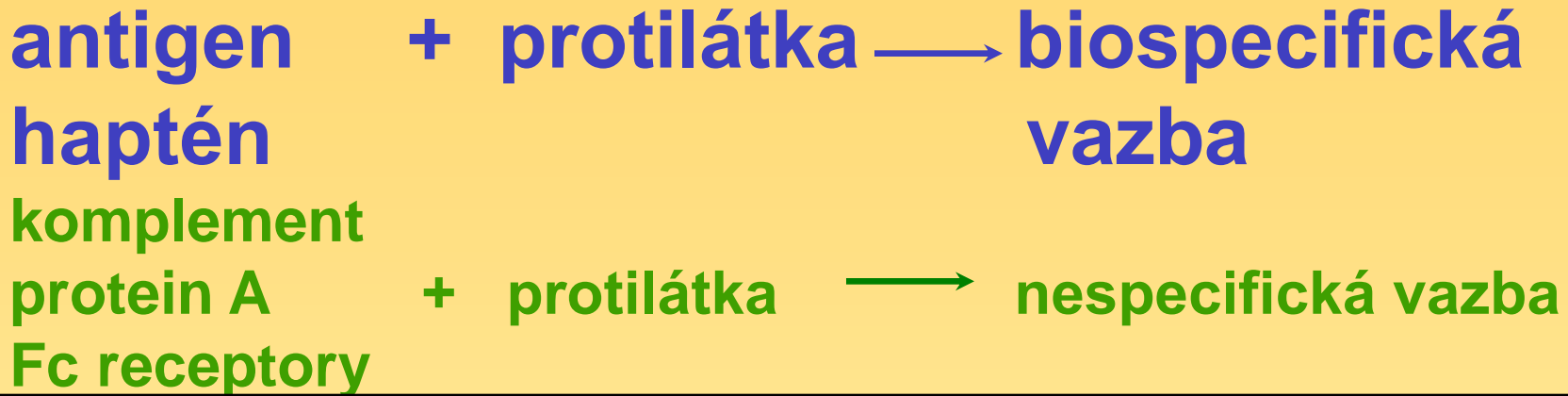


ÚVOD DO IMUNOCHEMICKÝCH METOD

Imunochemické metody



Význam imunochemických metod

- ✓ důkaz přítomnosti (určení množství) antigenu
- ✓ důkaz přítomnosti (množství) protilátky

Sledování průběhu reakce:

- ✓ úbytku jednoho z dvojice reaktantů
- ✓ tvorby reakčního produktu (imunokomplexu)

Kvalitativní reakce:

pozitivita reakce

- ✓ vznik zákalu
- ✓ vznik precipitátu
- ✓ vznik aglutinátu

Kvantitativní reakce:

množství vzniklých imunokomplexů se přesně měří

Typy imunochemických metod:

- ✓ **charakter antigenu**
- ✓ **charakter protilátky**
- ✓ **prostředí, kde reakce probíhá**
- ✓ **způsob detekce (určení imunokomplexu)**

Charakter antigenu

- ✓ kompletní
- ✓ nekompletní (haptén)

Kompletní antigen

- ✓ různý počet determinantů
- ✓ různou rozpustnost (koloidní nebo korpuskulární)
- ✓ různá forma (volný nebo vázaný na nosič)
- ✓ může mít jinou biologickou aktivitu (enzymovou, hormonální, receptorovou)
Ize využít pro detekci

Charakter protilátky

- ✓ polyklonální (konvenční)–vazebná místa nerovnocenná
- ✓ monoklonální

protilátka proti hapténu

vnitřní afinita protilátky

protilátka proti antigenu

avidita protilátky (počet vazebných míst)

Protilátka v imunoreakcích

- ✓ volná
- ✓ vázaná
 - B-lymfocyty
 - nosič (částice, jamka, adsorbent)
 - Fc-receptory na různých buňkách
 - v imunokomplexech (rozpustit v nadbytku)

Prostředí, kde reakce probíhá: *in vitro*

- ✓ kapalné
- ✓ polotuhé (gelové)
- ✓ kombinované (jedna složka v kapalném, druhá v tuhém)

Detekce imunokomplexu:

✓ pozorování



- přímo volným okem



- po zabarvení



- optické metody

(turbidimetrie, nefelometrie)



✓ označení reaktantu

- radioaktivním izotopem ^{14}C , ^3H , ^{131}I (RIA)
- enzymy (EIA)
- fluorochromy (FIA)
- luminofory (CIA)
- stabilní volné radikály (spinové IA SIA)
- částice

Kombinace 4 uvedených faktorů, umožňují změřit v laboratoři reakci mezi antigenem a protilátkou různými způsoby. Tyto kombinace pak představují různé imunochemické metody a jejich modifikace.

Rozdělení imunochemických metod do několika generací

✓ metody první generace

semikvantitativně

v kapalném prostředí

✓ metody druhé generace

kvantitativně

imunodifuze,

imunoelektroforeza

✓ metody třetí generace

kvantitativně

přítomnost i hapténů

vysoká citlivost, automatizace
(RIA, EIA, CIA atd.)

✓ metody čtvrté generace

kontinuálně

(protilátkové elektrody,
biosensory)

Sérologické metody

Provádějí se v **kapalném prostředí**

stanovuje se :
- protilátka
- antigen
- někdy i haptén

Antigen korpuskulární	aglutinační reakce
Antigen rozpustný	precipitační reakce

- ✓ důkaz přítomnosti Ag nebo Ab
- ✓ přibližná koncentrace

Význam

- ✓ zjišťuje se množství protilátek v krevním séru (lidí nebo zvířat), kteří jsou podezřelí z infekčního onemocnění.
když je k dispozici antigen
- ✓ určení Ag, při identifikaci bakterií (serotypizace)

Koncentrace protilátek

se vyjadřuje **titrem séra**

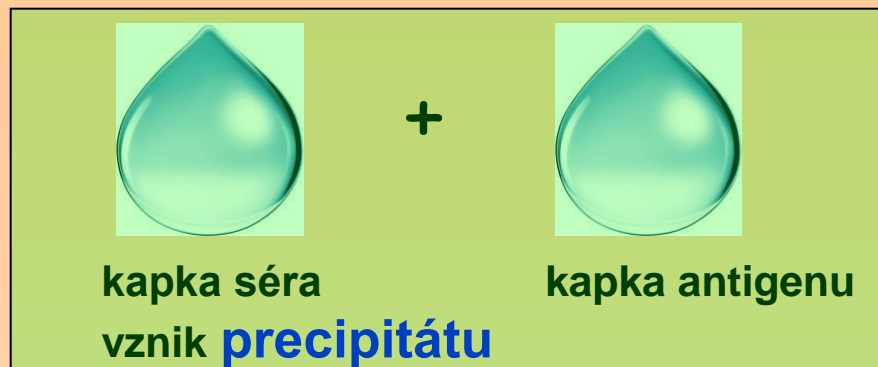
čím větší zředění séra, které ještě reaguje s antigenem, tím je větší přítomnost protilátek
sérum se ředí fyziologickým roztokem
geometrickou řadou 1:2, 1:4, 1:8 atd.

