

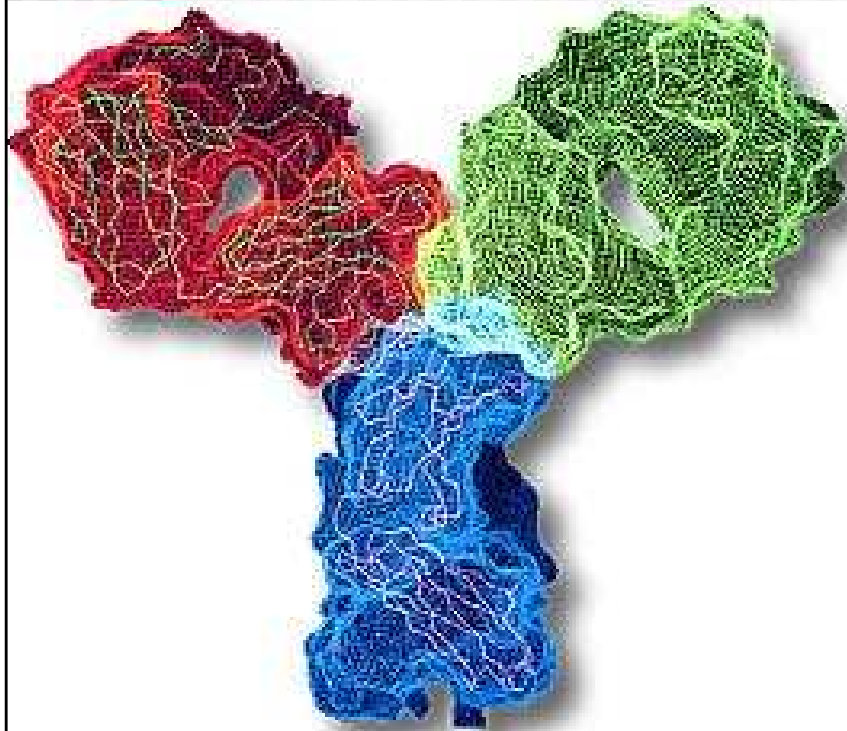
Imunizace

Serologické reakce II

pro studenty PŘF

hlavně pro obor

Obecná biologie



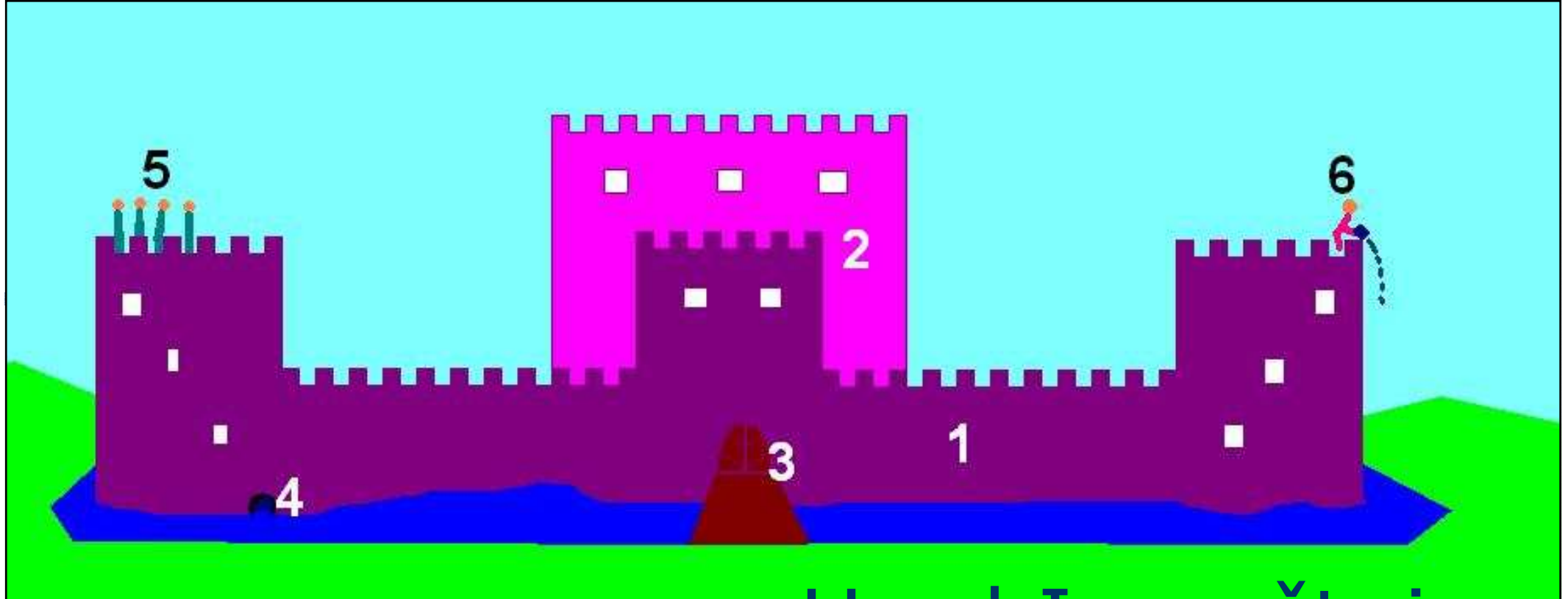
Ondřej Zahradníček

Dnes máme na programu

- Využití systému obranyschopnosti organismu k jeho umělému posílení – umělá imunizace (pasivní a aktivní)
- Využití existence interakce antigen – protilátka v praktické mikrobiologické diagnostice (druhá část) → praktika

Základní rozdělení mechanismů obranyschopnosti organismu: opakování

Anatomické bariéry a funkční mechanismy		
imunita	Vlastní	Nespecifická buněčná
		Specifická buněčná
		Nespecifická látková
		Specifická látková



Hrad Imunštejn

- 1 – vnější hradba (kůže)
- 2 – vnitřní opevnění (hematoencefalická bariéra)
- 3 – dubová brána (sliznice – slabší než hradby, ale pevná)
- 4 – stoka (teoreticky možnost vniknout dovnitř, ale proud odpadní vody brání vniknutí)
- 5 – obránci hradu (buněčná imunita)
- 6 – vylévání horké vody přes hradby (vylévání produktů toxických pro útočníka, humorální imunita)

Možnosti posílení jednotlivých složek imunity

- **Kůže, sliznice** – celková péče o zdraví, nekouření (respirační sliznice) apod.
- **Funkční mechanismy:** netlumení průjmu, u produktivního kašle léky podporující vykašlání a ne tlumící kašel (ty jsou vhodné tam, kde se nic nevykašle)
- **Prostředí nevyhovující mikrobům:** prebiotické, probiotické a symbiotické preparáty (perorální, vaginální čípky aj.)

