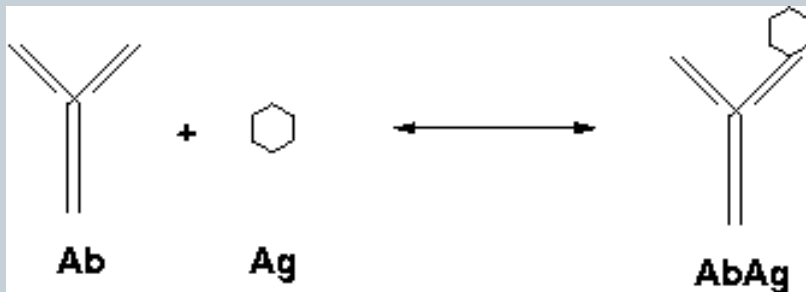
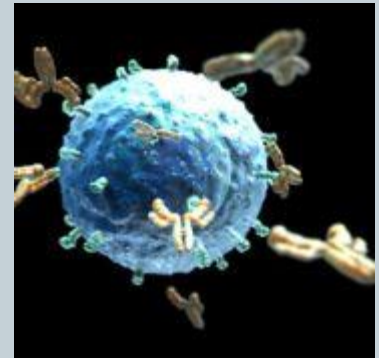


TEST PFC (Plaque-Forming Cells Assay)

WYKRYWANIE KOMÓREK PRODUKUJĄCYCH PRZECIWCIAŁA



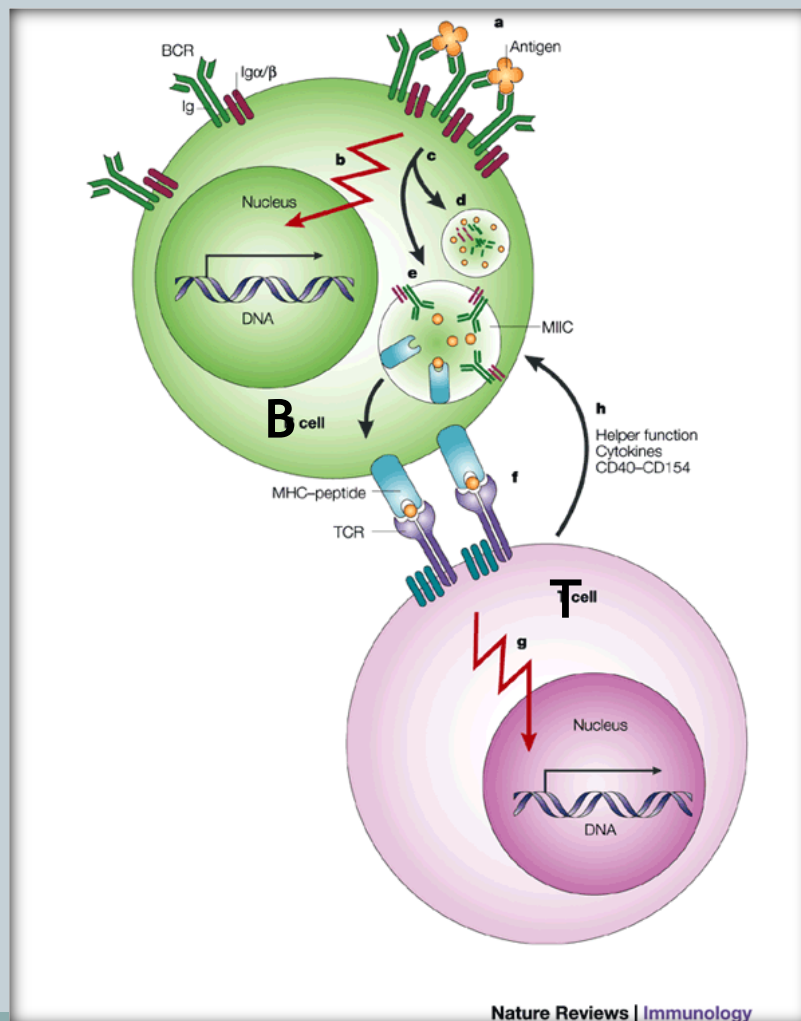
http://www.zgapa.pl/zgapedia/data_pictures/_uploads_wiki/p/przeciwcialo_powinowactwo.png



