

IMUNOCHEMICKÉ TESTY

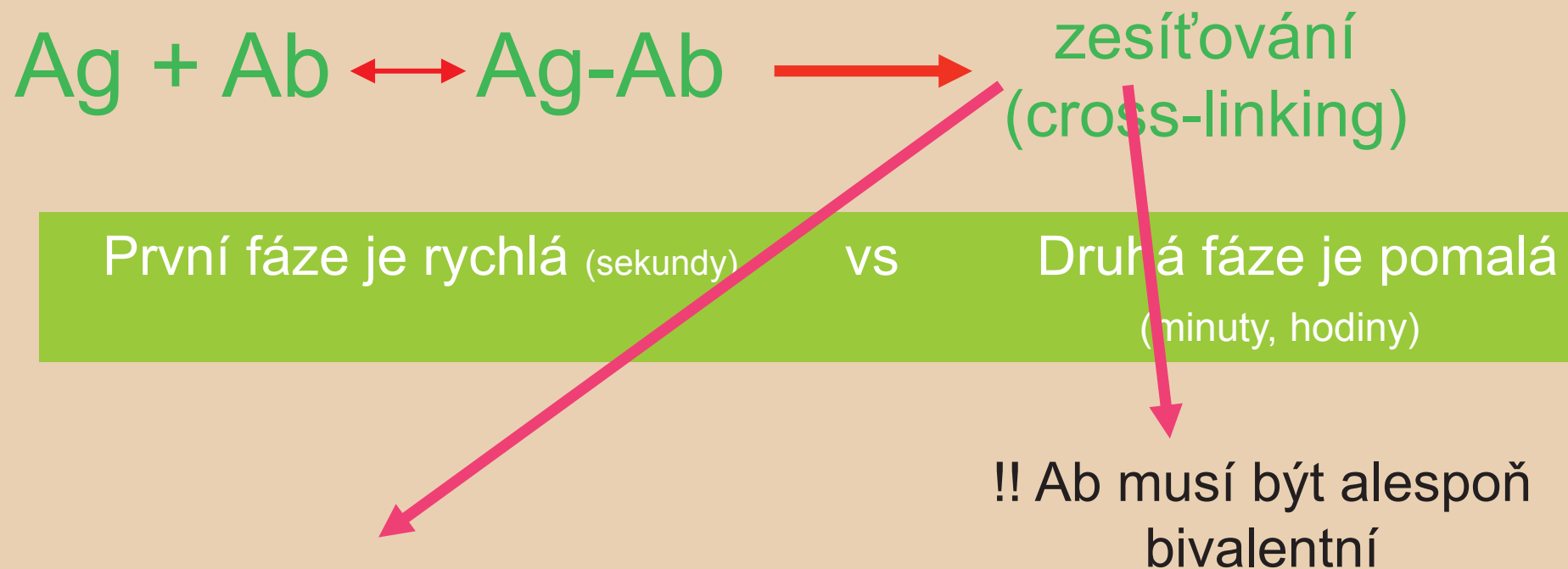
přehled a principy metod

3. část precipitace, imunodifúzní testy

3. ročník Klinická biologie a chemie



Reakce antigenu s protilátkou



Podle povahy antigenu:

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

Precipitační metody v
roztoku

Imunodifúzní metody v
gelovém prostředí

IMUNOPRECIPITACE

Rozpustný antigen + rozpustná protilátka = precipitát
(sraženina)

Precipitát je výsledkem tvorby trojrozměrné mřížkové struktury po interakci: polyvalentního antigenu s polyvalentní protilátkou.

PRECIPITAČNÍ REAKCE má dvě fáze:

- 1) Rychlá fáze: tvoří se rozpustné imunokomplexy (detekce jen speciálními metodami)
- 2) Pomalá fáze: agregace rozpustných imunokomplexů se tvoří nerozpustné komplexy (reakce několik minut až hodin)

antigeny se nazývají **precipitogeny** a protilátky **precipitiny**⁴

Ne všechny protilátky mají schopnost precipitovat antigen

Neprecipitující protilátky: - monovalentní nebo univalentní
(mají jen jedno vazebné místo)

Příčina neprecipitace: nízká afinita protilátek
musí se přidat velký nadbytek
antigenu, aby mohl reagovat
aspoň s některými vazebnými
místy,
nadbytek brání, aby proběhla
druhá fáze precipitace:
agregace malých komplexů

