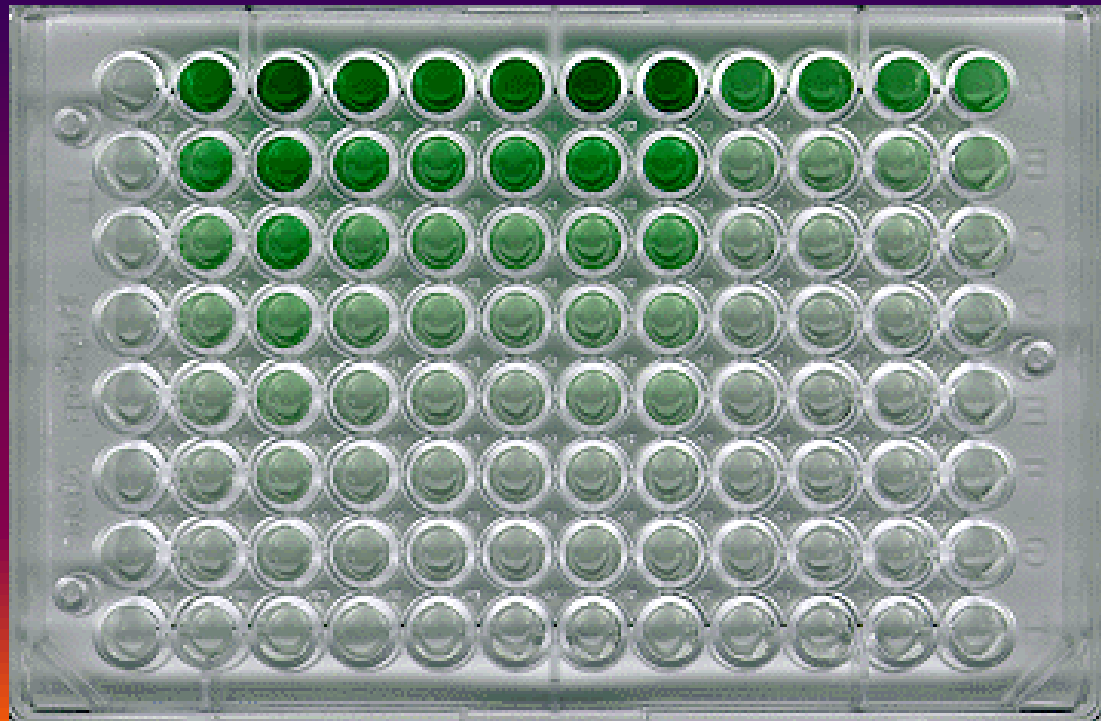


IMUNOESEJE



IMUNOESEJE

- tyto metody využívají vazebné reakce mezi protilátkou a ligandem (antigenem), informace o vazbě je zprostředkována pomocí značek
- množství značené komponenty v imunokomplexu je závislé na koncentracích výchozích neznačených komponent.

