

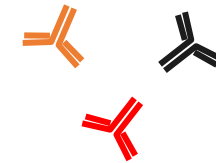
# Klinická imunologie 3.

Marcela Vlková

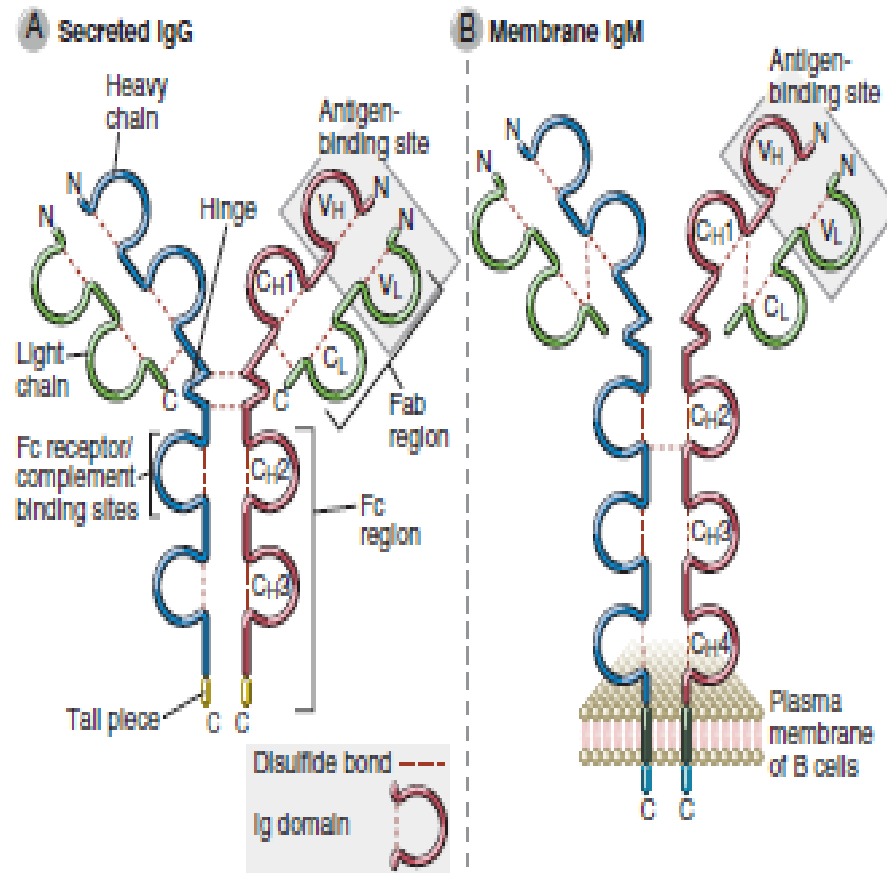
# B lymfocyty

- základními buňkami specifické humorální imunity
- primární funkce - produkce protilátek – imunoglobulinů (Ig)
- Ig- zaměřeny proti mikroorganismům nebo jejich toxinům působících v tělních tekutinách či dutinách tj. mimo buňky





# BCR receptor



- Skládá se ze dvou identických těžkých řetězců a dvou identických lehkých řetězců
- Na každém řetězci jsou variabilní a konstantní oblasti

