

Imunohistochemické metody

-stanovení Ag či Ab

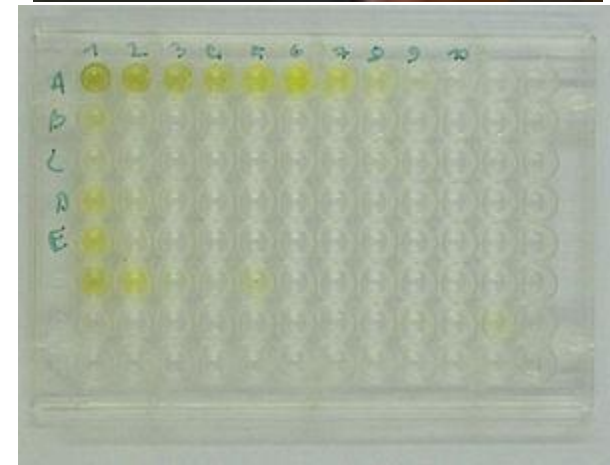
Reakce:

Ag + Ab → IK - *imunokomplex*

- jeden z reaktantů nese značku:

- radioaktivní (RIA)
- fluorescenční (FIA)
- enzymatickou (EIA)

-a další



ELISA (angl. zkratka enzyme-linked immunosorbent assay), známá také jako EIA (angl. zkratka enzyme immunoassay)

je analytická metoda využívaná ke kvantitativnímu stanovení různých antigenů/Ab.

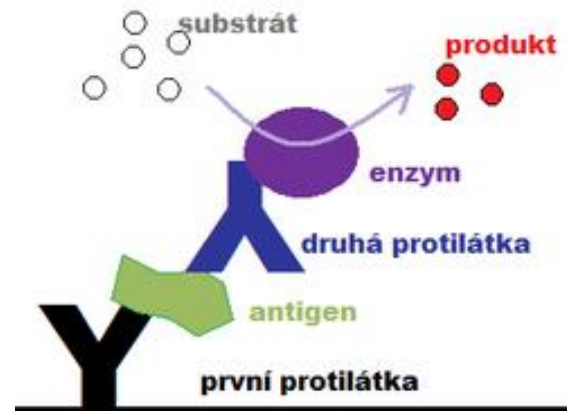
Tato metoda má řadu variant.

Všechny jsou založeny na vysoce specifické interakci antigenu a protilátky, přičemž na jednoho z těchto partnerů je kovalentně navázán enzym (nejčastěji peroxidáza nebo alkalická fosfatáza).

Enzym katalyzuje chemickou přeměnu substrátu, který je přidán do reakční směsi, na produkt, který je barevný. Stanovuje se pak spektrofotometricky (viz chromogenní substrát), nebo na základě fluorescence (fluorimetrické stanovení). Koncentrace produktu je úměrná koncentraci antigenu nebo protilátky ve vzorku.

Dalším společným znakem metod ELISA je zakotvení (adsorpce nebo kovalentní navázání) antigenu nebo protilátky na nerozpustný nosič (často povrch reakční nádoby nebo mikrotitrační destičky), což usnadňuje separaci imunochemicky navázaných molekul.

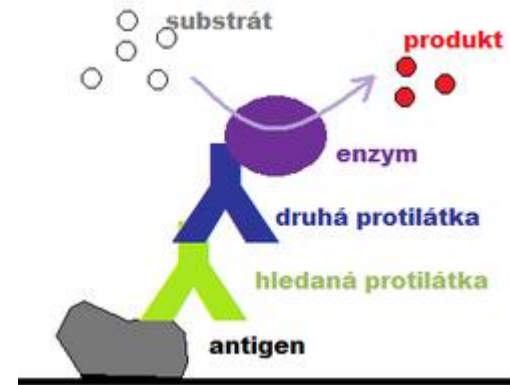
Sendvičová ELISA



A: Standardní **sendvičová ELISA** na zjištění koncentrace **antigenu:**

1. navázání protilátky na dno zkušavky
 2. přidání vzorku a inkubace - dochází ke vzniku vazby **antigen-protilátka**
 3. odmytí nenavázaného antigenu
 4. přidání druhé protilátky, vázající stejný antigen, na které je kovalentně připojen **enzym**
 5. inkubace a odmytí nadbytečné protilátky s enzymem
 6. přidání substrátu a průběh **enzymem katalyzované reakce**
 7. zastavení reakce a měření
- Jako *sendvičová* se nazývá proto, že antigen je jako sendvič mezi dvěma protilátkami.

capture ELISA



B: Obdobně lze reakci provést na detekci protilátek ve vzorku. To probíhá obdobně, jen je v 1. kroku navázán na zkumavku antigen a druhá protilátka je proti hledané protilátce. Tato metoda se označuje jako capture ELISA.

