

Imunologické laboratorní metody

ZÁKLADNÍ DĚLENÍ IMUNOLOGICKÝCH LABORATORNÍCH VYŠETŘENÍ

- **Serologická vyšetření**
 - *základním materiálem pro vyšetření*
 - **SÉRUM**
- **Buněčná vyšetření**
 - *základním materiálem pro vyšetření*
 - **PERIFERNÍ ŽILNÍ KREV**
- **Další zdroje materiálu pro imunologické vyšetření**
 - *mozkomošní mok, lymfatické uzliny, bioptické vzorky orgánů, kostní dřev, bronchoalveolární laváž*

ODBĚR MATERIÁLU K IMUNOLOGICKÉMU VYŠETŘENÍ

SEROLOGICKÁ VYŠETŘENÍ – proces získávání séra

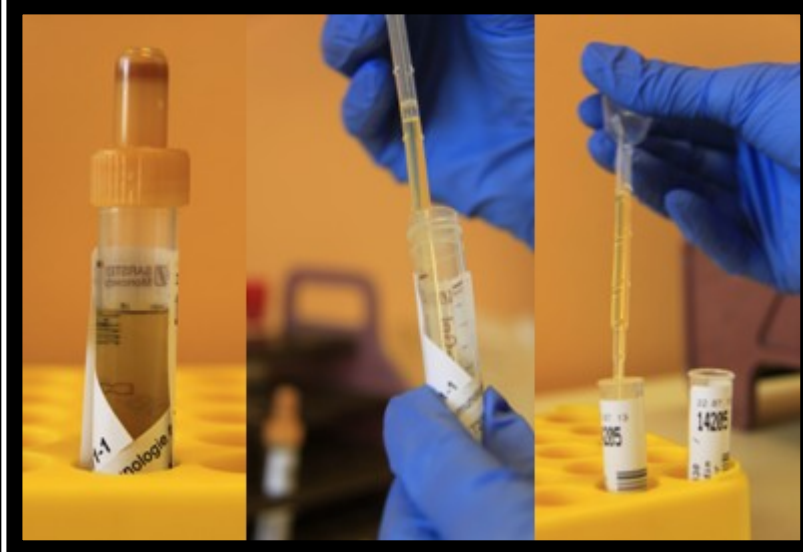
1. odběr venózní srážlivé krve



2. centrifugace



3. přenesení séra do jiné zkumavky



4. uchování séra k dalšímu použití

- 2 týdny při teplotě 4 °C
- měsíce při teplotě -20 °C
- roky při teplotě -80 °C

ODBĚR MATERIÁLU K IMUNOLOGICKÉMU VYŠETŘENÍ

BUNĚČNÁ VYŠETŘENÍ – proces získávání buněk

protisrážlivé činidlo EDTA



protisrážlivé činidlo heparin



*Krev odebranou pro buněčná
vyšetření není většinou
možno skladovat delší dobu.*



*Vyšetření je nutné provést do
několika desítek minut
(vyšetření fagocytárních funkcí)
až několika hodin (vyšetření
počtu a funkce lymfocytů).*

PRIMÁRNÍ A SEKUNDÁRNÍ FÁZE SEROLOGICKÉ REAKCE

Primární fáze serologické reakce

- *pokud je zkoumaná protilátka v séru přítomna, dochází k vazbě protilátky na antigen*
- ***není patrná pouhým okem***

Sekundární fáze serologické reakce

- *uplatňuje se multivalence antigenu a polyvalence protilátek*
- *vzniká prostorový komplex velkého počtu molekul antigenu a protilátek o vysoké molekulové hmotnosti*

PRIMÁRNÍ A SEKUNDÁRNÍ FÁZE SEROLOGICKÉ REAKCE

... vzniklé komplexy jsou

- ***viditelné pouhým okem***
(AGLUTINACE, PRECIPITACE)
 - ***mění roztok pravý na nepravý (kolloidní)***
(TURBIDIMETRIE, NEFELOMETRIE)
-
- *pokud uspořádání reakce umožňuje průběh jen primární fáze reakce nebo průběh sekundární fáze jen ve velmi omezeném rozsahu, je nutné vizualizovat reakci imunochemicky následnou detekcí*
(IMUNOESEJE)

CITLIVOST METOD K PRŮKAZU PROTILÁTEK

precipitace

30 $\mu\text{g/ml}$

aglutinace

1 $\mu\text{g/ml}$

radioimunoassay a ELISA

1 pg/ml

POLYKLONÁLNÍ a MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY

- **POLYKLONÁLNÍ PROTILÁTKY**

- *Směs imunoglobulinových molekul, jejichž vazebná místa nesou specifitu vůči různým epitopům na celé molekule antigenu*
- **Získávají se obvykle imunizací zvířat**

- **MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY**

- *Produkt jednoho klonu B-lymfocytů, vykazují jedinečnou specifitu proti jednomu epitopu na molekule antigenu*
- **Získávají se obvykle metodikami in vitro**

PŘEHLED METOD PRO STANOVENÍ ANTIGENU NEBO PROTILÁTKY

- ***vizualizace pomocí sekundární fáze reakce***
 - **AGLUTINACE** (*přímá, nepřímá*)
 - **PRECIPITACE** (*jednoduchá, v kombinaci s elektroforézou, imunofixace*)
- ***vizualizace pomocí následné detekce***
 - **IMUNOFLUORESCENCE**
 - **IMUNOANALÝZA** (*RIA, EIA, řada modifikací*)
 - **IMUNOBLLOT, IMUNODOT**

a g l u t i n a c e

a g l u t i n a c e

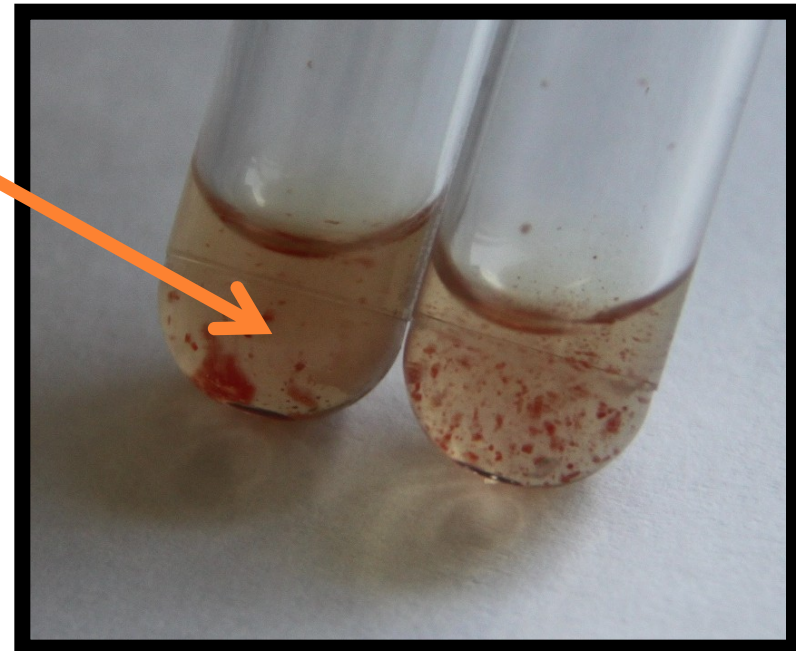
princip reakce

antigen KORPUSKULÁRNÍ POVAHY

Vazbou dvoj a vícevazebných protilátek na povrch antigenu dojde k překonání odpudivých, způsobených negativním nábojem na povrchu částic (zeta potenciál), a vytvoří se mezi nimi můstky ...

