

# **Granulozytenfunktionstest und ELISpot**

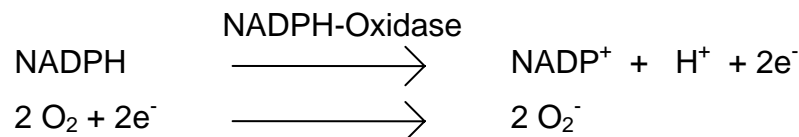
**PD Dr. med. Monika Lindemann**

## Granulozytenfunktionstest (NBT-Test)

### Bedeutung und Prinzip

Zur Abwehr mikrobieller Infektionen sind sowohl ein intaktes „Erkennungssystem“, also Lymphozyten und Antigen-präsentierende Zellen notwendig, als auch Effektorzellen, deren Funktion darin besteht Keime zu eliminieren. Die klassischen Phagozytose-fähigen Granulozyten und Monozyten/Makrophagen sind in erster Linie die Effektorzellen, die Mikroorganismen aufnehmen und durch intra- und extrazelluläre Mechanismen abtöten können. Die Aufnahme/Phagozytose aktiviert diese Effektorzellen, so dass intrazellulär eine Reihe von Substanzen freigesetzt bzw. neu synthetisiert werden, so z. B. Wasserstoffsuperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), Chlorid-Radikalen und Superoxidanionen ( $\text{O}_2^-$ ). Diese toxischen Substanzen, die intrazellulär in den Phagosomen wirken, werden zusätzlich auch nach außen abgegeben. Dort sind sie unserer Messung zugänglich.

Die Bildung von  $\text{O}_2^-$  erfolgt durch Aktivierung einer membranständigen NADPH-Oxidase, die NADPH oxidiert und Sauerstoff reduziert:



Mittels Nitroblau-Tetrazolium (NBT), einem zunächst hellgelben löslichen Farbstoff, können  $\text{O}_2^-$ -Ionen sichtbar gemacht werden. Bei Anwesenheit von  $\text{O}_2^-$ -Ionen entsteht aus dem löslichen NBT durch Reduktion ein rot-violetter unlöslicher Komplex.

Bei dem im Praktikum durchgeführten NBT-Test wird die Fähigkeit der Granulozyten geprüft, *Candida albicans* zu phagozytieren und in der Folge  $\text{O}_2^-$ -Ionen zu bilden. Die Radikalbildung lässt sich durch die rot-violette Färbung der Hefepilze mikroskopisch nachweisen.

Das häufigste klinische Symptom bei eingeschränkter Granulozytenfunktion ist die Hautinfektion mit opportunistischen Mikroben. Eine seltene aber ausgeprägte Form dieser Immundefizienz ist die sog. septische Granulomatose. Typisch sind hier neben Hautinfektionen (z. B. mit *Staphylokokkus epidermidis* und *Aspergillus*) der Befall von Lunge, Knochenmark und Lymphknoten.

Bei der septischen Granulomatose, einem angeborenen Defekt des oxidativen Metabolismus der Granulozyten, ist eine Bildung von toxischen Sauerstoffmetaboliten nicht möglich. Daraus resultiert eine Störung der intrazellulären Keimabtötung. Klinisch zeigen sich schwere rezidivierende Infektionen v. a. mit *Staphylokokken*, *Enterobacteriaceae* und Pilzen, z. B. als Lymphadenitis, Pneumonie, Leberabszess und Osteomyelitis.

## Versuchsdurchführung

1. Adhärenzobjektträger unter fließendem Wasser (Wasserhahn) spülen, bis die grüne Schutzschicht abgewaschen ist. Mit Hanks-Puffer nachspülen. Flüssigkeit auf dem Objektträger durch mehrmaliges Klopfen auf Papierunterlage entfernen.

