

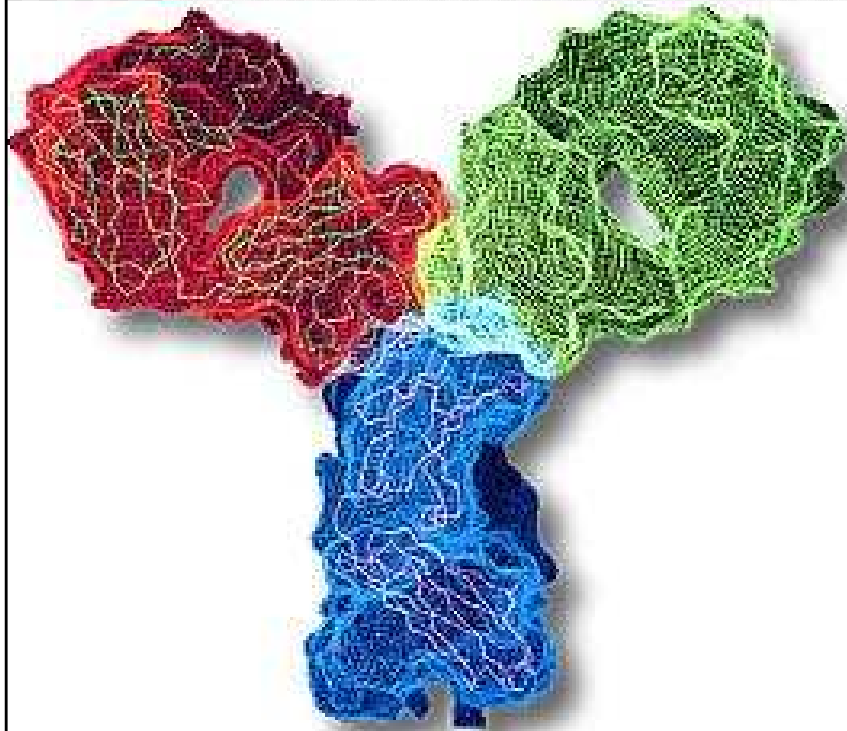
# Imunizace

## Serologické reakce II

pro studenty PŘF

hlavně pro obor

Obecná biologie



Ondřej Zahradníček

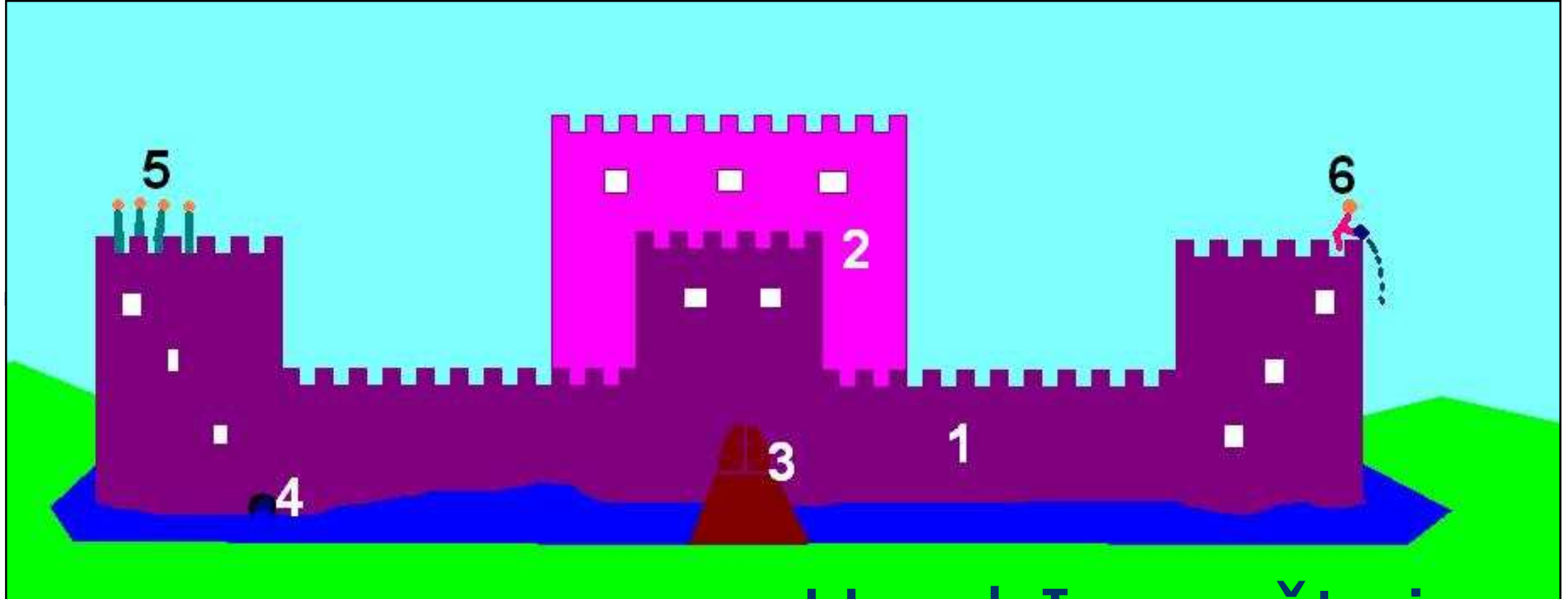
# Dnes máme na programu

---

- 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 něj 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 