IMUNOESEJE



- Přímé

- kvalitativní metodika k průkazu antigenu

- **Ag** – **Ab***

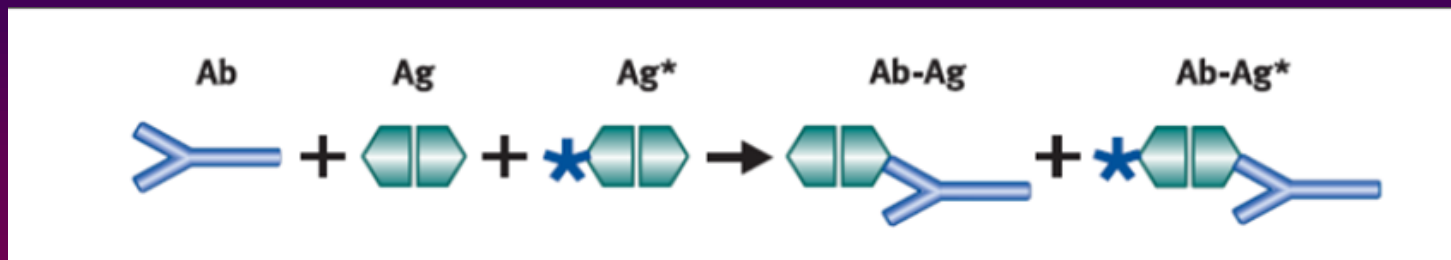
- Nepřímé

- průkaz protilátek v séru

- **Ag** – **Ab** – **Ab***

• Kompetitivní

- limitované množství reaktantu (protilátka), aby mohlo docházet ke kompetici
- značený i neznačený ligand soutěží o vazebná místa protilátky
- neznačený antigen blokuje vazbu značeného antigenu, množství vzniklého produktu je nepřímo úm. konc. neznačeného ligandu v testovaném vzorku
- čím víc se naváže značeného ligandu, tím méně neznačeného



http://imunologie.lf2.cuni.cz/soubory_vyuka/immunoreakce.pdf

• Nekompetitivní (sendvičová)

- protilátka je v nadbytku, všechn analyt je vyvázán
- analyt je vázán mezi dvěma specifickými protilátkami
- množství vzniklého produktu je přímo úm. konc. neznačeného ligandu v testovaném vzorku

