

# Časové rozdělení metod

## Metody I.generace

- Některé techniky v roztoku – precipitační, aglutinační, KFR

## Metody II.generace

- Kvantitativně i složité směsi antigenu,
- Imunodifúze, imunoelfo

## Metody III.generace

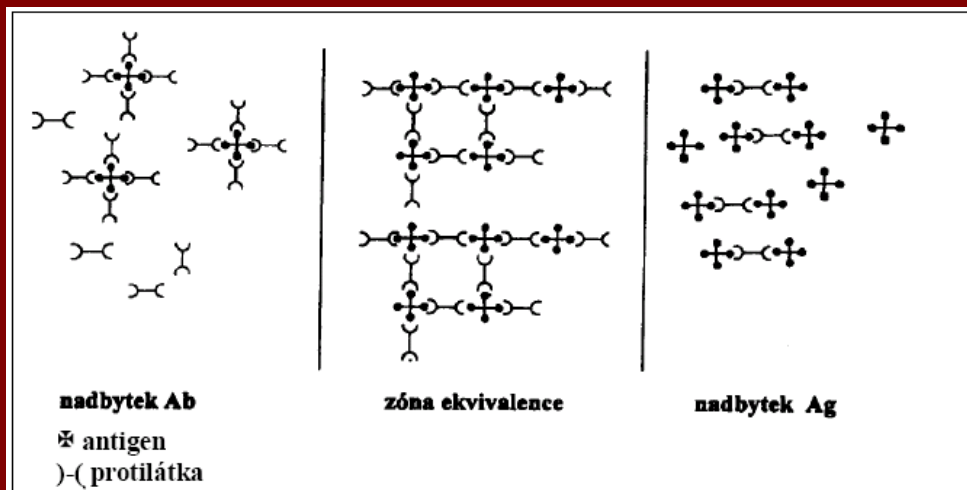
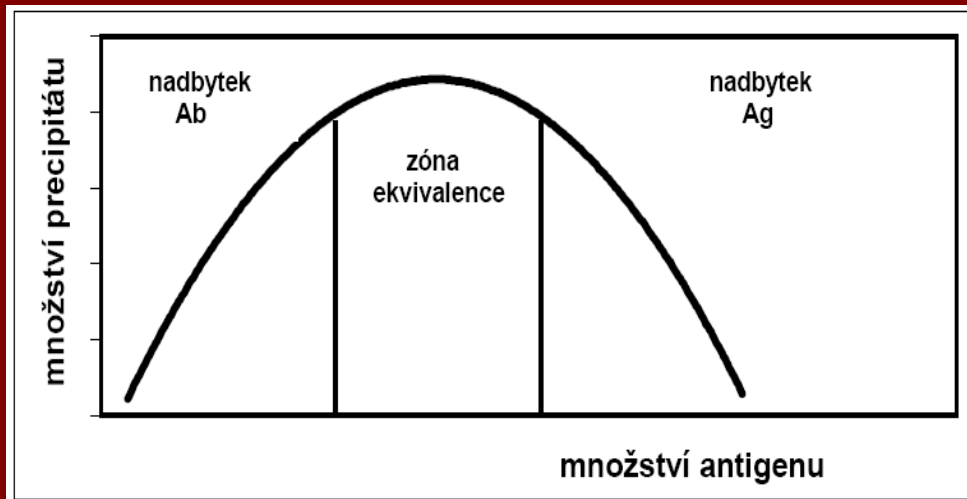
- Velmi citlivé metody, stanoví Ag, Ab i hapteny
- Imunoanalýzy – př. RIA, FIA, EIA, imunoturbidimetrie
- – nefelometrie, -fluorimetrie, popř jejich kombinace

## Metody IV.generace

- Kontinuálně měří Ag, Ab i hapteny
- imunosenzory

# Serologické metody - precipitace

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**

**tvář a velikost části**

# PRECIPITAČNÍ metody:

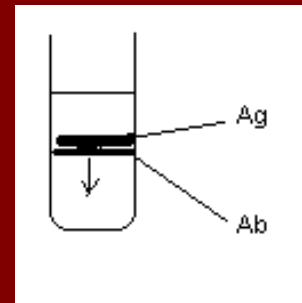
- Ag + Ab → Ag-Ab
- precipitinogen precipitin precipitát sraženina
- solubilní /rozpustný/

• - dělíme:

• A) v kapalinách :

