



# Imunoanalýza ELISA

---

Mgr. Julie Štíhová

Fakultní nemocnice u Sv. Anny v Brně  
Ústav klinické imunologie a alergologie

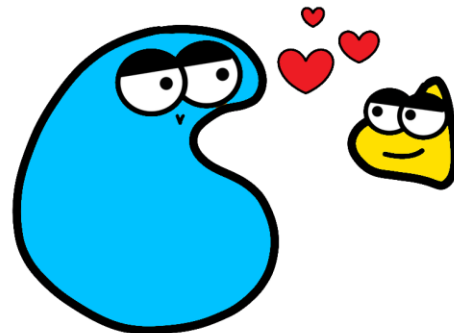
# Imunoanalytické metody

---

Vizualizace reakce **antigen-protilátka** pomocí **značky**

Rozdělení metod dle typu  
značky:

- EIA – značkou je enzym
- RIA - radioizotop
- LIA - luminofor
- FIA - fluorofor



You are the substrate to my enzyme  
and nothing could ever denature us.

Rozdělení metod dle  
uspořádání:

- Homogenní – bez promývání
- Heterogenní – s promýváním
  - Kompetitivní
  - Nekompetitivní

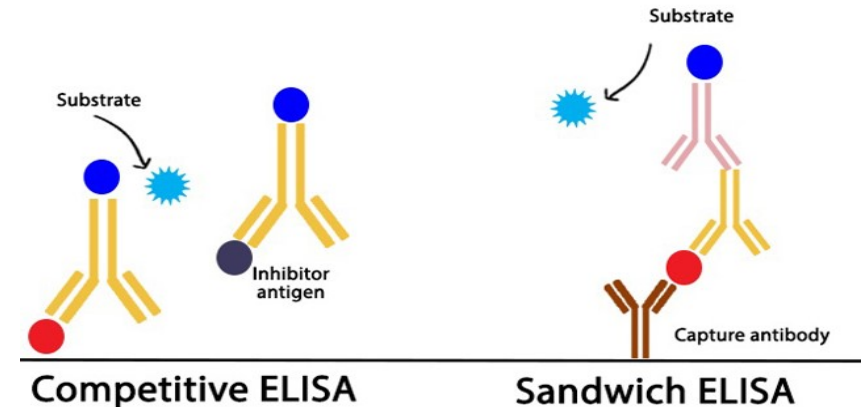
# Imunoanalytické metody

## Heterogenní **kompetitivní**:

- Analyt ze vzorku + značený analyt od výrobce – soutěž o omezené množství antigenu
- Měřený signál je **nepřímo úměrný** množství analytu

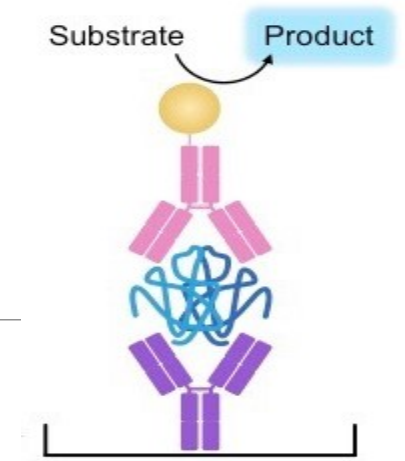
## Heterogenní **nekompetitivní**:

- Detekční protilátka / antigen v nadbytku – analyt ze vzorku vyvázán
- Měřený signál je **přímo úměrný** množství analytu



# ELISA

## Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay



- Heterogenní imunoanalýza – nutná separace nezreagovaných složek pomocí promývání
- Zahrnuje jednotlivé kroky
  - Vazba antigenu / protilátky na pevnou fázi (stěna destičky)
  - Na navázaný Ag se váže zkoumaná protilátka z přidaného séra
  - Na navázaný komplex se váže sekundární protilátka s konjugovaným enzymem
  - Pro vizualizaci se do reakce přidá substrát pro daný enzym - enzymatická přeměna substrátu na barevný produkt – měření na spektrofotometru
  - **Používané enzymy:**
    - **Křenová peroxidáza** (tetrametylbenzidín → tetrametylbenzimidín → 450 nm)
    - **Alkalická fosfatáza** (p-nitrofenylfosfát → nitrofenol → 405 nm)
  - Mezi výše uvedenými jednotlivými kroky je vždy tzv. promýváním, při kterém se nadbytek reaktantu odstraní přidávkem pufru do jamky, který je pak také z jamky odstraněn – separace nezreagovaných složek
- Vysoká citlivost – **pg/ml**

# Kautování ELISA desky

## ○ Imobilizace Ag nebo Ab na plastový povrch desky

### 1. Povrchová aktivace desky

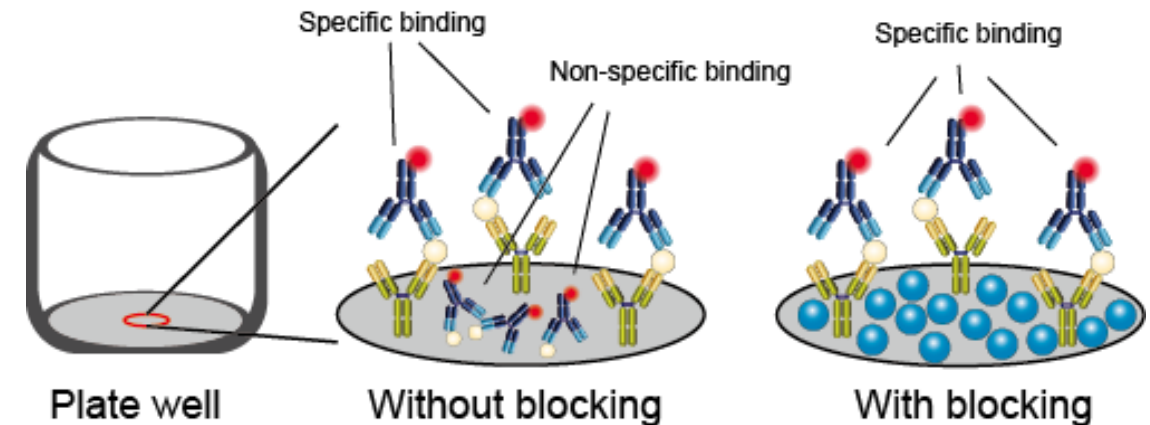
- vazba  $\text{NH}_2$  nebo  $\text{COOH}$  skupin – tvorba kovalentních vazeb s protilátkou nebo antigenem
- Vhodné pro stanovení malých molekul – např. peptidy

### 2. Pasivní adsorpce

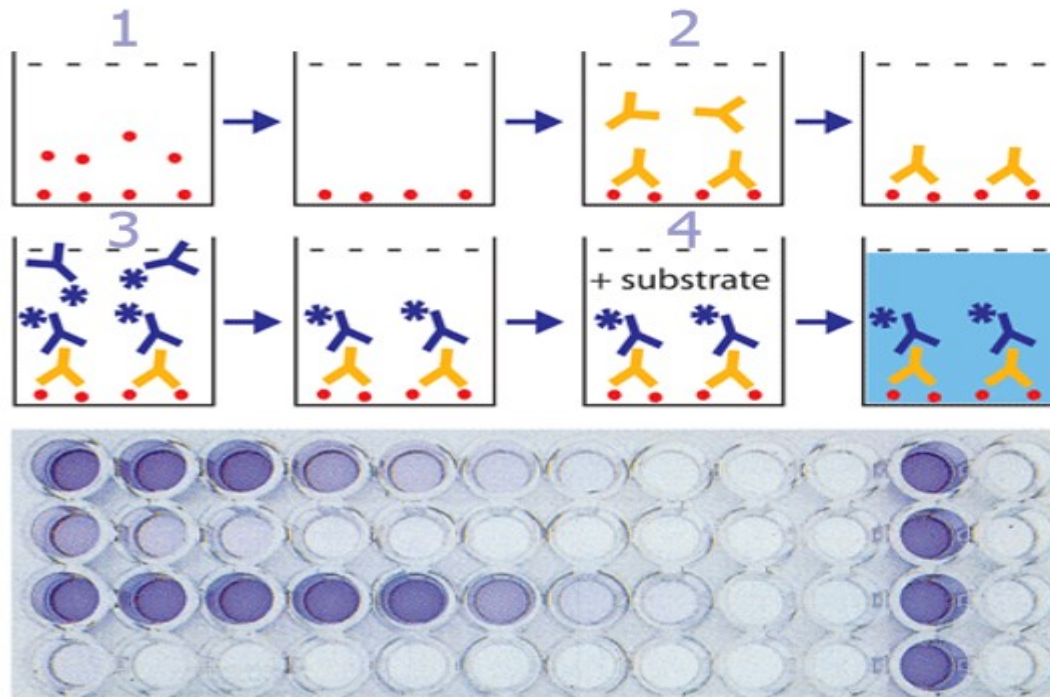
- Hydrofobní interakce mezi nepolárními strukturami proteinu a plastovým povrchem desky
- Protein určený k adsorpci je rozpuštěn v alkalickém **kautovacím pufru** (pH 9,5) – naleptává plastový povrch a usnadňuje adsorpci Ag nebo Ab

## ○ Blokování desky

- Po navázání Ab/Ag zůstává část plastového povrchu volná. Aby bylo zabráněno nespecifickým vazbám, je nutno tato místa zablokovat inertní bílkovinou BSA – bovinní sérový albumin



# Vlastní průběh ELISY



1. Potažení jamek antigenem
2. Přidání vzorku séra
3. Přidání enzymem značené protilátky (anti-human IgG)
4. Přidání substrátu
5. Odečtení barevné reakce

Za každým krokem následuje tzv. promývací krok, kde se obsah jamky odsaje, do jamky se přidá nejčastěji fosfátový pufr a následně se obsah jamky odsaje. Toto promytí se opakuje zpravidla 3x za sebou, aby byl odstraněn veškerý nezreagovaný materiál.

