



IMMUNOLÓGIAI ÉS  
BIOTECHNOLÓGIAI  
INTÉZET



# 5. gyakorlat: Immunszerológia precipitáció, agglutináció ELISA, immunoblot technikák

Az immunológia alapjai

PTE-KK, Immunológiai és Biotechnológiai Intézet  
Pécs, 2021.

# A szerológia fogalma

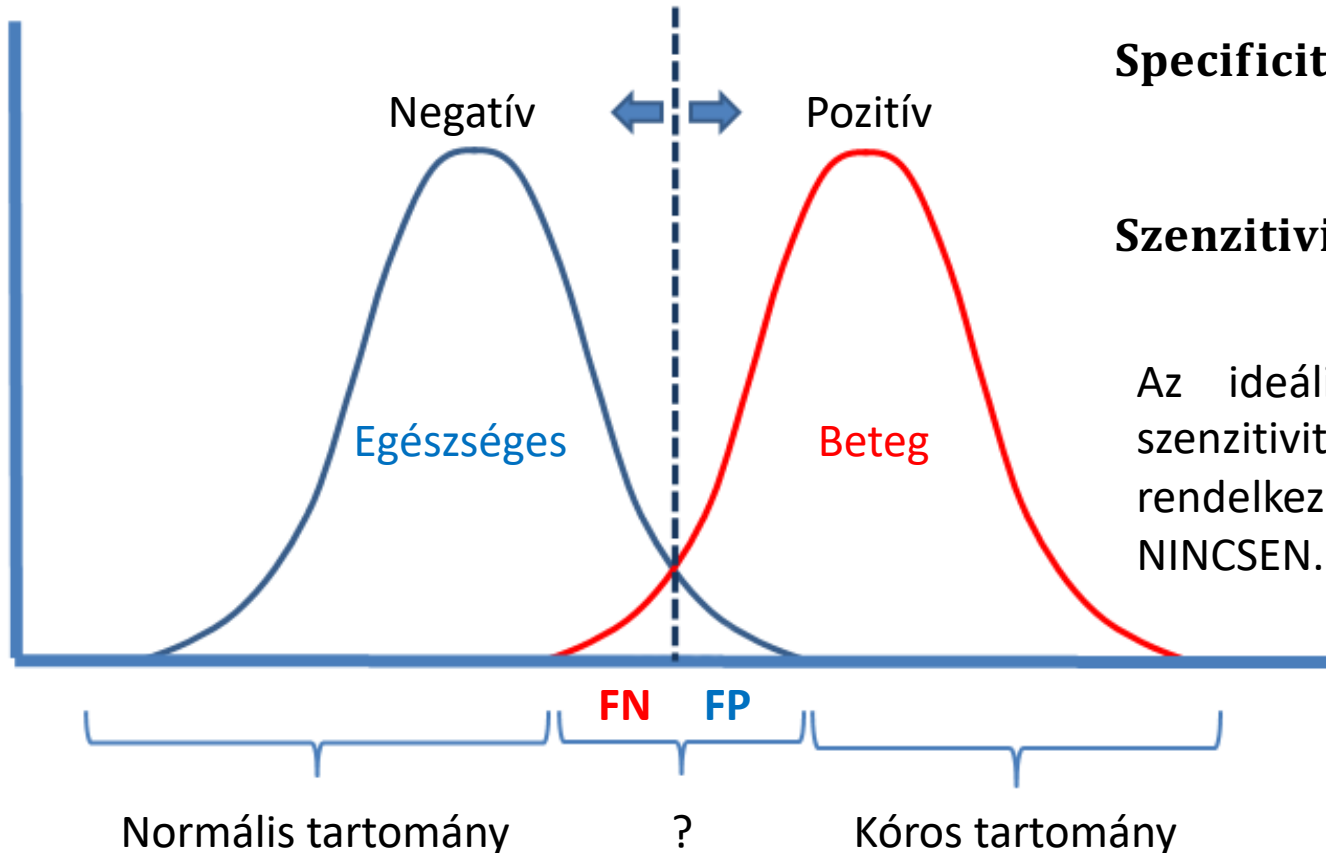
- A **vérszérum** és más testnedvek laboratóriumi vizsgálata, a gyakorlatban elsősorban az azokban található **antitestek** kimutatását értik alatta.
- Emlékeztek?
  - **Vérplazma**: alvadásgátolt vér felülúszója
  - **Vérszérum**: alvadt vér felülúszója
- Ezek is **antigén-antitest reakción** alapulnak (mindkettő kimutatható).
- Milyen módszerek tartoznak ide?
  - **Precipitáción** alapulók
  - **Agglutináción** alapulók
  - **Immunoassay vizsgálatok** (ELISA, ELISPOT, radioimmunoassay, stb., lásd jövő héten)
  - **Immunoblot technikák** (Western blot, Dot blot, lásd jövő héten)
  - **Indirekt immunfluoreszcens mikroszkópia**
- Főbb klinikai felhasználás:
  - **Fertőző betegségek** diagnosztikája (pl. a kórokozók ellen termelt antitestek kimutatása)
  - **Autoimmun betegségek** diagnosztikája (kóros autoantitestek kimutatása)
  - **Immunhiányos állapotok** diagnosztikája (antitestek szintjeinek mérése)
  - **Vércsoport meghatározás**

# Specificitás, szenzitivitás

**FN = Fals negatív**

**FP = Fals pozitív**

Határérték



Fogalmak:[1.]

$$\text{Specificitás} = \frac{\text{Valódi negatív}}{\text{Összes negatív}}$$

$$\text{Szenzitivitás} = \frac{\text{Valódi pozitív}}{\text{Összes pozitív}}$$

Az ideális vizsgálat 100%-os szenzitivitással és specificitással rendelkezik, de ilyen vizsgálat NINCSEN.

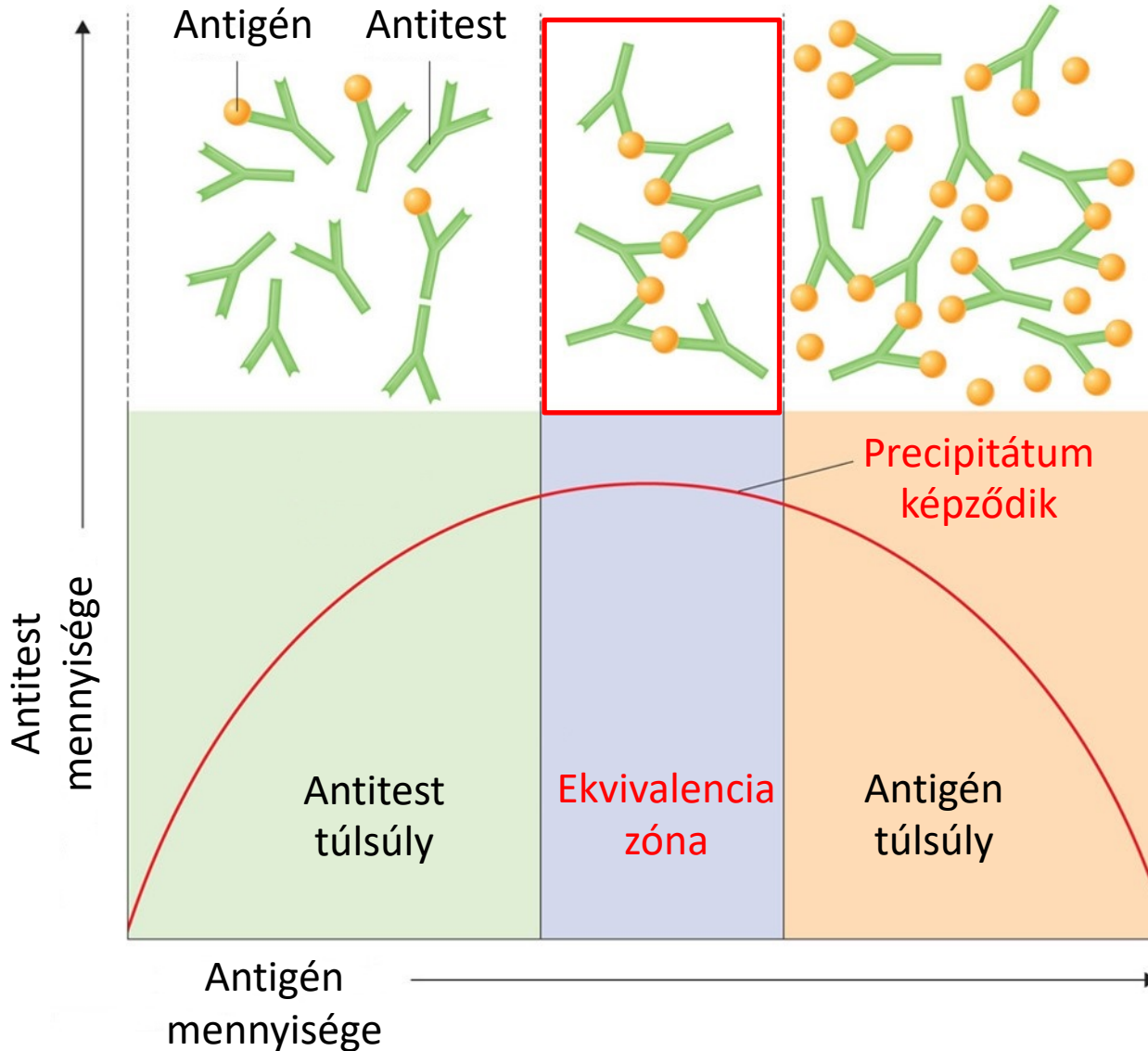
Fals pozitív  
eredmény



Fals negatív  
eredmény



# Precipitáció



Ha az oldatban lévő antigén mellett megfelelő arányban van jelen az azt felismerő antitest is, akkor nagyobb fehérje komplexeket hoznak létre.



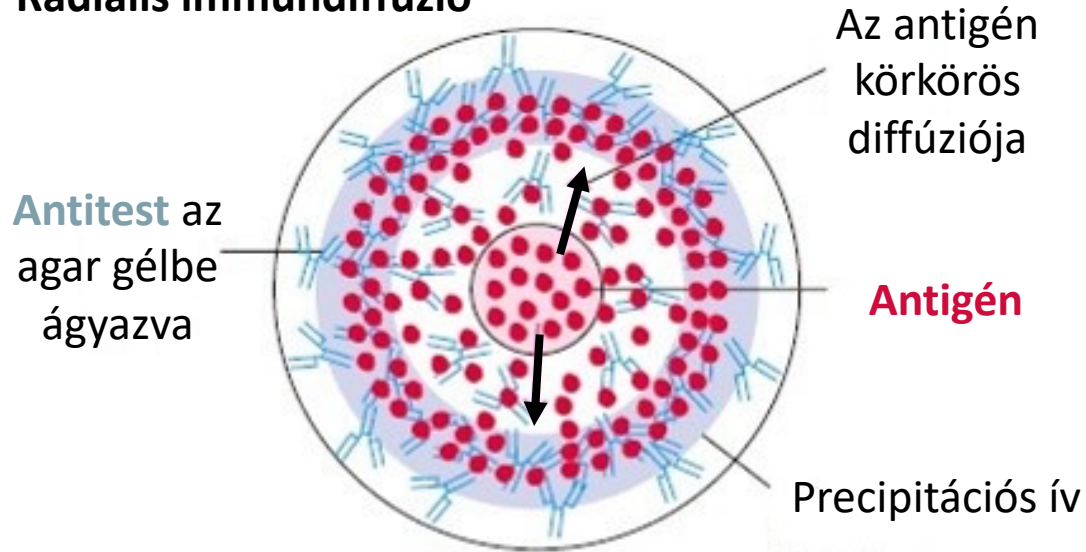
A nagyobb komplexeknek csökken az oldékonysága és kicsapódnak (precipitáció).

Ezen alapul:

- **Immundiffúzió**
- **Immunelektroforézis**

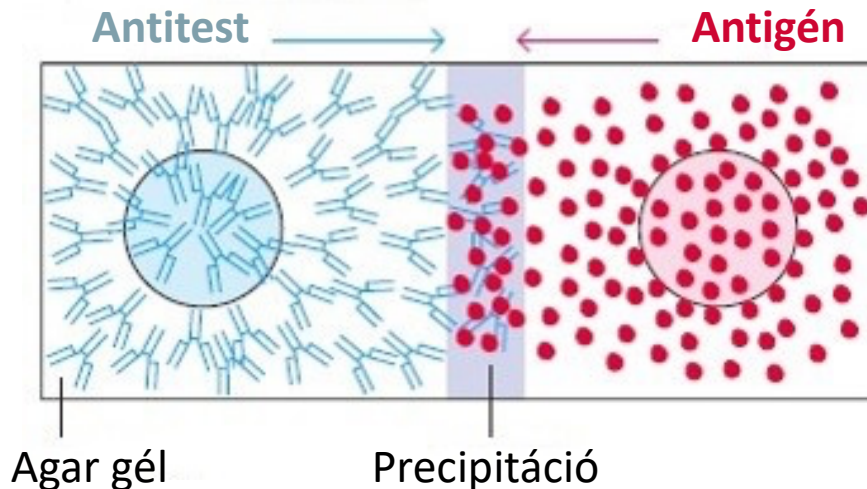
# Immundiffúzió I.

## Radiális immundiffúzió



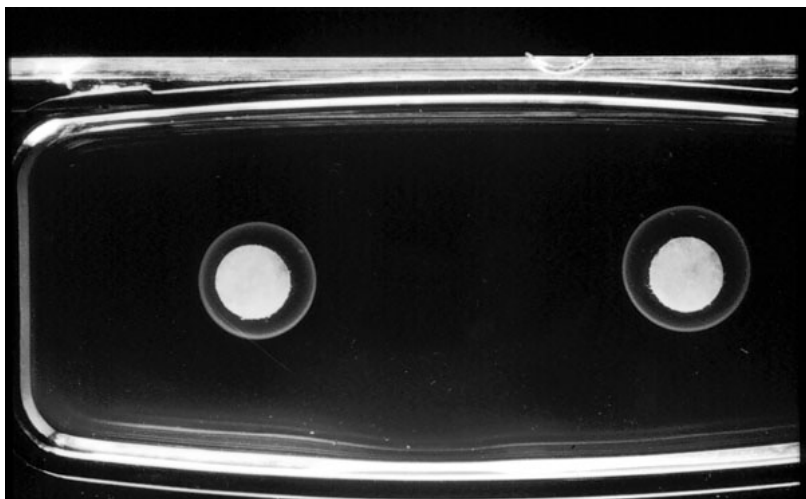
Egyszerűen kivitelezhető, de ma már **elavult** technikák.

## Kettős immundiffúzió



# Immundiffúzió II.

**Mancini-féle**<sup>[2.]</sup> radiális immundiffúzió:



Az agar gél **egyenletes koncentrációban** tartalmaz antigént. Hozzáadják a vizsgált szérumot, az abban található antitest kör irányba elkezd diffundálni. Amint az antigén-antitest arány eléri az ideális tartományt, kicsapódnak.

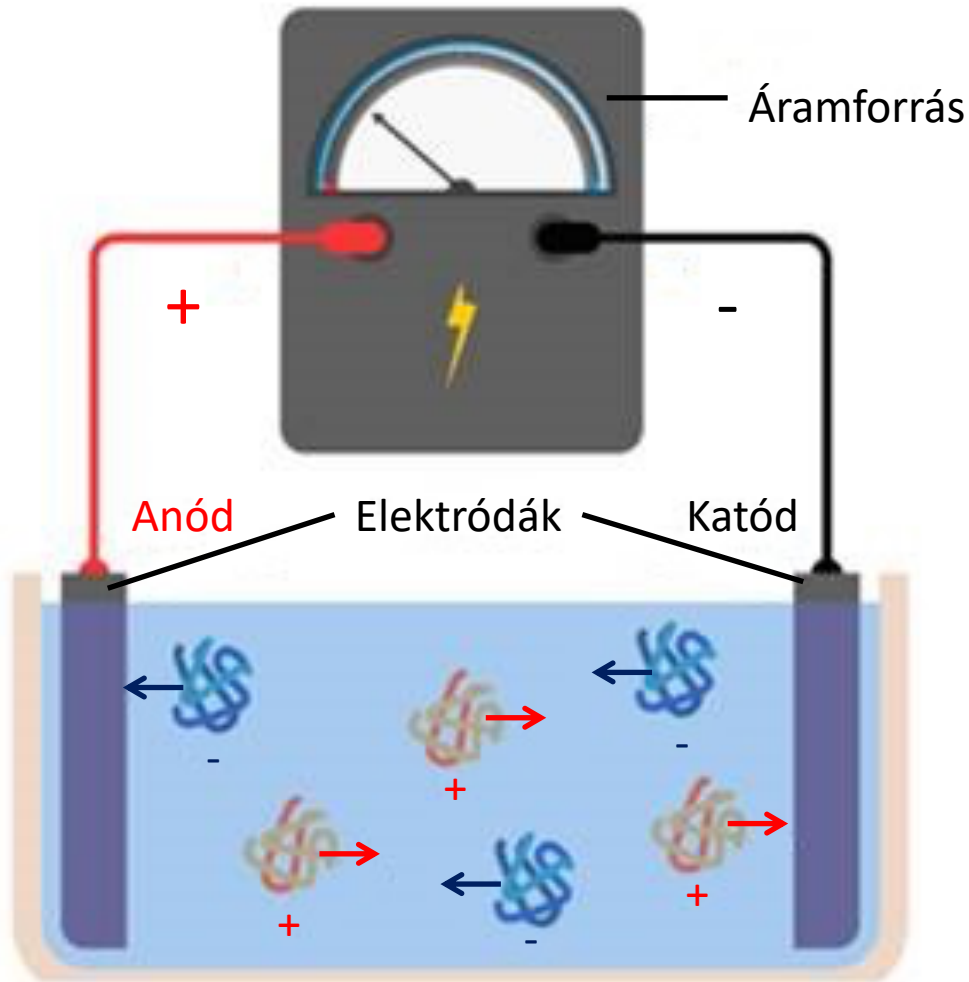
**Szemikvantitatív** módszer.

**Ouchterlony-féle**<sup>[3.]</sup> kettős immundiffúzió:



A gél középső rése az antigént, a körülötte található rések pedig a különböző szérumokat tartalmazzák. Ahogy az antigén és a szérumokban található antitest **egymás felé diffundál**, precipitációs íveket hoznak létre. **Szemikvantitatív** módszer.

