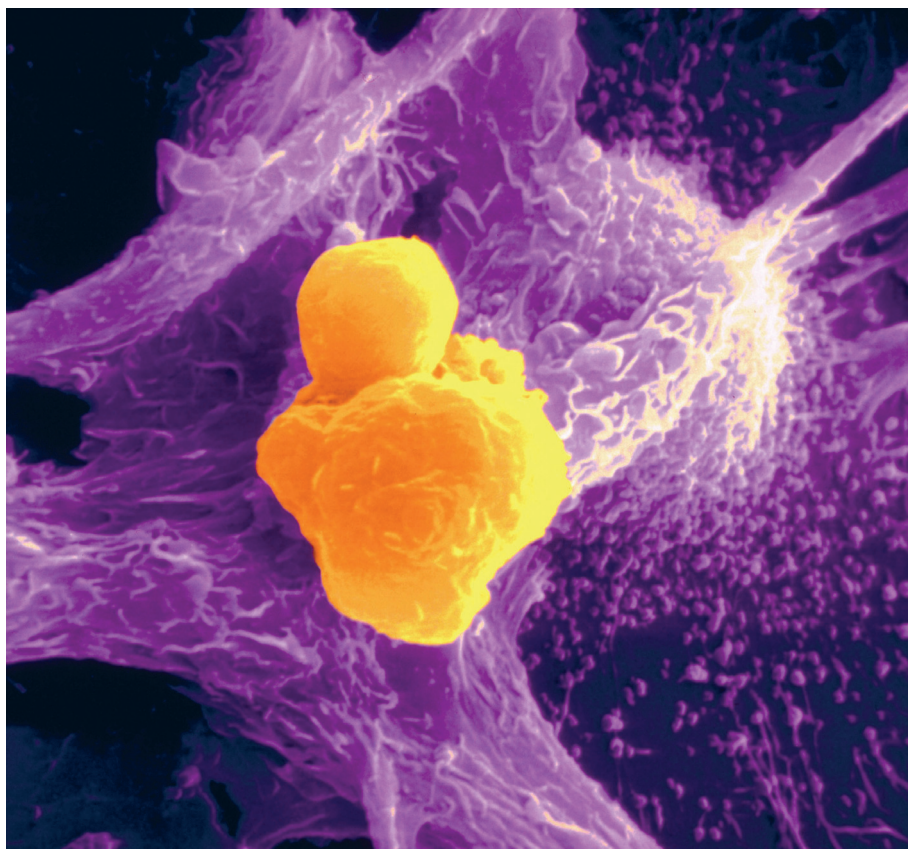


Jiřina Bartůňková, Milan Paulík a kolektiv

Vyšetřovací metody v imunologii

2., přepracované a doplněné vydání



Jiřina Bartůňková, Milan Paulík a kolektiv

Vyšetřovací metody v imunologii

2., přepracované a doplněné vydání

Upozornění pro čtenáře a uživatele této knihy

Všechna práva vyhrazena. Žádná část této tištěné či elektronické knihy nesmí být reprodukována a šířena v papírové, elektronické či jiné podobě bez předchozího písemného souhlasu nakladatele. Neoprávněné užití této knihy bude **trestně stíháno**.

VYŠETŘOVACÍ METODY V IMUNOLOGII

2., přepracované a doplněné vydání

Editoři:

Prof. MUDr. Jiřina Bartůňková, DrSc.
RNDr. Milan Paulík, CSc.

Autorský kolektiv:

Prof. MUDr. Jiřina Bartůňková, DrSc., Ústav imunologie UK 2. LF UK a FN Motol, Praha
Doc. MUDr. Ondřej Hrušák, Ph.D., Ústav imunologie UK 2. LF UK a FN Motol, Praha
RNDr. Milan Paulík, CSc., FN Thomayerova, Praha
Prof. MUDr. Karel Smetana, DrSc., Anatomický ústav UK 1. LF UK, Praha
Prof. MUDr. Anna Šedivá, DSc., Ústav imunologie UK 2. LF UK a FN Motol, Praha
Doc. MUDr. Radek Špišek, Ph.D., Ústav imunologie UK 2. LF UK a FN Motol, Praha
Ing. Luděk Šprongl, Nemocnice Šumperk
MUDr. Eva Vernerová, Ústav imunologie UK 2. LF UK a FN Motol, Praha

Technická spolupráce:

Mgr. Štěpán Peterka

Recenze:

Prof. RNDr. Jan Krejsek, CSc.
Prof. MUDr. Tomáš Zima, DrSc., MBA

Vydání odborné knihy schválila Vědecká redakce nakladatelství Grada Publishing, a.s.

Autoři i nakladatelství děkují společnosti BARIA s.r.o. za finanční podporu, která umožnila vydání publikace.

Text vznikl za podpory VZ MŠM 002162 0812.

© Grada Publishing, a.s., 2011

Obrázky dodali autoři.

Obrázek 12 podle předlohy autorů překreslila Jana Řeháková, DiS.

Cover Photo © fotobanka allphoto, 2011

Vydala Grada Publishing, a.s.

U Průhonu 22, Praha 7

jako svou 4510. publikaci

Odpovědná redaktorka Šarlota Pokorná

Sazba a zlom Šarlota Pokorná

Počet stran 168 + 4 strany barevné přílohy

2. vydání, Praha 2011

Vytiskly Tiskárny Havlíčkův Brod, a. s.

Názvy produktů, firem apod. použité v knize mohou být ochrannými známkami nebo registrovanými ochrannými známkami příslušných vlastníků, což není zvláštním způsobem vyznačeno.

Postupy a příklady v této knize, rovněž tak informace o lécích, jejich formách, dávkování a aplikaci jsou sestaveny s nejlepším vědomím autorů. Z jejich praktického uplatnění ale nevyplývají pro autory ani pro nakladatelství žádné právní důsledky.

