



# Imunoanalýza ELISA

---

MGR. JULIE ŠTÍCHOVÁ

FAKULTNÍ NEMOCNICE U SV. ANNY V BRNĚ

ÚSTAV KLINICKÉ IMUNOLOGIE A ALERGOLOGIE

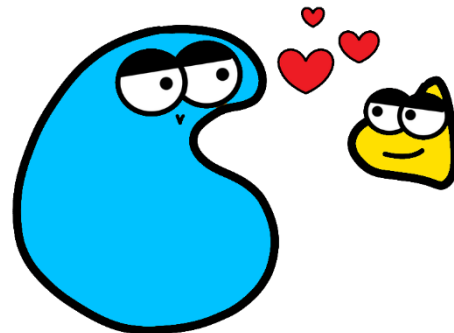
# Imunoanalytické metody

---

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

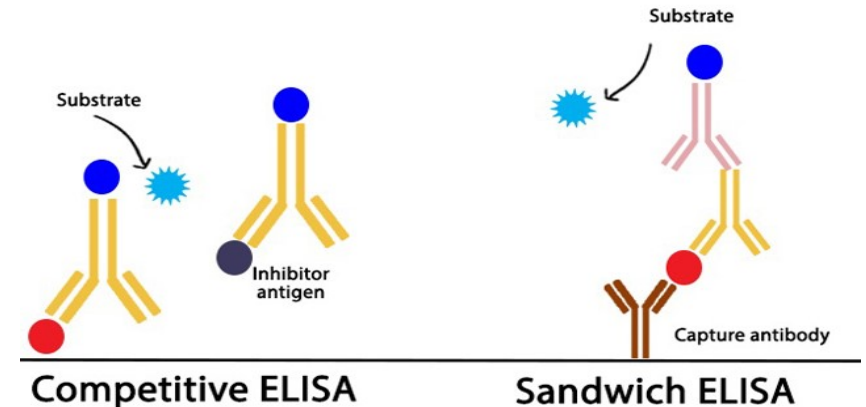
# Imunoanalytické metody

## Heterogenní **kompetitivní**:

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

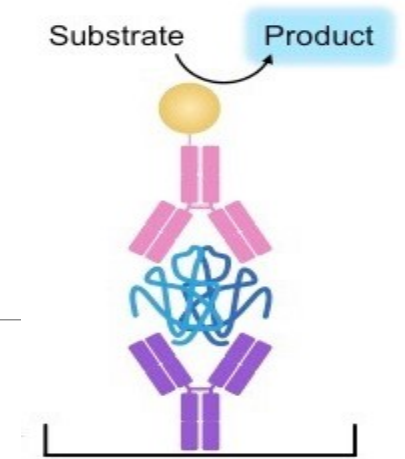
## Heterogenní **nekompetitivní**:

- 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** (tetrametylbenzidin → tetramethylbenzimidin → 450 nm)
    - **Alkalická fosfatáza** (p-nitrofenylfosfát → nitrofenol → 405 nm)
  - Mezi výše uvedenými jednotlivými kroky je vždy tzv. promývání, při kterém se nadbytek reaktantu odstraní přidáním 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

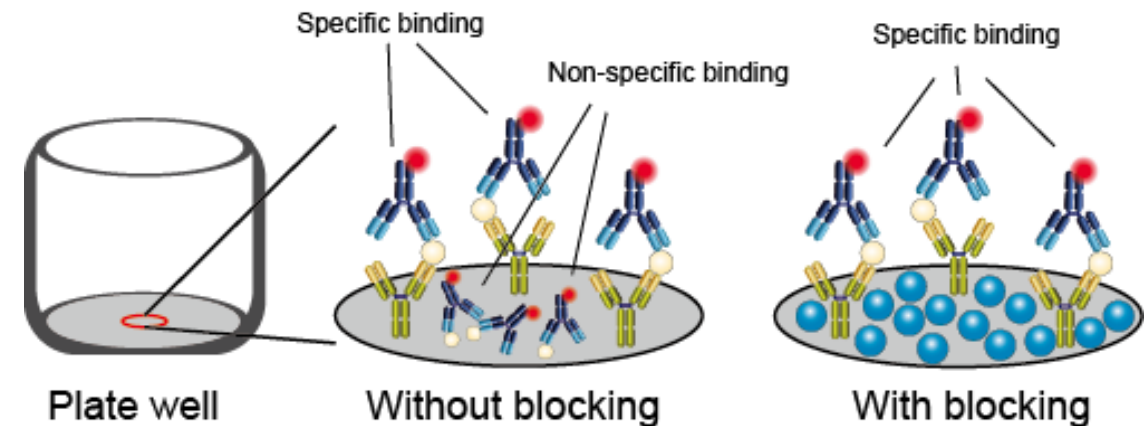
- vazba  $\text{NH}_2$  nebo  $\text{COOH}$  skupin – tvorba kovalentních vazeb s protilátkou nebo antigenem
- Vhodné pro stanovení malých molekul – např. peptidy

