

# PRAKTICKÁ CVIČENÍ Z IMUNOLOGIE

## Přehled tématických celků a praktických úloh:

### Histologie imunitních orgánů:

**Úloha 1:** Mikroskopování trvalých preparátů brzlíku, sleziny, tonzil, Peyerových plátů, lymfatických uzlin

### Histologie buněk imunitního systému:

**Úloha 2:** Mikroskopování krevních roztěrů savců, ptáků, ryb, plazů

### Fagocytóza a metody jejího sledování:

**Úloha 3:** Stanovení fagocytárních schopností leukocytů krve in vitro za pomoci hydrofilních partikulí MSHP

**Úloha 4:** Stanovení fagocytárních schopností leukocytů krve in vitro metodou chemiluminiscence

### Elektroforetické metody:

**Úloha 5:** Raketová elektroimunodifúze podle Laurella

### Imunodifúzní metody:

**Úloha 6:** Stanovení lysozymu metodou jednoduché radiální difuze

### Metody stanovení protilátek:

**Úloha 7:** Turbidimetrické stanovení celkových Ig a IgG

**Úloha 8:** Dvojitá radiální imunodifúze podle Ouchterlonyho

### Metody separace buněk:

**Úloha 9:** Izolace lymfocytů

### Metody sledování komplementového systému:

**Úloha 10:** Stanovení bakteriolytické aktivity komplementu chemiluminiscenčně

### Hemaaglutinační metody:

**Úloha 11:** Stanovení antigenů krevních skupin za použití bromelinu

### Metody sledování imunity bezobratlých:

**Úloha 12:** Sledování mikrobicidních faktorů hemolymfy

Zásady správné laboratorní praxe ve cvičení z imunologie

Práce s potenciálně nebezpečným biologickým materiálem

Obecné laboratorní postupy, pipetování, hematologické postupy

## Histologie imunitních orgánů

**Lymfatický cévní systém:** v rámci lymfatického řečiště lze podle velikosti a struktury cévní stěny rozlišit: lymfatické kapiláry, lymfatické cévy a lymfatické kmeny. Všechny tyto struktury slouží k odvodu tekutiny – lymfy z tkáňových prostor a navrácení této tekutiny do krevního oběhu, což se děje v místě tzv. hrudního mízovodu, kde lymfy ústí do dolní duté žíly. Tok lymfy na rozdíl od toku krve se uskutečňuje pouze jedním směrem a to k srdci. Pohyb lymfy je zajišťován součinností chlopní, stahů svalstva ve stěně cévy a kontrakcemi okolní tkáně

**Lymfatické kapiláry:** začínají v tkáních jako slepě zakončené tenké cévy, vystlané pouze jednou vrstvou endotelu. Stěna lymfatické kapiláry není tak kompaktní jako je tomu u krevní kapiláry. Bazální lamina jako extracelulární struktura je vytvořena pouze místy a soudržnost celého útvaru lymfatické kapiláry je zajišťována mikrofibrilami, které endoteliální buňku upevňují k okolnímu pojivu. Díky těmto mikrofibrilám jsou možné i určité kontrakce endoteliálních buněk, což napomáhá vstupu tekutiny z tkání do lymfatického řečiště.

**Lymfatické cévy:** jejich stěna je podobná stěně žil, není ale patrné rozdělení na tři zřetelné vrstvy (intima, medie, adventicie). Jednosměrný tok lymfy je zajištěn četnými chlopněmi, přičemž úseky mezi chlopněmi bývají často rozšířeny, takže lymfatická céva vizuálně připomíná korálky navlečené na šňůrce. Podél větších lymfatických cév se nacházejí lymfatické uzliny, často ve větším počtu. Lymfatické cévy se vyskytují ve všech tkáních s výjimkou nervové tkáně a kostní dřene.

**Lymfatické kmeny:** mají opět stavbu podobnou větším cévám, je zde vyvinuta i hladká svalovina ve střední vrstvě. Podobně jako u větších krevních cév je zde vyvinuto krevní zásobení cévní stěny, tzv. vasa vasorum (cévy cév) a stěna je rovněž inervována pletením nervů.

**Imunitní orgány:** rozdělují se zpravidla na primární neboli centrální – brzlík a kostní dřeň, kde vznikají T a B lymfocyty a sekundární neboli periferní, kam lymfocyty cestují a kde dokončují pod vlivem antigenů svůj vývoj (mandle, Peyeroovy plaky, slezinu, lymfatické uzliny, apendix). Základem struktury těchto orgánů je síť tvořená tzv. retikulárními buňkami a vyplněna různými typy buněk imunitních, tedy imunocyty. Větší imunitní orgány mají základní síť výrazněji vyvinutou, s výjimkou brzlíku je tato síť tvořena retikulárním pojivem mesenchymového původu. Zastoupení imunocytů není ve všech imunitních orgánech stejné, lze říci, že v daném imunitním orgánu bývá zastoupeno vždy více typů resp. diferenciacních stádií buněk, přičemž v určité oblasti orgánu určitý typ buněk převládá.

**Thymus:** primární lymfatický orgán, je původu mezenchymálního (lymfocyty) a endodermálního (epitelové buňky). Vzniká v oblasti 3. a 4. žaberního oblouku.

Struktura: thymus je obalen vazivovým pouzdrém, ze kterého vybíhají směrem dovnitř orgánu přepážky a tyto oddělují jednotlivé lalůčky thymické tkáně. Každý lalůček je tvořen vnější vrstvou (kůra – cortex) a centrální světlou oblast, nazývanou dřeň – medulla)

Nosnou strukturou kůry jsou epitelální buňky, hvězdicovitého tvaru s velkými oválnými jádry, která se jeví jako světlá. Tyto buňky obsahují v cytoplasmě cokeratinová fibrily, což dokládá jejich epitelální původ. Jsou spolu spojeny desmosomy na koncích cytoplasmatických výběžků. Mezi touto nosnou sítí epitelálních buněk se nachází imunocyty, přičemž převládajícím typem v brzlíku jsou lymfocyty. V kůře převládají malé lymfocyty, v dřeni potom střední a velké, které mají větší podíl cytoplasmy, proto se dřeň jeví ve světelném mikroskopu světlejší než kůra. V dřeni se nachází tzv. Hassalova tělíska, tvořená koncentricky uspořádanými oploštělými elementy retikulárních buněk, které se ve středu tělíska rozpadají na bezbuněčnou hmotu. funkce těchto tělísek je stále sporná.

Cévní a lymfatické zásobení: cévy vstupují i vystupují přes pouzdro, lymfatické aferentní cévy zde nejsou – thymus lymfu nefiltruje!! pouze se zde tvoří malé množství lymfy, které thymus opouští eferentními lymfatickými cévami. V oblasti kůry se mezi krevními cévami a tkání thymu nachází tzv. hematothymická bariéra, která brání průniku antigenů do kůry thymu, v dřeni tato bariéra není vyvinuta.

Thymus je vzhledem k celkové velikosti těla největší po narození, zhruba od puberty u člověka involuje a je postupně nahrazován tukovou tkání.

Koloběh T lymfocytů: vznikají v kostní dřeni, krví se dostávají do kůry thymu, následně do dřene, v průběhu této doby dochází k jejich maturaci (dozrání a „imunologickému vyškolení“). Odtud putují lymfocyty do sekundárních lymfatických orgánů, do tzv. thymus závislých oblastí těchto orgánů, konkrétně do parakortikální oblasti lymfatických uzlin, do periarteriálních pochev v bílé pulpě sleziny, do Peyerských plaků aj.

V thymu jsou dále produkovány tzv. thymové hormony – thymosiny, které působí jako růstové a diferenciatní faktory lymfocytů.

**Lymfatická uzlina:** sekundární lymfatický orgán kulovitého až oválného tvaru, nachází se podél větších lymfatických cév, přičemž nahromaděny jsou zejména v tříselech, axile, v hrudní a břišní dutině, podél cév v oblasti krku apod.

Základní funkcí je filtrace lymfy: všechny lymfy, která vzniká ve tkáních z tkáňového moku musí projít aspoň jednou uzlinou, než je navracena do krevního oběhu.

Struktura: na povrchu se nachází vazivové pouzdro, na vkleslé straně uzliny se nachází tzv. hilus – místo vstupu cév. Vazivové pouzdro vytváří podobně jako v thymu přepážky směrem dovnitř uzliny. vlastní tkáň uzliny je rozlišena na zevní a vnitřní kůru a dřev. Zevní korová oblast se nachází pos vazivovým obalem, na jejím povrchu je vytvořen tzv. subkapsulární sinus, na který navazuje intermediální sinus a posléze dřevové siny. Těmito siny se rozlévá lymfa která do uzliny vstupuje přes pouzdro a jako první vstupuje do subkapsulárního sinu. Do lumen těchto sinů zasahují výběžky antigenprezentujících buněk, které vycytávají antigeny lymfou přinášení. Očištěná lymfa se sbírá do eferentních lymfatických cév a v místě hilu opouští uzlinu. Krevní cévy vstupují a vystupují v místě hilu. Nejdůležitějším útvarem zevní korové oblasti jsou lymfatické uzlíky, tvořené velkým množstvím lymfoidních buněk a také nosnými buňkami lymfatické tkáně, což jsou retikulární buňky mezenchymového původu. vnitřní korová vrstva obsahuje méně lymfoidních buněk a uzlíky se zde nevyskytují. Dřev je tvořena dřevovými provazci, mezi nimiž se nacházejí volné prostory vyplněné lymfou – dřevové siny. Převládajícím buněčným typem v dřevu jsou antigen prezentující buňky – dendritické buňky, případně makrofágy.

Princip imunitní reakce v uzlině spočívá v tom, že antigeny obsažené v lymfě se při průtoku lymfy uzlinou zachycují fagocytózou v APC buňkách, poté jsou prezentovány lymfocytům, které pod jejich vlivem proliferují a diferencují do stadia plasmatických buněk nebo imunokompetentních T lymfocytů. Proces proliferace a diferenciac se uskutečňuje právě v lymfatických uzlicích. Pokud v uzlině probíhá intenzivní imunitní odpověď, uzlina až několikanásobně zvětšuje svůj objem a uzlíky nabývají charakteru tzv. sekundárních uzlíků a vnitřní světlejší oblasti. Tato centra jsou tvořena právě plasmatickými buňkami schopnými produkovat protilátky. Lymfocyty opouštějí lymfatické uzliny cestou eferentních lymfatických cév, které ústí do krevního oběhu a mají schopnost se prostřednictvím krevních cév dostat znovu zpět do příslušné uzliny. Takto mohou lymfocyty kolovat v organismu.

**Slezina:** u člověka představuje největší lymfoidní orgán, dochází zde především ke kontaktu velkého množství fagocytujících buněk s krví, proto se slezina označuje někdy také jako „krevní filtr“. Další důležitou funkcí se destrukce erytrocytů a produkce aktivovaných lymfocytů, které zde proliferují a dozrávají. Ve slezině dochází také k tvorbě protilátek plasmatickými buňkami.

Stavba: na povrchu se nachází vazivový obal – pouzdro, které podobně jako u již popsaných orgánů vysílá přepážky - trabekuly směrem do nitra sleziny. Vnitřní hmota sleziny se nazývá parenchym neboli pulpa. Na mediálním povrchu je vytvořen hilus, kde vstupují arteria a vystupuje vena a vystupuje také eferentní lymfatická céva. Nosné elementy sleziny jsou retikulární buňky, z imunocytů jsou zastoupeny: lymfoidní buňky, makrofágy a antigen prezentující buňky.

Slezinnou pulpu je možné i pouhým okem na čerstvém materiálu rozlišit na bílou a červenou pulpu. V bílé pulpě se nacházejí lymfatické uzlíky podobě jako v kůře lymfatických uzlin, červená pulpa je tvořena vazivovými strukturami tzv. Billrothovými provazci, mezi nimiž se nacházejí krevní siny.

Krevní oběh: tepenný oběh vychází z arterie lienalis, která se po vstupu do hilu sleziny větví a v trabekulách vstupuje směrem dovnitř orgánu. V místech, kde arteriální větve trámce opouští a vstupují do parenchymu jsou obaleny bílou pulpou ve které převládají lymfocyty. Tyto oblasti se nazývají periarteriální lymfatické pochvy. Arteriální řečiště potom přechází do krevních sinů v červené pulpě a následně je sbírána do žilního řečiště, které prostřednictvím vena linealis vystupuje v hilu ven. Mezi bílou a červenou pulpou se nachází tzv. marginální zóna, která obsahuje málo lymfocytů, zato velmi mnoho makrofágů a APC buněk. Zde se uskutečňuje hlavní část antigenní „filtrace“ krve. Zachycené antigeny jsou prezentovány lymfocytům, které zde mohou přestupovat z arterií do pulpy, aktivovat se a proliferovat v místech lymfatických uzlíků. Jsou zde tedy přítomny APC buňky, T i B lymfocyty a může zde být účinně realizována imunitní odpověď. Vznikající protilátky jsou odváděny žilním řečištěm do oběhu. V bílé pulpě sleziny lze rozlišit oblasti osídlené převážně T lymfocyty – periarteriální pochvy a oblasti s převahou B lymfocytů – marginální zóna a periferní bílá pulpa. Červená pulpa je histologicky tvořená retikulární tkání a vysokým obsahem retikulárních vláken.

**Tonzily (mandle):** jsou složeny z částečně opouzdřené lymfoidní tkáně, nachází se pod epitelem v počátečním úseku trávicího traktu. Podle své lokalizace se dělí na mandle patrové (2), nosní (1),

jazykové (2). Mandle tvoří pod epitelem souvislý pás lymfoidní tkáně, ve kterém se nacházejí lymfatické folikuly většinou se zárodečnými centry, kde je realizována imunitní odpověď na antigeny vstupující v této oblasti do organismu. Na patrových mandlích jsou výrazně vyvinuté tzv. krypty – epitelové záhyby, které se zanořují hluboko do tkáně tonzil a na jejich spodině se nacházejí odloupané epitelální buňky, lymfocyty, živé a mrtvé bakterie. Při zánětu se tyto krypty jeví jako „hnisavé čepy“. Nosní mandle nemá krypty vyvinuté, jazykové mají pouze jednu.

**Neopouzdrěná lymfoidní tkáň:** se nachází v řídkém vazivu v různých částech těla, nejvíce je vyvinuta v lamina propria trávicího traktu, dýchacího nebo urogenitálního traktu. V trávicí soustavě se pro tyto struktury používá označení Peyerovy plaky, nebo se někdy označují tyto tkáně jako GALT, resp. MALT (čili lymfoidní tkáň asociovaná se střevem, resp. sliznicemi, mukosou). Histologicky má tato neopouzdrěná tkáň podobnou strukturu jako uzlíky v lymfatických uzlinách, skládají se z hustě nakupených T lymfocytů (na obvodu uzlíku) a B lymfocytů v centru, které se diferencují na plazmatické buňky.

## Úloha 1: Mikroskopování trvalých preparátů brzlíku, sleziny, tonzil, Peyerových plaků, lymfatických uzlin

### Histologie buněk imunitního systému

**Leukocyty:** z krevního řečiště vycestovávají do tkání, kde plní imunologické funkce. Jejich zastoupení v pojivkách, zejména v řídkém vláknitém pojivu je natolik významné, že jsou považovány za součást této tkáně a nazývají se v této souvislosti jako volné buňky pojiva.

Podle tvaru jádra a obsahu granul v cytoplasmě se dělí na granulocyty a agranulocyty.

Granulocyty (neutrofilů, eozinofilů, bazofilů) obsahují dva typy granul:

specifická granula, která se specificky barví podle typu kyselými nebo bazickými komponentami barvicí směsí Romanovského.

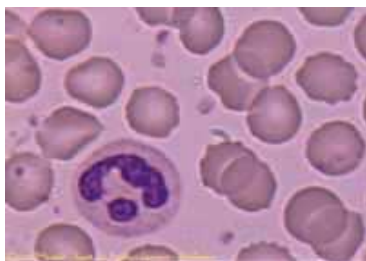
azurofilní granula, která jsou považována za lyzosomy a barví se purpurově.

Agranulocyty (monocyty, lymfocyty) specifická granula neobsahují, azurofilní ano.

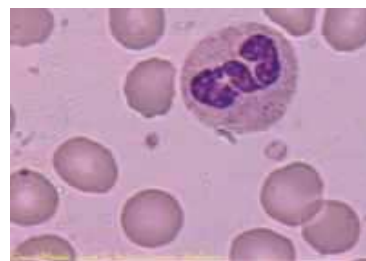
Počet leukocytů u člověka je 6 – 10 000 v mikrolitru krve.

**Neutrofilů:** tvoří 60 - 70 % cirkulujících leukocytů, mají 12 – 15 mikrometrů, jádro se skládá z 3 – 5 segmentů spojených tenkými spojkami jaderné hmoty. U nezralých neutrofilů má jádro segmentaci pouze naznačenou a tento typ buňky se nazývá tyčka nebo tyč. U samic savců je někdy na neutrofilech pozorovatelné tzv. Barrovo tělíčko – kondenzovaný X chromozóm, který se jeví jako paličkovitý přívěšek na jednom segmentu. Ve zralých neutrofilech je cca jedna třetina granul azurofilních (primární lyzosomy) a dvě třetiny tvoří granula specifická. Mitochondrie a proteosyntetický aparát je málo vyvinuté. V cytoplasmě neutrofilů je dále obsažen glykogen, to souvisí se schopností neutrofilů přežít i v anaerobním prostředí (např. v částečně nekrotických tkáních) a dokonce v těchto podmínkách vykonávat své imunologické funkce. Neutrofilů jsou terminální stadia buněk, v oběhu žijí jen 6 – 7 hodin, v tkáních je jejich poločas života 1 – 4 dny bez ohledu na to, zda fagocytují či nikoli.

Neutrofil segment



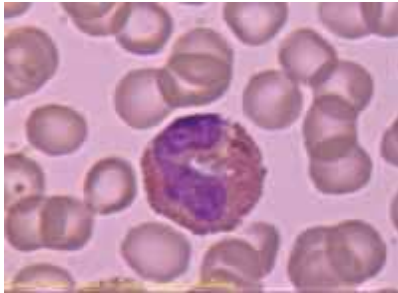
Neutrofil tyčka



**Eozinofilů:** tvoří 2 – 4 % cirkulujících leukocytů, jedná se rovněž o terminální stadia buněk, mitochondrie, ER a Golgiho komplex je málo vyvinuté. Eozinofilů jsou trochu větší než neutrofilů, mají typicky dvousegmentové (brýlovité jádro). Obsahují hodně (až 200 v buňce) specifických granul, která

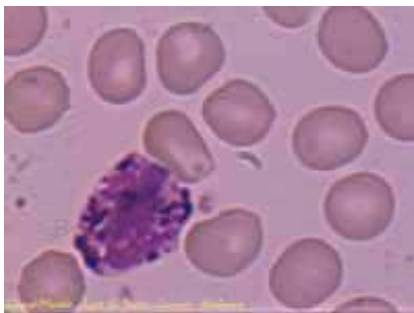
se barví eozinem cihlově červeně. Granula obsahují bílkovinu s výrazným zastoupením argininu, která se označuje hlavní bazický protein.