• I. prstencová

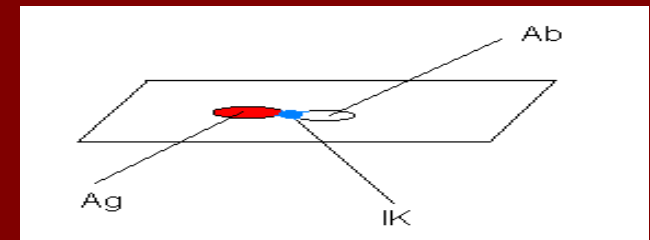
• – prsteneček sraženiny precipitátu



• II. sklíčková – určení pod mikroskopem

• B) v gelu:

• **IMUNODIFÚZE**



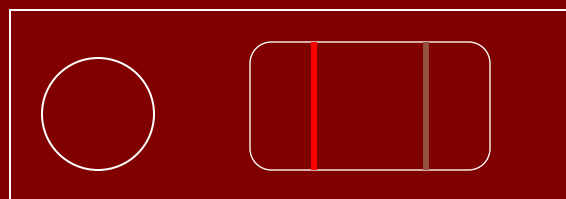
• **využití** : ke stanovení Ag, Ab, H

## **PRECIPITAČNÍ metody:**

- **praxe** – 1. zjištění výskytu či stanovení Ab v séru při inf. onemocnění  
2. identifikace patogena
- Koncentrace Ab se vyjadřuje jako **TITR SÉRA**.
- = **nejmenší zředění Ab, které ještě reaguje s Ag**
- - hodnocení : **kvalitativně** – odečtení okem
- **kvantitativně** :
  - a, zjištěním **množství precipitátu**
  - b, zjištěním **množství Ag** v precipitátu či supernatantu
  - c, změna **optických vlastností** vzorku – 2 metody :
- **NEFELOMETRIE – TURBIDIMETRIE**

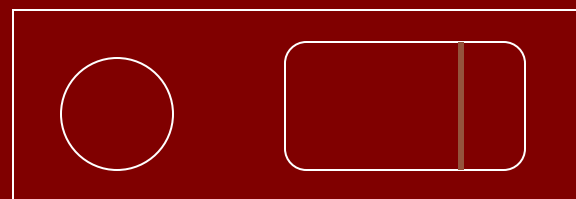
## *př. Precipitační imunochemické metody*

*Screeningové metody* – jednoduché precipitační testy  
terénní kazetové testy pracující v oblasti ekvivalence



S T C

Negativní výsledek



S T C

Pozitivní výsledek

Za nepřítomnosti nebo nedostatku drogy ve vzorku moče vytvoří protilátka imunokomplex (precipitát) se značenou drogou vázanou v místě testu T. (S – vzorek, C – kontrola)

# Imunodifúze

- specifická **reakce Ag s Ab - precipitace**

**/gel z agaru nebo agarózy/- AGAR** směs polysacharidů extrahovaných z červených mořských řas

■ přírodní agar nutno přečišťovat ■ **frakcionací** vznikají 2 složky: ■ **agaróza**

- neobsahuje vedlejší aniontové skupiny - pro difúzi více vhodná

- **standardnější složení** než agar a nižší schopnost **nespecifické adsorpce**

■ **agaropektin**

- obsahuje aniontové skupiny ■ **pro difúzi nevhodný**

• - **příprava gelu:**

• rozvaření agarózy v pufru na vodní lázni

• nanesení na skleněné destičky – ztuhnutí ve vodorovné poloze /při teplotě pod 42°C/

• - **princip ID:**

• - vzájemná **volná difúze Ab a Ag** v gelu na základě **koncentračního spádu** až do místa střetnutí ■ zde vznikají **precipitační linie** ■ **ploučky** ■ **stence** ■ **uhy** /záleží na použitém materiálu/

