

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
 - Dvojrozměrná
 - 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 antigenů
- 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 hapteny
- Imunosenzory, MALDI - TOF, SELDI – TOF hmotnostní spektroskopie

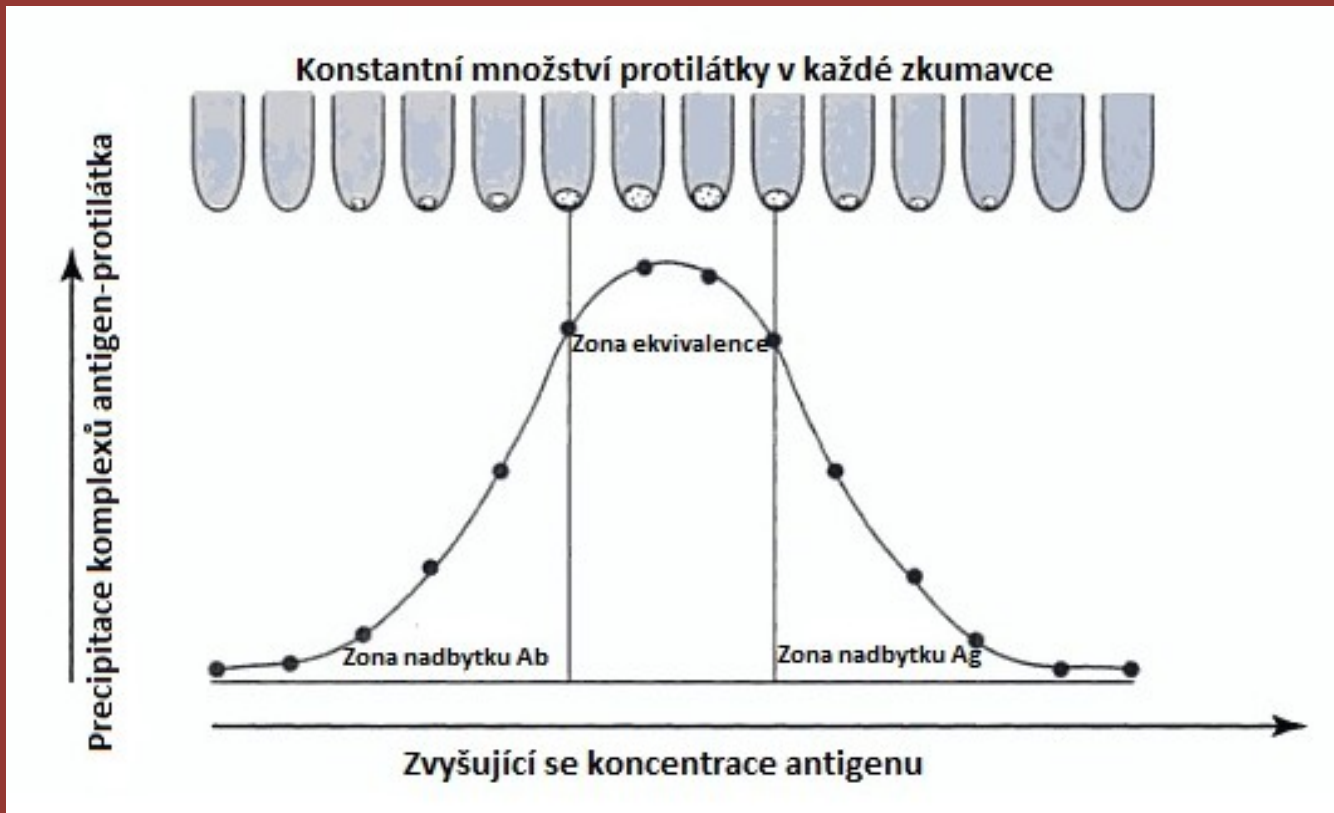
Příklady metod I.-IV. generace

- **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

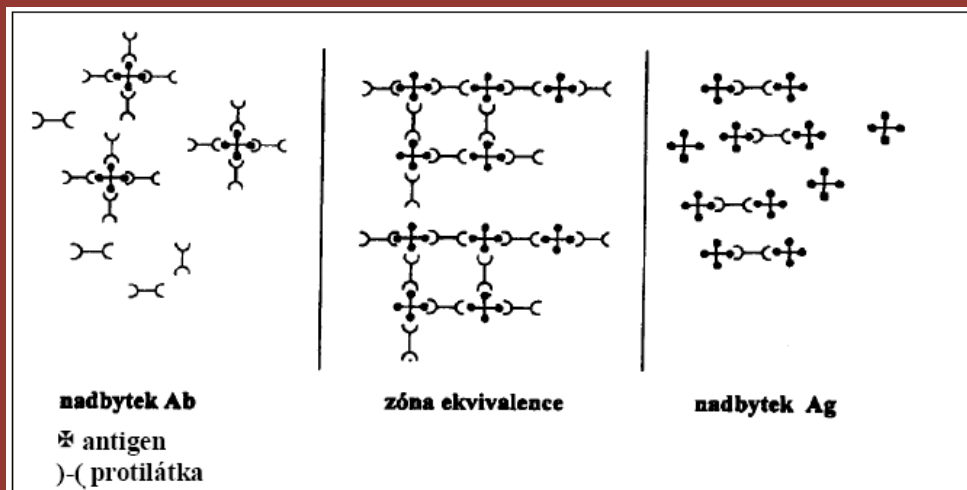
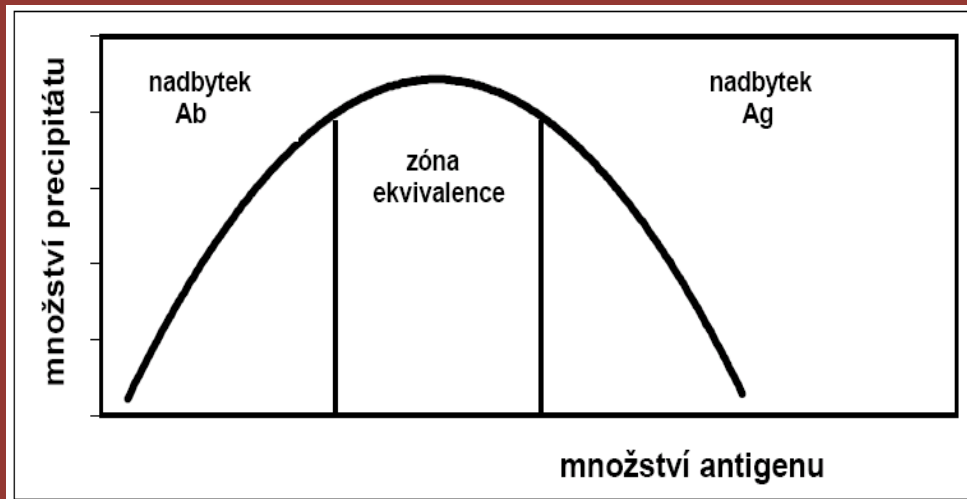
Precipitační křívka