# System záchytná + detekční Ab

- Detekční (sekundární) protilátka proti hledanému Ag je konjugovaná s enzymem,
- Proč je každá protilátka od jiného živočišného druhu?

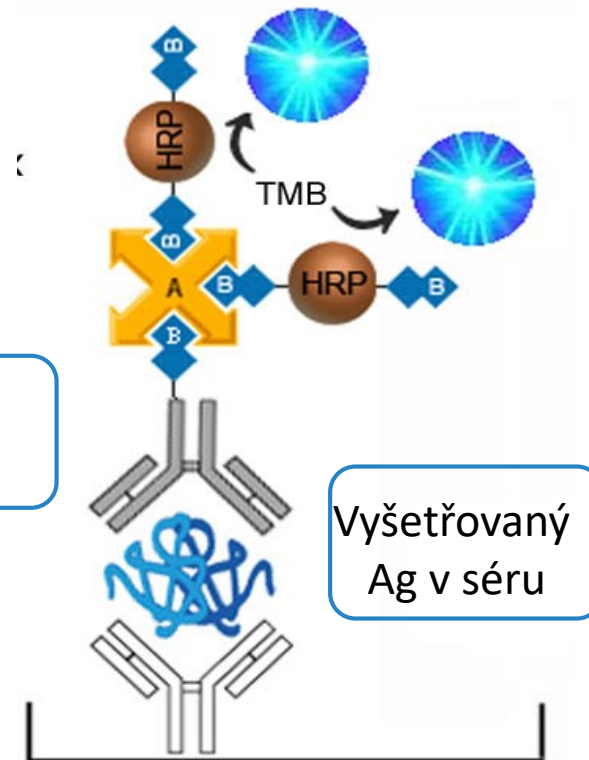
**Tato kombinace významně snižuje riziko zkřížené reaktivity, která by mohla způsobit vznik nespecifických imunokomplexů (zdroj falešné positivity)!!!**

Lidská monoklonální protilátka – s **vysokou specifitou** váže pouze konkrétní antigen

Záchytná protilátka – s **vysokou senzitivitou** váže všechny varianty daného antigenu

Detekční protilátka  
humánní, monoklonální

Záchytná protilátka  
myší, polyklonální



Vyšetřovaný  
Ag v séru

# Enzymatická detekce – přidání substrátu

---

Nejčastěji používané enzymy detekčních nebo-li sekundárních protilátek:

- **Křenová peroxidáza**
- Alkalická fosfatáza

Pro křenovou peroxidázu jsou používány tyto substráty:

- **3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidin** – modré zbarvení + stop činidlo → žluté zbarvení – odečet při **450nm**
- 2, 2'-azinobis(3-ethylbenzthiazol-6sulfonát)
- o-fenylendiamin
- o-dianisidin
- o-toulidin

Pro alkalickou fosfatázu se používá substrát

- 4-nitrofenylfosfát

Luminescenční Immunoassay

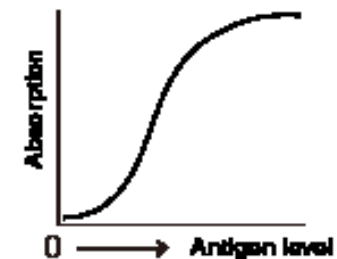
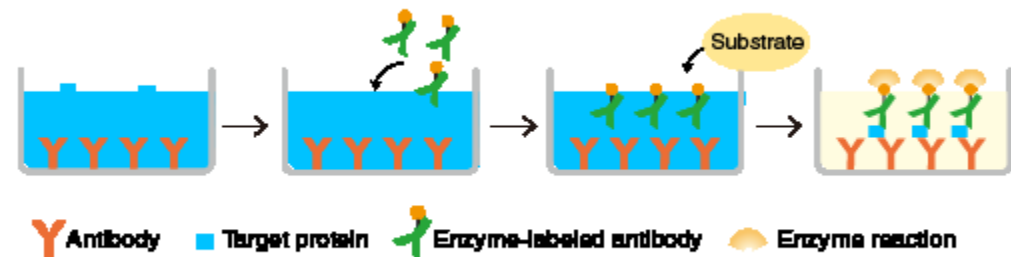
- Chemiluminescenční substráty – detekce záblesků luminiscence
  - SuperSignal
  - ECL



# Sendvičová ELISA - uspořádání

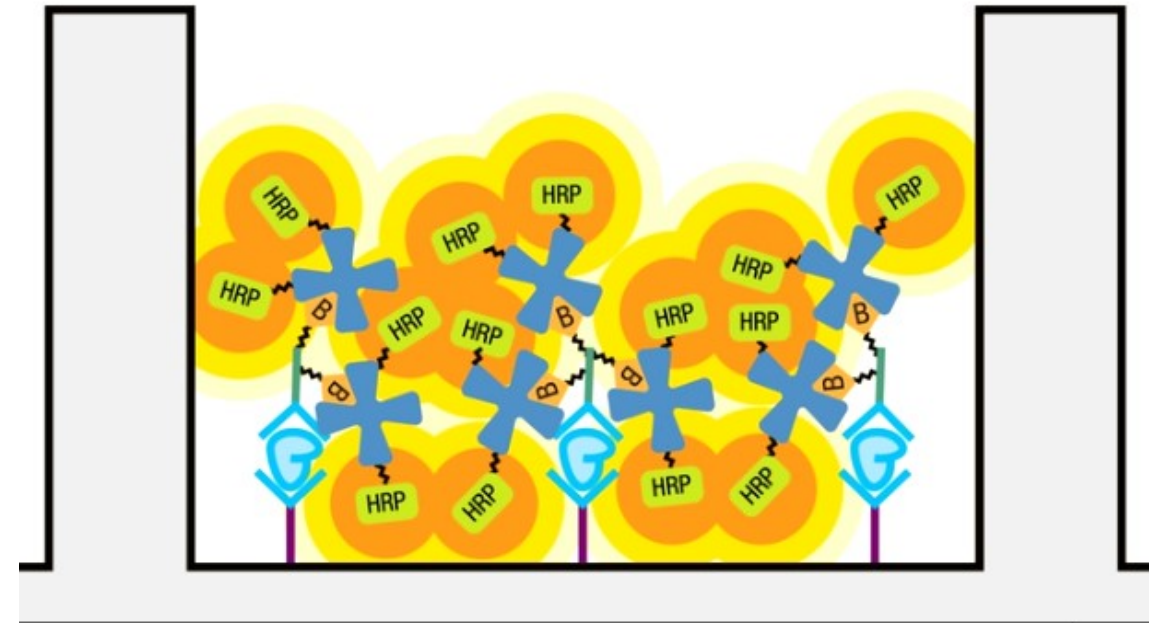
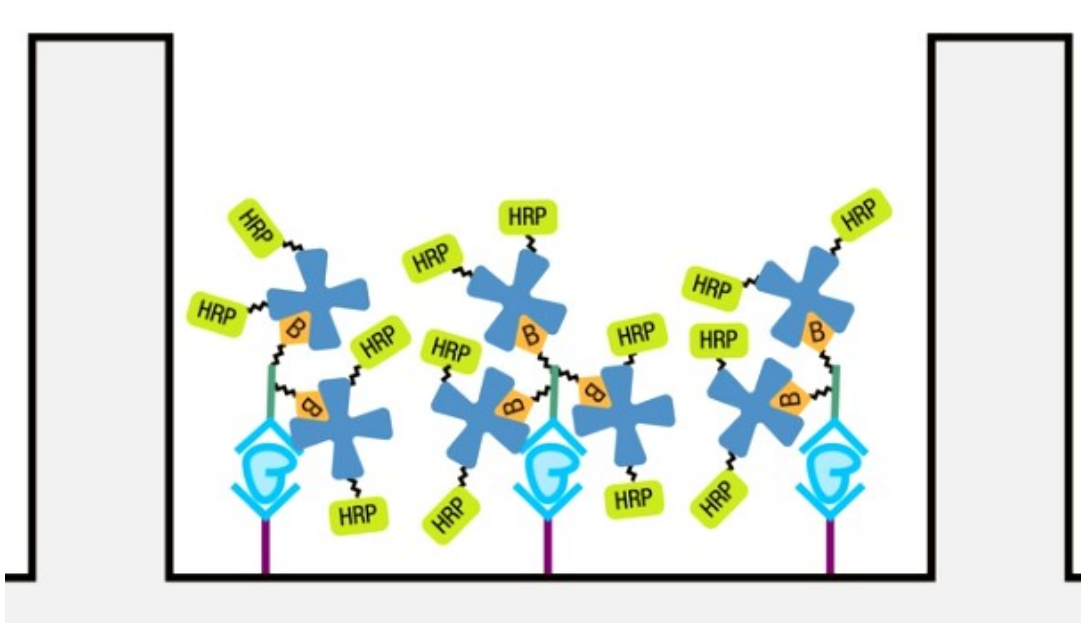
- Použití dvou protilátek specifických na různé epitopy jednoho antigenu.
- Jedna z protilátek je navázána na povrch jamky destičky a vycytává antigen ze vzorku.
- Druhá protilátka značená enzymem slouží k detekci tohoto antigenu.
- Antigen je tedy mezi protilátkami jako plátek masa mezi houskami v sendviči.