*... vzniká **AGLUTINÁT***

- ***snadná vizualizace proběhlé reakce***
 - díky velikosti antigenu
 - díky průběhu reakce v tekutině



a g l u t i n a c e

faktory ovlivňující kvalitu aglutinační reakce

- ***dostatek protilátek***

- příliš velké ředění protilátek → aglutinace neproběhne

- ***přítomnost protilátek proti různým epitopům***

- rozdíl v aglutinaci mezi monoklonálními a polyklonálními protilátkami

- ***vzdálenost mezi jednotlivými antigenními částicemi***

- odpuzivé elektrické síly na povrchu částic klesají se čtvercem vzdálenosti

a g l u t i n a c e

přímá a nepřímá

přímá aglutinace

antigeny se nacházejí přímo na zkoumané částici

průkaz krevních skupin, přímý Coombsův test, určování izolovaných bakteriálních kmenů (zejména ze skupiny enterobaktérií), Widalova reakce, Weil-Felixova reakce, průkaz některých zoonóz, ...

nepřímá aglutinace

zkoumaný antigen je navázán na povrchu vhodných makromolekulárních částic

latex-fixační test, nepřímý Coombsův test, rychlé testy pro ambulantní vyšetření (ASLO), ...

a g l u t i n a c e

určování krevních skupin

ANTIGENY NA POVRCHU ERYTROCYTŮ

polysacharidové

skupinový systém ABO (antigen A, antigen B)

skupinový systém Lewis, P a li

glykoproteinové

skupinový systém Rh (antigen D)

skupinový systém MNSs, Lutheran, Kell, Duffy, Diego

p r e c i p i t a c e

precipitace

princip reakce

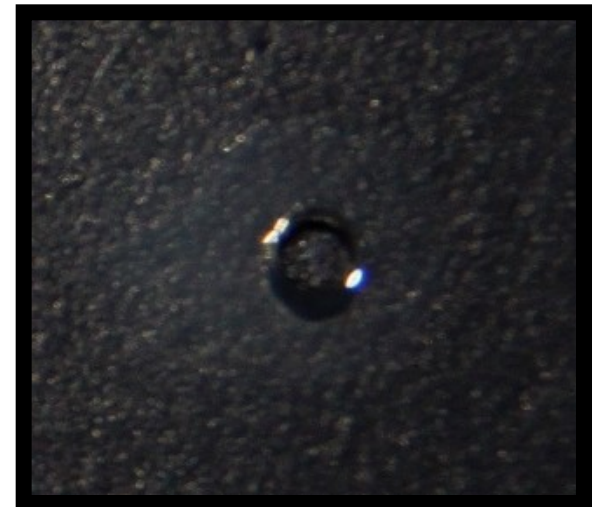
antigen NEKORPUSKULÁRNÍ POVAHY o nízké molekulové hmotnosti

Antigen o nízké molekulové hmotnosti je rozpustný v kapalině a tvoří pravý roztok a při optimálním poměru antigenu a protilátky dochází ke vzniku makroskopicky zřetelné prostorové mřížky tvořené imunokomplexy.

*... vzniká **PRECIPITÁT*** →

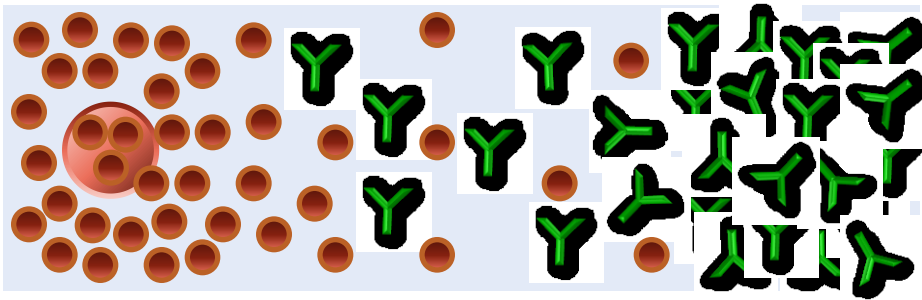
PRECIPITACE PROBÍHÁ ...

- v kapalinách (nefelometrie, turbidimetrie)*
- v gelech (vstříčná a radiální imunodifuze)*

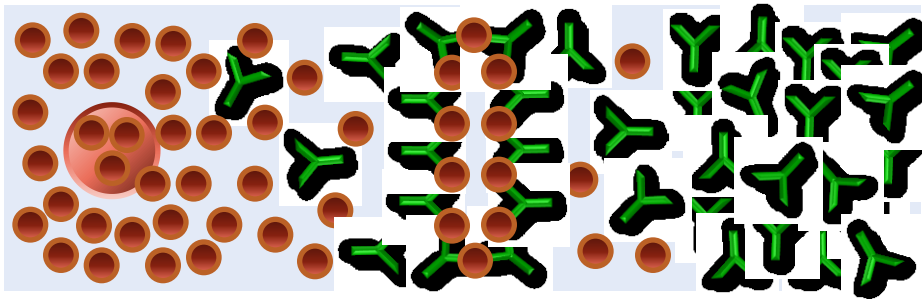


precipitace

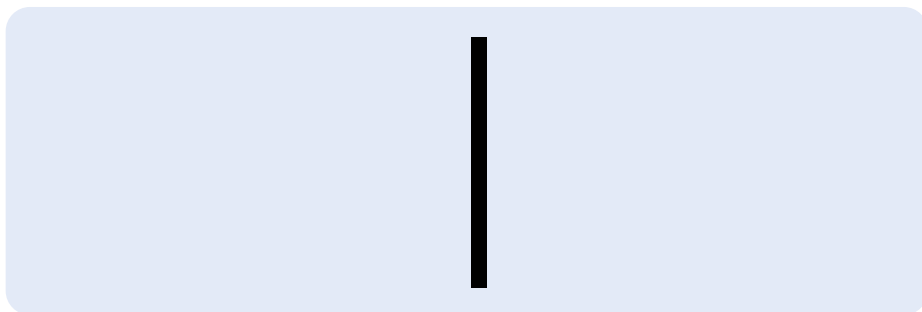
... v gelech



*antigen a protilátka difundují
gelem na podkladě koncentračního
gradientu*



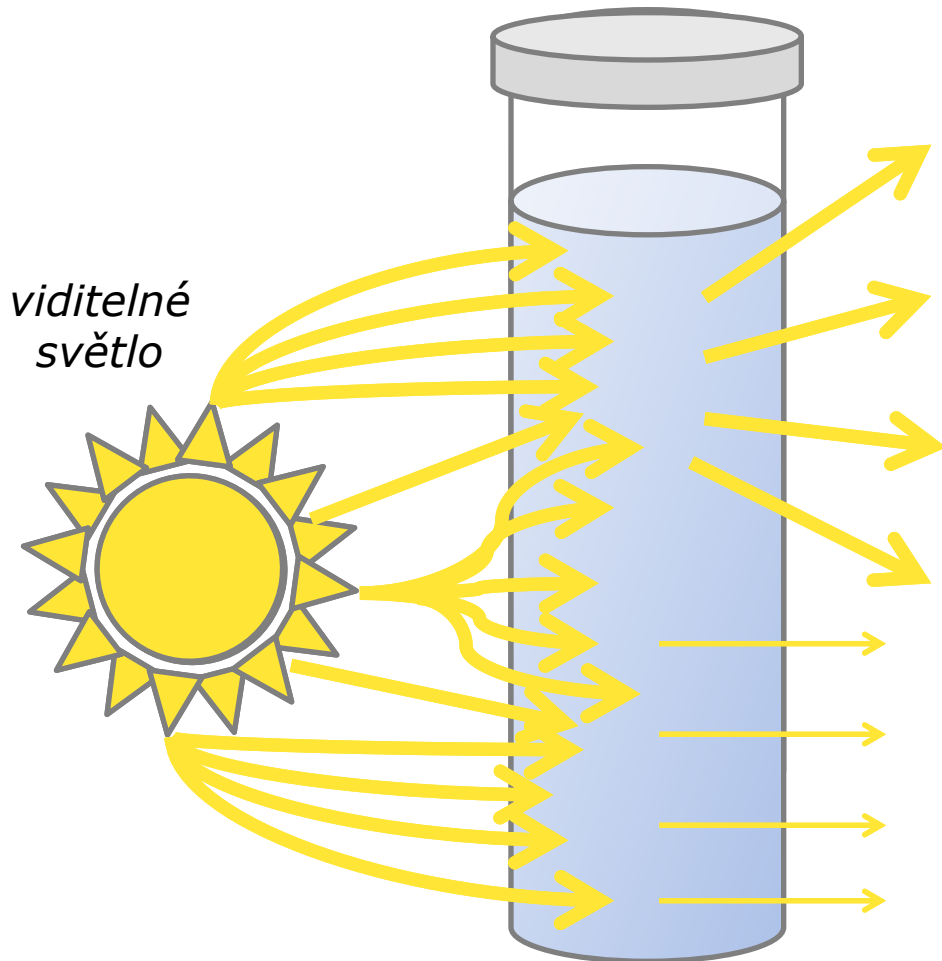
*v místě ekvimolární koncentrace
antigenu a protilátky ...*