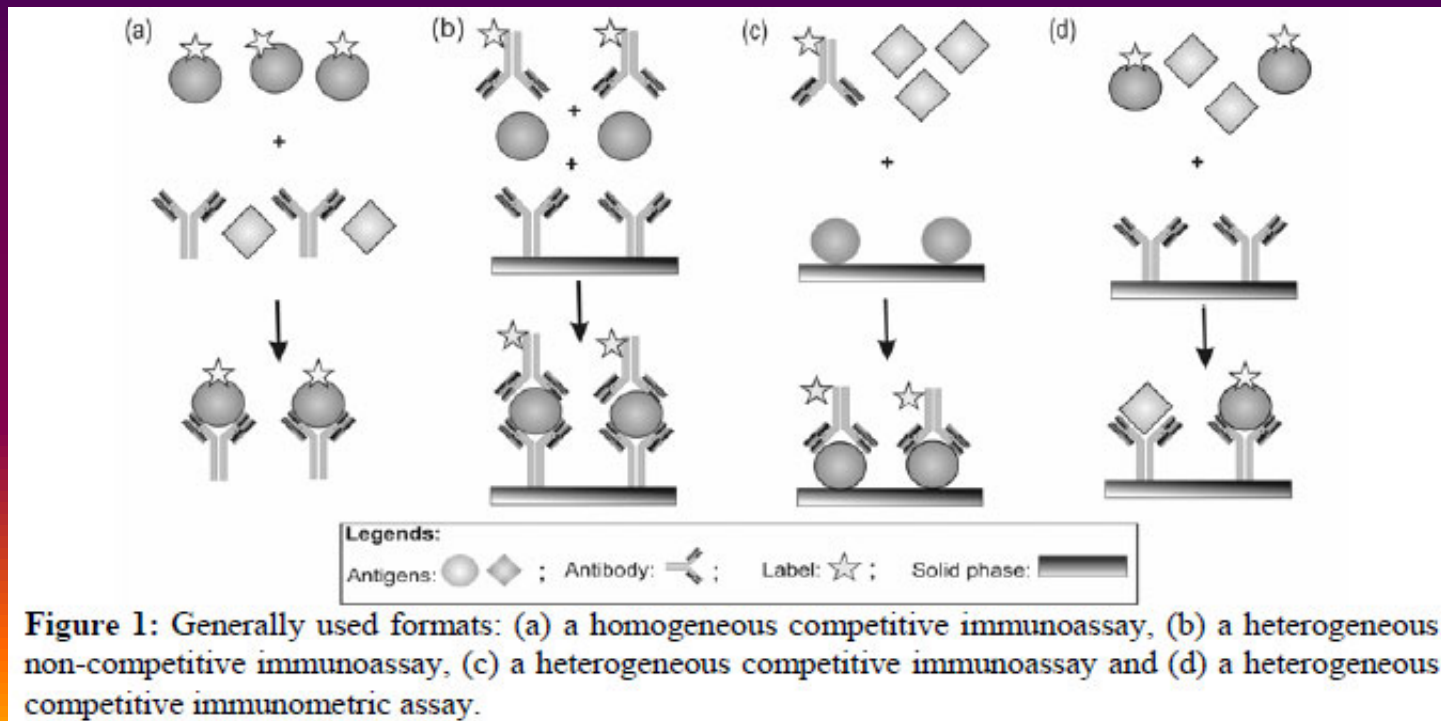
- Homogenní

- není potřeba oddělovat Ab-Ag od volného Ag*

- Heterogenní

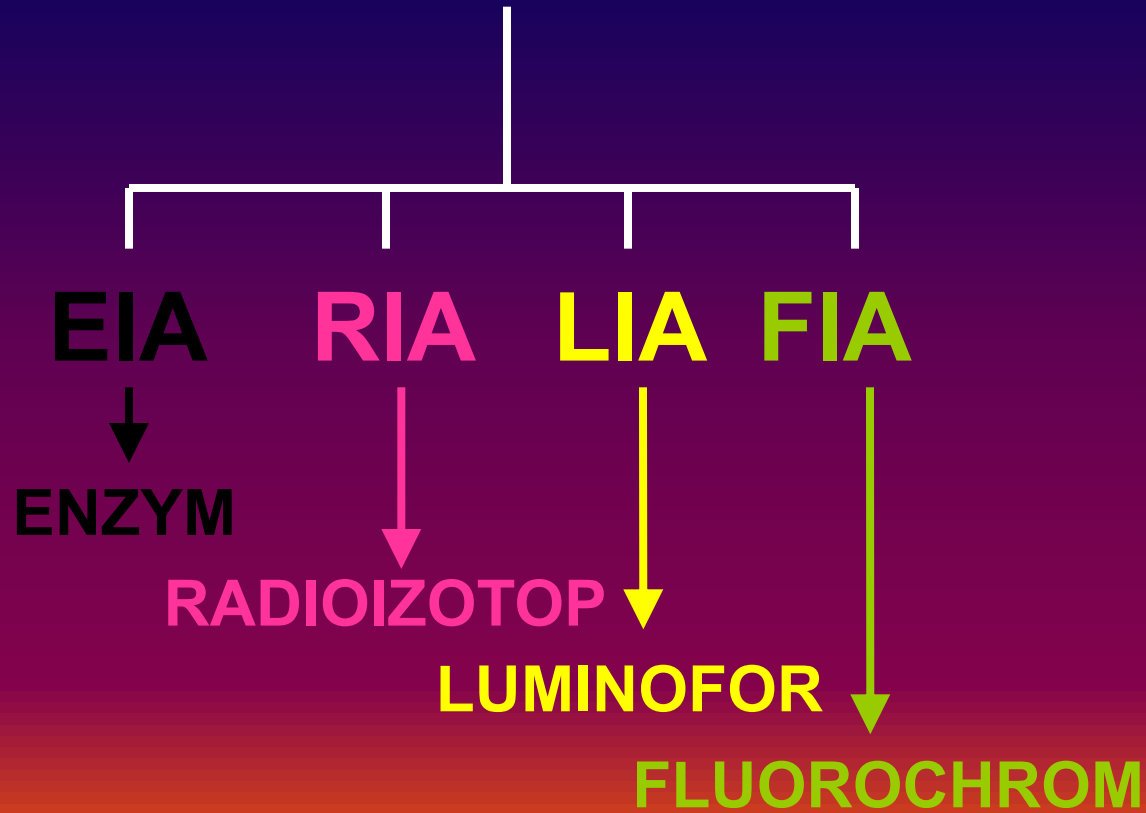
- jedna z komponent je navázána na pevnou fázi

