KLINICKÁ BIOCHEMIE

Imunochemické metody stanovení bílkovin

Mgr. Petra Bořilová Linhartová, Ph.D.
plinhart@med.muni.cz

Obsah přednášky

Imunochemické metody stanovení bílkovin

- Plazmatické bílkoviny, proteiny akutní fáze
- Kvalitativní a kvantitativní stanovení bílkovin - elektroforéza bílkovin, spektrofotometrické a chromogenní stanovení, bílkoviny v moči

- Imunochemické metody stanovení bílkovin
- Imunoanalýza: RIA, EIA a další
- Imunochromatografie, imunochromatografické proužky

Bílkoviny

- složeny z 20 různých AA vzájemně vázaných peptidovými vazbami, přesné pořadí aminokyselin určuje primární strukturu bílkovin
- další uspořádání bílkovin je dáno vodíkovými můstky (sekundární struktura), elektrostatickými silami, hydrofobními interakcemi a disulfidovými můstky (terciární struktura)
- oligomery identických nebo podobných podjednotek bílkovin se mohou někdy navzájem vázat nekovalentními vazbami a vytvářet tak kvartérní strukturu
- obsahují v řetězci více než 100 AA, jedná se velké polymery o molekulové hmotnosti 10 – 1000 kDa ale i více

Plazmatické bílkoviny

- Krevní plazma a intersticiální tekutina

Biosyntéza
- Játra – většina
- Lym – Ig
- Enterocyty – apoprotein B-48

Odbourávání
- Hepatocyty
- Mononukleární fagocytární systém – degradace komplexů (haptoglobin-hemoglobin, antigen-protilátka)

Plazmatické bílkoviny

Regulace syntézy

↑	↓
Zánět	Poškození jater – parenchymální tkáň
Hypertyreoizmus	Nutriční deficit
Hyperkortikalizmus	hypotyreodizmus
↑ c STH	DM
Fe deficience	Alkoholizmus
Ztráta proteinů	
Klonální produkce Ig	

Plazmatické bílkoviny

- **pre-proteiny**

- posttranslační modifikace v drsném ER a GA (proteolýza, glykosylace, fosforylace) - většinou **glykoproteiny** (kromě Alb a CRP)
  - N-glykoproteiny: Asn
  - O-glykoproteiny: Ser a Thr (muciny a proteoglykany)

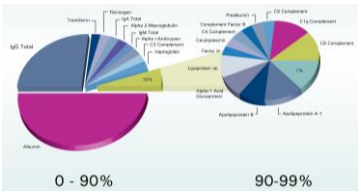
- **polymorfizmus** – Ig, ceruroplasmin, transferin

- charakteristický poločas setrvání v oběhu: Alb - 20 dnů

Plazmatické bílkoviny

- celkový protein = více než 300 proteinů (některé enzymy a proteohormony jsou klasifikovány zvlášť)
- Sérum: 62-82 g/l (35-50 g/l Alb a 20-35 g/l sérové globuliny = transportní proteiny, reaktanty akutní fáze, globuliny)

Plazmatické bílkoviny



Plazmatické bílkoviny

- málo stavů ovlivňuje c všech bílkovin
- **Hypoproteinémie**
  - hromadění tekutiny v extravaskulárním tkáňovém prostoru → edém
  - malnutrice (albumin, transferin, C3)
  - děti a gravidní
- **Hyperproteinémie**
  - dehydratace
  - plazma > sérum (fibrinogen)
  - odběr ve stoje (10-15%)
  - svalová aktivita (12%)
- většinou změny c jednotlivých složek

Plazmatické bílkoviny

Fce

- **Udržování onkotického (koloidně osmotického) tlaku**
  - brání nadměrnému pronikání intervaskulární tekutiny do extravaskulárního prostoru

- **Transport minerálů, hormonů, lipidů, katabolitů**
  - Prealbumin
  - Albumin – MK, bilirubuin, Ca, léky, vitamíny
  - Ceruroplasmin - Cu
  - Transferin - Fe
  - Apoproteiny – lipidy
  - Haptoglobin – volný hemoglobin
  - Transkortin – **CO?**
  - TBG – thyroxin
  - RBG - retinol

Plazmatické bílkoviny

Fce

- **Hemokoagulace a fibrinolýza**
  - koagulační faktory – IX, VIII, trombin, fibrinogen
  - antikoagulační faktory (faktory rozpouštějící tromby) – plazmin

- **Enzymy a inhibitory enzymů**
  - tvorba komplexů s enzymy a jejich odstranění
  - cholinesteráza, ceruroplazmin
  - inhibitory proteáz – bránící napadení poškozených a zanícených tkání proteolytickými enzymy (α_1-antitrypsin, α_1-antichymotrypsin, α_2-makroglobulin)

Plazmatické bílkoviny

Fce

- **Obranné reakce organizmu**

- Specifická a nespecifická imunita
  - Ig – odstranění antigenů
  - Komplementový systém – odstranění buněčných antigenů

- Akutní fáze zánětu
  - α_1-antitrypsin, α_1-kyselý glykoprotein, haptoglobin, α_2-makroglobulin

Plazmatické bílkoviny

Klinické využití

- Kardiomarkery
- Tumormarkery
- Reaktanty akutní fáze
- Buněčné enzymy
- Hormony
- Cytokiny

Proteiny akutní fáze

- Zánětlivé a stresové markery
- Zánět, trauma, nádorové bujení
- Destrukce buněk, reverzibilní poškození b. a reparace, metabolická aktivizace (IS)
- Změny c proteinů během zánětu či nekróz
- Syntéza v játrech

Proteiny akutní fáze

Pozitivní	Negativní
C-reaktivní protein	Albumin, prealbumin
Složky komplementu (C3, C4)	Transferin
α_1-antitrypsin, α_1-antichymotrypsin, α_2-makroglobulin	Antitrombin
Haptoglobin, hemopexin, ferritin, ceruroplasmin	Transkortin
Sérový amyloid A (SAA)	RBP
Prokalcitonin	
Fibrinogen	
TNF-α, IL-1, IL-6	

Význam –

- **Kritérium syntézy bílkovin v játrech a ukazatel malnutrice**

Proteiny akutní fáze

Význam +

- **Složky imunitní reakce**
  - likvidace noxy, úloha při odstraňování poškozených b., modulace imunitní odpovědi (CRP, C3, C4, cytokiny)
- **Ochrana před kolaterálním poškozením tkáně**
  - z fagocytů atd. - proteolytické enzymy a reaktivní formy kyslíku
  - Inhibitory proteáz (α_1-antitrypsin, α_1-antichymotrypsin, α_2-makroglobulin)
  - Haptoglobin, hemopexin, ferritin, ceruroplasmin
- **Transport odpadních látek**
  - Hemoglobin, hemopexin, SAA
- **Koagulace a bílkoviny podílející se na regeneraci**
  - Fibrinogen, prokalcitonin, protrombin, von W f, plazminogen

Proteiny akutní fáze

Rychlost změn plazmatických c

- **Časně** (6-10 h)
  - CRP, SAA, prokalcitonin
- **Se střední dobou odpovědi** (12-36 h)
- α_1- kyselý glykoprotein, α_1-antitrypsin, haptoglobin, fibrinogen
- **Pozdní** (48-72 h)
- C3, C4, ceruroplasmin

Plazmatické bílkoviny

Albumin

- 55-65% celkové plazmatické bílkoviny
- 40% v plazmě, 60% v extracelulárním prostoru
- játra produkují cca 12 g za den (dle příjmu AA)
- biol. poločas 20 dní

Fce

- onkotický tlak
- proteinová rezerva organizmu
- transport – steroidní hormony, žluč. k., MK, bilirubin, léky (sulfonamidy a salicyláty), ionty Ca, Mg, Zn, Cu

Plazmatické bílkoviny

Albumin

- **Odběr:** ráno, nalačno (10 – 12 hodin před odběrem nejíst, být v klidu, vypít 2 – 3 dl vody). Před odběrem 15 minut sedět.