#### Eozinofil



Bazofily: tvoří méně než 1% cirkulujících leukocytů, jádro je méně kondenzované než u ostatních granulocytů, bývá esovitého tvaru a často je překryto specifickými granulemi, protože tato se podobně jako jádro barví zásaditými složkami barviva. Hlavní komponentou specifických granul je histamin a heparin. Bazofily vykazují řadu podobností s žírnými buňkami, které se v minulosti označovaly jako tkáňové bazofily. Jedná se však o odlišné typy buněk, vzniklé z jiných prekurzorů kostní dřeně.

#### Bazofil

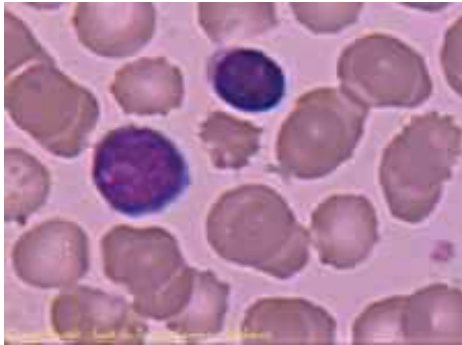


Lymfocyty: podle stupně diferenciace rozeznáváme lymfocyty malé, střední a velké. V periferním oběhu převládají malé lymfocyty, které mají průměr 6 – 8 mikrometrů, kulovité jádro, které vyplňuje téměř celou buňku. Jádra lymfocytů se intenzivně barví, chromatin je kondenzován ve formě hrubých zrněk. Cytoplazma se v krevních nátěrech jeví jako úzký lem okolo jádra, je bazofilní, po obarvení je světle modrá. V lymfocytech jsou obsaženy mitochondrie a proteosyntetický aparát. Ve světelném mikroskopu nelze rozeznat, zda se jedná o T nebo B lymfocyty a potíže činí i určení velkých lymfocytů pro jejich podobnost s monocyty. Imunocytochemickými metodami bylo zjištěno, že většina lymfocytů kolujících v krvi jsou dlouhožijící paměťové T lymfocyty. Pouze asi 15 % cirkulujících lymfocytů jsou B lymfocyty, které se po antigenním podnětu mohou několikrát dělit (proliferace) a vyžrát (diferenciace) v plazmatické buňky produkující ve tkáních protilátky. T i B lymfocyty mohou vyžrát buď v tzv. efektorová stadia nebo v paměťové buňky, které mohou v organismu mnoho let, patrně i po celý život jedince. U člověka a některých dalších savců dochází po pubertě k postupné involuci thymu a jeho přeměně na tukovou tkáň, přesto buněčná imunita zůstává funkční až do konce života. Není zcela jasné, zda a pokud ano tak kde se uskutečňuje maturace a „školení“ lymfocytů.

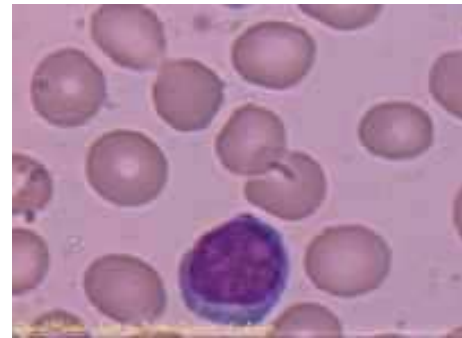
Vývoj lymfocytů je poměrně komplikovaný, některé detaily stále nejsou zcela objasněny. Lymfocyty vznikají z lymfoidní pluripotentní buňky v kostní dřeně. Diferenciace v imunokompetentní buňky se uskutečňuje v primárních imunitních orgánech: thymu (T lymfocyty) a kostní dřeně (B lymfocyty). U ptáků je za místo dozrávání B lymfocytů považována Fabriciova burza, objevena v 60. letech minulého století. Diferenciace v imunokompetentní buňky mimo jiné znamená, že z celkové populace lymfocytů vytvořených v organismu se zachovávají pouze ty, které mají optimální afinitu k vlastním MHC molekulám, resp. endogenním peptidům prezentovaným těmito molekulami. Ostatní lymfocyty, jejich receptory vykazují k těmto molekulám příliš nízkou nebo naopak příliš vysokou afinitu zanikají procesem apoptózy. Rozsah tohoto děje je obrovský: předpokládá se, že až 80 % vytvořených lymfocytů zaniká v thymu z důvodu této „nevhodné“ receptorové výbavy. Vysvětlení je pravděpodobně takové, že lymfocyty v této své vývojové etapě exprimují celé spektrum receptorů příslušného živočišného druhu. To je z evolučního hlediska výhodné, protože takto se zvyšuje pravděpodobnost,

že v rámci populace se vždy najde jedinec, který bude svými receptory na imunitních buňkách schopen reagovat na určitý (třeba atypický) antigen.

Lymfocyt malý



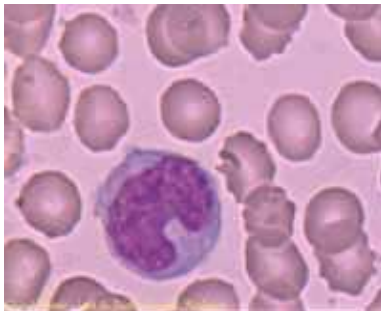
Lymfocyt střední



**Monocyty:** jsou největší, 12 – 20 mikrometrů, jádro je oválné, často s ledvinovitým výkrojem, který však nemusí být v mikroskopu vždy patrný. Chromatin je na rozdíl od lymfocytů méně kondenzovaný, jádra se tudíž jeví jako světlejší než u velkých lymfocytů. Cytoplazma obsahuje jemná azurofilní granula (lyzosomy) která jsou na hranici rozlišitelnosti světelného mikroskopu. Na monocytech mohou být patrné i výběžky cytoplazmy, svědčící o probíhající fagocytóze. V jádře se mohou vyskytovat jaderka a dobře je vyvinutý i proteosyntetický aparát.

Poločas setrvání monocytů v krvi je 12 – 100 hodin, poté zpravidla pronikají do tkání, kde se ve vazivu diferencují na makrofágy.

Monocyt



**Trombocyty:** jsou bezjaderné okrsky cytoplazmy odškrbené z mateřské buňky – megakaryocytu, který je polyploidní a nachází se v kostní dřeni. Fragменты destiček mají velikost 2 – 4 mikrometry a v krvi se nacházejí v množství 400 000/ mikrolitr. Patří mezi krátkověžící buňky, v periferní krvi přetrvávají zhruba 10 dní. Membrána destiček je bohatá na glykosoaminoglykany a glykoproteiny a má zřejmě význam pro adheze destiček na poškozená místa v cévách a vzájemné agregace destiček. destičky obsahují velké množství granul, která jsou ohraničena membránou a také glykogenové inkluze. V tzv. alfa – granulích je obsažen fibrinogen.

## Úloha 2: Mikroskopování krevních roztěrů savců, ptáků, ryb, plazů

### Fagocytóza a metody jejího sledování

Fagocytóza je jeden ze základních projevů živočišných buněk. V savčím mnohobuněčném organismu existuje celá řada buněk, u kterých je schopnost fagocytózy zachována. Ovšem pouze určitá skupina buněk využívá fagocytózu k jinému účelu než k získávání potravy. Tyto buňky se označují jako profesionální fagocyty a lze je rozdělit do dvou skupin podle toho, zda jsou určeny k přímé likvidaci

škodlivin (neutrofilů, eosinofilů) nebo zda mají za úkol pouze zpracování a prezentaci antigenu (dendritické buňky, monocyty, makrofágy).

Proces fagocytózy se skládá z několika dílčích kroků

<b>Krok fagocytózy</b>	<b>Metoda k jeho detekci</b>
1) Chemotaxe	Boydenova komůrka, Rebutckovo kožní okénko
2) Rozpoznání / navázání	MSHP test
3) Pohlcení	MSHP test
4) Degradace / usmrcení	Detekce oxidativního vzplanutí, bakteiricní test

Pro stanovení fagocytózy existuje více metod, přičemž některé se zaměřují pouze na dílčí kroky (např. na pohlcení – MSHP test, nebo na degradaci - oxidativní vzplanutí) zatímco jiné jiné metody jsou schopny monitorovat celý popsany proces (baktericidní test z plné krve).

Testy pro stanovení chemotaxe

Pro průběh chemotaxe je nutný

- 1) podnět (chemokiny, leukotrieny apod.)
- 2) receptory pro výše uvedené
- 3) cytoskelet umožňující lokomoci buněk

V každém z těchto dílčích kroků může docházet k poruchám. Uvedené testy nás informují pouze o celkovém průběhu procesu a nelze s jejich pomocí určit, ve kterém konkrétním kroku je porucha.

Boydenova komůrka

Je založena na průchodu fagocytů přes nitrocelulózu membránu z jedné části nádoby do druhé, kde je umístěn chemoatraktant. Počet buněk, které vykazují pozitivní chemotaxi je možné kvantifikovat. Metoda byla hodně uplatňována před zhruba 30 lety. V současnosti se již nepoužívá pro velkou pracnost, variabilitu výsledků a poměrně malou výpovědní hodnotu.

Rebutckovo kožní okénko

Princip je založen na migraci leukocytů do místa zánětu (poškození tkáně). Sterilní krycí skličko se přikládá v určitých časových intervalech na pokožku, která se předtím naruší sterilním skalpelem. Leukocyty, které pronikly na povrch do místa zánětu pak ulpí na přiloženém sklíčku. Skličko se obarví a výsledek se hodnotí vizuálně.

MSH test

Slouží k detekci míry pohlcování (ingescence). Částice, které se v tomto testu používají jsou z hydroxyethylmetakrylátu. Jsou hydrofilní, mají nízký negativní náboj, proto mají minimální nespecifické adheze na buňky a vzájemně neagregují. Pro stanovení se používá plná krev, reakční poměry složek udává výrobce MSHP, test trvá hodinu a inkubuje se při 37 °C. Dále je potřeba zajistit mírné třepání během celého procesu – buňky musí mít relativní klid na ingesci partikulí, ale zároveň partikule nesmí klesnout ke dnu. Ze suspenze se zhotoví krevní roztěr, který se obarví. Intenzita fagocytózy se poté hodnotí ve světelném mikroskopu. Jako pozitivní se zpravidla označují buňky, které pohlty 3 a více partikulí. Lze hodnotit i počet partikulí fagocytovaných 1 buňkou.

Z protisrážlivých aditiv lze použít heparin nebo EDTA. Heparin se používá v koncentraci 10 – 50 U/ml, ovšem tlumí míru fagocytózy. EDTA zase vychytává vápenaté ionty, které jsou nutné pro aktivaci buněk.

**Výhody:** jednoduchost

**Nevýhody:** nutná zkušenost s vyhodnocováním, krev musí být čerstvá (do 2 hodin po odběru), nutnost použití antikoagulantů.

**Využití:** Výpovědní hodnota této metody je omezená. Měřit lze pouze snížení hodnot. Zvýšení nelze dost dobře detekovat, neboť každý fagocyt je schopen fagocytózy, pokud je mu dodán substrát v nadbytku.

Ke snížení fagocytózy však dochází pouze za velmi vážných stavů jako jsou například konečná stadia nádorových onemocnění nebo těžké imunodeficence. Nízkou schopnost fagocytózy mají také prekuzory periferních neutrofilů – tyčky. Větší využití má metoda ve výzkumu než v klinické praxi.

Například v toxikologických testech, kdy xenobiotika mohou ovlivňovat funkce fagocytů. Další využití je sledování účinnosti léčby kolonie stimulujícími faktory (GM-CSF).

#### Baktericidní test

Test zachycuje všechny fáze fagocytózy. Princip je stejný, jako u MSHP, místo částic se využívá živého patogenu (*Candida albicans*, *Stafylococcus aureus*). Test se provádí na plné krvi nebo izolovaných granulocytech.

Jelikož fagocyt využívá více mikrobicidních fagocytů. Případný defekt fagocytózy není možno v buňce přesně lokalizovat.

#### **Vyhodnocení**

U velkých mikroorganismů (*C. albicans*) lze vyhodnocovat mikroskopicky po obarvení s využitím trypanovou modří. Hodnotí se množství usmrcených (obarvených) mikroorganismů. Před vlastním hodnocením je třeba leukocyty lysovat.

U malých mikroorganismů (*S. aureus*) se využívá hodnocení na kultivačních půdách. Bakterie se po proběhlé reakci vysadí na živnou půdu a ty, které přežily vytvoří kolonie, které se počítají.

#### **Výhody:**

**Nevýhody:** metoda je náročná na práci a těžko standardizovatelná, je opět potřeba čerstvá krev, antikoagulantia, neustálé třepání, pro kultivace mikrobů je nutné zázemí mikrobiologické laboratoře. Při pasážování mikroorganismu dochází ke snižování jeho virulence a změnách antigenních vlastností, proto je obtížné srovnání jednotlivých stanovení.

Detekce oxidativního vzplanutí:

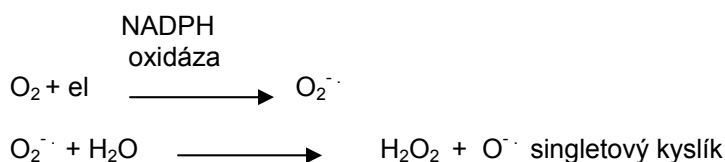
NBT test: při stanovení se využívá substrát NBT – nitroblue-tetrazolium chlorid. Detekce oxidačního metabolismu je založena na redukcí bezbarvé tetrazoliové soli (NBT) na barevný formazán. NBT vstupuje do buněk a po jejich aktivaci se vlivem oxidačních pochodů ve vakuole nebo na membránách buněk redukuje na barevnou formu – tmavě modrý formazán. Touto metodou se prokazuje hlavně schopnost fagocytů tvořit kyslíkové radikály aktivací NADPH oxidázy. Reakci lze vyhodnocovat odečítáním v optickém mikroskopu, kdy se hodnotí procento pozitivních buněk, tedy těch, které obsahují tmavě modré skvrny formazánu. Další možností je spektrofotometrické hodnocení intenzity vzniklého zbarvení, v tomto případě se pracuje na mikrotitračních deskách. Metodu lze kombinovat se sledováním ingesce MSH partikulí a zjistit tak, zda buňky, které mají normální fagocytózu jsou schopny tvořit kyslíkové radikály cestou oxidativního vzplanutí.

Výhody a nevýhody:

Metoda je levná, nenáročná. Krev musí být podobně jako u ostatních metod detekce fagocytózy zpracována do dvou hodin po odběru.

Chemiluminiscence:

Tato metoda je nejvhodnější pro kvantitativní hodnocení oxidativního vzplanutí. Klíčovým enzymem je NADPH oxidáza v membráně fagocytů, která přenáší elektron na molekulový kyslík, čímž se tvoří superoxidový radikál:



Během těchto procesů vznikají elektronově excitované stavy, které emitují fotony. Při chemiluminiscenčním stanovení jsou emitované fotony zachycovány tzv. luminoforem (luminol, izoluminol nebo lucigenin). Ten je přijetím fotonů uveden do excitovaného stavu a následně vyzáří energii v podobě světla, které je detekováno přístrojem – luminometrem.

Vzorky se vyšetřují vždy v paralelkách, stanovení je vysoce citlivé. Lze hodnotit jednak spontánní CL, kdy se nepřidává aktivátor a aby vzorky měly stejný objem a tedy i koncentraci reakčních složek, přidává se místo aktivátoru médium. Dále se stanovuje aktivovaná CL, kdy jako aktivátorů se používá např. PMA – phorbol myristát acetát, který aktivuje přímo proteinkinázu C a dále pak NADPH oxidázu. Dalším používaným aktivátorem je suspenze mikroorganismů, škrobových částic nebo Zymosanu, což je složka bakteriálních buněčných stěn.



Meření trvá zpravidla jednu hodinu a výsledkem je CL křivka, která má za fyziologických podmínek tvar charakteristický pro použitý vzorek (plná krev, izolované buňky) a zejména pro typ použitého aktivátoru.

Výhody a nevýhody:

CL aktivitu je nutné změřit do dvou hodin po odebrání krve, krev musí být heparinizována, přičemž se musí počítat s tím, že heparin může zhaset chemiluminiscenci. Měření trvá poměrně dlouho – 1 hodinu. Výsledek je nutno většinou přepočítat na počet buněk ve vzorku, nebo dát do vzorku již známý počet buněk. Vzhledem k tomu, že luminometry nepatří k běžnému vybavení imunologických laboratoří, je tato metoda využívána spíše jen ve výzkumu nebo v rámci speciálních vyšetření deficitů fagocytózy. Dovede totiž zachytit širší spektrum poruch včetně deficitů myeloperoxidázy, než testy NBT.

Touto metodou lze sledovat i zvýšení hodnoty oxidativního vzplanutí, které mohou být nebezpečné. Vlivem vyšší produkce kyslíkových radikálů může docházet k tzv. oxidativnímu poškození buněk a tkání vlastního organismu. Při těchto stavech bývá zvýšena i spontánní chemiluminiscence.

### Úloha 3: Stanovení fagocytárních schopností leukocytů krve in vitro za pomoci hydrofilních partikulí MSHP

#### Princip

Během inkubace plné krve s mikrosférickými hydrofilními partikulami (tzv. MSH partikule - MSHP) pohlcují profesionální fagocyty z krve (neutrofilny, eozinofily, monocyty) MSH částice, které jsou pozorovatelné v mikroskopu pod imerzí. Po určité době inkubace se z krvinkové masy zhotoví krevní nátěr, obarví se a hodnotí mikroskopicky. Sleduje se jednak počet buněk, které fagocytovaly, a také počet částic v jednotlivých buňkách.

#### Pomůcky a chemikálie

1. Komerčně dodávaná souprava MSHP: obsahuje partikule v množství 600 000/ dest. vody a fosfátový pufr PBS. Obě původně oddělené složky se před použitím smíchají v poměru 1 : 1 a směs se důkladně protřepe.
2. Heparin - zásobní roztok v koncentraci 5 000 U/ml. *Při stanovení fagocytózy nemá koncentrace heparinu překročit 10 U/ml plné krve. Myší krev vykazuje vyšší schopnost koagulace než lidská, proto ve cvičení budeme používat vyšší koncentraci heparinu a to 50 U/ml, což odpovídá 10 µl zásobního roztoku heparinu na 1 ml plné krve.*
3. Komerčně dodávaná souprava na barvení krevních nátěrů – Leukodif.
4. Jehly, tampony, desinfekční roztok alkohol – éter, náplast, podložní sklíčka, rukavice, mikroskopavky, pipety, termostat aj.

#### Postup:

1. Společně provedeme odběr myší krve z krční cévy do nadbytku heparinu (1 ml krve + 10 µl zásobního roztoku heparinu).
2. Společně si připravíme dva zásobní roztoky (500 µl směsi MSHP a PBS v poměru 1:1):
  1. roztok **bez heparinu** pro myší krev, která bude heparinizovaná již při odběru
  2. roztok **s heparinem** – přidáme 5 µl zásobního roztoku heparinu. Tento roztok bude pro lidskou krev.

S myší krví pracuje každý zvlášť, zatímco s lidskou pracujeme ve skupinách po dvou až třech. Z myší i lidské krve děláme vždy 2 roztěry. Jeden bez partikulí a druhý s partikulami po inkubaci.

3. Do dvou označených eppendorfek napipetujeme:
  1. eppendorfka (pro myší krev): 15 µl suspenze MSHP **bez heparinu** + 30 µl krve
  2. eppendorfka (pro lidskou krev): 7,5 µl suspenze MSHP **s heparinem** + 15 µl krve
4. Eppendorfky uzavřeme, mírně protřepeme a inkubujeme 30 minut při 37 °C. Během inkubace alespoň 2x mírně protřepeme. Pipetou přeneseme krvinkovou masu na čisté podložní sklíčko a zabroušeným sklíčkem uděláme roztěr, který po zaschnutí obarvíme.

