

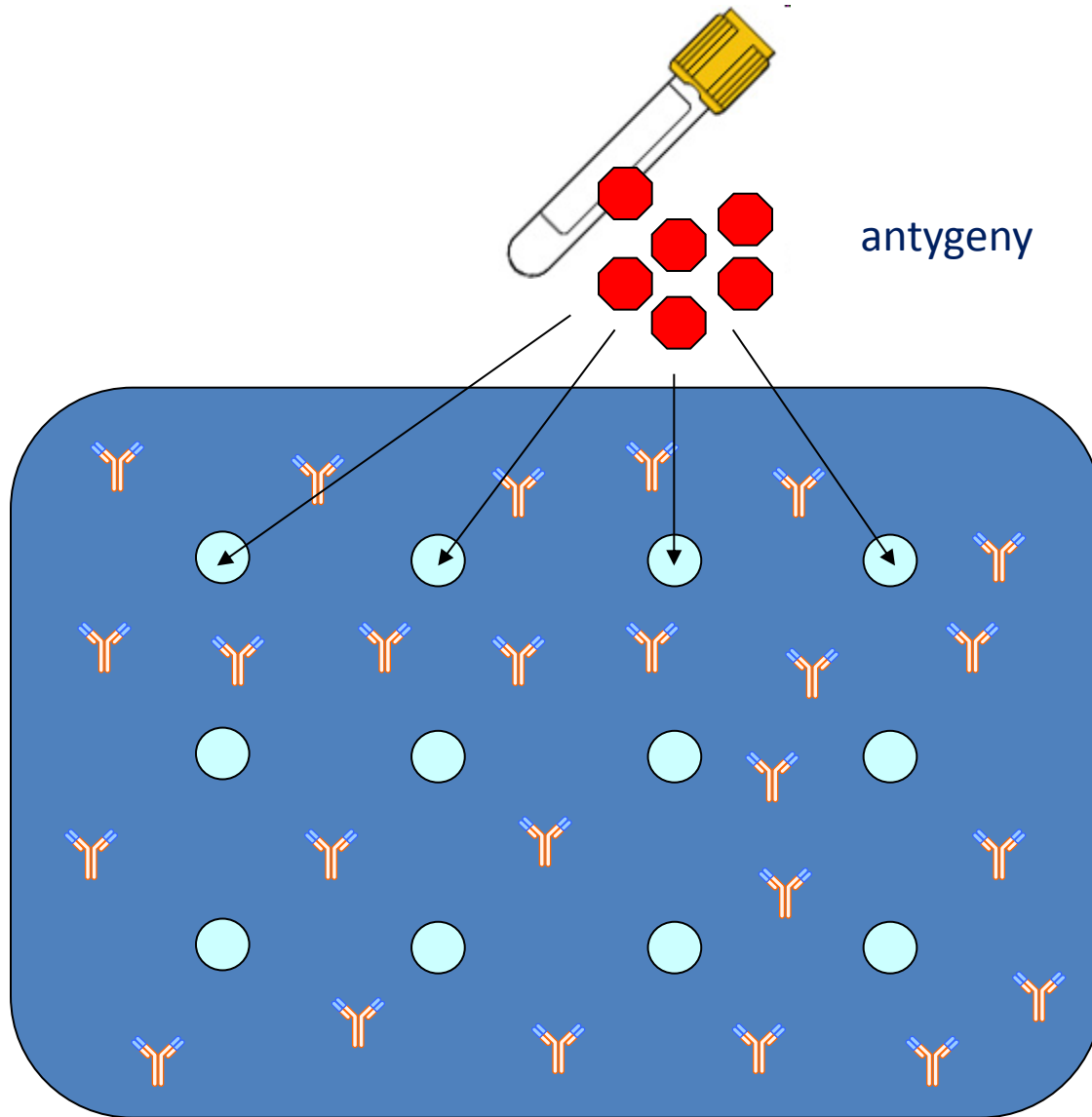
# Ocena ilościowa reakcji antygen - przeciwciało

Mariusz Kaczmarek

# Metody ilościowe oparte na tworzeniu immunoprecypitatów

- immunodyfuzja radialna wg Mancini
- immunoelektroforeza raketowa wg Laurella
- turbidymetria
- nefelometria