ISBN 978-80-247-3533-7 (tištěná verze)

ISBN 978-80-247-7089-5 (elektronická verze ve formátu PDF)

ISBN 978-80-247-7090-1 (elektronická verze ve formátu EPUB)



Obsah

Seznam zkratk	12
Úvod	15
Předmluva	16
1 Stručná fyziologie a patologie imunitního systému (J. Bartůňková)	17
1.1 Složky a funkce imunitního systému	17
1.2 Buněčné složky imunity	18
1.2.1 Buněčná imunita nespecifická	19
1.2.1.1 Fagocyty buňky	19
1.2.1.2 Buňky NK	20
1.2.1.3 Bazofily, žírné buňky a další buňky	20
1.2.2 Buněčná imunita specifická	20
1.2.2.1 Lymfocyty T – pomahači	20
1.2.2.2 Lymfocyty T – supresorově cytotoxické buňky	21
1.2.2.3 Paměťové buňky	21
1.3 Humorální složky imunity	22
1.3.1 Nespecifické složky humorální	22
1.3.1.1 Komplementový systém	22
1.3.1.2 Proteiny akutní fáze	23
1.3.2 Specifické složky humorální	23
1.3.2.1 Protilátky	23
1.3.2.2 Autoprotilátky	25
1.3.2.3 Monoklonální protilátky	25
1.4 Komunikace mezi složkami imunity	25
1.4.1 Cytokiny	25
1.4.2 Adhezivní molekuly	26
1.5 HLA systém	26
1.6 Fyziologická imunitní reakce	27
1.7 Patologické imunitní reakce	28
1.7.1 Atopická reakce – časná přecitlivělost, I. typ	28
1.7.2 Cytotoxická reakce, II. typ	29
1.7.3 Imunokomplexová reakce, III. typ	29
1.7.4 Reakce oddálené přecitlivělosti, IV. typ	30
1.8 Nemoci z poruch imunity	30
1.8.1 Imunodeficience	30
1.8.1.1 Primární imunodeficience	31
1.8.1.2 Sekundární imunodeficience	32
1.8.2 Autoimunitní onemocnění	33
1.8.2.1 Systémové autoimunitní choroby	33
1.8.2.2 Orgánově specifické autoimunitní choroby	35
1.8.3 Alergie	36
2 Metody používané v laboratorní diagnostice imunopatologických stavů (M. Paulík)	39
2.1 Metody užívané k vyšetřování složek humorální imunity	39

2.1.1	Obecné principy reakce antigen–protilátka	39
2.1.1.1	Nativní a rekombinantní antigeny	40
2.1.1.2	Polyklonální a monoklonální protilátky	40
2.1.1.3	Afinita	41
2.1.1.4	Avidita	41
2.1.2	Elektroforéza a imunoelektroforéza	41
2.1.2.1	Princip metod a jejich úskalí	41
2.1.2.2	Uplatnění	42
2.1.2.3	Přístrojové vybavení a ekonomická rozvaha	43
2.1.2.4	Podmínky odběru materiálu, rychlost vyšetření	43
2.1.3	Radiální imunodifuze	43
2.1.3.1	Princip metody a její úskalí	44
2.1.3.2	Uplatnění	44
2.1.4	Nefelometrie a turbidimetrie	45
2.1.4.1	Princip metod a jejich úskalí	45
2.1.4.2	Přístrojové vybavení, uplatnění a ekonomická rozvaha	46
2.1.5	Aglutinace a hemaglutinace	47
2.1.6	Komplement fixační testy	47
2.1.7	Imunoreakce se značenými protilátkami – RIA, ELISA, EIA	47
2.1.7.1	Principy metod a jejich úskalí	48
2.1.7.2	Uplatnění	50
2.1.7.3	Přístrojové vybavení a ekonomická rozvaha	50
2.1.8	Imunoblotting	52
2.1.8.1	Princip metod a jejich uplatnění	52
2.1.9	Imunofluorescence	52
2.1.9.1	Princip metody a její úskalí	53
2.1.9.2	Přístrojové vybavení a ekonomická rozvaha	55
2.1.9.3	Uplatnění	55
2.1.10	Stanovení protilátek a antigenů průtokovou cytometrií	55
2.2	Metody užívané k vyšetřování složek buněčné imunity	56
2.2.1	Techniky izolace buněk (<i>R. Špíšek</i>)	56
2.2.1.1	Gradientová centrifugace	57
2.2.1.2	Izolace lymfocytů T pomocí rozet	58
2.2.1.3	Imunomagnetická selekce buněk	58
2.2.1.4	Selekce pomocí průtokové cytometrie	60
2.2.2	Průtoková cytometrie (<i>O. Hrušák</i>)	60
2.2.2.1	Princip metody	60
2.2.2.2	Analýza a grafické znázornění	61
2.2.2.3	Odesílání výsledků	63
2.2.2.4	Úskalí metody	63
2.2.2.5	Uplatnění	64
2.2.2.6	Přístrojové vybavení a ekonomická rozvaha	66
2.2.2.7	Podmínky odběru, rychlost vyšetření	66
2.2.2.8	Slide-based cytometrie	66
2.2.3	Proliferace lymfocytů (blastická transformace)	67
2.2.3.1	Princip metody a úskalí	67
2.2.3.2	Uplatnění	68
2.2.3.3	Přístrojové vybavení a ekonomická rozvaha	68

