

# Metody stanovení protilátek

# Metody

- Stanovení protilátek - základní imunologická vyšetření.
- stanovení kvantitativní, kvalitativní a stanovení specifických protilátek
- Metody: Imunodifúze - radiální ID

Aglutinace

RIA? FIA, EIA – ELISA

Western blot

Nefelometrie, turbidimetrie

Fyziologické hodnoty množství protilátek v séru u člověka:

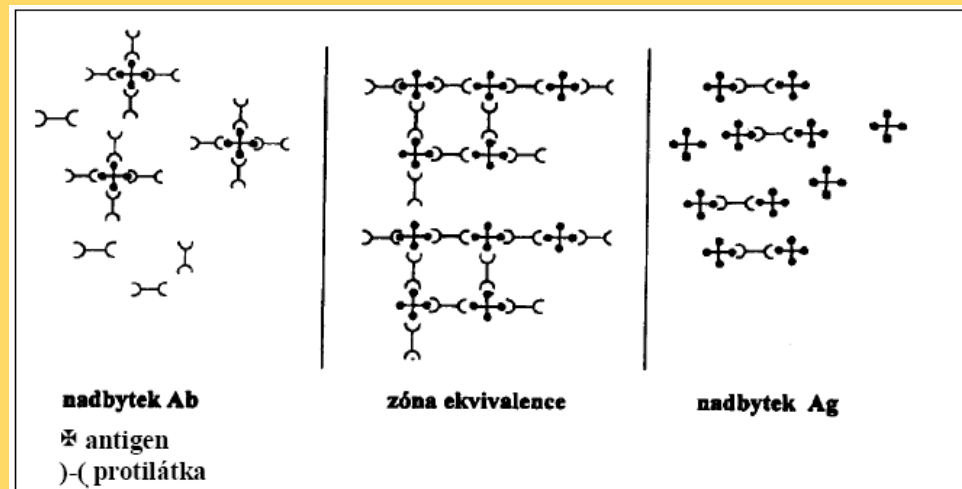
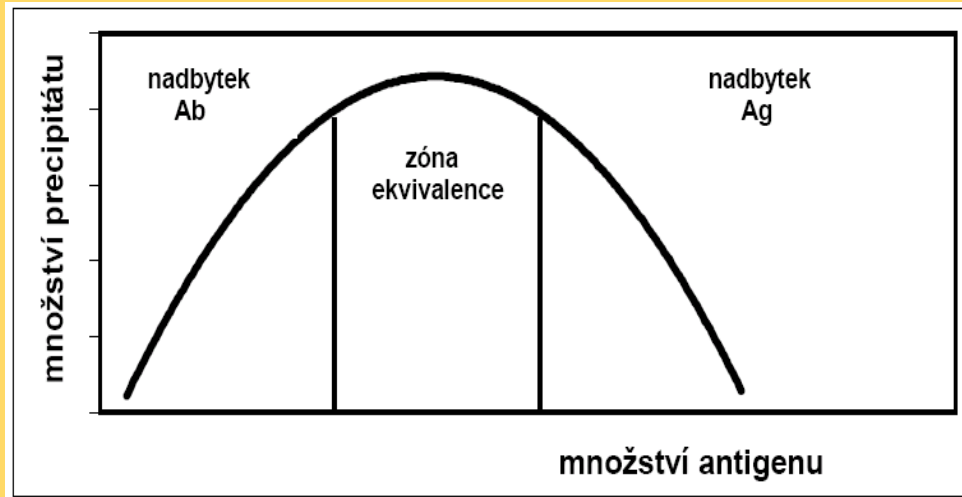
IgG 8 – 18 g/l; IgA 0,9 – 3,5 g/l; IgM 0,9 – 2,5 g/l; IgD 0,1 g/l; IgE 0,0003 g/l

# Stanovení protilátek

- SÉROLOGICKÉ METODY - všechna stanovení protilátek v krevním séru.
- Příklady sérologických reakcí a způsobů vizualizace:
- Aglutinace vizuálně hodnotitelný aglutinát
- Precipitace vizuálně hodnotitelný precipitát nefelometrické, resp, turbidimetrické hodnocení
- Komplement fixační reakce hemolýza erytrocytů
- Imunoelektroforéza precipitát antigenů nebo protilátek rozdělený v elektrickém poli

# Serologické metody – precipitace, aglutinace

Imunoprecipitační křivka (Ag – antigen, Ab – protilátka)



## Oblast ekvivalence

*Precipitační metody*

## Oblast nadbytku protilátky

*Nekompetitivní metody*

- zákalové nefelometrie  
turbidimetrie

- s markerem EIA, IRMA..