- Detekce analytů s vysokou Mr (proteiny)
- Vysoká přesnost



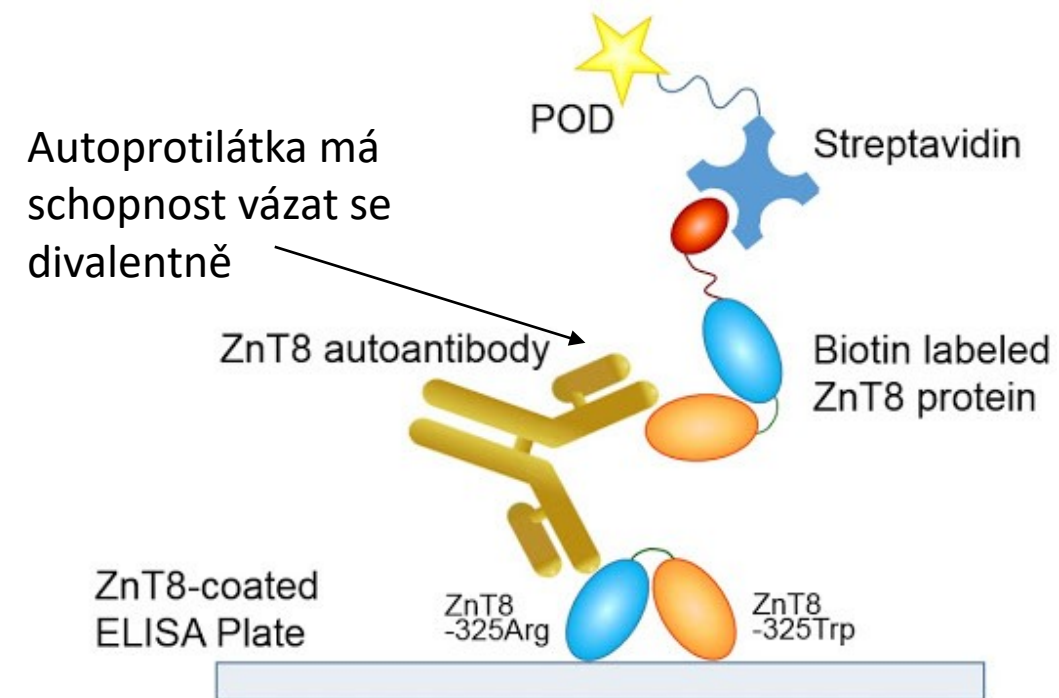
# Sendvičová ELISA – vyšší senzitivita

- System biotin – avidin/streptavidin – na jeden imunokomplex se váže více molekul enzymu
- Po přidavku substrátu vzniká silnější zbarvení (pro analyty s nízkou koncentrací)

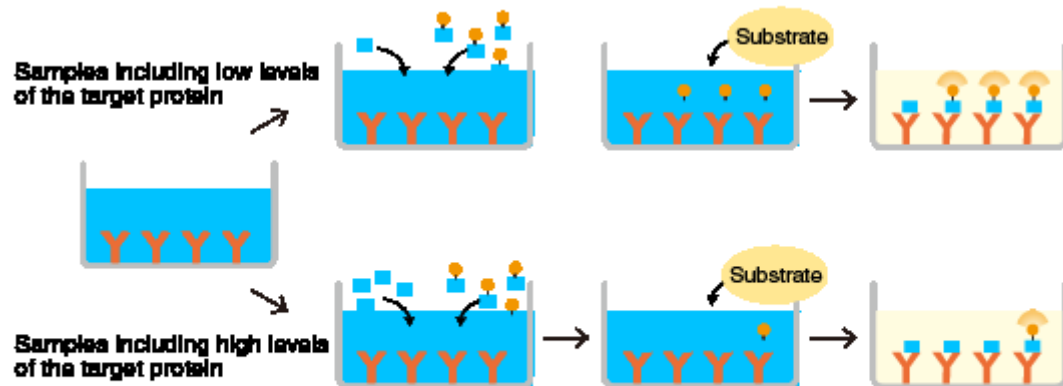


# Sendvičová ELISA využívající divalentní vazby některých autoprotilátek

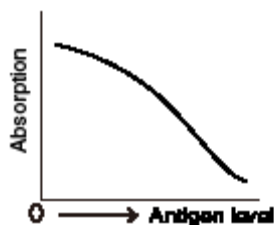
- **Diabetes mellitus I. typu**
  - Autoprotilátky proti dekarboxyláze kyseliny glutamové (anti-GAD)
  - Autoprotilátky proti zinkovému transportéru ZnT8 (anti-ZnT8)
- Destička pokryta Ag
- Vazba auto-Ab jedním Fab fragmentem na Ag
- Druhý Fab fragment váže biotinem značený antigen ze setu
- Přídavek streptavidinem značeného enzymu
- Přídavek substrátu → zbarvení



# Kompetitivní ELISA - uspořádání



Y Antibody    ■ Target protein    ■ Enzyme-labeled antigen    ☀ Enzyme reaction

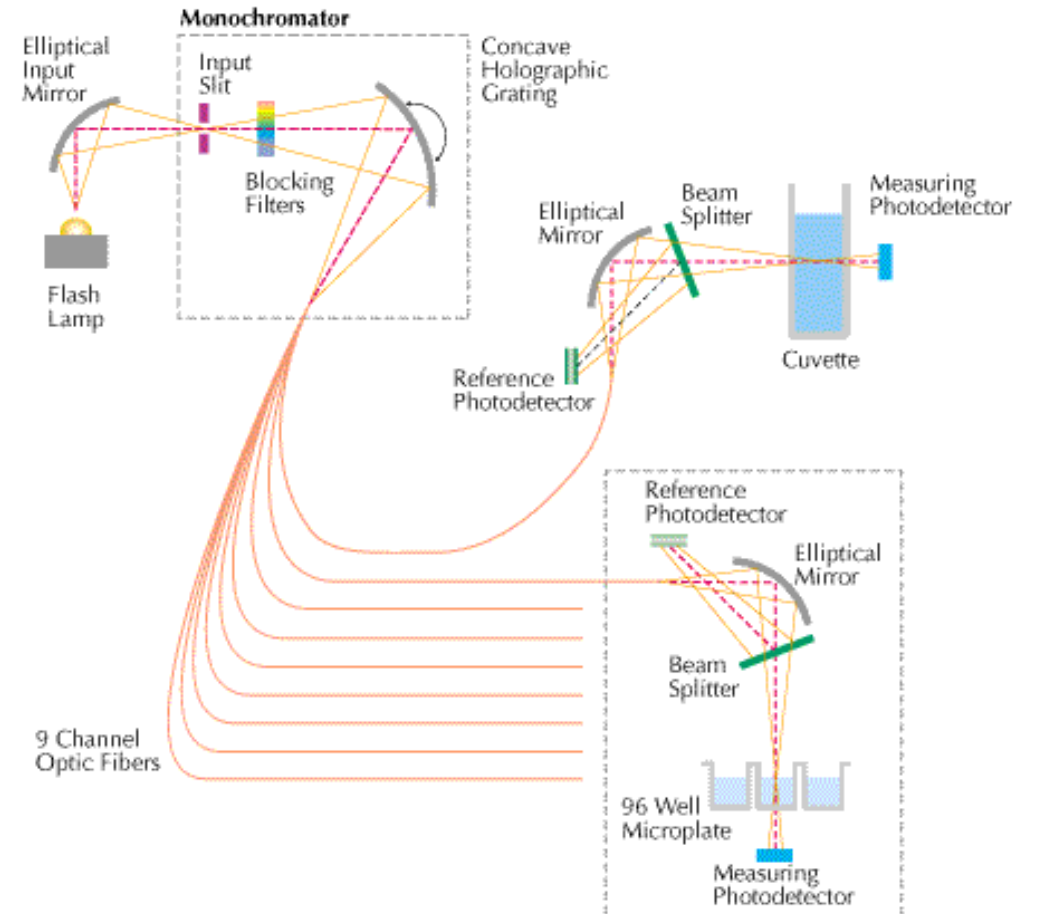


- Na rozdíl od nekompetitivní ELISY se navíc přidává enzymem značený Ag.
- Přidaný enzymem značený antigen kompetuje – soutěží - s hledaným Ag v séru o vazebné místo zkoumaného Ag.
- Čím více je zkoumaného Ag v séru, tím méně se naváže enzymem značeného Ag a tím nižší je pak měřená absorbance.

- Detekce analytů s malou Mr

# Měření výsledků

- Přístroj ELISA reader
- Princip – vertikální spektrofotometrie
  - Zdroj světla – Xe výbojka
  - Výběr vlnové délky – interferenční filtry
  - Optická dráha – 9 optických vláken (8 měří vzorky, 9. vlákno kontrola intenzity záření)
  - 9 detektorů - fotodiody



# Výsledky

---

## 1. Kvalitativní

- Hodnotíme vizuálně přítomnost / nepřítomnost reakce → **ano / ne**  
– výsledek je pak pozitivní či negativní, použití cut-off kalibrátoru, hodnoty s absorbancí nad tuto hodnotu jsou hodnoceny jako pozitivní

