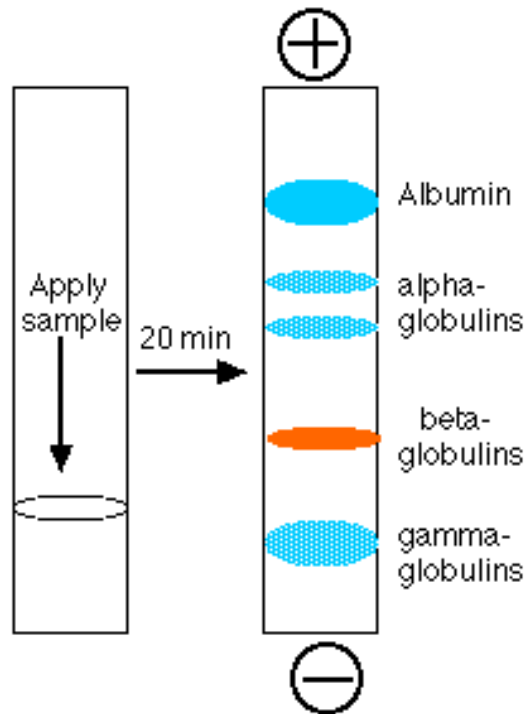


Imunofixace

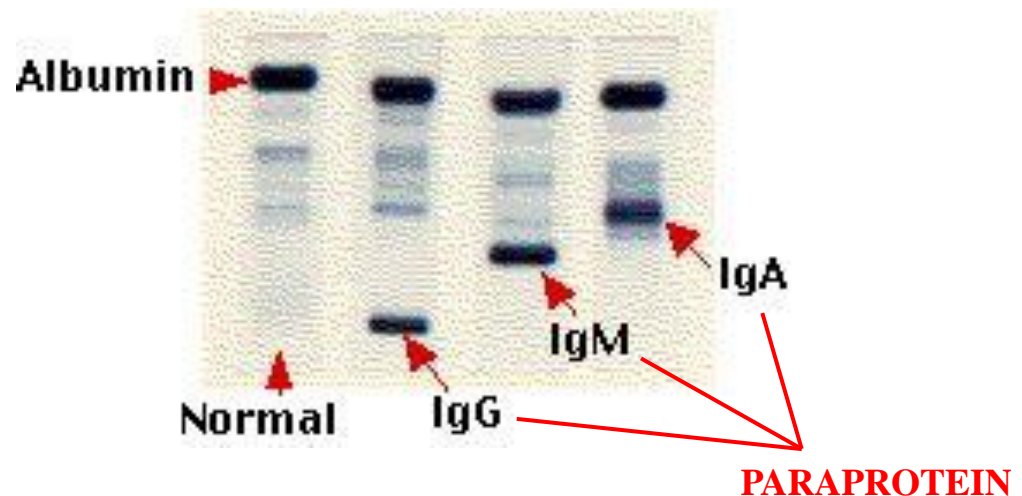
ELFO sérových proteinů

Elektroforéza sérových proteinů

- Vzorek séra se nanese na agarózový gel
- Proteiny se rozdělí na jednotlivé zóny podle velikosti a náboje
- Může odhalit přítomnost paraproteinu, ale neurčí jeho typ