Pozn. lidskou krev odebíráme dle pokynů vyučujícího na vyhrazeném místě a dbáme zásad správné laboratorní práce.

## Hodnocení

Během počítání buněk si zaznamenáváme jednotlivé typy leukocytů do tabulky včetně počtu zfagocytovaných partikulí. Krevní diferenciál vyhodnocuje ze 100 buněk.

Z nátěru bez MSHP určíme diferenciální počet leukocytů pro myši i lidskou krev.

V nátěrech s MSHP určíme:

- fagocytární aktivitu tj. počet buněk které fagocytovaly / počet buněk schopných fagocytózy. Výsledek násobíme 100.
- fagocytární index tj. počet fagocytovaných částic / počet fagocytujících buněk.

Oba parametry vyhodnotíme pro lidskou i myši krev.

## Úloha 4: Stanovení fagocytárních schopností leukocytů krve in vitro metodou chemiluminiscence

**Teorie:** fagocyty, především neutrofilů reagují na stimulační podnět oxidativním vzplanutím, při kterém se tvoří kyslíkové radikály – tzv. reaktivní kyslíkové metabolity RKM. Tyto radikály představují velmi silný baktericidní mechanismus fagocytů. Klíčovým enzymem pro vznik kyslíkových radikálů je NADPH-oxidáza, která přenáší elektron na molekulární kyslík a ten se tímto redukuje na superoxidový radikál. Superoxidový radikál je základem pro další RKM, např. peroxid vodíku, hydroxylový radikál. Peroxid vodíku může vstupovat do reakce s myeloperoxidázou a  $Cl^-$  ionty, při které se tvoří vysoce reaktivní oxidanty, včetně kyseliny chlorné.

Princip stanovení: při reakcích oxidativního vzplanutí vznikají elektronově excitované stavy zúčastněných částic. Při návratu do základního stavu jsou emitovány fotony. Tato chemiluminiscence (CL) je pro potřeby stanovení zesílena tzv. luminoforem (luminol nebo lucigenin).

luminol + oxidant  $\rightarrow$   $\alpha$ -aminoftalát +  $N_2$  + světlo (425nm)

Vznikající světlo lze detekovat na speciálních přístrojích zvaných luminometry, které jsou vybaveny citlivým detektorem s fotonásobičem.

### **Materiál a pomůcky:**

HBSS pH 7,4 (Hanksův roztok)

roztok luminolu v borátovém pufru 0.01 M, (3-aminophthal-hydrazid, mol. Hmotnost 177,16) aktivátor: suspenze opsonizovaných zymozanových částic (OZP) v HBSS (2,4 mg/ml)

krev ředěná HBSS (10  $\mu$ l krve v 5 ml HBSS)

šablona s měřicími jamkami (mikrotitrační destička), pipety, plasty, Luminometr.

**Postup:** dle schématu napipetujeme do jamek složky reakce v tomto pořadí:

luminol

HBSS v případě spontánních

aktivátor v případě aktivovaných,

vzorek krve rozředěný v HBSS, v případě blanku pouze HBSS

Ihned měříme na luminometru v režimu: interval mezi jednotlivými měřeními: 90 s, počet měřících cyklů 40, teplota 37°C, bez míchání.

**Vyhodnocení:** z naměřených hodnot po odečtení blanku určíme pík – maximální hodnotu chemiluminiscence a čas, kdy bylo píku dosaženo. Pro potřeby přesných srovnání jednotlivých vzorků je nutné naměřený CL signál přepočítat na počet fagocytů. Dále je potřeba uvést při jaké koncentraci

luminolu a aktivátoru bylo měření provedeno, tj, jaká je koncentrace v měřící jamce - tyto hodnoty vypočteme z koncentrací uvedených v materiálu a metodách.

Schéma destičky:

spont blank	spont vzorek	spont vzorek	spont vzorek	spont vzorek	spont vzorek	spont vzorek	spont vzorek	spont vzorek	spont vzorek	spont vzorek	spont vzorek	spont vzorek
spont blank	spont vzorek	spont vzorek	spont vzorek	spont vzorek	spont vzorek	spont vzorek	spont vzorek	spont vzorek	spont vzorek	spont vzorek	spont vzorek	spont vzorek
spont blank	spont vzorek	spont vzorek	spont vzorek	spont vzorek	spont vzorek	spont vzorek	spont vzorek	spont vzorek	spont vzorek	spont vzorek	spont vzorek	spont vzorek
spont blank	spont vzorek	spont vzorek	spont vzorek	spont vzorek	spont vzorek	spont vzorek	spont vzorek	spont vzorek	spont vzorek	spont vzorek	spont vzorek	spont vzorek
akt blank	akt vzorek	akt vzorek	akt vzorek	akt vzorek	akt vzorek	akt vzorek	akt vzorek	akt vzorek	akt vzorek	akt vzorek	akt vzorek	akt vzorek
akt blank	akt vzorek	akt vzorek	akt vzorek	akt vzorek	akt vzorek	akt vzorek	akt vzorek	akt vzorek	akt vzorek	akt vzorek	akt vzorek	akt vzorek
akt blank	akt vzorek	akt vzorek	akt vzorek	akt vzorek	akt vzorek	akt vzorek	akt vzorek	akt vzorek	akt vzorek	akt vzorek	akt vzorek	akt vzorek
akt blank	akt vzorek	akt vzorek	akt vzorek	akt vzorek	akt vzorek	akt vzorek	akt vzorek	akt vzorek	akt vzorek	akt vzorek	akt vzorek	akt vzorek
akt blank	akt vzorek	akt vzorek	akt vzorek	akt vzorek	akt vzorek	akt vzorek	akt vzorek	akt vzorek	akt vzorek	akt vzorek	akt vzorek	akt vzorek
akt blank	akt vzorek	akt vzorek	akt vzorek	akt vzorek	akt vzorek	akt vzorek	akt vzorek	akt vzorek	akt vzorek	akt vzorek	akt vzorek	akt vzorek

spontánní blank: 25 µl luminol 250 µl HBSS, 25 µl HBSS – místo aktivátoru  
aktivovaná blank : 25 µl luminol, 250 µl HBSS, 25 OZP

vzorek spontánní: 25 µl luminol, 25 µl HBSS, 250 vzorek  
vzorek aktivovaná: 25 µl luminol, 25 µl OZP, 250 vzorek

## Elektroforetické metody

**Princip:** rozdělení proteinů (nejčastěji krevních bílkovin) na základě jejich pohyblivosti v elektrickém poli. Po tomto kroku většinou navazují další metody založené na reakci antigen – protilátka. Důležité je, že bílkoviny se dělí podle povrchového náboje. K realizaci elektroforetických metod je nutný zdroj stejnosměrného elektrického proudu, speciální elektroforetické vany, vhodný pufr a vhodný nosič. Jako nosič se v minulosti používal papír, acetatcelulósová membrána nebo agar, dnes se prakticky výlučně používá agaróza nebo polyakrylamidový gel.

Rozdíl mezi agarózou a agerem spočívá v tom, že agar je nehomogenní směs polysacharidů získaných z mořských řas, zatímco agaróza je homogenní, po chemické stránce se jedná o polymer složený z disacharidových jednotek – agarobiózy. Agaróza se pro elektroforézu používá v koncentraci 0,5 – 2 %. Při této koncentraci tvoří gel, který vyhovuje požadavkům, pouze je křehký, což mírně komplikuje manipulaci.

Polyakrylamid je homogenní, hydrofilní, má výborné mechanické vlastnosti, nízkou elektroosmózu a nízkou absorpci. Lze ho připravit v různé hustotě, zkoumané látky se potom dělí nejen podle náboje, ale i podle velikosti molekul. Nevýhodou je pouze toxicita základního monomeru.

**Imunoelektroforéza:** jedná se o elektroforetickou separaci následovanou imunoprecipitací rozdělených proteinů specifickými protilátkami, většinou v prostředí agarózy. V této metodě je tedy obsažena i imunologická reakce antigen – protilátka. Metoda imunoelektroforéza (imunoelfo) byla poprvé publikována v roce 1952 a od té doby našla rozsáhlé uplatnění v imunologickém výzkumu i diagnostice. V současnosti se nejvíce používá při stanovení paraproteinů (čili neúplných řetězců imunoglobulinů) při monoklonálních gamapatiích.

**Výhody a nevýhody:** metoda imunoelektroforézy je nenáročná na čas i vybavení, není drahá. Pouze proces odečítání a interpretace výsledků je do značné míry závislý na zkušenostech pracovníka, o

složitosti této problematiky svědčí fakt, že o imunoprecipitaci proteinů existují celé samostatné monografie.

**Imunofixace:** je modifikací imunoelektroforézy; spočívá v tom, že po elektroforéze se na agarózový gel položí maska s výřezy. Otvory se naplní příslušnými protilátkami anti IgG, anti IgA, anti IgM, anti kappa, anti lambda. Vzniklé precipitační linie se pak porovnávají se standardním sérem a lze tak posuzovat odchylky ve smyslu poklesu nebo nárustu jednotlivých tříd protilátek, resp. lehkých řetězců.

**Využití elektroforetických metod:**

- orientační vyšetření bílkovin krevní plasmy: zde se nejčastěji posuzují linie odpovídající albuminu,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  a  $\gamma$  globulinu. Při imunologických vyšetřeních lze touto metodou zachytit zvýšení, resp. snížení  $\gamma$  globulinové frakce.
- rozdělení antigenů pro imunoblotting
- obecně dělení bílkovin v experimentálních studiích

## Úloha 5: Raketová elektroimunodifuze podle Laurella

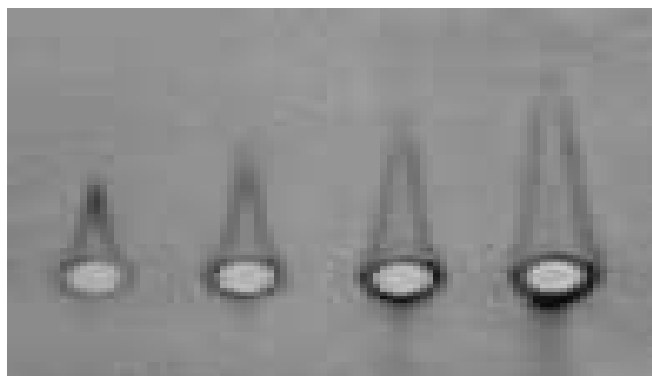
Zkoumaný antigen je stejnosměrným elektrickým proudem roznášen do gelu s protilátkou. Vznikající precipitát má podobu raket. Podstatou techniky je neustálé rozpouštění precipitátu putujícím přebytkem antigenu až do okamžiku, kdy je veškerý antigen vyváznán specifickou protilátkou. Jde o jednu z nejpřesnějších kvantitativních difuzních metod.

Pomůcky: stojánek se zkumavkami, nastavitelné mikropipety, skleněné desky 5 x 5 cm, agaróza 1%, Ag - lidské sérum koncentrované, ředěné 1:2, 1:4, 1:8, Ab, vodní lázeň 48 – 49°C, zdroj napětí, elektroforetické komory

Provedení: Na vodní lázni rozvaříme 1% agarózu (pufru dáme o 5 ml méně). Vytemperujeme ji na 48-49°C stejně. Smícháme 5 ml agarózy s malým množstvím koncentrované protilátky a naléváme 2,4 ml na čistá skla. Necháme ztuhnout ve vodorovné poloze, podle šablony vysekáme jamky. Pipetou nanese 3  $\mu$ l vzorku antigenu. Sklíčka uložíme do elektroforetických komor. Imunoelektrodifúze bude probíhat 2 hodiny při konstantním proudu 20 mA.

Sušení a barvení: Po inkubaci pereme skla nejvýše 2 minuty ve fyziologickém roztoku, zabalíme je do chromatografického papíru navlhčeného fyziologickým roztokem a přes noc sušíme při pokojové teplotě. Poté sejmeme papír, skla opereme pod tekoucí vodou a barvíme barvicím roztokem (225 ml CH<sub>3</sub>OH, 25 ml CH<sub>3</sub>COOH, 0,25 g amidočerni 10B) do dostatečného obarvení linií. Pozadí odbarvíme diferenciačním roztokem (CH<sub>3</sub>OH : CH<sub>3</sub>COOH 10:1). Nakonec opereme v destilované vodě a usušíme bez papíru.

Vyhodnocení: plocha raketky po odečtení startovací jamky je úměrná koncentraci antigenu. Pro zjednodušení je možné změřit pouze výšku raketky od horního okraje startovací jamky.



1 : 8

1 : 4

1 : 2

konc.

## Imunodifuzní metody

Metoda radiální difuze byla nejvíce používána v 80tých letech minulého století, kdy sloužila jako standardní metoda pro stanovení různých sérových proteinů. Stanovovaly se nejčastěji protilátky a části komplementu. Dnes se ke stanovení těchto parametrů nahrazeno nefelometrií a turbidimetrií. V současné době se pomocí radiální difuze stanovují hlavně IgD protilátky, které mají malou aviditu, proto nelze využít turbidimetrického respektive nefelometrického stanovení. Dále se radiální difúze používá při stanovení lysozymu.

### Příklady

	<i>V gelu</i>	<i>V jamce</i>	<i>Výsledek reakce</i>
Stanovení aktivity lysozymu	Bakterie	Lysozym	Projasnění gelu
Přítomnost antigenu ve vzorku	Protilátka	Antigen	Vznik precipitačního prstence
Stanovení hemolytické aktivity komplementu	Senzibilizované erythrocyty	Sérum s komplementem	Změna barvy gelu v důsledku hemolýzy

### Princip radiální difuze

Při této metodě je jedna ze složek (**bakterie**, protilátky nebo senzibilizované erythrocyty) rozpuštěna v agarózovém gelu a druhá (**lysozym**, antigen, sérum s komplementem) difunduje z jamky radiálně do okolního gelu. Při manipulaci je potřeba dodržet správnou teplotu tak, aby gel byl tekutý a zároveň nedocházelo k denaturaci proteinů teplotou.

**Výhody a nevýhody:** jednoduchost, časově náročná, nutná zkušenost a zručnost, při kvantitativním hodnocení je nevýhodou její omezený rozsah.

## Úloha 6: Stanovení lysozymu metodou jednoduché radiální difuze

Lysozym je látka enzymatické povahy. Rozkládá polysacharid murein, který je základním komponentem buněčných stěn bakterií, čímž lyzuje grammpozitivní bakterie. Vyskytuje se nejen u obratlovců (sliny, sekrety, krevní sérum, mléko moč, pot, játra, cytoplazma fagocytů ...), ale i u bezobratlých (hemolymfa ...) a některých rostlin (*Papaya latex*, *Ficus apod.*). Více viz rozšiřující informace na konci kapitoly.

### Pomůcky

připravená skleněná plotna 5x5 cm s vrstvou agarózy, která obsahuje bakterie (*Micrococcus luteus*) vývěva, Petriho misky na vlhkou komůrku, borát-fosfátový pufr, zabroušená jehla na vysekávání jamek, vývěva, hemolymfa.

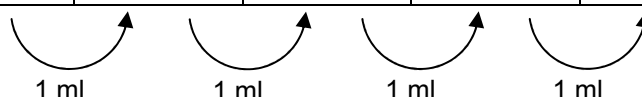
### Postup připraveno předem

- Příprava mikrokoka:
  - Micrococcus luteus* (dříve *M. lysodeicticus*) naočkujeme na misku a inkubujeme 24 – 48 hod.
- Příprava skleněných desek:
  - očistíme skla alkoholem
  - na vodní lázni rozvaříme 1,2% agarózu v borát-fosfátovém pufru (budeme-li chtít nalité plotny uchovávat delší dobu, přidáme několik kapek merthiolátu pro konzervaci)
  - do agarózy přidáme mikrokoka pomocí kličky (cca 30 mg na 10 ml)
  - důkladně promícháme a pipetujeme 2,4 ml na skla 5x5 cm umístěné na absolutně vodorovné ploše. Necháme ztuhnout.
  - Z Petriho misky a vlhkého filtračního papíru připravíme vlhkou komůrku

### Vlastní práce:

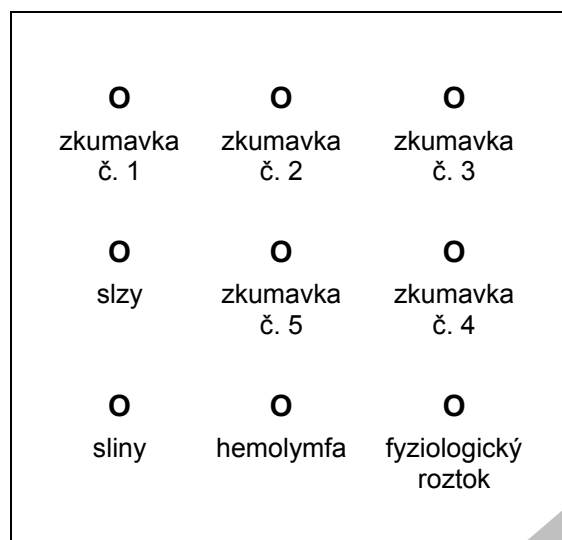
1. zabroušenou jehlou napojenou na vývěvu vysekáme do agarózy jamky dle šablony
2. příprava kalibrační řady
  - 1 mg lyofilizovaného lysozymu má aktivitu přibližně 24 000 jednotek.
  - **zásobní roztok** lysozymu má koncentraci 10 mg/ml
  - z těchto údajů vypočteme koncentraci a aktivitu lysozymu v jednotlivých ředěních

Označení zkumavky	1.	2.	3.	4.	5.
Přidáme borát-fosfátový pufr		1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Množství zásobního roztoku	2 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml



	1x	2x	4x	8x	16x
Ředění:					
Koncentrace lysozymu:					
Aktivita lysozymu:					
Celkový objem:	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	2 ml

1. Do každé jamky napipetujeme 2,6  $\mu$ l vzorku podle schématu ↓
2. Desky inkubujeme 48 hodin ve vlhké komůrce při 4 °C.
3. Odečtení výsledků a hodnocení.



### Hodnocení:

Lysozym difunduje do okolí jamek a lyzuje mikrokoka v gelu. Pomocí speciálního měřítka SEVAC odečteme druhé mocniny průměrů prstenců. Sestavíme kalibrační křivku jako lineární závislost druhých mocnin průměrů prstenců na koncentraci lysozymu. Pomocí kalibrační křivky určíme koncentraci lysozymu ve slinách, slzách a v hemolymfě.

1 mg lysozymu je přibližně 24 000 jednotek.

Pomocí kalibrační křivky nebo její regresní rovnice stanovíme koncentraci lysozymu v slzách, slinách a hemolymfě. V tomto případě nám hodnota pro slzy padla mimo rozsah kalibrační křivky, výsledek je proto pouze odhad a v praxi by bylo vhodné vzorek znovu změřit naředěný tak, aby výsledek ležel v rozsahu jejích hodnot.