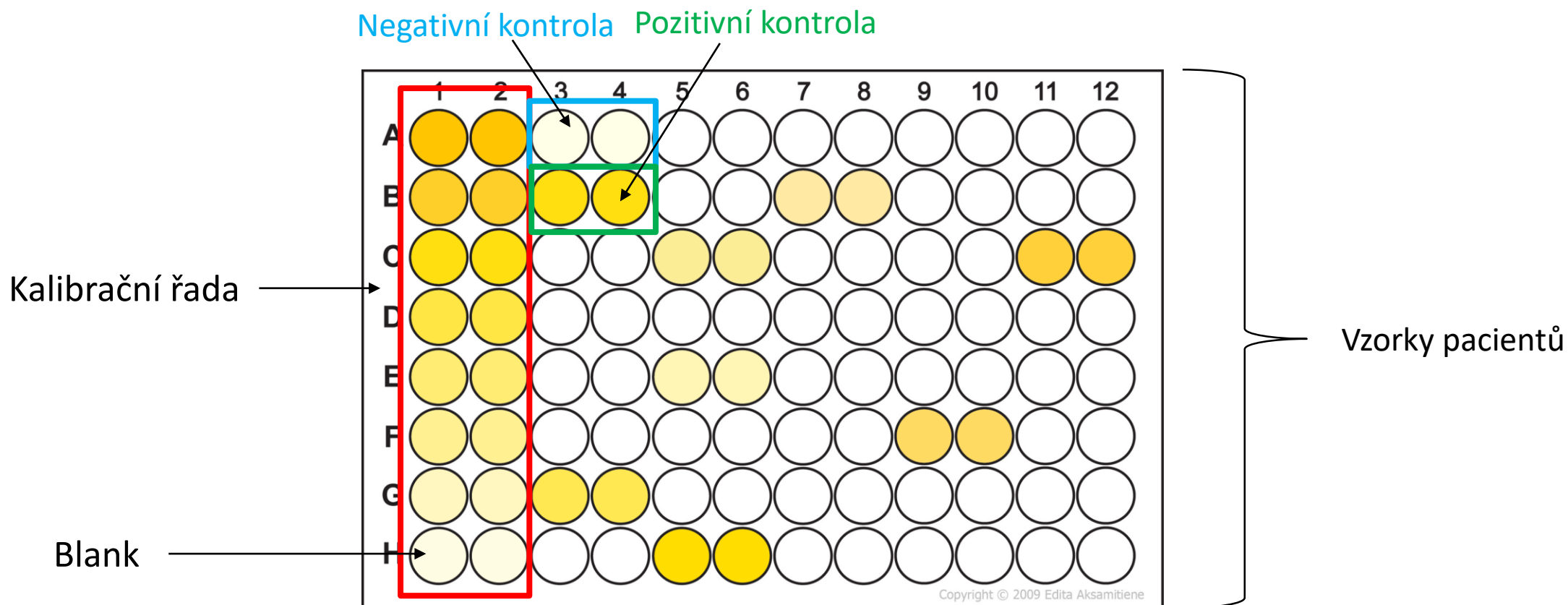
## 2. Semi-kvantitativní

- IP (index positivity) = absorbance vzorku / absorbance cut-off kalibrátoru

## 3. Kvantitativní

- Kalibrační křivka – ředění kalibrátoru o známé koncentraci analytu
- Výsledek (absorbance = OD, optická denzita) se odečítá z kalibrační křivky
- Přepočet absorbance na koncentraci (Lambert-Beerův zákon)
- Výsledek má číselnou hodnotu s udanými jednotkami (např. U/ml, ug/ml)

# Hodnocení výsledků - kvantitativní



# Využití ELISA v imunologii

---

- **Antiinfekční imunita**
  - Stanovení protilátek proti některým infekčním agens
- **Autoimunitní onemocnění**
  - Stanovení autoprotilátek

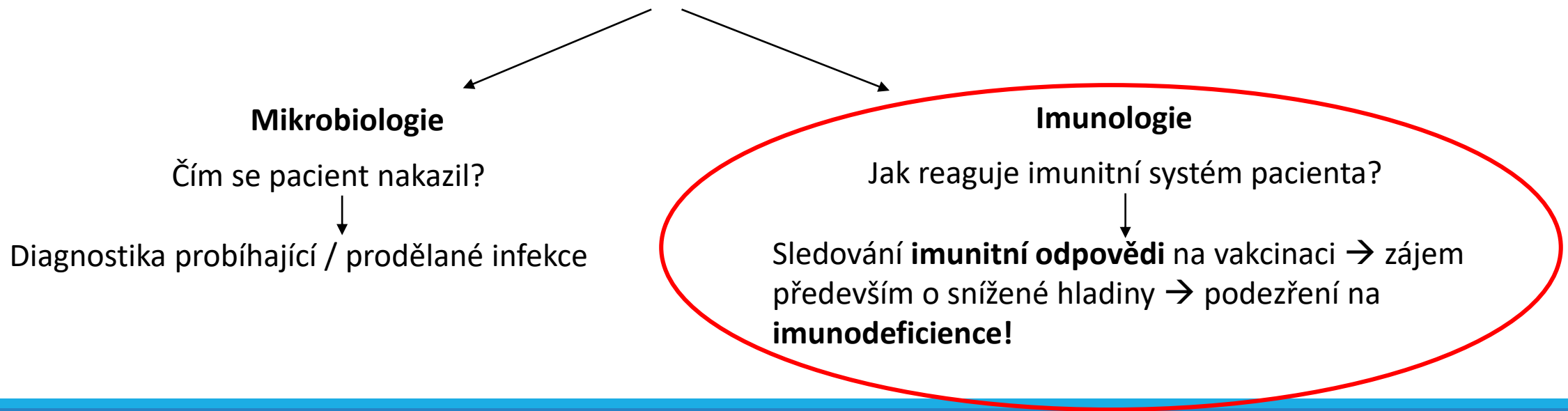


# ELISA a antiinfekční imunita

- Stanovení přítomnosti protilátek proti vybraným infekčním agens

- Protilátky proti tetanickému toxoidu
- Protilátky proti difterickému anatoxinu
- Protilátky proti kapsul. antigenu *Haemophilus influenzae typ b*
- Protilátky proti specifickému pneumokokovému kapsulárnímu polysacharidu (anti-PCP)

Očkování



# ELISA stanovení autoprotilátek u autoimunitních onemocnění

---

- Anti-dsDNA - Systémový lupus erythematosus -SLE
- **ENA** – proti extrahovatelným nukleárním antigenům (SS-A, SS-B, Jo1 ....)
- Proti bazální membráně glomerulů – autoimunitní glomerulonefritidy
- Proti cyklickým citrulinovaným peptidům – RA
- Proti tkáňové transglutamináze – celiakie
- Proti tyrosin fosfatáze, dekarboxyláze kys. Glutamové – DM I
- Anti-LC - proti antigenu jaterního cytosolu typu 1 (autoimunitní hepatitidy)
- Anti-TTG –proti tkáňové transglutamináza (celiakie)
- Anti-TG-tyreoglobulin, anti-TPO-tyreoidální peroxidáza (tyreoitidy)
- RF – proti Fc molekule IgG (revmatoidní artritida, Sjogren sy.)
- ASCA – proti *Sacharomyces cerevisiae* (Crohnova choroba) – pozor, není to auto-Ab!

# Hodnocení výsledků

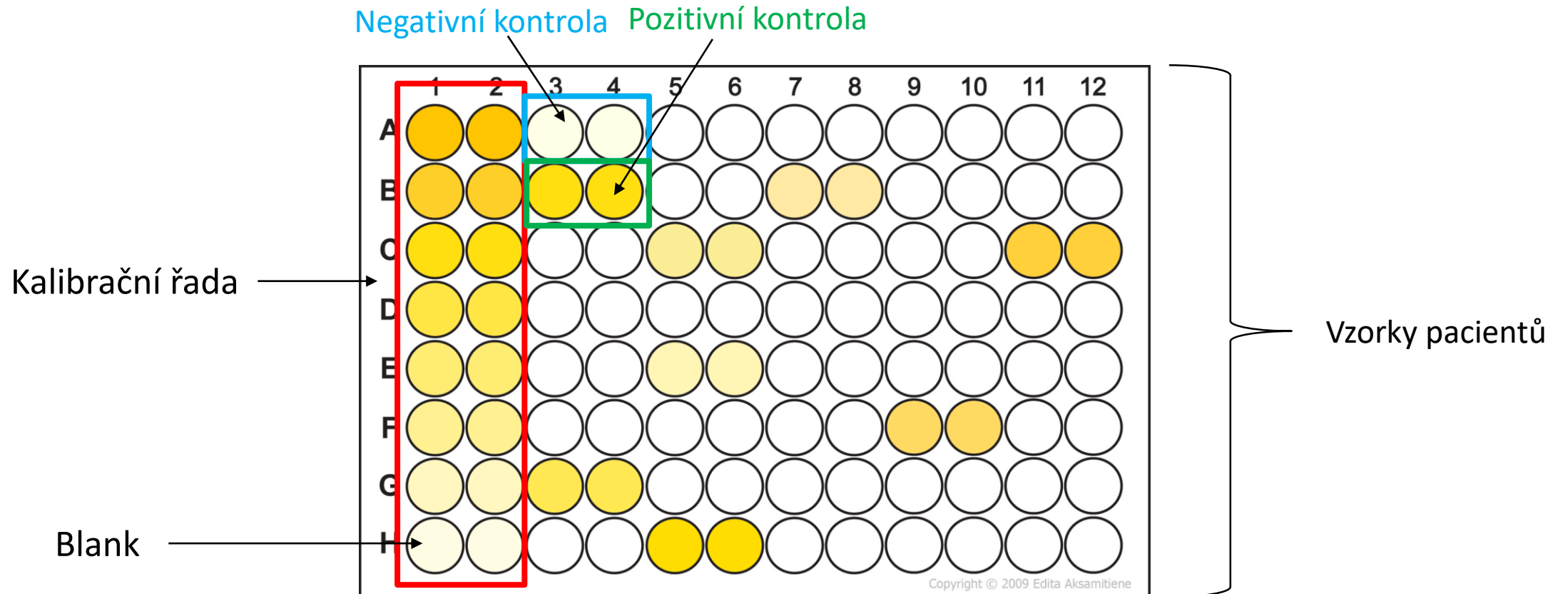
---

- V klinické laboratoři existuje určitá hierarchie hodnocení výsledků
- Podílí se na něm laborant i VŠ pracovník
- **Vždy se hodnotí zároveň papírový výsledek s ELISA deskou**

