

Nové metody diagnostiky v imunologii

ELISA – Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay

- **Dôkaz protilátok:** špecifický antigén vyvolávateľa je z výroby naviazaný na stenu mikrotitračnej doštičky v diagnostickej súprave.
- Do doštičky sa pridáva vyšetrované sérum pacienta
- Po inkubácii sa pridá konjugát ten sa naviaže na komplex antigénu a hľadanej protilátky
- Pridá sa chromogén, po jeho väzbe na enzým oxiduje na farebný produkt = pozitívna reakcia

- Slúži aj **na stanovenie antigénu** v krvi alebo inom tekutom materiáli
- Postup je analogický, ale namiesto antigénu je na stenu mikrotitračnej doštičky naviazaná protilátka proti hľadanému antigénu. Tá zachytí antigén zo vzorky a na komplex sa naviaže enzýmom značená protilátka, po pridaní chromogénu v pozitívnom prípade dôjde k farebnej zmene
- **RIA** podobný princíp ako ELISA, ale namiesto enzýmom značených protilátok sa pridávajú rádioaktívne značené protilátky

ELISA test na detekciu protilátok alebo antigénu

Dôkaz protilátok – 1. vírusový antigén je naviazaný na povrch 2. Pacientovo sérum sa pridá a umožní sa mu väzba jeho protilátok na antigén na povrchu. Nenaviazané sérum je odstránené premývaním. 3. S enzýmom konjugované protilátky proti ľudským imunoglobulínom sa pridajú a po inkubácii opäť odstránia premývaním. 4. Pridá sa substrát, ktorý umožní farebnú reakciu enzýmu

Dôkaz antigénu – 1 antivírusové protilátky sú naviazané na povrch 2. pridá sa vzorka obsahujúca antigén – CSM, tkanivo, nenaviazaný antigén je po inkubácii odstránený premývaním. 3. Pridajú sa antivírusové protilátky na vychytenie antigénu. 4. Pridajú sa s enzýmom konjugované protilátky proti komplexu a 5 substrát, ktorý umožní farebnú reakciu

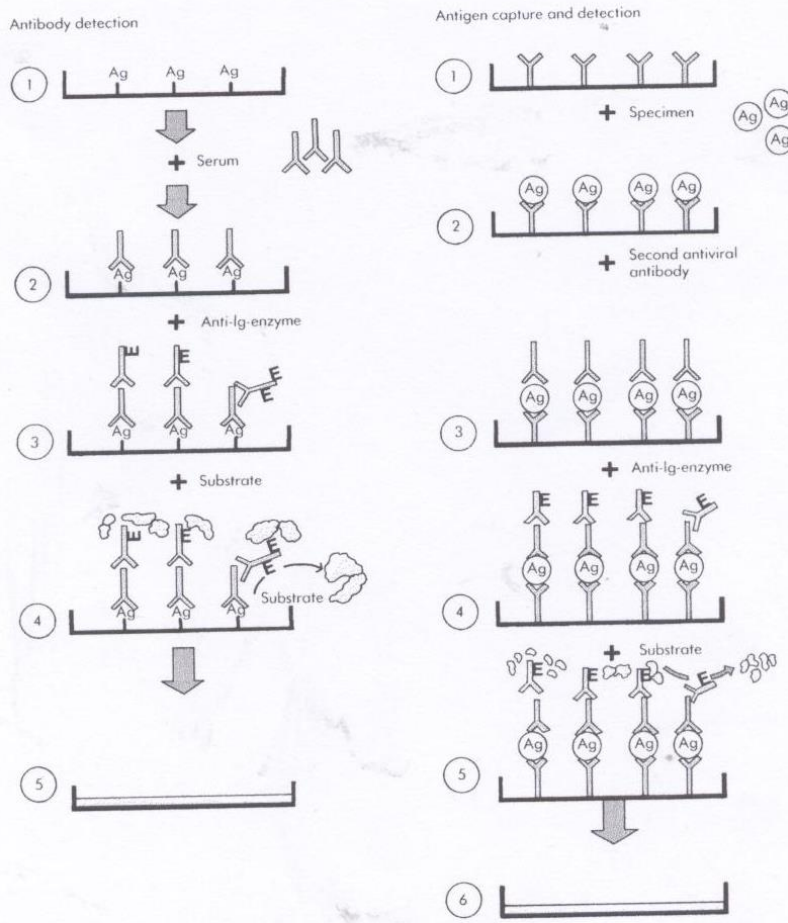
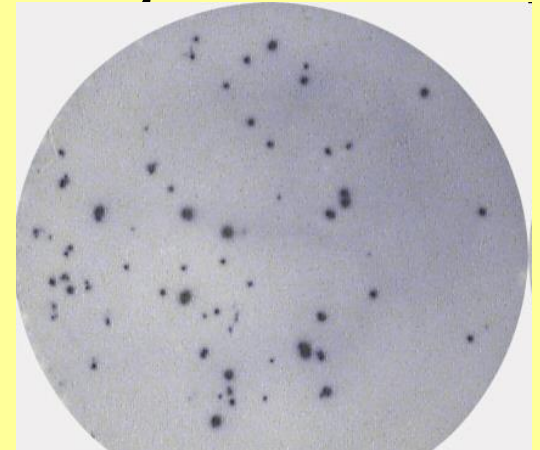


