

Sledování parametrů imunitní odpovědi

MVDr. Mgr. Monika Dušková, Ph.D.

Které parametry imunitního systému měříme

Počty a typy krevních buněk

Fagocytóza

Aktivita komplementového systému

Aktivita lysozymu

Hladiny sérových bílkovin

Hladiny celkových a specifických protilátek

Produkci kyslíkových radikálů

Antioxidační mechanismy

S jakým materiálem pracujeme

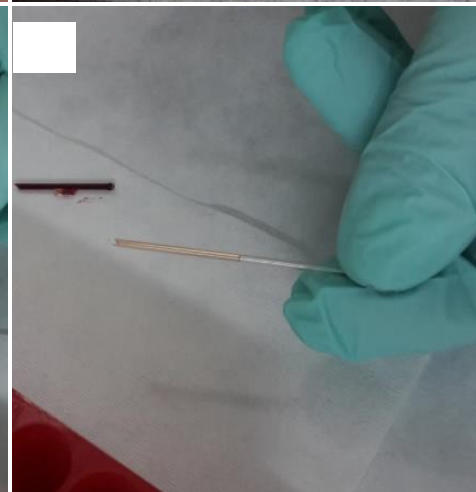
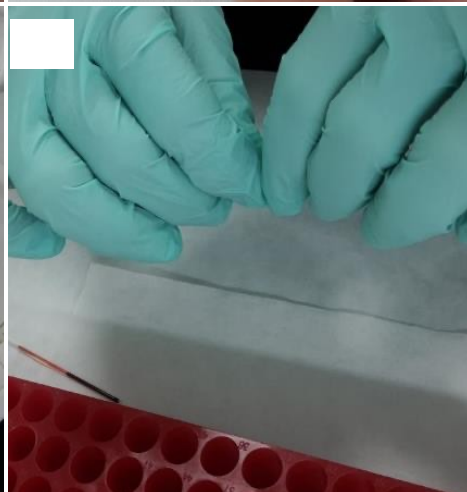
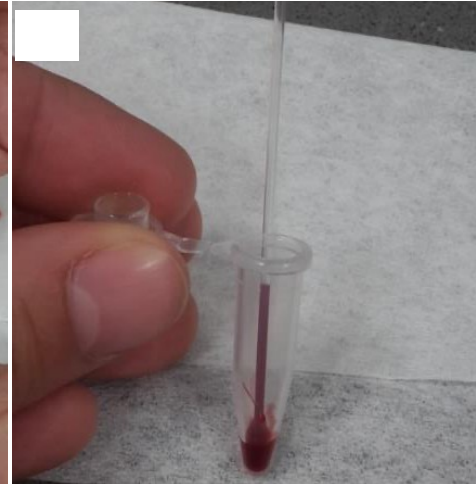
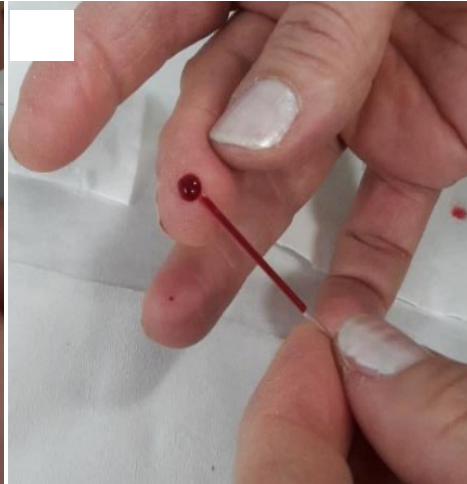
Buňky ex vivo: plná krev kapilární, žilní

