

# EIA metody

Sérologický průkaz infekčních nemocí,  
kvantifikace antigenů, nádorových markerů,  
toxinů.....

# Reakce antigenu s protilátkou



První fáze je rychlá (sekundy)

vs

Druhá fáze je pomalá

(minuty, hodiny)

Podle povahy antigenu:

- Precipitace = antigen je solubilní
- Aglutinace = antigen je korpuskulární (erytrocyt)

# Uspořádání testů EIA

- homogenní x heterogenní
- kompetitivní x nekompetitivní
- konjugát – Ab značená enzymem (HRP, AP, Gly)
- substráty pro enzymy, i fluorescenční (citlivost)
- chromogeny pro HRP (OPD, TMB, 5AS, DAB)

# Kompetitivní uspořádání EIA

- heterogenní
- homogenní
- závislost signálu na koncentraci analytu: ?
- vhodné pro nízkomolekulární analyty (haptén) – toxiny, drogy, léky, aditiva, alergeny a pod.

# Nekompetitivní uspořádání EIA

- heterogenní
- (homogenní) – schéma?
- závislost signálu na koncentraci analytu: ?
- sendvičové uspořádání vhodné pro vysokomolekulární analyty

# EIA metody

**TITRACE protilátek** - kvantifikace Ab, jednotka – titr (stupeň ředění)  
nebo I.U. (IgE)

**protilátky proti bakteriálním infekcím** (*Helicobacter pylori*, **protilátky proti borelióze** (*B. burgdorferi, garinii, afzelii*) – *diagnóza, účinnost terapie, prognostický význam*

**protilátky proti virovým infekcím**

*(herpetické viry, hepatitidy, HIV a mnoho jiných) - diagnóza, účinnost terapie, prognostický význam*

**Kvantifikace antigenů** – jednotka ng analytu/ml vzorku

**přímý průkaz Ag** (*HBsAg, HIV*) *při infekčních onemocněních*

**průkaz a kvantifikace nádorových markerů** (příklady – na lab. cvičení, min. 5)

**průkaz alergenů v potravinách, potravních doplňcích, průkaz toxinů**

# ENZYMOVÁ IMUNOANALÝZA – EIA

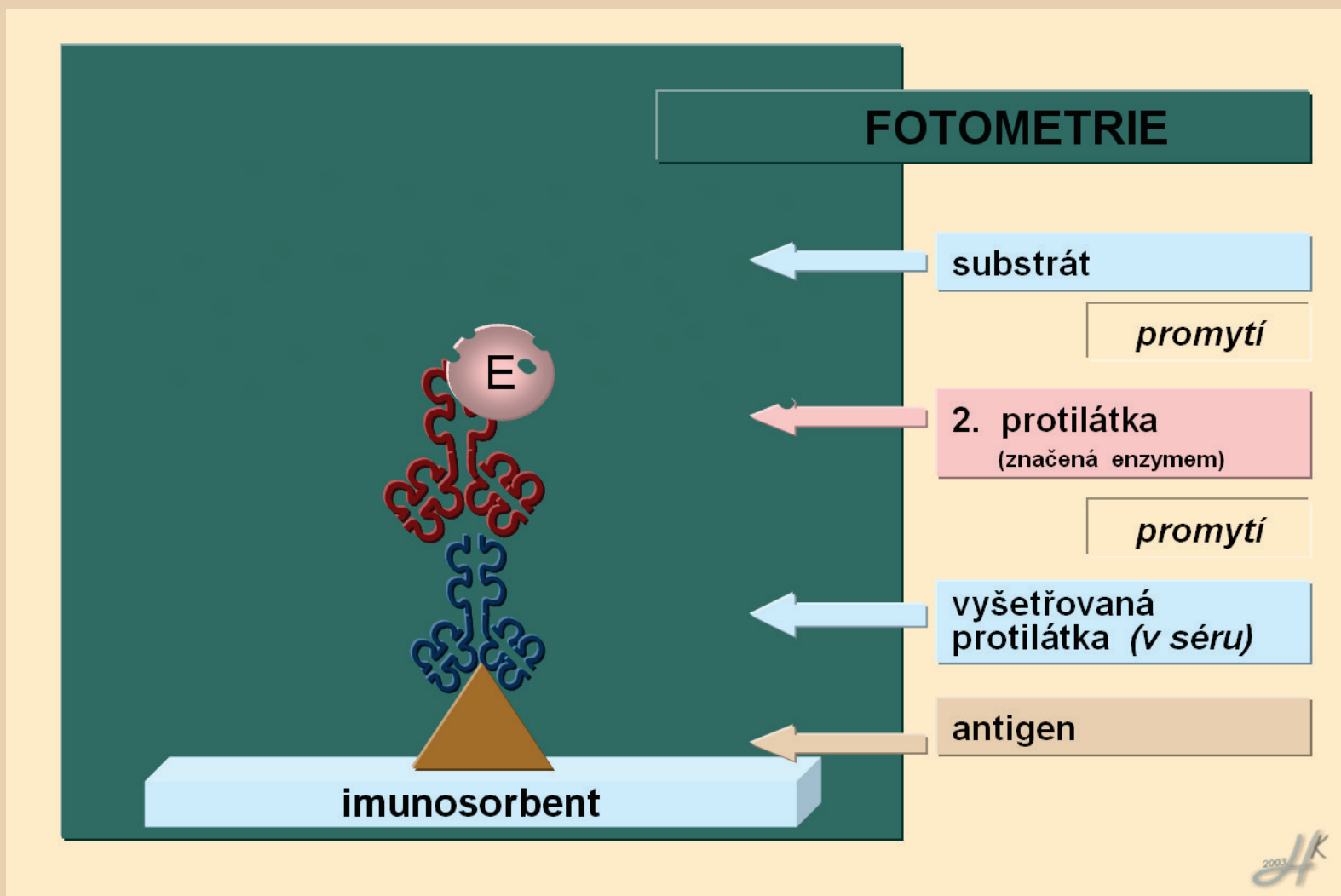
## (ELISA - enzyme linked immunosorbent assay)

- Lze využít jak **pro stanovení protilátek** (v izotypech IgG, IgM aj.)  
tak pro stanovení antigenu
- **komplex Ag - Ab detekován sekundární protilátkou značenou enzymem** (křenuvová peroxidáza, alkalická fosfatáza)

**Ag: celobuněčný lyzát** (rozbití ultrazvukem, hypotonické prostředí, zmražování - rozmražování), **bakteriální exoprodukty**, **rekombinantní Ag aj.**, **alergen**, **autoantigen**,