### 2. Pasivní adsorpce

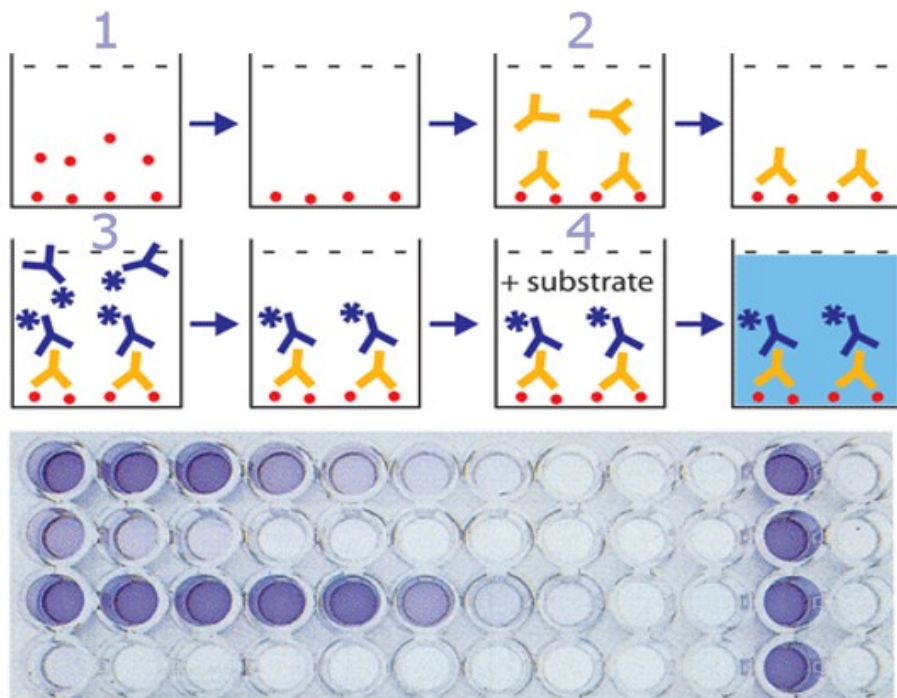
- Hydrofobní interakce mezi nepolárními strukturami proteinu a plastovým povrchem desky
- Protein určený k adsorpci je rozpuštěn v alkalickém **kautovacím pufru** (pH 9,5) – naleptává plastový povrch a usnadňuje adsorpci Ag nebo Ab

## ○ 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 zachytná + detekční Ab

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

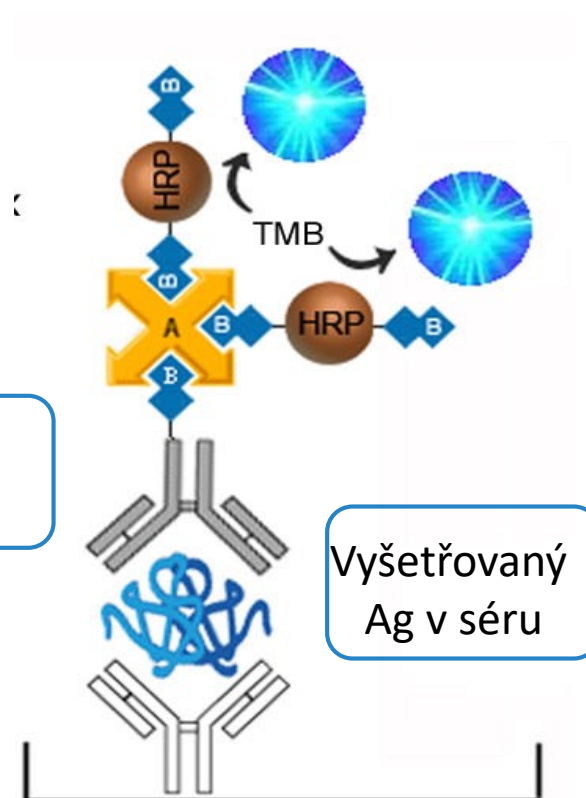
**Tato kombinace významně snižuje riziko zkřížené reaktivity, která by mohla způsobit vznik nespecifických imunokomplexů (zdroj falešné positivity)!!!**

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

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

Detekční protilátka  
humánní, monoklonální

Zachytná protilátka  
myší, polyklonální



# 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** – po přidavku stop činidla (ředěná kyselina sírová) dojde ke změně barvy z modré na žlutou → odečítání absorbance při **450 nm**
- 2, 2'-azinobis(3-ethylbenzthiazol-6sulfonát)
- o-fenylendiamin
- o-dianisidin
- o-toulidin

Pro alkalickou fosfatázu se používá substrát

- 4-nitrofenylfosfát

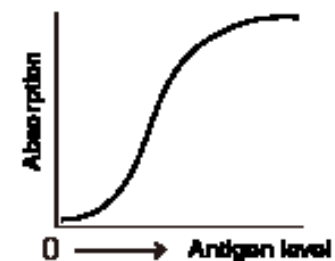
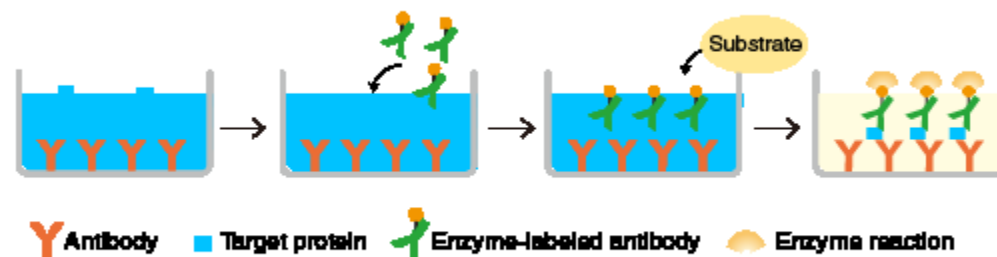
Luminscenční Immunoassay