1:20, 1:40, 1:80

Koncentrace antigenu

mikrobní antigeny (identifikace bakterií, serotypizace)

Precipitační metody



✓ podložní sklíčko

✓ zkumavka

kvalitativně:

vznik precipitátu (+ -)

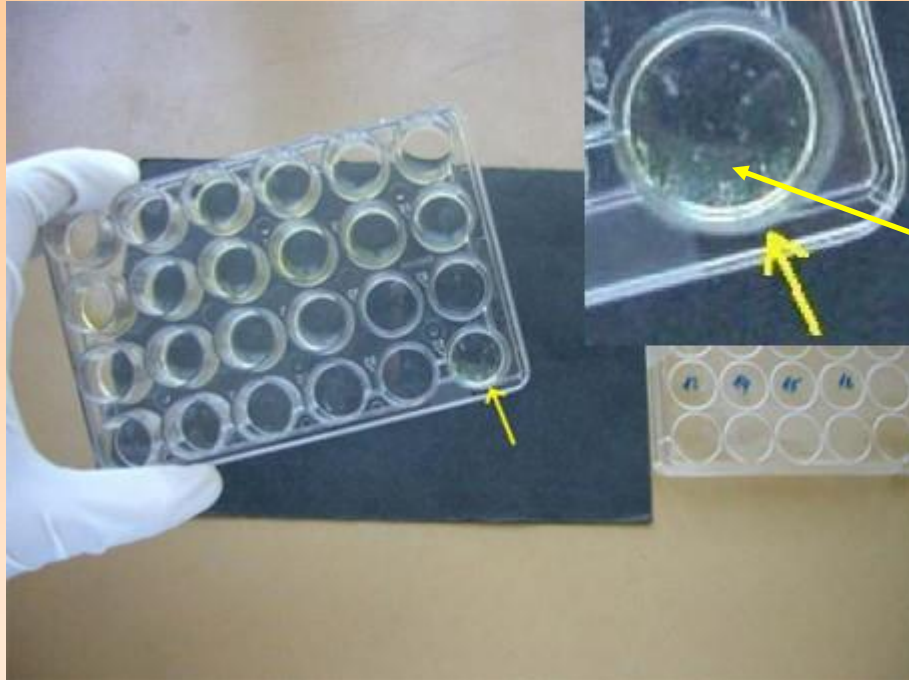
kvantitativně:

přesné stanovení koncentrace
precipitátu

křížové reakce

precipitace podobných příbuzných antigenů

málo specifické protilátky



shluky kardiolipinu

**Vyšetření syfilis – průkaz *Treponema pallidum*
v krvi pacienta (fosfolipid obsažený ve stěně membrány TP)**

Koncentraci volného hapténu lze určit:

dvě řady zkumavek:

1. řada: protilátka + **konjugát haptén-nosič**
2. řada: protilátka + **konjugát haptén-nosič+haptén**

- ✓ protilátka má vyšší afinitu k hapténu jak ke konjugátu (prostorové důvody)
- ✓ nejprve proběhne reakce s volným hapténem, výsledkem je obsazení volných vazebných míst Ab
- ✓ vznikají malé rozpustné komplexy Ab-haptén
tvorba nerozpustných **Ab-konjugát-haptén**
se neuskuteční **inhibice precipitace**
- ✓ koncentrace hapténu pomocí kalibračky se známými koncentracemi hapténu

Nefelometrie a turbidimetrie

- ✓ třetí generace metod
- ✓ precipitační sérologická reakce
- ✓ detekce imunokomplexu (ng množství)
- ✓ možnost automatizace

Měří se zákal

- ✓ turbidimetricky: spektrofotometr
- ✓ nefelometricky: nefelometr
- ✓ fluoronefelometricky:

Nefelometrie

automatické nefelometry a imunonefelometry

zdroj světla laser

objem vzorku: krevní sérum 10 μ l a méně

laserový imunonefelometr dokáže analyzovat

z 0,2 ml až 20 různých antigenů

kvalitní monospecifické Ab

Koncentrace antigenu je přímo úměrná

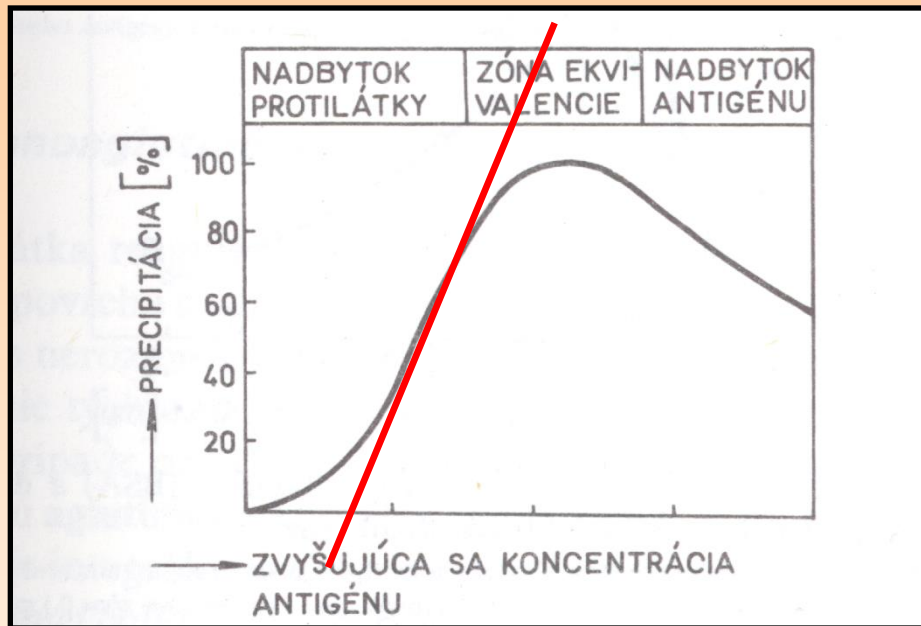
imunoprecipitátu (zákalu jen v oblasti nadbytku Ab)

Je třeba nalézt vhodné ředění pro příslušnou

dvojici Ag-Ab (někdy určí výrobci diagnostických souprav)

nefelometrie je 5 - 10 x citlivější jak

turbidimetrie (turbidimetrie: 5 až 20 mg/l)



volba koncentrace Ab pro nefelometrické stanovení

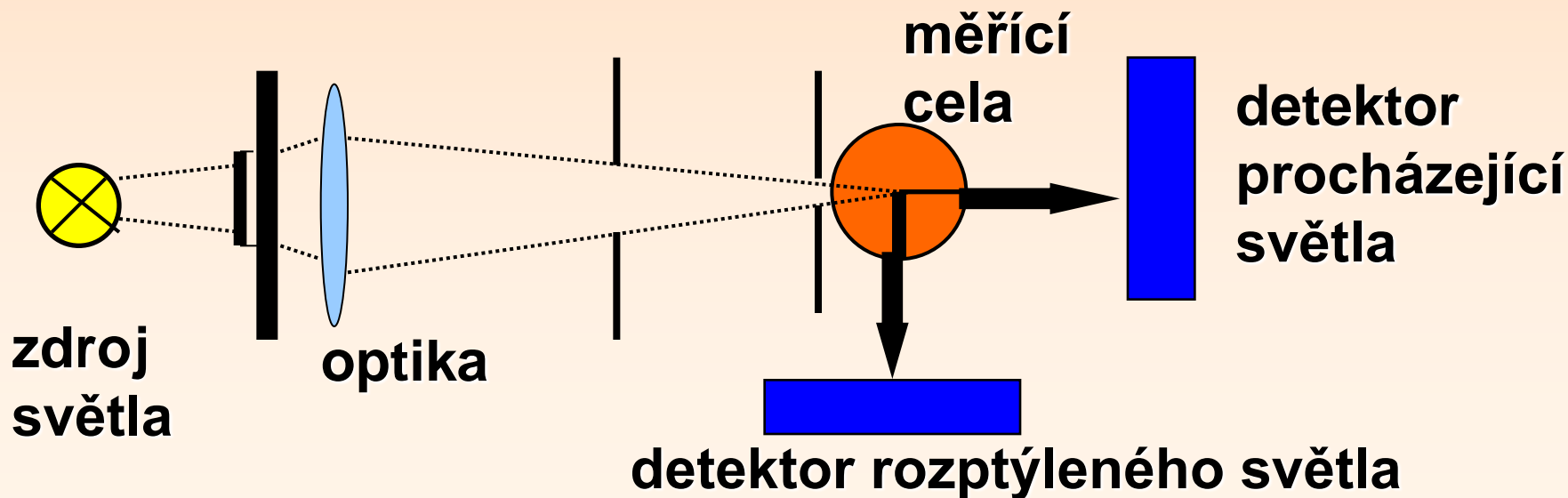
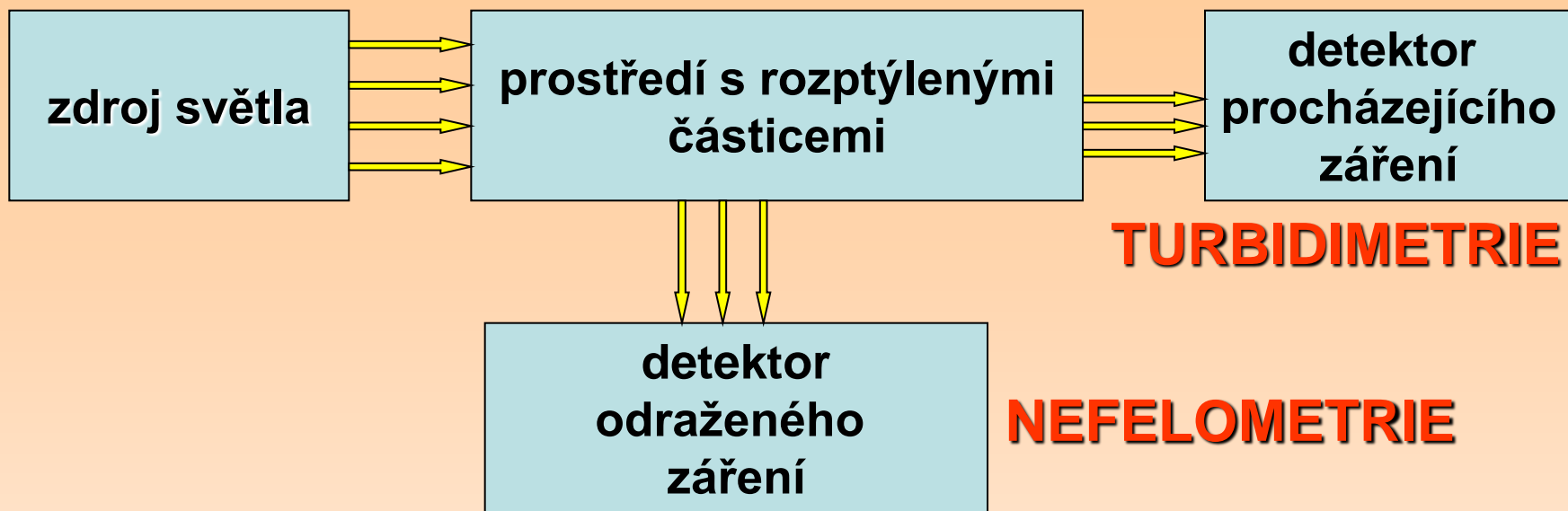
Rozdíl mezi turbidimetrií a nefelometrií