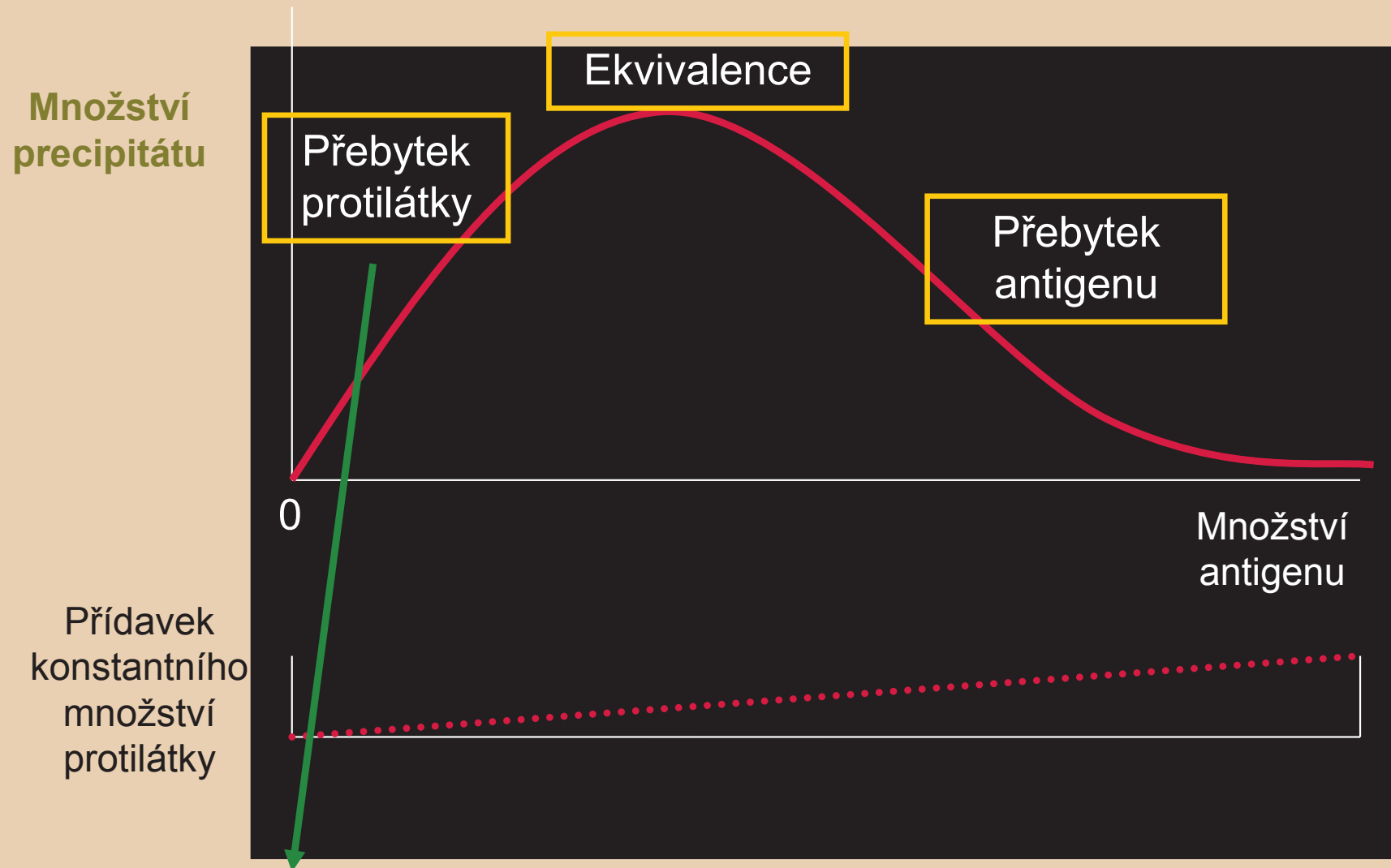
Monoklonální protilátky nemají schopnost precipitovat antigeny

Nesouvisí s nízkou afinitou (ta je většinou vysoká) ale s velkou specifitou - schopností reagovat jen s jednou antigenní determinantou na molekule komplexního antigenu

Precipitaci ovlivňuje izotyp protilátky

IgM obvykle hůře precipitují

IgG jsou dobrými precipitanty,



Falešně negativní výsledek

Při agregaci rozpustných imunokomplexů na velké nerozpustné komplexy se uplatňují NESPECIFICKÉ, hlavně hydrofóbní vazby mezi jinými částmi protilátkové a antigenové molekuly.

