

616-074-078

ZÁKLADNÍ IMUNOLOGICKÁ LABORATORNÍ VYŠETŘENÍ V KLINICKÉ DIAGNOSTICE

I. Humorální imunita

Npor. MUDr. Tomáš VOTRUBA, mjr. MUDr. Přemysl RÁKOSNÍK
Vojenský ústav hygieny, epidemiologie a mikrobiologie, Praha
(náčelník: plk. MUDr. V. Kotlář, CSc.)

O imunologii se tvrdí, že patří mezi bouřlivě se rozvíjející obory současného lékařství. Je pravda, že množství teoretických poznatků, které je publikováno, je skutečně ohromné. Řada z těchto poznatků je aplikovatelná i do moderní klinické praxe a v mnoha ohledech může pomoci při stanovení nebo upřesnění diagnózy. Často jsme však svědky určité skepse nebo naopak neodůvodněného nadšení, pokud jde o vyžadování imunologických vyšetření. Vzhledem k tomu, že jde vesměs o vyšetření velice drahá a časově nesmírně náročná, měla by se vyžadovat jen na základě pečlivé úvahy a přísně individuálně. Protože tento problém se týká všech pracovišť v naší republice, nevychýbá se

tudíž ani vojenským imunologickým laboratorům. Těmito otázkami se zabývala i Světová zdravotnická organizace (WHO), která závěry svých expertů shrnula do memoranda (1). To je velmi racionálním návodem, která imunologická vyšetření nám mohou za daných podmínek poskytnout ty informace, které od klinické imunologie očekáváme.

Cílem našeho článku je podat odborné vojenské veřejnosti na základě tohoto memoranda ucelenou informaci o dané problematice a o možných metodických přístupech, které by pomohly správně se zorientovat v některých otázkách imunologické diagnostiky.

IMUNOGLOBULINY

Máme na mysli IgA, IgG a IgM. Pro stanovení IgD nejsou známy žádné klinické indikace a otázka IgE je probírána jinde.

Pro kvantifikaci imunoglobulinů přichází v úvahu jednoduchá radiální imunodifúze a zákalová měření v kapalném prostředí (imunonefelometrie a imunoturbidimetrie). Radiální imunodifúze je nejrozšířenější metodou naší laboratorní imunochemické praxe (především zásluhou IDP souprav ÚSOL). Technika má koncentrační omezení 10 mg.l^{-1} (při vhodném uspořádání lze měření provádět s přesností kolem 10 %). Technika dle Manciniové je přesnější (2) než technika dle Faheyho (3). Nevýhodou je možné zkreslení výsledků vlivem vytvořivších se agregátů nebo štěpů imunoglobulinů. Nelze provádět stanovení IgM nižší molekulové hmotnosti a sekrečního IgA, pokud nejsou k dispozici odpovídající standardy stejného typu. Zákalové techniky ve vodném prostředí se v posledních letech více rozšířily. Jejich výhodou je rychlost, automatizovatelnost, určitým problémem nutnost vyčeřovat chylózní séra. Koncentrace imunoglobulinů se mění mimo jiné s věkem, pohlavím, geografickou polohou, proto je vhodné, aby si každá laboratoř stanovila vlastní normy pro zdravou dospělou nebo dětskou populaci.

Kvantifikace imunoglobulinů je nutná při podezření na primární nebo sekundární imunodeficienci. Samozřejmě toto vyšetření nemůže být jediným kritériem primární imunodeficiency. Někdy např. IgA-deficiency nemusí být spojena s žádnými projevy onemocnění a naopak pacienti s vysokou hladinou určitého imunoglobulinu mohou mít velmi špatnou odpověď na řadu antigenů.

Podstatné je toto vyšetření také u pacientů s některými formami hypogamaglobulinemií, u nichž probíhá substituční léčba imunoglobulinovými preparáty. Pomocné je toto vyšetření u idiopatických monoklonálních gamapatií pro jejich odlišení od maligní monoklonální gamapatie. U monoklonálního myelomu koncentrace normálních imunoglobulinů klesají obvykle s časem, zatímco u prvního benigního onemocnění se v podstatě nemění. Zdůrazňujeme jen normální imunoglobuliny, protože M-protein se imunochemicky kvantifikovat nedá.