Turbidimetrie

- ✓ měří se snížení zářivého toku, k němuž dochází jeho rozptylem na částicích suspendovaných v kapalině.
- ✓ spektrofotometr

Nefelometrie

- ✓ měří tok záření vzniklého rozptylem paprsků zdroje na částicích v roztoku.
- ✓ velké zředění, aby nedošlo k velké absorpci rozptýleného záření
- ✓ speciální přístroje nefelometry (nákladnější)

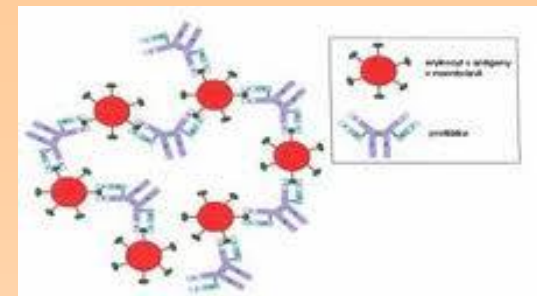




nefelometr

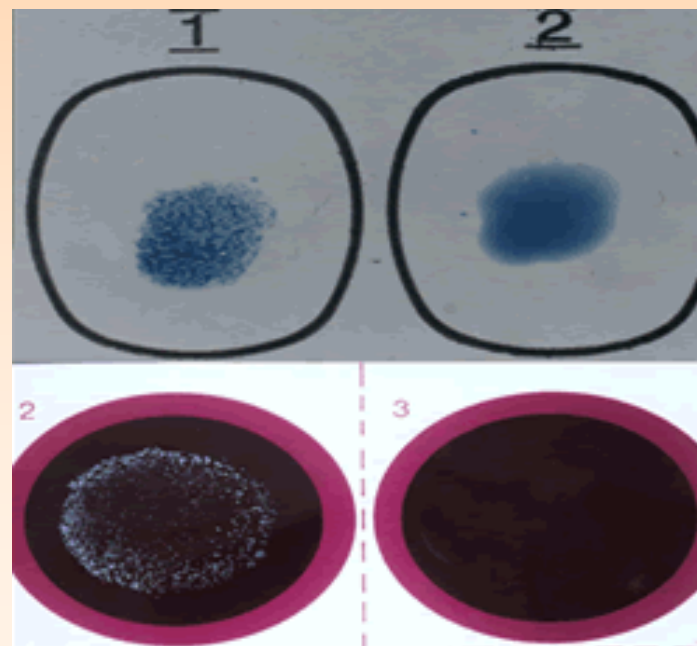
Aglutinační metody

obdoba precipitačních metod
antigen je nerozpustný – korpuskulární



Identifikace:

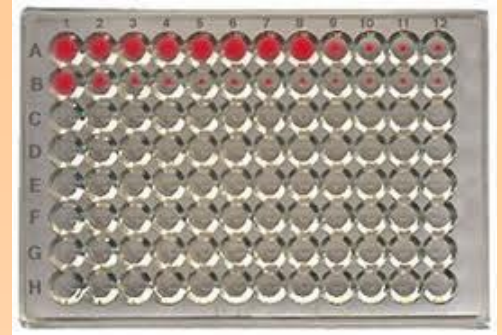
- ✓ bakterie
- ✓ mikroorganismy
- ✓ živočišné buňky
- ✓ erytrocyty
- ✓ pomocí aglutinogenů
důkaz protilátek



pozitivní

negativní

Důkaz protilátek v séru



Řada zkumavek nebo mikrotitrační destička konstantní množství korpuskulárního Ag sérum s protilátkami v geometrické řadě nechá se stát několik hodin při 37°C a pak ještě v ledničce

Výsledek: vytvoření aglutinátu (kontrolní jen Ag - čirý) (zkumavky, mikrotitrační destičky, podložní sklíčka)

Vyhodnocení:

přímo okem
pod mikroskopem

Výhody aglutinačních metod

- ✓ spotřeba malého množství Ag i Ab
- ✓ pipetování do jamek se dá automatizovat
- ✓ výsledky se dají lehce a dobře odečítat

Rozdělení aglutinačních metod

- ✓ přímé
- ✓ nepřímé (pasivní)

přímé: s protilátkou reagují aglutinogeny na povrchu částic

nepřímé: reagují rozpustné antigeny nebo haptény, které se předtím pasivně adsorbovaly na povrch buňky nebo inertní částice

Aglutinační reakce jsou **citlivější** jak precipitační.

**Aglutinogeny izolované z povrchu částic lze provést
inhibici přímé aglutinace
antigeny a čistými haptény lze provést inhibici
pasivní aglutinace**

(obdoba inhibice precipitace)

Hemaglutinační reakce

Přímá

Na povrchu erytrocytů je několik antigenů, s kterými reagují protilátky.

Suspenze erytrocytů není stabilní a po určitém čase erytrocyty sedimentují (aglutinace a sedimentace je odlišitelná).

Nepřímá -pasivní hemaglutinační metoda

Na povrch erytrocytu lze pasivně absorbovat různé rozpustné antigeny a haptény. Reakcí se specifickou Ab pro tyto antigeny nebo haptény dojde k aglutinaci

Oddělení erythrocytů, které aglutinují antiserum

Specifické antisérum může aglutinovat i čisté erytrocyty (čisté erytrocyty promíchat s krevním sérem odstředit a pak teprve nechat reagovat s antigen-Ery).

Absorbce antigenů nebo hapténu na erythrocyty

✓ **spontálně**

viry

některé bakterie a jejich Ag

vaječný albumin

BSA

deoxyribonukleové kyseliny

většina antibiotik aj.

