

# Imunitní systém ve zdraví a nemoci

Hrazeno z projektu MUNI 3.2.1, realizovaném v rámci Národního programu obnovy pro oblast vysokých škol pro roky 2022-2024, reg. číslo NPO\_MUNI\_MSMT-16606/2022.



Financováno  
Evropskou unií  
NextGenerationEU



Národní  
plán  
obnovy

MSMT  
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

# Imunologické metody

doc. RNDr. Alena Žáková, Ph.D.



# Obsah

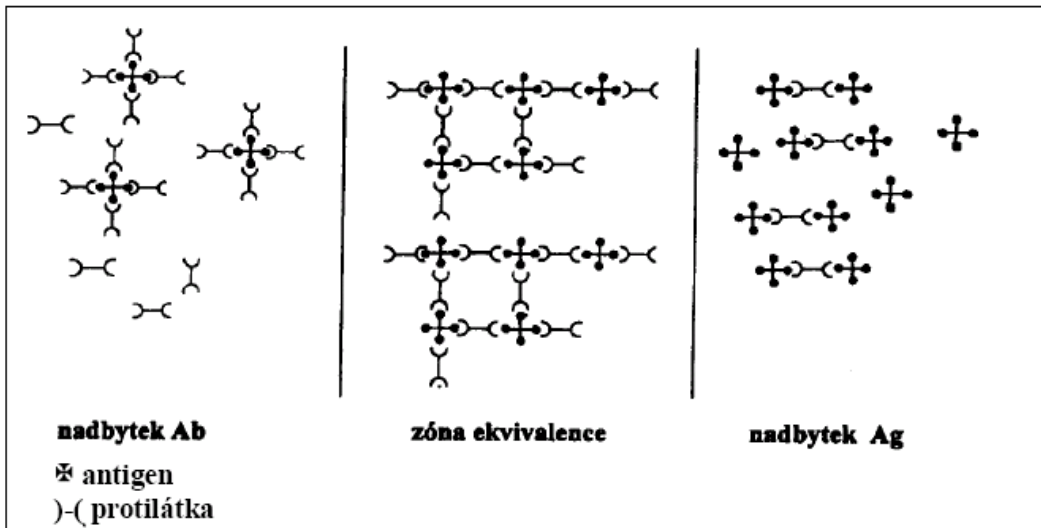
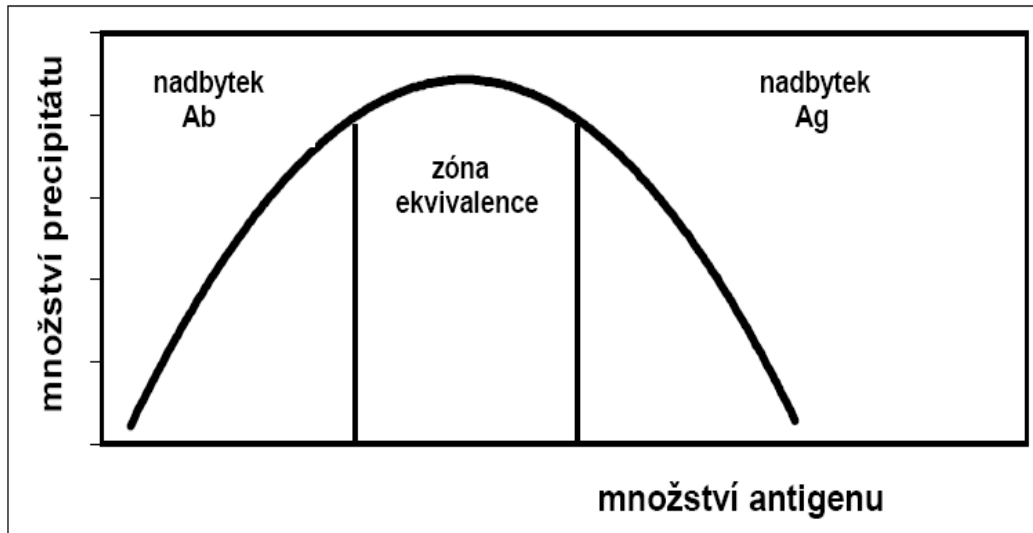
Serologické – precipitační, imunodifuze, aglutinace, hemaglutinace, HIT, KFR, imunoelektroforéza, imunofixace

Metody vyšetření KS, fagocytózy, separace buněk, počítání leukocytů, krevní diferenciál

Metody stanovení protilátek

# Serologické metody - precipitace

Imunoprecipitační křivka (Ag – antigen, Ab – protilátka)



## Oblast nadbytku protilátky

Vzrůstá mn. precipitátu s s  
přídavkem Ag, nestabilní IK

*Nekompetitivní metody*

- zákalové nefelometrie  
turbidimetrie
- s markerem EIA

## Oblast ekvivalence

Mn. precipitátu nejvyšší, nejvyšší  
stabilita IK

*Precipitační metody, okometricky*

## Oblast nadbytku antigenu

Tvoří se malé komplexy IK, které  
neprecipitují, nestabilní

*Kompetitivní metody*

- heterogenní RIA, ELISA...

## PRECIPITAČNÍ metody:

- Ag + Ab → Ag-Ab
- precipitinogen precipitin precipitát sraženina
- solubilní /rozpustný/

**praxe** – 1. zjištění a stanovení výskytu Ab v séru při inf. onemocnění 2. identifikace patogena

Koncentrace Ab se vyjadřuje jako **TITR SÉRA**.

=> *nejmenší zředění Ab, které ještě reaguje s Ag*

- hodnocení :

**kvalitativně** – odečtení okem, pokud dostatečné mn. precipitátu (více než 0,1g/l), při nižším mn. - fyzikálně

• **kvantitativně** :

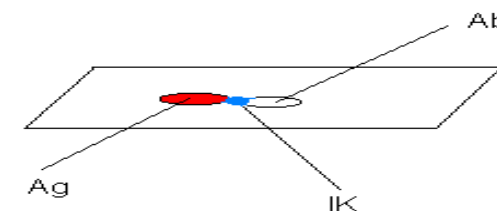
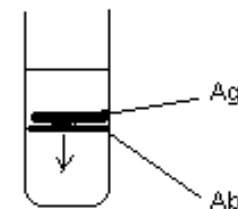
a, zjištěním **množství precipitátu**

b, zjištěním **množství Ag** v precipitátu či supernatantu

c, fyzikálně - změna **optických vlastností** vzorku – 2 fyzik.metody :

**NEFELOMETRIE** –\* **TURBIDIMETRIE**

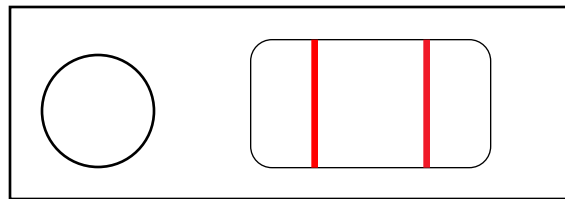
Nově - Ab, Ag značené - RIA,FIA,EIA



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

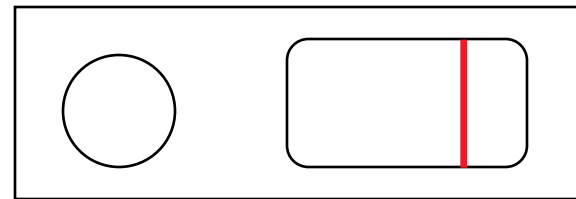
# př. *Precipitační imunochemické metody*

*Screeningové metody* – jednoduché precipitační chromatografické testy - terénní kazetové testy pracující na bázi chromatografie a v oblasti ekvivalence



S T C

Negativní výsledek (Ag v testu, ne v moči)

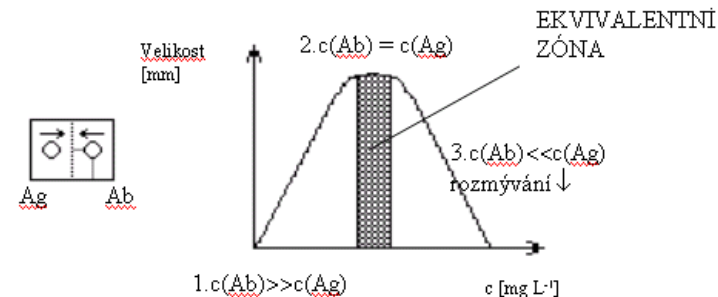


S T C

Pozitivní výsledek (Ag v testu i v moči)

Za nepřítomnosti nebo nedostatku drogy ve vzorku moče vytvoří protilátka imunokomplex (precipitát) se značenou drogou vázanou v místě testu T. (S – vzorek, C – kontrola)