## 1. fáze kontroly – zdravotní laborant

- Vizuální kontrola desky –zbarvení
- Vizuálně hodnotí, zda se naměřená absorbance (barva jamek) shoduje s výsledky na papíře (pozitivní pacienti – shodují se souřadnice jamek na desce se souřadnicemi v tištěných výsledcích?)
  - ANO – kontrola pokračuje do další fáze
  - NE – hledáme příčinu (záměna desky)

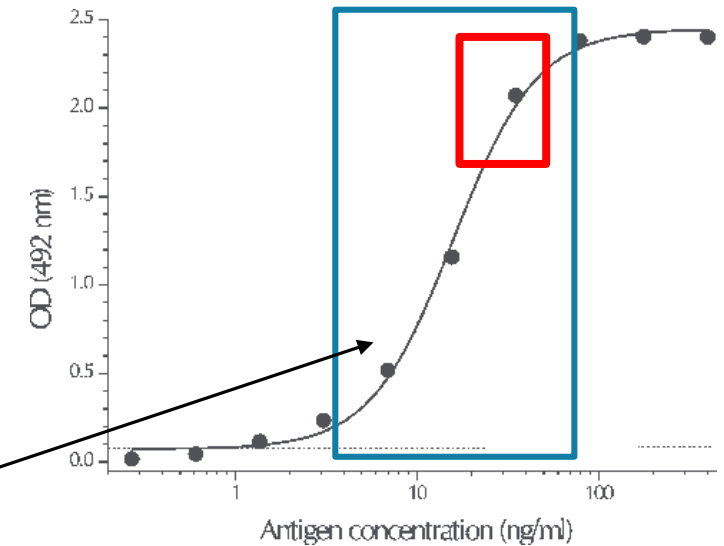
# Hodnocení výsledků



# Hodnocení výsledků

## 2. fáze kontroly – VŠ pracovník

- Vizuální kontrola desky
  - Není zbarvení celé desky moc tmavé nebo světlé? – uměle zvýšené či snížené naměřené hodnoty vzhledem ke kalibrační křivce
  - Není v některých jamkách sraženina / nečistota – uměle pozitivní výsledky?
- Hodnocení s tištěnými výsledky – kontrola kalibrace:
  - Kontrola průběhu kalibrační křivky
  - Kontrola jednotlivých bodů – není některý výrazně mimo?
  - **Pozitivní kontrola – leží v rozmezí, které udává výrobce?**
  - Pozitivní vzorek pacienta – souhlasí poloha na desce s papírovým výsledkem?



Ideální reálná kalibrační křivka – zploštění u nízkých koncentrací a vysokých koncentrací – koncentrace zkoumaného analytu v séru by měla ležet ve vyznačené přímkovém úseku

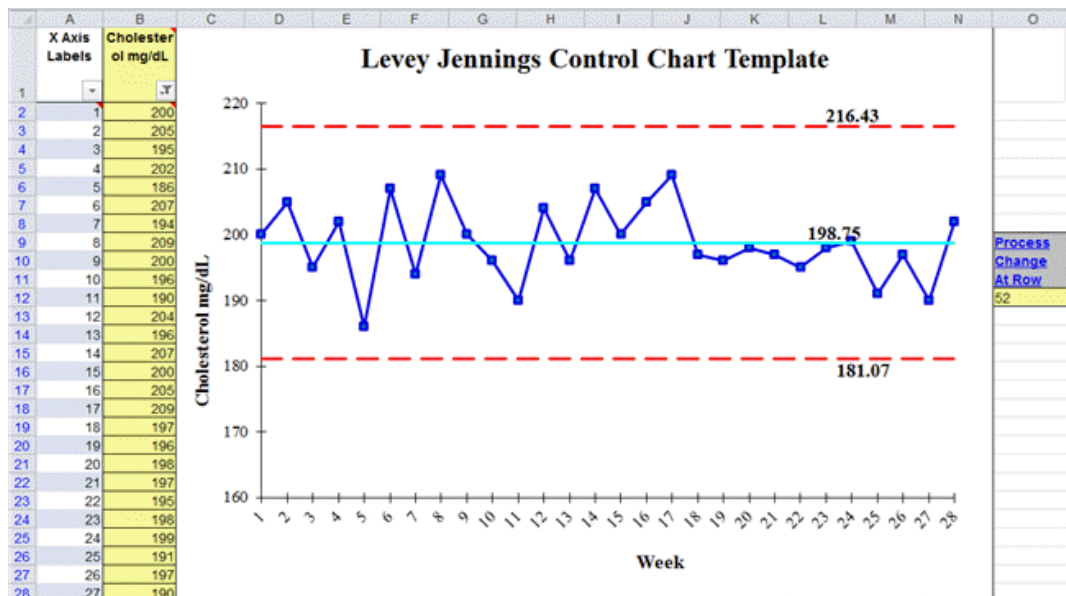
# Hodnocení výsledků

---

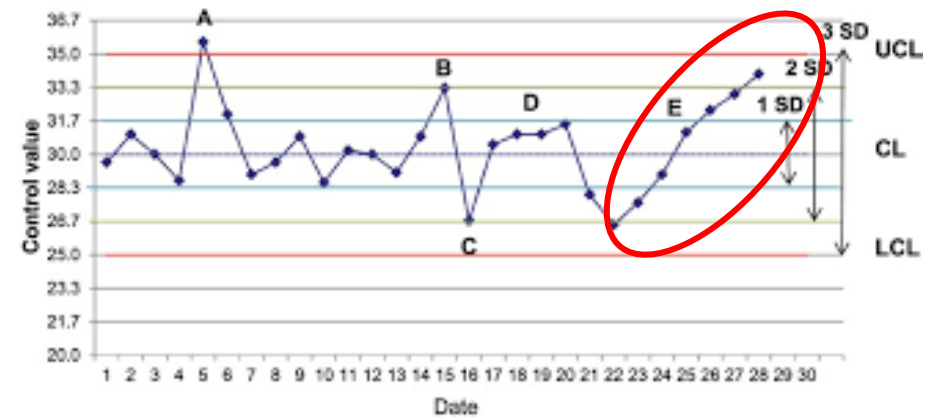
- Pokud nevyšly kontroly, musí se hledat příčina:
  - Máme tu správnou desku? Na jakém programu byla změřena? Jaká je šarže kontrol (mohlo nedávno dojít ke změně)
- Pokud pozitivní kontrola vyšla příliš vysoká/nízká:
  - Všímáme si rozsahu kalibrace – měla by být co nejširší – od velmi nízkých hodnot absorbance až po vysokou
  - Zjišťujeme, jak vypadala předchozí měřená kalibrace u minulého zpracování testu
  - Kontrola pozitivních pacientů se záznamy v LISu (pokud již pacient byl dříve vyšetřen a aktuálně změřený výsledek se shoduje s jeho historií, je pravděpodobně špatně pouze kontrola):
    - Možná chyba ředění laborantky
    - Kontrola lahvičky – set, šarže

# Hodnocení výsledků

- Výsledky měření kontrol se dlouhodobě zaznamenávají v čase – interní kontrola kvality
  - Levey-Jenningsův diagram → Westgardova pravidla
  - Varovné a regulační meze



Stoupající nebo klesající trend může například značit expiraci setu, „zahušťování“ pozitivní kontroly, vadu spektrofotometru....



# Hodnocení výsledků

---

- Pokud nevyjde kalibrace a kontroly – nutno vyšetření opakovat
- Pokud je vše v pořádku – VŠ výsledek ELISY podepíše (přebírá za ně odpovědnost)

## 3. Fáze kontroly

- Přepis výsledků ELISA do pracovního listu
- Přepisování výsledků z pracovního listu do systému (POZOR na překlepy)

## 4. Fáze kontroly - VŠ

- Ve chvíli, kdy má pacient všechna požadovaná vyšetření hotová, provádí se validace výsledků
- VŠ v počítači kontroluje, zda výsledky dávají logický smysl
- Seznam výsledků, které je nutno okamžitě hlásit lékaři abnormální hodnoty– VŠ mu vysvětluje, co to znamená – možnost ovlivnění léčby pacienta
- Uvolnění výsledků – tzn. propuštění výsledků počítačovým systémem pro tisk



# Hodnocení výsledků

---

## 5. Fáze kontroly – VŠ

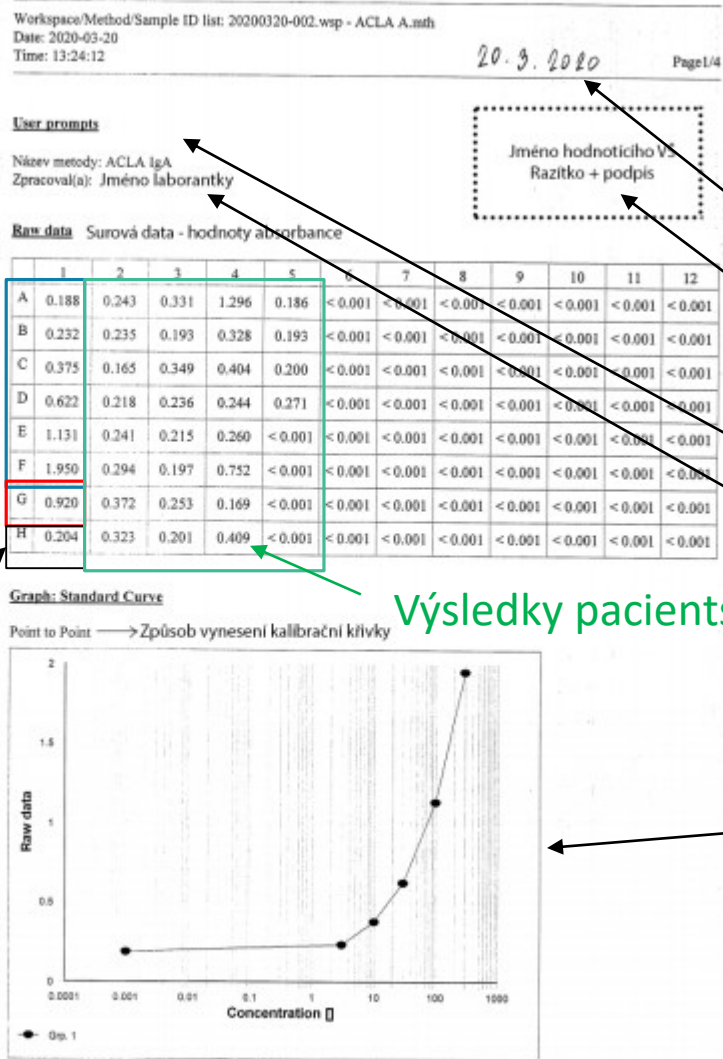
- Zvalidované a uvolněné výsledky pacienta se tisknou v papírové podobě
- Expedice výsledků – VŠ, který výsledky uvolnil opět kontroluje tyto výsledky pacienta v papírové podobě →
  - Není ve výsledcích něco podezřelého?
  - Nezapomnělo se na žádné vyšetření?
- Po expedici výsledků do nich může přes počítačový systém nahlédnou ošetřující lékař dané nemocnice - před tímto krokem mohou výsledky“ vidět pouze pracovníci laboratoře
- Tištěné výsledky opouštějí pracoviště a putují k ošetřujícímu lékaři

