

B) VYŠETŘOVACÍ METODY V IMUNOLOGII A JEJICH INTERPRETACE

1. Vyšetření imunologického a alergologického pacienta – anamnéza, fyzikální a laboratorní vyšetření.

anamnéza – výrazná dědičná zátěž u imunodeficitních, alergických, i autoimunitních chorob

- u imunodeficitů důležitá doba začátku potíží (vrozené, získané)
- vzhledem k častým kombinacím je vhodné se vyptat na všechny typy patologií imunitního systému (deficity, alergie, autoimunity)

fyzikální vyšetření

- neliší se od interního – zaměřeno na systémy, které mohou být postižené při podezříváném onemocnění
- důkladné vyšetření lymfatických uzlin, plic, kůže a sliznic u primárních imunodeficitů
- krční a pneumologické vyšetření při alergiích
- klouby, lymfatické orgány, kůže a sliznice u systémových autoimunit

laboratorní vyšetření

- nejčastěji periferní krev, vzácně lymfatické uzliny, biopsie orgánů, kostní dřeň
- dělení vyšetření na sérologická a buněčná
 - sérologické – hladiny složek séra se vztahem k imunitnímu systému (imunoglobuliny, proteiny akutní fáze, komplement, autoprotilátky, specifické protilátky)
 - buněčné – počet a funkce buněk
- nepřeceňovat význam laboratorního vyšetření – falešná pozitiva, nízká specifita testů

2. Odběr biologického materiálu k imunologickému vyšetření - indikace, interpretace.

- nejčastěji periferní krev, vzácně lymfatické uzliny, biopsie orgánů, kostní dřeň
- dělení vyšetření na sérologická a buněčná
 - sérologické – hladiny složek séra se vztahem k imunitnímu systému (imunoglobuliny, proteiny akutní fáze, komplement, autoprotilátky, specifické protilátky)
 - buněčné – počet a funkce buněk

sérologie

- venózní krev do sterilní zkumavky, nechat zkoagulovat, po koagulaci centrifugace – oddělení séra od koláče a přenesení do zkumavky
- skladování séra při 4°C jeden až dva týdny, delší skladování při -20°C (někdy i dlouhodobě při -80°C)

- další materiály: mozkomíšní mok, sliny
- inaktivace séra – zahřátí séra na 56°C po dobu 20 minut (funkční inaktivace komplementového systému – není možná aktivace), používá se při měření koncentrací složek komplementu, inaktivuje se také HIV!
- materiál ochránit proti poškození, doplnit průvodkou a označit jako infekční materiál

buněčné vyšetření:

- nutno odebrat krev nesrážlivou – použití heparinu (po vazbě na antitrombin III inhibuje trombin), EDTA (vyvazuje ionty vápníku), defibrinace? (baňka se skleněnými kuličkami, třepání 10 min)
- není možno krev delší dobu skladovat, vyšetření do několika desítek minut (fagocytární funkce) až hodin (počet a funkce lymfocytů)

výsledky:

- vyjádření kvalitativní nebo kvantitativní – jednotky SI, titr, arbitrální jednotky, mezinárodní jednotky, počet buněk buď v procentech nebo v počtech na jednotku objemu
- titr – nejvyšší ředění vyšetřované tekutiny, které ještě dá pozitivní reakci (ředění v řadě zkumavek dvojkovou řadou) – vyšetření protilátek, autoprotilátek
- mezinárodní jednotky – definovány biochemickou nebo biologickou funkcí jednotky, spíše přežitek z minulosti (vyjádření imunoglobulinů IgE, IgD, u látek, kde není možné stanovit molekulovou hmotnost)
- arbitrální jednotky – určují si je laboratoře pro testy, které je obtížné standardizovat

3. Polyklonální a monoklonální protilátky používané v imunologické diagnostice - příprava, rozdíly.

polyklonální protilátky

- od hyperimunizovaných zvířat – opakované podání antigenu, po dostatečné stimulaci a vytvoření maxima protilátek je odebrána krev a izolováno sérum
- séra obsahují protilátky namířené proti různým epitopům antigenu
- bývají přítomné i protilátky proti jiným antigenům – většinou nízký titr
- nespecifická antiséra
- pro zesílení odpovědi používáme adjuvancia – kompletní (inaktivovaná mykobakteria v olejové emulzi) nebo inkompletní (jen olejová emulze) Freundovo adjuvans ve veterině, hydroxid hlinitý v lidské medicíně

