

Univerza v Ljubljani
Fakulteta *za farmacijo*

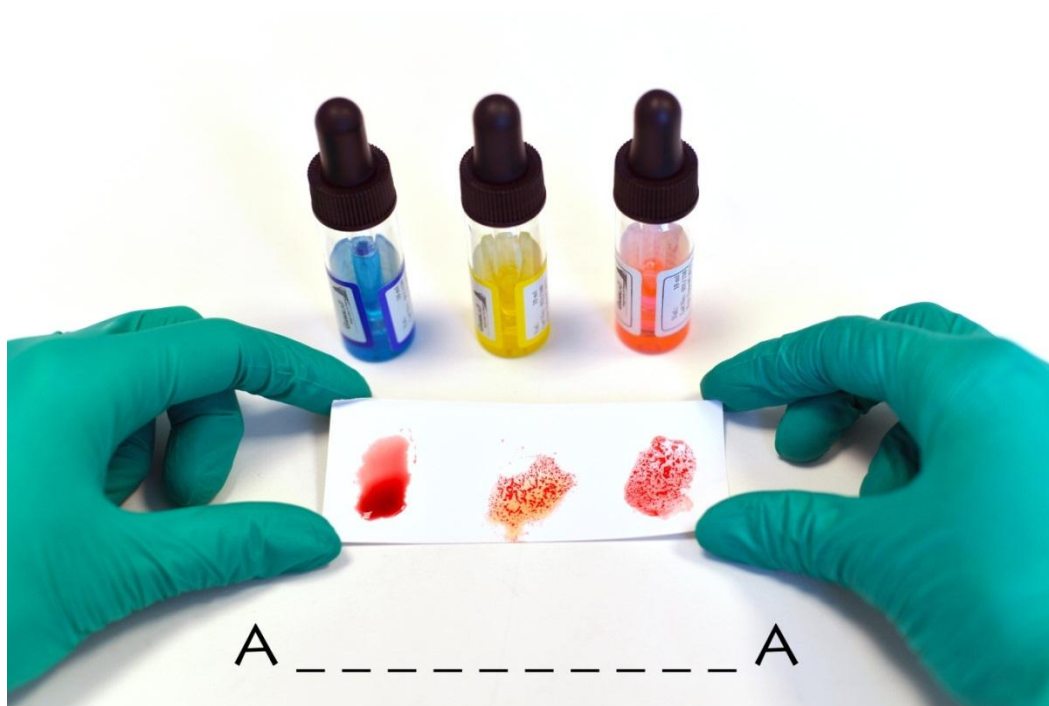


NAVODILA IN DNEVNIKI ZA VAJE IMUNOLOGIJA Z IMUNOKEMIJO

Univerzitetni študijski program Laboratorijska biomedicina

2. letnik

Martina Gobec, Jasna Omersel



Ljubljana, 2016

Naslov: Navodila in dnevniki za vaje Imunologija z imunokemijo

Avtorici: doc. dr. Martina Gobec, asist. dr. Jasna Omersel

Uredili: doc. dr. Martina Gobec, asist. dr. Jasna Omersel

Recenzenta: prof. dr. Borut Božič, doc. dr. Saša Čučnik

Fotografija naslovnice: Mitja Derenda

Izdala: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Katedra za klinično biokemijo

Kraj in leto izida: Ljubljana, 2016

CIP - Kataložni zapis o publikaciji

Narodna in univerzitetna knjižnica, Ljubljana

616-097(075.8)(076.5)(0.034.2)

GOBEC, Martina, 1983-

*Navodila in dnevniki za vaje Imunologija z imunokemijo [Elektronski vir] : univerzitetni študijski program
Laboratorijska biomedicina : 2. letnik / Martina Gobec, Jasna Omersel. - Ljubljana : Fakulteta za farmacijo,
Katedra za klinično biokemijo, 2016*

Način dostopa (URL): <http://www.ffa.uni-lj.si/knjiznica/e-knjige/>

ISBN 978-961-6378-74-1 (pdf)

1. Omersel, Jasna

287001088

PREDGOVOR

Vsako potovanje se začne s prvim korakom, ne glede na to, kako majhen je. Nekaj temu podobnega velja za kitajski rek, ampak menim, da ga lahko preslikamo tudi na potovanja, ki to niso v fizičnem smislu. Potovanje je tudi odkrivanje novih področij znanj. Imunologija in imunokemija je predmet drugega letnika Laboratorijske biomedicine, je pa hkrati tudi osnovni tečaj s področja imunologije.

Osnovni tečaj pomeni, da se seznanjamo z osnovami – s pojmi, z načini delovanja in s poenostavitvami, ki omogočajo razumevanje pojavov in povezav. K temu sodijo tudi vaje, za katere je napisana pričujoča skripta, ki naj študentom olajša priprave na posamezne eksperimente in pripravo poročil o rezultatih, predvsem pa o opažanjih. V fazi odkrivanja novega so dobra opažanja celo pomembnejša kot uspešen ali neuspešen eksperiment. Mnogo ponesrečenih poskusov je ob skrbnem opažanju in pronicljivosti opazovalca pomenilo pomemben napredek. Tudi v imunologiji poznamo kar nekaj takih primerov, če omenim samo odkritje delovanja plesni, iz katere so izolirali penicilin. Vaje so torej namenjene tudi ostrenju opažanja in pričujoča skripta predstavlja pripravo na to.

Prof. dr. Borut Božič

VSEBINA

1. VAJA: Strokovna terminologija: obdelava besedila na temo imunskih procesov in imunokemije	1
2. VAJA: Celična imunost - izolacija mononuklearnih celic iz levkocitnega koncentrata	7
3. VAJA: Topnost imunskih kompleksov – precipitacija v gelu	12
4. VAJA: Interakcije med antigeni in protitelesi - reakcija aglutinacije	17
5. VAJA: Imunokemijske metode na trdnih nosilcih: določanje alergen-specifičnih IgE v serumu	21
LITERATURA	26

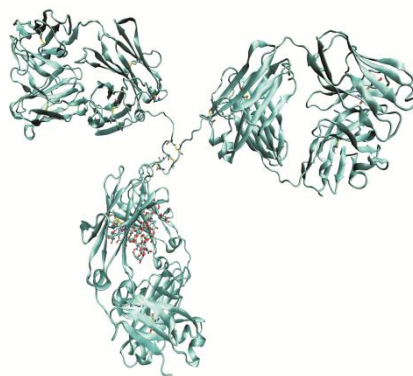
1. VAJA

Strokovna terminologija: obdelava besedila na temo imunskih procesov in imunokemije