*... vzniká **precipitační linie***

precipitace

... v kapalinách



NEFELOMETRIE

*měření rozptylu
viditelného světla*

TURBIDIMETRIE

měření úbytku prošlého světla

ELISA

ELISA

enzyme-linked immunosorbent assay

princip reakce

ke zjištění koncentrace antigenu nebo protilátky

*k detekci reakce mezi antigenem a protilátkou se používá **enzym**
(konjugát zvířecí protilátky proti lidské protilátce IgG, IgA nebo IgM značené enzymem)*

Použití v klinické praxi:

- *v současnosti zřejmě nejvíce používaná laboratorní metoda v imunologických a klinických laboratořích*
- *průkaz protilátek (antibakteriálních, antivirových, autoprotilátek) nebo antigenů*
- **vysoká citlivost testu umožňuje průkaz analytů o nízké koncentraci**
- *ELISA není vhodná k detekci analytů o vyšší koncentraci (např. koncentrace sérových imunoglobulinů) – vzhledem k nutnosti vysokého ředění vzorků možnost velké chyby stanovení!*

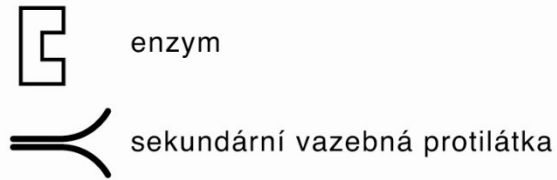
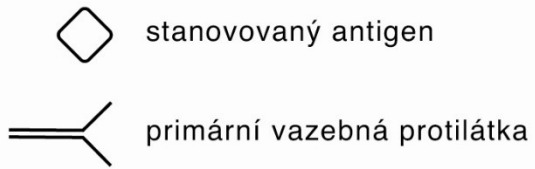
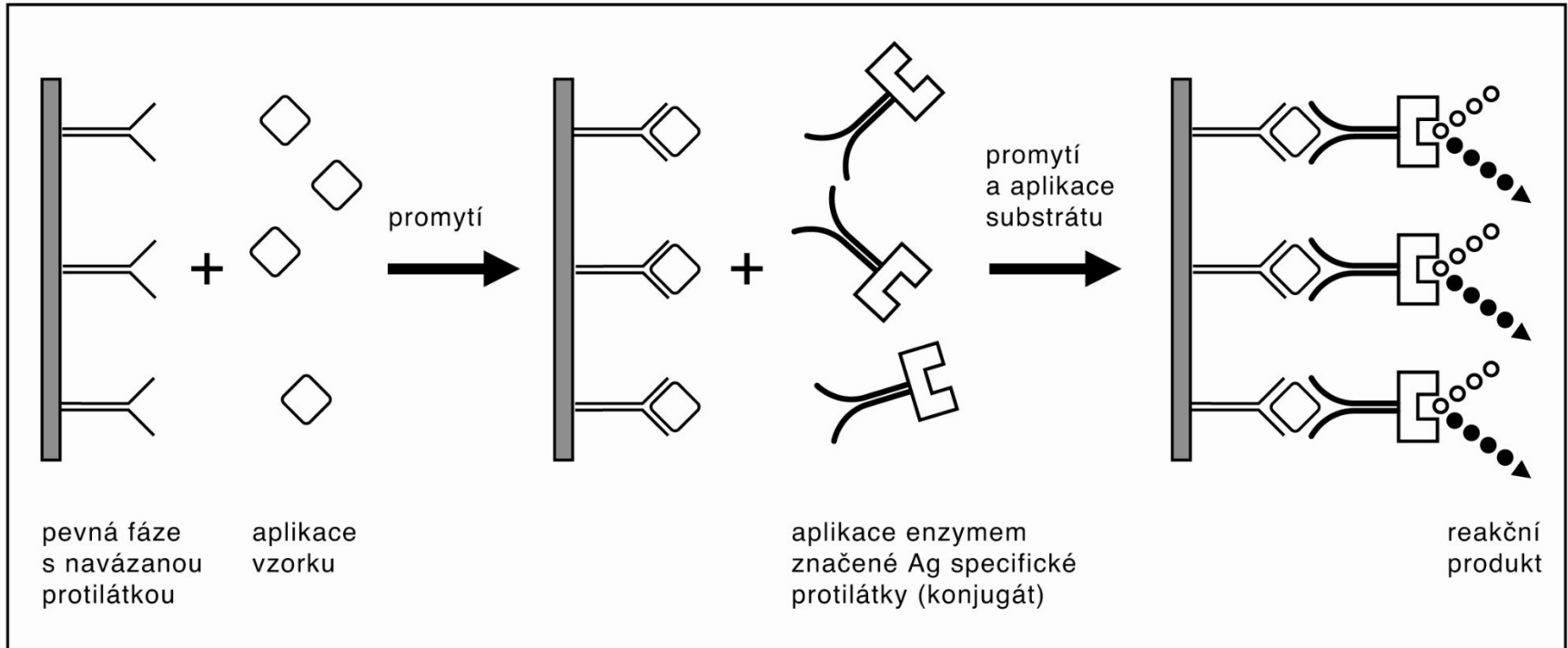
ELISA

enzyme-linked immunosorbent assay princip reakce

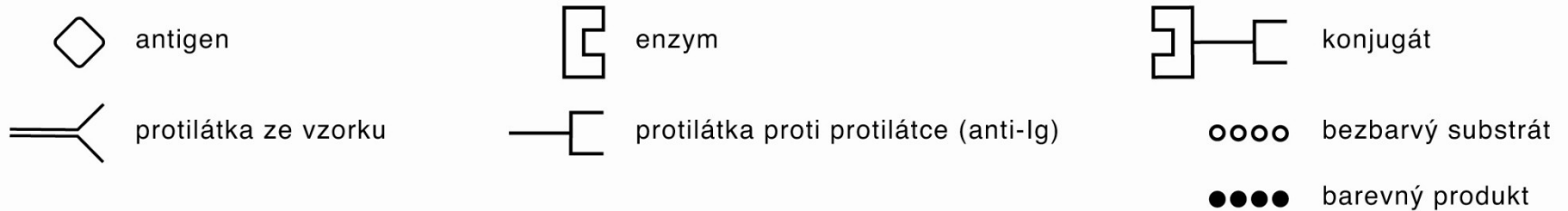
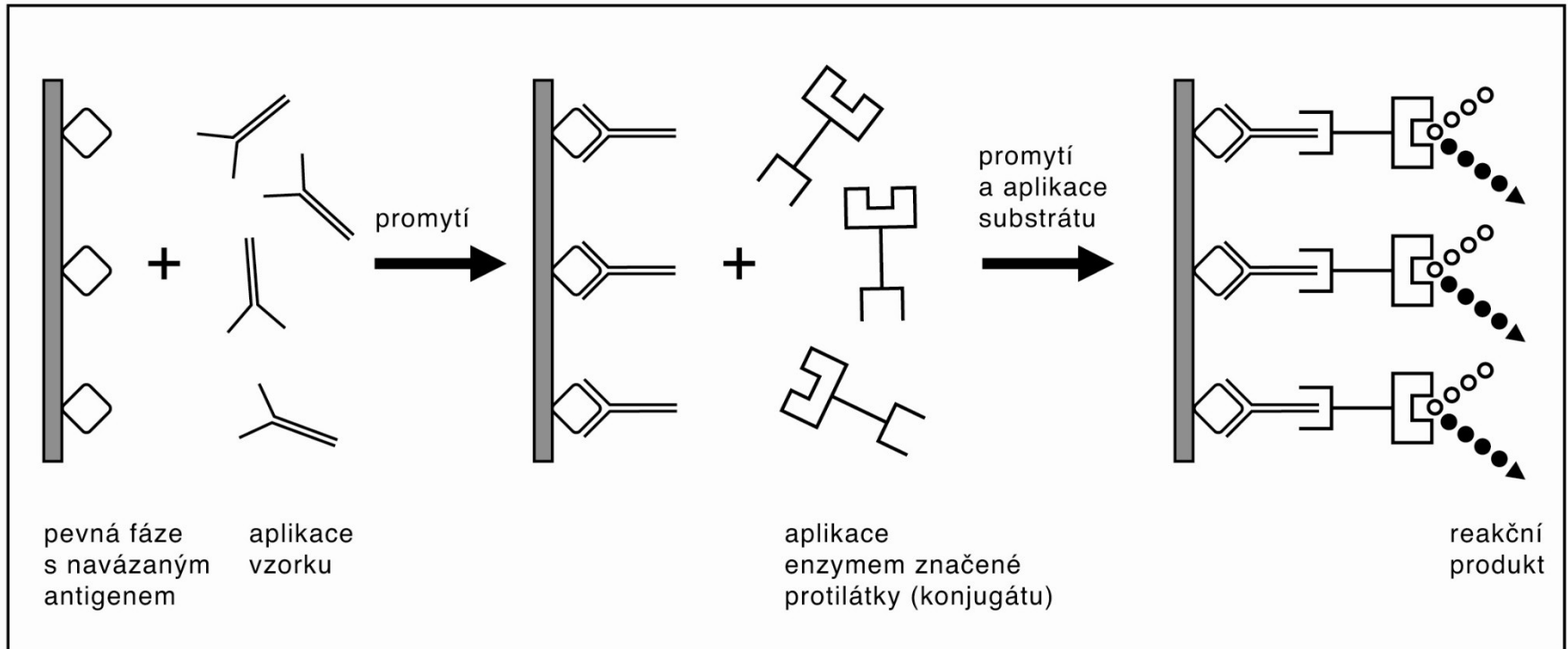
ke zjištění koncentrace antigenu nebo protilátky

