

Imunologické laboratorní metody

POLYKLONÁLNÍ a MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY

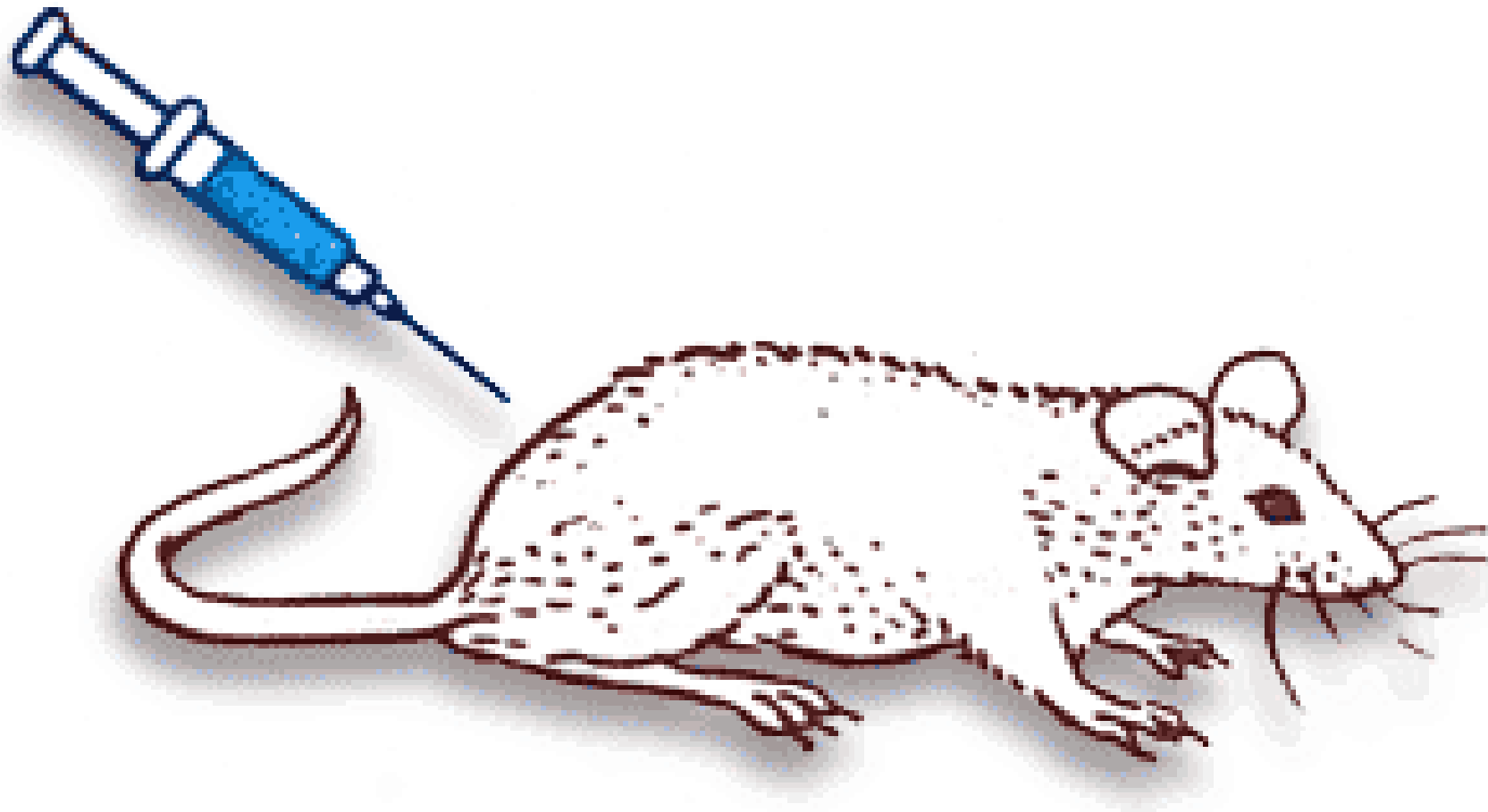
- **POLYKLONÁLNÍ PROTILÁTKY**

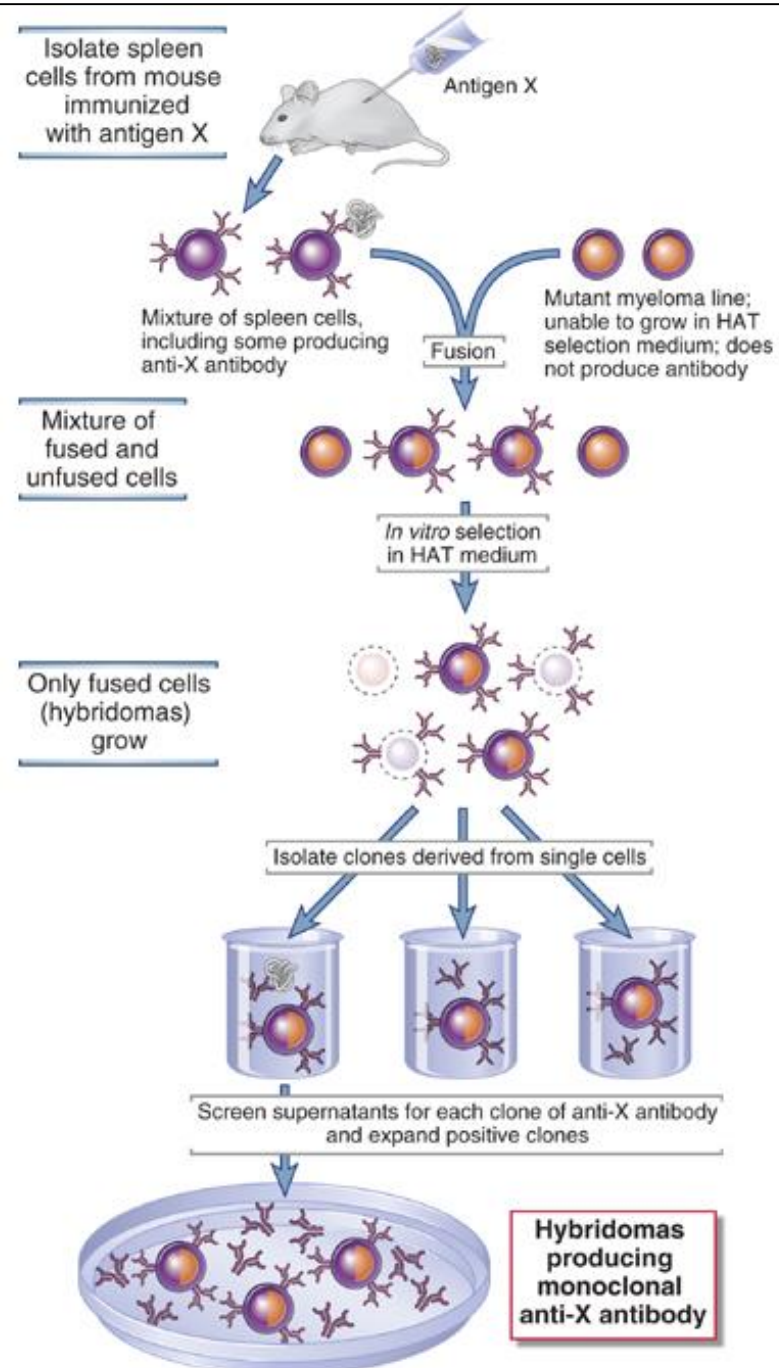
- *Směs imunoglobulinových molekul, jejichž vazebná místa nesou specifitu vůči různým epitopům na celé molekule antigenu*
- **Získávají se obvykle imunizací zvířat**

