

WYBRANE TECHNIKI ANALIZ BIOCHEMICZNYCH

ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) test immunoenzymatyczny lub immunoenzymosorbcyjny



Antygen - związek, który wywołuje reakcję immunologiczną w organizmie; związek, który może być wykryty za pomocą swoistych przeciwciał

Przeciwciało - glikoproteiny wytwarzane w odpowiedzi na czynnik antygenowy

Enzym - związek, który działa w bardzo małych stężeniach jako katalizator specyficznych reakcji

Substrat - związek, z którym enzym reaguje w sposób specyficzny

Chromogen - związek, który zmienia kolor w wyniku reakcji enzymu z substratem

Enzymy zastosowane w teście ELISA:

- muszą łatwo łączyć się z białkiem
- nie jest wskazanym, aby występowały naturalnie w płynach biologicznych
- substrat dla tych enzymów powinien być łatwo dostępny, a produkt tej reakcji powinien być barwny

Dzięki odpowiednim enzymom uwidacznia reakcja barwna powstająca podczas łączenia się antygenu ze specyficznym przeciwciałem (reakcja **antygen-przeciwciało**).

Najczęściej stosowane enzymy to:

- **fosfataza alkaliczna AP** (przekształca bezbarwny fosforan p-nitrofenolu w żółty p-nitrofenol),
- **peroksydaza chrzanowa POX** (daje niebieskie zabarwienie w obecności tetrametylobenzydyny),
- **oksydaza glukozowa GO** (z kwasem 5-aminosalicylowym daje kolor brunatny).

Zmiana barwy roztworu mierzona jest spektrofotometrycznie. Zawartość białka w badanym materiale odczytuje się z krzywej kalibracyjnej (wykonuje się szereg roztworów o znanych rozcieńczeniach i poddaje takim samym zabiegom, co próby badane).

Materiałem wykorzystanym do badania mogą być:

- SUROWICA KRWI,
- PŁYNY USTROJOWE,
- MOCZ
- MEDIUM PO HODOWLI KOMÓRKOWEJ,
- HOMOGENATY TKANKOWE.

ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) test immunoenzymatyczny lub immunoenzymosorbcyjny



Wykrywa określone białka
w badanym materiale
z użyciem przeciwciał
(monoklonalnych lub poliklonalnych)
skoniugowanych
z odpowiednim enzymem

- **wysoka czułość,**
- **duża przepustowość,**
- **wynik ilościowy**

Przeciwciała monoklonalne zbiór przeciwciał, które wykazują jednakową swoistość względem danego antygeny, są otrzymywane z jednego klonu limf. B.

Przeciwciała poliklonalne względem tego samego antygeny wykazują różne powinowactwo

