

Aglutinace přímá a nepřímá, Coombsův test,
„antiglobulinová séra“

Precipitační reakce v roztoku a v gelu

Imunoelektroforéza, imunoelektrofixace, Western-
blot

Imunofluorescence.

Chemiluminiscence.

ELISA, RIA, LIA

Praktikum č. 3

doc. MUDr. Zita Chovancová, Ph.D.

ZÁKLADNÍ DĚLENÍ IMUNOLOGICKÝCH LABORATORNÍCH VYŠETŘENÍ

- **Serologická vyšetření**
 - *základním materiálem pro vyšetření*
 - **SÉRUM**
- **Buněčná vyšetření**
 - *základním materiálem pro vyšetření*
 - **PERIFERNÍ ŽILNÍ KREV**
- **Další zdroje materiálu pro imunologické vyšetření**
 - *mozkomošní mok, lymfatické uzliny, bioptické vzorky orgánů, kostní dřev, bronchoalveolární laváž*

ODBĚR MATERIÁLU K IMUNOLOGICKÉMU VYŠETŘENÍ

SEROLOGICKÁ VYŠETŘENÍ – proces získávání séra

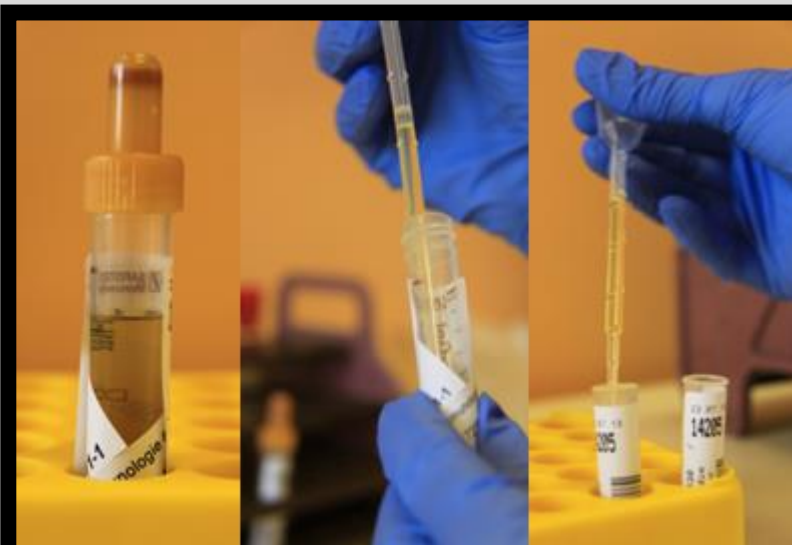
1. odběr venózní srážlivé krve



2. centrifugace



3. přenesení séra do jiné zkumavky



4. uchování séra k dalšímu použití

- 2 týdny při teplotě 4 °C
- měsíce při teplotě -20 °C
- roky při teplotě -80 °C

ODBĚR MATERIÁLU K IMUNOLOGICKÉMU VYŠETŘENÍ

BUNĚČNÁ VYŠETŘENÍ – proces získávání buněk

protisrážlivé činidlo EDTA



protisrážlivé činidlo heparin



*Krev odebranou pro buněčná
vyšetření není většinou
možno skladovat delší dobu.*



*Vyšetření je nutné provést do
několika desítek minut
(vyšetření fagocytárních funkcí)
až několika hodin (vyšetření
počtu a funkce lymfocytů).*

typy odběrových zkumavek



INAKTIVACE SÉRA

Zahřátí séra na 56 °C po dobu 30 minut.



*Dochází k funkční inaktivaci proteinů
komplementové kaskády, proto již nelze vyšetřit
aktivitu komplementové kaskády.
Dochází také k inaktivaci viru HIV.*



***Je ale možné měřit koncentraci většiny
sérových bílkovin včetně složek
komplementové kaskády.***

REAKCE ANTIGENU S PROTILÁTKOU IN VITRO

- **EPITOP**

- *oblast antigenu, která reaguje s vazebným místem příslušné protilátky*

- **PARATOP**

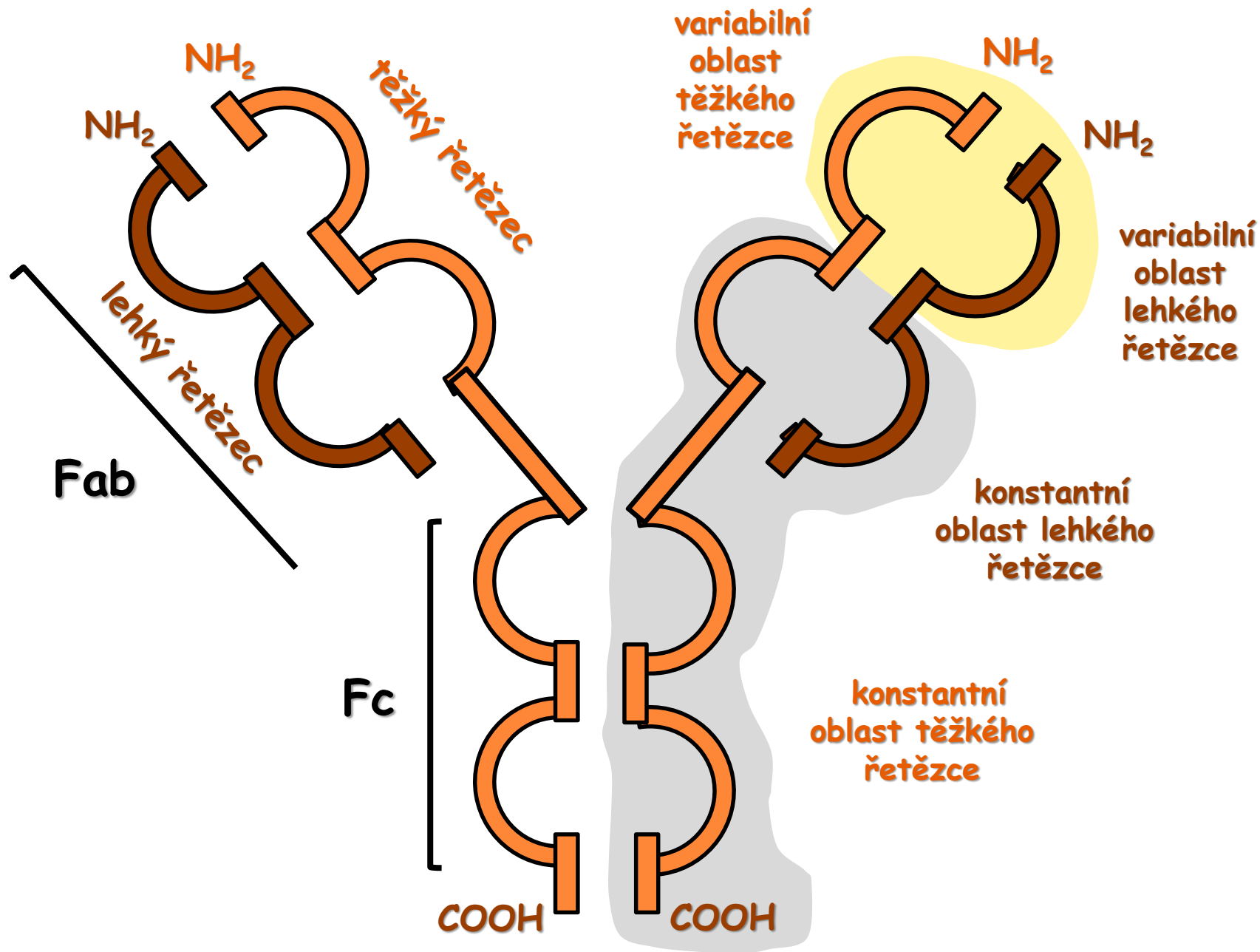
- *vazebné místo protilátky (oblast N-terminálních částí variabilních částí lehkého a těžkého řetězce)*

- **AFINITA**

- *síla vazby mezi epitopem a paratopem*

- **AVIDITA**

- *síla interakce polyvalentní protilátky s polyvalentním antigenem*



PRIMÁRNÍ A SEKUNDÁRNÍ FÁZE SEROLOGICKÉ REAKCE

Primární fáze serologické reakce

- *pokud je zkoumaná protilátka v séru přítomna, dochází k vazbě protilátky na antigen*
- ***není patrná pouhým okem***

Sekundární fáze serologické reakce

- *uplatňuje se multivalence antigenu a polyvalence protilátek*
- ***vzniká prostorový komplex velkého počtu molekul antigenu a protilátek o vysoké molekulové hmotnosti***

PRIMÁRNÍ A SEKUNDÁRNÍ FÁZE SEROLOGICKÉ REAKCE

... vzniklé komplexy jsou

- ***viditelné pouhým okem***
(AGLUTINACE, PRECIPITACE)
 - ***mění roztok pravý na nepravý (koloidní)***
(TURBIDIMETRIE, NEFELOMETRIE)
-
- *pokud uspořádání reakce umožňuje průběh jen primární fáze reakce nebo průběh sekundární fáze jen ve velmi omezeném rozsahu, je nutné vizualizovat reakci imunochemicky následnou detekcí*
(IMUNOESEJE)