# Immunoddyfuzja radialna wg Mancini

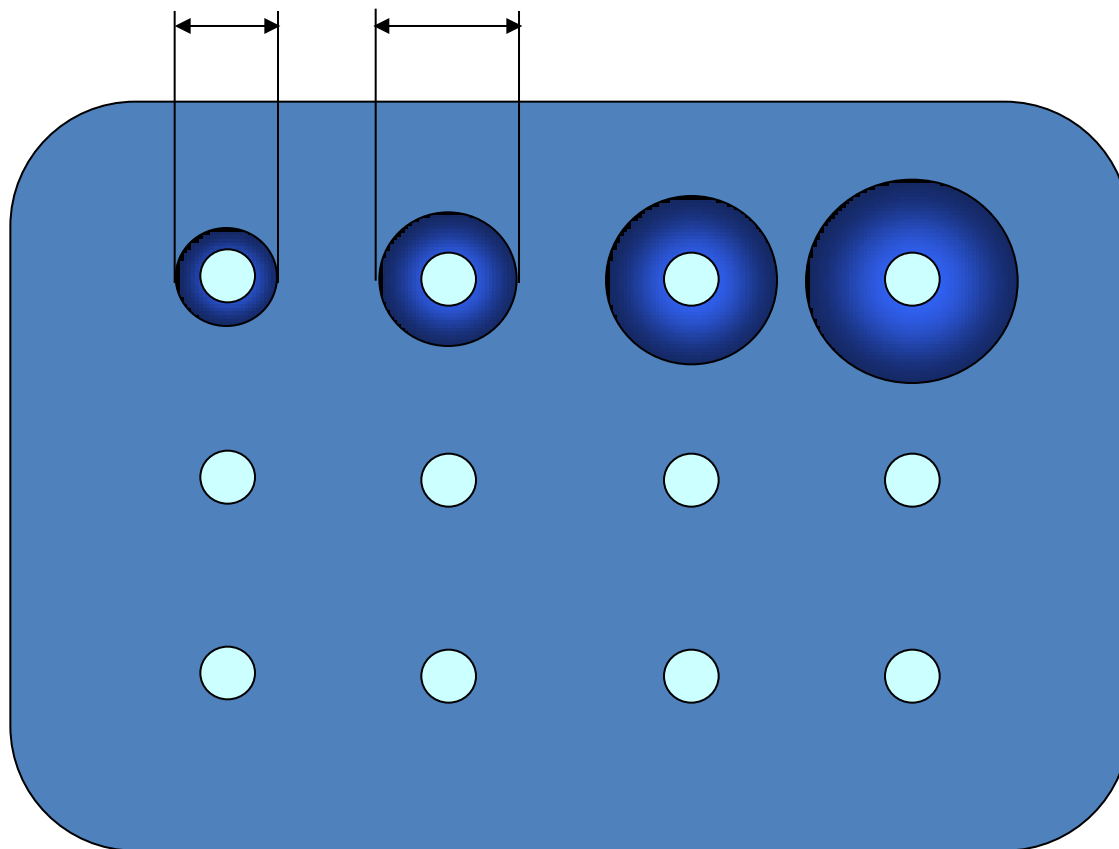


żel z przeciwciałami

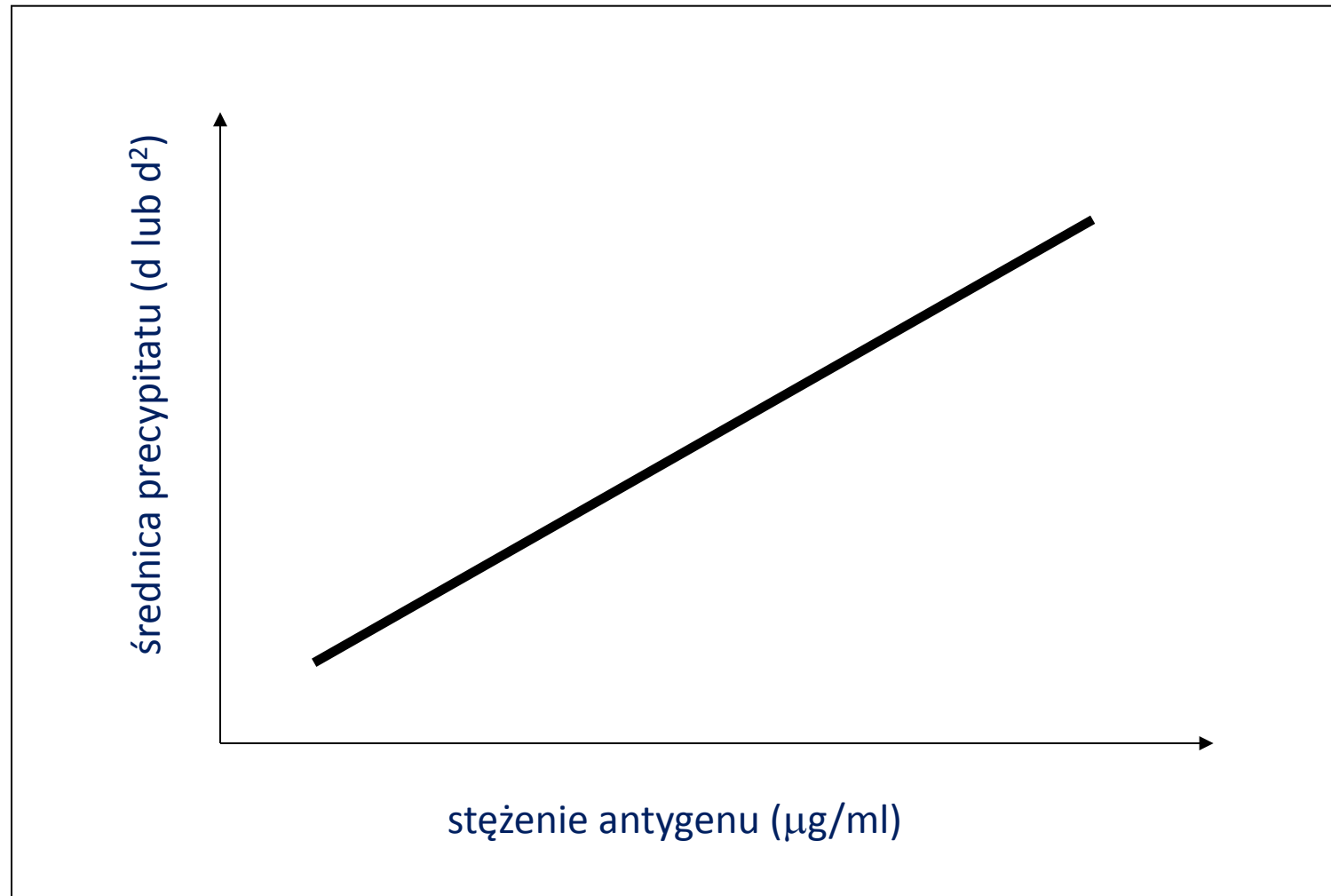
wg Orczyk-Pawłowicz, Kątnik-Prstowska

# Immunoddyfuzja radialna wg Mancini

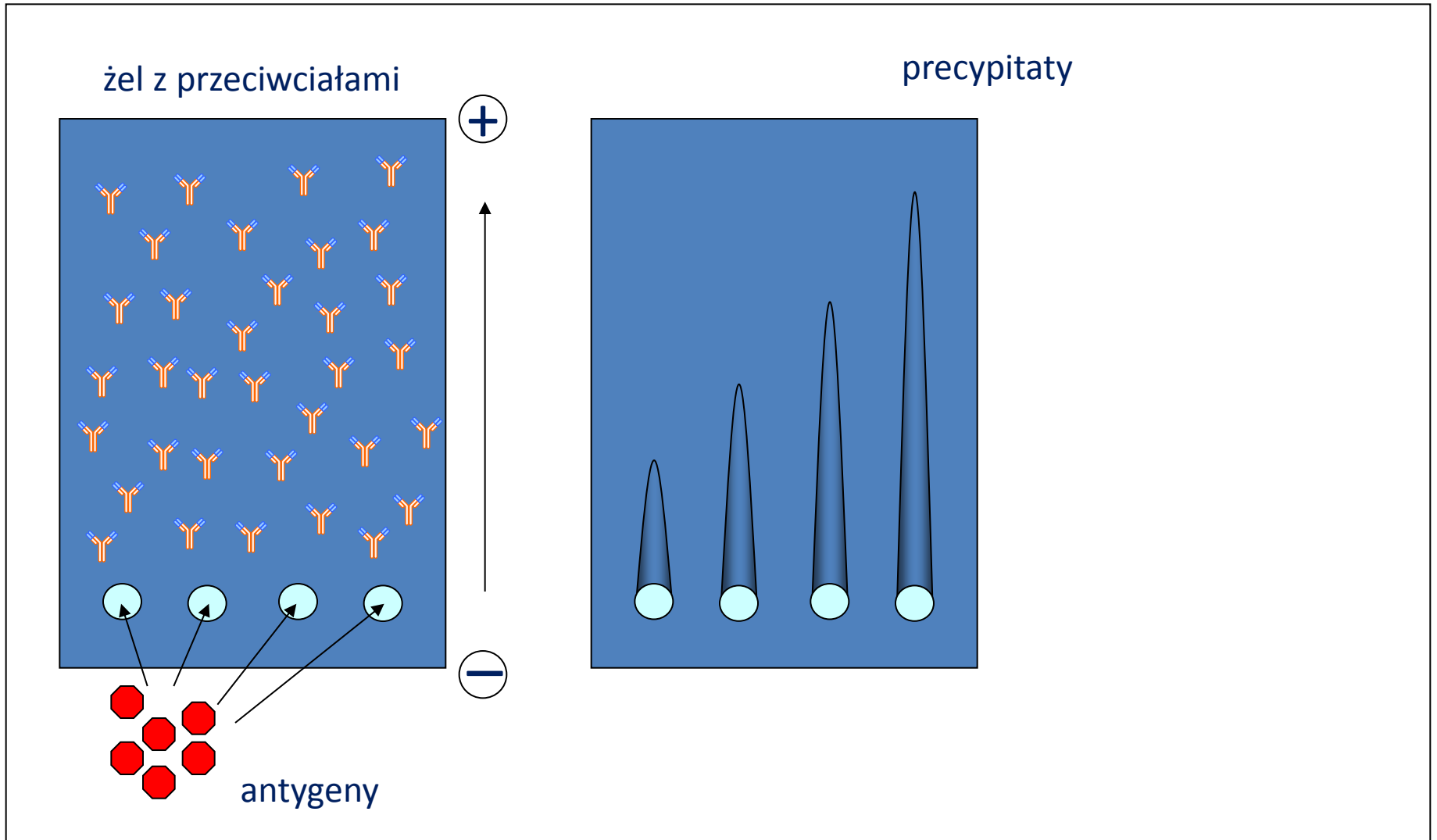
średnica kręgów precypitacyjnych



# Immunodyfuzja radialna wg Mancini - krzywa wzorcowa

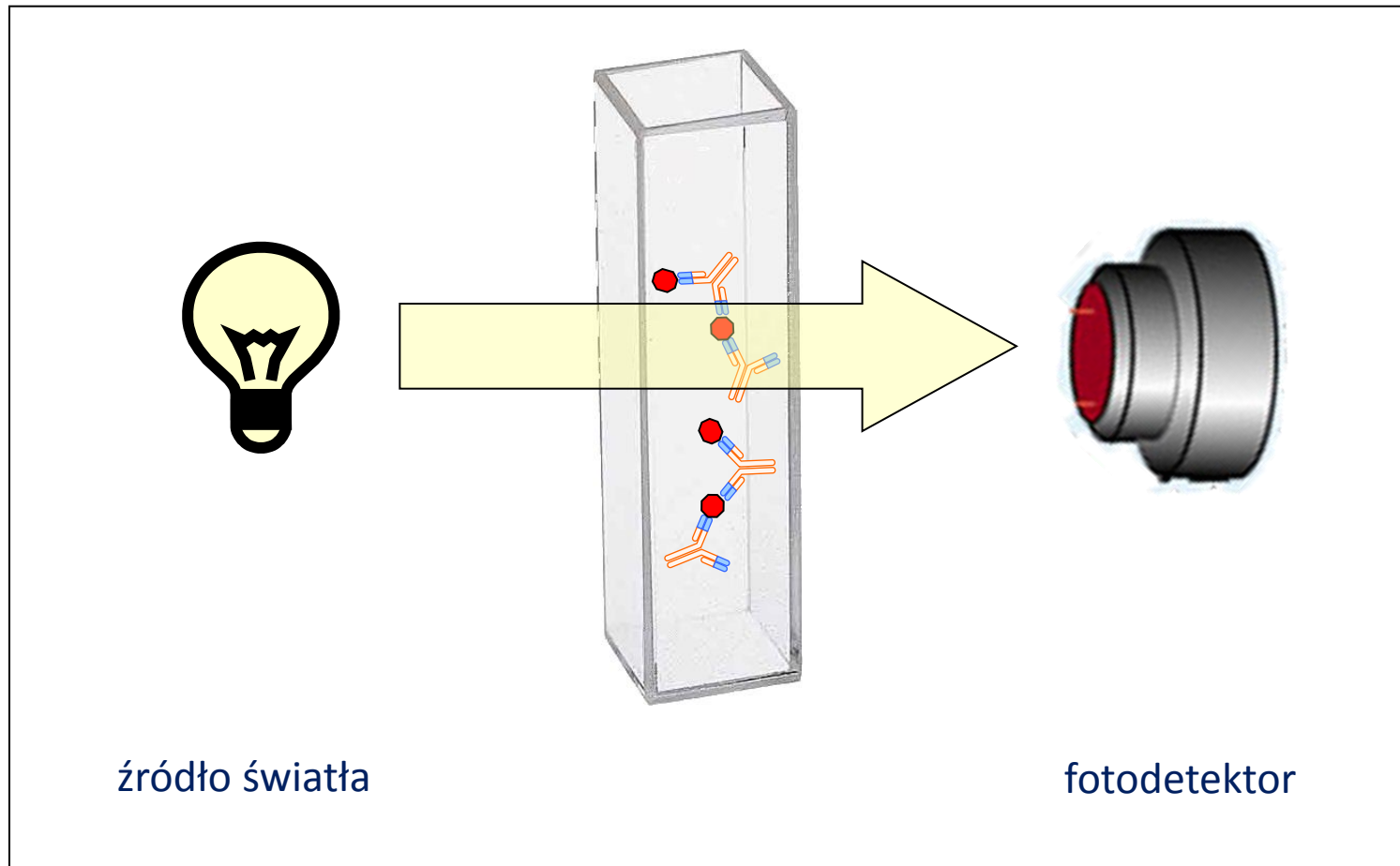


