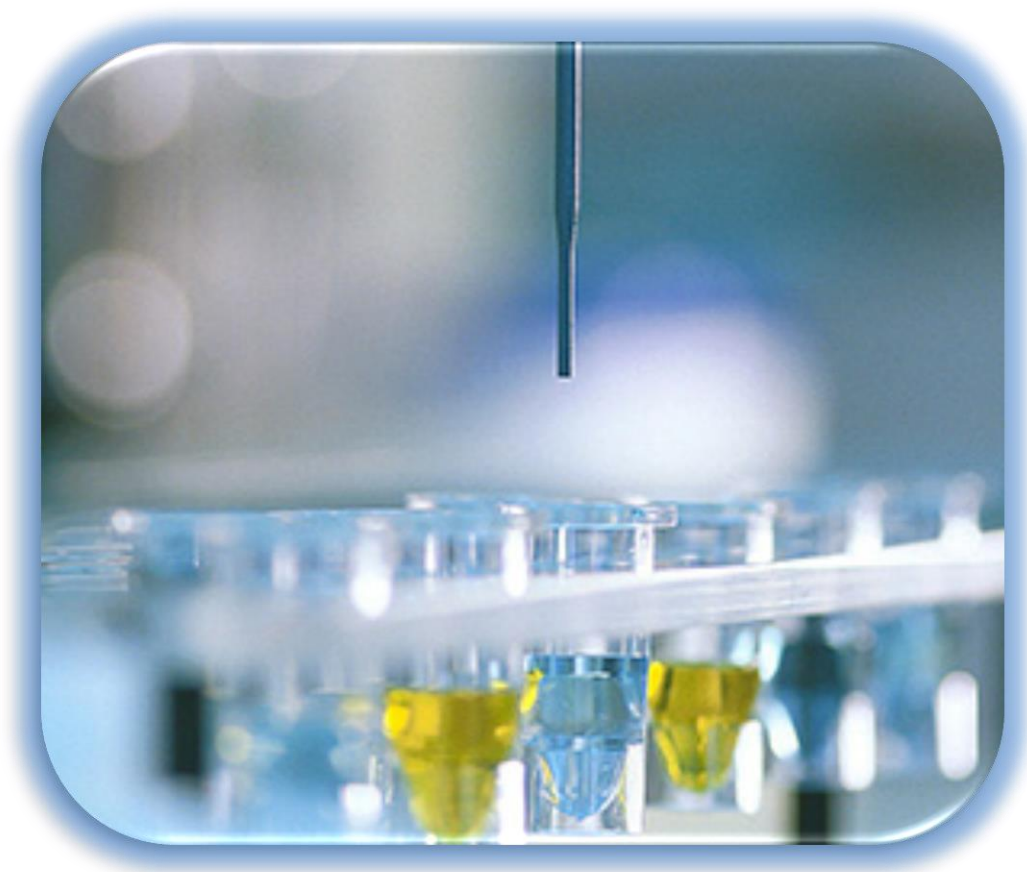


# NÁVODY NA PRAKTICKÉ CVIČENIA Z IMUNOLÓGIE

Neuschlová Martina

Nováková Elena

Kompaníková Jana



Univerzita Komenského v Bratislave Jesseniova lekárska fakulta v Martine

2016



# **Návody na praktické cvičenia z imunológie**

**MUDr. Martina Neuschlová, PhD.**

**doc. MUDr. Elena Nováková, PhD.**

**MUDr. Jana Kompaníková, PhD.**

Táto publikácia je výstupom projektu KEGA č. 032UK-4/2015 MŠV VaŠ SR

**Autori:** Martina Neuschlová, Elena Nováková, Jana Kompaníková: Ústav mikrobiológie a imunológie. Univerzita Komenského v Bratislave Jesseniova lekárska fakulta v Martine

**Vydavateľ:** Univerzita Komenského v Bratislave Jesseniova lekárska fakulta v Martine

**Vydanie:** prvé

---

© M. Neuschlová, E. Nováková, J. Kompaníková, 2016

ISBN 978-80-8187-017-0

EAN 978801870170

## **PREDSLOV**

Publikácia Návody na praktické cvičenia z imunológie je určená pre študentov medicíny, zubného lekárstva, nelekárskych študijných programov, ako aj pre lekárov, vedecko-výskumných a zdravotníckych pracovníkov. Návody na praktické cvičenia z imunológie sú výstupom projektu KEGA č. 032UK-4/2015 MŠVVaŠ SR.

Laboratórne techniky používané v imunológii umožňujú identifikovať zložky vrodenej aj získanej imunity, humorálnej aj bunkovej imunity. Racionálne indikovanie laboratórnych vyšetrení a schopnosť včasného stanovenia správnej diagnózy je veľmi dôležité z hľadiska prognózy pacienta a prevencie vzniku irreverzibilných tkanivových a orgánových poškodení s potrebou zvýšených nákladov na dlhodobú liečbu. To je možné iba vďaka kvalitnej príprave, získaním potrebných poznatkov v oblasti imunológie a ich prepojením s poznatkami z ostatných medicínskych oblastí.

Návody na praktické cvičenia z imunológie poskytujú na jednej strane teoretické poznatky a na druhej strane najčastejšie praktické metódy používané v imunologických laboratóriách. Umožňuje čitateľom zvoliť si vlastné tempo štúdia, získať spätnú väzbu prostredníctvom kontrolných otázok zaradených v závere každej kapitoly.

Získanie dôkladných poznatkov o možnostiach laboratórnej diagnostiky sa v praxi prejaví konkrétnym prínosom, aby sa mohli nielen včas rozpoznať a účinne liečiť ochorenia, ale tiež vhodne stimulovať jednotlivé zložky imunitného systému v súlade s ich vývojom, alebo naopak tlmiť zložky imunitného systému, ak si to zdravotný stav pacienta vyžaduje.

Na základe erudovaných znalostí je možné racionálne indikovať laboratórne vyšetrenia priamej i nepriamej diagnostiky, znížiť traumatizáciu pacienta zbytočnými vyšetreniami a odbermi, a tým zlepšiť kvalitu života pacienta.

MUDr. Martina Neuschlová, PhD.

# Obsah

<b>1</b>	<b>BUNKY IMUNITNÉHO SYSTÉMU</b>	<b>11</b>
1.1	HEMATOPOÉZA	11
1.2	CD ZNAKY BUNIEK IMUNITNÉHO SYSTÉMU	12
1.3	POLYMORFONUKLEÁRNE LEUKOCYTY	13
1.3.1	Neutrofily	13
1.3.2	Eozinofily	14
1.3.3	Bazofily	14
1.4	MONONUKLEÁRNE BUNKY	15
1.4.1	Mastocyty	15
1.4.2	Monocyty	15
1.4.3	Antigén prezentujúce bunky – APC	16
1.4.4	Makrofágy	16
1.4.5	Dendritové bunky	17
1.4.6	Lymfocyty	18
1.5	IZOLÁCIA MONONUKLEOVÝCH BUNIEK Z PERIFÉRNEJ KRVI	22
1.5.1	Separácia T-a B-lymfocytov na základe tvorby roziet	23
1.5.2	Separácia pomocou prietokovej cytometrie	24
	Otázky k samohodnoteniu	24
<b>2</b>	<b>VYŠETROVACIE METÓDY V IMUNOLÓGII</b>	<b>25</b>
2.1	KOMPLEMENT	25
2.1.1	Klasická cesta aktivácie komplementu	26
2.1.2	Alternatívna cesta aktivácie komplementu	26
2.1.3	Lektínová cesta aktivácie komplementu	26
2.2	PORUCHY KOMPLEMENTOVÉHO SYSTÉMU	27
2.3	STANOVENIE ZLOŽIEK KOMPLEMENTU	28
2.3.1	Stanovenie zložiek komplementu pomocou jednoduchkej radiálnej imunodifúzie	28
2.3.2	Stanovenie celkovej aktivity komplementovej kaskády	30
2.4	LYZOZÝM (muramidáza)	31
2.4.1	Stanovenie lyzozýmu metódou jednoduchkej radiálnej imunodifúzie	32
2.5	STANOVENIE BAKTERICÍDNEJ AKTIVITY SÉRA	33
2.6	STANOVENIE PROTEÍNOV AKÚTNEJ FÁZY ZÁPALU	34

2.6.1 Stanovenie CRP – C-reaktívneho proteínu .....	34
2.7 FAGOCYTÓZA .....	37
2.7.1 Neutrofily .....	37
2.7.2 Eozinofily .....	39
2.7.3 Monocyty .....	40
2.7.4 Makrofágy .....	41
2.7.5 Proces fagocytózy .....	42
2.7.6 Vyšetrenie fagocytujúcich buniek.....	44
2.7.7 Prečo sa vyšetruje fagocytárna aktivita? .....	48
2.7.8 Kedy sa vyšetruje fagocytárna aktivita?.....	48
Otázky k samohodnoteniu.....	49
 <b>3 METÓDY POUŽÍVANÉ NA VYŠETRENIE ZLOŽIEK HUMORÁLNEJ IMUNITY .....</b>	<b>50</b>
3.1 SÉROLOGICKÉ REAKCIE .....	50
3.2 ANTIGÉN .....	50
3.3 PROTILÁTKY.....	51
3.4 SÉROLOGICKÉ REAKCIE .....	52
3.4.1 Fázy sérologických reakcií .....	52
3.4.2 Využitie sérologických reakcií.....	52
3.4.3 Hodnotenie sérologických reakcií.....	53
3.5 AGLUTINÁCIA .....	53
3.5.1 Rozdelenie aglutinačných reakcií .....	54
3.5.2 Priame aglutinácie .....	54
3.5.3 Nepriame aglutinácie.....	57
3.6 PRECIPITÁCIA.....	60
3.6.1 Zóna ekvivalencie .....	60
3.6.2 Precipitácie v tekutom prostredí .....	61
3.6.3 Precipitácie v gélovom prostredí – imunodifúzie .....	61
3.7 ELEKTROFORÉZA A IMUNOELEKTROFORÉZA .....	65
3.7.1 Elektroforéza .....	65
3.7.2 Imunoelektroforéza .....	66
3.8 KOMPLEMENT FIXAČNÉ REAKCIE (KFR) .....	68
3.8.1 Fázy komplement fixačnej reakcie.....	68
3.8.2 Hodnotenie výsledku komplement fixačnej reakcie.....	68

Otázky k samohodnoteniu .....	70
<b>4 NOVŠIE METÓDY V IMUNOLÓGII</b> .....	71
4.1 IMUNOFLUORESCENCIA .....	71
4.1.1 Priama imunofluorescencia .....	71
4.1.2 Nepriama imunofluorescencia .....	72
4.2 IMUNOANALYTICKÉ METÓDY .....	74
4.2.1 Enzýmová imunoanalýza – EIA .....	74
4.2.2 Rádioimunoanalýza – RIA .....	76
4.2.3 Chemiluminiscenčná imunoanalýza .....	77
4.2.4 Fluorescenčná imunoanalýza .....	77
4.3 IMUNOBLOTOVACIE TECHNIKY – IMUNOBLOT .....	77
4.3.1 Western blot .....	77
4.3.2 Imunodot .....	78
4.3.3 Využitie imunoblotovacích techník .....	78
4.4 ELISPOT (Enzyme-Linked ImmunoSPOT assay) .....	79
4.5 PCR – Polymerase Chain Reaction .....	81
Otázky k samohodnoteniu .....	83
<b>5 METÓDY POUŽÍVANÉ NA VYŠETRENIE ZLOŽIEK BUNKOVEJ IMUNITY</b> .....	84
5.1 DÔKAZ ŠPECIFICKEJ BUNKOVEJ IMUNITY, METÓDY POUŽÍVANÉ <i>IN VIVO</i> A <i>IN VITRO</i> PRI DIAGNOSTIKE TUBERKULÓZY .....	84
5.1.1 Kožný tuberkulínový test .....	85
5.1.2 IGRA testy (Interferón Gamma Release Assay) .....	87
Otázky k samohodnoteniu .....	88
<b>6 IMUNODEFICITNÉ STAVY</b> .....	89
6.1 PRIMÁRNE IMUNODEFICITY .....	89
6.1.1 Klinická manifestácia .....	89
6.1.2 Liečba pri primárnych imunodeficitoch .....	91
6.2 SEKUNDÁRNE IMUNODEFICITY .....	91
6.2.1 Príčiny sekundárnych imunodeficitov .....	91
6.2.2 Liečba pri sekundárnych imunodeficitoch .....	92
6.3 DIAGNOSTIKA IMUNODEFICIENCIÍ .....	92

6.3.1 Anamnéza.....	92
6.3.2 Klinický obraz.....	92
6.3.3 Spektrum imunologických vyšetrení v prípade diagnostiky imunodeficiencií. ....	93
6.3.4 Metódy používané v laboratórnej diagnostike imunodeficitných stavov.....	94
Otázky k samohodnoteniu.....	94
<b>7 AUTOIMUNITNÉ OCHORENIA A ICH DIAGNOSTIKA.....</b>	<b>95</b>
7.1 AUTOIMUNITA .....	95
7.2 AUTOPROTILÁTKY.....	95
7.3 DELENIE AUTOIMUNITNÝCH OCHORENÍ .....	96
7.4 SYSTÉMOVÉ AUTOIMUNITNÉ OCHORENIA.....	96
7.5 ORGÁNOVO ŠPECIFICKÉ AUTOIMUNITNÉ OCHORENIA.....	97
7.6 DIAGNOSTIKA AUTOIMUNITNÝCH OCHORENÍ.....	98
7.6.1 Nepriama imunofluorescencia .....	98
7.6.2 Ďalšie metódy v diagnostike autoimunitných ochorení .....	100
Otázky k samohodnoteniu.....	101
<b>8 VAKCINAČNÁ IMUNOLÓGIA .....</b>	<b>102</b>
8.1 IMUNIZÁCIA .....	102
8.2 PASÍVNA IMUNITA.....	103
8.2.1 Výhody a nevýhody pasívnej imunity .....	103
8.2.2 Spôsoby navodenia pasívnej imunity.....	103
8.3 AKTÍVNA IMUNITA.....	103
8.3.1 Výhody a nevýhody aktívnej imunity.....	103
8.3.2 Spôsoby navodenia aktívnej imunity .....	104
8.4 DRUHY VAKCÍN .....	104
8.5 INDIVIDUÁLNA A KOLEKTÍVNA IMUNITA.....	107
Otázky k samohodnoteniu.....	107
<b>LITERATÚRA .....</b>	<b>108</b>
<b>REGISTER.....</b>	<b>111</b>

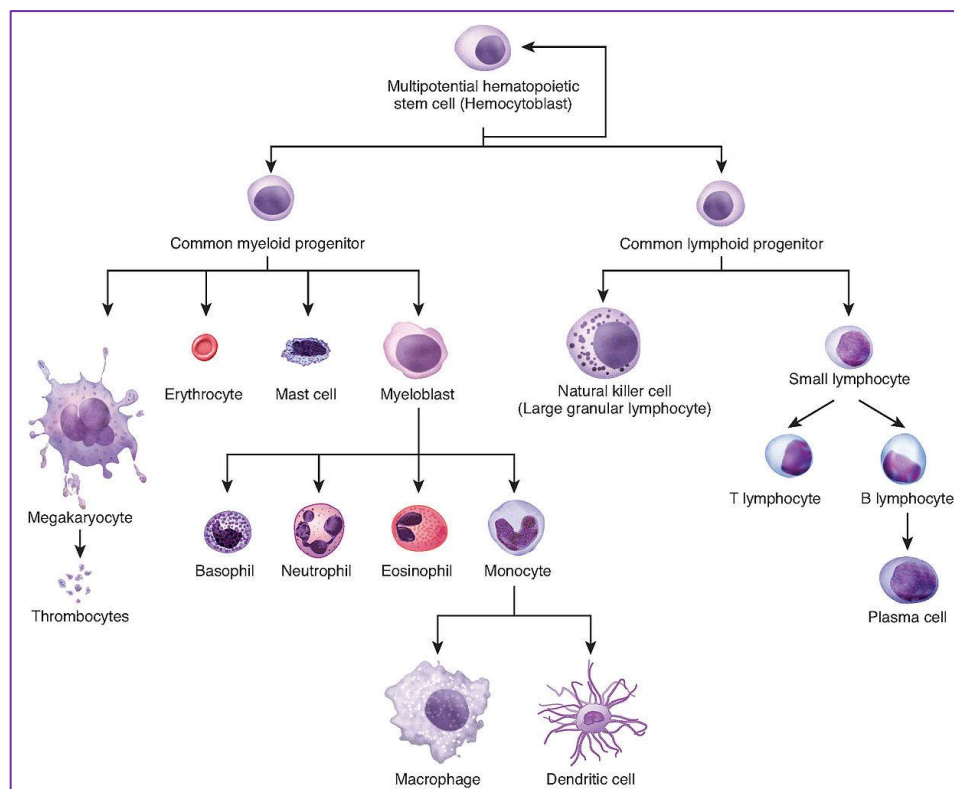


# 1 BUNKY IMUNITNÉHO SYSTÉMU

## 1.1 HEMATOPOÉZA

Bunky, ktoré zabezpečujú imunitnú reakciu sa nazývajú **imunokompetentné bunky**. Bunky imunitného systému majú rôzne dlhý čas života. Ich úbytok je dopĺňovaný hematopoézou. **Hematopoéza je formovanie a vývoj červených a bielych krviniek z pluripotentnej hematopoetickej kmeňovej bunky**. Je to proces tvorby a obnovy krvných buniek, tie prechádzajú štádiom proliferácie, diferenciácie a dozrievania. **Z pluripotentnej kmeňovej bunky sa diferencuje myeloidná a lymfoidná línia** multipotentných buniek (obrázok 1).

**Z lymfoidnej línie** sa vyvíjajú lymfocyty, **z myeloidnej línie** ostatné krvné bunky: granulocyty, monocyty, erytrocyty a trombocyty. Hematopoéza u dospelého človeka prebieha v kostnej dreni a regulovaná je početnými cytokínmi (krvné rastové faktory GM-CSF, M-CSF, G-CSF, erythropoetín, trombopoetín, interleukíny IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9), tiež niektorými hormónmi a nervovými vplyvmi. Pre správnu činnosť hematopoézy sú potrebné vitamíny a minerály.



**Obr. 1** Hematopoéza

([https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/9/9f/0337\\_Hematopoiesis\\_new.jpg/1246px-0337\\_Hematopoiesis\\_new.jpg](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/9/9f/0337_Hematopoiesis_new.jpg/1246px-0337_Hematopoiesis_new.jpg))

Percentuálne zastúpenie jednotlivých krvných leukocytov je znázornené v tabuľke 1.

**Tab 1.** Percentuálne zastúpenie krvných leukocytov u človeka (vlastné spracovanie)

Granulocyty (PMNL)	Neutrofilné granulocyty		60 %
	Eozinofilné granulocyty		4 %
	Bazofilné granulocyty		< 0,2 %
Agranulocyty	Monocyty		8 %
	Lymfocyty	T-lymfocyty	25 %
		B-lymfocyty	
		NK bunky	

## 1.2 CD ZNAKY BUNIEK IMUNITNÉHO SYSTÉMU

Bunky imunitného systému sú charakterizované prítomnosťou membránových znakov (glykoproteínových antigénov). Tie sa objavujú v membráne buniek počas ich vývoja a označujú sa CD (Cluster of Designation).

**CD znak** je **jedinečná molekula alebo komplex molekúl, ktoré bunka exprimuje**. Tieto molekuly pomáhajú diferencovať typ alebo subtyp bunky, jej maturationálne štádium, stupeň aktivácie atď.

Názov pozostáva z písmen CD a číslíc (napr. CD1, CD2,...). Niektoré CD znaky sú špecifické len pre niektoré bunky, a preto je možné ich využiť na presnejšiu izoláciu rôznych bunkových populácií. Prehľad niektorých najdôležitejších CD znakov a typov buniek je uvedený v tabuľke 2. Doteraz (2016) je oficiálne známych 371 CD znakov, okrem toho pribúdajú ďalšie. Aktuálny prehľad oficiálne uznaných CD znakov je dostupný na internetovej adrese: <http://www.hcdm.org>.

**Tab 2.** Prehľad CD znakov a typov buniek (vlastné spracovanie)

CD2	Nezrelé T-lymfocyty
CD3	Všetky T-lymfocyty (súčasť TCR)
CD4	T helper lymfocyty
CD8	T cytotoxické lymfocyty
CD14	Monocyty a makrofágy
CD15	Neutrofily a eozinofily
CD16	NK bunky, neutrofily
CD19	B-lymfocyty
CD38	Plazmatické bunky
CD56	NK bunky
CD58	Endotelové bunky, bunky predkladajúce antigén T-lymfocytom
CD68	Dendritové bunky, makrofágy
CD80 a 86	Bunky predkladajúce antigén T-lymfocytom
CD203	Bazofilné granulocyty, mastocyty

### 1.3 POLYMORFONUKLEÁRNE LEUKOCYTY

Patria medzi bunky imunitného systému pochádzajúce z myeloidnej línie. Charakteristické je pre ne viaclaločné jadro. Pomenovanie získali podľa prítomnosti početných granúl v cytoplazme, pričom na základe rozličného farbenia granúl pri mikroskopickom dôkaze sa delia na tri typy:

- Neutrofily: ich granuly sa nefarbia ani bázickými ani kyslými farbivami
- Eozinofily: ich granuly sa farbja kyslými farbivami na červeno
- Bazofily: ich granuly sa farbja bázickými farbivami na tmavomodro.

#### 1.3.1 Neutrofily

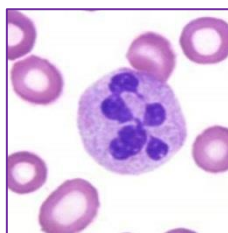
**Neutrofily** (neutrofilné granulocyty, mikrofágy) predstavujú viac ako polovicu všetkých leukocytov (60 % z leukocytov), veľkosti 15  $\mu\text{m}$ . Zdraví ľudia majú asi 5000 neutrofilov v každej kvapke krvi. Nezrelé neutrofily majú jadro v tvare tyčky, zrelé neutrofily majú segmentované jadro. V cytoplazme sa nachádzajú dvojaké typy granúl, ktoré obsahujú antimikrobiálne pôsobiace látky:

- **Primárne azurofilné granuly** obsahujú hydrolázy, myeloperoxidázy.
- **Sekundárne granuly** obsahujú laktoferín, lyzozým, alkalickú fosfatázu, kolagenázu a iné.