# 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**

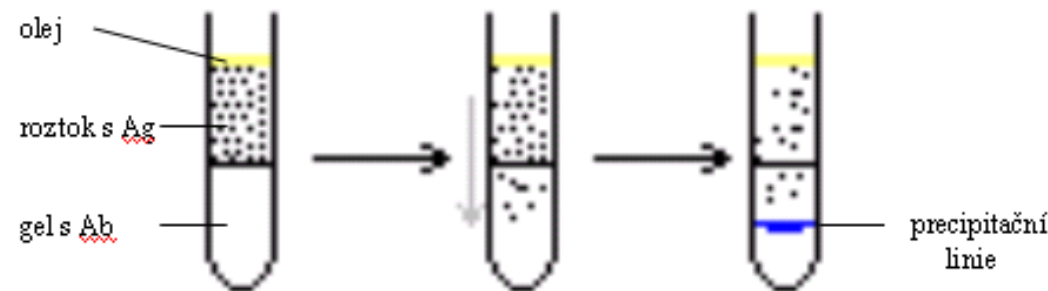
-**používá se v konc. 0,5-2%**

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)

- 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** → **obloučky** → **prstence** → **kruhy** /záleží na použitém materiálu/
- vzniklé precipitáty **detekujeme**:
  - \* *okem* - zákal
  - \* *barvením* – Coomassie blue, amidočern
  - \* *sekundárními protilátkami*
  - \* *Au, Ag, radioizotopy (FIA)*
- vznik precipitátů je **děj postupný!!!**

### **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 MANCINIŮVÉ

- 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

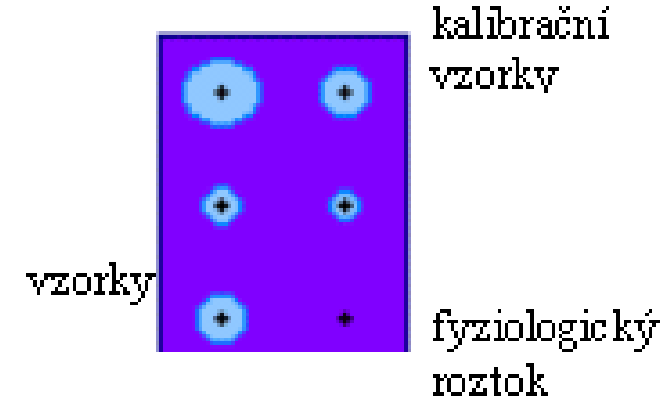
→ čím je vzorek koncentrovanější – větší průměr prstence

→ **změření druhé mocniny průměrů prstenců** – vynesení kalibrační křivky a odečet koncentrace neznámého vzorku-  
využití:

- ke **kvantitativnímu stanovení Ag**

- **klinická praxe: dříve stanovení**

**koncentrace IgG, IgA, IgM, IgD, podtříd IgG, složek komplementu a proteinů akutní fáze, nyní jen IgD, protože má nízkou aviditu (pro nefelometrii se nehodí)**



### jamky - vzorky:

-gel s Ab

- \* **fyziologický roztok –blank**

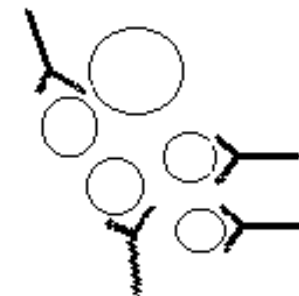
- \* **vzorky o neznámé**

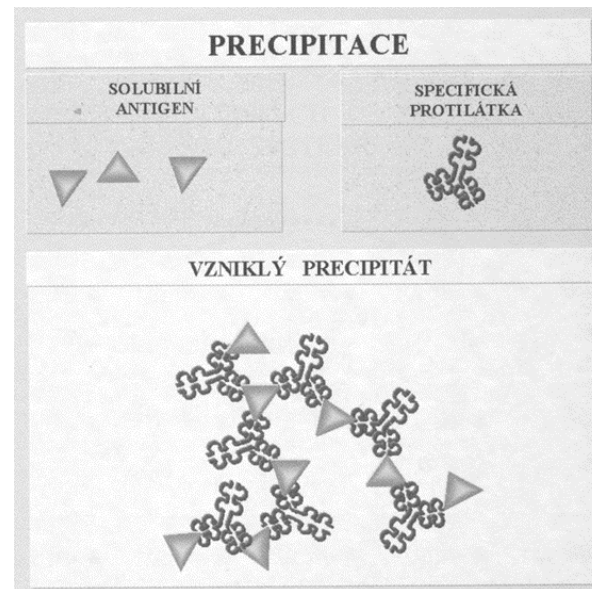
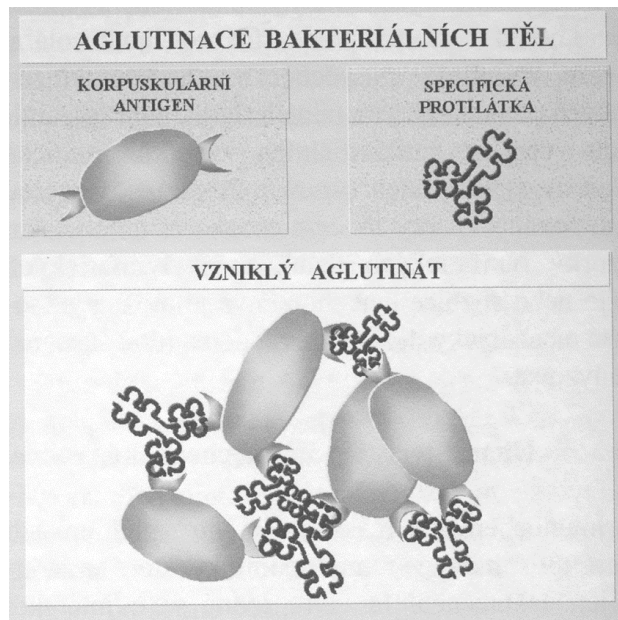
**koncentraci**

- \* **vzorky o známé koncentraci (kalibrační)**

# Aglutinační metody

- Ag + Ab → Ag-Ab
- *aglutinogen* + *aglutinin* → *aglutinát*
- *princip* : **KORPUSKULÁRNÍ** / částicový / Ag
- 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
- **Nejúčinnější AgM-multivalence, IgG nejčastější**
- **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, IgE)
  2. – inkompletní Ab viz hemaglutinace

