dokonale odlišuje vlastní od cizího
- Reakce na cizorodý materiál je bezprostřední
- Nevzniká paměť
- Propojení s adaptivní imunitou
- První linie obrany proti patogenům
- Účast v normálních fyziologických procesech

IMUNITA VROZENÁ A ZÍSKANÁ

Vlastnost	Imunita vrozená	Imunita získaná
Specifičnost	struktury společné pro různá agens (molekulární znaky patogenů – „PAMP“ – dsRNA, CpG, LPS, manany, glykany, fosforylcholin...)	strukturální detaily antigenů (antigenní determinanty, epitopy)
Receptory	zakódované v genomu buněk zárodečné linie, není nutné přeskupování genů	vytvářejí se během vývoje somatickými rekombinacemi, přeskupování genů nutné
Distribuce receptorů	neklonální: všechny buňky dané skupiny jsou identické	klonální: klony buněk odlišné specifičnosti mají odlišné receptory
Odlišení vlastního od cizorodého	perfektní vyselektováno v evoluci	ano, ale není perfektní (autoimunizace)
Nástup reakce	bezprostřední (0-4-96 hod)	s latencí (> 96 hod)
Paměť	nevzniká	vzniká

Význam vrozené imunity

„... za přežití obratlovců při infekcích jsou převážně - tj. více než z 90% - odpovědny vrozené, elementární, mechanismy rezistence, mezi něž patří interferonem aktivované makrofágy, polymorfonukleární fagocyty a četné jiné faktory hostitele...“

(Rolf M. Zinkernagel: On differences between immunity and immunological memory, 2002)

SIGNÁLY NEBEZPEČÍ:

- EXOGENNÍ (PAMPs)
- ENDOGENNÍ (např. STRESOVÉ PROTEINY UVOLNĚNÉ Z NEKROTICKÝCH BUNĚK)

PAMPs - Pathogen-associated molecular patterns
tj. molekulární motivy (vzory) asociované
s patogenitou

PRRs - Pattern recognition receptors
tj. Receptory na buňkách hostitele,
rozeznávající PAMPs

Receptory vrozené imunity („PRR“)

V cirkulaci, rozpustné, sekretované:

lektin vázající manózu (MBL)

Na buňkách, membránové:

zprostředkovávající endocytózu (např. pro manan na makrofázích)

signalizační „Toll-like receptory“, **TLR**

Intracytoplazmatické:

„Nucleotide-binding oligomerization domain proteins“, **NOD**

„Retinoic acid inducible gene I“, **RIG**

PAMPs:

lipopolysacharid (LPS)

