

Metody používané v klinické praxi

- Metody využívající sérologické reakce
- Testy funkce a počtu buněk imunitního systému
- Základy alergologického vyšetření
- Imunologické vyšetření a základy interpretace výsledků imunologických laboratoří
- Příklad vyšetření v laboratořích

metody využívající sérologické reakce

A. Precipitační metody

V kapalinách

V gelu

B. Imunodifuzní metody

- Jednoduchá imunodifúze
- dvojitá imunodifúze

C. Imunoelektroforetické metody

Kombinace s elfo

- Imunoelektroforéza podle Williamse a Grabara
 - Raketová imunoelektroforéza
 - Protisměrná
 - Dvojměrná
 - **D. Aglutinační metody**
 - **E. Hemaglutinační**
 - **F. Komplementové**
 - **G. Immunoblotting**
 - **Zákalové reakce**
 - Imunonefelometrie
 - Imunoturbidimetrie

H. Imunochemické metody

a) RIA

b) FIA

c) EIA

Časové rozdělení metod

Metody I.generace

- Některé techniky v roztoku – precipitační, aglutinační, KFR

Metody II.generace

- Kvantitativně i složité směsi antigenu,
- Imunodifúze, imunoelfo

Metody III.generace

- Velmi citlivé metody, stanoví Ag, Ab i hapteny
- Imunoanalýzy – př. RIA, FIA, EIA, imunoturbidimetrie
- – nefelometrie, -fluorimetrie, popř jejich kombinace

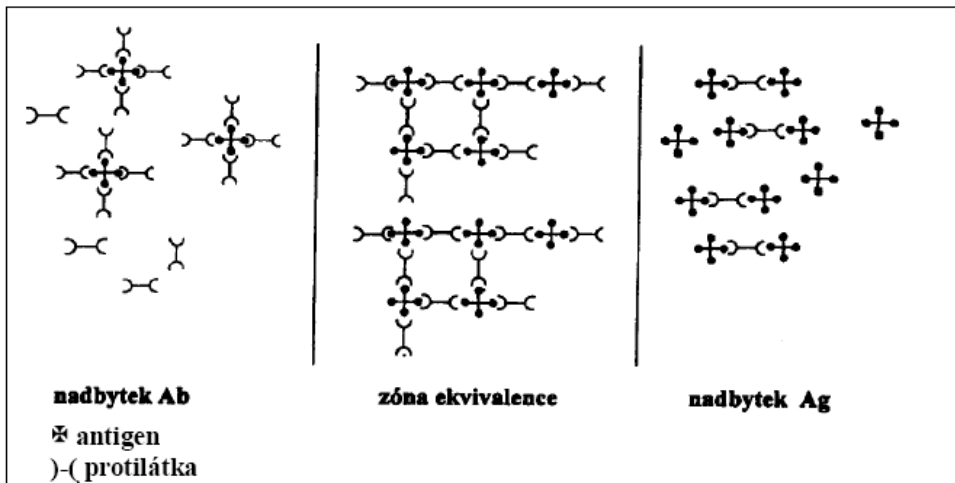
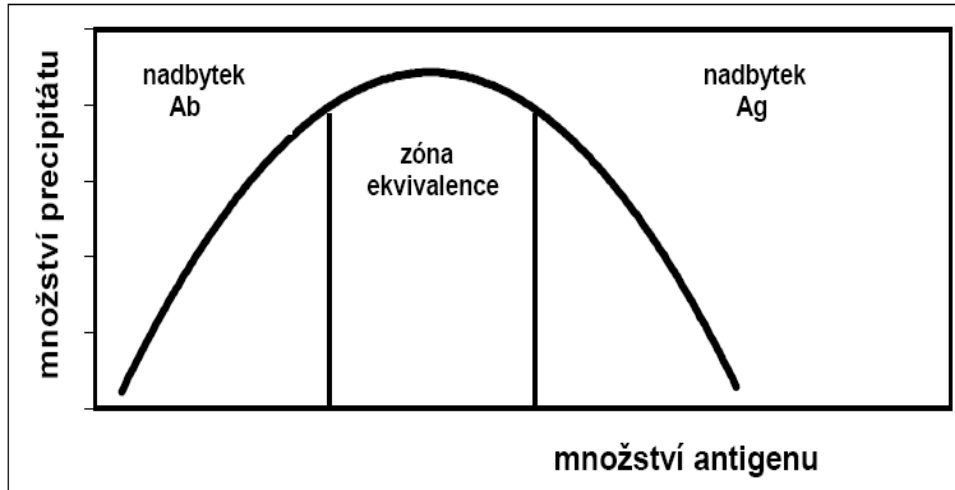
Metody IV.generace

