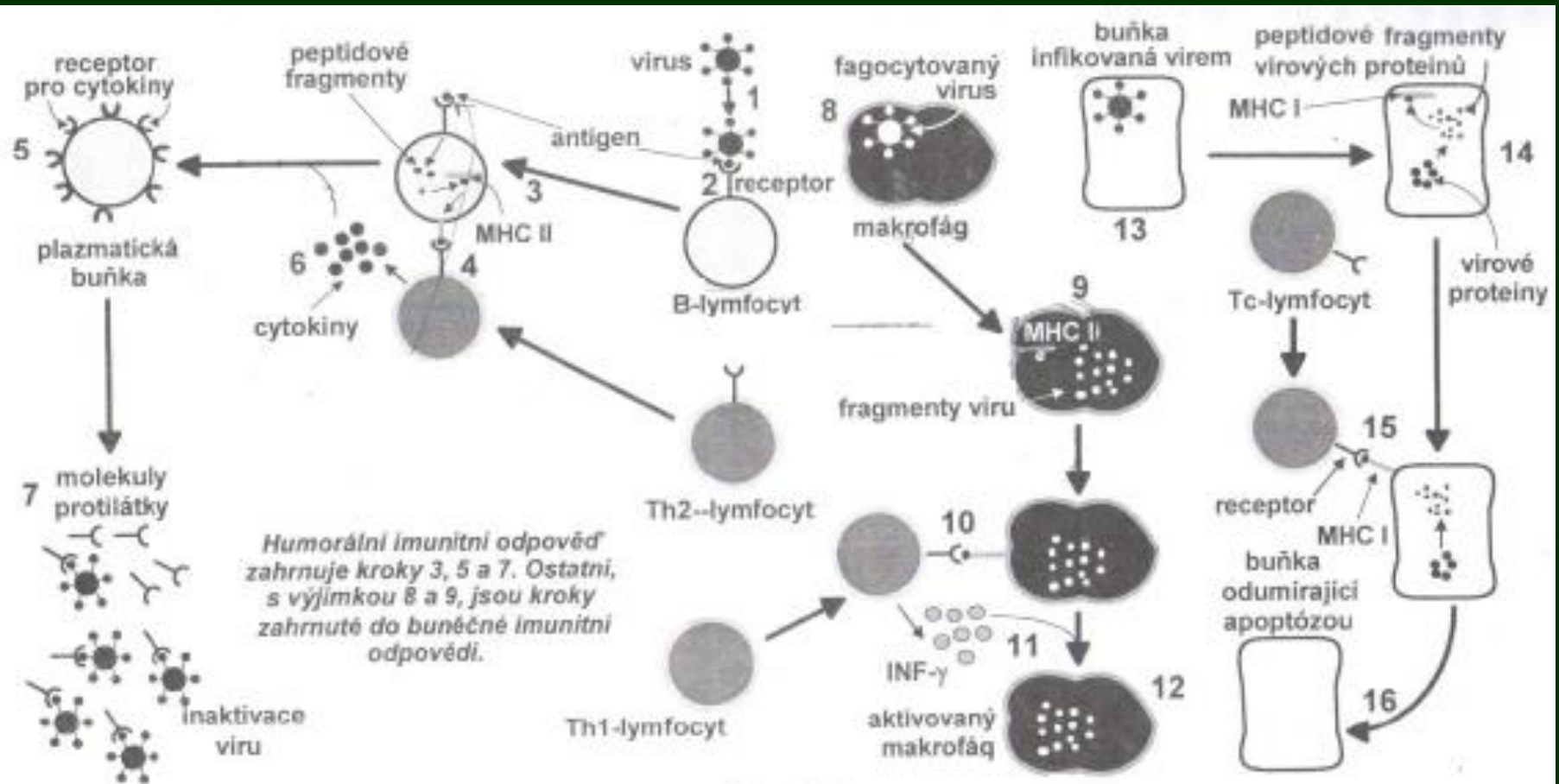


Téma 05_Imunologické metody



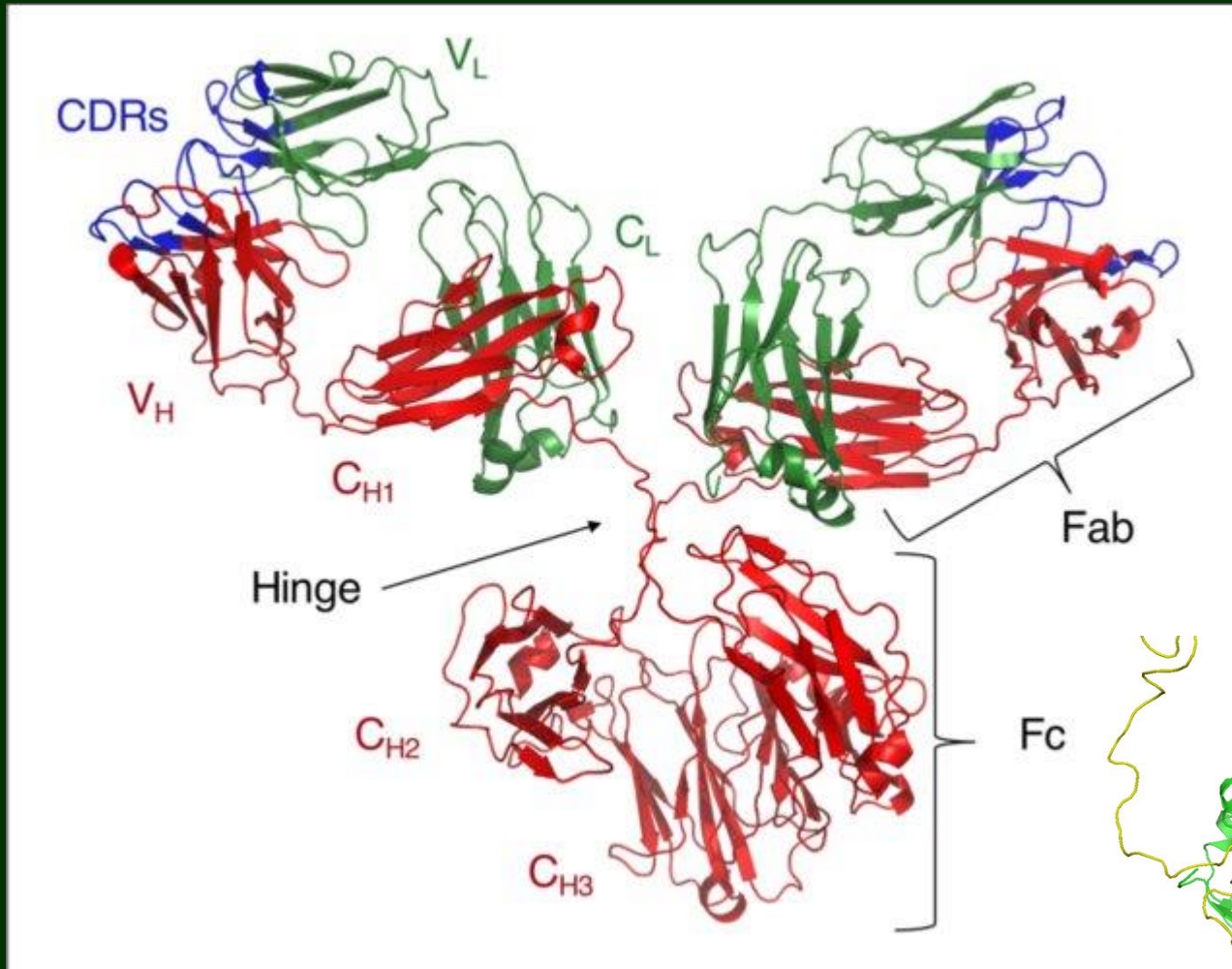
Humorální a buněčná imunita



Obr. 319

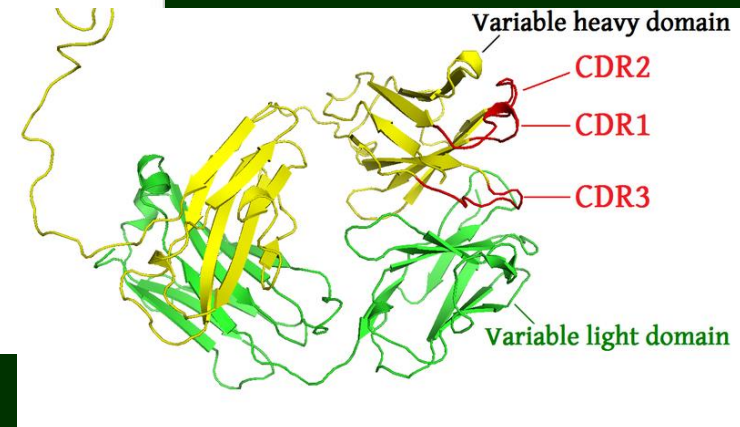
Globální a zjednodušené schéma humorální a buněčné imunitní odpovědi organismu na antigen

Krystalografická struktura molekuly IgG a vazebného místa

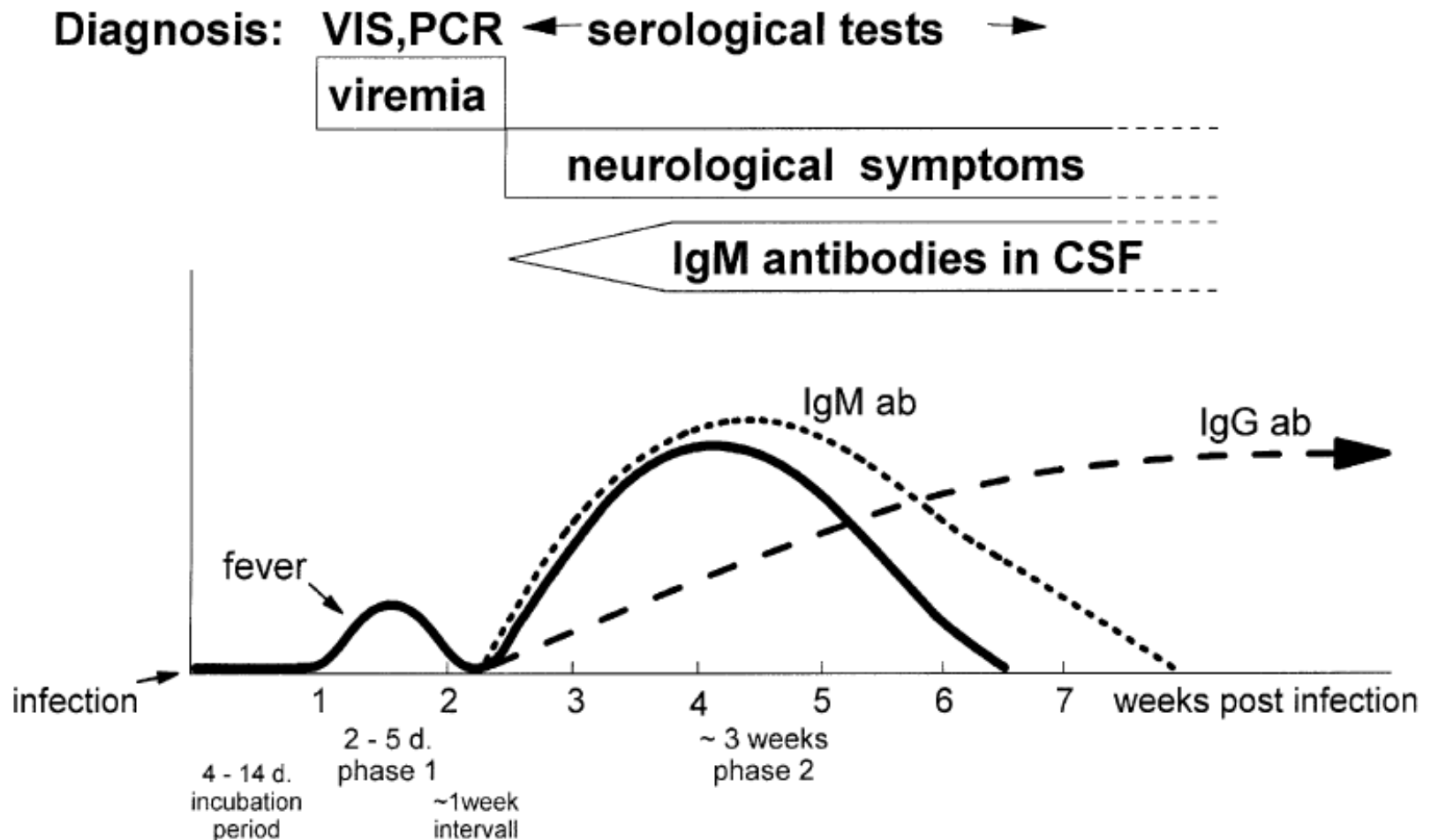


Imunoglobulinové třídy:

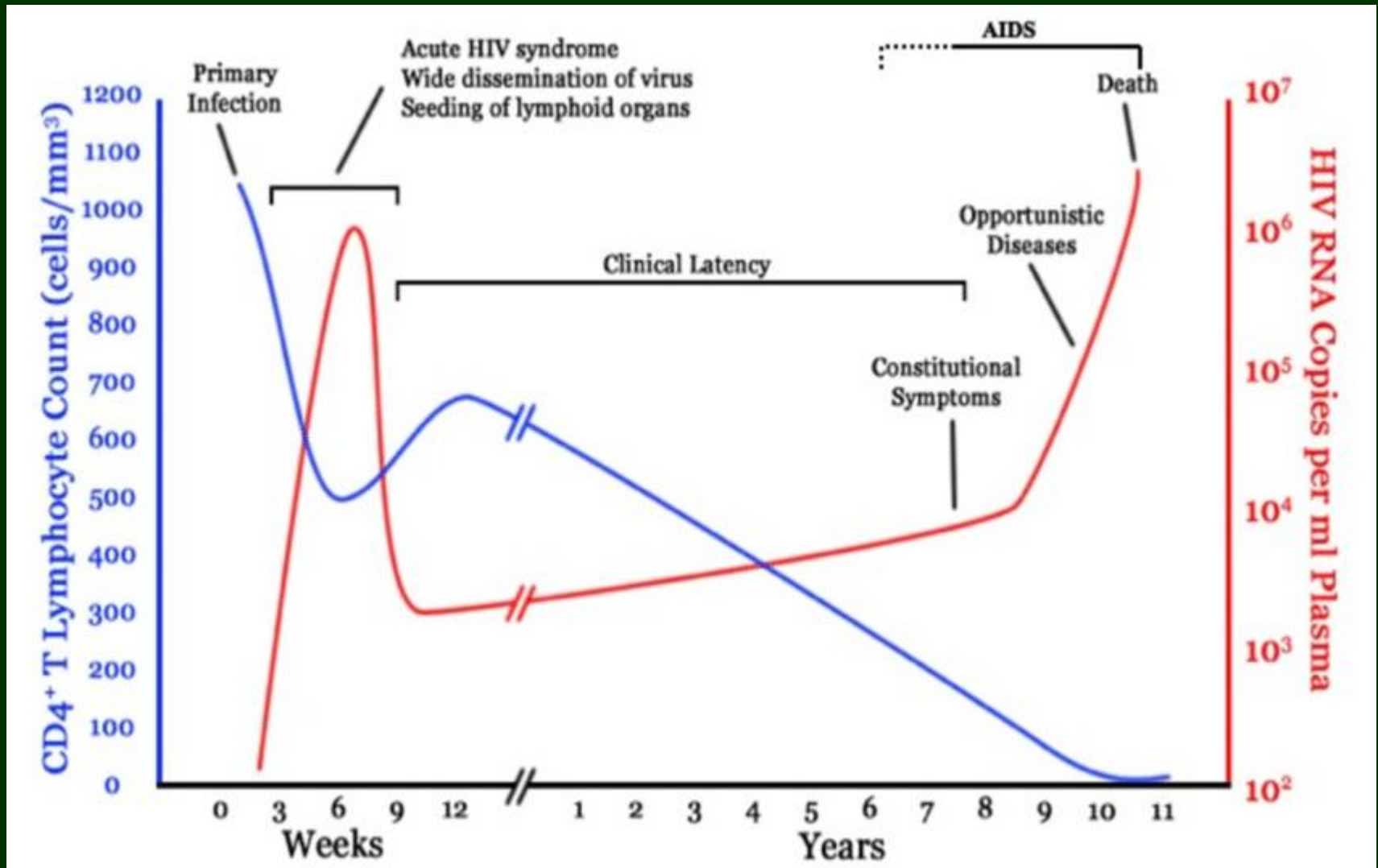
IgG
IgM
IgA
IgD
IgE



Imunologická odpověď na přítomnost patogena v organismu (virus klíšťové encefalidity)

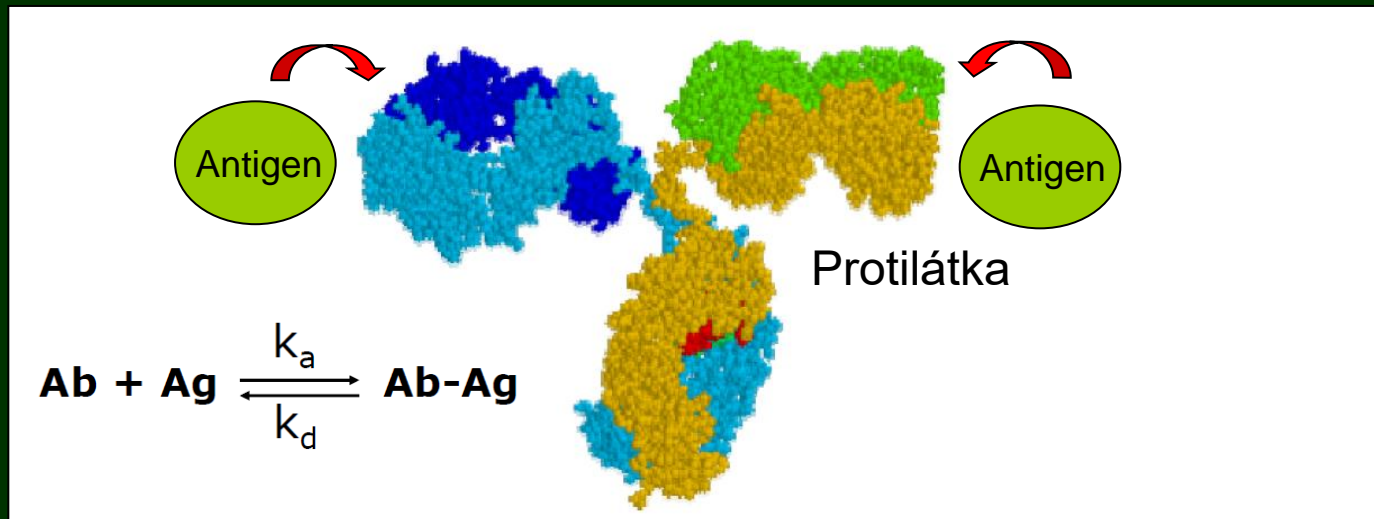


Imunologická odpověď na přítomnost HIV organismu



Imunologické metody

- Založeny na interakci protilátka-antigen
- Detekce buď protilátek nebo samotného patogena
 - Polyklonální protilátky-imunizace zvířat
- Monoklonální protilátky-hybridomová technologie
 - Rekombinantní protilátky-mol.biol.techniky
 - Nanoprotilátky-velbloudovití, paryby



Imunologické metody

- **Klasické imunologické metody**
(aglutinační techniky, imunodifuzní techniky, imunoelektroforetické metody)
- **Imunoanalytické metody** (immunoassays)
- **Rychlé imunologické metody** (lateral flow immunoassays, dipstick techniky)
 - **Biosenzorové technologie**

Klasické imunologické techniky

Klasické imunologické techniky

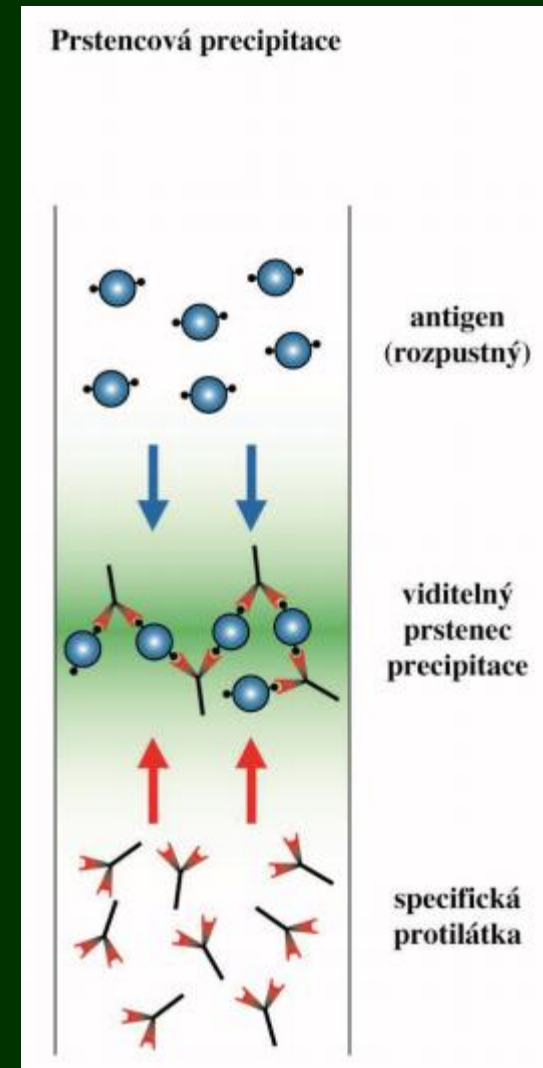
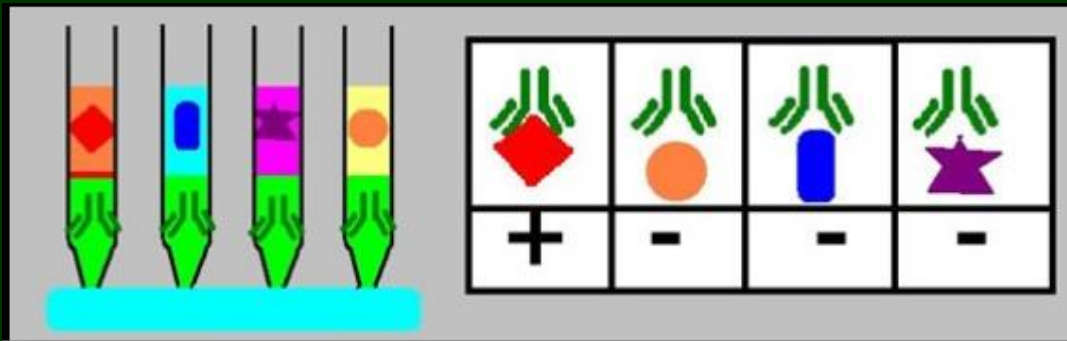
- Precipitační metody
- Aglutinační metody
- Komplement-fixační reakce
- Imunodifuzní metody
- Imunoelektroforetické metody
- Neutralizační testy

Precipitační metody

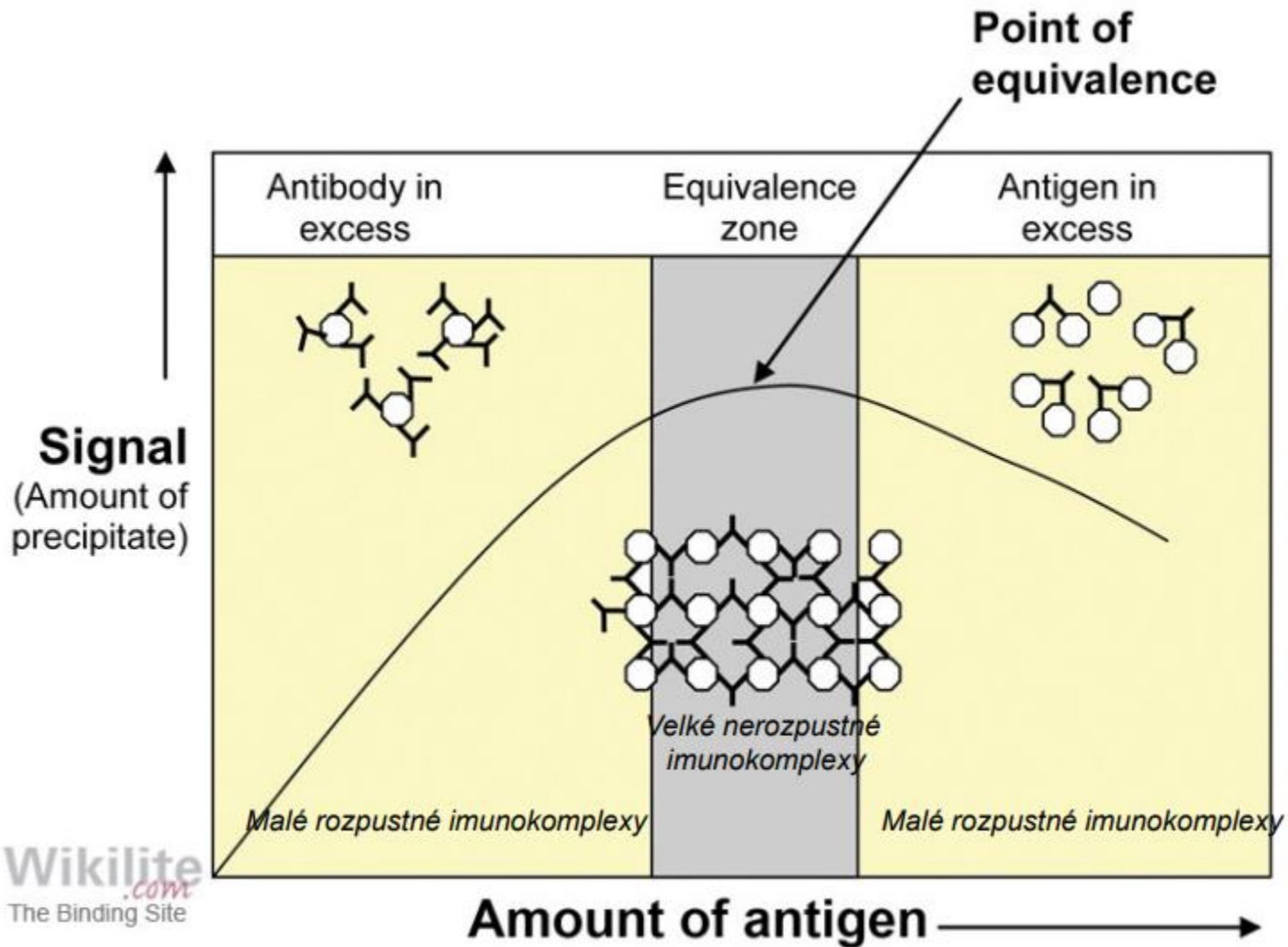
Ag je volná biomolekula, koloidní antigen, protein

Vznik precipitačního prstence na rozhraní roztoků antigenů a protilátky

Používá se zvířecí sérum + **extrakt (lyzát)** bakteriálního kmene



Dynamika tvorby imunokomplexů



Stanovení množství precipitátu (kvantitativní)

**v roztoku: nefelometrie,
turbidimetrie**

množství precipitátu – zákal

přídavek PEG

kvantitativní stanovení (*kalibrační křivka*)

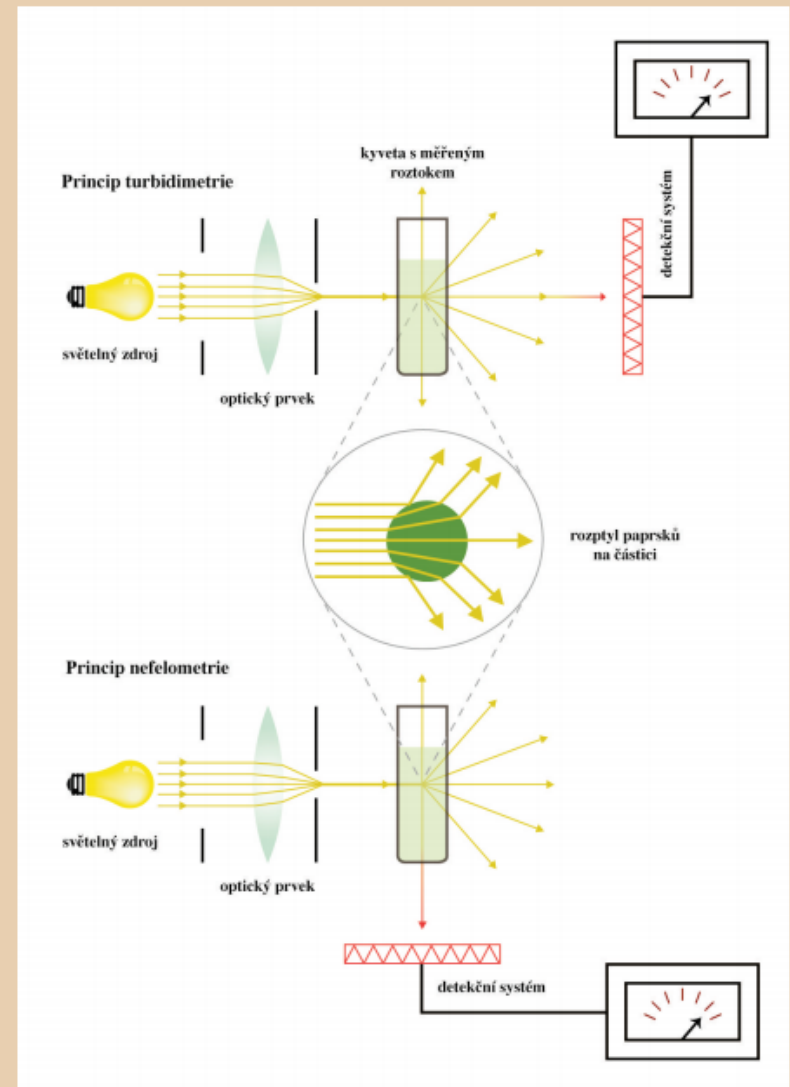
výsledky poskytují velmi rychle

lze je plně automatizovat,

vhodné pro velké série vzorků

**používají se pro stanovení proteinů v
komplexních vzorcích, bakteriálních
lyzátech, homogenátech potravin a pod.**

Citlivost metody – mg- μ g/ml



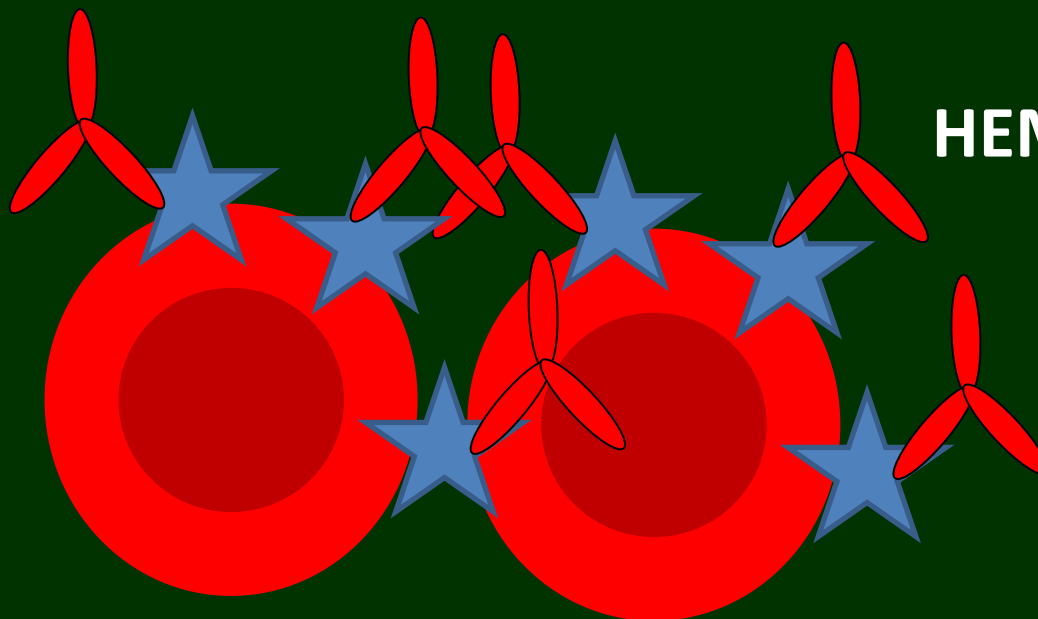
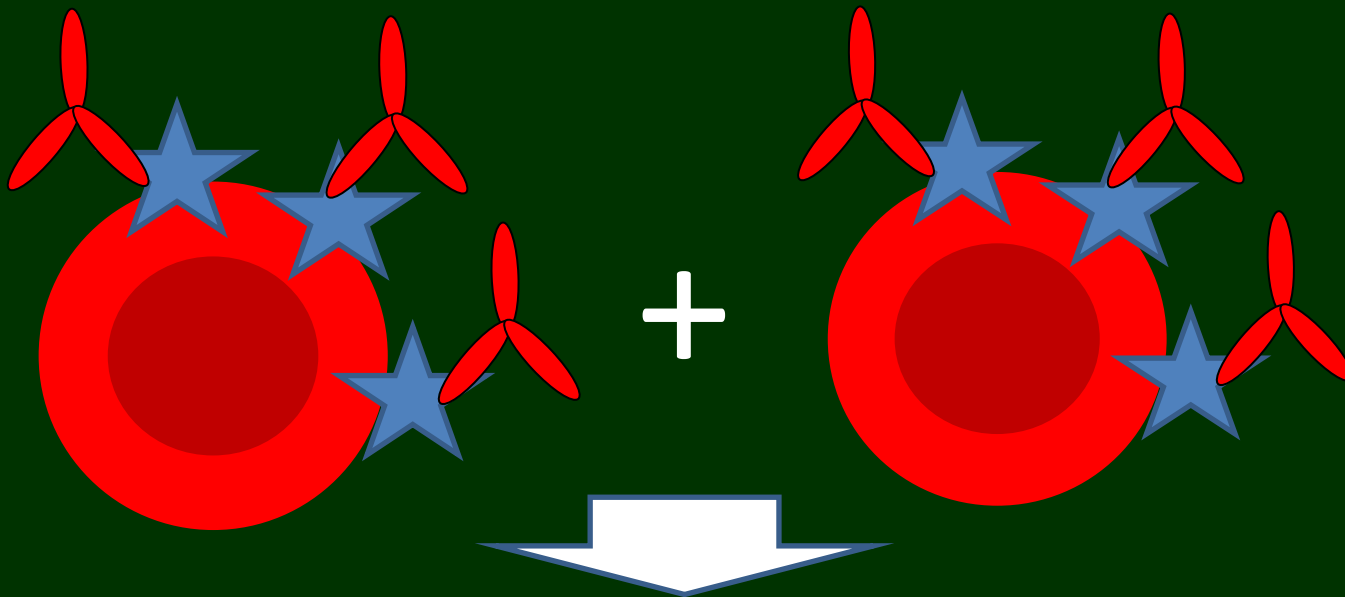
Příklad využití precipitačních metod:

Průkaz protilátek proti syfilis.

Detekce nespecifických protilátek (ne proti *T. pallidum*) proti kardiolipinu (látky, která se objevuje ve zvýšené koncentraci u syfilitiků)

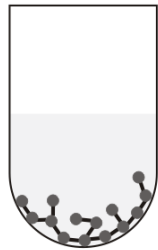
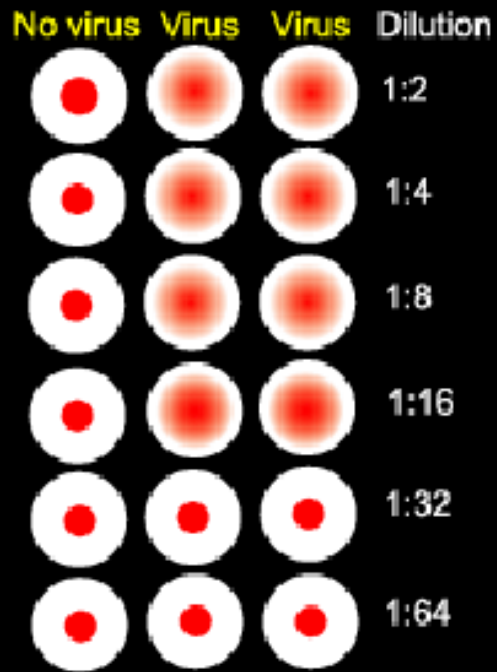
Aglutinační metody

- Ag je bakteriální (nebo jiná) buňka nebo virus, korpuskulární antigen
- Aglutinační technikou se známým antisérem se identifikují různé bakterie, případně jiné mikroorganismy a živočišné buňky, např. erythrocyty.
- Na druhé straně známé aglutinogeny umožňují identifikovat specifické protilátky
- Pokud se jako aglutinogen použijí erythrocyty, jde o hemaglutinační metody.
- Na erythrocyty se můžou pasivně adsorbovat různé rozpustné antigeny a hapteny.
- Když se na erythrocyty, které mají pasivně navázaný antigen, působí specifickým antisérem, nastane jejich aglutinace.
- Latexová aglutinace – latexové částice místo erythrocytů



HEMAGGLUTINACE

Hemaglutinační testy



aspect du
fond du tube



résultat positif



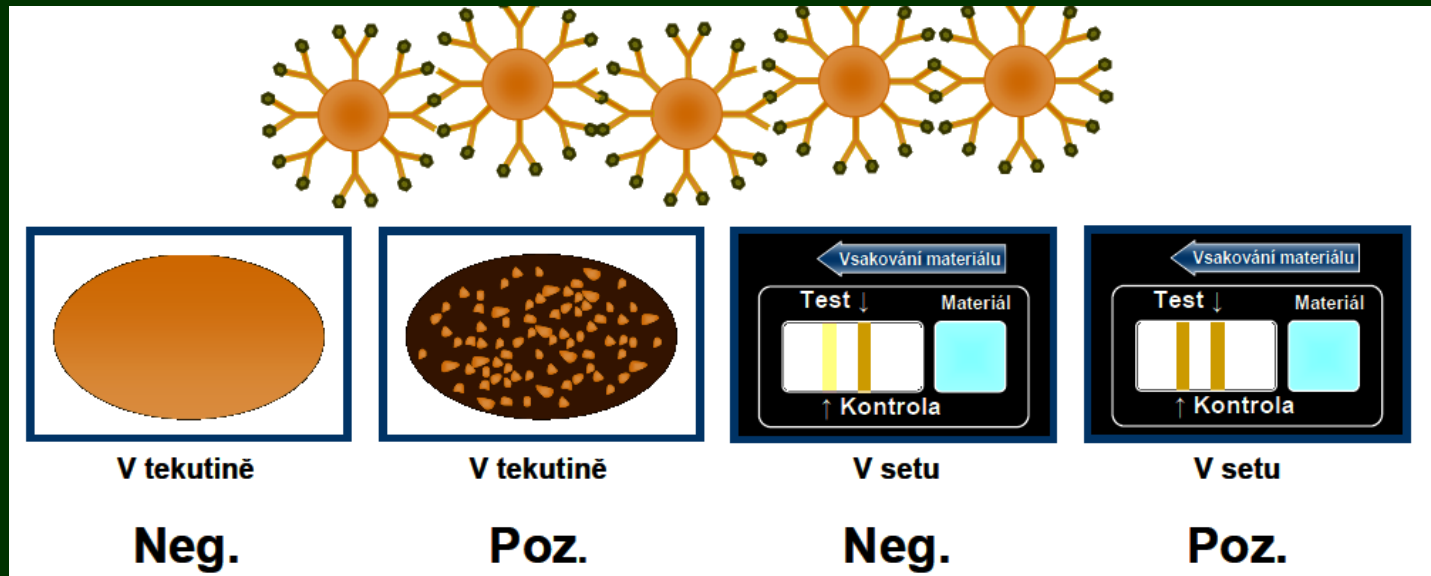
résultat négatif

Latexová aglutinace

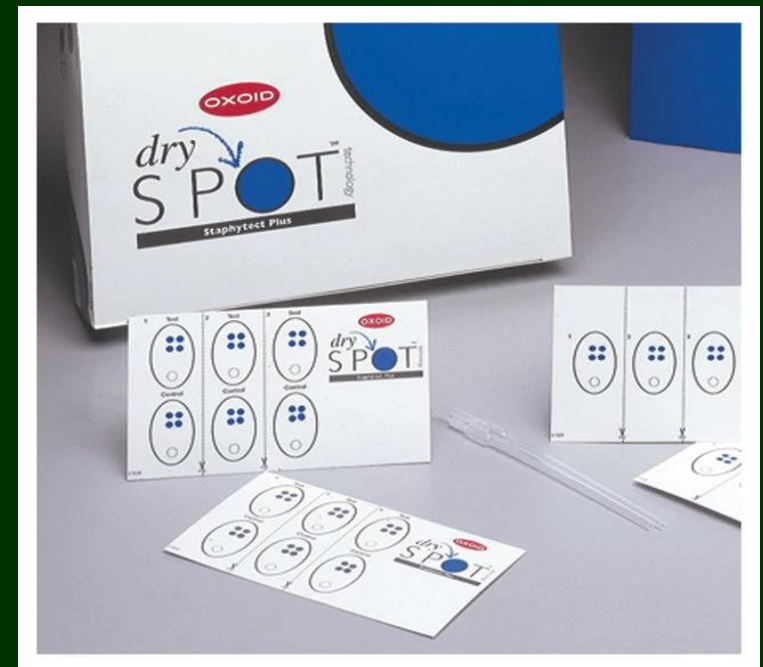
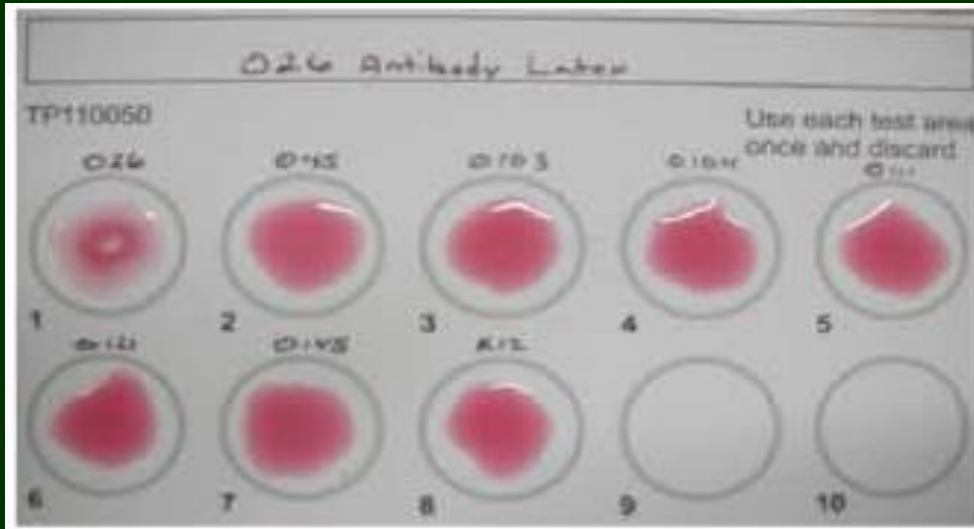


Protilátky jsou vázány na latexové částice. Po smíchání s virem dojde k pouhým okem viditelné agutinaci latexových částic.