UVOD

Osnovno imunokemijsko reakcijo, vezavo antigena in protitelesa, danes s pridom izkoriščamo v visoko občutljivih in specifičnih analitskih tehnikah, uporabljenih na področju biotehnoloških in medicinskih znanosti. Široko uporabnost imunokemijskih metod omogoča njihova raznolikost, relativno lahka prilagodljivost in visoka analitska občutljivost. Od prvih znanstvenih raziskav in poročil o možni uporabi protiteles v kvantitativne analitične namene (Heidelberger in Kendall, 1932) imunske reakcije rutinsko uporabljamo v klinično-biokemijski diagnostiki za meritve količine (koncentracije) iskanega parametra: protiteles (protimikrobnih, avtoimunskih), prostega antigena ali celic (posredno, preko antigena, vezanega na ali v celici). V tem primeru protitelesa ali antigen nastopajo kot iskani analit, prav tako pa lahko obe molekuli uporabljajmo kot biokemijski reagent, s katerim s pomočjo imunske reakcije merimo druge molekule. *In vitro* imunokemijsko reakcijo izvajamo v serumu (imunoserologija), na celičnih (imunocitologija) in tkivnih preparatih (imunohistokemija). V vseh primerih na rezultat pomembno vplivajo lastnosti protiteles (afiniteta, avidnost in specifičnost), antigena (protein, glikoprotein, dostopnost antigenskih determinant, ...) in vrsta ter priprava biološkega vzorca.

Na vajah boste pridobili pomembna teoretična in praktična znanja, vezana na osnovno imunokemijsko reakcijo oziroma specifične metode, ki se uporabljajo v klinično-biokemijski diagnostiki. Brez poznavanja principov imunokemijske reakcije je kasneje veliko težje komentirati in ovrednotiti laboratorijski rezultat in morebitna odstopanja, do katerih lahko pride v analizni fazi specifične metode. Oboje namreč lahko pomembno vpliva na pravilno postavitve diagnoze ali ustrezen izbor terapije za posameznega pacienta. Prva vaja je namenjena študiju teoretičnih primerov, samostojnemu delu in preverjanju poglobljenega razumevanja pojmov, metod in principov imunokemijske reakcije, ki poteka *in vitro* ali v organizmu, hkrati pa je tudi osnova za kvalitetno izvedbo nadaljnjih praktičnih vaj pri predmetu Imunologija z imunokemijo.



Slika 1: Prostorska struktura proteinskih verig molekule protitelesa.

SLOVARČEK STROKOVNE TERMINOLOGIJE

Tako na vajah kot predavanjih pri predmetu Imunologija z imunokemijo se boste srečali s številnimi novimi pojmi, ki so pomembni za razumevanje strokovne literature s področja imunologije in klinične diagnostike.

Afiniteta protiteles

Aglutinacija

Agranulociti

Alergen

Antigen

Avidnost protiteles

Epitop

Fc

Fab

Hipertonična raztopina

Hipotonična raztopina

Imunizacija

Imunogen

Imunoglobulin

Konjugat

Kvalitativen rezultat

Kvantitativen rezultat

Monoklonsko protitelo

Navzkrižna reaktivnost

Osmolarnost

Označevalec

Paratop

PBMC

Precipitacija

Protitelo

Regije CDR

Serum

Semikvantitativni rezultat

Specifičnost protiteles

Substrat

Titer

PROTOKOL

V parih preberite dodeljeni članek oz. študijski primer, nato na kratko odgovorite na zastavljena vprašanja, ki bodo v pomoč pri skupinski razpravi. Odgovore po potrebi podkrepite s skicami. Za pojasnitev nerazumljivih ali novih pojmov si poleg zapiskov s predavanj pomagajte tudi z brskanjem po spletu, pri čemer bodite pozorni na zanesljivost vira (npr. terminološki slovarji, strani uveljavljenih strokovnih združenj, agencij, ...).

Študijski primeri:

Primer št. 1:

- Navedite področje uporabe imunokemijske reakcije.
- V nekaj stavkih jasno predstavite namen uvedene metode, problematiko oz. aktualnost primera.
- Navedite oz. opišite vrsto (biološkega) vzorca in pripravo vzorca (predanalizna faza).
- Opredelite, katere molekule v vzorcu nastopajo kot antigeni.
- Kratko predstavite metodo določanja omenjenih antigenov in skicirajte imunokemijsko reakcijo.
- Zakaj so posamezni, natančno definirani pogoji med inkubacijo s primarnimi protitelesi pomembni?
- Kakšni so bili pomisleki raziskovalcev ob uvedbi in uporabi nove metode?

Primer št. 2:

- Navedite področje uporabe imunokemijske reakcije.
- V nekaj povedih jasno predstavite potek bolezni po okužbi (t.i. štirje stadiji bolezni sifilis).
- Navedite vrsto (biološkega) vzorca in pripravo vzorca (predanalizna faza).
- V obliki tabele predstavite, kaj je analit in kaj dodani reagent pri posameznih metodah za dokazovanje okužbe z bakterijo *Treponema pallidum*.
- Kratko predstavite metodo FTA-ABS in skicirajte imunokemijsko reakcijo.
- Zakaj hemolitični in kontaminirani vzorci niso primerni za testiranje?
- Kako podamo rezultat, pridobljen s posamezno metodo?

REZULTATI IN POROČILO

- a. Na Sliki 1 označite in poimenujte glavne strukturne dele molekule protitelesa.
- b. Predstavitev študijskega primera.