- **Vyhodnocení výsledků:** do 24 hodin, při urgentním požadavku do 2 hodin

- **Fyziologické hodnoty v séru:**
  - Novorozenci 0 - 6 týdnů: 27 - 33 g/l
  - Kojenci 6 týdnů - 1 rok: 30 - 43 g/l
  - Muži, Ženy 1 - 110 let: 35 - 53 g/l

Plazmatické bílkoviny

Albumin ↓ c

- **sníženou tvorbu albuminu** v játrech, při:
  - těžkém poškození jater - cirhóza jater (↑ ALG/GLB ratio)
  - podvýživě s nedostatečným přívodem bílkovin ve stravě (kwashiorkor)

- **zvýšené ztráty albuminu** z organizmu, při:
  - nefrotickém syndromu – onemocnění ledvin s výraznými ztrátami bílkovin moči
  - popáleninách
  - onemocnění střev, žaludku s výraznými ztrátami bílkovin stolicí
  - Otoky, tekutina v tělních dutinách

- **zánětlivá onemocnění, zvýšený katabolizmus**:
  - zánětem nebo nádorem vyvolaná ↓ c bílkovin krvi (neg protein akutní fáze)

Plazmatické bílkoviny

Albumin ↓ c

- **onemocnění s nadprodukcí protilátek** (např. chronický zánět, MM)

- jiné stavy se sníženou hladinou albuminu v krvi:
  - **sepse** (systémový infekční zánět s rozsevem choroboplodných zárodků z původního místa infekce do jiných orgánů s jejich poškozením)
  - **šok** (těžký život ohrožující stav, kdy dochází k selhání krevního oběhu s těžkou poruchou prokrvení tkání a orgánů)
  - **převodnění** organizmu
  - **analbuminemie** - velice vzácná vrozená porucha tvorby ALB, onkotický tlak bývá poloviční než u normálních c ALB, vznikají pouze mírné otoky - kompenzačně se zvyšuje tvorba jiných bílkovin

↑ c

- **dehydratace, ketodieta**

Proteiny akutní fáze

CRP

- β_2 – globulin
- Precipituje C-polysacharid pneumokoků
- Aktivuje komplemetový systém, hraje úlohu opsoninu (vazba na fosfocholin odumřelých b. a některých bakt)
- ↑ c po 4 hod po navození reakce akutní fáze (první dny ↑ c více než 100x)

- rozdíl mezi bakt a vir horečnatými onem.
- monitorování léčby ATB

- ↑ c u akutních onemocnění (infarkt myokardu, hluboká žilní trombóza, bakt infekce..) a u chronických (malignita, revmatická choroba, nekróza tkáně, zánětlivé střevní onem)

Proteiny akutní fáze

Prokalcitonin

- sekrece stimulována bakt endotoxiny
- ↑ c po 2 hod po navození reakce akutní fáze, max 6-8, až 72 hod
- regulace zánětu a analgetické úč
- ↑ c indikátor časné sepse, orgánová selhání bakt původu, šokové stavy

Haptoglobin

- váže volný hemoglobin (jinak prochází glomeruly a precipituje v tubulech → poškození ledvin), zamezení ztráty Hb a Fe
- ↑ c – akutní záněty, maligní nádory, poranění
- ↓ c – hemolytické anemie

Proteiny akutní fáze

SAA

- vazba na HDL
- Syntéza – hepatocyty, aktivované makrofágy a fibroblasty
- ↑ c po 8 hod po navození reakce akutní fáze
- ↑ c i u méně závažných infekcí (i virových)
- ↑ c - infekce, marker rejekce štěpu, prognostický marker chorob KVS, chronicky u revmatoidní artritidy, TBC a lepry

Proteiny akutní fáze

α_1-antitrypsin
- inhibitor serinových proteáz
- ↑ c – akutní záněty, nádory, akutní i chronická hepatopatie, cirhózy
- ↓ c – glomerulonefritidy, RA, genetické příčiny

α_2-makroglobulin
- inhibitor proteáz a transport cytokinů a růstových faktorů
- ↑ c – akutní záněty, nefrotický sy, RA, parodontitida (GCF), Crohnova choroba a ulcerózní kolitida
- ↓ c – progrese rakoviny prostaty

Proteiny akutní fáze

Ceruroplazmin
- transport plazmatické Cu
- ↓ c – onem jater, Wilsonova, Menkesova choroba, malnutrice

Fibrinogen
- koagulační faktor I
- ↑ c – akutní záněty, poškození tkání, rizikový faktor aterosklerózy
- ↓ c – hepatopatie, DIC

Transferin
- transport Fe
- ↑ c – anemie z nedostatku Fe
- ↓ c - popáleniny, infekce, malignity, onem jater a ledvin

Proteiny akutní fáze

Imunoglobuliny
- protilátky produkované B-lym po stimulaci antigenem
- reagují specificky s antigenními determinanty (epitop)
- tetramer – 2 H (izotypy – G, M, A, E, D) a 2 L (λ a κ, C a V oblast) řetězce – disulfidické můstky

Stanovení bílkovin

Kvalitativní stanovení

- oddělení jednotlivých frakcí bílkovin ve směsi (např. krevní sérum) je možné na základě jejich odlišné velikosti, resp. molekulové hmotnosti pomocí **elekroforézy**

Kvantitativní stanovení

- samotná koncentrace bílkovin nevypovídá o jejich biologické aktivitě, tu je třeba stanovit zvlášť jako např. enzymovou nebo imunologickou aktivitu

- **Proteiny:** celková bílkovina, ALB, TnI, IgA…
- **Hormony:** TSH, fT4, testosteron, hCG…

- Problém odhadu obsahu a charakteru proteinů je v tom, že jako standard používáme čistý protein, ale analyzujeme obvykle směs, nebo protein o neznámém aminokyselinovém složení.

