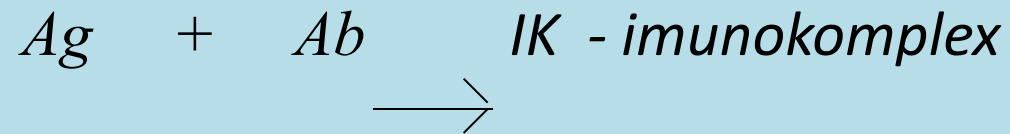


Imunochemické metody

- Je to praktická realizace poznatků imunologie, radiochemie, enzymologie a fotometrie a dalších.
- Vznik imunochemických diagnostických metod:
V průběhu 70-80tých let s rozvojem klinické imunologie, virologie, farmakologie a dalších oborů
- Zvýšily se nároky na rychlost a kvalitu požadovaných laboratorních vyšetření. Klade se důraz na vysokou citlivost, specifitu a možnost automatizace.
- Do té doby sloužily k detekci Ag a Ab klasické metody: KFR, neutralizace Ag pomocí specifické Ab, světelná či elektronová mikroskopie, prostá či elektroforetická imunodifuze, které byly nahrazeny imunochemickými metodami: FIA, RIA, EIA, chemiluminiscence a další

- stanovení Ag či Ab v histologických preparátech, tělních tekutinách a jiných vzorcích, jsou to munoeseje, reakce třetí generace

základem je reakce:



-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.

Druhy reakcí:

- enzym EIA, EMIT enzyme multiplied immunoassay technique
- geneticky upravený enzym CEDIA
- radioizotop RIA
- fluorescenční látka FIA
- chemiluminiscenční látka LIA, CL

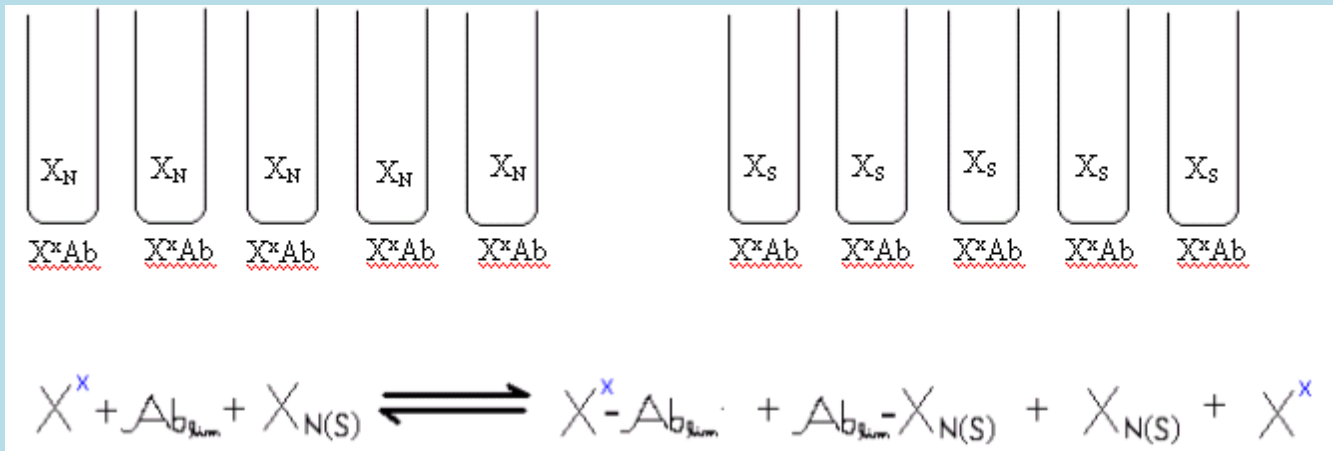
- **Antigeny Ag** – makromolekuly (polymery: proteiny, polypeptidy...)
 - navozují specifickou imunitní odpověď
 - specificky reagují s protilátkami
 - haptén – nízkomolekulární látka (léčiva, drogy) navázána na
 - vysokomolekulární nosič
- **Protilátky Ab** – bílkoviny (glykoproteiny) tělních tekutin
 - vykazují specifickou vazebnou schopnost vůči antigenu, na jehož
 - podnět se vytvořily, mohou být cíleně připravené
 - jen proti **jedné chemické skupině**
 - **která je společná pro více strukturně chemicky příbuzných látek**