peptidoglykany

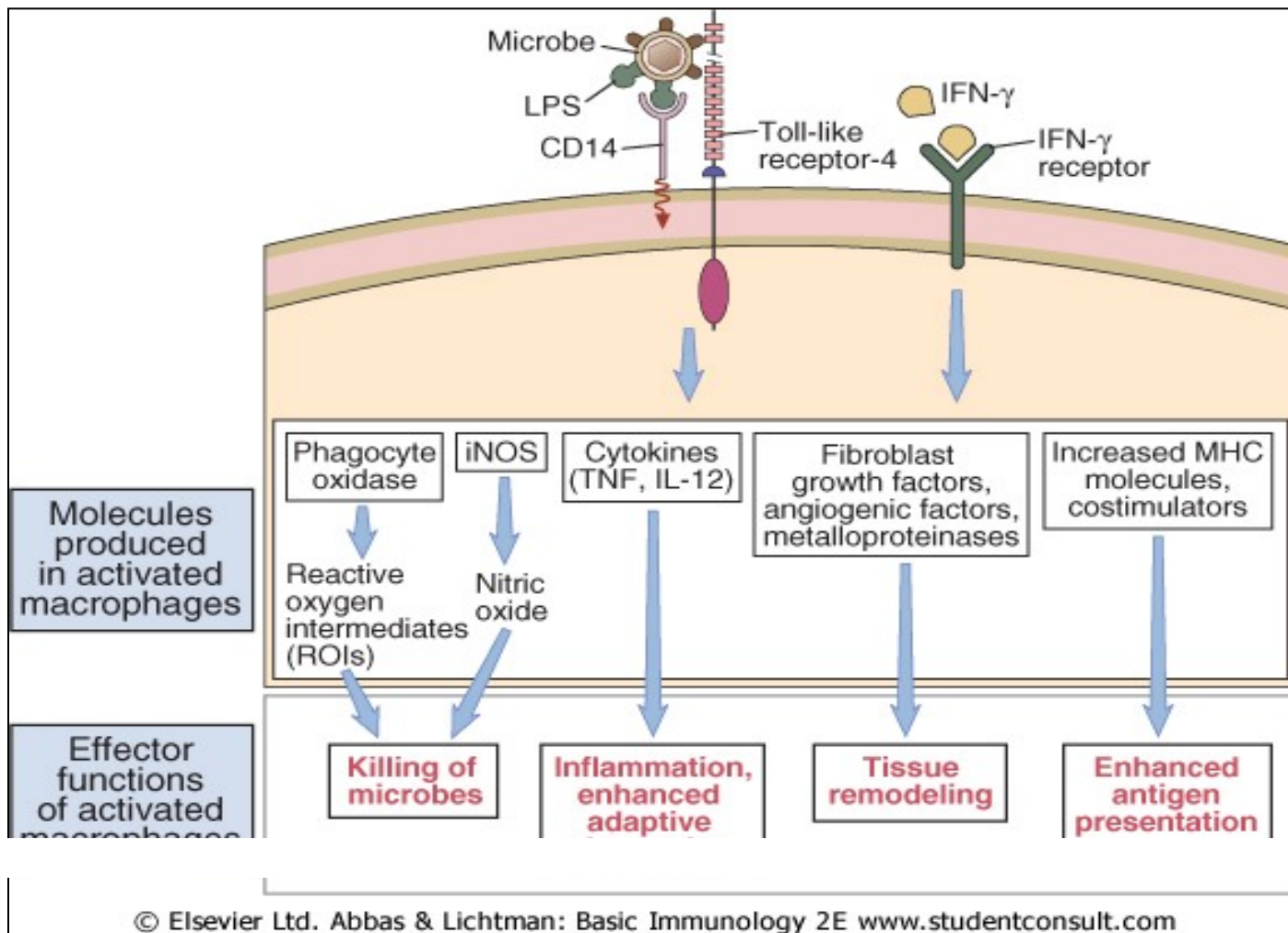
lipoproteiny

manany

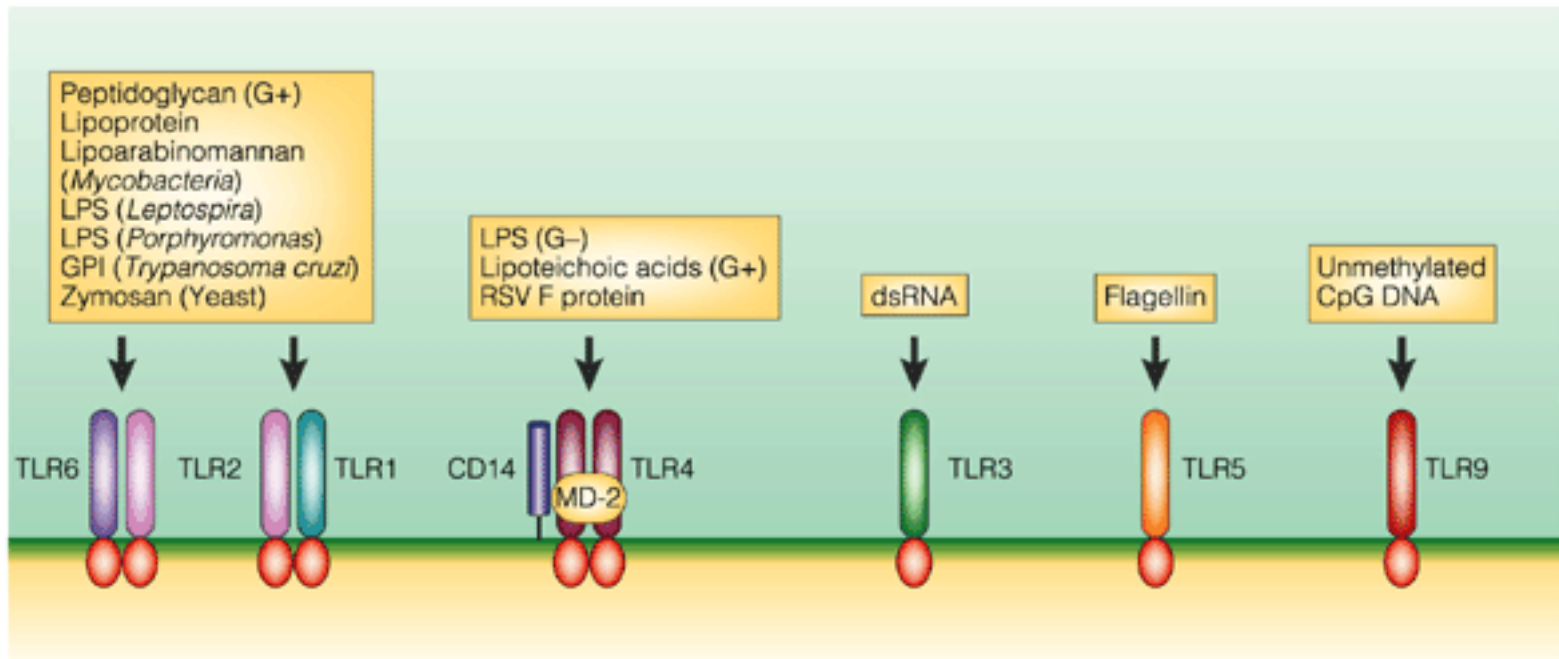
glukany

bakteriální DNA

Aktivace buněk cestou TLR a cytokinových receptorů



TOLL-LIKE RECEPTORY



System vrozené imunity

Celulární složky

Epitelové buňky (antimikrobiální peptidy, cytokiny)

Mastocyty (farmakologicky aktivní)

Profesionální fagocyty (neutrofilní leukocyty, mononukleární fagocyty)

NK buňky (natural killer)

Dendritické buňky (prezentace antigenů)

Innate lymphoid cells

System vrozené imunity

Humorální složky

Mikrobicidní faktory (lysozym, defensiny, kathericidiny a další)

Histamin, eikosanoidy

Komplementový systém

Pentraxiny (CRP, SAP, PTX3)

Kolektiny (MBL, SP-A, SP-B), Fikoliny

Cytokiny (Interferony α, β, γ , $\text{TNF}\alpha$, IL-1, IL-6, chemokiny)

Regionalizace imunitního systému

Slizniční imunita

Regionalizace imunitního systému

- Periferní oblasti imunitního systému je možno rozdělit do několika funkčních oblastí jejichž imunitní odpověď má určité odlišné charakteristiky.
- Nejtypičtějsími kompartmenty imunitního systému jsou:
 - Lymfatické uzliny a slezina
 - Imunitní systém sliznic (MALT)
 - Kožní imunitní systém

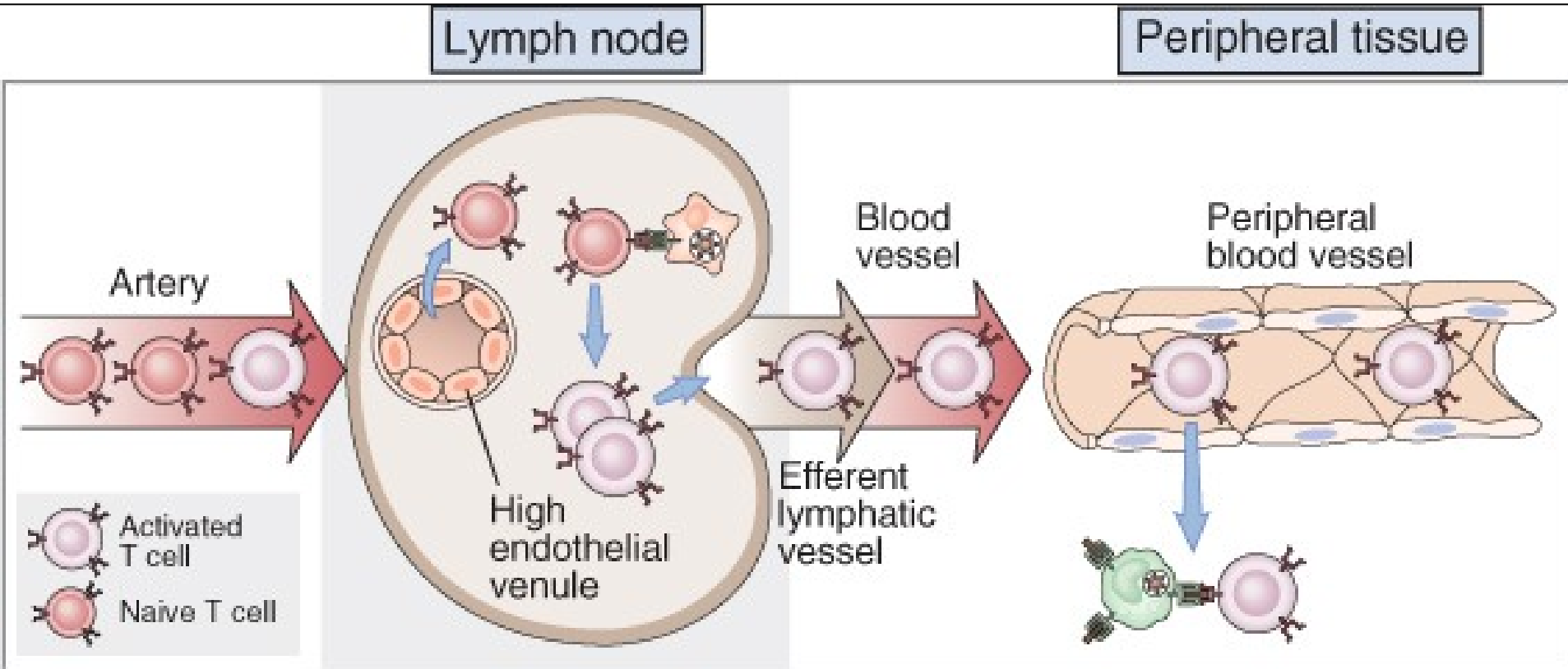
Homing lymfocytů

- Řízená migrace a usazování se lymfocytů u určitých tkáních imunitního systému.
- Je závislá na expresi adhezivních molekul označovaných jako **homingové receptory** na lymfocytech.
- Na endoteliích cílových tkání jsou exprimovány příslušné ligandy pro tyto receptory, označované jako **adresiny**.

High endothelial venules

- Specializované venuly, jsou místem kde lymfocyty pronikají z krevního oběhu do stromatu lymfatických uzlin nebo do slizničního imunitního systému.
- Jsou na nich adhezivní molekuly umožňující vazbu zejména „naivních“ (panenských) T- lymfocytů.

