

metody využívající sérologické reakce

A. Precipitační metody

V kapalinách

V gelu

B. Imunodifuzní metody

- Jednoduchá imunodifúze
- dvojitá imunodifúze

C. Imunoelektroforetické metody

Kombinace s elfo

- Imunoelektroforéza podle Williamse a Grabara
 - Raketová imunoelektroforéza
 - Protisměrná
 - Dvojměrná

- ## D. Aglutinační metody

E. Hemaglutinační

F. Komplementové

G. Immunoblotting

Zákalové reakce

- Imunonefelometrie
- Imunoturbidimetrie

H. Imunochemické metody

a) RIA

b) FIA

c) EIA

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 při stanovení Ag, Ab i haptenu
- Imunoanalýzy – př. RIA, FIA, EIA, imunoturbidimetrie
- – nefelometrie, -fluorimetrie, chemiluminiscence, popř jejich kombinace

Metody IV.generace

- Kontinuálně měří Ag, Ab i haptenu
- Imunosenzory, MALDI - TOF, SELDI – TOF hmotnostní spektroskopie

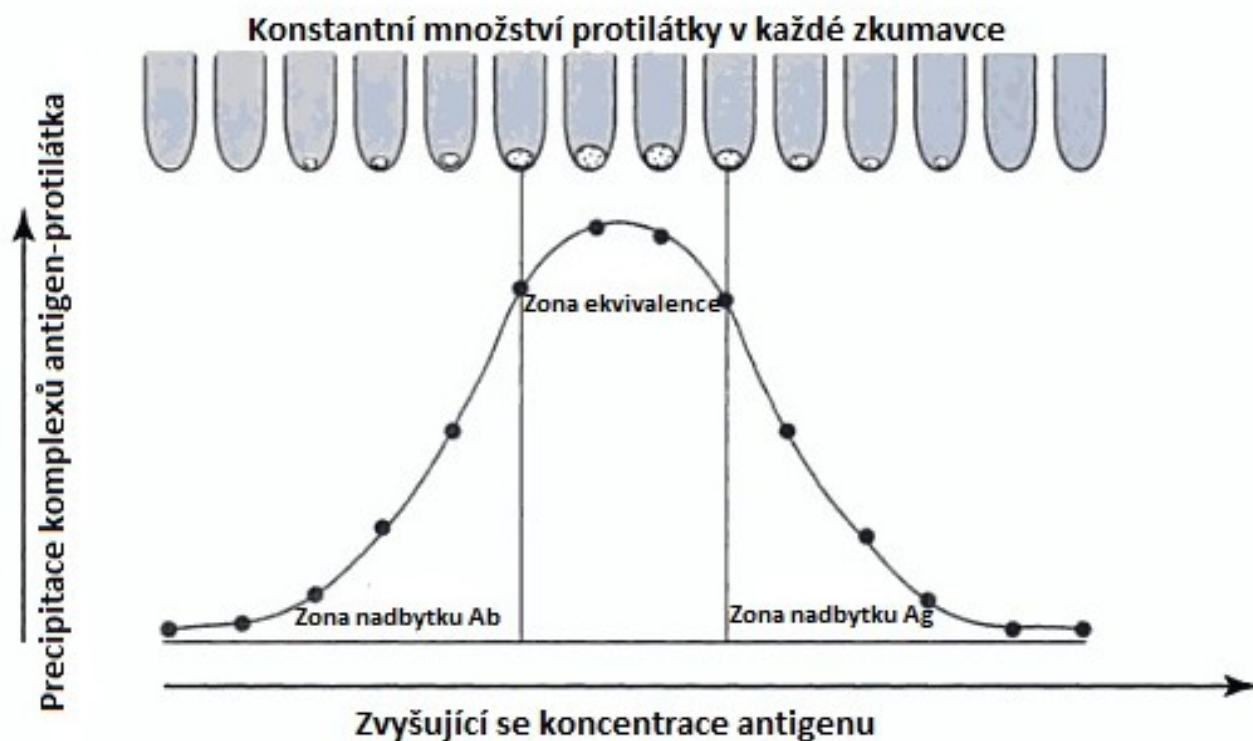
Příklady metod I.-IV. generace