záškrtcem, 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

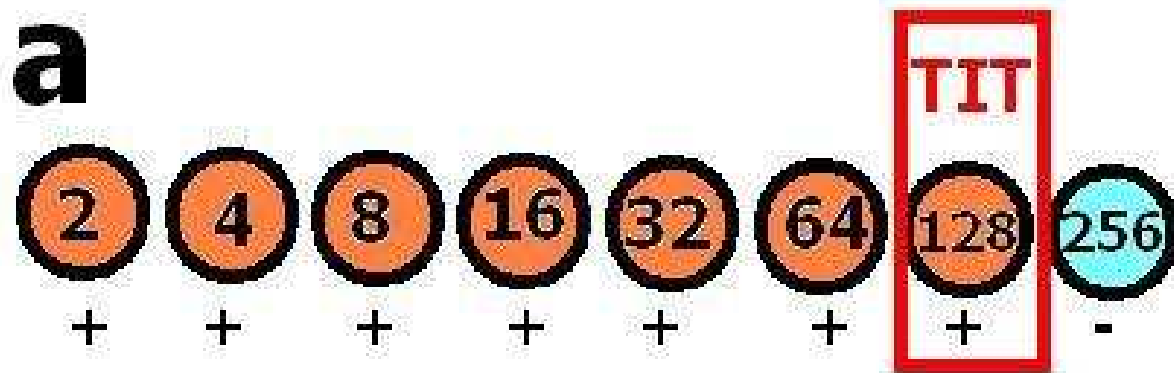
- Akutní infekce: velké množství 1  
protilátek, převážně třídy IgM
- Pacient po prodělané infekci: malá  
množství protilátek, hlavně IgG  
(imunologická paměť) 2
- *Chronická infekce: různé možnosti*