# Hodnocení výsledků

---

- VŠ svým podpisem odpovídá za výsledky!
- O každé fázi zpracování vzorků a kontrol musí existovat záznam – kdo, kdy
  - Razítka, podpisy
  - V PC – laboratorní pracovník zapisuje pod svým jménem
- VŠ také ovlivňuje laboratorní pracovníky – měl by si všímat nálady na pracovišti, motivovat lidi, aby se nebáli přiznat chybu
- Jde o zdraví lidí, zatajování chyb nepřichází v úvahu

# Příklad ELISA ACLA - kvantitativně



Kalibrace

Pozitivní k.

Negativní k.

Výsledky patientských vzorků

- Výsledky ELISY z readru
- **Metoda ACLA** - protilátky proti kardiolipinu při vyšetření **antifosfolipidového syndromu**
- Výtisk obsahuje:
  - hodnoty absorbance
  - musí být uvedeno datum provedení testu
  - musí být uvedeno, kdo test hodnotil – jméno VŠ
  - musí být uveden název testu
  - musí být uvedeno, kdo daný test zpracovával = jméno laborantky
  - Kalibrační křivka
- Dále hodnoty absorbance pro jednotlivé vzorky a přepočítání na koncentraci dle kalibrační křivky (není vyobrazeno)

# Příklad ELISA ACLA – kvantitativně, pokračování

Výsledek z readeru dále obsahuje:

- Naměřené hodnoty absorbancí jednotlivých vzorků, kalibrací a kontrol
- Přiřazené hodnoty koncentrací
- Označení jednotlivých jamek
- Záznam mezí koncentrací ve kterých by se měla pohybovat pozitivní kontrola

Hodnoty kalibrace

Sloupec 1  
Hodnoty  
absorbance

Sloupec 2  
Hodnoty  
koncentrací

Výsledky kontrol

Označení  
jednotlivých  
jamek

Workspace/Method/Sample ID list: 20200120-002.wsp - ACLA A.mth  
Date: 2020-03-20  
Time: 13:24:12  
Page 2/4

1 Raw data

	2 Single conc. (	
	1	2
A1	0.188	< 0.001
B1	0.232	3.000
C1	0.375	10.000
D1	0.622	30.000
E1	1.131	100.000
F1	1.950	300.000
G1	0.920	60.700
H1	0.204	0.018
A2	0.245	3.291
B2	0.235	3.077
C2	0.165	<Min
D2	0.218	0.235
E2	0.241	3.236
F2	0.294	5.056
G2	0.372	9.751
H2	0.323	6.454
A3	0.331	6.904
B3	0.193	0.002
C3	0.349	8.034
D3	0.236	3.103
E3	0.215	0.136
F3	0.197	0.005
G3	0.253	3.580
H3	0.201	0.011
A4	1.296	124.774
B4	0.328	6.732
C4	0.404	11.377
D4	0.244	3.319
E4	0.260	3.798
F4	0.752	40.801
G4	0.169	<Min
H4	0.409	11.633
A5	0.186	<Min
B5	0.193	0.002
C5	0.200	0.009

Magellan V 6.5

# Příklad ELISA ACLA – kvantitativně, pokračování

Na záznam z ELISA readeru navazuje  
výsledková listina, kde musí být  
uvedeno:

Název testu

Datum provedení

Kdo zpracoval – jméno laborantky

Souřadnice kalibrátorů, kontrol a vzorků  
pacientů

Např. Sérum pacienta č.9 bylo v jamce  
A9 a zjištění koncentrace ACLA  
protilátek byla 6 APL/ml

Strana 1 z 2 20.03.2020 9:57:41

Pracovní list I\_ACLAA Ústav klinické imunologie a alergologie  
Oddělení laboratorní imunologie

Datum provedení: 20.3.2020 Vyhodnotil: Jméno hodnotícího VS

Zpracoval: Jméno laborantky (razítko + podpis) Jednotky: APL/ml

Sarže: 19290 Sarže: \_\_\_\_\_  
Exp: 6/2021 Exp: \_\_\_\_\_  
Datum dodávky: 11.3.2020 Datum dodávky: \_\_\_\_\_

Údaje o použitém ELISA kitu

Souřadnice kalibrátorů → A1-F1  
Souřadnice + kontroly → G1-K1  
Souřadnice - kontroly → H1-L1

Pacient	Výsledek vyšetření (jednotky APL/ml)
1 PAC 1 [18.11.19 0] 3	3
2 PAC 2 [18.03.19 0] 3	3
3 PAC 3 [---] 0	0
4 PAC 4 [05.02.19 0] 0	0
5 PAC 5 [18.11.19 0] 3	3
6 PAC 6 [---] 5	5
7 PAC 7 [30.09.19 2] 9	9
8 PAC 8 [28.01.20 0] 6	6
3/4 9 PAC 9 [13.02.17 3] 6	6
10 PAC 10 [---] 0	0
11 PAC 11 [---] 1	1
12 PAC 12 [---] 3	3
13 PAC 13 [---] 0	0
14 PAC 14 [---] 0	0
15 PAC 15 [---] 3	3
16 PAC 16 [---] 0	0
4/4 17 PAC 17 [---] 124	124
18 PAC 18 [---] 6	6

Souřadnice vzorků pacientů → B1-L1

Strana 1 z 2 20.03.2020 9:57:41

Pracovní list <b>L_ACLAA</b>		Ústav klinické imunologie a alergologie Oddělení laboratorní imunologie
Datum provedení: <u>20.3.2020</u>		Vyhodnotil:
Zpracoval: Jméno laborantky (razítko + podpis)		Jméno hodnotičiho VŠ
		Jednotky: <u>APL/ml</u>

Souřadnice kalibrátorů → <u>H<sub>1</sub>-F<sub>1</sub> cal.</u>	Sarže: <u>19290</u>	Sarže: _____
Souřadnice + kontroly → <u>G<sub>1</sub>-K+</u>	Exp: <u>6/2021</u>	Exp: _____
Souřadnice - kontroly → <u>H<sub>1</sub>-K-</u>	Datum dodávky: <u>11.3.2020</u>	Datum dodávky: _____

Údaje o použitém ELISA kitu

Pacient	Výsledek vyšetření (jednotky APL/ml)
<u>2/</u> A 1 PAC 1 [18.11.19 01] <u>3</u>	
B 2 PAC 2 [18.03.19 01] <u>3</u>	
C 3 PAC 3 [---] <u>0</u>	
D 4 PAC 4 [05.02.19 01] <u>0</u>	
E 5 PAC 5 [18.11.19 01] <u>3</u>	
F 6 PAC 6 [---] <u>5</u>	
G 7 PAC 7 [30.09.19 21] <u>9</u>	
H 8 PAC 8 [28.01.20 01] <u>6</u>	
<u>3/</u> A 9 PAC 9 [13.02.17 31] <u>6</u>	
B 10 PAC 10 [---] <u>0</u>	
C 11 PAC 11 [---] <u>1</u>	
D 12 PAC 12 [---] <u>3</u>	
E 13 PAC 13 [---] <u>0</u>	
F 14 PAC 14 [---] <u>0</u>	
G 15 PAC 15 [---] <u>3</u>	
H 16 PAC 16 [---] <u>0</u>	
<u>4/</u> A 17 PAC 17 [---] <u>124</u>	
B 18 PAC 18 [---] <u>6</u>	

Souřadnice vzorků pacientů

# Příklad ELISA ACLA– kvantitativně, pokračování

Na záznam z ELISA readeru navazuje výsledková listina, kde musí být uvedeno:

Kde byl výsledek zpracován

Kdo hodnotil

Údaje o použité ELISA kitu

Vyhodnocení koncentrací pro jednotlivé pacienty

## Příklad č. 2 LKM

### autoprotilátky proti mikrozomům jater a ledvin Semikvantitativní hodnocení – index positivity

Workspace/Method/Sample ID list: 20200219-002.wsp - 450\_IP.mth  
Date: 2020-02-19  
Time: 11:44:17  
Page 1/1

#### User prompts

Název metody: LKM  
Zpracoval(a): Jméno laborantky

Jméno hodnotícího VŠ  
Razítko + podpis

#### Raw data Surová data - absorbance

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.069	0.115	0.118	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
B	0.857	0.118	0.144	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
C	0.442	0.129	0.158	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
D	0.294	0.092	0.093	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
E	0.591	0.096	0.126	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
F	0.104	0.116	0.128	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
G	0.109	0.100	0.113	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
H	0.091	0.124	0.112	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

#### IP Index positivity - přepočet z hodnot absorbance

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.156	0.260	0.267	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
B	1.939	0.267	0.326	< 0.001	< 0.001	0.002	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
C		0.292	0.357	< 0.001	< 0.001	0.002	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
D	0.665	0.208	0.210	< 0.001	< 0.001	0.002	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
E	1.337	0.217	0.285	< 0.001	< 0.001	0.002	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
F	0.235	0.262	0.290	< 0.001	< 0.001	0.002	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
G	0.247	0.226	0.256	< 0.001	< 0.001	0.002	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
H	0.206	0.281	0.253	< 0.001	< 0.001	0.002	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

vzorky jednotlivých pacientů

Negativní k.