ANTIGLOBULINOVÉ PROTILÁTKY

sekundární antisérum

- *xenogenní protilátky (např. králičí nebo myší), získané hyperimunizací, purifikované afinitní chromatografií, případně značené (fluorochromy, enzymy a podobně)*
- *váží se na konzervované struktury imunoglobulinových molekul, nikoliv jejich vazebné místo!*

Příklady sekundárních antisér:

- *RaHuIgG (rabbit anti-human IgG) reaguje s lidskými IgG různých specifit (proti Rh, proti antigenům mikrobů ...)*

CITLIVOST METOD K PRŮKAZU PROTILÁTEK

precipitace

30 $\mu\text{g/ml}$

aglutinace

1 $\mu\text{g/ml}$

radioimunoassay a ELISA

1 pg/ml

INTERPRETACE LABORATORNÍCH TESTŮ

- **SPECIFICITA**

- *pravděpodobnost, že test bude **negativní u zdravých osob***

- **SENZITIVITA**

- *pravděpodobnost, že test bude **pozitivní u nemocných***

POLYKLONÁLNÍ a MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY

- **POLYKLONÁLNÍ PROTILÁTKY**

- *Směs imunoglobulinových molekul, jejichž vazebná místa nesou specifitu vůči různým epitopům na celé molekule antigenu*
- **Získávají se obvykle imunizací zvířat**

- **MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY**

- *Produkt jednoho klonu B-lymfocytů, vykazují jedinečnou specifitu proti jednomu epitopu na molekule antigenu*
- **Získávají se obvykle metodikami in vitro**

KOMPLETNÍ A INKOMPLETNÍ PROTILÁTKY

- ***Tzv. INKOMPLETNÍ PROTILÁTKY***
 - *přestože dojde k jejich vazbě na antigen, nedojde k sekundární fázi reakce a tím k vizualizaci serologické reakce*

Příčiny

- **na straně antigenu**
 - *nízká antigenicita (málo epitopů, jejich špatná dostupnost)*
 - *velké elektrické odpudivé síly mezi částice*
- **na straně protilátky**
 - *ne všechny protilátky se uplatňují v aglutinačních reakcích stejně (IgM x IgG)*

PŘEHLED METOD PRO STANOVENÍ ANTIGENU NEBO PROTILÁTKY

- ***vizualizace pomocí sekundární fáze reakce***
 - **AGLUTINACE** (*přímá, nepřímá*)
 - **PRECIPITACE** (*jednoduchá, v kombinaci s elektroforézou, imunofixace*)
- ***vizualizace pomocí následné detekce***
 - **IMUNOFLUORESCENCE**
 - **IMUNOANALÝZA** (*RIA, EIA, řada modifikací*)
 - **IMUNOBLOT, IMUNODOT**

a g l u t i n a c e

p r e c i p i t a c e

E L I S A

c h e m i l u m i n i s c e n c e

i m u n o f l u o r e s c e n c e

e l e k t r o f o r é z a

i m u n o e l e k t r o f o r é z a

i m u n o f i x a c e

W e s t e r n b l o t

a g l u t i n a c e

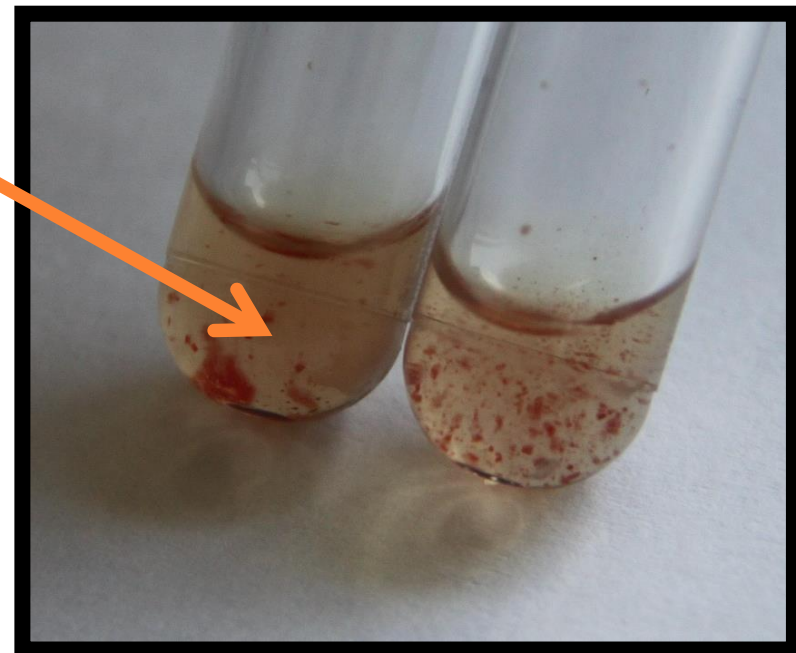
princip reakce

antigen KORPUSKULÁRNÍ POVAHY

Vazbou dvoj a vícevazebných protilátek na povrch antigenu dojde k překonání odpuzivých, způsobených negativním nábojem na povrchu částic (zeta potenciál), a vytvoří se mezi nimi můstky ...

*... vzniká **AGLUTINÁT***

- ***snadná vizualizace proběhlé reakce***
 - díky velikosti antigenu
 - díky průběhu reakce v tekutině



a g l u t i n a c e

faktory ovlivňující kvalitu aglutinační reakce

- ***dostatek protilátek***
 - příliš velké ředění protilátek → aglutinace neproběhne
- ***přítomnost protilátek proti různým epitopům***
 - rozdíl v aglutinaci mezi monoklonálními a polyklonálními protilátkami
- ***vzdálenost mezi jednotlivými antigenními částicemi***
 - odpuzivé elektrické síly na povrchu částic klesají se čtvercem vzdálenosti

a g l u t i n a c e

přímá a nepřímá

přímá aglutinace

antigeny se nacházejí přímo na zkoumané částici

průkaz krevních skupin, přímý Coombsův test, určování izolovaných bakteriálních kmenů (zejména ze skupiny enterobaktérií), Widalova reakce, Weil-Felixova reakce, průkaz některých zoonóz, ...

nepřímá aglutinace

zkoumaný antigen je navázán na povrchu vhodných makromolekulárních částic

latex-fixační test, nepřímý Coombsův test, rychlé testy pro ambulantní vyšetření (ASLO), ...

a g l u t i n a c e

určování krevních skupin

ANTIGENY NA POVRCHU ERYTROCYTŮ

polysacharidové

skupinový systém AB0 (antigen A, antigen B)

skupinový systém Lewis, P a li

glykoproteinové

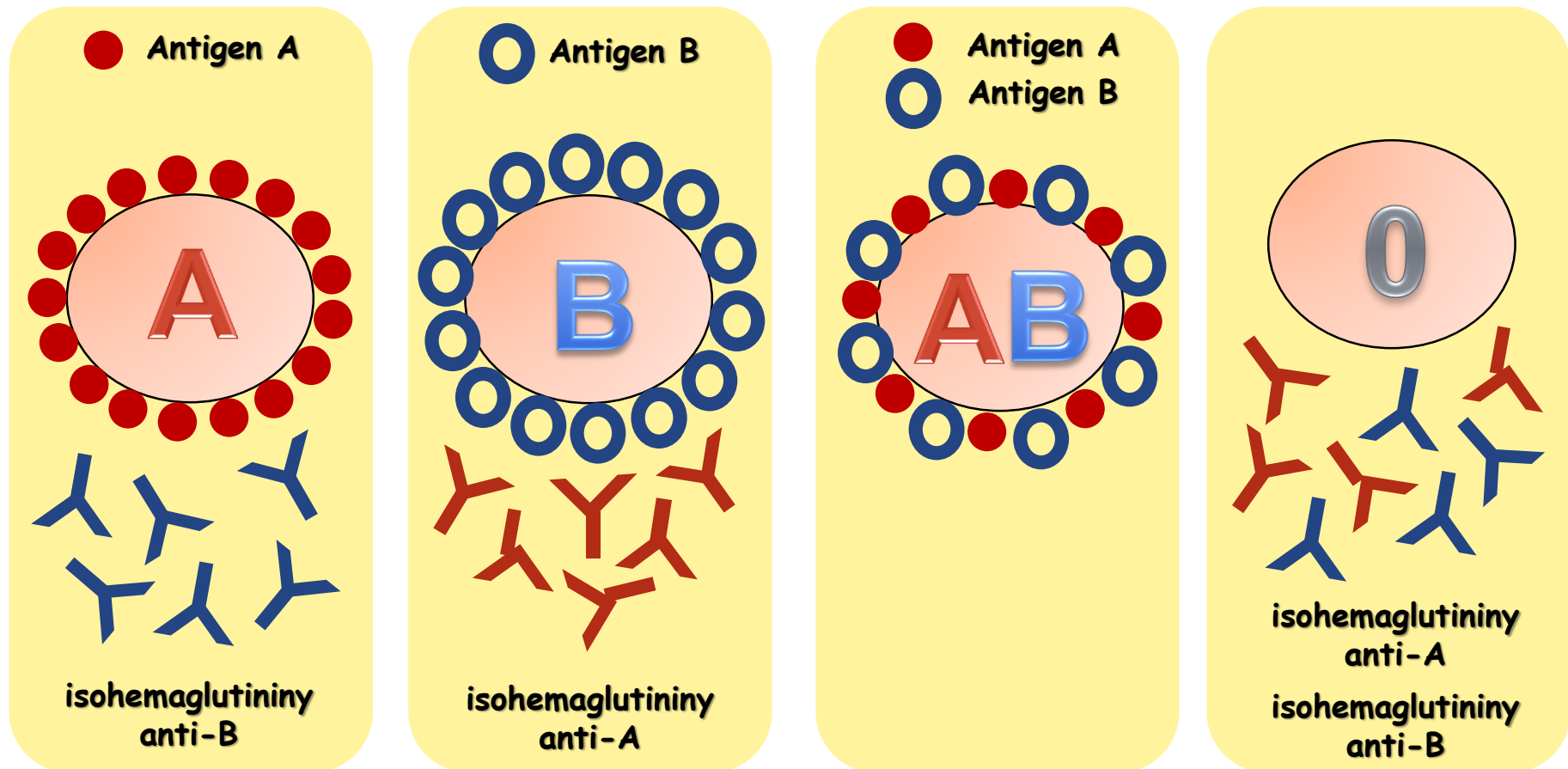
skupinový systém Rh (antigen D)

