

Speciální imunologické metody zimní semestr 2007

Přednáška 2 hod, ukončení : **k**

cvičení 2 hod, ukončení: **z**

formou cvičení v bloku **celé 4 dny** (28 hod)

Teorie bude použita z výukových učebnic kombinovaná s použitím metod v praxi z diagnostických laboratoří

Přednášky:

1. přednáška: Seznámení se s programem předmětu a cvičení, organizace přednášek a cvičení.

Metody používané v klinické praxi - Sérologické reakce

2. přednáška: Doc. J. Michálek, fakultní nemocnice Brno

Možnosti buněčné imunoterapie a její uplatnění v klinické medicíně.

3. přednáška:

-imunoeseje, RIA, FIA, EIA

4. přednáška: Podrobněji metoda EIA, ELISA

5. přednáška: ELISA, stanovení postupů jednotlivých druhů ELISA, sestavení vlastní ELISY, stanovení koncentrací jednotlivých složek

6. přednáška:

a) stanovení leukocytárních populací a jejich funkce

b) speciální in vitro testy- testy na vyšetřování lymfocytárních funkcí, testy na proliferaci lymfocytů, test blastické transformace lymfocytů

7. přednáška: Alergologické vyšetření

8. přednáška: Základy interpretace výsledků imunologických laboratorních testů, metody používané v klinických laboratořích, druhy laboratoří a které techniky na jaké vyšetření se používají

9-11. přednáška: Exkurze do laboratoří:

Předběžně jsou domluveny: TEST LINE, BIOPLUS, VÚVL

Náplň blokového cvičení:

metoda ELISA, metoda blastické transformace lymfocytů

01 METODY POUŽÍVANÉ V KLINICKÉ PRAXI

Serologické metody

A. Precipitační metody

V kapalinách

V gelu

B. Imunodifuzní metody

- Jednoduchá imunodifúze
- dvojitá imunodifúze

C. Imunoelektroforetické metody

Kombinace s elfo

- Imunoelektroforéza podle Williamse a Grabara
- Raketová imunoelektroforéza
- Protisměrná
- Dvojrozměrná
- D. Aglutinační metody

E. Hemaglutinační

F. Komplementové

G. Immunoblotting

Zákalové reakce

- Imunonefelometrie
- Imunoturbidimetrie

H. Imunochemické metody

a) RIA

b) FIA

c)EIA

Časové rozdělení metod

Metody I.generace

- Některé techniky v roztoku – precipitační, aglutinační, KFR

Metody II.generace

- Kvantitativně i složité směsi antigenu,
- Imunodifúze, imunoelfo

Metody III.generace

- Velmi citlivé metody, stanoví Ag, Ab i hapteny
- Imunoanalýzy – př. RIA, FIA, EIA, imunoturbidimetrie
- – nefelometrie, -fluorimetrie, popř jejich kombinace

Metody IV.generace

- Kontinuálně měří Ag, Ab i hapteny
- imunosenzory

Imunoprecipitační křivka (Ag – antigen, Ab – protilátka)

Oblast ekvivalence

Precipitační metody

Oblast nadbytku protilátky

Nekompetitivní metody

- zákalové nefelometrie
turbidimetrie
- s markerem EIA, IRMA..

Oblast nadbytku antigenu

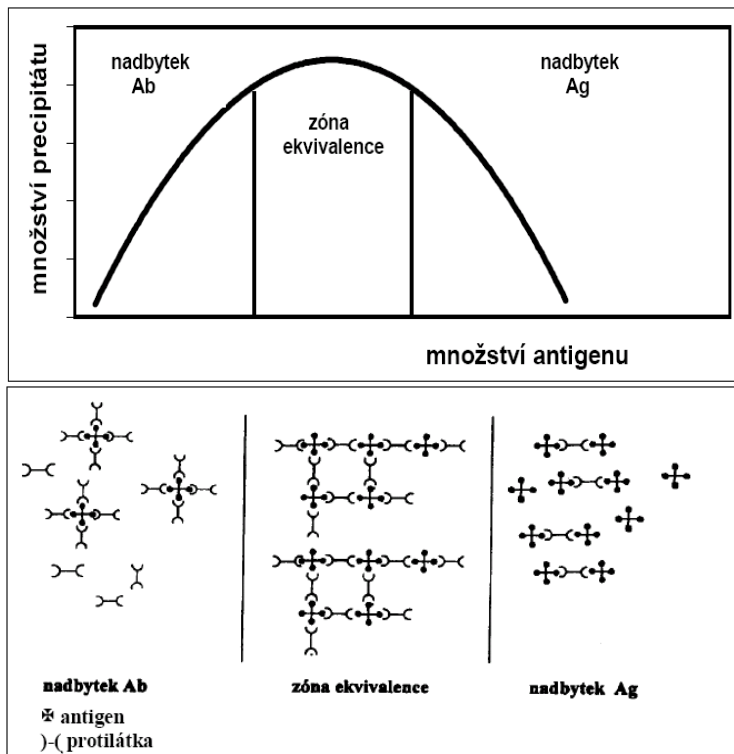
Kompetitivní metody

- heterogenní RIA, ELISA..

- **homogenní FPIA, EMIT...**

faktory ovlivňující precipitaci:

- typ *Ab* /např. *IgG*/
- **teplota** – se zvyšující se teplotou se urychluje precipitace /např. 38°C/
- **vzájemná koncentrace** Ag a Ab
- **pH**
- iontový **náboj**
- **tvár a velikost** částí



PRECIPITAČNÍ metody:

- $Ag + Ab \rightarrow Ag-Ab$
- *precipitinogen precipitin precipitát* sraženina
- solubilní /rozpuštěný/

- - **dělíme:**
- A) v kapalinách :
- **I. prstencová**
- – prstenec sraženiny precipitátu

- **II. sklíčková** – určení pod mikroskopem

- B) v gelu:

IMUNODIFÚZE

- využití : ke stanovení **Ag, Ab, H**

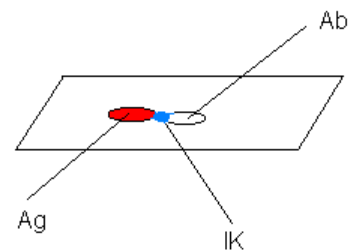
- praxe – 1. zjištění výskytu či stanovení Ab v séru při inf. onemocnění 2. identifikace patogena

- Koncentrace Ab se vyjadřuje jako **TITR SÉRA**.

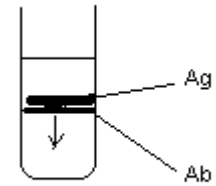
- => **nejmenší zředění Ab, které ještě reaguje s Ag**

- - hodnocení : **kvalitativně** – odečtení okem

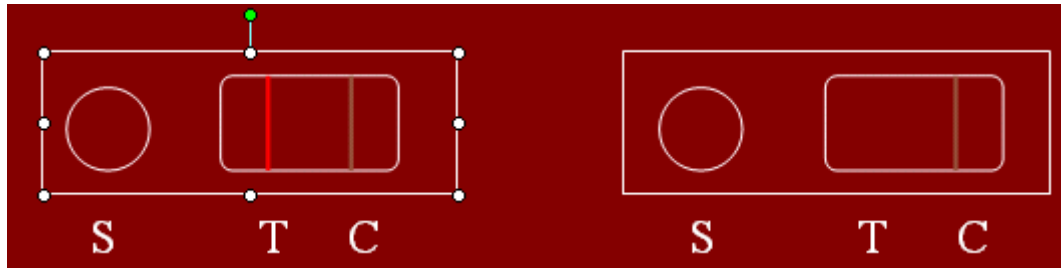
- **kvantitativně** :



- a, zjištěním *množství precipitátu*
- b, zjištěním *množství Ag* v precipitátu či supernatantu
- c, změna *optických vlastností* vzorku – 2 metody :
- **NEFELOMETRIE –* TURBIDIMETRIE**



Screeningové metody – jednoduché precipitační testy
terénní kazetové testy pracující v oblasti ekvivalence



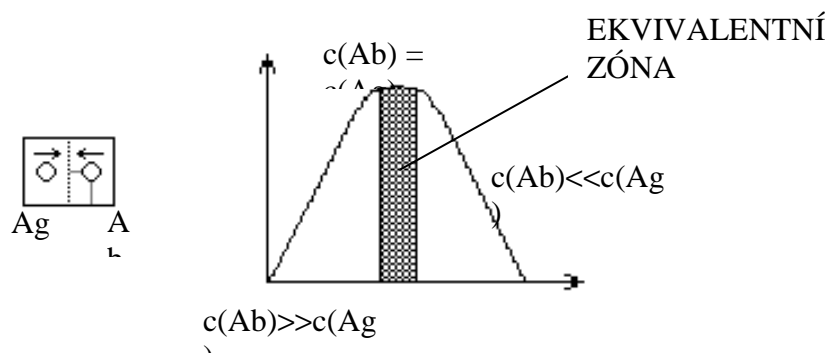
Negativní výsledek

Pozitivní výsledek

Za nepřítomnosti nebo nedostatku drogy ve vzorku moče vytvoří protilátka imunokomplex (precipitát) se značenou drogou vázanou v místě testu T. (S – vzorek, C – kontrola)

IMUNODIFÚZNÍ METODY

- specifická *reakce Ag s Ab*
- základem je *imunoprecipitace* v gelovém prostředí /vyrábí se z agarů a agarózy/
- **AGAR** ~ směs polysacharidů extrahovaných z červených mořských řas
 - * základní jednotkou: *agaroglykosidáza* / 1,3- β -glykosidická vazba/
 - * navázány i *vedlejší skupiny* – např. *sulfátová, fosfátová* ~ snižují čistotu, způsobují zvýšenou absorpci agarů pro některé látky → zabraňují migraci látek
 - přečištěním ~ *frakcionizací* vznikají 2 složky:
 - **agaróza**
 - neobsahuje vedlejší skupiny - pro difúzi více vhodná
 - *standardnější složení* než agar a větší schopnost *nespecifické absorpce*
 - **agaropeptin**
 - obsahuje aniontové skupiny → *pro difúzi nevhodný*
- příprava:
rozvaření v pufru na vodní lázni
nanesení na skleněné destičky – nechá se zatuhnout /při teplotě pod 42°C/
- princip:
 - vzájemná *volná difúze Ab a Ag* v gelu na základě *koncentračního spádu* až do místa střetnutí ~ vznikají *precipitační linie* → *obloučky* → *prstence* → *kruhy* /záleží na použitém materiálu/
 - vzniklé precipitáty *detegujeme*:
 - * *okem* - zákal
 - * *barvením* – commsy blue, aminočern
 - * *sekundárními protilátkami*
 - * *radioizotopy*
- vznik precipitátů je *děj postupný!!!*



napřed převažuje Ag nad Ab ~ *komplexy se rozpadají*
/dochází k rozmívání sraženin – jedna látka naráží do druhé/

- **faktory** ovlivňující precipitaci:

- typ **Ab** /např. IgG/
- **teplota** – se zvyšující teplotou se urychluje precipitace /např. 38°C/
- **vzájemná koncentrace** Ag a Ab
- **pH**
- iontový **náboj**
- **tvar a velikost** částic
- ...

- **rozdělení** metod:

- * **jednoduchá** – difunduje pouze jedna složka – buď Ag či Ab
- * **dvojitá** – difundují obě – Ag i Ab
- **jednorozměrná** – putuje jedním směrem
- **dvojezměrná** /radiální/ – putuje více směry

Ag a Ab si neodpovídají – **nevytvoří se linie**

více typů - tolik **linií**, kolik bude mít **párů sobě odpovídajících Ab a Ag**

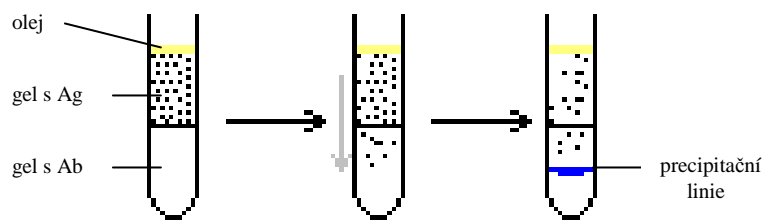
① **jednoduchá imunodifúze**

- **migruje 1 složka**:

1. **složka** se smíchá s **gelem** už při jeho přípravě
2. **složka** se dává do vyřezaných jamek – **MIGRUJE** – vzniká **precipitační linie**

① **jednorozměrná ~dle OUDINA**

- ve spodní části zkumavky agarózový gel s Ab, převrstveno gelem s Ag
- zalito parafínovým olejem – zábrana odpařování
- **Ag difunduje 1 směrem do gelu s Ab**
- čím je Ag **koncentrovanější**, tím **dále** vznikají **precipitační linie** /odečitatelnější/



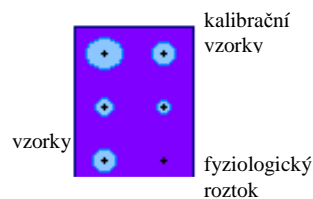
- využití: • detekce **počtu Ag párů**

② radiální /dvojměrná/ imunodifúze ~RID ~dle MANCHINIOVÉ

- na skleněnou destičku se nalije gel, který obsahuje Ab → nemigruje

- jamky - vzorky:

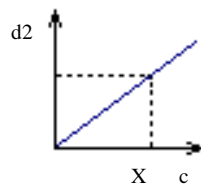
- * fyziologický roztok – blank
- * vzorky o *neznámé koncentraci*
- * vzorky o *známé koncentraci*



po obarvení modré precipitační kruhy – změří se –druhé mocniny kruhů

→ čím je vzorek koncentrovanější – kruh má větší průměr

- kalibrační křivka:



- využití: • ke **kvantitativnímu stanovení Ag**

• klinická praxe: **stanovení koncentrace IgG, IgA, IgM, IgD**, více složek *komplementu* a *plazmatických proteinů*

② dvojitá imunodifúze

- difundují obě složky

- koncentrace by měly být vzájemně **ekvivalentní** – jinak se budou překrývat

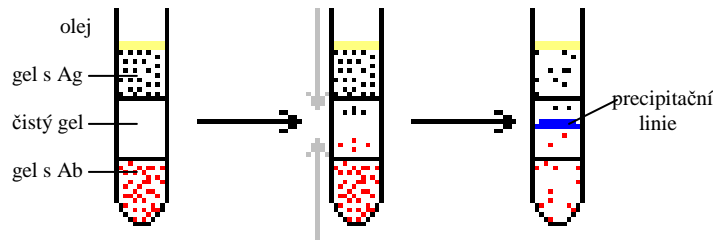
- využití: • **kvalitativní stanovení Ag**

- určení **imunochemické příbuznosti či odlišnosti Ag**

① jednosměrná

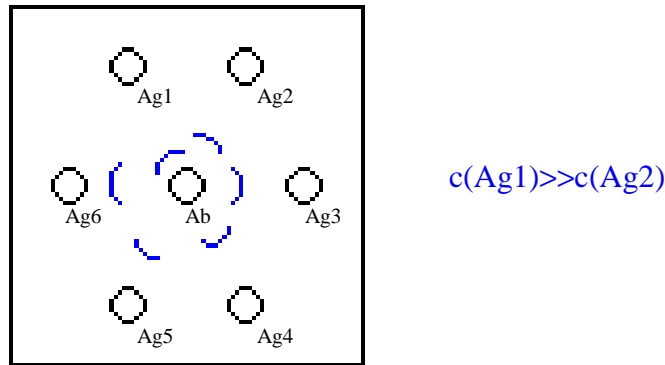
- ve zkumavce **agarózový gel s Ab** a agarózový gel s Ag

- mezi nimi **čistý gel** – v místě vyrovnání se vytvoří **precipitační linie**

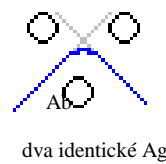
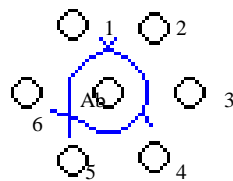


② radiální ~dle OUCHTERLONYHO

- na skleněné desce nanášíme **čistý gel**
- jamky – různé Ag či různé koncentrace jednoho Ag
- **precipitační obloučky** – koncentrovanější Ag – dále od Ag

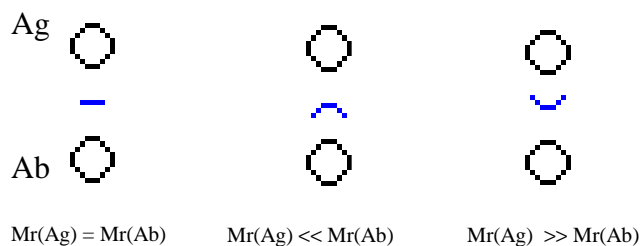


- využití:
 - titrace Ag – **koncentrace Ag** určuje umístění linie
 - důkaz **přítomnosti Ab**
 - porovnávání **identity a neidentity Ag směsí** → umístění precipitační linie
- průkaz Ab při alergických alveolitidách, průkaz Ab proti některým patogenům, např. *Toxoplasma gondii*



1 a 2 částečně identické /některé determinanty navíc/
3 některé determinanty navíc než 4
5 a 6 si neodpovídají

- porovnání M_r Ag a Ab → určuje tvar precipitační linie



- menší molekula se dostane dále do gelu

Aglutinační metody

- $Ag + Ab \rightarrow Ag-Ab$
- *aglutinogen* *aglutinin* *aglutinát*
- korpuskulární-
- **princip : KORPUSKULÁRNÍ** / částicový / Ag
- při reakci dochází ke shlukování Ag a Ab na základě vytváření můstků - Ab mezi buňkami za vzniku shluků
- **přímá** – použití bakterií, buněk
- **nepřímá, pasivní** – na jejich povrch je Ag uměle navázán, př.latex-fixační test
- **Předpoklady ke vzniku vazeb:**

1. dostatek Ab, 2. přítomnost Ab proti různým epitopům 3. vzdálenost mezi částicemi co největší 4. Ab funkčně jednovazebné nevytváří aglutinaci (IgA, IgE) – inkompletní Ab viz hemaglutinace

- - *hodnocení*: **kvalitativně** - odečtení okem
- **kvantitativně** : a, zjištěním *množství aglutinátu*
- b, zjištěním *množství Ag* v aglutinátu či supernatantu
- *využití* : ke stanovení **Ag, Ab, H** (viz precipitační metody)
- 1. K určování izolovaných bakteriálních kmenů
- 2. K průkazu Ab proti patogenům –Widalova reakce – průkaz tyfu, paratyfu, Weil-Felixova – skvrnitého tyfu, Ab proti *Francisella tularensis*
- 3. Nepřímá k průkazu auto Ab proti štítné žláze, Ab proti autoAg –

Latexová aglutinace, latex-fixační test

- rychlé kvalitativní stanovení
- Ag nebo Ab imobilizován na latexových kuličkách
- Stanovení Ab proti IgG – revmatoidní faktor

Hemaglutinace

- $Ag + Ab \rightarrow Ag-Ab$
- *hemaglutinogen* *hemaglutin* *hemaglutinát*
- - savčí krvinky
- (i části)
- - dochází ke *shlukování krvinek*, vlivem komplementu či virové částice pak dochází k *LYZI*.