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/

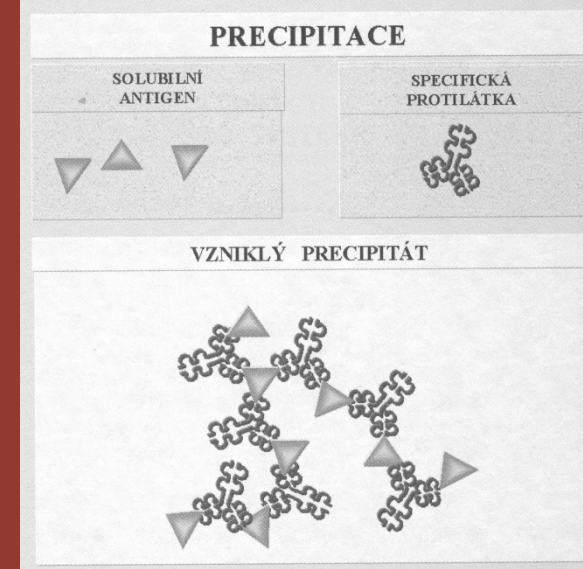
vzájemná koncentrace Ag a Ab

pH

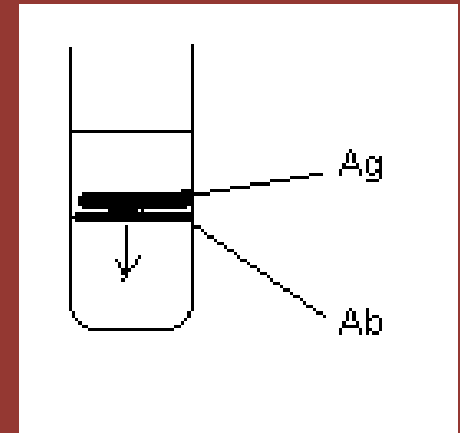
iontový náboj

tvář a velikost části

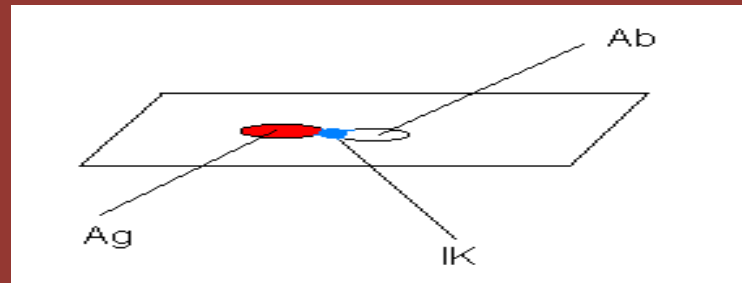
PRECIPITAČNÍ metody:



- Ag + Ab → 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 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 Ag (patogena)
- Koncentrace Ab se vyjadřuje jako **TITR SÉRA**.
- = **nejmenší zředění Ab, které ještě reaguje s Ag**
- - hodnocení : **kvalitativně** – odečtení okem

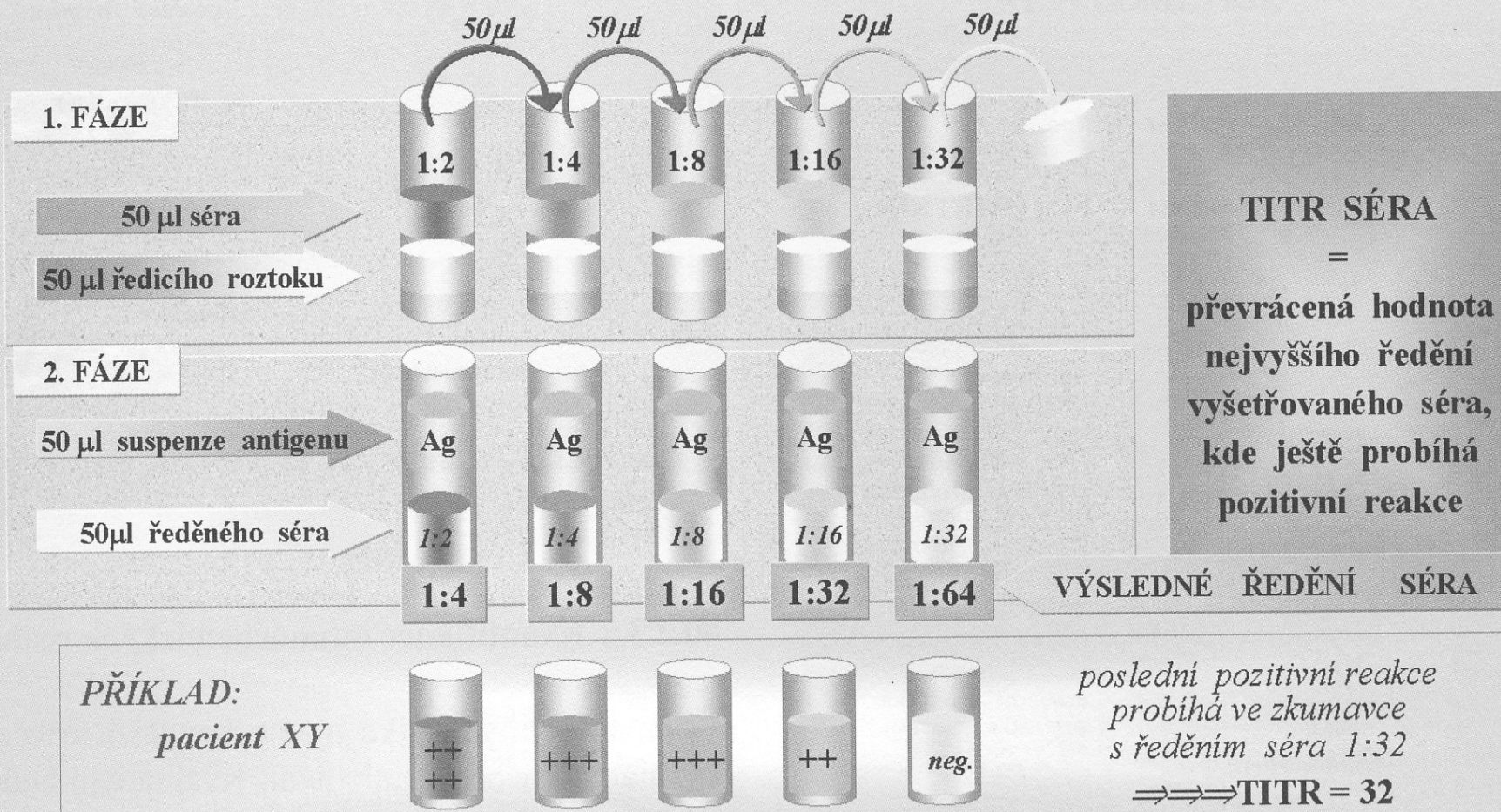
kvantitativně :

- 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

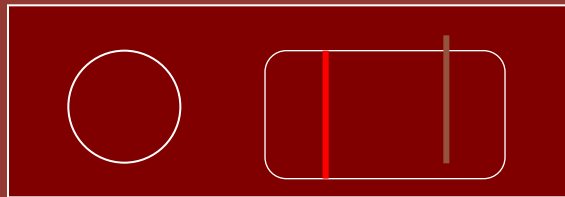
Titrace séra



Precipitační imunochemické metody

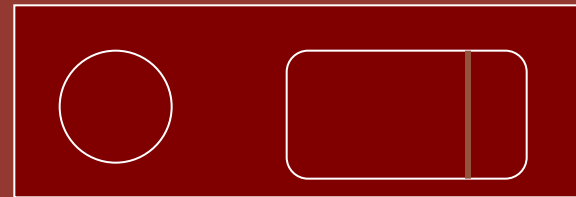
Screeningové metody – jednoduché precipitační testy terénní kazetové testy pracující v oblasti ekvivalence, imunochromatografická

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 spádu** až do místa střetnutí **zde** vznikají **precipitační linie**, **ploučky**, **stence**, **uhy** /záleží na použitém materiálu/

