



IMMUNOLÓGIAI ÉS  
BIOTECHNOLÓGIAI  
INTÉZET



# 11. gyakorlat: Rövid és hosszú távú sejtkultúrák, funkcionális tesztek

Az immunológia alapjai

PTE-KK, Immunológiai és Biotechnológiai Intézet

Pécs

## Az immunválasz szuppressziója - Összefoglalás

**1. Antigén**, mint fő regulátor: Az antigén dózisa, kémiai szerkezete, bejutási helye befolyásolja/regulálja a kialakuló immunválaszt.

**2. Kostimuláció:** aktivált sejteken megjelenő CTLA-4 nagyobb affinitással kötődik az antigénprezentáló sejteken lévő B7-hez, ezáltal megszűnik a kostimuláció.

### **3. Regulatórikus T sejtek:**

CD3+CD4+CD25+ sejtek, fontos transzkripciós faktoruk a FoxP3.

Fajtái: természetes vagy perifériás

Szuppressziós mechanizmus: Magas CD25 (IL-2R alfa lánc) révén IL-2-t elvonnak a környezetből; CTLA-4 expresszió révén gátolják a kostimulációt; citokintermelés (IL-10 TGFbéta) révén főleg makrofágokat és dendritikus sejteket gátolnak.

### **4. Humorális/B sejtés reguláció:**

Regulatórikus B sejtek

Antigén + IgG egyidejű megkötése a B-sejtek gátlásához vezet (gátló FcγR!)

Anti-idiotípus hálózat

### **Patológiás szuppresszió:**

Tumorok képesek gátolni az immunválaszt (MDSC-k kialakulása, PDL1 expresszió)

## Regionális immunitás - Összefoglalás

Az eddig tanult immunológiai folyamatokon, sejteken, molekulákon túl bizonyos helyeken (régiókban) specializálódott sejtek, molekulák segítik az immunválaszt. Ilyen speciális régiók a nyálkahártya és a bőr.

**MALT:** mukóza-asszociált nyirokszövet (elsősorban gasztrointesztinális traktus, de ide tartozik még pl az urogenitális traktus és a légutak).

**Intesztinális immunrendszer:** tolerálni kell a sok veszélytelen/hasznos idegen antigént (étel, normál mikrobiom), miközben észlelni és eliminálni kell a kórokozókat.

**Nyirokszövetek:** Programozott (Peyer plakk, mezenteriális nyirokcsomó; in utero alakulnak ki) és indukált (kriptoplakk, izolált limfoid folliculus; antigéningertől függően alakulnak

**Veleszületett immunválasz:** Specializálódott epitél sejtek (M sejt, Paneth sejt, kehely sejt), antigén prezentáló sejtek, veleszületett limfoid sejtek

**Adaptív válasz:** elsősorban IgA, mely T-dependens vagy T-independens módon is keletkezhet. Dimerként szekretálódik a bél lumenébe. T sejtek lehetnek citotoxikusak (főleg intraepiteliális) vagy helper (inkább lamina propria, Peyer plakk).

**Bélbe történő limfocita homing:**  $\alpha 4\beta 7$  (fehérvérsejt) – MAdCAM-1 (endotél sejt)

## Regionális immunitás - Összefoglalás

**SALT:** bőr-asszociált nyirokszövet. A béllel szemben itt nincs organizált nyirokszövet, csak diffúz sejtek.

**Veleszületett immunválasz:** Keratinociták, antigén prezentáló sejtek (Langerhans sejtek)

**Adaptív válasz:** Hasonlóan a bélhez, a T sejtek lehetnek citotoxikusak (főleg intraepidermálisan) vagy helper (inkább dermálisan).

**Bőrbe történő limfocita homing:** CLA (fehérvérsejt) – E-selectin (endotél sejt)

# Orvosi kutatások főbb lépcsőfokai



In vitro  
kísérlet



In vivo  
állatkísérlet



Humán vizsgálat

Könnyen **standardizálható**  
és reprodukálható



Nehéz belőle következtetni  
az élőlényekben  
végbemenő folyamatokról

Élő szervezetben  
**modellezhető** kórállapotok,  
tesztelhetők gyógyszerek, stb.



A nyert eredmények **nem**  
**feleltethetők meg** az  
emberi vizsgálatokkal

Orvosi szempontból a  
**leginkább releváns**



**Körülményes** (pl. nehéz  
mintát szerezni, etikai  
megfontolások, stb.)

# Sejt/szövet tenyésztés bevezető<sup>[1.]</sup>

- Miért van rá szükség?
  - Kísérleti **állatok kímélése**, ha lehetséges.
  - Precízen **kontrollálható** kísérleti körülmények. (pl. sejtszám, médium, hőmérséklet, vizsgált anyag koncentrációja, inkubációs idők, stb.)

- Osztályozás:

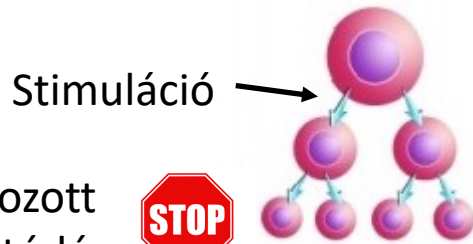


Sejtkultúra

vs.



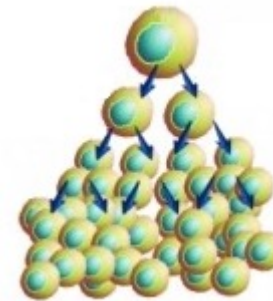
Szövet vagy szervkultúra



Korlátozott  
sejtosztódás

**Rövid távú** sejtkultúra (pl.  
normál sejtek biopsziából)

vs.



Korlátlan  
sejtosztódás

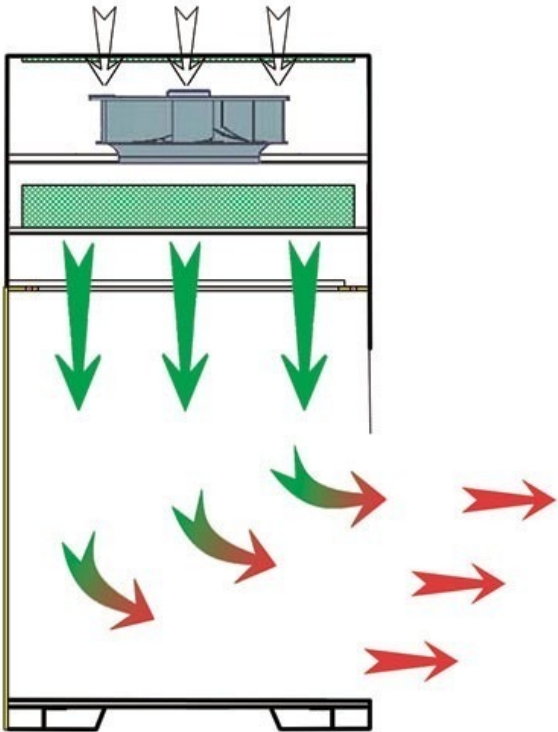
**Hosszú távú** sejtkultúra (pl.  
daganatos sejtvonal)

# Sejtenyésztés

- A **teljes sterilitás** alapfeltétel! → Fertőzött sejt kultúra esetén kontrollálhatatlan a kísérlet.
  - Munka a sejtenyésztő fülke alatt
  - Steril eszközök használata (pl. pipettahegy, petri csésze, stb.)
  - Sejtenyésztő médiumok antibiotikus védelme
- A sejtek **sejtenyésztő médiumokban** tarthatók, melyek tartalmazzák a számukra szükséges **tápanyagokat** (szénhidrátok, aminosavak, nukleinsavak, vitaminok, hormonok, növekedési faktorok, stb.) és **optimális pH-val** rendelkeznek.
- A sejtek rövid távon **inkubátorokban** tárolhatók, ahol állandó a:
  - Hőmérséklet ( $\approx 37\text{ °C}$ )
  - Páratartalom ( $\approx 90\%$ )
  - $\text{CO}_2$  tartalom ( $\approx 5\text{-}6\%$ )
- Hosszú távú (évek, évtizedek) tárolás **folyékony nitrogénben** lehetséges. Klinikai felhasználás:
  - Ivarsejtek fagyasztása infertilitást okozó kemoterápiás kezelések előtt<sup>[2.]</sup>
  - Köldökzsínórvér fagyasztása (hemopoetikus őssejtekben gazdag, nem rutinszerű, jelenleg ellentmondásos módszer<sup>[3, 4.]</sup>)

# Sejttenyésztő steril fülke

Lamináris áramlású fülkéknél a sterilitást a fülkén belül a **steril levegő áramlása** biztosítja.



A sémás ábrán látható fülke esetén a kintről beszívott levegő egy **HEPA szűrőn** (High Efficiency Particulate Air) halad át. A szűrt, steril levegő fentről lefelé áramlik, majd a fülke munkarésénél a fülkét használó személy irányába kifelé távozik. A pontos felépítés és elrendezés azonban gyártóként változik.



# Gyakran használt médiumok



RPMI

(Roswell Park Memorial Institute)

Elsősorban **lymphoid sejtek** és **hybridómák** tenyésztésére használják.



DMEM

(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)

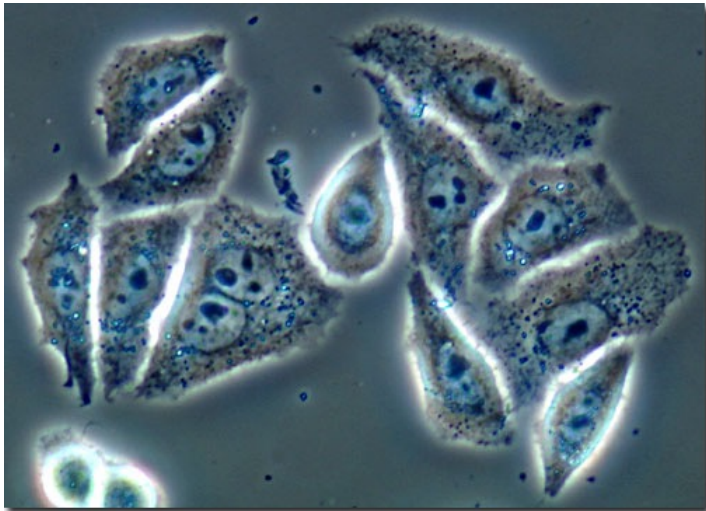
Általánosabban használt médium, **sokféle sejtípushoz** (fibroblast, izomsejt, gliasejt, neuron, stb.) használják.

Általában fenolvörös **indikátort** tartalmaznak → Elhasznált, savas médiumnál sárgára vált, alkalikus pH-n pedig lilás színű.

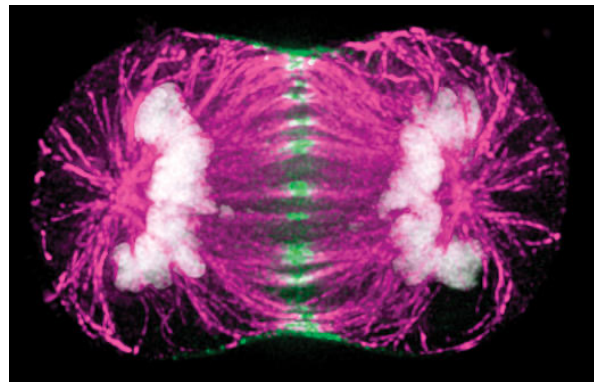
# Sejtvonalak 1.

## 1. HeLa sejtvonal

- Az **első** daganatos sejtvonal 1951-ből.<sup>[5.]</sup>
- Eredete: A 31 éves **Henrietta Lacks** méhnyakrákjából (cervix adenocarcinoma) izolálták, aki még abban az évben elhunyt.
- A sejtvonalat a tudta nélkül hozták létre, ez később etikai kérdéseket vetett fel, mikor a HeLa sejtek teljes genomját publikálták 2013-ban.<sup>[6.]</sup>
- Mai napig az **egyik legelterjedtebb sejtvonal**, kiterjedten használják kutatásra.



HeLa sejtek



Osztódó HeLa sejt



Henrietta Lacks  
(1920-1951)

# Sejtvonalak 2.

## 2. Jurkat sejtek

- Tumoros T-sejtvonal, egy 14 éves acut lymphoblastos leukémiában (ALL) szenvedő beteg (JM) perifériás véréből izolálták a 70-es években.<sup>[7.]</sup>
- T-sejt jelátvitel, a T-sejtes leukémia és a HIV fertőzés kutatására használják.

## 3. Raji sejtek

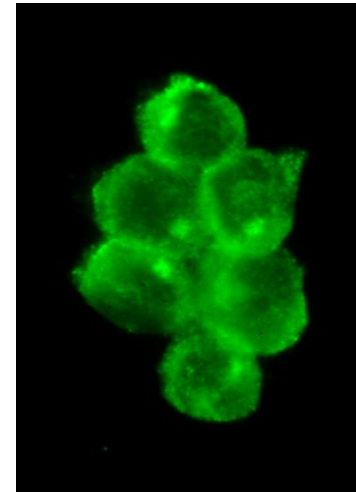
- Tumoros B-sejtvonal, egy 11 éves Burkitt-lymphomás betegből izolálták Nigériában 1963-ban.<sup>[8.]</sup>
- EBV pozitív, a vírus integrálódott a genomba.<sup>[9.]</sup>
- Transzfekciós kísérletek gyakori sejtvonala.

