

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

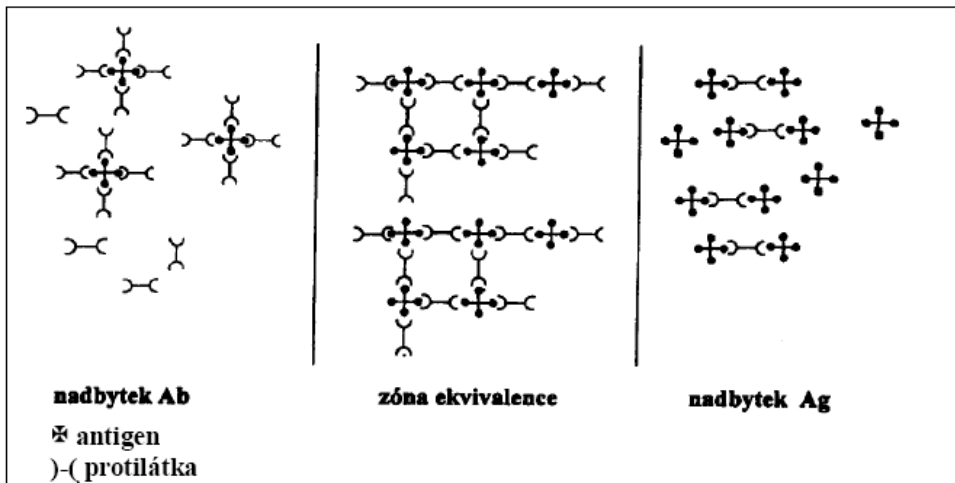
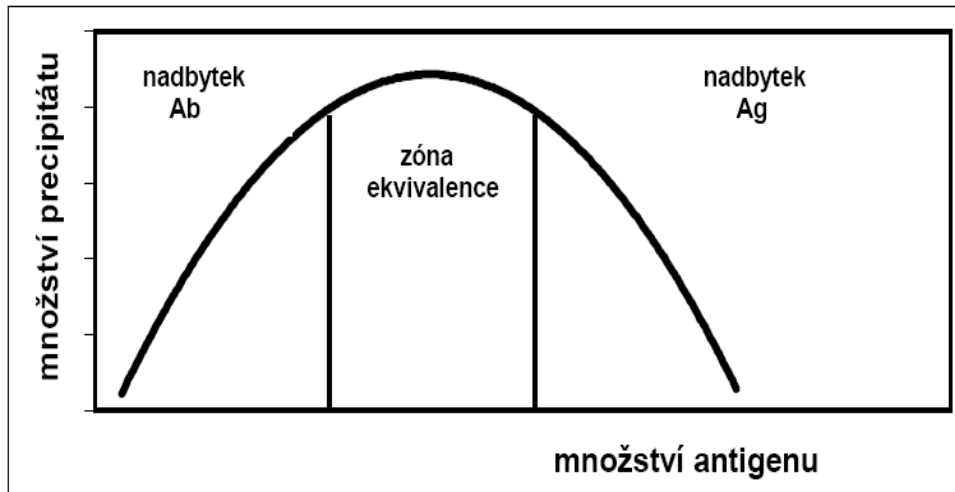
Metody IV.generace

- 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

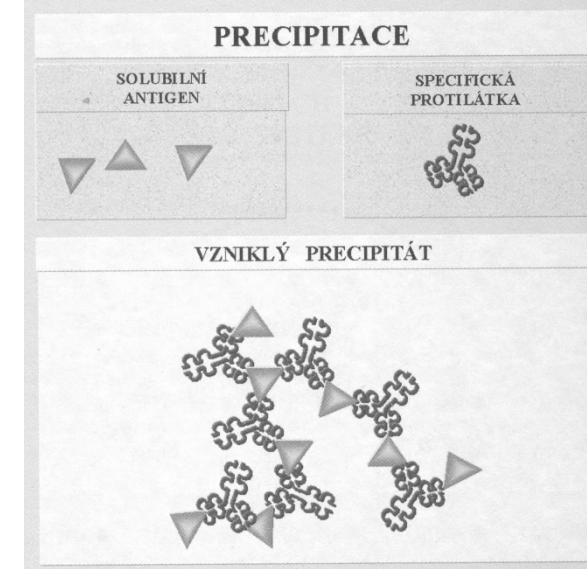
Kompetitivní metody

- 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:



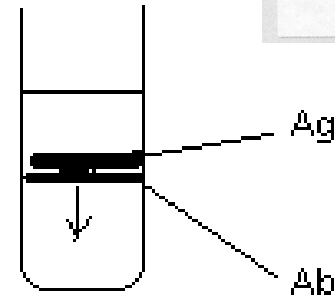
- $Ag + Ab \rightarrow Ag-Ab$
- *precipitinogen precipitin precipitát sraženina*
- solubilní /rozpustný/