2.2.4	Enzyme-linked ImmunoSpot Assay (ELISPOT) (<i>R. Špíšek</i>)	68
2.2.4.1	Princip metody	68
2.2.4.2	Uplatnění	70
2.2.4.3	Přístrojové vybavení a ekonomická rozvaha	70
2.2.5	Cytotoxické testy (<i>R. Špíšek</i>).	70
2.2.5.1	Cytotoxický test založený na uvolňování ⁵¹ Cr – princip metody	70
2.2.5.2	Úskalí metody	71
2.2.5.3	Uplatnění	71
2.2.5.4	Podmínky odběru materiálu, rychlost vyšetření	72
2.2.5.5	Přístrojové vybavení a ekonomická rozvaha	72
2.2.6	Fagocytóza (<i>J. Bartůňková</i>).	72
2.2.6.1	Princip metody	72
2.2.6.2	Úskalí metody	72
2.2.6.3	Uplatnění	73
2.2.6.4	Přístrojové vybavení a ekonomická rozvaha	73
2.2.7	Baktericidní test	73
2.2.7.1	Princip metody	73
2.2.7.2	Úskalí metody	74
2.2.7.3	Uplatnění	74
2.2.7.4	Přístrojové vybavení, ekonomická rozvaha	74
2.2.7.5	Podmínky odběru materiálu, rychlost vyšetření	74
2.2.8	Testy oxidačního metabolismu – NBT, INT	74
2.2.8.1	Princip metody	74
2.2.8.2	Úskalí metody a uplatnění	75
2.2.8.3	Přístrojové vybavení, ekonomická rozvaha	75
2.2.9	Chemiluminiscence	75
2.2.9.1	Princip metody	75
2.2.9.2	Úskalí metody	76
2.2.9.3	Uplatnění	76
2.2.9.4	Přístrojové vybavení, ekonomická rozvaha	76
2.2.9.5	Podmínky odběru materiálu, rychlost vyšetření	76
2.2.10	Imunohistochemické metody (<i>K. Smetana</i>).	76
2.2.10.1	Princip metody	77
2.2.10.2	Příprava buněk a tkání	77
2.2.10.3	Vlastní imunohistochemická reakce	77
2.2.10.4	Metoda vícenásobného značení	78
2.2.10.5	Úskalí metody	79
2.2.10.6	Uplatnění	80
2.2.10.7	Přístrojové vybavení a ekonomická rozvaha	80
2.2.10.8	Podmínky odběru materiálu, rychlost vyšetření	81
2.2.11	Lektinově histochemické metody v imunologii	81
2.2.11.1	Princip metody	81
2.2.11.2	Průkaz exprese endogenního lektinu	82
2.2.11.3	Průkaz exprese specifického cukerného motivu metodou lektinové histochemie	82
2.2.11.4	Průkaz vazebné reaktivity exprimovaného lektinu metodou reverzní lektinové histochemie	82

2.2.11.5	Vícenásobné značení na úrovni jedné buňky v lektinové histochemii	83
2.2.11.6	Úskalí metody	83
2.2.11.7	Uplatnění	83
2.2.11.8	Přístrojové vybavení	83
2.2.11.9	Podmínky odběru materiálu, rychlost vyšetření	83
2.2.11.10	Ekonomická rozvaha	83
2.3	Metody molekulární biologie (<i>R. Špíšek</i>)	84
2.3.1	PCR	84
2.3.1.1	Princip metody	84
2.3.2	Reverzně transkriptázová PCR	85
2.3.2.1	Princip metody	85
2.3.2.2	Uplatnění	86
2.3.3	Kvantitativní PCR v reálném čase	86
2.3.3.1	Princip metody	86
2.3.3.2	Analýza produktů PCR, RT-PCR a kvantitativní PCR v reálném čase	86
2.3.3.3	Princip a uplatnění	87
2.3.4	Genomika (<i>R. Špíšek</i>)	88
2.3.5	DNA mikročipy (<i>M. Paulík, R. Špíšek</i>)	88
2.3.5.1	Princip	88
2.3.5.2	Uplatnění	89
2.3.5.3	Přístrojové vybavení a ekonomická rozvaha	89
2.3.6	Proteomika	90
2.3.6.1	Princip	90
2.3.6.2	Uplatnění	90
3	Možnosti vyšetřování složek imunity (<i>A. Šedivá</i>)	93
3.1	Vyšetření parametrů humorální imunity	93
3.1.1	Protilátky	93
3.1.1.1	Metody vyšetření protilátek	93
3.1.1.2	Indikace k vyšetření	94
3.1.1.3	Interpretace patologických výsledků	95
3.1.2	Vyšetření monoklonální komponenty	96
3.1.2.1	Indikace k vyšetření	96
3.1.2.2	Interpretace patologických výsledků	96
3.1.3	Kryoglobuliny	96
3.1.3.1	Metody stanovení	97
3.1.3.2	Indikace k vyšetření	97
3.1.3.3	Interpretace výsledků	97
3.1.4	Vyšetření imunokomplexů	97
3.1.4.1	Metody stanovení	97
3.1.4.2	Indikace k vyšetření	97
3.1.4.3	Interpretace výsledků	98
3.1.5	Proteiny akutní fáze a sedimentace erytrocytů	98
3.1.5.1	Metody stanovení	98
3.1.5.2	Indikace k vyšetření	99
3.1.5.3	Interpretace vyšetření	99

3.1.6	Komplement a jeho složky	100
3.1.6.1	Metody stanovení složek a funkce komplementu	100
3.1.6.2	Porovnání metodických přístupů	101
3.1.6.3	Indikace k vyšetření a interpretace patologických hodnot	101
3.1.7	Autoprotilátky (<i>J. Bartůňková</i>)	102
3.1.7.1	Metody stanovení a jejich porovnání	102
3.1.7.2	Indikace k vyšetření	104
3.1.7.3	Výskyt jednotlivých typů autoprotilátek	104
3.1.7.4	Interpretace patologických výsledků	106
3.2	Vyšetření parametrů buněčné imunity (<i>J. Bartůňková</i>)	106
3.2.1	Stanovení povrchových znaků lymfocytů a dalších buněk	106
3.2.1.1	Metody stanovení	106
3.2.1.2	Indikace k vyšetření	107
3.2.1.3	Rozmezí normálních hodnot	107
3.2.1.4	Interpretace patologických výsledků	108
3.2.2	Funkční testy lymfocytů	109
3.2.2.1	Metody stanovení	109
3.2.2.2	Porovnání jednotlivých metodických přístupů	109
3.2.2.3	Indikace k vyšetření	110
3.2.2.4	Rozmezí normálních hodnot	110
3.2.2.5	Interpretace patologických výsledků	110
3.2.3	Cytotoxicita buněk NK a lymfocytů T	111
3.2.3.1	Metody stanovení	111
3.2.3.2	Porovnání jednotlivých metodických přístupů	111
3.2.3.3	Indikace k vyšetření	111
3.2.4	Stanovení cytokinů (<i>R. Špísek</i>)	111
3.2.4.1	Metody stanovení	111
3.2.4.2	Indikace k vyšetření	112
3.2.5	Fagocytóza (<i>J. Bartůňková</i>)	113
3.2.5.1	Metody stanovení	113
3.2.5.2	Porovnání jednotlivých metodických přístupů	113
3.2.5.3	Indikace k vyšetření	113
3.2.5.4	Rozmezí normálních hodnot	113
3.2.5.5	Interpretace patologických výsledků	113
3.2.6	Chemotaxe	114
3.2.6.1	Metody stanovení	114
3.2.6.2	Indikace k vyšetření	114
3.2.7	Oxidační metabolismus	115
3.2.7.1	Metody stanovení	115
3.2.7.2	Porovnání jednotlivých metodických přístupů	115
3.2.7.3	Indikace k vyšetření	115
3.2.7.4	Rozmezí normálních hodnot a interpretace patologických výsledků	115
3.2.8	Mikrobicidie fagocytů	115
3.2.8.1	Metody stanovení	115
3.2.8.2	Indikace k vyšetření	116
3.2.9	Test aktivace bazofilů (<i>E. Vernerová</i>)	116
3.2.9.1	Metody stanovení	116