EIA, IMUNOENZYMOVÉ METODY

- **Podstata:** tyto metody pracují také s antigenem a protilátkou, které však stanovují na základě označení jednoho z reaktantů enzymem.
- **Výhody:** ekonomičtější (levnější než RIA), časově méně náročná, citlivost (např. Ag s Mr 10 000 lze určovat už při koncentraci 10pg/ml, 10⁻¹² mol/l), vysoká specifita). Jsou vhodné pro automatizaci a vyhodnocení přes počítač, bezpečnější, delší doba expirace, lepší kontrolovatelnost reakce

Dělení EIA:

podle toho, zda aktivita enzymu v konjugátu zůstane nezměněná nebo jestli se změní, oddělování složek

- **homogenní EIA:** katalytická aktivita v konjugátu (AgE, HE) ve vazbě (po vazbě) s Ab se mění

- **heterogenní EIA:** katalytická aktivita v konjugátu s Ab se nemění

Homogenní EIA (– enzyme immunoassay technique):

- při této metodě se nemusí oddělovat volný reaktant od reaktantu vázaného v imunokomplexu – metoda má 1 krok → je homogenní
- enzymová aktivita konjugátu se po vazbě na Ab může snížit nebo zvýšit
- **Princip:** enzymová aktivita volného konjugátu enzymu je jiná než aktivita komplexu konjugát-protilátka (v případě AgE, HE).

- Necháme-li zreagovat směs známého z_n množství enzymem značeného haptenu (AgE, HE) a neznámého množství neoznačeného haptenu (Ag, H) s limitovaným množstvím Ab, aktivita enzymu je přímo úměrná množství konjugátu navázaného na protilátku.



limit.množ.

aktivita E je úměrná

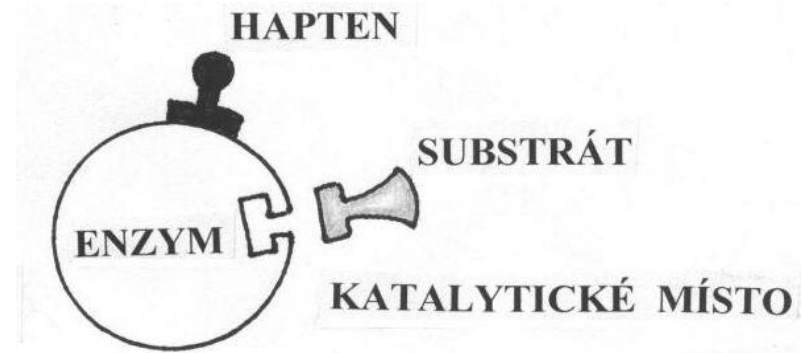
množství konjugátu navázaného na Ab

Schéma homogenní EIA

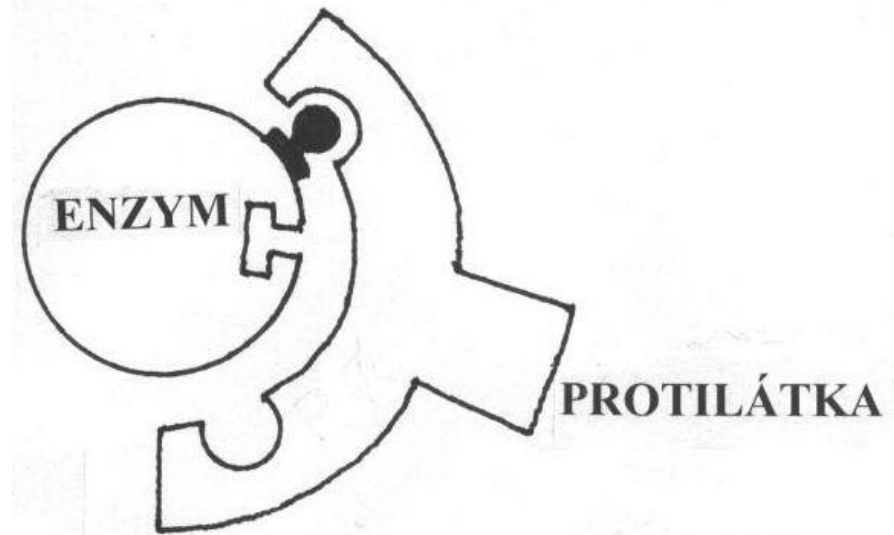
-varianty reaktivity a nereaktivity

A) Enzymová aktivita konjugátu po vazbě na Ab se inhibuje:

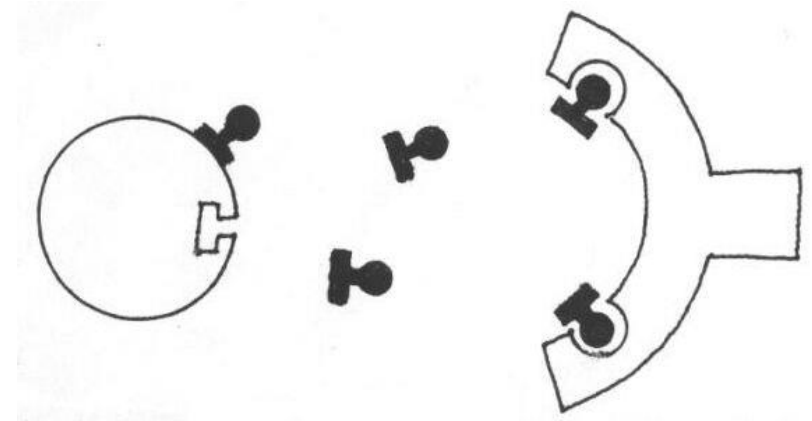
- substrát se může vázat na katalytické místo enzymu a lze tuto aktivitu měřit



■ protilátka se navázala na konjugát E + H. Zabránila tak přístupu substrátu ke katalytickému místu enzymu. E aktivitu nelze měřit (inhibice).

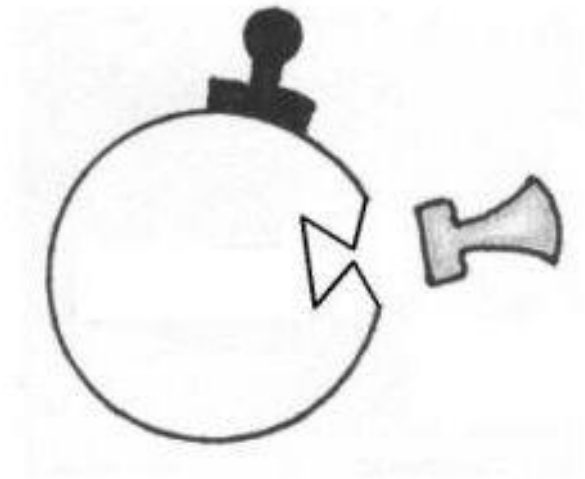


- Přidaný volný H vytěsňuje z vazbových míst protilátky konjugát EH a tím se uvolní katalytické místo pro S a Enzymová aktivita se obnoví



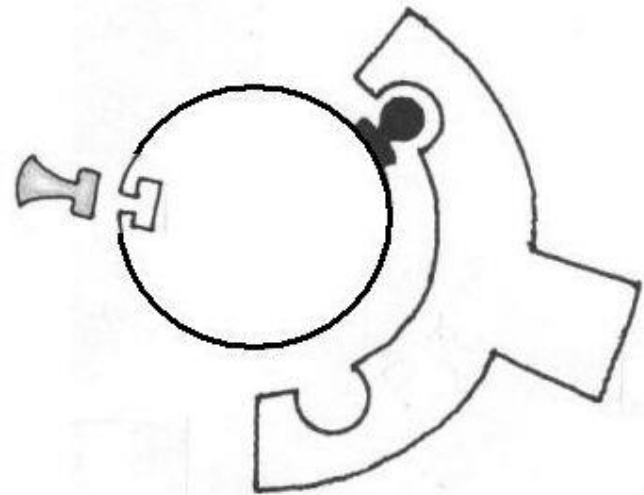
B) Enzymová aktivita konjugátu po vazbě na Ab se aktivuje

- substrát se nemůže navázat na katalytické místo enzymu, neboť vazbou H vznikly v molekule enzymu také konformační změny, které znemožňují vazbu. E aktivita je neměřitelná.



EH + S → nereaktivita

Vazbou haptenu na Ab vznikly opět konformační změny, které umožňují přístup substrátu ke katalytickému místu. E aktivita je měřitelná.



$\text{EH} + \text{S} + \text{Ab} \rightarrow \text{aktivita se obnoví}$

Další vlastnosti homogenní EIA

- Použitý enzym: lysozym, malátdehydrogenáza, glukózo-6-fosfátdehydrogenáza.
- Použití: na kvantitativní stanovení především nízkomolekulárních látek (haptenu), např. určení koncentrace antibiotik, omamných látek, hypnotik, sedativ, kardiotonik, cytostatik a hormonů jako tyrozin, trijódtyronin, kortizol aj.
- Výhoda: jednoduchost, rychlost (trvá několik minut) – heterogenní trvá několik hodin.
- Nevýhoda: nižší citlivost, složitá příprava reagensů

Heterogenní EIA

- Zde se musí oddělit volný reaktant od značeného reaktantu vázaného v komplexu s Ab. Technika je dvoustupňová – heterogenní.
- **Způsob oddělení:**
 1. precipitací imunokomplexů polyetylenglykolem
 2. pomocí druhé – sekundární Ab
 3. **nejčastější:** imobilizací jedné z dvojic reaktantů navázáním na tuhý nosič (stěna zkumavky, jamka destičky). Oddělení volné a vázané označené složky se uskutečňuje promytím. Jde o princip immunoabsorbentové analýzy = ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY = ELISA
- **Požadované vlastnosti enzymů:** malá Mr, vysoká stabilita a enzymová aktivita, kovalentní vazba na Ab, hapteny, Ag, produkt enzymové reakce musí být dostatečně barevný či jinak detekovatelný, levný, dostupný.
- **Používané enzymy:** peroxidáza (křenuvová), alkalická fosfatáza, β -D-galaktozidáza