skupinový systém MNSs, Lutheran, Kell, Duffy, Diego

aglutinace

určování krevních skupin

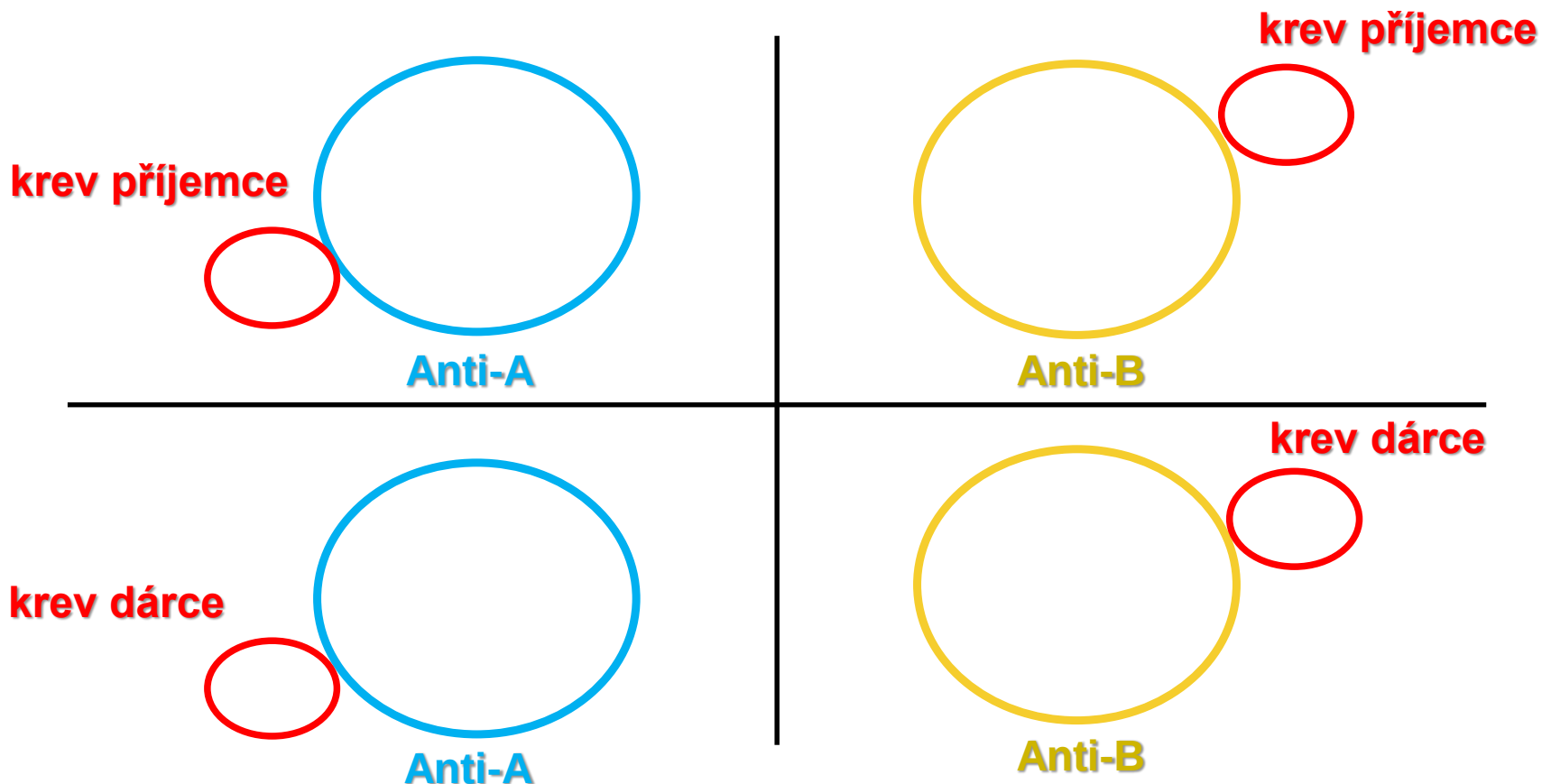
skupinový systém ABO



a g l u t i n a c e

určování krevních skupin systému AB0 v klinické praxi

křížová zkouška



a g l u t i n a c e

skupinový systém Rh

COOMBSŮV TEST

Průkaz inkompletních protilátek proti antigenům Rh

PŘÍMÝ Coombsův test

*Průkaz in vivo **navázaných** antierytrocytárních
protilátek*

NEPŘÍMÝ Coombsův test

*Průkaz **cirkulujících** antierytrocytárních protilátek*

Coombsovo antisérum

*protilátky proti lidským sérovým globulinům
(polyspecifické antisérum obsahující protilátky proti IgG, komplementu, těžkým
i lehkým řetězcům imunoglobulinů)*

a g l u t i n a c e

latex-fixační test

k průkazu revmatoidního faktoru (RF)

*Autoprotilátka namířená proti Fc části
imunoglobulinu ve třídě IgG*

Princip metody:

- na částice latexové suspenze jsou navázány modifikované lidské imunoglobuliny (agregované IgG)*
- v případě přítomnosti IgM protilátek proti Fc části lidského IgG v séru pacienta jsou takto připravené částice tímto sérem aglutinovány*

a g l u t i n a c e
p r e c i p i t a c e

E L I S A

c h e m i l u m i n i s c e n c e

i m u n o f l u o r e s c e n c e

e l e k t r o f o r é z a

i m u n o e l e k t r o f o r é z a

i m u n o f i x a c e

W e s t e r n b l o t

p r e c i p i t a c e

princip reakce

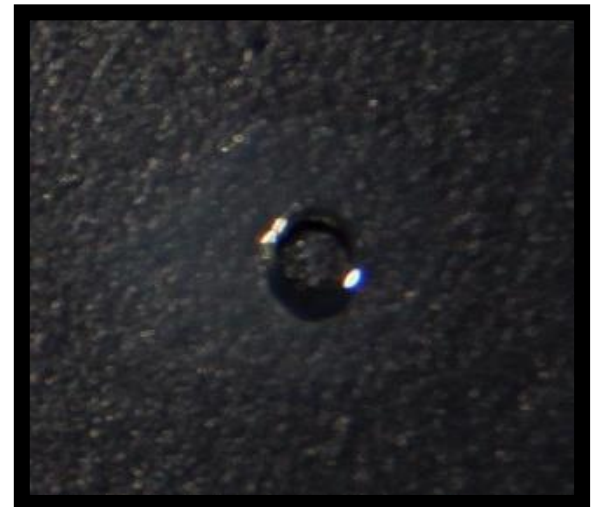
antigen NEKORPUSKULÁRNÍ POVAHY o nízké molekulové hmotnosti

Antigen o nízké molekulové hmotnosti je rozpustný v kapalině a tvoří pravý roztok a při optimálním poměru antigenu a protilátky dochází ke vzniku makroskopicky zřetelné prostorové mřížky tvořené imunokomplexy.