Patria k najaktívnejším leukocytom s veľmi vyvinutou schopnosťou fagocytózy. Zaradujú sa medzi **profesionálne fagocyty**. Sú to základné bunky **1. obrannej línie proti patogénom**, cudzorodým bunkám.

Sú to **veľmi výkonné bunky imunitného systému** („ťažné kone“), významné sú v obrane proti infekcii tým, že napadnú baktérie. Majú dôležitú úlohu v zápalovom procese, pretože sa rýchlo mobilizujú do miesta zápalu, sú to **prvé bunky prichádzajúce na miesto poškodenia**. V mieste zápalu sa na endoteliách ciev objavajú molekuly, ku ktorým neutrofily pevne adherujú a prestúpia diapedézou cez stenu cievy. Následne zamieria do miesta, odkiaľ prichádzajú chemotaktické signály. Látky uvoľnené z granúl neutrofilov majú silný baktericídny účinok a slúžia na likvidáciu pohltých častíc. **Fagocytujú, ale nie sú antigén prezentujúce bunky.**

Neutrofily žijú iba krátko, necelý deň, nemajú mitochondrie. Ako zdroj energie využívajú cytoplazmatický glykogén, ten je zdrojom glukózy pri anaeróbnej glykolýze. Neutrofily tak môžu účinkovať aj v mieste bakteriálnej infekcie – v poškodenom tkanive s nízkym obsahom kyslíka (obrázok 2).

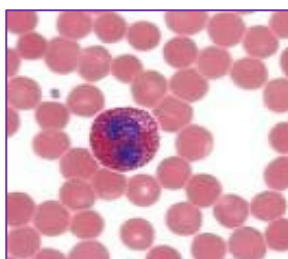


**Obr. 2** Neutrofil (<https://airaanisa.files.wordpress.com/2013/01/neutrofil.jpg>)

### 1.3.2 Eozinofily

**Eozinofily** predstavujú 4 % z leukocytov, veľkosti 18  $\mu\text{m}$ . Zdraví ľudia majú niekoľko sto eozinofilov v kvapke krvi. V cytoplazme majú okolo 200 granúl, ktoré obsahujú špecializované proteíny: hlavný bázický proteín, eozinofilný kationický proteín, eozinofilnú peroxidázu..., ktoré pôsobia toxicky na parazity (hlavne červy) a nádorové bunky.

Sú schopné **len slabo fagocytovať**. Avšak **po aktivácii sa z granúl uvoľňujú aktívne metabolity, secernujú sa leukotriény, prostaglandíny a cytokíny, ktorými je poškodzovaný povrch parazita**. Počet eozinofilov je pri parazitárnej infekcii zvýšený, čo je jedným z laboratórnych diagnostických znakov. Na bunkovej membráne eozinofilov sa nachádzajú **receptory pre imunoglobulíny IgE a zložky komplementu**. Zohrávajú **dôležitú úlohu pri alergických reakciách**, aj pri chronickom zápale (obrázok 3).

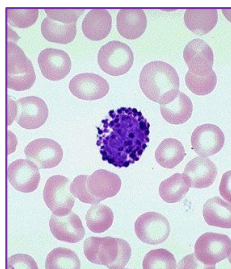


**Obr. 3** Eozinofil (upravené podľa: <http://www.hematoloji.org.tr/files/image/kan/kan10.jpg>)

### 1.3.3 Bazofily

**Bazofily** predstavujú len menej ako 0,2 % z leukocytov. Cirkulujú v krvi a morfológicky sú podobné mastocytom. V cytoplazme majú granuly, ktoré obsahujú veľké množstvo zápalových mediátorov: histamín, heparín... Neobsahujú peroxidázu.

Aktivované sú predovšetkým **pri alergickej reakcii** (zápal je bežnou súčasťou alergických reakcií). Histamín rozširuje cievy a podieľa sa na vzniku žihľavky, ktorá je často prítomná pri alergických reakciách. V bunkovej membráne sa nachádzajú **receptory pre imunoglobulín IgE**. Bazofily **nefagocytojú** (obrázok 4).



**Obr. 4** Bazofil (<http://www.angelfire.com/ok3/apologia/drafts/basophil.jpg>)

## 1.4 MONONUKLEÁRNE BUNKY

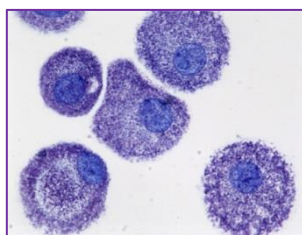
### 1.4.1 Mastocyty

**Mastocyty (žírne bunky)** sú tkanivové bunky s priemerom okolo 30  $\mu\text{m}$ . Sú to mononukleárne bunky s metachromaticky sa farbiacimi granulami. Majú relatívne malé jadro. Vyskytujú sa v spojivovom tkanive, hlavne pri krvných, lymfatických cievach a pri periférnych nervoch. Sú lokalizované predovšetkým v blízkosti epitelových povrchov dýchacieho, tráviaceho systému a kože, ktoré sú vystavené pôsobeniu alergénov vonkajšieho prostredia. Morfologicky sa podobajú bazofilom, ktoré cirkulujú v krvi. Ich granuly obsahujú mnohé zápalové mediátory (heparín, histamín...). Neobsahujú peroxidázu.

Mastocyty sú **najdôležitejšie bunky pri alergických reakciách**. V ich bunkovej membráne sa nachádzajú **receptory pre imunoglobulíny IgE** ( $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ ). Pri prvom kontakte s alergénom dochádza k senzibilizácii jedinca, vytvoria sa špecifické protilátky triedy IgE, ktoré sa naviažu svojim Fc-fragmentom na mastocyty (alebo bazofily), ktoré majú pre protilátky IgE špecifické receptory ( $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ ). Po následnej expozícii jedinca tomu istému antigénu sa antigén spojí s nadviazanými protilátkami IgE, čo spôsobí degranuláciu mastocytov (alebo bazofilov) a **uvolnenie mediátorov alergickej reakcie do extracelulárneho priestoru**. Tieto mediátory sú dvojakého druhu, primárne a sekundárne:

- ✓ Primárne mediátory sú tie, ktoré sú už vopred vytvorené a uskladnené v granulách: histamín, proteoglykány (heparín, chondroitínsulfát), proteázy a niektoré cytokíny.
- ✓ Sekundárne mediátory sú tie, ktoré sa syntetizujú *de novo*. Patria sem leukotriény, prostaglandíny, faktor aktivujúci trombocyty – PAF.

Výsledkom ich pôsobenia je kontrakcia hladkého svalstva, bronchov, značná vazodilatácia a prienik tekutiny do extravaskulárneho priestoru (obrázok 5).



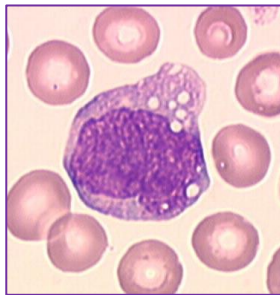
**Obr. 5** Mastocyty (<http://www.mastcellaware.com/images/mastcells-lg-1.jpg>)

### 1.4.2 Monocyty

**Monocyty** (obrázok 6) predstavujú okolo 6-8 % z leukocytov, veľkosti 12-20  $\mu\text{m}$ , sú agranulocyty (neobsahujú granuly). Sú to mononukleárne bunky s vakuolizovanou cytoplazmou, ktorá sa farbí slabo bazofilne sivo-modro. Majú okrúhly alebo nepravidelný tvar s veľkým excentricky uloženým jadrom, ktoré má zvyčajne nepravidelný tvar (obličkovitý). Zdraví ľudia majú okolo 500 monocytov v kvapke krvi.

Pre fagocytózu sú vybavené početnými receptormi, pomocou ktorých rozpoznávajú častice určené na pohltenie a likvidáciu. Zrelé monocyty putujú z kostnej drene do krvi, po

troch dňoch opúšťajú krvné riečisko diapedézou a premiestňujú sa do tkanív, kde sa premenia na **tkanivové makrofágy**, ktoré prežívajú niekoľko mesiacov (ak nie sú aktivované zápalovým procesom) a na **dendritové bunky**.



**Obr. 6** Monocyt (<http://www.svt.ac-versailles.fr/IMG/jpg/monocyt.jpg>)

### 1.4.3 Antigén prezentujúce bunky – APC

Medzi antigén prezentujúce bunky (**Antigen Presenting Cells – APC**) patria **dendritové bunky**, **makrofágy** a **B-lymfocyty**. Schopnosť prezentácie antigénu majú najmä myeloidné dendritové bunky a makrofágy. Schopnosť prezentácie antigénu majú aj B-lymfocyty, ale v menšej miere.

### 1.4.4 Makrofágy

**Makrofágy** sú pohyblivé mononukleárne fagocytujúce bunky. Sú to **profesionálne fagocyty** a zároveň **antigén prezentujúce bunky**. Prekurzorom makrofágov sú monocyty. Tkanivové makrofágy **sú významné v 1. obrannej línii proti patogénom**. Fixné makrofágy sú nepohyblivé a sú usadené v spojivách, v prípade potreby sa môžu meniť na voľné makrofágy, ktoré sú schopné amébovitého pohybu a fagocytózy.

Nachádzajú sa v rôznych tkanivách a podľa miesta výskytu majú svoje pomenovanie. Väčšina makrofágov sa nachádza na strategických miestach, kde sa predpokladá invázia mikroorganizmov alebo je pravdepodobná akumulácia cudzorodých častíc. Prvýkrát popísal makrofágy Mečnikov v roku 1892 na základe ich schopnosti fagocytovať mikroorganizmy.

Makrofágy: v spojivovom tkanive sa označujú ako **histiocyty**,  
v pečeni sú **Kupfferove bunky**,  
v kostiach **osteoklasty**,  
v mozgu **mikroglie**,  
v pľúcach **alveolárne makrofágy**,  
v serózných dutinách **peritoneálne a pleurálne makrofágy**,  
v podslizničnom tkanive sú súčasťou **MALT** (mucosa-associated lymphoid tissue) a ďalšie.

Makrofágy žijú dlho, niekoľko mesiacov, pokiaľ ich neaktivuje zápalový proces alebo poškodenie tkaniva. Ich úlohou je okrem fagocytózy aj prezentácia antigénov

T-lymfocytom, regulácia zápalu, deštrukcia mikroorganizmov, odstraňovanie odumretých buniek, deštrukcia nádorových buniek a buniek infikovaných hubami a parazitmi, produkcia rôznych signálnych a antimikrobiálnych proteínov, podpora hojenia rán a obnova tkanív (v rane najskôr pohltnia a usmrtnia baktérie, potom produkujú enzýmy potrebné na rozklad poškodeného tkaniva a nakoniec syntetizujú rastové faktory potrebné na remodeláciu tkaniva) a udržiavanie homeostázy železa.

#### 1.4.5 Dendritové bunky

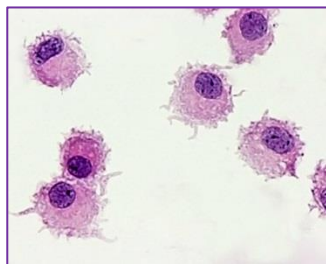
**Dendritové bunky (DC)** sú **najdôležitejšie antigén prezentujúce bunky** (obrázok 7), zohrávajú rozhodujúcu úlohu v iniciovaní získanej imunitnej odpovede. Pôsobia ako poslovia medzi vrodenu a získanou imunitnou odpoveďou. Aktivované dendritové bunky predstavujú aktivačný signál pre naivné T-lymfocyty. Svoje pomenovanie dostali podľa charakteristického vzhľadu s početnými membránovými výbežkami (vetvami; dendrón je po grécky strom). Ich prekursorom sú monocyty.

**Lokalizované** sú predovšetkým v nelymfatických periférnych tkanivách na miestach kontaktu s vonkajším prostredím. Vyskytujú sa v tkanivách najmä kože (v pokožke sa označujú ako Langerhansove bunky), sliznici dýchacieho systému a tráviaceho traktu (intersticiálne DC), v aferentných lymfatických cievkach (závojnaté DC), v cirkulácii v periférnej krvi (0,4 %), v sekundárnych lymfatických tkanivách (vmedzerené DC), v medule týmusu (týmusové DC). Nezrelé formy dendritových buniek sú tiež v krvi. Môžu sa deliť na zrelé a nezrelé.

**Nezrelé dendritové bunky** nie sú schopné účinne aktivovať T-lymfocyty. Zachytávajú však veľké množstvá rozpustných a korpuskulárnych častíc fagocytózou a makropinocytózou. Vo fagolyzozómoch je pohltený materiál spracovaný na peptidy. **Dendritové bunky slúžia ako vyhľadávače.** Svojimi výbežkami zasahujú medzi epitelové bunky a ak zachytia antigén, migrujú do regionálnych lymfatických uzlín. Popritom zároveň spracujú zachytený antigén a predstavia ho ako peptid viazaný na molekuly HLA II. triedy Th-lymfocytom. Táto väzba predstavuje prvý signál potrebný pre aktiváciu naivných Th-lymfocytov. Počas tohto procesu dendritové bunky dozrievajú. Výsledkom je zvýšená expresia kostimulačných molekúl v dendritových bunkách, ktoré reagujú s partnerskými molekulami Th-lymfocytov. Tieto kostimulačné interakcie predstavujú druhý signál potrebný pre optimálnu aktiváciu naivných Th-lymfocytov do subpopulácií Th-lymfocytov, ktoré sú schopné uvoľňovať rôzne cytokíny a tým regulovať imunitnú odpoveď. Nie všetky antigény však vstupujú so bunky prostredníctvom fagocytózy. Niektoré sú naviazané na povrch cieľovej bunky a následne degradované pomocou proteazómov, potom sa prezentujú v spojení s HLA I. triedy cytotoxickým Tc-lymfocytom.

**Zrelé dendritové bunky** teda prezentujú antigén podľa toho, či ide o extracelulárny antigén (exogénna dráha prezentácie – antigén prezentujú DC na svojom povrchu v spojení s HLA molekulami II. triedy) alebo intracelulárny antigén (endogénna dráha prezentácie – antigény autológne, vírusové, nádorové sú prezentované dendritovými bunkami v spojení s HLA molekulami I. triedy).

Dendritové bunky sa delia tiež na myeloidné a plazmacytoidné. **Myeloidné dendritové bunky** (mDC – myeloid dendritic cell) sa nachádzajú v lymfoidných orgánoch, v miestach najpravdepodobnejšieho vstupu antigénov, v koži, respiračnom a gastrointestinálnom trakte. Ich najzákladnejšou biologickou úlohou je prezentácia antigénu a následná polarizácia imunitnej odpovede. **Plazmacytoidné dendritové bunky** (pDC – plasmacytoid dendritic cell) cirkulujú v krvi a boli nájdené aj periférnych lymfatických orgánoch. Produkujú veľké množstvo interferónov (najmä alfa), čo vedie k aktivácii buniek imunitného systému, a to k aktivácii NK buniek a makrofágov a vedie k zintenzívneniu fagocytózy. Interferóny sú dôležité na vytvorenie antivírusovej imunitnej reakcie. Ďalšou skupinou sú folikulárne dendritové bunky, ktoré sú takto pomenované podľa miesta svojho výskytu v lymfatických folikuloch, kde vytvárajú mikroarchitektúru (sieť) a hoci majú tiež dlhé „dendritické“ výbežky, nie sú to dendritové bunky v pravom zmysle slova. Nemajú hematopoetický pôvod, neexprimujú HLA II. triedy, nefagocytujú a ani neprezentujú antigén. Zachytávajú antigény opsonizované komplementom alebo protilátkami. Podieľajú sa na vytváraní budúcich pamäťových B buniek.

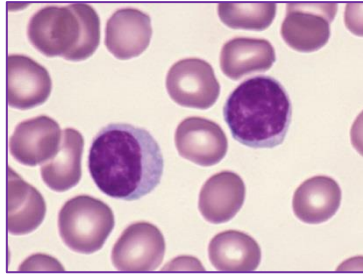


**Obr. 7** Dendritové bunky (<http://www.amsvans.com/blog/wp-content/uploads/2013/06/tip-dendritic-cells-stained-purple-multiple-sclerosis-ms-study.jpg>)

#### 1.4.6 Lymfocyty

**Lymfocyty** (obrázok 8) predstavujú 25-30 % všetkých leukocytov. Sú to **agranulocyty pochádzajúce z lymfoidnej línie**.

Sprostredkujú **špecifické imunitné reakcie**. Vyskytujú sa hlavne v lymfe a vo všetkých orgánoch lymfatickej sústavy. Sú to okrúhle bunky s veľkým okrúhlym až oválnym jadrom a úzkym lemom cytoplazmy, ktorá sa farbí svetlo modro. Jadro zaberá skoro celú bunku, je tvorené hustou kompaktnou sieťou chromatinu. Čo do veľkosti môžu byť malé, stredné a veľké. Malý zrelý lymfocyt je najmenším leukocytom (8-12  $\mu\text{m}$ ). Podľa funkcie, membránových znakov (CD znakov) a povrchových receptorov na rozpoznávanie antigénov (TCR, BCR) sa rozlišujú jednotlivé druhy lymfocytov: T-lymfocyty, ktoré tvoria 65-75 % a B-lymfocyty, ktoré tvoria (20-30 %). Vo svetelnom mikroskope sa nedajú rozlíšiť, ale na základe povrchových membránových znakov sa dajú odlíšiť prietokovým cytometrom. **Základom pre klasifikáciu** je prítomnosť membránových znakov (CD znakov) a expresia receptorov pre rozpoznávanie antigénov (TCR, BCR).



**Obr. 8** Lymfocyty (<http://www.pathologystudent.com/wp-content/uploads/2010/07/normal-lymphs.jpg>)

### ***T-lymfocyty***

**T-lymfocyty** sa vyvíjajú z kmeňovej pluripotentnej hematopoetickej bunky v kostnej dreni a svoju konečnú morfológickú a funkčnú podobu získavajú po migrácii do týmusu.

Sú **zodpovedné za bunkami sprostredkovanú špecifickú imunitu (celulárnu)**. Antigénové receptory T-lymfocytov rozpoznávajú peptidové fragmenty proteínových antigénov, ktoré sú viazané na molekuly HLA na povrchu antigén prezentujúcich buniek. Na základe exprese rozdielneho antigénového receptora (TCR) sa delia T-lymfocyty na dve základné populácie: **s receptorom  $TCR\alpha\beta$**  a **s receptorom  $TCR\gamma\delta$** . T-lymfocyty s receptorom  $TCR\alpha\beta$  sú v prevahe (95 %) v porovnaní s T-lymfocytmi s receptorom  $TCR\gamma\delta$  (5 %). T-lymfocyty, ktoré majú receptor  $TCR\alpha\beta$  sa ďalej delia na **pomocné (Th, helper)**, **cytotoxické (Tc)** a **prirodzené regulačné (nTreg) lymfocyty**. Všetky majú membránové znaky CD2 a CD3, navyše pre subpopuláciu pomocných Th-lymfocytov je typický znak CD4, pre subpopuláciu cytotoxických Tc-lymfocytov je to znak CD8 a regulačné nTreg-lymfocyty majú znak CD25.

- **Pomocné Th-lymfocyty** napomáhajú B-lymfocytom v produkcii protilátok a pomáhajú fagocytom pri zničení pohltených mikroorganizmov.
- **Cytotoxické Tc-lymfocyty** zabíjajú intracelulárne prežívajúce mikroorganizmy.
- Ďalšou skupinou T-lymfocytov sú **prirodzené regulačné nTreg-lymfocyty**, ktoré tlmia imunitnú odpoveď a podieľajú sa na udržiavaní tolerancie na vlastné antigény a na zabránení vzniku autoimunitných procesov.

T-lymfocyty sa po aktivácii antigénom diferencujú na **efektorové bunky (Te)** a **pamäťové bunky (Tm)**. Aby boli naivné T-lymfocyty aktivované antigénom, antigén im musí byť prezentovaný aktivovanou APC, ktorá exprimuje aj kostimulačné molekuly. Antigén je rozpoznaný TCR receptorom vo forme peptidového fragmentu naviazaného na HLA molekulu na povrchu APC. TCR vie rozpoznať antigén iba vo väzbe s molekulami HLA I. (endogénna dráha prezentácie antigénu) alebo HLA II. triedy (exogénna dráha aktivácie antigénu). Aktivácia T-lymfocytov sa potom môže uskutočniť, ak budú APC súčasne exprimovať aj ko-stimulačné molekuly potrebné ako druhý signál pre aktiváciu naivných T-lymfocytov.

**Efektorové T-lymfocyty** priamo napádajú a eliminujú bunky napadnuté vírusmi alebo tumorálne zmenené a riadia spoluprácu rôznych buniek imunity tým, že syntetizujú molekuly, ktoré napomáhajú iným bunkám zničiť patogéna.