Základní složky systému ELISA

- **Imunosorbční povrch (pevná fáze):** používá se upravený polystyrén ve formě mikrotitračních destiček, kuliček, hřebenů, pruhů. Důležitá je vhodná polymerizační teplota a délka polymerizace. Při přehnaně vysokých sorbčních vlastnostech by docházelo k navázání nežádoucích látek, a tím ke snížení citlivosti a specifity reakce. Při nízkých sorbčních vlastnostech by nezabezpečovalo dostatečně souvislý a stabilní imunosorbční povrch (nestabilita a nespolehlivost systému vede k snížení citlivosti a reprodukovatelnosti). Používá se koncentrace 1 – 10mikrogramů/ml proteinu v karbonátovém pufru o urč. pH

Imobilizace antigenu na pevný nosič

Antigen se váže pasivní adsorpcí, proces se nazývá coating-koutování

Používají se destičky s plochým dnem kvůli fotometrickému stanovení

- **Vazba proteinů je ovlivněna:** kapacitou adsorpce, povahou proteinů, teplotou a pH vazebného roztoku, dobou adsorpce a koncentrací vazebného proteinu
- **Promývání**-účelem je oddělit navázané a nenavázané reagenty, promývá se 3x, nesmí vzniknout bubliny-brání kontaktu promývacího roztoku s povrchem buněk
- **Blokování**- k eliminaci nespecifických vazeb mezi proteiny a volnými vazebnými místy, blokovací roztoky obsahují: hovězí sérový albumin nebo kasein, želatina, sušené mléko atd
- **Konjugát:** specifická Ab (mono- nebo polyklonální) s vhodným navázaným enzymem. Ten pak reaguje se substrátem a vytváří v přítomnosti vhodného chromogenu dostatečně intenzivní barevnou reakci.
- **Zastavení reakce:** v době, kdy se vztah mezi enzymem, substrátem a produktem nachází v lineární fázi silnou kyselinou či zásadou. Způsobí denaturaci enzymů. Přidáním zastavovacího roztoku se mění absorpční spektrum produktu

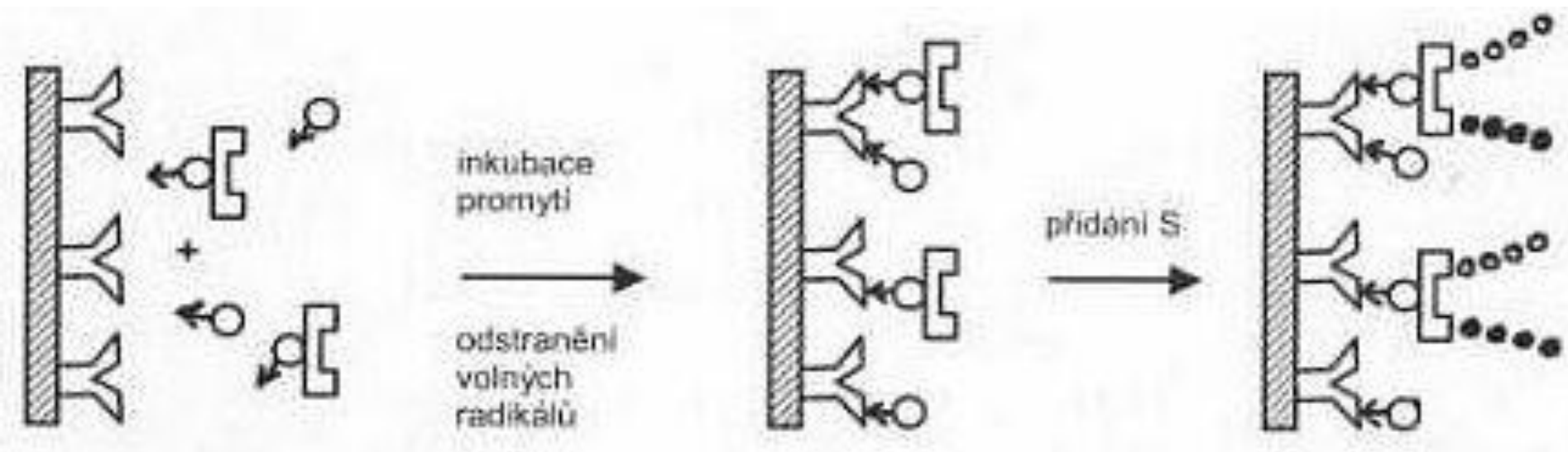
- **Substrát:** při použití konjugátu s peroxidázou jako chromogen slouží (ortofenylén- diamin hydrochlorid = OPD, kyselina aminosalicyllová, atd) které v přítomnosti peroxidu vodíku jako substrátu – katalyzátoru vyvolají barevnou reakci.
- **Přístroje:** ELISA – reader je spektrofotometr upravený na odečítání absorbance v reakčních jamkách. Filtry jsou nastavené s volitelnou vlnovou délkou optimální pro určitý ELISA systém (obvykle mezi 405 až 570 nm) v závislosti na typu použitého konjugátu a substrátovo - chromogenním roztoku.