Imunoterapie (léčení imunopreparáty) posílení imunity v užším slova smyslu

Použití: prevence, profylaxe i léčení chorob

- **Imunizace** – viz dále
- **Imunosuprese** – potlačení imunitních reakcí – u nadměrné nebo špatné imunity
- **Imunostimulace** – nespecifické povzbuzení nedostatečné imunity
- **Desenzibilizace** – podávají se mikrodávky antigenu, aby si na ně organismus "zvykl" a nereagoval přehnaně; dávky se postupně zvyšují

Imunizace - princip

- Imunizace je založena na posílení specifické látkové, méně často i buněčné imunity
- Hladovému muži na břehu řeky
 - nachytáme ryby – pasivní imunizace
 - pomůžeme, aby se naučil ryby chytat – aktivní imunizace
 - někdy kombinujeme obojí

Pasivní imunizace

- Do organismu jsou vneseny už hotové protilátky nebo sérum, které je obsahuje.
- Nevýhoda: protilátky od cizího člověka nikdy nejsou stejné, fungují méně účinně a postupně se jich tělo zbavuje (krátkodobý účinek)
- Výhoda: organismus je chráněn okamžitě. Nevýhodu krátkodobého účinku lze odstranit, pokud pasivní imunizaci zkombinujeme s pasivní (například u tetanu)

Možnosti pasivní imunizace

- Nespecifická séra
 - z krve mnoha dárců
 - obsahují protilátky proti mnoha běžným chorobám
 - obsahují i také řadu nežádoucích složek
 - proto se s jejich používáním čím dál více váhá.
- Specifické protilátky – příklady
 - TEGA – proti tetanu
 - HEPAGA – proti hepatitidě B
 - BOSEA – globuliny proti botulismu
 - GASEA – proti plynaté sněti

Aktivní imunizace

- **Aktivní imunizace = očkování:** do organismu je vnesena očkovací látka, obsahující antigen. Tělo je antigenem "vyprovokováno" a vytváří protilátky.
- **Očkování proti TBC – výjimka:** cílem zde není vyvolat tvorbu protilátek, ale tvorbu buněčné imunity, což souvisí se zvláštními mechanismy u TBC infekce

Výroba očkovací látky

Některé viry (např. chřipkové) se musí pro výrobu vakcíny pomnožit na oplodněných vejcích



Očkovací látky proti bakteriálním nákazám I

- **Očkování živými bakteriemi** se používá u tuberkulózy. Očkování se provádí ihned po narození a nepřeočkovává se, jen se kontroluje stav imunity (tzv. tuberkulínovým testem). Bakterie je speciální vakcinační kmen, jiný druh, ale antigenně podobný TBC.
- **Bakteriny** – celé usmrcené bakterie. Například očkování proti černému kašli, způsobenému *Bordetella pertussis*.

Očkovací látky proti bakteriálním nákazám II

- **Anatoxiny neboli toxoidy** – tam, kde bakterie škodí hlavně prostřednictvím toxinů (jedů). Anatoxin = jed zbavený jedovatosti (toxicity), který si zachovává antigenní působení. Např. očkování proti tetanu a záškrtu.
- **Čištěné povrchové antigeny** (např. polysacharidové), např. *Haemophilus influenzae* b, *Neisseria meningitidis* aj.

Očkovací látky proti virovým nákazám

- **Živé vakcíny** – pěstují se oslabené kmeny virů na buněčných kulturách. U oslabených osob mohou vyvolat různé reakce. Spalničky, zarděnky, příušnice; na lžičce podávaná (IgA!!) – dětská obrna (Sabin).
- **Usmrcený virus.** Virus je vypěstován a poté usmrcen, nejčastěji formaldehydem. Klíšťová encefalitida, žloutenka A
- **Chemovakcíny.** Antigen byl získán „chemickou“ cestou (rekombinací DNA). Např. látka Engerix proti hepatitidě B.

Druhy očkování

- **Základní očkování** – dnes již deset očkovaní tzv. očkovacího kalendáře
- **Očkování mimo tento základ, např.**
 - **Očkování u profesionálního rizika** (hepatitida B u zdravotníků, klíšťová encefalitida u lesníků)
 - **Očkování před cestou** (žlutá zimnice...)
 - **Očkování pro oslabené** (chřipka)
 - **Očkování profylaktické** (vzteklina)
 - **Očkování na přání** (chřipka, klíšťová e.)

Očkování proti TBC

- Očkuje se **samostatně**, momentálně první týden po narození (uvažuje se o změně)
- Během dalších let se provádí tzv. **tuberkulinová zkouška** – kožní test buněčné imunity. Pokud je negativní, očkuje se znovu. Pozor, očkovat ty, kteří imunitu mají, by bylo nebezpečné
- V devadesátých letech ve dvou krajích experimentálně pozastaveno. Pro velký nárůst počtu případů TBC rychle obnoveno a děti doočkovány

Očkování proti TBC



Calmette-Guérinův bacil (odtud pojem „kalmetizace“)

Očkování proti tetanu

- Očkuje se **v čtyřkombinaci**, spolu se záškrtcem, dávivým kašlem a hemofily
- Několikrát se **přeočkovává**, nejprve proti celé kombinaci, pak už jen proti samotnému tetanu (po deseti letech)
- Tetanus dnes není běžný, ale je natolik závažný, že očkování je stále namístě. Tetanická klostridia se i dnes vyskytují ve střevě zvířat, a tedy i v zemi, pokud by se neočkovalo, bylo by riziko velké

Očkování proti záškrtu

Očkování proti černému kašli

- Očkuje se **v čtyřkombinaci**, spolu s tetanem a hemofily
- Po základním očkování se několikrát přeočkovává
- Záškrt je stále aktuální, zejména vzhledem k migraci z postsovětských republik, kde se difterie i pertuse stále občas vyskytují
- U nás se oboje vyskytuje občasně

Očkování proti „Hib“

- Jde o očkování proti ***Haemophilus influenzae***, a to proti opouzdřeným kmenům s pouzderným typem **b**
- Látka je **čištěný polysacharid**
- Očkuje se **v čtyřkombinaci**, spolu se záškrtem, dávivým kašlem a tetanem
- Bylo zavedeno před několika lety a po jeho zavedení **významně poklesl počet invazivních hemofilových infekcí** předškoláků (záněty mozkových blan, plic, příklopky hltanové)

Očkování proti hepatitidě B

- Očkuje se **samostatně**, ale zároveň s předchozí čtyřkombinací (momentální stav, uvažuje se o změně). Je to **chemovakcína**
- Další z poměrně nedávno zavedených očkování – i dříve ovšem používáno, ale jen u rizikových skupin (např. děti HBsAg pozitivních matek) či profesního rizika (zdravotníci)

Očkování proti dětské obrně

- Očkuje se **samostatně**, používá se **perorální Sabinova vakcína – živý virus**. Je velmi účinná, ale má riziko komplikací, i když jen nepatrné
- Pravděpodobně se ale přejde na **injekční Sabinovu vakcínu (usmrcený virus)** a bude se očkovat v kombinaci s několika jinými vakcínami.
- U nás se dětská obrna nevyskytuje, ale vyskytuje se v Asii i JV Evropě, takže cíl, kterým je celosvětová eradikace tohoto závažného onemocnění, je ještě daleko

Salk a Sabin



Očkování proti spalničkám

- Očkuje se **v trojici se zarděnkami a příušnicemi**, ve všech třech případech jde o živé viry
- U těchto očkování se nejčastěji objevují pochyby, jestli je nutné a vhodné
- Ovšem spalničky jsou poměrně nepříjemné, pro dítě bolestivé onemocnění, a způsobují ekonomické ztráty (absence rodiče v práci)
- Existuje i riziko sklerotizující spalničkové panencefalitidy (zánětu mozku), hlavně u dospělých. Je velmi vzácné, ale závažné.