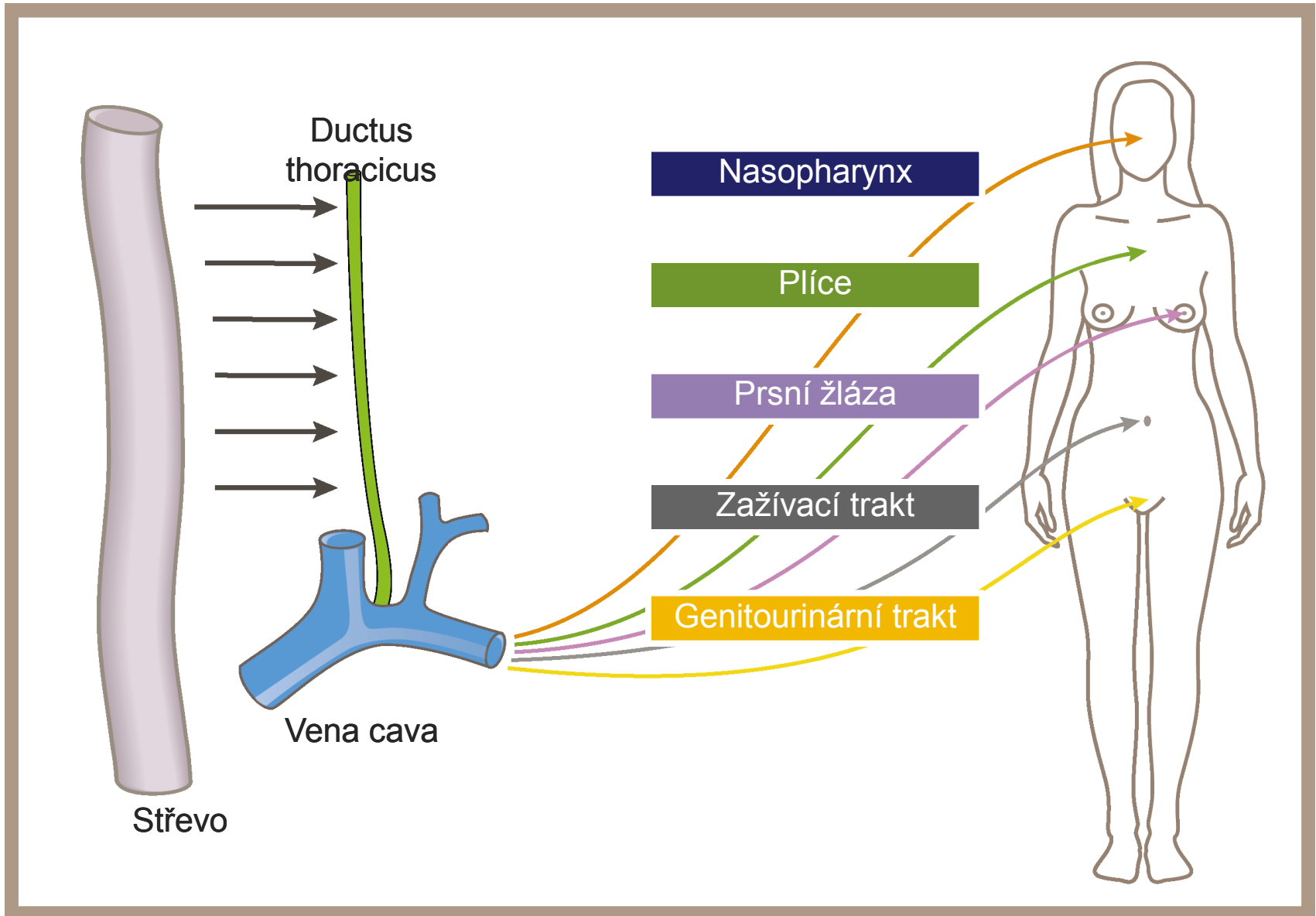
Cirkulace lymfocytů



MALT (Mucous Associated Lymphoid Tissue)

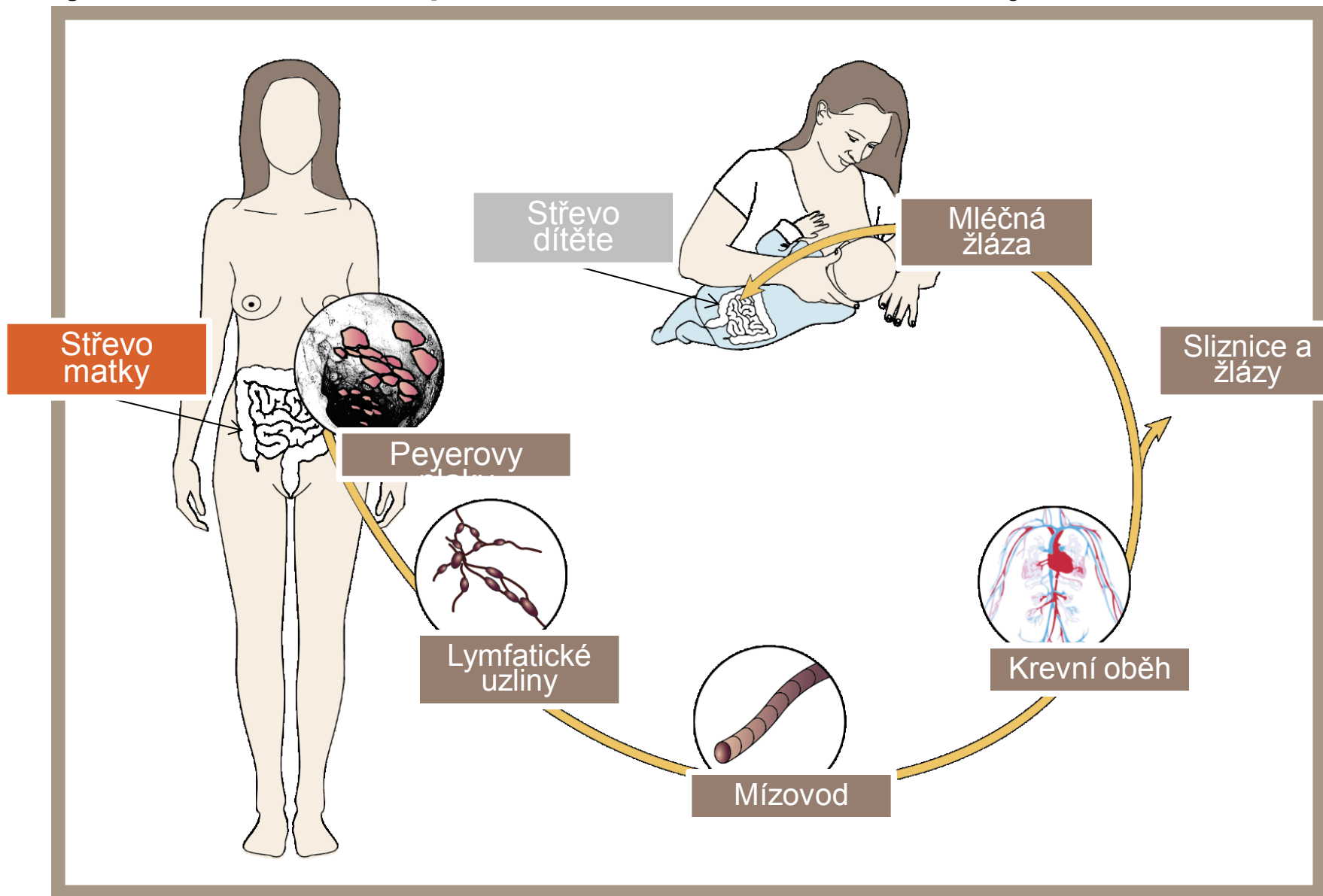
- GALT (Gut Associated Lymphoid tissue)
- BALT (Bronchi Associated Lymphoid Tissue)
- Imunitní tkáň systému močového, genitálního, spojivky, středního ucha....
- Prsní žláza

SPOLEČNÝ IMUNITNÍ SYSTÉM SLIZNIC



Mléčná žláza

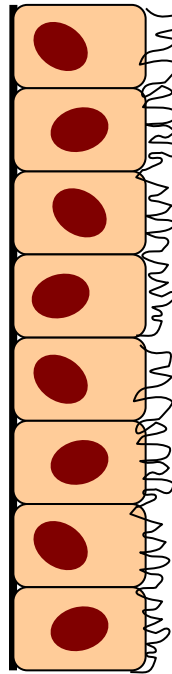
jako součást společného imunitního systému sliznic



Epitelové buňky jako integrální součást vrozené imunity na sliznicích

EXPRESE

- enzymy
- transplantační antigeny
- adhezivní molekuly
- receptory pro:
 - mikroby
 - cytokiny
 - polymerní Ig



PRODUKCE

- cytokiny
 - prozánětlivé
 - růstové faktory
 - chemotaktické
- antibiotické peptidy
- mediátory

