

# Immunodiagnostyka

*dr Agnieszka Pawełczyk*

*Zakład Immunopatologii Chorób Zakaźnych i Pasożytniczych WUM  
2016/2017*

# Antygen

|  |   |
|--|---|
| <b>Sposób pobudzenia układu immunologicznego</b>   | <ul style="list-style-type: none"><li>•immunogeny</li><li>•hapteny</li></ul>                                  |
| <b>Pochodzenie</b>   | <ul style="list-style-type: none"><li>•antygeny zewnętrzne</li><li>•autoantygeny</li></ul>                    |
| <b>Udział limfocytów Th w pobudzeniu odpowiedzi odpornościowej</b>                               | <ul style="list-style-type: none"><li>•antygeny grasiczozależne</li><li>•antygeny grasiczonieależne</li></ul> |
| <b>Liczba epitopów na pojedynczej cząsteczce antygeny rozpoznawanych przez dane przeciwciało</b> | <ul style="list-style-type: none"><li>•antygeny monowalentne</li><li>•antygeny poliwalentne</li></ul>         |

# Przeciwciała

```
graph TD; A[Przeciwciała] --> B[RÓŻNICE W BUDOWIE ŁAŃCUCHÓW CIĘŻKICH]; A --> C[AKTYWNOŚĆ];
```

## RÓŻNICE W BUDOWIE ŁAŃCUCHÓW CIĘŻKICH

### KLASY:

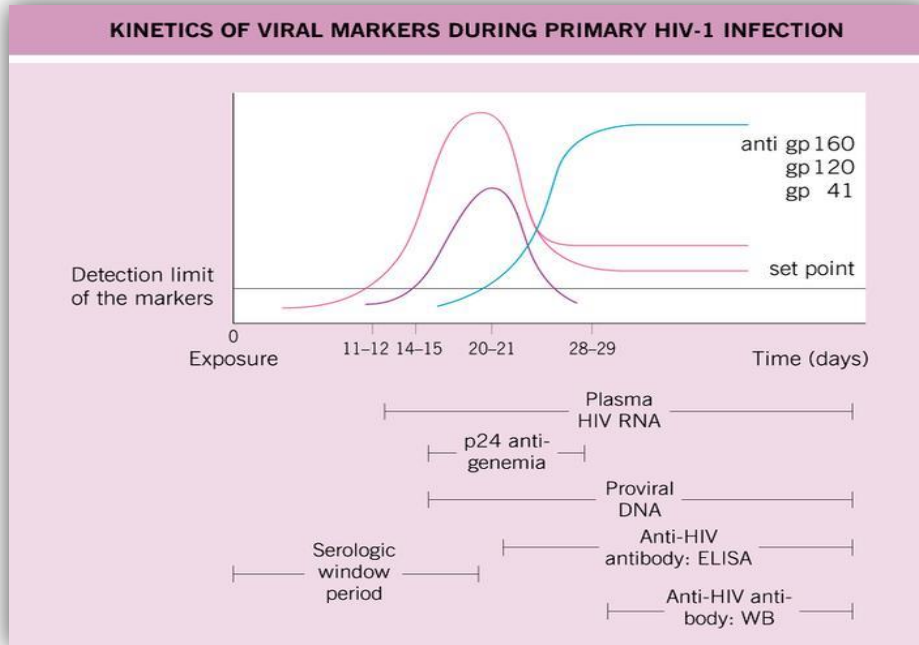
- IgA
- IgD
- IgE
- IgM
- IgG

## AKTYWNOŚĆ

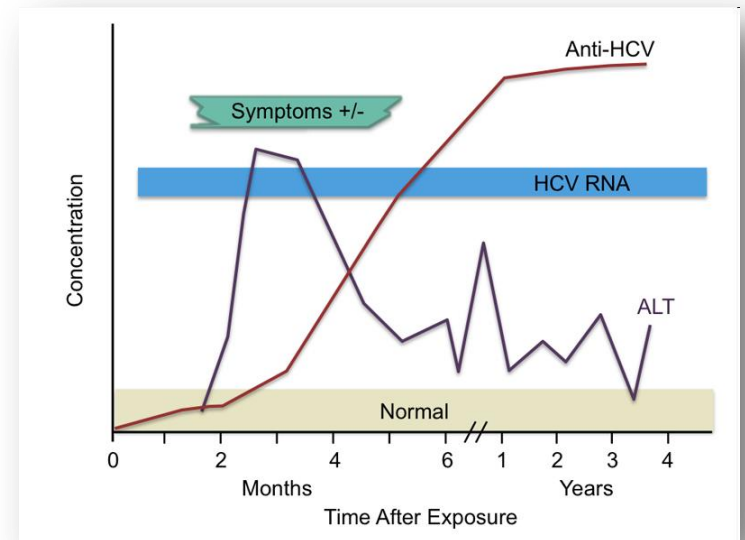
- antytoksyny
- precypityny
- lizyny
- opsoniny
- aglutyniny