---

## Rozšiřující informace

---

### LYSOZYM

#### Obecná charakteristika

Lysozym je protein o velmi malé molekulové hmotnosti (14,6 KDa), který se skládá z jediného polypeptidového řetězce tvořeného 129 jednotkami. Vnitřní stabilitu zajišťují disulfidické můstky. Jedná se o důležitý enzym s antibakteriálním účinkem, který byl objeven v roce 1922 (Alexander Fleming). Vyskytuje se uvnitř speciálních lytických váčků, nebo je součástí přímo specializovaných buněčných organel (lyzozomů), ale nachází se také např. v granulích leukocytů. U člověka je lysozym obsažen v krevním séru a ve velkém množství v tělních sekretech: mléko, moč, slzy, sliny, hlen. Obecně tento nespecifický humorální faktor nacházíme u bezobratlých i obratlovců, ale uvolňuje se např. i ze základní desky bičíku bakteriofága, čímž dochází k perforaci hostitelské buňky (a podruhé se uplatňuje, když se nové bakteriofágy dostávají z buňky ven).

Lysozym se izoluje z vaječného bílku, kde se také ve velkém množství nachází, a v případě infekčních procesů dutiny ústní nebo hltanu ho lze podávat jako antiseptikum v podobě tablet (Larypront, Heinrich Mack Nachf., GMBH & CO. KG).

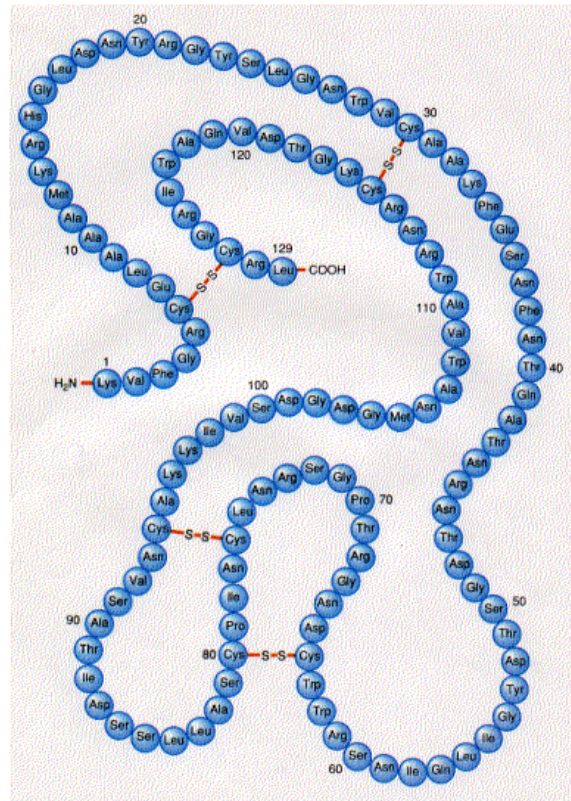
#### Mechanismus účinku

Lysozym je bazický polypeptid enzymatické povahy, který se uplatňuje při rozkladu polysacharidu mureinu tím, že štěpí  $\beta$ -1,4-glykosidickou vazbu, která spojuje zbytky n-acetylglukósamínu a kyseliny n-acetylmuramové.

Murein (peptidoglykan) je základní stavební součástí buněčné stěny bakterií, jeho polysacharidové řetězce obsahují střídavě zbytky n-acetylglukósamínu a kyseliny n-acetylmuramové, na jejíž karboxyl je navázán řetězec 4 aminokyselin v pořadí L alanin, D glutamová kyselina, libovolná aminokyselina a D alanin. Jednotlivé tetrapeptidové řetězce jsou vzájemně propojeny, a právě účinkem lysozymu z mureinu vznikají disacharidové jednotky. Inhibiční aktivita tohoto enzymu je nejsilnější proti gram pozitivním bakteriím, kterým chybí vnější membrána. Gram negativní bakterie mohou být vystaveny působení lysozymu teprve po poškození nebo odstranění vnější membrány, např. prostřednictvím nisinu (narušuje membránu), EDTA nebo citrátů s chelatačním účinkem, kdy na sebe tyto látky váží vápenaté ionty, a tím naruší stabilitu lipopolysacharidů v membráně.

#### Působení látek na buněčnou stěnu bakterií

Bakterie mají (na rozdíl od živočišných buněk) cytoplazmatickou membránu krytou buněčnou stěnou, která se u jednotlivých kmenů liší svou stavbou, tloušťkou i kvalitou. Buněčná stěna je pro život bakterií velmi důležitá - je nezbytná pro jejich přežití, udržuje tvar buňky a zabezpečuje optimální vnitřní prostředí (vysoký intracelulární tlak). Poškození buněčné stěny nebo inhibice tvorby některé z komponent vedou k poruše její funkce, což může způsobit až lýzi buňky. Většina struktur bakteriální buněčné stěny se nevyskytuje v organismu člověka, proto je buněčná stěna pro inaktivaci mikroorganismu vhodným místem. Inhibice syntézy buněčné stěny je hlavním mechanismem účinku

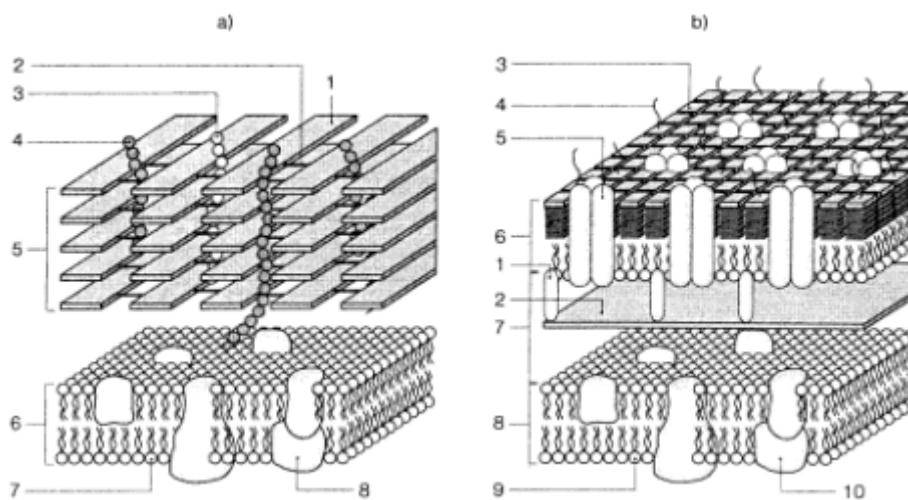


celé řady antibiotik (peniciliny, cefalosporiny, monobaktamy, karbapenemy, vankomycin, bacitracin). Lysozym buněčnou stěnu z vnějšku hydrolyzuje.

Buněčná stěna **grampozitivních** bakterií (G+) o síle 20-80 nm je tvořena převážně silnou peptidoglykanovou vrstvou (15-20 nm), přičemž samotný murein představuje 10-50 % suché hmotnosti celé bakterie. K účinku antibiotik i lysozymu jsou G+ bakterie velmi citlivé.

**Gramnegativní** bakterie (G-) mají buněčnou stěnu tvořenou tenkou, ale pevnou peptidoglykanovou vrstvou (cca 10 nm), nad kterou se nachází ještě membrána tvořená dvojvrstvou fosfolipidů a bílkovin. Právě vnější fosfolipidová membrána brání průniku hydrofilních antibiotik (např. G penicilin). Tato antibiotika ovlivňují gramnegativní bakterie pouze v případě, že jsou schopna pronikat transmembránovými póry zevní membrány (např. ampicilin, amoxycilin). Vlastní murein tvoří cca 3 % suché hmotnosti buňky. I pro působení lysozymu musí mít G- bakterie poškozenou nebo odstraněnou vnější membránu, jinak jsou k účinkům těchto látek velmi málo citlivé.

Rozdíly ve stavbě buněčné stěny grampozitivních a gramnegativních bakterií



**a) Buněčná stěna grampozitivních bakterií:**

1. polysacharidový řetězec peptidoglykanu (mureinu) 2. příčné propojení 3. polysacharid 4. kyselina teichoová 5. buněčná stěna 6. cytoplazmatická membrána 7. fosfolipid 8. protein

**b) Buněčná stěna gramnegativních bakterií:**

1. lipoprotein 2. peptidoglykan 3. lipopolysacharid 4. antigeny 5. porinové trimery 6. vnější membrána 7. periplasmatický prostor 8. cytoplazmatická membrána 9. fosfolipid 10. protein

MJ Pelczar, ECS Chang y, NR Krieg. *Microbiology*. Mc Graw Hill inc.,1986. New York. 5.ed.

## Metody stanovení protilátek

Stanovení protilátek patří bezesporu mezi základní imunologická vyšetření. Rozlišujeme stanovení **kvantitativní, kvalitativní a stanovení specifických protilátek**. Při kvantitativním stanovení určujeme koncentraci celkových protilátek nebo koncentraci určitého izotypu. Kvalitativní stanovení zohledňuje druh izotypu, tedy třídu resp. podtřídu protilátek. Stanovení protilátek podle jejich specifity vůči určitému antigenu je vlastně podmnožina kvalitativního stanovení, můžeme ovšem stanovovat i koncentrace těchto specifických protilátek.



Stanovení protilátek se dnes nejčastěji provádí nefelometricky nebo turbidimetricky. Lze také použít stanovení radiální difúzí, touto metodou se však stanovuje většinou jen IgD, který má nízkou aviditu a nefelometrie se pro jeho stanovení nehodí. Tato stanovení přinášejí informaci o kvalitě (třída imunoglobulinů) a následně také o koncentraci. Specifické protilátky se nejčastěji stanovují ELISA nebo RIA metodou. Z dalších metodik používaných ke stanovení protilátek lze jmenovat:

- aglutinační metody, které jsou rychlé a nenáročné, nicméně jsou málo citlivé a obtížně reprodukovatelné. Používají se při stanovení krevních skupin a při stanovení protiinfekčních protilátek. Viz aglutinační metody.

- nepřímá imunofluorescence je metoda náročná na vybavení, profesní zkušenost i finance. Používá se v omezeném spektru indikací, kdy stanovujeme specifické protilátky proti antigenům, jež jsou součástí buněk. Např. antinukleární protilátky nebo protilátky proti cytoplasmě neutrofilů při autoimunitních onemocněních, nebo protilátky proti určitým patogenům (borrelie, treponemy) které se detekují přímo v lidských buňkách resp. tkáních. Základní princip spočívá v detekci protilátek specifickým antigenem, což je vlastně protilátka proti této protilátce navíc fluorescenčně značená. Inmunofluorescence může být v uspořádání tzv. přímém nebo nepřímém, vždy je k hodnocení potřeba fluorescenční mikroskop, což činí metodu velmi finančně nákladnou. Problém je také subjektivní chyba hodnocení.

- westernblot je metoda používaná v poslední době při průkazu specifických protilátek např. proti jednotlivým antigenním determinantám borrelií nebo některým nukleárním antigenům. Metoda je pracná, časově náročná, je nutné realizovat několik dílčích kroků: elektroforetické rozdělení bílkovin, přenos na membránu a následnou vizualizaci protilátek reakcí s příslušnými antigeny.

**Stanovení IgE:** vzhledem ke své nízké koncentraci v séru (viz tabulka) vyžaduje IgE jiné postupy stanovování než ostatní třídy imunoglobulinů. Nejčastěji se používá ELISA nebo RIA metoda podobně jako při stanovení specifických protilátek ostatních tříd. Specifický antigen je v prvním kroku navázán na pevný nosič (papír, membránu, celulósový polymer, povrch mikrotitrační destičky). Ve druhém kroku se na tento antigen váže námi sledovaná protilátka a ve třetím kroku je tato navázána protilátka označena buď sekundární protilátkou s enzymatickou značkou pro následnou vizualizaci - ELISA technika nebo radioaktivně značenou sekundární protilátkou v případě RIA techniky. Množství IgE se potom nejčastěji vyjadřuje jako jednotky enzymové aktivity IU/ml nebo pomocí škály 0 – 6, kde 0 znamená nedetekovatelné množství IgE.

Protilátky se nejčastěji stanovují v séru, lze je ale stanovit v celé řadě dalších tělních tekutin, např. v plasmě, moči, mozkomíšním moku, výpotcích apod.

Stanovení monoklonální (patologické) komponenty:

Při podezření na monoklonální gamapatie se stanovuje množství mono, bi nebo oligoklonálních protilátek, které jsou produkty jednoho nebo několika málo patologicky zmnožených klonů B lymfocytů. Tyto protilátky se také někdy označují jako paraproteiny - nekompletní lehké řetězce protilátek.

K jejich stanovení se používá metodika imunoelektroforézy nebo imunofíce. Patologický paraprotein lze také stanovovat nefelometricky, kdy se použije protilátka proti lehkým řetězcům, ta vytvoří imunokomplexy s patologickými protilátkami a množství těchto imunokomplexů se stanoví.

Stanovení kryoglobulinů:

Kryoglobuliny je různorodá skupina atypických protilátek, které se ve větším množství objevují v organismu při patologických stavech různé etiologie (např. hematologické malignity, revmatoidní artritida, vaskulitidy, chronické zánětlivé stavy, vleklé infekce apod.). Precipitují spontánně za nižších teplot než je fyziologická teplota. Při vyšetření se musí krev odebírat za odlišných podmínek tak, aby nedošlo k jejímu ochlazení pod 37°C. Poté se sleduje vznik kryoprecipitátu v chladu a porovnává se se situací za teploty 37°C.

Indikace k vyšetření protilátek: vyšetření celkových protilátek je indikováno zpravidla v jiných patologických stavech než vyšetření specifických protilátek.

Celkové protilátky se stanovují při podezření na imunodeficit, kdy očekáváme zpravidla nižší hladinu hypo až agamaglobulinémii a při chronických zánětech, kdy je očekávána naopak hladina vyšší - hypergamaglobulinémie. Při autoimunitních chorobách bývají rovněž vyšší hodnoty celkových protilátek v důsledku polyklonální aktivace B buněk, která je u autoimunit poměrně častá.

Fyziologické hodnoty množství protilátek v séru:

IgG: 8 – 18 g/l

IgA 0,9 – 3,5 g/l

IgM 0,9 – 2,5 g/l  
IgD 0,1 g/l  
IgE 0,0003 g/l

Nejčastější metodou stanovení kvantitativního stanovení protilátek je dnes nefelometrie, resp. turbidimetrie. Princip obou metod je podobný. Ještě zhruba před 15 lety byla nejčastěji používanou metodou pro tento účel radiální difúze. Pro stanovení specifických protilátek se dnes nejčastěji používají ELISA metodiky.

Nefelometrie, turbidimetrie: jsou založeny na měření množství imunitních komplexů, které vznikají po reakci stanovené protilátky s přidaným antigenem. Např. chceme-li stanovit celkové IgG, použijeme protilátku anti IgG.

Reakce antigen – protilátka je základem celé řady metod v humorální, ale i buněčné imunitě. Jako antigen často vystupuje protilátka proti stanovené protilátce. Zde je trochu nejasnost v terminologii. Navíc pro označení stanoveného ligandu se také někdy užívá označení receptor. Obecný princip reakce antigen – protilátka byl popsán už v roce 1929, kdy byl také popsán základní tvar precipitační křivky této reakce. Metody využívající reakci antigen – protilátka jsou obecně hodnoceny podle toho jak si poradí s touto oblastí křivky, kdy je koncentrace antigenu v nadbytku, tvoří se malé imunokomplexy, které špatně precipitují a vysoké koncentrace antigenu tak mohou být falešně považovány za nízké, protože množství vytvořených imunokomplexů je nízké. Klasickou precipitační křivku lze pro účely stanovení rozdělit na tři oblasti:

1. oblast využitelnou pro měření – tj. oblast nadbytku protilátky, kde množství precipitátu je vzrůstá s přidáním antigenu.
2. kritický bod – tj. oblast ekvivalence, kde leží nejvyšší koncentrace antigenu, kterou lze ještě správně změřit
3. oblast za kritickým bodem, zde nelze v daném systému měřit

Nefelometrie a turbidimetrie se měří v kyvetě, roztoku, v roli antigenu zde vystupuje stanovená protilátka a přidáváme protilátku proti ní. V reakčním roztoku bývá dále obsažena enhancující látka, nejčastěji polyetylen glykol. Pokud se pohybujeme v oblasti křivky využitelné pro měření, je množství precipitátu je přímo úměrné koncentraci stanovené protilátky. Výsledkem reakce antigen – protilátka je precipitát, který se projevuje jako zákal.

U nefelometrie se měří intenzita záblesků světla, které se odrazí od komplexů Ag – Ab. Využívá se tzv. Tyndalova efektu. Detektor není umístěn přímo proti zdroji světla, ale v určitém úhlu od laserového zdroje.

Turbidimetrie má princip podobný, měří se úbytek intenzity světla, které prošlo měřicí kyvetou. Opět se využívá toho, že komplexy antigen – protilátka odrážejí světlo. Turbidimetrie je méně citlivá než nefelometrie.

Obě metody mohou být uspořádány ve dvou odlišných režimech stanovení:

1. „End point“ systém – smíchá se stanovený antigen a protilátka v prostředí polyetylen glykolu a po určité době inkubace, kdy je dosaženo rovnovážného stavu se provede měření. Tento způsob je použitelný u systémů, které jsou odzkoušené a kde je jistota, že koncentrace stanovené složky leží v oblasti křivky využitelné pro měření, tzn. nemůže nastat situace, kdy je antigenu nadbytek nad kritický bod. Pokud by tomu tak bylo, může se v tomto uspořádání stát, že naměříme falešně nízké hodnoty antigenu.

2. Kinetický (rate) systém – měřící směs v kyvetě se musí míchat, měření startuje ihned po přidání protilátky a měří se v určitých krátkých časových (několikasekundových) intervalech. Atypický průběh hodnot signalizuje, že systém mohl překročit bod ekvivalence. Většina komerčních analyzátorů má ve svém softwaru možnost řešení těchto situací např. dotitrováním nadbytku antigenu.

Pomocí turbidimetrie a nefelometrie se stanovují základní bílkoviny séra: imunoglobuliny, kromě IgD, lehké řetězce imunoglobulinů, složky komplementu C3 a C4, proteiny akutní fáze zánětu – CRP, orosomukoid, transferin, albumin aj.

Zejména stanovení CRP nabývá v posledních letech na významu v diagnostice. Normální hodnoty CRP se pohybují okolo 2 mg/l, při zánětu jeho koncentrace stoupá velice rychle, řádově během hodin. Je to jeden z nejspolehlivějších nespecifických markerů zánětů, je poměrně snadno měřitelný, měření není zatíženo nespecifickými chybami. Dnes i běžné ordinace praktických lékařů mohou mít ve svém vybavení analyzátor CRP.

ELISA: dnes velice rozšířená metodika pro stanovení specifických protilátek. Princip spočívá ve spektrofotometrickém stanovení komplexu antigen – protilátka. Stanovení je nejčastěji uspořádáno tak, že na povrch jamek mikrotitrační desky je navazána protilátka proti stanovované složce (to je v případě měření specifických protilátek také protilátka). Tato protilátka se váže nejčastěji prostou absorpcí. Místa na vnitřním povrchu jamky, kde se protilátka nenaváže, se musí tzv. vyblokovat – vyvážou se např. albuminem. V dalším kroku se přidá vzorek obsahující sledovanou složku a po určité době inkubace se promytím pomocí pufru odstraní nenavázané molekuly. Následně se přidá tzv. druhá (sekundární) protilátka označená enzymem (konjugát). Používají se např. systémy křenová peroxidáza – ortofenylendiamin, nebo biotin – avidin. Po opětovné inkubaci a promytí se přidá substrát pro enzym a příslušná enzymatická reakce je provázena barevnou změnou, která se detekuje fotometricky.

