

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 dřeň, bronchoalveolární laváž

ODBĚR MATERIÁLU K IMUNOLOGICKÉMU VYŠETŘENÍ

SEROLOGICKÁ VYŠETŘENÍ – proces získávání séra

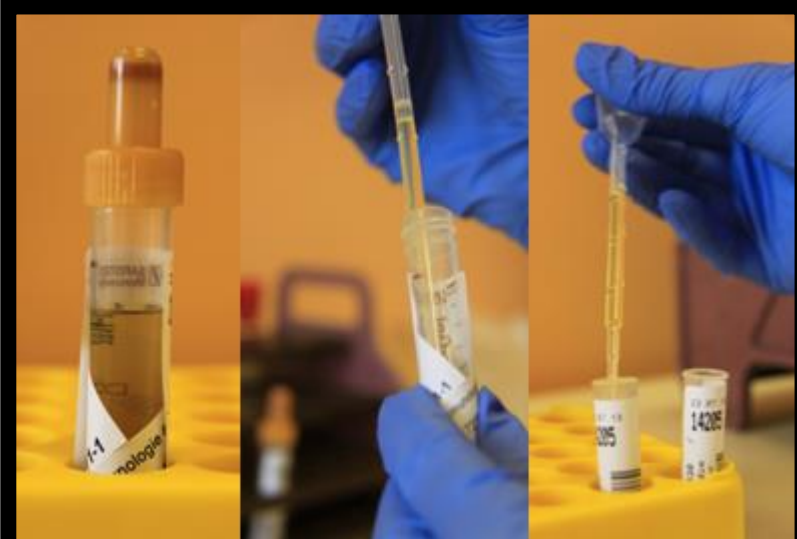
1. odběr venózní srážlivé krve



2. centrifugace



3. přenesení séra do jiné zkumavky



4. uchování séra k dalšímu použití

- 2 týdny při teplotě 4 °C
- měsíce při teplotě -20 °C
- roky při teplotě -80 °C

ODBĚR MATERIÁLU K IMUNOLOGICKÉMU VYŠETŘENÍ

BUNĚČNÁ VYŠETŘENÍ – proces získávání buněk

protisrážlivé činidlo EDTA



protisrážlivé činidlo heparin



*Krev odebranou pro buněčná
vyšetření není většinou
možno skladovat delší dobu.*



*Vyšetření je nutné provést do
několika desítek minut
(vyšetření fagocytárních funkcí)
až několika hodin (vyšetření
počtu a funkce lymfocytů).*

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 (koloidní)**
(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 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 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

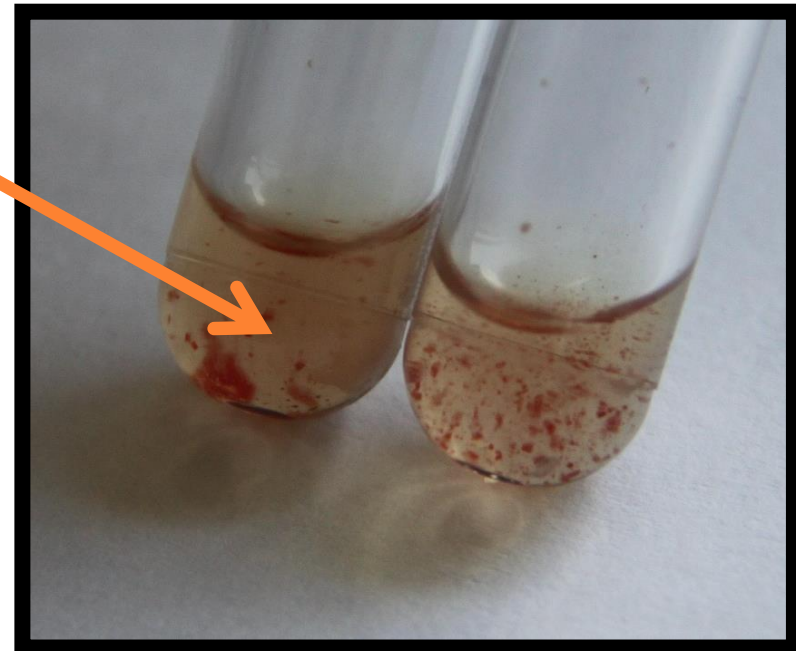
princip reakce

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 ABO (antigen A, antigen B)