Užití: zejména u průjmových onemocnění (rotaviry, adenoviry)



Aglutinační testy

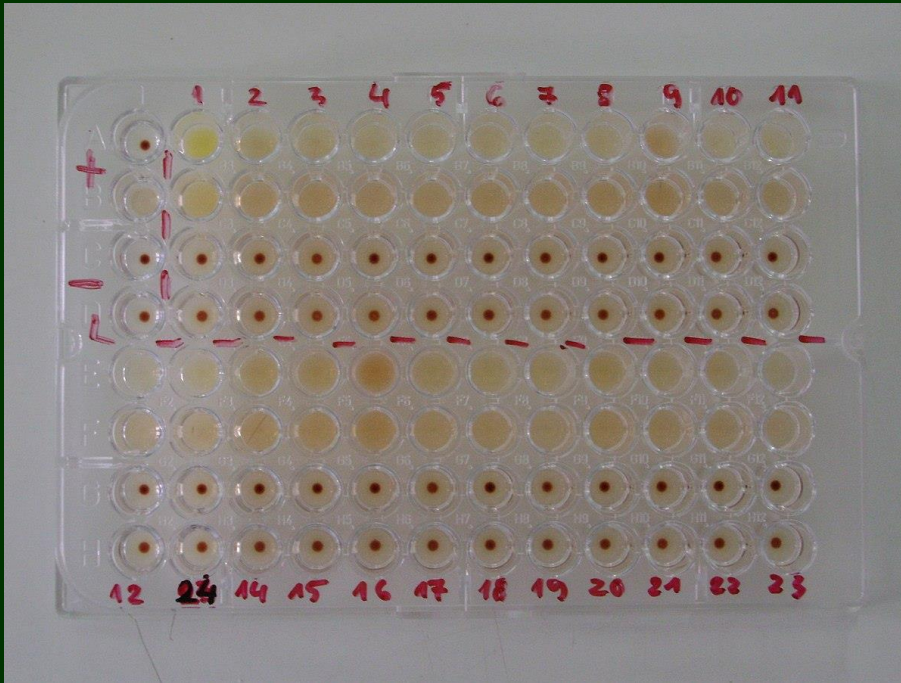


Komerčně dostupné latexové aglutinační testy pro detekci Shiga toxin produkující E. coli

STEC: E. coli produkující Shiga toxin, nejčastěji E. coli O157:H7, též „non-O157“ E. coli

- **Dryspot E. coli Seroscreen** (Meridian BioScience, Inc., Cincinnati, OH)
detekce non-O157 E. coli
- **VTEC-RPLA** (Oxoid Ltd. Hampshire, UK)
detekce non-O157 E. coli
- **VTEC-RPLA SEIKEN** (Denka Seiken Co., Ltd., Tokyo, Japonsko)
detekce non-O157 E. coli

Treponema pallidum pasivní hemaglutinace (TPPH)
Dnes červené krvinky nahrazeny polycelulózovými částicemi (TPPA)

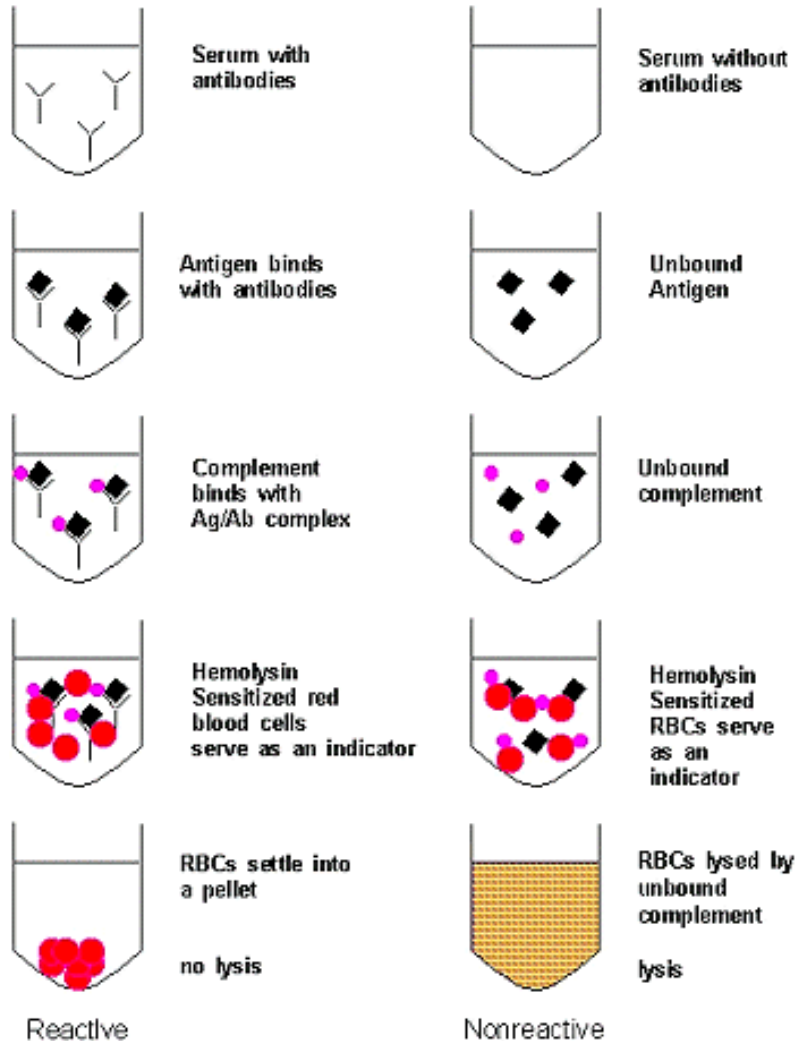


Komplement-fixační reakce

- V prvním stupni reaguje antigen s protilátkou v přítomnosti známého množství komplementu, který se spotřebovává, navazuje se na vznikající imunokomplexy
- Zdroj komplementu: **čerstvé krevní sérum z morčete**
- V druhém stupni se měří zbytková hemolytická aktivita komplementu, který se nenařadil na imunokomplexy (obdobu zpětné titrace), čímž se určí množství vázaného komplementu a tím také množství protilátky nebo antigenu.
- Druhý stupeň se dělá tak, že se k složkám, které reagovali v prvním stupni, přidají **ovčí erythrocyty obalené amboceptorem (králičí protilátky proti ovčím erythrocytům)**.
- Pokud se v prvním stupni spotřeboval veškerý komplement, nemůže v druhém stupni nastat hemolýza = pozitivní komplement-fixační reakce.
- Pokud se komplement nespoteřeboval, nastane hemolýza, protože komplement je volný a může se navázat na komplex erythrocyt-antierythrocytová protilátka = negativní komplement-fixační reakce.

Metoda vazby komeplementu

Complement Fixation Test



• 3 kroková reakce

- 1) přidá se sérum s antigenem komplementárním k hledaným protilátkám
- 2) přidá se komplement
- 3) přidá se hemolytický komplex (beraní erythrocyty a králičí protilátky proti nim)

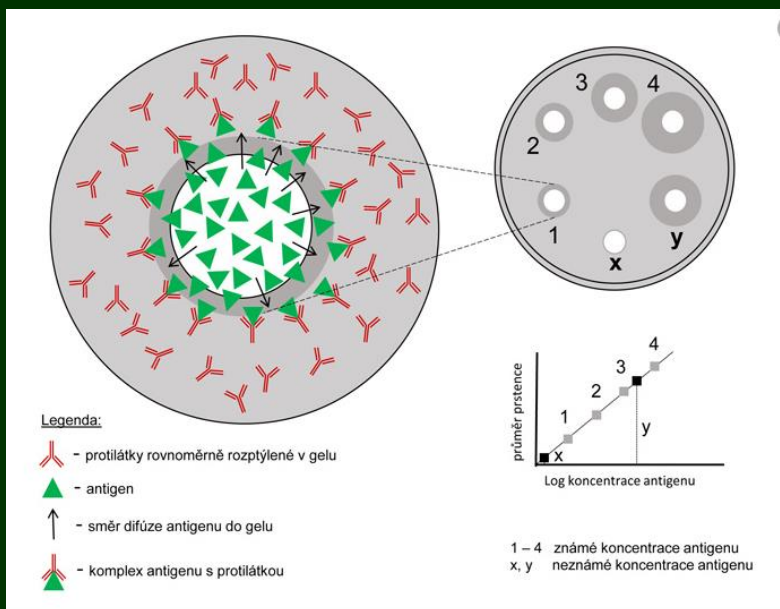
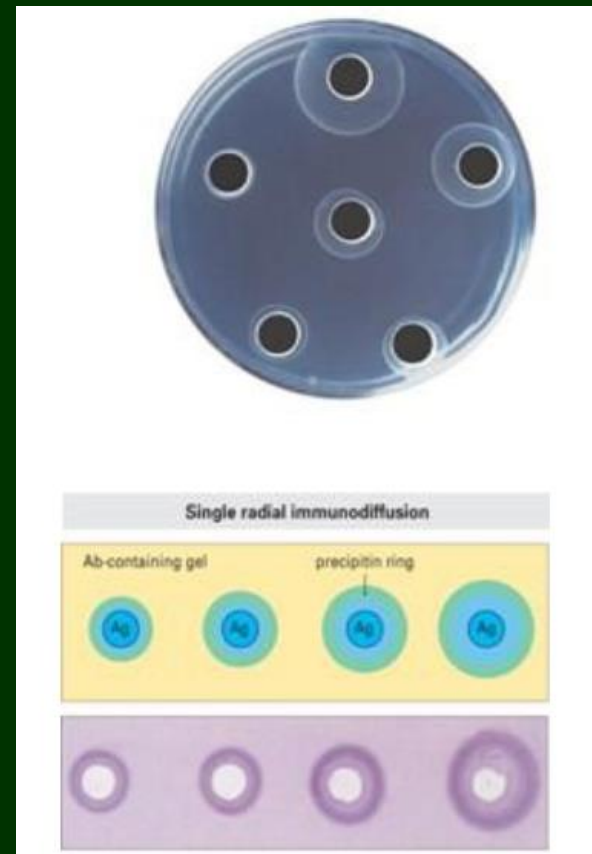
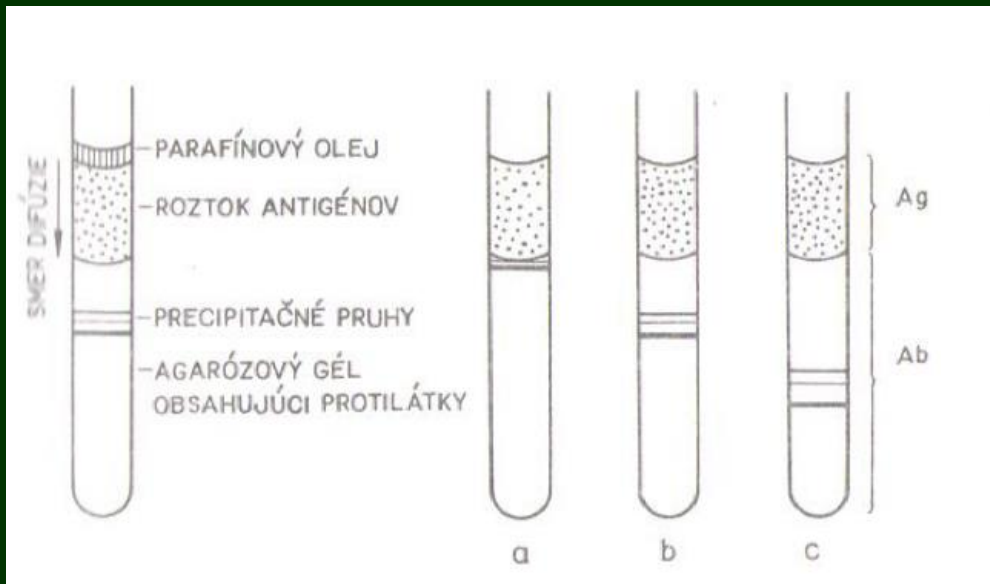
Použití pro testování na přítomnost jakéhokoli antigenu (patogenu) nebo protilátky.

Např. průkaz protilátek proti respiračním virům nebo bakteriím r. Mycoplasma a Chlamydia u pneumotických pacientů

Průkaz protilátek proti viru klíšťové encefalitidy

Průkaz protilátek proti Toxoplasma gondii.

Jednoduchá imunodifuze (Oudinova metoda)

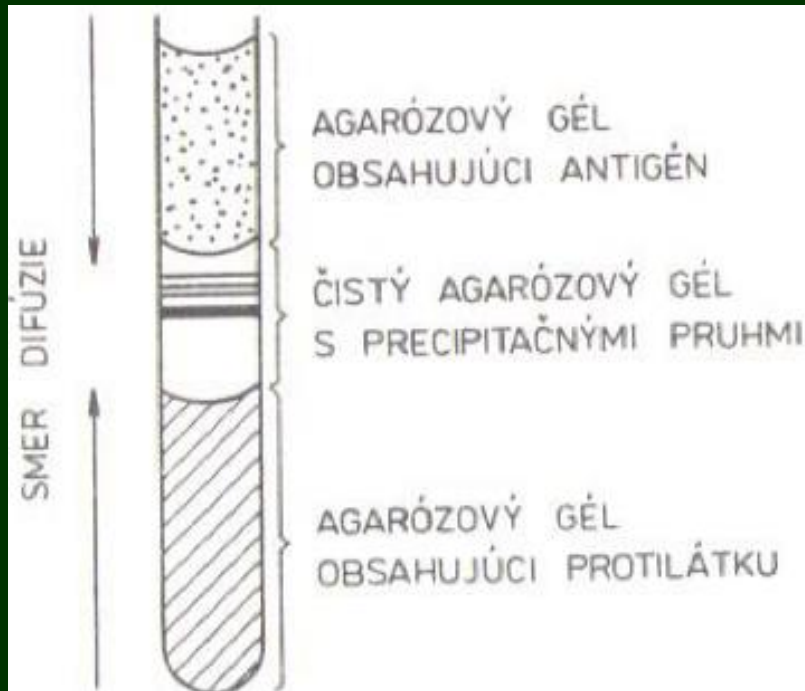


Jednoduchá radiální imunodifuze

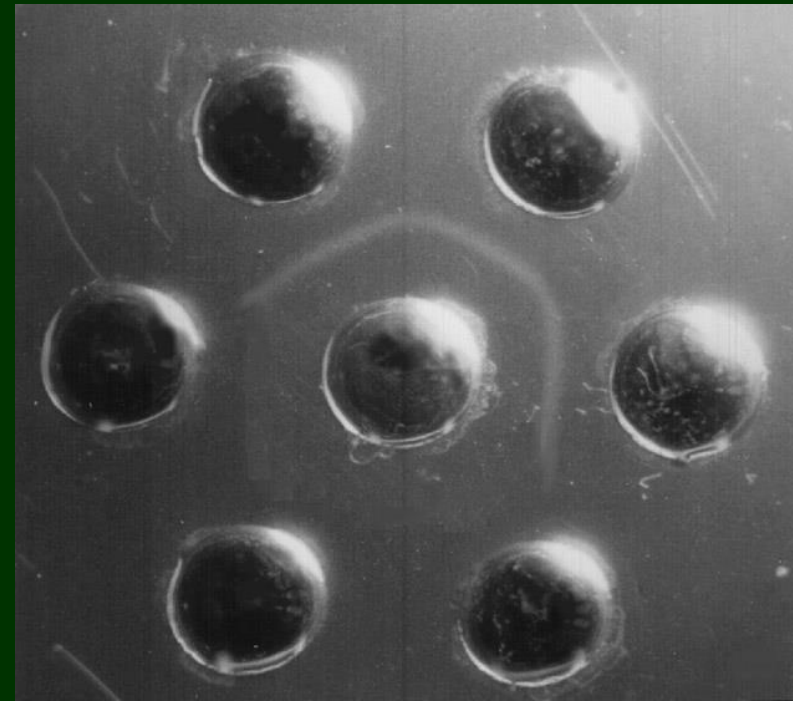
Koncentrační gradient Ag
 Ab rovnoměrně rozptýlena v gelu
 Plocha prstence úměrná konc. Ag
 Kvant. stanovení – kalibrač. křivka

Jednoduchá jednorozměrná imunodifuze

Dvojitá imunodifuze

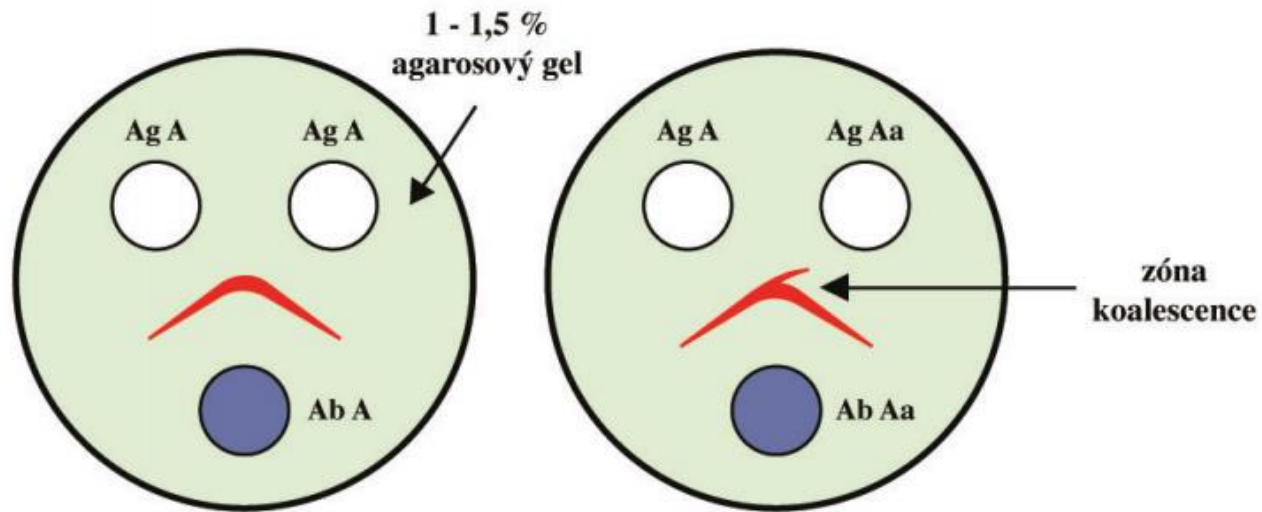


Dvojitá jednorozměrná
imunodifuze



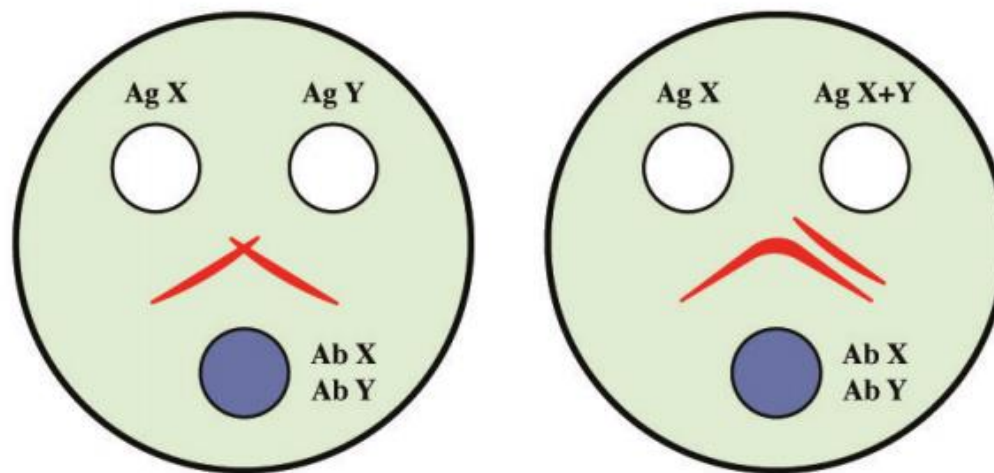
Dvojitá dvojrozměrná
imunodifuze

Difundují Ag a Ab proti sobě v gelu
Precipitační linie v bodě ekvivalence
Posouzení příbuznosti/podobnosti antigenů
Použití: systémové kandidózy, aspergilózy
Kvalitativní stanovení



identické antigeny A

částečně identické antigeny A, Aa



neidentické antigeny X, Y

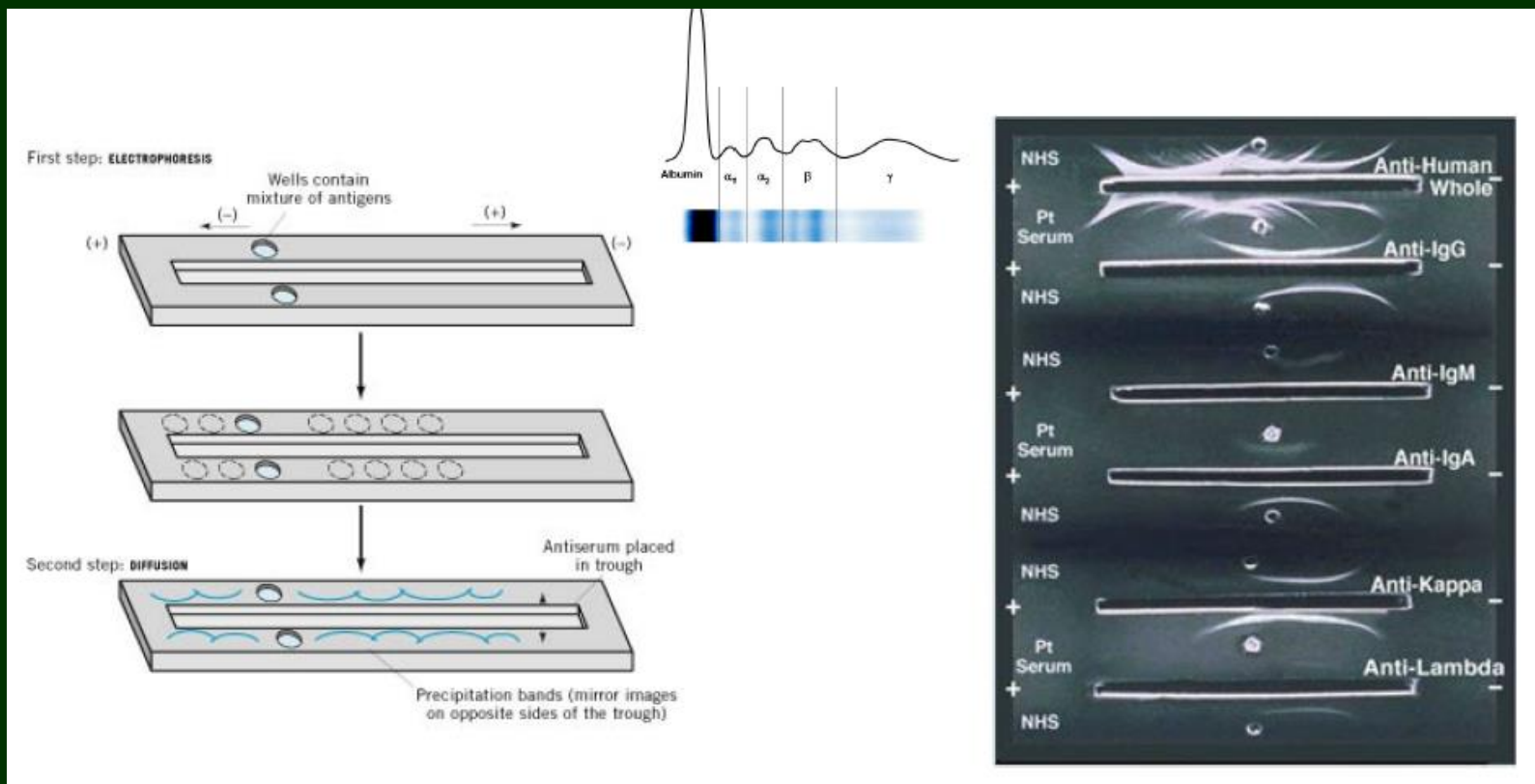
komplexní reakce dvou
různých antigenů X a Y

Imunoelektroforéza (Grabar/Williams)

Imunoelektroforéza je kombinací elektroforetického dělení a imunodifuze

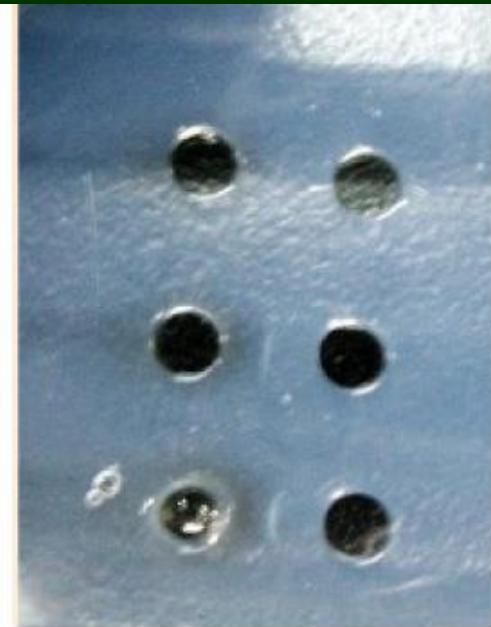
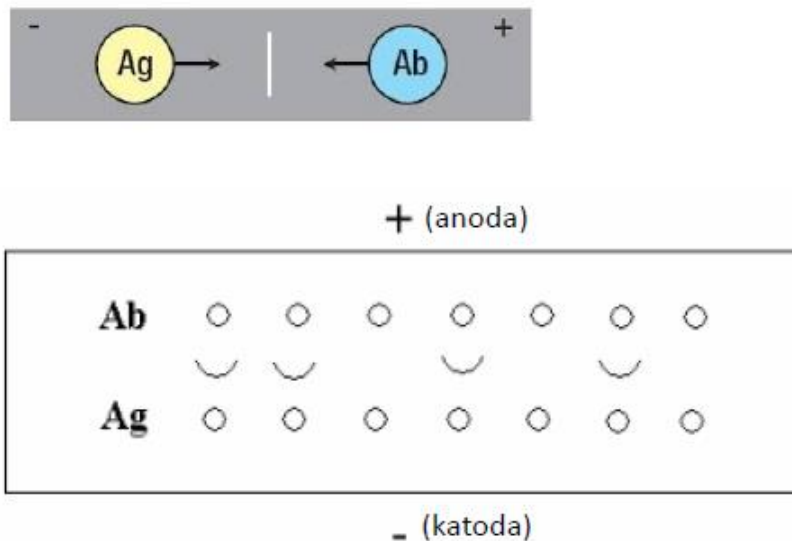
1. fáze: rozdělení proteinů ve stejnosměrném el. poli
2. fáze: imunodifuze a interakce s protilátkou

Mezi Ag a Ab se vytvoří precipitační linie, lze zvýraznit barvením
Zjišťování např. poruch v biosyntéze imunoglobulinů



Protisměrná imunoelektroforéza

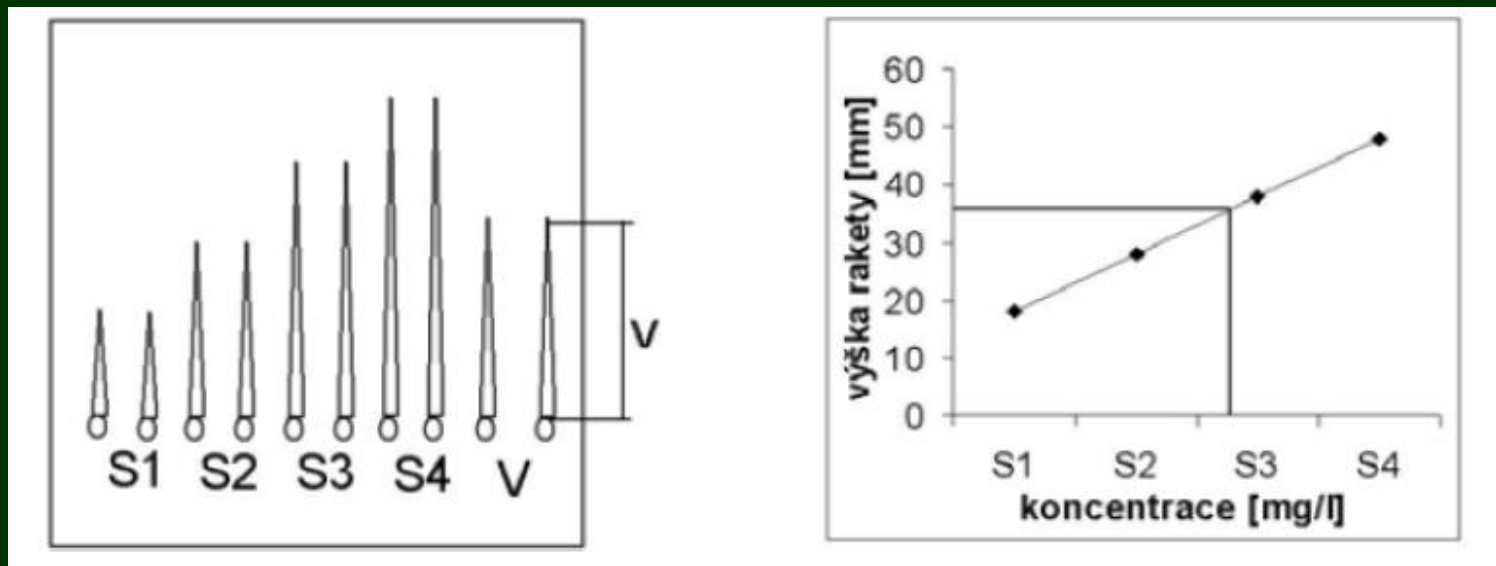
- využívá opačný pohyb Ag a Ab v el. poli
- jedná se o **imunodifuzi v el. poli**, čímž se imunodifuzní reakce značně zrychlí
- je to **obměna jednorozměrné dvojité difuze**, odečet do 30 min (rychlejší)
- Ag a Ab se umístí do dvou proti sobě položených startovacích jamek v gelu tak, aby protilátka byla blíže k anodě a antigen ke katodě
- **v el. poli se Ag pohybuje k anodě a Ab ke katodě**, v místě setkání se vytvoří precipitační linie, možno zvýraznit barvením



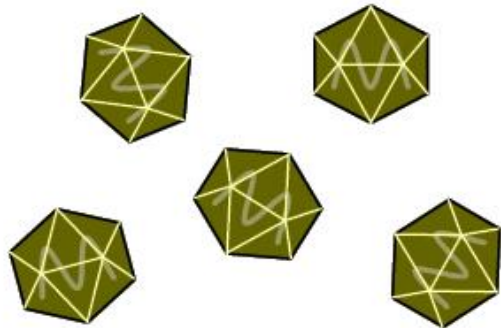
Kvalitativní důkaz antigenu, které mají anodickou pohyblivost

Raketová imunoelektroforéza

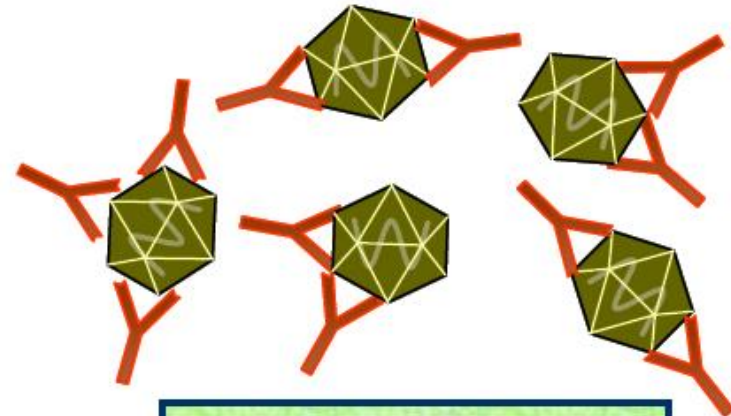
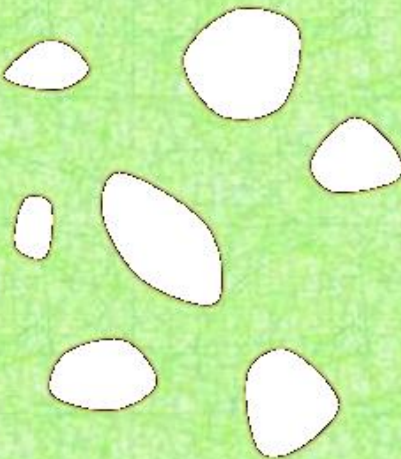
- umožňuje stanovit koncentraci proteinů až 0.1mg/L
- imunodifuzní technika v el. poli (elektroimunodifuze)
- molekuly Ag se nepohybují volnou difuzí, ale jejich pohyb je určován stejnosměrným el. polem
- většina proteinových antigenů putuje k anodě, v gelu se střetávají s molekulami Ab
- po dosažení ekvivalentního poměru vznikají precipitáty ve tvaru rakety
- výška rakety je přímo úměrná koncentraci antigenu
- je možné i opačné spořádání – stanovení koncentrace Ab v séru



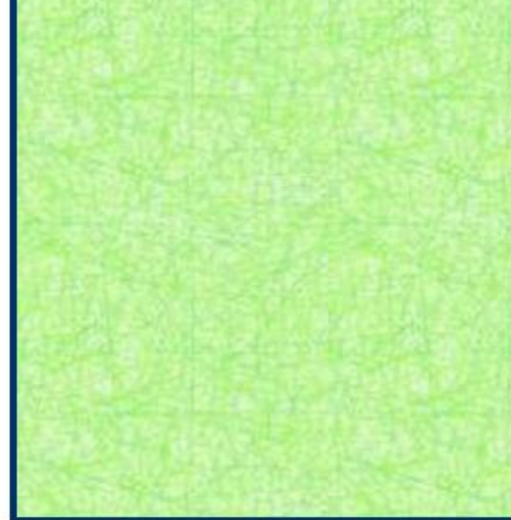
Virus-neutralizační test



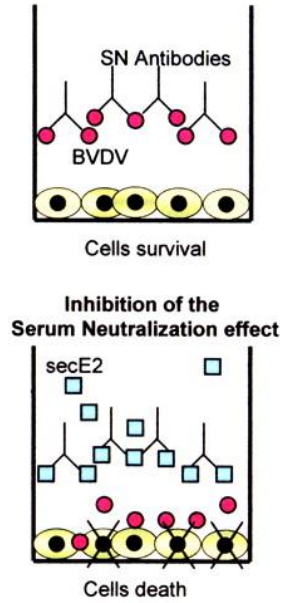
Tkáňová kultura
Množení viru –
makroskopicky po obarvení