Ke zviditelnění aglutinačních reakcí při použití inkompletních Ab je možno použít a) aglutinaci v bílkovinném prostředí b) v prostředí s proteolytickými enzymy c) použitím antiglobulinového Coombsova séra - králičí ab proti lidským Ig

- **využití**: K zjišťování krevních skupin a průkaz Ab proti krevním elementům.
- **Přímý Coombsův test** – k průkazu navázaných antierytrocytárních Ab, reakce pacientových ery s Coombsovým antiserem, přítomnost navázaných Ab se projeví hemaglutinátem
- **Nepřímý Coombsův test** – k průkazu cirkulujících antierytrocytárních Ab
- 1. fáze, pacientovo sérum s ery od dárce, navázání Ab pokud jsou přítomny, vymytí, přidání Coombsova séra, které způsobí aglutinaci
- **při 2 reakcích:**

- * **KFR** – *komplement fixační reakce*
- * **HIT** – *hemaglutinačně inhibiční test* :

HIT

- Patří také mezi metody serologické, založené na inhibici biologických účinků antigenů
- HIT – pasivní hemaglutinace
- Vycházíme ze skutečnosti, že viry (některé bakterie atd) mají schopnost se spontánně absorbovat na červené krvinky (rozpustný Ag). Ery pak aglutinují – shlukují se jen v přítomnosti specifické Ab

- *odpovídá-li* protilátka Ag, po přidání obalených ERY Ag se Ag vyváže a vznikne **HEMAGLUTINÁT**

Ab + Ag - Ery → *hemaglutinát, proběhne hemaglutinace*

- *neodpovídá-li* protilátka virovému Ag, nedojde k hemaglutinaci

- situace, kdy přidáme stejný Ag do reakce
- Ab + Ag - Ery → *hemaglutinát* + stejný Ag → Ag -Ab + Ag - Ery → *inhibice hemaglutinace*
- *Metodou inhibice pasivní hemaglutinace lze dokázat velmi malé mn. rozpustného Ag nebo H (metoda je velmi citlivá)*

pro vyhodnocení můžeme použít i optické metody

KOMPLEMENTOVÉ METODY

METODY VYUŽÍVAJÍCÍ FAKTU AKTIVACE KOMPLEMENTOVÉHO SYSTÉMU

KOMPLEXEM – ANTIGEN-PROTILÁTKA, KFR

KOMPLEMENT-FIXAČNÍ REAKCE /KFR/

- patří mezi *serologické metody*

- složky reakce:

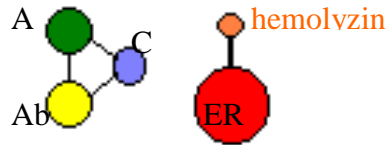
- *vyšetřované sérum*
- chceme v něm *prokázat protilátku / komplement v séru je tepelně inaktivován /*
- *známý specifický Ag*
- jsou-li v séru Ab, vytvoří se *imunokomplex IK*
- **KOMPLEMENT**
váže se na IK a aktivuje protilátku, - zdrojem nejčastěji sérum morčete
- *hemolytický komplex*
- *komplex Ag /beraní ERY/ a protilátky ~EMBOCEPTORu /hemolyzinu/, získaného imunizací králičího séra beraními erytrocyty*
→ aby došlo k hemolýze je nutná *spoluúčast KOMPLEMENTU* a inkubace 30 minut při 30 °C

- průběh reakce:

- * **POZITIVNÍ** ~ ve vyšetřovaném séru *je Ab*

protilátka v séru vytvoří *komplex s Ag* – na něj se *naváže komplement*. Po přidání hemolytického systému *nezbývá již komplement do 2. části reakce*

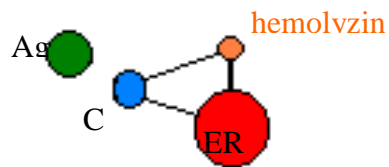
→ k hemolýze **NEDOJDE**:



* **NEGATIVNÍ** ~ ve vyšetřovaném séru *není Ab*

- v 1. fázi reakce se *nevytvoří IK – komplement se nevyváže* a zbývá do 2. fáze reakce, kdy *aktivuje hemolysin*

→ **DOJDE** k hemolýze:



- velmi **záleží na množství komplementu** – *každý vzorek se musí titrovat*, aby bylo množství komplementu konstantní

- *použití:*

- **diagnostika** příjice /*syphilis*/, bruceózy, pasteurely
- **ve virologii** průkaz protilátek téměř všech virových nákaz
- **typizace neznámých Ag** nově izolovaných virů
- **průkaz protiorganových Ab**

Vyšetření komplementového systému

- Stanovují se

- a) hladiny jednotlivých složek K v séru –
za pomoci antisér, většinou proti C3, C4, C1q
- b) celková aktivita komplementové kaskády-

Se provádí testem CH50 – (50% hemolýza způsobená komplementem), stupeň hemolýzy závisí na množství přidaného K, nepřímá úměra

Využití: K detekci poruch nedostatečného mn. Nebo defektů složek K systému

Vyšetření cirkulujících a deponovaných IK

Principy metodik

1. Využívající fyz – chem vlastností – CIK- největší makromolekuly séra mohou být precipitovány pomocí PEG (polyetylénglykol). Precipitát je úměrný mn. cirkulujících CIK
- 2. CIK na sebe váží C1 – C3 složky K. V první fázi se odstraní nenavázaný C1q. V druhé fázi se stanoví koncentrace C1q, jež odráží i hladinu CIK (totéž pro C3,C4)
- 3. průkaz vazbou na buňky, které exprimují receptor pro Fc fragment IgG. Lze využít trombocyty
- **Využití:** Pro monitoring jakýchkoliv zánětlivých procesů. Pro diagnostiku imunokomplexových chorob je důležitější průkaz IK deponovaných v tkáních. To se provádí po bioptickém odběru vzorku z tkáně (kůže, svaly, ledviny) pomocí přímé fluorescence se prokazuje uložení IgG

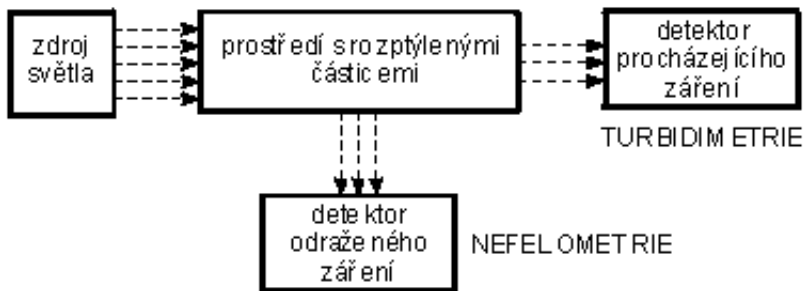
Zákalové reakce

metoda probíhající v roztoku

Princip: při reakci Ag a Ab vzniká zákal-precipitát, jehož intenzita je při konstantním množství mn. Ab úměrná koncentraci vyšetřovaného Ag

NEFELOMETRIE – rozptyl viditelného světla měřeného pod úhlem

- * **TURBIDIMETRIE** – úbytek viditelného světla při průchodu vzorkem měřeného ve stejné rovině
- * Výhoda: možnost automatizace, rychlost provedení, přesnost, ale vyšší cena



02 IMUNOELEKTROFORETICKÉ METODY

- kombinace metod elektroforetických a imunodifúzních

Přehled metod:

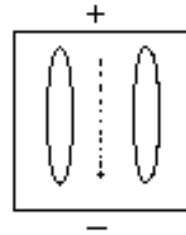
- ① imunoelektroforéza *podle WILLIAMSE a GRABARA*
- ② **RAKETOVÁ** imunoelektroforéza
- ③ **PROTISMĚRNÁ** imunoelektroforéza
- ④ **DVOJROZMĚRNÁ** imunoelektroforéza

Pro přednášku v rámci Speciální imunologické metody je třeba znát jen metodu první a její využití:

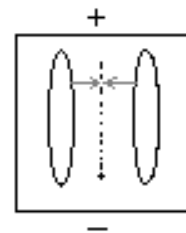
① imunoelektroforéza **podle WILLIAMSE a GRABARA:**

- 1953 Williams a Grabar

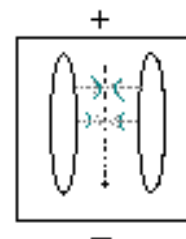
- 2 stupně: • **nalít destičky** (agarózní gel s pufrem)
vytvoření 2 žlábků a nanesení Ag mezi ně



- po rozdělení elektroforézou se do žlábků napipetují **protilátky**
inkubace 48 hodin v lednici
→ dochází k **DIFUZI**



→ v místě ekvivalence se vytváří **PRECIPITAČNÍ obloučky**

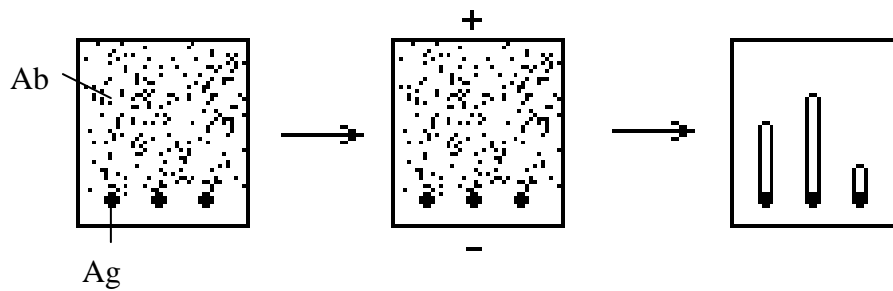


- *příčně*dělení **podle velikosti** molekul a jejich tvaru
- *svisle*dělení **podle náboje**
- jednotlivé obloučky znamenají jednotlivé bílkoviny
- detekce až 35 sérových proteinů /dnes se častěji používá ELISA/

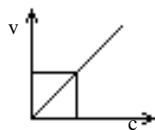
② **RAKETOVÁ imunoelektroforéza:**

- Laurell 1966

- kombinace jednoduché radiální imunodifúze s elektroforézou
- monospecifická Ab + *jeden Ag /či směs Ag/*

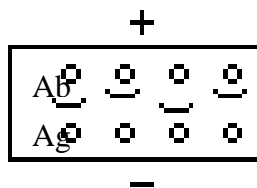


→ užívá se pro **zjišťování koncentrace Ag** – koncentrace je přímo úměrná výšce „raketky“ kalibrační křivka:



③ PROTISMĚRNÁ imunoэлектрофорéza:

- obměna jednosměrné dvojité imunodifúze, kdy je **pohyb urychlován el. proudem**



2 řady jamek:

Ab...vždy k (-)

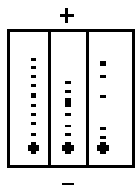
Ag...pouze ty se (-) nábojem

- v místě ekvivalence **vzniknou precipitační obloučky**

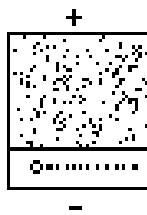
④ DVOJROZMĚRNÁ imunoэлектрофорéza:

- vypracována nezávisle na sobě : 1965 Laurell a Laurellová
1966 Clair a Frieman

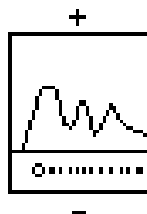
- postup: • čistý gel + Ag – elektroforéza, rozřeže se:



• nanese na čisté sklíčko a zalije se gelem, který obsahuje **rozptýlené polyspecifické protilátky**:



- v místě ekvivalence se vytvoří **precipitační útvary** – výška a plocha útvaru je úměrná koncentraci Ag:



→ v séru lze detegovat až 50 proteinů

- využití metod:

Metoda	KVALITATIVNÍ	KVANTITATIVNÍ
1.	++	-
2.	-	++
3.	++	-
4.	++	+

legenda:
 ++...velmi vhodná
 +.....vhodná
 -.....nevhodná

ELEKTROFORÉZA

- bílkoviny – **AMFOLYTY** – obsahují *kyselé i bazické skupiny*
- určitý počet **labilních protonů** (určitá hodnota K_a = disociační konstanta)
- z individuálních pak lze vypočítat **hodnotu pH**, při které je **počet kladných nábojů roven počtu záporných** → **pI** ...*izoelektrický bod*
- **pH = pI** → molekula nemá náboj
- nerovná-li se molekula náboj má ~ po vložení do *el. pole se pohybuje rovnoměrně zrychleně*
- proti zrychlení působí **odpor prostředí**
- molekuly s (-) nábojem → **k anodě** (+)
 (+) nábojem → **ke katodě** (-)
- *pohyblivost* molekul je dána:
 - ① **velikostí povrchového náboje**
 - elektrochemicky se uplatňují pouze *skupiny na povrchu globule* ~ **KONFORMAČNÍ STRUKTURA**
 - velmi silně se mění *vlastnosti při denaturaci* ~ na povrch se dostanou další skupiny
 → *mění se elektrochemické vlastnosti*
 - ② **velikostí molekul**
 - větší se pohybují pomaleji ~ *odpor prostředí*
 - záleží i na *velikosti síta nosiče*

③ tvaru molekul

- kulovité se pohybují rychleji

④ podmínkách prostředí

- * typ nosiče ~ agaróza, polyakrylový gel
- * hodnota pH tlumivého prostředí /pufry/
- * iontové složení prostředí

⑤ síla el. pole

- 2 způsoby elektroforézy:

- **volná** ~ volný elektrolyt, elektrody volně v roztoku
- po vypnutí proudu molekuly difundují zpět
→ nákladné a nepřesné
- **zónová** ~ zvýšení viskozity prostředí, ve kterém se elektroforéza provádí
(ve vodě větší rychlost difuze než ve škrobu)
- vytváří se tedy **pórovité gely** - škrob, acetylcelulóza, agar, polyakrylamid, agaróza

- směs bílkovin se nanese do míst startu, pustí se el. proud → bílkoviny se detegují barvivy

PÓROVITÉ NOSIČE jsou ponořeny do vodivého roztoku /pufry/

- funkce: přenos el. proudu

- udržování konst. pH → dělené molekuly během elektroforézy nemění náboj

elektroforéza globulinů

- kvalitativní a kvantitativní určení, popř. i pro preparativní separaci

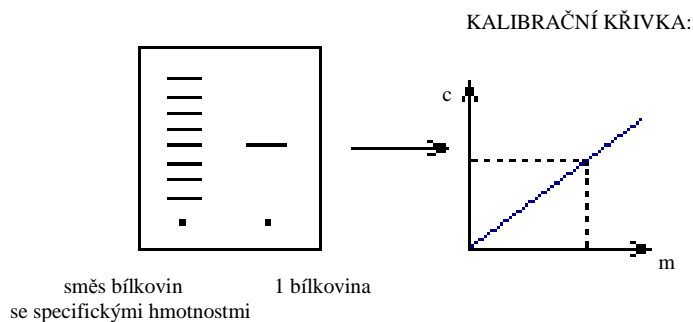
dělení: • podle náboje

- podle velikosti molekul (M_r)

používá se **SDS-page**:

- SDS – *sodium dodecylsulfát* – TENZID, váže se v poměru 1,4 g SDS/ 1 g bílkoviny

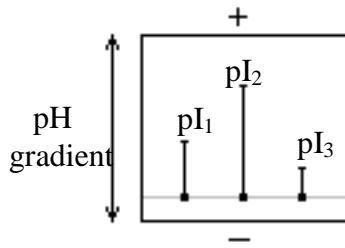
→ udílí bílkovinám **UNIFORMNÍ náboj**



Izoelektrická fokusace

- počet (+) nábojů se rovná (-) → **molekula ztrácí náboj**, přestane se pohybovat v el. poli

- používá se gel s **gradientem v pH**



- využití: odlišování podtříd IgG a IgM

- *Využití:* Imunoelfo séra podle **WILLIAMSE a GRABARA** se v současné době používá výhradně k průkazu monoklonálního imunoglobulinu v lidském séru – paraproteinu. Je vždy produkován klonem buněk vycházející z jedné plazmatické b., mající genetickou informaci pro tvorbu jedné variabilní oblasti lehkých a těžkých řetězců a jedné třídy Ig molekuly. Na rozdíl od imunoglobulinů běžného séra s velkým mn. Různých variabilních oblastí Ig molekul.
- Paraprotein se nachází. 1. u nemocných s myelomem (nádor vycházející z plazmatických buněk) 2. při jiných malignitách lymfatického systému, 3. při chronických zánětech 4. ve vyšších věk. skupinách
- Vzniká neobvyklý pruh při klasické elfo séra, neboť paraprotein se pohybuje uniformně (stejný náboj a Mr). V určitém místě elektroforetického pruhu způsobí vysokou koncentraci Ig příslušné třídy. Při následné precipitaci s přidáním antisérem je v oblasti, kam paraprotein doputoval, výrazně více antigenu, precipitační linie je deformovaná a posunuta blíže ke žlábků s antisérem.

03 BLOTTING

SOUTHERN BLOTTING

- *byl vyvinut Edwardem M. Southernem v roce 1970 (Edinburghská Univerzita)*
- *slouží k detekci DNA, najítí části sekvence DNA či konkrétního genu v genomu*
– molekuly DNA se přenášejí z agarózového gelu na membránu

NORTHERN BLOTTING

- *slouží k detekci RNA*
- *přenos nám umožňuje zjistit přítomnost, nepřítomnost a relativní množství specifických RNA sekvencí*
- *způsob určování, kterým zjistíme který gen byl přepsaný na mRNA anebo za jakých podmínek je exprese regulována*

WESTERN BLOTTING

- *slouží k detekci bílkovin*
- *touto metodou dokážeme najít jednu bílkovinu v množství jiných, přičemž určit i délku daného proteinu*
- *metoda je však závislá na použití velmi kvalitních protilátek zaměřených na vybranou bílkovinu*

PODSTATOU BLOTTINGU: IZOLOVANÁ LÁTKA (OBVYKLE SEPAROVANÁ) SE PŘENÁŠÍ NA MEMBRÁNU.

PODLE TYPU PŘENOSU SE BLOTY LIŠÍ:

- *Difúzní blottiny: v přenosovém pufru*
- *Vakuový blotting: přenos pomocí vakua*
- *Kapilární blotting: přenos kapilárními silami přes filtrační papír*
- *Tankový elektroblotting: k přenosu využito el. pole (2-3 l pufru), na boku nádoby - elektrody*
- *„Semi dry“ blotting: využití plošných elektrod (100 ml)*
- *Kapkovací dot blotting: bílkoviny nejsou rozseparovány – imobilizace jednotlivých vzorků*

POUŽÍVANÉ MEMBRÁNY

- *PVDF (polyvinyliden difluoridová) – hydrofilní interakce*

- Nitrocelulosová – **hydrofilní interakce**
- Nylonová – **elektrostatická interakce**

WESTERN BLOT

- **3 kroky:**
 - SDS PAGE (**gradientová elektroforéza**)
 - BLOTTING
 - IMUNODETEKCE

SDS PAGE

Nejpoužívanější metodou je PAGE – SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS (sodium dodecyl sulphate). Umožňuje následné určení relativních molekulových hmotností jednotlivých proteinových frakcí.

Polyakrylamidové gely se připravují kopolymerací polymerů – **akrylamidu** a ***N,N*-metylen-bis-akrylamidu** (BISu).

Polymerací akrylamidu vznikají dlouhé řetězce polymerů, zařazení BISu způsobuje zesílení „můstky“, které vznikají z bifunkčních zbytků BISu. Vytvořená polyakrylamidová matice nese elektrický náboj a je chemicky dost inertní.

Polyakrylamidový gel je tedy struktura skládající se z otevřených pórů obsahujících pufr.

Pro stanovení M_r se používá detergent SDS. Všechny bílkoviny shodně vážou SDS v poměru 1,4 SDS na 1 g bílkoviny. Po navázání na bílkoviny ve vzorkovém pufru s alkalickým pH udělí molekuly SDS bílkovině negativní náboj. Na molekulu bílkoviny se naváže takové množství molekul SDS, že její vlastní náboj pozbude významu a dělení může probíhat podle velikosti molekul.

Molekula určitého proteinu postupuje v gelu až do momentu, kdy velikost pórů je menší než velikost molekuly a ta se v tomto místě gelu „zasekne“.

Použitím směsi standardních bílkovin se známou M_r a po sestrojení kalibrační křivky je možné vypočítat M_r jednotlivých frakcí.

- ***Připravíme gel – tvořen separačním gelem a hřebínkovým gelem. (nechat vyžrát do druhého dne)***
- ***Do jamek, které vytvořil hřebínek nanášíme vzorky.***
- ***Gel umístíme do elektroforetické vany. Do anodového i katodového prostoru nalijeme Runnig pufr.***
- ***Asi 1 hodinu necháme vanou procházet stejnosměrný proud (200 V). Dokud zóna bromfenolové modři nedoputuje ke spodnímu okraji gelu.***
- ***Po sjetí elektroforézy odstraníme hřebínkový gel.***

WESTERN BLOTTING

- ***Sestavíme blotovací zařízení pro semi-dry blotting.***
- ***Na grafitovou elektrodu umístíme 3 filtrační papíry navlhčené transferovým puftrem. Následující vrstvy jsou: nitrocelulósová membrána, gel s proteiny a další 3 navlhčené filtrační papíry.***

- *Celou aparaturu zkompletujeme přiložením horní elektrody a zapojíme ke zdroji (proud 100mA, 50 min).*

IMUNODETEKCE

- *Z membrány odřízneme sjezd s proteinovými standardy a obarvíme amidovou černí.*
- *Propláchneme membránu v promývacím roztoku.*
- *Inkubujeme 60 – 120 min. s primární protilátkou v blokovacím roztoku.*
- *Promyjeme a inkubujeme 60 min. se sekundární protilátkou v blokovacím roztoku.*
- *Opět promyjeme a vložíme do substrátového roztoku, dokud se neobjeví bandy.*
- *Vyvolávání ukončíme namočením membrán do vodovodní vody.*

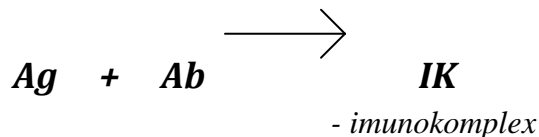
04 IMUNOHISTOCHEMICKÉ METODY

- STANOVENÍ AG ČI AB V HISTOLOGICKÝCH PREPARÁTECH, TĚLNÍCH TEKUTINÁCH, A JINÝCH VZORCÍCH, IMUNOESEJE, REAKCE TŘETÍ GENERACE.

- moderní imunologické diagnostické metody
- vznikly v 80. letech min. století
- vychází z poznatků imunologie, enzymologie, fotometrie a radiochemie

SLEDUJE REAKCE AG S AB

- *stanovení Ag či Ab* – buď v biologických tekutinách nebo histologických preparátech



- jeden z reaktantů nese *značku* – MARKER a tím je vizualizován výsledek. Detekční systém tak zvyšuje citlivost reakce a umožňuje modifikace, které prostou specifikační reakcí nejsou dosažitelné:

- * *radioaktivní* (RIA)
- * *fluorescenční* (FIA)
- * *enzymatickou* (EIA)

antigeny Ag – makromolekuly (polymery: proteiny, polypeptidy...)