- Chemiluminscenční substráty – detekce záblesků luminiscence
  - SuperSignal
  - ECL



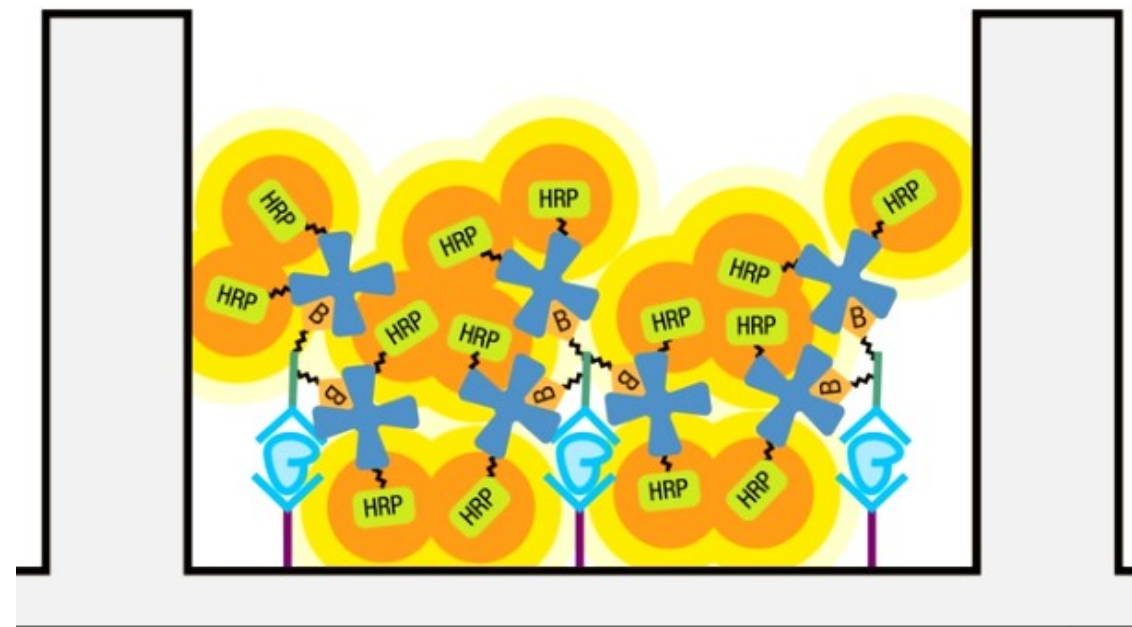
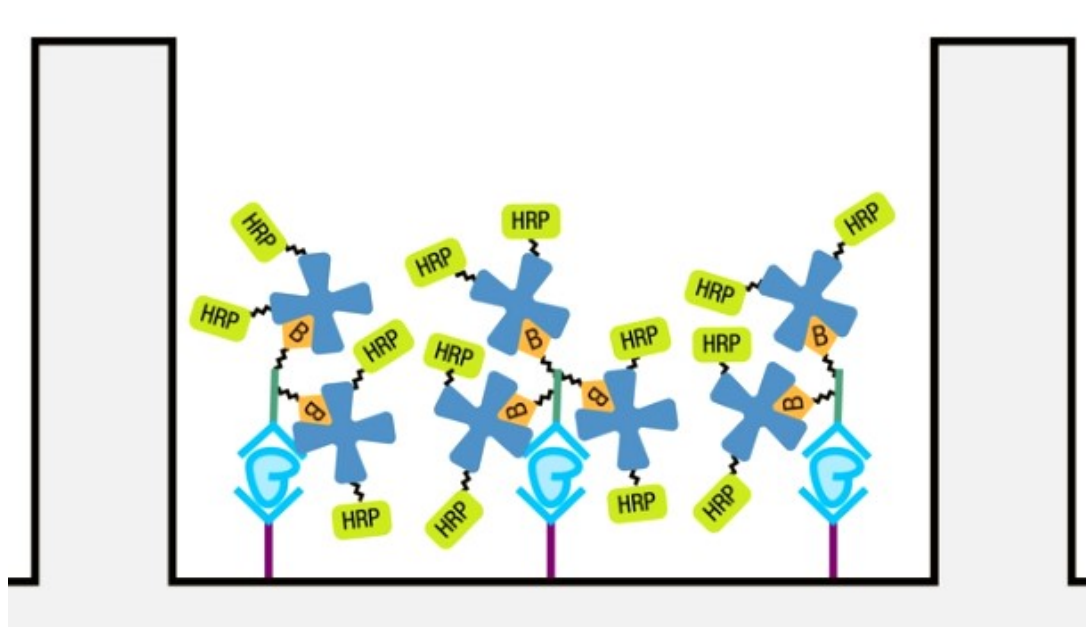
# Sendvičová ELISA - uspořádání

- Použití dvou protilátek specifických na různé epitopy jednoho antigenu.
- Jedna z protilátek je navázána na povrch jamky destičky a vychytává 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