# Immunoelktroforeza raketowa wg Laurella



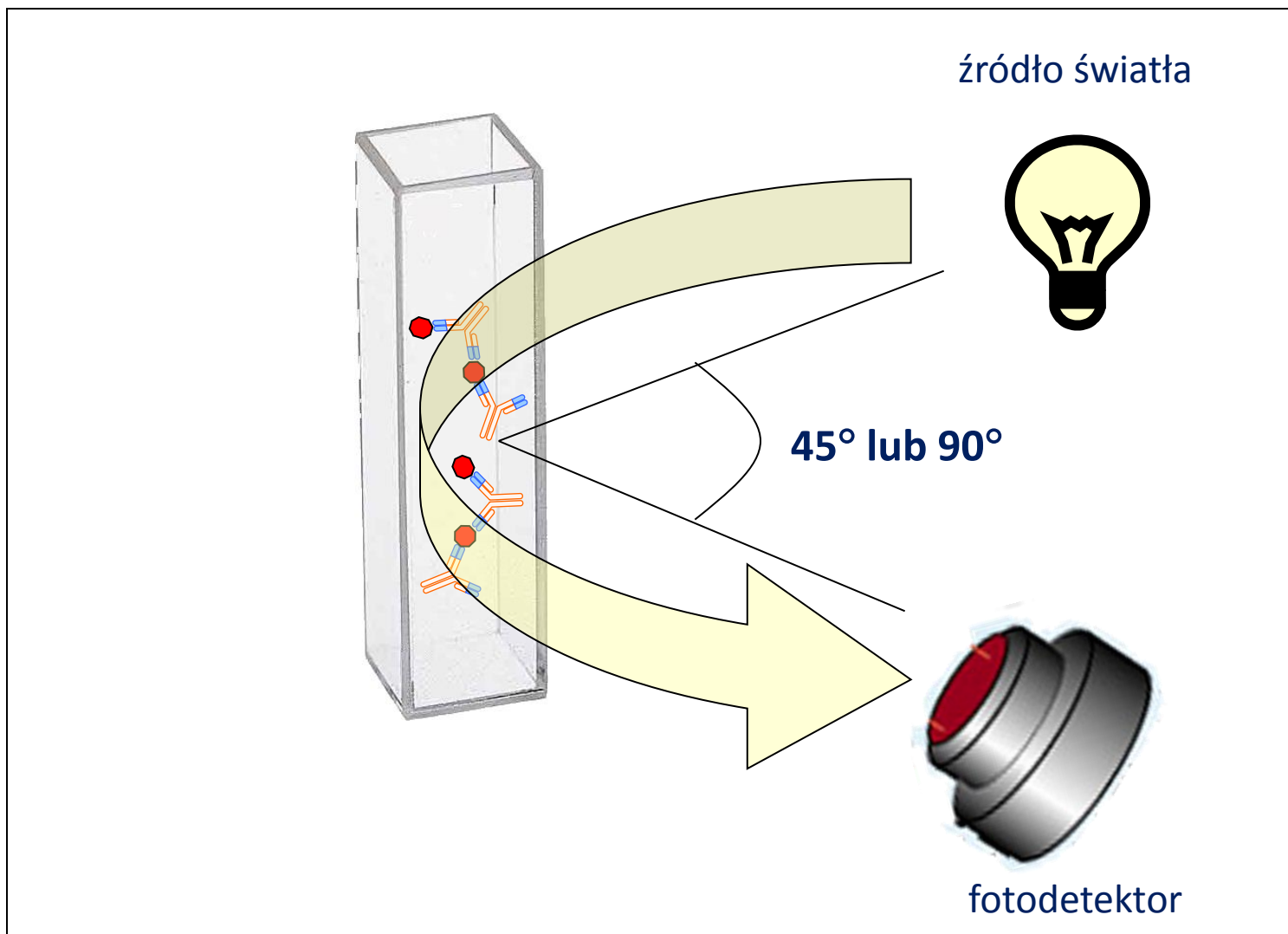
# Turbidymetria

Pomiar światła przechodzącego przez zawiesinę



# Nefelometria

Pomiar światła rozproszonego przez zawiesinę



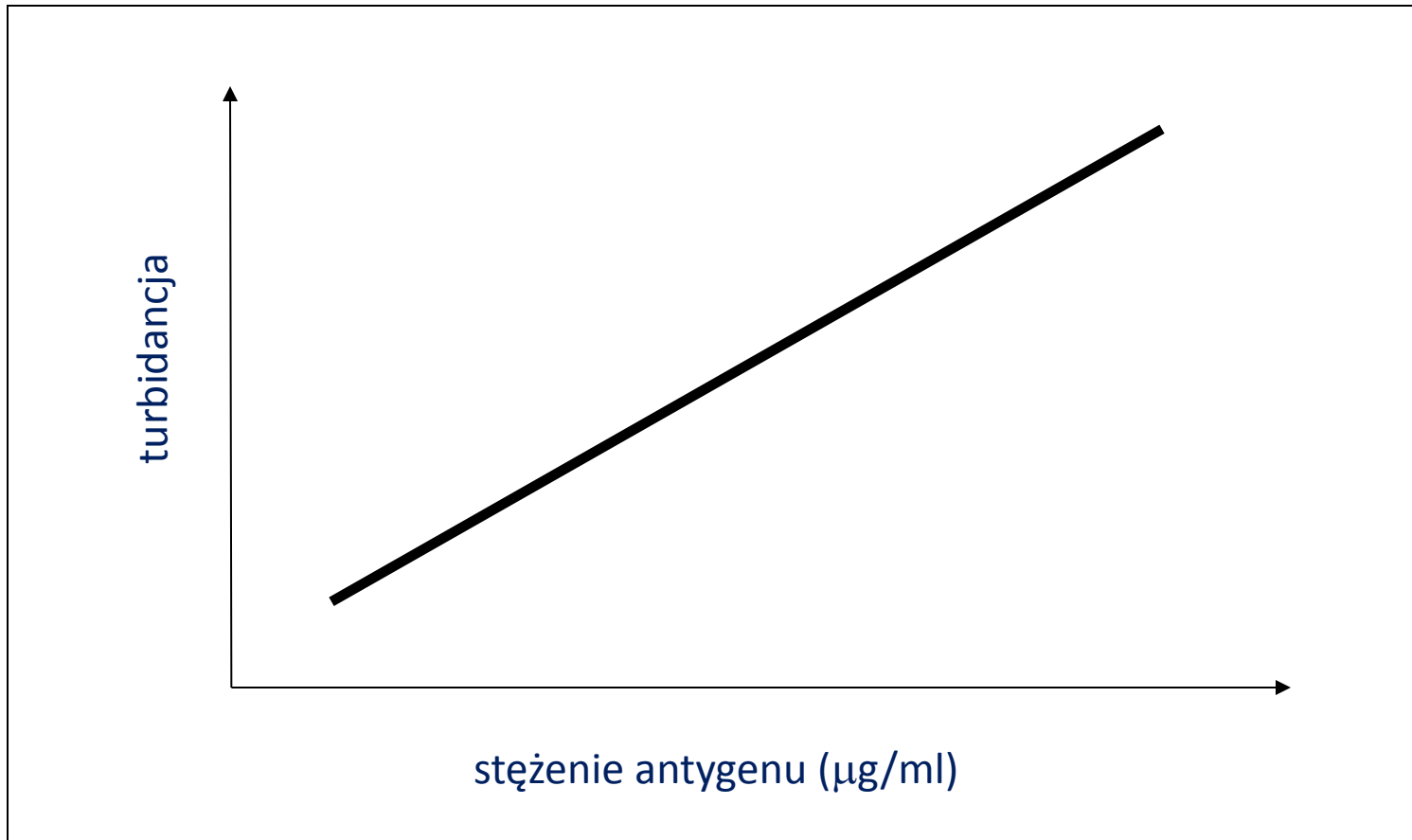


# Warunki reakcji

1. Prawidłowe przygotowanie roztworów
2. Temperatura
3. Jakość analizowanego materiału
  - bez elementów komórkowych i związków barwnych
  - czysty pod względem bakteriologicznym