Plazmatické bílkoviny

ELFO plazmatických bílkovin

- diagnostika onemocnění, která se projevují změnami v zastoupení jednotlivých frakcí bílkovin krevního séra či patologickou přítomností bílkovin (sérum, moč, likvor)

- ELFO séra probíhá v pufru o alkalickém pH

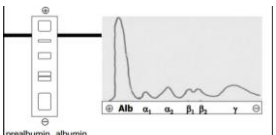
- rozdělené frakce na nosiči lze obarvit a jejich poměr stanovit fotometricky po elucí bílkovin s navázaným barvivem, nebo také denzitometricky, tzn. měřením odraženého, nebo prošlého světla, pokud je použitý nosič transparentní

- při znalosti hmotnostní koncentrace celkové bílkoviny a poměrů mezi absorbancemi jednotlivých frakcí lze tyto frakce kvantifikovat

Plazmatické bílkoviny

Typy plazmatických bílkovin

- dle ELFO pohyblivosti (agaróza, acetátcelulóza)
- 5-6 frakcí



prealbumin, albumin
α_1-globuliny: α1-antitrypsin, α1-fetoprotein, α1-lipoprotein
α_2-globuliny: α2-makroglobulin, haptoglobin, ceruloplasmin, feritin
β-globuliny: transferin, C-reaktivní protein, β-lipoprotein, fibrinogen
γ-globuliny (hl. IgG, IgA, IgM)

Stanovení bílkovin

Kvantitativní stanovení

- **chromogenní stanovení** - indukováním tvorby barevného produktu přidáním vhodného činidla a následnou **spektrofotometrickou kvantifikací**
  - **Biuretova metoda**
  - **Lowryho metoda** (Folin-Ciocalteuovo činidlo)
  - **BCA metoda**
  - **Metoda dle Bradfordové** (Coomassie Blue)

Všechny tyto metody jsou destruktivní, vzorek je pro další analýzu nepoužitelný!

- **přímé spektrofotometrické stanovení** - absorbance ultrafialového světla (při 280 nm)

Stanovení bílkovin

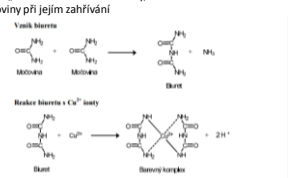
Biuretova metoda

- v alkalickém prostředí
- tvorba komplexní sloučeniny Cu^{2+} s ionty peptidových vazeb (fialové zbarvení)
- fotometrickému stanovení - komplex silně absorbuje světlo v oblasti 540-560 nm
- látky obsahující v molekule alespoň dvě peptidové vazby (-CO-NH-) nebo dvě amidové -CO-NH_2 (není specifická pouze pro bílkoviny)
- **biuretovo činidlo**: síran měďnatý, alkalizující složka (převede peptidovou vazbu na enolformu), vinan draselno-sodný (zabraňuje jako komplexotvorná látka srážení Cu^{2+} na $Cu(OH)_2$), jodid draselný (chrání Cu^{2+} před autoredukcí)
- citlivost malá kolem 10–100 mg bílkoviny/ml
- standard (BSA, ovalbumin), nezávisí na AA složení, rušena např. NH_4^+, Tris

Stanovení bílkovin

Biuretova metoda

- intenzita zbarvení komplexu přímo úměrná c bílkovin
- peptidy se 2 čtyřmi a více zbytky AA vytvářejí komplex červený, tripeptidy fialový, dipeptidy nereagují
- „biuret„ - triviální název sloučeniny, která vzniká ze dvou molekul močoviny při jejím zahřívání



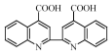
Stanovení bílkovin

Lowryho metoda

- biuretova reakce s následnou redukcí Folin-Ciocalteuovým fenolovým činidlem
- charakteristické modrofialové zbarvení (v čase nestabilní)
- velmi citlivá 2-100 mg/ml, ale na druhé straně je dvoustupňová a vyžaduje minimální dobu inkubace 40 min
- měření absorbance při 750 nm
- standard (BSA, OVA), rušena např. NH_4^+
- více závisí na složení proteinu (redukce fosfomolybdenanů a fosfowolframanů Tyr, Trp, Cys)

BCA metoda

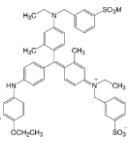
- podobná s Lowryho, ale činidlem je BCA (kyselina bicinchoninová)
- fialově zbarvený komplex
- citlivost 0,5 mg/ml
- měření absorbance při 562 nm



Stanovení bílkovin

Metoda dle Bradfordové

- principem je adsorpční vazba barviva Coomassie Brilliant Blue G-250 na molekulu proteinu, činidlo (vodný roztok) obsahuje barvivo, ethanol a H_3PO_4
- barva hnědá, po reakci s proteinem intenzivně modrá
- velmi citlivá 1 mg/ml, výsledek již za 5 minut
- závisí na obsahu bazických (zvl. Arg), ale i aromatických AA
- negativní interference: detergenty (SDS, Triton)…
- lineární kalibrace max. po 20 mg proteinu
- měření absorbance při 595 nm



Stanovení bílkovin

Přímé spektrofotometrické stanovení

- chromofory v molekulách proteinů, které absorbují v UV oblasti spektra
- nedestruktivní metoda
- křemenné kyvety
- v blízké UV oblasti (280 nm) není velká citlivost – 50 mg/ml
- v daleké UV oblasti (205 nm) pak dochází ke značné interferenci
- velká závislost na AA složení proteinu
- UV absorpce je dána aromatickými AA (hlavně Trp a Tyr), je nutná jejich přítomnost
- interference širokého absorpčního pásu NA (λmax = 260 nm) se eliminuje měřením při dvou vlnových délkách a početní korekcí
- v daleké UV oblasti se využívá vlnová délka 205 nm (maximum absorpce peptidové vazby je při 192 nm)

Stanovení bílkovin

Edelhochova metoda

- při znalosti AA složení je možné spočíst extinkční koeficient proteinu ϵ_{280}
- podmínkou je přítomnost Trp nebo Tyr v molekule

Fluorescenční stanovení

- reakce primárních AA v proteinu (Lys, N-koncová aminoskupina) s o-ftalaldehydem
- citlivost metody může být zvýšena hydrolýzou proteinů před měřením
- ruší Tris, nejlépe použít borátový pufr, pH 10.4
- měří se po přídavku NaOH, excitační vlnová délka 340 nm. emise mezi 440 a 455 nm

Stanovení bílkovin

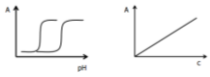
Stanovení bílkovin v moči pomocí diagnostických proužků

- Bromkresolový purpur (BCP) – specifický pro albumin, Bromkresolová zeleň (BCG)
- acidobazický indikátor při určitém pH mění svou barvu (chovají se jako slabé kyseliny, přičemž protonovaná forma má jiné zbarvení než disociovaná forma): při pH nižším než 3,5 jsou žluté, při vyšším pH jsou zelené až modré

Stanovení bílkovin

Stanovení bílkovin v moči pomocí diagnostických proužků

- v reakční zóně testovacího proužku je kromě indikátoru i pufr, který udržuje pH v rozmezí 3,0 až 3,5, indikátor tedy má žlutou barvu
- AA bílkovin se vážou na indikátor → změní jeho vlastnosti → přechodová oblast se posune směrem ke kyselejšímu pH.
- indikátor s navázanou bílkovinou má zelenou barvu, jako kdyby byl v alkaličtějším prostředí (proto **bílkovinná chyba indikátoru**)
- intenzita zbarvení závisí na c bílkoviny, kolísá od zelené až po modrou a hodnotí se vizuálně nebo instrumentálně