- - vzniklé precipitáty **detekujeme:**

okem - zákal

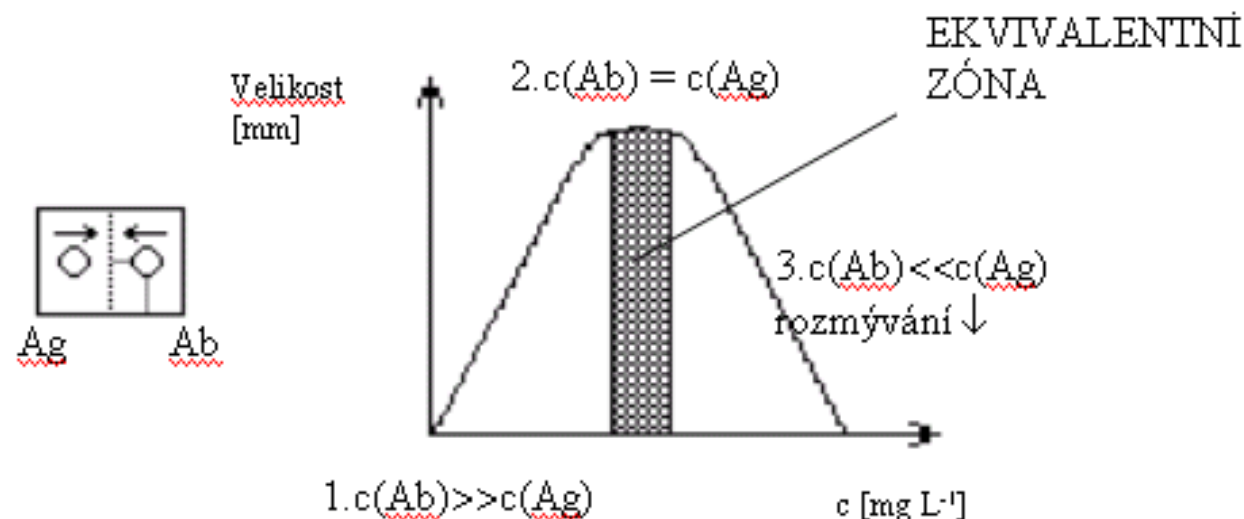
barvením – Coomassie blue, amidočern

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

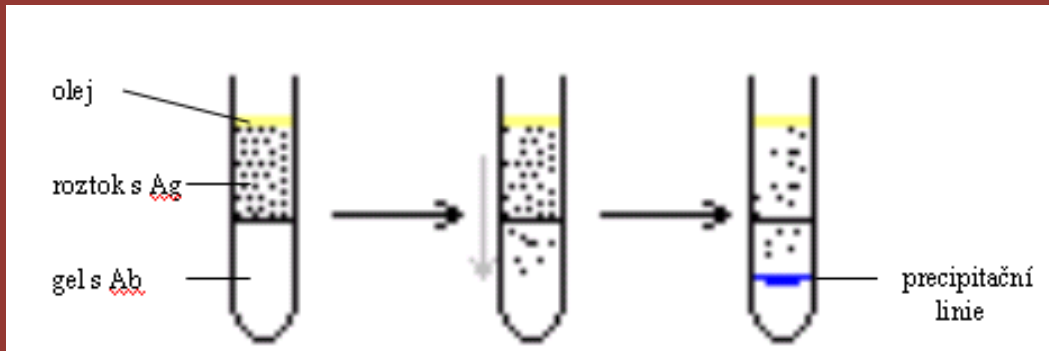
jednorozměrná – složka putuje v gelu jedním směrem

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



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**

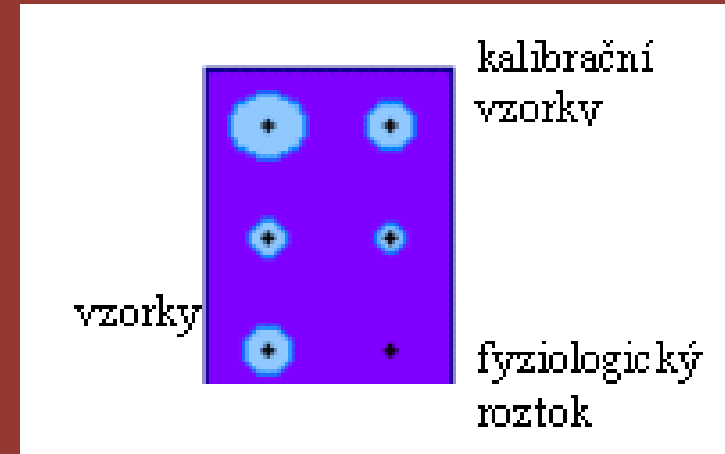
Jednoduchá jednorozměrná imunodifúze ~ dle OUDINA

- - 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
- inkubace ve vlhké komůrce ve vodorovné poloze → difúze všemi směry (radiální)
- po obarvení - modré precipitační prstence
- **průměr** 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

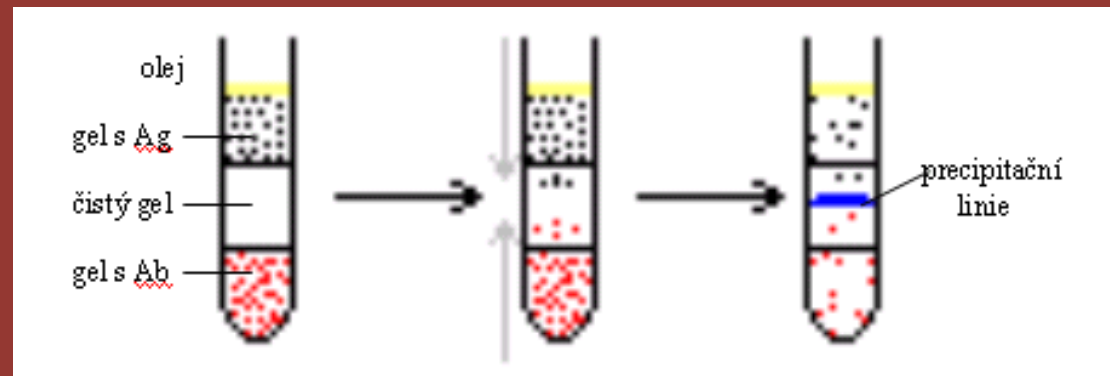
fyziologický roztok –blank

vzorky o neznámé

koncentraci

vzorky o známé koncentraci (kalibrační)