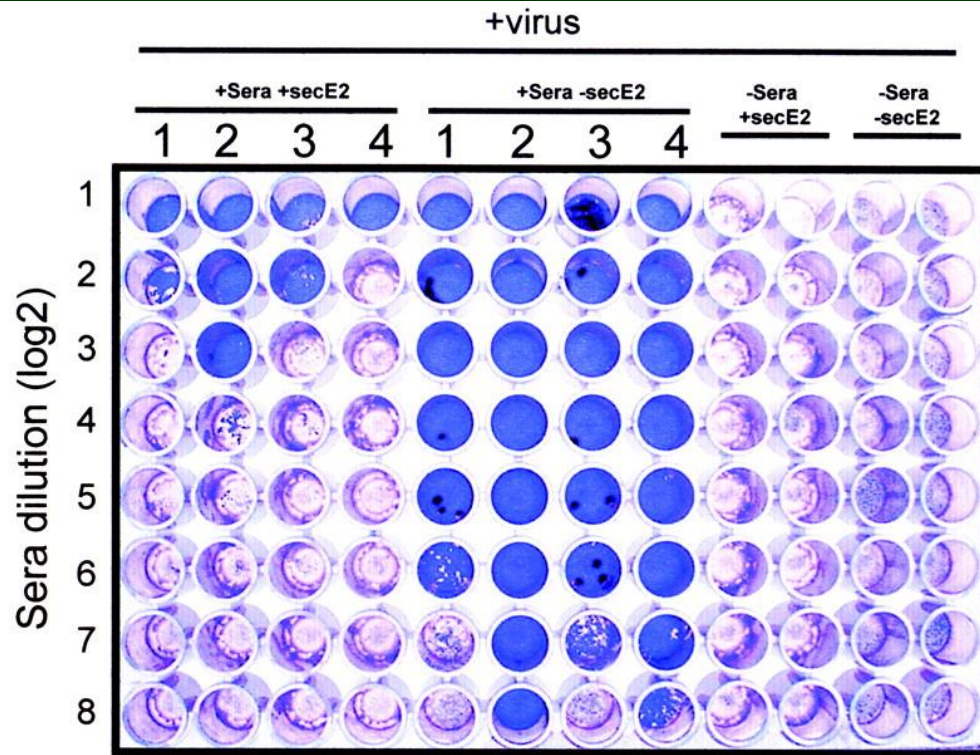
Tkáňová kultura
Virus neutralizován –
makroskopicky po obarvení



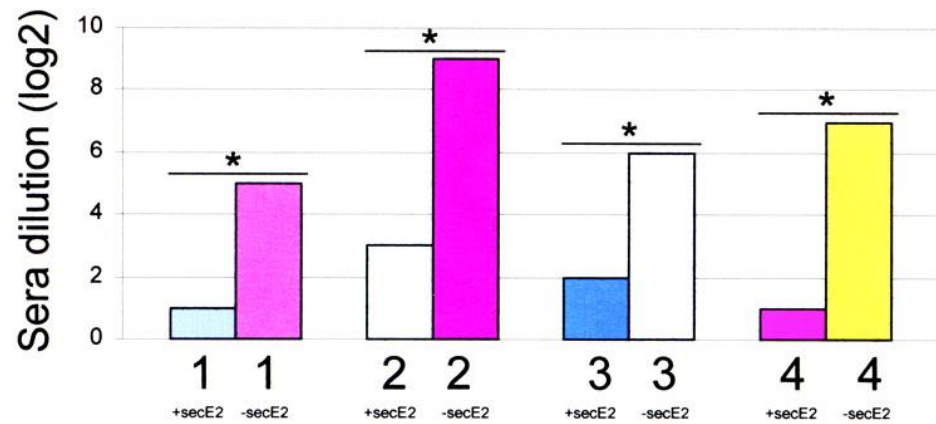
a) Serum Neutralization effect



b)



c)



* = P < 0,009

Imunonalytické metody

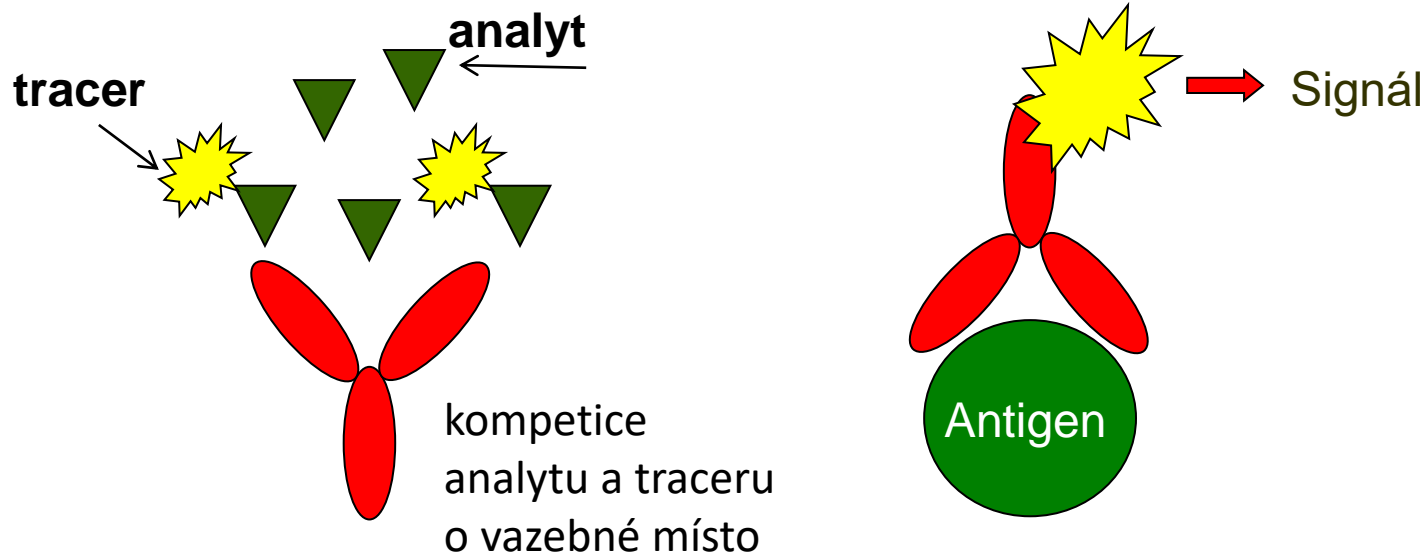
Imunoanalytické metody

- Radioizotopové metody
- Imunoenzymové metody
 - Fluorescenční metody
- Chemiluminiscenční metody
 - Alternativní metody

Imunoanalytické metody

Homogenní x heterogenní

Kompetitivní x nekompetitivní



Imunoenzymové metody (EIA)

protilátka nebo antigen značený enzymem
kolorimetrické stanovení (absorbance)

Enzymy používané v EIA

- Peroxidase (EC 1.11.1.7)
- Alkaline phosphatase (EC 3.1.3.1)
- Glucose oxidase (EC 1.1.3.4)
- Catalase (EC 1.11.1.6)
- β -Galactosidase (EC 3.2.1.23)
- Urease (EC 3.5.1.5)
- Adenosine deaminase (EC 3.5.4.4)

Křenová peroxidáza (EC 1.11.1.7)

(Hydrogen-Peroxide Oxidoreductase)

Mass (Dalton): 40.000-44.000

Lysine (for derivatisation): 1-3

•Chromogenic: - H₂O₂

Substrates OPD (*o*-Phenylenediamine)

Absorption measurement: 492 nm

- H₂O₂

TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine)

Absorption measurement: 450 nm

- H₂O₂

ABTS (2,2'-Azino-di-(3-ethyl-benzthiazoline sulfonate-6))

Absorption measurement: 410 nm (414 nm)

Fluorogenic

Substrate: - H₂O₂

HPPA (3-(*p*-Hydroxyphenyl) propionic acid))

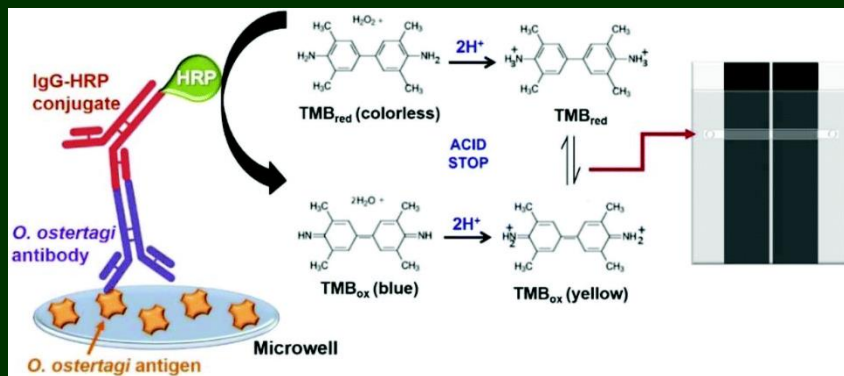
Excitation: 320 nm

Emission: 404 nm

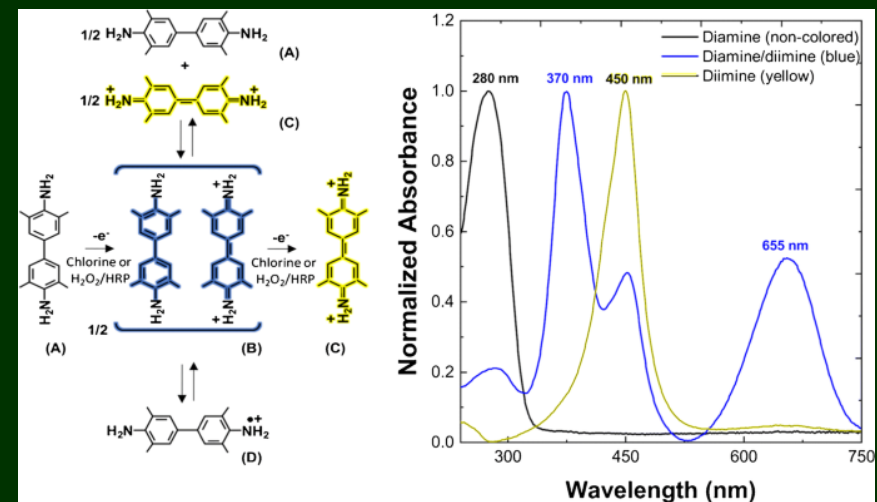
TMB can act as a hydrogen donor for the reduction of hydrogen peroxide to water by peroxidase enzymes such as horseradish peroxidase.

The resulting diimine causes the solution to take on a blue colour, and this colour change can be read on a spectrophotometer at the wavelengths of 370 and 650 nm.

The reaction can be halted by addition of acid or another stop reagent. Using sulfuric acid turns TMB yellow. The colour may be read at 450 nm.



Singh et al. 2019



Oxidation of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) to 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine diimine

Alkalická fosfatáza (EC 3.1.3.1)

(Orthophosphoric Monoester Phosphohydrolase)

Mass (Dalton): 80.000-84.000 (dependent from organism)

Chromogenic

Substrate: pNPP (*p*-Nitrophenylphosphate)
Absorption: 405 nm

Fluorogenic

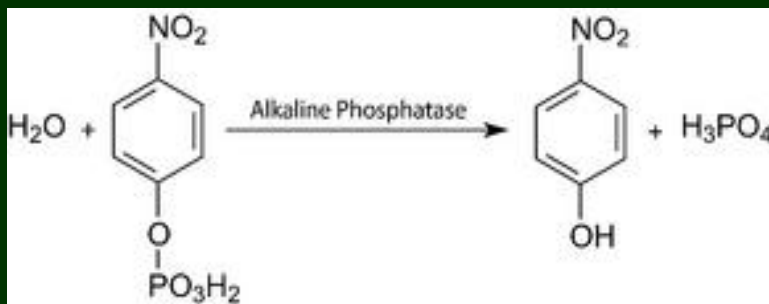
Substrate: 4-MU-P (4-Methylumbelliferylphosphate)

Excitation: 360 nm

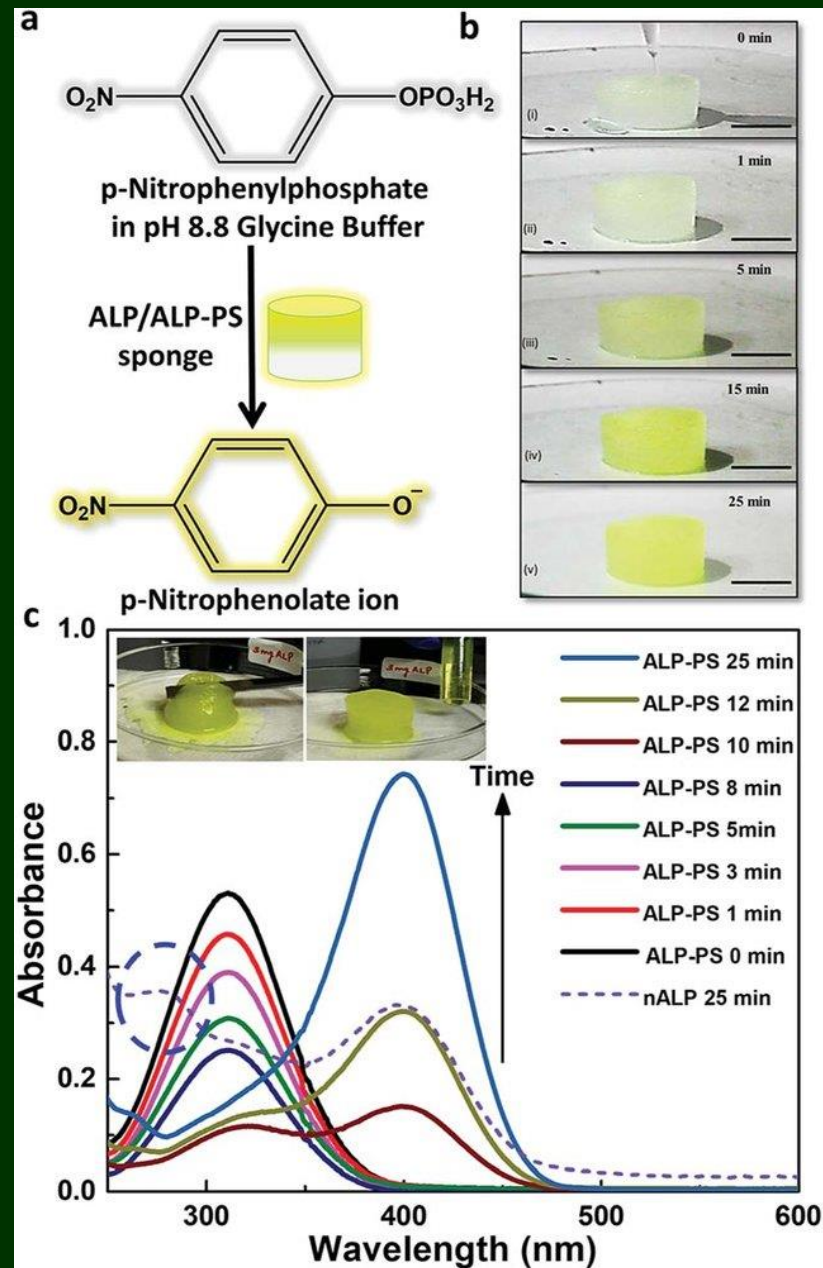
Emission: 450 nm

pNPP

p-nitrophenol + kys. fosforečná



AP je metaloproteinový enzym katalyzující hydrolýzu monoesterů kyseliny fosforečné v alkalickém prostředí (v optimu pH 9,5–10,5) na kyselinu fosforečnou a alkohol. Ovlivňuje metabolismus makroergických fosfátových vazeb a napomáhá transportu anorganických fosfátů přes buněčnou membránu.



ELISA

Enzyme linked immunosorbent assay



Conventional microtiterplate

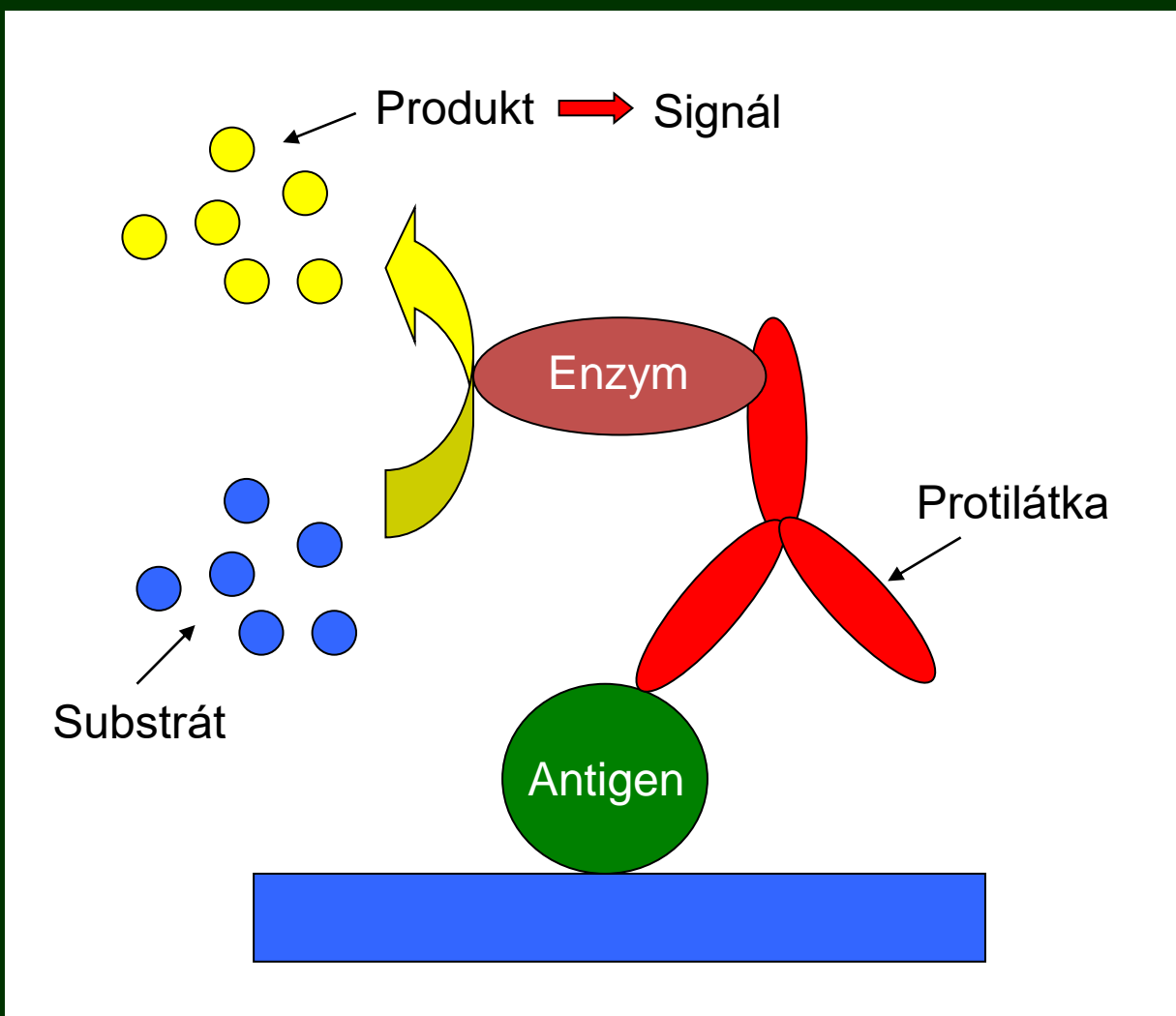


Strips in microtiterplate format

Nekompetitivní ELISA systémy

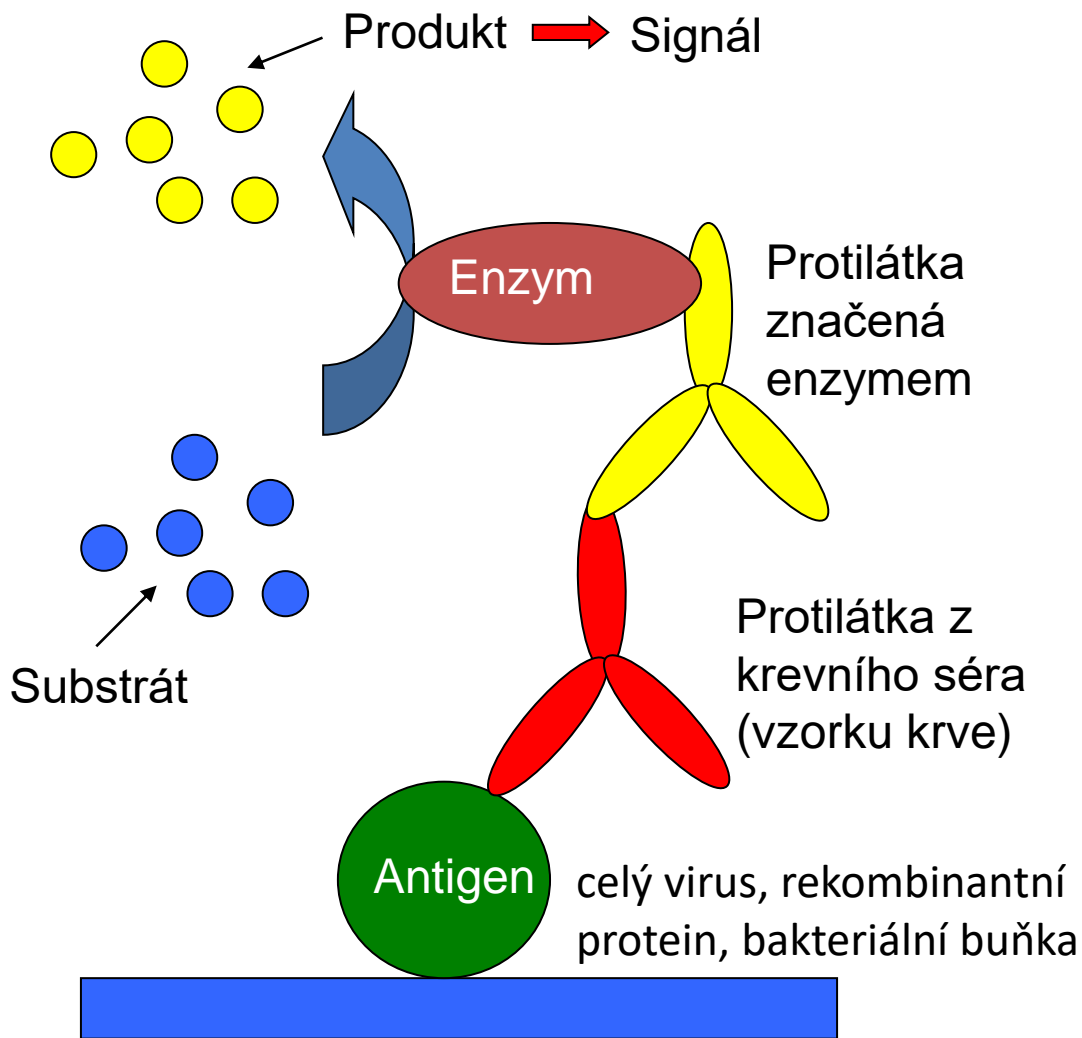
Přímá nekompetitivní ELISA

toto uspořádání se v praktické diagnostice nepoužívá. Možné využití při vývoji ELISA technik



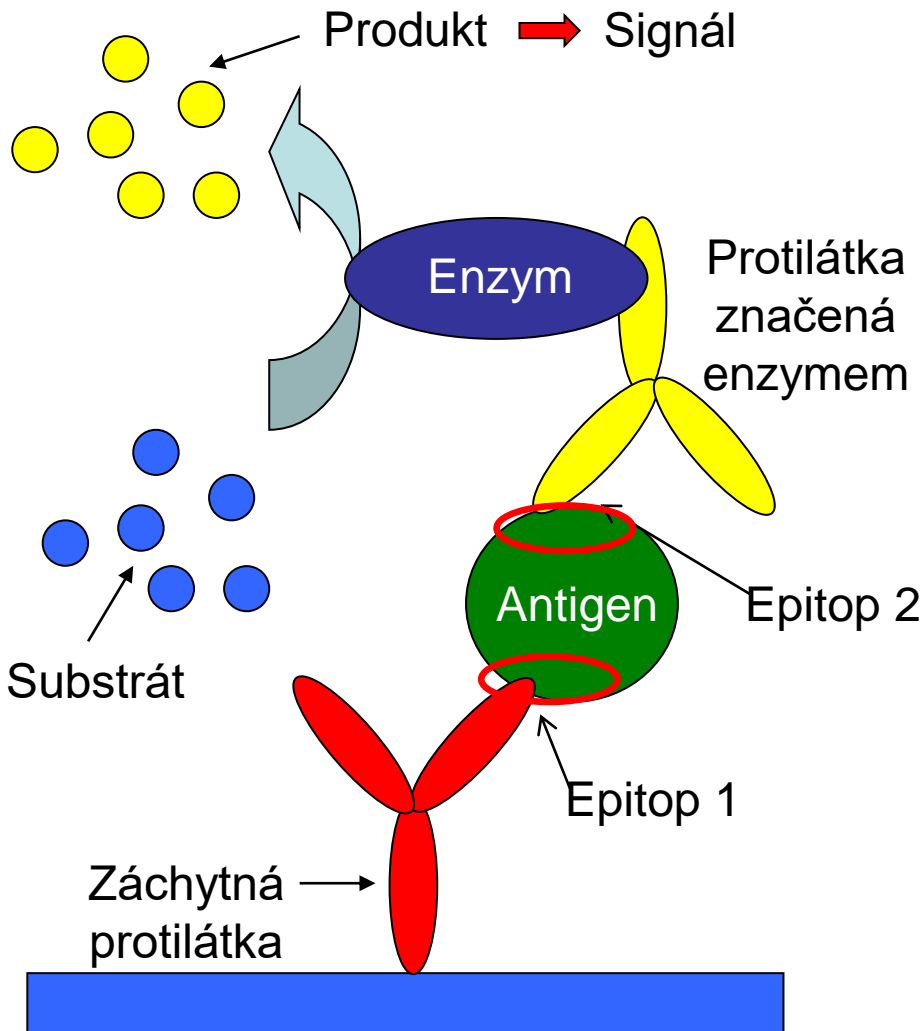
Nepřímá nekompetitivní ELISA

Pro sérologická stanovení protilátek.



Sandwich ELISA

Přímé stanovení patogena ve vzorku (např. SARS-CoV-2 ve sputu nebo HSV ze stěru)

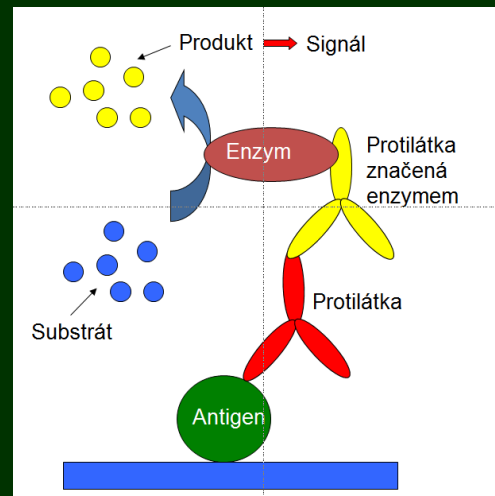
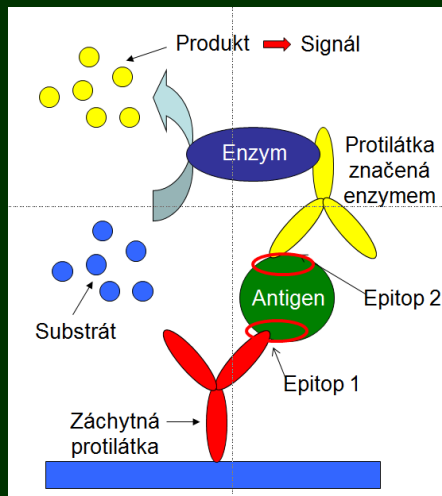


Při velkých antigenech (virová částice, bakteriální buňka) možno Epitop 1 = Epitop 2

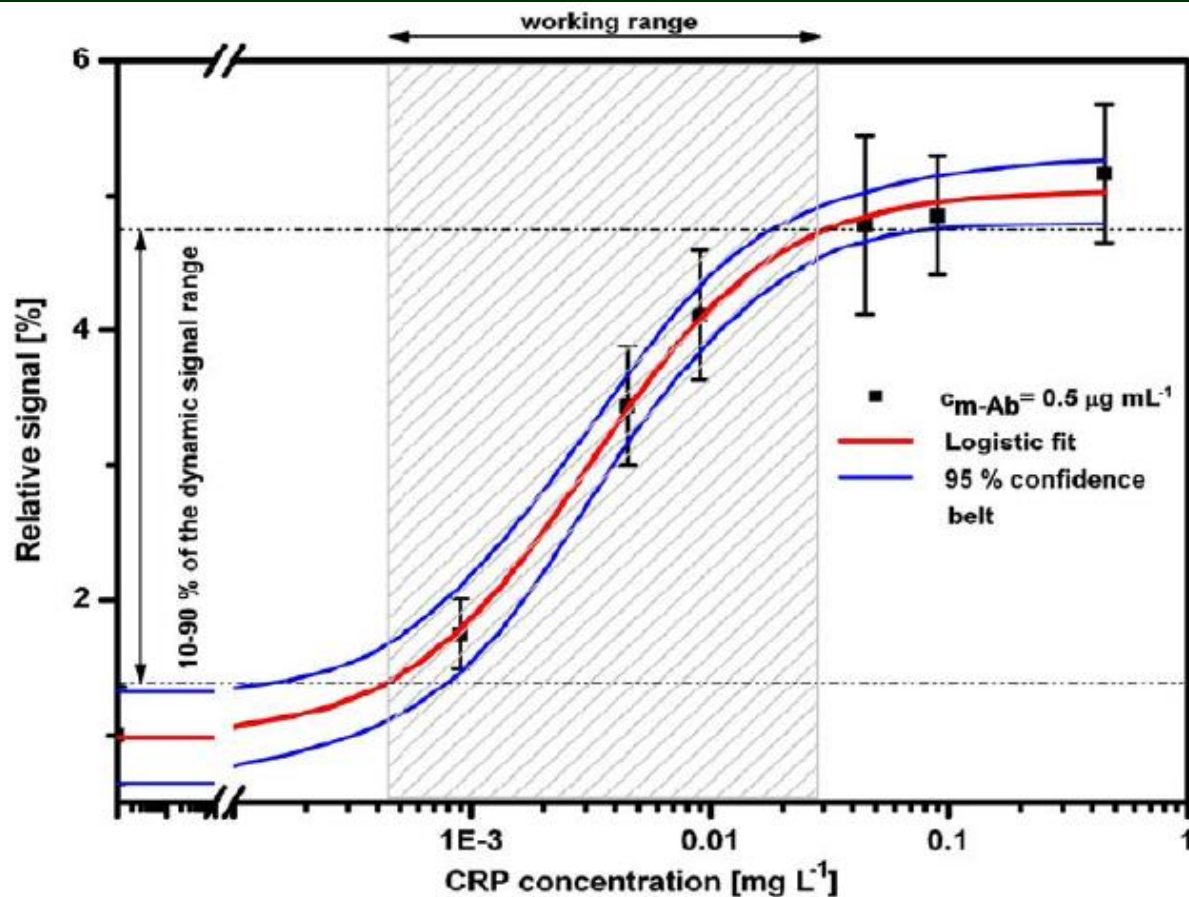
Při antigenech typu protein nebo haptén-proteinový konjugát Epitop 1 \neq Epitop 2

Stanovení

- mikrobiální antigen = přítomnost mikroorganismu v daném prostředí (např. v krvi pacienta, ve vzorku potravin, ve vzorku životního prostředí) – Přímé stanovení (méně časté)
- specifickou protilátku proti mikroorganismu v klinických vzorcích, nepřímé sérologické stanovení (častější)



Standardní křivka pro nekompetitivní ELISA



Signál je přímo úměrný koncentraci analytu

Charakteristiky nekompetitivní ELISA (sandwich)

Nadbytek záchytné protilátky

Detekce proteinů, virionů, buněk

Vyšší citlivost než u kompetitivní ELISA

Vyšší specifita (nepravděpodobné, že odlišné antigeny sdílí 2 stejné epitopy)

ELISA-based (serological) methods for tick-borne encephalitis diagnostics

	Serology
Advantages	<p>Allows reliable detection of IgM and IgG antibodies in serum and CSF from the second week of disease</p> <p>High throughput of clinical specimens is possible</p> <p>Commercial kits are available</p>
Disadvantages	<p>Cross-reactions with antibodies elicited by heterologous flaviviruses</p> <p>NT has high specificity but requires biosafety facility</p>

Commercial IgG/IgM-ELISA kits for the detection of anti-TBEV antibodies



Sensitivities and specificities of the different EIA test systems for the detection of TBEV-specific IgG antibodies, as determined with our serum panel

Test system	Sensitivity (%)	Specificity (%)
Serion classic	92	14
Vir-ELISA	73	81
Immunozytm	83	49
FSME-ELISA	99	46
Enzygnost	84	78
Anti-FSME ELISA	78	41

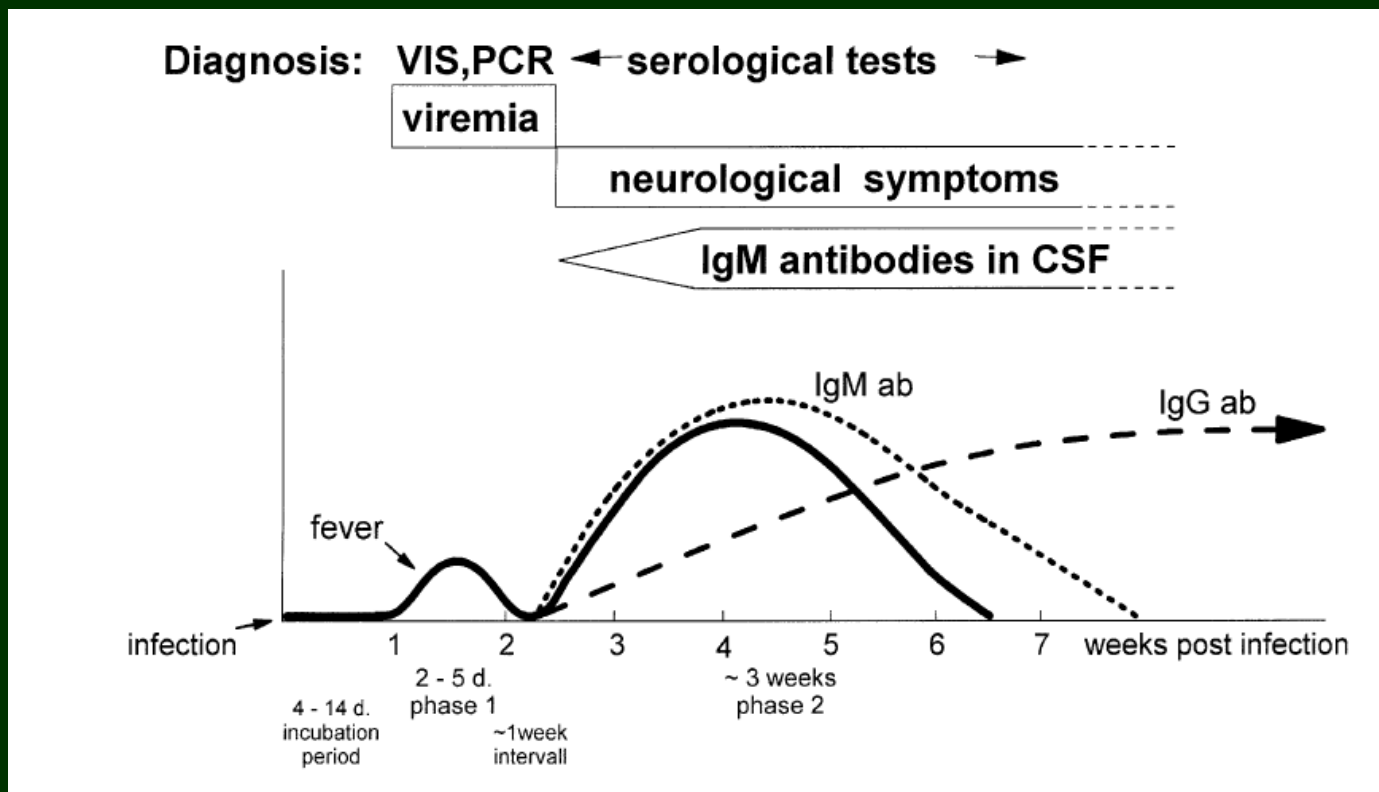
Positive results for the detection of TBEV-specific IgG antibodies, as determined with the different test systems^a

Test system	TBEV + (Inf) [n = 109]	TBEV + (vac) [n = 30]	YF+ [n = 24]	Dengue+ [n = 13]
Serion classic	100 (92%)	28 (93%)	19 (79%)	13 (100%)
Vir-ELISA	94 (86%)	8 (27%)	1 (4%)	6 (46%)
Immunozytm	94 (86%)	21 (70%)	10 (42%)	9 (69%)
FSME-ELISA	107 (98%)	30 (100%)	7 (29%)	13 (100%)
Enzygnost	88 (81%)	29 (97%)	1 (4%)	7 (54%)
Anti-FSME ELISA	86 (79%)	23 (77%)	16 (67%)	6 (46%)

^a TBE+: sera positive for anti-TBE IgG antibodies after TBE infection (inf) or vaccination (vac); YF+: sera positive for anti-ellow fever-virus antibodies after vaccination; Dengue+: sera positive for anti-Dengue antibodies after Dengue infection; total number of tested sera; (), percentage of positive results for TBEV-specific IgG antibodies

Virological interpretations of serological test results in case of a clinically suspected TBE


Serological test result	Interpretation
Specific IgM- and IgG-positive	Proven TBE virus infection, provided that long-persisting IgM-antibodies due to a 1st or 2nd vaccination within the previous months can be excluded
Specific IgM- and IgG-negative	Testing of a control sample necessary
Specific IgM-positive, IgG-negative	Suspected TBE, testing of a control sample necessary
Specific IgM-negative, IgG-positive	Immunity/successful vaccination; Exceptions: passive immunization, vaccination failure, cross-reactive antibodies



Subviral particle-based ELISA

- co-expression of recombinant prM/E protein of TBEV in mammalian cells
- release of subviral particles (SPs) into the culture medium
- using the SPs as antigen for development of TBE-specific ELISA
- SP-IgG and SP-IgM ELISA systems
- No cross-reactivity with antibodies against other flaviviruses

Komerčně dostupné kity pro detekci gram-negativních bakterií (společnost Abnova)



[Products](#)
[Services](#)
[Support](#)
[Connection](#)
[About Us](#)

[Advanced](#)

[Login](#)
[My Account](#)
[Interest product](#)
[Order Status](#)
[Cart](#)

Product Browser

- DNA & RNA >
- siRNA/Chimera >
- Proteins/Peptides >
- MaxPab® Ab >
- Monoclonal Ab >
- Polyclonal Ab >
- Conjugate Ab >
- Secondary/Tag Ab >
- Beads/Dyes >
- Lysates/Slides >
- Ab Pairs/Kits >
- Ab & Tissue Arrays >
- IHC/Pathology Ab >
- In Situ Hybridization >
- Circulating Rare Cell >
- Systems >
- GMP/ASR/IVD >

Last updated: 2015/9/20

[Home](#) > [Products](#) > [All Product Showcase](#)

Gram (-) Bacteria ELISA Kits : we have 35 products

List alphabetically by product name : **B - T**

[B](#)
[C](#)
[M](#)
[S](#)
[T](#)

Result: 1 - 20 Pages: 1 2

Catalog #	Product Name, Description and Alias	Application (key)
KA2091	<p>Bordetella pertussis IgA/IgM ELISA Kit ** <i>Bordetella pertussis</i> IgA/IgM ELISA Kit is an enzyme linked immunosorbent assay for the detection of specific IgA and/or IgM antibodies to <i>Bordetella pertussis</i> in human serum.</p>	• Quant
KA2090	<p>Bordetella pertussis IgG ELISA Kit ** <i>Bordetella pertussis</i> IgG ELISA Kit is an enzyme linked immunosorbent assay for the semi-quantitative determination of specific IgG antibodies to <i>Bordetella pertussis</i> in human serum.</p>	• Quant
KA1282	<p>Borrelia burgdorferi IgG ELISA Kit ** <i>Borrelia burgdorferi</i> IgG Ab ELISA Kit has been designed for the detection and the quantitative determination of specific IgG antibodies against <i>Borrelia burgdorferi</i> in serum and plasma.</p>	• Quant
KA2081	<p>Chlamydia pneumoniae IgA ELISA Kit ** <i>Chlamydia pneumoniae</i> IgA ELISA Kit is an enzyme linked immunosorbent assay for the detection of IgA antibodies specific to <i>Chlamydia pneumoniae</i> in human serum.</p>	• Quant
KA1466	<p>Borrelia IgG ELISA Kit ** <i>Borrelia</i> IgG ELISA Kit is a solid phase enzyme immunoassay for the quantitative measurement of IgG class autoantibodies against <i>Borrelia</i>.</p>	• Quant

Product Compare

Click this icon to add products to compare list. Select up to 10 products.