### Obecné principy spektrofotometrie:

Každý prvek či molekula má schopnost pohlcovat (absorbovat) světlo (elektromagnetické záření). Absorpcí určitého kvanta záření o určité vlnové délce a intenzitě přivede částici do tzv. excitovaného stavu. Tento stav je charakteristický nestabilitou a částice mají tendenci vracet se do původního stavu vyzářením nadbytečné energie opět v podobě elektromagnetického záření.

Různé částice jsou schopny absorbovat záření jen o určitých vlnových délkách. Vzdálenosti energetických hladin před a po absorbování energie přímo určuje vlnovou délku elektromagnetického záření, které je částice schopna pohltit. Energeticky nejnáročnější jsou přechody elektronů mezi energetickými hladinami a jsou vyvolány absorpcí určitého kvanta ultrafialového (UV: 190 – 380 nm) nebo viditelného světla (VIS: 380 – 780 nm). S látkami, které vnímáme jako viditelné světlo se setkáváme každý den – jsou to všechny látky, které vnímáme jako barevné. Sluneční záření se skládá ze všech vlnových délek viditelného světla a při absorpci některé z nich dochází k rozkladu barev, což my vnímáme jako barvu.

Ke kvantifikaci pohlceného záření slouží přístroje zvané absorpční spektrometry (spektrofotometry). Tyto přístroje zjišťují změnu v intenzitě elektromagnetického záření (světla), ke které došlo při průchodu vzorkem. Jako vzorek se používá roztok obsahující rozpuštěnou látku, která je schopna absorbovat záření určité vlnové délky. Procentuální vyjádření pohlceného záření označujeme jako absorpenci ( $A$ ). V praxi to pak vypadá tak, že v roztoku rozpustíme měřenou látku, jejíž přítomností nebo aktivitou dochází ke změně absorpčních vlastností celého roztoku. Pomocí spektrometru změříme množství světla, které tento vzorek pohltí a zároveň změříme množství pohlceného světla čistým rozpouštědlem. Porovnáním těchto hodnot jsme schopni určit vlastní absorpci rozpuštěné látky ve vzorku.

Absorbance při určité vlnové délce závisí na koncentraci ( $c$ ) a na mohutnosti vrstvy ( $l$ ) měřeného vzorku. Vztah mezi výše uvedenými veličinami lze vyjádřit pomocí Lambert-Beerova zákona:

$$A_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} l c$$

$\epsilon_{\lambda}$  – molární absorpční koeficient představuje konstantu rozpouštědla.

Lambert-Beerův zákon platí pouze pro roztoky o nízkých koncentracích ( $10^{-2}$  mol/l) a nedá se použít u látek, které vykazují specifické interakce s prostředím (fluorescence, luminiscence apod.). V naprosté většině případů však tento zákon můžeme použít a představuje základní postup pro zjištění koncentrace látky v roztoku.

Základním ověřením platnosti Lambert-Beerova zákona a zároveň metodologickým základem je sestavení grafické závislosti absorbance roztoku na jeho koncentraci. Tato závislost by měla být přímá, lineární a měla by nám poskytovat nástroj pro stanovení neznáme koncentrace našeho vzorku (známe-li jeho absorpenci dosadíme ji do grafu a odečteme koncentraci).

Schéma absorpčního spektrofotometru

Základní prvky absorpčního spektrofotometru jsou:

- zdroj záření
- monochromátor
- měřící komůrka
- detekční systém

**Zdroj světla** ve spektrofotometru musí mít vysokou intenzitu světla na všech vlnových délkách ve viditelném spektru. Důvod je ten, že do detektoru se dostane jen zlomek z energie vyzářené světelným zdrojem. Čím je intenzita světelného zdroje

#### Vlnová délka

625 až 740 nm

590 až 625 nm

565 až 590 nm

520 až 565 nm

500 až 520 nm

430 až 500 nm

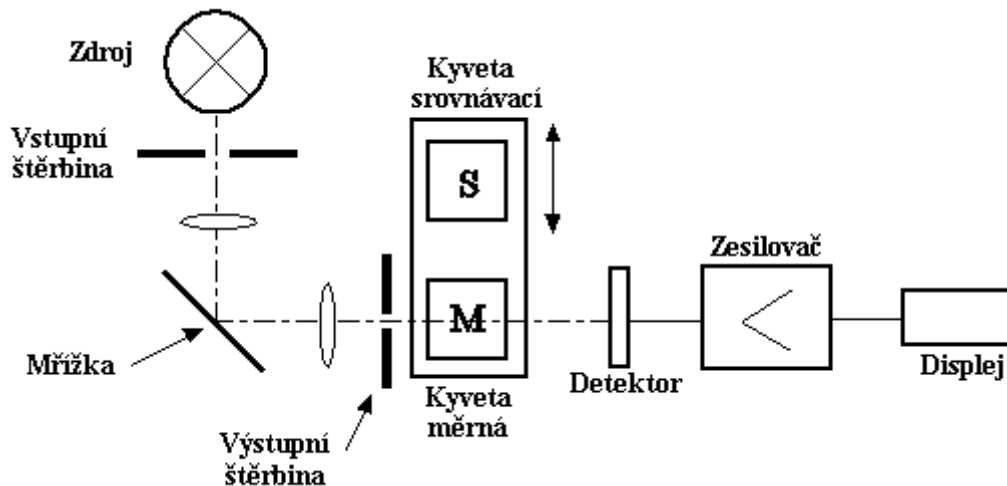
380 až 430 nm

vyšší, tím více užitečného signálu dopadá na detektor a užitečnou informaci lze lépe oddělit od šumu. Jako zdroj elektromagnetického záření pro viditelnou oblast se u levných přístrojů využívá wolframová nebo halogenová žárovka, u drahých potom pulzní xenonová výbojka.

**Monochromátor** je soustava prvků (hranol, reflexní mřížka apod.), které mají za úkol vytvořit na výstupu monochromatický paprsek. Jinými slovy v něm dochází k výběru elektromagnetického záření o přesně definované vlnové délce (např. 550 nm).

**Měřicí komůrka** je prostor do kterého se umísťuje měřený vzorek. Starší přístroje využívali tzv. kyvety, což byly speciální zkumavky čtvercového průřezu s objemem cca 1 – 1,5 ml. Současný trend směřuje k minimalizaci objemu vzorku a kyvety byly nahrazeny moderními mikrodestičkami. Dnes jsou k dispozici destičky s 96-, 384- až třeba 9600 jamkami (nejpoužívanější jsou 96ti jamkové).

**Detekční systém** sestává z vlastního detektoru elektromagnetického záření a dalších zařízení na postdetekční zpracování signálu. Detektor převádí zářivý tok na elektrický signál, který je dále postdetekčně zesílen fotonásobičem a nakonec zobrazen na displeji.



Související informace:

[http://www.vscht.cz/anl/lach1/5\\_Foto.pdf](http://www.vscht.cz/anl/lach1/5_Foto.pdf)

[http://www.microplate.org/history/det\\_hist.htm](http://www.microplate.org/history/det_hist.htm)

## Úloha 7: Turbidimetrické stanovení celkových Ig a IgG

### Stanovení celkových imunoglobulinů:

Poměrně spolehlivá metoda, při níž se frakce proteinů odpovídající imunoglobulinům vysráží z roztoku vhodnou chemikálií, např. síranem zinečnatým.

**Pomůcky:** stojánek se zkumavkami, nastavitelné mikropipety, roztok síranu zinečnatého ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 208 mg do 1000 ml destilované, 15 minut převařené vody),  $\text{pH} = 5,8$ , fyziologický roztok, standardní lidské sérum o známé koncentraci imunoglobulinů, lidské sérum s neznámou koncentrací imunoglobulinů, spektrofotometr pro viditelnou oblast schopný měřit při vlnové délce 590 nm.

**Provedení:** K 5  $\mu\text{l}$  kontrolního séra/vzorku přidáme 300  $\mu\text{l}$  roztoku  $\text{ZnSO}_4$  a dobře roztřepeme. Jako slepý vzorek bude sloužit směs séra s fyziologickým roztokem. Směs necháme stát 120 minut. Po důkladném roztřepání těsně před vlastním měřením se intenzita vytvořeného zákalu stanovuje spektrofotometricky při vlnové délce 590 nm na základě úbytku absorbance.

**Vyhodnocení:** Od absorbancí vyšetřovaného vzorku a kontrolního séra se odečtou absorbance příslušných slepých zkoušek. Koncentrace imunoglobulinů ve vyšetřovaném séru se vypočte z kalibrační křivky sestavené z hodnot několika ředění standardního séra.

### Stanovení IgG:

Určení lidského imunoglobulinu je založeno na reakci mezi imunoglobuliny jako antigeny a specifickém antiséru jako protilátce, se kterou budou imunoglobuliny reagovat. Při této reakci vzniká nerozpustný komplex tvořící zákal, který je měřen spektrofotometricky Spekoem nebo ELISA - readerem při 340 nm.

Pomůcky: ELISA – reader, termostat na 37°C, třepačka, komerční kit obsahující příslušné roztoky, lidské anti IgG, lidský IgG, automatické pipety, mikrotitrační destičky

Složka A fosfátový pufr (pH 7,5), PEG, NaCl, azid sodný  
Složka B antisérum anti IgG, azid sodný  
Složka C Good's pufr (pH 7,5), chlorid sodný, azid sodný

Roztok B+C: rozpustit 1 díl roztoku B a 3 díly roztoku C

Kalibrátor: lidský imunoglobulin IgG. Používá se k získání kalibrační křivky

Vzorek: lidské sérum

### Příprava kalibrační křivky:

<b>PRACUJÍCÍ KALIBRÁTOR</b>	1	2	3	4	5
<b>FYZIOLOGICKÝ ROZTOK</b>	80	30	30	30	30
<b>KALIBRÁTOR</b>	20				
<b>ŘEDĚNÍ</b>	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80
<i>přenáší se 30 µl</i>		←	←	←	←
<b>KONCENTRACE (mg/ml)</b>	C/5	C/10	C/20	C/40	C/80

### Příprava vzorků k měření množství IgG:

ROZTOK	BLANK	KALIBR	VZOREK
FYZIOLOG. ROZTOK	5 µl	-	-
KALIBR. ROZTOK 1-6	-	5 µl	-
ŘEDĚNÝ VZOREK	-	-	5 µl
REAGENT A	225 µl	225 µl	225 µl
REAGENT B+C	25 µl	25 µl	25 µl

Důkladně promíchat, nanést 100 µl a inkubovat 10 min. při 37°C, poté změřit při 340 nm na ELISA-readeru.

### Vyhodnocení:

- Vytvořit kalibrační křivku, kde na ose X bude koncentrace v mg/ml pro každý kalibrátor a na ose Y bude hodnota absorbance při 340 nm.
- Určit koncentraci vzorku z kalibrační křivky.

Referenční hodnoty pro zdravého jedince: IgG = 640 - 1350 mg/dl = 6,4 – 13,5 mg/ml.

## Úloha 8: Dvojitá radiální imunodifúze podle Ouchterlonyho

Ouchterlonyho modifikace imunodifúze probíhá na skleněné destičce v agarozovém gelu, do kterého se vysekají jamky podle různých šablon. Do nich se nanáší Ag a Ab. Ty difundují radiálně do gelu a v místě střetu vytvářejí charakteristické precipitační linie. Podle jejich počtu lze opět stanovit počet přítomných dvojic Ag a Ab. Když kolem jedné jamky s Ab vysekáme podle různých šablon několik jamek a do nich napipetujeme různé Ag, můžeme podle tvaru obloučků a jejich propojení určovat identitu, příbuznost nebo odlišnost Ag. Lze také porovnávat vzájemnou molekulovou hmotnost Ag a Ab.

Protože Ag a Ab difundují kolem jamek radiálně, nazývá se tato metoda dvojitá radiální imunodifúze.

- Úkol: 1. Stanovení ekvivalence Ag a Ab  
2. Stanovení míry příbuznosti Ag a Ab

Pomůcky: stojánek se zkumavkami, nastavitelné mikropipety, skleněné desky 5x5 cm, Petriho misky na vlhkou komůrku, 1% agarosa, Ag, Ab, fyziologický roztok.

Provedení: Na vodní lázni rozvaříme 1% agarosu a nalejeme po 2,4 ml na 2 skla. Necháme ztuhnout ve vodorovné poloze, podle šablony vysekáme jamky pro Ag a Ab. Pipetou nanese 32  $\mu$ l Ag do okrajových a 100  $\mu$ l Ab do střední jamky, vložíme do vlhké komůrky a necháme inkubovat v lednici 48 hodin.

Sušení a barvení: Po inkubaci pereme skla nejvýše 2 minuty ve fyziologickém roztoku, zabalíme je do chromatografického papíru navlhčeného fyziologickým roztokem a přes noc sušíme při pokojové teplotě. Poté sejmeme papír, skla opereme pod tekoucí vodou a barvíme barvicím roztokem (225 ml CH<sub>3</sub>OH, 25 ml CH<sub>3</sub>COOH, 0,25 g amidočerni 10B) do dostatečného obarvení linií. Pozadí odbarvíme diferenciačním roztokem (CH<sub>3</sub>OH : CH<sub>3</sub>COOH 10:1). Nakonec opereme v destilované vodě a usušíme bez papíru.

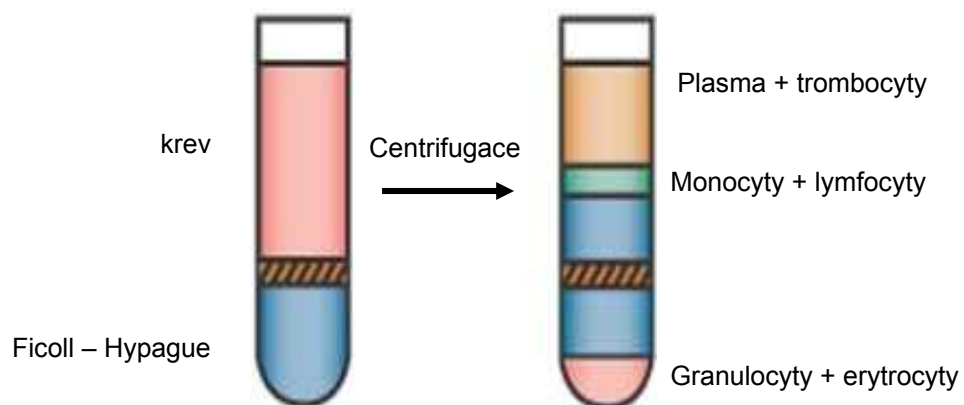
Vyhodnocení: Ředění Ag a Ab jsou ekvivalentní tehdy, nachází-li se precipitační linie uprostřed mezi jamkami Ag a Ab.

## Metody separace buněk

Pro izolace krevních elementů z plné krve se používají různé metody, přičemž důležitý faktor je čistota získané buněčné populace. Zpravidla platí, že čím je čistota vyšší, tím je vyšší její cena a náročnost.

### **Gradientová centrifugace**

Metoda je založena na rozdílné hustotě separovaných buněk. Erytrocyty a granulocyty mají vyšší hustotu než monocyty a lymfocyty. Separace je velmi jednoduchá a spočívá v navrstvení heparinované krve na separační gradient (např. Ficoll-Hypaque) s následnou centrifugací. Poté dojde k typickému rozdělení buněk viz obrázek.



Vrstva lymfocyty / monocyty / plasma / trombocyty se musí znovu promývat a centrifugovat, aby se odmyly trombocyty.

Celá příprava trvá asi hodinu a z 1 ml periferní krve lze získat  $1 - 2 \times 10^6$  mononukleárních buněk. Tyto buňky lze dále použít k řadě funkčních testů (proliferační testy, testy cytotoxicity, průtoková cytometrie apod.). Je-li vyžadována frakce čistých lymfocytů, musí se monocyty oddělit pomocí adherence na plastový povrch.

**Výhody a nevýhody:** cena, jednoduchost, buňky po centrifugaci zůstávají plně funkční. V některých případech (při separaci pupečnickové krve, u malých dětí a nebo také za patologických stavů) se v krvi vyskytuje zvýšené množství prekurzorů erytrocytů, které obsahují jádra a po separaci zůstávají v horní

vrstvě. Technicky obtížné je sesbírání prstence lymfocytů a monocytů. Nejlepších výsledků je dosahováno při teplotě 18 – 20 °C. Pokud mají být buňky v další fázi použity pro kultivaci musí se pracovat za sterilních podmínek.

### Isolace lymfocytů pomocí rozet

Metoda využívá povrchových receptorů lymfocytů. CD2 na povrchu T-lymfocytů funguje jako receptor pro povrchové antigeny ovčích erytrocytů a vytváří s nimi tzv. Rozety (označované jako T-rozety). Podobně B-lymfocyt reaguje s myšími erytrocyty.

Tato metoda byla používána před objevem monoklonálních protilátek a průtokové cytometrie. Hodnocení spočívalo ve zjišťování počtu rozet ve světelném mikroskopu. Dnes se tato metoda využívá ve spojení s gradientovou centrifugací. Erytrocyty se oddělují osmotickou lýzou.

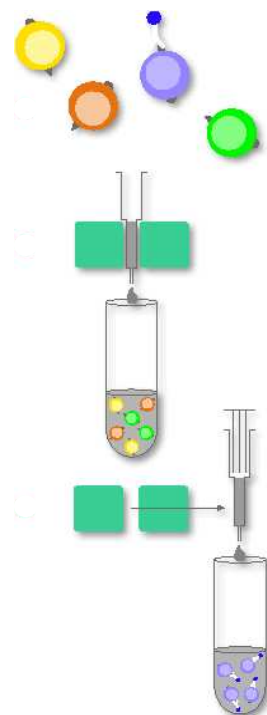
**Výhody a nevýhody:** metoda využívá vazbu na receptor buněk, tudíž dochází k aktivaci buněk.

### Imuno-magnetická separace

Široce používaná metoda separace na základě povrchových markerů buněk.

Používá se v pozitivním nebo negativním uspořádání. Pozitivní separace spočívá ve výběru buněk podle přítomnosti určitého znaku (povrchové molekuly). Negativní pak spočívá v odstranění všech, které specifický znak nenesou. Používají se tzv. selekční protilátky, které jsou pevně navázány na magnetické částice.

Nejprve se buňky naváží na povrch magnetických kuliček, které jsou potaženy specifickou selekční protilátkou. Poté suspenze buněk prochází separační kolonou, která je umístěna v magnetickém poli. Magnetické kuličky s navázanými buňkami zůstávají v magnetickém poli, zatímco zbytek buněk projde kolonou. Jde-li nám o frakci buněk, která zůstává zachycena v magnetickém poli pomocí specifických protilátek, hovoříme o tzv. pozitivní selekci. Naopak jde-li nám o frakci buněk, která kolonou prochází aniž by se vázala na specifické protilátky navázané na povrchu magnetických kuliček, hovoříme o negativní selekci. Nevýhoda pozitivní selekce je aktivace buněk prostřednictvím vazby na povrchový marker. Tudíž se častěji využívá negativní selekce, při které ze suspenze vychytáváme všechny typy buněk, které chceme odstranit. Je tedy jasné, že negativní selekce je dražší, neboť při ní potřebujeme více druhů specifických protilátek. Často se používá pro izolaci buněk CD34 a subpopulaci lymfocytů.



**Výhody a nevýhody:** existuje široká škála komerčně dostupných separátorů a kitů specifických pro určité buněčné populace. Jednoduchost, rychlost. Doporučená teplota izolace je 4 °C. Při vyšší teplotě dochází k nespecifické vazbě monoklonálních protilátek na jiné buněčné populace.