Pozitivní k.

Cut-off kalibrátory

Výsledky patientských vzorků

Výsledky ELISY z readeru

- Metoda LKM - autoprotilátky proti mikrozomům jater a ledvin při vyšetření **autoimunitních hepatitid**
- Výtisk obsahuje:
  - Název metody
  - Jméno laborantky, která metodu zpracovala
  - Jméno VŠ pracovníka, který hodnotil výsledky
  - Naměřená surová data (absorbance) kontrol, kalibrátorů a vzorků pacientů
  - Vypočtené indexy positivity na základě poměru absorbací vzorků a kalibrátoru

Pracovní list	I_LKM	Ústav klinické imunologie a alergologie Oddělení laboratorní imunologie
Datum provedení:	19.2.20	Vyhodnotil:
Zpracoval:	Jméno odpovědné laborantky Razítko + vlastnoruční podpis	Jméno odpovědného VŠ

1A: K- Negat. kontrola  
 B: K+ Pozit. kontrola  
 C: 00 Kalibrátor 0  
 D: 0,000 Kal. 10  
 E: 0,30

Sarže: 18500  
 Exp: 12/20  
 Datum dodávky: 12.11.19

Jednotky: 17  
 Jednotky - zde  
 Index Pozitivity (IP)

Pacient (Jméno, RC, laboratorní číslo)

Pacient	Index pozitivity	Údaje o použitém ELISA kitu
F 1 PAC 1	0,255	
G 2 PAC 2	0,247	
H 3 PAC 3	0,206	
2A 4 PAC 4	0,260	
B 5 PAC 5	0,267	
C 6 PAC 6	0,292	
D 7 PAC 7	0,208	
E 8 PAC 8	0,217	
F 9 PAC 9	0,212	
C 10 PAC 10	0,226	
H 11 PAC 11	0,281	
3A 12 PAC 12	(23,01,18 0,272) 0,267	
B 13 PAC 13	0,326	
C 14 PAC 14	0,357	
D 15 PAC 15	0,210	
E 16 PAC 16	0,215	
F 17 PAC 17	0,290	
G 18 PAC 18	0,256	

## Příklad č. 2 LKM

### autoprotilátky proti mikrozomům jater a ledvin

### Semikvantitativní hodnocení – index pozitivity

Na záznam z ELISA readeru navazuje výsledková listina, kde musí být uvedeno:

- Kde byl výsledek zpracován
- Kdo hodnotil
- Údaje o použité ELISA kitu
- Souřadnice kontrol a kalibrátorů
- Vyhodnocení koncentrací pro jednotlivé pacienty



# System vyšetření autoprotilátek

---

- ELISA kity velice drahé – cca 10 tisíc
- Např. stanovení ENA – obsáhlá skupina autoprotilátek proti extrahovatelným nukleárním antigenům
- Vyšetření probíhá ve dvou fázích:
  1. screening ENA: je pacient pozitivní na ENA? → ANO / NE
  2. Pokud ANO – teprve se nasazuje na ELISU, která určí podtyp ENA (SS-A, SS-B, Jo1, Scl-70, SM, ...)

# Další metody vyšetření autoprotilátek

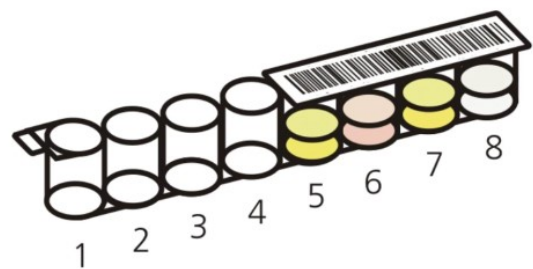
---

1. Imunofluorescence – samostatná přednáška
2. **Přístrojová ELISA – analyzátor Alegria**
3. **Chemiluminiscence – analyzátor Isys**
4. **Imunoblot**



# Analyzátor Alegria

## Princip – ELISA na stripech – stanovení autoprotilátek



Jamka 1 a 2: prázdné, určené k ředění vzorku

Jamka 3 a 4: pokryté antigenem

Jamka 5: pozitivní kontrola (obsahuje hledanou autoprotilátku)

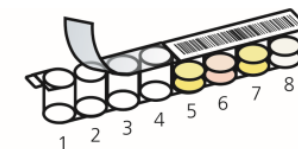
Jamka 6: křenovou peroxidázou označená anti-lidská IgM/G/A

Jamka 7: ředící pufr

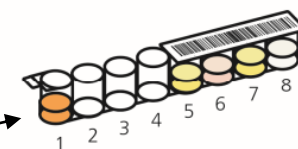
Jamka 8: TMB substrát (tetra-methyl-benzidin)

Stačí pouze odtrhnout alobal z prvních 4 jamek a do první z nich napipetovat pacientovo sérum (10ul) → analyzátor provede ELISU sám

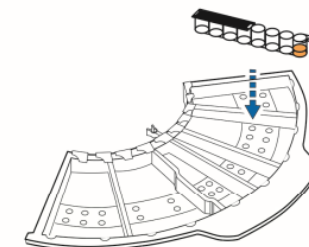
1



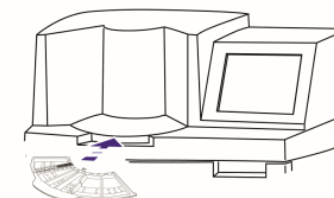
2



3



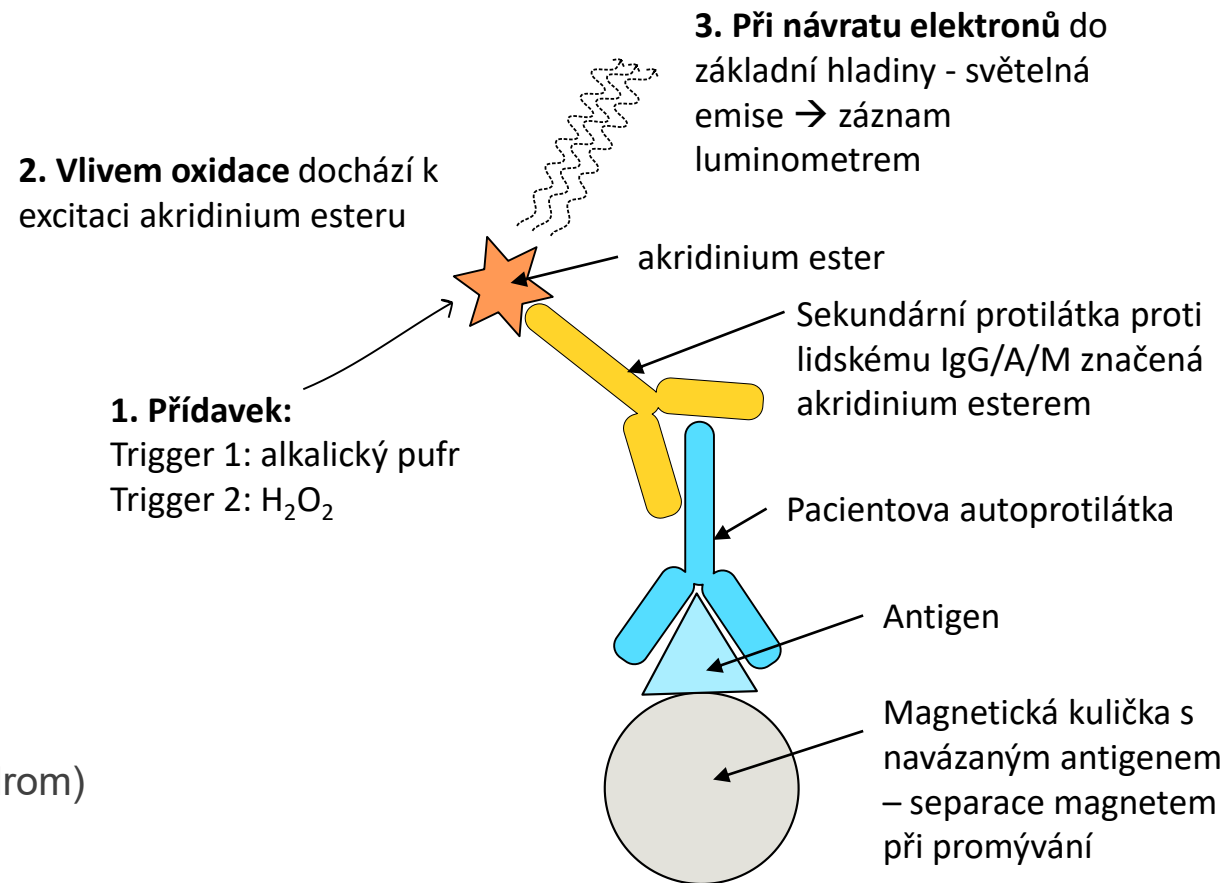
4





# Analyzátor Isys

- Princip – chemiluminiscence
- Pevná fáze – magnetické kuličky
- Měření světelné emise která vzniká chemickou reakcí
- Extrémní citlivost
- Signál úměrný koncentraci auto-Ab ve vzorku
- V naší laboratoři:
  - Stanovení ENA (screening + jednotlivé antigeny)
  - TTG – IgA a IgG (celiakie)
  - dsDNA – IgG (SLE)
  - ACLA – kardiolipin – IgM a IgG (antifosfolipidový syndrom)