skupinový systém Lewis, P a li

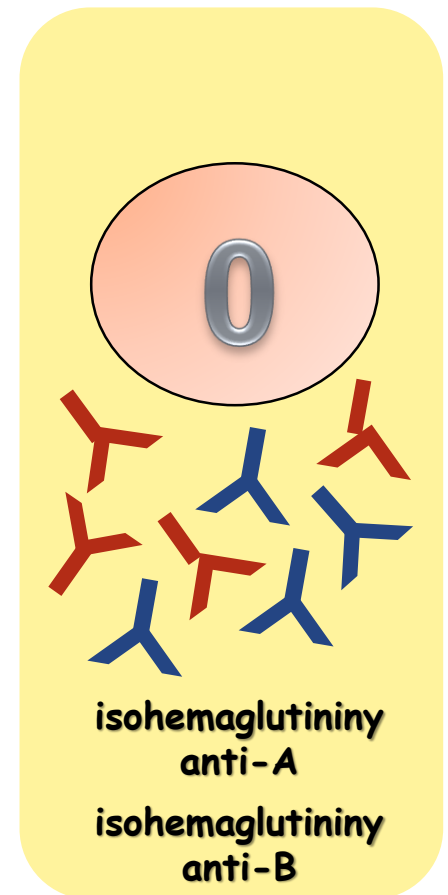
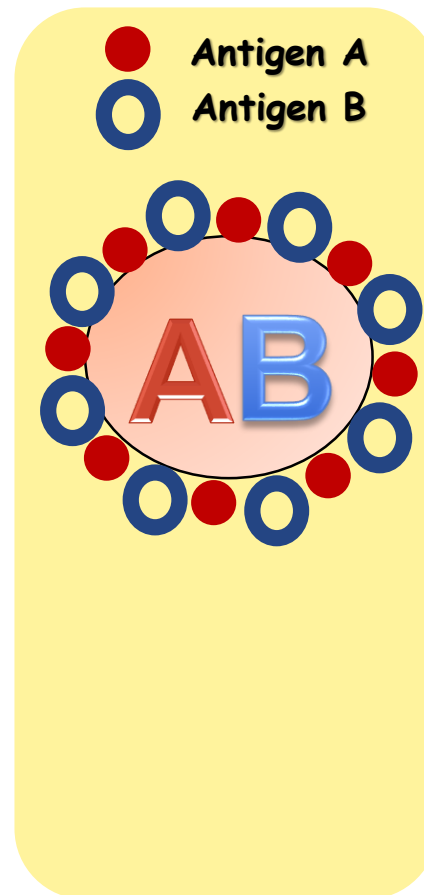
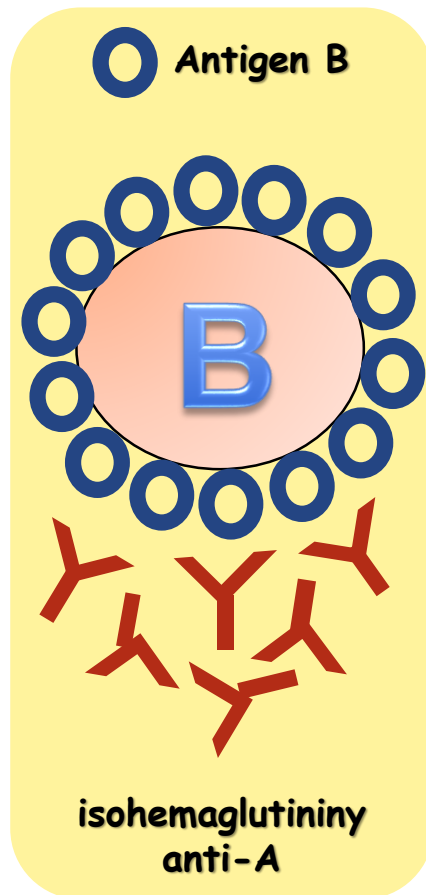
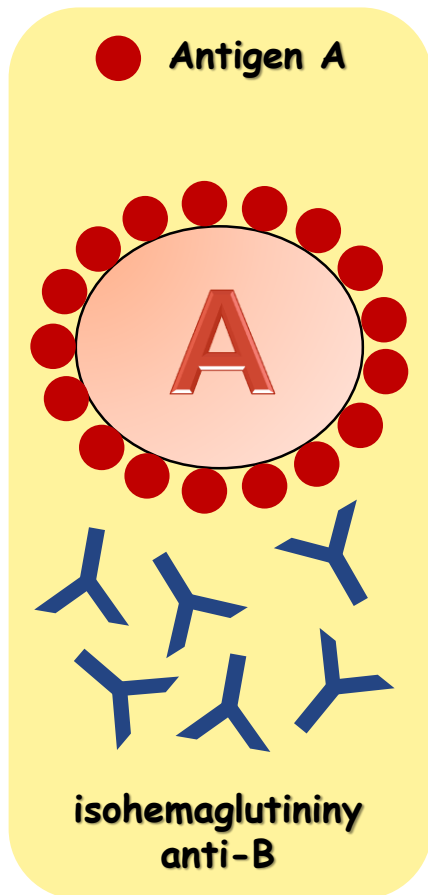
glykoproteinové