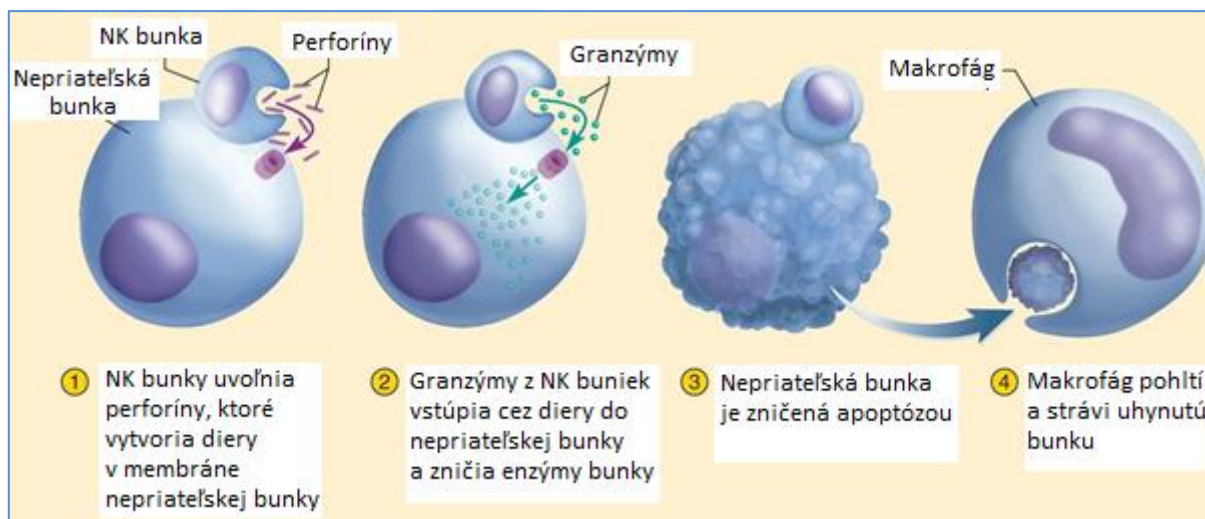
**Pamäťové T-lymfocyty** prežívajú v organizme mnoho rokov a pri opakovanom stretnutí sa s antigénom zabezpečujú rýchlu a intenzívnejšiu imunitnú odpoveď. Charakteristickou vlastnosťou T-lymfocytov je ich neustály pohyb. Opúšťajú týmus a krvou sa dostávajú do sekundárnych lymfoidných orgánov (slezina, lymfatické uzliny), odtiaľ vycestujú do tkanív, vracajú sa späť do lymfatických uzlín a nakoniec do krvného obehu. Tento cyklus sa uskutoční priemerne za 24-48 hodín.

### **NK bunky**

**NK (natural killer) bunky – prirodzené zabíjače** sú osobitnou populáciou lymfocytov, pochádzajú z lymfoidnej línie. Tvoria 5-15 % z celkovej populácie lymfocytov v periférnej krvi. Diferencujú sa v kostnej dreni a časť môže vzniknúť aj v týmuse. Morfologicky ide o heterogénnu populáciu s najvyšším podielom veľkých granulárnych buniek s priemerom 10-12 µm. Majú membránový znak CD16, CD56, CD57, nemajú CD3 znak (ktorý je inak typický pre všetky T-lymfocyty). Charakterizované ako non B a non T-bunky, neexprimujú TCR, BCR. Majú schopnosť nešpecificky rozpoznávať niektoré cudzorodé bunky a zabíjať ich.

NK bunky sú **komponentami vrodenej imunity (bunkovej zložky)**. Sú schopné rýchlo napadnúť infikované bunky bez predchádzajúcej senzibilizácie. NK bunky majú **význam v protinádorovej a protívirusovej imunite** a svojou produkciou početných cytokínov sa zapájajú aj do **regulácie imunitných procesov**. Sú hlavným efektorom cytotoxicity závislej na protilátkach (ADCC – **antibody-dependent cellular cytotoxicity**), obsahujú receptor pre protilátky (Fc). Uvoľnené cytokíny IL-2, IFN-γ zvyšujú proliferáciu a cytotoxickú aktivitu NK buniek. Pod vplyvom produkcie interleukínu IL-2 sa diferencujú do agresívnejšej skupiny buniek, tzv. LAK buniek (lymphokine activated killer cells). IFN-γ aktivuje makrofágy k efektívnejšej fagocytóze pohltých mikroorganizmov. NK bunky a makrofágy sú jedným z príkladov, kedy dva bunkové typy účinne spolupracujú pri eliminácii intracelulárnych patogénov. Makrofágy pohltia mikroorganizmy a produkujú IL-12, IL-12 aktivujú NK bunky k sekrécii IFN-γ, ktorý následne aktivuje makrofágy, aby zničili pohlté mikroorganizmy.

NK bunky zohrávajú kľúčovú úlohu v rejekcii nádorov, imunitnom dohľade, odolnosti proti infekciám a regulácii imunitných reakcií. Zničenie nádorových a vírusom infikovaných buniek zahŕňa ich rozpoznanie (NK bunky vyprázdnia obsah svojich cytoplazmatických granúl do extracelulárneho priestoru v mieste kontaktu s infikovanou bunkou. Uvoľnené proteíny ako perforín, granzým, serínová esteráza vnikajú do rakovinových alebo infikovaných buniek a napokon dôjde k ich zničeniu. NK bunka je potom znovu uvoľnená a znovu sa môže viazať na ďalšiu rakovinovú bunku, celý proces sa tak môže opakovať (obrázok 9).



**Obr. 9** Zničenie nádorových a vírusom infikovaných buniek NK bunkami (upravené podľa: [https://classconnection.s3.amazonaws.com/933/flashcards/2828933/jpg/immune\\_surveillance--nk\\_cells-144BCA0EDA02A2CDE51.jpg](https://classconnection.s3.amazonaws.com/933/flashcards/2828933/jpg/immune_surveillance--nk_cells-144BCA0EDA02A2CDE51.jpg))

### NKT bunky

NKT bunky predstavujú menšiu samostatnú **subpopuláciu T-lymfocytov** (v krvi okolo 0,01-1 %). Dozrievajú v týmuse. Rozpoznávajú rôzne typy antigénov. Podieľajú sa na modulácii imunitnej odpovede, pretože po stimulácii vedú veľmi rýchlo produkovať množstvo cytokínov. Majú schopnosť lýzy buniek, podobne ako NK bunky sa uplatňujú predovšetkým v **protinádorovej a antimikrobiálnej imunite**.

### K bunky

K bunky (**killer cells**) predstavujú skôr funkčný druh lymfocytov, ktoré **sú schopné zničiť bunku v spojení s protilátkou, ktorá je na ňu naviazaná**. K bunky sa zúčastňujú na ADCC reakcii – bunkami sprostredkovanej cytotoxicite závislej od protilátky. K bunky sú zložkami vrodenej imunity.

### B-lymfocyty

**B-lymfocyty** sa nachádzajú v periférnej krvi v množstve 20-30 % z lymfocytov. Vyvíjajú sa z kmeňovej pluripotentnej hematopoetickej bunky v kostnej dreni, kde aj dozrievajú. Obsahujú membránový znak CD19.

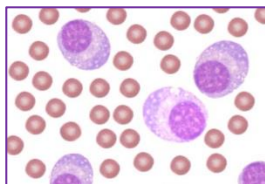
Zrelé B-lymfocyty **nesú na svojom povrchu molekuly imunoglobulínov, ktoré slúžia ako špecifický receptor pre antigén BCR**.

Sú **zodpovedné za humorálnu časť špecifickej imunity**. V prítomnosti antigénu (týmus nezávislého antigénu) alebo aj v spolupráci s T-lymfocytmi (týmus závislý antigén) sa menia B-lymfocyty na **plazmocyty (plazmatické bunky)**, ktoré produkujú veľké množstvo špecifických protilátok (samotné B-lymfocyty nemajú schopnosť produkovať protilátky). Časť aktivovaných B-lymfocytov sa nemení na plazmatické bunky, ale zostáva v relatívnom klude v organizme dlhú dobu ako **pamäťové B-lymfocyty**.

## Plazmatické bunky

**Plazmatické bunky** majú excentricky uložené jadro, veľké množstvo cytoplazmy s početnými mitochondriami, s množstvom mohutného endoplazmatického retikula a Golgiho aparátom.

Plazmatické bunky sú vydifferentované efektorové bunky B-lymfocytovej línie prispôsobené na účinnú produkciu protilátok. Ich **úlohou je produkovať protilátky rovnakej špecifickosti ako mal pôvodný B-lymfocyt, z ktorého sa vyvinuli**. Plazmatické bunky vykazujú vlastné antigény, ktoré sa nenachádzajú na jej B bunkových prekurzoroch, nemajú povrchové Ig receptory, majú na svojom povrchu membránový CD38 znak. Žijú len niekoľko dní. Protilátka, ktorá je produkovaná určitou plazmatickou bunkou (a jej špecifickým klonom) môže byť z ktorejkoľvek triedy (IgM, IgG, IgA, IgE, IgD), ale bude viazať len taký antigén, ktorý navodil jej tvorbu (obrázok 10).

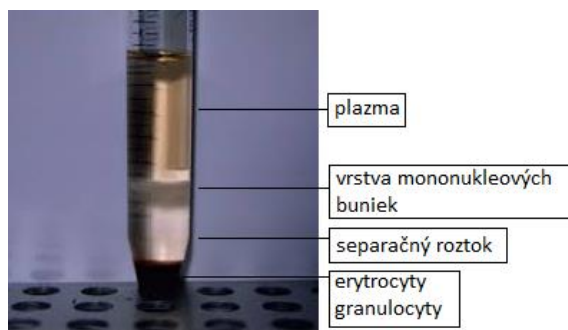


**Obr. 10** Plazmatické bunky (<http://www.lymphsystem.net/wp-content/uploads/2012/04/PCL.jpg?33fe37>)

## 1.5 IZOLÁCIA MONONUKLEOVÝCH BUNIEK Z PERIFÉRNEJ KRVÍ

Izolácia mononukleových buniek z periférnej krvi **sa robí separačným postupom pomocou gradientovej centrifugácie** s cieľom oddelenia mononukleových buniek (lymfocytov a monocytov) od erytrocytov a granulocytov.

**Postup:** Používa sa nezrazená venózna krv, ktorá sa v skúmavke riedi s fyziologickým roztokom v pomere 1:1 a potom sa opatrne navrství separačným roztokom (napr. ficoll-verografin, telebrix) a centrifuguje sa (2000 otáčok/min.). Počas centrifugácie bunky s nižšou hmotnosťou ako separačný roztok zostávajú nad jeho hladinou a bunky s vyššou hmotnosťou klesajú na dno skúmavky. Nad separačným roztokom a vrstvou mononukleových buniek sa nachádza plazma (obrázok 11).



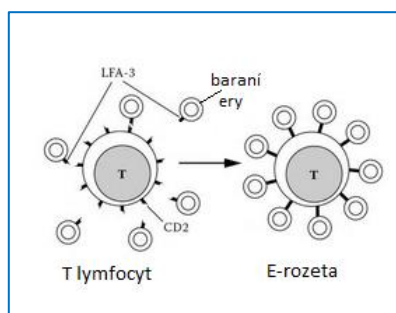
**Obr. 11** Izolácia lymfocytov pomocou separačného roztoku (upravené podľa: [http://www.szu.sk/userfiles/file/Katedry/kat\\_149/BUNKOV%C3%81%20IMUNOL%C3%93GIA%20-%20laborat%C3%B3rne%20met%C3%B3dy.pdf](http://www.szu.sk/userfiles/file/Katedry/kat_149/BUNKOV%C3%81%20IMUNOL%C3%93GIA%20-%20laborat%C3%B3rne%20met%C3%B3dy.pdf))

**Výsledok:** Pipetou sa odsajú mononukleové bunky. Takto získaná suspenzia sa sцентрифугuje, sediment sa 2 x premyje fyziologickým roztokom a bunky sa spočítajú v Bürkerovej komôrke. Za fyziologických okolností sa z 1 ml krvi získa  $1-2 \times 10^6$  mononukleových buniek. V súčasnosti existuje niekoľko modifikácií tejto klasickej metódy, ktoré umožňujú presnejšiu izoláciu rôznych bunkových populácií.

### 1.5.1 Separácia T-a B-lymfocytov na základe tvorby roziet

T-a B-lymfocyty majú rôzne membránové receptory pre väzbu s erytrocytmi iných živočíšnych druhov. **T-lymfocyty majú na svojom povrchu receptor (CD2) pre baranie (ovčie) erytrocyty (s LFA3) a vytvárajú E-rozety (obrázok 12). B-lymfocyty majú receptor pre myšie erytrocyty a vytvárajú M-rozety.**

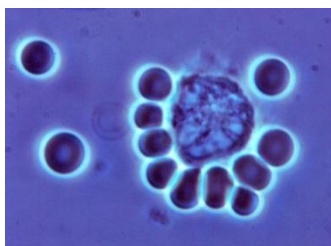
**Postup:** Najskôr sa erytrocyty chemicky opracúvajú (napr. neuraminidázou), aby sa dosiahla pevnejšia väzba s ľudskými lymfocytmi. Zvieracie erytrocyty sa po zmiešaní s ľudskými lymfocytmi naviažu na povrch lymfocytov a vytvoria hviezdicovité útvary, ktoré sa označujú rozety. Za rozetu sa považuje lymfocyt s naviazanými najmenej tromi erytrocytmi.



**Obr. 12** Schéma tvorby E-rozety (upravené podľa: Cruse JM, Lewis RE. *Illustrated Dictionary of Immunology*, Third Edition. CRC Press Taylor & Francis Group 2009; 816 pp. ISBN 978-0-8493-7987-1)

Vytvorené rozety sa potom oddelujú od lymfocytov, ktoré neviazali erytrocyty na princípe akým sa izolujú mononukleové bunky (pomocou gradientovej centrifugácie). V tomto prípade nad separačným roztokom zostávajú nerozetujúce lymfocyty a pod separačný roztok sedimentujú rozetujúce lymfocyty.

**Výsledok:** Takýmto postupom sa získa suspenzia lymfocytov (napr. suspenzia T-lymfocytov pomocou E-roziet) s čistotou okolo 95 %. V Bürkerovej komôrke sa počíta množstvo lymfocytov a roziet (obrázok 13).



**Obr. 13** Rozeta – mikroskopický obraz (<http://sondrabarrett.com/wp-content/uploads/2011/05/pmn-rosette.jpg>)

Rozetové testy umožňujú rozlíšiť dva typy roziet, a to aktívne a celkové, v závislosti od pomeru erytrocytov a lymfocytov a doby inkubácie.

- **Aktívne rozety** majú vyššiu aviditu receptorov pre ovčie erytrocyty (aj pri malom počte erytrocytov) a utvoria sa ihneď po pridaní erytrocytov.
- **Celkové rozety** sa dokazujú po 18-24 hodinách inkubačnej doby pri nadbytku erytrocytov (odrážajú zhruba počet T-lymfocytov).

**Imunitný stav pacienta lepšie odrážajú aktívne rozety.**

### 1.5.2 Separácia pomocou prietokovej cytometrie

**Prietoková cytometria** je štandardnou metódou na analýzu populácie jednotlivých buniek, pri ktorej sa bunková suspenzia značí najčastejšie pomocou monoklonálnych protilátok s naviazanou fluorescenčnou molekulou. Značené molekuly monoklonálnych protilátok sa naviažu na antigény vyšetrovaných buniek. Suspenzia takto označených buniek sa vloží do prietokového cytometra, v ktorom cez trysku prechádza tenký prúd suspenzie a v ňom letia bunky za sebou. Tento prúd buniek je pretínaný laserovým lúčom a získané údaje sú zaznamenávané do počítača a analyzované softwarom.

Prietoková cytometria predstavuje zlatý štandard stanovenia bunkových populácií. Je to rýchla, senzitívna, automatizovaná metóda umožňujúca štatistické spracovanie.

### Otázky k samohodnoteniu

1. Čo je to hematopoéza? Ktoré bunky imunitného systému vznikajú z myeloidnej línie a ktoré z lymfoidnej línie?
2. Čo je charakteristické pre polymorfonukleárne leukocyty? Ktoré z nich prichádzajú ako prvé na miesto poškodenia? Ktoré z nich majú na membráne receptory pre imunoglobulíny IgE?
3. Čo je typické pre mastocyty? Pri akých reakciách zohrávajú dôležitú úlohu a prečo? Ktoré mediátory uvoľňujú do extracelulárneho priestoru?
4. Ktoré bunky sa diferencujú z monocytov? Ktoré bunky patria medzi antigén prezentujúce bunky (APC)? Kde sú predovšetkým lokalizované dendritové bunky? Aká je ich úloha?
5. Ktoré bunky patria medzi agranulocyty pochádzajúce z lymfoidnej línie? Ktoré imunitné reakcie sprostredkujú? Čo je základom pre klasifikáciu lymfocytov?
6. Aké sú subpopulácie T-lymfocytov? Na aké bunky sa diferencujú T-lymfocyty po aktivácii antigénom? Za ktorú časť imunitnej odpovede sú zodpovedné T-lymfocyty?
7. Ktoré bunky pochádzajúce z lymfoidnej línie majú význam v protinádorovej a protivírusovej imunite?
8. Ktoré bunky lymfoidnej línie sú zodpovedné za humorálnu časť špecifickej imunity? Aké receptory nesú na svojom povrchu? Na aké bunky sa menia v prítomnosti antigénu?
9. Popíšte princíp izolácie mononukleových buniek z periférnej krvi. Popíšte princíp separácie T- a B-lymfocytov na základe tvorby roziet a pomocou prietokovej cytometrie.

## 2 VYŠETROVACIE METÓDY V IMUNOLÓGII

Laboratórne techniky používané v imunológii sú zamerané buď na rozpoznanie a zistenie množstva antigénov alebo protilátok v telesných tekutinách a tkanivách alebo na stanovenie buniek imunitného systému a ich funkcií. Imunologické vyšetrovacie laboratórne techniky sa súčasne rozdeľujú aj na humorálne a bunkové.

- Pri humorálnych imunologických vyšetreniach môže byť vyšetrované najčastejšie sérum alebo plazma.
- Pri bunkových imunologických vyšetreniach sa najčastejšie vyšetruje plná krv odobratá do skúmavky s protizrážanlivým prostriedkom.

Pre potreby diagnostiky v oblasti imunológie však môžu byť okrem týchto materiálov vyšetrované aj rôzne telesné tekutiny (cerebrospinálny likvor, výpotky, bronchoalveolárne laváže a iné) alebo tkanivá (bioptické vzorky).

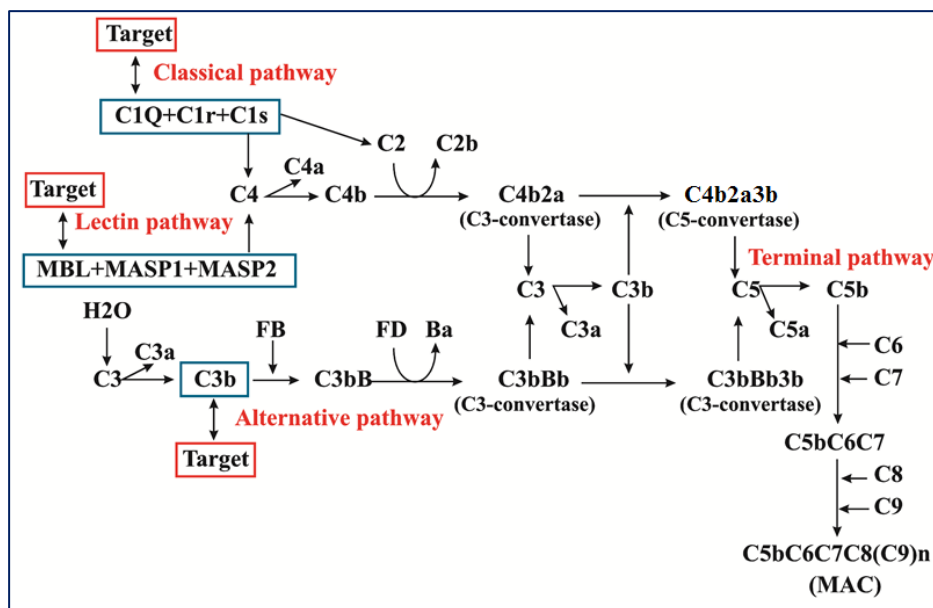
### 2.1 KOMPLEMENT

**Komplement** je komplex približne 30 sérových glykoproteínov, ktoré vytvárajú **jeden zo základných efektorových systémov vrodenej nešpecifickej imunity**. Syntetizujú sa hlavne v pečeni, menej v mononukleárných fagocytoch, slezine a kostnej dreni. **Hlavnými zložkami** sú sérové proteíny C1 až C9. **Tie sa kaskádovo aktivujú premenou z neaktívnej formy na aktívne enzýmy, ktoré pôsobia na ďalšie zložky tejto kaskády**. Správna funkcia komplementového systému závisí na dokonalej súhre všetkých zložiek.

Podstatou pri aktivácii jednotlivých zložiek komplementu je premena prvej neaktívnej zložky C1 na aktívny proteolytický enzým, ktorý rozštípe molekulu nasledujúcej zložky na dva fragmenty (väčší fragment b, menší fragment a – s výnimkou C2). Jeden z nich má proteolytickú aktivitu a rozštípe nasledujúcu zložku komplementu.

Tento fragment sa označuje písmenom b, je väčší a ostáva naviazaný na povrchu antigénu. Druhý fragment, označovaný ako fragment a má inú biologickú aktivitu. Je menší a pôsobí v tekutej fáze. Horizontálna čiara nad súčasťou alebo komplexom komplementu označuje enzymatickú aktivitu. Niektoré zložky nie sú číslované, ale označené ako faktory (faktor B, D, P = properdín, H, I). Fragment so stratenou biologickou aktivitou sa označuje na začiatku „i“ (napr. iC3b). Niektoré zložky majú označenie podľa funkcie (MBP, MASP).

K aktivácii komplementu dochádza **klasickou, alternatívnou alebo lektínovou cestou** (obrázok 14).