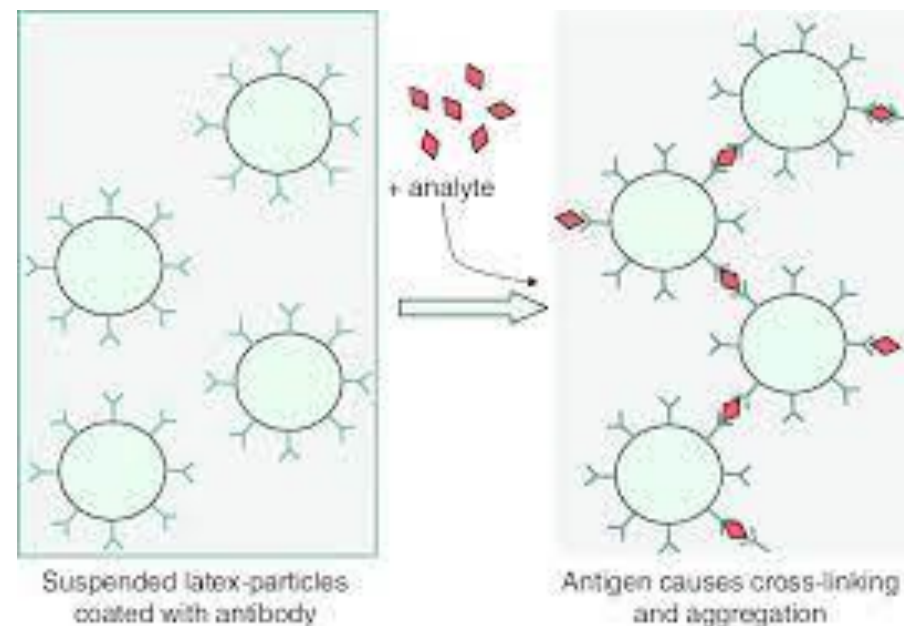




## Rozdíl mezi aglutinací a precipitací

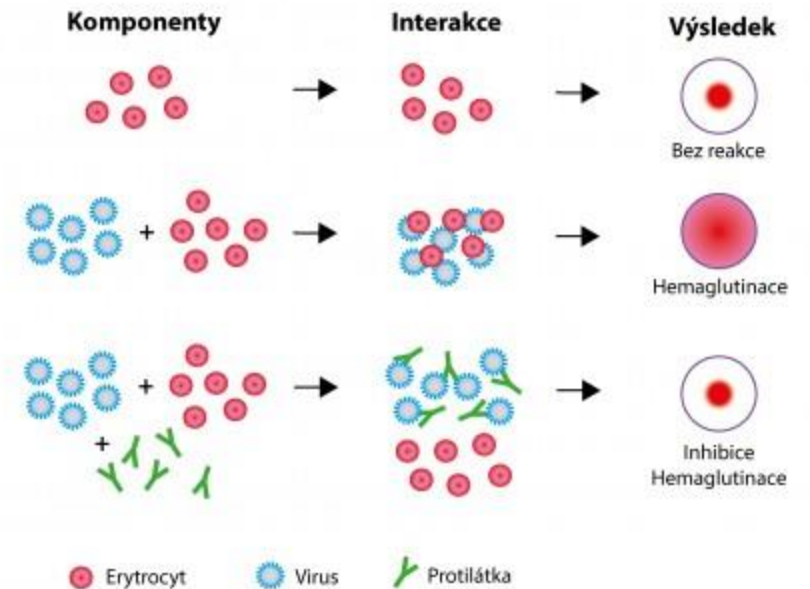
### Latexová aglutinace, latex-fixační test

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



# 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, paratyfu, Weil-Felixova – skvrnitého tyfu, Ab proti *Francisella tularensis*
  3. K Průkazu Treponema p., EBV – mononukleóza
  4. Nepřímá - k průkazu auto Ab proti štítné žláze, Ab proti autoAg –



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

1. - *hodnocení*: **kvalitativně** - odečtení okem
  - **kvantitativně** : a, zjištěním **množství aglutinátu**
  - b, zjištěním **množství Ag** v aglutinátu
  - **Nevýhoda**: nízká citlivost okolo 0,2-2mg Ab
  - Titr séra: nejvyšší zředění, které ještě vyvolá vznik aglutinátu
- *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, paratyfu, brucelám, listeriím **Weil-Felixova** – skvrnitého tyfu, Ab proti *Francisella tularensis*
  - 3.Nepřímá k průkazu auto Ab proti štítné žláze, Ab proti jiným autoAg , RF

**Latexová aglutinace**, latex-fixační test

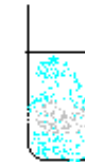
- **rychlé kvalitativní stanovení**
- **Ag nebo Ab imobilizován na latexových kuličkách**
- **Stanovení Ab proti IgG – revmatoidní faktor**



# Hemaglutinace

- Ag + Ab → Ag-Ab
- hemaglutinogen hemaglutin hemaglutinát
- - savčí krvinky (i části)
- - dochází ke **shlukování krvinek**, vlivem komplementu či virové částice pak dochází k **LYZI**.
- Nevýhoda:** ery mohou lyzovat (nízká životnost) nebo se při skladování shlukovat
- **využití:** K zjišťování krevních skupin a průkaz Ab proti krevním elementům, průkaz lues, **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, vymytí, přidání Coomsova séra, které způsobí aglutinaci
- při 2 reakcích:
  - \* **HIT** – *hemaglutinačně inhibiční test*
  - \* **KFR** – *komplement fixační reakce*

- 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 (**Ab + Ag - Ery aglutinace č.krvinek**), tj stav, kdy odpovídá protilátka Ag a tedy se po přidání obalených ERY Antigenem se Ag vyváže protilátkou a vznikne **HEMAGLUTINÁT**  
Ab + Ag - Ery → **hemaglutinát, proběhne hemaglutinace**



- **neodpovídá-li** protilátka virovému Ag, nedojde k hemaglutinaci v situaci, kdy přidáme stejný Ag do reakce
- Ab + Ag - Ery → **hemaglutinát** + stejný Ag → Ag + Ab, Ag - Ery → **inhibice hemaglutinace**
- Metodou inhibice pasivní hemaglutinace lze dokázat velmi malé mn. rozpustného Ag nebo H (metoda je velmi citlivá) pro vyhodnocení můžeme použít i optické metody

# Komplementové metody

metody využívající faktu aktivace komplementového systému komplexem – antigen-protilátka,

## Komplement fixační reakce

**Složky reakce:** Ab, Ag, C, ERY, hemolyzin

- 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 ~ **EMBOCEPTORu /hemolyzinu/**, získaného imunizací králičího séra beraními erytrocyty

→ aby došlo k hemolýze je nutná **spoluúčast**

**KOMPLEMENTU** a inkubace 30 minut při 30 °C



# KFR

průběh reakce:

\* **POZITIVNÍ** ~ ve 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**

→ **k hemolýze NEDOJDE:**

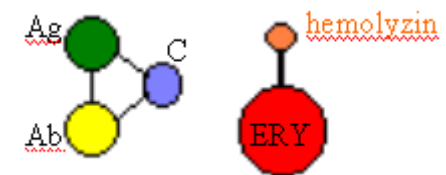
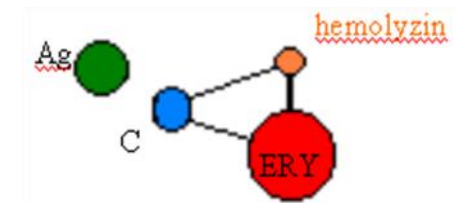
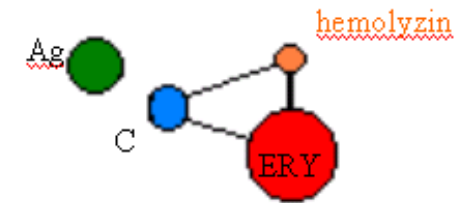
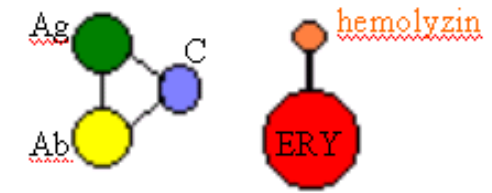
\* **NEGATIVNÍ** ~ ve vyšetřovaném séru **není Ab**  
- v 1. fázi reakce se **nevytvoří IK** – **komplement se nevyváže** a zbývá do 2. fáze reakce, kdy **aktivuje hemolysin**

→ **DOJDE k hemolýze:**

- velmi **záleží na množství komplementu** – **každý vzorek se musí titrovat**, aby bylo množství komplementu konstantní

- **použití:**

- **diagnostika** příjice /syfilis/, bruceózy, pasteurely
- **ve virologii** průkaz protilátek téměř všech virových nákaz
- **typizace neznámých Ag** nově izolovaných virů
- **průkaz protiorgánových Ab**



## *Vyšetření komplementového systému*

- a) Stanovují se 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, hemolýza -  
spektrofotometrie

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

## *Vyšetření cirkulujících a deponovaných IK*

Principy metodik

1. Využívající fyz – chem vlastností – CIK- největší makromolekuly  
séra mohou být precipitovány pomocí PEG (polyetylénglykol).