Datum:

Pregledal/-a:

Komentar:

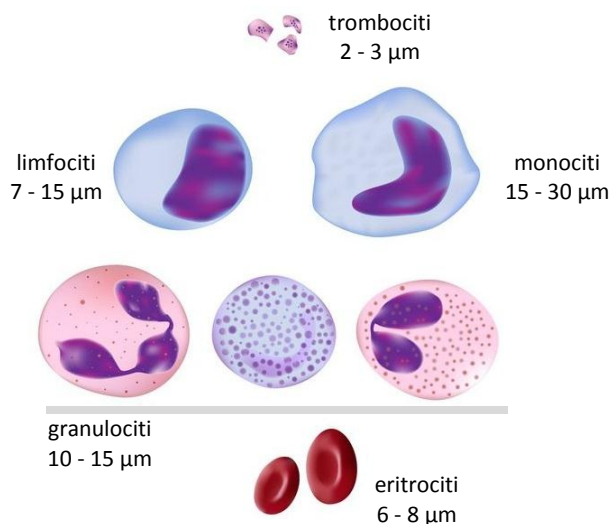
2. VAJA

Celična imunost - izolacija mononuklearnih celic iz levkocitnega koncentrata

UVOD

Mononuklearne celice periferne krvi (PBMC, *angl. Peripheral Blood Mononuclear Cells*) so heterogena populacija celic z enim okroglim nezažetim jedrom in citoplazmo, ki ne vsebujejo granular. Mednje tako sodijo limfociti in monociti. Od ostalih krvnih celic (eritrociti, granulociti, trombociti) jih lahko preprosto in učinkovito ločimo z uporabo gradientnega medija in centrifugiranja. Gradientni mediji so različne kemijske sestave. Na vaji bomo uporabili Ficoll Paque PLUS™, ki vsebuje hidrofilni polisaharid in natrijev diatrizoat, katera dajeta raztopini ustrezno gostoto in osmolarnost za optimalno ločevanje celičnih populacij. Hidrofilni polisaharid je močno razvejan neionski kopolimer saharoze in epiklorohidrina, zaradi česar ima gradientni medij nizko viskoznost in visoko gostoto, lastnosti ključni za ločevanje krvnih celic. Uspešnost ločevanja na gradientnem mediju je odvisna od številnih dejavnikov: stanja krvi (uporaba antikoagulantov, čas od odvzem do procesiranja, temperatura shranjevanja, patološka stanja darovalca,...), temperature vzorca in gradientnega medija, natančnosti pri nanašanju krvi na gradientni medij ter čas centrifugiranja.

S tem ločevalnim postopkom pridobljene celice so primerne za nadaljnjo ločevanje na podpopulacije, študije efektorskih lastnosti limfocitov ter določanje prisotnosti površinskih označevalcev pri posameznih bolezenskih stanjih.



Slika 1: Shematski prikaz krvnih celic in njihovih premerov.

OPIS METODE

Ločevanje celic na gradientnem mediju je možno zaradi različne gostote in velikosti posameznih celičnih populacij, ki so posledica samih lastnosti celic (Slika 1), ali njihovih interakcij z gradientnim medijem. Po centrifugiranju tako nastane več plasti:

- popolnoma na dnu se nahajajo eritrociti, ki ob stiku s hidrofiličnim polisaharidom tvorijo večje skupke;
- plast nad eritrociti so granulociti, katerim se zaradi osmotskega pritiska (gradientni medij je rahlo hipertoničen) poveča gostota;
- nad gradientnim medijem se nahaja plast PBMC, nad katero pa je plazma s trombociti, saj imajo nižjo gostoto kot sam medij oziroma ostale krvne celice.

Pod optimalnimi pogoji ločevanja z gradientno metodo izoliramo iz začetnega krvnega vzorca 60 ± 20 % PBMC z > 80 % živostjo, hkrati pa delež granulocitov ne presega 5% oziroma 10% v primeru eritrocitov.

REAGENTI

- levkocitni koncentrat (frakcija krvnega vzorca, obogatena z levkociti in trombociti)
- gradientni medij Ficoll Paque PLUS™ (pri 20 °C je $\rho = 1.077 \pm 0,001$ g/mL)
- fosfatno pufrana slanica (PBS), pH= 7.4
- tripansko modrilo

LABORATORIJSKI PRIBOR

plastične centrifugirke
Pasteurjeva pipeta
Neubauerjeva komora
svetlobni mikroskop
centrifuga
pipete in nastavki
injekcijska igla in brizga

PROTOKOL

Priprava vzorca:

V 15 mL konusno centrifugirko odpipetiraj 2 mL vzorca krvi in mu dodaj 6 mL PBS, zapri z navojnim zamaškom ter nato nežno in hkrati temeljito premešaj.

Postopek izolacije mononuklearnih celic:

1. Steklenico Ficoll-Paque PLUS™ večkrat pretresi, odstrani modri pokrovček, nato z injekcijsko iglo prebodi gumijasti zamašek in v brizgo povleci 3,8 mL.
2. Ficoll-Paque PLUS™ izbrizgaj v novo, prazno 15 mL epruveto z navojnim zamaškom.

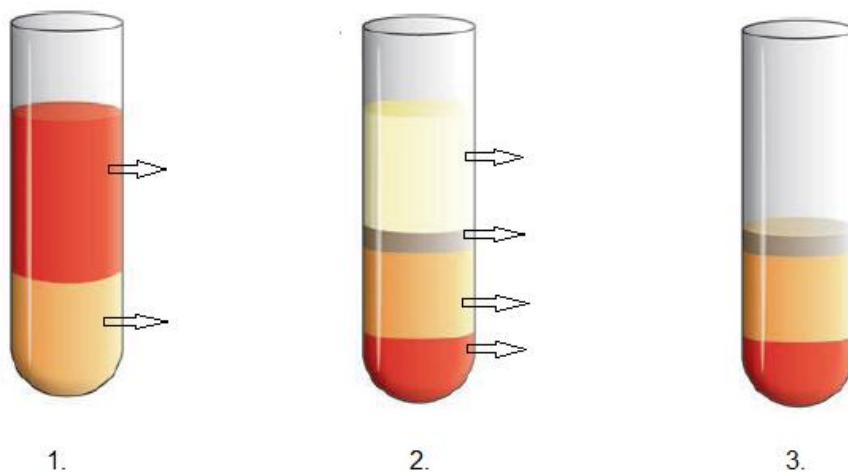
3. Na Ficoll-Paque PLUS™ s Pasteurjevo pipeto ob steni epruvete počasi in previdno nanesi 7,6 mL razredčenega krvnega vzorca. Pazi, da se vzorec ne zmeša z gradientnim medijem!
4. Centrifugiraj 15 min pri 500 x g brez zavore (centrifuga CENTRIC 322A (Tehtnica): 2300 vrtljajev/min).
5. Z novo Pasteurjevo pipeto počasi in v celoti poberi belo plast celic, ki se nahaja med plazemskim slojem in gradientnim medijem (pazi na kontaminacijo z drugimi plastmi!), ter jo prenesi v novo 15 mL centrifugirko in dodaj 12 mL PBS.
6. Centrifugirko zapri z navojnim zamaškom in vsebino previdno premešaj z obračanjem. Centrifugiraj 10 min pri 300 x g (centrifuga CENTRIC 322A (Tehtnica): 1700 vrtljajev/min).
7. Previdno odlij supernatant.
8. Celice ponovno sperij z 12 mL PBS in centrifugiraj 10 min pri 100 x g (centrifuga CENTRIC 322A (Tehtnica): 1100 vrtljajev/min). Nato previdno odlij supernatant.
9. Celice resuspendiraj v 1 mL PBS in določi število izoliranih PBMC ter njihovo živost.