- olejová emulze zabrání rychlé degradaci antigenu, mykobakteria specificky stimulují imunitní systém

monoklonální protilátky

- výroba hybridomovou technologií: imunizace myši antigenem, izolace B-lymfocytů ze sleziny, inkubace lymfocytů s buňkami myšího myelomu -> za určitých podmínek fúze = hybridom – má DNA obou linií, schopnost neomezeně se dělit a schopnost produkce imunoglobulinů, vytváří klon, nutno izolovat klon, který produkuje Žádané protilátky (obtížné!), je možné ho neomezeně dlouho pěstovat v kultivačním médiu (tkáňová kultivace je náročná, pěstuje se v ascitické tekutině myši)
- velmi přesná diagnostika (snižuje se riziko falešné positivity při reakci jiné protilátky), testy ELISA a RIA, malé využití při aglutinaci a precipitaci (nutné použití více protilátek proti různým epitopům)
- diagnostické využití při radionuklidových zobrazeních při hledání nádorů – zatím experimentálně
- terapeutické využití – imunosupresivní agens (transplantace, anti-CD3), antitoxiny, terapie zhoubných nádorů
- nevýhoda – myší původ (xenogenní materiál) – omezená doba použití -> humanizace (metody molekulární biologie na úrovni DNA)

4. Vyšetřování parametrů humorální imunity – metody, referenční hodnoty, indikace, interpretace.

- principem metod ke reakce antigenu a protilátky
- epitop – oblast antigenu, kam se váže protilátka, pro reakci je výhodný antigen s více epitopy (přirozené antigeny)
- vazebné místo protilátky (paratop) – oblast terminálních částí variabilních částí rozpoznávající epitop
- afinita – veličina síly vazby mezi jedním epitopem a protilátkou
- avidita – síla interakce polyvalentní protilátky s polyvalentním antigenem, vrůstá s afinitou a počtem vazebných míst
- precipitační křivka:
 - nadbytek protilátky – veškerý antigen je vyvázn – malé rozpustné imunokomplexy, při aglutinaci fenomén prozóny
 - pásmo ekvivalence – vznik velkých nerozpustných imunokomplexů

- nadbytek antigenu – malé rozpustné imunokomplexy
- průběh reakce:
 - primární fáze reakce – velmi rychle, vazba antigenu a protilátky, není patrná okem
 - sekundární fáze reakce – multivalence Ag a polyvalence AB -> velké komplexy v koloidním roztoku – měření turbidimetrií, nefelometrií
 - u starších reakcí (aglutinace, precipitace) probíhá druhá, vizualizační fáze samovolně
 - u novějších reakcí (imunoeseje) je nutno doplnit vizualizaci, druhá fáze neprobíhá nebo jen omezeně
- typy reakcí:
 - aglutinace
 - precipitace
 - imunofluorescence
 - imunoanalýza (ELISA, RIA)
 - imunoblot
 - (komplement fixační reakce, inhibiční a neutralizační testy – mikrobiologie)

AGLUTINACE

- nejstarší, snadná vizualizace je zajištěna velikostí antigenů (makromolekuly), reakce probíhá v tekutém prostředí, včetně druhé fáze
- vícevazebné protilátky vytváření mezi antigen můstky, které se shlukují do aglutinátů (okem)
- faktory ovlivňující kvalitu:
 - dostatek protilátky
 - přítomnost protilátek proti různým epitopům (ne monoklonální protilátky)
 - vzdálenost mezi antigenními částicemi (odpudivé elektrické síly klesají se vzdáleností)
- typy:
 - přímá – suspenze antigenů je tvořena částicemi, na kterých se antigeny přirozeně vyskytují (antigeny krevních skupin na ery)
 - nepřímá – navazujeme zkoumaný antigen na povrch makromolekulárních částic (ery, latex -> latex-fixační test)
- využití (na ústupu) – určení kmenů bakterií, průkaz heterofilních protilátek, Widalova reakce, Weil-Felix, imunohematologie, autoprottilátky proti autoantigenům
- hodnocení: kvalitativní (pozitivní, negativní), kvantitativní (stanovení titru – obrácená hodnota ředění: $128 = 1:128$)

- kompletní a inkompletní protilátky:
 - kompletní – naváží protilátku a proběhne vizualizace
 - inkompletní – naváží protilátku, ale vizualizace neproběhne (protilátky proti Rh faktoru)
- Coombsův test – používá protilátky proti lidským imunoglobulinům (reagens AGH)
 - přímý – průkaz in vivo navázaných antierytrocytárních protilátek – přítomnost se projeví vznikem aglutinátu
 - nepřímý – průkaz cirkulujících antierytrocytárních protilátek – erytrocyty dárce, které exprimují příslušný antigen, po inkubaci použijeme AGH -> aglutinace

PRECIPITACE

- antigen je nekorpuskulární, rozpustný v pravém roztoku
- pokud se reaktanty nachází v optimálním poměru, dojde k vytvoření precipitátu
- provádí se v tekutém (vodném) nebo polotekutém (gelovém) prostředí
- precipitace v gelu:
 - antigeny i protilátky difundují gelem, v místě optimálního poměru vytváří precipitát (zóna ekvivalence)
 - vstříčná (dvojitá) imunodifuze – difuze Ag i Ab ze dvou jamek proti sobě -> precipitační linie, průkaz specifity antigenu i protilátky
 - jednoduchá radiální imunodifuze – inkorporace specifické protilátky do gelu, antigen do jamky -> precipitační prstence – plocha precipitačního prstence je přímo úměrná koncentraci antigenu (možnost stanovení koncentrace antigenu – IgG, IgA, IgM, komplement C3, C4, CRP, ...) – dnes málo využívaná, ale zlatý standart
- precipitace v tekutém prostředí
 - vzniká zákal (koloid), intenzita je úměrná koncentraci antigenu, měří se turbidimetrií nebo nefelometrií, odečtení z kalibrační křivky

