

# Téma 05\_Imunologické metody



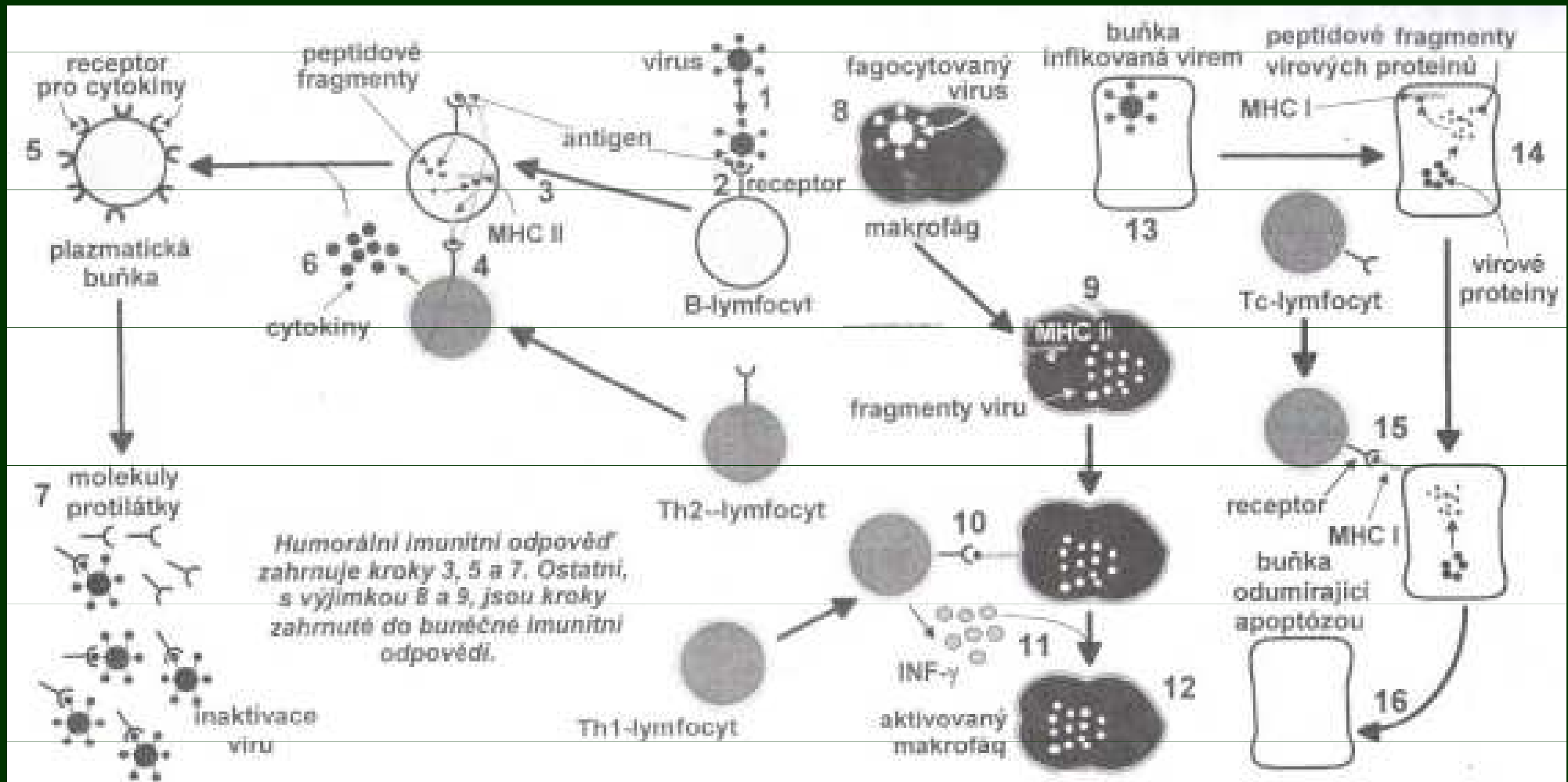
Financováno  
Evropskou unií  
NextGenerationEU



NÁRODNÍ  
PLÁN OBNOVY

MŠMT  
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

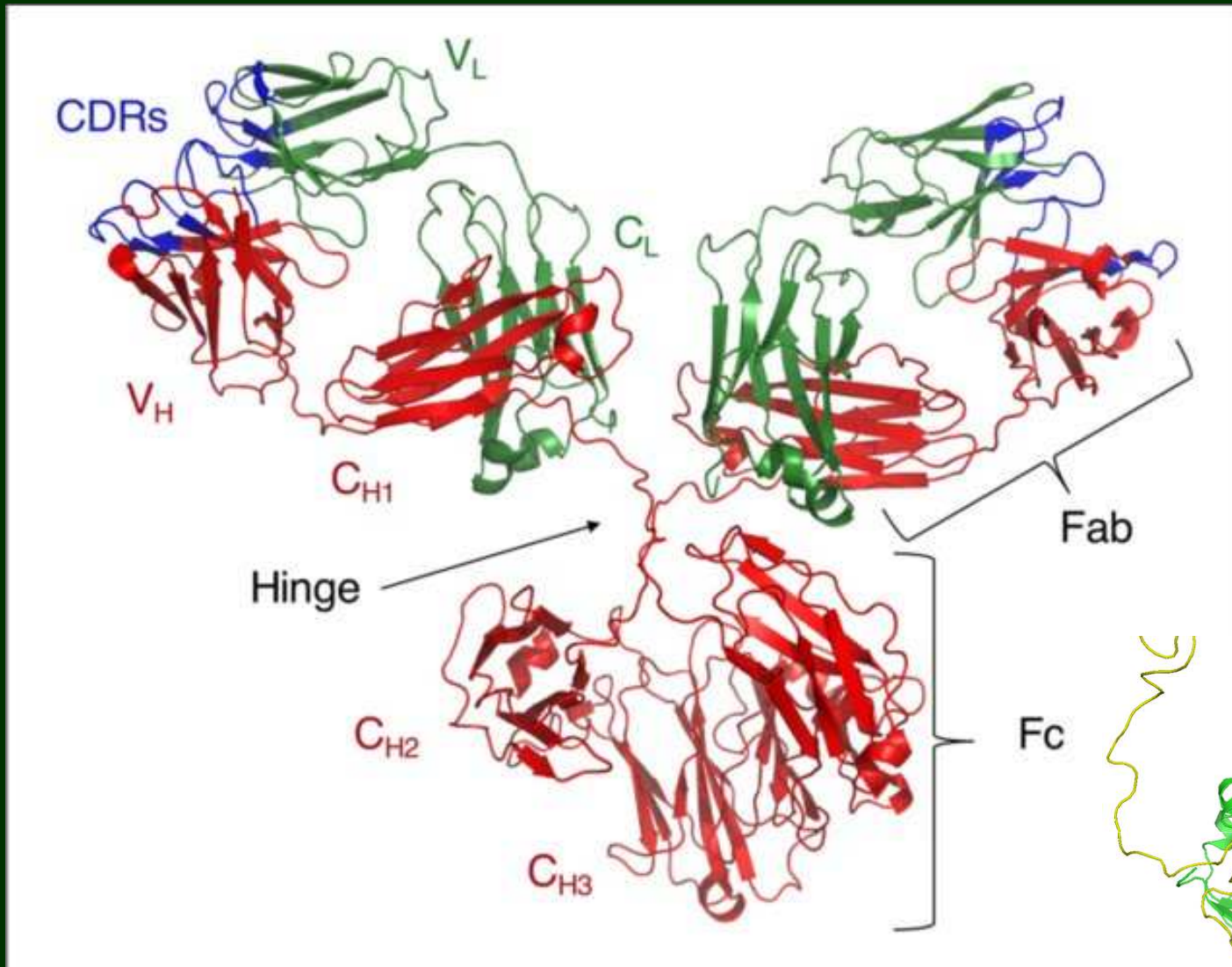
# Humorální a buněčná imunita



Obr. 319

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

# Krystalografická struktura molekuly IgG a vazebného místa



Imunoglobulinové třídy:

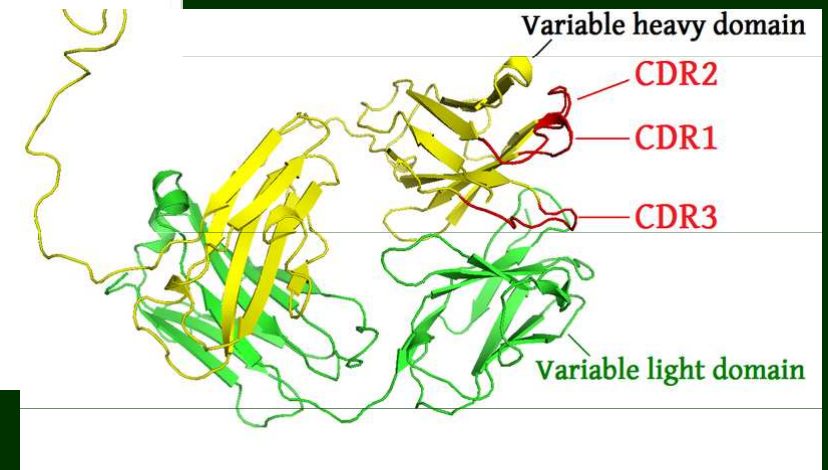
IgG

IgM

IgA

IgD

IgE



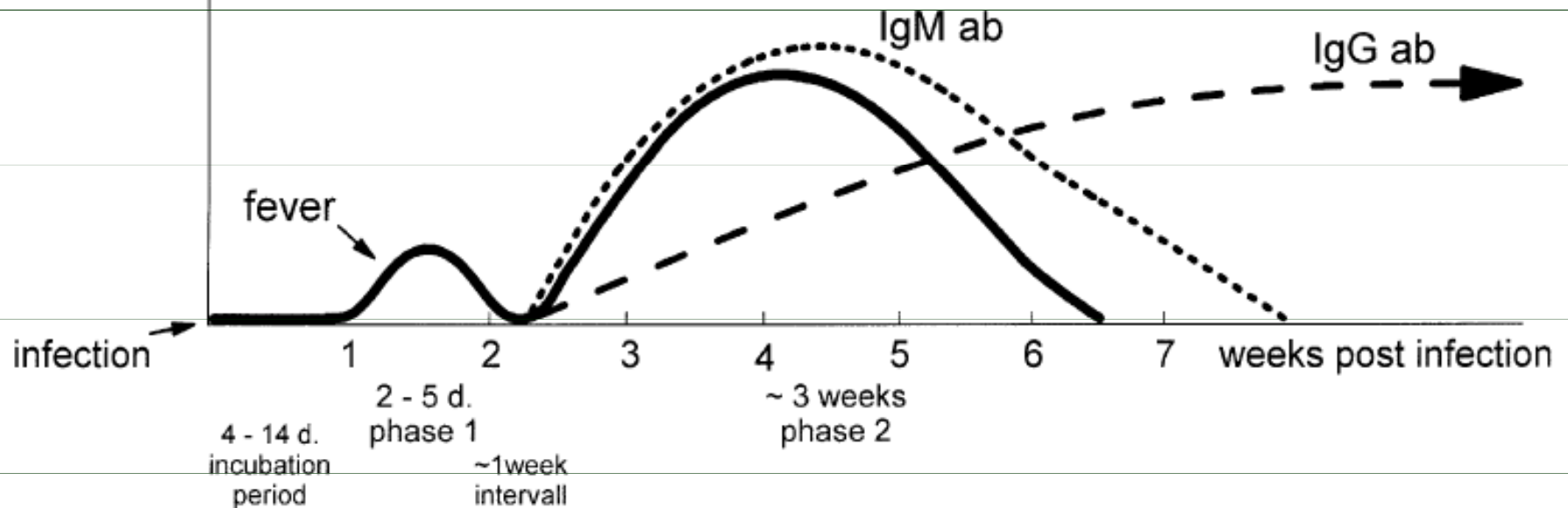
# Imunologická odpověď na přítomnost patogena v organismu (virus klíšťové encefalitidy)

Diagnosis: VIS, PCR ← serological tests →

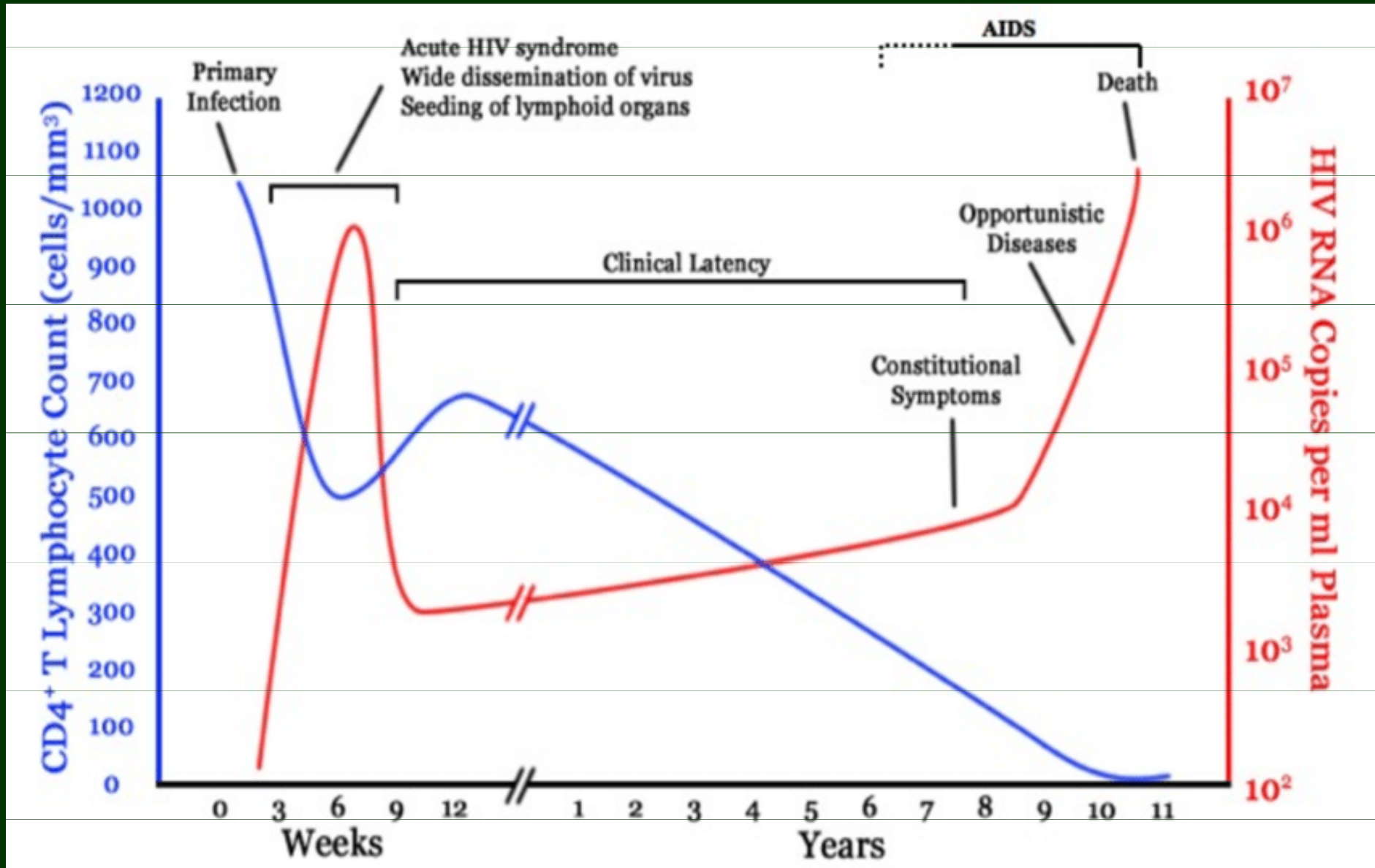
viremia

neurological symptoms

IgM antibodies in CSF

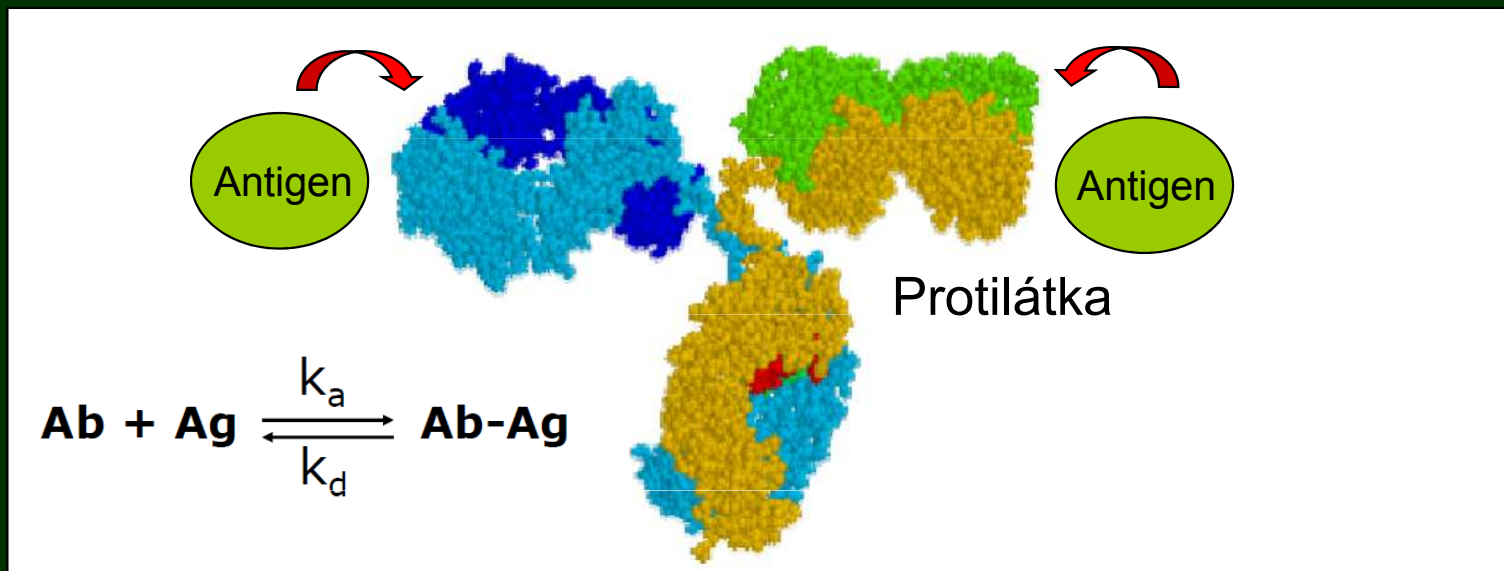


# Imunologická odpověď na přítomnost HIV organismu



# 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

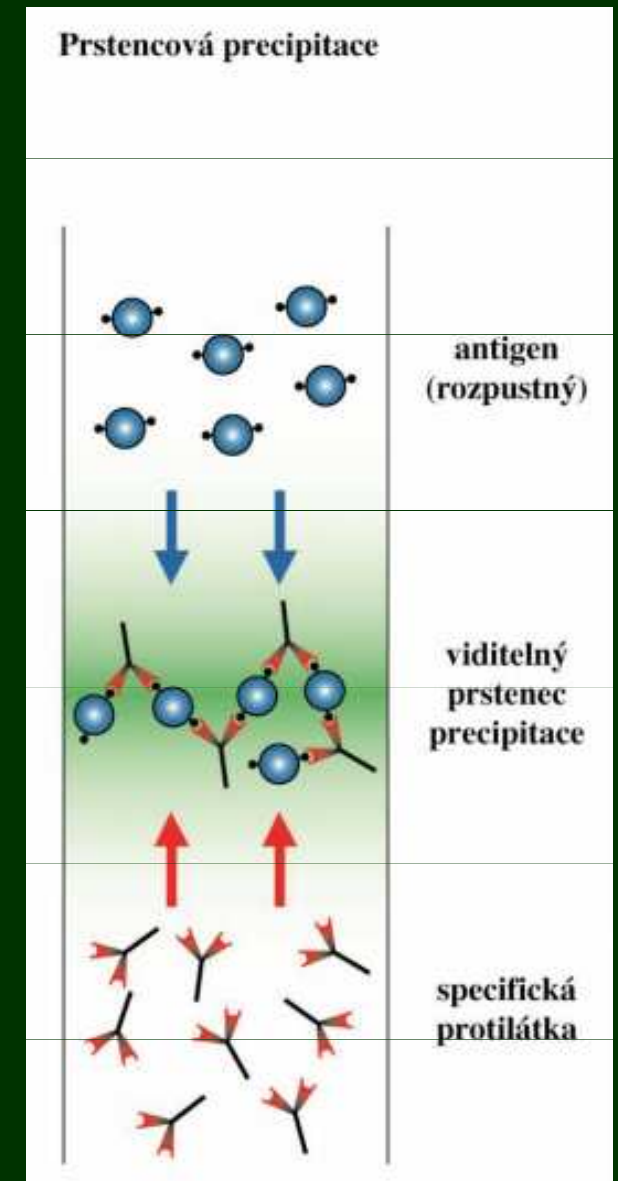
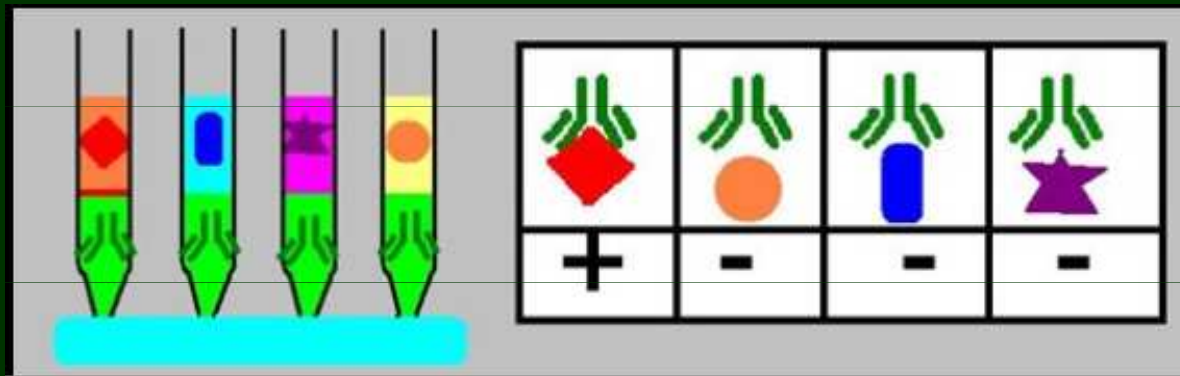
- Precipitační metody
- Aglutinační metody
- Komplement-fixační reakce
- Imunodifuzní metody
- Imunoelektroforetické metody
- Neutralizační testy

# Precipitační metody

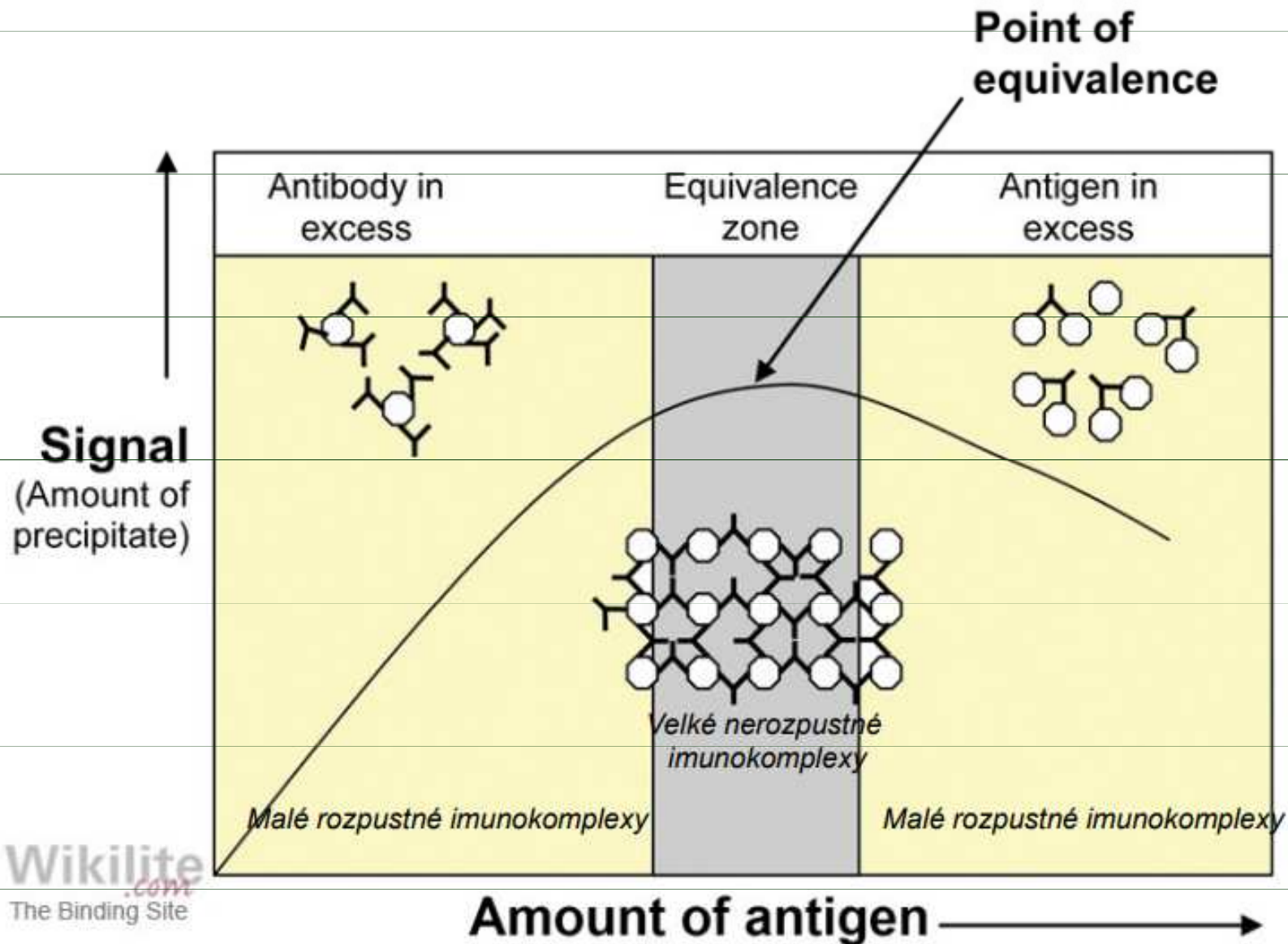
Ag je volná biomolekula, koloidní antigen, protein

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*)

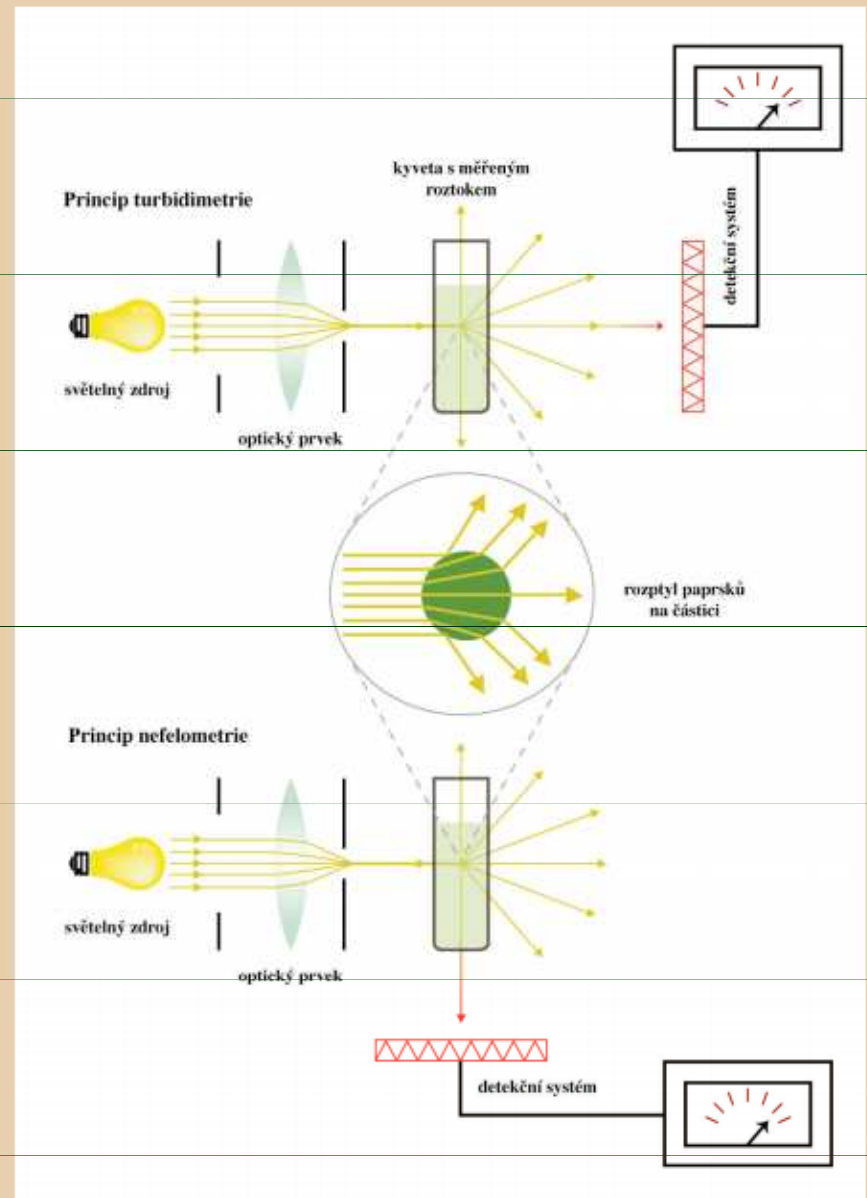
výsledky poskytují velmi rychle

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- $\mu$ g/ml**



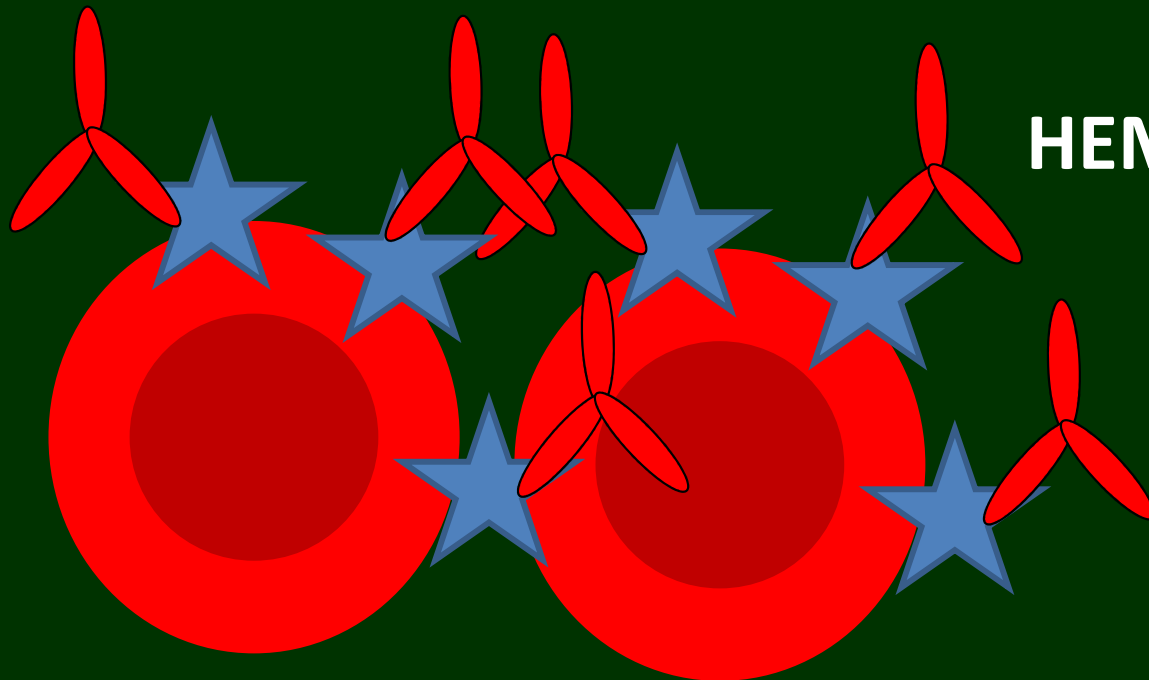
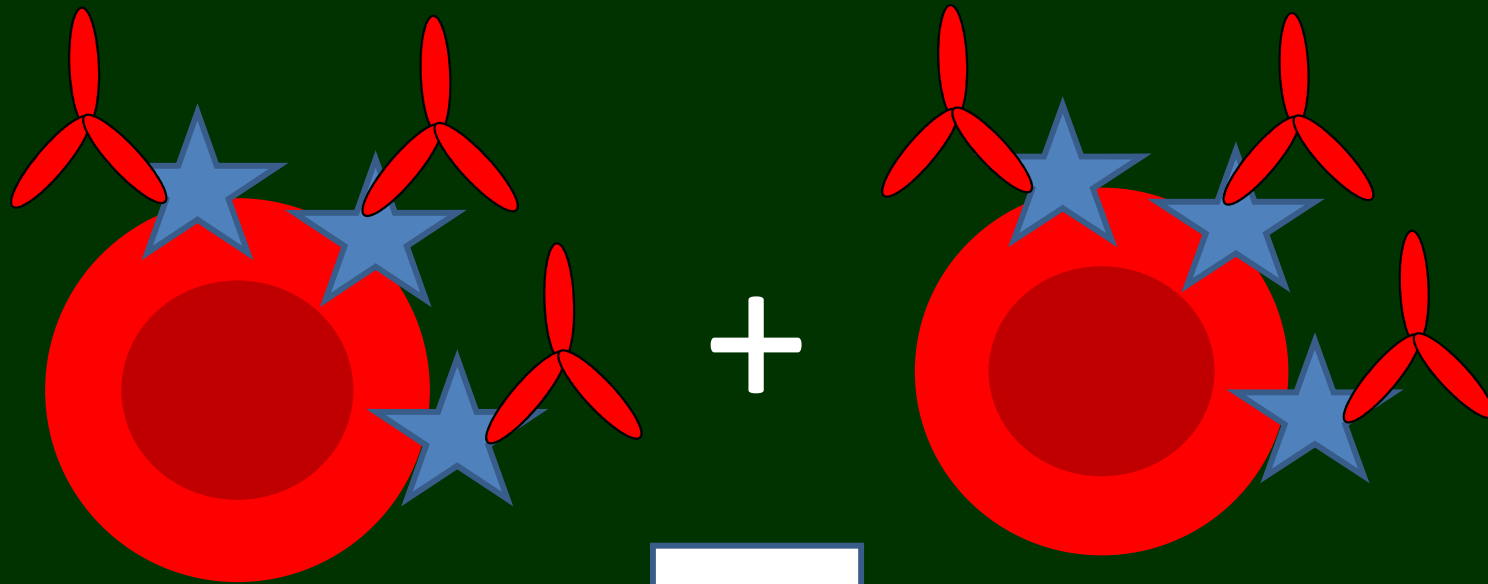
Příklad využití precipitačních metod:

Průkaz protilátek proti syfilis.