✓ **chemicky**

taninu

bisdiazotovaný benzidin

1,3-difluoro-4,6-dinitrobenzen

chlorid chromitý

glutaraldehyd

karbodiimidů

**erythrocyty s navázaným Ag nesmí spontálně
aglutinovat**

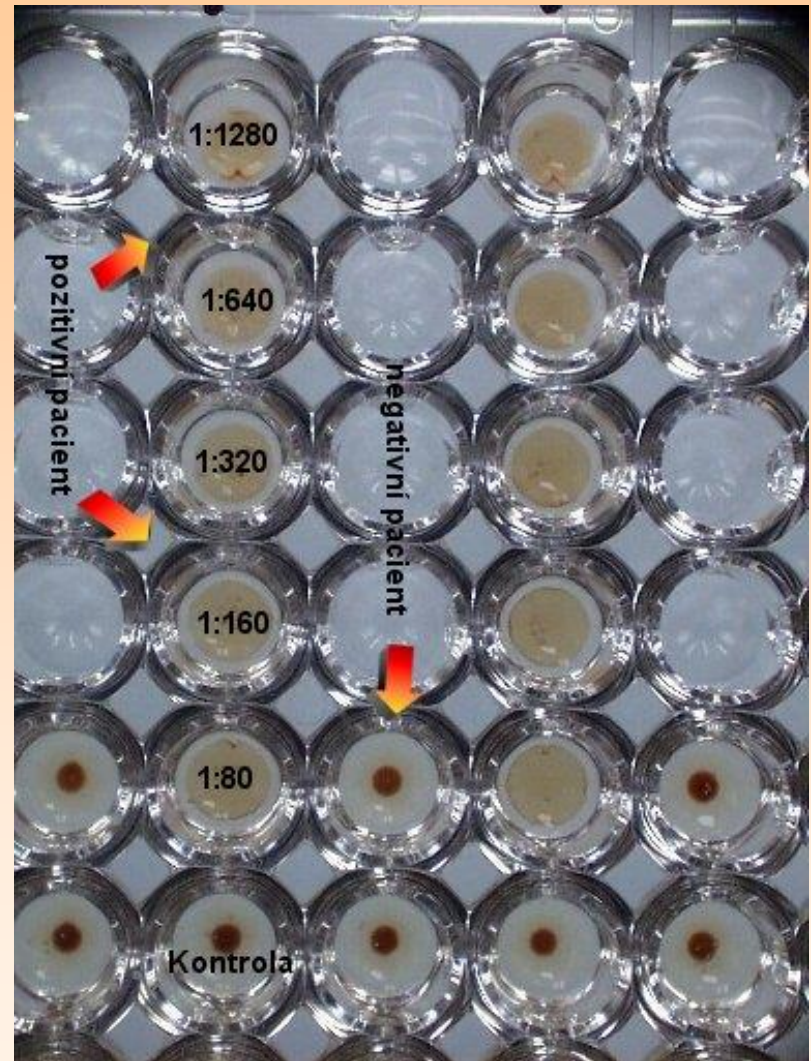
Praktická aplikace

Diagnostika syfilis

- Vyšetření kardiolipinem (haptén fosfolipid v membráně *Treponema pallidum*)
- Protilátky proti TP (reaginy)
- Do všech jamek sérum pacienta Zředěné (1:80 až 1: 1280)
- Kuřecí erytrocyty

Pozitivní: aglutinát po celém dnu jamky

Negativní: sedimentace erytrocytů uprostřed jamky



Ředění: 1:80 až 1:1280

Inhibice pasivní aglutinace

směs erytrocytů obalených antigenem + Ab + antigen
= inhibice aglutinace

je velmi citlivá a dají se dokázat velmi malá množství rozpustného antigenu nebo hapténu.

Hemaglutinační reakce často IgM-multivalentnost, velká molekula

Odlišení IgG od IgM

2-Merkaptoethanol -pentamér IgM rozštěpí a ztratí schopnost aglutinace.

V přítomnosti 2-merkaptoethanolu reagují pouze IgG.

Místo erytrocytů lze využít:

- ✓ latexové částice
- ✓ syntetické polymery

Imunodifúzní metody

Imunoprecipitace se uskutečňuje v **gelovém** prostředí

Agar x agarosa

Agar z buněčných stěn červených mořských řas

Agarosa neobsahuje vedlejší aniontové skupiny

Nemá iontový charakter, ale charakter molekulového síta

Gel:

0,5- 2% agarosa

vroucí vodní lázeň

tlumivý roztok

při 42°C vzniká gel





difunduje jedna nebo obě složky
imunodifúze se uskutečňuje v jednom nebo ve dvou rozměrech

Místo střetu dvou složek:

precipitační linie
oblouček, prstenec,
kruh

Detekce:

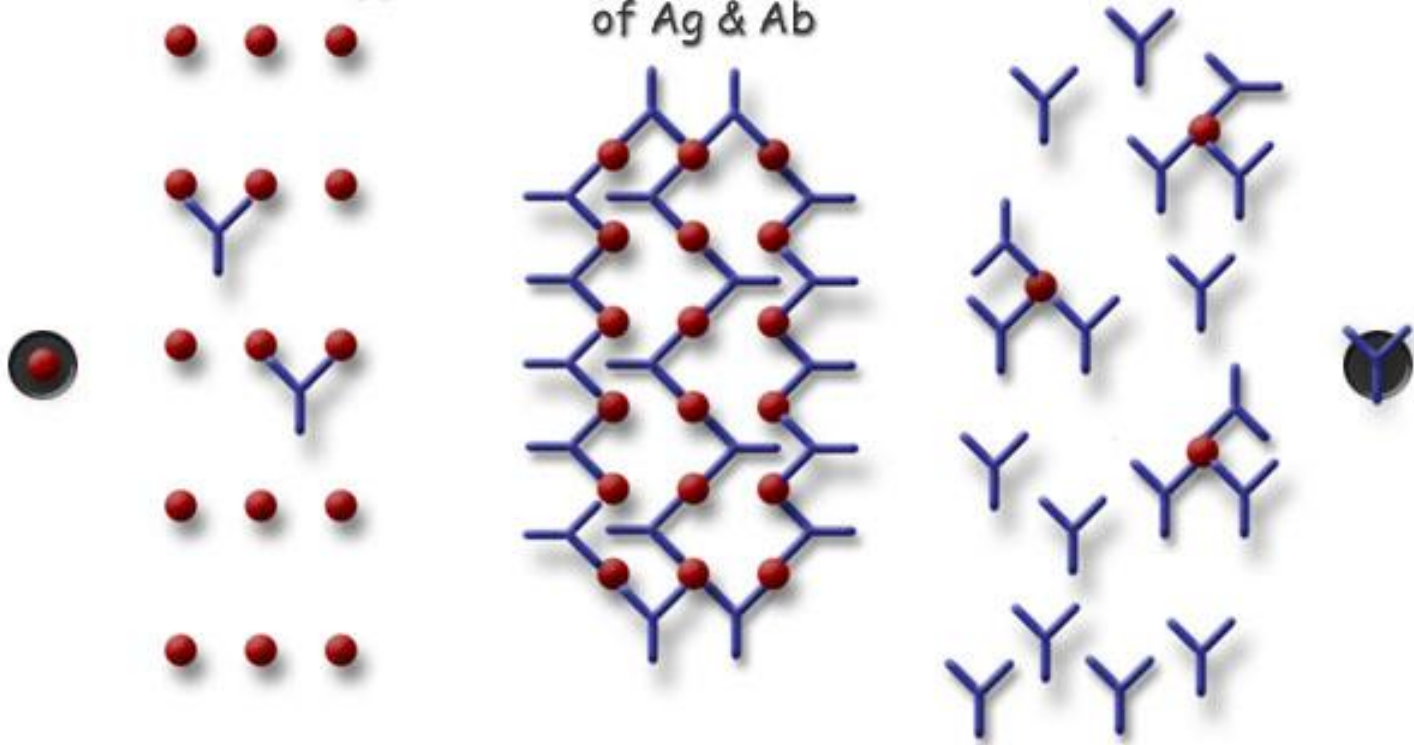
- ✓ okem (in situ) 
- ✓ zbarvení 
 - barviva na proteiny
 - aktivita enzymů
- ✓ autoradiograficky (izotop)
- ✓ sekundární protilátka označená enzymem aj.



Ag a Ab pohybují volnou difúzí
v místě střetu se začíná tvořit **imunoprecipitát**,
který se stává nepropustný pro obě složky.