Rychlost precipitace je přímo úměrná teplotě

Rychlost precipitace stoupá v rozsahu 0 až 56°C, ale množství precipitátu se stoupající teplotou klesá

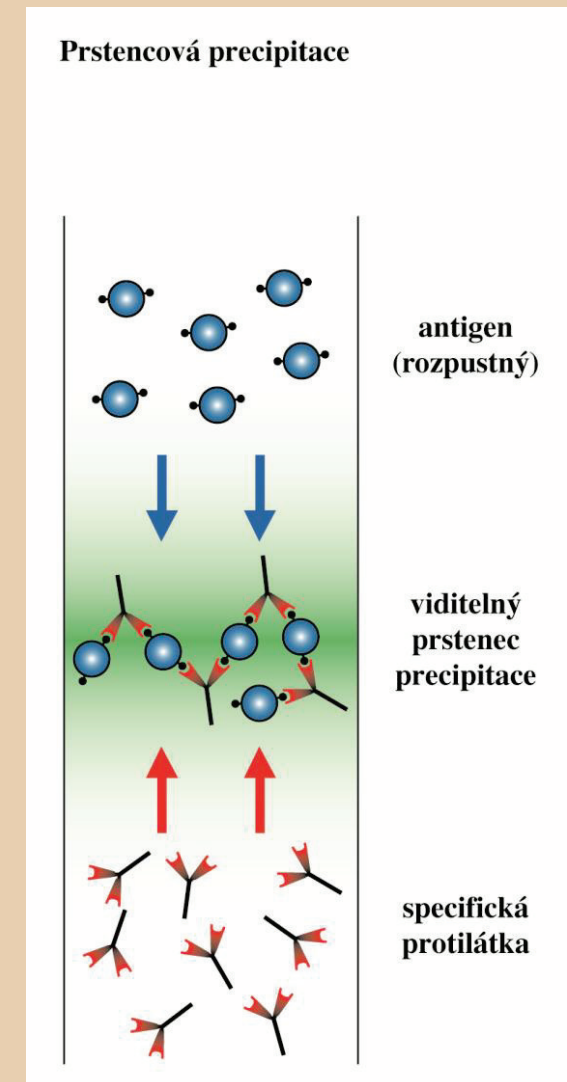
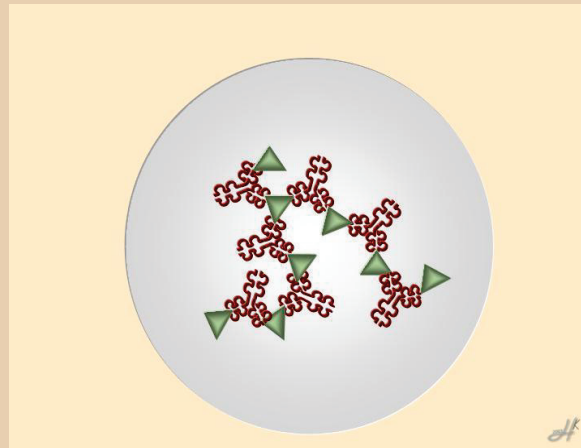
Optimum pH

Je v rozsahu 6,5 až 8,2

PRECIPITACE:

- v gelu, vizuální hodnocení (kvalitativní metoda)

- v roztoku (zákal)
prstěncová precipitace v kapiláře
nebo ve zkumavkách - kvantifikace



Stanovení množství precipitátu (kvantitativní)