  - oczyszczone przeciwciała

# Krzywa standardowa

Zależność między natężeniem wiązki światła przechodzącej przez roztwór koloidu lub jej rozproszeniem a stężeniem roztworu koloidalnego dla serii roztworów wzorcowych



# Zastosowanie metod opartych na tworzeniu precipitatów

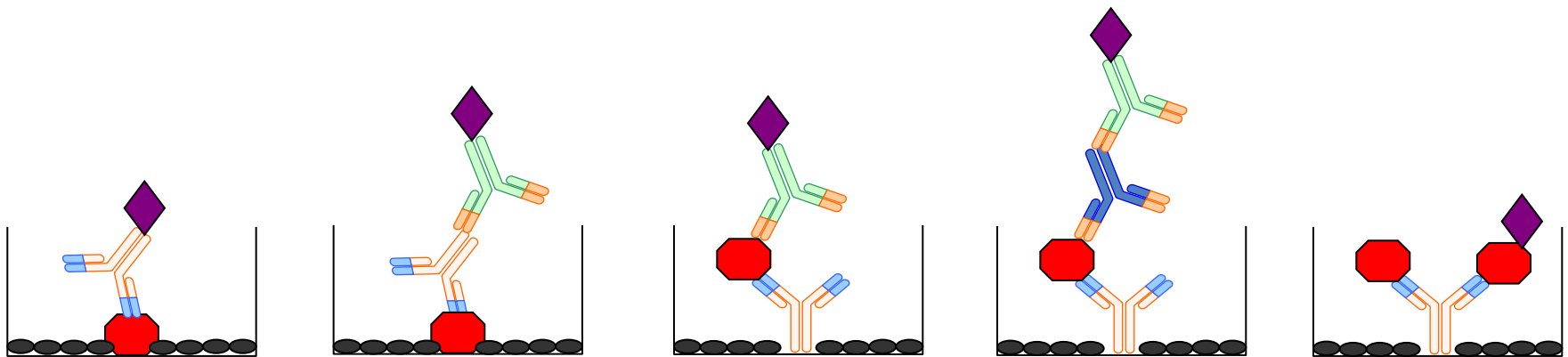
- albumina,
- składowe dopełniacza C3c, C4
- kwaśna  $\alpha_1$ -glikoproteina,
- $\alpha_1$ -antychymotrypsyna,
- apolipoproteina,
- białko CRP,
- haptoglobina,
- $\beta_2$ -mikroglobulina,
- RF,
- hemoglobina,
- czynniki krzepnięcia,
- ASO
- ceruloplazmina,
- transferyna,
- fibronektyna,
- lizozym,
- immunoglobuliny (IgG, A, M, D, E),
- podklasy immunoglobulin (IgG1-4, IgA1-2),
- łańcuchy lekkie Ig  $\kappa$ ,  $\lambda$
- hormony

# Metody ilościowe wykorzystujące znaczniki

testy fazy stałej:

- radioimmunologiczne (RIA)
- immunoenzymatyczne (ELISA)