- ✓ navozují specifickou imunitní odpověď
- ✓ specificky reagují s protilátkami
- ✓ haptén – nízkomolekulární látka (léčiva, drogy) navázána na vysokomolekulární nosič

protilátky Ab – bílkoviny (glykoproteiny) tělních tekutin

- ✓ vykazují specifickou vazebnou schopnost vůči antigenu, na jehož podnět se vytvořily, mohou být cíleně připravené

- jen proti jedné chemické skupině
- která je společná pro více strukturně chemicky příbuzných látek

- **Heterogenní imunometody** – separace molekul značeného reagens vázaného v imunokomplexu od volných molekul značeného reagens v roztoku (radioimunometody, ELISA) – vysoká citlivost
- **Homogenní imunometody** – bez separace frakcí, jsou jednodušší, rychlejší, lze je automatizovat (enzymová, fluorescenční a chemiluminiscenční immunoanalýza)

RIA ~ RADIOIMMUNOASSAY

ZAVEDENA 1959

Princip metody: spojuje jednoduchou imunologickou reakci Ag s Ab s metodikami radiochemie, která používá Ag nebo Ab značené radionuklidy

- citlivost: 10^{-9} - 10^{-17} mol/l → velmi významné, nejcitlivější
- je možné stanovit látky i v tělesných tekutinách /krev, moč, mozkomíšni mok.../ i v 10^{-12} (pikogramech)
- stanovujeme *jakékoliv látky, proti nimž lze vytvořit protilátku*
protilátku získáme komerčně nebo injekcí Ag či haptenu do králíka nebo morčete
- POSTUP:

V metodě je využito kompetice, kdy stanovený Ag a známé mn. téhož Ag značeného radioaktivním izotopem soutěží při tvorbě imunokomplexu o omezený počet vazebných míst specifické Ab (ta je v lim. množství)

1) imunizace ~ příprava Ab:

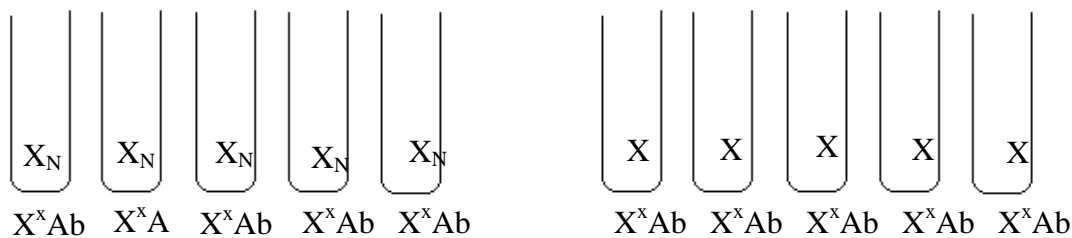
- injekce **Ag** či **haptenu** do zvířete /králík, morče/
- *nekompletní Ag – je potřeba navázat makromolekulární nosič*

2) značení radioaktivním prvkem (Ag = X...značka)

- 3 prvky: $^3H, ^{14}C, ^{125}I, ^{131}I$
- označený Ag $\rightarrow X^x$

3) vlastní reakce:

- 4 složky: $X^x, Ab_{lim60\%} / Abs/, X_N, X_S$
- 2 sady zkumavek, odlišné koncentrace v jednotlivých zkumavkách
- X_S slouží jako kontrola pro reakci s X_N



X^x značený Ag

$Ab_{lim60\%}$ protilátka ze zvířete /je limitováno ~ známo její množství/

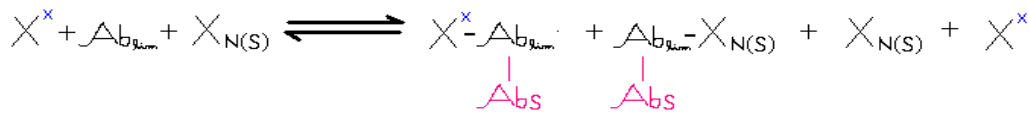
X_N neznámý antigen

X_S standardní antigen

4) oddělení IK:

- **imunochemické – sekundární protilátka Abs**

- vyrobí se proti prvotní protilátce Ab ~ Ab pak vystupuje jako Ag
 $\rightarrow Abs + Ab$...vznikají sraženiny IK

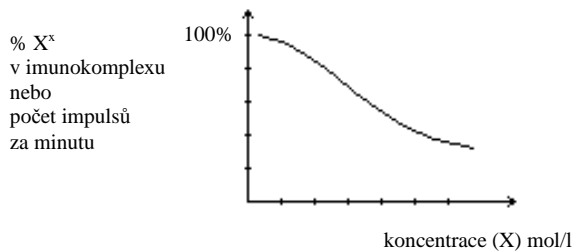


- izolace IK – *filt, centrifuga...*

• **molekulární metody** – *elektroforéza, chromatografie, centrifugace* .

5) vyhodnocení:

- čím **více molekul X** se bude v každé zkumavce nacházet, tím **méně molekul X^x** se bude moc **navázat s protilátkou**



- **VÝHODY:** * vysoká *citlivost, specifičnost, přesnost, automatizace procesů*
* *mikromnožství* látek přímo v biologických kapalinách

- **NEVÝHODY:** * *nakladné* zařízení, drahé přístroje, drahá scintilační tekutina
* *radioaktivní* materiál – zdravotní riziko, γ nebo β záření, zvl. bezpečnost při práci, likvidace radioakt. materiálu
* vlastnosti *radionuklidů* ~ *zhodnocování krátkým poločasem rozpadu* – časová náročnost (musí se provést hned), u izotopů vydávajících γ záření (¹²⁵I, ¹³¹I, ⁷⁵Se) je omezena expirace souprav krátkým poločasem rozpadu

VYUŽITÍ:

využití v kriminalistice, soudním lékařství (detekce jedovatých látek)
stanovování velmi malého množství látek (nízko i vysokomolekulárních) např.: kardiotonika, cytostatika (léčba infekčních onemocnění, nádorových onemocnění) hladiny hormonů, léčiv, vitamínů, drogy, minoritních složek séra, ve virologické diagnostice, vyšetření specif. autoprotilátek např. proti acetylcholinovému receptoru při *myastemia gravis*,
v alergodiagnostice: **RAST** test (radioallergensorbent test) je vyvinutý pro detekci Ab proti specifickému alergenu, **RIST** test (radioimmunosorbent test) je testem vyvinutým pro zjištění antigenu, **Radioimmunoprecipitace** je pokládána za nejpřesnější metodu pro stanovení IgE v sérech

Fluorescenční analýza - FIA – FLUORESCENCE IMMUNO-ASSAY

Vypracována v r. 1941, uvedena do praxe v 50. letech

Princip: navázáním fluoresceinu – fluorochromu na bílkovin séra (Ag nebo Ab), podmínkou je neztratit imunologické vlastnosti. Výsledkem je spojení vysoké specifity imunologických reakcí s citlivostí průkazu fluorescence pomocí fluorescenčního mikroskopu

- stejný princip jako RIA a EIA
- značku, kterou se označuje molekula Ab nebo Ag, tvoří fluorescenční sonda (nejčastěji fluoresceintiokyanát = FITC – vyvolává žlutozelenou fluorescenci nebo tetrametylrodaminizotiokyanát = TMRITC – oranžově červená, Phicoerythrin PE - oranžová
- detekce se provádí fluorimetry nebo počítači fotonů

přístroje :

- SPEKTROFLUOROMETR
 - měří fluorescenci vztaženou na celý preparát
- FLUORESCENČNÍ MIKROSKOP
- FLOWCYTOMETR – princip fluorescence je využíván v řadě detekčních systémů např.

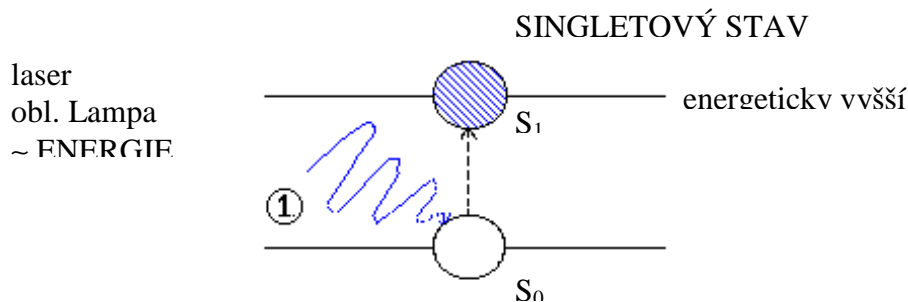
Podstata:

FLUORESCENCE

- třístupňový proces u **FLUOROFORŮ a FLUOROCHROMŮ**

- schopny absorbovat určité množství světla /struktura – ar. kruh/

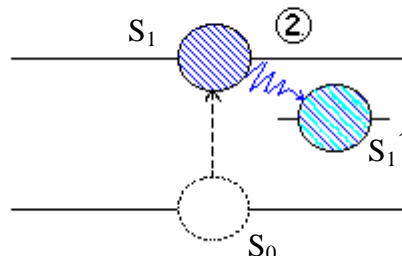
1, FÁZE → EXCITACE



2, FÁZE → DOBA EXCITOVANÉHO STAVU

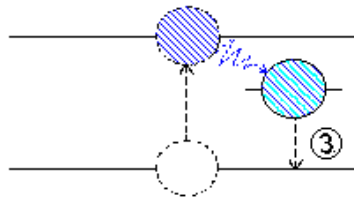
- trvá 10^{-9} s ~ velmi krátká

- *konformační změna*
- *disipace energie* → část energie se ztrácí – přechází na nižší stav



3, FÁZE → EMISE

- vyzáření energie, přechází na základní stav → vyzáření **EMISNÍ ENERGIE**
 /~ energie emisního spektra/



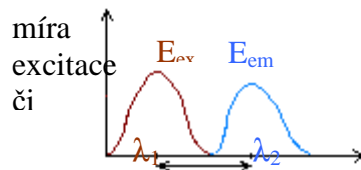
energie **EXCITAČNÍ** se **NEROVNÁ** **EMISNÍ !!!**

$$E_{ex} > E_{em}$$

$$h \cdot (c/\lambda_{ex}) > h \cdot (c/\lambda_{em})$$

$$\Rightarrow \lambda_{ex} < \lambda_{em} \Rightarrow \text{vl. délka excitační je menší než emisní}$$

→ základní poznatek **FLUORESCENCE**



STOKESŮV SHIFT $\lambda_2 - \lambda_1$

FLUORESCENCE

- je *cyklický proces* $\sim 10^4 - 10^5$ * možnost opakování – podle fotostability fluorescenční barvy málo stabilní \Rightarrow dojde k *vysvícení*, následuje *irreverzibilní destrukce* ~ **PHOTOBLEACHING**

DETEKCE FLUORESCENCE :

① **externí zdroj světla** – LASER, OBLOUKOVÁ LAMPA

② **FLUOROFOR**

③ **FILTRY** ~ separace vl. délek světla zajišťujícího detekci

Fluorescenční: jako zdroj excitace využívá lampu s výbojkou pro UV záření. Obraz fluoreskujícího objektu na tmavém pozadí získáme pomocí 2 komplementárních filtrů: **1. primárního excitačního** propouštějícího krátkovlnné záření a **2. sekundárního okulárového** zadržujícího emitované primárním filtrem pouze viditelné záření objektu.

FUNKCE FLUOROFORŮ :

Mají schopnost absorbovat světlo v UV oblasti a vyzařovat ve viditelné. Jsou vhodné k vizualizaci sledovaných objektů. Jsou látky schopné vyzařovat (emitovat) přebytečnou E jako záření o vyšší vlnové délky. Na konjugaci jsou vhodné pouze fluorochromy obsahující chemickou skupinu, která se pevně váže na bílkovinu. (Specificky se váží na určité struktury v BB \Rightarrow umožní jejich zviditelnění a další analýzu ~ vyšší fluorescence = více fluoroforu = více látky v BB)

- **background fluorescence** ~ fluorescence pozadí – je nežádoucí, musí se odfiltrovat

- 2 složky : • **AUTOFLUORESCENCE** samotného vzorku /flavony, flavoprot., NADH.../

• **REAGENT BACKGROUND** ~ reagenční pozadí / fluorofor se naváže tam, kam nemá, či se nenaváže tam, kam má /

Pozitivní reakce: se jeví ve fluoresc. Mikroskopu vyzařováním světla určité barvy typické pro použitý fluorochrom

FIA

- heterogenní techniky
- homogenní techniky

Mikroskopická IFA má 2 modifikace: **1. Přímá** a **2. nepřímá** IFA patří mezi heterog. techniky

Přímá

a) detekce Ag

Vyšetřovaná tkáň je fixovaná na sklíčku (Ag), přidáme známou značenou protilátku AbF, inkubujeme a promyjeme. Ve fluorescenčním mikroskopu pak pozorujeme pozitivitu vzorku - záření na sklíčku

\parallel Ag + AbF \rightarrow \parallel měření fluorescence

b) detekce Ab

známý značený Ag nebo haptén fixován na sklíčku HF nebo AgF převrstvíme vyšetřovaným sérem. Po inkubaci a promytí pozorujeme sklíčko pod fluor. mikroskopem

\parallel AgF, HF + Ab \rightarrow \parallel měření fluorescence

Nepřímá – průkaz Ab ve vyšetřovacím séru

Tkáň se známým Ag nebo buněčná kultura (suspenze jader. buněk) fixovaná na sklíčku převrstvíme vyšetřovaným sérem i kontrolními vzorky, následuje inkubace a promytí. Přidáme konjugát (sekund. Ab) s fluorochromem, opět inkubujeme a promyjeme a pak pozorujeme v mikroskopu

\parallel Ag + Ab + Ab_sF \rightarrow \parallel měření fluorescence

Použití: průkaz proti Ag buněčných jader

Význam využití: průkaz a titrace Ab, průkaz Ag např. ANA test – protilátky proti nukleárnímu Ag (fluorescenční reakce v oblasti jader)

Přímá: k průkazu Ag v tkáňových řezech (např. deponované IK) nebo v další biolog. Vzorcích pro rychlý průkaz patogenů ve sputu či bronchoalveolární laváži

Nepřímá: k průkazu autoprotilátek jak a) orgánově nespecifických (antinukleárních Ab proti mitochondriím, hladkému svalstvu b) orgánově specifických (ab proti parietálním b. žaludku, β buňkám pankreatu, bazální membráně glomerulů, slinným žlázám a pod)

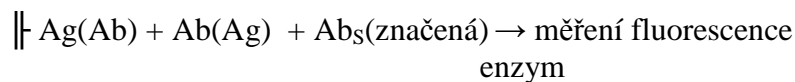
Imunofluorometrické analýzy (IFMA)

Použití: na detekci Ag, Ab, mikroorganismů, receptorů v tkáňových řezech.

Podstata: na tuhou fázi se imobilizuje primární Ab, která ze zkoumaného vzorku naváže specifický Ag (mikrob, virus, protein atd.) . Množství navázaného Ag se kvantifikuje pomocí značené sekundární Ab.

V případě stanovení Ab se na tuhou fázi naváže Ag, který ze vzorku vycytá Ab. Ty se kvantifikují pomocí antiizotypových značených Ab.

Tuhá fáze: polyakrylamidové kuličky, disky z polymetakrylátu.



Fluorescenčně – polarizační imunoanalýza (FPIA)

- využívá ozařování fluoroforu polarizovaným světlem. Absorbovaná energie se při návratu molekuly do neexcitovaného stavu uvolňuje ve formě polarizovaných fotonů. Tato sekundární polarizace je nepřímo úměrná době fluorescence a rotačnímu pohybu fluoroforového konjugátu. Pokud se fluorofor naváže na malou molekulu haptenu, jeho náhodné rotace snižují polarizační signál. Po vazbě na Ab se jeho rotace zpomalí a v důsledku toho se polarizační signál zesílí (měří se tedy zvýšení fluorescence po vazbě Ag na Ab) – rychlá, přesná kvantifikace látek s nižším Mr jak 20 000.

05 PRINCIPY A APLIKACE METODY EIA, ELISA PŘI DETEKCI AG A AB

Je to praktická realizace poznatků imunologie, enzymologie a fotometrie.

Vznik imunohistochemických metod:

V průběhu 70tých let s rozvojem klinické imunologie, virilogie, farmakologie a dalších oborů

Se zvýšily nároky na rychlost a kvalitu požadovaných laboratorních vyšetření. Klade se důraz na vysokou citlivost, specifitu a možnost automatizace.

Do té doby sloužily k detekci Ag a Ab klasické metody: KFR, neutralizace Ag pomocí specifické Ab, světelná či elektronová mikroskopie, prostá či elektroforetická imunodifuze, které byly nahrazeny imunohistochemickými metodami: FIA, RIA, EIA

IMUNOENZYMOVÉ METODY

Podstata: tyto metody pracují také s antigenem a protilátkou, které však stanovují na základě označení jednoho z reaktantů enzymem.

Výhody: ekonomičtější (levnější než RIA), časově méně náročná, stejně citlivá (10^{-12} mol/l), vysoká specifita jako u RIA (např. Ag s M_T 10 000 lze určovat už při koncentraci 10pg/ml). Jsou vhodné pro automatizaci a vyhodnocení přes počítač, bezpečnější, delší doba expirace, lepší kontrolovatelnost reakce.

Podmínky, které se musí splnit:

- pro každý typ EIA se musí zvolit nejvhodnější enzym
- musí se použít nejvhodnější způsob jeho vazby na Ag nebo Ab
- ve vzniklém konjugátu musí zůstat zachována specificky reagující místa, tj. determinanty na molekule antigenu nebo vazebná místa na molekule Ab
- musí vytvářet dostatečně intenzivní barevnou reakci se substrátem v prostředí chromogenu

dělení EIA: podle toho, zda aktivita enzymu v konjugátu zůstane nezměněná nebo jestli se změní

- homogenní EIA: katalytická aktivita v konjugátu (AgE nebo HE) po vazbě nebo ve vazbě s Ab se mění
- heterogenní EIA: katalytická aktivita v konjugátu (AgE nebo HE) po vazbě nebo ve vazbě s Ab se nemění

Homogenní EIA (EMIT – enzyme multiplied immunoassay technique):

- při této metodě se nemusí oddělovat volný reaktant od reaktantu vázaného v imunokomplexu – metoda má 1 krok → je homogenní
- enzymová aktivita konjugátu se po vazbě na Ab může snížit nebo zvýšit

Princip: enzymová aktivita volného konjugátu enzymu je jiná než aktivita komplexu konjugát-protilátka (v případě, že konjugát je tvořen AgE nebo HE).

Necháme-li zreagovat směs známého množství enzymem značeného haptenu (Ag) a neznámého množství neoznačeného haptenu (Ag) s limitovaným množstvím Ab, aktivita enzymu je přímo úměrná množství konjugátu navázaného na protilátku.

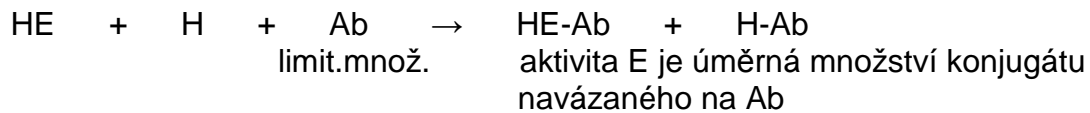
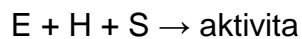
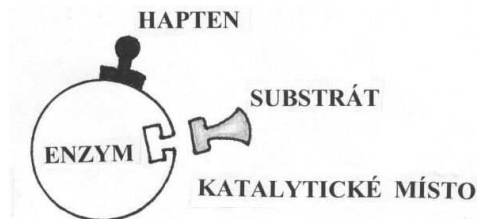


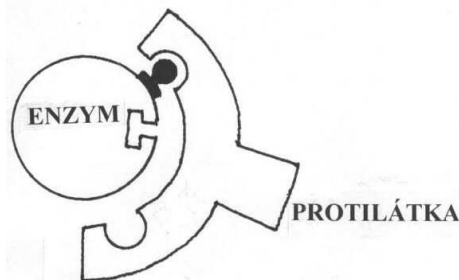
Schéma homogenní EIA

Enzymová aktivita konjugátu po vazbě na Ab se inhibuje:

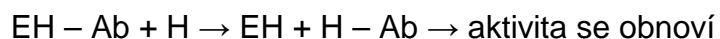
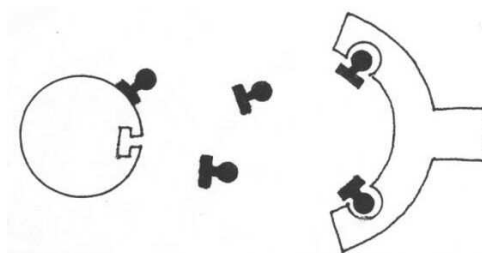
substrát se může vázat na katalytické místo enzymu a lze tuto aktivitu měřit



protilátka se navázala na konjugát E + H. Zabránila tak přístupu substrátu ke katalytickému místu enzymu. E aktivitu nelze měřit (inhibice).

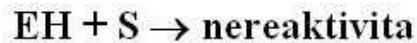
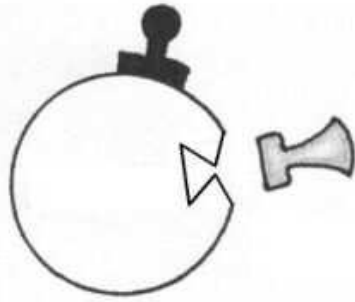


Přidaný volný H vytěsňuje z vazbových míst protilátky konjugát EH a tím se uvolní katalytické místo pro S a Enzymová aktivita se obnoví

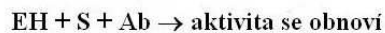
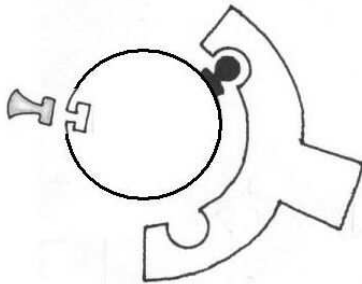


Enzymová aktivita konjugátu po vazbě na Ab se aktivuje

substrát se nemůže navázat na katalytické místo enzymu, neboť vazbou H vznikly v molekule enzymu také konformační změny, které znemožňují vazbu. E aktivita je neměřitelná.



Vazbou haptenu na Ab vznikly opět konformační změny, které umožňují přístup substrátu ke katalytickému místu. E aktivita je měřitelná.



Použitý enzym: lysozym, malátdehydrogenáza, glukózo-6-fosfátdehydrogenáza.

Použití: na kvantitativní stanovení především nízkomolekulárních látek (haptenu), např. určení koncentrace antibiotik, omamných látek, hypnotik, sedativ, kardiotonik, cytostatik a hormonů jako tyrozin, trijódtyronin, kortizol aj.

Výhoda: jednoduchost, rychlost (trvá několik minut) – heterogenní trvá několik hodin.

Nevýhoda: nižší citlivost, složitá příprava reagentů

Heterogenní EIA

Zde se musí oddělit volný označený reaktant od značeného reaktantu vázaného v komplexu s Ab. Technika je dvoustupňová – heterogenní.

Způsob oddělení: -

1. precipitací imunokomplexů polyetylen glykolem
2. pomocí druhé – sekundární Ab
3. nejčastější: imobilizací jedné z dvojic reaktantů navázáním na tuhý nosič (stěna zkumavky, jamka destičky). Oddělení volné a vázané označené složky se uskutečňuje promytím. Jde o princip imunoabsorbentové analýzy = ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY - ELISA

Požadované vlastnosti enzymů: malá reaktivní hmotnost, vysoká stabilita a enzymová aktivita, kovalentní vazba na Ab a (hapteny) Ag, produkt enzymové reakce musí být barevný či jinak detekovatelný.

