

# Průtoková cytometrie a stanovení lymfocytárních subpopulací

Jana Nechvátalová

Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně



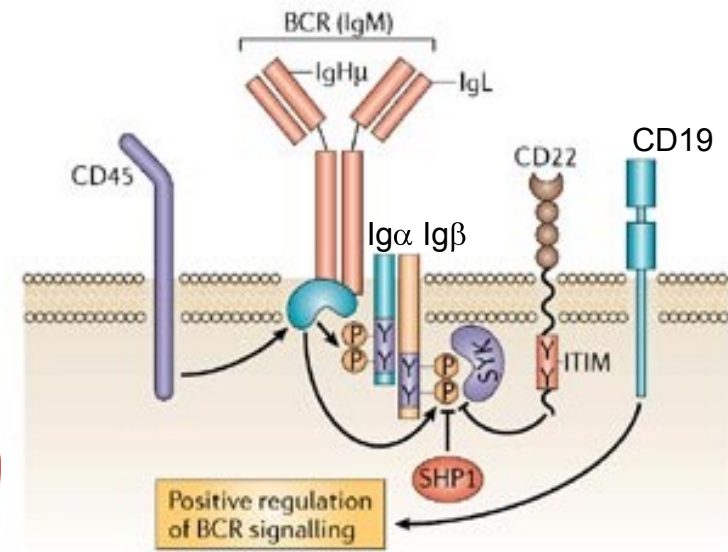
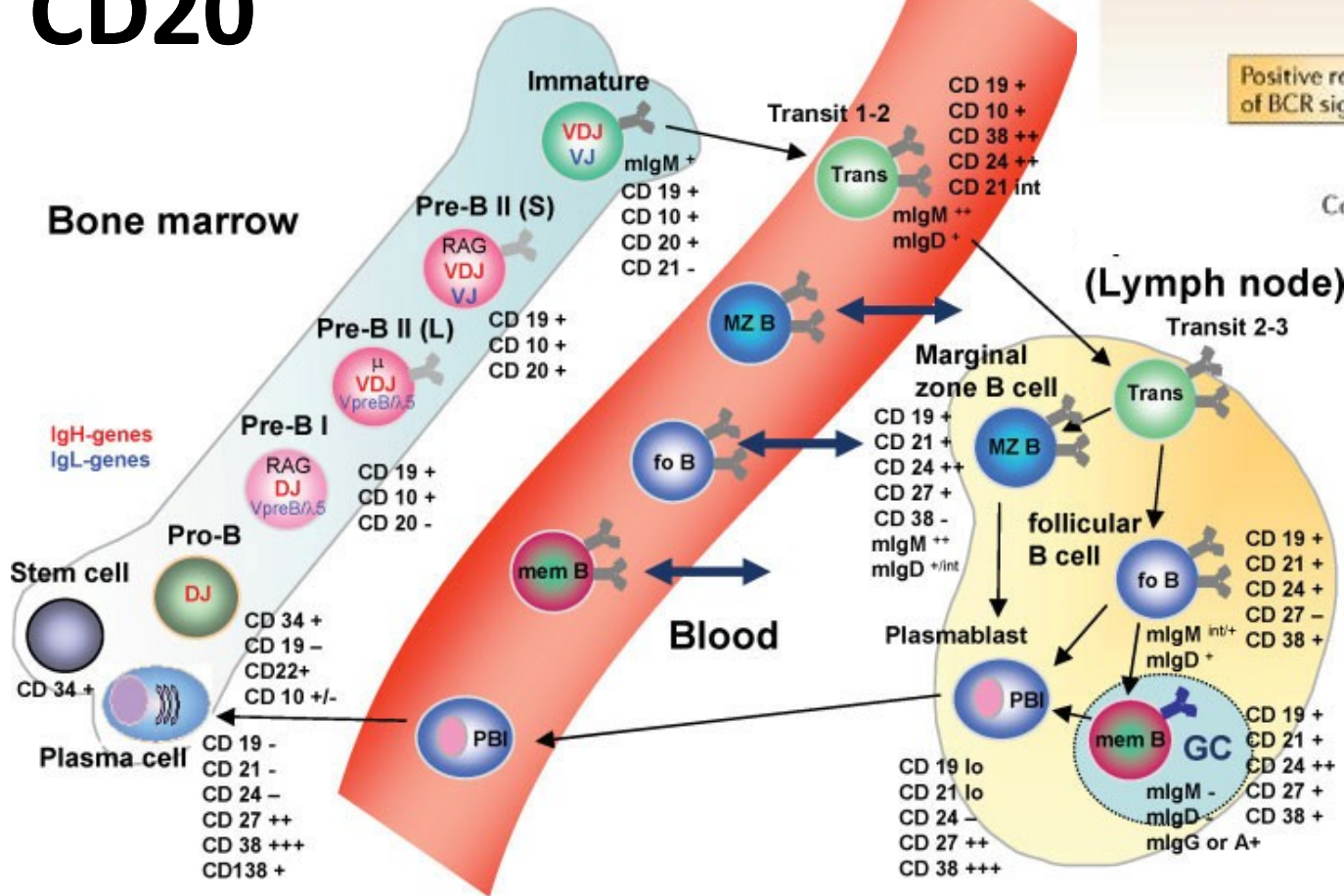
# Cluster Designation (Cluster of Differentiation)

- **buňky exprimují (vystavují) na svém povrchu různé specifické molekuly** – znaky, které můžeme uspořádat do skupin charakterizujících buněčnou linii, stav diferenciaci jednotlivé buňky a její aktivace
- **CD klasifikace:** znak definované struktury rozpoznatelný monoklonální protilátkou je zařazen do skupiny diferenciačních CD znaků a označen číslem (CD1, CD2, CD3,...). V současné době je na lidských leukocytech charakterizováno asi 400 znaků.
- **Využití:** CD znaky jsou používány k označení plně definovaných molekul. Molekuly zařazené do CD klasifikace jsou členěny podle funkce. Rozlišení adhezních membránových molekul, receptory pro rozmanité cytokiny, molekuly vyjádřené na T lymfocytech, B lymfocytech, trombocytech či jiných buněčných populacích.

# B lymphocyty

## CD19

## CD20



Copyright © 2006 Nature Publishing Group  
Nature Reviews | Immunology

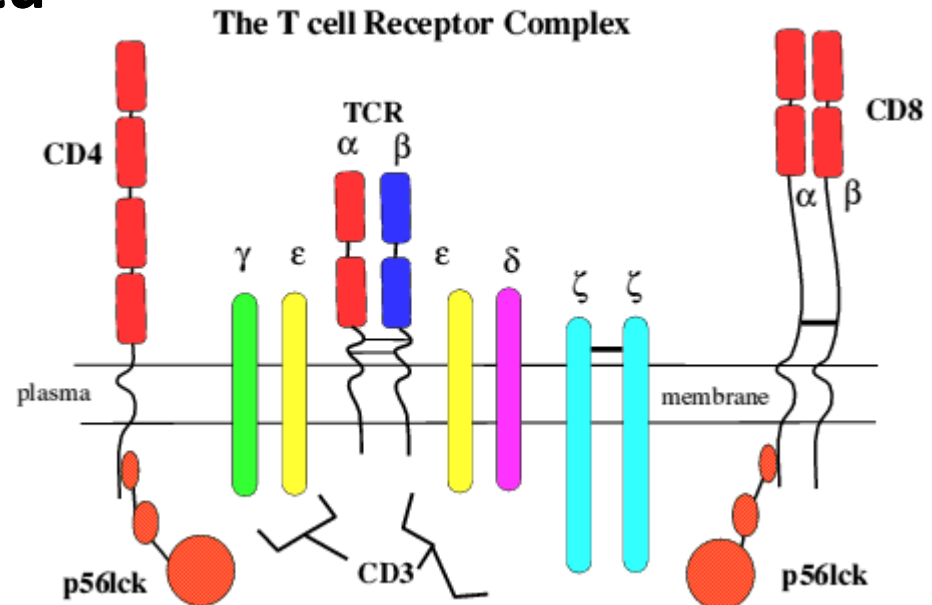
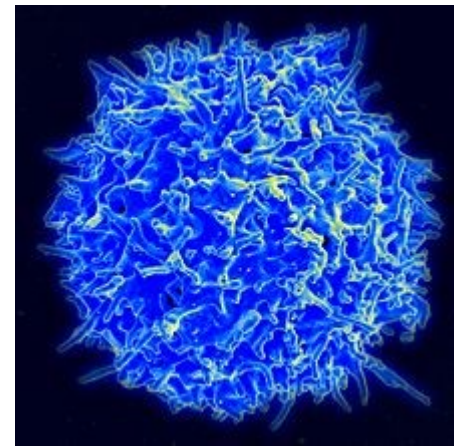
# T lymfocyty

CD3 na povrchu všech T lymfocytů

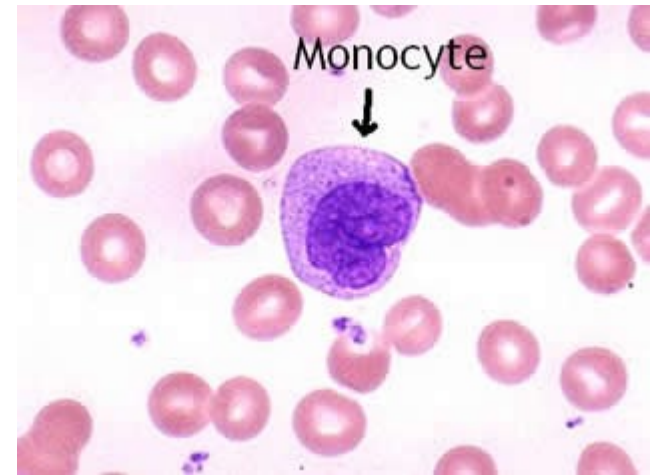
CD4 na povrchu  $T_H$  lymfocytů ( $T_H1$ ,  $T_H2$ )

CD8 na povrchu  $T_C$  lymfocytů

Treg – CD4+CD25+  
Foxp3+



# Monocyty



**CD14**

**HLA DR**

- součástí nespecifické imunity
- schopnost fagocytózy
- tkáňová forma = makrofág

# NK buňky

**CD16+**

**CD56+**

**CD3-**



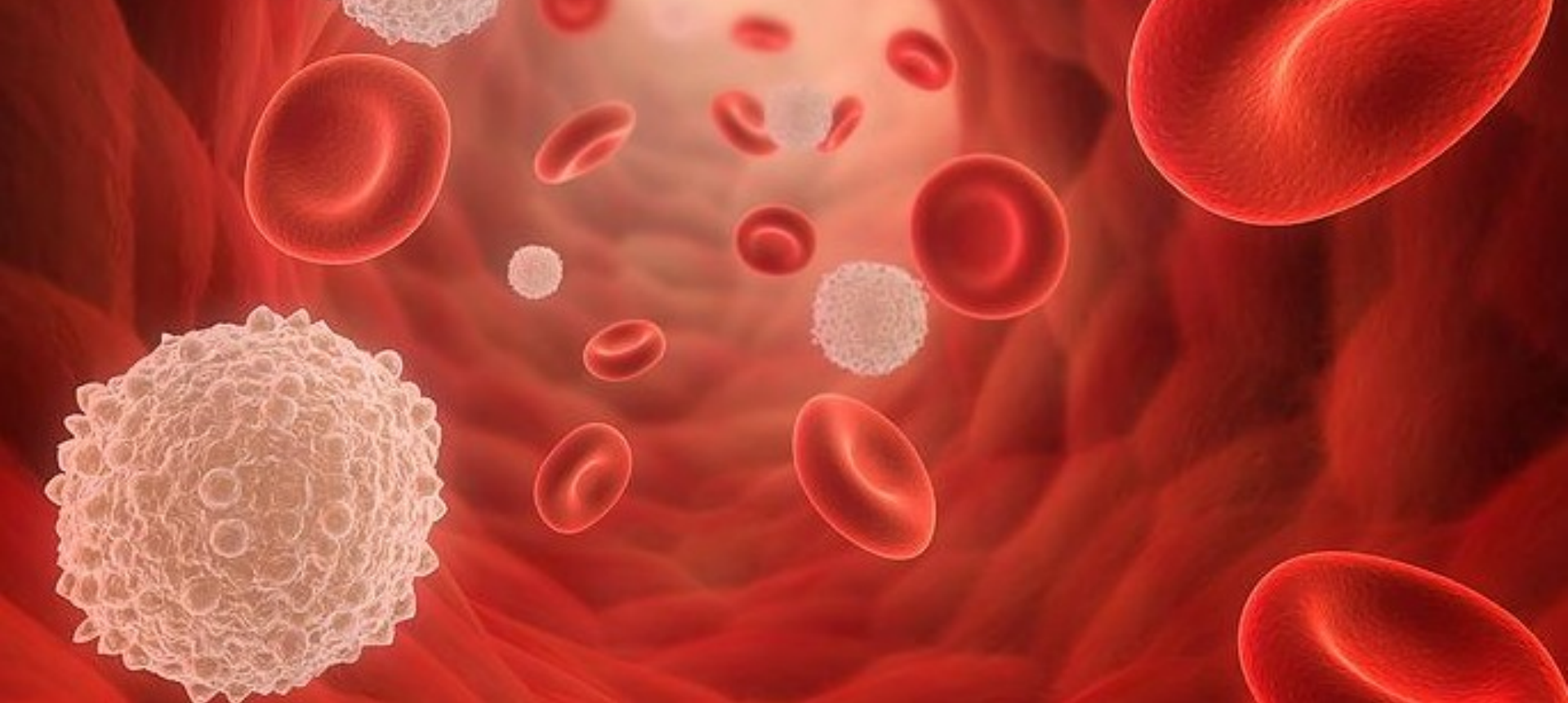
- rozeznávají buňky, které mají na povrchu abnormálně málo MHC I - nádorové a virově infikované buňky
- používají cytotoxické mechanismy (perforin, granzymy)

Pozn. **NKT** buňky

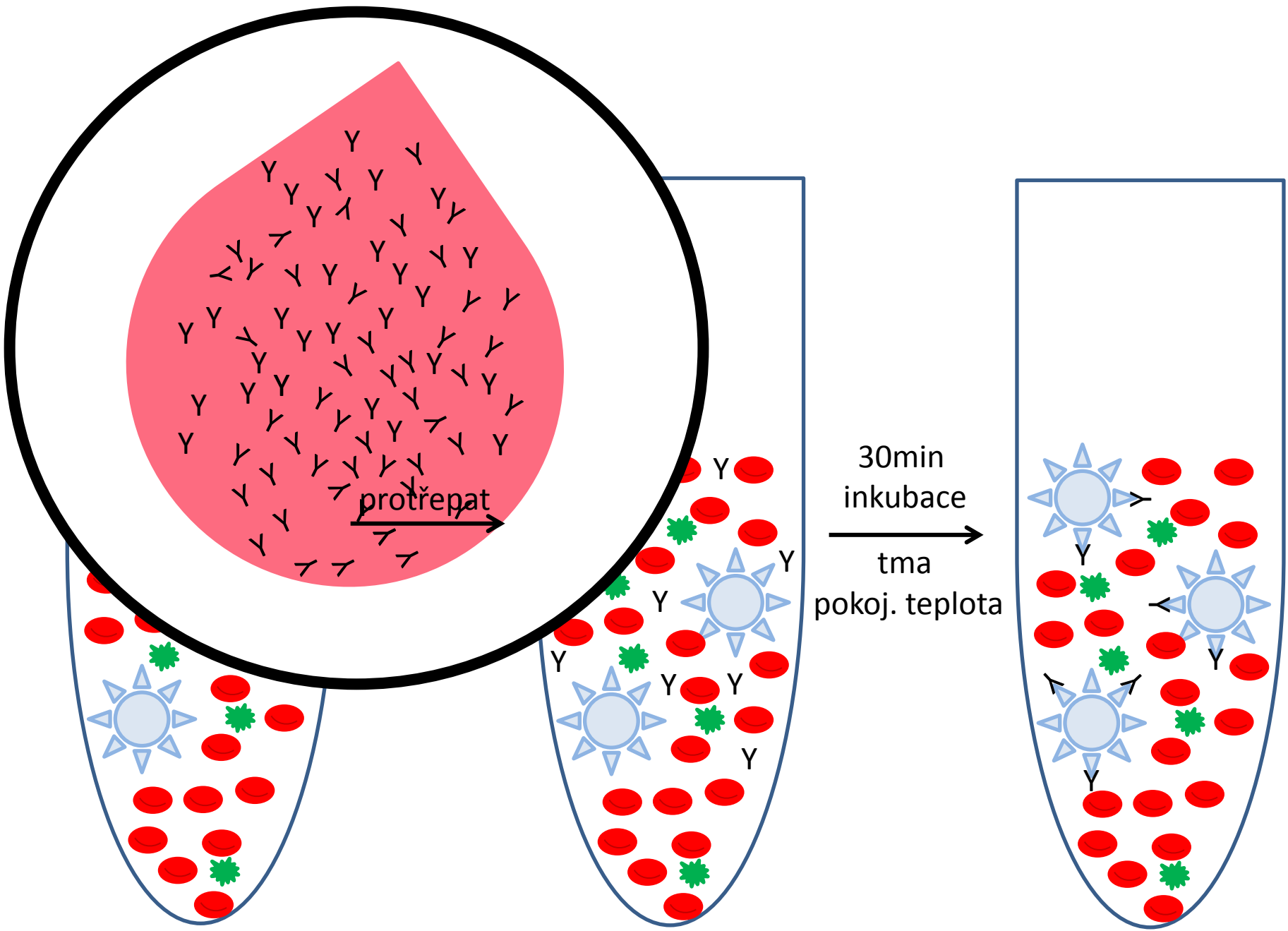
**CD16+**

**CD56+**

**CD3+**

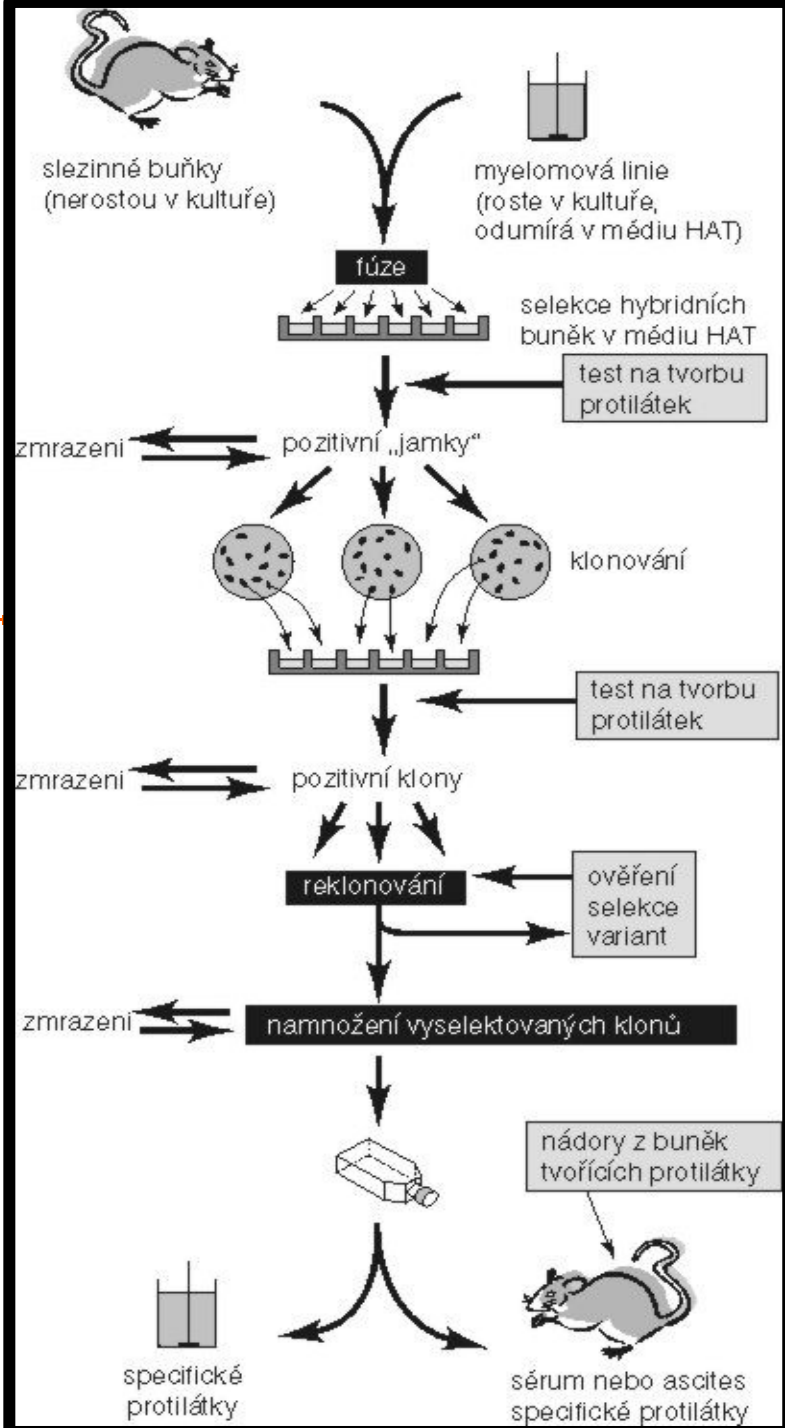


Pro stanovování  
**lymfocytárních subpopulací**  
odebírat krev do zkumavky s **EDTA**



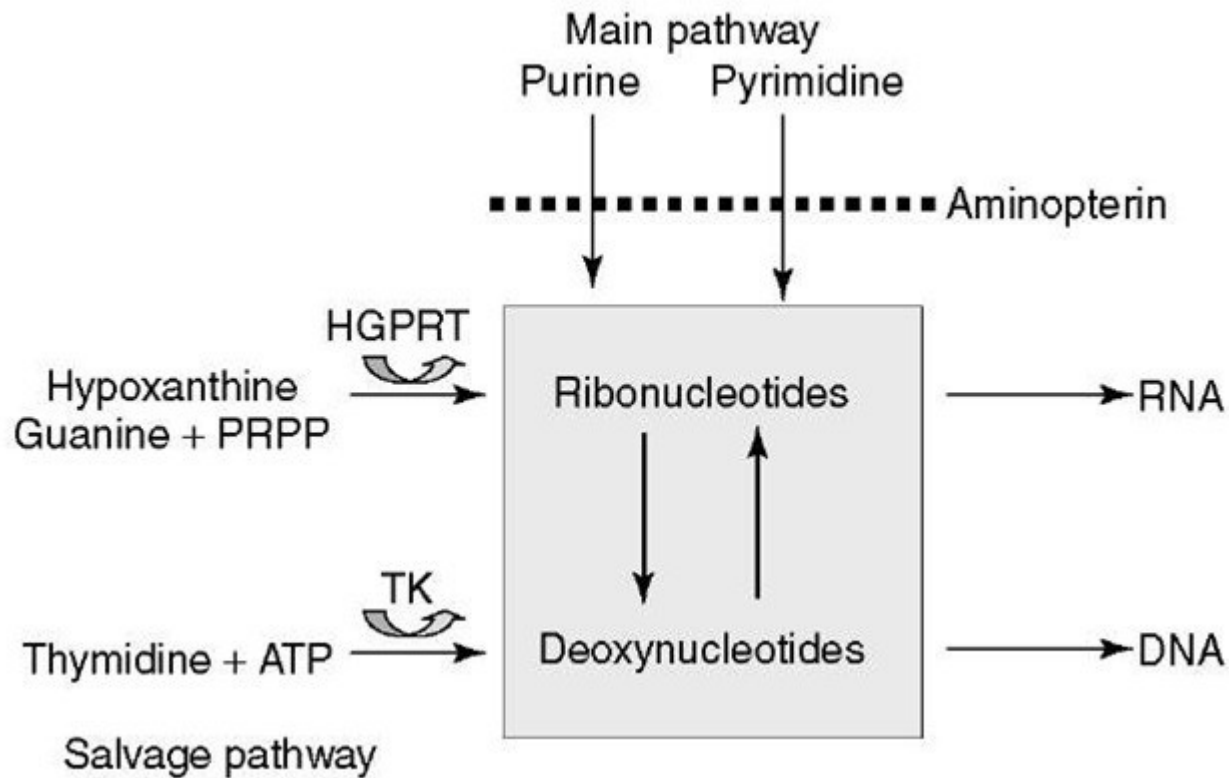


# Mnoklonální protilátky



- protilátky jsou produktem jediného klonu B lymfocytů (klony vzniklé fúzí buněk produkujících protilátky a myelomových buněk, jež schopnost produkce svého vlastního imunoglobulinu ztratily)
- jsou naprosto totožné a jsou přísně specifické proti jedinému epitopu