# Fehérje elektroforézis

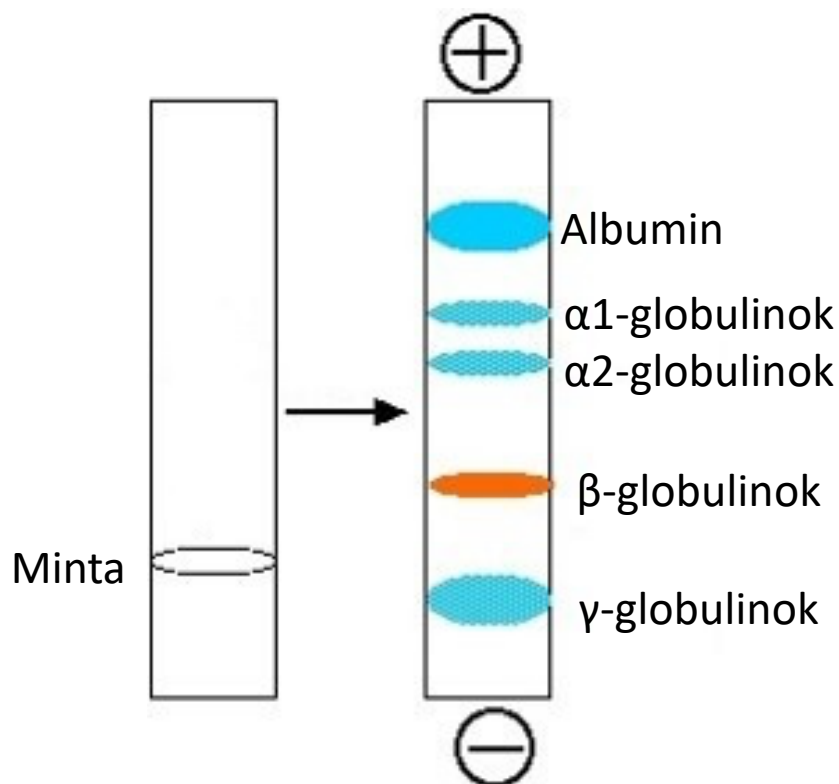


- Az elektromos töltéssel bíró molekulák, köztük a fehérjék is, elektromos erőter hatására a töltésükkel ellentétes pólus irányába vándorolnak.
- A vándorlási sebességük függ:
  - A közeg ellenállásától (standardizálható)
  - Az alkalmazott feszültségtől (standardizálható)
  - A **fehérjék méretétől** és **töltésétől** (utóbbi **pH-függő**)
- Az eltérő sebességgel futó fehérjék így fizikailag **elválaszthatók**.
- A közeg lehet:
  - Szilárd (pl. papír, nitrocellulóz)
  - Fél-folyékony (pl. agaróz vagy poliakrilamid gél)
  - Folyékony



# Szérum protein elektroforézis

- A vészérumot enyhén alkalikus közegben futtatják, ilyen körülmények között a szérum fehérjék többsége a pozitív elektróda felé mozdul el, láthatóvá pedig nem-specifikus fehérje festékekkel tehető.<sup>[4.]</sup>



Arne Tiselius

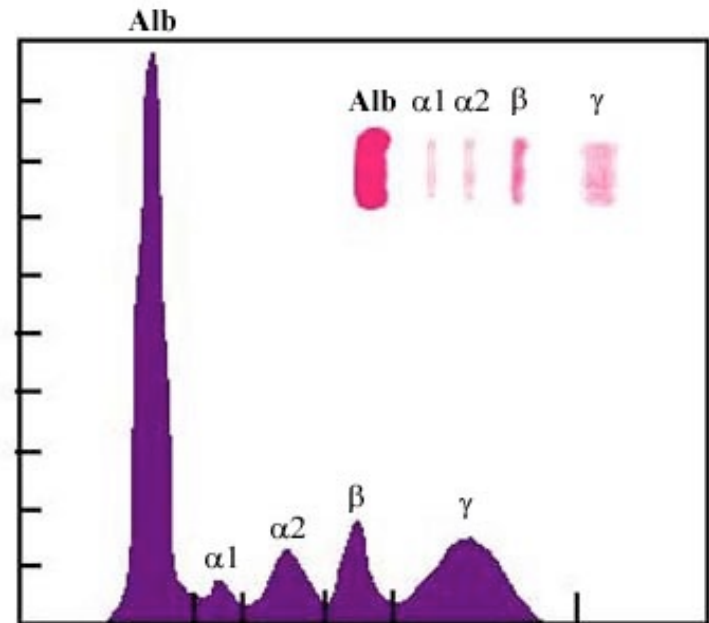
1948-as Kémiai Nobel-díj:

„Az elektroforézis és az adszorpciós analízis terén végzett kutatásaiért, különös tekintettel a szérum fehérjék komplex természetét feltáró eredményeiért.”<sup>[5.]</sup>

# Szérum elektroforézis analízise

Néhány példa az egyes frakciókban futó fehérjékre:[6.]

- Legnagyobb frakció az **albumin**. ↓
- $\alpha$ 1-globulinok:
  - **$\alpha$ 1-antitripszin** ↑
  - **Szérum amiloid A** ↑
  - **Retinol-kötő fehérje** ↓
  - **Transzkortin** ↓
- $\alpha$ 2-globulinok:
  - **Cöruoplazmin** ↑
  - **Angiotenzinogén**
  - **Haptoglobin** ↑
- $\beta$ -globulinok:
  - **$\beta$ 2-mikroglobulin** ↑
  - **Transzferrin** ↓
  - **Plazminogén**
- $\gamma$ -globulinok:
  - **Immunglobulinok**



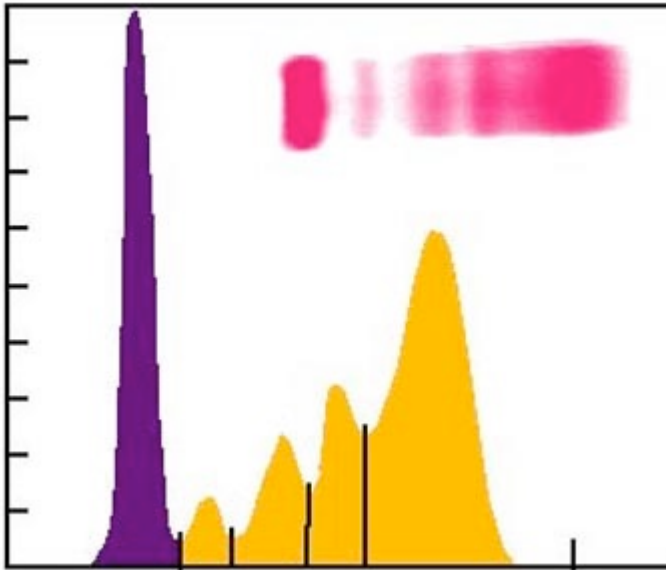
Szérum elektroforézis normális mintázata és az abból készült denzitometriás diagram.

Gyulladásos citokinek hatására (pl.  $\text{TNF}\alpha$ , IL-1, IL-6) az **akut fázis reakció** során a termelésük:

- **Növekszik** (pozitív akut fázis fehérjék, legfőbb képviselőjük a **CRP**, ami a  $\beta$ - és a  $\gamma$ -frakció között fut<sup>[7.]</sup>)
- **Csökken**

# Példák kóros szérumszéklet elektrofórezisére I.

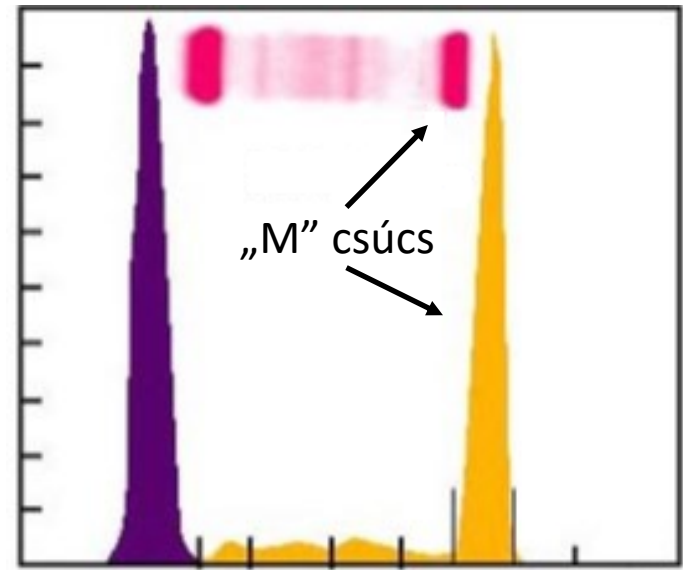
## Poliklonális gammopathia



**Több B-sejt klón** által termelt immunoglobulin többlet, valamilyen **gyulladásos folyamat** áll mögötte:<sup>[7.]</sup>

- Fertőzés
- Autoimmun betegség
- Daganat
- Májbetegség (pl. hepatitis, cirrhosis)

## Monoklonális gammopathia



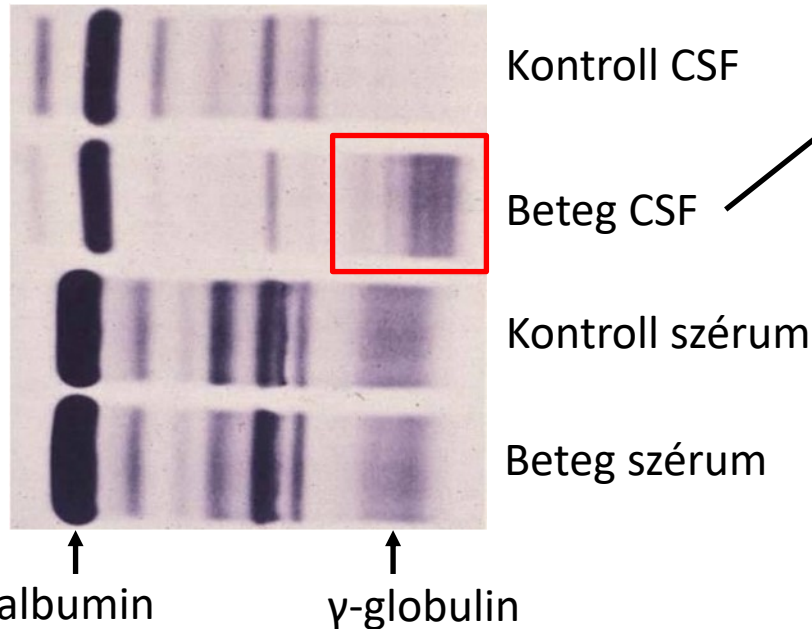
**Egyetlen B-sejt klón** által termelt immunoglobulin többlet, **plazmasejtes daganat** áll mögötte:<sup>[7.]</sup>

- Myeloma multiplex
- Waldenström macroglobulinaemia
- MGUS (Monoclonal gammopathy of undetermined significance)



# Egyéb testfolyadékok elektroforézise

## Liquor cerebrospinalis (CSF)

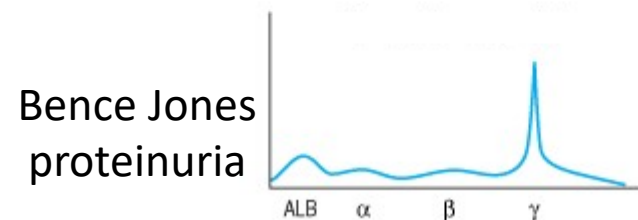
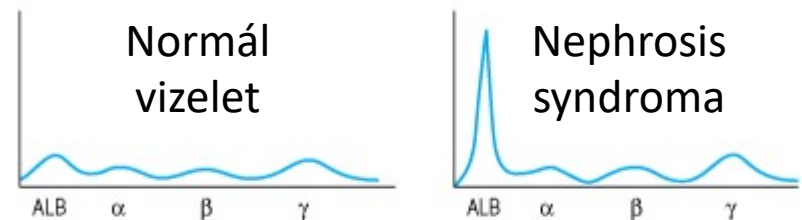


A beteg esetében több, különböző csík látszik a gamma-globulin frakcióban, ami azonban eltér a szérumban található mintázattól.

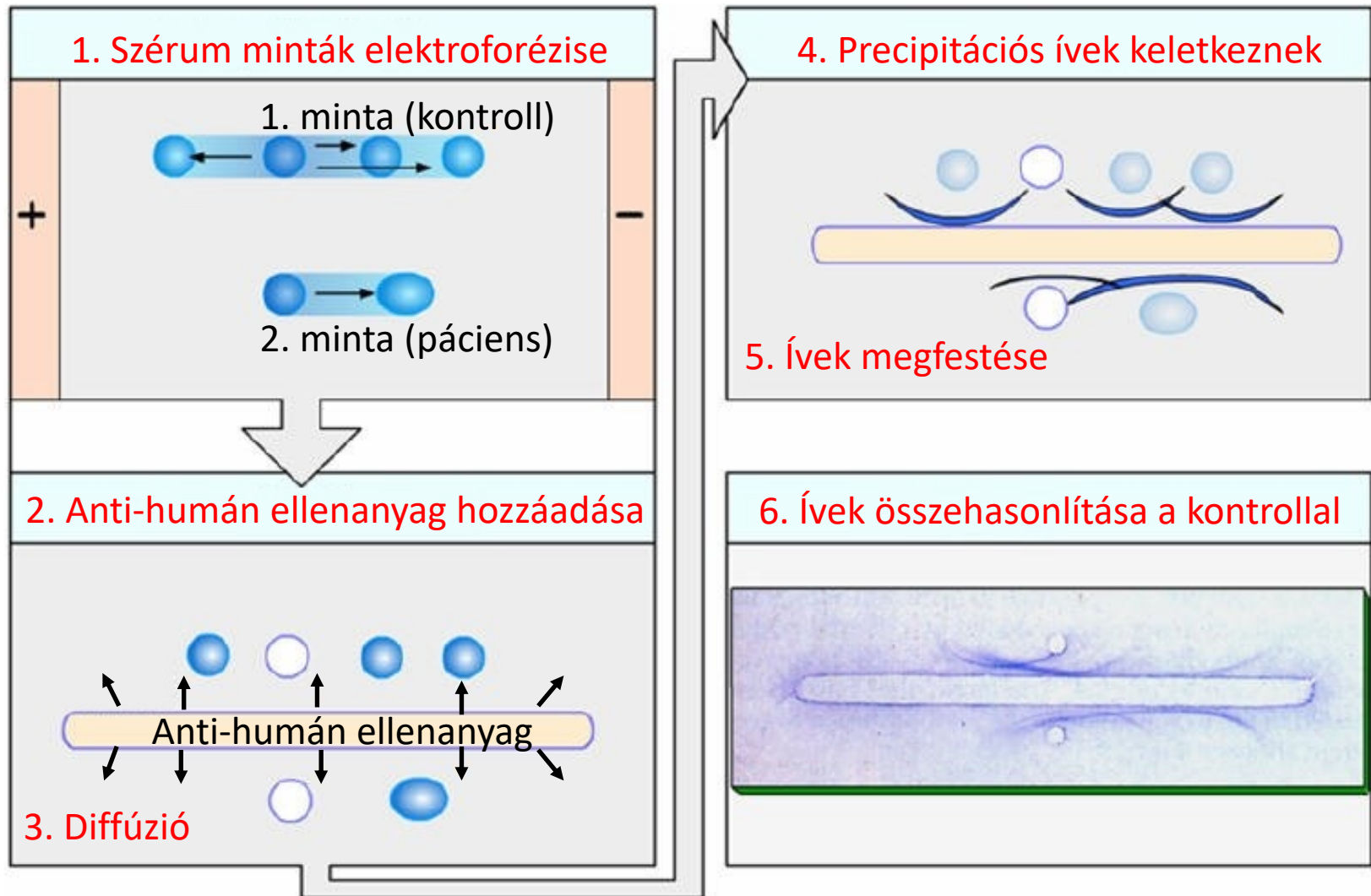
↓  
Kóros immunglobulin termelődik helyileg a központi idegrendszerben. (oligoklonális gammopathia, pl. sclerosis multiplex esetén<sup>[9.]</sup>)

## Vizelet elektroforézis:

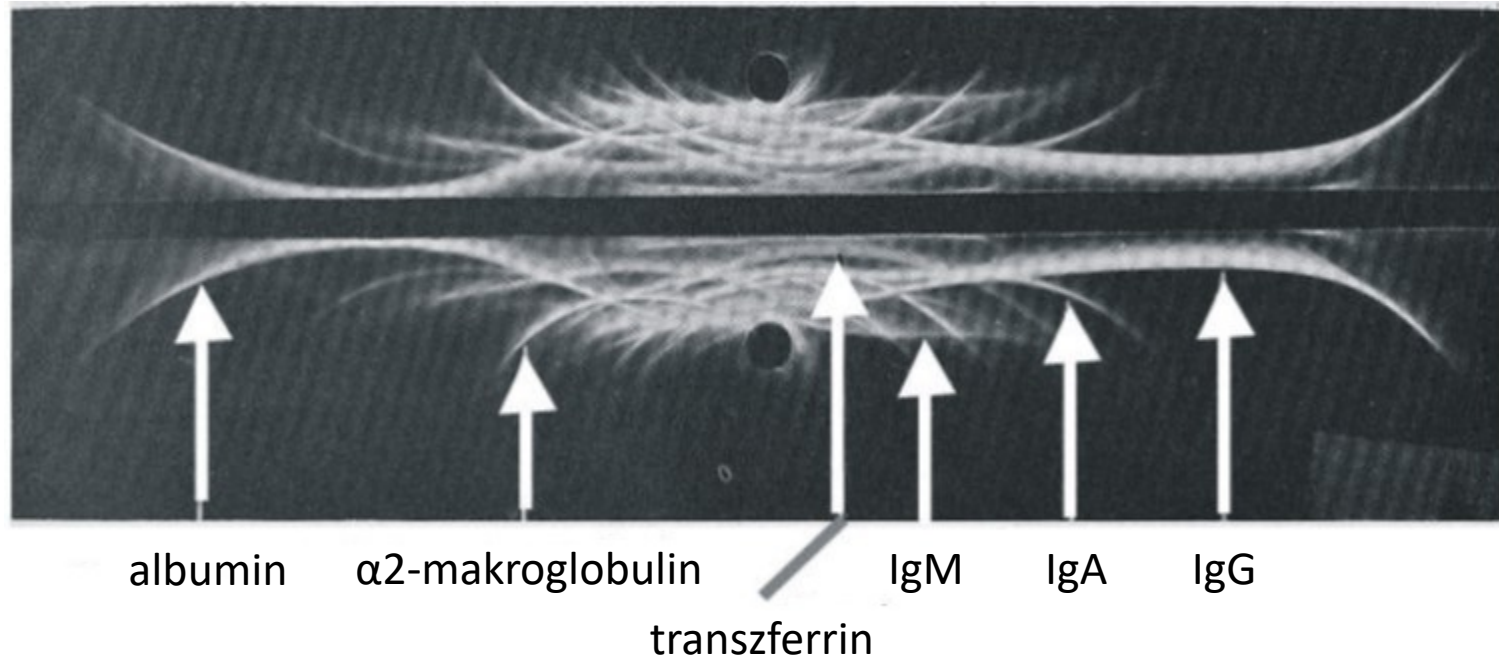
Myeloma multiplex gyanúja esetén, szérum elektroforézissel egy időben végzik, a vesében kórosan filtrálódó immunglobulin könnyű láncot (Bence Jones fehérje<sup>[10.]</sup>) keresik.