- vazba **antigenu** na pevnou fázi (jamka mikrotitrační destičky)
 - inkubace a následné promytí destičky
- aplikace **séra s předpokládaným výskytem protilátek** proti vyšetřovanému antigenu (dojde k vazbě protilátky na antigen)
 - inkubace a následné promytí destičky
- aplikace **konjugátu** zvířecí (myší, králíčí, ...) protilátky proti lidskému IgG, IgA nebo IgM konjugované s enzymem
 - inkubace a následné promytí destičky
- aplikace **substrátu** (bezbarvý substrát → enzym → barevný produkt)
 - inkubace
- zastavení probíhající enzymatické reakce
- změření absorbance jamek spektrofotometricky (intenzita výsledného zbarvení je v určitém rozmezí koncentrací přímo úměrná množství navázané protilátky)

Stanovení Ag metodou ELISA



Stanovení Ab metodou ELISA



ELISA READER



immunofluorescence

imunofluorescence

princip reakce

zjištění přítomnosti antigenu nebo autoprotilátky

*k detekci přítomnosti antigenu nebo protilátky se používá **fluorochrom** (konjugát zvířecí protilátky proti antigenu nebo proti lidské protilátce ve třídě IgG, IgA nebo IgM značené flourochromem)*

PŘÍMÁ IMUNOFLOURESCENCE

- detekce přítomnosti **antigenu nebo protilátky ve tkáních** pomocí protilátek značených flourochromem*
- diagnostika puchýřnatých chorob, SLE, porfyrií, vaskulitid, glomerulonefritid a podobně*

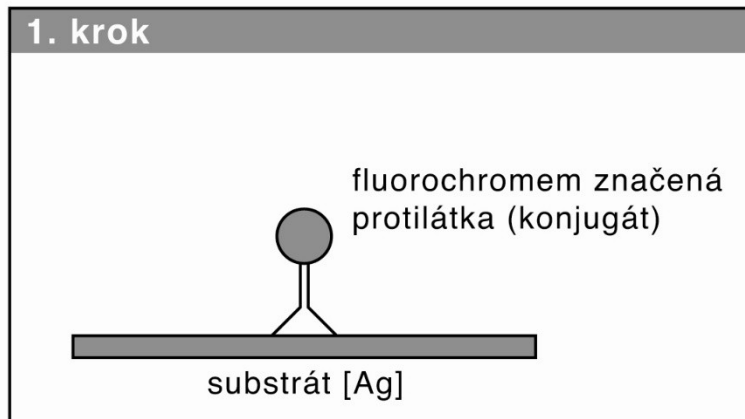
NEPŘÍMÁ IMUNOFLOURESCENCE

- detekce přítomnosti specifických **protilátek v séru** tak, že protilátky přítomné v séru pacienta jsou po vazbě na antigen dárcovské tkáně označené zvířecí protilátkou proti lidským IgG, IgA a IgM imunoglobulinům značenou flourochromem*
- detekce přítomnosti autoprotilátek*

