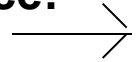


# Imunochemické metody

- stanovení Ag či Ab v histologických preparátech, tělních tekutinách, a jiných vzorcích, Imunoeseje, reakce třetí generace.

základem je reakce:



- imunokomplex

-jeden z reaktantů nese značku a tím je vizualizován výsledek. Detekční systém tak zvyšuje citlivost reakce a umožňuje modifikace, které prostou precipitací reakce nejsou dosažitelné.

-enzym EIA, EMIT enzyme multiplied immunoassay technique

geneticky upravený enzym CEDIA

radioizotop RIA

fluorescenční látka FIA

chemiluminiscenční látka LIA

\*

# Charakteristika reaktantů

- **Antigeny *Ag*** – makromolekuly (polymery: proteiny, polypeptidy...)

- ✓ navozují specifickou imunitní odpověď

- ✓ specificky reagují s protilátkami

- ✓ haptén – nízkomolekulární látka (léčiva, drogy) navázána na vysokomolekulární nosič

**Protilátky *Ab*** – bílkoviny (glykoproteiny) tělních tekutin

- ✓ vykazují specifickou vazebnou schopnost vůči antigenu, na jehož

podnět se vytvořily, mohou být cíleně připravené **a)** jen proti **jedné chemické skupině b)** která je společná pro více strukturně chemicky příbuzných látek

# *Imunochemické metody*

moderní imunologické diagnostické metody, vznikly v 80. letech min. století  
vychází z poznatků imunologie, molekul. biol., enzymologie, fotometrie a radiochemie

- *Heterogenní imunometody* – separace molekul značeného reagens vázaného v imunokomplexu od volných molekul značeného reagens v roztoku (radioimunometody, ELISA) – vysoká citlivost
- *Homogenní imunometody* – bez separace frakcí, jsou jednodušší, rychlejší, lze je automatizovat (enzymová, fluorescenční a chemiluminiscenční immunoanalýza)

# RIA ~ *radioimmunoassay*

- zavedena 1959
- **Princip metody:** spojuje jednoduchou imunologickou reakci Ag s Ab s metodikami radiochemie, která používá Ag nebo Ab značené radionuklidy
- - citlivost:  $10^{-9}$ -  $10^{-17}$  mol/l → velmi významné, nejcitlivější
- - je možné stanovovat látky i v tělesných tekutinách /krev, moč, mozkomíšní mok.../ i v pg $10^{-12}$ (pikogramech)
- - stanovujeme ***jakékoliv látky, proti nimž lze vytvořit protilátku***
- protilátku získáme komerčně nebo injikací Ag či haptenu do králíka nebo morčete

## - POSTUP:

V metodě je využito kompetice, kdy stanovený Ag a známé mn. téhož Ag značeného radioaktivním izotopem soutěží při tvorbě imunokomplexu o omezený počet vazebných míst specifické Ab (ta je v lim. množství)

⇒ **imunizace** ~ příprava Ab:

- injekce **Ag** či **haptenu** do zvířete /králík, morče/  
- *nekompletní Ag – je potřeba navázat makromolekulární nosič*

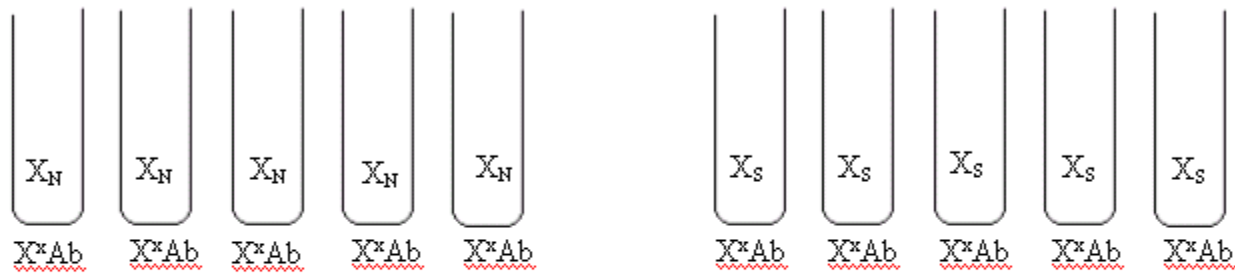
✿ **značení radioaktivním prvkem** (Ag = X...značka)