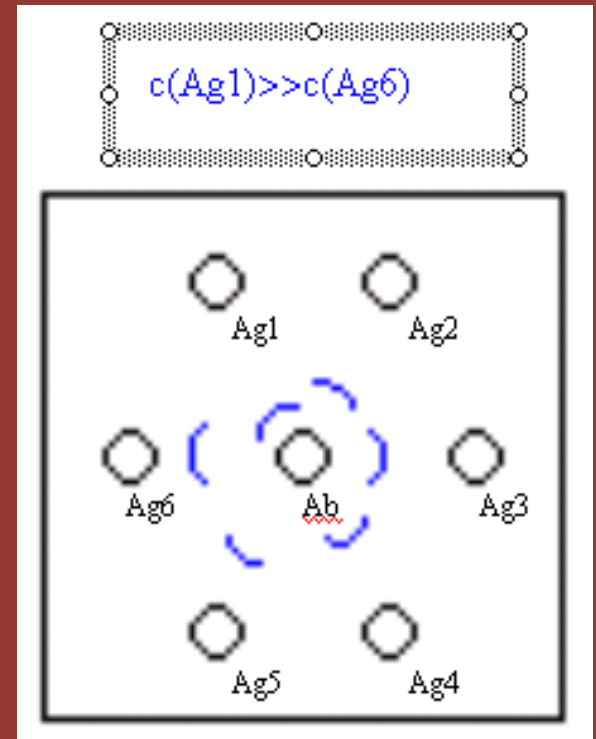
Imunodifúze



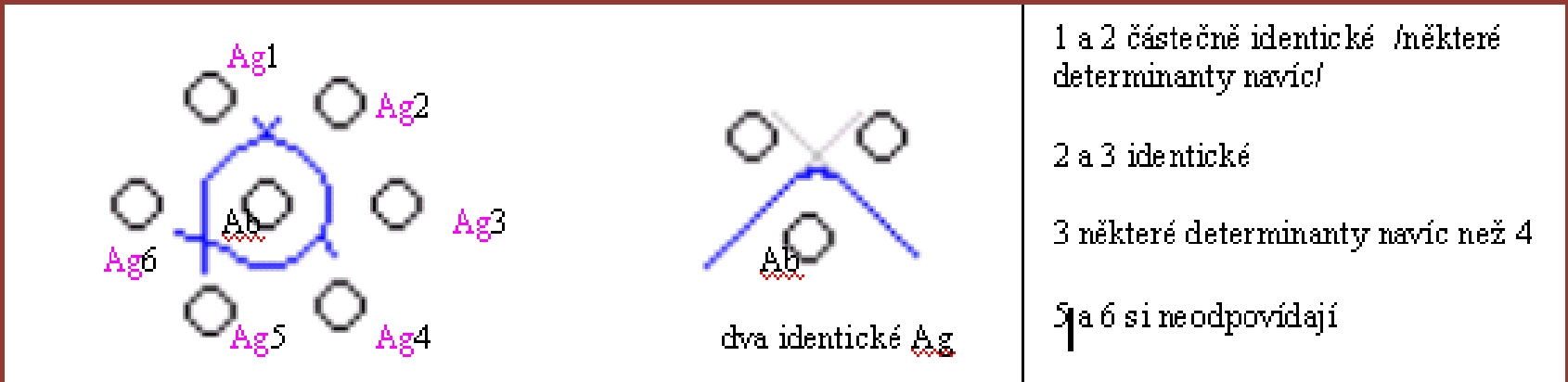
- **dvojitá imunodifúze**
- - gelem *difundují obě složky*
- - *koncentrace Ag a Ab musí být vzájemně ekvivalentní*
– proti překrývání linií
- **Dvojitá jednorozměrná imunodifúze**
- - ve zkumavce *agarózový gel s Ab* a *agarózový gel s Ag*
- - mezi nimi **čistý gel** – v místě vyrovnání koncentrací 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 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, odlišení Ag



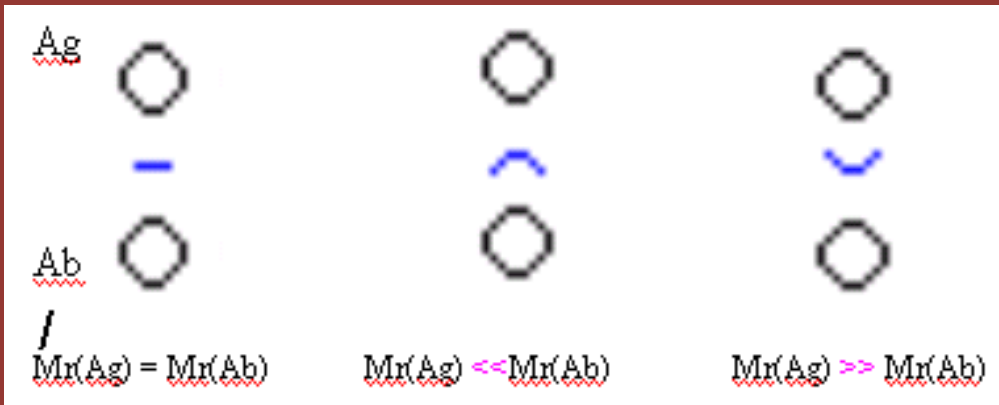
• - využití: Ag

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



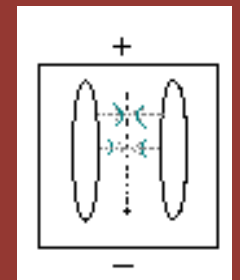
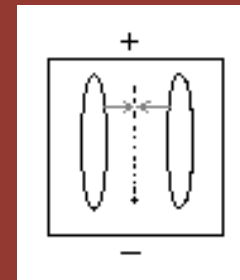
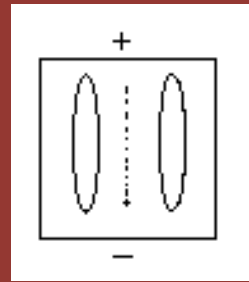
- menší molekula se dostane dále do gelu

Souhrn využití ID

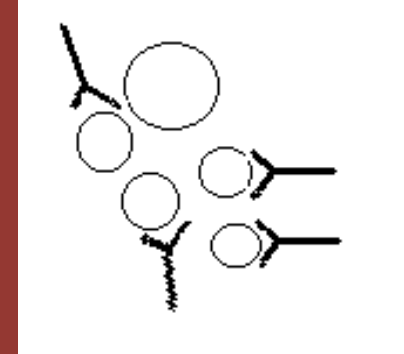
- Kvalitativní i kvantitativní stanovení Ag, a Ab, porovnání Ag směsí
- stanovení koncentrace IgG, IgA, IgM, IgD, složek komplementu a proteinů akutní fáze
- průkaz Ab při alergických alveolitidách, průkaz Ab proti některým patogenům, např. *Toxoplasma gondii*

Imunoelektroforetické metody

- kombinace metod elektroforetických a imunodifúzních
- Bílkoviny se dělí v závislosti na molekulové váze a elektrické náboji jednotlivých molekul. Při běžné elfo se sérum dělí na zónu albuminu, $\alpha - 1$, $\alpha - 2$, β , γ globulinů. Stanovení zastoupení jednotlivých frakcí může mít význam při hodnocení stádia zánětlivého procesu. Při akutních zánětech stoupá zastoupení $\alpha - 1$, později i $\alpha - 2$, při chronických zánětech dochází ke zvýšení zastoupení γ globulinů a poklesu albuminu.
- imunoelektroforéza **podle WILLIAMSE a GRABARA**
- **RAKETOVÁ** imunoelektroforéza
- **PROTISMĚRNÁ** imunoelektroforéza
- **DVOJROZMĚRNÁ** imunoelektroforéza
- **Př. imunoelektroforéza podle WILLIAMSE a GRABARA:**
 - - 1953 Williams a Grabar
 - - 2 stupně: 1. **nalití destičky** (agarózní gel s puftrem)
 - vytvoření 2 žlábků a nanesení Ag mezi ně
 - po rozdělení elektroforézou se do žlábků 2. napipetují **protilátky**
 - inkubace 48 hodin v lednici ████████ dochází **k DIFUZI**
 - ████████ místě ekvivalence se vytváří **PRECIPITAČNÍ obloučky**