• - vzniklé precipitáty **detegujeme:**

■ **optikem** - zákal

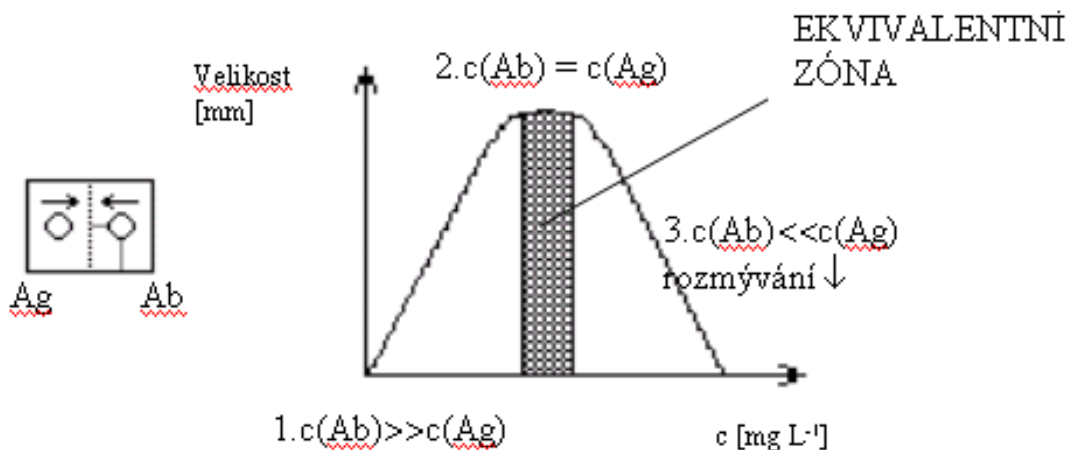
■ **barvením** – Coomassie blue, amidočerň

■ **sekundárními protilátkami**

■ **Au, Ag, radioizotopy**

- vznik precipitátů je **děj postupný!!!**

# Imunodifúze



1. nejdříve vznikají rozpustné imunokomplexy (IK) – nedostatek Ag
2. po vyrovnání  $c(\text{Ab}) = c(\text{Ag})$  vznikají pevné IK – detekce sraženiny  
...EKVIVALENTNÍ ZÓNA
3. převaha Ag nad Ab ~ rozpad IK (Ag naráží na IK – rozmývání sraženiny)

## - rozdělení imunodifúzních metod:

**jednoduchá imunodifúze** – gelem difunduje pouze jedna složka – Ag nebo Ab

**dvojitá imunodifúze** – gelem difundují obě složky – Ag i Ab

**jednorozměrná** – složka putuje v gelu jedním směrem

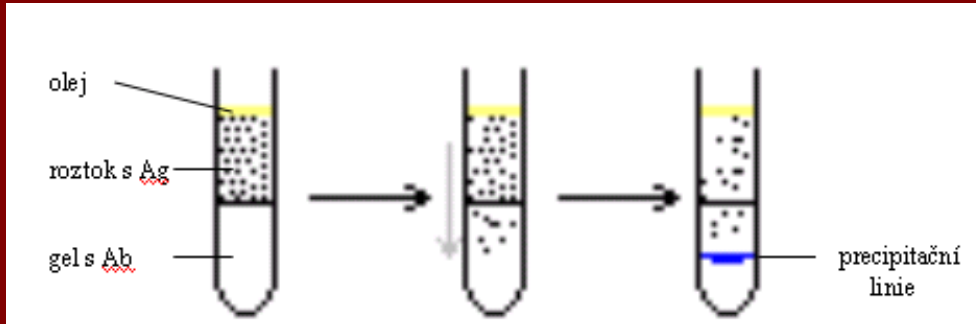
**dvojezměrná /radiální/** – složka putuje více směry

Ag a Ab si neodpovídají – **nevytvoří se precipitační linie**

Směs více typů Ag a Ab – počet **linií** odpovídá **počtu** sobě si odpovídajících párů

**Ab a Ag**

# Imunodifúze



roztok s Ag  
gel s Ab  
olej

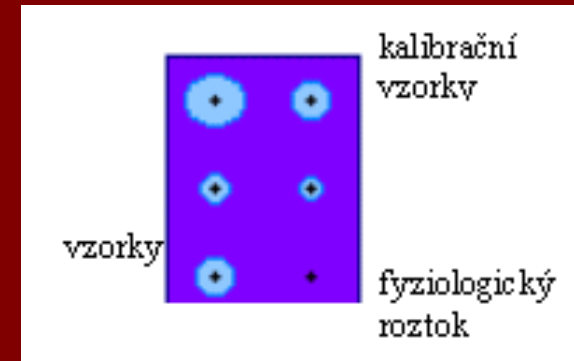
- **jednoduchá imunodifúze**
- - migruje 1 složka:
- **1. složka se smíchá s gelem už při jeho přípravě (nemigruje)**
- **2. složka se aplikuje následně do vyřezaných jamek – MIGRUJE – v místě vyrovnání koncentrací vzniká precipitační linie**
- ↗ **jednoduchá jednorozměrná imunodifúze podle OUDINA**
- - ve spodní části zkumavky agarózový gel s Ab, převrstveno roztokem s Ag - zalito parafínovým olejem – zábrana odpařování
- - čím je Ag koncentrovanější, tím dále od roztoku s Ag vznikají precipitační linie /odečitatelnější/
- - využití: **detekce počtu Ag párů**



