

# Metody používané v klinické praxi

- Metody využívající sérologické reakce
  - exkurze TEST-LINE firma
- Testy funkce a počtu buněk imunitního systému
  - přednáška VÚVI
- Základy alergologického vyšetření
- Imunologické vyšetření a základy interpretace výsledků imunologických laboratoří
  - exkurze ve firmě Bioplus?
- 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, Dvojrozměrná

- **D. Aglutinační metody**

**E. Hemaglutinační**

**F. Komplementové**

**G. Metody fagocytózy**

## H. Immunoblotting – TeST-LINE

Zákalové reakce

- Imunonefelometrie
- Imunoturbidimetrie

## H. Imunochemické metody

a) RIA

b) FIA

c) EIA – TEST-LINE

# ***Časové rozdělení metod, metody používané v klinické praxi***

## **Metody I.generace**

- Některé techniky v roztoku – precipitační, aglutinační, HIT, KFR,

## **Metody II.generace**

- Kvantitativně i složité směsi antigenu,
- Imunodifúze, imunoelfo, latexová aglutinace

## **Metody III.generace**

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

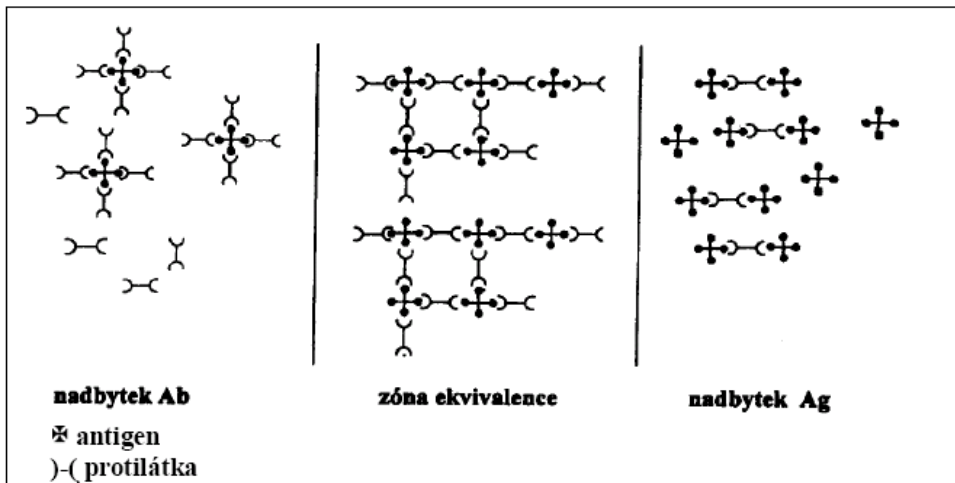
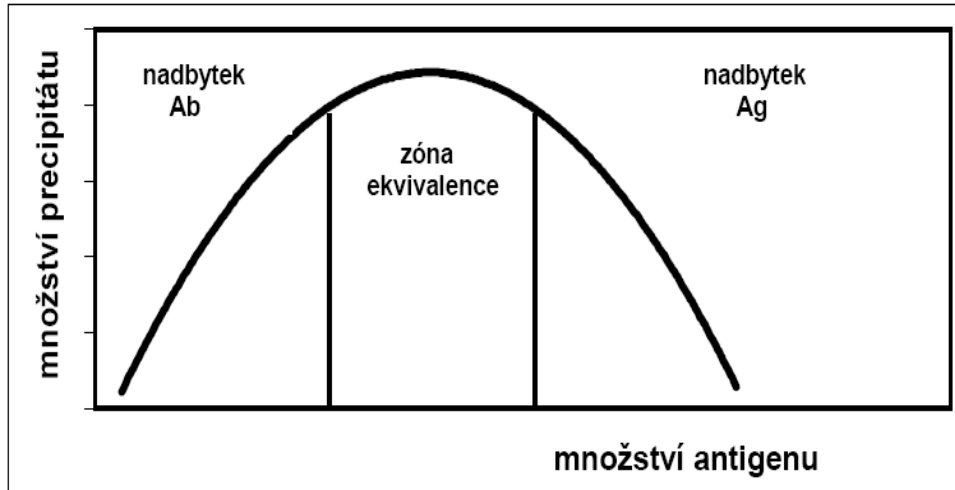
## **Metody IV.generace**