## 4. HepG2 sejtek

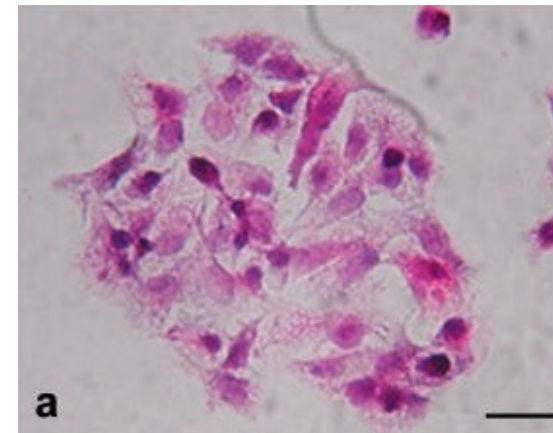
- Egy 15 éves beteg májrákjából (hepatocellularis carcinoma) származik.<sup>[10.]</sup>

## 5. Sp2 sejtek

- Nem-szekretoros egér myeloma sejtvonal, hybridóma fúzióhoz használják.<sup>[11.]</sup> → lásd 3. gyakorlat



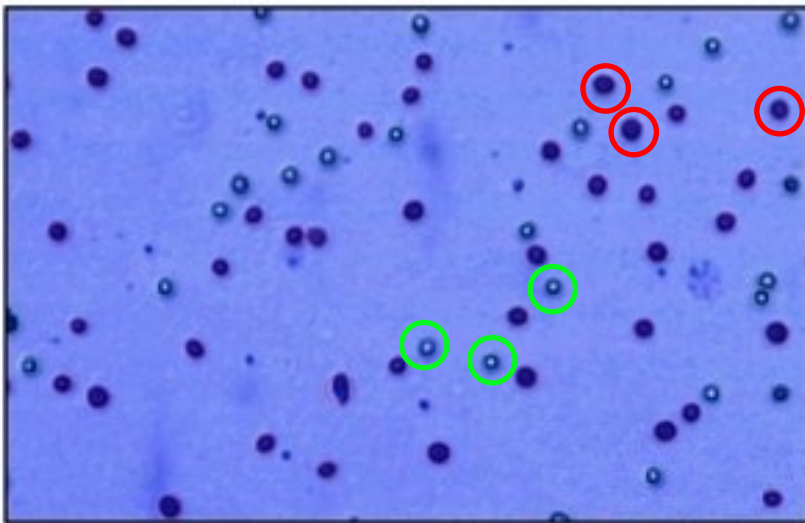
Összetapadt Jurkat sejtek



HepG2 sejtek

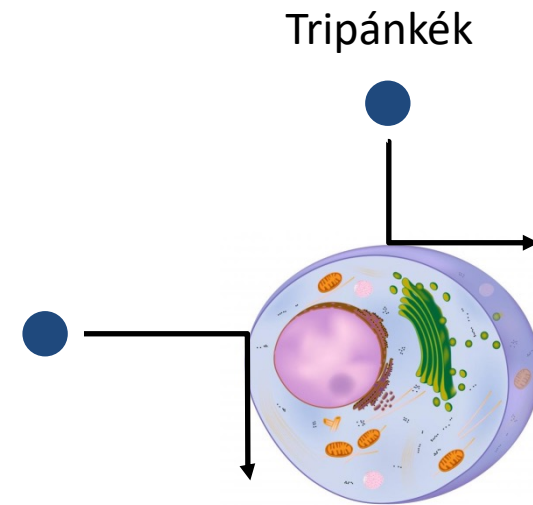
# Sejt életképesség meghatározása

- A sejtek életképességét **festékkizárásos tesztekkel** szokták meghatározni, pl.:
  - **Tripánkék**
  - 7-amino-aktinomicin D
  - Propidium-jodid
- Lényeg: Az életképes sejtek aktív mechanizmusokkal igyekeznek kizárni ezeket a xenobiotikumokat. (pl. efflux)



Élő sejtek

Elpusztult sejtek



Tripánkék

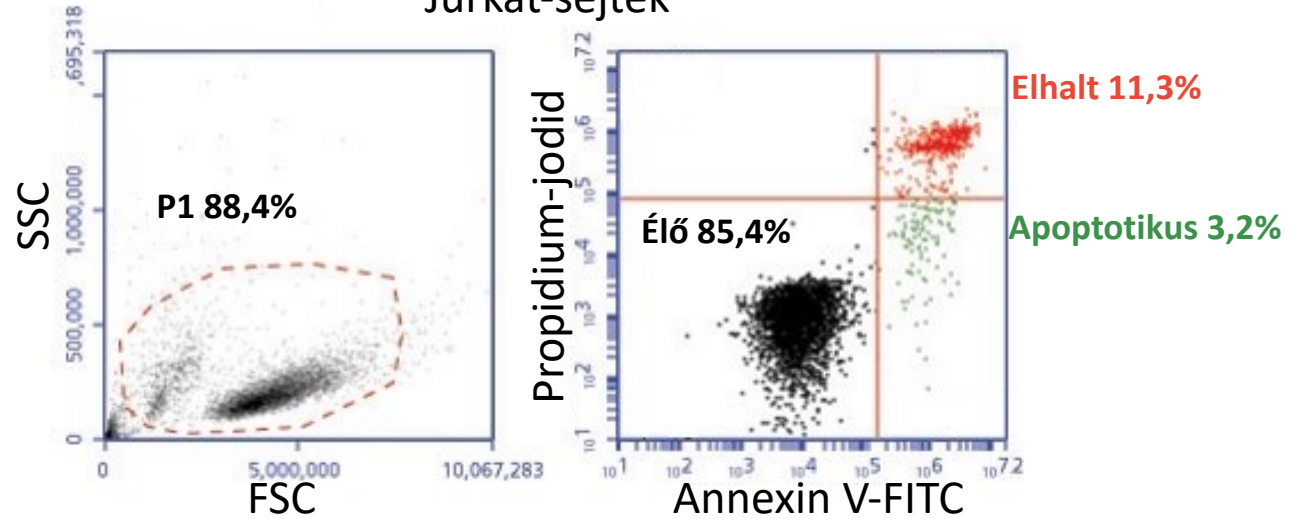
Élő sejt

# Példa sejt életképesség vizsgálatára

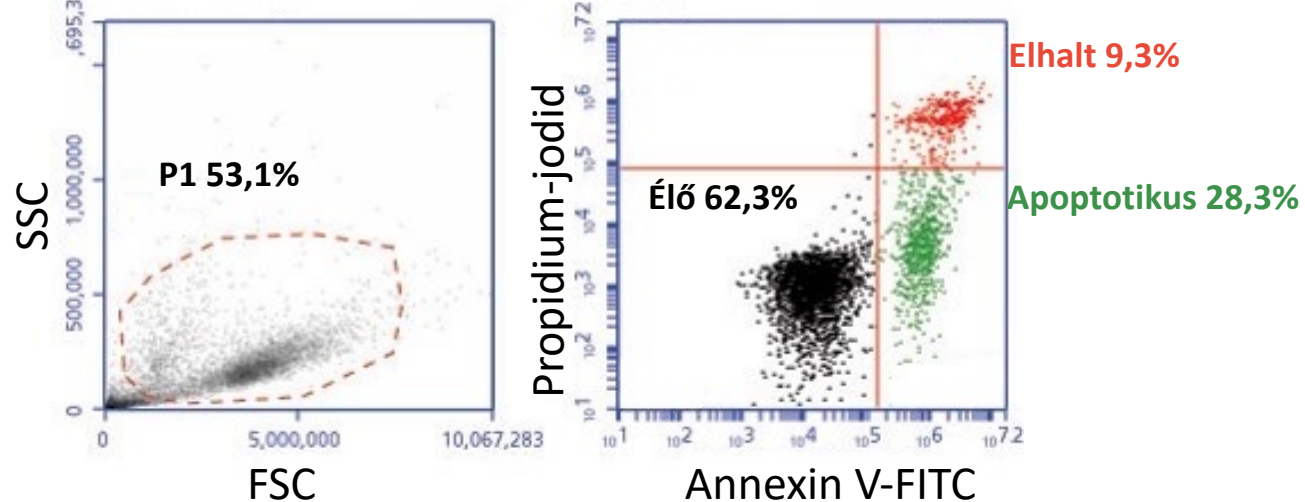
**Propidium-jodid:** DNS-t kötő fluoreszcens molekula, mely azonban az élő sejtek membránján nem jut át.

**Annexin V:** Az apoptotikus sejtek membránjában előforduló foszfatidil-szerinhez kötődik.

Jurkat-sejtek



Jurkat-sejtek + camptothecin (kemoterápia)

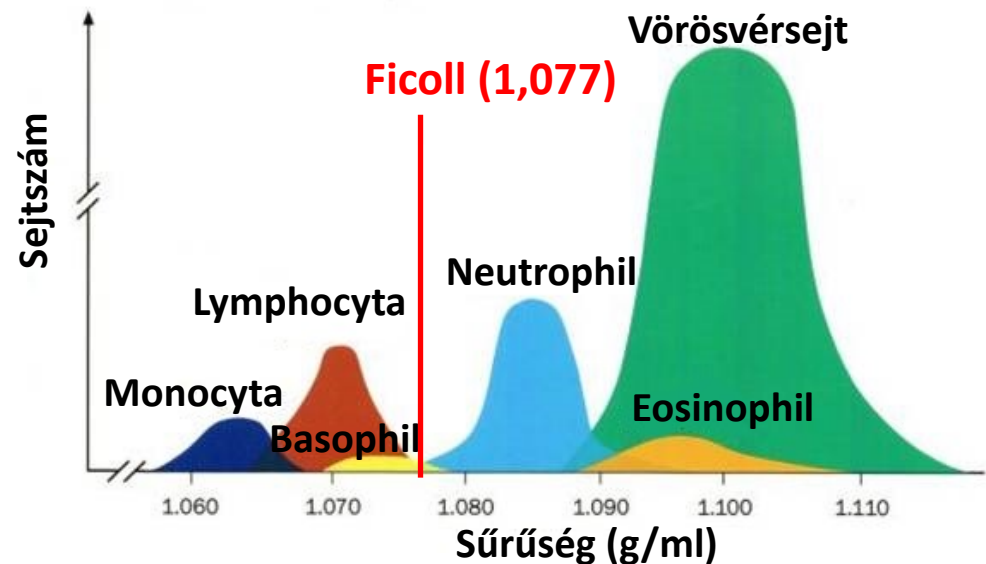


# Phagocyták funkcionális tesztjei

- **Izoláció:** Normálisan a sejtek kitapadnak az üveg vagy műanyag felületekhez.
- **Migráció:** Spontán vagy chemotaxissal irányított sejt migráció vizsgálata in vitro vagy in vivo. (pl. skin window teszt)
- **Phagocytosis** vizsgálata:
  - Nem-opszonizált
  - Opszonizált (pl. Fc receptoron vagy complement receptoron keresztül)
- **Oxidatív burst és phagocytá enzimek** vizsgálata:
  - Nitro-kék-tetrazólium (NBT) teszt, myeloperoxidáz (MPO) teszt, alkalikus foszfatáz teszt, lizozim teszt, stb.
- **Citokin termelés** vizsgálata:
  - ELISA, ELISPOT
  - CBA (Cytometric Bead Array): Multiplex áramlási citometriás mérés mikrogöngyök segítségével

# Mononukleáris sejtek izolálása

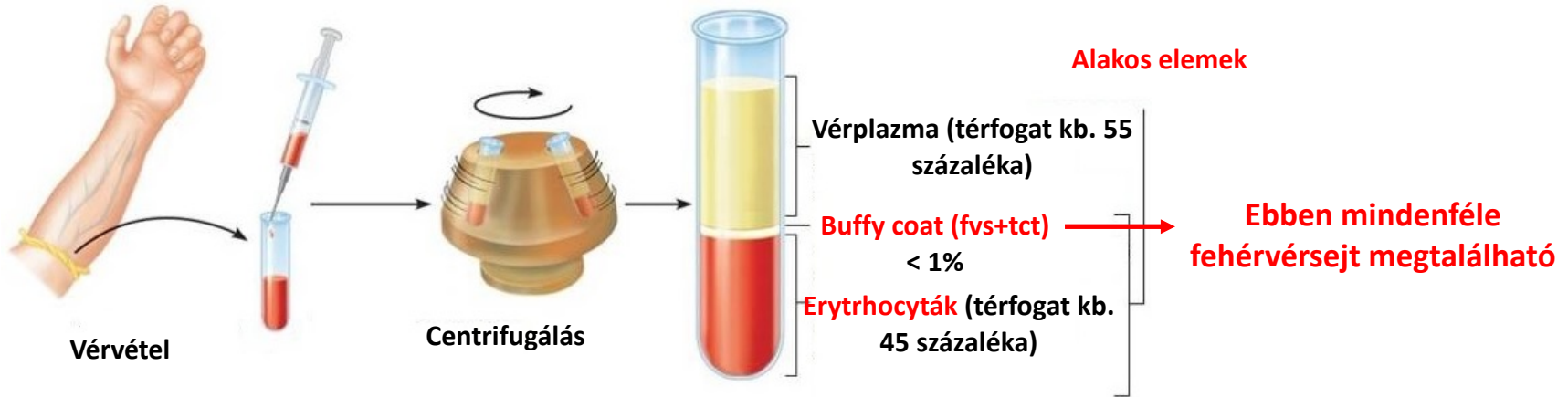
- **Fizikai paramétereken alapuló módszerek:**<sup>[19.]</sup>
  - Filtráció (vérszámok mérete alapján)
  - Grádiens centrifugálás (pl. **Ficoll-grádiens centrifugálás**, a vér alakos elemeinek sűrűsége alapján)