# Immunelektroforézis I.



# Immunelektroforézis II.



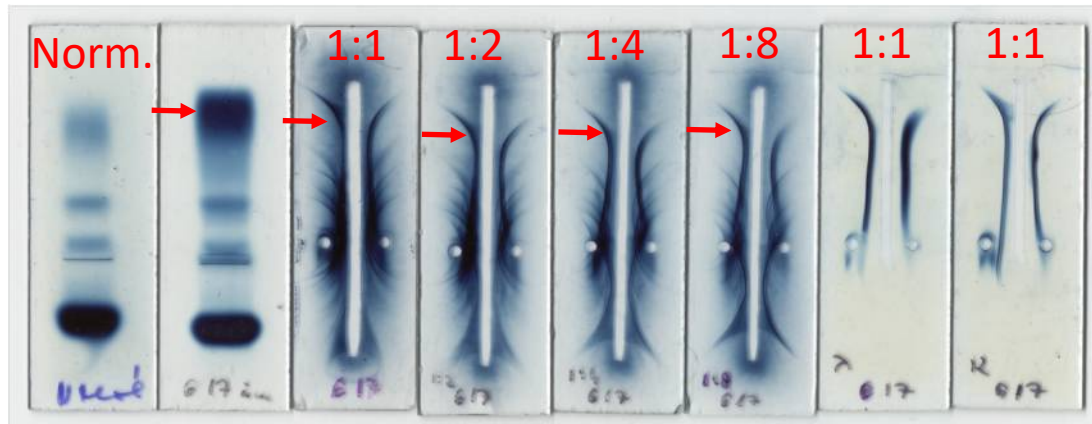
A látható íveket mindig normál kontrollal hasonlítják össze.<sup>[11.]</sup>

Poliklonális ellenanyagok használata esetén a formálódó ívek száma attól függ, milyen anti-humán szérumot használnak (ló, nyúl, kecske, stb.).

Monoklonális ellenanyagok segítségével egy-egy szérumfehérje specifikusan azonosítható a mintában.

**Szemikvantitatív vizsgálat**, a klinikai gyakorlatban ma már nem használják.

# 1. Poliklonális hipergammaglobulinémia (Rheumatoid arthritis)



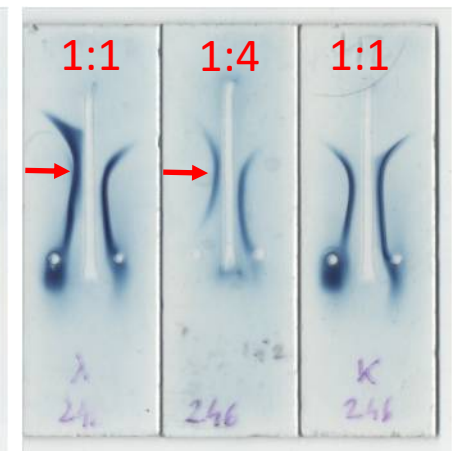
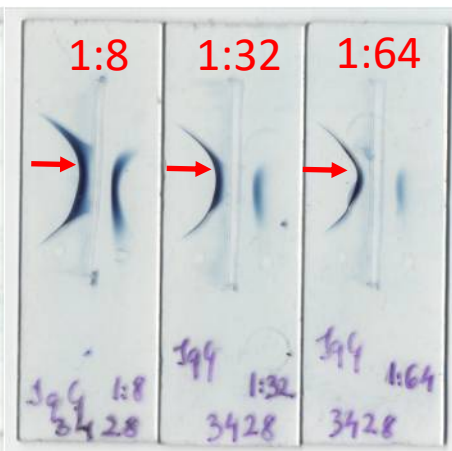
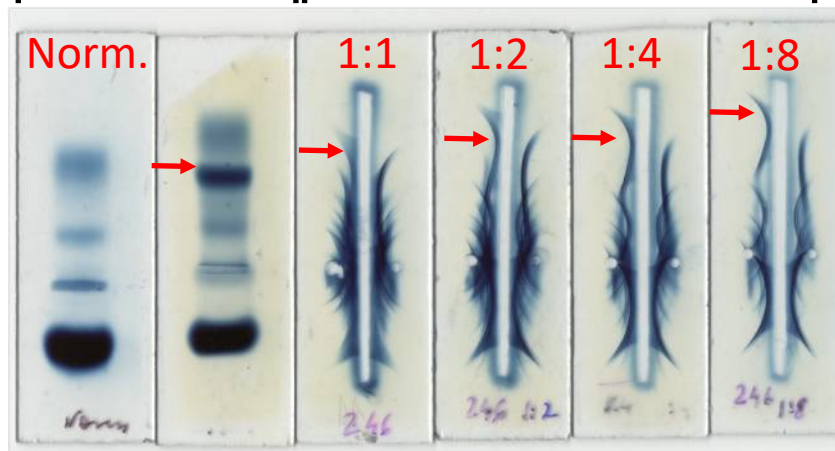
Sérum ELFO

Poliklonális iELFO

Anti-IgG

Anti-λ

Anti-κ



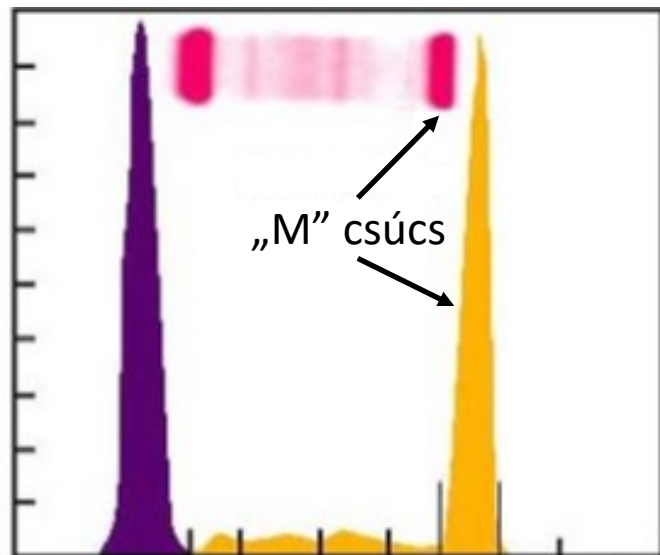
(Magyarázat:

Az 1. betegnél autoimmun folyamat eredményeként több B-sejt klón aktiválódott és termelt ellenanyagot, míg a 2. betegnél egyetlen daganatos klón szaporodott fel, az utódsejtek mindegyike ugyanolyan izotípusú immunglobulint termel.)

# 2. Monoklonális gammopathia (IgG λ immunglobulint termelő myeloma multiplex)



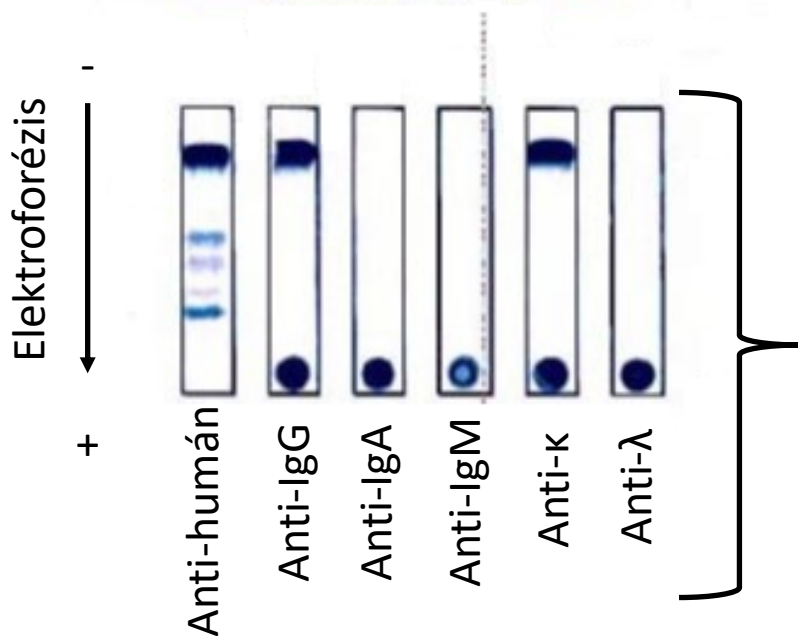
# Immunfixáció



1. Több párhuzamos szérumszérum elektroforézist végeznek ugyanabból a betegmintából.<sup>[12.]</sup>
2. Ezt követően az egyes megfuttatott géleken antitestekkel mutatnak ki meghatározott fehérjéket. (A hozzáadott antitest az antigénnel precipitátumot képez, mely valamilyen festék hozzáadásával látható. Az antigének az esetek többségében maguk a humán immunglobulinok.)

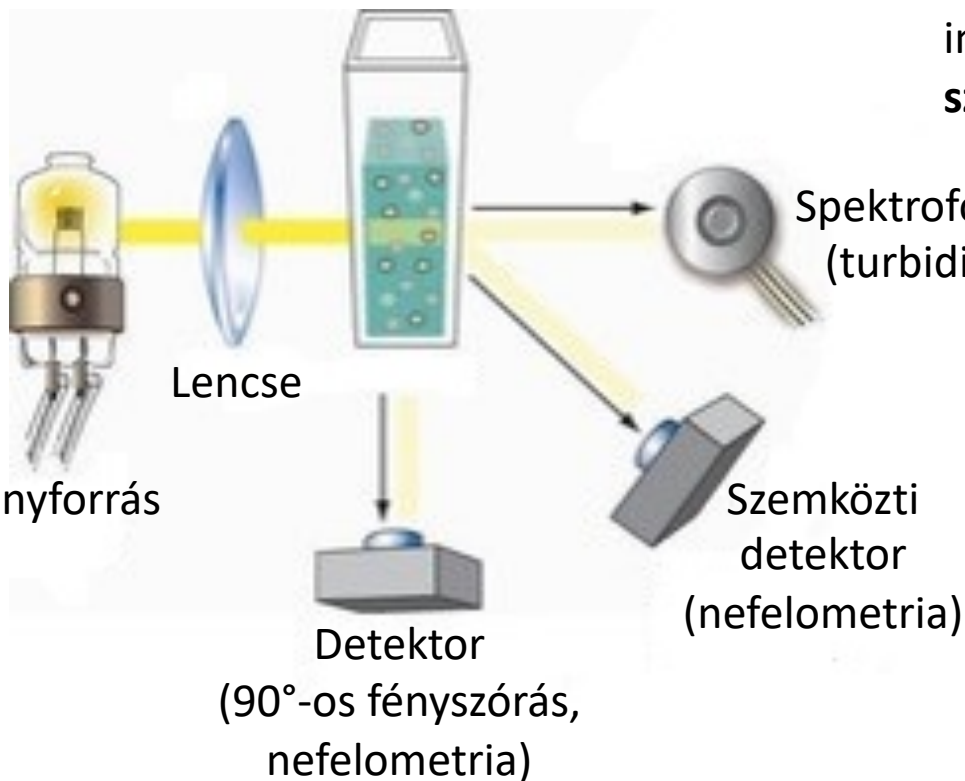
Felhasználás:

- Általában **plazmasejtes daganatok** diagnosztikája a rájuk jellemző kóros monoklonális antitestek („**paraprotein**”) kimutatásán keresztül a szérumban.<sup>[13.]</sup>



IgG  $\kappa$  izotípusú monoklonális ellenanyagot termelő myeloma multiplex

# Nefelometria, turbidimetria



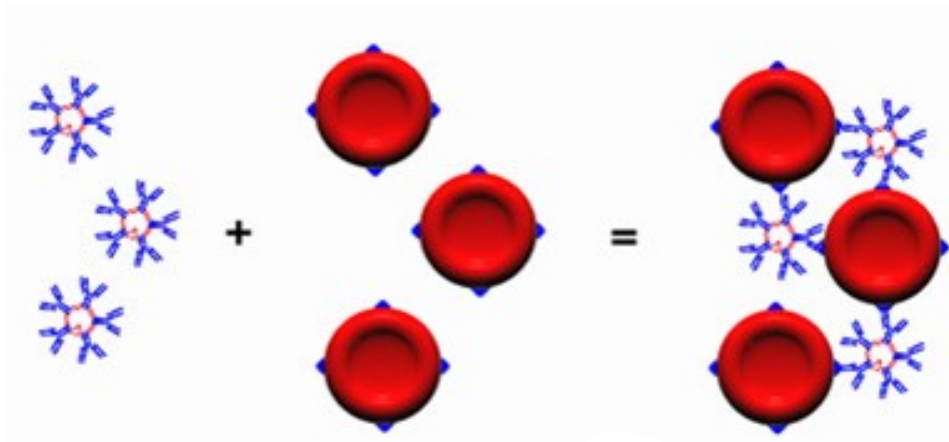
Az **oldatban** található **makromolekulák** (pl. immunkomplexek) a méretükkel arányosan **szórják a fényt**.

Nefelométer segítségével a **fényszórás alapján** azonosítható a vizsgált komplex, turbidimetria esetén pedig a küvettán átjutott **fény intenzitásának csökkenését** mérik.<sup>[14.]</sup>

**Felhasználásuk:** Immunkomplexek mérése, pl. össz IgA, IgM, IgG szintek meghatározása, könnyű lánc szint mérése (pl. myeloma multiplexben), complement szintek mérése

# Agglutináció

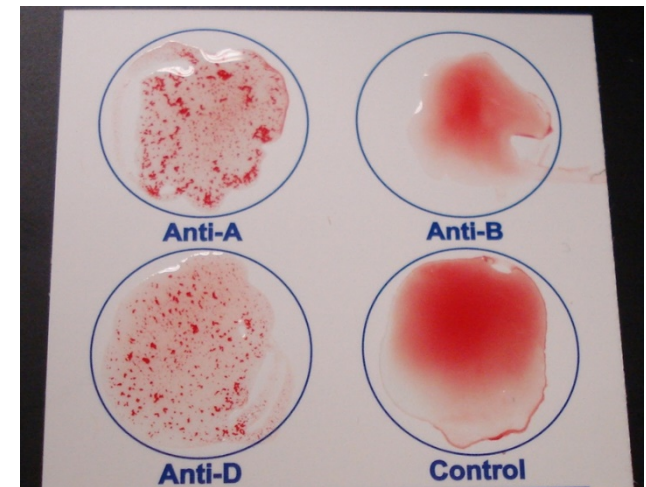
- Ha az antitestek **nagyobb partikulumokat** (pl. sejteket, latex gyöngyöket) kötnek keresztbe, azok **összecsapzódnak**. = **agglutináció** (ha vörösvérsejtek csapzódnak össze, akkor **hemagglutináció**)
- Az agglutináció az **antitestek egyik élettani funkciója** is, a kórokozók agglutinációja hátráltatja a fertőzések terjedését.<sup>[15.]</sup>
- Lehet **direkt** vagy **indirekt**, illetve **aktív** vagy **passzív**.
- Számos laboratóriumi teszt agglutináción alapul, melyek szabad szemmel is láthatók.



Anti-„A” IgM

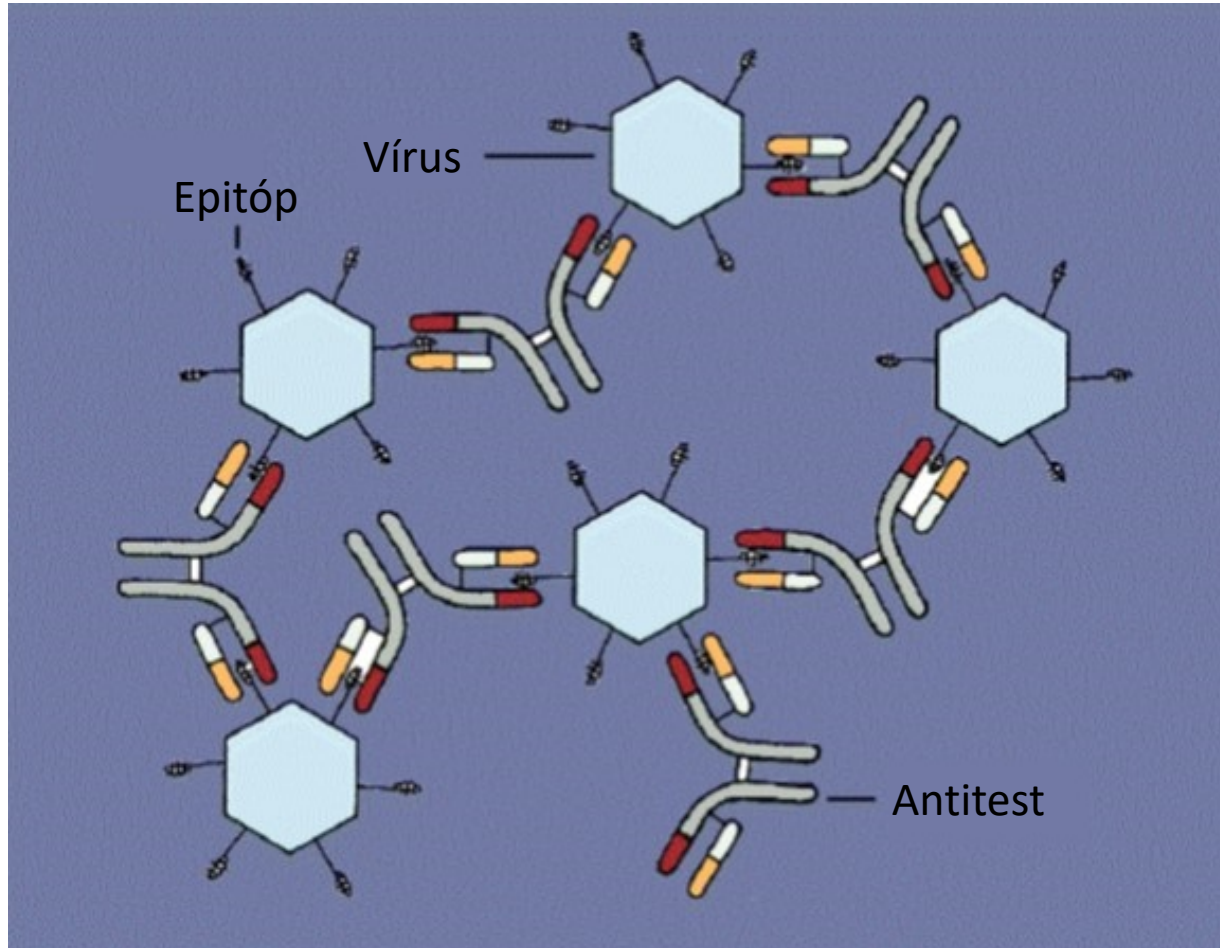
Vörösvérsejt  
„A” antigénnel

Hemagglutináció



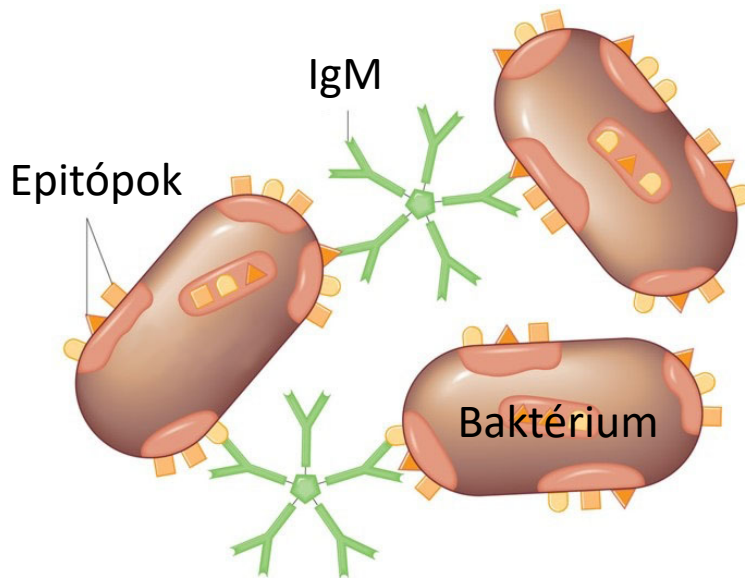
Vércsoport meghatározás:  
A, Rh(D) pozitív

# Az agglutináció élettani szerepe



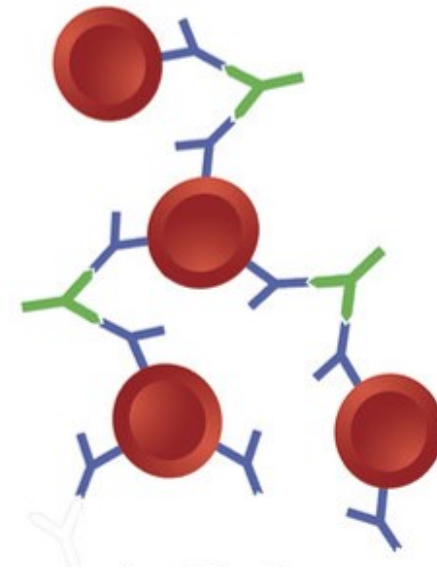
# Direkt vagy indirekt

## Direkt agglutináció:



- Ugyanaz az antitest képes keresztbe kötni a partikulumokat.
- Az **IgM** izotípusú antitestekre jellemző.