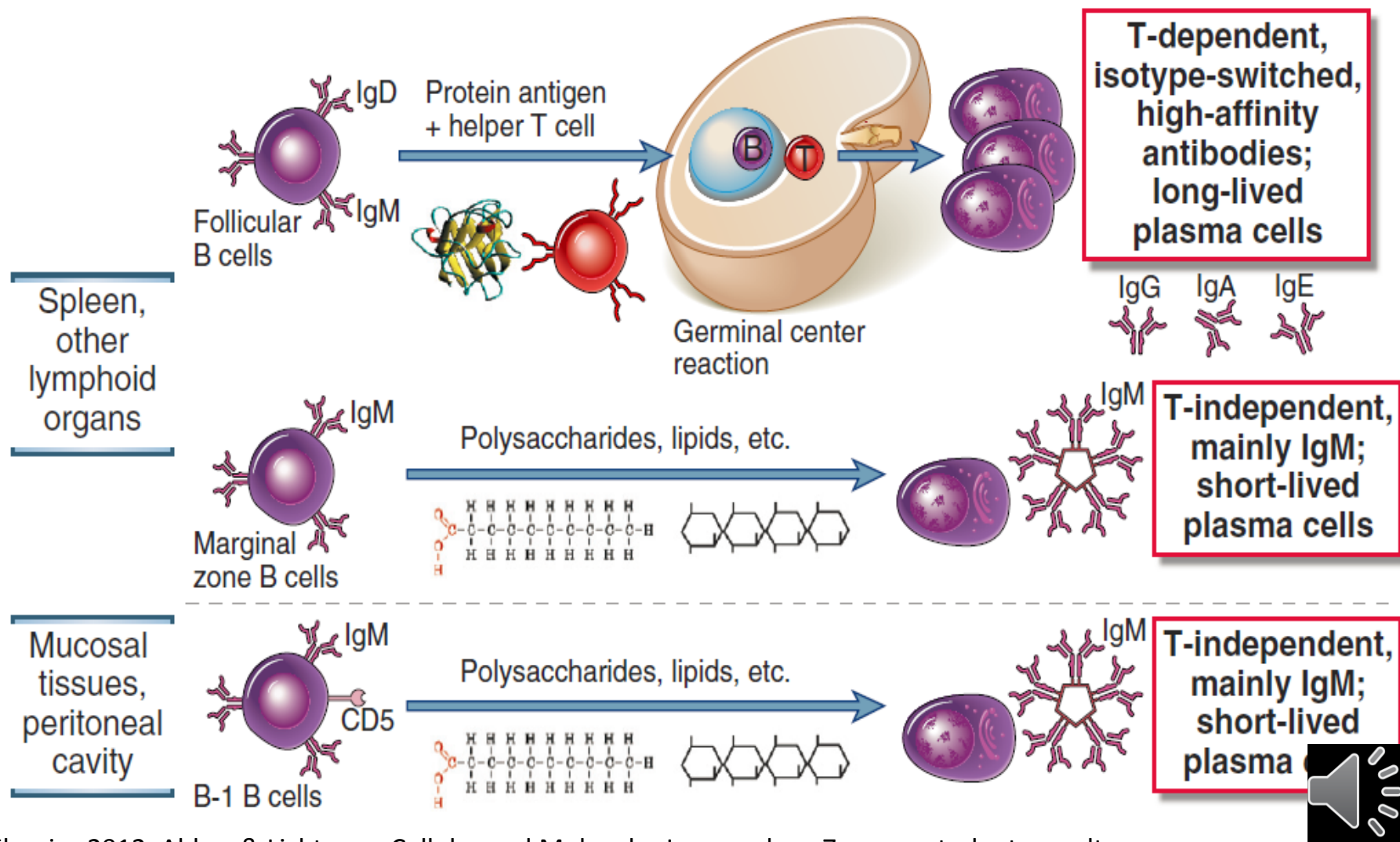


# Protilátky

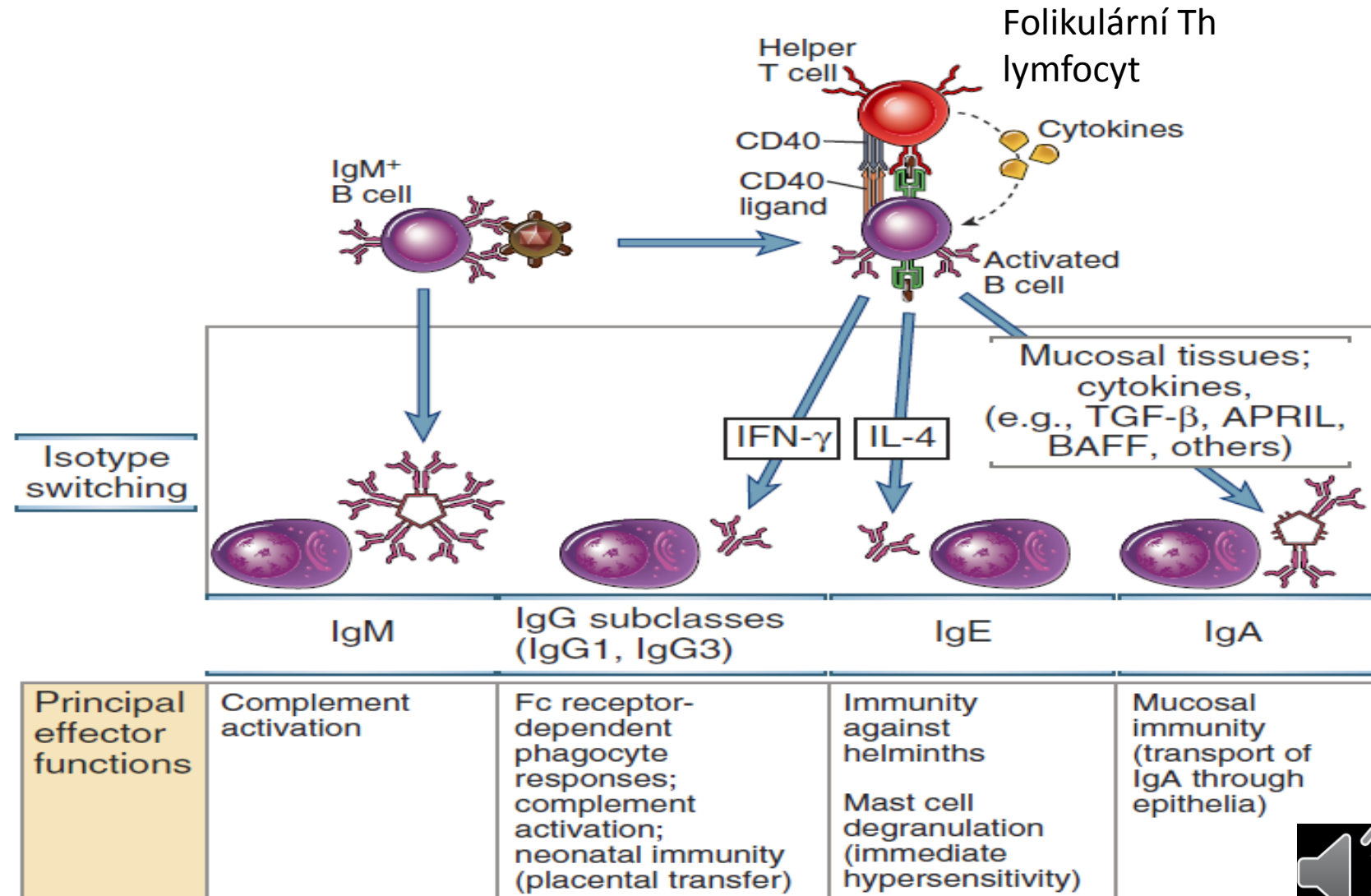
- Ig existují ve dvou formách:
  - membránově vázané na povrchu B-lymfocyту , kde fungují jako receptor pro antigen
  - sekretované , které jsou v cirkulaci, tkáních, mukóze
  - jsou sekretovány plazmatickými buňkami, které vznikají z B-lymfocyту po jeho aktivaci a další diferenciaci
  - Vážou se na Ag a aktivují efektorové mechanismy vedoucí k eliminaci Ag



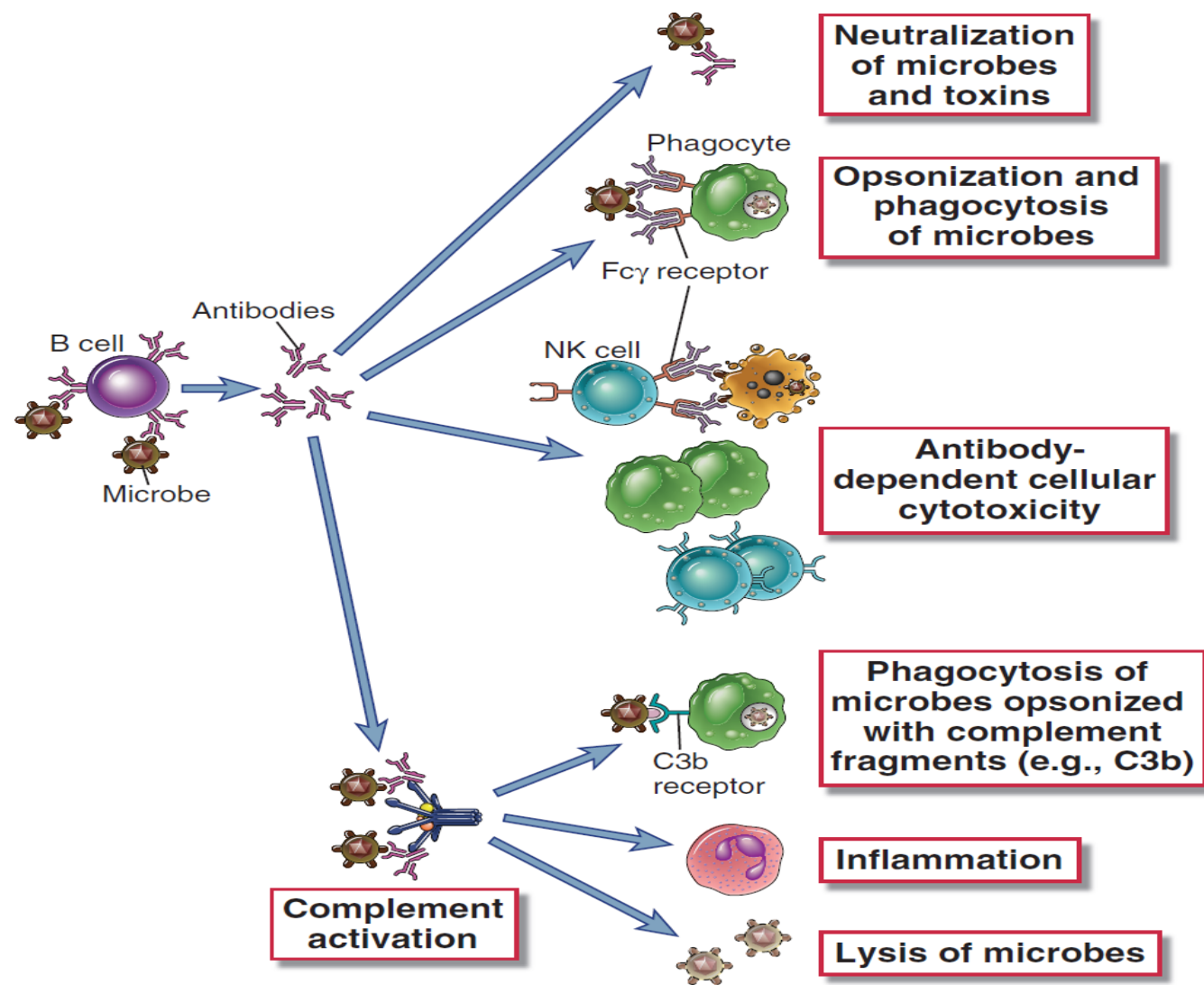
# B-lymfocytární subpopulace



# Izotypový přesmyk a funkce jednotlivých Ig



# Efektorové funkce protilátek



# Adaptivní imunita: paměť

Zvýšení imunitní reakce po opakovaném setkání s původním antigenem.