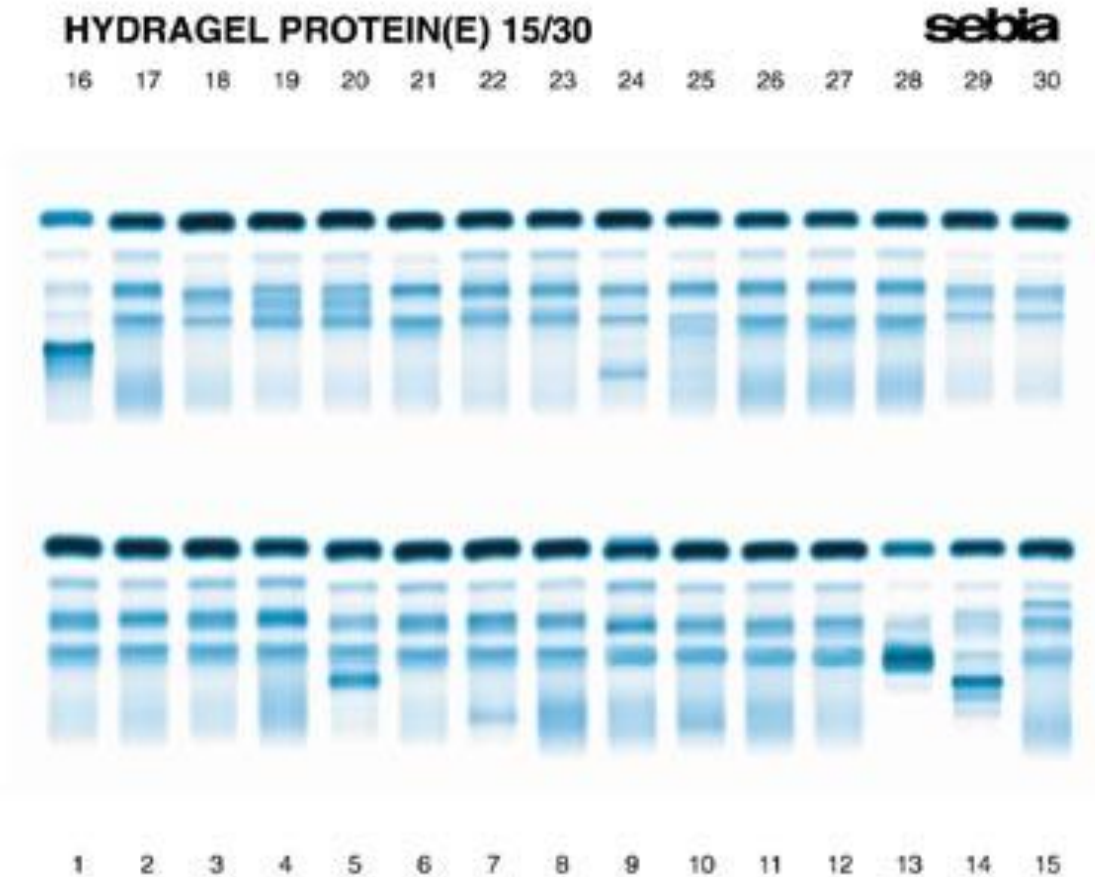


Separating serum proteins
by electrophoresis



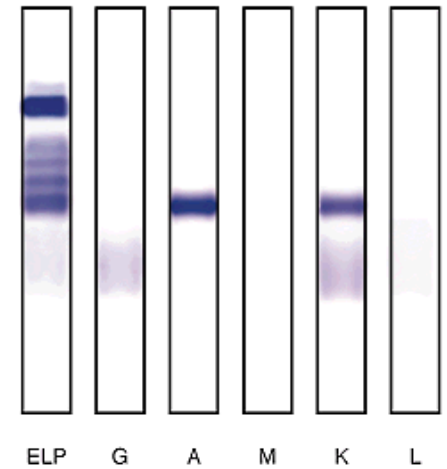
- lze zachytit pouze hrubé změny:
hyper- nebo hypogamaglobulinémie,
případně paraproteinémie

Elektroforéza sérových proteinů



Imunofixace

- Metodou imunofixace lze identifikovat PARAPROTEIN v séru, moči a likvoru



paraprotein = monoklonální imunoglobulin (monoklonální gamaglobulin)

- je produkován 1 klonem B-lymfocytů
- může sestávat z těžkého řetězce IgG/A/M (vzácně i D a E) a lehkého řetězce kappa / lambda
- stav, kdy má pacient v séru paraprotein se nazývá **paraproteinémie** nebo **monoklonální gamapatie**