- Kontinuálně měří Ag, Ab i hapteny
- imunosenzory

- 1929 Heidelberg a Kendall – popsali reakci rozpustného Ag s odpovídající Ab ve vhodném poměru.
 - Výsledek reakce – precipitát
- Stanovili precipitační křivku a 3 oblasti reakce Ag s Ab

Serologické metody - precipitace

Imunoprecipitační křivka (Ag – antigen, Ab – protilátka)



Oblast ekvivalence

Precipitační metody

Oblast nadbytku protilátky

Nekompetitivní metody

- zákalové nefelometrie
turbidimetrie

- s markerem EIA, IRMA..

Oblast nadbytku antigenu

Kompetitivní metody

- heterogenní RIA, ELISA..
- homogenní EMIT...

- **faktory** ovlivňující precipitaci:

- typ **Ab** /např. IgG/
- **teplota** – se zvyšující se teplotou se urychluje precipitace /např. 38°C/
- **vzájemná koncentrace** Ag a Ab
- **pH**
- iontový **náboj**
- **tvar a velikost** částí

PRECIPITAČNÍ metody:

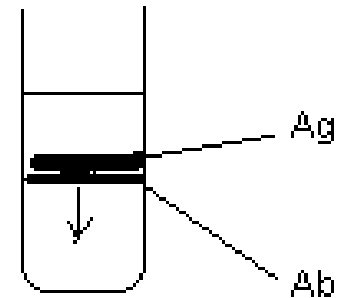
- $Ag + Ab \rightarrow Ag-Ab$
- *precipitinogen* *precipitin* *precipitát* sraženina
- solubilní /rozpustný/

• - *dělíme:*

• *A) v kapalinách :*

• **I. prstencová**

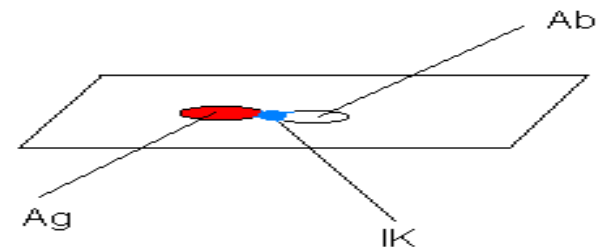
• – prstenec sraženiny precipitátu



• **II. sklíčková** – určení pod mikroskopem

• *B) v gelu:*

• **IMUNODIFÚZE**



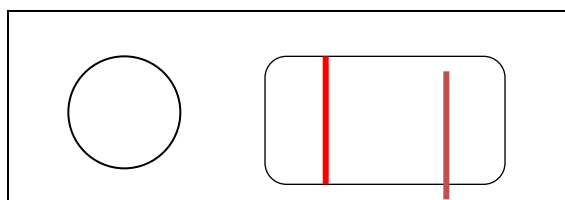
• *využití* : ke stanovení Ag, Ab, H

PRECIPITAČNÍ metody:

- **praxe** – 1. zjištění výskytu či stanovení Ab v séru při inf. onemocnění 2. identifikace patogena
- Koncentrace Ab se vyjadřuje jako **TITR SÉRA**.
- => *nejmenší zředění Ab, které ještě reaguje s Ag*
- - hodnocení : **kvalitativně** – odečtení okem
- **kvantitativně** :
 - a, zjištěním **množství precipitátu**
 - b, zjištěním **množství Ag** v precipitátu či supernatantu
 - c, změna **optických vlastností** vzorku – 2 metody :
 - **NEFELOMETRIE –* TURBIDIMETRIE**