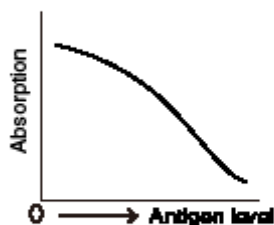
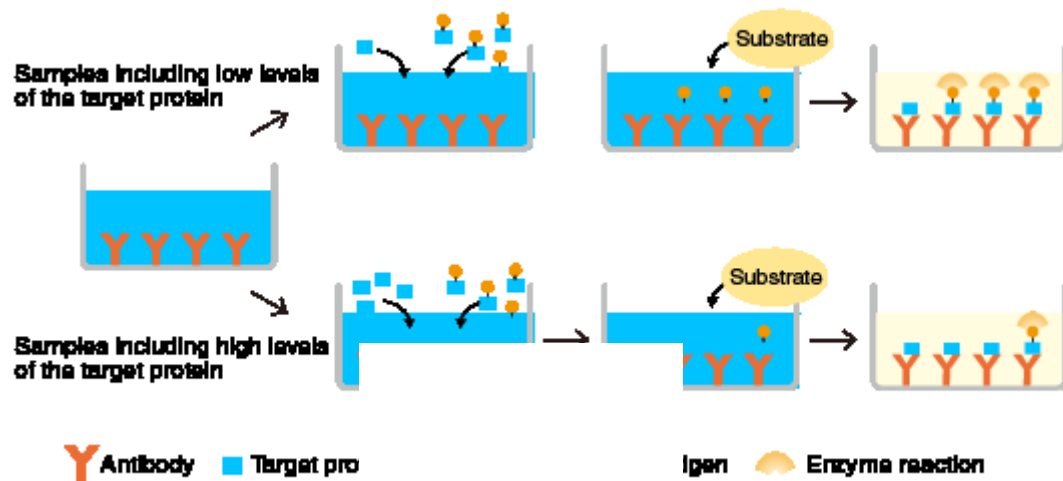


# Sendvičová ELISA – vyšší senzitivita

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



# Kompetitivní ELISA - uspořádání



- 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

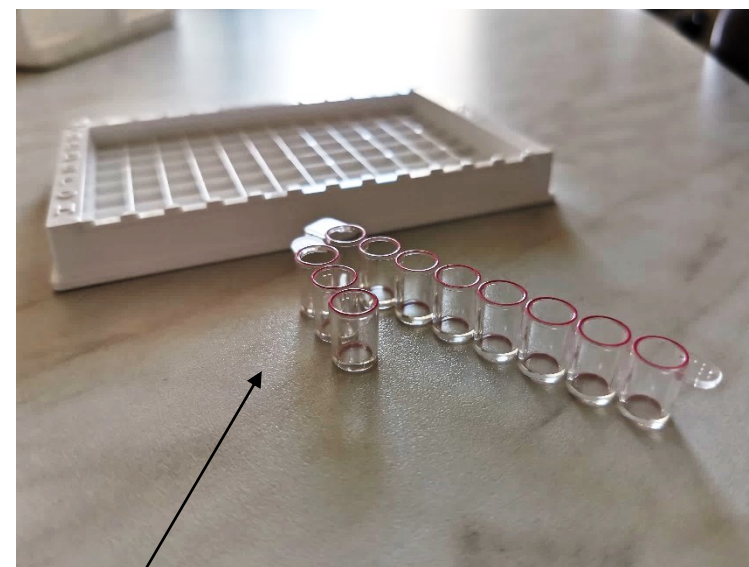
# Komerční ELISA kity

Součástí kitu jsou:

Diluent  
Promývací roztok  
Konjugát  
Substrát  
Stop činidlo

Negativní kontrola  
Pozitivní kontrola

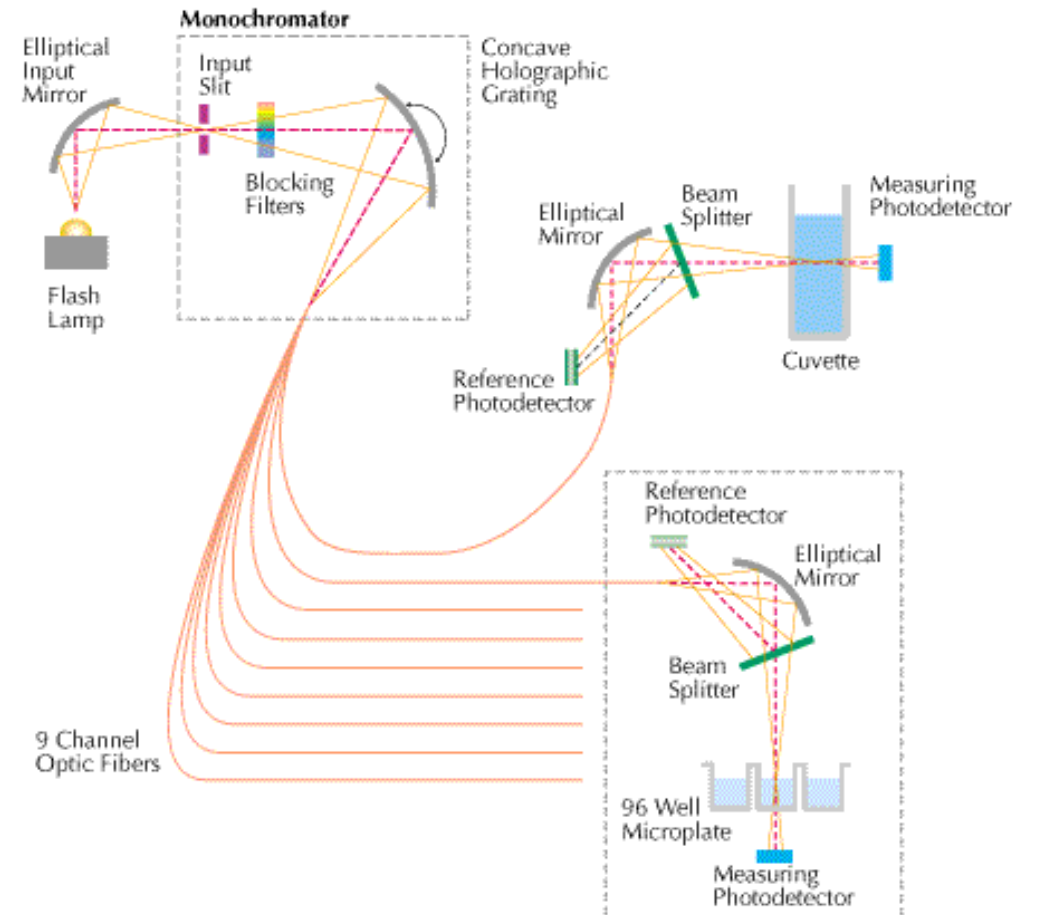
Sada již naředěných kalibrátorů



Destička – odnímatelné stripy s jamkami – lze upravit počet stripů v ELISE dle počtu vyšetřovaných sér