Používané enzymy: peroxidáza (křenová), alkalická fosfatáza, β -D-galaktózidáza atd.

Základní složky systému ELISA

Imunosorbční povrch (pevná fáze): používá se upravený polystyrén ve formě mikrotitračních destiček, kuliček, hřebenů, pruhů. Důležitá je vhodná polymerizační teplota a délka polymerizace. Při přehnaně vysokých sorbčních vlastnostech by docházelo k navázání nežádoucích látek, a tím ke snížení citlivosti a specifity reakce. Při nízkých sorbčních vlastnostech by nezabezpečovalo dostatečně souvislý a stabilní imunosorbční povrch (nestabilita a nespolehlivost systému vede k snížení citlivosti a reprodukovatelnosti).

Konjugát: specifická Ab (mono- nebo polyklonální) navázaná na enzym tak, aby nebyl porušena původní schopnost Ab vázat se s Ag. Použit se dá enzym, který po reakci se substrátem vytváří v přítomnosti vhodného chromogenu dostatečně intenzivní barevnou reakci (nejvhodnější enzymy: křenová peroxidáza a alk. fosfatáza).

Substrát: při použití konjugátu s peroxidázou jako chromogen slouží ortofenyléndiamin hydrochlorid = OPD, který v přítomnosti peroxidu vodíku jako substrátu – katalyzátoru vyvolá barevnou reakci.

Přístroje: ELISA – reader je spektrofotometr upravený na odečítání absorbance v reakčních jamkách. Filtry jsou nastavené s volitelnou vlnovou délkou optimální pro určitý ELISA systém (obvykle mezi 405 až 570 nm) v závislosti na typu použitého konjugátu a substrátovo - chromogenním roztoku.

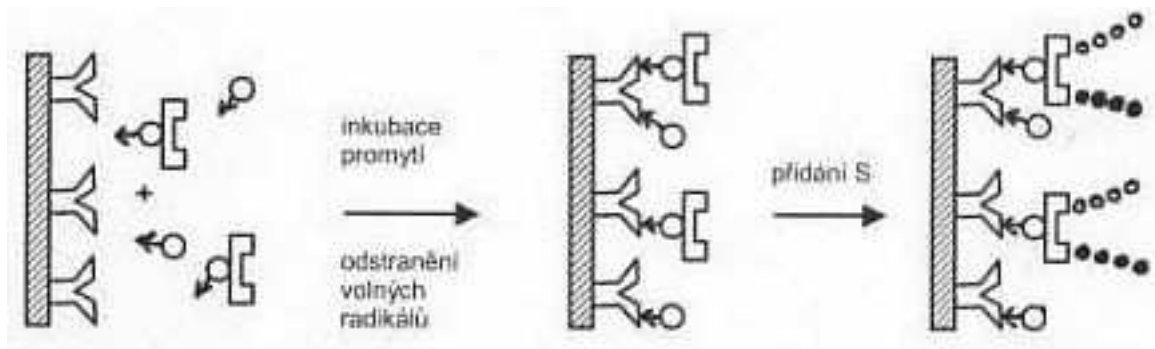
Typy ELISA:

- kompetitivní ELISA pro Ag a hapteny
- 4. sendvičová ELISA pro Ag (kompetitivní a nekompetitivní)
- 5. nepřímá ELISA pro Ag
- 6. sendvičová ELISA pro Ab = nepřímá pro Ab
- 7. ELISA pro zachycení IgM

Použití:

- 1.) při průkazu neinfekčních Ab (Ag) – inzulin, hormony, α -fetoprotein
- 2.) Stanovení autoprotilátek
- 3.) Při diagnostice onemocnění vyvolaných obtížně kultivovatelnými původci (viry hepatitidy, borrelie, mykoplazmata atd.)
- 4.) Průkaz virů, bakterií a parazitických nákaz

Kompetitivní ELISA pro Ag a hapteny – stanovení Ag



Na tuhou látku se naváže Ab specifická pro Ag, který se má stanovit

Pak se přidá známé množství enzymem značeného Ag (AgE) a buď známé (standardní) množství nebo neznámé (analyzované) množství neoznačeného Ag (Ag)

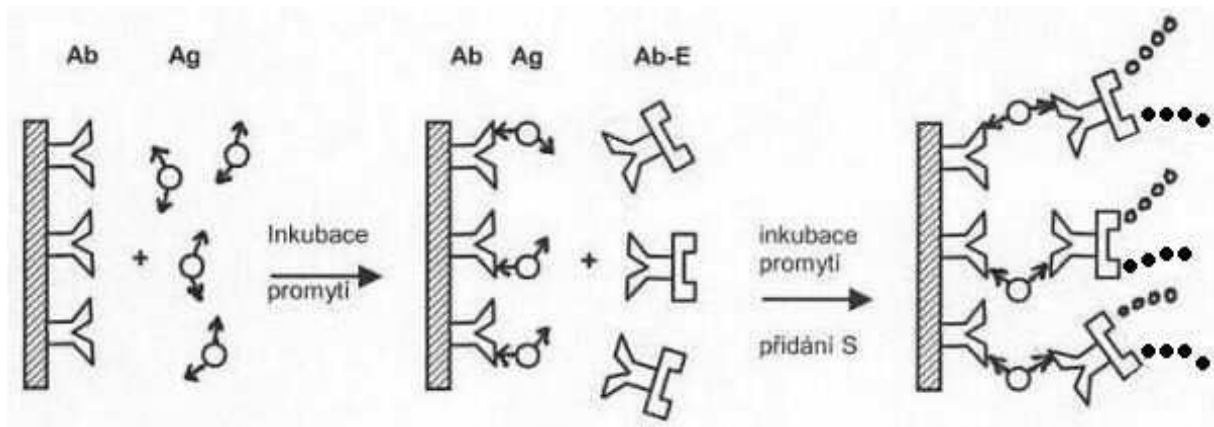
V průběhu inkubace soutěží značený s neoznačeným (standardním či zkoumaným) Ag. Po promytí zůstávají jen Ag vázané na Ab.

Pak se přidá roztok substrátu, který enzym přítomný v imunokomplexech rozloží za vzniku barevného produktu.

Intenzita (absorbance) zbarvení roztoku s produktem enzymové reakce se měří spektrofotometricky. Z hodnot absorbancí naměřených v jamkách se známým (standardním) množstvím Ag se sestrojí analytická čára (kalibrační křivka), pomocí které se určí koncentrace analyzovaných roztoků Ag.

Použití: na kvantitativní stanovení nízkomolekulárních látek (stanoven hormonů: tyrozin, trijódtyrozin, prolaktin, inzulin atd, léků: teofylin, digoxin aj., a proteinů: IgE, AFP, CEA)

Sendvičová ELISA pro antigeny



Na tuhou fázi se naváže Ab.

Na ni se potom navazuje známé nebo neznámé množství antigenu. Promytí.

Přidá se volná enzymem značená Ab, která reaguje s volnými hapteny antigenu imobilizovaného vazbou do komplexu s Ab. Inkubace, promytí, přidání S.

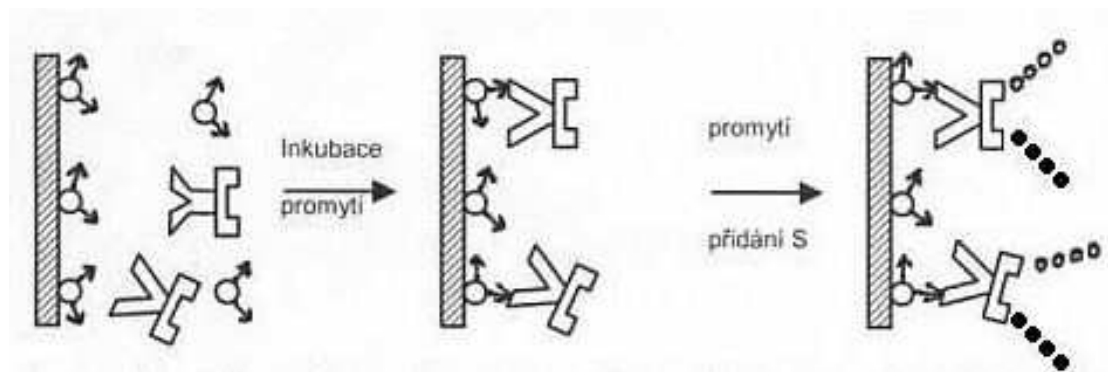
Přidá se substrát na detekci enzymové aktivity.

Z naměřených hodnot standardních vzorků se sestrojí analytická čára (kalibrační křivka), podle které se vyhodnotí vzorky s neznámou koncentrací zkoumaného Ag.

Výhoda: nemusí být k dispozici značený čistý Ag. Stačí jen standardní Ag třeba i ve složité směsi jiných Ag (například lidské sérum). Musí v něm však být přesně známý obsah analyzovaného Ag. Ab se může označovat enzymem vždy tou stejnou konjugační reakcí.

Nutnost: obě Ab musí mít stejnou specifickost. Ag musí mít nejméně 2 determinanty (reagují s ním 2 molekuly Ab).

Nepřímá ELISA pro antigeny (kompetitivní) , vyjadřuje se jako % inhibice



Ag se naváže na tuhou fázi a reakční prostor se promyje. Pokud jde o malý Ag, naváže se předem na větší nosič, např. BSA-bovinní sérový albumin.

Zkoumaný roztok, ve kterém se předpokládá přítomnost Ag, se míchá se specificky značenou Ab a směs se inkubuje s imobilizovaným Ag.

Inkubace, promytí a přidání substrátu, čímž se vyvolá barevná reakce.

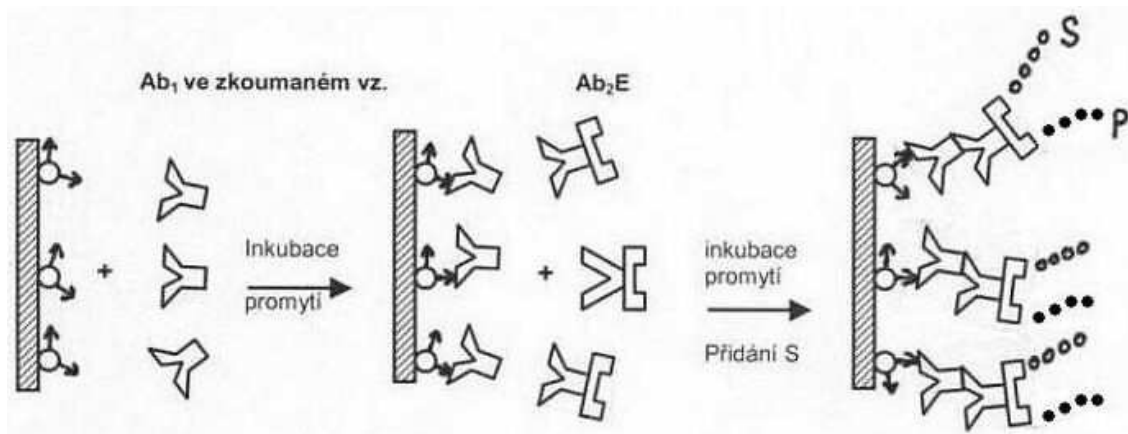
Rozdíl naměřené absorbance ve vzorku s volným Ag a v kontrolní jamce (bez volného Ag) určuje množství Ag ve zkoumaném vzorku. Je to kompetitivní ELISA, ve které o vazbová místa Ab soutěží Ag ve zkoumaném vzorku (volný) a Ag imobilizovaný. Čím víc Ag bude ve vzorku, tím méně Ab se může navázat na imobilizovaný Ag a tím menší barevná intenzita bude v reakčním roztoku. Nejvíce zbarvený roztok bude v kontrolní jamce, kde reakční směs neobsahovala volný Ag. Modifikace: místo označené Ab se použije neoznačená Ab (např. králičí IgG) a imobilizované Ag se detekují pomocí označeného Ig ve funkci sekundární Ab (např. prasečího IgG proti králičímu IgG).

Výhoda: možnost použití komerčně dostupné označené Ab.

Modifikace: Ag + sérum + AbE + S → barevná reakce
virus + IgG + anti IgGE + S → barevná reakce

Sendvičová ELISA pro protilátky

Neboli nepřímá ELISA na detekci Ab – slouží na důkaz neboli titraci Ab specifických pro určitý Ag. Antigen se naváže na tuhou fázi a promyje. Další postup ukazuje obrázek:



Antigen se naváže na tuhou fázi a promyje.

Přidá se zředěné sérum, ve kterém se má určit přítomnost Ab.

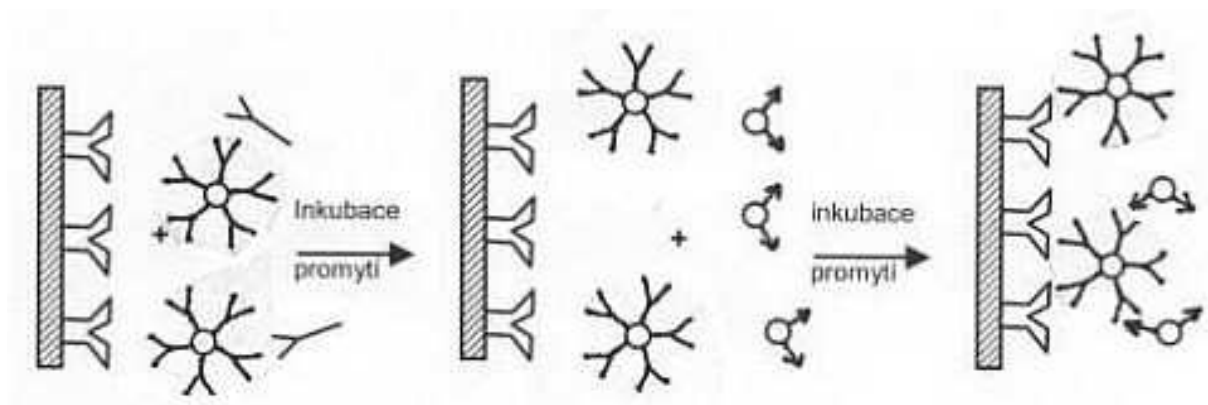
Inkubace, promytí – přitom dochází k navázání na imobilizované Ag

Přidá se enzymem značená sekundární Ab, promytí

Přidá se enzymový substrát a změní se intenzita barevné reakce.

Použití: na titraci Ab třídy IgG a IgM.

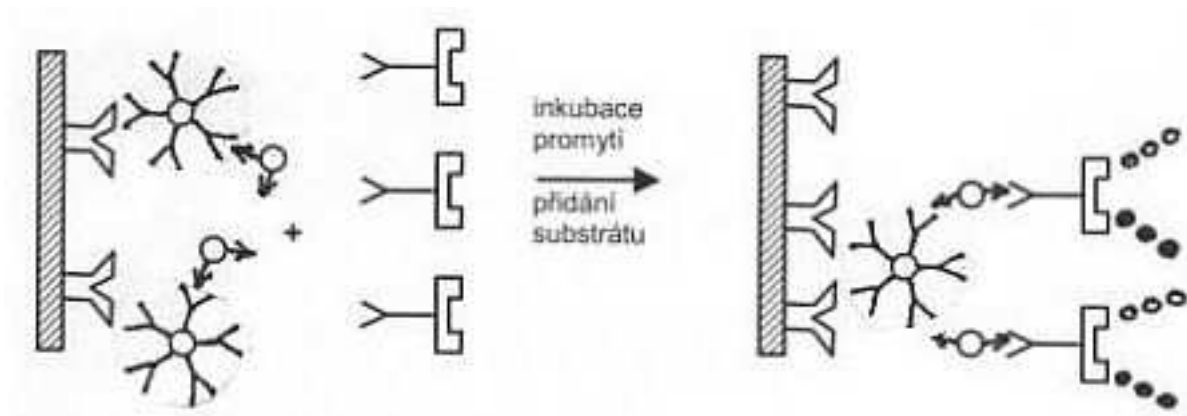
ELISA na zachycení protilátek IgM



Na tuhou fázi se naváží anti-IgM Ab

A tou se z vyšetřovaného séra vychytá IgM.

Přidá se roztok antigenu, který se naváže na ty imobilizované Ig, které mají pro ně specifické vazbové místo, promytí



Přidá se specificky značená Ab proti Ag. Inkubace, promytí

Aplikací substrátu se vyvolá barevná reakce. Její intenzita je úměrná množství antigeně specifického IgM immobilizovaného v druhém kroku metody.

V praxi použití: na důkaz Ab proti některým virovým Ag, např. proti viru hepatitidy A.

Teorie k základnímu cvičení z imunity

IMUNOENZYMOVÉ METODY

Podstata: tyto metody pracují také s antigenem a protilátkou, které však stanovují na základě označení jednoho z reaktantů enzymem.

Výhody: ekonomičtější (levnější než RIA), časově méně náročná, stejně citlivá (10^{-12} mol/l), vysoká specifita jako u RIA (např. Ag s M_r 10 000 lze určovat už při koncentraci 10pg/ml). Jsou vhodné pro automatizaci a vyhodnocení přes počítač, bezpečnější, delší doba expirace, lepší kontrolovatelnost reakce.

Podmínky, které se musí splnit:

8. pro každý typ EIA se musí zvolit nejvhodnější enzym
9. musí se použít nejvhodnější způsob jeho vazby na Ag nebo Ab
10. ve vzniklém konjugátu musí zůstat zachována specificky reagující místa, tj. determinanty na molekule antigenu nebo vazebná místa na molekule Ab
11. musí vytvářet dostatečně intenzivní barevnou reakci se substrátem v prostředí chromogenu

dělení EIA: podle toho, zda aktivita enzymu v konjugátu zůstane nezměněná nebo jestli se změní

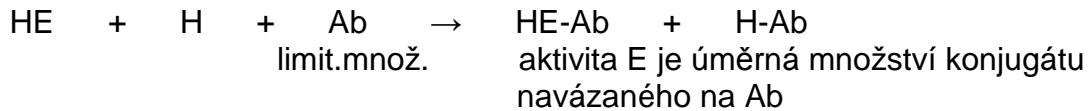
12. homogenní EIA: katalytická aktivita v konjugátu (co je konjugát-vysvětlit) s Ab se mění
13. heterogenní EIA: katalytická aktivita v konjugátu s Ab se nemění

Homogenní EIA (EMIT – enzyme multiplied immunoassay technique):

14. při této metodě se nemusí oddělovat volný reaktant od reaktantu vázaného v imunokomplexu – metoda má 1 krok → je homogenní
15. enzymová aktivita konjugátu se po vazbě na Ab může snížit nebo zvýšit

Princip: enzymová aktivita volného konjugátu enzymu je jiná než aktivita komplexu konjugát-protilátka.

Necháme-li zreagovat směs známého množství enzymem značeného haptenu (Ag) a neznámého množství neoznačeného haptenu (Ag) s limitovaným množstvím Ab, aktivita enzymu je přímo úměrná množství konjugátu navázaného na protilátka.



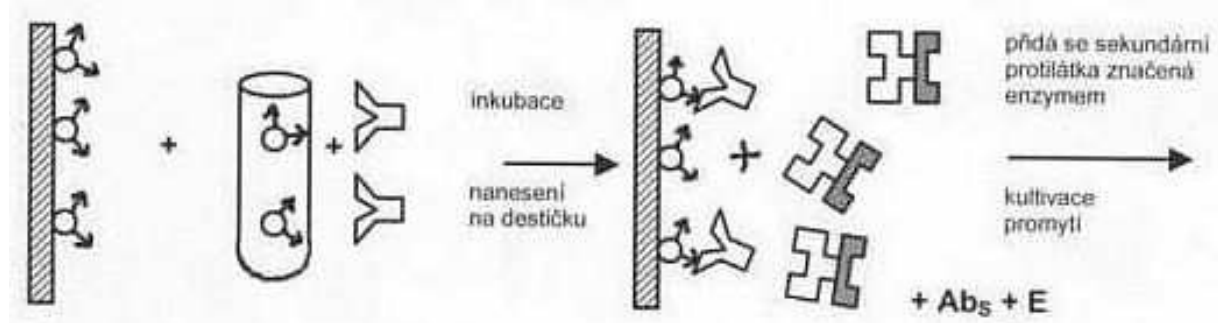
ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

Enzymoimunosorbentová analýza, patří mezi heterogenní EIA (enzyme immuno analysis).

Vlastnosti: musí se oddělit volný označený reaktant od značeného reaktantu vázaného v komplexu s Ab (Ag). Nejčastějším způsobem dělení je imobilizace jedné z dvojice reaktantů navázáním na tuhý nosič (jamka destičky). Volná a vázaná složka se oddělí promytím.

Rozeznáváme 5 typů metody ELISA.

NEPŘÍMÁ ELISA pro Ag – (kompetitivní)

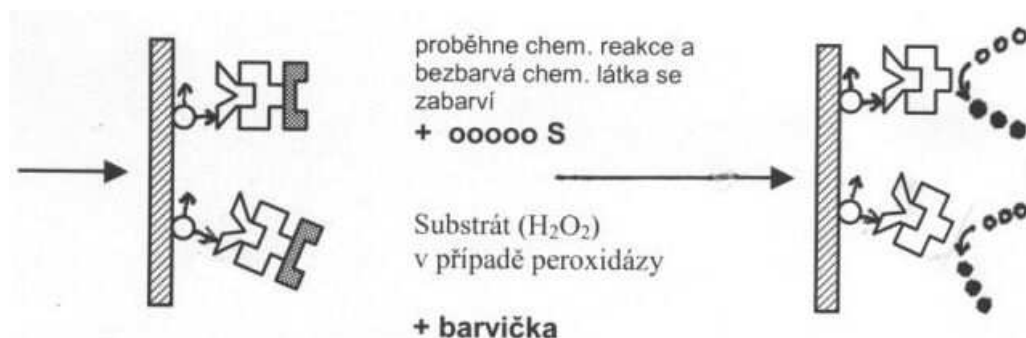


Ag na destičce se naváže na tuhou fázi a reakční prostor se promyje. (Malý Ag se naváže na větší. Nosič = BSA)

Ve zkumavce se připraví směs Ag a Ab o určité koncentraci a nanese na destičku. Pokud si odpovídají, dojde při kultivaci k reakci. Po kultivaci se směs Ag a Ab nanese na destičku.