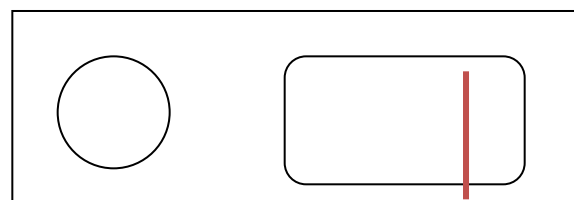
př. Precipitační imunochemické metody

Screeningové metody – jednoduché precipitační testy
terénní kazetové testy pracující v oblasti ekvivalence



S T C

Negativní výsledek



S T C

Pozitivní výsledek

Za nepřítomnosti nebo nedostatku drogy ve vzorku moče vytvoří protilátka imunokomplex (precipitát) se značenou drogou vázanou v místě testu T. (S – vzorek, C – kontrola)

Využití: Rychlé chromatografické testy – stanovení přítomnosti drogy v tělesných tekutinách, Ab nebo Ag u infekčních nemocí (Chlamydie, Adenovirus, Rotavirus), (*Helicobacter pylori*, Influenza A,B, Rota a Adenovirus)

Imunodifúze

- specifická **reakce Ag s Ab - precipitace**

/gel z agaru nebo agarózy/- **AGAR** ~ směs polysacharidů extrahovaných z červených mořských řas

* → přírodní agar nutno přečišťovat ~ **frakcionací** vznikají 2 složky: ● **agaróza**

- neobsahuje vedlejší aniontové skupiny - pro difúzi více vhodná

- *standardnější složení* než agar a nižší schopnost *nespecifické adsorpce*

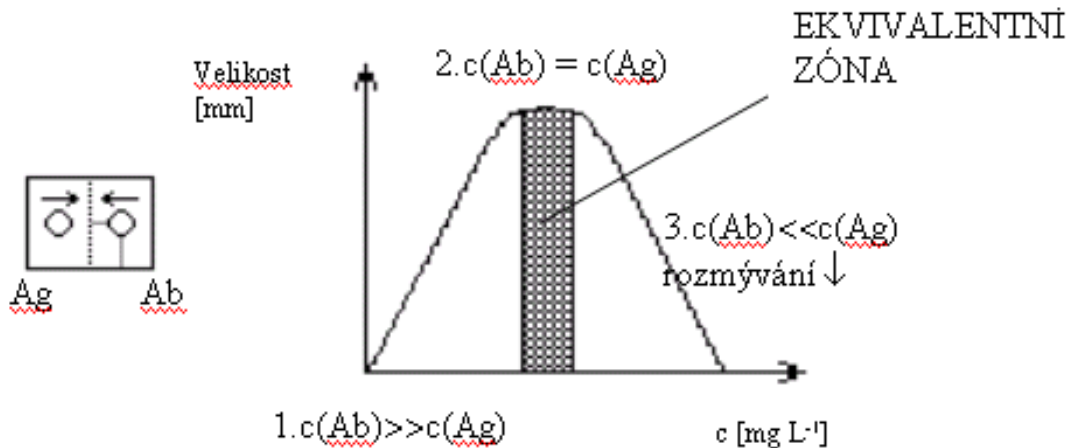
● **agaropektin**

- obsahuje aniontové skupiny → *pro difúzi nevhodný*

imunodifúze

- - příprava gelu:
- rozvaření agarózy v pufru na vodní lázni
- nanesení na skleněné destičky – ztuhnutí ve vodorovné poloze /při teplotě pod 42°C/
- - princip ID:
- - vzájemná **volná difúze Ab a Ag** v gelu na základě **koncentračního spádu** až do místa střetnutí ~ zde vznikají **precipitační linie** → **obloučky** → **prstence** → **kruhy** /záleží na použitém materiálu/
- - vzniklé precipitáty **detekujeme**:
 - * **okem** - zákal
 - * **barvením** – Coomassie blue, amidočern
 - * **sekundárními protilátkami**
 - * **Au, Ag, radioizotopy**
- vznik precipitátů je **děj postupný!!!**

Imunodifúze



1. nejdříve vznikají rozpustné imunokomplexy (IK) – nedostatek Ag
2. po vyrovnání $c(Ab) = c(Ag)$ vznikají pevné IK – detekce sraženiny
...EKVIVALENTNÍ ZÓNA
3. převaha Ag nad Ab ~ rozpad IK (Ag naráží na IK – rozmývání sraženiny)