Obr. 14 Cesty aktivácie komplementu

(<http://www.intechopen.com/source/html/43780/media/image1.jpeg>)

Ústrednou zložkou komplementu je glykoproteín C3, pretože jeho fragment C3b sa viaže na povrch mikroorganizmov. **Konečným výsledkom kaskádovej reakcie je lýza cieľovej bunky.**

### 2.1.1 Klasická cesta aktivácie komplementu

Klasická cesta aktivácie komplementu začína aktiváciou C1. **Spúšťa sa naviazaním protilátok IgM alebo IgG na povrch antigénu.** Po naviazaní protilátky na antigén dôjde ku konformačnej zmene imunoglobulínovej molekuly a odkryje sa väzbové miesto pre zložku komplementu C1q (toto väzbové miesto sa nachádza v Fc časti molekúl IgM alebo IgG). K aktivácii dochádza po naviazaní C1q na tieto molekuly, následne sa zmení konformácia C1r a C1s, ktoré sa stávajú serínovými proteázami a vznikne aktivovaný komplex obsahujúci všetky tieto zložky C1qrs (viď obrázok 1). **Pri klasickej ceste aktivácie dochádza k časovému posunu „naštartovania“ o 4-5 dní.**

### 2.1.2 Alternatívna cesta aktivácie komplementu

Alternatívna cesta aktivácie je evolučne najstaršia, **spúšťaná je vonkajšími faktormi, predovšetkým bakteriálneho pôvodu** (viď obrázok 13). Aktivovaná môže byť súčasťami bakteriálnych stien gram pozitívnych aj gramnegatívnych baktérií (lipopolysacharidmi, peptidoglykanom), bakteriálnymi exoproduktami, povrchmi húb (zymozan), vírusmi a vírusmi infikovanými bunkami, nádorovými bunkami, niektorými parazitmi...

### 2.1.3 Lektínová cesta aktivácie komplementu

Lektínová cesta aktivácie komplementu bola objavená ako posledná. Táto cesta je obdobou klasickej cesty aktivácie, avšak **aktivátorom** nie je protilátka, ale **sérový lektín – manózu viažuci lektín** (MBL – manose binding lectin). MBL patrí medzi proteíny akútnej fázy zápalu, zvyšuje sa pri zápale. **Viaže manózu, ktorá je typickou zložkou povrchu**

**mnohých mikroorganizmov.** Po väzbe MBL na povrch mikroorganizmu sa naň naviažu proteínazy MASP-1 a MASP-2, a tým vzniká komplex podobný ako C1qrs a následne môže pokračovať kaskáda aktivácie podobne ako pri klasickej ceste (viď obrázok 13). V tomto prípade však nie je nutná prítomnosť protilátok ako pri klasickej ceste aktivácie.

Pri aktivácii komplementu sa uvádza do činnosti celý rad mechanizmov, ktoré majú veľký význam pri obrane organizmu predovšetkým proti infekcii. Jednotlivé zložky komplementu majú vlastnosti chemotaxínov, opsonínov, regulujú proces fagocytózy a zápalovej reakcie, navodzujú uvoľňovanie histamínu, podieľajú sa na lýze mikroorganizmov, uvoľňovaní biologicky aktívnych látok, tvorbe druhých signálov pre začatie špecifickej imunitnej odpovede (tab.3). okrem obranných efektorových funkcií pôsobí komplement a produkty jeho aktivácie aj na reguláciu imunitnej odpovede.

**Tab. 3** Biologické účinky komplementu

<b>Biologické účinky komplementu</b>	<b>Komplement</b>
<i>Lýza buniek</i>	C5b-C9, MAC
<i>Zápalová odpoveď</i>	
<b>degranulácia</b> mastocytov a bazofilov	C3a, C4a, C5a
degranulácia neutrofilov	C5a
degranulácia eozinofilov	C3a, C5a
<b>extravazácia a chemotaxia</b> leukocytov v mieste zápalu	C3a, C5a, C5b67
agregácia trombocytov	C3a, C5a
uvoľňovanie neutrofilov z kostnej drene	C3c
uvoľňovanie hydrolytických enzýmov z neutrofilov	C5a
zvýšenie expresie CR1 a CR3 na neutrofiloch	C5a
<b>opsonizácia, stimulácia fagocytózy</b>	C3b, C4b, iC3b
<b>neutralizácia vírusov</b>	C3b, MAC
<b>solubilizácia a odstraňovanie imunokomplexov</b>	C3b

## 2.2 PORUCHY KOMPLEMENTOVÉHO SYSTÉMU

K patologickým prejavom môže viesť zvýšená aktivita komplementového systému spôsobená neregulovanou aktiváciou, ale aj znížená aktivita spôsobená geneticky podmieneným alebo získaným deficitom niektorej zložky komplementu.

Pri vyšetrení komplementového systému nájdeme zvýšené hladiny jednotlivých zložiek veľmi zriedkavo. Väčšinou sa prakticky vyšetrujú iba **zložky C3 a C4**. Ich zvýšené hladiny môžu byť prejavom zápalovej aktivity, pretože zložky komplementu reagujú podobne ako proteíny akútnej fázy zápalu.

**Znížená aktivita komplementu** môže byť spôsobená na jednej strane **geneticky podmienenými poruchami** alebo chýbaním niektorých zložiek komplementu, na druhej strane **získanou poruchou zložiek komplementu, inhibítorov a receptorov komplementu**. Pri posudzovaní vrodených príčin sú veľmi časté vrodené heterozygotné deficity C4. Zo získaných príčin dominujú pečňové zlyhania. Jednou z ďalších možností

je zvýšená spotreba komplementového systému pri aktivácii imunokomplexami antigén – protilátka. Takáto zvýšená spotreba komplementu býva v akútnom štádiu imunokomplexových vaskulítid. Znížené hladiny zložiek komplementu môžu byť príčinou viacerých patologických stavov: napr. ťažkých rekurentných infekcií spôsobených pyogénnymi baktériami, opakovaných neisseriových meningítid, autoimunitných, imunokomplexových chorôb, hereditárneho angioedému (pri deficite C1-inhibítora).

Pri podozrení na poruchu niektorej zložky klasickej cesty aktivácie komplementového systému sa robí test CH 50, pri podozrení na poruchu alternatívnej zložky sa môže robiť vyšetrenie AH 50. Pri podozrení na hereditárny angioedém – recidivujúce edémy nejasnej etiológie vyšetrujeme koncentráciu C1-INH v sére (prítomný je deficit inhibítora C1 zložky komplementu – C1-INH).

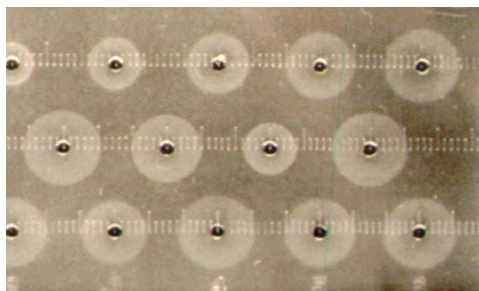
## 2.3 STANOVENIE ZLOŽIEK KOMPLEMENTU

Po aktivácii komplementu klasickou, alternatívnou alebo lektínovou cestou prebieha kaskádová reakcia veľmi rýchlo a jednotlivé zložky komplementu majú len krátky polčas a väčšinou nízku koncentráciu v sére. Preto stanovenie jednotlivých zložiek predstavuje problém. Na vyšetrenie sa posieľa zrazená krv 5 ml v deň odberu, treba zabezpečiť rýchly transport pacientovej krvi do laboratória. **V praxi sa väčšinou stanovujú iba dve kľúčové zložky komplementu C3 a C4.** Pri vyšetrení sa využívajú metódy reakcie proteínu so špecifickým antisérom. Môže sa použiť jednoduchá radiálna imunodifúzia alebo ELISA metódy. V súčasnej dobe sa často využíva nefelometria. Zložky C3 a C4 majú síce určené normálne hodnoty, ale tie sú ešte modifikované laboratóriami v závislosti od použitých metód a antisér. Hodnoty pre C3 zložku sa uvádzajú v rozmedzí 0,8 – 1,2 g/l a pre C4 zložku 0,15 – 0,4 g/l.

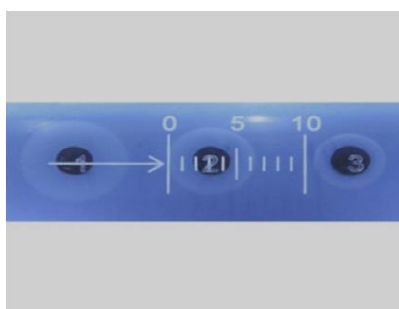
### 2.3.1 Stanovenie zložiek komplementu pomocou jednoduchej radiálnej imunodifúzie

**Postup:** Jednoduchá radiálna imunodifúzia sa robí na sklenených alebo plastových platniach, na ktoré sa vylieva horúci (okolo 50 °C) roztok agarózy alebo agaru zmiešaný so špecifickou protilátkou proti hľadanej zložke (zjednodušene antigénu). Po ochladení gélový roztok agarózy stuhne. Do stuhnutej gélovej vrstvy sa vyrežú podľa predlohy v dostatočných vzdialenostiach okrúhle otvory. Do otvorov sa napipetuje antigén. Časť otvorov sa naplní štandardnými roztokmi zo známou koncentráciou antigénu (napr. C3). Do ostatných otvorov sa napipetujú vzorky vyšetřovaného séra, v ktorom sa hľadá daná zložka komplementu (teda napr. C3). Platňa sa potom vo vodorovnej polohe vloží do vlhkej komôrky, aby počas reakcie nedošlo k vysušeniu a následnému popraskaniu gélu. V tomto systéme difunduje iba jedna zložka a tou je v tomto prípade antigén (jednoduchá imunodifúzia). Protilátka, ktorá sa rovnomerne rozmiešala v géli, nemôže difundovať. Antigén difunduje z otvoru všetkými smermi do gélu (radiálna – dvojrozmerná imunodifúzia), pričom reaguje s protilátkami a vytvára precipitačný prstenec. **Priemer precipitačného prstenca je tým väčší, čím je väčšia koncentrácia antigénu.** Pri metóde podľa Manciniovej a spol. (1965) sa po skončení imunodifúzie zmerajú priemery

precipitačných prstencov. Najskôr sa zmerajú priemery precipitačných prstencov okolo otvorov, kde sa pipetovali známe koncentrácie antigénu. (obrázok 15,16).



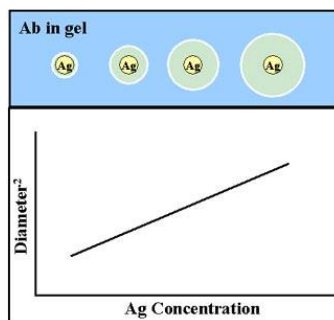
**Obr. 15** Precipitačné prstence v géli  
(<http://jeeves.mmg.uci.edu/immunology/Assays/RadImmDiff.htm>)



**Obr. 16** Precipitačné prstence pri jednoduchovej radiálnej imunodifúzii  
(<http://www.idbiotech.com/rid-srid-kit-test-radial-immunodiffusion/57-horse-igg-idr-rid.html>)

Z týchto údajov sa graficky znázorní analytickou čiarou závislosť priemeru prstenca od koncentrácie antigénu. Vtedy je priemer prstenca (alebo jeho druhá mocnina) priamo úmerný koncentrácii antigénu (obrázok 17).

**Výsledok:** Pomocou vytvoreného grafu sa po zmeraní priemeru precipitačného prstenca vyšetrovanej vzorky určí koncentrácia antigénu vo vzorke. **Jednoduchá radiálna imunodifúzia je základnou metódou na kvantitatívne stanovenie antigénov.** Citlivosť tejto metódy pre proteínové antigény je 0,02 mg/ml. Precipitačné prstence sa odčítavajú priamo alebo po zafarbení farbivami špecificky reagujúcimi s proteínmi (napr. coomassie blue).



**Obr. 17** Analytická čiara pri jednoduchovej radiálnej imunodifúzii  
(<http://bookcoverings.com>)

### Indikácie na vyšetrenie C3 a C4

Indikácie na vyšetrenie C3 a C4 sú pri podozrení na imunokomplexové ochorenia, defekt v komplementovom systéme, na zhodnotenie aktivity ochorení, pri ktorých dochádza ku spotrebe komplementu: reumatická choroba, niektoré chronické infekcie, chronická hepatitída, SLE (systémový lupus erythematosus). Pokles obidvoch zložiek je prognosticky nepriaznivým znamením pri septických stavoch.

**Znížené hodnoty C3** sa vyskytujú pri SLE s glomerulonefritídou, akútnej sérovej chorobe, akútnej glomerulonefritíde, imunokomplexových chorobách, cirróze pečene, infekčnej endokarditíde, myastenia gravis, diseminovanej intravaskulárnej koagulopatii, hereditárnom angioedéme, hereditárnom deficite C2, lymfosarkóme, zmiešanej kryoglobulinémii. Pacienti s deficitom majú vysoké riziko vzniku vážnych bakteriálnych infekcií spôsobených grampozitívnymi aj gramnegatívnymi baktériami.

**Zvýšené hodnoty C3** sa vyskytujú pri obštrukčnom iktere, tyreoiditíde, akútnej reumatickej horúčke, reumatoidnej artritíde, nodóznej polyarteritíde, akútnom infarkte myokardu, ulceróznej kolitíde, dne, diabete, Reiterovom syndróme.

**Hodnoty C4** bývajú znížené pri ochoreniach spojených s tvorbou imunokomplexov: SLE, reumatoidná artritída, glomerulonefritída, chronická hepatitída, kryoglobulinémia.

#### 2.3.2 Stanovenie celkovej aktivity komplementovej kaskády

Na vyšetrenie toho, či kaskáda komplementu úspešne prebieha po aktivácii, sa používajú funkčné testy klasickej alebo alternatívnej cesty aktivácie komplementu, vrátane lektínovej cesty. Vyšetrenie hemolytickej aktivity komplementu je indikované pri podozrení na akúkoľvek poruchu v kaskáde komplementu, hlavne mimo zložky C3 a C4. Pri podozrení na poruchu niektorej zložky klasickej cesty aktivácie komplementového systému sa robí **test CH 50 (50 % hemolýza štandardného množstva senzibilizovaných červených krviniek spôsobená určitým množstvom komplementu za štandardných podmienok)**. Pri podozrení na poruchu alternatívnej zložky sa môže robiť vyšetrenie AH 50. Rozdielny je iba spúšťací mechanizmus komplementovej kaskády.

**Postup:** Na vyšetrenie sa posielajú zrazená krv 5 ml v deň odberu, treba zabezpečiť rýchly transport pacientovej krvi do laboratória, lebo krv musí byť spracovaná do jednej hodiny od odberu. Tieto testy merajú účinky membranolýtického komplexu MAC (membrane attack complex – membránový útočný komplex), ktorý sa vytvára na konci komplementovej kaskády. Meria sa v ňom hemolýza cieľových ovčích erytrocytov opsonizovaných králičími protilátkami, ktoré sú vystavené účinku komplementu v sére vyšetřovaného jedinca. Ak je komplementová kaskáda aktivovaná, vedie k lýze senzibilizovaných ovčích erytrocytov. Stupeň hemolýzy sa zisťuje meraním absorbancie hemoglobínu uvoľneného do supernatantu. Ak komplement chýba, hodnota CH 50 je nulová, ak je znížená jedna alebo viac zložiek klasickej cesty aktivácie komplementu, CH 50 je znížená. CH 50 (pri klasickej ceste) aj AH 50 (pri alternatívnej ceste) sú **skrínigové testy citlivé na nečinnosť, neprítomnosť alebo zníženie akejkoľvek súčasti komplementového systému**.

**Výsledok:** Normálne hodnoty hemolytickej aktivity komplementu majú veľmi široké rozmedzie. Uvádzajú sa v hemolytických jednotkách. **Jedna hemolytická jednotka účinnosti komplementu je daná množstvom komplementu, ktorý spôsobí lýzu 50 % štandardného množstva senzibilizovaných ovčích erytrocytov.** Môžu sa pohybovať od 41 – 90 hemolytických jednotiek. V prípade, že výsledky testov ukážu zvýšené hladiny CH 50, mohlo by to indikovať vážne zdravotné ťažkosti ako rakovinu, ulceróznú kolitídu a infekcie. Oveľa častejšie sa zisťujú pri poruche prebiehajúcej niekde v kaskáde výrazne nižšie hodnoty CH 50. To môže byť spôsobené viacerými faktormi. Nízky komplement CH 50 môže byť aj dedičný. Chýbanie ktorejkoľvek zložky môže viesť k rozvoju autoimunitných ochorení, opakujúcich sa infekcií. Nízke hodnoty CH 50 boli zistené aj pri podvýžive, rejekcii po transplantácii obličiek, hereditárnom angioedéme, cirróze pečene, lupusovej nefritíde, hepatitíde, SLE, glomerulonefritíde. Nízke hodnoty hemolytickej aktivity komplementu sú fyziologicky prítomné u novorodencov a v prvých mesiacoch života.

Ku nežiadúcej, nešpecifickej aktivácii komplementu alternatívnou cestou môže dôjsť pri kontakte s povrchmi umelých materiálov, čo sa deje pri použití implantátov, dialýze alebo pri kardiochirurgických operáciách, pri ktorých je krv odvádzaná do mimotelového obehu. **Miera aktivácie komplementu je dôležitým ukazovateľom biokompatibility materiálov.**

## 2.4 LYZOZÝM (muramidáza)

Lyzozým je proteín s veľmi nízkou molekulovou hmotnosťou (14,6 KDa), ktorý sa skladá z jediného polypeptidového reťazca tvoreného 129 jednotkami. Jeho vnútorná stabilita je zabezpečená disulfidickými mostíkmi. Je to dôležitý **hydrolytický enzým s antibakteriálnym účinkom, ktorý deštruuje bunkovú stenu grampozitívnych baktérií tým, že štiepi 1,4-beta-D-glykozidickú väzbu medzi N-acetylmuramovou kyselinou a N-acetylglukozamínom v mureíne bunkovej steny.**

Mureín (peptidoglykán) je základnou stavebnou súčasťou bunkovej steny baktérií. Jeho polysacharidové reťazce obsahujú striedavo zvyšky N-acetylglukozamínu a kyseliny N-acetylmuramovej, na jej karboxyl je naviazaný reťazec štyroch aminokyselín v poradí L alanín, D glutamová kyseliny, ľubovolná aminokyselina a D alanín. Jednotlivé reťazce sú vzájomne prepojené. Účinkom lyzozýmu sú väzby štiepené a nastáva lýza bunkovej steny zvonku. Keďže bunková stena je pre baktérie veľmi dôležitá, jej poškodenie vedie k poruche jej funkcie.

Lyzozým bol objavený v roku 1922 Alexandrom Flemingom. **Vyskytuje sa ako súčasť špecializovaných bunkových organel – lyzozómov, nachádza sa tiež v granulách leukocytov.** Lyzozým sa zúčastňuje degradačných a mikrobicídnych procesov a usmrčuje mnohé grampozitívne baktérie. Patogény však bývajú na lyzozým rezistentné. Čo sa týka gramnegatívnych baktérií, ich vrstva mureínu býva pod vonkajšou lipidovou membránou, preto lyzozým vyžaduje pre svoje pôsobenie spoluprácu s komplementom. Komplement rozruší vonkajšiu membránu tým, že vďaka

membránovému útočnému komplexu vytvorí diery vo vonkajšej membráne. Pôsobí synergicky s komplementom a protilátkami pri lýze baktérií.

Lyzozým sa nachádza v pomerne vysokej koncentrácii v granulách neutrofilov, v krvnom sére a vo väčšine telesných sekrétov, napríklad aj v nosovom hliene, slinách, slzách, materskom mlieku, kde dosahuje vysoké koncentrácie. Vo všeobecnosti možno povedať, že tento nešpecifický humorálny faktor sa nachádza u bezstavovcov i stavovcov, uvoľňuje sa však aj z bičíka bakteriofága, a tým dochádza k perforácii hostiteľskej bunky. Uplatňuje sa potom aj keď sa nové bakteriofágy uvoľňujú z bunky von. Veľa lyzozýmu obsahuje aj vaječný bielok. V prípade infekčných procesov prebiehajúcich v ústnej dutine alebo hltane je možné ho podávať ako lokálne antiseptikum, napr. aj v podobe tabliet.

Lyzozým spolu s komplementom sú podkladom baktericídnej aktivity séra. Čerstvé sérum usmrcuje baktérie, ale prakticky iba nepatogénne.

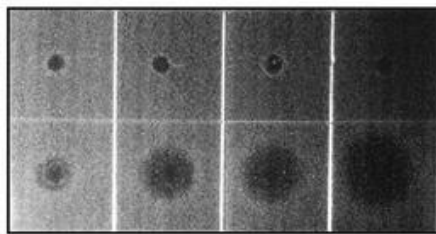
#### 2.4.1 Stanovenie lyzozýmu metódou jednoduchkej radiálnej imunodifúzie

Na stanovenie lyzozýmu sa využíva schopnosť lyzozýmu lyzovať bunkovú stenu grampozitívnych mikroorganizmov. **V teste sa používa grampozitívna baktéria *Micrococcus lysodeiticticus*.** Môže sa vyšetrovať tiež pomocou špecifických protilátok.

**Postup:** Na sklenenú platničku sa vyleje agar alebo agaróza zmiešaná so suspenziou *Micrococcus luteus* (predtým *lysodeiticticus*) (v rovnakom pomere). Po stuhnutí sa vyrežú otvory, do ktorých sa pipetujú jednak známe vzorky štandardného roztoku lyzozýmu v stúpajúcich koncentráciách a do ostatných skúmané vzorky. Inkubuje sa 24 hod. vo vlhkej komôrke pri izbovej teplote.

Lyzozým difunduje do okolia jamiek a spôsobí lýzu mikrokoka. Potom sa odmerajú priemery lýzy mikrokoka (obrázok 18). Z nameraných hodnôt lýzy štandardného lyzozýmu sa vytvorí kalibračná krivka.

**Výsledok:** Pomocou vytvorenej krivky sa určí množstvo lyzozýmu v skúmaných vzorkách na základe nameraného priemeru lýzy spôsobenej lyzozýmom, ktorý bol prítomný vo vzorke od pacienta. Referenčné hodnoty sa pohybujú v rozmedzí  $20,8 \pm 3,2$  mg/l. Každé pracovisko si však vytvára svoje referenčné hodnoty, ktoré sú závislé od použitých štandard lyzozýmu.



**Obr. 18** Lýza *Micrococcus luteus* rôznymi koncentraciami lyzozýmu

(<http://www.jfmed.uniba.sk>)

## 2.5 STANOVENIE BAKTERICÍDNEJ AKTIVITY SÉRA

Antibakteriálne látky ako **lyzozým spolu s komplementom sú podkladom prirodzenej baktericídnej aktivity séra**. Čerstvé sérum usmrčuje baktérie, ale prakticky iba nepatogénne. Táto prirodzená baktericídna aktivita je odlišná od baktericídnej aktivity v sére pacienta počas liečby antimikrobiálnymi látkami a môže byť meraná.

