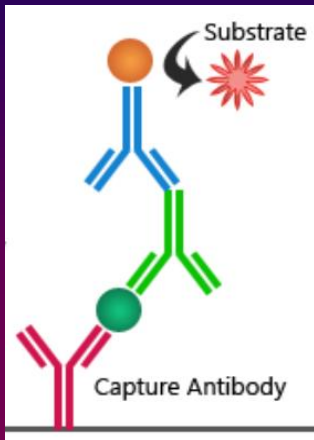
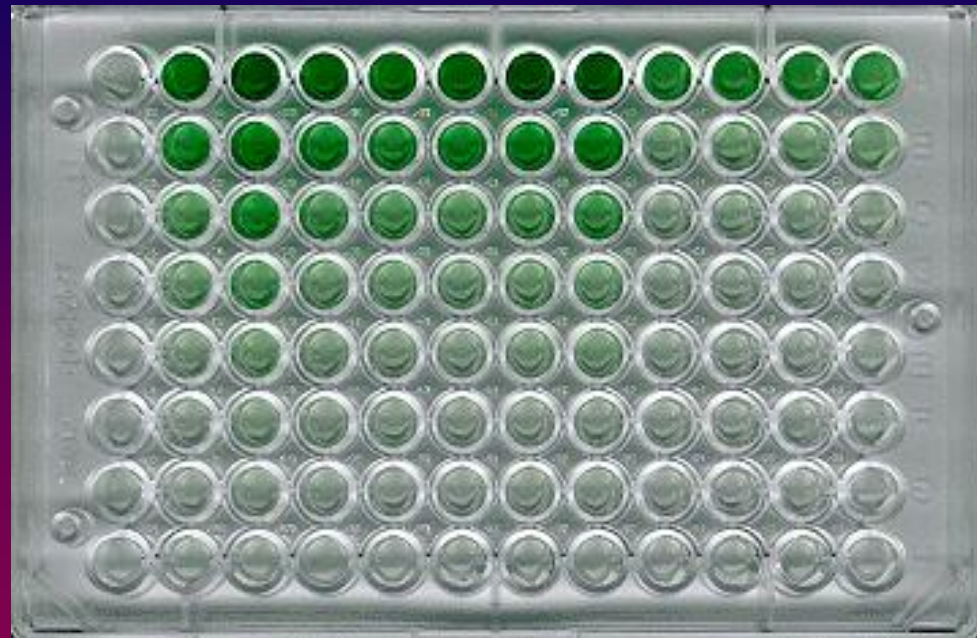


# IMUNOANALÝZA

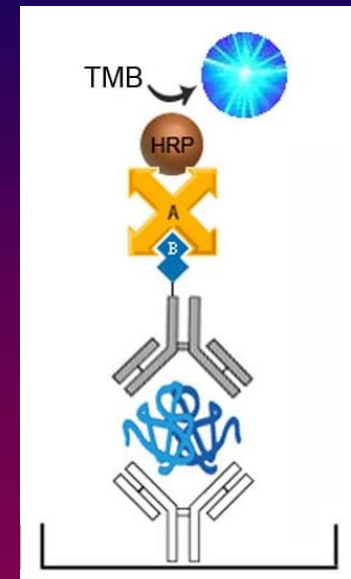
## ELISA, RIA, FIA, LIA



[www.bosterbio.com](http://www.bosterbio.com)



[http://www.biology.arizona.edu/immunology/activities/elisa/elisa\\_intro.html](http://www.biology.arizona.edu/immunology/activities/elisa/elisa_intro.html)



[www.lsbio.com](http://www.lsbio.com)

Mgr. Petr Bejdák

Ústav klinické imunologie a alergologie

Fakultní nemocnice u sv. Anny a Lékařská fakulta MU

# IMUNOANALÝZA, IMUNOASSAY (IA)

→ vizualizace sekundární fáze **reakce antigen x protilátka** pomocí **značky**

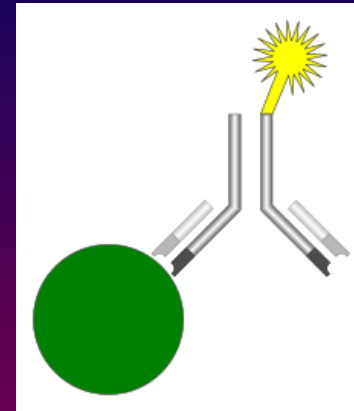
## Rozdělení IA podle druhu značky:

**EIA** - enzymová

**RIA** - radioaktivní

**LIA** - luminiscenční

**FIA** - fluorescenční



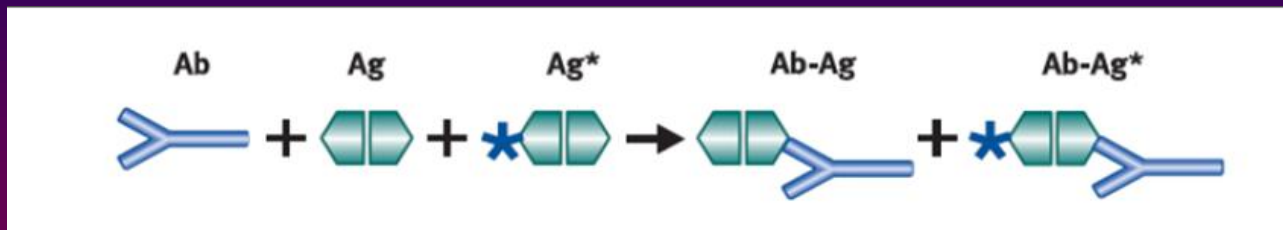
<https://en.wikipedia.org/wiki/Immunoassay>

## Rozdělení IA podle uspořádání:



# Kompetitivní IA

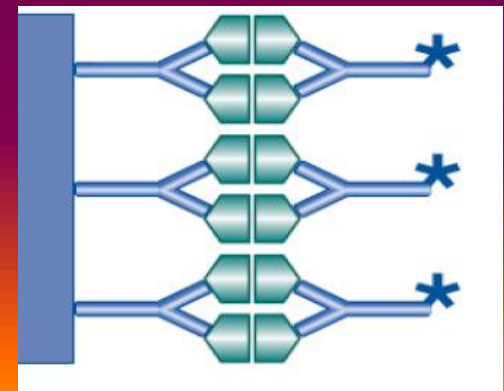
- v reakci je **omezené množství detekční protilátky** a známé množství značeného ligandu (antigenu)
- přidá se vzorek s neznámým obsahem neznačeného ligandu
- **oba typy ligandu soutěží o vazebná místa detekční protilátky**
- síla signálu je **nepřímo úměrná koncentraci neznačeného ligandu** - čím víc se naváže neznačeného ligandu, tím méně značeného



[http://imunologie.lf2.cuni.cz/soubory\\_vyuka/imunoreakce.pdf](http://imunologie.lf2.cuni.cz/soubory_vyuka/imunoreakce.pdf)

# Nekompetitivní IA

- detekční protilátka je v nadbytku
- všechny stanovený antigen je vyvázn a následně označen druhou protilátkou, která nese značku
- síla signálu je přímo úměrná koncentraci antigenu v testovaném vzorku



## **Homogenní IA**

- není potřeba oddělovat navázané a nenávané složky reakce
- jen kompetitivní uspořádání
- méně citlivé než heterogenní

## **Heterogenní IA**

- nutnost separace navázaných a volných reaktantů (analyt, detekční protilátka) – po přidání reaktantu a inkubaci následuje krok promytí
- může být kompetitivní i nekompetitivní

# ELISA

(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

- heterogenní IA
- vysoká citlivost - umožňuje stanovit analyt v množství  $10^{-9}$  až  $10^{-12}$  g
- jedna z reakčních složek (Ag nebo Ab) je navázána na pevnou fázi (stěnu mikrotitrační destičky)
- detekce založena na enzymatické přeměně bezbarvého substrátu na barevný produkt
- čím ↑ intenzita zbarvení (absorbance, optická denzita), tím ↑ koncentrace zjišťovaného analytu ve vzorku
- měří se pomocí spektrofotometru

Často používané enzymy a chromogenní substráty:

alkalická fosfatáza (alkaline phosphatase)

p-nitrofenylfosfát → p-nitrofenol (absorbance 405nm)

křenová peroxidáza (horseradish peroxidase)

tetramethylbenzidin → tetramethylbenzidindiimin (absorbance 450nm)