- **MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY**

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

Příprava monoklonálních protilátek



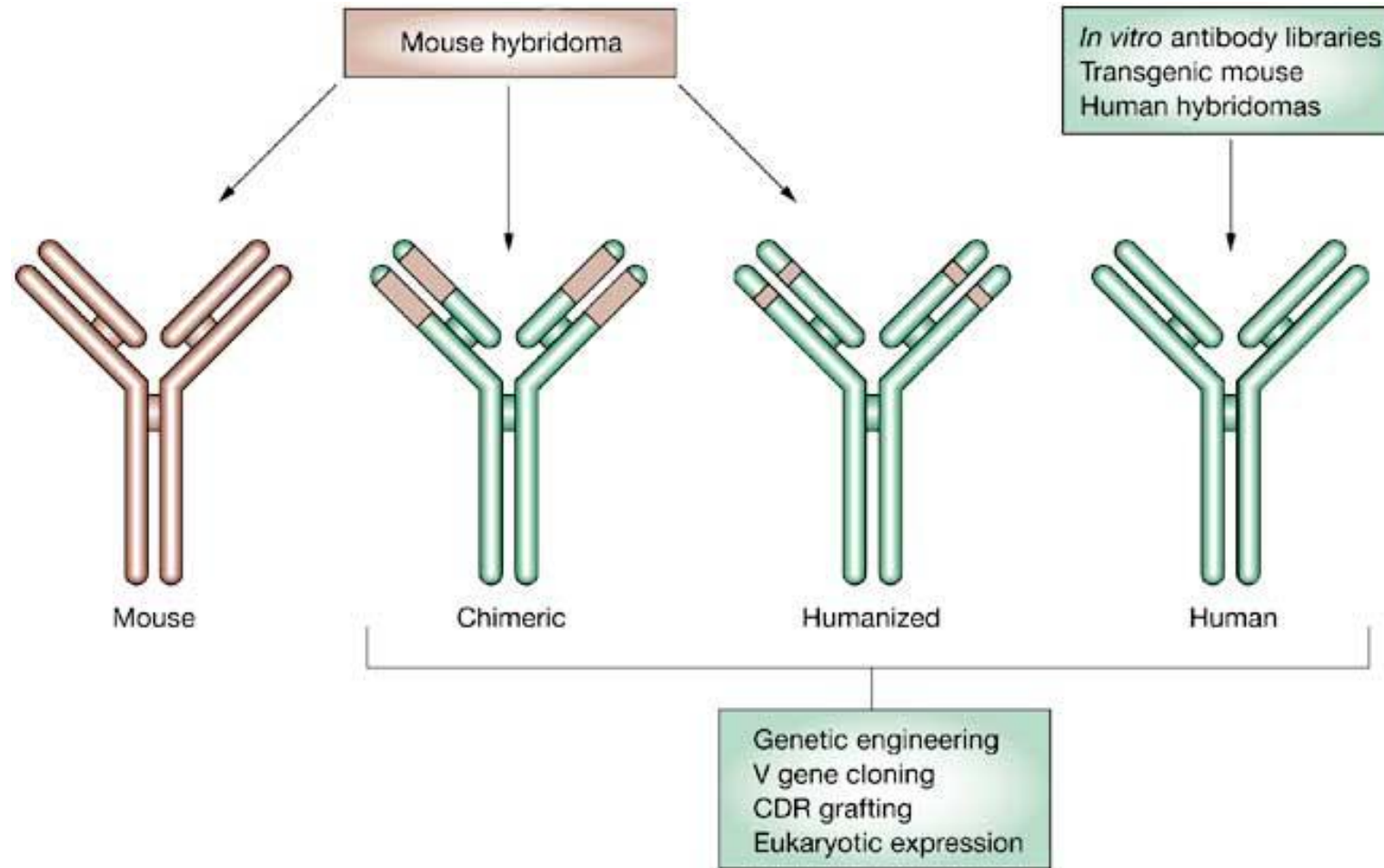


Využití monoklonálních protilátek

- V diagnostice, jedná se o vysoce specifická diagnostická agens používaná v různých oblastech především imunologie a mikrobiologie.
- V terapii, k zacílení buněk a molekul důležitých patogenezi nemocí. Tvoří velkou část tzv. biologických terapií.
- Ve výzkumu



Typy monoklonálních protilátek používaných k terapii



Hohlfeld R *et al.* (2005) Drug Insight: using monoclonal antibodies to treat multiple sclerosis; *Nat Clin Pract Neurol* 1 34-44 [doi: 10.1038/ncpneuro0016]

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- α (infliximab, adalimumab) – revmatoidní aritida, Crohnova choroba,
- **Blokáda adhezivních molekul:**
 - anti integrin α 4b1 (natalizumab) – roztroušená mozkomíšní skleróza
 - Anti-CD11a (efalizumab) - psoriáza
- **Protialergická léčba:**
 - anti-IgE (omalizumab): těžké formy astmatu

Příklady využití monoklonálních protilátek v léčbě zhoubných nádorů

- Protilátky proti anigenům bílých krvinek:
 - anti CD-20 (rituximab) léčba lymfomů,
 - anti-CD52 (Alemtuzumab) – léčba lymfomů
- Anti-receptorové protilátky:
 - anti-epidermal growth factor (receptor HER-2) (trastuzumab) – mamární karcinom
 - anti-epidermal growth factor (receptor EGFR) (cetuximab) – kolorektální karcinom

Další příklady využití monoklonálních protilátek v medicíně

- Antiagregační léčba:
 - trombocytární receptor gpIIb/IIIa (abciximab)
- Antivirová léčba:
 - RS virus (palivizumab),
 - SAR-Cov2
- Osteoporóza
 - RANKL (Denosumab)
- Hyperlipidémie
 - protein PCSK9 (alirocumab, evolocumab)
- Migréna
 - CGRP nebo jeho receptor (Eptinezumab Erenumab Fremanezumab Galcanezumab)

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 dřeň, bronchoalveolární laváž

ODBĚR MATERIÁLU K IMUNOLOGICKÉMU VYŠETŘENÍ

SEROLOGICKÁ VYŠETŘENÍ – proces získávání séra

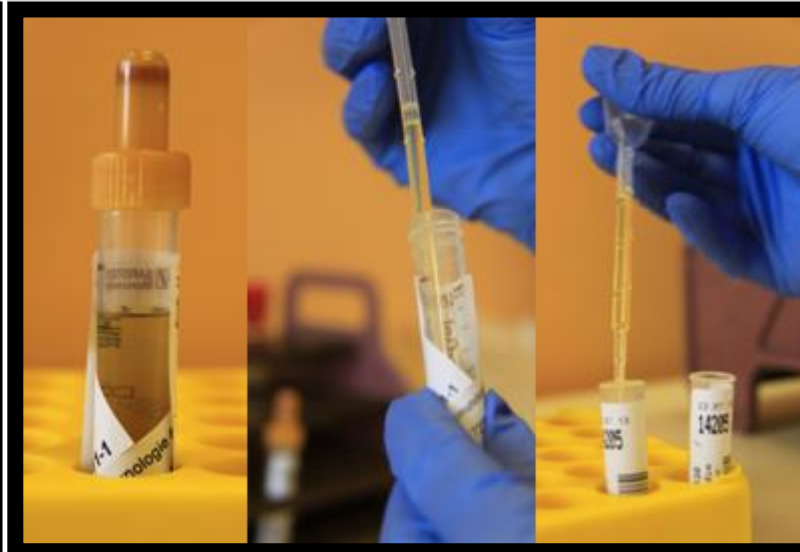
1. odběr venózní srážlivé krve



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*

PŘEHLED METOD PRO STANOVENÍ ANTIGENU NEBO PROTILÁTKY

- ***vizualizace pomocí sekundární fáze reakce***

- **AGLUTINACE** - *korpuskulární antigen (erytrocyt, bakterie, latexová částice)*
- **PRECIPITACE** - *antigen je rozpustný, molekulární*

- ***vizualizace pomocí následné detekce***

- **IMUNOFLUORESCENCE**
- **IMUNOANALÝZA** (*RIA, EIA, řada modifikací*)
- **IMUNOBLLOT, IMUNODOT**

a g l u t i n a c e

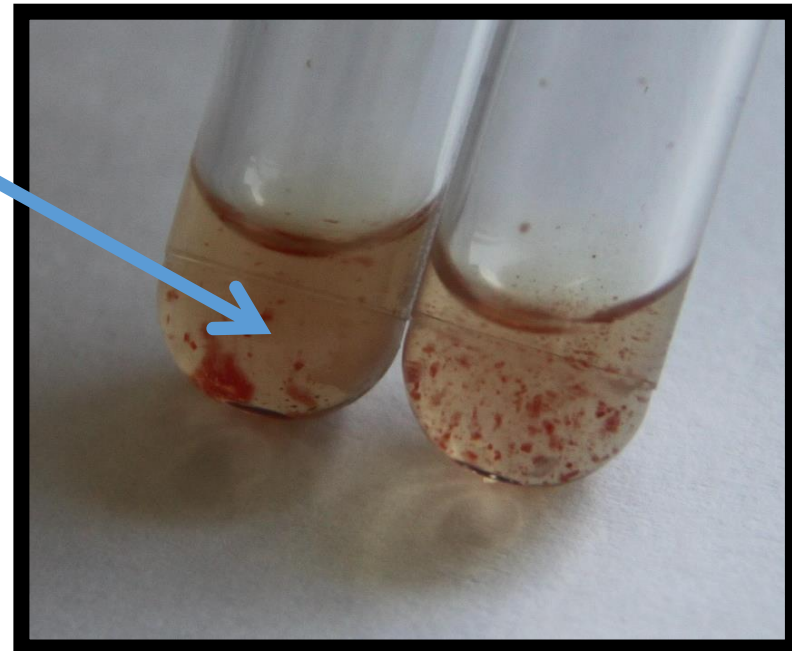
princíp reakce

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 ***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 Ii