INTERAKCE SE SLOŽKAMI ADAPTIVNÍ IMUNITY

Epitelové buňky regulují pohyb a funkční zapojení imunitních buněk

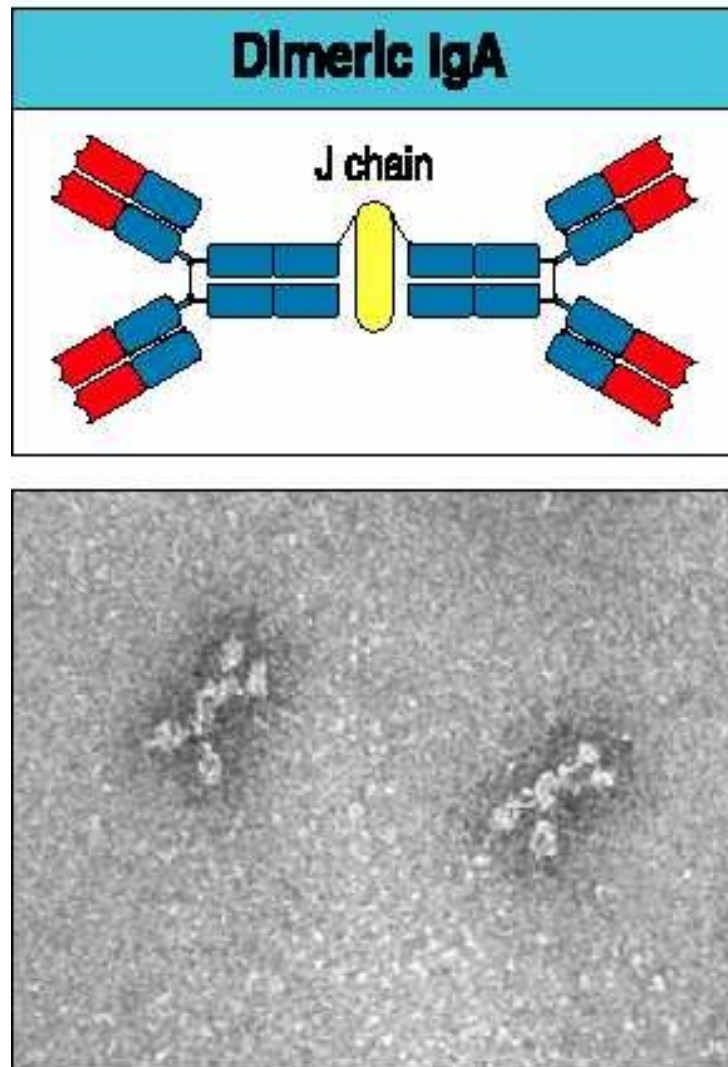
Antimikrobní mechanismy na sliznicích

Faktor	Mechanismus
komensální bakterie	kompetice s exogenními mikroby, produkce protizánětlivých látek
těsné spoje epitelu	brání průniku bakterií
řasinky	zachytávají mikroby
mucin	zachytává bakterie
lysozym	zabíjí G+ bakterie (stěny)
laktoferin	váže železo (inhibice růstu mikrobů)
antibiot. peptidy (hlavně β defensiny)	usmrcují bakterie
sekreční Ig	blokují adhezenci bakterií k epitelu

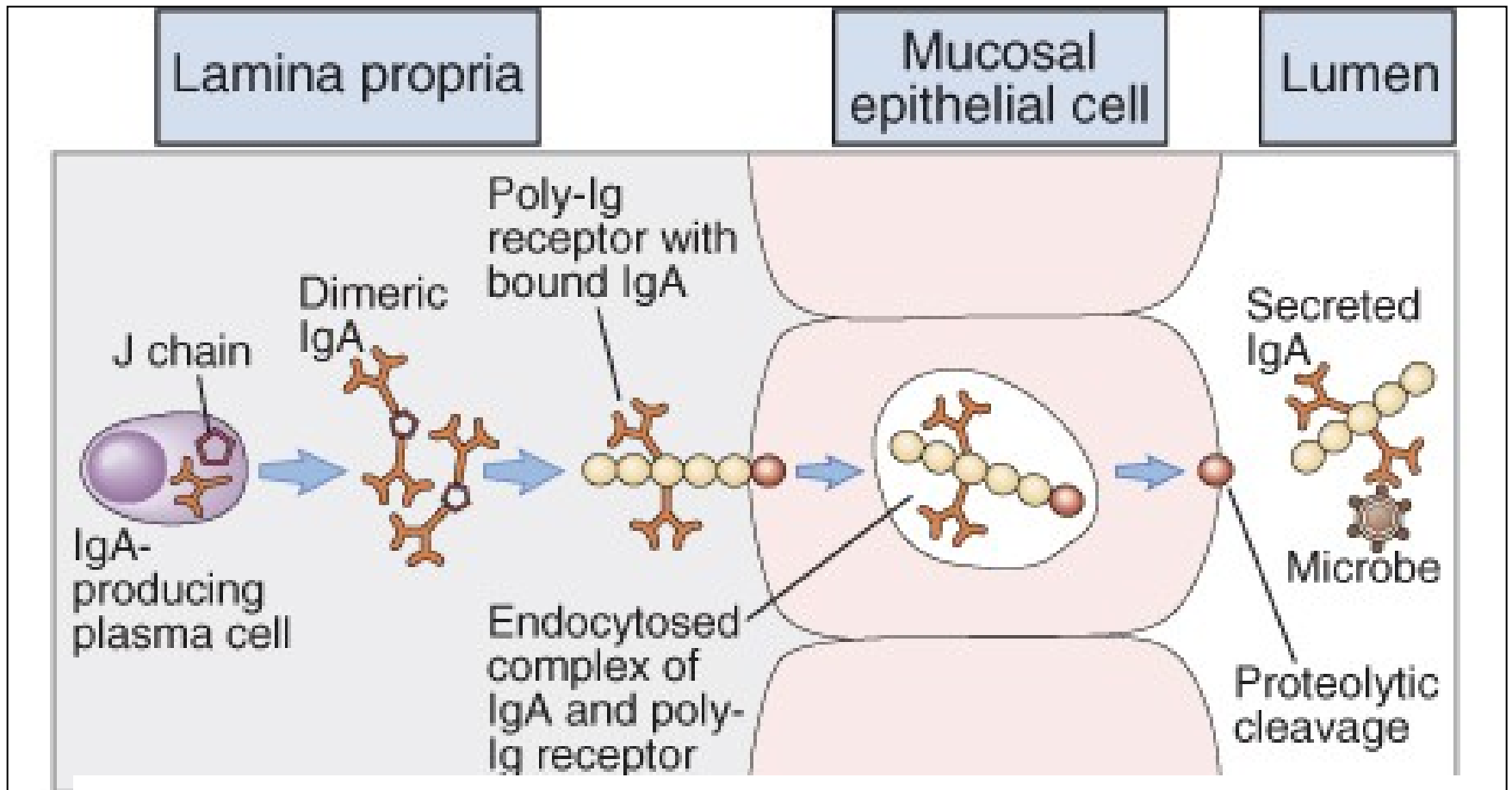
Charakteristické rysy GALT

- Hlavním imunoglobulinem imunitní odpovědi je IgA.
- Existence zvláštních forem lymfocytů, zejména tzv. intraepiteliálních lymfocytů.
- Podání antigenu orální cestou vede často k indukci imunitní tolerance.

Figure 2.29



Tvorba sekrečného IgA



Sekreční komponenta

- „Zbytek“ poly-IgR vázaný na J-řetězec slizničního IgA.
- Stabilizuje molekulu slizničního IgA, především ji brání před účinky proteolytických enzymů.

Buněčné složky specifické imunity v MALT

- T-a B- lymfocyty tonsil, Payerských plaků, appendixu.
- Plazmatické buňky, zejména v submukóze, jsou zodpovědné za tvorbu IgA.
- T-lymfocyty v lamina propria – obvykle CD4+. Jedná se zřejmě o lymfocyty původně aktivované v Payerských plátech které recirkulovaly do lamina propria sliznic.
- Intraepiteliální lymfocyty

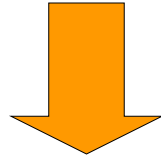
Intraepiteliální T-lymfocyty

- TCR typu $\alpha\beta$ i $\gamma\delta$
- Extratymická diferenciaci
- První linie specifické imunitní odpovědi
- Většina je CD8+
- Nízká antigenní specificita TCR

M-buňky

- Specializované enterocyty zajišťující transport antigenu z prostředí střeva směrem dovnitř Payerova plátu nebo dalších organizovaných slizničních lymfatických tkání.
- Přenos antigenů se uskutečňuje transcytózou.