- nutnost separace navázaných složek reakce od volných složek reakce (detekční protilátka, konjugát)



vizualizace sekundární fáze interakce AgxAb navázanou značkou:

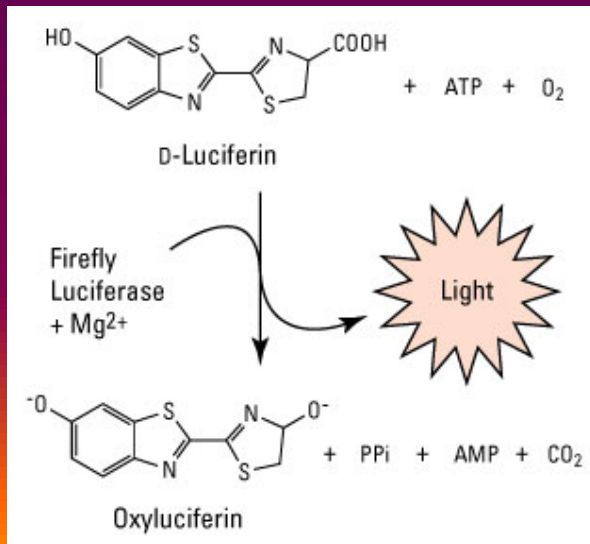
IMUNOESEJE



RIA

- kompetitivní heterogenní metoda
- oddělení nukleární medicíny
- detekce reakce Ag-Ab pomocí radioaktivního izotopu jako značky navázané na jednu ze složek reakce , nejčastěji ^{125}I
- měří se intenzita radioaktivního zářiče – není třeba přidávat substrát
- vyšetřování hladin různých hormonů a jejich metabolitů, vitamínů a jejich metabolitů, specifického IgE, některých autoprotiátok – např. vyšetření Ab proti acetylcholinovému rec. při myastenia gravis

- **FIA** – jako značka se používá molekula fluorochromu, detekce signálu se provádí fluorimetricky
- **LIA** – značka – luminofory (při oxidaci vyzařují světlo), detekce na luminometru