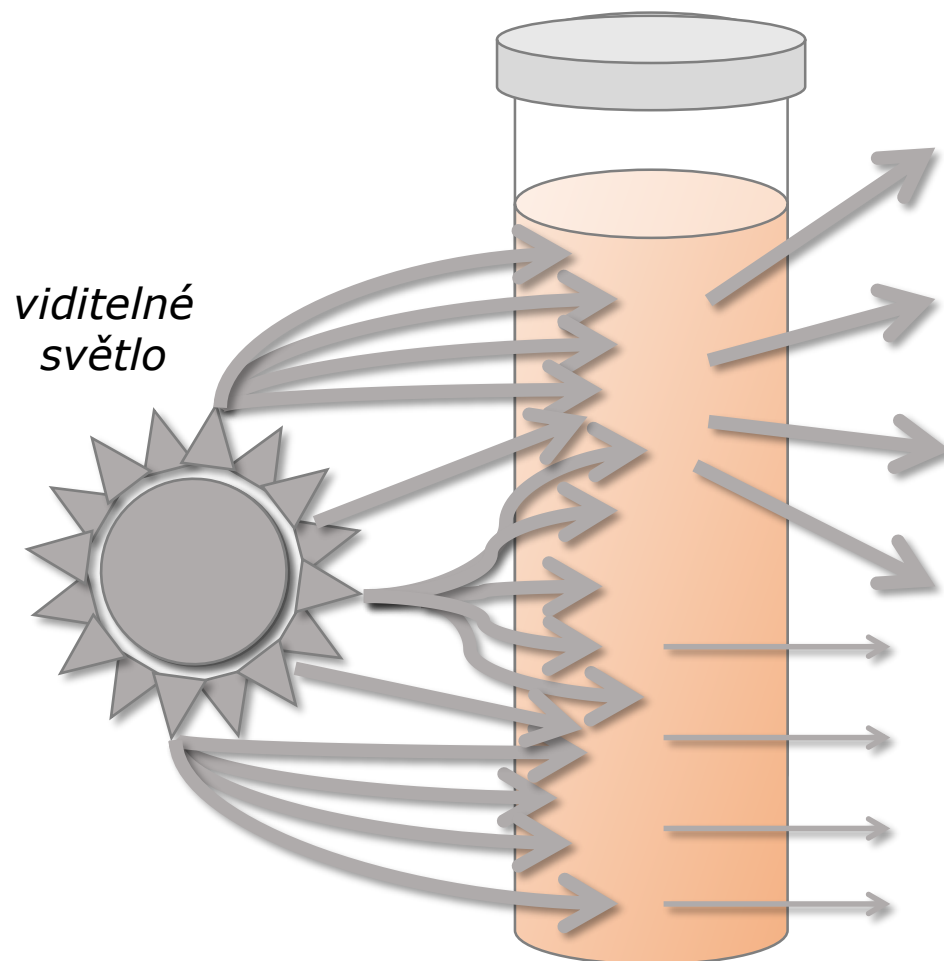
glykoproteinové

skupinový systém Rh (antigen D)

skupinový systém MNSs, Lutheran, Kell, Duffy, Diego

precipitace

... v kapalinách



NEFELOMETRIE

*měření rozptylu
viditelného světla*

TURBIDIMETRIE

měření úbytku prošlého světla

aglutinace

precipitace

ELISA

imunofluorescence

elektroforéza

imunoelektroforéza

imunofixace

Western blot

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, autoproti látek) 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

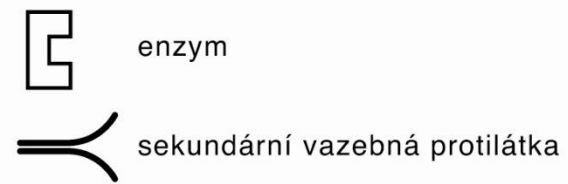
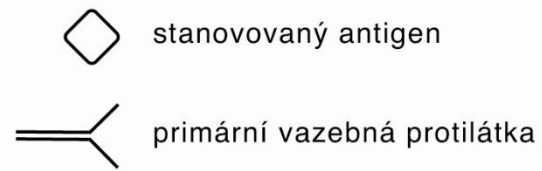
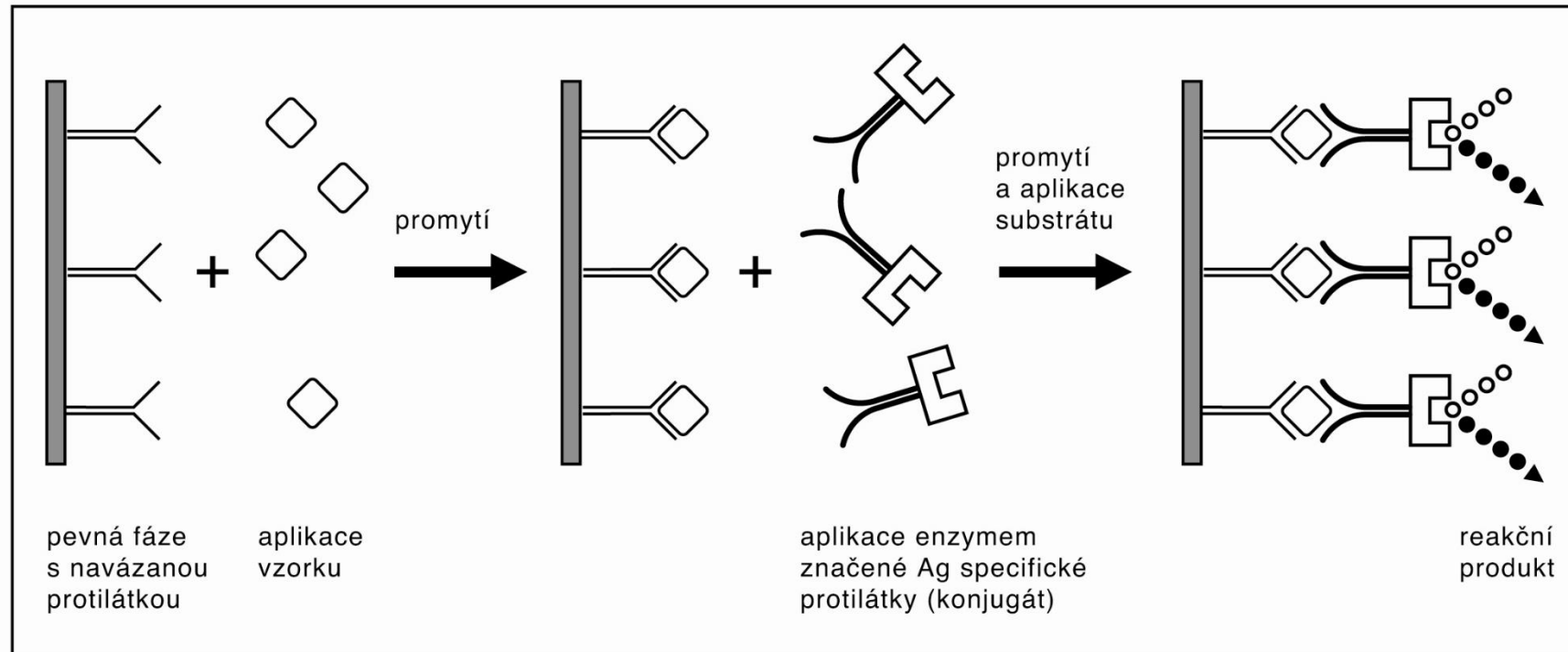
enzyme-linked immunosorbent assay