# Okienko serologiczne

## HIV



## HCV



## Pamięć immunologiczna

zdolność układu immunologicznego do silniejszego i szybszego reagowania na każdy następny kontakt z danym antygenem, dzięki obecności komórek pamięci. Jest wynikiem stymulacji długo żyjących limfocytów B i T.

## Reakcja krzyżowa

zachodzi gdy przeciwciała przeciwko jednemu antygenowi rozpoznają i wiążą się z podobnymi (kolejność aminokwasów, struktura przestrzenna) antygenami (np. w chorobach alergicznych).

## Awidność

siła wiązania Ag poliwalentnego (mającego wiele epitopów) z kilkoma paratopami przeciwciała.

Zwiększa się wraz z czasem trwania choroby.

Czułość testu

Swoistość testu

**Wyniki fałszywie (+)**

**Wyniki fałszywie (-)**

**Wyniki nieokreślone**

# Materiał biologiczny do badań immunodiagnostycznych

- surowica
- wymazy (np. ze zmian skórnych, gardła, nosa, ucha, oka)
- aspiraty (np. z jamy bębenkowej, z ropni, płynu wysiękowego, z zatok)
- płyn mózgowo-rdzeniowy
- bioptaty i wycinki
- mocz
- kał



# Materiał nie nadający się do badania

- źle pobrane próbki
- próbka częściowo wylana;
- widoczna pleśń w próbce;
- zanieczyszczona substancjami pochodzenia zewnętrznego (substancje kontrastowe, barwniki, oleje);
- materiał pobrany jedną wymazówką do wielokierunkowego badania (bakterie tlenowe, beztlenowe, prątki, grzyby);
- materiały nie nadające się do badania w kierunku beztlenowców przy zleconym takim badaniu:
  - popłuczyny żołądkowe, mocz, kał, wymazy z nosa, oka, gardła, powierzchni skóry oraz środowiska zewnętrznego.

# **Dobór odpowiedniej metody zależy od:**

**Rodzaju materiału  
biologicznego**

**Celu badania**

**Miejsca występowania  
poszukiwanego składnika**

**Wiarygodności testu i  
jego wartości  
diagnostycznej**

**Rodzaju poszukiwanego  
składnika**

**Czasu wykonania**

**Spodziewanego stężenia  
poszukiwanego składnika**

**Możliwości  
technicznych**

# **Charakterystyka wybranych metod immunodiagnostycznych**

# Zastosowanie:

- 1. Diagnostyka chorób zakaźnych i inwazyjnych**
- 2. Określenie antygenów zgodności tkankowej (transplantologia i transfuzjologia)**
- 3. Ustalanie grup krwi (hematologia, transfuzjologia, transplantologia)**
- 4. Ustalanie poziomu wielu białek w płynach ustrojowych**
- 5. Ocena stanu czynnościowego układu immunologicznego**