*... vzniká **PRECIPITÁT*** 

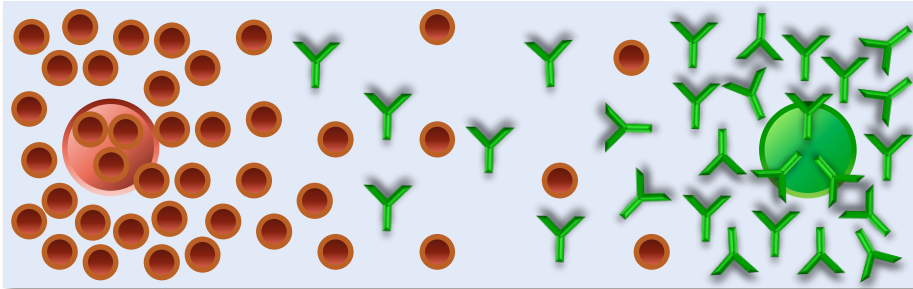
PRECIPITACE PROBÍHÁ ...

- v kapalinách (nefelometrie, turbidimetrie)*
- v gelech (vstříčná a radiální imunodifuze)*

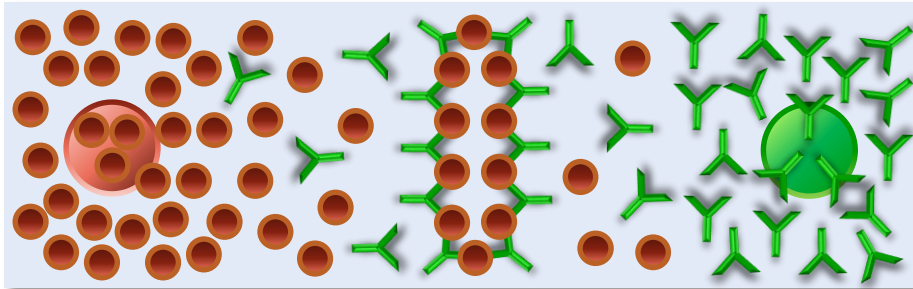


p r e c i p i t a c e

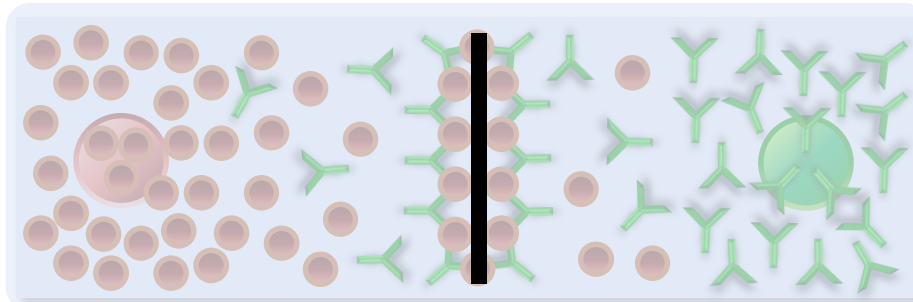
... v gelech



*antigen a protilátka difundují
gelem na podkladě koncentračního
gradientu*



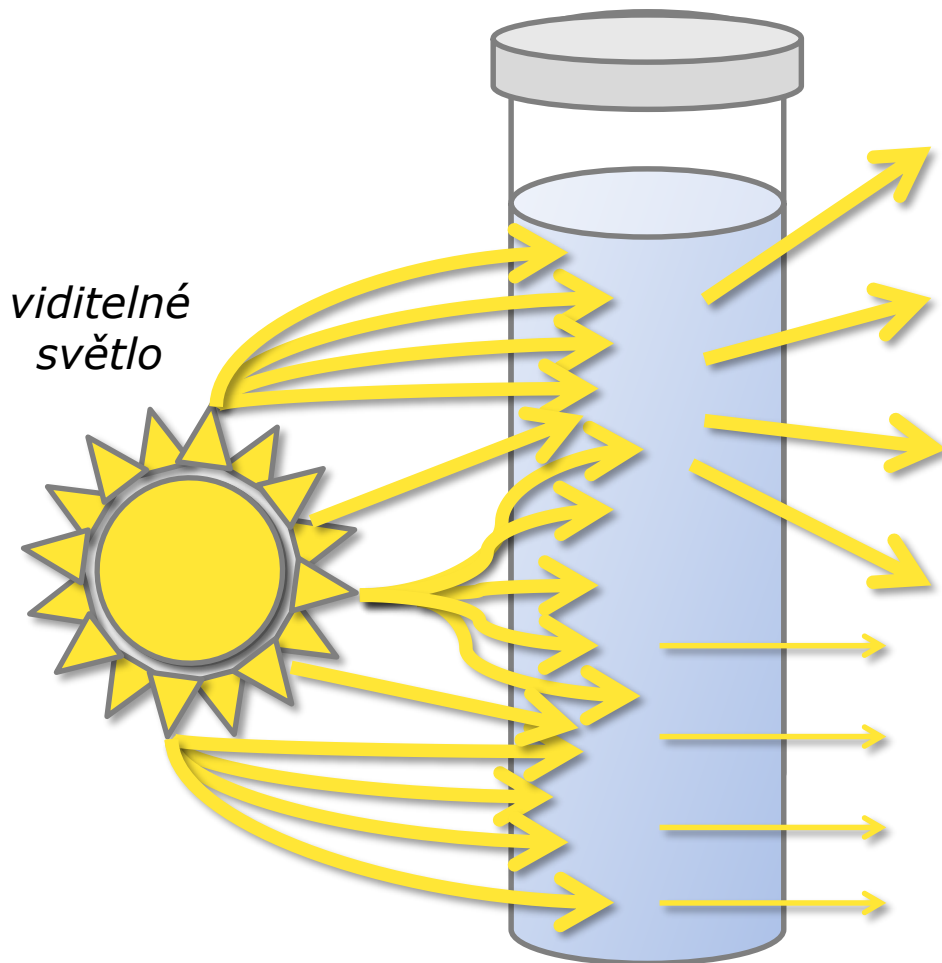
*v místě ekvimolární koncentrace
antigenu a protilátky ...*



*... vzniká **precipitační linie***

precipitace

... v kapalinách



ROZPTYL **ETRIE**

rozptylu
viditelného světla

ÚBYTEK **ETRIE**

m
pošlého světla

a g l u t i n a c e
p r e c i p i t a c e

ELISA

c h e m i l u m i n i s c e n c e
i m u n o f l u o r e s c e n c e
e l e k t r o f o r é z a
i m u n o e l e k t r o f o r é z a
i m u n o f i x a c e
W e s t e r n b l o t

ELISA

enzyme-linked immunosorbent assay

princip reakce

ke zjištění koncentrace antigenu nebo protilátky

*k detekci reakce mezi antigenem a protilátkou se používá **enzym**
(konjugát zvířecí protilátky proti lidské protilátce IgG, IgA nebo IgM značené enzymem)*

Použití v klinické praxi:

- *v současnosti zřejmě nejvíce používaná laboratorní metoda v imunologických a klinických laboratořích*
- *průkaz protilátek (antibakteriálních, antivirových, autoproti látek) nebo antigenů*
- **vysoká citlivost testu umožňuje průkaz analytů o nízké koncentraci**
- *ELISA není vhodná k detekci analytů o vyšší koncentraci (např. koncentrace sérových imunoglobulinů) – vzhledem k nutnosti vysokého ředění vzorků možnost velké chyby stanovení!*