# Opakování Pojem titr

**a**



**b**

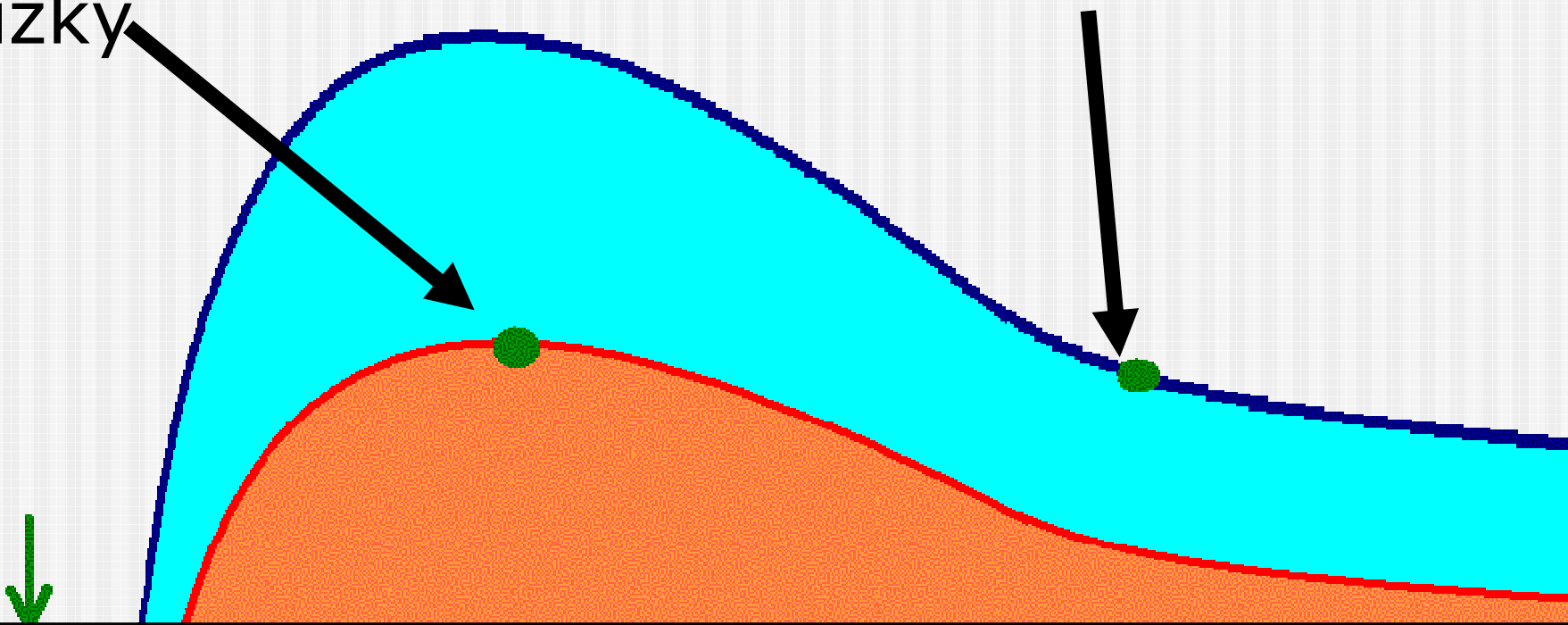


**Tit** – nejvyšší ředění, kde je pozitivní reakce. Máme-li dvě řady, je titrem nejvyšší ředění z obou řad dohromady.

# 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

	<b>Průkaz antigenu</b>	<b>Antigenní analýza</b>	<b>Nepřímý průkaz</b>
<b>Aglutinace</b>	občas	často	někdy
<b>Precipitace</b>	málokdy	málokdy	občas
<b>KFR</b>	často (viry)	ne	často (viry)
<b>Neutralizace</b>	občas	ne	často
<b>Značené složky</b>	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

---







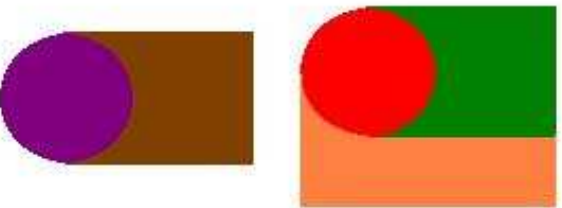
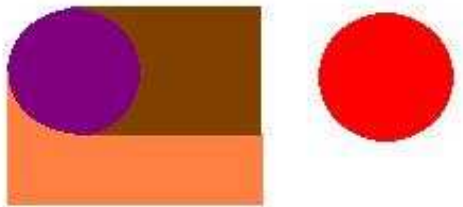





- Komplement se tedy **váže na komplex antigen-protilátka**. To ale samo o sobě není vidět.
- Proto používáme ještě tzv. **indikátorový komplex** – beraní erytrocyty + králičí protilátky proti nim. V případě, že se na tento komplex naváže komplement, dojde k hemolýze

# 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)

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



# Problémy s KFR

---

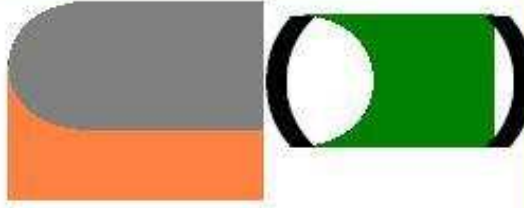
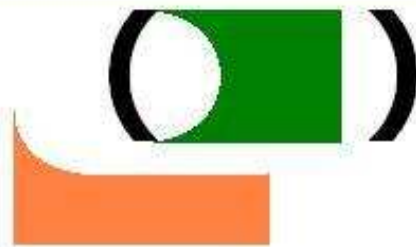