http://www.zdrowemiasto.pl/cache/%5B2144%5Dig1_jpg.jpg_41244_x180_y0.jpg

Aktywacja LIMFOCYTÓW B

2

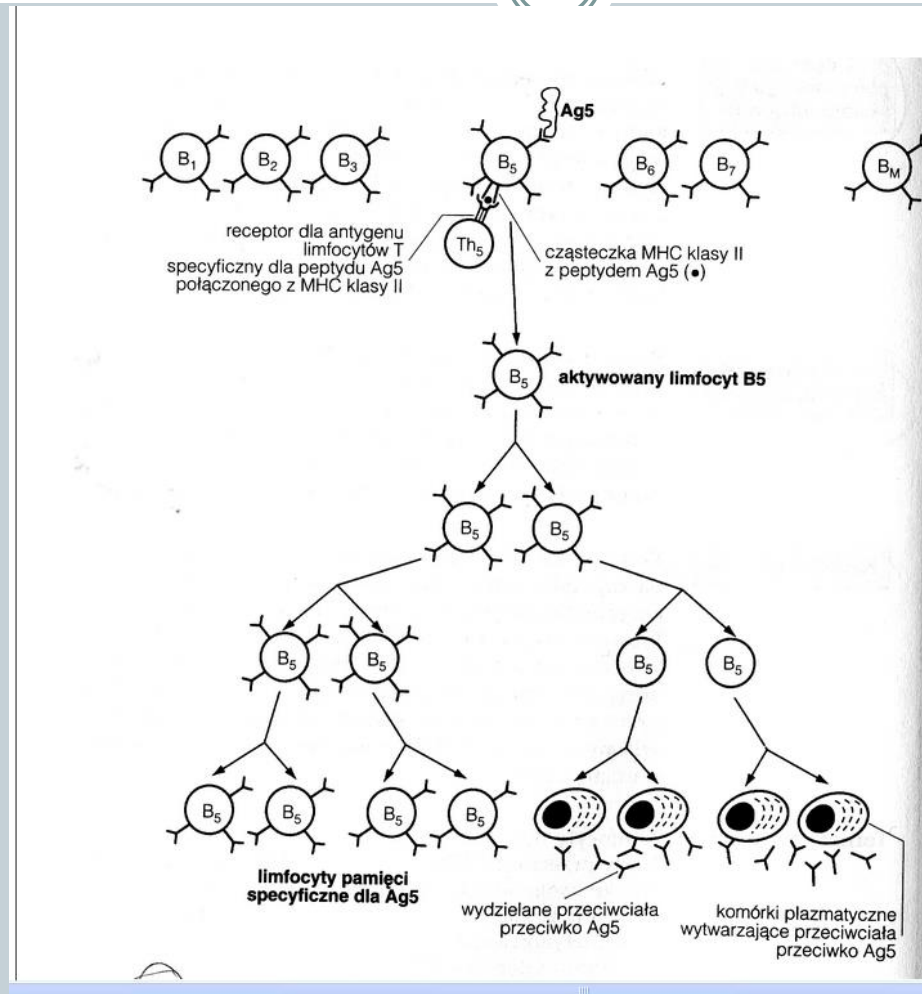


1. BCR- Ag/MHC
2. CD40-CD40L

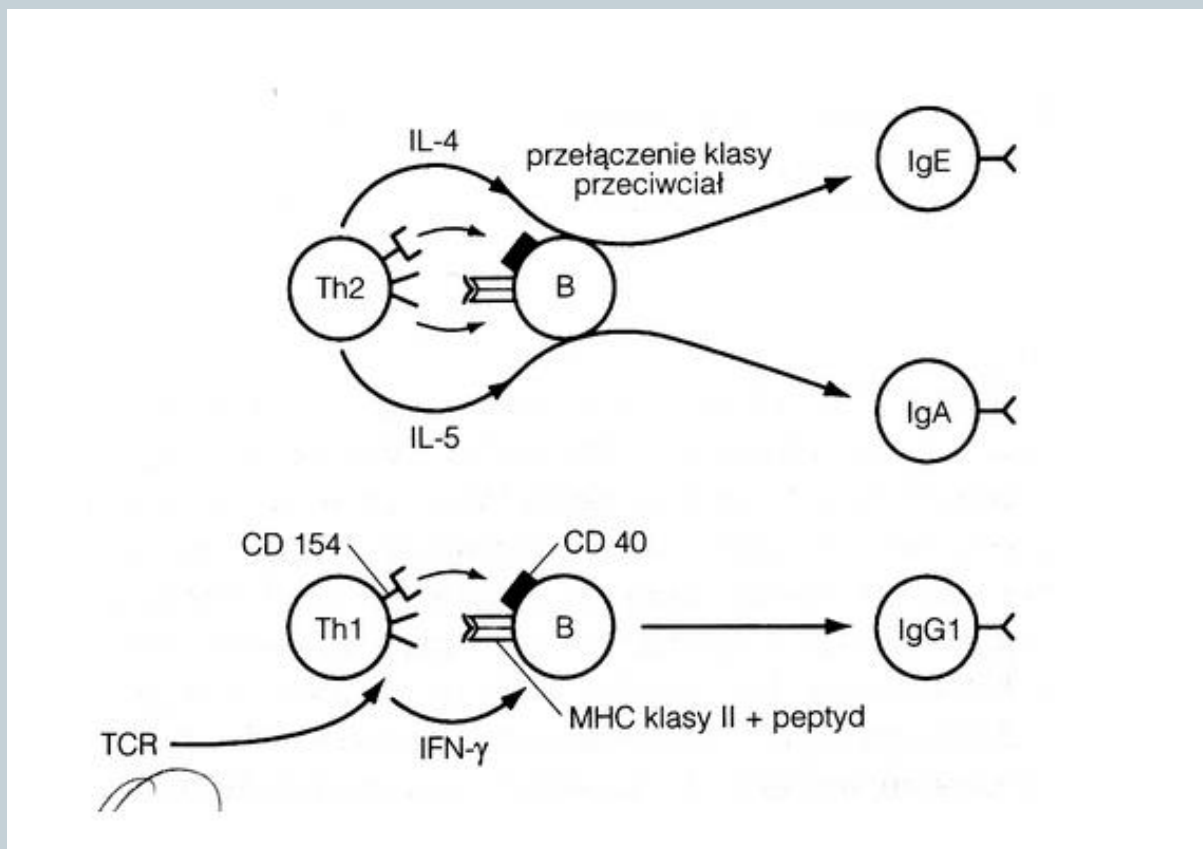
Czynniki Indukujące aktywację Limfocytów

- **Antygeny**- substancje posiadające cechy:
 - ✦ zdolność wywoływania swoistej odpowiedzi immunologicznej
 - ✦ zdolność do swoistej reakcji z produktem odpowiedzi immunologicznej
- **T-zależne (grasiczozależne)**- wzbudzają wydzielanie przeciwciał dopiero po uprzednim pobudzeniu limfocytów Th; większość białek.
- **T-niezależne (grasiczonieależne)** -wywołują produkcję przeciwciał bez wcześniejszej prezentacji przez APC i pobudzenia Th; polimery (lipopolisacharydy bakteryjne, LPS)