- 3 prvky:  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$

- označený Ag → **Xx**

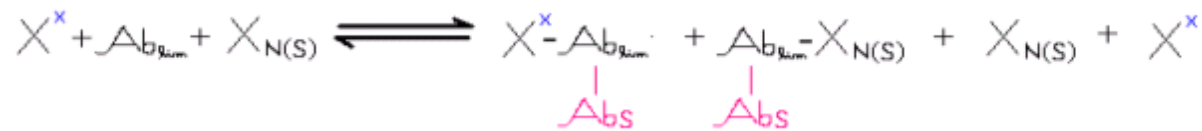
✿ **vlastní reakce:**

- 4 složky:



**Xx**.....značený Ag  
**Ab lim60%**.....protilátka ze zvířete /je limitováno ~ známo její množství/  
**XN**.....neznámý antigen  
**XS**.....standardní antigen

∅ **oddělení IK:**  
 • **imunochemické** – sekundární protilátka **Abs**  
 - vyrobí se proti prvotní protilátce Ab ~ Ab pak vystupuje jako Ag  
 → Abs + Ab ...vznikají sraženiny IK



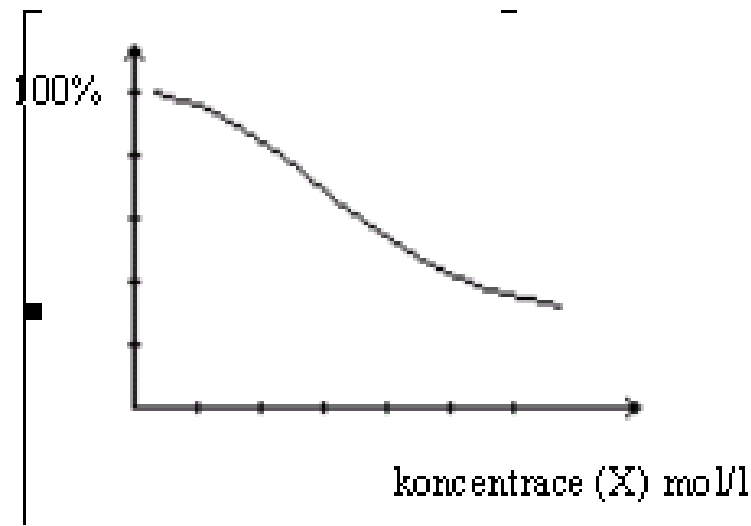
- **izolace IK** -imunochemicky – Abs, **fyzikálně** - filtrace, centrifugace...  
**molekulární metody** – elektroforéza, chromatografie ...

∞ **vyhodnocení:**

- čím **více molekul X** se bude v každé zkumavce nacházet, tím **méně molekul Xx** se bude moc **navázat s protilátkou**

## Vyhodnocení:

%  $X^*$   
v imunokomplexu  
nebo  
počet impulsů  
za minutu



**- výhody:** \* vysoká citlivost, specifčnost, přesnost,  
automatizace procesů

\* mikromnožství látek přímo v biologických kapalinách

**- nevýhody:** \* **nakladné zařízení**, drahé přístroje-scintilátor, drahá  
scintilační tekutina

\* **radioaktivní materiál** – zdravotní riziko,  $\gamma$  nebo  $\beta$  záření, zvl.  
bezpečnost při práci, likvidace radioakt. materiálu

\* **vlastnosti radionuklidů** ~ znehodnocování krátkým poločasem  
rozpadu – časová náročnost (musí se provést hned), u izotopů  
vydávajících  $\gamma$  záření ( $^{125}I$ ,  $^{131}I$ ,  $^{75}Se$ ) je omezena expirace souprav  
krátkým poločasem rozpadu

- využití:
- využití v kriminalistice, soudním lékařství (detekce jedovatých látek), stanovování velmi malého množství látek (nízko i vysokomolekulárních) např.: kardiotonika, cytostatika (léčba infekčních onemocnění, nádorových onemocnění), hladiny hormonů, léčiv, vitamínů, drogy, minoritních složek séra, ve virologické diagnostice, vyšetření specif. autoprotilátek např. proti acetylcholinovému receptoru při *myastemia gravis*,



- v alergodiagnostice: **RAST** test (radioallergensorbent test) je vyvinutý pro detekci Ab proti specifickému alergenu, **RIST** test (radioimmunosorbent test) je testem vyvinutým pro zjištění antigenu, **Radioimmunoprecipitace** je pokládána za nejpřesnější metodu pro stanovení IgE v sérech