Imunofixace

- Paraprotein se vyskytuje např. u mnohočetného myelomu a jiných hematoonkologických onemocnění
- 75 – 80% nemocných mnohočetným myelomem má v moči přítomny monoklonální lehké řetězce (Bence-Jonesova bílkovina). BJB poškozují buňky proximálních tubulů ledvin.
- U některých lidí je v séru přítomen paraprotein, aniž by měli příznaky onemocnění, u některých z nich se nemoc později rozvine

MGUS = monoklonální gamapatie neznámého významu
(monoclonal gammopathy of unknown significance)

Imunofixace - princip

- dvoustupňová metoda
- první fáze: směs bílkovin se rozdělí podle ***elektroforetické pohyblivosti***
- druhá fáze: identifikace typu bílkoviny pomocí specifických protilátek - ***imunoprecipitace, barvení***
- Imunofixace je pouze kvalitativní metoda
- kvantitu paraproteinu lze určit z ELFO sérových proteinů podle intenzity zabarvení proužku

Imunofixace - postup

1. V gelu se zhotoví obvykle 6 startů, do nichž se aplikuje vzorek téhož pacienta
2. Po skončení elektroforézy se na povrch gelu přiloží šablona s vyříznutými okénky v místě elektroforetických drah
3. První dráha je klasická ELFO sérových proteinů, aplikuje se fixační roztok
4. Do ostatních drah se nanášejí specifické protilátky proti těžkým řetězcům IgG, IgA, IgM a proti lehkým řetězcům κ nebo λ

Imunofixace - postup

5. Protilátky difundují do gelu a v místě, kde reagují s příslušným antigenem vytvářejí imunokomplexy ve formě precipitátu
6. Promytím vhodným pufrům se odstraní jak antigeny nereagující s aplikovanou protilátkou, tak i nadbytek protilátky.
7. Po promytí v gelu zůstanou pouze nerozpuštěné imunokomplexy, vytvářející ohraničný pruh, který se zvýrazňuje obarvením

Imunofixace

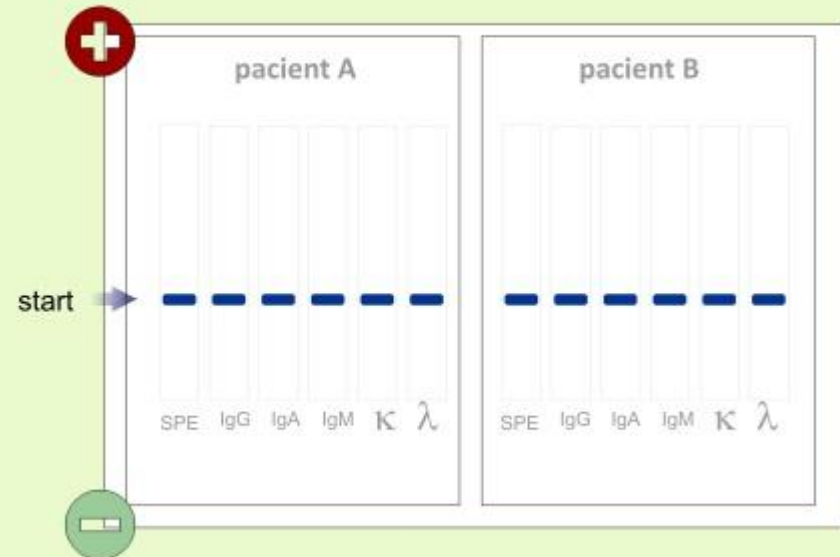
vzorky jsou aplikovány do 6ti specifických stop šablony