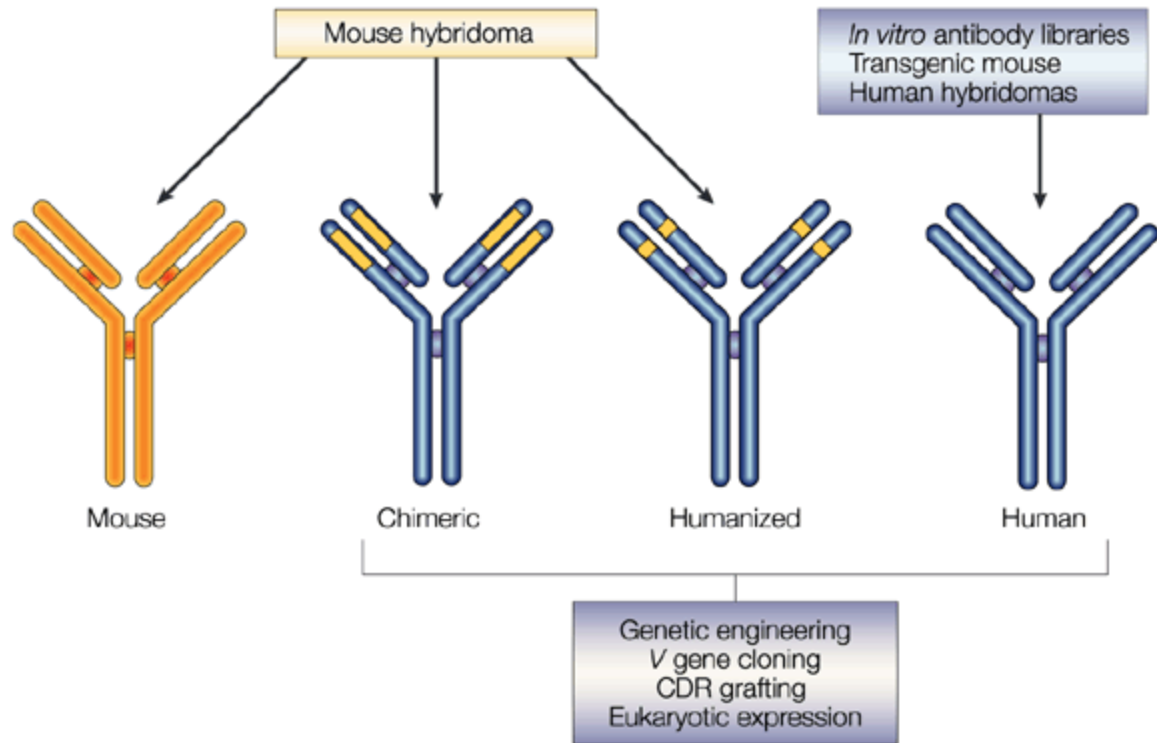


HAT – Hypoxantin, Aminopterin, Thymidin

HGPRT – hypoxantin-guanin-fosforibosyl transferáza

TK – thymidinkináza

# MAb POUŽÍVANÉ K TERAPII



- **Myší (celé) -momab**
- **Chimérické (myší  $V_H V_L$ ) -ximab**
- **Humanizované (myší hypervar.úseky) -zumab**
- **Lidské (připravené technikami mol.biol. dle knihoven)**

# Příklady klinického využití monoklonálních protilátek v léčbě imunopatologických chorob

- **Imunosuprese:**
- - anti-CD3 (OKT3),
  - anti CD25 (basiliximab, daclizumab),
  - anti CD20 (rituximab)
- **Blokáda prozánětlivých cytokinů:**
  - Anti –TNF-a (infiximab, adalimumab) – revmatoidní artritida, Crohnova choroba,
- **Blokáda adhezivních molekul:**
  - anti integrin  $\alpha 4\beta 1$  (natalizumab) – roztroušená mozkomíšní skleróza
  - Anti-CD11a (efalizumab) - psoriáza
- **Protialergická léčba**
  - anti-IgE (omalizumab): těžké formy astmatu



# LYZOVÁNÍ ERYTROCYTŮ

**Roztok A:** na 1,5 l destilované vody – 1,8 ml 99% kyseliny mravenčí

**Roztok B:** na 1,5 l destilované vody 9,0 g bezvodého  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 21,75 g NaCl,  
46,95 g bezvodého  $\text{Na}_2\text{SO}_4$

**Roztok C:** na 1,5 l PBS (pH 7-7,4) - 15 g paraformaldehydu

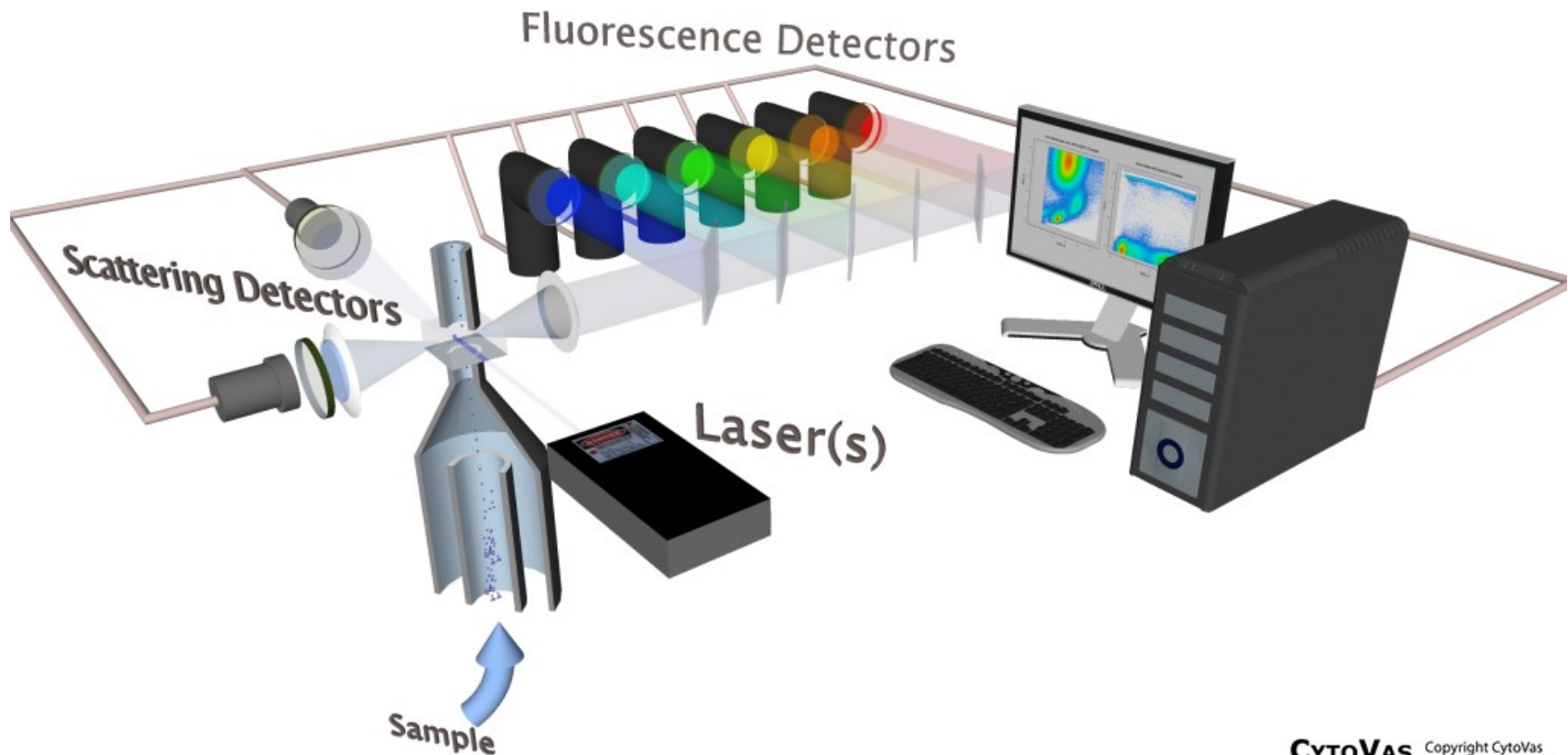
# Průtoková cytometrie

## FLOW CYTOMETRY



# Průtokový cytometr

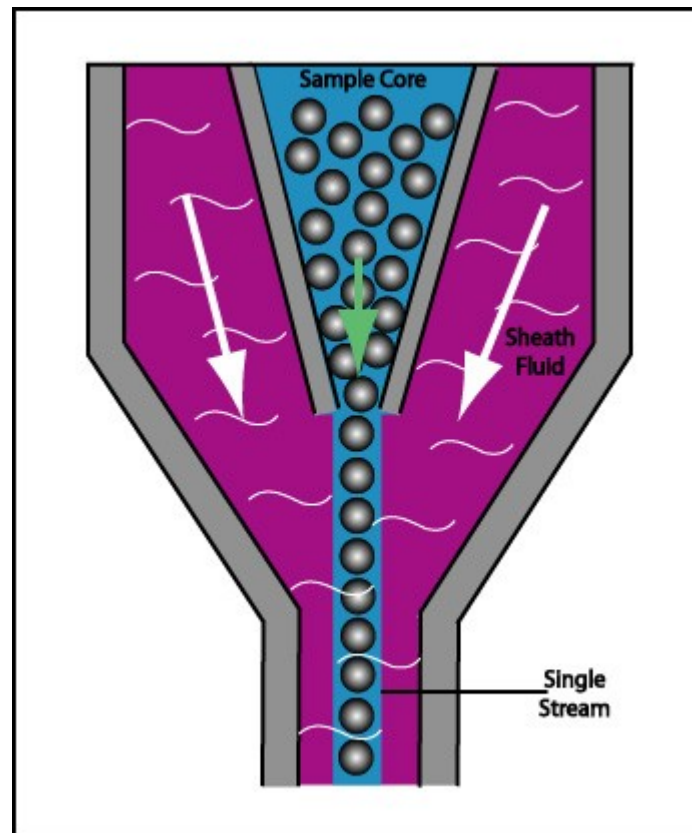
1. FLUIDNÍ SYSTÉM
2. OPTIKA
3. ELEKTRONIKA



# 1. FLUIDNÍ SYSTÉM

Zajišťuje transport bb. v nosné tekutině (pod tlakem) do průtokové komory. Buňky se pohybují jedna za druhou

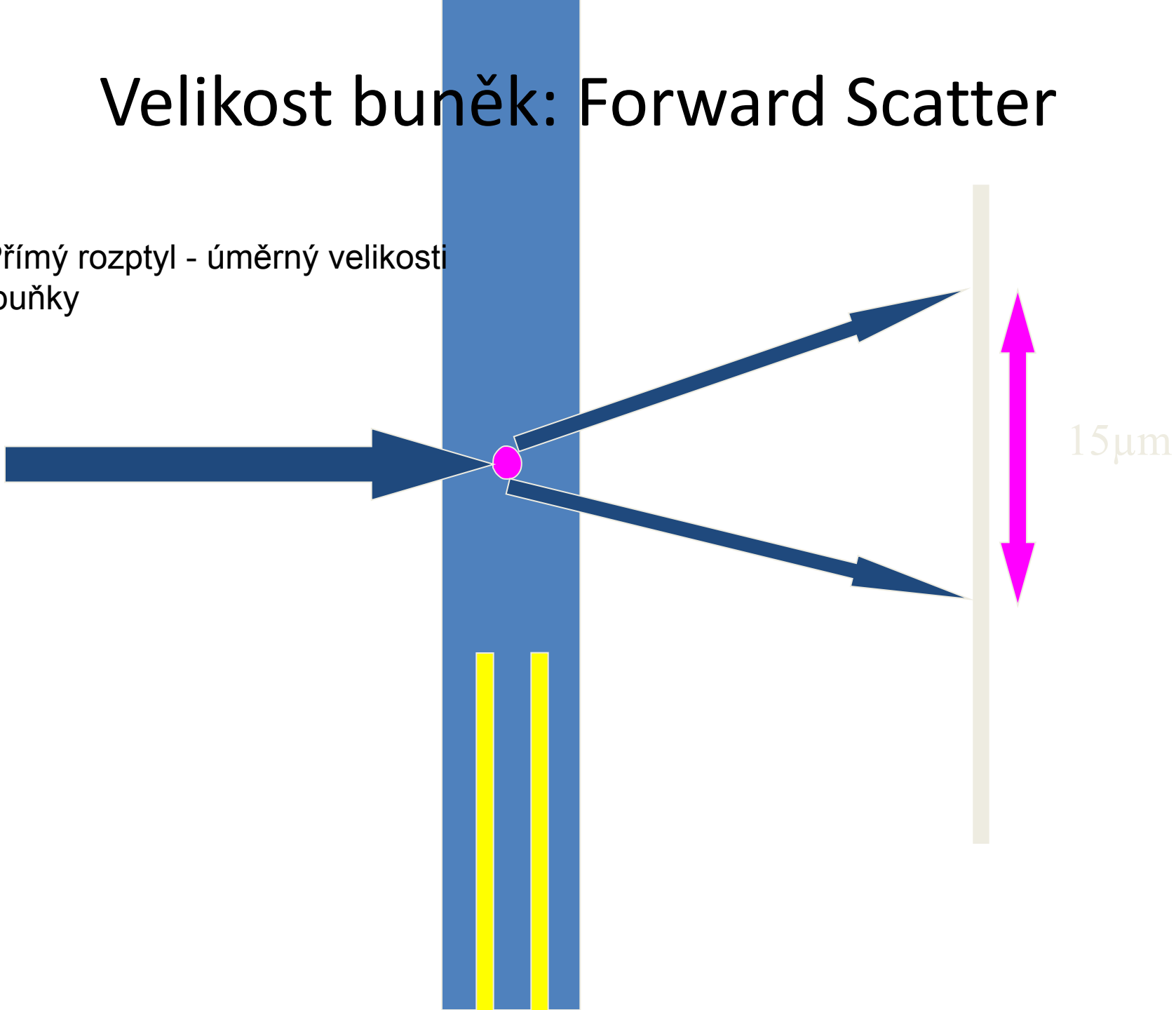
na základě hydrodynamické fokusace - nosná tekutina (destil. voda, komerční tekutiny) bývá do komory přinášena tenkou Kapilárou pod větším tlakem než suspenze částic, které jsou tak udržovány jen v úzké centrální části proudu. Zrychlení vznikající při výstupu vodního paprsku z komůrky nutí částice pohybovat se jedna za druhou.





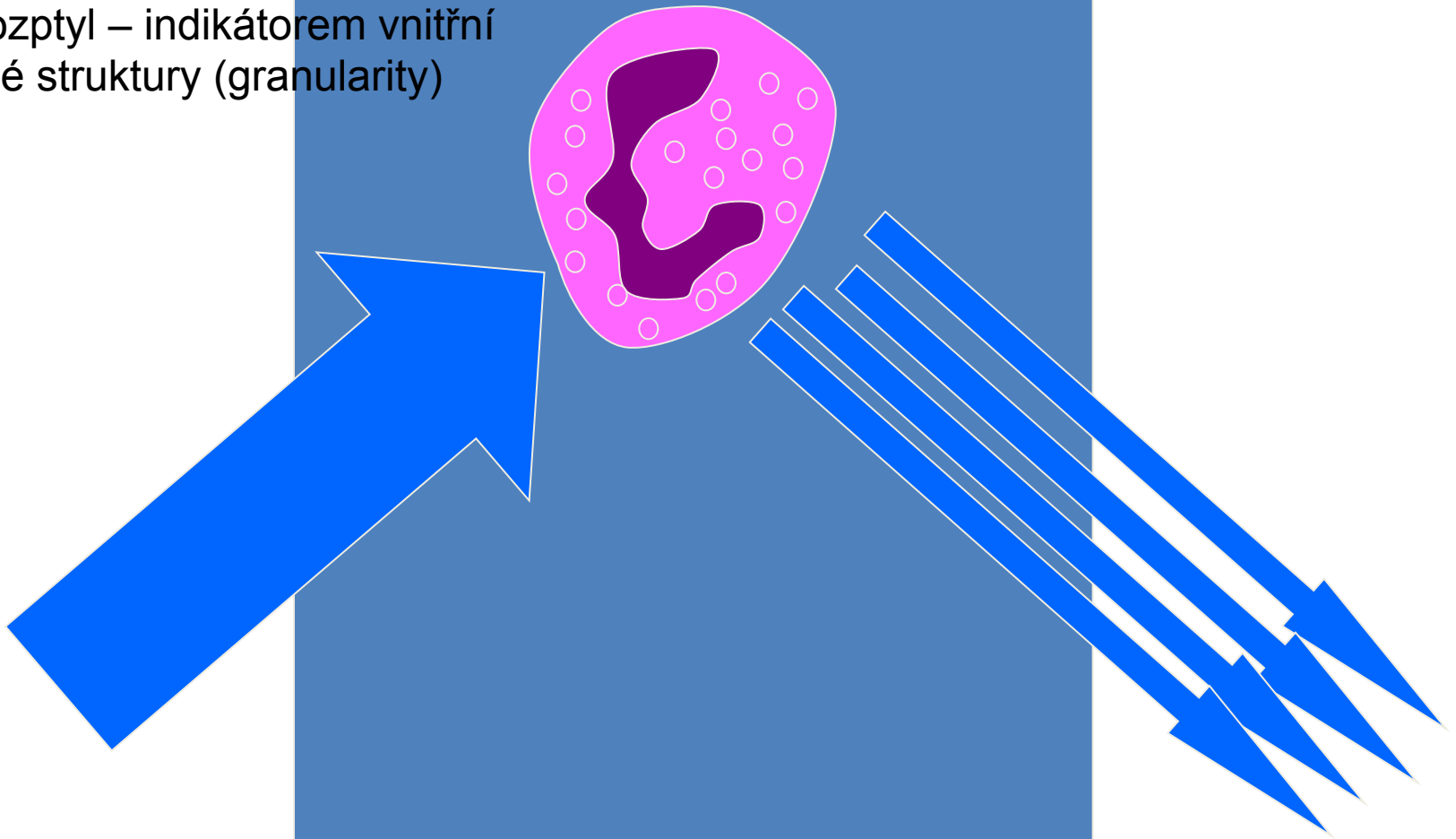
# Velikost buněk: Forward Scatter

Přímý rozptyl - úměrný velikosti  
buňky



# Granularita buněk: Side Scatter

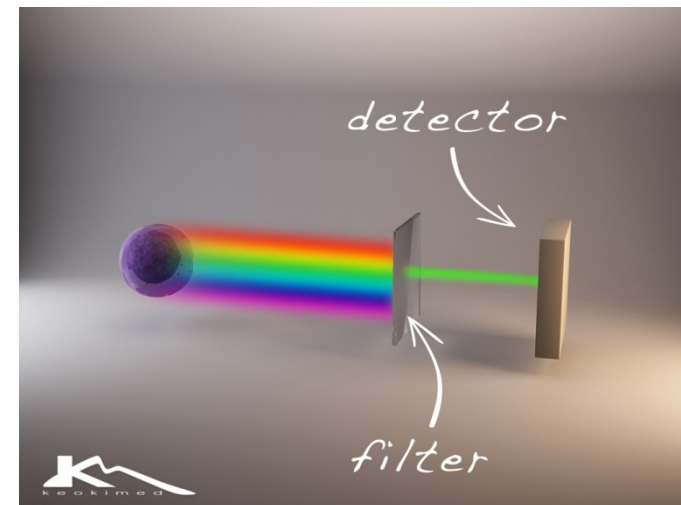
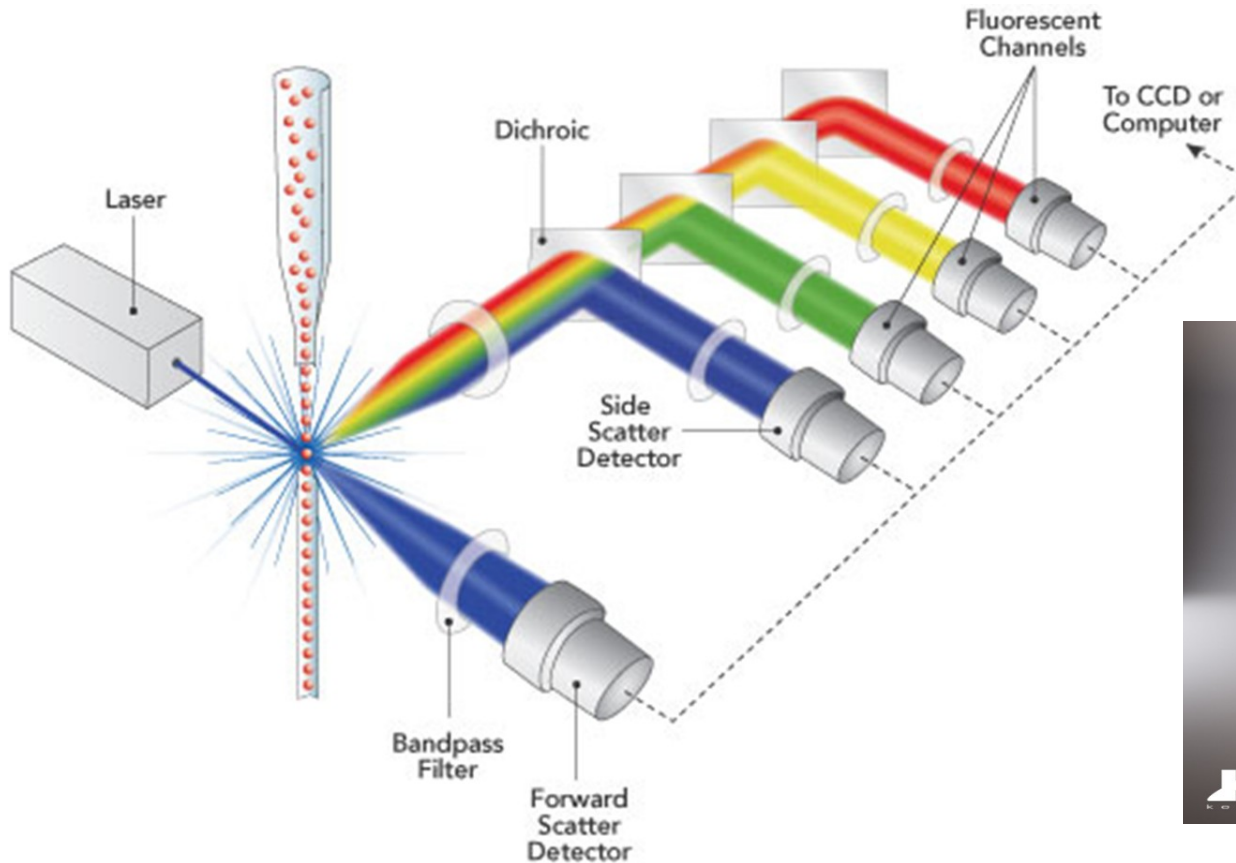
Boční rozptyl – indikátorem vnitřní buněčné struktury (granularity)