# Testy fazy stałej



**bezpośredni**

**pośredni**

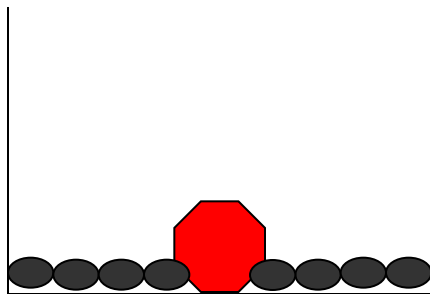
**kanapkowy**

**kanapkowy  
z podwójnym  
przeciwciałem  
detekcyjnym**

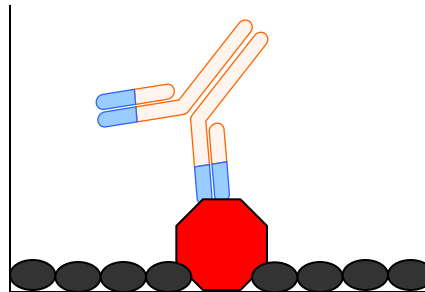
**kompetycyjny**

# Test pośredni w fazie stałej

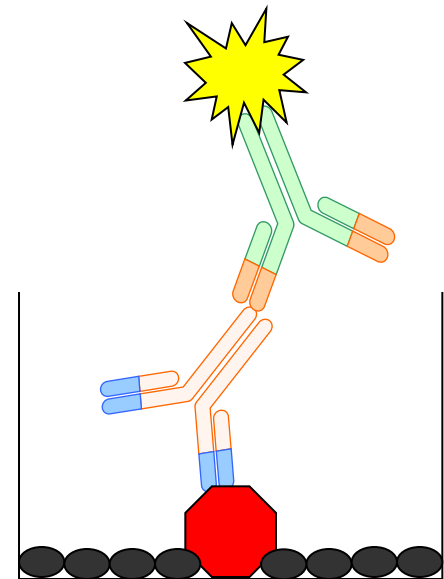
antygen



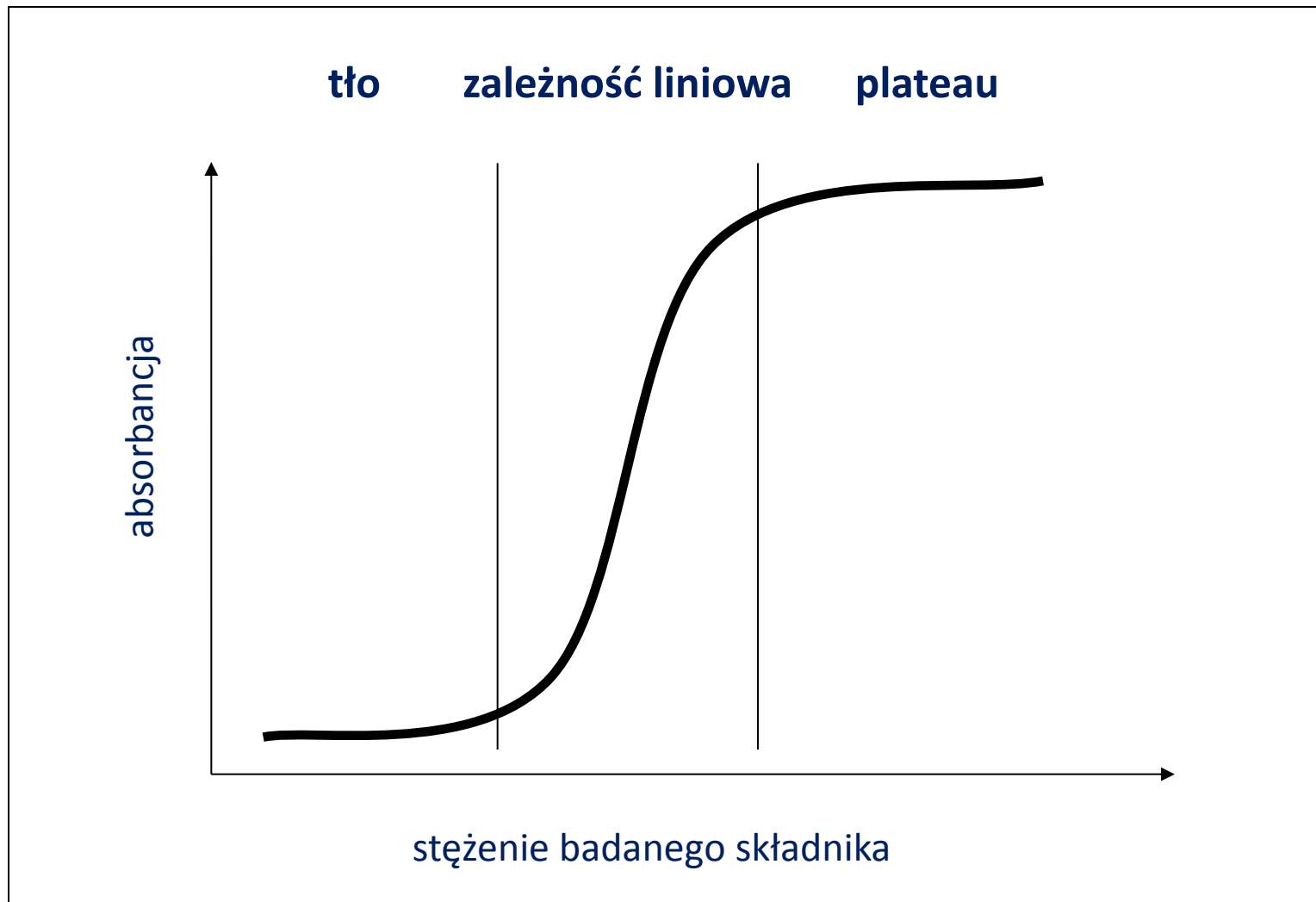
przeciwciała I°



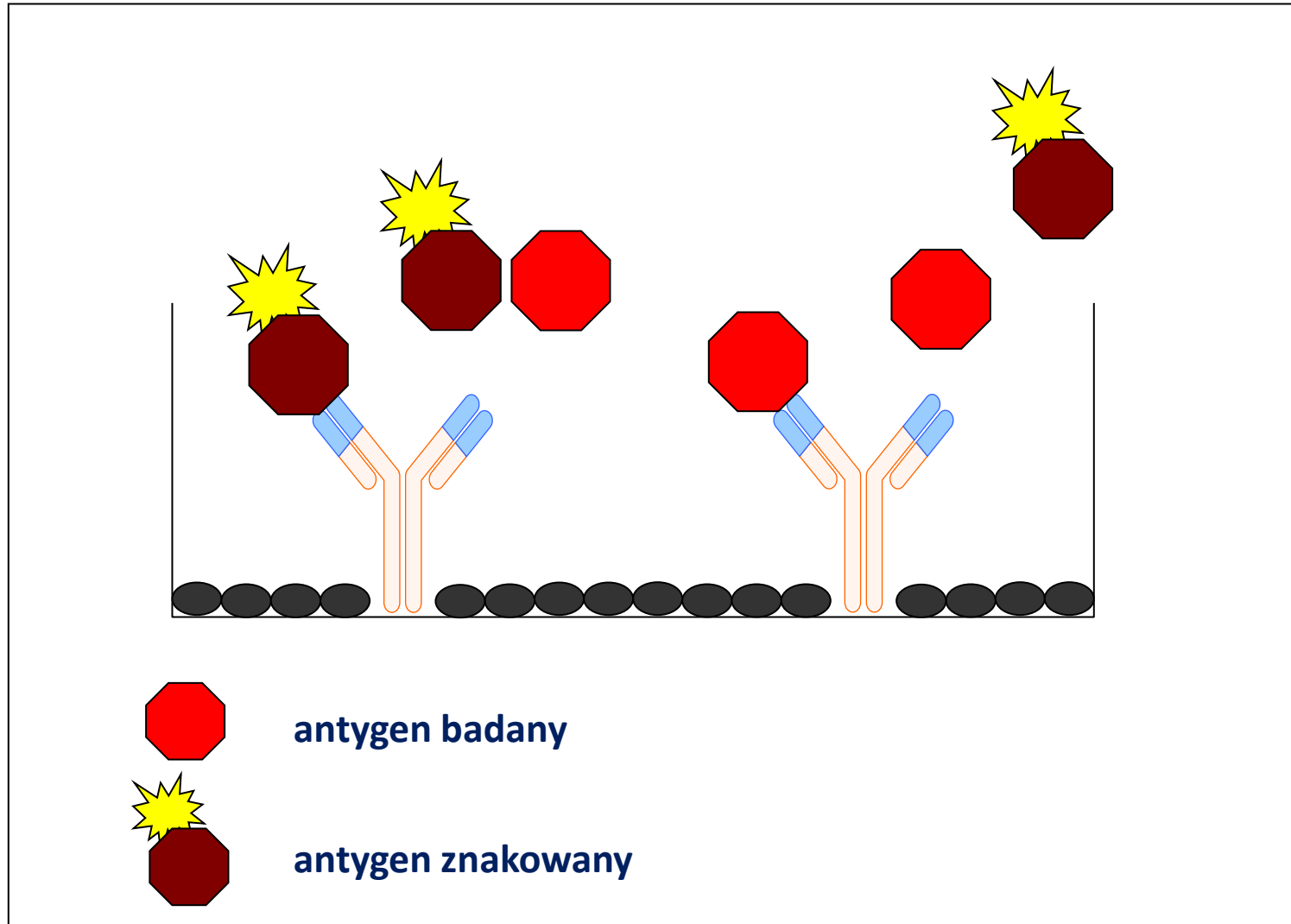
przeciwciała II°  
znakowane



# Krzywa kalibracyjna

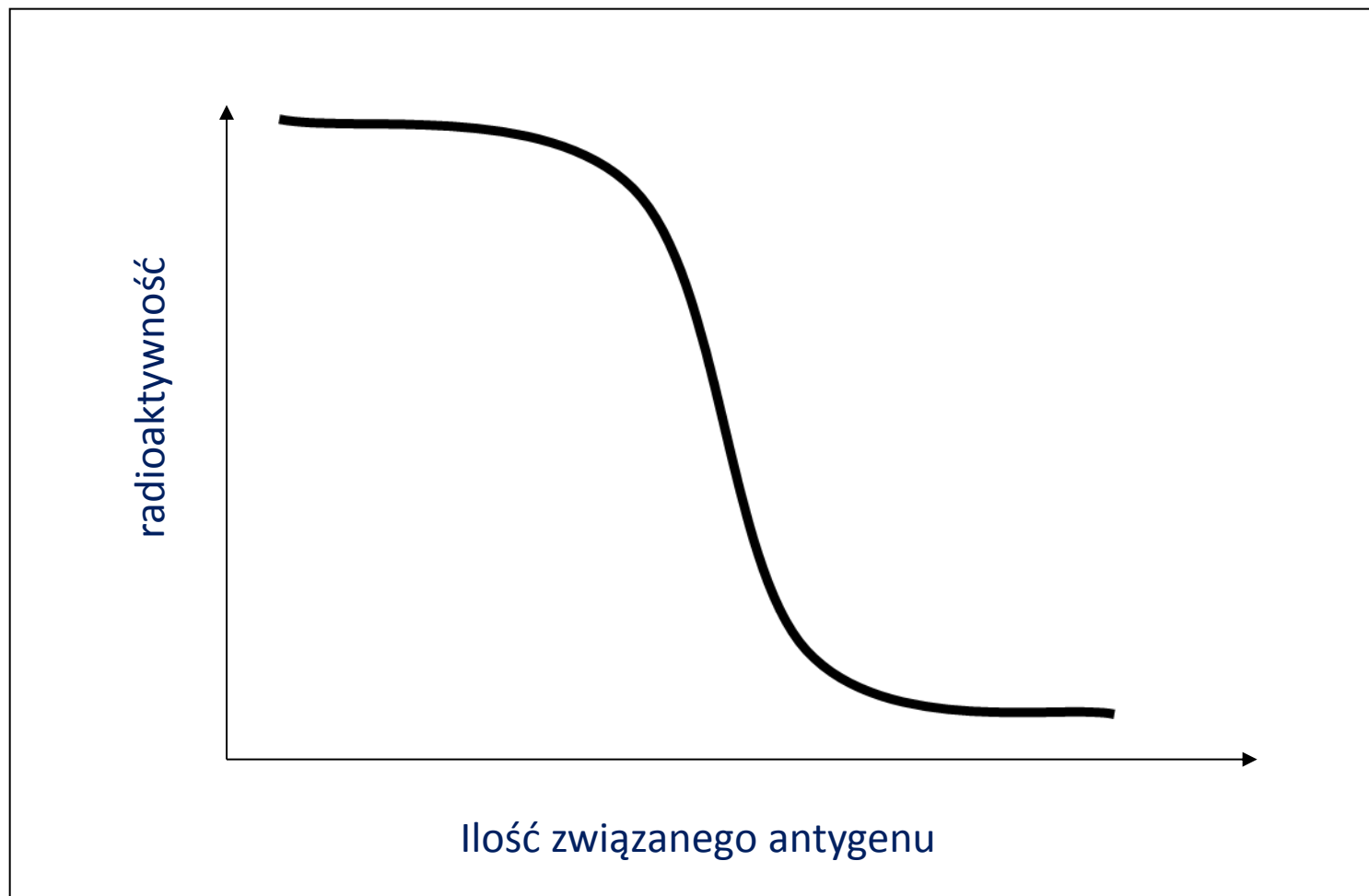


# Test kompetycyjny w fazie stałej





# Krzywa wzorcowa



# Metody radioimmunologiczne

## RIA - Radio-Immuno-Assay

Pomiar radioaktywności substancji znakowanych izotopem promieniotwórczym.

Najczęściej stosowane izotopy:

$^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$  – emitery  $\gamma$  - do znakowania antygenów białkowych

$^{14}\text{C}$ ,  $^3\text{H}$  – emitery  $\beta$  - do znakowania związków drobnocząsteczkowych

1. Test bezpośredni w fazie płynnej (Farra)
2. Test pośredni w fazie stałej,
3. Test podwójnego wiązania w fazie stałej (test „kanapkowy”, sandwich test), IRMA - Immuno-Radio-Metric Assay
4. Test kompetycyjny w fazie stałej,

# Metody radioimmunologiczne

- hormony,
- antygeny nowotworowe (np. CEA, AFP),
- autoprzeciwciała,
- swoiste przeciwciała klasy IgE (np. RAST, RIST),