**v roztoku: nefelometrie,
turbidimetrie**

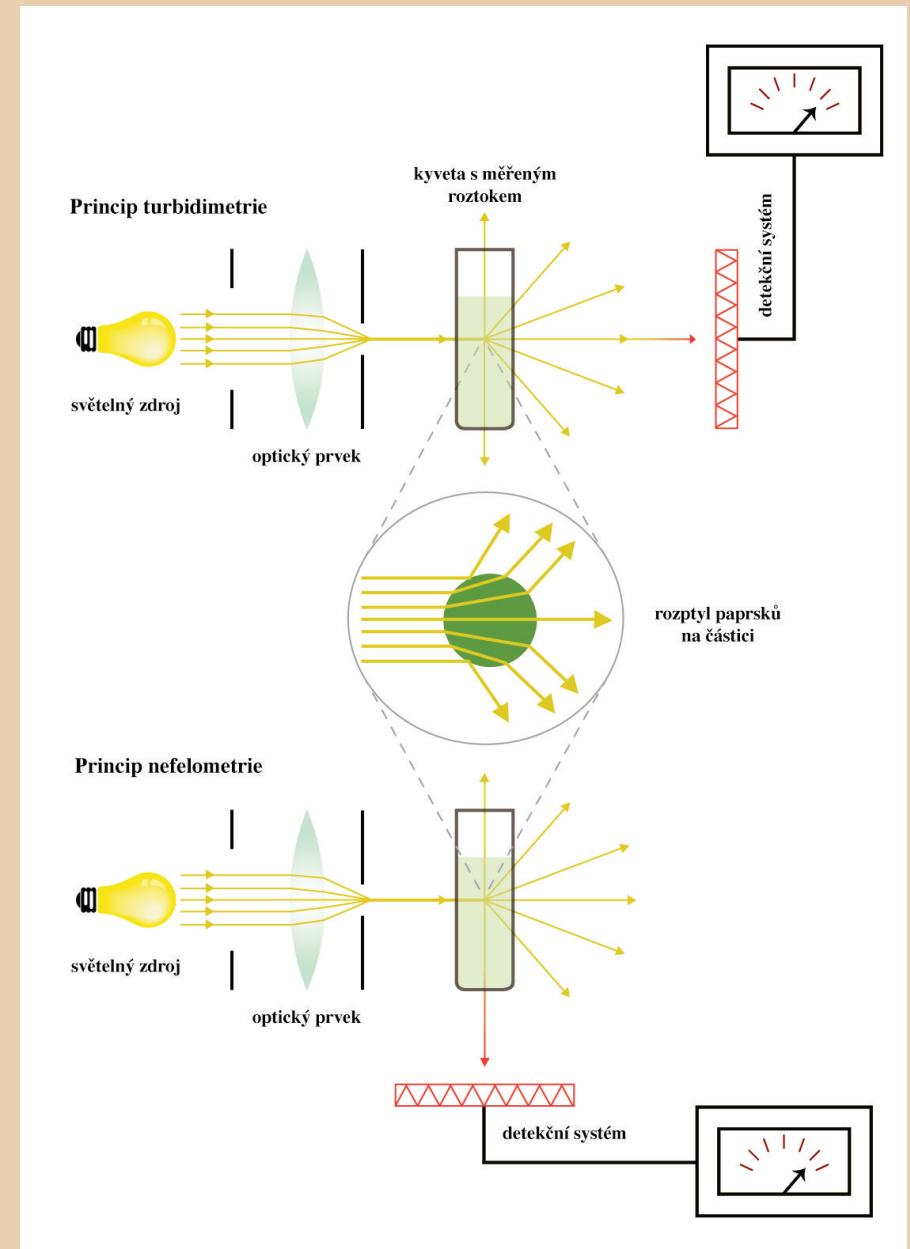
**množství precipitátu – zákal
přídavek PEG**

kvantitativní stanovení (*kalibrační křivka*)

**výsledky poskytují velmi rychle
lze je plně automatizovat,
vhodné pro velké série vzorků**

**používají se pro stanovení proteinů v
komplexních vzorcích, bakteriálních
lyzátech, homogenátech potravin a pod.**

Citlivost metody – mg- μ g/ml



Precipitace v gelu

IMUNODIFÚZNÍ TESTY

Jednoduchá imunodifúze

Dvojitá imunodifúze

Imunoelektroforéza

JEDNODUCHÁ RADIÁLNÍ IMUNODIFÚZE *(MANCINI)*

• precipitace v gelu

- gel – hydratovaný polysacharid
- antisérum rozptýleno v gelu
- antigen difunduje z jamky do gelu
 - vzniká precipitační prstenec
- obsah prstence odpovídá koncentraci Ag