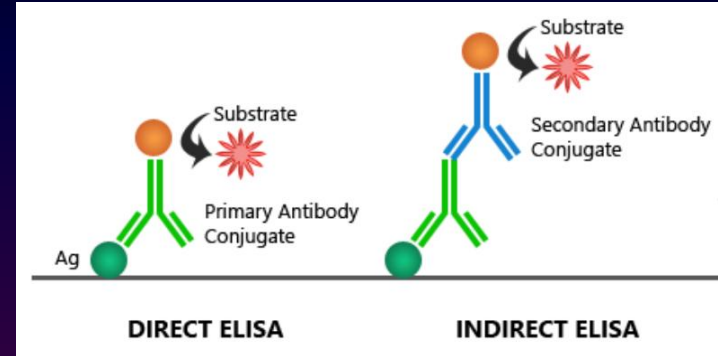
# ELISA

Mnoho možných uspořádání:

nekompetitivní — přímá  
nepřímá

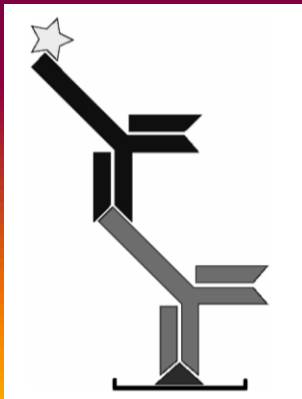
kompetitivní — přímá  
nepřímá

kvantitativní – kalibrační křivka, výsledkem je koncentrace  
semikvantitativní - absorbance vzorku / absorbance kalibrátoru  
- výsledkem je index positivity (IP)

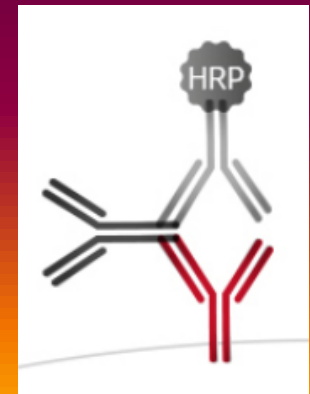
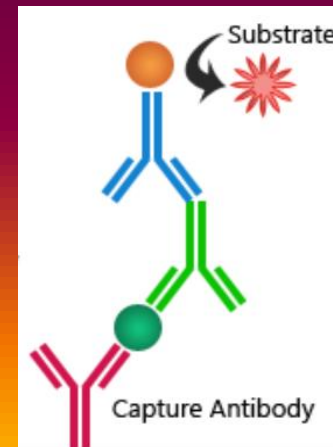
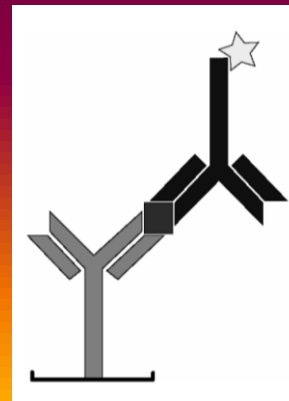


<http://www.bosterbio.com/protocol-and-troubleshooting/elisa-principle>

detekce  
protilátky



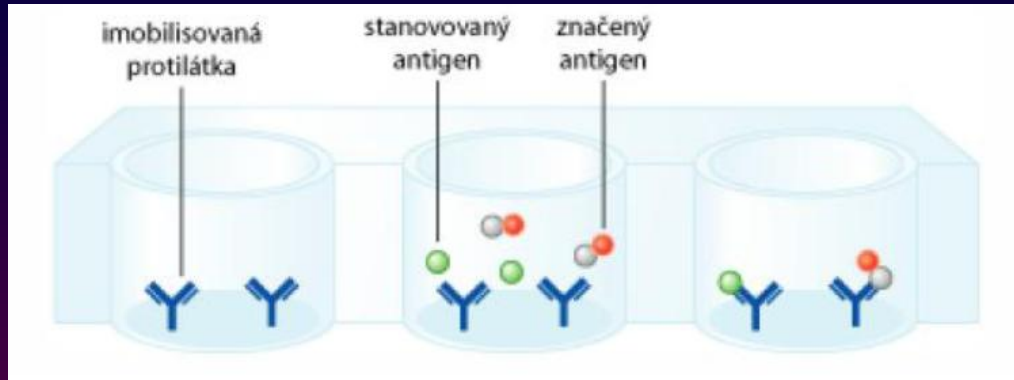
detekce  
antigenu  
(sendvičové  
uspořádání)