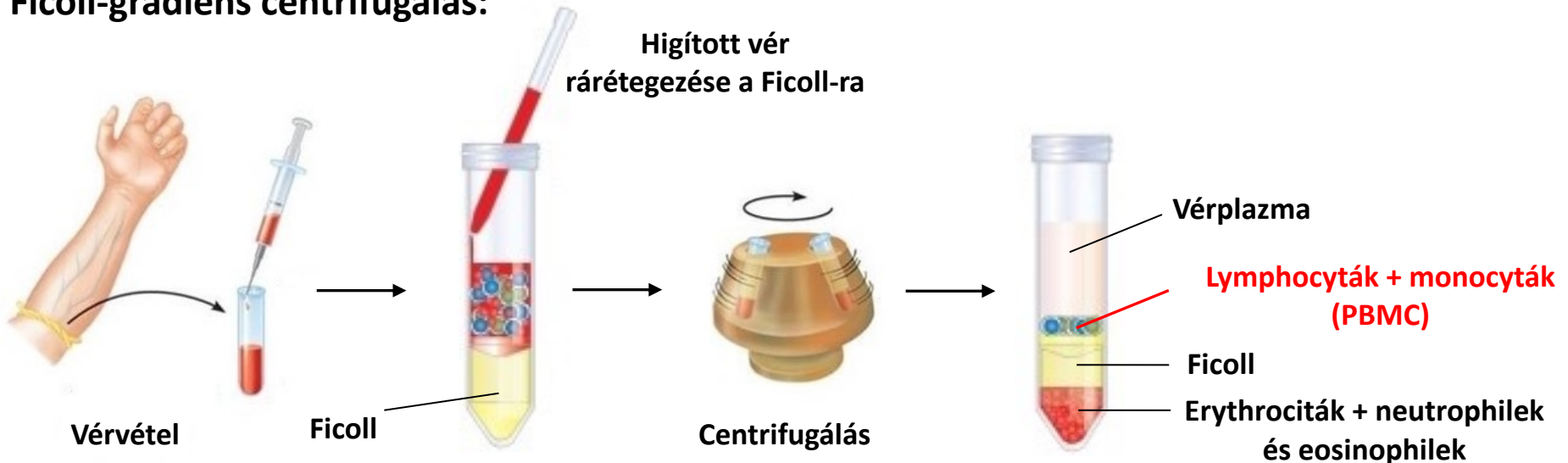
- **Adhéziós tulajdonságokon alapuló eljárások:**
  - Nylon vatta: monocyták és a B-sejtek kitapadnak
  - Műanyag/üvegfelület: monocyták kitapadnak, lymphocyták eltávolíthatók

# Ficoll-grádiens centrifugálás 1.

Közönséges centrifugálás:

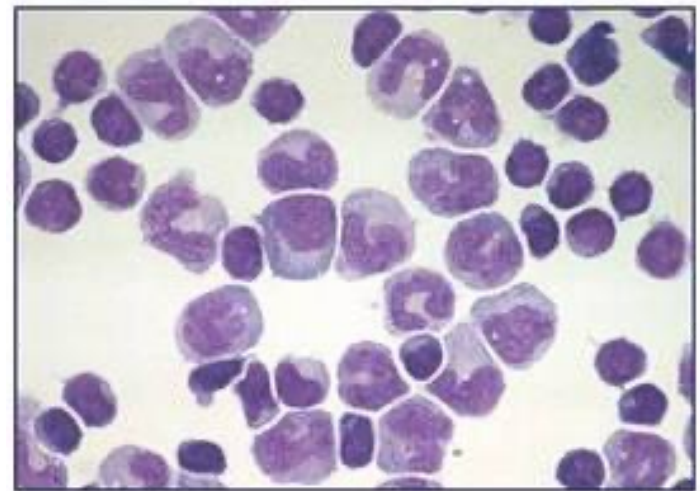
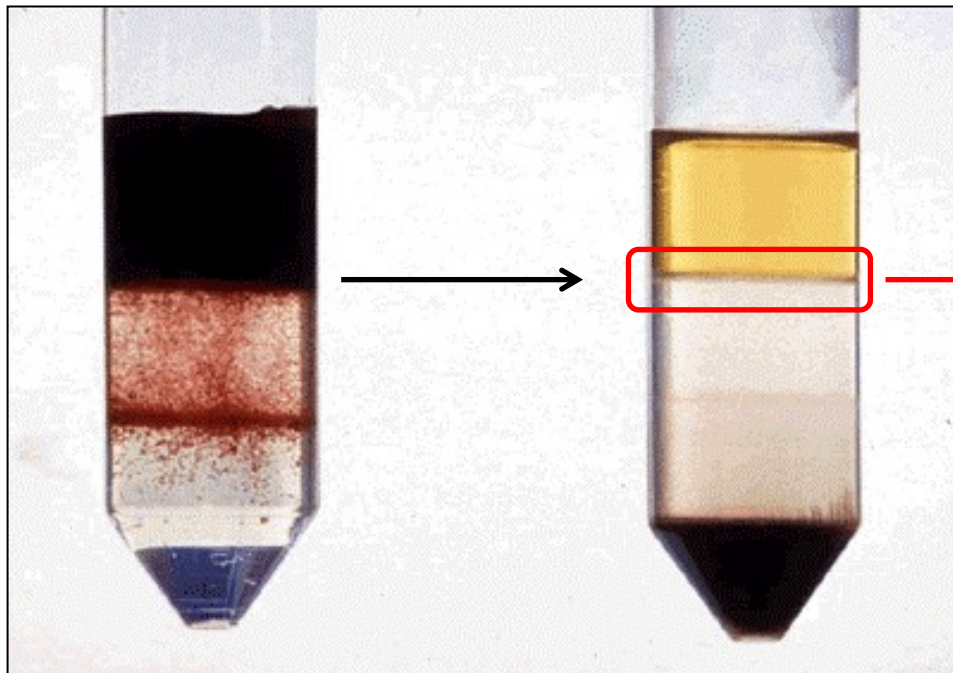


Ficoll-grádiens centrifugálás:





# Ficoll-grádiens centrifugálás 2.



Perifériás vér mononukleáris sejtjei (**PBMC**, Peripheral blood mononuclear cells = nem-szegmentált magvú fehérvérsejtek): **Lymphocyták, monocyták** (és kis arányban basophil granulocyták)<sup>[20.]</sup>

# Skin window teszt<sup>[12.]</sup>



1. Az alkar voláris felszínén **eltávolítják a bőr felső rétegét.** (cél: látszódjanak a kapillárisok, de még ne vérezzen)



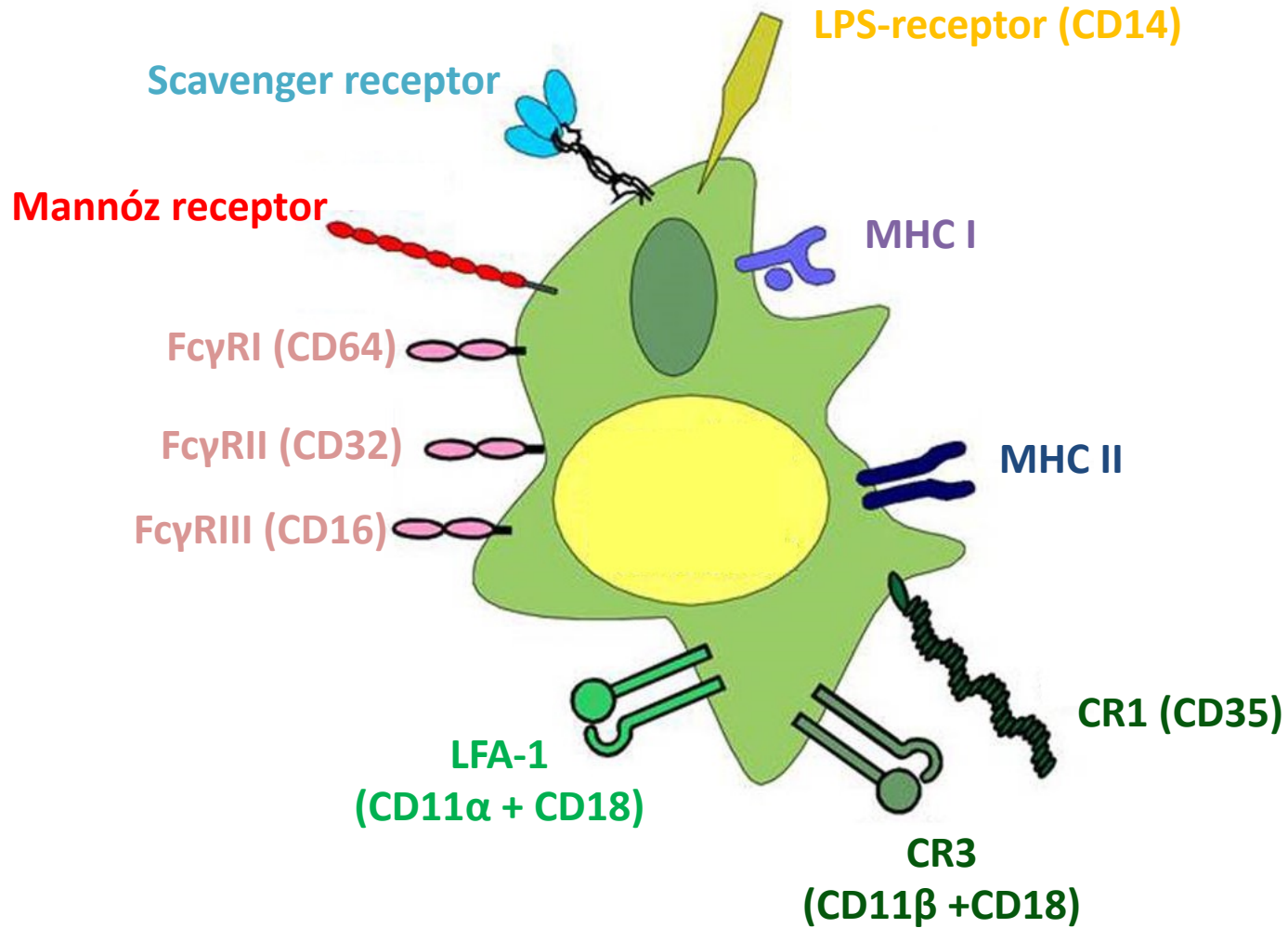
Skin window az alkaron

2. A képződött **sebre filter papírt tesznek**, a papír a vizsgálattól függően különböző anyagokat, **chemokineket** (pl. IL-8) tartalmazhat.
  3. A sérülés helyén a **sejtek kilépnek az érpályából** és a filter papírba vándorolnak.
  4. A papírt bizonyos idő elteltével eltávolítják, a sejteket üveglapra kenik és megvizsgálják a **sejtes összetételt.**
- Értelme: **Sejt migráció in vivo vizsgálata**, pl. egészséges önkéntesek összehasonlítása autoimmun betegekkel, stb.



A beavatkozás nem hagy heget, a seb napokon belül gyógyul.