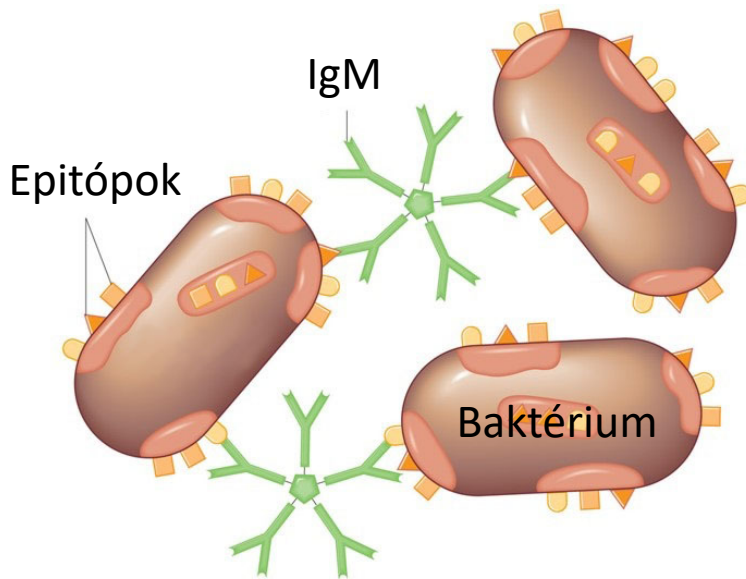
## Indirekt agglutináció:



- Egy másodlagos antitest köti keresztbe a részecskéket.

# Aktív vagy passzív

## Aktív agglutináció:



- A sejt a **saját**, sejtfelszíni **antigénjével** vesz részt a reakcióban.
- Példa:
  - Vércsoport meghatározás
  - Bakteriális sejtfelszíni antigén kimutatása

## Passzív agglutináció:

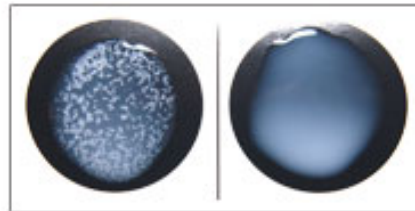


- A reakcióban résztvevő hordozó részecskére **mesterségesen van rákötve az antigén.**
- Példa:
  - Latex agglutinációs tesztek (lásd következő diákon)

# Az agglutináció orvosi jelentősége

- Az antitestek egyik élettani funkciója, a kórokozók elleni védelem része.
- Bizonyos kórállapotokban (pl. autoimmun haemolyticus anaemia, AIHA) in vivo is létrejöhet hemagglutináció.
- Diagnosztikai tesztek:
  - **Latex agglutinációs tesztek:**
    - **Autoimmun kórképek** (autoantitestek kimutatása)
    - **Fertőzések** (kórokozó antigénjét vagy az ellene termelt antitestet mutatják ki)
    - Egyéb fehérjék (pl. CRP, hCG, D-dimer) kimutatása
  - **Hemagglutinációs tesztek:**
    - **Vércsoport meghatározás**
    - **Coombs-teszt**
    - Hemagglutinációs assay
  - Hemagglutináció-gátláson alapuló vizsgálatok:
    - Vírus hemagglutininek azonosítása
    - Vírus hemagglutininek neutralizáló antitestek tesztelése

# Latex agglutinációs teszt



Pozitív      Negatív

**Latex gyöngyök** felszínére van kötve a reakcióban résztvevő antigén/antitest.



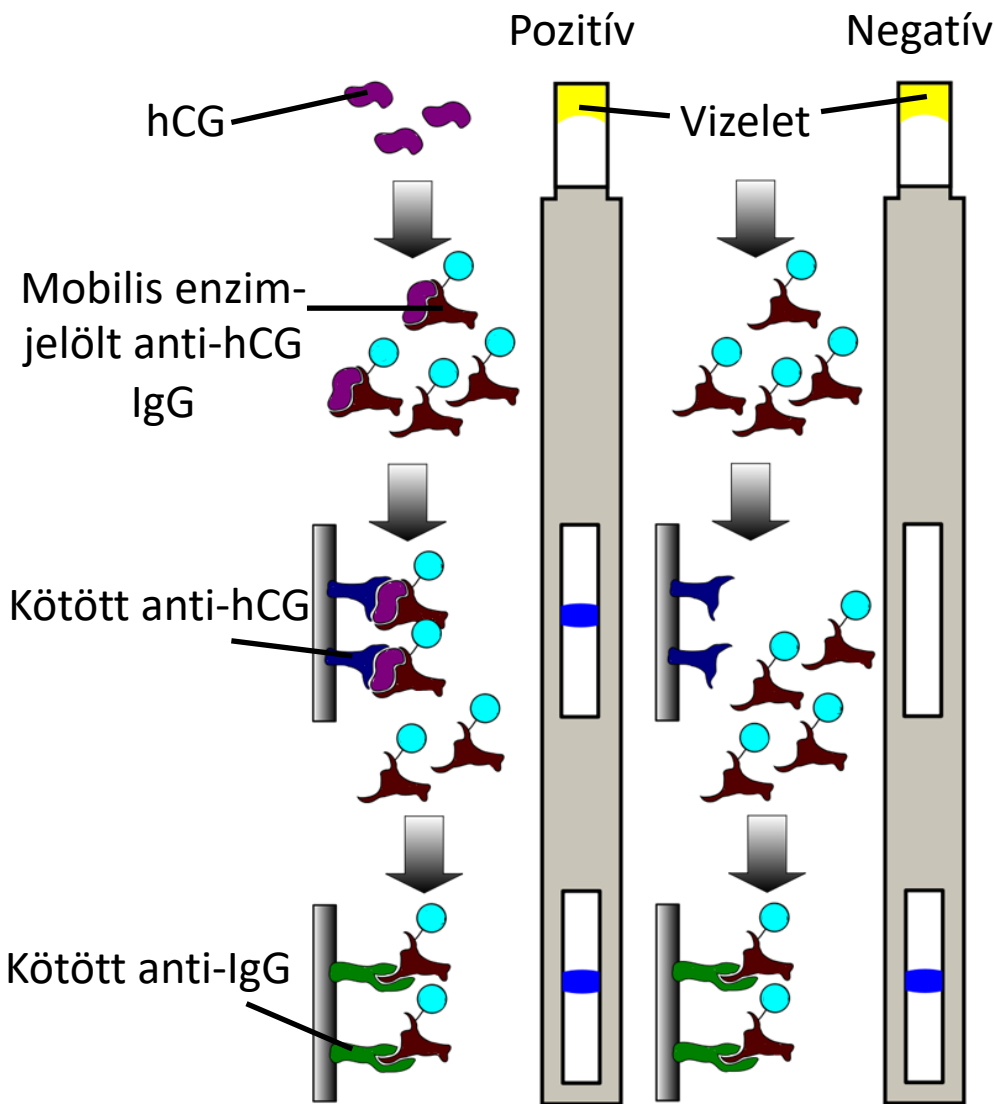
Ha a hozzáadott mintában jelen van a vizsgált antitest/antigén, akkor az a gyöngyök összezsapzódását idézi elő.

Felhasználás:

- **Autoimmun kórképek diagnosztikája, pl.:**
  - Rheumatoid arthritis (rheumatoid faktor, RF<sup>[16.]</sup>), SLE (különböző autoantitestek)
- **Fertőző betegségek diagnosztikája**
  - Kórokozó elleni antitestek kimutatása (pl. anti-streptolizin O antitest, ASO/AST<sup>[17.]</sup>)
  - Bakteriális antigének kimutatása
- Egyéb fehérjék kimutatása, pl.:
  - **C-reaktív protein** (CRP, akut fázis fehérje<sup>[18.]</sup>), D-dimer<sup>[19.]</sup> (vérrögképződés jele lehet), **humán choriogonadotropin** (hCG, terhességben)

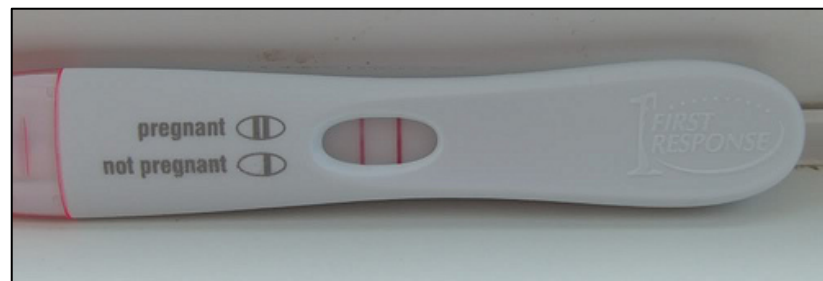


# Terhességi gyorssteszt



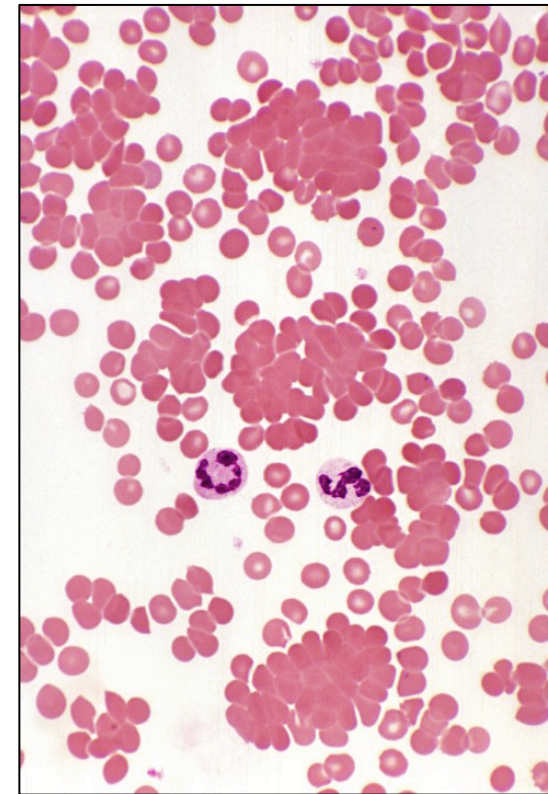
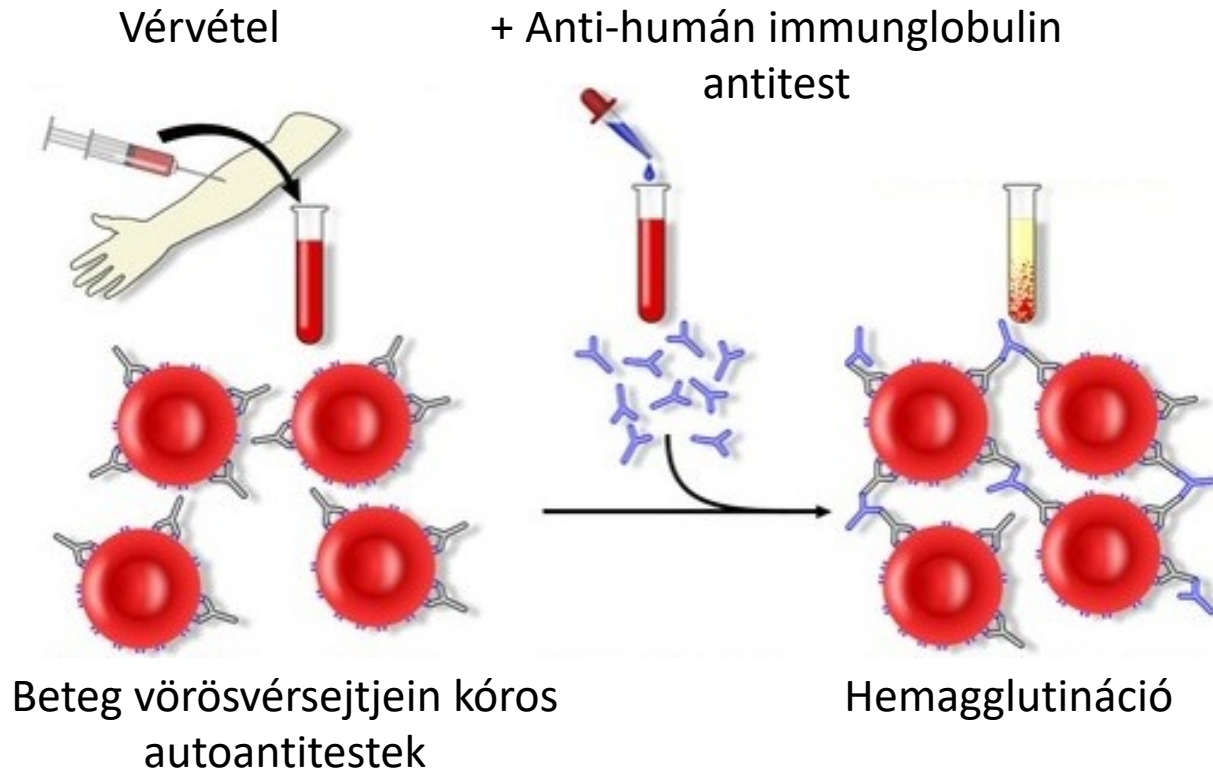
A megtermékenyülést követően a trophoblastok által termelt hCG megjelenik a vizeletben.

A hCG számos immunológiai módszerrel (ELISA, agglutináció) kimutatható, a gyorssteszték **kromatográfián** alapulnak.<sup>[20.]</sup>



Csík akkor jön létre, ha megkötődik az enzim-jelölt antitest. Ha nincs hCG a vizeletben, akkor ez csak a kontroll esetében következik be és egy csík látható.

# Direkt Coombs-teszt (Direkt antiglobulin teszt<sup>[21.]</sup>)

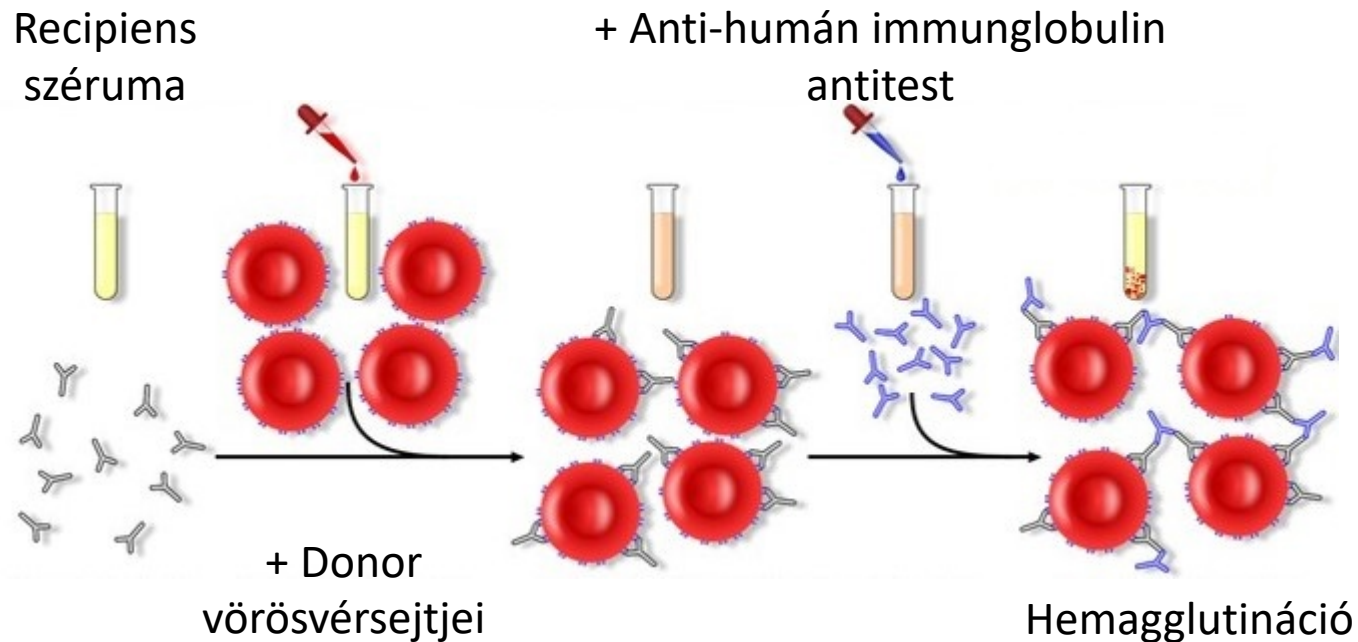


In vivo  
hemagglutináció  
AIHA-s betegben.

Felhasználása: **Immun-mediált haemolysisek** diagnosztikája,<sup>[22.]</sup> pl.:

- AIHA (autoimmun haemolyticus anaemia, anaemia=vérszegénység)
- Erythroblastosis foetalis (Alloimmun magzati haemolyticus vérszegénység)

# Indirekt Coombs-teszt (Indirekt antiglobulin teszt)

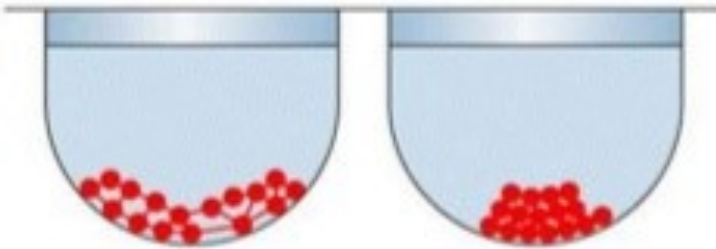


Felhasználás:

- **Vérátömlesztések** előtti antitest szűrés<sup>[23.]</sup> (ABO és Rh mellett egyéb antitestek jelenlétét keresik a recipiens szérumában.)
- **Terhesgondozás** során a placentán átjutó, erythroblastosist okozó Rh(D)-ellenes antitestek szűrése.<sup>[24.]</sup>

# Hemagglutinációs assay

1:20 1:40 1:80 1:160 1:320 1:640 Kontroll



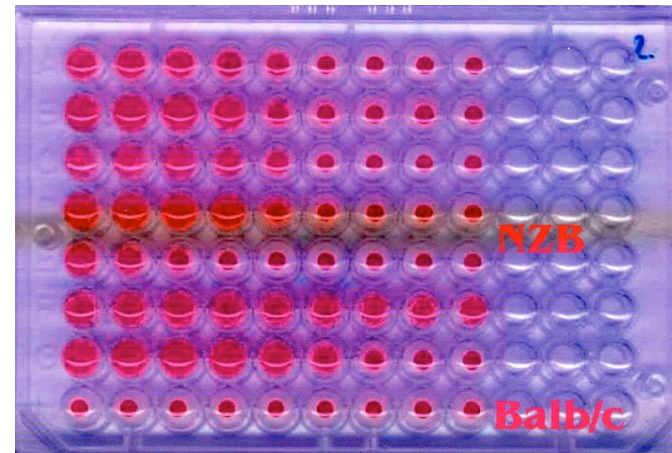
Hemagglutináció

Negatív

Minden részbe ugyannyi **vörösvérsejtet** helyeznek, majd a mintát sorozatos feles hígításokban adják hozzájuk.