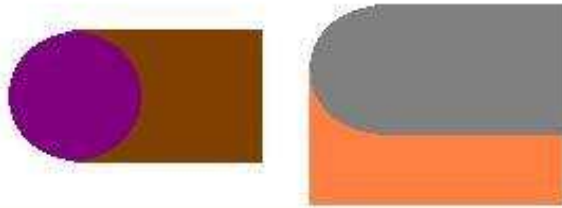
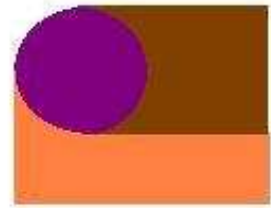





- Příliš mnoho komplementu → falešná negativita. **Co dělat?** Titrovat komplement (viz další obrazovka)
- Některá složka séra sama o sobě vyvazuje komplement (složka antikomplementarity): falešně pozitivní výsledky. **Co dělat?** Provést test antikomplementarity. Je to vlastně „skoro normálně“ provedená 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	
<b>1</b> 	<b>1</b> 	 složka zodpovědná za antikomplementaritu anticomplementarity component
 <b>vázaný - bound</b>	 <b>volný - free</b>	 <b>antibody protilátka</b>
<b>2</b> 	<b>2</b> 	 <b>complement</b>
<b>NO HEMOLYSIS NENÍ HEMOLÝZA</b>	<b>HEMOLYSIS HEMOLÝZA</b>	 <b>beraní ery sheep RBC</b>
		 <b>amboceptor</b>