Očkování proti zarděnkám

- Také zarděnky v době před očkováním znamenaly velké ekonomické ztráty, komplikace pro školy a školky apod.
- Zarděnky jsou také nebezpečné u těhotných, kde existuje riziko potratu u infikovaných žen.
- Proto byly v 80. letech očkovány nejprve dívky ve 12 letech a pak i všechny dvouleté děti

Očkování proti příušnicím

- Pro příušnice platí totéž co pro předchozí dvě choroby
- Zatímco zarděnky byly nebezpečné těhotným dámám, příušnice hrozí spíše pánům (dospělým) – riziko zánětu varlat (orchitidy), vedoucí až k neplodnosti

Očkování „MMR“ (measles, mumps, rubella = spalničky, zarděnky, příušnice)



Očkování proti chřipce

- V poslední době populárnější než dříve, vzhledem k riziku tzv. aviární chřipky (H5N1)
- U chřipky je ovšem třeba počítat s rizikem antigenního driftu (drobné změny antigenní struktury) a shiftu (větší antigenní posuny). Proto očkování nezanechává trvalou imunitu a musí se každý rok obnovovat

Očkování proti chřipce



Očkování proti klíšťové encefalitidě

- Často žádané očkování – ovšem lidé většinou nechávají očkovat děti, ačkoli onemocnění probíhá závažněji u dospělých. Do 6 let se nedoporučuje.
- Očkuje se dvěmi dávkami zpravidla v zimním období, třetí („boosterová“) dávka následuje další zimu. Doporučuje se po třech letech přeočkovat
- Nechrání samozřejmě proti borelióze

Další očkování



- proti meningokokové infekci
- proti pneumokokové infekci
- proti planým neštovicím (1)
- proti různým tropickým chorobám
- proti rakovině cervixu
- proti HIV (výzkum)

Úvodem k druhé části

- Budeme pokračovat v diagnostice, založené na interakci **antigenu** (v případě mikrobiálních antigenů jde o povrchovou část těla mikroba) s **protilátkou** (imunoglobulinem, který je tvořen makroorganismem).
- Přitom můžeme prokazovat **zvířecí protilátkou antigen** (přímý průkaz) nebo **antigenem protilátku v séru** (nepřímý průkaz)

Průkaz antigenu a antigenní analýza (opakování)

- **V rámci průkazu antigenu** (tedy přímého průkazu) lze ještě dále rozlišit dva podtypy:
 - **Přímý průkaz antigenu ve vzorku**, například ve vzorku mozkomíšního moku
 - **Antigenní analýza (identifikace) kmene**, izolovaného ze vzorku (například kmene meningokoka)
- U **nepřímého průkazu** naopak vždy pracujeme se vzorkem, a to **se vzorkem séra**, kde hledáme protilátky

A ještě trochu opakování: Interpretace

- **Průkaz antigenu** (včetně antigenní analýzy) je přímá metoda. Pozitivní výsledek znamená přítomnost mikroba v těle pacienta
- **Průkaz protilátek**: je to nepřímá metoda. Nicméně jsou způsoby, jak alespoň odhadnout, kdy přibližně se mikrob s tělem pacienta setkal:
 - **Množství protilátek** (relativní – jako **titr**)
 - **Třída protilátek**: IgM/Ig
 - *Avidita protilátek – síla vazby na antigen*

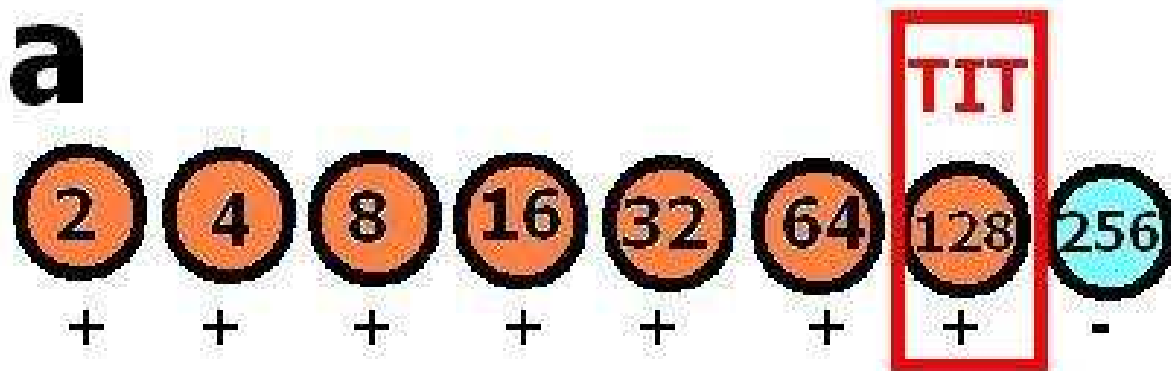
Jak tyto informace zjistit

- Akutní infekce: velké množství 1
protilátek, převážně třídy IgM
- Pacient po prodělané infekci: malá
množství protilátek, hlavně IgG
(imunologická paměť) 2
- *Chronická infekce: různé možnosti*