ODMIANY TESTU ELISA

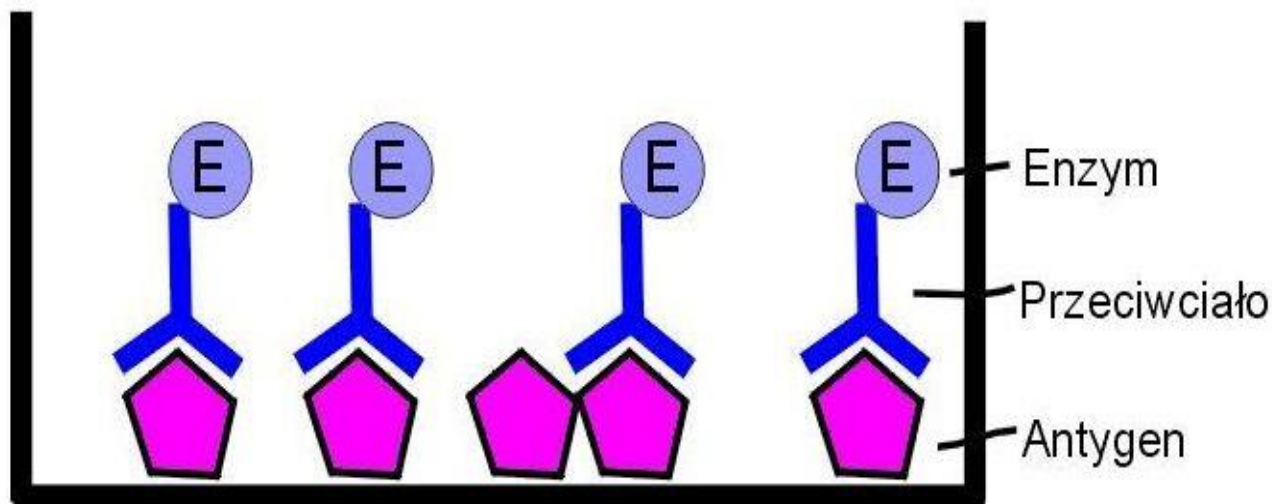


Test ELISA bezpośredni

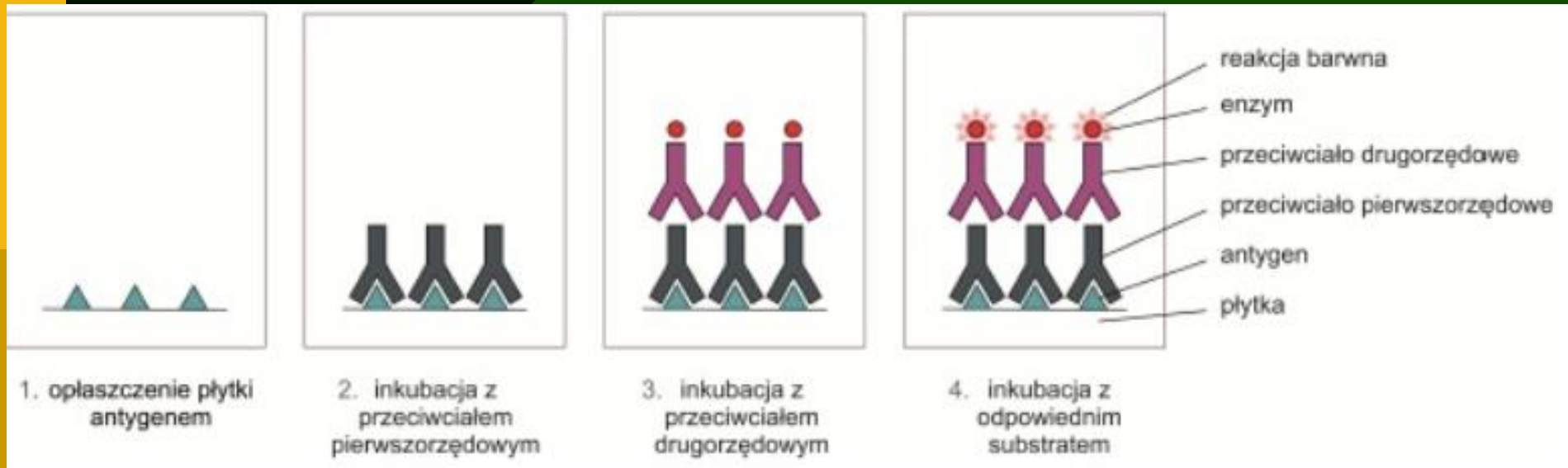
Test bezpośredni wymaga obecności **swoistego przeciwciała**, które dodatkowo musi być wyznakowane enzymem.

*Do wykrycia antygeny trzeba **przygotować porcję znakowanych swoistych przeciwciał***