- leki,
- witaminy.



# Metody immunoenzymatyczne

## ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay

Wykorzystanie katalitycznych właściwości enzymów w wykrywaniu i ilościowym oznaczaniu substancji w reakcjach immunologicznych.

Najczęściej stosowane enzymy:

- Fosfataza alkaliczna
- Peroksydaza chrzanowa
- $\beta$ -Galaktozydaza
- Oksydaza glukozowa
- Ureaza
- Katalaza

# Koniugaty i substraty

znakowane enzymem przeciwciała  
lub antygeny detekcyjne

Enzym	Związek	Odczyt (filtr, $\lambda$ )
Fosfataza alkaliczna	<i>p</i> -nitrofenylofosforan sodowy	410 nm
Peroksydaza chrzanowa	<i>o</i> -fenylenodiamina (OFD) + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	495 nm
	Tetrametylobenzydyna (TMB)	650 nm bez przerywania reakcji 450 nm z H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>

# Testy ELISA w diagnostyce medycznej

- oznaczanie antygenów (kompletnych)
- oznaczanie specyficznych przeciwciał
- testy kompetytywne – oznaczanie haptenów (antygenów niekompletnych)

# Wykrywanie antygenów

- zastosowanie swoistych przeciwciał,
- poliklonalność przeciwciał zwiększa swoistość testu, można użyć przeciwciał od dwóch różnych gatunków zwierząt,
- częściej stosuje się przeciwciała monoklonalne, także dwa różne.

## Oznaczenie stężeń:

- hormonów białkowych
- markerów towarzyszących nowotworom