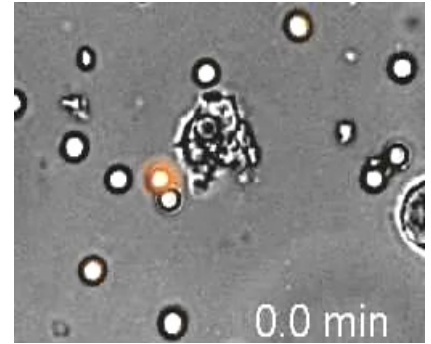
# A macrophagok sejtfelszíni molekulái



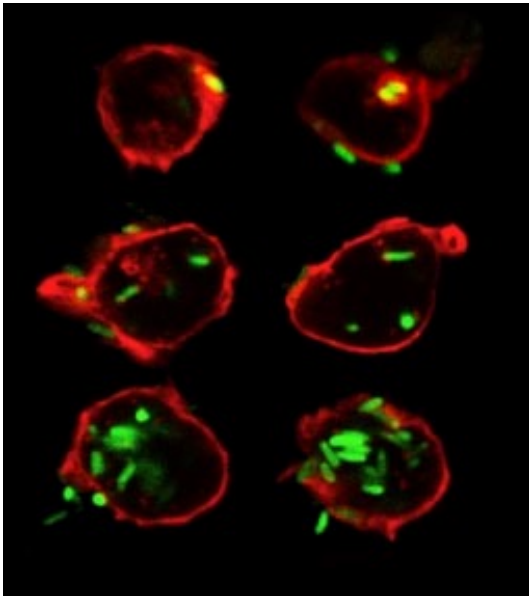
# Phagocytosis teszt

Módszer:

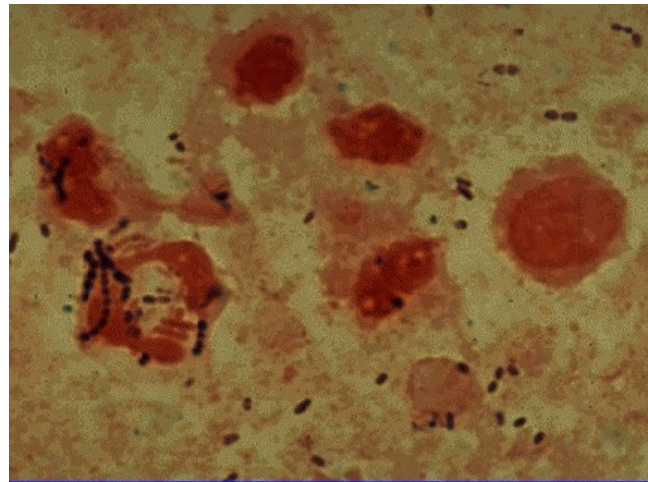
- **Jelölt partikulumokat** (pl. egész baktériumokat) inkubálnak együtt a phagocytáló sejtekkel.
- **Értékelés mikroszkóppal** vagy **áramlási citometriával** (utóbbi → 5. gyakorlat)



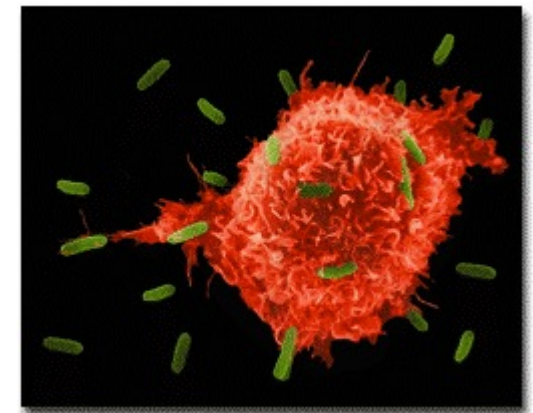
Videó: Egy neutrophil granulocyta phagocytál számos gomba konídiumot (=gomba spóra).



Phagocytosis fluoreszcens mikroszkóppal vizsgálva

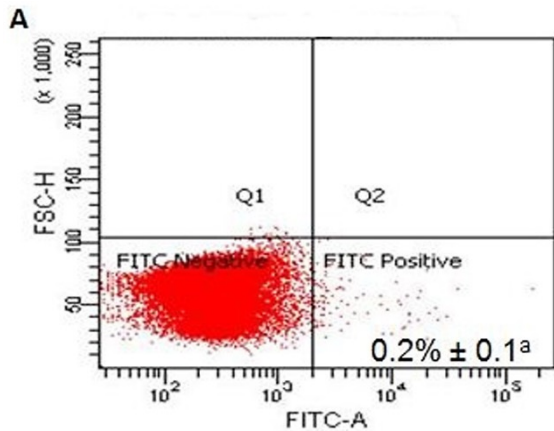


Phagocytosis immunhisztokémiával vizsgálva

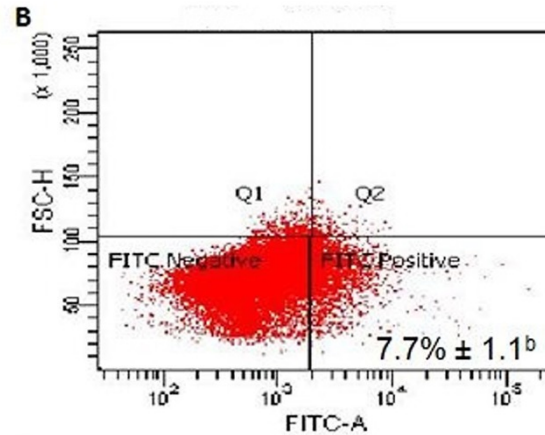


# Példa phagocytosis vizsgálatára

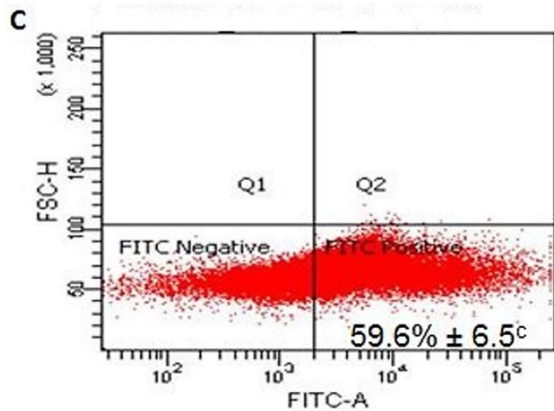
**A:** Kezeletlen macrophagok FITC-el jelölt latex gyöngyök nélkül



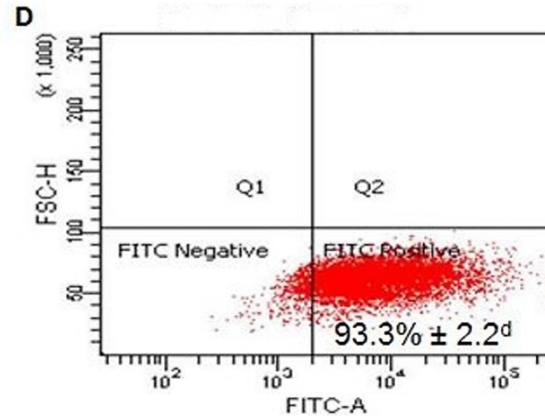
**B:** Kezeletlen macrophagok FITC-el jelölt latex gyöngyökkel inkubálva



A kezelések hatására fokozódik a macrophagok phagocytáló képessége.

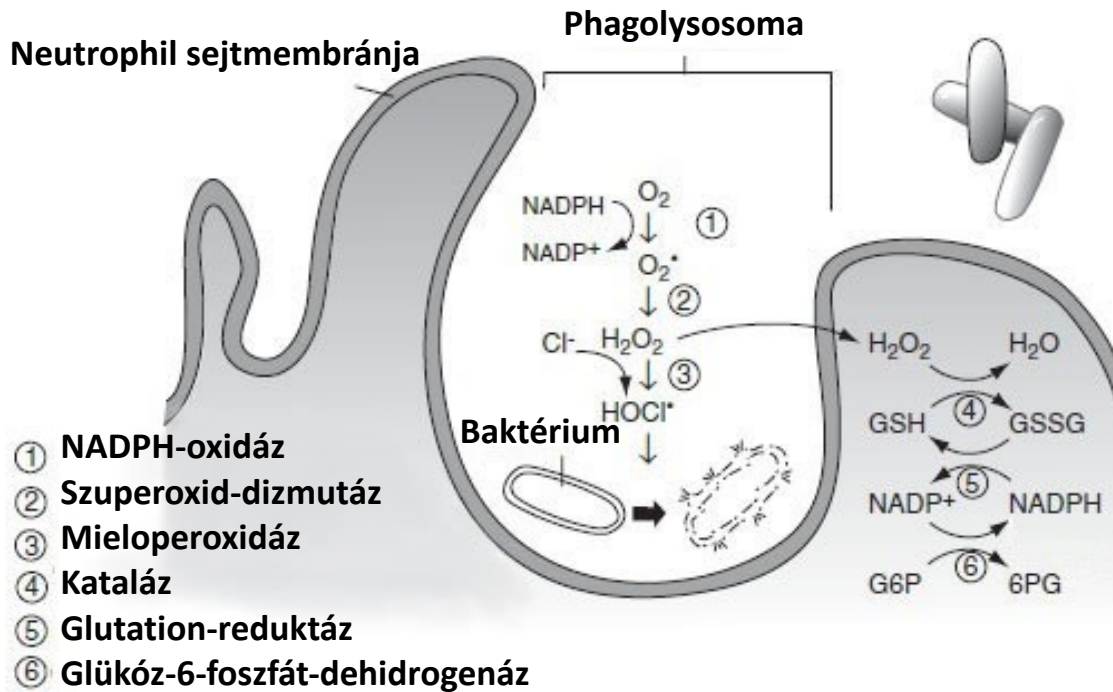


**C:** Növényi poliszachariddal kezelt macrophagok FITC-el jelölt latex gyöngyökkel inkubálva



**D:** LPS-el kezelt macrophagok FITC-el jelölt latex gyöngyökkel inkubálva

# Oxidatív burst



1. Phagocytosis (phagosoma)



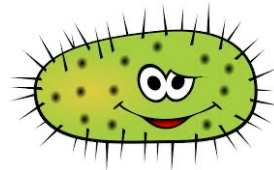
2. Phagosoma + enzimeket és szabadgyököket tartalmazó lysosoma egyesül → **phagolysosoma**



3. Az enzimek és az oxidáló szabadgyökök elpusztítják a kórokozót



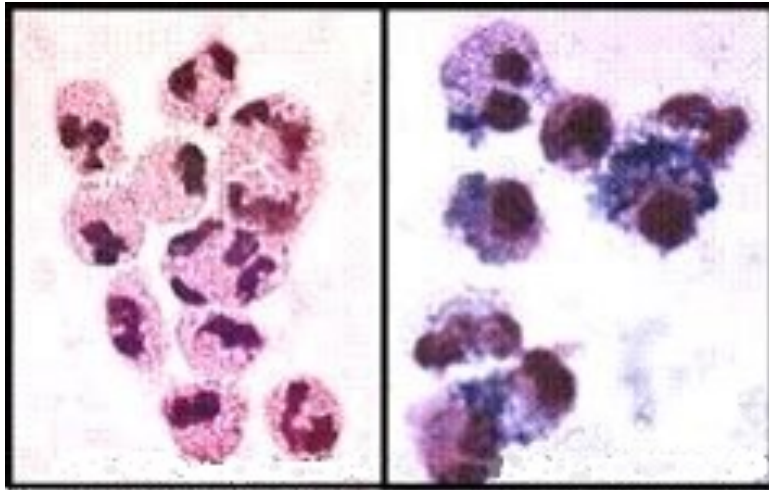
Neutrophil



Kórokozó baktérium

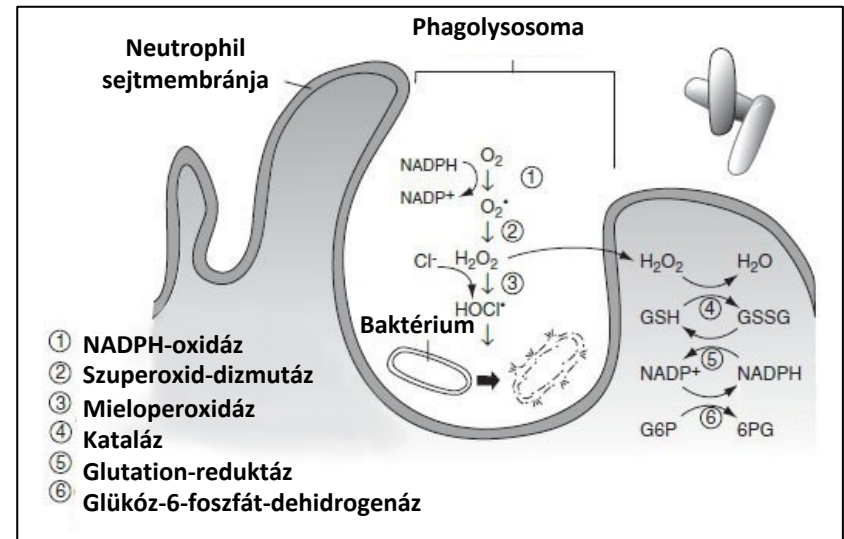


# NBT teszt



CGD-s beteg

Normál kontroll



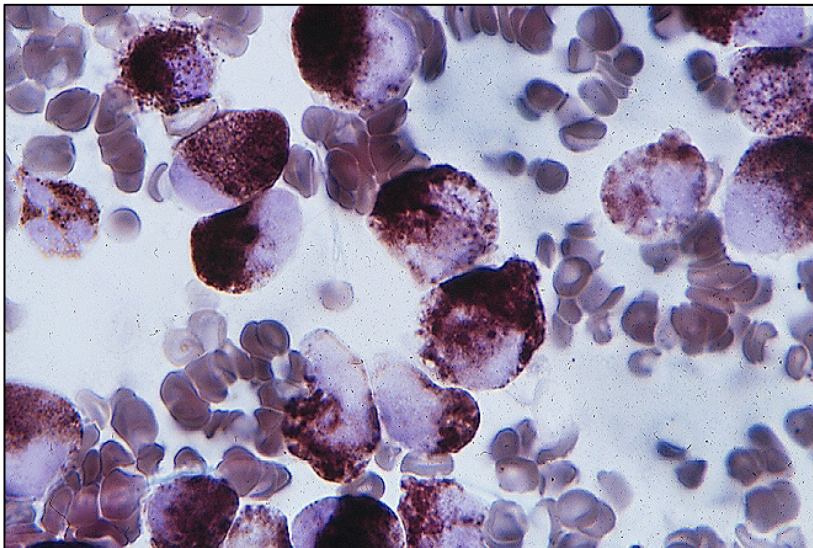
**Lényege:** A reaktív **szabadgyökök** redukálják a festéket, mely **kékes színt** ad.<sup>[13.]</sup>