ELISA bezpośrednia



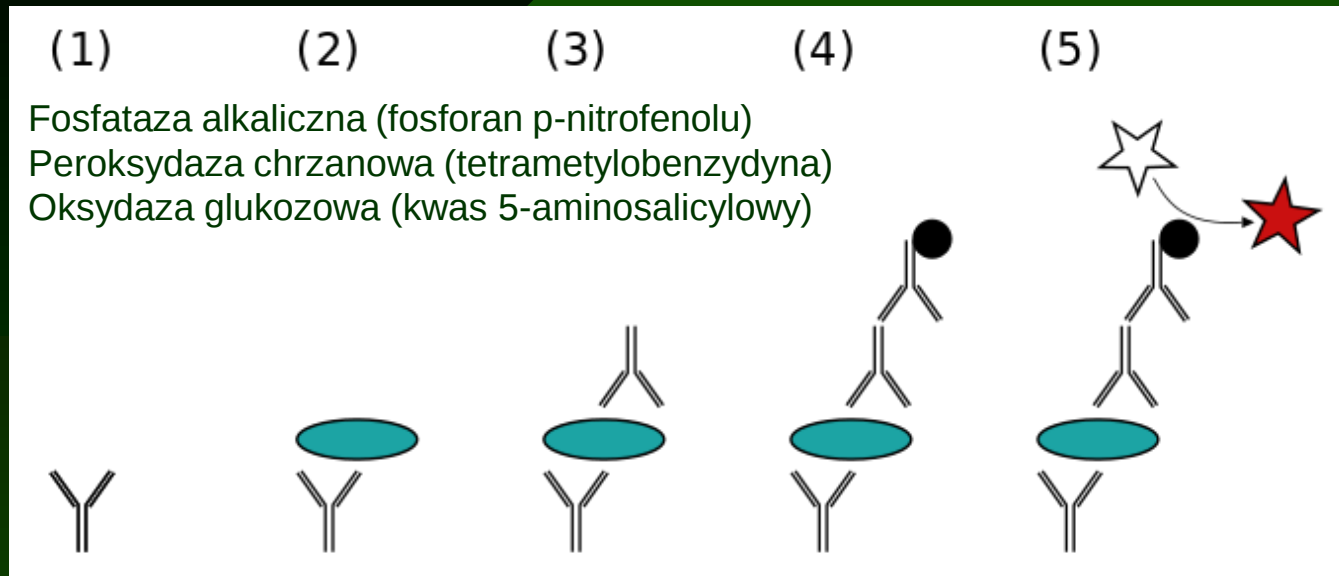
Test ELISA pośredni



- antygen opłaszczający płytkę **wykrywany jest przez swoje, nieznakowane przeciwciało** i tworzy z nim kompleks immunologiczny.
- **dodawane są skoniugowane z enzymem przeciwciała drugorzędowe**, nacelowane na część stałą łańcucha przeciwciała pierwszorzędowego.

Pozwala to na dowolny dobór przeciwciał drugorzędowych, które są uniwersalne dla organizmu, z którego pochodzą przeciwciała pierwszorzędowe.

Sandwich" ELISA – test podwójnego wiązania



1. umieszczenie specyficznego względem danego antygenu **przeciwciała na fazie stałej**, np. płytce
2. Dodawany jest badany materiał - **jeśli w materiale znajduje się poszukiwane białko**, będzie się ono łączyć do przeciwciał związanych z płytką
3. antygen jest wyodrębniony z mieszaniny, po czym dodaje się **przeciwciała wykrywające**
4. dodawane jest kolejne **przeciwciało**, tym razem **wyznakowane enzymem**.
5. dodawany jest **substrat**, który jest konwertowany do wykrywalnej formy przez enzym na przeciwciałach drugorzędowych

Test ELISA – zastosowanie

- zakażenia HIV,
- toksyny cholery,
- kiły,
- salmonelli
- WZW typu B i C,
- rotawirusy i adenowirusy,
- bakterie *E. coli*,
- Obecność toksyn *Clostridium difficile* w kale w przypadku rzekomobłoniastego zapalenia jelita grubego,
- bakterie *Yersinia*,
- choroby pasożytnicze,
- gronkowiec złocisty,
- pałeczki *H. pylori*.

Dodatkowo:

- **w diagnostyce boreliozy.** W pierwszym etapie wykonuje się test w klasie IgG i IgM (wynik pozytywny graniczny i negatywny wynik testu przesiewowego powinien być zweryfikowany dodatkowymi technikami)
- **w oznaczeniach markerów nowotworowych** w przypadku m.in. nowotworów jajnika, żołądka, wątroby i prostaty

HIV, Human Immunodeficiency Virus, ludzki wirus nabytego zespołu upośledzenia odporności, retrowirus ; wirus RNA, zawierający 2 nici RNA, lentiwirus (grupa wirusów powolnych, charakteryzujących się długim okresem latencji, tj. uśpienia – czas od infekcji do pojawienia)