Quick Order (Tutorial)

Input Catalog #, place order here!

Komerčně dostupné kity pro detekci filovirů

Virus	ELISA Kit Description	Species	IgG Specific Cat#	IgM Specific Cat#
Zaire Ebola	Zaire-Ebola Virus Nucleoprotein (EBOV NP) antibody ELISA Kits**	Mouse	AE-320500-1	AE-320510-1
		Human	AE-320520-1	AE-320530-1
		Monkey/Chimp	AE-320550-1	AE-320560-1
	Zaire-Ebola Virus Glycoprotein (EBOV GP) antibody ELISA Kits**	Mouse	AE-320600-1	AE-320610-1
		Human	AE-320620-1	AE-320630-1
		Monkey/Chimp	AE-320650-1	AE-320660-1
		Dog	AE-320670-1	
	New Pig	AE-320680		
	Zaire-Ebola Virus Glycoprotein (EBOV VP40) antibody ELISA Kit**	Mouse	AE-320700-1	AE-320710-1
		Human	AE-320720-1	AE-320730-1
Monkey/Chimp		AE-320750-1	AE-320760-1	
	Zaire-Ebola Virus Antigen ELISA kit, Qualitative (detects viral antigens in human or animal samples)		AE-320800-48 (48 tests) AE-320800-96 (96 tests)	
Sudan Ebola	Sudan-Ebola Virus Glycoprotein (EBOV GP) antibody ELISA Kit**	Mouse	AE-321600-1	AE-321610-1
		Human	AE-321620-1	AE-321630-1
		Monkey/Chimp	AE-321650-1	AE-321660-1
New Reston	Reston virus Glycoprotein (REBOV GP) antibody ELISA **	Human	AE-323620-1	
		Monkey	AE-323630-1	
		Pig	AE-323640-1	
		G. Pig	AE-323650-1	
New Ebola Combo	Zaire+Sudan+Reston+Bundibugyo+Tai Forest Glycoproteins antibody Combo ELISA Kits** (5 proteins coated as a mix)**	Human	AE-325600-XH	
		Monkey	AE-325600-XM	
Marburg	Marburg Virus Glycoprotein (MARV GP) antibody ELISA Kit**	Mouse	AE-322600-1	AE-322610-1
		Human	AE-322620-1	AE-322630-1
		Monkey/Chimp	AE-322650-1	AE-322660-1

Komerčně dostupné kity pro detekci různých mikroorganismů

ThermoFisher SCIENTIFIC		Q	Order Support	Sign In
<ul style="list-style-type: none"> Product Line LSIVet™ (34) 	<ul style="list-style-type: none"> LSIVet™ Avian IBD Serum ELISA Kit 	VETIBD5I	5 x 96 well plates	
	<ul style="list-style-type: none"> LSIVet™ Avian IBV Serum ELISA Kit 	VETIBV5I	5 x 96 well plates	
<ul style="list-style-type: none"> Species All Sensitive Animals (5) Cattle/Bovine (17) Goat/Caprine (16) Poultry (3) Sheep/Ovine (16) Swine/Porcine (9) Turkey (3) 	<ul style="list-style-type: none"> LSIVet™ Avian NDV Serum ELISA Kit 	VETNDV5I	5 x 96 well plates	
	<ul style="list-style-type: none"> LSIVet™ BVD/BD Antigen Skin LeucoC Organs ELISA Kit 	VETBVDAG1	1 x 96 well plate	
	<ul style="list-style-type: none"> LSIVet™ BVD/BD Antigen Skin LeucoC Organs ELISA Kit 	VETBVDAG5	5 x 96 well plates	
	<ul style="list-style-type: none"> LSIVet™ Bovine IBR Screening Serum ELISA Kit 	IBRS10	10 x 96 well plates	
	<ul style="list-style-type: none"> LSIVet™ Bovine IBR Screening Serum ELISA Kit 	IBRS5	5 x 96 well plates	
<ul style="list-style-type: none"> Target Organism A. pleuropneumoniae (1) Bluetongue Virus (BTV) (1) Border Disease Virus (BDV) (5) Bovine Coronavirus (BCV) (1) Bovine Herpesvirus 1 (BHV-1) (2) Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) (5) C. burnetii (2) + More 	<ul style="list-style-type: none"> LSIVet™ Bovine Neosporosis Advanced Serum ELISA Kit 	LSINEOA2	2 x 96 well plates	
	<ul style="list-style-type: none"> LSIVet™ Bovine Neosporosis Advanced Serum ELISA Kit 	LSINEOA5	5 x 96 well plates	
	<ul style="list-style-type: none"> LSIVet™ Bovine PI3 Serum ELISA Kit 	SPIV2	1 x 96 well plate	
	<ul style="list-style-type: none"> LSIVet™ Porcine A. pleuropneumoniae Serum ELISA Kit 	VETAPP5I	5 x 96 well plates	
	<ul style="list-style-type: none"> LSIVet™ Porcine Aujeszky gB Serum ELISA Kit 	PRVGB2I	2 x 96 well plates	
	<ul style="list-style-type: none"> LSIVet™ Porcine Aujeszky gB Serum ELISA Kit 	PRVGB5I	5 x 96 well plates	
	<ul style="list-style-type: none"> LSIVet™ Porcine Aujeszky gE Serum ELISA Kit 	PRVGE2C	2 x 96 well plates	
<ul style="list-style-type: none"> Validated Application ELISA (34) 	<ul style="list-style-type: none"> LSIVet™ Porcine Aujeszky gE Serum ELISA Kit 	PRVGE2I	2 x 96 well plates	
	<ul style="list-style-type: none"> LSIVet™ Porcine Aujeszky gE Serum ELISA Kit 	PRVGE5C	5 x 96 well plates	
	<ul style="list-style-type: none"> LSIVet™ Porcine Aujeszky gE Serum ELISA Kit 	PRVGE5I	5 x 96 well plates	
	<ul style="list-style-type: none"> LSIVet™ Porcine PRRS/EU Confirmation Serum ELISA Kit 	PRRSBI5	240 tests	
	<ul style="list-style-type: none"> LSIVet™ Porcine PRRS/EU Serum ELISA Kit 	VETPRE5I	5 x 96 well plates	

Kompetitivní ELISA systémy

Kompetitivní ELISA

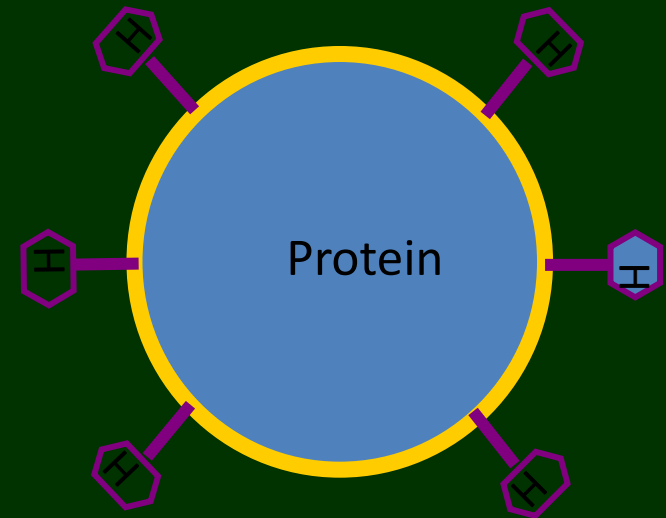
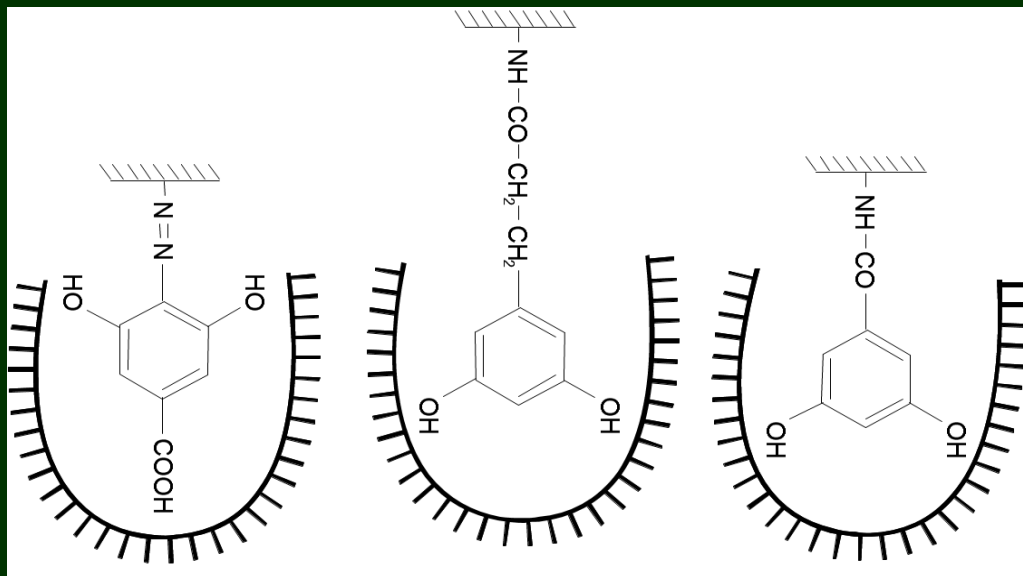
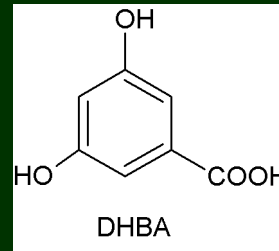
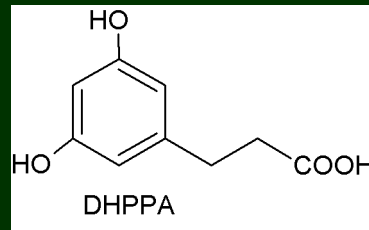
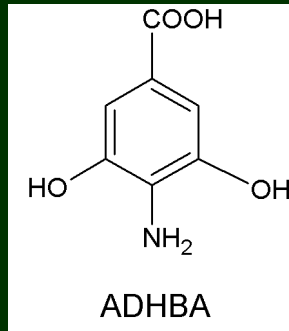
Přímá kompetitivní ELISA (hapten-
proteinový konjugát = tracer)

Nepřímá kompetitivní ELISA (značená
protilátka nebo tracer)

Vhodná pro analýzu malých molekul (haptenu)

Alkylresorcinoly: biomarkery příjmu celozrnné stravy

Kompetice stanovované organické molekuly s tracerem o aktivní místo protilátky



Conjugation yield (hapten density)
= number of haptens in protein molecule
(moles/mol)

Figure 1: Scheme of conjugation reactions using MBS heterobifunctional reagent.

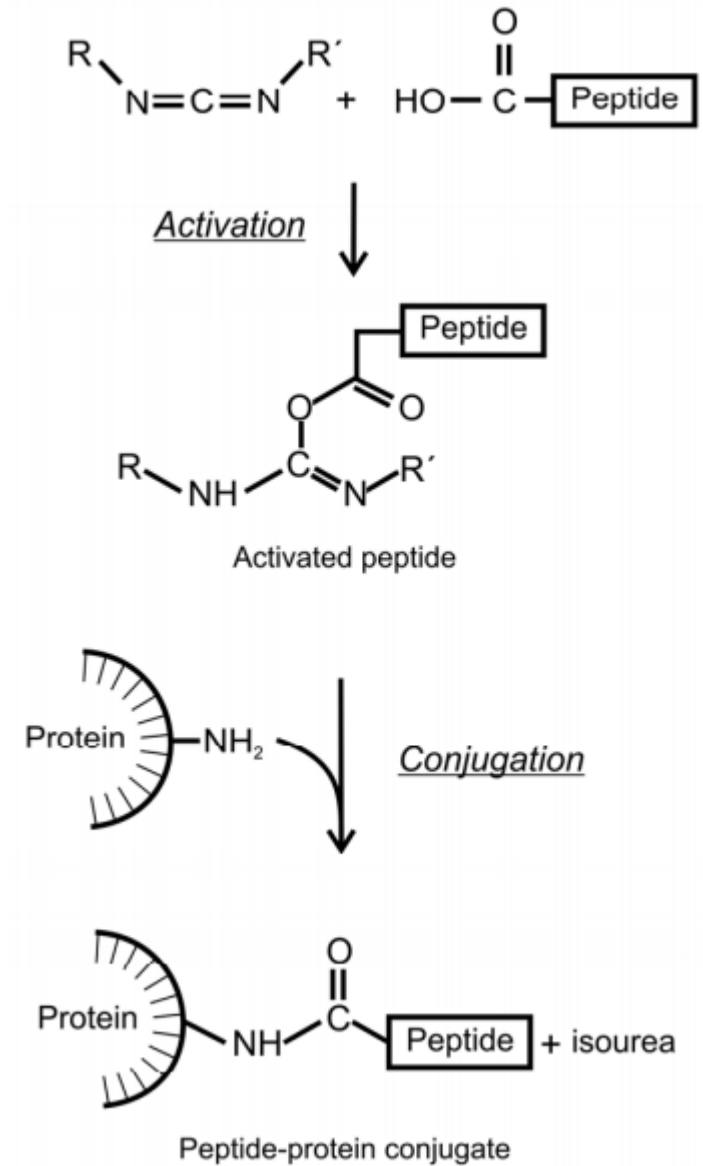
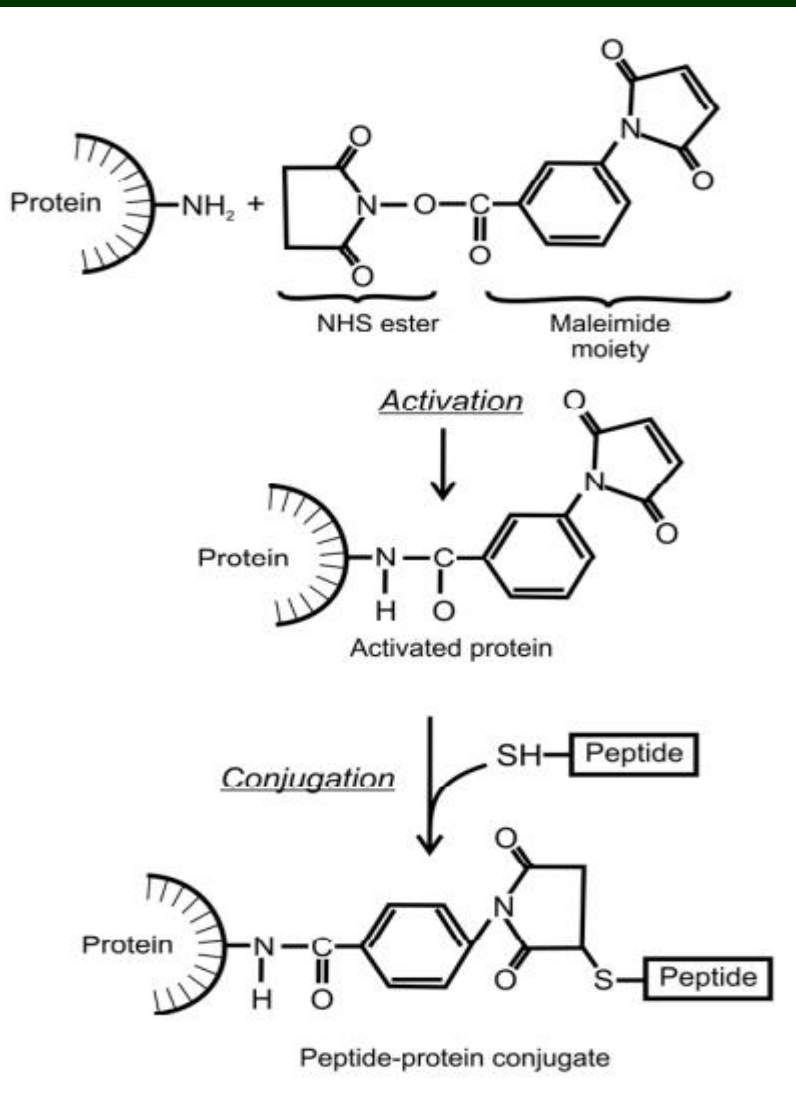
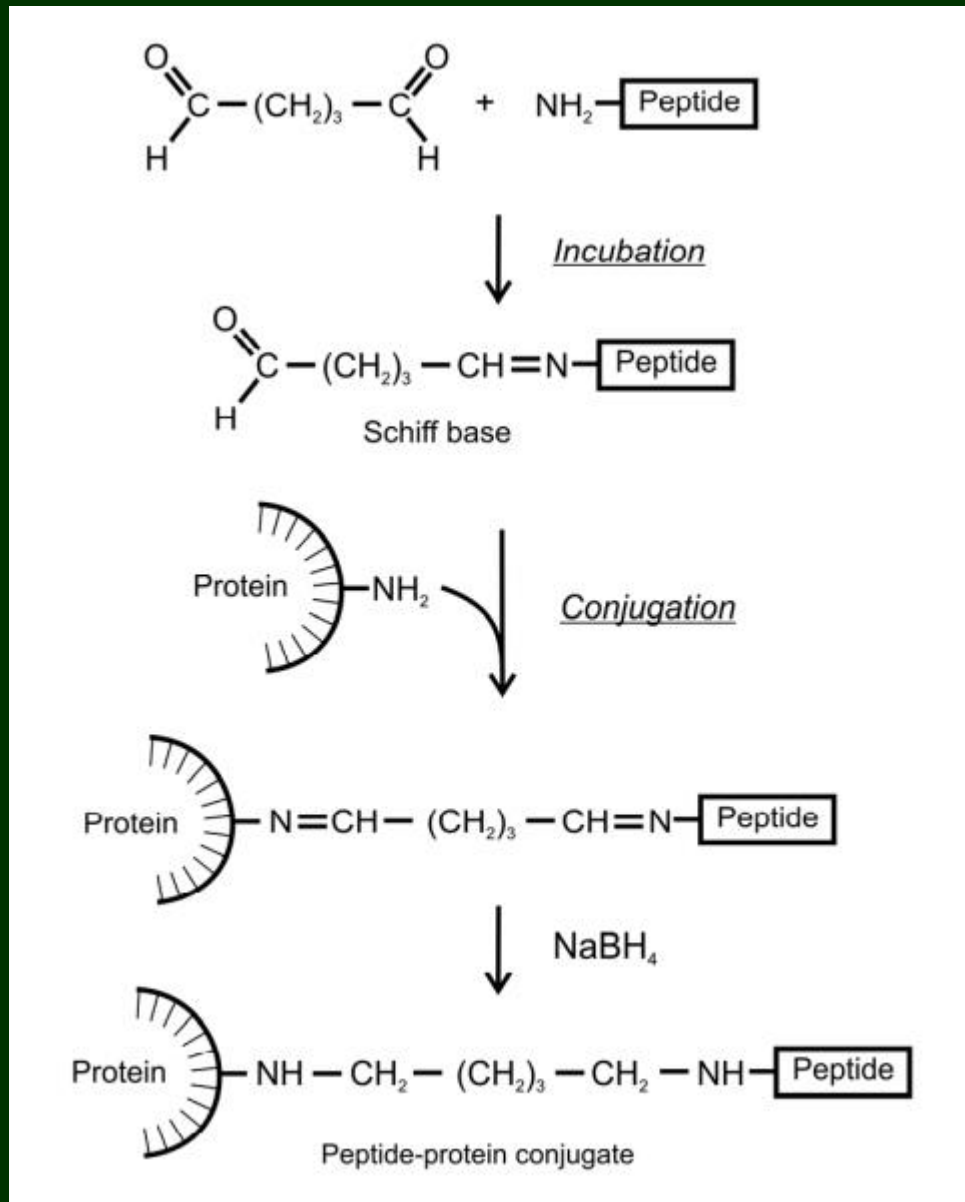
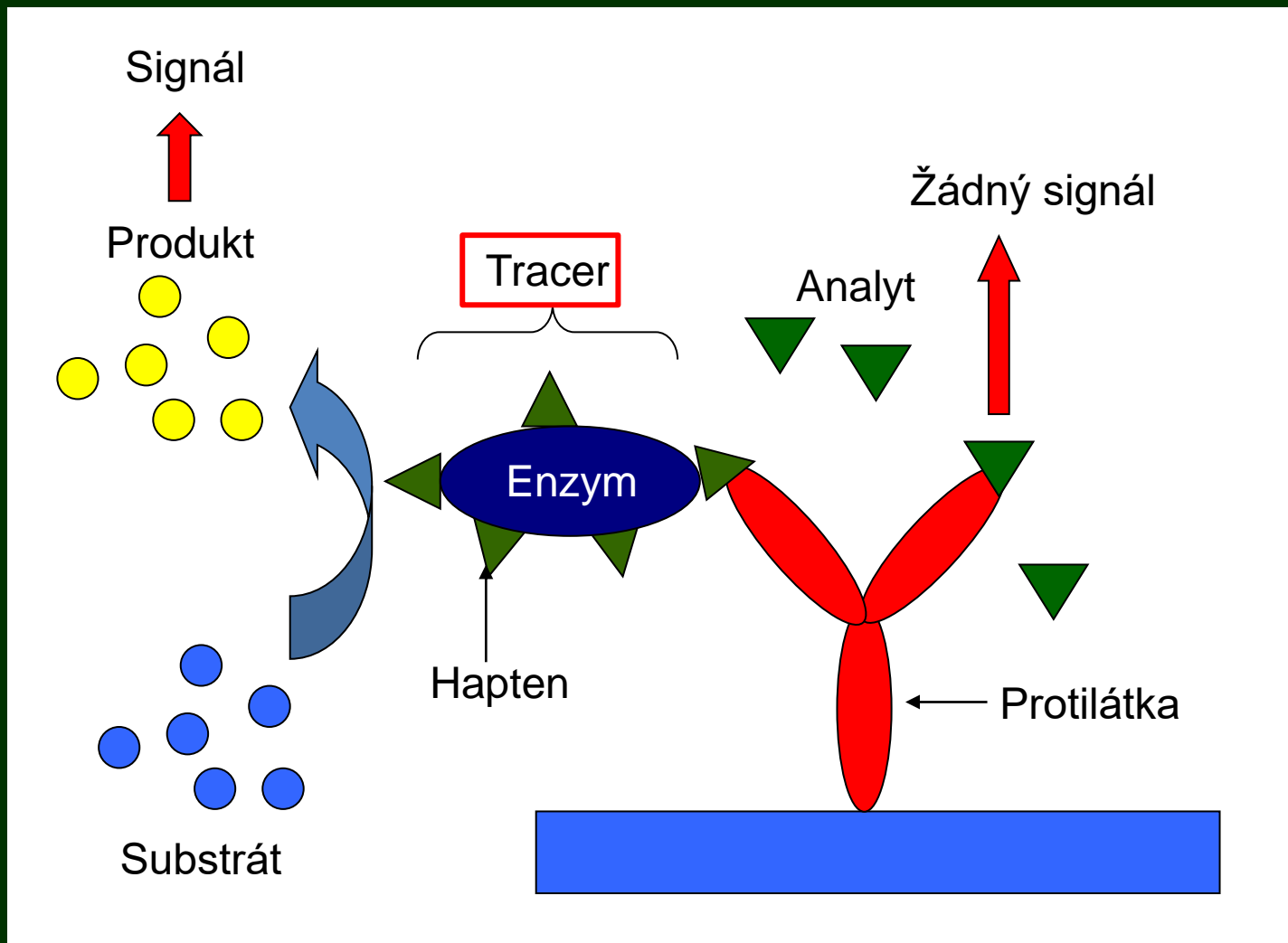


Figure 3: Scheme of conjugation reactions using glutaraldehyde.

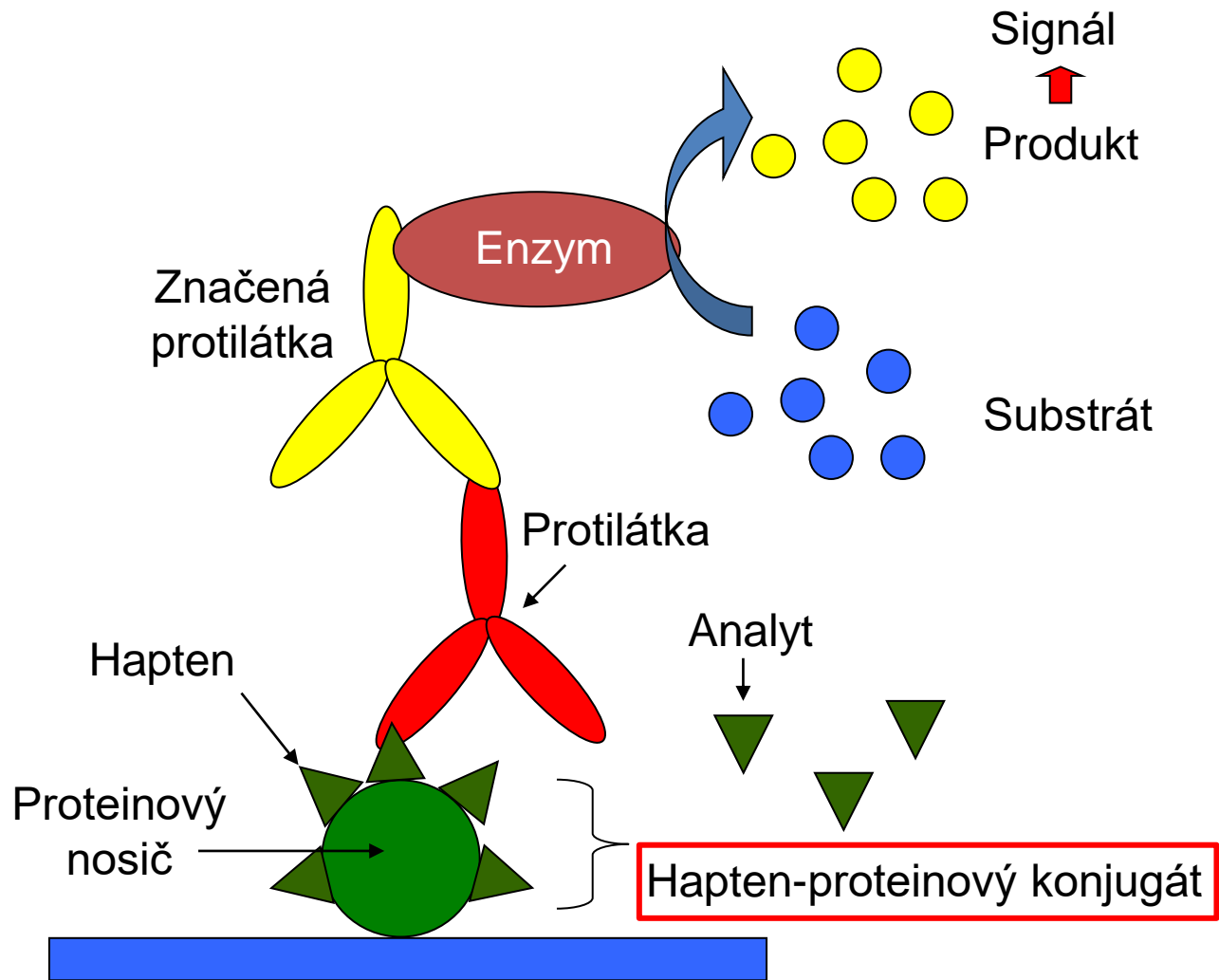


Eyer, Fránek, 2012

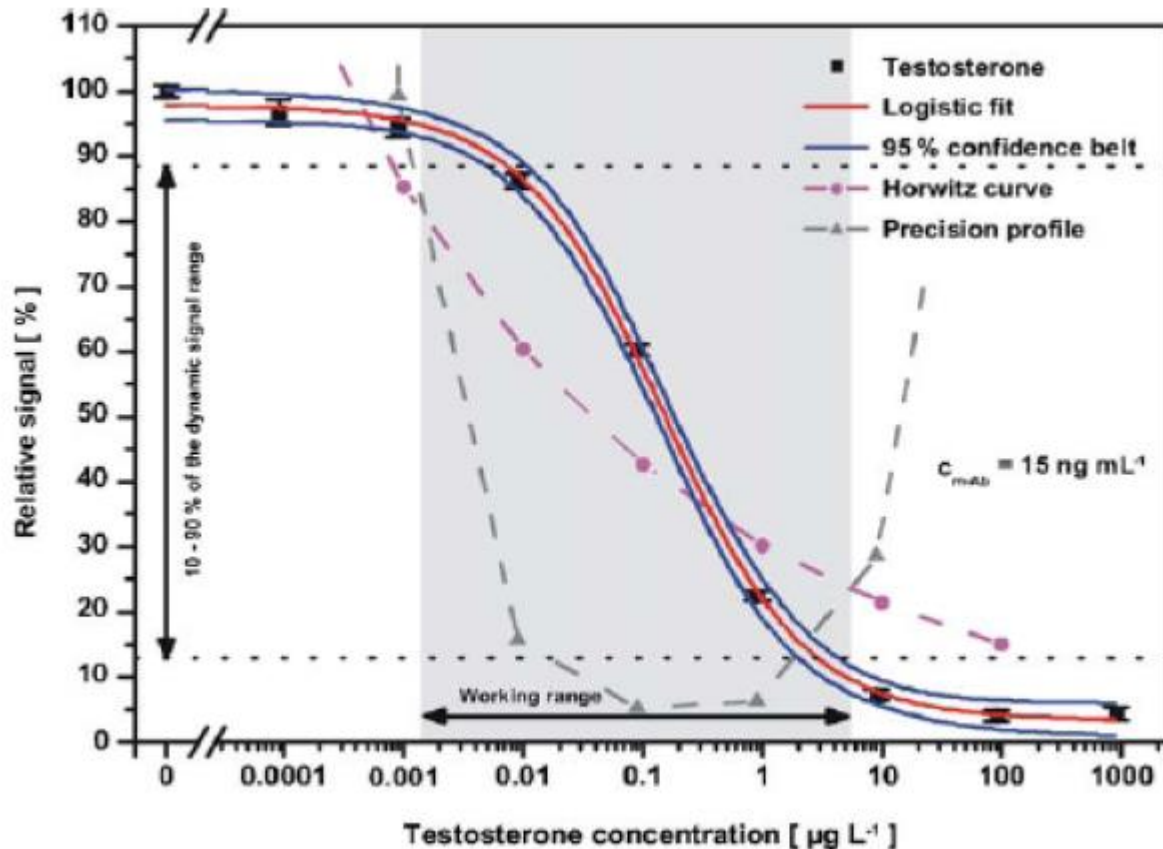
Přímá kompetitivní ELISA



Nepřímá kompetitivní ELISA



Standardní křivka pro kompetitivní ELISA



Signál je nepřímo úměrný koncentraci analytu

Vytěsnění značky analytem

Charakteristiky kompetitivní ELISA

Omezený počet vazebných míst pro antigen

Detekce malých molekul (haptenu)

Křížová reaktivita se strukturně příbuznými analyty

Nižší citlivost ve srovnání s nekompetitivní

ELISA techniky vyvinuté na odd. Analytická biotechnologie, VÚVeL, Brno

polychlorované bifenyly

2,4-dichlorooctová kyselina (herbicide 2,4-D)

s-triazinové herbicidy

sulfonamidy

4-nonylfenol a oktylfenol

alkylresorcinoly a jejich metabolity

nitrofuránová antibiotika

akrylamid

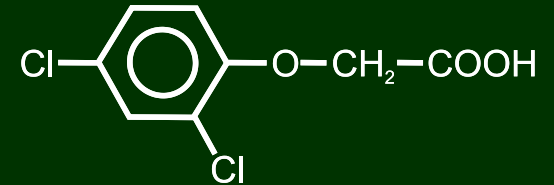
neopterin, nitrotyrosin

rostlinné hormony

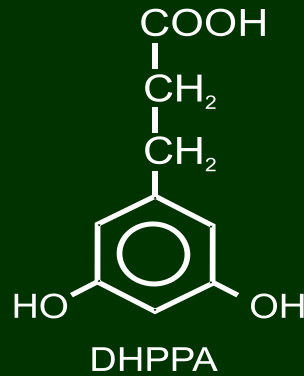
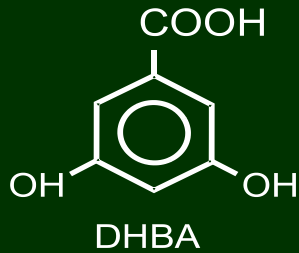
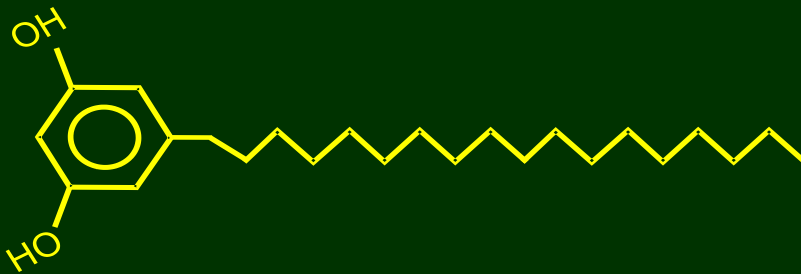
Nonylfenol



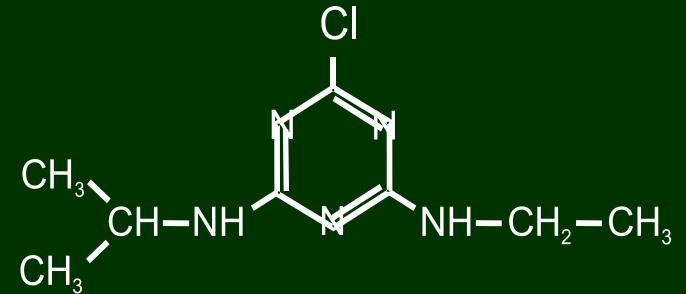
Herbicid 2,4-D



Alkylresorcinol a jeho metabolity



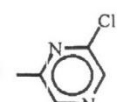

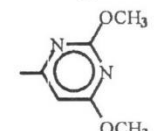
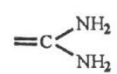
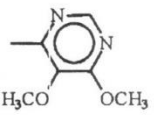
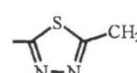
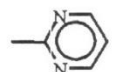

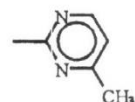
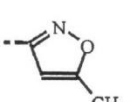
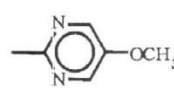
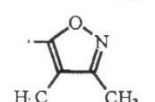
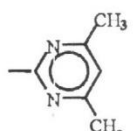

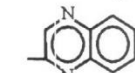
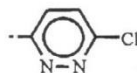
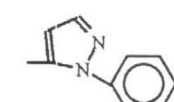
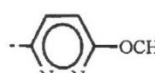
s-triazinové herbicidy



Neopterin, nitrotyrozin

Sulfonamidy



Drug	R-group	Abbreviation			
Sulfanilamide	- H	SAN	Sulfachloropyrazine		SCR
Sulfacetamide		SAM	Sulfadimethoxine		SDM
Sulfaquandine		SG	Sulfadoxine		SD
Sulfamethizol		SEZ	Sulfadiazine		SDZ
Sulfathiazol		STZ	Sulfamerazine		SMR
Sulfamethoxazole		SMX	Sulfamethoxydiazine		SMDZ
Sulfisoxazole		SIX	Sulfamethazine		SMZ
Sulfapyridine		SP	Sulfaquinoxaline		SQ
Sulfachloropyridazine		SCP	Sulfaphenazole		SPZ
Sulfamethoxy-pyridazine		SMP			