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

latexová aglutinace

aglutinační reakce, při které je antigen (při průkazu protilátek) nebo protilátka (při průkazu antigenu) navázán na povrch latexových částic

**příkladem je *latex-fixační test* k průkazu
revmatoidního faktoru (RF)**

- *RF je autoproti látka namířená proti Fc části IgG*
- *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

princip reakce

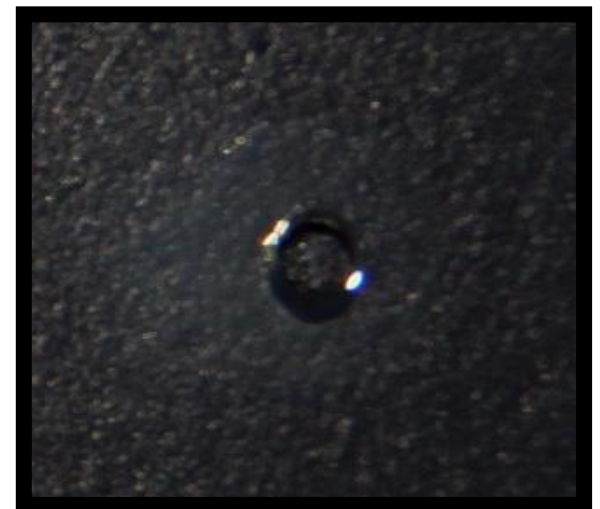
antigen NEKORPUSKULÁRNÍ POVAHY o nízké molekulové hmotnosti

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 

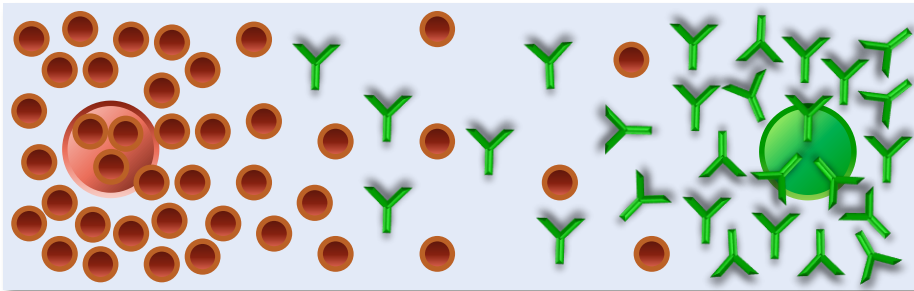
PRECIPITACE PROBÍHÁ ...