# 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

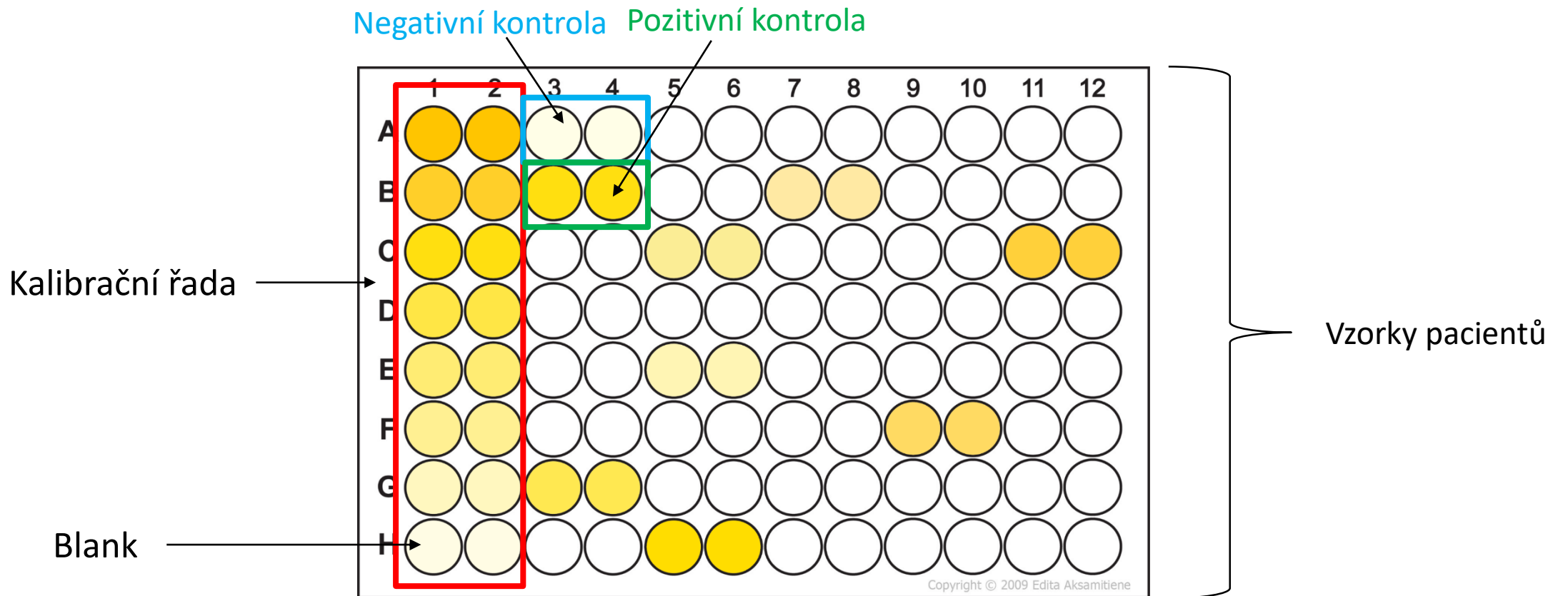
## 2. Semi-kvantitativní

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

## 3. Kvantitativní

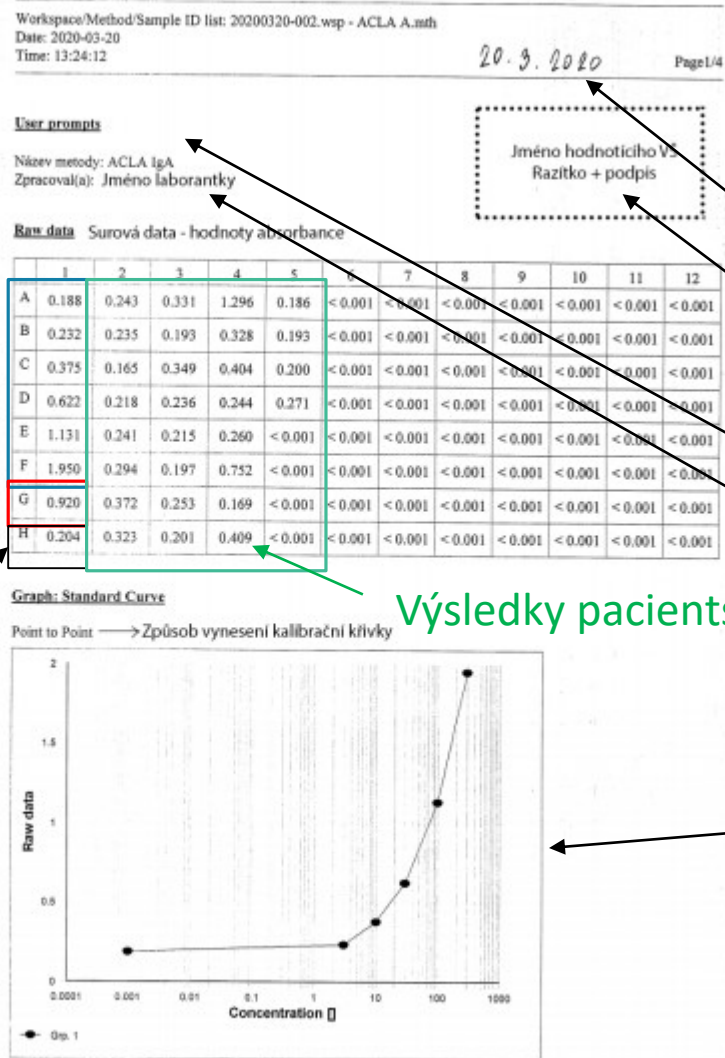
- **Kalibrační křivka** – ředění kalibrátoru o známé koncentraci analytu
- Výsledek (absorbance = OD, optická denzita) se odečítá z kalibrační křivky
- Přepočet absorbance na koncentraci (Lambert-Beerův zákon)
- Výsledek má číselnou hodnotu s udanými jednotkami (např. U/ml, ug/ml)

# Hodnocení výsledků - kvantitativní



# Příklad

## ELISA ACLA - kvantitativně



Kalibrace

Pozitivní k.

Negativní k.

Výsledky patientských vzorků

- Výsledky ELISY z readru
- **Metoda ACLA** - protilátky proti kardiolipidům 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, uvedené jednotky (např. IU/ml) (není vyobrazeno)