IMUNOELEKTROFORÉZA

- elektroforéza + imunodifuze – v prvním kroku elektroforéza séra, v druhém se do žlábků naplní specifické antisérum proti některému lehkému nebo těžkému řetězci imunoglobulinů, antisérum difunduje agarem, v optimálním poměru vzniká precipitační oblouk
- využití k průkazu paraproteinu, linie je posunuta směrem k antiséru (mnoho antigenu)
- imunofixační elektroforéza (imunofixace) – v současnosti k průkazu paraproteinu (citlivější)
 - dvoustupňová: elektroforetická separace + imunoprecipitace monospecifickými antiséry

- nález MGUS – prekanceróza myelomu (monoklonální gamapatie nejasného významu)
- isoelektrická fokusace bílkovin – dělení bílkovin na podkladě jejich isoelektrického bodu, využití: intratekální syntéza IgG, stanovení fenotypu alfa-1-antitrypsinu
- elektroforéza bílkovin v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE) – základ imunoblotu

IMUNOESEJE

- reakce antigen-protilátka probíhá na pevné fázi (destička, zkuševka), k vizualizaci je nutno použít detekční protilátku s navázanou značkou (radioizotop, enzym, fluorochrom)
- v současnosti základní metody
- rozdělení podle použitého detekčního reaktantu:
 - radionuklidy (RIA - radioimunoanalýza)
 - enzymy (ELISA)
 - fluorochromy (FIA – fluorescenční imunoanalýza)
 - luminofory, chemiluminiscenční látky (při oxidaci vyzařují světlo)
- dělení podle metodického principu:
 - kompetitivní – soutěž značeného i neznačeného ligandu na známé množství analytu
 - nekompetitivní – přebytek detekční protilátky

IMUNOFLUORESCENCE

- protilátka s navázaným fluorochromem (schopnost absorbovat světelnou energii v UV a vyzařit ji ve viditelném spektru), pozitivní reakce viditelná ve fluorescenčním mikroskopu
- přímá fluorescence
 - průkaz antigenu, detekčním reagens je protilátka o známé specifitě s fluorochromem
 - antigen může být ve tkáni, kultuře, ...
 - preparát je fixován na podložní sklo, převrství se konjugátem, inkubuje, promyje a hodnotí – lze hodnotit i lokalizaci antigenu
 - využití: průkaz antigenu v tkáňových řezech, biopsii, stěry, ..
- nepřímá imunofluorescence
 - průkaz protilátek v séru
 - předpokládané protilátky se aplikují na vhodný antigenní substrát, vytvoření případných imunokomplexů, promytí, přidání konjugátu (proti-protilátka), inkubace, promytí, hodnocení (struktury exprimující cílené antigeny)
 - využití: velmi často, průkaz autoprotiátek (orgánově specifických i nespecifických)

ENZYMOVÁ IMUNOANALÝZA (EIA)

- detekce pomocí enzymu, který je kovalentně navázaný na některý z reaktantů (většinou protilátku)
- enzymová imunoanalýza na pevné fázi = ELISA – jeden z reaktantů je vázán na pevný nosič (destička)
- kompetitivní x nekompetitivní, průkaz antigenu x protilátky
- nekompetitivní průkaz antigenu:
 - protilátka na pevném nosiči + vzorek s antigenem + enzymem značená protilátka proti antigenu + substrát -> barevný výsledek (měření spektrofotometricky)
 - metoda kvalitativní i kvantitativní
 - mezi každým krokem je nutné promytí!
- nekompetitivní průkaz protilátky
 - antigen na pevném nosiči + vzorek s protilátkou + protilátka proti protilátce značená enzymem + substrát

RADIOIMUNOANALÝZA

- radioaktivní jód, pro kvantitativní detekci
- metoda na pevné fázi je velmi podobná ELISA – místo enzymu radioizotop
- dnes na ústupu, využití pro analýzu hormonů, vitamínů a jejich metabolitů, autoprottilátky (myastenia gravis, DMI, Grawe-Based)

IMUNOBLOT

- kombinace elektroforézy a imunoanalytického průkazu specifické protilátky
- směs proteinových antigenů se rozdělí elektroforeticky v gelu, otisk elektroforeogramu na matrici, ponoření matrice do pacientova séra s protilátkami, inkubace, vizualizace pomocí druhé protilátky se značkou
- využití: značné, ale je třeba využívat uvážlivě