- **Metody I.generace** – pacientův vzorek obsahující *S. aureus* koaguluje králičí plasmu
- **Metody II.generace** – ve vz. pacienta se identifikují povrchové Ag *S. aureus* pomocí fibrinogenu / IgG, rutinní **Metody III.generace** – stanovení Ag pouzdra *S. aureus*, odhalení MRSA (metycilin rezist.), bez pouzdra – reakce s fibrinogenem nebo nebo IgG
- **Metody IV.generace** – zjištění rezistentního kmene hned! CM-MP částice (Carboxylate modified microparticles) navázány na latex a jsou schopné detekovat kapsulární polysacharidy *S. aureus* ve vzorku pacienta. Silná, jasně viditelná aglutinace za 20s.

Precipitační křivka

- 1929 Heidelberg a Kendall – popsali reakci rozpustného Ag s odpovídající Ab ve vhodném poměru.
 - Výsledek reakce – precipitát
- Stanovili precipitační křivku a 3 oblasti reakce Ag s Ab

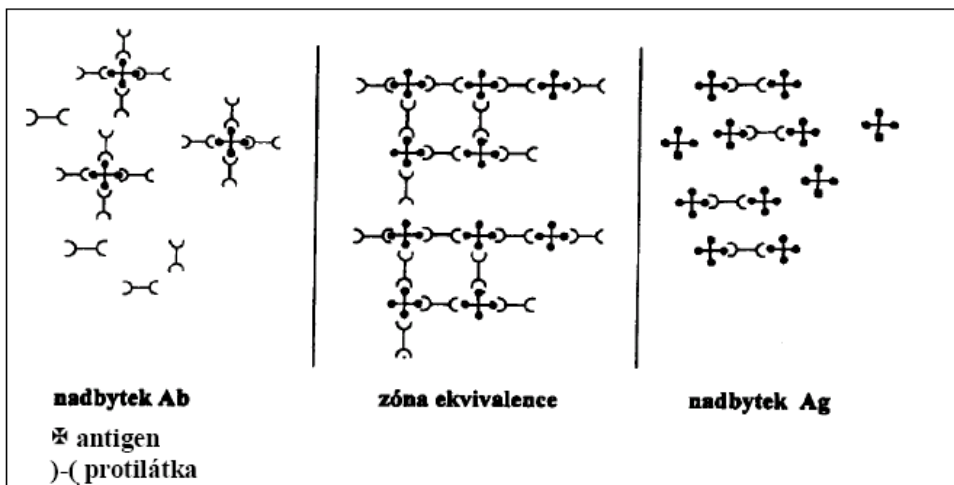
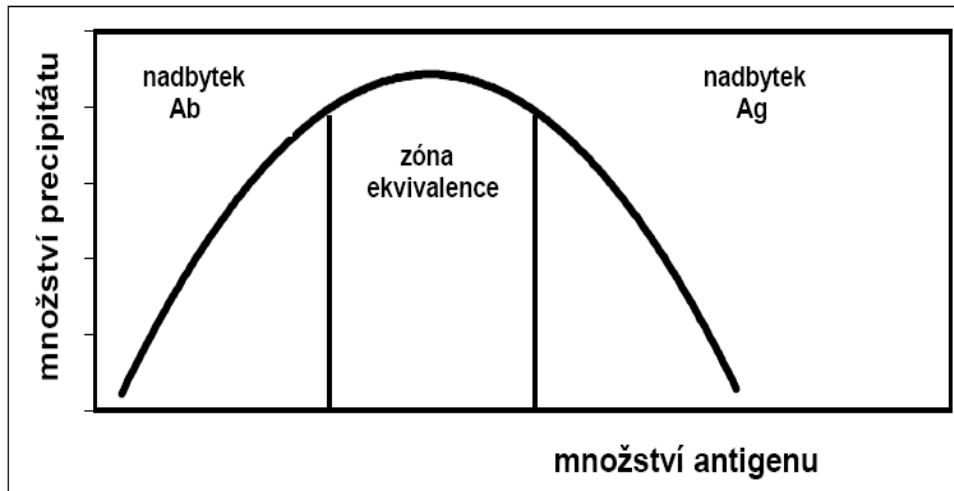
Precipitační křivka