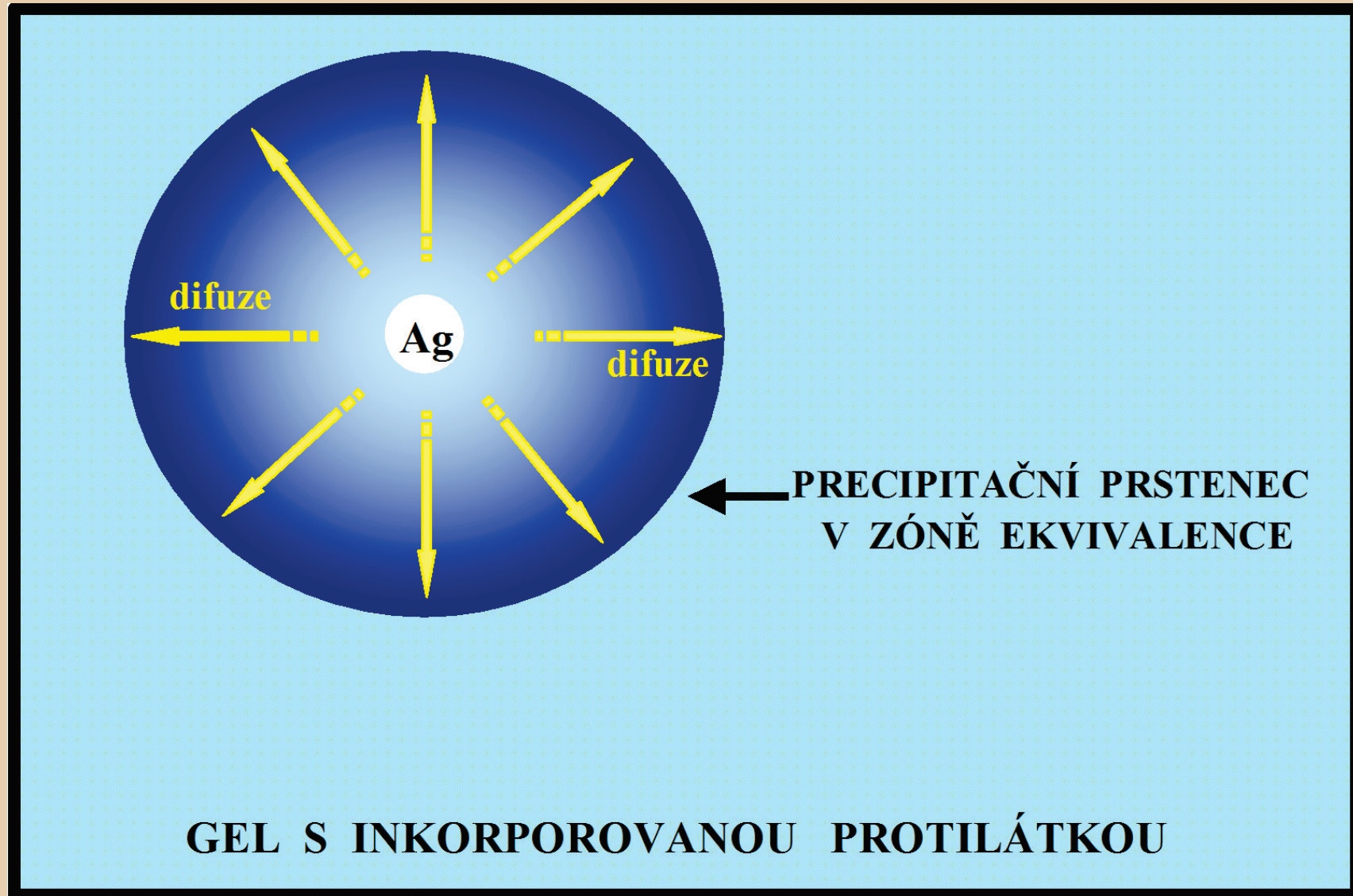
• kvantitativní stanovení *(kalibrační křivka)*

• jednoduchá a levná technika

• dlouhé inkubace *(výsledky za 48-72 hod.)*

• nelze automatizovat, vhodná pro menší série vzorků

RADIÁLNÍ IMUNODIFÚZE



DVOJITÁ IMUNODIFÚZE (OUCHTERLONY)

- precipitace v gelu v Petriho miskách
- do gelu difunduje proti sobě Ag a Ab
- v bodě ekvivalence vzniká precipitační linie
- kvalitativní průkaz