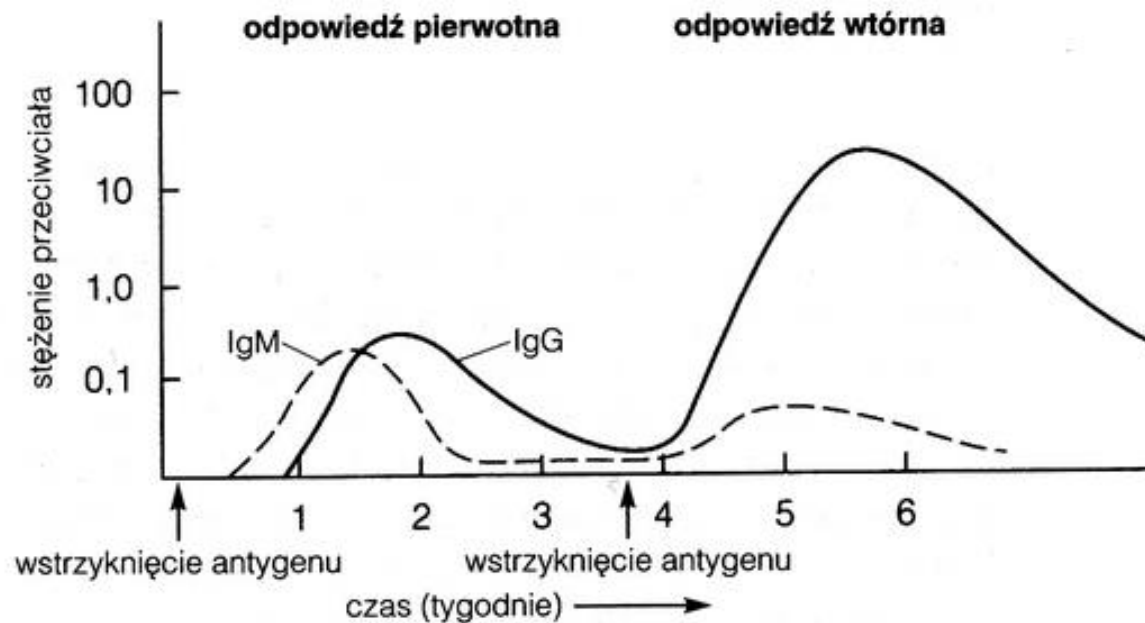
Selekcja klonalna/ aktywacja lim B



Zmiana klasy sytetyzowanych immunoglobulin – udział interakcji Th/B i cytokin



Kinetyka odpowiedzi immunologicznej



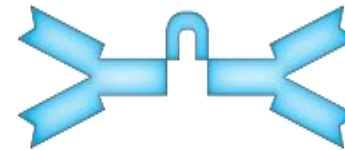
Izotyp przeciwciała

Funkcje przeciwciał

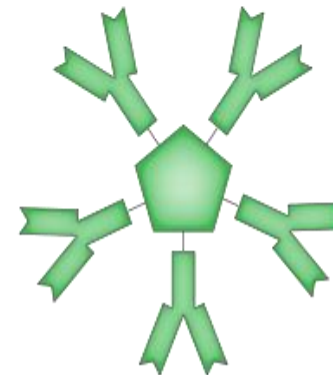
IgG	Opsonizacja antygenów: ułatwienie fagocytozy przez Ma i Ne Aktywacja dopełniacza ADCC z udziałem NK i makrofagów Odporność noworodków: transfer przez łożysko
IgM	Aktywacja dopełniacza Receptor dla antygeny naiwnych Li B
IgA	Odporność w błonach śluzowych układu pokarmowego
IgE	ADCC z udziałem Eo Degranulacja komórek tucznych i Ba
IgD	Receptor dla Ag naiwnych Li B