Klonální selekce – klonální expanze

Diferenciace: terminální efektorové buňky  
dlouze žijící paměťové buňky

Imunitní reakce

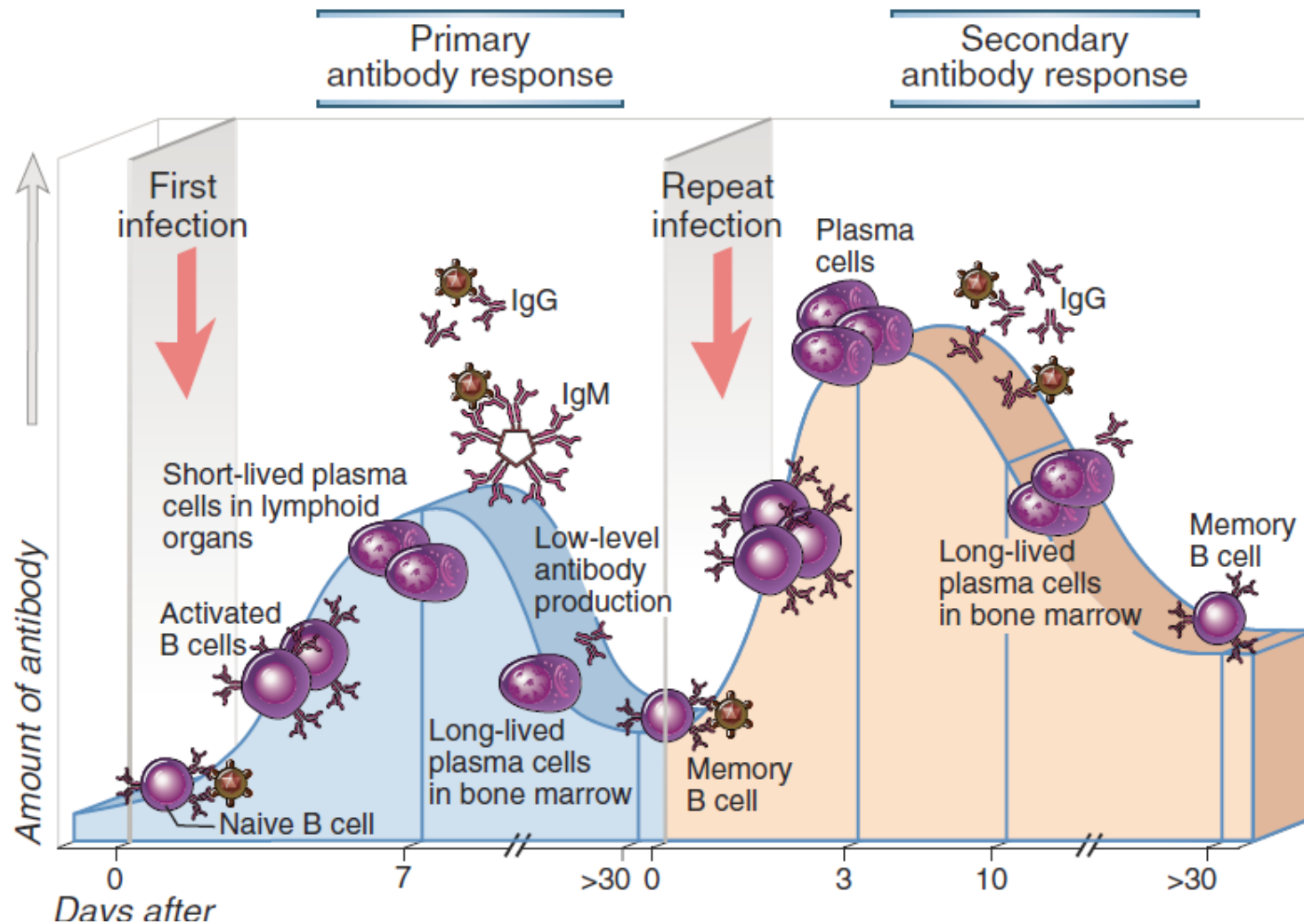
primární

sekundární (anamnestická, “booster“)



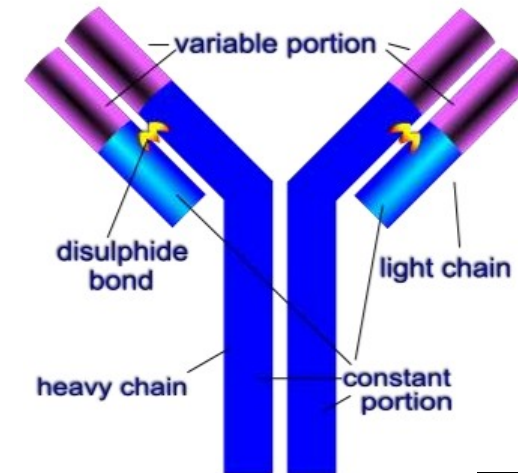
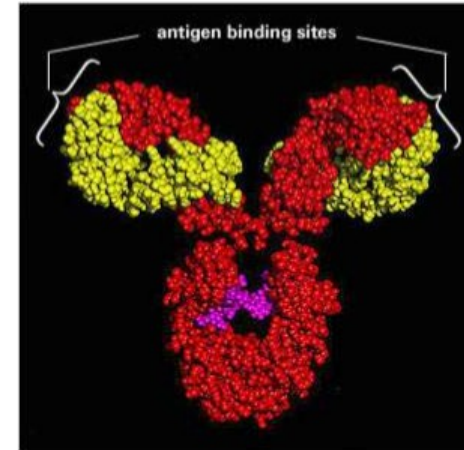


# Imunitní protilátková odpověď



# Protilátky – imunoglobuliny (Ig)

- Peptidoglykany
- Tvar molekuly Y
- Dva těžké a dva lehké řetězce spojené disulfidickými můstky
- Variabilní část – vazba Ag
- Konstantní část - určuje příslušnost Ig do třídy: - existuje 5 tříd Ig: IgA, IgG, IgD, IgE a IgM



# Vazba Ag a protilátky

- Nevazebné interakce
  - Vodíkové můstky
  - Iontové interakce
  - van der Waalsovy síly
  - Dipol-dipol
- Interakce mezi antigenem a protilátkou závisí na pH, iontové síle a přítomnosti dalších látek např. detergentů, chelatotropních činidel ...



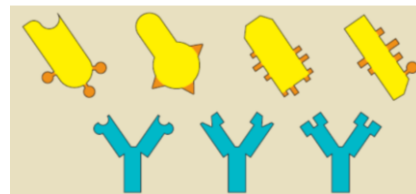
# Imunochemické metody

- Podstatou je interakce Ag a protilátky (Ig) in vitro za tvorby imunokomplexů
- Možnost stanovit přítomnost a koncentraci jak protilátek tak antigenů
- Reakce je vysoce specifická, tj. vysoce citlivá
- Může vznikat precipitát, aglutinát či imunokomplex
- Pro provedení těchto reakcí potřebujeme předem připravené protilátky – tzv. antiséra



# Rozdělení imunologických laboratorních metod

**serologické (humorální)** - detekce antigenů a protilátek, tvorba protilátek proti infekčnímu agens



**buněčné** - počty a funkce jednotlivých typů leukocytů



Monocyte



Lymphocyte



Neutrophil



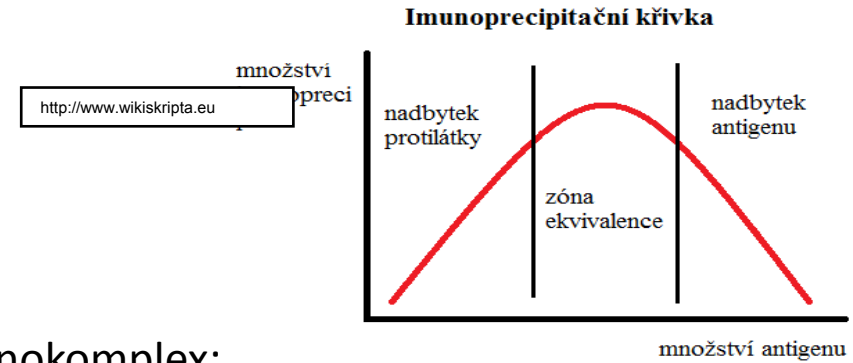
Eosinophil



Basophil



# Serologické metody



Reakce antigenu (Ag) s protilátkou (Ab) = imunokomplex:

- 1. Primární fáze**
  - rychlá, nepozorovatelná pouhým okem
  - tvorba imunokomplexů Ag + Ab
  - vznik vazby jednotlivých epitopů s vazebnými místy protilátek
- 2. Sekundární fáze**
  - pomalá, pozorovatelná pouhým okem
  - uplatňuje se multivalence Ag a polyvalence Ab
  - vznik prostorového komplexu

Pokud nedochází k sekundární fázi reakce, je nutné imunokomplexy vzniklé v primární fázi vizualizovat – imunochemické metody



# Serologické metody

## **1. Klasické serologické metody je přítomna primární i sekundární reakce**

- Aglutinace (přímá / nepřímá)
- Precipitace (v kapalině, v gelu)

## **2. Imunochemické metody s následnou detekcí – není přítomna sekundární reakce**

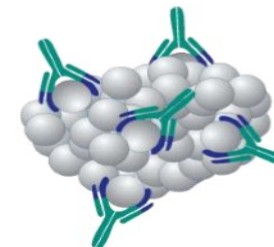
- Imunofluorescence (přímá / nepřímá)
- Imunoanalýza (EIA-ELISA, RIA, FIA, LIA)
- Immunoblot, imunodot

## **3. Metody založené na efektorovém účinku protilátek (využívané v klinické mikrobiologii)**

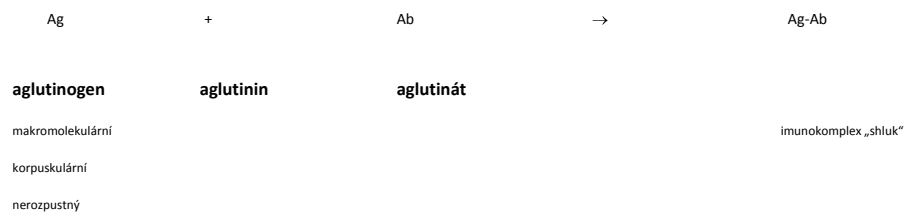
- Komplement fixační reakce
- Inhibiční a neutralizační testy



# Aglutinace vs Precipitace

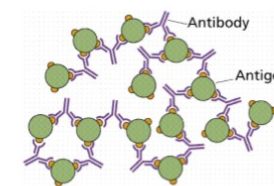
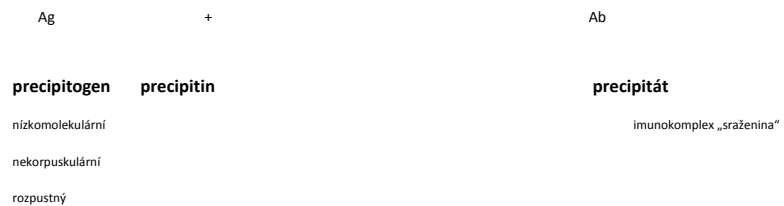


## Aglutinace (shlukování)



Protilátky naměřené proti epitopům antigenních částic vytvářejí mezi korpuskulární můstky, které vedou ke vzniku shluků (aglutinátů)

## Precipitace (srážení)



Reakce mezi solubilním antigenem a protilátkou s následným vznikem precipitátu  
(hydrofobní vazby – nerozpustný komplex)





# Stanovení hladin imunoglobulinů – využití aglutinace a precipitace

- Detekce celkových hladin protilátek v séru – nefelometrie
- Detekce proteinů akutní fáze
- Detekce protilátek proti revmatoidnímu faktoru
  
- Detekce protilátek - pomocí precipitace s příslušným antigenem (Salmonela, Listerie, ...)
  