Hodnocení a standardizace testů

- Nesledujeme absolutní hodnotu absorbance, ale její přírůstek k blanku
- Vzorky můžeme testovat kvalitativním i kvantitativním způsobem
- Kvalitativní: je třeba znát pozitivní, negativní kontroly a hraniční hodnotu (cut off). Za pozitivní lze považovat hodnoty statisticky odlišitelné od vzorku s nulovou koncentrací vyšetřovaného agens.
- V praxi se hraniční vzorek stanoví vyšetřením několika desítek hraničních kontrol, 1. pak se uvažuje hodnota $X + 3sd$ (X je hodnota negativní kontroly) (sd směrodatná odchylka), 2. neg. kontrola se násobí číslem 2,1
- 3. Hodnoty se vloží do grafu a vypočítají se intervaly podle průměru hodnot
- Kvantitativní: využívají se kalibrační křivky vzorku. Vzorek je nutné vyšetřovat ve dvou nebo více zředěních, aby bylo jisté, že se koncentrace Ag ve vzorku nachází v oblasti kalibrační křivky.

- **Typy ELISA:**
- kompetitivní ELISA pro Ag nebo hapteny
- sendvičová ELISA pro Ag (kompetitivní a nekompetitivní)
- nepřímá ELISA pro Ag
- sendvičová ELISA pro Ab = nepřímá pro Ab
- ELISA pro zachycení IgM
- **Použití:**
- při průkazu neinfekčních Ag – hormony -inzulin, α -fetoprotein
- Stanovení autoprotilátek
- Průkaz virů, bakterií a parazitických nákaz
- Při diagnostice onemocnění vyvolaných obtížně kultivovatelnými původci (viry hepatitidy, borrelie, mykoplazmata atd.)

Kompetitivní ELISA pro Ag a nebo hapteny – stanovení Ag



Na tuhou látku se naváže Ab specifická pro Ag, který se má stanovit

Pak se přidá známé množství enzymem značeného Ag (AgE) a buď známé (standardní) množství nebo neznámé (analyzované) množství neoznačeného Ag (Ag)

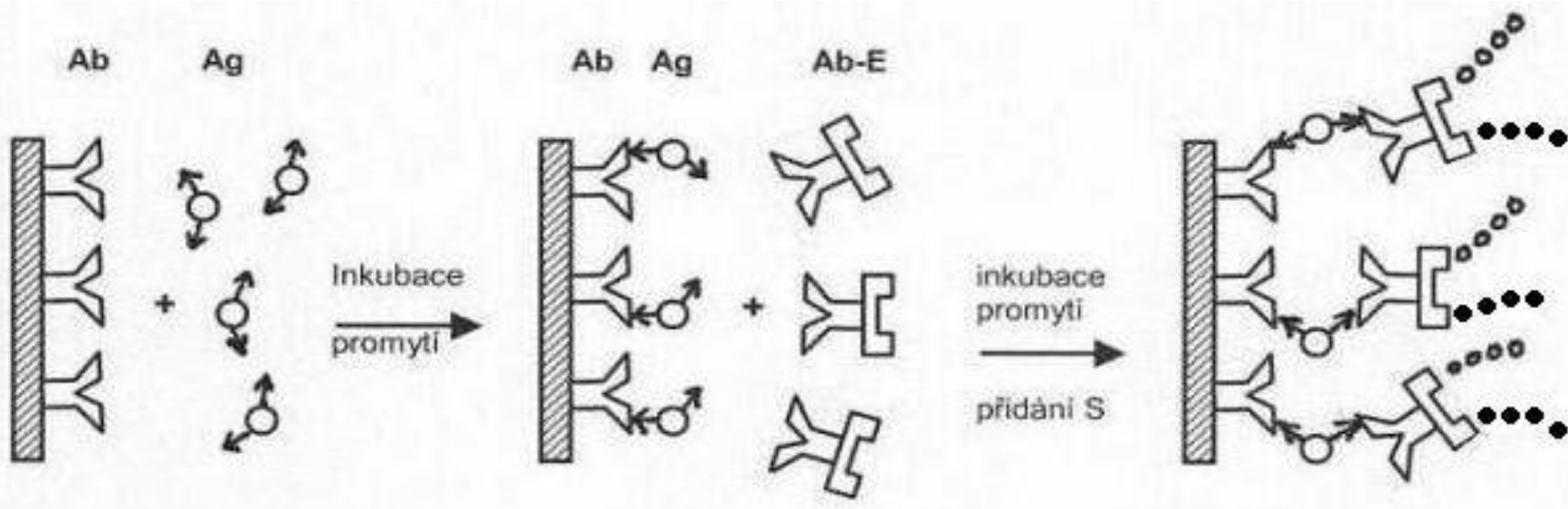
V průběhu inkubace soutěží značený s neoznačeným (standardním či zkoumaným) Ag. Po promytí zůstávají jen Ag vázané na Ab.