# Imunodifúze

## ✧ jednoduchá radiální /dvojrozměrná/ imunodifúze dle MANCINIOVÉ

- - na skleněnou destičku se nalije gel, který obsahuje Ab
- inkubace ve vlhké komůrce ve vodorovné poloze → difúze všemi směry (radiální)
- po obarvení - modré precipitační prstence
- čím je vzorek koncentrovanější – větší průměr prstence
- → změření druhé mocniny průměrů prstenců – vynesení kalibrační křivky a odečet koncentrace neznámého vzorku-
- využití:
- ke kvantitativnímu stanovení Ag
- klinická praxe: stanovení koncentrace IgG, IgA, IgM, IgD, složek komplementu a proteinů akutní fáze



### jamky - vzorky:

-gel s Ab

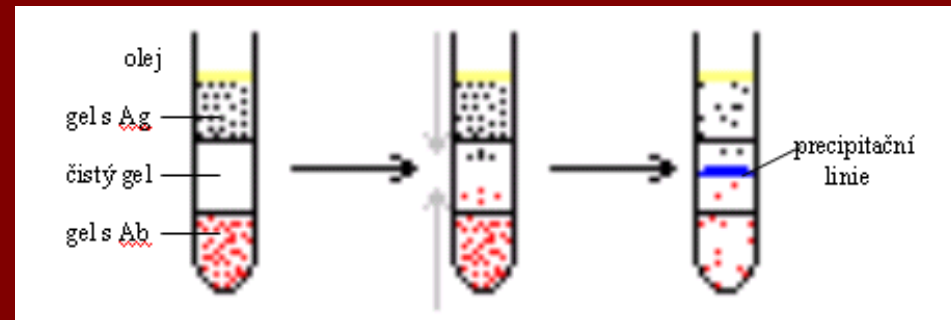
fyziologický roztok –blank

vzorky o neznámé koncentraci

vzorky o známé koncentraci (kalibrační)

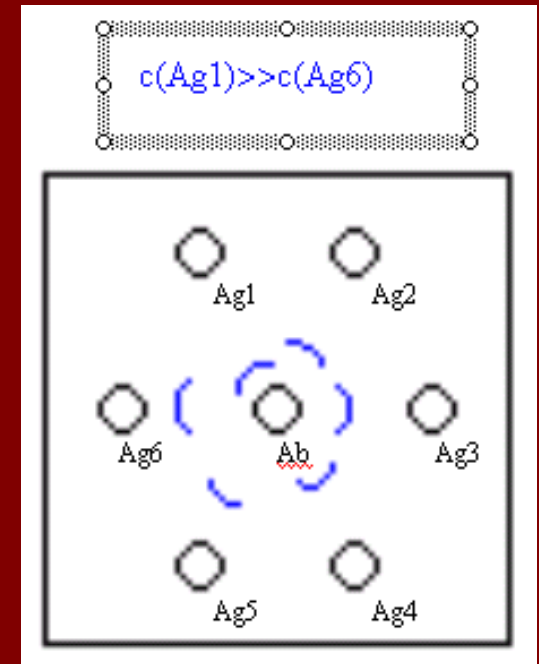
# Imunodifúze

- **dvojitá imunodifúze**
- - gelem *difundují* obě složky
- - *koncentrace* Ag a Ab musí být vzájemně **ekvivalentní** – proti překrývání linií
- ↗ **dvojitá jednorozměrná imunodifúze**
- - ve zkumavce **agarózový gel s Ab** a agarózový gel s **Ag**
- - mezi nimi **čistý gel** – v místě vyrovnání koncentrací se vytvoří **precipitační linie**-
- **využití:** ■ **kvalitativní důkaz Ag**  
■ **určení imunochemické příbuznosti či odlišnosti Ag**