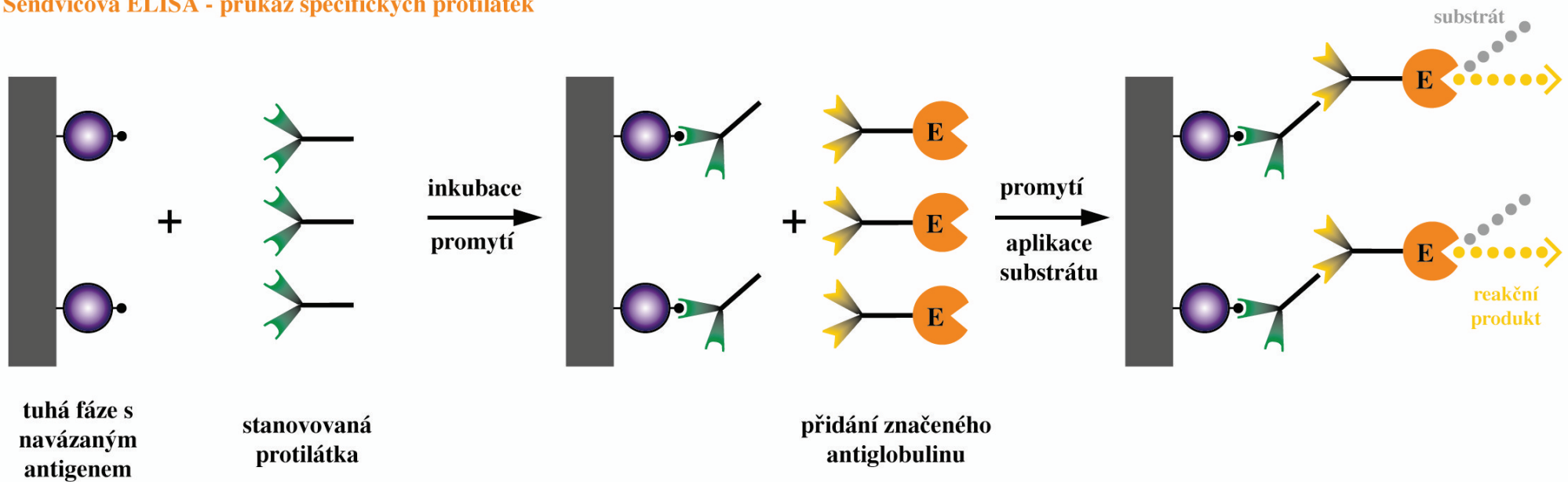
- **protilátková odpověď v jednotlivých třídách Ig** (IgG, IgM)
- **vysoká citlivost** (<1ng/l)
- **hodnocení testu**
  - **kvalitativní** (hraniční sérum, cut-off)
  - **kvantitativní** (kalibrační křivka)