ELISA

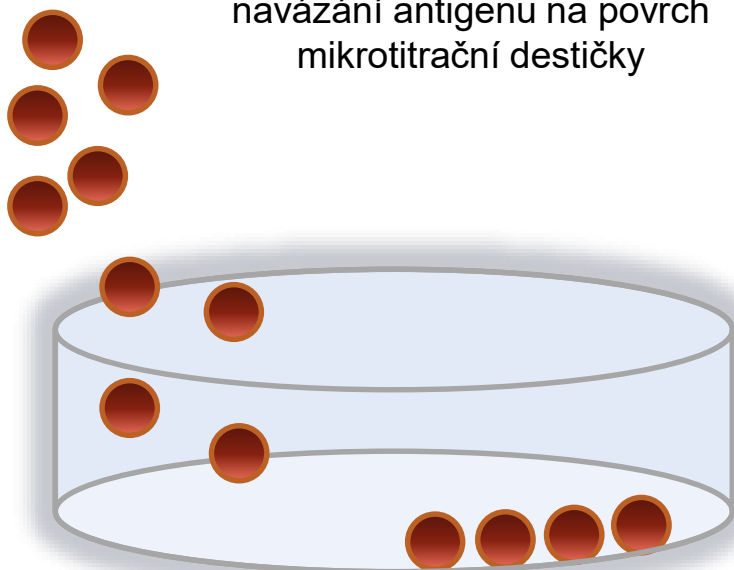
enzyme-linked immunosorbent assay

princip reakce

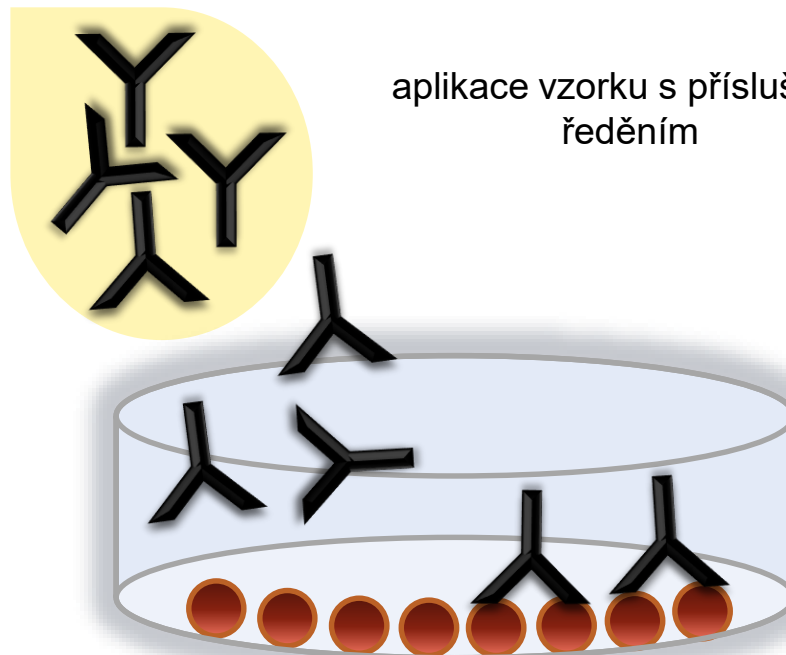
ke zjištění koncentrace antigenu nebo protilátky

- vazba **antigenu** na pevnou fázi (jamka mikrotitrační destičky)
 - inkubace a následné promytí destičky
- aplikace **séra s předpokládaným výskytem protilátek** proti vyšetřovanému antigenu (dojde k vazbě protilátky na antigen)
 - inkubace a následné promytí destičky
- aplikace **konjugátu** zvířecí (myší, králičí, ...) protilátky proti lidskému IgG, IgA nebo IgM konjugované s enzymem
 - inkubace a následné promytí destičky
- aplikace **substrátu** (bezbarvý substrát → enzym → barevný produkt)
 - inkubace
- zastavení probíhající enzymatické reakce
- změření absorbance jamek spektrofotometricky (intenzita výsledného zbarvení je v určitém rozmezí koncentrací přímo úměrná množství navázané protilátky)

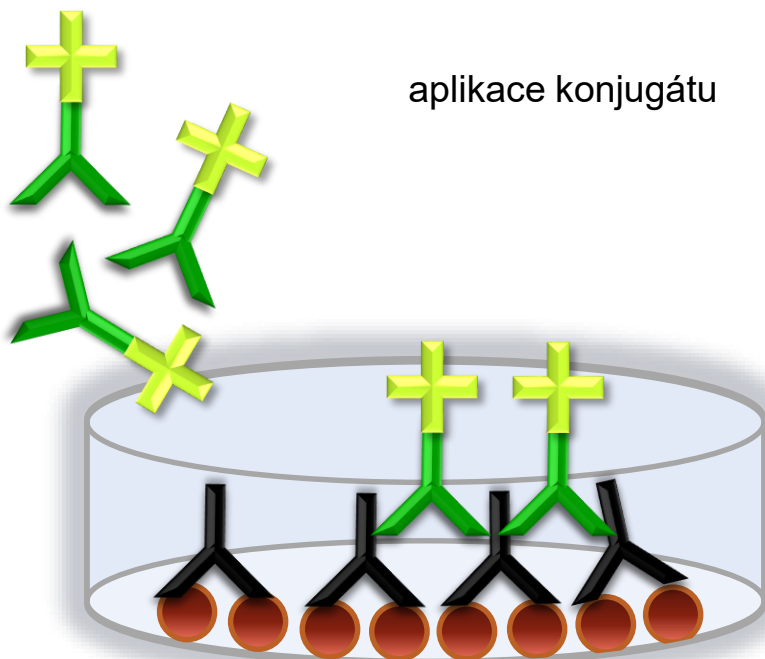
navázání antigenu na povrch
mikrotitrační destičky



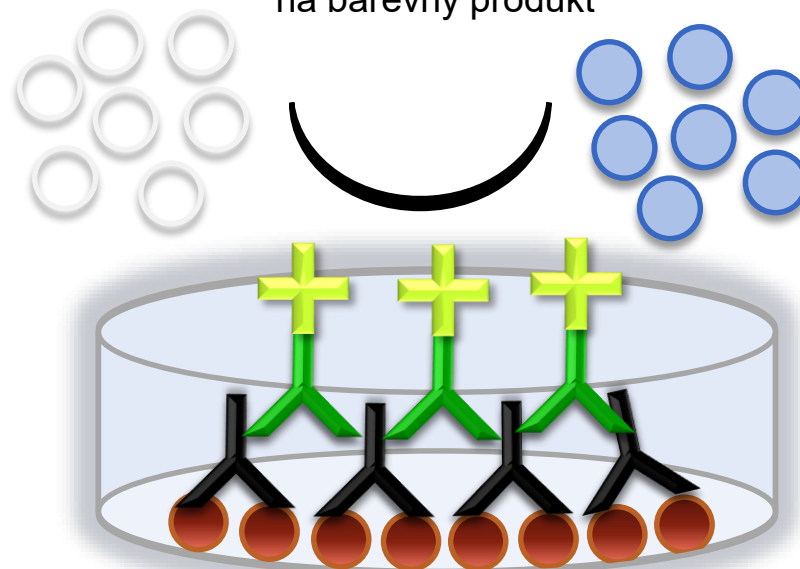
aplikace vzorku s příslušným
ředěním



aplikace konjugátu



enzymatická přeměna substrátu
na barevný produkt



a g l u t i n a c e

p r e c i p i t a c e

E L I S A

ch e m i l u m i n i s c e n c e

i m u n o f l u o r e s c e n c e

e l e k t r o f o r é z a

i m u n o e l e k t r o f o r é z a

i m u n o f i x a c e

W e s t e r n b l o t

chemiluminiscence

princip reakce

zjištění přítomnosti antigenu nebo protilátky

k detekci přítomnosti antigenu nebo protilátky se používá

chemiluminiscenční substrát *(reaguje s enzymem na detekční protilátce)*

- *pevná fáze tvořená kuličkami potaženými antigeny nebo protilátkami je umístěna v reakční kyvetě*
- *přidání vzorku pacienta, kde se analyt (antigen, protilátka) naváže na protilátku nebo antigen na kuličkách*
- *přidání detekční protilátky s navázaným enzymem (obvykle alkalická fosfatáza) namířené proti analytu*
- *po inkubaci a promytí je přidán chemiluminiscenční substrát, který reaguje s enzymem na detekční protilátce → emise světla*
- *emise světla měřena luminometrem → intenzita světla je úměrná množství analytu ve vzorku*

Použití: stanovení sérové koncentrace specifický IgE protilátek, ale také proteinů akutní fáze, hormonů, nádorových markerů a dalších

a g l u t i n a c e

p r e c i p i t a c e

E L I S A

c h e m i l u m i n i s c e n c e

i m u n o f l u o r e s c e n c e

e l e k t r o f o r é z a

i m u n o e l e k t r o f o r é z a

i m u n o f i x a c e

W e s t e r n b l o t

imunofluorescence

princip reakce

zjištění přítomnosti antigenu nebo autoprotilátky

*k detekci přítomnosti antigenu nebo protilátky se používá **fluorochrom** (konjugát zvířecí protilátky proti antigenu nebo proti lidské protilátce ve třídě IgG, IgA nebo IgM značené flourochromem)*

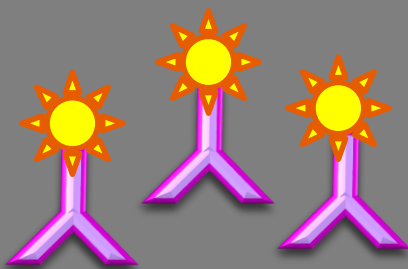
PŘÍMÁ IMUNOFLOURESCENCE

- *detekce přítomnosti **antigenu nebo protilátky ve tkáních** pomocí protilátek značených flourochromem*
- *diagnostika puchýřnatých chorob, SLE, porfyrií, vaskulitid, glomerulonefritid a podobně*

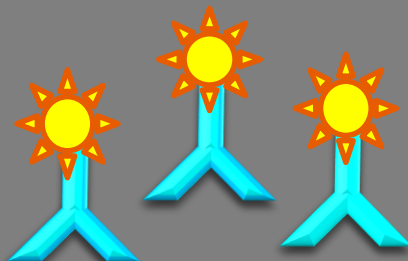
NEPŘÍMÁ IMUNOFLOURESCENCE

- *detekce přítomnosti specifických **protilátek v séru** tak, že protilátky přítomné v séru pacienta jsou po vazbě na antigen dárcovské tkáně označené zvířecí protilátkou proti lidským IgG, IgA a IgM imunoglobulinům značenou flourochromem*
- *detekce přítomnosti autoprotilátek*