Přímá a nepřímá imunofluorescence

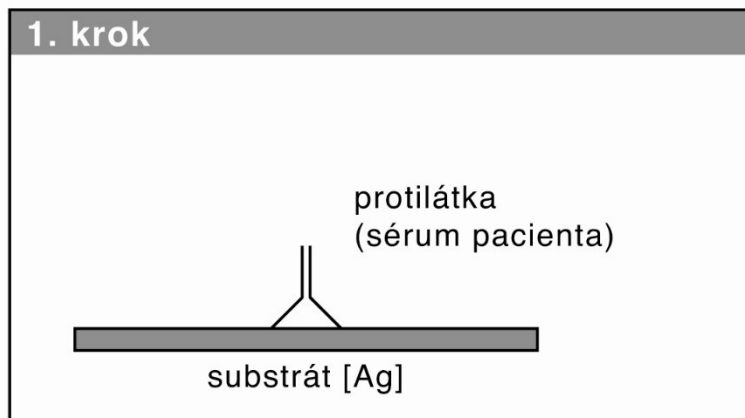
Přímá imunofluorescence

1. krok

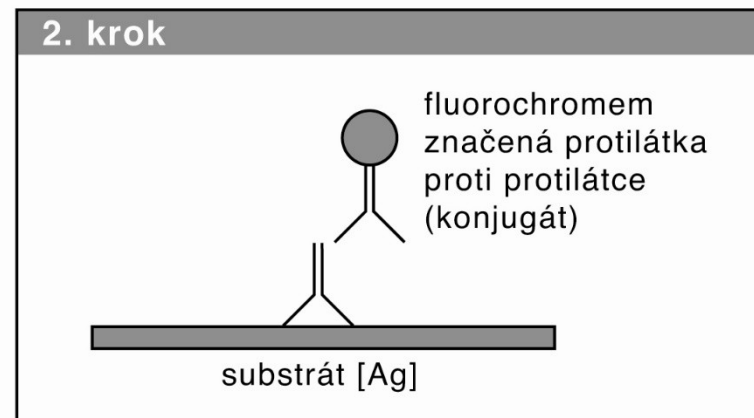


Nepřímá imunofluorescence

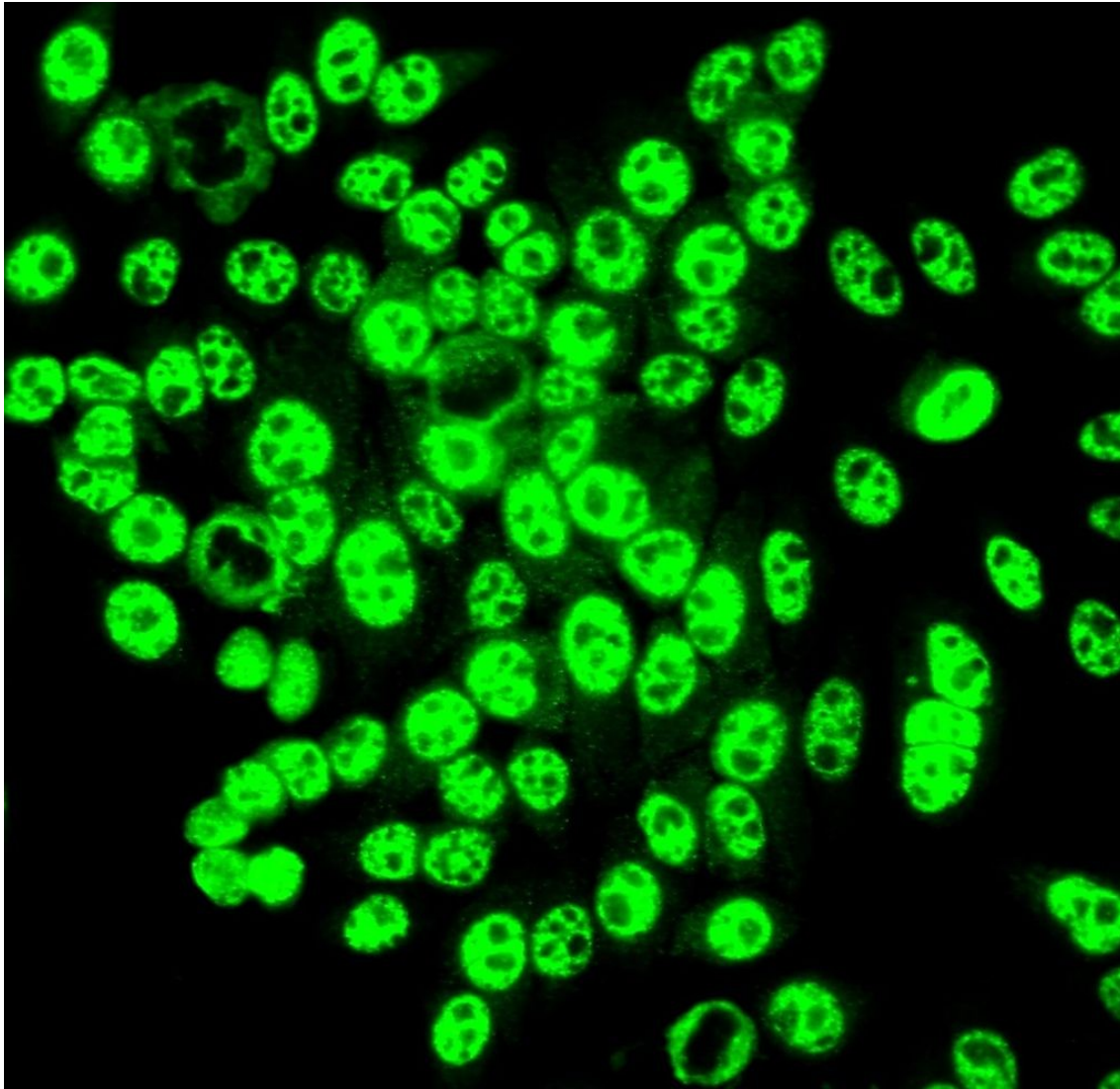
1. krok



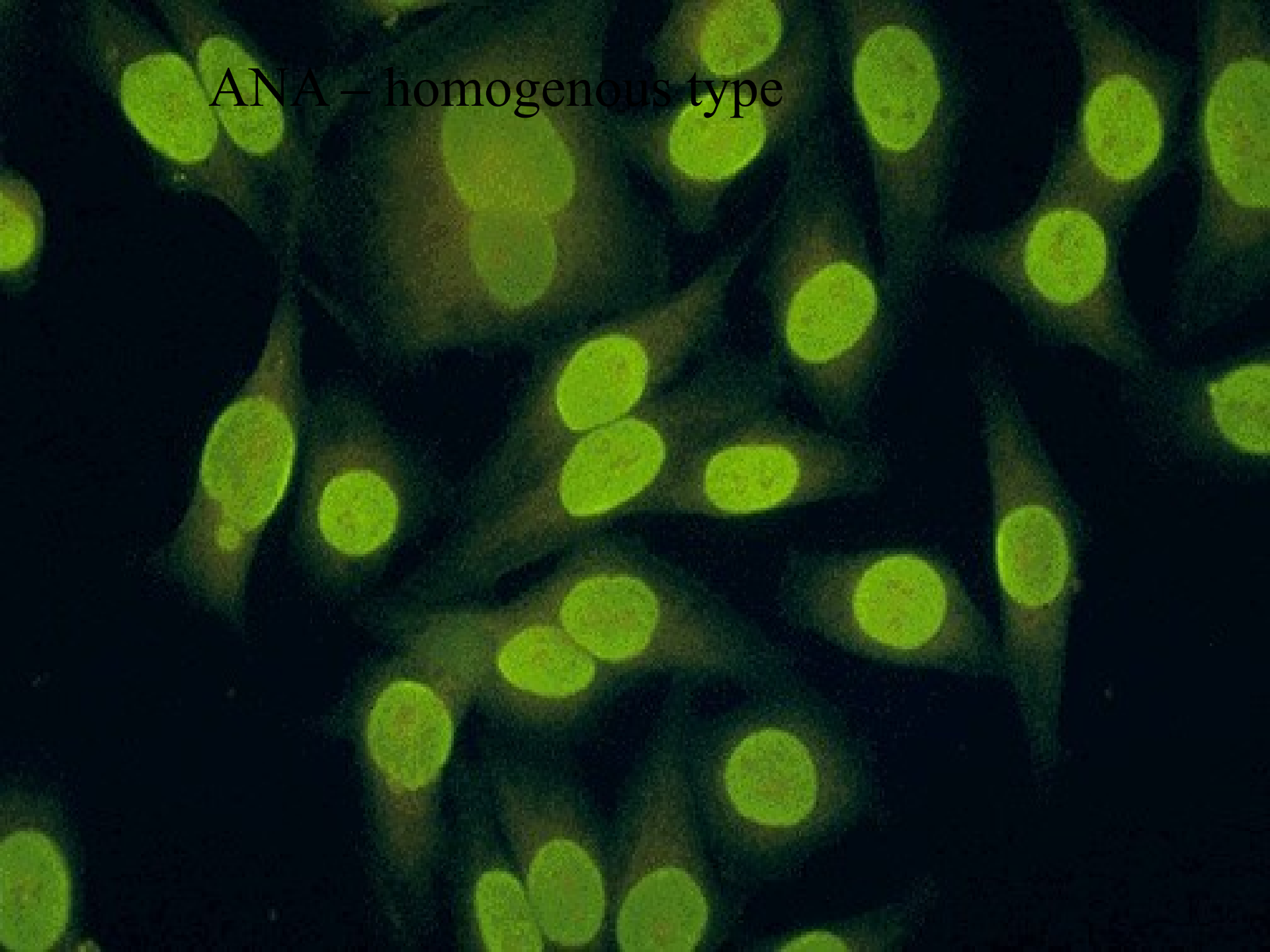
2. krok



ANA
Positive granular type



ANA – homogenous type



elektroforéza

e l e k t r o f o r é z a

princip metodiky

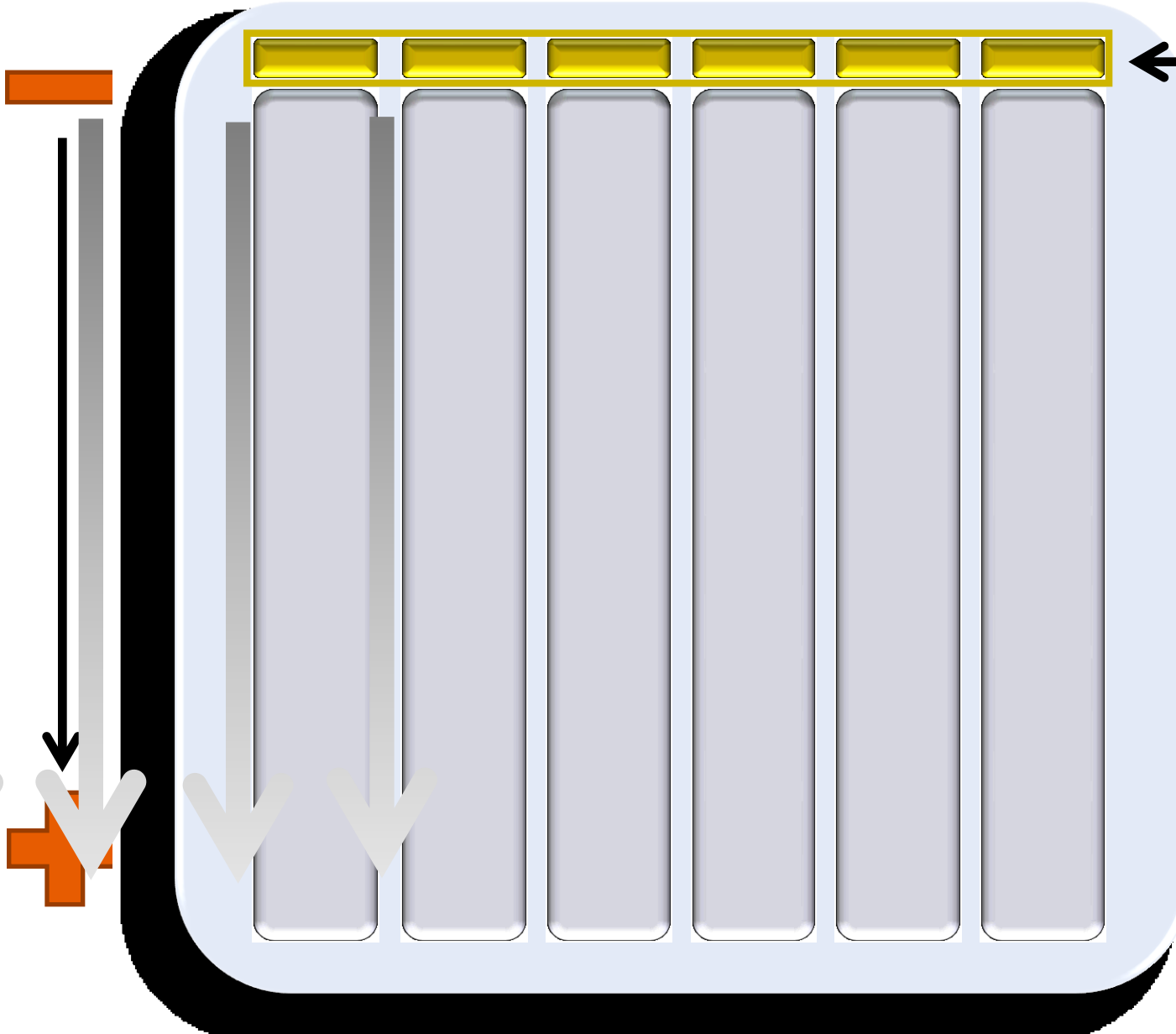
- *nabité částice se pohybují v elektrickém poli*
- *rychlost pohybu částic je závislá na velikosti celkového povrchového náboje, velikosti a tvaru molekuly a její koncentraci v roztoku*

NATIVNÍ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA BÍLKOVIN

- *bez denaturačních činidel*
- *proteiny migrují gelem podle svého celkového náboje, velikosti a tvaru (citlivost elektroforézy je dána charakterem pórů gelu)*
- ***elektroforéza sérových bílkovin (rozdělení proteinů plazmy na 5-6 frakcí)***
- ***Využití elektroforézy v klinické praxi:***
- *analýza a dělení směsí bílkovin, charakterizace povrchů organismů (bakterií, virů a podobně), diagnostika monogenních chorob a podobně*

elektroforéza

*Aplikace séra
pacientů do
elektroforetických
drah ...*



*... rozdělení
sérových
proteinů dle
náboje, proteinů
a velikosti ...*

elektroforéza sérových bílkovin



albumin

alfa 1 globulin

alfa 2 globulin

beta 1 globulin

beta 2 globulin

gama globulin

Western blot

Western blot

immunoblot

princip metodiky

elektroforetické dělení bílkovin a jejich následní přenesení na povrch membrány a typizace specifickými protilátkami

1. fáze

- *rozdělení séra elektroforézou na gelu*

2. fáze

- *přenos rozdělených antigenů na vhodnou matici*
- *imobilizace antigenů a zablokování nespecifických vazebných míst*
- *vizualizace antigenů radiograficky, barevnou reakcí, fluorescenčně (specifické protilátky → immunoblotting)*
- **Využití v klinické praxi:**
- *testy na HIV pozitivitu, definitivní test pro BSE, konfirmační test pro hepatitidu B, diagnostika boreliových infekcí*

výsledný protokol blotu ...

control band

NuMA

Scl70

Ku86

ACA80

Ku76

M2-74

RNP70

RNP70

RNP70

RO/SS-A60

Jo1

RO/SS-A52

La/SS-B45

Histon1

rRNP38

RNP33

SmB'

PM/Scl

SmB

RNP22

SmD

ACA17

baseline

Date: Th 18. Jul 2013

Patient: 13711

Antigene: ANA

Antibodies: IgG