## 2. OPTIKA

Excitační část – laser

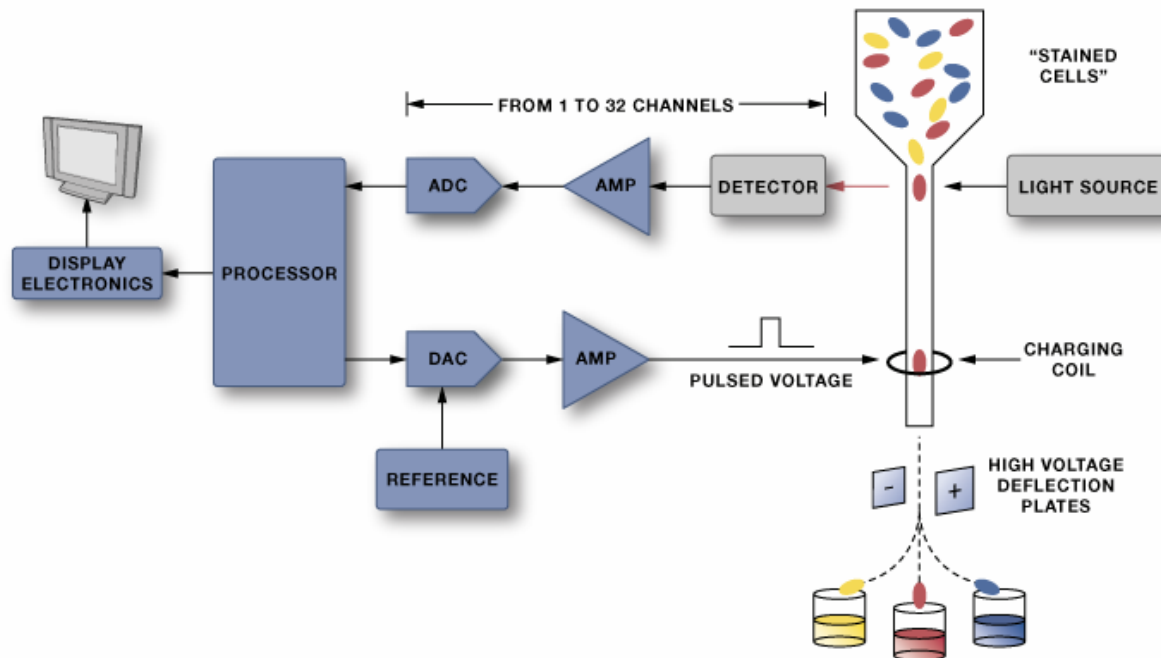
Sběrná část – systém čoček, zrcadel a optických filtrů zachycující fluorescenci částic vyzářenou po jejich projití světelným paprskem



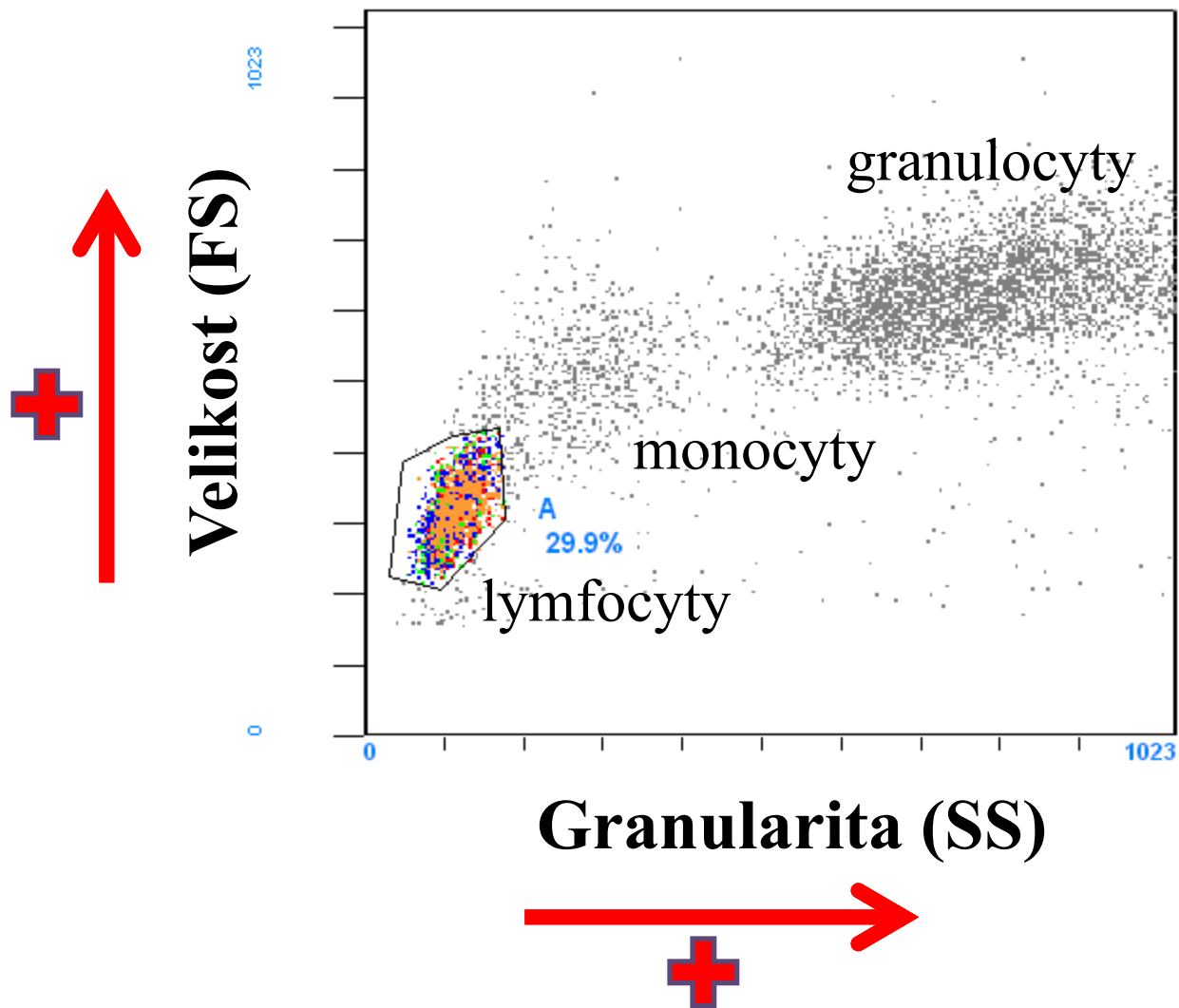
### 3. ELEKTRONIKA

Převádí optické signály (fluorescenci) na signály elektronické (fotonásobiče, fotodiody).

Po zesílení signálu a dalším zpracování dojde k jeho digitalizaci pro počítačovou analýzu



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



# Fluorescence

## Fluorochromy:

- Polycyklické organické molekuly a jejich deriváty
  - Fluorescein isothiokyanát (FITC)**, Cyaniny, Texas Red, řada Alexa, řada Pacific and Cascade,  
AmCyan, *Propidium iodide*, 7-AAD, CFSE,
- Fluorescenční proteiny
  - Phycoerythrins (PE)**, Allophycocyanin, PerCP, GFP a jiné fluorescenční proteiny

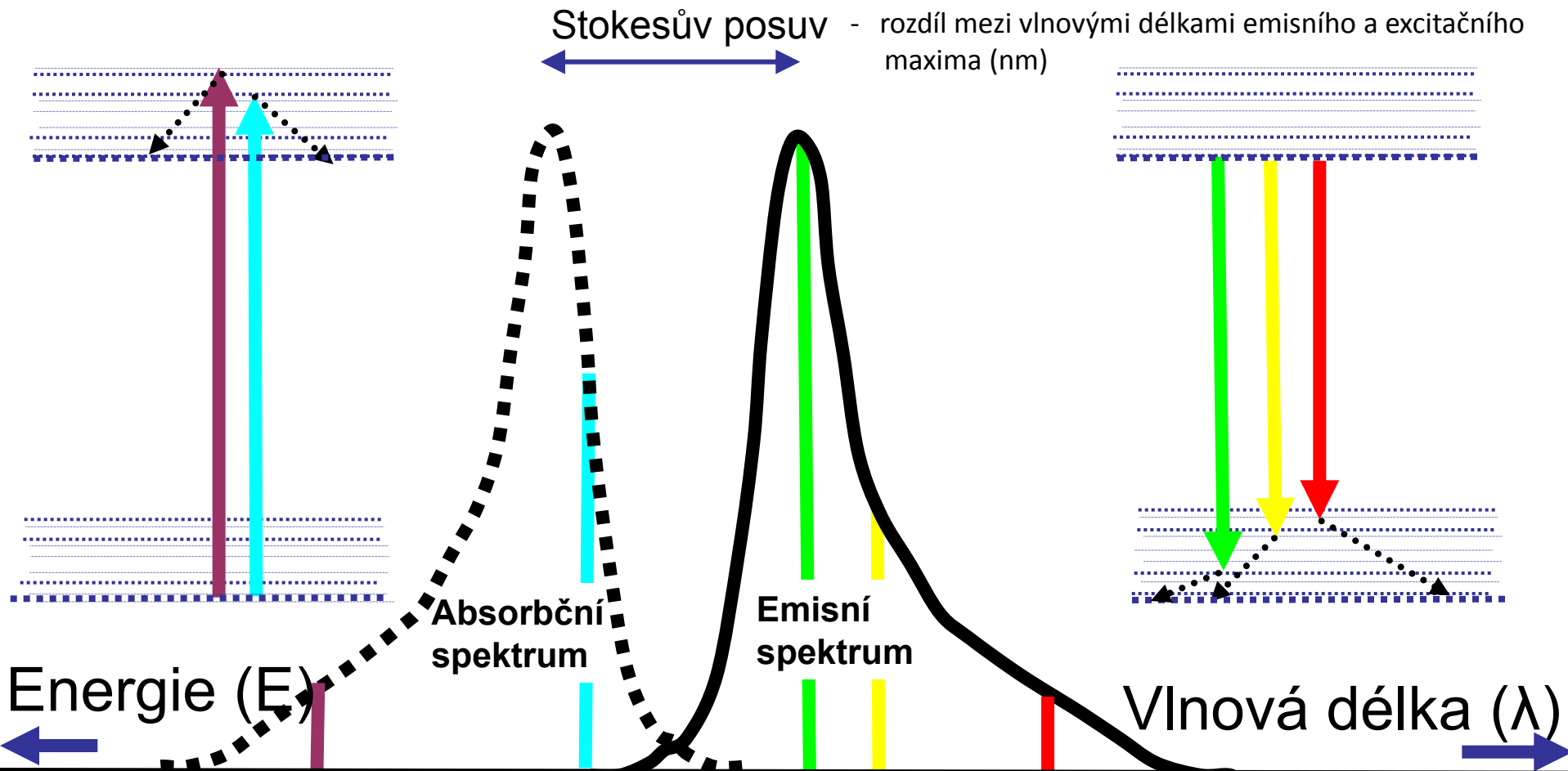
***Schopné absorbovat fotony budícího záření (např. 488 nm)***

***a následně ( $10^{-8}$  s) emitovat fotony s***

***delší vlnovou délkou (v tomto případě 500 – 800 nm).***

***Fluorescenční světlo má tedy jinou barvu***

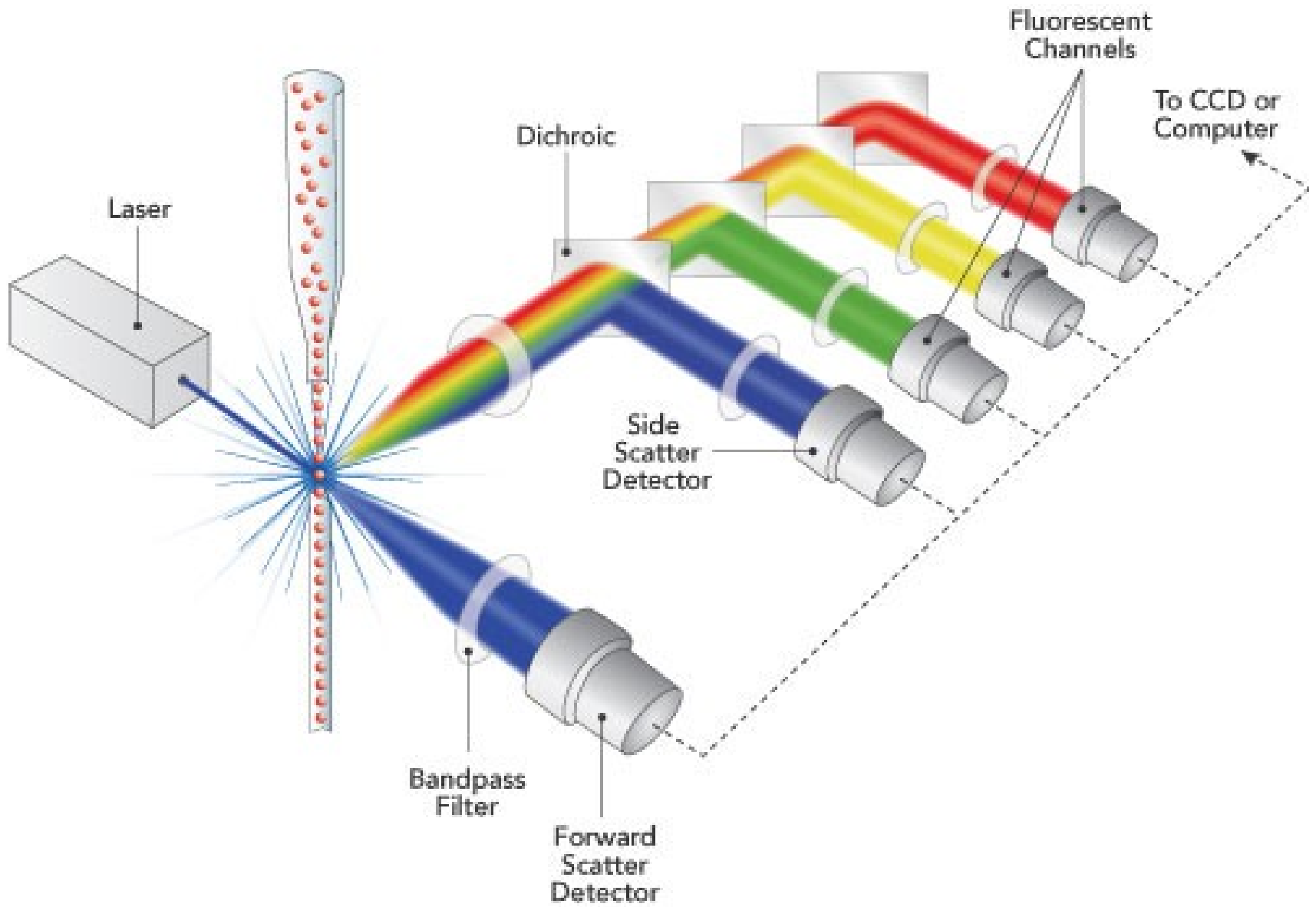
# Fluorescence



Část energie se přemění na energii vibrační

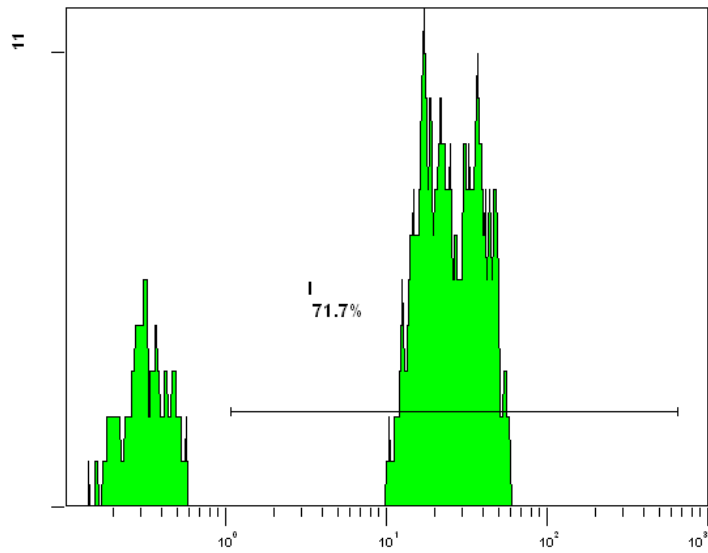
Emitované záření má větší vlnovou délku a tudíž nižší energii

$$E = h \cdot c / \lambda$$



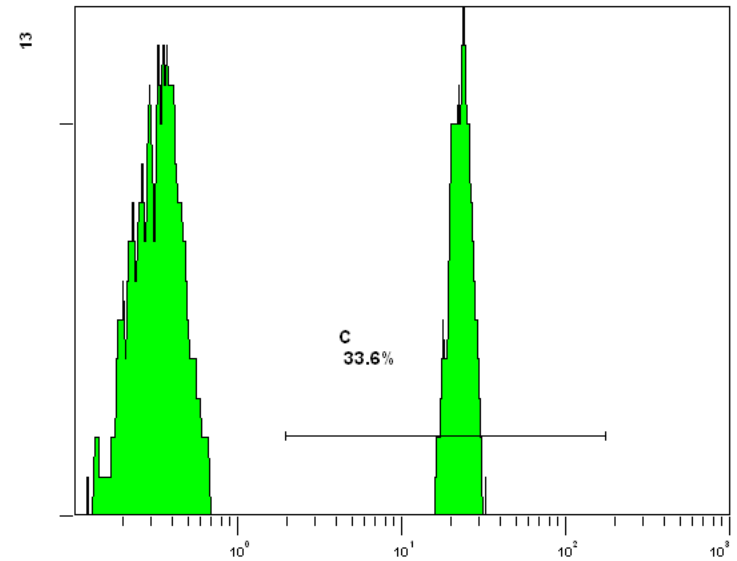


[F1][A] 20051674.LMD : FL4 LOG

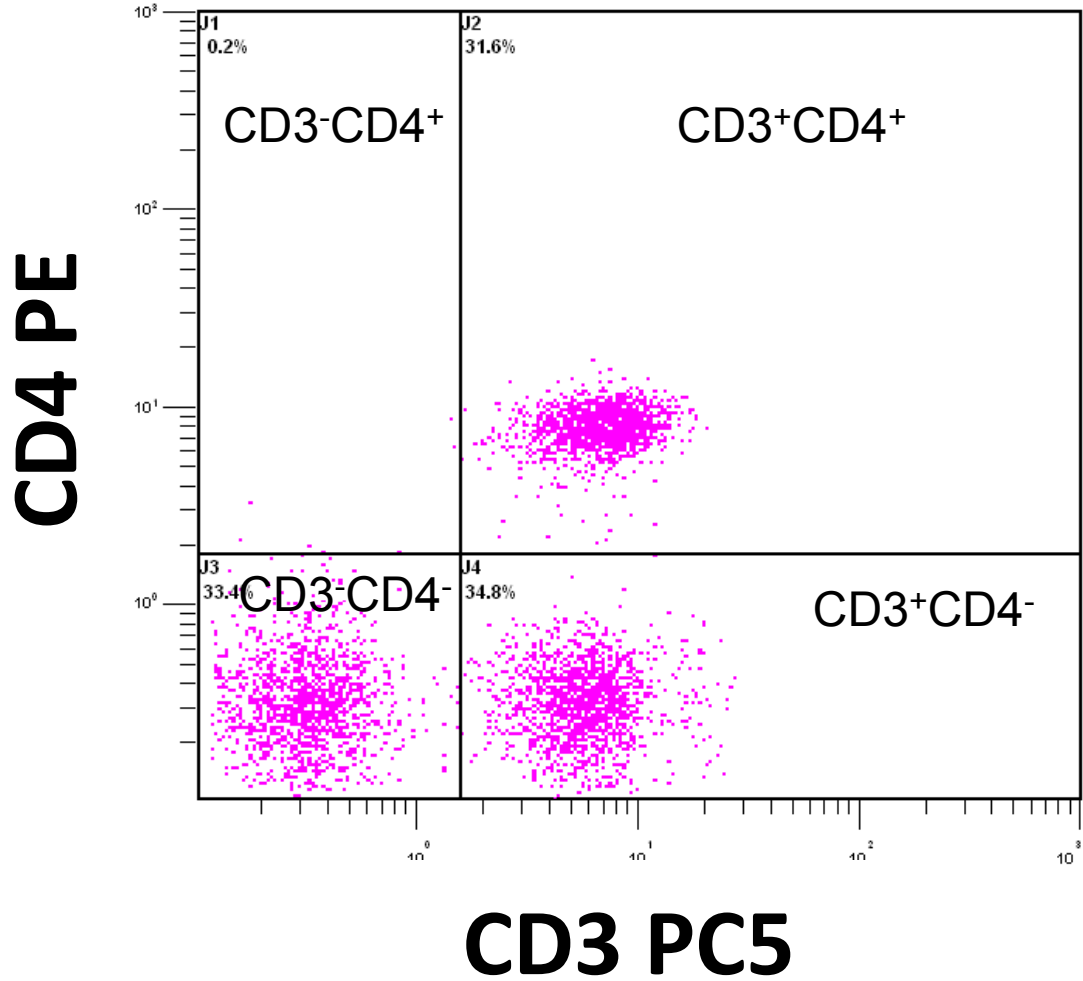


**CD3 PC5**

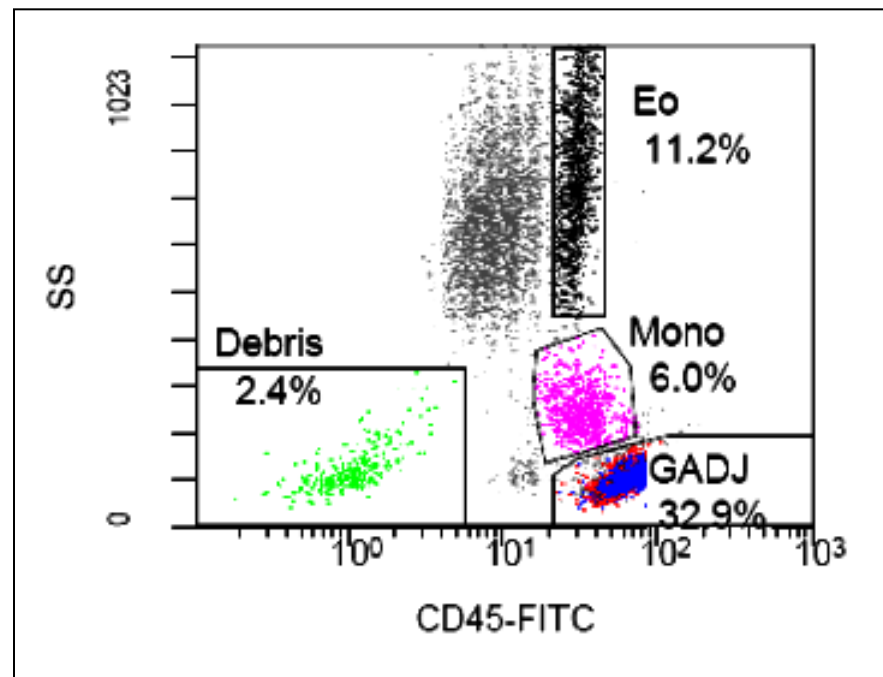
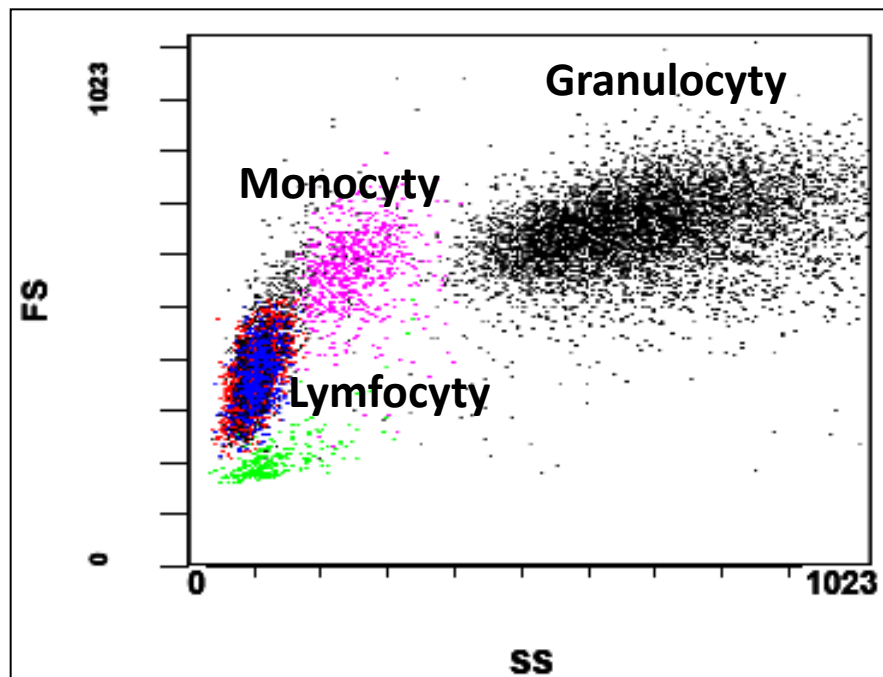
[F1][A] 20051674.LMD : FL2 LOG