- 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:

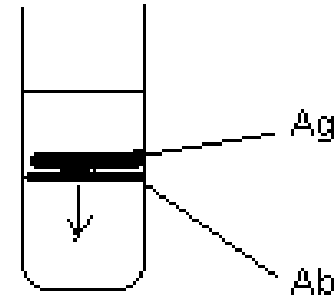
- $Ag + Ab \rightarrow Ag-Ab$
- *precipitinogen*    *precipitin*    *precipitát*    sraženina
- solubilní /rozpustný/

• - *dělíme:*

• *A) v kapalinách :*

• **I. prstencová**

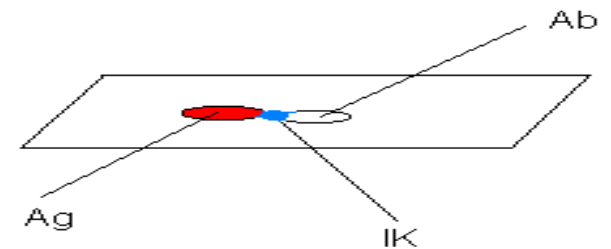
• – prstenec sraženiny precipitátu



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

• *B) v gelu:*

• **IMUNODIFÚZE**



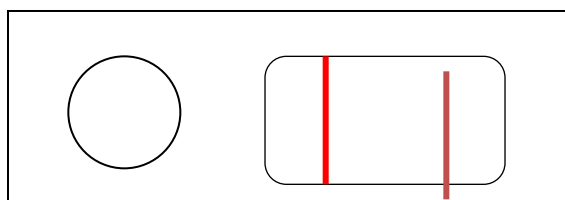
• *vyžití* : ke stanovení Ag, Ab, H

## **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**

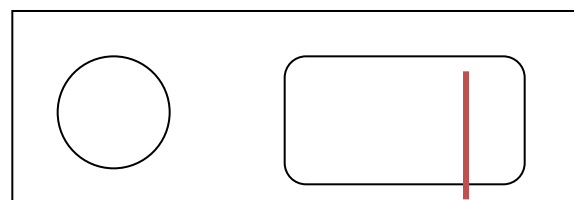
# př. Precipitační imunochemické metody

*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*

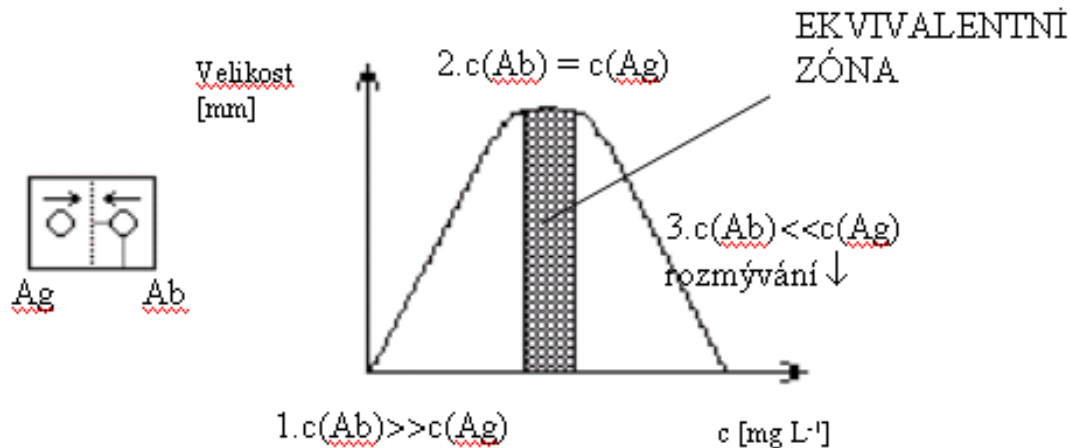
● **agaropektin**

- 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  $c(\text{Ab}) = c(\text{Ag})$  vznikají pevné IK – detekce sraženiny  
...EKVIVALENTNÍ ZÓNA
3. převaha Ag nad Ab ~ rozpad IK (Ag naráží na IK – rozmývání sraženiny)

