

IMUNOCHEMICKÉ METODY

Imunochemické metody jsou založeny na použití protilátek jako „specifických vazebných činidel. Pomocí imunochemických metod lze stanovit v původním biologickém materiálu celou řadu cizorodých látek (farmaka, toxické látky), látky tělu vlastní, látky infekčního původu nebo specifické protilátky vzniklé na nějaký imunologický podnět.

Antigeny jsou makromolekulární látky přirozeného nebo umělého původu, které imunitní systém rozpozná jako cizí. Po vpravení do vhodného organismu, antigeny stimulují tvorbu protilátek, lymfokinů, regulačních a výkonných T-lymfocytů, čímž navodí imunitní odpověď. Antigen může být nekompletní, pak hovoříme o haptenu nebo kompletní, který se označuje jako imunogen. Imunogen lze charakterizovat schopností vyvolat a stimulovat tvorbu protilátek, narozdíl od antigenu, který se pouze specificky váže na protilátku bez toho, že by vyvolal tvorbu protilátek. Tvorbu protilátek lze vyvolat až po navázání haptenu na makromolekulární molekulu – nosič, kdy vznikne konjugát, který je imunogenní. Antigenní determinanta haptenu je pak jednou z determinant na struktuře konjugátu.

Specifitou reakce antigen-protilátka se rozumí míra afinity vazebného místa protilátky vůči určitému vlastnímu epitopu na molekule antigenu. Afinita vyjadřuje energii vazby mezi jedním vazebným místem na protilátce a příslušným epitopem na antigenu. Afinita vazby je dána součtem všech odpuzivých a přitažlivých sil (van der Waalsovy síly, vodíkové můstky, hydrofobní interakce aj.) mezi dvěma komplementárními strukturami.

Avidita vyjadřuje celkovou energii vazby mezi protilátkou a antigenem a je dána součtem vazebných afinit všech jednotlivých vazebných míst na protilátce se všemi odpovídajícími epitopy na antigenu.

Při normální imunitní odpovědi hostitele na imunogen dochází ke stimulaci lymfocytů, které po diferenciaci produkují plazmatické buňky schopné sekretovat protilátky. Komplexní antigen je schopný vyvolat tvorbu celé řady protilátek s různou specitou, které jsou produkty různých buněčných linií plazmatických buněk. Takto vzniklé protilátky se proto nazývají polyklonální a mají schopnost reagovat s různými epitopy imunogenu. Naproti tomu monoklonální protilátka je produktem jediného klonu plazmatické buňky. Hybridní buněčné linie (hybridomy) vznikají fúzí imunizací sensitizovaných myších lymfocytů ze sleziny s nesmrtelnou linií myšího myelomu.

Výsledkem fúze je hybridomová buňka, která si zachovala nesmrtelnost myelomové linie a schopnost produkovat protilátku slezinné buňky.

Jedinečná schopnost monoklonální protilátky reagovat s jedním epitopem na multivalečním antigenu na druhé straně způsobuje, že většina monoklonálních protilátek nevytváří síť a tudíž neprecipituje makromolekulární antigeny. Z toho důvodu nelze monoklonální protilátky používat při tradičních precipitačních metodách. Naproti tomu imunosaturační metody založené na kotvené protilátce na pevné fázi používají většinou monoklonální protilátky.

Precipitace imunokomplexů v kapalně fázi a stanovení jejich množství turbidimetricky nebo nefelometricky patří k velmi používaným metodám pro analýzu celé řady látek.

Tabulka I.

Látky měřené imunoprecipitační reakcí pomocí rozptylu světla (turbidimetrie a nefelometrie)

Specifické proteiny	Imunoglobuliny
prealbumin	IgG
albumin	IgA
α_1 -antitrypsin	IgM
α_1 -kyselý glykoprotein	Koagulační faktory
apolipoprotein A	antitrombin III
haptoglobin	Léky
α_2 -makroglobulin	digoxin
ceruloplasmin	fenobarbital
transferin	teofyllin
hemopexin	gentamycin
apolipoprotein B	tobramycin
C ₃ , C ₄	
C-reaktivní protein	
fibrinogen	

Při stanovení antigenů je nutno zajistit, aby v roztoku precipitoval jen jeden systém antigen-protilátka. V praxi to znamená, že pro stanovovanou bílkovinu či haptenu se používá

přísně monospecifické antisérum. Imunoprecipitační reakce antigen-protilátka zpočátku probíhá velmi rychle (v řádu milisekund) a pokračuje pomaleji po několik hodin. pro turbidimetrická a nefelometrická měření se používají dva rozdílné postupy měření, a to kinetické měření vzniku imunoprecipitátu a měření množství imunoprecipitátu v pseudoekvilibru. Kinetické měření se provádí obvykle v prvních minutách reakce, protože na počátku je velikost změny poměru intenzity rozptýleného světla za jednotku času maximální. Naproti tomu měření v pseudorovnovážném stavu se provádí až za 30-60 minut, kdy změna intenzity rozptýleného světla je relativně malá vzhledem k době potřebné pro změření vzorků. Ve skutečnosti v tomto čase není reakce ještě v rovnováze, a proto se tento stav nazývá pseudorovnovážným. Při kinetickém způsobu měření se využívá skutečnosti, že rychlost vzniku precipitátu a čas k dosažení maximální rychlosti tvorby precipitátu jsou přímo úměrné koncentraci antigenu. Výhoda tohoto způsobu měření je v tom, že se nemusí provádět slepé zkoušky ani čekat 30-60 minut.

Provedení nefelometrických nebo turbidimetrických stanovení může být vylepšeno urychlením reakce přidávkem lineárních polymerů, jako je například polyethylenglykol (PEG 6000) v koncentracích 30-60 g/l. Tato modifikace dovoluje měřit nižší koncentrace antigenu a poskytuje daleko stabilnější suspenze imunokomplexů. Nefelometrické metody jsou citlivější než turbidimetrické, průměrný detekční limit pro sérové proteiny je $1 \cdot 10^{-3}$ - $1 \cdot 10^{-2}$ g/l. lepší citlivosti lze dosáhnout u stanovení v tělních tekutinách jako jsou mozkomíšní mok nebo moč, vzhledem k jejich nižšímu obsahu bílkovin a lipidů, lze dosáhnout lepšího poměru signál/šum. Při stanovení nízkomolekulárních proteinů (např. myoglobin M_r 17800) lze dosáhnout vyšší citlivosti použitím latexových částic obalených protilátkou.

Všechny zmiňované reakce jsou založeny na hodnocení imunoprecipitátu, to je když reakce proběhla do třetí fáze. Za určitých podmínek lze k analytickým účelům využít i počáteční rychlou fázi reakce antigen-protilátka. nezbytnou podmínkou pro sledování počáteční fáze reakce antigen-protilátka je označení jednoho z reaktantů reakce, která pro proběhnutí reakce umožňuje dostatečně citlivé kvantitativní stanovení značeného volného reaktantu nebo reaktantu vázaného v komplexu. První metody tohoto typu používaly ke značení radioaktivní izotopy (^{125}I , ^3H a další). V současnosti převládají neizotopové techniky využívající značení enzymy, luminofory, fluorescenčními látkami atd.

Při vývoji imunochemických metod se značenými molekulami se využívají reakce kompetitivní a nekompetitivní. při kompetitivním uspořádání imunochemického stanovení je možnost smíchat všechny komponenty najednou (simultánní) nebo postupně. U **simultánního kompetitivního** stanovení soutěží značený a neznačený antigen o vazbu na protilátku. v tomto systému musí být avidita protilátky pro značený i neznačený antigen totožná. Za těchto podmínek je pravděpodobnost vazby protilátky na označený antigen nepřímo úměrná koncentraci neznačeného antigenu. U **postupného kompetitivního** stanovení se nejprve neznačený antigen smíchá s přebytkem protilátky a vazba se nechá doběhnout do rovnováhy. Pak se teprve přidá značený antigen a vazba se nechá opět doběhnout do rovnováhy. Po oddělení se stanoví frakce vázaného značeného antigenu a ta je potom použita k výpočtu koncentrace neznačeného antigenu. Při použití dvoustupňové metody může být na protilátku navázaná větší frakce neznačeného antigenu než u simultánního stanovení, zejména při nízkých koncentracích antigenu. tento postup dosahuje dvou až čtyřnásobné citlivosti vůči simultánnímu stanovení.

U nekompetitivního stanovení antigenu je třeba na povrch pevné fáze navázat nadbytek protilátky specifické pro antigen. V druhé fázi stanovení antigen reaguje s takto zakotvenou protilátkou a ostatní proteiny jsou vymyty. Nakonec je přidána sekundární značená protilátka (konjugát), která reaguje s již navázaným antigenem přes druhý, rozdílný epitop. Navázaná značená druhá protilátka je po promytí stanovena a její koncentrace nebo aktivita je přímo úměrná koncentraci antigenu. při nekompetitivních stanovením mohou být jak primární, tak sekundární značená protilátka buď polyklonální nebo monoklonální. Jestliže se použijí dvě monoklonální protilátky proti různým epitopům, můžeme současně inkubovat vzorek jak s primární tak sekundární protilátkou, což značně zjednoduší protokol stanovení.

Imunochemická metoda, která vyžaduje pro kvantifikaci děje oddělení volného reaktantu od jeho vázané formy, se označuje jako **heterogenní**, naproti tomu metody, které tento krok nevyžadují se nazývají **homogenní**.

Heterogenní metoda vyžaduje, aby rychlostní konstanta tvorby imunokomplexu byla mnohem větší jak její disociační konstanta a musí být k dispozici vhodná separační metoda. Nejvíce používanými separačními technikami jsou **precipitace** a **adsorpce na pevné fázi**. Precipitace může být vyvolána přidáním látek, které sráží proteiny (síran amonný), nebo imunologicky, přidáním druhé precipitující protilátky. Jestliže primární

protilátka je králičího původu, druhá protilátka by měla být kozí nebo ovčí se specifitou proti králičímu γ -globulinu. Tento postup má výhodu ve svém univerzálním použití pro kterékoliv stanovení, nevýhodou je delší doba zpracování.

Separační techniky využívající adsorpce na pevnou fázi se široce používají. Kompetice značeného a neznačeného antigenu o navázání na vazebná místa protilátky probíhá na povrchu pevného nosiče s protilátkou přichycenou buď fyzikální adsorpcí nebo kovalentní vazbou. Používá se několik různých typů nosičů, včetně vnitřních povrchů polystyrenových zkumavek nebo jamek mikrotitračních destiček a vnějších povrchů nerozpustných materiálů, jako jsou celulóza, magnetické latexové částice nebo kuličky. při použití zkumavek nebo mikrotitračních destiček jsou povrchy s přichycenou protilátkou a navázaným antigenem promyty na místě a stanovení je zakončeno přidáním činidla s indikátorem (izotopem nebo enzymem).

Homogenní imunoanalýza nevyžaduje oddělení volného a vázaného značeného reaktantu. U tohoto typu analýz dochází ke změně aktivity značené molekuly po vazbě na antigen. V praxi to znamená, že je třeba inkubovat vzorek se stanovovaným antigenem, značeným antigenem a protilátkou a přitom měřit aktivitu značkovací molekuly, což činí metodu jednodušší a rychlejší.

Imunochemické metody, které využívají jako značky enzymy patří do souboru metod označovaných jako enzymová imunoanalýza EIA (Enzyme Immunoassay). Existují dvě hlavní techniky, a to ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) a EMIT (Enzyme Multiplied Immunoassay Technique).

ELISA používá ke značkování komplexu antigen-protilátka enzymy. pro správné provedení techniky ELISA je třeba splnit řadu předpokladů. Antigen nebo protilátka musí být navázán na povrch nerozpustného nosiče bez ztráty imunoreaktivity. Použité enzymy musí mít vysokou specifickou aktivitu, tj. přeměňují velká množství substrátu na detekovaný produkt. Stabilita enzymů a také imunologická reaktivita konjugátu musí být stabilní jak během reakce, tak i během jeho skladování. Aktivita enzymů, které jsou použity při značkování se nemůže přirozeně vyskytovat v analyzovaných biologických tekutinách. Většina ELISA metod jsou stanovení na pevné fázi, kde buď antigen nebo protilátka jsou adsorbovány na povrch pevného nosiče. Některé pracovní protokoly ELISA jsou založeny na kompetitivním charakteru vazebné reakce ligand-protilátka, jiné naopak vycházejí z nekompetitivního charakteru vazebné reakce. ve všech postupech je zařazen krok

separace vázaného enzymového konjugátu od volného enzymového konjugátu. Množství vázaného enzymového konjugátu stanovíme po přidání substrátu měřením katalytické reakce enzym-substrát. Jedna molekula enzymu může během několika minut přeměnit velké množství molekul substrátu na stejné množství molekul produktu, poskytující zesílenou a snadno detekovatelnou změnu v zabarvení. Protože součástí této techniky je separační krok, patří tento typ mezi heterogenní stanovení.

Protilátky používané při ELISA metodách mohou být monoklonální i polyklonální. Jsou dodávány jako antiséra nebo izolované imunoglobulinové frakce. Protilátky mohou být použity ve formě roztok nebo imobilizované na pevném nosiči. Při technikách ELISA mohou protilátky vystupovat v neznačené podobě nebo ve formě konjugátů.

Antigeny jsou získávány purifikací z přírodního materiálu nebo rekombinantní technologií. Jsou používány jako enzymové konjugáty buď v rozpustné nebo imobilizované formě. Standardy a kontrolní séra jsou dodávány jako lyofilizovaná lidská séra s azidem sodným a s deklarovanou koncentrací antigenu.

Enzymové konjugáty jsou buď antigeny nebo protilátky kovalentně navázané na vybraný enzym. Při přípravě konjugátu lze postupovat tak, že protilátky a enzymy jsou nekovalentně značkovány biotinem a pak se využívá jeho silné vazebné afinity k avidinu. Avidin má pro biotin čtyři vazebná místa a jen některé reagují s biotinylovanou protilátkou, zbylá vazebná místa mohou sloužit jako receptory pro biotinem značený enzym. Celý postup tak může být zkrácen použitím biotinem značené protilátky a enzymem značeného avidinu.

Pufry, které se při ELISA metodách používají slouží k ředění vzorků a činidel v soupravě a k jejich rekonstituci z lyofilizované formy. Reakce ELISA probíhají v prostředí pufrů, které zajišťují určité pH a koncentraci iontů.

Při ELISA metodách se používá ke značení enzym **peroxidasa** a její substrát peroxid vodíku, který v přítomnosti chromogenu 1,2-diaminobenzenu dává měřitelný žluto-oranžový produkt. Dalším enzymem, který se využívá ke značení imunokomplexů, je **β -D-galaktosidasa** a její substrát *o*-nitrofenyl- β -D-galaktopyranosid, který je přeměňován na měřitelný žlutý nitrofenolový produkt. Ke značení se také často používá **alkalická fosfatasa** a její substrát *p*-nitrofenylfosfát, který je přeměňován na nitrofenolát.

Zastavujícím činidlem peroxidasové reakce je 1M kyselina sírová, která zároveň stabilizuje konečný barevný produkt enzymové reakce. U souprav, které používají alkalickou fosfatasu se enzymová reakce zastavuje roztokem hydroxidu sodného.

K detekci antigenu nebo haptenu se často používá technika ELISA využívající **kompetitivní** vazebnou reakci na pevné fázi. U tohoto typu stanovení soutěží o vazbu na omezený počet vazebných míst na pevném povrchu imobilizovaných protilátek neznáčený ligand s ligandem značeným enzymem. Po krátké inkubaci je separován volný komplex od komplexu vázaného. Po promytí je přidán substrát a enzym přítomný ve vázané frakci je přeměněn na barevný produkt. Množství vzniklého produktu je nepřímo úměrné koncentraci neznáčeného ligandu v testovaném vzorku. Absorbance standardů, kontrolních a testovacích vzorků je měřena na ELISA readru při příslušné vlnové délce. Měří se obvykle do dvou hodin po zastavení reakce. Referenční jamky, které obsahují jen konjugát ligandu s enzymem vykazují nejintenzivnější zbarvení. Úbytky zbarvení v jamkách jsou úměrné množství nekonjugovaného antigenu. Standardní křivky dostaneme lineárním vynesemím průměrných hodnot absorbancí dvojic standardů na osu y proti příslušné koncentraci antigenu na ose x. Koncentrace antigenu v kontrolních a testovaných vzorcích, stanovovaných současně se standardy, mohou být stanoveny odečtením průměrných absorbancí vzorků ze standardní křivky. Tuto závislost běžně zpracovává počítač zabudovaný v ELISA readru. Kompetitivní metodu ELISA je možné použít ke stanovení protilátek. v tomto případě soutěží neznáčené protilátky v analyzovaném vzorku s určitou danou koncentrací značených protilátek o vazbu na omezené množství antigenu imobilizovaného na pevném povrchu (vnitřní povrch polystyrenových zkumavek nebo jamek mikrotitračních destiček).

Nekompetitivní ELISA, známá pod názvem **sendvičová technika** je nejvíce používanou metodou ELISA pro stanovení antigenů, které mají nejméně dvě různé antigenní determinanty. Základem stanovení jsou polystyrenové kuličky s adsorbovaným nadbytkem specifické protilátky (většinou monoklonální) proti antigenu. Tyto kuličky jsou specifické pro jednu antigenní determinantu na sledovaném antigenu. Vzorek je inkubován s kuličkami povlečenými protilátkou tak, až se všechen antigen ze vzorku naváže na imobilizované protilátky na kuličkách. Po odstranění nenavázaného materiálu se stanoví množství navázaného antigenu pomocí další enzymem značené protilátky, která je namířena proti druhé antigenní determinantě na stejném antigenu. Po druhé inkubaci a

separaci nadbytečného nenavázaného konjugátu, je stanovena aktivita enzymu, který je navázán na sendviči, přidáním vhodného substrátu. Množství vzniklého produktu je přímo úměrné množství antigenu ve vzorcích. Jestliže je druhá protilátka monoklonální, mohou se obě protilátky přidat současně, což značně zkrátí celkovou dobu analýzy. Změna zabarvení je přímo úměrná množství antigenu ve vzorku. Vhodným enzymem pro značení bývá alkalická fosfatasa.

PRAKTICKÁ ČÁST

1. Stanovení imunoglobulinu IgG turbidimetry

Lidský IgG má molekulovou hmotnost okolo 150 000 daltonů a skládá se ze dvou identických těžkých řetězců a dvou identických lehkých řetězců, které jsou spolu spojeny disulfidovými vazbami. IgG je produkován plazmovými buňkami (B-buňky) a představuje 75% všech tříd rozpustného imunoglobulinu. Hlavní funkcí IgG je vázat antigeny, které iniciují aktivaci komplementu a spouštět další katabolismus antigenu.

Snížené koncentrace IgG se objevují u primárních a také u sekundárních syndromů deficitu imunity. Zvýšená ztráta proteinů, způsobená nefrotickým syndromem, může mít za následek sníženou koncentraci IgG. Vysoké zvýšení jedné třídy imunoglobulinů, způsobené mnohočetným myelomem, může mít za následek pokles jiných tříd imunoglobulinů, např. IgG.

Zvýšené koncentrace IgG lze pozorovat u závažných infekčních chorob a u chorob autoimunity. Četné formy myelomu produkují vysoká množství monoklonálního nebo polyklonálního IgG. Kvantitativní stanovení IgG je nezbytné pro diferenční diagnostiku těchto chorob. Všechny metody kvantifikace IgG se kalibrují pro polyklonální IgG.

Princip stanovení:

Stanovení IgG je založeno na reakci imunoglobulinu se specifickým antisérem jako protilátkou. Tato reakce vytváří nerozpustný komplex, produkující zákal, který je fotometricky měřen při 570 nm.

Pracovní postup:

Činidlo zahřejeme v termostatu na 37°C. Do kyvety pipetujeme 1,5 ml činidla A 10 µl destilované vody nebo vzorku nebo standardu. Zamícháme, vložíme do spektrofotometru a zapneme stopky. Hodnotu absorbance odečítáme přesně za 5 minut od přidavku vzorku.

Referenční hodnoty:

7-16 g/l

2.Stanovení IgA imunoturbidimetry v séru nebo plazmě

Lidský IgA má molekulovou hmotnost kolem 160 000 daltonů. IgA v séru je produkován plazmatickými buňkami (B-buňky) a představuje asi 15% všech tříd rozpustného imunoglobulinu. Asi 90% IgA je monomerní, zbytek je dimerní nebo polymerní. Většina IgA není přítomna v séru, ale na povrchu membrán sliznic. V tkáních membrán plic a gastrointestinálního traktu se IgA uvolňuje plazmovými buňkami v dimerní formě. Dva kusy ve tvaru Y jsou spolu svázány nejen společným řetězem, ale i speciálním peptidem, který se nazývá sekreční komponent. tento typ IgA se nazývá sekreční IgA. V lidském séru normálně není přítomen, avšak v jiných tělních tekutinách, např. v potu, slzách a gastrointestinálních a bronchiálních výměšcích ano. Hlavní funkcí IgA v séru je vázat se na antigeny a spouštět další katabolismus antigenu.

Snížené koncentrace IgA v séru se objevují u primárních i sekundárních deficitů imunity. Vysoké zvýšení jedné třídy imunoglobulinu, které je vyvoláno mnohočetným myelomem, může mít za následek pokles v jiných třídách imunoglobulinů. Zvýšená ztráta IgA způsobená těžkou enteritidou může mít za následek sníženou koncentraci. Zvýšené koncentrace IgA lze pozorovat při těžkých infekcích a chorobách autoimunity. zejména zánětlivé procesy jater mohou mít za následek zvýšené hladiny IgA v séru. Podobně jako u jiných tříd imunoglobulinů, produkují četné formy myelomy vysoká množství monoklonálního nebo polyklonálního IgA. Kvantitativní stanovení IgA v séru je nezbytné pro diferenční charakteristiku těchto chorob. Všechny metody kvantifikace IgA se kalibrují pro polyklonální IgA v séru.

Princip stanovení:

Stanovení IgA je založeno na reakci mezi imunoglobulinem A jako antigenem a specifickým antisérem jako protilátkou. Tato reakce vytvoří nerozpustný komplex, produkující zákal, který je fotometricky měřen při 570 nm.

Materiál a metody

Souprava BioVendor-Laboratorní medicína a.s., Centrální Trade Park, Evropská 873,
Modřice

Složení soupravy:

R1: (reakční pufr)

Tris pufr pH 7,5 100 mmol/l

NaCl 180 mmol/l

Polyethylenglykol (PEG)

detergenty a stabilizátory

R2: (protilátka)

Tris pufr pH 8,0 100 mmol/l

NaCl 180 mmol/l

Protilátka (kozí) proti lidskému IgA

Stabilizátory

Vzorek:

Sérum, plazma (EDTA nebo heparin)

Stabilita: 7 dní při 15-25°C

 3 měsíce při 2-8°C

 6 měsíců při -20°C

Vzorek po rozmrazení už nemůže být opakovaně zmražen.

Pracovní postup

Napipetuje se do zkumavek podle tabulky:

	Vzorek/ml	Standard/ml	Blank/ml
Vzorek	0,002	-	-
Dest. voda	-	-	0,002
Standard	-	0,002	-
R1	0,250	0,250	0,250

Promíchat a 3-5 minut inkubovat při 37°C, změřit absorbanci A_1 vzorku, standardu A_2 a blanku A_{bl} a potom přidat

R2	0,050	0,050	0,050
----	-------	-------	-------

Promíchat a 3 minuty inkubovat při 37°C, změřit absorbanci A_2 vzorku, standardu a blanku.

Výpočet:

Koncentraci neznámého vzorku odečteme z kalibrační křivky, kterou sestrojíme minimálně z 5 bodů. jednotlivé body kalibrační křivky určíme podle vztahu:

$$c_{\text{IgA}} = c_{\text{st}} \cdot (\Delta A_2 - \Delta A_{\text{bl}}) / (\Delta A_{\text{st}} - \Delta A_{\text{bl}}) \text{ (g/l)}$$

3. Stanovení CRP (C-reaktivní protein) – latexová aglutinace

C-reaktivní protein (CRP) je nejznámější z proteinů akutní fáze, což je skupina proteinů, jejichž koncentrace v krvi se zvyšuje jako reakce na zánětlivá onemocnění. CRP je normálně přítomen při nízké koncentraci v krvi zdravých lidí (méně jak 5 mg/l). Zvyšuje se až na 500 mg/l při akutních zánětlivých procesech, spojených s bakteriálními infekcemi, pooperačními stavy nebo poškozením tkání po 48 hodinách. Měření CRP je užitečný laboratorní test, který se provádí za účelem zjištění akutních infekčních stavů a za účelem monitorování zánětlivých procesů i u akutních revmatických a gastrointestinálních chorob. Ve srovnání se stanovením počtu leukocytů je citlivější a projeví se dříve. Do referenčních mezí se vrací po léčbě rychleji.

Princip měření:

Serum obsahující C-reaktivní protein způsobuje aglutinaci latexových částic pokrytých antihuman C-reaktivním proteinem. Aglutinace latexových částic odpovídá koncentraci CRP a může být měřena turbidimetricky při 540 nm.

Pracovní postup:

Pracovní roztok zahřejeme na 37°C. Spektrofotometr nastavíme proti destilované vodě. Napipetujeme 1 ml pracovního roztoku a přidáme 7 µl vzorku. Zamícháme, kyvetu vložíme do spektrofotometru a zapneme stopky. Po 10 s zapíšeme absorbanci (A_1) a pak po 2 minutách (A_2).

Výpočet:

Výpočet koncentrace provedeme podle následujícího vztahu:

$$\frac{(A_2 - A_1)_{\text{vzorek}}}{(A_2 - A_1)_{\text{standard}}} \times c_{\text{standardu}} = c_{\text{vzorek}} \text{ (mg/l)}$$

4. Stanovení anti-streptolysinu O red latex ASLO^{Latex}

Antistreptolysiny (ASL) jsou specifické protilátky mimobuněčných produktů streptokoka hnisavého, mezi nimiž je antistreptolysin O jednou z nejčastěji používaných protilátek při klinických laboratorních vyhodnocováních. Reakce antistreptolysinu O

poskytuje užitečné informace pro stanovení diagnózy a monitorování streptokokových infekcí, např. angína, otitida, spála, revmatická horečka, glomerulonefritida. Protilátky proti streptolysinu lze zjistit 1 až 3 týdny po propuknutí infekce, přičemž maximální hodnoty se objevují ve 3 až 6 týdnu.

ASO red latex je suspenze polystyrenových latexových částic s imobilizovaným antigenem streptolysinem O. Vzorokly mající aktivitu ASO 200 IU/ml a vyšší vykazují aglutinaci a jsou interpretovány jako pozitivní..

Provedení:

Test se provádí se vzorky a činidlem při laboratorní teplotě. Na kontrolní kartu se napipetuje 50 µl vzorku (krevního séra) nebo každé kontroly do separovaných kruhů. Zatřepe se lahvičkou s latexem před použitím. Lahvička s činidlem A se drží ve vertikální poloze a do každého kruhu se kápne jedna kapka činidla. promícháme činidlo se vzorkem/kontrolou, rozetřít směs přes celou testovací plochu pomocí míchadélka, použít na každou směs jiné míchadélko, pomalu kroužit ručně po dobu 2 minut. Po 2 min odečíst pod světelným zdrojem míru aglutinace.

Interpretace výsledků:

pozitivní: aglutinace do 2 minut

negativní: bez aglutinace

5. Stanovení anti-EBNA-1 EBV IgG

EBV (anglická zkratka virus Epstein a Barrové) je druh herpetického viru (podčeleď *gama*, rod *Lymphocryptovirus*), který v organismu nejčastěji napadá buňky imunitního systému. Virus je všudepřítomný a většina populace se s ním setká a vytvoří si proti němu protilátky. Jediným přirozeným hostitelem je člověk. Po přímoinfekci mohou být lymfocyty transformovány a mohou být polyklonálně aktivovány s produkcí autoprottilátek. Infekce může mít ráz lytický (produktivní), má rovněž schopnost transformovat lidské buňky. Velká část infekcí v dětství probíhá bez příznaků. K onemocnění spojeným s EBV patří zejména syndrom infekční mononukleózy, Burkittův lymfom, nazofaryngeální karcinom atd. Infekce postihuje častěji osoby se sníženou odolností a chronickou únavou (podle některých teorií EVB způsobuje či spíše doprovází syndrom chronické únavy).

Princip metody:

ELISA-VIDITEST antiEBNA-1 EBV IgG je imunoanalytický test na pevné fázi. Na povrch jamek je navázán specifický antigen, který představuje imunodominantní epitop EBNA-1. jeho imunoreaktivita je zvýšena konjugací na bílkovinný nosič. jsou-li v testovaných sérech přítomny příslušné protilátky, navážou se na imobilizovaný peptid. Navázané protilátky pak v dalším kroku reagují s protilátkami proti lidskému IgG značeným křenovou peroxidasou. Množství navázaných značených protilátek se stanoví barevnou enzymovou reakcí. Negativní séra nereagují, mírná změna v zabarvení jamek je pozadím reakce.

Materiál a metody.

Souprava ELISA-VIDITEST anti-EBNA-1 EBV IgG –výrobce VIDIA s.r.o., Nad Safinou II/365, Vestec, Jesenice

Obsah soupravy:

ELISA, odlamovací stripy v manipulačním rámečku, potažené specifickým antigenem

Standard A 8 AU/ml

Standard B 20 AU/ml

Standard C 50 AU/ml

Standard D 100 AU/ml

Standard E 170 AU/ml

Standard F 800 AU/ml

AU/ml znamená arteficiální jednotky/ml

konjugát protilátek proti lidskému IgG značených peroxidasou (10x koncentrovaný)

promývací roztok (10x koncentrovaný)

ředící roztok v pracovní koncentraci

chromogensubstrátový roztok v pracovní koncentraci

stop roztok v pracovní koncentraci

sáček se zipem pro uchovávání zbytku odlamovacích stripů

Návod k použití soupravy

Certifikát kontroly kvality

Příprava reagensí:

Všechny složky soupravy se vytemperují na laboratorní teplotu. Těsně před vyšetřením se zamíchá vyšetřovanými séry a standardy. testovaná séra se ředí ředícím roztokem 1:100 (5 µl séra + 500 µl ředícího roztoku). Standardy se neředí.

Pracovní koncentrace promývacího roztoku se připraví naředěním 1:9 ve vhodném objemu deionizované vody (100 ml promývacího roztoku + 900 ml vody). Pokud jsou v koncentrovaném roztoku krystali soli, zahřeje se roztok na vodní lázni 32-37°C teplé a dobře se před ředěním promýchá.

Naředí se Px konjugát 1:100 ředícím roztokem (např. 01 ml Px konjugátu + 10 ml ředícího roztoku).

Chromogensubstrátový roztok TMB a stop roztok jsou již v pracovní koncentraci.

Pracovní postup:

Stripy vakuově zatavené se nechají před otevřením sáčku vytemperovat na laboratorní teplotu, aby nedošlo k orosení destičky. připraví se potřebný počet stripů pro stanovení a zbytek se s desikantem uzavře do sáčku se zipem

Naplní se jamky po 100 µl jednotlivých standardů a naředěních testovaných sér. první jamka pro stanovení pozadí reakce se naplní samotným ředícím roztokem (DB).

Pro kvalitativní a semikvantitativní stanovení se naplní tři jamky standardem D a další jamky jednotlivými standardy. Pro kvantitativní hodnocení se naplní vždy po dvou jamkách standardem A,B,C,D,E a F. Zbývající jamky se naplní testovanými séry. Každé sérum stačí aplikovat na jednu jamku. Pro vyloučení chyby se séra a kontrolní vzorky aplikují do dvou jamek.

Inkubace probíhá 30 minut při laboratorní teplotě.

Obsah jamek se pak odsaje do pojistné nádoby obsahující desinfekční prostředek. Jamky se promyjí 4x 250 µl promývacího roztoku. Je třeba se vyvarovat přetékání jamek přes okraje. Obsah jamek se odsaje a destička se překloupí na přířez z buničité vaty.

Napipetuje se 100 µl ředěného Px konjugátu. Inkubuje se 45 minut.

Obsah konjugátu se odsaje a promyje se 4x 250 µl promývacího roztoku. Odsaje se a vyklepne se na přířez buničité vaty.

Do jamek se pak napipetuje po 100 µl chromogensubstrátového roztoku. Inkubuje se 10 minut(+/- 5 sec). Doba inkubace se začíná měřit po napipetování 1. stripu destičky. Pipetuje se v pravidelném rytmu. Stripy se překryjí alobalem, neprůhledným víčkem nebo se na dobu reakce uloží do tmy.

Reakce se zastaví přidáním 100 μ l stop roztoku. Pipetuje se ve stejném rytmu jako při rozpipetování chromogensubstrátového roztoku, aby enzymová reakce probíhala všude stejnou dobu. Je třeba zkontrolovat, jestli v jamkách nejsou jemné bublinky, pokus ano, je třeba jemným poklepem na rámeček destičky je odstranit.

Intenzita barevné reakce se změří na spektrofotometru při 450 nm nejpozději do 20 minut po zastavení reakce. Doporučuje se použít referenční filtr 630 nm.

Testovací schéma:

- Krok 1. Připravit reagentie a testovaná séra v pracovním ředění
- Krok 2. Aplikace 100 μ l/jamku kontrolních a testovaných sér
 Inkubace 30 minut při laboratorní teplotě
 4x se promyje (250 μ l promývacího roztoku/jamku) a vyklepne se
- Krok 3. Aplikace 100 μ l ředěného Px konjugátu/jamku
 Inkubace 45 minut při laboratorní teplotě
 4x se promyje (250 μ l promývacího roztoku/jamku) a vyklepne se
- Krok 4. Aplikace 100 μ l chromogensubstrátového roztoku/jamku
 Inkubace 10 minut při laboratorní teplotě, ve tmě
- Krok 5. Aplikace 100 μ l stop roztoku/jamku
- Krok 6. Změřit absorbanci při 450 nm do 20 minut

Hodnocení testu.

1. Kvalitativní orientační hodnocení:

- a) Spočítá se průměrná hodnota standardu D. Pokud es některá z hodnot liší víc jak o 20% od průměru, vyloučí se a spočítá se průměr ze zbývajících hodnot.
- b) Stanoví se hodnota cut-off tak, průměrná hodnota standardu D se vynásobí korelačním koeficientem. (Např. pro soupravu č.š. 021006) je 0,17).
- c) Séra s hodnotou OD menší jak cut-off jsou negativní a séra s hodnotou cut-off větší jsou považována za pozitivní.

2. Semikvantitativní hodnocení:

Stanoví se hodnota indexu pro jednotlivé vzorky sér:

- a) Nejdříve se opět stanoví cut-off hodnota jako v předešlém způsobu hodnocení.
- b) Stanoví se hodnota indexu pro jednotlivé vzorky sér tak, že se vydělí OD testovaného séra cut-off hodnotou
- c) Odečte se v tabulce 1 „Hodnocení výsledků“ stupeň reaktivity séra

Tabulka 1. Hodnocení výsledků

<u>hodnota indexu</u>	<u>vyhodnocení</u>
< 1,00	negativní
1,00-1,30	+/-
1,33-4,00	+
4,01-6,50	++
6,51-12,00	+++
<u>> 12,00</u>	<u>++++</u>

6. Detekce lidského gonadotropinu (hCG) v lidské moči – těhotenský test

hCG je hormon produkovaný placentou. U normálních osob je hCG v moči časným indikátorem těhotenství. *Instant-View* pregnancy urine Dip-strip test využívá monoklonální protilátky specifické k hCG v jedнокrokovém imunochromagrafickém testu k přesné detekci hCG v hladinách blízkých nebo vyšších než je 25 IU/ml.

Princip metody

Testovací proužek obsahuje: 1) podušku obsahující myší monoklonální anti-hCG protilátky konjugované ke koloidnímu zlatu a 2) nitroceluzovou membránu obsahující testovací linii (linie T) a kontrolní linii (linie C).

Linie T je potažena anti-hCG protilátkami. Pokud je dostatečné množství vzorku aplikováno na podušku testovacího proužku, hCG ze vzorku se váže na konjugát protilátka-zlato ještě v polštářku a poté putuje podél proužku. Pokud vzorek obsahuje hCG v hladině blízké nebo větší než je 25 IU/ml, dostatek hCG se váže k vazebné protilátce nanesené v linii T a způsobí objevení karmínově červené linie. Pokud vzorek neobsahuje hCG nebo obsahuje množství hCG pod detekovatelnou linii, linie T se neobjeví.

Linie C je potažena kozími anti-myšími protilátkami, které by se měly vázat na konjugát protilátka-zlato a vytvořit karmínově červenou linii bez ohledu na přítomnost hCG.

Materiál a metody

Souprava Instant-View Pregnancy Urine Test (Dip-Strip), výrobce: Alfa Scientific Designs Inc. Poway, CA 92064 USA, dovozce: ELISABETH PHARMACON, s.s r.o., Botanická 33, Brno

Odběr vzorku:

Vzorek musí být odebrán do čisté nádoby a uchováván max. 8 hodin při teplotě 15-30°C nebo 3 dny při teplotě 2-8°C.

Pracovní postup při testování

Vzorky a další testovaný materiál musí být vytemperovány na pokojovou teplotu. Proužek se vyjme ze zatavené folie. Testovací proužek se drží za konec k tomu určený. Poduška se ponoří do vzorku asi na 10 sekund. testovací proužek se drží ve vzorku na úrovni označení na proužku šipkami. Pak se proužek vyjme a položí se na suchý vodorovný povrch. Silně pozitivní výsledky mohou být pozorovány do 2-3 minut. Slabě pozitivní výsledky se mohou vyvíjet delší dobu (do 5 minut).

Důležité: výsledky neodečítat po 10 minutách!

Interpretace výsledků:

pozitivní: objeví se obě linie (C a T), výsledek indikuje, že ve vzorku byl detekován hCG.

negativní: pokud se objeví pouze linie C, test indikuje, že hladina hCG ve vzorku není detekovatelná a výsledek je negativní. Pokud je podezření na těhotenství, test se opakuje po 2-3 dnech s novým vzorkem a novým testem.

neplatný: Pokud se v kontrolní oblasti neobjeví linie do 5 minut, opakovat testování s novým testovacím proužkem.