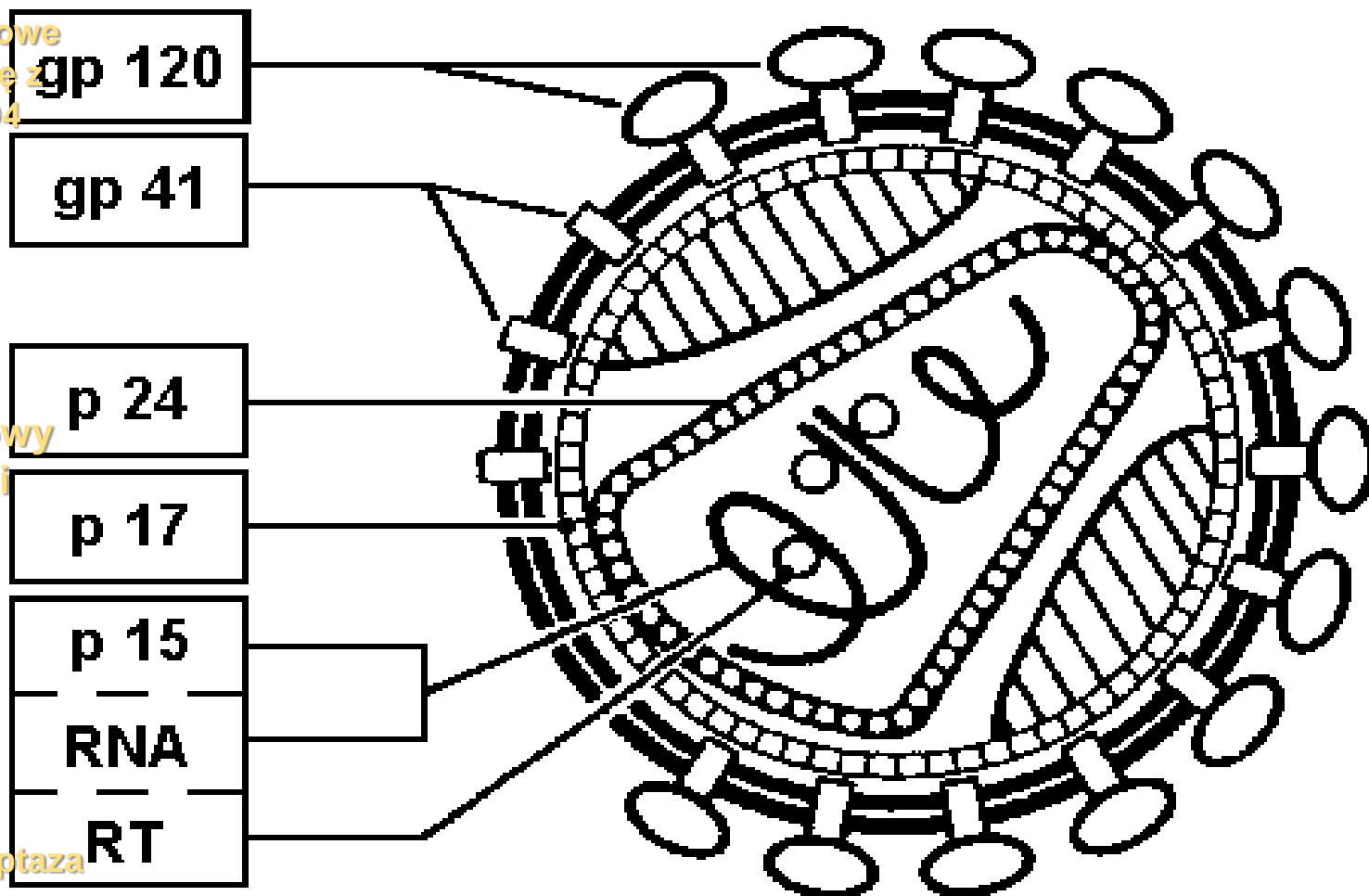
białko powierzchniowe
otoczki wiążące się z
białkiem typu CD4

białko
przebłonowe
otoczki

plaszcz białkowy
wirusa, czyli
kapsyd

Materiał
genetyczny
wirusa

odwrotna transkryptaza



W rdzeniu są umieszczone niezbędne do wytworzenia potomnych cząstek wirusowych w procesie replikacji. Wśród nich jest już wyżej wymieniona rewertaza (a ponadto integraza i proteaza)

Genom stanowią dwie takie same nici RNA

Zawierają one następujące geny:

- .*gag*, kodujący białka strukturalne;
- .*pol*, kodujący odwrotną transkryptazę;
- .*gen* kodujący proteazę;
- .*env*, kodujący glikoproteiny osłonki lipidowej;
- .geny regulacyjne.