## FIA

- Vypracována v r. 1941, uvedena do praxe v 50. letech
- **Princip:** navázáním fluoresceinu – fluorochromu na bílkovin séra (Ag nebo Ab), podmínkou je neztratit imunologické vlastnosti. Výsledkem je spojení vysoké specifity imunologických reakcí s citlivostí průkazu fluorescence pomocí fluorescenčního mikroskopu- citlivost:  $10^{-9}$ -  $10^{-12}$  mol/l
- **fluorescenční barviva:**
  - **TMRITC**.....tetramethylrodaminizothiokyanát
  - **FITC** .....fluorescein izothiokyanát,
  - **PE**..... ..... **phycoerythrin**
- - podstata: molekula přechází **ze základního energetického stavu** při absorbování energie do stavu **EXCITOVANÉHO**, kde je **nestabilní** a **vyzářením energie** ve formě tepla či světla (emise) *se vrací zpět*
- - energie dodána lampou v přístroji
- **ENNÍ**

- **vlastnosti SONDY:**

- \* *intenzita fluorescence dostatečně vysoká*
- \* *fluorescenční signál odlišitelný od pozadí*
- \* *vazba na sondu nesmí deformovat vazebné vlastnosti Ag a protilátky*  
*nenavázané barvivo musí být lehce odstranitelné*

**! biologický materiál sám o sobě vyzařuje energii → pozadí**

- 2 druhy:

- ★ **HOMOGENNÍ**
- ★ **HETEROGENNÍ**

★ **HETEROGENNÍ**:- *vlastnosti*:

- **intenzita** fluorescence se v průběhu reakce nemění
  - stanovení **vysokomolekulárních látek**
  - **nutné oddělení IK** od volných reaktantů
- 2 způsoby oddělování:

\* **PRECIPITACE** ~ srážení v imunologii

- PEG ~ *polyethylenglykol* → **srazí se**

- \* **navázání na pevný nosič**

★ **HOMOGENNÍ**:- *vlastnosti*:

- **intenzita** fluorescence se při vzniku konjugátu **mění**
- • **nemusíme oddělovat IK** od volných reaktantů
- stanovení **nízkomolekulárních látek** /hapten/ - *antibiotika, sedativa, hypnotika ...*

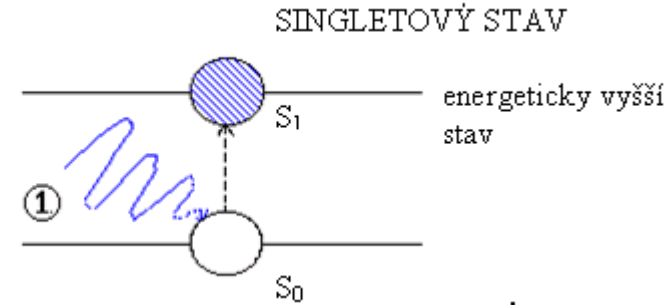
Citlivost je omezována interferencí s různými látkami ve vzorku (zejména v krevním séru), malý stupeň fluorescenčních změn.

**Podstata:** kompetitivní princip, využívá se fluorescenční polarizace, zhášení, stupňované fluorescence, excitační přenos fluorescence, fluorescenčně značený substrát.

# • FLUORESCENCE

- - třístupňový proces u **FLUOROFORŮ** a **FLUOROCHROMŮ**
- - schopny absorbovat určité množství světla /struktura – ar. kruh/
- **1. FÁZE → EXCITACE**

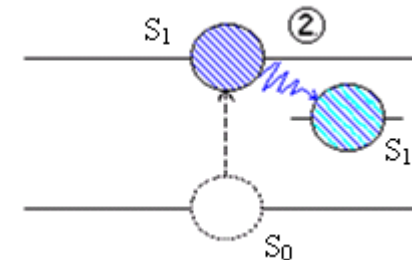
laser  
obl. Lampa  
~ ENERGIE  
EXCITACE



## 2. FÁZE → DOBA EXCITOVANÉHO STAVU

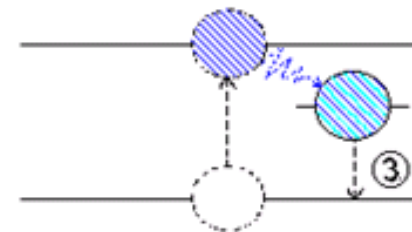
- trvá  $10^{-9}$ s ~ velmi krátká

- *konformační změna*
- *disipace energie* → část energie se ztrácí
- – přechází na nižší stav



## 3. FÁZE → EMISE

- vyzáření energie, přechází na základní stav → vyzáření **EMISNÍ ENERGIE**  
/~ energie emisního spektra/



**energie EXCITAČNÍ se NErovná EMISNÍ !!!**

$$E_{ex} > E_{em}$$

$$h \cdot (c/\lambda_{ex}) > h \cdot (c/\lambda_{em})$$

⇒  $\lambda_{ex} < \lambda_{em}$  ⇒ vl. délka excitační je menší než emisní