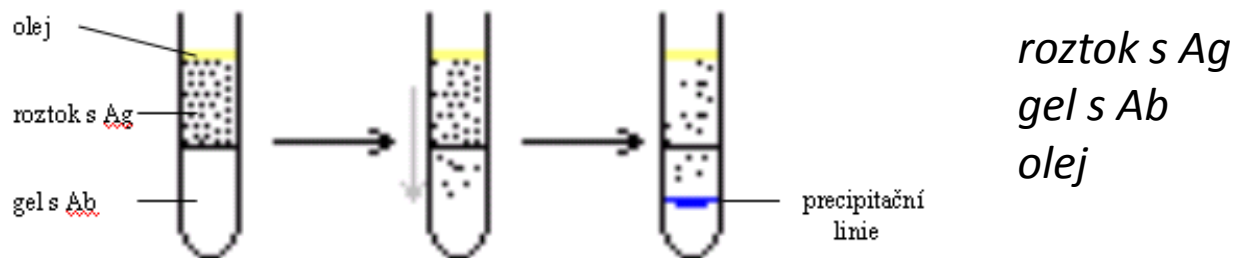
- rozdělení imunodifúzních metod:

- * jednoduchá imunodifúze – gelem difunduje pouze jedna složka – Ag nebo Ab
- * dvojitá imunodifúze – gelem difundují obě složky – Ag i Ab
- jednorozměrná – složka putuje v gelu jedním směrem
- dvojezměrná /radiální/ – složka putuje více směry

Ag a Ab si neodpovídají – **nevytvorí se precipitační linie**

Směs více typů Ag a Ab – počet **linií** odpovídá **počtu** sobě si odpovídajících párů **Ab a Ag**

Imunodifúze



- **jednoduchá imunodifúze** - migruje 1 složka:
- **1. složka** se smíchá s gelem už při jeho přípravě (nemigruje)
- **2. složka** se aplikuje následně do vyřezaných jamek – **MIGRUJE** – v místě vyrovnání koncentrací vzniká **precipitační linie**

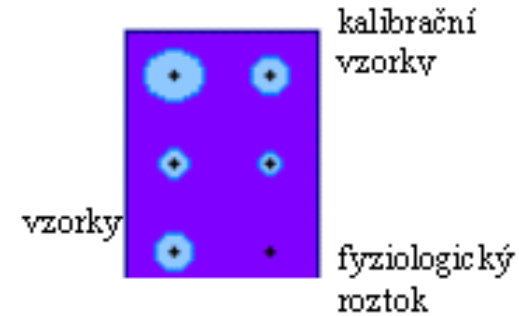
Jednoduchá jednorozměrná imunodifúze ~ dle OUDINA

- - ve spodní části zkumavky agarózový gel s Ab, převrstveno roztokem s Ag - zalito parafínovým olejem – zábrana odpařování
- - čím je Ag koncentrovanější, tím dále od roztoku s Ag vznikají precipitační linie /odečitatelnější/
- - **využití:** • detekce počtu Ag párů

Imunodifúze

Jednoduchá radiální /dvojrozměrná/ imunodifúze dle MANCINIOVÉ

- - na skleněnou destičku se nalije gel, který obsahuje Ab → nemigruje
- inkubace ve vlhké komůrce ve vodorovné poloze → difúze všemi směry (radiální)
- *po obarvení - modré precipitační prstence*
- → čím je vzorek koncentrovanější – větší průměr prstence
- → změření druhé mocniny průměrů prstenců – vynesení kalibrační křivky a odečet koncentrace neznámého vzorku-
- využití:
 - ke **kvantitativnímu stanovení Ag**
- **klinická praxe: stanovení koncentrace IgG, IgA, IgM, IgD**, složek komplementu a proteinů akutní fáze