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

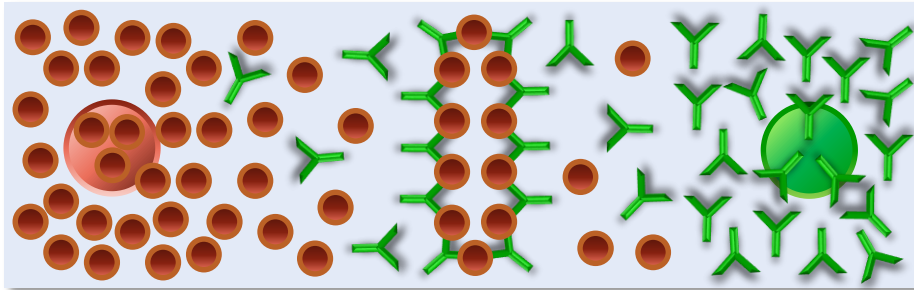


precipitace

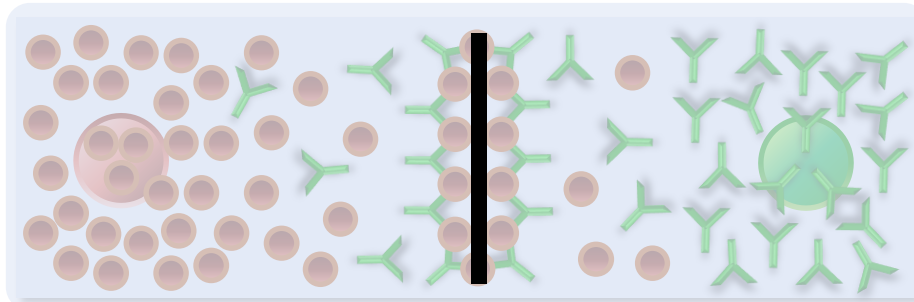
... v gelech



*antigen a protilátka difundují
gelem na podkladě koncentračního
gradientu*



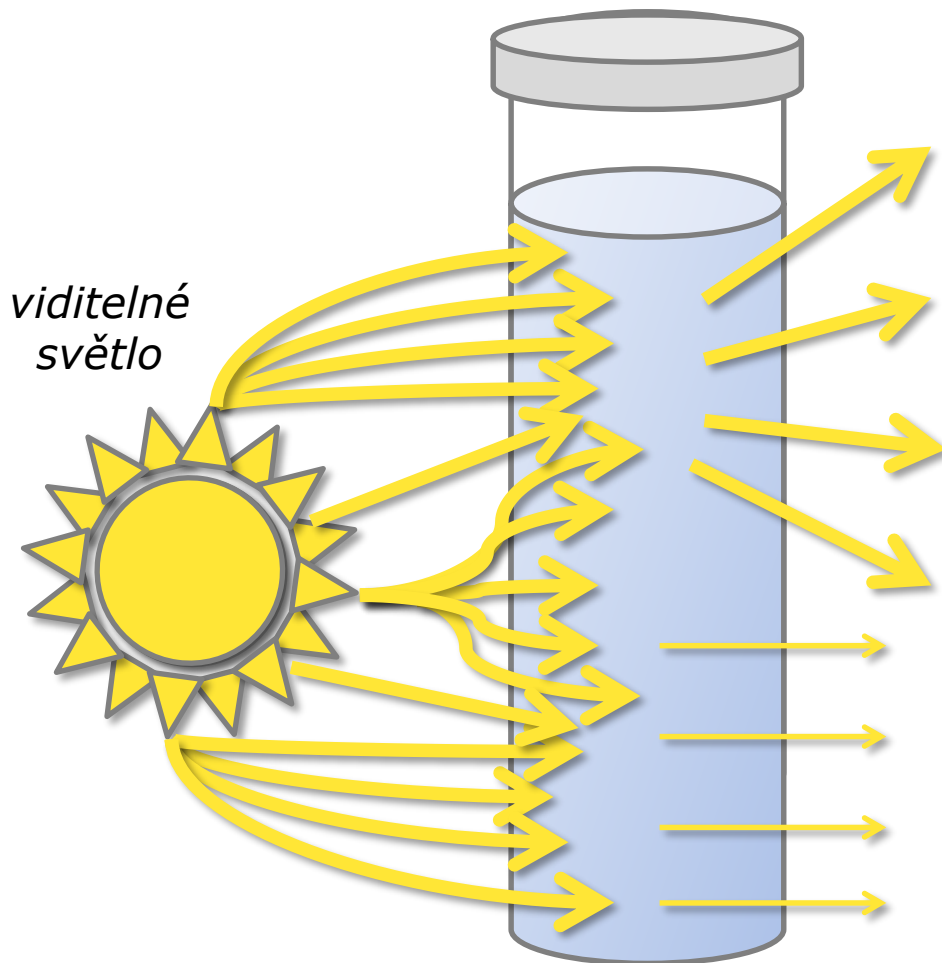
*v místě ekvimolární koncentrace
antigenu a protilátky ...*