princip reakce

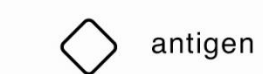
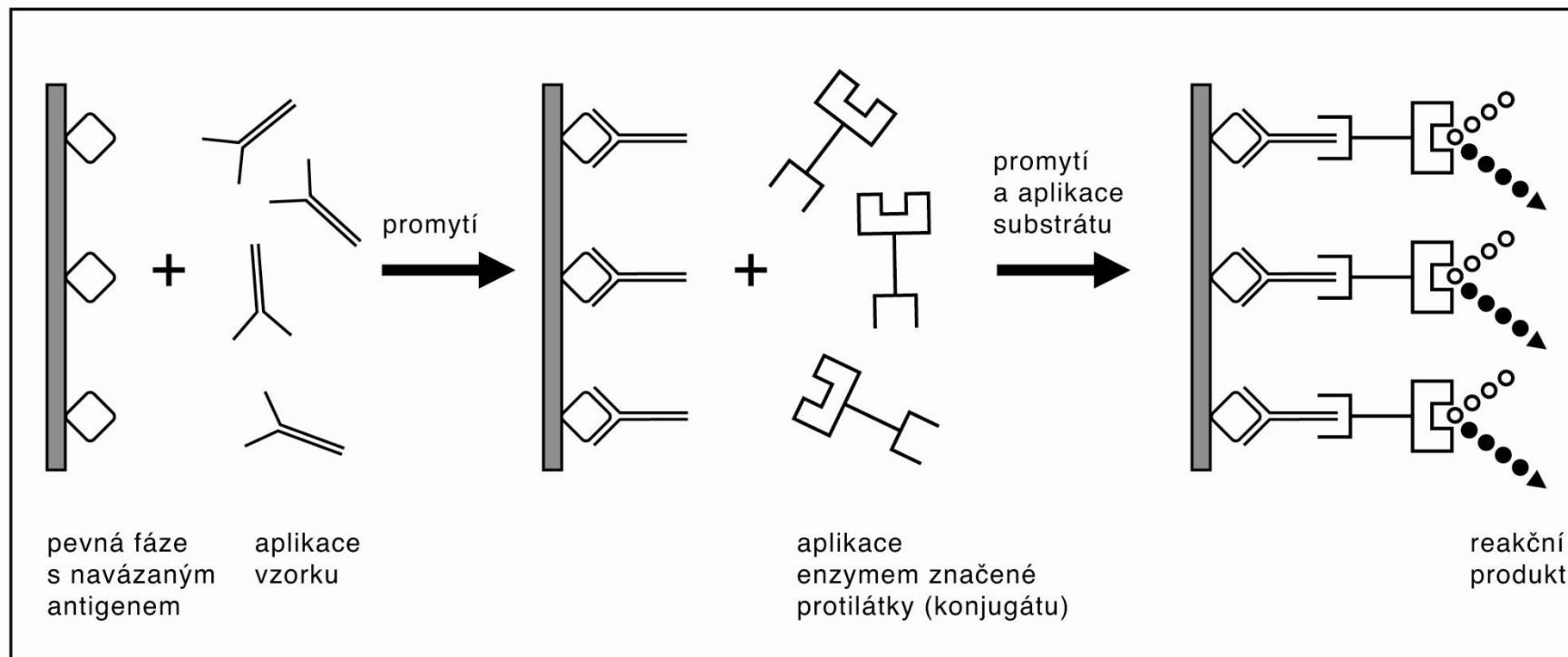
ke zjištění koncentrace antigenu nebo protilátky

- 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, králičí, ...) 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)

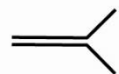
Stanovení Ag metodou ELISA



Stanovení Ab metodou ELISA



antigen



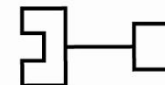
protilátka ze vzorku



enzym



protilátka proti protilátce (anti-Ig)