Stanovení bílkovin

Stanovení bílkovin v moči pomocí diagnostických proužků

- **FP**: u výrazně alkalických močí (pH nad 8), je-li moč velmi koncentrovaná (dojde k vyčerpání pufru v reakční zóně), vysoké koncentrace některých látek s aminoskupinami (kontaminace odběrové nádoby některými dezinfekčními prostředky), jež se na indikátory váží podobně jako bílkoviny
- nevýhoda: rozdílná citlivost vůči jednotlivým bílkovinám
- proužky reagují velmi dobře s ALB (od 0,1 až 0,5 g/l), nižší citlivost u globulinů, glykoproteinů a Bence-Jones bílkoviny
- nelze prokázat tzv. mikroalbuminurii (c ALB 20 až 200 mg/l, resp. denní ztráty albuminu v rozmezí 30 až 300 mg/24 hodin)
- průkaz glomerulární proteinurie

Stanovení bílkovin

Stanovení bílkovin v moči kyselinou sulfosalicylovou

- zákal vzniká asi od 0,1 g/l (údaje se liší) a více než v případě detekčního proužku reagují i tubulární proteiny (glykoproteiny), globuliny a mikroproteiny
- vyšetření je tedy více citlivé při malých tubulárních proteinuriích
- při hodnotách nad 0,5 g/l zjištěných detekčním proužkem není tedy toto vyšetření nutné
- hraniční hodnoty jsou kolem 0,3 g/l, jasně patologické nad 0,75 g/l (extrémní zvýšení nalezneme u manifestního nefrotického syndromu vždy nad 5 g/l)
- glomerulopatie, tubulointersticiální nefropatie, gamapatie (jako paraproteinurie), mikroalbuminurie

Stanovení bílkovin

Stanovení bílkovin v moči

Proteinurie

- **prerenální - (overflow proteinuria)** při nadměrné tvorbě nízkomolekulárních proteinů a peptidů, překračující normální resorpční kapacitu tubulů. Nalezneme ji při zvýšené tvorbě poly - nebo častěji monoklonálních lehkých řetězců jako Bence-Jonesovu bílkovinu, fibrin degradačních produktů (FDP) při hyperkoagulaci, alfa-1-kyselého glykoproteinu (orosomukoidu) při zánětech, při hemolýze a rhabdomyolýze (hemoglobin a myoglobin - ovšem ty nejsou detekčními papírky jako protein zachyceny), lysozymurie u nádorů.
- **glomerulární** - při zvýšené propustnosti bazální membrány glomerulů. Nález v moči je dán selektivitou či neselektivitou proteinurie, dle přítomnosti a intenzity zánětu může být provázen i leukocyturií a erytrocyturií.

Stanovení bílkovin

Stanovení bílkovin v moči

Proteinurie

- **tubulární** - při poruše zpětné resorpce profiltrovaných hlavně nízkomolekulárních bílkovin, které jsou tak indikátory poškození tubulů. Jde o beta-1-mikroglobulin, alfa-1-kyselý glykoprotein, retinol vázající protein (RBP), alfa-1-mikroglobulin, N-acetyl-beta-D glukosaminidáza (NAG), při zvýšené sekreci tubulárních bílkovin a enzymů např. vyvolané zánětlivými intersticiálními procesy (Tamm - Horsfallův glykoprotein, enzymy kartáčového lemu - LDH, ALP) a opět lyzozomální NAG
- **postrenální** - při zánětech, atrofii, nekrózách a nádorech vývodných močových cest, kdy se dostávají průnikem krve nebo exsudátu do moči vysokomolekulární komponenty (alfa-2-makroglobulin, IgM, HDL-lipoprotein).

Stanovení bílkovin

Kazuistika

- mladá žena s horečkou, bolestmi v podbřišku a dysurií

Anamnéza

- RA: matka zdravá, otec je po operaci pro ucpání močovodu kamenem, bratr zdráv
- OA: dosud vážněji nestonala, běžné respirační infekty, 3x měla angínu, brala antibiotika. Mívá potíže s krční páteří. Operace 0, úrazy 0, léky trvale nebere, kromě antikoncepce.
- GA: Menstruace od 12 let, pravidelná.
- AA: 0
- SA: Studuje střední školu. Bydlí s rodiči.
- EA: Týden pobyt v přírodě pod stanem, před 2 dny se vrátila.
- NO: 2 dny teplota do 38 °C, bez třesavky, celková malátnost, pálení při močení, bolesti v podbřišku, močí často a malé porce, moč je tmavší.

Stanovení bílkovin

Laboratorní nálezy		
vyšetření	výsledky	
FW (sedimentace)	28/45 (mírně zvýšená)	
Krevní obraz	leukocyty	12 000/µl (↑)
	diferenciální rozpočet	70 % neutrofilů
		5 % bylí (↑)
		20 % lymfocytů
		35 % monocytů
Biochemie		
	urea, kreatinin, Na, K, Cl, jaterní testy	v normě
	CRP	61 mg/l (↑)
Moč chemicky		
	bílkovina	+++
	krev	++
	žlučová barviva	0
	sediment	leukocyty - plné pole
		erytrocyty - plné pole
		válce 0

Imunochemie

- Základní pojmy
  - Antigen
  - Protilátka
  - Reakce antigen-protilátka
- Imunoreakce
- Imunochemické metody
- Kazuistiky

Imunochemie
základní pojmy

Antigen

- polymer – protein, polypeptid, polysacharid, nukleoprotein
- vlastnosti: imunogennost (navozují specifickou imunitní odpověď) a specifičnost (specificky reagují s produkty této odpovědi) → antigennost
- faktory ovlivňující vyvolání imunitní odpovědi
  - chemická povaha
  - velikost (neúplný antigen = hapten)
  - komplexita
  - valence
  - konformace, přístupnost
  - cizorodost
  - genetická příbuznost

Imunochemie
základní pojmy

Antigen

- **antigenní determinanta = epitop** (konformační, sekvenční)
- skupina molekul na povrchu antigenu - specifické, reakce s vazebným místem protilátky
- počet = valence antigenu
- **hapten** (nekompletní antigen) = nemůže navodit tvorbu protilátek, ale specificky reaguje s produkty imunitní odpovědi

Imunochemie
základní pojmy

Protilátky (Ab) - imunoglobuliny

- Produkce plazmatickými b. vyvíjejícími se z B-lym po stimulaci antigenem
- Glykoproteiny (4 – 18 % sacharidy)
- **Paratop** – vazebné místo pro antigen
- v lidském těle cca 10 000 různých Ig (cca 20 % plazmat. bílkoviny)

- **IgG**: 75% sérových Ig, monomer, prochází placentou
- **IgM**: 10% sérových Ig, pentamer, inicializuje imunitní odpověď
- **IgA**: 15% sérových Ig, mono a dimer, hl. imunoglobulin sekretů (proti lokálním infekcím)
- **IgE**: nízké koncentrace, snadná vazba na buňky, alergie
- **IgD**: stopová množství, monomer, fce ???