**CD4 PE**

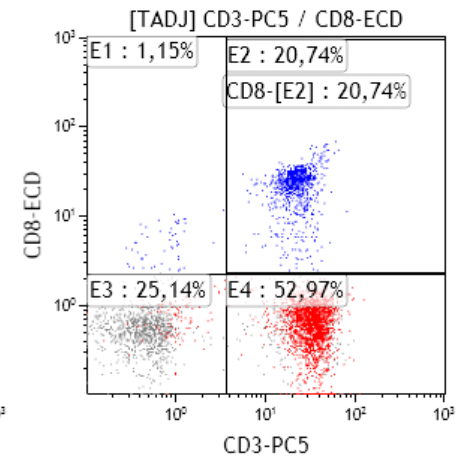
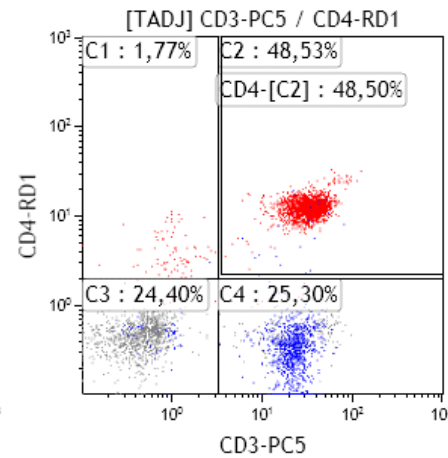
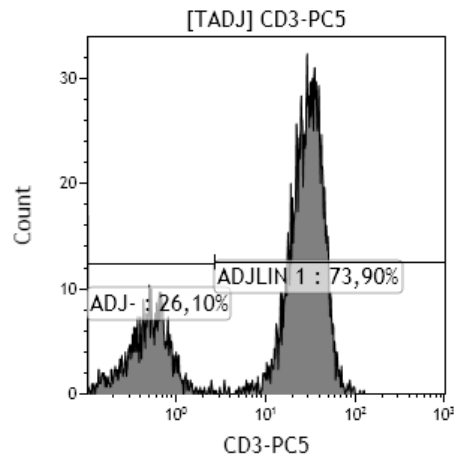
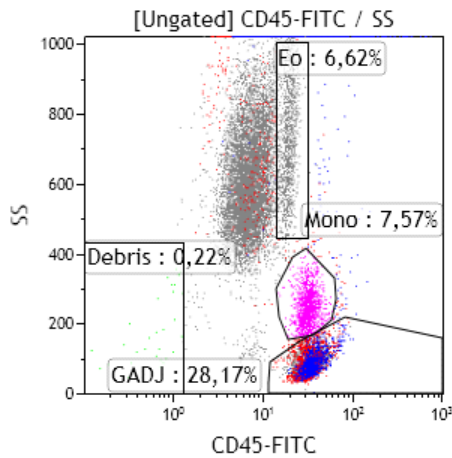


# Krevní diferenciál



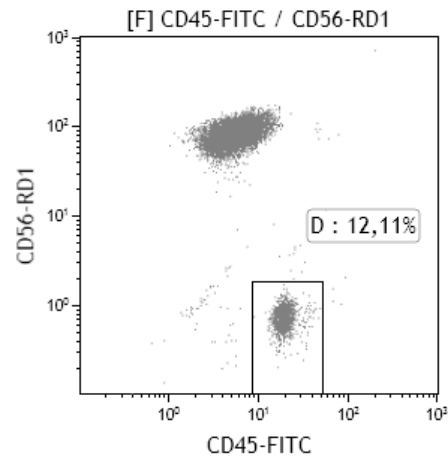
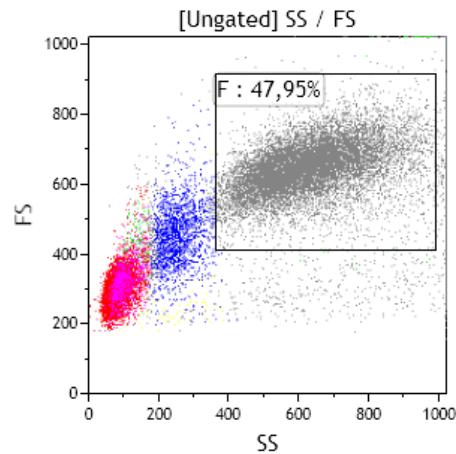
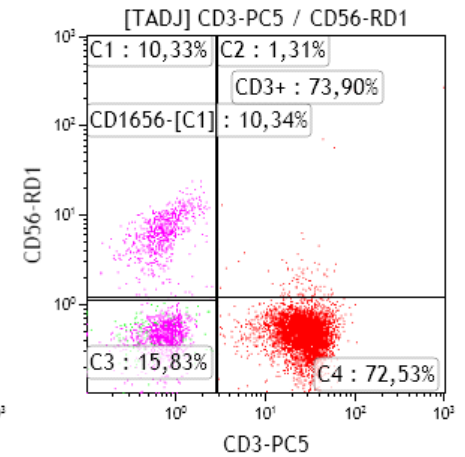
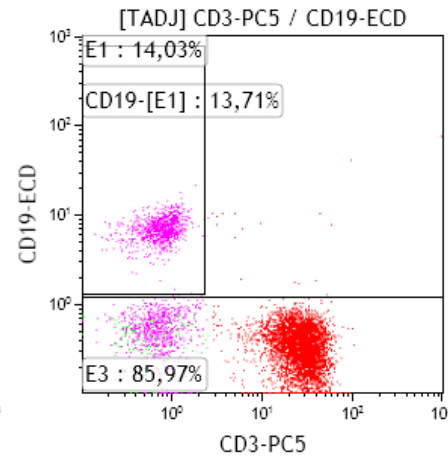
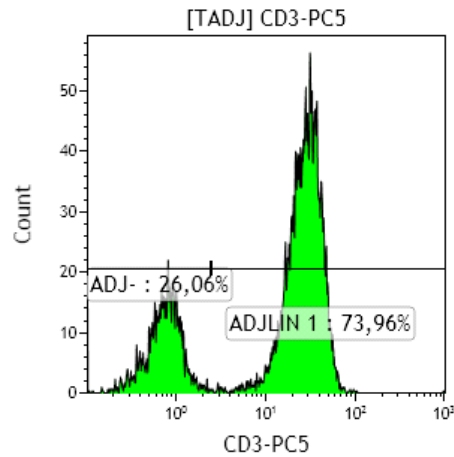
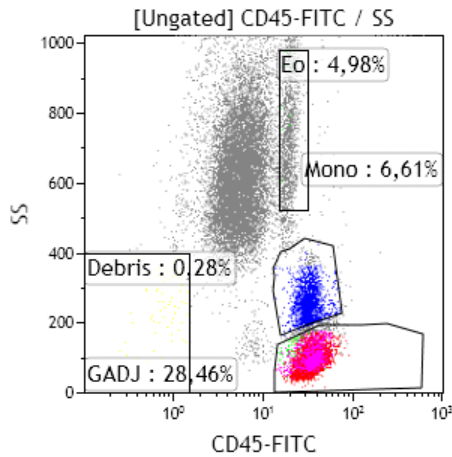
# Zkumavka A

## CD45/CD3/CD4/CD8



# Zkumavka B

## CD45/CD3/CD19/CD56 + CD16



# Vyšetření lymfocytů periferní krve

ZNAK	EXPRESE	FUNKCE	ZASTOUPENÍ NA LYMFOCYTECH PERIFERNÍ KRVE (%)
CD3	všechny T-lymfocyty	asociován s TCR, přenos signálu	55-83
CD4	pomocné T-lymfocyty	receptor pro MHC II, aktivace	28-57
CD8	cytotoxické T-lymfocyty	receptor pro MHC I, aktivace	10-39
CD19	B-lymfocyty	regulátor aktivace	6-19
CD16/CD56	NK-buňky	FcR pro IgG/mediátor adheze	7-31
HLA-DR	B-lymfocyty, monocyty, aktivované T-lymfocyty	MHC II, prezentace Ag	B-lymfocyty konstitutivně (na všech B-lymfocytech), T-lymfocyty 3-7 (na aktivovaných T-lymfocytech)

# Věková závislost zastoupení lymfocytárních subpopulací

**Table I.** Relative size of lymphocyte subpopulations in blood

Lymphocyte subpopulations	Age groups									
	Neonatal (n = 20)	1 wk-2 mo (n = 13)	2-5 mo (n = 46)	5-9 mo (n = 105)	9-15 mo (n = 70)	15-24 mo (n = 33)	2-5 yr (n = 33)	5-10 yr (n = 35)	10-16 yr (n = 23)	Adults (n = 51)
CD19 <sup>+</sup> B lymphocytes	12% (5-22)	15% (4-26)	24% (14-39)	21% (13-35)	25% (15-39)	28% (17-41)	24% (14-44)	18% (10-31)	16% (8-24)	12% (6-19)
CD3 <sup>+</sup> T lymphocytes	62% (28-76)	72% (60-85)	63% (48-75)	66% (50-77)	65% (54-76)	64% (39-73)	64% (43-76)	69% (55-78)	67% (52-78)	72% (55-83)
CD3 <sup>+</sup> /CD4 <sup>+</sup> T lymphocytes	41% (17-52)	55% (41-68)	45% (33-58)	45% (33-58)	44% (31-54)	41% (25-50)	37% (23-48)	35% (27-53)	39% (25-48)	44% (28-57)
CD3 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> T lymphocytes	24% (10-41)	16% (9-23)	17% (11-25)	18% (13-26)	18% (12-28)	20% (11-32)	24% (14-33)	28% (19-34)	23% (9-35)	24% (10-39)
CD4/CD8 ratio per CD3 <sup>+</sup>	1.8 (1.0-2.6)	3.8 (1.3-6.3)	2.7 (1.7-3.9)	2.5 (1.6-3.8)	2.4 (1.3-3.9)	1.9 (0.9-3.7)	1.6 (0.9-2.9)	1.2 (0.9-2.6)	1.7 (0.9-3.4)	1.9 (1.0-3.6)
CD3 <sup>+</sup> /HLA-DR <sup>+</sup> T lymphocytes	2% (1-6)	5% (1-38)	3% (1-9)	3% (1-7)	4% (2-8)	6% (3-12)	6% (3-13)	7% (3-14)	4% (1-8)	5% (2-12)
CD3 <sup>+</sup> /CD16-56 <sup>+</sup> NK cells	20% (6-58)	8% (3-23)	6% (2-14)	5% (2-13)	7% (3-17)	8% (3-16)	10% (4-23)	12% (4-26)	15% (6-27)	13% (7-31)

The relative frequencies are expressed within the lymphocyte population; median and percentiles (5th to 95th percentiles).

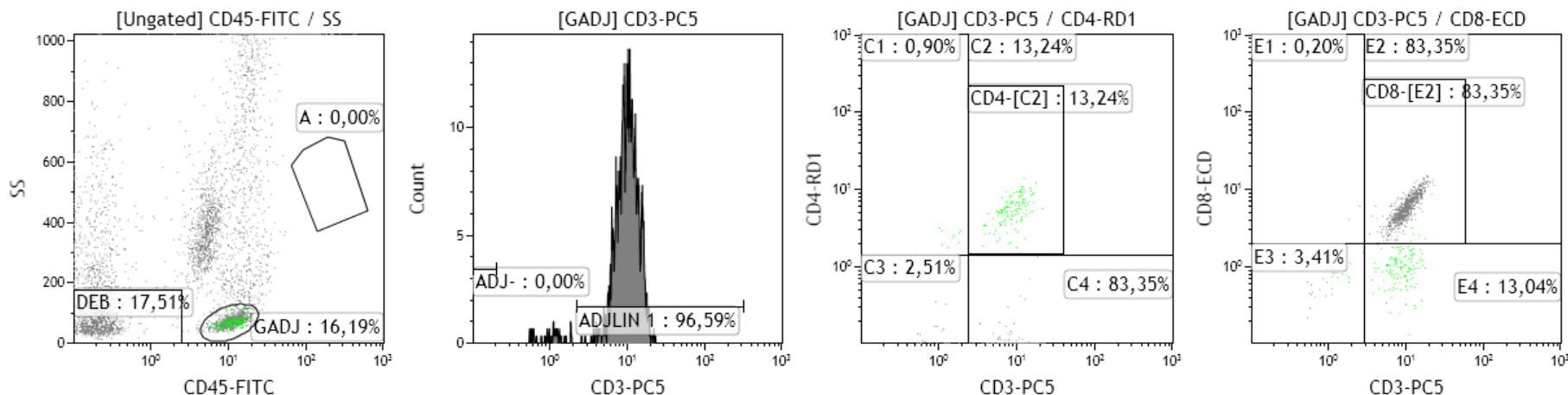
# Hodnocení nálezu jednotlivých subpopulací

Snížení/ zvýšení	subpopulace	onemocnění
↓	CD19+, CD3+, CD4+, CD8+	při imunosupresi – např. cyklosporin (způsobuje lymfopenii)
↓	CD19+	u některých pacientů s CVID
↑	CD19+	B – buněčná leukémie
↓	CD3+	při expozici člověka toxickými chemikáliemi
↑	CD3+	T – buněčná leukémie
↓	CD4+	u některých pacientů s CVID (běžný variabilní imunodeficit – <u>c</u> ommon <u>v</u> ariable <u>i</u> mmunodeficiency) - virové infekce (EBV, CMV, HIV)
↑	CD4+	autoimunity, alergie
↓	CD8+	autoimunity (roztroušená skleróza, <u>s</u> ystematický <u>l</u> upus <u>e</u> rythematodes-SLE)
↑	CD8+	u některých pacientů s CVID - virové infekce (EBV, CMV, HIV)



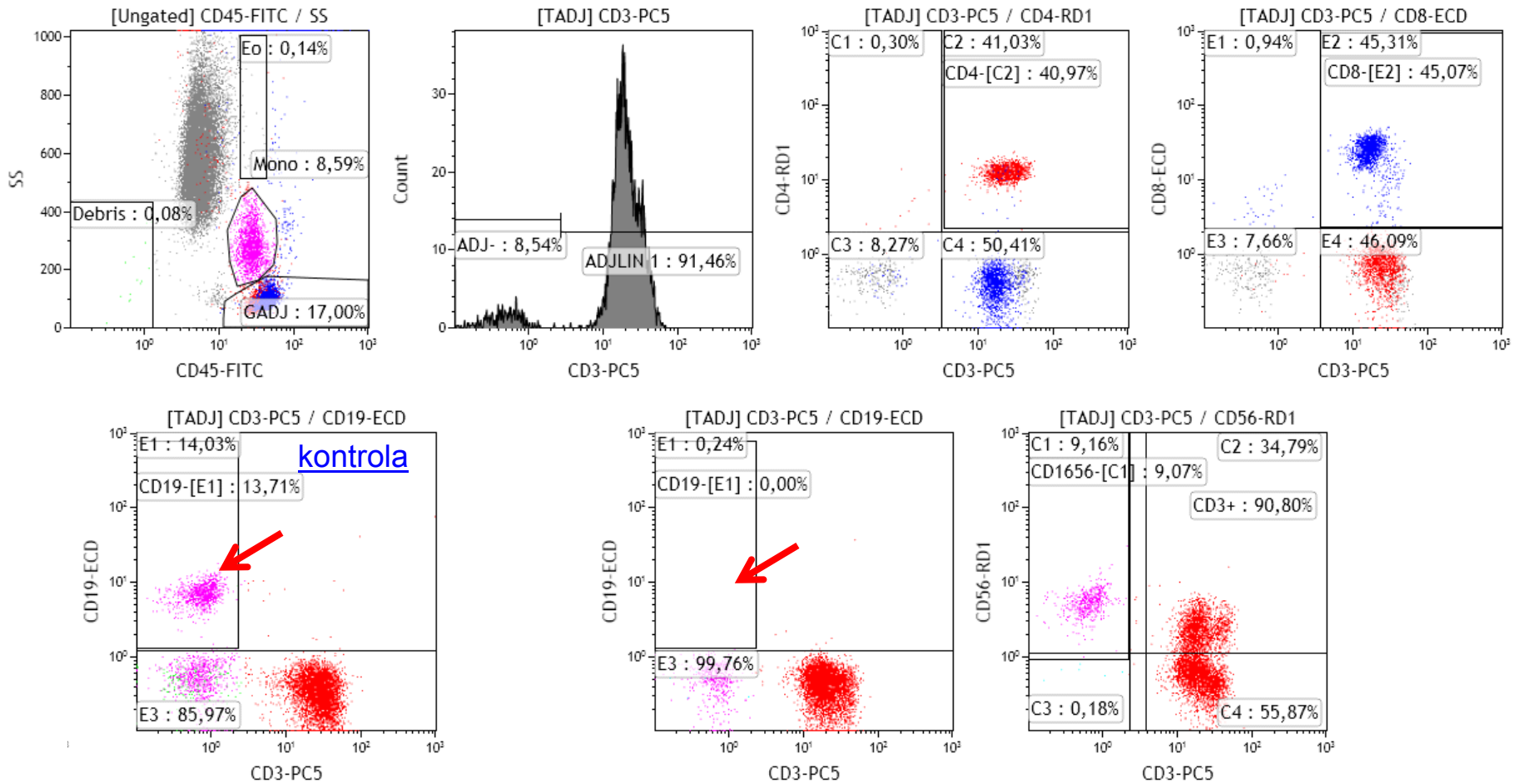
# Bronchoalveolární laváž (BAL)

- imunofenotypizace



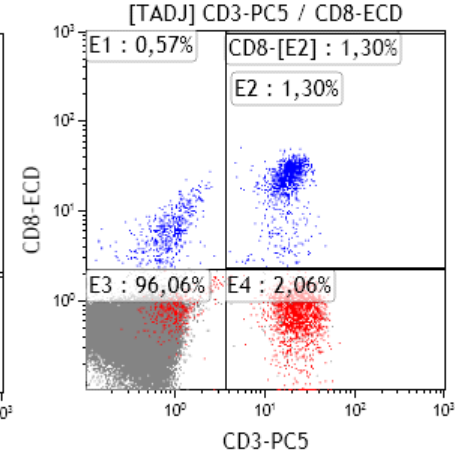
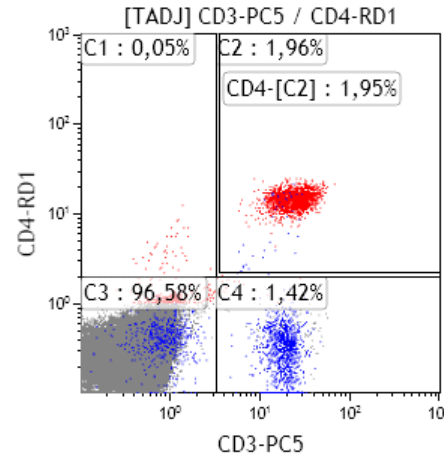
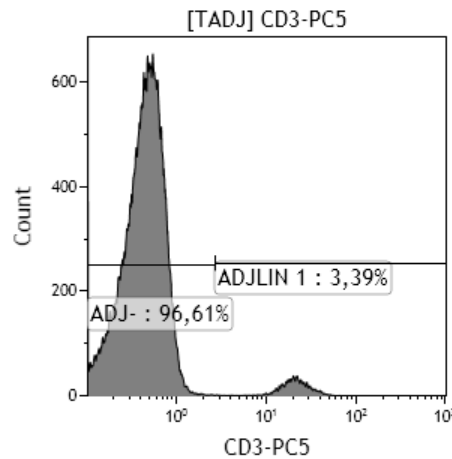
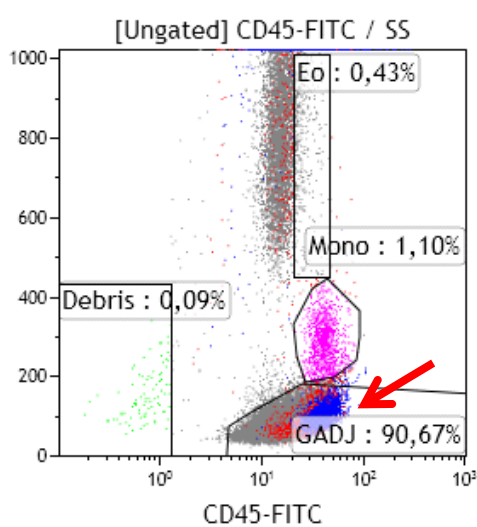
při převráceném poměru CD4+/CD8+  
- podezření na sarkoidózu

# Pacientka: Ž, \*1957

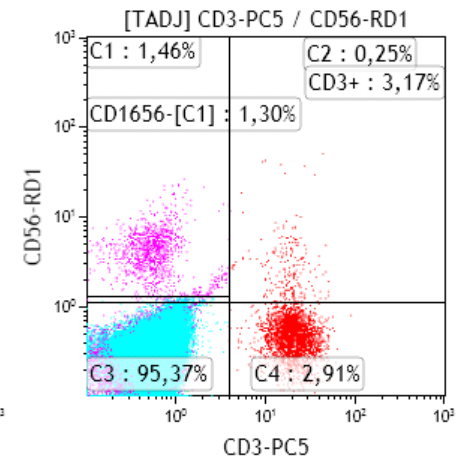
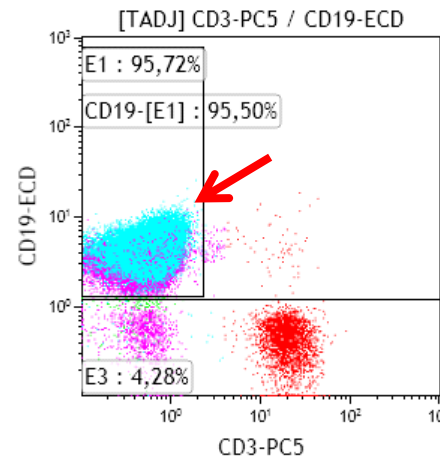
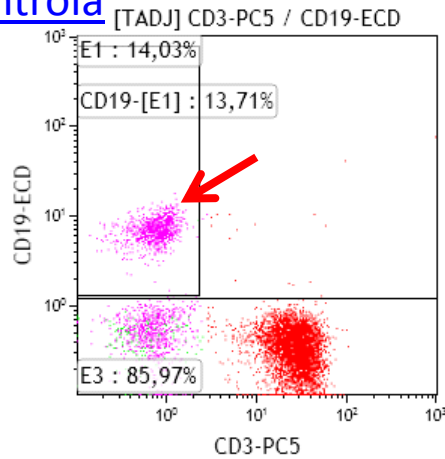
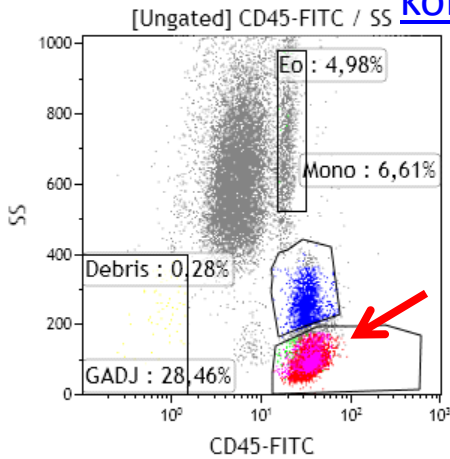


- pacientka z revmatologie
- léčba např. rituximabem způsobuje depleci B-lymfocytů (po 4-6 měsících návrat k normálním hladinám)

