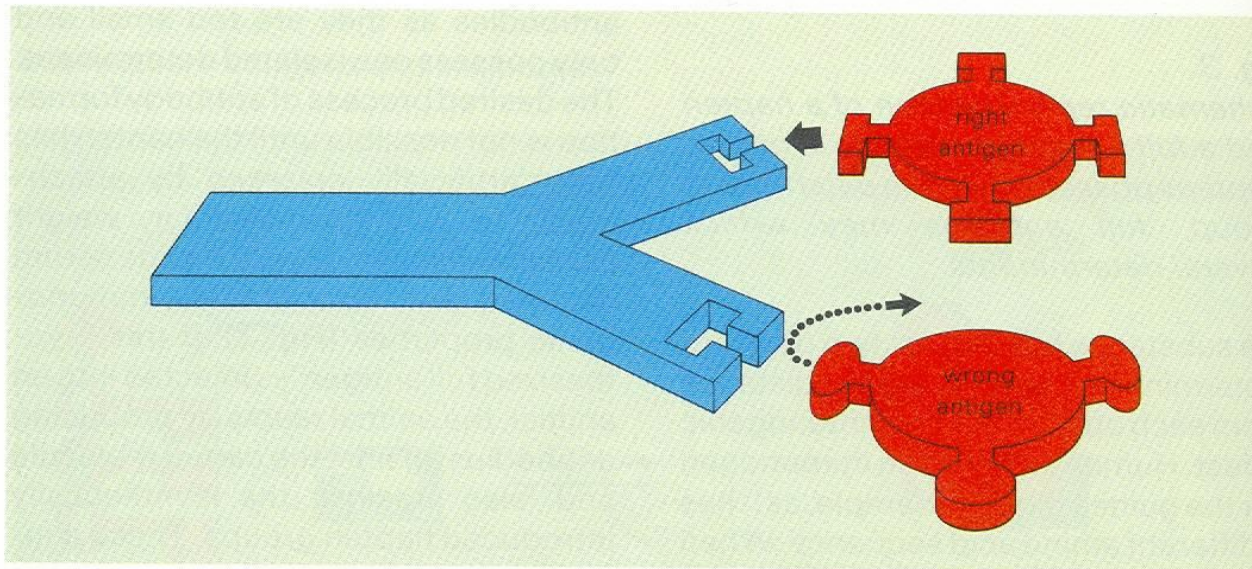


Reakcja Ag-Ab

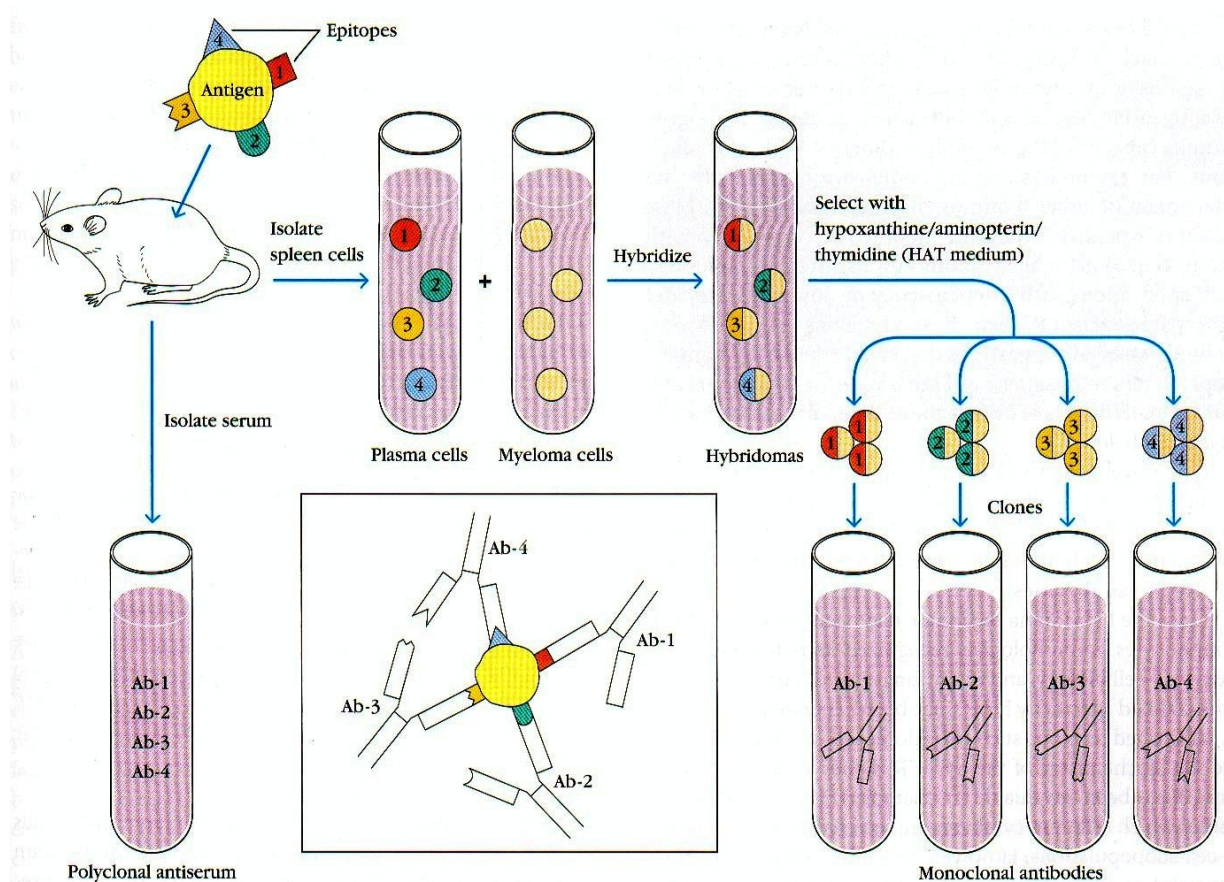
badania doświadczalne i diagnostyka kliniczna

Przeciwciało (Ab) na drodze specyficznego rozpoznania identyfikuje **antygen** (Ag)



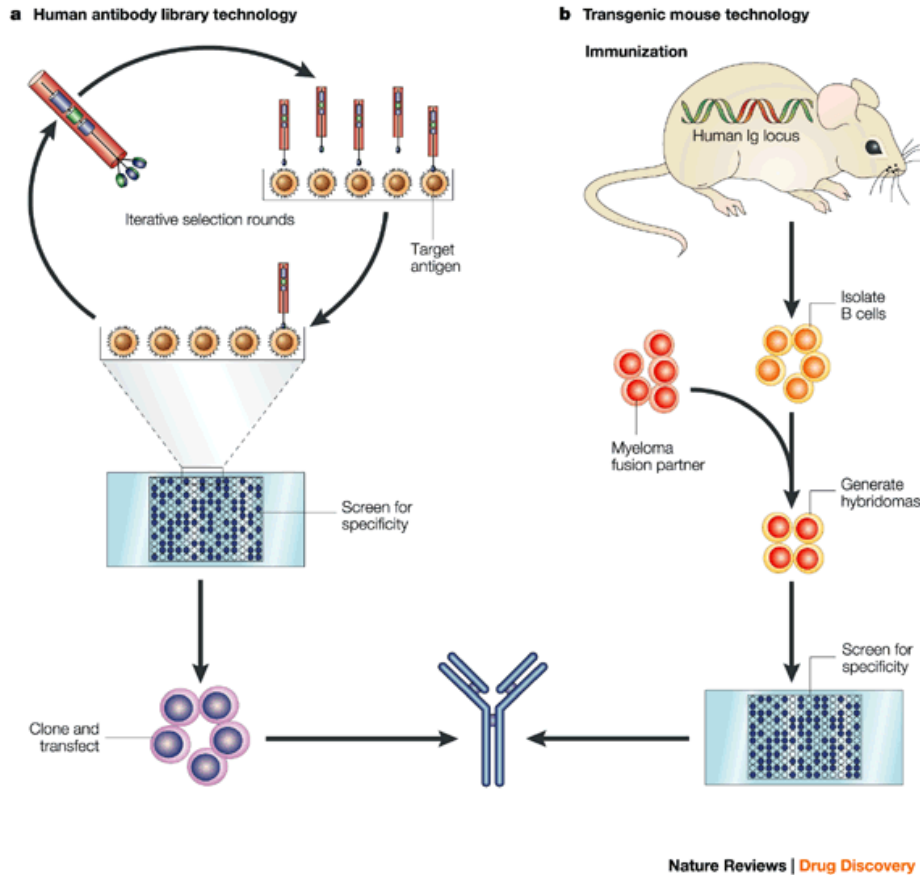
Schematic representation of the specificity of the antigen-antibody reaction (lock and key principle)

Przeciwciała poliklonalne



Przeciwciało poliklonalne produkowane w odpowiedzi na wielowartościowy antygen stanowi mieszaninę przeciwciał monoklonalnych, skierowanych swoiście przeciwko jednemu z czterech epitopów. Wszystkie przeciwciała reagują z odpowiednim antygenem, ale poszczególne cząsteczki mają różny region zmienny.

Przeciwciała monoklonalne



Przeciwciała monoklonalne są produktem jednej komórki oraz jej komórek potomnych, mają identyczny zarówno region zmienny jak i stały.

Reagują tylko z jednym epitopem danego antygeny.

Antygen

Substancja, która może być swoiście rozpoznana przez przeciwciała lub receptory komórek.

Właściwości antygenów:

- **immunogenność** (zdolność do wywołania swoistej odpowiedzi immunologicznej)
- **antygenowość** (zdolność do swobodnego łączenia się z immunoglobulinami i receptorami)

Podział :

- **kompletne** – białka lub wielocukry, m.c. 5000, 10000 <
- **niekompletne** – zw. małowcząsteczkowe, (same nie mają zdolności do indukcji produkcji przeciwciał, nabierają aktywności immunologicznej po sprzęgnięciu z nośnikiem (np. białka surowicy))

Antygen

Naturalne

związane z komórkami

(leukocytami, erytrocytami, płytkami krwi)

związane z drobnoustrojami

(białka, glikolipoproteiny, wielocukry)

Sztuczne

hapteny

Syntetyczne

polimery aminokwasów o najprostszej strukturze
(szerokie zastosowanie w badaniu mechanizmów odpowiedzi immunologicznej.)

Antygen

Hapteny

Hapten wykazuje tylko antygenowość.

Haptenami mogą być proste związki (np. glukoza, trinitrofenol, alergeny, leki, narkotyki).

Hapteny immunogenność zyskują po połączeniu z nośnikiem (np. cząsteczka białka).

W odpowiedzi na hapten połączony z nośnikiem limfocyty B rozpoznają hapten, a limfocyty Th nośnik białkowy.

Ag naturalne kompletne

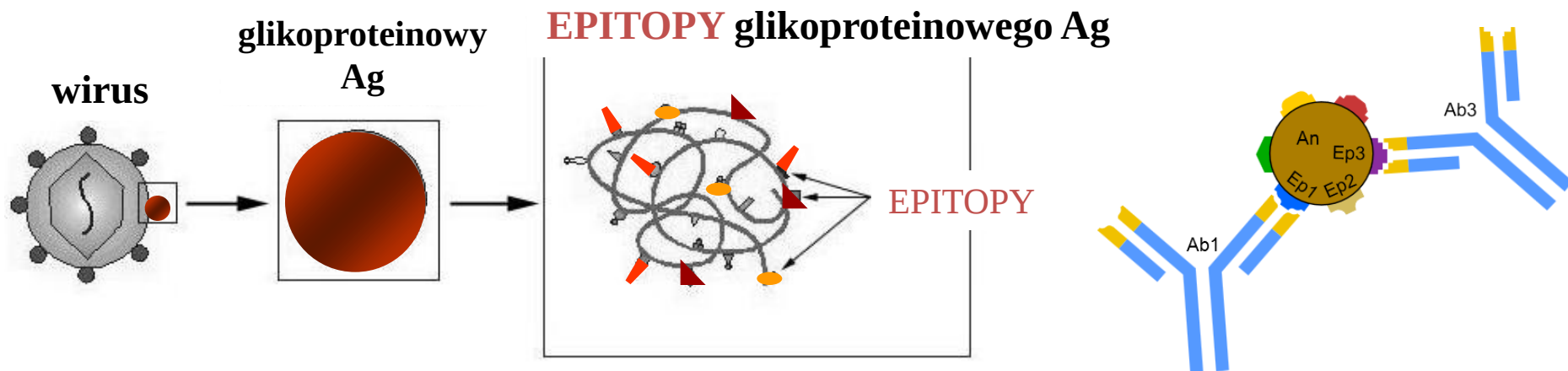
Ab wiążą określone fragmenty **Ag**



EPITOPY

(Determinanta antygenowa)

Jedna cząsteczka **Ag** może mieć wiele różnych **EPITOPÓW**, każdy z nich decyduje o powstaniu innego przeciwciała



Ag naturalne kompletne

Epitopy obecne w jednej cząsteczce antygeny mogą być identyczne lub różne.

Epitopy mogą być wiązane przez przeciwciała o tej samej lub różnej swoistości.

Antygen zawierający wiele epitopów nazywamy **wielowartościowym** lub poliwalentnym.

Oddziaływanie Ag-Ab

Antygen łączy się z miejscem wiążącym przeciwciała z tym większą siłą, im ściślej antygen i miejsce wiążące są do siebie dopasowane.

Różne typy niekowalencyjnych oddziaływań mogą przyczyniać się do wiązania antygeny z przeciwciałem:

- siły elektrostatyczne,
- wiązania wodorowe,
- siły van der Waalsa,
- oddziaływania hydrofobowe.

Oddziaływanie Ag-Ab

Powinowactwo- siła wiązania pojedynczej determinanty antygenowej przez miejsce wiążące antygen przeciwciała.

Wartościowość- to liczba determinant antygenowych, które może związać cząsteczka przeciwciała.

IgG, IgD i IgE: 2-wartościowe (mają po 2 miejsca wiążące)

IgA: 2- lub 4-wartościowe

IgM: 10-wartościowe

Awidność (zachłanność)- siła wiązania wielowartościowego antygeny przez przeciwciało (zależy od powinowactwa i liczby poszczególnych miejsc wiążących w stosunku do odpowiednich determinant)

WYKRYWANIE REAKCJI Ag – Ab

PRECYPITACJA

AGLUTYNACJA

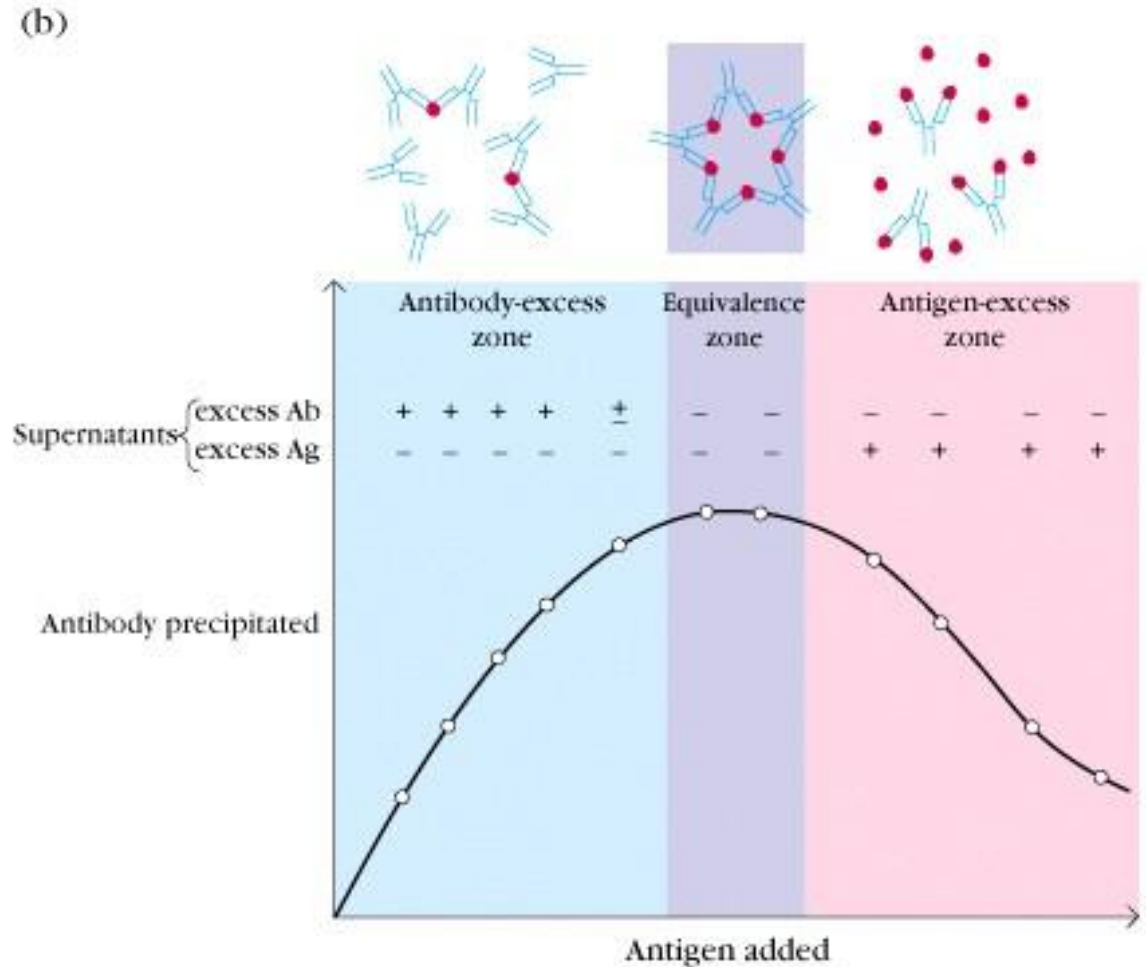
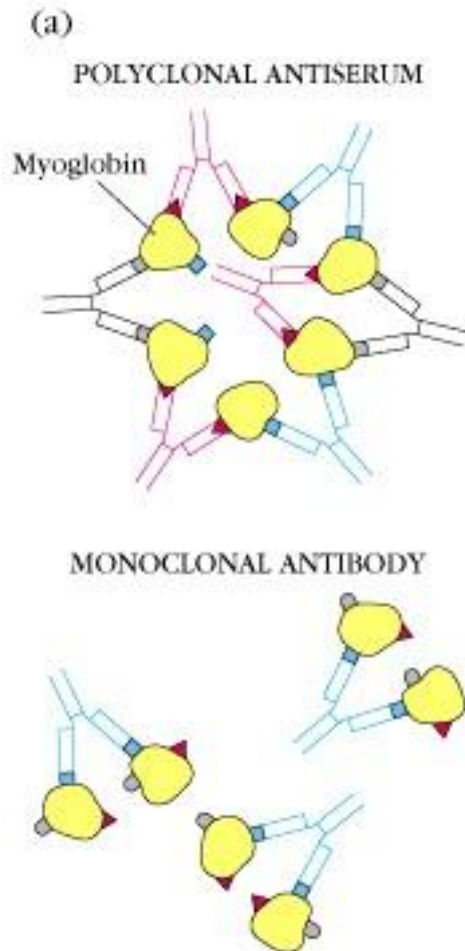
testy IMMUNOCHEMICZNE

PRECYPITACJA - wykrywanie reakcji Ag – Ab

Reakcja wiązania rozpuszczalnego wielowartościowego **Ag**
in vitro przez swoiste **Ab**

Wytrącają się kompleksy immunologiczne **PRECYPITATY**

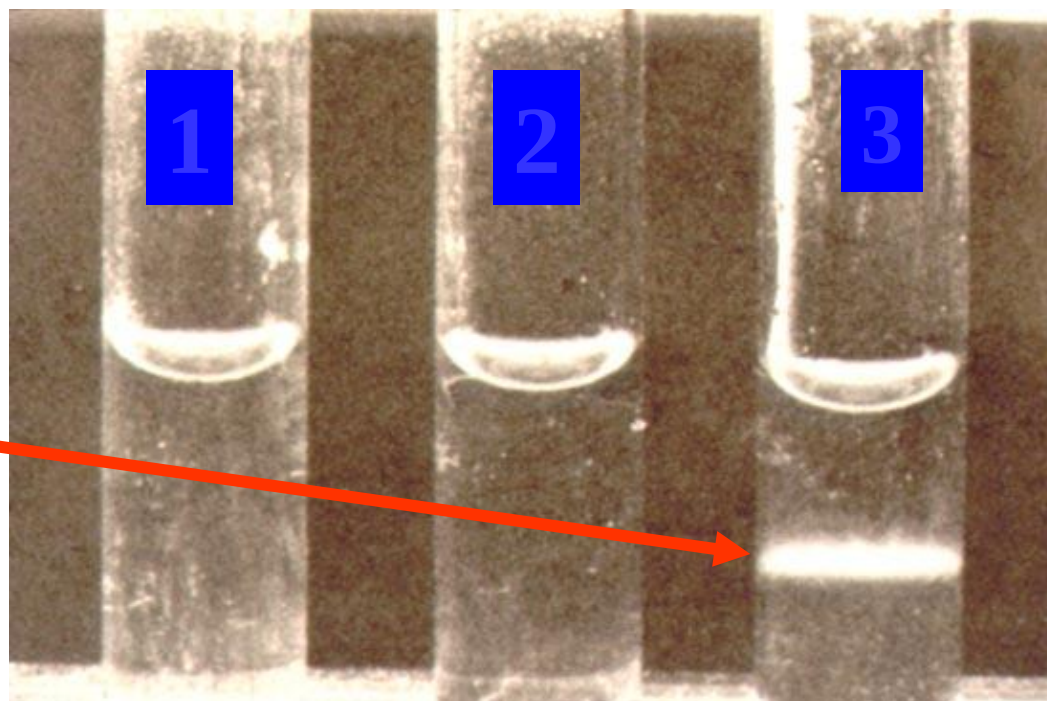
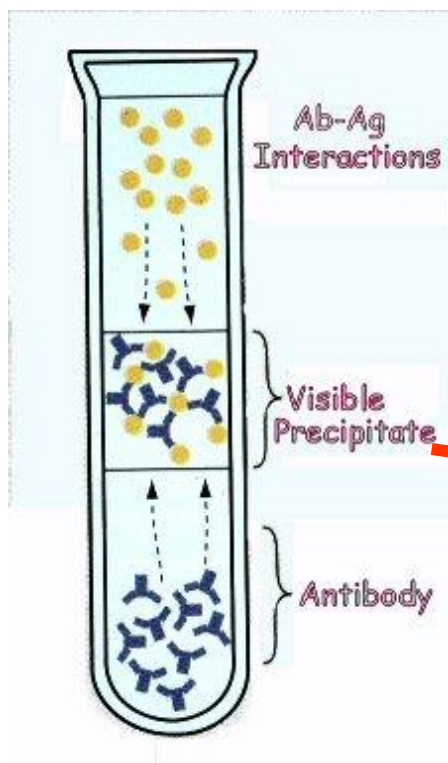
Precypitacja



Precypitacja klasyczna – w środowisku płynnym

Precypitacja pierścieniowa- do roztworu antygen/przeciwciała dodaje się surowicę. Na granicy faz obu roztworów pojawia się warstwa precipitatu.