# Imunodifúze

- dvojité **radiální** imunodifúze **dle OUCHTERLONYHO**
- na *skleněné desky* nanesen **čistý gel**
- menší jamky – *různé Ag* či *různé koncentrace* jednoho Ag
- větší prostřední jamka – Ab
- koncentrovanější Ag → **precipitační obloučky** blíže jamky s Ab
- inkubace ve vlhké komůrce
- počet precipitačních linií odpovídá počtu odpovídajících si párů Ag a Ab
- **Využití** –průkaz Ab při alergických alveolitidách, průkaz Ab proti některým patogenům, např. *Toxoplasma gondii*



# Imunodifúze

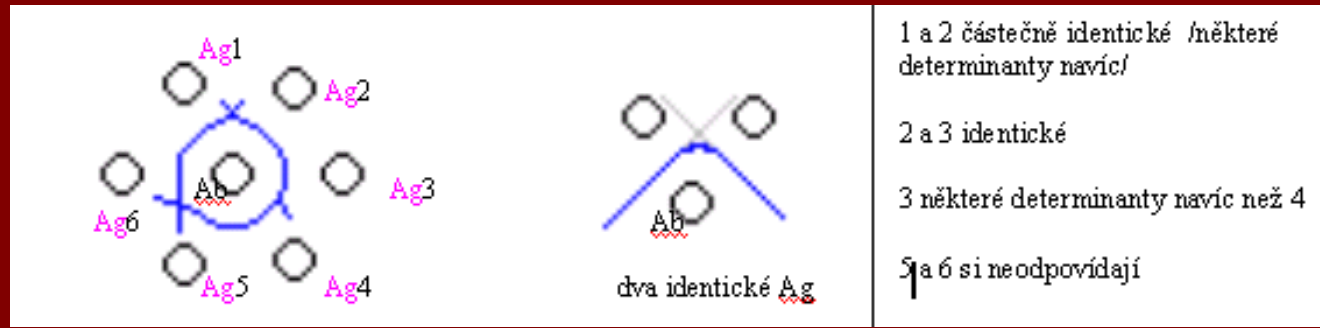
- využití:

■ titrace Ag –  
**koncentrace Ag**  
 určuje *umístění*  
*precipitační linie*

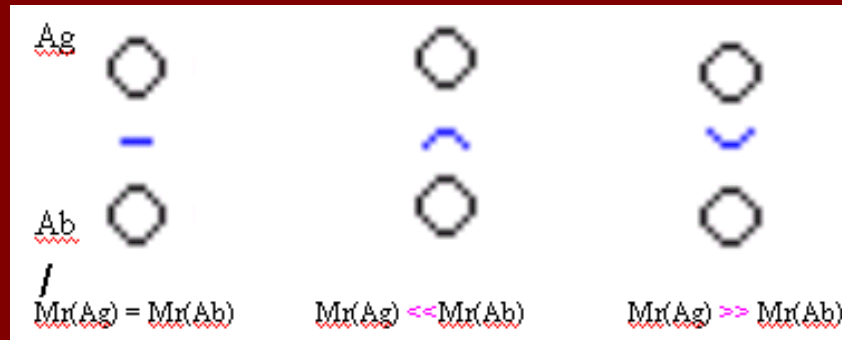
■ důkaz *přítomnosti Ab*

■ porovnávání *identity a*  
*neidentity Ag směsí*

■ *umístění*  
*precipitační linie*



porovnání  $M_r$  (Ag) a  $M_r$  (Ab) určuje  *tvar precipitační linie*



- *menší molekula se dostane dále do gelu*

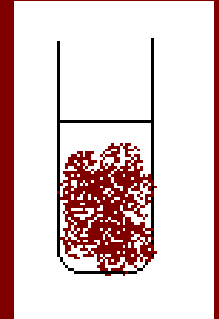
# Aglutinace

- **využití** : ke stanovení **Ag, Ab, H** (viz precipitační metody)
  1. K určování izolovaných bakteriálních kmenů
  2. K průkazu Ab proti patogenům –Widalova reakce – průkaz tyfu, paratyfu, Weil-Felixova – skvrnitého tyfu, Ab proti *Francisella tularensis*
  3. Nepřímá k průkazu auto Ab proti štítné žláze, Ab proti autoAg –

## **Latexová aglutinace**, latex-fixační test

- **rychlé kvalitativní stanovení**
- **Ag nebo Ab imobilizován na latexových kuličkách**
- **Stanovení Ab proti IgG – revmatoidní faktor**

# Hemaglutinační



- Ag + Ab → Ag-Ab
- hemaglutinogen hemaglutin hemaglutinát
- - savčí krvinky (i části)
- - dochází ke **shlukování krvinek**, vlivem komplementu či virové částice pak dochází k **LYZI**.