- Detekce mikroorganismů pomocí předem připravených protilátek (Salmonela, Streptokoky, Stafylokoky, ...)
- 
- Detekce antigenů vylučovaných mikroorganismy pomocí předem připravených protilátek (Streptokoky – zápal plic, Haemophilus influenzae – meningitida, ...)
- 
- Krevní skupiny – průkaz krevních skupin reakcí protilátek s antigeny na červených krvinkách



# Průkaz protilátek

- Má několik rovin:
  - 1. Pacient tvoří nebo netvoří protilátky – diagnóza imunodeficitu
  - 2. Pacient tvoří nebo netvoří protilátky všech tříd - diagnóza selektivního deficitu IgA, IgM, deficit podtříd Ig
  - 3. Pacient tvoří specifické protilátky – odolnost proti infekcím, často se používá v mikrobiologii



# Průkaz protilátek – po infekci interpretace

- akutní infekce: velké množství protilátek, převážně třídy IgM, případně IgM i IgG (1)
- po prodělané infekci: malé množství protilátek, pouze IgG (imunologická paměť) (2)
- chronická infekce: různé možnosti podle aktivity infekce



# Průkaz protilátek - interpretace

- **obtížné zjistit absolutní koncentraci protilátek proti konkrétnímu antigenu** (ne celkové množství imunoglobulinů) v jednotkách mol/l, mg/l apod.
- **zjišťuje se relativní množství konkrétních protilátek postupným ředěním pacientova séra:**
  - **pozitivní reakce i po vysokém zředění v séru je velké množství protilátky**
  - **pozitivní reakce jen při nízkém zředění v séru je malé množství protilátky**



# Protilátky třídy IgM

- **pentamer** → **neproniká to tkání**
- **teoreticky 10 vazebných míst** - prakticky je jich 5 prostorově blokováno
- **aktivuje komplement, snadno aglutinuje**
- **vytvářeny jako první** jejich produkce nevyžaduje izotypový přesmyk
- pokud dojde k **infekci fétu**, jsou **IgM přítomny již při narození** - IgM musely být vytvořeny fětem nikoli matkou



# Protilátky třídy IgD

- nízké koncentrace v séru,
- nízká afinita k Ag
- nachází se hlavně **na povrchu B-lymfocytů**
- funkce receptoru pro antigen



# Protilátky třídy IgG

- **tvorí se o něco později než IgM**
- **monomery (2 vazebná místa), proniká do tkání**
- **opsonizace, aktivace komplementu klasickou cestou**
- **imunologická paměť (opakované setkání s antigenem)**
- **neutralizace toxinů**
- **jediné procházejí placentou** - novorozenci mají stejnou hladinu IgG protilátek jako dospělý



# Protilátky třídy IgA

- **slizniční protilátky** -tvořeny B-lymfocyty převážně ve sliznicích
- poločas rozpadu asi 1 týden →
- **tvoří dimery**
- **blokáda adhezních molekul** - reagují s adhezními molekulami bakterií
- **opsonizace**
- nemají schopnost aktivovat komplement





# Protilátky třídy IgE

- uvolňuje mediátory zánětu (histamin, serotonin, prostaglandiny, leukotrieny),
  - zodpovědné za **reakce časně přecitlivělosti a alergické reakce**
  - **úloha v antiparazitární obraně** (červi)
- Jeden ze základních testů pro screening atopických stavů – koncentrace IgE v séru se významně zvyšuje u atopiků a koreluje s klinickými obtížemi
- Časný test pro predikci atopie u novorozenců
- Monitorování parazitóz
- Diagnostika vrozených imunodeficitních stavů – hyper IgE syndrom
- Normální hladiny u dospělých – pod 200IU/ml (sérum)
- Stanovení celkového IgE nefelometricky
- Stanovení specifického IgE



# Imunopatologické reakce humorální - s účastí IgE protilátek

- **Atopie – reakce typu 1 nebo též přecitlivělost časného typu**
- K reakci dochází velmi rychle po setkání s Ag (minuty)
- Spojen s tvorbou IgE proti některým antigenům alergenům z vnějšího prostředí:
  - složky pylových zrněk
  - antigeny roztočů z domácího prachu
  - potravinové antigeny
  - zvířecí srst
  - Většina alergenů proteiny nebo glykoproteiny s enzymatickou aktivitou



# ALERGICKÁ PŘECITLIVĚLOST neboli přecitlivělost prvního typu

## Zprostředkovaná IgE -**atopická**

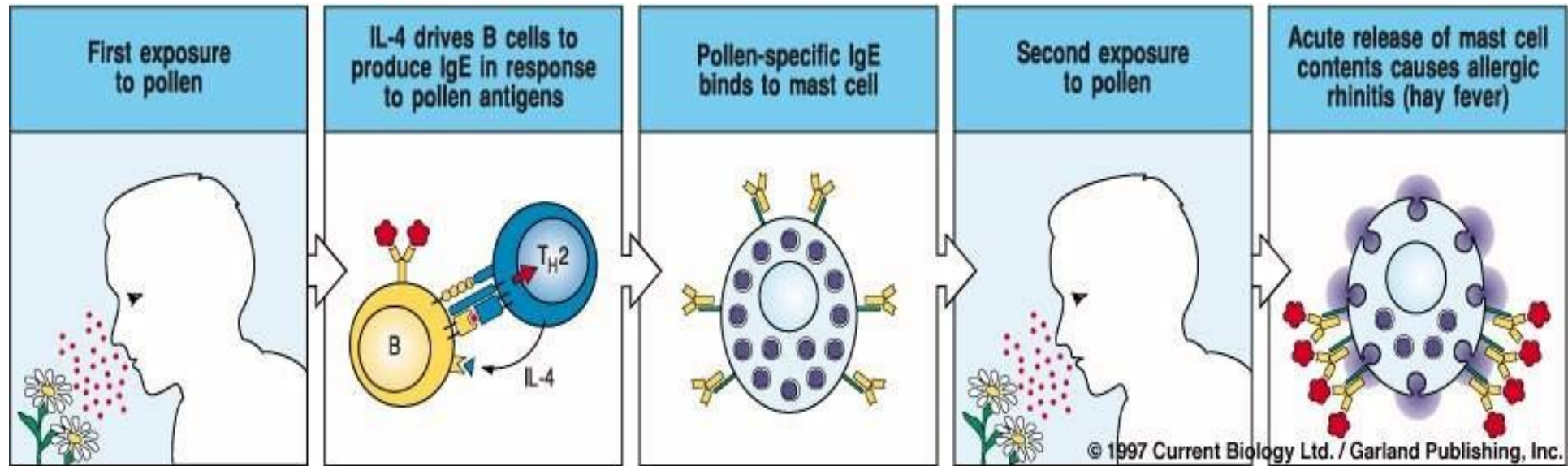
- atopie je individuální nebo rodinný sklon k tvorbě protilátek IgE již na malá množství alergenů, obvykle proteinů
- typické projevy – senná rýma, bronchiálního astma  
rhinokonjunktivitida
- syndromu alergického ekzému/dermatitida

## **neatopická**

- hmyzí jed, helmintózy, léky,...



# Type-I hypersensitivity



- Při prvním setkání s alergenem je daný alergen rozeznán imunitním systémem jako Ag, dojde k aktivaci IS a tvorbě IgE protilátek a alergeny se naváží svým Fc koncem na Fc epsilon receptory žírných buněk.
- Při dalším setkání s alergenem dojde k vazbě alergenu na navázané IgE na žírných buňkách, to způsobí pohyb Fc epsilon receptorů na membráně, jejich konformační změnu, což všechno v důsledku vede k aktivaci žírné buňky, tj. vyplavení mediátorů připravených v žírné buňce, které ovlivní okolní tkáně a buňky.