Závislost tvorby precipitátu na vzájemné koncentraci protilátka – antigen (Stanly, 2002)

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

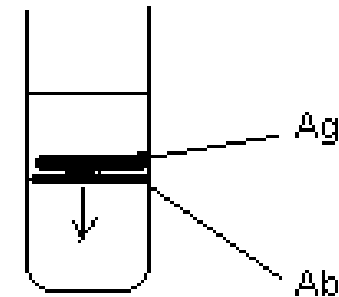
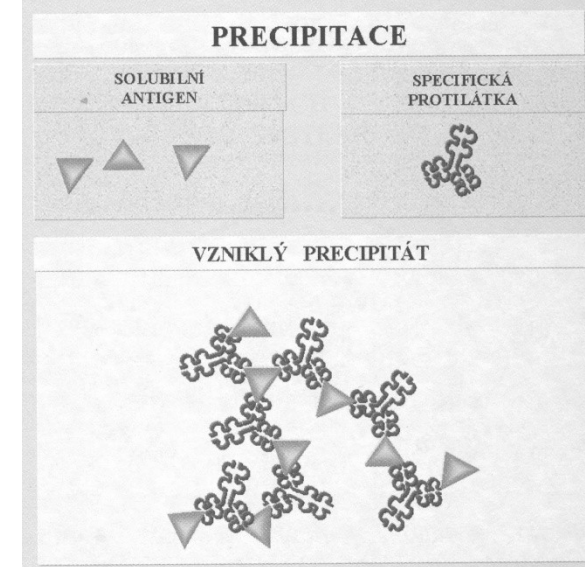
- heterogenní RIA, ELISA..
- homogenní EMIT (EIA)...

- faktory ovlivňující precipitaci:

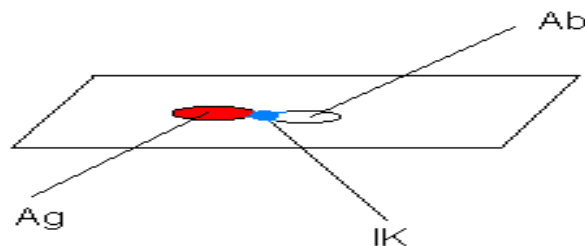
- typ **Ab** /např. IgG/
- **teplota** – se zvyšující se teplotou se urychluje precipitace /např. 38°C/
- **vzájemná koncentrace** Ag a Ab
- **pH**
- iontový **náboj**
- **tvar a velikost** části

PRECIPITAČNÍ metody:

- $Ag + Ab \rightarrow Ag-Ab$
- *precipitinogen precipitin precipitát* sraženina
- solubilní /rozpustný/
- **Koncentrace 0,1g/ a vyšší!!**
- - *dělíme:*
- **A) v kapalinách :**
- **I. prstencová**
- – prsteneček sraženiny precipitátu