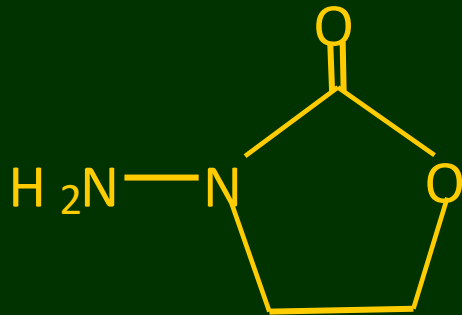
ELISA kit pro multianalýzu sulfonamidů

R-Biopharm AG Darmstadt, Německo

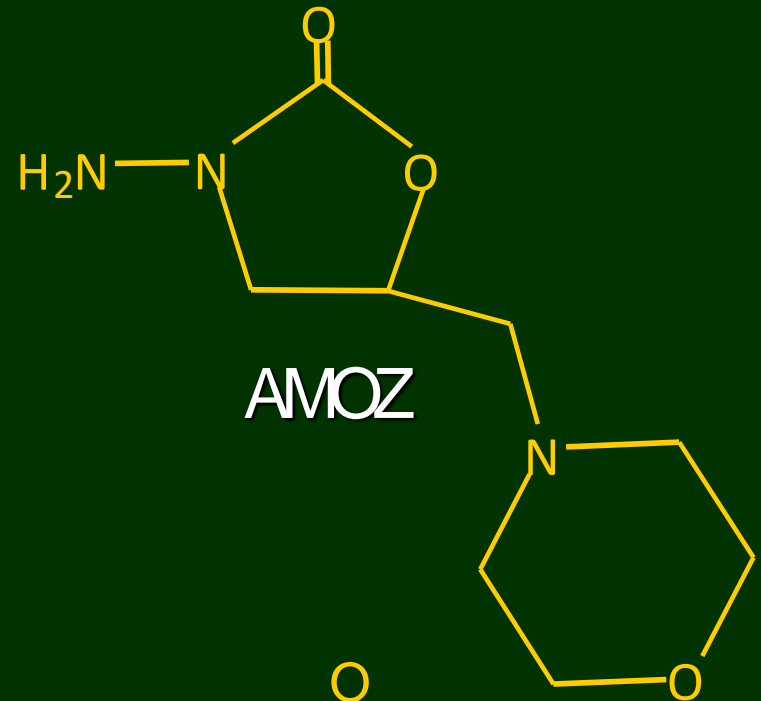


foto: M. Fránek

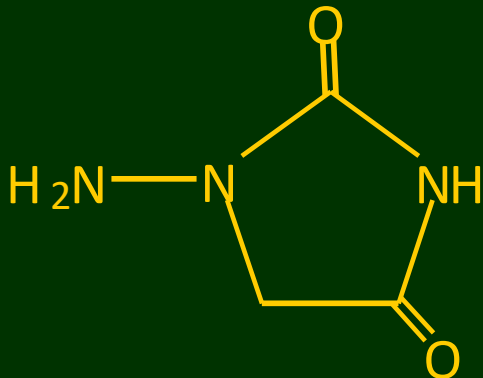
Nitrofuranové metabolity



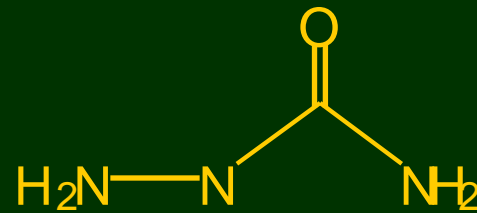
AOZ



AMOZ



AHD



SEM

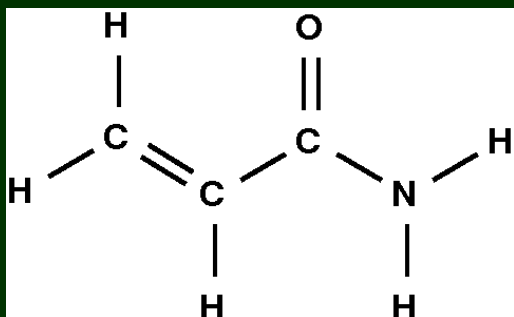
ELISA kit pro detekci A0Z a AMOZ

R-Biopharm AG Darmstadt, Německo

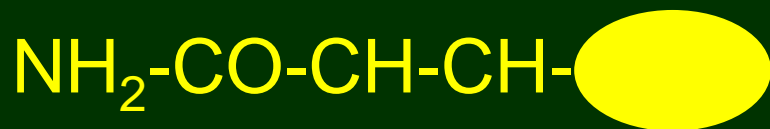


foto: M. Fránek

Akrylamid



M.W. = 70 g/mol

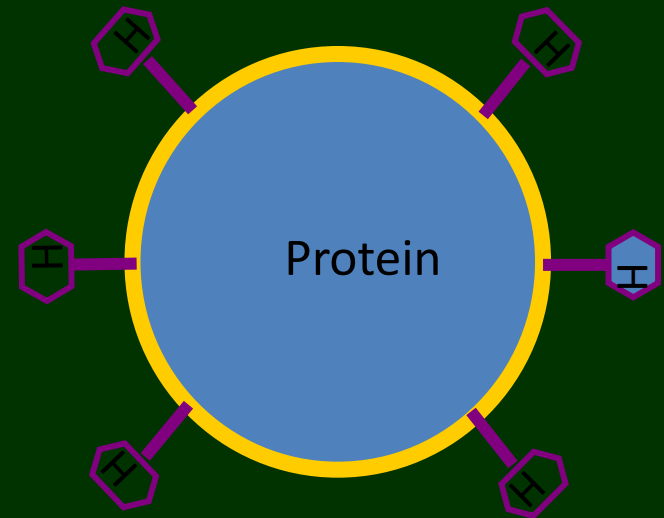
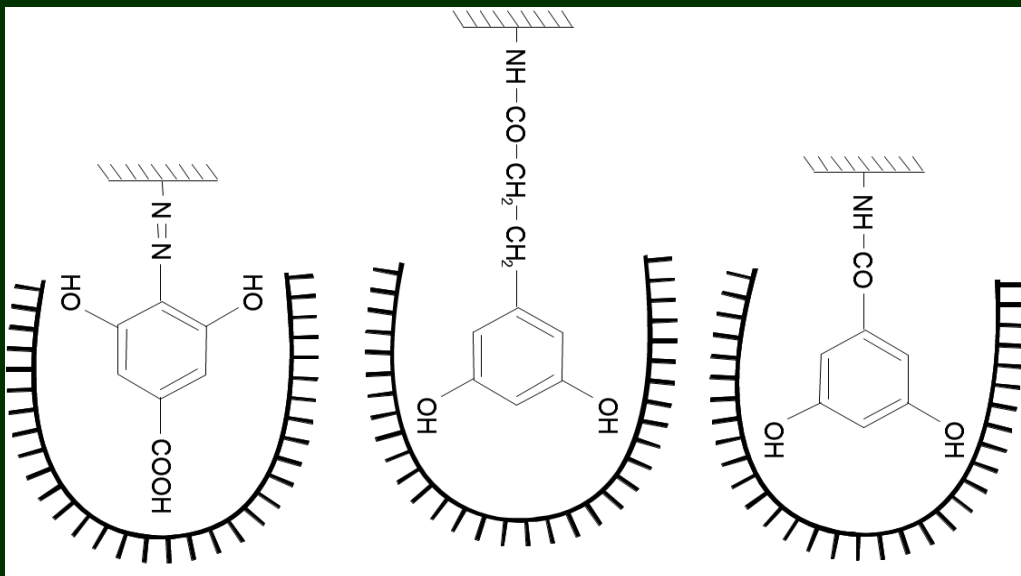
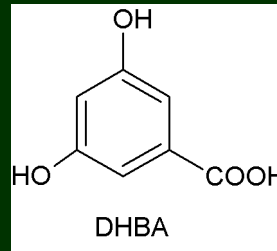
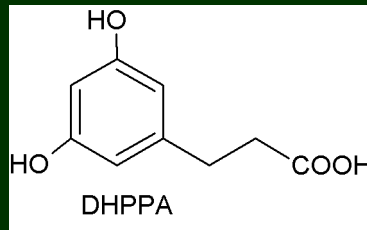
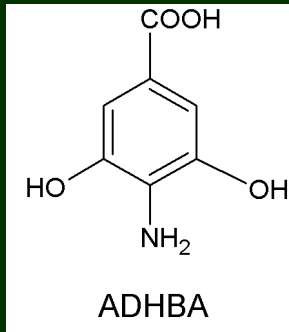


derivatizace –
zvětšení molekuly



foto: M. Fránek

Alkylresorcinoly: biomarkery příjmu celozrnné stravy



Conjugation yield (hapten density)
= number of haptens in protein molecule
(moles/mol)

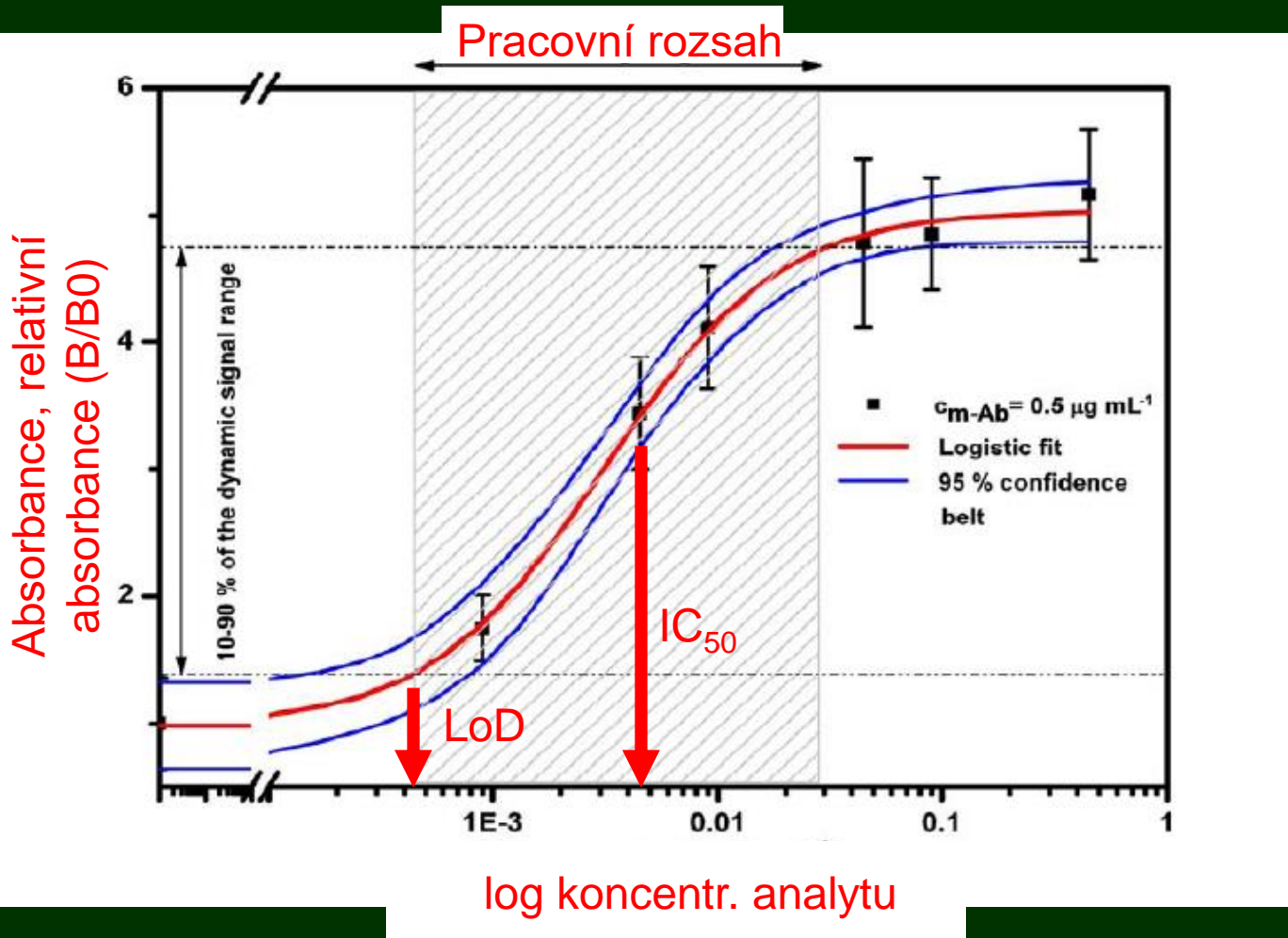
Limit detekce $\bar{x}_{(0)}+3SD$

Limit kvantifikace $\bar{x}_{(0)}+10SD$

Intenzita signálu

Hodnota IC_{50}

Pracovní rozmezí



Imunoenzymové metody

Výhody

snadné a rychlé provedení

mnoho možných forem uspořádání

netřeba speciálně vybavené laboratoře

k dispozici vysoký počet komerčně dostupných kitů

Nevýhody

nižší citlivost než RIA nebo FIA (10^{-9} – 10^{-10} mol/l)

Radioizotopové imunoanalytické metody

radioaktivně značená protilátka nebo analyt (tracer)

Radioizotopy

Radioizotop	Poločas rozpadu	Emitované částice
→ ^3H	12,3 let	β
^{14}C	5,73 let	β
^{57}Co	270 dní	λ
^{75}Se	120,4 dní	λ
^{123}I	14,3 dní	β
→ ^{125}I	60,2 dní	λ
^{131}I	8,05 dní	β / λ

Tritium je beta zářič (β^-), při svém rozpadu produkuje elektron (e^-), antineutrino ($\bar{\nu}_e$) a vzniká ^3He .

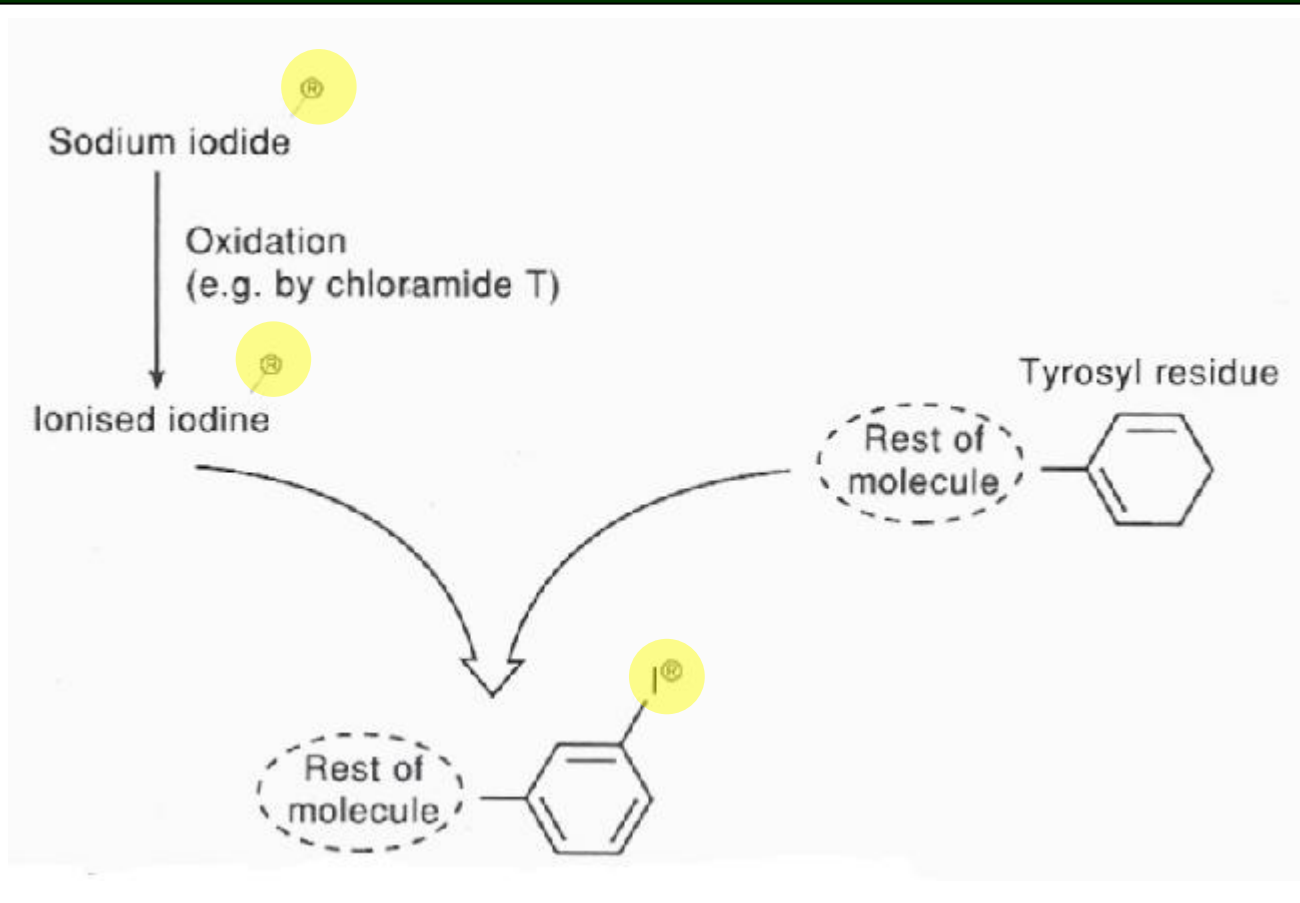
Příprava radioaktivně značených reagentů

Triciované reagenty

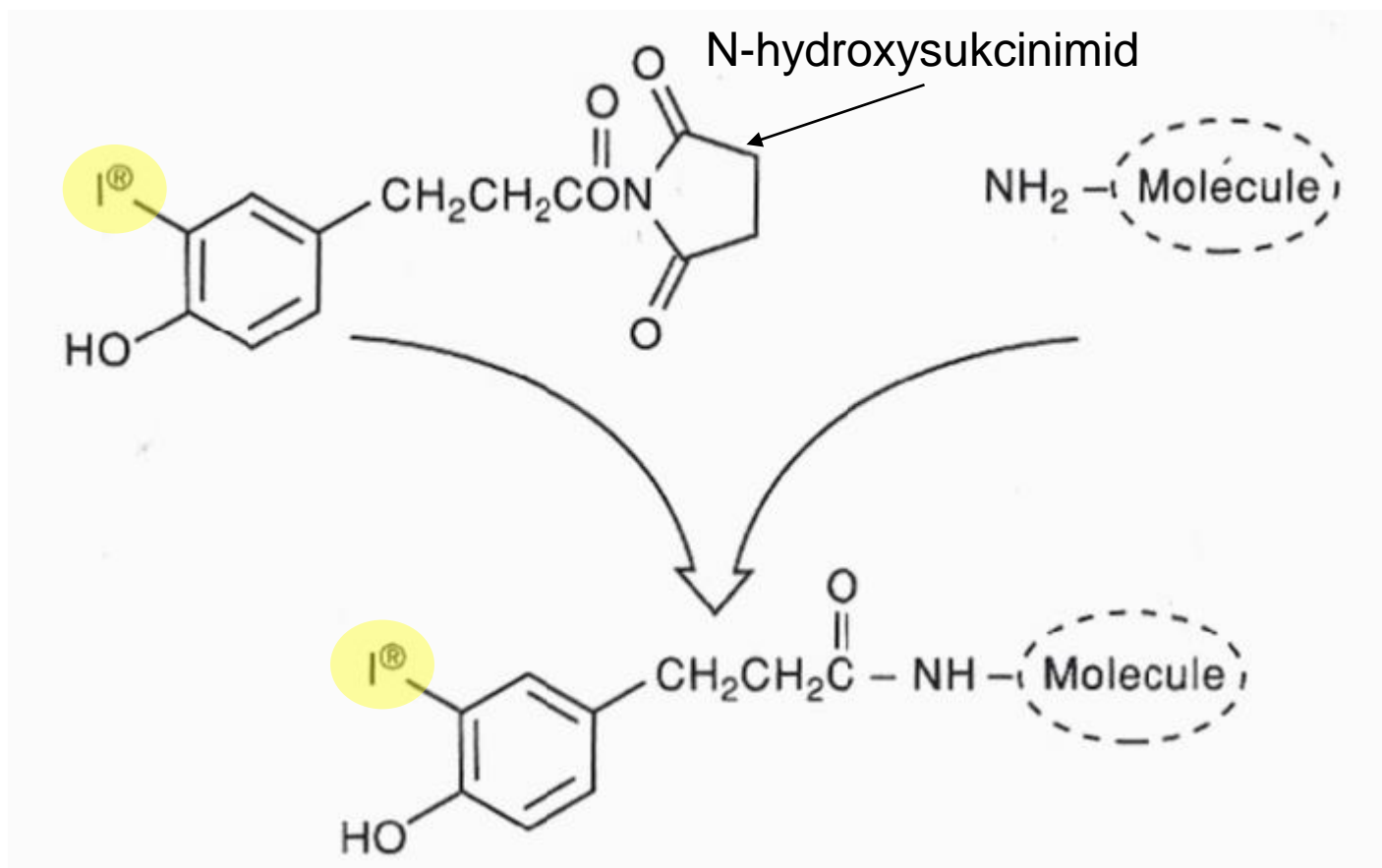
Radioiodinace

Konjugace s radioaktivně značenými molekulami

Radioiodination



Konjugace s radioaktivně značenými molekulami



Princip radioizotopových metod

Postup:

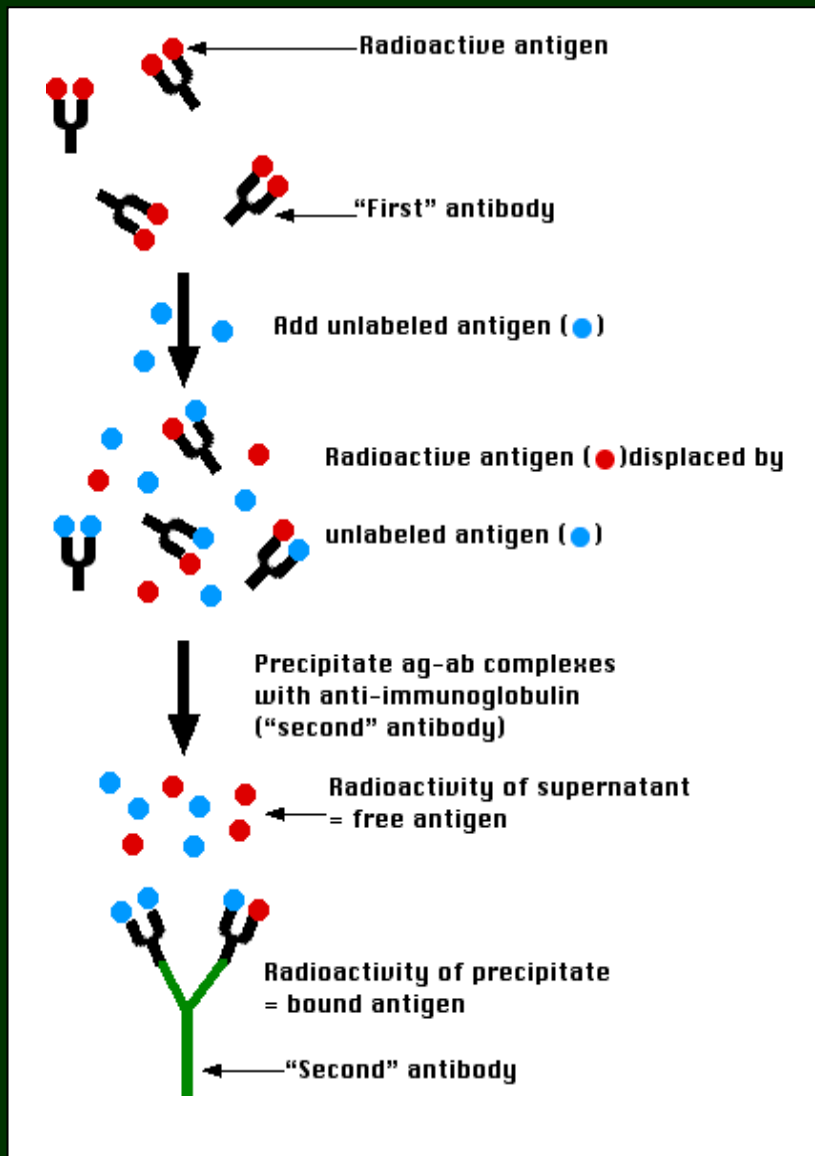
- $Ab + Ag + Ag^*$
- separace imunokomplexů
- měření radioaktivity

Separace imunokomplexů při RIA

- radioimunoanalýza na pevné fázi
- sekundární precipitační protilátky
- elektroforéza
- ionexová chromatografie
- precipitace přidáním solí

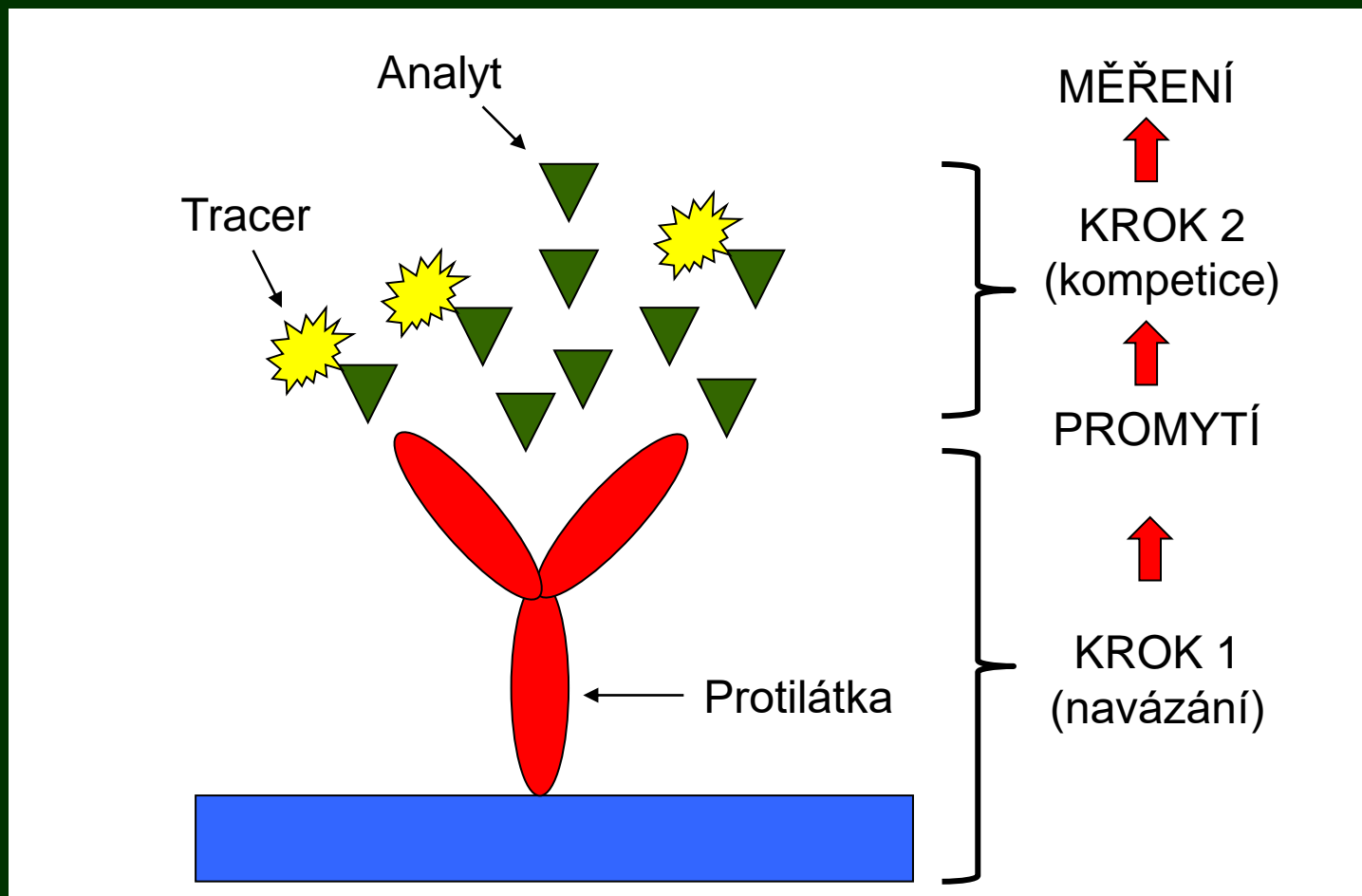
Typy:

- kompetitivní (RIA)
- nekompetitivní (IRMA)



Radioimunonalyza (RIA)

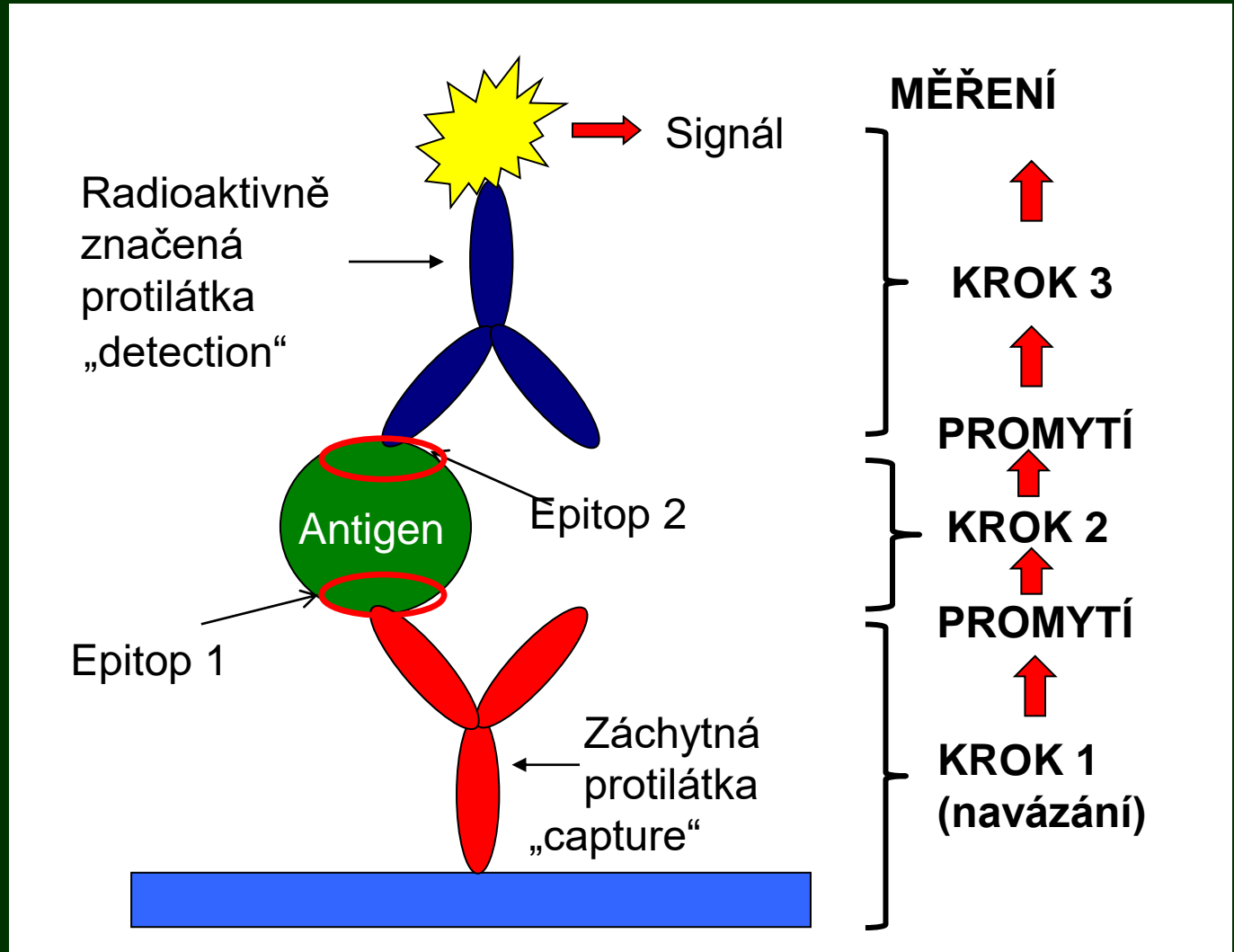
Kompetitivní radioimunoanalytická metoda



Limitní koncentrace traceru

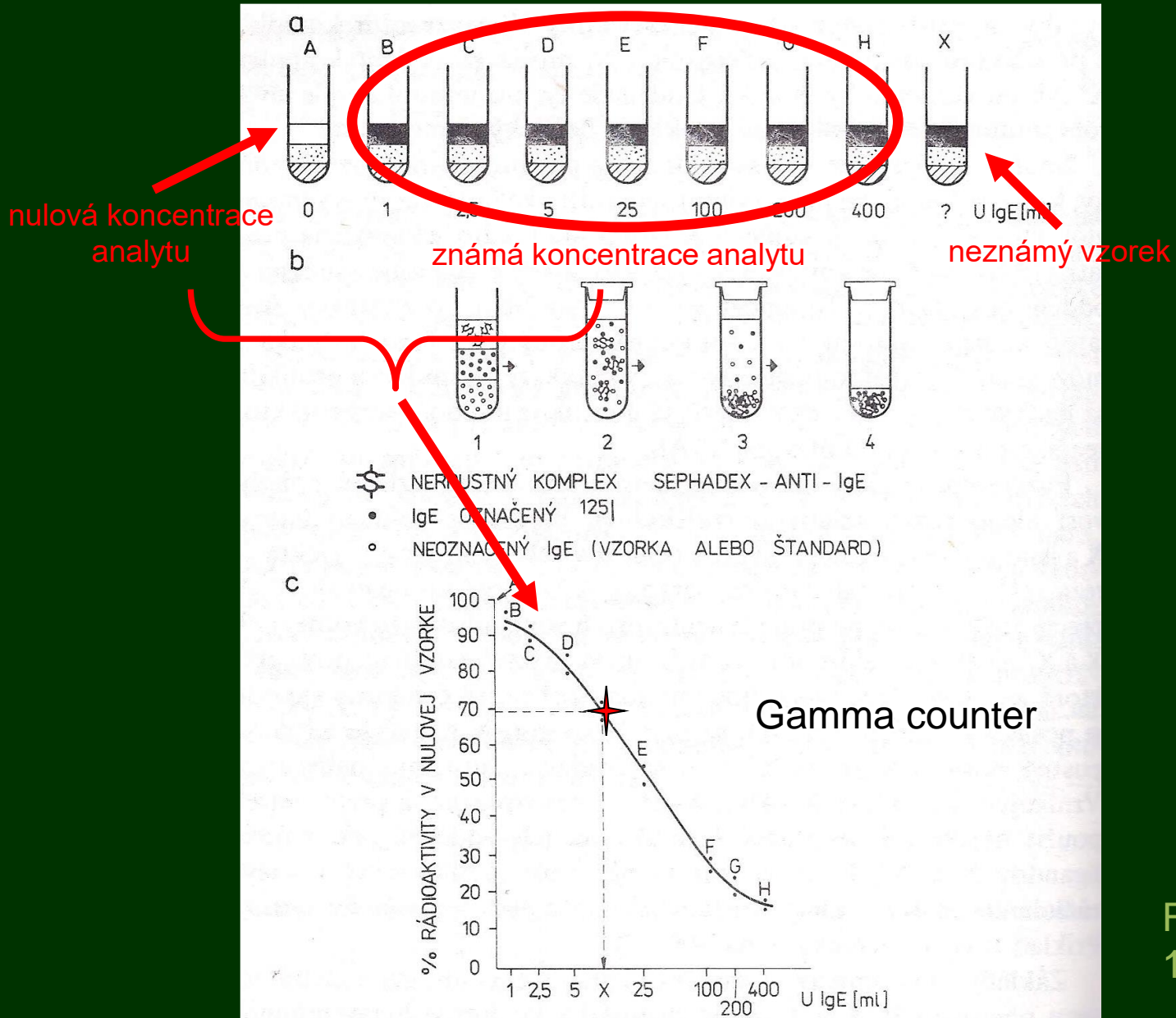
Immunoassay (IRMA)

Nekompetitivní radioimunoanalýza



Sandwich
upořádání

Provedení RIA na pevné fázi



Ferenčík,
1989

Citlivost radioizotopových imunoanalytických metod

RIA: předpokládaná citlivost: 10^{-14} mol/l

pozorovaná citlivost: 10^{-12} mol/l (pro ^{125}I)

10^{-10} mol/l (pro tritium)

IRMA: předpokládaná citlivost: 10^{-16} mol/l

pozorovaná citlivost: 10^{-14} mol/l (pro ^{125}I)

Radioimunoanalýza

Výhody

vysoká citlivost a specifita

Nevýhody

práce s radioaktivním materiálem

nutnost speciální legislativy pro práci s radioaktivním materiálem

Radio Immunoassay Kits

Please note: new products are continuously being added to these lists. If you do not find what you are looking for please feel free to [contact us \(contact.html\)](#).

** indicates kits are FDA exempt and can be used in clinical applications in the United States. 510(k) cleared indicates kits which are cleared by the FDA for clinical sale in the United States. All other kits are for non-clinical research use only.

Description	Methodology	Catalog Number
Acetylcholine Receptor Ab (individualkitspecs_ria/IB88400.html) 510(k) cleared	RIA	IB88400
Acetylcholine Receptor Blocking (individualkitspecs_ria/IB88401.html)	RIA	IB88401
Acetylcholine Receptor Modulating Ab (individualkitspecs_ria/IB88402.html)	RIA	IB88402
Adrenaline (Plasma) (individualkitspecs_ria/IB88553.html)	RIA	IB88553
Adrenaline (Plasma / Urine) (individualkitspecs_ria/IB88161.html)	RIA	IB88161
Adrenaline (Urine) (individualkitspecs_ria/IB88171.html)	RIA	IB88171
Adrenaline / Noradrenaline (2 Cat) (Plasma) (individualkitspecs_ria/IB88556.html)	RIA	IB88556
Adrenaline / Noradrenaline (2 Cat) (Plasma / Urine) (individualkitspecs_ria/IB88165.html)	RIA	IB88165
Adrenaline / Noradrenaline (2 Cat) (Urine) (individualkitspecs_ria/IB88175.html)	RIA	IB88175
Adrenaline / Noradrenaline / Dopamine (3 Cat) (Plasma) (individualkitspecs_ria/IB88557.html)	RIA	IB88557
Adrenaline / Noradrenaline / Dopamine (3 Cat) (Plasma / Urine) (individualkitspecs_ria/IB88186.html)	RIA	IB88186
Adrenaline / Noradrenaline / Dopamine (3 Cat) (Urine) (individualkitspecs_ria/IB88176.html)	RIA	IB88176
Angiotensin II (individualkitspecs_ria/IB8320.html)	RIA	RB 320
Atrial Natriuretic Peptide (ANP) (individualkitspecs_ria/BANI1.html)	RIA	BANI 1
C3a Des Arg (individualkitspecs_ria/RK-518.html)	RIA	RK-518
C4a Des Arg (individualkitspecs_ria/RK-519.html)	RIA	RK-519
cAMP (individualkitspecs_ria/IB78169.html)	RIA	IB78169
CBG (individualkitspecs_ria/IB79150.html)	RIA	IB79150
cGMP (individualkitspecs_ria/IB78173.html)	RIA	IB78173
Cholecystokinin (CCK) (individualkitspecs_ria/IB8302.html)	RIA	RB 302
Chromogranin A (individualkitspecs_ria/IB8321.html)	IRMA	RB 321
Chromogranin B (individualkitspecs_ria/IB8322US.html)	RIA	RB 322 US
Dopamine (Plasma) (individualkitspecs_ria/IB88555.html)	RIA	IB88555
Dopamine (Plasma / Urine) (individualkitspecs_ria/IB88163.html)	RIA	IB88163
Dopamine (Urine) (individualkitspecs_ria/IB88173.html)	RIA	IB88173
Endorphin Beta (individualkitspecs_ria/IB8301.html)	RIA	RB 301
Endothelin (individualkitspecs_ria/IB8304.html)	RIA	RB 304
Gastrin (individualkitspecs_ria/MD302.html)**	RIA	MD 302
Ghrelin (individualkitspecs_ria/R90.html)	RIA	R90
Glucagon (individualkitspecs_ria/IB8310.html)**	RIA	RB 310
IGF-1 (individualkitspecs_ria/IGF-R20.html)**	RIA	IGF-R20
IGF-1 (individualkitspecs_ria/IGF-R21.html)**	RIA	IGF-R21
IGF-1 CT (individualkitspecs_ria/IGF-R22.html)**	RIA-CT	IGF-R22
IGF-2 (individualkitspecs_ria/IB830.html)	RIA	R30
IGFBP-3 (individualkitspecs_ria/IGF-R10.html)	RIA	IGF-R10
IGFBP-3 (individualkitspecs_ria/IGF-R11.html)	RIA-CT	IGF-R11
Melatonin (Direct) (individualkitspecs_ria/IB88111.html)	RIA	IB88111
Melatonin (Research) (individualkitspecs_ria/IB88139.html)	RIA	IB88139
Metanephrine (Plasma) (individualkitspecs_ria/IB88521.html)	RIA	IB88521
Metanephrine (Urine) (individualkitspecs_ria/IB88523.html)	RIA	IB88523
Metanephrine / Normetanephrine (2-Met) (Plasma) (individualkitspecs_ria/IB88525.html)	RIA	IB88525
Metanephrine / Normetanephrine (2-Met) (Urine) (individualkitspecs_ria/IB88526.html)	RIA	IB88526
MSH-alpha (individualkitspecs_ria/IB8303.html)	RIA	RB303
Noradrenaline (Plasma) (individualkitspecs_ria/IB88554.html)	RIA	IB88554
Noradrenaline (Plasma / Urine) (individualkitspecs_ria/IB88162.html)	RIA	IB88162
Noradrenaline (Urine) (individualkitspecs_ria/IB88172.html)	RIA	IB88172
Normetanephrine (Plasma) (individualkitspecs_ria/IB88522.html)	RIA	IB88522
Normetanephrine (Urine) (individualkitspecs_ria/IB88524.html)	RIA	IB88524
Neuropeptide Y (individualkitspecs_ria/IB8317.html)	RIA	RB317
Osteocalcin (individualkitspecs_ria/IB79151.html)	IRMA	IB79151
Pancreatic Polypeptide (individualkitspecs_ria/IB8316.html)	RIA	RB 316
Serotonin (individualkitspecs_ria/IB88189.html)**	RIA	IB88189
Somatostatin (individualkitspecs_ria/IB8306.html)	RIA	RB 306
Vasopressin (individualkitspecs_ria/IB8319.html)	RIA	RB 319
VIP (individualkitspecs_ria/IB8311.html)	RIA	RB 311
Vitamin D-3 (individualkitspecs_ria/IB79149.html)	RIA	IB79149

RIA kity



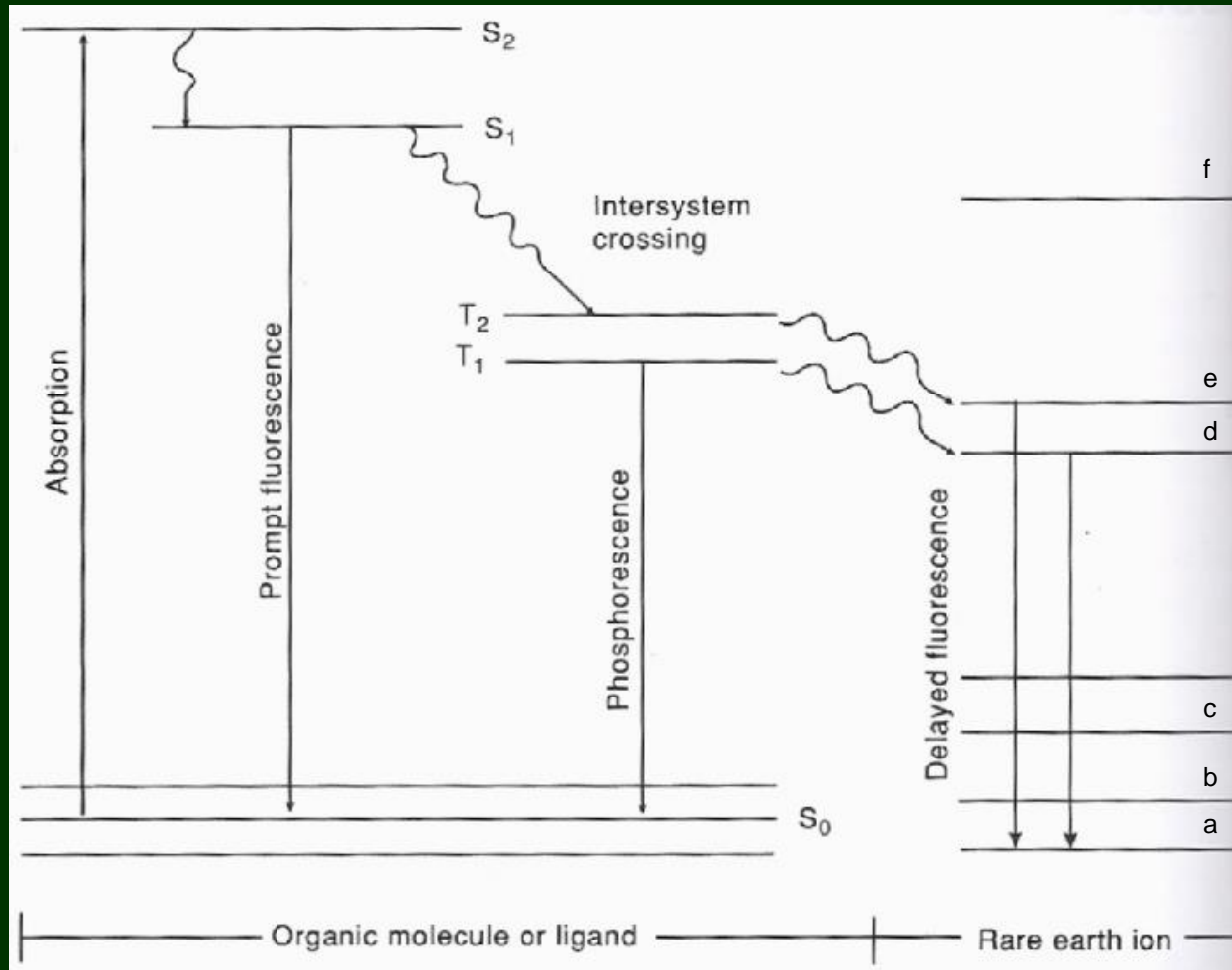
Kity pro stanovení hormonů (tyroxin)



Fluorescenční imunoanalýza (FIA)

protilátka nebo analyt značený fluorescenční sondou
(fluoroforem)

Teorie fluorescence



Stokesův posun: rozdíl mezi vlnovou délkou absorbovaného a emitovaného záření (obvykle 30-50 nm)

Fluorescenční sondy používané pro FIA

Probe	Excitation max. (nm)	Emission max. (nm)	Decay time (ns)	Quantum yield
Fluorescein	492	520	4.5	0.85
Rhodamine B-isothiocyanate	550	585	3.0	0.7
Lissamine-rhodamine B-sulphonyl chloride	530,565	595	1.0	–
Umbelliferones	380	450	–	–
Danasychloride	340	480–520	14.0	0.3
Anilino-naphthaline sulphonic acid (ANS)	385	471	16.0	0.8
Fluorescamine	394	475	7.0	0.1
2-methoxy 2,4-diphenyl-3(2H) furanone (MDPF)	390	480	–	0.1
N-(3-Pyrene)-maleimide (NPM)	340	375,392	100.0	–
Lucifer yellow	430	540	–	–
Porphyrins	400–410	619–633	–	–
Chlorophylls	430–453	648–669	–	–
Phycobiliprotein	550–620	580–660	–	0.5–0.98
Erythrosin	492	517	10 ⁸	0.01

Table 1 Properties of fluorescent probes used in FIA and IFMA.