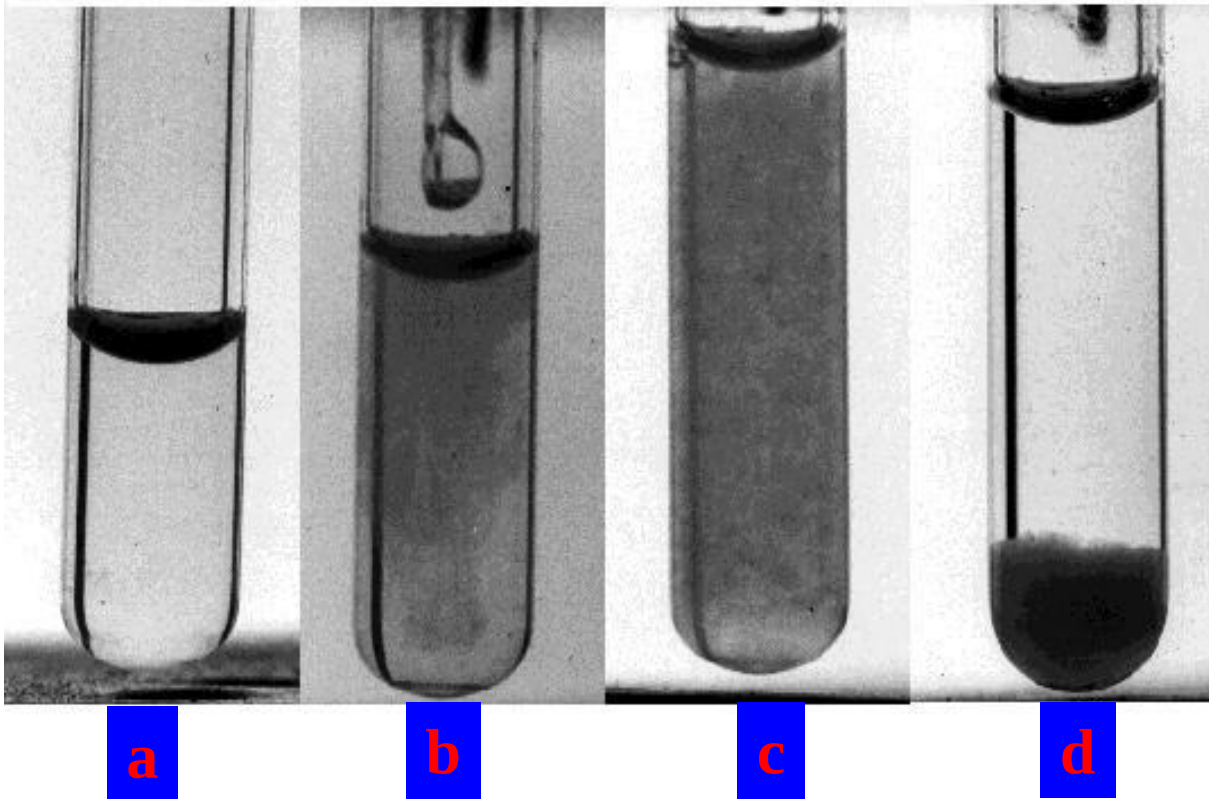
Odczyn jakościowy



Precypitacja klasyczna – w środowisku płynnym c.d.

Precypitacja probówkowa

Odczyn jakościowy



- a) Ab anty-polisacharydy pneumokoków
- b) Dodanie roztworu polisacharydów
- c) nierozpuszczalny kompleks Ag-Ab (zmętnienie)
- d) Po 1h – osad (precypitat)

Precypitacja klasyczna – w środowisku płynnym c.d.

Precypitacja szkiełkowa- Roztwór antygeny oraz surowicę nakrapla się na szkiełko. W przypadku odczynu dodatniego na dnie szkiełka pojawi się osad (precypitat).

Odczyn jakościowy

Ag + surowica → **mikrobiologia**
bakteriologia

Precypitacja klasyczna – w środowisku płynnym c.d.

Immunoprecypitacja pozwala na wyizolowanie z mieszaniny białek określonego antygeny za pomocą swoistego dla niego przeciwciała.

Powstałe kompleksy antygen-przeciwciało wytrącają się z roztworu, a następnie są odzyskiwane w polu magnetycznym dzięki zastosowaniu przeciwciał połączonych z nierozpuszczalnymi nośnikami (kulkami magnetycznymi).

Po dodaniu buforu następuje oddysocjowanie kompleksu antygen-przeciwciało od kulek magnetycznych.

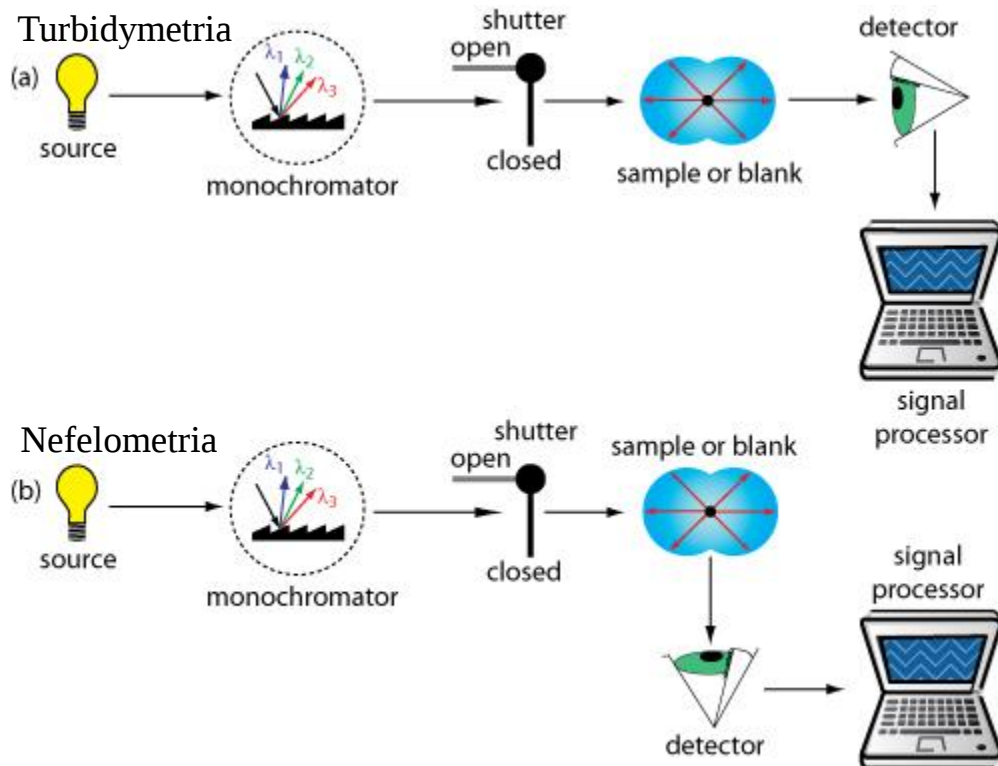
Odmiany immunoprecypitacji:

- immunoprecypitacja chromatyny-ChIP (umożliwia badanie oddziaływań DNA-białko)
- immunoprecypitacja RNA- RIP (umożliwia badanie oddziaływań RNA-białko).

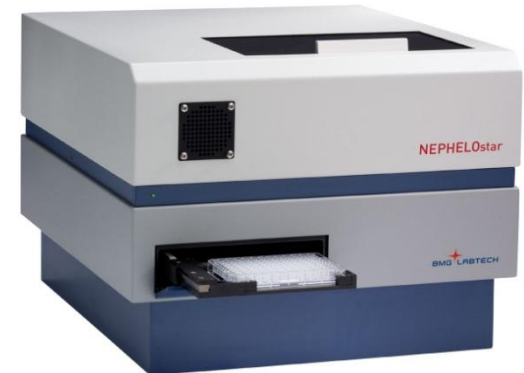
Nefelometria i turbidymetria

Metody pozwalające na oznaczenie ilościowe zawiesiny koloidalnej w badanej próbce przez pomiar natężenia światła przepuszczanego przez badaną próbkę:

- Turbidymetria- detektor jest umieszczony na jednej linii z próbką i źródłem światła
- Nefelometria- detektor jest umieszczony pod pewnym kątem (najczęściej 90°).



<http://www.biogenet.com.pl/>



ISOGEN

Proces ten jest wysoce zautomatyzowany dzięki czemu może być szeroko stosowany w diagnostyce medycznej.

Precypitacja w żelu (immunodyfuzja)

IMMUNODYFUZJA- Metoda bazuje na zjawisku dyfuzji rozpuszczalnego antygeny i przeciwciała w podłożu (żel agarozowy). Na granicy zetknięcia się **Ag** i **Ab** w obszarach ekwiwalentnych (tzn. o równym stężeniu) pojawiają się łuki bądź też pierścienie.

Metoda pozwala badać kilka układów Ag-Ab.

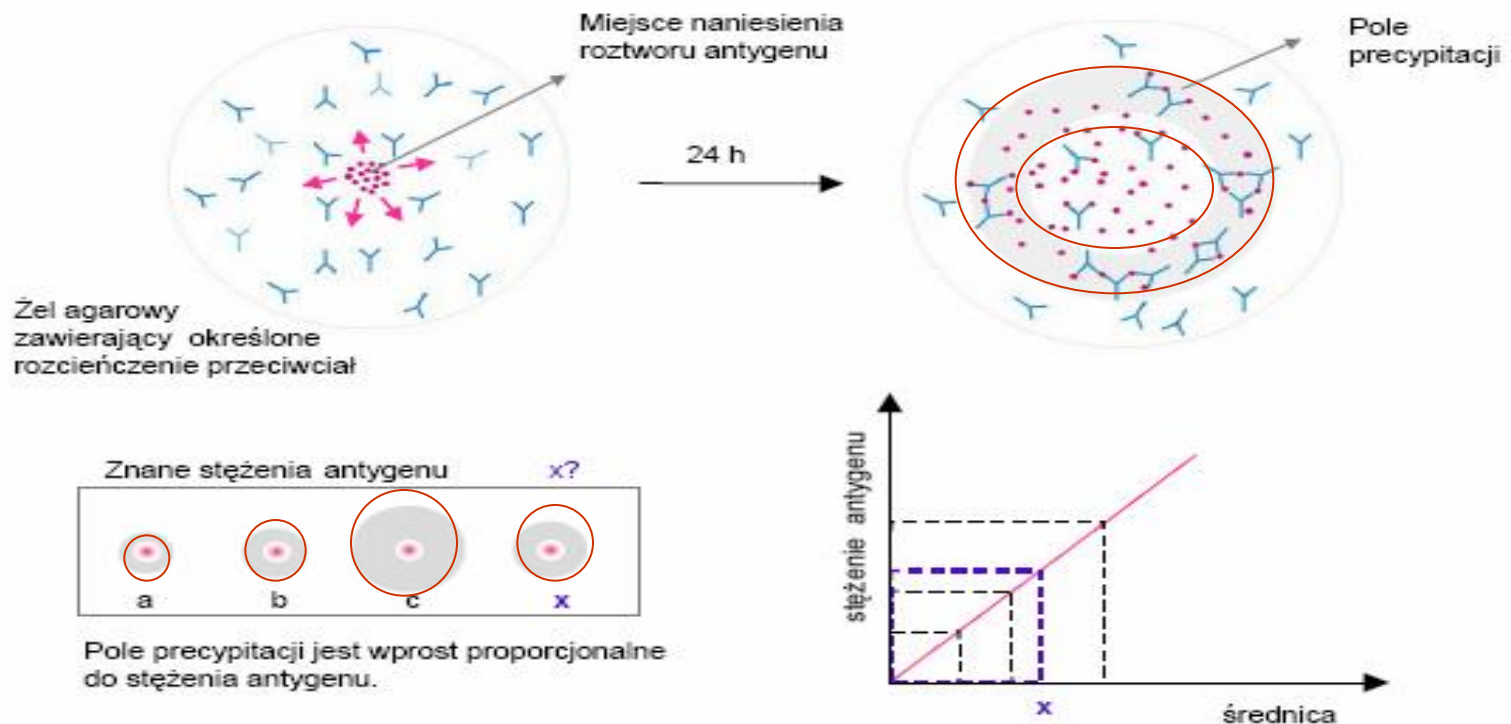
Metoda jakościowego lub ilościowego oznaczania.

Precypitacja w żelu

immunodyszfuzja **radialna** wg Manciniego

Reakcja dyfuzji radialnej wg Manciniego

- służy do ilościowej oceny antygenu
- przeciwciała unieruchomione są w żelu agarowym, antygen dyfunduje

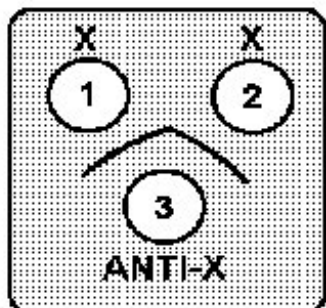
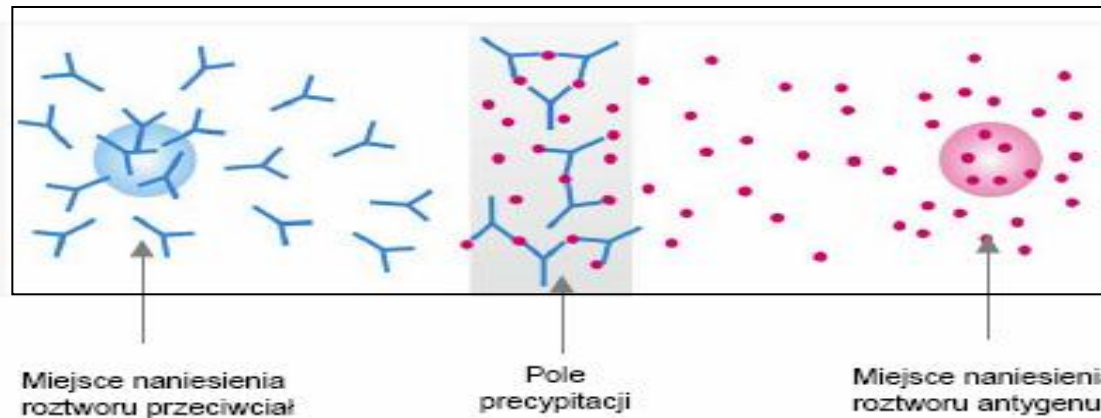


Jest to metoda jakościowo-ilościowa, pozwala rozróżnić reakcję antygenu z różnymi przeciwciałami obecnymi w surowicy.

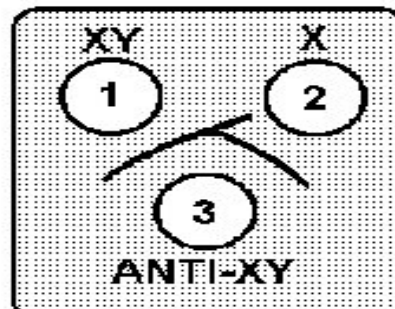
Precypitacja w żelu

podwójna dyfuzja wg Ouchterlony'ego

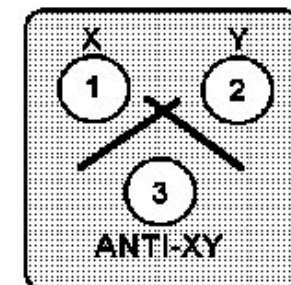
Dyfundują cząsteczki antygeny i przeciwciała



identyczność Ag

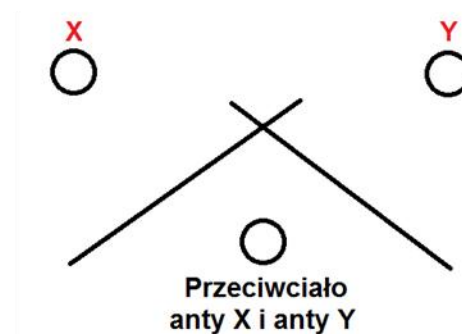
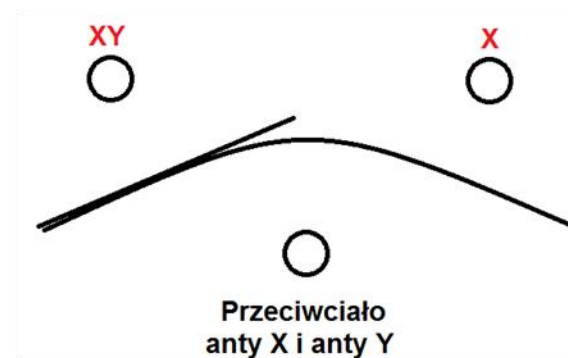
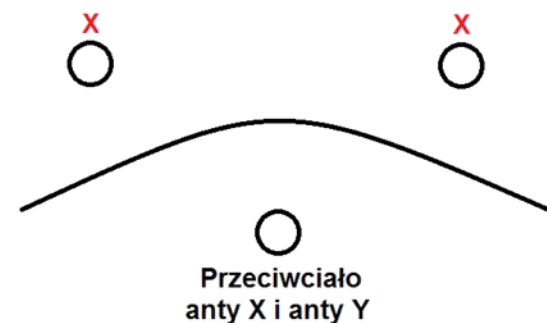
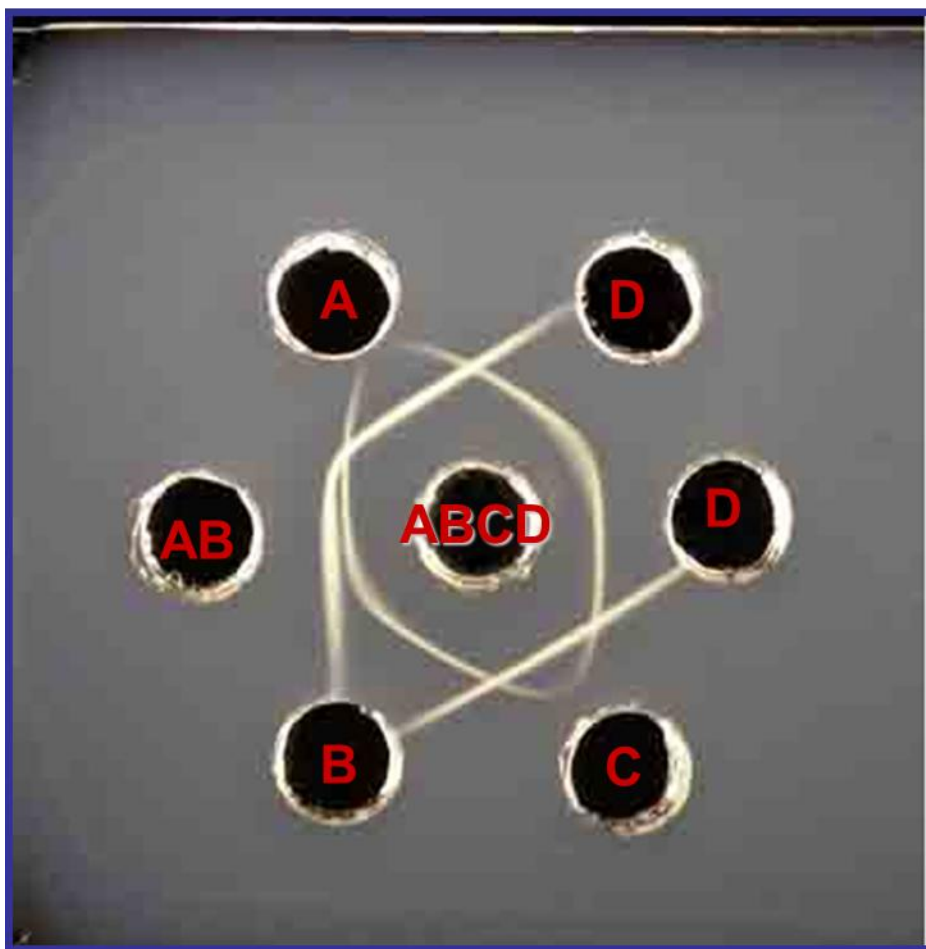


częściowa
identyczność Ag



brak
identyczności Ag

Podwójna immunodyszfuzja płytkowa

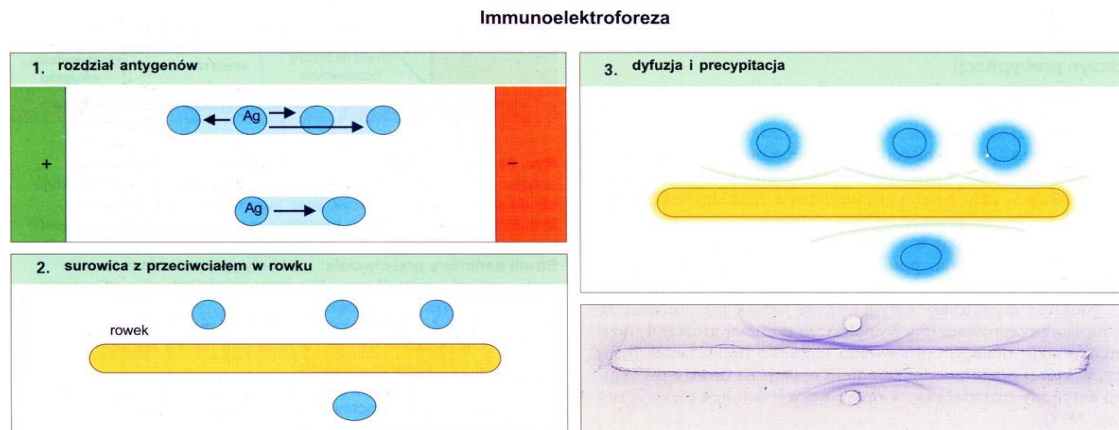


Immunoelektroforeza

Metoda rozdzielu i identyfikacji rozpuszczalnych antygenów – białek w żelu (**połączenie elektroforezy i immunodyszfuzji**).