Pokud si Ag s Ab ve zkumavce neodpovídají, Ab se naváže na Ag na destičce. Jde o kompetitivní metodu ELISA, protože o vazebná místa Ab soutěží s Ag ve zkoumaném vzorku (volný) a imobilizovaný na destičce.

Čím více Ag bude odpovídat Ab, tím méně Ab se naváže na destičkový Ag a tím menší barevná intenzita se nachází v reakčním roztoku (tj. největší procento inhibice)



Nejvyšší intenzita barvy bude v kontrolním vzorku (dává se na imobilizovaný Ag jen čistá Ab), a to je 0%. Nejmenší hodnota bude v blanku (tj. prostředí reakce), to je 100%.

PŘÍMÝ TEST ELISA

Pro zjištění max. množství Ag, který se může navázat do jamek destičky, pro ideální zjištění zředění konjugátu

Reakce:

Ag + AbE

		5 µg →	2,5 µg →	1,25 µg →	0,675 µg →								bez Ag
1/400	A												
1/800	B												
1/1600	C												
	D												
	E	K											
	F	K											
	G	BL	I										
	H	BL											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

Příprava Ag:

Jako Ag vystupuje sérum a sekundární protilátka s enzymem (konjugát) nebo jakýkoliv antigen a proti němu protilátky s navázaným enzymem

- 50 µg karbonátového pufru do každé jamky předem
- naředit Ag v karbonátovém pufru do výsledné koncentrace – 10 µg/ml
- připravit 50 µl ředěného Ag do sloupce 1 (8x promíchat)
- přenos 50 µl do sloupce 2, atd až do sloupce 11
- 12. sloupec neobsahuje Ag.
- nechat přes noc

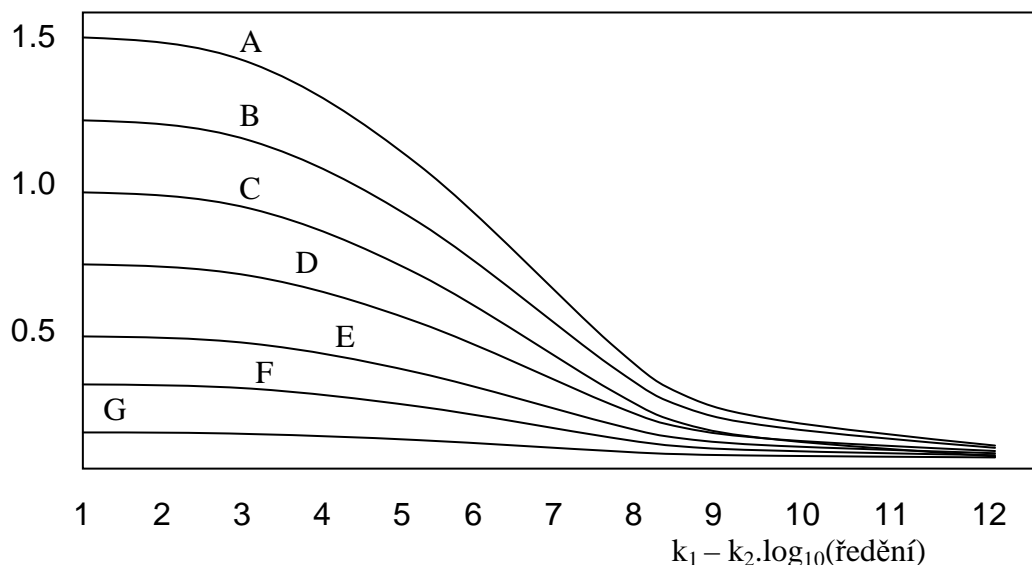
Příprava AbE:

- konjugát naředit v poměru 1/200 v blokovacím roztoku (1 ml blokovacího pufru + 5 µl konjugátu)
- do každé jamky nanést 50 µl blokovacího roztoku
- do řady A nanést 50 µl ředěného konjugátu 1/200 (výsledná koncentrace je 1/400 v řadě A
- přenášet 50 µl z řady A → B → C atd.
- nezapomenout na BI a K

K=kontrola je 100% reagující Ag s Ab

BI=bez AbE nebo Ag jen s fyziologickým roztokem

Výsledek:



Vyhodnocení:

Křivky reprezentují titraci rozdílného ředění konjugátu proti každému ředění Ag.

Můžeme zjistit:

- Maximální množství Ag, které se může navázat na stěnu jamek (vazebná kapacita plastu – kolísá od proteinu k proteinu).
- Konečný bod titrace konjugátu v určitém ředění ukazuje stejná hodnota při nejnižší koncentraci Ag.
- Ve sloupci bez Ag barva znamená nespecifické adsorpce konjugátu (při nižších ředěních vznikají problémy nespecifických vazeb). V ostatních koncentracích hodnoty A charakterizují pozadí destiček.
- Při nízkých koncentracích Ag dochází ke ztrátě citlivosti (schopnost reagovat s Ag).

Vyžaduje se:

1. vysoké hodnoty (kolem 1,5 A)
2. hodnoty bez nespecifických vazeb konjugátu
3. optimální ředění konjugátu
4. optimální ředění Ag - u A = 1 – 1,5 OD

Takto můžeme zjistit optimální ředění Ag a Ab pro nepřímý test ELISA. Konjugát však musí být zaměřen proti Ag nebo antigenem musí být sérum.

„BOX titrace“ přímý test ELISA

Tato technika se používá pro stanovení optimální koncentrace vazebného Ag a konjugátu

Řed.séra		1	2	3	4	5	6
100	A	P	N	P	N	P	N

50	B						
25	C						
12,5	D						

tj Ab proti Ab_sE

sérum

Ab= Ag = sérum

P = pozitivní sérum

N = negativní sérum

- do řady A se aplikuje sérum v koncentraci 100 µg/ml
- do řady B se aplikuje sérum v koncentraci 50 µg/ml, atd, do poslední řady H se nedává sérum
- do sloupce 1 se dává pozitivní kontrola (sérum)
- do sloupce 2 se dává negativní kontrola (sérum) (Pozn.: pozitivní kontrola musí obsahovat poměrně málo Ab (Ag), aby jejich hodnota byla uprostřed kalibrační křivky. V praxi to bývá okolo 10 – 20ng/ml)

Konjugát

- do sloupců 1 – 2 se aplikuje konjugát o určité koncentraci
- do sloupců 3 – 4 se aplikuje konjugát o poloviční koncentraci
- do sloupců 5 – 6 se aplikuje konjugát o čtvrtinové koncentraci (optimální koncentrace konjugátu se pohybuje v rozmezí 0,1 – 10 µg/ml)

Co se vyžaduje:

- musí se nalézt podmínky testu tak, aby negativní kontroly měly absorpenci 0,05 – 0,150 a maximální pozitivní hodnoty nad 1,0.

Dodržování podmínek: vždy použít blank

- bez Ag, s Ab_s
- bez Ab_s s Ag

Nepřímý test

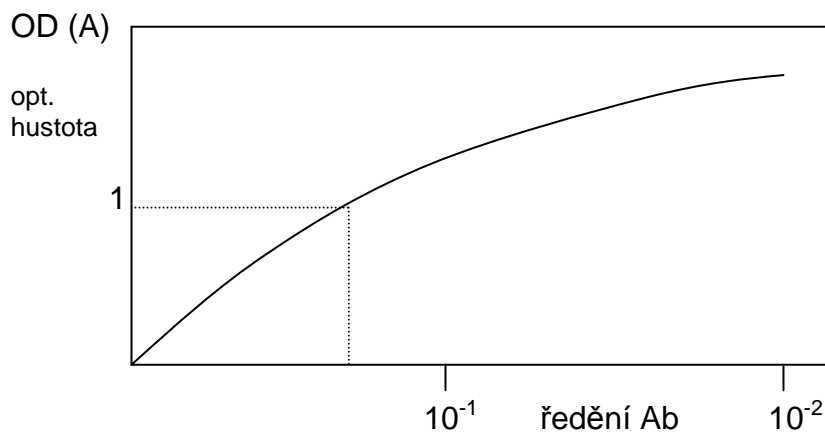
Reakce: Ag + Ab + Ab_s

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10x +	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
B	50x											
C	100x											
D	150x											
E	200x											
F	250x											
G	300x											x
H	350x										x	x
	1:100		1:500		1:1000		1:2000		1:5000		nic	

- 1.) Naneseme na destičku Ag o známé c: + s Ag (1-2 µg/ml), - bez Ag
- 2.) Ředění Ab (sérum) 10x, 50x, 100x, 150x, 200x, 250x, atd. do jamek A, B, C, D
- 3.) Ředění Ab_s: 1:100, 1:500, 1:1000, 1:1500, 1:2000

4.) Blank x : 1.) bez Ab_s, 2.) s Ab (sérem), 3.) bez Ag

Výsledek: pokud křivka stoupá, Ab vykazuje dostatečnou specifitu a afinitu



Nepřímý test ELISA

Kompetitivní inhibice mezi antigeny

Reakce: $Ag_1 + Ag_2 + Ab + Ab_s$

1.) Nanést Ag na destičku (př. *B. afzelii*) v optimální koncentraci navázat, pak 2 kroky

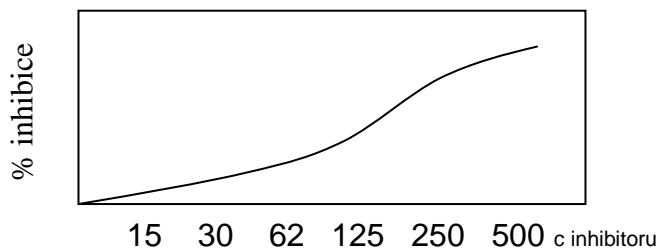
- 50 μ l kompetitoru (druhý Ag, např. *B. garinii*) o různé koncentraci: 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml V řádcích A, B, C, 1 hodina kultivace
- nanést 50 μ l Ab (ve správném ředění dle předchozího pokusu)
- Ab_s v optimálním ředění (ve správném ředění dle předchozího pokusu)

	1	2	3	...			12
A	500 pg Ag	500	500				BL
B	250 pg	250					BL
C	125 pg						BL
D	62,5						BL
	...						

Hodnocení:

Čím vyšší % inhibice (nižší OD), tím silnější druhý Ag a naopak: čím vyšší OD, tím silnější Ag na destičce už navázaný.

Použití mléka na vysycení: 3% roztok ve vazebném roztoku, v blok. pufru je 0,3 %



STANOVENÍ IDEÁLNÍ KONCENTRACE AG NEPŘÍMOU METODOU ELISA

Pozn.: v případě stanovení Ab proti borreliím a použití borrel. Ag na destičky můžeme testovat optimální koncentraci pomocí nepřímé metody ELISA. Po zjištění optimální koncentrace Ab a AbsE „box titrací“ nanese se na destičku s různou koncentrací Ag tyto optimální hodnoty

Ag + Ab + AbsE

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	C _{Ag}
1													10
2													μg/ml
3													5
4													μg/ml
5													2,5
6													μg/ml
7													1,25
8													μg/ml
nebo	10 μg		5 μg		2,5 μg		1,25 μg		0,6 μg		0,3 μg		

Alergie

Stav přecitlivělosti (hypersenzitivity) organismu na určitou látku - alergen.

Podstatou je porucha řízení imunitního systému vedoucí k nadměrným reakcím poškozujícím organismus či určité orgány.

Působení alergenů se musí kombinovat s dalšími faktory vnitřními (geny) a vnějšími (zevní prostředí).

V první fázi alergické reakce dochází k senzibilizaci, vytvoření paměťových lymfocytů B pro tvorbu specifických IgE protilátek. Při druhém a dalším setkání s alergenem již tato reakce probíhá bouřlivě s typickým alergickým až anafylaktickým průběhem.

Typy hypersenzitivních reakcí

Samotné rozdělení je problematické, protože se různé typy překrývají (až 6 různých typů).

- I. typ** - stavy vyvolané anafylaktickou (časnou, protilátkovou) přecitlivělostí
- II. typ** - stavy vyvolané cytotoxickou protilátkovou přecitlivělostí
- III. typ** - stavy přecitlivělosti vyvolané imunitními komplexy
- IV. typ** - pozdní, oddálená hypersenzitivita, DTH (delayed type hypersensitivity)
– stav vyvolaný pozdní buněčnou přecitlivělostí



Hypersenzitivita I. typu - anafylaxe - atopie - reakce časného typu

Je to nejběžnější typ alergických reakcí, je především závislá na IgE a v jejím průběhu dochází k masivnímu uvolnění produktů degranulace bazofilů a mastocytů.

1. Senzibilizace (indukční fáze)

- a) Prezentace Ag (alergenu) Th2 lymfocytům prostřednictvím antigen prezentujících buněk (APC).
- b) Vazba alergenu na molekuly MHC II a následně sekrece IL-4 a IL-13, které aktivují B lymfocyty k produkci IgE.
- c) Vazba IgE (s navázaným Ag nebo bez něj) na membrány bazofilů a mastocytů. Navázáním IgE jsou mastocyty a bazofily senzibilizovány a připraveny k reakci, která nastane při dalším setkání s alergenem.

2. Vlastní reakce časného typu

- a) Navázání alergenů na oblasti IgE, které jsou ukotveny na mastocytech a bazofilech (napojit se mohou přímo i protilátky s navázaným alergenem).
- b) Přemostění sousedních na buňku navázaných molekul IgE alergenem (k aktivaci mastocytů může docházet i vznikem křížové vazby IgE s alergenem specifickou IgG).
- c) Aktivaci mastocytů a bazofilů, exocytóza granul, uvolnění histaminu, heparinu aj. Během aktivace mastocytů se syntetizují cytokiny, chemokiny a lipidové mediátory. IL-4 indukuje isotypový přesmyk a další tvorbu IgE, čímž dochází k amplifikaci reakce.
- d) Několik hodin po expozici alergenem aktivace T-lymfocytů, čímž je zahájena pozdní část reakce - aktivace epitelových buněk (především v dýchacích cestách, při reakcích na aeroalergeny), chemotaxe a aktivace zánětlivých buněk. Během reakce typu I v dýchacím traktu výrazně statisticky vzrůstá počet MHC II pozitivních T-lymfocytů.

Systemová reakce - anafylaktický šok

Reakce antigenů a protilátkami v oběhovém systému a ve všech tkáních.

Protilátky musí být přítomny ve velkém množství - projev až po mnohokrát opakované imunizaci nebo u vysoce senzibilizovaných jedinců.

Antigenů musí být mnoho, nebo musí být vysoce účinný (vysoká afinita k protilátkám).

Během anafylaxe se uplatňují především IgE u člověka, psů, králíků, krys a myší a IgG u morčat.

K anafylaxi může dojít i po náhodném proniknutí alergenu do krevního oběhu během hyposenzibilizace, nebo při testování přecitlivělosti.



Hypersenzitivita II. typu – cytotoxická hypersenzitivita

Typická reakce autoimunitních chorob a imunitních eliminací krve a tkání při transfuzi a transplantaci.

Tvorba IgG a IgM, které mají schopnost aktivovat komplement, nebo způsobovat na protilátkách závislou buněčnou cytotoxicitu (ADCC). Fagocyty a NK-buňky vážou Fc-části IgG - rozpoznání buňky označené protilátkami a její likvidace svými cytotoxickými mechanismy.

Možná příčina jsou děje navazující u některých přecitlivělých jedinců na nákazy určitými viry, bakteriemi nebo parazity. popř. odpovědi na podávání určitých léků (neimunogenní složka infekčního agens nebo lékový metabolit se napojí na buněčnou membránu a vzniklý komplex projeví imunogenní vlastnosti, jindy se na membránu naváže komplex cizorodých složek s protilátkami).

Vlastní cytotoxická reakce může být vyvolána různými mechanismy.

a) Protilátky proti povrchovým strukturám buněk aktivují komplement, který způsobí lýzu buněk.

b) Destrukce cílových buněk může být zprostředkována ADCC, v níž efektorové buňky s navázanou protilátkou přes Fc fragment vyvolají cytotoxickou reakci s produkcí perforinu, TNF, případně reaktivních radikálů kyslíku při ox. vzplanutí.

c) Protilátka může působit jako opsonin a aktivovat fagocytózu, která je uskutečňována především neutrofilními granulocyty, v menší míře makrofágy a eozinofily, pokud mají receptory pro IgM, IgG, nebo C3 složku komplementu.

Klinické příznaky se projevují, jakmile cytotoxická reakce poškodí kritické množství tkáně a vyvolá dysfunkci atakovaných buněk či tkání. První reakce se mohou objevit po 5 až 8 hodinách.

Hypersenzitivita III. typu

1. Reakce s tvorbou imunokomplexů

Podobná atopii (reakce typu I), ale způsobena protilátkami IgG a IgM. Protilátka s antigenem tvoří imunokomplexy. V závislosti na jejich množství, velikosti, struktuře a fyzikálně-chemických vlastnostech může dojít místo eliminace fagocytujícími buňkami k jejich ukládání do tkání. Imunokomplexy se pak vážou na Fc receptor fagocytů nebo aktivují komplement, který spouští kaskádu poškozujících reakcí, v níž hlavní roli hrají přilákané neutrofilie a pomocnou úlohu mají aktivované mastocyty. Dochází k zánětu, který může při přetrvávání velkých nefagocytovatelných komplexů přecházet do chronického stavu.

2. Aktivace krevních destiček a granulocytů imunokomplexy během vaskulitidy (zánětu cévy)

Zvláštním typem reakce je sérová choroba. Může se objevit po aplikaci velkých dávek antigenu (léčebné použití heterologních antisér). Příčinou vzniku je zvýšená tvorba imunokomplexů perzistujícího antigenu a nově vytvořených protilátek. Obvykle se objevuje 5 až 15 dní po aplikaci a způsobuje vaskulitidy, glomerulonefritidy a artritidy, tím může maskovat perzistentní infekci, proti níž bylo léčebné sérum použito. Morfologicky lze v cévách postižených oblastí prokázat poškození imunokomplexové povahy. Masivní ukládání komplexů je pak provázeno granulocytopenií a poklesem komplementu. U části případů se účastní i anafylaktické mechanismy podmíněné faktory krevních destiček, mastocytů a granulocytů. Při značném nadbytku antigenu v komplexech probíhá onemocnění mírněji, při mírném nadbytku antigenu a při rovnovážném stavu mezi antigeny a protilátkami hrozí prudký průběh.

Hypersenzitivita IV. typu – pozdní, zprostředkovaná buňkami

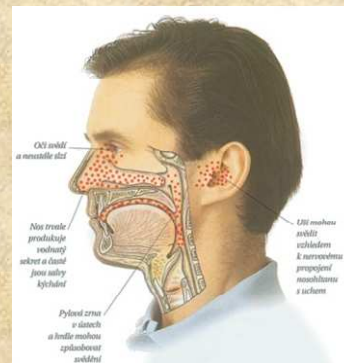
Tento typ lokální reakce je způsoben zánětlivou reakcí závislou na Th1 buňkách a monocyttech. Po intradermální, nebo kontaktní aplikaci antigenu nastává maximální reakce po 24 až 72 hodinách proto, že do místa vpichu musí nejprve migrovat Th1 buňky a makrofágy a vzájemně se stimulovat.

Senzibilizace spočívá v prezentaci antigenu Th lymfocytům a jejich přeměně v lymfocyty typu Th1. Senzibilizované lymfocyty po další aktivaci antigenem zahájí vlastní reakci produkcí cytokinů, které vtahují do místa reakce makrofágy a aktivují je ke zvýšené fagocytární aktivitě a lytických enzymů. Vzniká tvrdý otok způsobený buněčnou infiltrací. Tato reakce je normálně namířena proti intracelulárním parazitům, které aktivované makrofágy dokáží usmrtit. Pokud se tak z různých důvodů nestane, dochází později k lokálnímu poškození tkáně až k nekrotizacím.

Diagnostika alergií

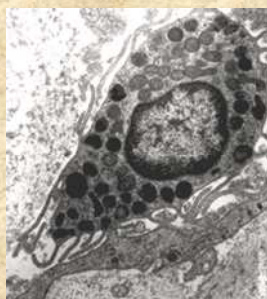
Diagnostické postupy použitelné v praxi při vyšetřování alergických onemocnění a při zvažování indikace alergenové imunoterapie musí splňovat jisté předpoklady. Musí to být testy:

- **detekující časný typ alergie (IgE)**
- **relativně spolehlivé (co nejvyšší senzitivita a specifita)**
- **vhodné pro rutinní práci (cena, rychlost)**
- **dostupné (nároky na vybavení)**
- **bezpečné pro pacienta.**



Kožní testy

Kožní testy prováděné s určitým alergenem zjišťují přítomnost specifických IgE protilátek vůči tomuto alergenu, navázaných na kožních mastocytech. Pokud se příslušný alergen váže na specifické IgE protilátky fixované na povrchu mastocytů, dojde k aktivaci a uvolnění mediátorů. Vazoaktivní mediátory vyvolávají lokální edém (kožní pupen), erytém (zarudnutí) a pruritus (svědění). Tyto příznaky se zpravidla začínají projevovat 5 minut po testu a maximální reakce je zjišťována mezi 10 - 20 minutami po provedení testu.



Stejně jako u dalších popisovaných diagnostických postupů je nutno zdůraznit, že **neplatí rovnice: pozitivní kožní test = průkaz alergie**. **Senzitivita a specifita kožních testů** je však velmi dobrá - pohybuje se obvykle mezi **80-90 %**.