Tělní tekutiny: plasma, sérum, hemolymfa

Vzorky lidské: odběry u sportovců, studentů

Vzorky zvířecí: zamražená plasma, sérum, spolupráce s VFU

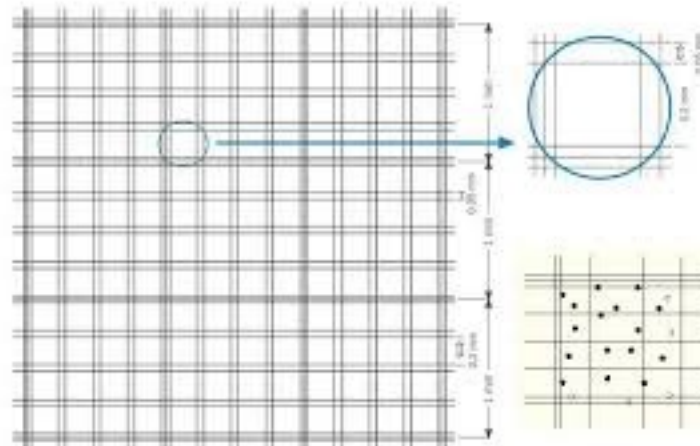
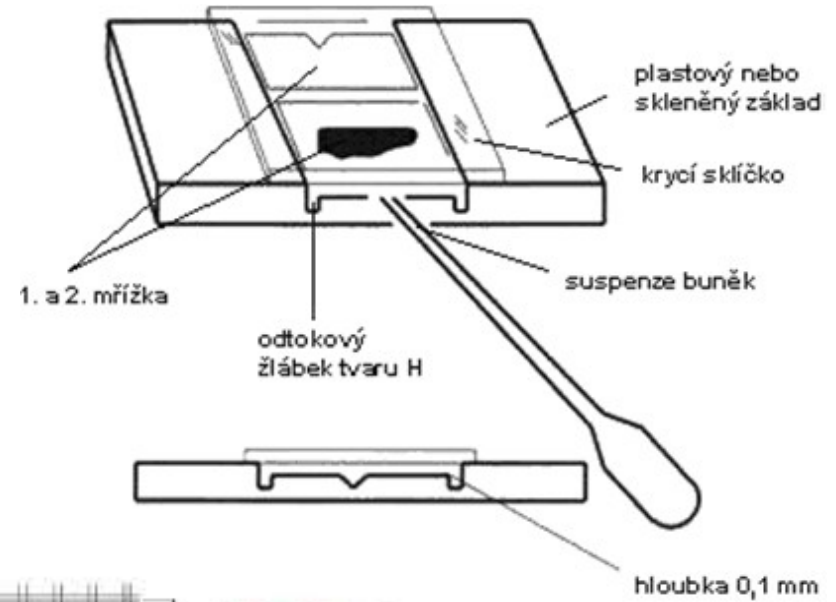
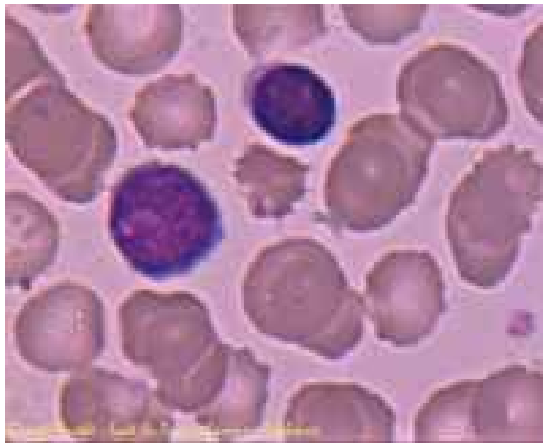
Odběr kapilární krve z prstu a separace plasmy