Test przebiega w 3 etapach:

- rozdział antygenów w żelu pod wpływem pola elektrycznego
 - dodanie do wyciętego w żelu rowka specyficznych przeciwciał
 - w miejscu zetknięcia się antygenu i przeciwciała tworzą się łuki precypitacyjne
- Wyniki porównuje się z testem wzorcowym z użyciem pełnej surowicy zdrowej osoby
- Miejsca w których nie ma łuków precypitacyjnych lub łuki te są znacznie grubsze świadczą o nieodpowiednim stężeniu danego antygenu.



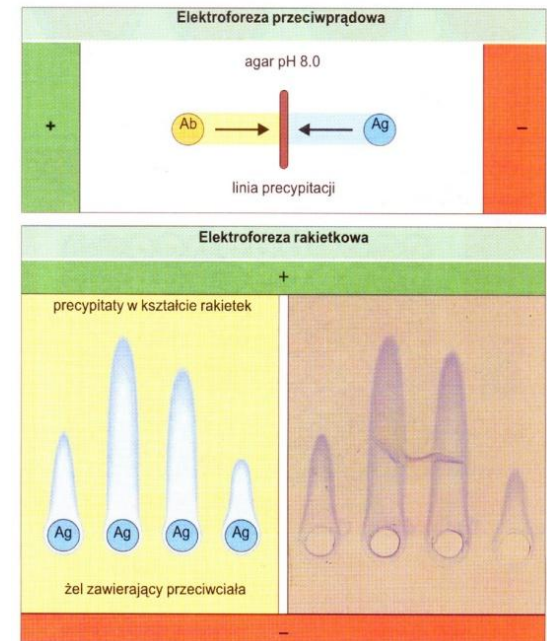
Immunoelektroforeza

Po umieszczeniu żelu w polu elektrycznym tak, aby doprowadzić do równoczesnej wędrówki antygeny i przeciwciała,

immunodyszfuzja staje się **elektroforezą przeciwpądową**,

immunodyszfuzja radialna **elektroforezą rakiękową**.

Elektroforeza przeciwpądowa i rakiękowa



Zastosowanie precypitacji w diagnostyce

<i>Czynnik oceniany</i>	<i>Metoda</i>
Przeciwciała przeciwwądrowe	Podwójna immunodyfuzja
Ilościowa ocena przeciwciał: IgG, IgM, IgD	Immunodyfuzja radialna
Ilościowa ocena białek dopełniacza: C3 i C4	Immunodyfuzja radialna
Antygeny bakteryjne	Immunoelktroforeza przeciwbieżna
Białka monoklonalne (surowica, mocz, płyn mózgowo-rdzeniowy)	Immunoelktroforeza
Czynniki krzepnięcia	Immunoelktroforeza rakietowa

AGLUTYNACJA- wykrywanie reakcji Ag-Ab

Reakcja **zlepiania** aglutynogenów przez swoiste **Ab-** aglutyniny, które rozpoznają **Ag** na ich powierzchni. Wytrącanie osadu

Aglutynogeny naturalne:

erytrocyty, leukocyty,
bakterie, grzyby, pierwotniaki

Aglutynogeny sztuczne:

kulki lateksowe

Hemaglutynacja

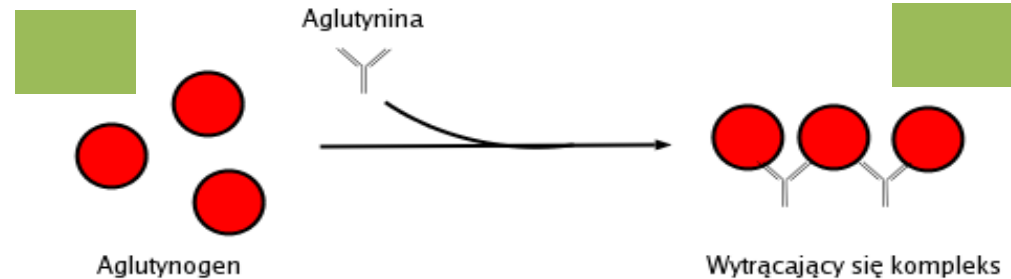
zlepianie krwinek czerwonych na skutek reakcji przeciwciała z antygenem na powierzchni erytrocytów

hemaglutynacja czynna

(bezpośrednia)

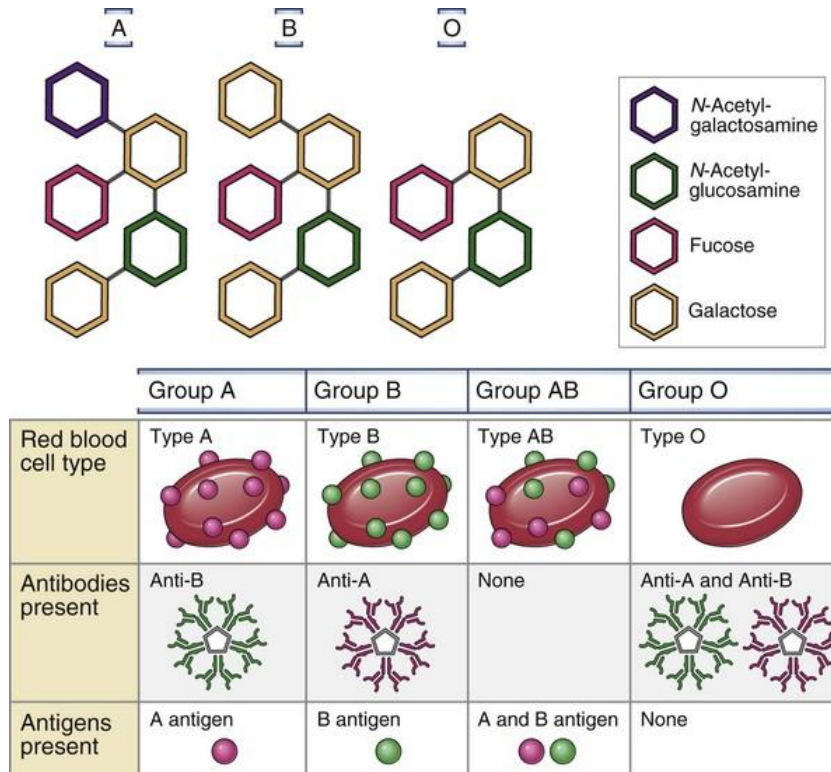
Ag powierzchniowy
erytrocytów

Aglutynina bezpośrednio
zlepia aglutynogen



Antygeny grupowe krwi AB0

Antygeny te znajdują się na erytrocytach, komórkach nabłonkowych, komórkach śródbłónka.



W surowicy występują "naturalnie" przeciwciała skierowane przeciwko antygenom układu AB0 nieobecnym na krwinkach:

- przeciwciała **anty-B** występują u osoby z **grupą krwi A**
- przeciwciała **anty-A** występują u osoby z **grupą krwi B**
- przeciwciała **anty-A** i **anty-B** występują u osoby z **grupą krwi 0**

Test hemaglutynacji

pozwała wykryć przeciwciała skierowane przeciwko antygenom grupowym krwi.

Hemaglutynacja bierna

Pacjent	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	Pos.	Neg.	miano
1													
2													
3													
4													
5													
6													
7													
8													

 Wynik dodatni

 Wynik ujemny

- Wykonuje się szereg rozieńczeń badanej próbki (np. surowicy) i do każdego dodaje się równą ilość antygeny.

-Najwyższe rozcieńczenie, w którym zaszła aglutynacja określa się jako miano przeciwciała.

Test hemaglutynacji

pozwała wykryć przeciwciała skierowane przeciwko antygenom grupowym krwi.

Hemaglutynacja bierna

Pacjent	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	Pos.	Neg.	miano
1													64
2													8
3													512
4													<2
5													32
6													128
7													32
8													4

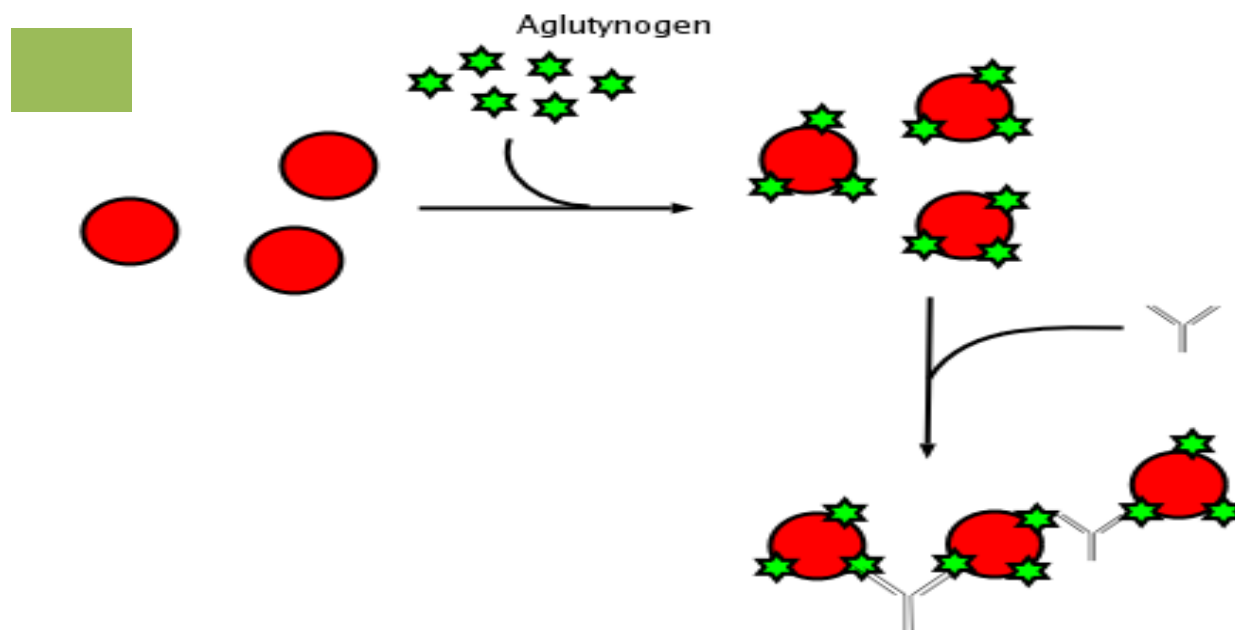
 Wynik dodatni  Wynik ujemny

- Wykonuje się szereg rozieńczeń badanej próbki (np. surowicy) i do każdego dodaje się równą ilość antygeny.

-Najwyższe rozcieńczenie, w którym zaszła aglutynacja określa się jako miano przeciwciała.

Hemaglutynacja bierna (pośrednia)

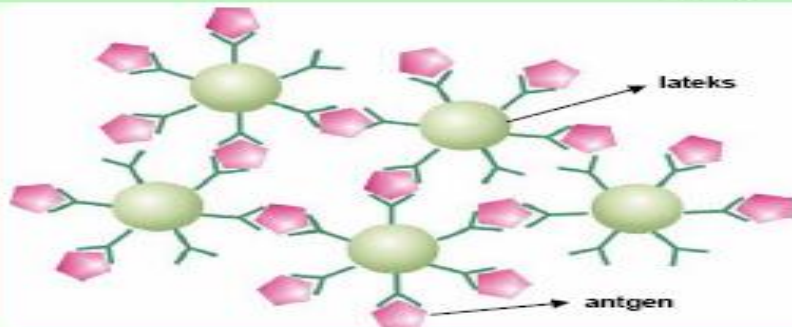
Ag osadza się na powierzchni erytrocytów, po dodaniu **Ab** zachodzi aglutynacja



AGLUTYNACJA KULECZEK LATEKSOWYCH

Komercyjne testy aglutynacji wykorzystują kuleczki lateksu opłaszczone antygenem lub przeciwciałami.

Test aglutynacji bezpośredniej



Wykrywa w surowicy/ płwocinie/ wymazie pacjenta obecność antygenu.

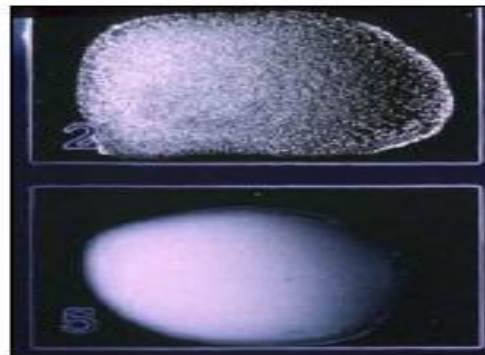
Kuleczki opłaszczone są przeciwciałami swoistymi wobec wykrywanego antygenu.

Wynik pozytywny: aglutynacja

Wynik negatywny: brak antygenu = brak aglutynacji

Wykrywanie czynnika reumatoidalnego w surowicy pacjenta z podejrzeniem reumatoidalnego zapalenia stawów

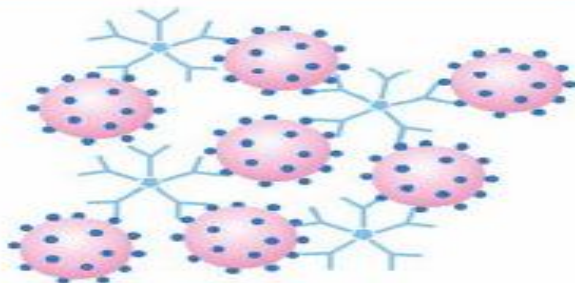
Kuleczki lateksu opłaszczone są przeciwciałami IgG skierowanymi przeciw czynnikowi reumatoidalnemu.



aglutynacja

brak aglutynacji

Test aglutynacji pośredniej



Wykrywa w surowicy/ płwocinie/ wymazie pacjenta obecność swoistych przeciwciał.

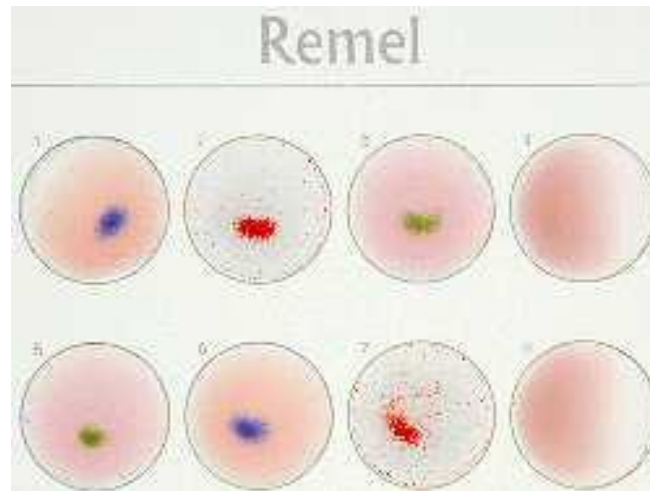
Kuleczki opłaszczone są określonym antygenem.

Wynik pozytywny: aglutynacja

Wynik negatywny: brak swoistych przeciwciał = brak aglutynacji

BAKTERIE

- IDENTYFIKACJA PRZY ZAKARZENIACH LUB TAKSONOMICZNA
- LAT latex agglutination test



***Salmonella* serogroups A, B, C, D, E, and G,**

Zastosowanie aglutynacji w diagnostyce

<i>Test</i>	<i>Cząsteczki aglutynowane</i>
Zimne aglutyniny (pierwotne zapalenie płuc)	Ludzkie krwinki czerwone grupy 0
Mononukleozą zakaźną	Erytrocyty barana
Aglutyniny przeciwbakteryjne	Bakterie
Czynnik reumatoidalny	Cząsteczki lateksu opłaszczane IgG
Różyczka	Taninowane krwinki czerwone opłaszczane antygenem wirusa
Tyreoglobulina	Erytrocyty opłaszczane tyreoglobuliną

Techniki immunochemiczne

Zastosowaniem **znaczników** (markerów)
do „wyznakowania” jednego ze składników reakcji
Ab-Ag

Zastosowanie technik immunochemicznych

- Identyfikacja populacji komórek
- Produkcja przeciwciał monoklonalnych
- Identyfikacja bakterii i innych mikroorganizmów
- Analiza funkcji badanych komórek (np..cytokiny inne białka).....

Techniki immunochemiczne- diagnostyka

- Diagnostyka wirusów
- Diagnostyka markerów nowotworowych
- Diagnostyka chorób autoimmunizacyjnych
- Diagnostyka hormonów
- Diagnostyka ciąży i płodności
- Diagnostyka uszkodzeń mięśnia sercowego
- Diagnostyka niedokrwistości
- Diagnostyka chorób wrodzonych i metabolicznych
- Toksykologia
- Transplantologia

Podział technik immunochemicznych

- **Immunoenzymatyczne** (znacznikami są enzymy)
- **Radioimmunologiczne** (znacznikami są izotopy)
- **Fluorescencyjne** (znacznikami są fluorochromy)
- **Chemiluminescencyjne** (znacznikami są określone substancje organiczne)

Techniki immunoenzymatyczne

(znacznikami są enzymy)

- wykrywanie **aktywności enzymu** związanego z jednym z reagentów (Ag lub Ab)
- Produkt reakcji przeprowadzanej przez ten enzym jest **barwny**
- Pomiar produktu barwnego metodami **spektrofotometrycznymi**
- Testy do oznaczeń ilościowych

**Techniki immunoenzymatyczne można
przeprowadzić w fazie**

płynnej - homogenne

stałej - heterogenne.

Test ELISA

Jest jednym z najczęściej stosowanych do wykrywania obecności antygenów lub przeciwciał.

Dzięki automatyzacji jest szybki i może być wykorzystywany w badaniach masowych.

