

IMUNOCHEMICKÉ TESTY

přehled a principy metod

I. část aglutinace

3. ročník Klinická biologie a chemie

ANTIGEN
(imunogenní molekula)

×

PROTILÁTKA

cíl diagnostiky (průkaz Ag)
- průkaz virové částice, bakterie nebo její části, autoantigenů, hormonů, nádorového markeru aj.

×

prostředek diagnostiky (reagencie, činidlo)
- získá se imunizací zvířete cílovým Ag

prostředek diagnostiky (reagencie, činidlo)
- virová částice, bakterie nebo její část, alergen, autoantigen aj.

×

cíl diagnostiky (průkaz Ab)
- stanovení specifické Ab odpovědi proti virům, bakteriím nebo jejich částem, alergenům, autoantigenům (autoprotilátka) aj.

IMUNOCHEMICKÉ METODY

využívají řadu biochemických a biofyzikálních metod jak tvořící se imunokomplexy vizualizovat

volba metody závisí na:

- charakteru antigenu (velikost, počet a struktura Ag determinant
- na charakteru odpovídající protilátky (avidita, specifita)
- na koncentraci antigenu

ANTIGENY



BAKTERIE *(nebo její část)*



BUŇKA *(nebo její část)*



VIRUS *(nebo jeho část)*



PROTILÁTKA *(nebo její část)*



NUKLEOVÉ KYS., TOXINY *apod.*

H

PROTILÁTKY

IgG



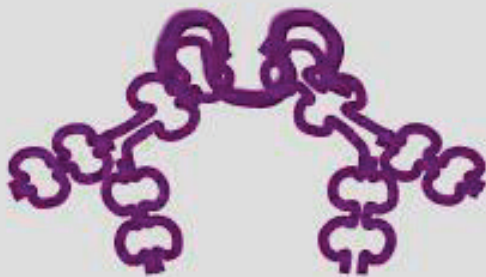
IgD



IgE

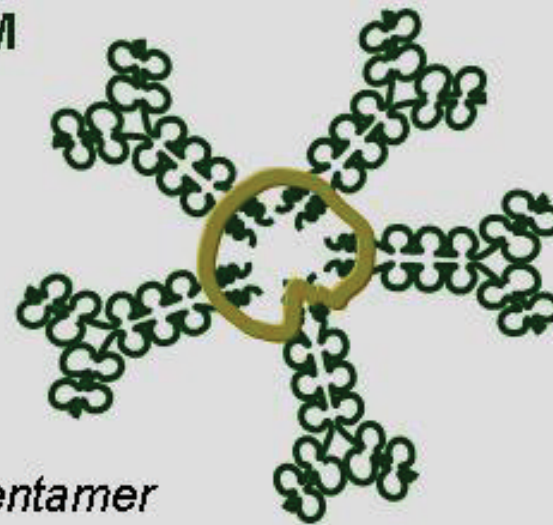


IgA



dimer

IgM



pentamer

JK

Třídy imunoglobulinů vhodných pro aglutinační testy

- **IgM**: výborný aglutinin

pentamer – 10 vazebných míst pro antigen

molekulová hmotnost 900 kDa

první izotyp protilátek, které se tvoří po setkání s antigenem

- **IgG**: monomer – 2 vazebná místa pro antigen

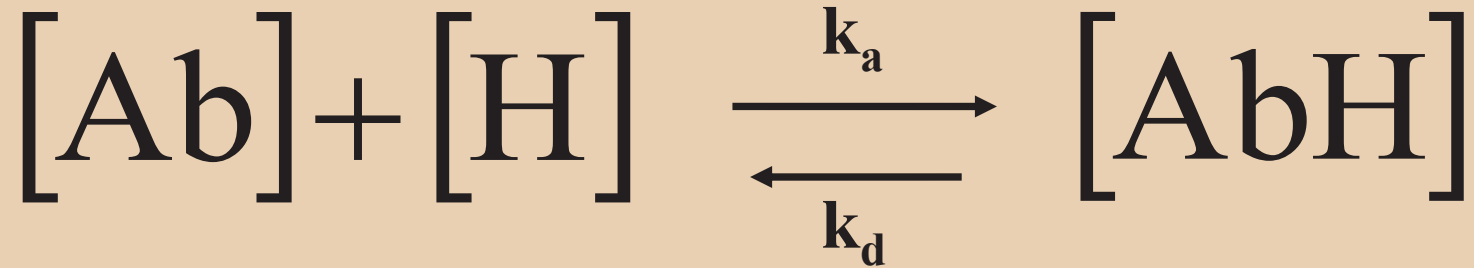
molekulová hmotnost 150 kDa

4 podtřídy IgG – IgG1-4

nejběžnější sérový imunoglobulin

Povaha interakcí Ag-Ab

- komplex antigen-protilátka (**imunokomplex**): nekovalentní vazby, více násobné (síla vazby)
- vazebné místo protilátky je **komplementární** ke struktuře antigenu
- reverzibilní komplex Ag-Ab – poměr **rychlostních konstant** vzniku a rozpadu definuje **asociační konstanta K_{as}** (10^6 - 10^{12} mol/l)
- **afinita protilátky** – síla vazby jednoho vazebného místa Ab s jednou antigenní determinantou Ag
- **avidita protilátky** – síla interakce polyvalentní Ab s polyvalentním Ag
vzrůstá se vzrůstající afinitou



Hranaté závorky: rovnovážné molární koncentrace
 k_a asociační konstanta
 k_d disociační konstanta

Guldbergův-Waagův zákon:

rychlost tvorby komplexu je úměrná koncentraci obou reagujících složek

rychlost asociace: $k_a [Ab][H]$

rychlost disociace: $k_d [AbH]$

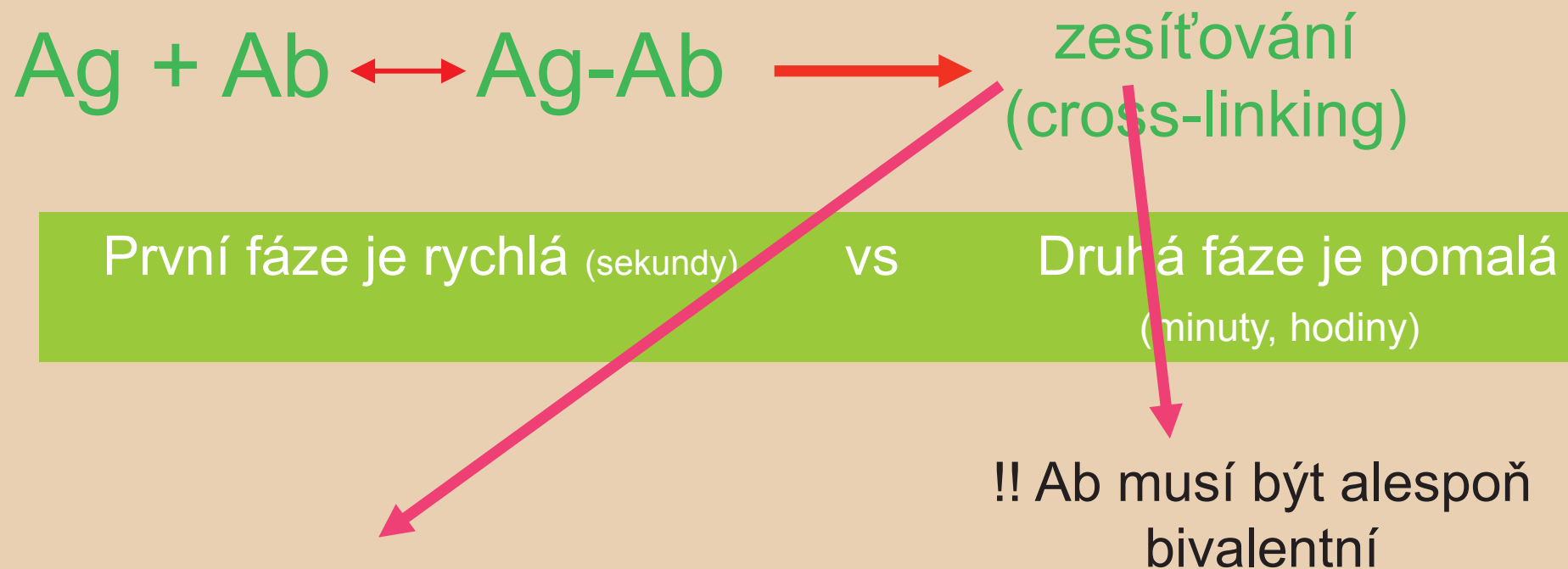
Při rovnováze se rychlost asociace = rychlosti disociace



$$\frac{k_a}{k_d} = K = \frac{[AbH]}{[Ab][H]}$$

Kde K je rovnovážná **asociační konstanta** charakterizuje efektivnost vazby a její hodnoty při reakci antigenů a protilátky se pohybují v rozsahu 10^5 až 10^{11} mol/l.

Reakce antigenu s protilátkou

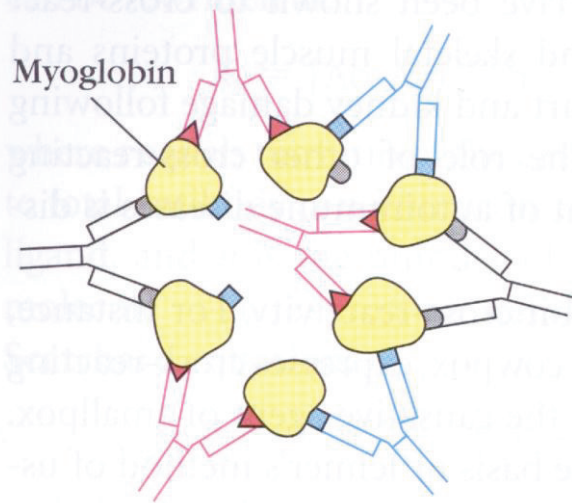


Podle povahy antigenu:

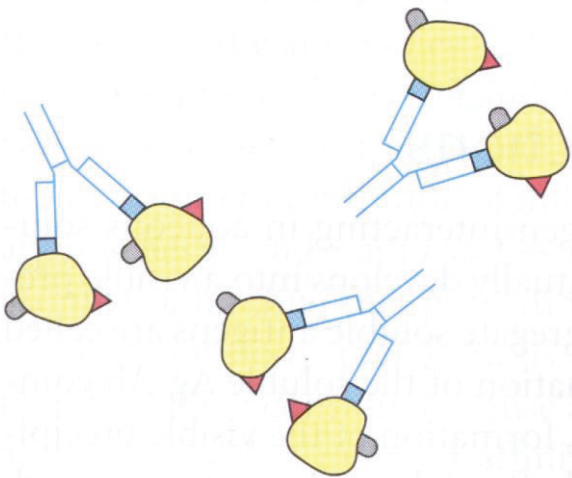
- **Precipitace = antigen je solubilní**
- **Aglutinace = antigen je korpuskulární (erytrocyt)**

(a)

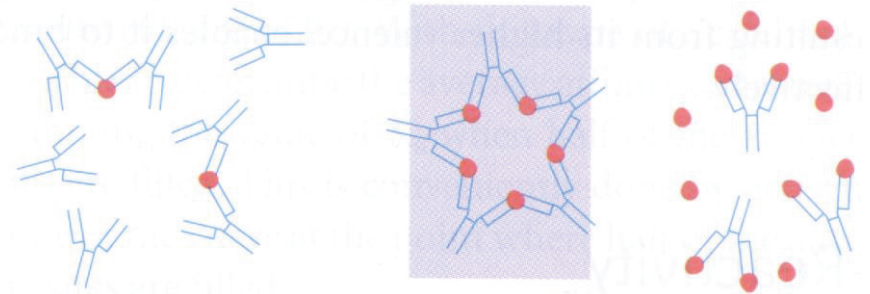
POLYCLONAL ANTISERUM



MONOCLONAL ANTIBODY

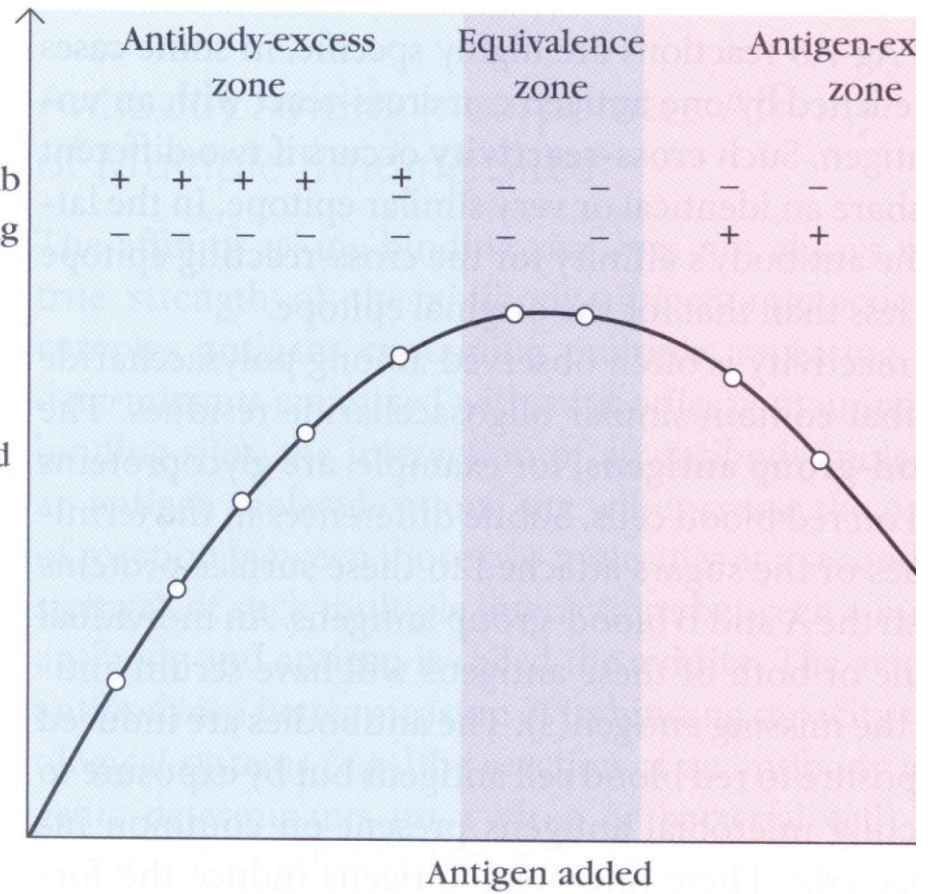


(b)



Supernatants { excess Ab
excess Ag

Antibody precipitated



AGLUTINACE

Protilátka reaguje s antigenními determinantami, které se nacházejí na povrchu částice (erytrocyty, bakterie nebo jiné buňky) tj. **NEROZPUSTNÝ KORPUSKULÁRNÍ ANTIGEN**

Výsledek: shlukování těchto částic **AGLUTINACE**

nerozpustný antigen
protilátky
komplex částic

aglutinogen
aglutininy
aglutinát

AGLUTINOGEN JE INTEGRÁLNÍ SOUČÁSTÍ POVRCHU ČÁSTICE = AKTIVNÍ (PŘÍMÁ) AGLUTINACE

AGLUTINACE

Při aglutinaci se neuplatňují nespecifické interakce fragmentů Fc na rozdíl od imunoprecipitace.

Také aglutinaci může inhibovat nadbytek protilátky nebo nadbytek korpuskulárního antigenu (viz aglutinační a precipitační křivka)

Částice s malým počtem antigenních determinant aglutinují hůře.

Podle počtu vazebných míst protilátky IgM jsou při aglutinaci účinnější než IgG.

Aglutinační testy

1) Přímá aglutinace

(Ag je primárně korpuskulární povahy)

2) Nepřímá aglutinace (nosič Ag. determinant je korpuskulární povahy)

3) Zpětná aglutinace (typizace bakterií)

4) RPLA - latexové částice jsou nosičem protilátek

Ery - korpuskulární charakter

4) Hemaglutinace (Ery – Ag)

5) Nepřímá hemaglutinace (Ery nosič Ag. Det.)

PŘÍMÁ AGLUTINACE

- korpuskulární charakter antigenu
- reakce Ag s Ab se projeví jako viditelný aglutinát

- důležitá je příprava antigenu: kultivace mikroba, promytí suspenze, nastavení optim. hustoty, inaktivace (teplota, fenol ...)

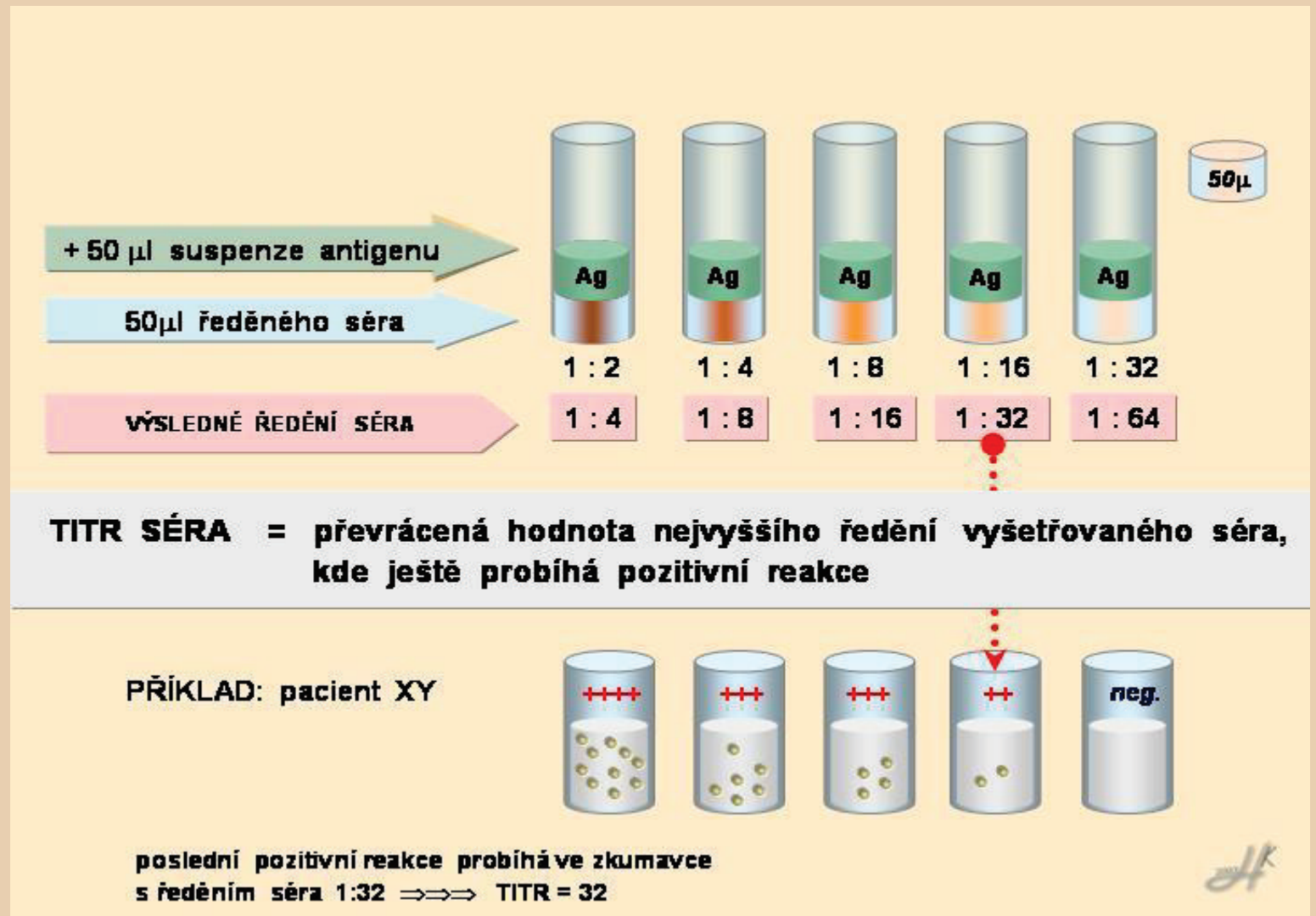
- Použití testu:
 - K průkazu protilátek
 - K identifikaci mikroba pomocí antiséra se specifickými Ab

- Provedení:
 - jamky mikrotitrační destičky (**kvalitativní i kvantitativní, miniaturizace**)
 - zkumavky (kvalitativní i kvantitativní)
 - na sklíčku - pouze **kvalitativní +/-** (screening)

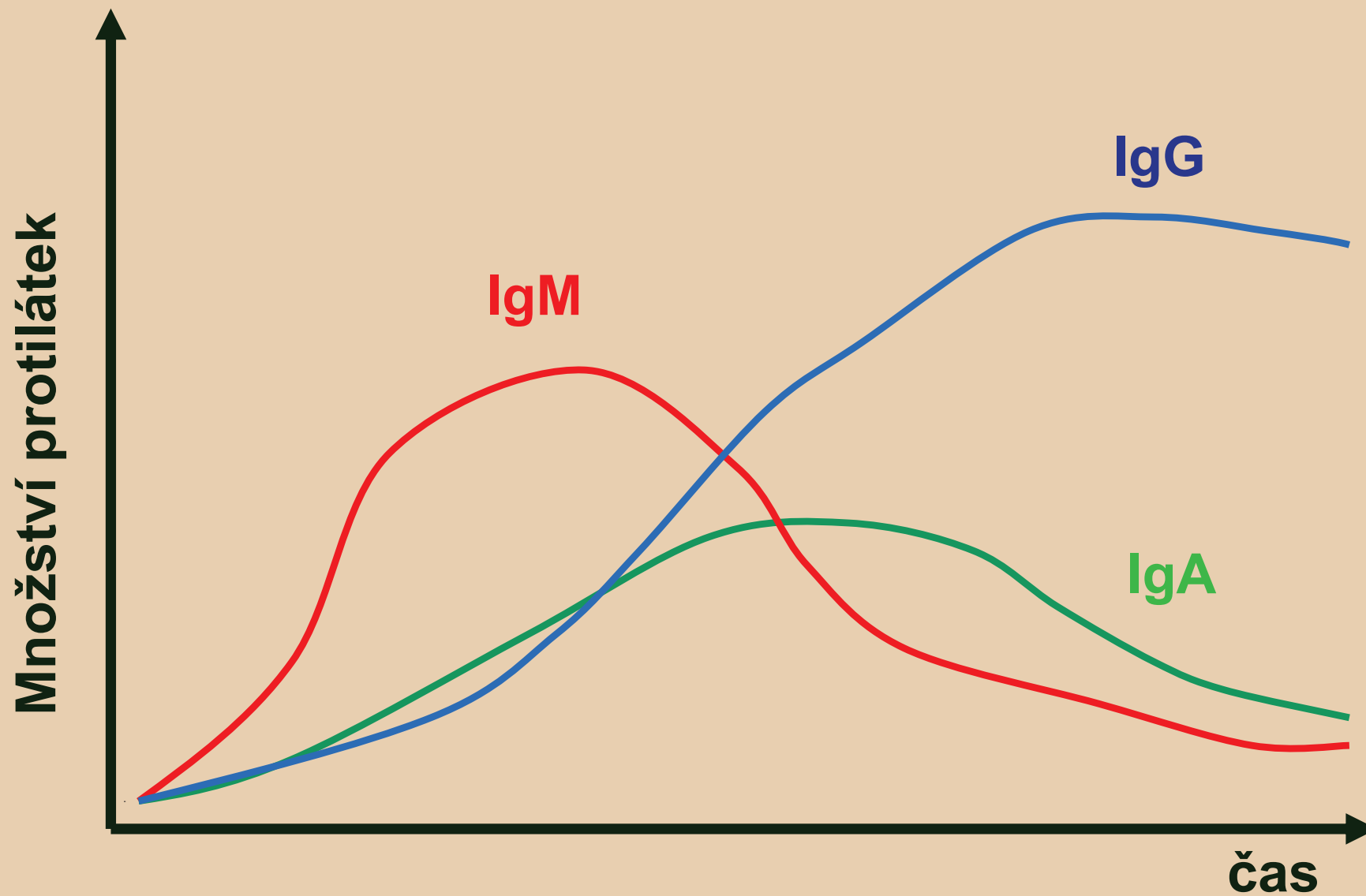
Kvantitativní stanovení - ředění séra geometrickou řadou

titr = převrácená hodnota nejvyššího ředění séra, které ještě dává pozitivní reakci (ředění 1:160 = titr 160)

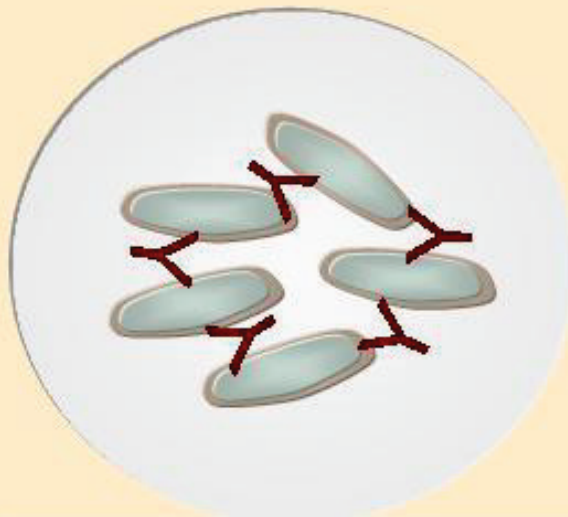
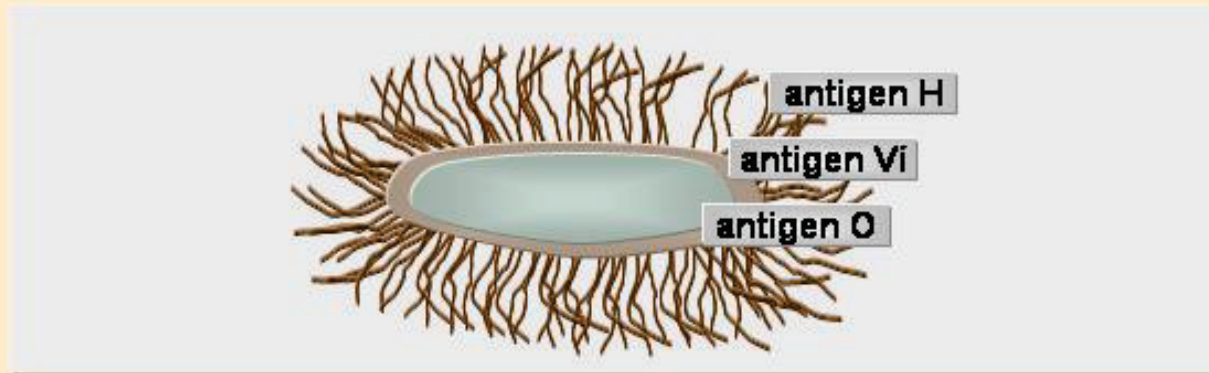
- sledování dynamiky titrů !



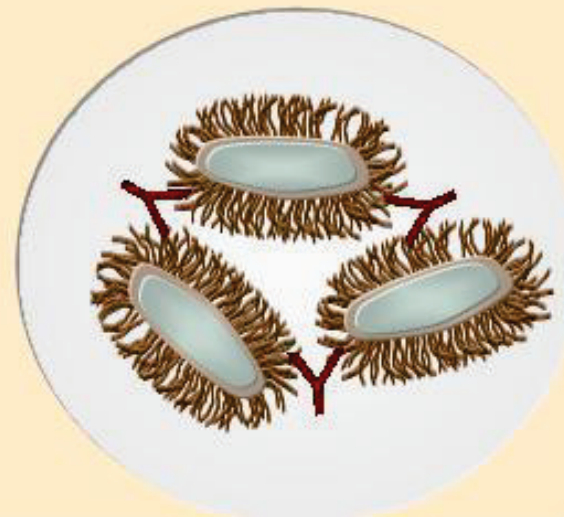
DYNAMIKA PROTILÁTKOVÉ ODPOVĚDI



Přímá AGLUTINACE



somatická aglutinace



flagelární aglutinace

H

AGLUTINACE - Widalova reakce

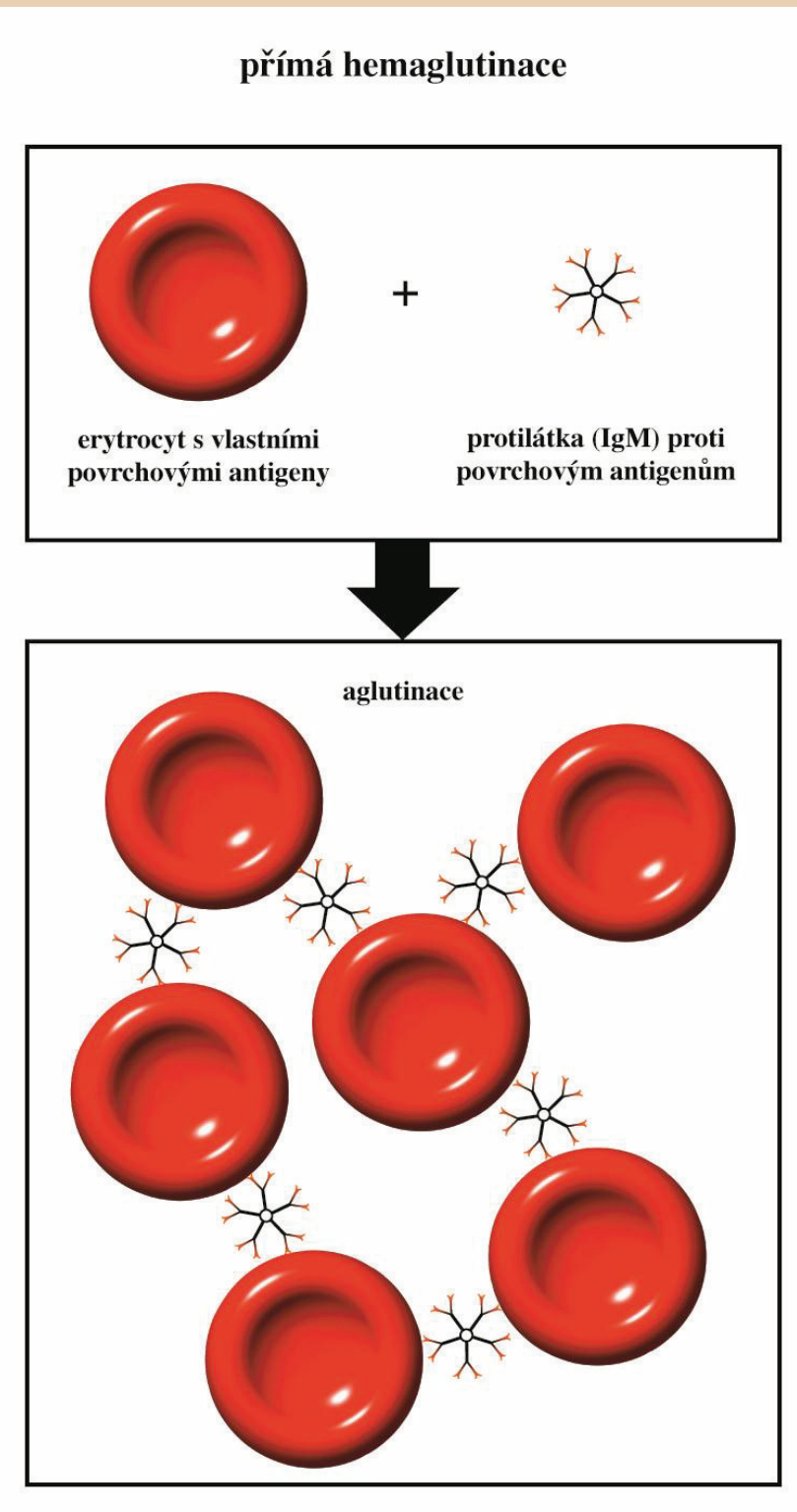
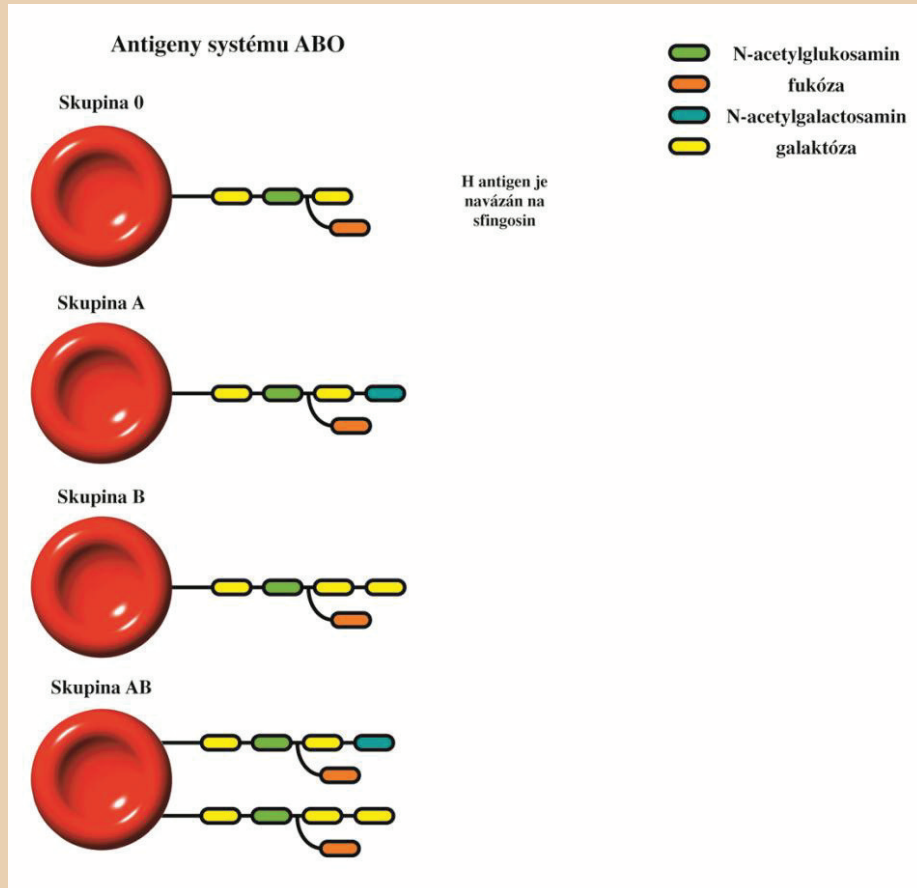
- **Salmonelózy** (*Salmonella sp.*) -
 - sérotypy
 - antigeny O – somatické
 - antigeny H – bičíkové
- **Vzhled aglutinátu**
 - kompaktní, zrnitý - **Ab proti O** (*somatickým*) **Ag**
 - chomáčkovitý (*roztřepatelný*) – **Ab proti H** (*bičíkovým*) **Ag**
 - antigen Vi (*povrchový, polysacharidový*
– *stnovuje se jinou metodou - hemaglutinací*)
- provedení ve zkumavkách
- hodnocení: **titr > 80, dynamika**

AGLUTINACE

příklady použití aglutinace v klinické praxi

- **Listerióza** (*L. monocytogenes*)
(sérotyp O-I, II nebo O-V)
hodnocení: **titr > 160**, dynamika (párové vzorky)
- **Tularémie** (*Francisella tularensis*)
hodnocení **titr > 20**, dynamika (párové vzorky)
- **Pertuse, parapertuse** (*Bordetella pertussis, parapertussis*)
hodnocení: **očkování !**
(směrodatný je min. 4-násobný vzestup nebo pokles titrů)

Stanovení krevně skupinového systému




Kompletní test stanovení krevní skupiny (testujeme Ery i sérum)


testované erythrocyty	A	B	AB	0
sérum A				
B				
AB				
0				

Serafol® ABO+D

Ch. - B./Lot No. 080601 Expiry date 31.12.01



Anti-A



Anti-B



Anti-D

Blut (Blood/Sang)


Name (Name/Nom) _____

Geb. Dat. (Date of Birth/ Date de Naissance) _____ Kors. - Nr. (Unit No./ No.Poche) _____

Datum (Date) 1/1 Blutgruppe (Blood Group/ Groupe Sanguin) A POS

Unterschrift (Signature) _____

Produced by **SIFIN** SIFIN GmbH D-13088 Berlin

Distributed by **Biotest AG** D-63303 Dreieich 

Orientační test stanovení krevní skupiny

PASIVNÍ (NEPŘÍMÁ) AGLUTINACE

inertní částice: buňky, erytrocyty, latexové částice

uměle navázané Ag, Ag. determinanty, Hapteny

Prokazujeme specifické protilátky

Podstatou je propojování polyvalentní antigenové částice molekulami protilátek, které musí být alespoň dvojevalentní.

Jednovalentní fragmenty protilátek Fab imunoaglutinaci **nevyvolávají**, ale mohou ji inhibovat,

Fragment F (ab)₂ je při aglutinaci stejně účinný jako celá IgG

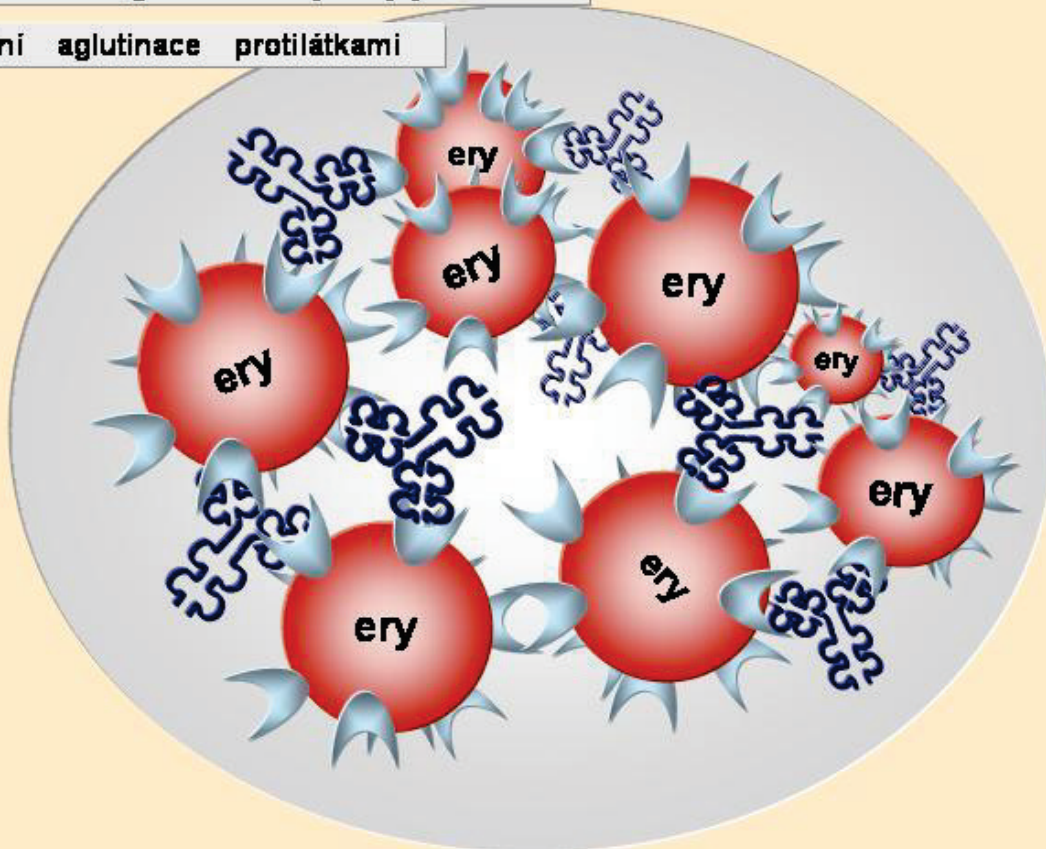
NEPŘÍMÁ **HEMAGLUTINACE**

- bakteriální Ag je navázán na zvířecích erythrocytech (*nosič*)
- polysacharidové Ag se váží přímo
- proteinové Ag se váží po opracování (*tanin, CrCl₃*)
- kvantitativní test (*titr*)
- **příklady použití v klinické praxi**
 - *Yersinia enterocolitica* (*O₃*),
 - *Yersinia pseudotuberculosis*
 - **syfilis** (*Treponema pallidum*, *TPHA*)
 - *Salmonella typhi* (*Vi Ag*)

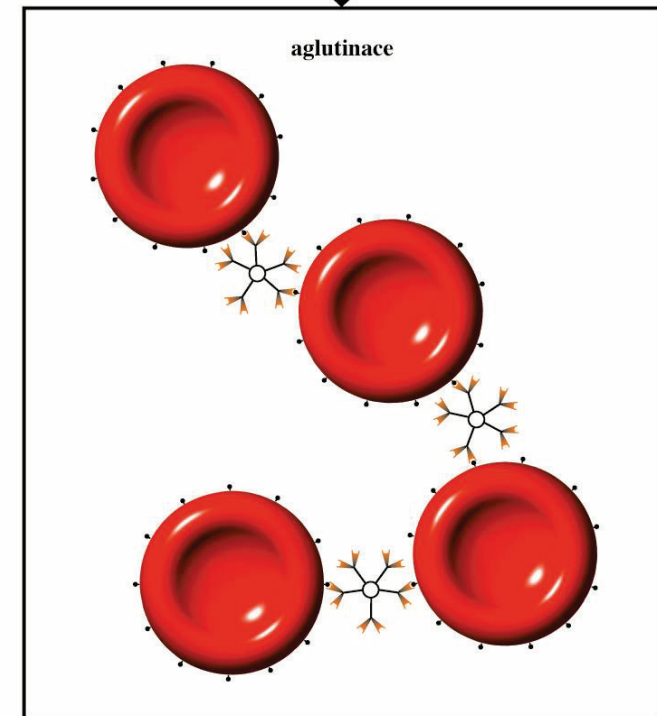
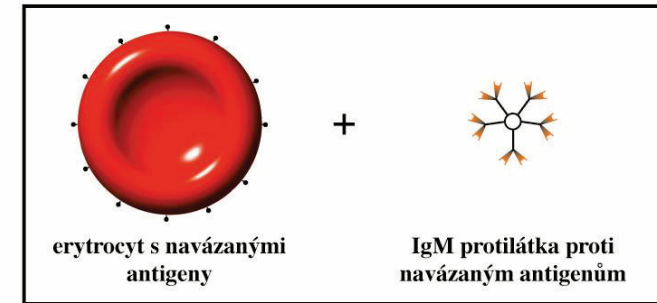
NEPŘÍMÁ HEMAGLUTINACE

1. navázání antigenů na erythrocyty

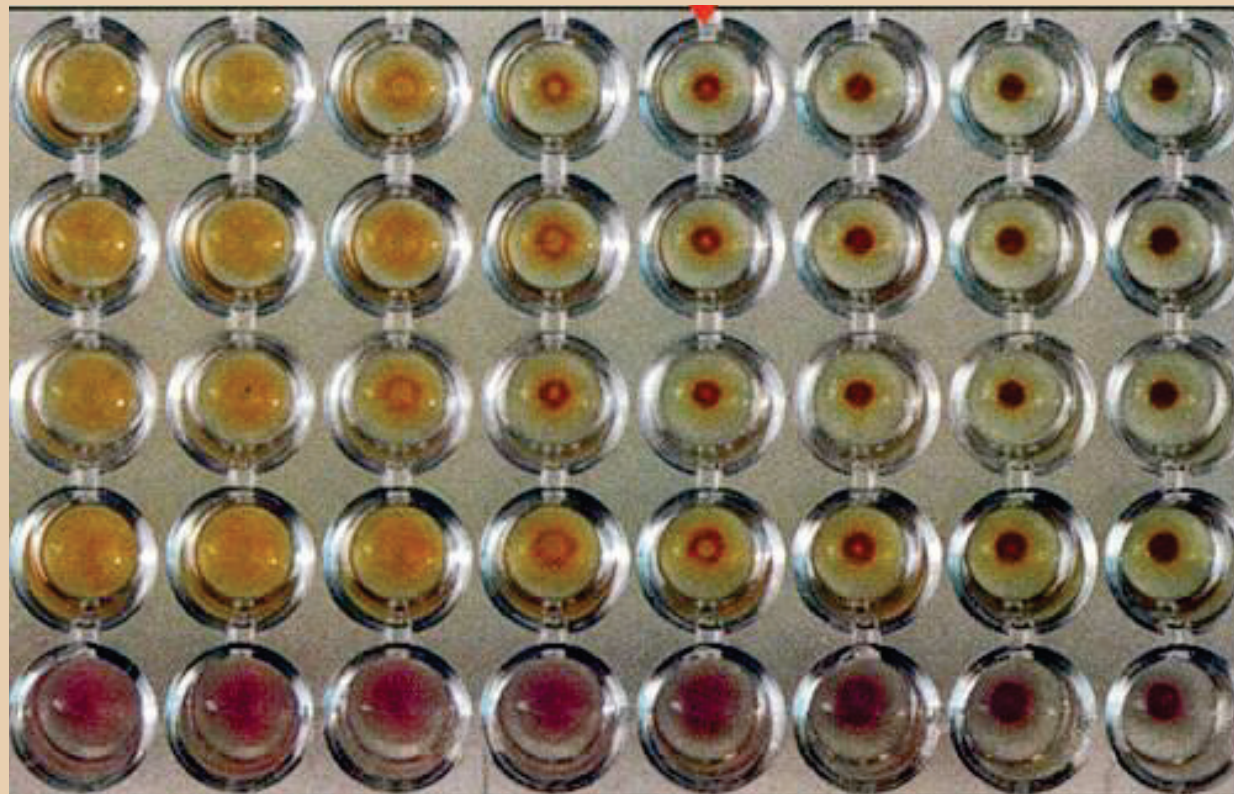
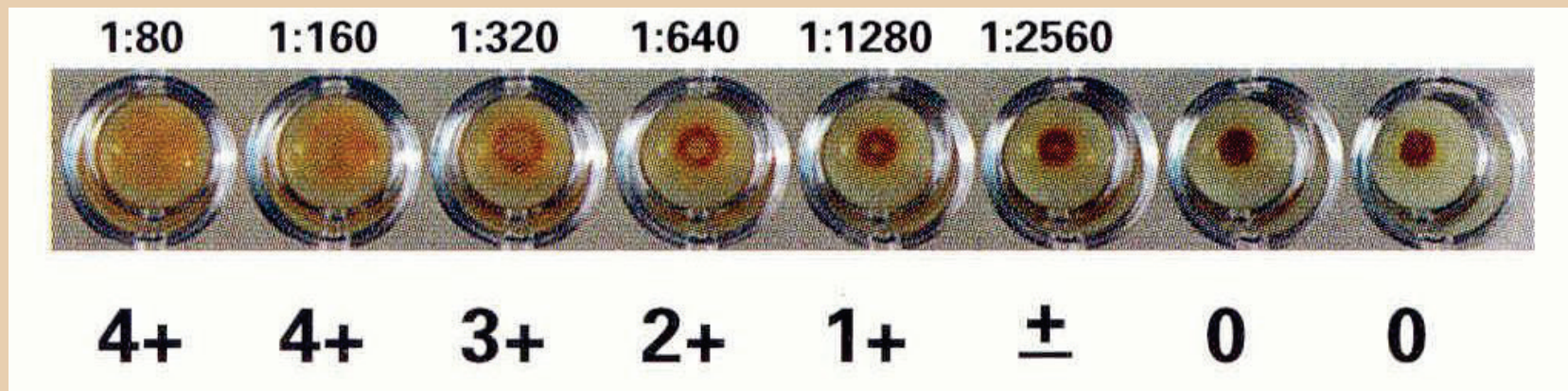
2. vlastní aglutinace protilátkami



nepřímá hemaglutinace



PŘÍKLAD VÝSLEDKU HEMAGLUTINAČNÍ TECHNIKY



SÉROLOGICKÝ PRŮKAZ SYFILIS

1. vyhledávací (*screeningové*) **testy**
krevní dárce, dárce orgánů, těhotné,
podezření na syfilis

1.1. Rychlá reaginová reakce (*RRR, RPR, VDRL*)

- **netreponemový test**
- **reaginy** (*Ab proti Ag lipidového charakteru - kardiolipin*)
- **nepřímá aglutinace – nosič Ag uhlíkové částice**
- **provedení na sklíčku, papírové kartičce, v destičce**
- **hodnocení kvalitativní, titry**
- **reakce 2-3 týdny od počátku infekce, titry reagují na léčbu**

SÉROLOGICKÝ PRŮKAZ SYFILIS

1.2. TPHA

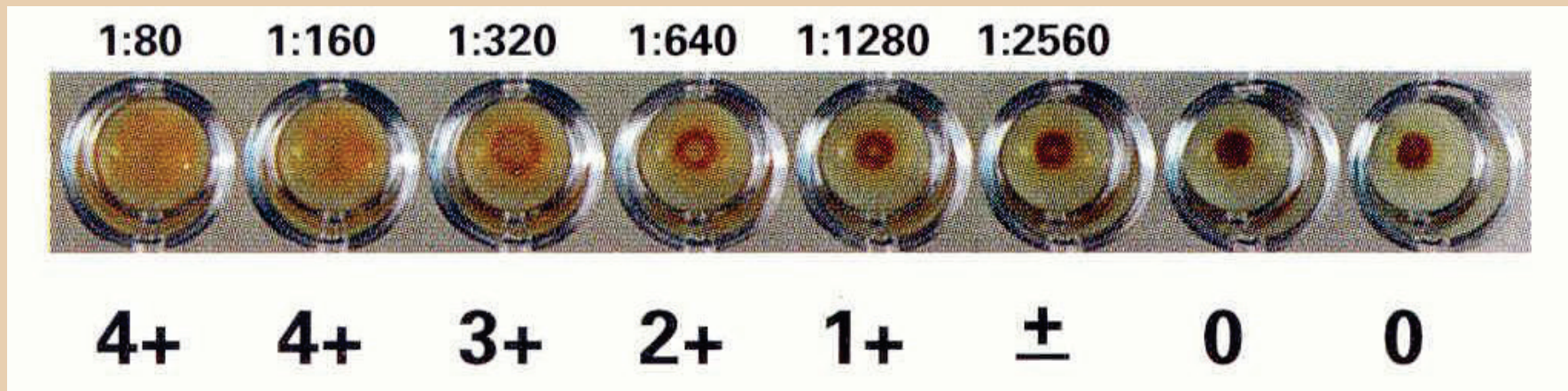
- treponemový test

- nepřímá hemaglutinace s antigenem

T. pallidum navázaným na zvířecí erythrocyty

- kvalitativní test (základní ředění 1:80)

- zůstává pozitivní celý život



Zpětná aglutinace pro určení sérotypů bakterií

ZPĚTNÁ AGLUTINACE (<i>typizace Salmonel</i>)				
skupina	sérotyp	O-antigen	H-antigen	
			1. fáze (<i>spec.</i>)	2. fáze (<i>nespec.</i>)
A	<i>S. paratyphi A</i>	1, 2, 12	a	-
B	<i>S. paratyphi B</i>	1, 4, 5, 12	b	1, 2
	<i>S. typhimurium</i>	1, 4, 5, 12	i	1, 2
C	<i>S. paratyphi C</i>	6, 7-Ví	c	1,5
	<i>S. choleraesuis</i>	6, 7	c	1, 5
	<i>S. newport</i>	6, 8	e, h	1, 2
D	<i>S. typhi</i>	9, 12-Ví	d	-
	<i>S. enteritidis</i>	1, 9, 12	g, m	-
	<i>S. panama</i>	1, 9, 12	l, v	1,5
E	<i>S. anatum</i>	3, 10	e, h	1, 6
	<i>S. london</i>	3, 10	l, v	1, 6

K typizaci se používají polyspecifická a monospecifická antiséra, polykl. protilátky

RPLA – reverse passive latex agglutination

Princip testu

Uspořádání

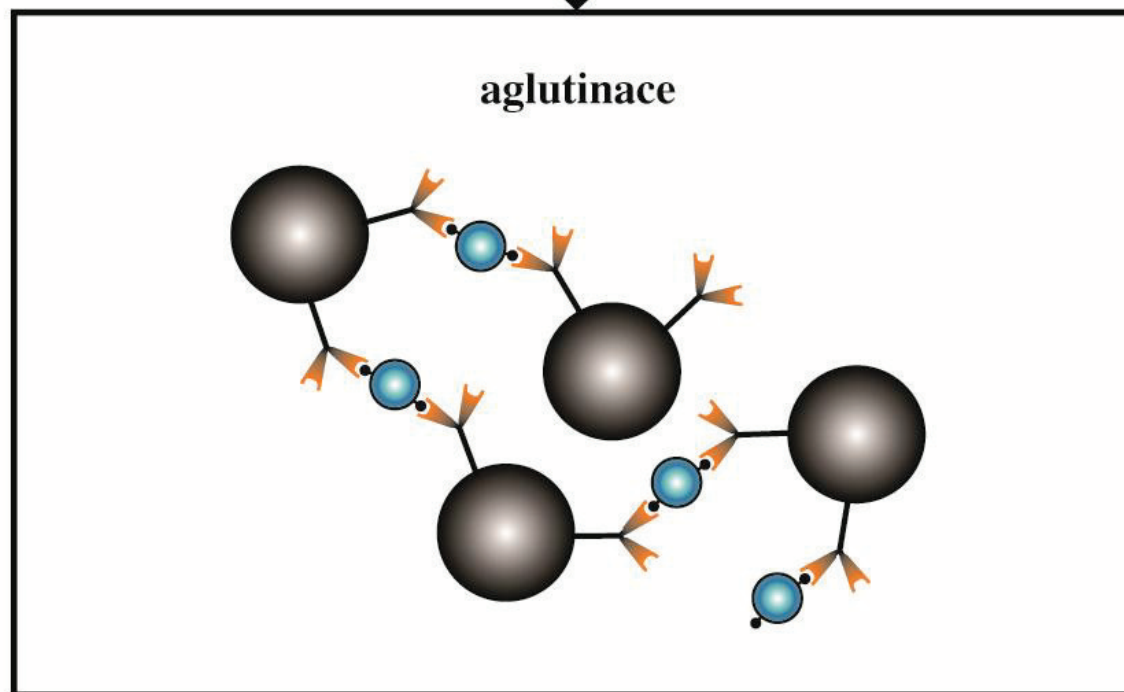
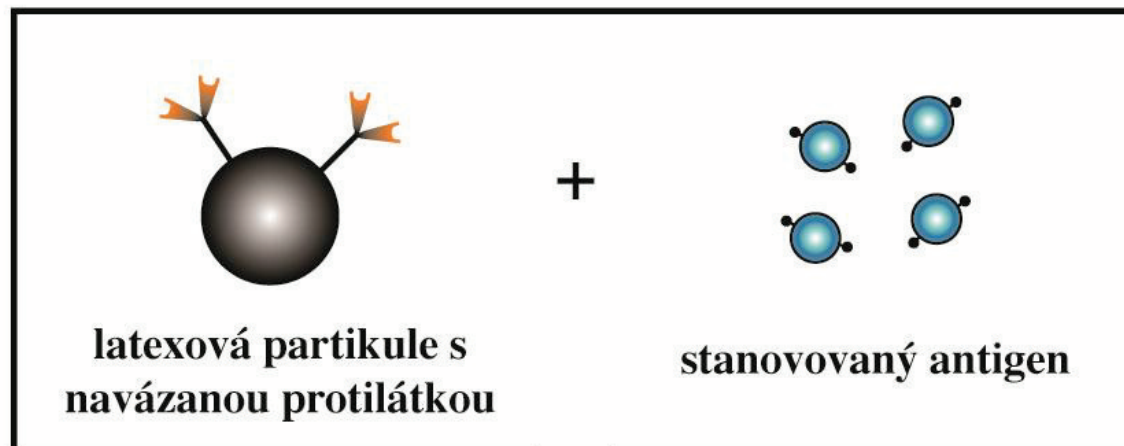
Co se prokazuje

Uplatnění testu

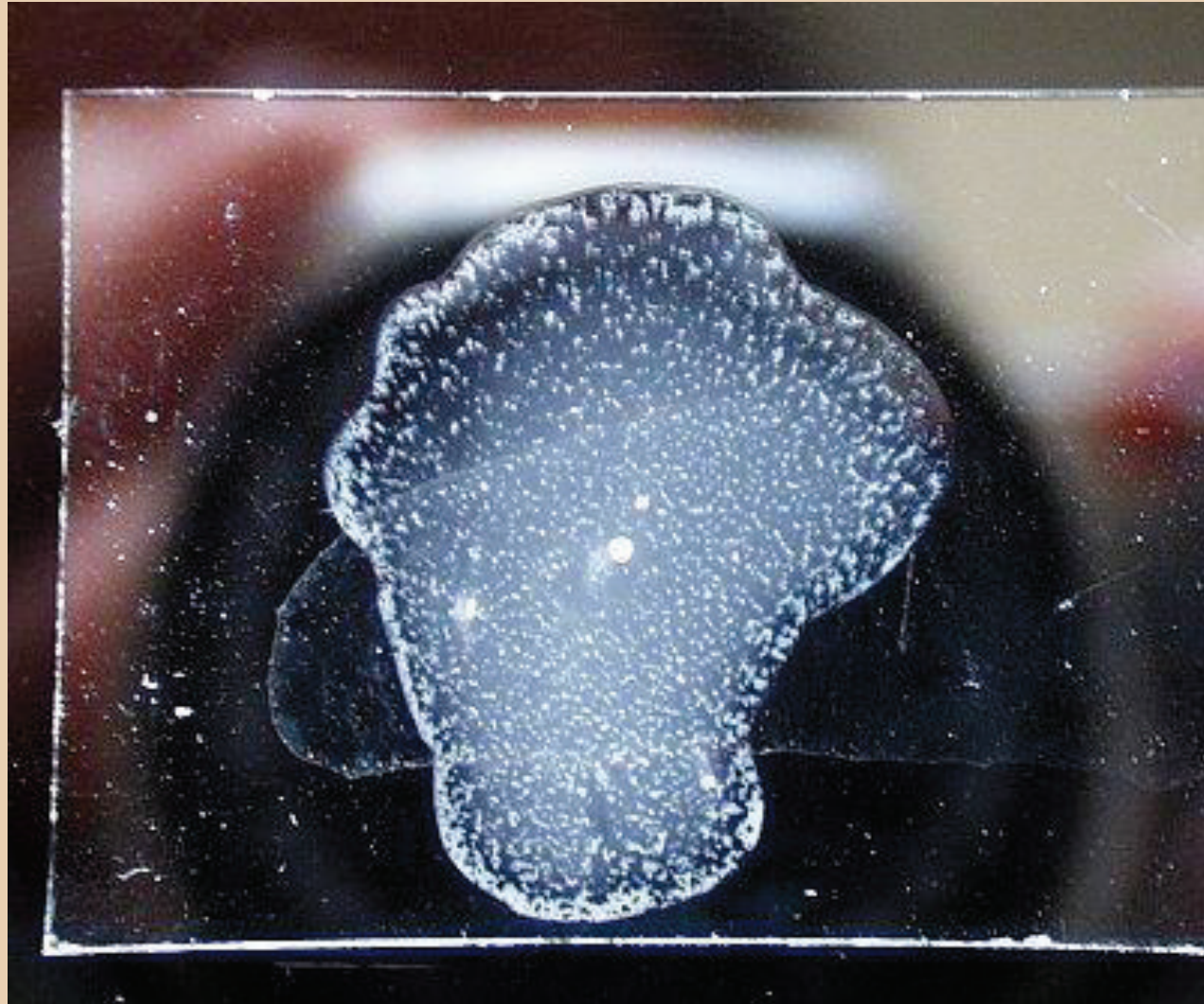
DOPLŇTE

Výhody testu – lze aglutinačním testem prokazovat i solubilní antigeny

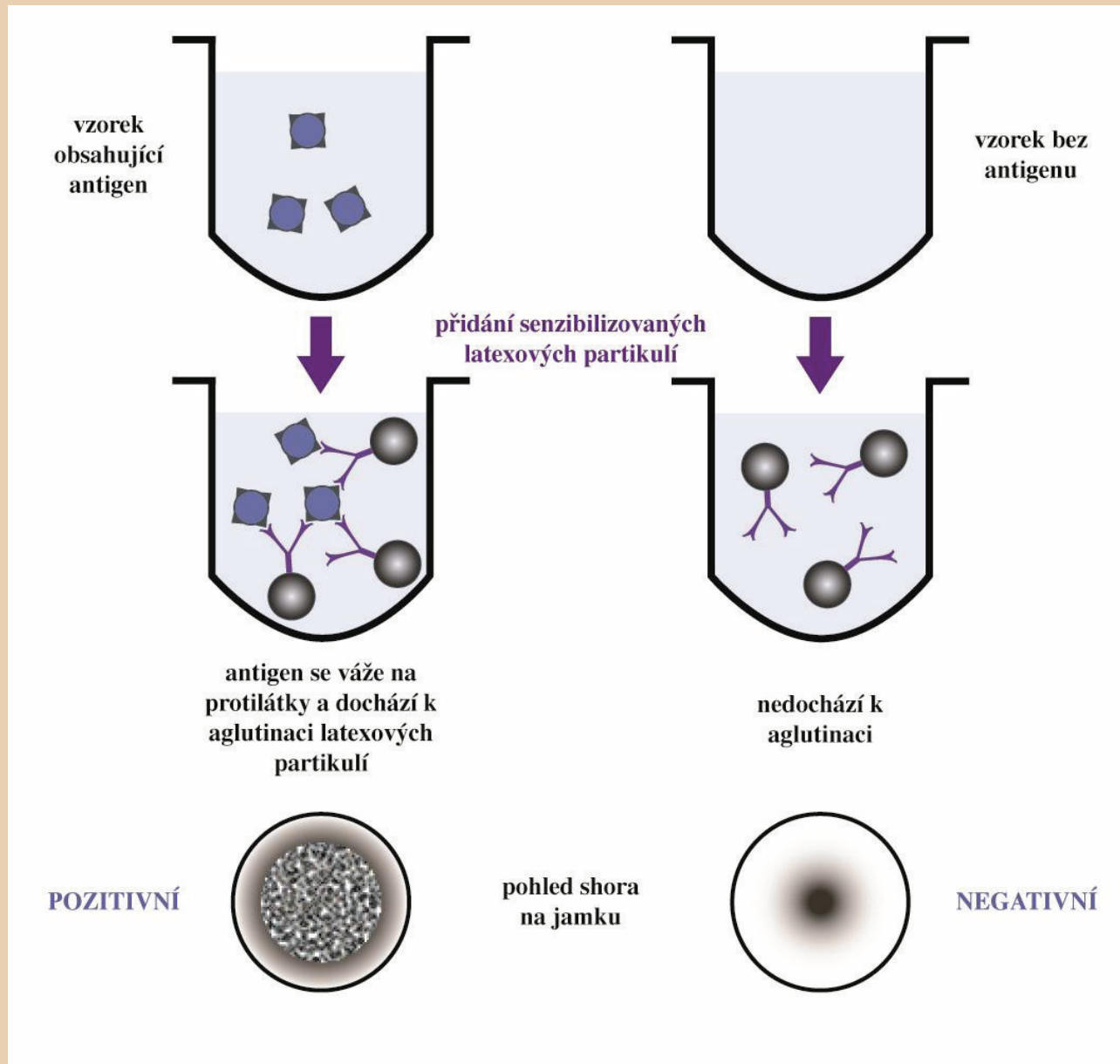
latexová aglutinace



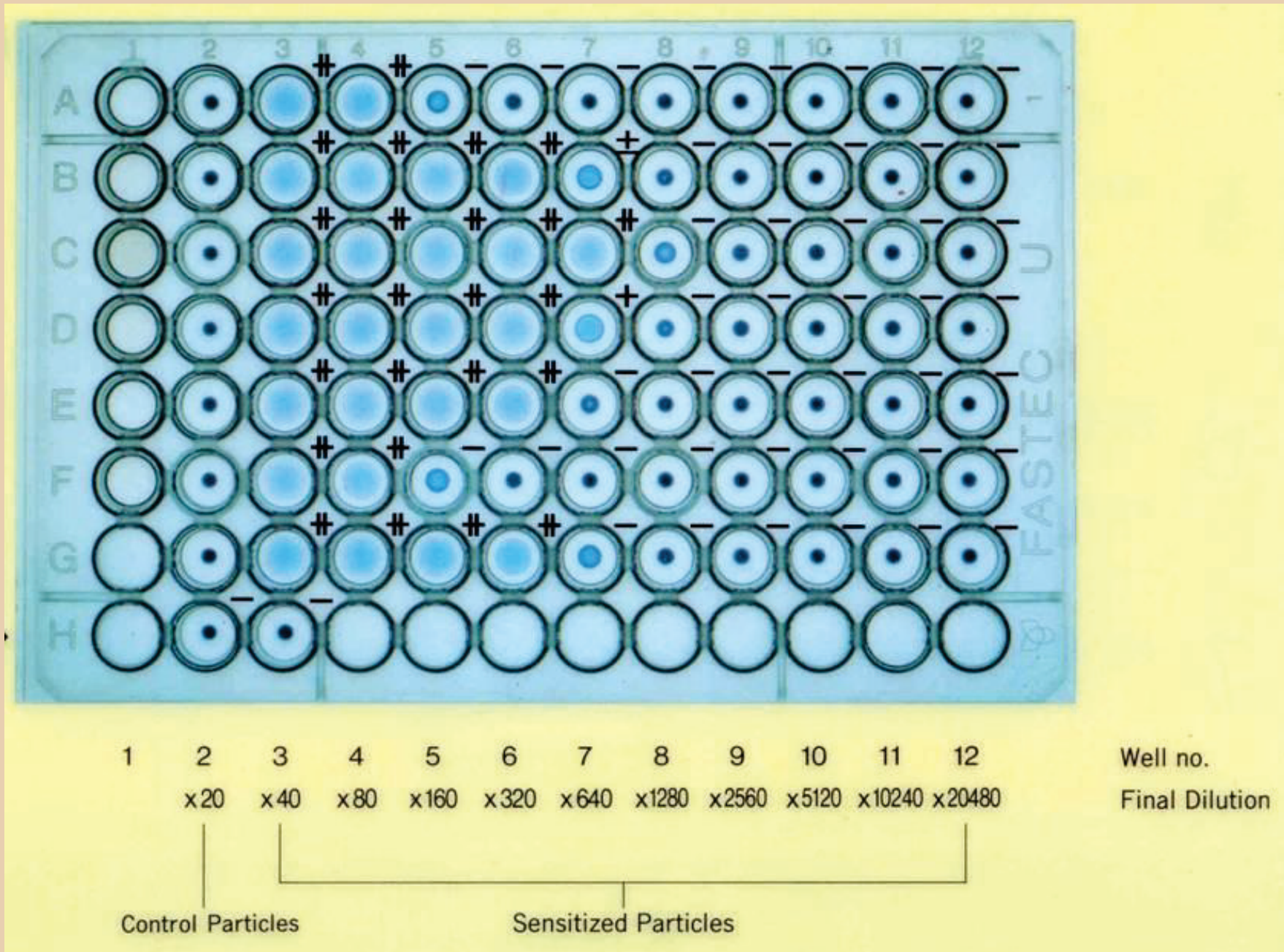
Pozitivní Latex fixační test sklíčkové uspořádání



Provedení testu v jamkách mikrotitrační destičky



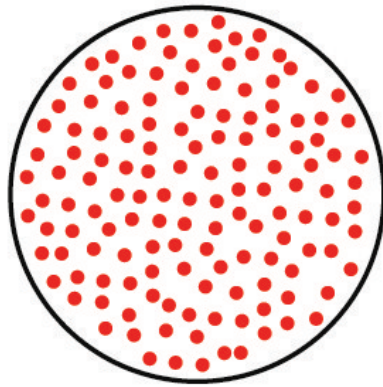
PŘÍKLAD VZHLEDU Latex. AGLUTINACE V DESTIČCE



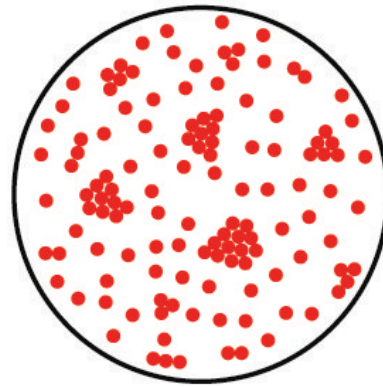
Průkaz Rh faktoru

Odečítání skupinové příslušnosti Rh (D)

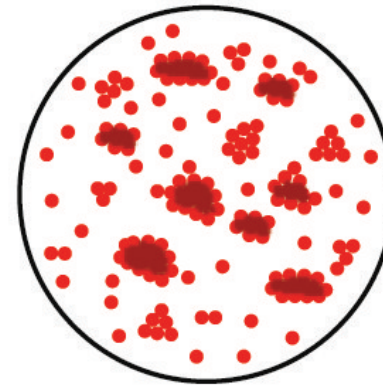
Mikroskopické vyšetření



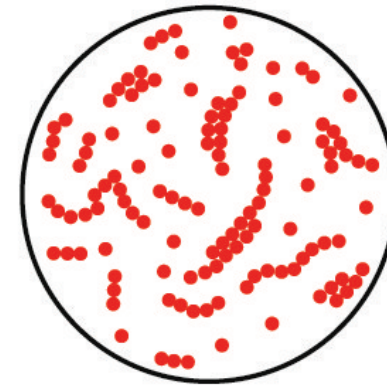
-



+

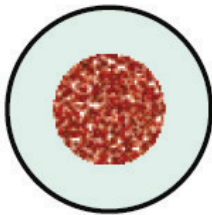


+++

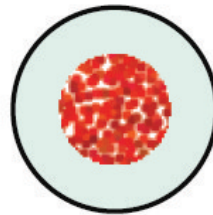


Pseudoaglutinace

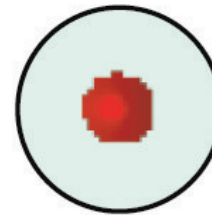
Makroskopické vyšetření - metoda stékající kapky



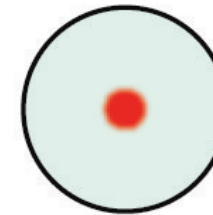
+++



++

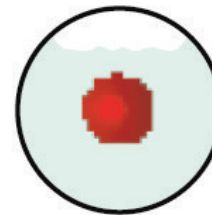
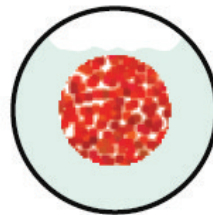


+



-

kolmý pohled na dno



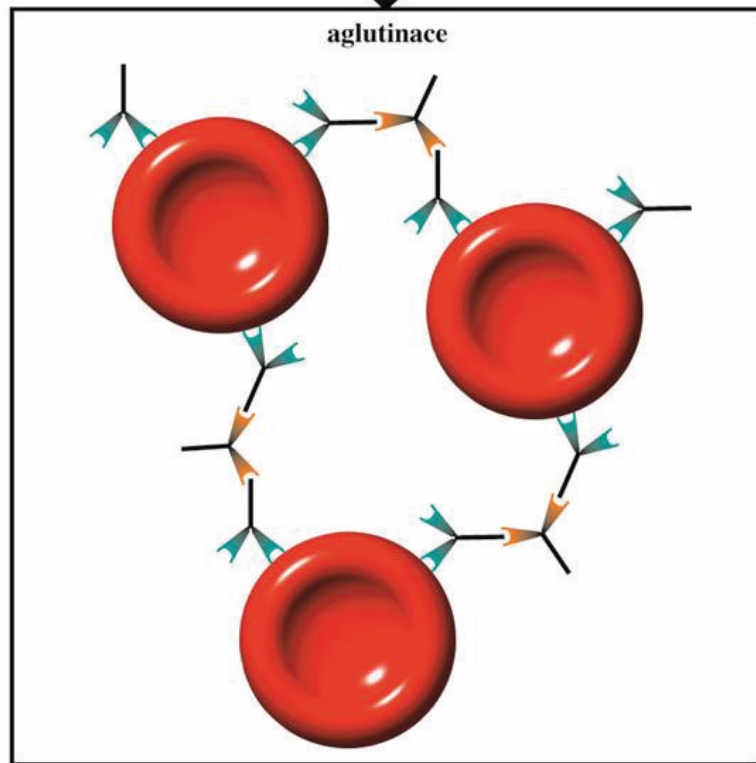
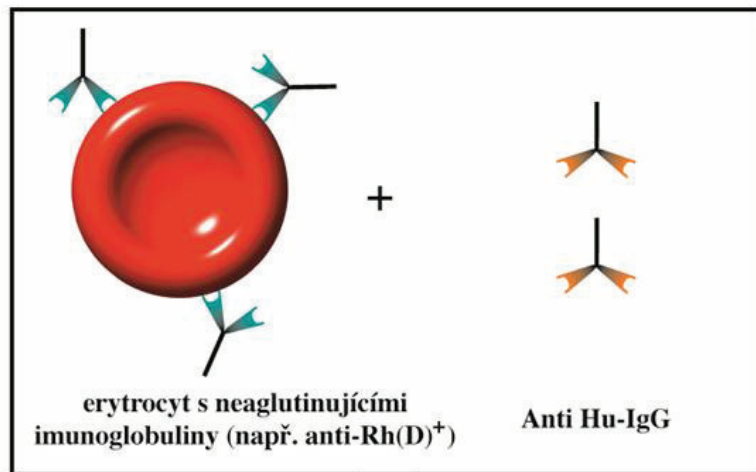
pohled na dno v
nakloněné poloze (45°C)

Coombsovy testy

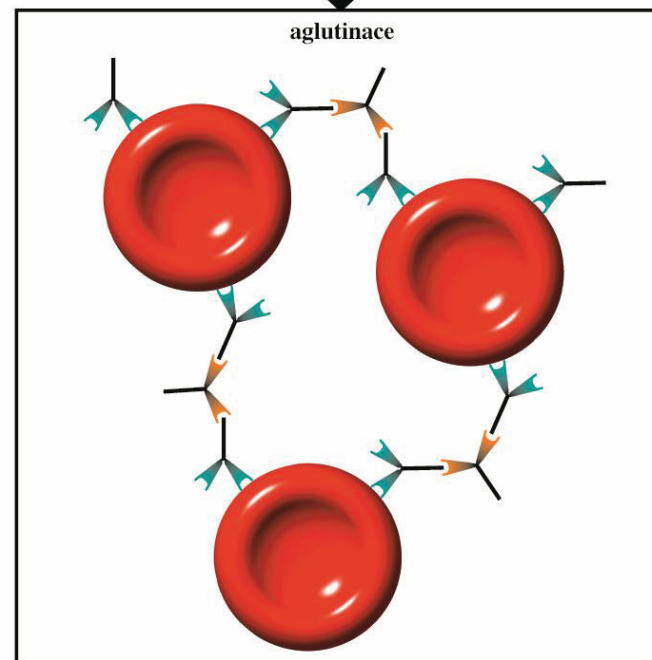
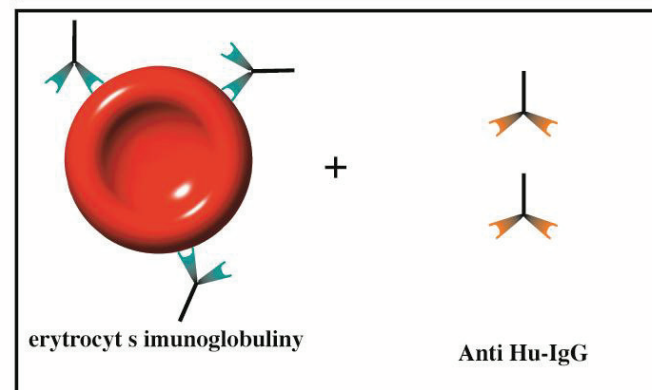
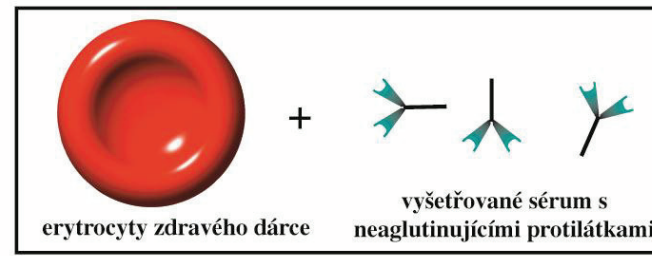
- DAT – direct antiglobulinum test
- průkaz senzibilizovaných erytrocytů
- Dg. autoimunitní hemolytické anémie

- IDAT – indirect antiglobulinum test
- průkaz specifických inkompletních Ab (IgG)
- Rh faktor, imunní protilátky....., infekce bakteriální, virové

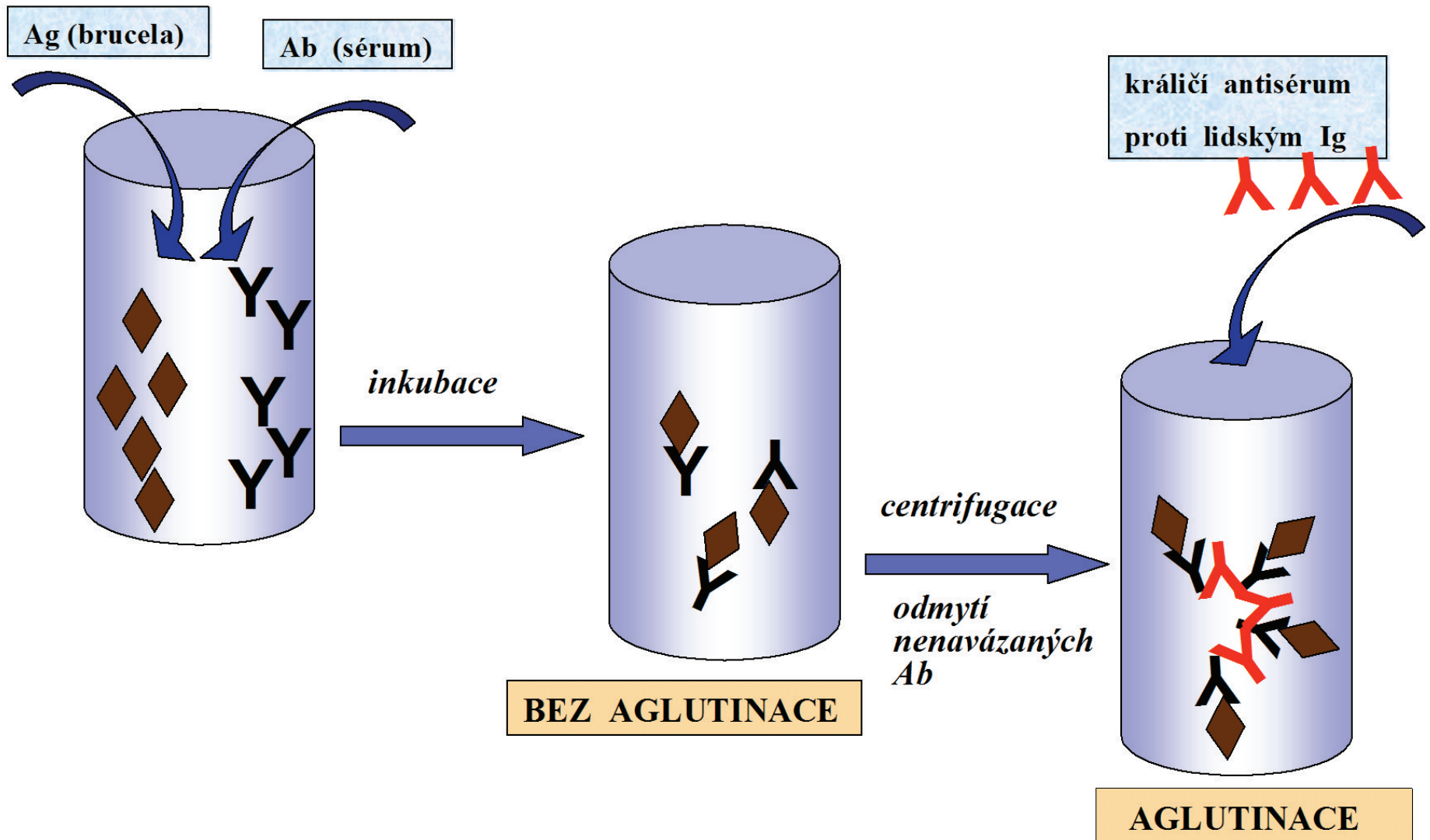
přímý Coombsův test (DAT)



nepośrední Coombsův test (IDAT)



Průkaz inkompletních protilátek pomocí AGH (antiglobulinum humanum)



HIT - test inhibice hemaglutinace