### Selekce pomocí průtokové cytometrie

Jedná se o tzv. třídění nebo-li sortování buněk, což je jedna z funkcí průtokového cytometru. Buňka se označí fluorescenční protilátkou a je přístrojem detekována na základě svých optických vlastností a elektrickým výbojem je vychýlena ze své dráhy a nasměrována do sběrné zkumavky.

**Výhody a nevýhody:** Vysoký stupeň čistoty (až 99 %). Vysoká náročnost na přístrojové vybavení.

## Úloha 9: Izolace lymfocytů z myší krve

### Princip

Tato metoda se běžně používá v biochemických či výzkumných laboratořích jako mezistupeň k dalšímu stanovení imunitních vlastností a aktivit lymfocytů jako je např. proliferace buněk, aktivita buněčných enzymů, a k izolaci DNA z lymfocytů. V nádorové terapii se používá izolovaných lymfocytů k určení proliferační odpovědi lymfocytů po vystavení nádorovým buňkám i extraktům, pro stanovení cytotoxické aktivity výkonných buněk proti nádorům.

### Pomůcky

centrifuga s malým rotorem, komůrky na počítání buněk, teplotní vodní lázeň s šikmou polohou pro zkumavky, eppendorfky, umělohmotné testovací nádoby - kalibrované, nastavitelné mikropipety a špičky

### Chemikálie

ajatin, 0,87%  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , roztok heparinu (5.000 jednotek/ml), Hanksův roztok na uchování lymfocytů, myší krev, Histopaque. Během centrifugace se erytrocyty a granulocyty shlukují pomocí polycukrózy a rychle sedimentují. Lymfocyty a monocyty zůstávají ve vrstvě plazma – Histopaque na povrchu. Myší krev.

### Postup

1. Připravíme si heparin do zkumavky (na 1 ml krve 50 jednotek). Z jedné myši lze získat cca 1 ml. Krev IHNEDE po odběru přidáme do zkumavky s heparinem a důkladně, ale jemně promícháme.
2. Krev navrstvíme na roztok Histopaque (2 díly krve a 1 díl Histopaque / 300  $\mu\text{l}$  krve + 150  $\mu\text{l}$  Histopaque).
3. Temperujeme 30 min při 37 °C v šikmé poloze, zároveň vytemperujeme i Hanksův roztok a roztok  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Šikmá poloha nám zvětší efektivní povrch, na kterém dochází k separaci.
4. Pipetou opatrně stáhneme horní světlou vrstvu lymfocytů ze zkumavky do eppendorfky.
5. Centrifugujeme 10 min při 1500 ot/min.
6. Sediment resuspendujeme v asi 300  $\mu\text{l}$   $\text{NH}_4\text{Cl}$ .
7. Centrifugujeme 10 min. při 1500 ot/min.
8. Sediment resuspendujeme v asi 300  $\mu\text{l}$  Hanksova roztoku.
9. Centrifugujeme 10 min při 1500 ot/min.
10. Sediment resuspendujeme ve známém množství Hanksova roztoku (200  $\mu\text{l}$ ).
11. Spočítáme množství buněk v Bürkerově komůrce ve světelném mikroskopu při 10x zvětšení objektivu.
12. Zjištěné množství buněk použijte k výpočtu množství Hanksova roztoku, které je potřeba přidat k suspenzi, abychom získali roztok o koncentraci buněk  $10^6$  /ml.
13. Dále určete množství buněk získaných z původních 300  $\mu\text{l}$  krve, tento údaj porovnejte s fyziologickými hodnotami a určete výtěžnost vlastní práce.

### Počítání v Bürkerově komůrce:

1. Na čistou a suchou Bürkerovu komůrku položte krycí sklíčko tak, aby těsně přiléhalo k ploškám po stranách (využijte navlhčení styčných ploch)
2. Připravenou suspenzi buněk dobře protřepejte.
3. Naneste cca 10  $\mu\text{l}$  buněčné suspenze ze strany na hranu krycího skla (do obou počítacích mřížek).
4. Sledujte ve světelném mikroskopu. Používá se středním zvětšení (100x) s přiclouňným kondenzorem (přivřená aperturní clona kondenzoru). Postupujte vždy čtverec po čtverci směrem zleva doprava a zhora dolů.
5. Po ukončení počítání obě části komůrky oddělte, opatrně opláchněte vodou a vytřete dosucha.



Poznámky:

Aby se nepočítaly buňky ležící na rozhraní sousedních čtverců dvakrát, počítáme jen ty, které leží nebo se dotýkají pouze 2 vybraných sousedních stran čtverce (např. horní a levé).

**Každý vzorek spočítejte nejméně 25 čtverců v každé z počítacích mřížek (celkem tedy 50 velkých čtverců).**

## Hodnocení

Pro stanovení počtu buněk v  $1 \text{ mm}^3$  suspenze využijte údaje o rozměrech 1 velkého čtverce:

Výška = 0,1 mm

Strana = 0,2 mm

Při počítání množství buněk získaných z původní krve berte v úvahu také ředění a množství krve na počátku pokusu.

Výtěžnost metody stanovíte porovnáním počtu buněk získaných z původního vzorku krve s fyziologickými hodnotami.

### Fyziologické hodnoty u myši:

Počet leukocytů: 4 000 – 30 000 /  $\mu\text{l}$  jako průměr se udává 10 000

Počet lymfocytů: 65 – 90 %

Počet neutrofilů: 10 – 20 %

Počet eosinofilů: 0 – 7 %

Počet monocytů: 0 – 3 %

Počet basofilů: 0 – 1 %

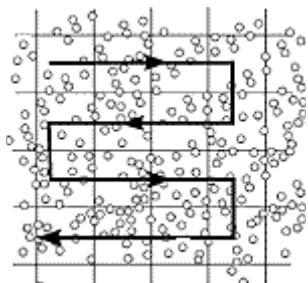
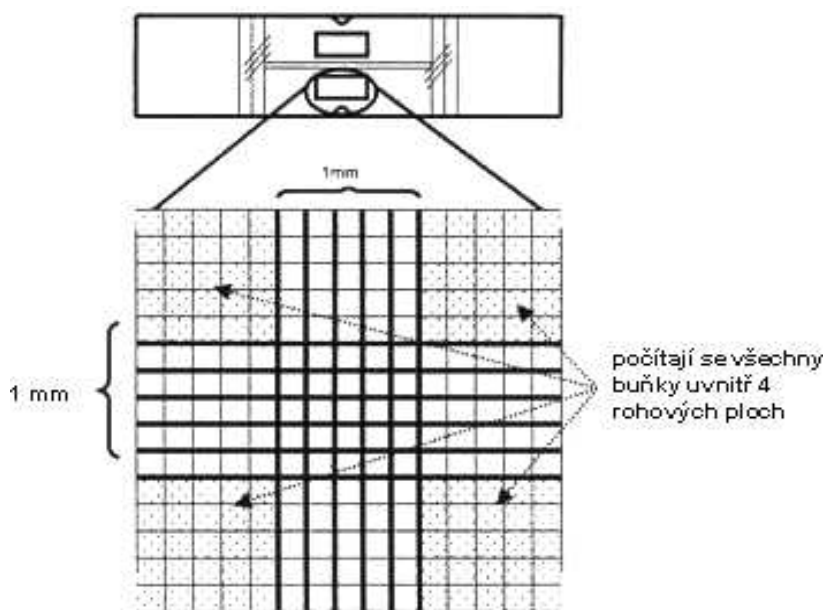
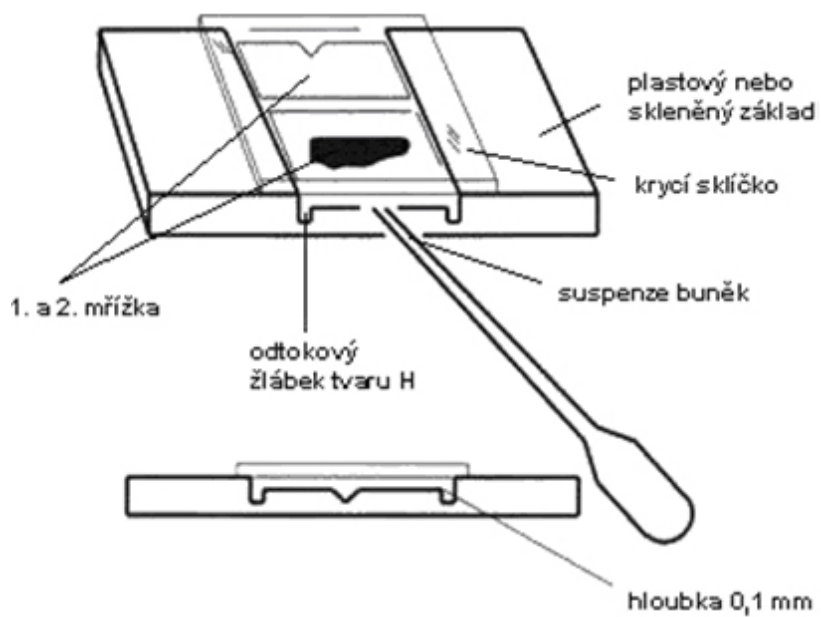
Související informace:

<http://www.cytometry.cz/cs/protokoly-facs/15-izolace-lymfocytu-z-periferni-krve.html>[http://www.protocol-online.org/prot/Cell\\_Biology/Cell\\_Separation/](http://www.protocol-online.org/prot/Cell_Biology/Cell_Separation/)

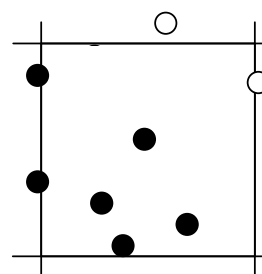
<http://www.biocompare.com/protocols/category/3481/B-Lymphocyte-Isolation.html>

<http://www.tebu-bio.com/file/thematic/65/>

## Popis Bürkerovy komůrky



Postup vybírání čtverců



Výběr buněk v 1 čtverci (černě označené se počítají, bílé ne)

upraveno podle **WHO.int**

## Metody sledování komplementového systému

Komplement plní v imunitním systému řadu klíčových funkcí. Komplementová kaskáda obsahuje základních složek, které se v průběhu aktivace postupně aktivují. Aktivace spočívá většinou v odštěpení krátkého úseku bílkovinného řetězce, přičemž tyto fragmenty plní v průběhu aktivace kaskády další funkce. Celkově lze efekty komplementu charakterizovat jako membranolytické, opsonizační a chemotaktické. Aktivace může probíhat třemi vcelku dobře popsanými cestami: klasickou, alternativní a lektinovou. Při sledování složek komplementu se zpravidla zaměřujeme na určitou část kaskády.

Stanovení jednotlivých složek je problematické, neboť kaskáda se aktivuje rychle a jednotlivé složky mají krátký poločas rozpadu. Navíc jejich koncentrace v séru jsou příliš nízké. Technicky realizovatelné diagnosticky přínosné je pouze stanovení složek C3 a C4, které se provádí nefelometricky za použití specifických protilátek proti těmto složkám. Je možné tyto složky stanovit i radiální difúzí nebo ELISA testem. Jde o sérové proteiny, podobně jako protilátky, proto způsoby stanovení jsou podobné. Stanovování ostatních složek aktivace kaskády se stanovuje pouze ve výjimečných případech spíše v rámci výzkumu.

Další hodně používanou možností je vyšetření funkční aktivity měřením membranolytického účinku. Existuje několik možností které se liší způsobem, kterým vizualizují konečný membranolytický účinek. Nestarší metodou pro toto stanovení je měření hemolytické aktivity, kdy se sleduje intenzita hemolýzy erytrocytů po působení komplementu. Hemolýzu lze sledovat buď v gelu pomocí radiální difúze nebo v gelu ve zkumavce, nebo lze použít spektrofotometrické stanovení. Běžně dostupné jsou tzv. spektrofotometrické CH 50 nebo CH 100 testy.

Lýza erytrocytů způsobená komplementem se využívá i v tzv. **komplement fixační reakci (KFR)**: je to poměrně stará metoda, která spojuje stanovení protilátek se stanovením komplementu a primárně se používala právě pro stanovení protilátek. Při reakci antigenu s protilátkou dochází k „fixaci“ komplementu a jeho spotřebě. Jde ve skutečnosti o jeho aktivaci. Komplement, který po této reakci ve směsi „zbude“ se stanovuje pomocí hemolýzy přidaných erytrocytů. Čím menší je lýza erytrocytů, tím méně komplementu ve směsi zbylo, tzn. tím více se ho spotřebovalo v prvním kroku při reakci sledované protilátky s antigenem, což znamená že tím více si odpovídal antigen se stanovovanou protilátkou nebo tím více bylo sledované protilátky v původním vzorku.

KFR je nenáročná na vybavení i finance, ale je to metoda pracná a celkem málo citlivá.

Z diagnostického hlediska má dále význam stanovení některých regulačních složek komplementové kaskády. Zejména jde o TZV. C1 inhibitor, který za fyziologických okolností hned v počátku reguluje rozběhnutí celé kaskády. Existuje vzorový deficit této složky, který se projevuje onemocněním zvaným hereditární angioedém. Onemocnění se projevuje nekontrolovatelnou, náhlou aktivací po relativně slabém podnětu (drobné poranění, menstruace, stomatologické výkony apod.), které může vést až k život ohrožujícím otokům sliznic a dalších komplikacím. Stanovení C1 inhibitoru se provádí nefelometricky jakožto sérového proteinu.

Stanovování komplementu se provádí v různých diagnostických situacích, jejich rozsah vyplývá z poměrně širokého rámce působení komplementu.

Jako nejčastější příklady lze uvést:

- podezření na deficity jednotlivých složek, kdy je snaha tyto složky přímo stanovit, jak už bylo uvedeno, v praxi je to možné u C3 a C4 složky
- imunokomplexové choroby, kdy se rovněž stanovuje C3 a C4 složka, ale potíže činí fakt, že koncentrace uvedených složek se u těchto chorom poměrně rychle mění. Normální hodnoty C3 a C4 složky se pohybují okolo 0,2 – 1,2 resp. 0,15 – 0,4 g/l.

Celková hemolytická aktivita se vyšetřuje při opakovaných vleklých infekcích určitými patogeny, např. Neisserii a dále při podezřeních na imunodeficit.

### **Úloha 10: Stanovení bakteriolytické aktivity komplementu chemiluminiscenčně**

Jedná se o relativně novou metodu, která je používána např. na stanovení aktivity komplementu u ryb. Ryby vykazují určité odlišnosti v aktivaci komplementové kaskády ve srovnání se savci: např. není zde



	A 4	A 4											
--	-----	-----	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Blank K(klasická cesta): sérum 0 $\mu$ l, 50 $\mu$ l HIS, 50 $\mu$ l suspenze bakterií

Blank A alternativní cesta): sérum 0 $\mu$ l, 50 $\mu$ l HIS s EGTA, 50 $\mu$ l suspenze bakterií

K 1: 5  $\mu$ l séra, 45  $\mu$ l HIS, 50 $\mu$ l suspenze bakterií

K2: 15  $\mu$ l séra, 35  $\mu$ l HIS, 50 $\mu$ l suspenze bakterií

K3: 20  $\mu$ l séra, 30  $\mu$ l HIS, 50 $\mu$ l suspenze bakterií

K4: 40  $\mu$ l séra, 10  $\mu$ l HIS, 50 $\mu$ l suspenze bakterií

A1: 5  $\mu$ l séra s EGTA, 45  $\mu$ l HIS s EGTA, 50 $\mu$ l suspenze bakterií

A2: 15  $\mu$ l séra s EGTA, 35  $\mu$ l HIS s EGTA, 50 $\mu$ l suspenze bakterií

A3: 20  $\mu$ l séra s EGTA, 30  $\mu$ l HIS s EGTA, 50 $\mu$ l suspenze bakterií

A4: 40  $\mu$ l séra s EGTA, 10  $\mu$ l HIS s EGTA, 50 $\mu$ l suspenze bakterií

## Hemaglutinační metody

Aglutinace (shlukování) patří ke klasickým sérologickým metodám. Lze ji využít při stanovování reakce antigen protilátka: jedna ze složek reakce je navázána na latexové partikule. Schopnost aglutinovat mají pouze protilátky IgG a IgM. Po proběhnutí reakce, kdy vzniknou komplexy Ag – Ab k aglutinaci, partikule vzájemně „propojené“ komplexy Ag – Ab klesají na dno reakční zkumavky. Reakce může probíhat i tak, že antigen je součástí povrchu bakterií, které jsou shlukovány při reakci se specifickými protilátkami. Reakce se obvykle hodnotí vizuálně a jako výsledek se udává titr séra – tedy nejvyšší ředění séra, které ještě vyvolalo aglutinaci.

Citlivost aglutinačních stanovení je poměrně nízká, na druhou stranu je to metoda nenáročná na vybavení a levná. Nevýhodou je krátká doba skladovatelnosti latexových partikulí, protože časem mají tendenci se shlukovat.

Hemaglutinace je modifikací která využívá vazby protilátek na erythrocyty, výsledkem je potom okem dobře pozorovatelný shluk erythrocytů, který je dostatečně pevný při standardním způsobu třepání. Rovněž u této modifikace činí potíže nízká citlivost a omezená životnost erythrocytů.

### Úloha 11: Stanovení antigenů krevních skupin za použití bromelinu

Antigeny krevního systému ABO jsou molekuly glykoproteinů vázané v membránách červených krvinek.

krevní skupina	antigen v membráně erythrocytů
A	A
B	B
O	H
AB	A i B

Podstatou sérologického stanovení těchto antigenů je **aglutinace – shlukování** erythrocytů, kdy reaguje antigen v membráně erythrocytů s příslušnou protilátkou označovanou jako *anti A*, *anti B* nebo *lektin* v případě antigenu H.

Výsledkem vzájemné reakce erythrocytárního antigenu a příslušné protilátky je **aglutinace** a reakci hodnotíme jako pozitivní, když shluk krvinek je pevný a nelze ho roztřepat.

**Bromelin** hydrolyzuje peptidické vazby v membránách erythrocytů a tímto způsobem membránu „natráví“. Z fyzikálního hlediska se jedná o snížení povrchového napětí membrány.

Důsledkem je zesílení některých interakcí antigen – protilátka, v našem případě by se účinkem bromelinu měla zvýšit intenzita aglutinace erythrocytů. Krvinky natrávené bromelinem by tedy měly být citlivější k působení příslušných protilátek, tj. aglutinace by se měla projevit i při větším zředění protilátek, než tomu bude u krvinek neovlivněných bromelinem.

#### Cíl práce:

srovnat míru aglutinace erythrocytů ovlivněných bromelinem s aglutinací neovlivněných erythrocytů

## Postup, pomůcky:

Pracujeme v rukavicích !!! *Dbáme na pečlivé značení všech zkumavek – krevní skupinu i číslo zkumavky (ředění), pro potřeby inkubace je nutno zkumavky značit navíc také vlastní značkou své pracovní skupinky.*

1. fyziologický roztok pro červené krvinky – 0,85% NaCl

2. 3% suspenze erytrocytů krevních skupin A, B, O ve fyziologickém roztoku – již připraveno

3. 3% suspenze erytrocytů hydrolyzovaných (natrávených) bromelinem – nutno připravit:

- do eppendorfek s 20  $\mu$ l 0,5% bromelinu přidáme 180  $\mu$ l erytrocytární suspenze (z bodu 2).