Imunochemie
základní pojmy

Reakce antigen-protilátka

- vazebné síly: elektrostatické, vodíkové, van der Waalsovy, hydrofobní interakce
- imunokomplex je stabilní v rozmezí pH 4-9
- možnosti disociace: vysoké nebo nízké pH (močovina, chaotropní látky)

- **afinita** = míra vazebné síly mezi jednou antigenní determinantou a protilátkou
- **avidita** = míra stability komplexu
- specifita = mírou je procento **zkřížené reakce** s látkou, pro jejíž stanovení není určena
- sekundární projev interakce ag-ab = **precipitace**

Imunochemie
základní pojmy

Reakce antigen-protilátka

- **Monoklonální Ab**
  - produkty jednoho klonu plazmatických buněk, připravených v laboratorních podmínkách hybridomovou technologií (buněčná fúze myelomových b s lymfocyty sleziny imunizovaných myší)
  - namířené proti jednomu epitopu určitého antigenu, identické kopie molekul Ig, které mají stejnou primární strukturu a stejnou specifitu vazebných míst
  - vyznačují se výraznou specifitou, ale špatně precipitují

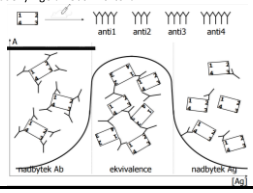
Imunochemie
základní pojmy

- **Polyklonální protilátky** (konvenční protilátky)
  - připravují imunizací zvířat (obvykle králíci, kozy, ovce) antigenem
  - krevní sérum imunizovaného zvířete, které obsahuje protilátky proti antigenu použitému k imunizaci, se označuje jako **antisérum**
  - Pokud byl k imunizaci použit jeden antigen (např. jedna bílkovina), vytvářejí se monospecifické protilátky (antisérum)
  - každý epitop v molekule antigenu stimuluje na tvorbu protilátek jeden klon B-lym
  - protože kompletní antigeny mají více epitopů, aktivují několik klonů B-buněk → směs monoklonálních protilátek, lišících se tím, že jejich vazebná místa mají různou afinitu, a tím i specifitu k jednotlivým epitopům určitého antigenu
  - imunizace zvířat směsí antigenů navozuje produkci polyspecifických protilátek, obsahující Ig proti většímu počtu antigenů (např. antisérum proti bílkovinám lidského séra používané při imunoelektroforéze)

Imunochemie
základní pojmy

Reakce antigen-protilátka – imunoprecipitační křivka

- 1935 – Heidelberger a Kendall
- základem pro různé imunochemické metody, které mohou být prováděny v gelu nebo v roztoku



Imunochemie
základní pojmy

Reakce antigen-protilátka – imunoprecipitační křivka

- **Oblast nadbytku Ab**
  - se zvyšujícím se množstvím Ag vzrůstá precipitát
  - na všechna vazebná místa Ag jsou Ab → malé rozpustné komplexy Ab-Ag, které se vzájemně nepropojují – úměrné ke c Ag
  - v supernatantu neprokazujeme žádný Ag, ale může se vyskytnout volná Ab
  - **Imunoturbidimetrie, imunonefelometrie a nekompetitivních imunoanalýz**

- **Oblast ekvivalence**
  - dochází k vzájemnému propojování molekul Ag a Ab → velké nerozpustné imunokomplexy s mřížkovitou strukturou, které agregují a vytvářejí imunoprecipitát
  - v supernatantu neprokazujeme volný Ag ani volnou Ab.
  - **imunodifúzní metody**

Imunochemie
základní pojmy

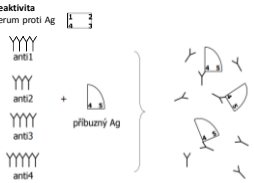
Reakce antigen-protilátka – imunoprecipitační křivka

- **Oblast nadbytku antigenu**
  - množství precipitátu klesá v důsledku vysoké c Ag
  - velké vzájemně propojené imunokomplexy se rozpadají
  - všechna vazebná místa protilátek jsou vysycena Ag a některé molekuly Ag zůstávají bez navázané Ab → malé rozpustné imunokomplexy
  - v supernatantu nejsou přítomny volné Ab, ale vzestupné množství volného Ag
  - podmínka nadbytku Ag musí být splněna u **kompetitivních imunoanalýz**

Imunochemie
základní pojmy

Křížová reaktivita

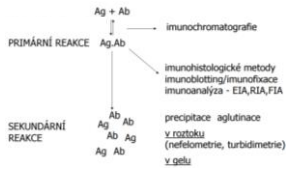
- antiserum proti Ag



- přítomnost identických nebo velmi podobných epitopů (antigenních determinant)
- Př. očkování proti černým neštovicím: Edward Jenner dosáhl ochrany proti černým neštovicím vakcinací odlišným, ale podobným virem kravských neštovic.

Imunochemie
základní pojmy

Typy imunoreakcí



Imunoreakce

Typy imunoreakcí

- Imunoprecipitační metody
  - Imunodifúzní metody – v gelu
  - Imunoturbidimetrie a imunonefelometrie – v roztoku
  - Aglutinace
  - Imunoelektroforéza
- Imunofixace
- Imunoanalýza – EIA, RIA, FIA
- Imunofluorescence
- Imunoblotting
- Microarray, imunosenzory….

Imunochemické metody

- **Klasické** (precipitace, difúze, ELFO)
  - v klinických laboratořích využívají převážně pro kvalitativní nebo semikvantitativní účely
  - limitovány svou citlivostí a vzhledem k manuální náročnosti rozsah jejich nasazení v praxi postupně klesá
- **Moderní** (imunoanalýza)
  - kvantitativní - na Ag nebo Ab je navázána určitá látka (značka, indikátor), což spolu s odpovídajícím způsobem detekce významně zvyšuje analytickou sensitivitu
  - automatizované

Imunoprecipitační metody

Imunodifúzní metody – v gelu (agar, agaróza)

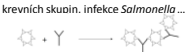
- jednoduchá – pohybuje se pouze jedna složka (tj. Ag nebo Ab) a druhá složka je rovnoměrně rozptýlena v gelu
- dvojitá – pohyb obou složek
- kvalitativní i kvantitativní

Imunoturbidimetrie a imunonefelometrie – v roztoku

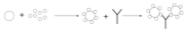
- výsledkem smísení roztoku Ag s odpovídající Ab je vznik malých agregátů → zákal
- světlo, které prochází zakaleným roztokem, je rozptylováno na rozdíl od roztoku, kde neproběhla žádná imunochemická reakce
- stupeň zákalu je v oblasti nadbytku Ab úměrný c Ag
- turbidimetrie - spektrofotometr
- nefelometrie - měření intenzity rozptýleného světla, které vychází z roztoku všemi směry, přístroj – nefelometr, využívající jako světelný zdroj obvykle laser

Aglutinační metody

- Využití
  - identifikace MO, živočišných b. a ery
  - stanovení krevních skupin, infekce *Salmonella* …



- **Přímá** – s Ab reagují aglutinogeny na povrchu částic
- **Nepřímá** - reagují rozpustné antigeny nebo hapteny, které předtím pasivně adsorbovaly na povrch b. nebo inertní částice (latex, ery)



- Inhibice aglutinace – detekce a kvantifikace Ag

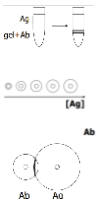
Aglutinační metody

Coombsův test = zjištění přítomnosti lidských Ig na ery membráně pomocí protilátek