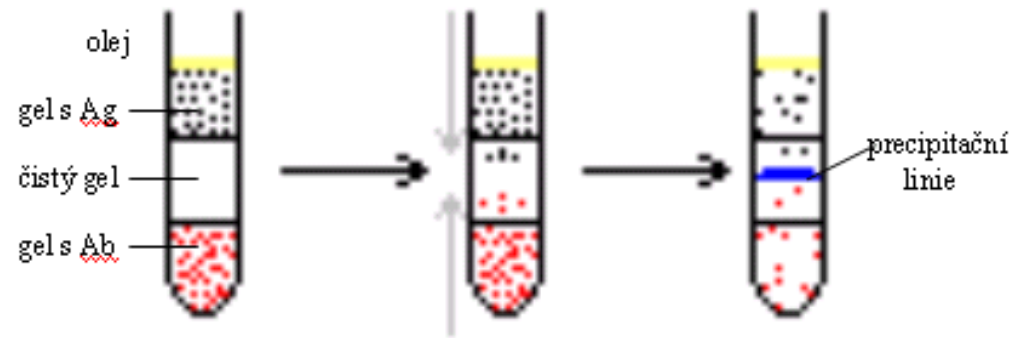


jamky - vzorky:

-gel s Ab

- * *fyziologický roztok* –blank
- * *vzorky o neznámé koncentraci*
- * *vzorky o známé koncentraci (kalibrační)*

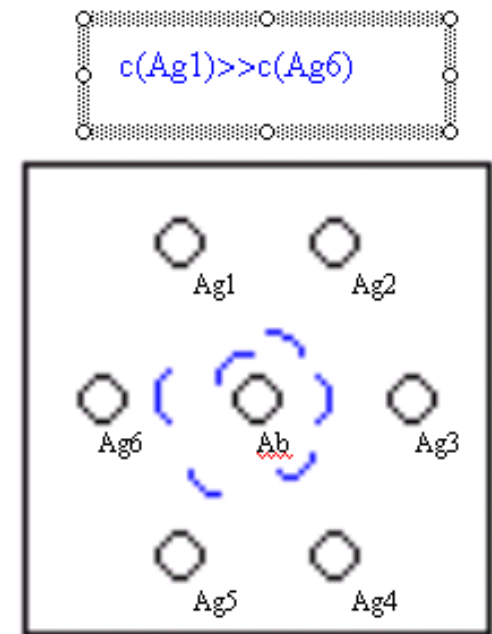
Imunodifúze



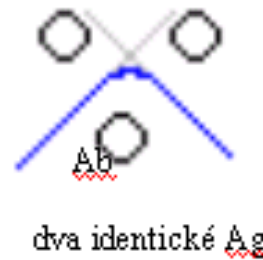
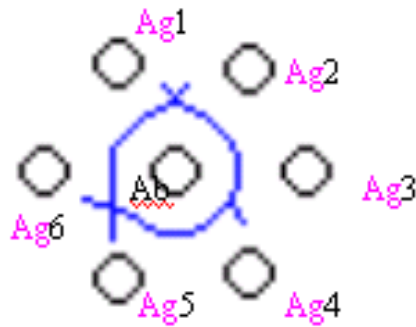
- **dvojitá imunodifúze**
- - gelem *difundují obě složky*
- - *koncentrace Ag a Ab musí být vzájemně **ekvivalentní*** – proti překrývání linií
- **Dvojitá jednorozměrná imunodifúze**
- - ve zkumavce **agarózový gel s Ab** a agarózový gel s **Ag**
- - mezi nimi **čistý gel** – v místě vyrovnání koncentrací se vytvoří **precipitační linie**-
- *využití:* • **kvalitativní důkaz Ag**
- určení **imunochemické příbuznosti či odlišnosti Ag**

Imunodifúze

- **Dvojitá radiální imunodifúze ~dle OUCHTERLONYHO**
- na *skleněné desky* nanesen **čistý gel**
- menší jamky – *různé Ag* či *různé koncentrace* jednoho Ag
- větší prostřední jamka – Ab
- koncentrovanější Ag → **precipitační obloučky** blíže jamky s Ab
- inkubace ve vlhké komůrce
- počet precipitačních linií odpovídá počtu odpovídajících si párů Ag a Ab
- **Využití** –průkaz Ab při alergických alveolitidách, průkaz Ab proti některým patogenům, např. *Toxoplasma gondii*