Opakování Pojem titr

a



b

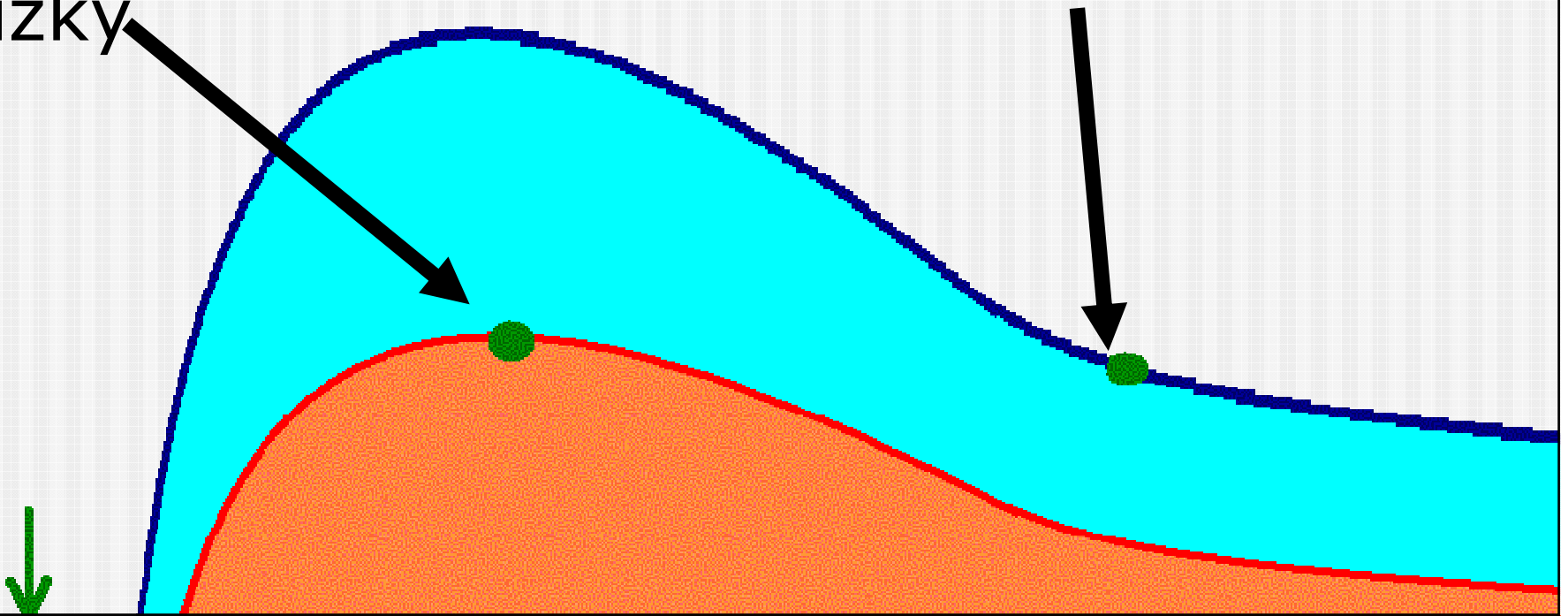


Titr – nejvyšší ředění, kde je pozitivní reakce. Máme-li dvě řady, je titrem nejvyšší ředění z obou řad dohromady.

Proč nestačí samotný titr

Někdy se stane, že málo reaktivní pacient má i v akutní fázi titr dosti nízký

Velmi reaktivní pacient naopak i dlouho po infekci titr relativně vysoký



Párová a nepárová séra

- **Párová séra** = první vzorek je uchováván v ledničce, dokud nepřijde i druhý. Pak jsou oba hodnoceny naráz. **4násobný vzestup** se v tom případě má za signifikantní pro akutní infekci.
- **Séra nejsou párová** (druhý vzorek je vyšetřen zvlášť): zvětšuje se riziko náhodné chyby, proto zpravidla vyžadujeme **8násobný vzestup** titru

Zapamatujte si:

- Veškeré „srandičky“ typu titry, třídy protilátek, zjišťování avidity, slouží k odlišení akutní infekce, chronické infekce a stavu po dávno prodělané infekci. Týkají se pouze **nepřímého průkazu!**
- **Přímý průkaz** totiž přímo prokazuje v těle pacienta část patogenova organismu. Není tedy nutné žádné další upřesnění

Typy serologických reakcí a jejich způsoby využití

	Průkaz antigenu	Antigenní analýza	Nepřímý průkaz
Aglutinace	občas	často	někdy
Precipitace	málokdy	málokdy	občas
KFR	často (viry)	ne	často (viry)
Neutralizace	občas	ne	často
Značené složky	velmi často	výjimečně	velmi často

Komplementfixace (KFR)

- Komplement = jedna ze složek imunitní reakce
- Pro KFR používáme morčecí komplement. Pacientův komplement je před reakcí inaktivován
- Komplement není schopen vázat se na samotný antigen
- Komplement není schopen vázat se na samotnou protilátku
- Komplement je schopen vázat se pouze na KOMPLEX obou

Princip komplementfixace

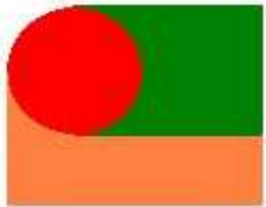


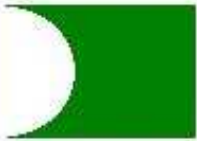

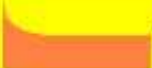
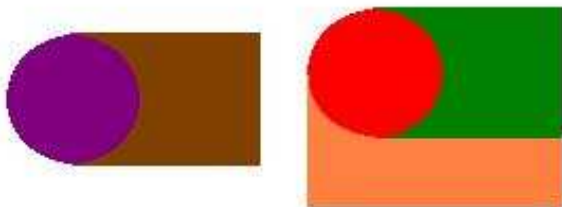
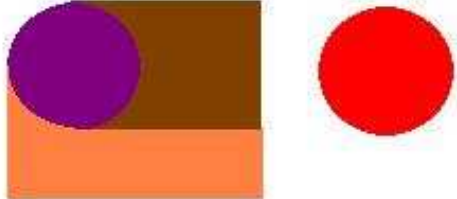





- Komplement se tedy **váže na komplex antigen-protilátka**. To ale samo o sobě není vidět.
- Proto používáme ještě tzv. **indikátorový komplex** – beraní erytrocyty + králičí protilátky proti nim. V případě, že se na tento komplex naváže komplement, dojde k hemolýze

Pokus k ověření funkce komplementu

Amboceptor = králičí protilátka proti beraním erytrocytům

1. Beraní ery + amboceptor bez komplementu → není hemolýza
2. Beraní ery + komplement bez amboceptoru → není hemolýza
3. Beraní ery + komplement + amboceptor → hemolýza
4. Králičí ery + komplement + amboceptor → není hemolýza

Princip KFR (negativní, pozitivní)

+	-	
1 	1 	 antigen  antibody protilátka
 vázaný - bound	 volný - free	
2 	2 	 complement  beraní ery sheep RBC
NO HEMOLYSIS NENÍ HEMOLÝZA	HEMOLYSIS HEMOLÝZA	 amboceptor
		

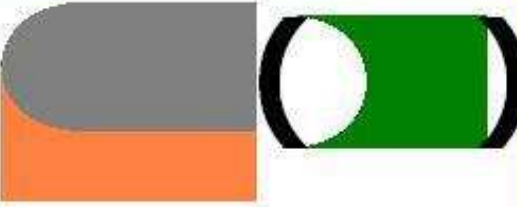
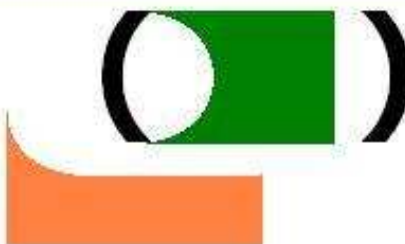