- **II. sklíčková** – určení poměru
- **B) v gelu:**
- **IMUNODIFÚZE**



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

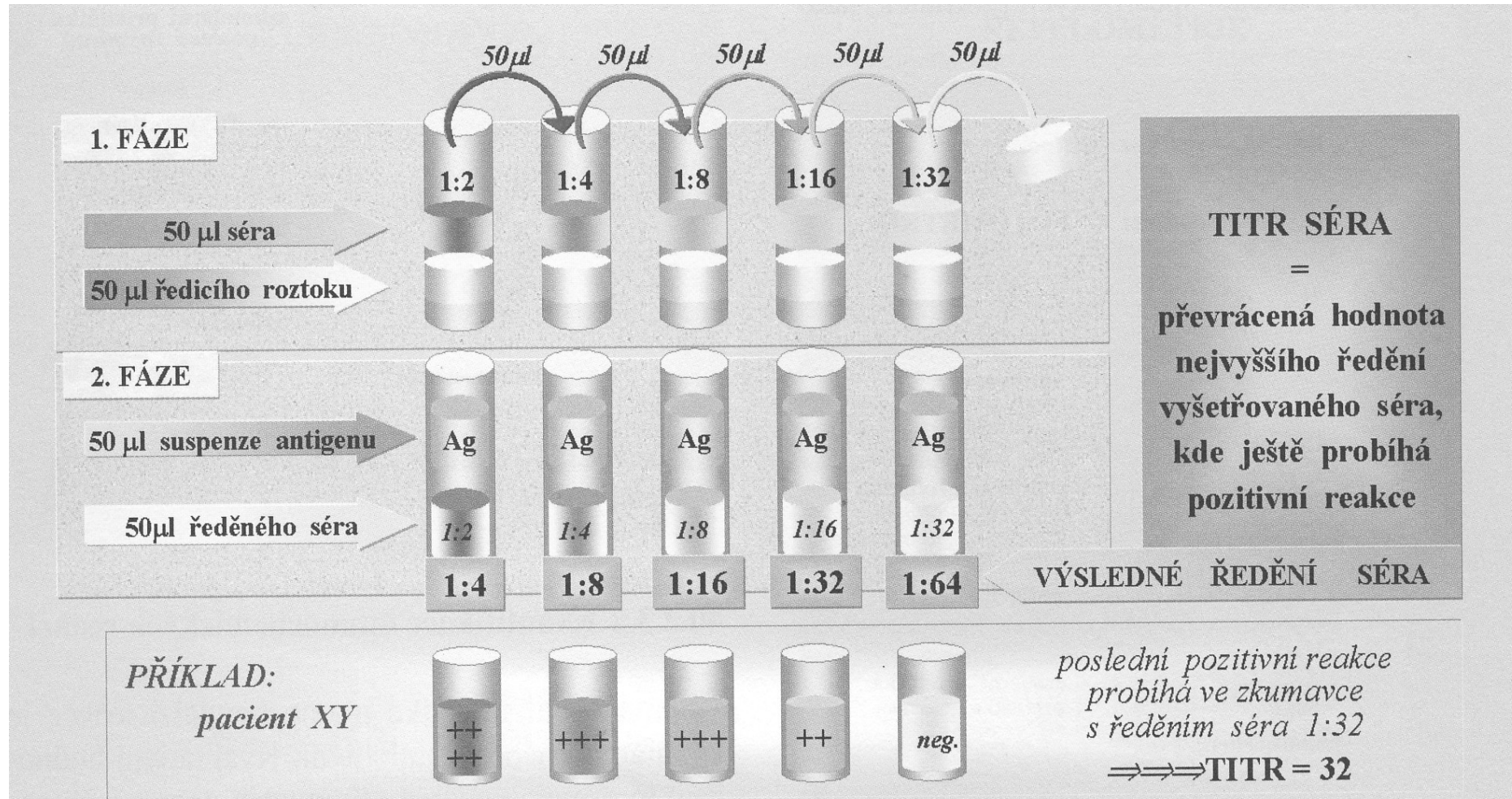
PRECIPITAČNÍ metody:

- **praxe** – 1. zjištění výskytu či stanovení Ab v séru při inf. onemocnění 2. identifikace Ag (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

- **Velmi nízké mn. precipitátu lze** hodnotit pomocí detekčních systémů využívajících Ab nebo Ag značené radioizotopem, fluoresc. látkou, enzymem, luminiscenční látkou

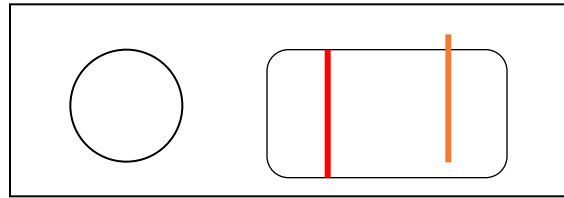
Titrace séra



Precipitační imunochemické metody

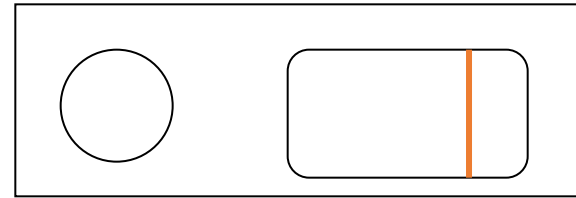
Screeningové metody – jednoduché precipitační testy terénní kazetové testy pracující v oblasti ekvivalence, imunochromatografická