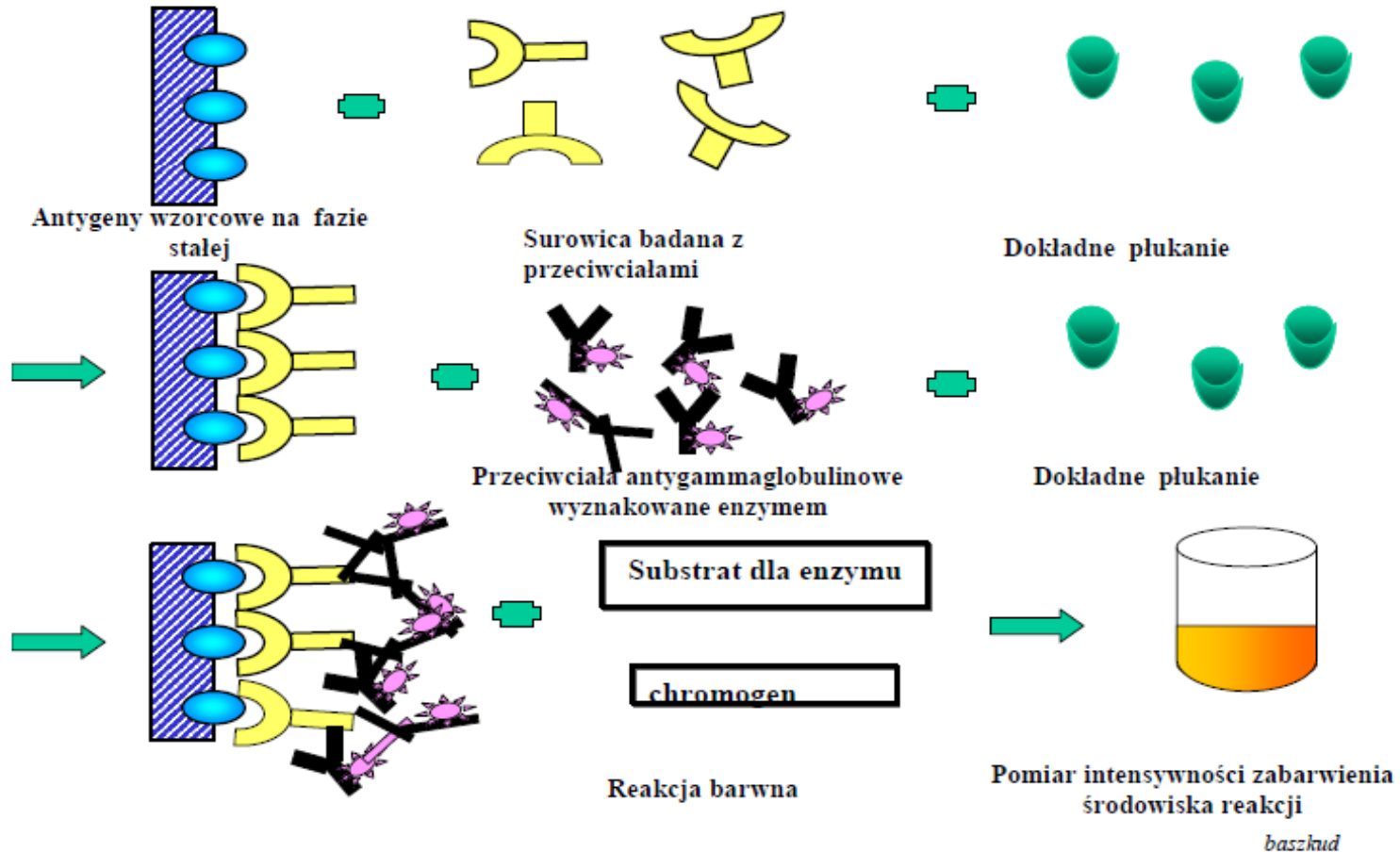
Test wykonuje się na gotowych mikropłytkach.

Wynik ocenia się na podstawie barwy roztworu spektrofotometrycznie.

Natężenie zabarwienia jest wprost proporcjonalne do ilości oznaczanego przeciwciała

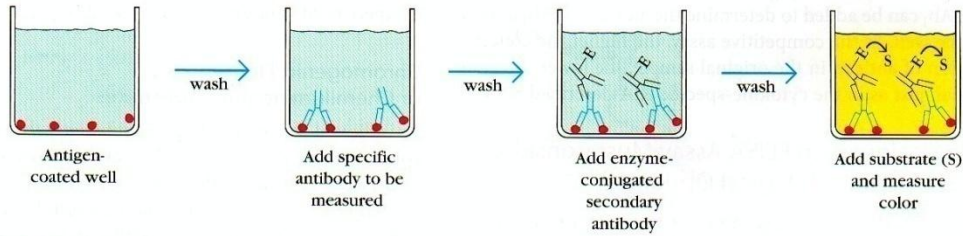


Test immunoenzymatyczny typu ELISA

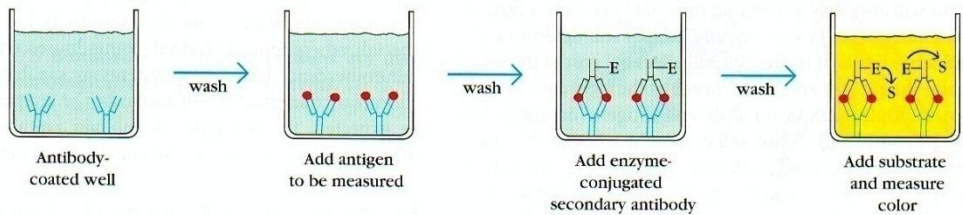


Test ELISA

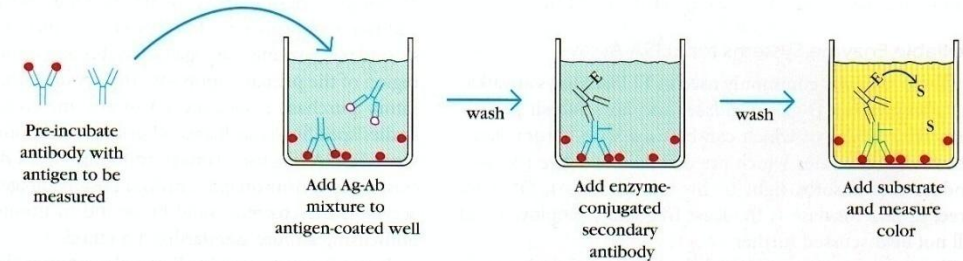
(a) Indirect ELISA



(b) Sandwich ELISA



(c) Competitive ELISA



Test kanapkowy (Sandwich ELISA)- antygen związany jest pomiędzy dwoma przeciwciałami: chwytającym, zaadsorbowanym na dnie płytki, i detekcyjnym, połączonym z enzymem.

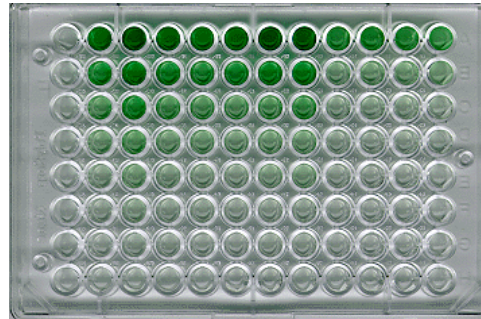
Test kompetycyjny- badany antygen konkuruje ze znakowanym antygenem o związanie się z przeciwciałem unieruchomionym na płytce, zmniejszając intensywność sygnału proporcjonalnie do ilości antygenu w badanej próbce.

Test ELISA

Analiza odbywa się przy użyciu spektrofotometru.

Im więcej było antygenu w badanej próbce tym więcej barwnego substratu i tym większa będzie jego gęstość optyczna (optical density).

Krzywa wzorcowa.



Najczęściej stosowane enzymy:

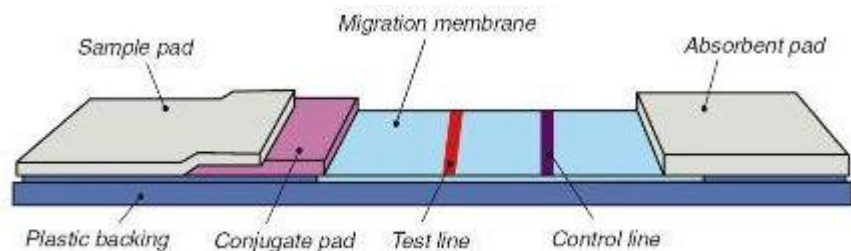
- fosfataza alkaliczna
- peroksydaza chrzanowa
- oksydaza glukozowa

Najczęściej stosowane substraty:

- fosforan p-nitrofenolu
- tetrametylobenzydyna
- kwas 5-aminosalicylowy.

ELISA – Test ciążowy

Wykrywana jest **gonadotropina kosmówkowa**, obecna w moczu ciężarnej kobiety już kilka dni po zapłodnieniu.



e-biotechnologia.pl

Kropla badanej substancji najpierw przemieszcza się wzdłuż błony nitrocelulozowej.

W teście umiejscowione są specyficzne przeciwciała, najczęściej w kompleksie ze złotem koloidalnym.

Po wchłonięciu próby przez membranę, antygen (jeśli próba okaże się pozytywna) wiąże się z kompleksem koloidalnego złota i odpowiednich przeciwciał.

Efektem tej reakcji jest uformowanie się kompleksu, który zostaje wykryty przez test.

Zalety testu **ELISA**

- Bardzo wysoka czułość
- Możliwość ilościowej oceny przeciwciał/antygenów
- Możliwość standaryzacji metody
- Trwałość i stabilność wyznakowanych reagentów przez wiele miesięcy

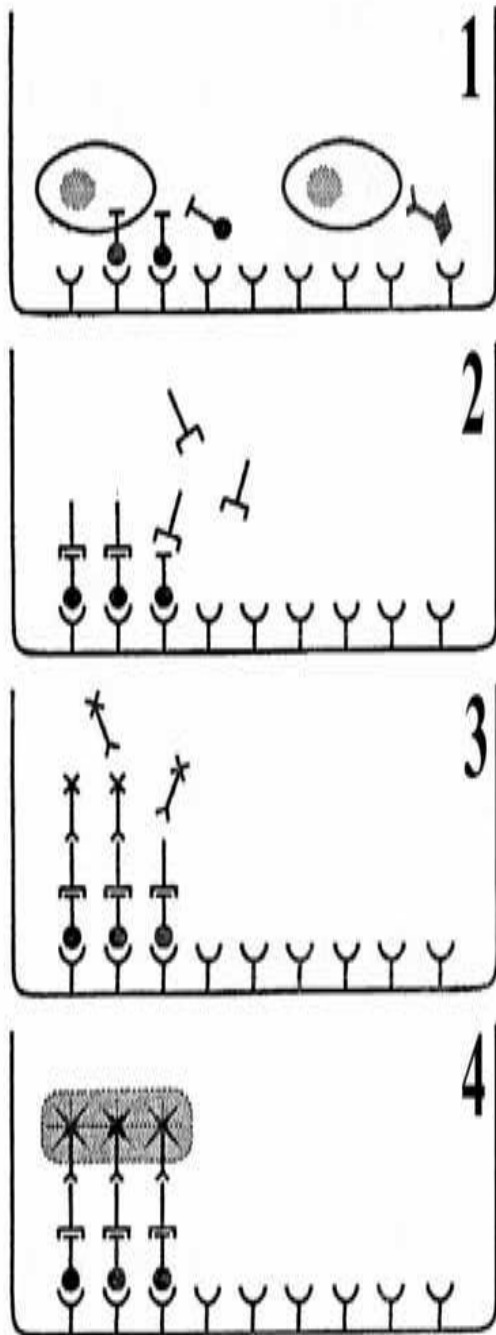
ELISPOT

(*Enzyme-Linked ImmunoSPOT assay*)

synonimy *ELISA Spot*.

jest połączeniem techniki immunoenzymatycznej fazy stałej
ELISA z krótkoterminową hodowlą komórkową
(od kilku godzin do kilku dni).

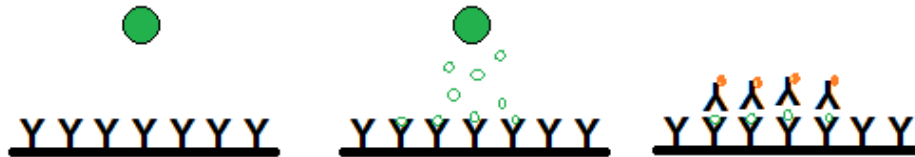
ELISPOT



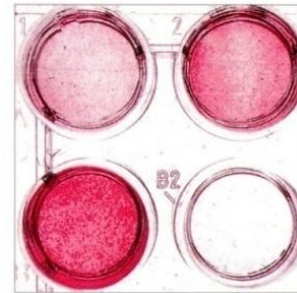
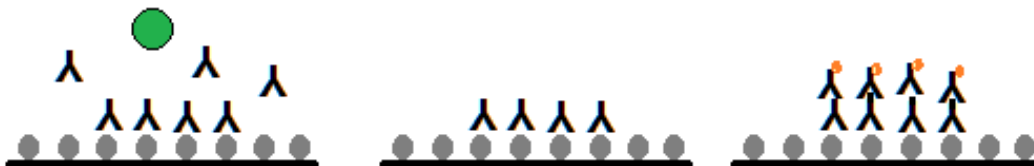
- Komórki inkubuje się w płytkach, których dno zostało opłaszczone **Ab** wiążącymi. Przeciwciała te są swoiste wobec interesującego nas białka, np. **określonej cytokiny, przeciwciała, markera błonowego, receptora** itd.
- W miejscu reakcji immunoenzymatycznej powstaje **plamka barwna - "spot"**. Przyjmuje się, że **każdy spot** jest **śladem jednej komórki** wydzielającej badane białko.

ELISPOT

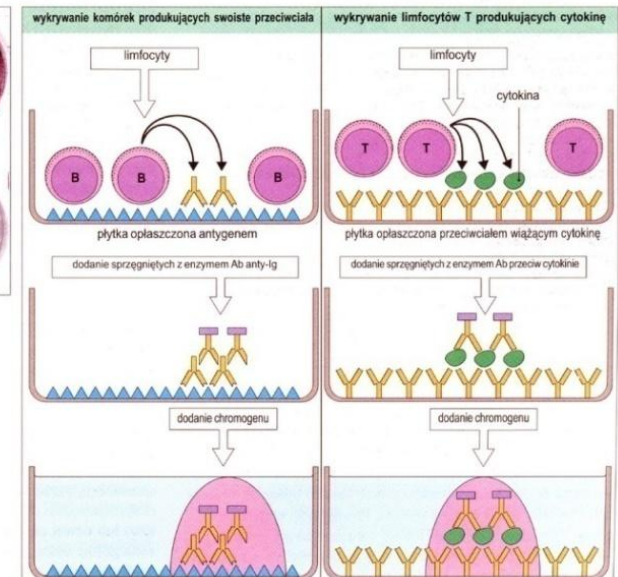
Wykrywanie cytokin i innych, wydzielanych przez komórki białek.



Wykrywanie przeciwciał produkowanych przez pojedynczy klon limfocytów B.



Metody ELISPOT



Porównywana cecha	ELISA	ELISPOT
Wynik badania:	Stężenie danej cytokiny wydzielonej przez wszystkie komórki w hodowli (np. pg/ml nadsączu)	Liczba komórek wydzielających daną cytokinę (np. n/1 mln komórek)
Zasada detekcji białka:	Reakcja immunoenzymatyczna	Reakcja immunoenzymatyczna
Przeciwciała pierwotne:	Oplaszczane w dodatkowej płytce sorbcyjnej po zakończeniu hodowli	Oplaszczane w płytce hodowlanej przed rozpoczęciem hodowli
Przeciwciała wtórne:	Dodawane do dodatkowej płytki sorbcyjnej po zakończeniu hodowli	Dodawane do płytki hodowlanej po zakończeniu hodowli
Wykonanie detekcji i reakcji barwnej:	W nadsączu z hodowli w osobnej płytce sorbcyjnej	Bezpośrednio w płytce hodowlanej
Faza ostatecznego pomiaru:	Faza płynna	Faza sucha
Uzyskanie wyniku ilościowego:	Pomiar ekstynkcji w reakcji barwnej i wyliczenie stężenia z krzywej kalibracyjnej	Komputerowa analiza obrazu (1 plamka = 1 komórka)
Możliwość przesyłania płytki do analizy poza laboratorium:	Nie	Tak
Okres, w którym jest możliwa powtórna analiza:	15-30 minut	Tygodnie - miesiące

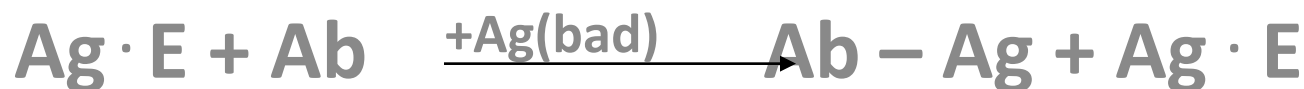
Technika **EMIT**

(enzyme multiplied immunoassay technique)

- Wykorzystuje możliwość zmiany aktywności enzymu poprzez blokowanie miejsca aktywnego dla substratu lub poprzez zmianę konformacji cząsteczki
- Prosta w wykonaniu, poddaje się łatwo automatyzacji

Identyfikacja w moczu, krwi stężenia leków, hormonów, narkotyków.

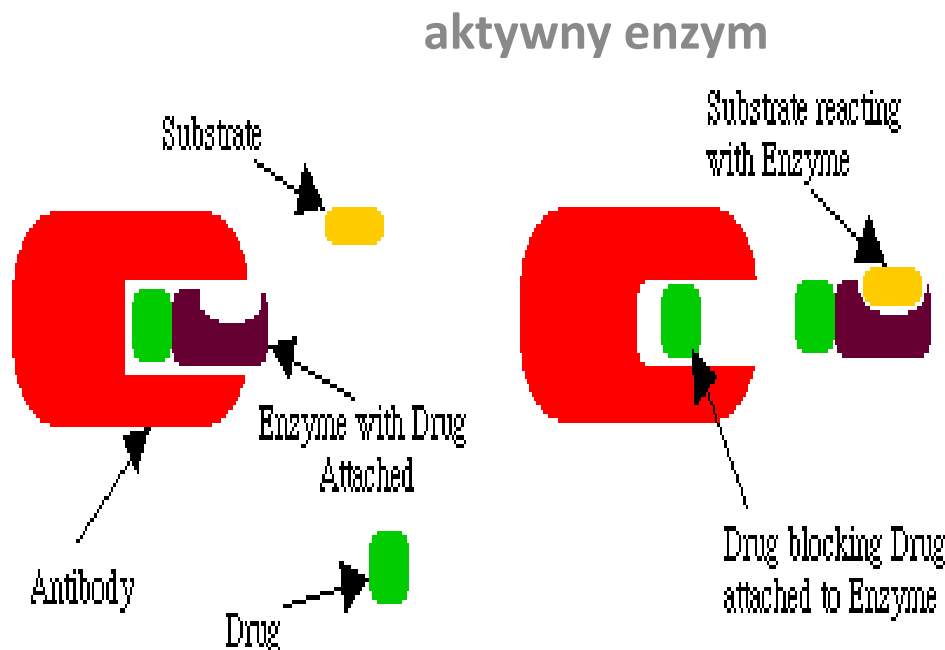
Schemat oznaczenia **EMIT**



Bez Ag

Ab – Ag · E

nieaktywny enzym

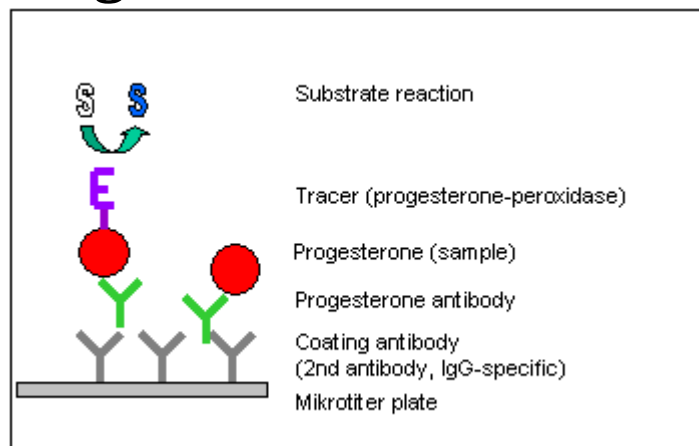


Współzawodnictwo o miejsce wiązania przeciwciał pomiędzy substancją w próbce a substancją oznakowaną enzymem.

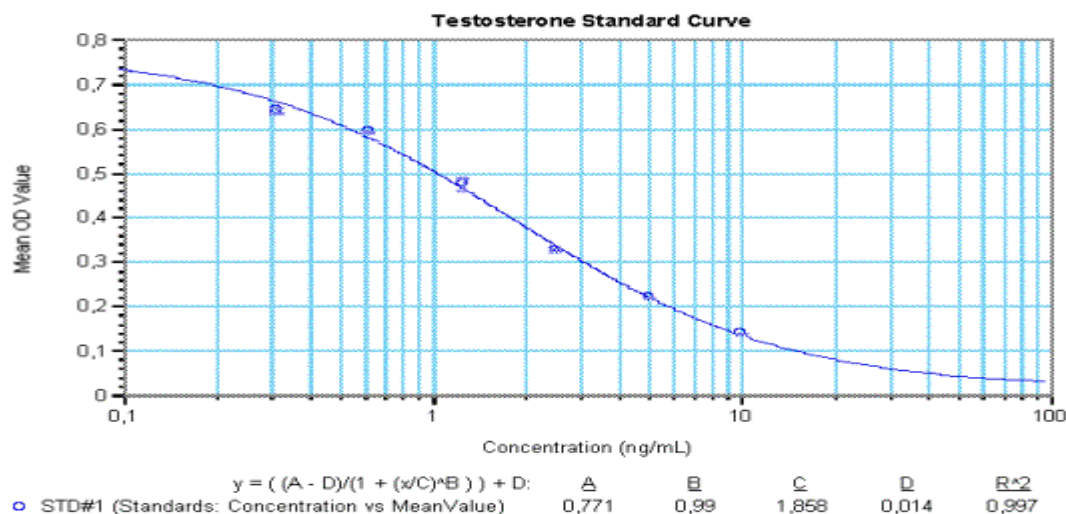
Aktywność enzymu obniża się w wyniku wiązania z przeciwciałem, tak więc stężenie leku w próbce można określić, mierząc aktywność enzymu.