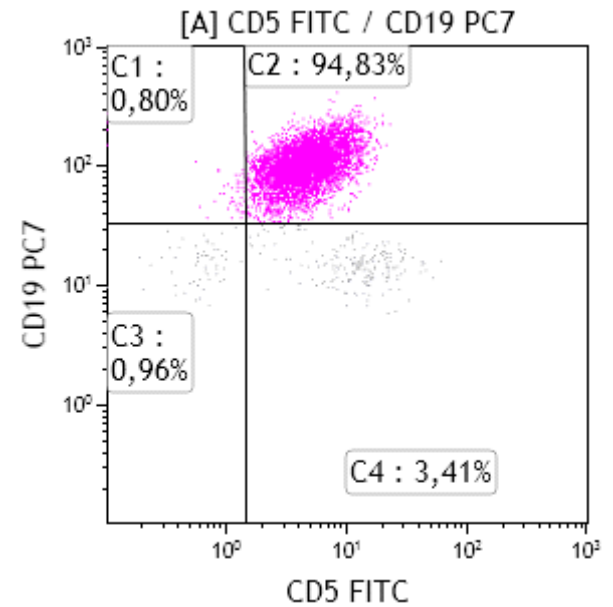
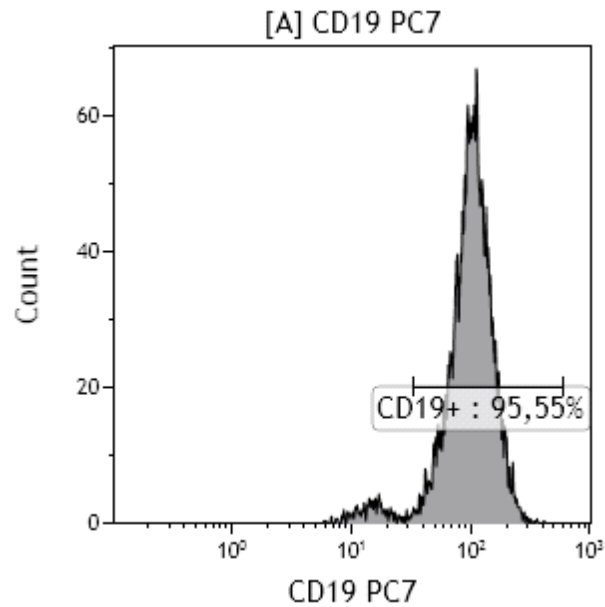
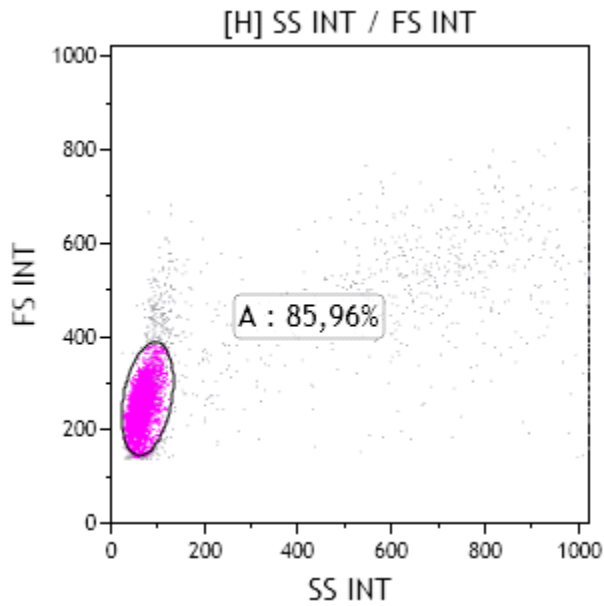
# Pacient: muž, \* 1966



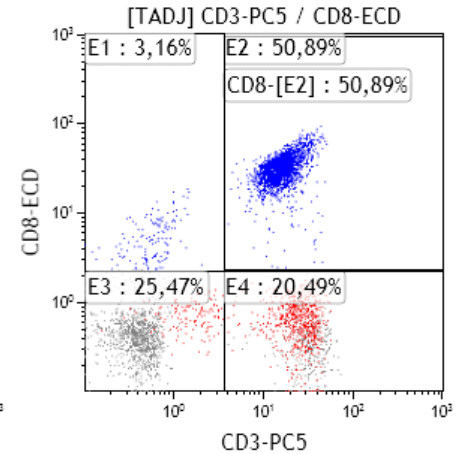
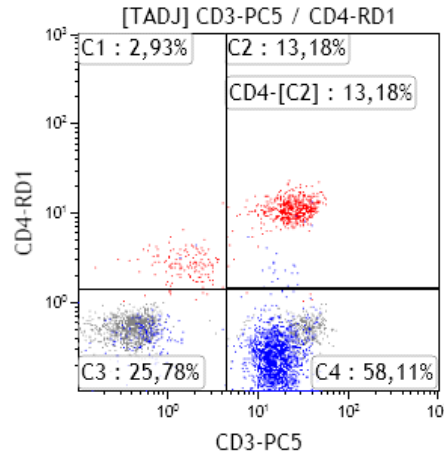
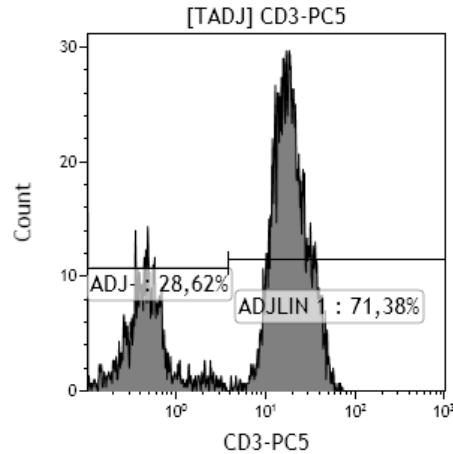
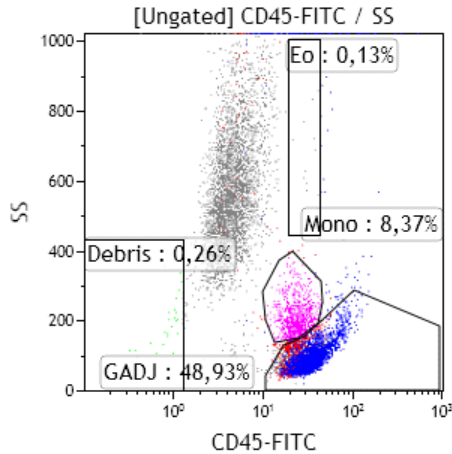
kontrola



# CD5+CD19+



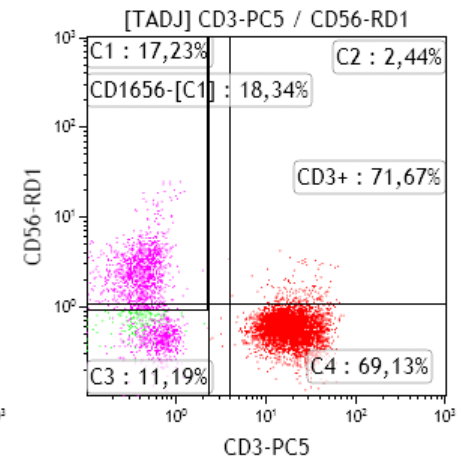
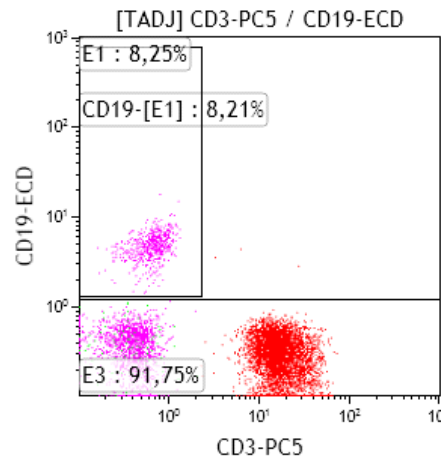
# Pacient: M, \*1999



**převrácený poměr  
CD8/CD4!**

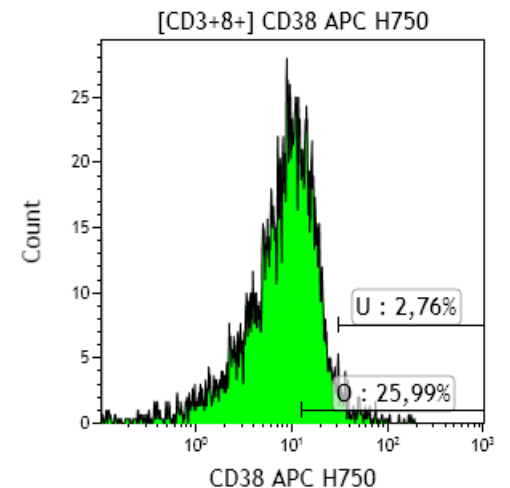
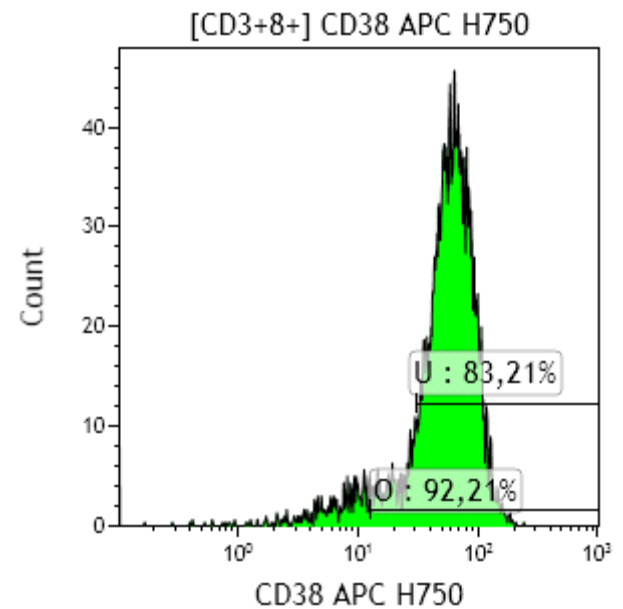
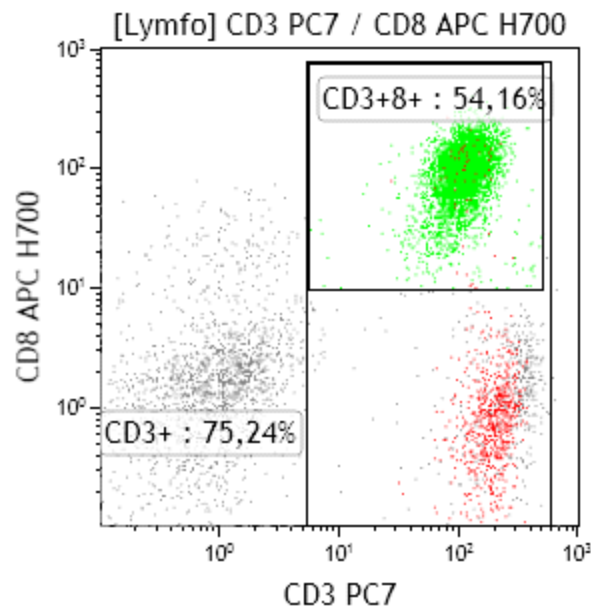
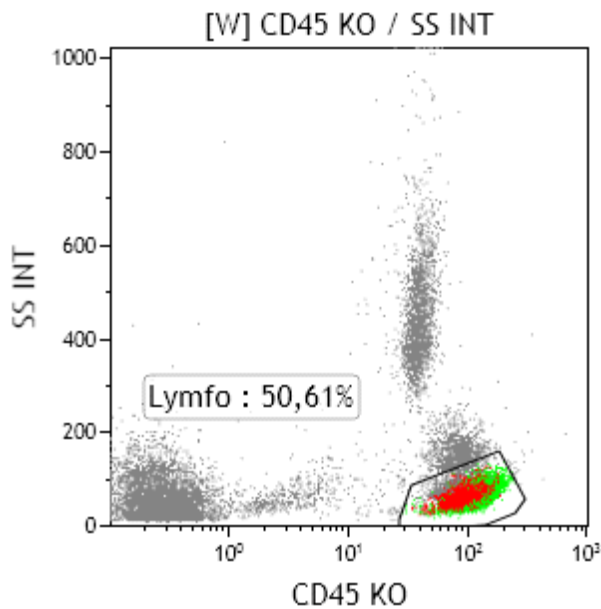
CD4+ 13,2%

CD8+ 50,9%

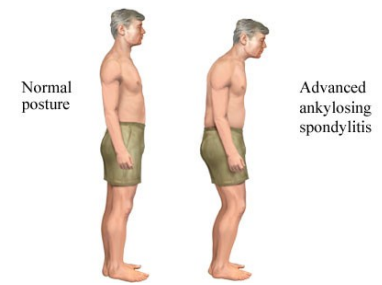


**virová infekce???** (CMV, EBV)

CD8+CD38+ 83,2%  
CD8++CD38++ 92,2%

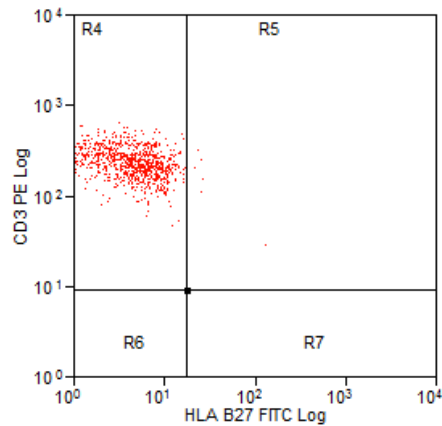


# HLA-B27

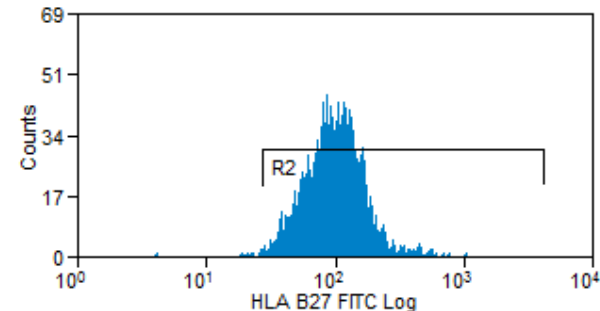
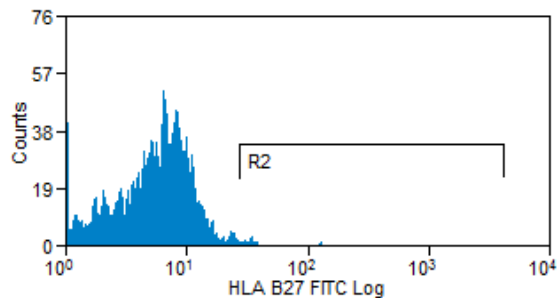
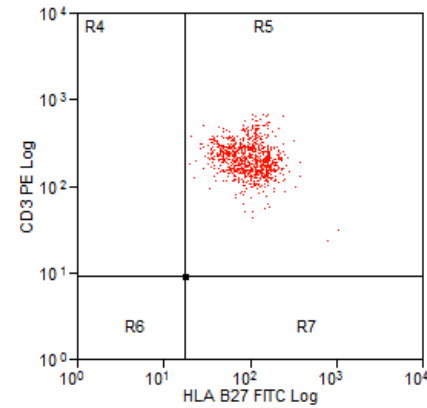


asociace HLA-B27 s řadou nespecificky zánětlivých onemocnění, jako jsou záněty kloubů, vnitřních struktur oka (uveitida), krátkých kostí rukou, nohou a šlach, dále lupénka (psoriasis), vyrážek, chronické bolesti spodní části zad a spondyloarthropatie, z nichž nejznámější je ankylózuující spondylitida (zánětlivé systémové onemocnění osového skeletu a kloubů - **Bechtěrevova nemoc**).

negativní



pozitivní

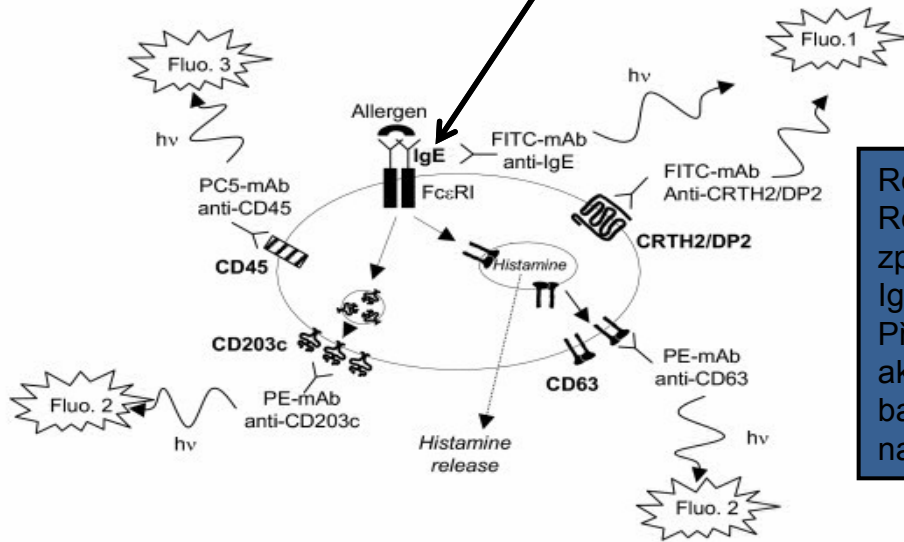


# Test aktivace bazofilů (basotest)

funkční test umožňující vyšetření aktivace bazofilů po setkání se s určitým alergenem in vitro

na povrchu **bazofilů** - FcεRI (receptor pro **IgE**)  
- CD203c

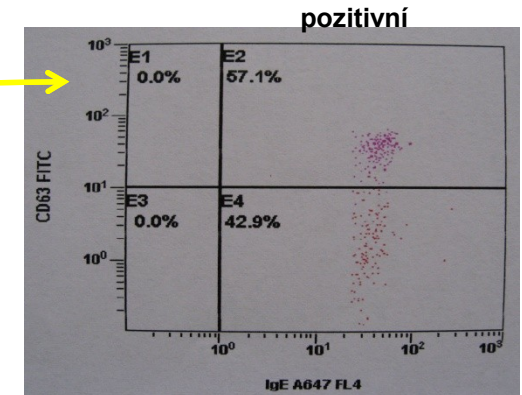
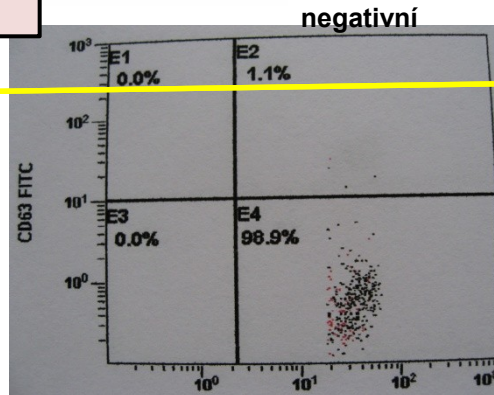
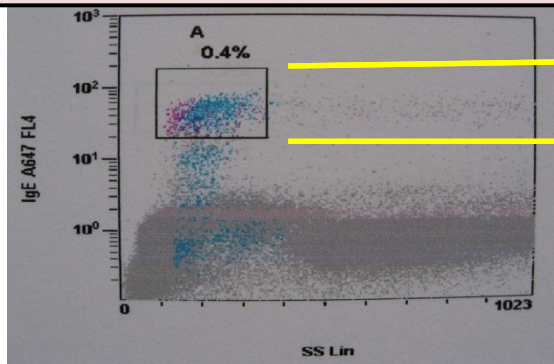
**založen na expresi aktivačního znaku (**CD63**) na povrchu periferních bazofilů po jejich expozici alergenem in vitro**



Reakce přecitlivělosti jsou podstatou alergických onemocnění. Reakce přecitlivělosti I. typu neboli **IgE** mediovaná **alergie** - je zprostředkována protilátkami IgE. IgE se naváže na bazofily ve fázi senzibilizace. Při dalším setkání s alergenem – alergen přemostí IgE, to vede k aktivaci bazofilů - masivnímu uvolnění produktů degranulace bazofilů a mastocytů → **zvýšená exprese CD63 a CD203c** na aktivovaných bazofilech.

ohraničíme **subpopulaci bazofilů** (IgE pozitivní)  
- sledujeme expresi CD63 (viz.obr.) a CD203c (není uvedeno)