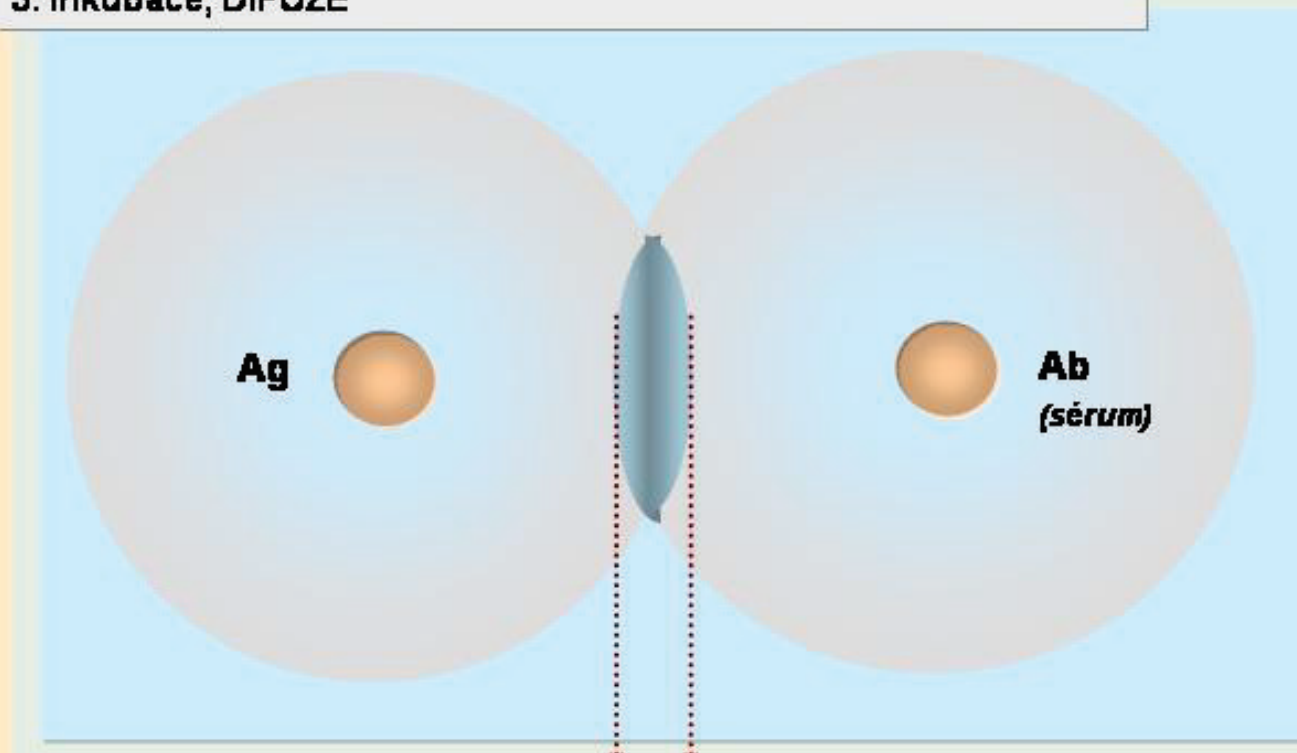
- příklady použití:
 - **systemové kandidózy** (*C. albicans*, *krusei*)
 - **aspergilózy** (*A. flavus*, *fumigatus*, *niger*, *terreus*)