# 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

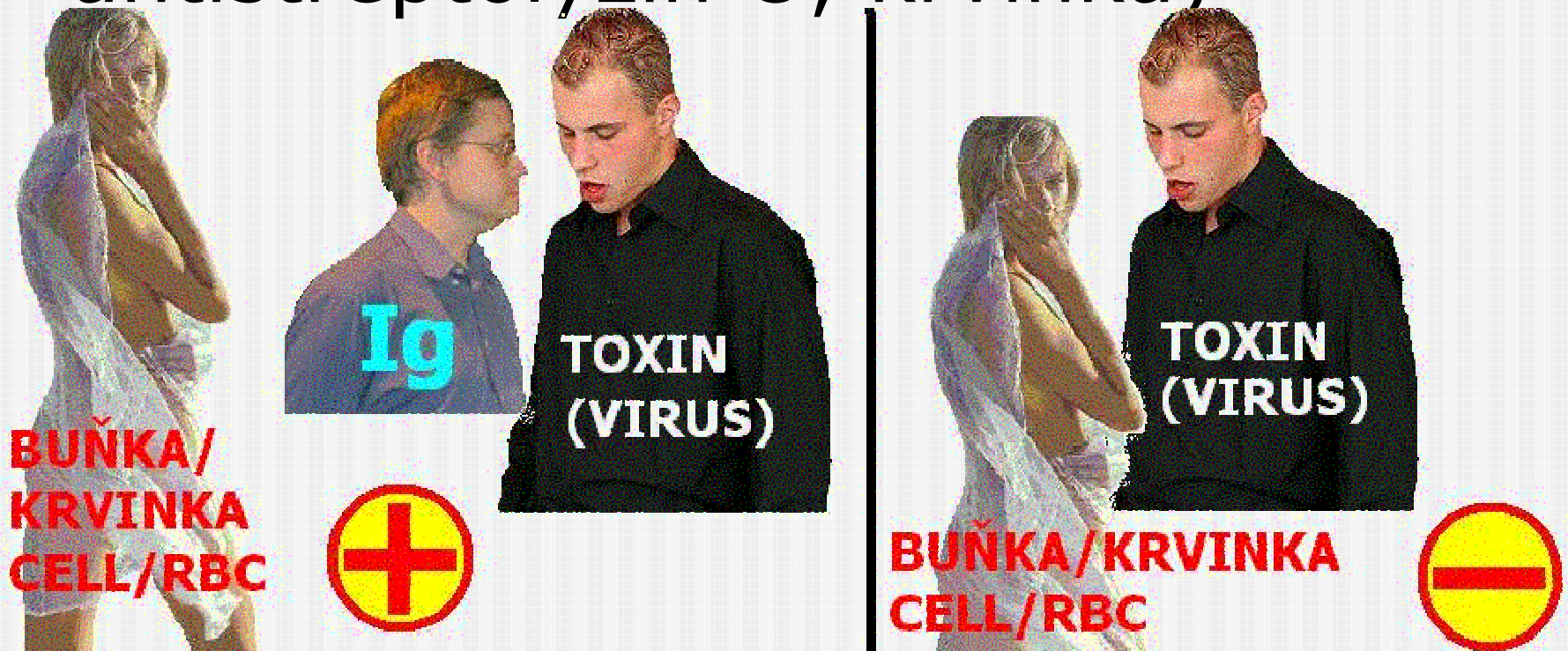
---

- 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 = streptolyzin O, Ig = antistreptolyzin 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.

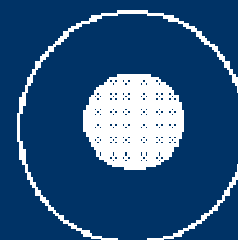
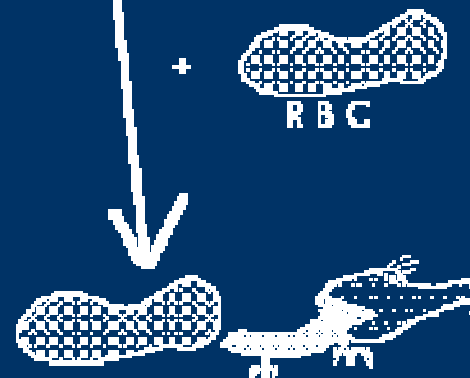
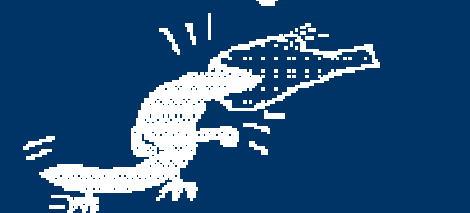
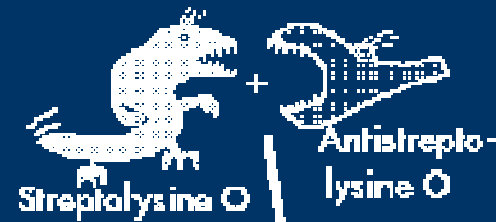