ORÁLNÍ TOLERANCE



inhibice systémové imunity následující po perorálním podání antigenu (proteinu)

Ustavení tolerance: 5-7 dní po orální aplikaci

Trvání: několik měsíců

Fyziologicky: tolerance k antigenům potravy

Komensální (normální) mikroflora

- ~ 10^{14} bakterií, ~ 1000 druhů
 - ~ 50% nekultivovatelných
- složitý ekosystém
- součást přirozené imunity sliznic a kůže
- vzájemné interakce mikroorganismů
 - kompetice-kolonizační resistance, produkce bakteriocinů ...
- interakce s makroorganismem: symbiosa, komensalismus, patogenita, účast v metabolismu hostitele (fysiologické funkce)
- modulace imunity

Imunitní systém kůže

- Keratinocyty hrají důležitou roli v produkci cytokinů a indukci lokální zánětlivé odpovědi.
- Langerhansovy buňky – jedná se o dendritické buňky vážící na sebe antigeny a přenášející je do lymfatických uzlin. Tam je prezentují T-lymfocytům.
- V dermis přítomny hlavně T-lymfocyty, žírné buňky.
- Imunitních reakcí se účastní i fibroblasty.

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

REAKCE ANTIGENU S PROTILÁTKOU IN VITRO

- **EPITOP**

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

- **PARATOP**

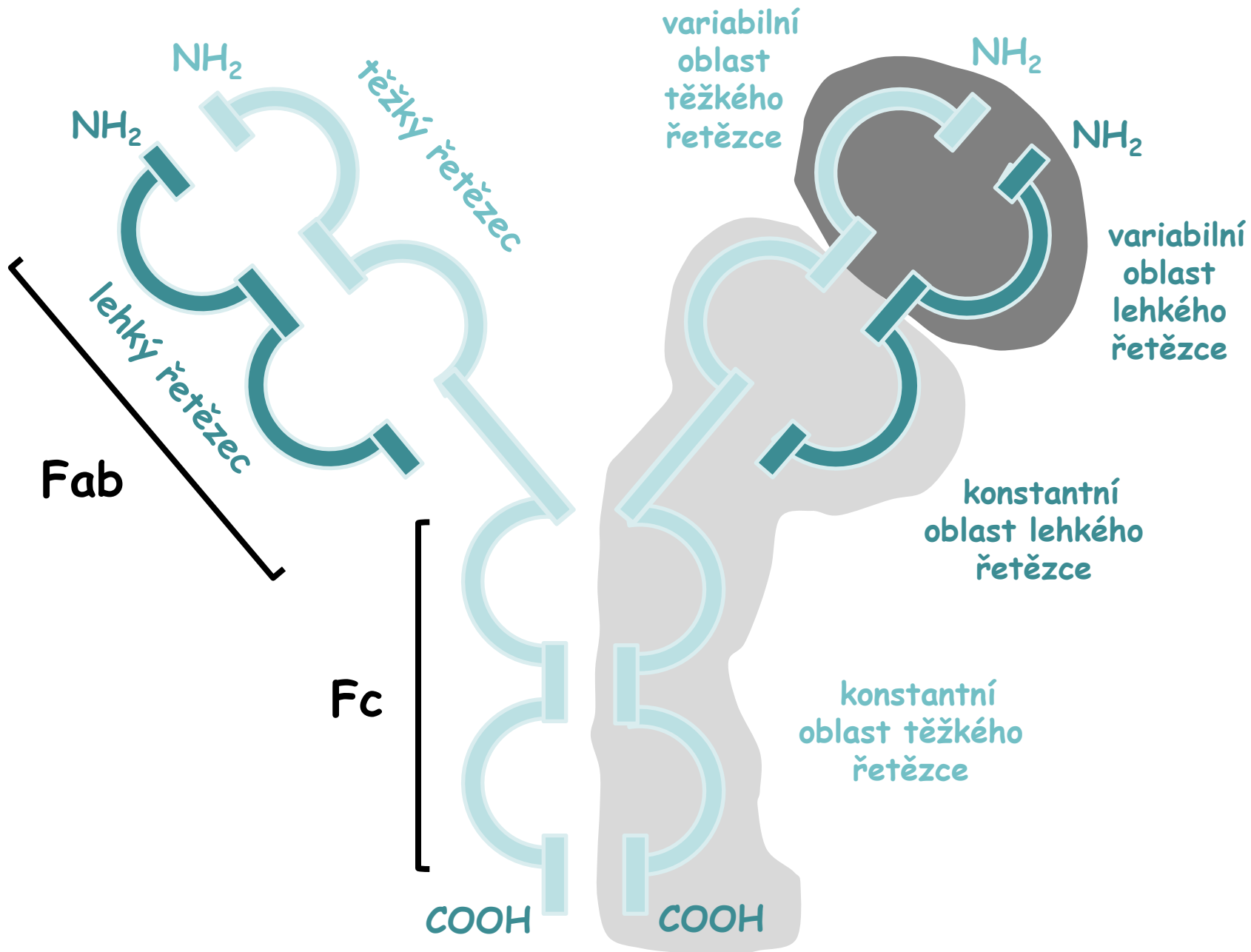
- *vazebné místo protilátky (oblast N-terminálních částí variabilních částí lehkého a těžkého řetězce)*

- **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)

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 odpudivé síly mezi částice*
- **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

princip 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 AB0 (antigen A, antigen B)

skupinový systém Lewis, P a Ii

glykoproteinové

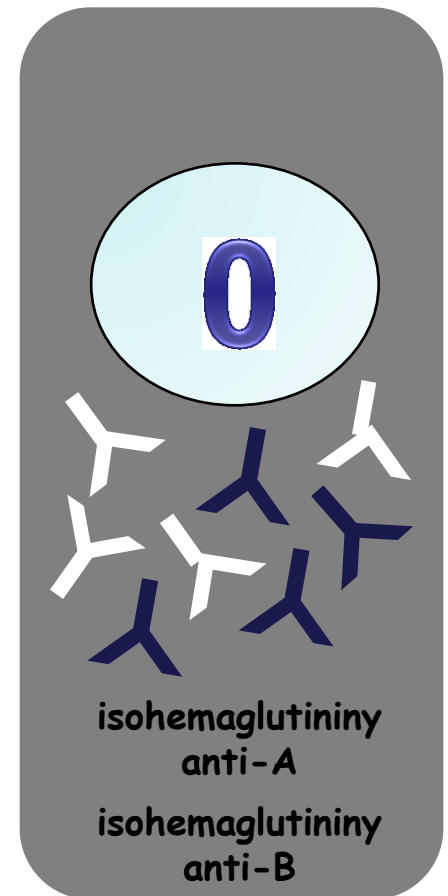
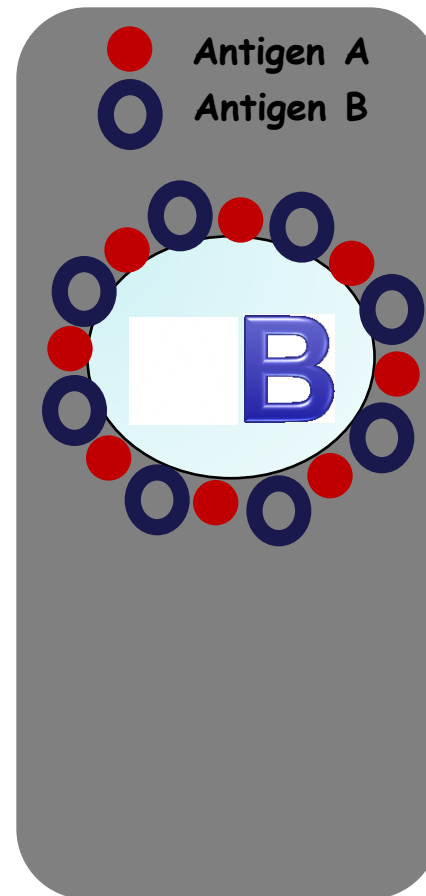
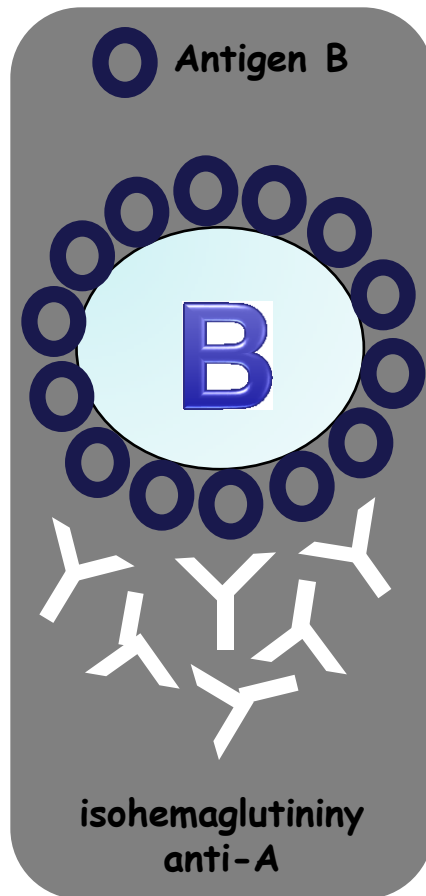
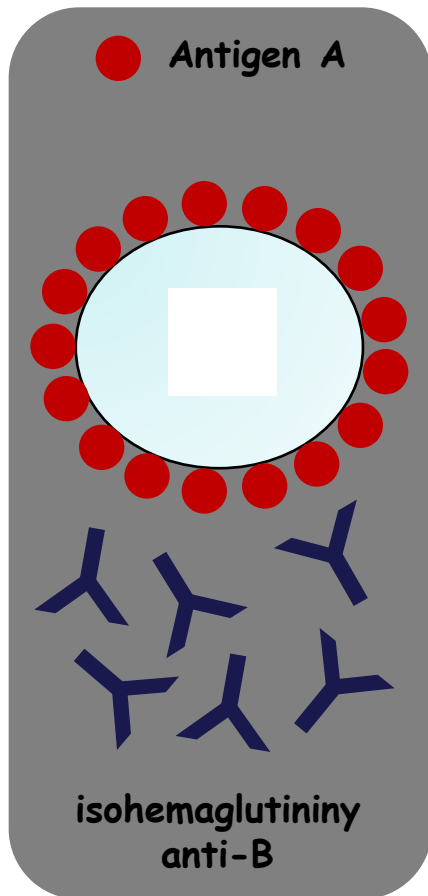
skupinový systém Rh (antigen D)