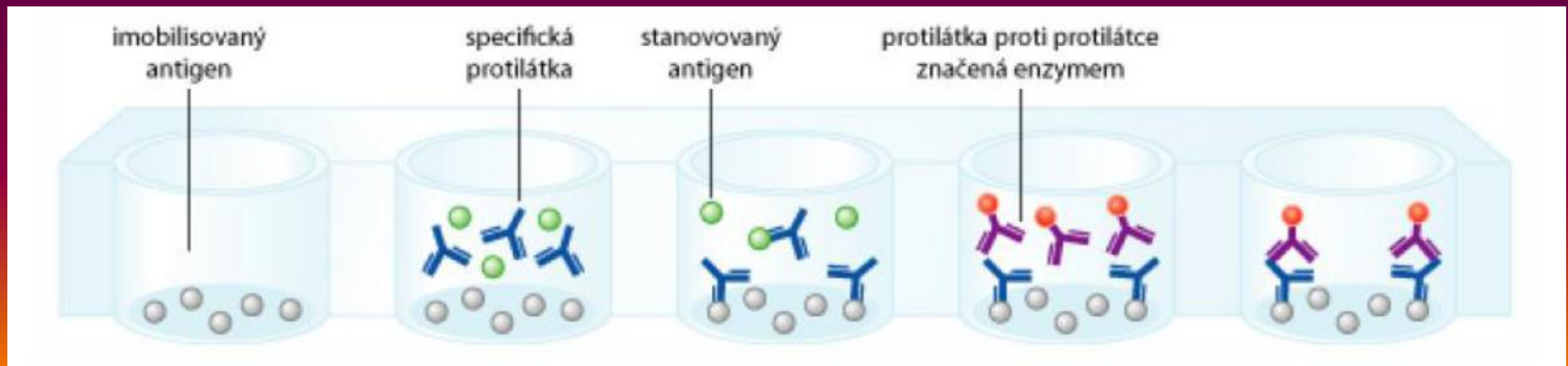
[www.mabtech.com](http://www.mabtech.com)

# ELISA

## Přímá kompetitivní ELISA



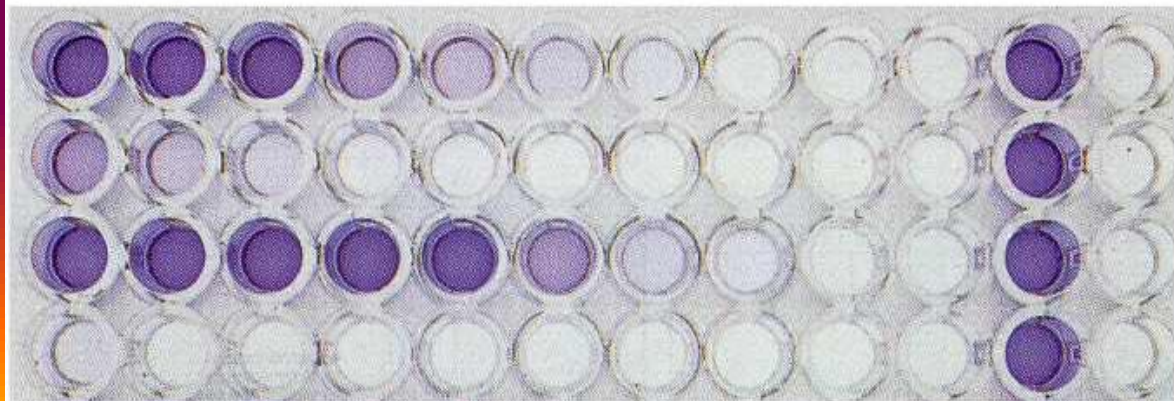
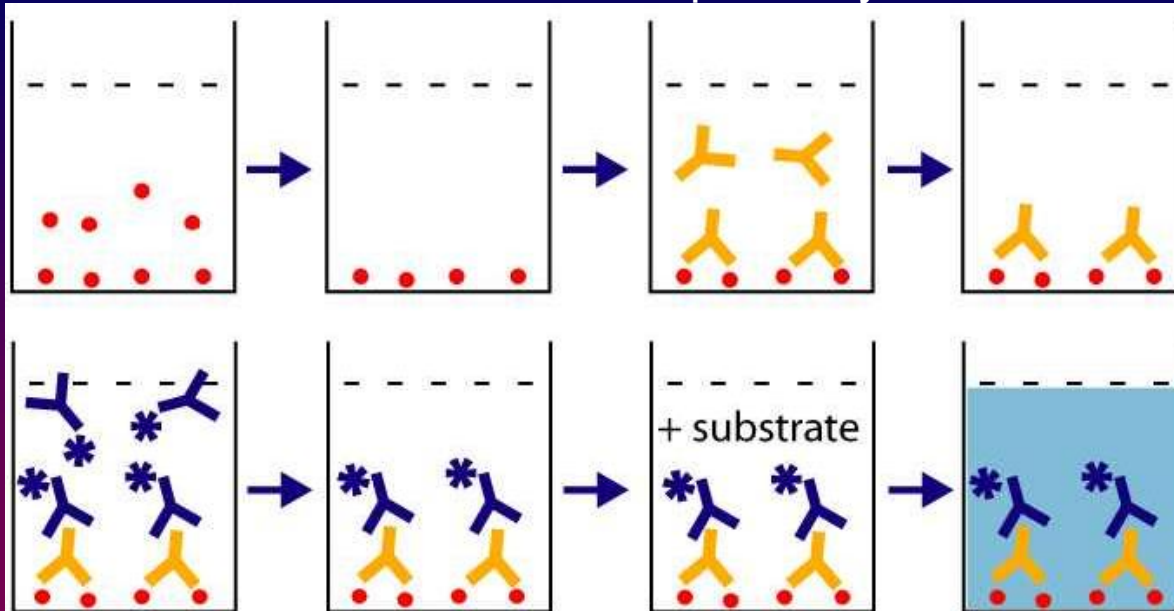
## Nepřímá kompetitivní ELISA