# Diagnostika atopické přecitlivělosti

- Anamnéza
- Celkový a specifický IgE
- Eosinofilie
- Specifické IgE
- Test aktivace bazofilů
- Eosinofilní kationický protein v séru
- Kožní testy
- Provokační a eliminační testy
- Vyšetřování NO ve vydechovaném vzduchu



# Nejčastější alergen

- Inhalační:
  - Pyly – traviny, stromy, plevele
  - Roztoči domácího prachu
  - Zvířecí alergen
  - Plísně
- Potravinové
  - Mléko
  - Vejce
  - Ořechy
  - Mořské plody
- Léky
  - Penicilinová antibiotika, lokální anestetika
- Injekční
  - Jed blanokřídlého hmyzu



# ALERGENY-taxonomie

*první tři písmena=rod    další písmeno=druh*

*arabské číslo=identifikační pořadí*

Phl p 1-13 Phleum pratense (bojínek, timotejka)

Bet v 1-7 Betula verrucosa (bříza)

Asp f 1-34 Aspergillus fumigatus

Der f 1-22 Dermatophagoides pteronyssimus -  
(roztoči)

Fel d 1-7 Felis domesticus

Api m 1-10 Apis mellifera (Celer)

Ara h 1 Arachis hypogaea (burský ořech)



# Alergeny vyvolávající pozdní typ přecitlivělosti

- Reaktivní chemikálie obsažené v  
lécích, kosmetických výrobcích,  
nátěrových hmotách, soli některých kovů  
silice rostlin
- Vznik kontaktní alergie – diferenciaci do Th1 lymfocytů





# Alergeny mohou způsobovat různou reakci

- Většina alergenů proteiny nebo glykoproteiny s enzymatickou aktivitou
- Komplexní organické sloučeniny – protilátková odpověď
- Anorganické látky (kovy) – buněčná odpověď



# Autoimunitní choroby



# Adaptivní imunita: autotolerance

Lymfocyty, které by poznávaly „vlastní“ antigeny jsou buď odstraněny nebo inaktivovány.

Imunologická tolerance centrální.

Imunologická tolerance periferní.

*Prolomení tolerance – autoimunizace.*



# IMUNOLOGICKÁ TOLERANCE

Destrukce nebo inaktivace lymfocytů s BCR nebo TCR,  
které poznávají a váží epitopy vlastních antigenů

## CENTRÁLNÍ

- T lymfocyty
  - thymus
    - negativní selekce
- B lymfocyty
  - kostní dřeň
    - negativní selekce

## PERIFERNÍ (T- i B-)

### Anergie

k úplné aktivaci lymfocytů chybí druhé, kostimulační signály

### Suprese

reaktivita lymfocytů je tlumena tzv. Treg



## prolomení tolerance



### nevhodné geny

determinující specifickou  
reaktivitu na autoantigeny  
i obecnou vnímavost  
k autoimunitním reakcím



### nevhodné prostředí

zevní i vnitřní



## AUTOIMUNITNÍ CHOROBA



# Autoimunitní choroby

- onemocnění, při kterém **autoprotilátky** nebo **autoreaktivní T-lymfocyty** vedou k poškození vlastních buněk nebo tkání
- postihují 5-7% populace, především ženy



# Prevalence autoimunitních chorob

(Mackay IR, BMJ 2000; 321: 93-96)

<i>Choroby štítné žlázy:</i>	> 3% dospělých žen
<i>Revmatoidní artritida:</i>	1% celkové populace, převaha žen
<i>Primární Sjögrenův syndrom:</i>	0,6-3% dospělých žen
<i>Systémový lupus erythematosus:</i>	0,12% celkové populace, převaha žen
<i>Roztroušená skleróza:</i>	0,1% celkové populace, převaha žen
<i>Diabetes I. typu:</i>	0,1% dětí
<i>Primární biliární cirhóza:</i> věku	0,05-0,1% žen středního a staršího věku
<i>Myasthenia gravis:</i>	0,01% celkové populace, převaha žen



# Klasifikace autoimunitních chorob

- Systémová
- Orgánově specifické





# Systemové choroby

- Systémový lupus erythematosus (SLE)
- Revmatoidní artritida (RA)
- Dermatopolymyositida
- Sjögrenova choroba
- Systémová sklerodermie
- Smíšená choroba pojiva
- Antifosfolipidový syndrom
- Některé vaskulitidy



# Orgánově specifické choroby

- Ulcerózní kolitida
- Crohnova choroba
- Celiakie
- Autoimunitní hepatitida (typ I, II, III)
- Primární biliární cirhóza
- Primární sklerozující cholangitida
- Inzulín-dependentní DM
- Hashimotova thyreotidita
- Graves-Basedowova choroba
- Addisonova choroba
- Atrofická gastritida a perniciózní anémie
- Myasthenia gravis
- Periferní demyelinizační neuropatie
- Roztroušená skleróza
- Hemolytická anémie, trombocytopenie, neutropenie
- Pemfigus
- a další



# Serologická diagnostika autoimunitních chorob

- Vnitřní stimulace imunitního systému
- V jejím důsledku vznikají autoprotilátky
- Jsou zaměřeny proti tělu vlastním tkáním
- Způsobují zánětlivou reakci
- Protilátky jsou zaměřeny proti:
  - orgánům
  - tkáním
  - trombocytům



# Diagnostika AIO obecně

Klinika

Nález autoprotilátek

Histologický nález



# Laboratorní diagnostika autoimunitních chorob

- ***NEPŘÍMÁ IMUNOFLUORESCENCE (IF)***
- ***ELISA***
- ***IMMUNOBLOTTING (IB)***



# Serologické metody

## 1. Klasické serologické metody

- Aglutinace (přímá / nepřímá)
- Precipitace (v kapalině, v gelu)

## 2. Imunochemické metody s následnou detekcí

- Imunofluorescence (přímá / nepřímá)
- Imunoanalýza (EIA-ELISA, RIA, FIA, LIA)
- Immunoblot, imunodot

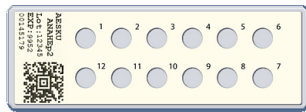
## 3. Metody založené na efektorovém účinku protilátek (využívané v klinické mikrobiologii)

- Komplement fixační reakce
- Inhibiční a neutralizační testy



# Základní princip imunofluorescence (IF)

1. Na sklíčko se substrátem (který obsahuje cílové antigeny) se aplikuje naředěné sérum pacienta (1:80 základní ředění) + vzorky pozitivní a negativní kontroly



2. Inkubace  
30 min v temnu

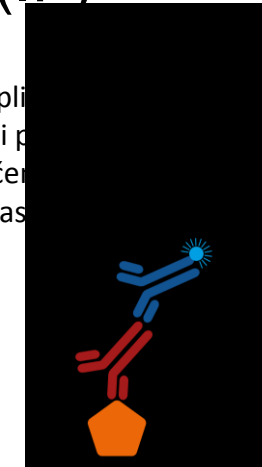
2. Pokrytí sklíčka komnautoproti cílovým přítorn substrátům suspenzí buněčná



3. Promytí skel v PBS+TWEEN – 5 min



4. Aplikace sekundárního protilátky proti primárnímu protilátce, je značená fluorescenčním (FITC) – nejčastěji zelenou



5. Inkubace 30 min v temnu



6. Promytí skel v PBS+TWEEN – 5 min



7. Otření hrany skla od přebytečného PBS+TWEEN, na jednotlivé pozice aplikace 1 kapky (cca 10ul) montovacího média - glycerinu