# Využití ELISA v imunologii

---

- **Antiinfekční imunita**

- Stanovení protilátek proti některým infekčním agens

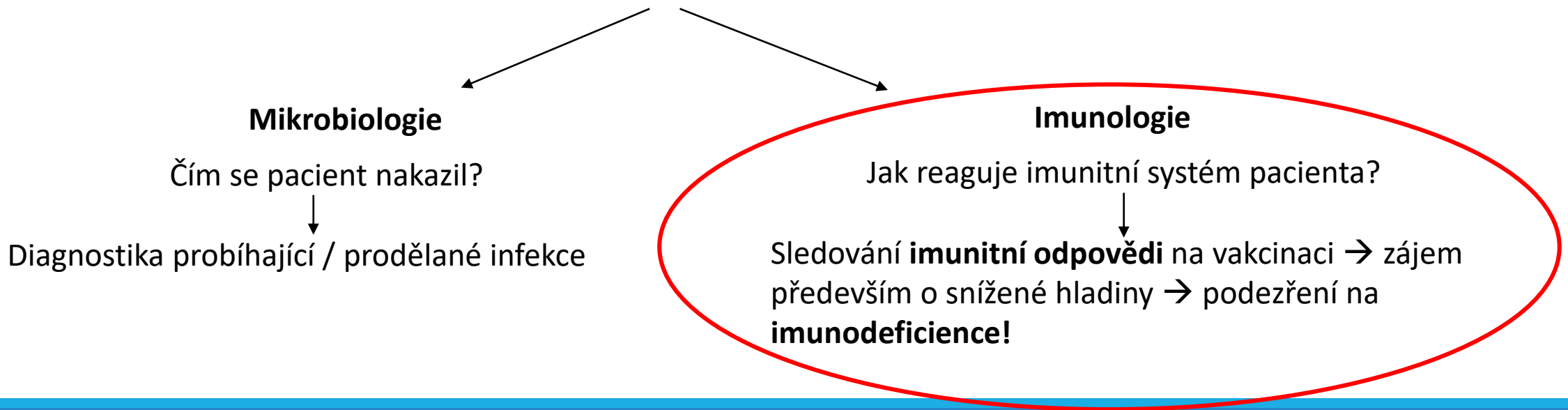
- **Autoimunitní onemocnění**

- Stanovení autoprotiátek

# ELISA a antiinfekční imunita

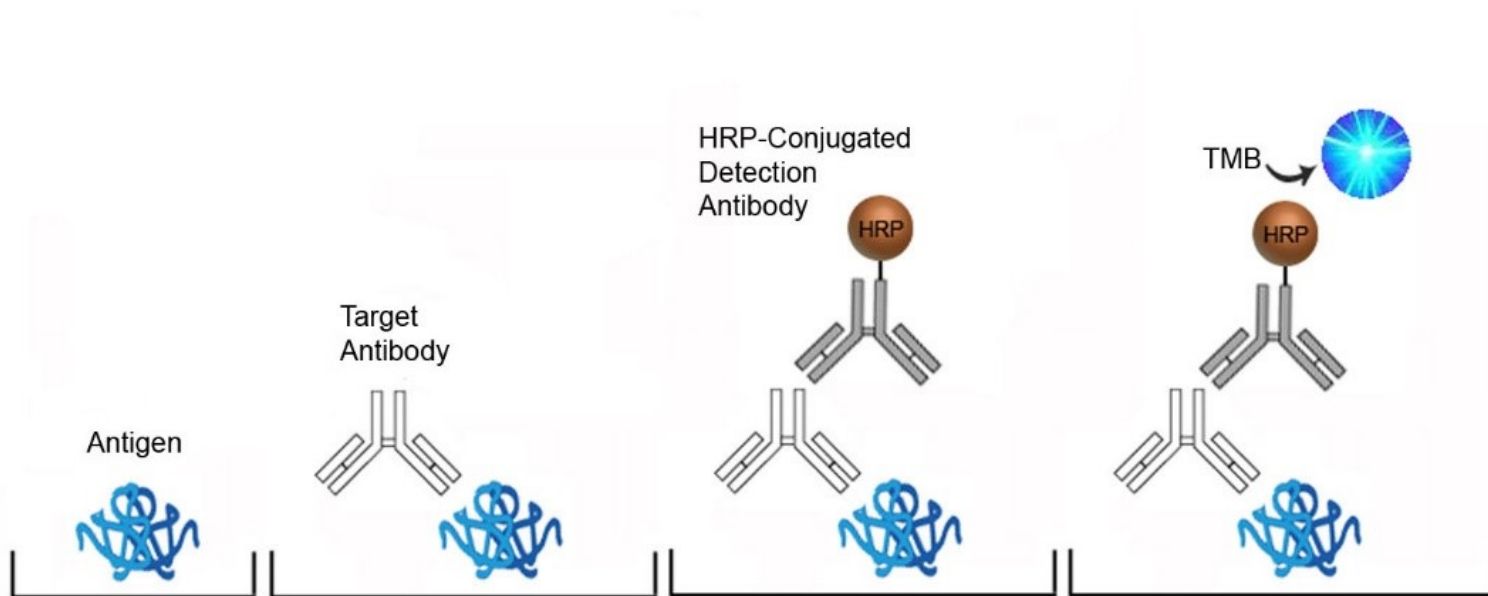
- Stanovení přítomnosti protilátek proti vybraným infekčním agens
  - Protilátky proti tetanickému toxoidu
  - Protilátky proti difterickému anatoxinu
  - Protilátky proti kapsul. antigenu *Haemophilus influenzae typ b*
  - Protilátky proti specifickému pneumokokovému kapsulárnímu polysacharidu (anti-PCP)

} Očkování



# ELISA a autoimunitní onemocnění

- Používá se téměř výhradně sendvičové uspořádání
- Hledáme autoprotilátky – destička potažena antigenem



# ELISA a autoimunitní onemocnění

---

- Stanovení celé škály autoprotiláték (orgánově nespecifické, orgánově specifické)
  - **ANA** – proti jaderným antigenům (anti-nuclear antibody; Systémový lupus erythematosus -SLE)
  - **ENA** – proti extrahovatelným nukleárním antigenům (SS-A, SS-B → Sjogrenův sy. a další)
  - **AMA** – proti mitochondriím (primární biliární cirhóza)
  - **ASMA, LKM, LC** - autoimunitní hepatitidy
    - ASMA - proti hladkým svalům (anti – smooth muscle antibodies)
    - LKM - proti mikrosomům jater a ledvin (LKM – liver kidney microsomes autoantibodies)
    - LC - proti antigenu jaterního cytosolu typu 1
  - **ANCA** – proti cytoplazmě neutrofilů (autoimunitní vaskulitidy a glomerulonefritidy)
    - cANCA – antigen je myeloperoxidáza
    - pANCA - antigen je proteináza 3
  - Anti-TTG –proti tkáňové transglutamináza (celiakie)
  - Anti-TG-tyreoglobulin, anti-TPO-tyreoidální peroxidáza (autoimunitní onemocnění štítné žlázy)
  - RF – proti Fc molekule IgG (revmatoidní artritida)
  - EMA –proti endomysiu (celiakie)
  - ASCA (pozor – není to autoprotilátka!) proti *Sacharomyces cerevisiae* (Crohnova choroba)

# Další metody vyšetření autoprotilátek – přehled

platí pro pracoviště ÚKIA FNUSA

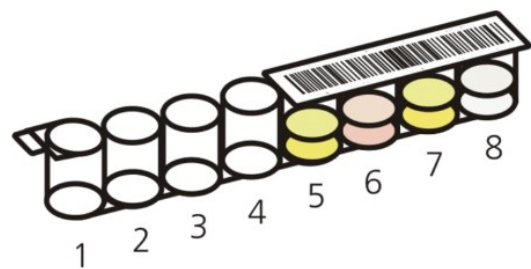
---

1. Imunofluorescence – samostatná přednáška
2. **Přístrojová ELISA** – analyzátor Alegria
3. **Chemiluminiscence** – analyzátor Isys
4. Enzymově zesílená chemiluminiscence – analyzátor Immulite - samostatná přednáška
5. Immunoblot – samostatná přednáška