Pak se přidá roztok substrátu, který enzym přítomný v imunokomplexech rozloží za vzniku barevného produktu

Legenda:

- Intenzita (absorbance) zbarvení roztoku s produktem enzymové reakce se měří spektrofotometricky. Z hodnot absorbancí naměřených v jamkách se známým (standardním) množstvím Ag se sestrojí analytická čára (kalibrační křivka), pomocí které se určí koncentrace analyzovaných roztoků Ag.
- **Použití:** na kvantitativní stanovení nízko- i vysokomolekulárních látek (stanovení hormonů: tyrozin, trijódtyrozin, prolakton, inzulin atd, léků: teofylin, dioxin aj., a proteinů: IgE, AFP alfa fetoprotein, CEA cefalosporin A)

Sendvičová ELISA pro antigeny



Na tuhou fázi se naváže Ab.

Na ni se potom navazuje známé nebo neznámé množství antigenu. Promytí.

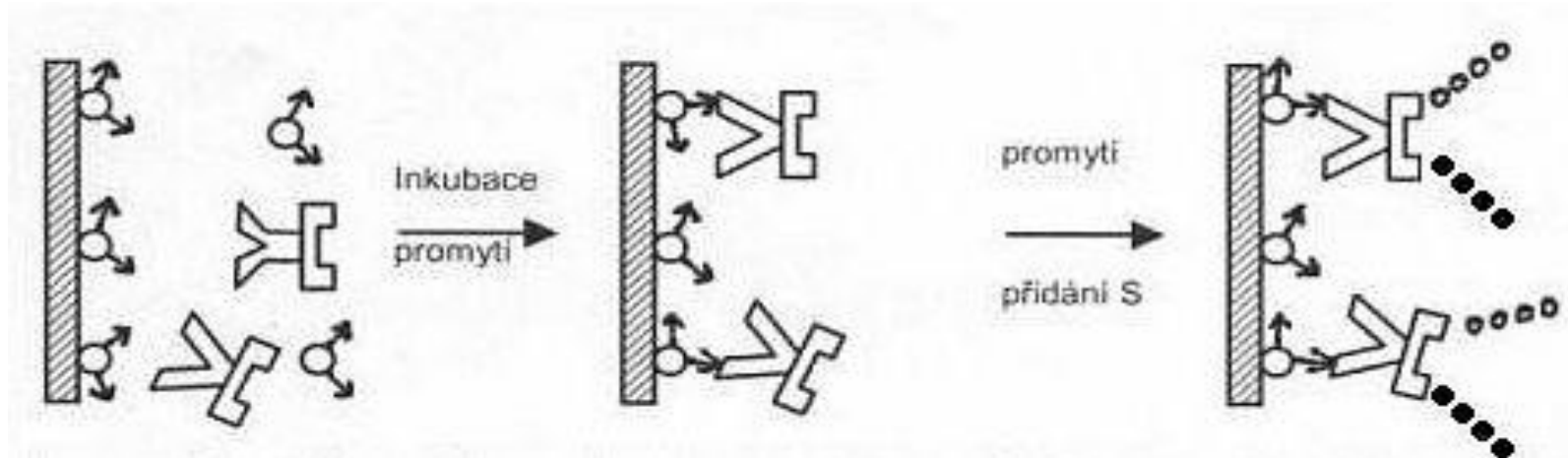
Přidá se volná enzymem značená Ab, která reaguje s volnými hapteny antigenu imobilizovaného vazbou do komplexu s Ab. Inkubace, promytí, přidání S.

Přidá se substrát na detekci enzymové aktivity.

Legenda:

- Z naměřených hodnot standardních vzorků se sestrojí analytická čára (kalibrační křivka), podle které se vyhodnotí vzorky s neznámou koncentrací zkoumaného Ag.
- **Výhoda:** nemusí být k dispozici značený čistý Ag. Stačí jen standardní Ag třeba i ve složité směsi jiných Ag (například lidské sérum). Musí v něm však být přesně známý obsah analyzovaného Ag. Ab se může označovat enzymem vždy tou stejnou konjugační reakcí.
- **Nutnost:** obě Ab musí mít stejnou specifickost. Ag musí mít nejméně 2 determinanty (reagují s ním 2 molekuly Ab).

Nepřímá ELISA pro antigeny, (kompetitivní), určení % inhibice



Ag se naváže na tuhou fázi a reakční prostor se promyje. Pokud jde o malý Ag, naváže se předem na větší nosič, např. BSA.