# ENA

---

- Extrahovatelné nukleární (jaderné) antigeny
- Mají vyšší Mr – lze je extrahovat
  - 1) Screening – vytipují se ti pacienti, kteří jsou pozitivní na ENA (obecně)
  - 2) Nasazení pozitivních vzorků na podtypy ENA:
    - **Sci-70** (antigen je DNA topoizomeráza I ) – systémová sklerodermie
    - **Smith (Sm)** – pozitivní anti-Sm u části pacientů se SLE (systémový lupus erythematoses)
    - **SSA/SSB** – Sjögrenův syndrom
    - **U1-snRNP** (ribonukleoprotein účastní se alternativního sestřihu mRNA) – smíšené onemocnění pojiva
    - **Jo-1** (antigenem je tRNA syntetáza) – polymyositida, dermatomyositida

### Systémová sklerodermie

Vlivem autoimunitní zánětlivé reakce (Th2 + Th17) se nadměrně tvoří kolagen – sklerotizace pokožky i vnitřních orgánů



### Sjögrenův syndrom

Vlivem autoimunitní zánětlivé reakce dochází k poškození slinných a slzných žláz → suchost očí, suchost v ústech



### Smíšené onemocnění pojiva

Překryvný syndrom – SLE+RA+systémová sklerodermie+polymyositida

Na obrázku Raynaudův fenomén – záchvatovitá bledost prstů – porucha cirkulace

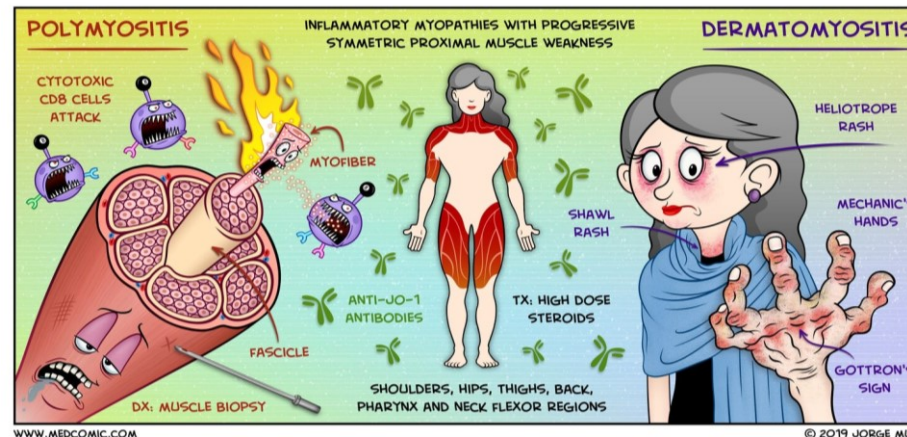


### SLE

Alterovaná apoptóza – tvoří se autoprotilátky proti antigenům jádra → imunokomplexy → poškození tkání (na obrázku motýlí exantém v obličeji)



**Polymyositida** – poškození svalů CD8 T-lymfocyty - bolesti  
**Dermatomyositida** – poškození svalových kapilár komplementem → mikroinfarkty svaloviny (klinika- exém nad klouby rukou a fialová vyrážka kolem očí)



# Imunoblot

---

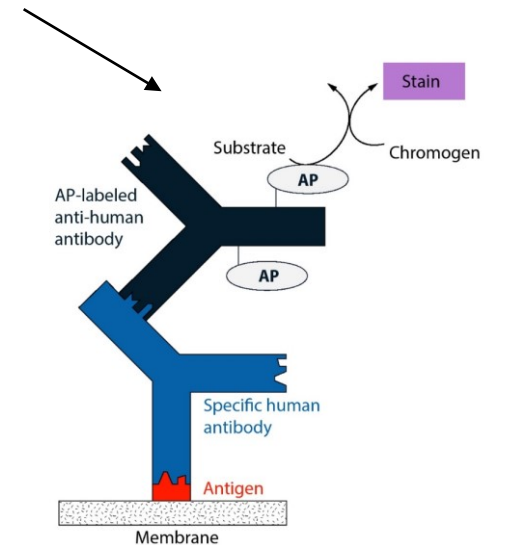
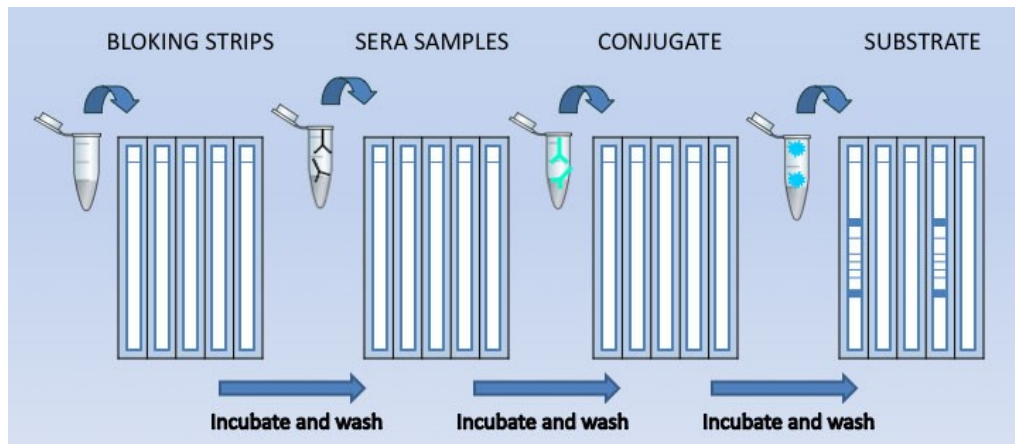
- Příprava blotů (probíhá u výrobce):
  - Proteiny (např. jaderné) elektroforeticky rozděleny v gelu – přenos (otisk) na nitrocelulózovou membránu - urychlení elektrickým proudem (elektroblotting)
  - Membrána je následně rozstříhána na jednotlivé diagnostické proužky
  - každý protein má na proužku definovanou polohu
  - Výrobce dodá i šablonu, kde jsou polohy jednotlivých proteinů zobrazeny
  - Výrobce tyto proužky společně se šablonou prodává laboratořím - kity



# Imunoblot

## ○ Princip stanovení:

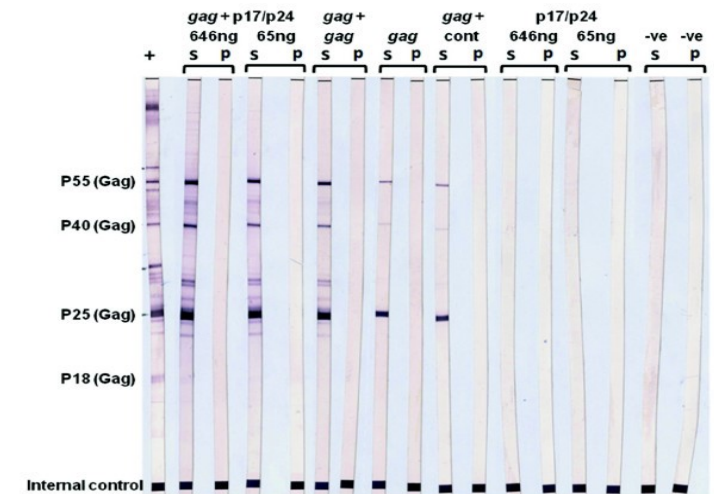
- Nejprve se musí zablokovat strip inertní bílkovinou (hovězí albumin) – zabrání se nespecifické vazbě protilátek ze séra na strip!
- Pokud je autoprotilátka proti určitému proteinu přítomna v séru pacienta, naváže se na tento protein imobilizovaný na stripu, dochází k imunoprecipitaci
- Detekce vazby autoprotilátky pomocí detekčních sekundárních protilátek značených **enzymem**
- Po přidavku substrátu jej enzym přemění na **barevný produkt**
- Výsledkem je vznik barevného proužku na stripu = pozitivita





# Imunoblot

- Jednotlivé barevné proužky se porovnávají s kontrolní šablonou
- Odečet vizuálně nebo denzitometricky (% positivity)
- Imunoblotem se vyšetřují pacienti, u kterých **nebyly** detekovány imunofluorescenčně či ELISOU autoprotilátky při přetrvávajících klinických příznacích
- Diagnostika – např. **roztroušená skleróza**



# Problémy při stanovení autoprotilátek

---

- Při použití různých metodik mohou být někteří pacienti negativní i když onemocněním trpí, např.
    - Pacient je na určitou autoprotilátku negativní na imunofluorescenci, na ELISE, ale pozitivní na imunoblotu
    - Nebo
    - Pacient je pozitivní jen na imunofluorescenci ale negativní na ELISE i imunoblotu
- PROČ?
- Různé metody mají **různě ovlivněn cílový antigen** (vliv zpracování), na který se autoprotilátka má vázat, např:
    - Imunofluorescence – použití krysích tkání – antigen se nemusí plně shodovat s lidským – protilátka se nemusí vždy navázat
    - ELISA – vlivem zpracování antigenů na desku může být ovlivněna struktura antigenu
    - Imunoblot – vlivem elektroforézy a elektroblotu může dojít k pozměnění konformace molekuly antigenu která vyústí v neschopnost vazby autoprotilátky
  - Nutnost brát ohled na kliniku pacienta, pokud má typickou symptomatologii ale na určité metodice vyjde negativní, je třeba otestovat autoprotilátky jinou metodikou