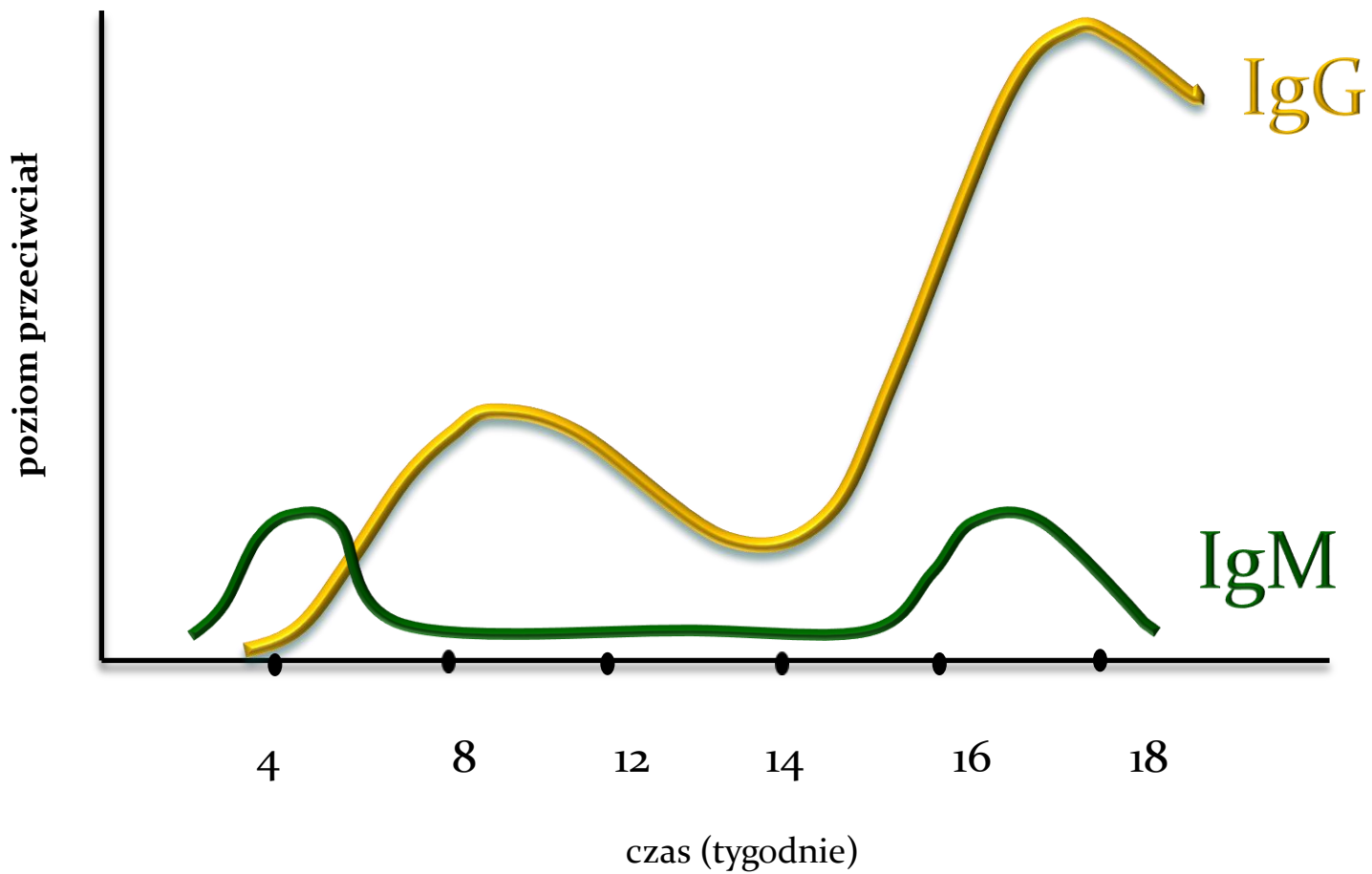
# Diagnostyka serologiczna chorób zakaźnych

- jednorazowy lub dwukrotny pomiar stężenia przeciwciał swoistych (zakażenia wirusowe, przeciwciała poszczepienne)

- ocena dynamiki serologicznej – wielokrotne badanie stężenia przeciwciał w określonych, różnych odstępach czasu w zależności od rodzaju patogenu (metody ilościowe).

- ocena obecności zntygenów

# PRZYKŁADOWA KINETYKA PRZECIWCIAŁ IgM i IgG



| PRZYKŁADOWE WZORCE SEROLOGICZNE |     | ZNACZENIE   |
|---------------------------------|-----|---|
| IgM                             | IgG |   |
| -                               | -   | brak zakażenia, brak odporności   |
| -                               | +   | przebyte zakażenie, czasami odporność/nie (gdy można rozwinąć zakażenie wtórne) |
| +                               | -   | wczesna faza zakażenia  |
| +                               | +   | zakażenie   |

PRZYKŁADOWE WZORCE SEROLOGICZNE

ZNACZENIE

IgM

**ALE...**

SAJ SYTUACJE ODBIEGAJĄCE OD  
PREZENTOWANYCH WZORCÓW

+

+

+

zakażenie



ALE...