Sledujeme expresi **CD63** na povrchu bazofilů

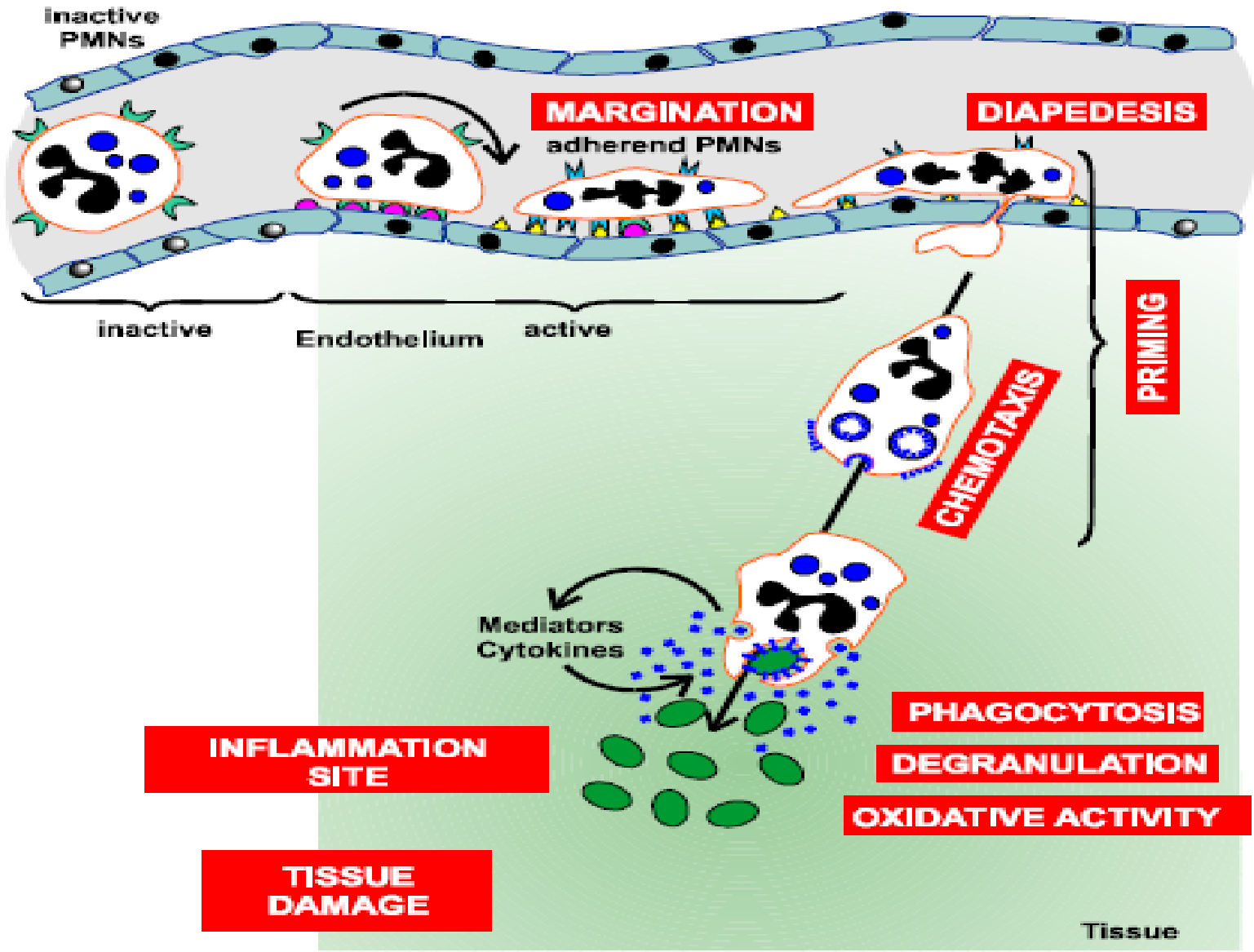


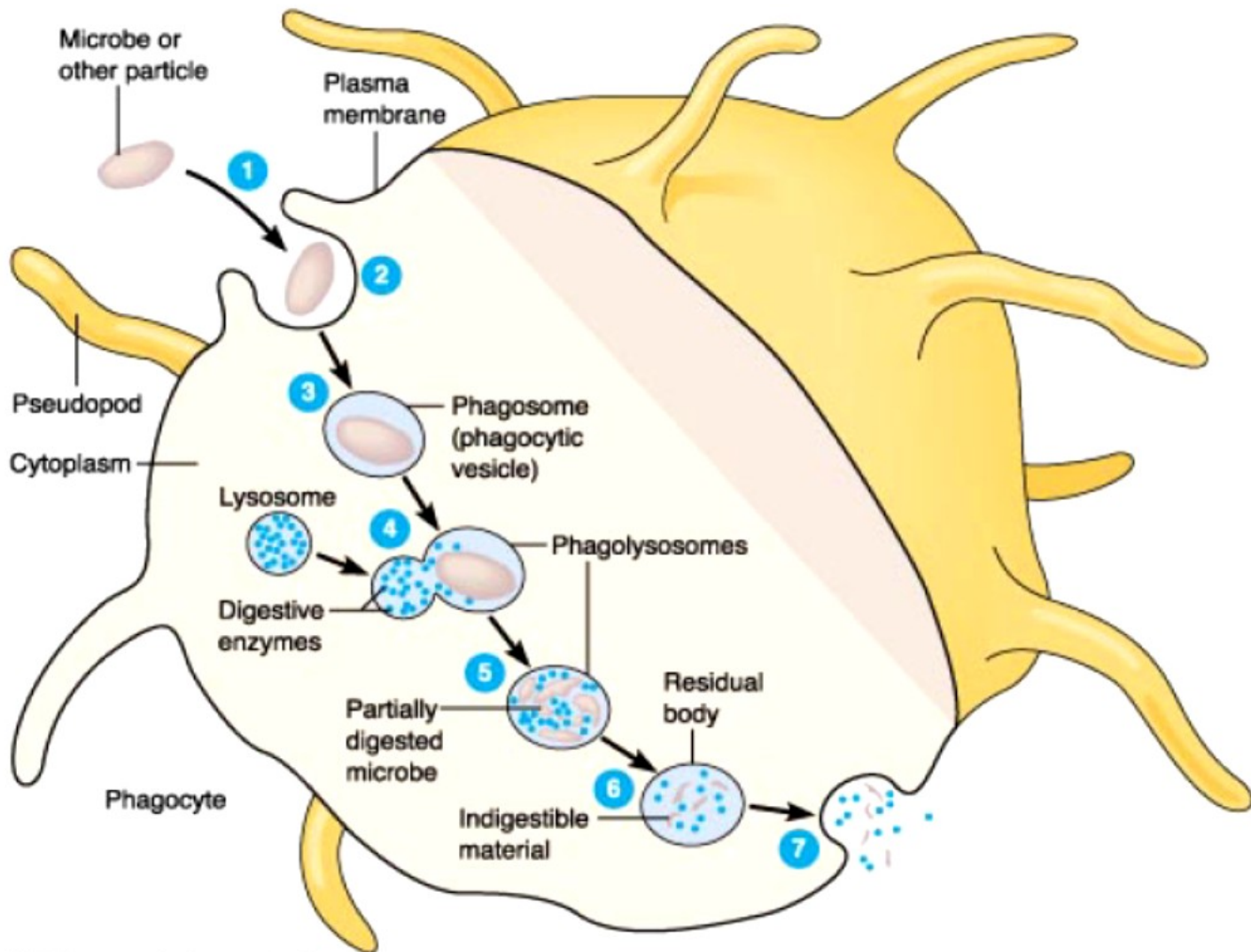


# Vyšetření fagocytózy

# PRŮBĚH FAGOCYTÓZY

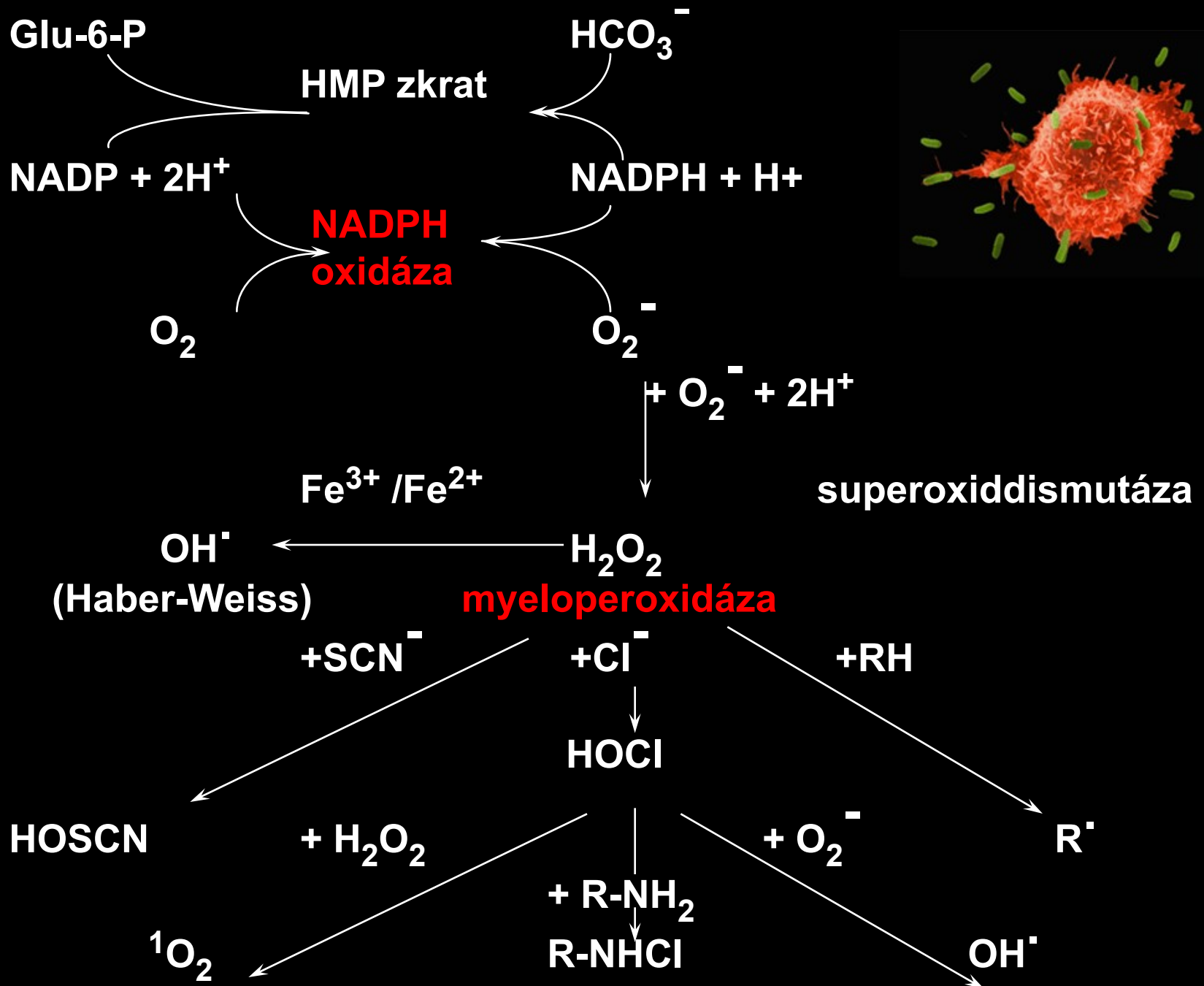
- **ADHEZE** („rolling“) → cytometrie – defektní exprese leukocytárních integrinů -  
Leukocyte Adhesion Deficiency Syndromes (LAD1, LAD2)
- **DIAPEDÉZA** = průchod leukocytů cévní stěnou
- **ROZPOZNÁNÍ OPONIZOVANÝCH ČÁSTIC**
- **CHEMOTAXE** → test migrace pod agarózou
  - ve směru chemotaktického gradientu (chemotaktické faktory, např. IL-8, směřují fagocyty do místa zánětu)
- **INGESCE** → fagocytóza mikroorganismů nebo inertních částic
- **DIGESCE**
  - mechanismus nezávislý na kyslíku
    - mikrobicidní test, detekce enzymů
  - mechanismus závislý na kyslíku
    - mikrobicidní test, NBT, INT, detekce myeloperoxidázy, chemiluminiscenční test, „burst“ test





**(a) Phases of phagocytosis**

Copyright © 2001 Benjamin Cummings, an imprint of Addison Wesley Longman, Inc.



# Vyšetření fagocytózy

## Burst test

- test je využíván ke kvantitativnímu vyhodnocení oxidačního vzplanutí u granulocytů a monocytů v **heparinizované plné krvi**
- fagocytující buňky se stimulují opsonizovanými *E.Coli*, fMLP (N-formyl-Met-Leu-Phe) nebo PMA (phorbol-myristát-acetát)
- dochází k oxidačnímu vzplanutí, při kterém se tvoří peroxidy, hydroxylové radikály, superoxidové anionty, které **oxidují membránově permeabilní fluorogenní substrát DHR 123** (dihydrorhodamin 123) **na zeleně fluoreskující rhodamin 123**
- počet (procento) zeleně fluoreskujících granulocytů a monocytů sledujeme na průtokovém cytometru.

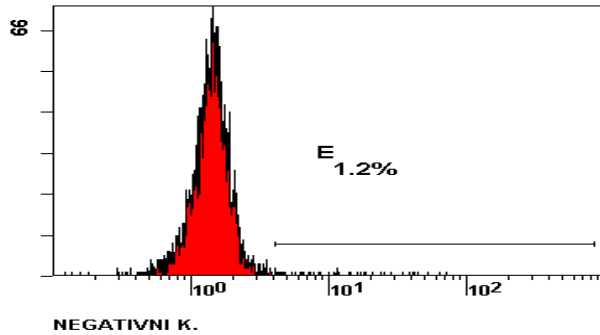
### Ref. rozmezí:

Aktivace pomocí	<b><i>E. Coli</i></b> u	<u>granulocytů</u> :	>80%
	<b>fMLP</b> u	<u>granulocytů</u> :	<15%
	<b>PMA</b> u	<u>granulocytů</u> :	>90%

# CHRONICKÁ GRANULOMATÓZA

BEZ STIMULACE

(1):20021459.LMD FL1 LOG A



ZDRAVÁ

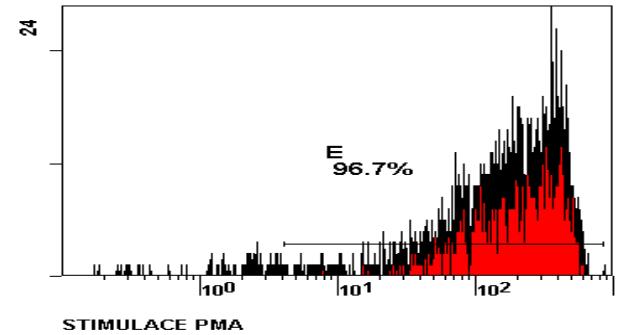
KONTROLA

STIMULACE PMA

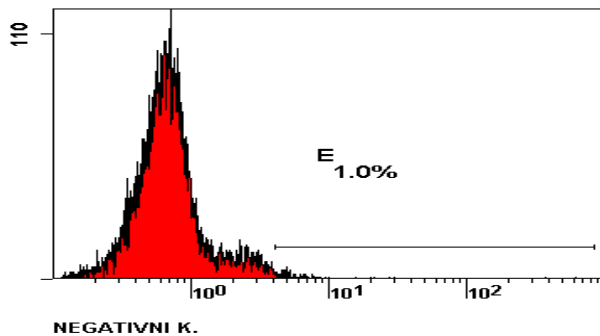
97%

STIMULACE PMA

(4):20211867.LMD FL1 LOG A



(3):20224644.LMD FL1 LOG A

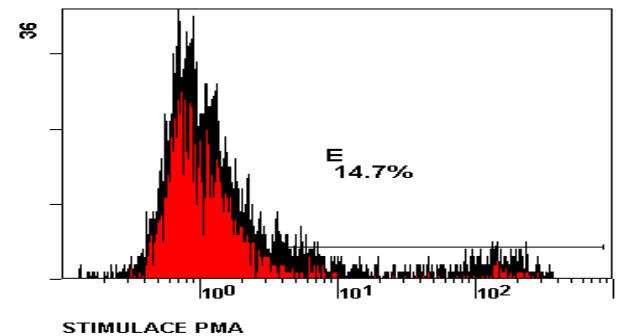


PACIENT

STIMULACE PMA:

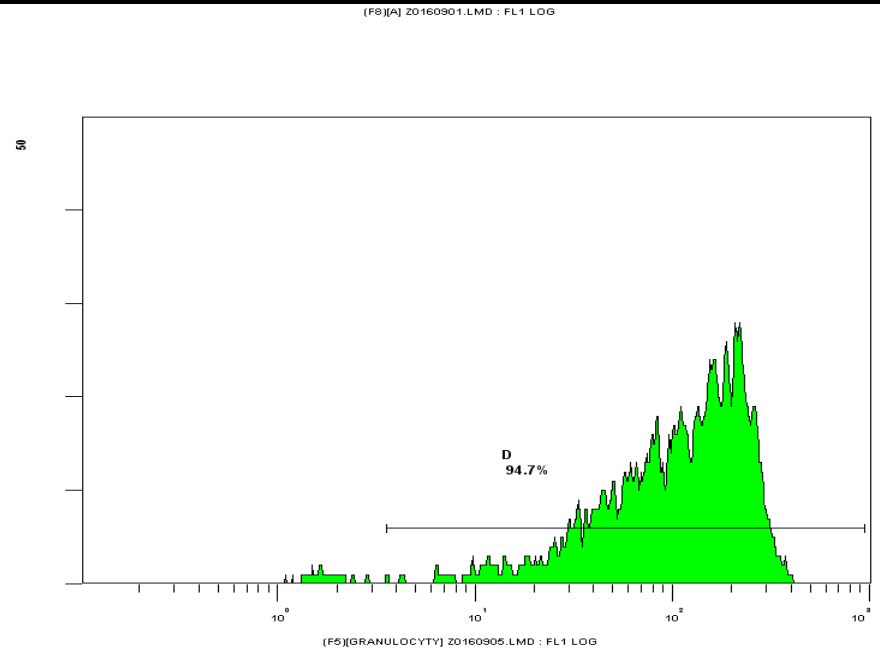
12%

(2):20021462.LMD FL1 LOG A

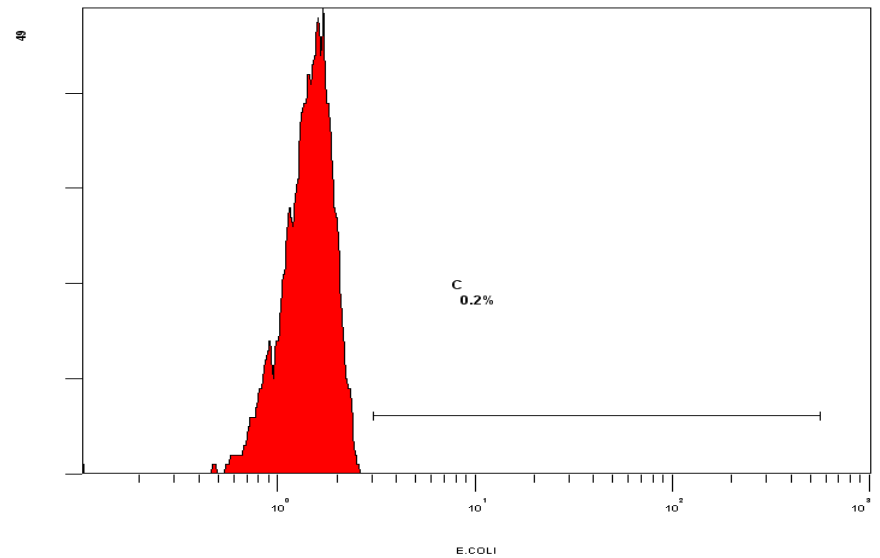


# STIMULACE *E.Coli*

ZDRAVÁ KONTROLA

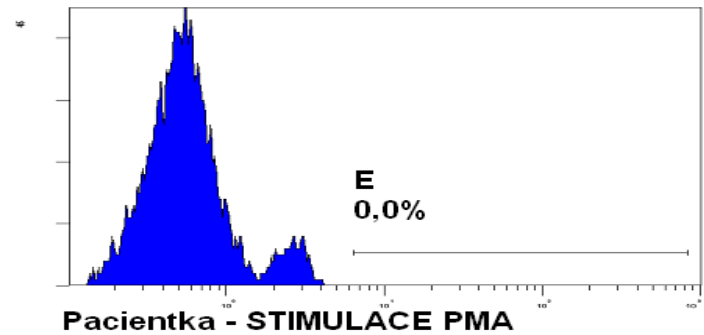
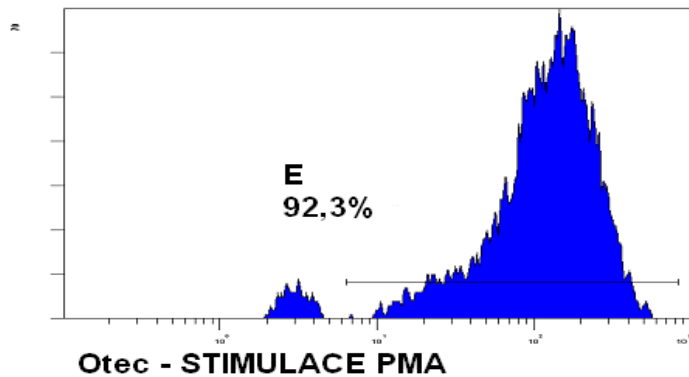
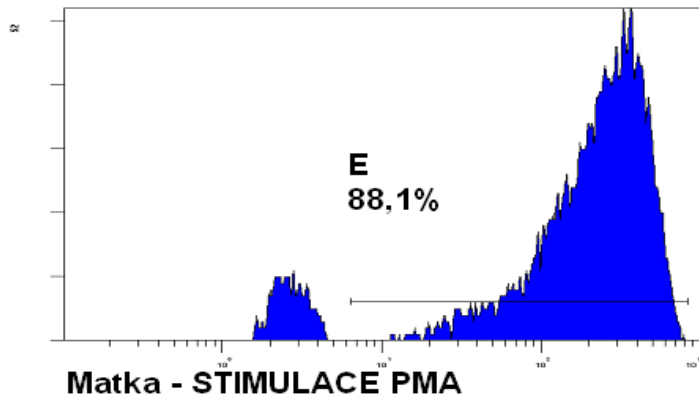


PACIENT S CGD

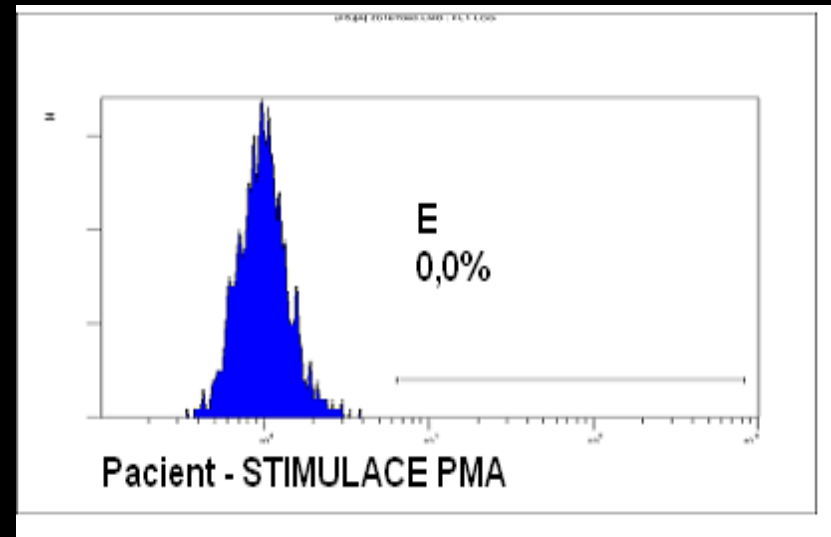
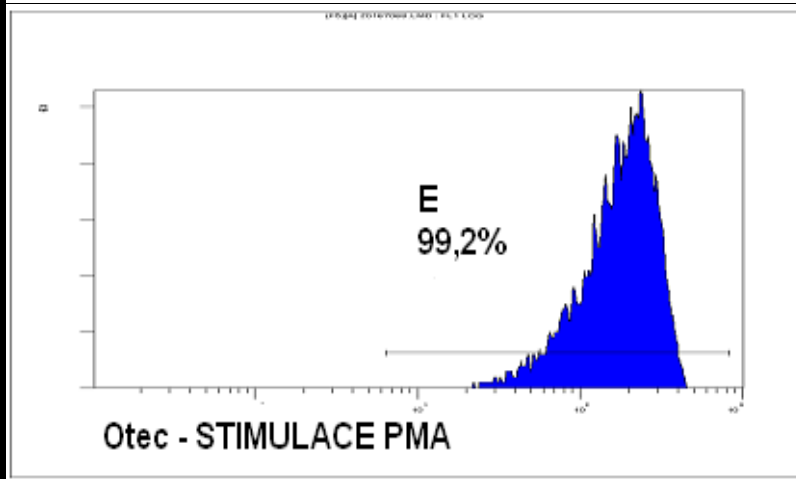
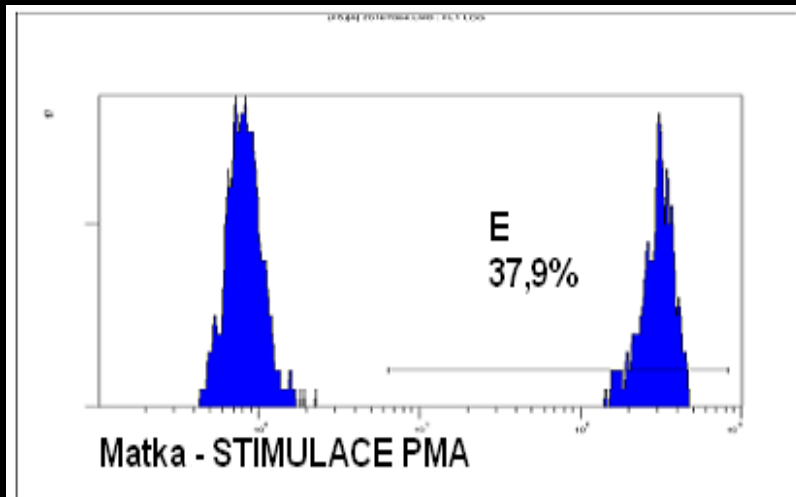




# CHRONICKÁ GRANULOMATÓZA (AUTOZOMÁLNĚ RECESIVNÍ)



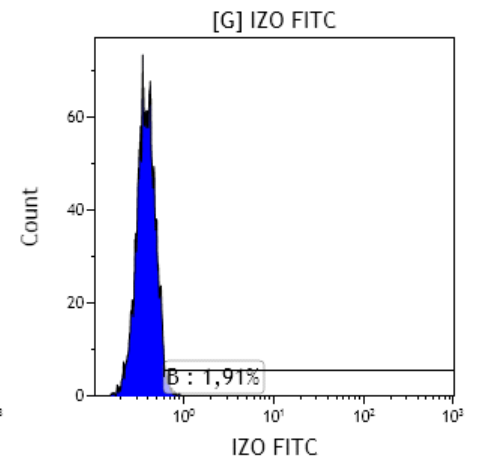
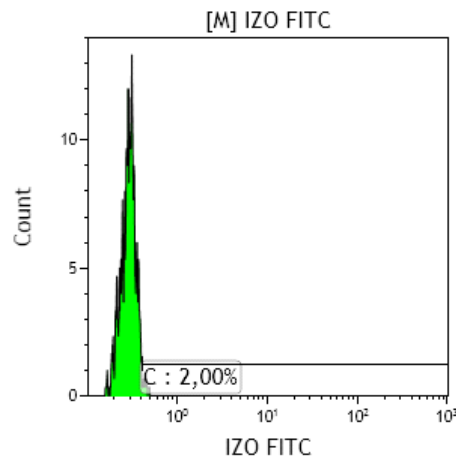
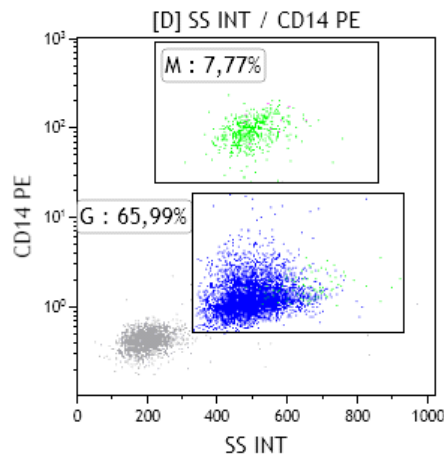
# CHRONICKÁ GRANULOMATÓZA (X-VÁZANÁ)