# ELISA – průkaz specifických protilátek



# ELISA sandvičová – průkaz Ab

## Sendvičová ELISA - průkaz specifických protilátek



# ELISA test - křivka

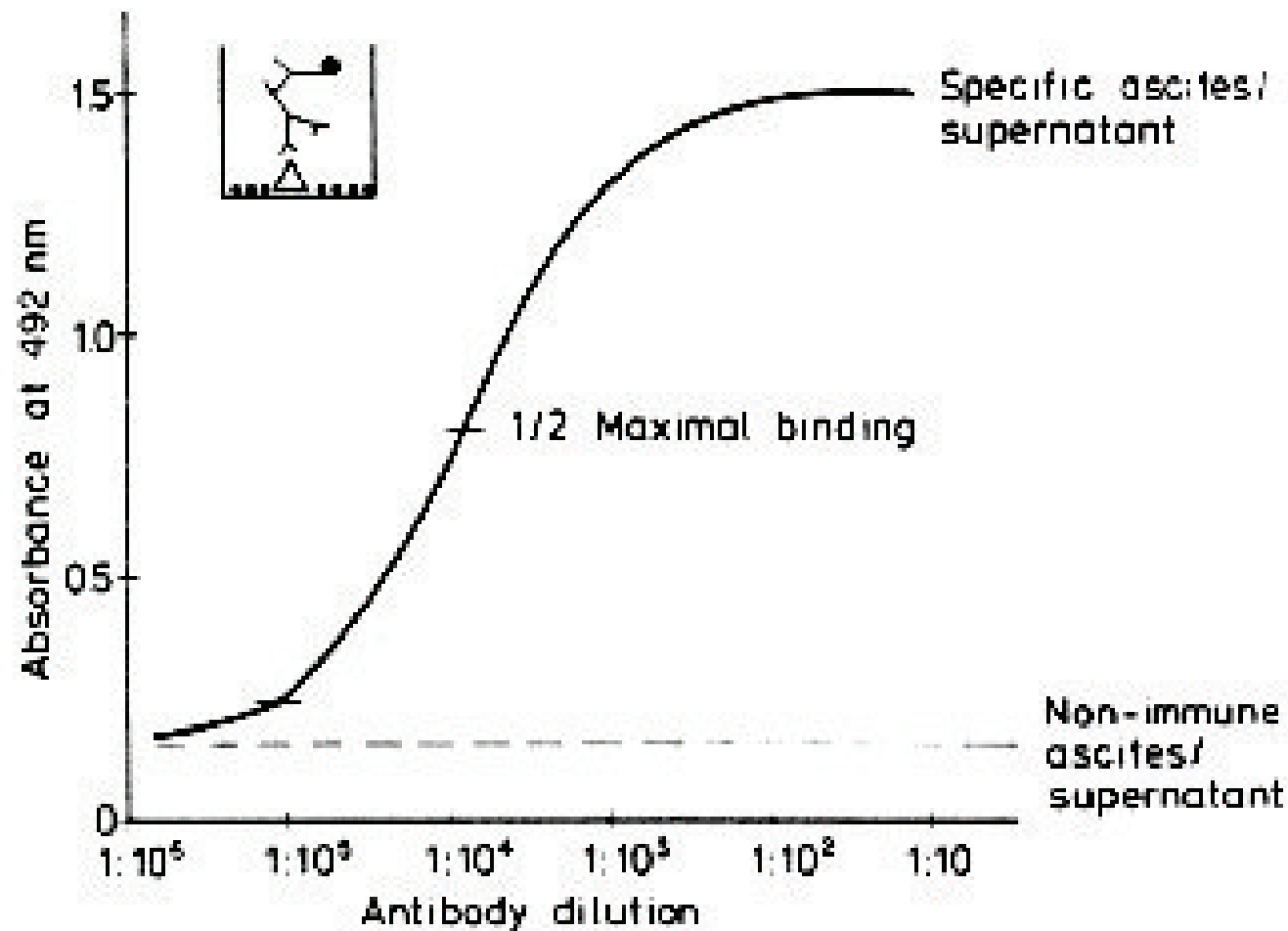
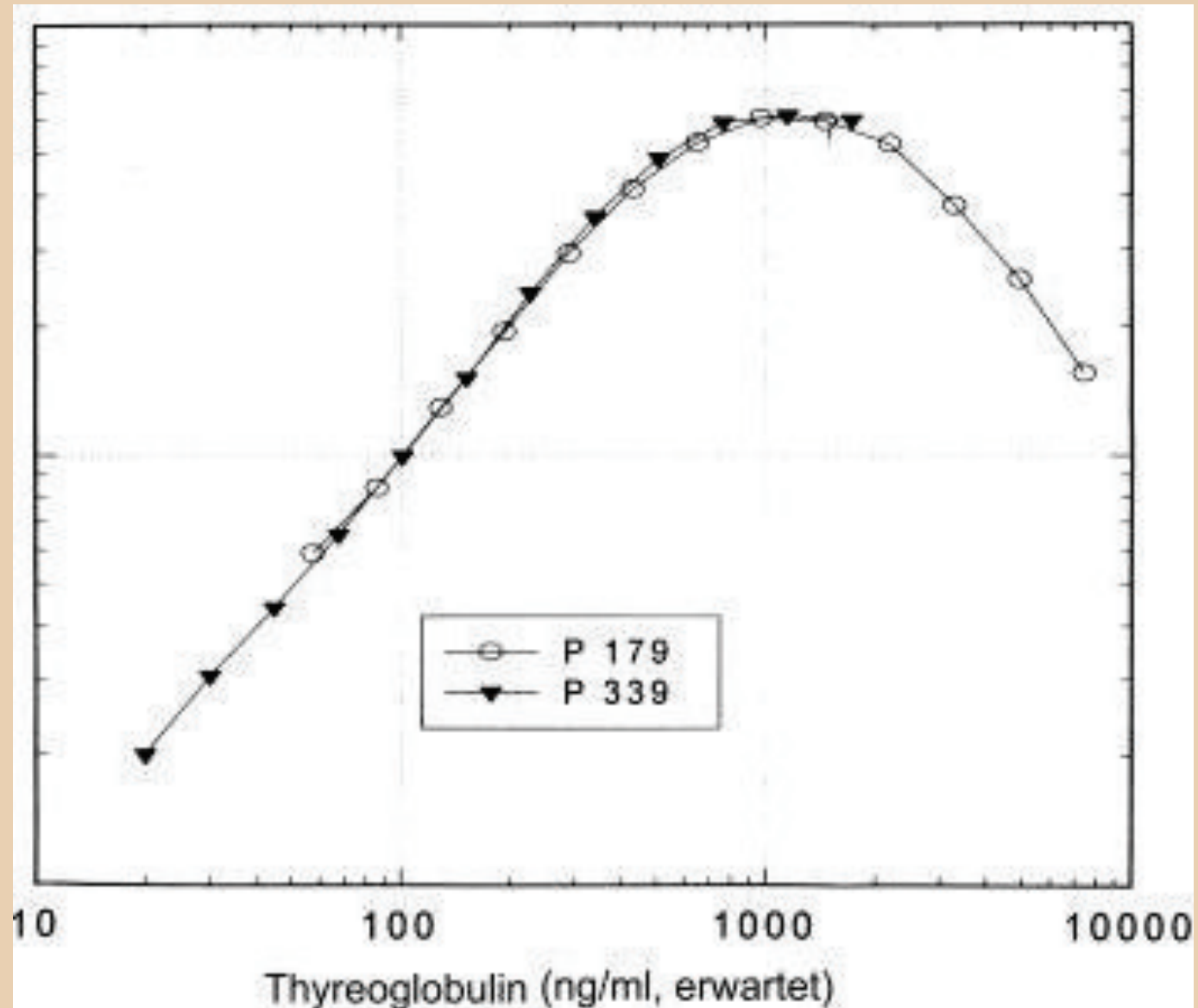
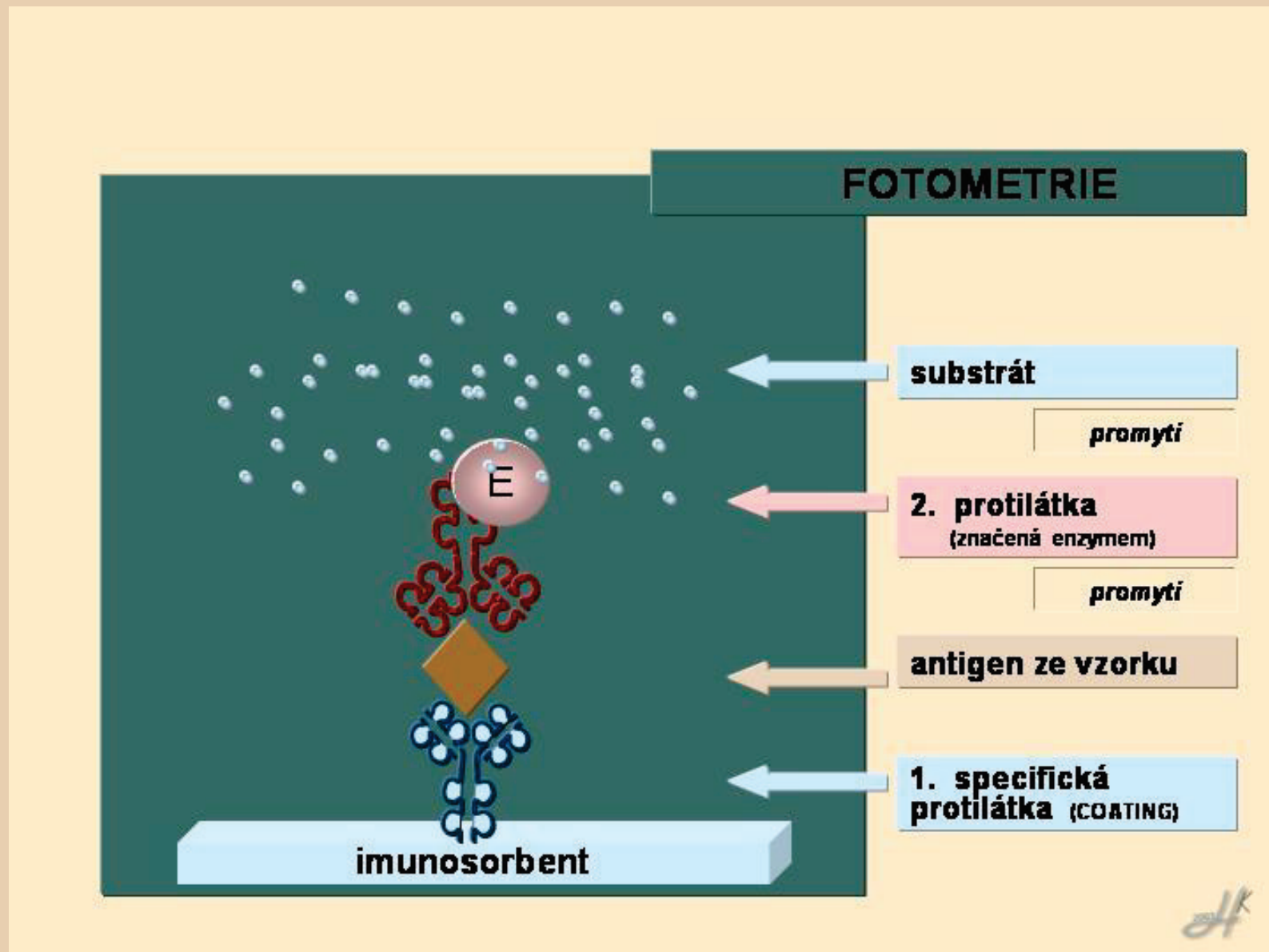