Podstatné je vyšetření také pupečnickové krve u novorozenců pro vytypování kongenitálních infekcí.

Je vhodné sledovat koncentrace imunoglobulinů u difúzní hypergamaglobulinemie, lymfoproliferativních chorob, u hepatopatií, především cirhózy jaterní, systémového lupus erythematoses.

IMUNOELEKTROFORÉZA

Přes určitý časový odstup se stále jedná o užitečnou a potřebnou metodu. Nejčastěji se užívá mikromodifikace podle Scheideggera (4). (Té

je také přizpůsobena imuno elektroforetická výbava, dodávaná ÚSOL.) Vedle toho jsou třeba dobrá precipitující antiséra. Pro stanovení třídy imunoglobulinů, pokud je přítomen monoklonální protein, jsou třeba specifická antiséra proti těžkým řetězcům pro identifikaci lehkých řetězců (anti-light chains) a proti volným lehkým řetězcům (anti-kappa, lambda free), což není totéž. Problémem je především otázka kvality antisér. V případě přítomnosti kryoglobulinu je třeba sérum inkubovat při 37°C a pak provést stanovení. Pro identifikaci některých typů IgM se doporučuje imunofixace.

Imuno elektroforetická analýza je nutná, jestliže klinický, hematologický nebo patologický náález vede k diagnóze nebo podezření na mnohočetný myelom, Waldenströmovu makroglobulinemii, heavy-chain disease, amyloidózu a choroby s depozity imunoglobulinů nebo v případě výskytu kryoglobulinu, proteinurie typu Bence-Jones, hyperviskozity séra. Užití imuno elektroforetické analýzy je užitečné u některých imunoproliferativních onemocnění jako lymfocytické leukémie, výskyt chladových aglutininů, Gaucherova choroba, trypanosomiasis.

Imuno elektroforéza moči je nutná v případě myelomu, amyloidózy a chorob s depozity imunoglobulinů a tehdy, když byl nalezen v séru monoklonální imunoglobulin.

IMUNOGLOBULIN E

Lze provádět stanovení celkového IgE nebo specifického IgE. Vzhledem k nízkým koncentracím je třeba používat citlivější metodiky než u ostatních imunoglobulinů.

Pro stanovení celkového IgE se používá buď RIA, nebo EIA. Nejčastěji jde o techniky s protilátkou na pevné fázi. Kompetitivní metody mohou být nespecificky inhibovány některými sérovými faktory. Nekompetitivní metody jsou citlivější. Užití enzymu jako amplifikačního faktoru je velice výhodné — prodlužuje se tak životnost reagentů, práce s ním je snazší než s izotopy (režim práce, přístrojová technika). Avšak EIA v běžném uspořádání je méně citlivá než RIA.

Stanovení celkového IgE není u žádné klinické diagnózy nepostradatelné kromě vzácně se vyskytujícího hyper-IgE-syndromu. Stanovení celkového IgE je užitečné pro rozlišení poruch závislých a nezávislých na IgE — u chronických rhinitid, bronchiálního astmatu, dermatitid, chronické urtikarie, alergie na potravu, svůj význam má u parazitárních chorob.

Je třeba mít na zřeteli, že i při normálních koncentracích IgE v séru může dojít k rozvoji onemocnění mechanismem jiným než atopickým.

Prognosticky může být zvýšená koncentrace v raném dětství indikátorem vysokého rizika atopické choroby.

Specifické IgE se dnes stanovuje hlavně radioalergosorbentním testem RAST a velmi po-

dobným enzymoimunostanovením. Použití komerční soupravy přináší však řadu problémů. Vzájemné srovnání výsledků získaných na soupravách různých výrobců většinou není možné. Většina alergenů obsahuje nečistoty, protilátky ostatních tříd imunoglobulinů ve vzorku mohou být příčinou interferencí.