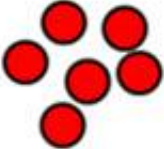
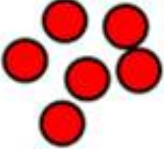

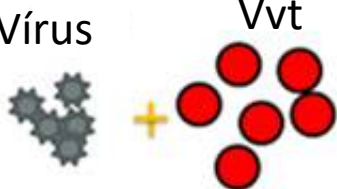


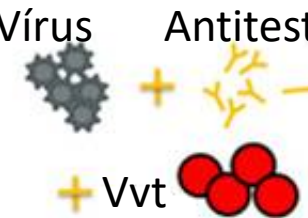
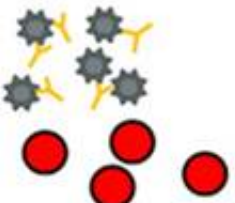



**Pozitív reakció** esetén a vörösvérsejtek összezsapzódnak és **nem tudnak lesülyedni a rés aljára**. (HA titer: a legkisebb hígítás, ami még agglutinációt okoz)



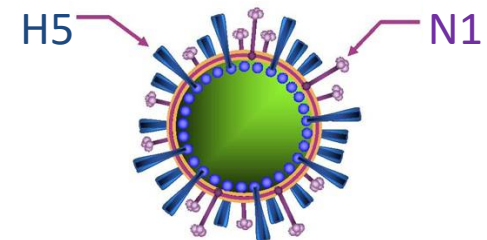
- NZB: New Zealand Black egértörzs<sup>[25.]</sup> (AIHA állatmodellje)
- BALB/c: albínó házi egér (kontroll)

# Hemagglutináció-inhibíciós assay

Összetevők	Reakció	Értékelés
Vvt 		Nincs reakció 
Vírus + Vvt 		Hemagglutináció 
Vírus + Antitest + Vvt 		Nincs reakció 

Egyes vírusok olyan fehérjékkel rendelkeznek, melyek segítségével in vitro hemagglutinációt tudnak létrehozni („hemagglutininek”).  
Pl.:

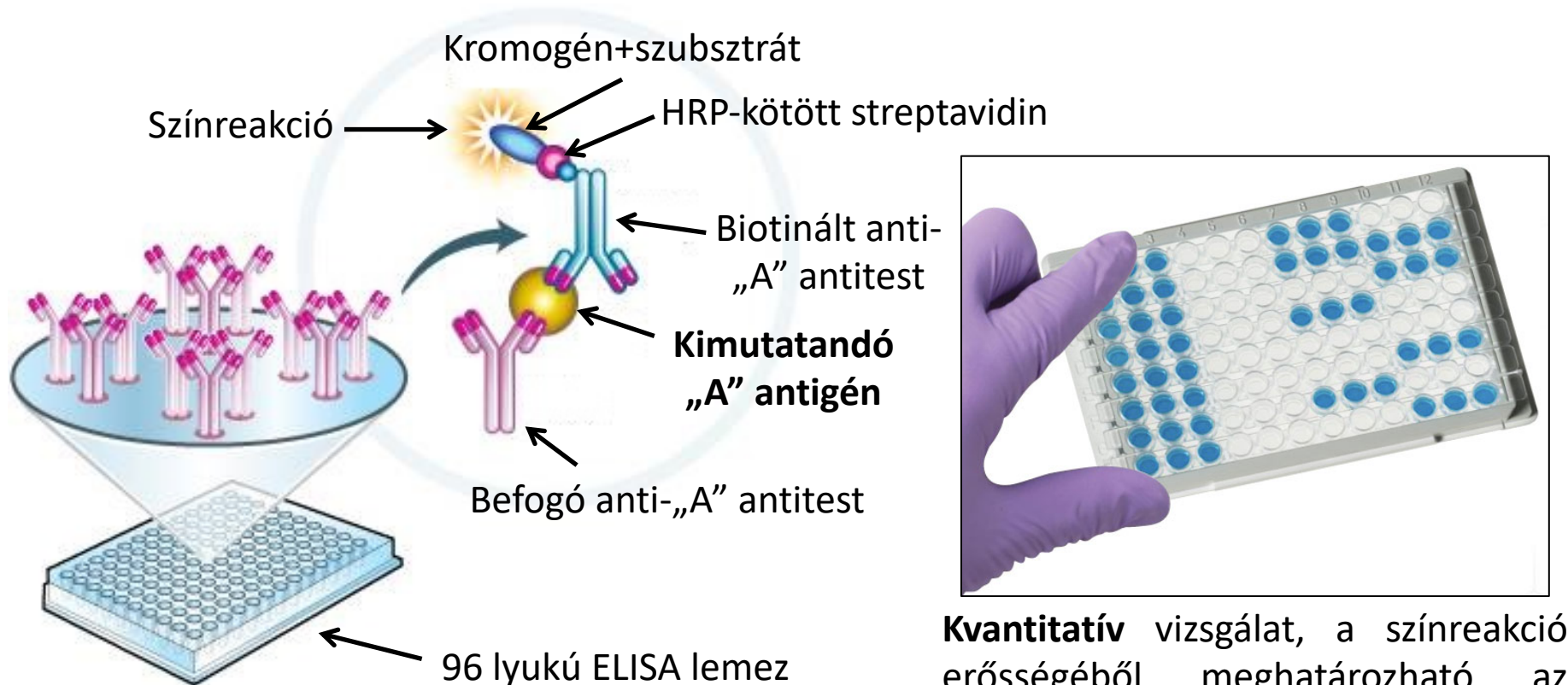
- Influenza hemagglutinin
- Kanyaró hemagglutinin
- Mumpsz hemagglutinin



- Az egyes hemagglutininek azonosítására használható módszer, gyakorlati jelentősége a **vírusok antigén-szerinti besorolása**,<sup>[26.]</sup> pl.: H5N1 = 5-ös típusú hemagglutinin (és 1-es típusú neuraminidáz) hordozó influenza vírus.
- Védőoltások hatására a hemagglutininek ellen termelt ellenanyagok vizsgálata az oltott egyéneknél.<sup>[26.]</sup>

# ELISA alapok I.

- **ELISA** = **E**nzyme-**L**inked **I**mmunosorbent **A**ssay<sup>[1.]</sup> (enzimhez kapcsolt immunoszorbens vizsgálat)
- Példa az ELISA működési elvére (ún. sandwich ELISA, lásd következő diákon):

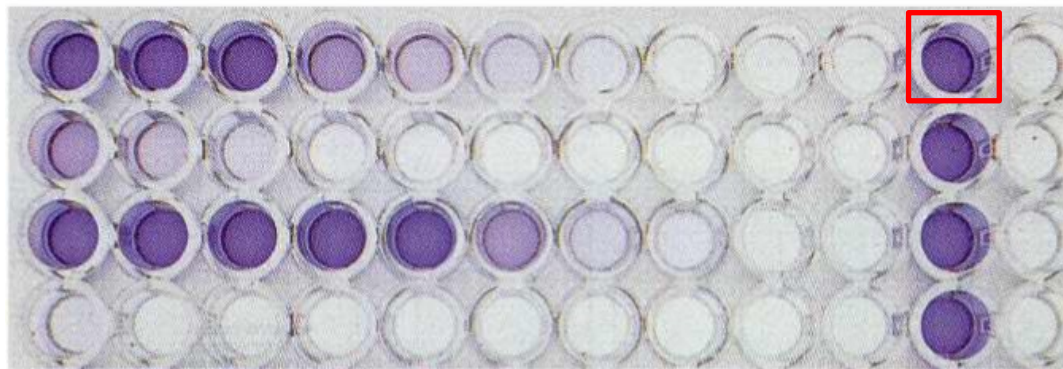
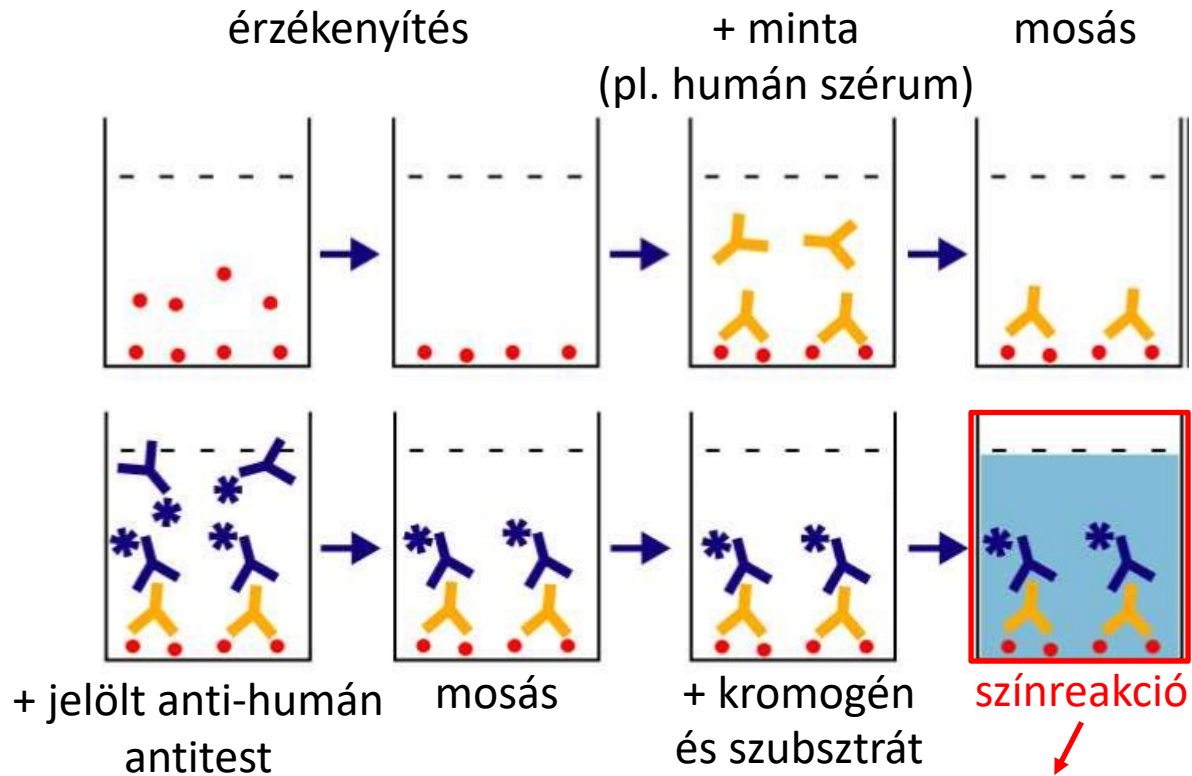


**Kvantitatív** vizsgálat, a színreakció erősségéből meghatározható az antigén **pontos koncentrációja!**

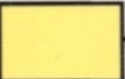


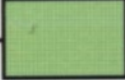
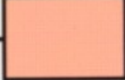
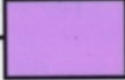





# ELISA alapok II.

- **Antigén-antitest reakción** alapul, **mindkettő** kimutatható.<sup>[2.]</sup>
- **Érzékenyítés:** Az egyiket szilárd fázishoz kötik.
- **Telítés:** Nem-specifikus kötőhelyek blokkolása.
- A kimutatni kívánt antitest/antigén **oldott formában** van. (pl. szérum)
- A befogó antitest/antigén megköti az oldatból a kimutatandó fehérjét, **kötött immunkomplex** képződik.
- A nem-kötődött fehérjéket mosással eltávolítják.
- A képződő immunkomplexet egy vagy több lépésben, **enzimatis reakcióval** teszik láthatóvá.
- A színreakciót adó kromogének **oldható végterméket** formálnak és egyenletesen eloszlanak az oldatban.
- Ismert koncentrációjú **standardok** segítségével az oldat **fényelnyeléséből** kiszámítható a vizsgált anyag pontos **koncentrációja**. → **Kvantitatív vizsgálat!**

# Az ELISA működési elve (indirekt ELISA)



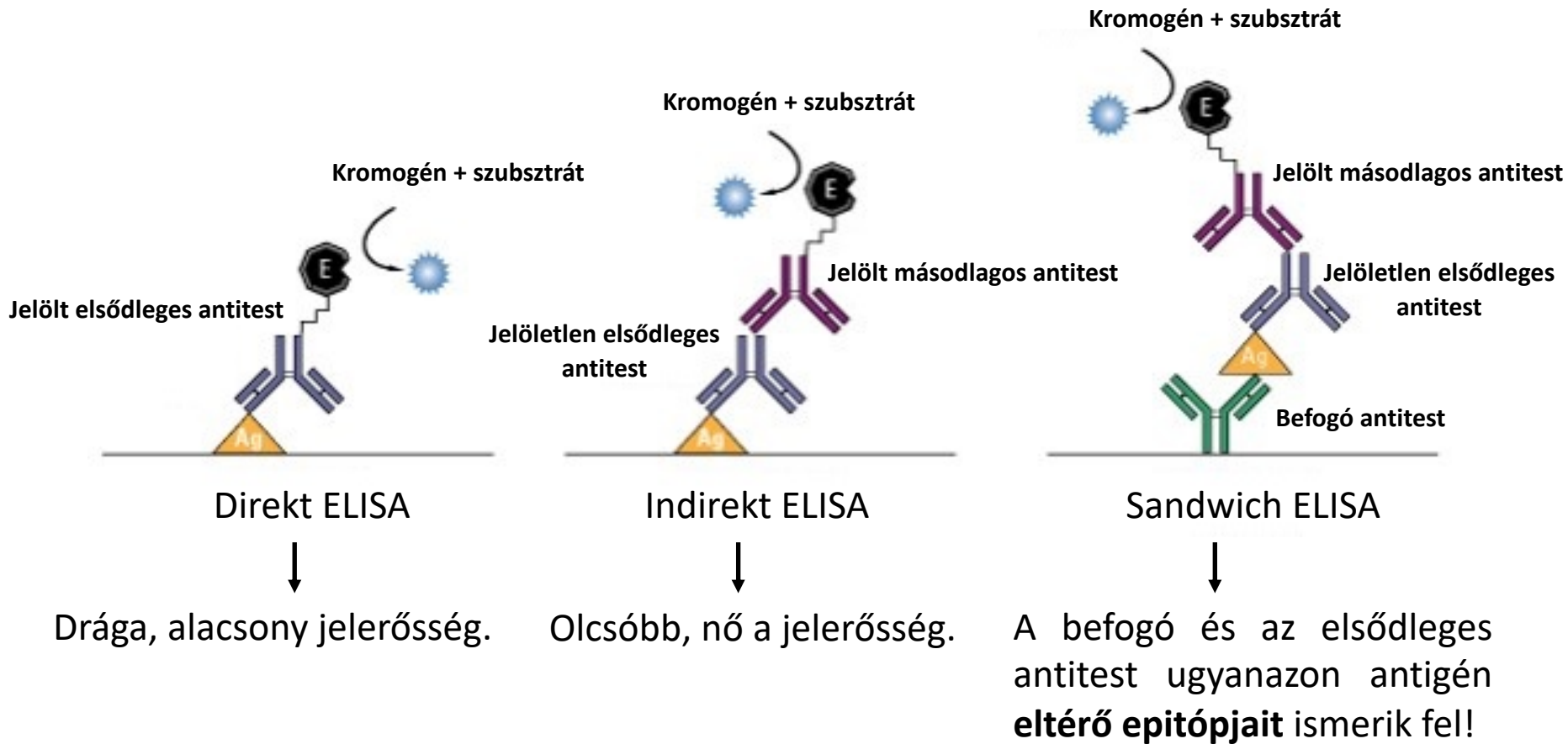


Alkalikus foszfátáz				
p-nitrofenil-foszfát (pNPP)		oldható	ELISA	
Nitro blue tetrazolium (NBT)		oldhatatlan	hisztokémia, immunoblot	
Fast Red		oldhatatlan	hisztokémia, immunoblot	
Peroxidáz				
ABTS		oldható	ELISA	
o-feniléndiamin (OPD)		oldható	ELISA	
tetrametilbenzidin (TMB)		oldható	ELISA	
o-dianizidin		oldható	ELISA	
5-aminoszalicilsav (5-ASA)		oldható	ELISA	
diaminobenzidin (DAB)		oldhatatlan	hisztokémia, immunoblot	
3-amino-9-etilkarbazol (AEC)		oldhatatlan	hisztokémia, immunoblot	
4-kloro-1-naftol (4C1N)		oldhatatlan	hisztokémia, immunoblot	

**ELISA** esetén a színreakciót adó kromogén **oldható végterméket** kell, hogy adjon. A színes végtermék **egyenletesen eloszlik** az oldatban, megváltoztatva annak fényelnyelését, melyet az ELISA olvasó lyukanként megmér.[2.]

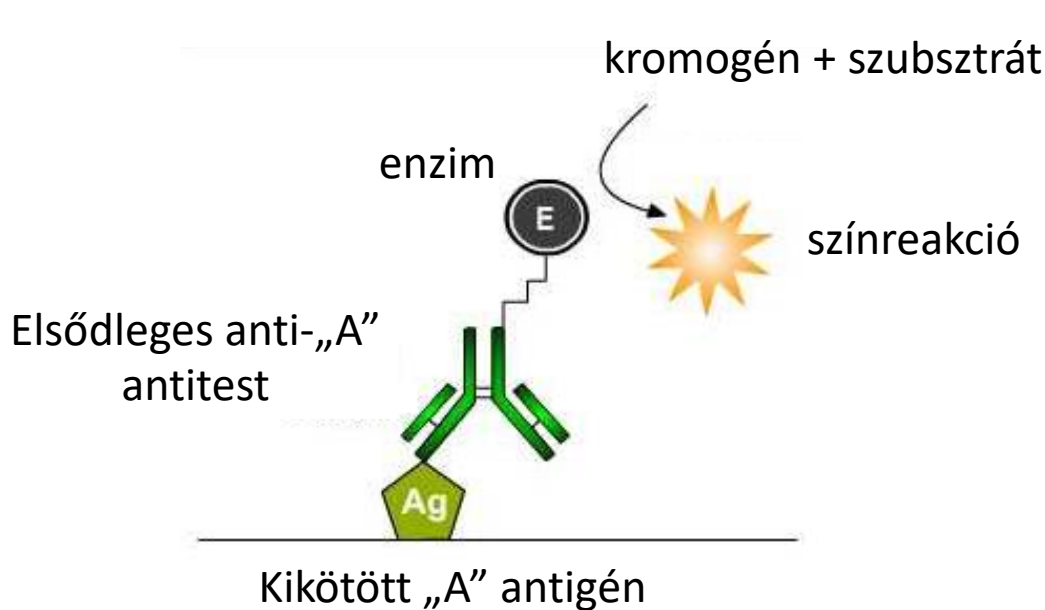
**Immunhisztokémia,** illetve blottolás esetén (pl. Western blot) fordítva, **oldhatatlan** végtermékre van szükség, hogy ne diffundáljon el a reakció helyétől és ott detektálják, ahol az antigén-antitest reakció létrejött.