**Krónikus granulomatózus betegség** (CGD, chronic granulomatous disease)<sup>[14.]</sup>:

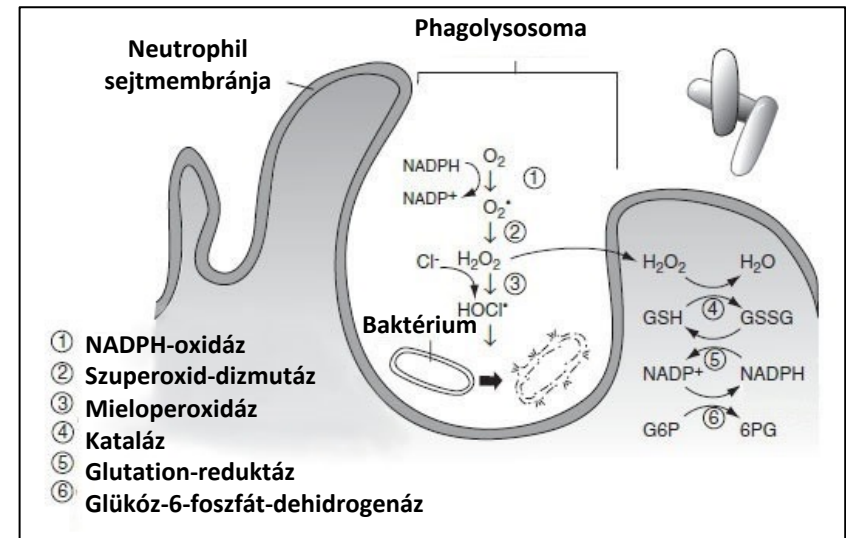
- Veleszületett **genetikai betegség**, leggyakrabban X-hez kötött recesszív.
- A veleszületett immunsejtek képtelenek reaktív oxigén szabadgyököket termelni. → Nem tudják elpusztítani a kórokozókat. → **Primer immunhiány**
- Visszatérő, elsősorban **bakteriális és gombás fertőzések** granulóma képződéssel gyermekkorban.

# Myeloperoxidáz festés

- A myeloperoxidáz (MPO) a myeloid immunsejtek (főleg neutrophil granulocyták) egyik jellegzetes enzime, mely a szabadgyök termelésben játszik szerepet.
- Sejten belüli kimutatása **leukémiás betegségekben** lehet fontos, a sejtek myeloid eredetének igazolására használt marker.<sup>[15, 16.]</sup>



Myeloperoxidáz kimutatása akut promyelocytás leukémiában (AML-M3 vagy APL)

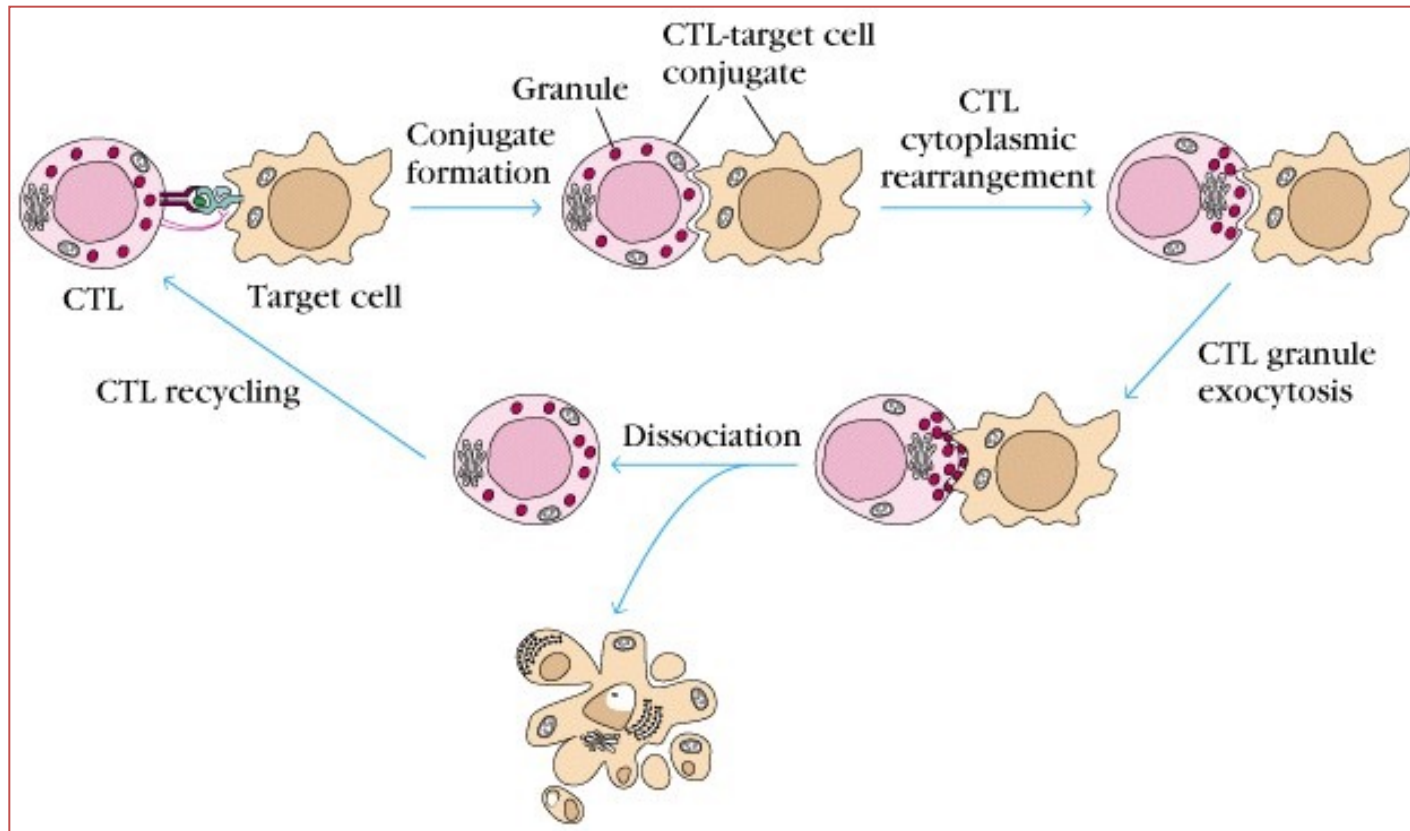




# Lymphocyták funkcionális tesztjei

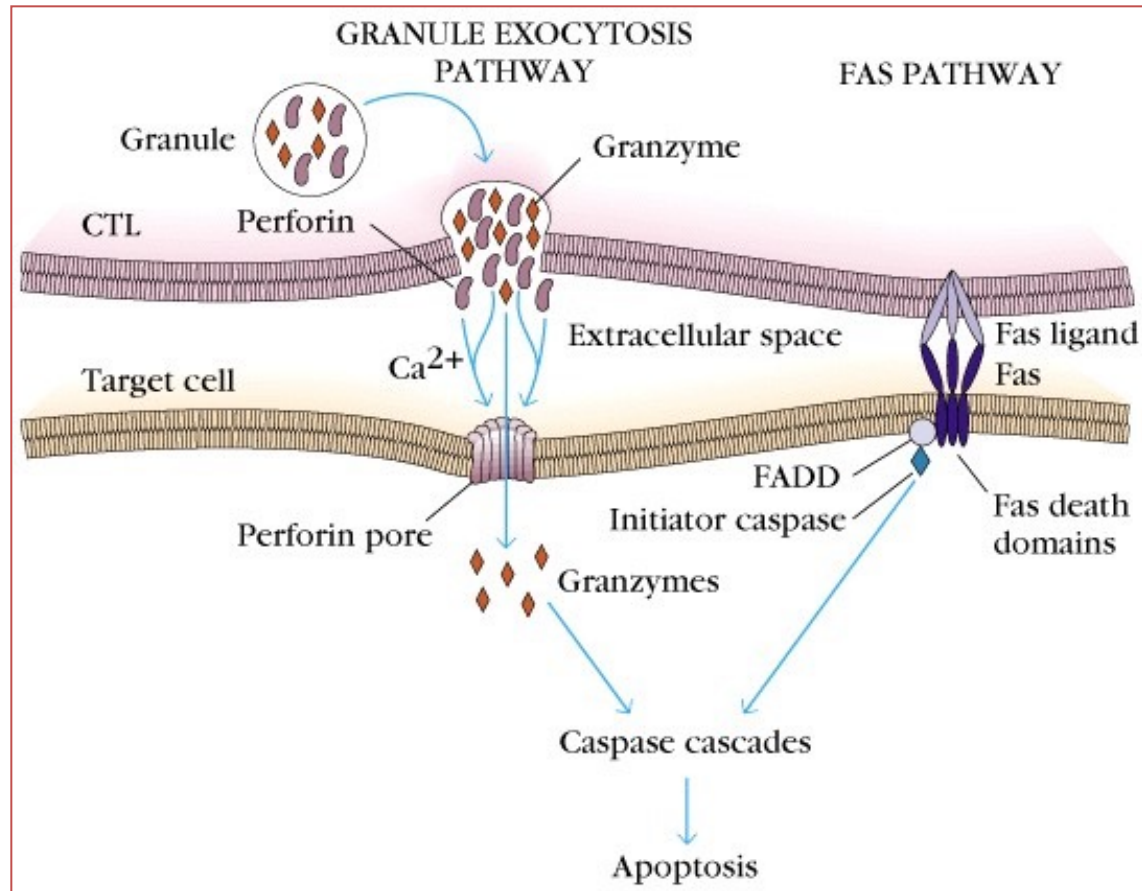
- **Lymphocyták polyclonalis aktivációja:**
  - Növényi lektinekkel, pl. fitohemagglutinin (PHA)
  - Bakteriális sejtfal komponensekkel, pl. lipopoliszacharid (LPS)
- **Cytotoxicitásának vizsgálata (T és NK sejtek):**
  - Cr-51 felszabadulás vizsgálata izotóp-jelölt célsejtek segítségével
  - Elpusztult célsejtek arányának áramlási citometriás meghatározása, pl. Annexin V vagy propidium-jodid festéssel<sup>[17.]</sup>
- **B-sejtek funkcionális tesztjei:**
  - Immunglobulin termelés detektálása (immuncitokémia, ELISA)
  - Immunglobulin génátrendeződés vizsgálata PCR-al
  - Plaque forming cell assay (PFC) → Immunotoxicitás vizsgálatára használják
  - Passzív cutan anaphylaxia teszt
- **Kevert lymphocyta kultúra:**
  - Transzplantációk előtt az inkompatibilitás kizárására
- **Citokin termelés mérése:**
  - ELISA, ELISPOT
  - CBA (Cytometric Bead Array)

# A CTL-mediálta target sejt pusztítás lépései:



1. Antigén felismerés, 2. Konjugáció, 3. CTL citoplazma átrendeződés
4. CTL granulum exocytosis 5. Cél sejt apoptosisa 6. Disszociáció

# A CTL indukálta apoptosis mechanizmusa:



**Szolubilis effektorok: perforin és granzim**

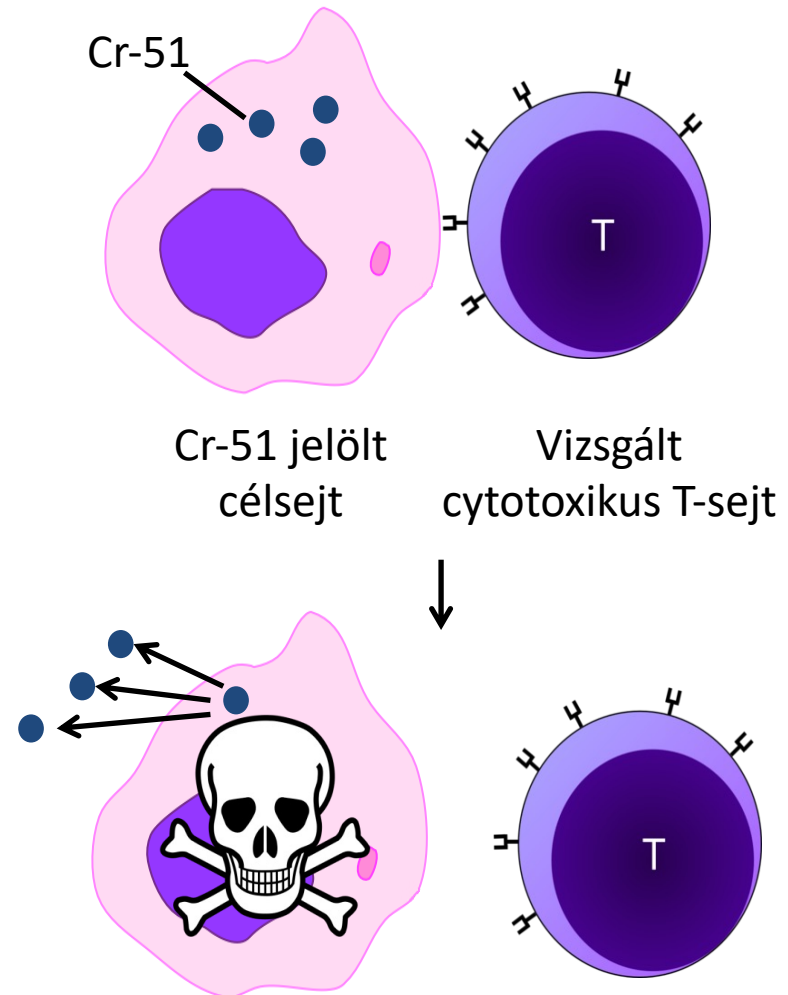
**Membránhoz kötött effektorok: Fas ligand (FAS-L)**