Določanje števila in živosti celic:

1. Celično suspenzijo dobro homogeniziraj, nato v epruveto odpipetiraj 20 µL vzorca in mu dodaj 20 µL tripanskega modrila ter dobro premešaj.
2. V enega izmed dveh števnih prostorov Neubauerjeve komore s pipeto nanesi 15 µL pripravljene obarvane suspenzije celic tako, da nastavek pipete prisloniš na rob krovnega stekelca in počasi iztisneš vsebino.
3. Pod svetlobnim mikroskopom preštej celice in izračunaj koncentracijo ter živost.

REZULTATI IN POROČILO

- a. Ob slikah ustrezno označi plasti krvnih celičnih populacij pred in po ločevanju na gradientnem mediju.



b. Komentiraj svojo izvedbo vaje (natančnost, problemi, ustreznost frakcij, itn.).

c. Oceni približen volumen plasti z mononuklearnimi celicami. _____

d. Izračunaj celokupno število izoliranih PBMC.

e. Izračunaj živost PBMC.

- f. Glede na dobljeni rezultat, preračunaj, kolikšen volumen medija (PBS) bi moral dodati, da bi pripravil delovno suspenzijo s koncentracijo živih celic 1×10^6 / mL.

Datum:

Pregledal/-a:

Komentar:

3. VAJA

Topnost imunskih kompleksov – precipitacija v gelu

UVOD

Imunodifuzija v dveh dimenzijah (Ouchterlony) je kvalitativna ali semikvantitativna tehnika, ki temelji na osnovni imunski reakciji med protitelesi in topnimi antigeni. V obodne vdolbinice na agaroznem gelu odpipetiramo raztopino protiteles oziroma preiskovani serum, v središčno vdolbinico pa dodamo antigen (Slika 1A). Gel inkubiramo v vlažni komori 48 h – 72 h, da poteče reakcija med antigeni in protitelesi. Rezultat odčitamo vizualno, tako da natančno pregledamo gel. Ko molekule difundirajo iz vdolbinic v gel, se v coni koncentracijske ekvivalence tvorijo veliki in s prostim očesom vidni netopni imunski kompleksi. V gelu opazujemo precipitacijske linije, ki se tvorijo med središčno in obodno vdolbinico. Določamo lahko prisotnost ali odsotnost specifičnih protiteles/antigena v vzorcu oziroma njihov titer ali pa tudi navzkrižno reaktivnost antigenov. Pri določanju navzkrižne reaktivnosti ugotavljamo ali imata npr. dva antigena istovetne epitope (reakcija istovetnosti), delno istovetne epitope (reakcija delne istovetnosti) ali pa nobenega skupnega epitopa (reakcija neistovetnosti). Imunodifuzija po Ouchterlonyu se je v preteklosti pogosto uporabljala za diagnostiko virusnih infekcij, danes pa jo nadomeščajo hitrejše in občutljivejše metode. Sama tehnika je časovno potratna, a poceni. Zato je danes še vedno uporabna za ugotavljanje navzkrižne reaktivnosti protiteles in antigenov pri uvajanju novih imunoloških analiznih metod.

OPIS METODE

Na vaji bomo določali titer protiteles proti davici, tetanusu, oslovskem kašlju in virusu otroške paralize v človeškem serumu. Protitelesa so pri človeku prisotna zaradi načrtne imunizacije s cepivom v otroštvu, ki zagotavlja takojšnji imunski odziv in zaščito ob morebitni okužbi. Kot antigen, ki ga bomo nanesti v osrednjo vdolbinico v gelu, bomo uporabili multivalentno cepivo, ki vsebuje nizke odmerke antigenov davice, tetanusa in oslovskega kašlja v kombinaciji z antigeni poliomielitisa. V obodne vdolbinice pa bomo dodali ustrezne redčine preiskovanega človeškega seruma. Po 48-urni inkubaciji bomo gel pregledali in nastale precipitacijske linije vizualizirali z barvanjem z raztopino barvila Commassie Brilliant Blue v očetni kislini.

REAGENTI

- človeški serumi, antigen
- agarosa
- fosfatno pufrana slanica (PBS), pH= 7.4
- raztopina za barvanje gela (trifenilmetansko barvilo Commassie Brilliant Blue®, očetna kislina, etanol, voda)
- raztopina za razbarvanje gela (etanol, očetna kislina, voda)

LABORATORIJSKI PRIBOR

čaša, urno steklo
 Pasteurjeva pipeta
 steklena kapilara (250 µL)
 injekcijska igla,
 škarje, pipete, petrijevka
 epruvete
 mikrovalovna pečica, inkubator
 filter papir
 stresalnik

PROTOKOL

V vsaki skupini študentov bomo pripravili po dve čaši raztopine agaroze (s prebitkom raztopine za 1/2 petrijevke), nato bo vsak študent vlijl svoj agarozni gel v petrijevko, iz njega izrezal vdolbinice, pripravil serijsko redčitev preiskovanega seruma in nato v obodne vdolbinice nanese redčine seruma, v osrednjo pa raztopino antigenov (Slika 1A).

