



Imunoanalýza ELISA

Mgr. Julie Štíhová

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

Imunoanalytické metody

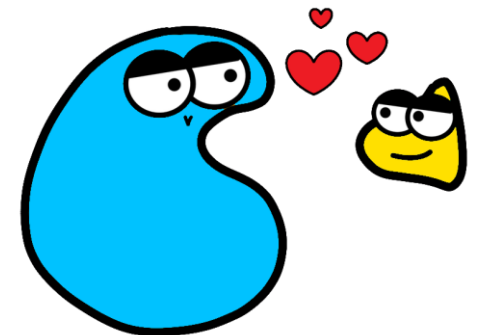
Vizualizace reakce **antigen-protilátka** pomocí **značky**

Rozdělení metod dle typu
značky:

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

Rozdělení metod dle
uspořádání:

- Homogenní
- Heterogenní
 - Kompetitivní
 - Nekompetitivní



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

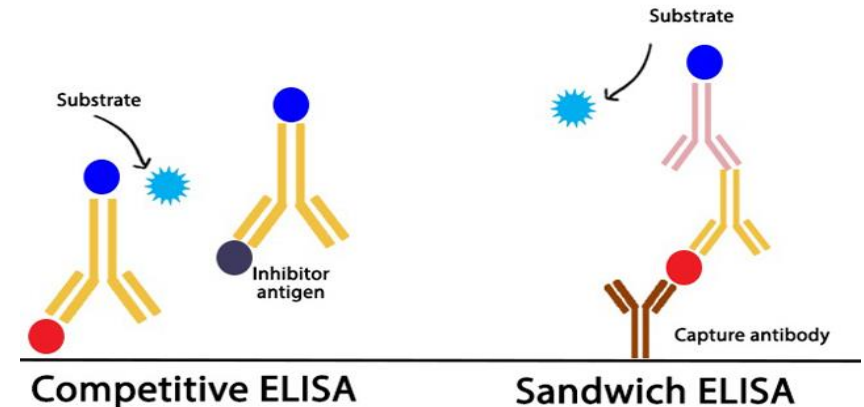
Imunoanalytické metody

Heterogenní kompetitivní:

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

Heterogenní nekompetitivní:

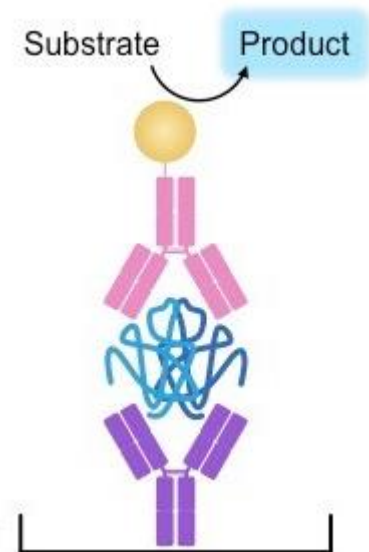
- Detekční protilátka / antigen v nadbytku – analyt ze vzorku vyvázán
- Měřený signál je **přímo úměrný** množství analytu



ELISA

Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

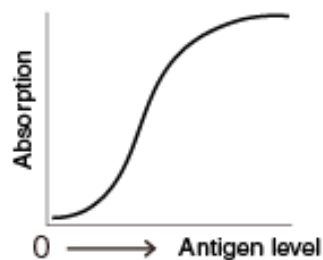
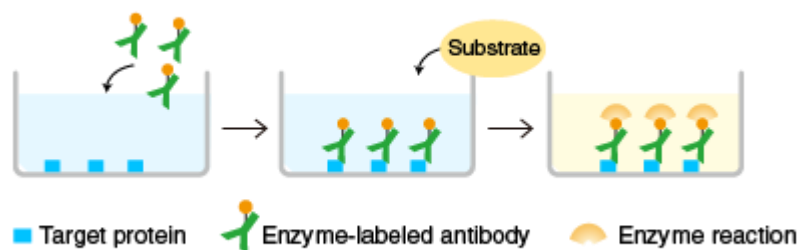
- Heterogenní imunoanalýza – nutná separace nezreagovaných složek
- Vazba antigenu / protilátky na pevnou fázi (stěna destičky)
- Vizualizace - enzymatická přeměna substrátu na barevný produkt
 - **Křenová peroxidáza** (tetrametylbenzidin → tetrametylbenzimidin → 450 nm)
 - Alkalická fosfatáza (p-nitrofenylfosfát → nitrofenol → 405 nm)
- Vysoká citlivost – **pg/ml**



ELISA - uspořádání

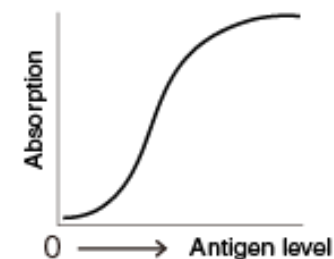
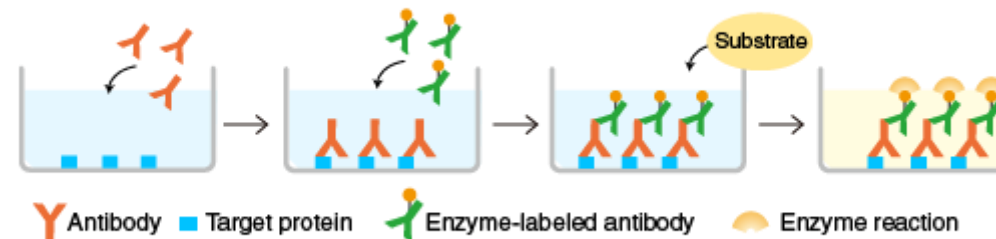
Přímá ELISA

- Analyt (Ab/Ag) imobilizován
- Detekce pomocí značené protilátky



Nepřímá ELISA

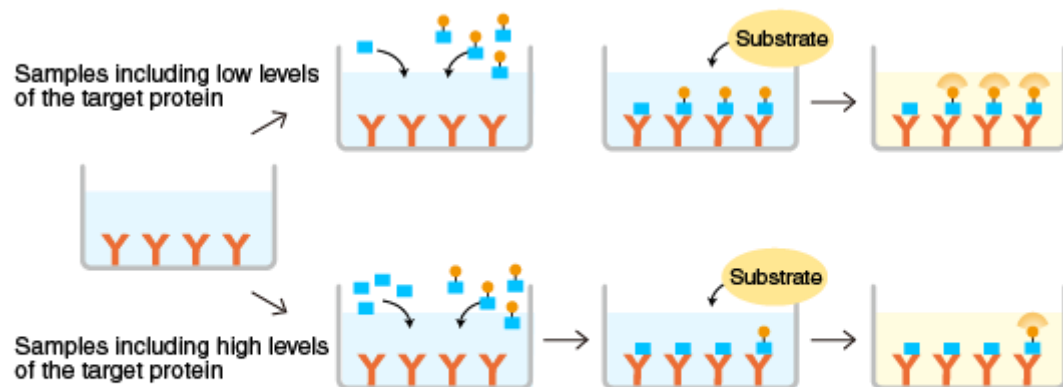
- Na analyt se váže primární neznačená protilátka
- Na primární protilátku se váže sekundární značená protilátka



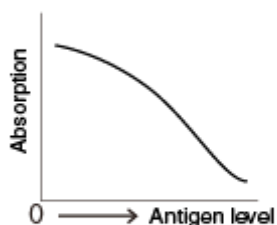
ELISA - uspořádání

Kompetitivní ELISA

- Detekce analytů s malou Mr

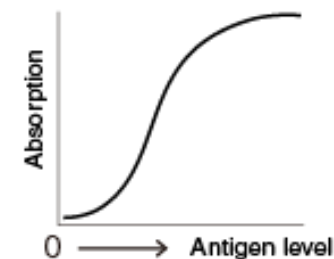
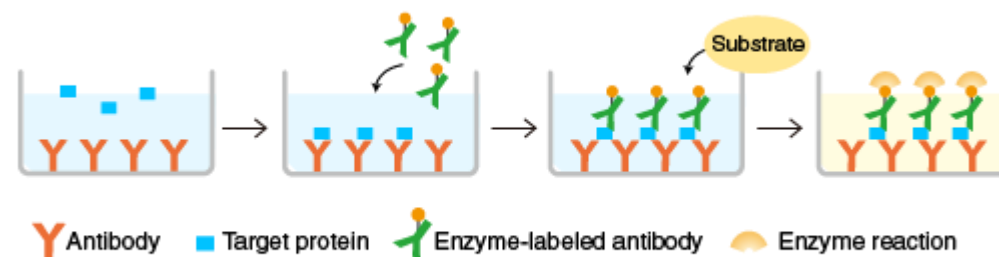


Y Antibody ■ Target protein ■ Enzyme-labeled antigen ☀ Enzyme reaction



Sendvičová ELISA

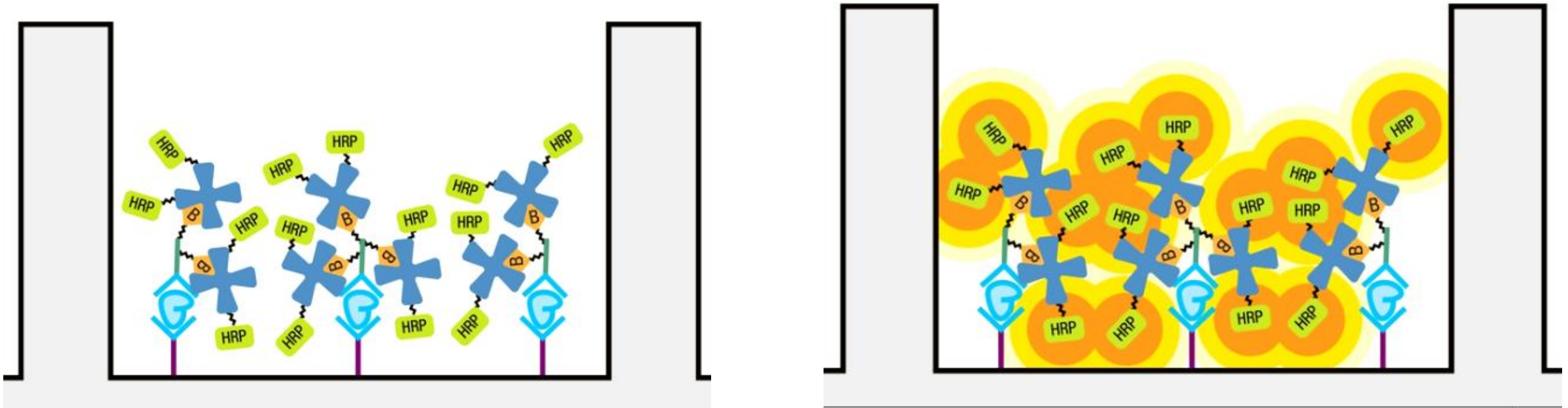
- Detekce analytů s vysokou Mr (proteiny)
- Vysoká přesnost



<http://ruo.mbl.co.jp/bio/e/support/method/elisa.html>

Sendvičová ELISA – vyšší senzitivita

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



Kautování ELISA desky

○ Imobilizace Ag nebo Ab na plastový povrch desky

1. Povrchová aktivace desky

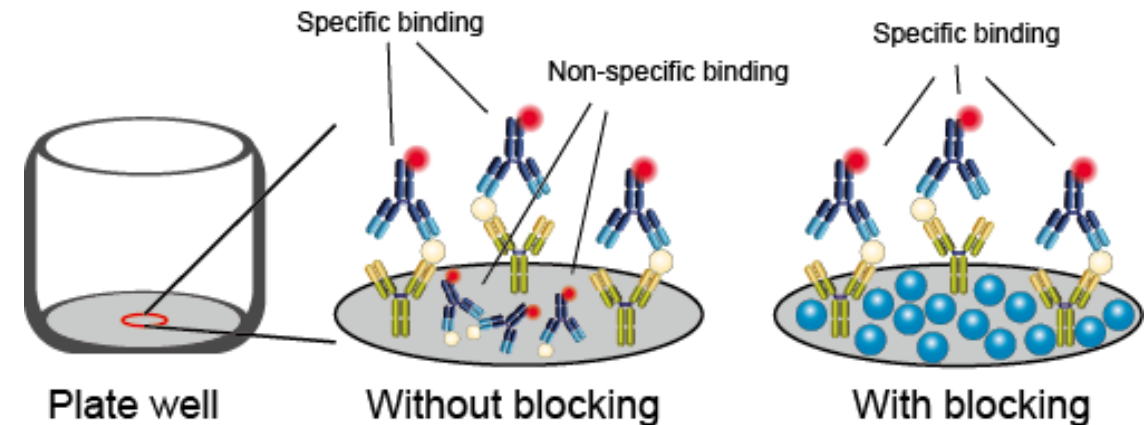
- vazba NH_2 nebo COOH skupin – tvorba kovalentních vazeb s protilátkou nebo antigenem
- Vhodné pro stanovení malých molekul – např. peptidy

2. Pasivní adsorpce

- Hydrofóbní 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



System zachytná + detekční Ab

Proč je každá protilátka od jiného živočišného druhu?

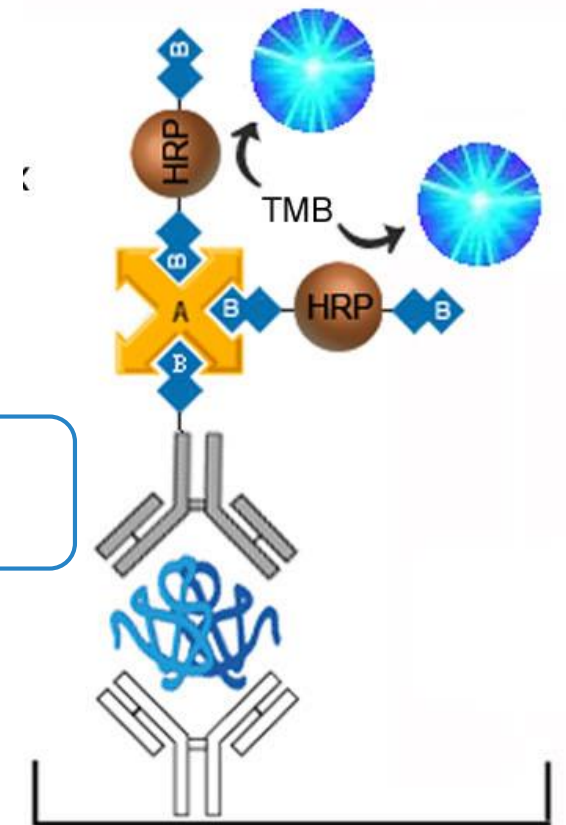
Tato kombinace významně snižuje riziko zkřížené reaktivity, která by mohla způsobit vznik nespecifických imunokomplexů (zdroj falešné positivity)!!!

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

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

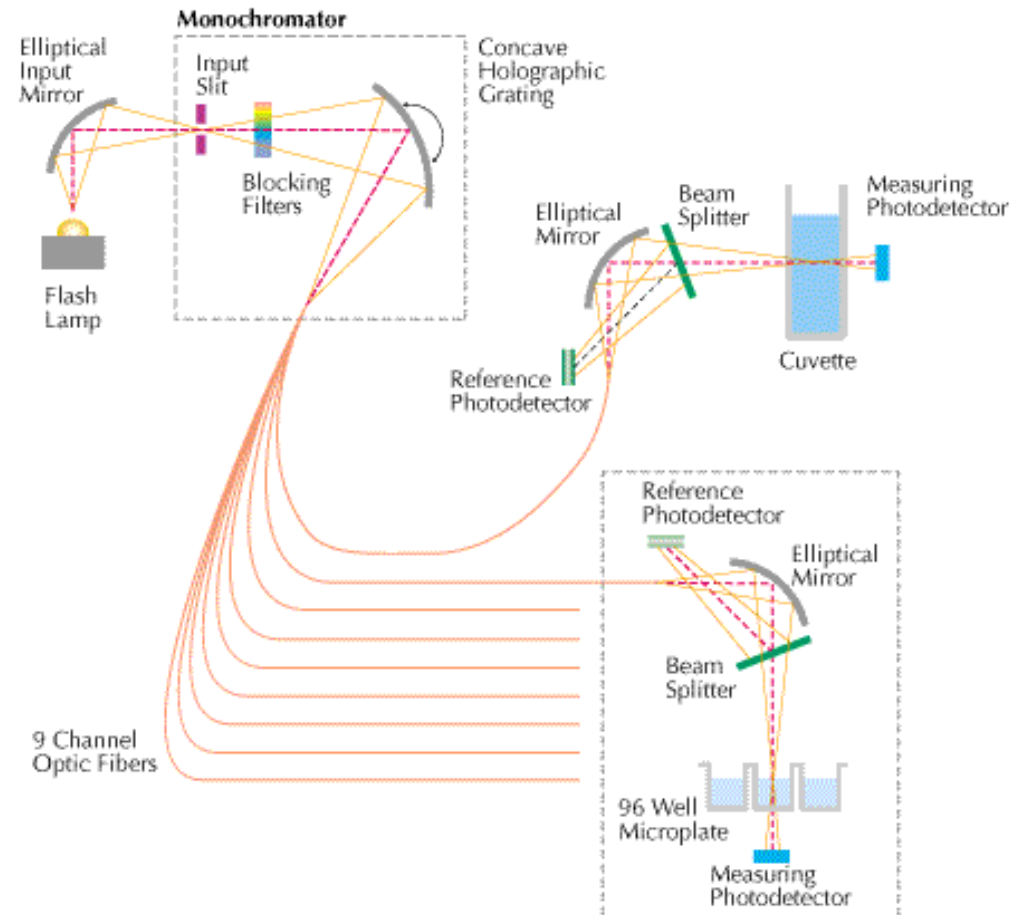
Detekční protilátka
humánní, monoklonální

Zachytná protilátka
myší, polyklonální



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 (např. srovnání vzorku s blankem)

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)

Využití ELISA v imunologii

- Antiinfekční imunita
 - Stanovení protilátek proti některým infekčním agens

- **Autoimunitní onemocnění**
 - Stanovení autoprotiátek

ELISA a antiinfekční imunita

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

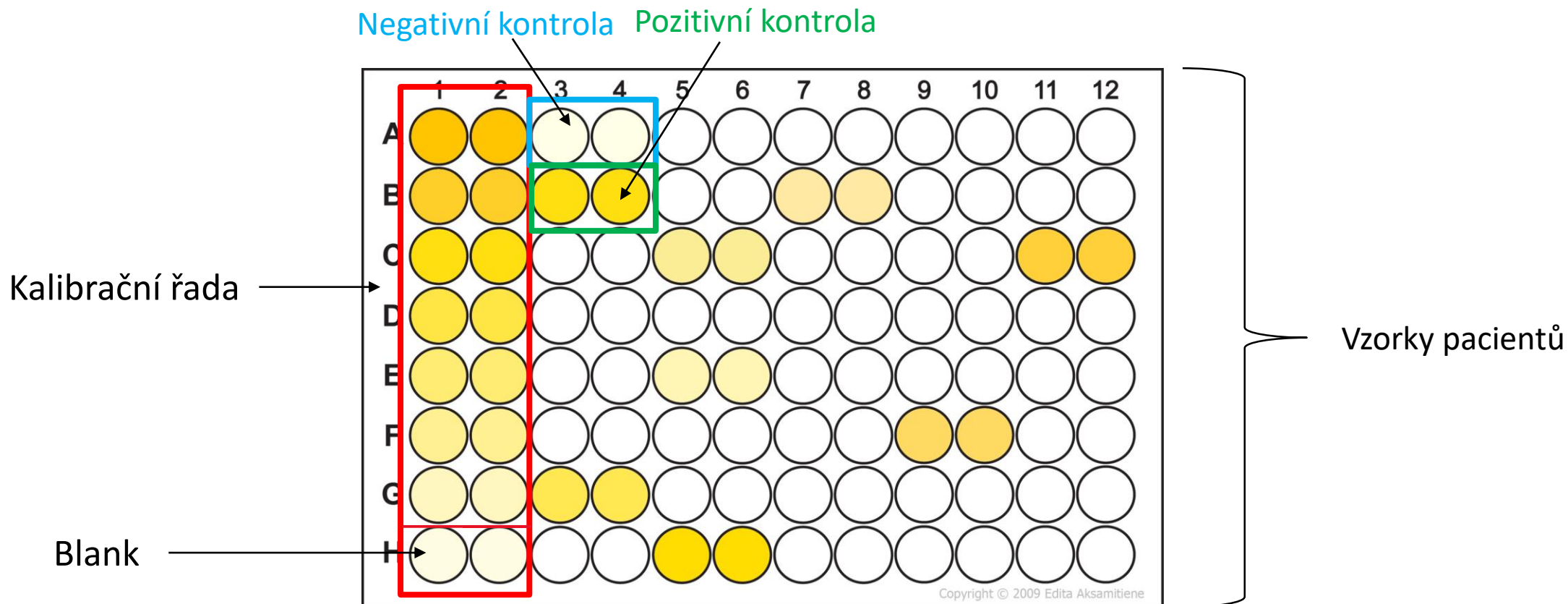


Sledování odpovědi na vakcinaci, sledování stavu imunitního systému (zájem především o snížené hladiny – imunodeficience)

Autoimunitní onemocnění

- Celá škála autoprotilátek (orgánově nespecifické, orgánově specifické)
 - ANA – proti jaderným antigenům (SLE)
 - ENA – proti extrahovatelným nukleárním antigenům (SS-A, SS-B, Jo1 atd. – Sjogrenův sy.)
 - AMA – proti mitochondriím (primární biliární cirhóza)
 - ASMA, LKM, LC – autoimunitní hepatitidy
 - ANCA – proti cytoplazmě neutrofilů
 - Anti-TTG – tkáňová transglutamináza (celiakie)
 - Anti-TG-tyreoglobulin, anti-TPO-tyreoidální peroxidáza (tyreoitidy)
 - RF – revmatoidní artritida
 - EMA – proti endomysiu – celiakie
 - ASCA – proti *Sacharomyces cerevisiae* – Crohnova choroba

Hodnocení výsledků - kvantitativní



Hodnocení výsledků

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

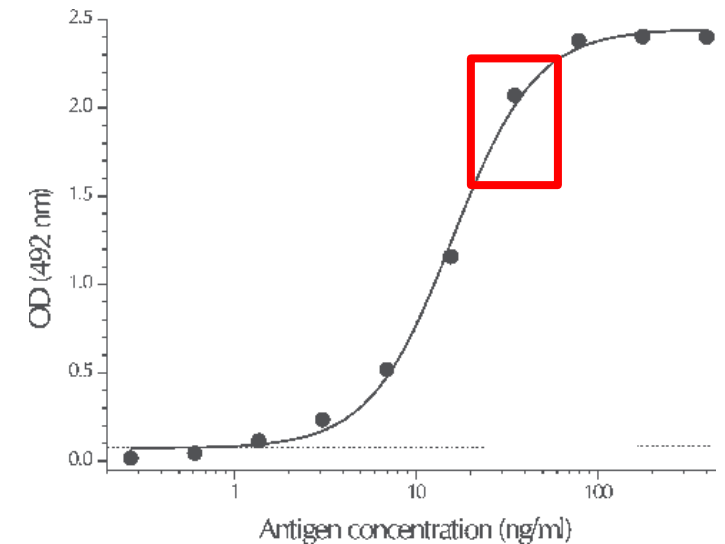
1. fáze kontroly – zdravotní laborant

- 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

2. fáze kontroly – VŠ pracovník

- Vizuální kontrola desky
 - Není zbarvení moc tmavé nebo světlé?
 - Není v jamkách sraženina / nečistota?
- 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?

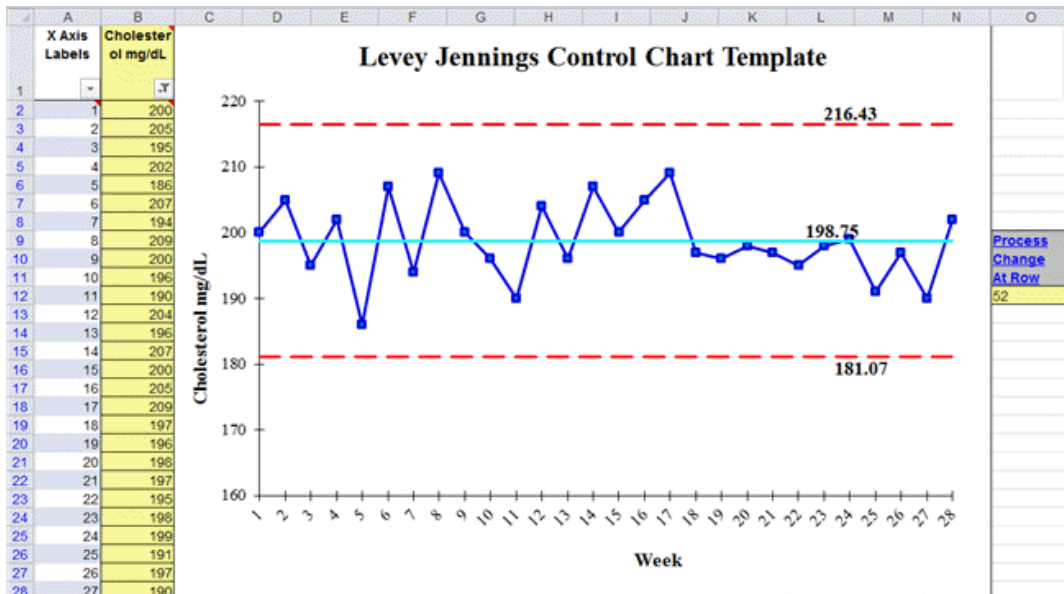


Hodnocení výsledků

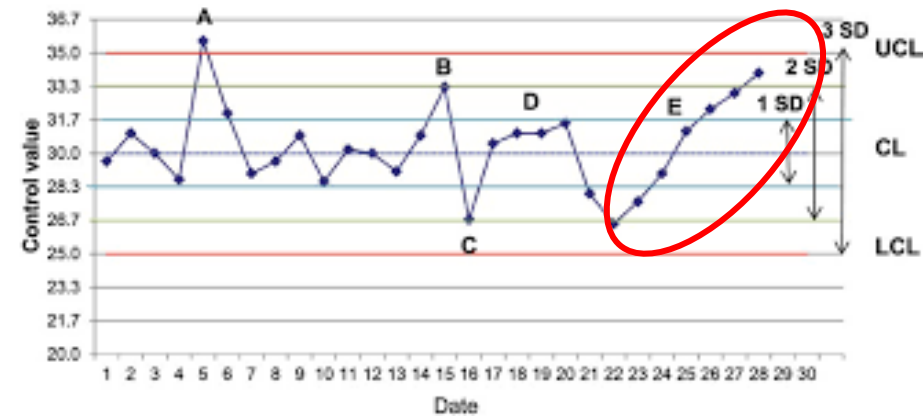
- Pokud nevyšly kontroly, musí se hledat příčina:
 - Máme tu správnou desku? Na jakém programu byla změřena? Jaká je šarže kontrol (mohlo nedávno dojít ke změně)
- Pokud pozitivní kontrola vyšla příliš vysoká/nízká:
 - Všímáme si rozsahu kalibrace – měla by být co nejširší – od velmi nízkých hodnot absorbance až po vysokou
 - Zjišťujeme, jak vypadala předchozí měřená kalibrace
 - 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 značit expiraci setu



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 smysl
- Seznam výsledků, které je nutno okamžitě hlásit lékaři – VŠ mu vysvětluje, co to znamená
- Uvolnění výsledků

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?

- Tištěné výsledky opouštějí pracoviště a putují k ošetřujícímu lékaři

Hodnocení výsledků

- VŠ svým podpisem odpovídá za výsledky!
- O každé fázi zpracování a kontroly 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

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. ELISA 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, ...)

Imunoblot

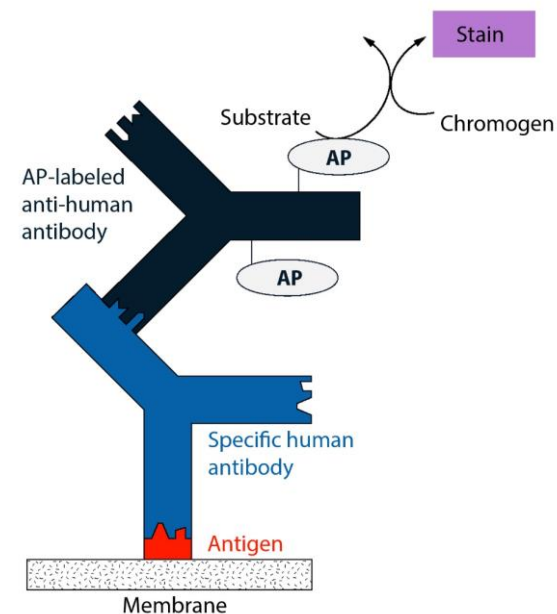
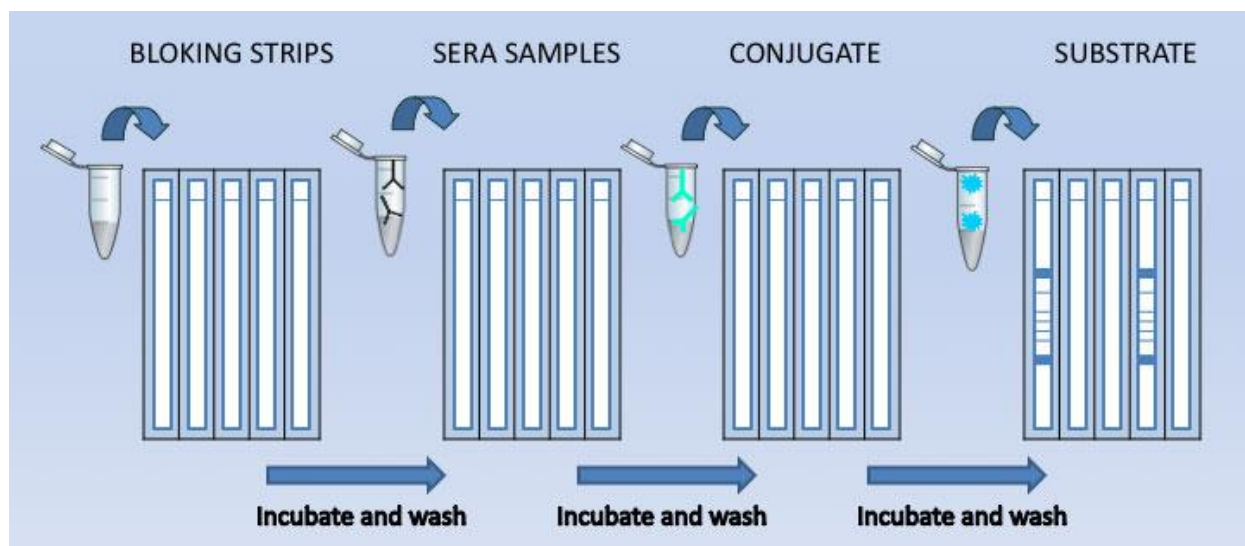
- Slouží k diagnostice autoantilátek
- Příprava blotů (výrobce):
 - Proteiny elektroforeticky rozděleny v gelu – přenos (otisk) na nitrocelulózovou membránu (blotting)
 - Membrána je rozstříhána na jednotlivé diagnostické proužky
 - každý protein má na proužku definovanou polohu
 - Odečítá se podle přiložené šablony



Imunoblot

○ Princip stanovení:

- Pokud je autoprotilátka proti určitému proteinu přítomna v séru, naváže se na tento protein immobilizovaný na stripu
- Detekce vazby autoprotilátky pomocí detekčních protilátek značených enzymem
- Enzym přemění substrát na barevný produkt
- Výsledkem je vznik barevného proužku na stripu



Imunofixace

- Diagnostika monoklonálních gamapatií (stanovení paraproteinů v séru a moči)
 - Podezření na monoklonální gamapatie – zvýšená celková bílkovina > 90 g/l)
 - Monoklonální gamapatie neznámého významu - MGUS (monitoring – řada pacientů po čase přechází do mnohočetného myelomu, makroglobulinémie či primární amyloidózu)
 - Maligní monoklonální gamapatie – mnohočetný myelom, plazmocytom
- Maligní lymfoproliferativní onemocnění
 - Waldenstromova makroglobulinemie
 - Maligní lymfomy
 - Chronická lymfatická leukemie
- Nemoc těžkých řetězců
- Primární AL amyloidóza

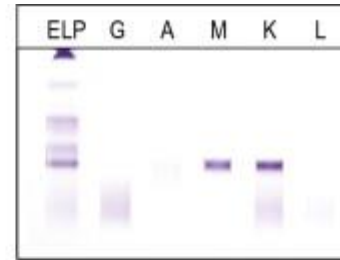
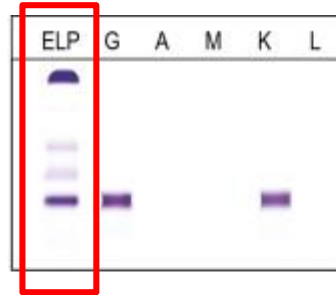
Imunofixace

Princip:

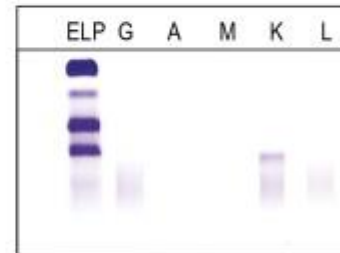
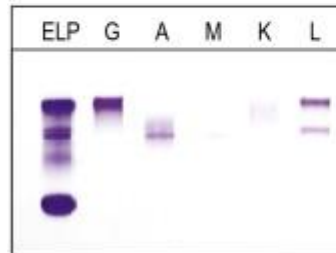
- Proteiny (sérum pacienta) rozdělné alkalickou elektroforézou jsou inkubovány se specifickými antiséry (anti IgG, IgA, IgM, řetězce kappa a lambda):
- V případě pozitivní reakce vzniká precipitát, který zůstává v gelu imobilizován
- Ostatní proteiny jsou vymyty
- Precipitáty jsou obarveny kyselou violetí nebo amidočerní
- Hodnocení – vizuální

Imunofixace

Referenční stopa – veškeré proteiny fixovány fixačním roztokem



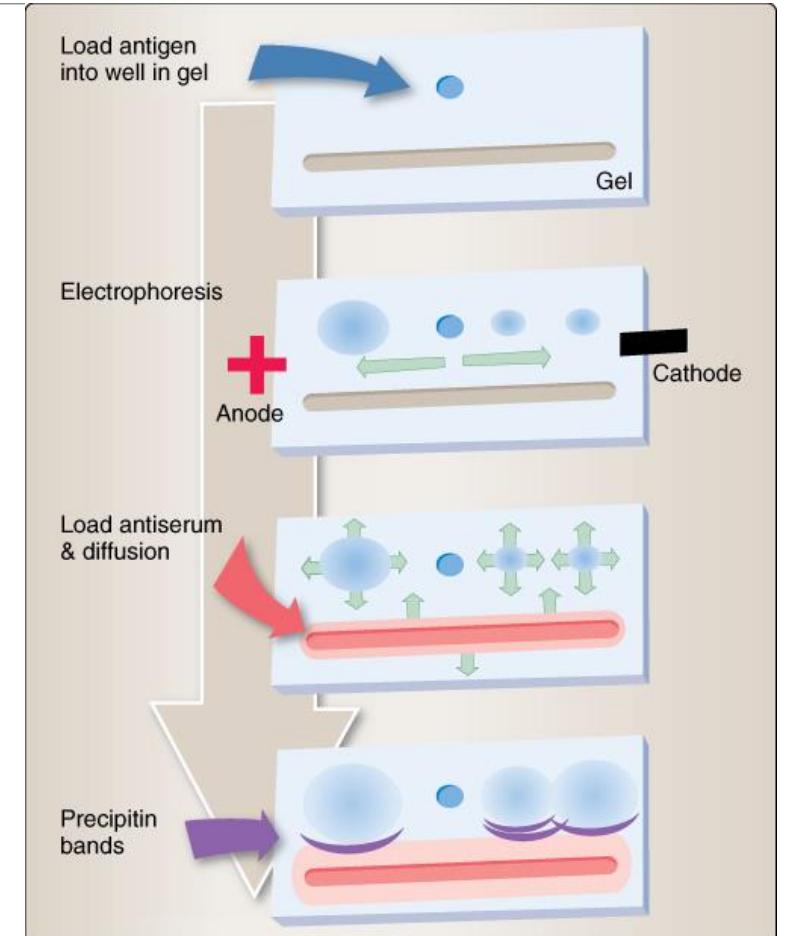
Zbývajících 5 drah – na každou naneseno jiné specifické antisérum



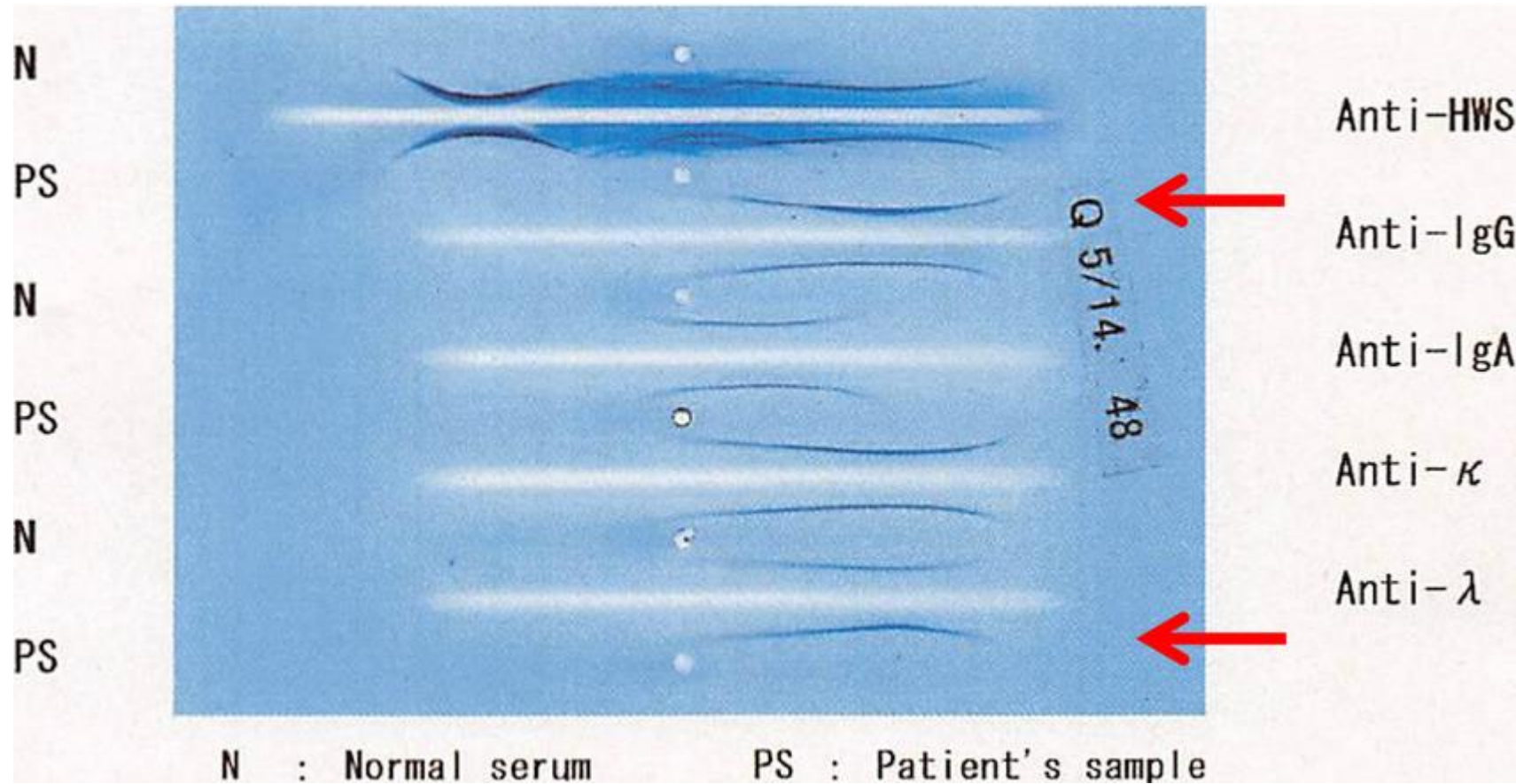
Imunofixační proužky jsou porovnávány s odpovídajícími frakcemi referenčního vzorku – proužek by měl mít stejnou migrační pozici

Imunoelektroforéza

- Kombinace elektroforézy s imunodifuzí:
 - Krok 1: elektroforetické rozdělení séra
 - Krok 2: Podél migrační dráhy se vyřízne žlábek – aplikace polyvalentního antiséra
- Antisérum difunduje do gelu – v zóně ekvivalence s antigenem (protein séra) vytvoří obloukovitou precipitační linii
- Při použití polyspecifického antiséra – až 35 precipitačních obloučků – mají charakteristický tvar a polohu (1 oblouček = 1 protein)



Imunoelektroforéza



Imunoelektroforéza

- Diagnostika monoklonálních gamapatií
- Hodnocení je kvalitativní
- Dnes spíše zastaralá metoda – nahrazena imunofixací

Raketová imunoelektroforéza

- Umožňuje kvantitativní stanovení proteinů (od 0,1 mg/l)
 - Gel obsahuje monospecifické antisérum
 - Proteiny séra elektroforeticky děleny (alkalické pH – anodická pohyblivost)
 - Při průchodu gelem vytváří cílový protein s monospecifickým antisérem precipitát v zóně ekvivalence → má tvar rakety
- S1-S4 – standardy o různé koncentraci
- V – vzorek pacienta
- Kvantitativní odečet z kalibrační křivky