# Króm-51 felszabadulás vizsgálata

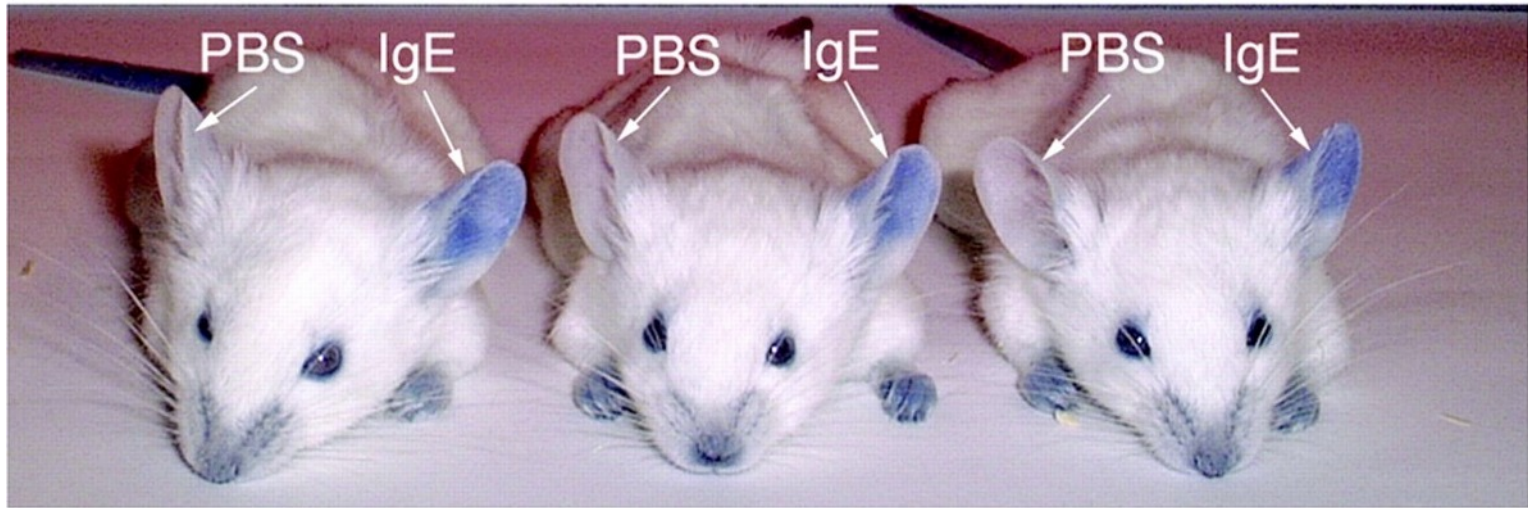
Cytotoxikus sejtek (T, NK) **sejtpusztító képességének**<sup>[18.]</sup> és az **ADCC-nek**<sup>[19.]</sup> (antitest-dependens celluláris cytotoxicitás, lásd előadáson) a vizsgálatára alkalmas in vitro módszer, pl.:

Tumoros betegek cytotoxikus sejtjeinek vizsgálata tumorsejtek ellen.

1. Cr-51 jelölt célsejtekkel együtt inkubált Tc sejtek
2. Célsejt elpusztul, a króm felszabadul
3. Centrifugálás, a Tc-k és a sejtörmelék leülepednek a cső aljára
4. A felülúszó króm tartalmának mérése

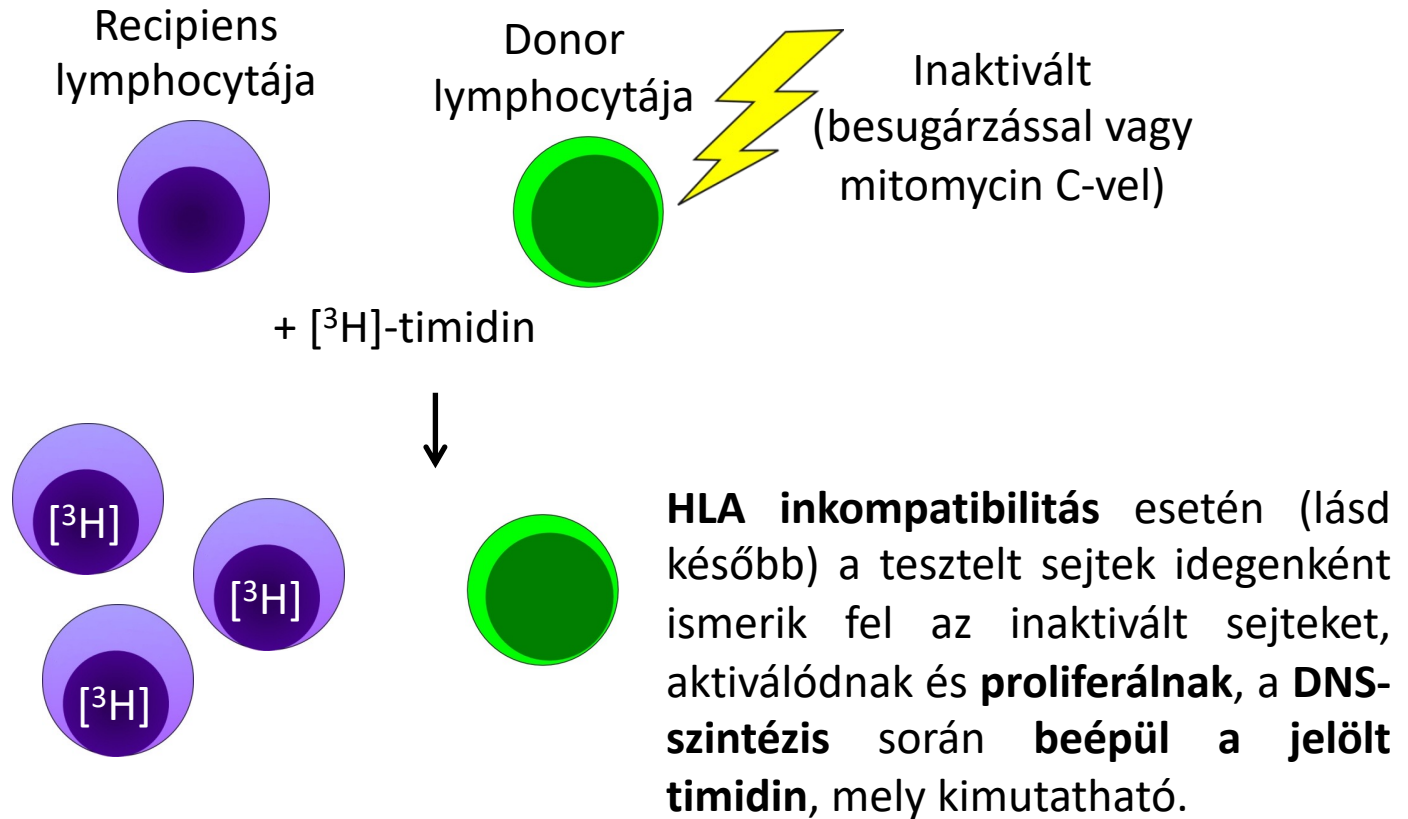


# Passzív cutan anaphylaxia teszt (PCA)



A kísérleti állatba **intradermálisan antitestet** (általában IgE-t) injektálnak (pl. vizsgált alany szérumát). 24-48 órával később **antigén keveréket** adnak be **intravénásan** Evans kék **festékkel** együtt. Antigén-antitest kapcsolódás esetén a reakció helyén **fokozódik az érfal permeabilitása** és felhalmozódik a festék.<sup>[20.]</sup>

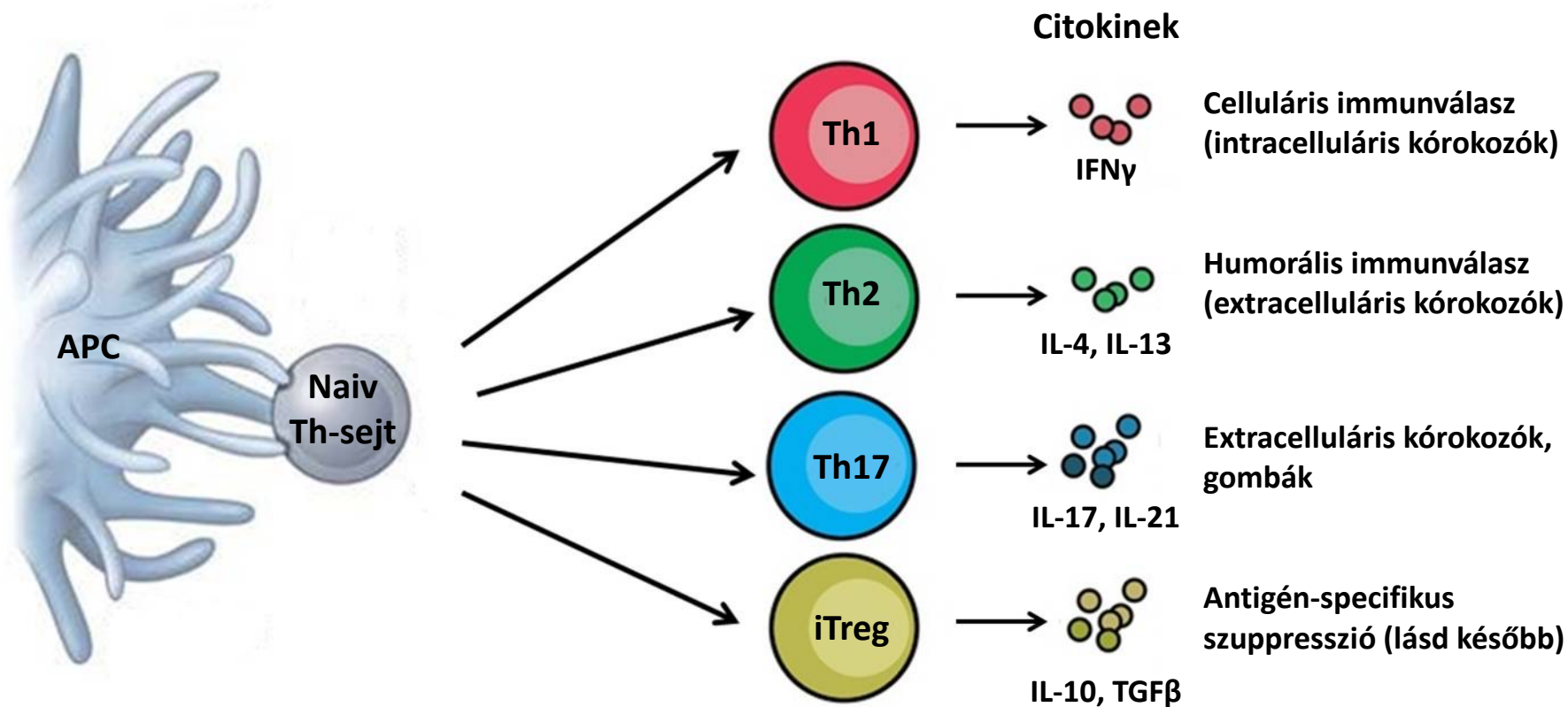
# Kevert lymphocyta kultúra (MLC)



Felhasználás:

**Transzplantációk előtt** a donor és a recipiens immunológiai inkompatibilitásának vizsgálata.<sup>[21, 22.]</sup>

# Th sejtek főbb altípusai

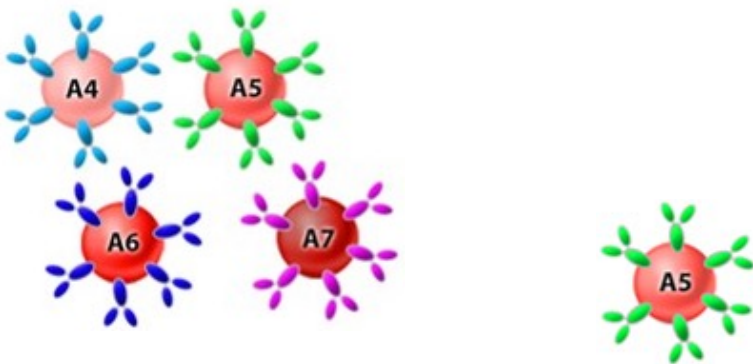


- Th17 sejteknek szerepe lehet különböző **gyulladásos autoimmun kórképekben**. (lásd később)
- **Regulatórikus T-sejtek** (Treg): Az immunválasz negatív szabályozásában (**szuppresszió**) fontosak (lásd később), jellemző immunfenotípusuk: **CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>/Foxp3<sup>+</sup>**