Ani měření specifického IgE není v žádné klinické situaci nutné. Stanovení specifického IgE je užitečné v případech, kdy není možné provést dobře kožní testy (extrémně vysoká hladina sensibilizace a z toho vyplývající nebezpečí pro pacienta, alergeny jsou toxické, nerozpustné, vysoce sensibilizující, u potravinových alergií, při rozporuplné interpretaci kožních testů). Výhodně se tím dá zmenšit frekvence provokačních testů.

KOMPLEMENT

Můžeme provádět buď měření celkové hemolytické aktivity komplementu CH₅₀, nebo stanovit jednotlivé složky.

Metodik měření „celkového komplementu“ je řada, většina z nich vychází z dnes již klasické práce Mayer-Kabatovy [5]. Se vzorky sér nemocných je třeba zacházet velice šetrně. Doporučuje se po jedné hodině stání krve při laboratorní teplotě odstředit krevní koláč a uložit sérum při teplotě -60 °C nebo není-li tato možnost, doporučuje se užívat EDTA plazma. Blíže k zacházení se sérem pro stanovení složek komplementu viz [6]. Vzhledem k tomu, že genetické defekty jednotlivých složek komplementu jsou vzácné, všeobecně platí, že imunochemické stanovení složek odráží funkční hladinu in vivo. Pro metodiku stanovení složek C3, C4, C1q, C1 inhibitoru, C3 proaktivátoru (faktor B) platí tytéž zásady jako pro metodiku stanovení imunoglobulinů.

Stanovení celkové aktivity komplementu je nutné jen v případě podezření na genetický defekt komplementu, tzn. u pacientů s rekurentními infekcemi, obzvláště rekurentními meningitidami, s hereditárním angioneurotickým edémem (HAE) a u pacientů z rodin s výskytem imunokomplexových chorob. Pro potvrzení HAE je nutné stanovit koncentraci C1 inhibitoru, popř. provést funkční vyšetření C1 inhibitoru (12–20 % pacientů s HAE má hladinu C1 inhibitoru normální nebo i zvýšenou, ale bílkovina není funkční).

Stanovení složek je pomocným vyšetřením při sledování pacientů s glomerulonefritidami, imunokomplexovými chorobami, jako je systémový lupus erythematosus, některé formy vaskulitidy. Rutinní stanovení komplementu u většiny akutních nebo chronických zánětlivých nebo infekčních onemocnění nemá velký význam.

IMUNNÍ KOMPLEXY

Existuje velmi široká paleta metodik pro stanovení imunních komplexů, založených na nej-

různějších principech [7], které také mají nej-různější výhody i nevýhody. Více v pracích [7, 8]. Doporučeny jsou metody stanovení pomocí C1q v kapalně fázi nebo na pevném povrchu, stanovení pomocí bovinního konglutinu, monoklonálního revmatoidního faktoru, pomocí Raji buněk. Velkou pozornost je třeba věnovat odběru a skladování vzorků. Krev se má po odběru nechat stát 2 hodiny při laboratorní teplotě nebo 37 °C, pak odstředit krevní koláč a sérum uložit při alespoň -60 °C. Problémem je také standardní materiál, nejrozšířenější je užití tepelně agregovaného IgG. Zahřívání vzorků na 56 °C (tzv. dekomplementace) vyžadované u některých metodik může vést ke tvorbě agregátů imunoglobulinů a tím k falešné pozitivitě. Zdrojem falešné pozitivity může být také přítomnost heparinu, endotoxinu nebo DNA ve vzorku, RF ve třídě IgM u metod užívajících RF, antilymfocytárních protilátek u Raji buněk. V důsledku těchto problémů výsledky stanovení, provedených různými metodikami, jsou jen obtížně srovnatelné.

Vyšetřování imunních komplexů není nepostradatelné u žádné diagnózy. Přítomnost imunních komplexů není specifická pro autoimunní onemocnění, což lze dokumentovat např. u glomerulonefritid.

Stanovení imunních komplexů může být pomocné při monitorování aktivity řady onemocnění, jako např. progresivní polyarthritis, systémový lupus erythematosus, vaskulitida a další. Má také význam u terapie plazmaferézou. Prognostický význam může mít u některých malignit (např. akutní leukémie).