Monomer
IgD, IgE, IgG

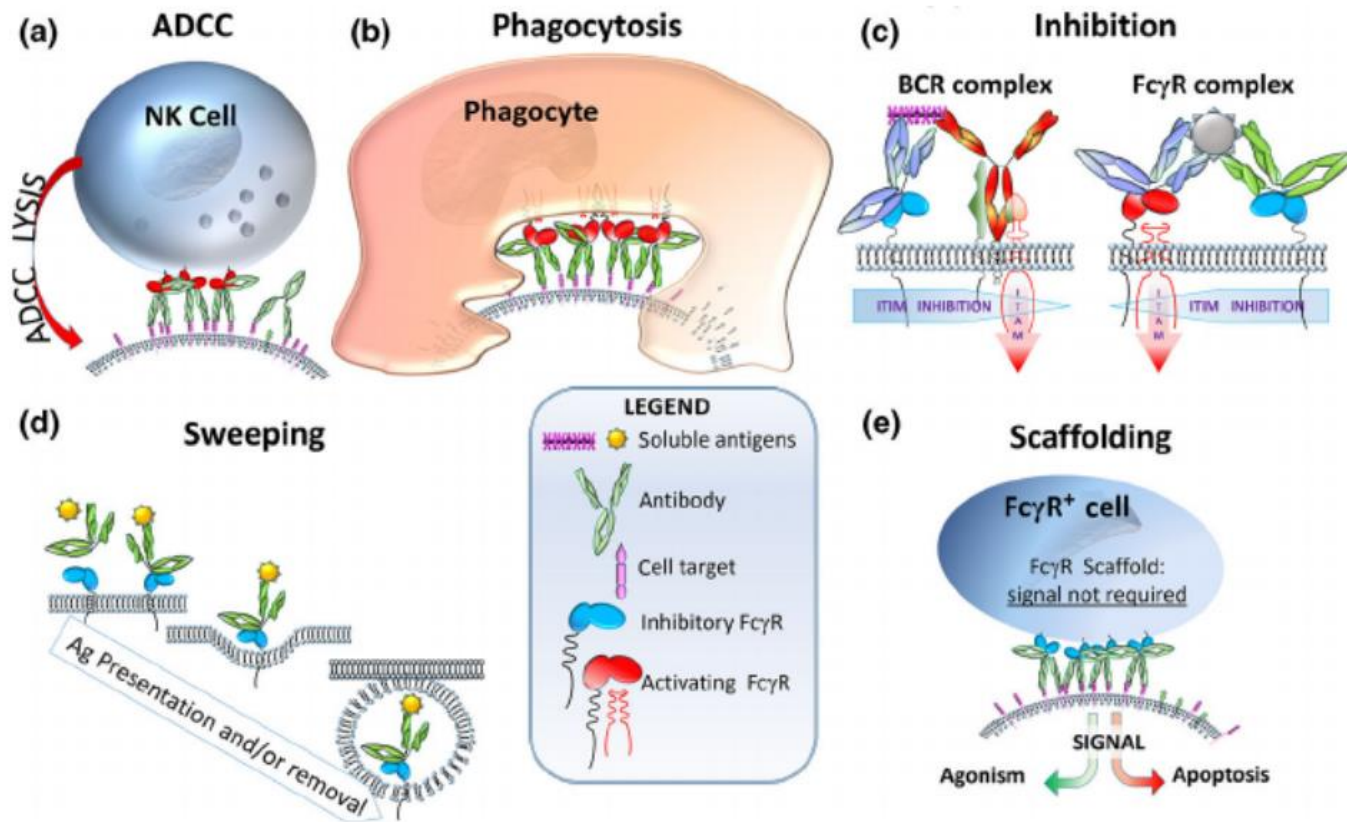


Dimer
IgA

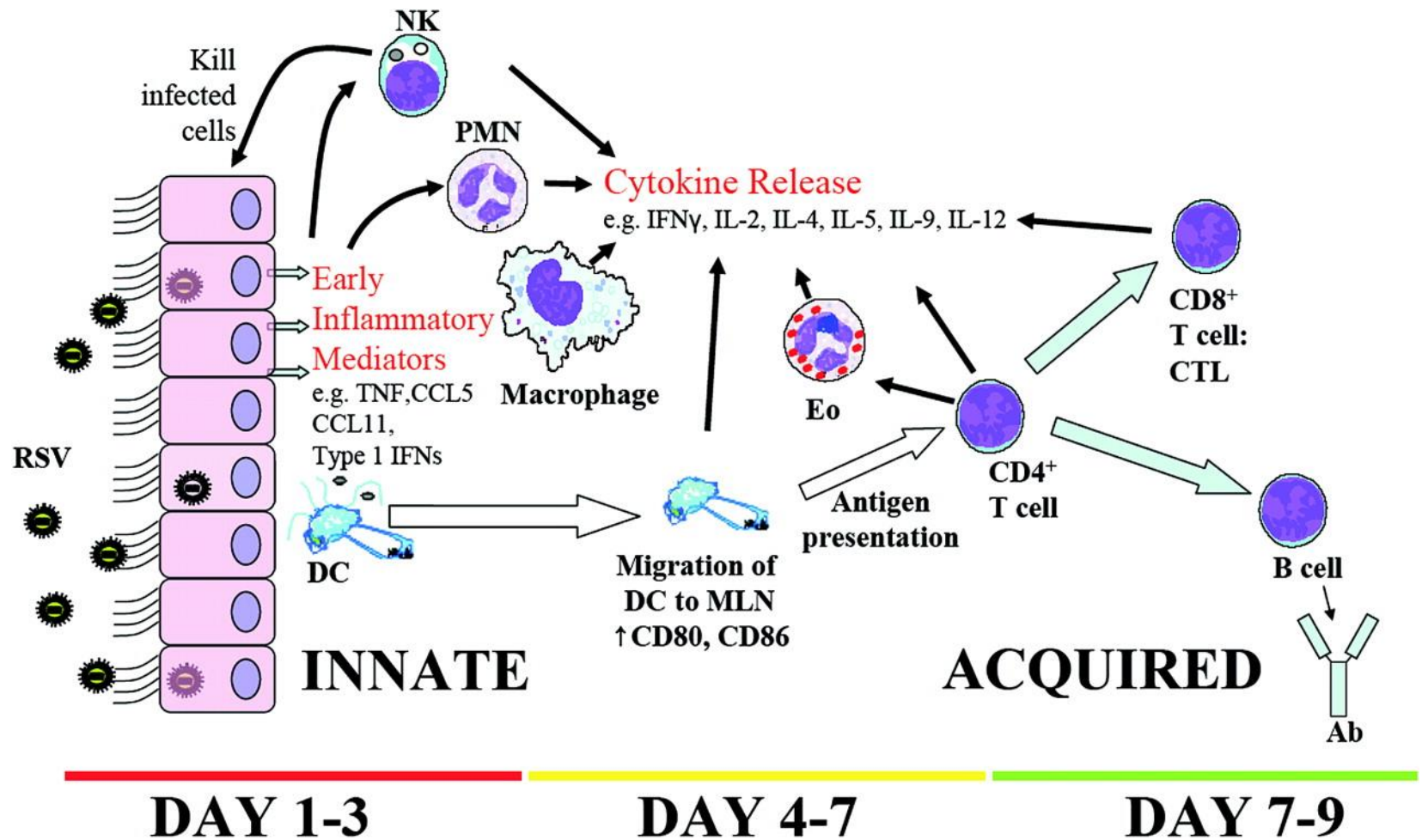


Pentamer
IgM

Rola przeciwciał w odpowiedzi immunologicznej

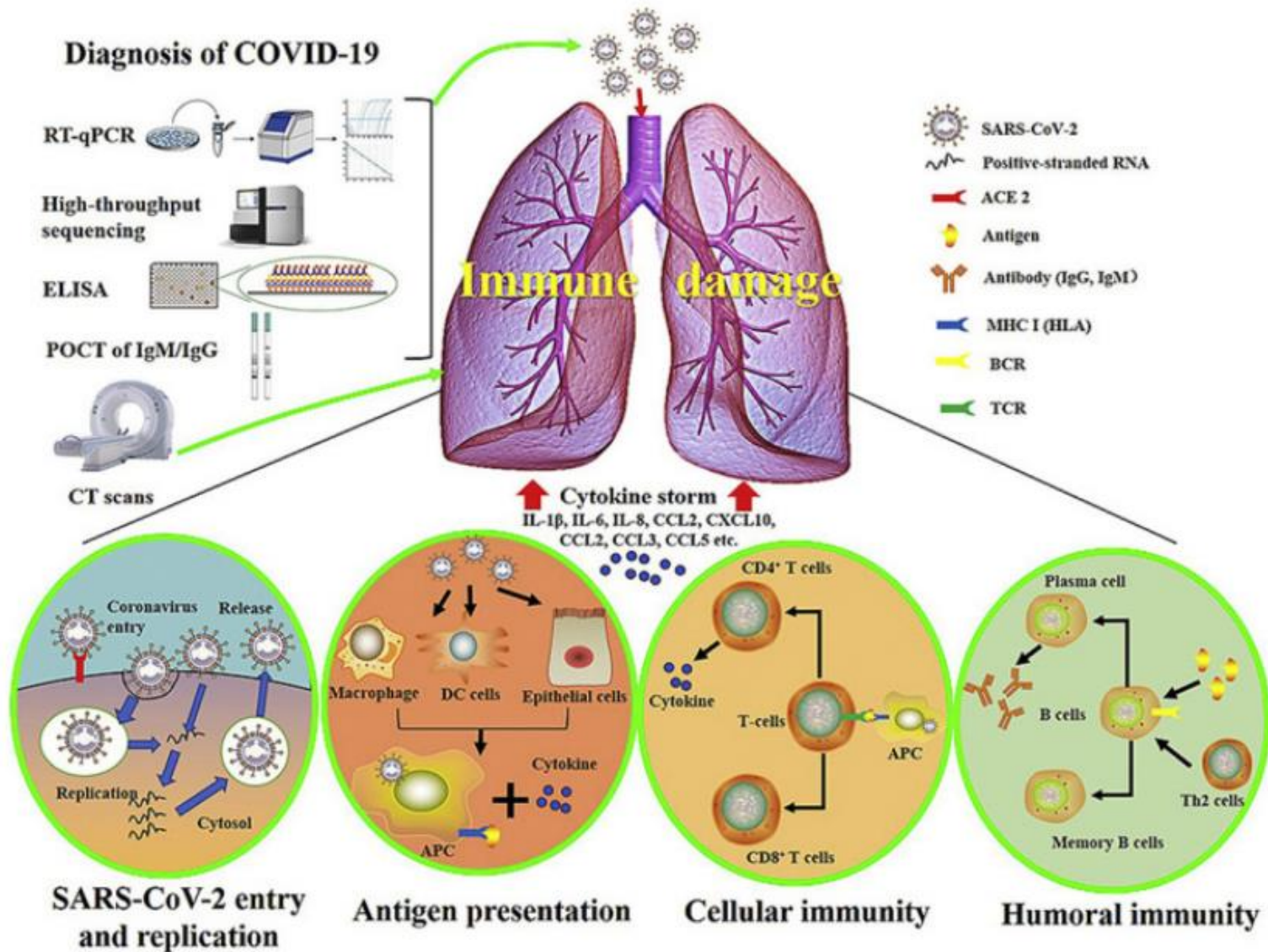


Przeciwwirusowa odpowiedź nabyta w tym powstawanie IgG



Peter J. M. Openshaw, and John S. Tregoning Clin.
Microbiol. Rev. 2005; doi:10.1128/CMR.18.3.541-555.2005