Precipitát je úměrný mn. cirkulujících CIK

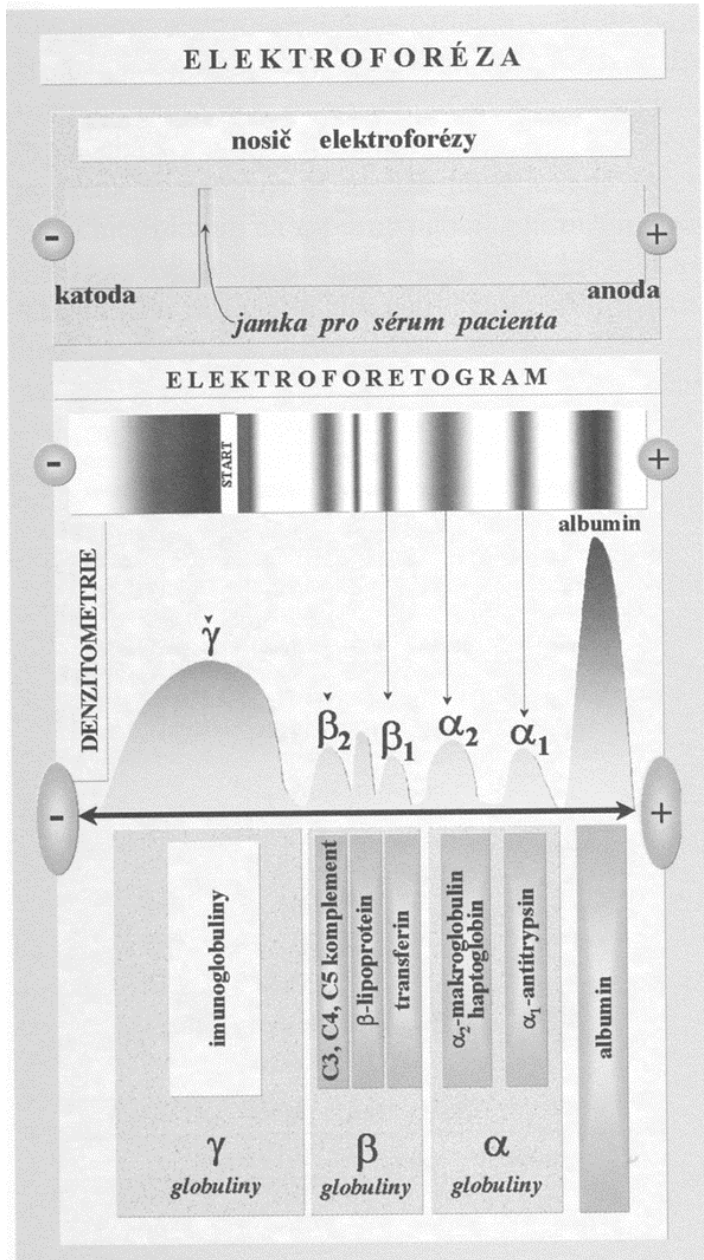
# Vyšetření komplementového systému

- 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
- *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 se prokazuje uložení IgG

# Metody imunoelektroforézy

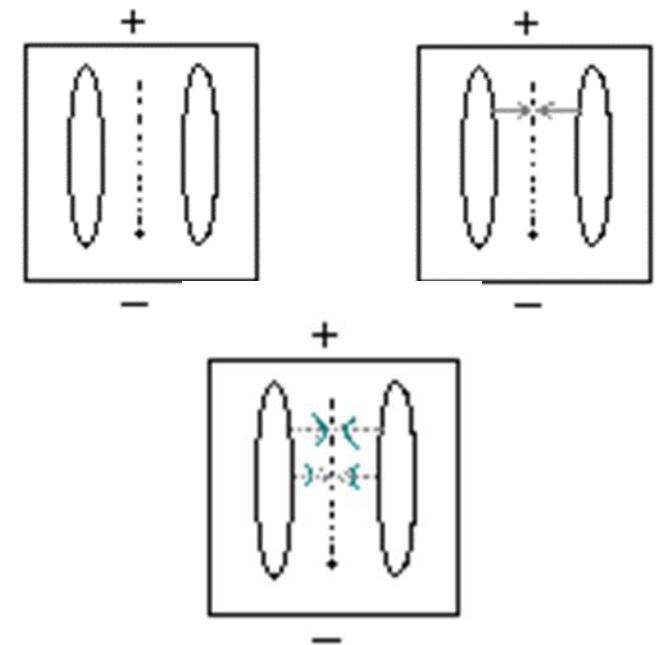
## Elfo sérových proteinů

Při běžné elfo se sérum dělí na zónu **albuminu**,  **$\alpha - 1$** ,  **$\alpha - 2$** ,  **$\beta$** ,  **$\gamma$  globulinů**. Stanovení zastoupení jednotlivých frakcí může mít význam při hodnocení stádia zánětlivého procesu. Při akutních zánětech stoupá zastoupení albumínů a  $\alpha - 1$ , později i  $\alpha - 2$  globulinů, při chronických zánětech dochází ke zvýšení zastoupení  $\gamma$  globulinů a poklesu albuminu



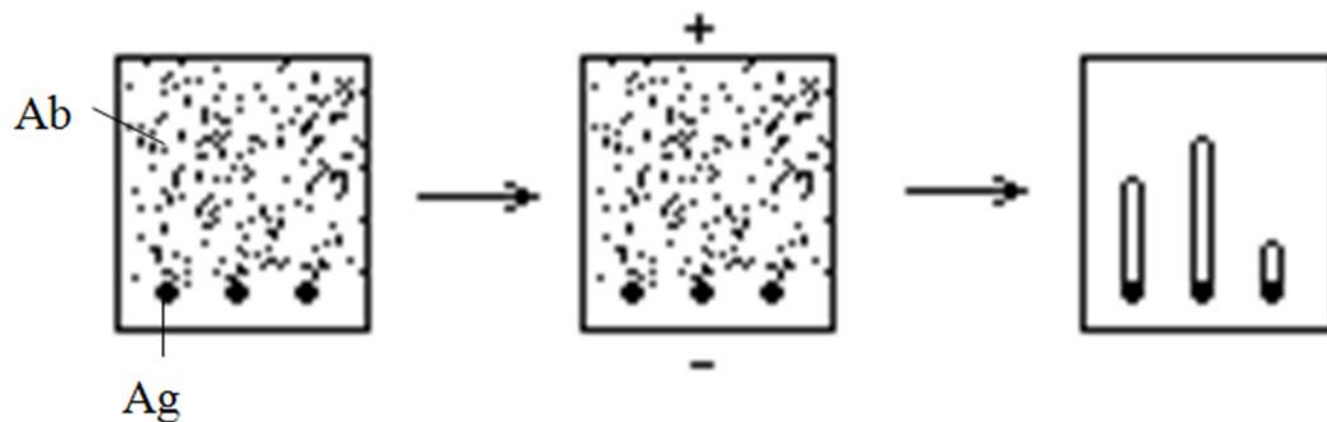
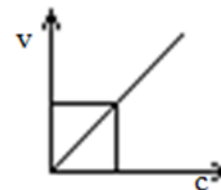
# Imunoelektroforéza podle WILLIAMSE a GRABARA:

- 1953 Williams a Grabar
- 2 stupně: 1. **nalití destičky** ( agarózní gel s pufrem ) 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**
- → v místě ekvivalence se vytváří **PRECIPITAČNÍ obloučky**



# Raketová elfo

- *Laurell 1966*
- kombinace jednoduché radiální imunodifúze s elektroforézou
- - monospecifická Ab + jeden Ag /či směs Ag/



užívá se pro zjišťování koncentrace Ag –  
koncentrace je přímo úměrná výšce „raketky“

Ab v gelu



# Imunofixace

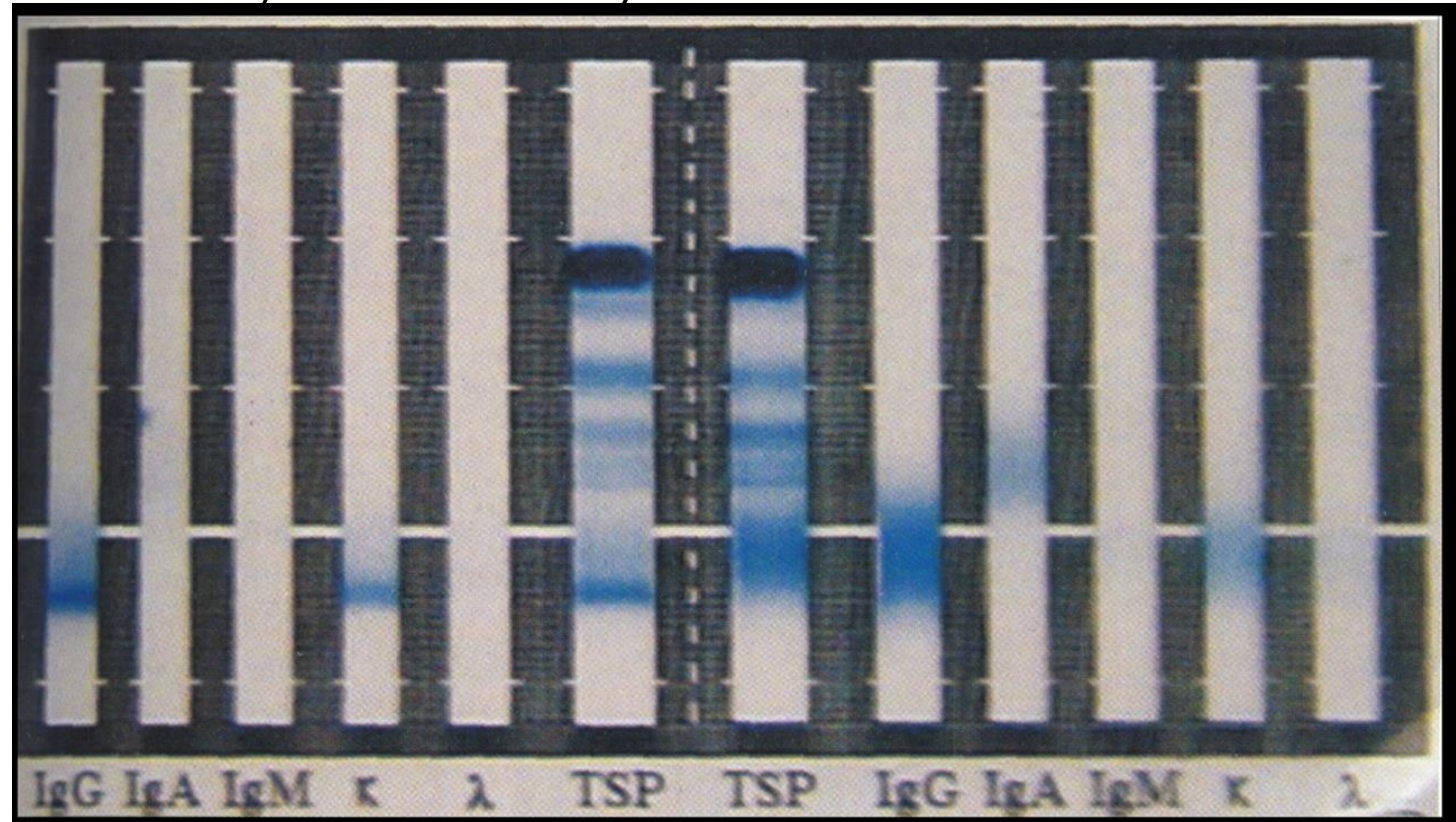
Rozdělení různých proteinů na základě jejich pohyblivosti v el. poli modifikační metodou