FIGURE 53-12 Enzyme immunoassays for quantitation of antibody or antigen. Antibody detection: 1, Viral antigen, obtained from infected cells, virions, or genetic engineering, is affixed to a surface. 2, Patient serum is added and allowed to bind to the antigen. Unbound antibody is washed away. 3, Enzyme-conjugated antihuman antibody is added, and unbound antibody is washed away. 4, Substrate is added and converted into chromophore, precipitate, or light. Antigen capture and detection: 1, Antiviral antibody is affixed to a surface. 2, Specimen containing antigen is added, and unbound antigen is washed away. 3, A second, antiviral antibody is added to detect the captured antigen. 4, Enzyme-conjugated anti-antibody is added, washed, and followed by 5, substrate, converted into chromophore, precipitate, or light.

ELISPOT – enzyme linked immnosorbent spot assay

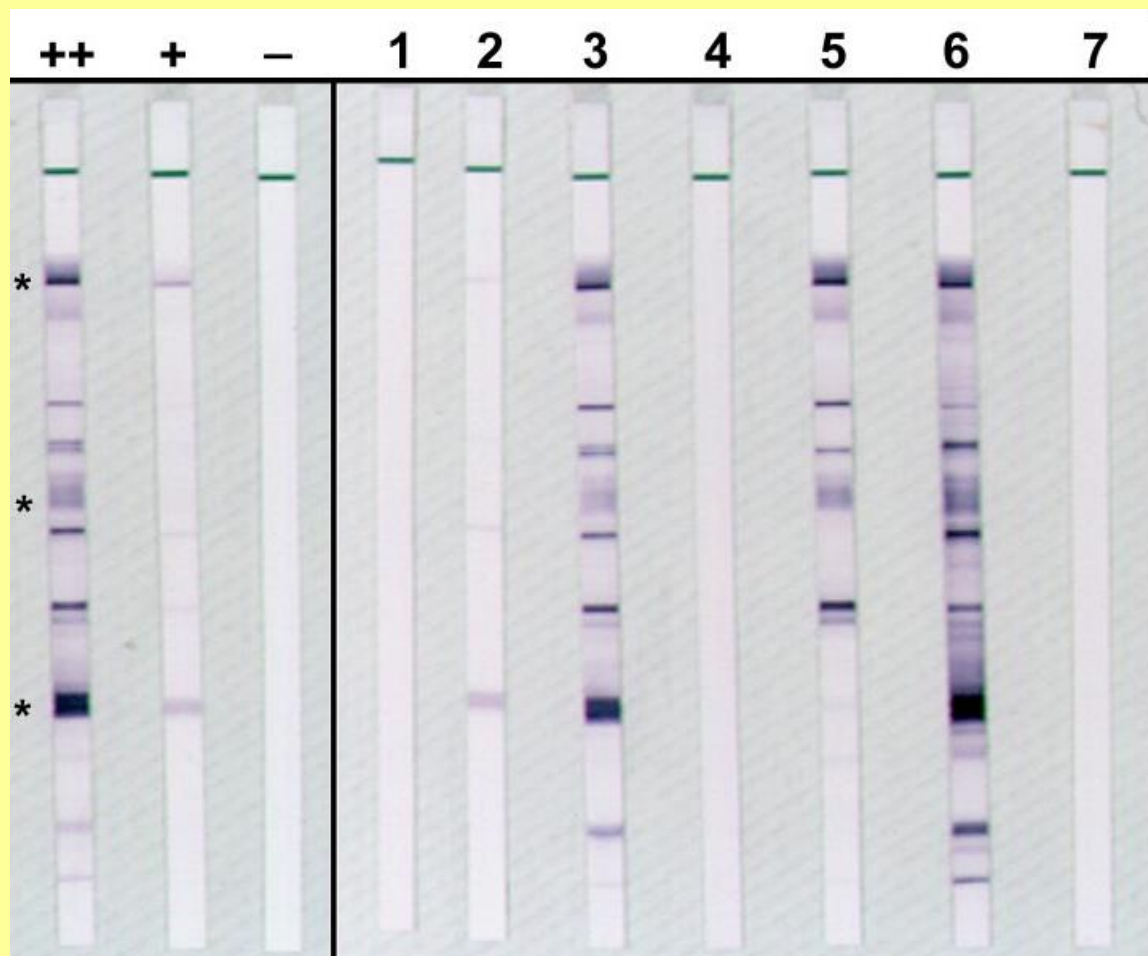
- Nedávno vyvinutá metodika
- Meria aj nízke početnosti aktivovaných lymfocytov
- Umožňuje rýchlu informáciu o bunkovej imunite na základe minimálneho invazívneho vyšetrenia periférnej krvi
- Používa sa na detegovanie aj veľmi malých množstiev cytokínov produkovaných T bunkami