Odpowiedź układu odpornościowego na SARS-CoV-2

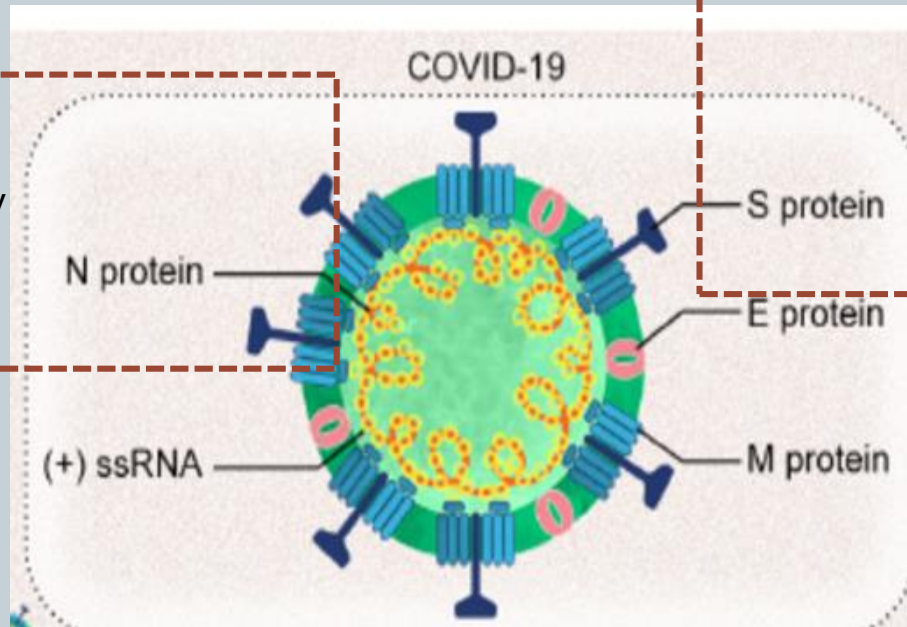


IgG specyficzne wobec SARS-CoV-2



Białko N

Wraz z genomem wirusa tworzy heliakny nukleokapsydy



Białko S

część osłonki białkowo lipidowej, wchodzi w skład wypustek glikoproteinowych odpowiada za przedostawanie się wirusa do komórek gospodarza