konjugát



bezbarvý substrát



barevný produkt

ELISA READER



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*

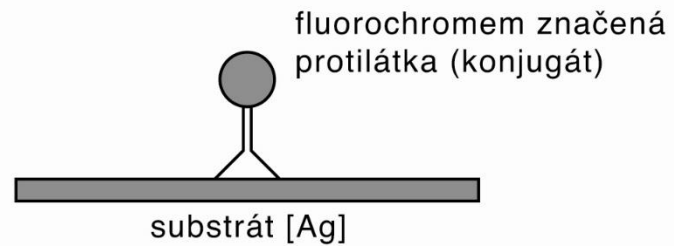
NEPŘÍMÁ IMUNOFLOURESCENCE

- *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

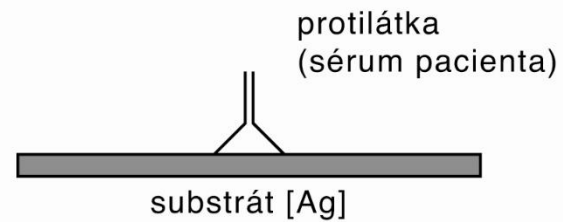
Přímá imunofluorescence

1. krok

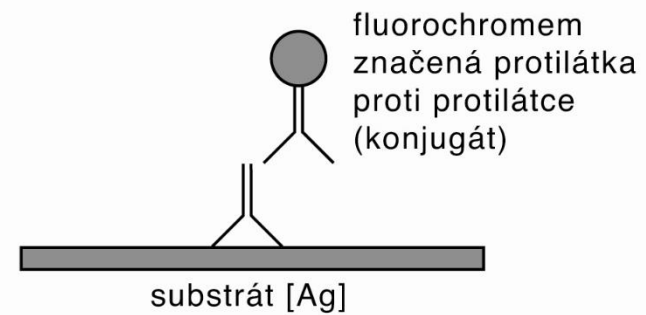


Nepřímá imunofluorescence

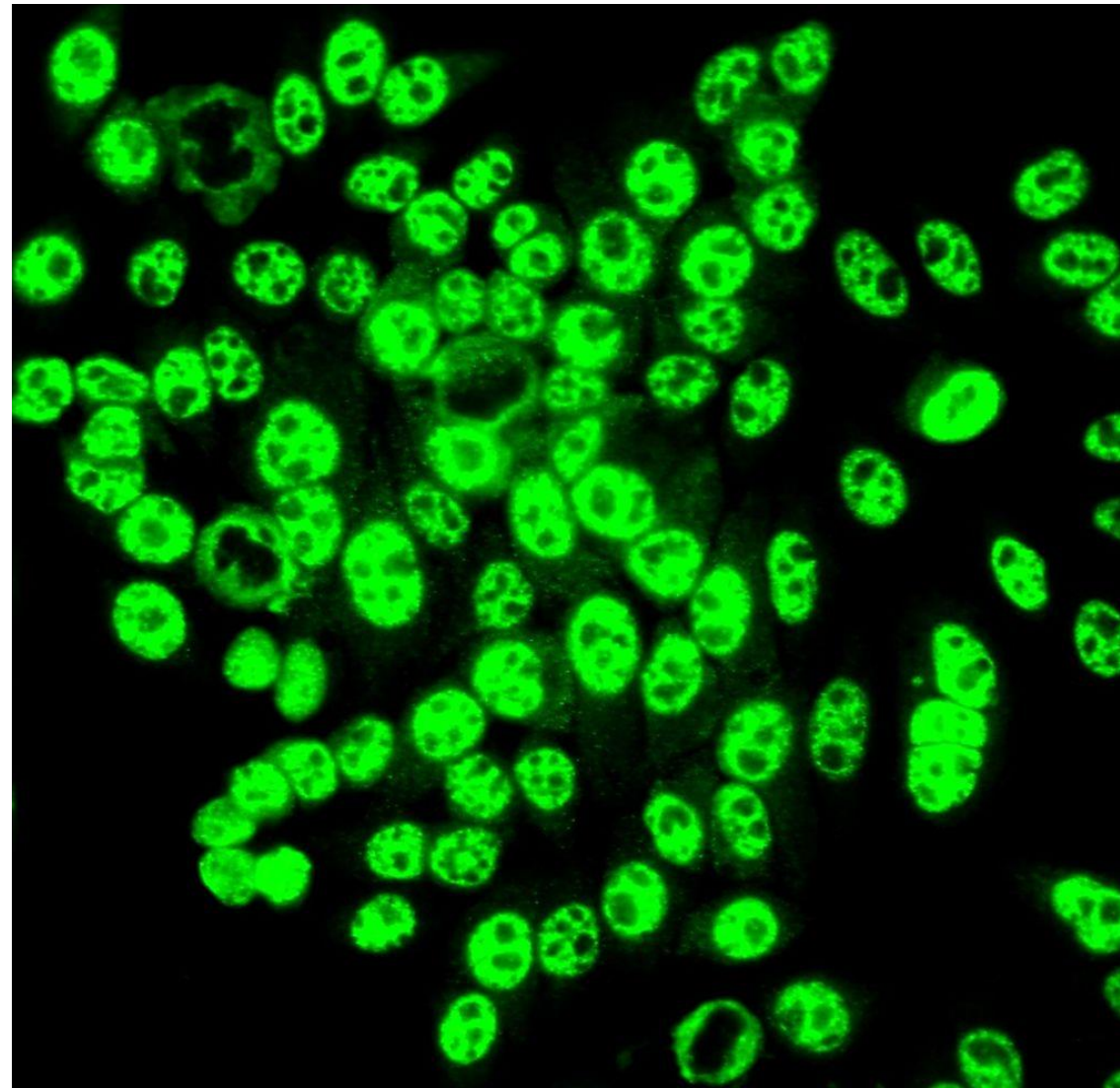
1. krok



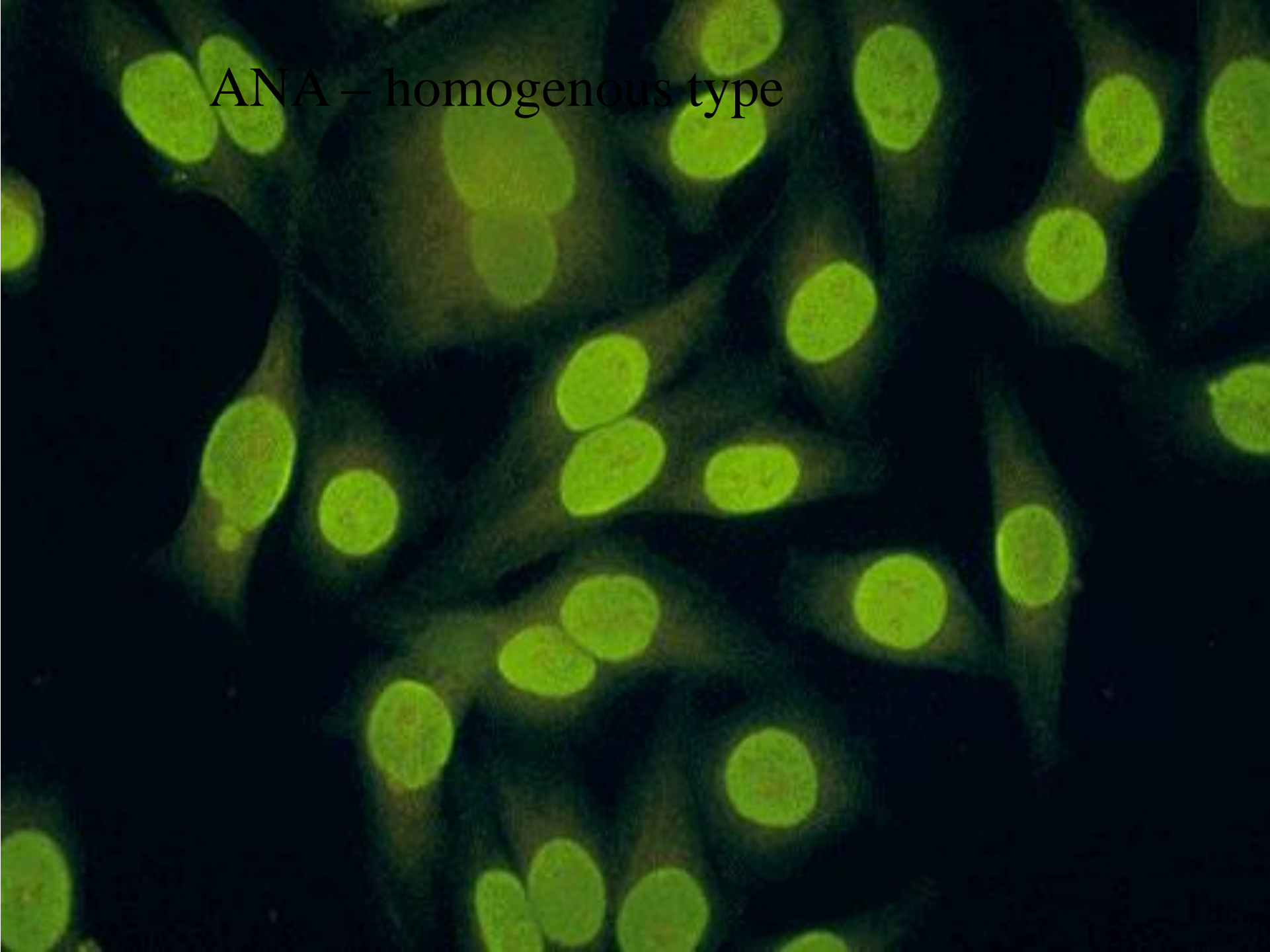
2. krok



ANA
Positive granular type



ANA – homogenous type



aglutinace

precipitace

ELISA

imunofluorescence

elektroforéza