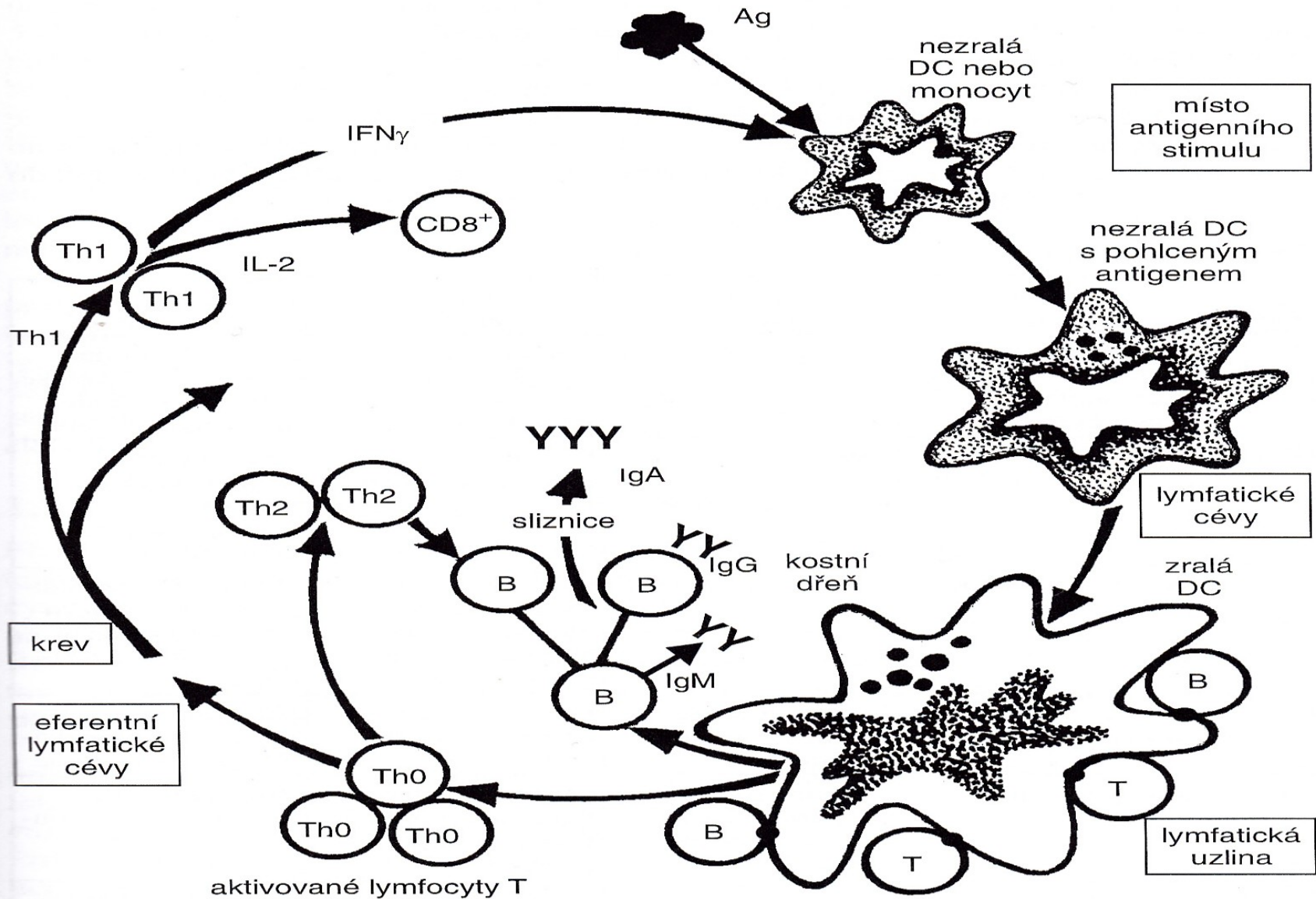
Počty a typy krevních buněk

počítání krevních elementů v Bürkerově komůrce

krevní diferenciál



Zjednodušené schéma imunitní reakce



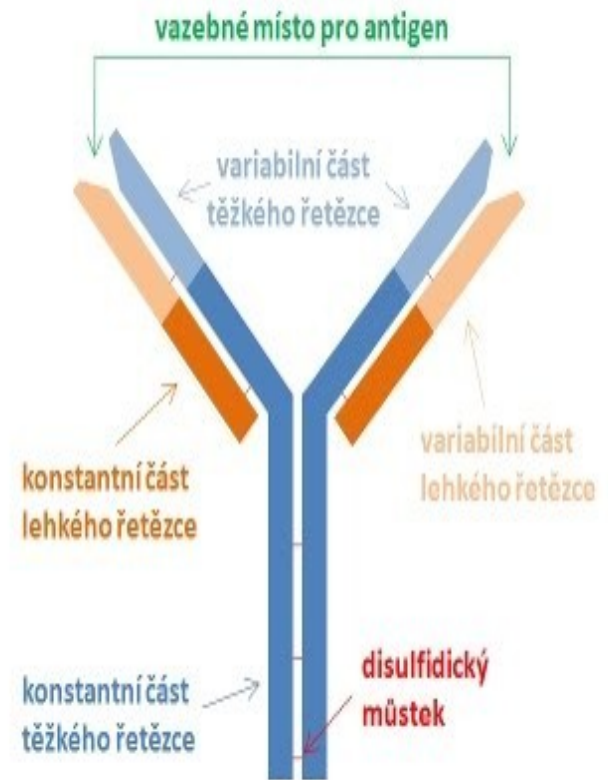
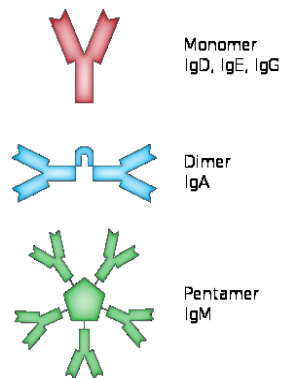
Důležité pojmy v IS: antigen a protilátka