Imunodifúze



1 a 2 částečně identické /některé determinanty navíc/

2 a 3 identické

3 některé determinanty navíc než 4

5 a 6 si neodpovídají

dva identické Ag

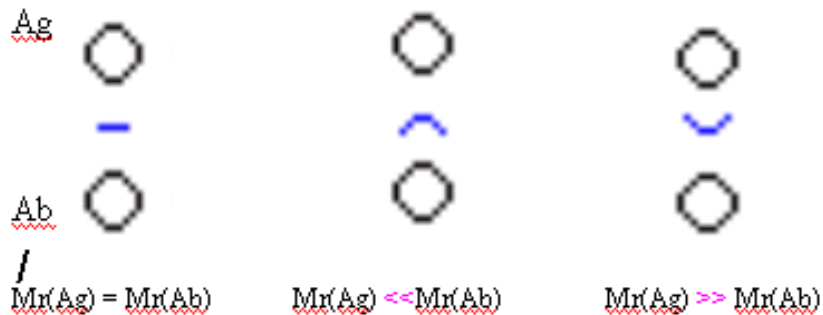
- využití: Ag

- titrace Ag – **koncentrace**
Ag určuje umístění precipitační linie

- důkaz **přítomnosti Ab**

- porovnávání **identity a neidentity Ag směsí** → umístění precipitační linie

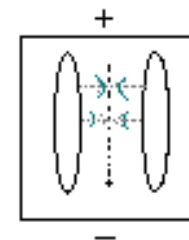
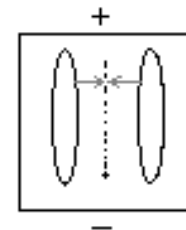
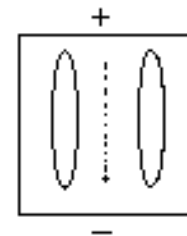
porovnání $M_r(\text{Ag})$ a $M_r(\text{Ab})$ → určuje tvar precipitační linie



- menší molekula se dostane dále do gelu

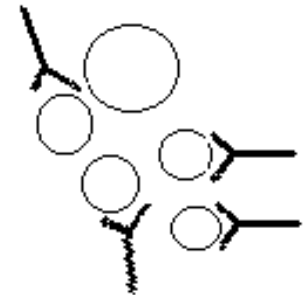
Imunoelektroforetické metody

- kombinace metod elektroforetických a imunodifúzních
- Bílkoviny se dělí v závislosti na molekulové váze a elektrické náboji jednotlivých molekul. Při běžné elfo se sérum dělí na zónu albuminu, $\alpha - 1$, $\alpha - 2$, β , γ globulinů. Stanovení zastoupení jednotlivých frakcí může mít význam při hodnocení stádia zánětlivého procesu. Při akutních zánětech stoupá zastoupení $\alpha - 1$, později i $\alpha - 2$, při chronických zánětech dochází ke zvýšení zastoupení γ globulinů a poklesu albuminu.
- imunoelektroforéza **podle WILLIAMSE a GRABARA**
- **RAKETOVÁ** imunoelektroforéza
- **PROTISMĚRNÁ** imunoelektroforéza
- **DVOJROZMĚRNÁ** imunoelektroforéza
- **Př. imunoelektroforéza podle WILLIAMSE a GRABARA:**
 - - 1953 Williams a Grabar
 - - 2 stupně: 1. **nalití destičky** (agarózní gel s puftrem)
 - vytvoření 2 žlábků a nanesení Ag mezi ně
 - po rozdělení elektroforézou se do žlábků 2. napipetují **protilátky**
 - inkubace 48 hodin v lednici → dochází **k DIFUZI**
 - → v místě ekvivalence se vytváří **PRECIPITAČNÍ obloučky**