pacient A

pacient B



start elektroforetické migrace



Imunofixace

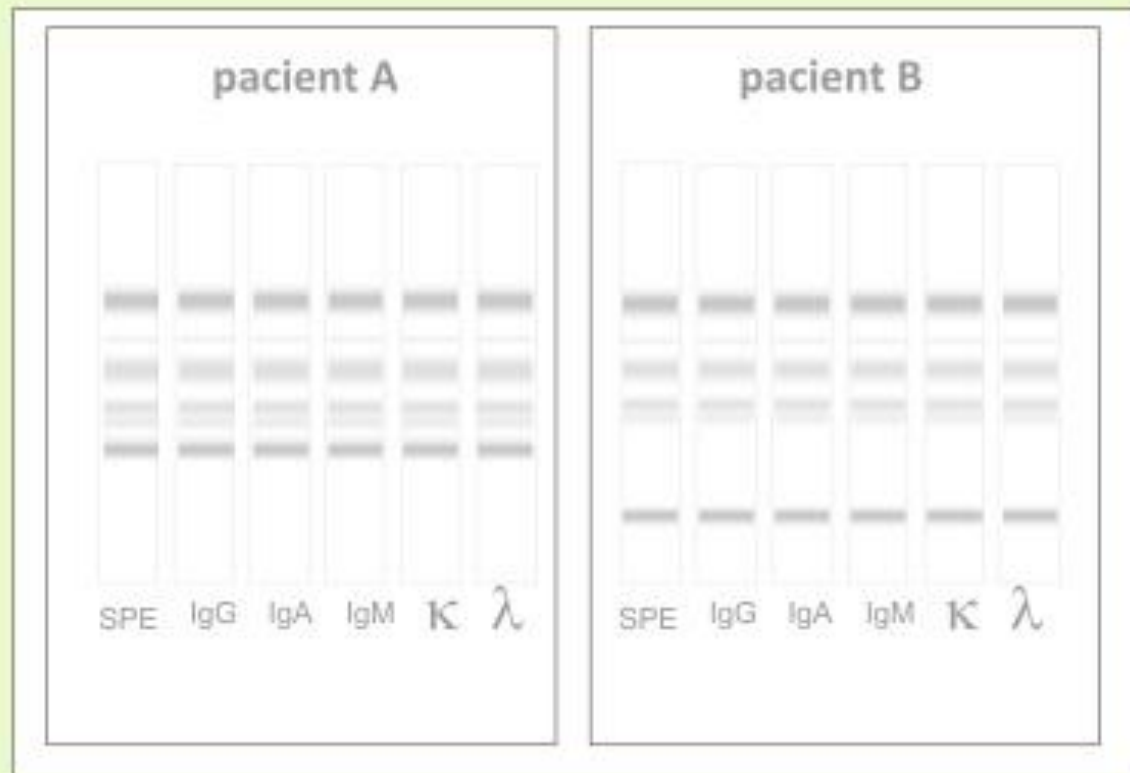
elektroforetická separace proteinů v alkalickém pH