• - *dělíme:*

• *A) v kapalinách :*

• **I. prstencová**

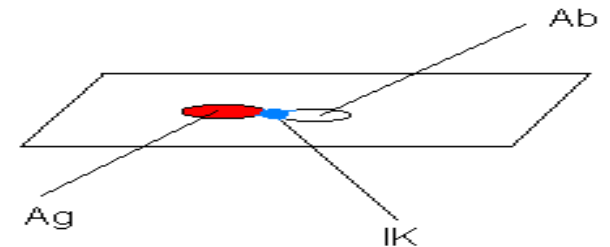
• – prstenec sraženiny precipitátu



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

• *B) v gelu:*

• **IMUNODIFÚZE**

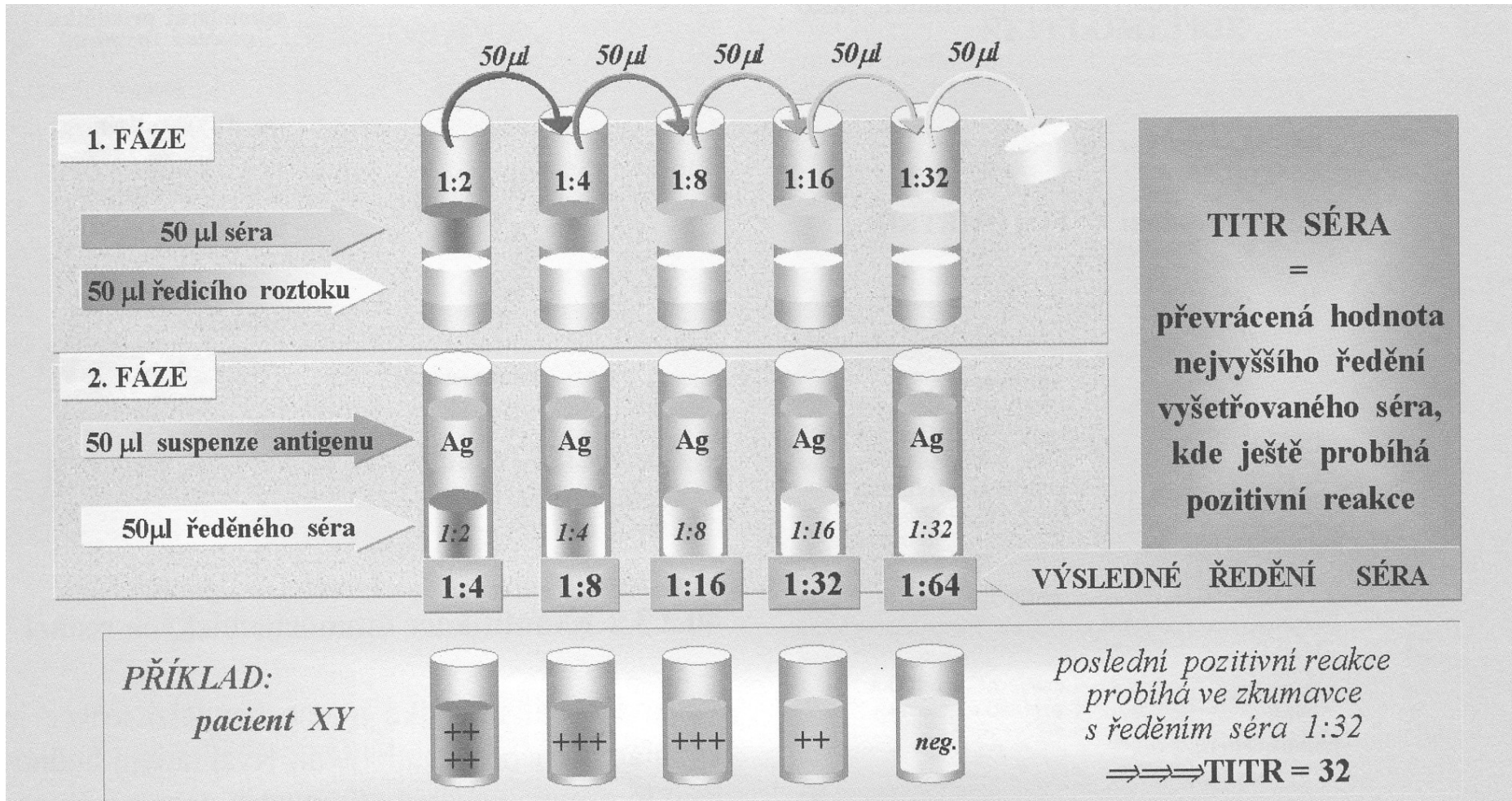


• *využití* : ke stanovení Ag, Ab, H

PRECIPITAČNÍ metody:

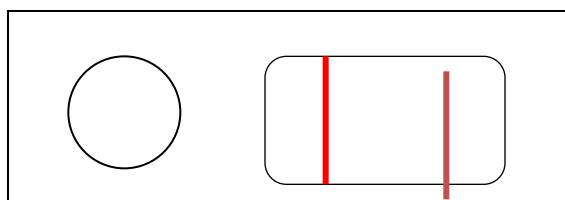
- **praxe** – 1. zjištění výskytu či stanovení Ab v séru při inf. onemocnění 2. identifikace patogena
- Koncentrace Ab se vyjadřuje jako **TITR SÉRA**.
- => *nejmenší zředění Ab, které ještě reaguje s Ag*
- - hodnocení : **kvalitativně** – odečtení okem
- **kvantitativně** :
 - a, zjištěním **množství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

Titrace séra



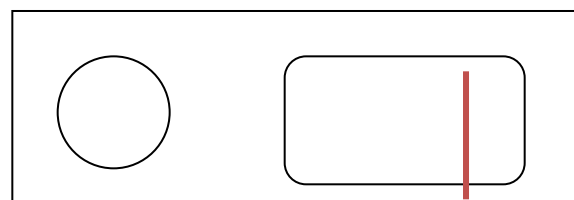
př. Precipitační imunochemické metody

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*

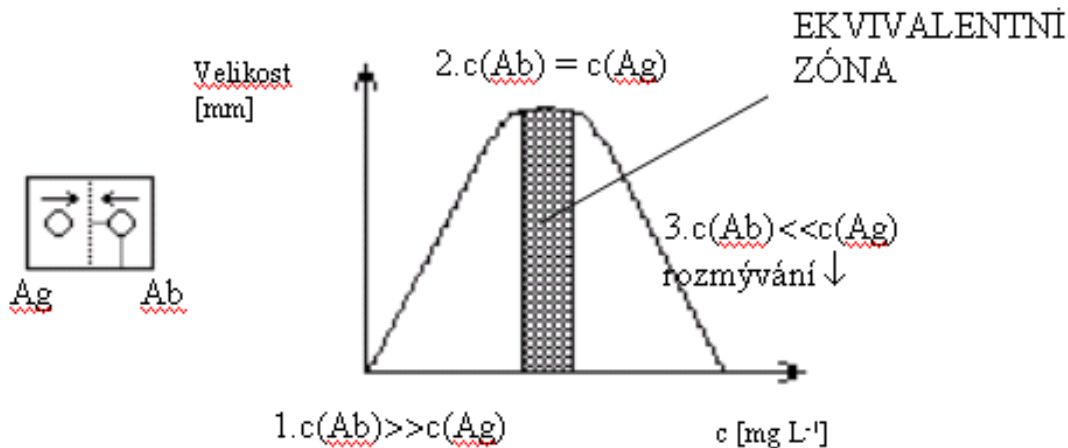
● **agaropektin**

- 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, amidočerň
 - * **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)

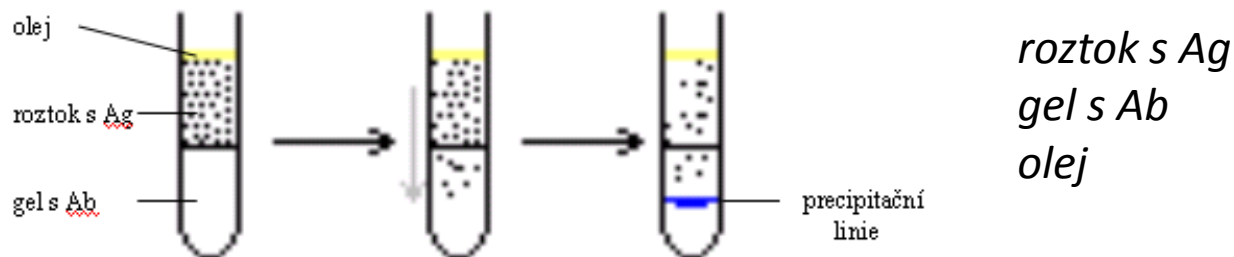
- rozdělení imunodifúzních metod:

- * 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**

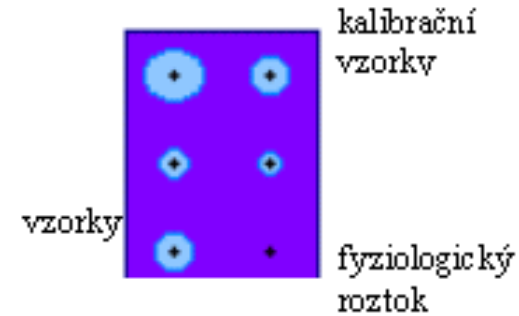
Jednoduchá jednorozměrná imunodifúze ~ dle OUDINA