Vzorky: moč, výtěr z nosu, pochvy, konečníku, krev jen vyjíměčně ! Stanovení Ag nebo Ab a jejich vizualizace barevnou složkou



S T C

Negativní výsledek



S T C

Pozitivní výsledek

Za přítomnosti drogy ve vzorku moče reaguje s Ag drogy protilátka za vzniku imunokomplexu (precipitát) se v místě testu T. (S – vzorek, C – kontrola)

Využití:

Rychlé chromatografické testy – stanovení přítomnosti drogy v tělesných tekutinách,
Ab (na desce přítomný antigen)
nebo Ag (na desce přítomná protilátka, např. u infekčních nemocí (*Chlamydie*, *Streptococcus pneumoniae*, *Adenovirus*, *Rotavirus*, *Helicobacter pylori*, Influenza A,B hormon gonádotropin u těhotných žen)

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*

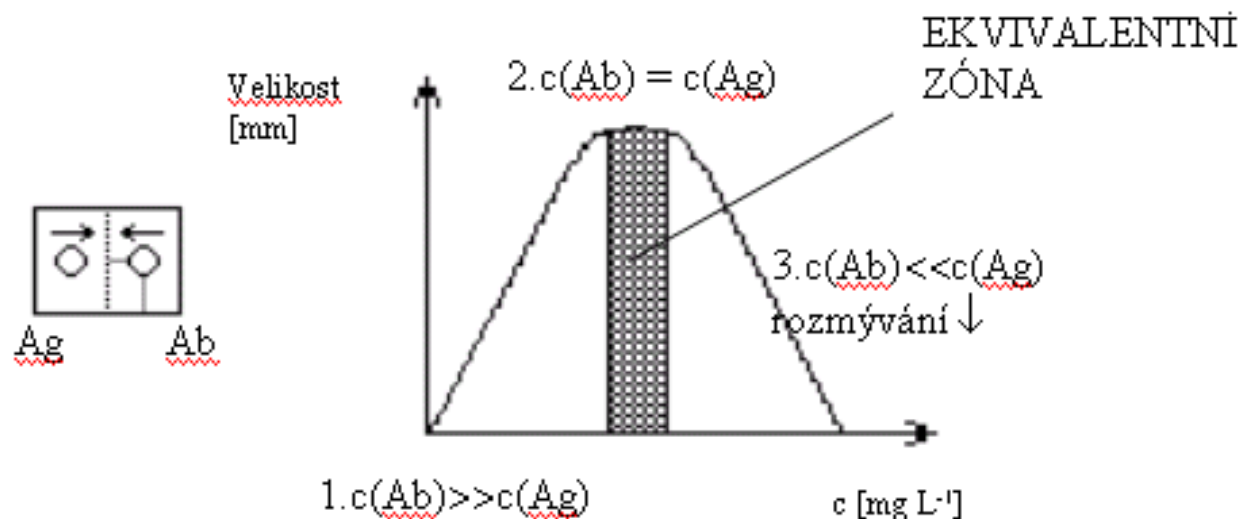
● **agaropektin**

- obsahuje aniontové skupiny → *pro difúzi nevhodný*

imunodifúze

- 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 snáhu**, až do místa střetnutí ~ zde vznikají **precipitační linie** → **obloučky** → **prstence** → **kruhy** /záleží na použitém materiálu/
- - vzniklé precipitáty **detekujeme:**
- * **okem** - zákal
- * **barvením** – Coomassie blue, amidočerň
- * **sekundárnými protilátkami**
- * **Au, Ag, radioizotopy**
- vznik precipitátů je **děj postupný!!!**