**Postup:** Pri stanovení baktericídnej aktivity séra musí byť substrátom živý mikroorganizmus. Často sa používa *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* alebo pseudomonády. Krv sa inkubuje so suspenziou príslušného mikroorganizmu a potom sa postupuje podľa zvoleného mikroorganizmu. Ak sa použijú veľké mikroorganizmy, ako napr. *C. albicans*, ich prežitie sa hodnotí mikroskopicky po vitálnom farbení trypanovou modrou. Pred vlastným vyhodnocovaním je potrebné fagocytujúce bunky lyzovať (napr. osmotickou lýzou). Usmrtené kandidy sú modré (zafarbené) a živé sú nezafarbené, lebo eliminovali modré farbivo. Ak sa použijú menšie mikroorganizmy (napr. stafylokoky, escherichie), robí sa vyočkovanie na pevné pôdy v Petriho miske a tie baktérie, ktoré prežili, vytvoria kolónie.

**Výsledok:** Následne sa narastené kolónie spočítajú. Po spočítaní množstva vyrastených kolónií z vyšetrovanej vzorky a kontroly sa baktericídna aktivita vypočíta podľa vzorca:

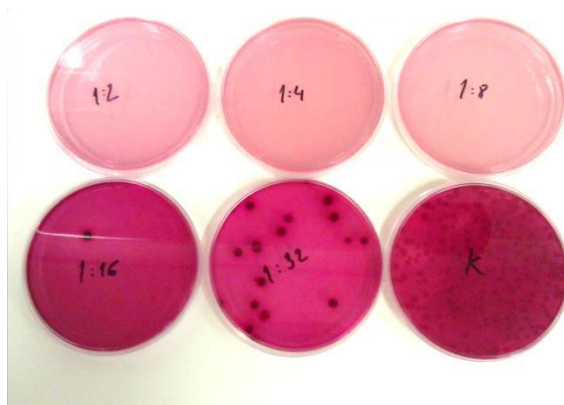
$$\frac{\text{počet vyrastených kolónií z vyšetrovanej vzorky} \times 100}{\text{počet vyrastených kolónií z kontroly}}$$

Táto metóda je pomerne náročná na prácu a ťažko štandardizovateľná. Potrebná je čerstvá krv, ktorá sa musí spracovať do 2 hodín od odberu. Nasleduje kultivácia mikroorganizmov, ktoré prežili, takže test trvá obvykle 2-3 dni. Uplatnenie baktericídnych testov pre rutinnú klinickú diagnostiku je však obmedzené. Častejšie sa s ich využitím stretávame vo výskume. Je dôležitým parametrom v imunologických štúdiách vzhľadom nato, že umožňuje hodnotiť vrodené obranné systémy imunity.

**Baktericídna aktivita séra môže byť ovplyvnená liečbou antimikrobiálnymi látkami.** Pri niektorých infekciách nestačí zistiť, či je mikroorganizmus citlivý na ATB, ale aj to, že na dosiahnutie liečebného efektu je potrebné dosiahnuť potrebný baktericídny účinok séra.

**Princíp:** sérum odobraté počas liečby ATB sa zriedi bujónom v geometrickom rade 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, atď. Každé riedenie sa naočkuje vlastným kmeňom získaným od chorého z hemokultúry. Po inkubácii sa jednotlivé riedenia vyočkujú na tuhú pôdu bez pridania antibiotík.

**Výsledok:** Za baktericídny titer sa považuje najvyššie riedenie séra, ktoré redukuje bakteriálnu populáciu aspoň o 99,9 % oproti kontrole s inaktivovaným sérom. Sérum sa inaktivuje zahriatím na teplotu 56°C po dobu 30 minút. Vhodnou liečbou antimikrobiálnymi látkami má byť dosiahnutý baktericídny účinok séra aj vtedy, ak je zriedené 8 až 16-krát (pri stafylokokovej endokarditíde až 32-krát) (obrázok 19).



**Obr. 19** Stanovenie baktericídnej aktivity séra (vlastné spracovanie)

## 2.6 STANOVENIE PROTEÍNOV AKÚTNEJ FÁZY ZÁPALU

**Proteíny akútnej fázy zápalu sú bielkoviny, ktorých koncentrácia sa zvyšuje v akútnej fáze zápalu v organizme.** Z tohto dôvodu je možné využiť ich meranie na diagnostické účely. Väčšinou sú produkované v pečeni a ich syntéza sa zvyšuje vplyvom zápalových cytokínov (IL-1, IL-6, TNF  $\alpha$ ). Medzi často vyšetrované proteíny akútnej fázy zápalu patria  $\alpha$ -1-antitrypsín (A1AT),  $\alpha$ -2-makroglobulín (A2M), orosomukoid (Oroso), ceruloplazmín (Cpl), transferín, fibrinogén, C-reaktívny proteín, prokalcitonín.

Všetky proteíny akútnej fázy zápalu majú v tele konkrétnu funkciu. Priamo sa zúčastňujú obranných reakcií, opsonizujú baktérie (napr. CRP), regulujú zápalovú odpoveď tým, že môžu blokovat proteázy uvoľnené z granulocytov a tak do istej miery chrániť tkanivá pred masívnym poškodením ( $\alpha$ -1-antitrypsín). Ďalej môžu mať funkciu prenášačov iónov (transferín, ceruloplazmín), zúčastňujú sa hemokoagulácie (fibrinogén).

Medzi najčastejšie vyšetrované proteíny akútnej fázy zápalu patria **CRP, prokalcitonín a orosomukoid**.

- **CRP** je citlivý a veľmi dynamický ukazovateľ akútnej fázy zápalu.
- **Orosomukoid** (tiež označovaný ako kyslý  $\alpha$ -1-glykoproteín) je syntetizovaný hlavne v pečeni. Zvyšuje sa pri zápale s podobnou dynamikou ako CRP.
- **Prokalcitonín** je prekursor kalcitonínu (hormónu produkovaného štítnou žľazou, ktorý sa podieľa na regulácii hladiny kalcia). Za fyziologických okolností sa nedá detegovať, jeho hladiny sa zvyšujú až pri zápale (bakteriálnom, mykotickom). U pacientov s podozrením na závažné infekcie sa stanovujú hladiny prokalcitonínu, ktorý sa zvyšuje najmä pri bakteriálnych, ale nie pri vírusových ochoreniach. Z tohto dôvodu sa využívajú jeho zvýšené hladiny na oddiferencovanie bakteriálneho pôvodu zápalu od zápalu inej etiológie.

### 2.6.1 Stanovenie CRP – C-reaktívneho proteínu

CRP je jeden z najčastejšie stanovovaných proteínov akútnej fázy zápalu v súvislosti s monitorovaním zápalu. Patrí medzi veľmi citlivé ukazovatele zápalu. Jeho

hladiny sú v sére za normálnych okolností veľmi nízke. Jeho zvýšenie môže byť len mierne alebo až dramatické.

Je to veľmi dynamický parameter. **Jeho dynamika je rýchlejšia ako u sedimentácie erytrocytov (FW)**, to znamená, že reaguje pri zápale oveľa rýchlejšie zvýšením koncentrácie, rádovo v hodinách. Reflektuje teda na závažnosť zápalu, ale keďže ide o nešpecifický parameter, neprispieva k samotnému určeniu podstaty ochorenia. Výsledok musí byť interpretovaný v súvislosti s ostatnými získanými údajmi o danom ochorení.

**Pri zápaloch bakteriálnej etiológie** jeho koncentrácia výrazne stúpa (10 násobne a viac). Zvýšené CRP však môže byť aj pri niektorých neinfekčných zápaloch, napríklad **infarkte myokardu, v pooperačnom období. Pri reumatických ochoreniach** môžu byť na jednej strane hladiny CRP výrazne zvýšené (v akútnej fáze reumatoidnej artritídy) alebo naopak pri aktívnej fáze SLE len minimálne zvýšené, čo kontrastuje s výraznou zápalovou aktivitou a vysokou sedimentáciou erytrocytov. Ak sa zistí vysoké CRP u pacientov so SLE, ide o komplikujúci, väčšinou infekčný proces. CRP je napríklad dôležitým markerom zápalu u pacientov s hypogamaglobulinémiou, pretože u nich sa obvykle nezvyšuje sedimentácia erytrocytov.

**CRP možno stanoviť semikvantitatívnymi alebo kvantitatívnymi metódami.**

#### *Stanovenie CRP semikvantitatívnou metódou*

Pri semikvantitatívnej metóde sa CRP stanovuje **zo séra pacienta pomocou jednoduchej precipitácie v kapilárach**. Kapilára sa jedným koncom ponorí do antiséra proti CRP, ktoré je súčasťou komerčnej súpravy na testovanie CRP. Po nasatí do polovice kapiláry sa vytiahne a ponorí do testovaného séra pacienta, ktoré sa tiež nasaje do kapiláry. Obsah kapiláry sa potom niekoľkokrát obrácaním premieša a vo vertikálnej polohe sa vloží do termostatu. Po inkubácii sa v pozitívnom prípade vytvorí precipitát a jeho veľkosť je možné stanoviť semikvantitatívne porovnaním s kontrolným pozitívnym sérom, ktoré je súčasťou komerčnej súpravy.

#### *Stanovenie CRP pomocou jednoduchej radiálnej imunodifúzie*

**Na kvantitatívne stanovenie CRP** je možné použiť jednoduchú radiálnu imunodifúziu (podľa Manciniovej), teda precipitačnú reakciu v gélovom prostredí. Princíp je obdobný ako pri stanovení zložiek komplementu **pomocou jednoduchej radiálnej imunodifúzie**.

**Postup:** Na sklenenú platničku sa naleje tekutý agar zmiešaný s protilátkou proti CRP (ACRP). Po stuhnutí agaru sa podľa predlohy v dostatočných vzdialenostiach vyrežú otvory. Do otvorov sa napipetuje sérum pacienta, v ktorom sa ide stanovovať CRP. Počas inkubácie vo vlhkom prostredí dochádza k difúzii CRP do gélu. Na základe reakcie antigénu (v tomto prípade CRP) s protilátkou (v tomto prípade ACRP, ktorá je zmiešaná s agarom) dôjde v okolí jamiek k vytvoreniu precipitačných prstencov. Priemer precipitačného prstenca je priamo úmerná množstvu určovanej zložky v sére. Z nameraných priemerov prstencov štandardných koncentrácií CRP sa zostrojí kalibračná

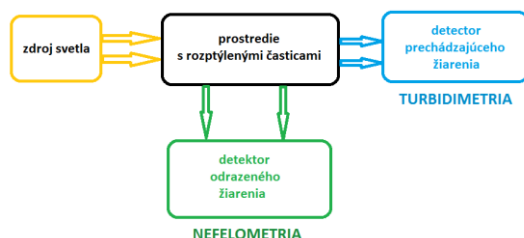
krivka, kde na jednu os sa nanesú známe koncentrácie CRP a na druhú os k tomu zodpovedajúce priemery precipitačných prstencov.

**Výsledok:** Pomocou vytvorenej kalibračnej krivky a po odčítaní priemeru precipitačného prstenca vytvoreného zo séra pacienta sa určí koncentrácia CRP v sére pacienta. V súčasnosti je však v klinickej praxi táto metóda nahradená automatizovanými metódami, ktoré umožňujú rýchle stanovenie CRP, čo je väčšinou požadované v akútnej fáze infekčných zápalových ochorení, kedy sú často potrebné veľmi rýchle až statimové výsledky. Napriek tomu je metóda jednoduchej radiálnej imunodifúzie stále považovaná za tzv. zlatý štandard pre zisťovanie koncentrácie rôznych proteínov.

#### *Stanovenie CRP pomocou nefelometrie alebo turbidimetrie*

**V klinickej praxi** sa na vyšetrenie CRP najčastejšie používa **nefelometria alebo turbidimetria**. K tomu slúžia veľmi praktické malé prístroje, sú jednoduché a sú prispôsobené na vyšetrenie CRP z krvi odobranej do kapiláry. Pracujú v režime POCT (point of care testing), čo znamená, že stanovenie tohto parametra sa robí priamo na mieste ošetrenia pacienta. Vďaka tomu je táto metóda využívaná v mnohých zdravotníckych zariadeniach. Štandardne je dostupná je v ambulanciách pediatrov, lekárov pre dospelých a v mnohých ďalších ambulanciách. **Keďže výsledky sú v priebehu pár minút, je to nepochybne prínosná metóda pre prax.**

**Nefelometria aj turbidimetria sú založené na meraní množstva vytvorených imunokomplexov.** Koncentrácia antigénu je potom závislá na rýchlosti vytvorenia zákalu a na hustote zákalu. Princípom je precipitácia v tekutom prostredí, kedy pri reakcii antigénu a protilátky vzniká zákal (koloid, precipitát), pričom jeho intenzita je pri konštantnom množstve použitej protilátky úmerná koncentrácii zisťovaného antigénu. Na meranie intenzity zákalu sa môže používať turbidimetria alebo nefelometria, ktorými sa môže kvantitatívne stanoviť množstvo antigénu vo vyšetrovanej vzorke pomocou kalibračnej krivky. Na vytvorenie kalibračnej krivky sa používa štandardizovaná vzorka so známymi koncentráciami antigénu a získané údaje sa spracovávajú pomocou počítačových programov.



**Obr. 20** Princíp nefelometrie a turbidimetrie (vlastné spracovanie)

**Pri nefelometrii** býva zdrojom svetla výbojka alebo laser. Detektor nie je umiestnený priamo oproti laseru, ale pod určitým uhlom a **meria intenzitu zábleskov svetla, ktoré sa odrazí od vznikajúcich komplexov antigén-protilátka** (ide o Tyndalov efekt).

**Pri turbidimetrii** sa využíva ako zdroj svetla dióda a detektor je umiestnený v tomto prípade priamo oproti dióde. **Meria sa úbytok intenzity svetla**, ktoré prešlo roztokom v kyvete obsahujúcej svetlo, ktoré odráža komplexy antigén-protilátka (ide o absorbanciu) (obrázok 20). Jednoduchosť prevedenia týchto metód umožnila celý postup automatizovať a plne ho využívať v každodennej praxi lekárov v priebehu celého dňa (statimové výsledky).

## 2.7 FAGOCYTÓZA

**Fagocytóza je schopnosť profesionálnych fagocytov rozpoznať, pohltiť, usmrtiť a degradovať usmrtený cudzorodý materiál.** V nešpecifickej obrane je najdôležitejšou prekážkou šírenia mikroorganizmov ich likvidácia prostredníctvom fagocytov.

**Medzi profesionálne fagocyty sa zaraďujú dva typy fagocytov.**

- Sú to na jednej strane **polymorfonukleárne leukocyty (PMNL) – nazývané aj mikrofágy**
- a na druhej strane **makrofágy**. Všetky sa vyvíjajú z kmeňových hematopoetických buniek kostnej drene.

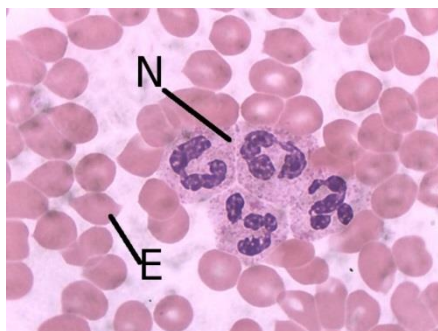
**Funkcia fagocytov** je na jednak **efektorová** – fagocytóza a eliminácia mikroorganizmov za účasti baktericídnych látok a hydrolytických enzýmov a funkcia **regulačná** – sprostredkovaná produkciou cytokínov, prostaglandínov, leukotriénov atď.

K mikrofágom patria hlavne neutrofily a eozinofily. Cirkulujú v krvi a sú pripravené rýchlo sa presúvať do miesta zápalu. Výhodou týchto granulocytov je, že sú pripravené ihneď vykonávať svoje efektorové funkcie.

### 2.7.1 Neutrofily

**Neutrofily** žijú veľmi krátko, približne 24 hodín. Sú najpočetnejšou skupinou leukocytov u človeka. Predstavujú až 60-70 % leukocytov ( $4,3-11 \times 10^9/l$  liter krvi), sú veľmi aktívne a hrajú dôležitú úlohu pri akútnom zápale. Výhodou je ich rýchla mobilizácia a uvoľňovanie mediátorov zápalu. Ich **hlavnou úlohou je fagocytóza a deštrukcia patogénov**. Sú **základné bunky 1. obrannej línie proti patogénom**, cudzorodým bunkám. Pre tieto ich schopnosti bývajú označované ako „foot soldiers – vojaci pešiaci“ alebo „ťažné kone“. Neutrofily však **nepatria medzi antigén prezentujúce bunky** (neexprimujú MHC II. triedy).

Neaktívne neutrofily sú v cirkulácii približne 6-7 hodín. Po aktivácii a migrácii do tkanív prežívajú 1-2 dni (hnis obsahuje živé alebo odumreté neutrofily a usmrtené baktérie). Neutrofily sú majú v priemere okolo 15  $\mu m$ . Nezrelé mladé formy neutrofilov majú jadro v tvare tyčky a majú nižšiu schopnosť fagocytózy ako zrelé formy. Zrelé formy neutrofilov majú segmentované jadro, ktoré obsahuje 4-5 segmentov (obrázok 21).



**Obr. 21** Neutrofily (N), Erytrocyty (E)  
(<http://galleryhip.com>)

Denne dozrieva približne  $10^{10}$  neutrofilov. Časť z nich adheruje na cievny endotel, keďže väzba je reverzibilná a nie je príliš silná, pomaly sa po ňom kotúľajú („rolling“). **Po ich aktivácii vhodnými chemotaktickými signálmi neutrofily opúšťajú krvné riečisko a migrujú do miest infekcie alebo poškodeného tkaniva po traume, kde pohlcujú a likvidujú baktérie.**

Prichádzajú do kontaktu s mikroorganizmami skôr ako makrofágy. Rýchlo ich však nasledujú krvné monocyty, ktoré sa následne v mieste invázie diferencujú na makrofágy, ktoré fagocytujú a zabíjajú baktérie.

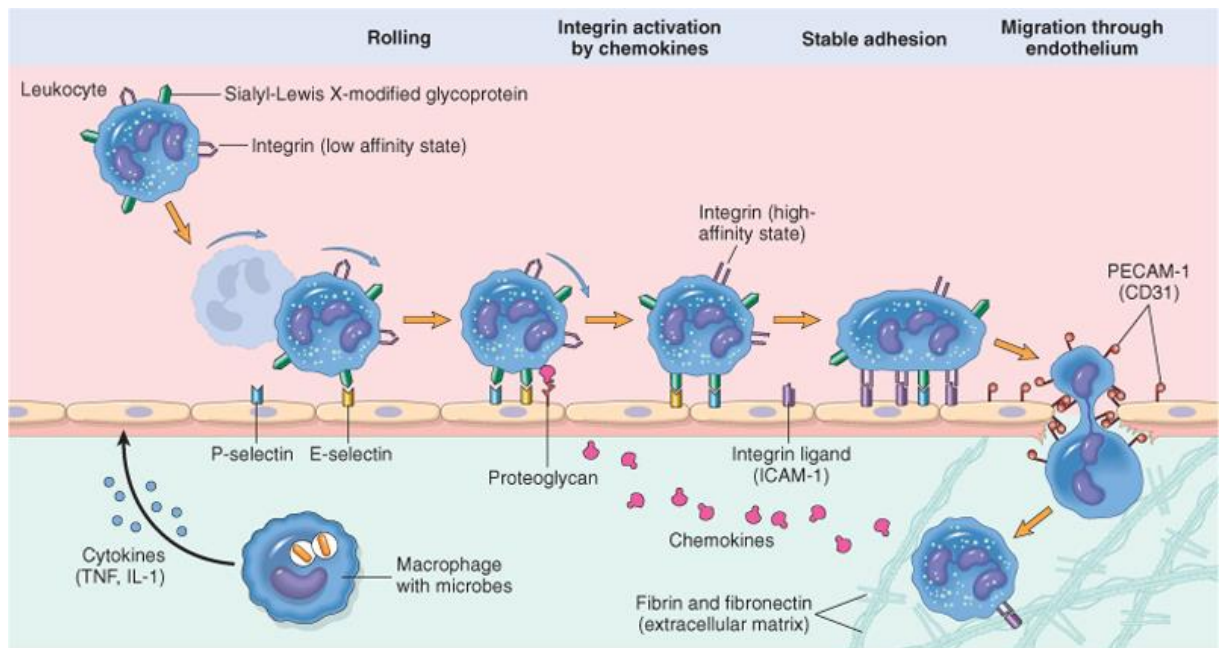
Adhézia neutrofilov je umožnená vďaka receptorom neutrofilov a ligandom na endotelových bunkách. Počas tohto procesu vplyvom zápalových cytokínov sa na povrchu endotelií zapálených tkanív exprimujú adhezívne molekuly.

Interakciou medzi adhezívnymi molekulami endotelií (selektínmi) a oligosacharidmi na povrchu neutrofilov sa kotúľanie (rolling) spomalí.

V prítomnosti zápalových cytokínov alebo chemokínov dochádza k väzbe povrchových adhezívnych molekúl neutrofilov – leukocytárnych integrínov na povrchový glykoproteín endotelových buniek – ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1). Táto väzba je už ireverzibilná, neutrofily pevne adherujú na endotel kapilár v postihnutej oblasti.

Pôsobením chemotaktických látok (pre neutrofily je hlavnou chemotaktickou látkou interleukín 8) uvoľnených v mieste poškodenia prestúpia pomedzi endotelové bunky ciev.

Tento proces sa označuje ako diapedéza (extravazácia) a následne je ich pohyb riadený chemotaktickými látkami uvoľňovanými v mieste poškodenia (zápalu) tkaniva (obrázok 22).