Z surowicy krwi

Progesteron, testosteron



Im mniejsze świecenie tym większe stężenie



Testy immunoenzymatyczne w diagnostyce laboratoryjnej

Najczęściej oznaczane **markery nowotworowe**

- AFP (alfa- fetoproteina) - rak wątroby
- CEA (antygen karcinoembrionalny) - nowotwory przewodu pokarmowego
- PSA (antygen specyficzny gruczołu krokowego) - rak prostaty
- CA 125 (antygen nowotworowy 125)
- Tyreoglobulina, kalcytonina - markery w nowotworach tarczycy
- TPA
- CA 19-9 (antygen towarzyszący nowotworom przewodu pokarmowego)

Przeciwciała charakterystyczne dla autoimmunizacyjnych chorób wątroby

- **Anty-M2**
- **ANA**
- **LKM-1**
- **Anty-Sp100**
- **Anty-gp210**
- **Anty- LBR**
- **Anty-SLA/LP**
- **LC-1**

Diagnostyka celiakii

Czułość i swoistość: Anty-Gliadyna, Anty-tTG

ELISA	czułość	swoistość
Anty-Gliadyna (IgA)	68.6%	90.7%
Anty-Gliadyna (IgG)	91.2%	78.7%
Anty-Gliadyna (GAF) (IgA)	83.2%	96.0%
Anty-Gliadyna (GAF) (IgG)	85.4%	98.7%
Anty-tTG (IgA)	97.8%	96.0%
Anty-tTG (IgG)	32.1%	100%

137 próbek do pacjentów z celiakią potwierdzoną biopsją jelita
75 potwierdzone biopsją próbki kontrolne

Techniki radioimmunologiczne

Techniki immunochemiczne, wykrywające reakcję **Ag** ze swoistym dla niego **Ab** w oparciu o **pomiar radioaktywności izotopu**, którym wyznakowany jest jeden ze składników reakcji (**Ag** lub **Ab**).

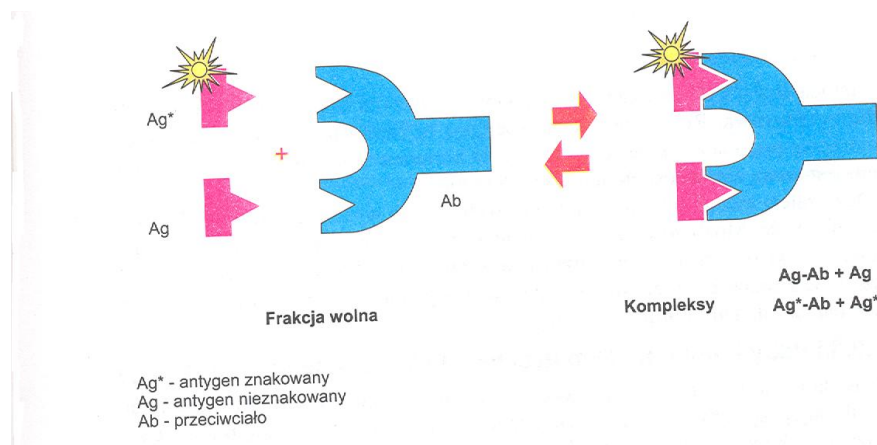
Służą do oznaczeń ilościowych, charakteryzują się wysoką czułością i specyficznością. RIA stosowane są do oznaczania stężenia hormonów, antygenów nowotworowych (np. CEA czy AFP), autoprzeciwciał, leków czy witamin.

Ze względu na przebieg reakcji immunologicznej metody radioizotopowe podzielono na dwie grupy:

- kompetycyjne
- niekompetycyjne

Test RIA – (*Radio Immuno Assay*)

Do układu zawierającego oznaczaną substancję (A - antygen) dodaje się przeciwciało (P) i pewną (znaną) ilość tej substancji znakowanej izotopem (A*).



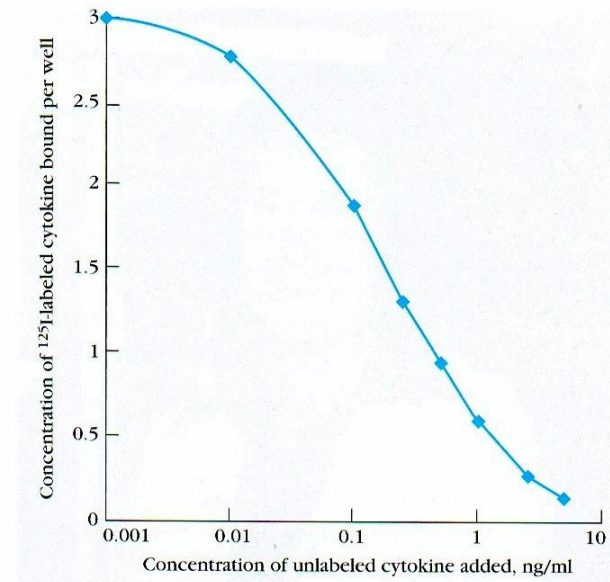
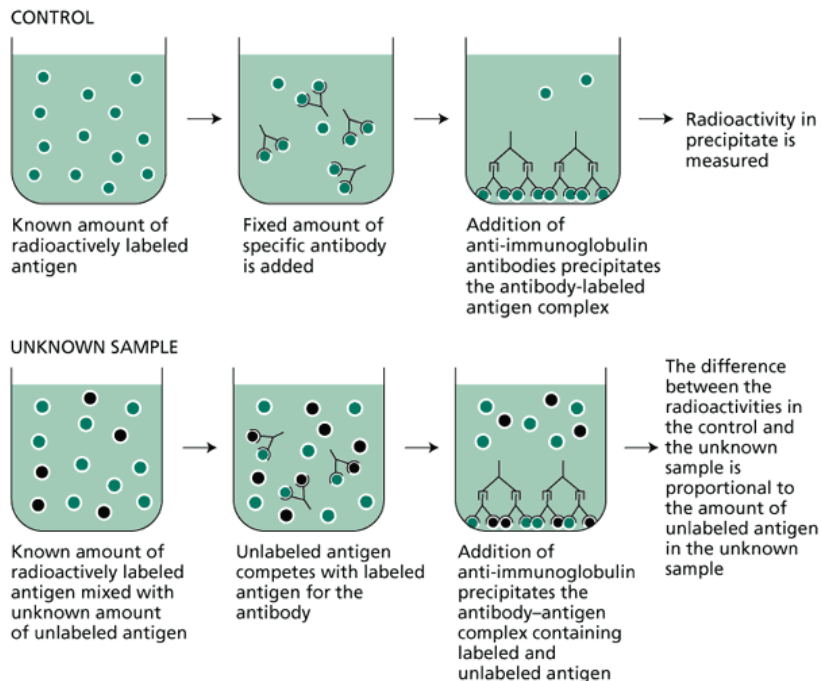
Reakcję zachodzącą w tym układzie można zapisać następująco:



W oznaczaniu ilości antygeny w próbce wykorzystuje się fakt, że dzięki nadmiarowi antygeny w stosunku do przeciwciała stosunek ilości kompleksów z antygenem znakowanym (A*P) do ilości kompleksów z antygenem nieznakowanym (AP) będzie taki sam jak stosunek ilości antygeny znakowanego (A*) do ilości antygeny nieznakowanego (A).

Test RIA – (*Radio Immuno Assay*)

Mierząc aktywność kompleksów A*P wyseparowanych z próbki i znając ilość dodanego przeciwciała (P) i antygeny znakowanego (A*) obliczyć można zawartość antygeny nieznakowanego w próbce (A).



Technika IRMA – (*Immunoradiometric assay*)

Występują tu w nadmiarze dwa przeciwciała, z których jedno jest znakowane radioizotopem (P^*) a drugie, skierowane przeciwko innej determinancie antygenowej badanej substancji (A), jest przytwierdzone do wewnętrznej powierzchni probówki i służy do separacji.

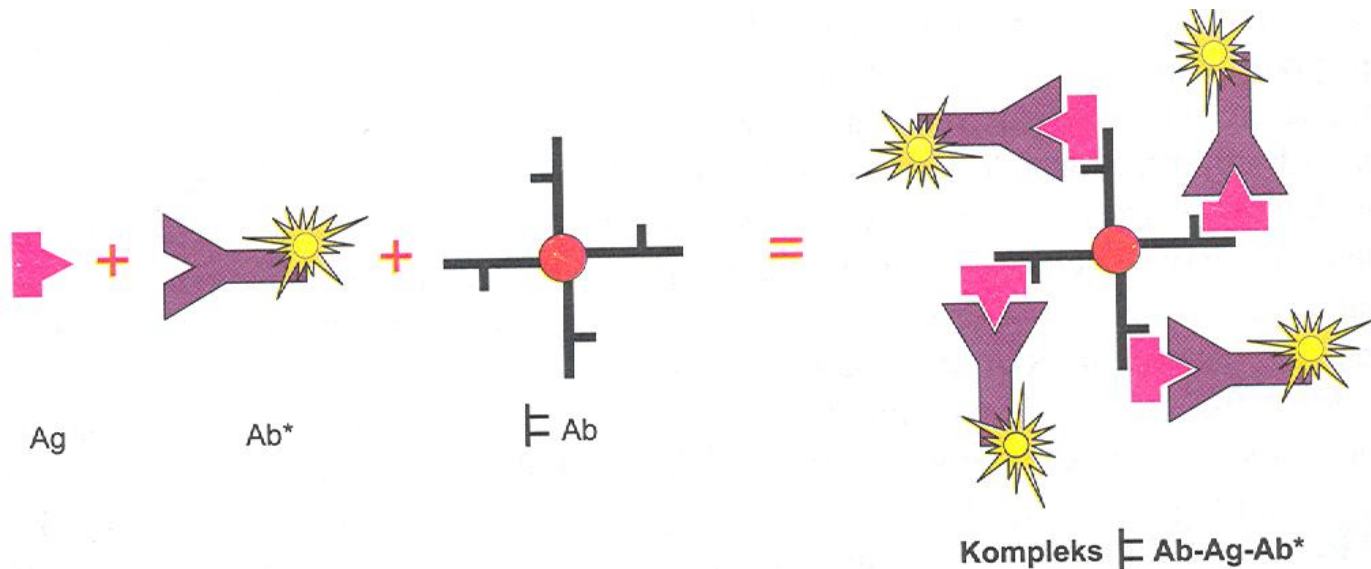
Reakcja immunologiczna przebiega następująco:



Wprowadzenie do probówki zawierającej przeciwciało przytwierdzone na ściankach, antygeny i przeciwciała znakowanego (P^*), powoduje powstawanie kompleksów przeciwciało-antygen-przeciwciało ($P_{\text{związane}}AP^*$) o charakterze tzw. kanapki. Dzięki nadmiarowi przeciwciał praktycznie cały antygen zostaje związany z przeciwciałami, natomiast nie związana część przeciwciała znakowanego jest następnie wypłukiwana a radioaktywność, która została w probówce pochodząca od kompleksów przeciwciało-antygen-przeciwciało jest miarą ilości antygeny związanego w próbówce.

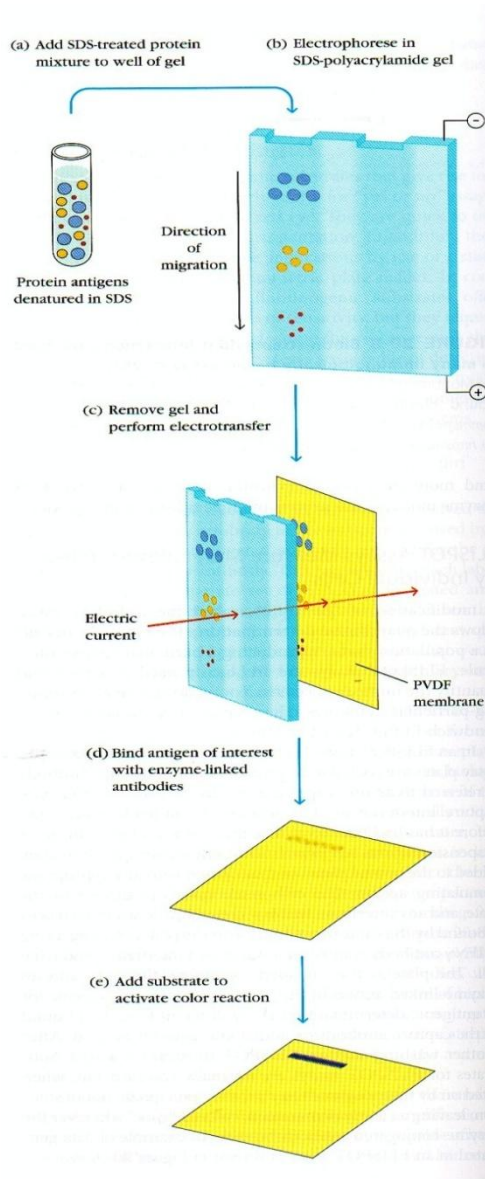
Schemat oznaczenia IRMA

niekompetycyjne - w których w nadmiarze występują dwa przeciwciała, metody IRMA, czyli immunoradiometryczne



Ag – antygen
Ab* – przeciwciało znakowane
⊢ Ab – przeciwciało związane z fazą stałą

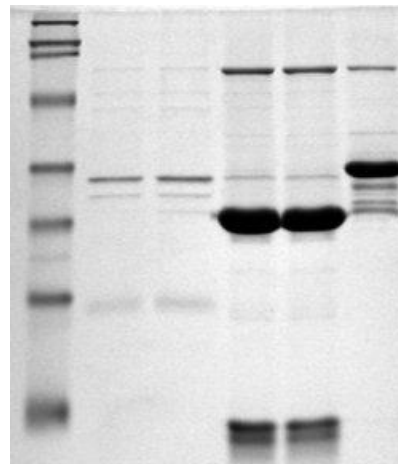
Immunoblotting- *Western Blotting*



Metoda *Western blotting* pozwala na wykrywanie określonych białek w homogenatach tkankowych lub ekstraktach białkowych.

Obejmuje **elektroforetyczny rozdział białek** w żelu poliakrylamidowym oraz ich **przeniesienie (odciśnięcie-blotting)** na specjalną błonę (np. nitrocelulozową).

Poszczególne antygeny mogą być następnie identyfikowane za pomocą **znakowanych swoistych przeciwciał**, reakcja wywoływana jest najczęściej luminescencyjnie.



Metoda *Western blotting* jest stosowana w diagnostyce

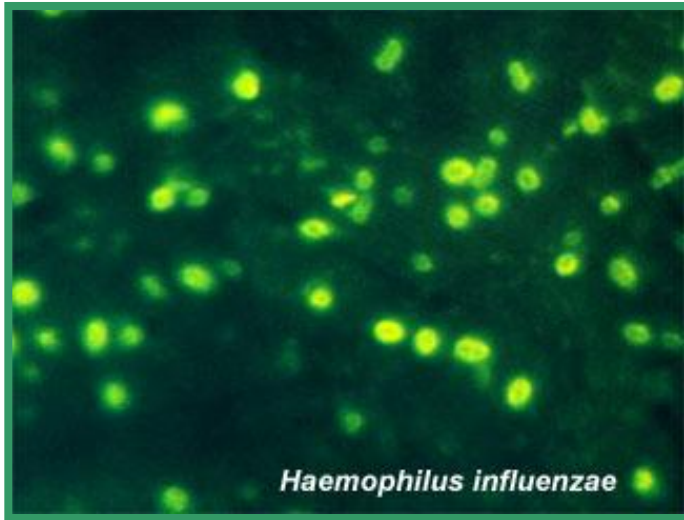
infekcji bakteryjnych (np. borelioza, prądki gruźlicy) oraz

zakażeniach wirusowych (HIV, wirus opryszczki, EBV i inne).

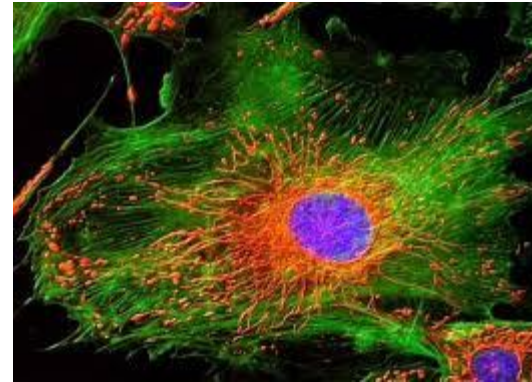
Metody immunofluorescencyjne

Technika ta wprowadzona ponad 40 lat temu wciąż pozostaje standardową techniką immunologiczną „gold standard technique” szeroko stosowaną w wielu laboratoriach na świecie, charakteryzującą się wysoką czułością i swoistością.

Immunofluorescencja

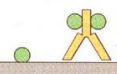
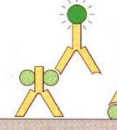


<http://embryology.med.unsw.edu.au/Defect/images/Haemophilus-influenzae.jpg>



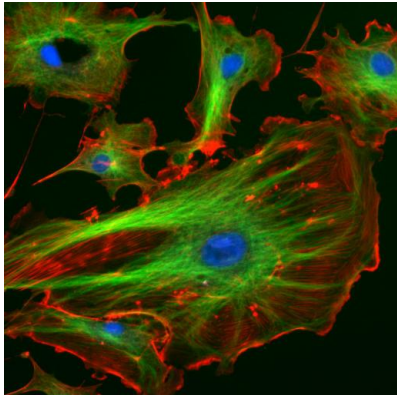
Haupt BJ et al., *Scientific World Journal* 2006,15:1609

Immunofluorescencja bezpośrednia i pośrednia

bezpośrednia	pośrednia	pośrednia wzmocniona udziałem dopełniacza
Ab znakowane FITC	przeciwciało (Ab)	przeciwciało (Ab)
		
plukanie	plukanie	plukanie
	dodanie anti-Ig FITC	dodanie dopełniacza
		
	plukanie	plukanie
		dodanie anti-C3 FITC
		
		plukanie

Immunocytochemia

Technika pozwala na wykrycie konkretnego antygenu znajdującego się w komórce przy użyciu odpowiednich przeciwciał.



Haupt BJ et al., *Scientific World Journal* 2006,15:1609



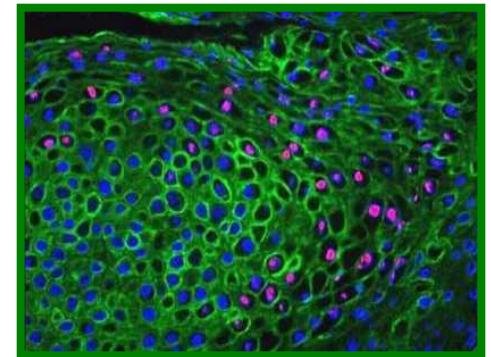
http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/55/Fluorescence_microscop.jpg

Immunohistochemia

Technikę wykorzystuje się do lokalizowania określonych antygenów w obrębie tkanki przy użyciu odpowiednich przeciwciał.

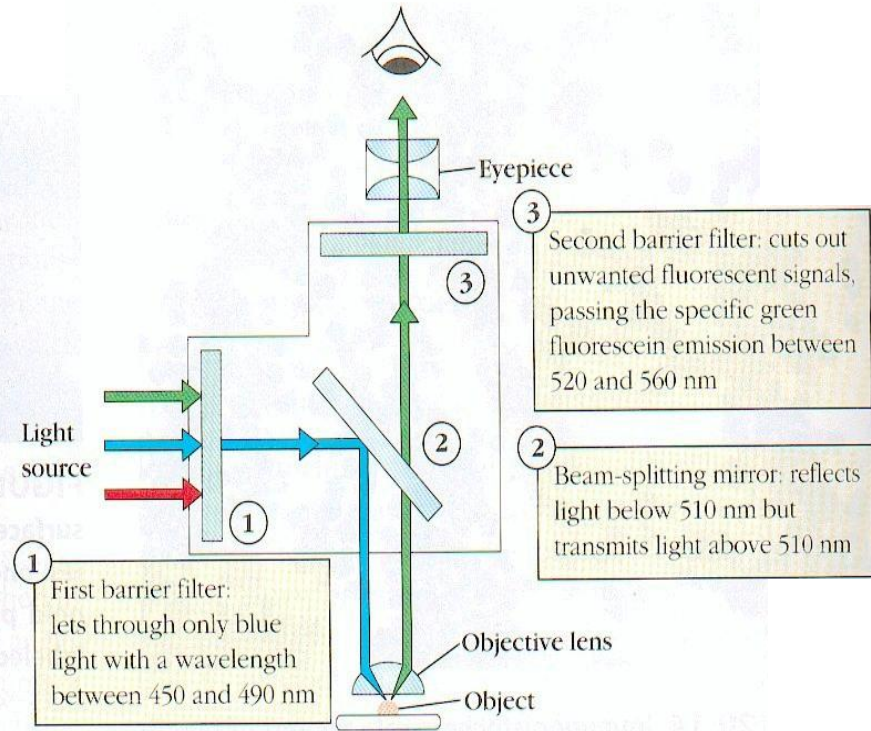
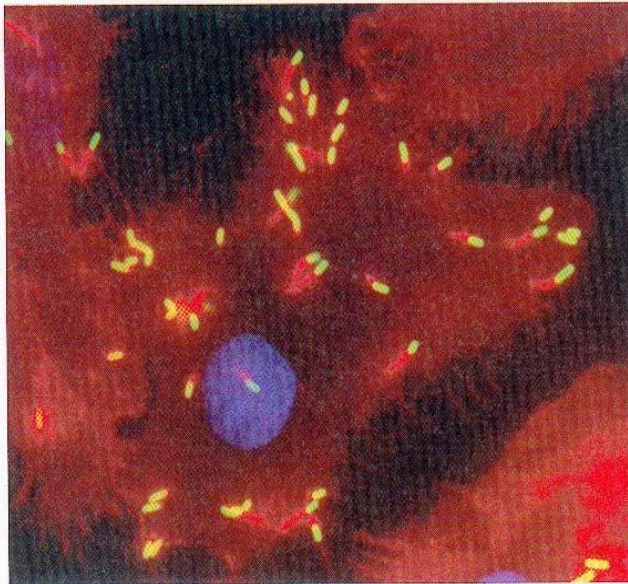
Wybór odpowiedniej techniki przygotowania preparatu zależy od:

- badanego antygenu,
- sposobu wykrywania oraz
- docelowej metody wizualizacji wyniku.