Ag & Abs combine

large aggregates form
at approximately equimolar concentrations
of Ag & Ab



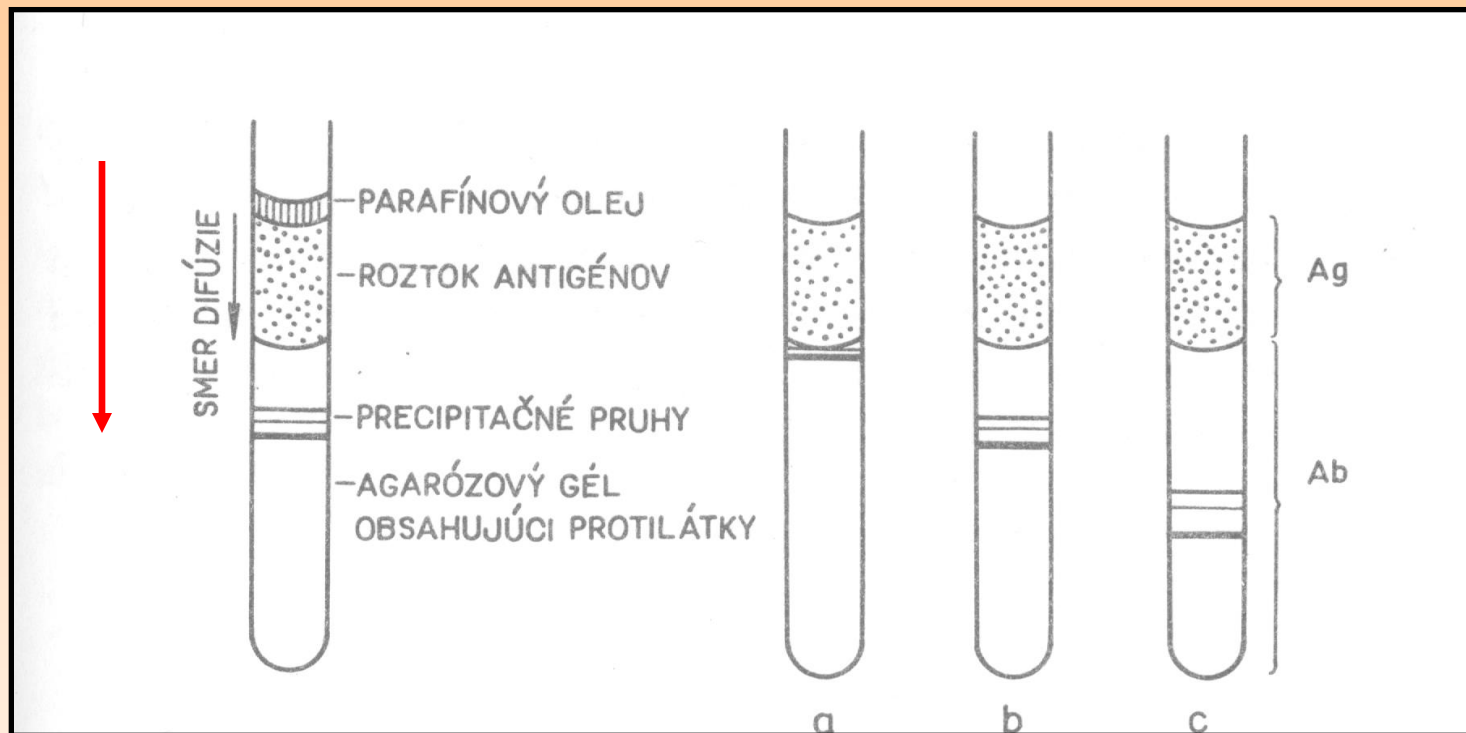
- ✓ koncentrace obou složek ekvivalentní = **precipitát**
- ✓ nadbytek jedné složky = **linie se rozmývá**

Počet precipitačních linií:

1 Ag : 1 Ab = 1 precipitační linie

**dva a více Ag nebo Ab = dvě a více precipitačních
linií**

Oudinova metoda jednoduchá radiální metoda



**Zkumavky 3-4 mm, na dně 0,3 - 0,5 ml 1% agarosy (ve veronal-acetátovém pufru, pH 8,6 + protilátka teplota Ab i gelu 50 - 55°C)
po zchládnutí 0,05 až 0,1 ml antigenu + parafinový olej**

Význam Oudinovy techniky

- ✓ důkaz počtu antigenů
- ✓ kvantitativní stanovení

kvantitativní stanovení:

Použije se monospecifická protilátka v gelu

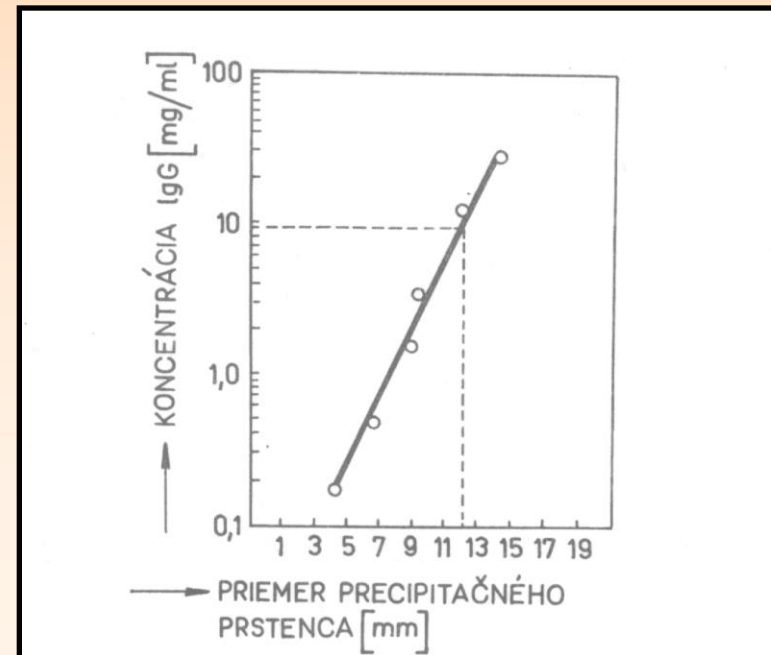
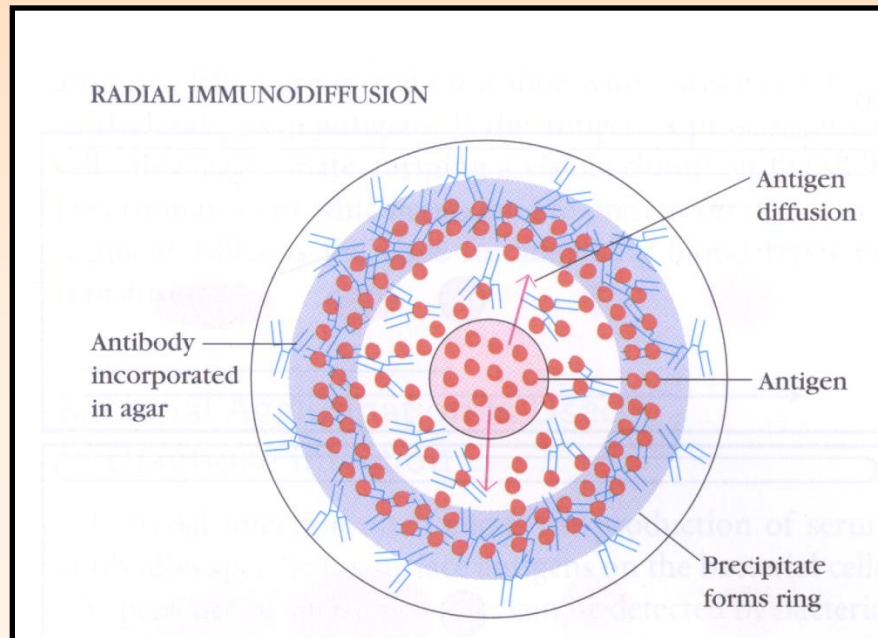
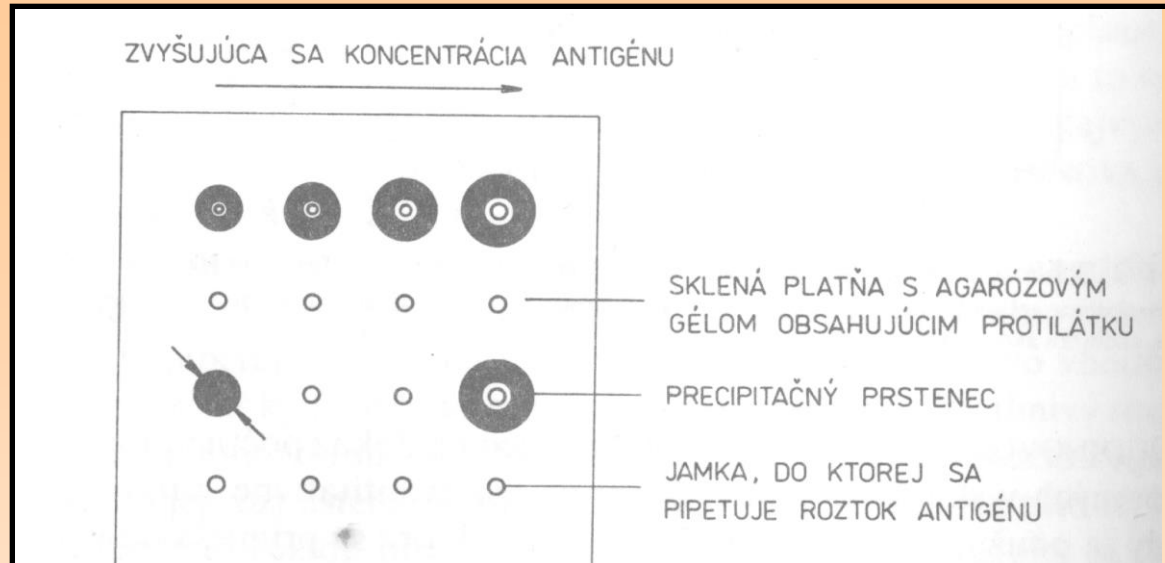
Na gel se navrší nadbytek antigenu.