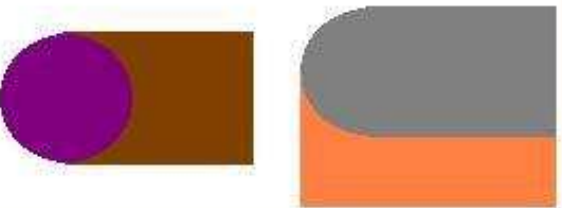
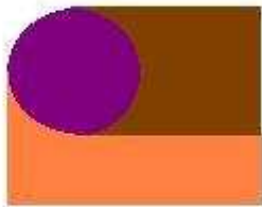





Problémy s KFR

- Příliš mnoho komplementu → falešná negativita. **Co dělat?** Titrovat komplement (viz další obrazovka)
- Některá složka séra sama o sobě vyvazuje komplement (složka antikomplementarity): falešně pozitivní výsledky. **Co dělat?** Provést test antikomplementarity. Je to vlastně „skoro normálně“ provedená reakce, ovšem bez antigenu

Titrace komplementu

- Pro reakci potřebujeme množství morčecího komplementu, které není moc velké ani malé.
- Proto zjišťujeme, jaké množství komplementu hemolyzuje pracovní jednotku krvinek s amboceptorem (hemolytická jednotka)

Test antikomplementarity

SERUM NOT OK	SERUM OK	
1 	1 	 složka zodpovědná za antikomplementaritu anticomplementarity component
 vázaný - bound	 volný - free	 antibody protilátka
2 	2 	 complement
NO HEMOLYSIS NENÍ HEMOLÝZA	HEMOLYSIS HEMOLÝZA	 beraní ery sheep RBC
		 amboceptor

Použití KFR

- KFR lze použít pro diagnostiku mnoha, zejména virových infekcí
- Jako i jiné serologické reakce se KFR používá k průkazu antigenu či protilátky
- Častější je ale průkaz protilátky, proto se jím budeme zabývat víc
- Berme to tedy tak, že máme laboratorní antigen, který konfrontujeme se sérem pacienta (kde hledáme protilátky)

Neutralizační reakce: obecný princip

- Protilátky fungují několika způsoby. Jeden z nich je přímá neutralizace.
- Tento způsob se zřídka vidí u celých bakterií. Pozorujeme ho u virů nebo bakteriálních toxinů

*Nicméně někdy protilátky neutralizují i určitou charakteristiku celé bakterie, např. pohyblivost *Treponema pallidum* u tzv. Nelsonova testu (TPIT).*

Neutralizace schématicky

- Protilátka (Ig) brání efektu toxinu/viru na buňku / krvinku
- Příklad: ASLO (Toxin = streptolyzín O, Ig = antistreptolyzín O, krvinka)



Příklady neutralizačních reakcí

Příklad	Neutralizován	Objekt	Reakce
1	Toxin bakterie (hemolyzin)	Erytrocyt hemolýza	ASLO
2	Virus	Erytrocyt shlukování	HIT
3	Virus	Buňka efekt metabolický	VNT

Příklad 1: ASLO

- Protilátka blokuje hemolytický efekt toxinu (streptolyzinu O) na krvinku.
- ASLO není nepřímý průkaz, přestože hledáme protilátky. Nepátráme tu po patogenovi, určíme samotné protilátky, jež mohou být nebezpečné
- U ASLO neužíváme geometrickou řadu. Hodnoty ředění jsou speciální.
- Titr nad cca 250 znamená možnost autoimunitní odpovědi

Proč se dělá ASLO

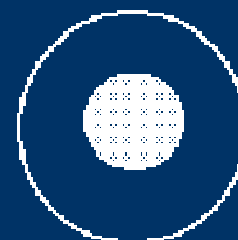
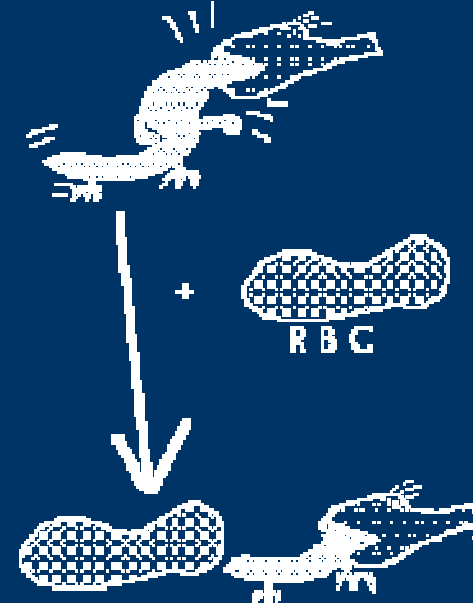
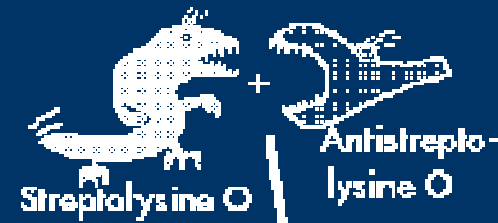
- Pomocí testu ASLO zjistíte, zda je přítomna normální protilátková odpověď, nebo přemrštěná automimunita s rizikem vývoje glomerulonefritidy nebo revmatické horečky
- Test ASLO se provádí zpravidla po prodělané streptokokové infekci. Průkazem protilátky se nesnažíme prokázat infekci (o té víme), ale zjistit, zda dochází k vývoji autoimunity. Nejde tedy vlastně o nepřímý průkaz, přestože prokazujeme protilátky.

ASLO: princip

Detection of ASO

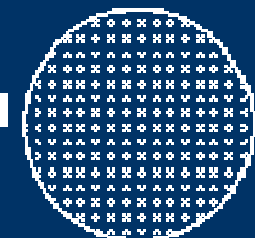
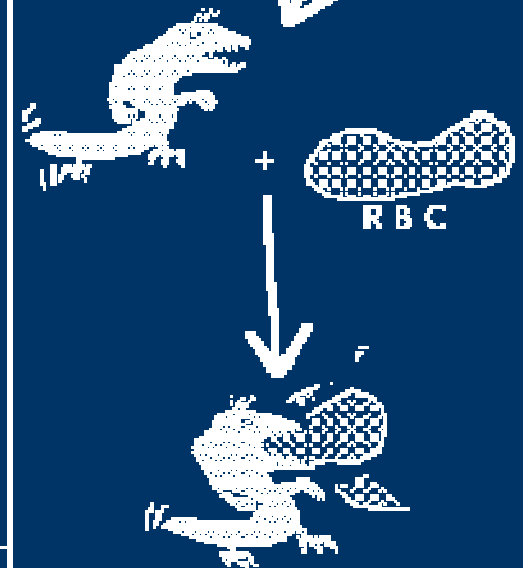
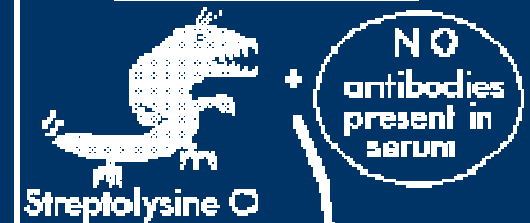
Anti-streptolysine O

Positive reaction:



NO HAEMOLYSIS

Negative reaction:



HAEMOLYSIS

Hodnocení ASLO

- Panel se odečítá naležato. Obsahuje pozitivní kontrolu a sedm pacientů.