2014/

Imunofixace

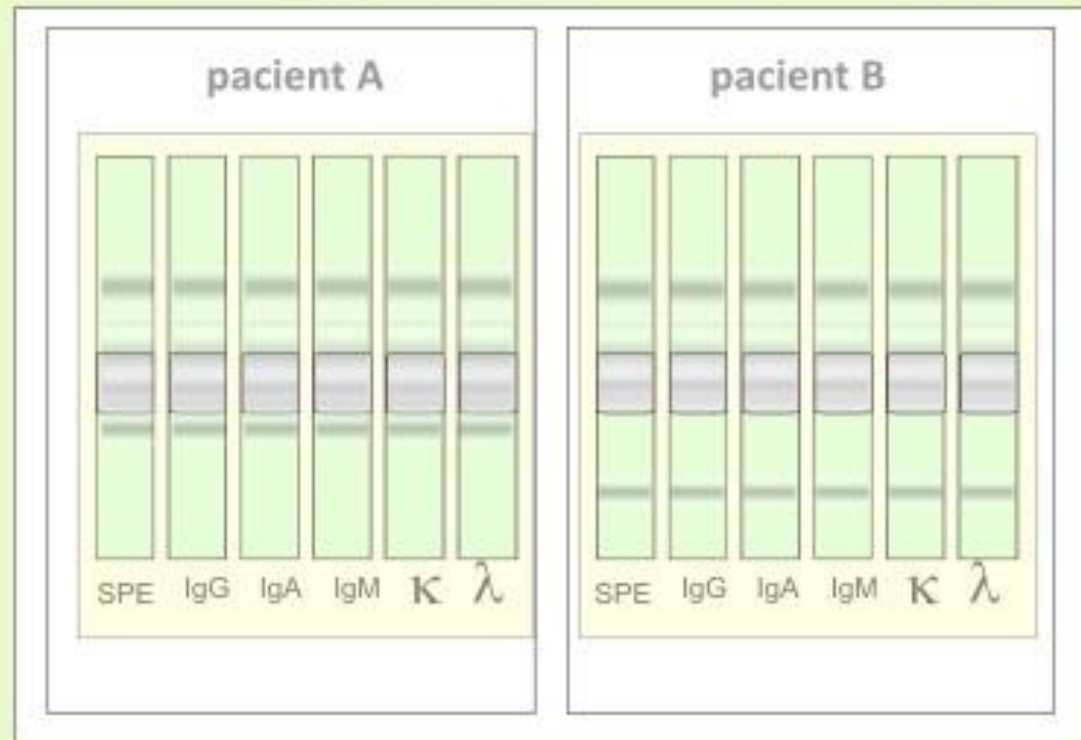
separované imunoglobulinové molekuly



2014/1

Imunofixace

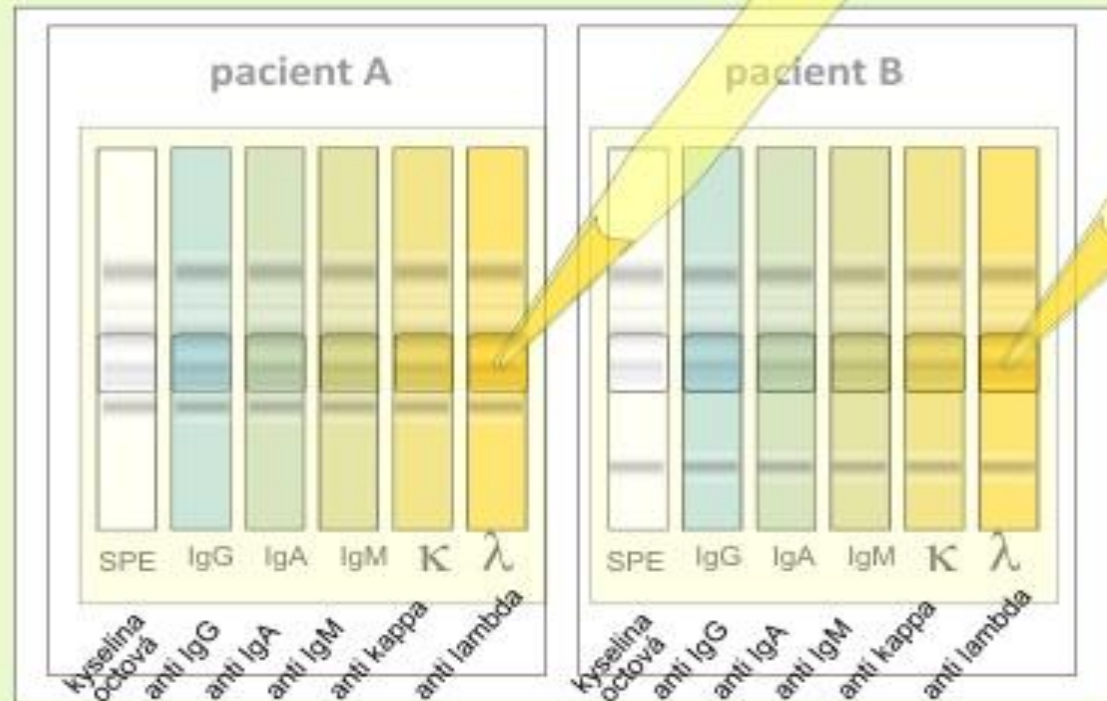
**přiložení magnetické masky
pro aplikaci roztoků antisér**