Imunochemické metody

- ***Heterogenní imunometody*** – oddělení volných molekul značených reaktantů (Ag, Ab, H, Abs) od značeného reaktantu vázaného v imunokomplexu, intenzita značené reakce se nemění, stanovení makromolekulárních látek (radioimunometody, ELISA) – vysoká citlivost
- ***Homogenní imunometody*** – bez separace frakcí, intenzita značené reakce se mění, stanovení nízkomolekulárních látek, jsou jednodušší, rychlejší, lze je automatizovat (enzymová, fluorescenční a chemiluminiscenční imunoanalýza)

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 více než v pg10-12(pikogramech)
- - stanovujeme **jakékoliv látky, proti nimž lze vytvořit protilátku**
- protilátku získáme komerčně nebo injekcí Ag či haptenu do králíka nebo morčete
- **značení radioaktivním prvkem** (Ag = X...značka)
- - 3 prvky: ^3H , ^{14}C , ^{125}I , ^{131}I
- - označený Ag → **Xx**
- **vlastní reakce:**
- - 4 složky:



Xx.....značený Ag

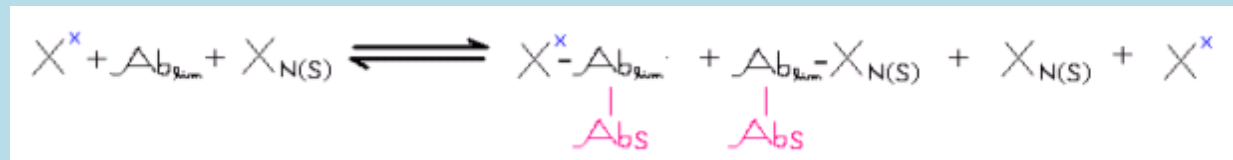
Ab lim60%.....protilátka ze zvířete /je limitováno ~známo její množství/