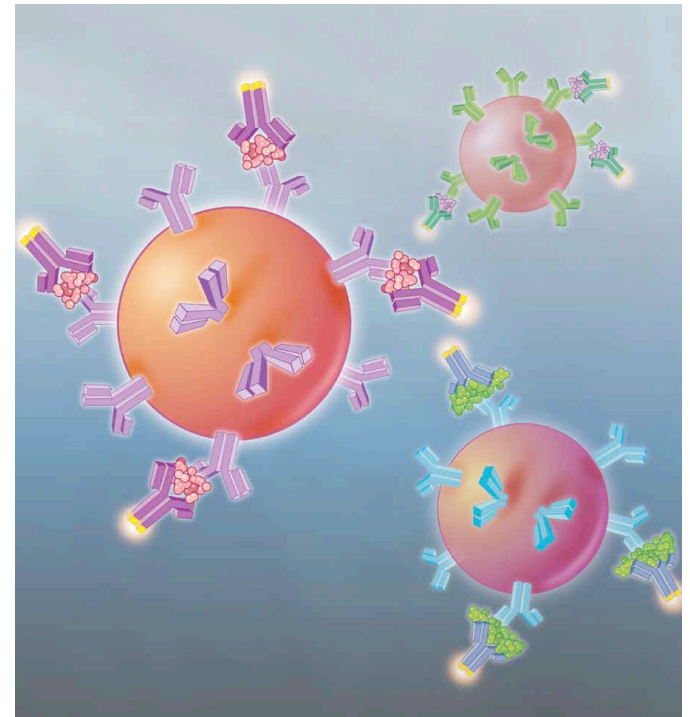
# CBA (Cytometric Bead Array<sup>[23.]</sup>)

- **Áramlási citometriás** módszer → lásd 5. gyakorlat
- Lényege: Különböző, valamilyen paraméter (pl. méret, fluoreszcens festék) alapján megkülönböztethető **mikrogyöngyök** („bead” = gyöngy) felszínére célzottan köthetők ki molekulák (pl. DNS, fehérjék, köztük antitestek is)
- Haszna: **Több molekula vizsgálható egyetlen mintában** („multiplex mérés”), a vizsgálat pedig **kvantitatív!**

Gyöngy keverék:



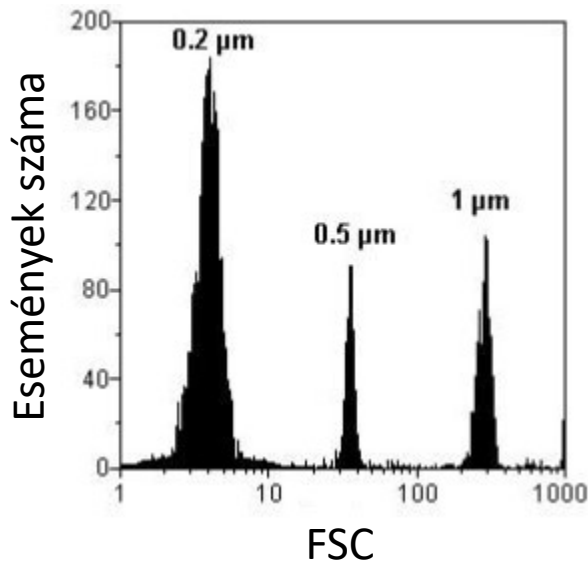
Méret vagy fluoreszcencia alapján kiválasztott gyöngy vizsgálata (kérdés: kötődött-e hozzá antigén?)



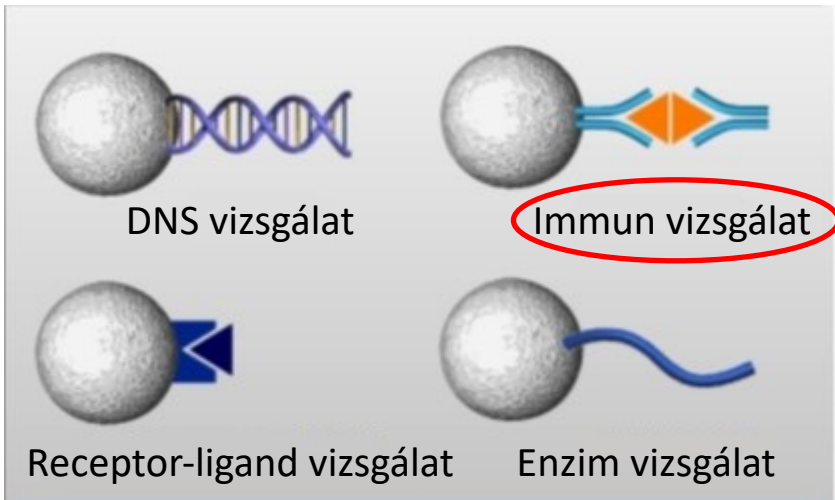
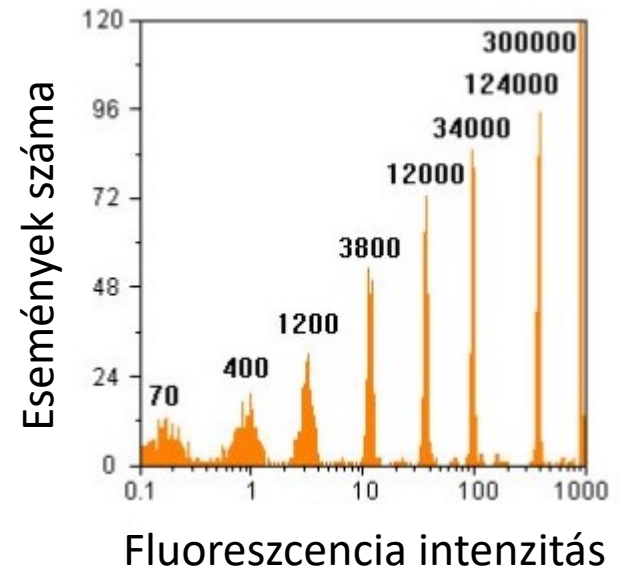


# Gyöngyök jellemzői

Méret szerinti csoportosítás:



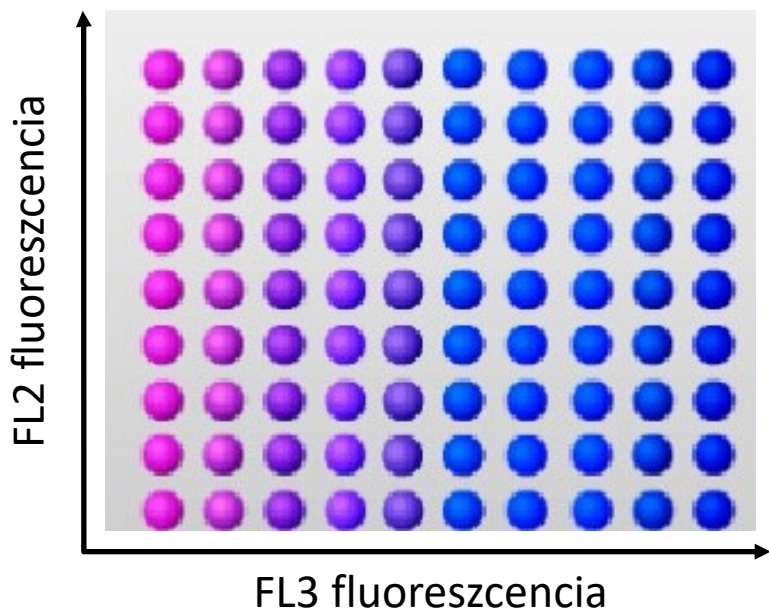
Fluoreszcencia szerinti csoportosítás:



Leggyakrabban különböző citokinek koncentrációinak meghatározására használják. [23, 24]

# Luminex xMAP technológia<sup>[25.]</sup>

Gyöngyök csoportosítása  
fluoreszcens jelölődés alapján



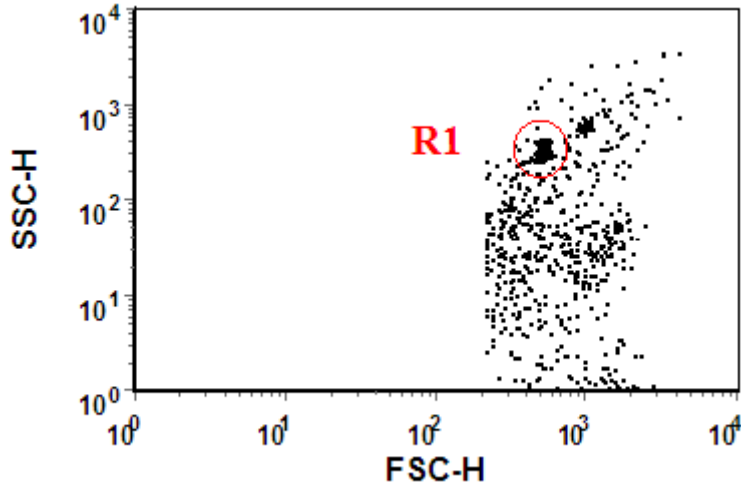
Kiválasztott gyöngyök további  
vizsgálata



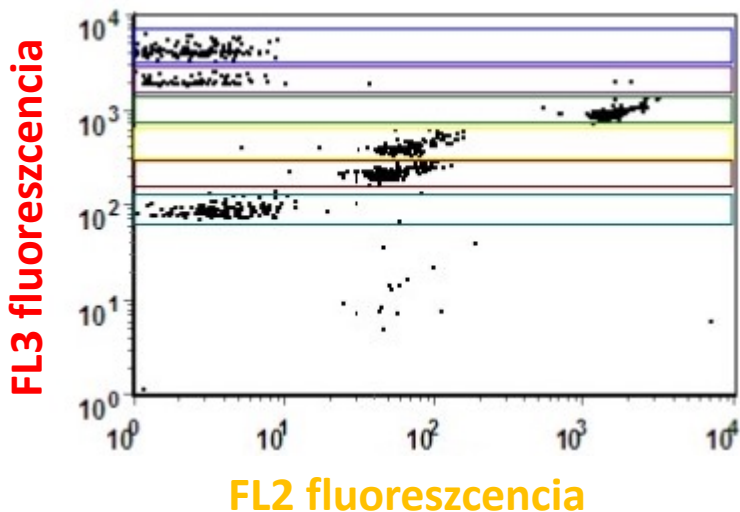
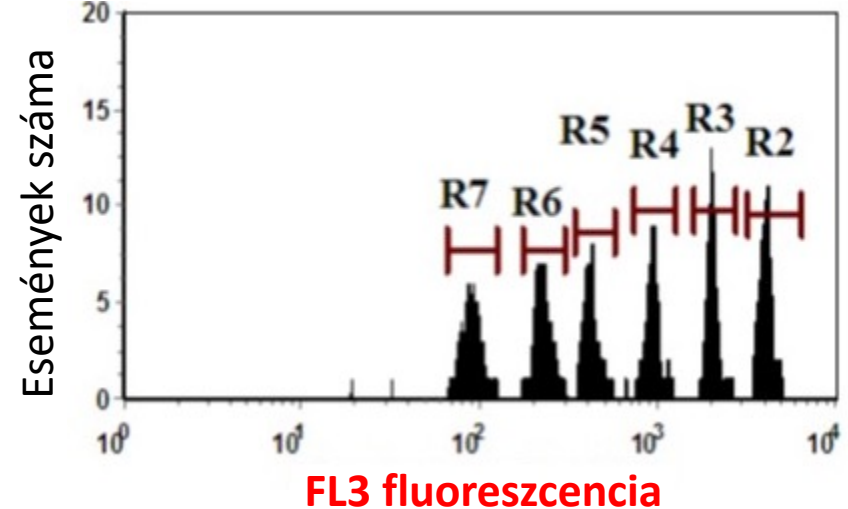
Lényeg: A gyöngyök mindegyike 2 festék kombinációját tartalmazza, azonban a kettő aránya mindegyik gyöngytípusban eltérő. Pl. az anti-IFN $\gamma$  antitesttel konjugáltban több az FL3 jelet adó festék, mint az anti-IL-6 antitesttel konjugáltban. Ezzel a módszerrel elméletileg akár 100 különböző féle gyöngy is vizsgálható egyetlen mintában.