# Főbb ELISA típusok



# Direkt ELISA

1. Kinyert „A” antigént kikötik a lemezre.
2. Enzim-jelölt anti-„A” antitesttel kimutatják az antigént.<sup>[3.]</sup>



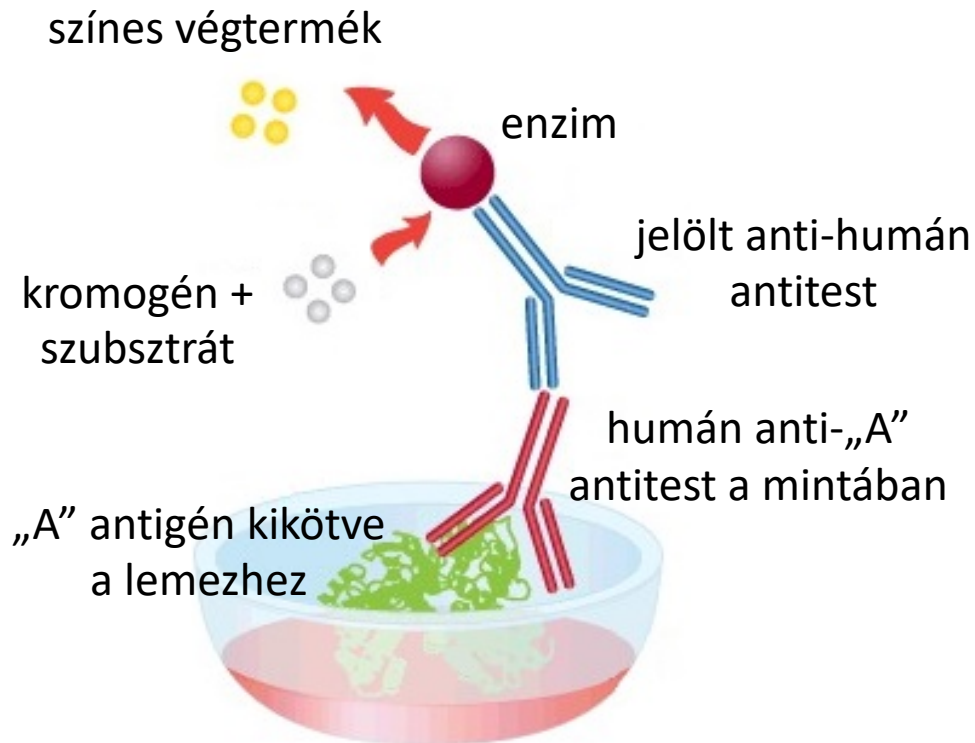
Előny:

- **Gyors**

Hátrány:

- **Drága** (jelölt elsődleges antitest szükséges hozzá)
- **Alacsony a jelerősség**, mert pl. a szérumban található fehérjék a kikötés során versenyeznek egymással, a vizsgált fehérjéből kis mennyiség kötődik ki. (Megoldás: Sandwich ELISA)

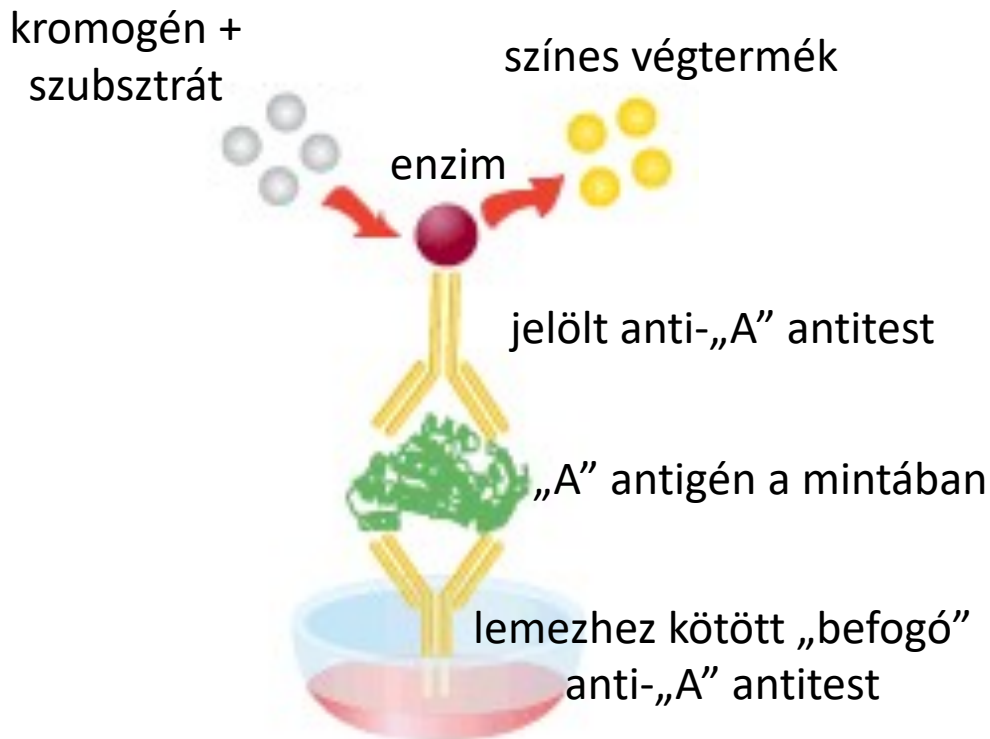
# Indirekt ELISA



Felhasználás: **Antitestek kimutatása** a mintában, pl.:

- **Hibridóma felülűszó** tesztelése<sup>[4.]</sup>
- Antigén-specifikus antitestek vizsgálata testfolyadékokból (pl. szérum autoantitestek mérése **autoimmun betegségekben**, részletesen lásd később)

# Sandwich ELISA



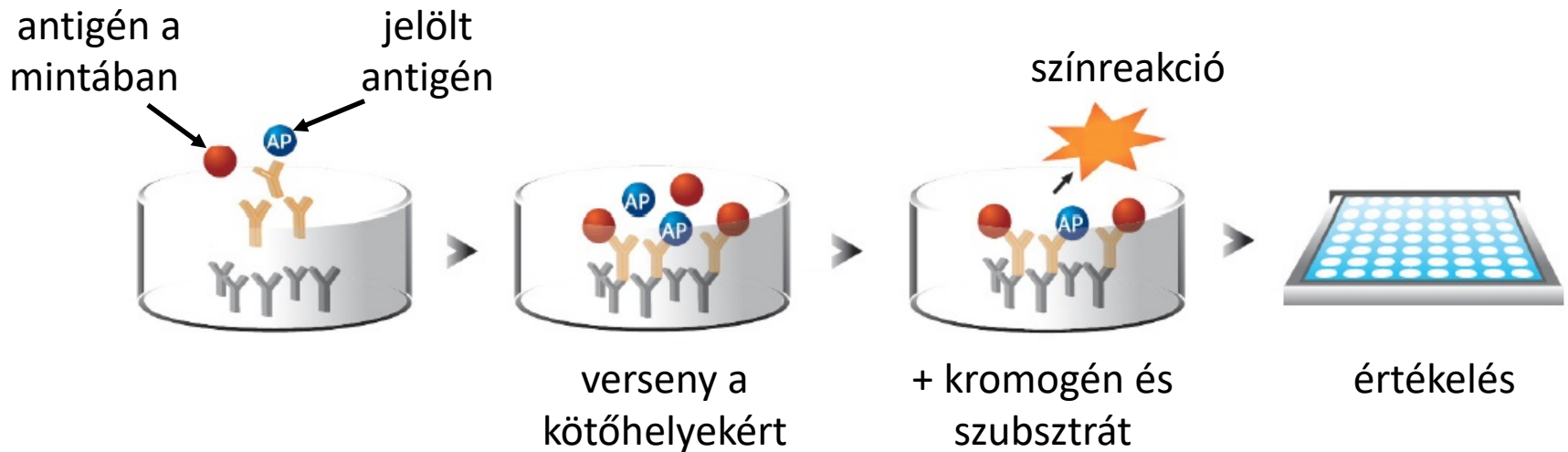
Felhasználás: **Antigén specifikus kimutatása** a mintában.

Pl.:

- Citokinek
- Tumormarkerek
- Hormonok
- Stb.

Feltétele: A befogó és a detektáló antitest **ugyanazon antigén eltérő epitópjait** ismerjék fel.

# Kompetíciós ELISA



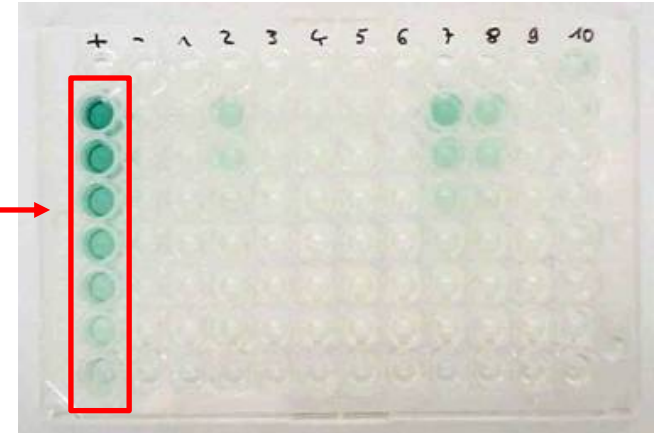
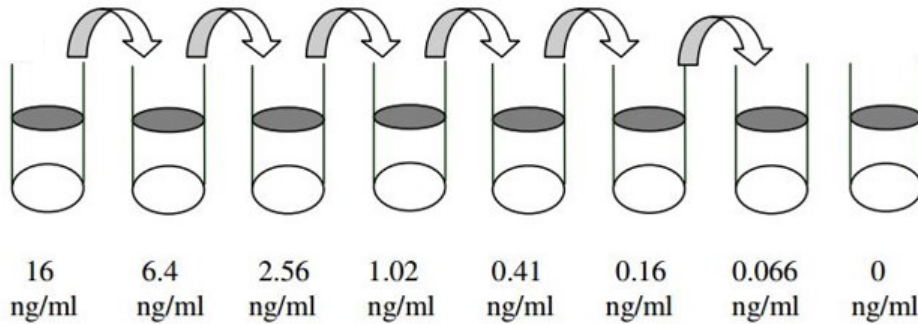
Felhasználás: **Antigén kimutatása** valamilyen mintában.

Elve:

1. Anti-„A” antitest kikötése a lemezhez.
2. A vizsgált mintához ismert mennyiségű enzim-jelölt „A” antigént adnak.
3. A mintában található jelöletlen „A” antigén **versenyez** a hozzáadott jelölt „A”-val a befogó antitest kötőhelyeiért.
4. A nem kötődött antigént kimossák.
5. A **színreakció** intenzitása **fordítottan arányos** a mintában található **antigén koncentrációjával**. (Minél kevesebb volt a mintában, annál több enzim-jelölt antigén tudott hozzákapcsolódni az antitestekhez.)

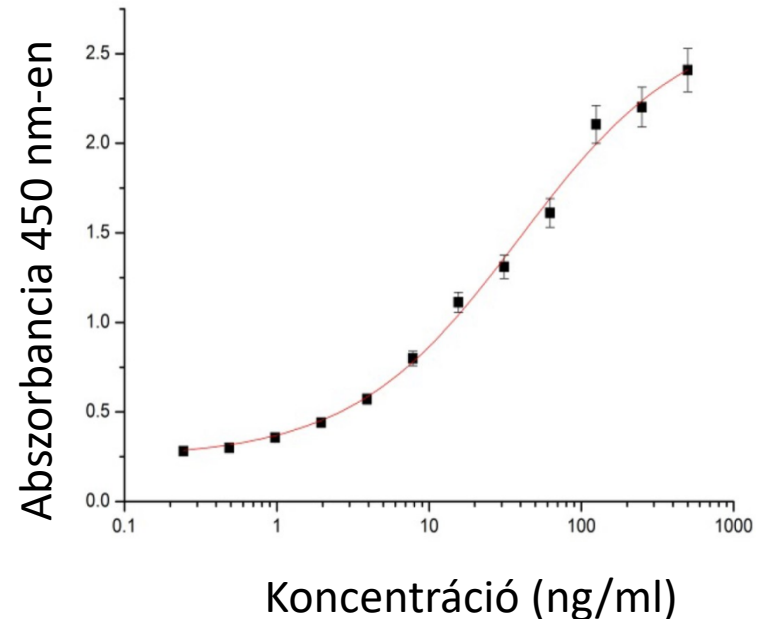
# ELISA értékelése I.

Ismert koncentrációjú **standard sor** készítése:



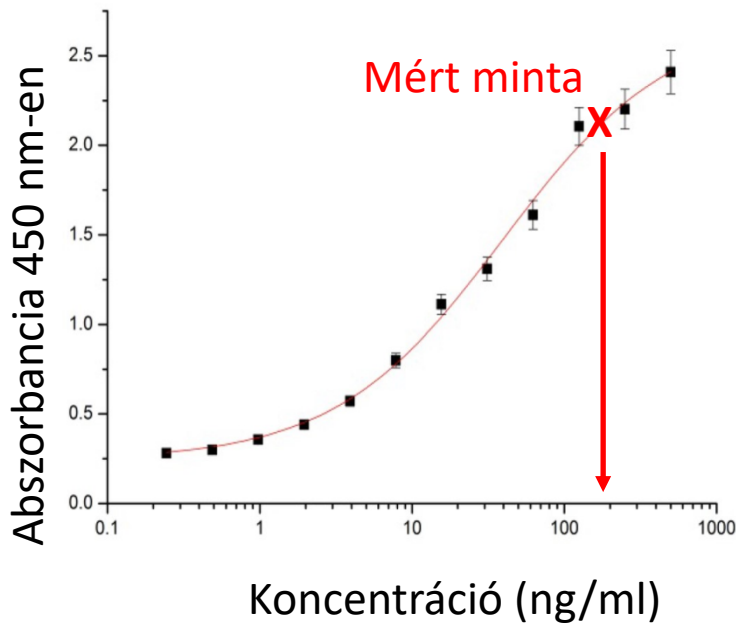
Egy ELISA olvasó, mely megméri az egyes lyukakban a **fényelnyelést** (abszorbancia).

Kalibrációs görbe a standardok alapján:

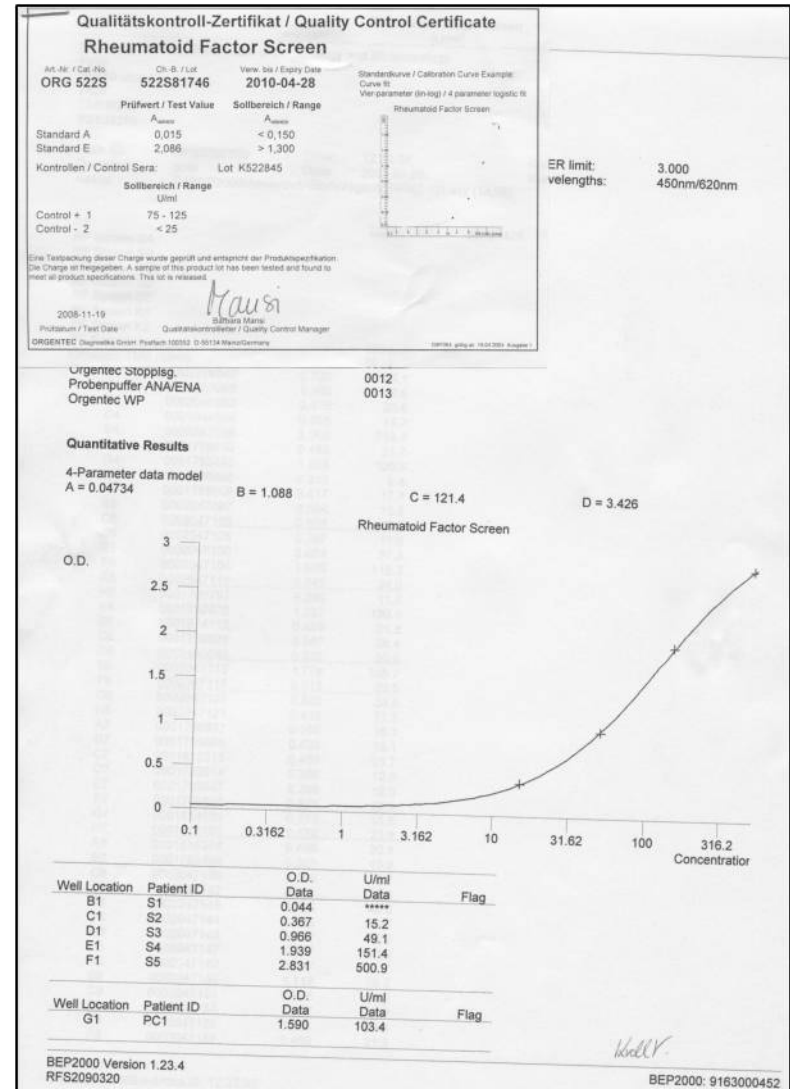


# ELISA értékelése II.

Kalibrációs görbe:



A mintában mért fényelnyelési értéket ráillesztik a kalibrációs görbére és leolvassák a pontos koncentrációt.



Egy rutin ELISA lelet  
(rheumatoid faktor meghatározás)



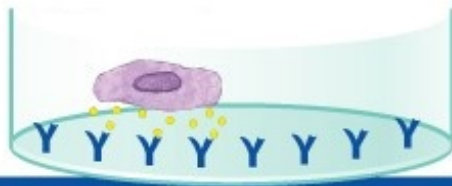
# AZ ELISA jelentősége

- Orvosi diagnosztika:
  - **Autoimmun kórképek** diagnosztikája<sup>[5.]</sup> (autoantitestek kimutatása testfolyadékokból, részletesen lásd később)
  - **Fertőző betegségek** diagnosztikája<sup>[6, 7.]</sup> (kórokozó antigénjeinek vagy az ellenük termelt antitestek kimutatása, pl. HIV elleni antitestek kimutatása **HIV szűrésnél**)
  - **Specifikus szérumfehérjék** koncentrációinak meghatározása, pl. CRP, hormonok<sup>[8.]</sup> ( $\beta$ -hCG, TSH, stb.) citokinek, tumormarkerek<sup>[9, 10.]</sup> (pl. AFP, PSA, CEA, stb.)
- Ipari felhasználás:
  - **Táplálékallergének** kimutatása az élelmiszerekben<sup>[11, 12.]</sup> (pl. glutén, mogyoró, tejfehérje, stb.)
  - Mérgezést okozó **toxinok** kimutatása élelmiszerekben<sup>[13.]</sup>
  - **Hibridómák** antitest termelésének tesztelése<sup>[4.]</sup>
  - Bizonyos ipari szennyezőanyagok kimutatása ipari hulladékokban, felszíni vizekben<sup>[14.]</sup>
- Kutatás

# ELISPOT

## ELISPOT vizsgálat<sup>[15.]</sup>

1. nap

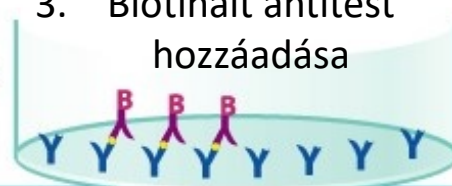


1. Az antigént termelő sejtek inkubálása az antigénre specifikus befogó antitesttel.

2. nap



2. Sejtek kimosása

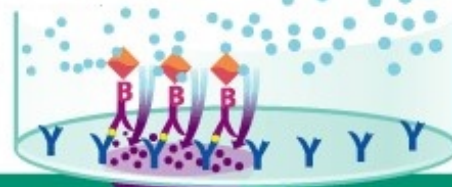


3. Biotinált antitest hozzáadása







3. nap



4. Enzim-jelölt streptavidin hozzáadása



5. Kromogén hozzáadása

-  befogó antitest
-  vizsgált antigén
-  biotinált antitest
-  enzim-jelölt streptavidin
-  színes végtermék
-  kromogén



6. Az antigén termelés helyén **kicsapódó** színes végtermék.

**Sejtek antigén termelésének** vizsgálatára alkalmas módszer.

Pl.:

Citokin termelés vizsgálata.