imunoelektroforéza

imunofixace

Western blot

e l e k t r o f o r é z a

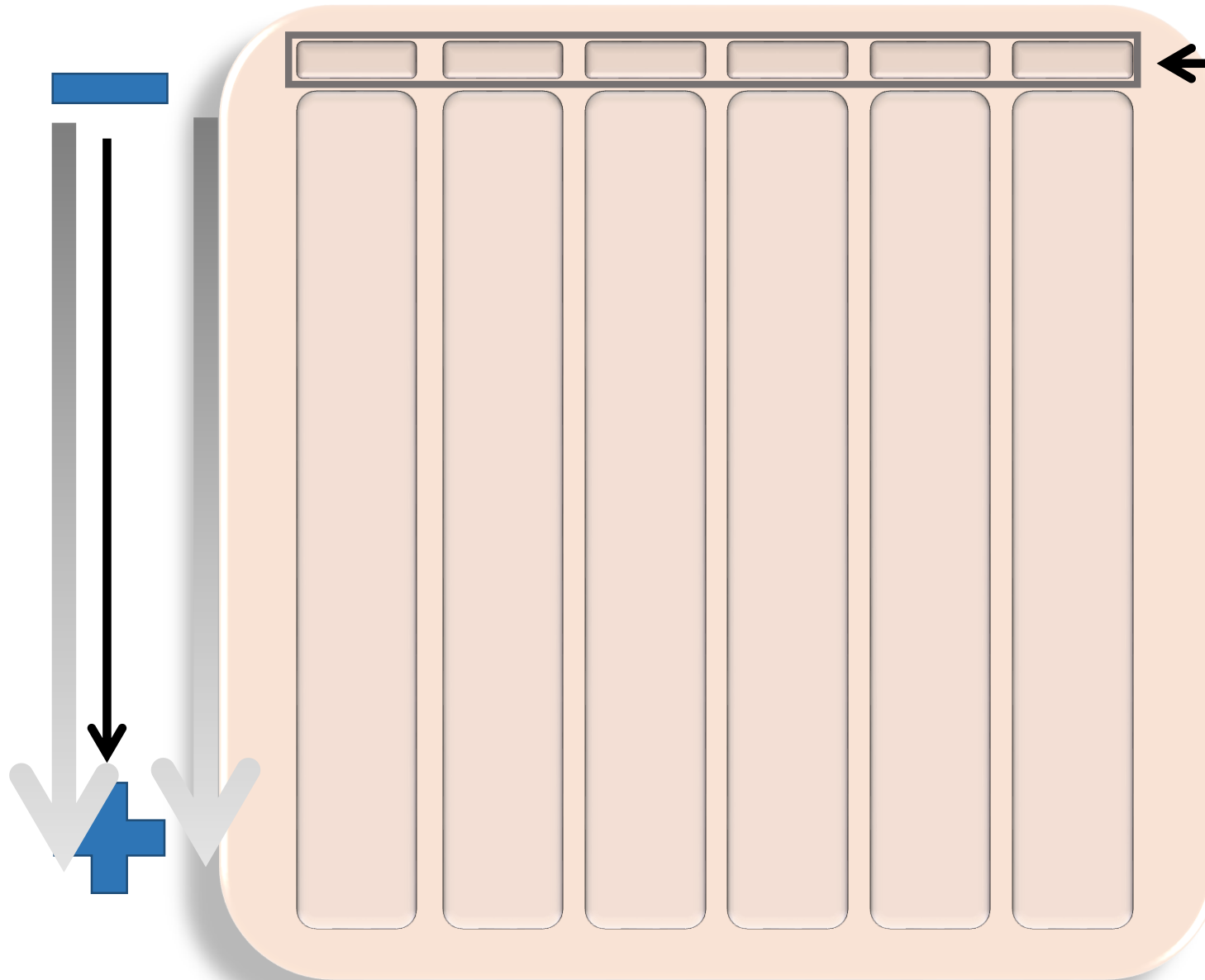
princip metodiky

- *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*

e**l**e**k**t**r**o**f**o**r**é**z**a

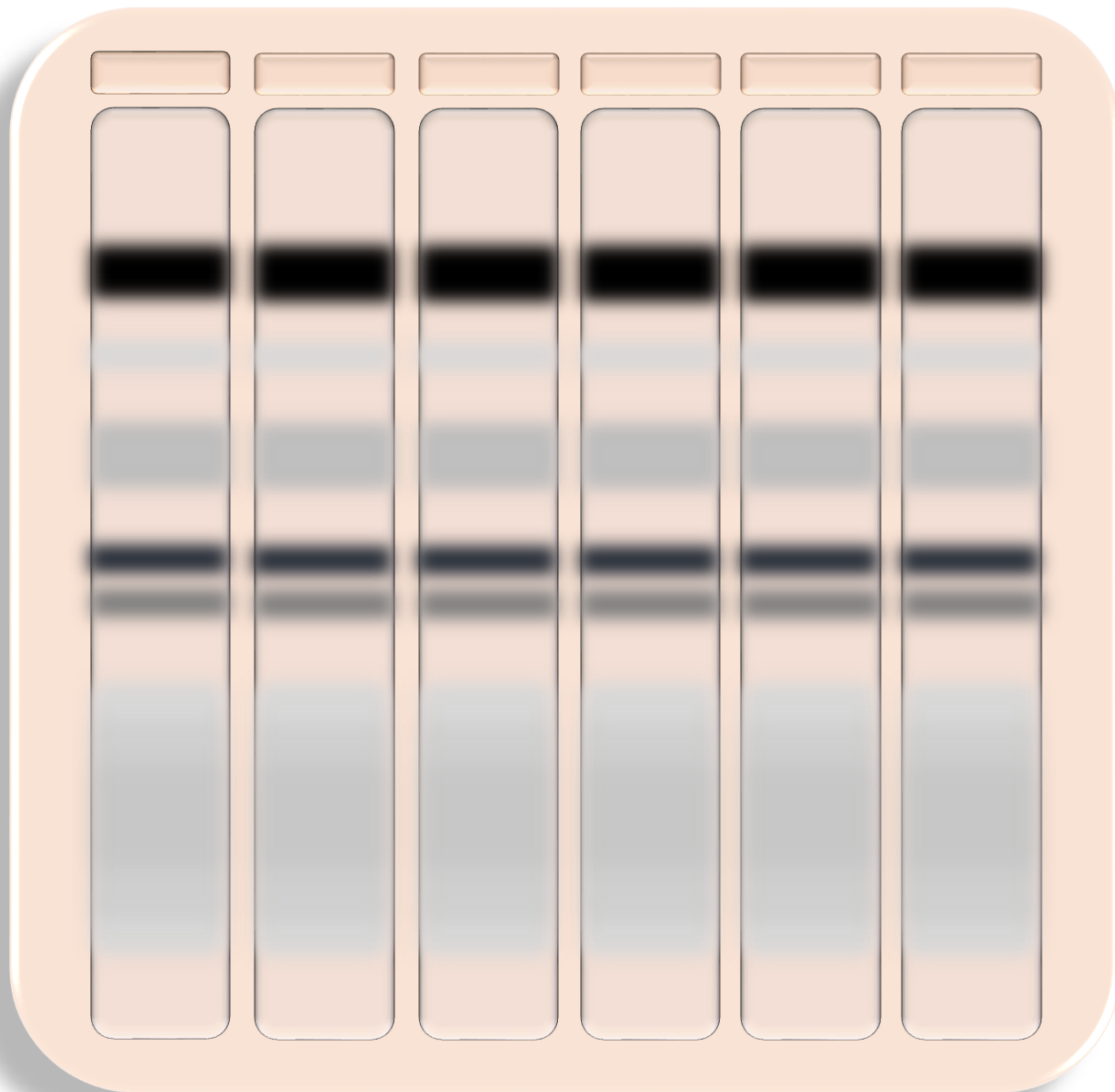


*Aplikace séra
pacientů do
elektroforetických
drah ...*



*... 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

immunoblot

princip metodiky

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

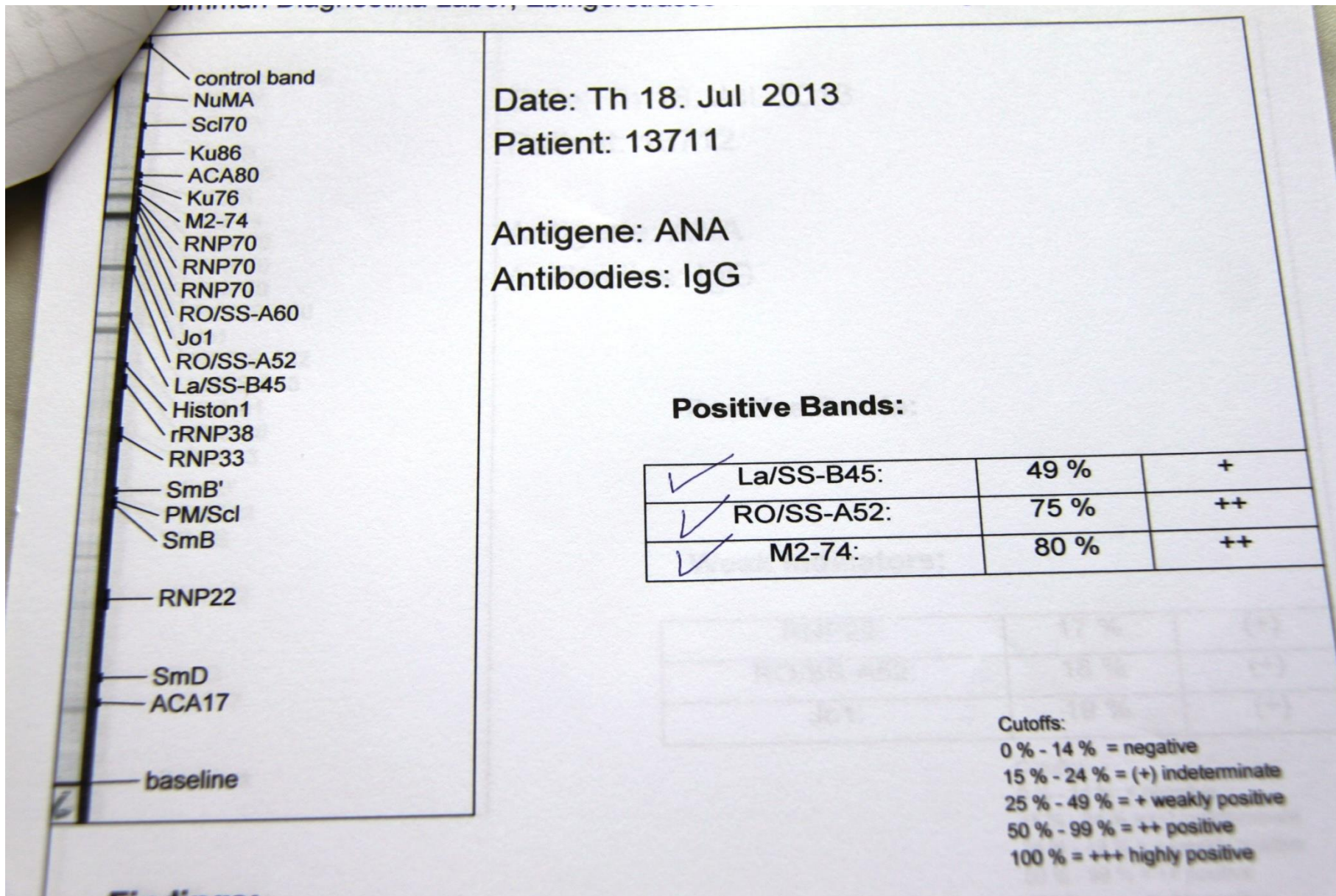
1. fáze

- *rozdělení antigenů 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 ...