# ASLO: princip

## Detection of ASO

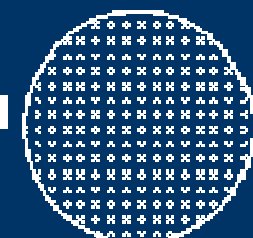
Anti-streptolysine O

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*



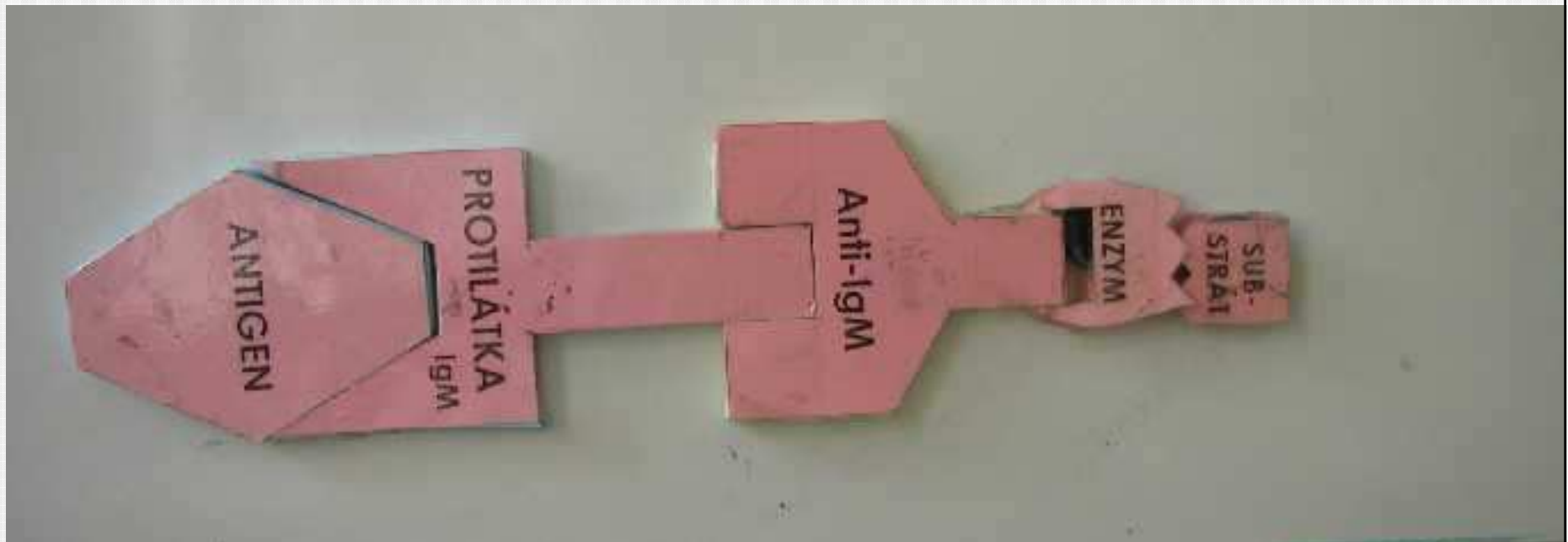
# Význam konjugátu

---

- 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

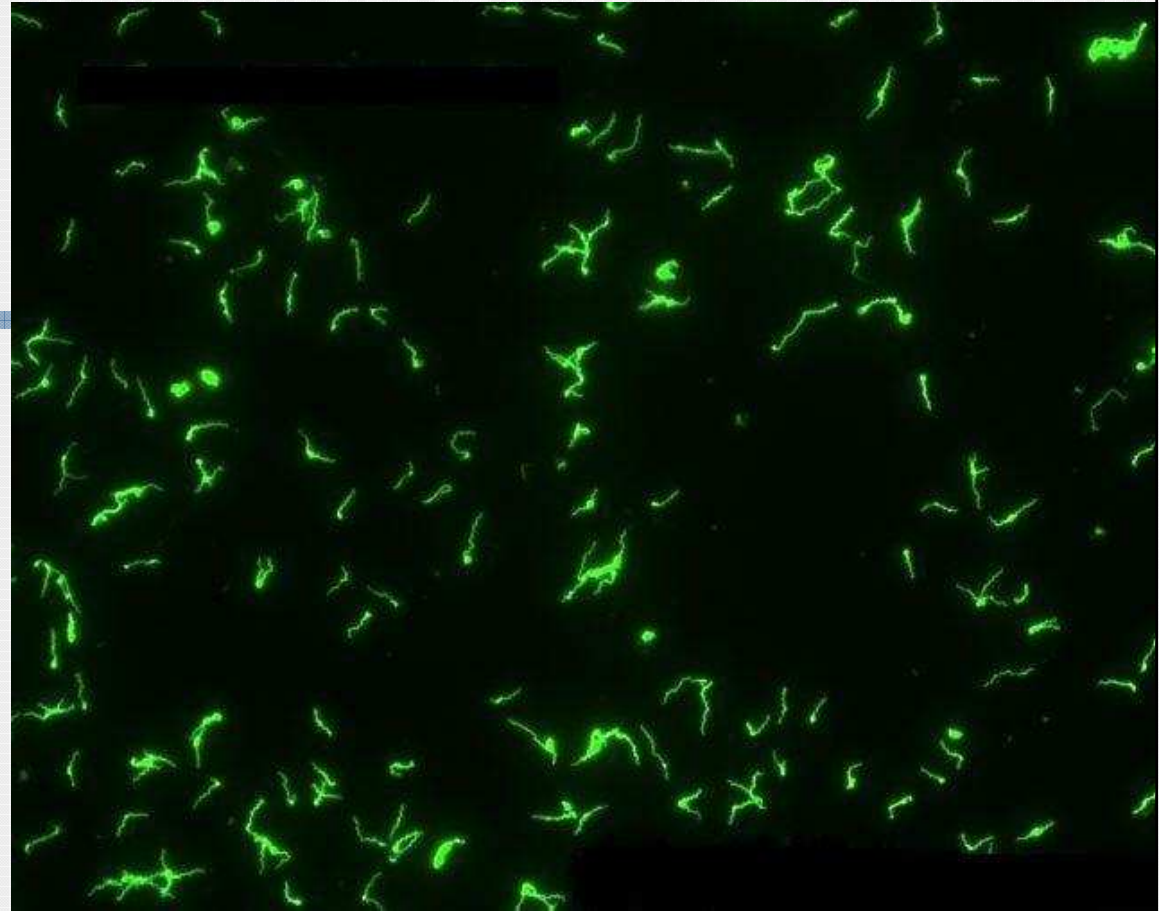
# Příklad reakce ELISA použité k detekci protilátky