3.2.9.2	Porovnání jednotlivých metodických přístupů	116
3.2.9.3	Indikace k vyšetření	117
3.2.9.4	Rozmezí normálních hodnot	117
3.2.9.5	Interpretace patologických výsledků	117
3.2.10	Eozinofilní kationický protein (ECP)	117
3.2.10.1	Metody stanovení	118
3.2.10.2	Indikace k vyšetření a rozmezí normálních hodnot	118
3.2.10.3	Interpretace patologických výsledků	118
3.2.11	Vyšetření apoptózy (<i>R. Špíšek</i>)	118
3.2.11.1	Metody stanovení	119
3.2.11.2	Indikace k vyšetření a interpretace patologických výsledků	119
3.2.12	Typizace HLA (<i>R. Špíšek</i>)	120
3.2.12.1	Metody stanovení	120
3.2.12.2	Nomenklatura	121
3.2.12.3	Materiál	121
3.2.12.4	Indikace k vyšetření	121
4	Vyšetřovací algoritmy při diagnostice imunopatologických stavů	123
4.1	Diagnostika imunodeficiencí (<i>A. Šedivá</i>)	123
4.1.1	Anamnéza	123
4.1.1.1	Anamnéza rodinná	123
4.1.1.2	Anamnéza osobní	123
4.1.2	Klinický obraz	124
4.1.3	Spektrum indikovaných imunologických vyšetření	125
4.1.3.1	Imunoglobuliny	125
4.1.3.2	Komplement	126
4.1.3.3	Počet, zastoupení a funkce lymfocytů	127
4.1.3.4	Počet, zastoupení a funkce fagocytárních buněk	128
4.1.3.5	Genetická vyšetření	128
4.1.3.6	Další vyšetření	128
4.2	Diagnostika autoimunitních onemocnění (<i>J. Bartůňková</i>)	128
4.2.1	Anamnéza	129
4.2.2	Klinický obraz	129
4.2.3	Spektrum indikovaných imunologických vyšetření	129
4.2.3.1	Autoprotilátky	129
4.2.3.2	Imunoglobuliny	134
4.2.3.3	Komplement	134
4.2.3.4	CRP a jiné proteiny akutní fáze	134
4.2.3.5	HLA	134
4.2.3.6	Subpopulace lymfocytů	134
4.2.3.7	Cytokiny	135
4.2.4	Spektrum dalších pomocných vyšetření	135
4.2.4.1	Sedimentace erytrocytů	135
4.2.4.2	Sérologické vyšetření	135
4.2.4.3	Histologické vyšetření	135
4.2.4.4	Hematologické vyšetření	136
4.2.4.5	Biochemické vyšetření	136

4.2.4.6	Zobrazovací a další metody	136
4.2.4.7	Neurologické pomocné vyšetřovací metody	136
4.3	Diagnostika alergických onemocnění (<i>E. Vernerová</i>)	136
4.3.1	Anamnéza	137
4.3.2	Klinický obraz	138
4.3.2.1	Alergická rýma	139
4.3.2.2	Atopický ekzém	139
4.3.2.3	Asthma bronchiale	139
4.3.2.4	Alergie na hmyzí bodnutí	139
4.3.2.5	Potravinová alergie	140
4.3.2.6	Systémová anafylaxe	140
4.3.3	Spektrum indikovaných imunologických vyšetření	140
4.3.3.1	Kožní testy	140
4.3.3.2	Stanovení koncentrace protilátek IgE	141
4.3.3.3	Stanovení koncentrace specifických protilátek IgE	142
4.3.3.4	Srovnání kožních testů a stanovení specifického IgE	142
4.3.3.5	Expoziční testy	142
4.4	Monitorování imunitní odpovědi při aktivní protinádorové imunoterapii (<i>R. Špíšek</i>)	143
4.4.1	In vivo hodnocení antigenně specifické imunity	143
4.4.1.1	Reakce pozdního typu přecitlivělosti (DTH)	143
4.4.2	In vitro fenotypické hodnocení antigenně specifické imunitní reakce	143
4.4.2.1	Analýza používaných variabilních regionů TCR	143
4.4.2.2	Tetramery molekul MHC s peptidy	144
4.4.2.3	Complementarity determining region 3	144
4.4.3	In vitro funkční analýza antigenně specifické imunitní reakce	144
4.4.3.1	Proliferace lymfocytů	144
4.4.3.2	Detekce produkovaných cytokinů	145
4.4.3.3	Detekce intracelulárních cytokinů	145
4.4.3.4	Kvantifikace mRNA pro cytokiny pomocí RT-PCR	146
4.4.3.5	Cytotoxické testy	146
4.4.4	Výběr metody pro imunologické sledování protinádorové imunoterapie	146
5	Systémy jakosti (kvality) v laboratoři (<i>L. Šprongl, M. Paulík</i>)	149
5.1	Standardizace	150
5.2	Certifikace	152
5.3	Akreditace	152
5.4	Kvalita laboratorní práce v imunologických laboratořích (<i>M. Paulík</i>)	153
	Doporučená literatura	155
	Rejstřík	157
	Souhrn	163
	Summary	164