## Oblast nadbytku antigenu

*Kompetitivní metody*

- heterogenní RIA, ELISA..
- homogenní EMIT...

- **faktory** ovlivňující precipitaci:

- typ **Ab** /např. IgG/
- **teplota** – se zvyšující se teplotou se urychluje precipitace /např. 38°C/
- **vzájemná koncentrace** Ag a Ab
- **pH**
- iontový **náboj**
- **tvar a velikost** části

# Důležité pojmy z oblasti sérologie jsou:

- sérokonverze – zvýšení hladiny specifických protilátek, tento pojem zahrnuje dynamiku tvorby protilátek
- séropozitivita,
- séronegativita – přítomnost, resp. nepřítomnost specifických protilátek v séru
- sérorezistence – stav, kdy při léčbě zůstává séropozitivita bez klinických příznaků sérorecidiva – znovuobjevení positivity séra po přechodném vymizení specifických protilátek •
- sérotyp (sérovar) skupina původců onemocnění (obvykle podmnožinu bakteriálního druhu), která se od jiných zástupců téhož bakteriálního druhu dá odlišit právě na základě sérologické reakce. Vykazuje tedy určitou antigenní specifitu v rámci druhu.

# Další stanovení

- Stanovení IgE
- Stanovení monoklonální (patologické) komponenty: při podezření na monoklonální gamapatie se stanovuje množství mono-, bi- nebo oligoklonálních protilátek, které jsou produkty jednoho nebo několika málo patologicky zmnožených klonů B lymfocytů (imunofixace).
- Stanovení kryoglobulinů (např. hematologické malignity, revmatoidní artritida, vaskulitidy, chronické zánětlivé stavy, vleklé infekce apod.). Stanovení za přísných teplotních podmínek 37°C (jinak precipitace)

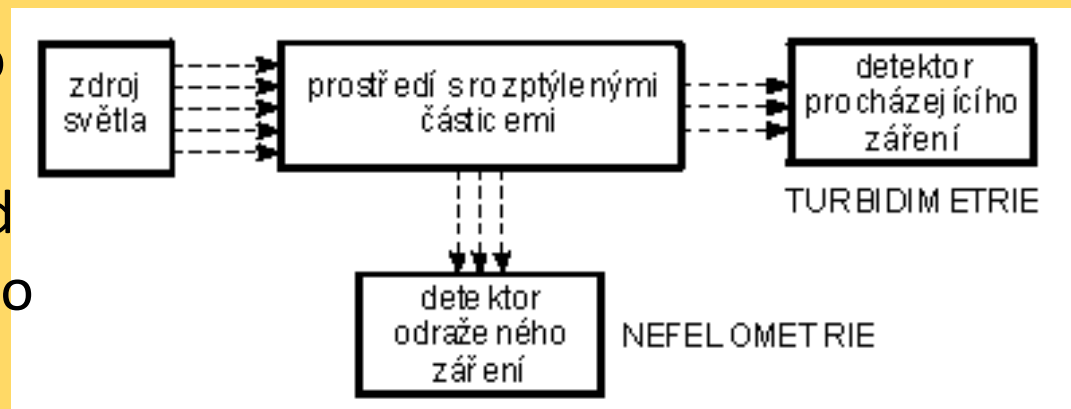
# Zákalové reakce

metoda probíhající v roztoku

**Princip:** při reakci Ag a Ab vzniká zákal-precipitát, jehož intenzita je při konstantním množství mn. Ab úměrná koncentraci vyšetřovaného Ag

\***NEFELOMETRIE** – rozptyl

monochrom. světla měřeného pod úhlem, měří se intenzita záblesků světla odraženého od IK (Tyndal. efekt), výbojka nebo laser