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

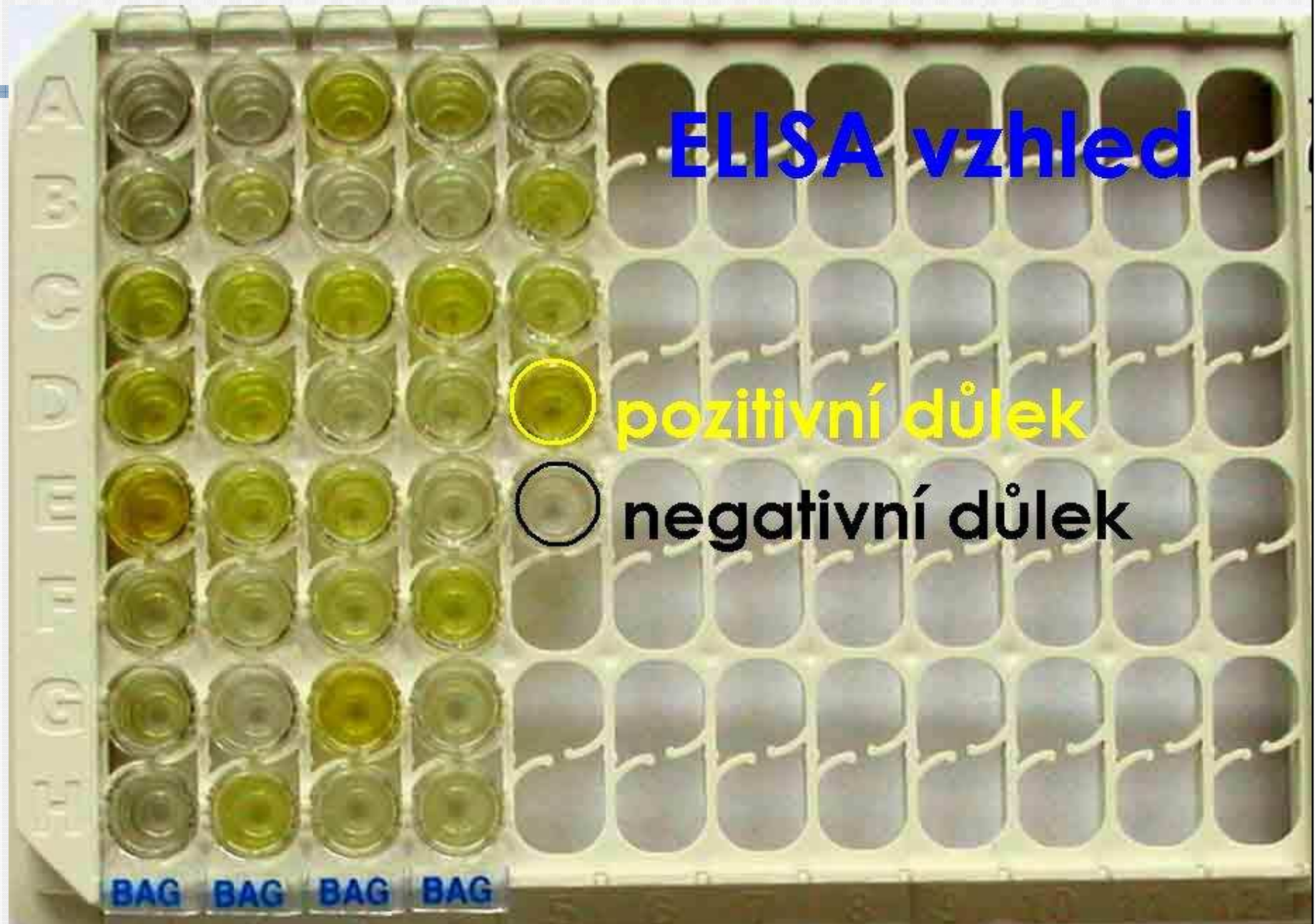
# ELISA – praktické provedení

- 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](http://www.medmicro.info))