Positive Bands:

✓ La/SS-B45:	49 %	+
✓ RO/SS-A52:	75 %	++
✓ M2-74:	80 %	++

Cutoffs:

0 % - 14 % = negative

15 % - 24 % = (+) indeterminate

25 % - 49 % = + weakly positive

50 % - 99 % = ++ positive

100 % = +++ highly positive

Buněčné laboratorní imunologické techniky

ZÁKLADNÍ SLOŽKY IMUNITNÍHO SYSTÉMU

Imunitní reakce je zajišťována různými druhy buněk a molekul a jejich vzájemnými interakcemi.

Buňky imunitního systému spolu s buňkami pojivovými a dalšími strukturami tvoří funkční a anatomické celky ...

- ***lymfatické tkáně a orgány***
- ***buňky imunitního systému***
- ***molekuly imunitního systému***

DIFERENCIÁLNÍ KREVNÍ OBRAZ

odběr nesrážlivé krve do EDTA

	<i>kojenci</i>	<i>děti</i>	<i>dospělí</i>
LEUKOCYTY	9 – 15 x 10 ⁹ /l	8 – 12 x 10 ⁹ /l	4 – 9 x 10 ⁹ /l
GRANULOCYTY/POLYMORFONUKLEÁRY	%	%	%
<i>neutrofilní granulocyty</i>	25 - 65	35 - 70	55 - 70
• segmenty	22 - 65	25 - 65	50 - 70
• tyče	0 - 10	0 - 10	3 - 5
<i>eozinofilní granulocyty</i>	1 - 7	1 - 5	2 - 4
<i>basofilní granulocyty</i>	0 - 2	0 - 1	0 - 1
MONONUKLEÁRNÍ LEUKOCYTY	%	%	%
<i>lymfocyty</i>	20 - 70	25 - 50	25 - 40
<i>monocyty</i>	7 - 20	1 - 6	2 - 6

CD klasifikační systém (Paříž 1982)

CD znaky (CD = cluster of differentiation)

- *molekuly buněčných membrán prokazované monoklonálními protilátkami (metodikou průtokové cytometrie)*
- **dnes známých více než 350 CD znaků**
*(9th International Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens (HLDA9),
březen 2010)*
- **Využití v klinické praxi:** vyšetření absolutního a relativního zastoupení buněčných subpopulací pomocí průtokové cytometrie (v imunologii rutinně vyšetření T-lymfocytárních, B-lymfocytárních subpopulací a NK buněk)
- **Odběr:** nesrážlivá krev (EDTA)

LYMFOCYTÁRNÍ SUBPOPULACE	CD ZNAKY	PROCENTUÁLNÍ ZASTOUPENÍ Z LYMFOCYTŮ
T lymfocyty	CD3⁺	58 – 85 %
Th lymfocyty	CD3 ⁺ CD4 ⁺	30 – 60 % z CD3⁺
Tc lymfocyty	CD3 ⁺ CD8 ⁺	15 – 35 % z CD3⁺
B lymfocyty	CD19⁺	7 – 23 %
NK buňky	CD16⁺/56⁺	6 – 20 %

PŘEHLED BUNĚČNÝCH IMUNOLOGICKÝCH VYŠETŘENÍ

V rámci imunologického vyšetření buněčných subpopulací stanovujeme:

- **absolutní a relativní počty buněk imunitního systému**
 - *Vycházíme ze stanovení celkového počtu leukocytů a diferenciálního krevního obrazu (absolutní a relativní počet lymfocytů, monocytů, granulocytů)*
- **funkci buněk imunitního systému**