**TURBIDIMETRIE** – úbytek monochrom. světla o 320nm při průchodu vzorkem v kyvetě měřeného ve stejné rovině

Výhoda: možnost automatizace, rychlost provedení, přesnost, ale vyšší cena, dioda, méně přesná

# Imunofixace

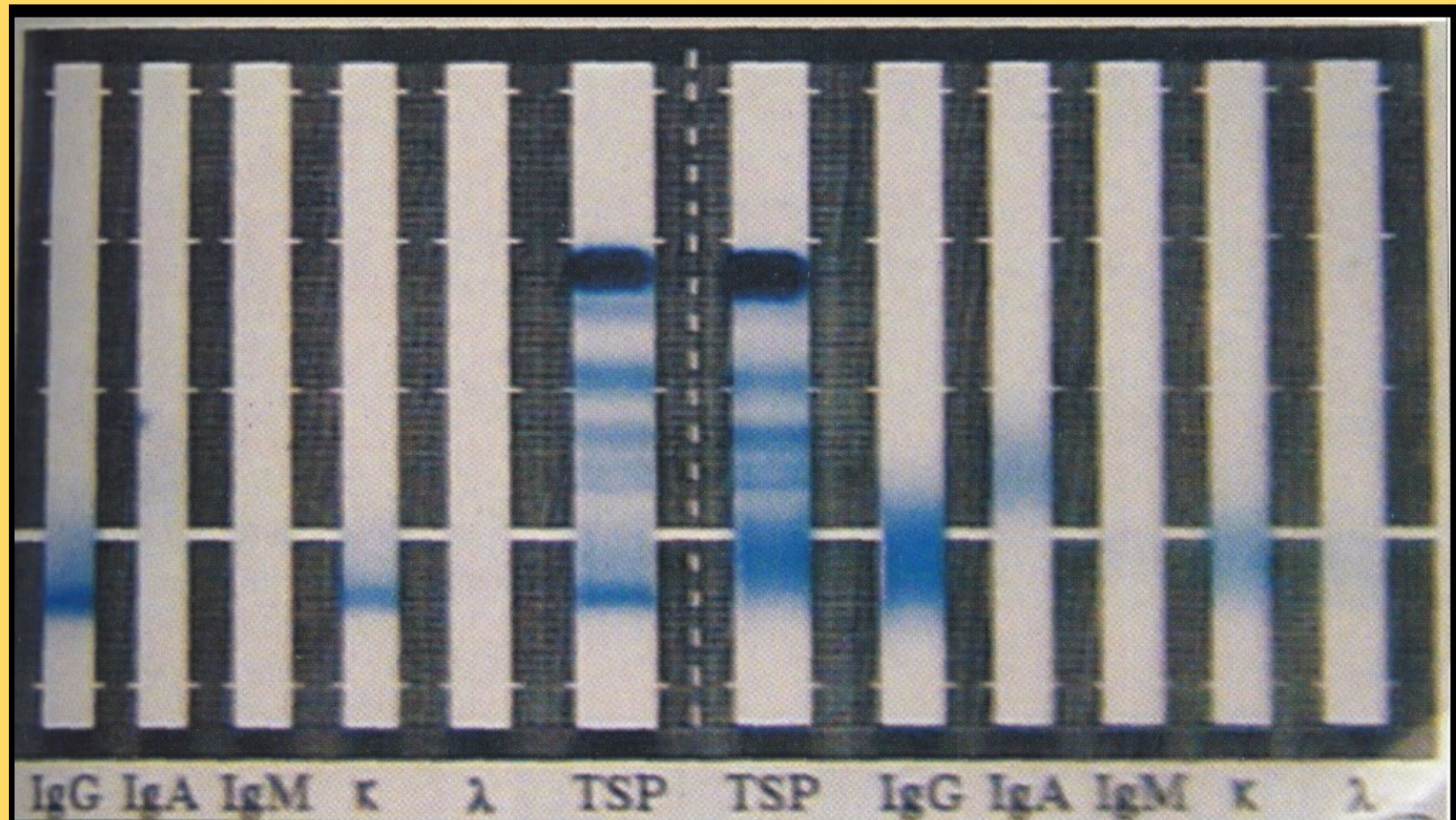
Rozdělení různých proteinů na základě jejich pohyblivosti v el. poli modifikační metodou