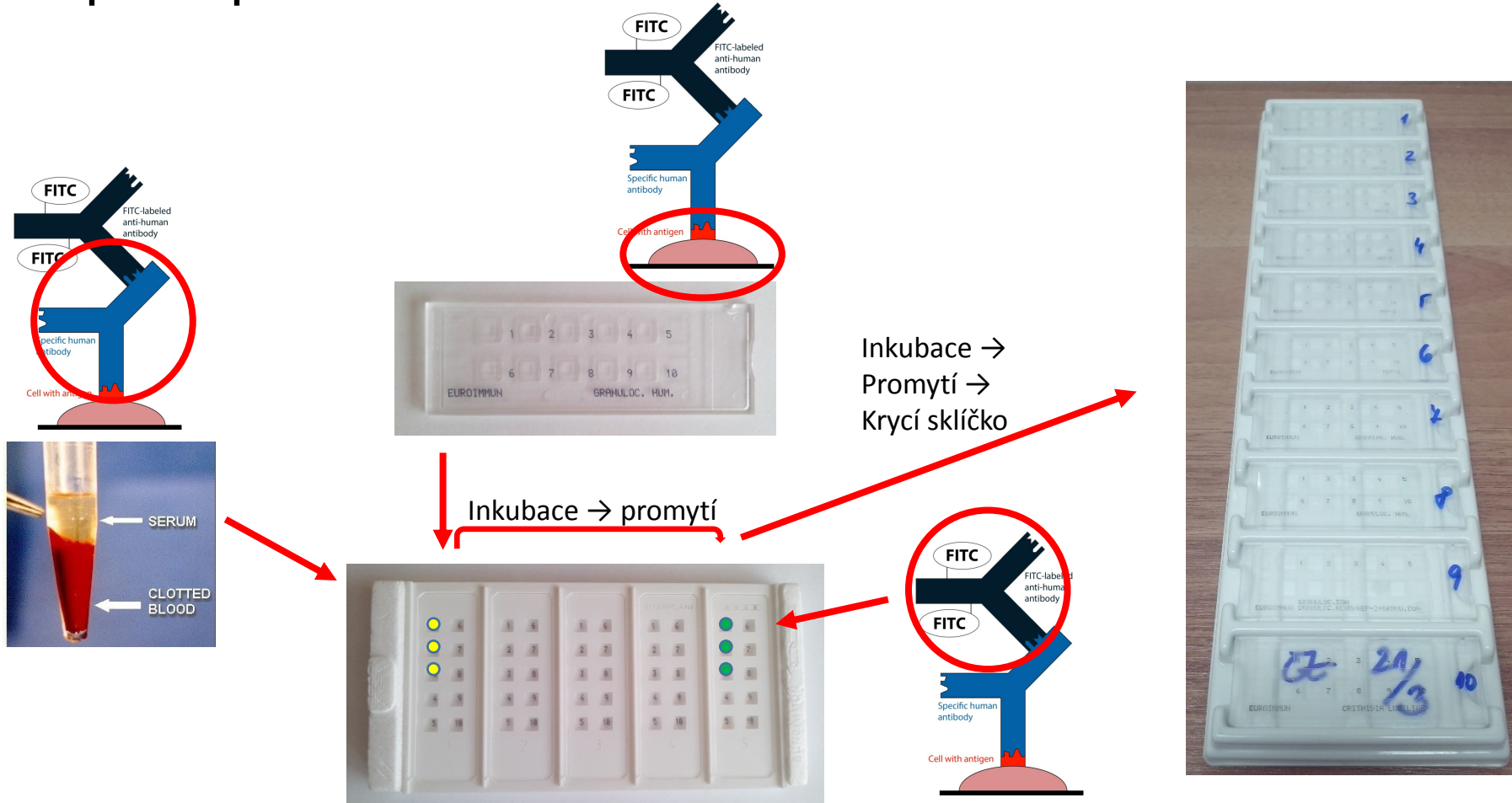
9. Skla jsou připravena k odečtení na mikroskopu



8. Usazení krycího skla, kontrola správného usazení, nutno se vyvarovat bublinám



# Základní princip





# Imunofluorescence

## Antigenní substráty používané při nepřímé IF

- **Buňky HEp2** (Human Epithelial) – detekce **ANA**
  - odvozené z linie HeLa (karcinom děložního čípku)
  - rychle se dělící buňky, v mitóze pozorovatelná **chromatinová destička** – důležitý znak pro odlišení jednotlivých typů ANA
- **Neutrofilní granulocyty** – detekce **ANCA**
- **Crithidia luciliae** – prvok, detekce protilátek proti **dsDNA**
- **Opičí jícen** – detekce **EMA**
- **LKS** (liver, kidney, stomach) – detekce **AMA, ASMA, GPC, RET, ...**
  - kombinace 3 krysích tkání: játra, ledviny, žaludek





# ANA (Anti Nuclear Antibodies)

- Velká skupina protilátek
- Váží se na různé antigeny v jádře (DNA, RNA, centromery, ...)
- Výskyt při různých autoimunitních onemocněních (systémový lupus erytematodes, Sjögrenův syndrom, revmatoidní artritida, ...)



**Fluorescenční obraz** v mikroskopu může vypadat stejně nebo podobně u různých protilátek – pokud vidíme určitý obraz, **nevíme ještě, o jakou autoprotlátku se jedná** (na jaký antigen se váže), k jejímu bližšímu určení mohou pomoci jiné metody (ELISA, ImunoBlot)



# Antinukleární autoprotilátky (ANA)

- Reagují s molekulovými terči přítomnými v jaderném aparátu buňky
- Výskyt u systémových nemocí
- Infekce EBV, CMV
- Výskyt roste asymptoticky s věkem
- Vyšetření IF
- Substrát: Hep-2 buňky – buněčná linie odvozená od lidského karcinomu

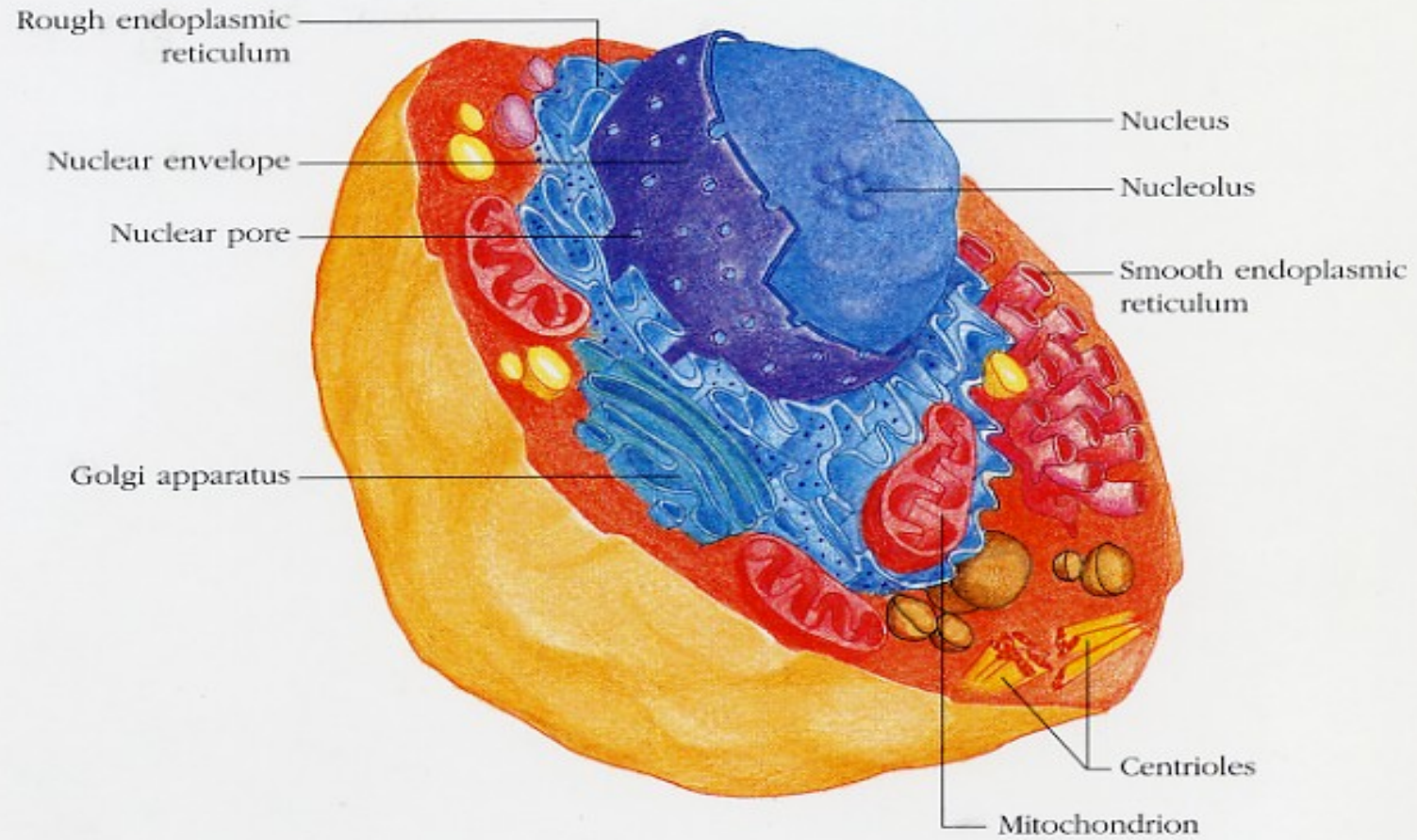


# I. Antinukleární protilátky (ANA)

- nepřímá imunofluorescence
- stanovení z lidského séra
- zákl. ředění 1 : 80, při pozitivním nálezu ANA protilátek dotitrovat geometrickou řadou do 1: 1280
- rozeznávají se různé typy fluorescence