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

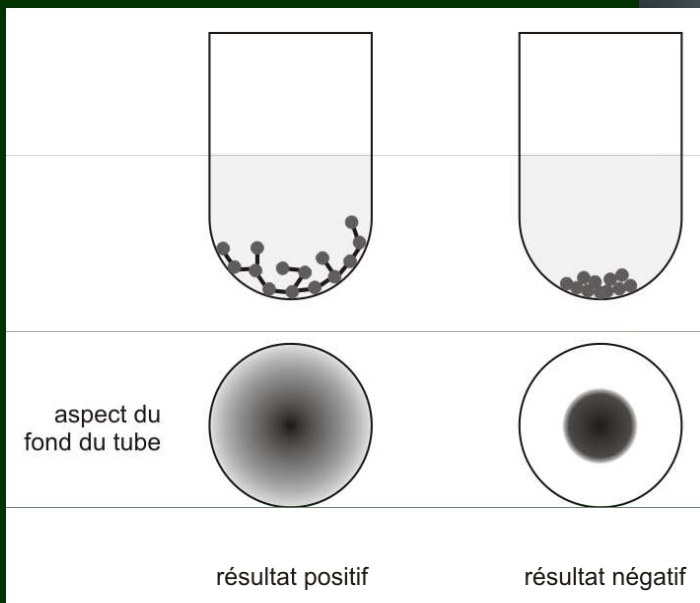
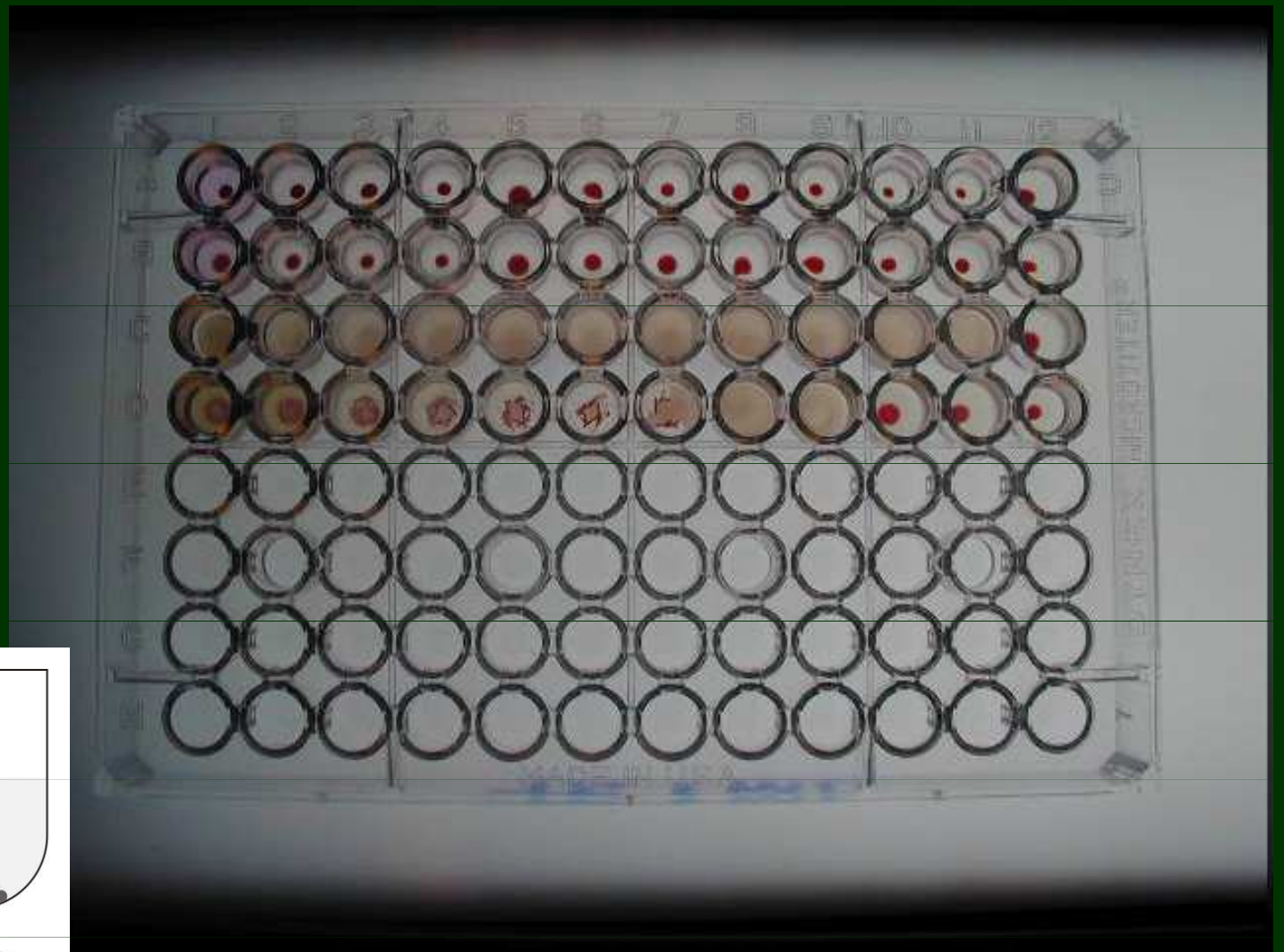
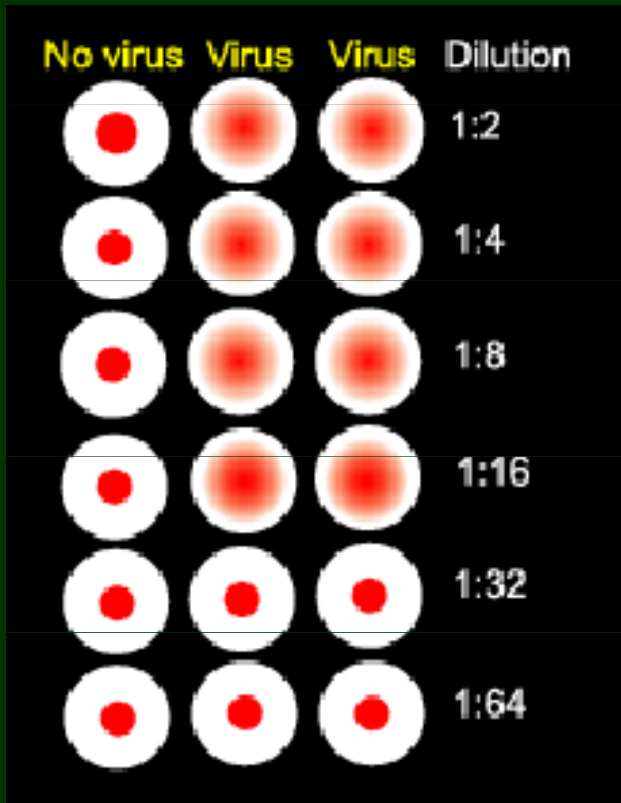
# Aglutinační metody

- 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. erytrocyty.
- Na druhé straně známé aglutinogeny umožňují identifikovat specifické protilátky
- Pokud se jako aglutinogen použijí erytrocyty, jde o hemaglutinační metody.
- Na erytrocyty se můžou pasivně adsorbovat různé rozpustné antigeny a hapteny.
- Když se na erytrocyty, které mají pasivně navázaný antigen, působí specifickým antisérem, nastane jejich aglutinace.
- Latexová aglutinace – latexové částice místo erytrocytů



**HEMAGGLUTINACE**

# Hemaglutinační testy



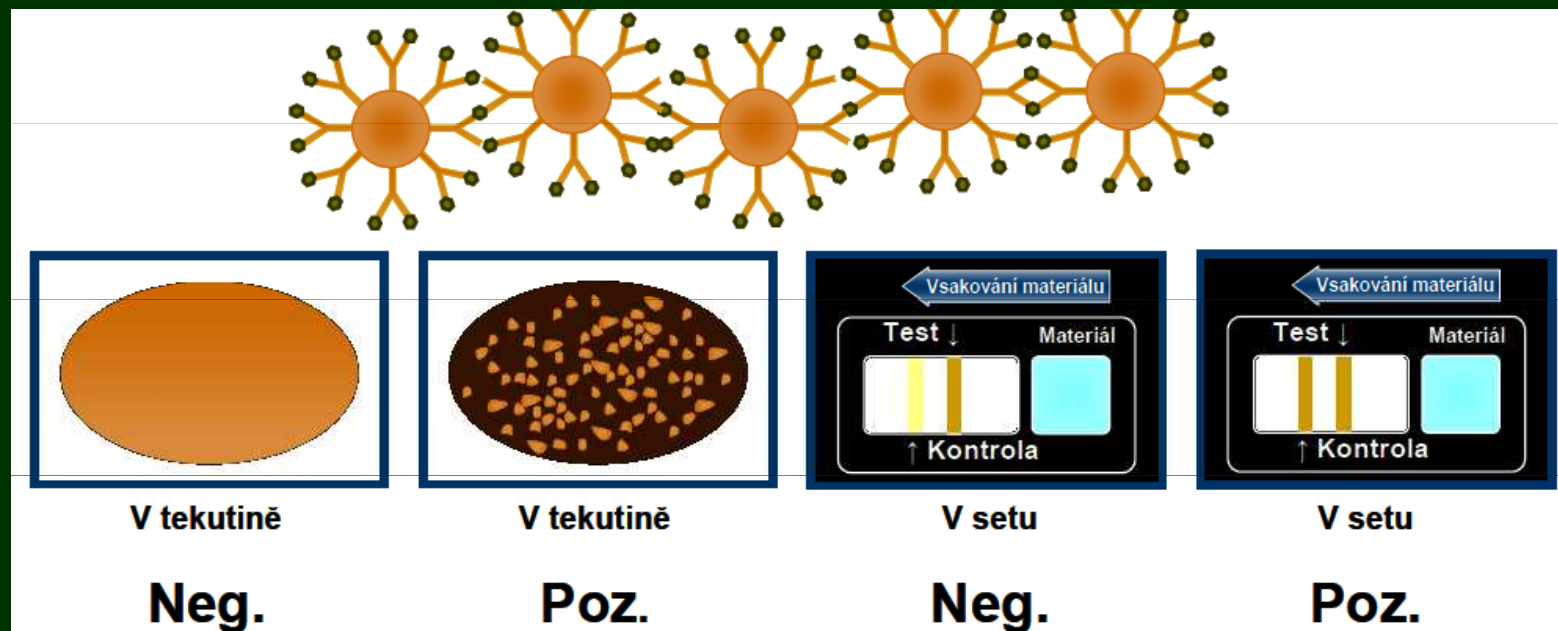


# Latexová aglutinace

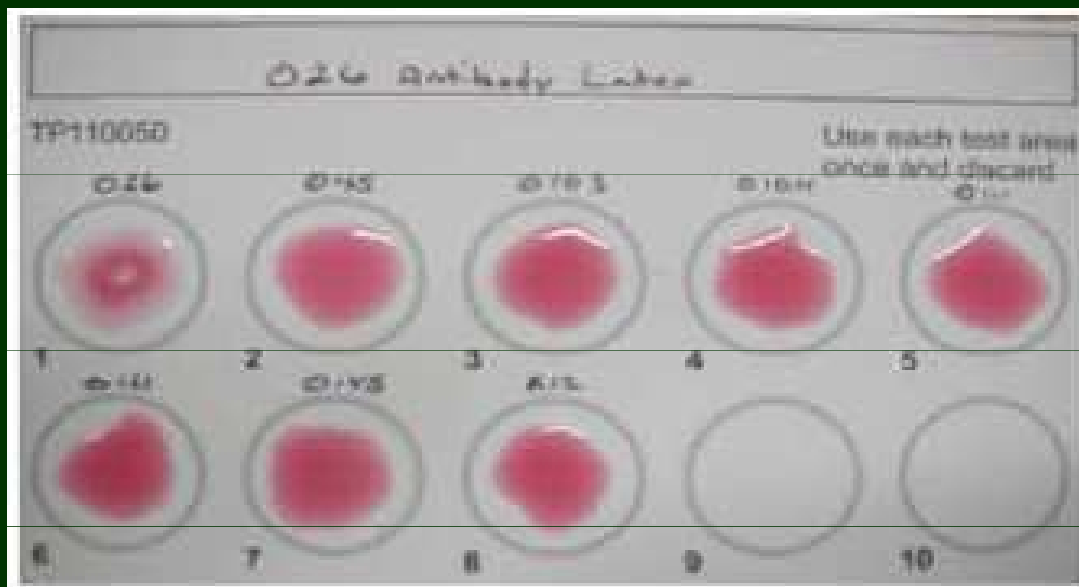


Protilátky jsou vázány na latexové částice. Po smíchání s virem dojde k pouhým okem viditelné aglutinaci latexových částic.

Užití: zejména u průjmových onemocnění (rotaviry, adenoviry)



# Aglutinační testy

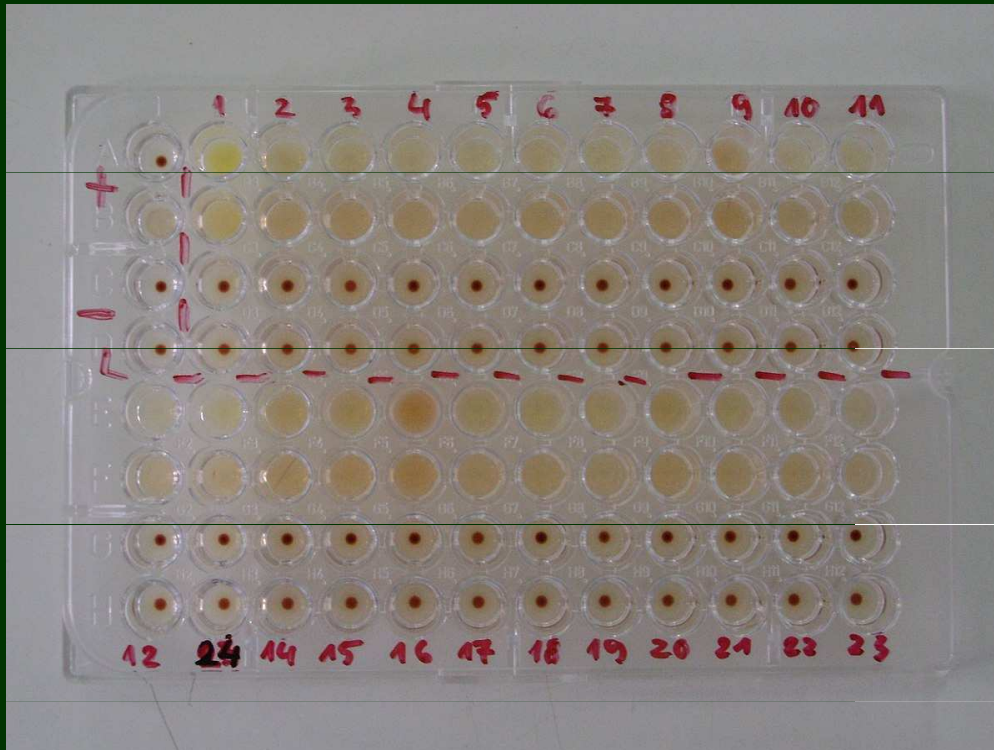


## Komerčně dostupné latexové aglutinační testy pro detekci Shiga toxin produkující E. coli

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 hemoglutinace (TPPH)  
Dnes červené krvinky nahrazeny polycelulózovými částicemi (TPPA)

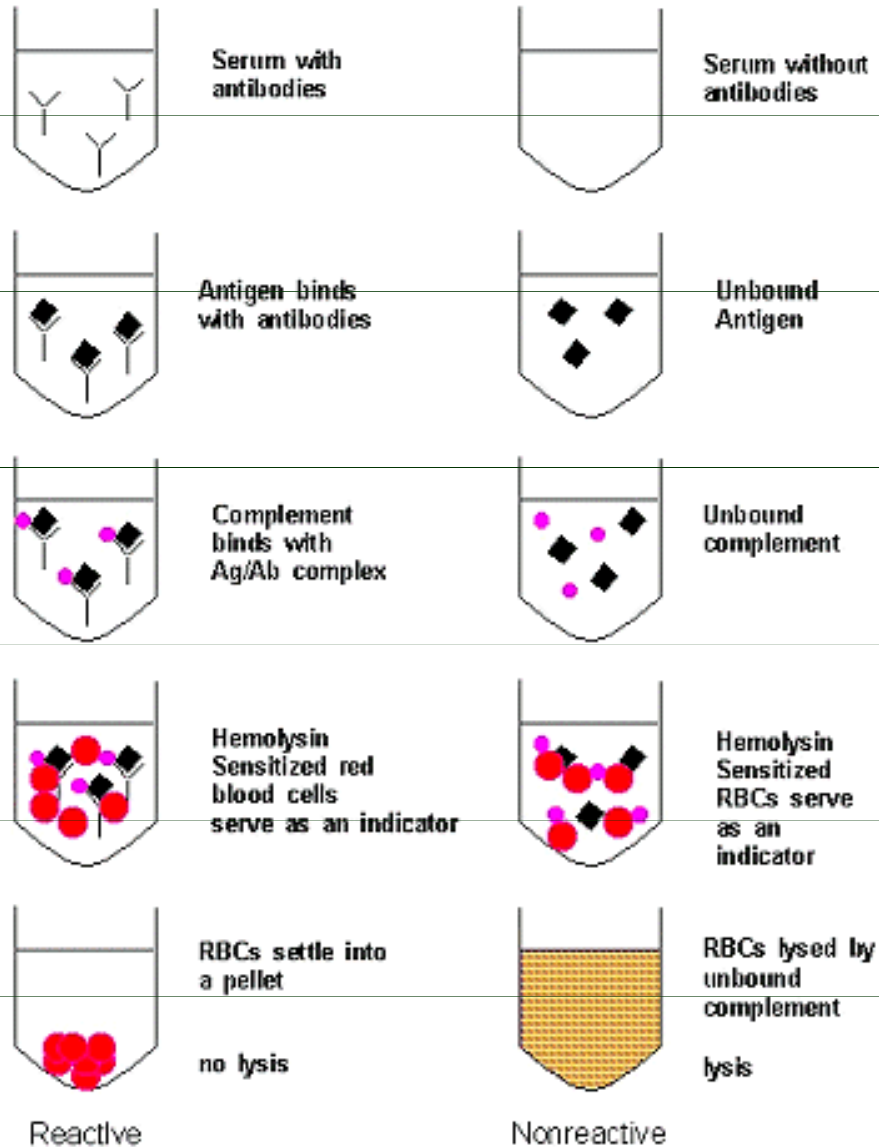


# Komplement-fixační reakce

- 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 nenašel na imunokomplexy (obdoba 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 nespoteboval, 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 erytrocyty a králičí protilátky proti nim)

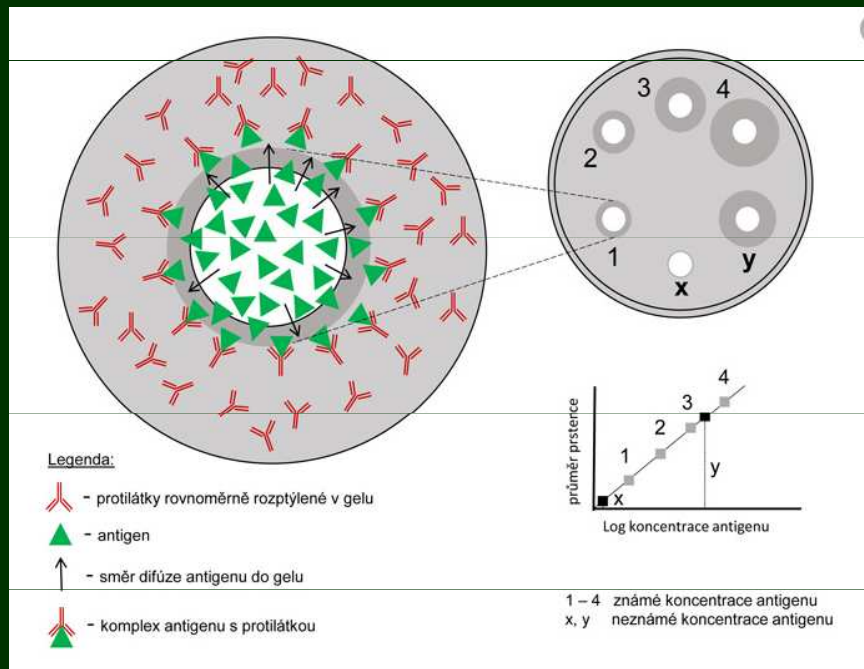
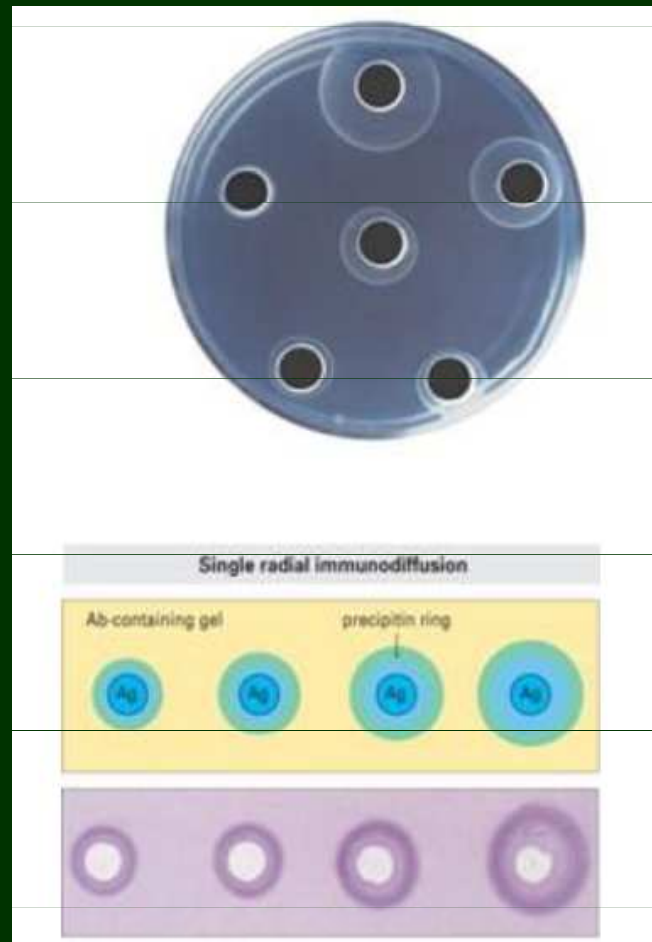
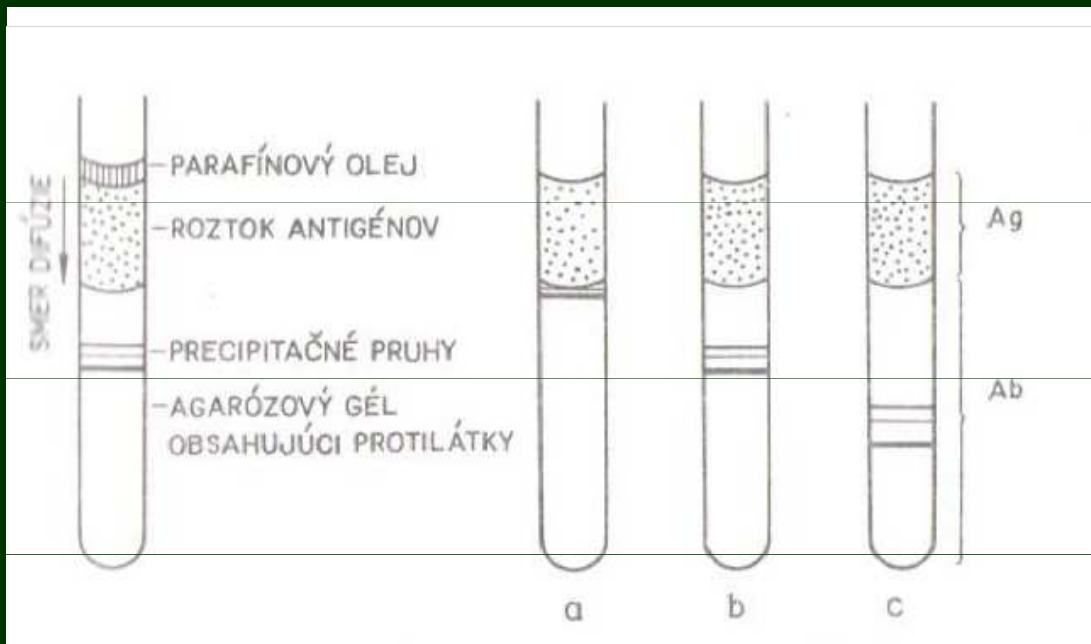
Použití pro testování na přítomnost jakéhokoli antigenu (patogenu) nebo protilátky.

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

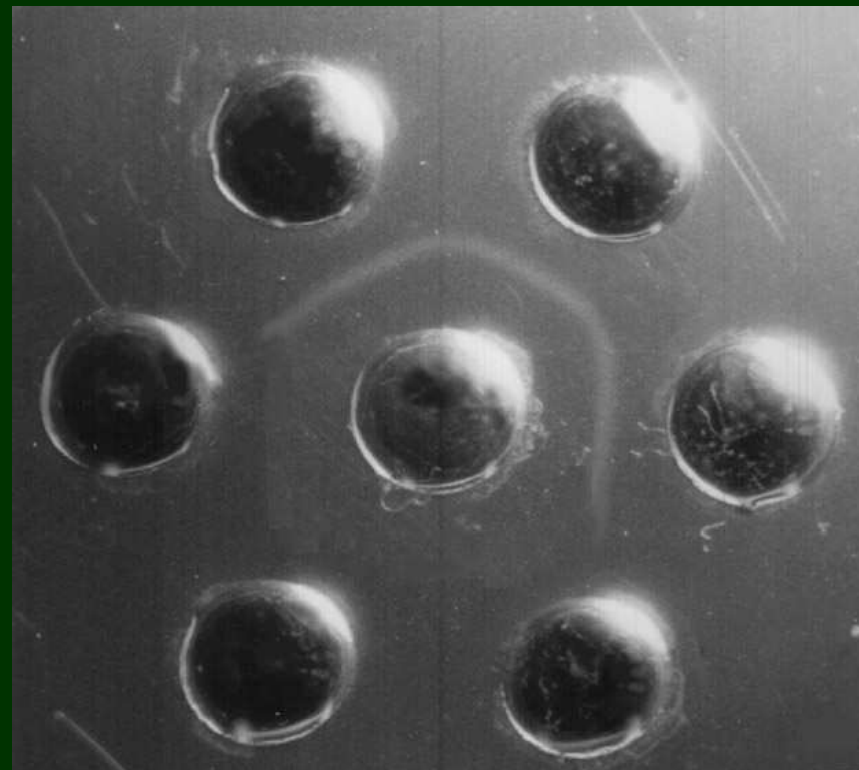
Koncentrační gradient Ag  
Ab rovnoměrně rozptýlena v gelu  
Plocha prstence úměrná konc. Ag  
Kvant. stanovení – kalibrač. křivka

Jednoduchá jednorozměrná imunodifuze

# Dvojitá imunodifuze



Dvojitá jednorozměrná  
imunodifuze

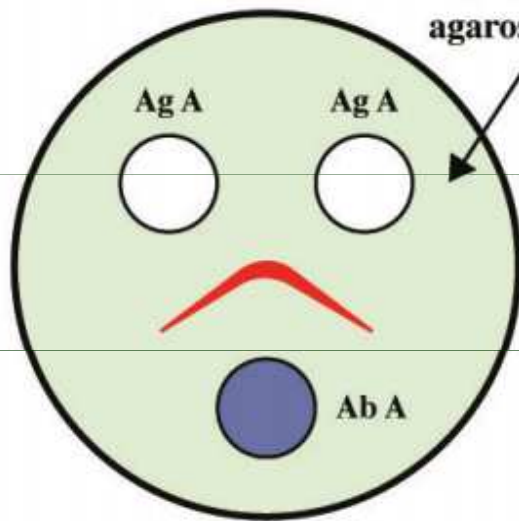


Dvojitá dvojrozměrná  
imunodifuze

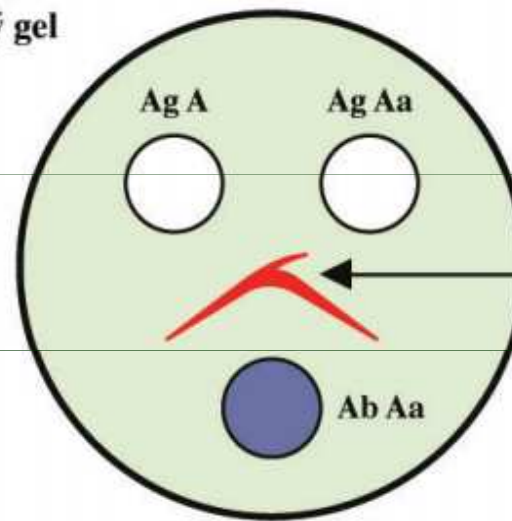
Difundují Ag a Ab proti sobě v gelu  
**Precipitační linie** v bodě ekvivalence  
Posouzení příbuznosti/podobnosti antigenů  
Použití: systémové kandidózy, aspergilózy  
**Kvalitativní stanovení**



1 - 1,5 %  
agarosový gel

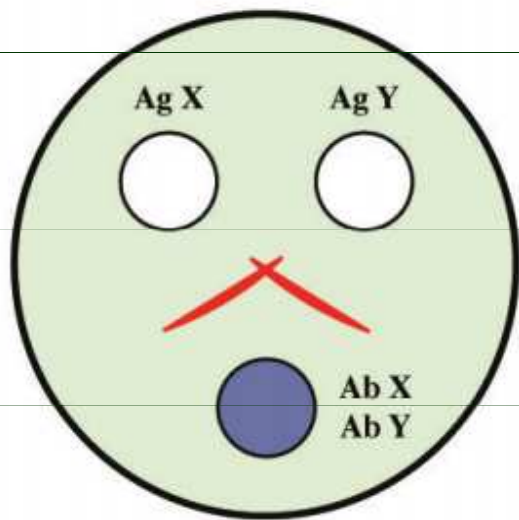


identické antigeny A

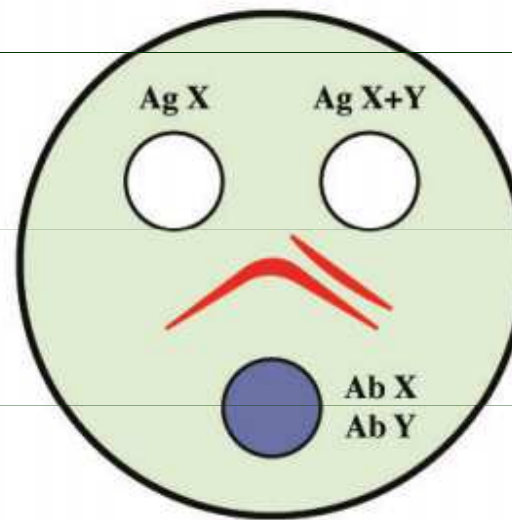


zóna  
koalescence

částečně identické antigeny A, Aa



neidentické antigeny X, Y



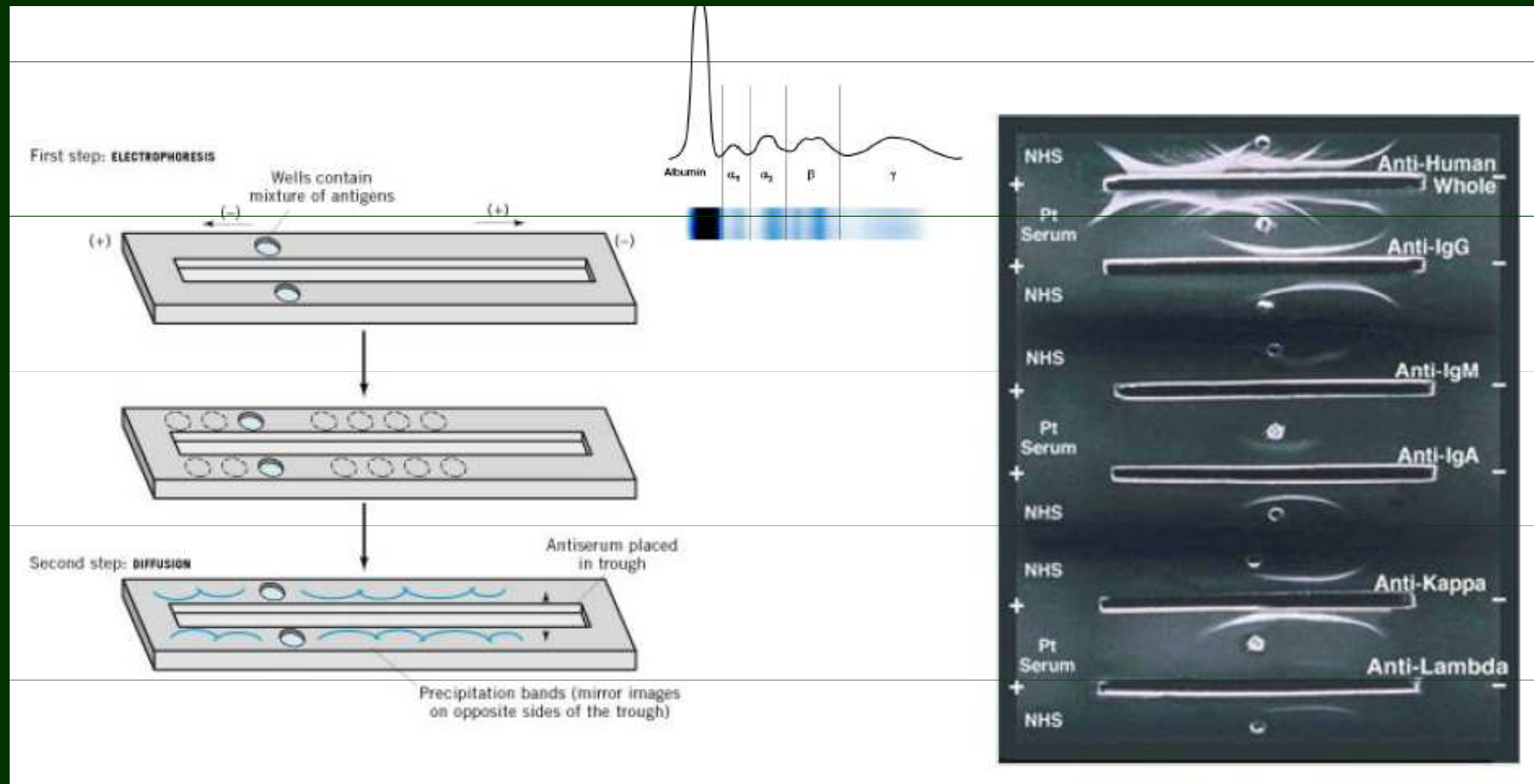
komplexní reakce dvou  
různých antigenů X a Y

# Imunoelektroforéza (Grabar/Williams)

Imunoelektroforéza je kombinací elektroforetického dělení a imunodifuze

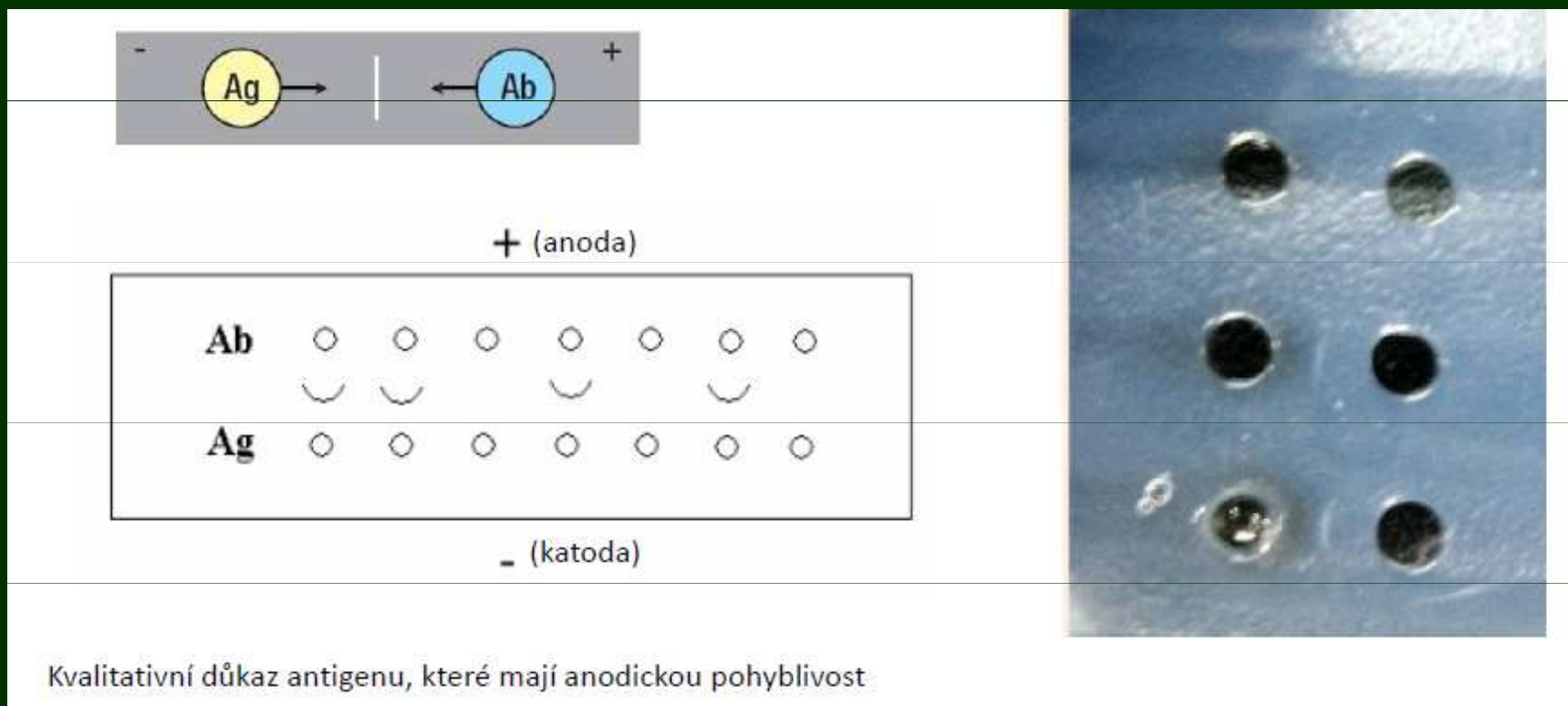
1. fáze: rozdělení proteinů ve stejnosměrném el. poli
2. fáze: imunodifuze a interakce s protilátkou

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



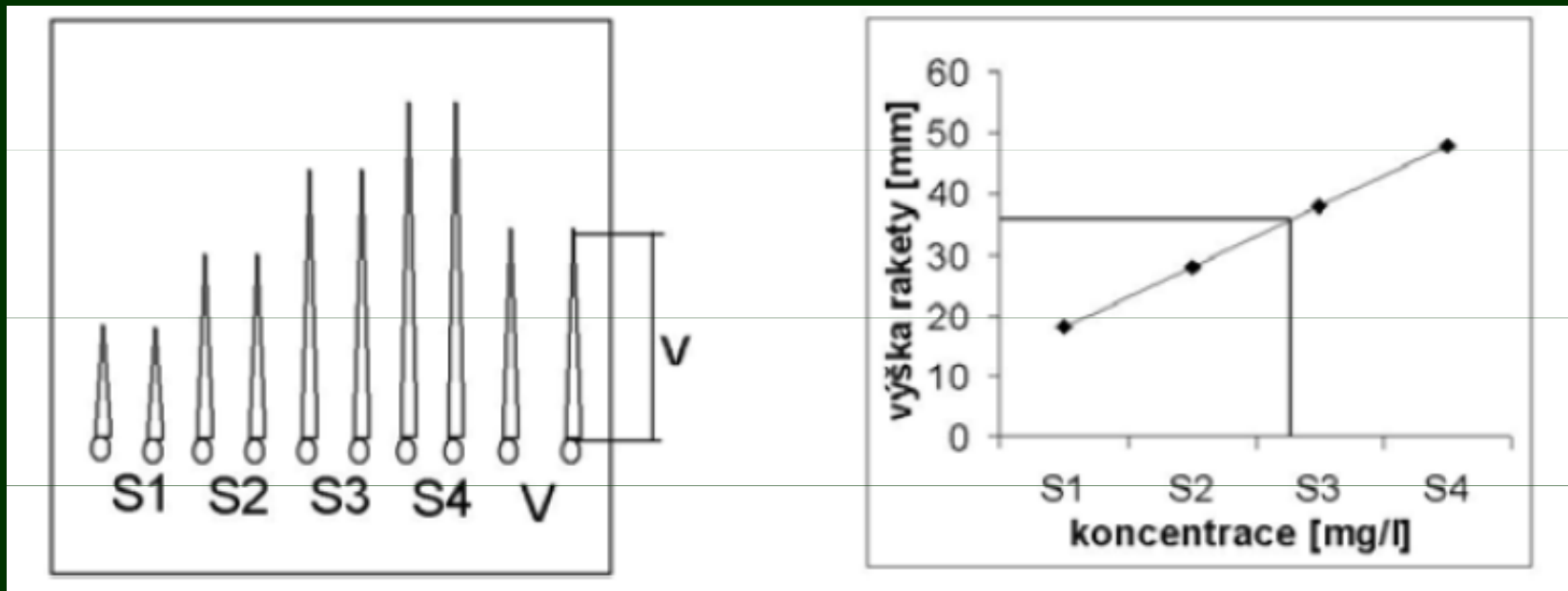
# Protisměrná imunoelektroforéza

- 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

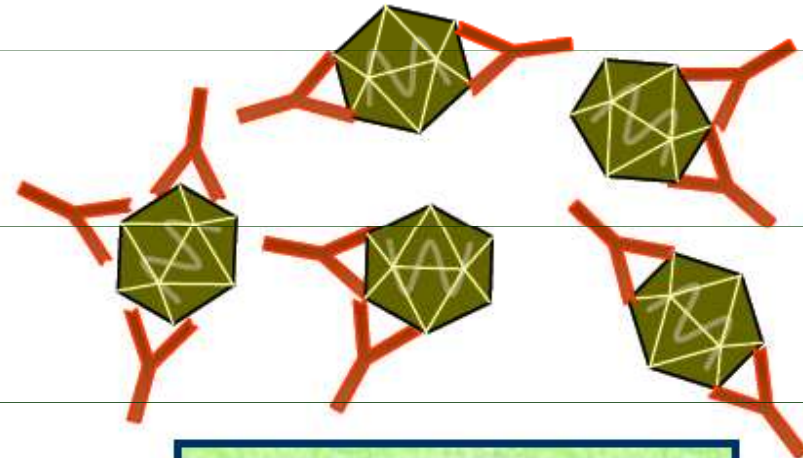
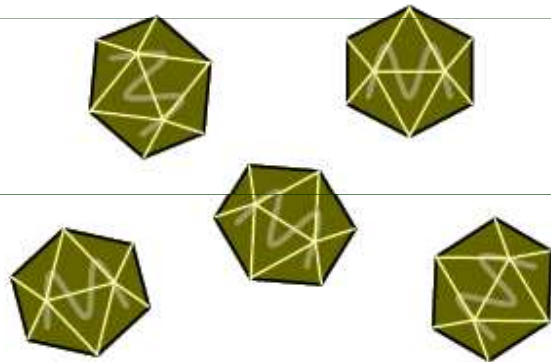


# Raketová imunoelktroforéza

- 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

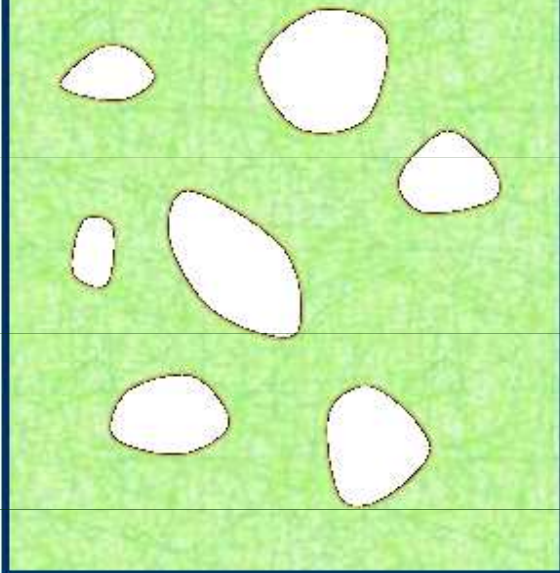


# Virus-neutralizační test



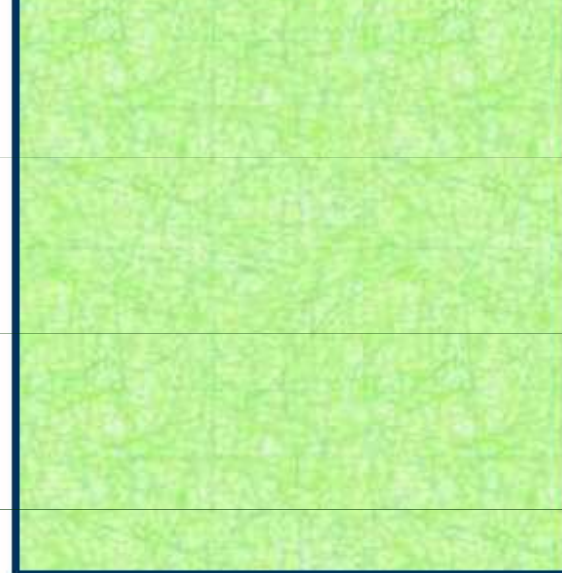
**Tkáňová kultura**

**Množení viru –  
makroskopicky po obarvení**

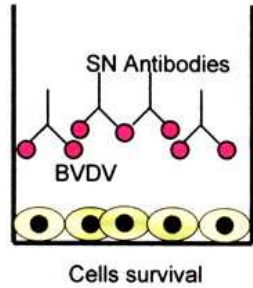


**Tkáňová kultura**

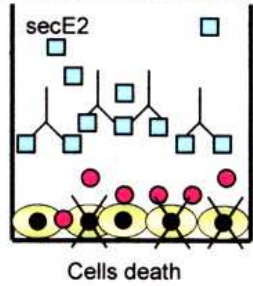
**Virus neutralizován –  
makroskopicky po obarvení**