Wrota zakażeń

- kontakt zakażonej krwi z krwią lub błoną śluzową osoby niezakażonej, np. używanie tej samej igły, niewysterylizowanych narzędzi dentystycznych itp.,
- kontakt seksualny (sperma, preejakulat, śluz szyjkowy)
- przeniesienie z matki na dziecko

Stadia zakażenia HIV

**.Stadium asymptomatyczne/
bezobjawowe (liczba komórek CD4 >
500/mm³):**

**.Stadium objawowe: (liczba komórek
CD4 w zakresie od 200 do 499/mm³)**

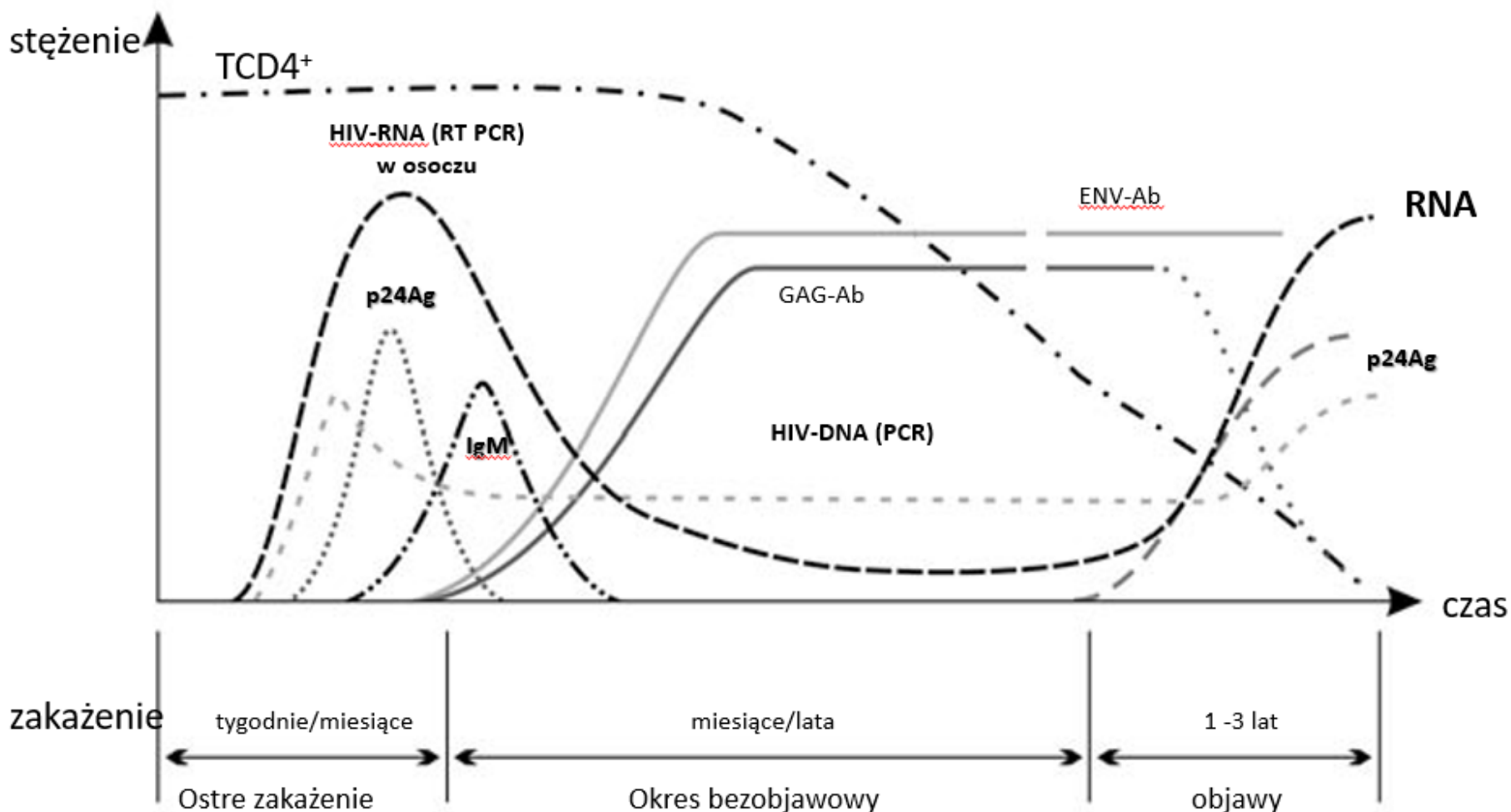
**.AIDS (liczba komórek CD4 <
200/mm³):**