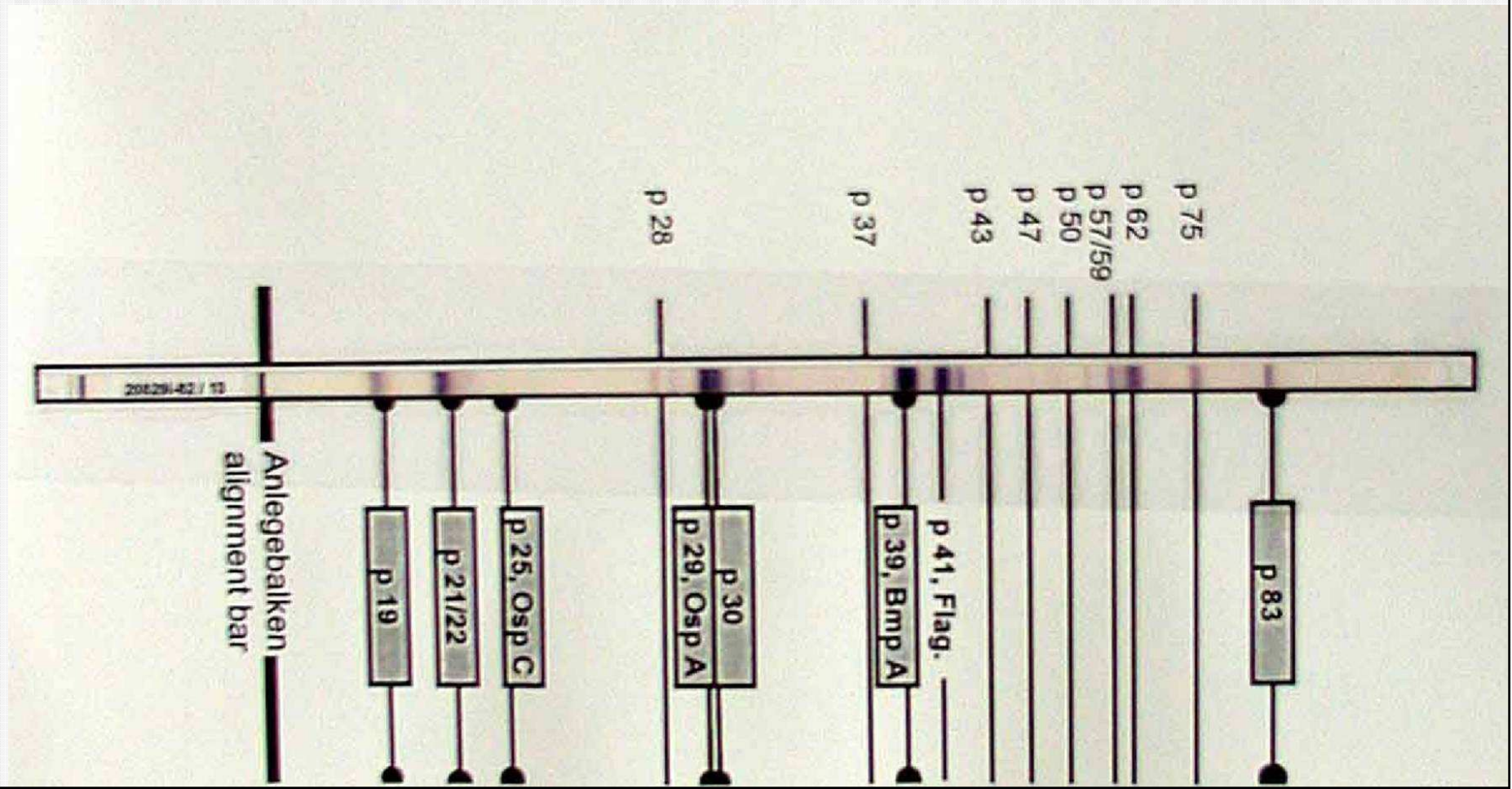
# Western blotting

---

- *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](http://www.medmicro.info))



# Pro dnešek děkuji za pozornost

Plyšový  
streptokok