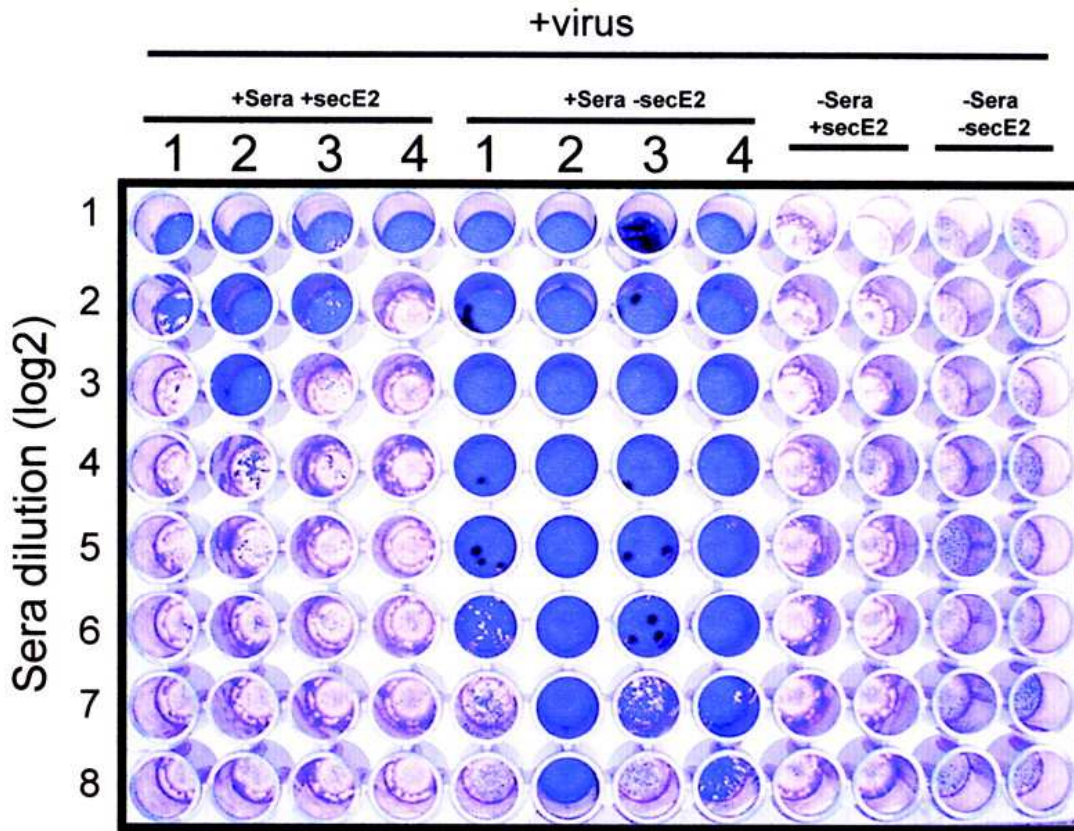
a) Serum Neutralization effect



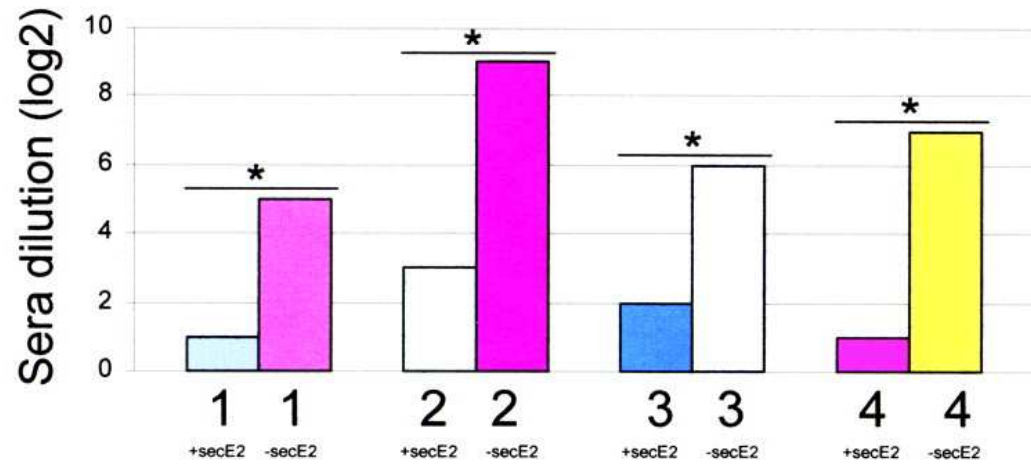
Inhibition of the Serum Neutralization effect



b)



c)



\* =  $P < 0,009$

# Imunonalytické metody

# Imunoanalytické metody

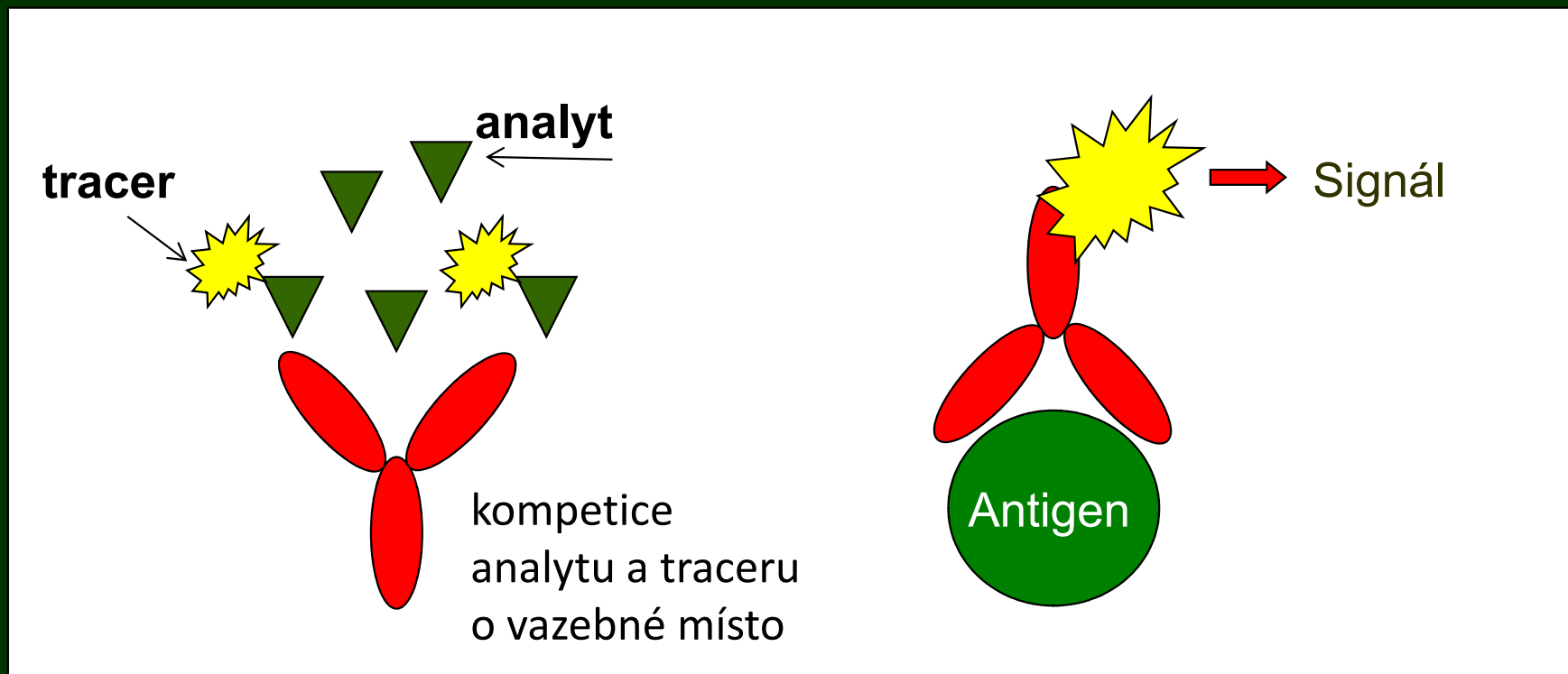
- Radioizotopové metody
- Imunoenzymové metody
  - Fluorescenční metody
- Chemiluminiscenční metody
  - Alternativní metody



# 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)
- $\beta$ -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: - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Substrates OPD (*o*-Phenylenediamine)

Absorption measurement: 492 nm

- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

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

Absorption measurement: 450 nm

- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

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

Absorption measurement: 410 nm (414 nm)

Fluorogenic

Substrate: - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

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

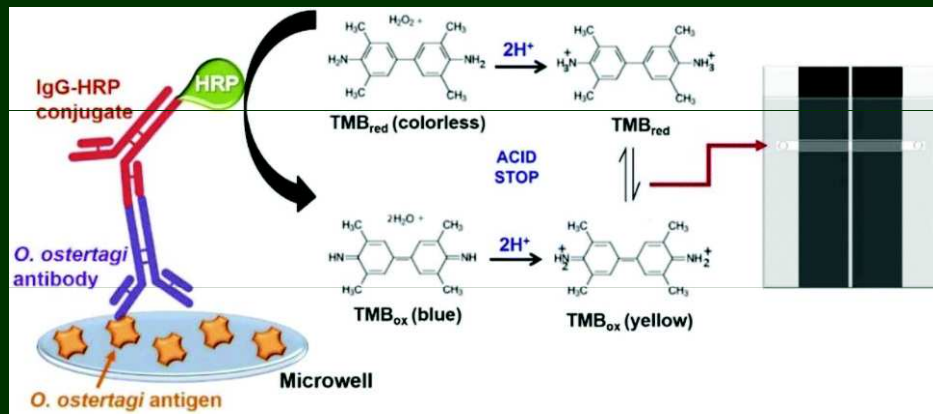
Excitation: 320 nm

Emission: 404 nm

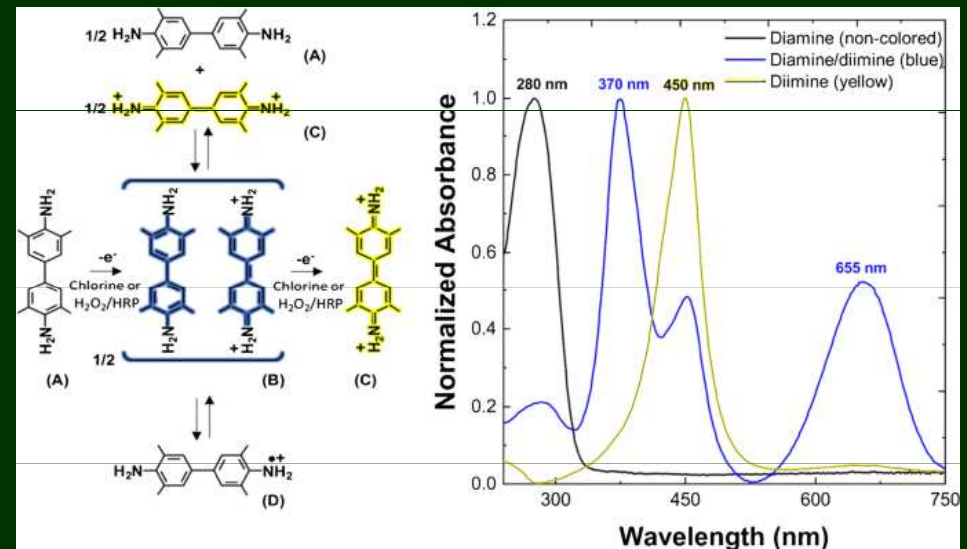
TMB can act as a hydrogen donor for the reduction of hydrogen peroxide to water by peroxidase enzymes such as horseradish peroxidase.

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

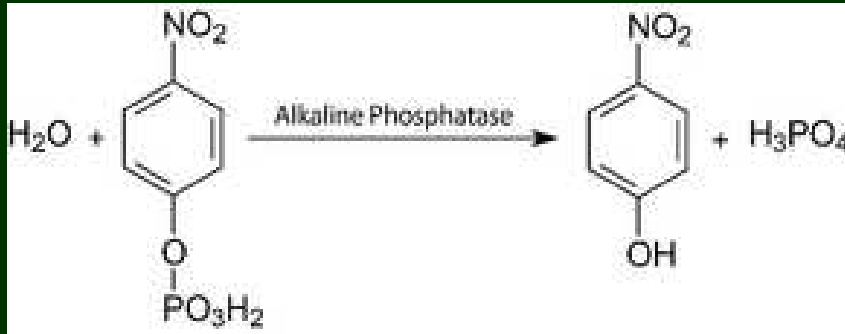
Substrate: 4-MU-P (4-Methylumbelliferylphosphate)

Excitation: 360 nm

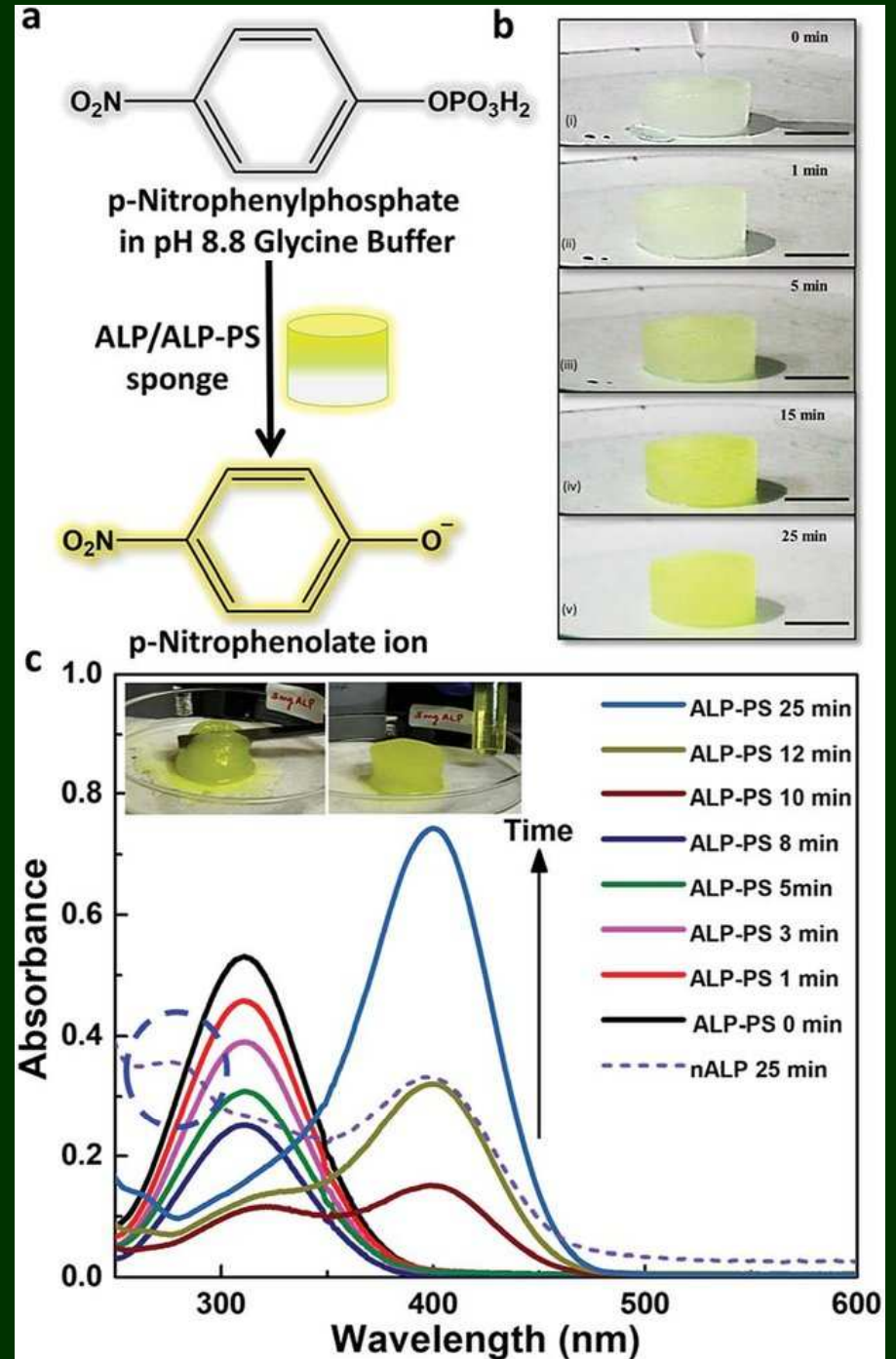
Emission: 450 nm

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

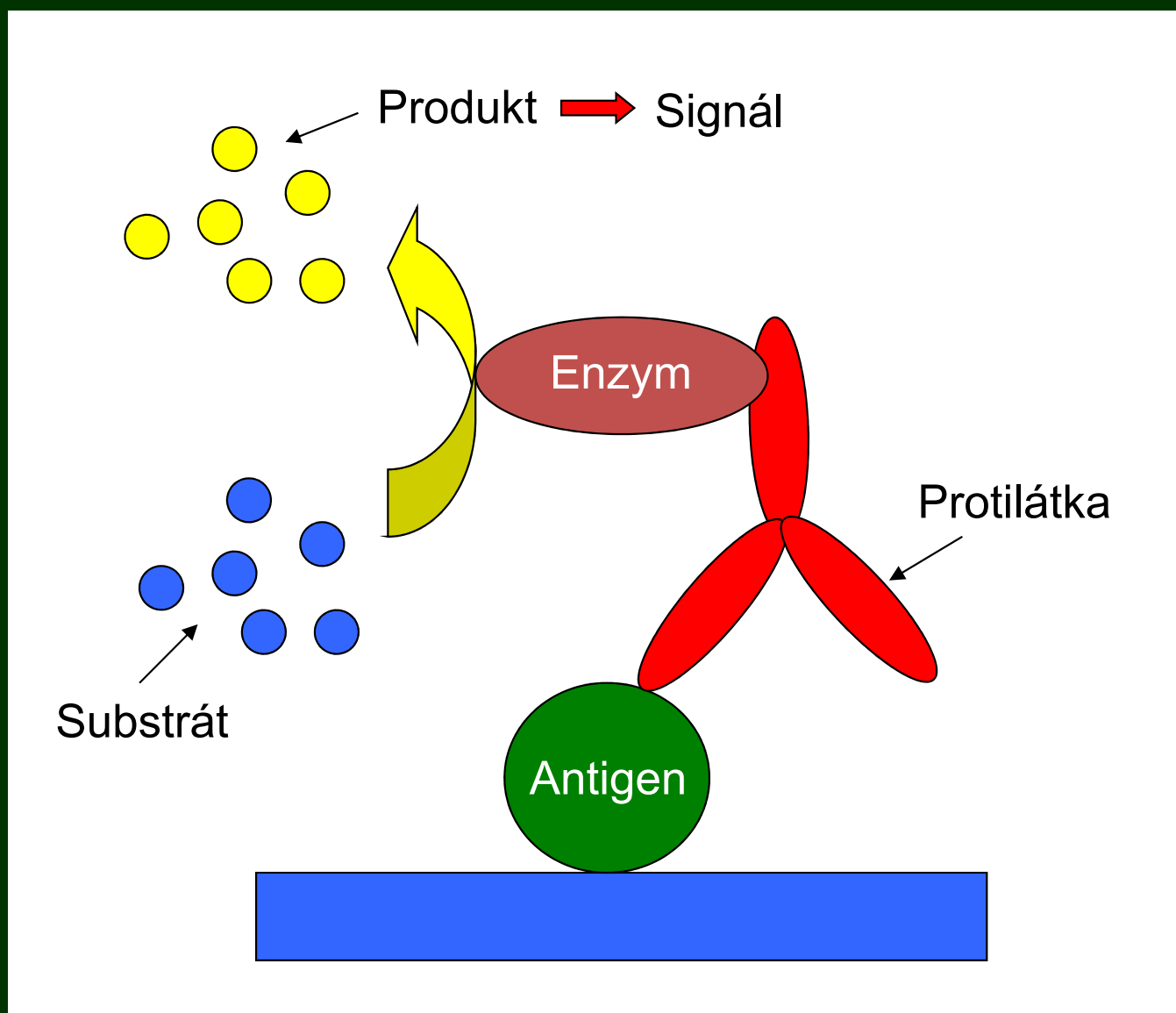


Strips in microtiterplate format

# Nekompetitivní ELISA systémy

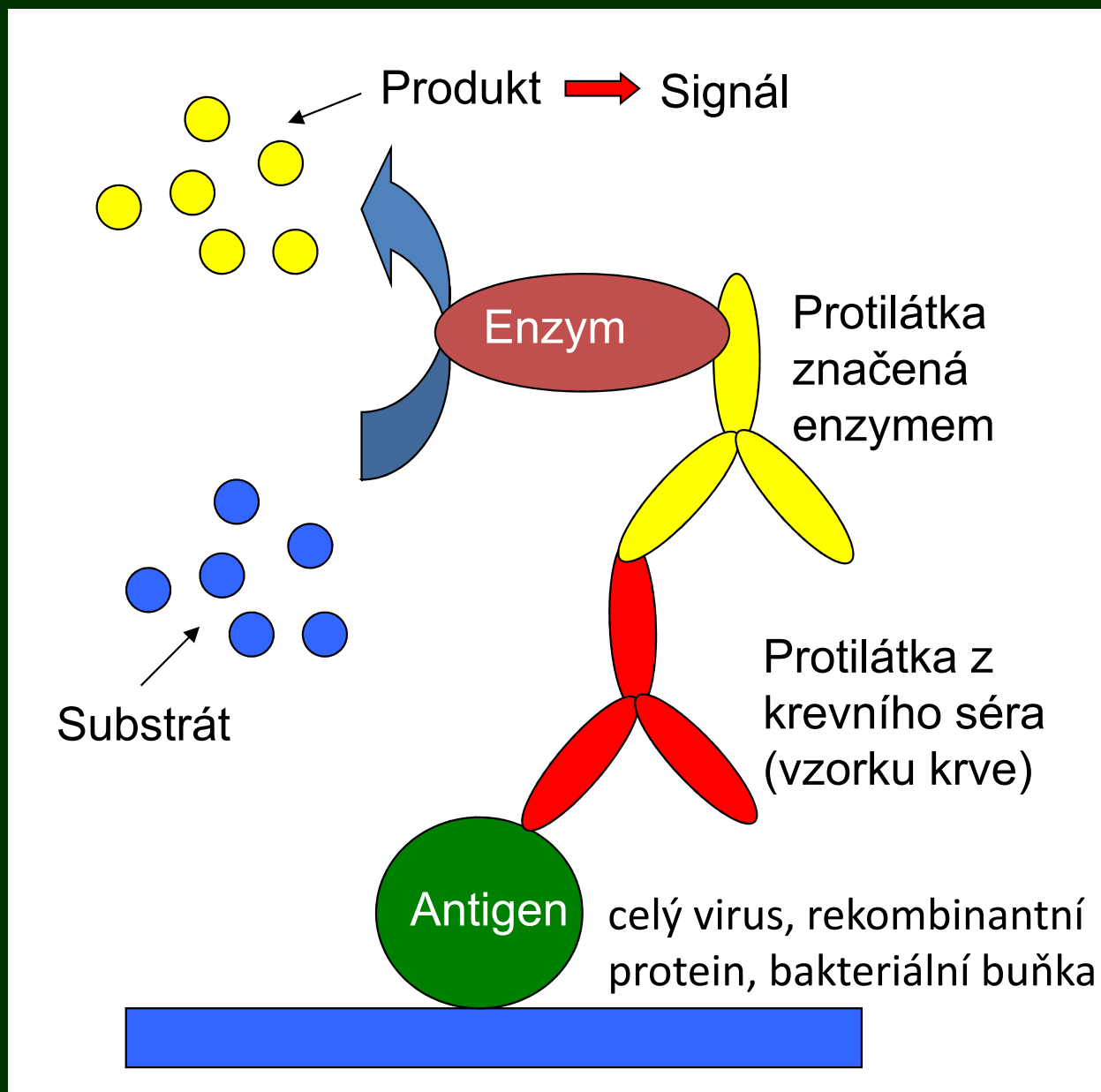
# Přímá nekompetitivní ELISA

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



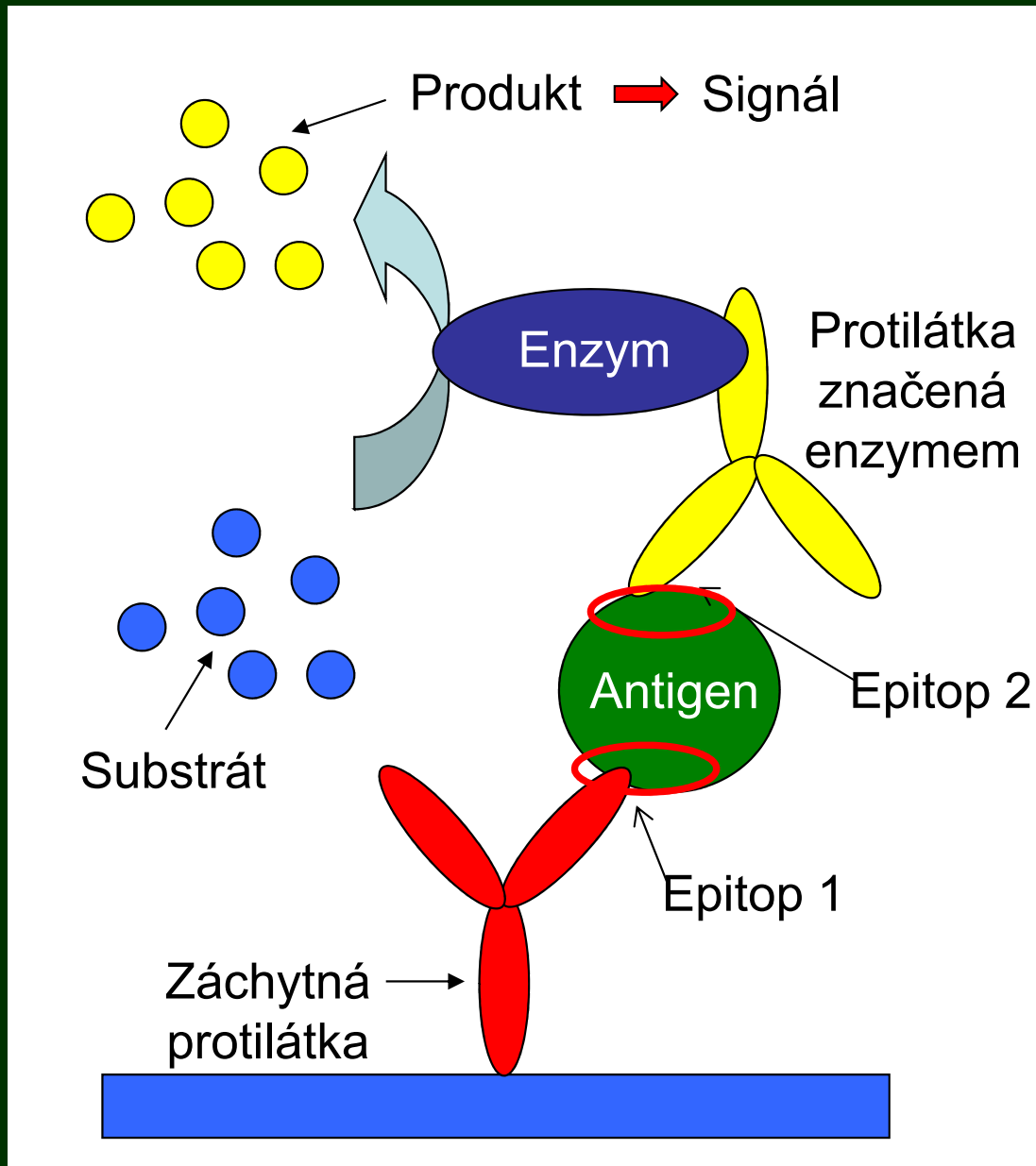
# Nepřímá nekompetitivní ELISA

Pro sérologická stanovení protilátek.



# Sandwich ELISA

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

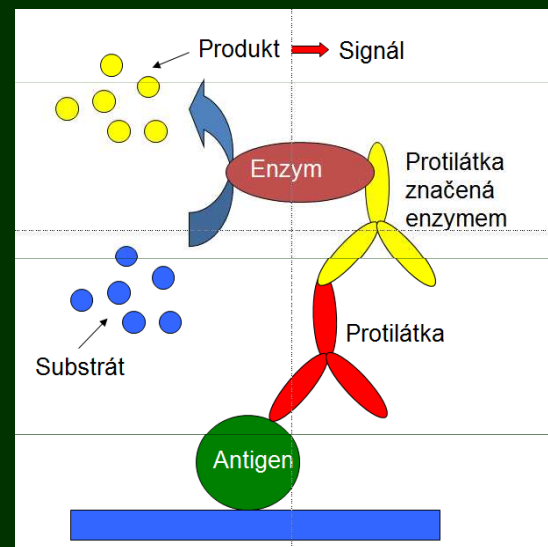
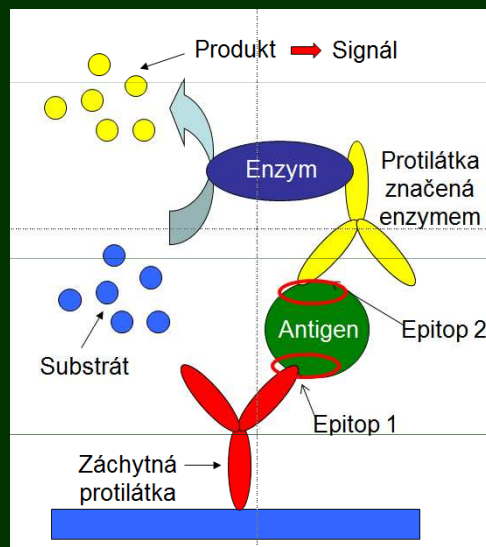


Při velkých antigenech (virová částice, bakteriální buňka) možno Epitop 1 = Epitop 2

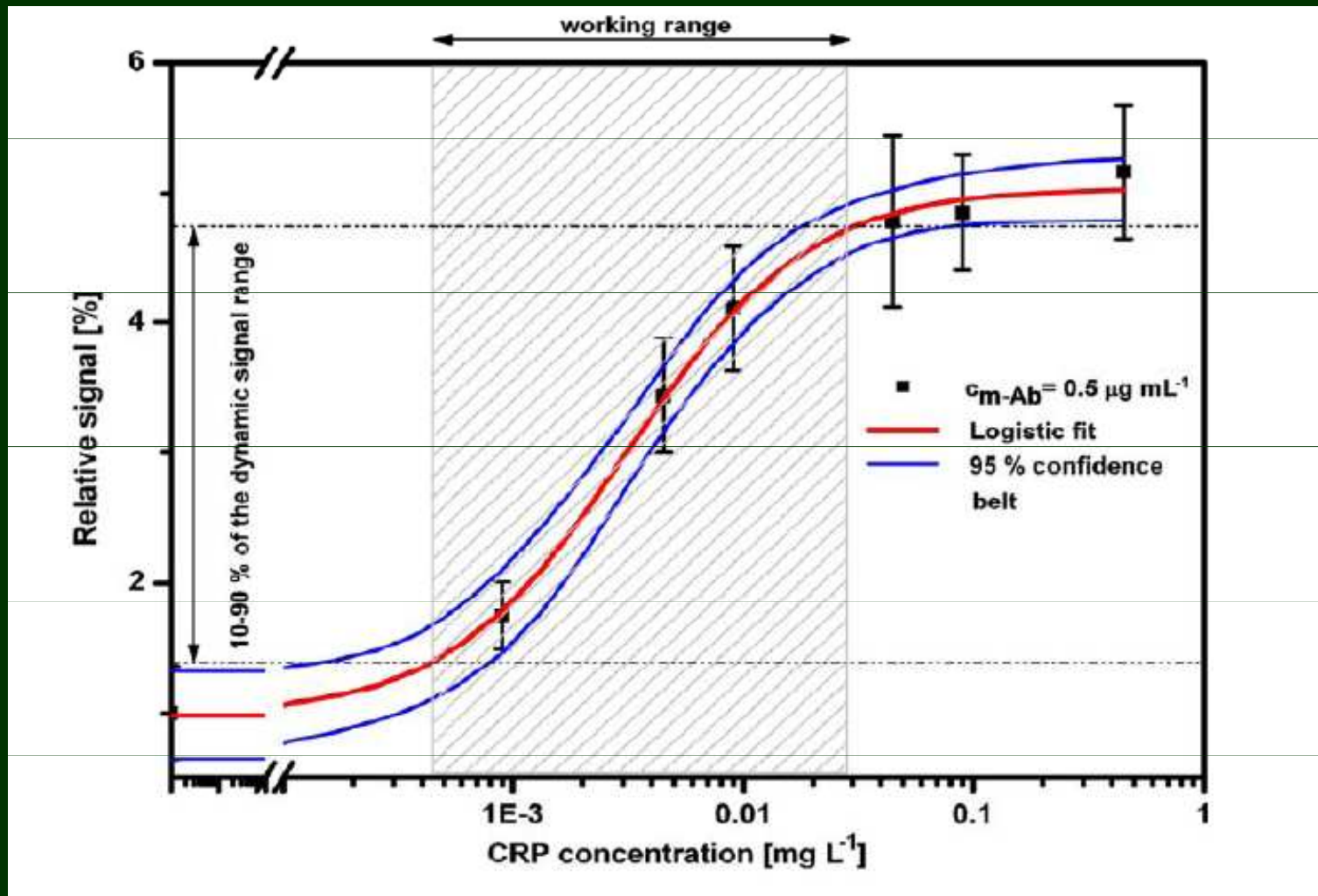
Při antigenech typu protein nebo haptén-proteinový konjugát Epitop 1  $\neq$  Epitop 2

# Stanovení

- mikrobiální antigen = přítomnost mikroorganismu v daném prostředí (např. v krvi pacienta, ve vzorku potravin, ve vzorku životního prostředí) – Přímé stanovení (méně časté)
- specifickou protilátkou 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
Immunozyt	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<sup>a</sup>

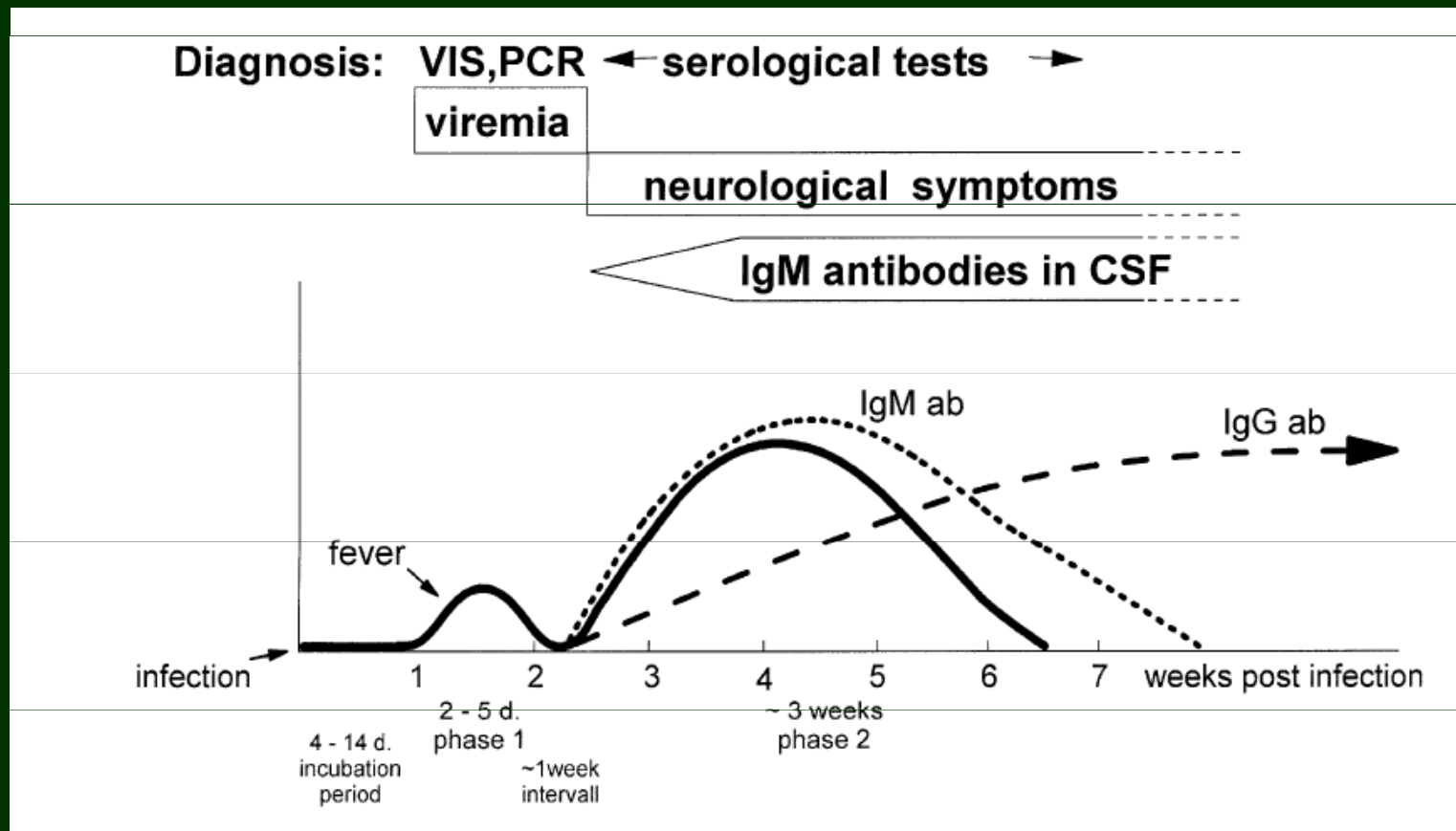
Test system	TBEV +(Inf) [n = 109]	TBEV +(vac) [n = 30]	YF+ [n = 24]	Dengue+ [n = 13]
Serion classic	100 (92%)	28 (93%)	19 (79%)	13 (100%)
Vir-ELISA	94 (86%)	8 (27%)	1 (4%)	6 (46%)
Immunozyt	94 (86%)	21 (70%)	10 (42%)	9 (69%)
FSME-ELISA	107 (98%)	30 (100%)	7 (29%)	13 (100%)
Enzygnost	88 (81%)	29 (97%)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

<sup>a</sup> 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

(Niedrig, 2000)

# 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)
<a href="#">KA2091</a>	<p><b><u>Bordetella pertussis IgA/IgM ELISA Kit</u></b></p> <p>✖✖</p> <p><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
<a href="#">KA2090</a>	<p><b><u>Bordetella pertussis IgG ELISA Kit</u></b></p> <p>✖✖</p> <p><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
<a href="#">KA1282</a>	<p><b><u>Borrelia burgdorferi IgG ELISA Kit</u></b></p> <p>✖✖</p> <p><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
<a href="#">KA2081</a>	<p><b><u>Chlamydia pneumoniae IgA ELISA Kit</u></b></p> <p>✖✖</p> <p><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
<a href="#">KA1466</a>	<p><b><u>Borrelia IgG ELISA Kit</u></b></p> <p>✖✖</p> <p><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
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	
			AE-320800-40 (40 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
▼ Product Line				
LSIVet™ (34)	<a href="#">LSIVet™ Avian IBD Serum ELISA Kit</a>	VETIBD5I	5 x 96 well plates	
	<a href="#">LSIVet™ Avian IBV Serum ELISA Kit</a>	VETIBV5I	5 x 96 well plates	
▼ Species				
All Sensitive Animals (5)	<a href="#">LSIVet™ Avian NDV Serum ELISA Kit</a>	VETNDV5I	5 x 96 well plates	
Cattle/Bovine (17)	<a href="#">LSIVet™ BVD/BD Antigen Skin LeucoC Organs ELISA Kit</a>	VETBVDAG1	1 x 96 well plate	
Goat/Caprine (16)	<a href="#">LSIVet™ BVD/BD Antigen Skin LeucoC Organs ELISA Kit</a>	VETBVDAG5	5 x 96 well plates	
Poultry (3)				
Sheep/Ovine (16)	<a href="#">LSIVet™ Bovine IBR Screening Serum ELISA Kit</a>	IBRS10	10 x 96 well plates	
Swine/Porcine (9)				
Turkey (3)	<a href="#">LSIVet™ Bovine IBR Screening Serum ELISA Kit</a>	IBRS5	5 x 96 well plates	
▼ Target Organism				
<i>A. pleuropneumoniae</i> (1)	<a href="#">LSIVet™ Bovine Neosporosis Advanced Serum ELISA Kit</a>	LSINEOA2	2 x 96 well plates	
Bluetongue Virus (BTV) (1)	<a href="#">LSIVet™ Bovine Neosporosis Advanced Serum ELISA Kit</a>	LSINEOA5	5 x 96 well plates	
Border Disease Virus (BDV) (5)	<a href="#">LSIVet™ Bovine PI3 Serum ELISA Kit</a>	SPIV2	1 x 96 well plate	
Bovine Coronavirus (BCV) (1)				
Bovine Herpesvirus 1 (BHV-1) (2)	<a href="#">LSIVet™ Porcine <i>A. pleuropneumoniae</i> Serum ELISA Kit</a>	VETAPP5I	5 x 96 well plates	
Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) (5)	<a href="#">LSIVet™ Porcine Aujeszky gB Serum ELISA Kit</a>	PRVGB2I	2 x 96 well plates	
<i>C. burnetii</i> (2)	<a href="#">LSIVet™ Porcine Aujeszky gB Serum ELISA Kit</a>	PRVGB5I	5 x 96 well plates	
<a href="#">+ More</a>	<a href="#">LSIVet™ Porcine Aujeszky gE Serum ELISA Kit</a>	PRVGE2C	2 x 96 well plates	
▼ Validated Application				
ELISA (34)	<a href="#">LSIVet™ Porcine Aujeszky gE Serum ELISA Kit</a>	PRVGE2I	2 x 96 well plates	
	<a href="#">LSIVet™ Porcine Aujeszky gE Serum ELISA Kit</a>	PRVGE5C	5 x 96 well plates	
	<a href="#">LSIVet™ Porcine Aujeszky gE Serum ELISA Kit</a>	PRVGE5I	5 x 96 well plates	
	<a href="#">LSIVet™ Porcine PRRS/EU Confirmation Serum ELISA Kit</a>	PRRSBI5	240 tests	
	<a href="#">LSIVet™ Porcine PRRS/EU Serum ELISA Kit</a>	VETPRE5I	5 x 96 well plates	