- 1. stupeň:** Elfo vyšetřovaného séra
- 2. Stupeň:** na agarózu se položí plastikovaná maska s výřezy, naplní se s antiséry (anti IgG, IgA, IgM, anti kappa, anti lambda), pak porovnání s precip. reakce s normálním sérem, TSP – testovaná séra pacientů

Hodnocení

a) Okometricky

b) denzitometricky



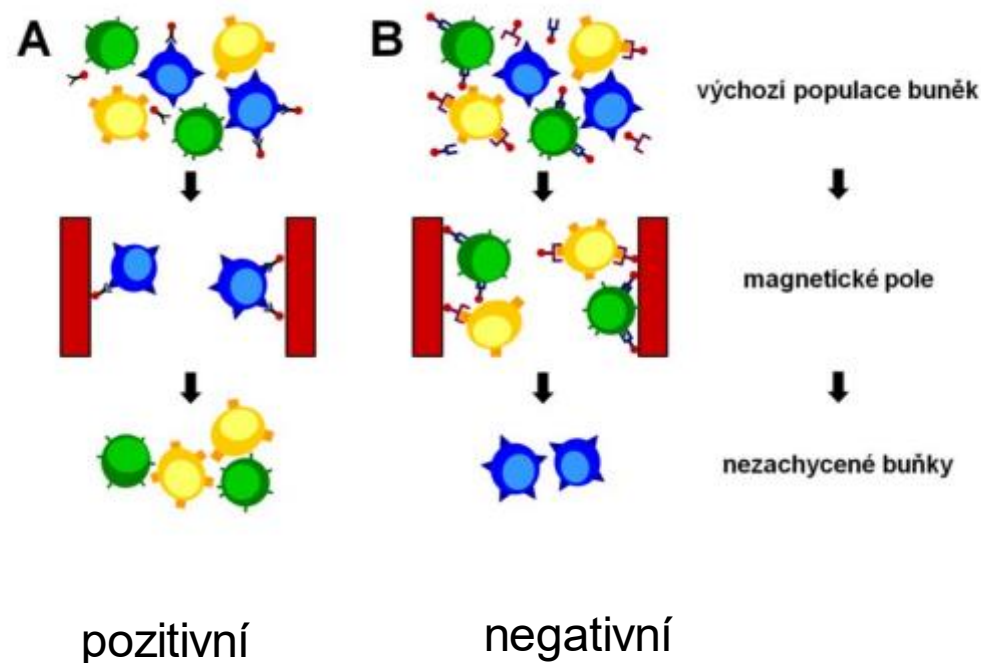
# Metody separace buněk

Používají se tzv. selekční protilátky, které jsou pevně navázány na magnetické částice.

Používá se v pozitivním nebo negativním uspořádání

Pozitivní separace spočívá ve výběru buněk podle přítomnosti určitého znaku (povrchové molekuly)

Negativní spočívá v odstranění všech, které specifický znak nenesou.

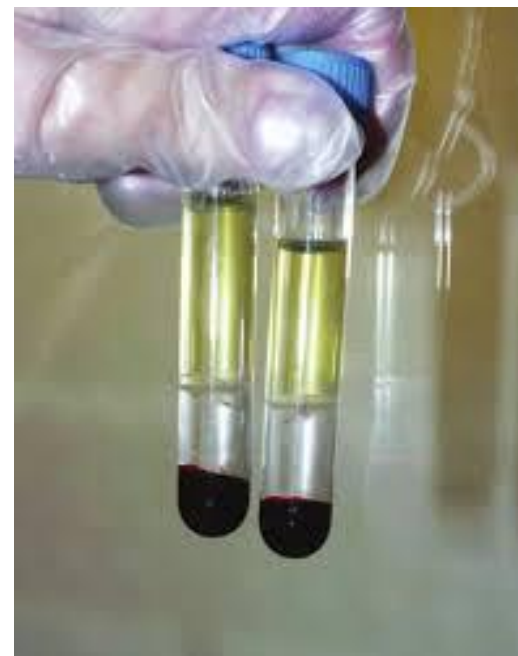
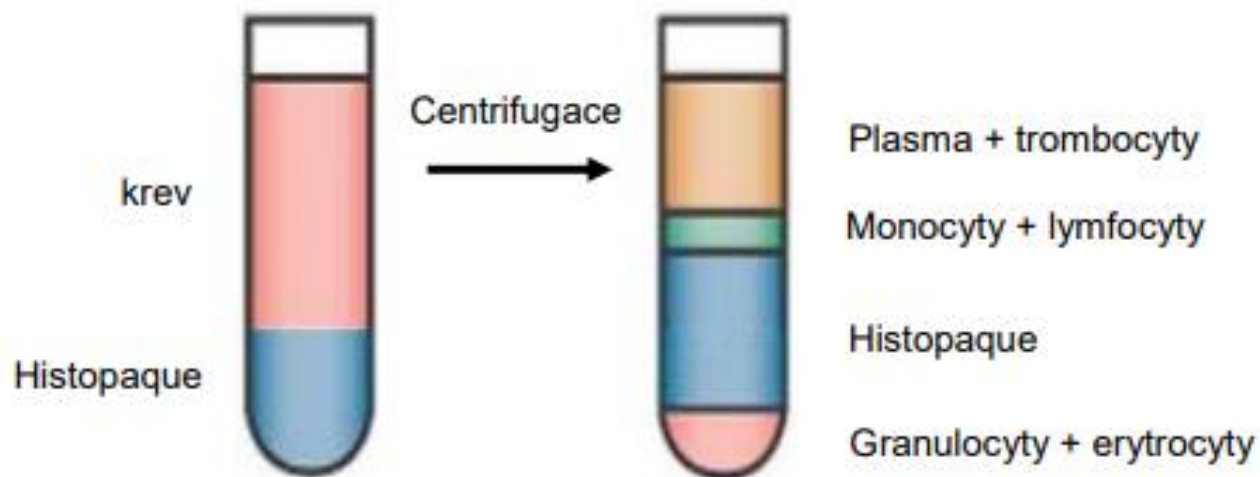




# Gradientová separace

Metoda založená na rozdílné hustotě buněk.