Seznam zkratek

ACA	anticentromerové autoprotilátky
ACLA	antikardiolipinové autoprotilátky (anticardiolipin autoantibodies)
ADCC	buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)
AIDS	syndrom získané imunodeficiencie (acquired immune deficiency syndrome)
ALPS	autoimunitní lymfoproliferativní syndrom
ANA	antinukleární autoprotilátky (antinuclear autoantibodies)
ANCA	antineutrofilní cytoplazmatické protilátky (antineutrophil cytoplasmic antibodies)
APC	buňka předkládající antigen (antigen-presenting cell)
aPTT	aktivovaný parciální tromboplastinový čas
ASMA	protilátky proti hladkému svalu (anti-smooth muscle autoantibodies)
BAT	test aktivace bazofilů (basophile activation test)
BCG	Calmetteův-Guérinův bacil
BCR	receptor lymfocytů B (B cell receptor)
BPI	protein zvyšující baktericidii a permeabilitu (bactericidal permeability increasing protein)
C1 INH	inhibitor C1 složky komplementu
CAST	test degranulace bazofilů
CD	diferenční antigen (cluster designation)
cDNA	komplementární kyselina deoxyribonukleová (complementary DNA)
CDR	oblast determinující komplementaritu (complementary determining region)
CFSE	carboxyfluorescein succinimidyl ester
CGD	chronická granulomatózní choroba (chronic granulomatous diseases)
CID	kombinovaný imunodeficit (combined immunodeficiency)
CL	chemiluminiscence
CMV	cytomegalovirus
CNS	centrální nervový systém
CRP	C-reaktivní protein (C-reactive protein)
CTL	cytotoxický lymfocyt T (cytotoxic T lymphocyte)
CVID	běžný variabilní imunodeficit (common variable immunodeficiency)
DBPCT	dvojitě slepý placebem kontrolovaný pokus (double blind placebo controlled test)
DC	dendritická buňka (dendritic cell)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
dsDNA	dvoušroubovice DNA (double stranded DNA)
DTH	reakce pozdní přecitlivělosti (delayed hypersensitivity test)
EA	časný antigen (early antigen)
EBNA	nukleární antigen viru Epstein-Barr (EB nuclear antigen)
EBV	virus Epstein-Barr (Epstein-Barr virus)
ECP	eozinofilní kationický protein (eosinophil cationic protein)
EDTA	kyselina dietylen tetraoctová
EHK	externí hodnocení kvality
EIA	enzymová imunoanalýza
ELISA	enzymová imunoanalýza na imunosorbentech (enzyme-linked immunosorbent assay)

ENA	extrahovatelné nukleární antigeny
FISH	fluorescenční in situ hybridizace (fluorescent in situ hybridization)
FITC	fluorescein izothyocyanát
FSc	parametr analýzy u průtokové cytometrie (forward scatter)
GAD	dekarboxyláza kyseliny glutamové (glutamic acid decarboxylase)
GAPDH	glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenáza
G-CSF	faktor stimulující kolonie granulocytů (granulocyte colony stimulating factor)
HBV	virus hepatitidy B
HCV	virus hepatitidy C
HIV	virus lidské imunodeficiency (human immune deficiency virus)
HLA	hlavní komplex lidských histokompatibilních antigenů (human leukocyte antigen complex)
HLH	hemofagocyující lymfohistiocytóza
CH100	celková hemolytická aktivita komplementu (100%)
CH50	celková hemolytická aktivita komplementu (50%)
IFN	interferon
IgA	imunoglobulin A
IgD	imunoglobulin D
IgE	imunoglobulin E
IgG	imunoglobulin G
IgM	imunoglobulin M
IL	interleukin
INT	jod-nitroblue tetrazolium
JCA	juvenilní chronická artritida
LAD	syndrom defektní adhezivity leukocytů (leukocyte adhesion deficiency syndrome)
LFA	adhezivní molekula ze skupiny integrinů (leukocyte-function-associated antigen)
LKM	protilátky proti mikrozomům jater a ledvin (liver-kidney microsomes antibodies)
MAC	komplex složek komplementu atakující membránu a vyvolávající lýzu (membrane attack complex)
MALT	slizniční imunitní systém (mucosa associated lymphoid tissue)
MBL	lektin vázající manózu (mannose binding lectin)
MCTD	smíšená choroba pojiva (mixed connective tissue disease)
MGUS	monoklonální gamapatie nejasného významu (monoclonal gammopathy of unknown significance)
MHC	molekuly tkáňové slučitelnosti (major histocompatibility complex), viz HLA
MPO	myeloperoxidáza
MSHP	mikrosférické hydrofilní partikule
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát (nicotinamid adenin dinucleotide phosphate)
NBT	nitrotetrazoliová modř (nitroblue tetrazolium chlorid)
NK	přírozený zabíječ (natural killer)
OPD	ortofenylendiamin
PAA	polyakrylamid
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza
PBMC	mononukleární buňky z periferní krve (peripheral blood mononuclear cells)
PCR	řetězová polymerázová reakce (polymerase-chain reaction)

PE	fykoerytrin
PEG	polyetylenglykol
PHA	fytohemaglutinin (phytohemaglutinin)
PI	propidium jodid
PMA	forbol myristát acetát (phorbol myristate acetate)
PMN	polymorfonukleární leukocyty (polymorphonuclear cell)
PWM	poke weed mitogen
RA	revmatoidní artritida
RAST	radioallergosorbent test
RF	revmatoidní faktory
RIA	radioimmunosorbent-assay
RISA	ring-immunosorbent assay
RNA	kyselina ribonukleová (ribonucleic acid)
RPMI	médium
RT-PCR	reverzně transkriptázová polymerázová řetězová reakce (reverse transcriptase polymerase chain reaction)
SCID	těžký kombinovaný imunodeficit (severe combined immunodeficiency)
SI	stimulační index
SLE	systémový lupus erythematoses (systemic lupus erythematoses)
SSc	parametr analýzy u průtokové cytometrie (side scatter)
SSP	sekvenčně specifické primery
Tc	cytotoxický lymfocyt T pro antigen (cytotoxic T cell)
TCR	receptor lymfocytu T (T cell receptor)
TdT	terminální deoxyribonukleotid transferáza
TGF	transformující růstový faktor (transforming growth factor)
Th	pomocný lymfocyt T (helper T cell)
TMB	tetrametylbenzidin
TNF	faktor nekrotizující nádory (tumor necrosis factor)
Tr	regulační lymfocyt T (regulatory T cell)
TSH	hormon stimulující tyroideu (thyreoid stimulating hormon)
VCA	virový kapsidový antigen (viral capsid antigen)
VCAM	vaskulární adhezivní molekula (vascular cell adhesion molecule)

