

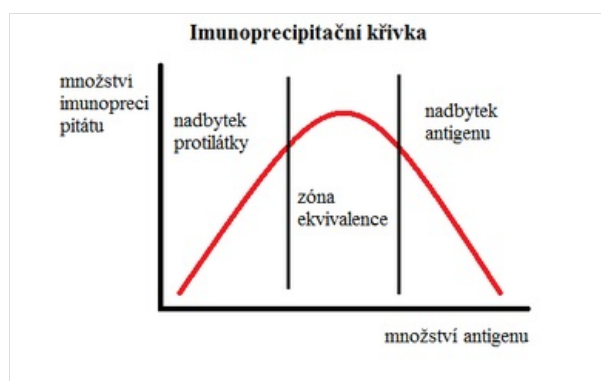
Imunochemické metody

Imunochemické metody jsou založeny na interakci antigen-protilátka. Pomocí těchto metod stanovujeme přítomnost patogenů nebo prokazujeme, zda vzorek obsahuje specifické protilátky vůči danému antigenu či nikoliv.

Antigen je makromolekulární látka přirozeného nebo umělého původu, kterou organismus rozpoznává jako cizí. Pokud je antigen (v tomto případě **imunogen**) vpraven do organismu, **navodí imunitní odpověď**. Dojde ke stimulaci lymfocytů, které po diferenciaci produkují plasmatické buňky schopné sekretovat protilátky. Protilátka je tedy molekula, které je schopna navázat se na antigen a tím spustit obrannou reakci organismu.

Rozlišujeme **polyklonální protilátky** (namířeny proti více epitopům určitého antigenu), **monoklonální protilátky** (namířeny proti jednomu epitopu antigenu) a **rekombinantní protilátky** (kombinace obou předchozích).

Imunoprecipitační metody

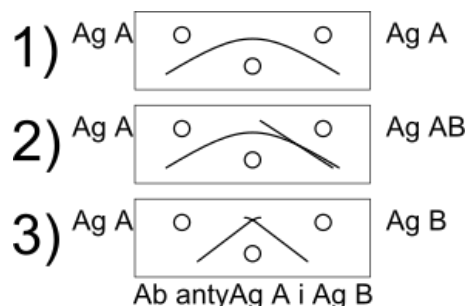


Jsou založeny na interakci rozpustného antigenu a rozpustné protilátky za vzniku sraženiny - **imunoprecipátu**. Tvorba precipitátu závisí na poměru antigenu a protilátky. Tento vztah vyjadřuje **imunoprecipitační křivka**.

Imunodifúzní metody

Detekuje se na základě dosažení **zóny ekvivalence**, přímo vizuálně. K reakci je nutné **gelové prostředí** - agar, agarosa. Rozlišujeme Ouchterlonovu metodu, jednoduchou radiální imunodifúzi, dále poté kombinace imunodifúze a elektroforézy.

Dvojitá radiální



1) Jedná se o **identické antigeny**, proto došlo k fúzi precipitačních linií v jednu. 2) Antigeny jsou **částečně identické**, větší interakce s paratopy má antigen na pravé straně (v tomto případě). 3) Dané precipitační linie vůbec neintegrovaly, tudíž se jedná o **neidentické antigeny**.

imunodifúze (dle Ouchterlony)

Jde o **kvalitativní** imunochemickou metodu, ve které se prokazují protilátky pomocí specifických antisér. Využívá se k prokázání a porovnání různých antigenů pomocí poměrně jednoduchého principu. Antigen tvoří se svojí specifickou protilátkou po ustálení ekvivalence **imunoprecipitační linii**. Podle tvaru linie lze určit, jestli byly dané antigeny identické, rozdílné či částečně shodné.

Jednoduchá radiální imunodifúze (dle Manciniové)

Vzorky s antigenem jsou aplikovány do jamek v agarózovém gelu obsahujícím specifickou protilátku. Během 2-3 dnů inkubace při pokojové teplotě antigen radiálně difunduje v tomto gelu. Při reakci antigenu se specifickou protilátkou se vytvoří **imunoprecipitační prstenec**, jehož plocha je úměrná množství antigenu. Výsledky vzorků vyhodnocujeme pomocí speciálního pravítka, kdy měříme plochu prstenců a tím stanovíme koncentraci antigenu ve vzorcích. Jedná se tedy o **kvantitativní** metodu, která je levná a nenáročná na vybavení, ale déle trvající kvůli dlouhé době inkubace.

Imunodetekce optickými metodami v roztoku

Principem těchto metod je reakce zředěného antigenu a monospecifické protilátky za vzniku zákalu. Nejedná se tedy o reakce probíhající v gelu, nýbrž v roztoku. Reakce probíhá v nadbytku protilátky, tudíž množství precipitátu je úměrné množství antigenu. Tyto metody jsou rychlé, automatizovatelné a dávají nám **kvantitativní** informace.

Imunoturbidimetrie

Pokud stanovujeme koncentraci antigenu v neznámém vzorku (př. plazmatické bílkoviny), použijeme metodu **imunoturbidimetrie**. Při reakci antigenu s protilátkou vzniká zákal. Pomocí **spektrofotometru** změříme intenzitu světla, které nebylo zákalem rozptýleno a stanovíme koncentraci antigenu v neznámém vzorku (použijeme pouze vzestupnou část křivky, kde je koncentrace antigenu přímo úměrná koncentraci precipitátu).

Podrobnější informace naleznete na stránce Turbidimetrie.

Imunonefelometrie

Metoda je založena na měření intenzity rozptýleného světla, které vychází z roztoku **všemi směry**. Měří se pod úhlem, který je odlišný od směru dopadajícího záření (obvykle 45° nebo 90°). Koncentraci antigenu stanovujeme stejně jako u imunoturbidimetrie. Používáme **nefelometr**, kdy zdrojem záření je obvykle laser. Nefelometrie (práh

citlivosti okolo $0,1 \text{ mg/l}$) je citlivější než turbidimetrie.

Imunoaglutinační metody

Jsou založeny na interakci nerozpustného antigenu a rozpustné protilátky za vzniku sraženiny - **aglutinátu**. Reaguje specifická protilátka s antigenem, který má korpuskulární charakter

- celá těla mikroorganismů - **přímá imunoaglutinace**
- erytrocyty - **hemaglutinace**,
- solubilní antigeny uměle navázané na povrch inertních částic - **nepřímá imunoaglutinace**.

Imunoanalytické metody se značenými reaktanty

Metody jsou založeny na **značení** antigenu nebo protilátky takovou látkou, která je citlivější než průkaz imunoprecipitátu. **Značkou může být enzym** (enzymová imunoanalýza), **radioizotop**, **ale i fluorescenční nebo chemická látka**.

Enzymová imunoanalýza

Tyto metody využívají enzymů ke značení antigenu nebo protilátky. Jako značka slouží peroxidáza nebo alkalická fosfatasa. Existují dvě hlavní techniky, a to **ELISA** (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) a **EMIT** (Enzyme Multiplied Immunoassay Technique).

Homogenní enzymová analýza

Vzorek, který obsahuje stanovovaný antigen se smíchá se známým množstvím téhož antigenu s navázaným enzymem (konjugát) a příslušnou protilátkou v omezeném množství. Při imunochemické reakci **soutěží neznačený antigen s konjugátem o navázání na omezené množství protilátky**. Při vazbě protilátky na enzym konjugátu může nastat konformační změna enzymu spojená se ztrátou aktivity. Čím je ve vzorku více neznačeného antigenu, tím více molekul protilátky s ním reaguje a tím zůstane zachováno více enzymové aktivity v konjugátu. Tato metoda se využívá ke stanovení nízkomolekulárních látek (léky, hormony).

Heterogenní enzymová analýza

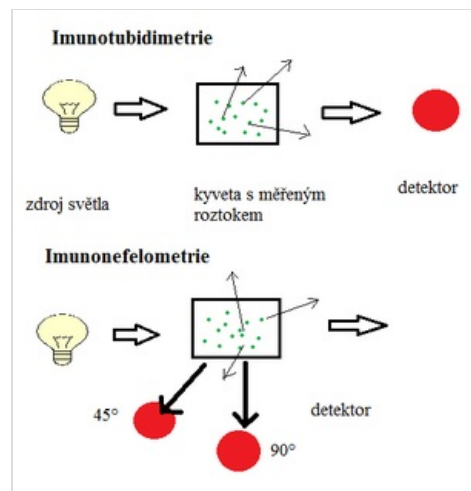
Jednou z metod je tzv. **ELISA**, kdy stanovujeme množství antigenu nebo protilátek. Antigen nebo protilátka jsou zde **pevně zakotveny na pevné fázi**, kterou může být buď povrch mikrotitračních jamek, zkumavky či magnetické částice. ELISA metody dělíme na **kompetitivní a nekompetitivní (sendvičové)**.

Kompetitivní technika

U tohoto typu stanovení soutěží o vazbu na omezený počet vazebných míst na pevném povrchu imobilizovaných protilátek neznačený ligand s ligandem značeným enzymem. Po krátké inkubaci je oddělen komplex vázaný od volného. Po promytí (odstranění nenavázaných molekul) je přidán substrát a enzym přítomný ve vázané frakci jej přemění na barevný produkt. Množství vzniklého produktu je nepřímo úměrné koncentraci neznačeného ligandu v testovaném vzorku. Následuje měření absorbance vzorků. Jamky, které obsahují jen konjugát ligandu s enzymem jsou nejintenzivněji zabarveny a úbytky zabarvení v jamkách jsou úměrné množství nekonjugovaného antigenu. Standardní křivky dostaneme vynesením koncentrace antigenu a absorbance. Z křivky stanovíme koncentraci antigenu vzorků (popř. to necháme udělat PC – Elisa reader).

Nekompetitivní (sendvičová) technika

Pomocí této metody stanovujeme protilátky nebo antigeny, které mají nejméně dva různé determinanty. Na povrchu jamek mikrotitračních stripů je navázán specifický antigen. V neznámých vzorcích, které přidáváme do jamek, vyšetřujeme přítomnost protilátek proti tomuto antigenu. Pokud vzorky obsahují danou protilátku proti danému antigenu, navážou se na antigen a vytvoří imunokomplex. Po promytí nenavázaných složek vzorku se imunokomplexy detekují **konjugátem** (bílkovina s navázaným enzymem). Vznikne tzv. „**sendvič**“, který je tvořen **antigenem ve stěně stripu, protilátkou a konjugátem**. Množství navázaných značených protilátek se zviditelní **enzymovou reakcí**. Po promytí přidáme **substrát**, který je pomocí peroxidázy přeměněn na barevný produkt. Enzymovou reakci zastaví přidáním STOP roztoku (slabá kyselina). Podle intenzity zbarvení vyhodnotíme, zda vzorky obsahovaly protilátku či nikoliv.



ELISA

Odkazy

Související články

- Turbidimetrie

Zdroje

Vlastní poznámky z hodin seminářů lékařské biochemie

<http://che1.lf1.cuni.cz/html/imuno.pdf>

[https://ulbld.lf1.cuni.cz/file/1045/Imunochemie 201314teorie.pdf](https://ulbld.lf1.cuni.cz/file/1045/Imunochemie%20201314teorie.pdf)