VYŠETŘENÍ KOMPLEMENTU

- stanovení hladin jednotlivých složek (nejčastěji C3, C4, inhibitor C1) nebo celkové hladiny komplementové kaskády
- test CH 50 (50% hemolýza definovaného množství červených krvinek způsobená určitým množstvím komplementu za standartních podmínek)
 - měření stupně hemolýzy ovčích krvinek (krvinky s antiery protilátkami) závislé na množství přidaného komplementového systému

- typická esovitá křivka (jako saturace hemoglobinu)
- detekce poruch komplementového systému – aktivita kaskády je limitována nejslabší složkou, při absolutních poruchách je test nedetekovatelný
- zpracování krve do 1 hodiny po odběru

VYŠETŘENÍ CÍRKULUJÍCÍCH A DEPONOVANÝCH IMUNOKOMPLEXŮ

- metody založené na fyzikálně-chemických vlastnostech imunokomplexů, velmi snadno vytváří koloidy
- vysrážení IK z roztoku pomocí polyethylenglykolu – vytvoří se zákal (metoda nespecifická, není dostačující k průkazu -> screening)
- cirkulující IK aktivují a váží složky komplementu, využití ve dvou metodách)
 - po odstranění nenavázaného C1q změříme koncentraci navázaného = koncentrace IK
 - na nosiči navázaná C1q + vzorek -> precipitát (měření nefelometrií)
- monitorování systémových autoimunit
- pro diagnostiku jsou důležitější deponované – po biopsii pomocí přímé imunofluorescence

5. Vyšetření populací lymfocytů a jejich funkcí – metody, referenční hodnoty, indikace, interpretace.

- normální počet neznamena normální funkce
- stanovení celkového počtu lymfocytů a diferenciálního rozpočtu -> absolutní počty lymfocytů, monocytů a granulocytů a relativní zastoupení, nezískáme ale subpopulace lymfocytů

lymfocytární subpopulace

- na základě exprese specifických molekul, průkaz pomocí monoklonálních protilátek
- klasifikace CD, současně asi 400 znaků, prokazujeme je metodou přímé imunofluorescence nebo průtokovou cytometrií (pomocí fluorescence) – odlišení buněčných populací a subpopulací (včetně koexprese více znaků)
- T lymfocyty CD3, těsně navázaný na T-buněčný receptor (TCR) + CD4 (pomocné T), CD8 (cytotoxické T)
- B lymfocyty CD 19, CD20, NK buňky CD56, CD16, bez CD3
- aktivizační znak T-lymfocytů HLA-DR, CD25, CD71, CD69, CD38, leukocyty CD45, monocyty CD14

- vyšetřovat u primárních nebo sekundárních imunodeficitů, charakteristika hematologických malignit
 - dřív experimentálně zjištěno, že ovčí ery specificky váží určité populace lymfocytů (T)

funkční vyšetření

- in vivo kožními testy pozdní přecitlivělosti (lokální imunitní reakce závislá na T-lymfocytech) – tuberkulinová reakce
- in vitro proliferační schopnost lymfocytů testem blastické transformace, stimulace rostlinnými lektiny (polyklonální aktivátory), monoklonálními protilátkami, hodnocení po několikadenní stimulaci průkazem inkorporace detekovatelné radioaktivně značené látky do DNA
- u závažných imunodeficitních stavů
- testy pomocí uvolňování cytokinů, exprese molekul

6. Vyšetření funkce fagocytujících buněk – metody, indikace, interpretace.

Kvantitativní vyšetření

- vyšetření počtu granulocytů a monocytů, diferenciál

vyšetření funkce

- zdroj buněk neutrofilní granulocyty z krve, analýza jednotlivých stádií (adheze, chemotaxe, adherence, ingesce a respirační vzplanutí, usmrcení mikroorganismu)
- adheze – test exprese povrchových antigenů (CD11/CD18) – u LAD syndromu
- chemotaxe – test migrace pod agarózou – měření vzdálenosti k chemotaktickému podnětu i spontánní hybnosti
- ingesce – zahrnuje i opsonizaci, test s kvasinkami
- mikrobicidní aktivita – v séru se inkubují látky s živými mikroorganismy – hodnotíme počet přežívajících mikrobů kultivací
- respirační vzplanutí – významná korelace s mikrobicidní aktivitou – testy redukce terazoliových solí, chemiluminiscence, ...
 - test NBT a INT – princip redukce soli na barevný produkt (měření fotometricky)
 - chemiluminiscence – fagocytující buňky produkují malé množství světla
 - burst test – hodnocení na průtokovém cytometru

- vyšetření provádíme při podezření na chronickou granulomatózní chorobu (nejčastější choroba z poruch fagocytózy)