Lanthanide ion	Ligand*	Excitation max. (nm)	Emission max. (nm)	Decay time (μs)	Relative fluorescence†
Sm ³⁺	b-NTA	340	600,643	65	1.5
Sm ³⁺	PTA	295	600,643	60	0.3
Eu ³⁺	b-NTA	340	613	714	100.0
Eu ³⁺	PTA	295	613	925	36.0
Tb ³⁺	FTA	295	490,543	96	8.0
Dy ³⁺	FTA	295	573	approx. 1	0.2
Nd ³⁺	BTA	800	1,060	1,350	–

*b-NTA, b-naphtoyltrifluoroacetone, PTA, pivaloyltrifluoroacetone, BTA, benzoyltrifluoroacetone

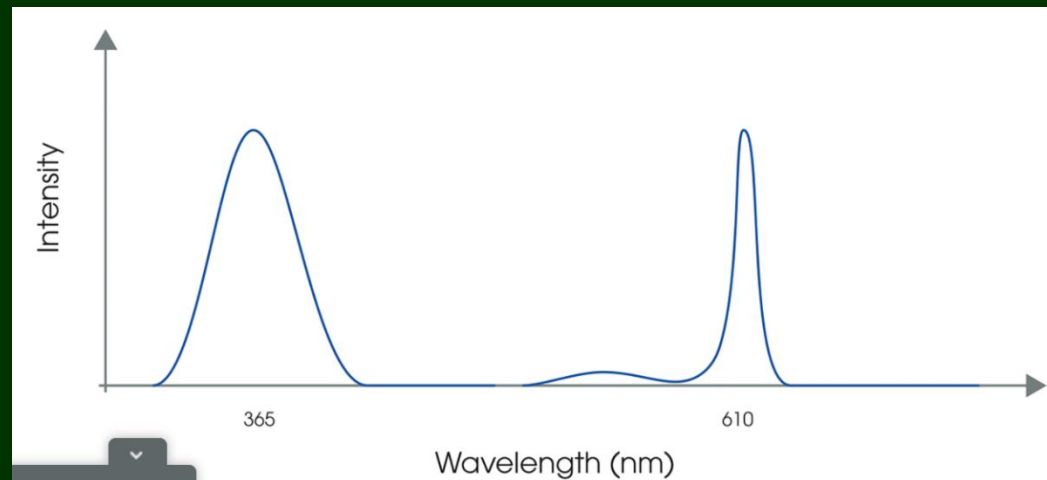
Time-resolved fluorescence

Time-resolved fluorescence (TRF) is very similar to standard fluorometric detection. The main difference between the two measurements is the timing of the excitation/emission process. During standard fluorometric detection, excitation and emission are simultaneous; the light emitted by the sample is measured while excitation is taking place. In contrast to this, TRF relies on the use of very specific fluorescent molecules, called **lanthanide chelate labels**, which allow detection of the emitted light to take place after excitation has occurred. The most commonly used lanthanide chelate label is the europium ion (Eu^{3+}).

Although conventional fluorophores are extremely popular, they share several limitations. Firstly, the simultaneous excitation/emission process can result in high background signal. Secondly, the Stokes shift (the difference between the maximum absorbance and emission wavelengths) of many commercially available fluorophores is relatively small, meaning that these reagents can suffer from self-quenching due to overlap between their absorption and emission spectra. Thirdly, biological matrices such as serum or tissue samples often contain autofluorescent substances; these can particularly be a source of background signal in homogeneous assays, where such components are not washed away before measurement. Finally, false positives can occur due to the fluorescent nature of certain chemical classes of test compounds.

Lanthanides offer several key advantages:

1. A large Stokes shift greatly increases the signal:background (S:B) ratio.
2. A sharp emission peak allows different lanthanides to be easily distinguished from one another and contributes to improved S:B.
3. High fluorescence intensity significantly improves assay sensitivity.
4. A long fluorescence lifetime ($\mu\text{seconds}$ – milliseconds), several orders of magnitude greater than any nonspecific background fluorescence (typically nanoseconds), and stable fluorescent signal enable the fluorescent emission to be read at a time well after any background fluorescence has decayed, delivering a greater dynamic range.



Time-resolved fluorescence

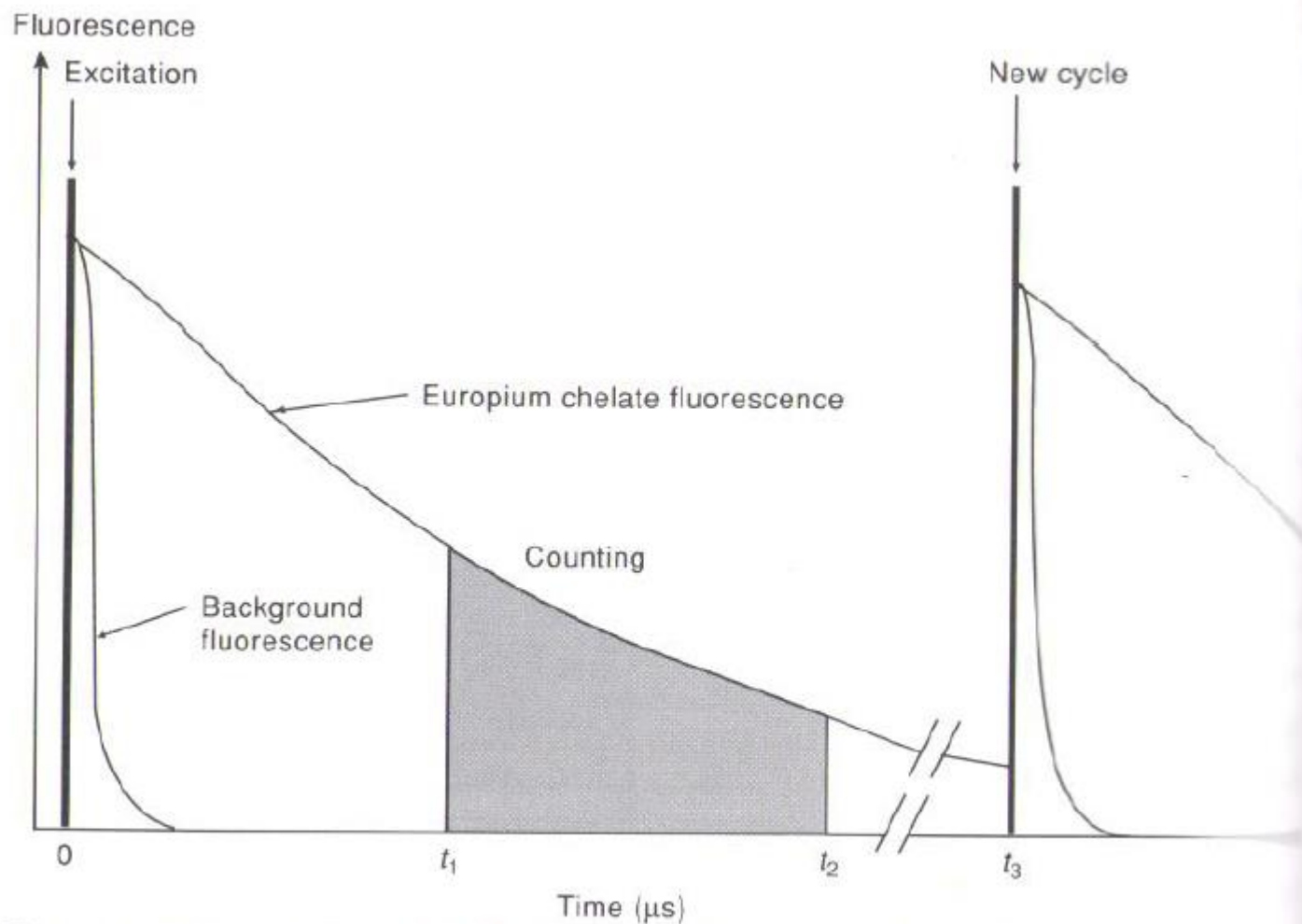


Figure 2 Principle of time-resolved fluorescence measurement. A pulse of light at the start of each cycle excites fluorescence. Measurement of the europium chelate fluorescence is delayed until background fluorescence has decayed (t_1-t_2). After a recovery period the cycle is repeated (t_3).

Heterogenní FIA

Separační fluoroimunoanalýza (SepFIA): obdoba RIA

Imunofluorometrické analýzy (IFMA): obdoba IRMA

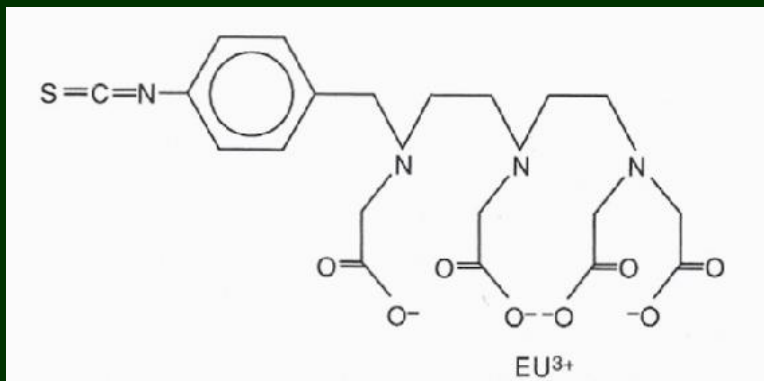
Využití klasických fluorescenčních sond (organických molekul)

Separace imunokomplexů polyethylen glykolem, síranem amonným, pevná fáze (polysacharidové, polystyrenové, polyakrylamidové nebo magnetické částice nebo mikrotitrační destičky)

Time-resolved fluorescence assays

Dissociation-enhanced lanthanide fluorescence immunoassay (DELFIA)

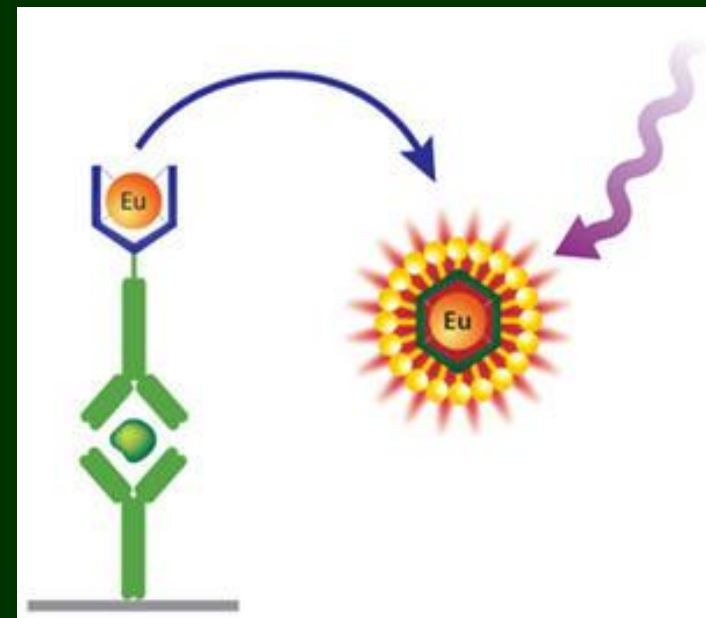
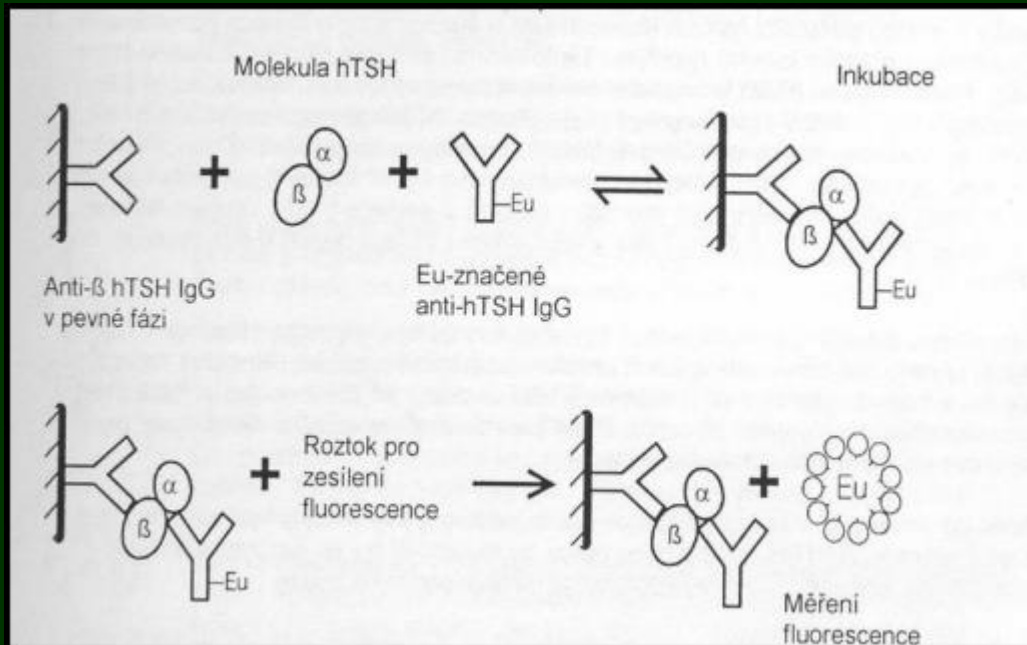
Europium chelator: N¹-(*p*-isothiocyanato-benzyl)-diethylene triamine tetraacetic acid-Eu³⁺ (N¹-ITC-benzyl DTTA Eu³⁺)



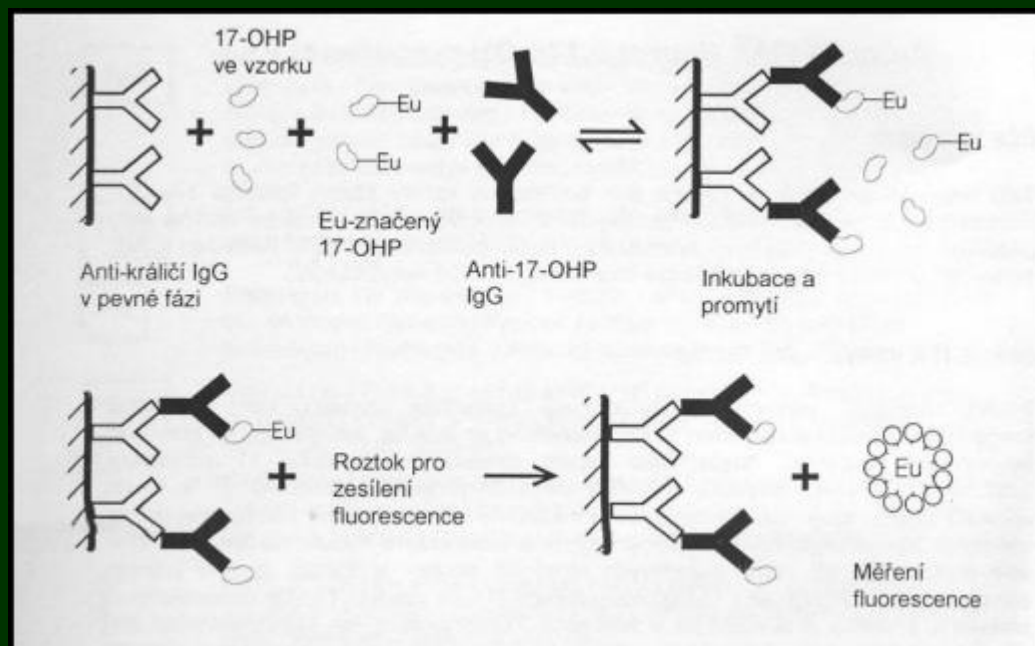
Zesilovač: β-diketon (vysoká absorptivita, efektivní energ. přenos na Eu³⁺)
energie tripletového stavu > nejnižší emisní energie Eu³⁺

Aktivační roztok: β-naphtyl trifluoroacetone, trioctylphosphine oxide, Triton X-100, kyselé prostředí

Princip DELFIA (sandwich)

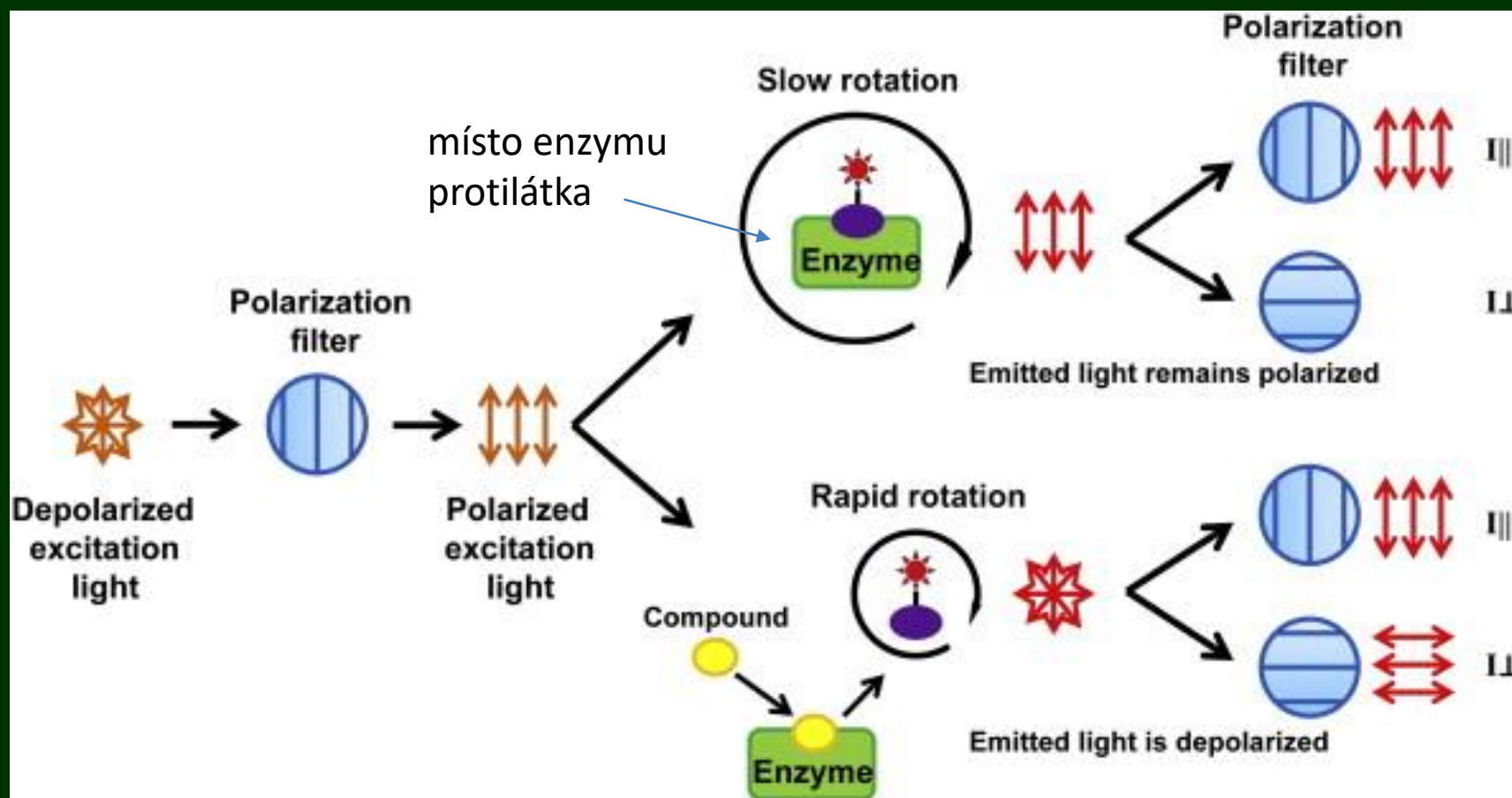


Princip DELFIA (kompetitivní stanovení)



Homogenní FIA

Fluorescence polarisation immunoassay (FPIA)



Fluorescence polarization immunoassay



Kity pro stanovení *Brucella abortus* (protilátky), aflatoxinu, fumonisinu a dalších látek.

Měřicí přístroje

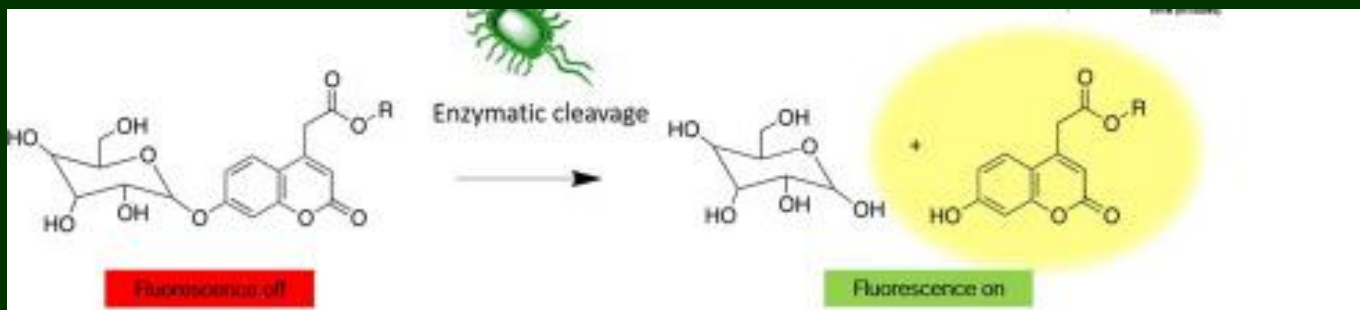
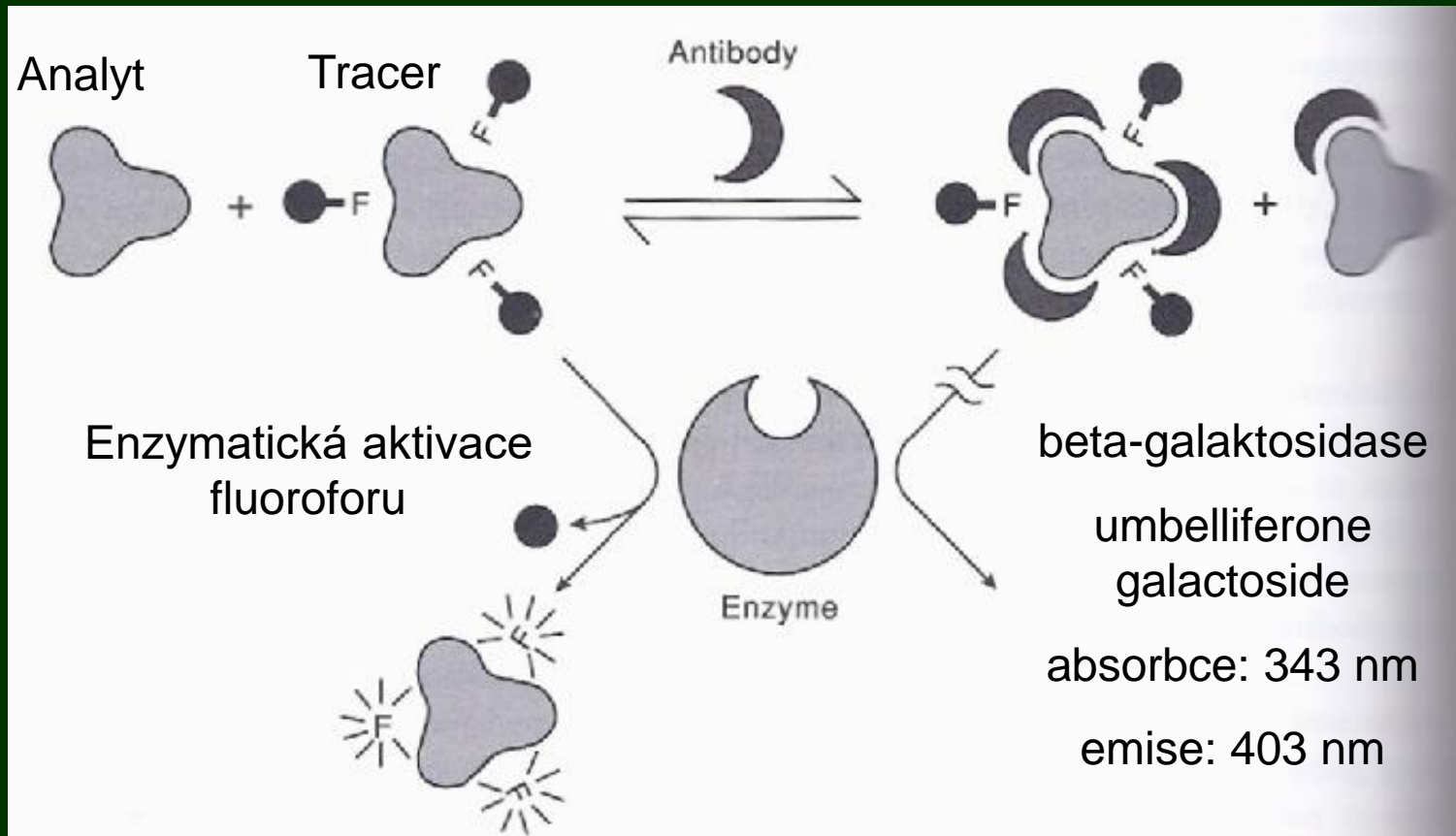
[BioTek™ Synergy 2](#)



[Sentry® 100](#)



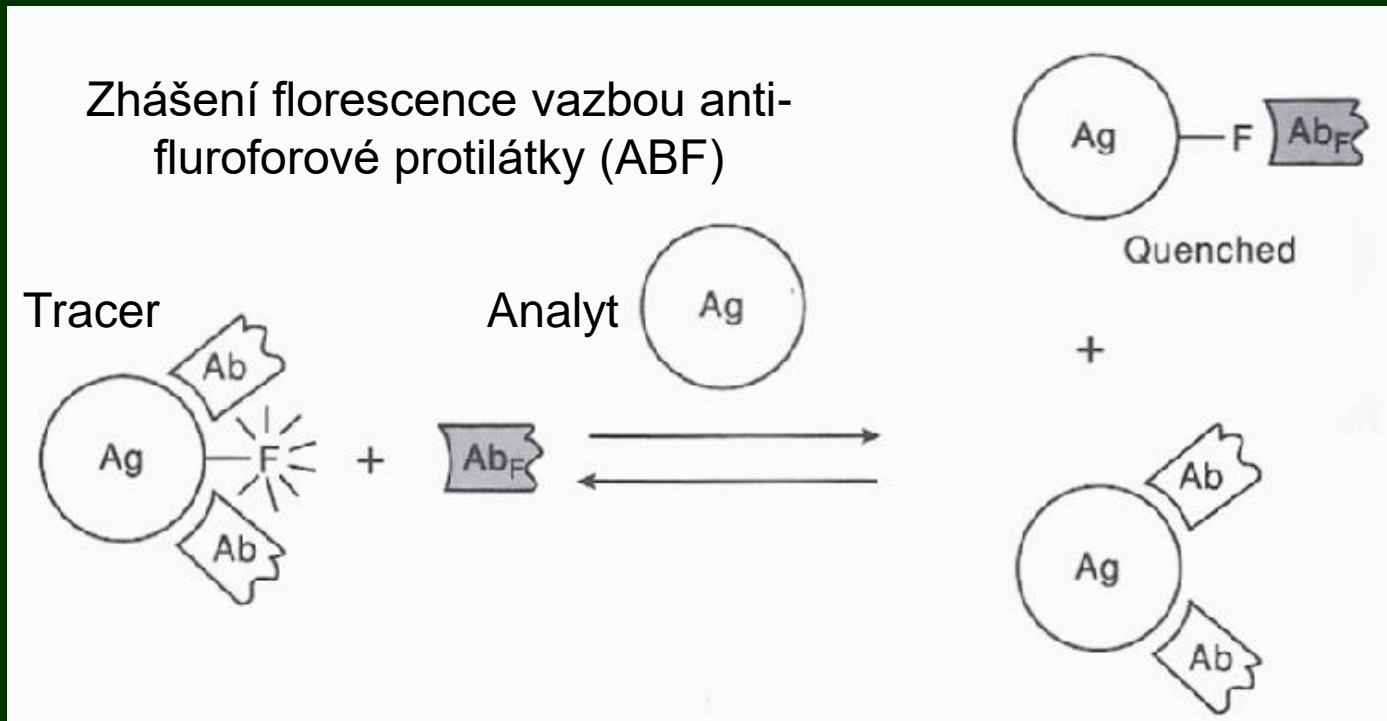
Release Fluoroimmunoassay (RFIA)



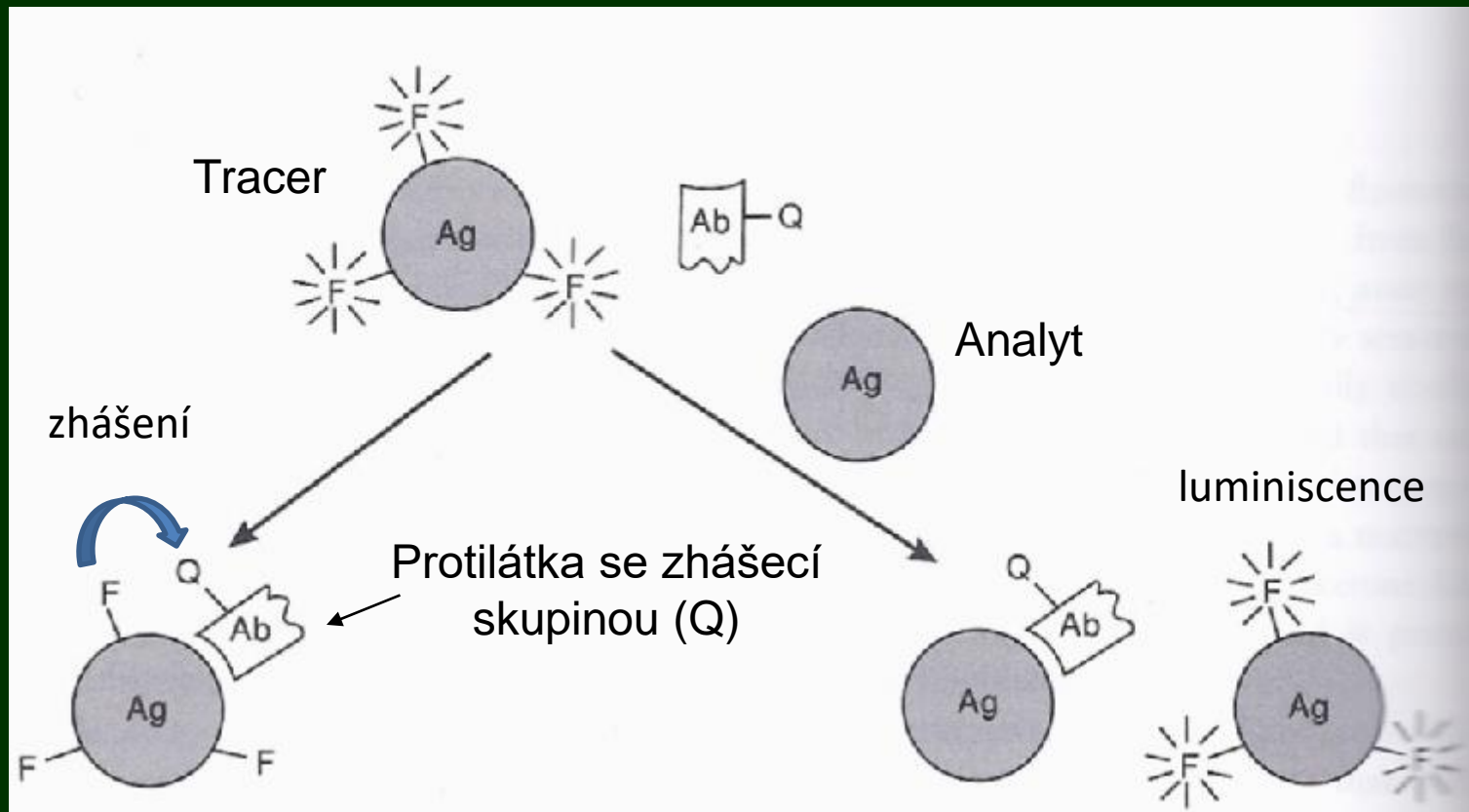
Fluorescence Modulation Immunoassay (FMIA)

Fluorescence Enhancement Immunoassay

Fluorescence-quenching Immunoassay



Fluorescence Excitation Transfer Immunoassay (FETI)