# Kompetitivní ELISA systémy



# Kompetitivní ELISA

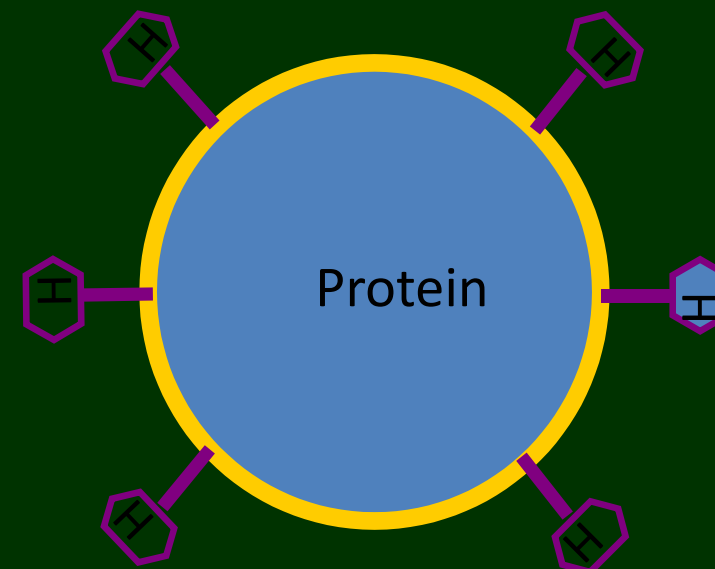
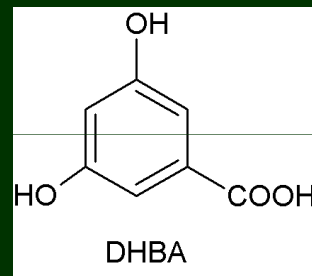
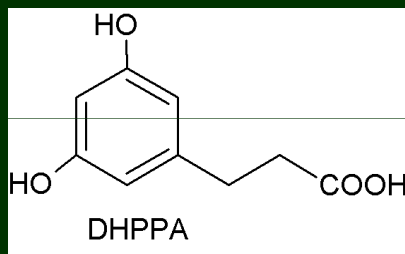
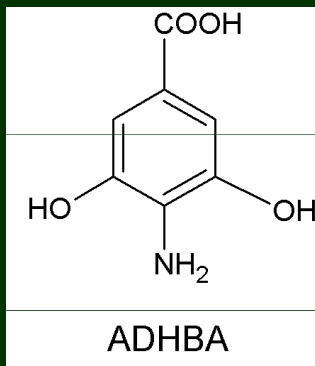
Přímá kompetitivní ELISA (hapten-  
proteinový konjugát = tracer)

Nepřímá kompetitivní ELISA (značená  
protilátka nebo tracer)

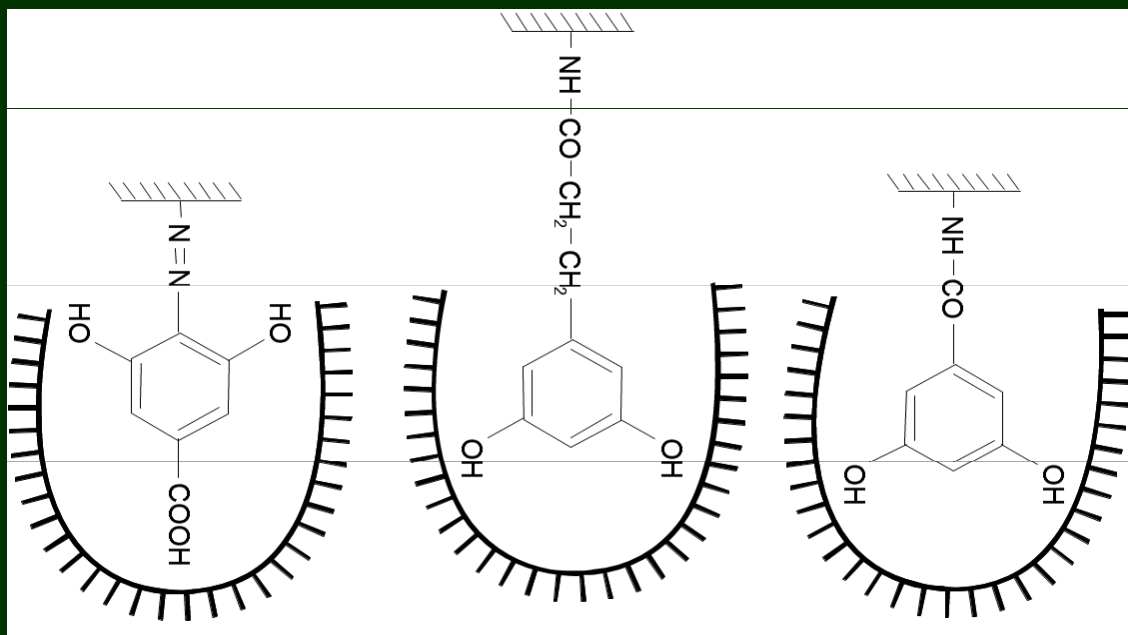
Vhodná pro analýzu malých molekul (haptenu)

# Alkylresorcinoly: biomarkery příjmu celozrnné stravy

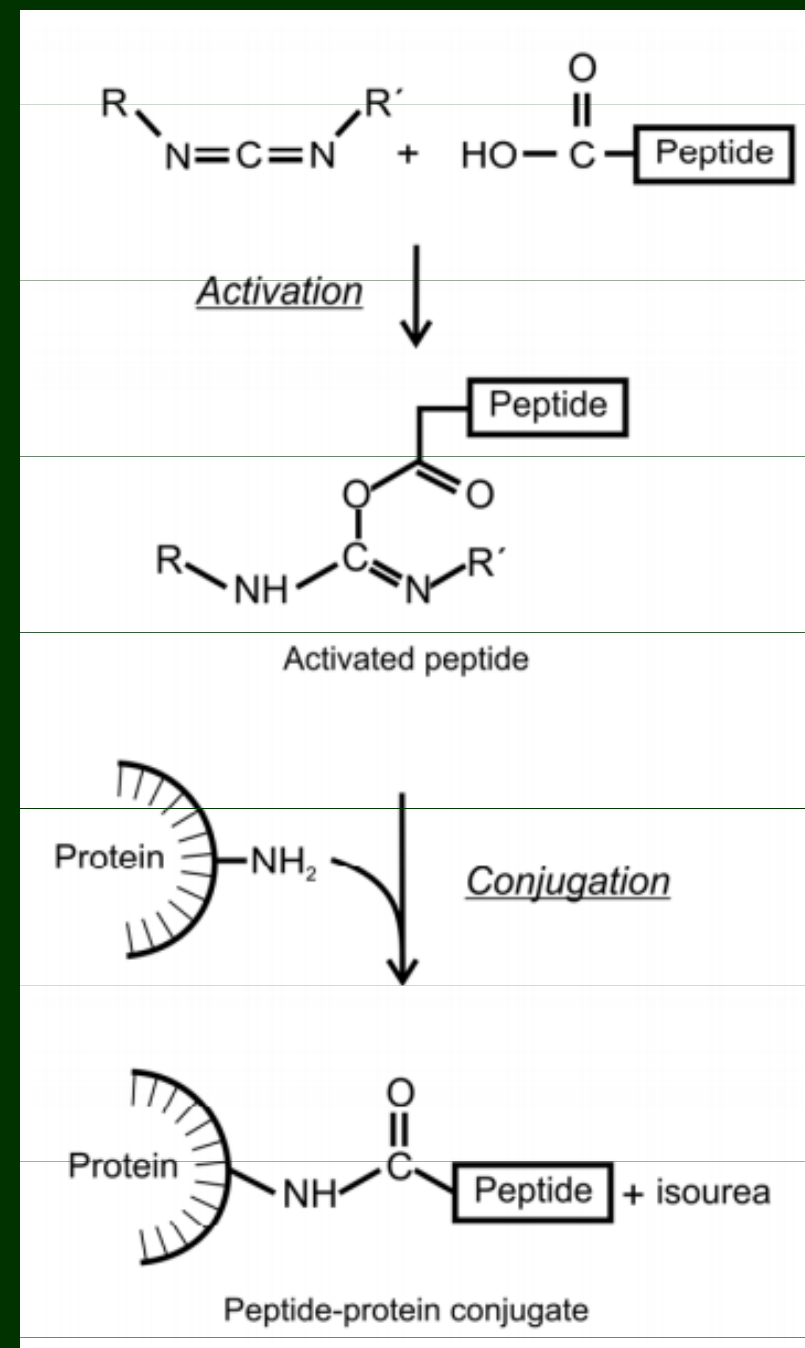
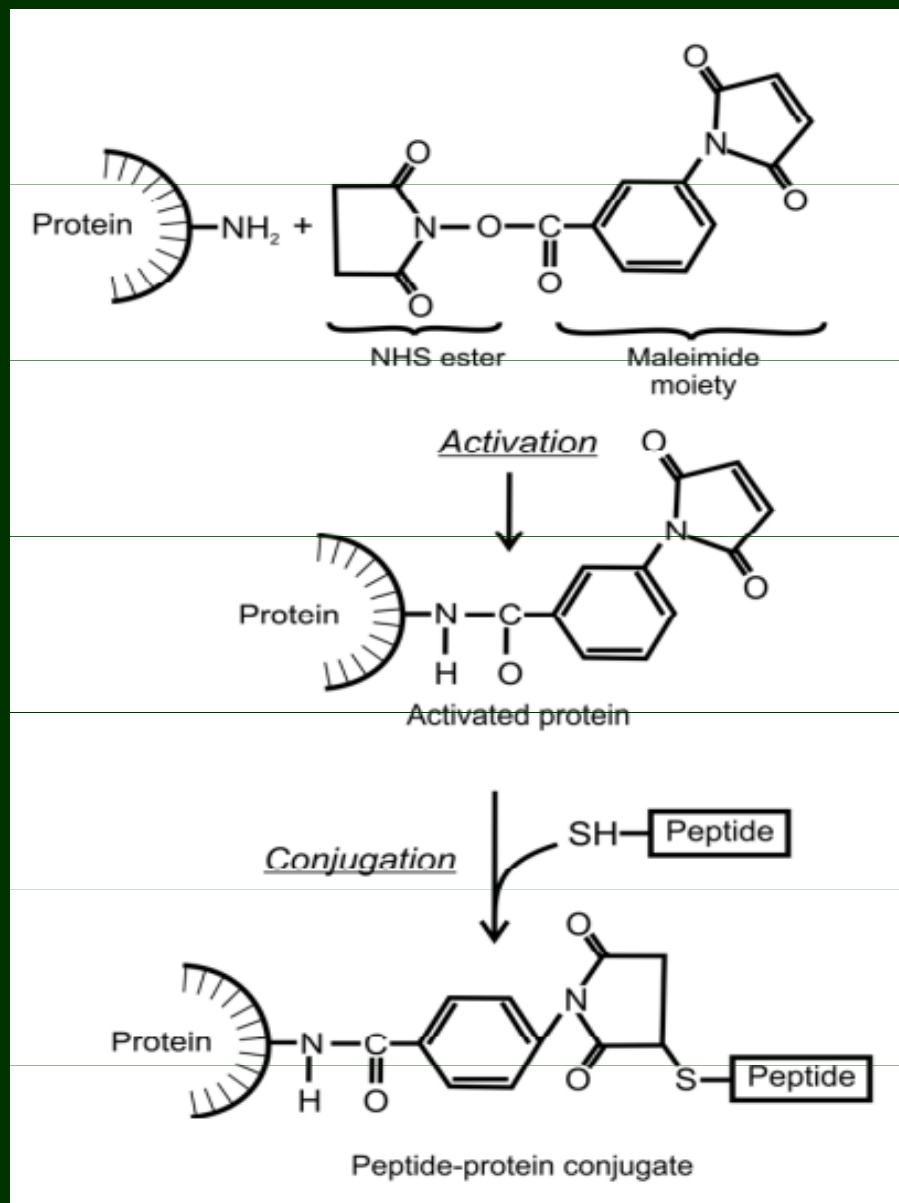
Kompetice stanovené organické molekuly s tracerem o aktivní místo protilátky



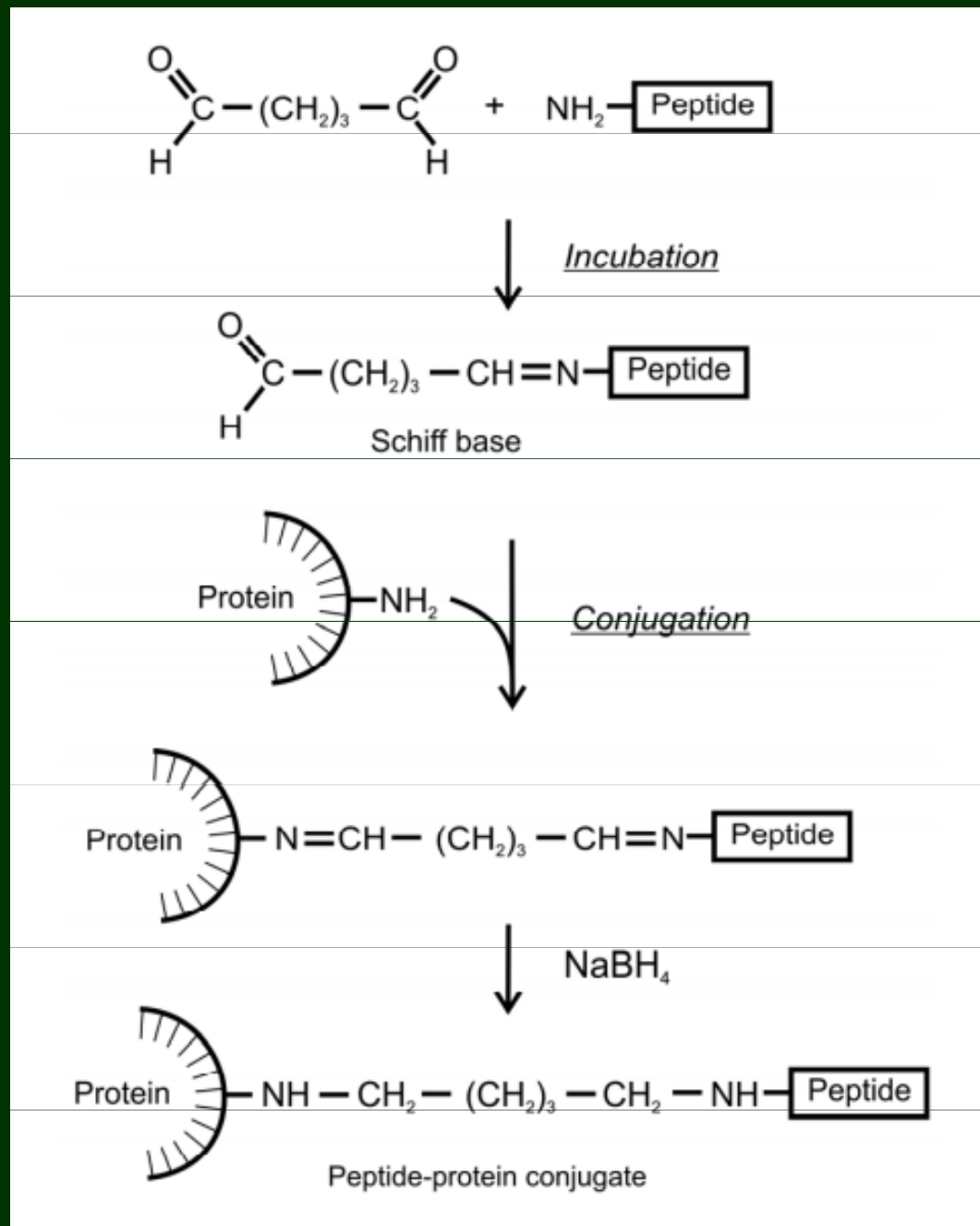
Conjugation yield (hapten density)  
= number of haptens in protein molecule  
(moles/mol)



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

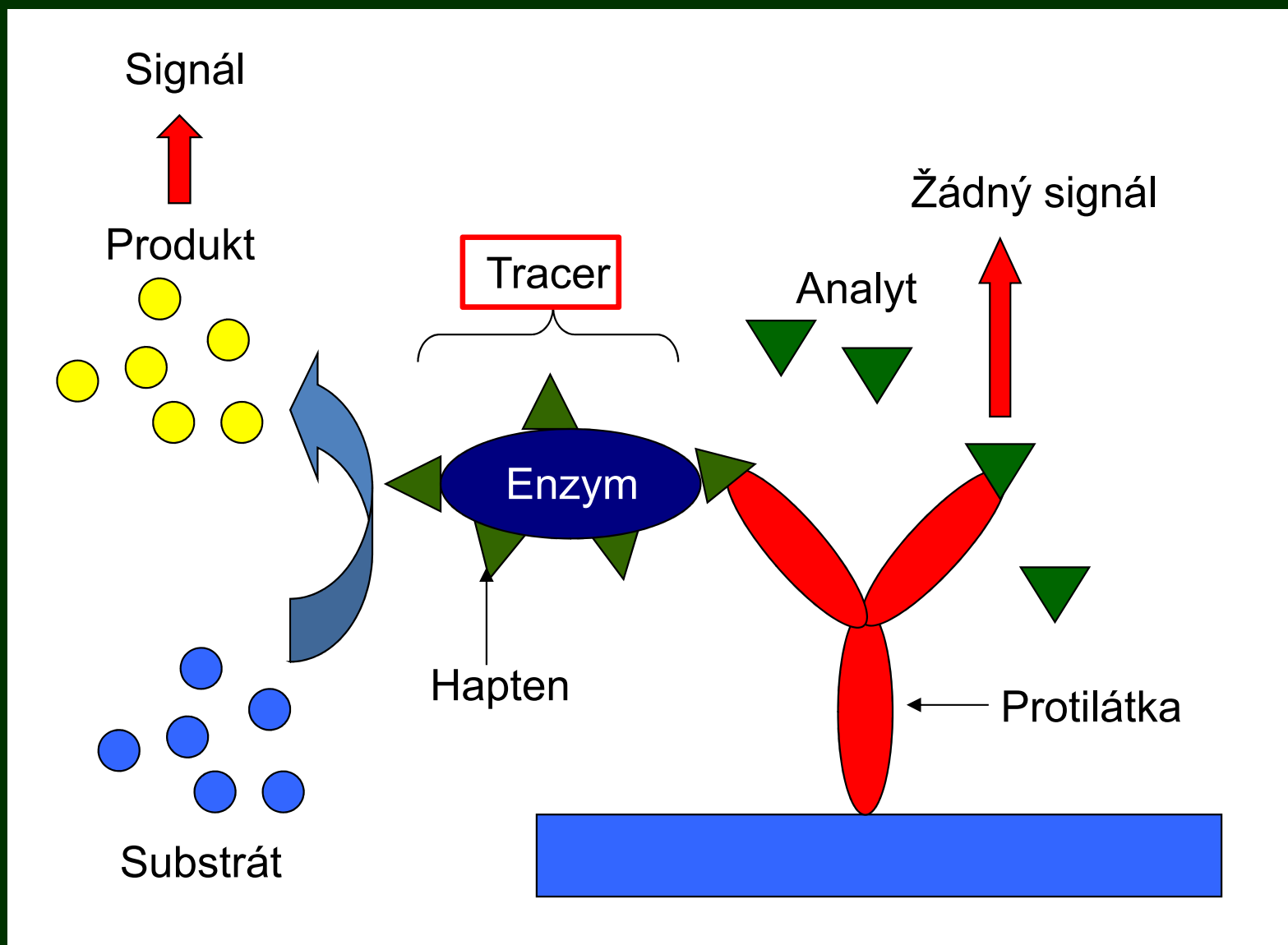


**Figure 3:** Scheme of conjugation reactions using glutaraldehyde.

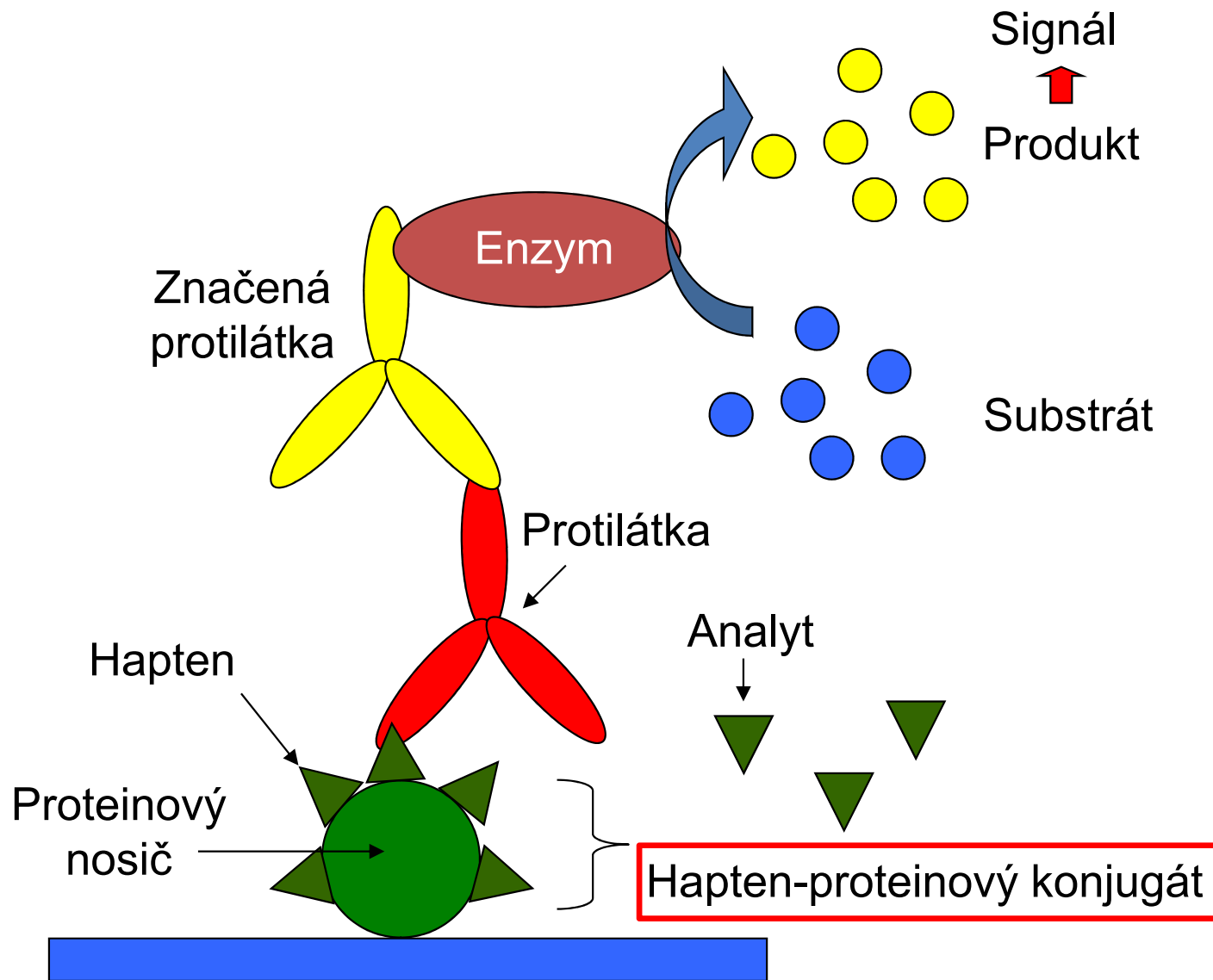


Eyer, Fránek, 2012

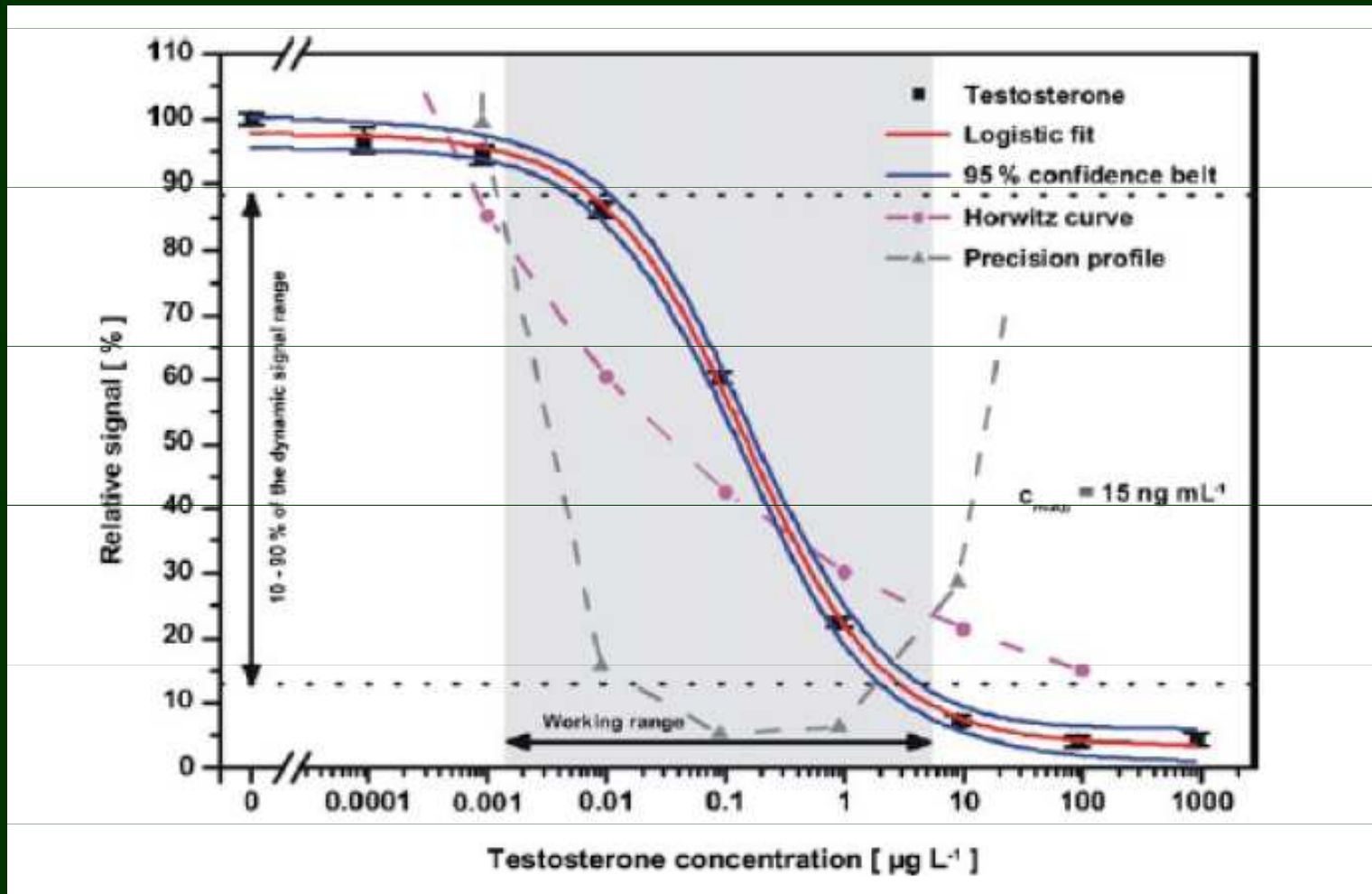
# Přímá kompetitivní ELISA



# 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

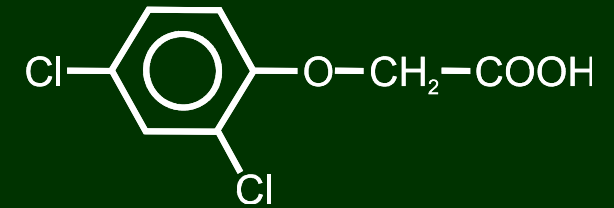
neopterin, nitrotyrosin

rostlinné hormony

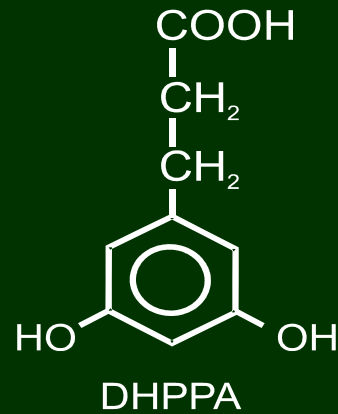
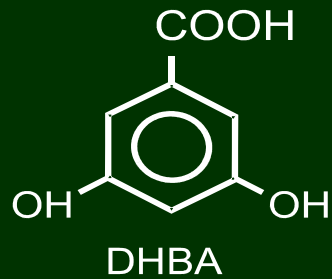
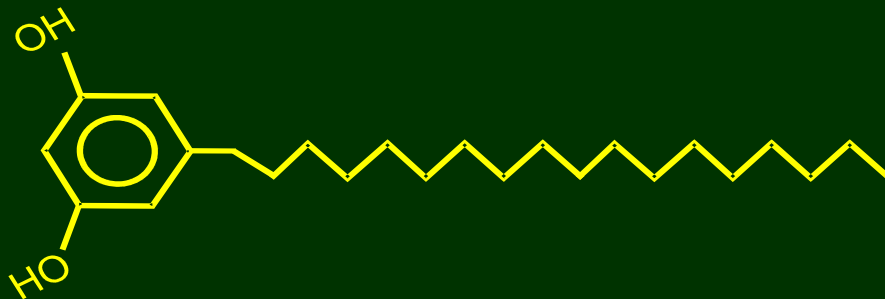
## Nonylfenol



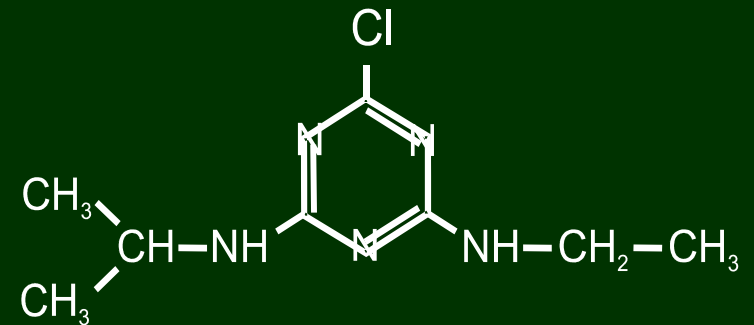
## Herbicid 2,4-D



## Alkylresorcinol a jeho metabolity



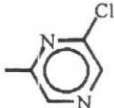

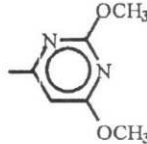
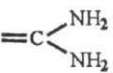
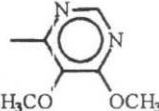
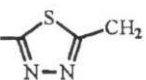
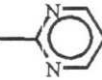
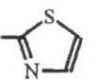
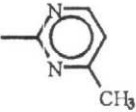
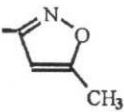
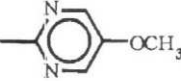
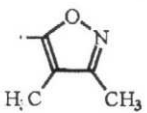
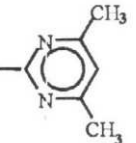
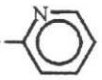
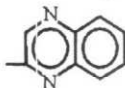
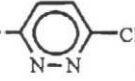
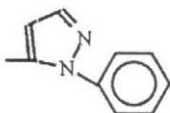
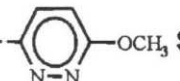
## s-triazinové herbicidy



## Neopterin, nitrotyrozin

# Sulfonamidy



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

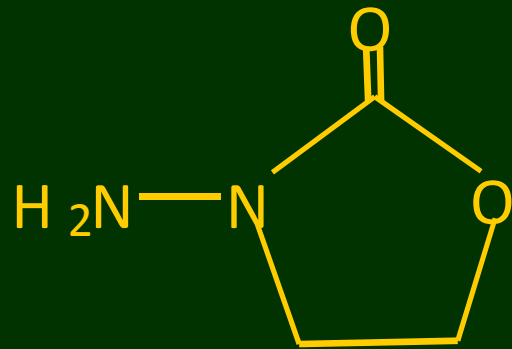
# ELISA kit pro multianalýzu sulfonamidů

## R-Biopharm AG Darmstadt, Německo

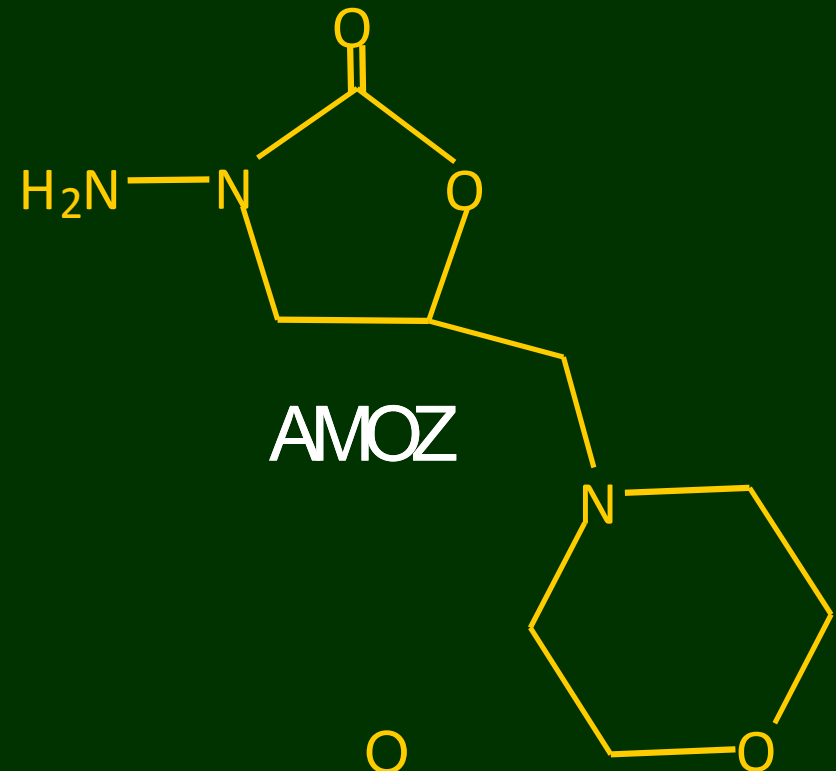


foto: M. Fránek

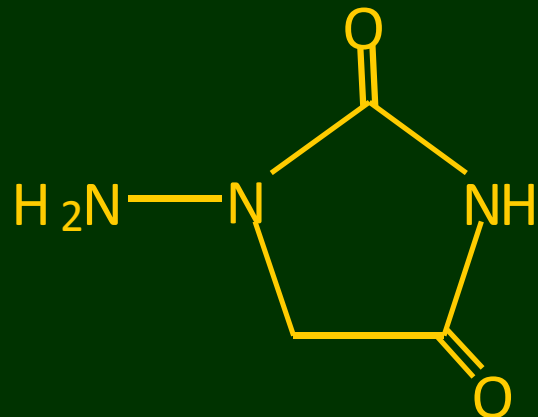
# Nitrofuranové metabolity



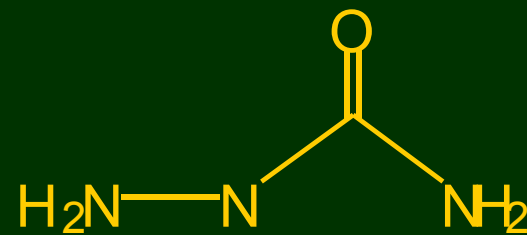
AOZ



AMOZ



AHD



SEM

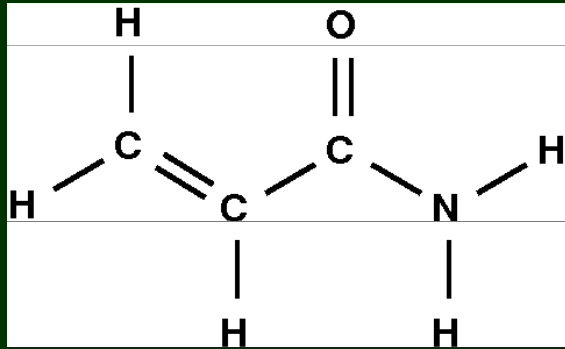
# ELISA kit pro detekci AOZ a AMOZ

## R-Biopharm AG Darmstadt, Německo

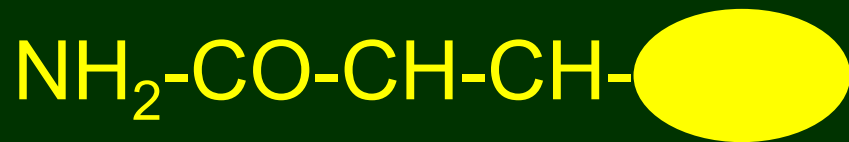


foto: M. Fránek

# Akrylamid



M.W. = 70 g/mol

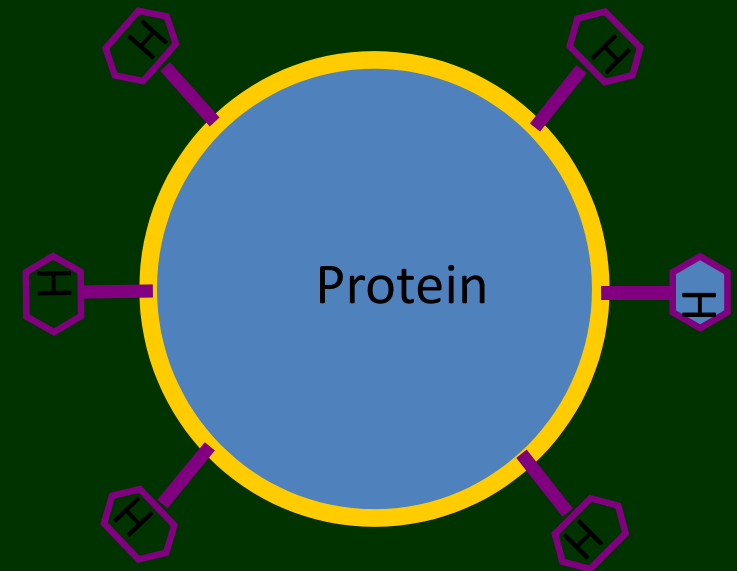
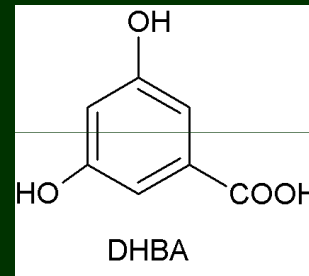
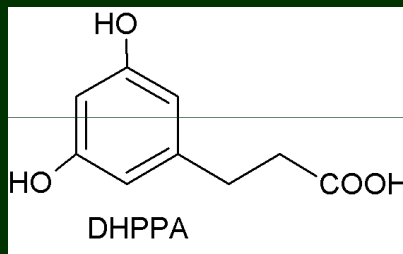
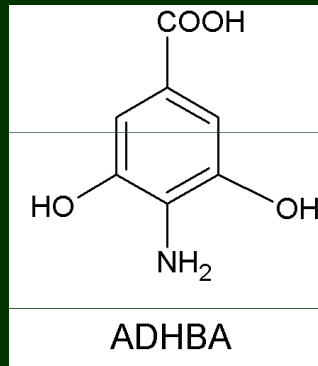