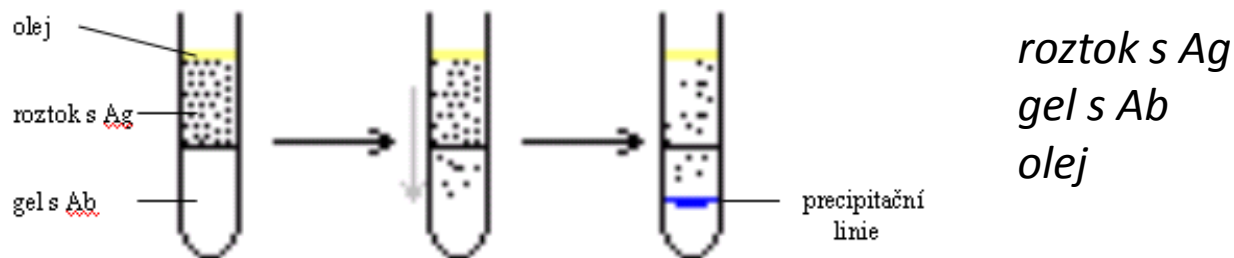
## - rozdělení imunodifúzních metod:

- \* 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 – **nevytvoří 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**

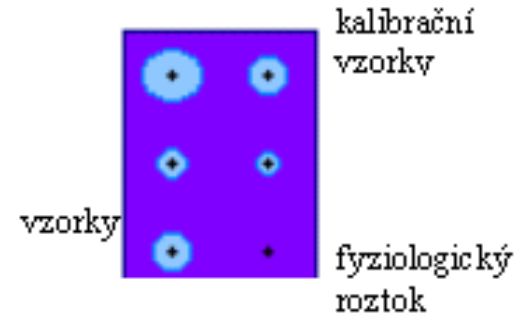
## Jednoduchá jednorozměrná imunodifúze ~ dle OUDINA