Citlivost FIA

Konvenční fluorofory: 10^{-9} – 10^{-10} mol/l

Lanthanoidní cheláty: 10^{-12} – 10^{-13} mol/l

FPIA mívá nižší citlivost a vyžaduje vyšší konc.
protilátky

Fluorescenční imunoanalýza

Výhody

vysoká citlivost

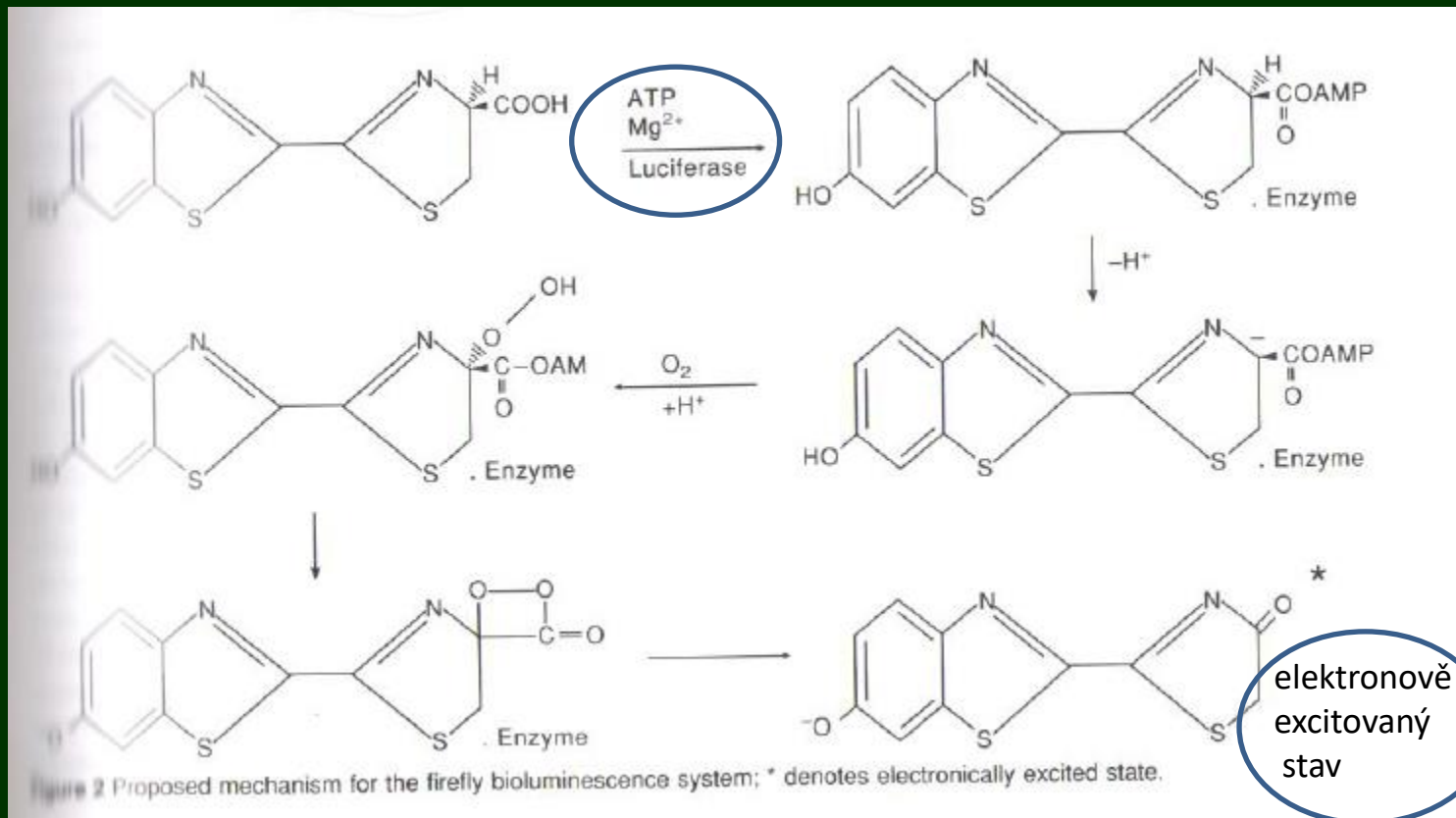
FPIA – rychlost, polní podmínky

Nevýhody

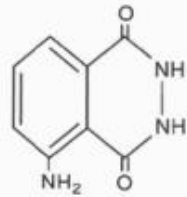
v praxi citlivost nižší kvůli přirozené fluorescenci
pozadí

Chemiluminiscenční imunoanalýzy (CLIA)

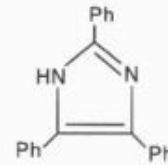
Nejvíce prostudovaný bioluminiscentní systém: luciferin + světlušková luciferáza



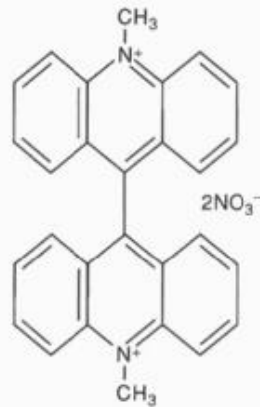
Struktury chemiluminoforů



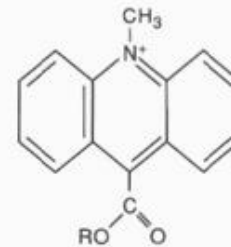
Luminol



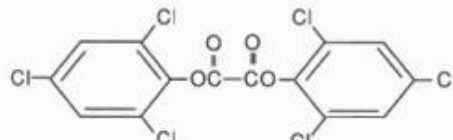
Lophine



Lucigenin



Acridinium esters

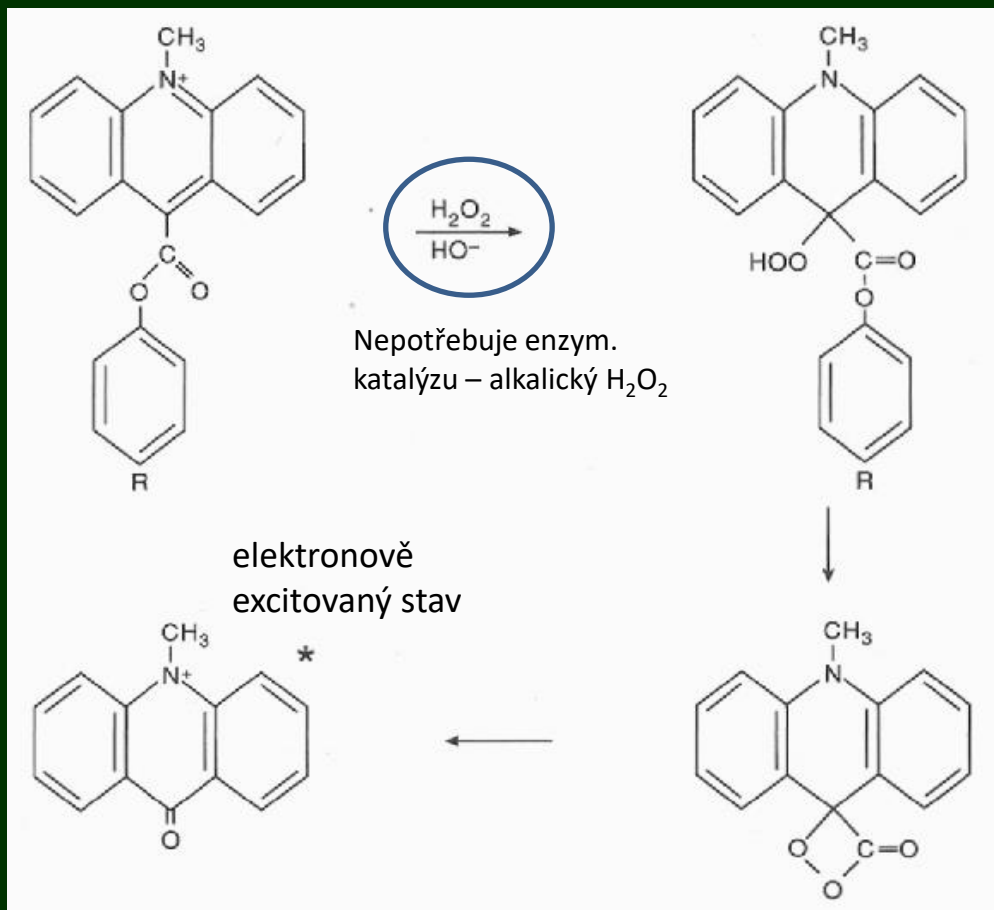


Oxalate ester



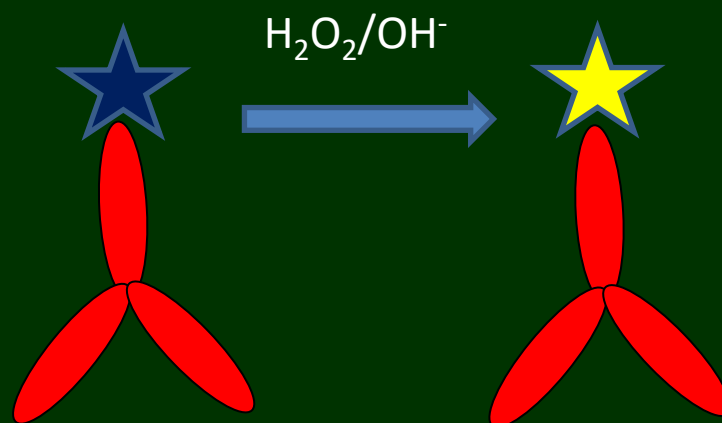
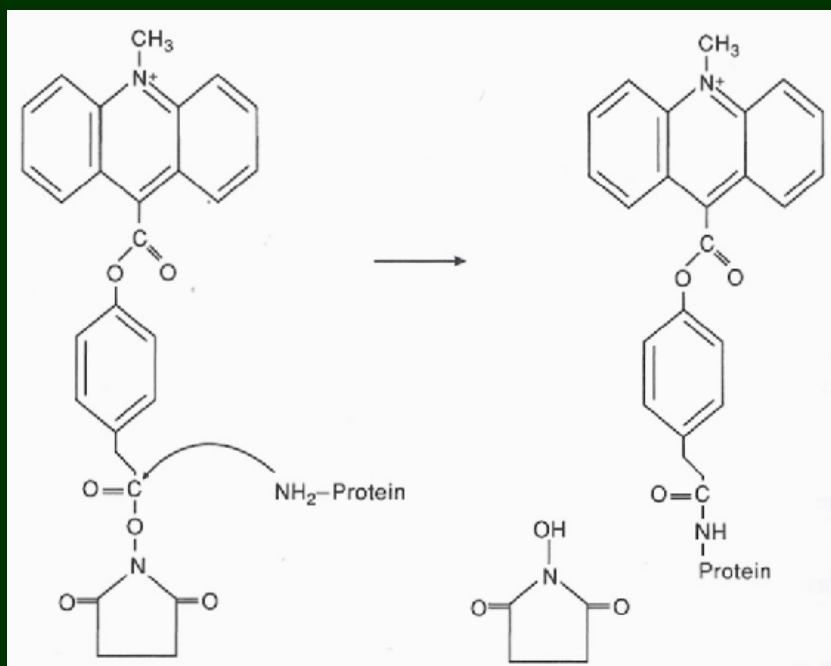
Adamantane dioxetane

Chemiluminiscenční reakce (akridiniové soli)



Příprava chemiluminiscenčně značených reagentů

Přímé uspořádání: protilátka nebo analyt/antigen značený chemiluminoforem, využívají se běžné typy konjugačních reakcí ke značení. Přídavek reagentu (např. H_2O_2) - vzniká elektronově excitovaná molekula



Nepřímé uspořádání: protilátka nebo antigen/analyt značeny enzymem/heamatinem... atd. + přídavek chemiluminoforu

Enzymy + luminofory používané v CLIA

peroxidáza nebo heamatin (luminol)

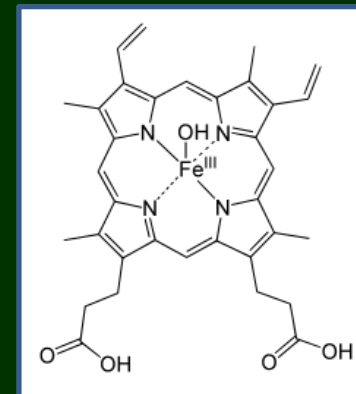
luciferáza (luciferin)

glukóza oxidáza (sacharóza)

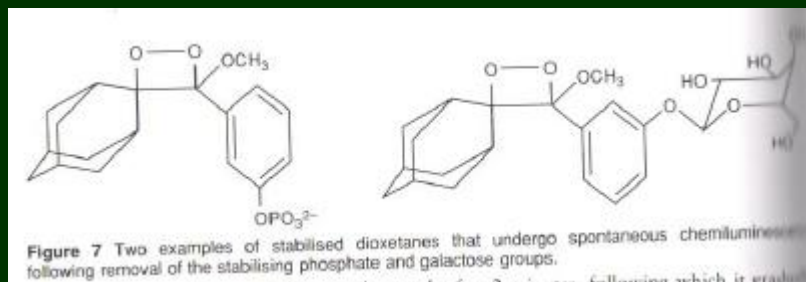
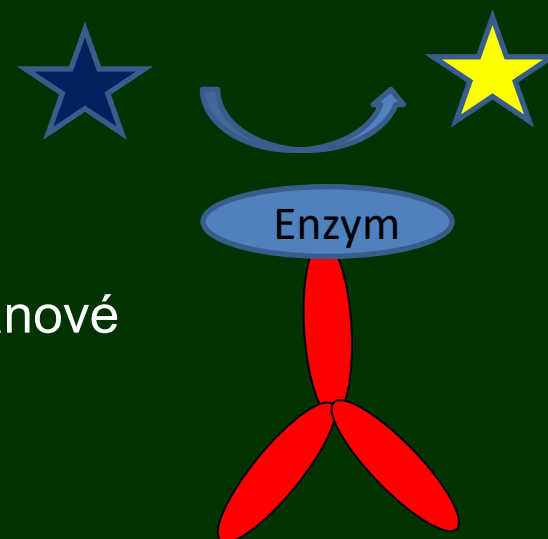
xantin oxidáza (hypoxantin)

alkalická fosfatáza (luciferin fosfát)

alkalická fosfatáza/beta-galaktozidáza (amadantanové dioxetany)

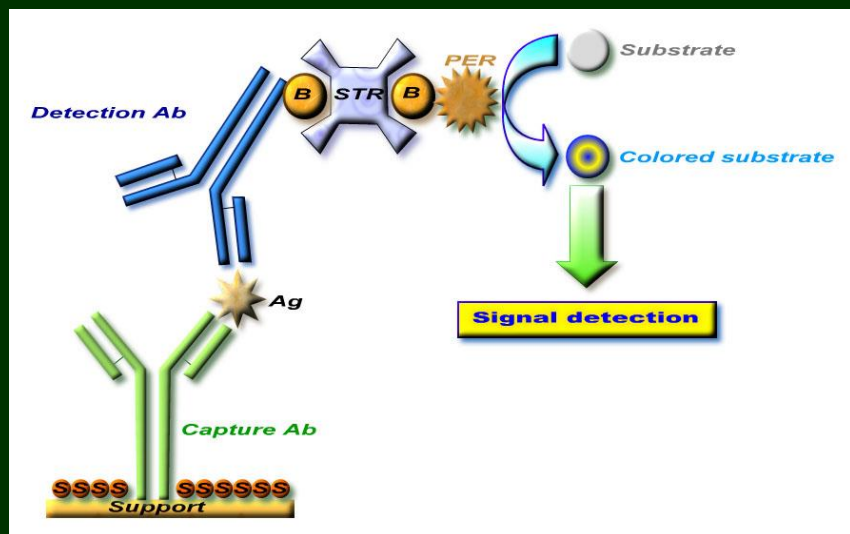


heamatin

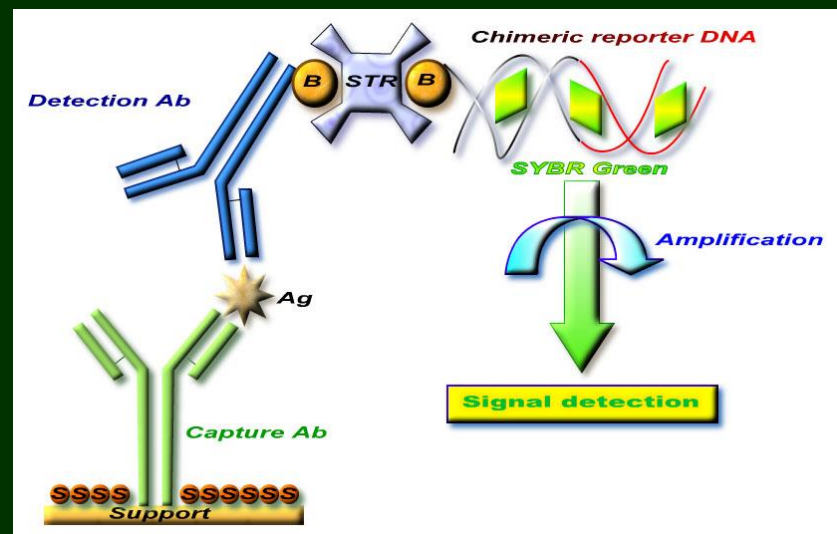


Alternativní imunoanalytické metody

Imuno-PCR



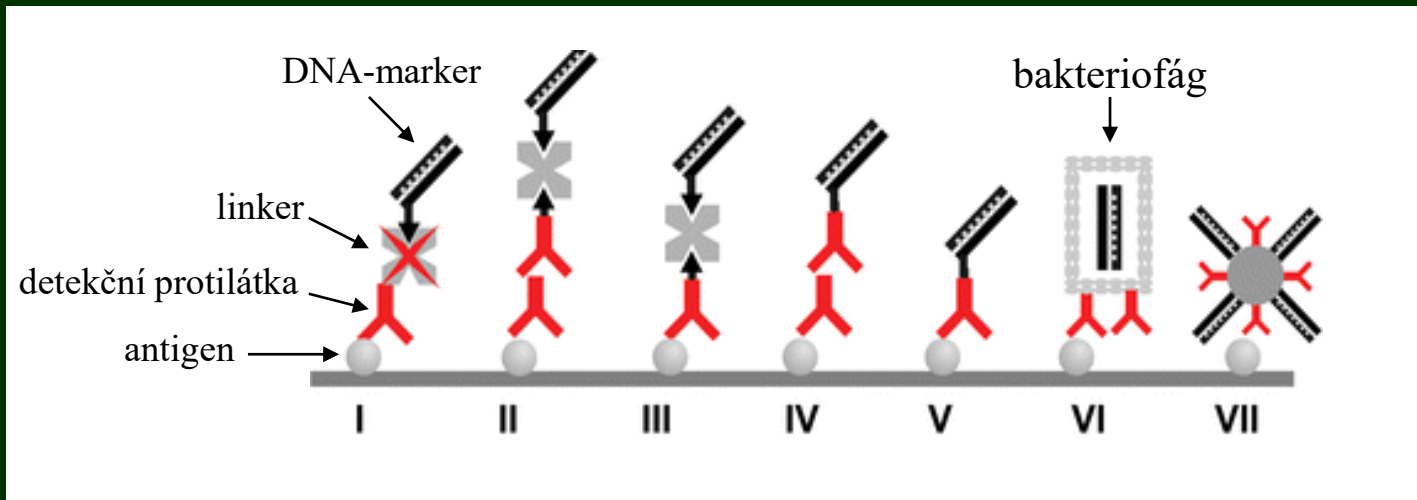
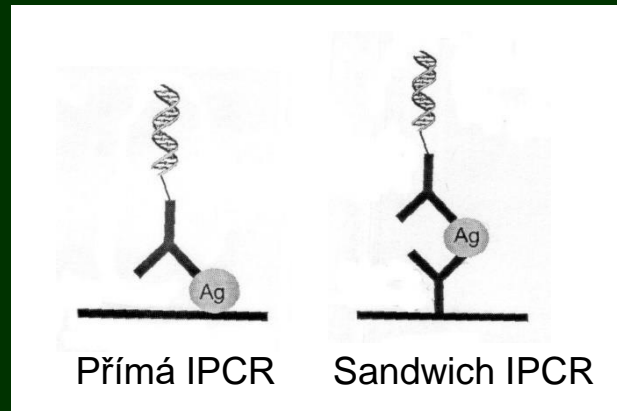
ELISA



Imuno-PCR

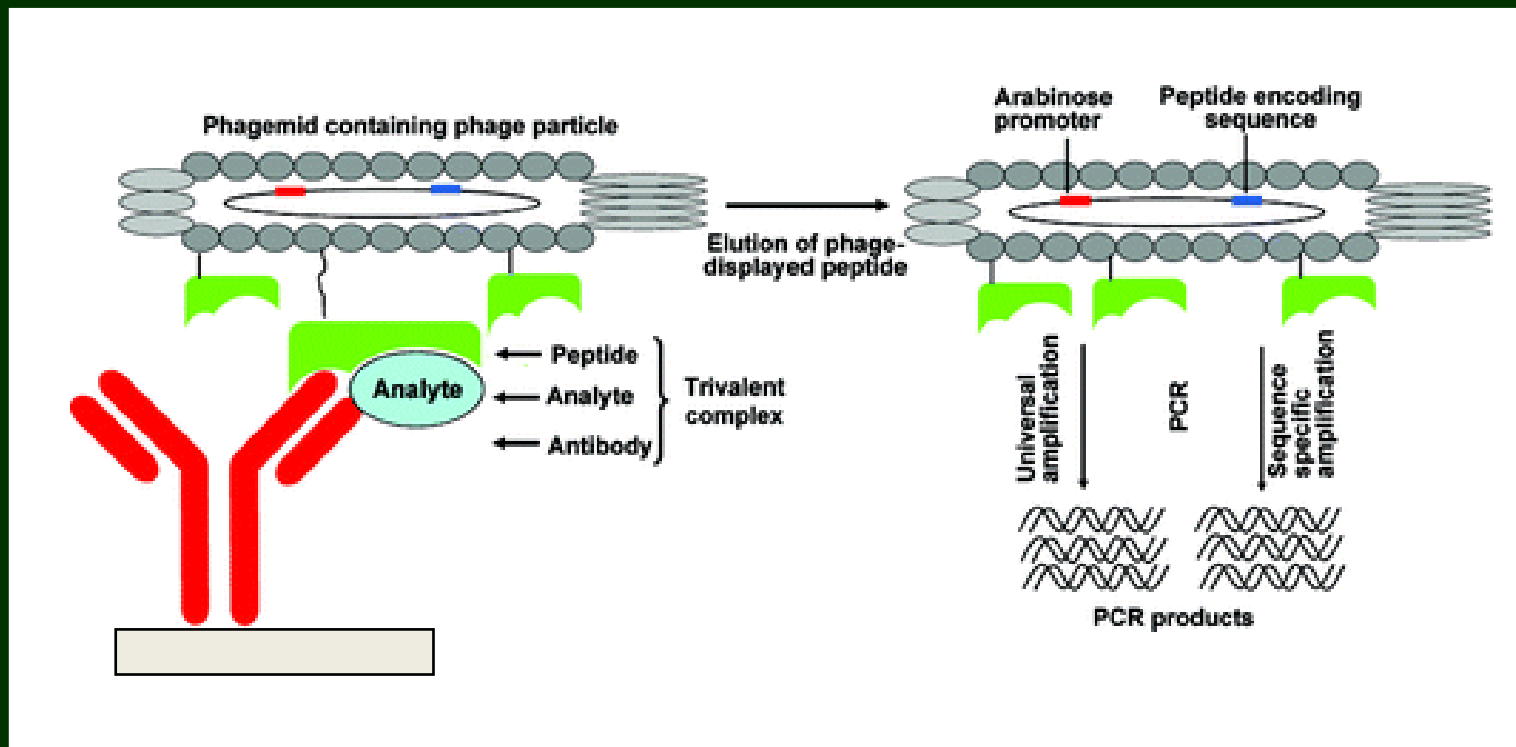
- Imuno-PCR: kombinace ELISA a PCR
- Snížení limitu detekce (LOD) 10-10 000 krát oproti klasické ELISA

Formáty imuno-PCR



PHAIA-PCR (phage anti-immunocomplex real-time polymerase chain reaction)

Nekompetitivní imunoanalytická metoda pro detekci malých molekul



Anti-idiotypové a anti-metatypové protilátky

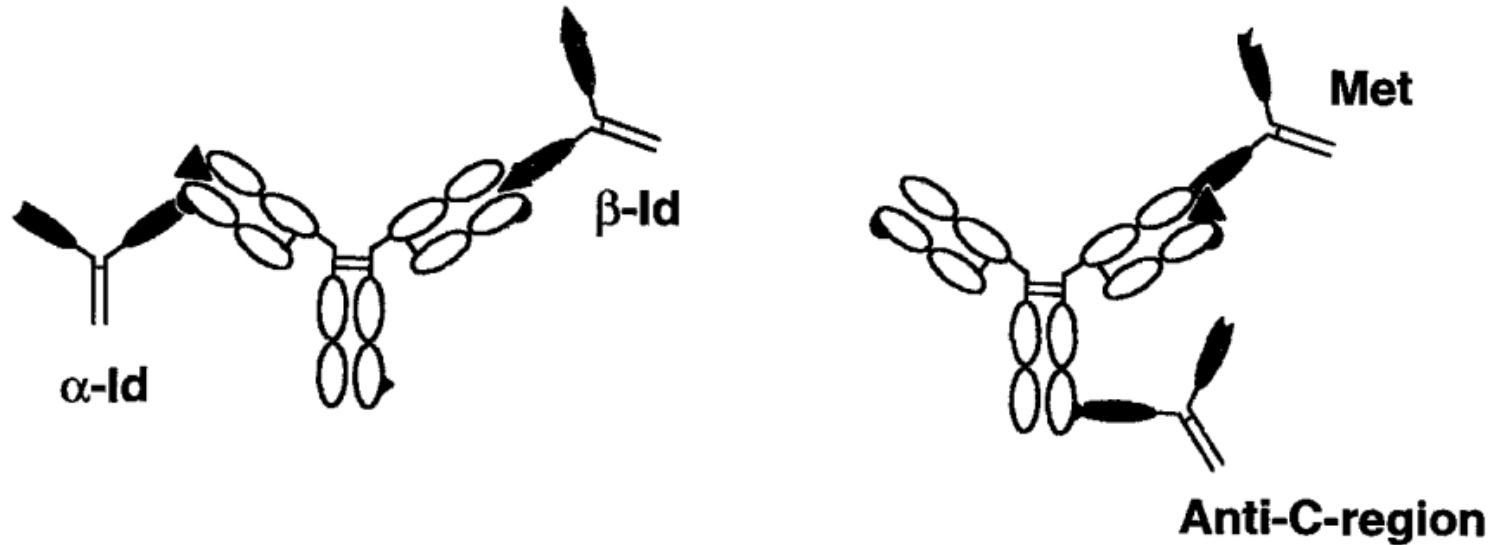


FIG. 11. Schematic representation of the binding properties of anti-idiotypic antibodies and anti-metatypic antibodies. \blacktriangledown , haptens; α -Id, α -type anti-idiotypic antibody; β -Id, β -type anti-idiotypic antibody; Met, anti-metatypic antibody; anti-C-region, antibodies recognizing the constant region of a primary antibody (recognizing isotype or allotype).

alfa-vazba do vnější části vazebného místa
(detekce)

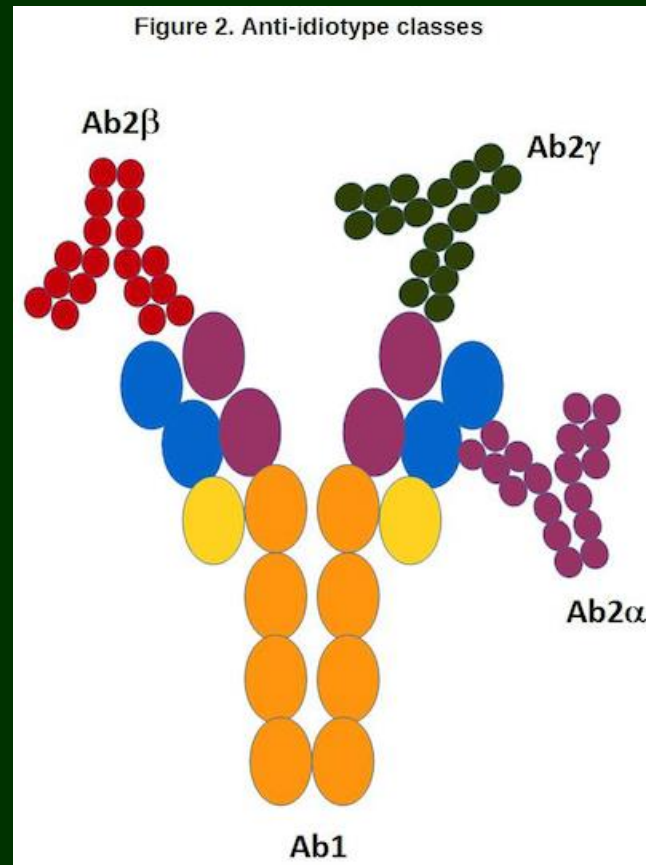
beta-vazba dovnitř vaz. místa (blokace
neobsazených míst)

Met - Rozpoznání komplexu
vazebné místo-antigen

Anti-C – vazba na Fc

Kobayashi and Goto, 2001

1. functionally block or mimic the target antigen ($Ab2_{\beta}$)
2. prevent the association of the antibody with its target ($Ab2_{\beta}$ or $Ab2_{\gamma}$),
3. uniquely identify the antibody (Ab_{α} , $Ab2_{\beta}$, or $Ab2_{\gamma}$)?



<https://mainebiotechnology.com/anti-idiotypes-in-the-immune-response-and-uses-as-therapeutics-and-analysis-tools/>

Nekompetitivní metody založené na anti-idiotypových protilátkách

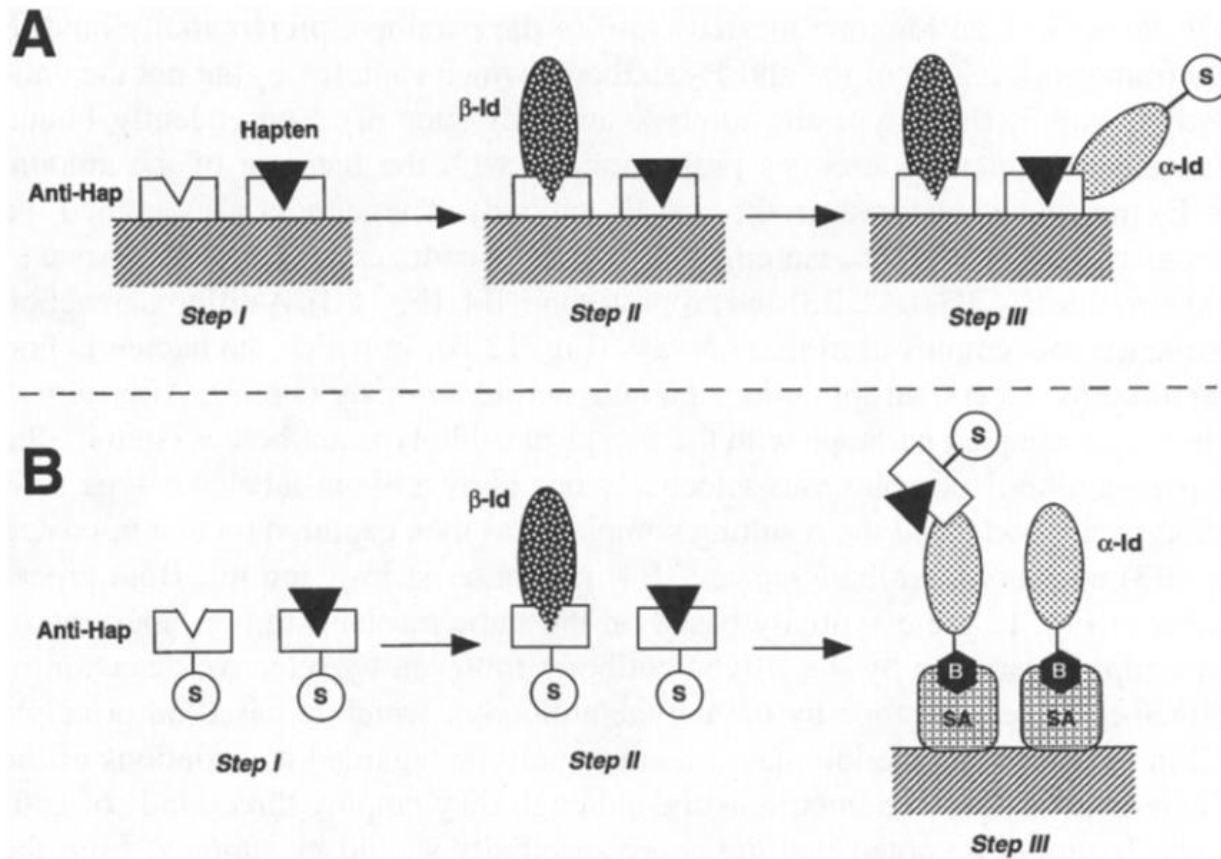


FIG. 12. Noncompetitive hapten immunoassay procedures (A and B) using a combination of the α -type and β -type anti-idiotypic antibodies, each recognizing the framework and paratope of the anti-hapten antibody. Anti-hap, anti-hapten antibody (primary antibody); α -Id, α -type anti-idiotypic antibody; β -Id, β -type anti-idiotypic antibody; S, signal-generating group; B, biotin; SA, streptavidin.

Nekompetitivní metody založené na anti-metatypových protilátkách

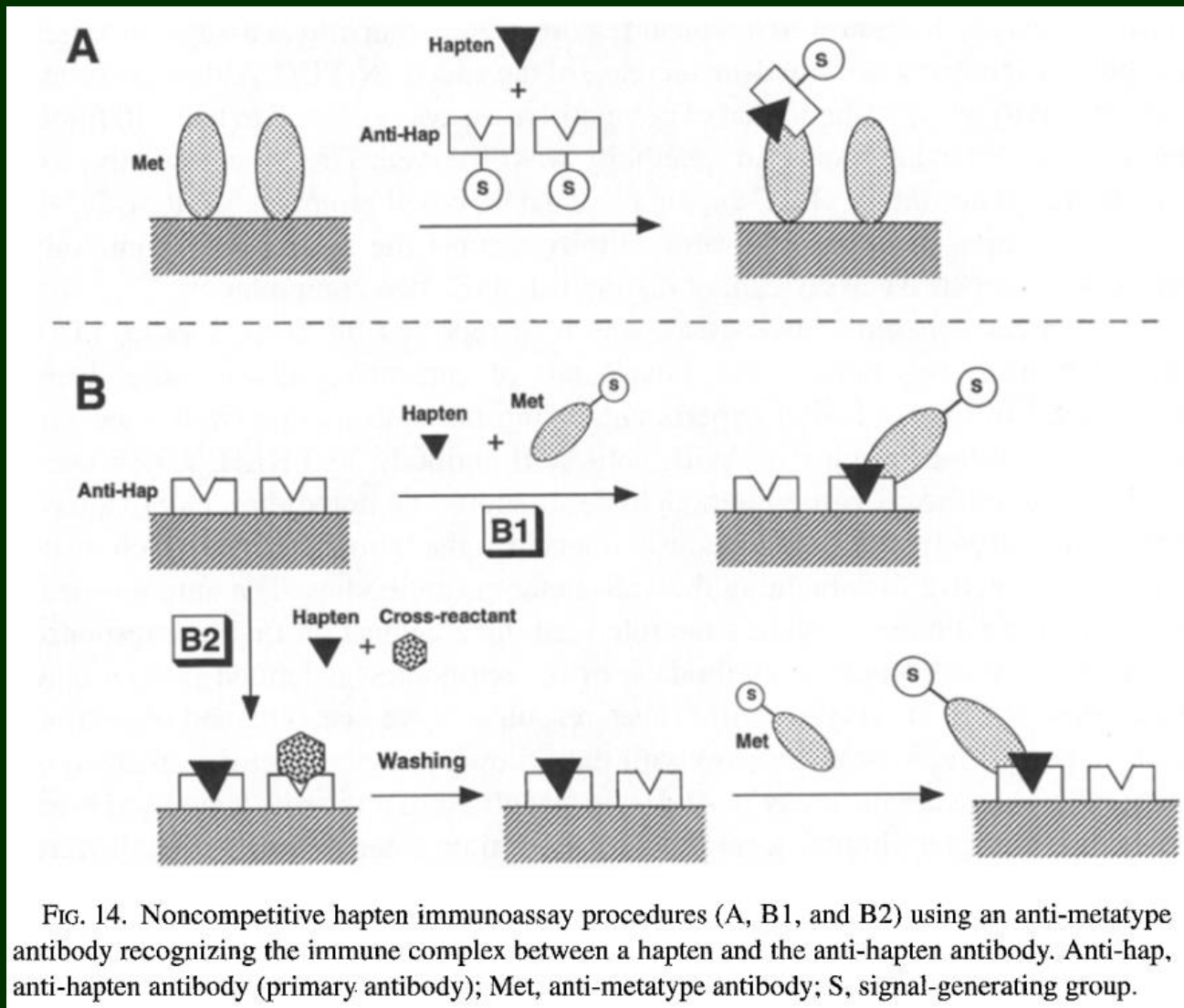


FIG. 14. Noncompetitive hapten immunoassay procedures (A, B1, and B2) using an anti-metatype antibody recognizing the immune complex between a hapten and the anti-hapten antibody. Anti-hap, anti-hapten antibody (primary antibody); Met, anti-metatype antibody; S, signal-generating group.