7. Vyšetření HLA–antigenů – metody, indikace, interpretace.

- stanovení HLA fenotypu = HLA typizace
 - sérologická typizace – starší, HLA antigeny
 - molekulárně genetická typizace – určuje HLA alely, přesnější
- histokompatibilní geny = geny produktů, které jsou zodpovědně na připojení nebo odvržení štěpu, nejdůležitější funkcí je prezentace antigenu T-lymfocytům – iniciace specifické imunitní reakce
- dělení na antigeny I. (HLA-A, B, C) a II. třídy (HLA-DrR, DQ, DP)
 - třída I je exprimována na všech jaderných buňkách, prezentují T-lymfocytům CD8+ antigeny z nitrobuněčné syntézy (virové a parazitární proteiny, vlastní aberované molekuly – nádorové)
 - třída II je na povrchu B-lymfocytů, makrofágů, dendritických buněk – antigen prezentujících buňky, nabízejí T lymfocytům CD4+ antigeny extracelulární
- geny jsou na 6. chromozomu, polymorfní (nejvíce B – přes 700 alel), významná část alel jsou vzácné, existuje velmi mnoho kombinací (haplotypů), každý člověk nese jeden mateřský a jeden otcovský haplotyp -> sourozenci mohou být HLA identičtí (25%)
 - třída I – maximálně dvě různé alely, od každého rodiče jedna
 - třída II – mohou se vzájemně kombinovat -> 10-20 různých molekul na jedné buňce
 - vazebná nerovnováha = některé kombinace alel jsou častější

metody typizace

- využití v transplantologii a v diagnostice chorob, které jsou s HLA asociovány
- sérologické techniky – na ústupu, pro typizace HLA I
 - lymfocytotoxický test – reakce protilátek s antigenními determinantami HLA molekul, vizualizace králičím komplementem -> lýza buněk s navázanými protilátkami, vitální barvení, protilátky se získávají od žen multipar, které jsou imunizovány antigeny svého partnera
- molekulárně-genetická typizace
 - metody analýzy DNA, především pro II. třídu, dnes už pro obě
 - rychlé, spolehlivější vyšetření s vyšším rozlišením (na úrovni alel), dražší
 - nezbytné u transplantace hematopoetických buněk

- PCR – vyšetření je zaměřeno na nejvíce polymorfní oblast (největší rozdíly), metody se specifickými primery, hybridizace se specifickými sondami, přímě sekvenování produktu
- PCR-SSP (PCR se sekvenčně specifickými primery) – menší počet vzorků
- komerční kity – nejprve nízké rozlišení, později podle potřeby vysoké

8. Molekulárně genetické metody v imunologické laboratorní diagnostice – PCR, sekvenování, NGS.

- poznání genetických defektů imunitního systému na molekulární úrovni přispívá k pochopení fyziologických a patofyziologických souvislostí, kauzální defekt byl určen asi už ¼ známých primárních imunodeficitů -> zlepšení diagnostiky, genetického poradenství, vývoje terapie
- molekulárně genetické vyšetření je většinou založeno na PCR, produkty se analyzují sekvenováním -> srovnání s normální sekvencí
 - u velkých genů lze nejprve vytipovat oblast sekvenování
- určování polymorfismů (variant genu, která se vyskytuje u více jak 1 % populace)
 - bodové substituce, repetitivní mutace
 - v budoucnu využití k individuálnímu stanovení rizika vzniku, prognózy i terapie
- PCR – vyšetření je zaměřeno na nejvíce polymorfní oblast (největší rozdíly), metody se specifickými primery, hybridizace se specifickými sondami, přímě sekvenování produktu
 - PCR-SSP (PCR se sekvenčně specifickými primery) – menší počet vzorků
 - komerční kity – nejprve nízké rozlišení, později podle potřeby vysoké
- PCR: denaturace DNA, hybridizace (nasednutí primerů) při ochlazení, elongace – syntetická fáze (při zahřátí), v každém dalším cyklu přibývají řetězce exponenciálně
- sekvenování: souhrnný termín pro biochemické metody, jimiž se zjišťuje pořadí nukleových bází (A, C, G, T) v sekvencích DNA, existuje mnoho metod
- NGS – sekvenování nové generace – rychlejší, levnější, paralelní čtení

9. Základy alergologického vyšetření a testování - anamnéza, fyzikální vyšetření, kožní testování, expoziční testy, eliminační testy, bronchoprovokační testy - indikace a hodnocení.

- podezření na alergickou etiologii klinických obtíží (chronické, sezónní rýmy, dušnost – AB, kopřivky, otoky, konjunktivitida) – předpokládá se první typ přecitlivělosti

- důležitá role IgE u prvního typu
- atopie = genetická predispozice odpovědi tvorbou IgE na specifické antigeny (alergeny)
- IgE jsou zvýšeny i u parazitárních infekcí
- alergeny:
 - inhalační – pylová zrna, kvetoucí stromy, traviny, kvetoucí plevely, spory plísní, roztoči, kočky, psi, morčata, ...
 - potravinové – bílkoviny vajec, mléka, luštěnin, ovoce, celeru, ořechy, plody moře, aditiva
 - lékové – ATB (penicilin), lokální anestetika, jód
 - jed hmyzu (včela, vosa)

PROJEVY:

- alergická rýma – vodnatá rýma se svěděním, kýchním, obstrukcí, vazba na roční období + konjunktivitida
- bronchiální astma – záchvaty expirační dušnosti, pískoty, noční potíže, astmatické ekvivalenty (epizody dráždivého, dusivého kašle)
- kopřivka – svědivá, zarudlá místa na kůži, rychlé změny lokalizace, může mít i fyzikální příčiny (slunce, chlad, vibrace), nebo být způsobena interními chorobami (Štítná žláza, nádory, SLE)
- angioedém (Quinckeho edém) – následek alergické reakce v hlubších vrstvách kůže
- atopický ekzém – často první projev, rozličný klinický obraz i lokalizace, dermatitida s výrazným svěděním, složitá patogeneze (IgE + T-lymfocyty)

VYŠETŘENÍ

- anamnéza – důkladná, stanovení diagnózy, vytipování alergenů, nutná dobrá znalost sezónnosti pylů a spor, složení potravin a aditiv a zkřížené reaktivitě
- fyzikální vyšetření – zaměřeno zejména na vyšetření postiženého systému
- alergologické testy – alergická senzibilizace in vivo, testování sadou nebo přímo na vytipovaný antigen, přecitlivělost prvního typu

TESTY ČASNÉ KOŽNÍ PŘECITLIVĚLOSTI

- intradermální aplikace antigenu, pokud jsou přítomny mastocyty s navázaným specifickým IgE, dojde k degranulaci -> lokální zarudnutí, indurace a svědění do 15 minut
- odečítání za 8 hodin – pozitivita třetího (imunokomplexového) typu přecitlivělosti, za 24 hodin – čtvrtý typ závislý na T-lymfocytech

- aplikace prick-testem (na kůži předloktí a jemný nekrvácující vpich lancetou) x intradermální injekce (vytvoří se 3 mm velký pupen)
- pozitivní kontrola (histamin, kodein), negativní kontrola (fyzák), pozitivní reakce u prick-testu je indurace větší než 4 mm
- testovací série: jarní pyly, trávy, podzimní pyly, roztoči, plísňe, peří
- intradermální testy jsou vždy rizikové!, vnášení podezřelého antigenu může vyvolat i anafylaxi

ELIMINAČNÍ TESTY

- po vysazení expozice alergenů dojde k vymizení příznaků, hlavně u potravinových alergií

EXPOZIČNÍ TESTY

- vysoká hodnota průkazu, rizikové
- snaha vyvolat alergickou reakci v postiženém orgánu
 - u rýmy intranasální aplikace alergenů, měření průchodnosti
 - profesionální astma – bronchomotorická odpověď po inhalaci

DALŠÍ LABORATORNÍ A KLINICKÉ VYŠETŘENÍ:

- spirometrie (rutinní u klasického vyšetření)
 - statické a dynamické plicní objemy: obstrukce – snížená FEV1, změny na křivce průtok, objem
 - nutno doplnit u lehčích forem astmatu bronchomotorickým testem (metacholin, fyzická námaha) s průkazem reverzibility (beta-2-mimetika)
- vyšetření eozinofilů a IgE (celkové i specifické)

testy IV. (buněčného) typu přecitlivělosti

- v dermatologii, alergeny pronikají epidermis, vznikají alergen-specifické T-lymfocyty (kontaktní ekzém = alergická kontaktní dermatitida)
- epikutánní plátkové testy – antigen aplikován v masti na kůži, inkluze, 24-48 hodin, odečtení za dalších 24 hodin, pozitivní reakce je vznik lokalizovaného erytému až puchýřů
- intradermální testy pozdní přecitlivělosti – tuberkulinová reakce (zjištění senzibilizace na antigeny MT), pozitivní reakce aspoň 6 mm indurace a erytém
- testy CMI (cell mediated immunity) – poruchy odpovědi T-lymfocytů, používají se anamnestické antigeny (většina lidí se s nimi v životě setkala – tuberkulin, kandidin, toxoplasmin, tetanický toxoid, ...), pacient by měl reagovat na většinu antigenů, pokud ne -> hypoergní, anergní P

10. Možnosti laboratorní imunologické diagnostiky u imunodeficitů.

- vyšetření protilátek elektroforézou (velmi hrubé), nebo nefelometrií a turbidimetrií
 - snížení hladin jedné nebo více tříd imunoglobulinů (primární protilátkové nebo kombinované imunodeficiency), došetření hladiny protilátek po antigenní stimulaci (tetanický anatoxin, pneumokokové polysacharidy)
- vyšetření komplementu – vrozená nebo získaná porucha tvorby jednotlivých složek
 - velmi časté jsou heterozygotní deficity C4
 - test CH 50 (klasická cesta aktivace), AH 50 (alternativní cesta)
- protilátky proti granulocytům -> autoimunitní granulocytopenie (ANCA protilátky nevyvolávají granulocytopenii!)
- vyšetření subpopulací lymfocytů – primární i sekundární imunodeficiency i hematologické malignity
 - imunodeficit: výrazný pokles jedné nebo více subpopulací -> analýza -> diagnostika T i B-lymfocytárních ID i klasifikace SCID
 - některé ID se nemusí projevit buněčným deficitem (CVID)
 - sledování CD4+ u HIV pozitivních
- vyšetření funkčních vlastností lymfocytů u závažných ID (blastická transformace), vyšetření fagocytárních funkcí pouze u podezření na vrozený defekt