Úvod

Uplynulo již dvacet let od doby, kdy se čtenářům dostala do rukou skvělá kniha Vybrané diagnostické metody v imunologii autorů J. Procházkové a C. Johna. Dodnes je tato publikace součástí knihovničky imunologických laboratoří. Pokud se nějaký student, ať již v pregraduálním, nebo postgraduálním studiu, chtěl něco dozvědět o základních imunologických technikách, sáhl po této knize. Doba však již pokročila a řada metod se změnila, některé zanikly, jiné přibýly. Studenti medicíny i přírodních věd, postgraduální studenti v biomedicině, lékaři stážující v laboratoři před atestací z alergologie a klinické imunologie začali postrádat ucelenou stručnou publikaci, kde by se něco dozvěděli nejen o principech moderních metod, ale také o indikacích k vyšetření a interpretaci výsledků. Posledním impulzem k sepsání této příručky pak byla akreditace bakalářského studia v oboru Zdravotní laborant na 2. lékařské fakultě UK v Praze, a tedy potřeba moderních učebních textů pro tento specifický obor. Kolektiv interních a externích učitelů 2. lékařské fakulty UK se proto rozhodl zaplnit chybějící mezeru na trhu a přichází s touto publikací.

Kniha je koncipována jako praktická přehledná příručka pro klinické i laboratorní pracovníky zabývající se imunologií. V první kapitole je jako výchozí informace pro další texty stručně rekapitulována fyziologie a patologie imunitního systému. Druhá kapitola pojednává o metodikách, které se používají pro diagnostiku imunitních parametrů. Metodicky neobsahují podrobný pracovní protokol, spíše se orientují na principy metod, jejich úskalí, limity, uplatnění v diagnostice různých parametrů imunity. U jednotlivých metod je také zmíněno, jaké přístrojové vybavení metoda vyžaduje a jak je ekonomicky náročná.

Třetí kapitola se zabývá možnostmi stanovení jednotlivých parametrů imunity. Zatímco ve druhé kapitole jsou zmíněny metody (např. nefelometrie), třetí kapitola se zabývá tím, jakými metodami lze stanovit jednotlivé parametry imunity (např. imunoglobuliny– nefelometrií, radiální imunodifuzí ...), jaké jsou výhody a nevýhody jednotlivých metod stanovení. Zároveň obsahuje odstavce o fyziologických hodnotách jednotlivých parametrů, popřípadě o specifitě nebo senzitivitě jednotlivých vyšetření a interpretaci patologických výsledků.

Čtvrtá kapitola obsahuje základní algoritmy vyšetření, která jsou indikována u jednotlivých druhů imunopatologických stavů – imunodeficiencí, autoimunitních a alergických chorob. Stručně jsou zmíněny i anamnestické a klinické aspekty, více pozornosti je věnováno laboratornímu spektru. Je zařazena i kapitola o možnostech monitorování protinádorové imunity, neboť předpokládáme, že imunoterapie se v blízké budoucnosti přenesou z vědeckého experimentu do klinické praxe a požadavky na imunologické laboratoře se v tomto směru zvýší.

Poslední kapitola je věnována problematice akreditace, certifikace a standardizace v klinických laboratořích.

Oproti starší publikaci Procházkové a Johna neobsahuje kniha podrobné laboratorní protokoly. Doba se změnila a celá řada testů je dodávána výrobcem v kompletech, setech nebo je zcela automatizována. Učebnice by byla v tomto aspektu nerovnoměrná: byly by podrobně popsány metody na vyšetření funkcí buněčných složek imunity, které jsou stále založeny na manuálním zpracování, zatímco u většiny testů humorální imunity by bylo napsáno – „zkumavku s krví dáme do analyzátoru a počkáme na výsledek“ nebo „postupujeme dle návodu výrobce“.

Doufáme, že publikaci shledají jako užitečnou lékaři a přírodovědci vzdělávající se v problematice klinické a laboratorní imunologie, postgraduální studenti v biomedicině přicházející do styku s laboratorními metodami, posluchači bakalářského studia a vyššího odborného studia oboru zdravotní laborant, ale i biochemici, mikrobiologové, farmakologové a také kliničtí lékaři jiných odborností.

Předmluva k 2. vydání

Na začátku školního roku 2009/2010 jsme si uvědomili při úvodní přednášce pro bakalářský obor zdravotní laborant, že při doporučování studijní literatury slovy: „Používejte naši novou učebnici Laboratorní vyšetřovací metody v imunologii,“ mluvíme o knize s rokem vydání 2005. Což znamená, že doporučujeme učebnici starou pět let. Rozhodli jsme se, že pro další školní rok učebnici inovujeme.

Ponechali jsme obdobnou strukturu jako v předešlém vydání, neboť jsme měli na tuto koncepci velmi pozitivní ohlasy. V nové učebnici jsme se snažili zachytit obraz počátku 21. století v imunologických laboratořích. Rozvoj laboratorních technik jde jako rozvoj všech technologií v lidské činnosti nezadržitelně kupředu, ale i v době špičkových technologií zůstávají některé metody „zlatým a prověřeným standardem“ a leckdy se jen obtížně nahrazují moderními technikami. Výpovědní hodnota některých nových technologií pro klinickou diagnostiku není v zásadě o moc přínosnější, než je tomu u metod klasických, přičemž finanční náročnost je někdy enormní. Zmínili jsme metody, které přinejmenším v principu ještě dlouho nezastarají (reakce založené na vazbě antigen–protilátka se používají již více než 80 let). Doplnili jsme metody, které nyní nejsou zcela rutinní, ale již se „o nich ví“, a můžeme očekávat, že si zanedlouho najdou své místo v laboratorní diagnostice, a které již v současnosti tvoří arzenál výzkumných laboratoří. Přestože je naše učebnice zaměřena zejména na laboratorní techniky a jejich význam, snažili jsme se, byť jen ve stručnosti, zmínit, že laboratorní vyšetření není samospasitelné a že ani v éře biočipů, mikroarraí a průtokové cytometrie neztratí v diagnostice imunopatologického stavu svůj význam anamnéza, fyzikální vyšetření a další pomocné vyšetřovací metody.