© Elsevier. Kumar et al: Robbins Basic Pathology 8e - [www.studentconsult.com](http://www.studentconsult.com)

**Obr. 22** Prienik fagocytov do infikovaných a poškodených tkanív  
(Kumar et al. Robbins Basic Pathology 8e, <http://www.studentconsult.com>)

V cytoplazme neutrofilov sa nachádzajú primárne a sekundárne granuly. Farbia sa neutrálnymi farbivami.

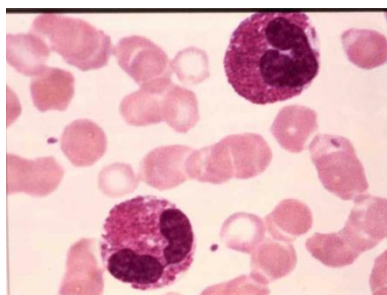
- **Primárne (azurofilné) granuly** sú väčšie a obsahujú myeloperoxidázu, hydrolázy, elastázu, lyzozým, katepsín G a ďalšie.
- **Sekundárne (špecifické) granuly** sú menšie a obsahujú laktoferín, lyzozým, alkalickú fosfatázu, kolagenázu a ďalšie.

Neutrofily uvoľňujú enzýmy z granúl do extracelulárneho priestoru, čo im umožňuje aktívne sa presúvať do miesta zápalu. Ak sa im nepodari stretnúť baktérie v primeranom čase, postupne odumierajú.

Ak sa uvoľní väčšie množstvo enzýmov do extracelulárneho priestoru, dôjde ku skvapalneniu tkaniva a odumretiu niektorých neutrofilov, čo má za následok **vytvorenie hnisu**. Taktiež neutrofily, ktoré splnili svoju úlohu, odumierajú a sú odstraňované ďalšími fagocytmi (najmä makrofágmi). Väčšie množstvo odumretých neutrofilov je súčasťou hnisu.

### 2.7.2 Eozinofily

**Eozinofily** predstavujú 1-3 % leukocytov. Majú priemer okolo 18  $\mu\text{m}$ . V cytoplazme obsahujú veľké množstvo malých **acidofilných granúl**. Môže ich byť až okolo 200. Farbia sa kyslými farbivami červeno (obrázok 23).



**Obr. 23** Eozinofily  
([www.studyblue.com](http://www.studyblue.com))

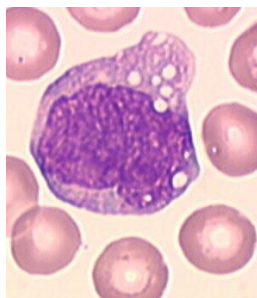
V granulách obsahujú kationické proteíny eozinofilov, eozinofilovú peroxidázu, hlavný bázický proteín, ribonukleázy, deoxyribonukleázy, lipázy, plazminogén.

Eozinofily majú na svojom povrchu **receptory pre zložky komplementu** (pre C3b) a **receptory pre protilátky IgE**. V cirkulácii perzistujú 8-12 hodín, v tkanivách 8-12 dní. Eozinofily fagocytujú len veľmi slabo. Pre eozinofily (a tiež monocyty) platí, že adherujú na cievnú stenu prostredníctvom iného typu adhezívnych molekúl ako neutrofilov, a to  $\beta 1$  integrínov a ich partnerskou molekulou na endoteli je VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1).

Po aktivácii však tvoria veľké množstvo metabolitov. Produkujú leukotriény, prostaglandíny a množstvo cytokínov. Zohrávajú dôležitú úlohu **pri alergických reakciách, v obrane proti parazitárnym infekciám vyvolaných mnohobunkovými červami** (hlavne proti helmintom v gastrointestinálnom trakte), **v obrane proti nádorovým bunkám**. Eozinofília je prítomná pri parazitárnych ochoreniach, alergiách a pri niektorých typoch nádorov kostnej drene a lymfatických uzlín.

### 2.7.3 Monocyty

Rýchlo po neutrofiloch sa aktivujú krvné **monocyty**, ktoré sa následne v mieste invázie **diferencujú na makrofágy**, ktoré fagocytujú a zabíjajú baktérie. Monocyty predstavujú 5-10 % leukocytov. Sú to **veľké mononukleárne bunky**, v priemere majú zvyčajne 12-25  $\mu\text{m}$ , majú veľké excentricky uložené jadro obličkovitého tvaru. **Cytoplazma je vakuolizovaná**, farbí sa slabo bazofilne (sivo-fialovo), obsahuje aj veľmi jemné azurofílné granuly (obrázok 24).



**Obr. 24** Monocyt  
(<http://www.svt.ac-versailles.fr/IMG/jpg/monocyt.jpg>)

Cirkulujú v krvnom riečišti približne 1-3 dni. Potom adherujú na cievny endotel a opúšťajú krvné riečište procesom diapedézy. Monocyty adherujú na cievnu stenu prostredníctvom  $\beta 1$  integrínov a ich partnerskou molekulou na endoteli je VCAM-1.

Monocyty sa po premiestnení do tkanív premieňajú na makrofágy. Monocyty dozrievajú na odlišné typy makrofágov podľa odlišnej anatomickej lokalizácie.

#### 2.7.4 Makrofágy

**Makrofágy** sú veľké mononukleárne fagocyty. Makrofágy vznikajú z krvných monocytov po ich prechode do tkanív.

Podľa odlišnej anatomickej lokalizácie dostali tkanivové makrofágy odlišné pomenovanie. Napríklad v pľúcach sa vyskytujú alveolárne makrofágy, v pečeni sú to Kupfferove bunky, histiocyty v spojivovom tkanive, mikroglia v centrálnej nervovej sústave, osteoklasty v kostiach, Langerhansove bunky v koži, peritoneálne a pleurálne makrofágy v serózných dutinách, makrofágy v podslizničnom tkanive sú súčasťou MALT.

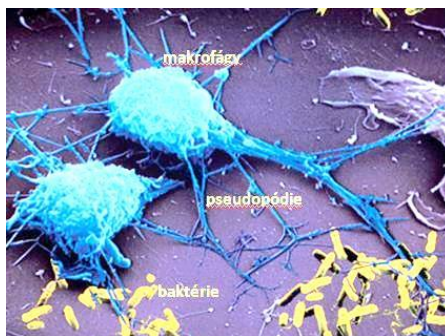
**Tkanivové makrofágy sú významné v 1. obrannej línii hostiteľa. Sú to profesionálne fagocyty a zároveň sa zaraďujú k antigén prezentujúcim bunkám. Exprimujú MHC II. triedy.**

Makrofágy majú na svojom povrchu **receptory pre zložky komplementu** (pre C3b) a **Fc receptory**. Dokážu **opakovane fagocytovať**. Za svoj život môžu sfagocytovať viac než 100 baktérií. Makrofágy bývajú označované aj „large eaters – veľkí jedáci“. Žijú dlho, v priemere 75 dní, niekedy mesiace až roky (obrázok 25, 26).



**Obr. 25** Makrofág

(<http://www.medical-labs.net/neutrophil-macrophage-and-myeloid-derived-dendritic-cell-function-840/>)



**Obr. 26** Makrofágy sa pripravujú na pohltenie baktérií

(farebná verzia scanovacej elektrónovej mikroskopie, upravené podľa: Barret a spol., 2012)

**Makrofágy sú schopné rozpoznať, pohltiť, spracovať a prezentovať antigén T bunkám.** Môžu byť aktivované napríklad fragmentom komplementu C3b, interferónom  $\gamma$ , endotoxínmi gramnegatívnych baktérií, čo následne zvýši ich schopnosť fagocytovať.

Okrem toho však produkujú rozličné imunoregulačné látky, signálne a antimikrobiálne proteíny. Niektoré z týchto molekúl sú schopné zúčastniť sa na spúšťaní špecifických imunitných reakcií a výsledkom je špecifická bunková imunitná odpoveď. Makrofágy tak predstavujú prechod medzi nešpecifickou a špecifickou imunitou.

#### 2.7.5 Proces fagocytózy

Fagocytóza je proces, pri ktorom špecializované bunky imunitného systému pohlcujú, usmrcujú a rozkladajú mikroorganizmy (cudzorodý materiál). **Je základom vrodenej nešpecifickej imunity človeka.**

##### *Chemotaxia*

Vlastnej fagocytóze predchádza chemotaxia. **Pri nej fagocyty putujú do miesta zápalu alebo poškodeného tkaniva.** Do tohto miesta sú **priťahované fagocyty molekulami, ktoré sa nazývajú chemotaxíny.** Medzi najúčinnnejšie chemotaxíny patria niektoré zložky komplementu, leukotriény, interleukín IL-8, ale hlavne súčasti baktérií. Fagocyty smerujú do miesta zápalu podľa chemotaktického gradientu. Hlavným chemotaxínom pre neutrofile je cytokín interleukín IL-8. Pre monocyty a eozinofily sú to MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MCP-1 a RANTES. Chemotaxíny spoločné pre všetky fagocyty sú C3a, C5a zložky komplementu, leukotrién LTB<sub>4</sub>, PAF (faktor aktivujúci trombocyty), fMLP (formyl-metionyl-leucyl-fenylalanín – peptid z bakteriálnych proteínov). Na povrchu fagocytov sa nachádzajú pre všetky tieto chemotaxíny príslušné receptory. Ich stimuláciou dochádza k chemotaxii a následnej aktivácii fagocytózy.

##### *Adherencia*

**Cudzorodý materiál sa prichytí na povrch fagocytu,** táto fáza sa volá adherencia. **Fagocyt dokáže rozpoznať cudzorodé štruktúry,** ktoré sa nachádzajú **na povrchu mikroorganizmov, označované ako PAMP** (pathogen associated molecular patterns) – s patogénom súvisiace molekulové vzory. Môže ísť napríklad o mannany, lipopolysacharidy, peptidoglykany, lipoteichoovú kyselinu, glukány a ďalšie. Tieto sú rozpoznávané receptormi fagocytov označovanými PRR (pattern recognition receptors) – vzor rozpoznávajúcimi receptormi. V tomto prípade je fagocytóza nezávislá na opsonínoch.

##### *Opsonizácia*

Iným dôležitým mechanizmom, ktorý umožní rozpoznať časticu ako cudzorodú a zabezpečiť jej fagocytózu je opsonizácia. V tomto prípade ide o fagocytózu závislú na opsonínoch. **Opsonizácia je ochutenie fagocytovaných častíc.** Opsonizáciou dochádza k zosilneniu väzby medzi mikroorganizmom a fagocytom, ktorý ho chce pohltiť. Medzi dôležité opsoníny patria protilátky IgG (hlavne IgG1 a IgG3), zložky komplementu (hlavne fragmenty C3 zložky komplementu), manózu viažuci lektín – MBL (mannose-binding lectin), fibronektín, proteíny akútnej fázy zápalu. Keďže fagocyty dokážu odstraňovať nielen patogény, ale aj vlastné apoptotické bunky alebo poškodené bunky, vedú ich

rozpoznať podľa neobvyklých štruktúr na ich povrchu (napríklad podľa fosfolipidov na povrchu apoptotických buniek, ktoré sa za normálnych okolností vyskytujú na vnútornej strane membrány) alebo po ich opsonizácii protilátkami alebo zložkami komplementu.

### *Ingescia*

Po rozpoznaní a prichytení cudzorodej častice dochádza k jej pohlteniu – ingescii. Nastáva remodelácia membrány a cytoskeletu závislá na bunkovom aktíne a myozíne, fagocyt začne vysieľať **panôžky – pseudopódie**, ktorými cudzorodú časticu obopne.

### *Fagozóm*

Keď je častica úplne obklopená, ocitá sa vo vnútri vakuoly, ktorá sa nazýva fagozóm.

### *Fagolyzozóm*

V ďalšom kroku **dochádza k splynutiu (fúzii) fagozómu s lyzozómom** a vzniká fagolyzozóm. Baktericídne pôsobiace látky a početné hydrolytické enzýmy lyzozómov napadnú pohltené častice a ničia ich. K optimálnej funkcii hydroláz prispieva aj kyslé prostredie (pH 4-5) vo fagolyzozómoch.

### *Oxidačné vzplanutie*

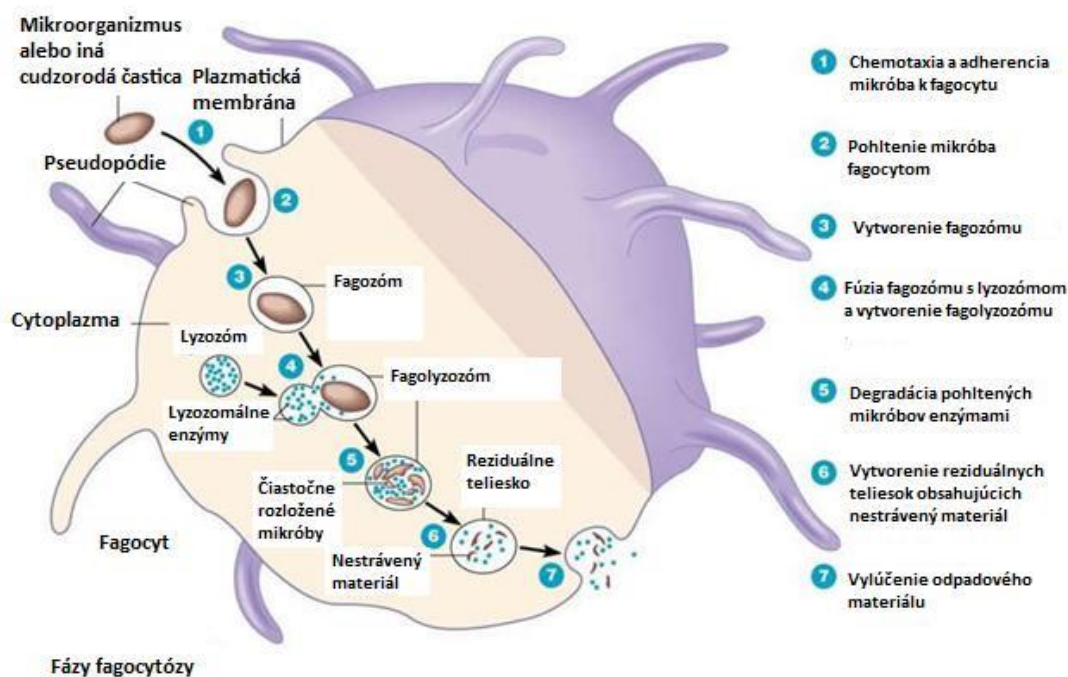
Po pohltení dochádza vo fagocytoch k **oxidačnému vzplanutiu**, počas ktorého sa vytvárajú reaktívne kyslíkové radikály s baktericídny účinkom. Celý proces je katalyzovaný NADPH-oxidázou a myeloperoxidázou. Pri nedostatku alebo absencii niektorých z enzýmov dochádza k funkčným poruchám až defektom v schopnosti likvidovať baktérie.

### *Oxid dusnatý*

Ďalším veľmi významným mikrobicídny prostriedkom fagocytov je **oxid dusnatý (NO)**, ktorý je produkovaný po aktivácii enzýmového systému NO syntázy. NO syntáza sa aktivuje v makrofágoch pod vplyvom cytokínov Th1 lymfocytov (interferónu- $\gamma$ , TNF). NADPH-oxidázový systém je dôležitý na likvidáciu pohltенých extracelulárnych patogénov, NO systém je dôležitý na likvidáciu intracelulárnych patogénov.

### *Degradácia a vylúčenie odpadového materiálu*

Po **usmrtení mikroorganizmov dochádza k ich degradácii** pomocou lyzozomálnych enzýmov. Ťažko stráviteľný alebo nestráviteľný materiál zostáva v reziduálnych telieskach a **následne je vylúčený ako odpadový materiál** (obrázok 27).



**Obr. 27** Fázy fagocytózy  
(upravené podľa <http://classes.midlandstech.edu>)

### 2.7.6 Vyšetrenie fagocytujúcich buniek

Na vyšetrenie fagocytózy sa využívajú viaceré metódy. Niektoré z týchto metód slúžia na analýzu jednotlivých krokov fagocytózy (chemotaxiu, adherenciu, ingesciu, oxidačné vzplanutie), iné metódy slúžia na analýzu účinnosti celého procesu fagocytózy (baktericídny test). Vyšetrenie fagocytózy sa väčšinou zameriava na vyšetrenie fázy pohltia, teda ingescie (obrázok 28).



**Obr. 28** Pohltie cudzorodých častíc pri fagocytóze  
([www.cellsalive.com/ouch.htm](http://www.cellsalive.com/ouch.htm))

### Fagocytárna aktivita a fagocytárny index- pomocou svetelnej mikroskopie

Na testovanie schopnosti fagocytov pohltiť cudzorodý materiál sa môžu používať baktérie, kvasinky alebo mikrosférické hydrofilné partikule (MSHP).

Na vyšetrenie fagocytózy sa používa nezrazená krv odobraná do heparínu (maximálne 10 IU/ml) a krv musí byť vyšetrená do 2 hodín po odbere. Heparín však tlmi

fagocytózu pri vysokých hodnotách. Ak sa používa EDTA, tá vychytáva kalciové ióny potrebné na aktiváciu buniek.

Pri tomto vyšetrení sa zisťuje **fagocytárna aktivita (FA) a fagocytárny index (FI)**.

- **Fagocytárna aktivita** predstavuje podiel fagocytujúcich neutrofilov zo 100. Uvádza sa v percentách.
- **Fagocytárny index** je počet pohltených častíc na jednu fagocytujúcu bunku.

Fagocytárny index sa lepšie odčítava, ak sa ako substrát používajú väčšie častice, napríklad sa môže použiť kvasinka *Candida albicans*. Ak by boli použité mikročastice MSHP, počítal by sa index oveľa ťažšie.

Pri týchto testoch sa zvyčajne hodnotí 100 buniek. Ak sa používajú mikročastice, ich štandardná veľkosť je 1 µm, sú hydrofilné, majú nízky negatívny náboj, preto majú minimálnu nešpecifickú adhéziu na bunkové povrchy a nízky sklon k spontánnej agregácii. To ich zvyhodňuje pred kvasinkami, ktoré majú tendenciu k zhlukovaniu. Pri použití kvasiniek je potrebné substrát poriadne pretrepať pred začatím testu. Na stanovenie sa používa plná krv, test trvá asi hodinu a prebieha pri teplote 37 °C. Počas celého procesu je potrebné zabezpečiť jemné pretrepávanie, aby častice neklesli na dno, ale zároveň musia mať fagocytujúce bunky relatívny klud na ingesciu častíc. Zo suspenzie sa potom zhotoví krvný náter a ten sa ofarbí. Intenzita fagocytózy sa potom hodnotí vo svetelnom mikroskope (obrázok 29).



**Obr. 29** Fagocytovaná *Candida albicans* ľudskými neutrofilmi (<http://www.jfmed.uniba.sk>)

**Fagocytárna aktivita vyjadruje percento fagocytov, ktoré prejavili schopnosť pohlcovať** mikroorganizmy alebo mikročastice. Vypočíta sa podľa vzorca:

$$FA \% = \frac{\text{počet fagocytujúcich PMNL}}{\text{počet PMNL schopných fagocytózy}} \times 100$$

**Fagocytárny index je priemerný počet mikroorganizmov alebo mikročastíc, ktoré pohltí jeden fagocyt.** Vypočíta sa podľa vzorca:

$$FI = \frac{\text{počet fagocytovaných (pohltých) častíc}}{\text{počet fagocytujúcich PMNL}}$$

Fyziologické hodnoty pre dospelého človeka sa pohybujú v rozmedzí:  $FA = 77,1 \pm 8,8 \%$

$$FI = 3,6 \pm 0,8$$

Referenčné hodnoty sa však môžu líšiť medzi jednotlivými laboratóriami.

Vyšetrovať sa môže aj proces fagocytózy ako celok, a nielen jednotlivé jej kroky. **Na testovanie všetkých fáz procesu fagocytózy až po finálny výsledok – usmrtenie pohltých mikroorganizmov sa používa baktericídny test.** Tento test závisí na dokončení všetkých krokov fagocytózy, a preto upozorní na poruchu niektorého z krokov fagocytózy alebo na kombinované poruchy viacerých krokov fagocytózy.

Pri fagocytóze dochádza k výraznej metabolickej aktivite fagocytytujúcich buniek, čo je možné prakticky využiť pri viacerých testoch. Používajú sa testy oxidatívneho vzplanutia – NBT a INT testy, chemiluminiscencia a prietoková cytometria.

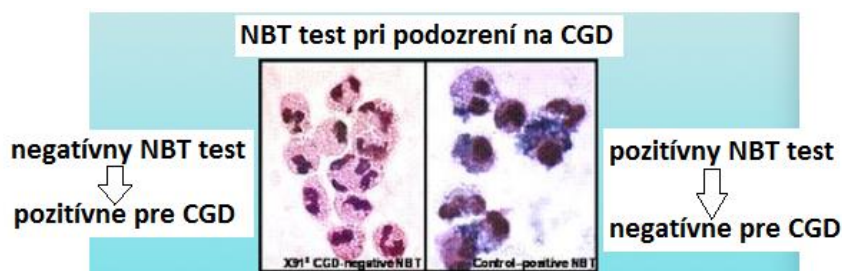
#### *Vyšetrovanie fagocytózy pomocou prietokovej cytometrie*

Pri vyšetrení fagocytárnej aktivity a fagocytárneho indexu **pomocou prietokovej cytometrie je test založený na meraní respiračného (oxidačného) vzplanutia granulocytov po ich stimulácii** inaktivovanými baktériami *Escherichia coli*. Po pohltí baktérie je vo fagocytoch aktivovaná NADPH-oxidáza, ktorá spustí respiračné vzplanutie. Vznikajú reaktívne medziprodukty vo vnútri fagocytov oxidujú dihydrorodamín 123 na fluorescenčný produkt rodamín 123, ktorý je detegovaný prietokovým cytometrom. Pri tomto vyšetrení sa vyžaduje krv odobraná do skúmavky s heparínom, lebo EDTA ruší stanovenie. Metóda umožňuje stanoviť FA % a FI. Vyšetrenie je indikované pri rôznych poruchách neutrofilov, vrátane cyklickej neutropénie, pri Kostmannovom syndróme, pri liečbe rastovými faktormi (G-CSF), aktívnych dysfunkciách, pri monitorovaní imunosupresívnej liečby, ktorá zasahuje neutrofile (cyklofosfamid, a iné myelotoxické látky), pri podozrení na chronickú granulomatóznú chorobu, uzlinový syndróm nejasnej etiológie, pri recidivujúcich stafylokokových infekciách kože a vnútorných orgánov, pri veľmi ťažkých stavoch ako je sepsa alebo konečné štádium nádorových ochorení.