# HEp-2 CELL



# Typ: Homogenní

## antigen :

histony - bazické proteiny asociované s DNA

polynukleotidy - dsDNA, ssDNA

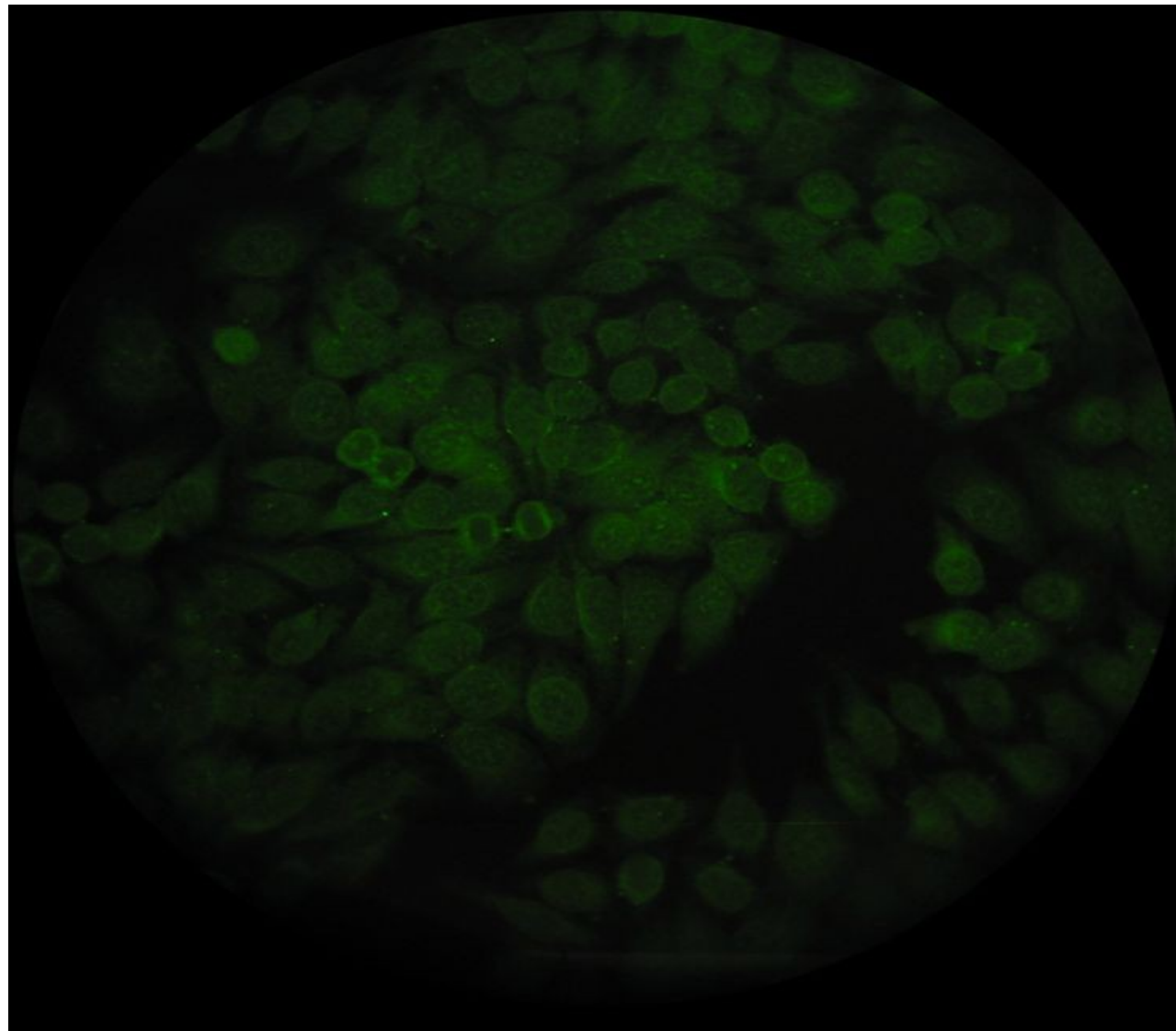
Ku - DNA vazebný protein

## klinické asociace :

SLE, léky indukovaný lupus, RA



# negativní obraz



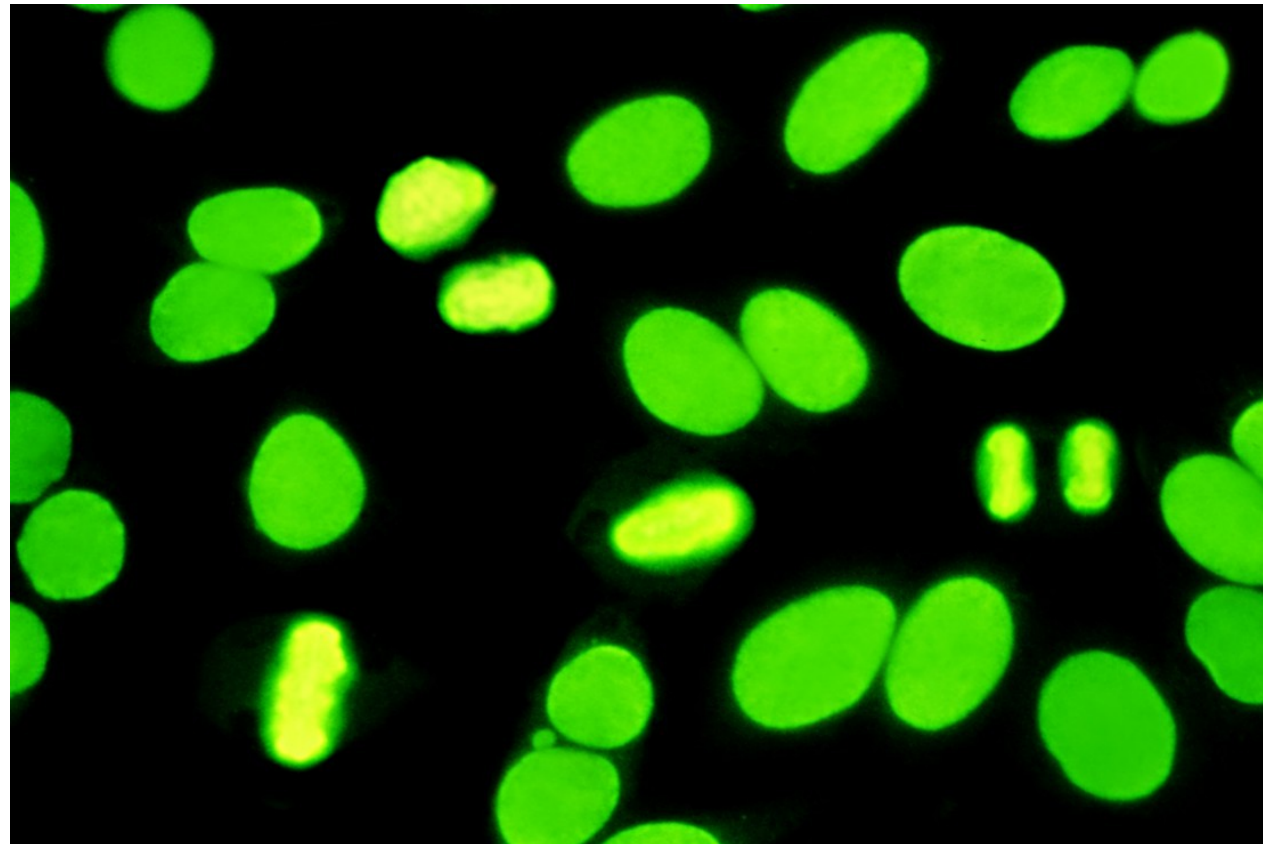


## Fluorescenční obraz na Hep-2

**HOMOGENNÍ**

**Polynukleotity - dsDNA, ssDNA**

**Histony - H1,H2A,H2B, H3,H2A-H2B komplex**



# Typ: Nukleární membrána

**antigen :**

lamina A, B, C

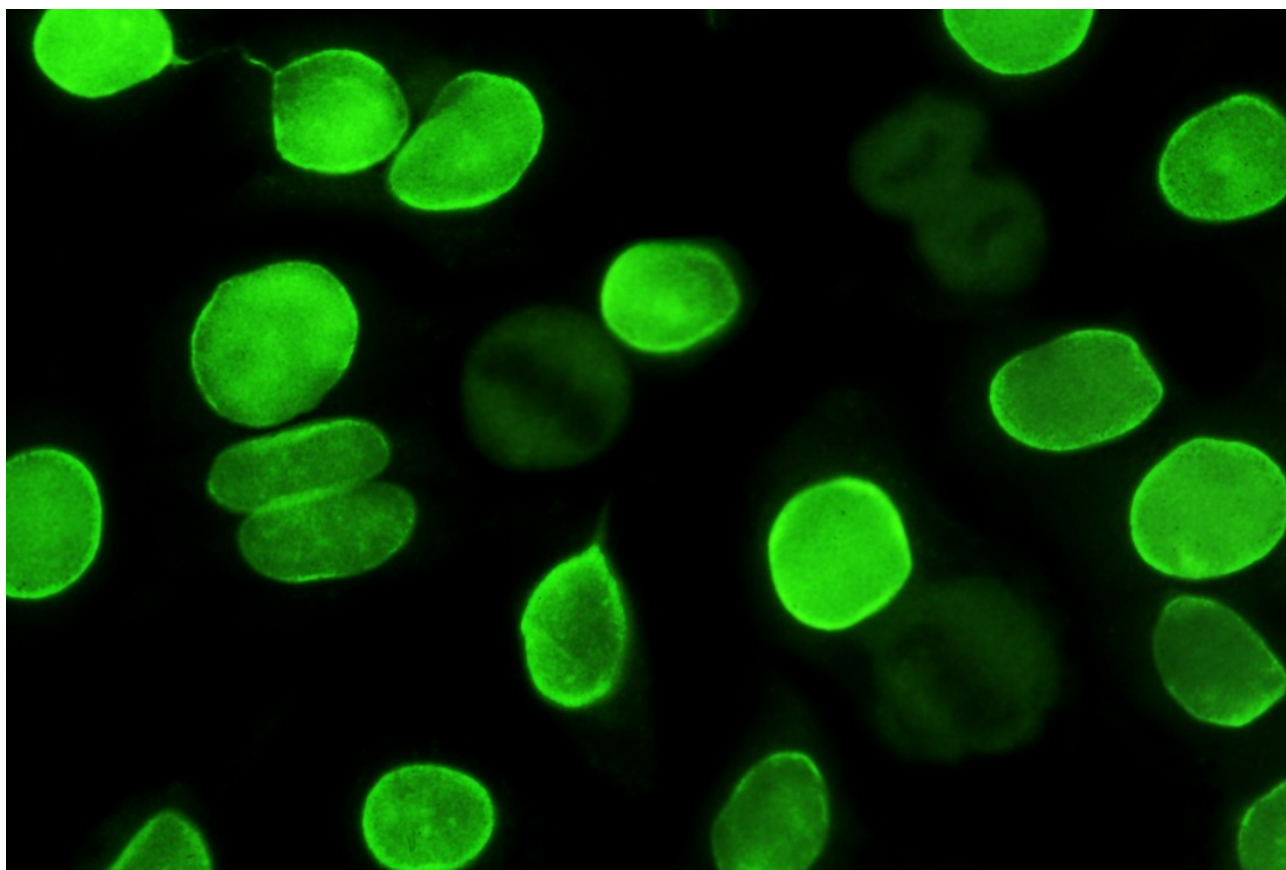
**klinické asociace :**

chronická autoimunitní hepatitida (CAH)  
sklerodermie, SLE, Primární biliární cirhóza



## Fluorescenční obraz na Hep-2

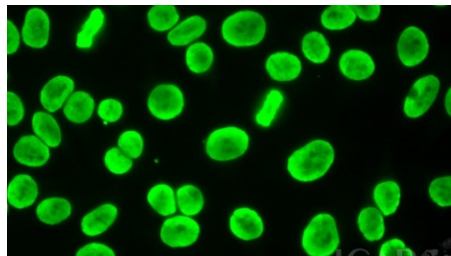
**Jaderná membrána**



# ANA – homogenní typ fluorescence

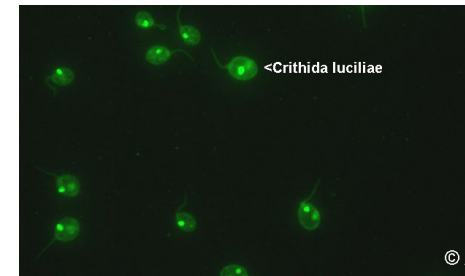
- U homogenního typu fluorescence svítí celé jádro Hep-2 buněk
- Nelze rozlišit, zda jsou přítomné autoprotilátky namířeny vůči dsDNA nebo proteinům asociovaným s DNA (histony apod.)
- Proto si laboratoř může v některých případech sama doordinovat další vyšetření → znovu provede IF takto pozitivních vzorků, ale s jiným substrátem – prvok *Crithidia luciliae*
- Pokud v prvokovi svítí pouze kinetoplast a jádro → jedná se o autoprotilátky proti dsDNA → typické pro **SLE** (systémový lupus erythematosus)

1. ANA protilátky – homogenní typ fluorescence



2. Sérum pacienta aplikováno na substrát *Crithidium luciliae*

3. Pokud je pozitivní kinetoplast a jádro → jedná se o protilátky proti dsDNA