- **Antigen** – cizorodá látka, na kterou imunitní systém reaguje tvorbou protilátek. Antigeny jsou části patogenních mikroorganismů - bakterie, viry, houby, plísně, paraziti
- **Protilátka** – bílkovina tvořená B lymfocyty, která specificky váže antigen a zneškodní ho.

Třídy protilátek (imunoglobulinů):

IgM, **IgG**, IgA IgD, **IgE**

Koncentrace IgG v plasmě: 8 -18 g/l



Stanovování množství protilátek

Základní princip: reakce antigenu a protilátky

Různé způsoby uspořádání, možnost navázat jednu ze složek na nosiče.

Stanovení:

kvalitativní (izotyp, specifita) x kvantitativní (množství, koncentrace)

Precipitace: vznik zákalu po reakci Ag – Ab v tekutém prostředí

Popsána v r. 1929 Heidelberg a Kendall

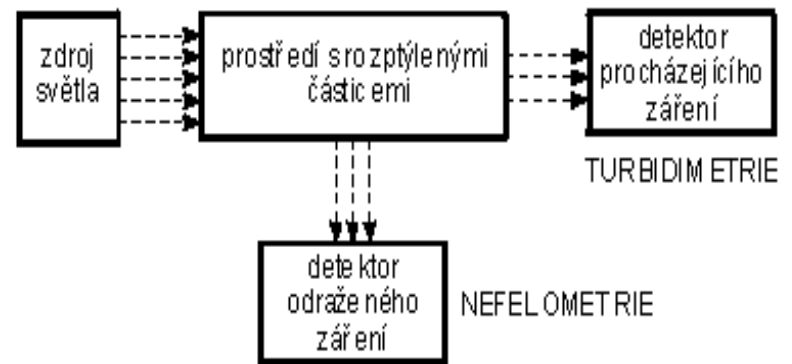
Stanovení protilátek: nefelometrie, turbidimetrie

Při reakci Ag a Ab vzniká **zákal-precipitát**, jehož intenzita je při konstantním množství Ab úměrná koncentraci vyšetřovaného Ag

Vhodná pro: kvantitativní stanovení protilátek ale i jiných sérových proteinů

Podmínkou je, aby byla komerčně dostupná protilátka proti stanovované složce.

Detekční limity: nefelometrie nad 10 mg/l, turbidimetrie 20 – 30 mg/l.