Buněčné laboratorní imunologické techniky

DIFERENCIÁLNÍ KREVNÍ OBRAZ

odběr nesrážlivé krve do EDTA			
	<i>kojenci</i>	<i>děti</i>	<i>dospělí</i>
LEUKOCYTY	9 – 15 x 10⁹/l	8 – 12 x 10⁹/l	4 – 9 x 10⁹/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 400 CD znaků**
- **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 %

Vyšetření relativního a absolutního zastoupení lymfocytárních subpopulací

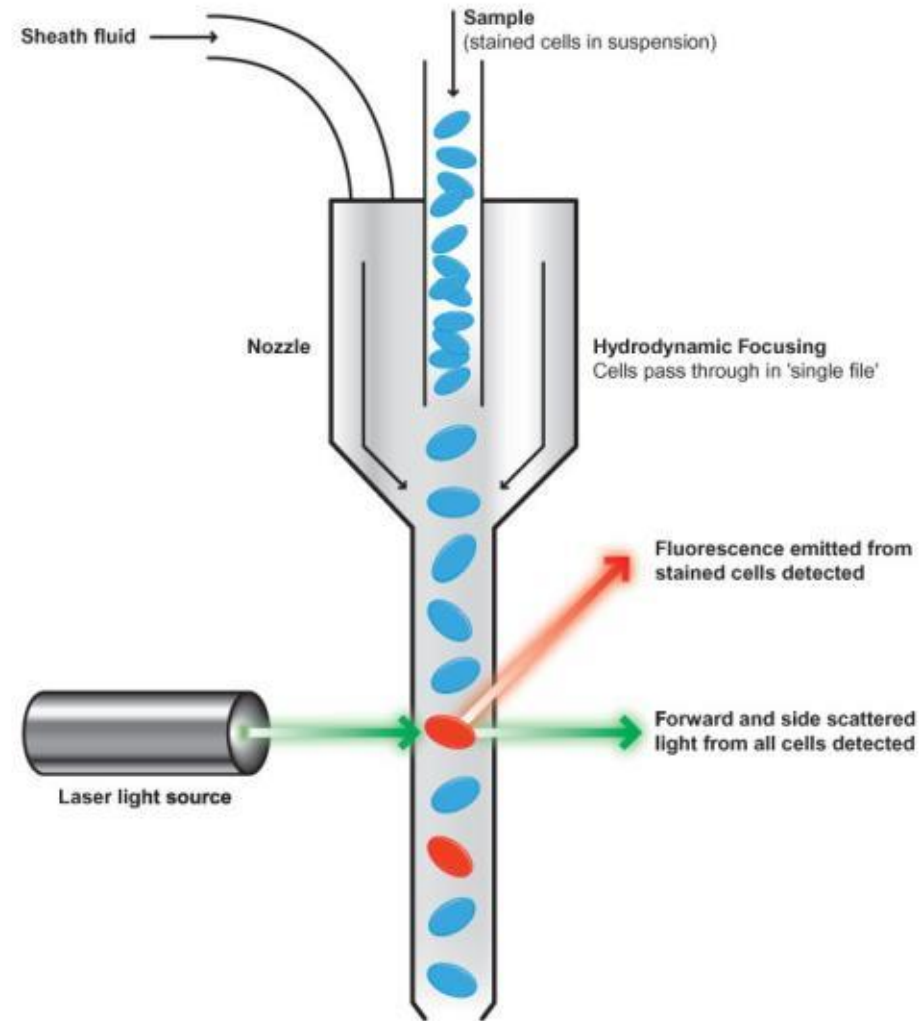
PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE

- 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

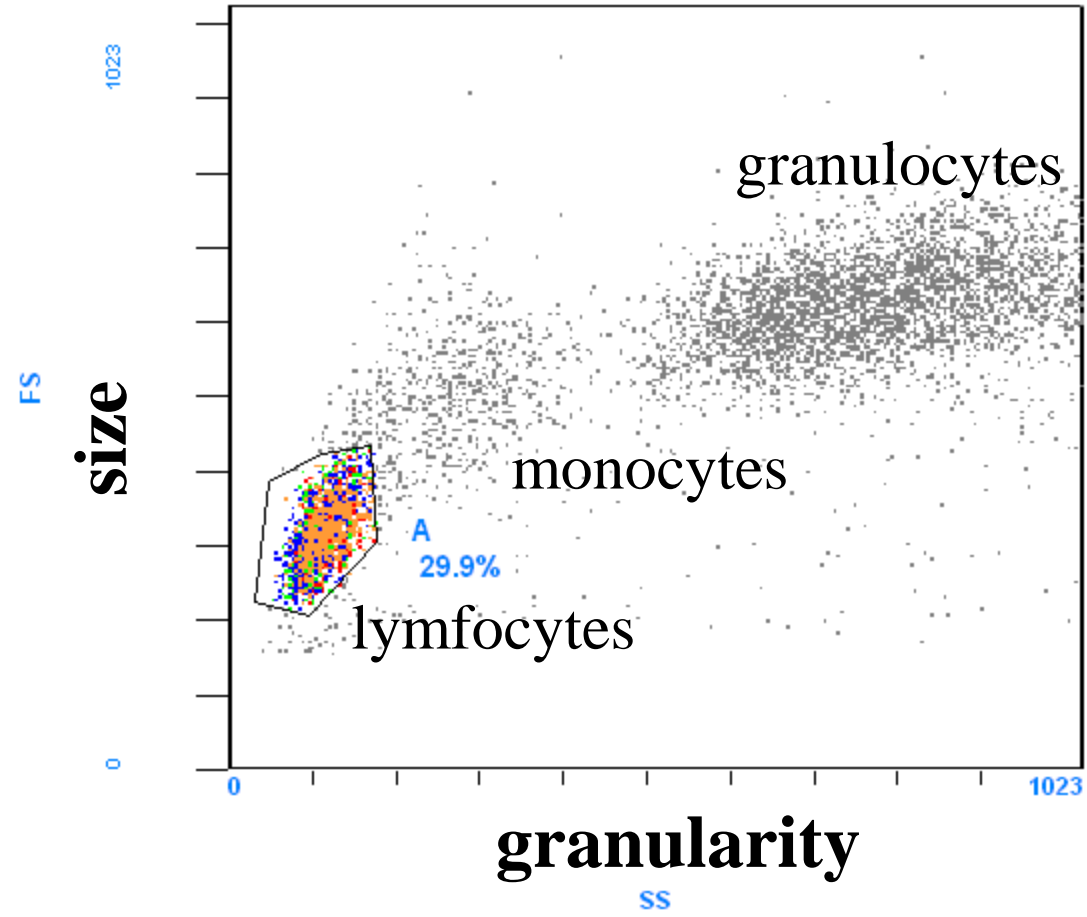
Průtokový cytometr



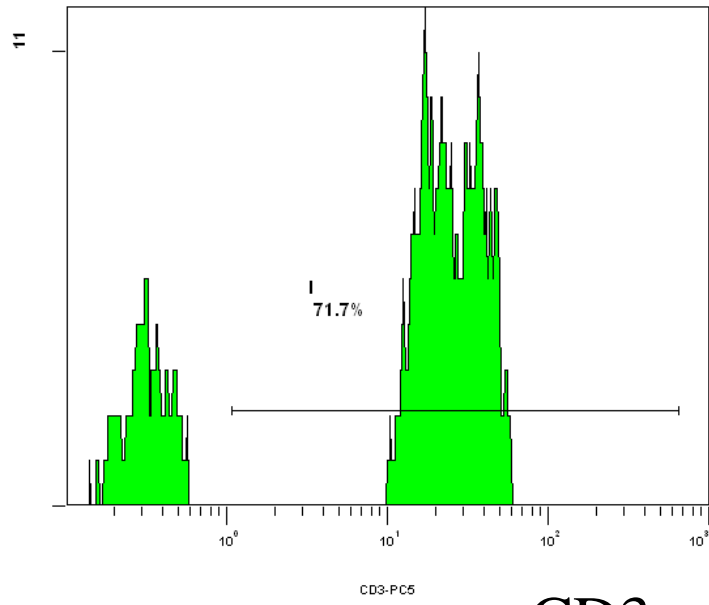
Průtoková cytometrie



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

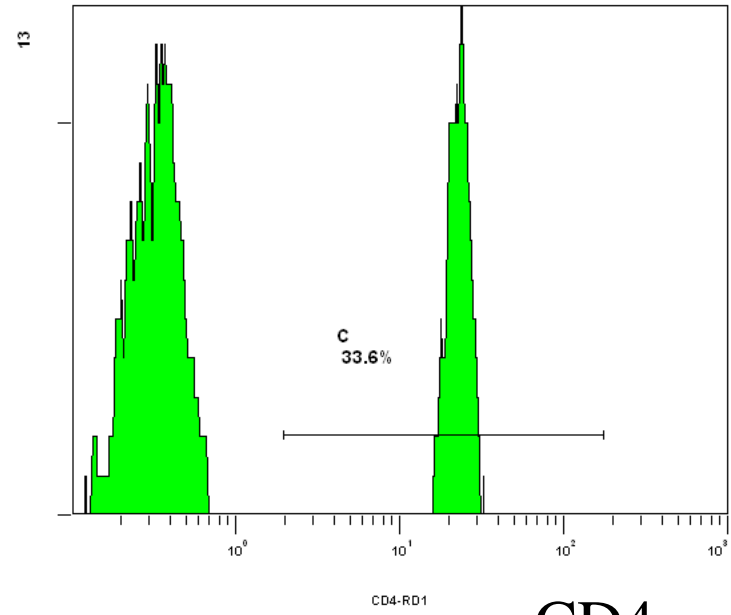


[F1][A] 20051674.LMD : FL4 LOG



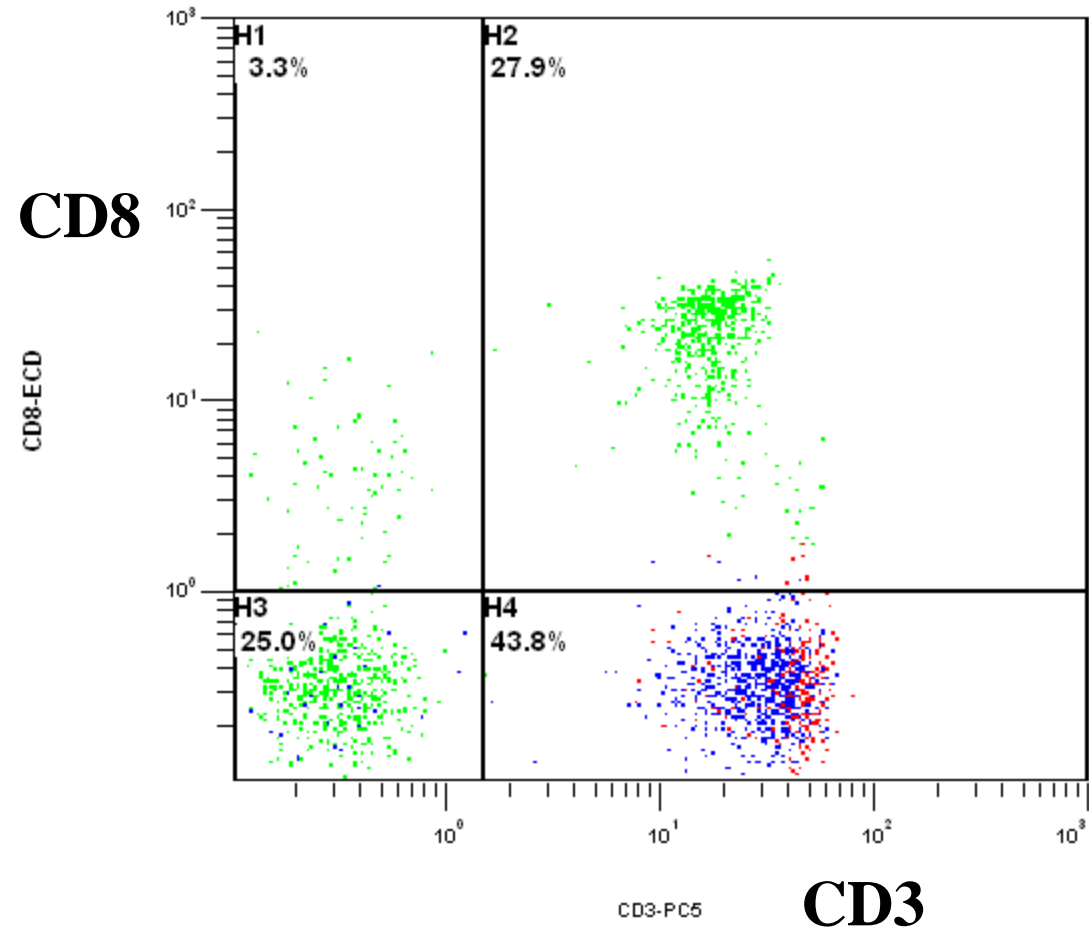
CD3

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

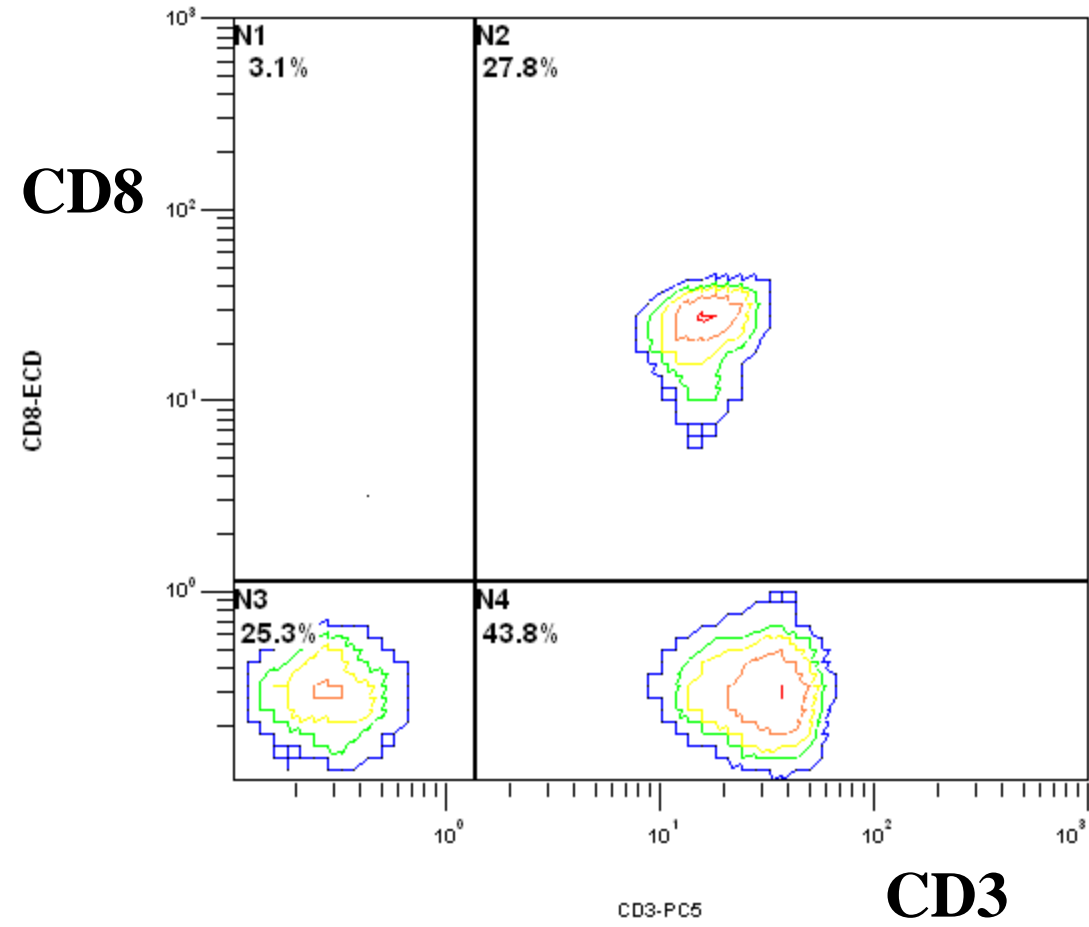


CD4

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



(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