# 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

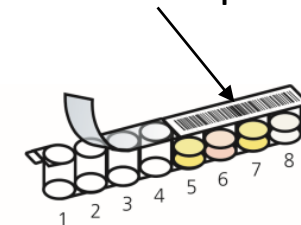
Jamka 8: TMB substrát (tetra-methyl-benzidin)

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

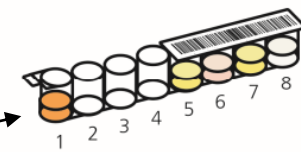
- Nevýhoda – v porovnání s ruční ELISOU drahé

## Čárový kód – identifikace stripu

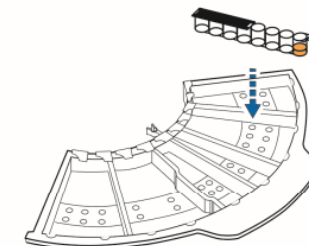
1



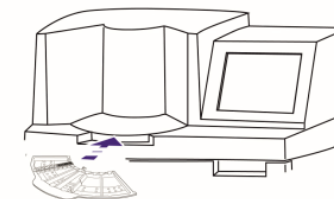
2



3



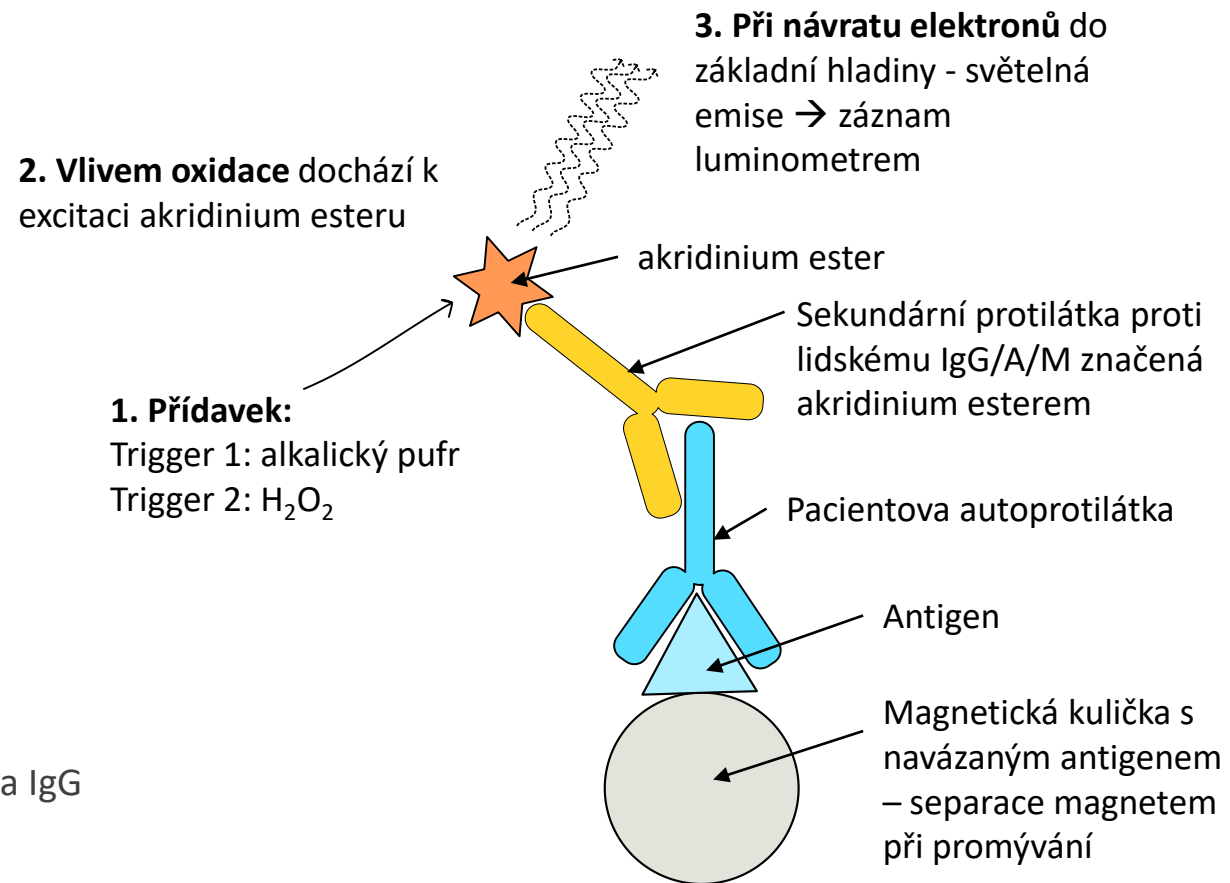
4





# 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 (tkáňová transglutamináza – celiakie) – třídy IgA a IgG
  - dsDNA – třída IgG (systémový lupus - SLE)
  - ACLA – kardiolipin (antifosfolipidový syndrom) – třídy IgM a IgG



# Protokoly

---

- Hlavička
- Princip metody
- Pomůcky
- Postup
- Výsledky – sestrojít kalibrační křivku, odečíst hodnoty pacientů
  - popsat jakou autoprotilátku stanovujeme, pro jaké onemocnění je typická
- Zhodnotit, co výsledek ELISY pro pacienta znamená