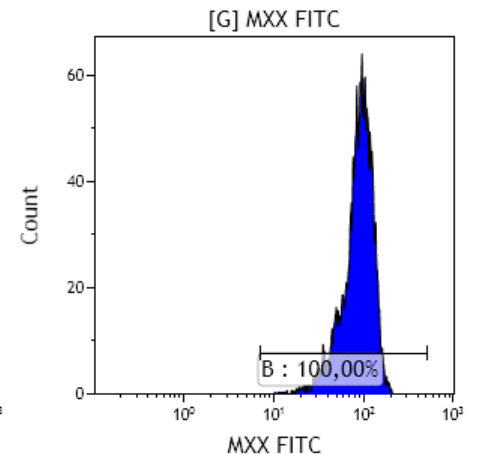
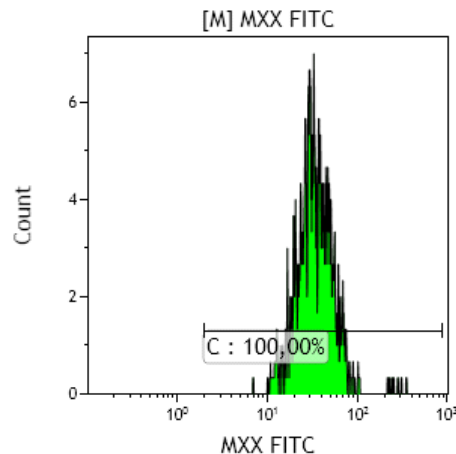
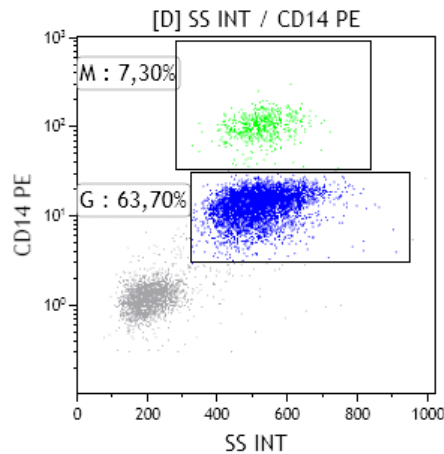
# Vyšetření fagocytózy

## Myeloperoxidáza

Negativní kontrola



Vzorek

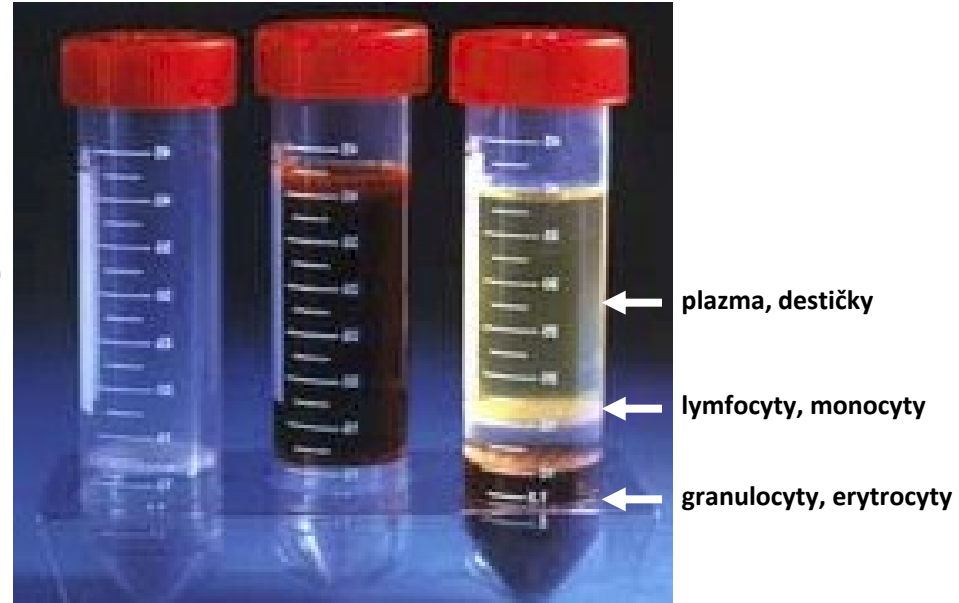


- deficit vede ke zvýšené náchylnosti k infekcím

# **Vyšetření lymfocytárních subpopulací**

# IZOLACE LYMFOCYTŮ

- 9ml heparinizované krve
- hustotní gradientová centrifugace (separační medium - lymphoprep)
- rozsuspendováno v RPMI-1640 s přidavkem 10% fetálního séra



- 300 $\mu$ l suspenze + monoklonální protilátky – inkubace
- promytí v PBS a naředění
- měření na průtokovém cytometru



# **SEROLOGICKÉ REAKCE**

## **(METODY HUMORÁLNÍ IMUNITY)**

Mgr. Jana Nechvátalová  
Ústav klinické imunologie a alergologie  
FN u sv. Anny

# Klasické serologické reakce

Aglutinace – reakce mezi korpuskulárním Ag a Ab s následnou aglutinací částic; proběhne 1.+ 2.fáze interakce Ag a Ab

Precipitace – reakce mezi solubilním Ag (nízkomolekulární) a Ab s následným vznikem precipitátu proběhne 1.+ 2.fáze interakce Ag a Ab

Imunoeseje – reakce mezi Ag a Ab vizualizována enzymem, fluorochromem n. radioaktivním zářičem (EIA, RIA n. FIA) ; většinou proběhne jen 1. fáze inter. Ag a Ab

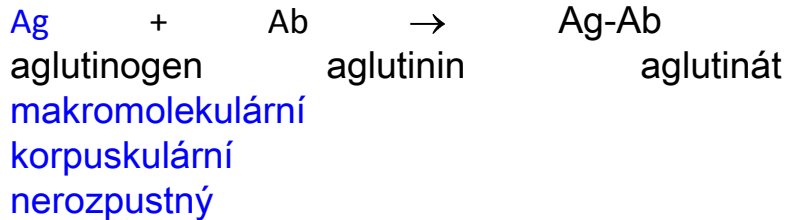
## Metodiky využívající efektorového účinku Ab:

Metodiky s aktivací komplementového systému komplexem Ag – Ab, např. komplement-fixační reakce (KFR)

Metodiky s inhibicí biologických účinků některých Ag, např. neutralizační test

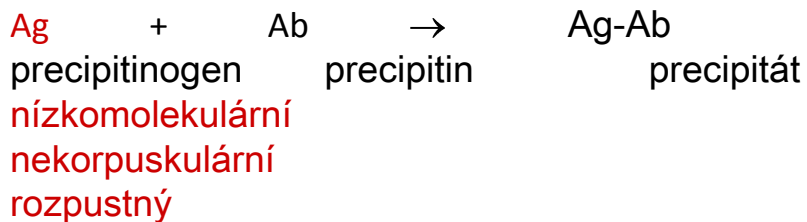
# Aglutinace x precipitace

- Aglutinace



Protilátky namířené proti epitopům antigenních částic vytváří mezi korpuskulemi můstky, které vedou ke vzniku shluků – aglutinátů.  
jako Ag slouží např. těla bakterií

- Precipitace



Reakce mezi solubilním antigenem a protilátkou s následným vznikem precipitátu (hydrofobní vazby – nerozpustný komplex).



# Aglutinace

## Přímá

Ag jsou přirozeně součástí povrch. struktur reagujících částic

Př. hemaglutinace




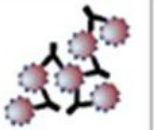


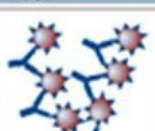


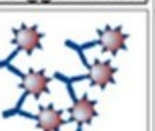

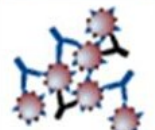


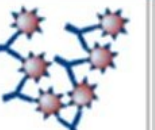




## Nepřímá

Zkoumaný Ag navazujeme na povrch částice uměle

Př. latex-fixační test – Ag nebo Ab navázaný na latex. částici, pokud dojde k aglutinaci, dokazujeme přítomnost Ab nebo Ag

# Přímá aglutinace

## Hemagglutination

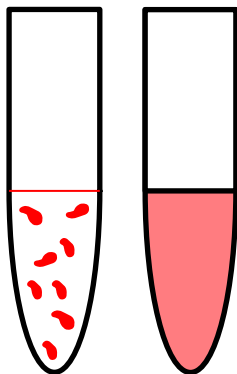
		red blood cells from individuals of type			
serum from individuals of type		AB	O	B	A
A	 Anti B antibodies				
		agglutination	no agglutination	agglutination	no agglutination
B	 Anti A antibodies				
		agglutination	no agglutination	no agglutination	agglutination
O	 Anti A + B antibodies				
		agglutination	no agglutination	agglutination	agglutination
AB	no antibodies to A or B				
		no agglutination	no agglutination	no agglutination	no agglutination

# Přirozené protilátky

- slouží ke screeningu diagnózy agamaglobulinémie
- tvoří se spontánně, bez záměrné imunizace
- jsou polyreaktivní s nízkou aviditou
- většina patří do isotypu IgM (IgM také nejvíce aglutinuje, je to pentamer)
- normální sérum zdravých jedinců obsahuje přirozené protilátky IgM, IgG a IgA.
- jejich fyziologický význam se předpokládá:
  - v časných stádiích infekčních procesů
  - při regulaci rozvoje autoimunitních chorob
  - též při odstraňování stárnoucích, fyziologicky degradovaných molekul a buněk

# Stanovení titru přirozených protilátek

- prokazují se aglutinací s králičími erytrocyty, a toto stanovení nám slouží ke screeningu diagnózy agamaglobulinémie.
- ve vyšetřovaném séru je třeba **inaktivovat komplement** (vodní lázeň...56 °C...30 min.)
- **sérum** každého pacienta se fyziologickým roztokem následně **naředí** dvojkovou řadou (1:2 – 1:256)
- z promytých **králičích erytrocytů** se připraví 0,5 % suspenze (ery + fyziol. roztok), která se přidá **do každé zkumavky** (1:4 – 1:512)
- všechny zkumavky se nechají **inkubovat 2 h při 37 °C** v termostatu, a pak přes noc při 4 °C v ledničce
- druhý den se **okometricky odečítá** hemaglutinace po důkladném protřepání zkumavek



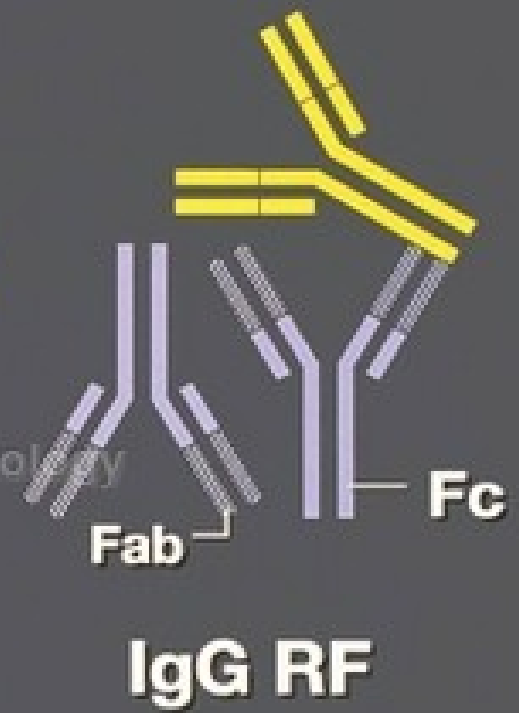
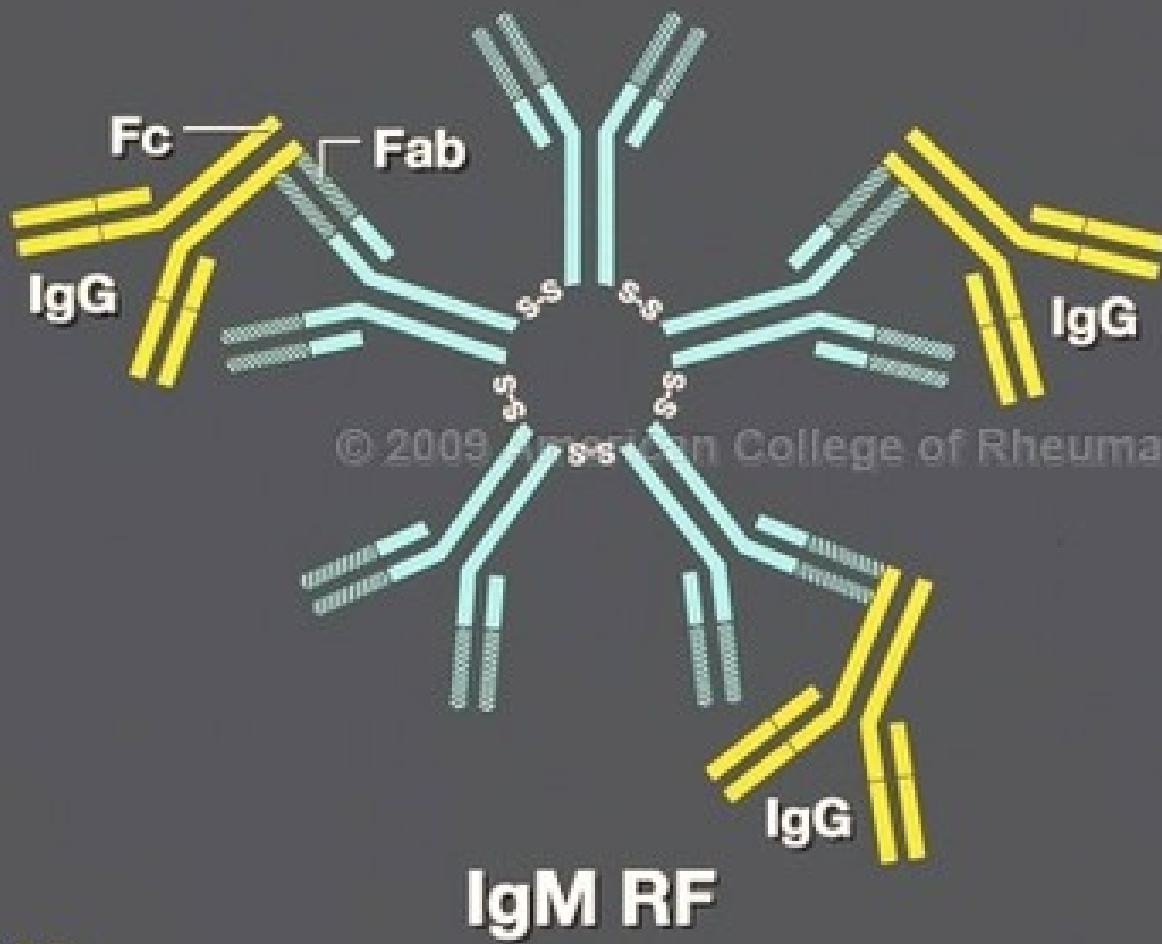
určuje se **titr protilátek**, neboli největší zředění séra, při kterém je aglutinace erytrocytů ještě prokazatelná

# Nepřímá aglutinace

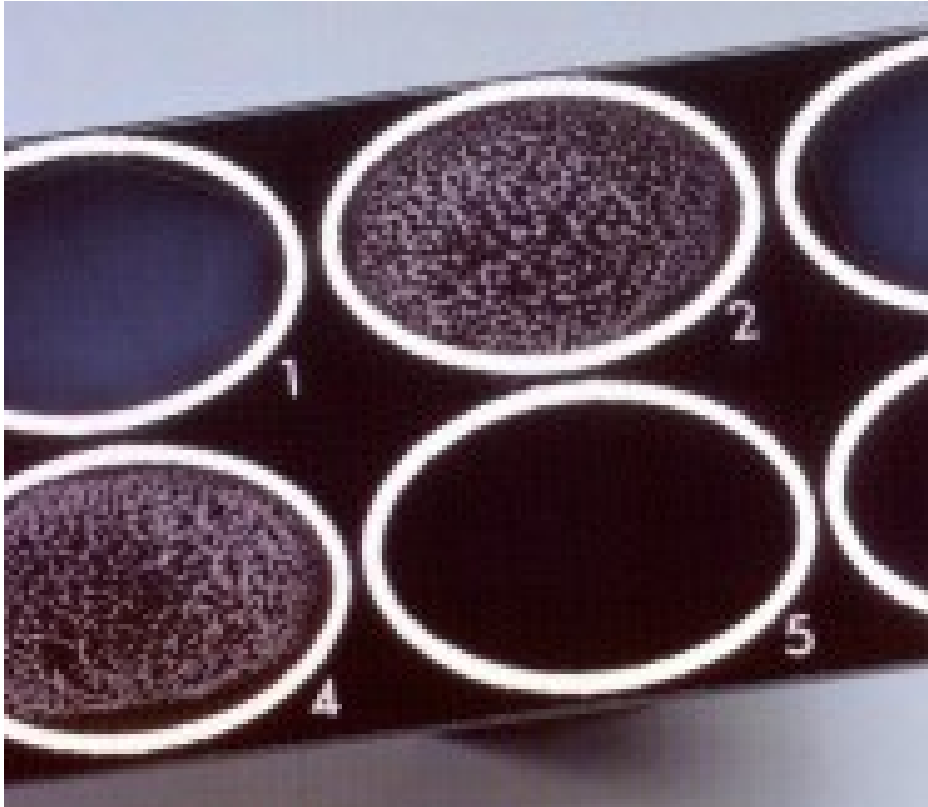
## Latex-fixační test

- k průkazu revmatoidního faktoru

**Revmatoidní faktor (RF)  
je autoprotilátka  
namířená proti Fc části  
IgG molekuly**



© ACR



# Revmatoidní faktor

- Autoprotilátka proti Fc fragmentu molekuly IgG
- Přítomen asi u 80% pacientů s revmatoidní artritidou
- Pozitivní je též u asi 5-10% nemocných s jinými systémovými autoimunitními chorobami, autoimunitní hepatitidy, endocarditis lenta
- Může být pozitivní i u zdravých osob
- Diagnosticky nejdůležitější je RF ve třídě IgM



# Revmatoidní artritida





Revmatoidní artritida

# Precipitace

## v tekutém prostředí

- využívá se efekt, že **při reakci Ag-Ab vzniká zákal – precipitát**, jehož intenzita je při konstantním množství přidané protilátky úměrná přidané koncentraci vyšetřovaného antigenu
- měření intenzity zákalu – nefelometrie, turbidimetrie
- obě metodiky umožňují kvantitativní stanovení obsahu proteinů ve vzorku odečtem z kalibrační křivky

# Nefelometrie a turbidimetrie

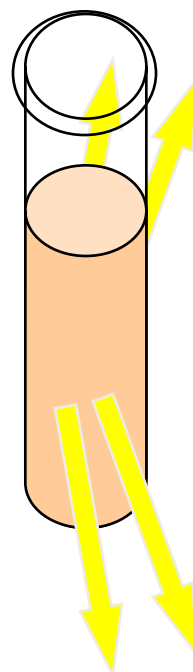
- reakce založené na měření množství imunitních komplexů vytvořených interakcí specifických protilátek s antigenem
- koncentrace příslušného Ag je úměrná rychlosti tvorby zákalu nebo hustotě zákalu
- stanovení sérových bílkovin
- měření probíhá v tekutém prostředí v měřící kyvetě (pufr, látka urychlující reakci, Ag, Ab)
- množství vytvořených komplexů je p.ú.konc. Ag

## Precipitace v tekutém prostředí:

# Nefelometrie

-hodí se pro nižší koncentrace

viditelné světlo



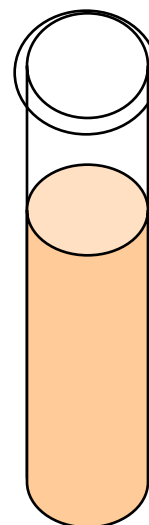
detektor je ve směru kolmém na vstupující paprsek

měří množství světla rozptýleného při průchodu paprsku  
(množství světla odraženého od vznikajících komplexů)

# Turbidimetrie

- hodí se pro koncentrovanější roztoky

viditelné světlo



detektor je v ose paprsku

měří množství procházejícího světla  
(úbytek intenzity světla, které prošlo roztokem v kyvetě)

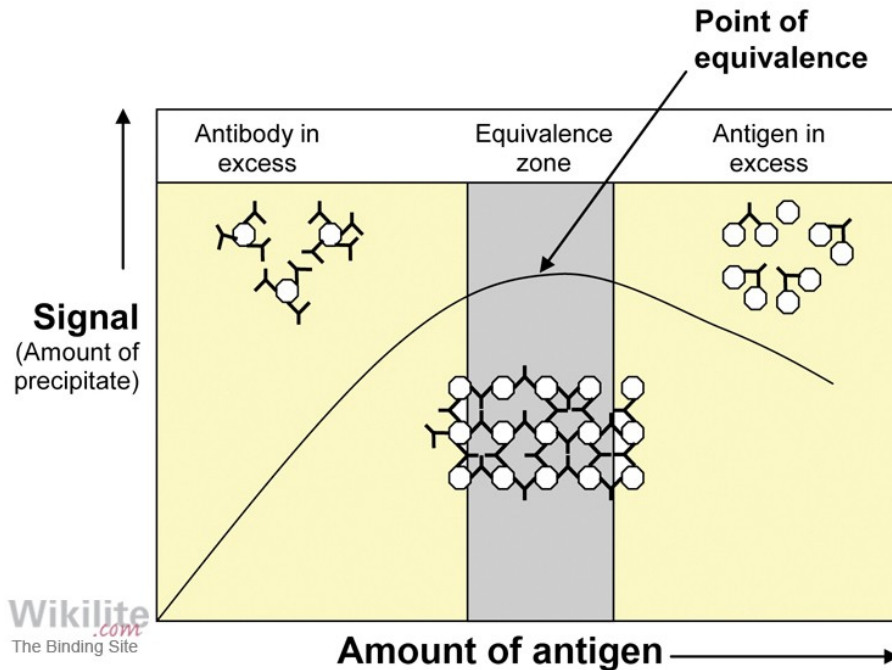
nefelometrie je 5-10x citlivější a nákladnější než turbidimetrie

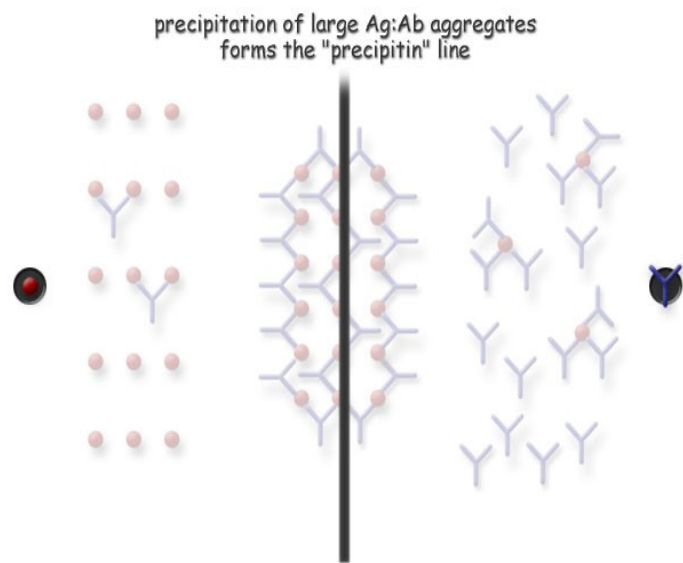
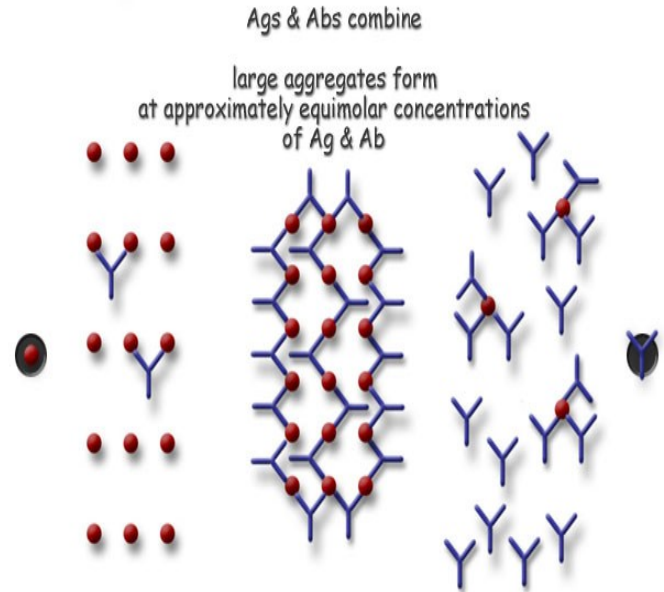
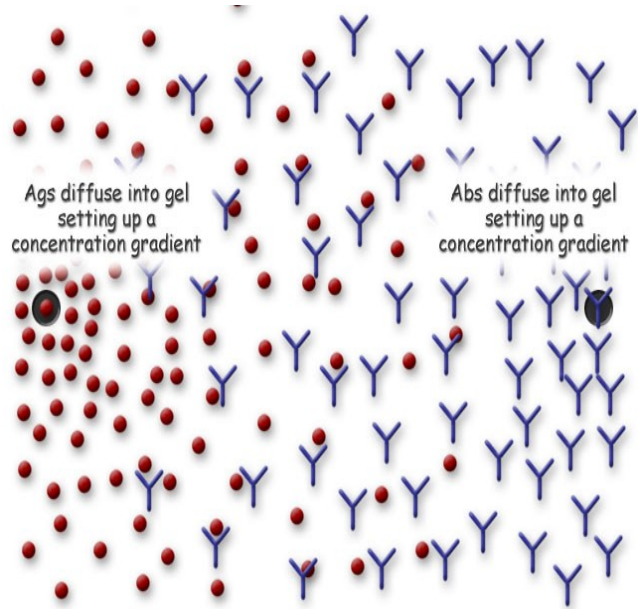
# Precipitace