PŘÍMÁ IMUNOFLOURESCENCE



konjugát s flourochromem



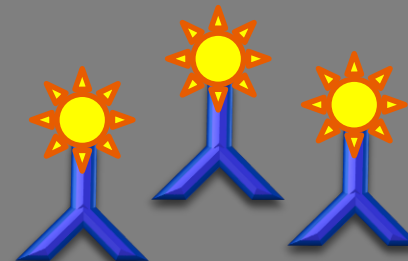
konjugát s flourochromem



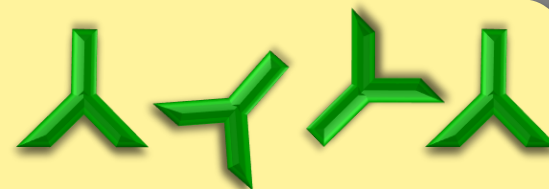
detekce antigenu
ve tkáni pacienta

detekce protilátky
ve tkáni pacienta

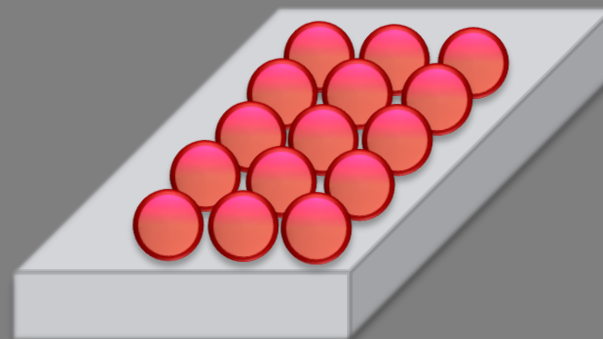
NEPŘÍMÁ IMUNOFLOURESCENCE



konjugát s flourochromem



detekce protilátky v séru pacienta



dárcovská tkáň s antigenem

a g l u t i n a c e

p r e c i p i t a c e

E L I S A

c h e m i l u m i n i s c e n c e

i m u n o f l u o r e s c e n c e

e l e k t r o f o r é z a

i m u n o e l e k t r o f o r é z a

i m u n o f i x a c e

W e s t e r n b l o t

e l e k t r o f o r é z a

princip metodiky

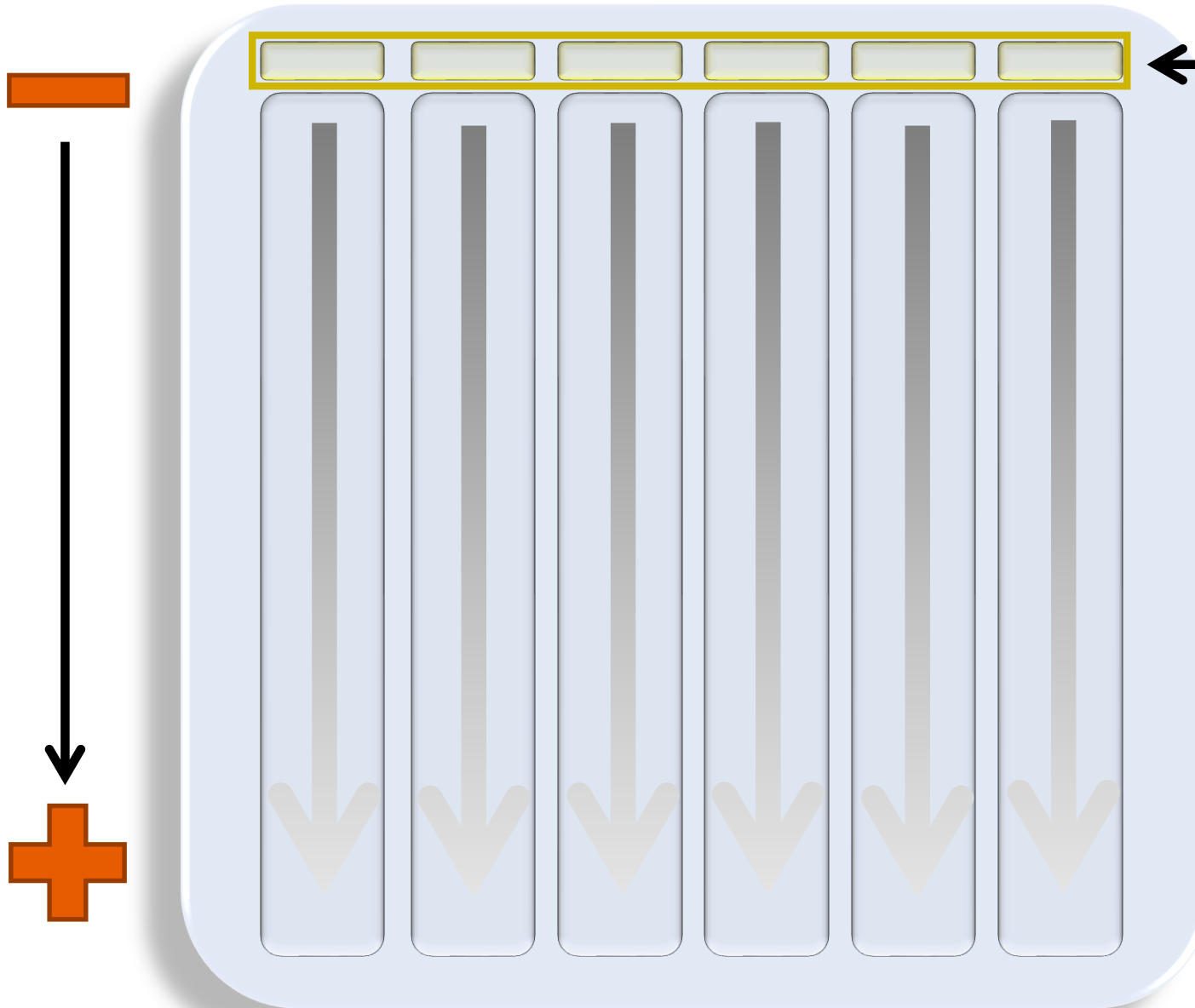
- *nabité částice se pohybují v elektrickém poli*
- *rychlost pohybu částic je závislá na velikosti celkového povrchového náboje, velikosti a tvaru molekuly a její koncentraci v roztoku*

NATIVNÍ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA BÍLKOVIN

- *bez denaturačních činidel*
- *proteiny migrují gelem podle svého celkového náboje, velikosti a tvaru (citlivost elektroforézy je dána charakterem pórů gelu)*
- ***elektroforéza sérových bílkovin (rozdělení proteinů plazmy na 5-6 frakcí)***
- ***Využití elektroforézy v klinické praxi:***
- *analýza a dělení směsí bílkovin, charakterizace povrchů organismů (bakterií, virů a podobně), diagnostika monogenních chorob a podobně*