- - 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

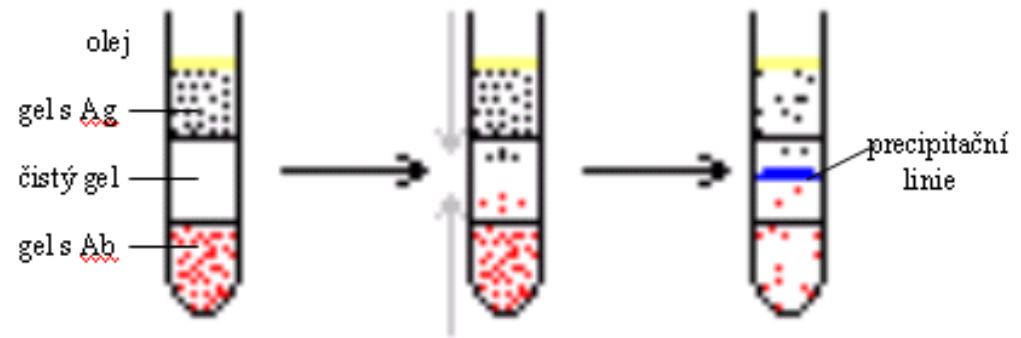


### jamky - vzorky:

-gel s Ab

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

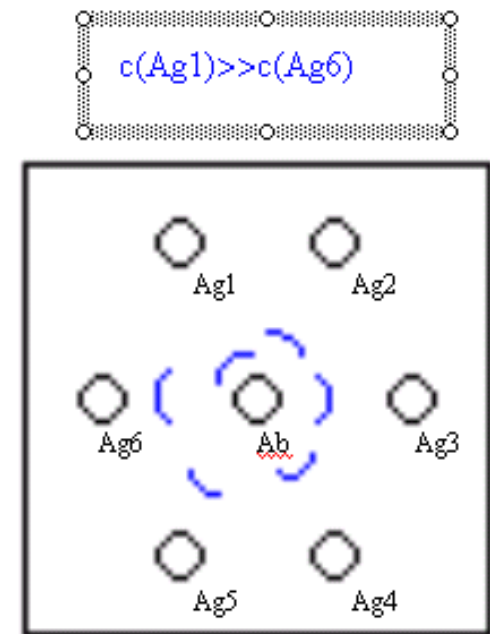
## Imunodifúze



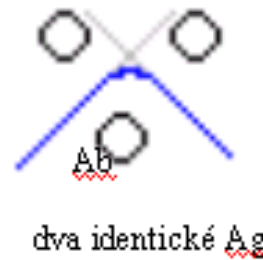
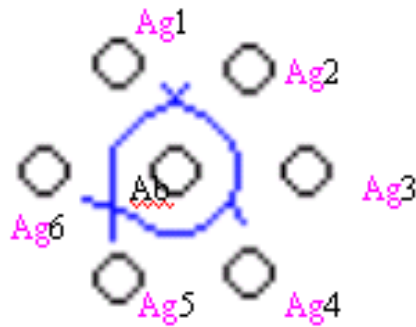
- **dvojitá imunodifúze**
- - gelem *difundují obě složky*
- - *koncentrace Ag a Ab musí být vzájemně **ekvivalentní*** – proti překrývání linií
- **Dvojitá jednorozměrná imunodifúze**
- - ve zkumavce **agarózový gel s Ab** a agarózový gel s **Ag**
- - mezi nimi **čistý gel** – v místě vyrovnání koncentrací 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/

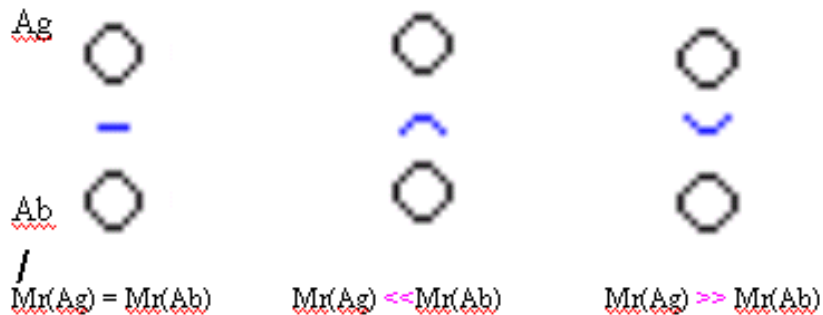
2 a 3 identické

3 některé determinanty navíc než 4

5 a 6 si neodpovídají

- - 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*

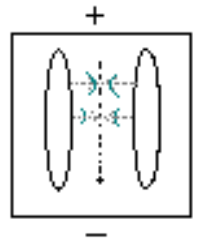
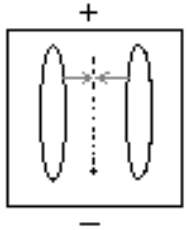
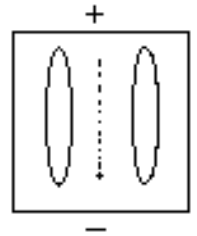


- *menší molekula se dostane dále do gelu*



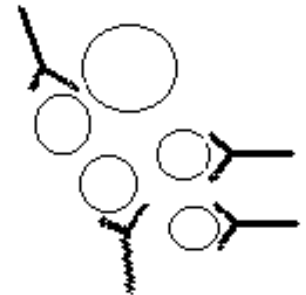
# Imunoelektroforetické metody

- 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,  $\alpha - 1$ ,  $\alpha - 2$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  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  $\gamma$  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



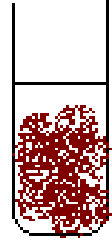
# Aglutinace

- **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**.

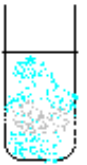
Ke zviditelnění aglutinačních reakcí při použití inkompletních Ab je možno použít **a)** aglutinaci v bílkovinném prostředí **b)** v prostředí s proteolytickými enzymy **c)** použitím antiglobulinového Coombsova séra - králičí ab proti lidským Ig

# 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