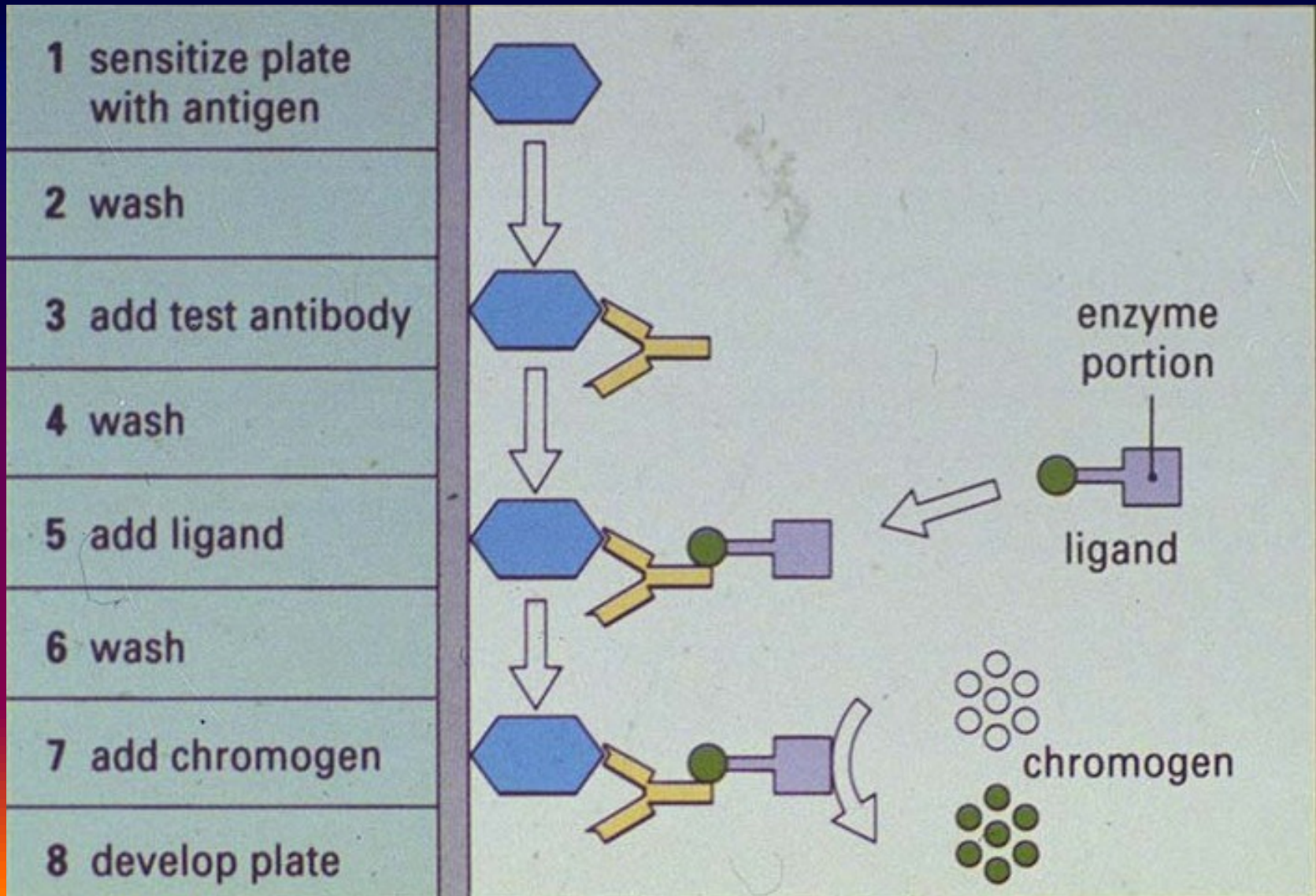
př. **bioluminiscence** - oxidace luciferinu (enzym luciferáza)
 —————> oxyluciferin a světlo