Vyšetření relativního a absolutního zastoupení lymfocytárních subpopulací

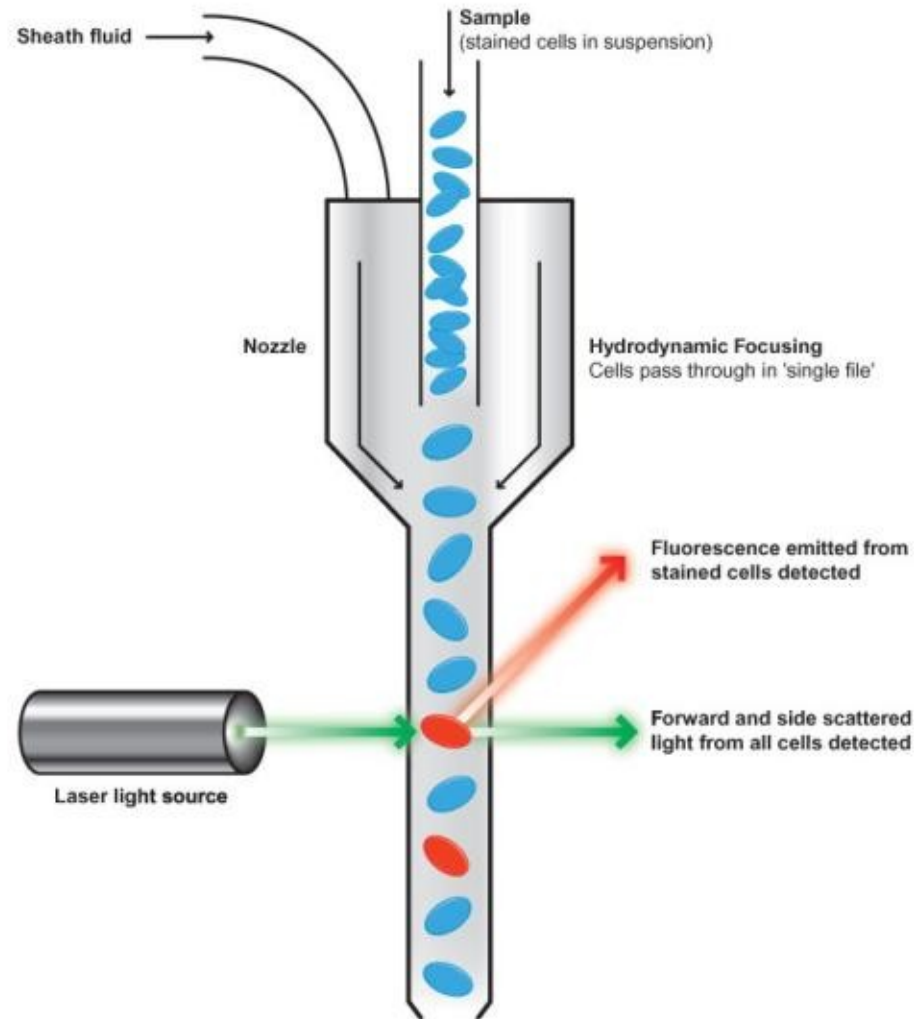
PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE

- využívá principu ***přímé imunofluorescence***
- buňky jsou inkubovány s protilátkou proti konkrétním CD znakům na povrchu buněk imunitního systému, která je označena fluorescenčním barvivem
- buňky laminárně proudí tryskou přístroje vystaveny laserovému paprsku světla