Western blot

- Na prúžku papiera je nanosená a elektroforézou rozložená antigénna štruktúra vírusu alebo baktérie.
- Pridáme na prúžok sérum. Ak obsahovalo protilátky proti vírusu alebo baktérii, naviažu sa zodpovedajúcim mieste prúžku. Po pridaní ďalšej protilátky proti komplexu ag-ab s farbičkou, sa zviditeľnia na prúžku.
- Môžeme diagnostikovať prítomnosť protilátok proti viacerým antigénom mikroorganizmu

- Proteíny antigénu testovaného agensa sú elektroforeticky separované a prenesené na nitrocelulóзовý papierový prúžok.
- Ten sa potom inkubuje spolu s protilátkami – sérom – pacienta,
- premyje sa, aby došlo k odstráneniu nenaviazaných protilátok a
- potom reaguje s konjugátom protilátky proti komplexu ag-ab s naviazaným enzýmom.
- Sérum pacienta sa naviaže na antigény na nitrocelulóze len tam, kde identifikuje vlastný špecifický antigén k protilátke v sére.



PCR – polymerase chain reaction (polymerázová reťazová reakcia)

- Každý organizmus – aj mikroorganizmus – obsahuje jemu špecifickú sekvenciu aminokyselín
- Pomocou enzýmov je možné túto sekvenciu „vystrihnúť“ a vo vzorke (tkanivo, embryo, moč, CSM....) nasyntetizovať na milióny kópii.
- Tieto potom identifikujeme prostredníctvom „protilátky“ proti tejto sekvencii – značenej enzýmom, fluorescenciou a pod.

- Metóda pre mnohonásobné zmnoženie (amplifikáciu) špecifického úseku DNA *in vitro*, založená na princípe replikácie, pričom veľkosť amplifikovaného úseku ohraničujú dva oligonukleotidy – primery

PCR – polymerázový reťazová reakcia – je rýchlou metódou na pomnoženie – amplifikáciu známej DNA. Vzorka sa zmieša s termostabilnou DNA polymerázou, DN-trifosfátmi a 2 DNA molekulami špecifickými - primermi - ,ktoré sú komplementárne so zakončeniami cieľovej sekvencie, ktorú chceme amplifikovať. Zmes je zahriata a tým denaturovaná, schladená, čo umožní väzbu primeru na cieľovú DNA a jej namnoženie. Cykly sa opakujú 32 krát. Po prvom cykle sa amplifikujú len sekvencie, ktoré boli rozložené primerom – Týmto je možné v krátkom čase 6 hodín, veľmi špecificky dokázať suspektný vírus alebo baktériu vo vzorke – napr. TBC v spúte ap.)