derivatizace –  
zvětšení molekuly

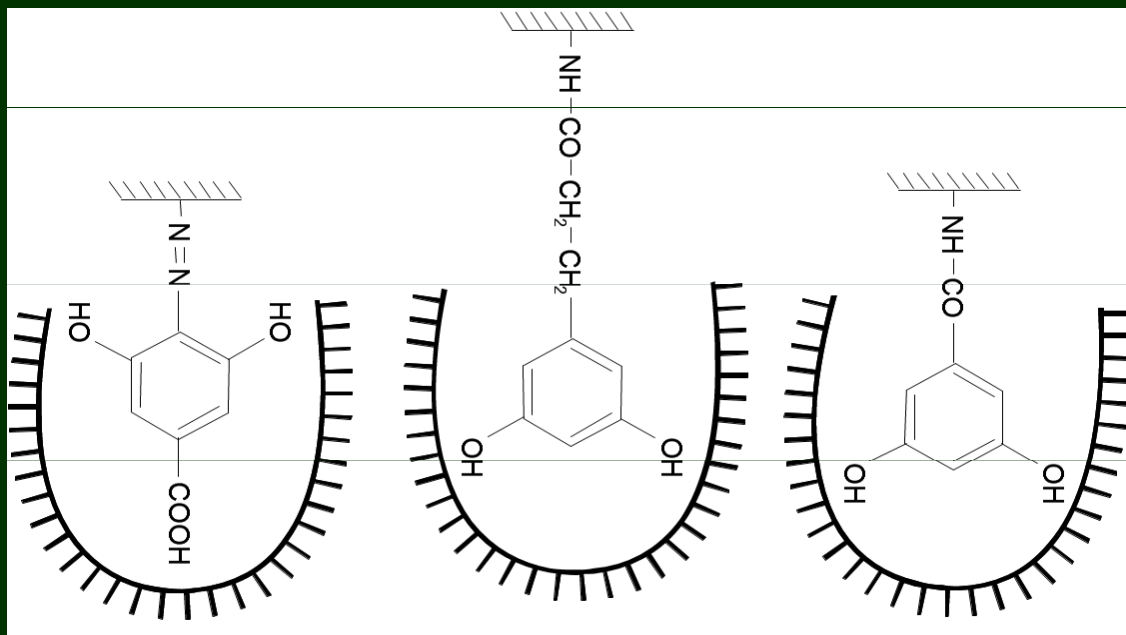


foto: M. Fránek

# Alkylresorcinoly: biomarkery příjmu celozrnné stravy



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





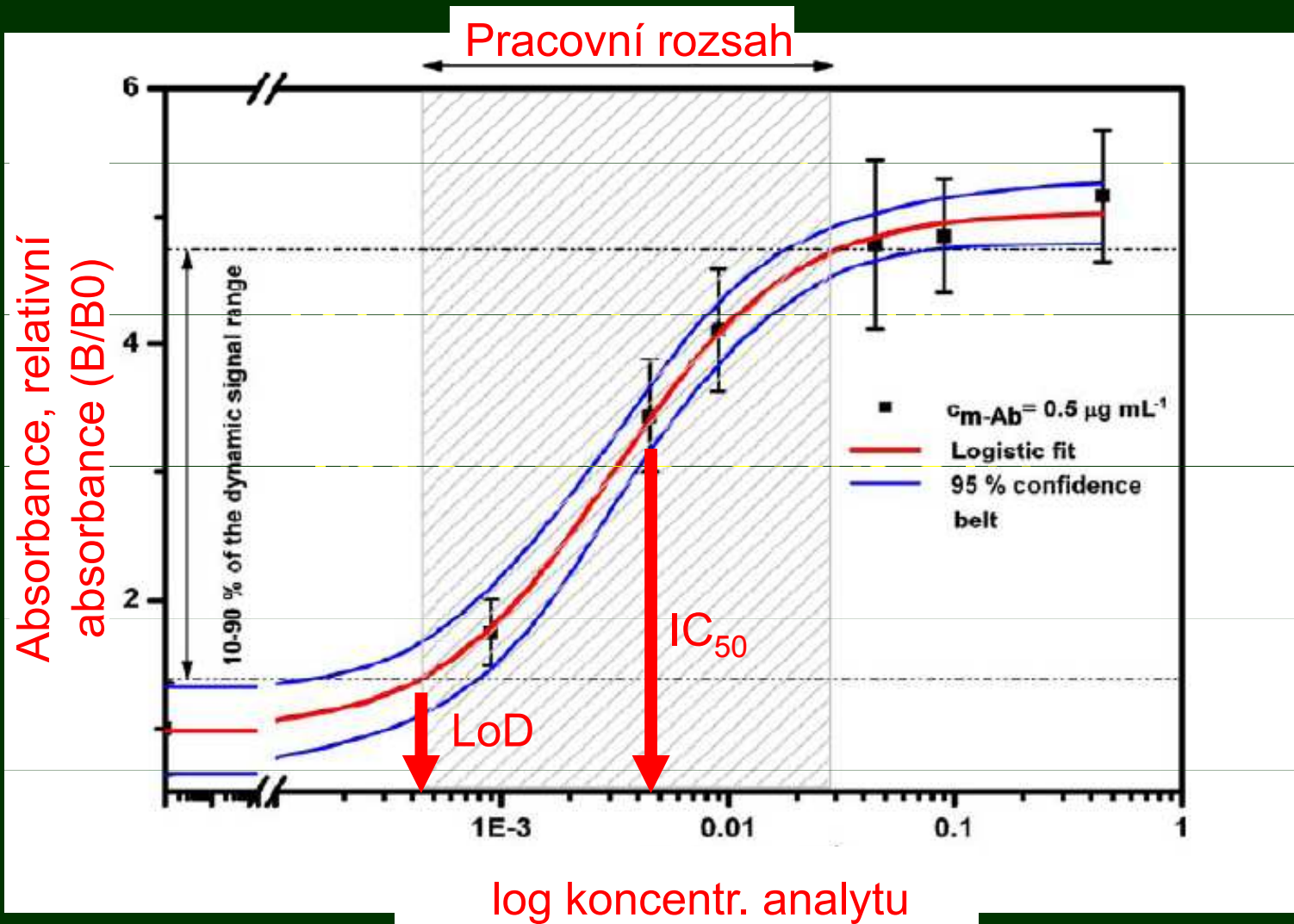
Limit detekce  $\bar{x}_{(0)}+3SD$

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
→ $^3\text{H}$	12,3 let	$\beta$
$^{14}\text{C}$	5,73 let	$\beta$
$^{57}\text{Co}$	270 dní	$\lambda$
$^{75}\text{Se}$	120,4 dní	$\lambda$
$^{123}\text{I}$	14,3 dní	$\beta$
→ $^{125}\text{I}$	60,2 dní	$\lambda$
$^{131}\text{I}$	8,05 dní	$\beta / \lambda$

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

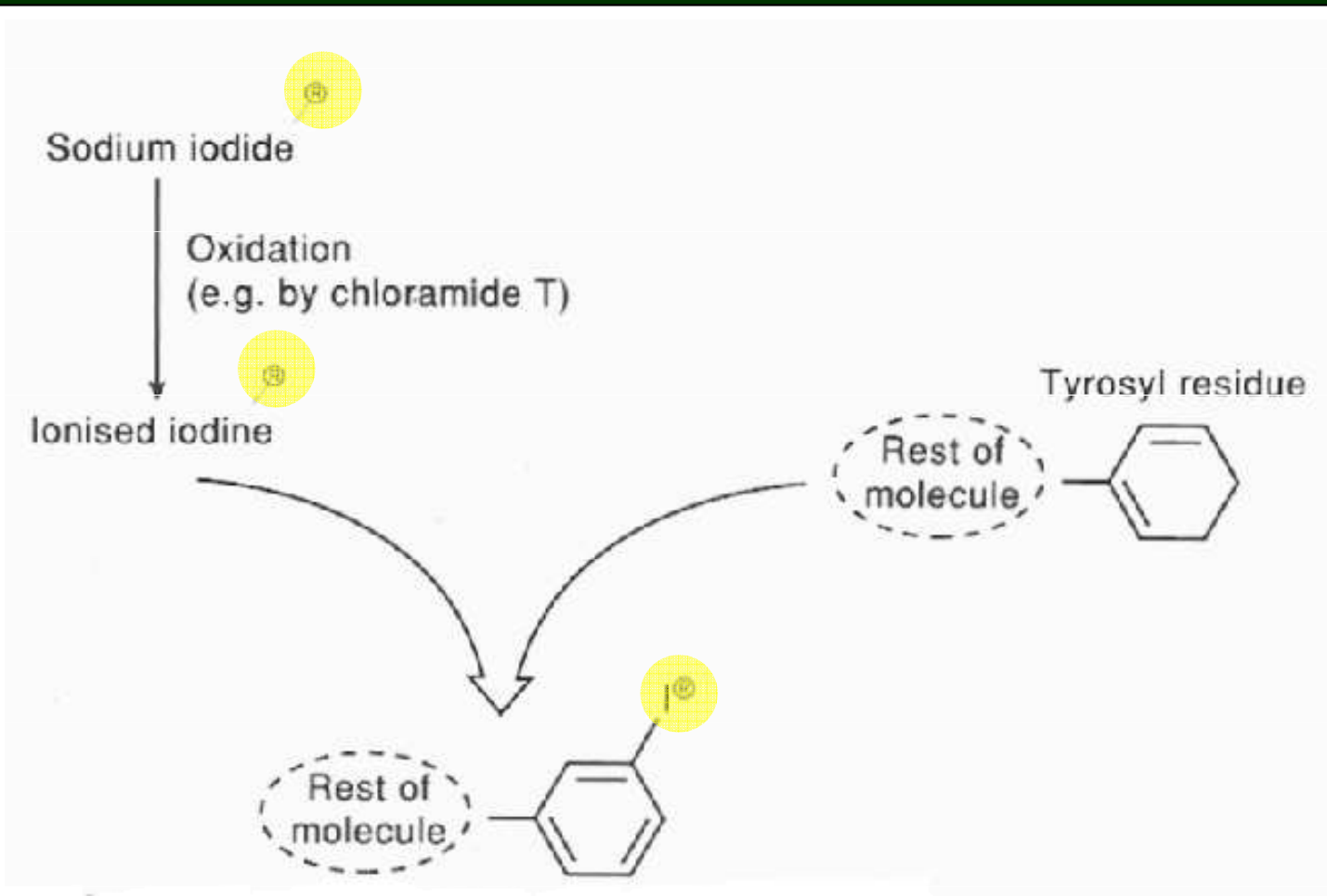
# Příprava radioaktivně značených reagentů

Triciované reagenty

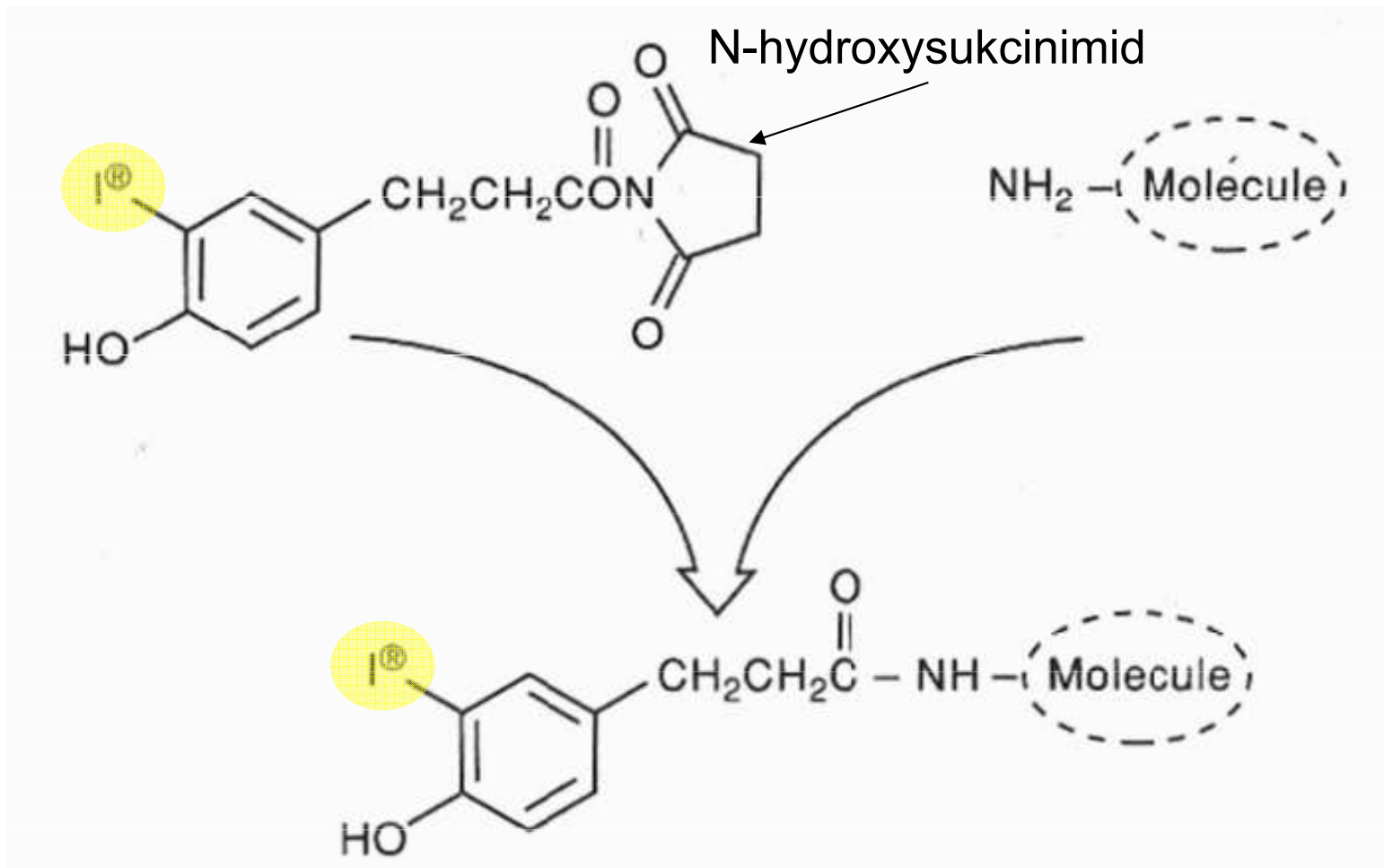
Radioiodinace

Konjugace s radioaktivně značenými molekulami

# Radioiodination



# Konjugace s radioaktivně značenými molekulami





# Princip radioizotopových metod

## Postup:

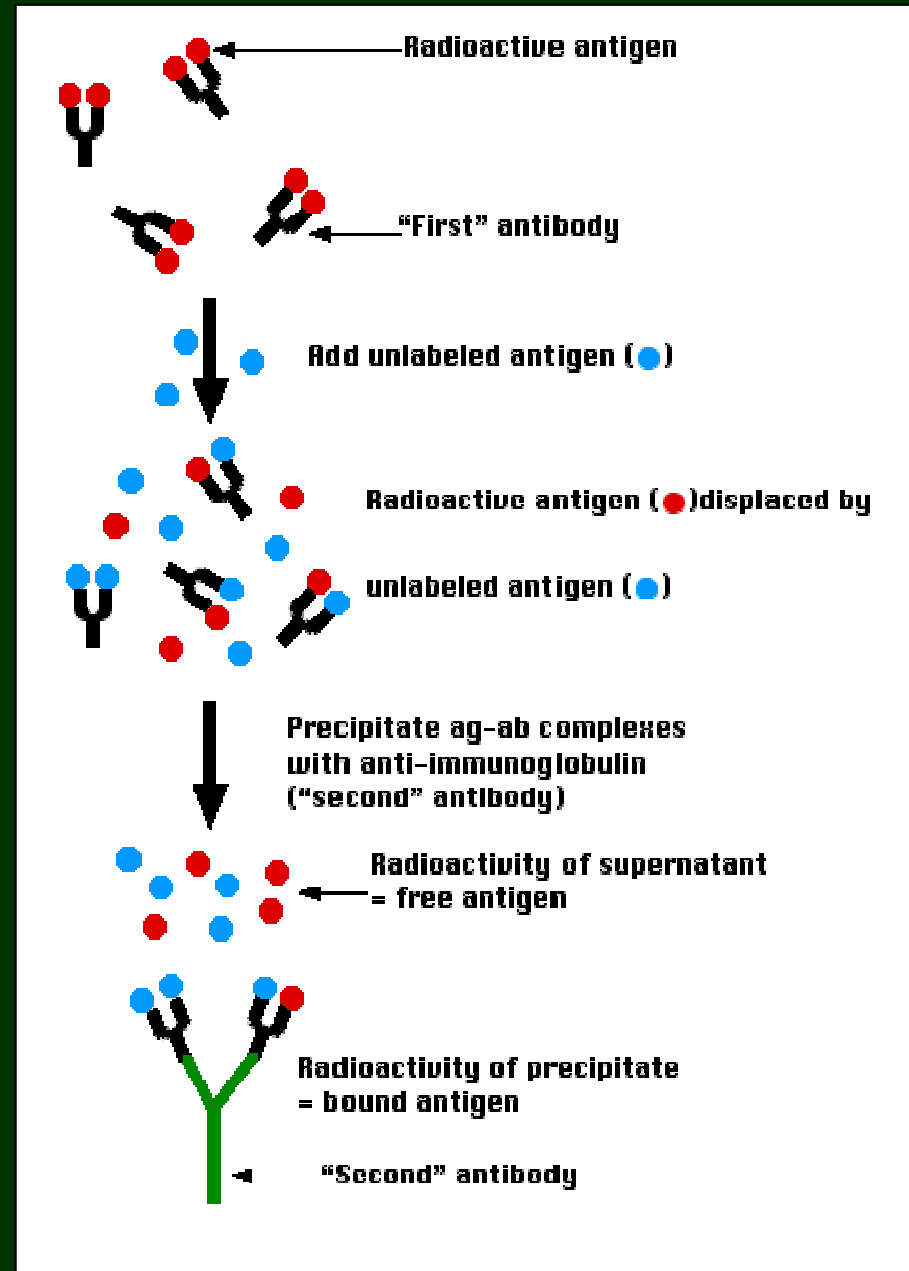
- $Ab + Ag + Ag^*$
- separace imunokomplexů
- měření radioaktivity

## Separace imunokomplexů při RIA

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

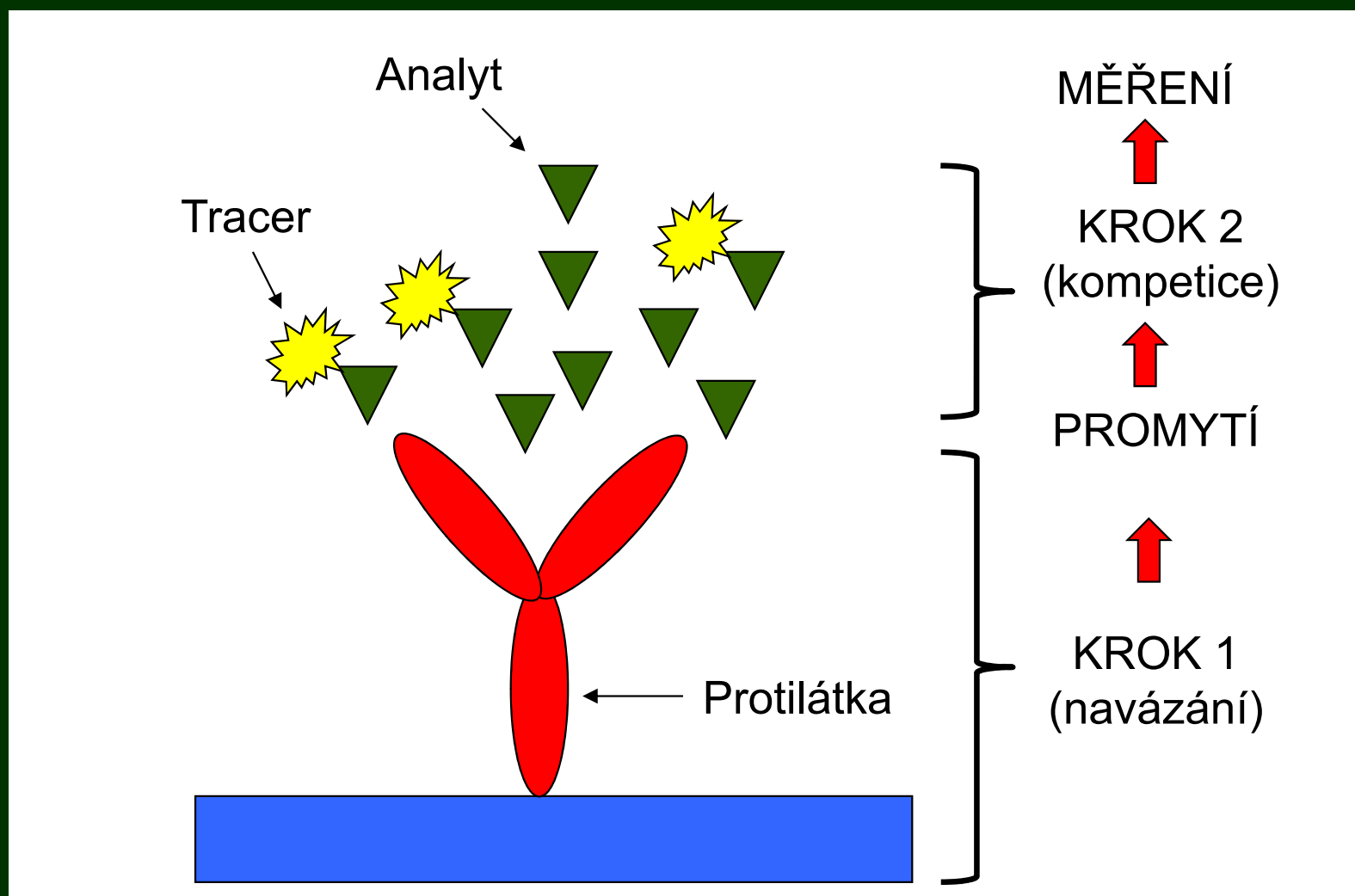
## Typy:

- kompetitivní (RIA)
- nekompetitivní (IRMA)



# Radioimunanalýza (RIA)

## Kompetitivní radioimunoanalytická metoda

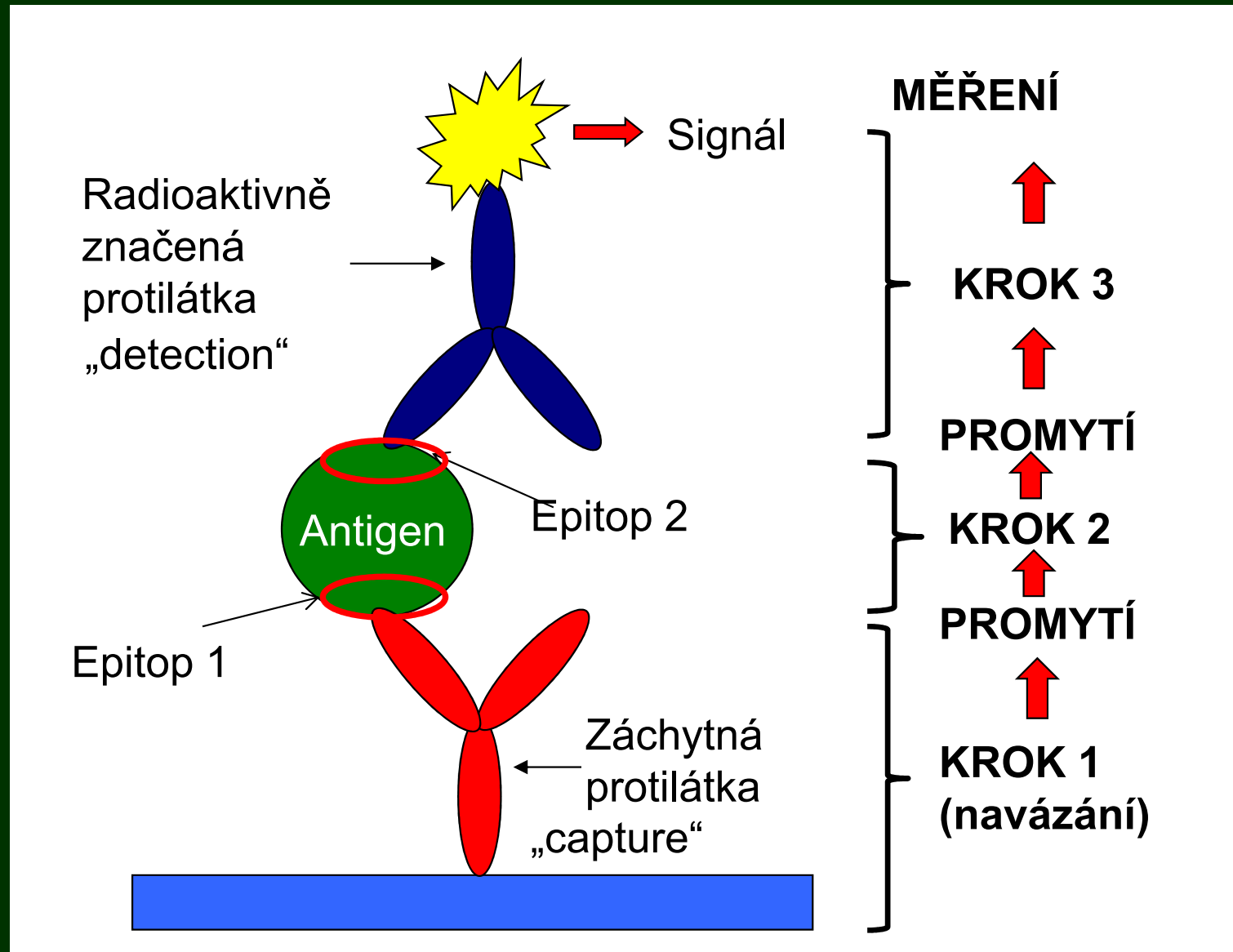


Limitní koncentrace traceru

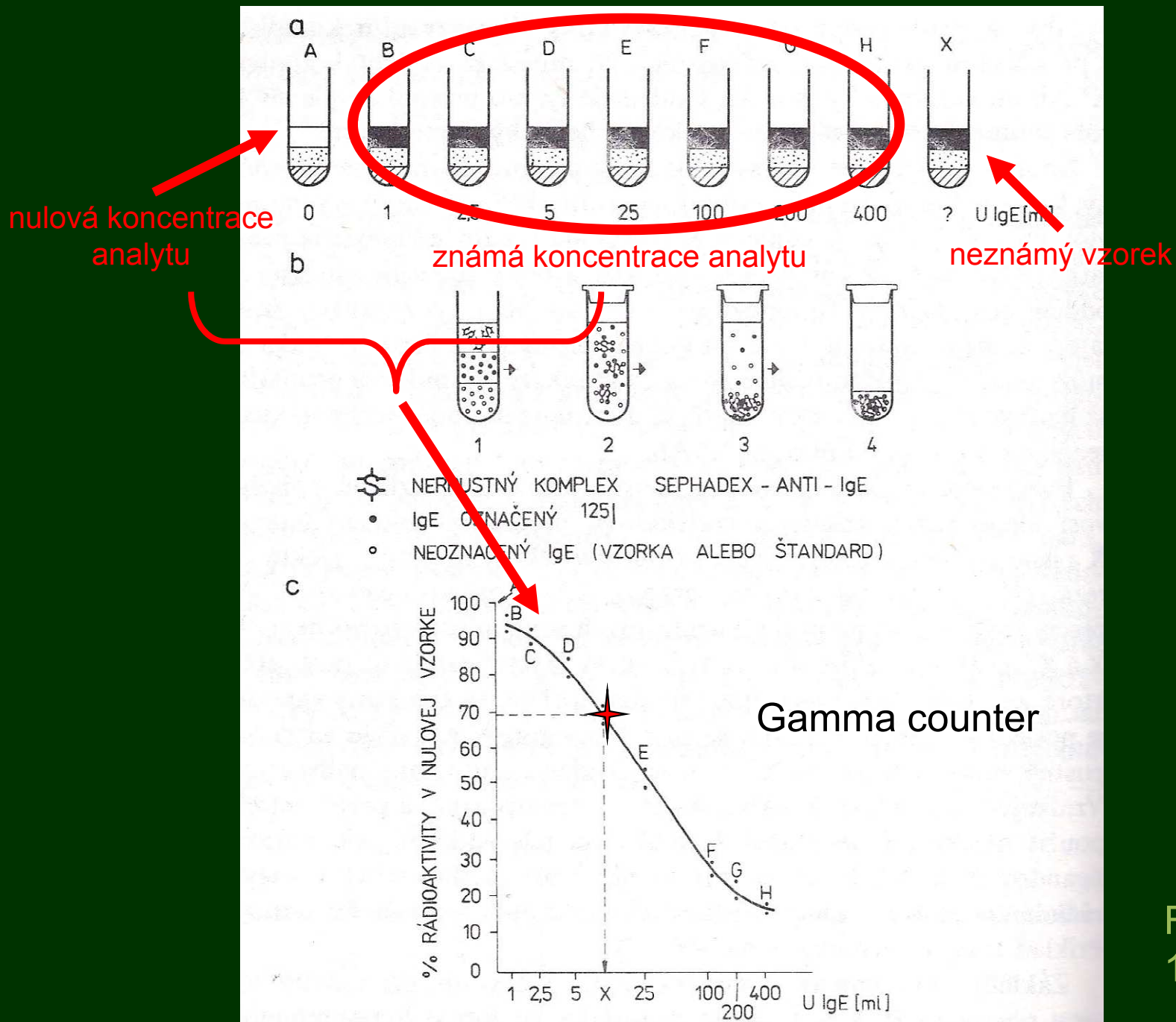
# Immunoradiometric assay (IRMA)

## 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  $^{125}\text{I}$ )

$10^{-10}$  mol/l (pro trícium)

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

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

# Radioimunoanalýza

## Výhody

vysoká citlivost a specifita

## Nevýhody

práce s radioaktivním materiálem

nutnost speciální legislativy pro práci s radioaktivním materiálem

# Radioimmunoassay 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
<a href="#">Acetylcholine Receptor Ab</a> ( <a href="#">/individualkitspecs_ria/IB68400.html</a> ) 510(k) cleared	RIA	IB68400
<a href="#">Acetylcholine Receptor Blocking</a> ( <a href="#">/individualkitspecs_ria/IB68401.html</a> )	RIA	IB68401
<a href="#">Acetylcholine Receptor Modulating Ab</a> ( <a href="#">/individualkitspecs_ria/IB68402.html</a> )	RIA	IB68402
<a href="#">Adrenaline (Plasma)</a> ( <a href="#">/individualkitspecs_ria/IB88553.html</a> )	RIA	IB88553
<a href="#">Adrenaline (Plasma / Urine)</a> ( <a href="#">/individualkitspecs_ria/IB88161.html</a> )	RIA	IB88161
<a href="#">Adrenaline (Urine)</a> ( <a href="#">/individualkitspecs_ria/IB88171.html</a> )	RIA	IB88171
<a href="#">Adrenaline / Noradrenaline (2 Cat) (Plasma)</a> ( <a href="#">/individualkitspecs_ria/IB88556.html</a> )	RIA	IB88556
<a href="#">Adrenaline / Noradrenaline (2 Cat) (Plasma / Urine)</a> ( <a href="#">/individualkitspecs_ria/IB88165.html</a> )	RIA	IB88165
<a href="#">Adrenaline / Noradrenaline (2 Cat) (Urine)</a> ( <a href="#">/individualkitspecs_ria/IB88175.html</a> )	RIA	IB88175
<a href="#">Adrenaline / Noradrenaline / Dopamine (3 Cat) (Plasma)</a> ( <a href="#">/individualkitspecs_ria/IB88557.html</a> )	RIA	IB88557
<a href="#">Adrenaline / Noradrenaline / Dopamine (3 Cat) (Plasma / Urine)</a> ( <a href="#">/individualkitspecs_ria/IB88166.html</a> )	RIA	IB88166
<a href="#">Adrenaline / Noradrenaline / Dopamine (3 Cat) (Urine)</a> ( <a href="#">/individualkitspecs_ria/IB88176.html</a> )	RIA	IB88176
<a href="#">Angiotensin II</a> ( <a href="#">/individualkitspecs_ria/RB320.html</a> )	RIA	RB 320
<a href="#">Atrial Natriuretic Peptide (ANP)</a> ( <a href="#">/individualkitspecs_ria/BANI1.htm</a> )	RIA	BANI 1
<a href="#">C3a Des Arg</a> ( <a href="#">/individualkitspecs_ria/RK-518.html</a> )	RIA	RK-518
<a href="#">C4a Des Arg</a> ( <a href="#">/individualkitspecs_ria/RK-519.html</a> )	RIA	RK-519
<a href="#">cAMP</a> ( <a href="#">/individualkitspecs_ria/IB78169.html</a> )	RIA	IB78169
<a href="#">CBG</a> ( <a href="#">/individualkitspecs_ria/IB79150.html</a> )	RIA	IB79150
<a href="#">cGMP</a> ( <a href="#">/individualkitspecs_ria/IB78173.html</a> )	RIA	IB78173
<a href="#">Cholecystokinin (CCK)</a> ( <a href="#">/individualkitspecs_ria/RB302.html</a> )	RIA	RB 302
<a href="#">Chromogranin A</a> ( <a href="#">/individualkitspecs_ria/RB-321.html</a> )	IRMA	RB 321
<a href="#">Chromogranin B</a> ( <a href="#">/individualkitspecs_ria/RB322US.html</a> )	RIA	RB 322 US
<a href="#">Dopamine (Plasma)</a> ( <a href="#">/individualkitspecs_ria/IB88555.html</a> )	RIA	IB88555
<a href="#">Dopamine (Plasma / Urine)</a> ( <a href="#">/individualkitspecs_ria/IB88163.html</a> )	RIA	IB88163
<a href="#">Dopamine (Urine)</a> ( <a href="#">/individualkitspecs_ria/IB88173.html</a> )	RIA	IB88173
<a href="#">Endorphin Beta</a> ( <a href="#">/individualkitspecs_ria/RB301.html</a> )	RIA	RB 301
<a href="#">Endothelin</a> ( <a href="#">/individualkitspecs_ria/RB304.html</a> )	RIA	RB 304
<a href="#">Gastrin</a> ( <a href="#">/individualkitspecs_ria/MD302.html</a> ) **	RIA	MD 302
<a href="#">Ghrelin</a> ( <a href="#">/individualkitspecs_ria/R90.html</a> )	RIA	R90
<a href="#">Glucagon</a> ( <a href="#">/individualkitspecs_ria/RB310.html</a> ) **	RIA	RB 310
<a href="#">IGF-1</a> ( <a href="#">/individualkitspecs_ria/IGF-R20.html</a> ) **	RIA	IGF-R20
<a href="#">IGF-1</a> ( <a href="#">/individualkitspecs_ria/IGF-R21.html</a> ) **	RIA	IGF-R21
<a href="#">IGF-1 CT</a> ( <a href="#">/individualkitspecs_ria/IGF-R22.html</a> ) **	RIA-CT	IGF-R22
<a href="#">IGF-2</a> ( <a href="#">/individualkitspecs_ria/R30.html</a> )	RIA	R30
<a href="#">IGFBP-3</a> ( <a href="#">/individualkitspecs_ria/IGF-R10.html</a> )	RIA	IGF-R10
<a href="#">IGFBP-3</a> ( <a href="#">/individualkitspecs_ria/IGF-R11.html</a> )	RIA-CT	IGF-R11
<a href="#">Melatonin (Direct)</a> ( <a href="#">/individualkitspecs_ria/IB88111.html</a> )	RIA	IB88111
<a href="#">Melatonin (Research)</a> ( <a href="#">/individualkitspecs_ria/IB88139.html</a> )	RIA	IB88139
<a href="#">Metanephrine (Plasma)</a> ( <a href="#">/individualkitspecs_ria/IB88521.html</a> )	RIA	IB88521
<a href="#">Metanephrine (Urine)</a> ( <a href="#">/individualkitspecs_ria/IB88523.html</a> )	RIA	IB88523
<a href="#">Metanephrine / Normetanephrine (2-Me) (Plasma)</a> ( <a href="#">/individualkitspecs_ria/IB88525.html</a> )	RIA	IB88525
<a href="#">Metanephrine / Normetanephrine (2-Me) (Urine)</a> ( <a href="#">/individualkitspecs_ria/IB88526.html</a> )	RIA	IB88526
<a href="#">MSH-alpha</a> ( <a href="#">/individualkitspecs_ria/RB303.html</a> )	RIA	RB303
<a href="#">Noradrenaline (Plasma)</a> ( <a href="#">/individualkitspecs_ria/IB88554.html</a> )	RIA	IB88554
<a href="#">Noradrenaline (Plasma / Urine)</a> ( <a href="#">/individualkitspecs_ria/IB88162.html</a> )	RIA	IB88162
<a href="#">Noradrenaline (Urine)</a> ( <a href="#">/individualkitspecs_ria/IB88172.html</a> )	RIA	IB88172
<a href="#">Normetanephrine (Plasma)</a> ( <a href="#">/individualkitspecs_ria/IB88522.html</a> )	RIA	IB88522
<a href="#">Normetanephrine (Urine)</a> ( <a href="#">/individualkitspecs_ria/IB88524.html</a> )	RIA	IB88524
<a href="#">Neuropeptide Y</a> ( <a href="#">/individualkitspecs_ria/RB317.html</a> )	RIA	RB317
<a href="#">Osteocalcin</a> ( <a href="#">/individualkitspecs_ria/IB79151.html</a> )	IRMA	IB79151
<a href="#">Pancreatic Polypeptide</a> ( <a href="#">/individualkitspecs_ria/RB316.html</a> )	RIA	RB 316
<a href="#">Serotonin</a> ( <a href="#">/individualkitspecs_ria/IB88189.html</a> ) **	RIA	IB88189
<a href="#">Somatostatin</a> ( <a href="#">/individualkitspecs_ria/RB306.html</a> )	RIA	RB 306
<a href="#">Vasopressin</a> ( <a href="#">/individualkitspecs_ria/RB319.html</a> )	RIA	RB 319
<a href="#">VIP</a> ( <a href="#">/individualkitspecs_ria/RB311.html</a> )	RIA	RB 311
<a href="#">Vitamin D-3</a> ( <a href="#">/individualkitspecs_ria/IB79149.html</a> )	RIA	IB79149

# RIA kity



Kity pro stanovení hormonů (tyroxin)

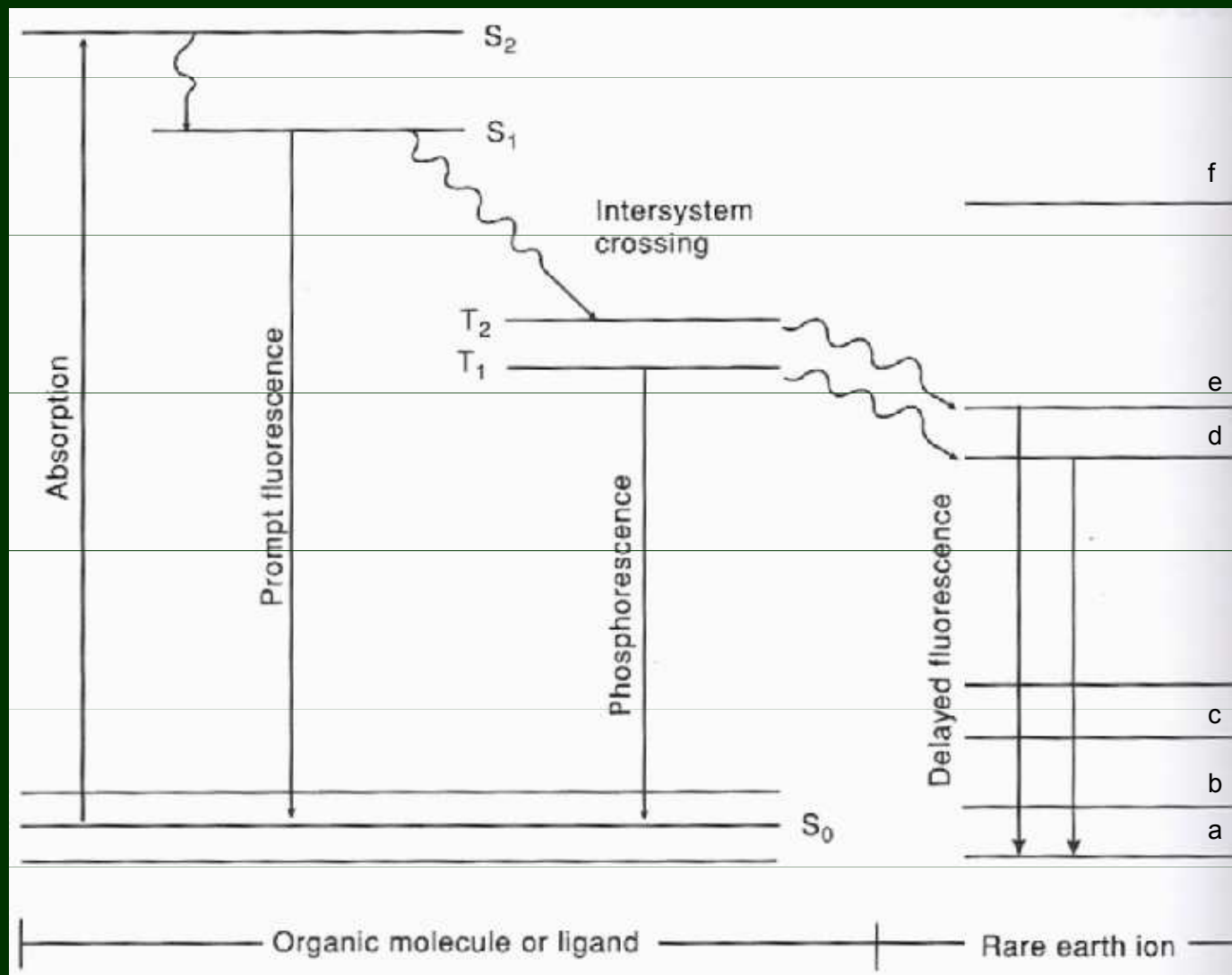


# Fluorescenční imunoanalýza (FIA)

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)	365	471	16.0	0.6
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 <sup>8</sup>	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 <sup>3+</sup>	b-NTA	340	600,643	65	1.5
Sm <sup>3+</sup>	PTA	295	600,643	60	0.3
Eu <sup>3+</sup>	b-NTA	340	613	714	100.0
Eu <sup>3+</sup>	PTA	295	613	925	36.0
Tb <sup>3+</sup>	FTA	295	490,543	96	8.0
Dy <sup>3+</sup>	FTA	295	573	approx. 1	0.2
Nd <sup>3+</sup>	BTA	800	1,060	1,350	–

\*b-NTA, b-naphthoyltrifluoroacetone, PTA, pivaloyltrifluoroacetone, BTA, benzoyltrifluoroacetone

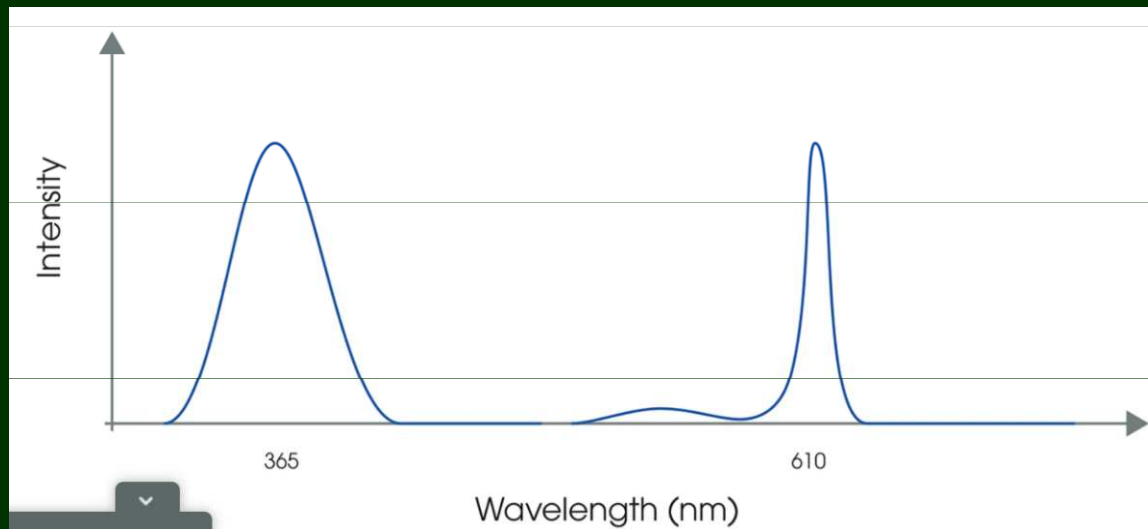
## Time-resolved fluorescence

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 ( $\text{Eu}^{3+}$ ).