*... vzniká **precipitační linie***

precipitace

... v kapalinách



rozptyl světla

NEFELOMETRIE

*měření rozptylu
viditelného světla*

úbytek světla

TURBIDIMETRIE

měření úbytku prošlého světla

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, králičí, ...) 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)

ELISA

enzyme-linked immunosorbent assay

princip reakce

**stanovení IgG protilátek
namířených proti antigenu
na dně mikrotitrační
destičky**

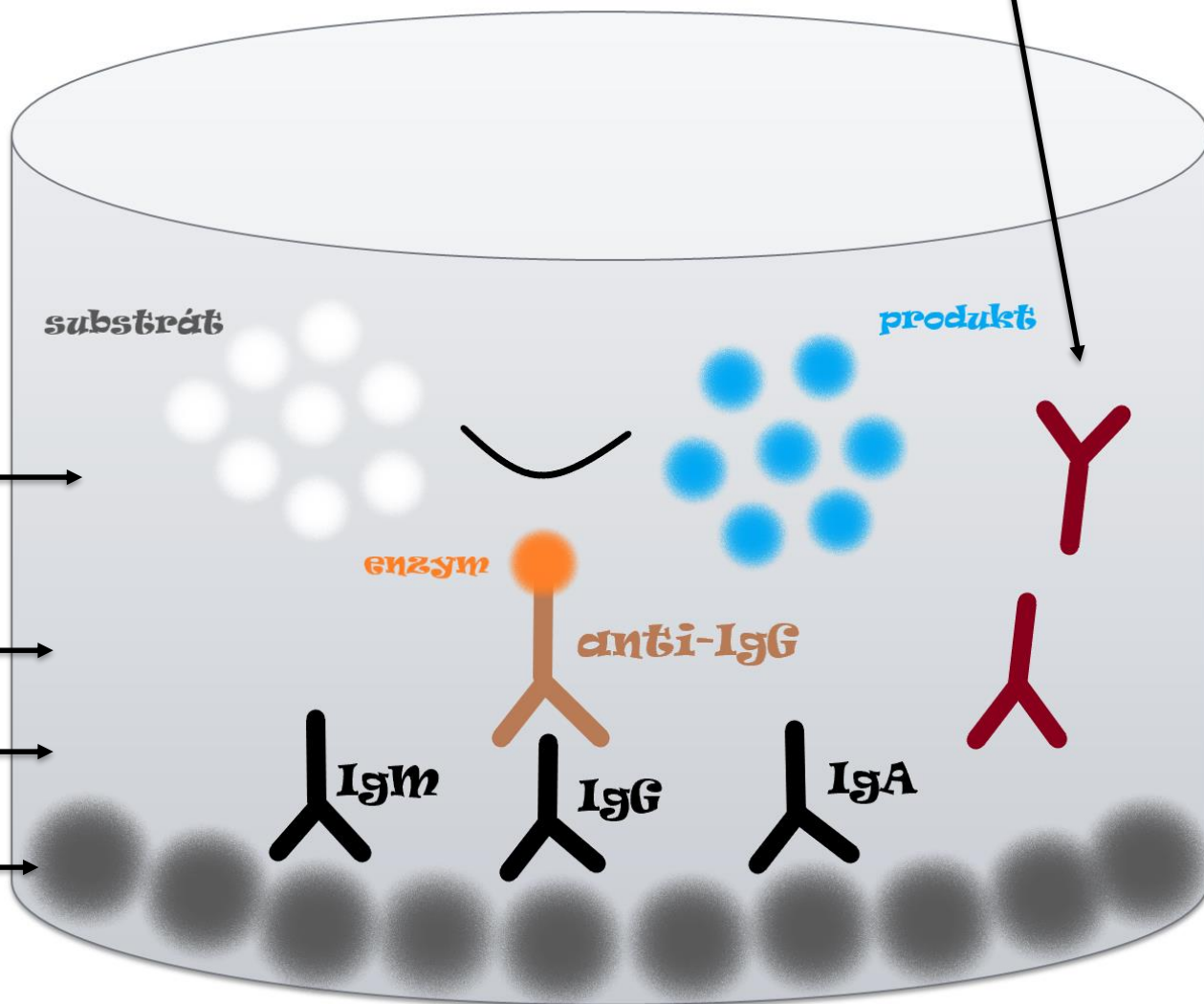
(pokud bychom chtěli stanovit IgA
protilátky (resp. IgM protilátky),
musíme použít konjugát anti-IgA
(resp. anti-IgM))