*Borrelia burgdorferi:*

*Toxoplasma gondii:*

# Wybrane rodzaje metod immunodiagnostycznych

- **Metody immunologiczne ze znacznikami**
  - immunoenzymatyczne
  - radioimmunologiczne
  - fluorescencyjne
  
- **Aglutynacja** (np. odczyn blokowania hemaglutynacji)
  
- **Precypitacja** (np. test kłaczkowania, immunodyfuzja, immunoelektroforeza)
  
- **Odczyn wiązania dopełniacza (OWD)**

# **Metody immunodiagnostyczne ze znacznikami**

## ELISA - ZASTOSOWANIE

| ELISA        | WYKRYWANIE   | Przykład  |
|--------------|--|---|
| POŚREDNIA    | <ul style="list-style-type: none"> <li>• toksyn bakteryjnych</li> <li>• antygenów wirusowych</li> <li>• przeciwciał</li> </ul> | toksyny cholery, toksyny enteropatogennych szczepów <i>E. coli</i> , enterotoksyny <i>Staphylococcus aureus</i> , wirusów: rotawirusy, <i>Hepatitis</i> wirus, <i>Parainfluencae</i> wirus  |
| BEZPOSREDNIA | <ul style="list-style-type: none"> <li>• przeciwciał</li> </ul>  | <i>Salmonella</i> , <i>Yersinia</i> , <i>Brucella</i> , riketsji, <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>M. leprae</i> , <i>Legionella pneumophila</i> , <i>Borrelia burgdorferi</i> , <i>Treponema pallidum</i> , <i>Babesia microtii</i> , <i>Toxoplasma sp.</i> , <i>Toxocara sp.</i> , <i>Echinococcus sp.</i> |

| Zalety                    | Ograniczenia     |
|---------------------------|------------------|
| Szybki                    | Reakcje krzyżowe |
| Czuły                     | -                |
| Brak toksycznych związków | -                |
| Niskie koszty             | -                |
| Tanie i trwałe odczynniki | -                |

## RIA

### Zastosowanie:

diagnostyka chorób zakaźnych:

- wirusowych: HIV, HBV, HCV, EBV
- bakteryjnych: *Treponema pallidum* ssp., *Legionella* sp., Chlamydia sp.
- pasożytniczych: *Toxoplasma* sp.

| Zalety           | Ograniczenia                 |
|------------------|------------------------------|
| Wysoka czułość   | Specjalistyczny sprzęt       |
| Wysoka swoistość | Specjalne środki ostrożności |
| Niskie koszty    | -                            |

# WB (Western blot)

## Zastosowanie:

diagnostyka zakażeń:

- wirusowych: HIV, *Herpes*, BSA (prion), HBV
- bakteryjnych: *Borrelia burgdorferi s.l.*

| Zalety                  | Ograniczenia   |
|-------------------------|--|
| Swoisty                 | Mogą zachodzić reakcje nieswoiste [wyniki fałszywie (+)] |
| Czuły<br>(nawet 0,1 ng) | Mogą występować reakcje fałszywie (-)                    |
| -                       | Kosztowne  |
| -                       | Wymagają dużej wprawy                                    |
| -                       | Droga aparatura  |

# FIA

## Zastosowanie:

Diagnostyka zakażeń bakteryjnych (*Borrelia* sp., *Chlamydia* sp.) oraz zarażeń pasożytniczych (stadia rozwojowe pasożytów), badanie autoprzeciwciał w chorobach autoimmunizacyjnych

| Zalety  | Ograniczenia                           |
|---------|--|
| Czuła   | Czasochłonna                           |
| Swoista | Odpowiedni sprzęt do obserwacji wyniku |

# Cytometria przepływowa

## Zastosowanie:

- Diagnostowanie i monitorowanie chorób, np.:
  - białaczki, chłoniaki;
  - wrodzone i nabyte niedobory immunologiczne;
  - choroby nowotworowe;
  - choroby płuc;
  - choroby autoimmunizacyjne;

| Zalety  | Ograniczenia                |
|---|-----------------------------|
| Szerokie zastosowanie   | Czasochłonna                |
| Analiza wieloparametrowa  | Drogie odczynniki           |
| Jednoczesne oznaczanie wielu antygenów (np. receptorów) w jednej próbce | Droga aparatura             |
| Bardzo duża czułość   | Wymagane duże doświadczenie |
| Bardzo duża swoistość   | -                           |
| Bezpieczna  | -                           |