- Přímé – značená primární Ab nebo Ag
- Nepřímé – využití sekundární Ab pro detekci

Imunodifúzní metody

- **Jednoduchá imunodifúze** (Oudin 1946)
- **Jednoduchá radiální imunodifúze** (Mancinioová)
  - 48 – 72 h : [Ag] ~ d
  - 6 – 24 h : [Ag] ~ log d
  - citlivost 0.02 mg/ml
  - kvantifikace IgG, IgM, IgA, IgD, albumin, …



- **Dvojitá radiální imunodifúze** (Ouchterlony 1949)
  - pouze kvalitativní důkaz přítomnosti Ag
  - **reakce identity** = linie vytvořené Ag umístěnými vedle sebe plně splývají
  - Mr – zakřivení precipitačního obloučku
  - Koncentrace - vzdálenost od jamky

Imunoelektroforéza

- kombinace elektroforézy s imunodifúzí
- v první fázi se směs Ag rozdělí podle své elektroforetické pohyblivosti na jednotlivé složky
- ve druhém kroku se naplní kanálek podél elektroforeogramu požadovaným antisérem – monospecifickým nebo polyspecifickým
- rozdělené Ag a Ab proti sobě difundují a v místě reakce antigenu a odpovídající protilátky se vytvoří precipitační oblouček

- Klasická a protisměrná – kvalitativní

- Raketová a dvourozměrná – kvantitativní

Imunofixace

- k identifikaci a typizaci monoklonálních Ig v séru, moči nebo mozkomíšním moku
- v první fázi se směs bílkovin rozdělí podle elektroforetické pohyblivosti (agarózový nebo acetátcelulózový gel) – 6 startů
- ve druhé fázi identifikujeme specifickou bílkovinu pomocí imunoprecipitační reakce
- šablona na gel
  - první pruh s fixačním roztokem
  - do ostatních vyříznutých proužků se nanášejí specifické Ab (proti IgG, IgA, IgM a proti lehkým řetězcům κ nebo λ), které difundují do gelu a v místě, kde reagují s příslušným antigenem vytvářejí imunokomplexy ve formě precipitátu
  - promytím vhodným pufrem se odstraní jak Ag nereagující s aplikovanou Ab, tak i nadbytek Ab
  - ohraničné pruh se zvýrazňuje obarvením

Imunofixace

- kritickým bodem imunofixace je použití vhodného ředění vzorku (imunoprecipitační křivka)
- Průkaz monoklonálních Ig
- oproti imunoELFO – rycvhlost a asi 10krát vyšší citlivost
- jen při podezření na přítomnost monoklonálního Ig (paraproteinu) – tzv. M-komponenty
- Monoklonální Ig jsou celé molekuly Ig nebo jejich části (L nebo H řetězce), jejichž přítomnost je typická pro monoklonální gamapatii (b. necitlivé na regulační signály)
- benigní x maligní formy (IgG, IgA: mnohočetný myelom = plazmocytom, IgM: Waldenströmova makroglobulinemie)
- někdy jsou syntezovány společně s tzv. Bence-Jonesovou bílkovinou, jejíž molekula je tvořena monomerem či dimerem L řetězců (moč)
- můžeme charakterizovat typ monoklonálního Ig, což umožňuje použití sady antisér (proti IgG, IgA a IgM a proti lehkým řetězcům κ a λ)

Imunofixace

- polyklonální Ig se projevují vznikem difúzně zbarvených precipitátů, prokazatelných při reakci s jedním nebo několika antiséry proti H nebo L řetězcům
- monoklonální Ig se prokazují jako úzký silně obarvený proužek v difúzním precipitátu polyklonálních Ig při reakci s jedním z antisér proti H řetězcům a s jedním z antisér proti L řetězcům
- Bence-Jonesova bílkovina vytváří úzký proužek pouze při reakci s jedním ze dvou antisér proti L řetězcům
- Obr. IgG monoklonálního Ig (sérum – paraprotein IgG kappa, moč – volné L řetězce kappa)

Kazuistika

- mladá žena s bolestmi kloubů na rukách

Anamnéza
- RA: matka zdravá, otec zdráv, bratr zdráv
- OA: dosud vážněji nestonala, pyelonefritida v těhotenství, Operace: apendektomie, úrazy 0, léky trvale nebere
- GA: Menstruace od 13 let, pravidelná, 1 porod
- AA: 0
- SA: vdaná, 4 měsíční dítě
- EA: Kojí
- NO: 2 dny teplota do 38 °C, s třesavkou

Laboratoř
- KO: normální nález

Imunoanalýza

- skupina imunochemických metod, které k detekci využívají dobře měřitelné značené látky – **indikátoru** a tím dosahují **vysoké citlivosti** (detekční limity těchto metod dosahují hodnot 10-15 až 10-20 mol/l)

Indikátor
- radioaktivní izotop (radioizotopové metody)
- nebo jiná látka: enzym, fluorescenční značka, DNA, koloidní částice a pod.
- je obvykle navázaný na protilátku (imunometrická analýza), nebo na antigen
- indukuje reakci Ag-Ab
- levný, vysoce purifikovaný, specifická reaktivita, detekce µ-ng/ml

Imunoanalýza

Indikátor

R: ^{125}I, ^{3}H, ^{14}C

E: peroxidasa, alkalická fosfatasa, glukosaoxidasa, G6PD, ..

F: fluorescein-isothiokyanát (FITC)

biotin-avidin

koloidní zlato, kov + elektroluminiscence

E + zesilovací systémy: chemiluminiscence, ...

Imunoanalýza

- stanovení na základě využití přirozených vlastností Ab:

1/ schopnost Ab vázat se na široké množství přirozených i umělých sloučenin, buněk i virů, které se chovají jako Ag

Ab jsou proteinového charakteru a jejich velké množství vazebných míst je odvozeno z obrovského počtu kombinací sekvencí AA.

2/ specificita protilátky pro reagující látku

Tato vlastnost umožňuje stanovení velmi nízkých (až 10^{-12}) koncentrací látek za přítomnosti dalších podobných sloučenin (např. stanovení stopových množství hormonů ve vzorku krve).

3/ síla vazby protilátky s antigenem

Využití reakce Ab-Ag *in vitro* je základem imunochemických metod.

Imunoanalýza

Historie imunoanalýzy

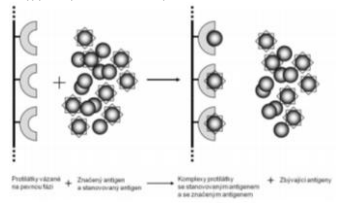
- 50. léta 20. století - fyzikové Rosalyn Yalowová (1977 NP) a Solomon Berson popsali princip kompetitivní **RIA** (radioimunoanalýzy), s jejíž pomocí změřili do té doby nedetekovatelná množství inzulinu v krvi (radioizotop I)
- metody, založené na soutěži značeného a neznačeného antigenu o vazebná místa, bude možné vypracovat i pro další analyty
- v roce 1971 se objevily metody, které místo radioizotopů využívaly enzymy = **ELISA** (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) - Eva Engvallová s Peterem Perlmanem ze Švédska a Bauke van Veemen s Antonem Schuursem z Holandska.