Výhody imunoanalytických metod

Nízké náklady

Robustnost

Velký počet vzorků v krátkém čase

Rychlost



Dipstick techniky
Imunosenzory

Technologie dipstick

(Lateral flow immunoassay)

Rychlé imunologické metody:

Rychlost

Nízké náklady

Vysoký počet vzorků

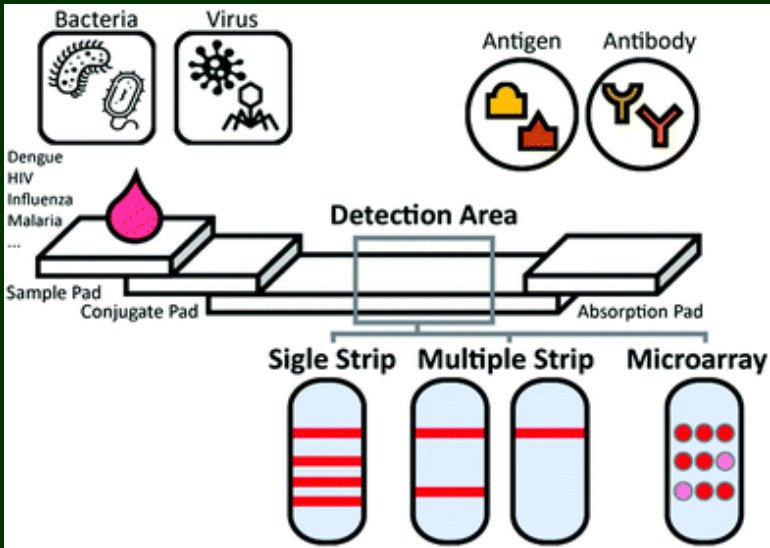
Nekvalifikovaný personál

Polní a provozní podmínky

Nižší citlivost

Preenrichment

Předběžné stanovení



Kim et al., 2019

<https://www.creative-diagnostics.com/food-analysis/tag-lateral-flow-immunoassay-30.htm>

LABEL TYPES

Typically, lateral flow assays utilize conjugated gold nanoparticles within the conjugate pad. Other labels include colored polystyrene beads, magnetic beads, quantum dots or upconverting nanoparticles. The optimization of the assay will ensure the label interacts correctly with the antibody and antigen to ensure efficiency and accuracy of results.

a Naked eye qualitative detection

b Naked eye semi-quantitative detection

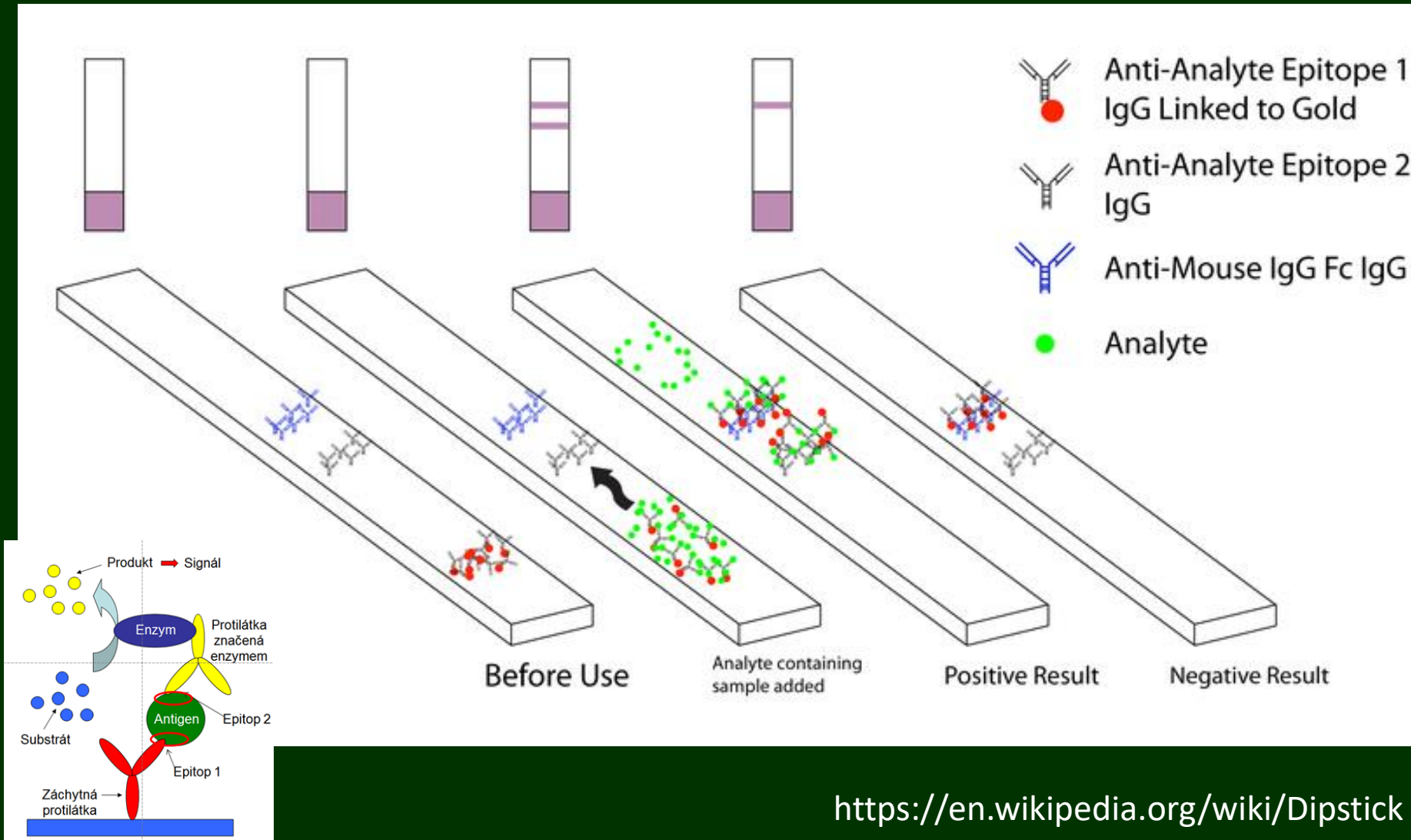
c Quantitative detection using a dedicated reader

d Quantitative detection using a smartphone

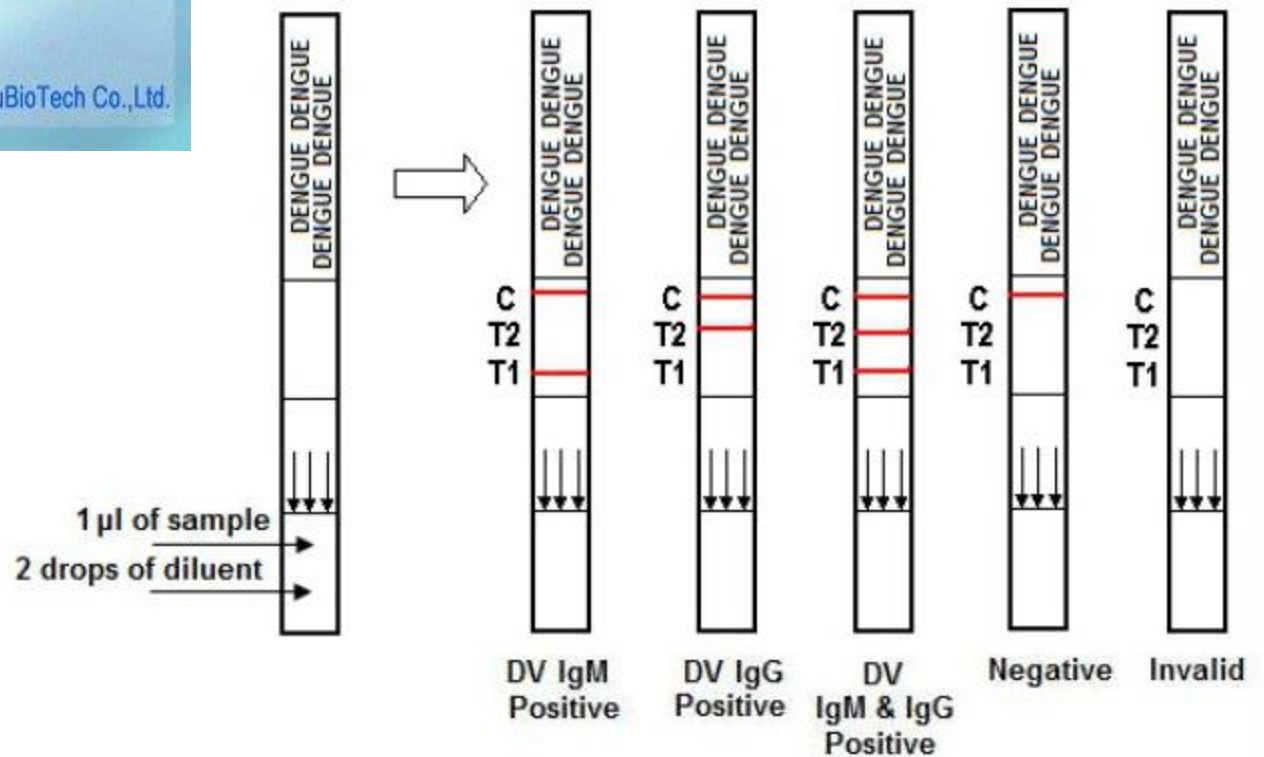
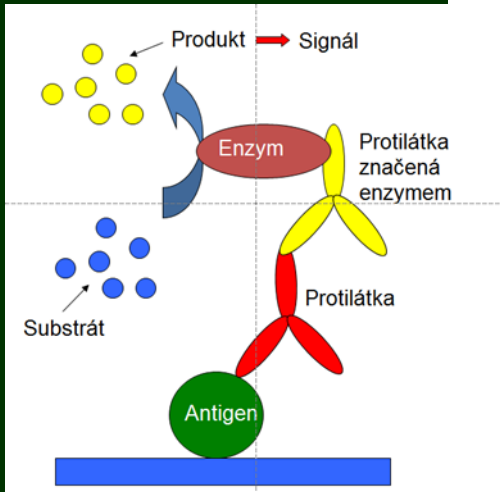
Parolo et al., 2020

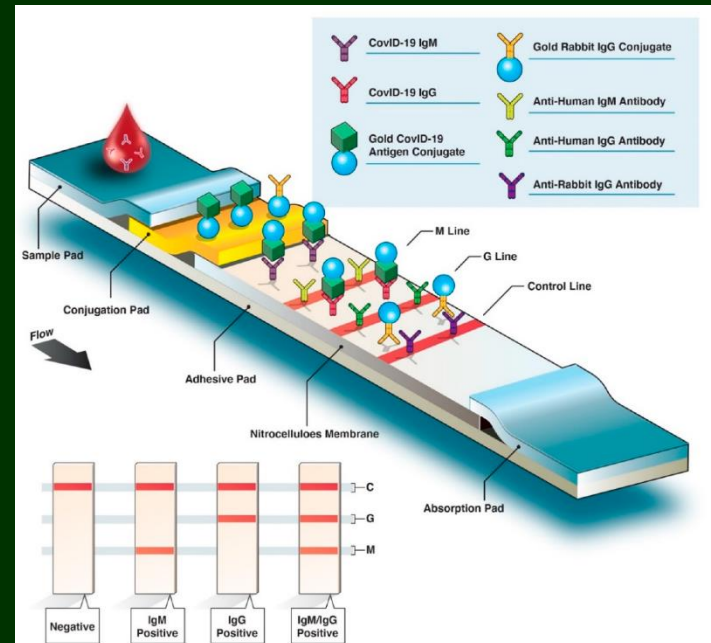
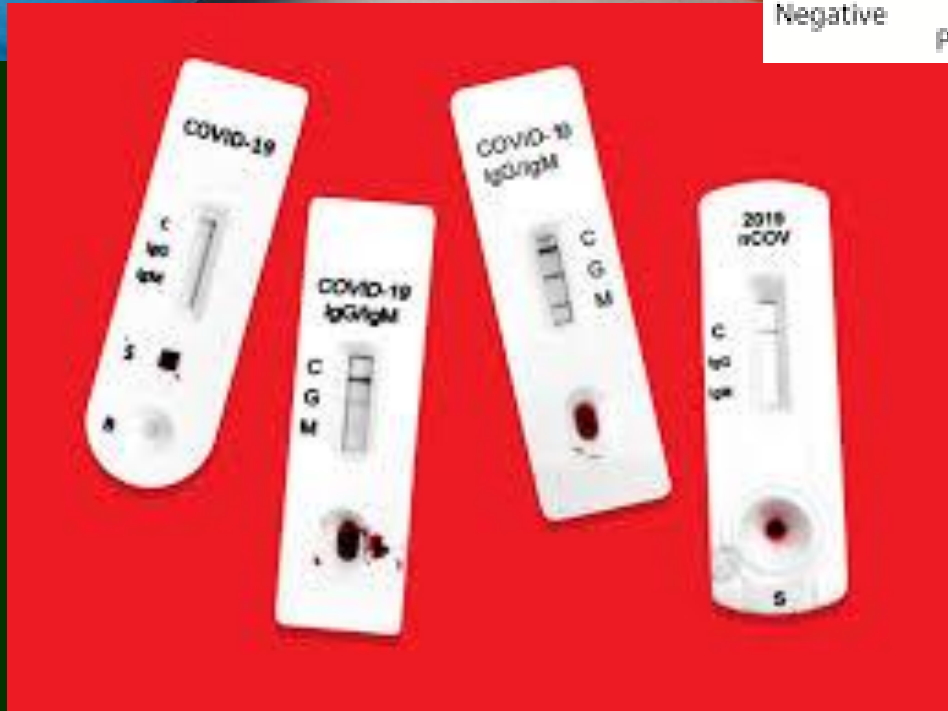
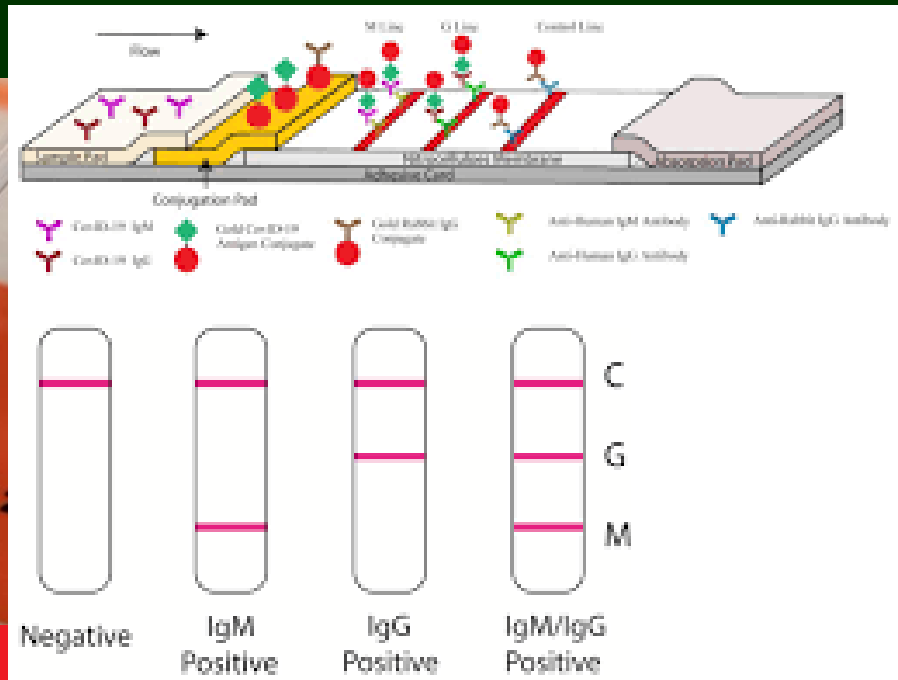
Technologie dipstick – sandwich uspořádání

diagnostika velkých antigenů (protein, virus, bakterie)



PanBio Dengue Duo IgM and IgG Rapid Strip Test (PanBio, Brisbane, Australia)





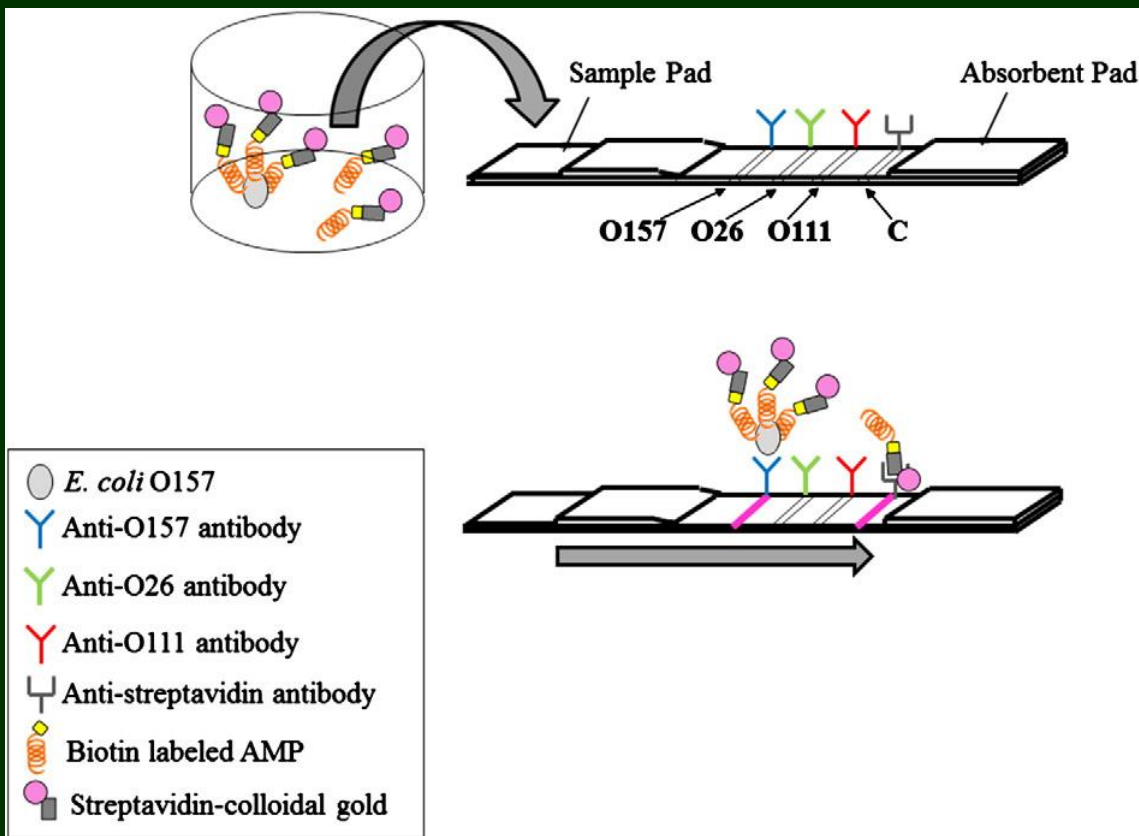


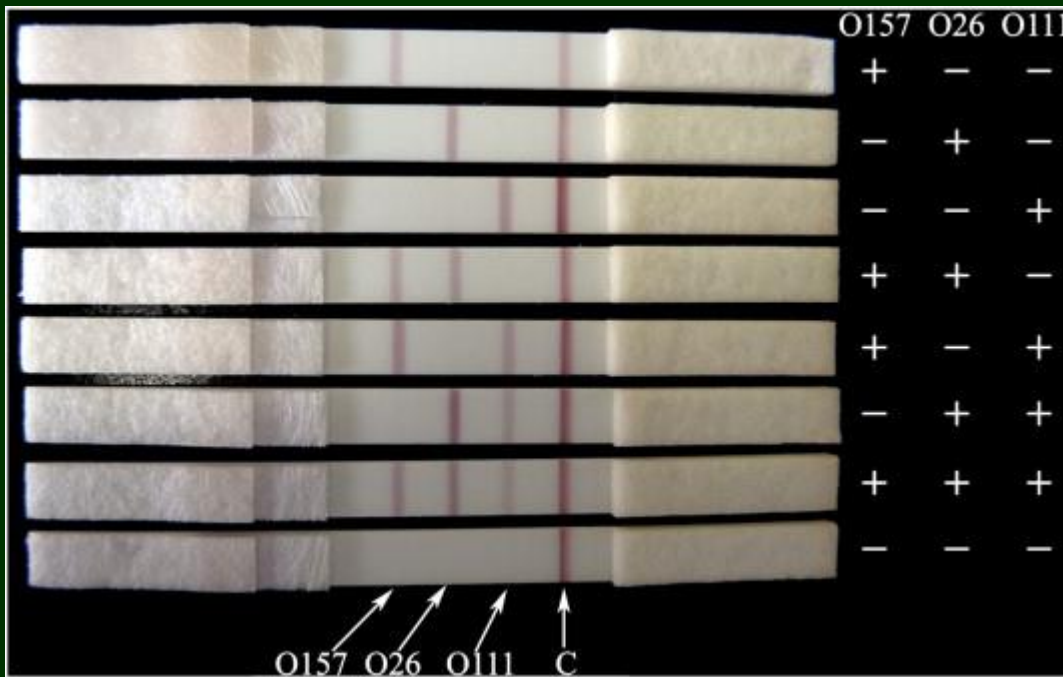
Fig. 1. Schematic diagram of the multiplex LFA strip. Arrows indicate the positions of the control (C) and test lines corresponding to O157, O26, and O111. Antigen (e.g., *E. coli* O157) and streptavidin–colloidal gold conjugate solutions are mixed, and then the mixture is applied to the sample pad of the LFA strip. After 15 min, it is possible to judge for positive or negative results (e.g., O157 positive).

For bacteria samples: **Sample preenrichment methods**

1. bacteria precultivation
2. immunomagnetic separation

Komerčně dostupné dipstick techniky pro detekci STEC

- **SMART II Rapid E. coli O157 Strip Test** (New Horizons Diagnostic, Inc.)
detekce E. coli O157 ve vzorcích potravin
LOD 1 CFU/25 g vzorku
- **O157 Coli-Strip** (Coris BioConcept, Gembloux, Belgie)
detekce E. coli O157 ve vzorcích stolice
LOD 10^4 CFU/ml
- **MaxSignal E. coli O157 Strip Test Kit** (Bioo Scientific, Austin, Texas)
detekce E. coli O157 ve vzorcích potravin
LOD 10^4 CFU/ml
- **ImmunoCard STAT!® EHEC** (Meridian, Bioscience, Inc., USA)
detekce E. coli O157:H7 nebo Shiga toxinu 1 a 2 ve vzorcích stolice



Simultaneous detection and identification of STEC O157, O26, and O111 by multiplex LFA. Using multiplex LFA, we succeeded in conducting single detection (strips 1–3), double detection (strips 4–6), and triple detection (strip 7) of the selected serogroups. A negative result was indicated by the appearance of the control line only (strip 8). Arrows indicate the positions of the control (C) and test lines corresponding to O157, O26, and O111.

Sensitivity of the multiplex lateral flow assay using an antimicrobial peptide to detect *E. coli* strains O157, O26, and O111 in serial dilution.

Test bacterium ^a	Strain	Bacterial cultures (CFU/mL)					
		10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³
<i>Escherichia coli</i> O157	ATCC 43888	+	+	+	+	+	–
<i>E. coli</i> O26	RIMD 05091876	+	+	+	+	w+	–
<i>E. coli</i> O111	RIMD 05091865	+	+	+	+	+	–

+, positive; w+, weakly positive; and –, negative.

^a Live cells cultured in mEC + n broth.

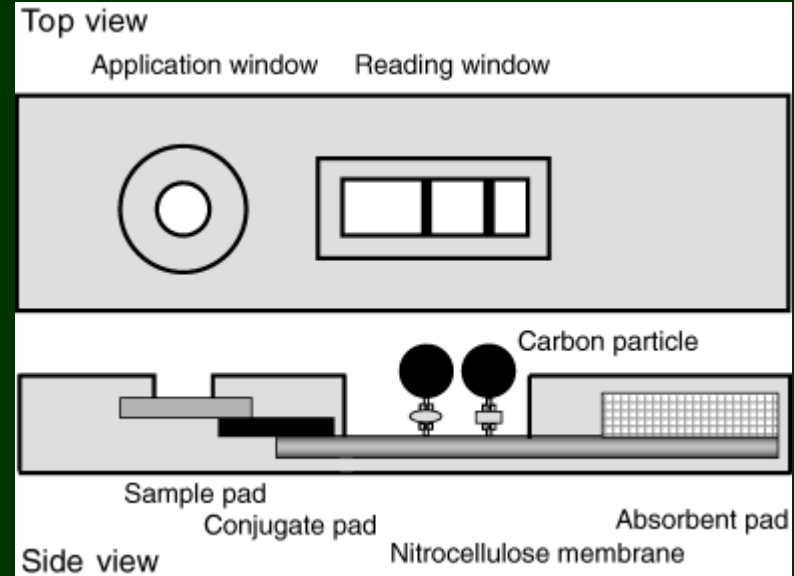


Table 3 Lateral flow immunoassay (LFIA) results for simultaneous detection of cells of *E. coli* O157 and verotoxin in artificially inoculated milk

Spiking organism	VT type	Test type		
		O157	VT1 and 2	VT2
<i>E. coli</i> O26 (99/47)	1	0	4	0
<i>E. coli</i> O26 (00/16)	1	0	4	0
<i>E. coli</i> O103 (99/10)	1	0	4	0
<i>E. coli</i> O111 (01/33)	1 and 2	0	4	0
<i>E. coli</i> O145 (01/32)	2	0	4	0
<i>E. coli</i> O157 (99/41)	Negative	4	0	0
<i>E. coli</i> O157 (00/10)	1 and 2	4	4	4
<i>E. coli</i> O157 (01/31)	2 and 2c	4	4	4
Uninoculated controls	Negative	0	0	0

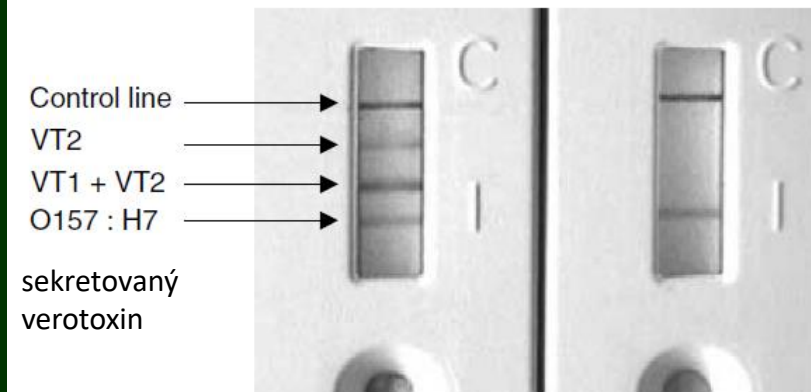
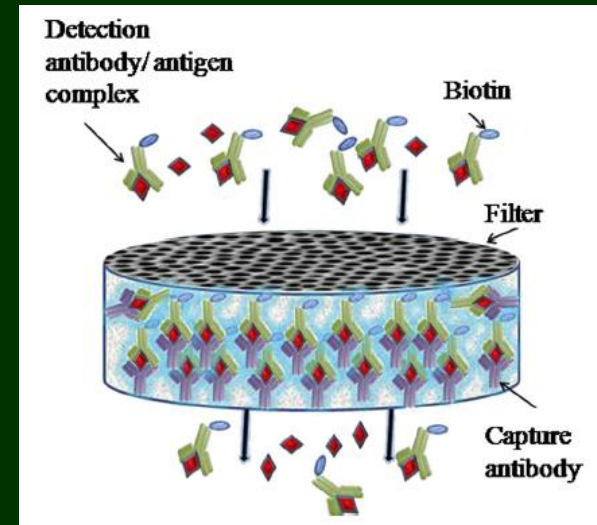
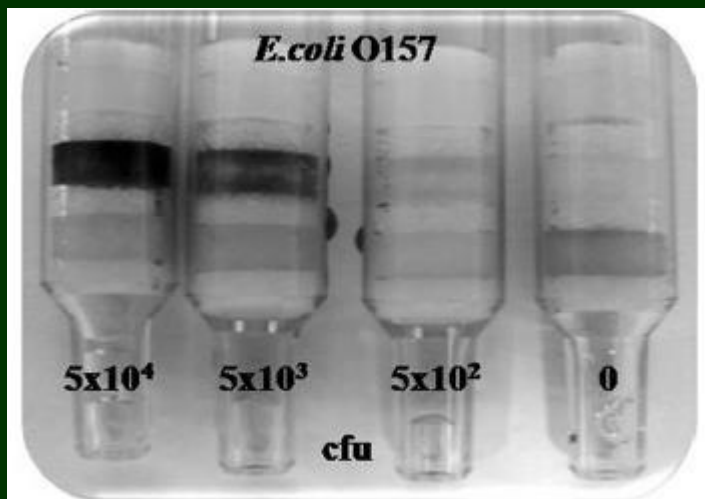
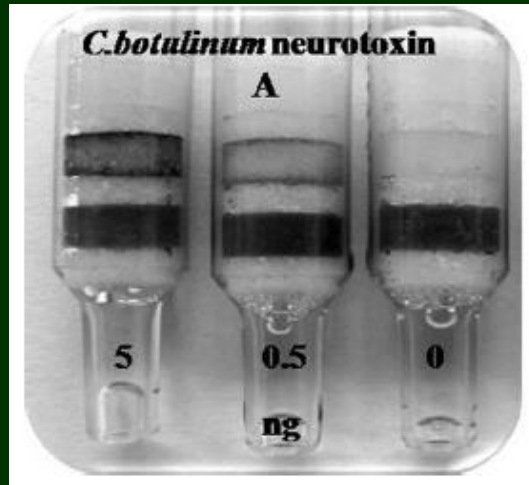


Fig. 5 Detailed view of test windows for single lane, multi-analyte LFIA device. Left: culture supernatant of *E. coli* O157 (VT1 and 2 producer); right: culture supernatant of *E. coli* O157 (VT-negative strain)

Komerčně dostupné dipstick techniky pro detekci STEC

- **SMART II Rapid E. coli O157 Strip Test** (New Horizons Diagnostic, Inc.)
detekce E. coli O157 ve vzorcích potravin
LOD 1 CFU/25 g vzorku
- **O157 Coli-Strip** (Coris BioConcept, Gembloux, Belgie)
detekce E. coli O157 ve vzorcích stolice
LOD 10^4 CFU/ml
- **MaxSignal E. coli O157 Strip Test Kit** (Bioo Scientific, Austin, Texas)
detekce E. coli O157 ve vzorcích potravin
LOD 10^4 CFU/ml
- **ImmunoCard STAT!® EHEC** (Meridian, Bioscience, Inc., USA)
detekce E. coli O157:H7 nebo Shiga toxinu 1 a 2 ve vzorcích stolice

Rapid Affinity Immunochromatography Column-Based Tests



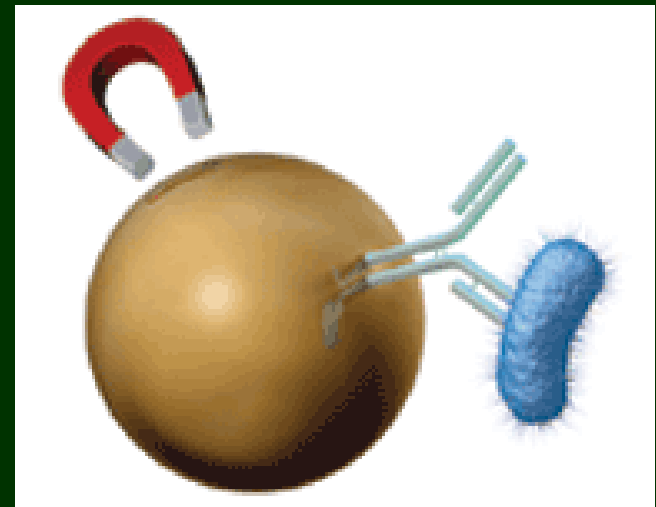
LOD: 500 CFU / 0,5 ml vzorku

Sample pre-enrichment methods

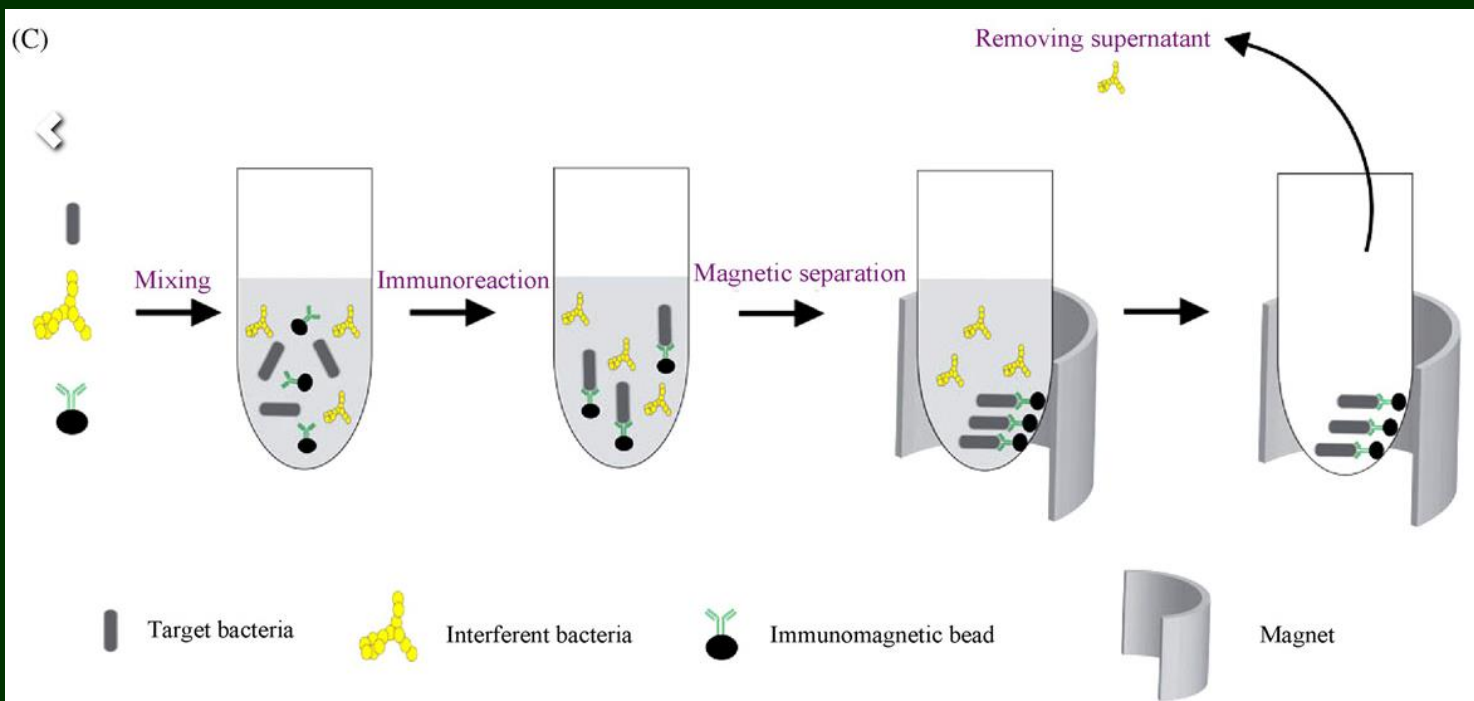
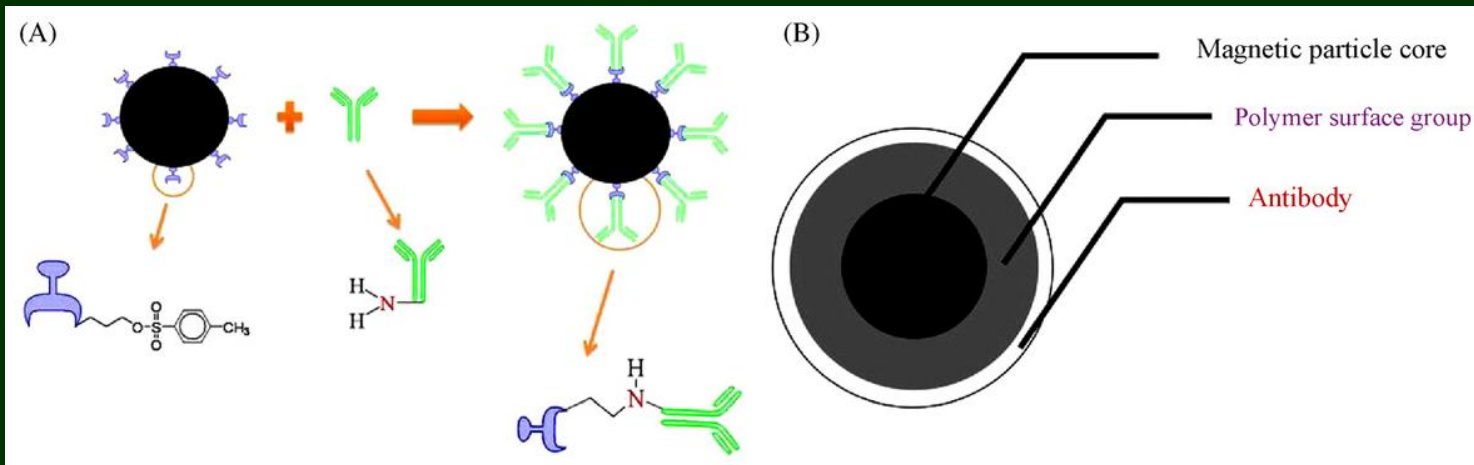
Bacteria
pre-cultivation



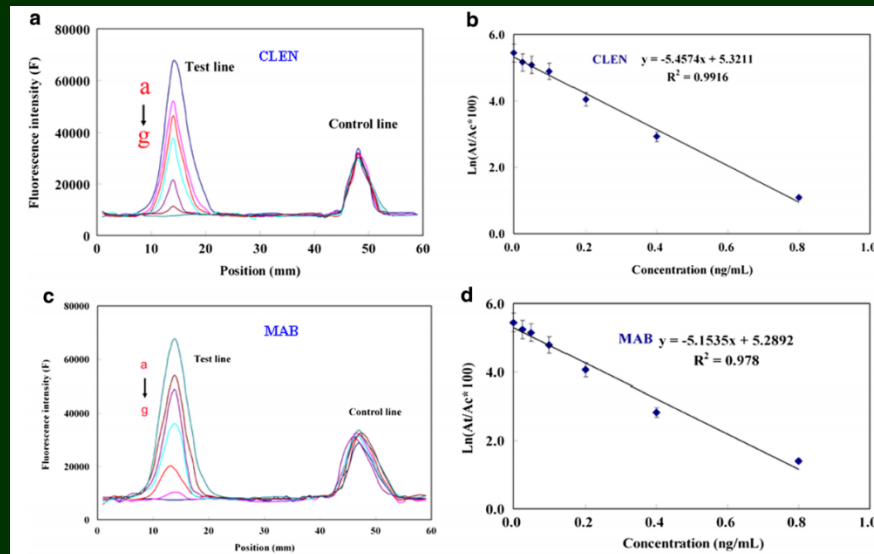
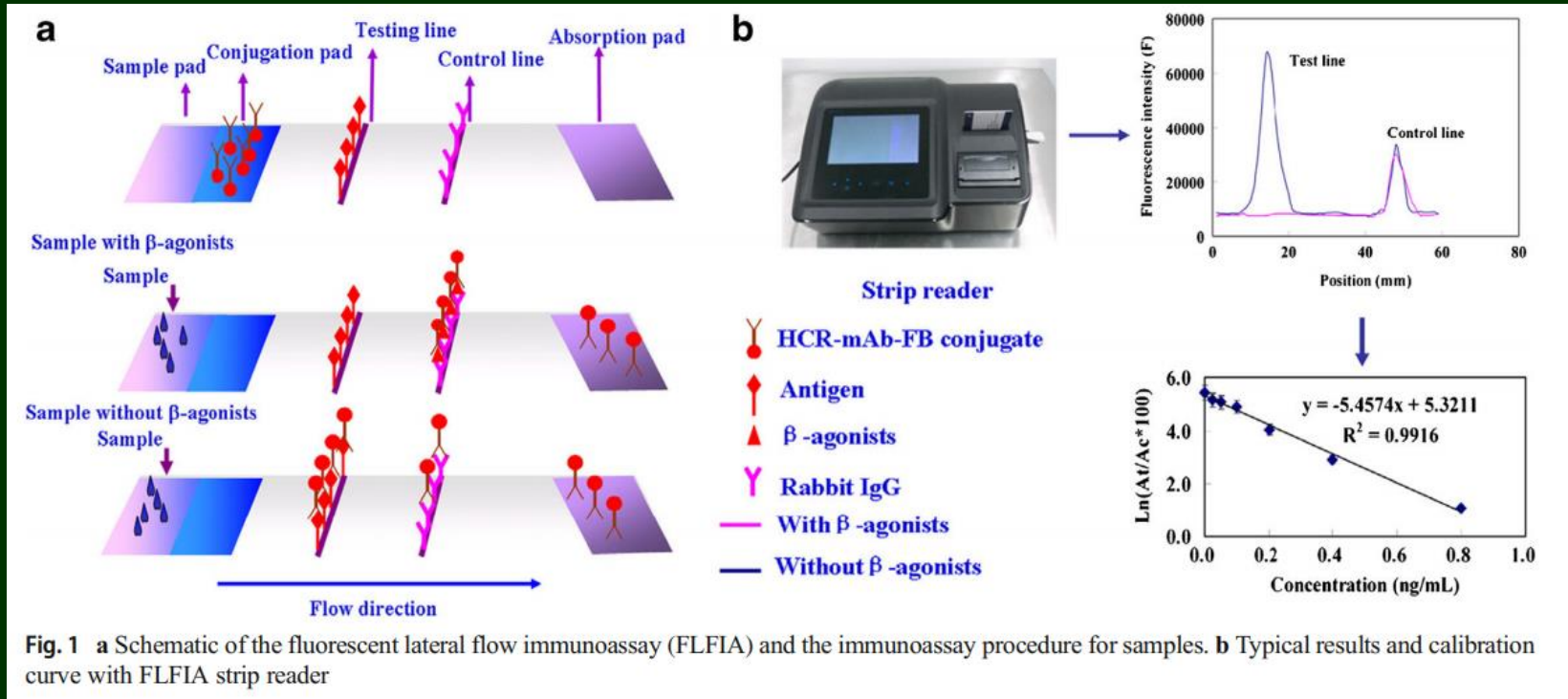
Immunomagnetic
separation



Immunomagnetic separation



(Semi)kvantitativní stanovení pomocí lateral flow immunoassays



Wang et al., 2018

Další možnosti kvantifikace signálu u LFA