Zkoumaný roztok, ve kterém se předpokládá přítomnost Ag, se míchá se specificky značenou Ab a směs se inkubuje s imobilizovaným Ag.

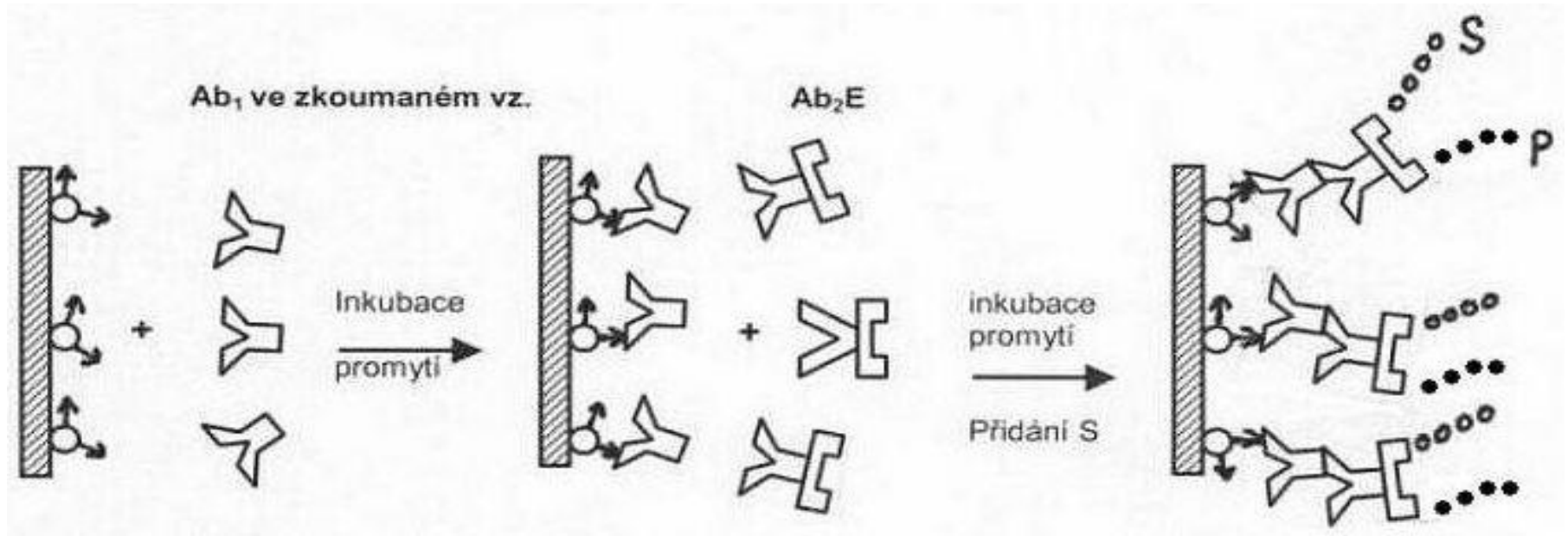
Inkubace, promytí a přidání substrátu, čímž se vyvolá barevná reakce.

Legenda:

- Rozdíl naměřené absorbance ve vzorku s volným Ag a v kontrolní jamce (bez volného Ag) určuje množství Ag ve zkoumaném vzorku. Je to kompetitivní ELISA, ve které o vazbová místa Ab soutěží Ag ve zkoumaném vzorku (volný) a Ag imobilizovaný. Čím víc Ag bude ve vzorku, tím méně Ab se může navázat na imobilizovaný Ag a tím menší barevná intenzita bude v reakčním roztoku. Nejvíce zbarvený roztok bude v kontrolní jamce, kde reakční směs neobsahovala volný Ag.
 - **Modifikace:** místo označené Ab se použije neoznačená Ab (např. králičí IgG) a imobilizované Ag se detekují pomocí označeného Ig ve funkci sekundární Ab (např. prasečího IgG proti králičímu IgG).
- Ag + (sérum+Ag) + AbE + S → barevná reakce
- virus + (IgG + Ag) + anti IgGE + S → barevná reakce
- **Výhoda:** možnost použití komerčně dostupné označené Ab.

Sendvičová ELISA pro protilátky

Neboli nepřímá ELISA na detekci Ab – slouží na důkaz neboli titraci Ab specifických pro určitý Ag. Použití: na titraci Ab třídy IgG + IgM.



Antigen se naváže na tuhou fázi a promyje.