- - 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

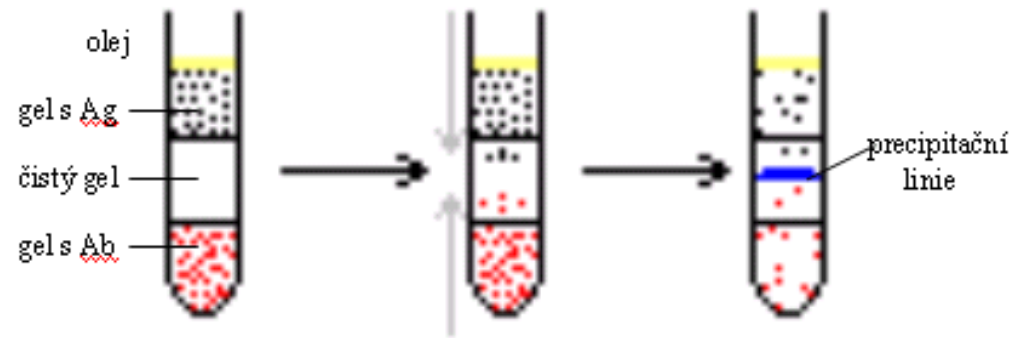


jamky - vzorky:

-gel s Ab

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

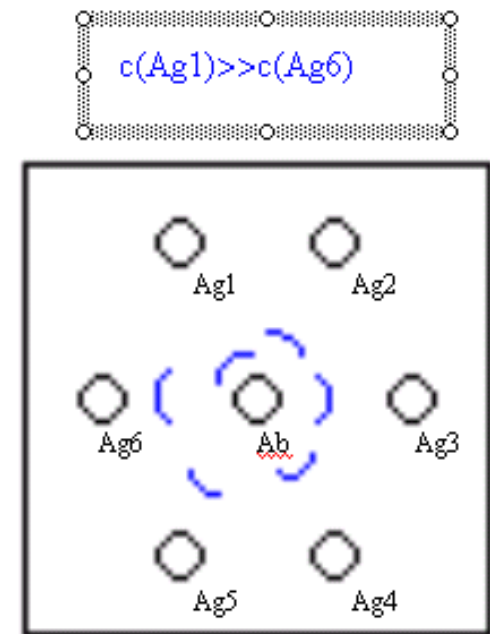
Imunodifúze



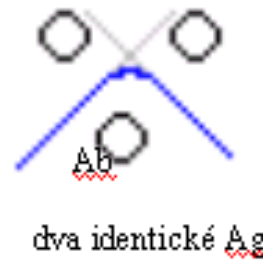
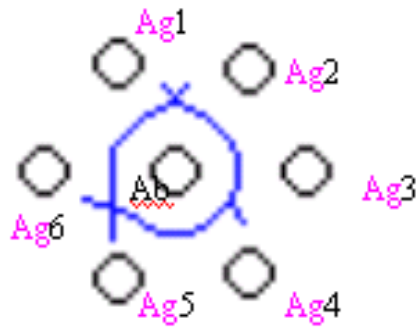
- **dvojitá imunodifúze**
- - gelem *difundují obě složky*
- - *koncentrace Ag a Ab musí být vzájemně **ekvivalentní*** – proti překrývání linií
- **Dvojitá jednorozměrná imunodifúze**
- - ve zkumavce **agarózový gel s Ab** a agarózový gel s **Ag**
- - mezi nimi **čistý gel** – v místě vyrovnání koncentrací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

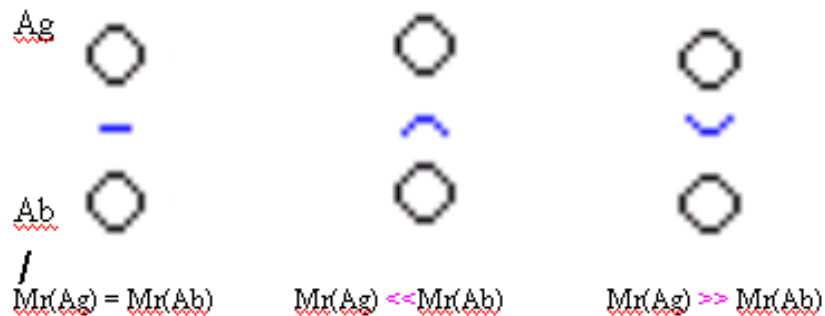
2 a 3 identické

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 $M_r(Ag)$ a $M_r(Ab)$ → určuje *tvar precipitační linie*



- *menší molekula se dostane dále do gelu*