Kožní testy jsou zejména vhodné pro diagnostiku alergie na inhalační alergeny nebo alergie na hmyzí bodnutí. U potravinových alergií bývá senzitivita a specifita kožních testů nižší. U alergií lékových je situace komplikovanější vzhledem k tomu, že se často nejedná o reakci zprostředkovanou IgE.



Expoziční (provokační) testy

Podstatou tohoto testu je vyvolat příznaky alergie tím, že vystavíme pacienta kontaktu s podezřelým alergenem. Jestliže reakce vznikne, je to potvrzení toho, že zkoušený alergen je příčinou pacientových obtíží.

Při expozičním testu s potravinovým nebo s poléťavým alergenem se provede rovněž slepý test s neškodnou látkou. Ani pacient ani člověk, který reakci hodnotí, neví, která látka je která (dvojitě slepá kontrolovaná studie s placebem). Expoziční test se využívá při potravinové alergii jako následné vyšetření po kožních testech. Test by se nikdy neměl provádět bez pečlivých předběžných zkoušek na tváři a rtech, a při vlastním expozičním testu je třeba začínat pouze s nepatrným množstvím potravin. Rovněž v oblasti lékových alergií je expoziční test mnohdy jediným možným způsobem objektivizace diagnózy.

K expozičním testům patří dále spojivkový test, kdy se roztok alergenu vkapává do spojivkového vaku jednoho oka, intranasální test, který se provede vkápnutím roztoku alergenu do jednoho nosního průduchu a bronchoprovokační test, kdy pacient vdechuje prostřednictvím inhalátoru testovaný alergen. Tyto testy jsou používány méně často. Důvodem pro to mohou být otázky na nezbytnost takovýchto postupů při poměrně vysoké spolehlivosti kožních testů a laboratorních diagnostických postupů pro inhalační alergeny. Zejména u průduškových specifických provokací nastupují pochybnosti o bezpečnosti (astmatický záchvat) a míře senzitivity a specifity tohoto testu. Přesto mají tyto testy své opodstatněné indikace, například v oblasti profesních alergóz.

Laboratorní metody

V rámci screeningu může první informaci vedoucí k diagnóze alergózy přinést stupeň eozinofilie v krevním obraze nebo hladina celkových IgE protilátek.

Eozinofilie

Vyšetření diferenciálního počtu leukocytů. Za zvýšené hodnoty se považuje počet eozinofilů nad $0,35 \times 10^9/l$.

Celková hladina IgE

Kvantifikace celkové hladiny IgE protilátek je prováděna řadou laboratorních metodik. Pouze **nejkvalitnější techniky** (EIA, FEIA-enzymová imunoanalýza s fluorescenční detekcí, chemiluminiscence) **dosahují prahové citlivosti kolem 0,5 U/ml (kU/l) (=1,2 ng/ml) a optimální přesnosti v rozsahu asi 7,5 - 50 U/ml (18 - 120 ng/ml)**. To je třeba mít na mysli zejména u vyšetřování novorozenců a malých dětí. U dospělých je naopak nutno sérum příslušně naředit.

Výpovědní hodnotu hladiny celkových IgE protilátek snižuje vysoká horní hranice normálu, která bývá obvykle definována v rozmezí 2SD. Distribuce hodnot v populaci je velmi šikmá. Hladiny závisejí na věku (vzestup do 5. - 7. roku věku).

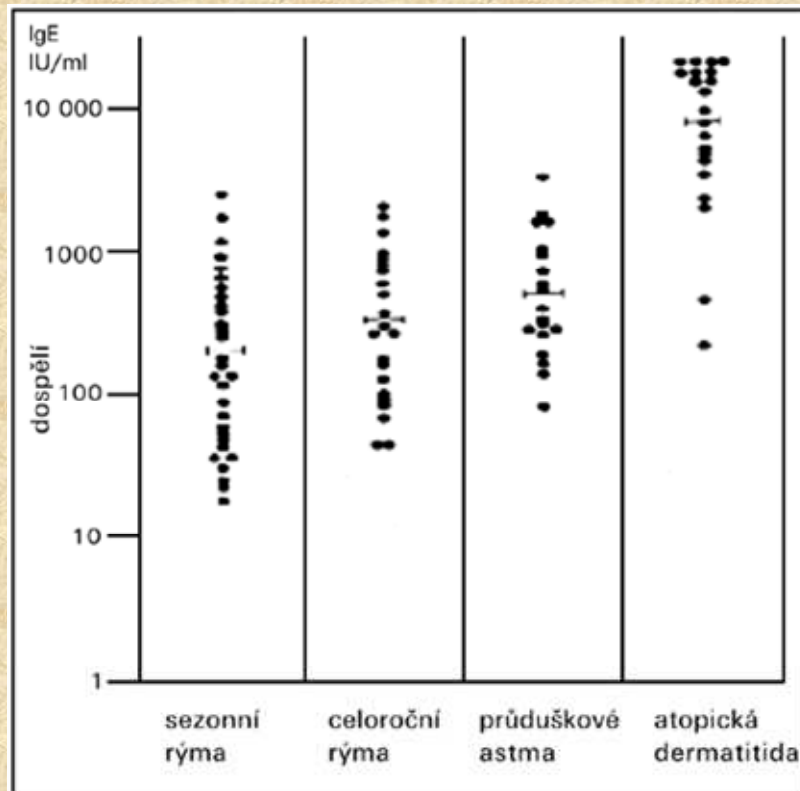
Za normální u novorozenců se považují hladiny do 0,7 U/ml. U dětí signalizuje již hladina +1SD výrazně zvýšené riziko vývoje alergózy. Normální hladina IgE newylučuje přítomnost alergózy. Při již stanovené diagnóze alergózy nepřinášejí vyšší hladiny IgE žádnou další informaci.

	Průměr	+ 1SD	+ 2SD
Novorozenec	< 12	< 12	< 12
1 - 11 měs.	< 12	12	56
1 rok	< 12	15	83
2 - 4 roky	< 12	33	130
5 - 80 let	20	85	367

Hladiny zvýšené nad +2SD bývají často u osob s polyvalentní alergií na více alergenů a s výskytem různých alergických symptomů. U osob alergických na 1 alergen a s postižením pouze 1 orgánu jsou často hladiny v normě. Výskyt alergických projevů na kůži (atopická dermatitida) a projevů gastrointestinálních zvyšuje pravděpodobnost zvýšené sérové hladiny IgE. U atopické dermatitidy nejsou vzácné extrémní hladiny. Frekvence zvýšené hladiny celkového IgE je vyšší u alergie pylové než u alergie na roztoče a plísňe. Při vyloučení parazitárního postižení je specifická zvýšená hladina IgE pro alergózu velmi vysoká (asymptomatický pacient - prealergický stav).

Stanovení specifického IgE

Provádí se u pacientů, u kterých nelze provést kožní test. Stanovujeme specifické IgE protilátky proti širokému spektru alergenů. Vyšetření metodami vysokoafinitní FEIA (CAP systém), chemiluminiscenční analýza (IMMULITE), ELISA.

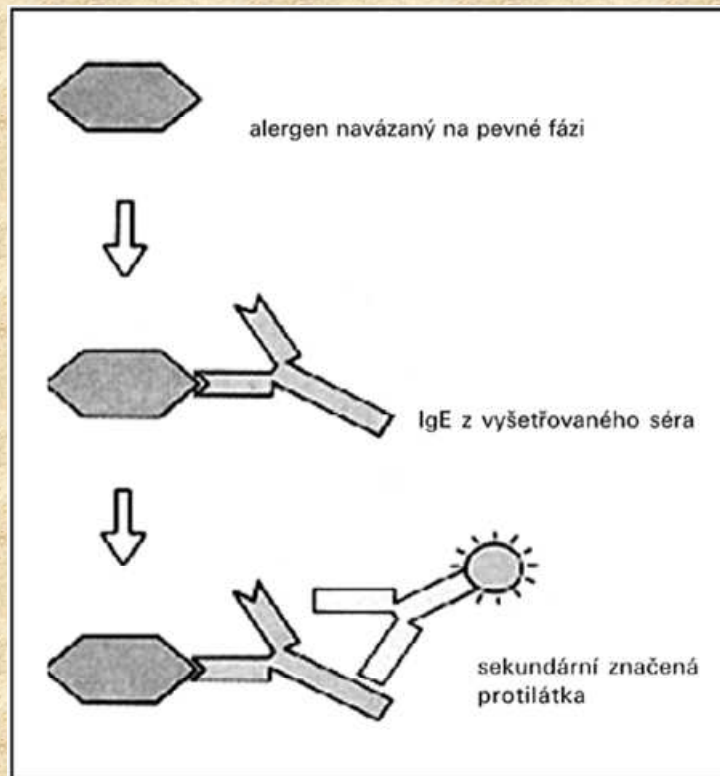


Stanovení specifických IgG

Pozitivita specifických IgG je dnes považována pouze za průkaz předchozí expozice alergenu či alergenů u pacientů, u kterých kožní testy i specifické IgE tzv. nevycházejí. U alergií na jed blanokřídlého hmyzu se někdy setkáváme s negativitou jak kožních testů tak specifických IgE, navzdory těžkým alergickým reakcím. Totéž platí také pro alergie na plísně a potraviny, méně potom na některé další inhalační alergeny . upřesnění stanovením IgG (EIA).

Hladina alergen-specifických IgE protilátek

Prototypem těchto testů je RAST (radioalergosorbent test). Alergen je navázán kovalentní vazbou na nitrocelulóзовou pevnou fází, kterou bývá papírový disk. Tento disk je inkubován s vyšetřovaným sérem, přičemž dochází k vazbě specifického IgE ze séra na disk. Po promytí disku je provedena druhá inkubace s protilátkou proti IgE, která je značena izotopem I^{125} . Intenzita navázané radioaktivity je pak přímo úměrná množství specifického IgE ve vyšetřovaném vzorku.



U těchto technik jsou používány různé pevné fáze k navázání alergenů, různé alergeny, různé enzymy k označení protilátek proti IgE, různé substráty a z toho vyplývající různé systémy detekce výsledného signálu. Rovněž jsou používány různé systémy standardů pro kalibraci. Z toho vyplývá, že **každá technika má svá vlastní kritéria pro hodnocení.**

První používanou pevnou fází byla nitrocelulóza. Vazba na antigen je stabilní, ale má i své nevýhody. Jednak může dojít k zamaskování některých epitopů antigenu a jednak dochází k nespecifické vazbě IgE na nitrocelulózu v případě, že hladiny celkového IgE jsou vysoké.

Navázání antigenu na pevnou fází v trojrozměrné podobě je významným zlepšením techniky. Alergen je v tomto případě navázán na hydrofilní derivát celulózy. Tento systém má schopnost vázat třikrát více bílkoviny alergenu než papírový disk. Tato technika je uváděna pod označením CAP System.

Jiným zlepšením původní metody je navázání antigenu v kapalně fázi. Toho je využito při technice AlaSTAT.

Jsou také používány různé enzymy ke značení anti-IgE protilátek. Například beta-galaktosidáza získaná z E. coli při RAST Phadezym technice, alkalická fosfatáza z E. coli (FAST), křenuv peroxidáza (AlaSTAT) atd. Bylo prokázáno, že **charakter enzymu hraje důležitou úlohu pro detekci zejména protilátek proti potravinovým alergenům**. Použití alkalické fosfatázy (např. FAST) snižuje citlivost techniky zejména pro potravinové alergeny rostlinného původu (ovoce, zelenina). Naopak galaktosidáza (např. RAST Phadezym) snižuje senzitivitu pro potravinové alergeny živočišného původu (zejména mléko). Je velmi pravděpodobné, že **charakter použitého substrátu hraje rovněž nezanedbatelnou roli**. Například substrát použitý při FAST technice je nevhodný pro stanovení protilátek proti celeru a jiné kořenové zelenině.

CAP

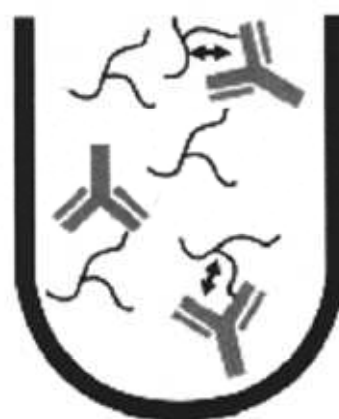
Vazba IgE na alergen
v pevné fázi



- vazba je omezena na
povrch pevné fáze

AlaSTAT

Vazba IgE na alergen
v kapalně fázi



- reaktanty jsou mobilní a
všude v dobrém vzájemném
kontaktu

Různé techniky používají různé protilátky anti-IgE - monoklonální i polyklonální. Liší se i v systému detekce: radioimunoassay, fluorescenční alergosorbent test (FAST) atd. Důležité hledisko moderních technik je trend k vysoké automatizaci.

Významným problémem je výběr standardů pro kalibraci. Mohou to být séra obsahující specifické protilátky proti pylu břízy (RAST), jílku (FAST) apod. CAP používá standard pro celkové IgE.

Vzhledem k těmto výše uvedeným odlišnostem jsou i **diskrepance ve výsledcích u různých technik velmi časté.**

Specifita testu, tedy vlastnost testu, že není falešně pozitivní, nesmí být zaměňována s pozitivitou na zkříženě reagující alergeny (nejčastěji pyly, ovoce, zelenina), která se nemusí projevovat klinicky. Specifita RAST testu je výborná - kolem 95 %. Specifita FAST testu je o něco nižší. Přítomnost specifických IgE protilátek proti určitému alergenu však není vyloučena ani u asymptomatické osoby.

Senzitivita (citlivost) testů se pohybuje u nejkvalitnějších technik **kolem 75 %**. Některé antigenní složky mohou z komerčně dostupných preparátů vymizet, a tím způsobit falešně negativní výsledek.

Výsledkem testů nejsou skutečné koncentrace:

- obsah specifických protilátek v séru je často vyšší než vazebná kapacita alergenu.
- nemusí být vždy zcela zajištěno, že po vazbě alergenu na pevnou fázi jsou dostupné všechny antigenní determinanty daného alergenu.
- během inkubace nemusí dojít k navázání všech specifických IgE protilátek (různá afinita protilátek proti různým epitopům) a nelze ani vyloučit interferenci specifických IgG protilátek (např. po imunoterapii).

Přesto lze pokládat množství navázané sekundární značené protilátky za úměrné (v určitém rozsahu) množství specifického IgE ve vyšetřovaném séru. **Křivky vyjadřující závislost vazby na množství specifických protilátek bývají paralelní pro různé alergeny i pro celkové IgE.** Proto lze takovou křivku použít jako kalibrační i pro jiné alergeny. **Konečným výsledkem je tedy spíše relativní než absolutní číslo.**

Testy detekující uvolnění mediátorů po expozici alergenu

Test uvolnění histaminu - kvantifikace histaminu uvolněného z bazofilů po inkubaci s alergenem. Kvantifikace histaminu se dnes provádí prakticky pouze ELISA nebo RIA technikou s využitím monoklonální protilátky proti histaminu. Tento test má však jistá omezení vzhledem k poměrně vysokému spontánnímu uvolňování histaminu z leukocytů.

CAST test (Cellular Allergen Stimulation Test) - měření hladiny leukotrienů po stimulaci leukocytů IL-3 a alergenem in vitro. Principem kvantifikace leukotrienů je opět ELISA technika s monoklonální protilátkou proti společné determinantě leukotrienů.

Tyto testy jsou v současné době určeny především pro výzkumné účely. Jejich rutinnímu využití brání poměrně vysoká cena a nároky na vybavení laboratoře. Rovněž senzitivita a specifita těchto testů může být v určitých situacích problematická. Perspektivně by testy detekující uvolnění mediátorů mohly najít uplatnění i v oblastech, kde reakce nejsou zprostředkovány IgE mechanismem (některé léky, potraviny).

Stanovení ECP (eosinofilní kationický protein)

Aktivované eozinofily degranulují a uvolňují do okolních tkání silně bazické granulární proteiny, které jsou schopny ničit parazity. Mohou však způsobit destrukci tkání spojenou s astmatem a jinými zánětlivými onemocněními. Mezi granulární proteiny patří i ECP. ECP narušuje buněčnou membránu a umožňuje průnik enzymů do buněk a jejich následné poškození a poškození tkání podslizničního vaziva, bazální membrány respirační sliznice i hladkého svalstva bronchu.

Existuje vysoká korelace mezi koncentrací ECP a klinickými astmatickými symptomy.

ECP odráží sezónní změny aktivity atopického onemocnění, nezávisle na koncentraci IgE.

Koncentrace ECP koreluje s aktivitou atopické dermatitidy.

Stanovení hladiny ECP se nabízí jako vhodný diagnostický ukazatel těžé zánětu u astmatu, ale v praxi se ukazují určité limitace využití tohoto ukazatele.

Metodika stanovení je velmi citlivá, je možno ji provádět pouze na určitých typech laboratorních analyzátorů ve specializovaných imunologických laboratořích. Doporučený čas na zpracování vzorku je 1-2 hodiny při uchování krve v pokojové teplotě, nebo okamžité oddělení séra a hluboké zamražení před vlastním zpracováním. Ne ve všech ordinacích alergologů a pneumologů lze tyto podmínky zajistit.

Vyšetřovací metoda: vysokoafinitní FEIA (CAP systém), chemiluminiscenční analýza (IMMULITE)

Referenční hodnoty: < 20 ug/l

Test aktivace bazofilů (BAT)

Test aktivace bazofilů s využitím průtokové cytometrie byl vyvinut jako alternativní metoda pro *in vitro* diagnostiku IgE zprostředkované alergické reakce pro různé alergeny. Po expozici alergenu dochází k aktivaci bazofilů s navázanými molekulami alergen-specifického IgE na povrchu buňky. Tento proces je charakterizován mj. i změnou exprese některých povrchových struktur těchto buněk. Prakticky je pro tento účel využito sledování změny exprese antigenu CD63 na buňkách nesoucích IgE (bazofilech) pomocí průtokové cytometrie. CD63 je proteinová molekula exprimovaná na cytoplazmatických granulích různých klidových buněk. Bylo prokázáno, že lidské bazofily aktivované *in vitro* (alergenem nebo anti-IgE protilátkami) prostřednictvím jejich vysokoafinitního receptoru pro IgE nově exprimují znak CD63 také na své membráně. Exprese CD63 na povrchu bazofilů tak velmi dobře koreluje s jejich degranulací.

Plná krev (event. suspenze leukocytů) je inkubována s alergenem. Současně je inkubována tzv. negativní kontrola, kde místo alergenu je přidán pouze ředící roztok a pozitivní kontrola, kdy je přidána látka způsobující aktivaci co největšího počtu bazofilů (kultivace s anti-IgE protilátkou nebo N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalaninem tzv. FMLP). Po inkubaci s alergenem jsou vzorek, negativní i pozitivní kontrola smíchány se dvěma protilátkami, protilátkou označující bazofily (anti-IgE nebo anti-CD203) a protilátkou vázající se na aktivované bazofily (anti-CD63). Po inkubaci je provedena lýza erytrocytů.

Měření je prováděno pomocí průtokového cytometru. Bazofily jsou tzv. gatovány na základě bočního rozptylu (side scatter) a specifického značení bazofilů (SS/anti-IgE nebo SS/CD203c). Na takto vybraných bazofilech je měřena exprese aktivačního znaku CD63. Výsledkem je procento aktivovaných bazofilů tj. anti-IgE+/CD63+ nebo CD203c+/CD63+ v závislosti na typu použitých protilátek.

07 PRÁCE S BUŇKAMI IMUNITNÍHO SYSTÉMU

Řada laboratorních technik moderní imunologie je založena na hodnocení počtu a aktivity jednotlivých typů buněk imunitního systému, případně na průkazu jejich produktů (cytokinů, reaktivních radikálů kyslíku a dusíku, enzymů apod). Tyto testy slouží v experimentální a klinické imunologii k vyhodnocení parametrů nespecifické, ale i specifické buňkami zprostředkované imunity. Jedná se o pracné, materiálně i přístrojově náročné techniky. Pro funkční testy buněk se odebírá krev do heparinu bez konzervačních látek v určité koncentraci. Vzorky je třeba dopravit do laboratoře do 2 hod od odběru. Při delší přepravě je třeba krev zchladit na 4°C, aby se zpomalilo stárnutí a snížení aktivity neutrofilů.

Pro úspěšné a přesné testování je nutné v práci s buňkami IS dodržovat celou řadu zásad:

- Do laboratoře je třeba je dodat rychle (optimálně do 2 hod) vzorek nesražené krve, při odběru je třeba používat protisrážlivé prostředky, vzorky odebírat asepticky.
- Buňky ve funkčních testech musí zůstat neporušené, plně vitální – je třeba pracovat rychle, šetrně.
- Pro zachování plné funkčnosti je třeba uchovávat b. ve vhodném prostředí (pH 7,2), je třeba dodat základní minerální látky a při dlouhodobých kultivacích i živiny.
-pro krátkodobé kultivace pufrovaný fyziologický roztok v různých modifikacích
-pro dlouhodobou kultivaci média s různými vlastnostmi (např. MEM s 5 – 10% séra)
- Je třeba pracovat asepticky, kontaminující bakterie ovlivňují výsledek testu a při vícedenní kultivaci vzorek zcela znehodnotí
- Pro některé testy se používají buňky v plné krvi, pro jiné se izolují různými postupy
- Pro dosažení standardního výsledku ve funkčních testech je potřeba do testu nasazovat živé buňky v určité koncentraci – buňky se psočítají a sleduje se jejich životnost (>95%)

Izolace buněčných populací

Buněčné funkční testy se provádějí buď v plné krvi, nebo po izolaci jednotlivých populací. Existuje celá řada separačních metod, které se uplatňují v různé míře pro jednotlivé testy.