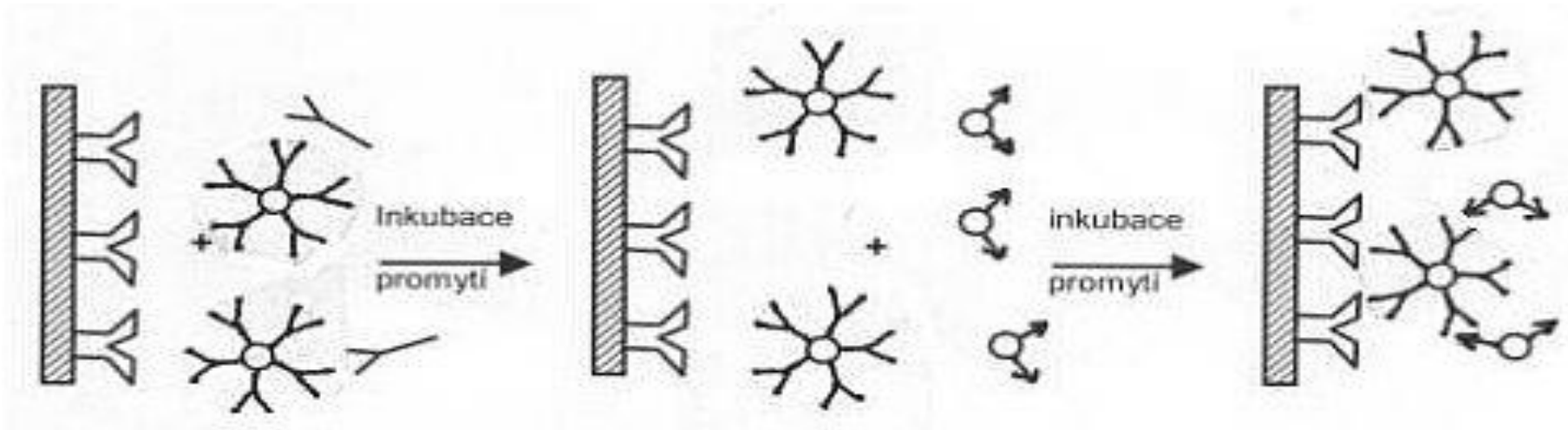
Přidá se zředěné sérum, ve kterém se má určit přítomnost Ab.

Inkubace, promytí – přitom dochází k navázání na imobilizované Ag

Přidá se enzymem značená sekundární Ab, promytí

Přidá se enzymový substrát a změří se intenzita barevné reakce.

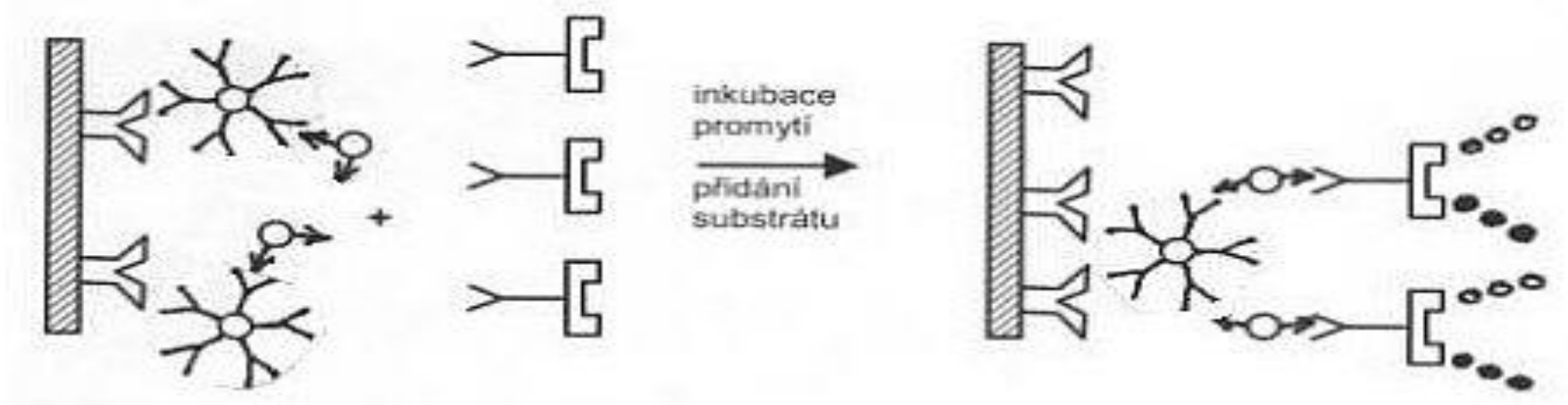
ELISA na zachycení protilátek IgM



Na tuhou fázi se naváží anti-IgM Ab

A tou se z vyšetřované ho séra vychytá IgM.

Přidá se roztok antigenu, který se naváže na ty imobilizované Ig, které mají pro ně specifické vazbové místo, promytí



Přidá se specificky značená Ab proti Ag. Inkubace, promytí

Aplikací substrátu se vyvolá barevná reakce. Její intezita je úměrná množství antigenně specifického IgM imobilizovaného v druhém kroku metody.

V praxi použití: na důkaz Ab proti některým virovým Ag, např. proti viru hepatitidy A.