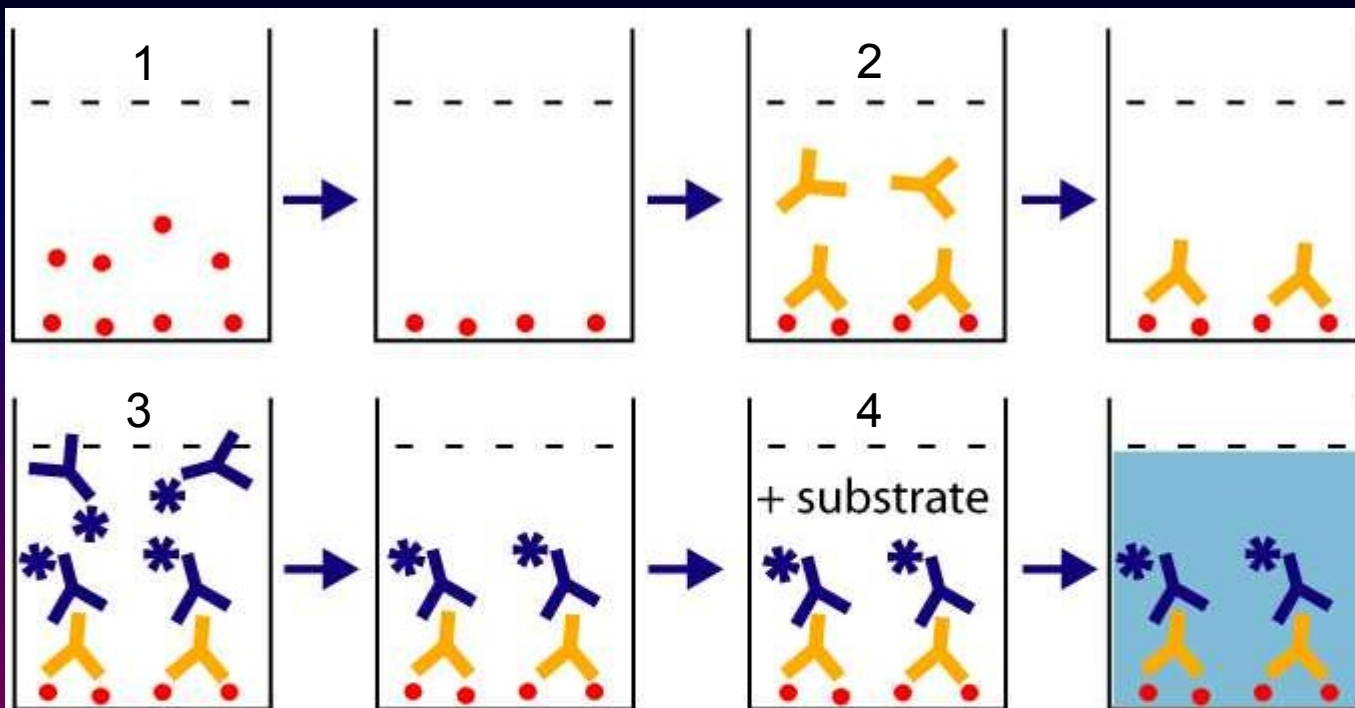
světélkování světlušek

EIA

- kovalentní vazba enzymu na některý z reaktantů
- heterogenní uspořádání – skupina metod **ELISA**
(**Enzyme-**Linked **Immuno**Sorbent **Assay****)******

ELISA-schéma





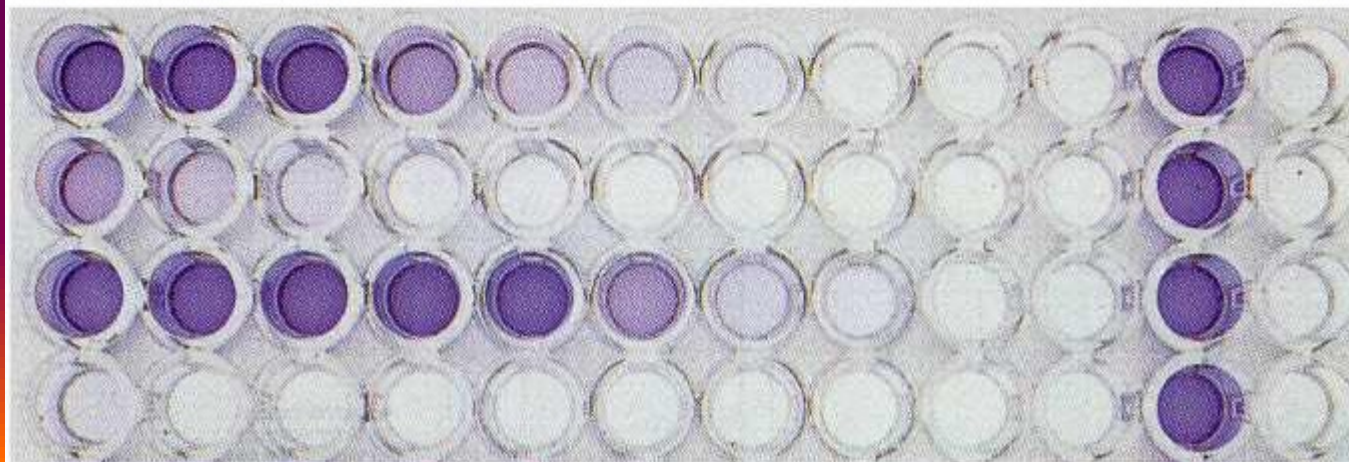
1. Potažení jamek antigenem

2. Přidání vzorku séra

3. Přidání enzymem značené protilátky (např. anti-human IgG)

4. Přidání substrátu

5. Odečtení barevné reakce



1. "kautování"