PRECIPITACE V GELU

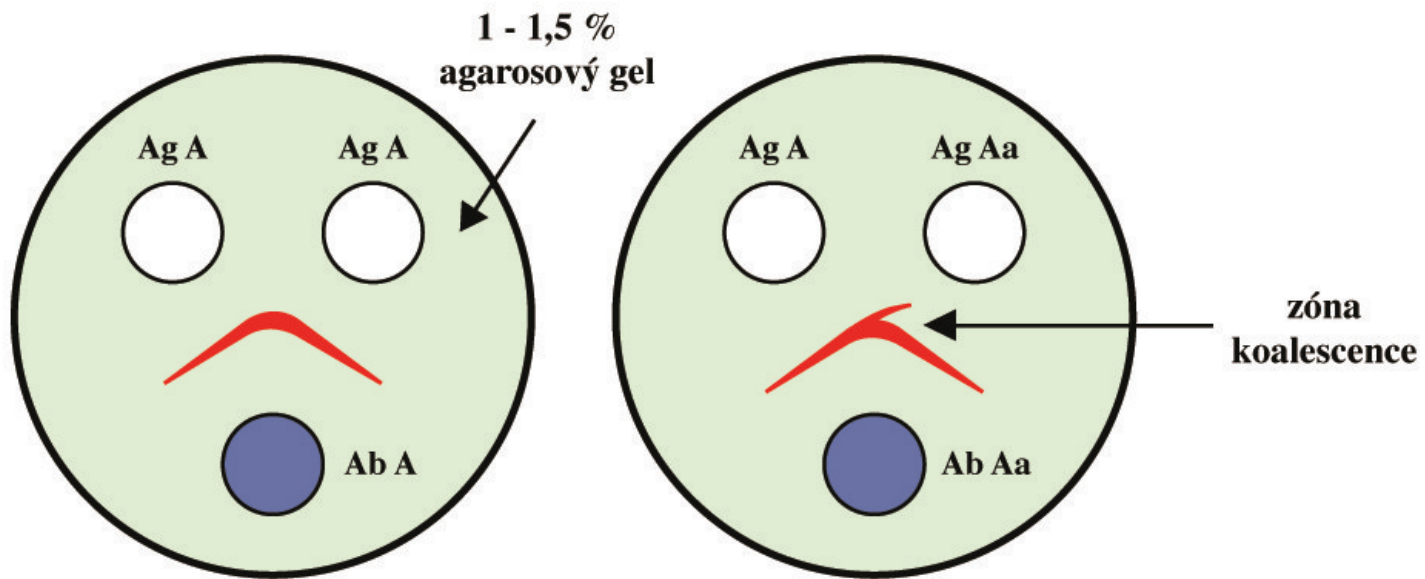
1. nalití gelu na podložní sklo (BEZ INKORPOROVANÉ PROTILÁTKY)

2. do připravených jamek pipetujeme antigen a protilátku (sérum)