Navrstvení heparinované krve na separační gradient (např. dextran, Ficoll, Histopaque). Po následné centrifugaci dojde k typickému rozdělení buněk



Plasma plus tromb.  
Hledaná vrstva mono  
plus lymfocyty  
histopaque  
ery plus granulocyty

# Zjišťování počtu leukocytů, krevní diferenciál

Pro stanovení koncentrace částic v 1 ml suspenze se používá výpočet:

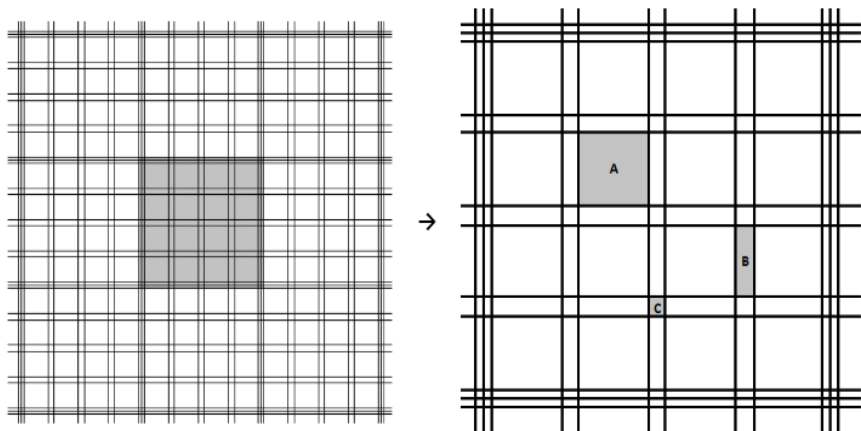
$$X = \frac{a \cdot 1000}{n \cdot V}$$

X... koncentrace buněk v 1 ml suspenze

a... stanovený počet buněk

n... počet opakování (počet spočítaných čtverců)

V... objem počítaného útvaru

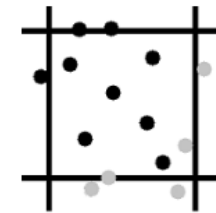


Počítací síť Bürkerovy komůrky

Počet před separací v plné krvi – leukocyty  
Zjištěná hodnota se musí ještě přepočítat pro lymfocyty

	Rozměry	Plocha	Hloubka	Objem
<b>Velký čtverec</b>	1 x 1 mm	1 mm <sup>2</sup>	0,1 mm	0,1 mm <sup>3</sup>
<b>Čtverec A</b>	0,2 x 0,2 mm	0,04 mm <sup>2</sup>	0,1 mm	0,004 mm <sup>3</sup>
<b>Obdélník B</b>	0,05 x 0,2 mm	0,01 mm <sup>2</sup>	0,1 mm	0,001 mm <sup>3</sup>
<b>Čtverec C</b>	0,05 x 0,05 mm	0,0025 mm <sup>2</sup>	0,1 mm	0,00025 mm <sup>3</sup>

## Velikost útvarů v počítací síti



Pravidlo pro počítání částic v počítací komůrce. Do celkového počtu částic se započítávají pouze ty, které leží nebo se dotýkají dvou zvolených stran, v tomto případě horní a levá (označeny černě). Částice dotýkající se pravé a spodní strany nezapočítáváme (označeny šedě).

## Metody fagocytózy

### –**VYUŽITÍ v praxi :**

–**zjištění : \* nedostatečnosti** či **poruch** jednotlivých fází fagocytózy

–**\* aktivity fagocytů** u pacientů s opakovanými infekcemi, opakovanou léčbou antibiotiky, nádorovým onemocněním, artritidou či revmatoidními onemocněními, při zátěžových situacích

## Testy na metabolickou aktivitu LEU, NBT test



*hodnocení:* - pod

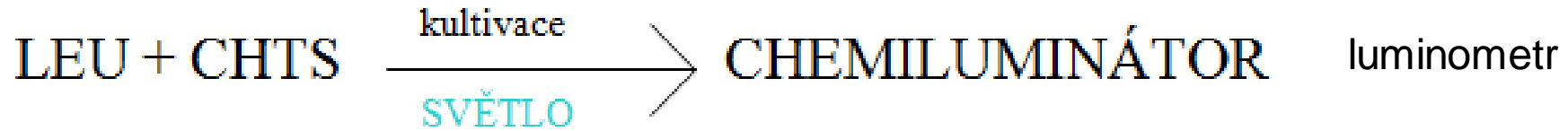
NBT nitroblue

tetrazolium chlorid

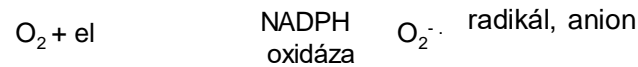
*-Touto metodou se prokazuje hlavně schopnost fagocytů tvořit kyslíkové radikály aktivací NADPH oxidázy*

# CHEMILUMINISCENČNÍ test

pro kvantitativní hodnocení oxidativního vzplanutí



plus  
luminol



Dalšími reakcemi vznik kyslíkových radikálů

## CHEMOTAKTICKÝ STIMUL

**vnitřní** – produkty vlastních BB – komplement, imunokomplex, IL, prostaglandiny

**vnější** – produkty ze stěn mikrobu – lipopolysacharid, GLP, manan

**Vznikají elektronově excitované stavy, které emitují fotony. Emitované fotony zachycovány tzv. luminoforem** (luminol, izoluminol nebo lucigenin), spontánní a aktivovaná CL (pomocí zymozanu), luminometr

# Metody stanovení protilátek

## metody souhrnně

- Stanovení protilátek - základní imunologická vyšetření.
- stanovení kvantitativní, kvalitativní a stanovení specifických protilátek
- Metody: Imunodifúze - radiální ID

Aglutinace

RIA? FIA, EIA – ELISA

Western blot

Nefelometrie, turbidimetrie

Fyziologické hodnoty množství protilátek v séru u člověka:

IgG 8 – 18 g/l; IgA 0,9 – 3,5 g/l; IgM 0,9 – 2,5 g/l; IgD 0,1 g/l; IgE 0,0003 g/l

# Stanovení protilátek

- SÉROLOGICKÉ METODY - všechna stanovení protilátek v krevním séru, viz prezentace
- Příklady sérologických reakcí a způsobů vizualizace
- Aglutinace vizuálně hodnotitelný aglutinát
- Precipitace vizuálně hodnotitelný precipitát nefelometrické, resp, turbidimetrické hodnocení
- Komplement fixační reakce hemolýza erytrocytů
- Imunoelektroforéza precipitát antigenů nebo protilátek rozdělený v elektrickém poli



## TŘÍDY, PODTŘÍDY IMUNOGLOBULINŮ

IgM    IgG<sub>1</sub>    IgG<sub>2</sub>    IgG<sub>3</sub>    IgG<sub>4</sub>    IgA<sub>1</sub>    IgA<sub>2</sub>    IgD    IgE

### fyzikálně-chemické vlastnosti

těžký řetězec	$\mu$	$\gamma_1$	$\gamma_2$	$\gamma_3$	$\gamma_4$	$\alpha_1$	$\alpha_2$	$\delta$	$\epsilon$
mol. hmotnost	970	150	150	170	150	160	160	180	190
sérová hladina (g/l) dospělé osoby	1,5 -3	3 -9	1,5 -6	0,2 -1	0,01 -1,0	0,5 -3,8	0,05 -0,85	0,01 -0,2	< 200 IU/ml
poločas rozpadu (dny)	10	21	20	7	21	6	6	3	2

### distribuce v tkáních

difúze do tkání	-	+++	+++	+++	+++	++ monomer	-	-	+
prostup přes epitel	+	-	-	-	-	-	+++	-	-
prostup přes placentu	-	+++	+	++	+-	-	-	-	-