<http://www.immunoportal.com/>

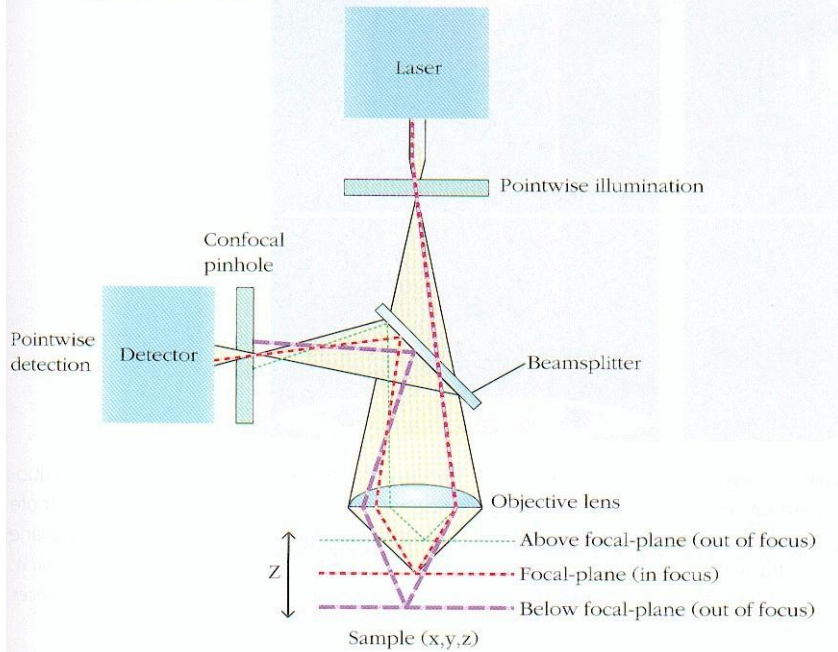
Ocena komórek w mikroskopie fluorescencyjnym



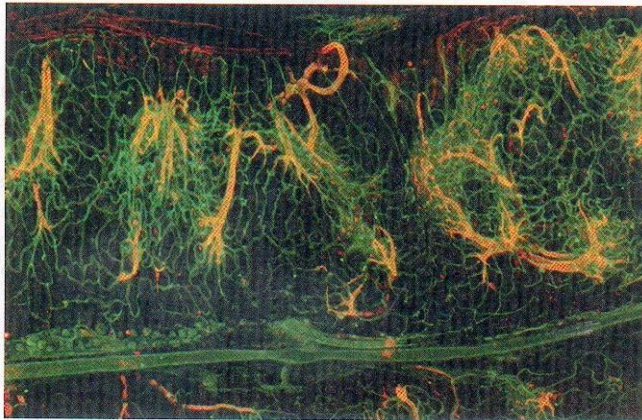
Komórki dendrytyczne człowieka (DC) zakażone bakterią *Listeria monocytogenes*.

Ocena komórek w mikroskopie konfokalnym

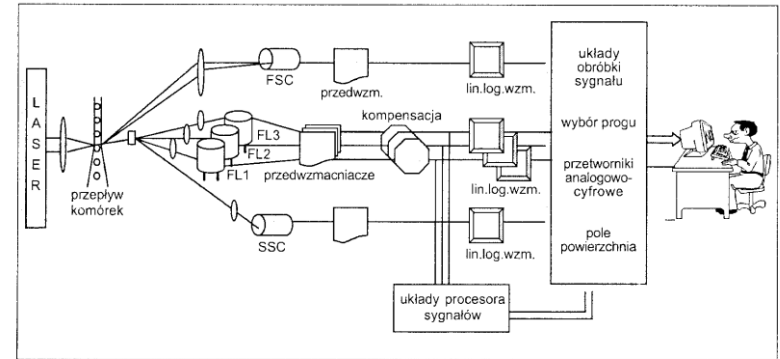
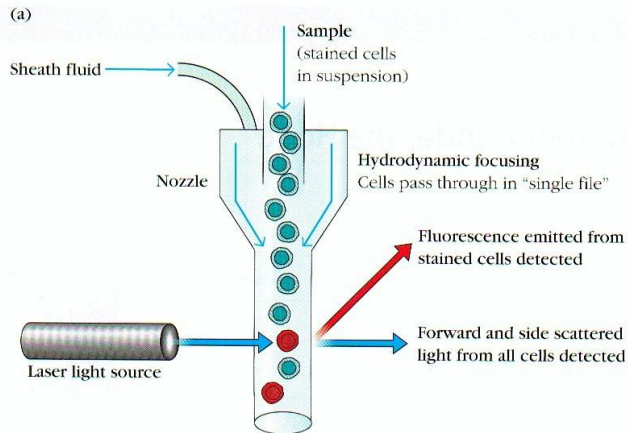
(a) Principal of confocal microscopy



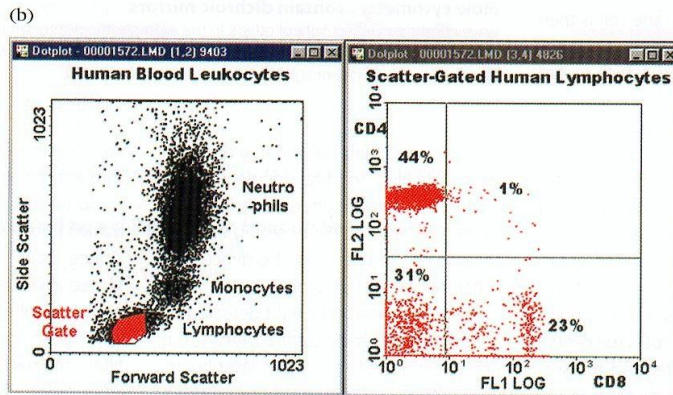
(b)



Cytometria przepływowa



Rycina 43.1 Schemat drogi sygnału w cytometrze przepływowym od lasera poprzez detektory, wzmacniacze, układy logiczne do komputera (wg dr J.Kantorskiego)



Pathway 885 Bioimager



System do cytometrii komórkowej przeznaczony do automatycznego, trójwymiarowego, przyżyciowego obrazowania komórek w czasie rzeczywistym oraz analizy utrwalonych preparatów tkankowych i komórkowych.

Aparat wyposażony w komorę z aktywnie regulowaną temperaturą i stężeniem CO² oraz robota umożliwiającego podawanie odczynników w trakcie eksperymentu bez konieczności otwierania komory inkubacyjnej.

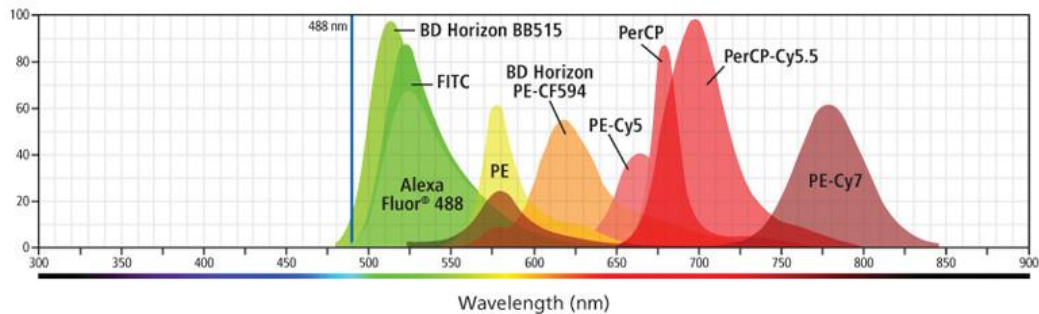
Obiektywy: 10x, 20x, 40x, 60x(oil)

Dwie lampy metalohalogenkowe emitujące światło w zakresie 340-750nm oraz

Filtry wzbudzenia: 470/40, 2×488/10, 555/28, 340, 380/1, OND, 360/10, 440/10, 335, 548/20, 460/10, 560/55, 635/20

Detekcja fluorescencji: FURA/FITC, FURA/TRITC, 435LP, 84101, 515LP, 570LP, 645/75

Cytometria przepływowa



Becton Dickinson

Najczęściej stosowane w diagnostyce fluorochromy

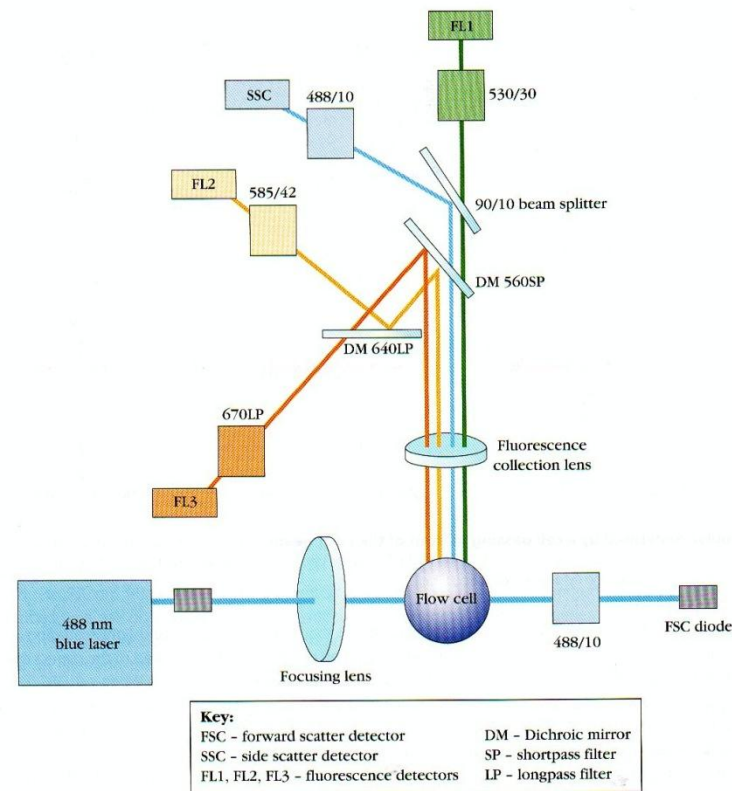
FITC Fluorescein isothiocyanate

PE Phycoerythrin

PerCP Peridinin chlorophyll protein

APC Allophycocyanin

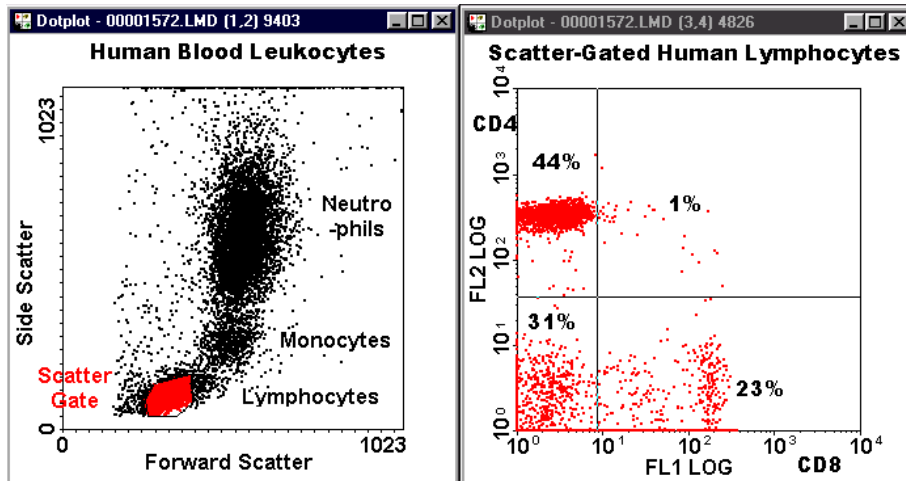
inne



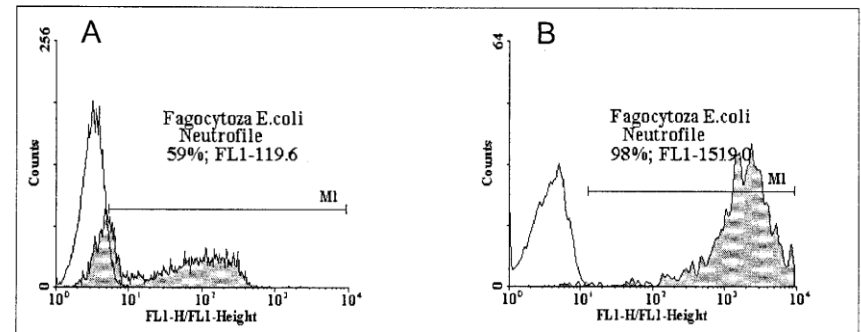
Owen J. A., Punt J., et. al., *Kuby. Immunology*, New York .

Ultraviolet (355nm)	Violet (405nm)	Blue (488nm)	Green (532nm)	Yellow (561nm)	Red (635-855nm)	Far Red/IR (685-785nm)
• AMCA • Atto 390 • Dylight 350	• Atto 425 • Dylight 405	• Atto 488 • Cy2 • FITC • HiLyte 488 • PerCP • PerCP-Cy5.5 • PerCP-Cy7 • R-PE • PE-Cy5 • PE-Cy5.5 • PE-Cy7	• Atto 532 • Cy3 • DyLight 550 • Dyomics 547 • FluorProbes 547H • HiLyte 555 • PE-Cy5 • PE-Cy5.5 • PE-Cy7 • Rhodamine • R-PE • Texas Red • TRITC	• Atto565 • Atto 594 • Atto 590 • Atto 610 • Cy3.5 • Dylight 594	• APC • APC-Cy7 • Atto 633 • Atto 637 • Atto 655 • Atto 680 • Atto700 • Cy 5.5 • Cy5 • Cy7 • DyLight 633 • DyLight 650 • DyLight 680 • Dyomics 647 • FluorProbes 647H • FluorProbes 682 • HiLyte 647	• DyLight755 • DyLight 800 • FluoProbes 752 • HiLyte 750

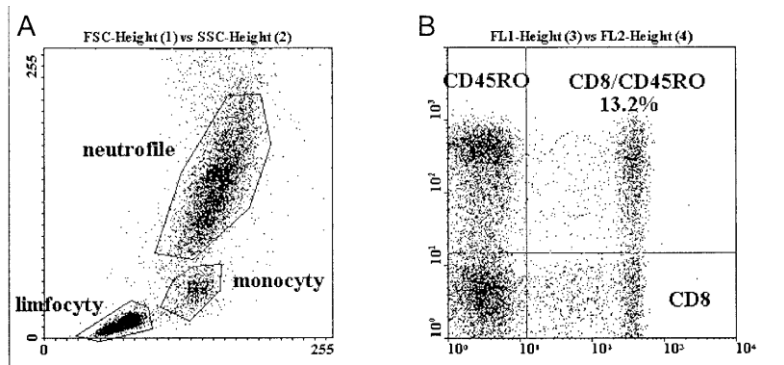
Cytometria przepływowa



<http://www.bio.umass.edu/micro/immunology/facs542/plan.htm>

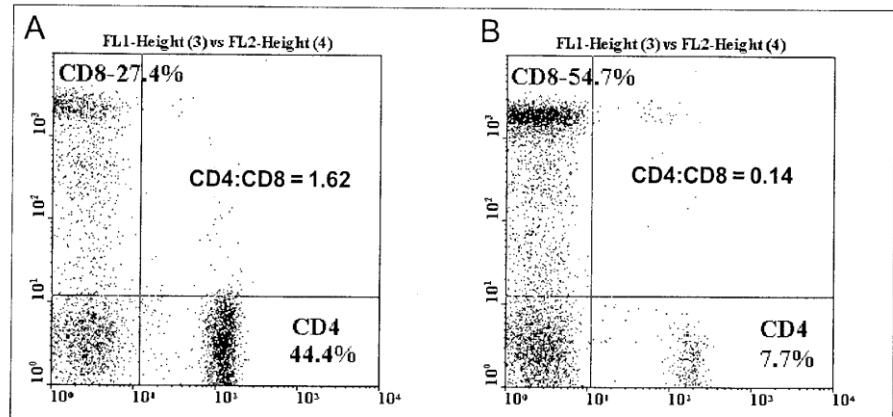


Rycina 43.5 Ocena fagocytozy *E.coli* przez neutrofile krwi pełnej (Phagotest, liza erytrocytów, FACScan). Histogramy pozwalają na obliczenie odsetka komórek fagocytujących i średnich wartości fluorescencji (pośrednio ilość wchłoniętych bakterii przez jedną komórkę).
(A) upośledzona fagocytoza u osoby z czyszcznością (B) fagocytoza neutrofilów osoby zdrowej



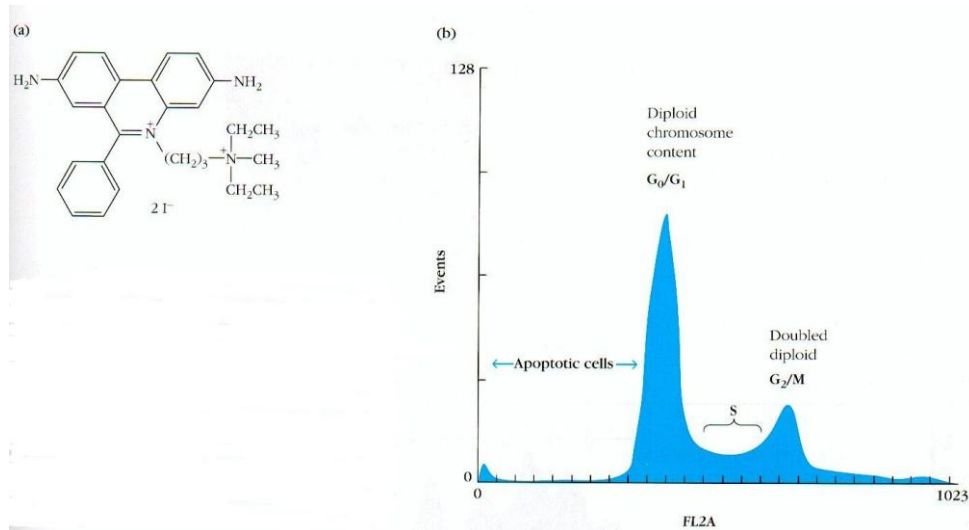
Rycina 43.2 Zasada działania cytometru przepływowego

(A) Typowe rozmieszczenie ludzkich krwinek białych na wykresie kropkowym pod względem ich wielkości i ziarnistości (FSC vs SSC, krew pełna, liza erytrocytów, FACScan).
(B) Zastosowanie dwukolorowego barwienia fluorochromami przeciwciał monoklonalnych (CD8 – FITC, CD45RO – PE) pozwala na ocenę określonej populacji komórek posiadających poszukiwany antygen powierzchniowy CD8+CD45RO+ (FL1 vs FL2, krew pełna, liza erytrocytów, FACScan)

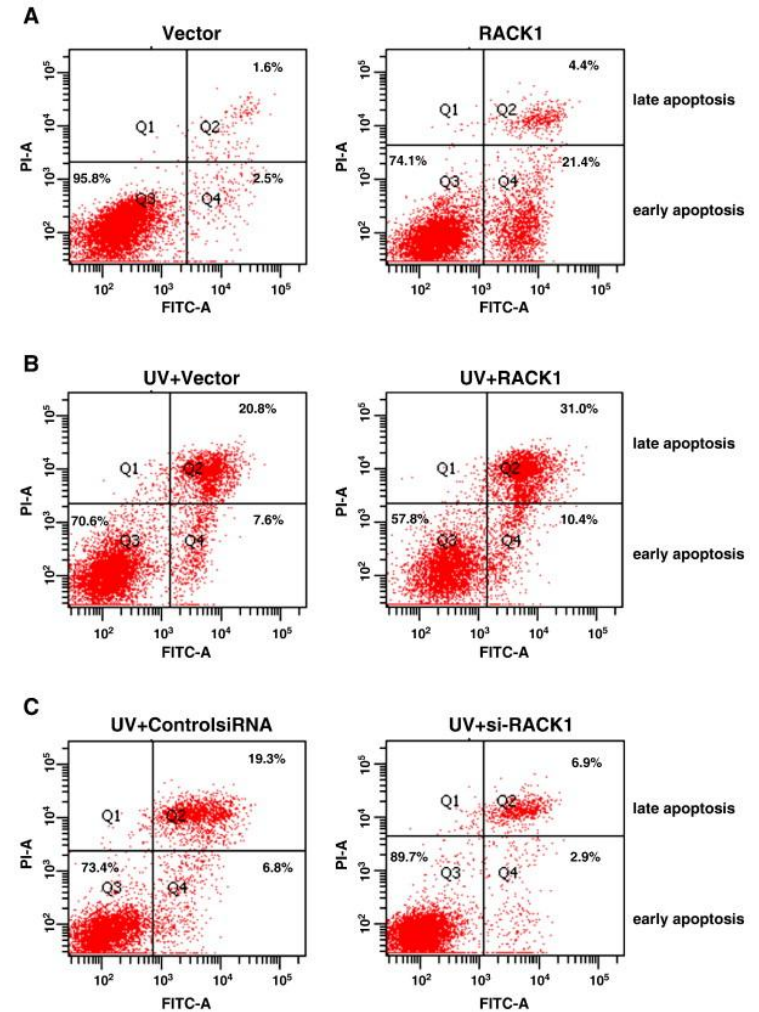
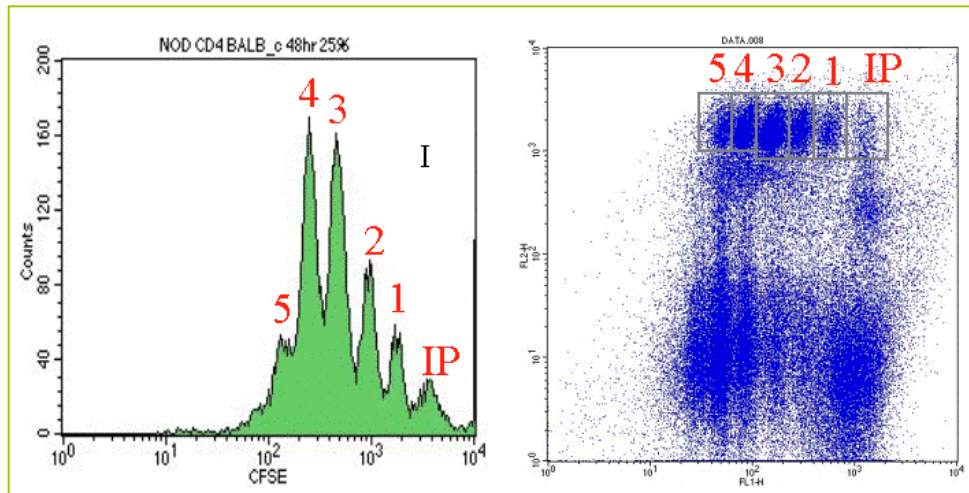


Rycina 43.3 Analiza fenotypu limfocytów CD4 i CD8 wśród limfocytów CD3 (A) osoby zdrowej i (B) osoby z pełnoobjawowym zespołem niedoboru odporności (FL1 vs FL2, krew pełna, liza erytrocytów, FACScan)

Cytometria przepływowa



Owen J. A., Punt J., et al., *Kuby. Immunology*, New York.