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

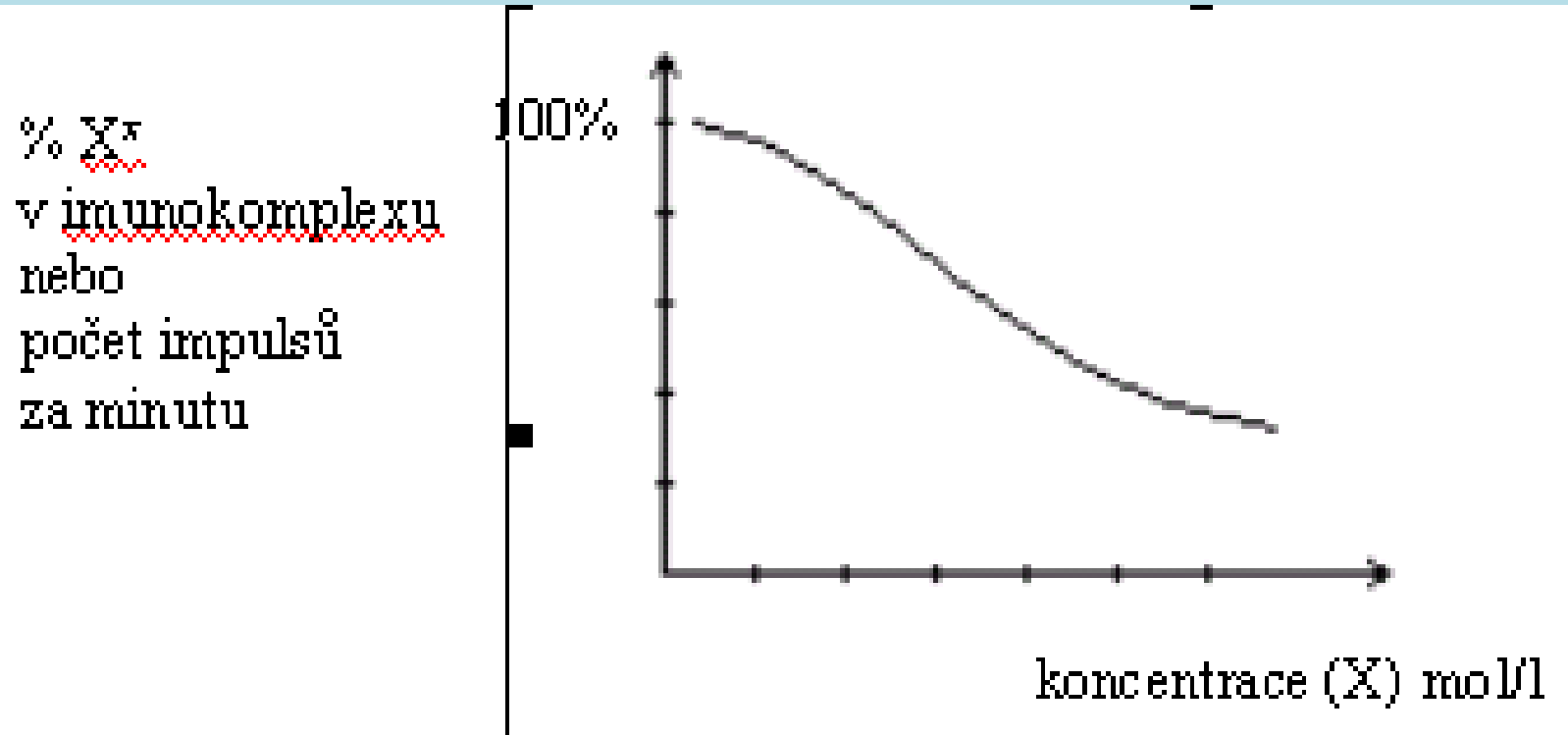


- **izolace IK** -imunochemicky – Abs, **fyzikálně** - filtrace, centrifugace...
- molekulární metody** – elektroforéza, chromatografie ...

vyhodnocení:

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

Vyhodnocení:



RIA

- **- výhody:** * vysoká citlivost, specifčnost, přesnost, automatizace procesů
- * mikromnožství látek přímo v biologických kapalinách
- **nevýhody:**
- * **nákladné zařízení**, drahé přístroje-scintilátory, drahá scintilační tekutina
- * **radioaktivní materiál** – zdravotní riziko, γ nebo β záření, zvl. bezpečnost při práci, likvidace radioakt. materiálu
- * **vlastnosti radionuklidů** ~ znehodnocování krátkým poločasem rozpadu – časová náročnost (musí se provést hned), u izotopů vydávajících γ 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. IgE) např.: kardiotonika, cytostatika (léčba infekčních onemocnění, nádorových onemocnění), hladiny hormonů, léčiv, vitamínů, drogy, minoritních složek séra, ve virologické diagnostice, vyšetření specif. Autoantilátka, např. proti acetylcholinovému receptoru při *myasthenia gravis*

- **v alergendiagnostice: RAST test**
(radioallergensorbent test) je vyvinutý pro detekci Ab proti specifickému alergenu, RIST test
(radioimmunosorbent test) je testem vyvinutým pro zjištění antigenu, radioimunoprecipitace 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
- FITCfluorescein 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

FUNKCE FLUOROFORŮ:

Mají schopnost absorbovat světlo v UV oblasti a vyzařovat ve viditelné.

Jsou vhodné k vizualizaci sledovaných objektů. Jsou látky schopné vyzařovat (emitovat) přebytečnou E jako záření vyšší vlnové délky. Na konjugaci jsou vhodné pouze fluorochromy obsahující chemickou skupinu, která se pevně váže na bílkovinu. (Specificky se váží na určité struktury v BB \Rightarrow umožní jejich zviditelnění a další analýzu \sim vyšší fluorescence = více fluoroforu = více látky v BB)

vlastnosti SONDY:

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

! biologický materiál sám o sobě vyzařuje energii \rightarrow pozadí

★ **HOMOGENNÍ FIA**

★ **HETEROGENNÍ**

- **background fluorescence** ~ fluorescence pozadí – je nežádoucí, musí se odfiltrovat, existují v podobě :
 - **AUTOFLUORESCENCE** samotného vzorku /flavony, flavoprot., NADH.../
 - **REAGENČNÍ POZADÍ** / fluorofor se naváže tam, kam nemá /
- **Pozitivní reakce:** se jeví ve fluoresc. mikroskopu vyzařováním světla určité barvy typické pro použitý fluorochrom, zvýší se fluorescence v případě vzniku IK na rozdíl od pozadí Ag s navázaným F, či jiným způsobem se upřednostní vznik signálu v případě vzniku IK

• FLUORESCENCE

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

2. FÁZE → DOBA EXCITOVANÉHO STAVU

- trvá 10^{-9} s ~ velmi krátká
- *konformační změna*
- *disipace energie* → část energie se ztrácí
- – přechází na nižší stav