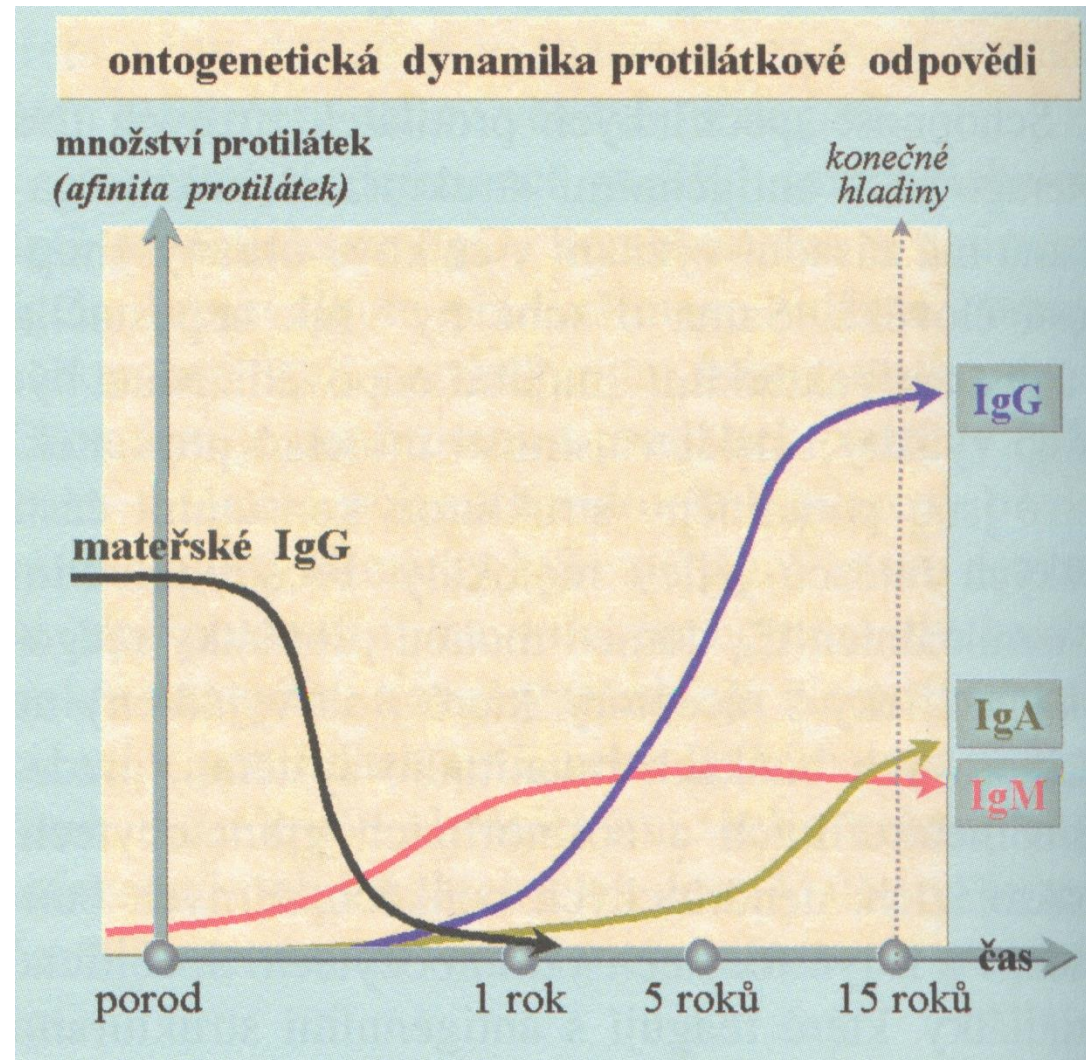
### funkční aktivita

neutralizace	+	++	++	++	++	++	++	-	-
opsonizace	-	+++	-	++	+	+	-	-	-
vazba na receptory fagocytů	-	+	-	+	+-	+	+	-	+
vazba na receptory mastocytů	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
klasická cesta aktivace kompl.	+++	++	+	+++	-	-	-	-	-
alternativní cesta aktivace kompl.	-	-	-	-	-	+	-	-	-

Charakteristika  
vlastností tříd a  
podtříd Ig



**Obr. Ig v ontogenezi:** přes placentu pasivně IgG do proroedu, v pozdních fázích těhotenství tvorba vlastních IgM, IgA pasivně v kolostru a mléku, ostatní či zvýšené hladiny značí intrauterinní infekce





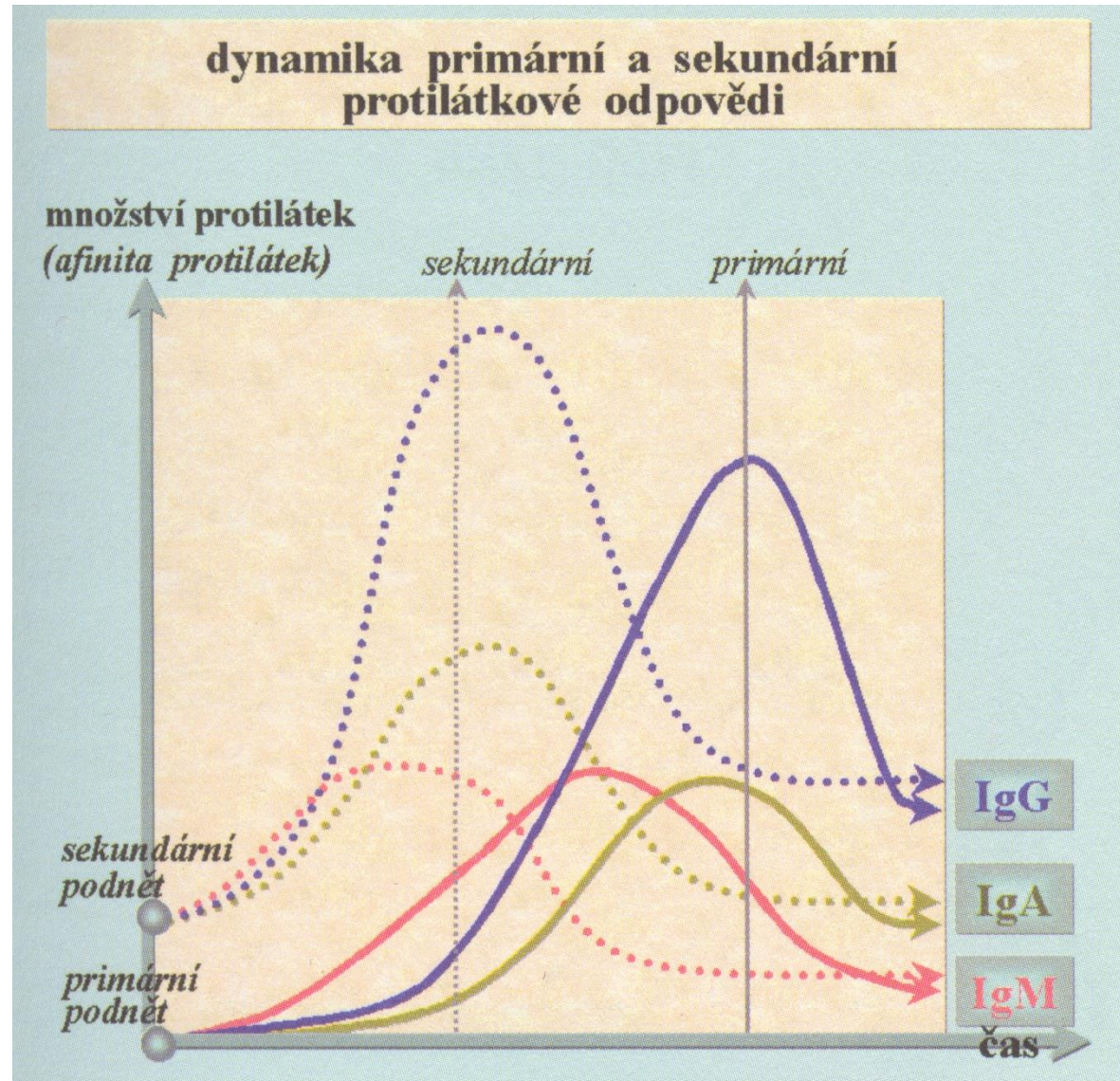
# Dynamika primární a sekundární protilátkové odpovědi

## Obr. Primární odpověď'

1. Tvorba Ab ve třídě IgM, potom další třídy a podtřídy (IgG, IgA..)
2. Postupné zvyšování afinity Ab podle procesu somatické mutace

## Sekundární odpověď'

1. rychlejší a intenzivnější tvorba tříd IgG, IgA, nižší tvorba IgM
2. Vyšší afinita a množství Ab expanzí paměťových buněk, které již prodělaly proces somatické mutace



## Důležité pojmy z oblasti sérologie jsou:

- sérokonverze – zvýšení hladiny specifických protilátek, tento pojem zahrnuje dynamiku tvorby protilátek
- séropozitivita,
- séronegativita – přítomnost, resp. nepřítomnost specifických protilátek v séru
- sérorezistence – stav, kdy při léčbě zůstává séropozitivita bez klinických příznaků
- sérorecidiva – znovuobjevení positivity séra po přechodném vymizení specifických protilátek •
- sérotyp (sérovar) skupina původců onemocnění (obvykle podmnožinu bakteriálního druhu), která se od jiných zástupců téhož bakteriálního druhu dá odlišit právě na základě sérologické reakce. Vykazuje tedy určitou antigenní specifitu v rámci druhu.