Aneksyna V - białko łączące się z fosfatydyloseryną.
Jodek propidyny

Cytometria przepływowa

Tabela 39.1 Najczęściej oceniane markery powierzchniowe komórek krwi obwodowej człowieka

Cząsteczka CD	Występowanie	Nazwa zwyczajowa	Funkcja
CD2	Limfocyty T, tymocyty Komórki NK	LFA - 2, T 11	adhezja T do APC lub innych komórek, kostymulacja
CD2R	Aktywowane limfocyty, NK	epitopy CD2 na aktywowanych limfocytach T	aktywacja limfocytów T
CD3	Limfocyty T	5 łańcuchów kompleksu CD3	przekazywanie sygnału do limfocytów T
CD4	Limfocyty T pomocnicze, subpopulacje monocytów, makrofagów, tymocyty	Leu-3	koaktywacja limfocytów T pomocniczych
CD5	Tymocyty, subpopulacje T, B	Lyt-1	aktywacja tymocytów i limfocytów T
CD8	Limfocyty T cytotoksyczne, tymocyty	Leu-2	koaktywacja limfocytów T cytotoksycznych
CD14	Monocyty, (granulocyty), Komórki Langerhansa, makrofagi	Mo2	białko wiążące LPS
CD19	Limfocyty B, komórki pre-B	B4	aktywacja i proliferacja limfocytów B
CD20	Limfocyty B, komórki pre-B	B1	kanal Ca^{2+} , regulacja aktywacji i proliferacji limfocytów B
CD21	Limfocyty B, komórki pre-B	C3dR, CR2, EBVR	aktywacja i proliferacja limfocytów B, element kompleksu przekazywania sygnału
CD22	Komórki pre-B, Subpopulacje limfocytów B	BL-CAM	pośredniczy w adhezji: forma α z monocytami i erytrocytami forma β z limfocytami T i B
CD45	Leukocyty	LCA (<i>Leukocyte Common Antigen</i>), T200	fosfataza tyrozynowa biorąca udział w przekazywaniu sygnału
CD45 RO	Aktywowane limfocyty T, monocyty, makrofagi, granulocyty, tymocyty		marker limfocytów T pamięci

Tabela 39.2 Zakres wartości prawidłowych markerów komórek jednojądrowych krwi obwodowej człowieka

Komórki-marker CD	Wartość średnia (%)	Zakres wartości (%)
CD4+	45	35 – 50
CD8+	35	25 – 45
CD3+	50	35 – 65
CD2	55	45 – 65
CD22	25	20 – 30
CD56	15	10 – 20
CD14	18	10 – 25
Wskaźnik CD4/CD8	1,4	1,1 – 1,7

Stosuje się dwa podstawowe warianty techniki immunofluorescencyjnej (*IF*):

-metodę bezpośrednią (*DIF- Direct Immunofluorescence*)

-metodę pośrednią (*IIF- Indirect Immunofluorescence*)

TESTY IMMUNOFLUORESCENCYJNE

- wykorzystują przeciwciała znakowane barwnikami fluorescencyjnymi:

FITC

izotiocyanian fluoresceiny,
po wzbudzeniu emituje kolor zielony

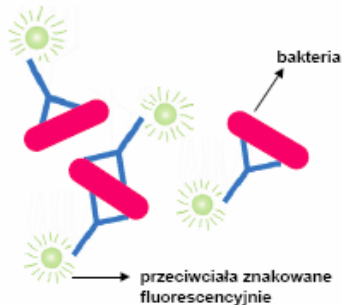
TRITC

izotiocyanian tetrametylorodaminy,
po wzbudzeniu emituje kolor czerwony



Cząsteczki barwnika przyłączone są do cząsteczek immunoglobulin kowalencyjnie (poprzez grupy aminowe lizyny).

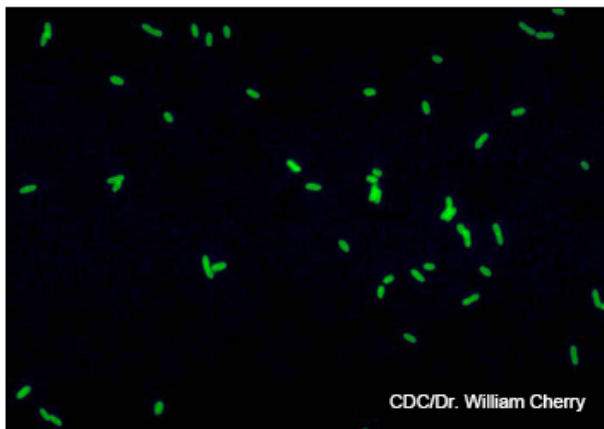
Test immunofluorescencyjny bezpośredni



Wykrywa w surowicy/ płwocinie/ wymazie pacjenta obecność antygenów/ bakterii.

Wynik pozytywny: fluorescencja obserwowana pod mikroskopem fluorescencyjnym

Wynik negatywny: brak antygenów = brak fluorescencji



CDC/Dr. William Cherry

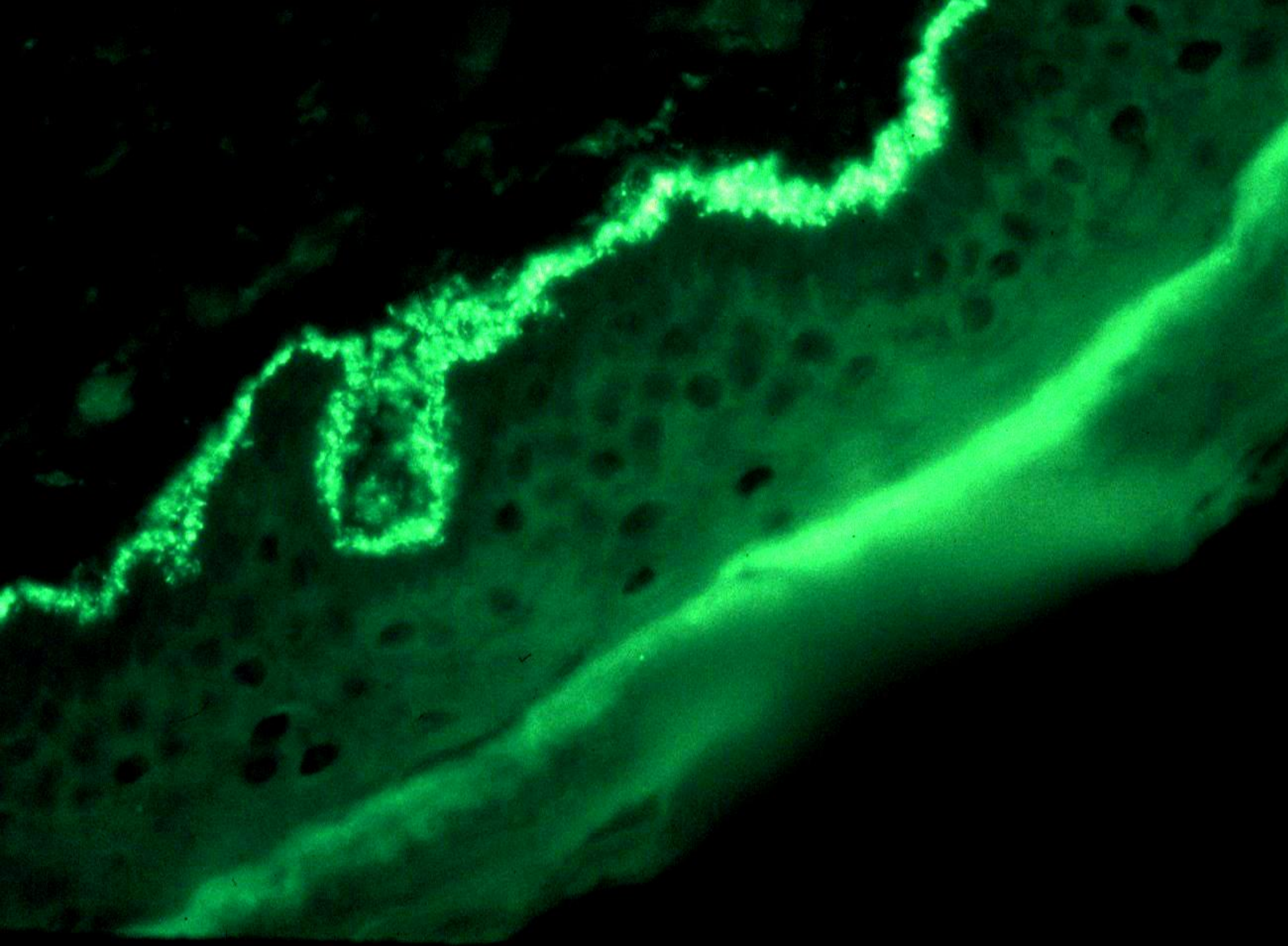
Test immunofluorescencyjny. Bakterie *Legionella pneumophila*

Metodę **bezpośrednią** stosuje się do wykrywania immunoglobulin związanych *in vivo* w tkankach.

Jest to metoda *jednofazowa*, w której zamrożone tkanki inkubuje się ze znakowanym przeciwciałem pochodzenia zwierzęcego skierowanym przeciw ludzkim immunoglobulinom.

W **SLE** (*toczeń rumieniowaty układowy*) w wycinkach skóry zdrowej i zmianach skórnych wykrywa się złogi immunoglobulin na granicy skórno-naskórkowej.

Złogi mają na ogół charakter **ziarnisty lub linijno-ziarnisty**. Wykrycie tego zjawiska w skórze ma duże znaczenie diagnostyczne dla **SLE** i zostało nazwane „*Lupus band test*” (**LBT**).



TESTY IMMUNOFLUORESCENCYJNE

Test immunofluorescencyjny pośredni

Wykrywa w surowicy/ płocinie/ wymazie pacjenta przy pomocy znakowanych fluorescencyjnie przeciwciał immunoglobuliny, które uprzednio związały się ze swoistym antygenem. Charakteryzują się większą czułością.

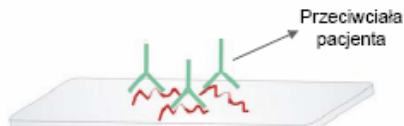
Wynik pozytywny: fluorescencja obserwowana pod mikroskopem fluorescencyjnym

Wynik negatywny: brak przeciwciał = brak fluorescencji

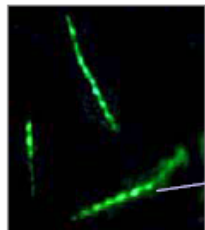
Diagnostyka kiły



Dodajemy surowicę pacjenta



Dodajemy przeciwciała znakowane fluorescencyjnie
przeplukujemy



Jeśli pacjent był/jest zakażony kiłą, obserwuje się świecenie krętków

Krętek kiły

www.primer.ru/std/gallery_std/treponema.htm

Wykrywanie autoprzeciwciał przeciwjądrowych

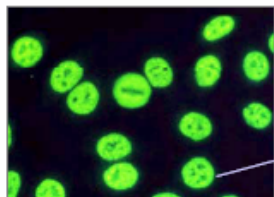
(układowe schorzenia autoimmunizacyjne)



Przeciwciała pacjenta



ANA test



Jądro komórkowe

<https://courses.stu.qmul.ac.uk/smd/kb/pathology/funmedpics/pathtes2.htm>

Metoda immunofluorescencji **pośredniej** jest metodą *dwufazową* 10-krotnie czulszą niż metoda **bezpośrednia**.

Jest stosowana rutynowo do wykrywania przeciwciał krążących.

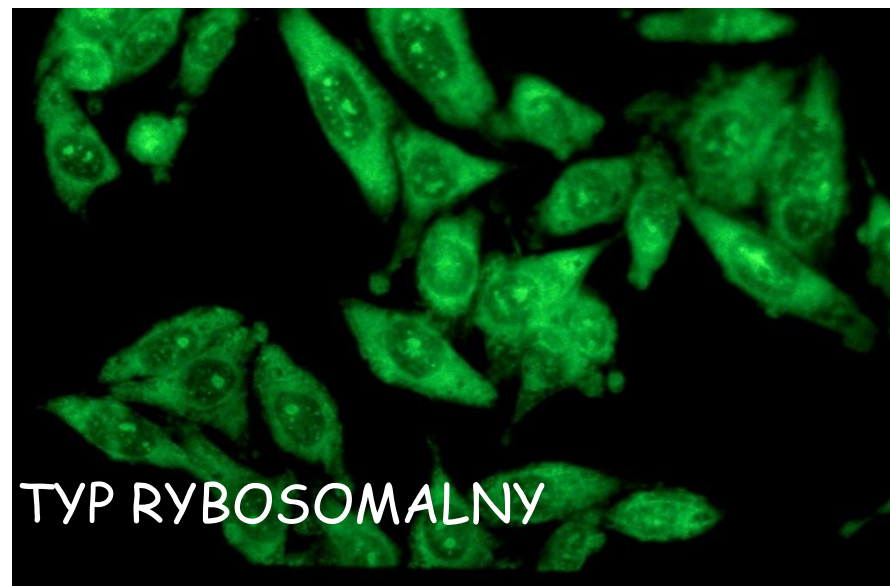
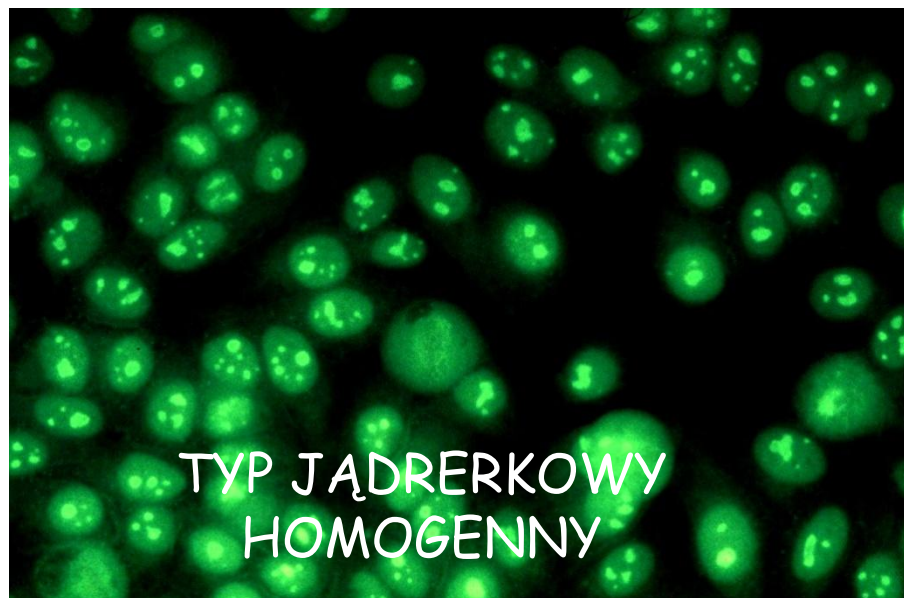
Technika ta oparta jest na zdolności wiązania przeciwciał krążących z odpowiednim antygenem obecnym w tkance użytej jako substrat antygenowy

W drugim etapie skrawek tkankowy ze związanym ludzkim przeciwciałem inkubuje się z przeciwciałem zwierzęcym znakowanym **fluorochromem** - pochodną fluoresceiny **FITC** (koniugat), co sprawia że w miejscu wiązania ze swoistym antygenem w tkance w mikroskopie fluorescencyjnym zaopatrzonym w lampę rtęciową emitującą promieniowanie UV obserwuje się charakterystyczną **żółto-zieloną fluorescencję**.

ANA są heterogenną grupą przeciwciał skierowaną przeciw różnym antygenom jądrowym.

Surowice z **ANA** inkubowane z substratem antygenowym dają różne typy (*patterns*) fluorescencji jądrowej w zależności od **lokalizacji antygeny** przeciwko któremu są skierowane.