Fig. 7.1.1 Antibody titre by ELISA: either half-maximal binding, i.e. 1:10<sup>4</sup>, or minimal detectable response above negative control, i.e. 1:10<sup>5</sup>

# Hook efekt testu ELISA

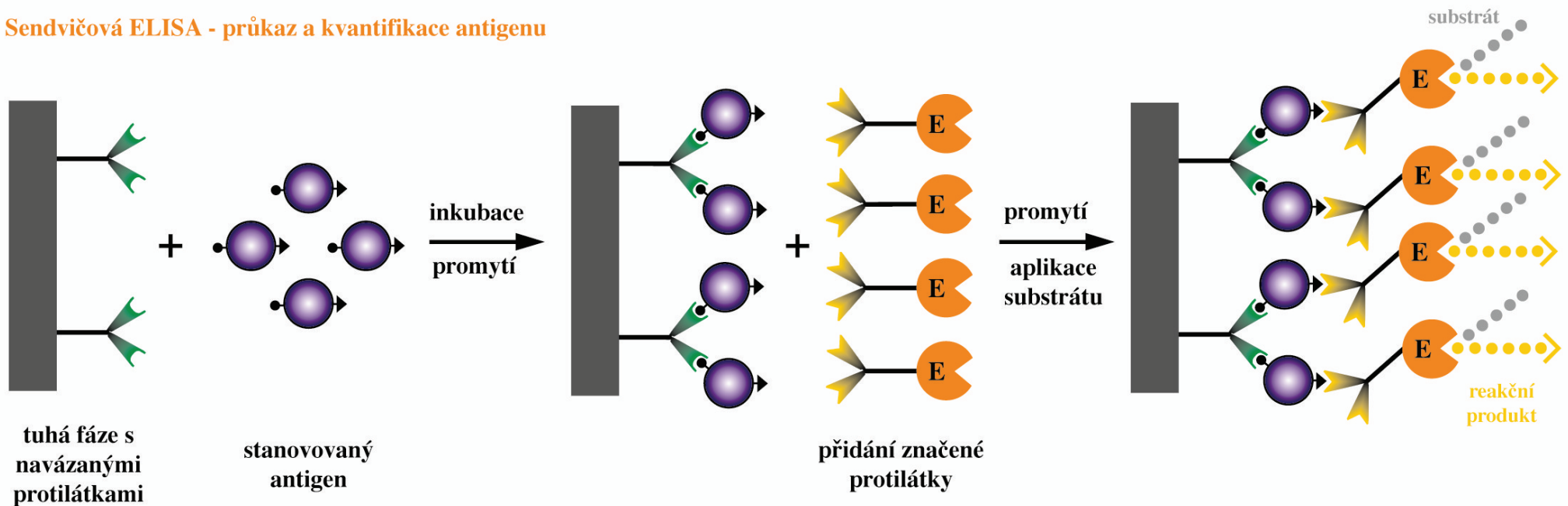


# ELISA – průkaz antigenu

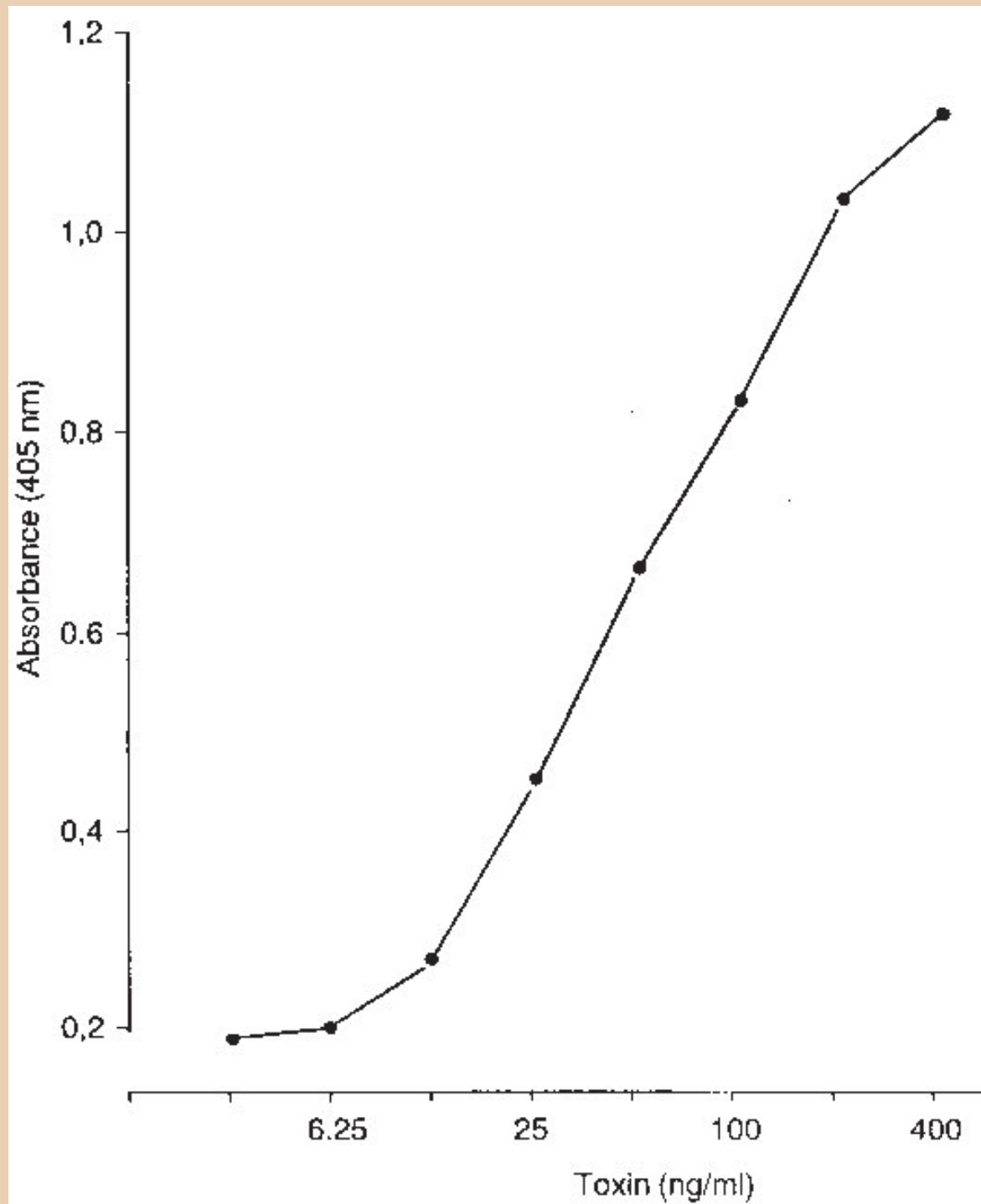


# ELISA sandvičová – průkaz Ag

## Sendvičová ELISA - průkaz a kvantifikace antigenu

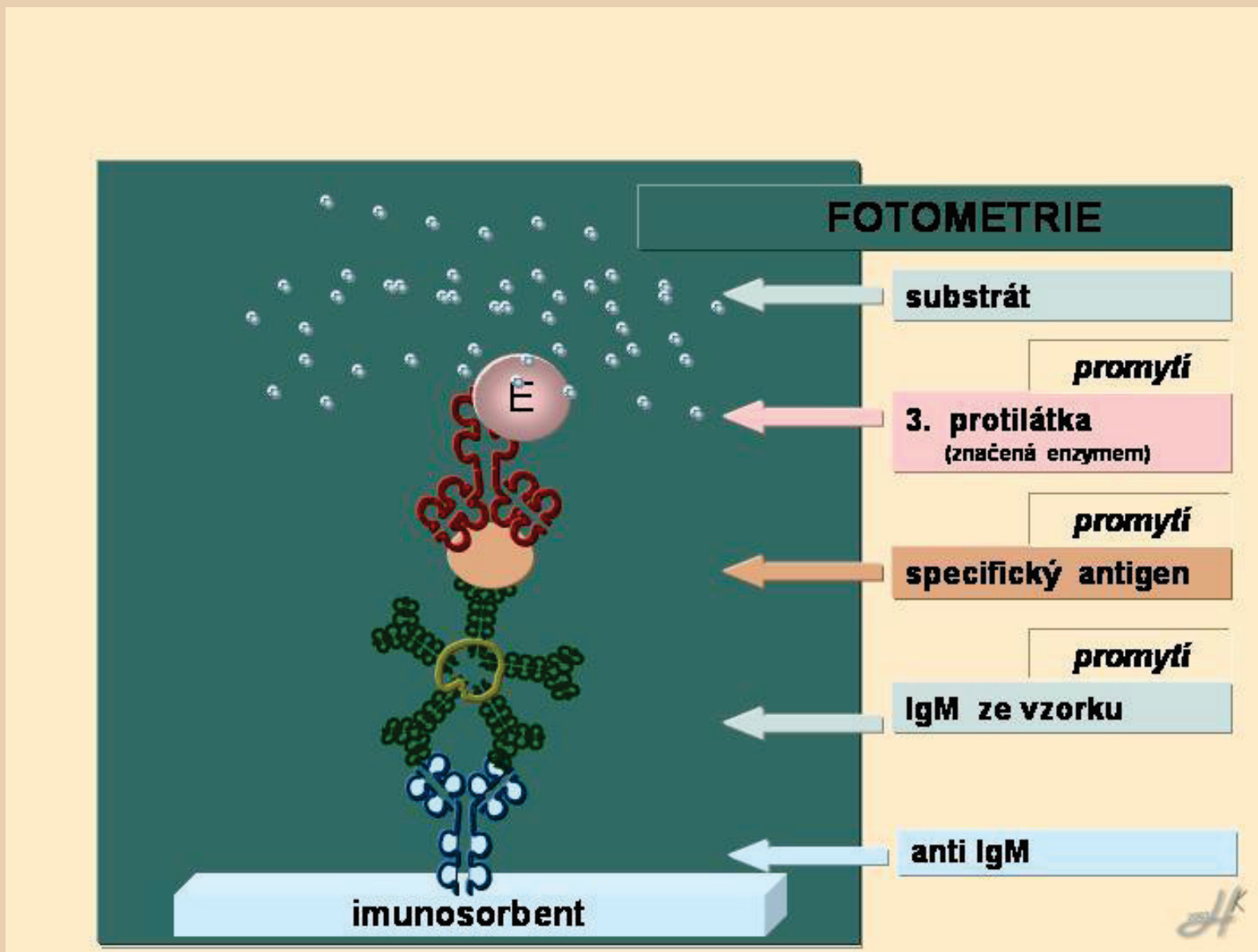


# Kvantifikace toxinu



# IgM „capture“ – průkaz specifických protilátek IgM

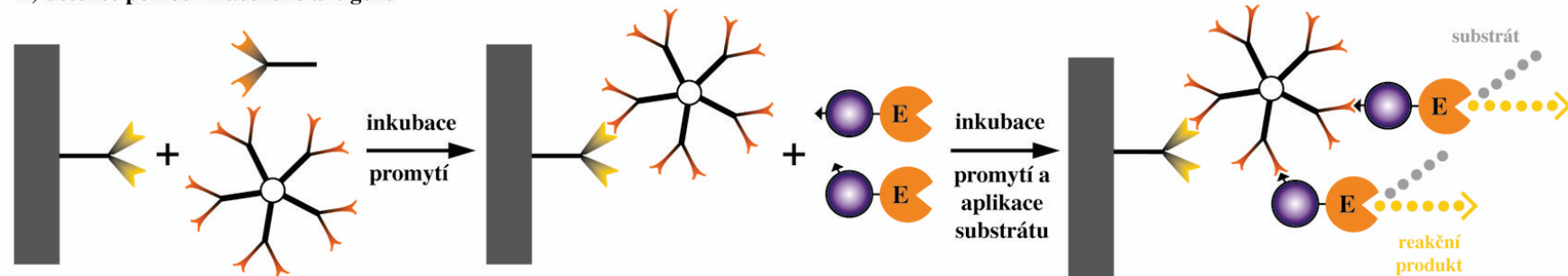
proti infekčnímu agens (odstranění vlivu specifických IgG protilátek)



# IgM capture metoda

## Metoda "IgM capture"

### A) detekce pomocí značeného antigenu

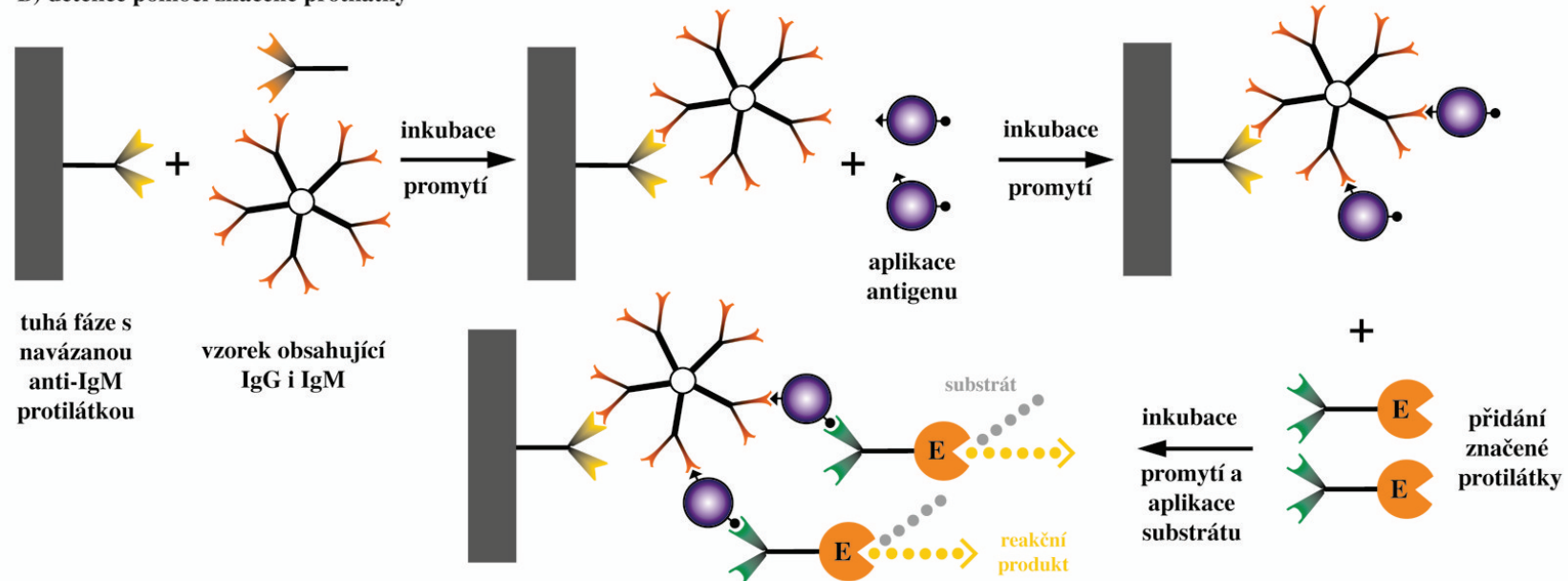


tuhá fáze s navázanou anti-IgM protilátkou

vzorek obsahující IgG i IgM

přidání značeného antigenu

### B) detekce pomocí značené protilátky



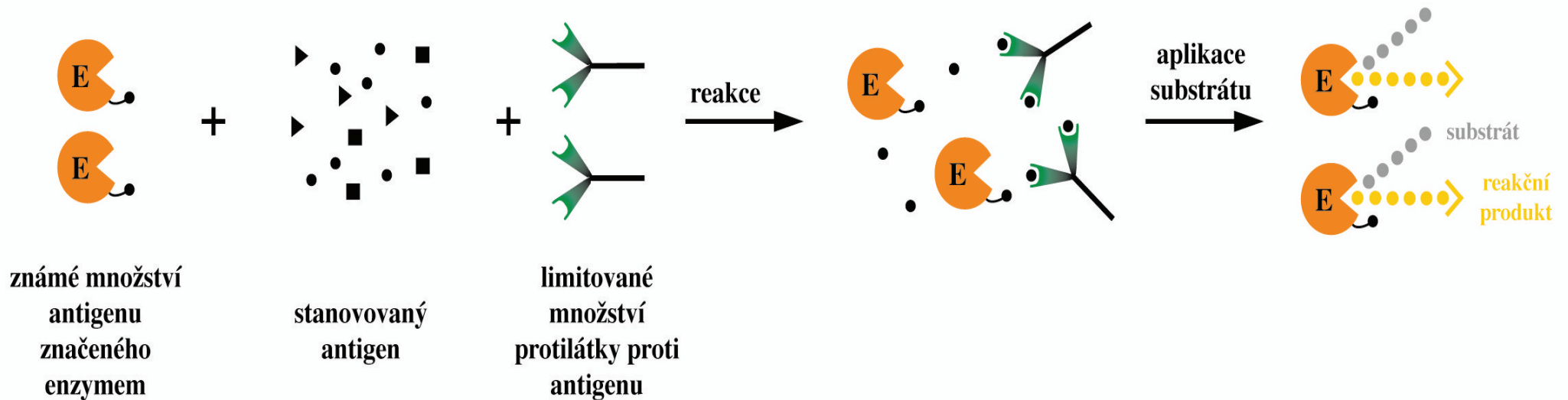
tuhá fáze s navázanou anti-IgM protilátkou

vzorek obsahující IgG i IgM

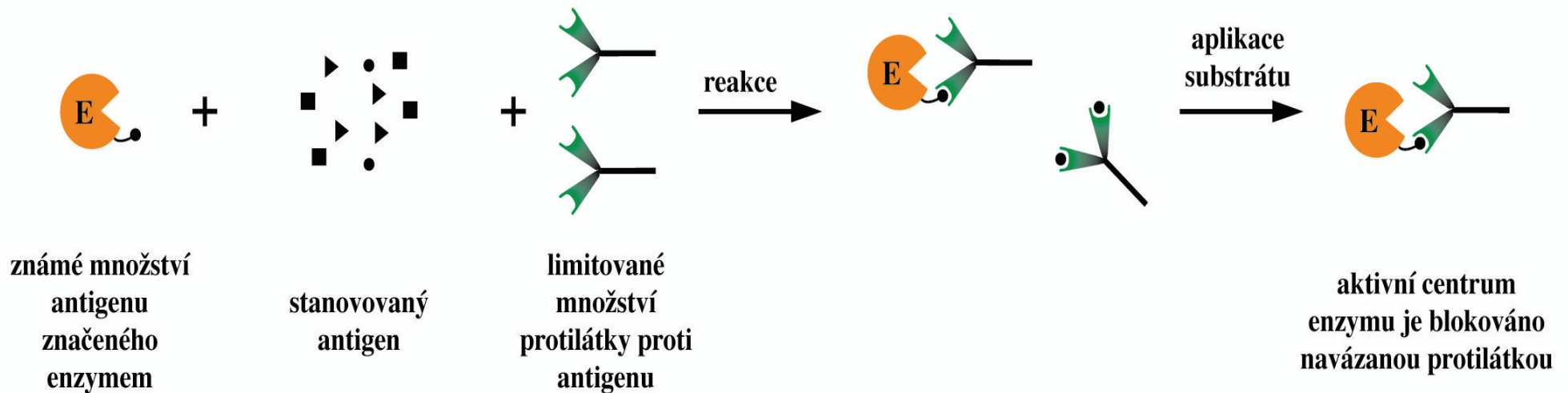
přidání značené protilátky

# Homogenní EIA

## Homogenní EIA s vysokou koncentrací stanovovaného antigenu

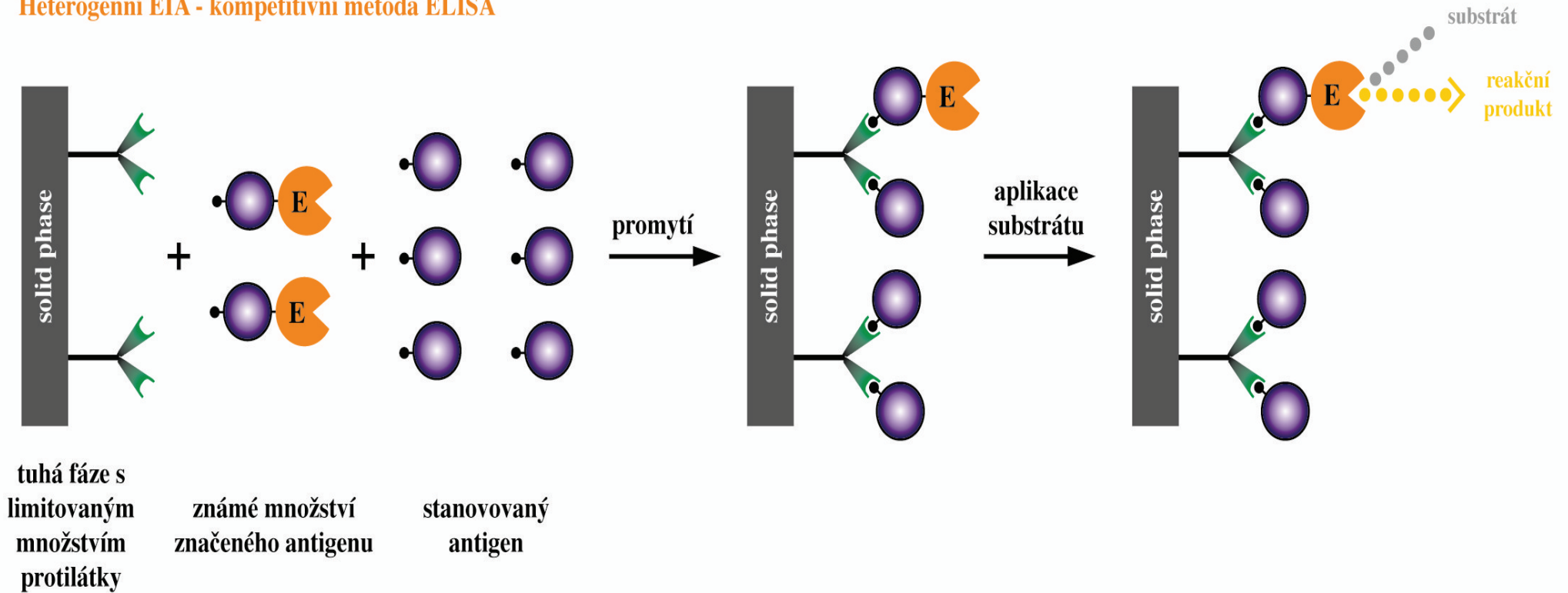


## Homogenní EIA s nízkou koncentrací stanovovaného antigenu



# Heterogenní EIA

## Heterogenní EIA - kompetitivní metoda ELISA



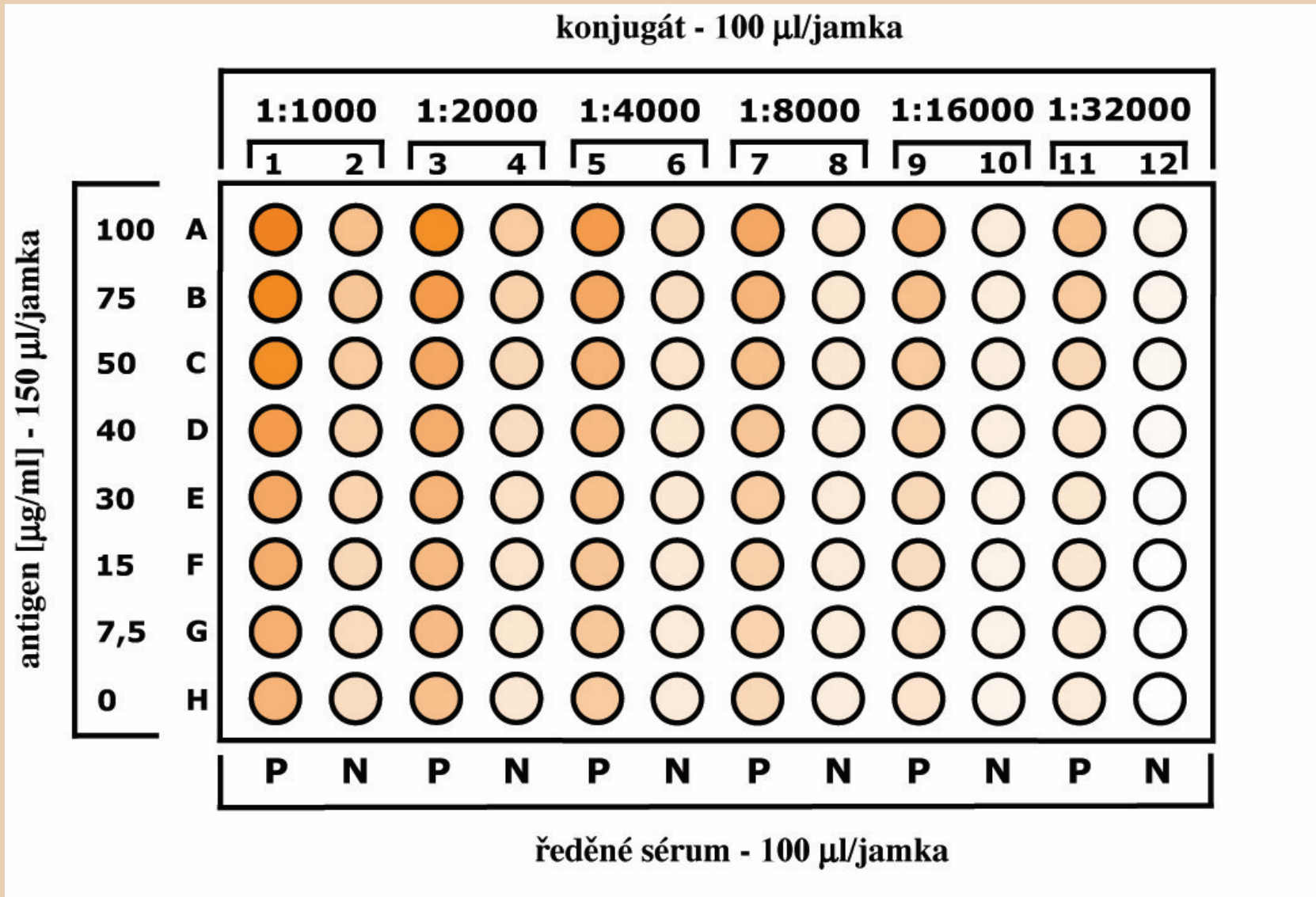
# EIA testy

- Kvalitativní – dublety, triplety vzorků s předem stanoveným stupněm ředění
- Kvantitativní – stanovení titru protilátek (stupeň ředění vyšetřovaného séra)