Hodnocení výsledků ASLO

Jan ka C C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Pro sta PIL	100	120	150	180	225	270	337	405	506	607	759	911

Příklad 2: HIT

- Hemaglutinačně **I**nhibiční **T**est
- Pozor, tohle **NENÍ** aglutinace, je to druh neutralizace!
- Protilátka neutralizuje virové shlukování krvinek (in vitro vlastnost většiny virů)
- **Úkol:** Odečtete výsledky HIT u klíšťové encefalitidy. Učiňte pravděpodobný závěr (akutní infekce? Pouze paměťové protilátky? a podobně)
- V prvním sloupci ředění 1 : 10

Úkol 3: VNT (nepleťte si to s TNT 😊)

- Virus Neutralizační Test
- Buněčná kultura bývá poškozena virem. Škodu můžeme pozorovat jako změnu barvy v důlku (pH se mění)
- Jsou-li přítomny protilátky, mohou tomuto vlivu na buňky zabránit

Průběh protilátkové odpovědi z hlediska tříd Ig

- **Protilátky IgM** se tvoří jako první, ale také jako první mizí. Neprocházejí placentou, jejich průkaz u novorozence je svědectvím jeho infekce
- **Protilátky IgG** se tvoří později a zůstávají jako paměťové přítomny dlouhodobě. Procházejí placentou (novorozenec je tedy může mít od matky)



Protilátky ostatních tříd

- Protilátky třídy **IgA** se u některých infekcí vyšetřují místo protilátek IgM. Tato třída se uplatňuje hlavně u slizniční imunity, a tedy u infekcí, kde branou vstupu je sliznice (například gastrointestinální)
- Protilátky třídy **IgE** se vyskytují u alergií. Zpravidla se však nestanovují specifické IgE proti nějakému patogenovi
- S protilátkami **IgD** se v mikrobiologii nepracuje

Reakce se značenými složkami

- Na povrch se postupně navazují jednotlivé složky
- Místo jedné ze složek se pokusíme navázat vzorek od pacienta, o kterém si myslíme, že danou složku možná obsahuje
- Je-li to pravda, složka se naváže
- Pokud se všechny složky postupně navážou, vznikne nepřerušovaný řetězec
- Na konci řetězce je vhodné značidlo

Promytí a jeho význam

- Pokud by v reakci zůstalo přítomno i to, co se na nic nenačázalo, nedokázali bychom odlišit pozitivní reakci od negativní
- Proto po každém kroku reakce následuje **promytí**, po kterém zůstanou přítomny pouze složky navázané na pevný povrch
- Je-li řetězec přerušen, odplaví promytí vše za místem přerušení

Průběh pozitivní reakce

(možnost se třemi složkami – mohou být jen dvě)

Značidlo,
které je
nakonec
detekováno

Třetí složka

Druhá složka

První složka

povrch

Průběh negativní reakce

(možnost se třemi složkami)

Důležité je promytí po každém kroku. Odstraní vše, co není navázáno, tedy nakonec i značidlo.

Značidlo,
které by bylo
detekováno

Třetí složka

Chybí druhá složka (vzorek negativní)

První složka

povrch

Typy značidel

- **Fluorescenční barvivo** je značidlem u imunofluorescence
- **Radioizotop** je značidlem u reakce RIA
- **Enzym** je značidlem u reakce ELISA
 - **Western blotting** je zvláštním případem reakce ELISA, kde jednotlivé antigeny jsou elektroforeticky rozděleny

Používáme-li jako značidlo enzym, je poslední složkou přidanou do reakce ještě příslušný substrát – tedy jeden krok navíc.

Možnosti uspořádání složek modře vždy složka pocházející ze vzorku získaného od pacienta

- Povrch-antigen-protilátka-značidlo (P)
- Povrch-protilátka-antigen-protilátka-značidlo (P, např. průkaz HBsAg)
- Povrch-antigen-protilátka-antigen-značidlo (N)
- Povrch-antigen-protilátka-konjugát-značidlo (N)

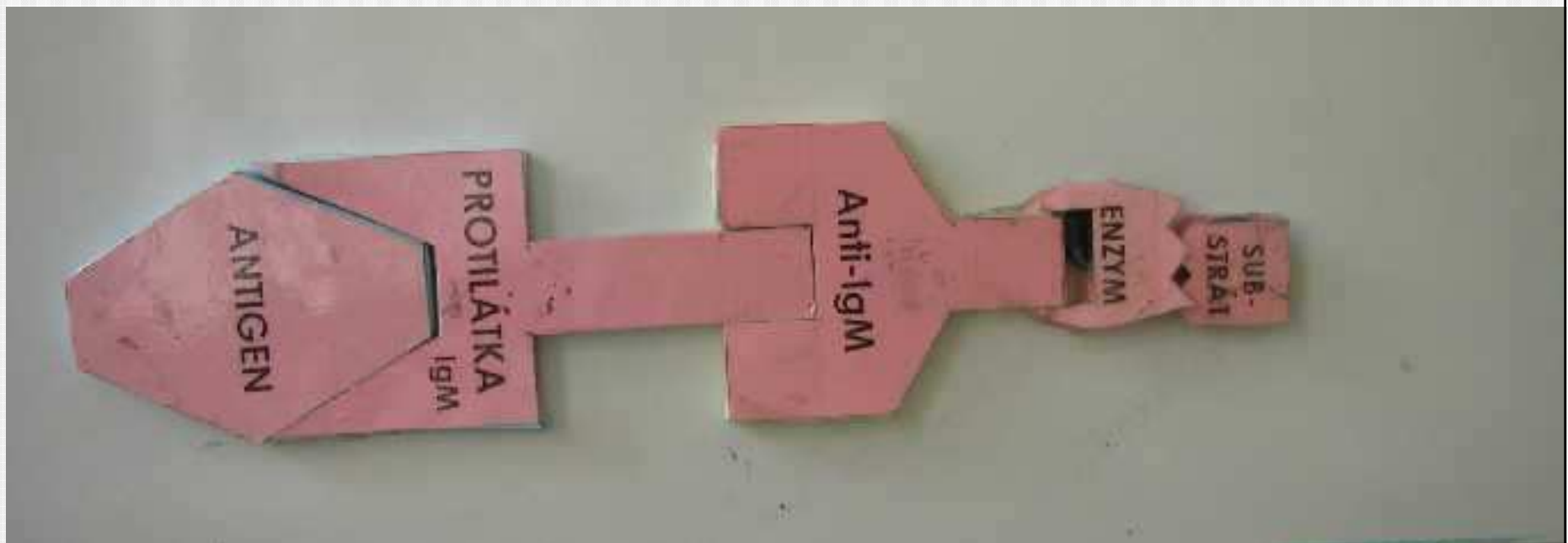
Konjugát je protilátka namířená proti lidské protilátce