Aglutinační metody



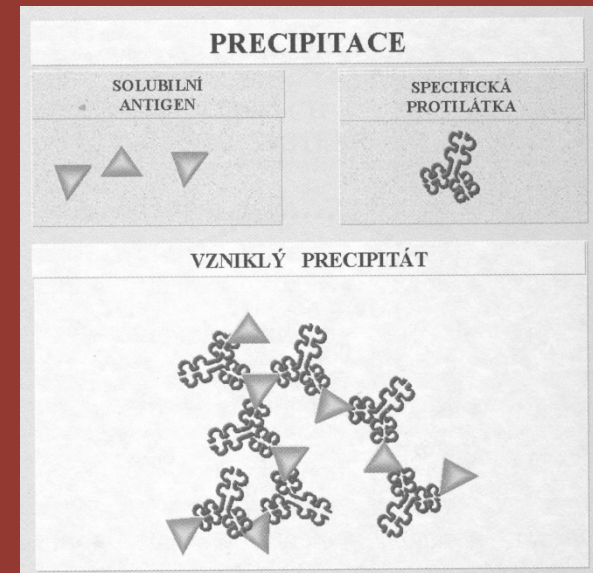
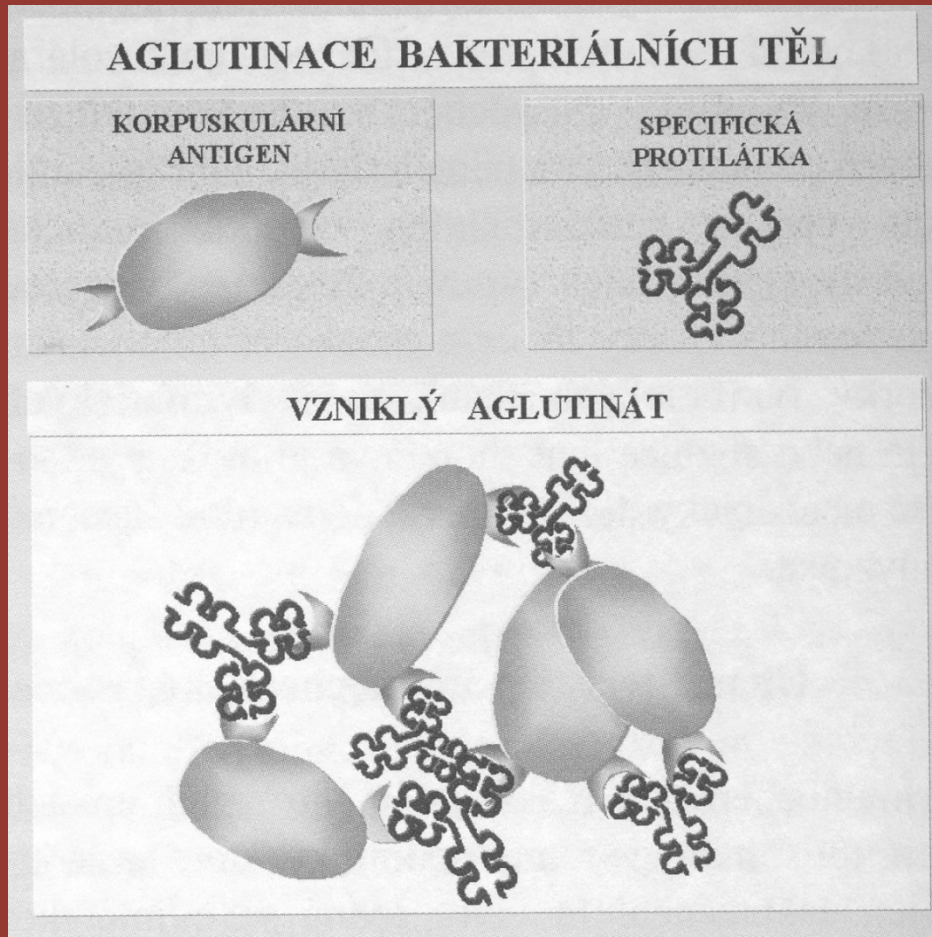
- Ag + Ab
- *aglutinogen* + *aglutinin* = *aglutinát*

- **princíp** : KORPUSKULÁRNÍ / částicový / Ag,
- solubilní je vázán na částice
- při reakci dochází ke shlukování Ag a Ab na základě vytváření můstků - Ab mezi buňkami za vzniku shluků
- **přímá** – použití bakterií, buněk
- **nepřímá, pasivní** – na jejich povrch je Ag uměle navázán, př. latex-fixační test, HIT
- **Předpoklady ke vzniku vazeb:**
 1. dostatek Ab
 2. přítomnost Ab proti různým epitopům
 3. vzdálenost mezi částicemi co největší
 4. Ab funkčně jednovazebné nevytváří aglutinaci (IgA mono, IgE, IgG) – inkompletní Ab viz hemaglutinace

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** (*Salmonella typhi*), **paratyfu** (*Salmonella paratyphi*) A,B,C, **Weil-Felixova** – skvrnitého tyfu (*Rickettsia prowazekii*) *Proteus vulgaris*, Ab proti *Francisella tularensis*
 3. K průkazu *Treponema* p., brucelózy (*Brucella* sp.), listeriózy (*Listeria* sp.), EBV – mononukleóza
 4. Nepřímá - Ab proti autoAg, př. k průkazu auto Ab proti štítné žláze

Rozdíl mezi aglutinací a precipitací



Hodnocení aglutinace:
kvalitativně - odečtení
okem

kvantitativně :

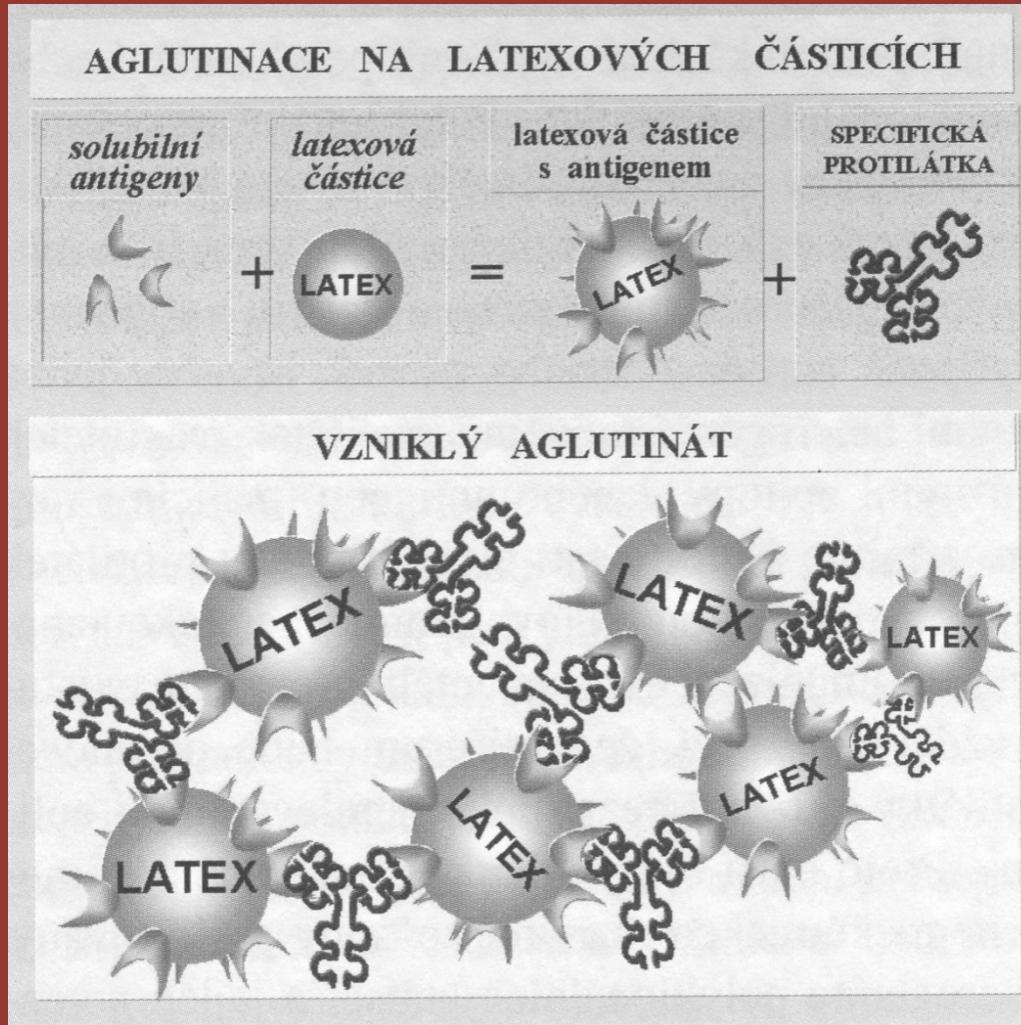
a) zjištěním ***množství aglutinátu***

b) zjištěním ***množství Ag***
v aglutinátu či
supernatantu

Latexová aglutinace, latex-fixační test

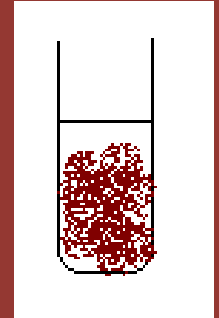
- **rychlé kvalitativní stanovení**
- **Ag nebo Ab imobilizován na latexových kuličkách**
- **Stanovení Ab proti IgG – revmatoidní faktor**
- **Průkaz patogenních Antigenů (*Helicobacter pylori*, Adeno- a *Rotavirus atd*)**