# Laboratorní diagnostika autoimunitních chorob

- *NEPŘÍMÁ IMUNOFLUORESCENCE*
- *ELISA*
- *IMMUNOBLOTTING*



# Stanovení ELISA: Antifosfolipidové protilátky

- Vznikají při infekčním poškození vlastních tkání – odhalují se fosfolipidové struktury, které by byly normálně nedostupné – charakter autoAg
- Protilátky vznikají proti:
  - Kardiolypinu
  - Fosfatidylserinu
  - Etanolaminu
  - Kys fosfatidové
  - $\beta$ 2 glykoprotienu



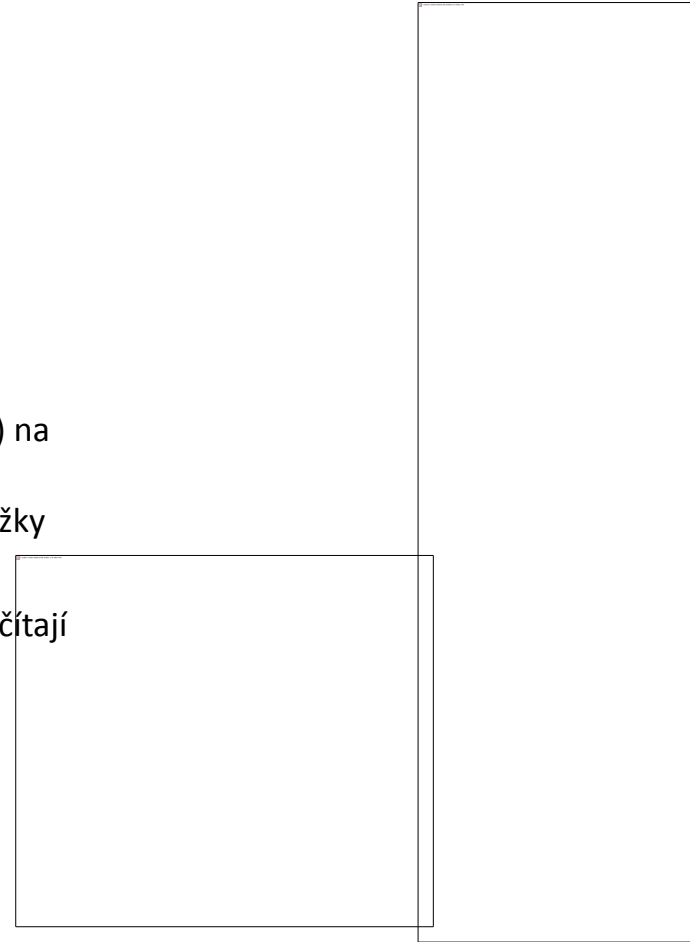
# Stanovení ELISA: Autoprotilátky - RF

- Revmatoidní faktory – rozpoznávají epitopy na Fc části molekuly IgG
- Immunopatologická zánětlivá reaktivita v kloubech
- Vytváření komplexů s autologními IgG, vazba na Fc fragment na makrofázích, tvorba prozánětlivých cytokinů – zánět
- Podobné stafylokokovému proteinu A
- Pozitivní při revmatoidní artritidě



# Imunoblot

- Slouží k diagnostice autoantilátek
- Příprava blotů (výrobce):
  - Proteiny elektroforeticky rozděleny v gelu – přenos (otisk) na nitrocelulózovou membránu (blotting)
  - Membrána je rozstříhána na jednotlivé diagnostické proužky
  - každý protein má na proužku definovanou polohu
  - Výrobce v kitu dodává i šablonu, podle které se bloty odečítají





# Imunoblot

## ○ Princip stanovení:

- Pokud je autoprotilátka proti určitému proteinu (antigenu) přítomna v séru, naváže se na tento protein (antigen) imobilizovaný na stripu
- Detekce vazby autoprotilátky pomocí diagnostických protilátek značených enzymem
- Enzym přemění substrát na barevný produkt
- Výsledkem je vznik barevného proužku na stripu