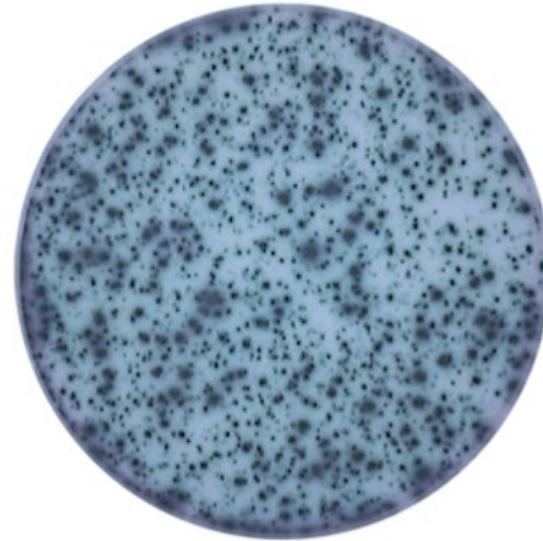
# IFN $\gamma$ termelés vizsgálata T-sejtekben

kezeletlen T-sejtek:



0 pötty („spot”)

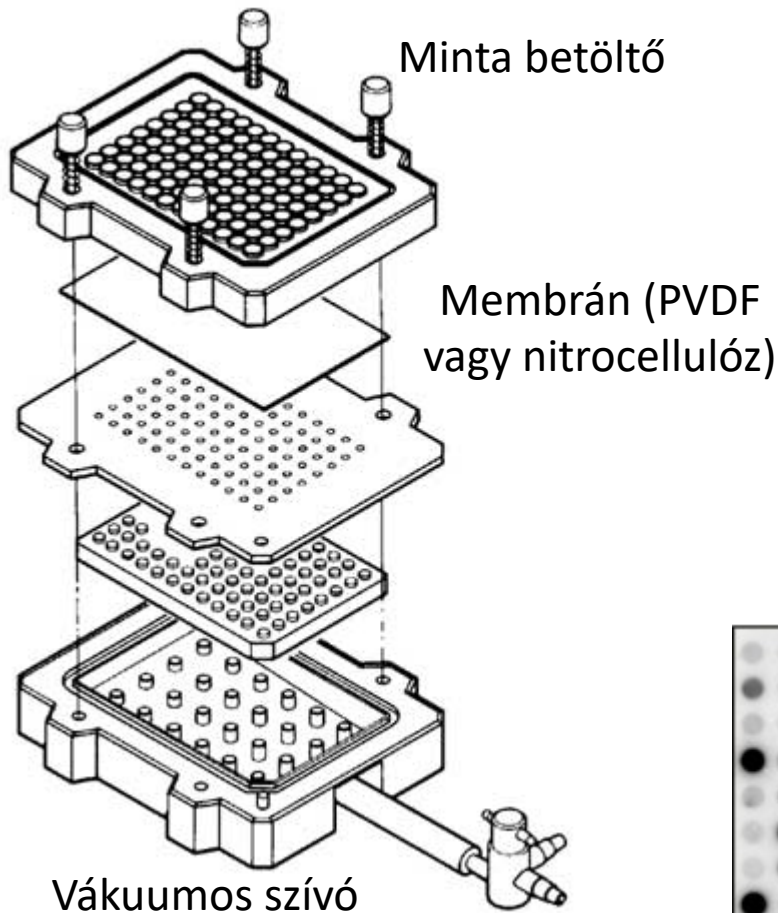
anti-CD3 kezelt T-sejtek:



760 pötty

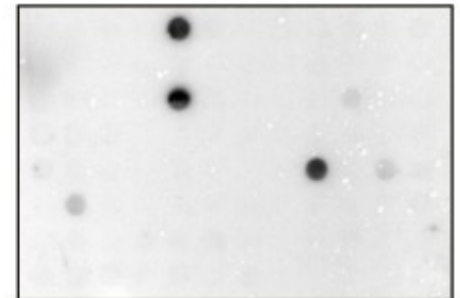
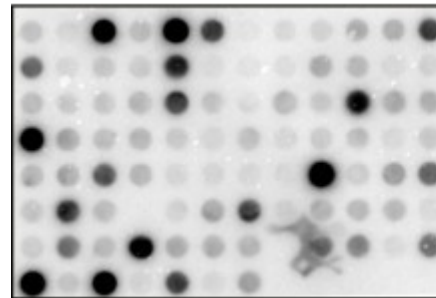
Interferon-gamma (IFN $\gamma$ ) termelés vizsgálata **ELISPOT módszerrel**. A sejtek ki lettek helyezve a lemezre, az általuk termelt IFN $\gamma$ -át a lemezhez kötött befogó antitestek megkötötték, melyet enzimatis reakcióval tettek láthatóvá. Az anti-CD3 antitesttel stimulált T-sejtek aktiválódtak és jelentős mennyiségben termeltek IFN $\gamma$ -át.

# Dot blot



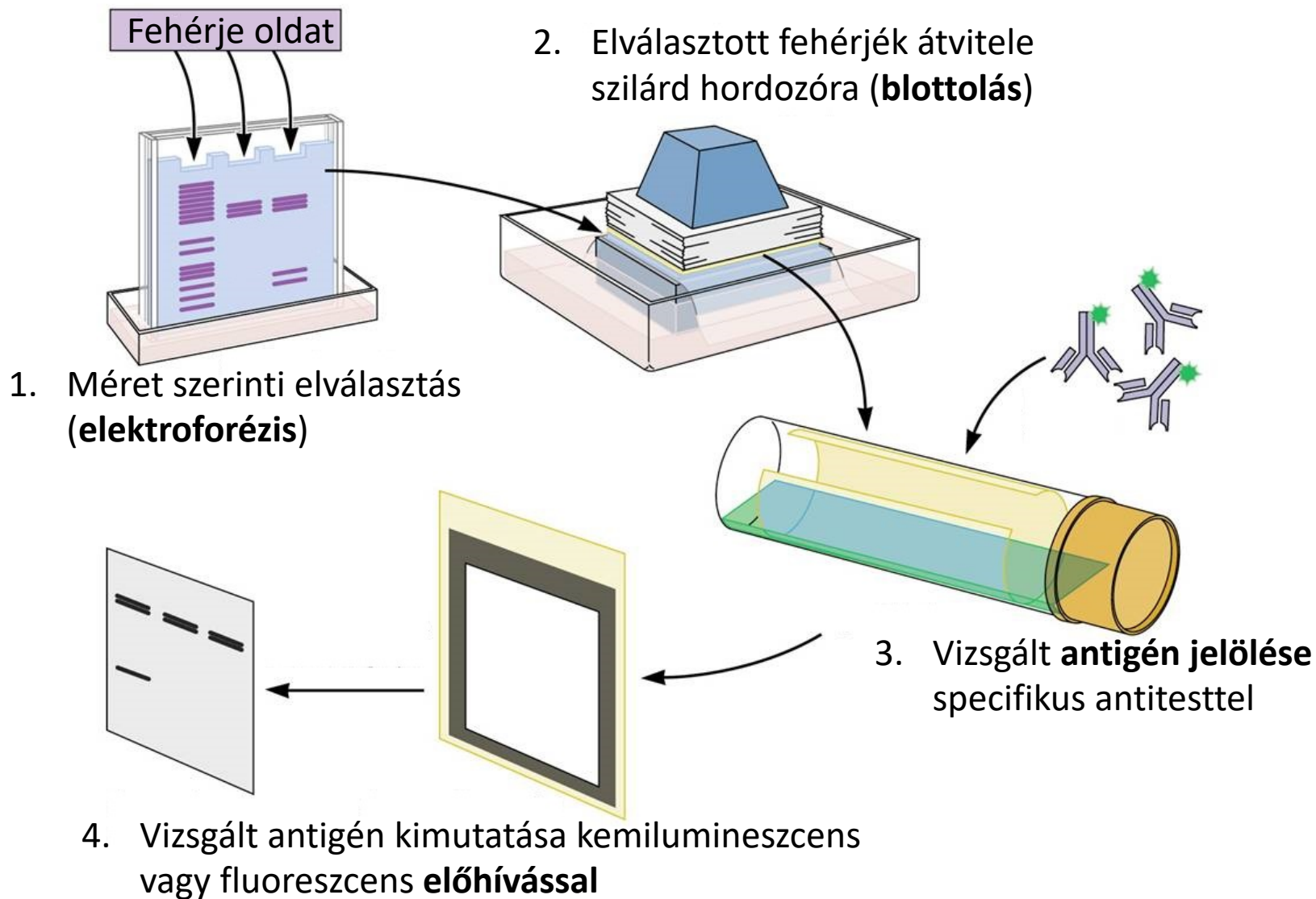
1. Antigént tartalmazó minta felcseppentése **szilárd hordozóra** (membrán).
2. A hordozón rögzült antigént jelölt antitesttel mutatják ki, vagy színes végterméket adó kromogénnel, vagy kemilumineszcens módon (lásd később).

**Felhasználás:** Meghatározott fehérje specifikus kimutatása kevert fehérjemintában.



Két minta összehasonlítása különböző fehérjékre nézve dot bloton.

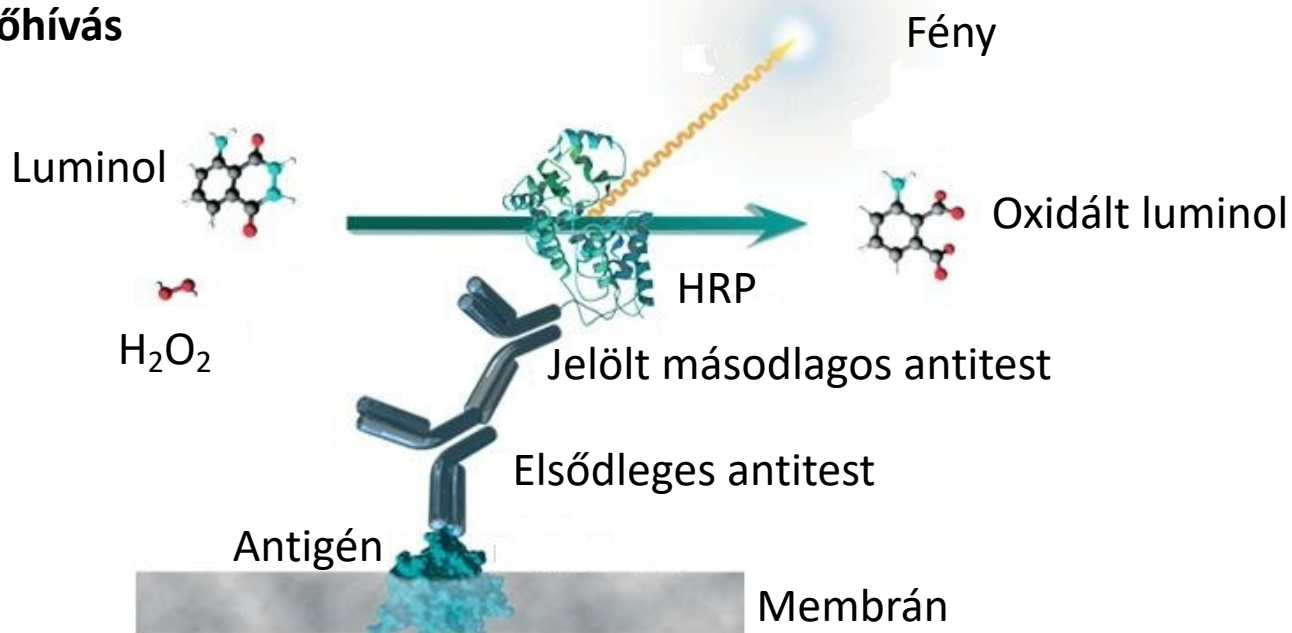
# Western blot<sup>[16.]</sup>



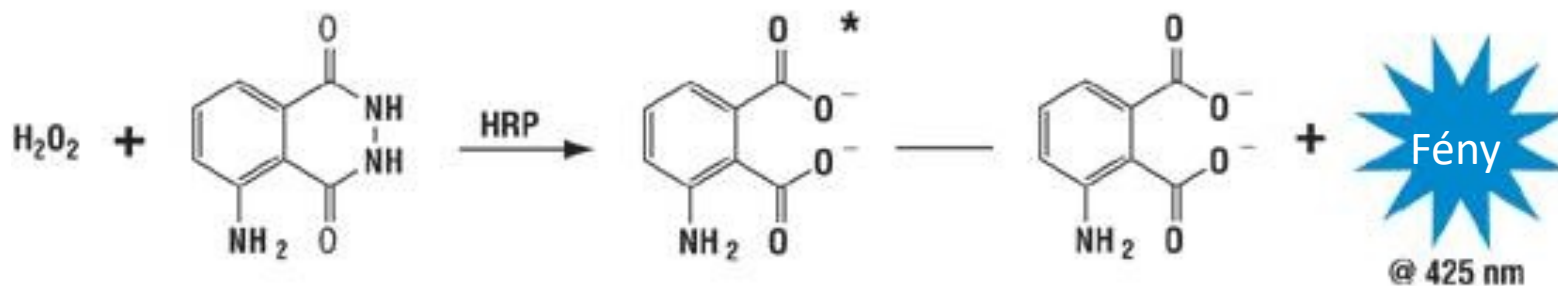
# Előhívás

A kötődött antitestek többféleképpen is láthatóvá tehetők, a leggyakoribb módszerek<sup>[17.]</sup>:

- Kemilumineszcens reakció
- Fluoreszcens előhívás

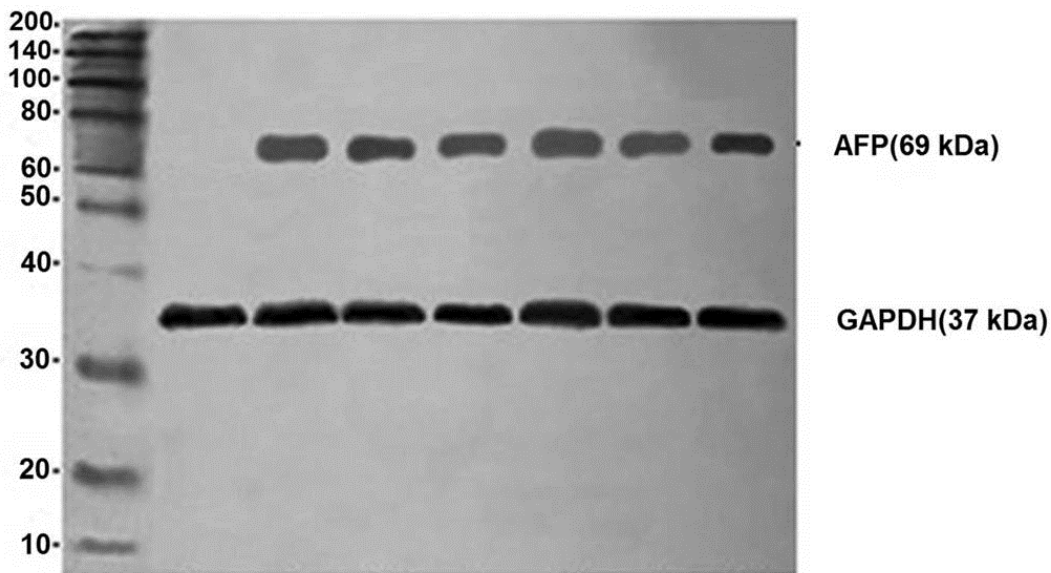


A luminol kemilumineszcens reakciója:

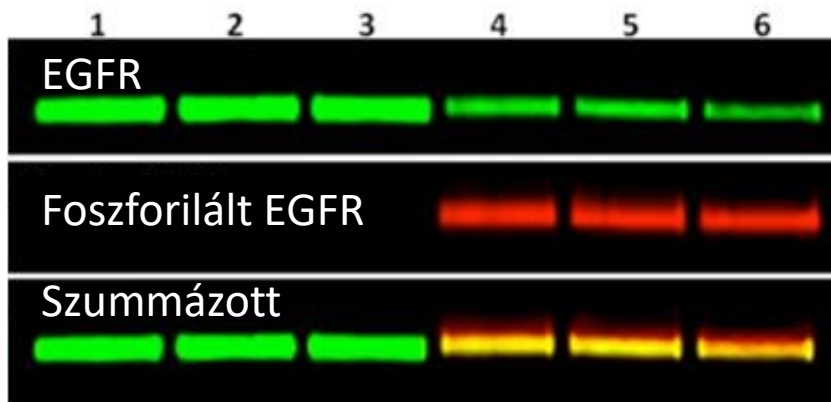


# Példák

AFP és a GAPDH (mennyiségi kontroll) együttes előhívása **kemilumineszcens** technikával:



EGFR foszforiláció vizsgálata **fluoreszcens Western blottal**:



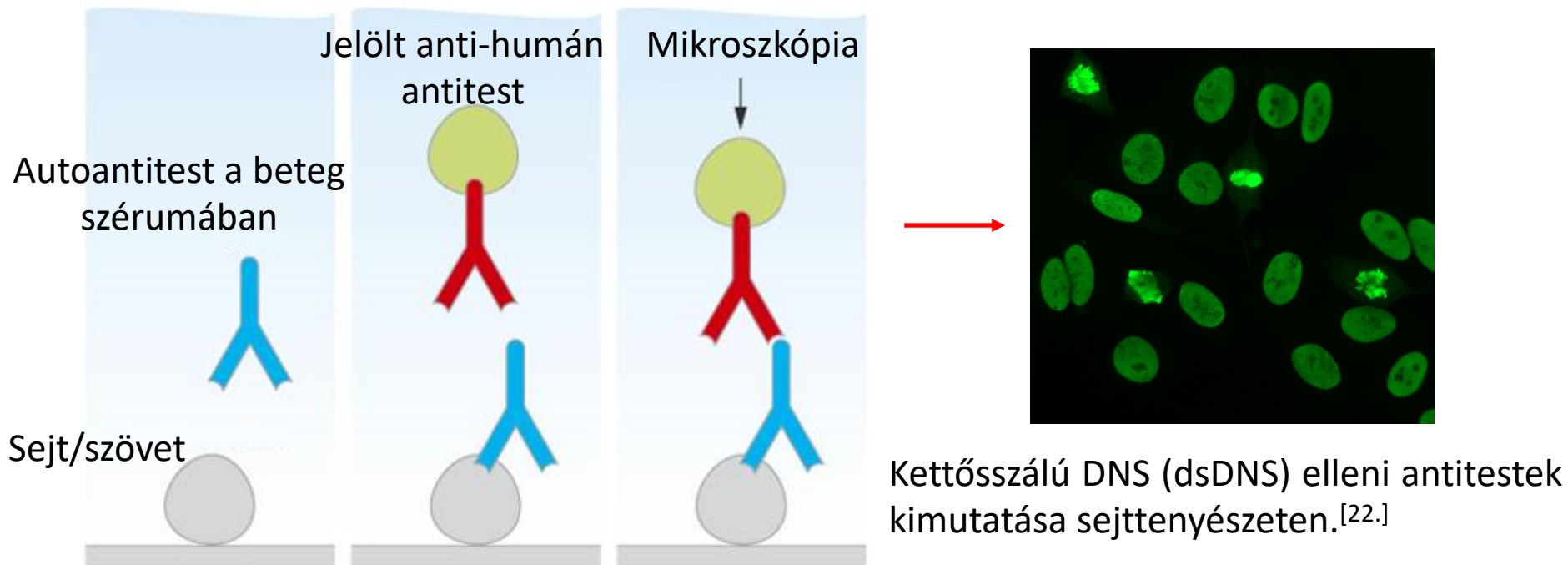
# A Western blot jelentősége

- Mire jó?
  - Egy kevert fehérjemintában **specifikusan mutat ki** meghatározott **fehérjéket**, melyek **méretét** is megadja, emellett **szemikvantitatív**.
  - Immunprecipitációval alkalmas **fehérje-fehérje kapcsolatok** kimutatására.
  - Alkalmas funkcionális vizsgálatokra, pl. fehérje **foszforiláció** detektálására.
- Kutatásban az egyik legelterjedtebb fehérjevizsgáló módszer.
- Klinikai gyakorlatban limitált a felhasználása, mert **nehezen standardizálható**.<sup>[18.]</sup>
- Példák a diagnosztikus felhasználásra:
  - Egyes **fertőző betegségek** gyanújának megerősítése, pl.:
    - Lyme-kór<sup>[19.]</sup>
    - BSE (Bovine spongiform encephalopathy, „kergemarha-kór”)<sup>[20.]</sup>
    - HIV szűrés során a pozitív ELISA lelet megerősítése.<sup>[21.]</sup>

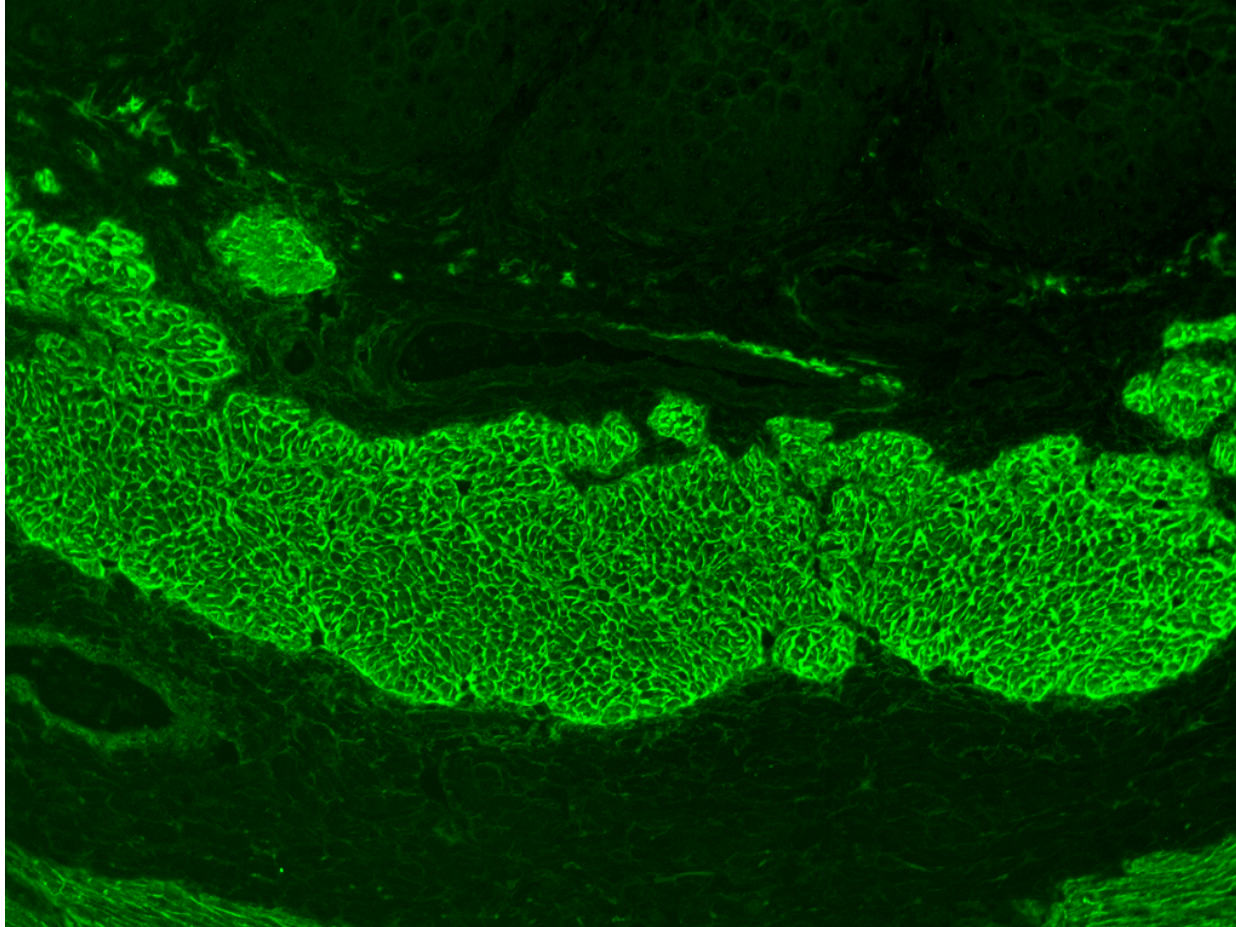


# Indirekt immunfluoreszcens mikroszkópia, mint szerológiai vizsgálómódszer

- Fluoreszcens mikroszkópia leírása → lásd 4. gyakorlat
- Felhasználás: **Autoimmun kórképek diagnosztikája** (részletesen lásd később)
- Lényeg: A beteg szérumát valamilyen sejtenyészethez vagy szövethez adják hozzá, mellyel egyes kóros autoantitestek reagálnak. A kikötődött humán autoantitesteket fluoreszcensen jelölt anti-humán ellenanyagokkal teszik láthatóvá.



# Indirekt immunfluoreszcencia példa



**Endomysium-ellenes autoantitest (EMA) kimutatása lisztérzékeny beteg szérumából majom nyelőcsövön.** A nyelőcső metszetet először a beteg szérumával inkubálták, majd fluoreszcensen jelölt (**FITC**) anti-humán ellenanyaggal kezelték.<sup>[23.]</sup>

# A szerológiai módszerek érzékenysége

Módszer	Becsült érzékenység ( $\mu\text{g}$ fehérje/ml minta)
Precipitáció folyadékokban	20-200
Ouchterlony-féle kettős immundiffúzió	20-200
Immunelektroforézis	20-200
Mancini-féle radiális immundiffúzió	10-50
Rakéta immunelektrofézis	2
Immunfluoreszcencia	1
Direkt agglutináció	0,3
Passzív agglutináció	0,006-0,06
ELISA	0,0001-0,01

# Hivatkozások 1.

1. Akobeng AK<sup>1</sup>: **Understanding diagnostic tests 1: sensitivity, specificity and predictive values.** *Acta Paediatr.* 2007 Mar;96(3):338-41.
2. Mancini G, Carbonara AO, Heremans JF: **Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion.** *Immunochemistry.* 1965 Sep;2(3):235-54.
3. Ouchterlony O: **In vitro method for testing the toxin-producing capacity of diphtheria bacteria.** *Acta Pathol Microbiol Scand.* 1948;25(1-2):186-91.
4. Tiselius A<sup>1</sup>: **Electrophoresis of serum globulin: Electrophoretic analysis of normal and immune sera.** *Biochem J.* 1937 Sep;31(9):1464-77.
5. Nobelprize.org: **The Nobel Prize in Chemistry 1948**  
([http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/1948/](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1948/))
6. Jain S<sup>1</sup>, Gautam V, Naseem S: **Acute-phase proteins: As diagnostic tool.** *J Pharm Bioallied Sci.* 2011 Jan;3(1):118-27. doi: 10.4103/0975-7406.76489.
7. O'Connell TX<sup>1</sup>, Horita TJ, Kasravi B: **Understanding and interpreting serum protein electrophoresis.** *Am Fam Physician.* 2005 Jan 1;71(1):105-12.
8. Stoller JK<sup>1</sup>, Aboussouan LS: **Alpha1-antitrypsin deficiency.** *Lancet.* 2005 Jun 25-Jul 1;365(9478):2225-36.
9. Link H<sup>1</sup>, Huang YM: **Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: an update on methodology and clinical usefulness.** *J Neuroimmunol.* 2006 Nov;180(1-2):17-28. Epub 2006 Sep 1.
10. Marshall T<sup>1</sup>, Williams KM: **Electrophoretic analysis of Bence Jones proteinuria.** *Electrophoresis.* 1999 Jun;20(7):1307-24.

# Hivatkozások 2.

11. Csako G<sup>1</sup>: **Immunoelectrophoresis: a method with many faces.** *Methods Mol Biol.* 2012;869:339-59. doi: 10.1007/978-1-61779-821-4\_28.
12. Csako G<sup>1</sup>: **Immunofixation electrophoresis for identification of proteins and specific antibodies.** *Methods Mol Biol.* 2012;869:147-71. doi: 10.1007/978-1-61779-821-4\_13.
13. Rajkumar SV<sup>1</sup>, Kyle RA<sup>1</sup>: **Protein electrophoresis and immunofixation for the diagnosis of monoclonal gammopathies.** *JAMA.* 2014 Nov 26;312(20):2160-1. doi: 10.1001/jama.2014.8237.
14. Mali B<sup>1</sup>, Armbruster D, Serediak E, Ottenbreit T: **Comparison of immunoturbidimetric and immunonephelometric assays for specific proteins.** *Clin Biochem.* 2009 Oct;42(15):1568-71. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2009.06.016. Epub 2009 Jun 26.
15. Cooper NR, Nemerow GR: **The role of antibody and complement in the control of viral infections.** *J Invest Dermatol.* 1984 Jul;83(1 Suppl):121s-127s.
16. Anuradha V<sup>1</sup>, Chopra A: **In the era of nephelometry, latex agglutination is still good enough to detect rheumatoid factor.** *J Rheumatol.* 2005 Dec;32(12):2343-4.
17. Kodama T<sup>1</sup>, Ichiyama S, Morishita Y, Fukatsu T, Shimokata K, Nakashima N: **Determination of anti-streptolysin O antibody titer by a new passive agglutination method using sensitized toraysphere particles.** *J Clin Microbiol.* 1997 Apr;35(4):839-42.
18. Komoriya T<sup>1</sup>, Terashima Y, Ogawa M, Moriyama M, Kohno H: **Development of a high-sensitivity latex reagent for the detection of C-reactive protein.** *J Immunol Methods.* 2011 Oct 28;373(1-2):63-6. doi: 10.1016/j.jim.2011.08.001. Epub 2011 Aug 26.
19. Froehling DA<sup>1</sup>, Elkin PL, Swensen SJ, Heit JA, Pankratz VS, Ryu JH: **Sensitivity and specificity of the semiquantitative latex agglutination D-dimer assay for the diagnosis of acute pulmonary embolism as defined by computed tomographic angiography.** *Mayo Clin Proc.* 2004 Feb;79(2):164-8.
20. Braunstein GD<sup>1</sup>: **The long gestation of the modern home pregnancy test.** *Clin Chem.* 2014 Jan;60(1):18-21. doi: 10.1373/clinchem.2013.202655. Epub 2013 Sep 11.

# Hivatkozások 3.

21. Zantek ND<sup>1</sup>, Koepsell SA, Tharp DR Jr, Cohn CS: **The direct antiglobulin test: a critical step in the evaluation of hemolysis.** *Am J Hematol.* 2012 Jul;87(7):707-9. doi: 10.1002/ajh.23218. Epub 2012 May 6.
22. Barcellini W<sup>1</sup>: **Immune Hemolysis: Diagnosis and Treatment Recommendations.** *Semin Hematol.* 2015 Oct;52(4):304-12. doi: 10.1053/j.seminhematol.2015.05.001. Epub 2015 May 19.
23. British Committee for Standards in Haematology<sup>1</sup>, Milkins C, Berryman J, Cantwell C, Elliott C, Haggas R, Jones J, Rowley M, Williams M, Win N: **Guidelines for pre-transfusion compatibility procedures in blood transfusion laboratories. British Committee for Standards in Haematology.** *Transfus Med.* 2013 Feb;23(1):3-35. doi: 10.1111/j.1365-3148.2012.01199.x. Epub 2012 Dec 6.
24. Abbey R<sup>1</sup>, Dunsmoor-Su R: **Cost-benefit analysis of indirect antiglobulin screening in Rh(D)-negative women at 28 weeks of gestation.** *Obstet Gynecol.* 2014 May;123(5):938-45. doi: 10.1097/AOG.0000000000000224.
25. Yoshida S<sup>1</sup>, Castles JJ, Gershwin ME: **The pathogenesis of autoimmunity in New Zealand mice.** *Semin Arthritis Rheum.* 1990 Feb;19(4):224-42.
26. Pedersen JC<sup>1</sup>: **Hemagglutination-inhibition assay for influenza virus subtype identification and the detection and quantitation of serum antibodies to influenza virus.** *Methods Mol Biol.* 2014;1161:11-25. doi: 10.1007/978-1-4939-0758-8\_2.

# Hivatkozások 4.

1. Lequin RM<sup>1</sup>: **Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)**. *Clin Chem*. 2005 Dec;51(12):2415-8. Epub 2005 Sep 22.
2. John R. Crowther: **The ELISA Guidebook** © 2001 Humana Press Inc.
3. Lin AV<sup>1</sup>: **Direct ELISA**. *Methods Mol Biol*. 2015;1318:61-7. doi: 10.1007/978-1-4939-2742-5\_6.
4. Delaunay T<sup>1</sup>, Louahed J, Bazin H: **Rat (and mouse) monoclonal antibodies. VIII. ELISA measurement of Ig production in mouse hybridoma culture supernatants**. *J Immunol Methods*. 1990 Jul 20;131(1):33-9.
5. Aggarwal A<sup>1</sup>: **Role of autoantibody testing**. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2014 Dec;28(6):907-20. doi: 10.1016/j.berh.2015.04.010. Epub 2015 May 23.
6. Ghosh M<sup>1</sup>, et al.: **Detection of hepatitis B virus infection: A systematic review**. *World J Hepatol*. 2015 Oct 18;7(23):2482-91. doi: 10.4254/wjh.v7.i23.2482.
7. Sun GG<sup>1</sup>, et al.: **Early serodiagnosis of trichinellosis by ELISA using excretory-secretory antigens of *Trichinella spiralis* adult worms**. *Parasit Vectors*. 2015 Sep 23;8(1):484. doi: 10.1186/s13071-015-1094-9.
8. Islam KN<sup>1</sup>, et al.: **Micro open-sandwich ELISA to rapidly evaluate thyroid hormone concentration from serum samples**. *Bioanalysis*. 2010 Oct;2(10):1683-7. doi: 10.4155/bio.10.125.
9. Schneider J<sup>1</sup>, et al.: **Comparison of the tumor markers tumor M2-PK, CEA, CYFRA 21-1, NSE and SCC in the diagnosis of lung cancer**. *Anticancer Res*. 2000 Nov-Dec;20(6D):5053-8.
10. Barak V<sup>1</sup>, et al.: **The Diagnostic and Prognostic Value of Tumor Markers (CEA, SCC, CYFRA 21-1, TPS) in Head and Neck Cancer Patients**. *Anticancer Res*. 2015 Oct;35(10):5519-24.
11. Valdés I<sup>1</sup>, García E, Llorente M, Méndez E: **Innovative approach to low-level gluten determination in foods using a novel sandwich enzyme-linked immunosorbent assay protocol**. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2003 May;15(5):465-74.
12. Jayasena S<sup>1</sup>, et al.: **Comparison of six commercial ELISA kits for their specificity and sensitivity in detecting different major peanut allergens**. *J Agric Food Chem*. 2015 Feb 18;63(6):1849-55. doi: 10.1021/jf504741t. Epub 2015 Feb 4.

# Hivatkozások 5.

13. Liang M<sup>1</sup>, et al.: **Development of an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay based on the multiepitope peptide for the synchronous detection of staphylococcal enterotoxin A and G proteins in milk.** *J Food Prot.* 2015 Feb;78(2):362-9. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-14-323.
14. Hirobe M<sup>1</sup>, et al.: **The use of enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) for the determination of pollutants in environmental and industrial wastes.** *Water Sci Technol.* 2006;54(11-12):1-9.
15. Kalyuzhny AE<sup>1</sup>: **Chemistry and biology of the ELISPOT assay.** *Methods Mol Biol.* 2005;302:15-31.
16. Hnasko TS<sup>1</sup>, Hnasko RM: **The Western Blot.** *Methods Mol Biol.* 2015;1318:87-96. doi: 10.1007/978-1-4939-2742-5\_9.
17. Mathews ST<sup>1</sup>, Plaisance EP, Kim T: **Imaging systems for westerns: chemiluminescence vs. infrared detection.** *Methods Mol Biol.* 2009;536:499-513. doi: 10.1007/978-1-59745-542-8\_51.
18. Gassmann M<sup>1</sup>, Grenacher B, Rohde B, Vogel J: **Quantifying Western blots: pitfalls of densitometry.** *Electrophoresis.* 2009 Jun;30(11):1845-55. doi: 10.1002/elps.200800720.
19. Gerritzen A<sup>1</sup>, Brandt S: **Serodiagnosis of Lyme borreliosis with bead based immunoassays using multiplex technology.** *Methods.* 2012 Apr;56(4):477-83. doi: 10.1016/j.ymeth.2012.02.007. Epub 2012 Mar 3.
20. Porcario C<sup>1</sup>: **Evaluation of two sets of immunohistochemical and Western blot confirmatory methods in the detection of typical and atypical BSE cases.** *BMC Res Notes.* 2011 Sep 29;4:376. doi: 10.1186/1756-0500-4-376.
21. Torian LV<sup>1</sup>, et al.: **Comparison of Multispot EIA with Western blot for confirmatory serodiagnosis of HIV.** *J Clin Virol.* 2011 Dec;52 Suppl 1:S41-4. doi: 10.1016/j.jcv.2011.09.017. Epub 2011 Oct 12.
22. Buchner C<sup>1</sup>, et al: **Anti-nuclear antibody screening using HEP-2 cells.** *J Vis Exp.* 2014 Jun 23;(88):e51211. doi: 10.3791/51211.
23. Amara W<sup>1</sup>, Husebekk A: **Improved method for serological testing in celiac disease--IgA anti-endomysium antibody test: a comparison between monkey oesophagus and human umbilical cord as substrate in indirect immunofluorescence test.** *Scand J Clin Lab Invest.* 1998 Nov;58(7):547-54.