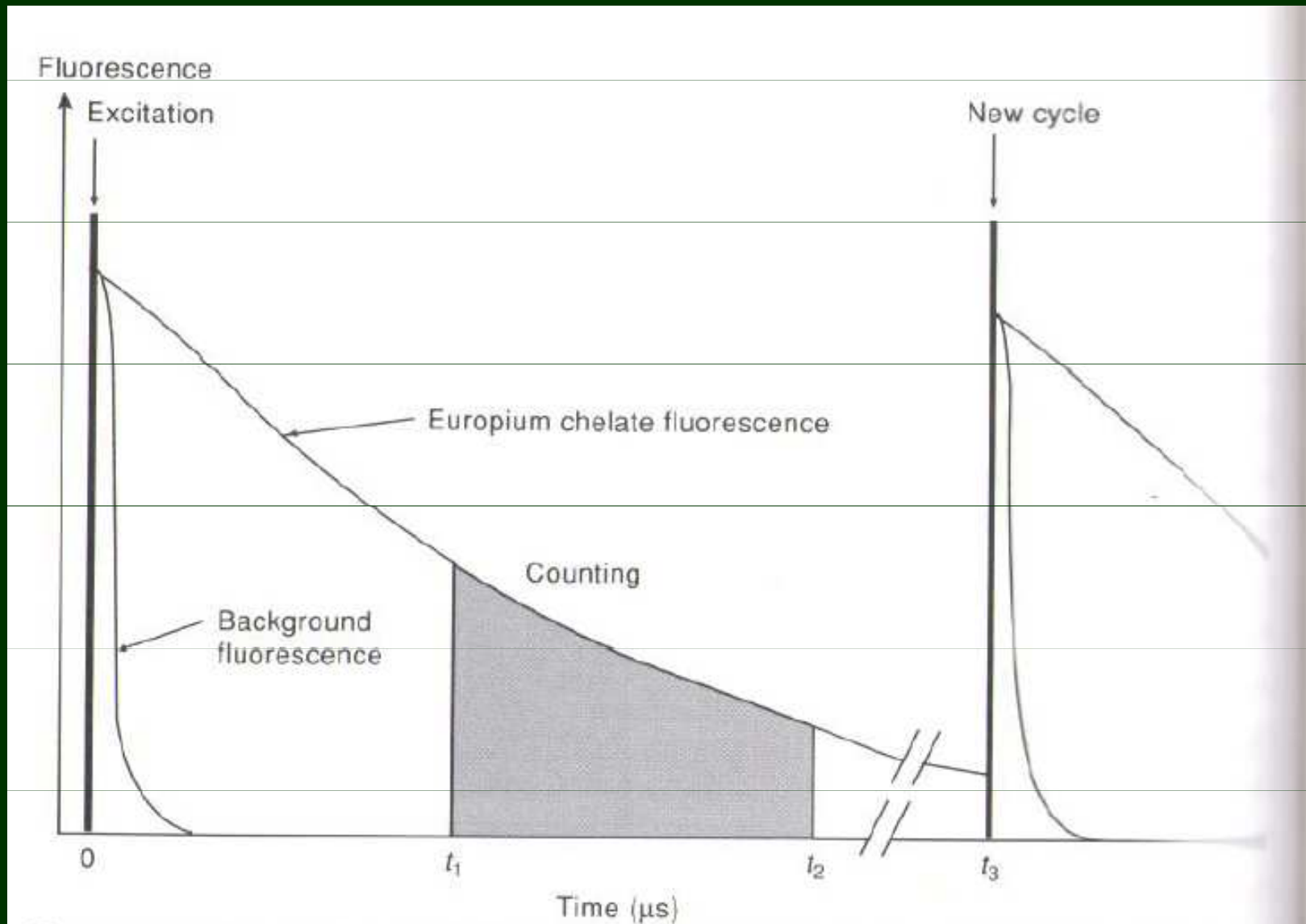
Although conventional fluorophores are extremely popular, they share several limitations. Firstly, the simultaneous excitation/emission process can result in high background signal. Secondly, the Stokes shift (the difference between the maximum absorbance and emission wavelengths) of many commercially 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 ( $\mu\text{seconds}$ – $\text{milliseconds}$ ), several orders of magnitude greater than any nonspecific background fluorescence (typically  $\text{nanoseconds}$ ), 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**

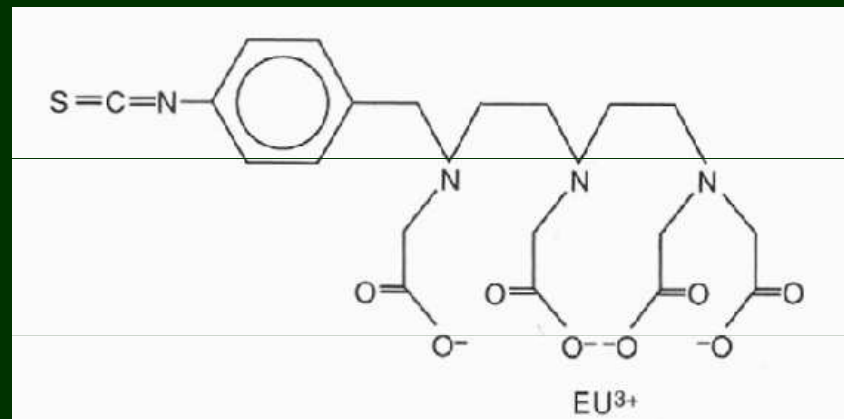
Využití klasických fluorescenčních sond (organických molekul)

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 (DELFI)

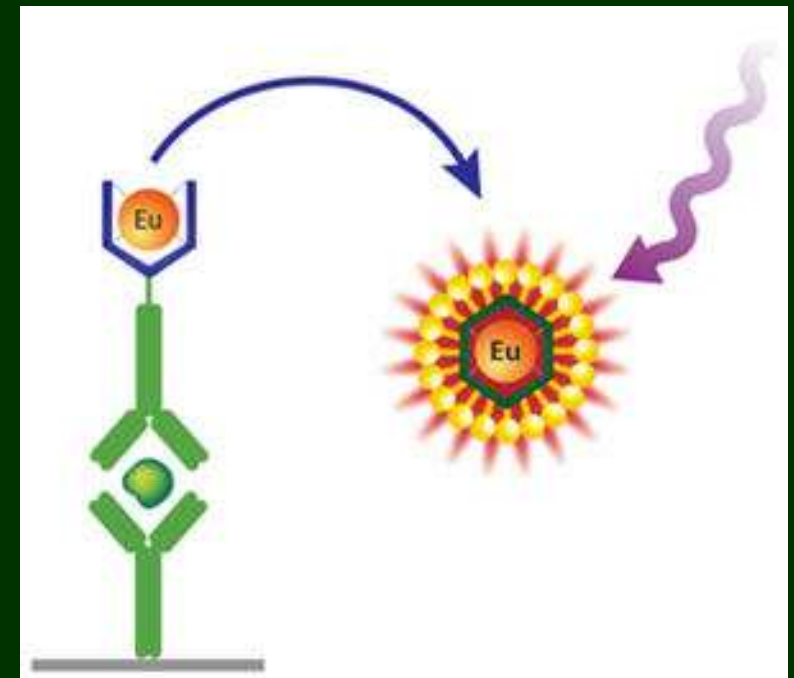
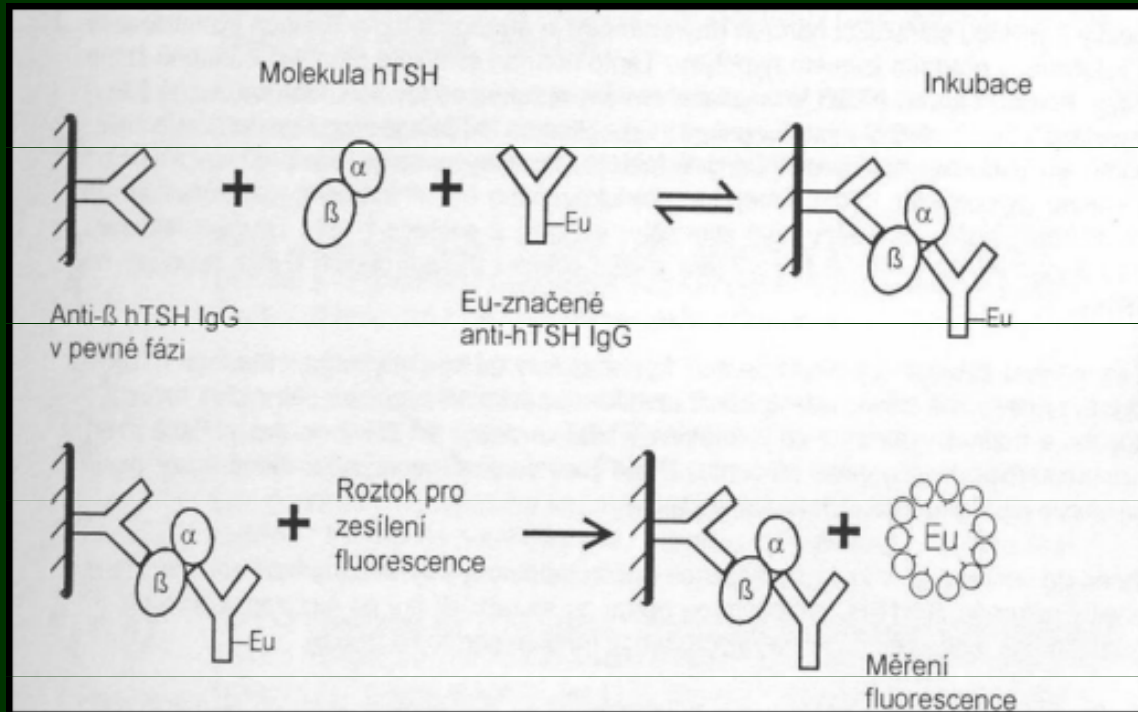
**Europium chelator:** N<sup>1</sup>-(*p*-isothiocyanato-benzyl)-diethylene triamine tetraacetic acid-Eu<sup>3+</sup> (N<sup>1</sup>-ITC-benzyl DTTA Eu<sup>3+</sup>)



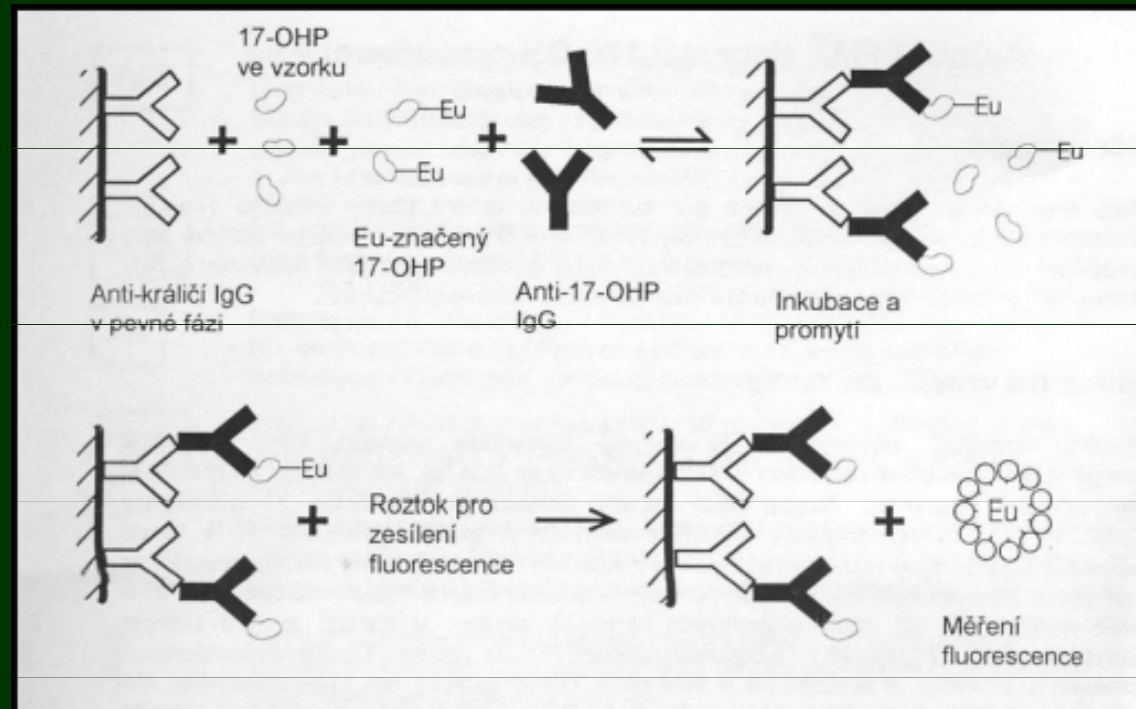
**Zesilovač:** β-diketon (vysoká absorptivita, efektivní energ. přenos na Eu<sup>3+</sup>)  
energie tripletového stavu > nejnižší emisní energie Eu<sup>3+</sup>

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

# Princip DELFIA (sandwich)



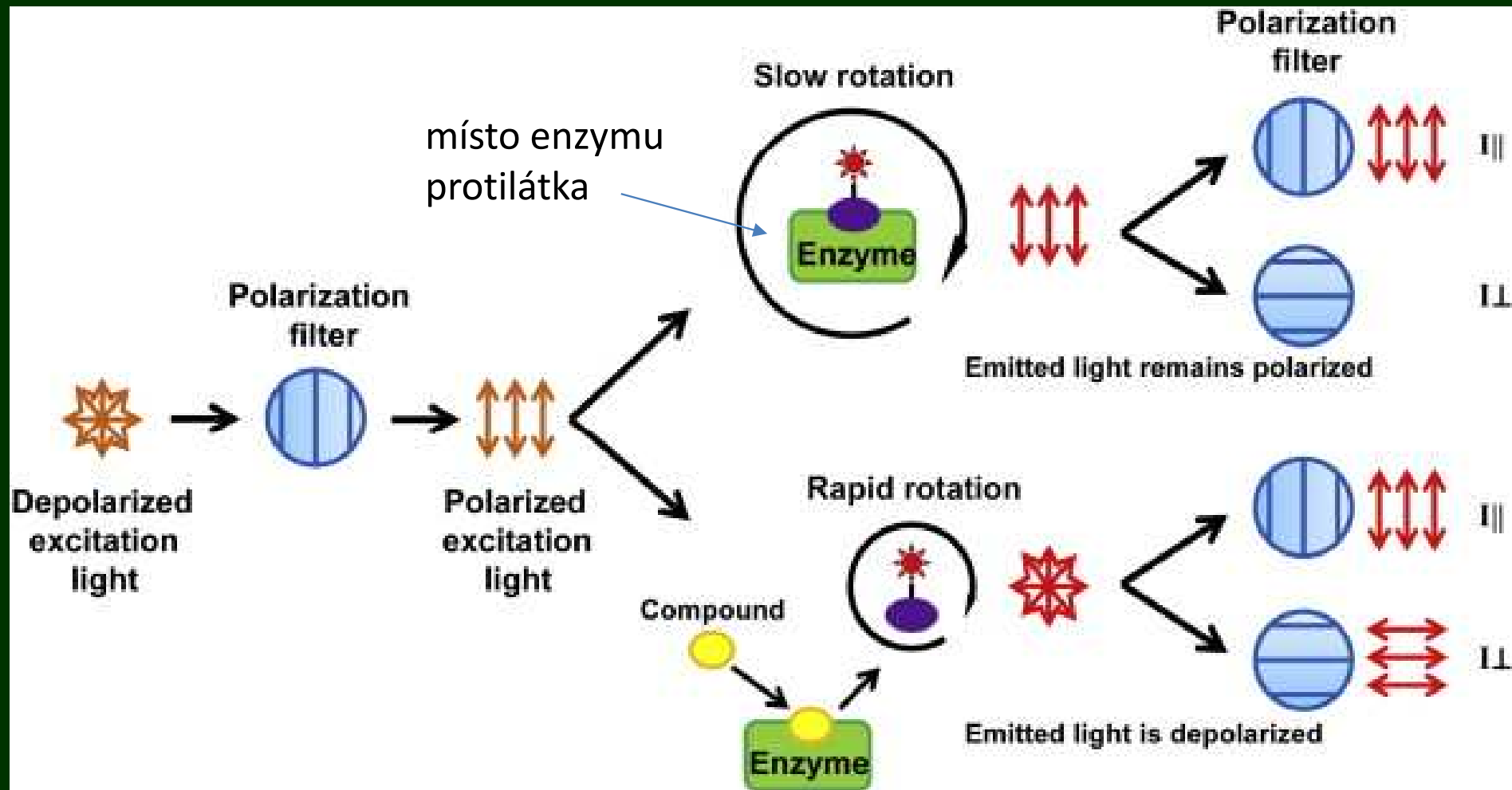
# Princip DELFIA (kompetitivní stanovení)



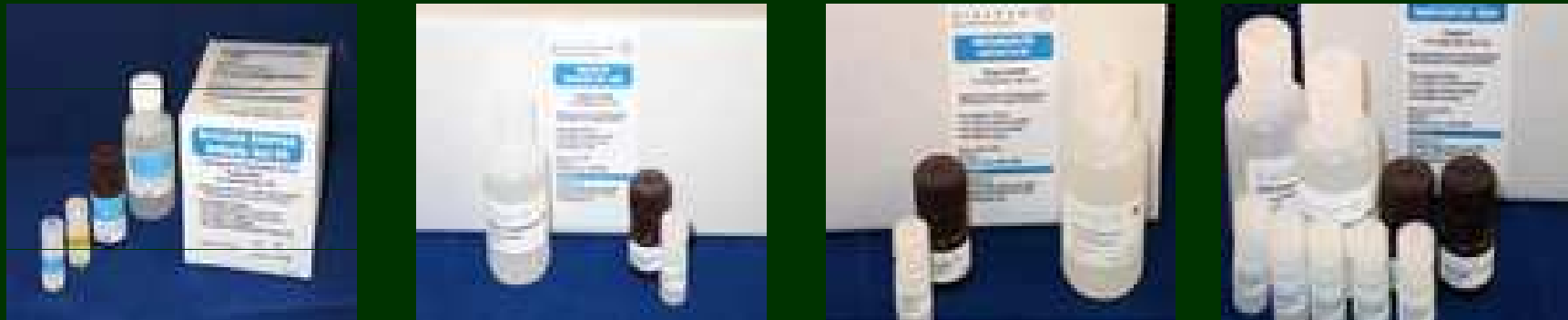


# Homogenní FIA

## Fluorescence polarisation immunoassay (FPIA)



# Fluorescence polarization immunoassay



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

# Měřicí přístroje

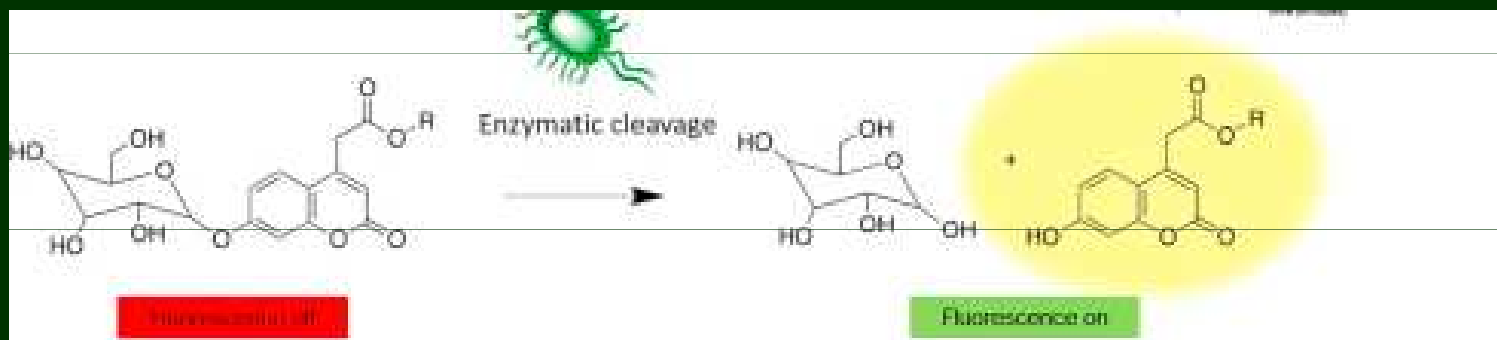
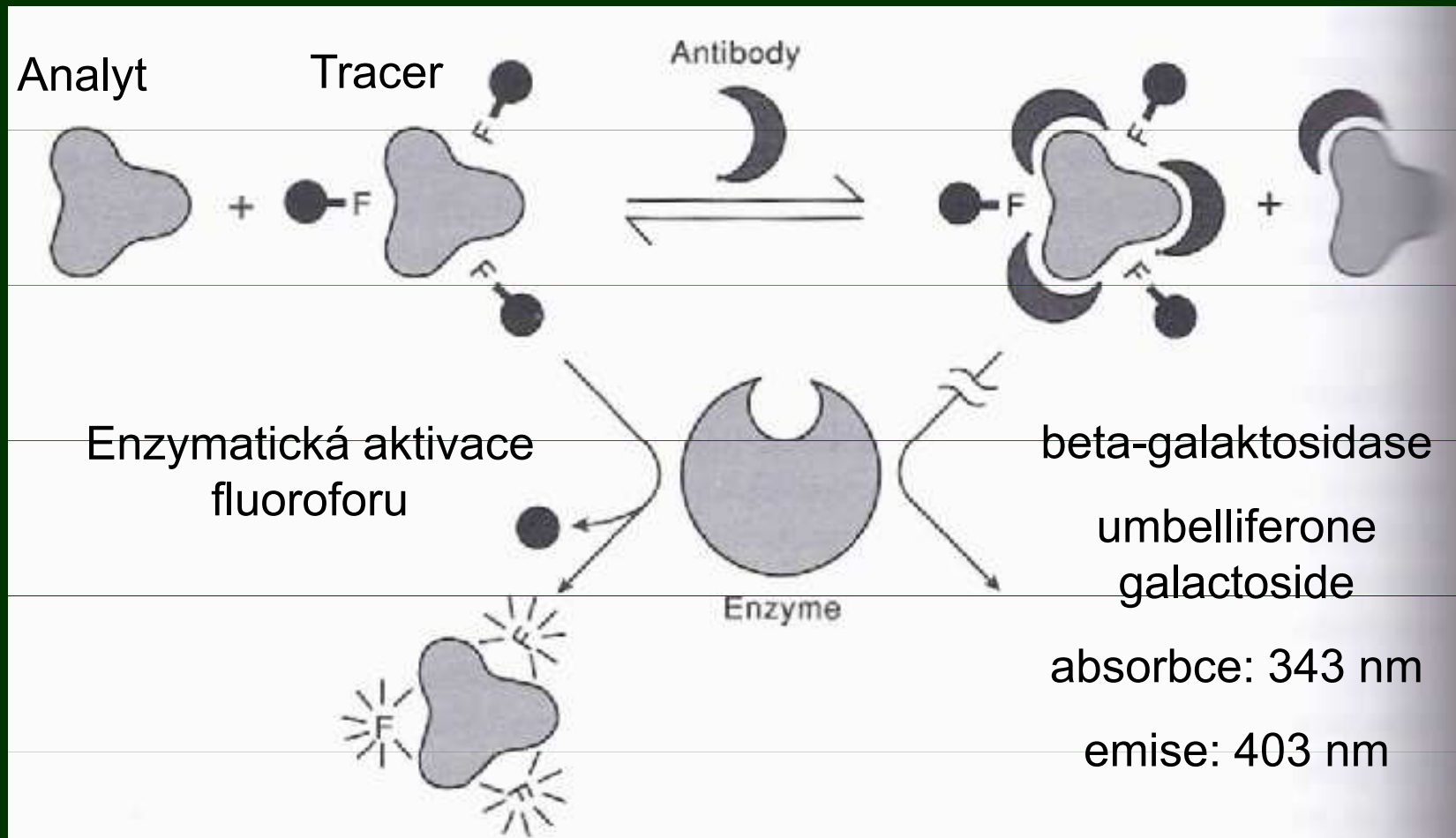
[BioTek™ Synergy 2](#)



[Sentry® 100](#)



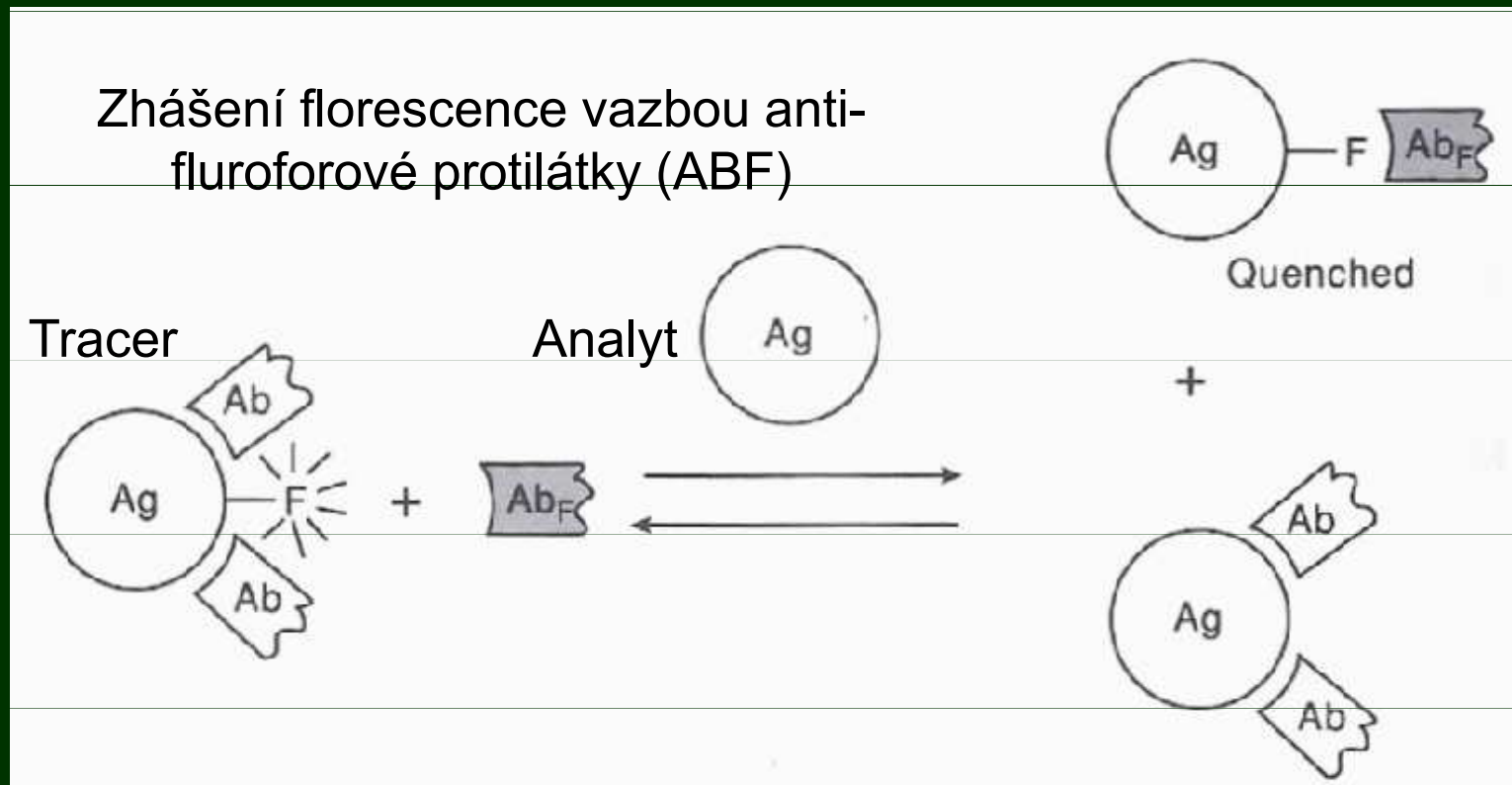
# Release Fluoroimmunoassay (RFIA)



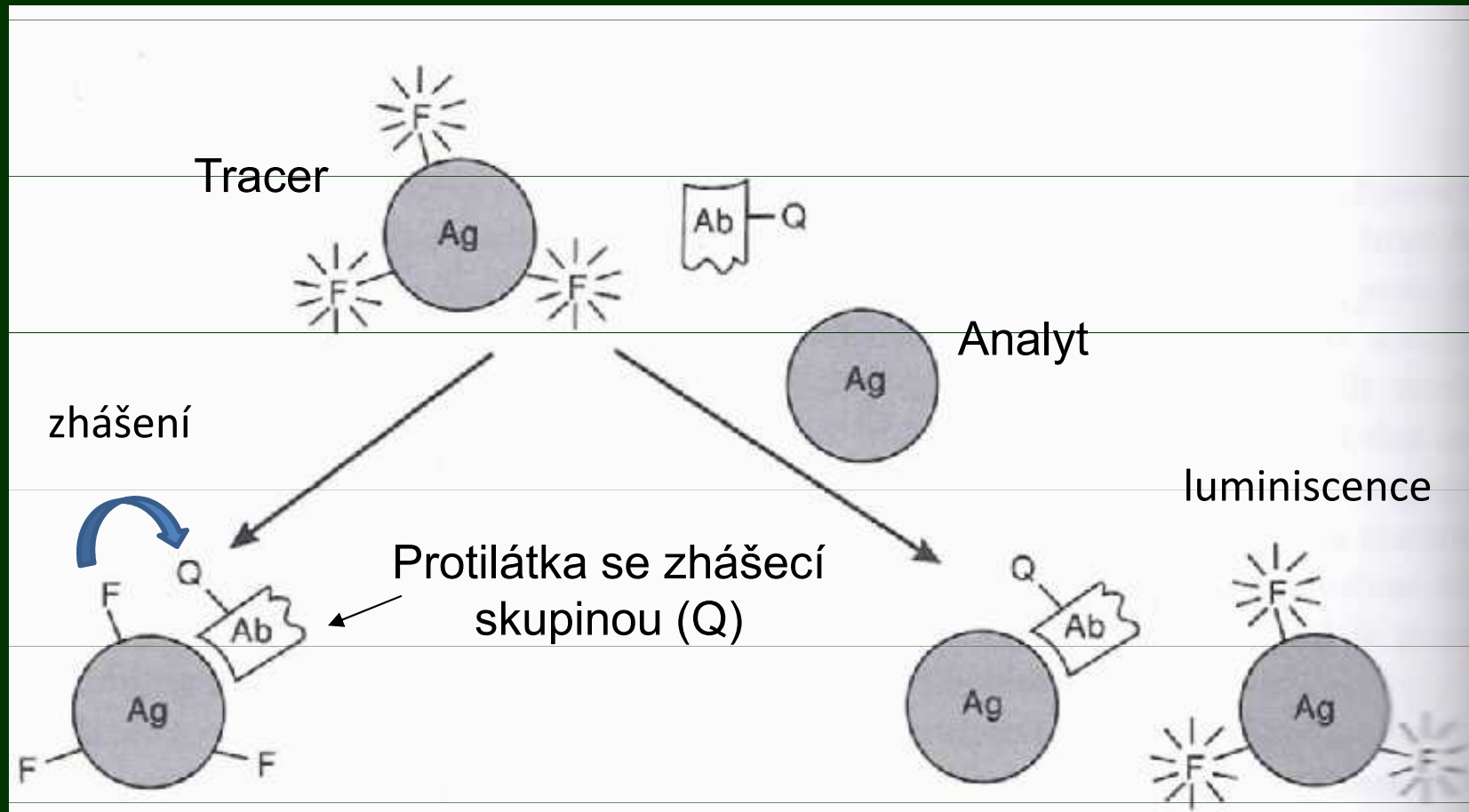
# Fluorescence Modulation Immunoassay (FMIA)

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

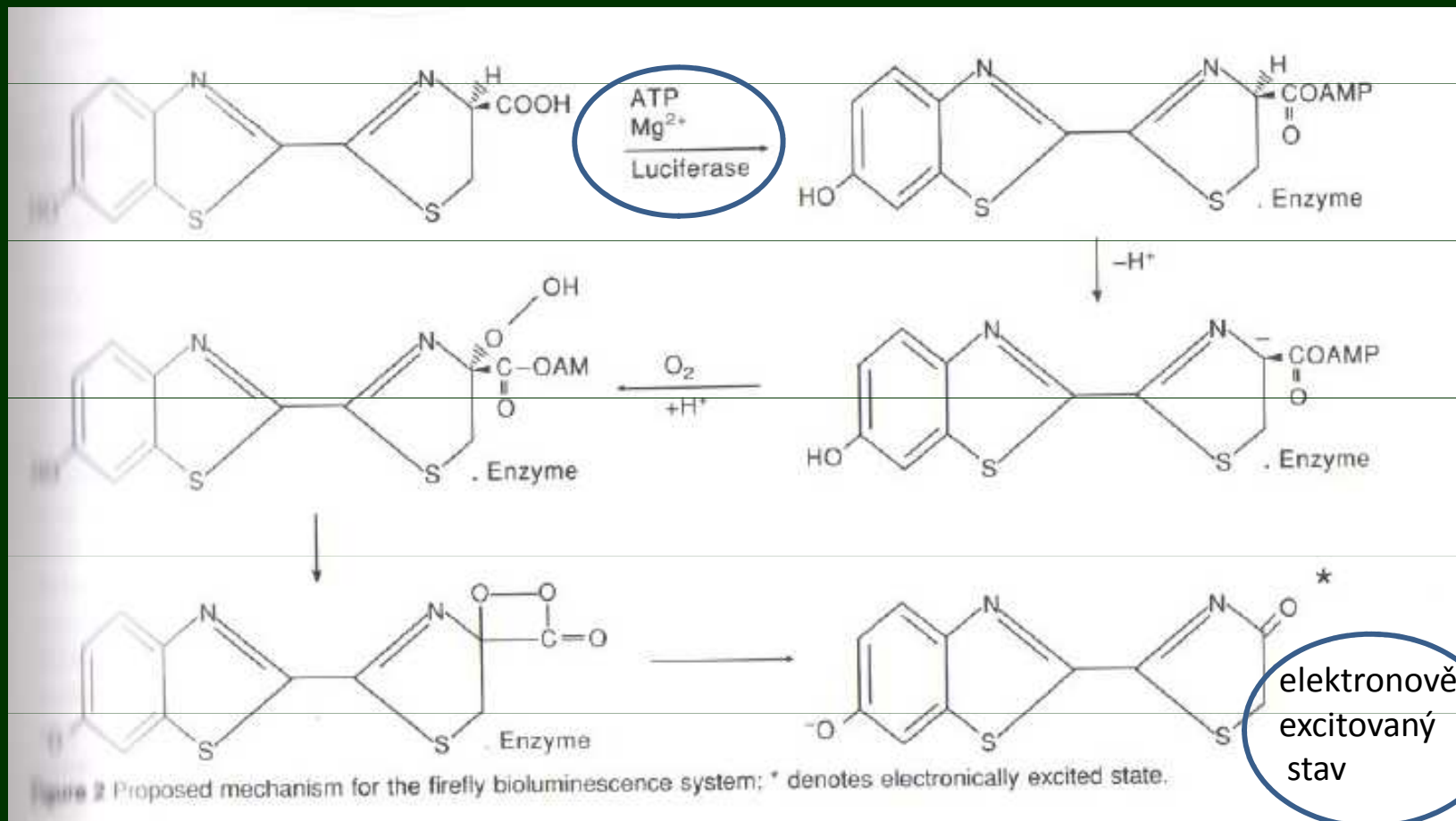
## Nevýhody

v praxi citlivost nižší kvůli přirozené fluorescenci  
pozadí

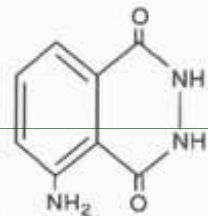


# **Chemiluminiscenční imunoanalýzy (CLIA)**

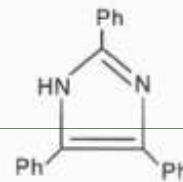
# Nejvíce prostudovaný bioluminiscentní systém: luciferin + světlušková luciferáza