Imunoanalýza

- rychlost, citlivost, reprodukovatelnost, více vzorků najednou
- 2 typy: kompetitivní vs. nekompetitivní

Imunoanalýza

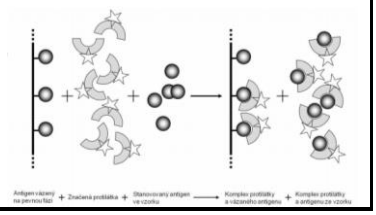
- rychlost, citlivost, reprodukovatelnost, více vzorků najednou
- 2 typy: kompetitivní vs. nekompetitivní



http://pfyziollfup.upol.cz/castwiki2/wp-content/uploads/2012/04/Imuno.pdf

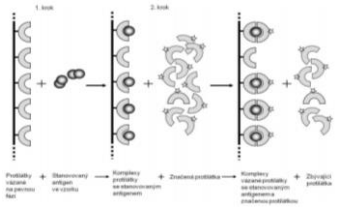
Imunoanalýza

- rychlost, citlivost, reprodukovatelnost, více vzorků najednou
- 2 typy: kompetitivní vs. nekompetitivní



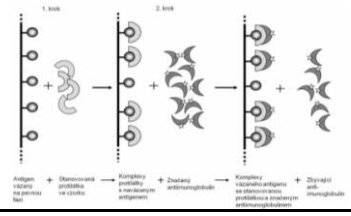
Imunoanalýza

- rychlost, citlivost, reprodukovatelnost, více vzorků najednou
- 2 typy: kompetitivní vs. nekompetitivní



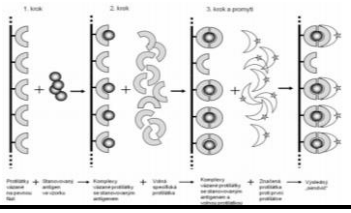
Imunoanalýza

- rychlost, citlivost, reprodukovatelnost, více vzorků najednou
- 2 typy: kompetitivní vs. nekompetitivní



Imunoanalýza

- rychlost, citlivost, reprodukovatelnost, více vzorků najednou
- 2 typy: kompetitivní vs. nekompetitivní



Imunoanalýza

- rychlost, citlivost, reprodukovatelnost, více vzorků najednou
- 2 typy: kompetitivní vs. nekompetitivní

- Homogenní – detekce vzniku komplexu přímo ve vzorku
- Heterogenní – nutná separace vzniklého komplexu pro závěrečná měření

Imunoanalýza

Enzymová imunoanalýza (EIA)
- využívají enzymů (PO, ALP) ke značení Ag nebo Ab

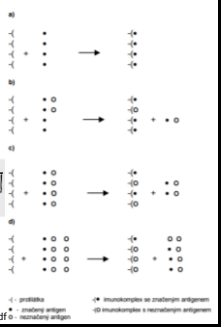
- **enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)**
  - heterogenní
  - jedna komponenta imunochemické reakce (Ag nebo Ab) nespecificky adsorbována na povrch pevné fáze (zkumavky, jamky mikrotitrační destičky, magnetické částice)

Imunoanalýza

Enzymová imunoanalýza (EIA)
- **homogenní EIA**
  - nevyžaduje oddělení vázané (v imunokomplexu) a volné značené Ag nebo Ab
- ke stanovení nízkomolekulárních látek (léků, hormonů steroidní a tyreoidální povahy a metabolitů), hapteny
- vzorek obsahující stanovovaný Ag + známé množství téhož Ag s navázaným E (konjugát) a příslušnou Ab v omezeném množství (**kompetitivní**)
- při vazbě Ab na E konjugátu se aktivní centrum může zablokovat nebo nastává konformační změna E molekuly spojená se ztrátou aktivity
- čím je ve vzorku více neznačeného Ag, tím více molekul Ab s ním reaguje a tím zůstane zachováno více E aktivity v konjugátu
- E aktivita je proporcionální c Ag v neznámém vzorku

Imunoanalýza

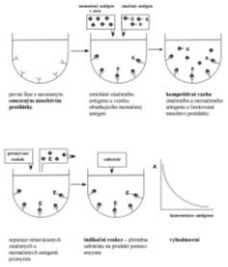
Kompetitivní enzymová imunoanalýza



http://che1.lf1.cuni.cz/html/imuno.pdf

Imunoanalýza

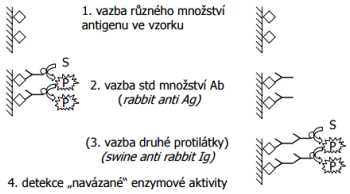
Kompetitivní enzymová imunoanalýza



Imunoanalýza

ELISA – jednoduchá

Přímá | **Nepřímá**



1. vazba různého množství antigenu ve vzorku

2. vazba std množství Ab (*rabbit anti Ag)*

(3. vazba druhé protilátky) *(swine anti rabbit Ig)*

4. detekce „navázané" enzymové aktivity

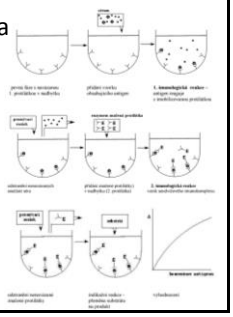
Imunoanalýza

Nekompetitivní ELISA pro stanovení Ag

- stanovení velkých Ag s několika vazebnými místy pro Ab (např. hCG, α1-fetoprotein, celkový IgE)
- nezbytné dvě různé Ab namířené proti různým antigenním determinantám stanovovaného Ag
- první Ab je v nadbytku navázaná na pevnou fázi
- + vzorky nebo standardy obsahující Ag → první imunochemické reakce
- po inkubaci → promytí a odstranění zbytku séra
- v nadbytku je přidána druhá Ab značená E → reakce s další antigenní determinantou vyšetřovaného Ag
- → vzniká sendvičový komplex – Ab-Ag-Ab-E
- odstranění nezreagovaného konjugátu
- přidá se S → enzymová reakce → měření absorbance produktu, která je přímo úměrná množství antigenu

Imunoanalýza

Nekompetitivní enzymová imunoanalýza pro stanovení Ag



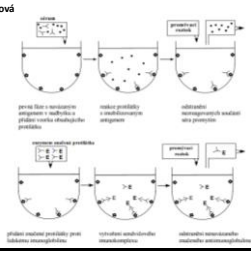
Imunoanalýza

Nekompetitivní ELISA pro stanovení Ab

- pro detekci specifických sérových Ab proti virům a parazitům, autoprotilátek a specifických protilátek IgE proti jednotlivým alergenům
- na pevnou fázi navázán Ag (popř. alergen) v nadbytku
- po přidání vyšetřovaného vzorku nebo standardů reagují všechny Ab přítomné ve vzorku s imobilizovaným Ag a vytvoří imunokomplex
- vzniklé imunokomplexy prokazujeme pomocí druhé Ab proti lidským ig značené E
- značené Ab mohou být namířeny proti jednotlivým Ig třídám (IgG, IgA, IgM či IgE)- význam např. pro určení fáze infekčního onemocnění (např. IgM v časné fázi a IgG v pozdější fázi)