Czy pacjenci wyleczeni z COVID-19 zostaną ponownie zarażeni?
Czy u pacjentów rozwija się pamięć immunologiczna i odporność związana z IgG ?



patogeniczność SARS-CoV-2 wydaje się być podobna do SARS-CoV **ALE**

Pacjenci w momencie wyzdrowienia z ostrej infekcji SARS mieli:
+ IgG i + Ig neutralizujące (blokują funkcje biologiczne wirusa)
a miano ich było znamienne

Bierna immunoterapia przy użyciu surowic pochodzących od pacjentów
rekonwalescentów

TEST PFC



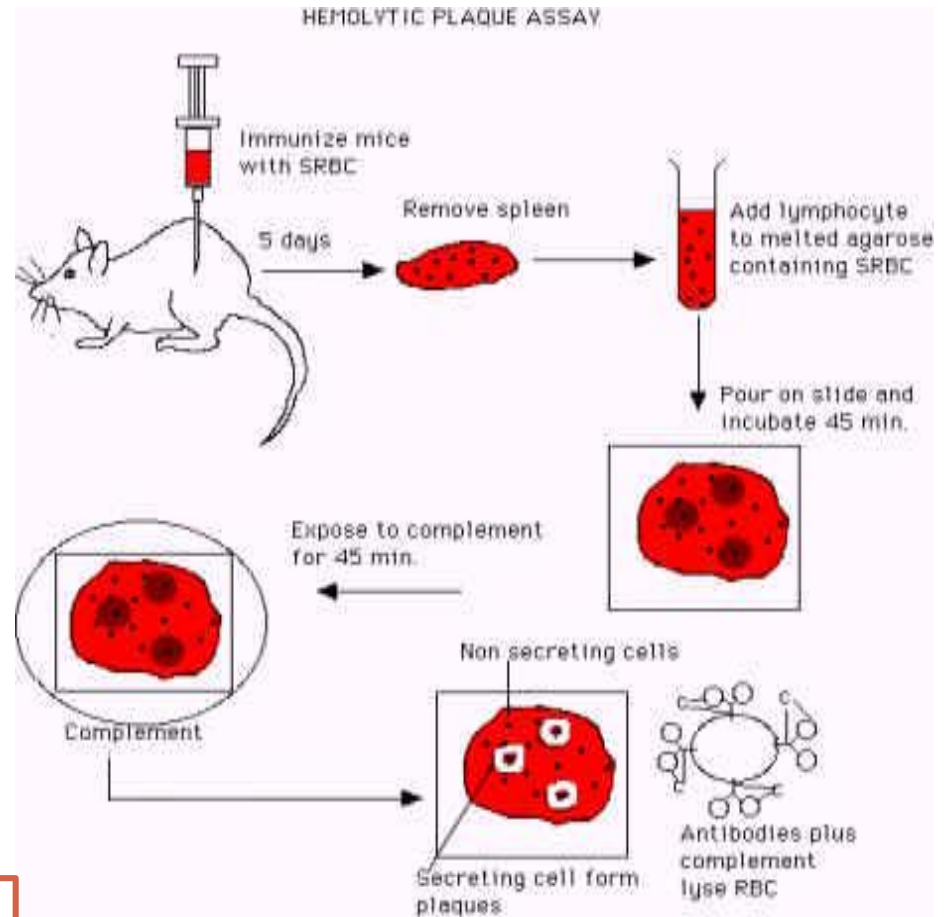
- Służy do wykrywania komórek produkujących przeciwciała przeciw danemu antygenowi
 - Przeciwciała skierowanych przeciw antygenom erytrocytów użytych do immunizacji, a następnie stosowanych jako komórki wskaźnikowe.
 - Przeciwciała przeciw antygenom rozpuszczalnym, immunizując zwierzęta antygenem i stosując jako komórki wskaźnikowe erytrocyty opłaszczone tym antygenem
- Zastosowania testu PFC
 - Ocena siły humoralnej odpowiedzi odpornościowej,
 - Badaniu korelacji między ilością komórek PFC a mianem przeciwciał (w surowicy)

DZIAŁANIE TESTU PFC



immunizacja myszy
↓
odpowieź pierwotna
↓
produkcja przeciwciał
↓
opłaszczanie antygeny przez Ig
↓
aktywacja układu dopełniacza
↓
liza antygenów
↓
powstające łySinki