Latexová aglutinace, latex-fixační test



- *Tyfus* - *Salmonella typhi*
- *Paratyfus* - *Salmonella paratyphi* A,B,C
podobné příznaky jako tyfus
- *Skvrnitý tyfus*, blechy, veš šatní, klíště -
Rickettsia prowazekii - *Proteus vulgaris*,
horečka, třesavka, vyrážka
- *Adenovirus*, *Rotavirus* *gastrointestinální*
infekce

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

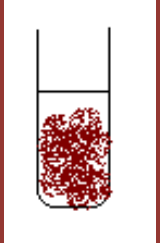
- a) aglutinaci v bílkovinném prostředí
- b) v prostředí s proteolytickými enzymy
- c) použitím antiglobulinového Coombsova séra - králičí ab proti lidským Ig

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
 - Využití při 2 reakcích:
 - **KFR** – *komplement fixační reakce*
 - **HIT** – *hemaglutinačně inhibiční test* :

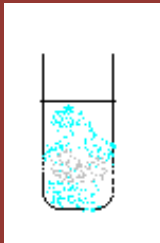
HIT

- 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 (rozpuštěný Ag).
- Ery pak aglutinují – shlukují se jen v přítomnosti specifické Ab






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

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



HIT

neodpovídá-li protilátka virovému (bakteriálnímu) Ag,
nedojde k hemaglutinaci

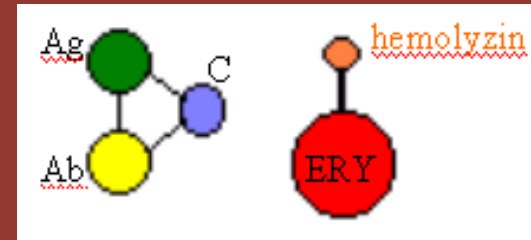
- situace, kdy přidáme stejný Ag do reakce
- Ab + Ag - Ery  **hemaglutinát** + stejný Ag 
přidání Ag + Ab - Ag - Ery  **inhibice**
hemaglutinace, vyvázání IK
- *Metodou inhibice pasivní hemaglutinace lze dokázat velmi malé mn. rozpustného Ag nebo H (metoda je velmi citlivá)*

pro vyhodnocení můžeme použít i optické metody

Využití: Průkaz Ab proti patogenní Ag jako *Candida Albicans, Aspergillus fumigatus, Treponema pallidum*

KFR komplement-fixační reakce

metody využívající faktu aktivace komplementového systému komplexem
– antigen-protilátka



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

■ vyšetřované Ab - **vyšetřované sérum**

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

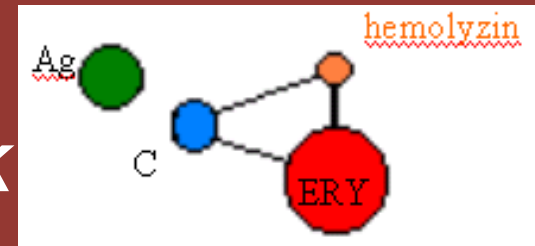
■ známý specifický Ag

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

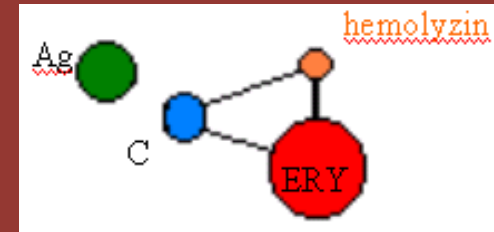
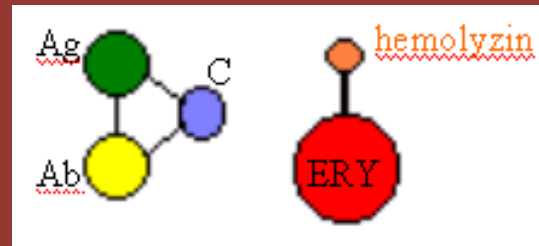
■ **KOMPLEMENT** - zdrojem nejčastěji sérum
morčete (**váže se na IK a aktivuje protilátku**)

hemolytický komplex: komplex Ag /beraní ERY/
a protilátky ■ AMBOCEPTORu /hemolyzinu/,
získaného imunizací králičího séra beraními
erytrocyty

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



KFR



- průběh reakce:
- * **POZITIVNÍ** 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** 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

KFR - využití

- **použití:**

- **diagnostika nemocí** příjice /syphilis/, Stanovení

Ab proti patogenním Ag bakterie (Bordetella, Brucella, Borrelie, Campylobacter,...), viry (Adenov. Cytomegalov., EBV...), prvoci (Toxoplazma...)

- **ve virologii** průkaz protilátek téměř všech virových nákaz

- **typizace neznámých Ag** nově izolovaných virů

- **průkaz protiorgánových Ab**

Vyšetření komplementového systému

- Stanovují se

- a) hladiny jednotlivých složek K v séru –
za pomoci antisér, většinou proti C3, C4, C1q

- b) celková aktivita komplementové kaskády-

Se provádí testem CH50 – (50% hemolýza způsobená komplementem), stupeň hemolýzy závisí na množství přidaného K, nepřímá úměra

Využití: K detekci poruch nedostatečného mn. nebo defektů složek K systému

Reakční směs:

2% nálev krvinek, Ab (hemolyzin), C komerční (vyšetřované sérum)

Výsledek: lýze buněk, vyčteření

Vyšetření cirkulujících a deponovaných IK

- Principy metodik
 - Ag+Ag=IK, CIK, DIK
1. Využívající fyz – chem vlastností – CIK- největší makromolekuly séra mohou být precipitovány pomocí PEG (polyetylénglykol). Precipitát je úměrný mn. cirkulujících CIK

Vyšetření komplementového systému

- Stanovují se

- a) hladiny jednotlivých složek K v séru –
za pomoci antisér, většinou proti C3, C4, C1q

- b) celková aktivita komplementové kaskády-

Se provádí testem CH50 – (50% hemolýza způsobená komplementem), stupeň hemolýzy závisí na množství přidaného K, nepřímá úměra

Využití: K detekci poruch nedostatečného mn. nebo defektů složek K systému

Reakční směs:

2% nálev krvinek, Ab (hemolyzin), C komerční (vyšetřované sérum)

Výsledek: lýze buněk, vyčteření

Vyšetření cirkulujících a deponovaných IK

- Principy metodik
 - Ag+Ag=IK, CIK, DIK
1. Využívající fyz – chem vlastností – CIK- největší makromolekuly séra mohou být precipitovány pomocí PEG (polyetylénglykol). Precipitát je úměrný mn. cirkulujících CIK

Vyšetření CIK

- 2. CIK na sebe váží C1 – C3 složky K. V první fázi se odstraní nenavázaný C1q. V druhé fázi se stanoví koncentrace C1q, jež odráží i hladinu CIK (totéž pro C3,C4)
- 3. průkaz vazbou na buňky, které exprimují receptor pro Fc fragment IgG. Lze využít trombocyty, žírné, fagocyty
- **Využití:** Pro monitoring jakýchkoliv zánětlivých procesů. Pro diagnostiku imunokomplexových chorob je důležitější průkaz IK deponovaných v tkáních. To se provádí po bioptickém odběru vzorku z tkáně (kůže, svaly, ledviny) pomocí přímé fluorescence (přímá FIA) se prokazuje uložení IgG