1. **stupeň:** Elfo vyšetřovaného séra
2. **Stupeň:** na agarózu se položí plastikovaná maska s výřezy, naplní se s antiséry (antiIgG, IgA, IgM, anti kappa, anti lambda), pak porovnání s precip. reakce s normálním sérem ,TSP – testovaná séra pacientů

## Hodnocení

a) Okometricky

b) denzitometricky





**Využití:** Stanovení c Ig, hlavních sérových proteinů,  
stanovení sérových bílk.(složky C, proteiny akut. fáze  
(CRP – stand. 2mg/l, transferin, alfa2 – makroglobulin)

**Úskalí:** V prec. křivce je třeba vymezit oblasti:

a) zóna využitelná pro měření Ab, tj oblast nadbytku Ab

b) **Kritický bod, oblast ekvivalence**, zde leží nejvyšší konc. Ag, kterou lze ještě měřit

c) oblast za krit. bodem pro Ag, zde nelze měřit

Dva režimy stanovení

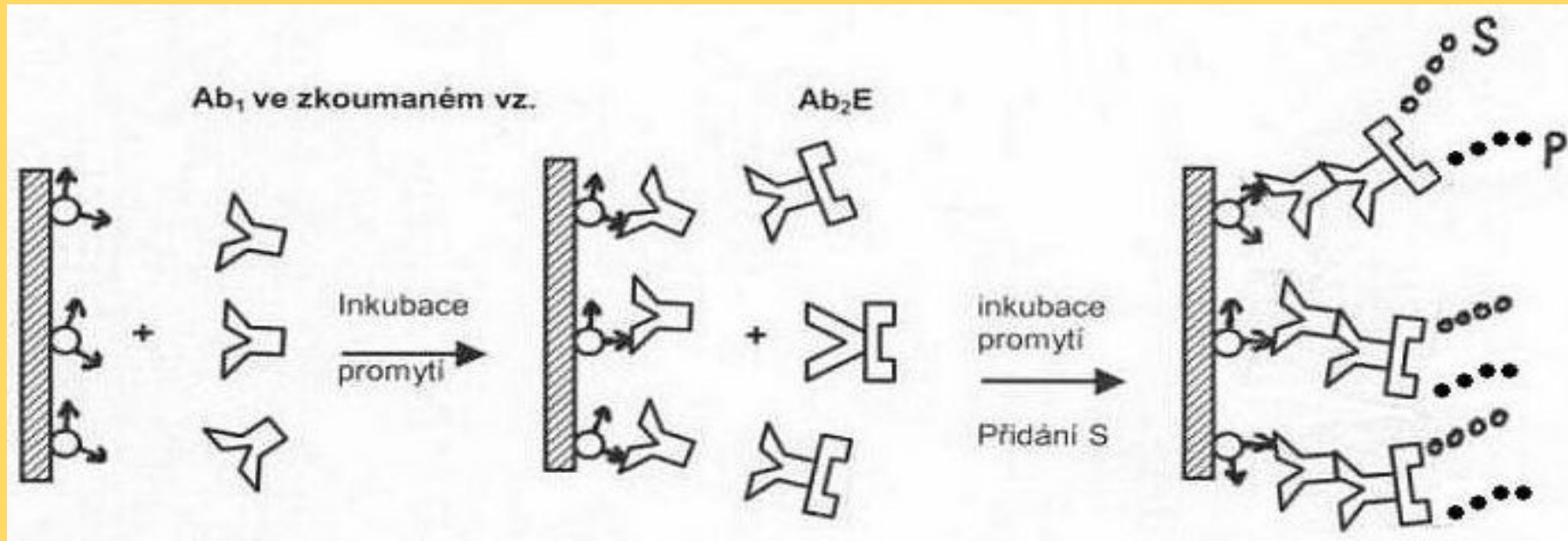
a) **End point** – měří se v prostředí polyetylénglykolu

b) **Rate kynetický systém** – měří se kineticky , v krátkých časových intervalech

# Metoda ELISA

## 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.