2014/1

Imunofixace

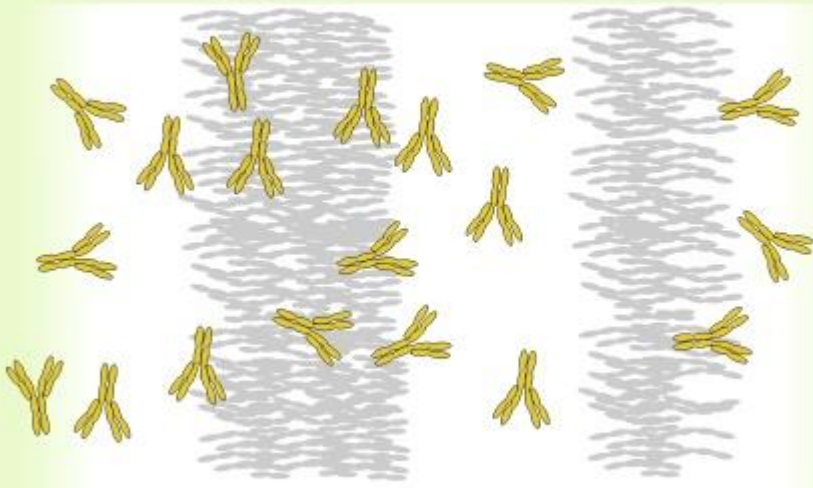
aplikace monospecifických antisér



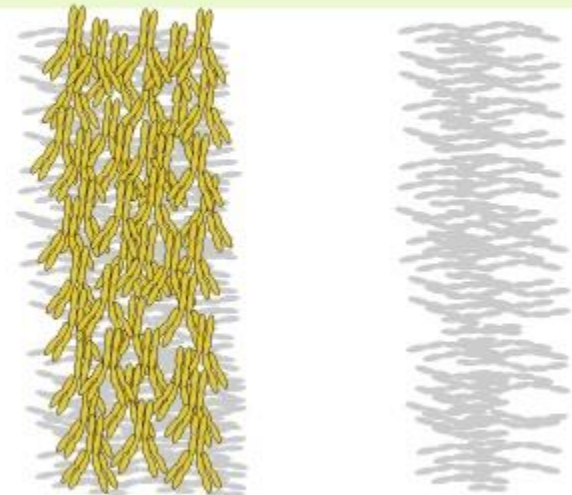
2010/

Imunofixace

monospecifická antiséra

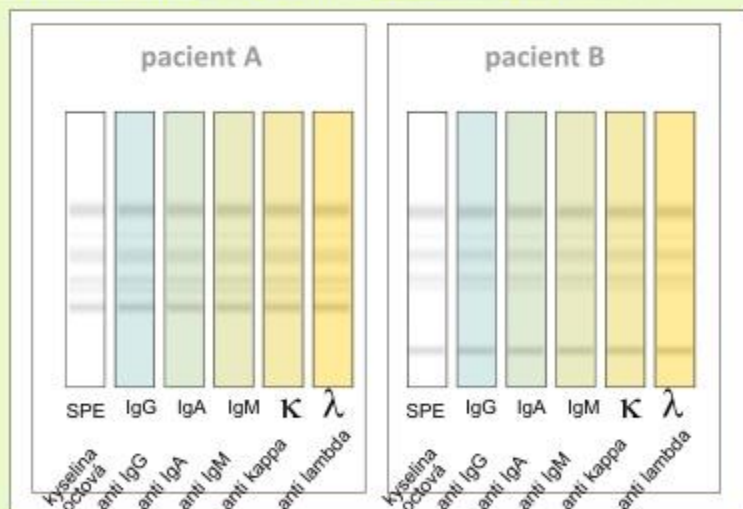


inkubace,
imunoprecipitace s monospecifickými antiséry