elektroforéza

*Aplikace séra
pacientů do
elektroforetických
drah ...*



*... rozdělení
sérových
proteinů dle
náboje, proteinů
a velikosti ...*

elektroforéza sérových bílkovin



albumin

alfa 1 globulin

alfa 2 globulin

beta 1 globulin

beta 2 globulin

gama globulin

a g l u t i n a c e

p r e c i p i t a c e

E L I S A

c h e m i l u m i n i s c e n c e

i m u n o f l u o r e s c e n c e

e l e k t r o f o r é z a

i m u n o e l e k t r o f o r é z a

i m u n o f i x a c e

W e s t e r n b l o t

imuno elektroforéza

princip metodiky

kombinace elektroforetického a imunodifuzního dělení

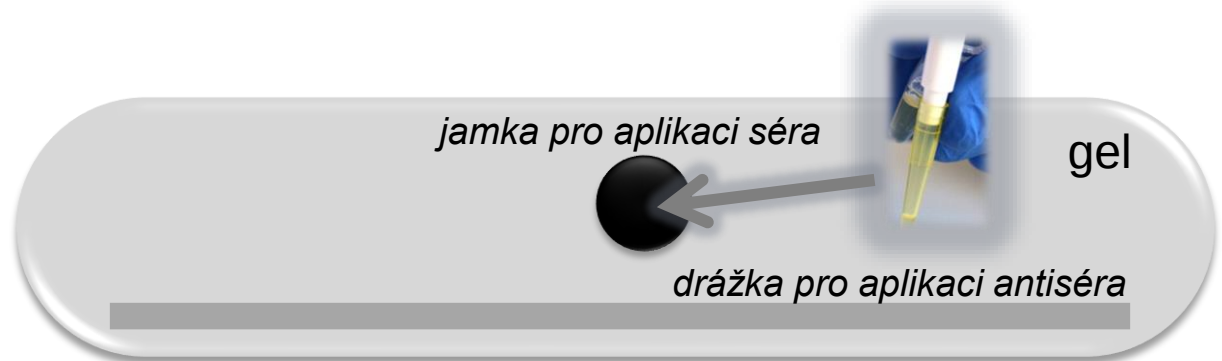
1. fáze

- *rozdělení séra elektroforézou na gelu*

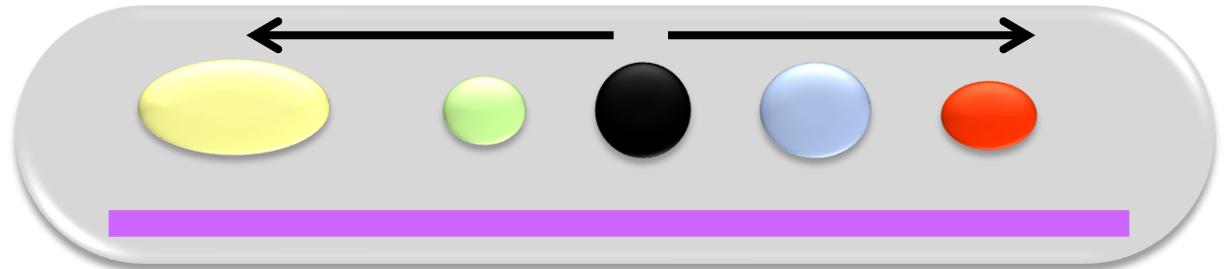
2. fáze

- *do gelové vrstvy se podélně na kraji vykrojí úzký žlábek*
- *do žlábků se napipetuje polyspecifické antisérum*
- *po inkubaci dojde k reakci mezi antigenem jednotlivých elektroforeticky rozdělených složek a antisérem → vytvoří se precipitační linie, která se zvýrazní obarvením*
- *každý oblouček (1 protein) a má charakteristický tvar a umístění na imuno elektroforegramu*
- ***Využití v klinické praxi:***
- *zjišťování některých gama patí a poruch v biosyntéze imunoglobulinů*

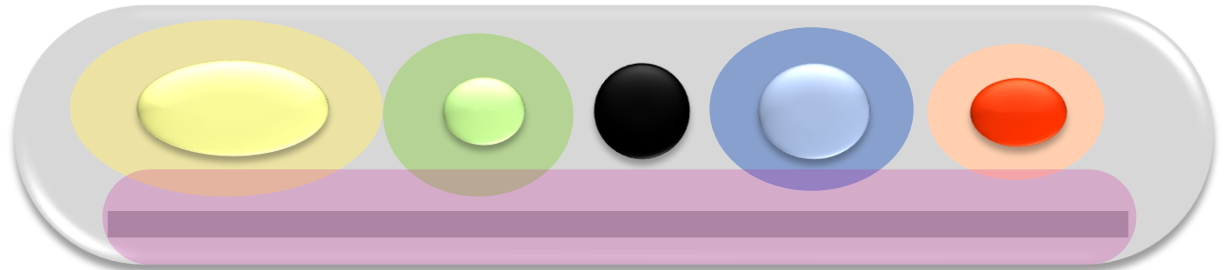
imuno elektroforéza



*rozdělení séra
elektroforeticky a
následně aplikace
polyspecifického antiséra
do drážky*



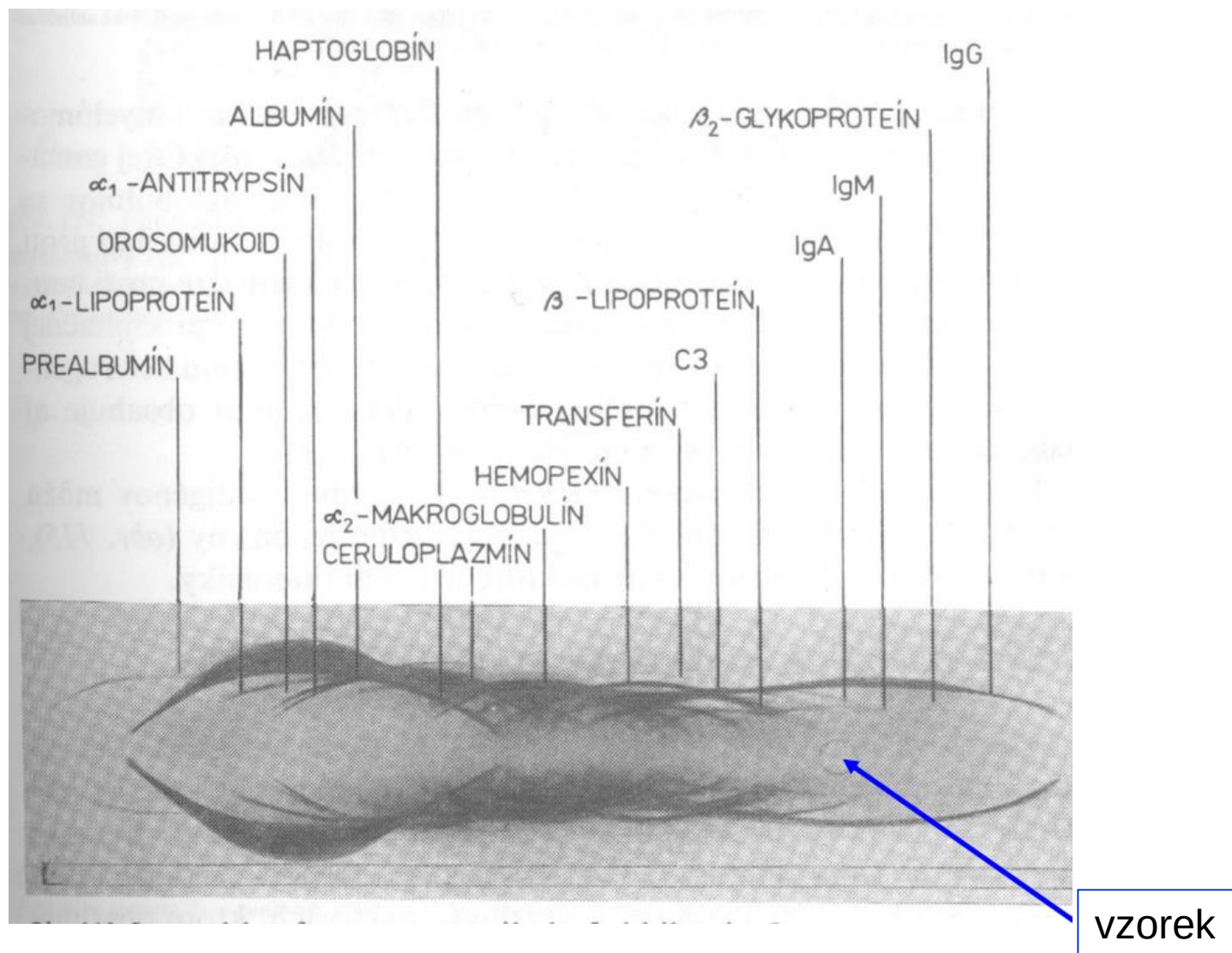
*difuze rozděleného
séra a antiséra
v gelu*



*vznik precipitačních
prstenců*



imuno elektroforéza



a g l u t i n a c e

p r e c i p i t a c e

E L I S A

c h e m i l u m i n i s c e n c e

i m u n o f l u o r e s c e n c e

e l e k t r o f o r é z a

i m u n o e l e k t r o f o r é z a

i m u n o f i x a c e

W e s t e r n b l o t

imunofixace

princip metodiky

elektroforetická separace proteinů v gelu a jejich následná imunoprecipitace s monospecifickými antiséry