přeměna bezbarvého substrátu
na barevný produkt

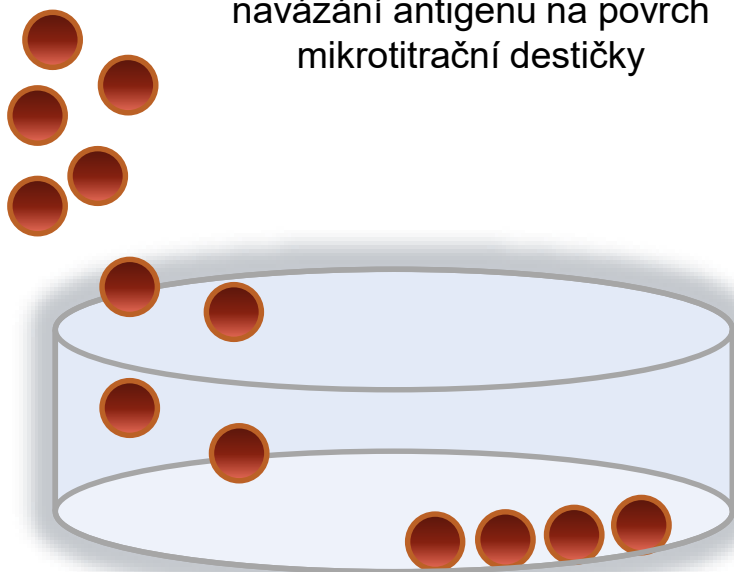
konjugát protilátky namířené
proti IgG značený enzymem

IgG, IgA a IgM protilátky proti
navázanému antigenu

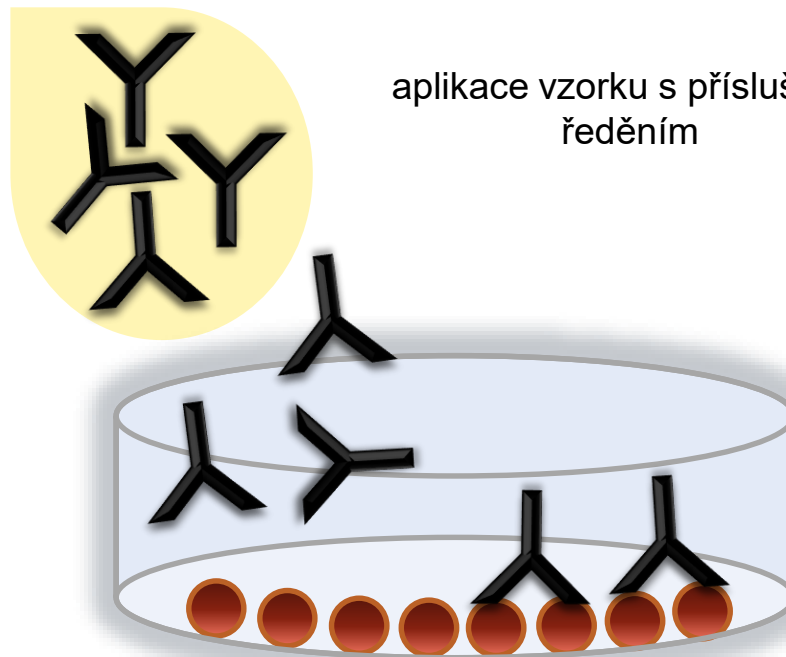
navázaný antigen na dně jamky
mikrotitrační destičky