Imunodifúze



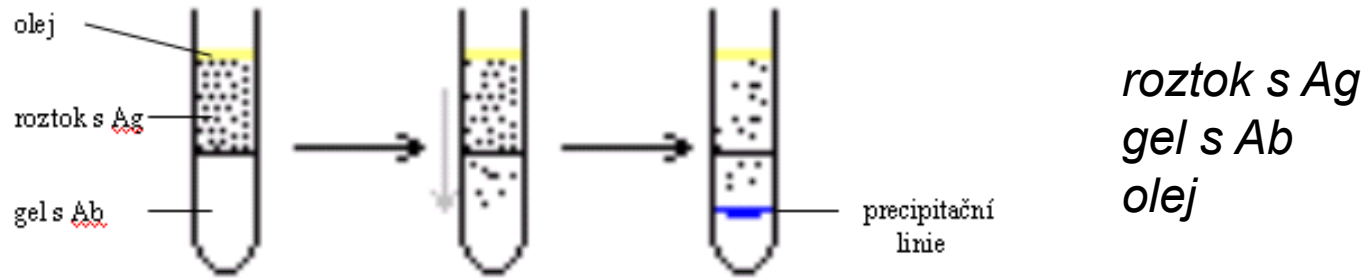
1. nejdříve vznikají rozpustné imunokomplexy (IK) – nedostatek Ag
2. po vyrovnání c(Ab) = c(Ag) vznikají pevné IK – detekce sraženiny
...EKVIVALENTNÍ ZÓNA

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
 - *dvojrozměrná /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



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**

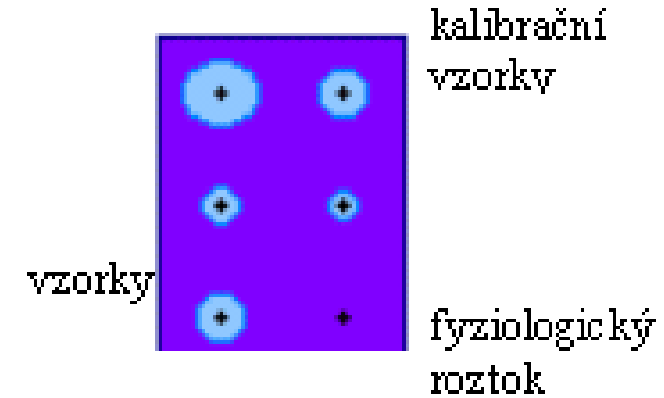
Jednoduchá jednorozměrná imunodifúze ~ dle OUDINA

- - 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 → nemigruje
- 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

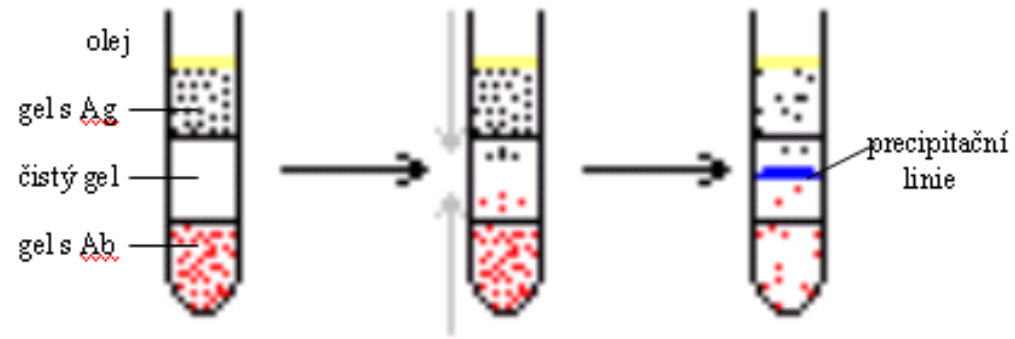
* *fyziologický roztok* –blank

* *vzorky o neznámé*

koncentraci

* *vzorky o známé koncentraci*
(kalibrační)