#### *Vyšetrovanie fagocytózy pomocou testov oxidatívneho vzplanutia (NBT a INT testy)*

**NBT** (nitroblue tetrazolium) **testy a INT** (iod nitrotetrazolium) **testy** patria medzi testy redukcie tetrazoliových solí. **Diagnostikujú poruchy v NADPH-oxidázovom systéme.** Týmito testami je možné zachytiť chronickú granulomatóznú chorobu (CGD).

**Pri NBT teste** sa používa nitroblue tetrazolium chlorid – bezfarebná tetrazoliová soľ, ktorá sa oxidačnými pochodmi vo vakuolách fagocytov alebo na membránach fagocytov redukuje na farebný tmavomodrý formazán, ktorý sa ukladá vo forme kryštálov v cytoplazme fagocytov. Zmena zafarbenia sa deteguje pomocou svetelnej mikroskopie (obrázok 30). Hodnotí sa percento pozitívnych buniek, teda tých, ktoré obsahujú tmavomodré škvrny formazánu. Ďalšou možnosťou je spektrofotometrické hodnotenie intenzity vzniknutého zafarbenia, v tomto prípade sa pracuje v mikrotitračných doštičkách.



**Obr. 30** NBT test pri podozrení na CGD (chronickú granulomatóznú chorobu)  
(upravené podľa <http://quizlet.com/13101861/immuno-block-4-flash-cards/>)

**INT test** pracuje na obdobnom princípe ako NBT test. Namiesto nitroblue tetrazolium chloridu sa používa jód-nitroblue tetrazolium a test prebieha v mikrotitračných doštičkách. Výsledná farebná reakcia sa odčíta pomocou ELISA. Krv na vyšetrenie musí byť spracovaná do 2 hodín.

### *Vyšetrenie fagocytózy pomocou chemiluminiscencie*

Pri chemiluminiscenčných metódach sa **sleduje oxidatívne vzplanutie fagocytov**. Táto metóda je najvhodnejšia na kvantitatívne hodnotenie oxidatívneho vzplanutia. **Kľúčovým enzýmom je NADPH-oxidáza v membránach fagocytov**, ktorá prenáša elektrón na molekulový kyslík, čím sa tvorí superoxidový radikál. Z neho sa ďalej tvorí peroxid vodíka, ktorý predstavuje substrát pre myeloperoxidázu.

Počas týchto procesov dochádza ku vzniku elektrónovo excitovaných stavov, ktoré emitujú fotóny. **Pri chemiluminiscenčnom stanovení sú emitované fotóny zachytené tzv. luminoforom (luminol, izoluminol). Ten sa dostáva po prijatí fotónov do excitovaného stavu a vyžiari energiu v podobe svetla. Toto vyžiarované svetlo je detegované prístrojom luminometrom v impulzoch za minútu (cpm).**

Vzorky sa vyšetrujú vždy v pároch. Vyšetruje sa aj spontánna aktivita chemiluminiscencie, aj aktivita po stimulácii podnetom, ktorý aktivuje fagocyty (PMA – phorbol-myristát-acetát, zymozan alebo mikroorganizmy). Tieto aktívatory sú schopné priamo aktivovať proteínkinázu C a potom ďalej NADPH-oxidázu.

Vyšetrenie je vysoko citlivé. Umožňuje zachytiť širšie spektrum porúch fagocytózy ako NBT testy (aj defekty myeloperoxidázy). Krv sa odoberá do heparínu a má sa vyšetriť do 2 hodín od odberu. Touto metódou sa dajú sledovať aj zvýšené hodnoty oxidatívneho vzplanutia, hlavne spontánneho, ktoré sú pri rôznych zápalových procesoch, pri sepe alebo systémových zápaloch. Vplyvom vyššieho množstva vyprodukovaných kyslíkových radikálov môže preto dôjsť ku oxidatívnejmu poškodeniu vlastných buniek a tkanív v organizme jedinca.

Pri teste je potrebné brať do úvahy aj koncentráciu PMNL. Pri leukocytóze môžu byť falošne vysoké hodnoty a pri neutropénii falošne nízke hodnoty chemiluminiscencie (preto sa robí súčasne aj analýza krvného obrazu s diferenciálnym rozpočtom leukocytov). Táto metóda sa využíva skôr pre vedecko-výskumné účely, možno ňou sledovať ovplyvnenie fagocytózy rôznymi liekmi, chemikáliami a podobne.

### 2.7.7 Prečo sa vyšetruje fagocytárna aktivita?

Na potvrdenie alebo vylúčenie porúch fagocytózy pri primárnych alebo sekundárnych imunodeficitoch. Pri podozrení na primárnu poruchu fagocytárnej aktivity je vyšetrenie fagocytózy metódou prvej voľby. Ide o vrodené imunodeficity, ktoré sa klinicky prejavujú už v rannom detstve. Vzácné sa ľahšie formy môžu objaviť až v dospelosti. Ide však o veľmi závažné poruchy, ktoré bez včasnej a vhodnej liečby bezprostredne ohrozujú život pacienta.

**Z primárnych imunodeficitov je porucha fagocytózy pri:**

- chronickej granulomatóznej chorobe (defekt mikrobicídie v dôsledku chýbania NADPH-oxidázy, kedy vzniká nedostatočné množstvo peroxidu vodíka). Klinicky sa prejavuje závažnými infekciami a tvorbou granulómov v orgánoch.
- Pomerne rozšírený je defekt myeloperoxidázy, ktorý je sprevádzaný častými kandidózami.
- Defekt glutathionsyntetázy s poruchou regenerácie NADPH.
- Chediak-Highashiho syndróm s anomáliami granúl a poruchou degranulácie.
- Z ďalších sú to defekt glukóza-6-fosfátdehydrogenázy a
- porucha ingescie.

**Sekundárne imunodeficity** sú vyvolané pôsobením vonkajšieho prostredia alebo liečebnými zásahmi. Vyšetrovať fagocytárnu aktivitu sa odporúča na monitorovanie klinického stavu pri liečbe imunosupresívami (kortikosteroidy a pod.), cytostatikami (cyklofosfamid a iné myelotoxické lieky), cytokínmi, rastovými faktormi (G-CSF, GM-CSF, INF- $\gamma$ , TNF). Vyšetrenie sa tiež doporučuje po transplantácii kmeňových hematopoetických buniek a pri syndróme zápalovej odpovede – SIRS.

**Zníženie fagocytárnej aktivity signalizuje riziko infekcie až sepsy.**

### 2.7.8 Kedy sa vyšetruje fagocytárna aktivita?

Vyšetrenie je vhodné u osôb, u ktorých sa objavili nasledujúce komplikácie:

- Recidivujúce a chronické infekcie kože a slizníc (pyodermie, abscesy, impetigá kože, diseminované kandidózy, chronické furunkulózy, lokalizované hnisavé zápaly)
- Infekcie lymfatických uzlín
- Gingivitídy, aftózne stomatitídy
- Infekcie dýchacích ciest (otitídy, sínusitídy, bronchitídy)
- Gynekologické zápaly
- Osteomyelitídy, meningitídy
- Sepsy
- BCG-itída po očkovaní proti tuberkulóze
- V prípade, ak sú tieto infekcie vyvolané pyogénnymi baktériami, plesňami, kvasinkami a parazitmi. Predovšetkým stafylokokmi (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*), enterobaktériami (*Escherichia coli*, *Klebsiella*

*pneumoniae*), *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Streptococcus pneumoniae*, intracelulárnymi baktériami.

Čo sa týka výpovednej hodnoty týchto testov, je vymedzená skôr na meranie znížených hodnôt. Zvýšenie hodnôt je ťažké identifikovať, lebo každý fagocyt je schopný fagocytózy, ak je mu dodaný substrát v nadbytku, môže byť pri prebiehajúcich akútnych infekciách.

**K zníženiu fagocytózy dochádza pri veľmi vážnych stavoch.** Napríklad v konečných štádiách nádorových ochorení, dlhotrvajúcich bakteriálnych infekciách, pri ťažkých imunodeficitoch. Nízku schopnosť fagocytovať majú aj mladé nezrelé formy neutrofilov – tyčky. Väčšie využitie majú tieto testy skôr vo výskume, napríklad v toxikológii, farmakológii.

## Otázky k samohodnoteniu

1. Komplement predstavuje jeden z efektorových systémov ktorej zložky imunity? Akými cestami sa môže aktivovať komplement? Čo je konečným výsledkom kaskádovej aktivácie komplementu?
2. Ktoré zložky komplementu sa v praxi zvyčajne stanovujú? Ktorá laboratórna metóda sa používa na ich stanovenie? Prečo sa stanovuje celková aktivita komplementu? Čo je to hemolytická jednotka?
3. Čo je to lyzozým? Aký má význam? Aký je princíp metódy na stanovenie lyzozýmu? Ktoré mikroorganizmy je možné použiť pri stanovení lyzozýmu?
4. Čo je prirodzená baktericídna aktivita séra? Ako sa inaktivuje sérum? Má čerstvé sérum silnejšiu alebo slabšiu baktericídnu aktivitu ako inaktivované sérum? Môže byť baktericídna aktivita séra ovplyvnená liečbou antimikrobiálnymi látkami?
5. Ktoré proteíny akútnej fázy zápalu sa v praxi najčastejšie stanovujú? Akými metódami sa môže stanoviť hladina CRP?
6. Čo je to fagocytóza? Ktoré bunky patria medzi profesionálne fagocyty? Aký je vlastný proces fagocytózy – jej jednotlivé kroky?
7. Popíšte princíp stanovenia fagocytárnej aktivity a fagocytárneho indexu pomocou svetelnej mikroskopie. Čo je fagocytárna aktivita? Čo je fagocytárny index?
8. Aké iné metódy sa používajú na vyšetrenie fagocytózy? Prečo a kedy sa vyšetruje fagocytóza?

# 3 METÓDY POUŽÍVANÉ NA VYŠETRENIE ZLOŽIEK HUMORÁLNEJ IMUNITY

## 3.1 SÉROLOGICKÉ REAKCIE

Diagnostika infekčných ochorení sa uskutočňuje metódami priamej a nepriamej diagnostiky. Priama diagnostika je vizualizácia pôvodcu infekčného ochorenia pomocou mikroskopie, kultivácie, detekcie antigénu, detekcie genetického materiálu. Nepriama diagnostika je detekcia reakcie makroorganizmu na prítomnosť mikroorganizmu. Tá sa uskutočňuje buď v oblasti bunkovej imunity pomocou kožných testov alebo v oblasti humorálnej imunity pomocou dôkazu špecifických protilátok sérologickými reakciami.

**Sérologické reakcie sú reakcie medzi antigénom (Ag) a protilátkou (Ab), ktoré prebiehajú v určitom prostredí (*in vivo* – v organizme alebo *in vitro* – v laboratórnych podmienkach).** Sérologické reakcie sa zaraďujú medzi metódy na vyšetrenie humorálnej imunity. Vlastnosťou antigénu a protilátky je, že **sa viažu špecificky**. To znamená, že na základe jednej zložky reakcie sa môže identifikovať druhá zložka reakcie. Napríklad, ak chceme dokázať antigén, použijeme séra so známymi protilátkami (polyklonálne, monoklonálne protilátky). Naopak, ak chceme dokázať protilátky, použijeme známy antigén.

## 3.2 ANTIGÉN

**Antigén (Ag) je cudzorodá látka, ktorá po vniknutí do organizmu vyvolá špecifickú imunitnú odpoveď.** Antigénmi môžu byť napríklad baktérie, vírusy, huby, parazity alebo ich časti, rôzne vysokomolekulové organické látky (bielkoviny, glykolipidy, polysacharidy), chemikálie, peľ a podobne.

Časť molekuly antigénu, proti ktorej je namierená imunitná odpoveď, sa nazýva **epitop**. Označuje sa tiež ako **antigénny determinant**. Je to väzbové miesto, na ktoré sa špecificky viaže príslušná protilátka.

**Špecifita antigénu** je daná vytvorením protilátok, ktoré reagujú len s daným antigénom (ktorý navodil ich tvorbu). Nešpecifické (heterofilné) antigény sú také antigény, ktoré navodili tvorbu protilátok reagujúcich aj s rôznymi podobnými antigénmi (skrížená reakcia).

### *Imunogény a haptény*

**Antigény, ktoré vyvolajú imunitnú odpoveď sa nazývajú imunogény.** Nie všetky antigény sú imunogénne. Veľmi malé antigény tzv. **haptény** nedokážu samé osebe vyvolať imunitnú odpoveď. Až po väzbe na inú väčšiu imunogénnu molekulu (teda na nosič) sa stávajú imunogénnymi a získajú schopnosť indukovať imunitnú odpoveď. V tomto prípade je nosič zodpovedný za imunogénnosť a haptén za špecifickosť imunitnej

reakcie. Hoci sú samotné haptény neimunogénne, s protilátkami však reagovať dokážu. Dobrými imunogénmi bývajú molekuly bielkovín, menej polysacharidy, lipidy a nukleové kyseliny zvyčajne až po väzbe na proteíny.

### **Rozdelenie antigénov**

Antigény sa delia:

- na prirodzené (nachádzajú sa v prírode) a
- syntetické (pripravené umelo v laboratóriu).

Tiež sa delia na:

- exogénne antigény pochádzajú z vonkajšieho prostredia.
- endogénne antigény (autoantigény, autológne antigény) sú súčasťou vlastných buniek a tkanív (napr. jadrové, cytoplazmatické antigény).

**Superantigén** je schopný navodiť aktiváciu veľkého množstva lymfocytov (napr. stafylokokový enterotoxín, toxín syndrómu toxického šoku).

**Alergén** je schopný vyvolať u citlivého človeka patologickú imunologickú reakciu.

Podľa rozpustnosti rozlišujeme antigény na korpuskulárne (nerozpustné) a koloidné (rozpustné).

- ❖ Medzi **korpuskulárne antigény** patria napríklad baktérie, vírusy, kvasinky, latexové častice, erytrocyty a pod.
- ❖ Medzi **koloidné antigény** patria bakteriálne toxíny, enzýmy, extrakty mikroorganizmov a pod.

## **3.3 PROTILÁTKY**

**Protilátky (Ab) sú zložené molekuly bielkovín (imunoglobulíny), ktoré sú podukované klonmi plazmatických buniek ako odpoveď na prítomnosť antigénov.** Protilátky sú schopné identifikovať a zneškodniť cudzorodé látky (baktérie, vírusy, ale aj transplantované orgány atď.) v organizme. S antigénom sa špecificky viažu a neutralizujú jeho funkciu tým, že táto väzba vyvolá ďalšie reakcie, ktoré odstránia antigén (aktivácia komplementu, makrofágov...). Behring a Kitaso v 19. storočí zistili, že krvné sérum imunizovaných zvierat obsahovalo špecifické protilátky, ktoré sa viazali na antigén, ktorý vyvolal ich tvorbu.

Medzi základné pojmy, ktoré sa používajú pri sérologických reakciách patria afinita a avidita protilátky.

- **Afinita protilátky** vyjadruje silu väzby medzi jedným epitopom určitého antigénu a väzbovým miestom protilátky. Súvisí so špecifitou protilátok. Afinita rastie v priebehu imunitnej odpovede na špecifický antigénny podnet.
- **Avidita protilátky** vyjadruje silu interakcie polyvalentnej protilátky s polyvalentným antigénom. Vzrastá s afinitou aj s počtom súčasne sa uplatňujúcich väzbových miest.

### Čo je sérum a plazma?

Protilátky, ktoré reagujú s antigénom sa nachádzajú vo vyšetrovaných sérach.

- ✓ **Sérum je tekutina, ktorú získame po centrifugácii zrazenej krvi.** Je to žltkastá tekutina zbavená krvných buniek. Zložením zodpovedá krvnej plazme, ale narozdiel od nej neobsahuje fibrinogén a zrážacie faktory krvi.
- ✓ **Plazma obsahuje zrážacie faktory, lebo sa získava po centrifugácii nezrazenej krvi.** Na prípravu séra sa odoberá za aseptických podmienok venózna krv, nalačno, v objeme 5 -10 ml do skúmavky bez pridania protizrážanlivých prostriedkov (bez heparínu alebo EDTA).

Vyšetrované séra nesmú byť hemolytické, chylózne, bakteriálne kontaminované, ani opakovane rozmrazované a zmrazované. Potrebné je sérum spracovať ihneď, pretože by inak došlo k zmene niektorých ukazovateľov ich degradáciou. Pokiaľ spracovanie séra nie je možné vykonať ihneď, môže sa zmraziť na dlhšiu dobu pri teplote  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## 3.4 SÉROLOGICKÉ REAKCIE

### 3.4.1 Fázy sérologických reakcií

Každá sérologická reakcia má dve fázy: špecifickú a nešpecifickú.

- **Pri špecifickej fáze** reaguje protilátka so špecifickým antigénom.
- **Pri nešpecifickej fáze** dochádza k vizualizácii vzniknutého imunokomplexu.

Dôležitú úlohu zohráva vzájomný pomer antigénu a protilátky v reakcii, prostredie, v ktorom reakcia prebieha a spôsob vizualizácie. V závislosti od týchto podmienok sa označujú sérologické reakcie rôznymi názvami.

**Podľa použitého antigénu**, ktorý môže byť korpuskulárny (nerozpustný) alebo koloidný (rozpustný), rozlišujeme niekoľko základných typov sérologických reakcií, a to aglutináciu, precipitáciu a komplement fixáciu (väzbu komplementu). **Podľa techniky** použitej na vizualizáciu výsledku, kedy sú zložky sérologických reakcií značené rôznymi markermi, rozlišujeme napríklad fluorescenciu, enzýmovú imunoanalýzu, rádioimunoanalýzu a pod. **Prostredie**, v ktorom sérologická reakcia môže prebiehať, je kvapalné alebo gélové (pripravené z agaru alebo agarózy).

### 3.4.2 Využitie sérologických reakcií

Sérologické reakcie možno využiť v priamej diagnostike a nepriamej diagnostike.

- **V priamej diagnostike** slúžia na priamy dôkaz antigénu, tzn. pri dôkaze infekčných vyvolávateľov (ich antigénov) vo vyšetrovanom materiáli pomocou známych protilátok (sérotypizácia kmeňa získaného kultiváciou vzorky).
- **V nepriamej diagnostike** ich možno využiť pri dôkaze špecifických protilátok v biologickom materiáli od pacienta ako dôkaz protilátkovej odpovede organizmu, a to pomocou známeho antigénu.

### 3.4.3 Hodnotenie sérologických reakcií

Hodnotenie sérologických reakcií je kvalitatívne a kvantitatívne.

- **Pri kvalitatívnom hodnotení** sa stanovuje pozitivita alebo negativita porovnaním s hraničnými referenčnými hodnotami.
- **Pri kvantitatívnom hodnotení** sa stanovuje titer protilátok. Titer protilátok je prevrátená hodnota najvyššieho riedenia séra, v ktorom došlo k pozitívnej reakcii s antigénom. Súvisí teda s koncentráciou určovanej protilátky v sére alebo iných biologických tekutinách. Napríklad pri zistení najvyššieho riedenia séra s pozitívnou reakciou je 1:160, potom titer bude 160.

Sleduje sa **dynamika tvorby protilátok**, odoberajú sa **minimálne dve vzorky séra v odstupe zvyčajne 14 dní**. Určujú sa tiež jednotlivé triedy imunoglobulínov: IgM, IgA – včasné protilátky, IgM dominujú v primárnej imunitnej odpovedi a sú markerom akútneho ochorenia. Inak povedané dôkaz týchto špecifických IgM znamená práve prebiehajúcu alebo nedávno prebehnutú infekciu. Nález špecifických IgG protilátok znamená, že k infekcii došlo už pred dlhšou dobou. Môžu pretrvávať v sére niekoľko mesiacov, niekedy rokov alebo celý život. Výsledky sérologických laboratórnych metód je treba posudzovať komplexne so zreteľom na klinický stav pacienta a výsledky ostatných vyšetrení.

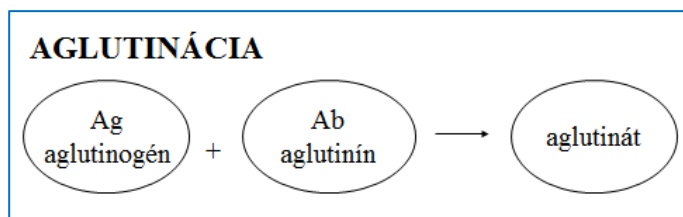
**O dôkaze akútneho ochorenia svedčí:**

- **štvornásobný vzostup titra**,
- **sérokonverzia** (zvrät zo stavu séronegativity na séropozitivitu voči špecifickému antigénu) alebo
- **dôkaz prítomnosti špecifických IgM protilátok**.

Na začiatku ochorenia môže nepriamy dôkaz vyvolávateľa pomocou sérologických reakcií vykazovať negatívny výsledok aj napriek tomu, že infekcia práve prebieha. Ide o **falošnú negativitu**. Protilátky je možné dokázať až po určitom čase. Časový interval od začiatku infekcie do obdobia, kedy je možné pôvodcu detegovať sérologickým vyšetrením protilátok sa volá **sérologické diagnostické okno**. Je závislé od dĺžky sérokonverzie. Poznanie dĺžky diagnostického okna je dôležité z epidemiologického hľadiska pri šírení závažných infekcií, tiež pri vyšetrovaní darcov krvi, transplantáciách orgánov a pod. **Počas intervalu sérologického diagnostického okna nie je možné spoľahlivo diagnostikovať infekciu u pacienta pomocou nepriamych sérologických vyšetrení**. Je však možné použiť priame diagnostické metódy (detekcia antigénu, nukleovej kyseliny...).