Význam konjugátu

- Konjugát se používá zpravidla u reakcí nepřímého průkazu (průkaz protilátek)
- Je to protilátka, pro kterou je antigenem lidská protilátka např. IgM nebo IgG
- Dokáže být selektivní proti určité třídě lidské protilátky
- Použití konjugátu je tedy podstatou možnosti selektivního průkazu jednotlivých tříd protilátek

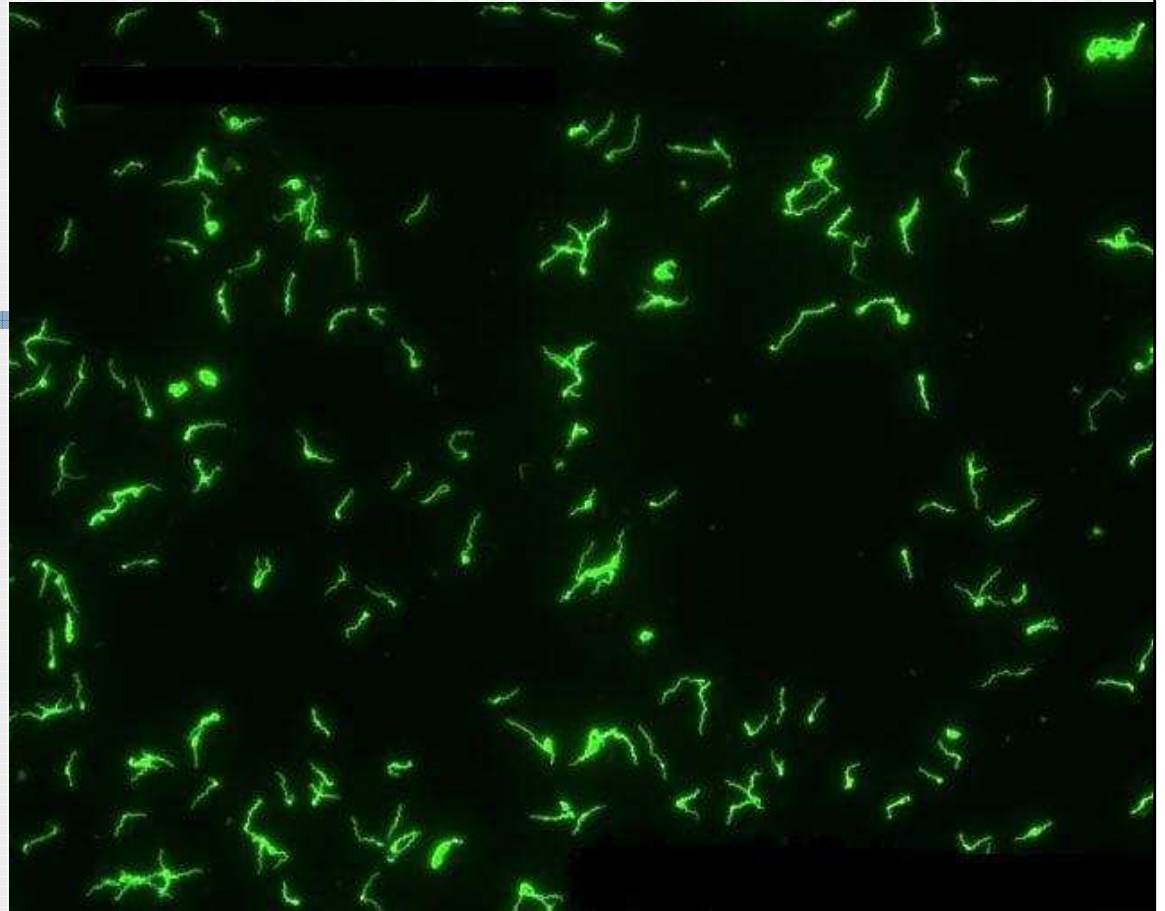
Příklad reakce ELISA použité k detekci protilátky

Všimněte si použitého konjugátu anti-IgM. Ten bude reagovat vždy jen s protilátkou IgM. Bude-li přítomna protilátka proti příslušnému antigenu, avšak třídy IgG, nebude s ní konjugát reagovat.



Přímá a nepřímá

imunofluorescence
vypadají stejně



Přímá imunofluorescence

- (Povrch)-(antigen)-(značená protilátka)

Nepřímá imunofluorescence

- (Povrch)-(antigen)-(protilátka)-(značená protilátka proti lidské protilátce)

ELISA – proč je tak oblíbená

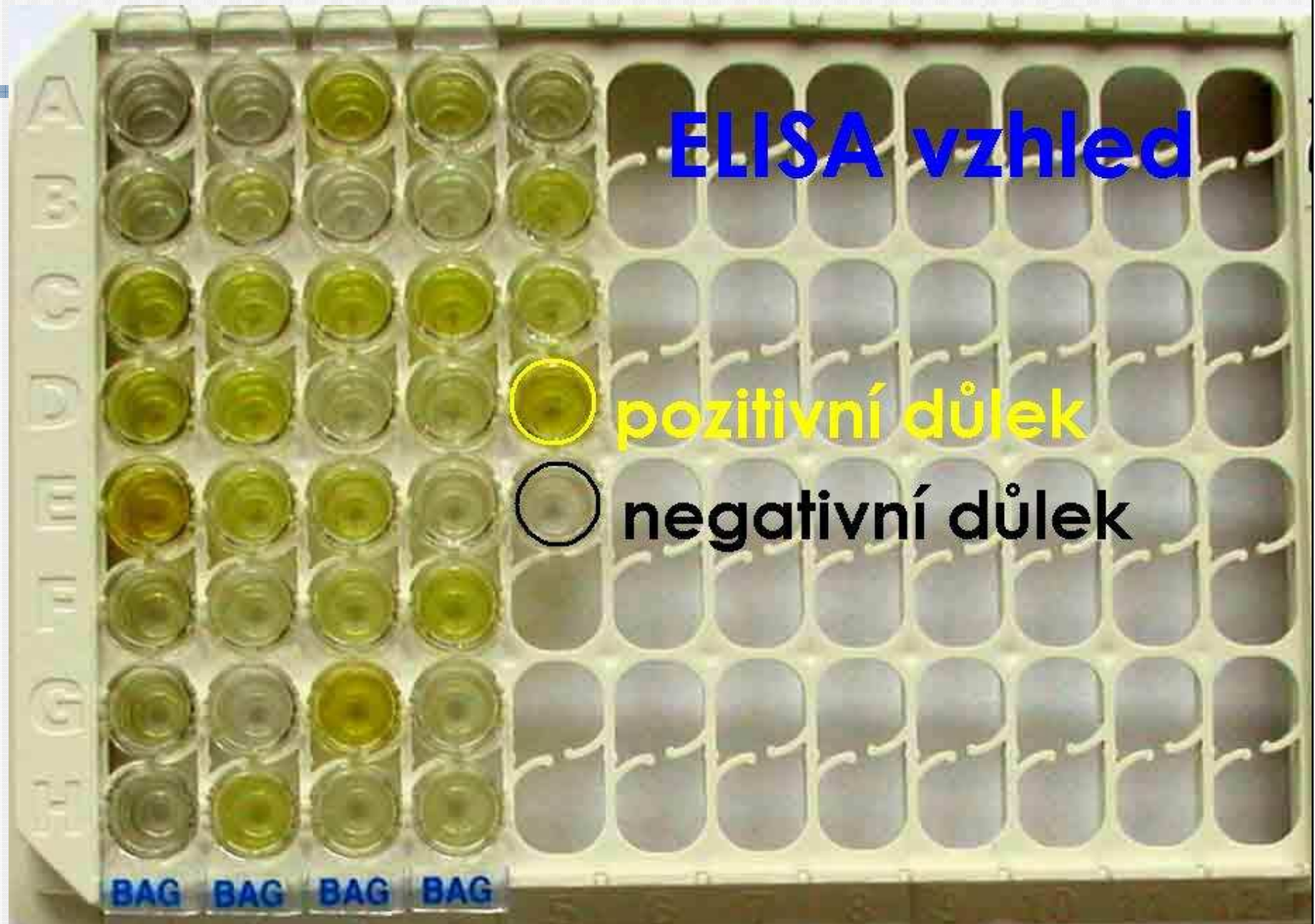
- U reakce ELISA je na konci celého procesu **enzymatická reakce**. Její intenzita se projeví jednoduše: intenzitou zbarvení v důlku, kde reakce probíhá. **Sytá barva = vysoce pozitivní.**
- Nenáročnost z hlediska **nákladů a nulové radiační nebezpečí** je výhodou oproti radioimunoassayím
- Možnost **automatizace** je velkou výhodou oproti imunofluorescenci