- zkumavky inkubujeme 10 – 15 minut při 37°C.

- centrifugujeme při 1000 ot., cca 30 sec, opatrně odsajeme supernatant, k sedimentu erytrocytů na dně eppendorfky přidáme 180  $\mu$ l fyziologického roztoku, opět centrifugujeme a odsajeme, celkem 3 x, čímž ze suspenze erytrocytů důkladně vymyjeme bromelin. Po posledním promytí přidáme 180  $\mu$ l fyz. roztoku a tímto máme připravenou 3% suspenzi natrávených erytrocytů.

4. připravíme si zkumavky s protilátkami, ve kterých budeme provádět aglutinaci.

Protilátky anti A, anti B ředíme geometrickou řadou 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256

Lektin ředíme 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32

celkem připravíme 2 sady po 15 aglutinačních zkumavkách:

anti A (5 zkumavek), anti B (5 zkumavek), lektin (5 zkumavek) pro krvinky bez bromelinu

anti A (5 zkumavek), anti B (5 zkumavek), lektin (5 zkumavek) pro krvinky s bromelinem

*Zkumavky značíme vždy A 1 až A 5, B 1 – B 5, H 1 – H 5.*

Zásobní roztoky pro anti A, anti B i lektin (anti H) jsou již připraveny, způsob ředění protilátek pro krvinky s bromelinem i bez bromelinu je stejný.

Anti A	1	2	3	4	5
Ředění	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
Pipetovat	200 $\mu$ l	200 $\mu$ l	200 $\mu$ l	200 $\mu$ l	200 $\mu$ l
	zás. r.	zás. r.	r. 2	r. 3	r. 4
		+	+	+	+
		200 $\mu$ l	200 $\mu$ l	200 $\mu$ l	200 $\mu$ l
		fyz. r.	fyz. r.	fyz. r.	fyz.r.

Anti B	1	2	3	4	5
Ředění	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
Pipetovat	200 $\mu$ l	200 $\mu$ l	200 $\mu$ l	200 $\mu$ l	200 $\mu$ l
	zás. r.	zás. r.	r. 2	r. 3	r. 4
		+	+	+	+
		200 $\mu$ l	200 $\mu$ l	200 $\mu$ l	200 $\mu$ l
		fyz. r.	fyz. r.	fyz. r.	fyz.r.

Lektin	1	2	3	4	5
Ředění	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
Pipetovat	200 $\mu$ l	200 $\mu$ l	200 $\mu$ l	200 $\mu$ l	200 $\mu$ l
	zás. r.	zás. r.	r. 2	r. 3	r. 4
		+	+	+	+
		200 $\mu$ l	200 $\mu$ l	200 $\mu$ l	200 $\mu$ l
		fyz. r.	fyz. r.	fyz. r.	fyz.r.

*Z 5. zkumavky vždy odebereme 200  $\mu$ l, aby objem byl ve všech zkumavkách stejný a to 200  $\mu$ l,*

5. do takto naředěných protilátek přidáme vždy po 20 µl příslušné erytrocytární suspenze: do prvních tří řad bez bromelinu, do druhých tří řad s bromelinem. Pořádně promíchat !!!!!

**Dáváme erytrocyty A do anti A, B do anti B, 0 do lektinu (anti H)**

6. zkumavky inkubujeme 10 minut při 37°C, poté centrifugujeme půl minuty při 1000 ot. Po lehkém protřepání odečítáme aglutinaci. Zde třepat velmi citlivě a hlavně stejně ve všech zkumavkách – zajímá nás, zda aglutinace „drží“ či nikoli.

7. do závěru vyhodnotíme citlivost reakce, (tj. uvedeme při kterém ředění byla reakce ještě pozitivní) a zhodnotíme vliv bromelinu na citlivost reakce.

## Metody sledování imunity bezobratlých

U bezobratlých nevyskytuje, i přes některé výjimky, typická adaptivní imunita, pro níž je charakteristická klonální selekce lymfocytů, tvorba specifických protilátek a imunologická paměť. Obrana bezobratlých živočichů je založena na reakcích vrozené (inátní) imunity, které jsou rychlé a nespecifické.

### Úloha 11: sledování mikrobicidních faktorů hemolymfy

**Téma:** Imunoturbidimetrické stanovení množství bakterií ve vzorku.

**Princip:** pod vlivem mikrobicidních faktorů hemolymfy dochází k lýze bakteriálních stěn a vyčeření roztoku. Výsledná reakce se určuje kvantitativně jako změna optických vlastností reakčního roztoku (imunoturbidimetrie měří úbytek viditelného světla po průchodu vzorkem). Jde o snížení zákalu vlivem mikrobicidních faktorů hemolymfy.

**Pomůcky:** roztok bakterií, stojánek se zkumavkami, fix na sklo, automatické pipety, špičky, fyziologický roztok, destičky na ELISA metodu, Elisa-reader, filtr na 340 nm, termostát, fenylthiomočovina proti srážení hemolymfy (dává se asi 0,5 mg do každé eppendorfky na hemolymfu), larvy bource morušového nebo zavíječe voskového.

**Postup:** Roztok bakterií o určité koncentraci naředíme do zkumavek takto: Do zkumavek 1. – 4. napipetujeme 220 µl fyziologického roztoku a do první zkumavky, označené K, napipetujeme 440 µl koncentrovaného roztoku bakterií. Potom přenášíme 220 µl vzorku z první zkumavky (označené K) do druhé, důkladně promícháme a přeneseme 220 µl do další zkumavky atd., naposled do zkumavky č. 4. Poslední ředění je 16x původní koncentrace. Vše během přenášení důkladně promícháváme. Do další řady pěti zkumavek přeneseme 100 µl z každého ředění a přidáme 15 µl hemolymfy. Promícháme a kultivujeme v termostatu 20 min při 37°C.

1.1.1.1 Kontrola	K	1.	2.	3.	4.
1.1.1.2 Násobek pův. konc.	1	0,5	0,25	0,125	0,0625
Ředění: Pipetuje se:	1x 440 µl bakt.	2x 220 µl fyz.r.	4x 220 µl fyz.r.	8x 220 µl fyz.r.	16x 220 µl fyz.r.
→ Přenáší se 220 µl:					
1.1.1.3 Celkem:	220 µl	220 µl	220 µl	220 µl	440 µl



<b>1.1.1.4 Vzorek</b>	1.1.1.5 <b>K´</b>	<b>1.´</b>	<b>2.´</b>	<b>3.´</b>	<b>4.´</b>
↓ Ředění:	1x	2x	4x	8x	16x
↓ Přenáší se:	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Hemolymfa:	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl
Celkem:	115 µl	115 µl	115 µl	115 µl	115 µl

Po 20 minutách kultivace pipetujeme z každé zkumavky (K, č. 1. – 4., K´, 1.´- 4.´) 100 µl na destičku a měříme při 340 nm zákalovou reakci proti blanku 1 (fyziologický roztok).

**Blank 1:** fyziologický roztok, **blank 2:** 100 µl fyziologického roztoku a 15 µl hemolymfy.

**Kontrola: K:** neředěný roztok bakterií, **K´:** 15 µl hemolymfy ve 100 µl neředěného roztoku bakterií.

#### Příklad výsledků:

Číslo zkumavky	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Vzorek	K	1.	2.	3.	4.	K´	1.´	2.´	3.´	4.´	Blank 1	Blank 2
Absorbance	0,254	0,209	0,145	0,100	0,074	0,246	0,174	0,149	0,129	0,104	0,051	0,083
$A_{\text{vzorku}} - A_{\text{blanku}}$	0,203	0,158	0,094	0,049	0,023	0,163	0,091	0,066	0,046	0,021	-	-

Od hodnot K, č. 1. – 4. se odečítá hodnota blanku 1, od hodnot K´, č. 1.´- 4.´ se odečítá hodnota blanku 2.

#### Výsledky:

- Vynáší se hodnoty standardní křivky (K, č. 1. – 4.) a vzorků (K´, č. 1.´- 4.´) do grafu závislosti hodnoty absorbance na ředění:
- Vypočítá se procentuální úbytek hodnoty absorbance vzhledem k příslušným kontrolám: K – K´, 1. – 1.´, 2. – 2.´, 3. – 3.´, 4. – 4.´ (výpočet % podle vzorce:  $100(K - K')/K$ ,  $100(\text{č.1.} - \text{č.1.}')/\text{č.1.}$  ... atd.):

Příklad výsledků:

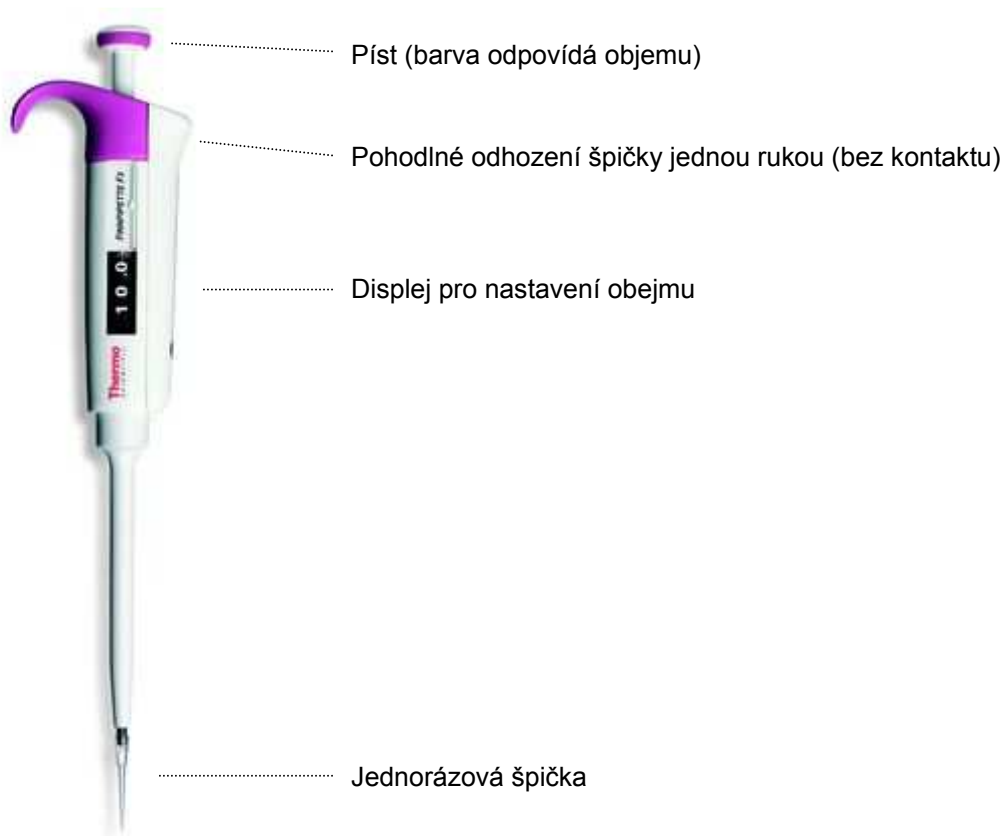
Zkumavka	K – K´	1. – 1.´	2. – 2.´	3. – 3.´	4. – 4.´
Úbytek v %	19,7	42,4	29,8	6,1	8,7

Závěr: Maximum procentuálního úbytku absorbance nastává u koncentrace bakterií: .....

## Obecné laboratorní postupy, pipetování, hematologické postupy

### Automatické pipety a zásady správného používání





Automatická pipeta slouží k manipulaci s řádově mikrolitrovými objemy zpravidla zředěných roztoků (hustota přibližně okolo hustoty vody). Vzdáleně připomíná injekční stříkačku upravenou k manipulaci s velmi malými objemy. Použití těchto pipet je možné jen s tzv. špičkami, což jsou jednorázové plastové špičky, které slouží ke kontaktu s roztokem. Samotná pipeta by se NIKDY neměla dostat do přímého kontaktu s pracovním roztokem. Automatické pipety jsou kalibrovány na vylití, což může znamenat, že v pipetě může zůstat minimální objem kapaliny. Nesnažte se jej za každou cenu z pipety dostat, hovoří se o tzv. mrtvém objemu.

V praxi se běžně používají automatické pipety s rozsahem od 0,1  $\mu\text{l}$  po 5000  $\mu\text{l}$ , přičemž obsahově podobné pipety se označují různými barvami:

- 0,1 – 10  $\mu\text{l}$  se označují bílým pruhem
- 5 – 200  $\mu\text{l}$  žlutým pruhem
- 100 – 1000  $\mu\text{l}$  modrým pruhem

Toto barevné označení usnadňuje také výběr špiček (jednorázové špičky jsou dostupné také ve více objemech) a většina špiček odpovídá svou barvou barevnému označení pipety. Při práci si tedy musíme zvolit pipetu s adekvátním rozsahem a špičku, která pasuje na tuto pipetu.

Automatická pipeta se ovládá pomocí tlačítka pístu. Pro přesnou práci s automatickými pipetami je třeba dodržovat následující zásady:

- zvyknout si na správné uchopení pipety jednou rukou
- pohyb pístu musí být plynulý a pomalý, zvláště při práci s viskózními roztoky (s větší hustotou)
- při pipetování roztoků s vysokou viskozitou nebo povrchovým napětím nižším než má voda se na vnitřní stěně špičky vytvoří vrstva roztoku. Při vypouštění tekutiny ze špičky tato vrstva ulpívá na její vnitřní stěně a tak by mohla vzniknout chyba. Protože množství roztoku, který ulpí ve špičce, je při opakovaném pipetování víceméně konstantní, je možné této chybě zabránit tím, že se vrstva roztoku vytvoří ještě před vlastním pipetováním: do špičky se nasaje roztok a vypustí se zpět do původní nádoby. Všechna následující pipetování budou mít stejnou přesnost a reprodučibilitu
- pracovní roztoky je nutno vytemperovat na pokojovou teplotu. Při odměřování roztoků, jejichž teplota se liší od teploty místnosti, se před vlastním pipetováním doporučuje špičku opakovaně propláchnout roztokem.
- špičku nasadte na pipetu a dobře ji utěsněte mírným pootočením

Pozn. Smočení špičky pipetovanou kapalinou před vlastním pipetováním zvyšuje přesnost pipetování, ovšem většinou se vynechává kvůli úspoře času.

### Vyvarujte se

- NIKDY nenasávejte tekutinu do pipety bez odpovídající špičky
- kapalina NESMÍ vtéci do pipety
- NIKDY neotáčejte pipetu špičkou vzhůru
- NIKDY nepokládejte na stůl pipetu se špičkou, ve které je kapalina nebo její zbytek

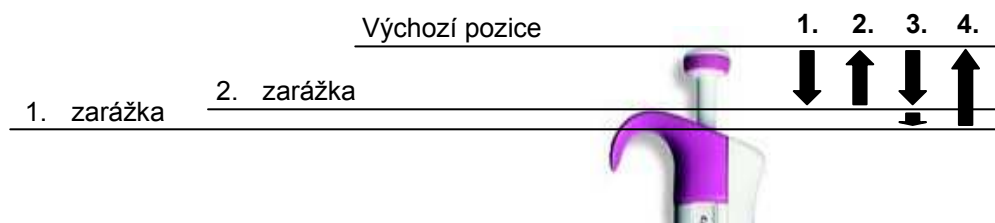
### Postupy při pipetování

Výběr konkrétní pipetovací techniky závisí na typu práce a metody pro kterou ji vybíráme. Například pro viskózní a pěnící roztoky nebo při práci s velmi malými objemy se používá technika obáčeného pipetování, neboť v těchto případech významně zvyšuje přesnost.

#### A) Přímá technika

*Přímá technika je klasický a nejčastěji používaný způsob pipetování. Umožňuje rychlé a přesné odměřování zředěných roztoků.*

1. Stlačte píst pipety k první zarážce.
2. Ponořte špičku těsně pod hladinu (2 – 3 mm) odměřovaného roztoku a POMALU uvolněte píst. Špička se naplní kapalinou. Počkejte asi jednu vteřinu a pak vytáhněte špičku z roztoku. Buničinou nebo mulem oťřete kapičky roztoku, které ulpěly na zevní stěně špičky; při tom se NESMÍTE DOTKNOUT ústí špičky.
3. Pod úhlem 10 – 45° přiložte špičku ke stěně zkumavky, do které chcete přenést měřený roztok. Jemně stlačte tlačítko pipety na první zarážku. Počkejte jednu vteřinu. Poté tlačte píst pipety na doraz, čímž dosáhnete úplného vyprázdnění špičky. Za stálého držení pístu vytáhněte špičku z roztoku.
4. Uvolněte tlačítko do výchozí polohy. Pokud je to nutné, vyměňte špičku a pokračujte v dalším pipetování.

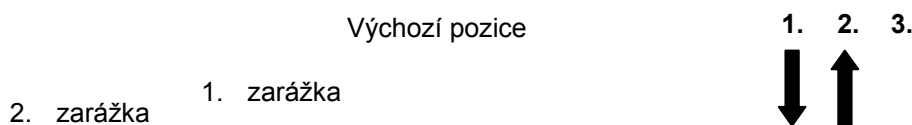


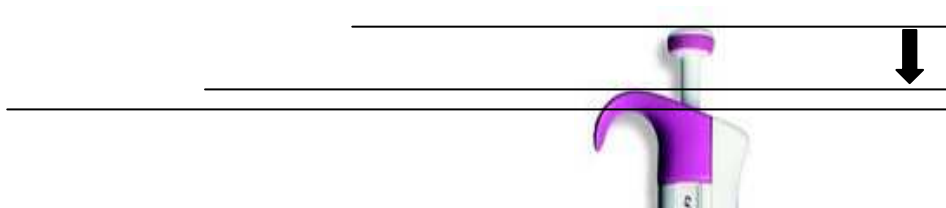
Znázornění postupu přímé techniky pipetování.

#### Obrácená technika

*Tato technika je vhodná pro pipetování roztoků s vysokou viskozitou nebo roztoků, které snadno tvoří pěnu. Dále se tato technika doporučuje pro pipetování velmi malých objemů.*

1. Stlačte píst až na druhý doraz.
2. Špičku ponořte těsně pod hladinu roztoku (2 – 3 mm) a pomalu uvolněte tlačítko. Špička se naplní tekutinou.
3. Pomalu stlačte píst na první doraz a tím vypustíte přesný objem roztoku ze špičky. Zbytek roztoku zůstává ve špičce, ten ale není součástí měřeného objemu, vyhodí se se špičkou, případně se vrátí zpět do původní nádoby.



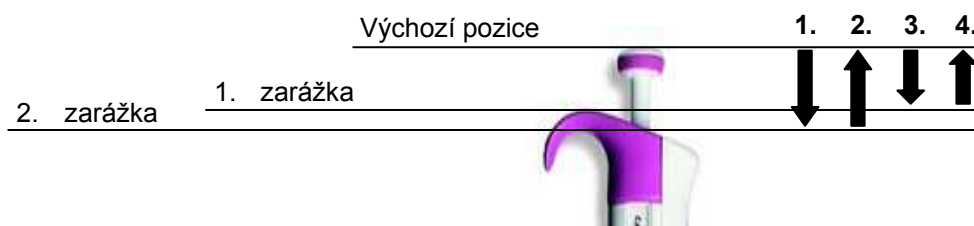


Znázornění postupu obrácené techniky pipetování.

### B) Opakovací technika

Jedná se o rychlý a jednoduchý způsob opakovaného odměřování stejného objemu téhož roztoku.