skupinový systém MNSs, Lutheran, Kell, Duffy, Diego

a g l u t i n a c e

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

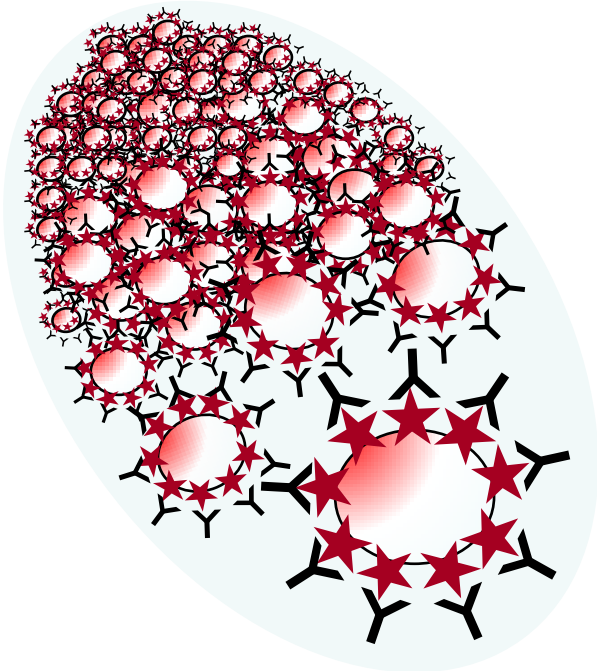
*Průkaz **cirkulujících** antierytrocytárních protilátek*

Coombsovo antisérum

protilátky proti lidským sérovým globulinům

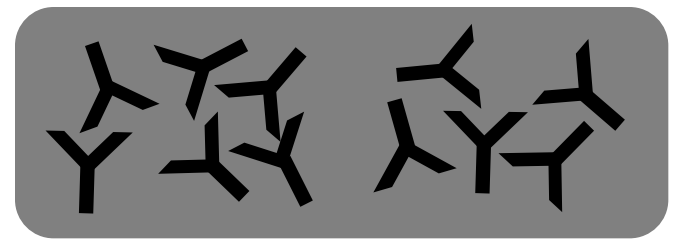
*(polyspecifické antisérum obsahující protilátky proti IgG, komplementu, těžkým
i lehkým řetězcům imunoglobulinů)*

krev dítěte

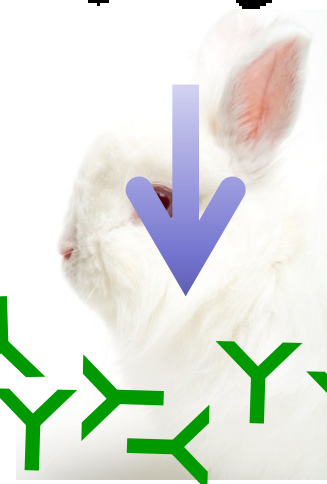


Coombsův test

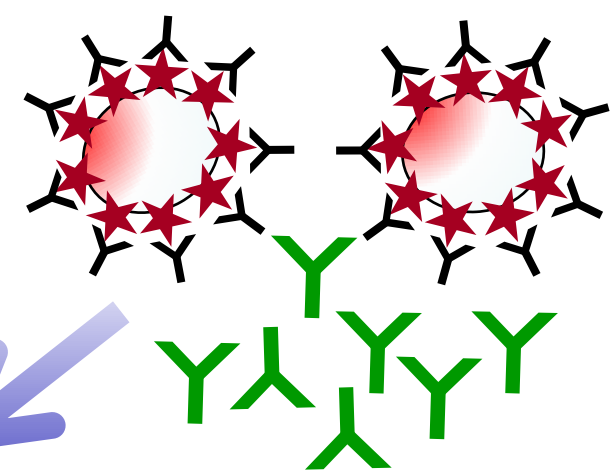
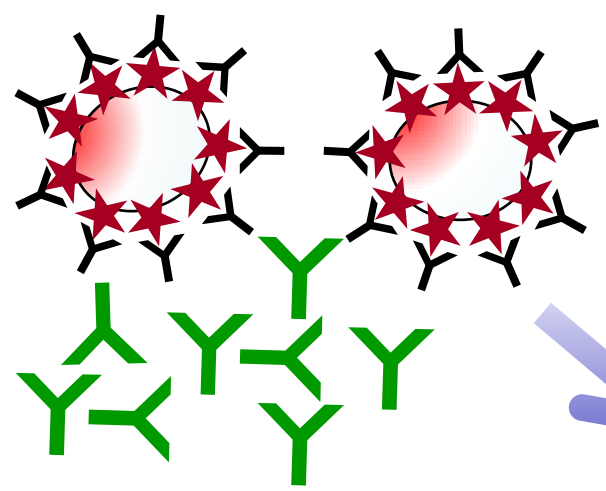
sérum matky



dárcovské erythrocyty



Coombsovo antisérum



AGLUTINACE

p r e c i p i t a c e

p r e c i p i t a c e

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.

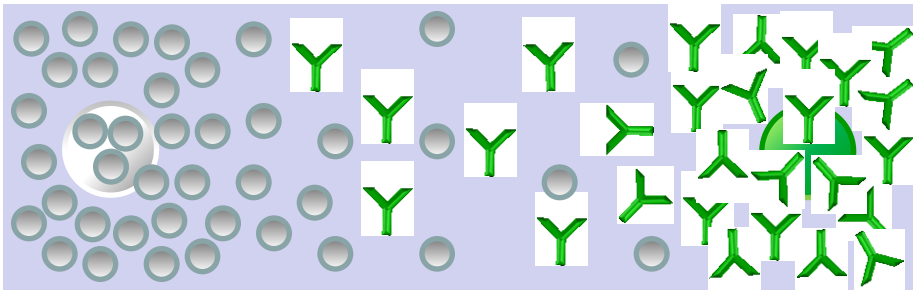
... vzniká PRECIPITÁT

PRECIPITACE PROBÍHÁ ...