11. Možnosti laboratorní imunologické diagnostiky u nádorových onemocnění.

- vyšetření protilátek elektroforézou (velmi hrubé - myelom), nebo nefelometrií a turbidimetrií
 - izolované zvýšení jedné třídy imunoglobulinů při myelomu
 - snížení sekundární poruchou tvorby protilátek u lymfomů a leukémií
- průkaz paraproteinu – elektroforeticky, vysoká sedimentace ery, vysoká hladina jedné třídy Ig, diagnostika pouze imunoeletroforeticky a imunofixací
 - současné vyšetření moče – Bence-Jonesova bílkovina (průkaz postupným zahříváním -> srážení při 50°C a potom rozpouštění při 80°C), imunoeletroforéza nebo imunofixace volných lehkých řetězců, paraprotein může být jenom v moči (ne v séru)
- další diagnóza myelomu – sternální punkce, imunoparéza u jiných tříd Ig, KO, RTG skeletu
- paraprotein nemusí znamenat myelom! (jiné malignity, chronické záněty, stáří)
- kryoglobuliny – mohou doprovázet paraproteinémií

- vyšetření subpopulací lymfocytů – primární i sekundární imunodeficity i hematologické malignity
 - imunofenotypizace leukémií a lymfomů na základě určení povrchových antigenů krevních elementů – charakteristika vývojové řady a vývojového stupně

12. Možnosti laboratorní imunologické diagnostiky u podezření na autoimunitní onemocnění.

- vyšetření protilátek nefelometricky nebo ELISA technikou – zvýšení IgE
- kryoglobuliny – sráží se při nižších teplotách, mohou doprovázet autoimunitní choroby, při odběru je nutno udržet teplotu 37°C
- vyšetření komplementu: snížení hladin zvýšenou potřebou při aktivaci komplexu antigen-protilátka (akutní stádium systémových imunokomplexových vaskulitid)
- vyšetření proteinů akutní fáze (pouze v akutní fázi 😊)
 - hladina CRP u revmatických chorob je výrazně zvýšená, u SLE mírně zvýšená
- vyšetření autoprotilátek (velmi vysoká hodnota při diagnostice, dlouhý seznam autoprotilátek (>100) – vyšetřují se pouze některé, některé autoimunity mohou být způsobeny autoreaktivními T-lymfocyty (Hashimotova thyreoidita)
 - revmatoidní faktor – proti IgG, průkaz nepřímou aglutinací a ELISA, u RA, SLE a Sjögrenova syndromu (20% séronegativních pacientů)
 - nahrazuje se průkazem protilátek pro cyklickým citrulinovaným peptidem (CCP) – specifitější pro RA
 - antinukleární protilátky (ANA) – nepřímou imunofluorescencí, důležité pro SLE, některé revmatické choroby (RA, sklerodermie, Sjögrenův syndrom), autoimunitní hepatitida
 - lze určit typ (homogenní, granulovaný, periferní, nukleonální) -> vazba na choroby
 - protilátky proti cytoplasmě granulocytů (ANCA) – Wegenerova granulomatóza, systémové vaskulitidy, ulcerózní kolitida, Crohnova choroba, nepůsobí cytotoxicky, ale stimulačně
 - protilátky proti membránovým fosfolipidům (ACLA), proti antigenům štítné žlázy (Hashimozova thyreoidita), stimulující protilátka (Graves-Basedow)
 - u DM I – proti ostrůvkovým buňkám, proti tyrosin kináze IA-2

- protilátky proti nadledvinám, hypofýze, vaječníkům, parietálním buňkám žaludku
- autoimunitní hepatitidy – proti hladkému svalstvu, anti-LKM (liver-kindey), anti-SLA (soluble liver antigen)
- antimitochondriální protilátky – primární biliární cirhóza
- celiakie, dermatitis herpetiformis – proti endomysiu hladké svaloviny
- proti ery – Coombsův test (hemolytická anémie), antitrombocytární – idiopatická trombocytopenická purpura, autoimunitní granulocytopenie
- myastenia gravis, pemfigus, pemfigoid, glomerulonefritida se srpkami, Goodpastureův syndrom

13. Možnosti laboratorní imunologické diagnostiky u alergických pacientů.

- vyšetření protilátek IgE nefelometricky nebo ELISA technikou – zvýšení IgE v séru při alergických reakcích prvního typu nebo u parazitárních chorob
 - hladina může být i normální! (= <100 IU/ml)
 - hladina specifického IgE (proti konkrétnímu antigenu) – ELISA, FIA, LIA, RIA
- vyšetření hladiny eozinofilů a eozinofilního kationického proteinu (ECP) – monitorování zánětu atopického pacienta
- vyšetření specifických T-lymfocytů (pozdní typ přecitlivělosti)