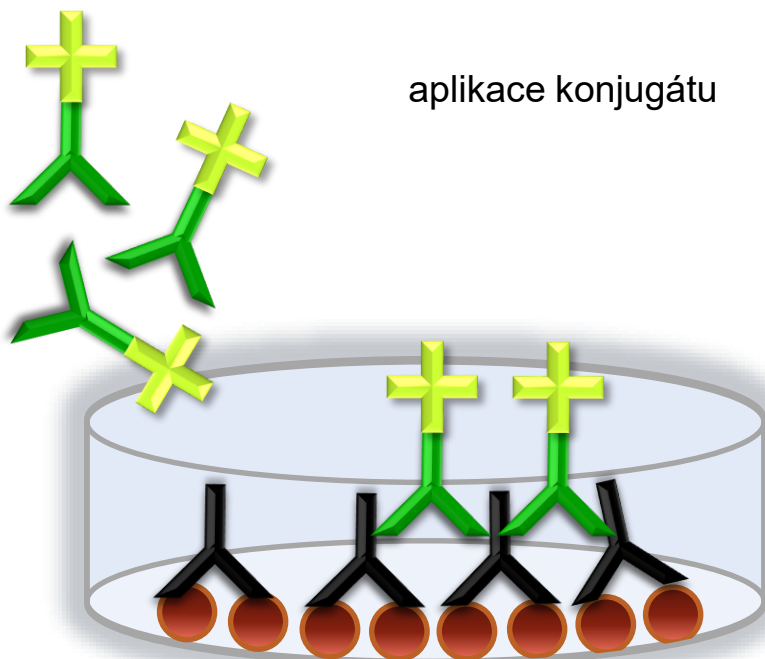
navázání antigenu na povrch
mikrotitrační destičky



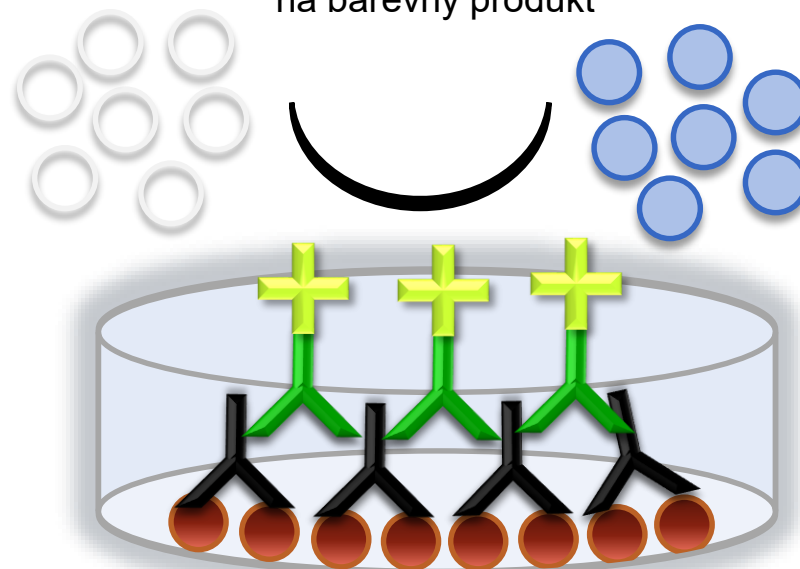
aplikace vzorku s příslušným
ředěním



aplikace konjugátu



enzymatická přeměna substrátu
na barevný produkt



imunofluorescence

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*

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

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*

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

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*