Postopek za pripravo 1 petrijevke z agaroznim gelom:

1. V čašo zatehtaj ustrezno količino agaroze za pripravo 15 mL 1 % raztopine agaroze v PBS. Dodaj PBS, pomešaj, čašo pokrij z urnim steklom in previdno segrevaj v mikrovalovni pečici do vrenja. Vsebinsko premešaj in ponovno segrevaj dokler raztopina ni bistra in brez delcev ter zračnih mehurčkov.
2. Petrijevko položi na ravno površino in vanjo nalij že nekoliko ohlajeno raztopino agaroze do višine 1-2 mm (prenesmo cca. 15 mL s Pasteurjevo pipeto). Počakaj 30 min, da se gel v petrijevki ohladi in strdi. Vmes pripravi serijsko redčitev vzorca.

Serijska redčitev vzorca:

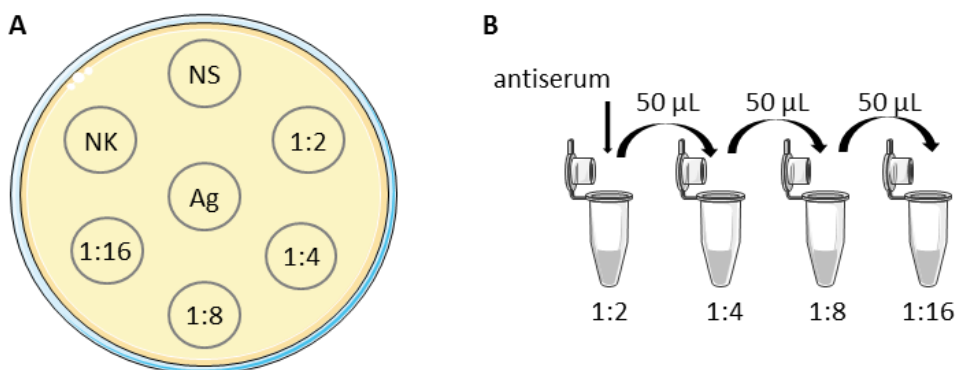
1. Vzorce seruma ogrej na sobno temperaturo (15-25°C) in jih premešaj na vrtinčniku.
2. Pripravi in označi epruvete za serijske redčitve (Slika 1B).
3. V vsako izmed epruvet odpipetiraj po 50 µL PBS. V prvo epruveto nato dodaj 50 µL vzorca seruma, vsebinsko dobro premešaj, nato pa iz nje v drugo epruveto prenesi 50 µL raztopine. Dobljena raztopina v prvi epruveti predstavlja redčitev vzorca 1:2. Nato po istem postopku nadaljuj z redčenjem do redčitve 1:16.

Priprava gela in nanos vzorcev in antigena na gel:

1. Petrijevko z gelom postavi na šablono z rozeto in s pomočjo steklene kapilare previdno izreži vdolbinice, tako kot je to prikazano na Sliki 1A. Vdolbinice naj bodo med seboj oddaljene cca. 9 mm, globoke pa cca. 2 mm. Z injekcijsko iglo nato natančno in v celoti odstrani izrezane koščke gela iz vdolbinic.
2. Na spodnji strani petrijevke z gelom z alkoholnim flomastrom označi luknjice (Slika 1A).
3. V osrednjo vdolbinico prenesi 12 μ L standardne raztopine antigena, v prvo obodno vdolbinico neredčen vzorec seruma, v ostale pa v smeri urinega kazalca preostale redčine in negativno kontrolo (PBS).
4. Petrijevko pokrij z vlažnim papirjem in jo inkubiraj 48 h pri 4°C.

Barvanje gela:

1. Na gel položi filter papir omočen z destilirano vodo, nato čez položi papirnate brisačke in pusti na ravni površini 15 min.
2. Gel spiraj v 15 mL PBS, na stresalniku 15 min.
3. Gel ponovno položi na z destilirano vodo omočen filter papir, nato čez položi papirnate brisačke in pusti 15 min.
4. Gel posuši v termostahirani komori pri 30 °C, 20 min.
5. Na gel vlij 15 mL raztopine za barvanje in inkubiraj 3 min na stresalniku.
6. Na gel vlij 15 mL raztopine za razbarvanje, inkubiraj 20 min pri 34°C.
7. Po 48 h inkubacije opazuj prisotnost/odsotnost precipitacijskih linij in določi titer protiteles. Kot rezultat vaje nariši precipitacijski vzorec in shemo ustrezno označi.



Slika 1: Shema nanosa razredčin vzorca seruma na gel (A) in serijska redčitev vzorca (B).
NS: neredčen serum; NK:negativna kontrola

REZULTATI IN POROČILO

a. V dnevnik vrišite shemo dobljenih precipitacijskih vzorcev in ustrezno označite.

b. Komentirajte svoje delo, morebitne napake in rezultat (titer) vzorca.

c. Kakšen je pomen rezultata negativne kontrole?

d. Kakšen je klinični pomen določanja titra protiteles? Navedite primer!

Datum:

Pregledal/-a:

Komentar:

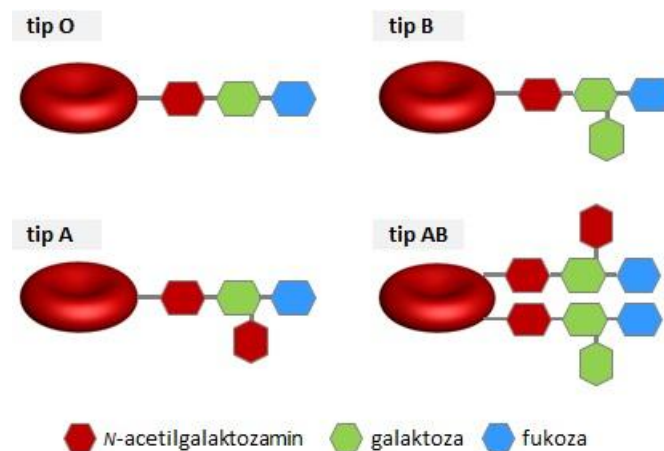
4. VAJA

Interakcije med antigeni in protitelesi - reakcija aglutinacije

UVOD

Dandanes je znanih več kot 300 različnih eritrocitnih antigenov, ki so razporejeni v 33 krvnoskupinskih razredov, a je pri transfuzijah in transplantacijah ključno ujemanje po ABO sistemu, ki ga je leta 1901 opredelil Karl Landsteiner. Mešanje krvi dveh posameznikov, ki po tem sistemu nista kompatibilna, je lahko usodno, saj pride do burne imunske reakcije. Namreč, če ima prejemnik krvi prisotna protitelesa proti antigenom na darovalčevih krvnih celicah, pride do aglutinacije eritrocitov, kar aktivira komplement in vodi v intravaskularno hemolizo ter posredno povzroči diseminirano intravaskularno koagulacijo, šok, odpoved organov in smrt. Do odziva imunskega sistema ob nekompatibilnih prejemnikih in darovalcih pride že ob prvem stiku z antigeni A oziroma B, saj so protitelesa krvnoskupinskega sistema ABO naravna protitelesa (razreda IgM), ki se razvijejo do šestega meseca starosti.