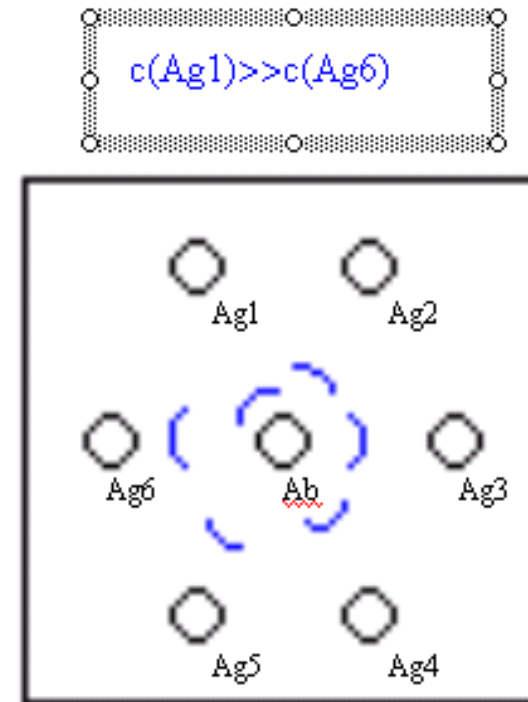
Imunodifúze



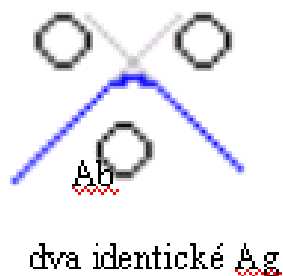
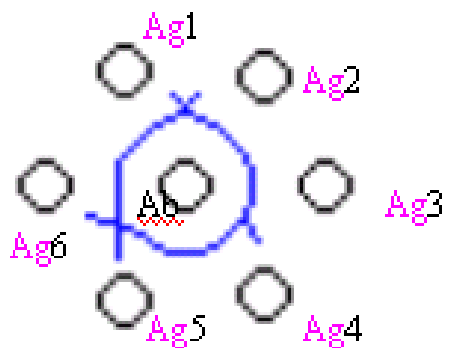
- **dvojitá imunodifúze**
- - gelem *difundují obě složky*
- - *koncentrace Ag a Ab musí být vzájemně ekvivalentní* – proti překrývání linií
- **Dvojitá jednorozměrná imunodifúze**
- - ve zkumavce **agarózový gel s Ab** a agarózový gel s **Ag**
- - mezi nimi **čistý gel** – v místě vyrovnání koncentrací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

Imunodifúze

- **Dvojitá radiální imunodifúze ~dle OUCHTERLONYHO**
- na *skleněné desky* nanesen **čistý gel**
- menší jamky – *různé Ag* či *různé koncentrace* jednoho Ag
- větší střední 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***



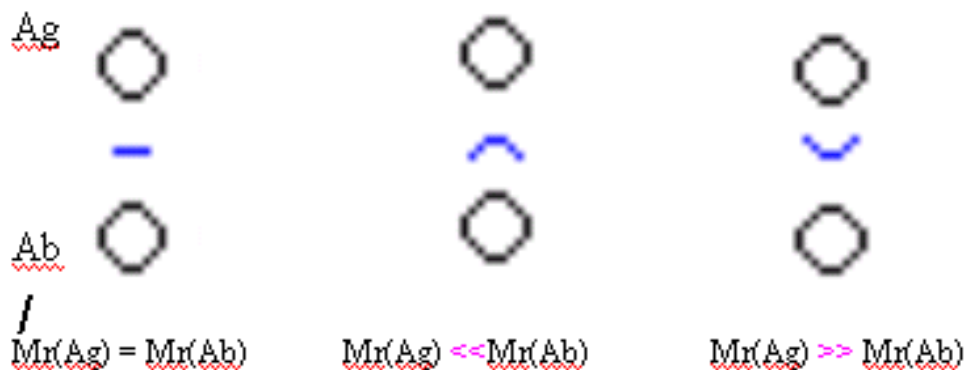
Imunodifúze, odlišení Ag



1 a 2 částečně identické /některé determinanty navíc/
 2 a 3 identické
 3 některé determinanty navíc než 4
 5 a 6 si neodpovídají

- - využití: Ag
- 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

Souhrn využití ID

- Kvalitativní i kvantitativní stanovení Ag, a Ab, porovnání Ag směsí
- stanovení koncentrace IgG, IgA, IgM, *IgD*, složek komplementu a proteinů akutní fáze
- průkaz Ab při alergických alveolitidách, průkaz Ab proti některým patogenům, např. *Toxoplasma gondii*