14. Před a potransplantační imunologické laboratorní vyšetření.

- zásadní rozdíl mezi transplantací solidních orgánů a hematopoetických kmenových buněk
 - solidní orgány – reakce imunokompetentních buněk příjemce proti buňkám štěpu -> imunosupresivní terapie
 - u kmenových buněk – GvHD – může být i výhoda
- systém HLA hraje roli při rozpoznávání cizorodých antigenů dárce, resp. Příjemce
- požadavky na shodu se liší podle typu transplantace

solidní orgány

- relativní riziko ztráty štěpu je o 25% vyšší u jedinců s neshodami v antigenech HLA-A, B, DR ve srovnání se shodou v 6 antigenech -> vzrůstá procento komplikací
- rutinní vyšetření krevní skupiny, HLA typizace s nízkým rozlišením (HLA-A, B, DR) u ledviny, bez HLA u srdce, plic, pankreatu a střeva (časové důvody), játra a rohovka shodu nevyžadují

- určení stavu senzitivace příjemce – inkubace séra příjemce s panelem alogenních lymfocytů – zjištění anti-HLA protilátek
 - senzitivace může nastat po tranfuzích, těhotenství, transplantacích, pozitivní při reakci s 50% populací z panelu
- křížová zkouška těsně před transplantací (sérum příjemce + lymfocyty dárce)

transplantace ledviny

- zařazení na listinu čekatelů – krevní skupina a HLA typizace s nízkým rozlišením (HLA-A, B, DR), vyšetření anti-HLA protilátek každé tři měsíce + vyšetření na hepatitidu B, C a CMV
- kadaver – spádová HLA laboratoř provede v režimu statim HLA typizaci a předá výsledek do národního centra, vybere se 50 příjemců, provedení cross-match testu -> konečný výběr 2 příjemců
- u živého dárce jde orgán konkrétnímu příjemci, odpadá režim statim

hematopoetické buňky

- indikace u maligních poruch krve, vybraných solidních nádorů, primárních i sekundárních aplastických anémií a závažných primárních imunodeficitů
- cílem je restaurace funkční krve po základním onemocnění nebo to terapii
- výrazně odlišné požadavky na HLA shodu – požadována je shoda na úrovni alel (high resolution s označením alely pomocí čtyřčíslic)
- preferovány jsou HLA identické sourozenecké transplantace (nemusí být natolik podrobné vyšetření, stačí prokázat stejný haplotyp od otce a matky)
- alogenní transplantát – v registru dárců, typizace genů HLA-A, B, DRB1, C, DRB3, DRB4, DQB1

posttransplantační vyšetření

- úlohou imunologie je posoudit adekvátnost imunosupresivní terapie (zda riziko infekce nepřevažuje přínos imunosuprese) a zhodnotit míru rizika rejekční reakce

15. Význam vyšetření polymorfismu HLA a dalších molekul u nádorových onemocnění, autoimunit a imunodeficitů.

- vyšetření je založeno na tom, že u některých nemocí se vyskytují určité HLA-antigeny častěji než ve zbytku populace -> lidé s určitými HLA antigeny (vrozená charakteristika) mají zvýšené riziko vzniku některé choroby, je zapotřebí působení i dalších faktorů
- u asociovaných chorob často hraje důležitou roli imunitní systém (autoimunita), někdy jsou bez vazby na imunitu (BAP, narkolepsie, idiopatická skolióza)

- mechanismus není objasněn, mohl by souviset se schopností některých HLA antigenů předkládat antigeny imunokompetentním buňkám, selhání mechanismu autoreaktivních T-lymfocytů v thymu
- oblast HLA může také ležet v blízkosti genu, který je kauzální ve vzniku určité choroby
- negativní prediktivní hodnota u celiakie a HLA -DQalfa/DQbeta
- relativní riziko – poměr mezi rizikem vzniku určité choroby u nositele definovaného rizikového faktoru a rizikem vzniku choroby v běžné populaci (RF je přítomnost HLA antigenu)
 - asociace mezi morbus Bechtěrev a HLA B27 – relativní riziko 87 (antigen je v populaci asi u 9% lidí, u nemocných v 95% případů – pouze jeden z 200 nositelů skutečně onemocní)

choroba	HLA antigen	relativní riziko
ankylozující spondylitis	B27	90-100
Rieterův syndrom	B27	37
psoriatická artritida	B27	12
revmatoidní artritida	DR4	6
dermatitis herpetiformis	DR3	56
pemfigus vulgaris	DR4	14
myastenia gravis	B8	4
roztroušená skleróza	DR2	5
celiakie	DR3	12
Goodpasturov syndrom	DR2	13