DIAGNOSTYKA CYTOMETRYCZNA

LIMFOCYTY T CD4+

Dzieci od 1 do 6 r. życia $> 1000/\text{mm}^3$
;stosunek TCD4+/TCD8+: 1,05 – 1,75
Dorośli 750 - 1500 $/\text{mm}^3$; stosunek
TCD4+/TCD8+: 1,3 – 2,6

Serokonwersja, czyli pojawienie się przeciwciał anti-HIV, następuje na ogół średnio 3 tygodnie po zakażeniu; wiremia – ilość wirusa w 1 ml krwi



TCD4⁺ limfocyty pomocnicze

HIV-RNA (RT PCR) HIV-DNA (PCR)

Metody pozwalające wykryć materiał genetyczny HIV-genomowy
RNA obecny w wirionach lub komplementarny DNA (cDNA) w
zakażonych komórkach

p24Ag

GAG-Ab antygeny kodowane przez jeden z regionów rdzenia

ENV-Ab antygen kodowany przez jeden z regionów otoczki

AIDS

Zespół nabytego niedoboru odporności,
(*Acquired Immunodeficiency Syndrome* lub *Acquired Immune Deficiency Syndrome*, **SIDA** łac. *Syndroma Immunitatis Defectus Acquisiti*)

Sytuacja epidemiologiczna HIV/AIDS na świecie w 2020 roku wg. danych WHO:

Liczba osób żyjących z HIV – 37.9 mln

Liczba osób leczonych antyretrowirusowo – 23.3 mln

Liczba osób nowo zakażonych HIV – 1.7 mln

Liczba zgonów związanych z AIDS – 770 tys.

Liczba osób, które zmarły z powodu AIDS od początku epidemii – 32.0 mln

AIDS

POLSKA

Podstawowe informacje epidemiologiczne HIV i AIDS w Polsce – dane od początku epidemii (1985 r.) do 31 grudnia 2021

26 486 zakażonych ogółem

3 815 ma AIDS

1 428 chorych zmarło

Więcej na ten temat: www.pzh.gov.pl

W połowie maja 2022 r. leczeniem ARV objętych było około **16 327** pacjentów. Obecnie leczenie jest prowadzone i finansowane w ramach Rządowego programu polityki zdrowotnej p.n. „Leczenie antyretrowirusowe osób żyjących z wirusem HIV w Polsce na lata 2022 – 2026”.