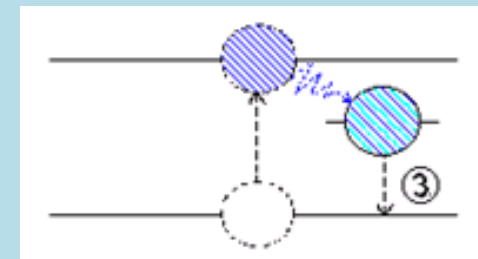
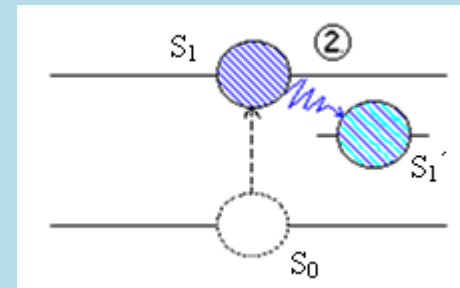
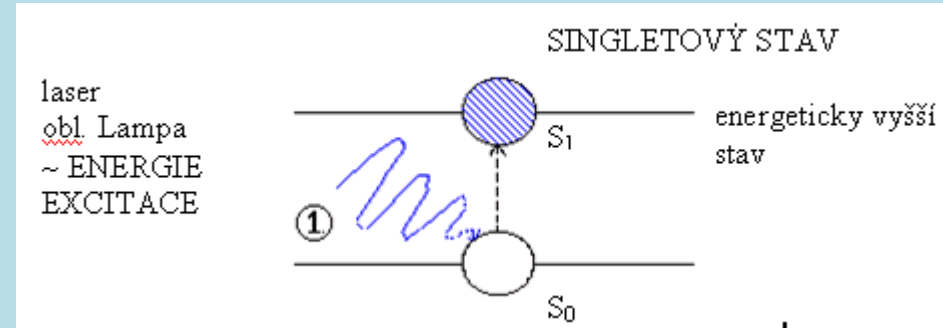
3. FÁZE → EMISE

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

energie EXCITAČNÍ se NErovná EMISNÍ !!!

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

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



- heterogenní techniky
- homogenní techniky
- ***Homogenní FIA***
- nevyžaduje separaci volného a v imunokomplexech vázaného Ag či Ab před měřením fluorescence.
- 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.

Heterogenní FIA

- **Podstata:** volné označené Ag se musí oddělit od Ag vázaných v imunokomplexech (nebo volné značené Ab od Ab v komplexech) ještě před uskutečněním měření.
- **Oddělení:**
- precipitací imunokomplexů
- použitím značeného reaktantu Ag nebo Ab vázaného v tuhé fázi

Heterogenní FIA

- Mikroskopická IFA má 2 modifikace: 1. Přímá a 2. nepřímá IFA patří mezi heterog. techniky
- **Přímá**
- a) detekce Ag
- Vyšetřovaná tkáň je fixovaná na sklíčku (Ag), přidáme známou značenou protilátku AbF, inkubujeme a promyjeme. Ve fluorescenčním mikroskopu pak pozorujeme pozitivitu vzorku - záření na sklíčku
- $\| \text{Ag} + \text{AbF} \rightarrow \|$ měření fluorescence

Heterogenní FIA

- b) detekce Ab
- známý značený Ag nebo haptén fixován na sklíčku, HF nebo AgF převrstvíme vyšetřovaným sérem. Po inkubaci a promytí pozorujeme sklíčko pod fluor. mikroskopem
- $\text{||- AgF, HF + Ab} \rightarrow \text{||- měření fluorescence}$

Nepřímá – průkaz Ab ve vyšetřovacím séru

- Tkáň se známým Ag nebo buněčná kultura (suspenze jader. buněk) fixovaná na sklíčku převrstvíme vyšetřovaným sérem i kontrolními vzorky, následuje inkubace a promytí. Přidáme konjugát (sekund. Ab) s fluorochromem, opět inkubujeme a promyjeme a pak pozorujeme v mikroskopu
- $\text{||- Ag + Ab + AbSF} \rightarrow \text{||- měření fluorescence}$

Detekce FIA

přístroje :

- SPEKTROFLUOROMETR

- měří fluorescenci vztaženou na celý preparát

- FLUORESCENČNÍ MIKROSKOP

Fluorescenční: jako zdroj excitace využívá lampu s výbojkou pro UV záření. Obraz fluoreskujícího objektu na tmavém pozadí získáme pomocí **2 komplementárních filtrů: 1. primárního excitačního 2. sekundárního okulárového**

FIA

- **Využití:** průkaz a titrace Ab, průkaz Ag např. ANA test – protilátky proti nukleárnímu Ag (fluorescenční reakce v oblasti jader)
- **Přímá:** k průkazu Ag v tkáňových řezech (např. deponované IK) nebo v další biolog. vzorcích pro rychlý průkaz patogenů ve sputu či bronchoalveolární laváži
- **Nepřímá:** k průkazu autoprotilátek jak a) orgánově nespecifických (antinukleárních) Ab proti mitochondriím, hladkému svalstvu b) orgánově specifických (ab proti parietálním b. žaludku, β buňkám pankreatu, bazální membráně glomerulů, slinným žlázám a pod)