Zákalové reakce

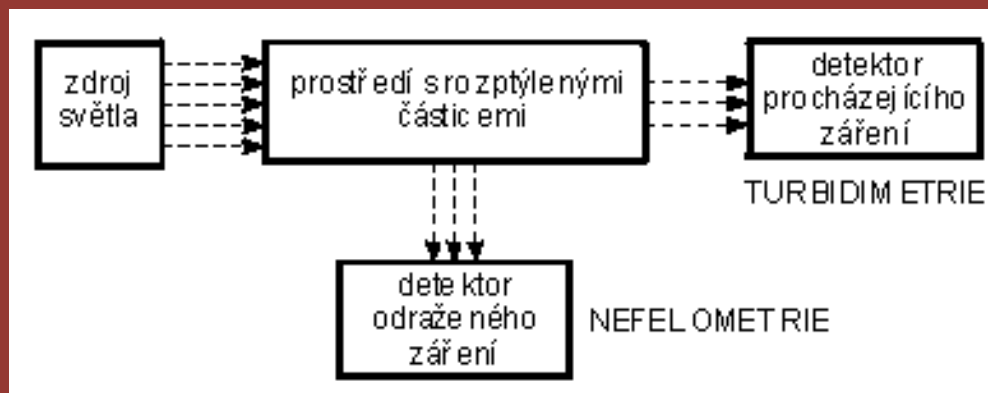
metoda probíhající v roztoku

Princip: při reakci Ag a Ab vzniká zákal-precipitát, jehož intenzita je při konstantním množství mn. Ab úměrná koncentraci vyšetřovaného Ag

■ **NEFELOMETRIE** – rozptyl viditelného světla měřeného pod úhlem

■ **TURBIDIMETRIE** – úbytek viditelného světla při průchodu vzorkem měřeného ve stejné rovině

■ **výhoda:** možnost automatizace, rychlost provedení, přesnost, ale vyšší cena



Imunoblotting

- **SOUTHERN BLOTTING**
- vyvinut v r. 1970, k detekci DNA, molekuly DNA se přenášejí z agarózového gelu na membránu k nalezení části sekvence DNA či konkrétního genu v genomu
- **NORTHERN BLOTTING**
- slouží k detekci RNA
- přenos nám umožňuje zjistit přítomnost, nepřítomnost a relativní množství specifických RNA sekvencí
- **WESTERN BLOTTING**
- slouží k detekci bílkovin
- touto metodou dokážeme najít jednu bílkovinu v množství jiných, přičemž určit i délku daného proteinu
- je závislá na použití velmi kvalitních Ab zaměřených na vybranou bílkovinu

- **Podstatou blottingu:** izolovaná látka (obvykle separovaná) se přenáší na membránu. Podle typu přenosu se bloty liší:
- **Difúzní blotting:** v přenosovém pufru
- **Vakuový blotting:** přenos pomocí vakua
- **Kapilární blotting:** přenos kapilárními silami přes filtrační papír
- **Tankový elektroblotting:** k přenosu využito el. pole (2-3 l pufru), na boku nádoby - elektrody
- **„Semi dry“ blotting:** využití plošných elektrod (100 ml)
- **Kapkovací dot blotting:** bílkoviny nejsou rozseparovány – imobilizace jednotlivých vzorků

- **Používané membrány**
- **Nylonová** – elektrostatická interakce
- **PVDF** (polyvinyliden difluoridová) – hydrofilní interakce
- **Nitrocelulosová** – hydrofilní interakce
- **WESTERN BLOT**
- 3 kroky:
- **1. SDS PAGE** (gradientová elektroforéza) **2. BLOTTING**
3. IMUNODETEKCE

- **SDS PAGE**

- Nejpoužívanější metodou je PAGE – SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti **SDS** (sodium dodecyl sulphate). Umožňuje následné určení relativních molekulových hmotností jednotlivých proteinových frakcí.
- Polyakrylamidové gely se připravují kopolymerací polymerů – **akrylamidu** a
- ***N,N'*–methylen-bis-akrylamidu** (BISu).
- Polymerací akrylamidu vznikají dlouhé řetězce polymerů, zařazení BISu způsobuje zesílení „můstky“, které vznikají z bifunkčních zbytků BISu. Vytvořená polyakrylamidová matice nese elektrický náboj a je chemicky dost inertní. Pro stanovení M_r se používá detergent SDS. Všechny bílkoviny vážou SDS v poměru **1,4 SDS na 1 g bílkoviny**. Molekuly SDS bílkovině udělí negativní náboj. Na molekulu bílkoviny se naváže takové množství molekul SDS, že její vlastní náboj pozbude významu a dělení může probíhat podle velikosti molekul.

Molekula určitého proteinu postupuje v gelu až do momentu, kdy velikost pórů je menší než velikost molekuly a ta se v tomto místě gelu „zasekne“.

Použitím směsi standardních bílkovin se známou Mr a po sestrojení kalibrační křivky je možné vypočítat Mr jednotlivých frakcí

- **WESTERN BLOTTING**

- Blotovacím zařízením pro semi-dry blotting přeneseme rozdělené proteiny pomocí el. proudu.

- **IMUNODETEKCE**

- Inkubace s primární protilátkou a následně se sekundární protilátkou v blokovacím roztoku.

- substrátového roztoku, dokud se neobjeví bandy.

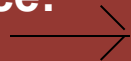
- Vyvolávání ukončíme namočením membrán do vodovodní vody.

- **Využití:** Stanovení Ab proti spec. proteinům , průkaz přítomnosti spec. Antigenů (Borrelia burgdorferi s.l.)

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, molekulární biologie, 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 ████████ lmi 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 injekcí 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*

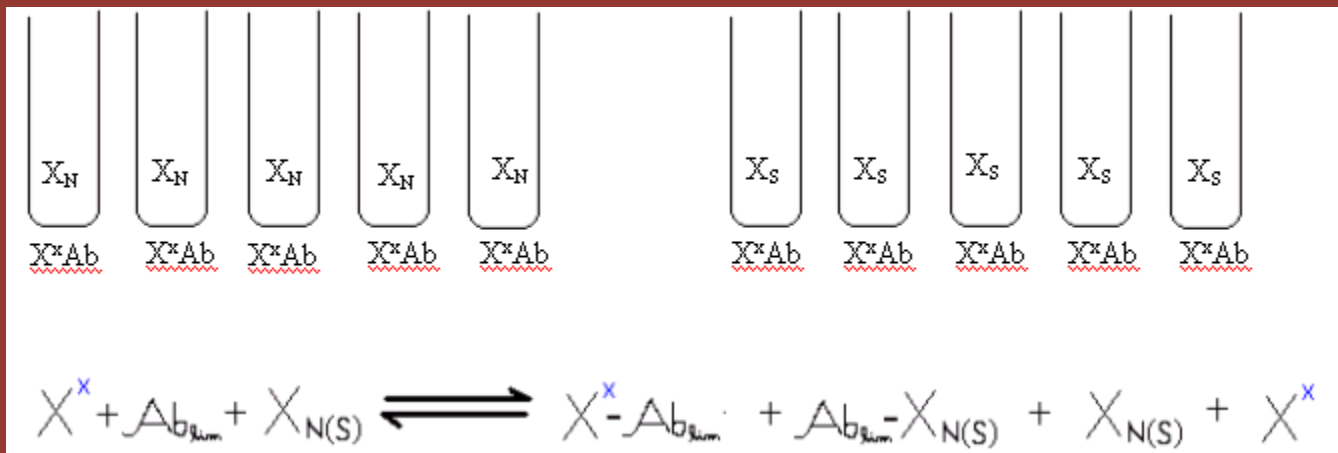
✿ **značení radioaktivním prvkem** (Ag = X...značka)

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

- označený Ag ■■■ x

✿ **vlastní reakce:**

- 4 složky:



Xx.....značený Ag

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

XN.....neznámý antigen

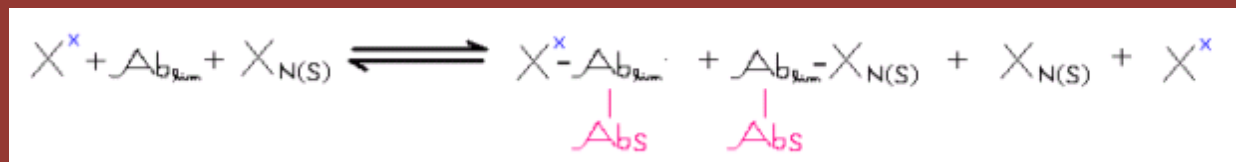
XS.....standardní antigen

☞ **oddělení IK:**

■ **imunochemické** – sekundární protilátka **Abs**

- vyrobí se proti prvotní protilátce Ab ■ Ab pak vystupuje jako Ag

■ Abs + Ab ...vznikají sraženiny IK

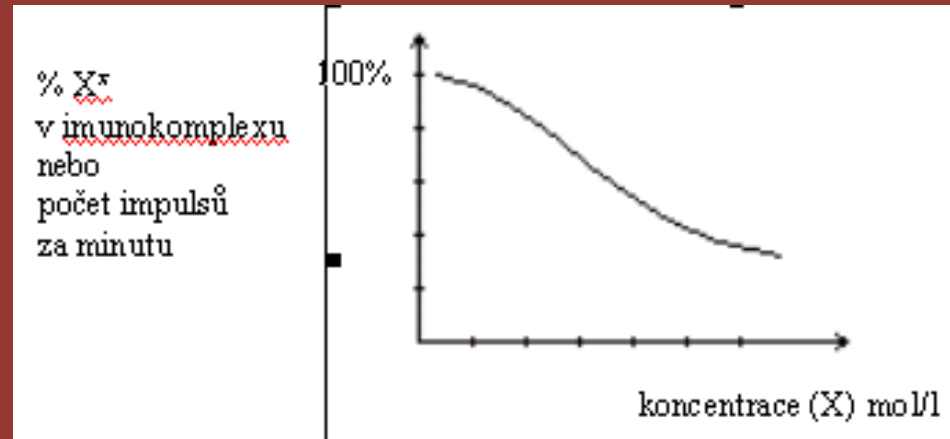


- **izolace IK** -imunochemicky – Abs, **fyzikálně** - filtrace, centrifugace...
molekulární metody – elektroforéza, chromatografie ...

☞ **vyhodnocení:**

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

Vyhodnocení:



- 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, 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.: 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 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
 - **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**

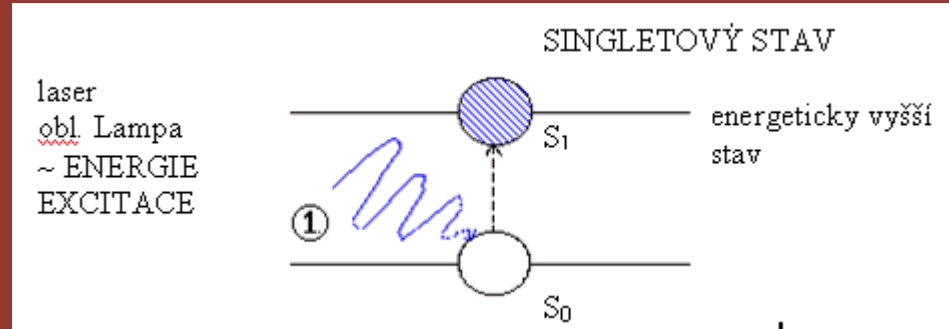
- 2 druhy:

- ★ **HOMOGENNÍ**
- ★ **HETEROG**

- ★ **HOMOGENNÍ**:- *vlastnosti*:
- **Intenzita** fluorescence se při vzniku konjugátu **mění**
- Stanovení **nízkomolekulárních látek** /hapten/ -
antibiotika, sedativa, hypnotika ...
- **Nemusíme oddělovat IK** od volných reaktantů
- ★ **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 **sráží se**
- **navázání na pevný nosič**
- -

• FLUORESCENCE

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



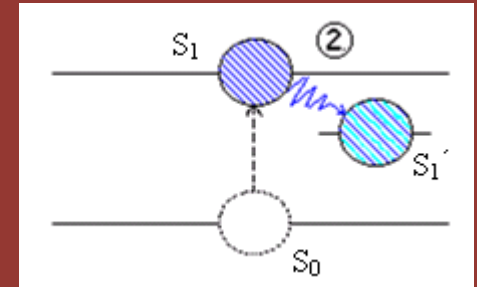
2. FÁZE → DOBA EXCITOVANÉHO STAVU

- trvá 10^{-9} s velmi krátká

konformační změna

disipace energie část energie se ztrácí

– přechází na nižší stav

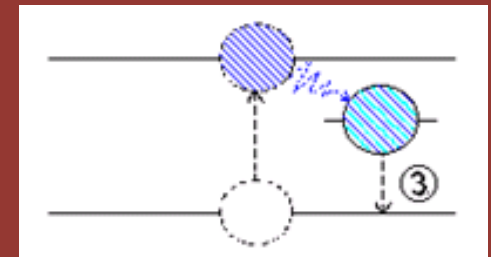


3. FÁZE → EMISE

- vyzáření energie, přechází na základní

stav vyzáření **EMISNÍ ENERGIE**

energie emisního spektra/



energie **EXCITAČNÍ** se **NEROVNÁ** **EMISNÍ !!!**

$$E_{exc} > E_{em}$$

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

$\lambda_{exc} < \lambda_{em}$. délka excitační je menší než emisní

- **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 o 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* ■■■■ možní jejich zviditelnění a další analýzu ■■■■ vyšší fluorescence = více fluoroforu = více látky v BB)
- - **background fluorescence** ■■■■ fluorescence pozadí – je nežádoucí, musí se odfiltrovat
- - 2 složky : ■■■■ **AUTOFLUORESCENCE** samotného vzorku /flavony, flavoprot., NADH.../
- ■■■■ **REAGENČNÍ POZADÍ** / fluorofor se naváže tam, kam
- nemá, či se nenaváže tam, kam má /
- **Pozitivní reakce:** se jeví ve fluoresc. Mikroskopu vyzařováním světla určité barvy typické pro použitý fluorochrom
- **Vlastnosti sondy:**
- navázané barvivo musí být lehce odstranitelné
- musí mít vysokou intenzitu fluorescence,
- fluorescenční signál musí být dobře odlišitelný od pozadí,
- vazba sondy na Ab či Ag nesmí měnit jejich imunologické vlastnosti.

- heterogení 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

- **Příklad 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
- \parallel Ag + AbF \rightarrow \parallel měření fluorescence
- **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
- \parallel AgF, HF + Ab \rightarrow \parallel měření fluorescence

- **Nepřímá – průkaz Ab ve vyšetřovacím séru**
- Tkáň se známým Ag nebo buněčná kultura (suspenze jader. buněk) fixovanou 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
- $\| \text{Ag} + \text{Ab} + \text{AbSF} \rightarrow \|$ měření fluorescence
- **Použití:** průkaz proti Ag buněčných jader

FIA

přístroje :

- SPEKTROFLUOROMETR

- měří fluorescenci vztaženou na celý preparát

- FLUORESCENČNÍ MIKROSKOP

- FLOWCYTOMETR

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** propouštějícího krátkovlnné záření a **2. sekundárního okulárového** zadržujícího emitované primárním filtrem pouze viditelné záření objektu.

- **Využití:** průkaz a titrace Ab (proti patog. Ag – Bordetella, Borrelia, Legionella, Treponema, EBV, 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, stanovení CRP, RF, ASLO
- **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)