Poglavitni geni, ki kontrolirajo prisotnost in položaj antigenov A in B, se nahajajo na kromosomu 9, pri čemer sta na vsakem lokusu prisotna 2 alela. Gena A in B se dedujeta ko-dominantno, gen O pa je nefunkcionalen (amorfen) in se deduje recesivno. Genski produkti so encimi glikoziltransferaze A oziroma B, ki katalizirata prenos določenega sladkorja na specifični substratni akceptor. Krvnoskupinski sistem ABO je eden od petih sistemov, ki ga opredeljujejo antigeni polisaharidne narave, ki so na eritrocitih vezani na transmembranske proteine (80 %) ali sfingolipide celične membrane (20 %) (Slika 1).

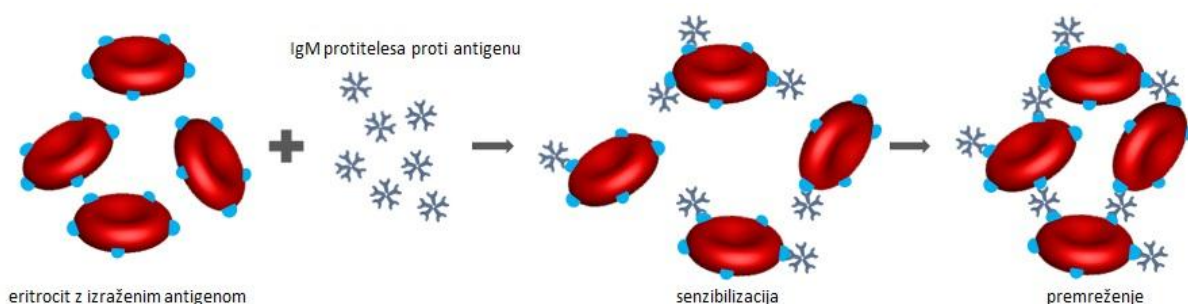


Slika 1: Shematski prikaz tipov krvnih skupin po ABO sistemu glede na prisotne antigene.

OPIS METODE

Reakcijo antigen – protitelo in s tem prisotnost eritrocitnih antigenov lahko določamo na več načinov. Najpogostejša in relativno enostavna je reakcija hemaglutinacije (zlepljanje eritrocitov), ki poteka v dveh fazah (Slika 2):

- faza I – senzibilizacija eritrocitov: v tej stopnji pride do vezave protiteles na eritrocitne antigene.
- faza II – premreženje: zaradi vezave protiteles pride do nastanka mostov oz. prečnih povezav med eritrociti. Oblikujejo se skupki zlepljenih eritrocitov (aglutinati), ki so vidni s prostim očesom.



Slika 2: Shematski prikaz aglutinacije.

Na aglutinacijo vplivajo številni dejavniki (koncentracija protiteles in antigena, temperatura, čas inkubacije, pH, ionska jakost, ...). Protitelesa proti antigenoma A in B zlepijo tiste eritrocite, na katerih je prisoten ustrezen antigen. Če do aglutinacije ne pride, pomeni, da na eritrocitih ni iskanih antigenov, kamor bi se vezala protitelesa.

REAGENTI

- reagenti Ecoclone®: IgM monoklonska protitelesa proizvedena v mišjih celičnih hibridomih, ki so namenjena za določanje antigenov A in B. Reagenti so obarvani po mednarodnem dogovoru; anti-A: modro; anti-B: rumeno; anti-AB: rožnato
- vzorec krvi

LABORATORIJSKI PRIBOR

zaščitne rokavice
papirnate ploščice
pipetni nastavki
lanceta
alkoholni robčki

PROTOKOL

1. Na papirnato ploščico od leve proti desni nanesi po 50 μ L posameznega reagenta za določanje krvnih skupin (t.j. anti-A, anti-B, anti-AB). Pazite, da so reagenti med seboj oddaljeni vsaj 3 cm!
2. Posameznemu reagentu dodaj po volumnu približno enako kaplino krvi.
3. S čistim pipetnim nastavkom posamezen reagent in kri pomešaj ter razmaži, tako da bo premer reakcijske zmesi približno 2 cm. Pazi, da ne pride do kontaminacije s sosednjimi vzorci!
4. Aglutinacija nastopi v nekaj sekundah, vendar končni rezultat odčitaj makroskopsko po 2 min. Med tem časom testni listič občasno premešaj z nagibanjem.

REZULTATI IN POROČILO

- a. Rezultati aglutinacije:

	anti-A	anti-B	anti-AB
aglutinacija (da/ne)			

Na podlagi testa aglutinacije je krvna skupina v vzorcu _____.

- b. Glede na določeno krvno skupino in ob predpostavki, da je analizirani vzorec Rh⁺, predlagajte osebe s krvnimi skupinami, ki bi lahko bile darovalci v primeru nujno potrebne transfuzije krvi. Komentirajte. Kako je v primeru, ko je vzorec Rh⁻?

- c. Glede na določeno krvno skupino pri vaji in ob predpostavki, da bo imel drugi starš krvno skupino AB, določite vse možne kombinacije krvnih skupin otrok. Komentirajte.
- d. Dopolnite tabelo možnih reakcij različnih vzorcev krvi z reagenti anti-A, anti-B in anti-AB.