Podstawowe typy fluorescencji jądrowej:



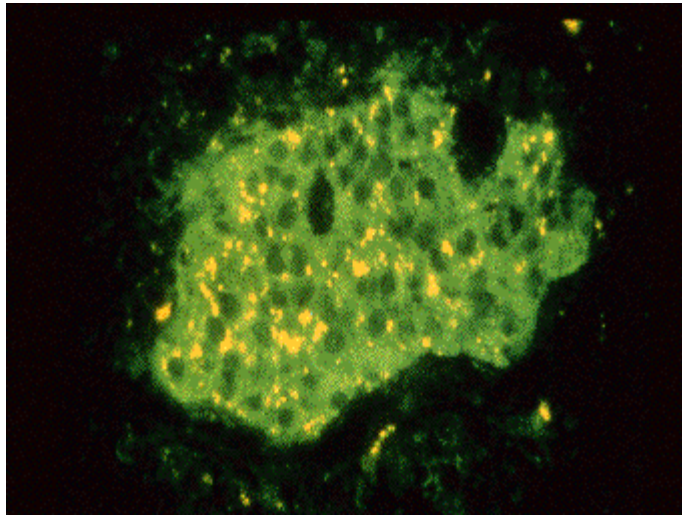
Zastosowanie metod immunofluorescencyjnych w cukrzycy

Autoprzeciwciała – markery destrukcji komórek β

- ⇒ przeciwwyspowe (ICA)
- ⇒ przeciwinsulinowe (IAA)
- ⇒ przeciw dekarboksylazie kwasu glutaminowego (anty-GAD₆₅)
- ⇒ przeciw fosfatazom tyrozyny (anty-IA-2)

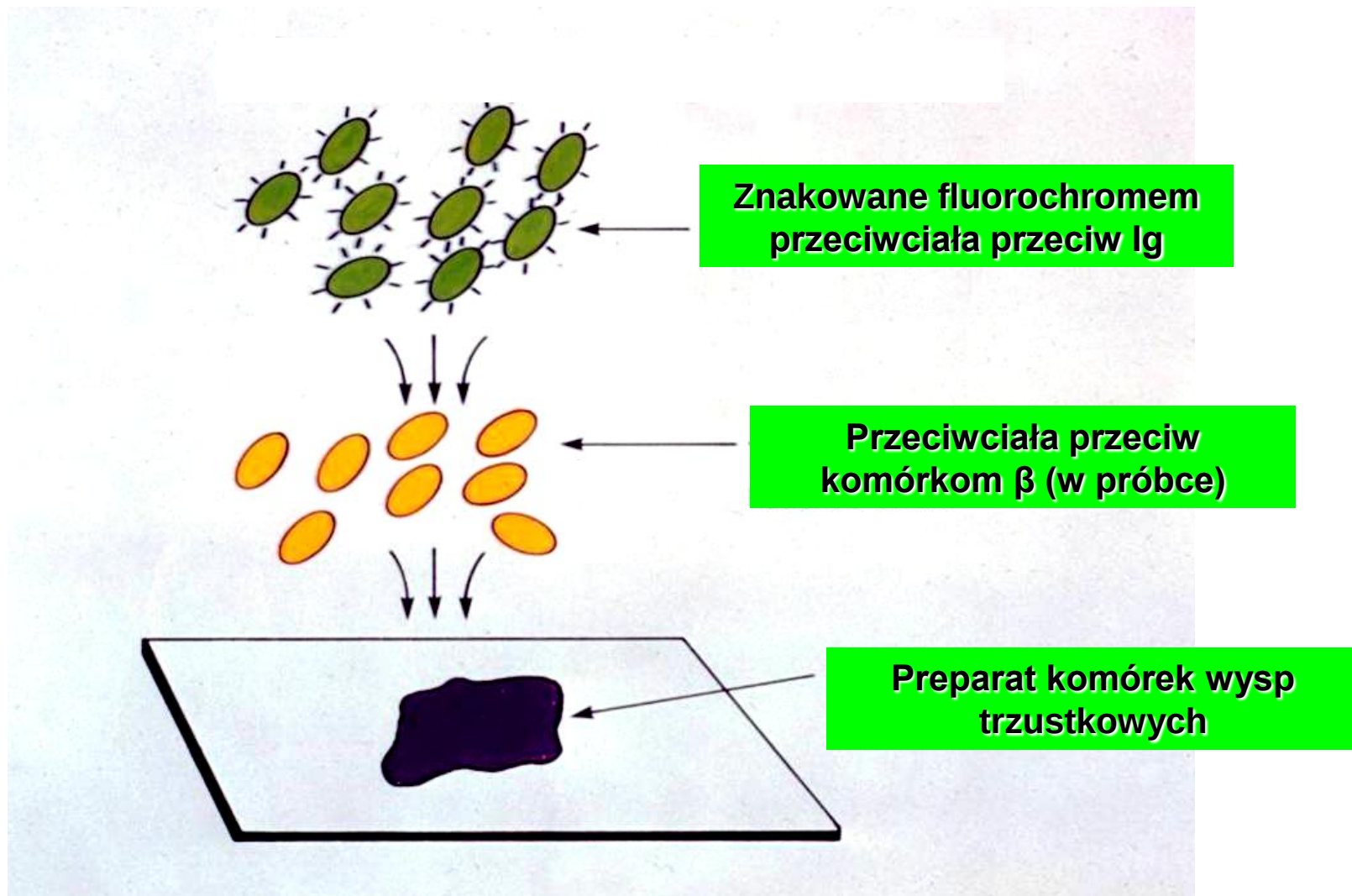


Ab przeciwwyspowe- trzustka



- Grupa przeciwciał przeciwko cytoplazmatycznym antygenom komórek β (ICA)
- Oznaczane metodą immunofluorescencji pośredniej
- Wyniki wyrażane w umownych jednostkach JDF (*Juvenile Diabetes Foundation*)

Technika immunofluorescencji pośredniej





Przeciwciała:

anty-GAD₆₅ (przeciw dekarboksylazie kwasu glutaminowego),

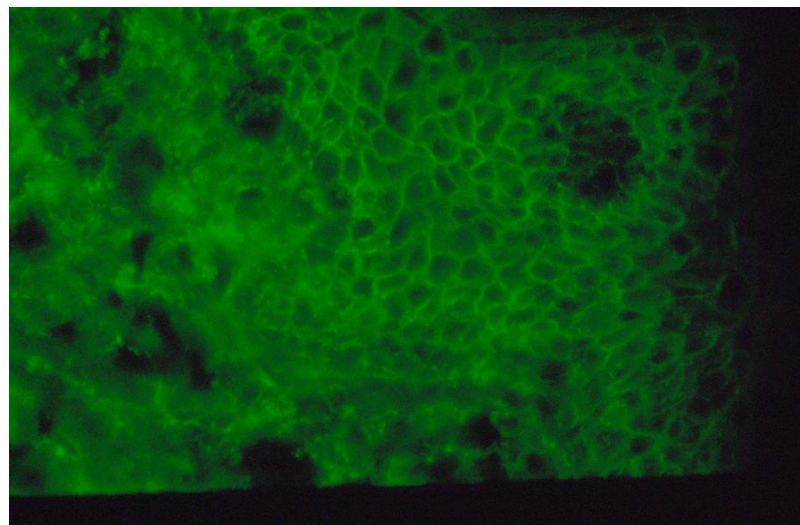
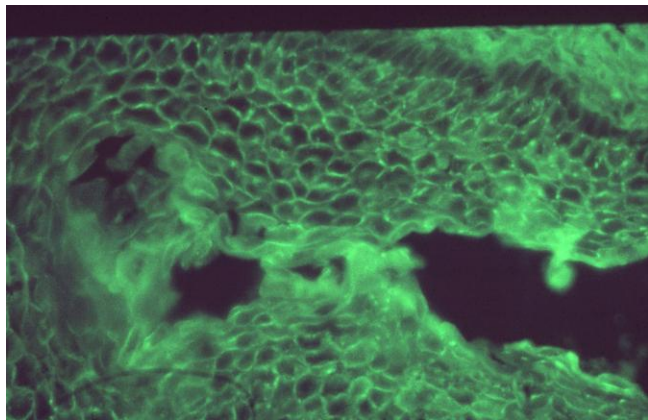
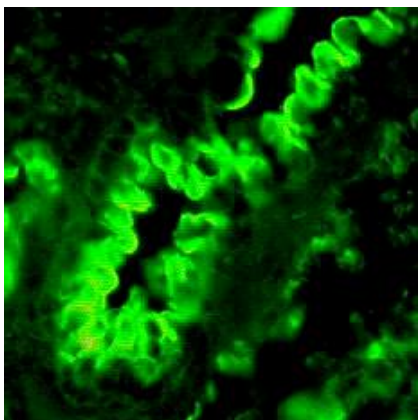
anty-IAA (przeciwinsulinowe),

anty-IA (przeciw fosfatazom tyrozyny)

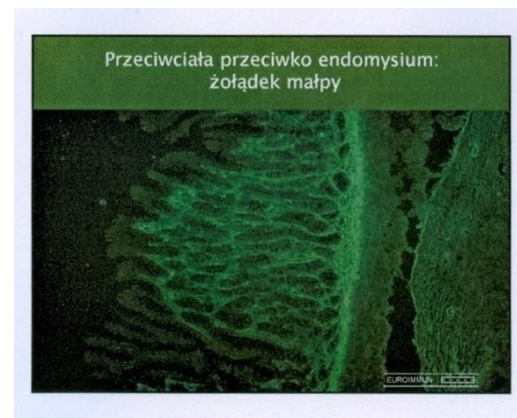
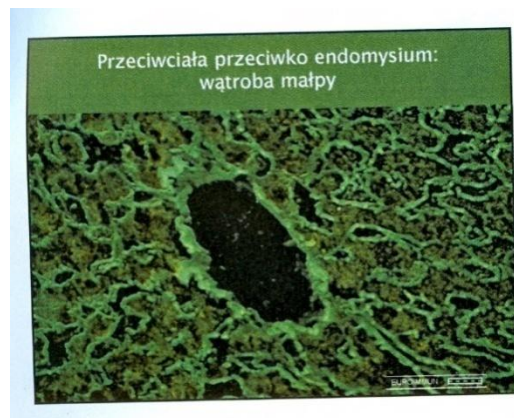
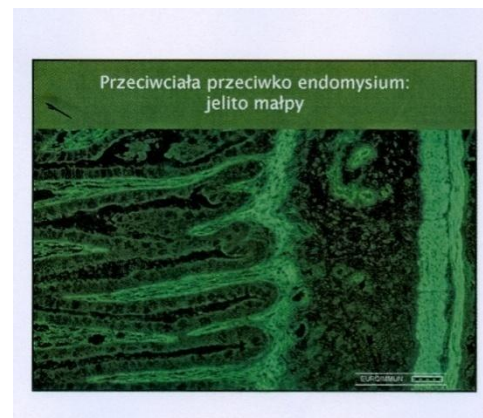


są oznaczane metodami
immunochemicznymi przy użyciu
półautomatycznych lub
zautomatyzowanych analizatorów

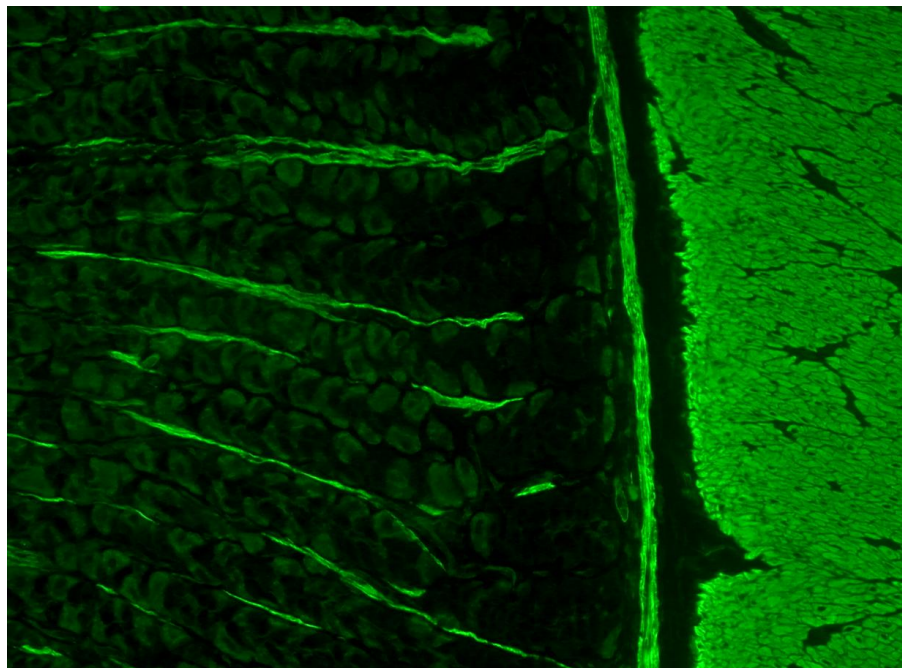
Pęcherzyca



Diagnostyka celiakii – techniki immunofluorescencyjne



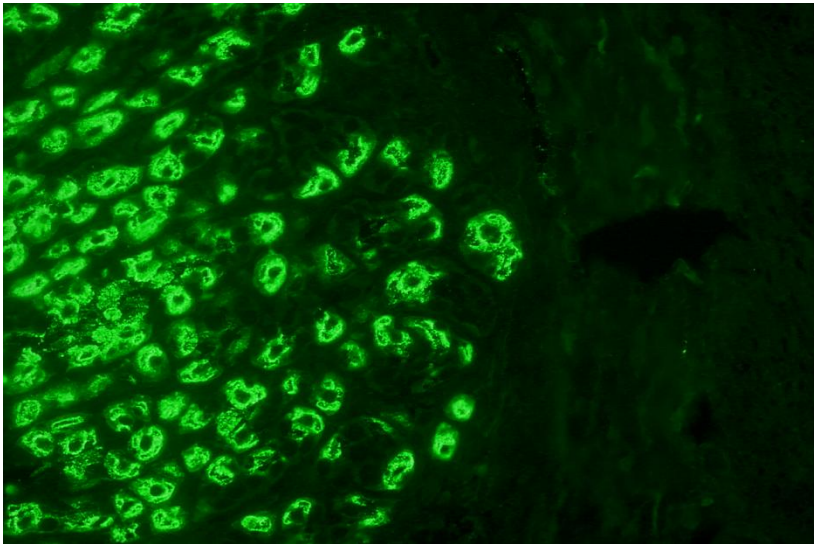
Przeciwciała skierowane przeciw mięśniom gładkim (ASMA)



Przeciwciała przeciw mięśniom gładkim można wykryć w:

- Autoimmunizacyjnym zapaleniu wątroby typu I,
- a także:
- mononukleozie zakaźnej,
- infekcjach wirusowych,
- w marskości poalkoholowej,
- rakach sutka, jajnika,
- w czerniaku złośliwym.

Przeciwciała skierowane przeciw komórkom okładzinowym żołądka

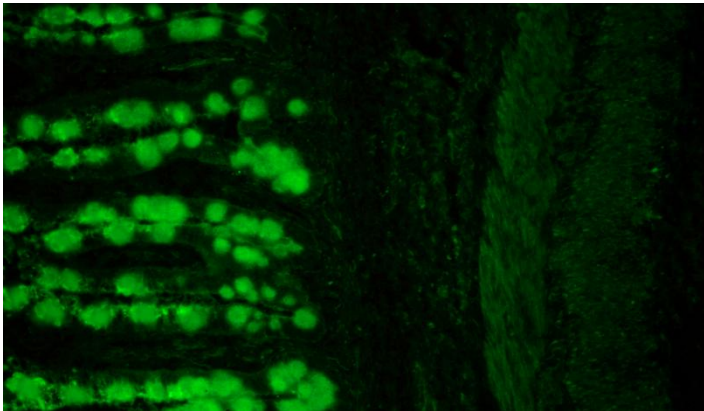


Wskazaniami do wykonania badania są:

- przewlekłe zanikowe zapalenie błony śluzowej żołądka,
- anemia złośliwa,
- choroba Addisona,
- bielactwo.

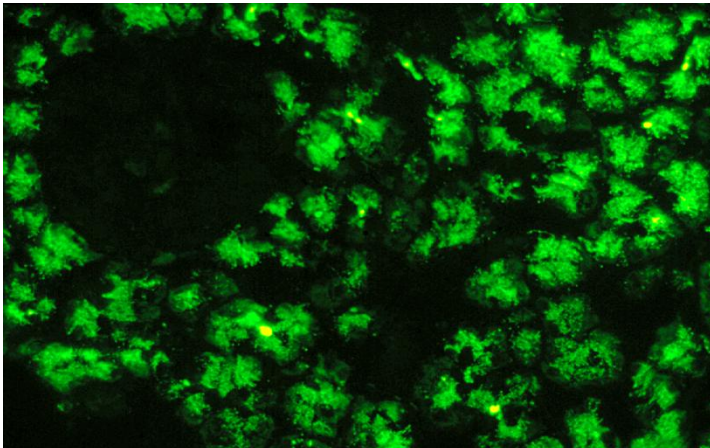
PRZECIWCIAŁA W DIAGNOSTYCE PRZEWLEKŁYCH ZAPALNYCH SCHORZEŃ JELIT

PRZECIWCIAŁA PRZECIW KOMÓRKOM KUBKOWATYM JELIT



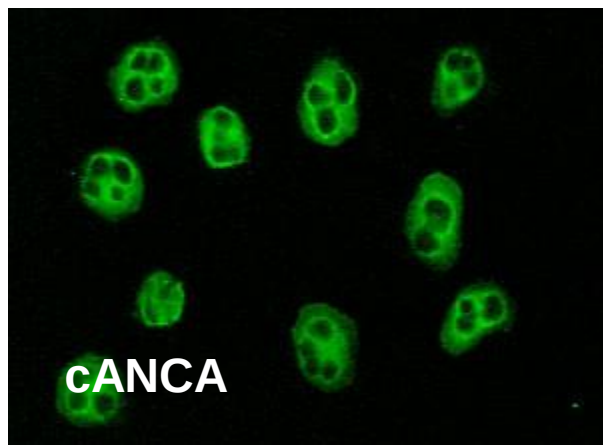
- Przeciwciała przeciw komórkom kubkowatym jelit występują u 28% pacjentów z Colitis Ulcerosa

PRZECIWCIAŁA PRZECIW KOMÓRKOM ZEWNĄTRZWDZIELNICZYM TRZUSTKI



- Wykrywane u pacjentów z Chorobą Leśniowskiego-Crohna (częstość występowania 39%)

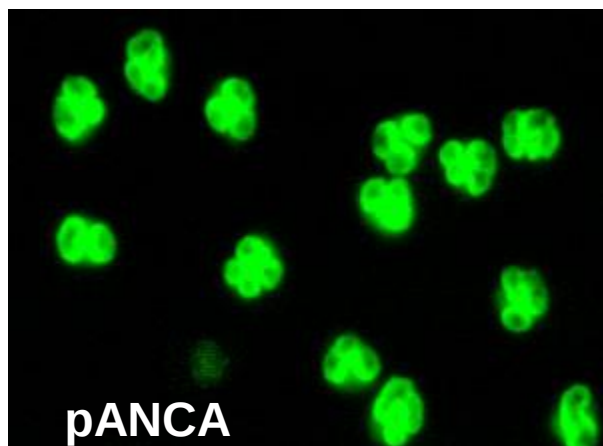
PRZECIWCIAŁA PRZECIW ANTYGENOM CYTOPLAZMY NEUTROFILI (ANCA)



Przeciwciała typu cANCA

występują w :

- ziarniniaku Wegenera
- Chorobie Leśniowskiego-Crohna
- mikroskopowym zapaleniu naczyń i innych zapaleniach naczyń



Przeciwciała typu pANCA

występują w :

- zapaleniach naczyń (Vasculitis)
- wrzodziejącym zapaleniu jelit
- autoimmunologicznych chorobach wątroby

Techniki chemiluminescencyjne

Oparte są na pomiarze emisji fotonów w przebiegu reakcji chemicznej

Jeden z reagentów znakuje się substancją organiczną (lucyferyna, ester akrydyny)

W czasie reakcji następuje emisja promieniowania w zakresie światła widzialnego, które mierzone jest luminometrem

Wymagania jakie stawiamy testom immunochemicznym

Wiarygodność wyników i ich użyteczność diagnostyczną determinuje:

czułości

swoistości analitycznej

dokładności

Sensitivity of various immunoassays

Assay	Sensitivity* (μg antibody/ml)
Precipitation reaction in fluids	20–200
Precipitation reaction in gels	
Ouchterlony double immunodiffusion	20–200
Agglutination reactions	
Direct	0.3
Agglutination inhibition	0.006–0.06
Radioimmunoassay (RIA)	0.0006–0.006
Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	~0.0001–0.01
ELISA using chemiluminescence	~0.00001–0.01 [†]
Immunofluorescence	1.0
Flow cytometry	0.006–0.06

*The sensitivity depends on the affinity of the antibody used for the assay as well as the epitope density and distribution on the antigen.

[†] Note that the sensitivity of chemiluminescence-based ELISA assays can be made to match that of RIA.

Source: Updated and adapted from N. R. Rose et al., eds., 1997, *Manual of Clinical Laboratory Immunology*, 5th ed., Washington, DC: American Society for Microbiology.

Czułość testu zależy od powinowactwa użytego w teście przeciwciała oraz gęstości i rozkładu epitopu na antygenie.

Zależność czułości i swoistości testów na przykładzie badania przeciwciał przeciwjądrowych w toczniu rumieniowatym układowym (SLE) i przeciwciał przeciwmitchondrialnych (AMA) w pierwotnej marskości żółciowej.

$$\text{Czułość} = \frac{\text{Liczba wyników prawdziwie dodatnich}}{\text{Liczba wyników prawdziwie dodatnich} + \text{Liczba wyników fałszywie ujemnych}} \times 100$$

$$\text{Specyficzność} = \frac{\text{Liczba wyników prawdziwie ujemnych}}{\text{Liczba wyników prawdziwie ujemnych} + \text{Liczba wyników fałszywie dodatnich}} \times 100$$

Przeciwciała przeciwjądrowe i (SLE)

Liczba przebadanych surowic	372
Wyniki prawdziwie dodatnie	90
Wyniki prawdziwie ujemne	220
Wyniki fałszywie dodatnie	60
Wyniki fałszywie ujemne	2

Czułość dla SLE

$$= \frac{90}{90 + 2} \times 100$$

$$= 98\%$$

Swoistość dla tocznia układowego

$$= \frac{220}{220 + 60} \times 100$$

$$= 79\%$$

AMA i pierwotna marskość żółciowa wątroby

Liczba surowic przebadanych	177
Wyniki prawdziwie dodatnie	90
Wyniki prawdziwie ujemne	80
Wyniki fałszywie dodatnie	1
Wyniki fałszywie ujemne	6

Czułość dla pierwotnej marskości żółciowej

$$= \frac{90}{90 + 6} \times 100$$

$$= 94\%$$

Swoistość dla pierwotnej marskości żółciowej

$$= \frac{80}{80 + 1} \times 100$$

$$= 99\%$$

Czułość badania wyznacza odsetek osób chorych, u których uzyskano wynik dodatni.

Wynik ujemny właściwego badania o bardzo dużej czułości można wykorzystać do wykluczenia choroby. Wyniki badań powinny być ujemne zarówno u osób zdrowych, jak i u osób cierpiących na inne, podobne choroby.

Swoistość badania wyznacza odsetek osób niechorujących na daną chorobę, u których wynik badania jest ujemny. Wynik badania jest dodatni tylko u osób chorujących na daną chorobę. Badania o wysokiej swoistości są wykorzystywane do potwierdzenia rozpoznania klinicznego.