Za kolektiv autorů editoři

1 Stručná fyziologie a patologie imunitního systému

Jiřina Bartůňková

1.1 Složky a funkce imunitního systému

Imunitní systém patří spolu s endokrinním a nervovým systémem k regulačním mechanismům organismu, které zajišťují jeho celistvost a udržování vnitřního prostředí (homeostázu). Základní vlastností imunitního systému je schopnost rozpoznat škodlivé od neškodného, cizí od vlastního. Škodliviny zevního i vnitřního původu jsou likvidovány, neškodné je tolerováno. Unikátní vlastností imunity, obdobnou nervové soustavě, je schopnost **učení a paměti**. Funkce imunitního systému zajišťuje vzájemná provázanost mechanismů imunity přirozené – **nespecifické** a adaptivní – **specifické**. Do nespecifické imunity patří polymorfonukleární leukocyty, monocyty, makrofágy a dendritické buňky a různé součásti plazmy, jako je komplement a proteiny akutní fáze. Do specifické imunity patří lymfocyty T a lymfocyty B, které se po diferenciaci do plazmatických buněk stávají producenty protilátek.

Látka, která je schopna vyvolat imunitní reakci, se nazývá **antigen**. Z chemického hlediska jsou antigeny většinou bílkoviny (proteiny) nebo bílkoviny spolu s cukernými složkami – glykoproteiny. Mohou však být i povahy tukové (lipidy, fosfolipidy, glykolipidy) a cukerné (polysacharidy). Pokud je antigen zevního původu, označuje se jako **exoantigen**. Jedná se nejčastěji o složky mikroorganismů. Jako **alergen** se označuje exoantigen, který je schopen u vnímavého jedince navodit nepřiměřenou imunologickou reakci – alergickou reakci. Alergeny mohou být pyly, zvířecí srst, potraviny, léky a další látky. Struktury vlastních tkání, proti nimž se vyvíjí imunitní reakce, se nazývají **autoantigeny**. Malé molekuly, které jsou schopny vyvolat imunitní reakci pouze po vazbě na makromolekulární nosič (např. albumin), jsou nazývány **hapteny** (např. léky). Malá oblast molekuly antigenu, která je rozeznávána antigenně specifickými receptory, se nazývá **epitop**.

Laboratorní imunologické metody jsou v převážné většině založeny na reakci antigen–protilátka (kapitola 2). Antigenem v těchto reakcích může být jakákoliv složka, která je vyšetřována, tj. i protilátka (např. lidský imunoglobulin). Protilátkou je pak v systému zvířecí imunoglobulin, který byl vyroben imunizací zvířete zkoumanou lidskou protilátkou, neboť ta coby cizorodá bílkovina představuje pro zvířecí imunitní systém antigen.

Buňky imunitního systému spolu s pojivovými buňkami a dalšími strukturami tvoří anatomické a funkční celky – **lymfatické orgány a tkáně**. Buňky zajišťující imunitní reakce se nazývají **imunokompetentními** buňkami. **Centrálními** lymfatickými orgány jsou **kostní dřeň** a **brzlík** (tymus). Jsou to místa, kde dochází ke vzniku, diferenciaci a zrání imunokompetentních buněk. V kostní dřeni vznikají všechny imunitní buňky ze společné **kmenové** buňky. Ta se dále diferenciuje na **myeloidní** a **lymfoidní** buněčné linie. Z myeloidní linie vznikají červené krvinky a krevní destičky a dva druhy bílých krvinek, granulocyty a monocyty. Z lymfoidní linie vzniká další druh bílých krvinek – lymfocyty. Ty, které se dále vyvíjejí v tymu, se označují jako **lymfocyty T**. V kostní dřeni se vyvíjí celá linie myeloidní a **lymfocyty** typu **B**, z nichž se posléze stávají buňky plazmatické, které produkují protilátky. Mezi imunokompetentní buňky se řadí také buňky dendritické, jejichž hlavní funkcí je pohltit a zpracovat antigen, vystavit jej na svém povrchu a přilákat příslušné lymfocyty T a B, které pak rozvinou imunitní reakci.

Periferní (sekundární) lymfatické orgány a tkáně jsou místem, kde probíhá imunitní reakce a kde se diferencují lymfocyty T a B do výkonných populací. Patří sem **slezi-**

na, lymfatické **uzliny** a lymfatická tkáň asociovaná se sliznicemi (**MALT** – mucous associated lymphoid tissue). Anatomická struktura periferních lymfatických orgánů umožňuje optimální spolupráci lymfocytů T a B s buňkami prezentujícími antigen. Dochází k jejich aktivaci, růstu, diferenciaci a konečnému vzniku výkonných lymfocytů. Lymfatické orgány a tkáň jsou propojeny sítí lymfatických a krevních cév. Nově vzniklé lymfocyty se dostávají z centrálních do periferních lymfatických orgánů krevním řečištěm, odkud přestupují cévní stěnou. Sekundární lymfatický orgán opouštějí lymfatickými cévami, jimiž se dostávají cirkulací do tkání.

Pro imunitní reakce jsou důležité interakce imunokompetentních buněk s dalšími buňkami, které nepocházejí z hematopoetických (krvetočných) kmenových buněk. Patří sem například folikulární dendritické buňky, endotelie (výstelka cév), buňky nervového systému, epitelální buňky sliznic a fibroblasty.

Funkce imunitního systému vykonávají jednak některé součásti krevního séra, nazývané **humorální faktory**, a jednak krevní **buňky**. Buňky kolují v krevním a mízním oběhu a v případě potřeby vycestují do místa, kde je jich potřeba. Některé buňky imunitního systému jsou usazeny v tkáních a necestují. Podle toho, zda se v imunitní reakci více uplatní humorální faktory nebo buňky, se složky imunity rozdělují na **humorální** a **buněčné**. Podle toho, jakým způsobem imunitní složky rozpoznávají antigen, dělíme imunitní systém na složky **specifické (adaptivní)** a **nespecifické (přírozené)**. Všechny složky imunity spolu úzce spolupracují a navzájem se ovlivňují a regulují buď přímým kontaktem zprostředkovaným adhezními molekulami na buněčném povrchu, nebo rozpustnými mediátory, zejména cytokiny. Základní charakteristiky buněčné a humorální imunity uvádí tabulka 1.