ELISA – praktické provedení

- Zpravidla máme k dispozici destičku s jamkami. Na rozdíl od klasických serologických reakcí má každý pacient nikoli celý řádek, ale jen jeden důlek. To proto, že nezjišťujeme titry
- Před vlastními důlky pacientů bývá:
 - BI – blank (pro kalibraci spektrofotometru)
 - K- a K+ – pozitivní a negativní kontrola
 - Cut off (dva či tři důlky) – výrobcem dodané „vzorky“ s právě hraniční hodnotou absorbance („odsekávají“ pozitiv. výsledky)

ELISA – ukázka

(www.medmicro.info)

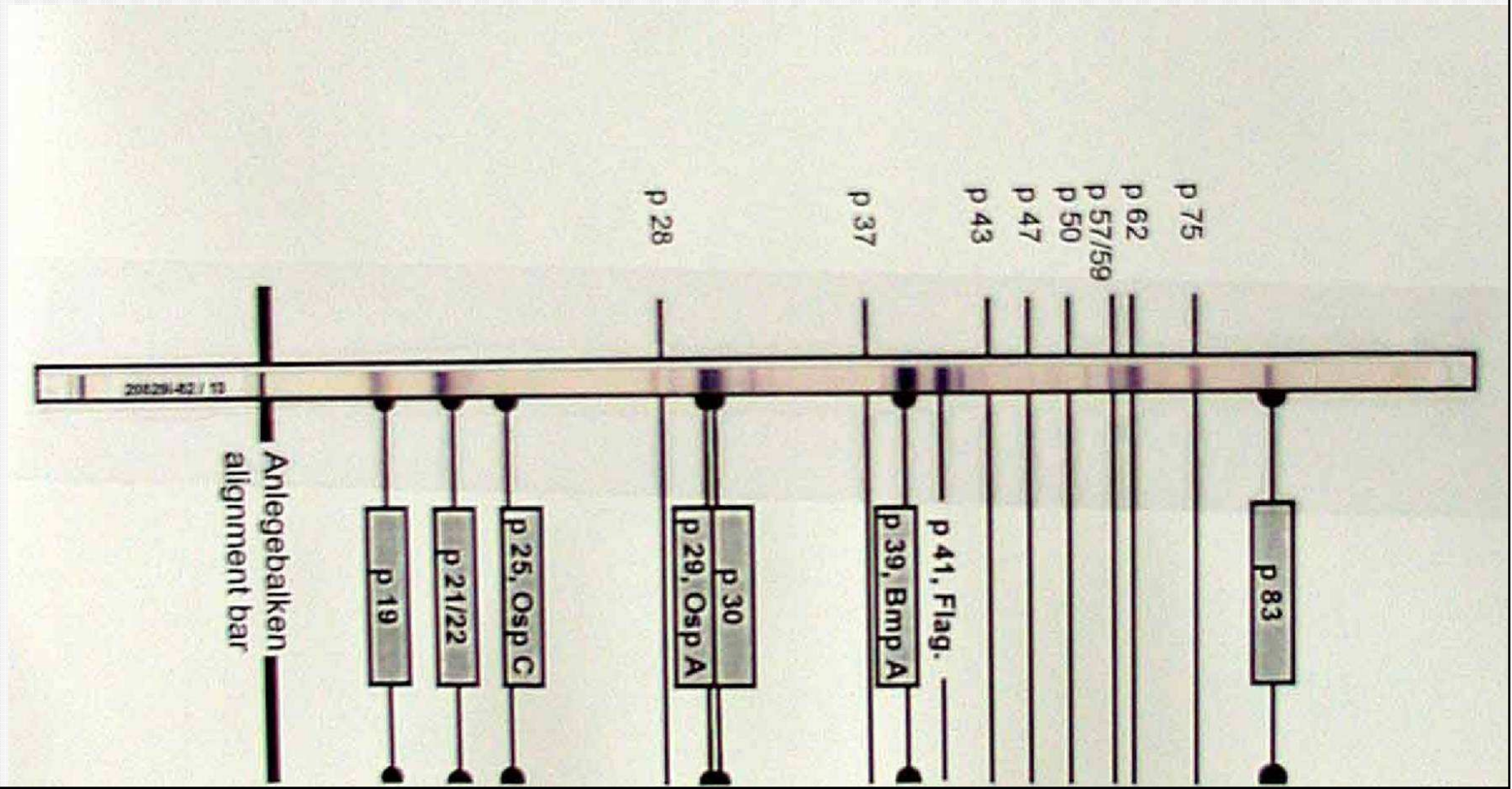


Western blotting

- *Název – slovní hříčka (badatel Southern)*
- Prakticky je to ELISA, ale směs antigenů je **rozdělena elektroforeticky** na jednotlivé antigenní determinanty
- Je tedy **přesnější** a pomáhá zejména tam, kde klasická ELISA traskotá na zkřížené pozitivitě např. příbuzných mikroorganismů

Western blot – vzhled

(obrázek z www.medmicro.info)



Pro dnešek děkuji za pozornost

Plyšový
streptokok