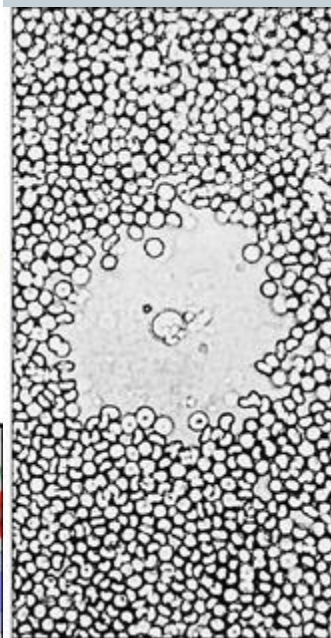
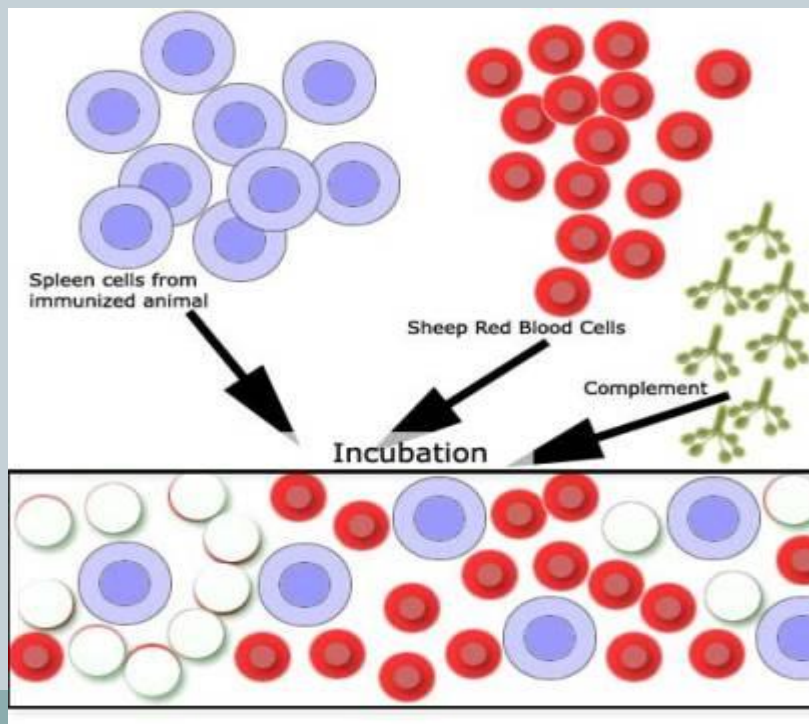
1 łySinka = 1 komórka produkująca Ig



Źródło obrazka- prezentacja z cwiczen

Mechanizm działania testu PFC

- Wskutek immunizowania zwierząt antygenem zapoczątkowuje się odpowiedź pierwotna, która indukuje produkcję przeciwciał. Kontakt z antygenem, powoduje że przeciwciała opłaszczają antygeny i aktywują dopełniacz. Aktywowany dopełniacz wywołuje lizę tych antygenów, oraz powstanie tzw. łysinek.



TEST PFC



- Wyróżniamy dwa rodzaje PFC:
 - bezpośrednią, która wykrywa komórki produkujące IgM,
 - pośrednią, wykrywająca komórki produkujące przeciwciała IgG

Wykrywanie komórek produkujących przeciwciała (PFC)



CZĘŚĆ PRAKTYCZNA

Grupa kontrolna

Myszy nastrzyknięte NaCl, by zachować takie same warunki w eksperymencie (czynnik stresu)

Grupa doświadczalna

Myszy immunizowane 4% SRBC (zawieszonymi w NaCl (erytrocyty owcy)

4 dni



Po 4 dniach wyizolować śledziona z myszy, zhomogenizować je i oddzielić z zawiesiny komórki od resztek tkanek. Potem obliczamy gęstość i żywotność komórek. Żeby przygotować zawiesiny o gęstości 10^6 na ml.

Mieszanina reakcyjna



- ★ 0,5ml zawiesiny komórek ze śledziona
- ★ 0,3ml MEM
- ★ 0,1ml 20% SRBC w MEM
- ★ 0,1ml wyadsorbowanego dopełniacza ze świnki morskiej
(dopełniacz dodajemy bezpośrednio przed wypełnieniem komór)

Przygotowujemy dwie mieszaniny, jedną z komórkami ze śledziona z myszy kontrolnej a drugą z immunizowanej.

Napełniamy komory notując objętości zużytej mieszaniny, będą nam potrzebne do dalszych obliczeń, i zaklejamy parafiną wolne brzegi.

🕒 Prowadzimy inkubację przez godzinę, w wilgotnej komorze, w 37°C

Spodziewane wyniki



U myszy immunizowanej będzie większy odsetek komórek produkujących przeciwciała niż u myszy kontrolnej



Liczba komórek PFC



$$\text{PFC}/10^6 = (\text{Lsr} * 10^6) / (\text{gęstość} * \text{żywołność} * \text{Vsr})$$

$\text{PFC}/10^6$ – liczba komórek produkujących przeciwciała na 10^6 śledzionowych komórek limfatycznych

Lsr – średnia liczba łysinek produkowana w komorach

Vsr – średnia objętość mieszaniny wlanej do komór

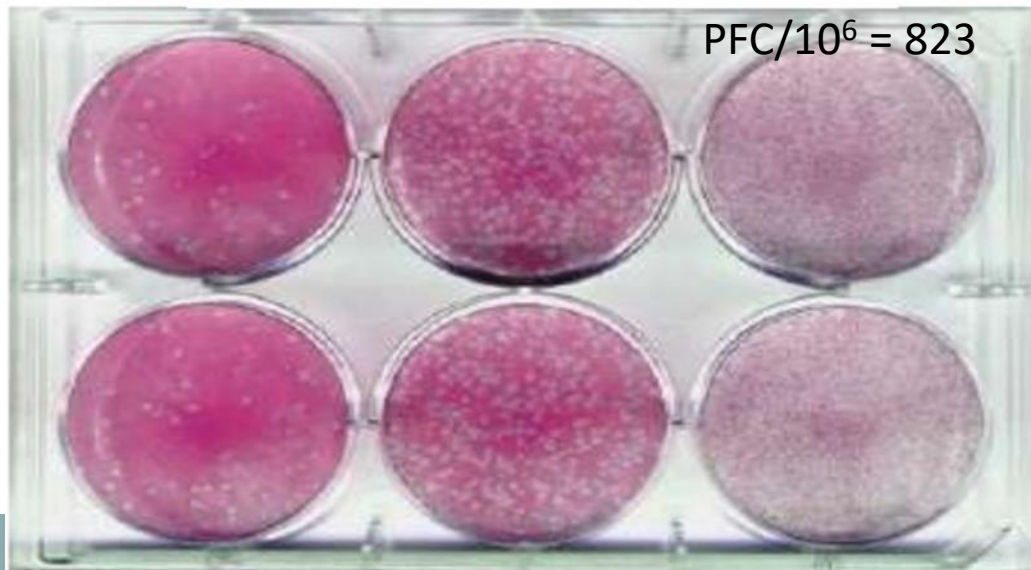
gęstość – gęstość komórek w mieszaninie reakcyjnej