Tab. 1 Srovnání humorální a buněčné imunity

	humorální	buněčná
nespecifické složky	proteiny akutní fáze, komplement	buňky NK, neutrofilní leukocyty, monocyty, makrofágy
specifické složky	protilátky	lymfocyty T
hlavní funkce	obrana proti extracelulárně žijícím mikroorganismům (opsonizace)	obrana proti intracelulárně žijícím mikroorganismům, u neutrofilů i obrana proti extracelulárním mikroorganismům, zánětlivá reakce
materiál na vyšetření	sérum, plazma, ev. jiné tekutiny (sliny, mozkomíšní mok)	nesrážlivá krev, bioptické vzorky tkání, ev. jiné zdroje (mozkomíšní mok, bronchoalveolární laváž)

1.2 Buněčné složky imunity

Do **buněčné** imunity nespecifické patří fagocytující buňky (polymorfonukleáry a monocyty/makrofágy) a buňky NK (tzv. přirození zabíječi – z anglického natural killer cells). Specifickou složku tvoří lymfocyty T. Po aktivaci produkují tyto buňky rozpustné mediátory, zvané **cytokiny**. Ty aktivují další složky imunity nebo samy sebe a stávají se z nich buňky regulační nebo zabíječské (cytotoxické).

Buněčná imunita se uplatňuje v obraně organismu proti virovým, plísňovým a některým bakteriálním infekcím (způsobeným nitrobuněčnými parazity, např. mykobakteriemi) a v obraně proti nádorům (zejména vyvolanými onkogenními viry). V transplantační medicíně se buněčné složky podílejí na odvržení transplantované tkáně. Složky buněčné imunity se vyšetřují z nesrážlivé krve.

1.2.1 Buněčná imunita nespecifická

1.2.1.1 Fagocytující buňky

Fagocytující buňky jsou buď **monocyty/makrofágy**, nebo **polymorfonukleární leukocyty**. Jsou nadány schopností fagocytózy, která zahrnuje putování za škodlivinou (chemotaxi), její rozpoznání, pohlcení, zpracování, usmrcení a sekreci látek, které působí na ostatní systémy imunity a další tkáňe organismu. Na membráně fagocytů jsou adhezní molekuly, které zajišťují přilnutí k endotelu cévní stěny. Rozpoznání cizorodé částice se děje prostřednictvím receptorů, které se váží přímo na struktury sdílené různými mikroorganismy (např. Toll-like receptory, lektinové receptory), nebo nepřímo prostřednictvím protilátky nebo komplementu (receptor pro Fc-část protilátky, komplementové receptory).

Po pohlcení mikroorganismu (nebo po aktivaci jinými podněty) se aktivuje systém enzymů, který zpracovává kyslíkovou molekulu na metabolity s baktericidním (bakterie zabíjejícím) účinkem. Baktericidní účinek mají i některé součásti cytoplazmatických granul s enzymatickou aktivitou (kationické proteiny, defenziny). Granula obsahují i další proteolytické enzymy, které se účastní trávení pohlceného mikroorganismu. Při rozsáhlém zánětu se mohou kyslíkové radikály a enzymy z granul dostat vně buňky a poškozovat okolní tkáň. Při zánětlivé reakci uvolňují fagocyty mediátory zánětu – produkty metabolismu kyseliny arachidonové, tj. prostaglandiny, leukotrieny a tromboxany. Tyto látky spolu s cytokiny stimulují specifické složky imunity a zpětně regulují rozsah zánětlivé reakce.

Výše zmíněné vlastnosti mají jak systém monocytomakrofágový, tak polymorfonukleární leukocyty. V některých funkcích se liší: monocytomakrofágový systém je tvořen **monocyty** kolujícími v krevním oběhu a z nich se diferencují tkáňové **makrofágy**. Monocyty se diferencují také v **dendritických buňkách**. V různých tkáních se buňky odvozené z monocytů nazývají různými jmény: Langerhansovy buňky v kůži, Kupfferovy buňky v játrech, alveolární makrofágy v plicích, peritoneální makrofágy v dutině břišní, oligodendroglie v centrálním nervovém systému aj. Systém monocytomakrofágový má hlavní význam při zpracování a předkládání antigenů lymfocytům. To je jedním z kroků k vyvolání specifické imunitní reakce. Při aktivaci monocytů se produkují různé **cytokiny**, které aktivují specifické složky imunity a zároveň zprostředkují celkovou reakci organismu na přítomnost škodliviny, např. zvýšení teploty, produkci proteinů akutní fáze. Toto je účinek zejména interleukinu 1 a 6 (IL-1, 6) a faktoru nekrotizujícího nádory (TNF). Lymfocyty T aktivované cytokiny (zejména interleukinem 12) pak zpětně produkcí interferonu gama aktivují makrofágy, které jsou pak schopny ničit pohlcené nitrobuněčné mikroby, jako např. mykobakteria, toxoplazmy aj. Aktivace makrofágu spočívá zejména v indukcii syntázy oxidu dusnatého za vzniku tohoto baktericidního oxidu dusnatého.

Polymorfonukleární leukocyty cirkulují v krevním oběhu, odkud mohou vycestovat. Mají krátký poločas života, kolem 12 hodin. U normálního jedince jich je v krvi přibližně $2-8 \times 10^9/l$. Fagocytózou jsou nadány neutrofilní a eozinofilní granulocyty. Neutrofilní granulocyty tvoří asi 40–60 % všech leukocytů, eozinofily asi 3 %. Neutrofilní granulocyty se uplatňují jako obránci první linie proti extracelulárním mikrobům, hlavně stafylokokům, kolibakteriím, pseudomonádám, ale i některým plísním (např. kandidám, aspergilům). Svými produkty aktivují další imunokompetentní buňky, podobně jako monocyty produkují zánětlivé cytokiny IL-1, IL-6 aj., které způsobí zvýšení teploty. Eozinofilní granulocyty se uplatňují zejména v obraně proti mnohobuněčným červům (parazitům) a při alergických reakcích.