Anti-A	Anti-B	Anti-AB	Krvna skupina

Datum:

Pregledal/-a:

Komentar:

5. VAJA

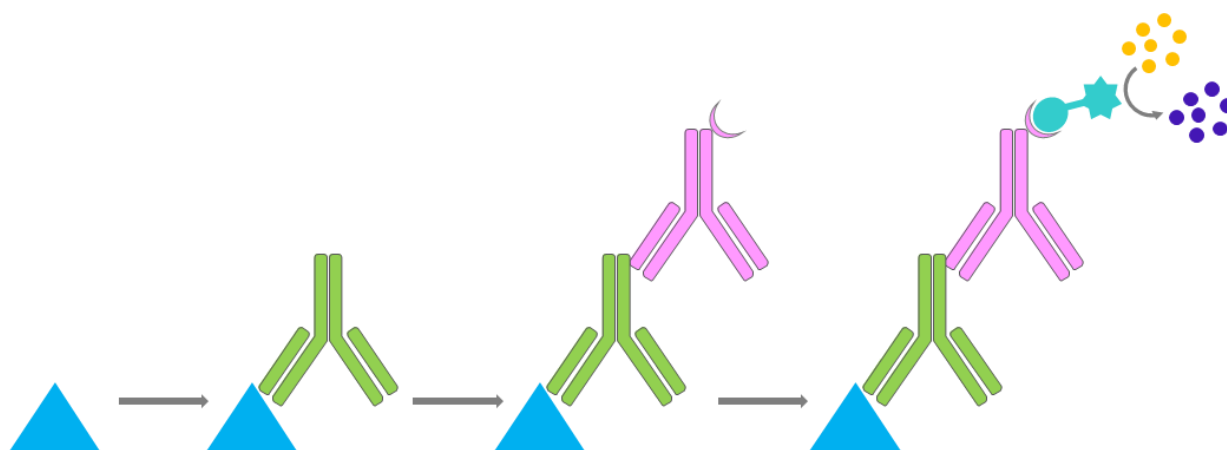
Imunokemijske metode na trdnih nosilcih: določanje alergen-specifičnih IgE v serumu

UVOD

Alergeni so snovi, ki v našem organizmu povzročajo alergijske reakcije – najpogostejše imunske bolezni. Tip imunskega odziva je močno odvisen od vrste antigena, njegove koncentracije, mesta vstopa, sorodnosti antigena s telesu lastnimi molekulami, Pomembno vlogo v alergijskem odzivu imajo protitelesa razreda IgE, ki se sicer normalno sintetizirajo v posamezniku kot odziv na sicer neškodljiv antigen. Ob ponovnem srečanju posameznika z istim antigenom pride do vezave antigena na molekule IgE, ki so prisotne na imunskih celicah, imenovanih mastociti in bazofilci. Ta vezava povzroči hitro sproščanje velike količine farmakološko aktivnih mediatorjev, ki povzročijo nenadno širjenje žil in s tem padec krvnega tlaka, povečano prepustnost žilja, lahko tudi kontrakcijo gladkih mišic (bronhospazem). To reakcijo imenujemo reakcija takojšnje preobčutljivosti, ki se pojavi nekaj minut po vdoru antigena v telo, v skrajni sistemski obliki pa vodi do urgentnega stanja imenovanega anafilaktični šok.

OPIS METODE

Za alergen specifične IgE bomo določali z imunokemijsko metodo na trdnem nosilcu (Slika 1). Vzorec seruma (s specifičnimi IgE) inkubiramo na testnem traku, na katerega so vezani različni alergeni. Posamezen alergen se bo vezal le z določeno vrsto specifičnih IgE, če so le-ti prisotni v serumu pacienta. S spiranjem odstranimo nespecifične IgE. Dodamo konjugat (anti-IgE-biotin), ki se veže na specifične IgE. Nevezan konjugat speremo in dodamo konjugat streptavidin-alkalna fosfataza. Streptavidin se veže z biotinom, nevezani konjugat speremo. Po dodatku specifičnega substrata (TMB) poteče encimsko-kemična reakcija, pri kateri pride do spremembe obarvanosti polja na testnem traku. Na mestih, kjer je prišlo do vezave specifičnih IgE iz vzorca seruma tako nastane modrovijoličen produkt oziroma modrovijolična lisa na testnem traku. Intenziteta barve, ki jo odčitamo vizualno, je sorazmerna koncentraciji specifičnih IgE v vzorcu seruma. Rezultat podamo semikvantitativno.



Slika 1: Potek imuno-kemijske reakcija na testnem traku.

REAGENTI

Reagenčni komplet RIDA qLine Allergy Panel 1 (R-Biopharm AG, Germany):

- nosilec (testni trak): nitrocelulozna membrana z vezanimi alergenskimi antigeni in standardi
- spiralni pufer (25 x): Tris/NaCl
- detekcijsko protitelo: živalsko protitelo proti humanim IgE, konjugirano z biotinom
- konjugat: streptavidin-peroksidaza
- substrat: TMB (tetrametilbenzidin)

LABORATORIJSKI PRIBOR

destilirana voda
vrtinčnik
merilni valj (200mL)
pipete
držalo za membrano
orbitalni stresalnik

OPOZORILO: Reagenti vsebujejo Na-azid, ki je strupen. Uporabljajte rokavice!

PROTOKOL

1. Reagente in vzorce ogrejemo na sobno temperaturo.
2. Iz koncentriranega (25 x) spiralnega pufra pripravimo 200 mL delovne raztopine redčenega spiralnega pufra (1 x).
3. Testni trak vstavimo v držalo in spiramo z razredčenim spiralnim pufrom, 500 μ L, 1 min, na stresalniku pri frekvenci 300 vrtljajev/min.
4. Testni trak popivnemo na brisački.
5. Na testni trak s pipeto dodamo 400 μ L seruma, inkubiramo 30 min pri sobni temperaturi, na stresalniku 300 vrtljajev/min.