Stanovení protilátek: ELISA metoda

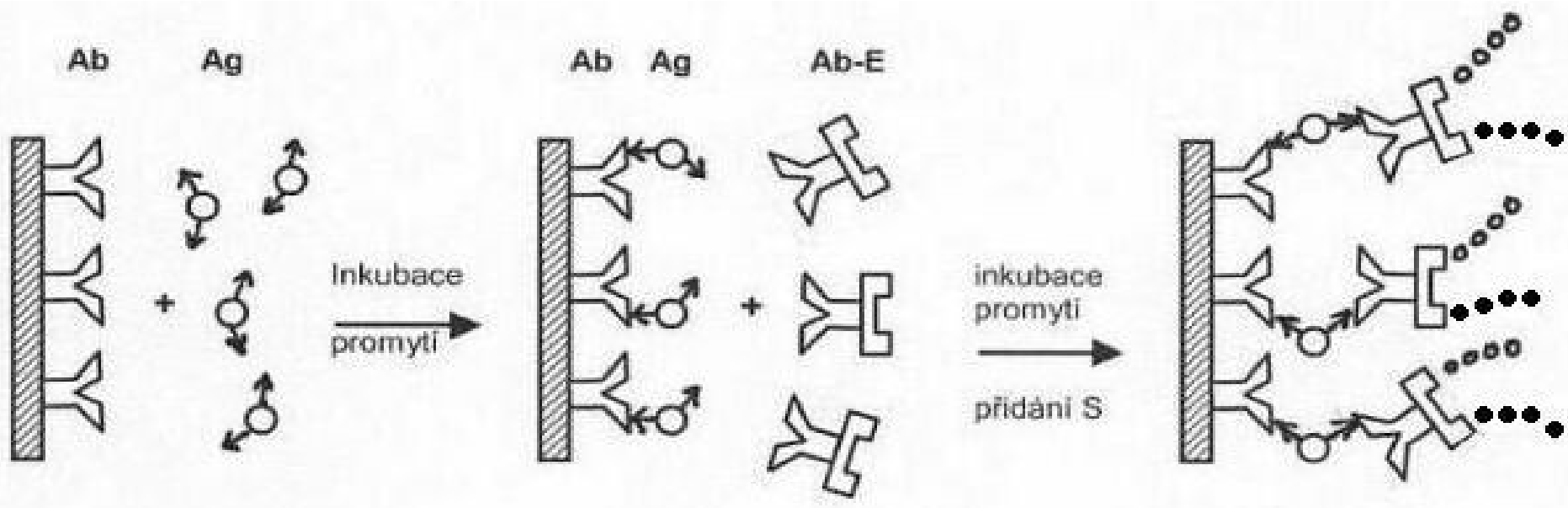
ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY = ELISA

Imobilizace jedné ze složek reakce (Ag – Ab) navázáním na pevný povrch (jamka destičky). Druhý reaktant se přidává v roztoku a vytvořené komplexy se detekují pomocí enzymatického systému.

Příklad využití metody ELISA pro detekci specifických protilátek v plasmě:

1. Na vnitřní povrch jamek se naváže jeden reaktant (Ab)
2. Přidá se vyšetřovaný vzorek (plasma) s obsahem druhého reaktantu (Ag)
3. Přidá se tzv. konjugát (protilátka proti vyšetřovanému reaktantu – sekundární protilátka - značená enzymaticky)
4. Přidá se substrát pro enzym a detekční systém (sloučenina, která při enzymatické reakci mění barvu) a detekuje se spektrofotometricky

Konkrétní schéma použití ELISA metody pro detekci antigenu ve vzorku



Na tuhou fázi se naváže Ab.

Na ni se potom navazuje známé nebo neznámé množství antigenu.

Přidá se volná enzymem značená Ab, která reaguje s volnými hapteny antigenu imobilizovaného vazbou do komplexu s Ab.

Přidá se substrát na detekci enzymové aktivity.

ELISA: pojmy, detekce, výsledek

Konjugát: protilátka s navázaným enzymem – peroxidázou

Substrát: peroxidu vodíku

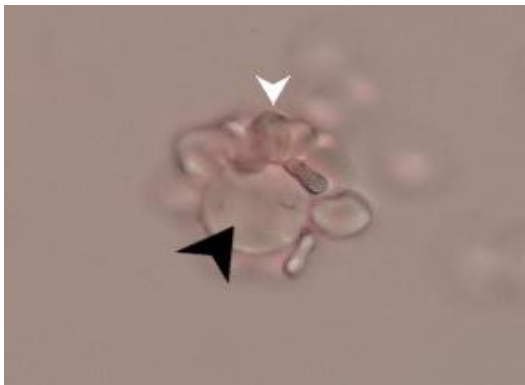
Chromogen: ortofenylen- diamin hydrochlorid = OPD. V přítomnosti peroxidu vodíku dochází ke změně barvy, která je detekovatelná na spektrofotometru

Přístroje: ELISA – reader je spektrofotometr upravený na odečítání absorbance v reakčních jamkách. Filtry jsou nastavené s volitelnou vlnovou délkou optimální pro určitý ELISA systém (obvykle mezi 405 až 570 nm) v závislosti na typu použitého konjugátu a substrátovo - chromogenním roztoku.