żywołność – żywołność komórek w zawiesinie

Przykładowe wyniki



Grupa kontrolna	Grupa doświadczana
Lśr=5	Lśr=80
V=0,1	V=0,13
Żywotność=0,83	Żywotność=1

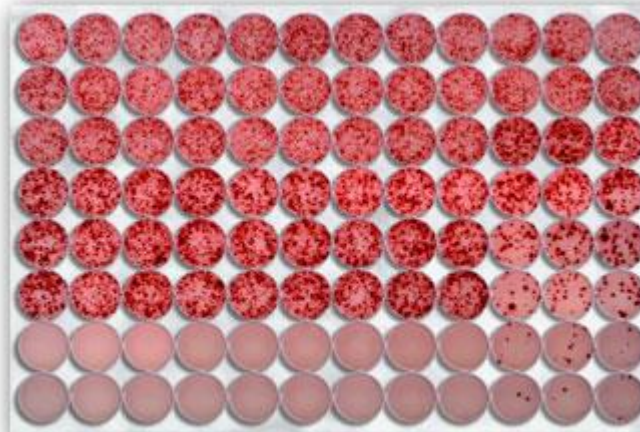


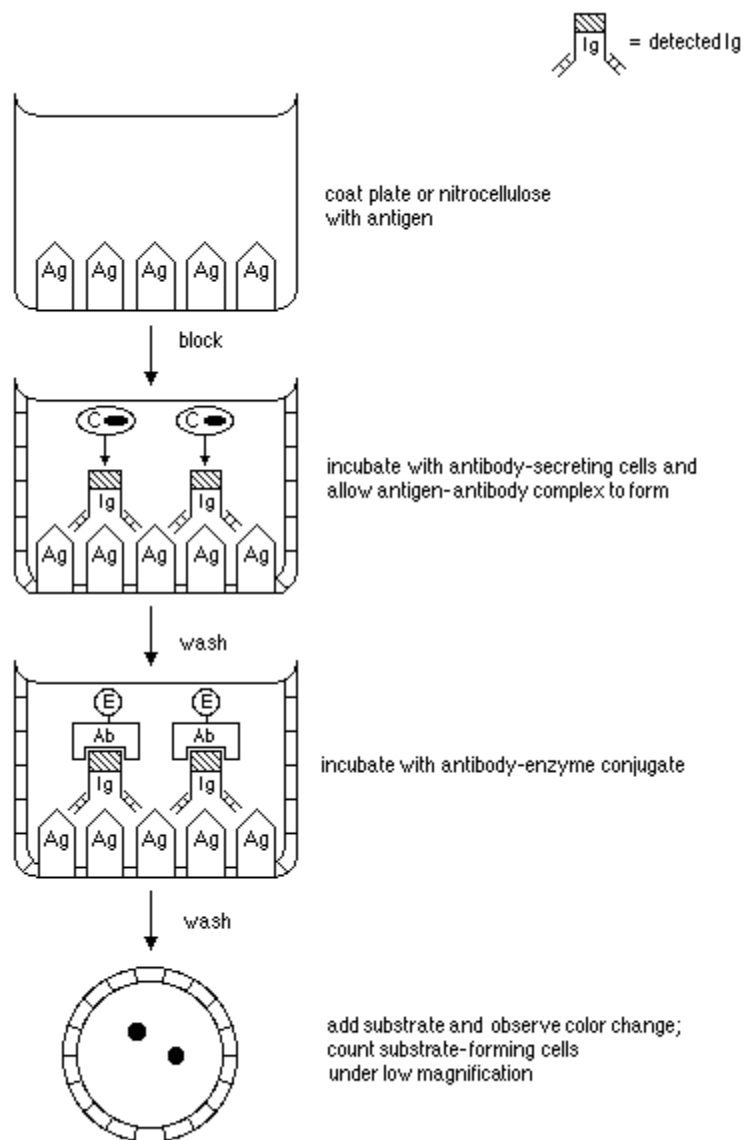
Inne metody wykrywania PFC



ELISPOT

Technika ta ma celu wykrycie i zliczenie indywidualnych, antygenowo specyficznych limfocytów B wytwarzających immunoglobuliny lub limfocytów lub limfocytów uwalniających specyficzne cytokiny. W praktyce technika ta może być wykorzystana do wykrycia każdej frakcji komórek wytwarzających jakiś specyficzny produkt.





Metodę można podzielić na dwa etapy:

1. Aktywujemy interesującą nas frakcję komórek w trakcie hodowli antygenem
2. Przenosimy aktywowane komórki na płytkę opłaszczoną antygenem i poddaje dalszej inkubacji.

Wytwarzane przez limfocyty przeciwciała zostają związane na płytce w miejscu w którym zostały wyprodukowane.

Potem na płytkę dodaje się przeciwciało drugorzędowe sprzężone z enzymem

Na końcu dodaje się substratu, który rozłożony przez enzym tworzy barwny produkt.

Każda plamka odpowiada jednej komórce

źródła



http://www.medicine.mcgill.ca/physio/vlab/other_exps/Immunology/PFC.htm
<http://www.meyerinst.com/html/biosciences/iplab/elispot/default.htm>
<http://www.currentprotocols.com/protocol/im0714>