Antigen vytvoří s protilátkou 1 precipitační pruh
šíře pruhu je přímo úměrná koncentraci antigenu.

Zvýraznění precipitačních pruhů:

7,5 % kyselinou octovou

Jednoduchá radiální imunodifuze (RID)



REAGENTS:

agar gel impregnated with antiglobulins (anti-IgG)

gel impregnated with uniform concentration of anti-IgG

1. add serum sample & IgG standards to wells

200 mg/dl

400 mg/dl

800 mg/dl

1600 mg/dl

sample A

sample B

2. allow time for diffusion of IgG's into gel



3. precipitin rings form at site of optimal IgG:anti-IgG concentration



4. measure ring diameters (proportional to IgG concentrations)



Vyhodnocení RID

- ✓ podle **MANCINIOVÉ (1965)**
precipitační prstence se měří až po skončení imunodifúze (48 až 72 hodin)
průměr prstence je přímo úměrný koncentraci Ag
pokud není precipitace ukončená, vzniká křivka
- ✓ podle **FAHEY, KELVEY (1965)**
průměry se měří už za 6 až 24 hodin před skončením imunodifúze
V tomto případě jsou průměry přímo úměrné logaritmu koncentrace

$$\log c = \frac{d - d_0}{K}$$

- c**..... koncentrace antigenu
d..... průměr precipitačního prstence
d₀..... průměr kruhového otvoru v gelu, do kterého se pipetuje antigen
K..... směrnice přímky

Druhá metoda je rychlejší, ale méně přesná

Citlivost je 0,02 mg/ml pro proteinové antigeny

Význam metody RID

- Stanovení koncentrace** IgG, IgA, IgM, IgD, albuminu, α_1 -antitrypsinu, ceruloplasminu α_2 -makroglobulinu, transferinu v klinické biochemii
- Požadavek** kvalitní monospecifické sérum
standardní roztok se známou koncentrací antigenu
- Desky lze vyrobit v laboratoři nebo použít diagnostické soupravy různých firem**

Provedení RID

**1,5 % agarosa ve veronalovém pufru (50°C)
se smíchá s protilátkami a vyleje se na diapozitivní sklo
nebo do Petriho misky
po ochlazení a ztuhnutí gelu se vyřežou otvory,
do kterých se pipetuje antigen
deska se vloží ve vodorovné poloze do vlhké komůrky
do lednice
antigen difunduje (jednoduchá), všemi směry (radiálně)
tj. dvojrozměrná
vznikají prstence
změří se jejich průměry**

Způsob vyhodnocení

precipitační prstence se dají odečítat:

- ✓ okem (lupa)
- ✓ po obarvení na bílkoviny
(amidočerň B, bromfenolová modř,
Coomassie blue)
- ✓ detekce substrátem (Ag je enzym)
- ✓ autoradiograficky (Ag značen izotopem)



Poznámka

**Při barvení precipitačních linií je třeba neprecipitované proteiny nejprve vymýt
(2-3 dny v 9 % NaCl, poté opláchnout vodou
pak lze teprve provést barvení)**

Dvojitá imunodifuze

Difundují v agarózovém gelu **obě složky** Ag i Ab

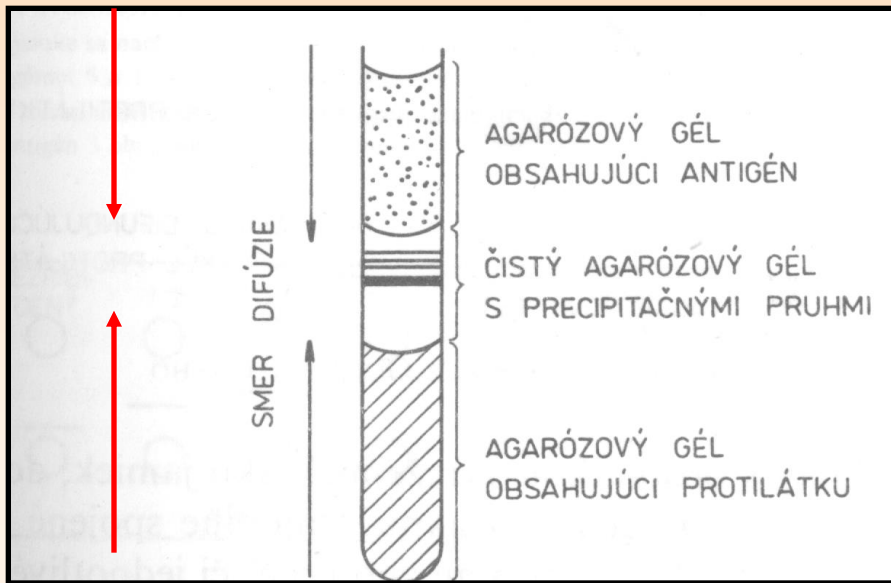
Je třeba pracovat s koncentracemi blízkými ekvivalentním

Význam:

Kvalitativní důkaz antigenů

Určení immunochemické příbuznosti

Pro kvantitativní stanovení nejsou vhodné

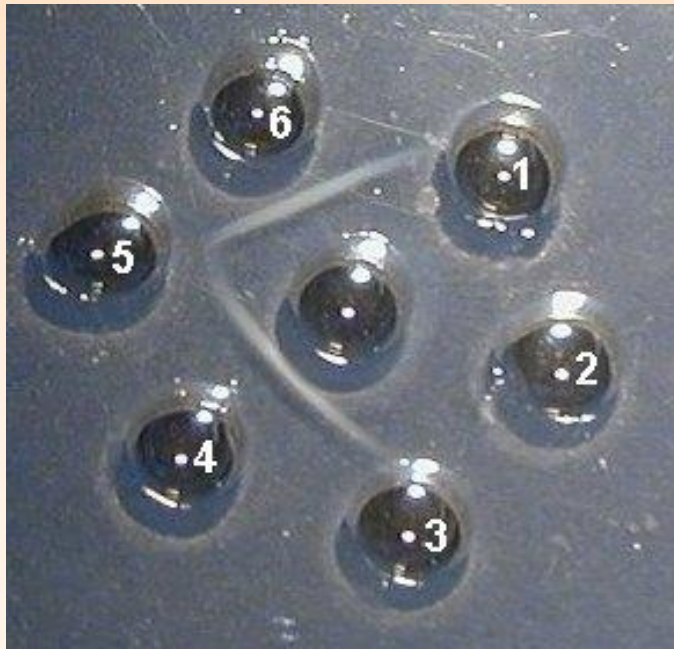


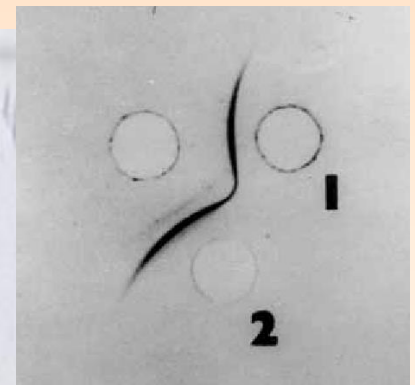
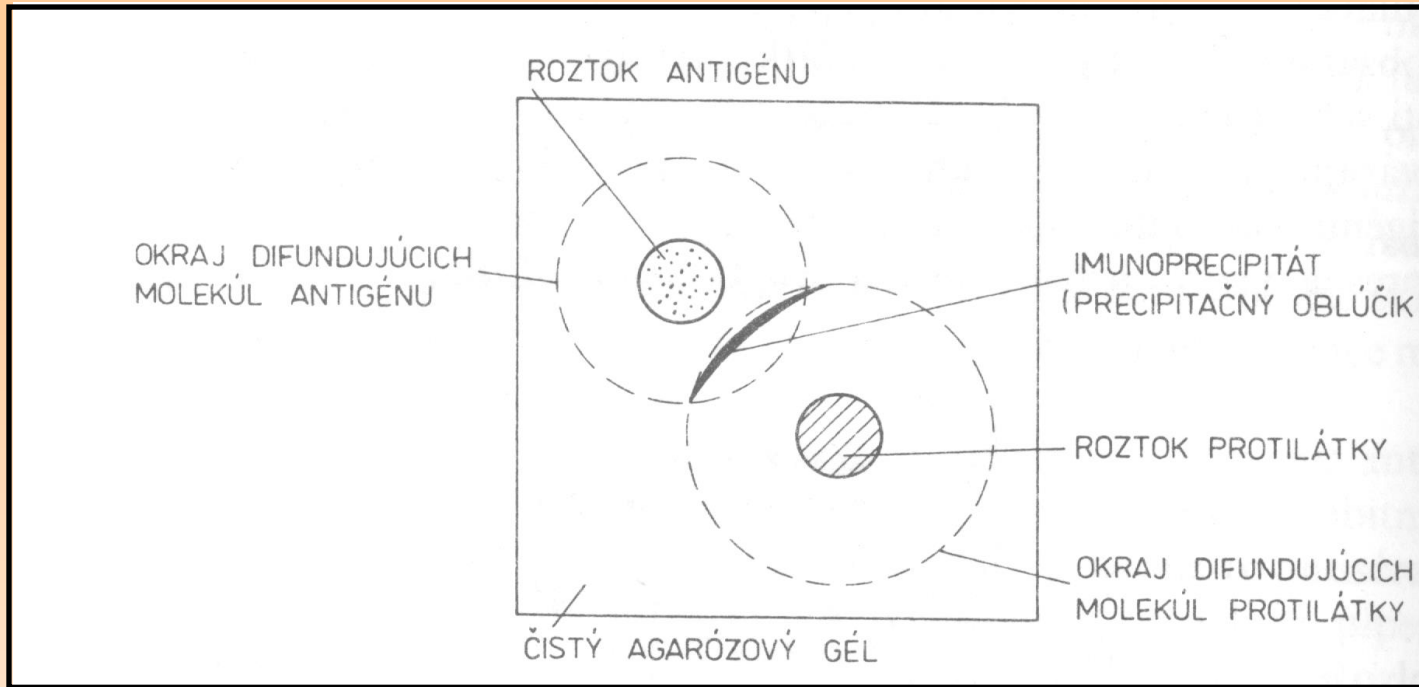
**Jednorozměrná dvojitá
imunodifuze
molekuly difundují v jednom
rozměru**