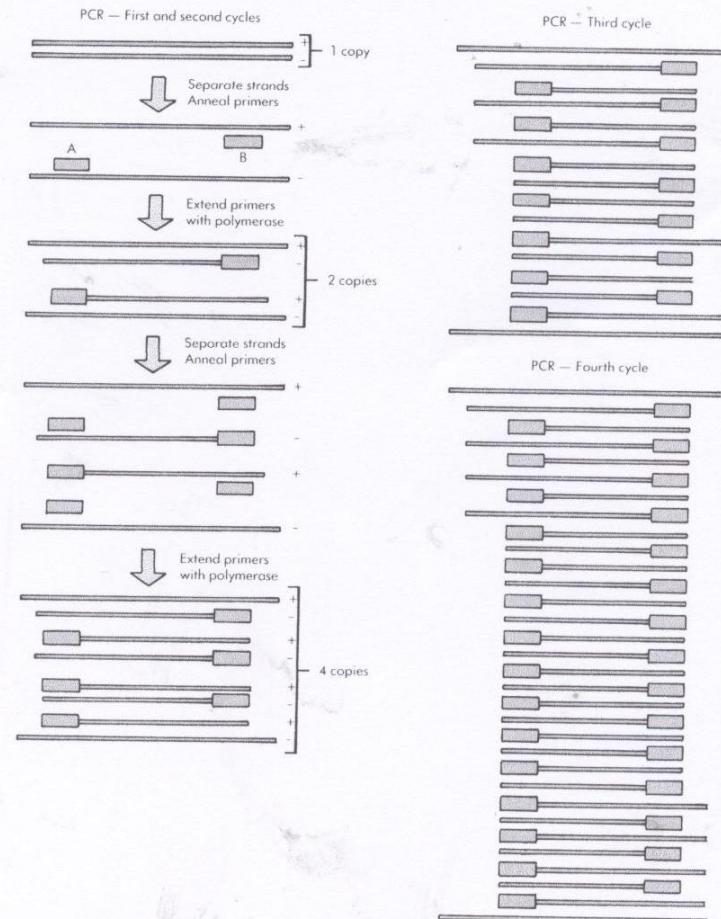


FIGURE 53-10 Polymerase chain reaction (PCR). The polymerase chain reaction is a rapid means of amplifying a known DNA (A sample) mixed with a heat-stable DNA polymerase, excess deoxyribonucleotide triphosphates, and two DNA primers, which complement the ends of the target sequence to be amplified. The mixture is heated to denature the cooled to allow binding of the primers to the target DNA and extension of the primers by the polymerase. The cycle 30 times. After the first cycle, only the sequence bracketed by the primers will be amplified. (Modified from Blair GE, *Biochem Educ* 20:87-90, 1992.)

Nefelometria, turbidimetria

Sú založené na meraní množstva imunitných komplexov, ktoré vznikajú po reakcii stanovovanej protilátky s pridaným antigénom.

V úlohe antigénu vystupuje stanovovaná protilátka a pridávame protilátku proti nej.

Výsledkom reakcie antigén – protilátka je precipitát, ktorý sa prejaví jako **zákal**.

- **Využitie:** Pomocou turbidimetrie a nefelometrie sa stanovujú základné bielkoviny séra: *imunoglobulíny, okrem IgD, ľahké reťazce imunoglobulínov, zložky komplementu C3 a C4, proteíny akútnej fázy zápalu – CRP, orosomukoid, transferín, albumín...*

- Funkcie lymfo T, B a ich subpopulácií sa testujú **v lymfocytotransformačnom teste**. Pri kultivácii lymfo s mitogénmi alebo s monoklonovými protilátkami reagujú tieto *blastickou transformáciou*.
- Porucha cytotoxických lymfo T sa testuje pomocou testu **CML (test bunkami sprostredkovanej lýzy)**. Cytotoxické lymfo sa pridajú k terčovým bunkám, ktoré sú označené rádioaktívnym izotopom ^{51}Cr . Po deštrukcii sa izotop sa uvoľní do supernatantu a jeho aktivita sa *meria na gamapočítači*.

- **Chemotaktická schopnosť** sa analyzuje v gelovom prostredí, kde sa k leu pridá v určitej vzdialenosti od nich látka, kt. provokuje u nich pohyb. Meria sa zóna vycestovaných buniek
- **NBT test:** využíva sa substrát NBT – nitroblue-tetrazolium chlorid. **Detekcia oxidatívneho vzplanutia** je založená na redukcii bezfarebnej tetrazoliovej soli (NBT) na farebný formazán.

- **Chemiluminiscencia:**
- Táto metóda hodnotí oxidatívne vzplanutie.
- V priebehu oxidatívneho vzplanutia vznikajú elektrónovo excitované stavy, ktoré emitujú fotóny. Následne sa vyžiari energia v podobe svetla, ktoré je detegované prístrojom – luminometrom.