# CBA analízis példa (citokin mérés)

Gyöngyök kapuzása:



Gyöngyök csoportosítása:



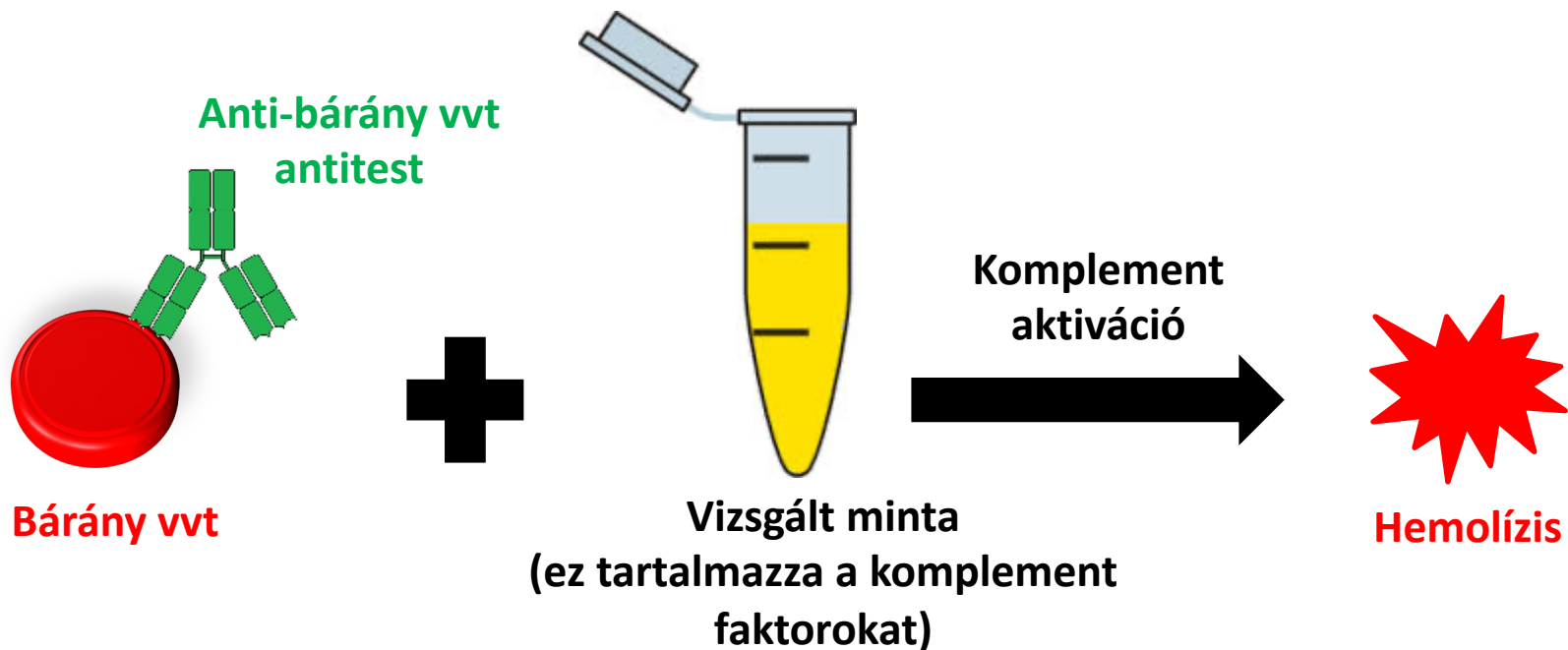
- R2 = IL-8 → Negatív
- R3 = IL-1 $\beta$  → Negatív
- R4 = IL-6 → **Erősen pozitív**
- R5 = IL-10 → **Pozitív**
- R6 = TNF $\alpha$  → **Pozitív**
- R7 = IL-12p40 → Negatív

**Kvantitatív vizsgálat:**

A pozitivitás mértéke is meghatározható!

# A komplement rendszer funkcionális tesztjei

- Mikor vizsgálják:
  - Visszatérő fertőzések, komplement rendszert érintő **immunhiány** gyanúja
  - **Autoimmun kórképek**
- Általános teszt: **hemolízisen** alapuló vizsgálatok → CH50 vagy CH100<sup>[26,27]</sup>



CH50 → a minta azon hígítása, ami a vvt-k 50%-át hemolizálja  
CH100 → a minta azon hígítása, ami az összes vvt-t hemolizálja

# QuantiFERON®

Blood Test for the Detection of  
Latent Tuberculosis Infection






## Sampling tubes of QuantiFERON TB Gold Plus

	<p><b>NIL Tube</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Negative control</li><li>• Allows adjustment for background noise.</li></ul>
	<p><b>TB1 ANTIGEN Tube</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Includes <i>Mycobacterium tuberculosis</i> specific antigens ESAT-6 and CFP-10</li><li>• Peptides recognized by MHC Class II to detect CD4 response.</li></ul>
	<p><b>TB2 ANTIGEN Tube</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Includes <i>Mycobacterium tuberculosis</i> specific antigens ESAT-6 and CFP-10</li><li>• Peptides recognized by MHC Class I and II to detect CD4 and CD8 combined response.</li></ul>
	<p><b>Mitogen Tube</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Positive control</li><li>• Includes PHA and allows to check the functionality of the immune system</li><li>• Objectives:<ul style="list-style-type: none"><li>• To identify individuals with weakened immune system</li><li>• To validate specimen handling conditions</li></ul></li></ul>



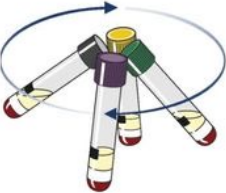
# QuantiFERON-TB Gold Plus Protocol

## Step 1: Whole Blood incubation



**Nil Control**      **ESAT-6 CFP-10**      **Mitogen Control**

1) 1mL of whole blood (x4) and incubation at +37°C for 16-24 h.

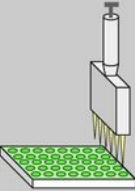


2) 15 minutes Centrifugation

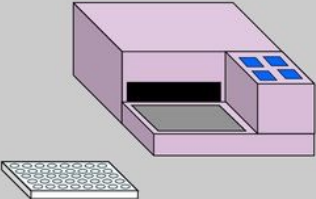
IFN- $\gamma$  is stable at 2-8° C for at least 4 weeks

## Step 2: INF- $\gamma$ ELISA testing

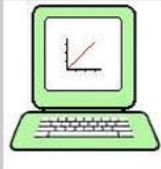
3) Add plasma and conjugate. Incubation 2H at room temperature



4) Wash then add Substrate. OD reading after 30 min.



5) Calculation and results printing





## Active and Latent Tuberculosis Infection

### TB-related morbidity and mortality

#### The TB pandemic – global emergency (1)

##### Active TB disease in 2013

- 9 million people developed TB disease
- 1.5 million people died

##### Latent TB infection (LTBI) in 2013

- 2 billion infected with *M. tuberculosis*
- 10% chance of developing active, contagious TB disease in their lifetimes

#### Screening and treatment (2)

2014 WHO guidelines, part of Broad strategy to “End TB” by 2035:

- Identify and treat LTBI for upper-middle and high income countries with TB incidence <100/100k population
- Screen and treat for LTBI in most at-risk populations for progression to active TB
- Reduce TB deaths by 95%; cut active TB cases by 90%

▶ As active TB rates decrease, LTBI diagnosis & preventive treatment grows in importance

1. WHO. Global tuberculosis report 2014. [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/137094/1/9789241564809\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/137094/1/9789241564809_eng.pdf?ua=1), Dec 1, 2014. 2. WHO. Guidelines on the management of latent tuberculosis infection. 2014 [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/136471/1/9789241548908\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/136471/1/9789241548908_eng.pdf?ua=1), Dec 1, 2014.





## From Latent TB infection to Active TB: Risk Factors

Risk factors to develop active TB form Latent TB infection	
Risk Factors	Estimation of relative risk*
AIDS	110 - 170
Well controlled HIV infection	50 - 110
Solid Organ Transplantation	20 - 74
Chronic Hemodialysis	10 - 25
Head and neck cancer	16
Recent tuberculosis infection (<2 years)	15
Systemic prolonged corticosteroids therapy	4.9
Anti-TNF $\alpha$ treatment	1.5 - 4
Diabetes	2 - 3.6
Malnutrition (body mass index < 20 kg/m <sup>2</sup> )	2 - 3
Passive smoking	2 - 3

\* Compared to a population without any risk factor

**HIV:** Human Immunodeficiency Virus

**TNF:** Tumor Necrosis Factor

Leroy H. et al in La revue du praticien vol. 62, avril 2012 p 484, adapted from Landry J, Menzies D. *Preventive chemotherapy. Where has it got us? Where to go next?* Int J Tuberc Lung Dis 2008;12:1352-64.

Sample to Insight

# Hivatkozások 1.

1. ThermoFischer Scientific: **Introduction to Cell Culture** (<https://www.thermofisher.com/hu/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/introduction-to-cell-culture.html>)
2. Jensen JR<sup>1</sup>, Morbeck DE, Coddington CC 3rd: **Fertility preservation**. *Mayo Clin Proc*. 2011 Jan;86(1):45-9. doi: 10.4065/mcp.2010.0564.
3. Gluckman E<sup>1</sup>: **Family-directed umbilical cord blood banking**. *Haematologica*. 2011 Nov;96(11):1700-7. doi: 10.3324/haematol.2011.047050. Epub 2011 Jul 12.
4. Roura S<sup>1</sup>, et al.: **The role and potential of umbilical cord blood in an era of new therapies: a review**. *Stem Cell Res Ther*. 2015 Jul 2;6:123. doi: 10.1186/s13287-015-0113-2.
5. Lucey BP<sup>1</sup>, Nelson-Rees WA, Hutchins GM: **Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination**. *Arch Pathol Lab Med*. 2009 Sep;133(9):1463-7. doi: 10.1043/1543-2165-133.9.1463.
6. Hudson KL<sup>1</sup>, Collins FS: **Biospecimen policy: Family matters**. *Nature*. 2013 Aug 8;500(7461):141-2. doi: 10.1038/500141a.
7. Schneider U, Schwenk HU, Bornkamm G: **Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma**. *Int J Cancer*. 1977 May 15;19(5):621-6.
8. Drexler HG<sup>1</sup>, Minowada J: **History and classification of human leukemia-lymphoma cell lines**. *Leuk Lymphoma*. 1998 Oct;31(3-4):305-16.
9. Anvret M, Karlsson A, Bjursell G: **Evidence for integrated EBV genomes in Raji cellular DNA**. *Nucleic Acids Res*. 1984 Jan 25;12(2):1149-61.
10. Aden DP, et al.: **Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line**. *Nature*. 1979 Dec 6;282(5739):615-6.

# Hivatkozások 2.

11. Melixetian MB<sup>1</sup>, et al.: **Mouse myeloma cell line Sp2/0 multidrug-resistant variant as parental cell line for hybridoma construction.** *Hybrid Hybridomics*. 2003 Oct;22(5):321-7.
12. Marks DJ<sup>1</sup>, et al.: **Modified skin window technique for the extended characterisation of acute inflammation in humans.** *Inflamm Res*. 2007 Apr;56(4):168-74.
13. Freeman R, King B: **Technique for the performance of the nitro-blue tetrazolium (NBT) test.** *J Clin Pathol*. 1972 Oct;25(10):912-4.
14. Song E<sup>1</sup>, et al.: **Chronic granulomatous disease: a review of the infectious and inflammatory complications.** *Clin Mol Allergy*. 2011 May 31;9(1):10. doi: 10.1186/1476-7961-9-10.
15. Gluzman DF<sup>1</sup>, et al.: **Immunocytochemical markers in acute leukaemias diagnosis.** *Exp Oncol*. 2010 Sep;32(3):195-9.
16. van den Ancker W<sup>1</sup>, et al.: **A threshold of 10% for myeloperoxidase by flow cytometry is valid to classify acute leukemia of ambiguous and myeloid origin.** *Cytometry B Clin Cytom*. 2013 Mar;84(2):114-8. doi: 10.1002/cyto.b.21072. Epub 2013 Jan 16.
17. Zaritskaya L<sup>1</sup>, et al.: **New flow cytometric assays for monitoring cell-mediated cytotoxicity.** *Expert Rev Vaccines*. 2010 Jun;9(6):601-16. doi: 10.1586/erv.10.49.
18. Brunner KT, et al.: **Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51-Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs.** *Immunology*. 1968 Feb;14(2):181-96.
19. Nelson DL<sup>1</sup>, Kurman CC, Serbousek DE: **51Cr release assay of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC).** *Curr Protoc Immunol*. 2001 May;Chapter 7:Unit 7.27. doi: 10.1002/0471142735.im0727s08.
20. Poulsen OM, Hau J: **Murine passive cutaneous anaphylaxis test (PCA) for the 'all or none' determination of allergenicity of bovine whey proteins and peptides.** *Clin Allergy*. 1987 Jan;17(1):75-83.

# Hivatkozások 3.

21. Cerilli J, et al.: **The significance of mixed lymphocyte culture in related renal transplantation.** *Surgery.* 1980 Nov;88(5):631-5.
22. Mickelson EM<sup>1</sup>, et al.: **Evaluation of the mixed lymphocyte culture (MLC) assay as a method for selecting unrelated donors for marrow transplantation.** *Tissue Antigens.* 1996 Jan;47(1):27-36.
23. Moncunill G<sup>1</sup>, Campo JJ, Dobaño C: **Quantification of multiple cytokines and chemokines using cytometric bead arrays.** *Methods Mol Biol.* 2014;1172:65-86. doi: 10.1007/978-1-4939-0928-5\_6.
24. Prabhakar U<sup>1</sup>, et al.: **Multiplexed cytokine sandwich immunoassays: clinical applications.** *Methods Mol Med.* 2005;114:223-32.
25. Zhang Y<sup>1</sup>, Birru R, Di YP: **Analysis of clinical and biological samples using microsphere-based multiplexing Luminex system.** *Methods Mol Biol.* 2014;1105:43-57. doi: 10.1007/978-1-62703-739-6\_4.