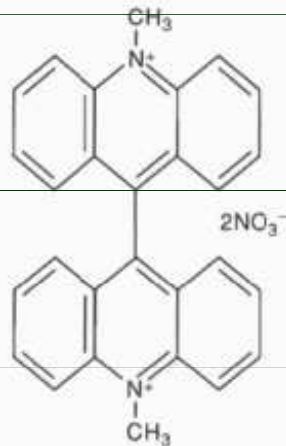
# Struktury chemiluminoforů



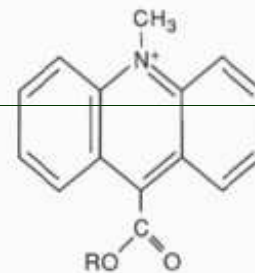
Luminol



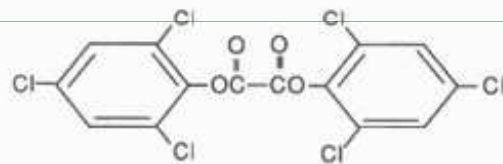
Lophine



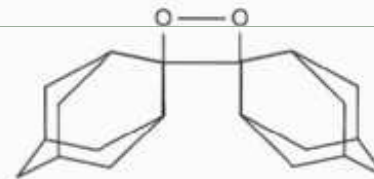
Lucigenin



Acridinium esters

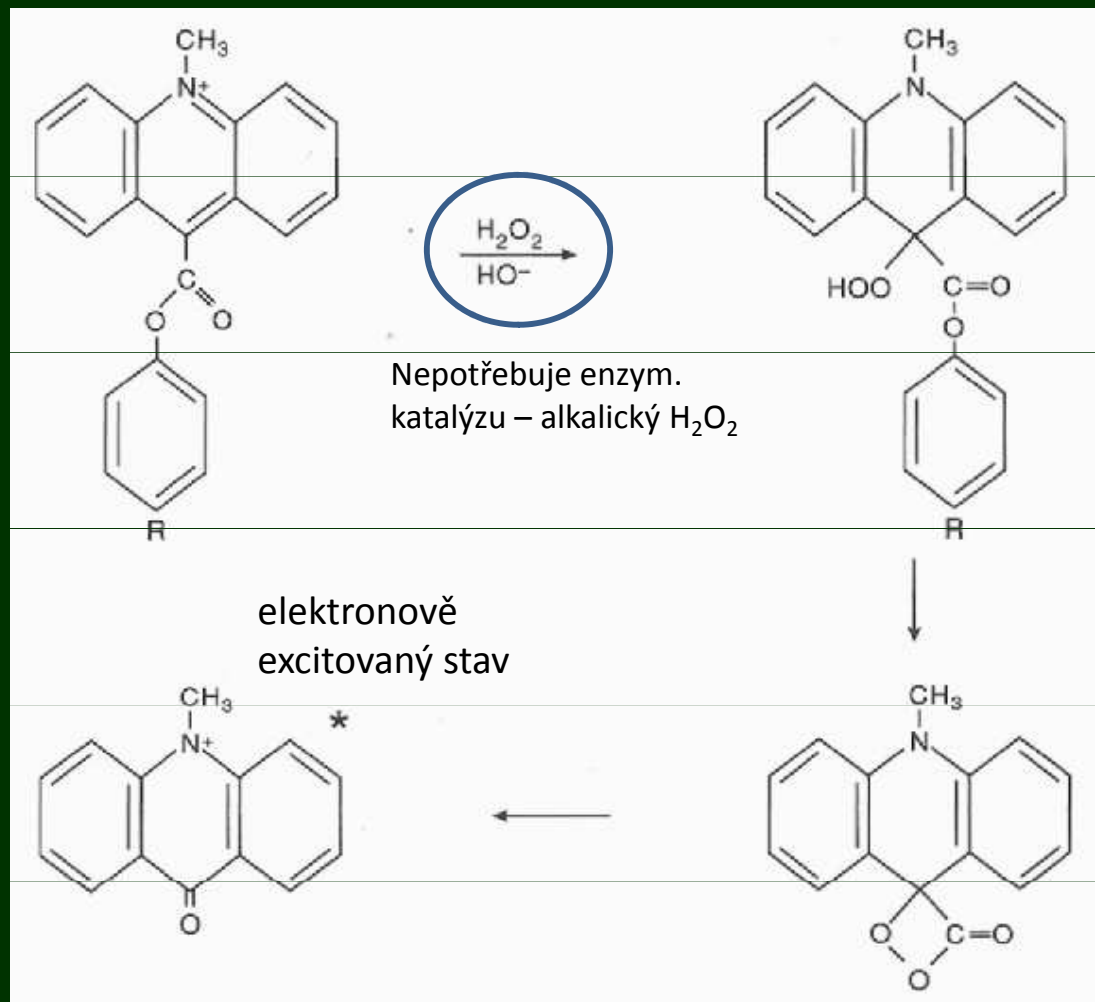


Oxalate ester



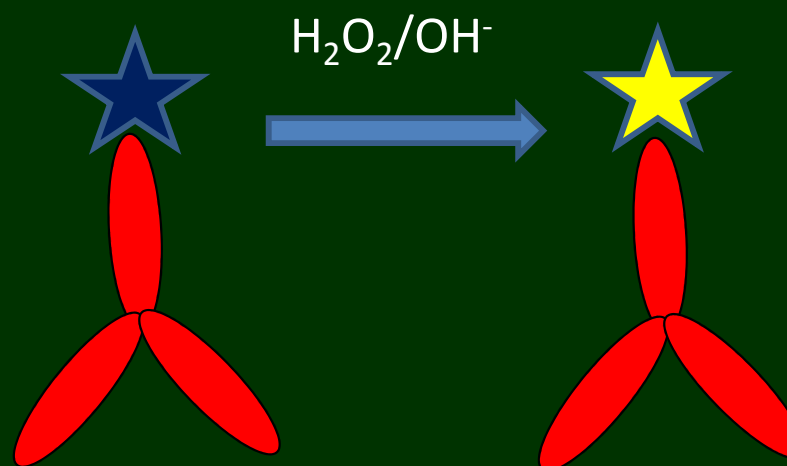
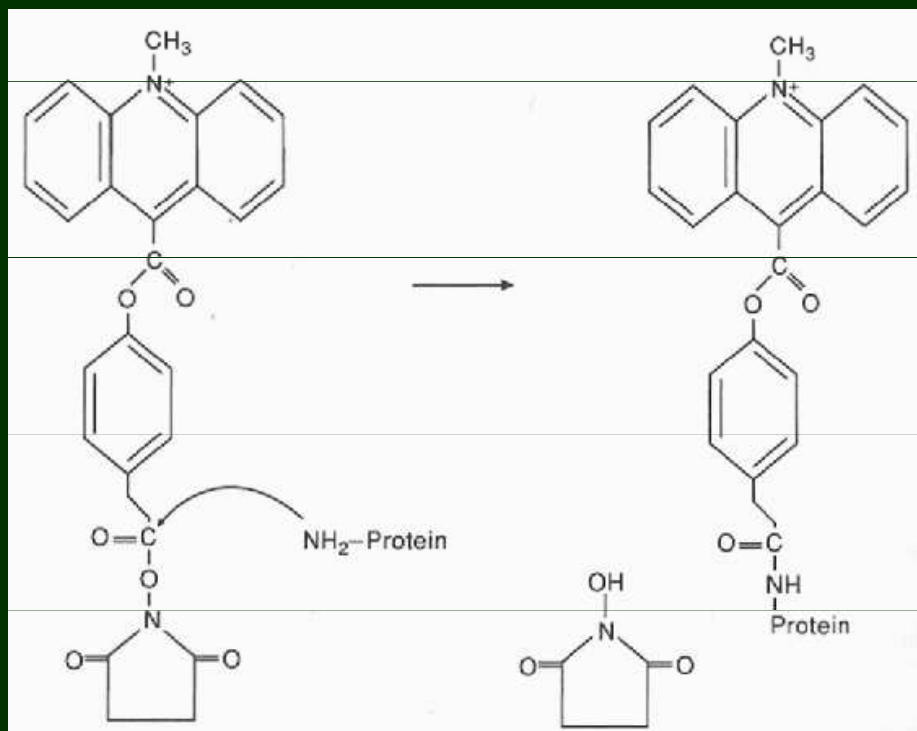
Adamantane dioxetane

# 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.  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) - 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)

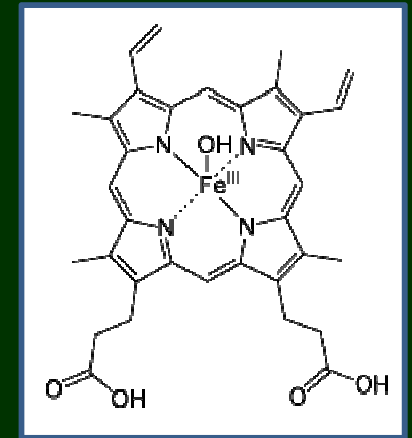
luciferáza (luciferin)

glukóza oxidáza (sacharóza)

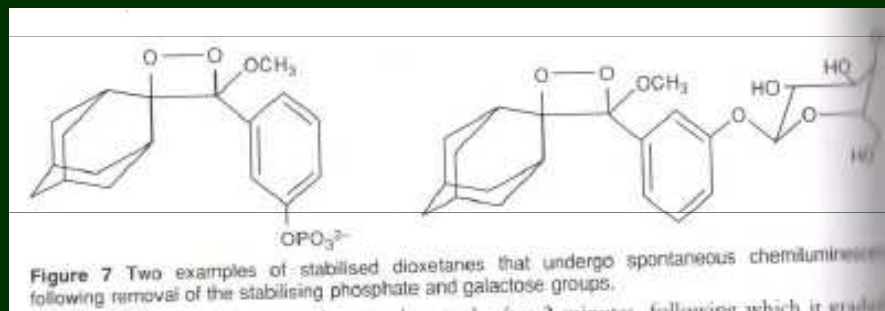
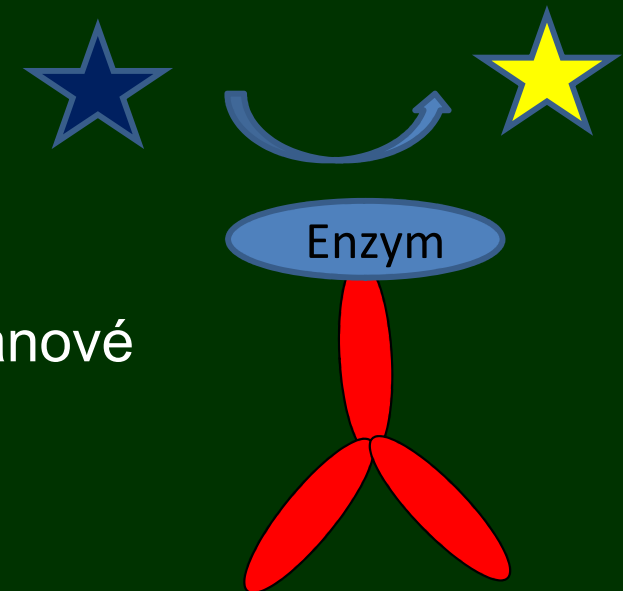
xantin oxidáza (hypoxantin)

alkalická fosfatáza (luciferin fosfát)

alkalická fosfatáza/beta-galaktozidáza (amadantanové dioxetany)

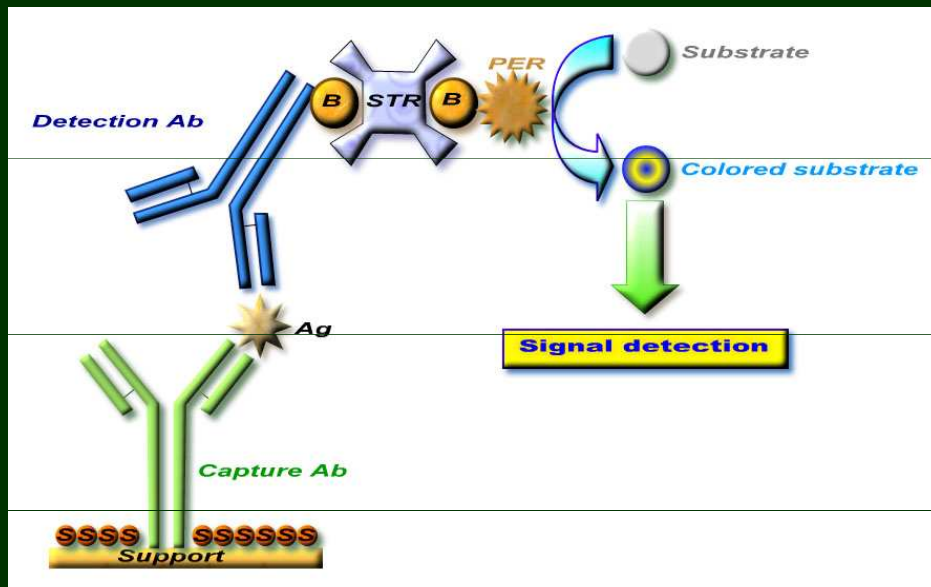


heamatin

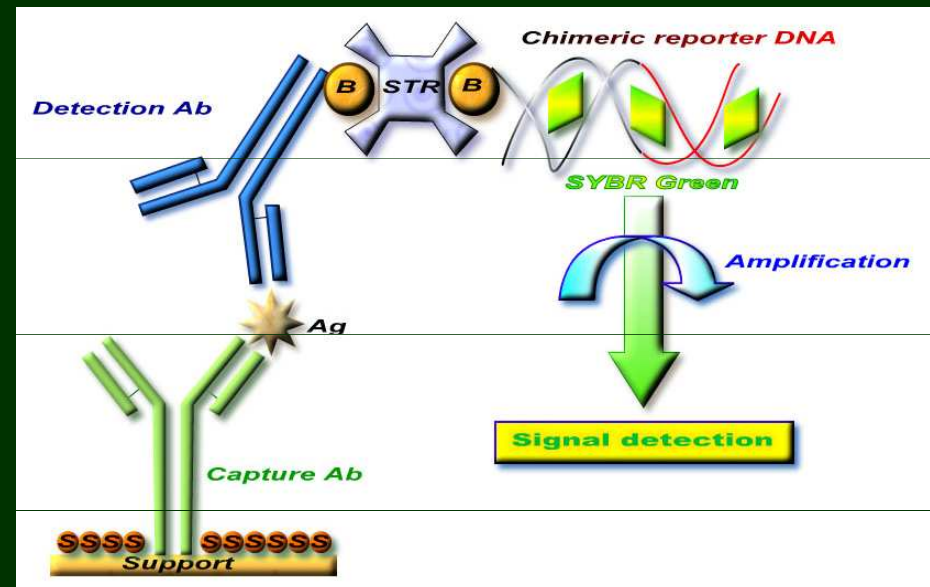


# Alternativní imunoanalytické metody

# Imuno-PCR



ELISA

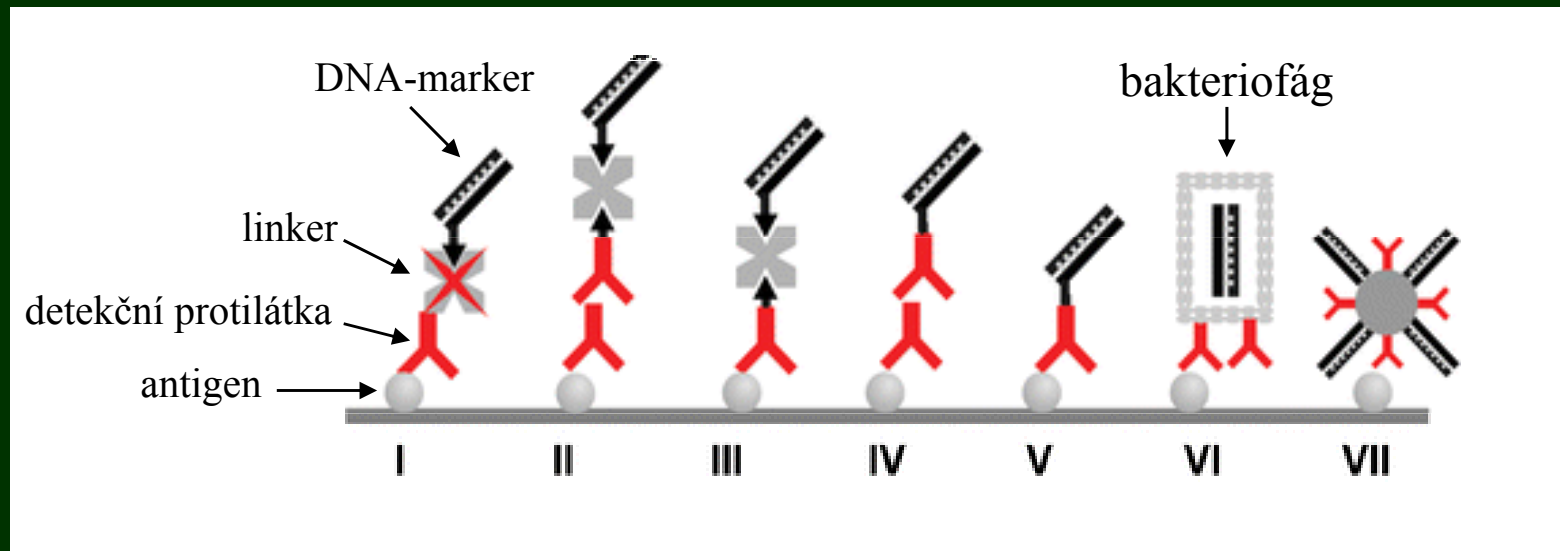
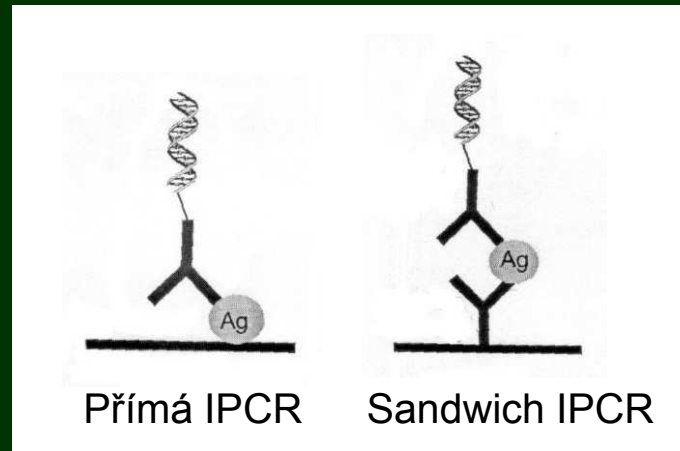


Imuno-PCR

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

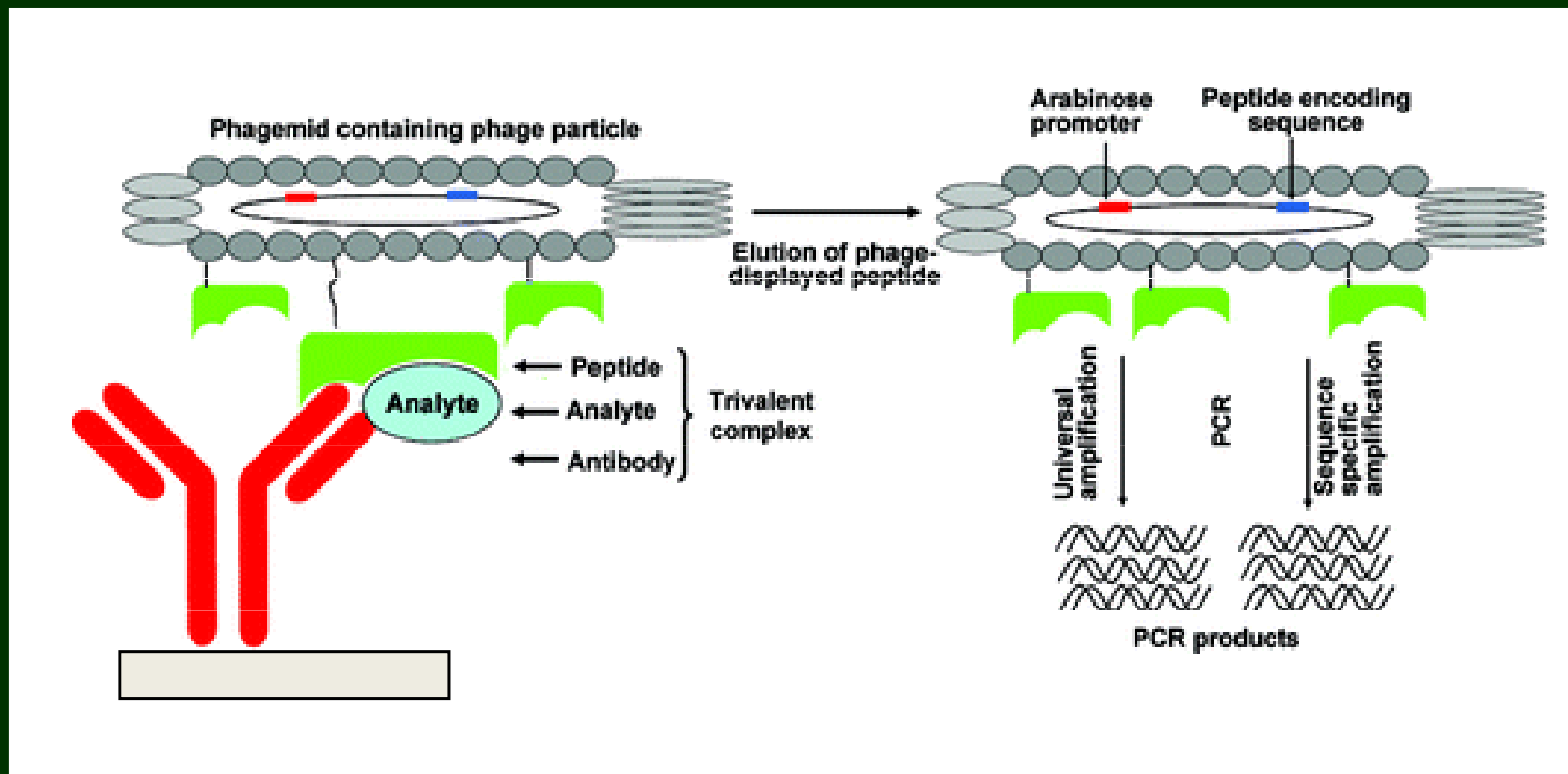


# Formáty imuno-PCR



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

Nekompetitivní immunoanalytická metoda pro detekci malých molekul



# Anti-idiotypové a anti-metatypové protilátky

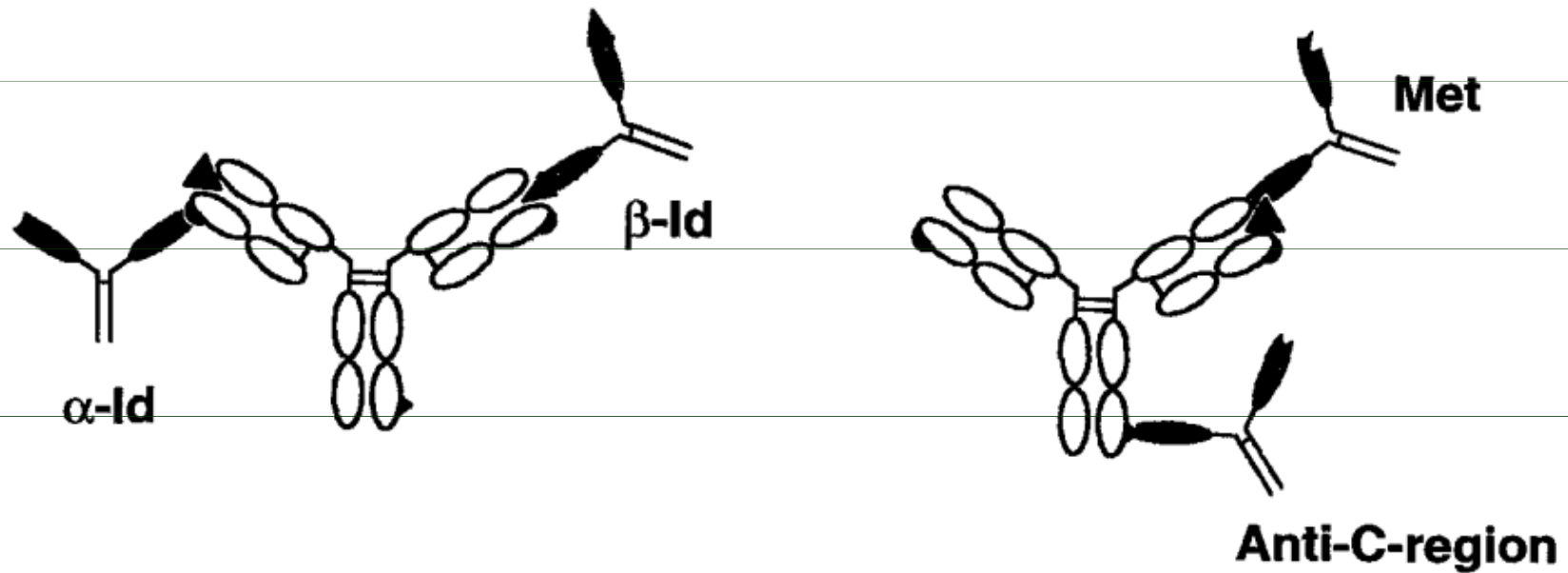


FIG. 11. Schematic representation of the binding properties of anti-idiotypic antibodies and anti-metatypic antibodies.  $\blacktriangledown$ , haptens;  $\alpha$ -Id,  $\alpha$ -type anti-idiotypic antibody;  $\beta$ -Id,  $\beta$ -type anti-idiotypic antibody; Met, anti-metatypic antibody; anti-C-region,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

alfa-vazba do vnější části vazebného místa  
(detekce)

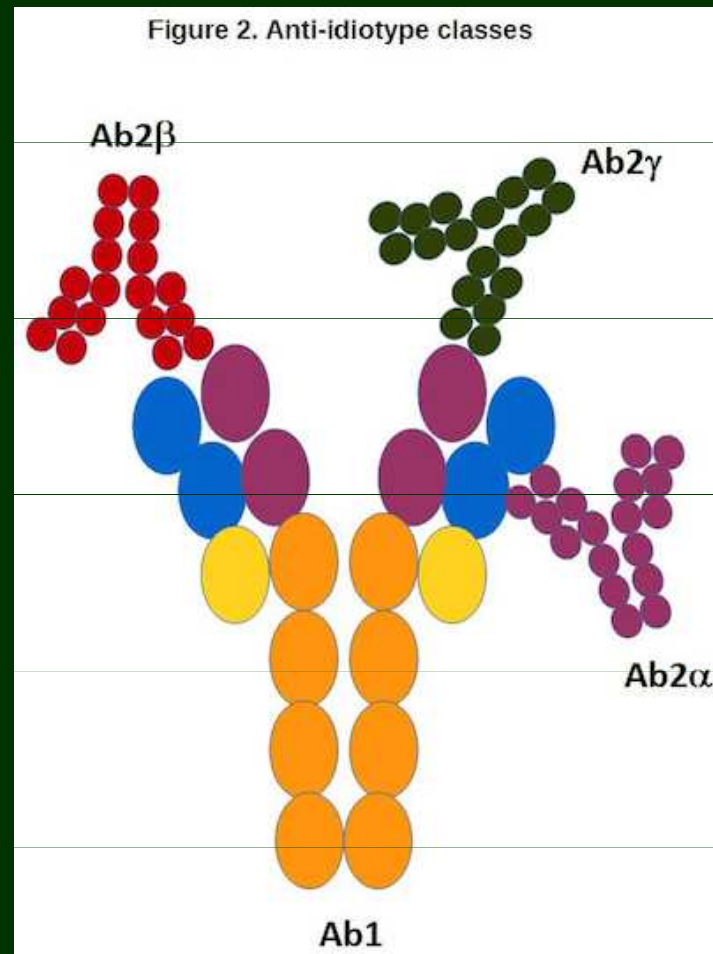
beta-vazba dovnitř vaz. místa (blokace  
neobsazených míst)

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 $\alpha$ ),
3. uniquely identify the antibody (Ab $\alpha$ , Ab2 $\beta$ , or Ab2 $\alpha$ )?



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

# Nekompetitivní metody založené na anti-idiotypových protilátkách

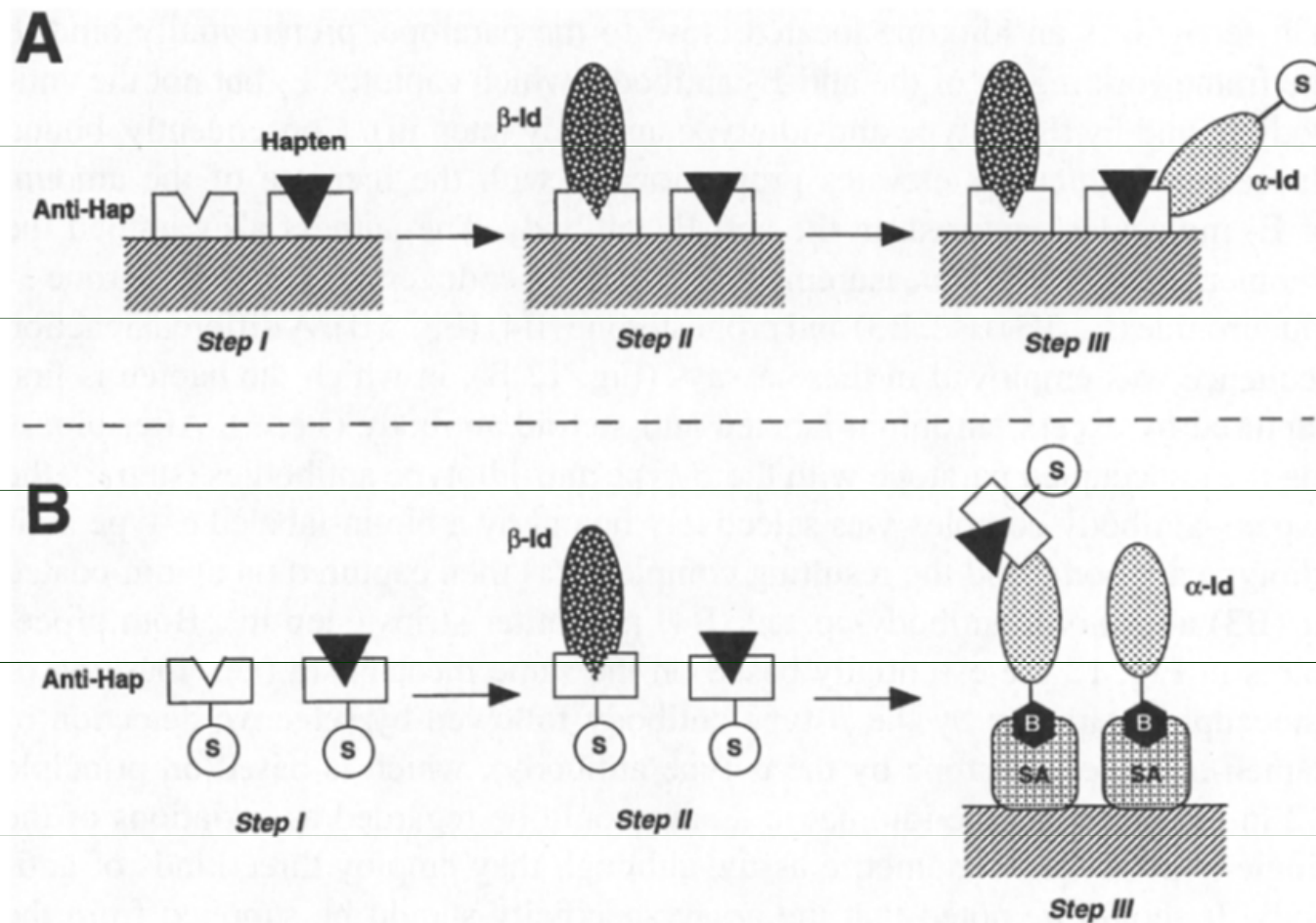


FIG. 12. Noncompetitive hapten immunoassay procedures (A and B) using a combination of the  $\alpha$ -type and  $\beta$ -type anti-idiotypic antibodies, each recognizing the framework and paratope of the anti-hapten antibody. Anti-hap, anti-hapten antibody (primary antibody);  $\alpha$ -Id,  $\alpha$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

# Nekompetitivní metody založené na anti-metatypových protilátkách

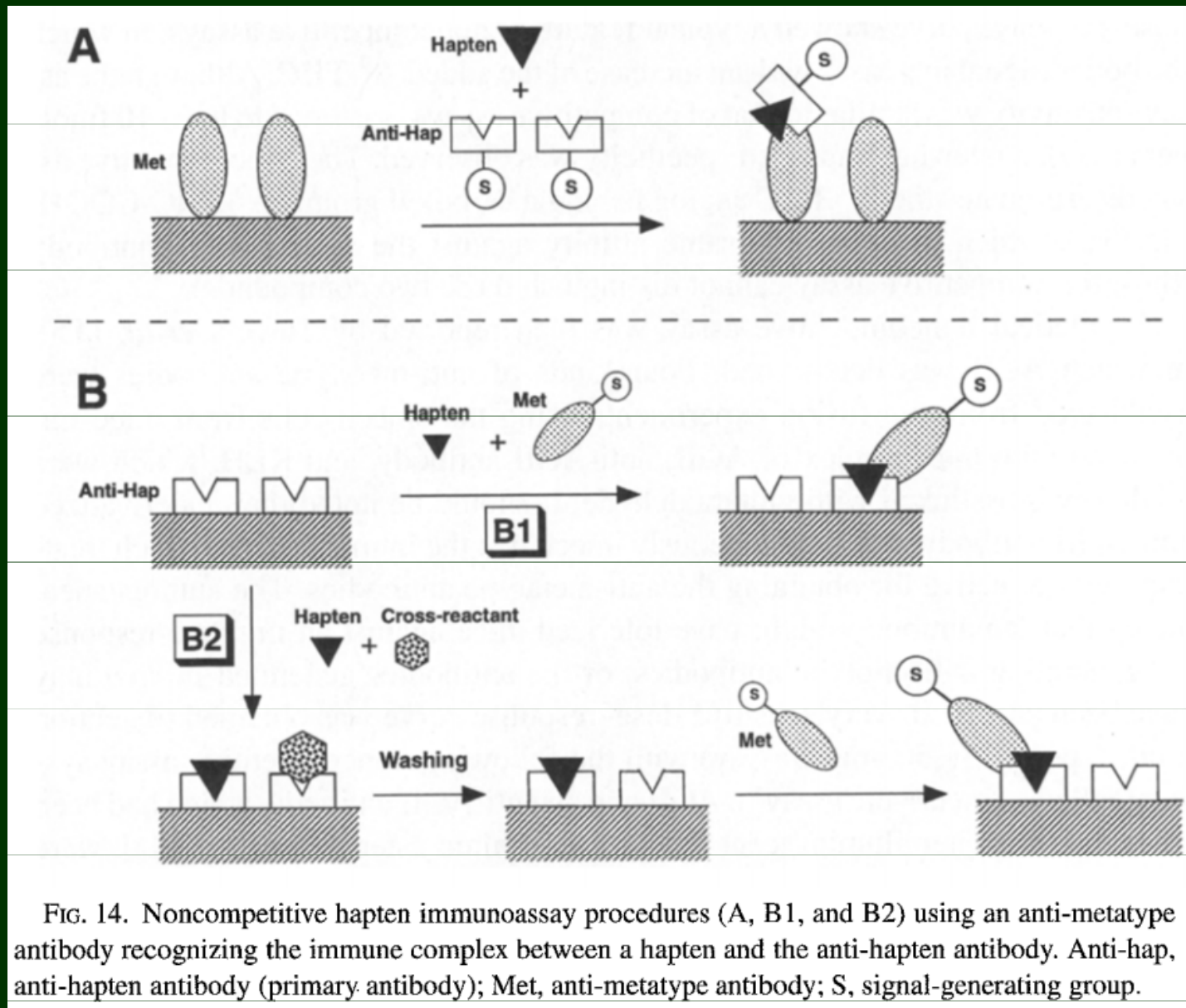


FIG. 14. Noncompetitive hapten immunoassay procedures (A, B1, and B2) using an anti-metatype antibody recognizing the immune complex between a hapten and the anti-hapten antibody. Anti-hap, anti-hapten antibody (primary antibody); Met, anti-metatype antibody; S, signal-generating group.

# 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

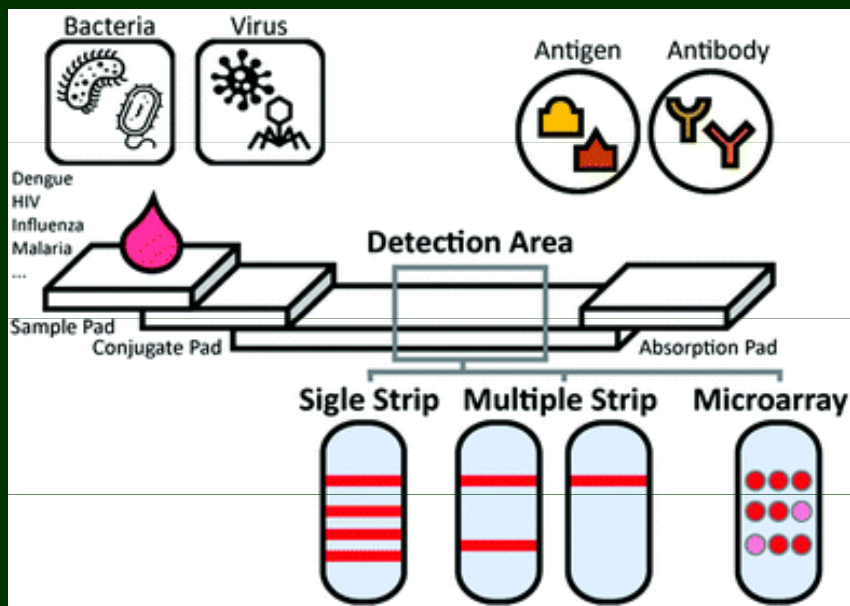
Nekvalifikovaný personál

Polní a provozní podmínky

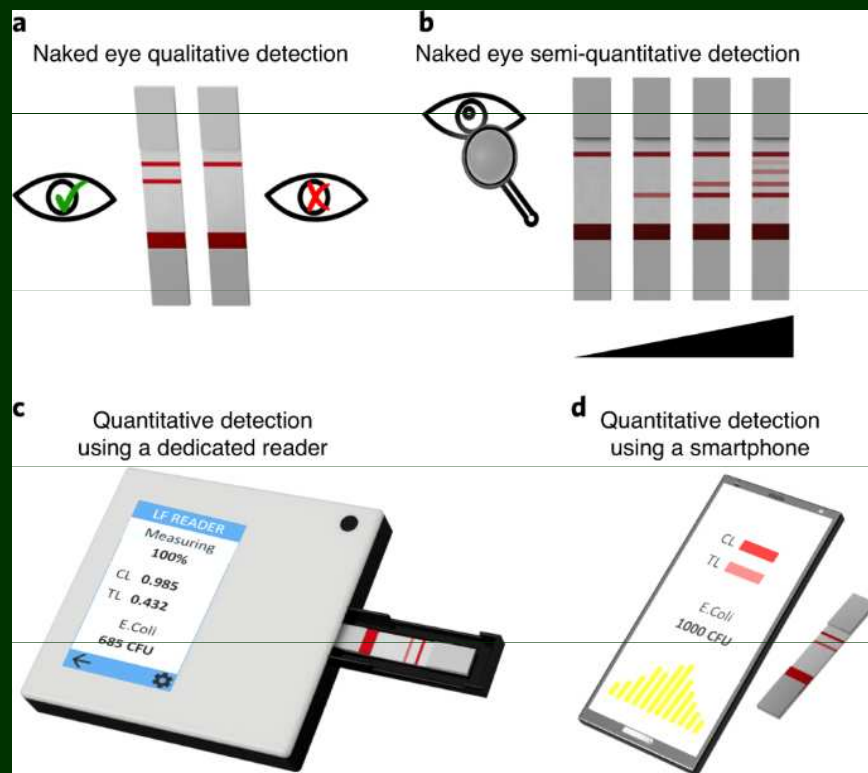
Nižší citlivost

Preenrichment

Předběžné stanovení



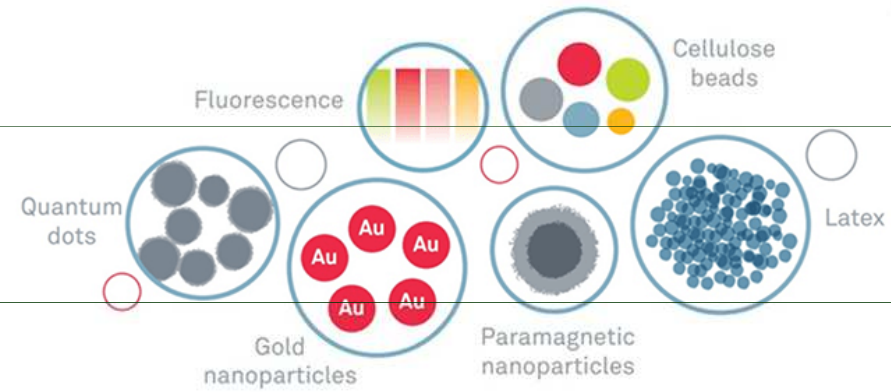
Kim et al., 2019



Parolo et al., 2020

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

**LABEL TYPES**

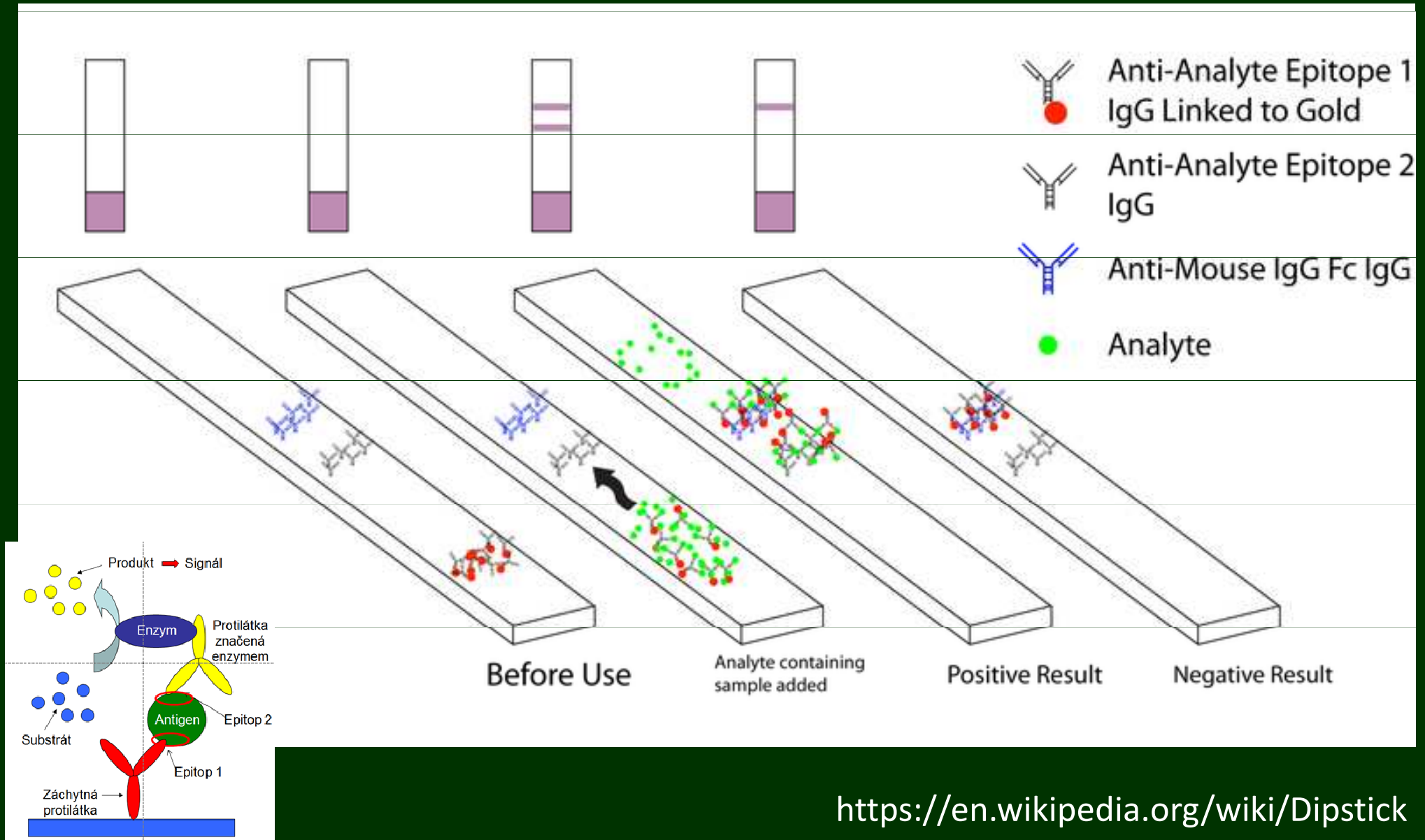


Typically, lateral flow assays utilize conjugated gold nanoparticles within the conjugate pad. Other labels include colored polystyrene beads, magnetic beads, quantum dots or upconverting nanoparticles.