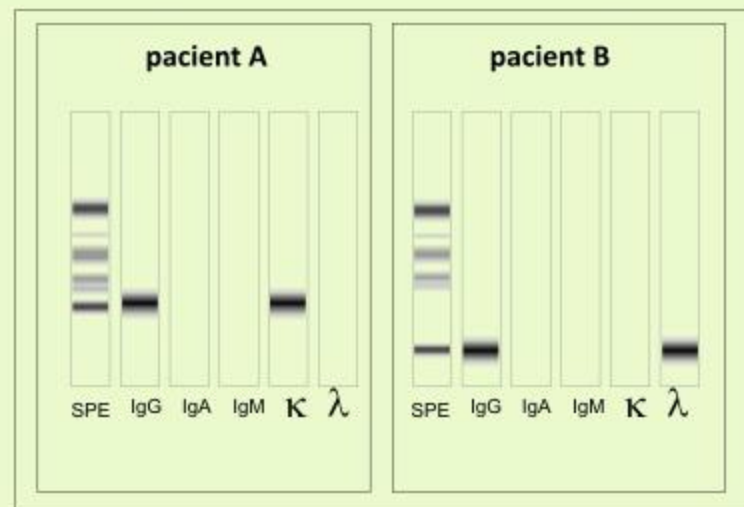


Imunofixace

inkubace,
imunoprecipitace s monospecifickými antiséry

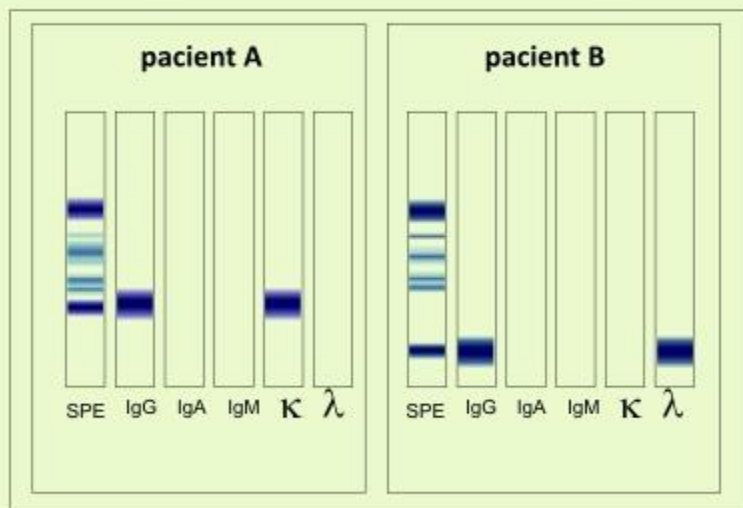


denaturace při 60°C

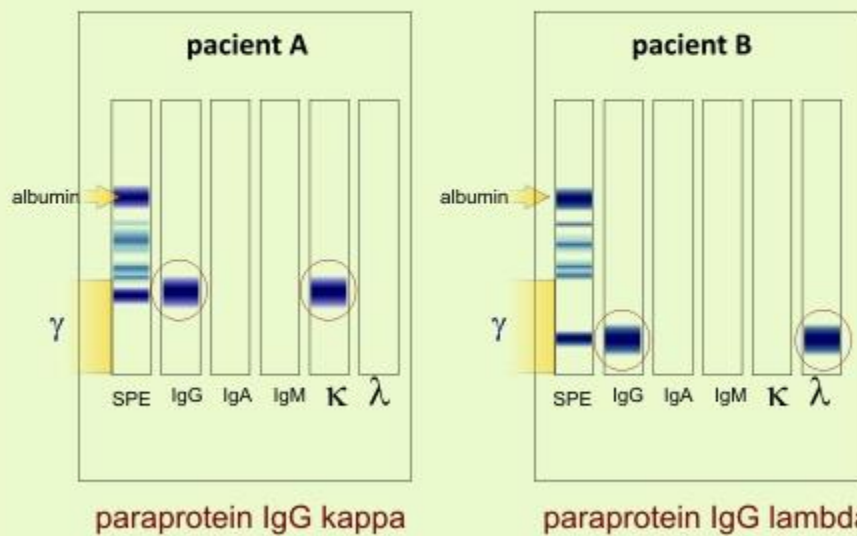


Imunofixace

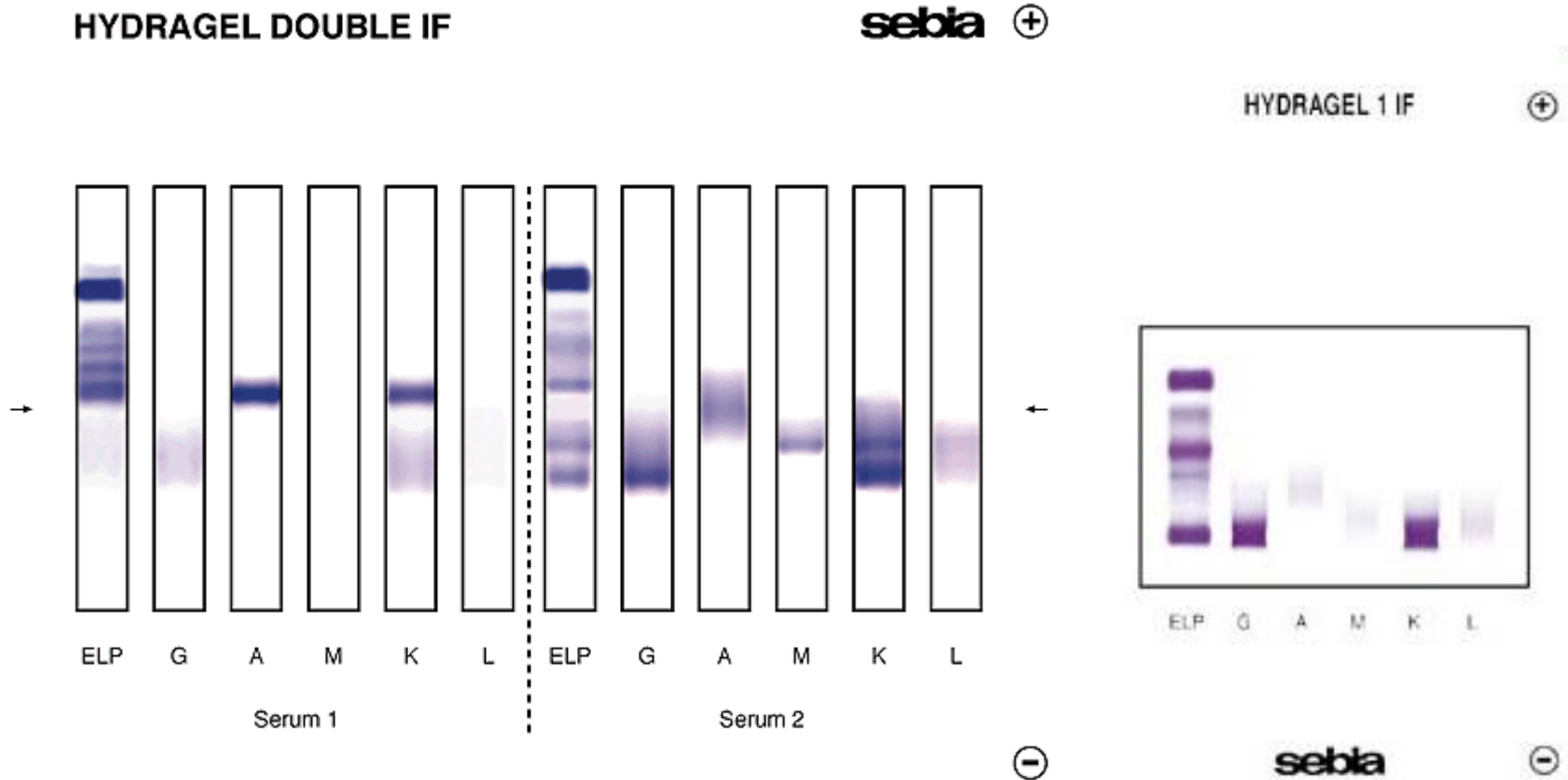
barvení



vyhodnocení



Imunofixace



Pozn. 75 – 80% nemocných mnohočetným myelomem má v moči přítomny monoklonální lehké řetězce (Bence-Jonesova bílkovina/paraprotein). BJB poškozují buňky proximálních tubulů ledvin.

MGUS monoklonální gamapatie nejasného původu