prázdná
jamka

polystyrén 



Ag

Ab 

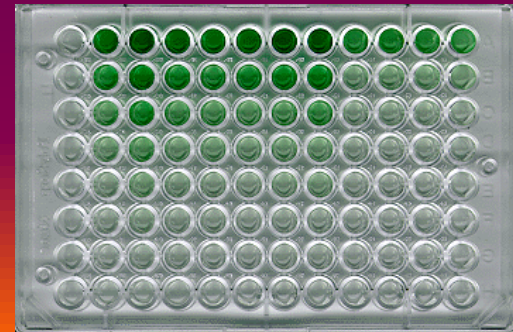
...následuje 2.blokování, 3. nanesení vzorků, atd...

4. Ab s enzymem – křenuv peroxidáza, alkalick fosfatáza, beta galaktozidáza,...

5. substrát – např. tetrametylbenzidin

6. barevn výsledek

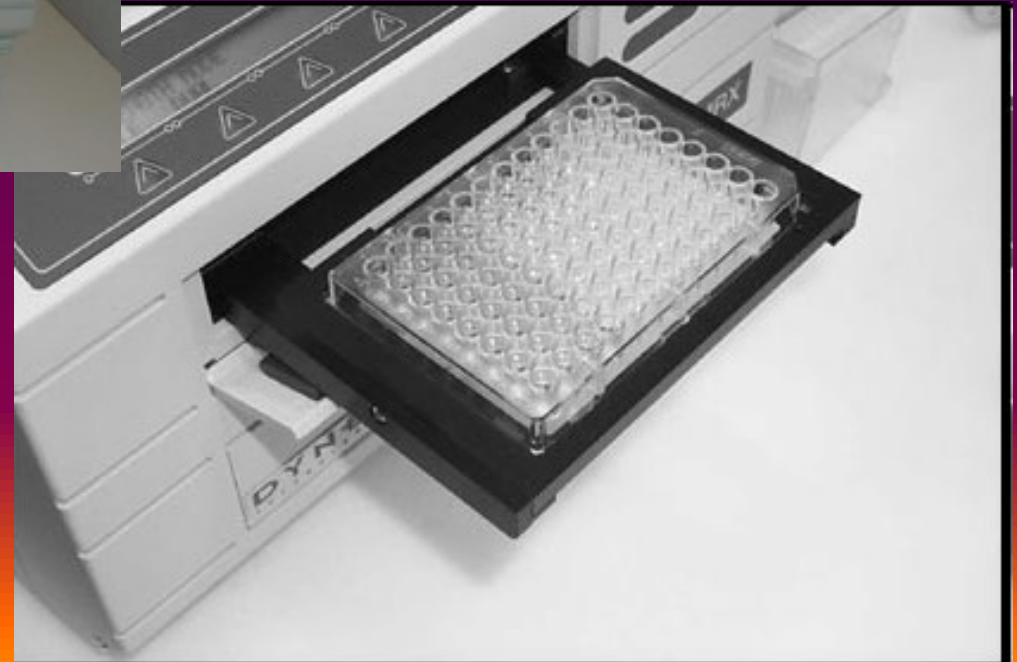
7. hodnocen...kalibrace, cut-off limity



EIA-ELISA I

- 1 reaktant imobilizován na povrch destičky
- detekovaný antigen musí mít 2 různé epitopy
- výsledkem je přeměna bezbarvého substrátu na barevný rozpustný produkt – tato přeměna pomocí enzymu na Ab
- čím ↑ intenzita zbarvení, tím ↑ koncentrace zjišťovaného Ag ve vzorku
- zbarvení se zjišťuje spektrofotometricky

ELISA reader



EIA-ELISA II

- nejen kvalitativní, ale i kvantitativní metoda
- lze stanovovat Ab i Ag (pozor na pojmy!!)
- k průkazu látek s nízkou koncentrací ve vyšetřovaných vzorcích v mikrobiologické serologii a imunologii:

specifických Ab

- Antivirových
- Antibakteriálních
- Autoprotilátek

nebo Ag