1. Stlačte píst až na druhý doraz.
2. Špičku ponořte těsně pod hladinu roztoku (2 – 3 mm) a pomalu uvolněte tlačítko. Špička se naplní tekutinou.
3. Pomalu stlačte píst na první doraz a tím vypustíte přesný objem roztoku ze špičky. Držte píst stále na prvním dorazu. Ve špičce zůstává zbytek roztoku, ten ale není součástí měřeného objemu.
4. Znovu ponořte špičku těsně pod hladinu původního roztoku a pomalu uvolněte tlačítko do výchozí polohy. Špička se opět naplní roztokem.
5. Pokračujte v pipetování tak, že opakuje postup uvedený v bodech 3 a 4.



Znázornění postupu opakovací techniky pipetování.

### C) Pipetování plné krve

Plná krev je velmi viskózní kapalina. Při jejím pipetování je lepší využít obrácenou techniku pipetování. Pipetujeme-li plnou krev nesmáme špičku před vlastním pipetováním a pro náběr krve používáme vždy čistou špičku. Při pipetování krve je nutné dbát opatrnosti a pipetovat pomalu, abychom se vyhnuli mechanické hemolýze.

#### Obrácenou technikou

1. Stlačte píst až na druhý doraz ponořte špičku pod hladinu roztoku a pomalu uvolněte tlačítko do výchozí pozice. Vyškejte 1 s než se hladina krve ve špičce ustálí.
2. Buničinou nebo mulem otřete kapičky krve, které ulpěly na zevní stěně špičky; při tom se nesmíte dotknout ústí špičky.
3. Přiložte konec špičky na vnitřní stěnu zkumavky nad hladinu přítomné kapaliny, zmáčkněte tlačítko na první doraz, počkejte jednu vteřinu a uvolněte tlačítko do výchozí pozice.
4. Vyhoďte použitou špičku.

#### Přímou technikou

1. Pro naplnění špičky užíjte přímou techniku (stlačte tlačítko na první doraz, ponořte špičku pod hladinu roztoku a pomalu uvolněte tlačítko do výchozí pozice).
2. Buničinou nebo mulem otřete kapičky krve, které ulpěly na zevní stěně špičky; při tom se nesmíte dotknout ústí špičky.
3. Stejně jako při použití přímé techniky vypustte krev do zkumavky s reakční směsí (přiložte konec špičky na vnitřní stěnu zkumavky, zmáčkněte tlačítko na první doraz, počkejte jednu vteřinu a pak zcela vyprázdněte špičku zmáčknutím tlačítka až na druhý doraz). Uvolněte tlačítko do výchozí pozice.
4. Nejméně třikrát propláchněte špičku reakční směsí: Stlačte tlačítko na první doraz a ponořte špičku do reakční směsi s přidanou krví. Držte tlačítko na prvním dorazu a zkontrolujte, zda je

špička skutečně pod hladinou. Pomalu uvolněte tlačítko do výchozí pozice. Špičku nechte nadále ponořenou v reakční směsi s přidanou krví. Opět stlačte tlačítko na první doraz a pomalu je uvolněte. Tento postup opakujte dokud vnitřní stěna špičky není zcela čistá.

5. Nakonec zmáčkněte tlačítko až na druhý doraz a tím špičku úplně vyprázdněte.
6. Vyhodte použitou špičku.

### Ředící řada:

V praxi se často setkáme s problémem ředění, kdy potřebujeme výchozí vzorek zředit. Nejčastěji se používá dvojnásobná ředící řada, při které snižujeme obsah rozpuštěné látky na polovinu. Výsledkem bývá sada několika zkumavek, kdy každá další zkumavka v řadě obsahuje roztok o přesně poloviční koncentraci rozpuštěné látky než zkumavka předcházející. Abychom Vám ulehčili manipulaci a výpočet takové ředící řady, ukážeme Vám jednoduchý postup, jak dosáhnout ředící řady s dvojnásobným ředěním. Níže uvedený postup se hodí například pro přípravu kalibrační křivky, jako je ředění standardu.

Častým problémem je chybná interpretace ředění. Nejčastěji se ředění udává ve 2 formách: podílové a násobné. Podílová formulace představuje počet dílů rozpuštěné látky ku celkovému počtu dílů roztoku (tedy např. 1 : 100). Násobná se pak uvádí jako několikanásobné zředění (např. 10x – desetinásobné).

### Podílové ředění

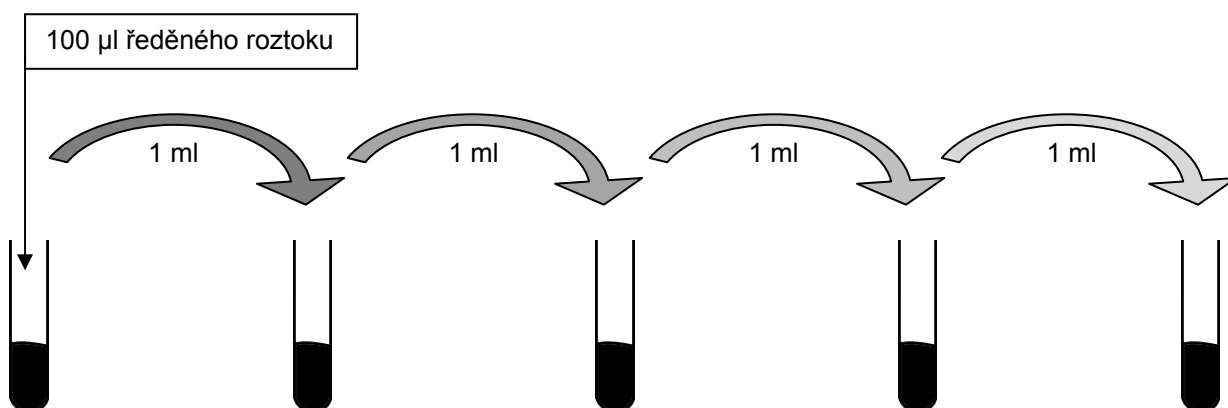
Máme-li zadáno ředění 1 : 100, pak nový roztok bude mít celkem 100 dílů, přičemž 1 díl (ted 1 setina) bude představovat původní zásobní roztok. Máte-li tedy zředit sérum 1 : 1000, pak vezmete například 1  $\mu$ l séra a přidáte 999  $\mu$ l fyziologického roztoku. Množství zásobního roztoku záleží na Vámi požadovaném výsledném objemu.

### Násobné ředění

Uvádí-li se v zadání, že zásobní roztok zředíte 10x, pak vychází z koncentrace, která musí být 10x nižší než zásobního roztoku. Například máte k dispozici 1 ml zásobního roztoku NaCl o koncentraci 10 g/ml a máte jej zředit 10x. Vezmete tedy například 100  $\mu$ l zásobního roztoku a přidáte 900  $\mu$ l vody. V 100  $\mu$ l zásobního roztoku byl rozpuštěn 1 g NaCl a tím, že jste roztok doplnili na 1 ml, získali jste výsledný roztok 1 g/ml, tedy 10x zředěnější.

### Postup přípravy ředící řady (příklad na obrázku dole):

- 1) Připravíme si dostatečný počet zkumavek, podle toho, kolik ředění budeme provádět.
- 2) Zjistíme, jaký výsledný objem každého ředění budeme potřebovat a kolik ředícího roztoku budeme přidávat (do všech zkumavek stejně – krom první, kde bude dvakrát tolik).
- 3) První zkumavka bude obsahovat dvojnásobný objem než ten, který budeme potřebovat. Musíme počítat s tím, že určitý objem budeme přenášet do druhé zkumavky. Budeme-li tedy potřebovat 1 ml každého ředění, připravíme 2 ml prvního ředění.
- 4) Přidáme ředící roztok do všech zkumavek.
- 5) Do první zkumavky v řadě přidáme vypočtený objem ředěného roztoku.
- 6) Důkladně promícháme.
- 7) Z první zkumavky odebereme stejný objem, jaký máme ředícího roztoku v již připravených zkumavkách a přeneseme jej do druhé zkumavky.
- 8) Důkladně protřepeme.
- 9) Pokračujeme od bodu 7, a opakujeme do poslední zkumavky v řadě. V poslední zkumavce budeme mít nakonec dvojnásobný objem, než ve všech předchozích.



2 ml

1 ml

1 ml

1 ml

1 ml

*Množství ředícího roztoku (většinou destilovaná voda nebo fyziologický roztok)*

### **Příprava hematologických vzorků:**

Analýza plazmy a krevního séra je běžnější než analýza plné krve. Důvodem je zřejmě jednodušší manipulace s plazmou a sérem. Obě tekutiny jsou oproti plné krvi méně viskózní, navíc odpadají problémy se srážením krve. Základním rozdílem mezi krevním sérem a krevní plazmou je přítomnost fibrinogenu v plazmě. Proto je třeba v plazmě zabránit přeměně fibrinogenu na fibrin přidáním antikoagulačních přípravků.

### **Příprava krevního séra**

Příprava krevního séra je velmi jednoduchá. Periferní krev opatrně odebereme do zkumavky. Je třeba pracovat dostatečně rychle, aby se nám krev nesrážela již při manipulaci. Odběrovou zkumavku necháme vysrážet 2 hodiny při pokojové teplotě nebo přes noc v lednici. Na závěr centrifugujeme, abychom oddělili krevní sraženinu od krevního séra.

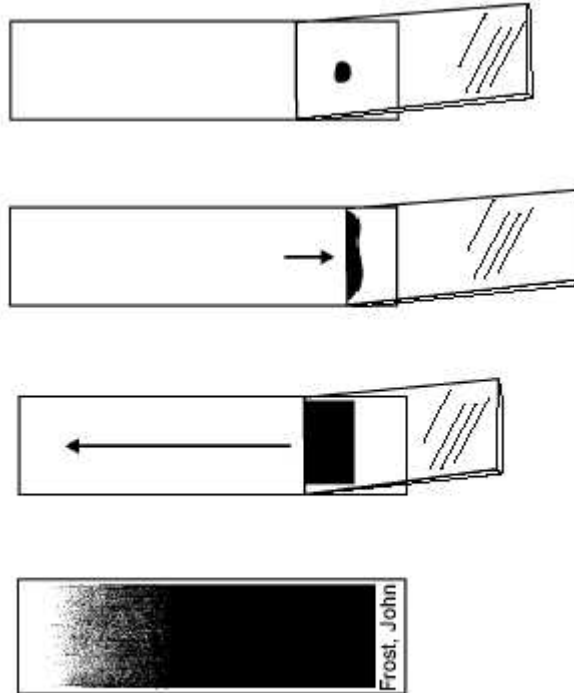
### **Příprava krevní plazmy**

Periferní krev se odebírá pomocí stříkačky nebo kapiláry jejichž stěny jsou potažené heparinem (nebo jiným protisrážlivým činidlem). Stejně tak odběrová zkumavka obsahuje protisrážlivý roztok s heparinem. Ihned po odběru je nutno opakovaným převrácením krev ve zkumavce promísit, aby nedošlo k jejímu srážení. Netřepeme, došlo by k hemolýze. Na závěr centrifugujeme, abychom oddělili buněčnou složku od krevní plazmy.

### **Příprava krevního roztěru**

Krevní nátěry se běžně provádí z periferní krve. Ke zhotovení krevního nátěru je třeba použít chemicky čistá a dokonale odmaštěná podložní sklíčka. Chemicky se čistí například ponořením do chromsírové směsi (1 díl 10% vodného roztoku dichromanu draselného a 1 díl koncentrované kyseliny sírové) nebo detergenčního prostředku. Po důkladném opláchnutí tekoucí vodou se sklíčka ponoří do 96% ethanolu nebo směsi ethanol-ether. Sklíčka se osuší na vzduchu nebo v termostatu. Očištěná skla chytáme zásadně za hrany, nikoliv za plochy sklíček.

Dezinfekcí ošetříme odebíraný prst a sterilní jehlou provedeme mělký vpich. První kapku krve, která se objeví po vpichu do bříška prstu setřeme sterilním tamponem. Druhou kapku již přeneseme na jeden konec podložního skla. Druhým podložním sklem provedeme roztěr dle obrázku. Druhé podložní sklo držíme pod úhlem 30-45 ° a snažíme se o rovnoměrný plynulý pohyb ke druhému konci podložního skla (snadněji dosažitelné s podložním sklem se zabroušeným okrajem).



Zhotovený nátěr musí být rovnoměrný, homogenní a přiměřeně tenký. Nátěr musí mít dlouhé okraje rovné a na konci přecházet do "ztracena", nejlépe 1 - 2 cm před koncem sklíčka, přičemž se obvykle vytvoří několik cípů.

Hotový nátěr se nechá na vzduchu dobře zaschnout. Poté se barví většinou komerčními soupravami (kity) například Leukodif (Lachema a.s.).

Nejčastější chyby při přípravě krevních roztěrů jsou:

- Příliš mnoho krve > tlustý nátěr
- Příliš málo krve > krátký nátěr
- Příliš dlouhé vyčkávání od odběru > srážení krve a vytvoření podélných pruhů
- Špatně odmaštěná skla > skvrnitý nátěr
- Třesoucí se ruka > vroubkovaný nátěr

## **Zásady správné laboratorní praxe ve cvičení z imunologie**

- 1) Před samotným započatím práce si prostudujte návod a nachystejte potřebné věci (např. zkumavky do stojánek apod.).
- 2) S reagensy, zvláště pak s biologickým materiálem (např. krev) pracujeme zásadně na filtračním papíře, abychom měli přehled o znečištění okolí. Na tento papír naopak NEPOKLÁDÁME sešity, tužky a jiné věci podobného charakteru.
- 3) Automatické pipety nikdy NEPOKLÁDÁME na stůl, vždy do stojánku. Mohlo by dojít k natečení zbytku kapaliny dovnitř pipety a znečištění následných pipetovaných roztoků.
- 4) Po přidání reagensie do zkumavky s nějakým obsahem VŽDY následuje promíchání, buď na elektrické třepače nebo pomocí pipety, kterou jsme právě použili (opakovaným nasátím a vypuštěním promíchaného obsahu zkumavky).
- 5) Při pipetování řady vzorků stejného složení, ale různé koncentrace lze použít stejnou špičku (pokud se její povrch nesmočí, což poznáme podle kapiček které zůstávají uvnitř či na povrchu). V tom případě začínáme pipetovat nejméně koncentrovaný vzorek a postupně přecházíme k vyšším koncentracím. Po napipetování vzorku do zkumavky se vždy přesvědčíme, zda nám část pipetovaného objemu nezůstala ve špičce. V tom případě použijeme novou špičku.

- 6) Použité a již nepotřebné špičky na pipety či plastové zkumavky odkládáme do speciálních kontejnerů určených pro biologický odpad. NEVYHAZUJÍ se do koše na odpadky.
- 7) Zkumavky se zásobním zmraženým krevním sérem po rozmrazení a odpipetování příslušných objemů ihned uzavřeme a vrátíme do mrazničky.

## **Práce s potenciálně nebezpečným biologickým materiálem**

*Práci s potenciálně nebezpečným biologickým materiálem upravuje Zákon č. 258/2000 Sb.*

### **Rizika**

Krev i jiné druhy biologického materiálu mohou být vehikulem přenosu významných, potenciálně život ohrožujících infekčních nemocí jako např. virová hepatitida B a C nebo HIV infekce. Po kontaminaci místa narušeného kožního krytu nebo sliznice biologickým materiálem je nutno postižené osoby sledovat a kontrolovat výskyt příznaků rizikového onemocnění.

Po rizikovém kontaktu s osobou nakaženou virovou hepatitidou A je třeba monitorovat např. hladinu anti-HAV ohrožené osoby po dobu 2 měsíců nebo IgM po dobu 6 měsíců. Při kontaktu s HIV se sleduje sledují hladiny anti-HIV 1,2 v období 43-56 dní.

V prevenci profesionální nákazy je po kontaminaci biologickým materiálem v závislosti na míře rizika infekce navíc u zdravotnických pracovníků možná postexpoziční aplikace normálního lidského imunoglobulinu v prevenci virové hepatitidy A a specifického imunoglobulinu (Hepatec) proti virové hepatitidě B. U obou těchto nemocí je možná i prevence i aktivní imunizací. V případě kontaminace biologickým materiálem s obsahem viru HIV se doporučuje co nejrychlejší zahájení postexpoziční chemoprophylaxe užíváním kombinace antiretrovirových léků.

**Úplně prvním krokem při kontaminaci biologickým materiálem, ať už s poraněním nebo bez něho, je místo dobře umýt vodou a mýdlem a aplikovat antiseptický virucidní prostředek (např. roztok Braunolu, Softaseptu, Cutaseptu apod.).**

### **Zacházení s biologickým materiálem**

K odběru biologického materiálu se používají pouze sterilní nástroje, sterilní pomůcky a jednorázové rukavice a to vždy pro každou ošetřovanou osobu. Rukavice musí splňovat technické požadavky na osobní ochranné prostředky, prostupnost musí odpovídat jejich použití a míře rizika biologických činitelů, jejich síla nesmí výrazně omezit citlivost rukou. Správný odběr biologického materiálu musí být proveden „lege artis“ a za aseptických podmínek. Odběry lze provádět pouze na ploše vyčleněné pro odběr. Po odběru je třeba řádně ošetřit místo odběru. Odběrová nádoba musí být jednoznačně označena tak, aby nemohlo dojít k její záměně a musí být zajištěna tak, aby nemohlo dojít ke kontaminaci obsahu z okolí, ani okolí obsahem.

S biologickým materiálem je při transportu nutno nakládat jako s infekčním materiálem! Vzorky musí být dokonale zabalené, většinou ve dvojitých obalech (ochranný a dekontaminovatelný transportní obal), aby nedošlo k poškození nebo rozbití.

- 8) Před samotným započítáním práce si prostudujte návod a nachystejte potřebné věci (např. zkumavky do stojánek apod.).
- 9) S reagensy, zvláště pak s biologickým materiálem (např. krev) pracujeme zásadně na filtračním papíře, abychom měli přehled o znečištění okolí. Na tento papír naopak NEPOKLÁDÁME sešity, tužky a jiné věci podobného charakteru.
- 10) Automatické pipety nikdy NEPOKLÁDÁME na stůl, vždy do stojánku. Mohlo by dojít k natečení zbytku kapaliny dovnitř pipety a znečištění následných pipetovaných roztoků.
- 11) Po přidání reagensie do zkumavky s nějakým obsahem VŽDY následuje promíchání, buď na elektrické třepače nebo pomocí pipety, kterou jsme právě použili (opakovaným nasátím a vypuštěním promíchaného obsahu zkumavky).
- 12) Při pipetování řady vzorků stejného složení, ale různé koncentrace lze použít stejnou špičku (pokud se její povrch nesmočí, což poznáme podle kapiček které zůstávají uvnitř či na povrchu). V tom případě začínáme pipetovat nejméně koncentrovaný vzorek a postupně

přecházíme k vyšším koncentracím. Po napipetování vzorku do zkumavky se vždy přesvědčíme, zda nám část pipetovaného objemu nezůstala ve špičce. V tom případě použijeme novou špičku.

- 13) Použité a již nepotřebné špičky na pipety či plastové zkumavky odkládáme do speciálních kontejnerů určených pro biologický odpad. NEVYHAZUJÍ se do koše na odpadky.
- 14) Zkumavky se zásobním zmraženým krevním sérem po rozmrazení a odpipetování příslušných objemů ihned uzavřeme a vrátíme do mrazničky.