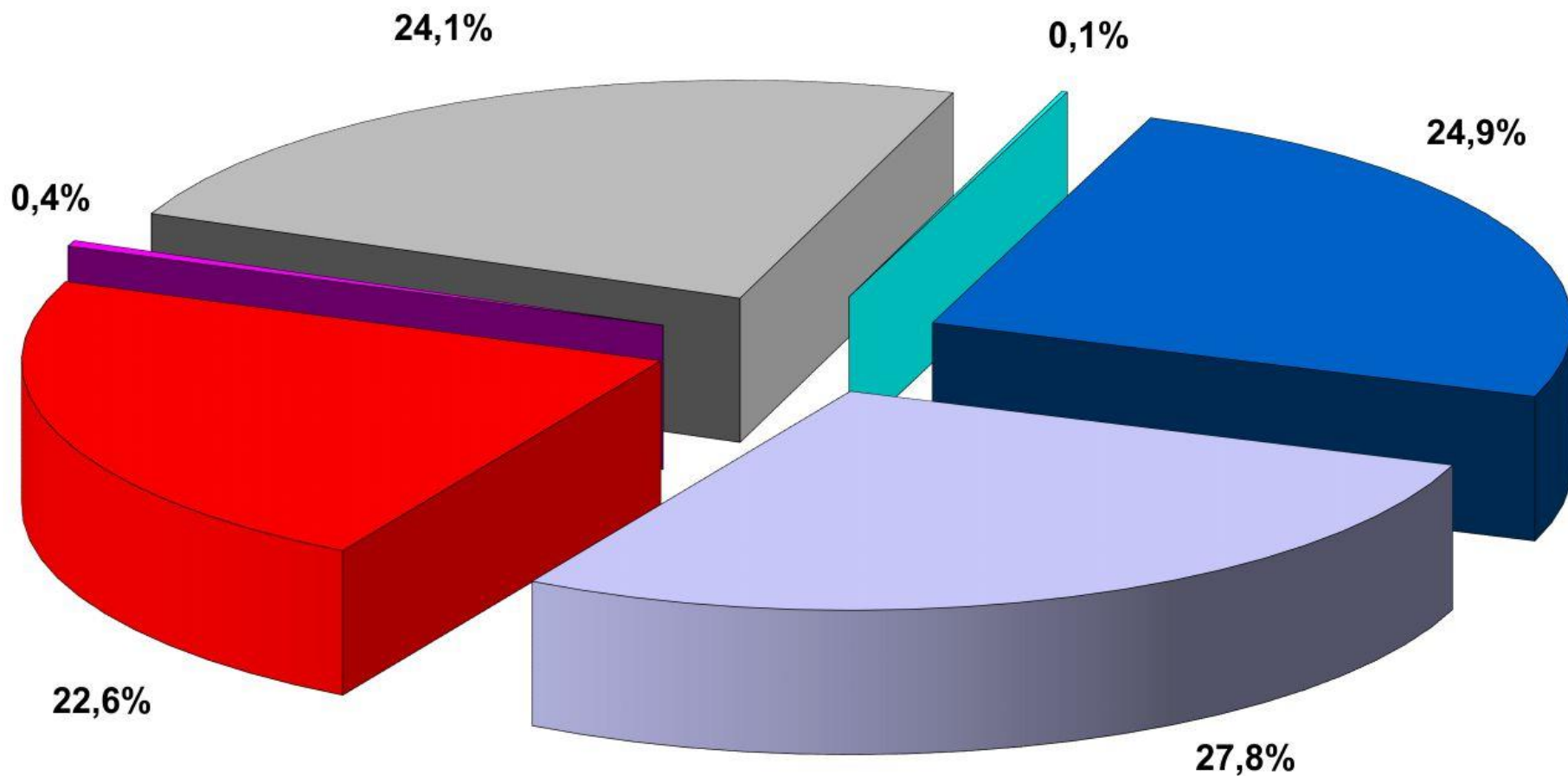
2018 r

23 656 zakażonych ogółem

3 657 na AIDS

1 408 chorych zmarło





■ kontakty homoseksualne (mężczyźni)
■ zakażenia wertykalne (matka-dziecko)

■ stosowanie narkotyków w iniekcjach
■ brak danych

■ kontakty heteroseksualne
■ zakażenia jatrogenne

© NIZP-PZH

Zachorowania na AIDS według prawdopodobnej drogi transmisji

HAART

(highly active antiretroviral therapy)



Pierwsza - faza ostra

Czyli ostry zespół antyretrowirusowy - pojawia się na 2-3 tygodnie od zakażenia, dochodzi wówczas do gwałtownego spadku ilości limfocytów T CD4+ połączonego z wysoką wiremią HIV.

Faza trwa przeważnie 2-4 tygodnie i charakteryzuje się objawami grypopodobnymi.

Na tym etapie choroby nie można wykonać testów serologicznych w kierunku zakażenia HIV, gdyż ilość przeciwciał anti-HIV jest jeszcze zbyt niska do wykrycia.

Druga - faza zakażenia bezobjawowego

Czas trwania przeciętnie 8-10 lat.

W tym okresie pacjent nie ma żadnych objawów klinicznych związanych z zakażeniem HIV,
nie stwierdza się także żadnych nieprawidłowości, poza występującym w części przypadków przewlekłym uogólnionym powiększeniem węzłów chłonnych.

Trzecia - faza objawowa choroby AIDS

Następuje gwałtowny spadek liczby komórek układu odpornościowego, liczba limfocytów T CD4+ obniża się do poziomu poniżej 200/ μ L.

Dochodzi do upośledzenia odporności, Rozwijają się choroby charakterystyczne i definiujące AIDS tj.: nowotwory (m.in. mięsak Kaposiego, chłoniak Burkita) oraz infekcje organizmów oportunistycznych