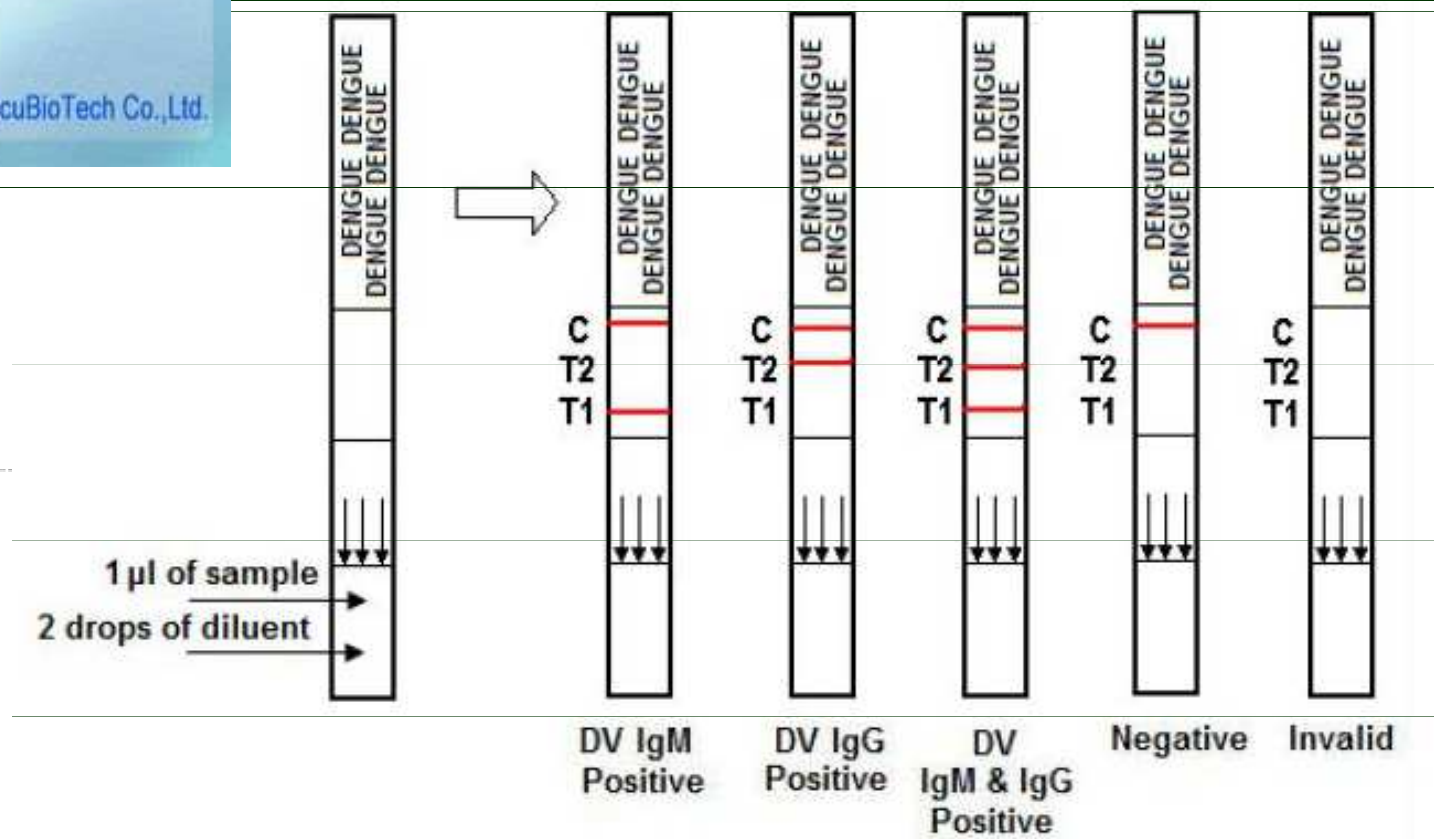
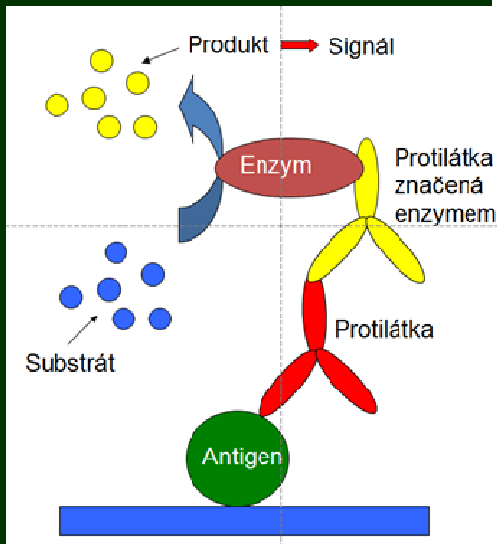
The optimization of the assay will ensure the label interacts correctly with the antibody and antigen to ensure efficiency and accuracy of results.

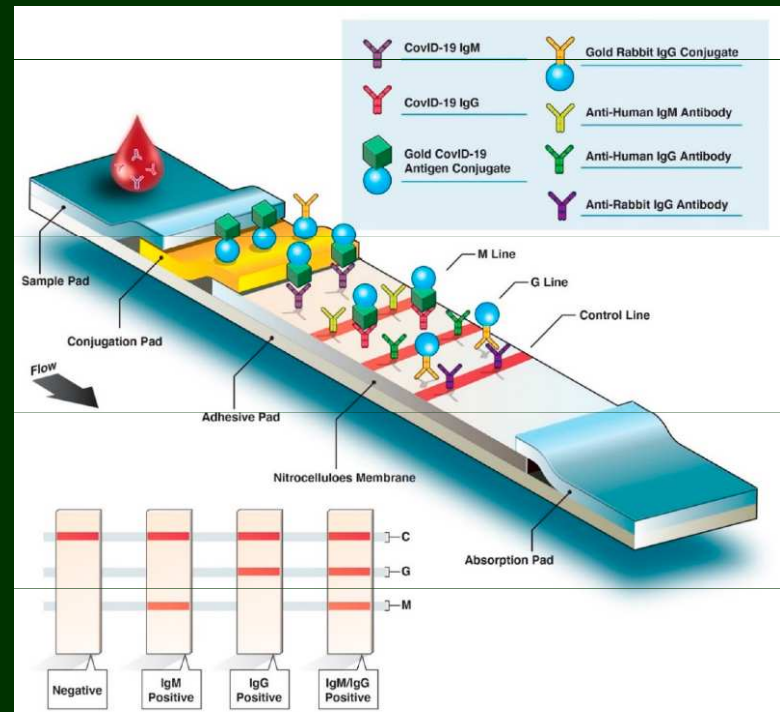
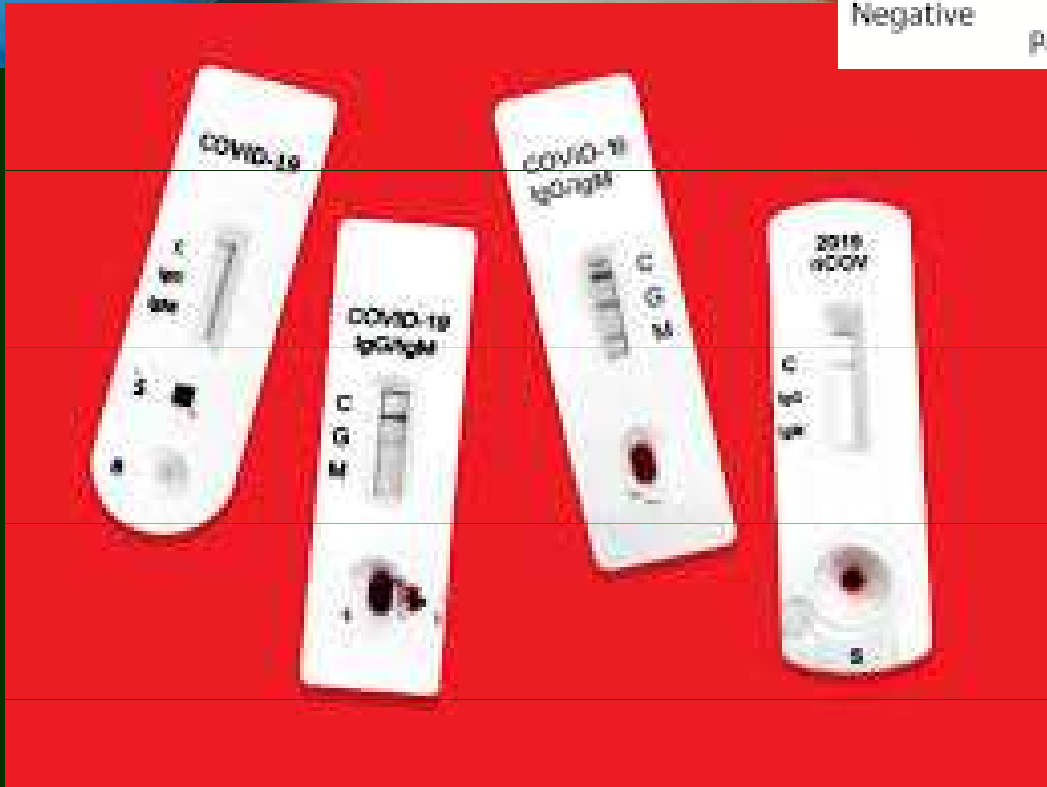
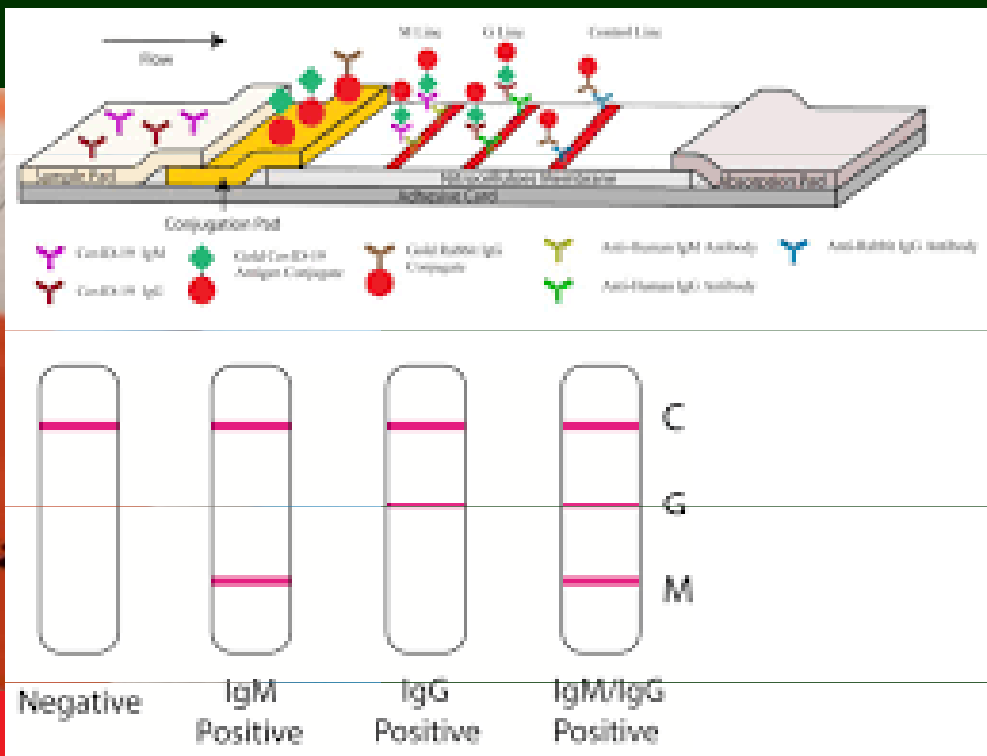
# Technologie dipstick – sandwich uspořádání

diagnostika velkých antigenů (protein, virus, bakterie)



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





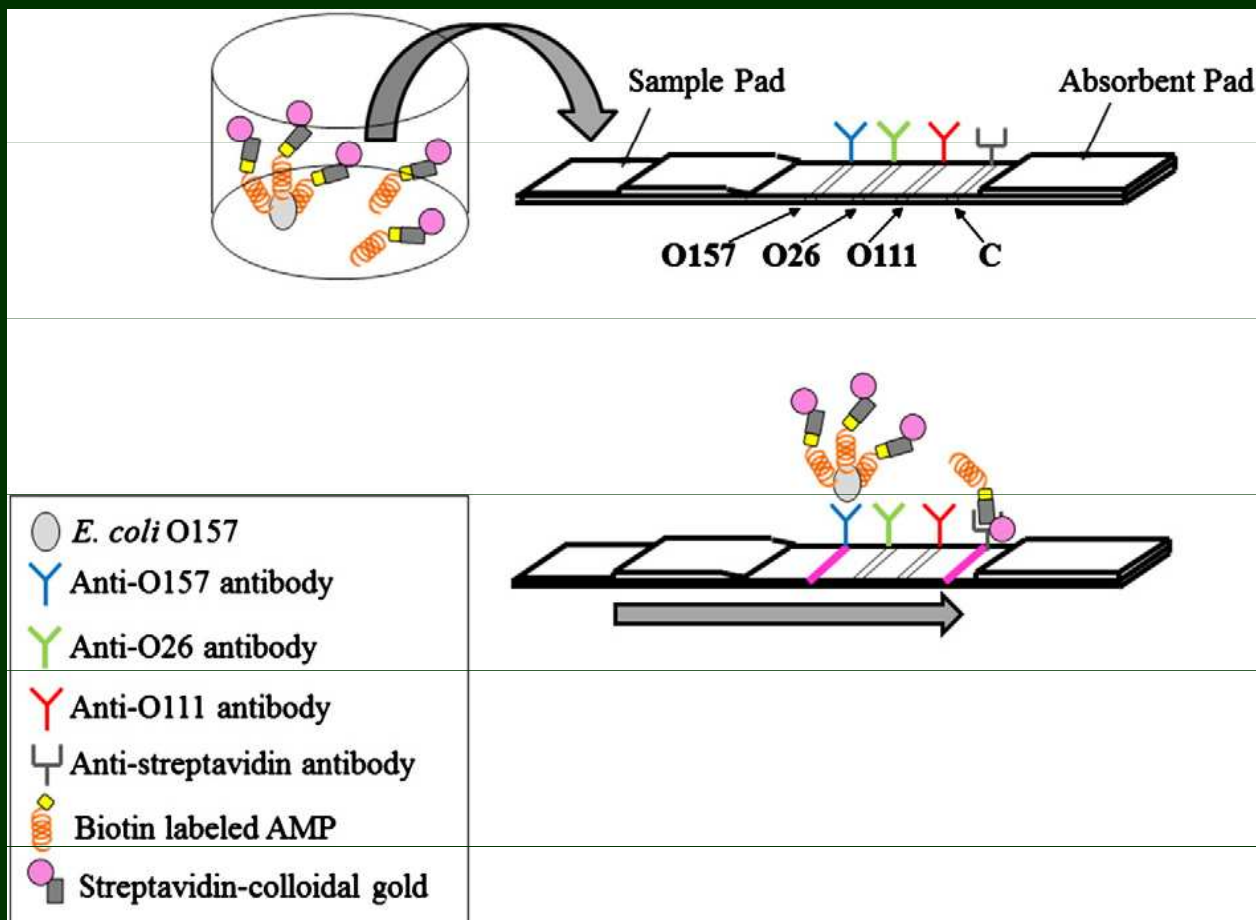


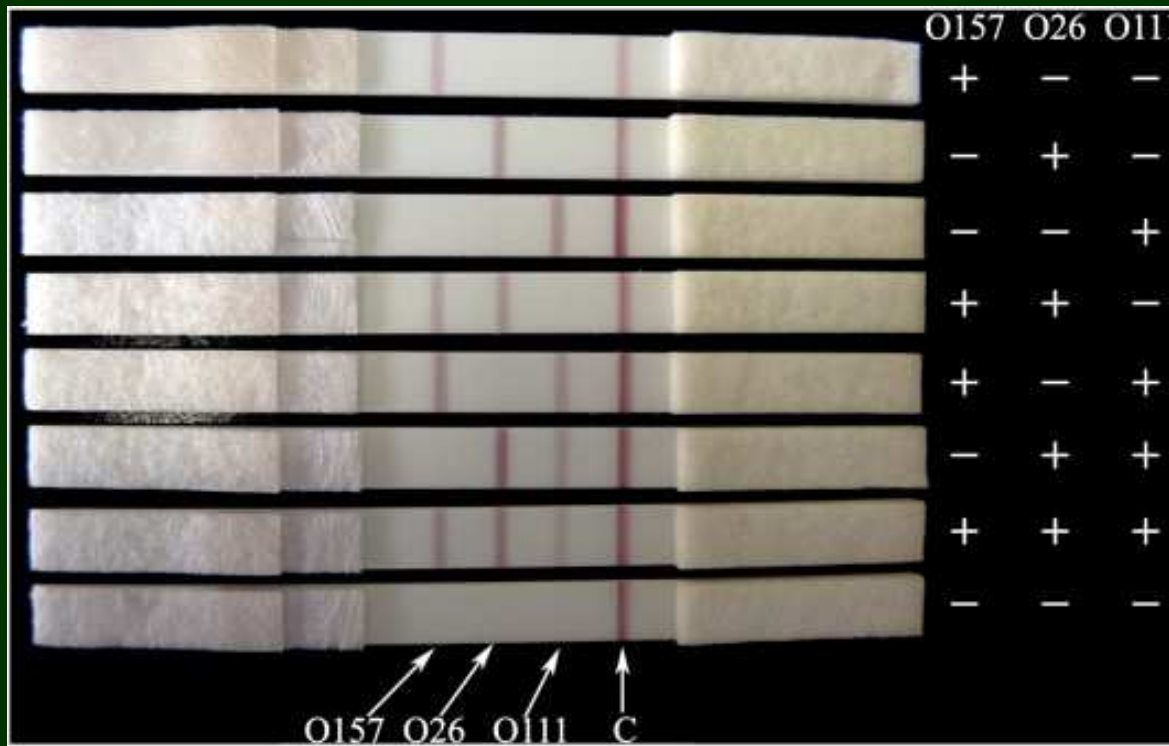
Fig. 1. Schematic diagram of the multiplex LFA strip. Arrows indicate the positions of the control (C) and test lines corresponding to O157, O26, and O111. Antigen (e.g., *E. coli* O157) and streptavidin–colloidal gold conjugate solutions are mixed, and then the mixture is applied to the sample pad of 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!<sup>®</sup> 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.

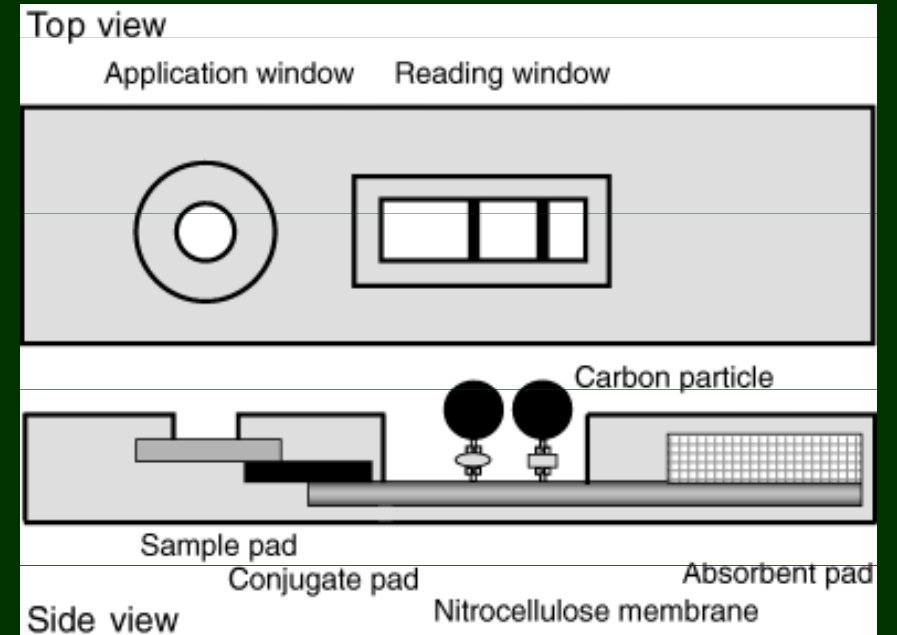
Sensitivity of the multiplex lateral flow assay using an antimicrobial peptide to detect *E. coli* strains O157, O26, and O111 in serial dilution.

Test bacterium <sup>a</sup>	Strain	Bacterial cultures (CFU/mL)					
		10 <sup>8</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>
<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.

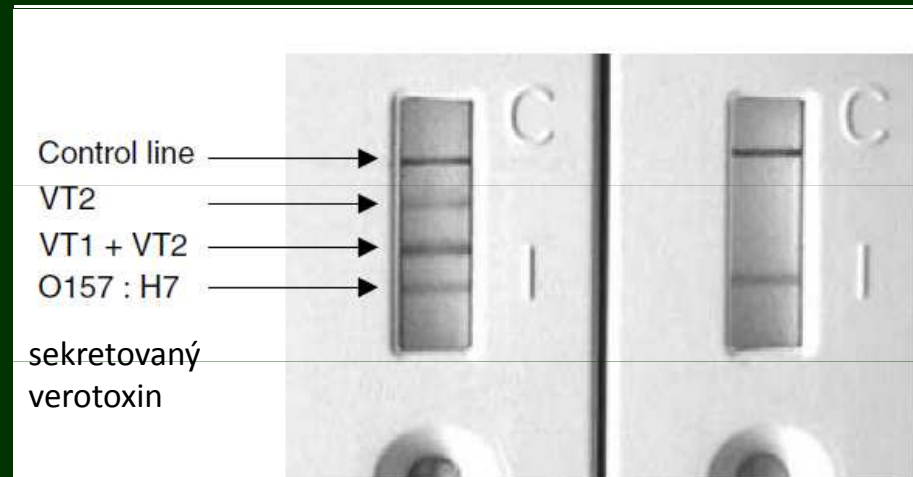
<sup>a</sup> Live cells cultured in mEC + n broth.





**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

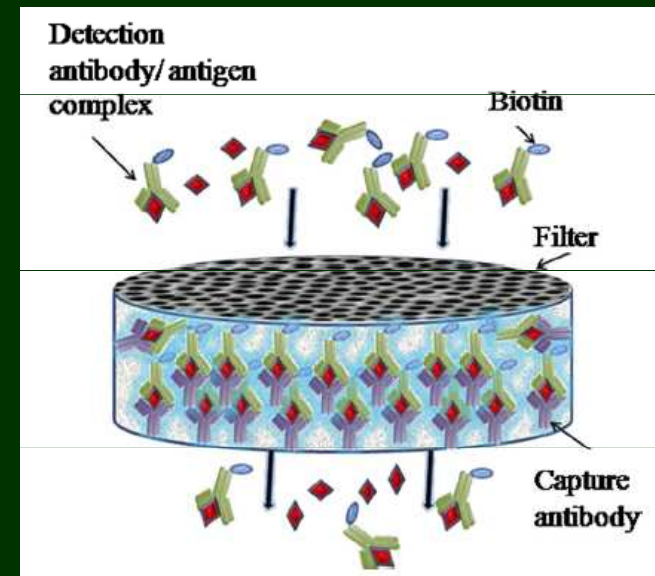
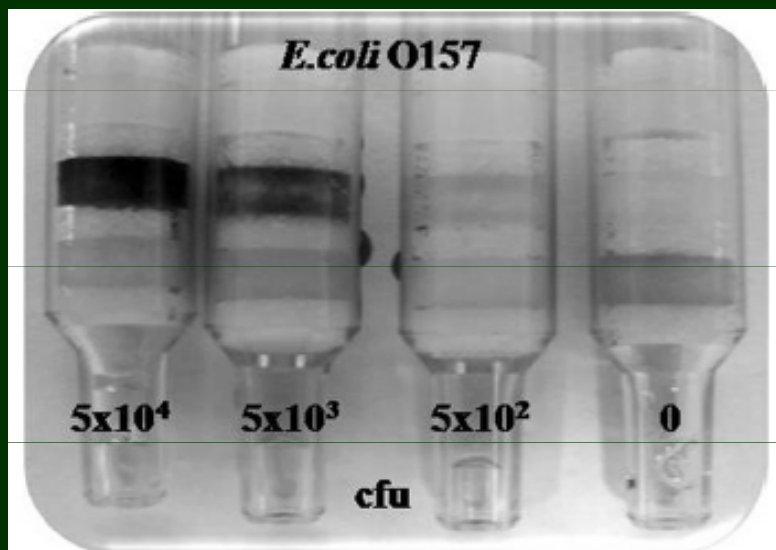
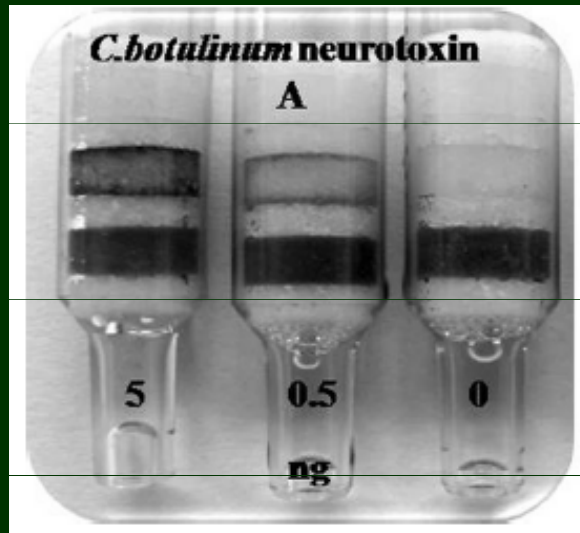


**Fig. 5** Detailed view of test windows for single lane, multi-analyte LFIA device. Left: culture supernatant of *E. coli* O157 (VT1 and 2 producer); right: culture supernatant of *E. coli* O157 (VT-negative strain)

# 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!<sup>®</sup> EHEC** (Meridian, Bioscience, Inc., USA)  
detekce E. coli O157:H7 nebo Shiga toxinu 1 a 2 ve vzorcích stolice

# Rapid Affinity Chromatography Column-Based Tests



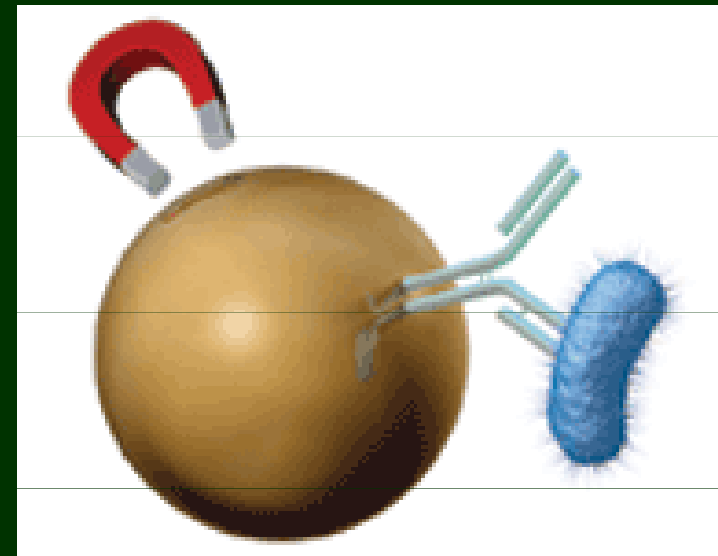
LOD: 500 CFU / 0,5 ml vzorku

# Sample preenrichment methods

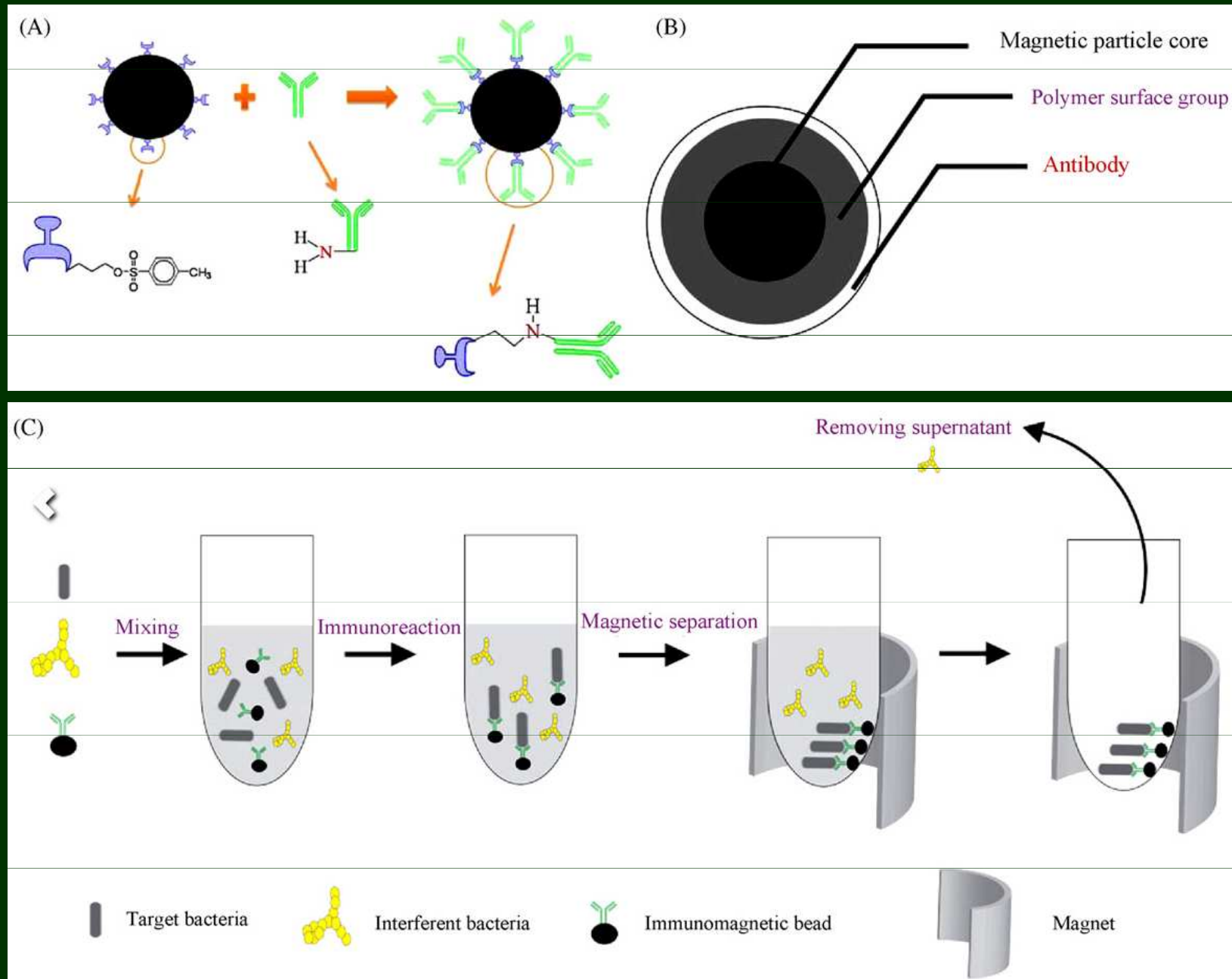
Bacteria  
precultivation



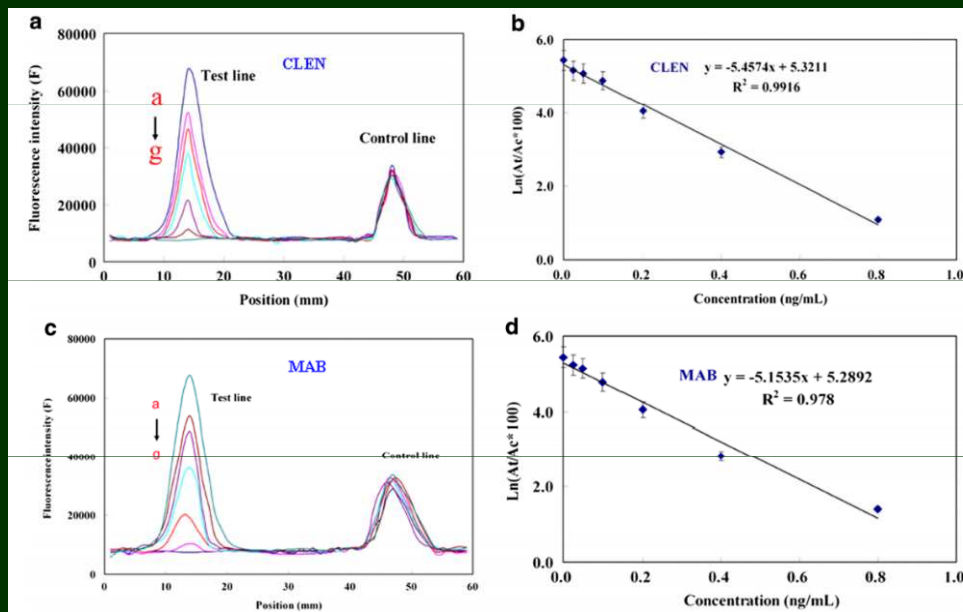
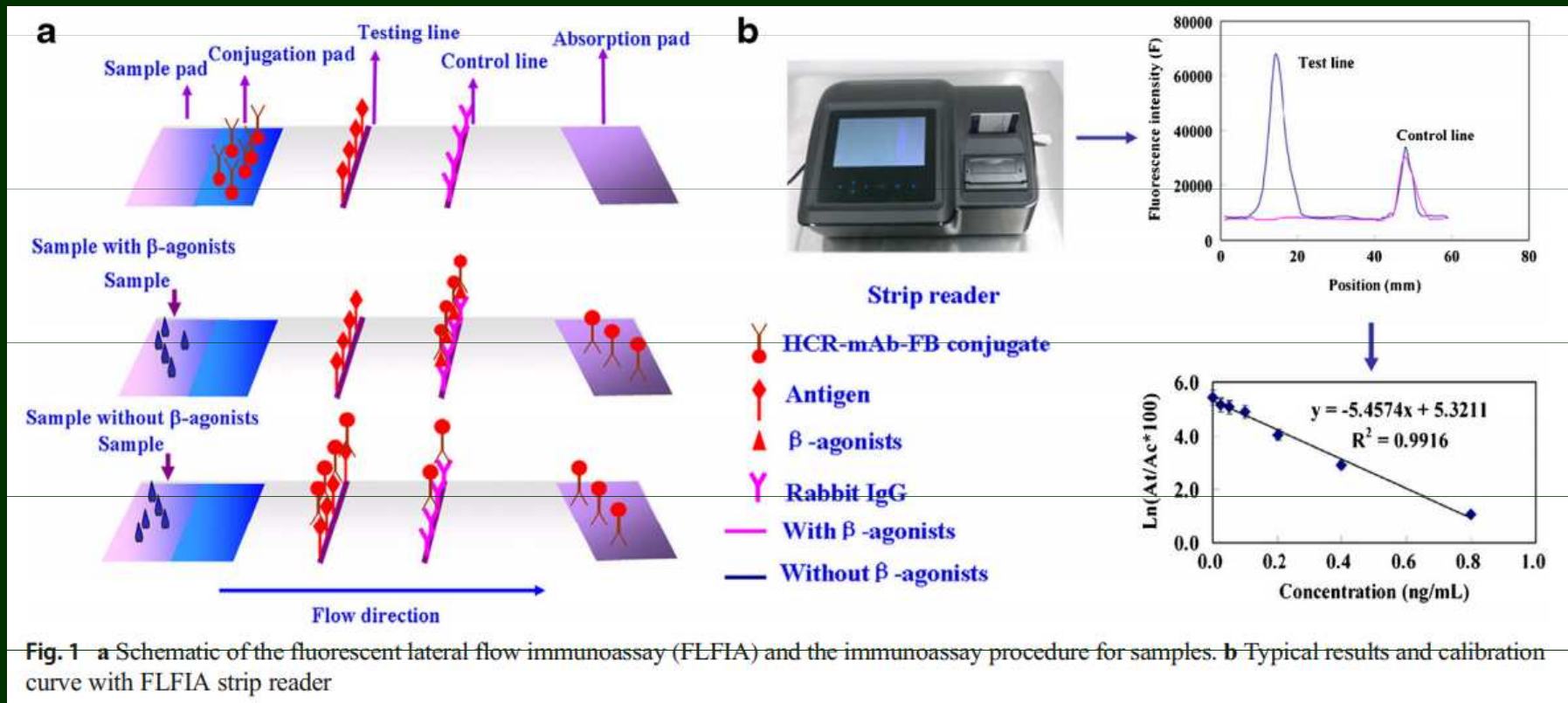
Immunomagnetic  
separation



# Immunomagnetic separation



# (Semi)kvantitativní stanovení pomocí lateral flow immunoassays



Wang et al., 2018

# Další možnosti kvantifikace signálu u LFA