Ve všech případech, kde je podezření na imunokomplexovou chorobu, by mělo být provedeno vyšetření vzorků tkání (kůže, ledviny).

AUTOPROTILÁTKY

Nejrozšířenější metodikou detekce autoprotilátek je nepřímá imunofluorescence. Určitým úskalím může být nehomogenost užívaných tkáňových materiálů, provedení metodiky a kvalita, nejčastěji fluoresceinem, popř. peroxidázou značené protilátky.

Antinukleární protilátky se prokazují nejčastěji na substrátu, kterým jsou jaterní buňky nebo leukocyty. Komerční fixované buňky nedávají tak dobré výsledky jako čerstvé preparáty. Stanovení protilátek proti nativní DNA (dvousřoubovice) se provádí nejčastěji na kinetoplastech vhodného substrátu (např. *Crithidia lucillae*). Stanovení antinukleárních protilátek je nutné pro diagnózu systémového lupus erythematosus. Testy na antinukleární protilátky jsou pomocné u diagnózy autoimunní formy chronické aktivní hepatitidy a progresivní systémové sklerózy.

Antithyroidní protilátky se prokazují na řezech lidských nebo opičích thyroideálních tkání. Jejich stanovení je nutné u diagnózy chronické tyreoiditidy a spontánního myxedému dospě-

lých. Pozitivní výsledek nevylučuje diagnózu adenokarcinomu nebo Gravesovy choroby.

Pro stanovení antimitochondriálních protilátek se užívají především buňky krysích ledvin. Jejich přítomnost je charakteristická, ale ne specifická pro primární biliární cirhózu.

Protilátky proti hladkému svaly se často nalézají u pacientů s chronickou aktivní hepatidou.

Těchto šest metodik je schopno podat vcelku ucelený obraz o jedné ze dvou vzájemně neoddělitelných složek obranyschopnosti organismu — o humorální imunitě. O druhé složce — buněčné imunitě — bude pojednávat druhá část našeho odborného sdělení.

Souhrn

Autoři v článku, který je první částí dvoudílného sdělení, shrnují některé metodické návody pro základní laboratorní vyšetření humorální imunity — stanovení imunoglobulinů, stanovení IgE, imunoelektroforézu, stanovení komplementu, autoprotilátek a cirkulujících imunních komplexů. V článku je uvedena také stručná klinická diagnostika s určením, kdy jsou vyšetření nutná, kdy užitečná a kdy pomocná.

Literatura

1. WHO MEMORANDUM: Use and abuse of eight widely used diagnostic procedures in clinical immunology. Bull. WHO, 59, 1981, s. 717.
2. MANCINI, G. - CARBONARRA, O. - HEREMANS, J. F.: Immunochemical quantification of antigens by single radial immunodiffusion. Immunochemistry, 2, 1965, s. 235.
3. FAHEY, J. L. - McKELVEY, E. M.: Quantitative determination of serum immunoglobulins in antibody-agar plates. J. Immunol., 94, 1965, s. 84.
4. SCHEIDEGGER, J. J.: Une micro-méthode de l'immunoélectrophorèse. Int. Allergy Immunol., 1, 1955, s. 103.
5. MAYER, M. M. - KABAT, E. A.: Experimentální imunochémie. 1. vyd. Praha 1965.
6. VOTRUBA, T. aj.: Některé aspekty kvantifikace složek lidského komplementu III. Podmínky odběru a uschování séra ke stanovení C3 složky. Problematika stanovení C3 složky. Čs. Epidemiol. Mikrobiol. Imunol., 32, 1983, s. 259.
7. THE ROLE of immune complexes in diseases. WHO Technical Report Series, No. 606, Ženeva 1977.
8. JÄGER, L. - HERRMANN, D.: Bedeutung von Immunkomplexreaktionen in der inneren Medizin. Z. ges. inn. Med., 35, 1980, s. 49.

Klíčová slova: Imunologická laboratorní vyšetření; Memorandum WHO; Stručná klinická diagnostika; Metodická doporučení.