1. Populaci všech leukocytů lze získat např. pomocí hypotonického šoku, tj krátkodobému vystavení buněk hypotonickému prostředí, kterému leukocyty s vyšší osmotickou rezistencí odolávají, zatímco erythrocyty podlehnou hemolýze. Zbytek ery po prvním kroku hemolýzy lze lyzovat 0,83% roztokem chloridu amonného.
2. lymfocyty a monocyty se získávají nejčastěji centrifugací na denzitním gradientu (médium specifické hmotnosti 1,077g/ml), kdy lymfocyty a monocyty s nižší specifickou hmotností vytváří prstenec nad denzitním médiem, zatímco granulocyty se dostávají do sedimentu. Mono se od lymfo mohou následně oddělit na základě jejich adherence ke sklu nebo plastickým hmotám.

Vlastní testy izolace buněk z periferní krve.

1. V prvním postupu izolujeme směs mononukleárních b. (mono a lymfo) na denzitním gradientu. Test využívá rozdílné specifické hmotnosti, kdy lehčí lymfocyty a mono zůstávají nad gradientem, zatímco červené krvinky a granulocyty propadávají.

OBR. SCHÉMA IZOLACE MONONUKLEÁRNÍCH BUŇEK NA DENZITNÍM GRADIENTU

Doplňit!!!!

I. Pracovní postup:

1. Do zkumavky napipetujeme 3ml roztoku verografinu
2. 1ml krve naředíme s 2ml média

3. Zkumavku nakloníme a verografin opatrně převrstvíme ředěnou krví
4. Odstředíme 30 – 40min při 400G
5. Opatrně odsajeme prstenec mononukleárních buněk
6. přidáme 4ml média, resuspendujeme
7. Odstředíme 5min
8. Opatrně slejeme (odsajeme) supernatant
9. Přidáme kapku séra, sediment resuspendujeme
10. Zhotovíme nátěr

U izolovaných buněk sledujeme:

- Čistotu suspenze na zhotoveném, obarveném nátěru
- Životnost zbarvením trypanovou modří
- Koncentraci buněk v suspenzi

2. Suspenzi všech leukocytů (např. testy fagocytární aktivity) můžeme získat např. pomocí hemolýzy červených krvinek. Ty mají nižší osmotickou rezistenci než leukocyty, takže při krátkodobém vystavení buněk hypotonickému prostředí červené krvinky lyzují, zatímco bílé zůstávají neporušené. Podmínkou je rychle vyrovnat původní izotonicitu prostředí.

Obr. Schéma izolace leukocytů pomocí hemolýzy červených krvinek

Doplnit!!!!

II. Pracovní postup:

1. Do označené zkumavky napipetujeme 1ml krve
2. Přidáme 2ml redestilované vody, smícháme
3. mícháme 40s, přidáme 1ml 2,7% roztoku NaCl
4. Odstředíme 5min
5. Opatrně slejeme (odsajeme) supernatant
6. Přidáme 4ml pufru, sediment resuspendujeme
7. Odstředíme 5min
8. Opatrně slejeme (odsajeme) supernatant
9. Přidáme kapku séra, sediment resuspendujeme
10. Zhotovíme nátěr

Nejpřesnější metody separace využívají specifickou vazbu monoklonálních protilátek na povrchové molekuly buněk. To se uskuteční např. pomocí magnetické separace (v tom případě se použijí protilátky s navázanými magnetickými částicemi) nebo třídičem buněk v průtokovém cytometru.

Stanovení koncentrace a životnosti buněk

Buňky izolované z výše uvedených postupů je třeba do testů nasazovat ve vhodné koncentraci. Proto se buňky po skončení počítají buď v Bürkerově komůrce nebo pomocí počítačových automatů. Princip se nijak neliší od počítání leukocytů v plné krvi (tj. od běžných hematologických postupů). Do kultivačních testů (např. testu blastické transformace lymfocytů) se buňky nasazují v koncentraci 1 – 2 mil./ml, ve fagocytárních testech se používají suspenze neutrofilů v koncentraci 5 – 10mil./ ml.

Další podmínkou je plná životnost a funkční aktivita testovaných buněk. Životnost se sleduje ve světelném nebo fluorescenčním mikroskopu (trypanová modř, propidium jodid), které jsou schopny proniknout přes porušenou cytoplazmatickou membránu do mrtvých buněk, ale nepronikají do buněk živých. Životnost buněčné suspenze na počátku testu by měla být alespoň 95%.

K uchování vitality a funkční aktivity se buněčné suspenze uchovávají v pufovaném fyziologickém roztoku (pH 7,2), často s ionty vápníku, hořčíku (nutné pro některé reakce) a obohacené glukózou (např. Hanksův solný roztok). Pro vícedenní kultivace se používají tekutá média s živinami a přísadkou bovinního fetálního séra, podobně jako při kultivaci tkáňových kultur.

Takto připravené suspenze buněk se používají v testech průkazu nespécifické aktivity nebo specifické buněčné imunity. Funkčním testům předchází testy stanovení počtu, případně morfologie daných buněk, které mají základ v hematologických a histologických technikách. Stanovení počtu buněk je také v řadě testů předpokladem k přepočtu zjištěné hodnoty funkční aktivity na konkrétní počet buněk.

Testy počtu a aktivity buněk imunitního systému

I. Metody stanovení počtu morfologie buněk

1. Celkové počty – Bürkerova komůrka, počítací automaty
2. Diferenciální počet – krevní nátěr hodnocený mikroskopicky, automaty
3. Morfologická charakteristika buněk krve, kostní dřeně - hematologie
4. Morfologická charakteristika buněk v lymfatických orgánech - histologie
5. Rozlišení buněk podle rozdílných vlastností (živé x mrtvé, nekrotické x apoptické) – světelná a fluorescenční mikroskopie, průtokové cytometrie
6. Subpopulace podle povrchových genotypických znaků buněk v suspenzích – průtoková cytometrie
7. Rozlišení povrchových nebo intracelulárních znaků buněk ve tkáních – imunohistochemie

II. metody stanovení aktivity buněk – funkční testy

1. Průkaz povrchových nebo intracelulárních znaků aktivity – průtoková cytometrie
2. Testy fagocytární aktivity (adherence, ingesce, produkce radikálů, baktericidie)
3. Testy aktivity lymfocytů – bioeseje, ELISA, RT – PCR
4. Testy specifické buněčné imunity – testy 1,3, a 4 po stimulaci specifickým antigenem
5. Testy in vivo, např. kožní test časné nebo oddálené přecitlivělosti

Vyšetření lymfocytárních subpopulací a jejich funkce

Stanovení počtu a funkce lymfocytů, včetně jejich subpopulací, je nezbytnou součástí celkového imunologického vyšetření pacienta přispívá ke stanovení správné diagnózy. Lymfocyty u zdravého jedince reprezentují v cirkulující krvi asi jednu třetinu buněk bílé řady. První důležitou informací o počtu a zastoupení lymfocytů získáme jednoduchým vyšetřením krevního obrazu. Diferenciální krevní obraz však není schopen charakterizovat jednotlivé lymfocytární subpopulace, neboť na základě buněčné morfologie není možno rozlišit T – a B-lymfocyty. Znalost počtu leukocytů a zastoupení lymfocytů je však nezbytným předpokladem správné interpretace imunologického vyšetření.

Průkaz povrchových nebo intracelulárních znaků aktivity

Studium lymfocytárních subpopulací se stalo realizovatelné poté, co bylo zjištěno, že buňky exprimují na svém povrchu rozličné specifické molekuly (znaky). Tyto můžeme uspořádat do skupin, jež charakterizují buněčnou linii, stav diferenciací jednotlivé buňky a její aktivace. Výrazný pokrok přinesla dostupnost monoklonálních protilátek, které jsou schopny rozpoznat molekuly na povrchu buňky jako antigeny. Povrchový znak definované struktury rozpoznatelný skupinou monoklonálních protilátek je zařazen do skupiny diferenciačních CD

znaků. V současné době je již na lidských leukocytech charakterizováno a označeno více než 200 povrchových znaků.

Jednotlivé znaky a jejich kombinace prokazujeme metodou přímé fluorescence. Buňky jsou inkubovány s protilátkou označenou fluorescenčním barvivem, fluorescenční mikroskop umožní analyzovat výsledek vazby Ag a Ab a znázornit tak buněčné populace, což je ale nesmírně časově náročné.

Průtoková cytometrie je metoda, která dokáže v krátkém časovém intervalu analyzovat tisíce buněk označených monoklonálními protilátkami. Individuální buňky jsou navíc charakterizovány i na základě své velikosti a granularity. Běžně můžeme zjišťovat koexpresi různých antigenů (běžně dvou až tří) na povrchu buněk pozitivních či negativních pro daný znak, tak i intenzitu fluorescence. Zavedení průtokové cytometrie do praxe umožňuje kvalitní znázornění a vyšetření lymfocytárních subpopulací.

Základní znaky používané pro T- lymfocyty jsou CD3, jež je součástí komplexu TCR – CD3 komplexu, CD4 a CD8, které charakterizují pomocné a cytotoxické T – lymfocytární subpopulace

Základní znaky používané pro B- lymfocyty jsou CD19 nebo CD20

Základní znak používaný pro NK buňky je CD56 bez koexprese s CD3. Aktivačním znakem je CD25 (receptor pro IL-2). Na všech leukocytech nalézáme CD45, na monocytech CD14.

Testy aktivity lymfocytů

Proliferace je jedním z fyziologických jevů buněčné aktivity. Použitím radioaktivně značeného thymidinu (^3H -thymidin) jsme schopni v laboratoři proliferaci lymfocytů kvantitativně vyšetřit, neboť thymidin se zabuduje do DNA dělících se buněk a takto je označí. Tvorba nové DNA je úměrná množství buněčných dělení.

K dělení můžeme lymfocyty stimulovat in vitro polyklonálně a nebo specificky. Lektiny, rostlinné proteiny vážící se na membránové glykoproteiny buňky, působí jako polyklonální mitogeny. Aktivují lymfocyt nezávisle na jeho antigenní specifitě. Pro stimulaci T-buněk se používají Phytohemagglutinin (PHA) a konkavalin A (Con A), k aktivaci B-buněk pak pokeweed mitogen (PWM). Monoklonálních protilátek lze také použít, příkladem může být anti-CD3 protilátka. Tetanického toxoidu (antigeny) využíváme ke specifické stimulaci, podobně též E.coli nebo tuberkulinu. Přítomnost buněk prezentujících antigen, jako jsou monocyty, je zde nezbytná.

Při vyšetření inkubujeme izolované buňky nebo plnou krev pacienta s příslušným stimulantem. Po několikadenní kultivaci přidáme do suspenze triciem značený thymidin a po několika hodinách oddělíme buněčnou suspenzi (s navázaným označeným thymidinem) od kultivačního media (v němž se nachází thymidin, který nebyl do DNA inkorporován). Energií radiace převedeme na světelný signál, testované buněčné vzorky vyhodnocujeme ve scintilačním počítači. Výsledky jsou vyjádřeny jako počet světelných impulzů za minutu. Celá metodika je náročná na sterilitu i přesnost provedení a je používána zejména při vyšetření nemocných s podezřením na závažnou primární nebo sekundární imunodeficienci.

Cytotoxické metody

Zničení cílových buněk může být dosaženo v imunitních reakcích různými buňkami: cytotoxickými T lymfocyty (T_c), NK buňkami nebo makrofágy, neutrofilů či dalšími cytotoxickými buňkami v cytotoxické reakci závislé na protilátkách (dříve se buňky účastnící se této reakce označovaly K buňky).

V testu cytotoxických lymfocytů (závislý na MHC, nezávislý na protilátkách) se používají lymfocyty z imunního zvířete, které se kultivují v různém poměru k cílovým buňkám (zpravidla nádorovým), jež byly označeny radioaktivním chromem (^{51}Cr). Po inkubaci a odstředění se supernatant testuje na radioaktivitu. Nedostatečná cytotoxická reaktivita se nachází u pacientů s nedostatečnou funkcí thymu, kombinovanou imunodeficiencí, některými

nádorovými chorobami, při imunosupresivní terapii a někdy i při mykobakteriálních chorobách (např. lepra), některých virových chorobách a vážných autoimunitních chorobách. NK buňky jsou spontánně cytotoxické pro různé buňky, mají Fc receptor, ale nemají povrchové imunoglobuliny. Jejich aktivita může být testována výše uvedeným testem uvolňování ^{51}Cr .

Cytotoxicita závislá na protilátkách (ADCC – antibody dependent cellular cytotoxicity) se testuje tak, že se nejprve cílové buňky zpracují sérem s protilátkami (ale bez komplementu), označí radioaktivním chromem (^{51}Cr) a pak exponují efektorovými buňkami. Tento typ buněčné toxicity byl pozorován u matek po opakovaných porodech dětí téhož otce, při transplantační reakci, autoimunitě i nádorových onemocněních.

Vyšetření HLA-antigenů

Stanovení HLA fenotypu vyšetřovaného jedince nazýváme HLA typizace. Typizaci můžeme provádět na dvou úrovních:

1. Historicky starší sérologická typizace definuje HLA antigeny, tj molekuly HLA exprimované na buněčných membránách.
2. Novější molekulárně genetická typizace určuje HLA alely, tj sekvence nukleotidů kódující HLA antigeny.

Metody molekulární genetiky, často označované jako DNA-typizační techniky, jsou mnohem přesnější než tradiční metody sérologické. Např. v případě sérologicky určeného antigenu HLA-DR4 můžeme pomocí DNA typizace odhalit jednu z dvacetišesti alel, které sérologické specifitě DR4 odpovídají.

DNA techniky se pro svou preciznost, rychlost a poměrně nízkou cenu postupně prosazují v rutinní HLA typizaci. V současnosti již nahradily sérologickou typizaci HLA II. Třídy (HLA-DR, DQ, DP) a v dohledné době pravděpodobně specializované přejdou na DNA techniky také při typizaci HLA I. Třídy. (HLA-A, B, C).

Ačkoliv se sérologická typizace zdá být na ústupu, popíšeme nejprve její princip. Na uspořádání sérologického typizačního testu se vysvětlí obecná podstata HLA typizace, ať už se provádí na sérologické nebo na molekulární úrovni.

1. Sérologická typizace HLA antigenů

tj určení molekul HLA antigenů exprimovaných na lymfocytech pomocí lymfocytotoxického testu

K sérologické typizaci používáme soubor diagnostických protilátek (antisér), které reagují s jednotlivými HLA antigeny, popř. se skupinami antigenů. Sestava anti-HLA protilátek (tzv. typizační panel) musí obsahovat takový počet protilátek, abychom mohli jednoznačně určit jednotlivé sérologické specifity. Tak např. panel olomoucké HLA laboratoře k typizaci HLA I. Třídy obsahuje přes 50 protilátek k určení 14 HLA-A natigenů, přes 100 protilátek k určení 29 HLA-B natigenů a asi 15 protilátek k určení 10 HLA-C natigenů. Počet protilátek je vždy vyšší než počet antigenních specifit, protože některé protilátky jsou polyspecifické, tj. reagují s více antigenními specifitami. Protilátky pocházejí od aloimunizovaných dárců. Vesměs ze sér odebíraných matkám, u kterých došlo v důsledku opakovaných těhotenství imunitní reakce na HLA-antigeny svého partnera. Při sestavování panelů se využívá také protilátek monoklonálních.

Pacientovi se odebere 10ml venózní krve do zkumavky s heparinem (protisrážlivé činidlo)
Laboratorní postup:

Krev je odeslána do laboratoře, kde se z ní izolují lymfocyty. Živé lymfocyty přikapeme do 60-ti jamkových destiček, kde je v každé jamce předkapána jiná anti-HLA protilátka.

V případě shody mezi protilátkou a natigenem přítomným na lymfocytární membráně se Ab na testovanou buňku naváže. Pokud Ab svůj natigen nenajde, k vazbě nedojde. Ke

zviditelnění vazby přidáváme do všech jameček králičí komplement. Ten usmrtí pouze buňky

s navázanou Ab (pozitivní reakce), ostatní buňky zůstávají intaktní (negativní). Pozitivní i negativní reakce hodnotíme mikroskopicky po vitálním barvení buněk (zviditelní živé buňky na úkor usmrcených). Vzhledem k časté pospecificitě protilátek je k vyhodnocení potřeba zkušeností s reaktivitou panelových Ab.

V některých laboratořích používají průtokového cytometru k určení jednotlivého antigenu (např. HLA-B27) v rámci diferenciální diagnostiky.

2. Molekulárně-genetická typizace HLA-antigenů

tj. určení nukleotidových sekvencí HLA alel pomocí PCR amplifikace se sekvenčně specifickými primery (PCR-SSP)

Při molekulární typizaci se používá, podobně jako u typizace sérologické, také panelovou sestavu DNA diagnostik. Jedná se o oligonukleotidy, které byly připraveny tak, aby byly komplementární k nukleotidovým sekvencím jednotlivých alel, resp. Skupin alel. Typizační soubor sestává buď ze specifických PCR-primerových párů nebo ze specifických oligonukleotidových sond. Počet používaných typizačních oligonukleotidů se pohybuje od několika desítek do stovek v závislosti na HLA-lokusu a na požadované přesnosti rozlišení. Rozlišení je možné na úrovni jednotlivých alel (vysoké) nebo na úrovni skupin alel zhruba odpovídajících sérologickým specifitám (nízké). Jen pro ilustraci komerční kit Fy. Dynal obsahuje 24 primerových párů k rozlišení 44 HLA-DRalel, reps. Skupin alel, oxfordská metoda „fototyp“ používaná v olomoucké laboratoři k typizaci HLA I.třídy obsahuje 103 primerových párů.

Pacientovi se odebírá 10ml krve do zkumavky s EDTA.

Laboratorní postup:

V laboratoři se extrahuje z krve vyšetřovaného pacienta DNA, kterou použijeme jako substrát v řadě PCR reakcí, z nichž každá obsahuje primerový pár specifický k sekvenci určité HLA-alely. Pokud vyšetřovaná DNA sekvenci příslušné alely obsahuje, primery ji najdou a naváží se k ní po celé své délce. Může tak proběhnout PCR amplifikace, jejímž výsledkem je PCR produkt (pozitivní reakce). Pokud daná alela ve vyšetřované DNA není přítomna, k vazbě primerů a následné amplifikaci nedojde (negativní reakce). Pozitivní a negativní reakce hodnotíme nejčastěji elektroforézou PCR produktů: elektroforetický gel obsahuje barvivo etidium-bromid, které se vestaví do DNA; po ozáření UV světlem toto barvivo zviditelní pozitivní reakce jako svítící proužky na gelu. HLA alely vyšetřovaného pacienty určíme podle toho, se kterými PCR primery jeho DNA pozitivně reagovala.

08 ZÁKLADY INTERPRETACE VÝSLEDKŮ IMUNOLOGICKÝCH LABORATORNÍCH TESTŮ

Vyšetření imunoglobulinů

O hladině Ig nás velmi zhruba informuje procentuální zastoupení gamafrakce při elektroforéze bílkovin, jedná se však o vyšetření velmi hrubé, které odhalí pouze výrazné změny ve smyslu plus nebo minus. Elektroforéza séra je výhodným screeningovým vyšetřením ke zjištění možného paraproteinu.

Pro vyšetření hladiny imunoglobulinů třídy **IgG, IgA, IgM** se používá radiální imunodifuze, nyní častěji **turbidimetrie** nebo spíše **nefelometrie**. Referenční „normální“ hladiny se liší podle laboratoře, v níž je měření prováděno.

Zvýšení hladin Ig můžeme najít:

1. Při subakutních a chronických zánětlivých procesech, zejména infekčního nebo revmatického původu. Někdy platí, že zvýšení IgA nacházíme při zánětech převážně slizničního charakteru nebo při jaterních cirhózách, zatímco zvýšení IgG odráží spíše záněty intersticiální (prostor mezi tkáňovými buňkami). Osamocené zvýšení IgM při normálních hladinách jiných isotypů jako odraz proběhlého nebo subakutního zánětu je oproti rozšířené představě poměrně řídké.
2. Izolované zvýšení hladiny jedné třídy Ig se vyskytuje při myelomu, případně i jiných monoklonálních gamapatiích.
3. U pacientů ve vyšších věkových skupinách, neboť hladiny Ig, zejména IgA, mají tendenci se zvyšovat s věkem.

Snížení hladin jedné nebo více tříd imunoglobulinů může být způsobeno:

1. poruchou tvorby Ig při primárních protilátkových nebo kombinovaných imunodeficittech.
2. Sekundární poruchou tvorby protilátek, nejčastěji při lymfomech nebo leukémiích.
3. Ztrátami Ig močí, stolicí nebo rozsáhlými secernujícími plochami.

Hladina IgE se zjišťuje nejčastěji ELISA technikami. Zvýšení IgE doprovází alergické stavy prvého (atopického) typu přecitlivělosti nebo parazitární choroby, může se však objevit i u řady jiných onemocnění (imunodeficitních, autoimunitních a dalších).

Normální hodnota IgE nevylučuje možnost alergického postižení. Snížení hladiny IgE nemá podle současných znalostí žádnou diagnostickou hodnotu. Hladiny IgE jsou výrazně závislé na věku, udávají se v mezin. Jednotkách (1 IU=2,4ng IgE). Pro dospělou populaci se za normální považuje pod 150 IU/ml.

Hladinu specifického IgE (tj IgE namířené proti konkrétnímu alergenu) je nutno zjišťovat velmi citlivými metodikami, nejčastěji ELISA nebo RIA. Vyšetření je indikováno zejména v případech, kdy u pacienta není možno provést kožní testy časně přecitlivělosti, např. při kožním ekzému, příliš nízkém věku pacienty, nebezpečí závažné anafylaktické reakce u silně senzibilizovaného pacienta.

Vyšetření hladiny IgD nemá s výjimkou podezření na IgD myelomu téměř žádnou diagnostickou hodnotu.

Z kvalitativních změn Ig má velký význam průkaz paraproteinu. Podezření na přítomnost paraproteinu je možno vyslovit již při elektroforetickém vyšetření séra. Z dalších laboratorních vyšetření budí podezření nejčastěji jinak neobjasnitelná vysoká sedimentace erytrocytů pacienta nebo vysoká hladina jediné třídy Ig při normálních nebo snížených hladinách ostatních tříd. Průkaz paraproteinu a jeho další charakteristika (typ těžkých a lehkých řetězců) jsou možné pouze imuno elektroforézou nebo imunofixací.