# **Metody immunodiagnostyczne bez znaczników**

# Aglutynacja

## Zastosowanie:

diagnostyka mikrobiologiczna

- serologiczne typowanie szczepów bakteryjnych, np.: *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia* spp., *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, *S. agalactiae*, *S. pyogenes* itd.
- ustalanie zgodności tkankowej, grupy krwi

## Zalety

Prosta

Szybka

Łatwy odczyt wyników

Niedroga

Stosunkowo wysoka  
czułość

# Immunodyfuzja

## Zastosowanie:

diagnostyka mikrobiologiczna np.  
wykrywanie toksyn bakteryjnych,  
(enterotoksyny, toksyny błoniczej)

| Zalety         | Ograniczenia                    |
|----------------|---------------------------------|
| Prosta         | Niska czułość                   |
| Czuła          | Długi czas oczekiwania na wynik |
| Niedroga       | -                               |
| Bezpieczna     | -                               |
| Gotowe zestawy | -                               |
| Szybka         | -                               |

# Immuno-elektroforeza

## Zastosowanie:

- diagnostyka chorób zakaźnych i pasożytniczych:
  - wykrywanie antygenów wirusowych, np.: HBVAgS;
  - wykrywanie antygenów bakteryjnych i grzybiczych w płynach ustrojowych, np.: *H. influenzae*, *N. meningitidis*, *E. coli* K1, *S. pneumoniae*, *S. agalactiae* oraz *Cryptococcus neoformans*
- diagnostyka grzybic narządowych, np.: kandydoza i aspergiloza;

# OWD

Wykorzystuje zdolność dopełniacza do lizy kompleksu:

**krwinka czerwona + swoiste przeciwciało**

## Przebieg testu:

### I. UKŁAD TESTUJĄCY

surowica badana + antygen + dopełniacz

pozbawiona własnego dopełniacza

### II. Inkubacja

### III. SYSTEM WYKRYWAJĄCY

krwinki czerwone owcy + przeciwciała swoiste

# Wynik OWD

Wykorzystuje zdolność dopełniacza do lizy kompleksu:

**krwinka czerwona + swoiste przeciwciało**

**Wynik testu:**

## **I. BRAK HEMOLIZY**

Kompleks Ag-Ab-dopełniacz  
=> BRAK „WOLNEGO” DOPEŁNIACZA

**WYNIK**  
**+**

## **III. OBSERWOWANA HEMOLIZA**

Nie powstał kompleks  
=> JEST „WOLNY” DOPEŁNIACZ

**WYNIK**  
**-**

# OWD

## Zastosowanie:

Diagnostyka chorób zakaźnych:

- wirusowych – grypa, cytomegalia, kleszczowe zapalenie mózgu i inne;
- bakteryjnych – kiła, leptospiroza, bruceloza, tularemia, listerioza i inne;
- grzybiczych – aspergiloza, kandydoza;

Diagnostyka chorób pasożytniczych np. toksoplazmoza,

| Patogen | Test przesiewowy  | Test potwierdzenia  |
|---------|---|---|
| EBV     | IFA (złoty standard), ELISA/EIA   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- WB,</li> <li>- awidność VCA IgG</li> </ul>   |
| HIV     | <ul style="list-style-type: none"> <li>- testy III generacji ELISA/EIA</li> <li>- testy IV generacji ELISA/EIA</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- WB</li> <li>- PCR</li> </ul>                 |
| HCV     | - III generacji EIA/ELISA   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- WB</li> <li>- RIBA</li> <li>- PCR</li> </ul> |



# Diagnostyka molekularna vs immunodiagnostyka

|                                | Testy serologiczne                   | Testy molekularne   |
|--------------------------------|--------------------------------------|---|
| Wykrywany materiał biologiczny | antygeny, przeciwciała               | Materiał genetyczny patogenu, ale także ekspresja genów dla np. cytokin |
| Okienko diagnostyczne          | tak                                  | tak   |
| Czułość                        | mniejsza                             | większa, co nie zawsze jest zaletą                                      |
| Swoistość                      | mniejsza                             | większa (ale np. potrzebna analiza bioinformatyczna)                    |
| Koszt                          | Mniejszy pojedynczego badania        | Większy, ale to się zmienia   |
| Szybkość wykonania             | zależy od rodzaju testu              | zależy od rodzaju techniki  |
| Zastosowanie                   | węższy zakres                        | Szeroki zakres  |
| Trudność wykonania             | problem dotyczy interpretacji wyniku | Problem dotyczy analizy wyniku  |

**Dziękuję za uwagę**