Ouchterlonova metoda

Dvojitá imunodifuze v agarosovém gelu na skleněné desce



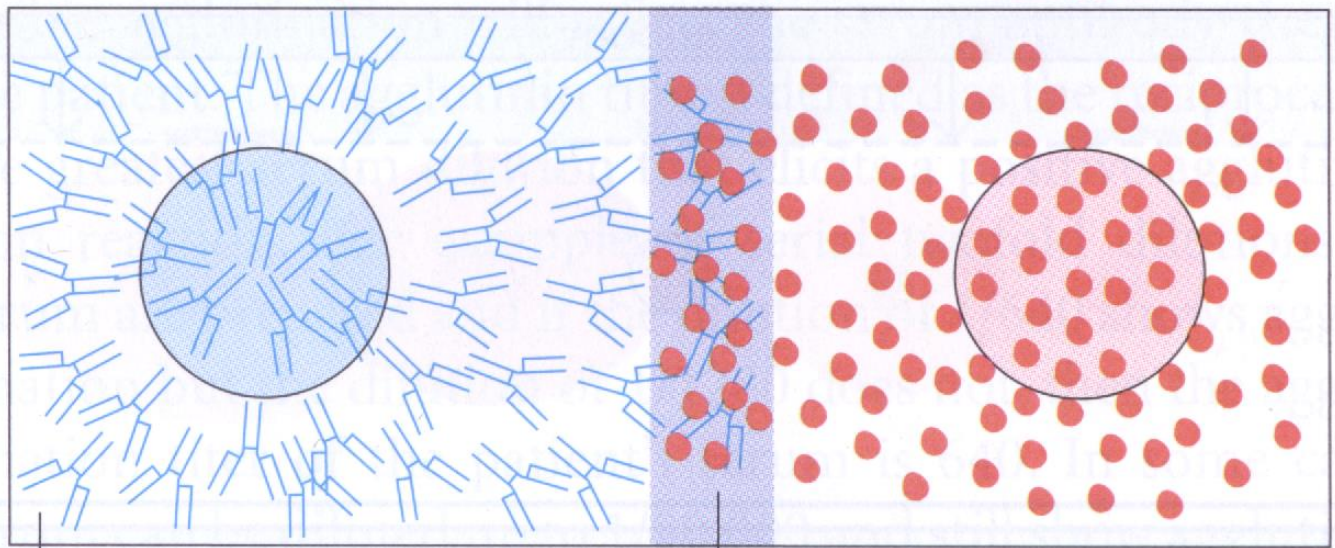




DOUBLE IMMUNODIFFUSION

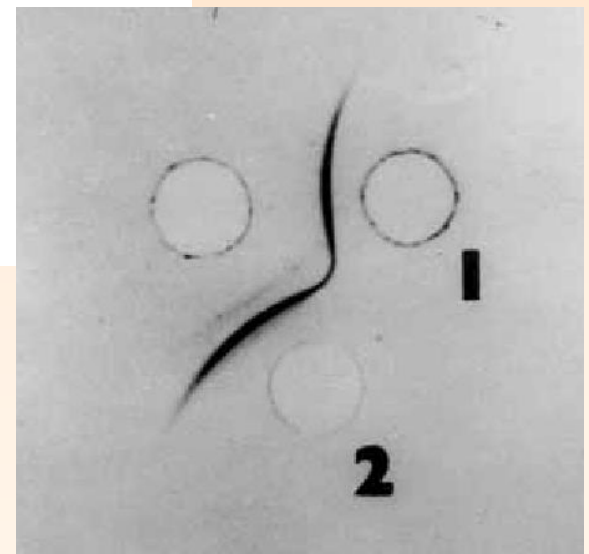
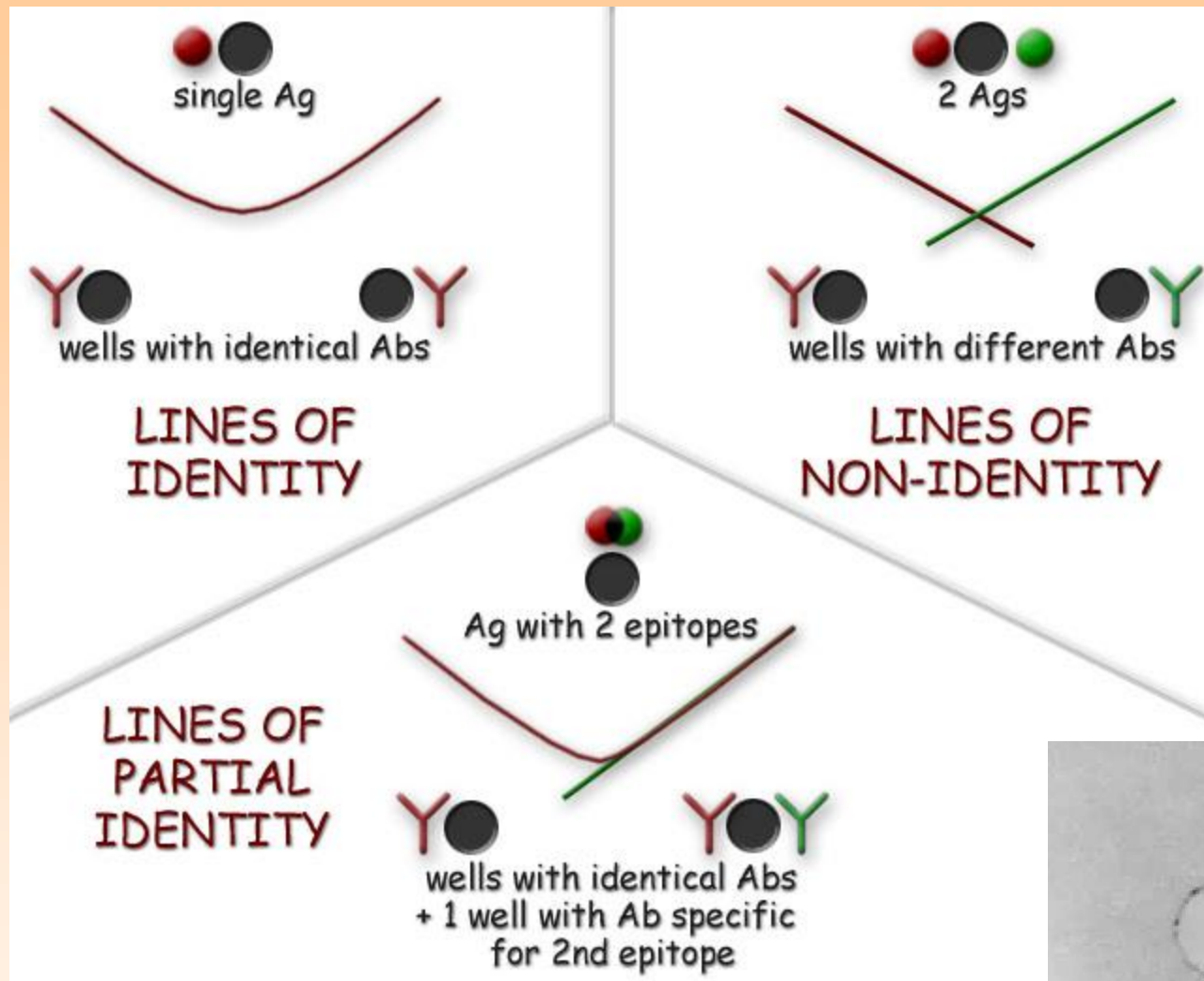
Antibody →

← Antigen



Agar matrix

Precipitate



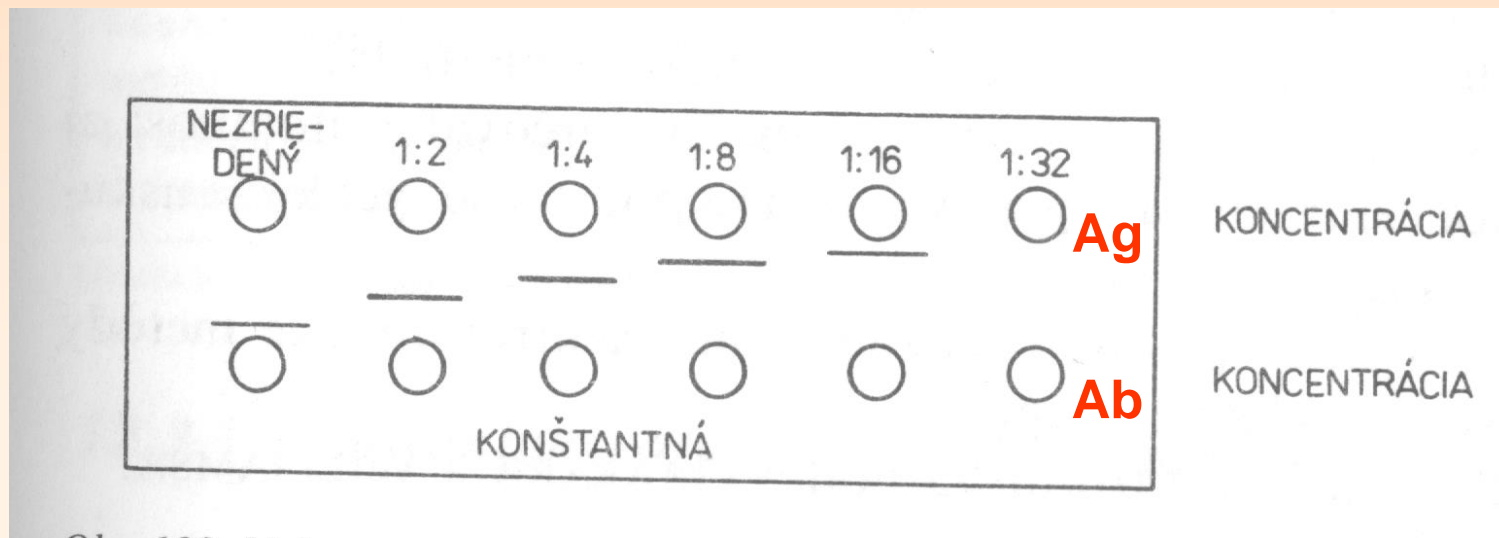
- ✓ Podle počtu linií mezi dvěma otvory lze zjistit **počet** přítomných Ag a Ab.
- ✓ Otvory se naplní různými Ag, vznikají **spojené** nebo různě **překřížené** obloučky.
- ✓ Lze určit zda jsou jednotlivé Ag identické nebo neidentické a z toho případně usuzovat na **příbuznost** antigenových determinantů

Použití:

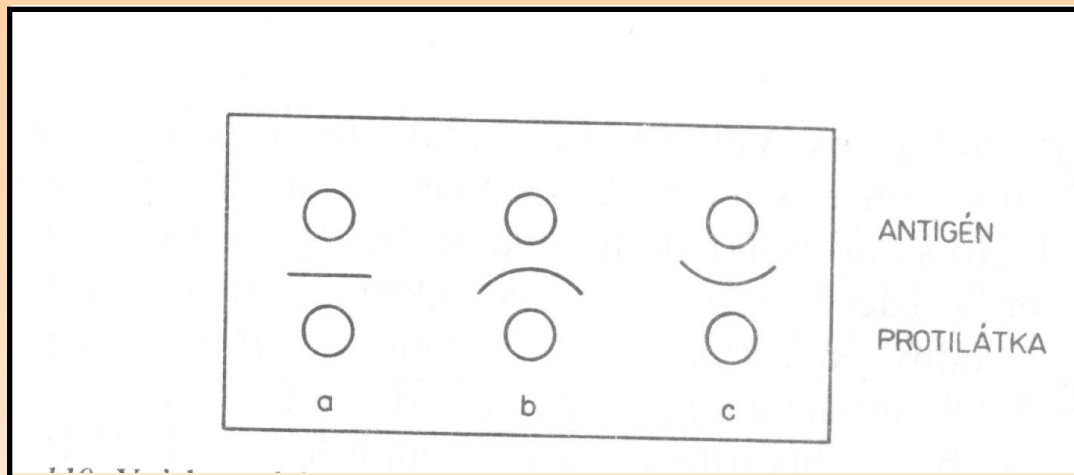
- kvalitativní důkaz antigenů (specifická antiséra)
- důkaz přítomnosti protilátek (pomocí čistých Ag)

Viditelný precipitát vzniká při optimálním poměru koncentrací Ag a Ab. Proto se provádí série měření při různém zředění protilátek.

Precipitační linie je umístěna podle vzájemné koncentrace antigenu a protilátky



Relativní molekulové hmotnosti Ag a Ab určují tvar (zakřivení) precipitační linie:



- a** Ag a Ab mají přibližně stejné M_r
- b** M_r antigenu je menší jak M_r protilátky (sérový albumin+IgG)
- c** M_r antigenu je větší jak M_r protilátky (ferritin+IgG)