## *Další spec. stanovení*

- Stanovení IgE
- Stanovení monoklonální (patologické) komponenty: při podezření na monoklonální gamapatie se stanovuje množství mono-, bi- nebo oligoklonálních protilátek, které jsou produkty jednoho nebo několika málo patologicky zmnožených klonů B lymfocytů (imunofixace).
- Stanovení kryoglobulinů (např. hematologické malignity, revmatoidní artritida, vaskulitidy, chronické zánětlivé stavy, vleklé infekce apod.). Stanovení za přísných teplotních podmínek 37°C (jinak precipitace)

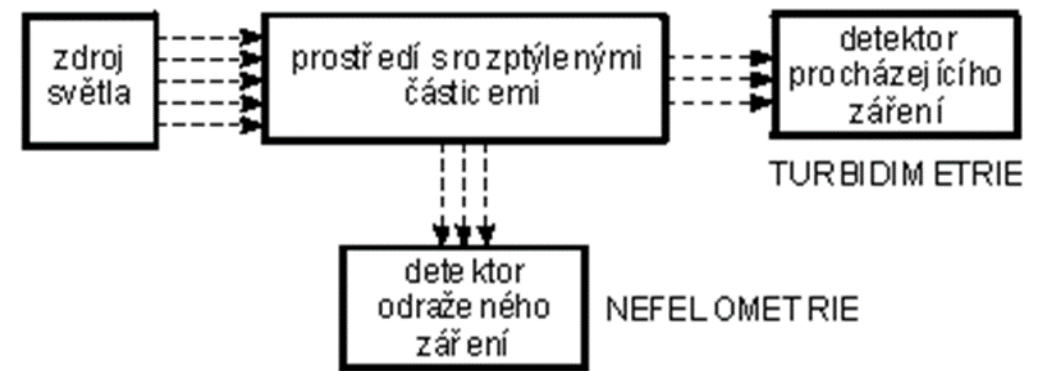
# Zákalové reakce

## 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 monochrom. světla měřeného pod úhlem, měří se intenzita záblesků světla odraženého od IK (Tyndal. efekt), výbojka nebo laser

**TURBIDIMETRIE** – úbytek monochrom. světla o 320nm při průchodu vzorkem v kyvetě měřeného ve stejné rovině  
Výhoda: možnost automatizace, rychlost provedení, přesnost, ale vyšší cena, dioda, méně přesná





# Imunofixace

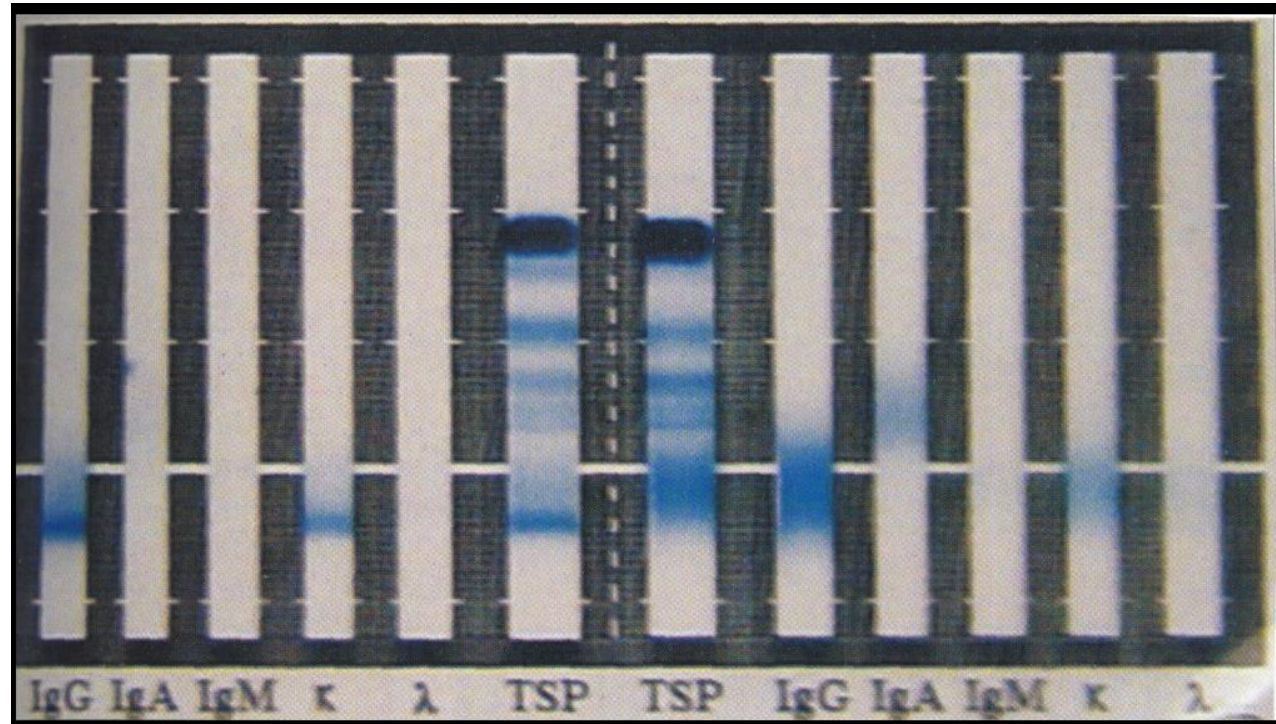
Rozdělení různých proteinů na základě jejich pohyblivosti v el. poli modifikační metodou

1. **stupeň:** Elfo vyšetřovaného séra
2. **Stupeň:** na agarózu se položí plastikovaná maska s výřezy, naplní se s antiséry (antiIgG, IgA, IgM, anti kappa, anti lambda), pak porovnání s precip. reakce s normálním sérem ,TSP – testovaná séra pacientů

## Hodnocení

a) okometricky

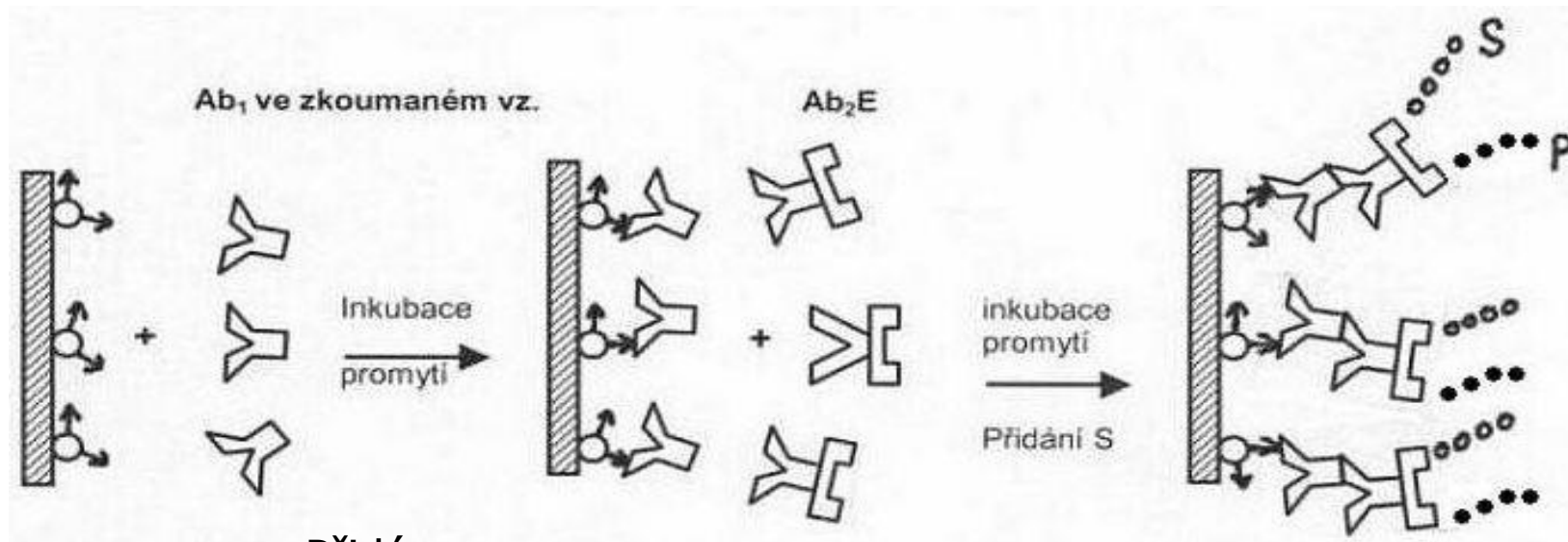
b) denzitometricky



# Metoda ELISA

## Sendvičová ELISA pro protilátky

Neboli nepřímá ELISA na detekci Ab – slouží na důkaz neboli titraci Ab specifických pro určitý Ag. Použití: na titraci Ab třídy IgG + IgM.



Antigen se naváže na tuhou fázi a promyje.

Přidá se zředěné sérum, ve kterém se má určit přítomnost Ab.

Inkubace, promytí – přitom dochází k navázání na imobilizované Ag

Přidá se enzymem značená sekundární Ab, promytí

Přidá se enzymový substrát a změří se intenzita barevné reakce.

## ***Další metody k doplnění:***

Metody tvorby monokl. Ab, FIA, RIA, EIA, používané v alergologii  
apod



# MUNI SCI



Financováno  
Evropskou unií  
NextGenerationEU



Národní  
plán  
obnovy



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY