

# Imunoanalytické metody

RNDr. Alena Mikušková

FN Brno – Dětská nemocnice, ODHB

# Imunochemické metody

- Založeny na reakci antigenu **Ag** s protilátkou **Ab**
  - tj. na reakci antigenních determinant s vazebným místem protilátky

## Antigen (Ag)

- Kompletní antigen = makromolekulární nosič (protein, polypeptid, polysacharid, nukleoprotein,...) + antigenní determinant (= epitop = určitá skupina atomů na povrchu molekuly antigenu)
  - navozuje specifickou imunitní odpověď (imunogen)
  - reaguje s produkty této odpovědi (protilátkami)

**Hapten** = nekompletní antigen = nízkomolekulární látka, specificky reaguje s protilátkami, sama tvorbu protilátek nenavozuje

## Protilátky (Ab)

- Glykoproteiny, elfo pohyblivost  $\beta - \gamma$  (imunoglobuliny – Ig)
  - produkty plazmatických buněk (ty se vyvíjejí z B-lymfocytů po stimulaci antigenem)

# Protilátky

- Lehké řetězce –  $\kappa$ ,  $\lambda$
- Těžké řetězce –  $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\epsilon$ ,  $\delta$ 
  - určují třídu imunoglobulinu IgG, IgM, IgA, IgE, IgD
- 2 vazebná místa pro antigen  
(kromě IgM = pentamer  $\rightarrow$  10)

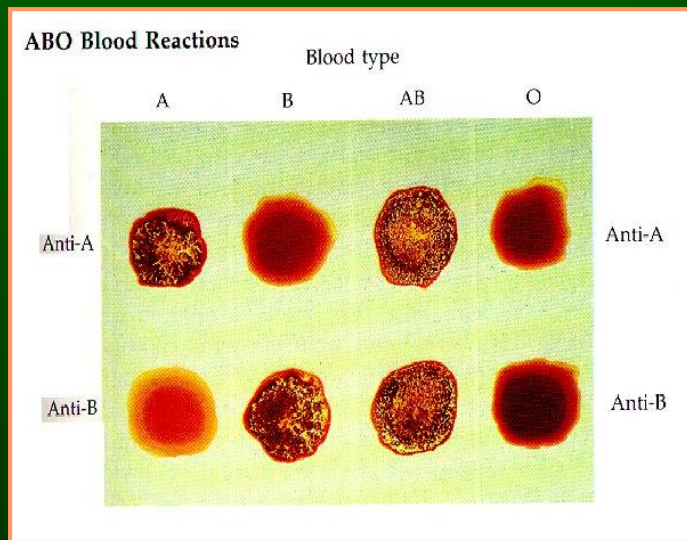


- **Monoklonální** – produkty jednoho klonu plazmatických buněk
  - připraveny hybridomovou technologií (fúze myelomových buněk s vyselektovaným klonem lymfocytů sleziny imunizovaných myší
  - výrazně specifické - vážou se jen na jeden epitop
- **Polyklonální** – příprava imunizací zvířete
  - namířeny proti různým epitopům antigenu

# Aglutinační metody

## Aglutinace (shlukování)

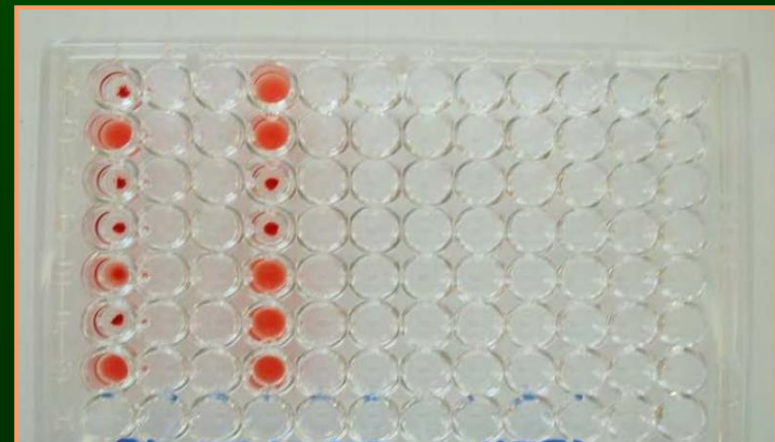
- Reakce protilátky s korpuskulárním antigenem
  - vede ke vzniku aglutinátu „vločkové konzistence“
  - korpuskulární antigen musí na svém povrchu nést větší počet antigenních determinant.



## ABO

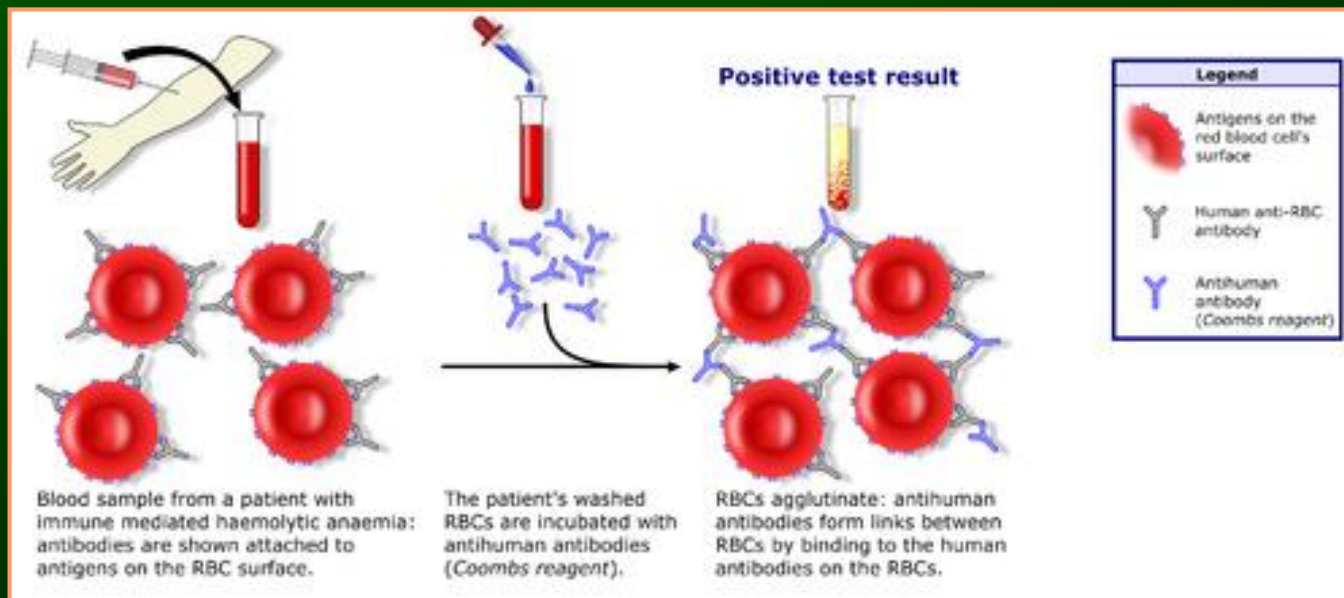
	..... jméno příjemce	Skupina
<b>Anti-A</b>	..... nar. ....	..... č. chorob.
<b>Anti-B</b>	..... konzerva č. ....	..... skup.
	..... dat. exspir. ....	..... dat. transf.

- Vyšetření antigenů Rh fenotypu a antigenu Kell na mikroděsce



# Imunochemické metody

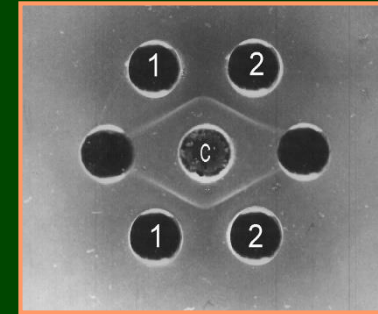
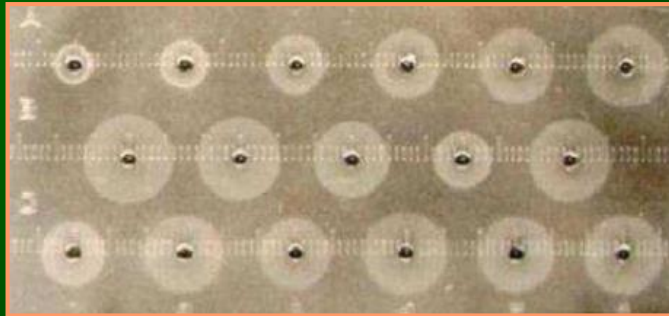
- **Aglutinační metody** – kvalitativní, semikvantitativní
- shlukování mikroskopických částic s obsahem povrchových antigenů, např. krvinek, bakterií apod. pomocí protilátek
- určování bakteriálních kmenů, průkaz protilátek proti patogenům
- hematologie – určování krevních skupin a průkaz Ab proti krevním elementům



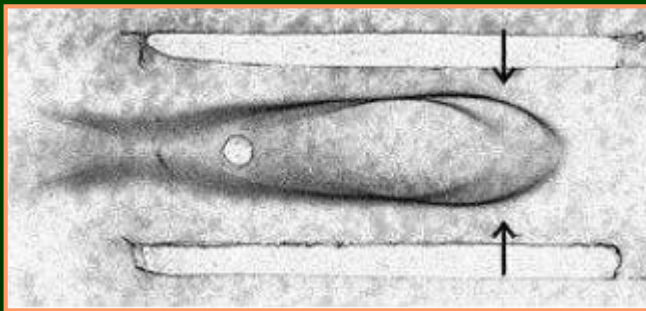
# Precipitační metody

„Klasické“ metody - vznik nerozpustného precipitátu – imunodifúze, imunoelektroforéza

- Jednoduchá + dvojitá radiální imunodifúze

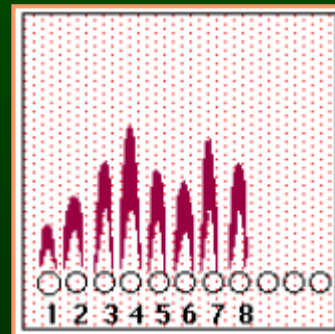


- Imunoelektroforéza

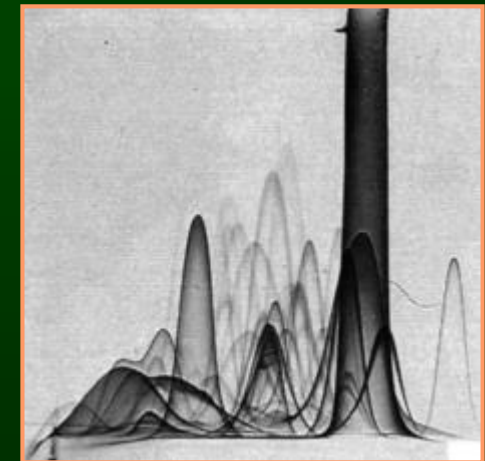


Již nepoužívané !!!

„Raketky“



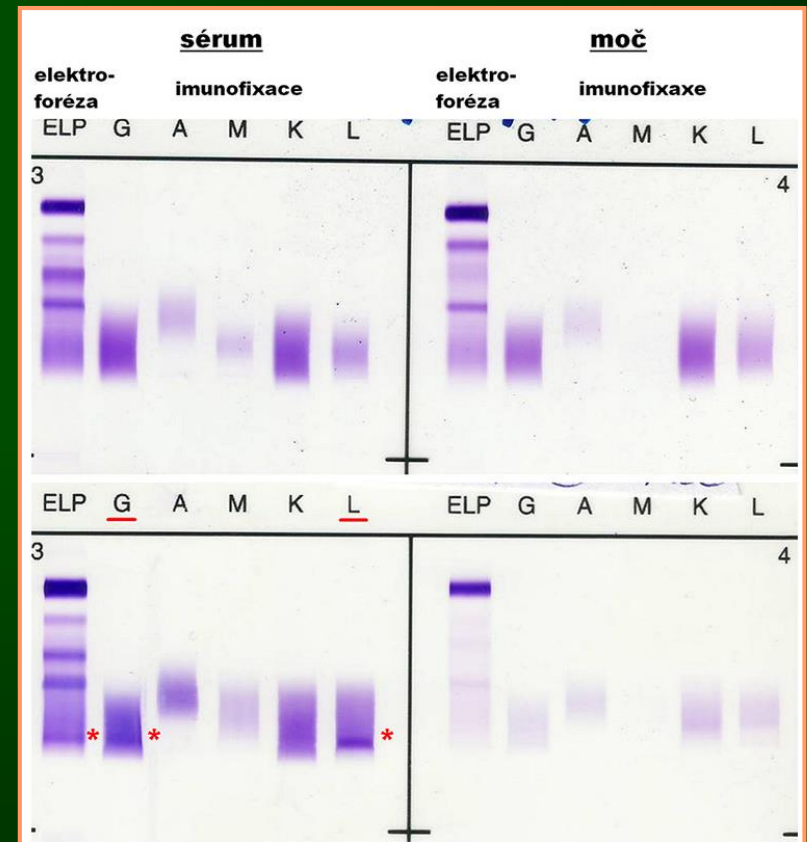
Dvourozměrná imunoelfo



# Současné imunoelektroforetické techniky:

## Imunofixace

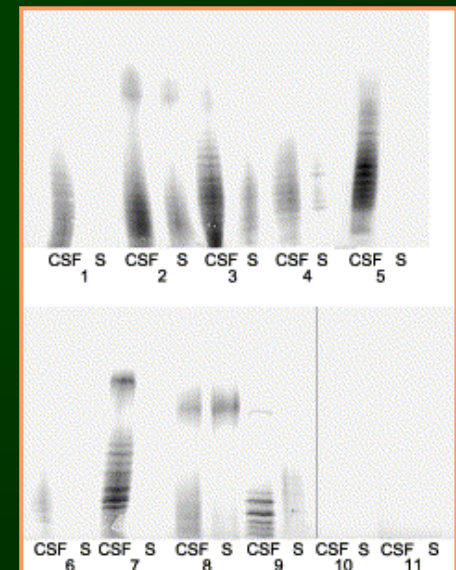
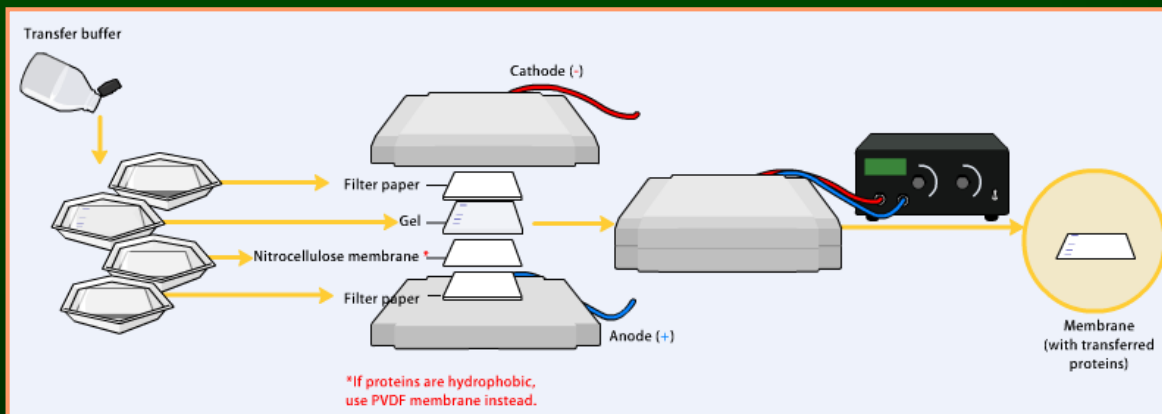
- rozdělení vzorku na gelu
  - elektroforéza, izoelektrická fokuzace
- následná aplikace antiséra
  - = Ab proti konkrétním těžkým nebo lehkým řetězcům
    - Anti-IgG značené peroxidázou
- vznik imunokomplexů
- promytí gelu + barevná vizualizace oligoklonálních pásů
  - chromogen = substrát peroxidázy
- Stanovení a typizace monoklonálních imunoglobulinů a jejich frakcí v séru / moči



# Současné imunoelektroforetické techniky

## Imunoblotting

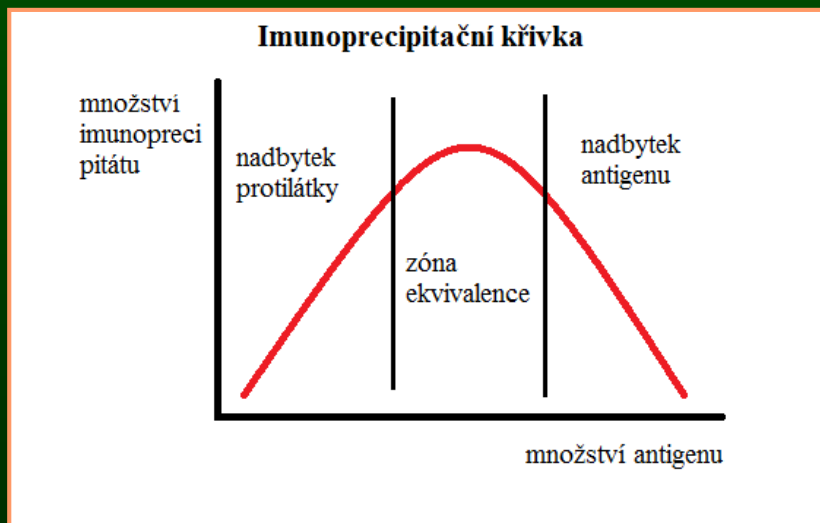
- elektroforetická separace proteinů na polyakrylamidovém gelu
- elektroforetický přenos proteinu na nitrocelulozovou membránu
  - tzn. vytvoření přesné „repliky“
    - antigeny na membráně lépe přístupné protilátkám
- aplikace enzymem značené protilátky – vznik komplexu
- vizualizace skvrn
  - po přidání substrátu enzymu vzniká zbarvení





# Imunoturbidimetrie

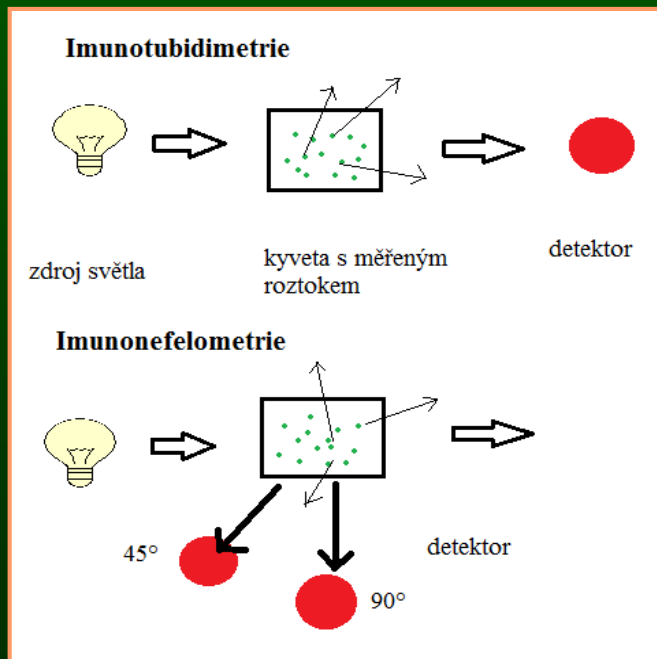
- Imunoprecipitace založená na interakci antigen - protilátka
  - vytvoření suspenze imunoprecipitátu v kyvetě → zákal.
    - podmínka: přítomnost polyvalentního antigenu (reakce antigenu s více epitopy)
- **Imunoprecipitát** = prostorová mřížka, kde se propojují epitopy (vazebná místa) antigenu s paratopy (vazebná místa) protilátek
- **imunoprecipitační křivka** = vyjádření množství imunoprecipitátu na množství protilátky a antigenu
- V oblasti nadbytku protilátky je množství komplexu Ag-Ab úměrné koncentraci Ag



- v reakci nadbytek Ab
  - vzestupná část křivky
- změření intenzity světla pohlčeného zákal
  - spektrofotometr
- stanovení koncentrace antigenu ve vzorku

# Imunonefelometrie

- měření intenzity světla rozptýleného zákalem
  - vychází z roztoku všemi směry
  - měření se pod úhlem odlišným od směru dopadajícího záření
    - obvykle 45° nebo 90°
- nefelometr - zdrojem záření je obvykle laser
- stanovení koncentrace antigenu stejně jako u imunoturbidimetrie



Nefelometrie = citlivější !

Imunoturbidimetrie, imunonefelometrie

- stanovení plazmatických proteinů
- CRP
- imunoglobuliny
- specifické proteiny
- koagulační faktory, ...

# Moderní kvantitativní imunochemické metody

- neprecipitační imunoanalýzy se značenými reaktanty (tzv. konjugáty)
- rychlé, citlivé, často automatizované, detekční limit řádově mg/l – pg/l

## Značení v imunoanalýze:

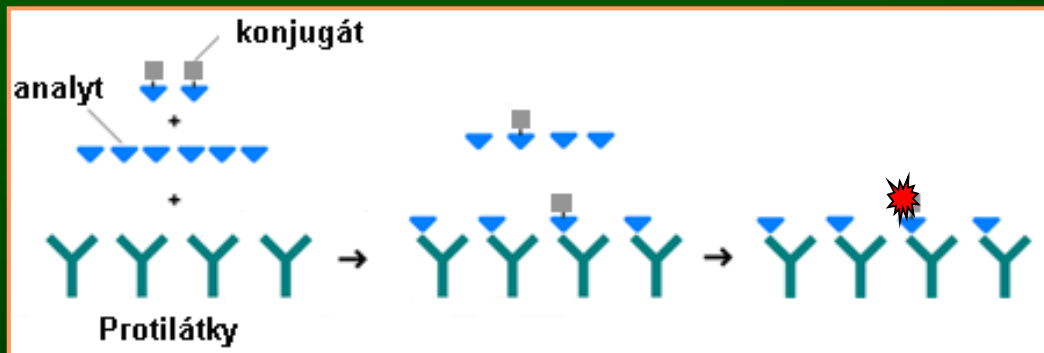
- radioizotop – radioimunoanalýza = Radio Immuno Assay - **RIA**
- enzym – enzyimoimunoanalýza – Enzyme Immuno Assay - **EIA**
- fluorescenční látka – fluoroimunoanalýza – Fluoro Immuno Assay - **FIA**
- chemiluminiscenční látka – luminoimunoanalýza – Luminiscence IA - **LIA**
- atd.

## Uspořádání imunochemické reakce:

- kompetitivní
- nekompetitivní

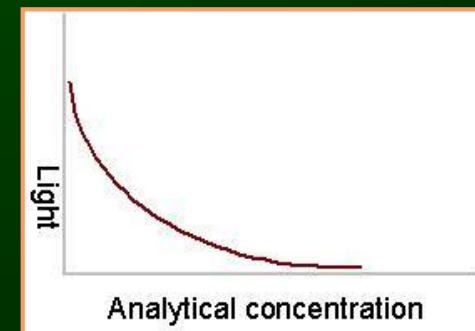
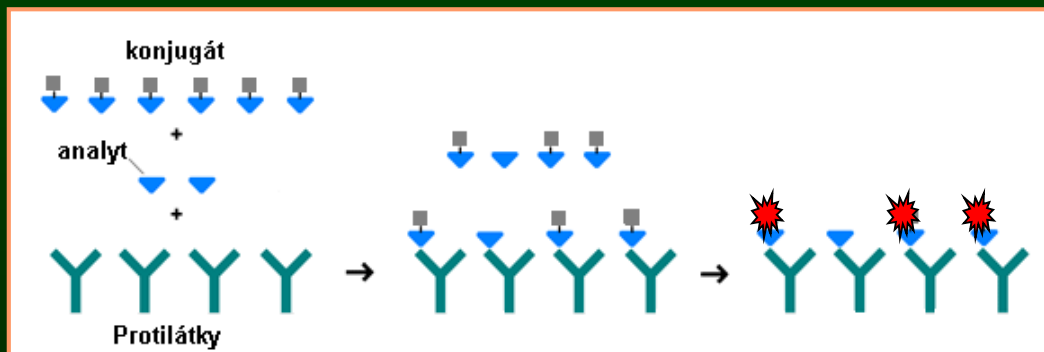
# Imunochemická reakce v kompetitivním uspořádání

- provedení – v nadbytku antigenu
- smíchání séra s neznámým obsahem antigenu Ag se známým množstvím značeného antigenu Ag\* (konjugát)
- soutěžení Ag a Ag\* o vazebná místa omezeného množství protilátek
  - navázání v tom poměru, v jakém byly v původní směsi
- případné odstranění nenavázaných látek + detekční reakce



- analyt – Ag ze vzorku
- konjugát – Ag\*
- odezva nepřímo úměrná konc. Ag ve vzorku

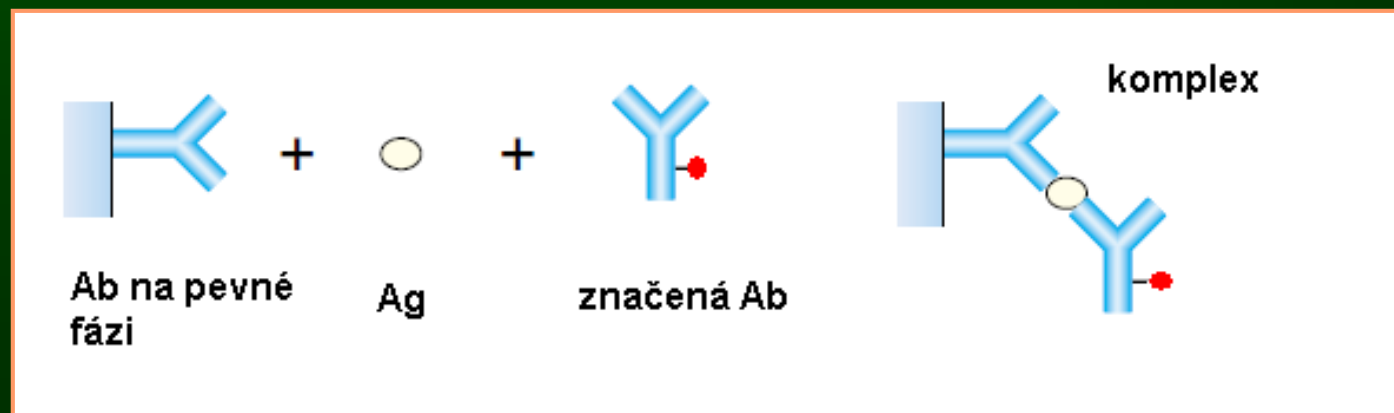
- vhodné pro stanovování malých molekul s jednou determinantou
  - hormony (steroidní, tyroidní), léky



# Imunochemická reakce v nekompetitivním uspořádání

## Stanovení antigenu:

- První protilátka Ab v nadbytku (navázaná na pevnou fázi)
- Přidání vzorku obsahujícího antigen Ag - 1. imunochemická reakce
  - odstranění nenavázaných složek séra promytím
- Přidání druhé (značené)\* protilátky Ab\* – 2. imunochemická reakce (s další antigenní determinantou)
  - vznik sendvičového komplexu **Ab-Ag-Ab\***
    - Odstranění nenavázaných složek séra promytím
- Detekční reakce - odezva přímo úměrná koncentraci Ag ve vzorku
- Vhodné pro stanovení velkých antigenů s několika vazebnými místy pro Ab

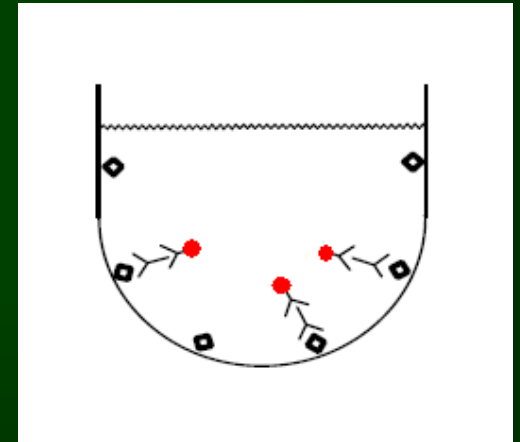


# Imunochemická reakce v nekompetitivním uspořádání

## Stanovení protilátky

- Na pevné fázi navázán antigen v nadbytku
- Přidání vzorku – reakce Ab ze vzorku s imobilizovaným Ag
  - promytí – odstranění nenavázaných složek
- Přidání 2. protilátky Ab\* (značený anti-Ig)
- Promytí a detekční reakce
  - odezva přímo úměrná koncentraci Ab ve vzorku

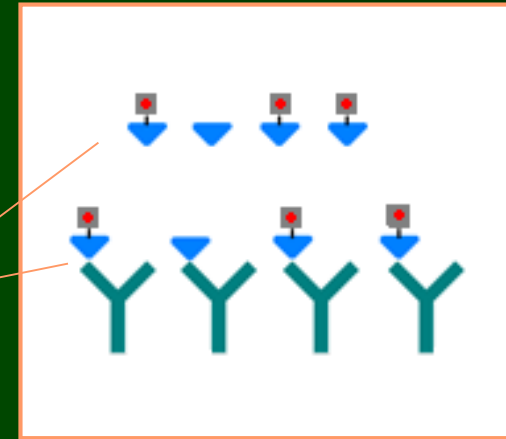
...a další komplikovaná uspořádání



# Uspořádání imunochemické reakce

- Dle nutnosti separace volného a vázaného konjugátu (značené  $Ag^*$  nebo  $Ab^*$ ):

odkud pochází signál – z volného nebo navázaného  $Ag^*$  ??



- **Heterogenní metody**

- Po vzniku imunokomplexu se vlastnosti signálu  $Ag^*$  resp.  $Ab^*$  nemění
- Nutnost separace – např. komplex navázaný na pevnou fázi
  - jamka mikrotitrační destičky, paramagnetické částice,...

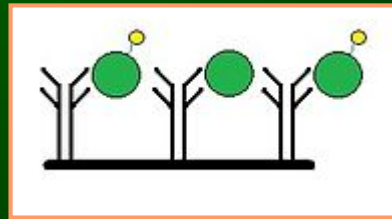
- **Homogenní metody**

- Využívají změny signálu  $Ag^*$  resp.  $Ab^*$  po vzniku imunokomplexu
  - bez nutnosti separace

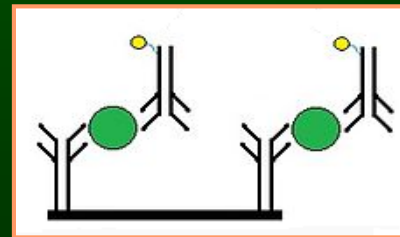
# Radioimunoanalytické (izotopové) metody

- Ag\* nebo Ab\* značené radionuklidem
  - $\gamma$ -zářiče  $^{125}\text{I}$ ,  $^{57}\text{Co}$ , ...
    - měření aktivity  $\gamma$ -záření (scintilační detektor)
- Heterogenní metody (nutnost separace komplexu)
  - imobilizace Ab na pevnou fázi (př. jamka mikrodestičky)

- **RIA – Radio Immuno Assay**
  - Kompetitivní Ab-Ag, Ab-Ag\*



- **IRMA – Immuno Radiometric Assay**
  - Sendvičová Ab-Ag-Ab\*



- Použití: hormony, léčiva, (auto)protilátky,...
- Citlivé x nestálé reagensie, nebezpečí práce s radioaktivním materiálem



# Enzymoimunoanalýza - EIA

- Značení Ag nebo Ab = **enzym**
  - ALP,  $\beta$ -galaktosidáza, glukózaoxidáza, křenová peroxidáza,...
- Indikační reakce – vznik barevného produktu po přidání substrátu enzymu
- **EMIT – Enzyme Multiplied Immunoassay Technique**
  - Homogenní kompetitivní enzymová imunoanalýza
    - Ag a Ag\* soutěží o vazebná místa na Ab
- Při vzniku imunokomplexu je enzymová aktivita inhibována
  - Měří se barevný produkt enzymové reakce nezreagovaného konjugátu
    - Odpadá nutnost separace volného a vázaného konjugátu
- Použití – stanovení nízkomolekulárních antigenů a haptenu
  - peptidové hormony
  - léčiva,...



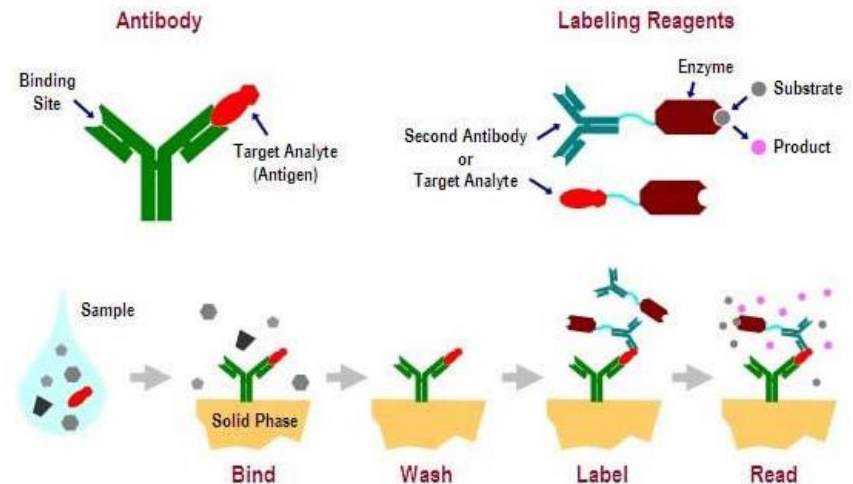
# Enzymoimunoanalýza - EIA

## ➤ ELISA – Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

- Heterogenní enzymová imunoanalýza
  - Ab nebo Ag navázány v jamce mikrotitrační destičky
  - nenavázané složky jsou po každém kroku vymyté
- Technika existuje v řadě modifikací
- Stanovení širokého spektra analytů
  - „zlatý standard“ měření jednotlivých proteinů



## ELISA

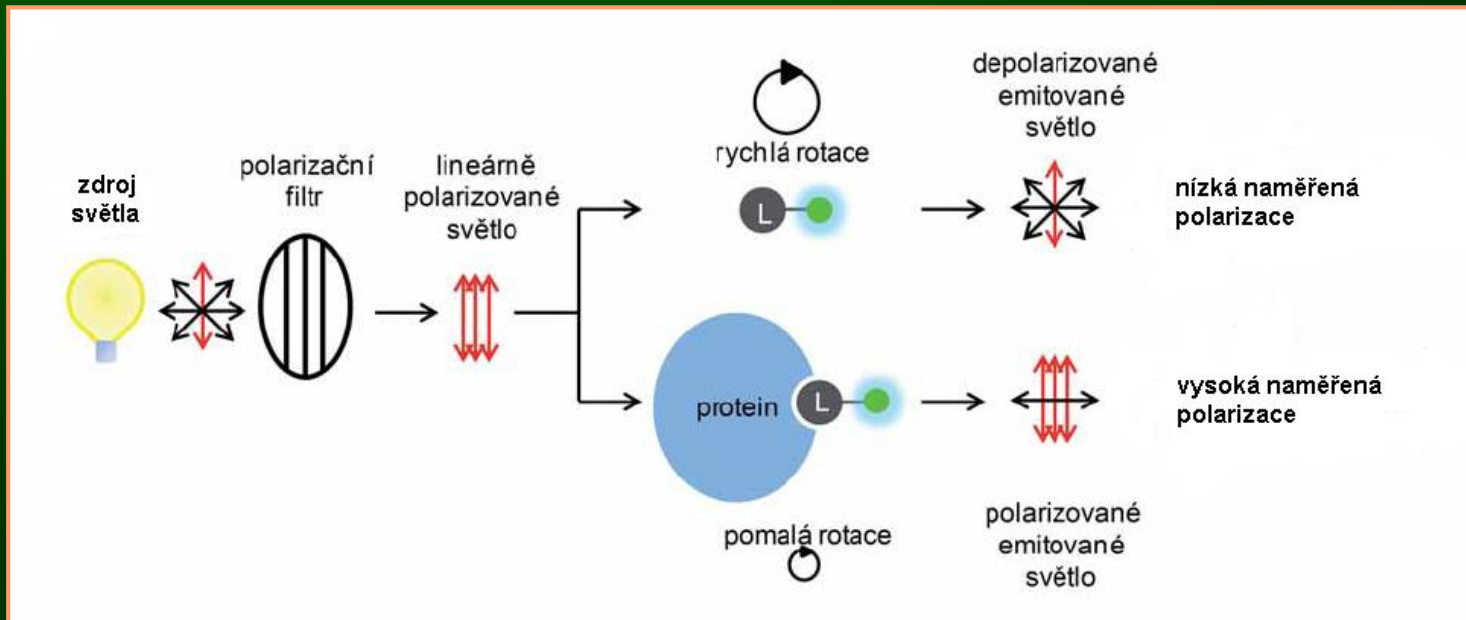


## ➤ MEIA – Microparticle EIA

- heterogenní enzymová IA
  - na mikročasticích
- Imunokomplex značený enzymem (ALP)
  - ALP rozkládá fluorogenní substrát

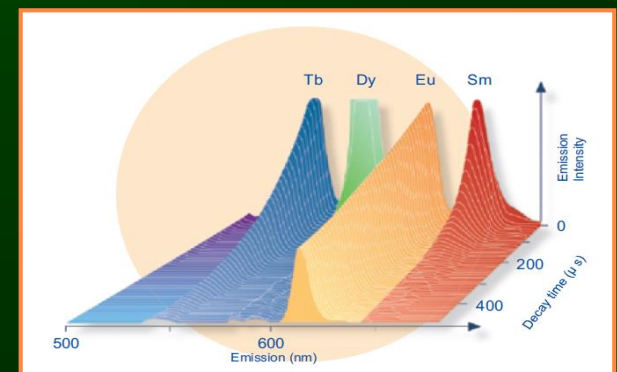
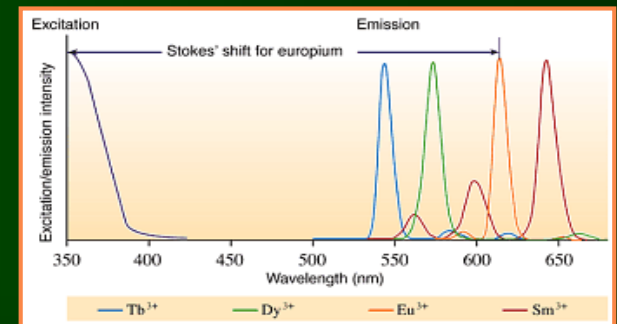
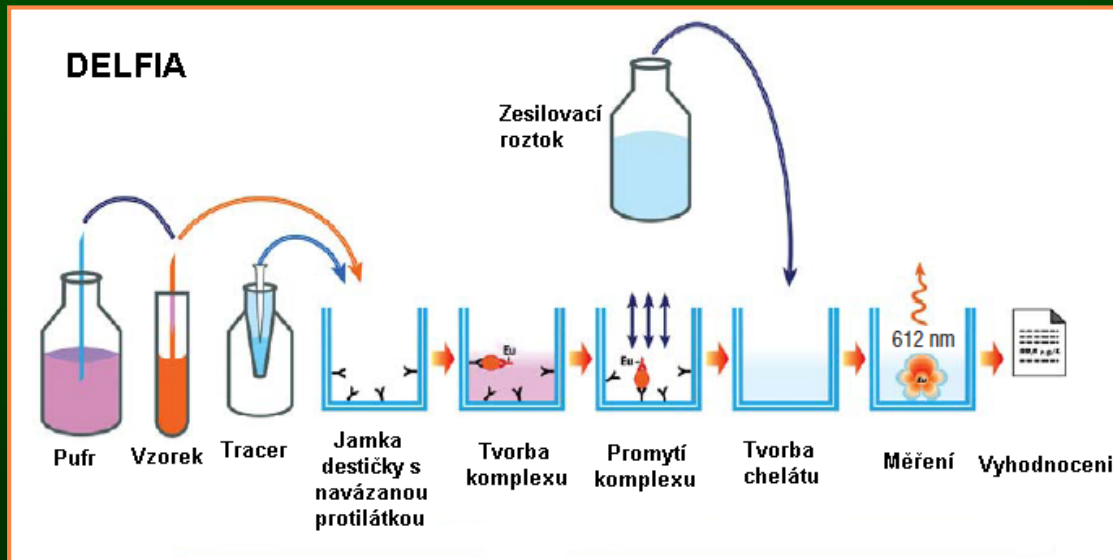
# Fluoroimunoanalýza - FIA

- Ag\* nebo Ab\* značeny fluoroforem (př. fluorescein)
  - Po dokončení imuno reakce je fluorofor excitován UV zářením, měří se fluorescence
- **FPIA – Fluorescence Polarization Immunoassay** – homogenní kompetitivní IA
- Rozlišení volného a vázaného Ag\* je založeno na rozdílné rotaci molekul v roztoku
  - fluorofor excitován polarizovaným UV světlem
  - malá molekula volného Ag\* rotuje rychle – sekundární záření je depolarizované
- Stanovení malých Ag (haptenu) – léky, drogy

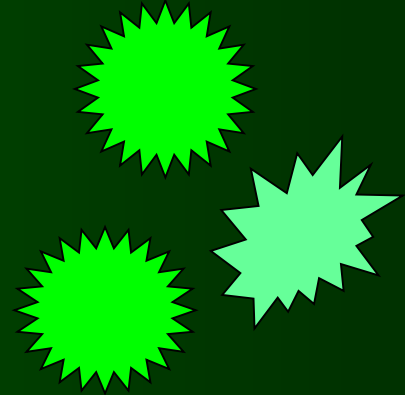
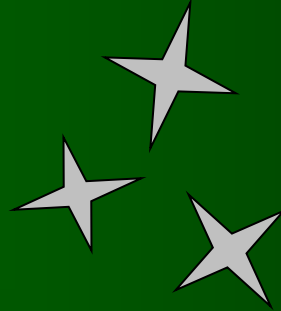


# DELFA - Dissociation-Enhanced Lanthanide Fluorescent ImmunoAssay

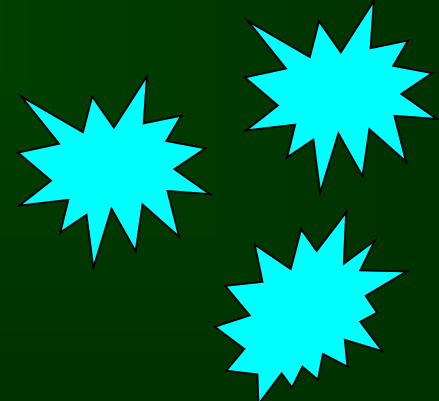
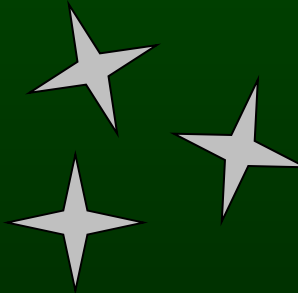
- Ab\* nebo Ag\* označeny fluoroforem – chelátem lanthanidu
  - europium, sammarium, terbium, dysprosium (přednostně Eu)
- Po proběhlé imunochemické reakci je Eu vytrženo z komplexu a přeměněno na nový intenzivně fluoreskující chelát
  - dlouhotrvající fluorescence s velkým Stokesovým posunem
  - časově modulované měření fluorescence chelátu lanthanidů
    - omezení interference matrice
- Citlivá metoda, heterogenní, kompetitivní i nekompetitivní



# FIA

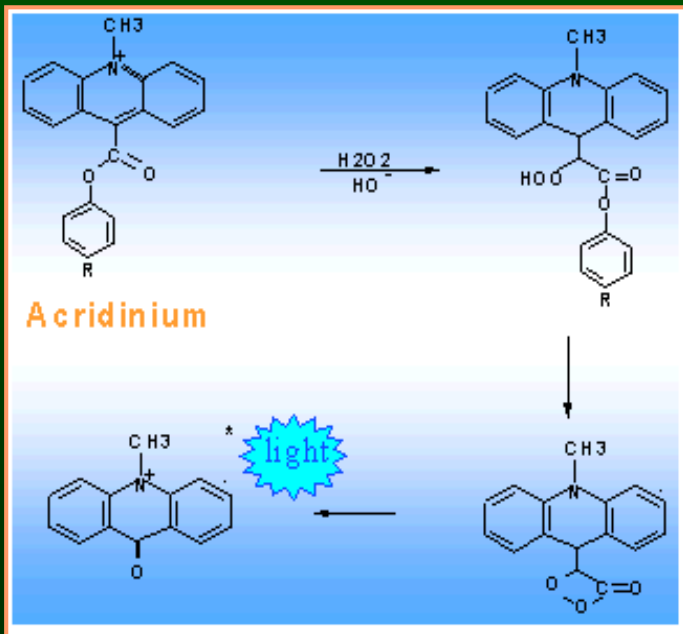
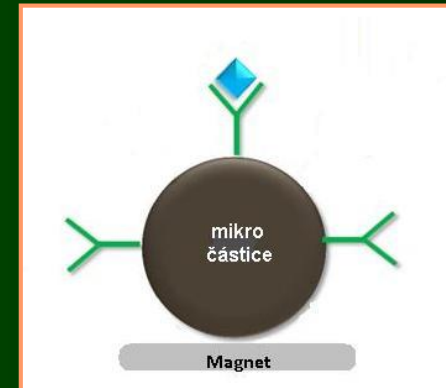


# LIA



# Luminoimunoanalýza - LIA

- Luminiscenční značka – chemiluminofor
  - emitované záření je výsledkem chemické reakce
- Heterogenní analýzy
  - Pro separaci využívají magnetické částice
- **LIA** - kompetitivní
- **ILMA** – nekompetitivní (sendvič)

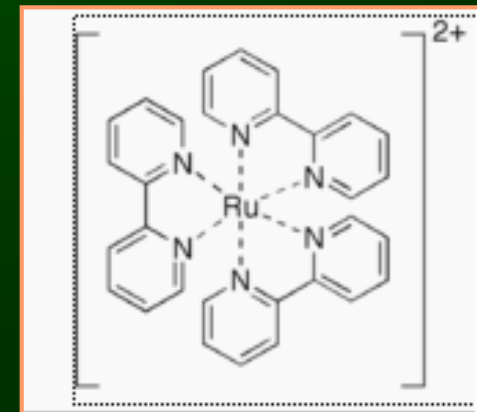
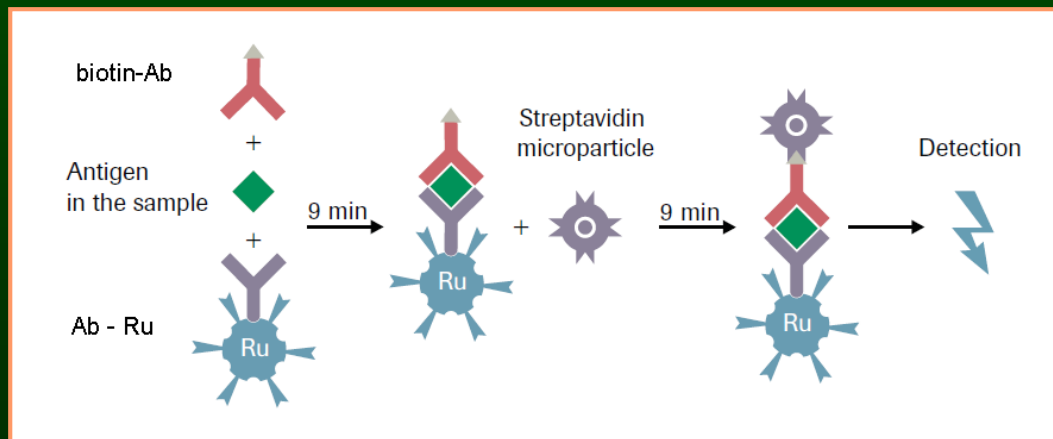


## CMIA (Chemiluminescent Microparticle IA)

- Záchytové molekuly (Ab resp Ag) fixovány na povrchu paramagnetických částic
- Značení Ag\* resp. Ab\* acridiniem
  - oxidace acridinia pomocí  $H_2O_2$  v alkalickém prostředí
  - Velmi citlivé metody

# Luminoimunoanalýza - LIA

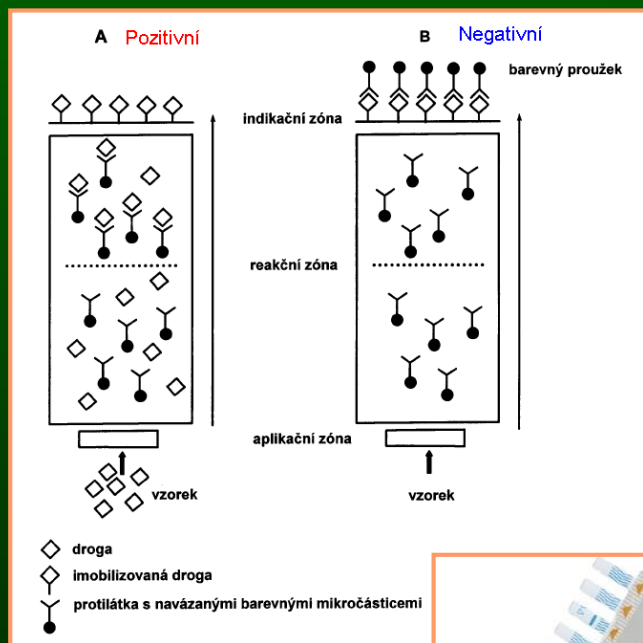
- **Elektrochemiluminiscence** – technologie Elecsys (Roche)
  - Záchytová molekula (protilátka nebo antigen) biotinylována
  - značení Ag\* nebo Ab\* = rutenium(II) tris-bipyridylový komplex
  - kompetitivní nebo sendvičová imunoreakce
  - přidání mikročastic potažených streptavidinem
    - celý imunokomplex se váže na pevnou fázi interakcí biotinu se streptavidinem
  - zachycení mikročastic magnetickým polem na povrchu elektrody
  - přidání substrátu tripropylaminu (TPA) a přivedení napětí na elektrody
    - ruthéniový komplex uvolní na elektrodě elektron za vzniku  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$  kationtu - elektrochemiluminiscenční emise