## v gelu

- agaróza, agar
- umožňují detekci precipitačních linií
- je založena na **pasivní difuzi látek v prostředí koncentračního gradientu**

- Ag i Ab difundují v prostředí gelu a v místě, kde konc. Ag i Ab dosáhnou optimálního (ekvimolárního) poměru vzniká precipitát





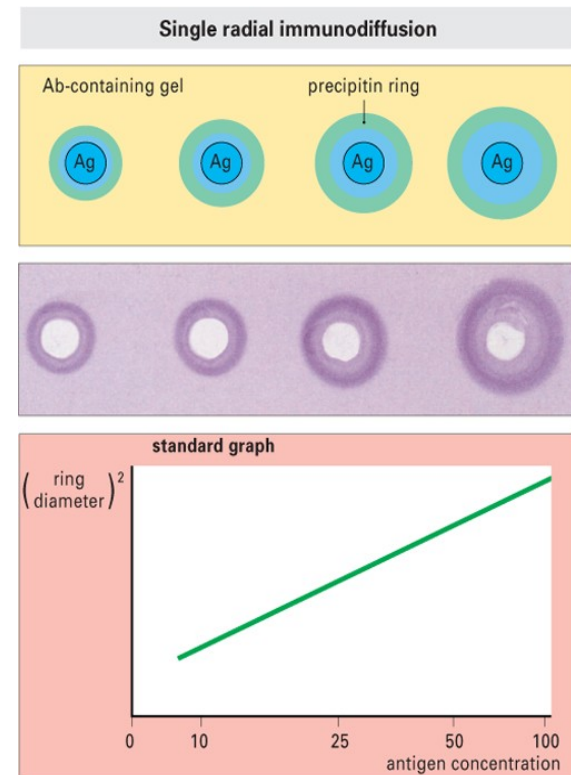
# Radiální imunodifuze

- pomocí RID je možno stanovit koncentrace mnohých bílkovinných součástí séra
- metodika se **dříve** používala při měření hladin celkového **IgG, IgA, IgM, složek komplementu** nebo různých **proteinů akutní fáze** - většina těchto vyšetření je však v dnešní době automatizována a provádí se na principu nefelometrie
- v naší laboratoři metodou RID ale stále měříme koncentrace **C2, C5** složek komplementu



# Podle počtu difundujících reaktantů:

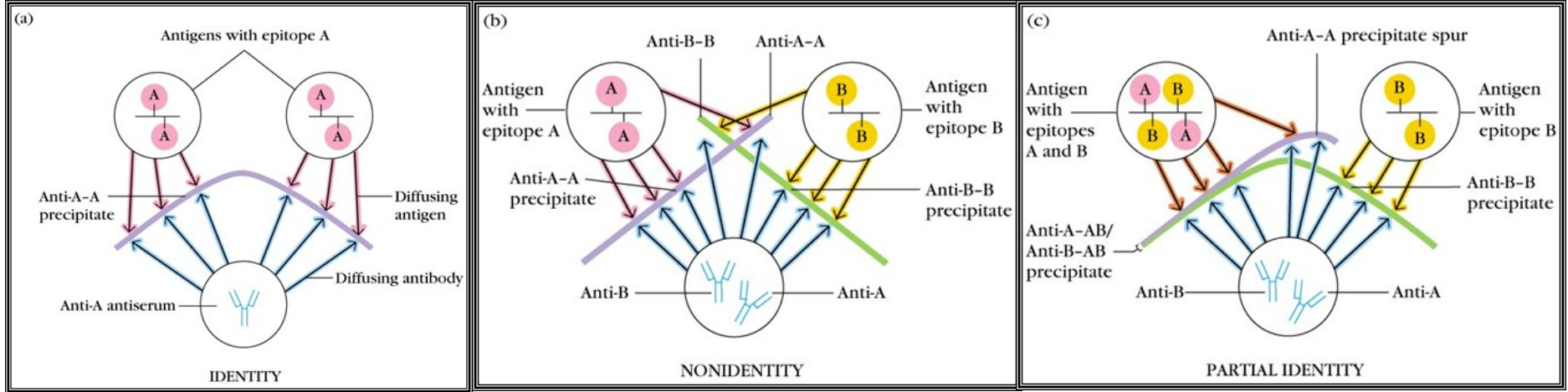
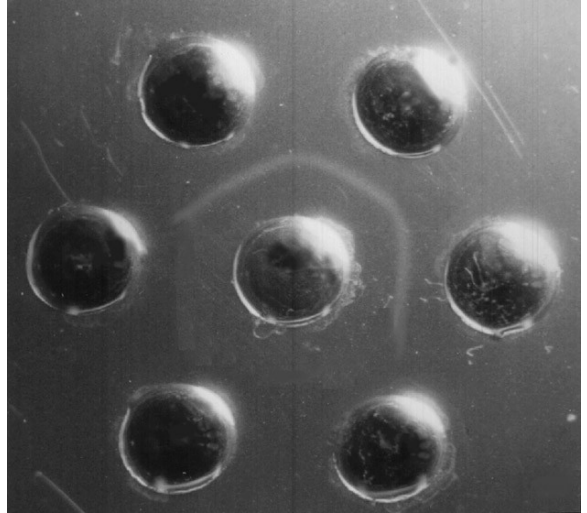
- jednoduchá radiální imunodifúze
  - koncentrační gradient jednoho z reaktantů (většinou Ag)
  - druhý reaktant (většinou Ab) - rovnoměrně rozptýlen ve struktuře gelu
  - výsledkem jsou ostře ohraničené kroužky precipitátu
  - plocha prstence – lineární funkcí konc. vyšetřovaného Ag
  - podle konc. standardu – kalibr. křivka



# • dvojitá radiální imunodifúze

(podle Ouchterlonyho)

- sledujeme antigenní příbuznost antigenů
- gradient vytváří jak Ag, tak Ab a dochází k protisměrné difúzi obou reaktantů (radiálně)
- v zóně ekvivalence – precipitační linie, která ukazuje na pozitivitu reakce
- hodnocení - **kvalitativní**



# Komplementfixační reakce (KFR)

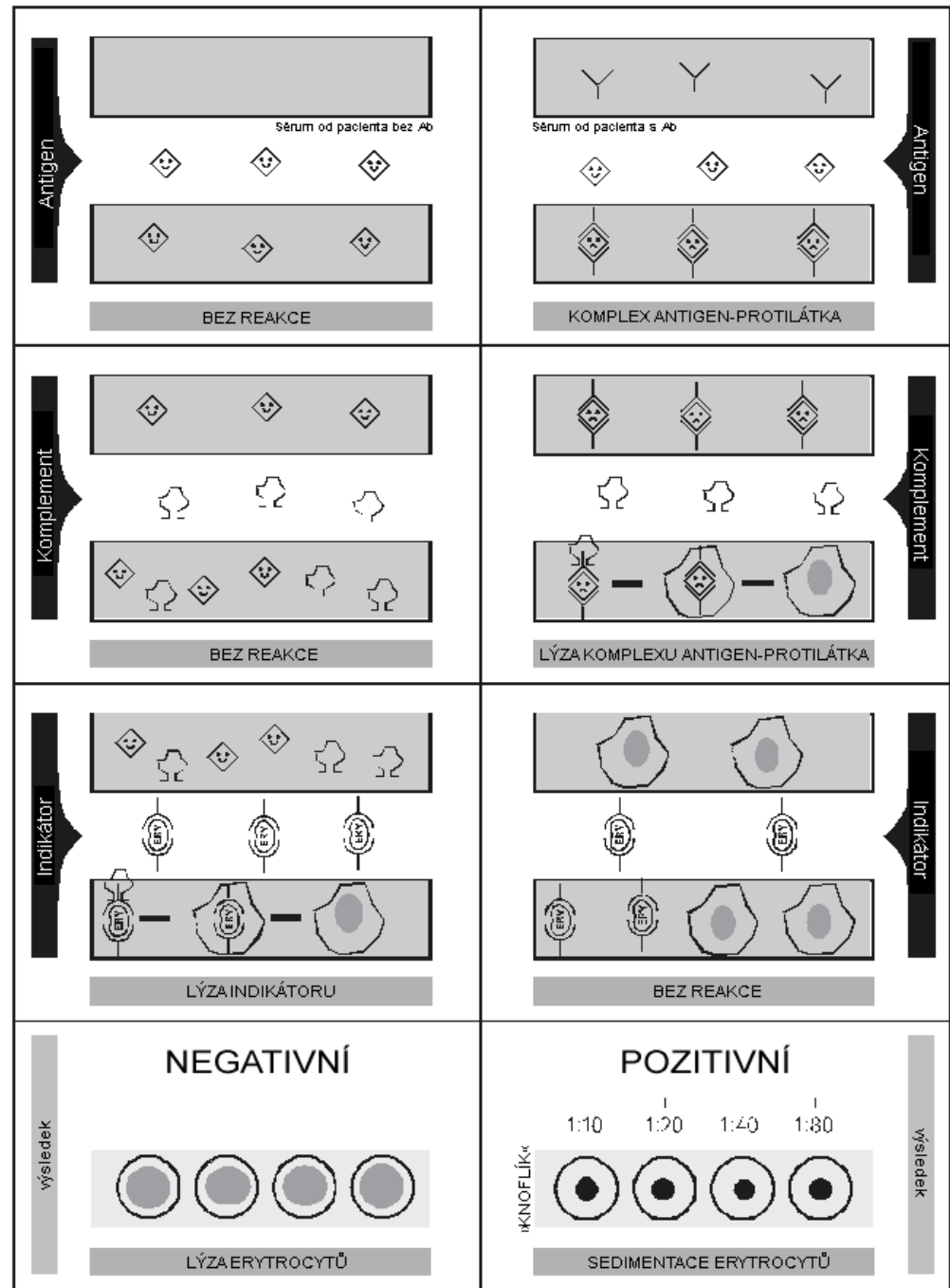
- sérologická metoda, která slouží nejčastěji **k průkazu přítomnosti protilátek**
- metoda byla vypracována v roce 1901 Bordetem a Genguem.
- imunologická metoda patřící mezi základní serologické metody, jež fungují na principu reakce protilátky s antigenem, využívá schopnosti komplementu vázat se na komplex antigenu s protilátkou
- využívá se např. **k průkazu protilátek proti původcům respiračních infekcí** a řady virových onemocnění ; zjištění ochranných protilátek po očkování
- lze použít k identifikaci jak specifických protilátek tak antigenu
- reakce se hodnotí v několika ředěních séra, jako výsledek se udává nejvyšší ředění séra (titr), při kterém ještě nedošlo k hemolýze
- metoda již na ústupu a je často nahrazována jinou technikou (např. ELISA), stále se používá v řadě diagnostických laboratořích například k diagnostice toxoplasmózy

inaktivovat pacientův vlastní komplement!  
56°C, 30minut

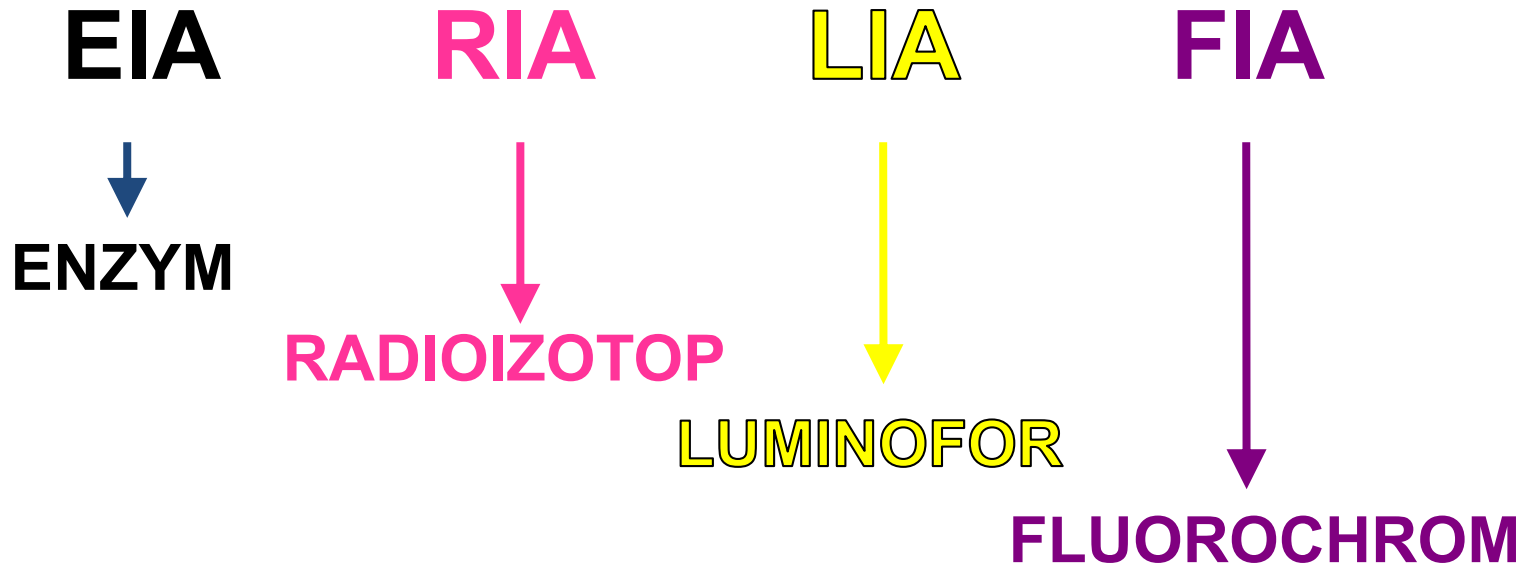
morčecí komplement

ovčí erytrocyty

králičí protilátky proti ovčím ery  
(=amboceptor)



# IMUNOESEJE



## Kompetitivní

- kompetice značeného a neznačeného ligandu o omezený počet vazebných míst protilátek
- neznačený antigen blokuje vazbu značeného antigenu, množství vzniklého produktu je nepřímo úm. konc. neznačeného ligandu v testovaném vzorku
- čím víc se naváže značeného ligandu, tím méně neznačeného

## Nekompetitivní

- protilátka je v nadbytku, všechny analyt je vyvázáán
- na navázaný analyt se poté váže sekundární protilátka značená enzymem
- množství vzniklého produktu je přímo úm. konc. neznačeného ligandu v testovaném vzorku

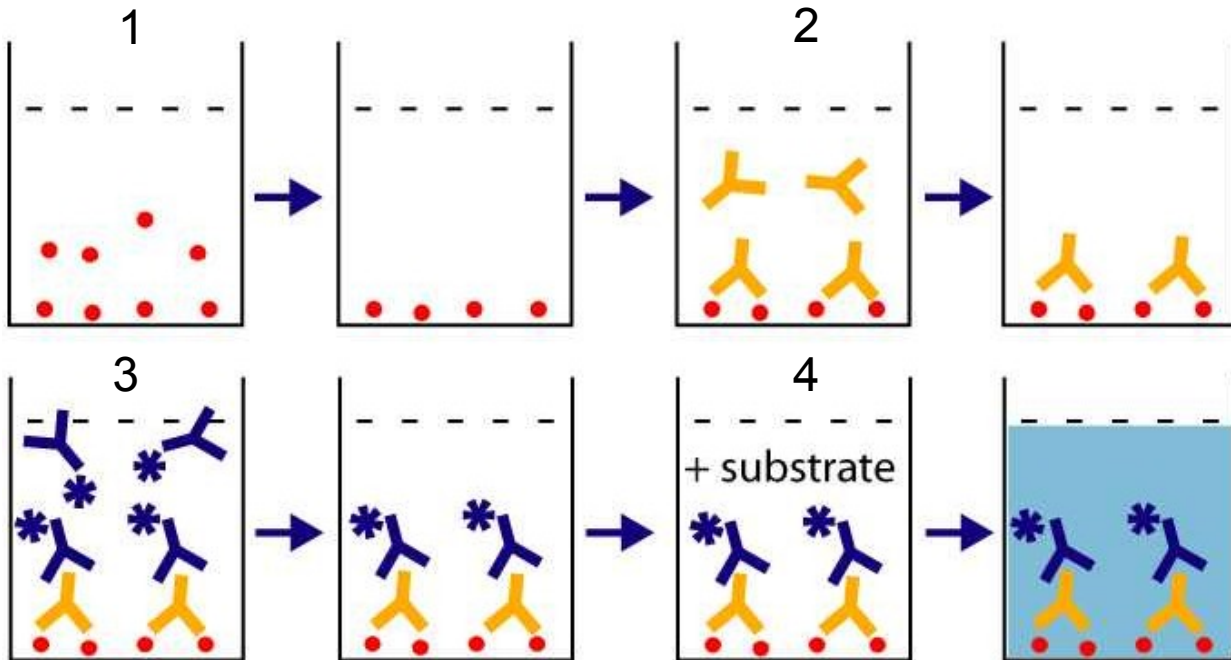
## Homogenní

- není potřeba oddělovat Ab-Ag od volného Ag\*

## Heterogenní

- nutnost separace navázaných složek reakce od volných složek reakce (detekční protilátka, konjugát)

# ELISA



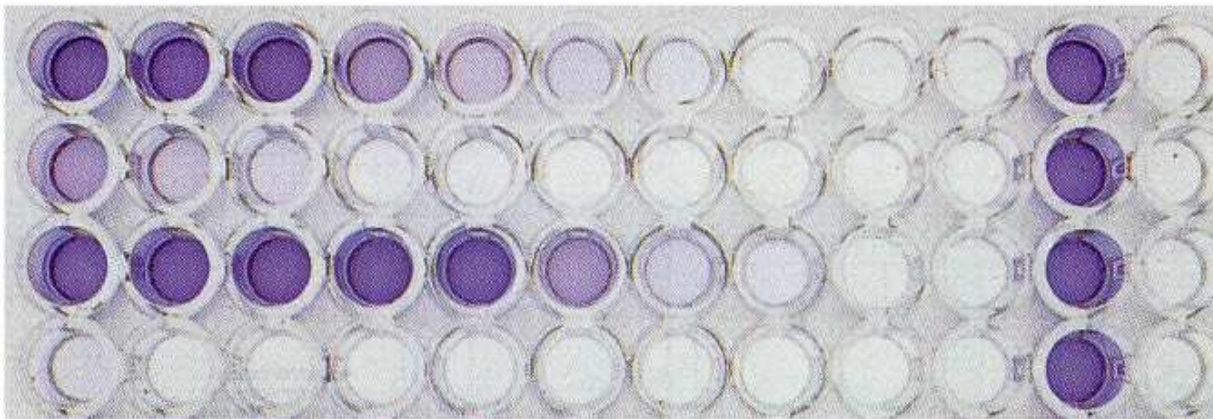
1. potažení jamek antigenem

2. přidání vzorku séra  
+ inkubace a promytí

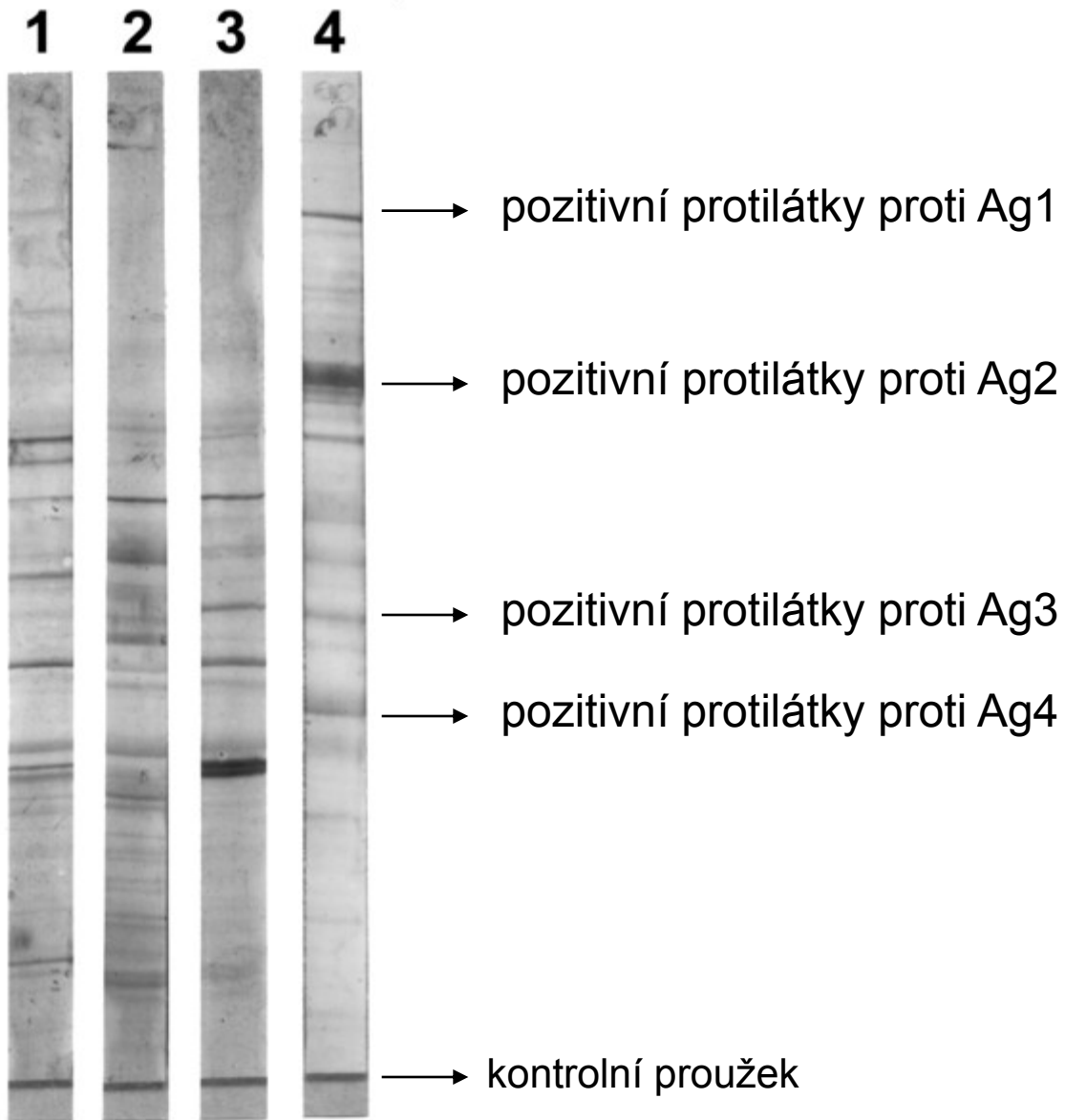
3. přidání enzymem  
značené protilátky  
+ inkubace a promytí

4. přidání substrátu

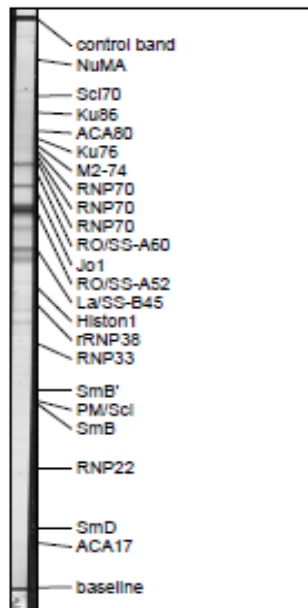
5. odečtení barevné reakce



# Imunoblot







Date: We 05. Feb 2014

Patient: 2038

Antigene: ANA

Antibodies: IgG

**Positive Bands:**

La/SS-B45:	69 %	++
RO/SS-A52:	100 %	+++

**Weak Indicators:**

rRNP38:	19 %	(+)
---------	------	-----

Cutoffs:  
 0 % - 14 % = negative  
 15 % - 24 % = (+) indeterminate  
 25 % - 49 % = ++ weakly positive  
 50 % - 99 % = +++ positive  
 100 % = ++++ highly positive

**Findings:**

---



---



---



---



---



---

**Comments:**

---



---



---



---



---



---

\_\_\_\_\_  
 Signature



**DĚKUJI ZA POZORNOST!**