1	2	3	4	5	6
1	2	3	4	5	6

Gruppe 1

Gruppe 2

2. In die Felder 1-6 je 25 µl der Granulozyten-Suspension (G) auftragen. Die Zellen 3 min sedimentieren lassen und danach den Überstand vorsichtig mit der Pipette absaugen. Eine zweite Gruppe von StudentInnen belegt entsprechend die untere Felderreihe.
3. Auftragen von je 25 µl NBT-Lösung (N) auf Felder 1+2, je 25 µl Candida-NBT-Lösung (CN) auf Felder 3+4 und je 25 µl Serum-Candida-NBT-Lösung (SCN) auf Felder 5+6.
4. 15 min in einem Brutschrank bei 37°C inkubieren.
5. Anschließend den Objektträger vorsichtig mit Methanol abspülen.
6. 30 min in 2% Methylengrün-Lösung inkubieren.
7. Objektträger mit Wasser kurz spülen, vorsichtig Flüssigkeit auf dem Objektträger durch mehrmaliges Klopfen auf Papierunterlage entfernen und 5 min trocknen lassen.
8. Granulozyten unter Verwendung des 100er Objektivs und Öl mikroskopisch beurteilen. Es sind die Granulozyten (grüne Kernfärbung) zunächst in den Feldern 1+2 zu identifizieren (hier soll nicht gezählt werden). In den Feldern 3 oder 4 sowie 5 oder 6 (jeweils Doppelansätze) sollen pro Feld 50 Granulozyten mikroskopiert werden. Dabei soll der Anteil von Granulozyten, die Candida phagozytiert bzw. O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Ionen gebildet haben (rot-violette Färbung) protokolliert werden (z. B. 30/50).

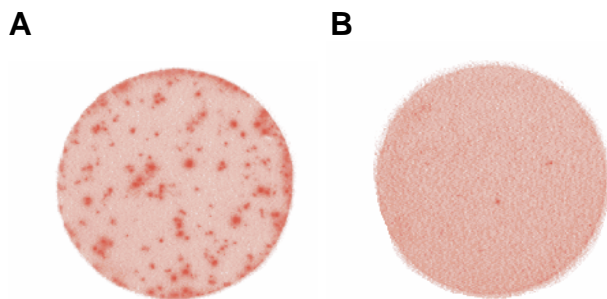
# ELISpot

## Bedeutung und Prinzip

Der ELISpot (Enzyme-linked-immuno-Spot) Test ist ein extrem sensitives Verfahren, um Zellaktivierung auf Einzelzellniveau zu messen. Bei dieser Aktivierung werden u.a. Zytokine, lösliche Polypeptide oder Glykoproteine, die der Zellkommunikation dienen, freigesetzt. Die von Zellen freigesetzten Proteine werden beim ELISpot durch zwei monoklonale Zytokinantikörper (mAb 1 und mAb 2) detektiert, die unterschiedliche Epitope dieses Zytokins erkennen. Der eine der beiden Antikörper ist beim ELISpot an eine feste Phase gebunden, so dass es sich vom Prinzip her um einen Festphasen-ELISA handelt.

Der ELISpot wird diagnostisch eingesetzt, um sehr sensitiv eine Tuberkulose-Immunität zu messen, d.h. eine latente oder aktive Tuberkulose anhand der T-Zell Reaktion zu detektieren. Ferner wird er im Rahmen von Studien eingesetzt, bei denen eine genaue Quantifizierung von zellulären Reaktionen erfasst werden soll, etwa um einen Impferfolg zu messen. Im Falle der Influenza-Impfung könnten z. B. vor und nach Impfung Lymphozyten und Monozyten aus Blutproben von Probanden isoliert und in Zellkulturexperimenten mit Influenza-Proteinen stimuliert werden. Sollten die Influenza-Proteine von den Zellen erkannt werden, so werden Zytokine wie Interferon- $\gamma$  gebildet und können mit Hilfe des ELISpot als kleine Punkte (Spots) detektiert werden.