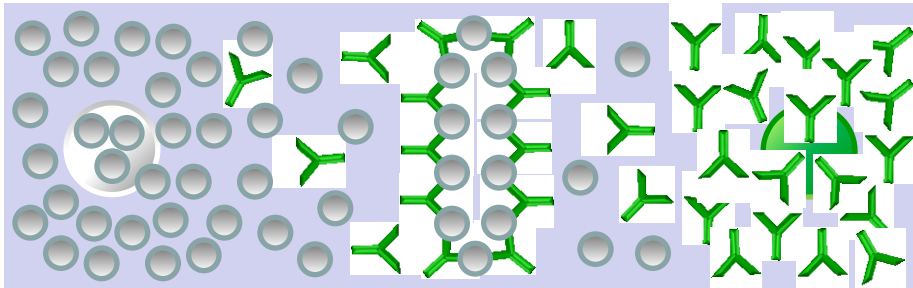
- v kapalinách (nefelometrie, turbidimetrie)*
- v gelech (vstřícná a radiální imunodifuze)*

precipitace

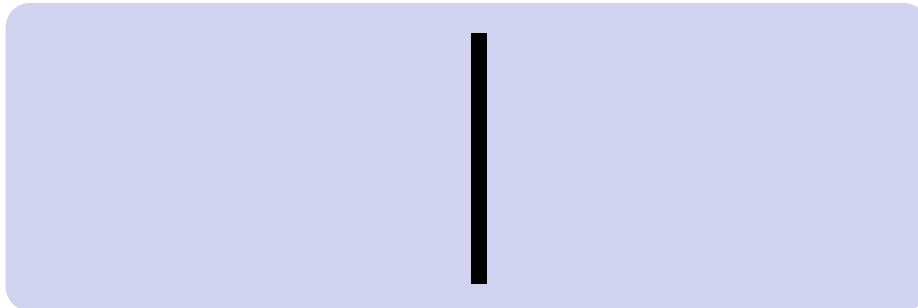
... v gelech



*antigen a protilátka difundují
gelem na podkladě koncentračního
gradientu*



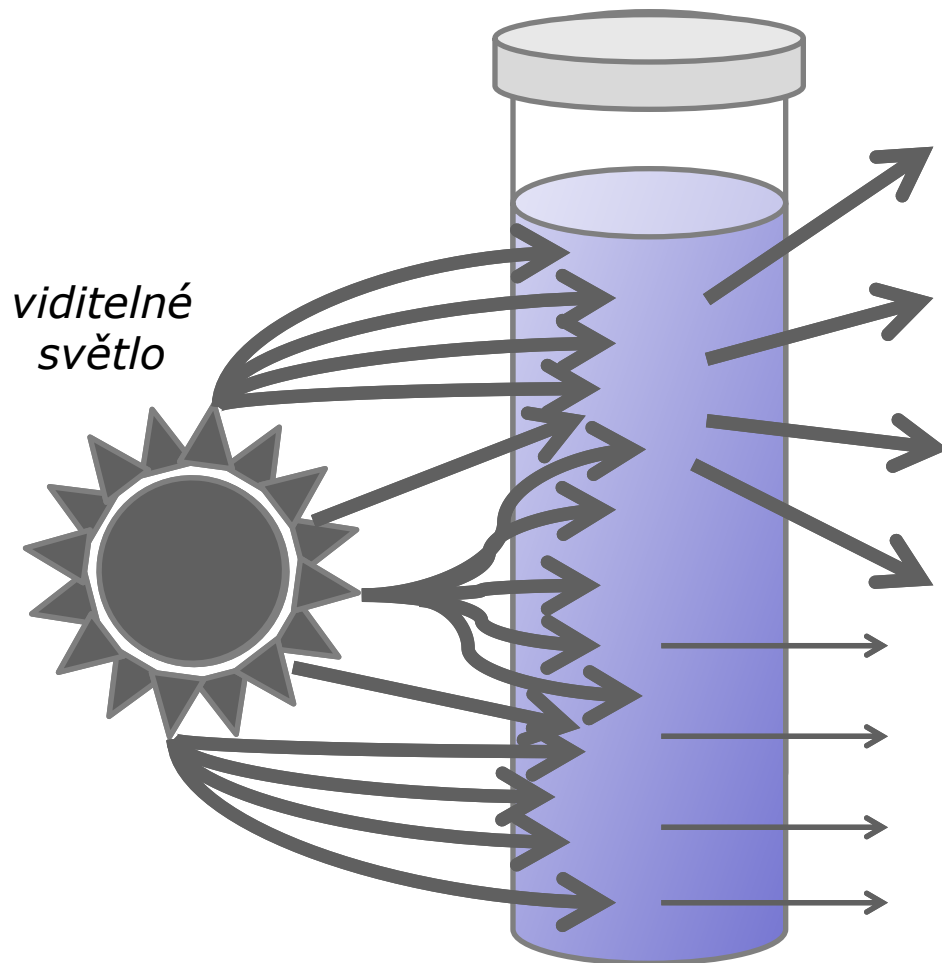
*v místě ekvimolární koncentrace
antigenu a protilátky ...*



*... 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!*

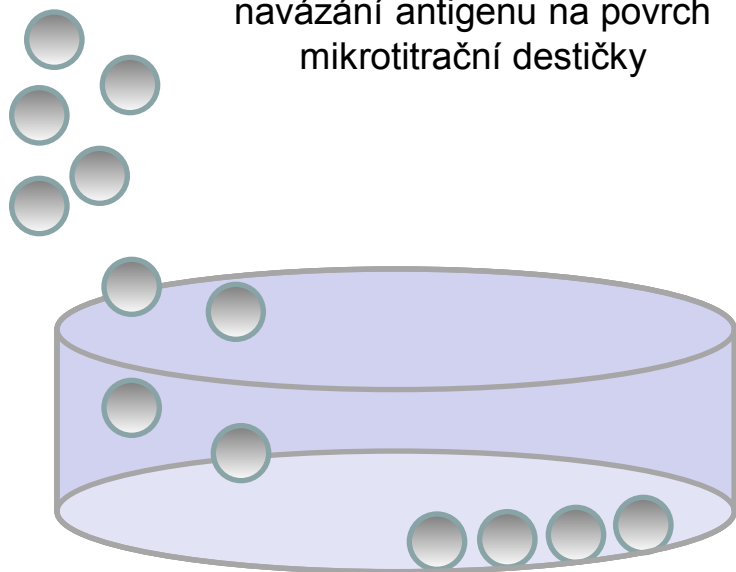
ELISA

enzyme-linked immunosorbent assay **princip reakce**

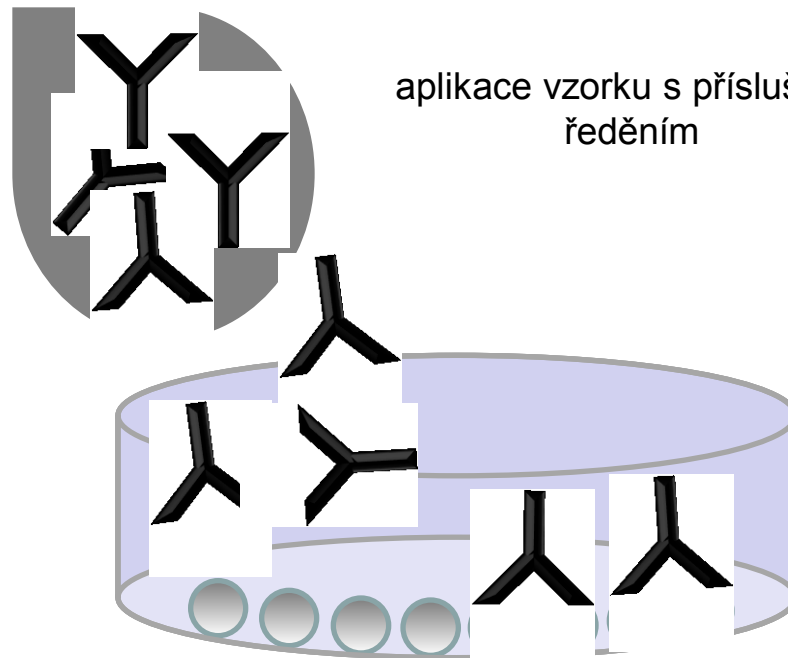
ke zjištění koncentrace antigenu nebo protilátky