Imunoanalýza

Nekompetitivní enzymová Imunoanalýza pro stanovení Ab

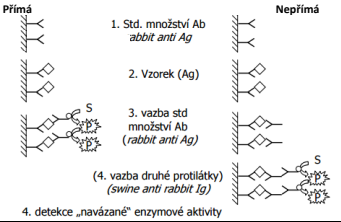


Imunoanalýza

ELISA – dvojitá sedvičová

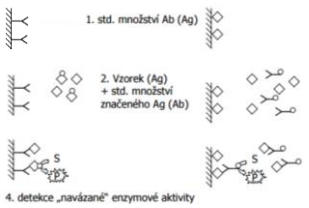
- pevnou fáze s navázanou Ab nebo Ag, které musí být v nadbytku vzhledem k analyzované látce

Přímá **Nepřímá**



Imunoanalýza

ELISA – kompetitivní (nepřímá detekce Ag)



Imunoblotting

Western blotting

- detekce proteinů po ELFO v PAA gelu – elektrotransfer proteinů z gelu na membránu a následná detekce pomocí série protilátek
- první Ab s vysokou specifitou k proteinu a druhá Ab značená alkalickou fosfatázou, peroxidázou
- využití – autoAb – antigangliosidové u neurologických autoimunitních onem. nebo u hepatopatií

Imunochromatografie

- Ag přítomný ve sledovaném vzorku s konjugátem za vzniku komplexu Ag-konjugát, který migruje směrem k specifickému proteinu imobilizovanému na porézní membráně (nitrocelulóza)
- je-li ve vzorku přítomen Ag, vznikne v místě navázání komplexu Ag-konjugát na imobilizovaný protein specifický band, signalizující pozitivní výsledek
- nadbytek konjugátu přítomného v testu, migruje dále membránou a váže se na jiný imobilizovaný protein za vzniku druhého bandu, který signalizuje ukončení testu

Imunochromatografie

Imunochromatografická metoda v podobě kazetového testu (precipitace)

- pro detekci protilátek proti HIV-1 a HIV-2 v lidském séru, plazmě nebo celé krvi
- vzorek je aplikován na destičku → migruje přes konjugátovou destičku, rozředí se a smíchá s selenium-antigen koloidním konjugátem → tento roztok migruje přes pevnou fázi do pacientovy části (panelu), kde jsou imobilizované rekombinantní Ag a syntetické peptidy
- jestliže jsou ve vzorku Ab, vážou se na antigen-selenový koloid a na Ag v pacientově okénku
- jestliže Ab ve vzorku nejsou, antigen-selenový koloid projde pacientovým okénkem a nevytvoří se žádná červená linie
- pro kontrolu kvality je zahrnut kontrolní panel

Imunochromatografie

Detekce genetického materiálu získaného ze vzorku

- nejprve izolována DNA, která je použita pro duplex PCR- všechny primery jsou označeny (fluorescein, digoxigenin, biotin) → značené amplikony
- amplikony aplikovány na imunostrip
- je-li ve vzorku přítomna DNA z detekovaných buněk, uhlíkaté nanočástice se prostřednictvím interakce neutravidin-biotin váží na značené amplikony
- při průchodu přes zónu obsahující Ab proti digoxigeninu jsou specificky zachytávány detekované amplikony

Imunochromatografie

Imunochromatografická detekce bakterií

- imunochromatografické testy neboli LFIA (Lateral Flow ImmunoAssay) se staly fenoménem poslední doby pro detekci rozličných analyt
- velmi rychlé, jednoduché a nenáročné na přístrojové vybavení, což umožňuje jejich realizaci v provozních podmínkách
- imunochromatografický test - nitrocelulózová membrána s imobilizovaným reaktantem (Ab) a vytváří tak testovací zónu
- imunostrip tři různé podložky - pro aplikaci vzorku, podložka s konjugátem barevné částice a Ab, a absorpční podložka, která napomáhá vzlínání vzorku (v plastovém pouzdře)
- vizuální hodnocení - pomocí barevných částic navázaných na jeden z imunoreaktantů, nejčastěji se používá zlato a uhlík.

Imunochromatografie

Imunochromatografická detekce

- Toxiny A/B
- *Cl.difficile*
- Rota/Adeno viry
- *Str.pneumoniae*
- *Leg.pneumophila* serotyp 1
- Chřipka A/B
- *Chlamydia trachomatis*

Imunochemické analýzy v diagnostice

- diagnostika v oblasti renálních, svalových, střevních a kožních biopsií či v průkazu extracelulárních substancí (např. kolagenu, amyloidu) a specifických infekčních agens (HPV, CMV apod.)
- malignity - diagnóza, prognóza a/nebo predikce
  - slouží k diferenciální diagnostice nediferencovaných (anaplastických) nádorů
  - k subtypizaci epitelových a mezenchymových nádorů
  - ke klasifikaci hematologických malignit (leukémií a maligních lymfomů)
  - Ke klasifikaci ostatních nádorů či jejich odlišení od nenádorových reaktivních změn apod.
  - v poslední době stoupá prognostická a prediktivní role IHC u zhoubných nádorů, která spočívá v detekci proliferačních markerů, proteinů buněčného růstu, receptorů růstových faktorů a hormonálních receptorů aj. v závislosti na tom, jakou roli hraje prokazovaný antigen v patologické tkáni

Imunochemické analýzy v diagnostice

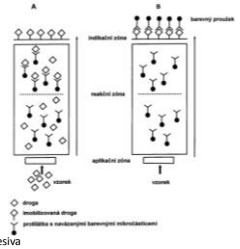
- testy určené k rychlé orientační diagnostice v terénu nebo u lůžka nemocného na principu tzv. suché chemie
- reagencie jsou zakotveny v porézním materiálu, který je připevněn na podložce z plastu nebo je vložen do plastového rámečku s otvory pro nanášení vzorku a odečítání výsledků
- stanovení hCG k průkazu těhotenství
- troponin T v diagnostice infarktu myokardu
- průkaz drog v biologickém materiálu

Imunochemické analýzy v diagnostice

Stanovení přítomnosti drog v moči nebo ve slinách

- soutěž mezi drogou ve vyšetřovaném vzorku a konjugátem drogy, který je imobilizován v indikační zóně proužku, o omezené množství specifické Ab
- reakční zónou obsahující specifické Ab navázané na barevné mikročástice, které se v průběhu reakce mobilizují
- moč i rehydratované značené Ab postupují reakčním proužkem a v indikační zóně se setkají se zakotvenými konjugáty drog
- pokud vyšetřovaný vzorek obsahuje drogu, vazebná místa barevně označených Ab jsou jimi saturována a nemohou se tedy navázat na imobilizované konjugáty drog
- barva indikační zóny zůstane nezměněna a výsledek je odečítán jako pozitivní
- v nepřítomnosti drogy ve vyšetřovaném vzorku jsou značené Ab zachyceny imobilizovaným konjugátem drogy - v indikační zóně se vytvoří barevný proužek, který znamená negativní výsledek

Imunochemické analýzy v diagnostice

Drogy v moči
A – pozitivní
B – negativní

- Amfetamin
- Metamfetamin
- Barbituráty
- Benzodiazepiny
- Kannabinoidy
- Kokain
- Opiáty
- Fencyklidin
- Tricyklická antidepresiva