- białek ostrej fazy
- cytokin,
- cząsteczek adhezyjnych,
- niektórych patogenów

# Wykrywanie swoistych przeciwciał

- Faza stała opłaszczona antygenem izolowanym z danego czynnika patogenego – białka silnie immunogenne wywołujące szybką odpowiedź zainfekowanego organizmu; antygeny rekombinowane zwiększają specyficzność testu; zastosowanie mieszaniny przeciwciał
- Badana surowica z poszukiwanymi przeciwciałami. Jeżeli badany miał kontakt z patogenem, przeciwciała są obecne i zwiążą się z antygenami na płytce.
- Koniugat - przeciwciało przeciwko ludzkim immunoglobulinom (albo konkretnej ich klasie), znakowane enzymem. Wiąże się do badanych przeciwciał, obecnych w kompleksach na płytce.
- Chromogen lub substrat reakcji enzymatycznej, który enzym przekształca w barwny produkt reakcji.

## Zastosowanie:

- diagnostyka chorób zakaźnych
- identyfikacja alergenów
- diagnostyka chorób autoimmunizacyjnych



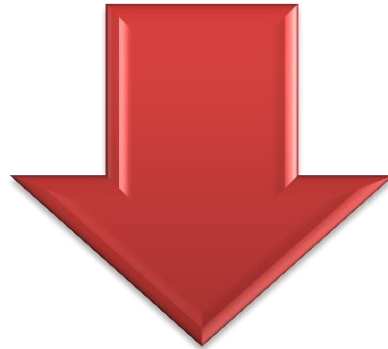
# Wykrywanie haptenów

Testy kompetycyjne (konkurencyjne)

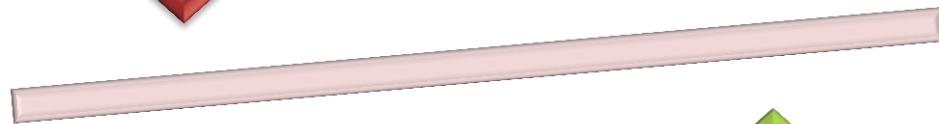
Oznaczenie stężeń:

- hormonów steroidowych i tarczycy
- pozostałości i metabolitów leków
- używek i suplementów (narkotyki, anaboliki)

# ELISA



**wysoka czułość  
i swoistość**



**wysoki koszt,  
czas oznaczenia,  
skomplikowana  
procedura**