- Kvantitativní – stanovení množství antigenu (mikro až nano gramy i méně) pomocí kalibrátoru a kalibrační křivky
- Kontroly pozitivní, negativní (matrice), kontroly nespecifické sorpce (blank)

**TYPICKÝ VÝSLEDEK STANOVENÍ  
SPECIFICKÝCH PROTILÁTEK TECHNIKOU ELISA**

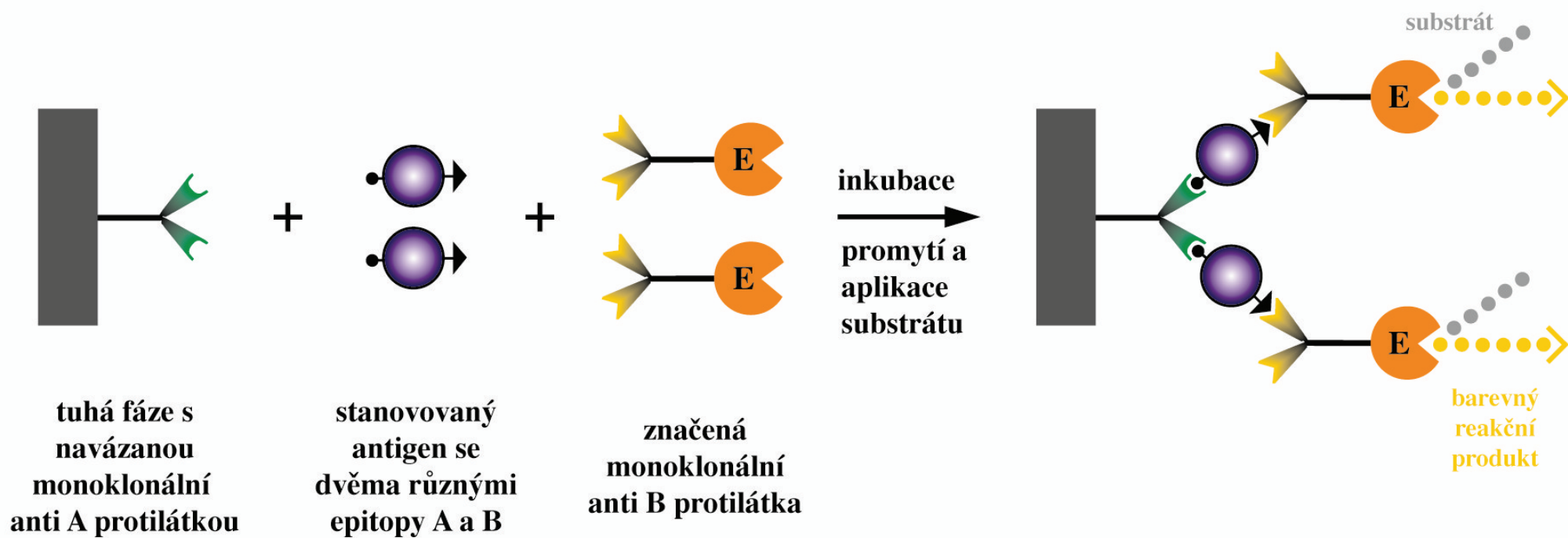


# Optimalizace ELISA – titrace Ag a optimalizace množství konjugátu



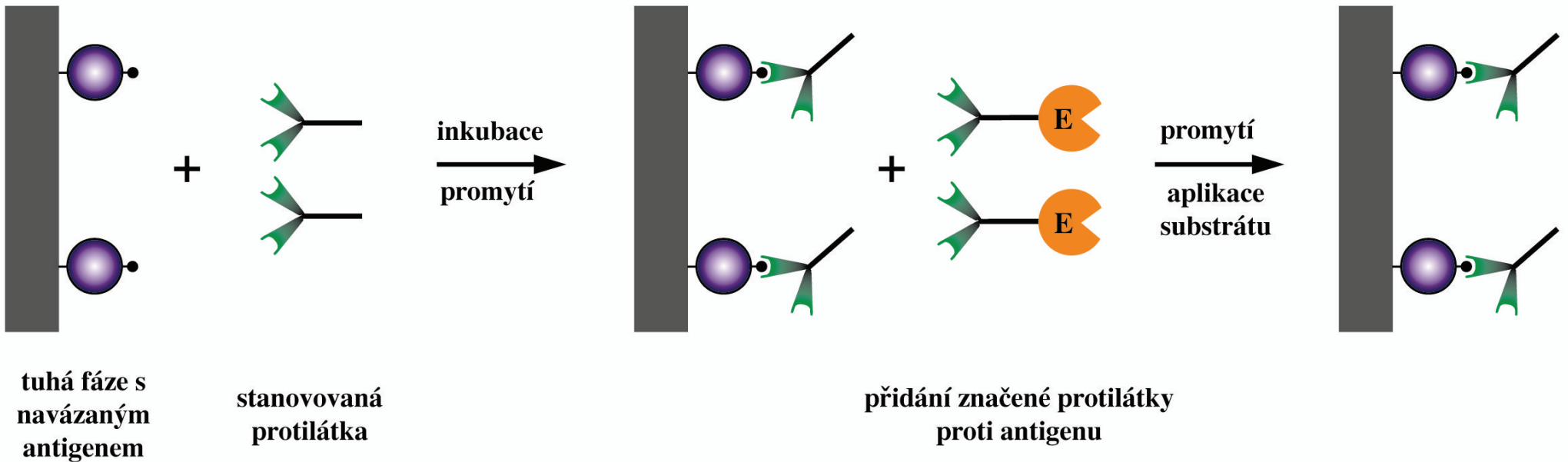
# One step ELISA

## Jednokroková ("One Step") ELISA



# Průkaz specifických protilátek

## "Blocking" detekce protilátek - ELISA



# Průkaz protilátek pomocí jejich dvojvaznosti

## Detekce protilátek pomocí jejich dvojvaznosti