Pro stanovení diagnózy myelomu je nutné provést další laboratorní vyšetření. Při sternální punkci se u pacientů s myelomem nachází zvýšený počet plazmatických buněk, často abnormální morfologie (myelomové buňky). Imunologické vyšetření většinou prokazuje zvýšenou hladinu té třídy Ig, v níž je přítomen paraprotein, zatímco u jiných tříd nacházíme imunoparézu – snížení hladin dané útlakem kostní dřeně. V krvi je přítomna anémie, někdy i leukopenie a trombocytopenie. V séru můžeme nalézt hyperkalcémii (nadměrný přebytek Ca) a zvýšenou hladinu beta – 2 imunoglobulinu. Na RTG skeletu, zejm. plochých kostí, nacházíme ostře ohraničená osteolytická ložiska.

Přítomnost paraproteinu nemusí znamenat přítomnost myelomu, paraprotein můžeme nalézt u nemocných s jinými malignitami lymfatického systému, při chronických zánětlivých procesech, ve stáří. Často se příčinu paraproteinu nepodaří vůbec zjistit – mluvíme o paraproteinémii neznámého významu.

Zvláštními typy Ig jsou též **kryoglobuliny**. Tyto Ig mají schopnost se při teplotách nižších než je teplota těla srážet. Mnohé kryoglobulinémie jsou klinicky němé, některé z nich však mohou vyvolávat závažné klinické obtíže: poškození funkce ledvin, vaskulitidu (je zánětlivé onemocnění cév v rámci autoimunitního onemocnění vedoucí někdy i k těžkému poškození orgánů - krvácení do mozku, do kůže, oka, selhání ledvin), chladovou kopřivku (alergická reakce na chlad, tj vylití histaminu do krve). Kryoglobulinémie často doprovázejí další imunopatologické stavy: paraproteinémie, autoimunitní choroby nebo chronickou hepatitidu C.

Při vyšetření přítomnosti kryoglobulinu je nutno zajistit takový transport krve, aby teplota neklesla od 37°C, nebo lépe krev odebrat přímo na ambulanci imunologického oddělení.

Vyšetření komplementového systému

Zvýšení hladin jednotlivých složek k. systému (většinou se vyšetřuje **C3 a C4**) nacházíme poměrně zřídka. Může být odrazem zánětlivé aktivity, neboť složky k.s. reagují jako proteiny akutní fáze. Snížení hladin složek k.s. může být způsobeno vrozenou poruchou tvorby jednotlivých složek (např. u C4 jsou heterozygotní deficity velmi časté) nebo zvýšenou spotřebou k.s. při aktivaci komplexu Ag-Ab. S takovou zvýšenou spotřebou se setkáváme zejména v akutním stádiu systémových imunokomplexových vaskulitid (je zánětlivé onemocnění cév v rámci autoimunitního onemocnění vedoucí někdy i k těžkému poškození orgánů - krvácení do mozku, do kůže, oka, selhání ledvin) Hladinu C3, C4 a případně jiných složek k.s. se vyšetřují jednoduchou radiální imunodifuzí, turbidimetry a nefelometry. Pokud je u pacienta podezření na defekt některé složky klasické cesty aktivace k.s., provádí se test **CH50** (50% hemolýza způsobená komplementem), při podezření na defekt alternativní složky lze provést vyšetření **AH50** (Stanovení 50% hemolytické aktivity komplementu Alternativní cestou). Při vyšetření nemocného na podezření na hereditární angioedém (vrozený nebo získaný deficit inhibitoru C1 složky komplementu- C1- INH) se vyšetřuje koncentrace C1 – INH v séru. Je možné též provést funkční test aktivity tohoto inhibitoru.

Proteiny „akutní fáze“

Vyšetření hladiny proteinů a.f. se provádí jednoduchou radiální difuzí, turbidimetry nebo nefelometry. Nejčastěji se sleduje hladina **C – reaktivního proteinu (CRP)**, zjišťování hladin jiných proteinů a.f. jako **alfa – 1 – antitrypsinu, orosomukoidu, ceruloplasminu, sérového amyloidu A** a dalších má již menší význam. Normálně je hladina CRP velmi nízká (pod 10mg/l), při zánětech stoupá až do hodnot stovek mg/l. Hladinu CRP více zvyšují záněty bakteriální než virové. Se zvýšením CRP se setkáváme i při zánětech neinfekčního charakteru – př. Při infarktu myokardu, v pooperačním období a mnoha jiných stavech. Důležité je sledování CRP u revmatických chorob: např. v akutní fázi revmatoidní artritidy jsou vždy

hladiny CRP výrazně zvýšeny, na druhé straně u SLE (systémový lupus erythematoses je multiorgánové autoimunitní onemocnění difúzní onemocnění pojivové tkáně, které je charakterizováno tvorbou autoprotilátek proti různým strukturám buněčného jádra.) nacházíme pouze minimální zvýšení CRP.

Všechny proteiny a.f. mají v těle nějakou funkci, proto snížení hladin těchto složek může vést k různým chorobám. Nejznámější je deficit **alfa – 1 – antitripsinu** (bílkoviny inaktivující proteázy uvolňující se z leukocytů při fagocytóze), jež vede ke vzniku plicního emfyzému – (rozedma=vymizení mezisklípkových přepážek) a k postižení jater. Nízkou hladinu ceruloplasminu nacházíme u Wilsonovy choroby projevující se jaterními a neurologickými příznaky způsobenými depozicí mědi v tkáních.

Vyšetření autoprotilátek

Průkaz přítomnosti autoprotilátek má často velmi vysokou hodnotu oří diagnostice autoimunitních chorob. Spektrum jednotlivých autoimunitních chorob je velmi široké a zasahuje do všech oblastí medicíny. V současné době se jedná o jistě stovky různých popsaných autoprotilátek, které je možno vyšetřovat. Přesto bývá sortiment vyšetřovaných protilátek prováděný většinou laboratoří úzký. Limitací, jež způsobuje toto zúžení diagnostické nabídky, je obtížnost průkazuněkterých autoprotilátek a někdy bývá též nízká výpovědní hodnota prokázané autoprotilátky. Některé autoprotilátky mohou mít velkou diagnostickou hodnotu, přesto nejsou příčinou vzniku konkrétního autoimunitního onemocnění. Mnohé autoimunitní choroby jsou totiž způsobeny autoreaktivními T – lymfocyty (jež je velmi těžké prokazovat) a přítomnost autoprotilátek bývá pouze doprovázejícím epifenomémem (nahodilý, vedlejší jev bez hlubšího významu). Např. u Hashimovy tyreoiditidy (parenchymu štítné žlázy lymfocytárním zánětem autoimunitní povahy), u níž nacházíme při laboratorním vyšetření protilátky proti tyreoglobulinu nebo mikrozomům štítné žlázy.

Revmatoidní faktor je autoprotilátka namířená proti konstantní části molekuly IgG. Nejčastěji bývá prokazován nepřímou aglutinací /latex-fixační test) nebo ELISA metodikami. Je diagnostickým znakem ukazujícím na onemocnění revmatoidní artritidou. Asi 20% nemocných s klinicky zřejmou revmatoidní artritidou nemá s revmatoidním faktor prokazatelný; pak se mluví o séronegativní revmatoidní aritritidě. Dále se s rev. F. můžeme setkat u některých nemocných s jinými typy revmatických chorob (systémový lupus erythematoses, Sjögrenův syndrom - porucha funkce žláz se zevni sekreci zejména slinných a slzných projevuje se nedostatečnou tvorbou jejich sekretu a suchosti ustní sliznice a spojivek) i u některých jiných onemocnění – chronických hepatitid, subakutní bakteriální endokarditidy a dalších. S nízkými titry revmatoidního faktoru se můžeme setkat u starších osob, ačkoli tito lidé netrpí žádnou z uvedených chorob.

Antinukleární protilátky (ANA, starší název ANF) se vyšetřují nepřímou imunofluorescencí. Substrátem pro toto vyšetření mohou být buňky tkáňových linií nebo řezy živočišnými tkáněmi, nejčastěji se používají krysí játra. Nález antinukleárních protilátek je důležitý diagnostický text pro systémový lupus erythematoses (SLE), i když u této choroby může být několik % nemocných ANA negativní. Dále se ANA Ab objevují ve variabilní frekvenci u nemocných s některými jinými revmatickými chorobami (revmatoidní artritida, sklerodermie, Sjögrenův syndrom), pacientů s chronickou autoimunitní hepatitidou a dalšími onemocněními. Poměrně častý je výskyt i u zdravých, zejména starších lidí, pak nacházíme jen nízké titry ANA. Frekvence těchto nepsecifických nálezů závisí na titru, v němž přítomnost ANA prokazujeme a na vyšetřované věkové skupině, řádově se však může jednat až o procenta zdravé populace.

Podle obrazu při imunofluorescenci můžeme odlišit několik typů antinukleárních Ab (typ homogenní, granulovaný, periferní a nukleolární), jednotlivé typy mají vazbu k určitým chorobám. Je též možno blíže specifikovat, proti kterým aAg jádra jsou protilátky namířeny – nejčastěji se prokazují protilátky proti dvouvláknové (nativní) DNA, histonům, a tzv, extrahovatelným nukleárním Ag (ENA). Do skupiny ENA se řadí antigeny označované jako Ro, La, Sm, Jo a další. Tato bližší specifikace ANA opět umožňuje přesnější stanovení diagnózy.

Antimitochondriální Ab jsou poměrně velmi spec. Laboratorním ukazatelem primární biliární cirhózy, u jiných chorob nebo u zdravých lidí se vyskytují zřídka. Nejčastěji je vyšetřujeme nepřímou imunofluorescencí na řezech zvířecími ledvinami, jejich přítomnost se projeví fluorescencí ledvinných kanálků.

Protilátky proti antigenům štítné žlázy - proti teryoglobulinu a mikrozomální peroxidáze se vyskytují zejména u nemocných s Hashimotovou tyreoiditidou, méně často u jiných postižení štítné žlázy vazbou na receptory pro TSH (tyreotropní hormon) je příčinou Graves-Basedowovy choroby (Graves-Basedowova choroba - je to autoimunní choroba, kdy protilátka TSI (thyroid-stimulating imunoglobulin) stimuluje receptory pro TSH a tím dochází k nadměrnému růstu štítné žlázy, k nadměrné produkci a uvolňování T hormonů). Jeho přítomnost se vyšetřuje zřídka, používají se RIA testy.

Protilátky proti hladkému svalstvu se vyskytují u nemocných s chronickou autoimunitní hepatitidou, mohou se ale objevit i při akutních hepatitidách a i u zdravých lidí. Protilátky proti bazální membráně glomerulů mohou být důležitým vodítkem ukazujícím na autoimunitní etiologii glomerulonefritid, zejména u rychle progredující formy.

Protilátky proti acetylcholinovému receptoru neuromuskulární ploténky jsou příčinou myastenia gravis (je choroba způsobená poruchou neuromuskulárního přenosu na nervosvalové ploténce. Jde o autoimunní onemocnění, kdy u většiny postižených je zvýšená hladina protilátek proti acetylcholinovému receptoru.). Jejich průkaz je obtížný, používají se metodiky RIA. Pro stanovení diagnózy m.g. není jejich průkaz většinou nutný.

Výskyt protilátek proti cytoplazmě granulocytů (ANCA) může být diagnostickým znakem pro Wegenerovu granulomatózu (systémovou vaskulitidou (autoimunitní zánětlivé onemocnění cév) středních a malých arterií, venul ojedinele i velkých arterií). WG postihuje primárně horní a/nebo dolní dýchací cesty a ledviny a její patogeneze není dosud objasněna). vyskytuje se zde tzv. c – ANCA (cytoplazmatická ANCA, protilátky jsou namířeny proti granulocytární proteináze 3). Její nálezy jsou pro Wegenerovu granulomatózu poměrně specifický. Dalším typem je p – ANCA (perinukleární ANCA, nejčastěji se jedná o protilátky proti leukocytární myeloperoxidáze) vyskytující se u rychle progredující glomerulonefritidy a u některých typů systémových vaskulitid (polyarteritid nodosa, Churgův – Straussův syndrom). Posledním typem je x- ANCA, která bývá pozitivní u nemocných s colitis ulcerosa (zánětlivé střevní onemocnění), méně často u Crohnovy choroby (jedná se o chronické zánětlivé onemocnění střev, jehož příčina vzniku. hlavní příčinou chronického střevního zánětu je abnormálně vystupňovaná imunitní reakce jedince na normální součásti potravy, střevní bakterie a trávicí šťávy, pravděpodobně geneticky podmíněná, která vede k poškození vlastní tkáně).

Ab proti retikulinu a endomysiu hladkého svalstva. Lze prokázat u nemocných s celiakií nebo s kožní chorobou dermatitis herpetiformis (Dühring) (alergická autoimunitní choroba sliznice tenkého střeva. Při těchto onemocněních má význam i stanovení třídy, v níž je uvedena autoprottilátka, neboť přítomnosti IgA protilátek svědčí o aktivitě zmíněných chorob. V období remise autoprottilátka třídy AgA postupně mizí, zatímco IgG autoprottilátka přetrvávají velmi dlouho po vymizení příznaků, někdy až celý život. Obdobný diagnostický

význam má i vyšetření Ab proti gliadinu, což je jedna z frakcí bílkoviny obilných zrn – lepku (glutenu). Zde se nejedná o autoprotilátku.

Ab proti erytrocytům se vyšetřují přímým a nepřímým Coombsovým testem, indikací je podezření na hemolytickou anémii (autoimunitní Červená krvinka (erytrocyt) je ničena protilátkami vlastního těla (hypersenzitivita typu II). Do destrukce krvinek se dále zapojuje komplement (intravaskulární hemolýza = uvnitř cév) nebo makrofágy (extravaskulární hemolýza = mimo cévy). Kromě klasických antierytrocytárních Ab bývají též vyšetřovány tzv. **chladové aglutininy** a **chladové hemoliziny**, jež vyvolávají aglutinaci a hemolýzu v závislosti na teplotě, při níž reakce probíhá. **Antitrombocytární Ab** je možné nalézt u některých nemocných s autoimunitní idiopatickou trombocytopenickou purpurou (Jde o **autoimunitní** onemocnění, kdy tělo produkuje protilátky proti krevním destičkám a tím potlačuje jejich funkci), cennější je však průkaz imunoglobulinů přímo navázaných na trombocyty pacienta. Protilátky proti granulocytům mohou být příčinou autoimunitní granulocytopenie (vzniká např. po chemoterapii, pozor, **protilátky proti cytoplazmě granulocytů – ANCA** granulocytopenii nevyvolávají!). Vyšetření těchto autoprotilátek obvykle zajišťují hematologická nebo transfúzní oddělení. Zřídka je diagnosticky přínosný nález protilátek proti parietálním buňkám žaludku, jež bývají přítomny u atrofické gastritidy a perniciózní anemie (autoimunitní onemocnění zažívacího traktu). Stejně **stanovení protilátek proti beta buňkám pankreatu** u diabetes mellitus, inzulin – dependentní diabetes, DM-1) není ve srovnání s metodikami biochemickými diagnosticky příliš přínosné. Laboratorně je možno stanovovat i protilátky proti nadledvinkám (u autoimunitní adrenalitydy), příčně pruhovanému svalstvu a mnoha dalších tkáním nebo orgánům. Klinický přínos těchto vyšetření je v současné době omezený, stále však probíhá intenzivní výzkum, snažící se nalézt diagnosticky cenné autoprotilátky, které by pomohly v laboratorní diagnostice autoimunitních chorob, stanovily pravděpodobnou závažnost postižení, prognózu či pravděpodobnou odpověď na léčbu.

Vyšetření cirkulujících IK.

Má většinou význam pouze při monitorování zánětlivého procesu, zvýšení nacházíme v subakutním, chornickém či rekonvalescentním stadiu různých zánětlivých procesů. Význam pro diagnózu imunokomplexových chorob je velmi omezený, u nemocných s těmito chorobami je možno nalézt poměrně často normální hladiny IK. Pro diagnózu imunokomplexového postižení je mnohem důležitější průkaz deponovaných IK v postižených tkáních pomocí přímé imunofluorescence.

Buněčná imunologická vyšetření

Vyšetření subpopulací lymfocytů má význam zejména při diagnostice nemocných s podezřením na primární nebo sekundární imunodeficiency. O možném imunodeficitu nás informuje výrazný pokles jedné nebo více lymfocytárních subpopulací. Vyšetření subpopulací lymfocytů má též velký význam pro imunofenotypizaci leukémií a lymfomů – pomocí zjištěné exprese různých antigenů na maligních buňkách můžeme určit z jaké vývojové linie a z jakého vývojového stupně maligní buňky pocházejí.

Nejčastěji vyšetřované základní lymfocytární subpopulace při imunologickém vyšetření

CD3	T-lymfocyty	60-80%
CD4	Th – pomocné buňky	35 – 60%
CD8	Tc – cytotoxické	15 – 35%
CD19	B-lymfocyty	10 – 20%
CD16	NK-buňky	8 – 18%

Vyšetření funkčních vlastností lymfocytů má klinický význam pouze při diagnostice závažných imunodeficitních stavů. Jedná se o speciální vyšetření používané pouze u omezeného počtu pacientů. Stejně i vyšetření fagocytárních schopností polymorfonukleárních granulocytů má význam pouze u pacientů s podezřením na defekt fagocytárních funkcí, zejména primární.

HLA typizace pacientů

Vyšetření HLA antigenů pacienta se provádí jednak v rámci vytypování vhodného páru dárce – příjemce při orgánových transplantacích a dále jako pomocné vyšetření při podezření na některé choroby asociované s výskytem typických HLA – antigenů.

Význam HLA typizace pro transplantaci, předtransplantační vyšetření

Vyšetření HLA antigenů poskytuje základní podklady k výběru optimálního páru dárce-příjemce.

Předpokladem úspěšné alotransplantace je HLA kompatibilita mezi dárce a příjemcem (tj shodný HLA fenotyp dárce a příjemce). Pokud se týká orgánových transplantací, kompatibilita v lokusech HLA-A, B a zejména HLA-DR je podstatná u transplantací ledvin, protože již odlišnost dárce od příjemce v jediné antigenní specifitě HLA-DR negativně ovlivňuje přežívání štěpu. U transplantací srdce a plic je HLA kompatibilita méně významná vzhledem k minimální expresi HLA antigenů na buňkách těchto tkání. Obdobně se k HLA fenotypu výrazně nepřihlíží u transplantací jater. Při transplantaci rohovkové tkáně se na HLA kompatibilitu v současné době nebere, v výjimkou retransplantací vůbec ohled.

Zcela zásadní je význam HLA kompatibility u alogenních transplantací kostní dřeně. Zde se nespokojujeme se shodou seroplogických specifit HLA-antigenů, jako je tomu zatím u transplantací ledvin, ale usilejeme o kompatibilitu na úrovni molekulárně geneticky definovaných alel. Pro úspěšnou transplantaci kostní dřeně je kromě shody v HLA-DR důležitá shoda alel také v dalších lokusech (HLA-A, B a DQ).

Význam vyšetření HLA pro diagnostiku chorob

Vyšetření HLA antigenů asociovaných s chorobami je založeno na faktu, že s některými onemocněními se vyskytují určité HLA antigeny častěji, než v běžné populaci. Vzhledem k tomu, že přítomnost HLA antigenů je vrozená, zatímco takto asociované choroby jsou „získané“, je přesnější říci, že lidé s určitými HLA antigeny mají zvýšené riziko vzniku některých chorob. Nejčastěji se jedná o choroby, v jejichž etiologii hraje důležitou roli imunitní systém, zejména o autoimunitní onemocnění, může se ale jednat i o choroby, u nichž zatím žádnou významnější etiopatogenetickou vazbu k imunitnímu systému neznáme (maniodepresivní choroba, narkolepsie (chorobná spavost projevující se záchvaty krátkého spánku), idiopatická skolióza (typ skoliózy) a další.). Mechanismus vzniku těchto asociací jednoznačně rozřešen není, u některých chorob snad souvisí se schopností některých HLA antigenů různě účinně předkládat určité antigeny imunokompetentním buňkám imunitního systému.

Jako relativní riziko označujeme poměr mezi rizikem vzniku určité choroby u nositele definovaného rizikového faktoru a rizikem vzniku této choroby v běžné populaci. V případě asociací chorob s HLA antigeny je takovým rizikovým faktorem přítomnost některého HLA antigenu. Klinicky nejvýznamnější asociace (relativní riziko 87) je mezi revmatickým onemocněním ankylozující spondylitidou (Bechtěrevova choroba) a antigenem HLA-B27. V běžné populaci se vyskytuje u 9% lidí, zatímco u nemocných postižených touto chorobou je nalézán asi v 95% případů. Na antigen HLA B-27 jsou vázány i některé další revmatické choroby, př. Reiterův syndrom (uretritida (zánět močového měchýře a dolních močových cest), konjunktivitida (zánětlivé onemocnění oční spojivky), artritida (autoimunitní zánětlivé onemocnění pojivové tkáně organismu. Zánět napadá klouby, svaly a vazy) s relativním rizikem 37.

Choroba	HLA antigen	relat. riziko
Ankylozující spondylitis	B27	87
Reiterův syndrom	B27	37
Psoriatická artritida	B27	12

Revmatoidní artritida	DR4	6
Dermatitis herpetiformis	DR3	56
Pemfigus vulgaris	DR4	14
Myastenia gravis	B8	5
Celiakie	DR3	19
Goodpastureův syndrom	DR2	13

Myastenia gravis poruchy nervosvalového přenosu

Dermatitis herpetiformis (nemoci metabolické a poruchy výživy)

Pemfigus vulgaris (kožní choroba autoimunitního charakteru)

Goodpastureův syndrom (je autoimunitní onemocnění, které se manifestuje jako kapilární vaskulitida).