# ELISA

→ v **klinické imunologii** se nejčastěji používá nekompetitivní uspořádání

Příklad – stanovení koncentrace protilátky:



1. Potažení jamek antigenem („kautování“)

2. Přidání vzorku séra, navázání stanovované protilátky (analyt)

3. Promytí

4. Přidání enzymem značené protilátky (konjugát) specifické např. k lidskému IgG

5. Promytí

6. Přidání substrátu

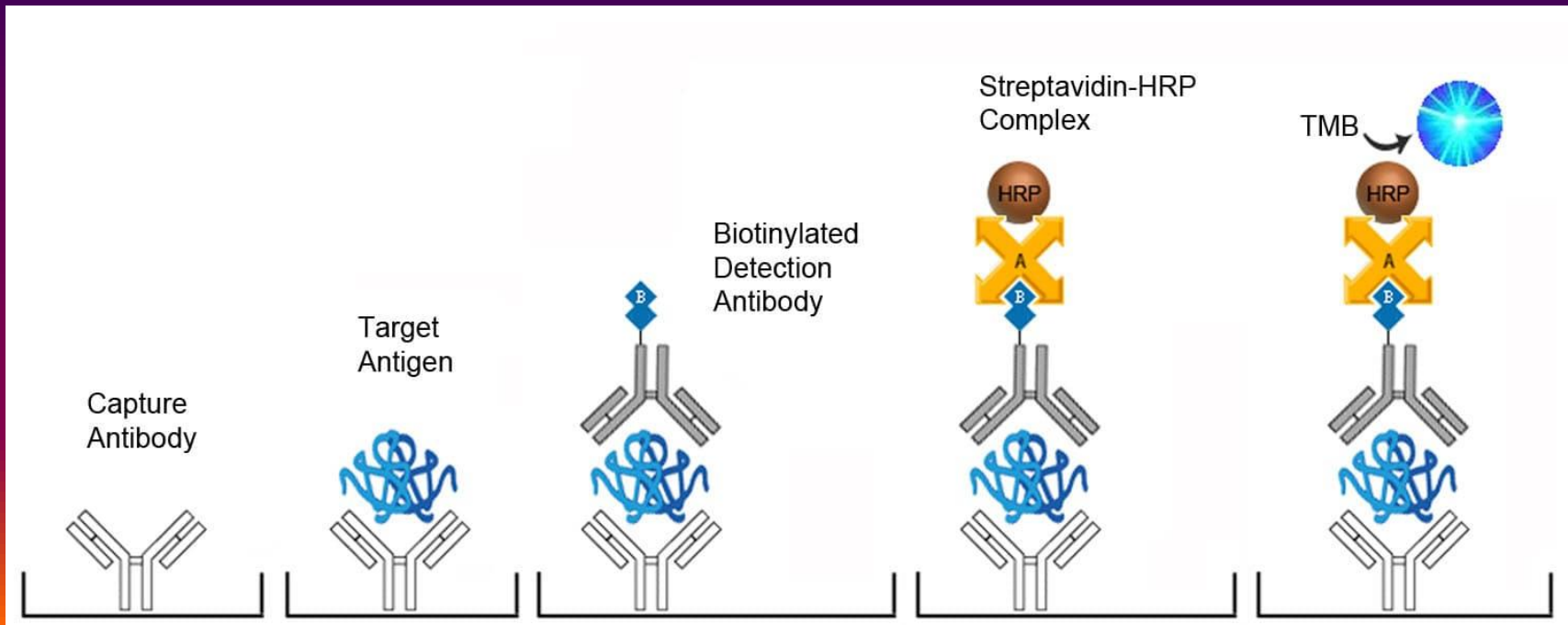
7. Odečtení barevné reakce



# ELISA

## System avidin – biotin (zesilující efekt)

Avidin je glykoprotein (MW 66-69 kDa), který má vysokou afinitu k malé molekule vitamínu biotinu (MW 0,24 kDa). Na jednu molekulu protilátky může být navázáno mnoho molekul biotinu. Biotinylovaná protilátka potom může vázat několik molekul avidinu. Podobné vlastnosti jako avidin má také streptavidin (MW 53 kDa) izolovaný z bakterie *Streptomyces avidinii*.



# Využití metod ELISA v klinické imunologii

- Stanovení protilátek i antigenů
- vyšetření komplementu, včetně funkčních testů
- vyšetření imunokomplexů

## Autoprotilátky

ANA – proti jaderným antigenům (DNA, nukleozómy, histony)

ENA – proti extrahovatelným jaderným antigenům

(SS-A, SS-B, Scl-70, Sm/RNP, Jo1)

AMA – proti mitochondriím (primární biliární cirhóza)

ASMA, LKM, LC (autoimunitní hepatitidy)

ANCA - proti cytoplazmě neutrofilů – anti-MPO, anti-PR3 (vaskulitidy)

anti-TTG – tkáňová transglutamináza (celiakie)

anti-TG - tyreoglobulin, anti-TPO – tyroidální peroxidáza (tyreoiditidy)

antiGAD, IA-2 (diabetes 1. typu)

RF(anti IgG), anti-CCP - revmatoidní artritida:

AFL – proti fosfolipidům, ACLA, B2GP (fosfolipidový syndrom)

AIGA (anti IgA)

# Využití metod ELISA v klinické imunologii

## Protilátky proti patogenům

*Rozsáhlé uplatnění v infekční serologii*

např: protilátky proti tetanickému toxoidu,

anti-PCP (pneumokokový kapsulární polysacharid)

(titr Ab stoupá po očkování, uplatnění v diagnostice imunodeficitů)

ASLO – anti-streptolysin O (streptokokové infekce)

## Další protilátky:

ASCA – anti-*Saccharomyces cerevisiae* (Crohnova nemoc)

GLIA – deamidovaný gliadin (celiakie)

proti proteinům kravského mléka

## Jiné:

imunokomplexy obsahující C1q

MBL (manózu vázající lektin)

# RIA (Radio Immuno Assay)

- oddělení nukleární medicíny
- práce s radioaktivním materiálem vyžaduje přísnější pravidla bezpečnosti práce
- detekce reakce Ag-Ab pomocí radioaktivního izotopu jako značky navázané na jednu ze složek reakce , nejčastěji  $^{125}\text{I}$
- měří se intenzita radioaktivního zářiče – není třeba přidávat substrát
- vyšetřování hladin různých hormonů a jejich metabolitů, vitamínů a jejich metabolitů, specifického IgE, některých autoprotilátek – např. vyšetření Ab proti acetylcholinovému rec. při myastenia gravis

## FIA (Fluorescence IA)

- jako značka se používá molekula fluorochromu
- detekce signálu se provádí fluorimetricky

## LIA (CLIA – Chemiluminescence IA)

- excitace elektronů a emise fotonů jako následek chemické reakce
- značka – chemiluminofor:  
luminol, izoluminol (aktivace přidáním  $H_2O_2$ ),  
luciferáza-luciferin
- citlivost je vyšší než u RIA