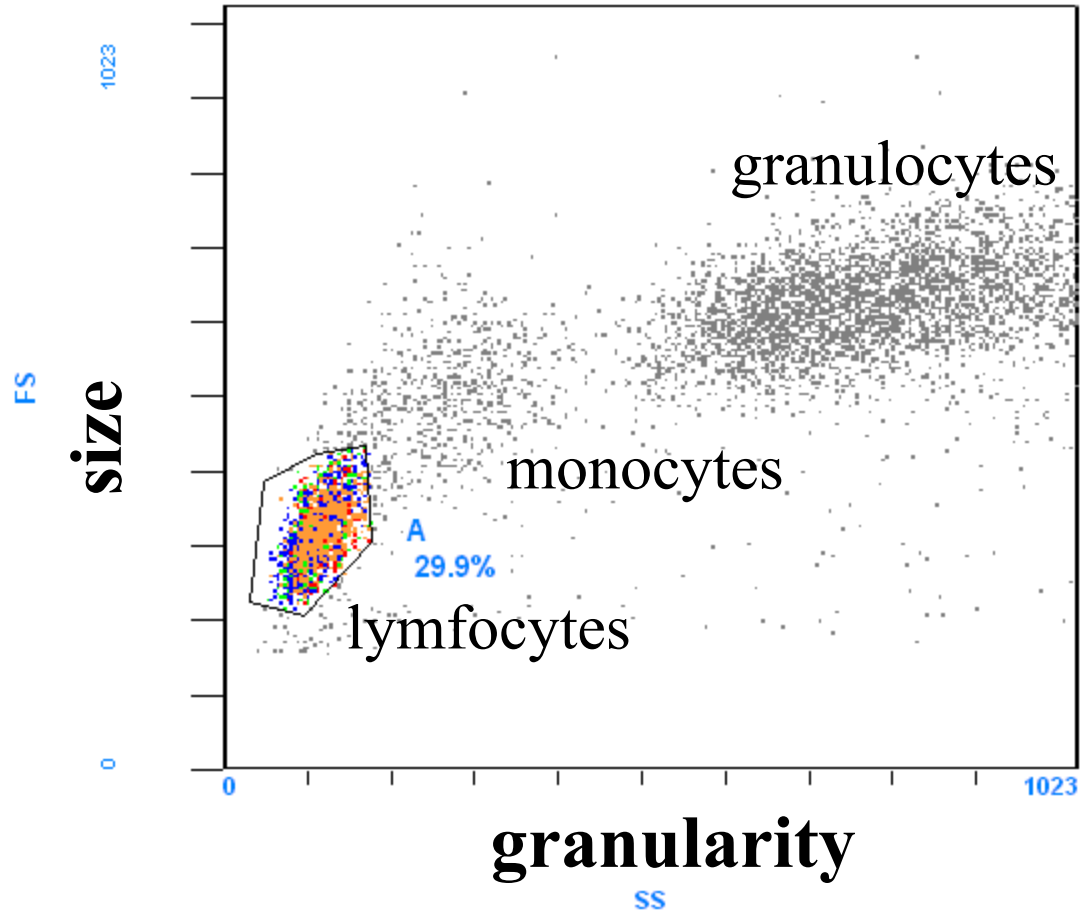
Průtokový cytometr



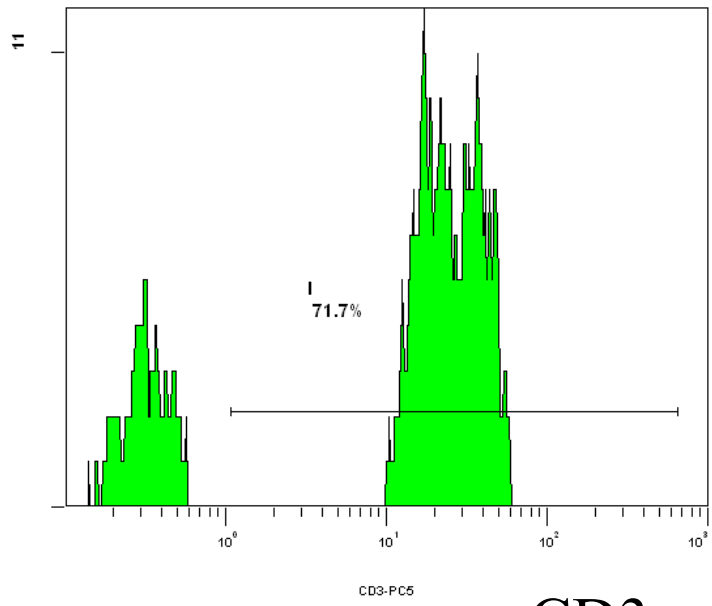
Průtoková cytometrie



(F1)[Ungated] Z0051674.LMD : SS/FS

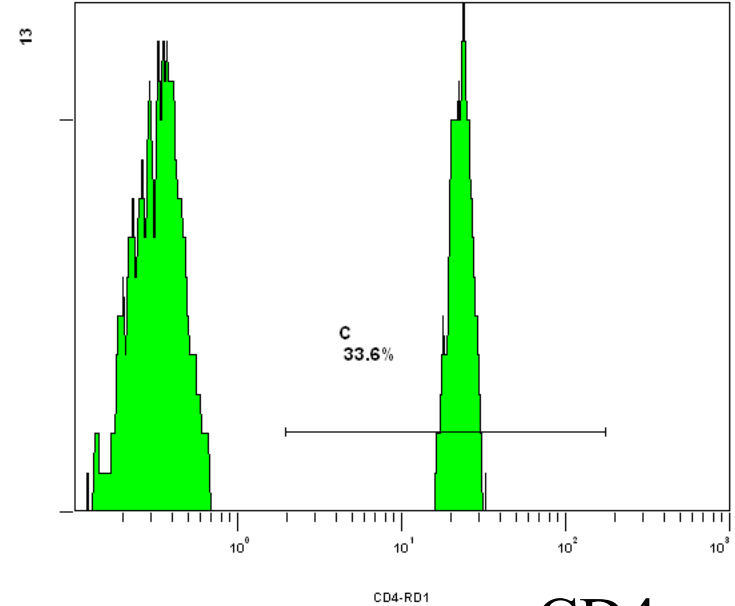


[F1][A] 20051674.LMD : FL4 LOG



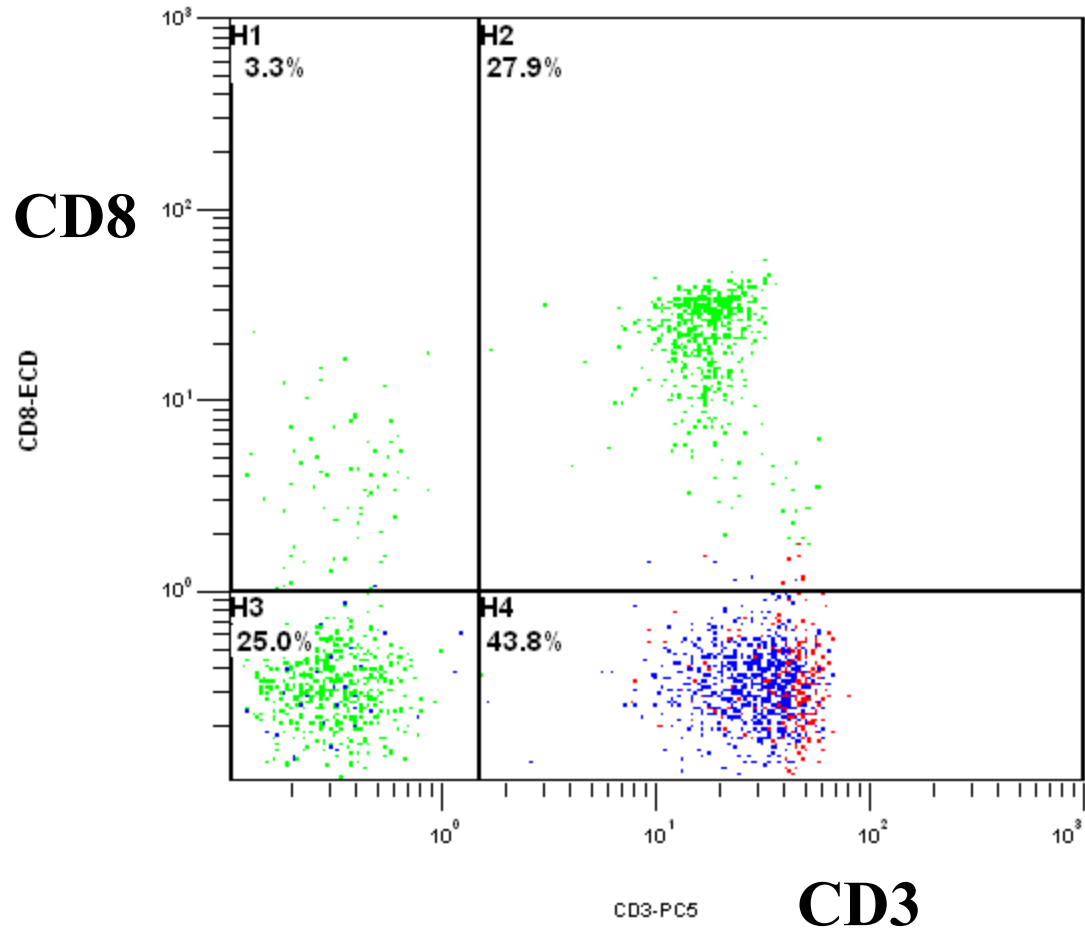
CD3

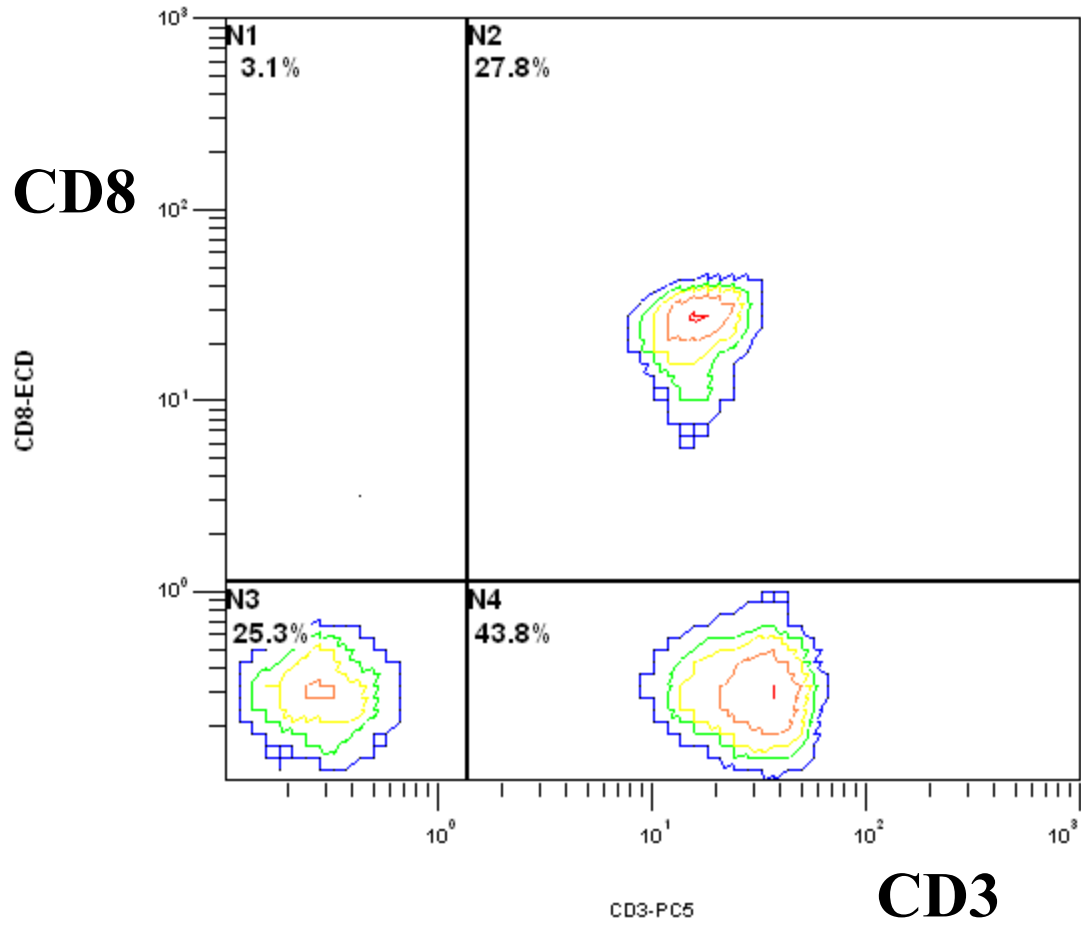
[F1][A] 20051674.LMD : FL2 LOG



CD4

(F1)[A] 20051674.LMD : FL4 LOG/FL3 LOG





Funkční vyšetření lymfocytárních subpopulací in vitro

PROLIFERAČNÍ SCHOPNOST LYMFOCYTŮ

jeden z fyziologických jevů buněčné aktivace

- Lymfocyty aktivovány
 - **Polyklonálními mitogeny**
 - pro B lymfocyty
 - pokeweed mitogen (PWM)
 - pro T lymfocyty
 - phytohemagglutinin (PHA)
 - konkanavalin A (ConA)
 - **Specifickými antigeny**
 - tuberkulin
 - tetanický toxoid