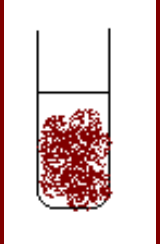
Ke zviditelnění aglutinačních reakcí při použití inkompletních Ab je možno použít **a)** aglutinaci v bílkovinném prostředí **b)** v prostředí s proteolytickými enzymy **c)** použitím antiglobulinového Coombsova séra - králičí ab proti lidským Ig

# Hemaglutinace

- **využití:** K zjišťování krevních skupin a průkaz Ab proti krevním elementům. **Přímý Coombsův test** – k průkazu navázaných antierytrocytárních Ab, reakce pacientových ery s Coombsovým antisérem, přítomnost navázaných Ab se projeví hemaglutinátem
- **Nepřímý Coombsův test** – k průkazu cirkulujících antierytrocytárních Ab
- 1. fáze, pacientovo sérum s ery od dárce, navázání Ab pokud jsou přítomny, vmytí, přidání Coomsova séra, které způsobí aglutinaci
- při 2 reakcích:
- **KFR** – *komplement fixační reakce*
- **HIT** – *hemaglutinačně inhibiční test* :

# HIT

- Patří také mezi metody serologické, založené na inhibici biologických účinků antigenů
- **HIT – pasivní hemaglutinace**
- Vycházíme ze skutečnosti, že viry (některé bakterie atd) mají schopnost se spontánně absorbovat na červené krvinky (rozpustný Ag). Ery pak aglutinují – shlukují se jen v přítomnosti specifické Ab

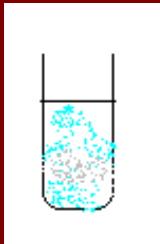


■ **odpovídá-li** protilátka Ag, po přidání obalených ERY Ag se Ag vyváže a vznikne **HEMAGLUTINÁT**

Ab + Ag - Ery ■ **hemaglutinát, proběhne hemaglutinace**

■ **neodpovídá-li** protilátka virovému Ag, nedojde k hemaglutinaci

- situace, kdy přidáme stejný Ag do reakce



• Ab + Ag - Ery ■ **hemaglutinát** + stejný Ag ■ Ag - Ab + Ag - Ery ■ **inhibice hemaglutinace**

- *Metodou inhibice pasivní hemaglutinace lze dokázat velmi malé mn. rozpustného Ag nebo H (metoda je velmi citlivá)*

*pro vyhodnocení můžeme použít i optické metody*



# Komplementové metody

metody využívající faktu aktivace komplementového systému komplexem  
– antigen-protilátka, KFR

- složky reakce: Ab, Ag, C, ERY, hemolyzin

## ■ Ab- vyšetřované sérum

- chceme v něm **prokázat protilátku** / komplement v séru je tepelně inaktivován /

## ■ známý specifický Ag

- jsou-li v séru Ab, vytvoří se **imunokomplex IK**

■ **KOMPLEMENT** - zdrojem nejčastěji sérum morčete (**váže se na IK a aktivuje protilátku**)

**hemolytický komplex: komplex Ag /beraní ERY/ a protilátky ■ EMBOCEPTORu /hemolyzinu/**, získaného imunizací králičího séra beraními erythrocyty

- ■ by došlo k hemolýze je nutná **spoluúčast KOMPLEMENTU** a inkubace 30 minut při 30 °C

## • průběh reakce:

- \* **POZITIVNÍ** ■ ve vyšetřovaném séru je **Ab**

protilátka v séru vytvoří **komplex s Ag** – na něj se **naváže komplement**. Po přidání hemolytického systému **nezbývá** již komplement **do 2. části reakce**

■ hemolýze **NEDOJDE**:

- \* **NEGATIVNÍ** ■ ve vyšetřovaném séru **není Ab**

- v 1. fázi reakce se **nevytvoří IK** – **komplement se nevyváže** a zbývá do 2. fáze reakce, kdy **aktivuje hemolyzin**

■ **DOJDE** k hemolýze:

- velmi **záleží na množství komplementu** – **každý vzorek se musí titrovat**, aby bylo množství komplementu konstantní

## • - použití:

- ■ **diagnostika** příjice /syfilis/, bruceózy, pasteurely
- ■ ve **virologii** průkaz protilátek téměř všech virových nákaz
- ■ **typizace neznámých Ag** nově izolovaných virů
- ■ **průkaz protiorqánových Ab**