1. fáze

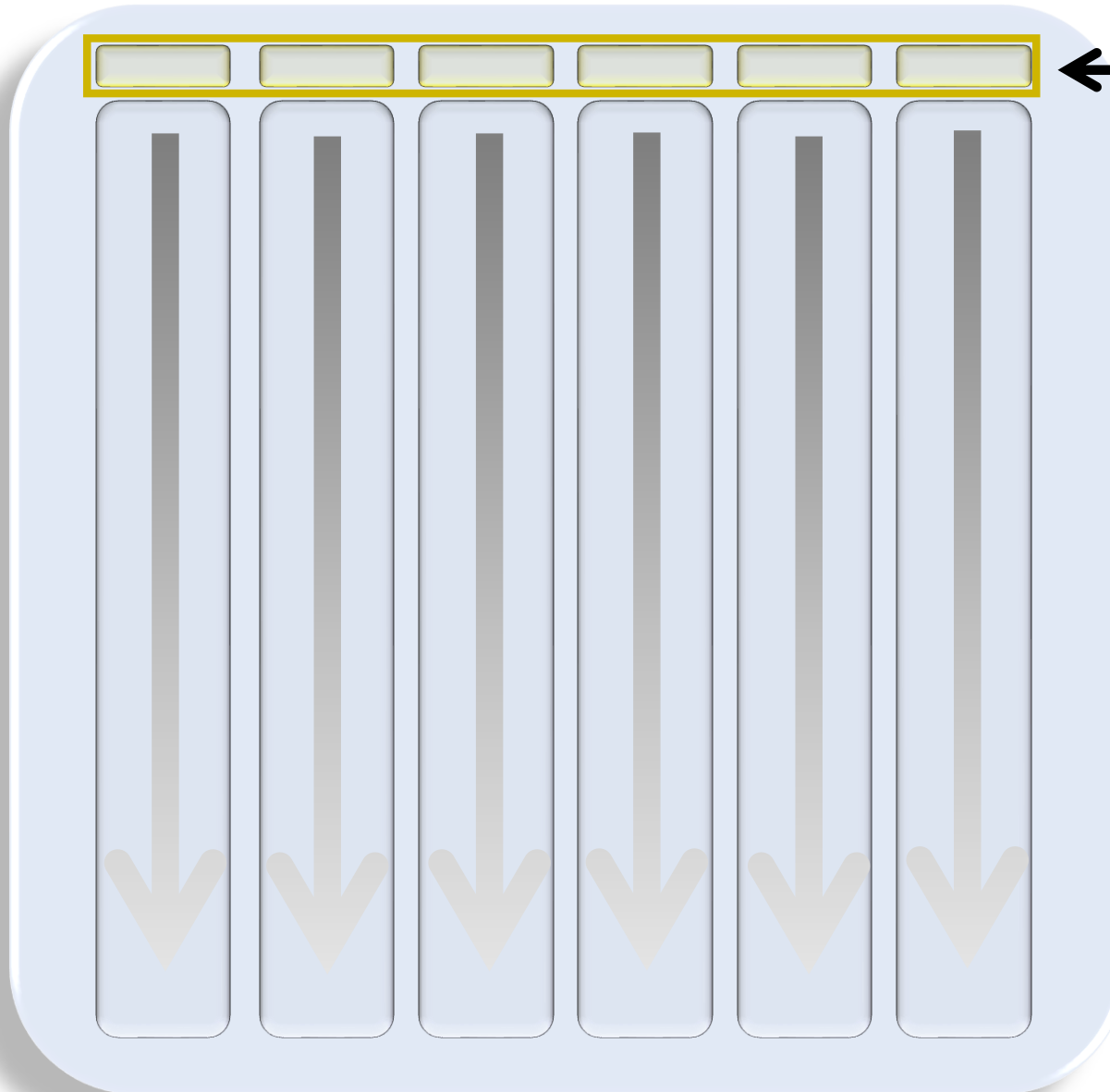
- *rozdělení séra pacienta elektroforézou na gelu do 6 drah*

2. fáze

- *do drah se napipetuje monospecifické antisérum (anti- IgG, IgA, IgM, kappa, lambda).*
- *antiséra difundují do gelu a v místě reakce s příslušným antigenem vytváří imunokomplexy ve formě precipitátu*
- ***Využití v klinické praxi:***
- *imunofixace bílkovin séra - určena k typizaci paraproteinu*
- *imunofixace bílkovin moče - určena k identifikaci paraproteinu, lehkých řetěců kappa a lambda v moči (Bence-Jonesova bílkovina)*

***imuno**fixace*

*Aplikace séra
jednoho pacienta
do 6
elektroforetických
drah ...*



*... rozdělení
sérových
proteinů dle
náboje, proteinů
a velikosti ...*

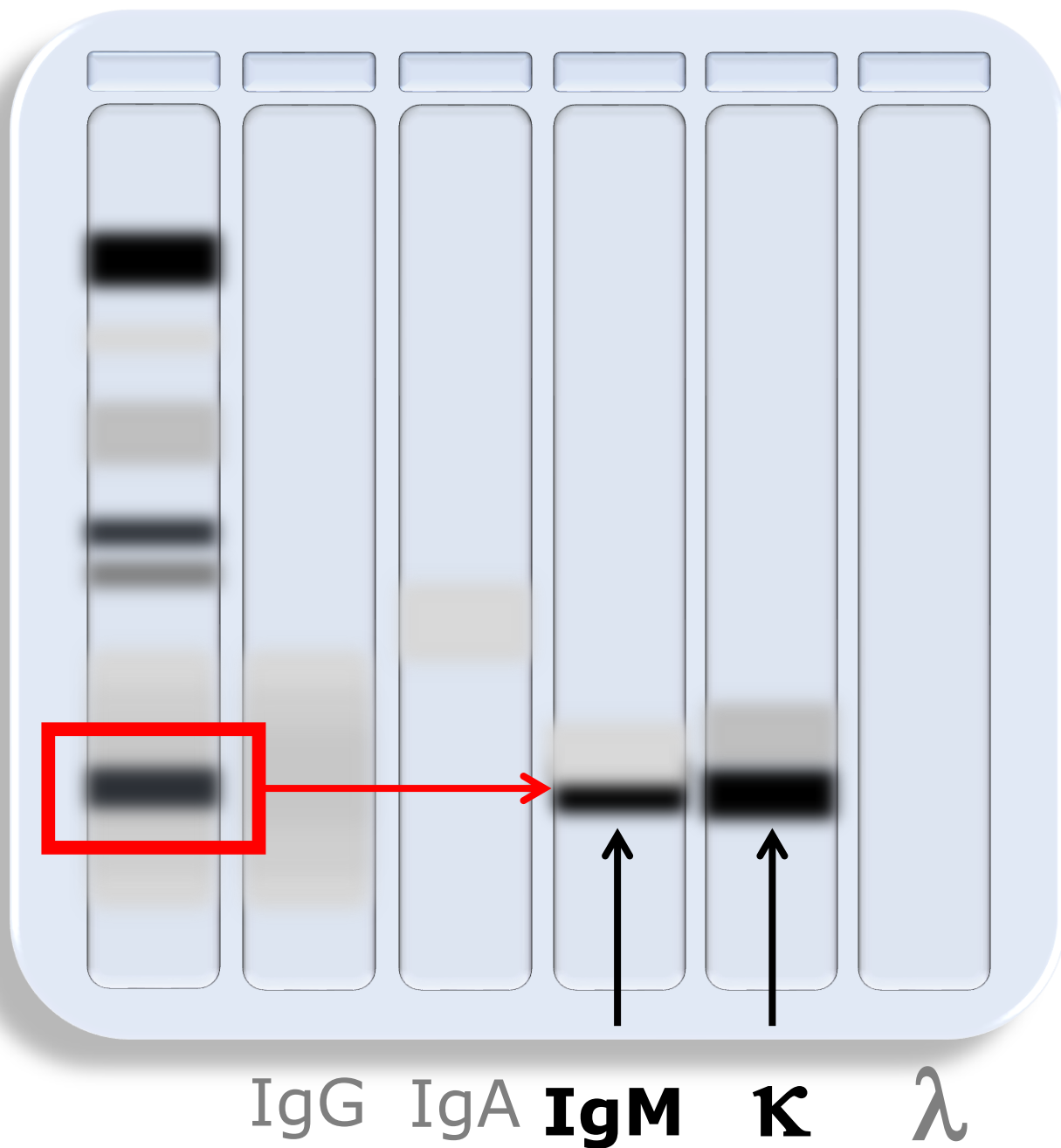
*... po rozdělení
séra 1 pacienta
elektroforeticky v
6 drahách se
přiloží šablona s
vyříznutými
proužky v zónách
elektroforetických
drah ...*

*... do jednotlivých
drah se aplikují
monospecifická
antiséra proti IgG,
IgA, IgM a lehkým
řetězcům κ a λ ...*



*průkaz
monoklonálního
imunoglobulinu a
jeho typizace*

*monoklonální
band*



a g l u t i n a c e

p r e c i p i t a c e

E L I S A

c h e m i l u m i n i s c e n c e

i m u n o f l u o r e s c e n c e

e l e k t r o f o r é z a

i m u n o e l e k t r o f o r é z a

i m u n o f i x a c e

W e s t e r n b l o t

Western blot

immunoblot

princip metodiky

elektroforetické dělení bílkovin a jejich následní přenesení na povrch membrány a typizace specifickými protilátkami

1. fáze

- *rozdělení séra elektroforézou na gelu*

2. fáze

- *přenos rozdělených antigenů na vhodnou matrici*
- *imobilizace antigenů a zablokování nespecifických vazebných míst*
- *vizualizace antigenů radiograficky, barevnou reakcí, fluorescenčně (specifické protilátky → immunoblotting)*
- ***Využití v klinické praxi:***
- *testy na HIV pozitivitu, definitivní test pro BSE, konfirmační test pro hepatitidu B, diagnostika boreliových infekcí*

Western blot immunoblot

touto metodou je možné porovnat množství proteinu v různých vzorcích

výhodou Western blotu je jeho vysoká specifita, protože falešně pozitivní výsledky způsobené nespecifickým navázáním protilátek můžeme vyloučit na základě znalosti molekulové hmotnosti hledaného proteinu

metoda však může poskytnout falešně negativní výsledek vlivem velkých proteinů, které mohou obtížně procházet gelem při elektroforéze

významným omezením použití Western blotu je fakt, že se proteiny denaturují

Metoda má i další nevýhody – je časově náročná. Oproti dalším metodám spotřebuje velké množství vzorku a automatizace je složitější než v případě dalších metod.