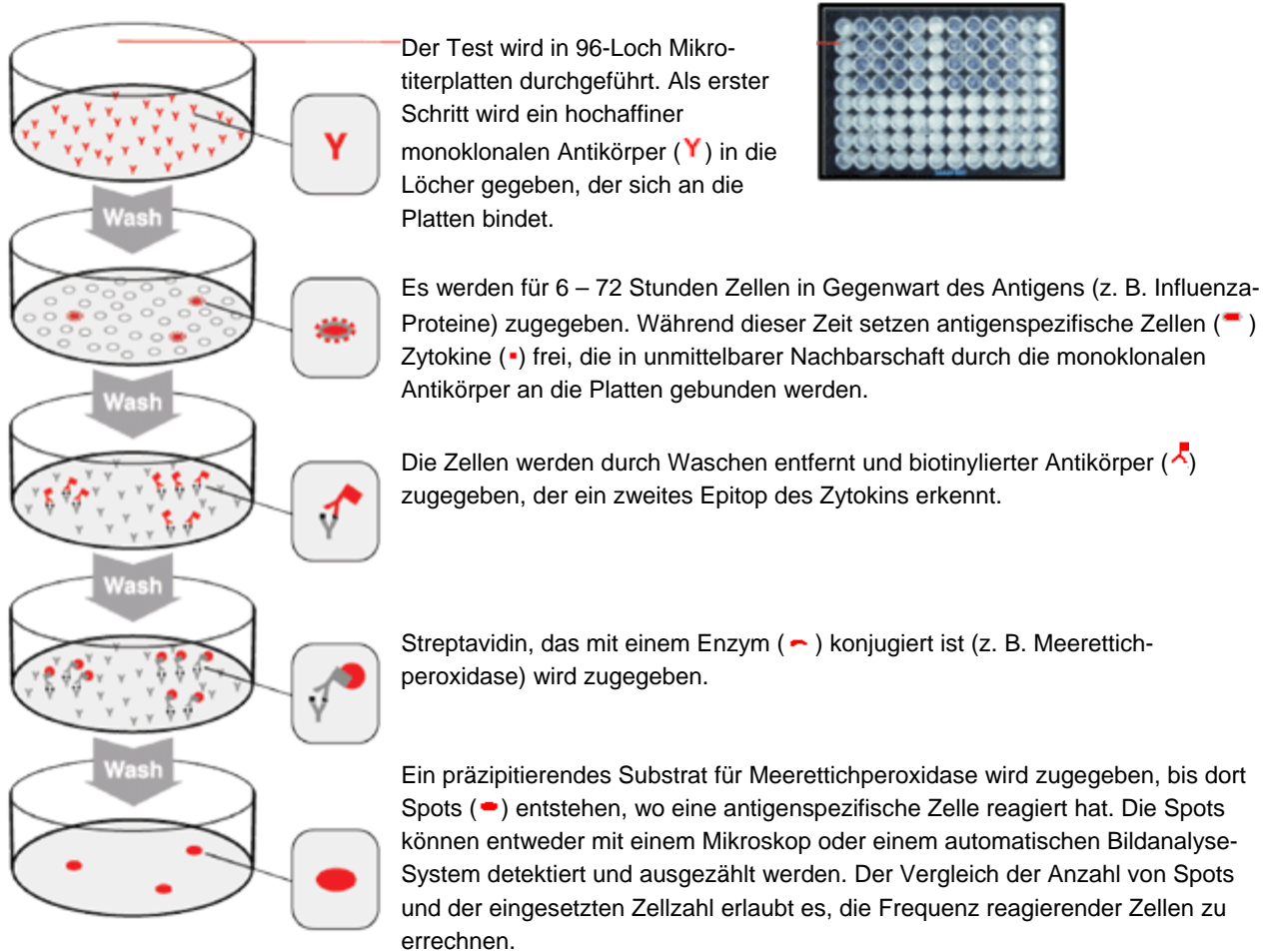
## ELISpot-Beispiel



A. Interferon- $\gamma$  Spots nach Stimulation von Lymphozyten und Monozyten mit Influenza-Proteinen bei einem Probanden, der gegen Influenza geimpft wurde.

B. Kontrollansatz (Kultur von Lymphozyten und Monozyten ohne Zusatz von Influenza-Proteinen).

## Einzelne Schritte des ELISpot Testes



## Zusammenfassung des Prinzips