Aglutinační metody

- $Ag + Ab \rightarrow Ag-Ab$
- *aglutinogen* *aglutinin* *aglutinát*
- korpuskulární-
- *princip* : **KORPUSKULÁRNÍ** / částicový / Ag
- při reakci dochází ke shlukování Ag a Ab na základě vytváření můstků
- Ab mezi buňkami za vzniku shluků
- **přímá** – použití bakterií, buněk
- **nepřímá, pasivní** – na jejich povrch je Ag uměle navázán, *př.latex-fixační test, HIT*
- **Předpoklady ke vzniku vazeb:**
 1. dostatek Ab, 2. přítomnost Ab proti různým epitopům 3. vzdálenost mezi částicemi co největší 4. Ab funkčně jednovazebné nevytváří aglutinaci (IgA, IgE) – inkompletní Ab viz hemaglutinace
- - *hodnocení*: **kvalitativně** - odečtení okem
- **kvantitativně** : a, zjištěním *množství aglutinátu*
- b, zjištěním *množství Ag* v aglutinátu či supernatantu



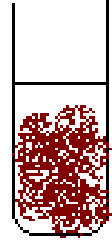
Aglutinace

- **využití** : ke stanovení **Ag, Ab, H** (viz precipitační metody)
 1. K určování izolovaných bakteriálních kmenů
 2. K průkazu Ab proti patogenům –Widalova reakce – průkaz tyfu, paratyfu, Weil-Felixova – skvrnitého tyfu, Ab proti *Francisella tularensis*
 3. K Průkazu Treponema p., EBV - mononukleóza
 3. Nepřímá - k průkazu auto Ab proti štítné žláze, Ab proti autoAg –

Latexová aglutinace, latex-fixační test

- rychlé kvalitativní stanovení
- Ag nebo Ab imobilizován na latexových kuličkách
- Stanovení Ab proti IgG – revmatoidní faktor
- Průkaz patogenních Antigenů (Helicobacter pylori, Adeno- a Rotavirus)

Hemaglutinační



- Ag + **Ab** → Ag-Ab
- *hemaglutinogen* *hemaglutin* *hemaglutinát*
- - savčí krvinky (i části)
- - dochází ke **shlukování krvinek**, vlivem komplementu či virové částice pak dochází k **LYZI**.

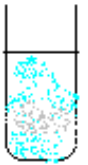
Ke zviditelnění aglutinačních reakcí při použití inkompletních Ab je možno použít **a)** aglutinaci v bílkovinném prostředí **b)** v prostředí s proteolytickými enzymy **c)** použitím antiglobulinového Coombsova séra - králičí ab proti lidským Ig

Hemaglutinace

- **využití:** K zjišťování krevních skupin a průkaz Ab proti krevním elementům. **Přímý Coombsův test** – k průkazu navázaných antierytrocytárních Ab, reakce pacientových ery s Coombsovým antisérem, přítomnost navázaných Ab se projeví hemaglutinátem
- **Nepřímý Coombsův test** – k průkazu cirkulujících antierytrocytárních Ab
 - 1. fáze, pacientovo sérum s ery od dárce, navázání Ab pokud jsou přítomny, vymytí, přidání Coomsova séra, které způsobí aglutinaci
 - při 2 reakcích:
 - * **KFR** – *komplement fixační reakce*
 - * **HIT** – *hemaglutinačně inhibiční test* :

HIT

- Patří také mezi metody serologické, založené na inhibici biologických účinků antigenů
 - HIT – pasivní hemaglutinace
 - Vycházíme ze skutečnosti, že viry (některé bakterie atd) mají schopnost se spontánně absorbovat na červené krvinky (rozpustný Ag). Ery pak aglutinují – shlukují se jen v přítomnosti specifické Ab
 - **odpovídá-li** protilátka Ag, po přidání obalených ERY Ag se Ag vyváže a vznikne **HEMAGLUTINÁT**
- Ab + Ag - Ery → **hemaglutinát, proběhne hemaglutinace**



HIT

neodpovídá-li protilátka virovému Ag, nedojde k hemaglutinaci

- situace, kdy přidáme stejný Ag do reakce
 - $Ab + Ag - Ery \rightarrow \text{hemaglutinát} + \text{stejný Ag} \rightarrow Ag - Ab$
 $+ Ag - Ery \rightarrow \text{inhibice hemaglutinace}$
 - *Metodou inhibice pasivní hemaglutinace lze dokázat velmi malé mn. rozpustného Ag nebo H (metoda je velmi citlivá)*
pro vyhodnocení můžeme použít i optické metody
- Využití:** Průkaz Ab proti patogen. Ag jako Candida Albicans, Aspergillus fumigatus, Treponema pallidum