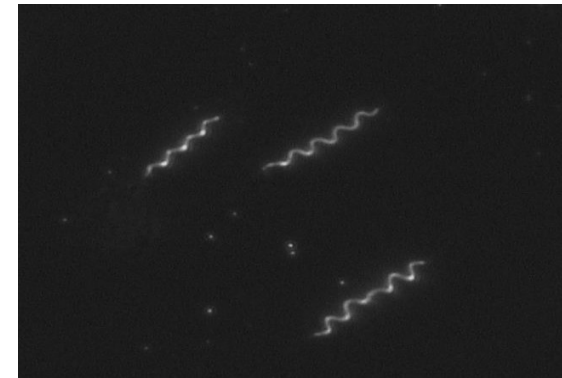
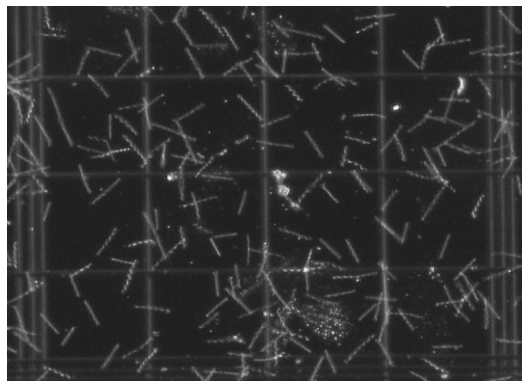


Rozetování erytrocytů způsobené *Borrelia burgdorferi sensu lato*

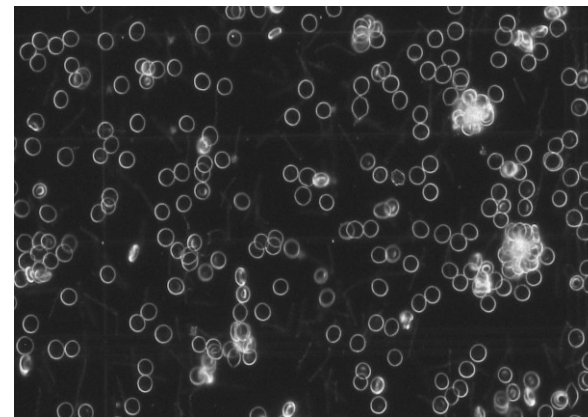
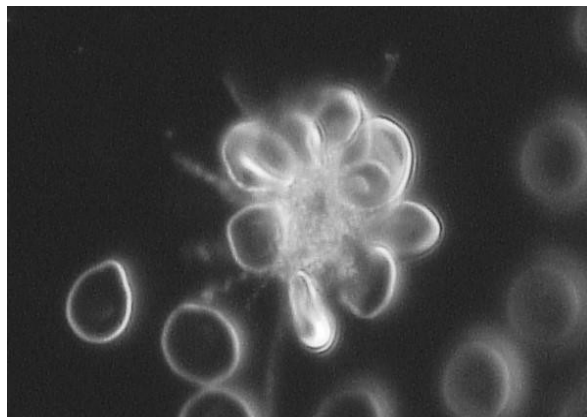
- Rozetování červených krvinek je známý jev, kdy se erytrocyty formují do shluků, které jsou pozorovatelné pomocí mikroskopu. V sedmdesátých letech 20. století byly rozetové metody velmi významné pro rozlišení, případně separaci základních subpopulací lymfocytů a pro diagnostiku leukémií.
- Dále je fenomén rozetování erytrocytů popsán při malárii, jejímž původcem je prvok *Plasmodium falciparum*. Zde se erytrocyty napadené původcem obalují zdravými erytrocyty a vzniklé rozety ucpávají kapiláry a způsobují mikroembolizace.
- Na konci 90. let minulého století bylo zjištěno, že rozety s erytrocyty tvoří i některé druhy borelií vyvolávajících návratnou horečku, např. *B. crocidurae*, *B. hispanica*, *B. duttonii* a *B. coriaceae*