3. inkubace, DIFUZE

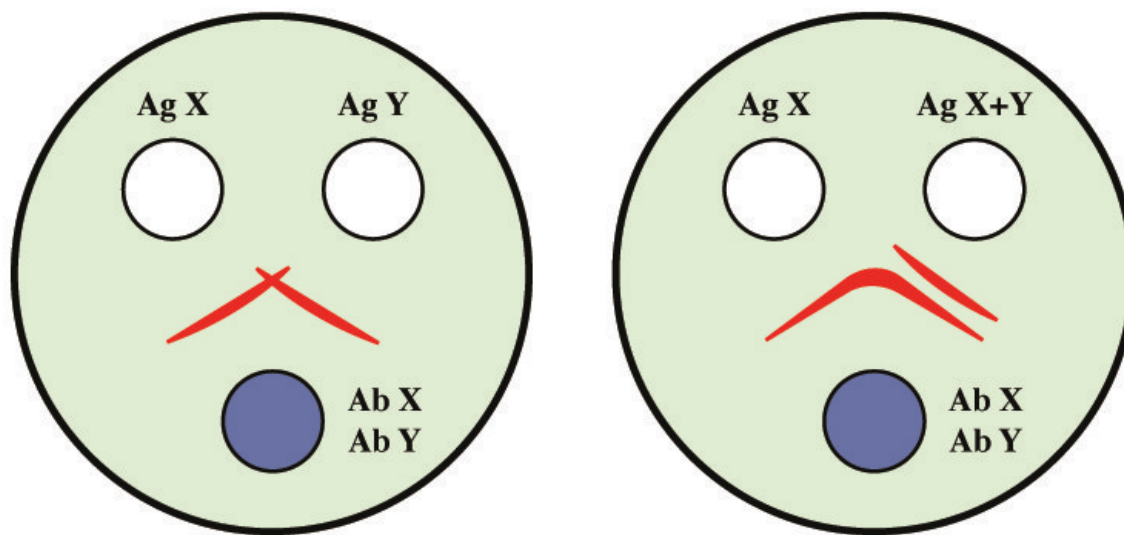


PRECIPITAČNÍ LINIE V ZÓNĚ EKVIVALENCE



identické antigeny A

částečně identické antigeny A, Aa



neidentické antigeny X, Y

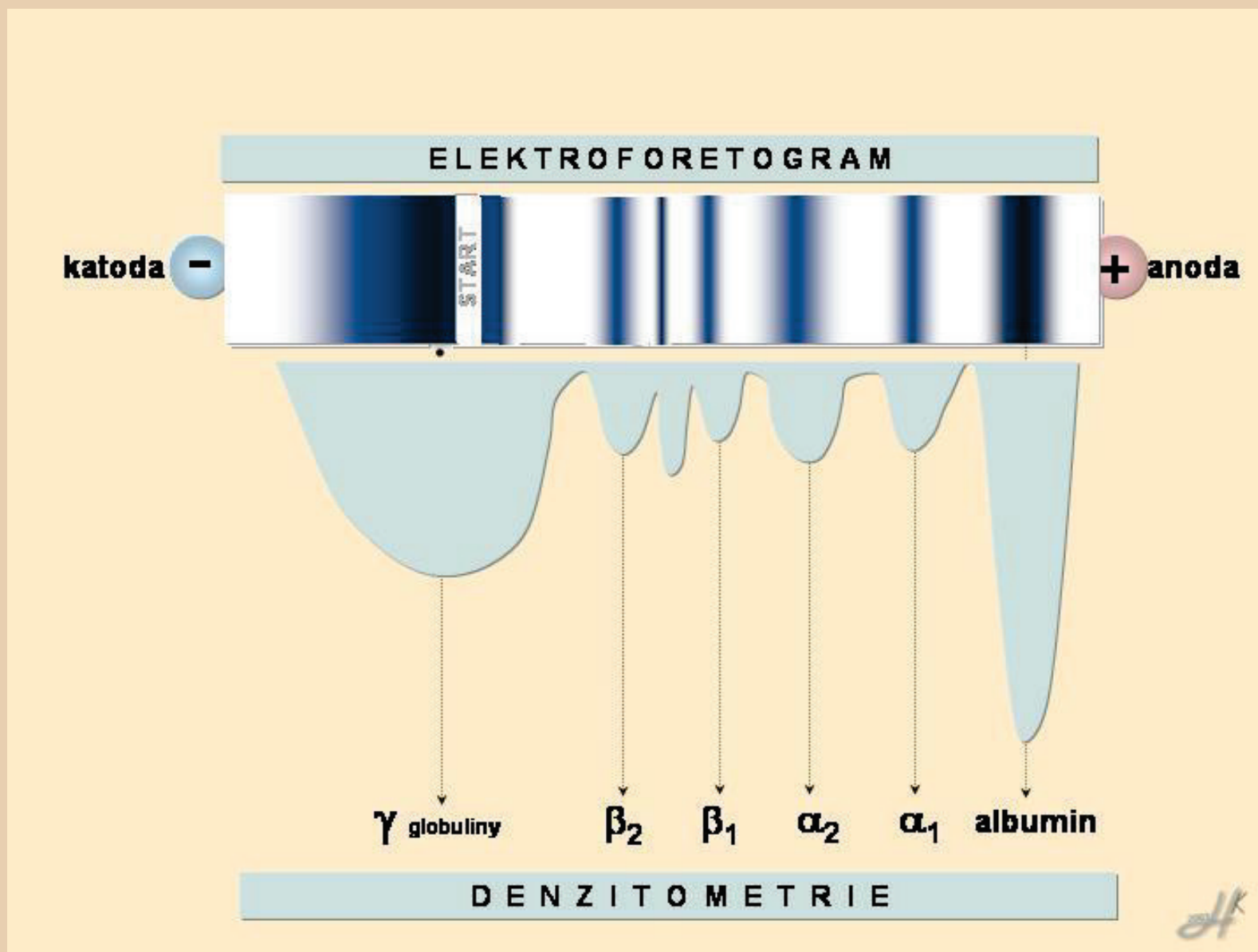
komplexní reakce dvou různých antigenů X a Y



IMUNOELEKTROFORÉZA

- **proteiny mají el. náboj**
- **podle náboje se rozdělí v elektrickém poli**
(albumin, α , β , γ -frakce)
- **orientační informace o změnách**
v kvantitativním zastoupení jednotlivých frakcí
imunoglobulinů
- **možnost denzitometrické kvantifikace**

ELEKTROFORÉZA



H

I M U N O E L E K T R O F O R É Z A

1. elektroforetické rozdělení sérových Ig

2. difuze a precipitace

3. obarvení precipitačních linií a hodnocení

pacient A: normální nález IgG, M, A



pacient B: paraprotein ve třídě IgA



M-gradient (paraprotein)

JK

HUNTER IMMUNOLOGY UNIT

IEP INDEX 470

DATE 26.5.94