- 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 (myši, 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)

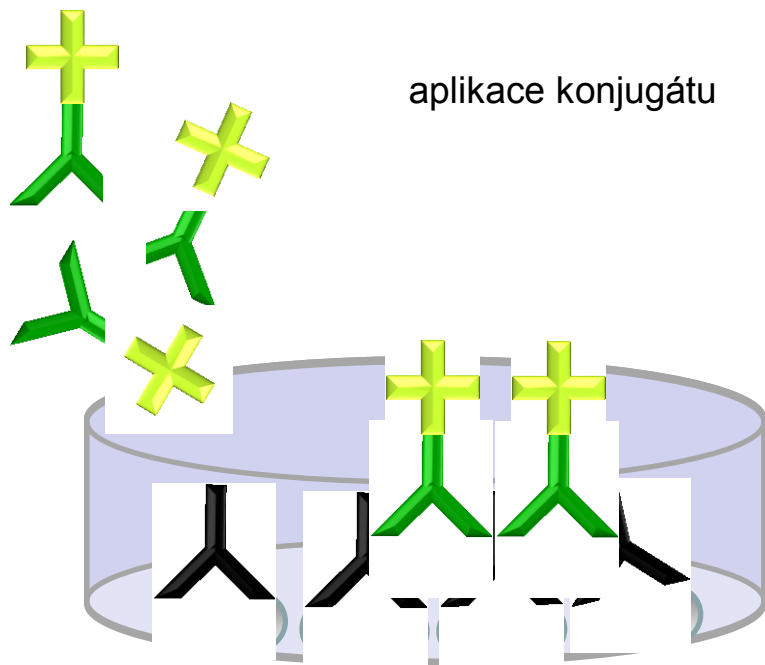
navázání antigenu na povrch
mikrotitrační destičky



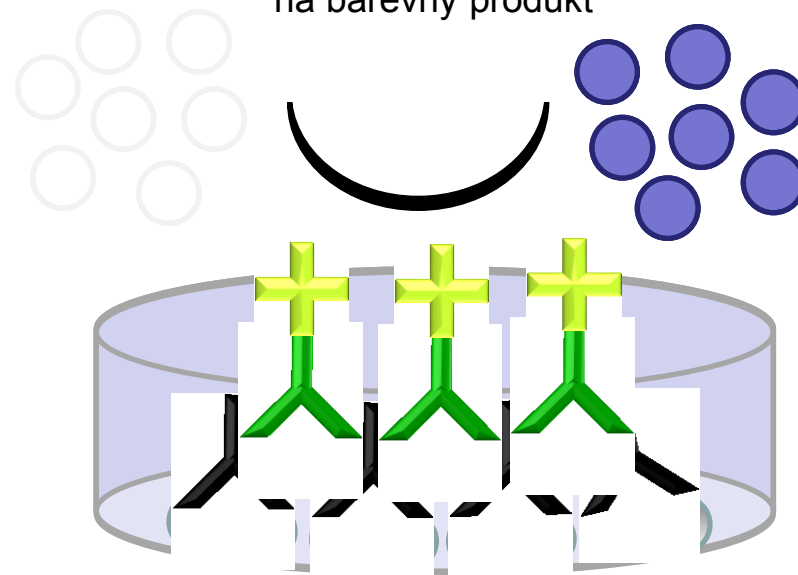
aplikace vzorku s příslušným
ředěním



aplikace konjugátu



enzymatická přeměna substrátu
na barevný produkt



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 flouorchromem)*

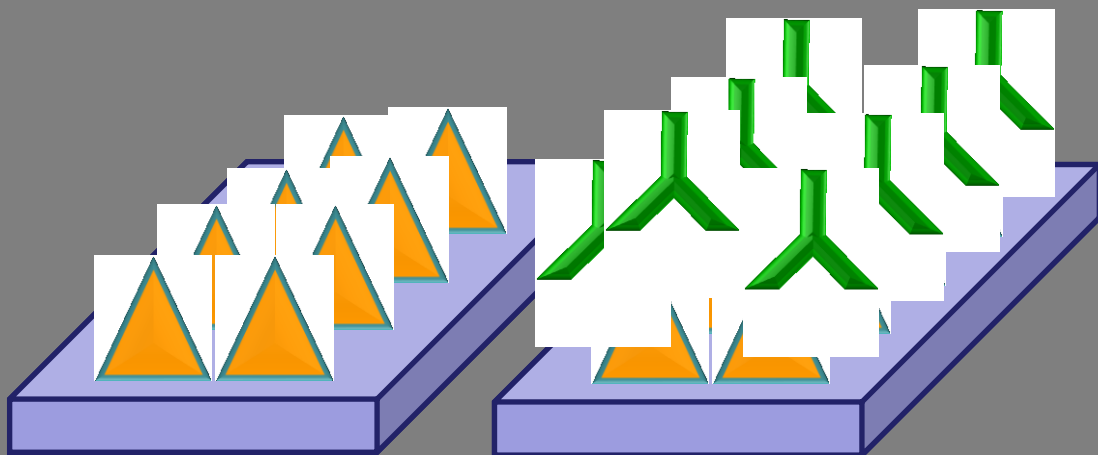
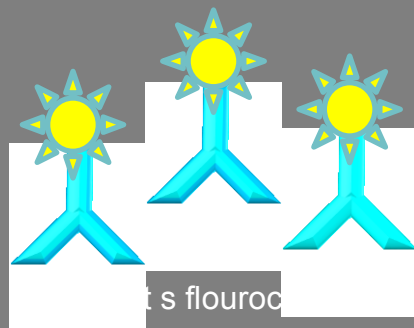
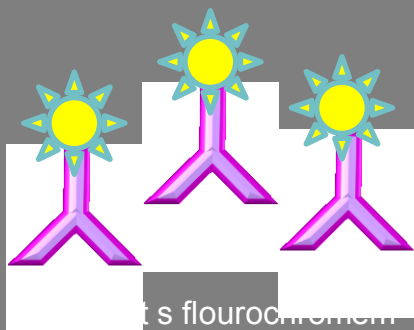
PŘÍMÁ IMUNOFLOURESCENCE

- *detekce přítomnosti **antigenu nebo protilátky ve tkáních** pomocí protilátek značených flouorchromem*
- *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 flouorchromem*
- *detekce přítomnosti autoprotilátek*

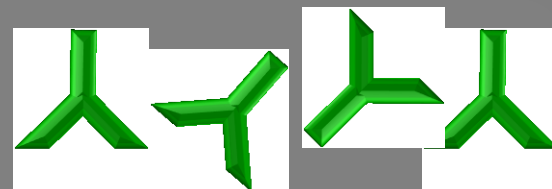
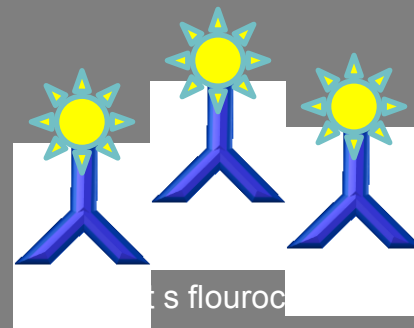
PŘÍMÁ IMUNOFLOURESCENCE



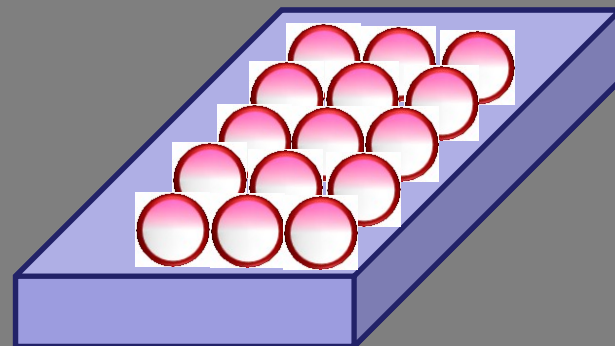
detekce antigenu
ve tkáni pacienta

detekce protilátky
ve tkáni pacienta

NEPŘÍMÁ IMUNOFLOURESCENCE



detekce protilátky v séru pacienta



dárcovská tkáň s antigenem

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*

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 řetěců 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*