Příklad rozety z erytrocytů nahloučených kolem centrální buňky

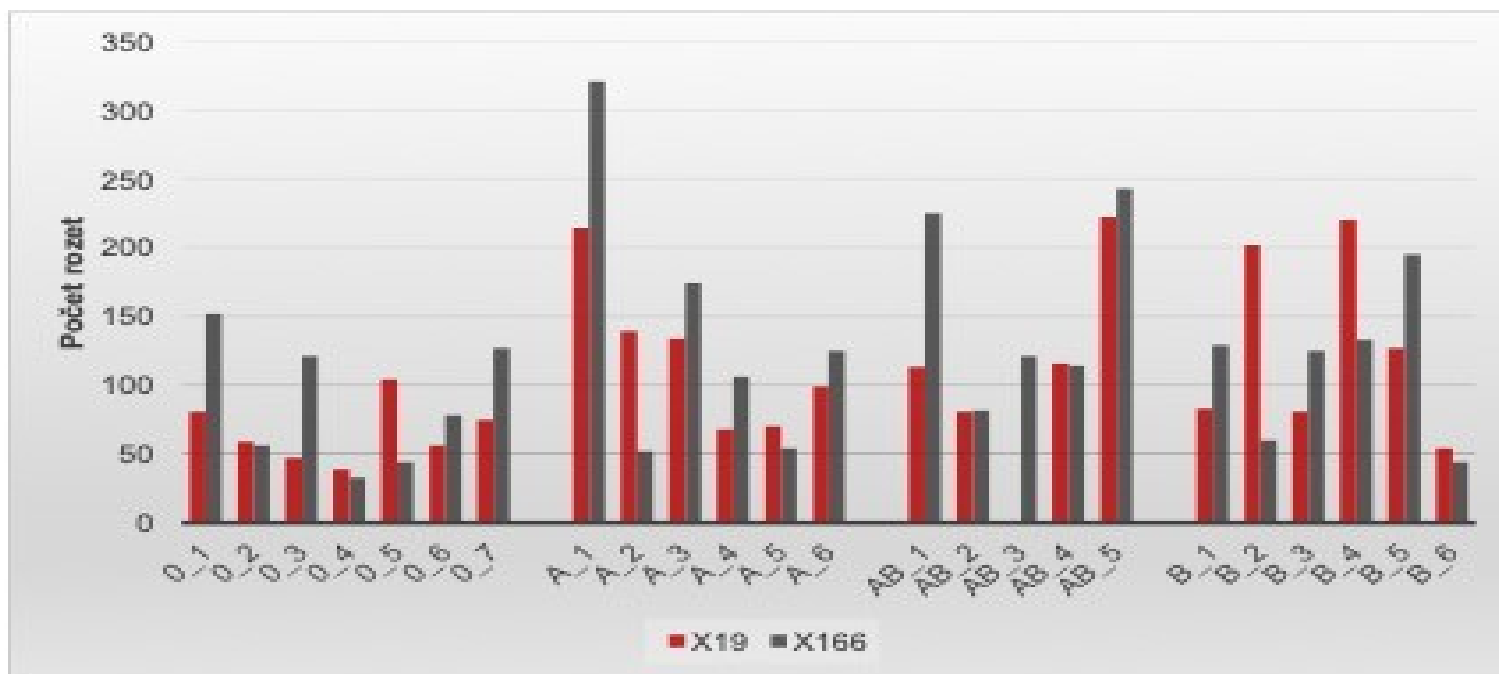


Kultury *Borrelia burgdorferi* s. l.



Rozety vzniklé při smíchání kultury borrelií s lidskými erytrocyty.
?? Fenomén rozetování může být spojen se závažnějším průběhem onemocnění ??

Otázka závislosti tvorby roset (borrelie plus erytrocyty) na krevní skupině ABO systému



Počet rozet v objemu 0,1 μ l reakční směsi u jednotlivých vzorků podle krevních skupin

Realizované závěrečné práce:

<https://is.muni.cz/auth/osoba/35892#skolitel>

V prezentaci byly použity obrázky převzaté z:

Bartůňková, Paulík a kol.: Vyšetřovací metody v imunologii, Grada Publishing, 2005

Hořejší, Bartůňková: Základy imunologie, Triton, 2002