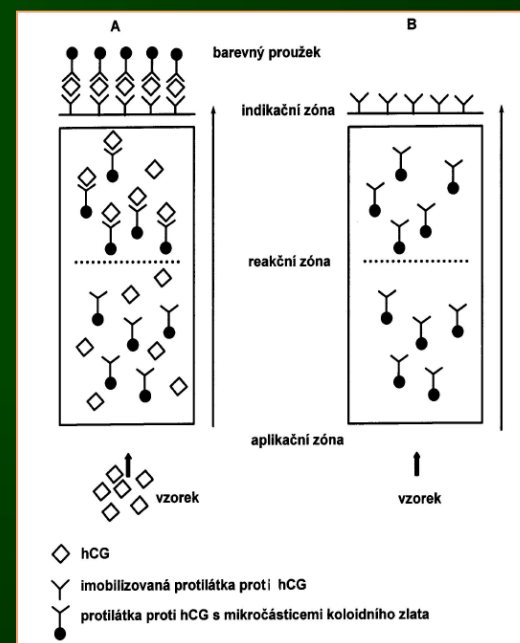
# Proužkové testy – rychlá imunochemická diagnostika

- Imunoafinitní chromatografie
- různá uspořádání a průběh imunochemické reakce

## drogy



## těhotenský test



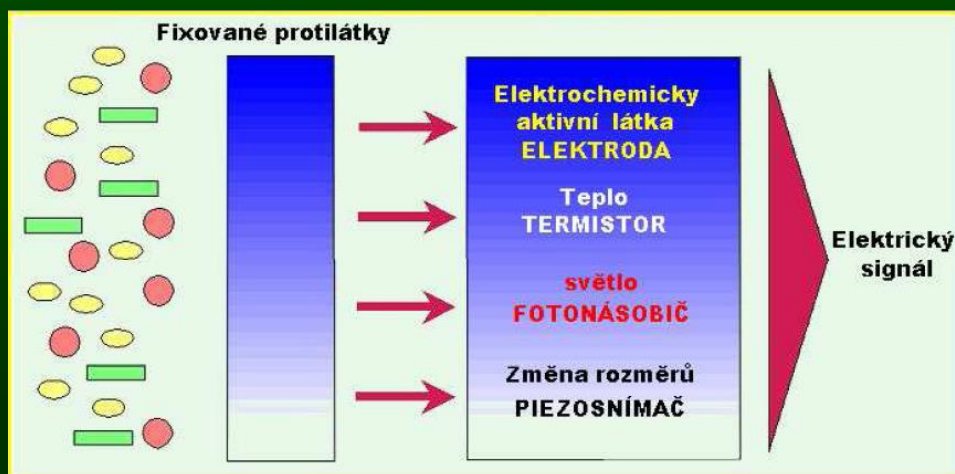


# Multiplexové metody



Měření – flow cytometrie

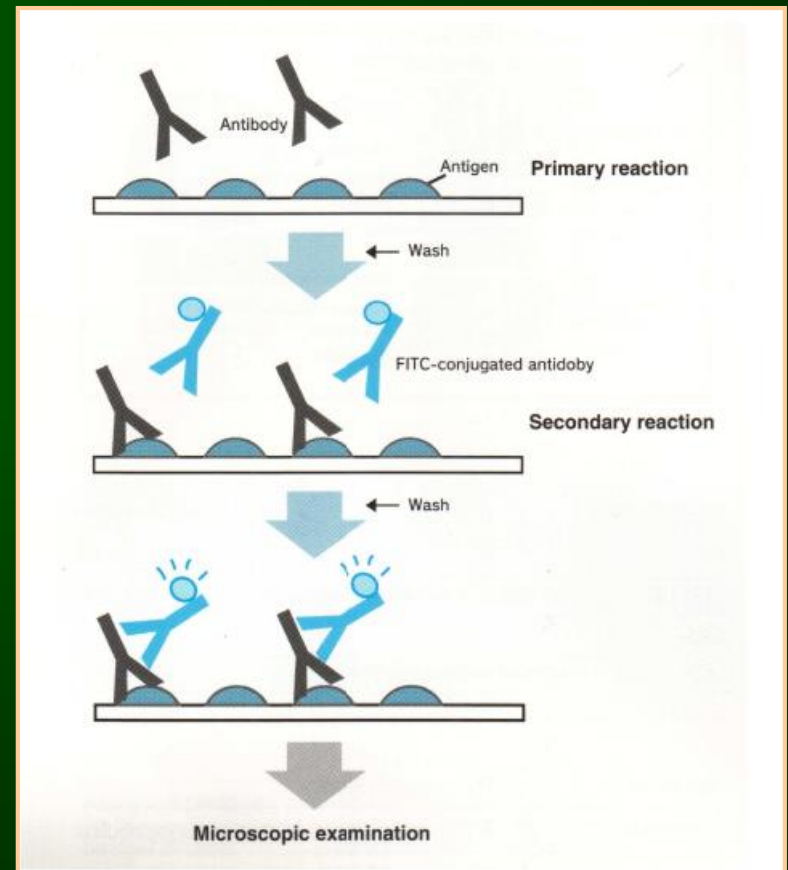
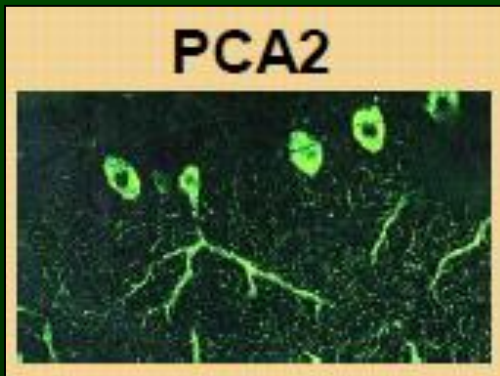
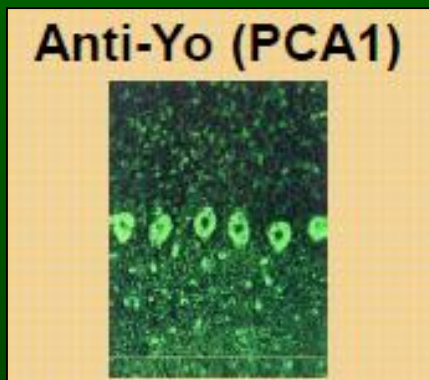
# Imunosenzory



- citlivý prvek biologického původu + elektronická jednotka → výstupní signál

# Imunohistochemie

- vazba protilátek s antigeny ve tkáni



*Děkuji Vám za pozornost...*

*...sendvič ???*