6. Ves odvečen pufer s pipeto odstranimo iz reakcijske posodice.
7. Testni trak spiramo z razredčenim pufrom, 400 μL , 3 x 1 min, na stresalniku pri frekvenci 300 vrtljajev/min.
8. Pazimo, da speremo vsa polja testnega traku.
9. Testni trak popivnemo na brisački.
10. V reakcijsko posodico dodamo 400 μL detekcijskih protiteles, inkubiramo na stresalniku, 45 min, pri sobni temperaturi, na stresalniku pri frekvenci 300 vrtljajev/min.
11. Testni trak spiramo z razredčenim pufrom, 400 μL , 3 x 1 min, na stresalniku pri frekvenci 300 vrtljajev/min.
12. Pazimo, da speremo vsa polja testnega traku.
13. V reakcijsko posodico dodamo 400 μL raztopine konjugata, inkubiramo na stresalniku, 20 min, pri sobni temperaturi.
14. Testni trak speremo s 1000 μL razredčenega spiralnega pufra, odlijemo in popivnemo na papirnato brisačko.
15. Testni trak ponovno spiramo z razredčenim pufrom, 400 μL , 2 x 1 min, na stresalniku pri frekvenci 300 vrtljajev/min. Pazimo, da speremo vsa polja testnega traku.
16. V reakcijsko posodico dodamo 400 μL raztopine substrata, inkubiramo 15 min na stresalniku, zaščiteno pred svetlobo.
17. Substrat s pipeto odstranimo iz reakcijske posodice.
18. Testni trak spiramo s 400 μL razredčenega spiralnega pufra, 1 min, na stresalniku pri frekvenci 300 vrtljajev/min.
19. Testni trak spiramo s 400 μL destilirane vode, 1 min, na stresalniku pri frekvenci 300 vrtljajev/min.
20. Testni trak dobro popivnemo na papirnato brisačko, osušimo na zraku (30 min) ali s sušilnikom za lase in vizualno odčitamo rezultat.

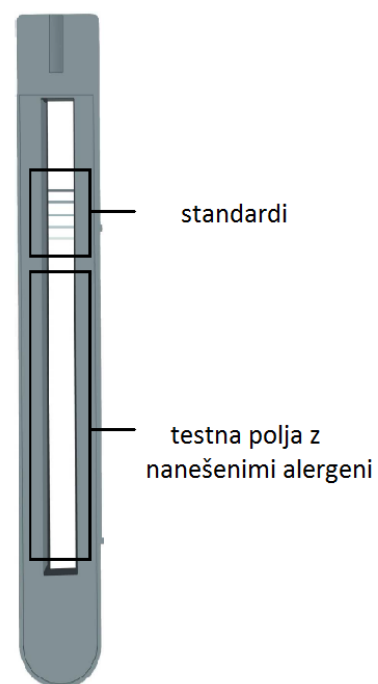
Odčitek rezultata

- Veljavnost testa: test je bil zanesljivo izveden, če je ozadje testnega traku ustrezno razbarvano in je jasno vidnih vseh 5 polj standardov.
- Pozitiven rezultat: rdeče-rjava obarvanost polja na testnem trakcu v polju z nanešenimi alergeni.
- Semikvantitativno vrednotenje rezultata: po primerjavi intenzitete obarvanosti polja s priloženo skalo standardov ocenimo pozitiven rezultat vzorca in določimo prisotnost specifičnih IgE za posamezne alergene (Preglednica I).

Preglednica I: Semikvantitativno vrednotenje koncentracije za alergen specifičnih IgE.

STANDARD	KONCENTRACIJA ZA ALERGEN SPECIFIČNIH IgE
0	nezaznavna
1	nizka
2	povišana
3	značilno povišana
4	visoka
5	zelo visoka

POZICIJA	ALERGEN
1	standard 5
2	standard 4
3	standard 3
4	standard 2
5	standard 1
1	pršica <i>Derm. pteronyssinus</i>
2	pršica <i>Derm. farinae</i>
3	jelša
4	breza
5	lešnik
6	trave
7	rž
8	navadni pelin
9	trpotec
10	mačka
11	konj
12	pes
13	gliva <i>Alternaria alternata</i>
14	jajčni beljak
15	mleko
16	arašidi
17	lešnik
18	korenje
9	pšenica
20	soja

**Slika 1:** Testni trak in vrsta ter razporeditev alergenov vezanih na testni trak.

REZULTATI IN POROČILO

- a. Opis vzorcev, materiala in opreme

Vrsta in številka biološkega vzorca:

- b. Meritve

pogoji merjenja:

- c. Rezultati

Kot rezultat testa nalepite sliko ali skicirajte testni trak, označite posamezna polja. Ovrednotite intenziteto barve na posameznem polju in komentirajte rezultate.

Datum:

Pregledal/-a:

Komentar:

LITERATURA

1. VAJA: Strokovna terminologija: obdelava besedila na temo imunskih procesov in imunokemije

- Side-Chain Theory. [Elektronski vir].
<http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/36175/title/Side-Chain-Theory--circa-1900/>.
[Dostopano: 16.9.2016]
- Weatherall DJ. The Specificity of Serological Reactions. The FASEB Journal. Vol 25-8, 2513-14, 2011.
- Kotnik V. Imunološki priročnik. Ljubljana: UL Medicinska fakulteta; 2010.
- PDB: 1IGT, Harris L.L. et. al., refined Structure of an intact Ig2a monoclonal antibody. Biochemistr v36 pp. 1581-97, 1997.

2. VAJA: Celična imunost - izolacija mononuklearnih celic iz levkocitnega koncentrata

- Isolation of mononuclear cells. [Elektronski vir].
http://www.gelifesciences.com/file_source/GELS/Service%20and%20Support/Documents%20and%20Downloads/Handbooks/pdfs/Isolation%20of%20Mononuclear%20Cells.pdf.
[Dostopano: 20.9.2016]
- Vozelj, M. Temelji imunologije. 1. izd., Ljubljana: DZS; 2001.
- Servier Medical art. [Elektronski vir].
<http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>
[Dostopano: 20.9.2016]

3. VAJA: Topnost imunskih kompleksov – precipitacija v gelu

- Vozelj, M. Temelji imunologije. 1. izd., Ljubljana: DZS; 2001.
- Servier Medical art. [Elektronski vir].
<http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>
[Dostopano: 20.9.2016]

4. VAJA: Interakcije med antigeni in protitelesi - reakcija aglutinacije

- Blood Groups and Red Cell Antigens. [Elektronski vir].
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2264/>.
[Dostopano: 20.9.2016]
- Reid, ME; Lomas-Francis, C. The Blood Group Antigen Facts Book. 2. Izd., New York: Elsevier Academic Press; 2004.

5. VAJA: Imunokemijske metode na trdnih nosilcih: določanje alergen-specifičnih IgE v serumu

- Vozelj, M. Temelji imunologije. 1. izd., Ljubljana: DZS; 2001.
- Reagenčni komplet RIDA qLine Allergy Panel 1, R-Biopharm AG, Germany. [Elektronski vir]
<http://www.r-biopharm.com/products/clinical-diagnostics/allergy-diagnostics/panel-tests/item/rida-qline-allergy-panel-2-3>.
[Dostopano: 16.9.2016]