## 3.5 AGLUTINÁCIA

**Aglutinácia je sérologická reakcia, pri ktorej reaguje korpuskulárny (nerozpustný) antigén (aglutinogén) so špecifickou protilátkou (aglutinínom) v určitom prostredí (fyziologický roztok) za vzniku aglutinátu (obrázok 31).** Aglutinín je protilátka schopná vyvolať aglutináciu (zhlukovanie) korpuskulárnych antigénov (alebo korpuskulárnych častíc s naviazanými antigénmi).



**Obr. 31** Aglutinácia (vlastné spracovanie)

### 3.5.1 Rozdelenie aglutinačných reakcií

Aglutinácie sa delia na priame a nepriame.

**Pri priamej aglutinácii** je suspenzia antigénu tvorená priamo časticami, na povrchu ktorých sa prirodzene vyskytujú skúmané epitopy (napríklad povrchové antigény baktérií). **Pri nepriamej aglutinácii** sa naväzuje – adsorbuje antigén na povrch vhodných makromolekulových častíc. Vhodnými nosičmi sú erytrocyty a latexové častice.

### 3.5.2 Priame aglutinácie

**Pri priamej aglutinácii sa riedi sérum geometrickým radom** a k nariedenému séru sa **pridáva štandardné množstvo známeho antigénu**. Slúži na dôkaz prítomnosti protilátok. Jej využitie je napríklad na dôkaz protilátok pri týfuse, paratýfuse, salmonelózach (Widalova reakcia), pri škvrnitom týfuse (Weil-Felixova reakcia), slúži aj na dôkaz protilátok pri brucelóze, tularémii, listerióze, yersinióze, dyzentérii, cholere a pod.

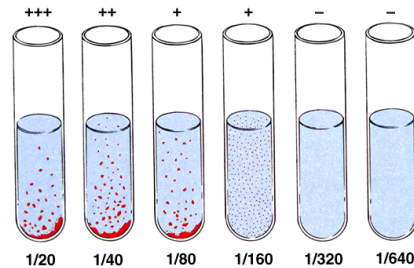
#### Widalova reakcia

Widalova reakcia je **klasická skúmavková aglutinačná metóda**. Je to **kvantitatívna metóda, ktorá sa opiera o dôkaz protilátok proti jednotlivým salmonelovým antigénom** (bičikový H, somatický O a kapsulárny Vi antigén). Sérologická diagnostika je založená na stúpajúcom titri, preto je vhodný párový odber v intervale 7 - 10 dní. Diagnostický význam má potom aspoň štvornásobný vzostup titra. Pri salmonelózach existuje značná skrížená reaktivita medzi jednotlivými H a O antigénmi pri tvorbe protilátok. Preto možno uvedenými H a O antigénmi diagnostikovať protilátkovú odpoveď proti najčastejším salmonelám, ktoré u nás spôsobujú ochorenia.

**Postup:** Pri Widalovej reakcii sa sérum pacienta riedi izotonickým roztokom chloridu sodného geometrickým radom a do každej skúmavky sa pridá (pri dôkaze protilátok proti bičikovému H antigénu) salmonelový H antigén. Pri dôkaze protilátok proti H antigénu sú potom výsledné riedenia séra v 11 skúmavkách 1:50, 1:100, 1:200 atď. Ak sa dokazujú protilátky proti somatickému O antigénu, pridáva sa salmonelový O antigén a výsledné riedenia sú v 11 skúmavkách 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 atď. Pri dôkaze protilátok proti kapsulárnemu Vi antigénu sa pridáva Vi antigén a sérum je nariedené do 8 skúmaviek od 1:20, 1:40 až po 1:2560. Diagnostický H antigén sa získava z bujónovej kultúry príslušného sérotypu salmonely po usmrtení formaldehydom. Diagnostický O antigén sa získava po usmrtení bakteriálnej suspenzie etanolom a diagnostický Vi antigén sa získava po usmrtení suspenzie agarovej kultúry *Salmonella typhi* obsahujúcej antigénnu zložku Vi použitím formaldehydu. Skúmavky s H antigénom sa inkubujú vo vodnom kúpeli 2 hodiny

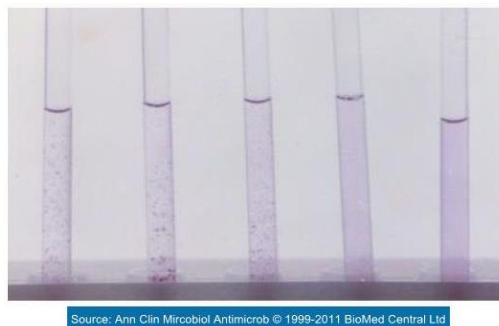
pri teplote 50-56 °C. Skúmavky s O antigénom sa inkubujú vo vodnom kúpeli 20-24 hodín pri teplote 50-56 °C. Skúmavky s Vi antigénom sa inkubujú 2 hodiny pri teplote 37 °C.

**Výsledok:** Ako kompletná pozitívna reakcia sa hodnotí reakcia v skúmavke, kde je supernatant úplne číry a na dne skúmavky sa nachádza sediment, ktorý je po zvrátení ťažko roztrepateľný. Je makroskopicky viditeľný aglutinát vo forme drobných jemných zrníčok alebo vločkovitých zhlukov. V kontrolnej skúmavke (bez séra) musí byť homogénny zákal bez prítomnosti aglutinátu (obrázok 32, 33, 34).

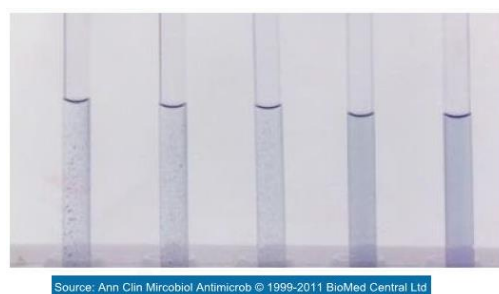


**Obr. 32** Widalova reakcia schematické znázornenie (titer = 160)

([http://biology.missouristate.edu/faculty\\_pages/MyersR/BIO%20520%20Lectures/Chapter%2015%20and%2016.html](http://biology.missouristate.edu/faculty_pages/MyersR/BIO%20520%20Lectures/Chapter%2015%20and%2016.html))



**Obr. 33** Pozitívna Widalova reakcia s H antigénmi  
(upravené podľa: <http://www.medscape.com/viewarticle/738531>)



**Obr. 34** Pozitívna Widalova reakcia s O antigénmi  
(upravené podľa: <http://www.medscape.com/viewarticle/738531>)

Medzi novšie metódy, ktoré boli vyvinuté ako rýchla a spoľahlivá alternatíva Widalovej reakcie patria IDL Tubex<sup>®</sup>, ktorý dokáže detegovať protilátky IgM O9 v priebehu pár minút. Ďalej Typhidot<sup>®</sup>, ktorý v priebehu 3 hodín deteguje špecifické IgM a IgG protilátky proti 50 kD antigénu *Salmonella typhi*. Novšia verzia tohto testu Typhidot

– M<sup>®</sup> bola vyvinutá len na detekciu špecifických IgM, test je založený na väzbe *S. typhi* so špecifickými IgM protilátkami.

### Spätná aglutinácia (sérotypizácia)

Pri spätnej aglutinácii sa určuje antigénna štruktúra baktérií, čo slúži na ich presnú identifikáciu – na sérotypizáciu neznámej antigénnej štruktúry baktérií. Ide o rýchly test, pri ktorom sú známe protilátky zmiešané s antigénmi testovaných baktérií na sklíčku a pozoruje sa vznik aglutinátu. Keďže reakcia prebieha na sklíčku, známa je tiež pod názvom sklíčková (spätná) aglutinácia. Sklíčková aglutinácia má široké využitie napríklad: na identifikáciu kmeňov rodu *Salmonella*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Francisella tularensis* a pod. Na sklíčkovú aglutináciu sa používajú hyperimúnne zvieracie séra (tzv. antiséra), ktoré obsahujú protilátky (aglutiníny) proti príslušným bakteriálnym antigénom. Aby bola zabezpečená čo najdlhšia aktivita a stabilita sér, sú lyofilizované. Séra sa rozpúšťajú v priloženom riediacom roztoku. Dostupné sú **polyvalentné a monovalentné diagnostické aglutinačné séra**. Polyvalentné obsahujú niekoľko zložiek v jednej fľaštičke. Monovalentné obsahujú v jednej fľaštičke iba jedno sérum. Najskôr sa robí aglutinácia s polyvalentnými sérami a ak je pozitívna, pokračuje sa aglutináciou s jednotlivými sérami, ktoré boli obsiahnuté v príslušnom polyvalentnom sére.

**Postup:** Je založený na miešaní zložiek reakcie na odmastenom podložnom sklíčku. Na sklíčko sa naniesie bakteriologickou kľučkou masa baktérií a rozotrie sa v kvapke fyziologického roztoku, až kým vznikne homogénna mliečna suspenzia bez zhlukov (tie by mohli inak simulovať aglutinát). Z tejto suspenzie sa odoberú 2-3 kvapky a nanesú sa na druhé sklíčko. Následne sa pridá diagnostické sérum a dôkladne sa zo suspenziou premieša. Pracuje sa asi na ploche 2 x 1 cm. Krúživým pohybom sklíčka by mala nastať aglutinácia do jednej minúty. Pozitívna aglutinácia sa prejaví vznikom zreteľných zhlukov rôzneho charakteru (v závislosti od vyšetrovanej kultúry) a tekutina je úplne alebo čiastočne vyčírená.

**Výsledok:** Najlepšie sa odčíta oproti svetlu alebo na čiernom podklade (obrázok 35). Na základe aglutinácie s monovalentným sérom sa určí sérotyp vyšetrovanej baktérie.



**Obr. 35** Spätná aglutinácia (sklíčková), vľavo pozitívna reakcia (zreteľné zhluky), vpravo negatívna reakcia (homogénna mliečna suspenzia)

([http://www.ssi.dk/English/SSI%20Diagnostica/Products%20from%20SSI%20Diagnostica/Antisera\\_antibodies/Salmonella%20antisera/Salmonella%20H%20antisera.aspx](http://www.ssi.dk/English/SSI%20Diagnostica/Products%20from%20SSI%20Diagnostica/Antisera_antibodies/Salmonella%20antisera/Salmonella%20H%20antisera.aspx))

### Chladová aglutinácia

Pri niektorých ochoreniach ako sú **atypická pneumónia, infekčná mononukleóza, hemolytická anémia**, sa v sére u ľudí dokazujú chladové aglutiníny chladovou aglutináciou. **Chladové aglutiníny majú schopnosť aglutinovať ľudské erytrocyty skupiny 0 pri chladničkovvej teplote (0-5 °C)**. Pri vyššej teplote túto schopnosť strácajú. Na vyšetrenie sa odoberá krv od pacienta, nechá sa zraziť pri izbovej teplote a odoberie sa sérum. Po nariadení séra geometrickým radom sa do každej skúmavky pridá suspenzia ľudských erytrocytov skupiny 0. Vloží sa do chladničky a po 24 hodinách sa reakcia odčíta. Prítomnosť chladových aglutinínov sa prejaví vznikom aglutinátu. Tento aglutinát však vymizne po inkubácii vo vodnom kúpeli pri teplote 37 °C.

### Fenomén prozóny

Pri ohodnotení aglutinačných reakcií v skúmavkách možno niekedy pozorovať, že **v nižších riedeniach séra pacienta (kde je ešte vysoké množstvo protilátky), sa vytvárajú iba malé imunokomplexy, nedôjde ku vzniku priestorovo usporiadaného aglutinátu, a preto sa makroskopicky javia ako negatívne**. Tento jav sa označuje ako fenomén prozóny. Môže to byť podmienené napríklad prítomnosťou inkompletných protilátok alebo blokujúcich protilátok. Inkompletné protilátky sa síce dokážu naviazať na antigén, ale nedôjde k sekundárnej fáze reakcie, a teda neprebehne vizualizácia sérologickej reakcie. Blokujúce protilátky sa zas dokážu naviazať na antigén rýchlejšie ako normálne protilátky. Ak je takýchto protilátok v sére veľa, naviažu sa na pridaný antigén a znemožnia väzbu normálnych protilátok.

### 3.5.3 Nepriame aglutinácie

Pri nepriamej aglutinácii je **antigén naviazaný na povrch vhodnej makromolekulovej častice, ktorá sa označuje ako nosič**. Najčastejšie sa používajú **erytrocyty alebo latexové častice**. Najznámejším príkladom nepriamej aglutinácie je hemaglutinácia a latexová aglutinácia.

### Hemaglutinácia

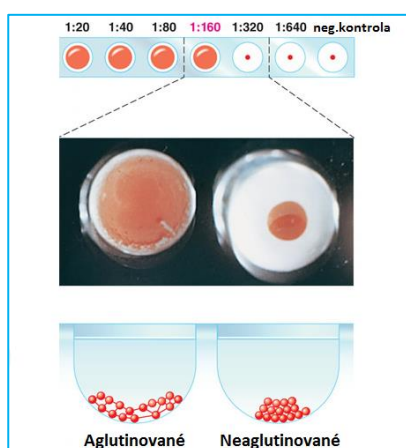
Hemaglutinácia je citlivá sérologická metóda, ktorá sa používa na dôkaz protilátok pri rôznych infekčných ochoreniach. **Pri hemaglutinácii sa zväčša používa suspenzia baraních formalizovaných erytrocytov, ktoré sa môžu senzibilizovať rôznymi rozpustnými antigénmi (hemantigénmi)**. Suspenzia formalizovaných erytrocytov sa môže (narozdiel od čerstvých erytrocytov) dlhodobo skladovať a majú aj lepšiu adsorbčnú schopnosť, čo ich zvyhodňuje pred použitím čerstvých erytrocytov. Komerčne pripravené formalizované erytrocyty (alebo čerstvé erytrocyty) možno senzibilizovať hemantigénom. Hemantigén je lyofilizovaný extrakt rôznych mikroorganizmov. Extrakty sú vhodne upravené, takže po rozpustení majú optimálnu koncentráciu potrebnú na senzibilizáciu erytrocytov.

**Možnosti využitia hemaglutinácie** sú veľmi široké. Môže sa uplatniť aj v diagnostike pohlavne prenosných ochorení, napr. syfylistu. Ide o TPHA test (*Treponema pallidum* hemaglutinačný test). Je to špecifický test, ktorý zachytáva celkové treponémové

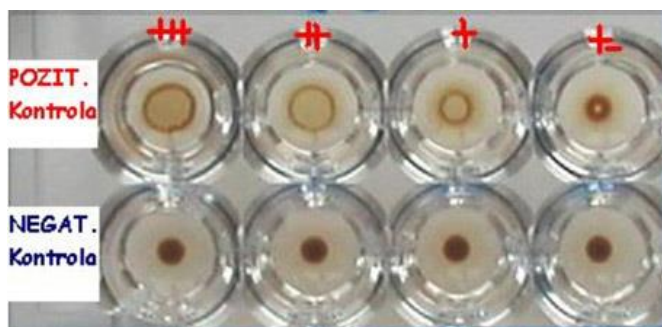
protilátky. Využíva sa pri podozrení na syfylis, ale aj v počas tehotenstva na vylúčenie infekcie tehotnej ženy, pretože v pozitívnom prípade hrozí intrauterinná infekcia s teratogénnymi následkami. Pozitívny nález TPHA protilátok si vyžaduje konfirmáciu, aby bolo možné potvrdiť akútne, prípadne liečené ochorenie na syfylis. Antigén *Treponema pallidum* (Nicholsov kmeň) je naviazaný v tomto prípade na morčacie erytrocyty a v sére pacienta hľadáme treponémové protilátky.

**Pozitívna hemaglutinácia sa prejaví vznikom aglutinátu v mikrotitračných doštičkách**, ktorý sa javí ako zhluk s nerovnomerne ohraničenými okrajmi na dne jamky.

**Negatívna reakcia sa prejaví ako sediment erytrocytov v tvare gombíka na dne jamky** s kompaktnými a rovnomernými okrajmi (obrázok 36, 37).



**Obr. 36** Princíp hemaglutinácie (upravené podľa © 2013 Pearson Education, Inc)  
(<http://classes.midlandstech.edu/carterp/Courses/bio225/chap18/lecture3.htm>)



**Obr. 37** TPHA test – pozitívna a negatívna reakcia pri hemaglutinácii  
(<http://www.medmicro.info/portal/syphilis/lv13/ch09s05.html>)

### Latexová aglutinácia

Latexová aglutinácia je **nepriama aglutinácia**, ktorá je používaná v rámci rýchlych testov umožňujúcich získanie orientačného výsledku v priebehu niekoľkých minút.

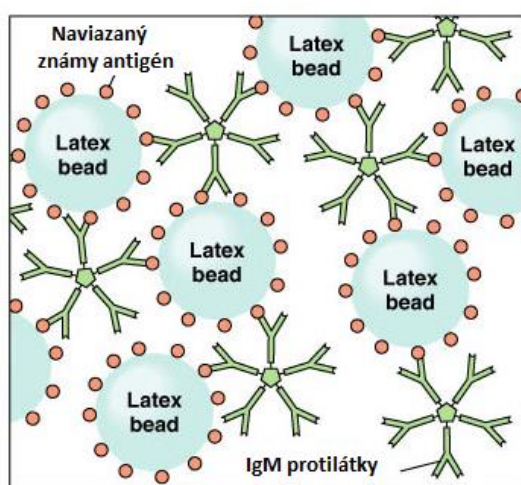
Využíva sa napríklad pri vyšetrení mozgovomiechového moku **pri podozrení na bakteriálnu meningitídu**. Latexovou aglutináciou sa dokazujú najbežnejšie patogénne mikroorganizmy pri bakteriálnej etiológii meningitíd (vyvolaných *Neisseria meningitidis*,

*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli* a *Streptococcus agalactiae*). Ak je v likvore prítomný niektorý z patogénov, vzniká aglutinácia.

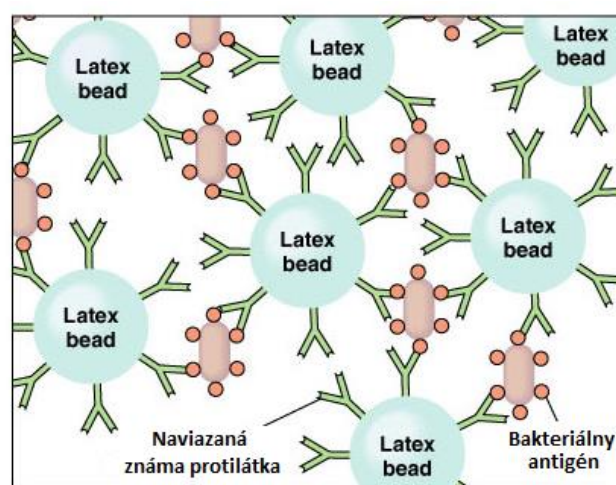
Latexová aglutinácia má široké využitie, napr. na dôkaz rotavírusov v stolici, sérologickú typizáciu kmeňov *Neisseria gonorrhoeae*, dôkaz *Staphylococcus aureus* a pod.

Pomocou latexovej aglutinácie sa môže zistiť prítomnosť protilátok aj antigénov.

- Na **dôkaz protilátok** je potrebné, aby boli na latexové častice naviazané známe antigény.
- Ak chceme **dokázať antigény mikroorganizmov**, na latexové častice musia byť naviazané známe špecifické protilátky (obrázok 38, 39).

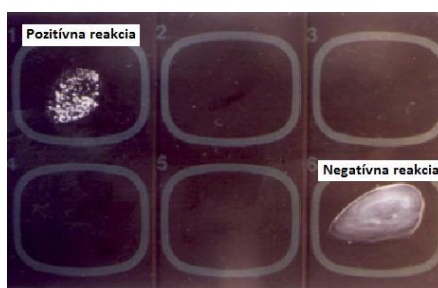


Reakcia pri pozitívnej latexaglutinácii na dôkaz protilátok. Na latexové častice sú naviazané antigény. Prítomnosť aglutinácie indikuje prítomnosť protilátok, v tomto prípade IgM.



Reakcia pri pozitívnej latexaglutinácii na dôkaz antigénov. Na latexové častice sú naviazané monoklonálne protilátky. Prítomnosť aglutinácie indikuje prítomnosť antigénov.

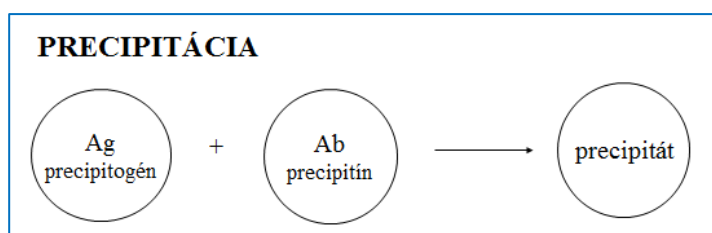
**Obr. 38** Využitie latexovej aglutinácie na dôkaz prítomnosti protilátok alebo antigénov (upravené podľa © 2013 Pearson Education, Inc. Publishing as Benjamin Cummings)  
([http://classes.midlandstech.com/carterp/Courses/bio225/chap18/18-06\\_IndirectAgglut\\_1.jpg](http://classes.midlandstech.com/carterp/Courses/bio225/chap18/18-06_IndirectAgglut_1.jpg))



**Obr. 39** Latexová aglutinácia – zhodnotenie vzhľadu reakcie (pozitívna reakcia = zhluky, negatívna reakcia = suspenzia) (<http://www.jfmed.uniba.sk>)

## 3.6 PRECIPITÁCIA

**Precipitácia** je reakcia, pri ktorej **reaguje koloidný (rozpustný) antigén** (precipitogén) **so špecifickou protilátkou** (precipitínom) **v určitom prostredí** (fyziologický roztok, gél) **za vzniku imunokomplexu, ktorý sa nazýva precipitát** (obrázok 40). Hlavnou súčasťou precipitátu sú protilátky, preto sa pri precipitáciách zvyčajne riedi antigén.

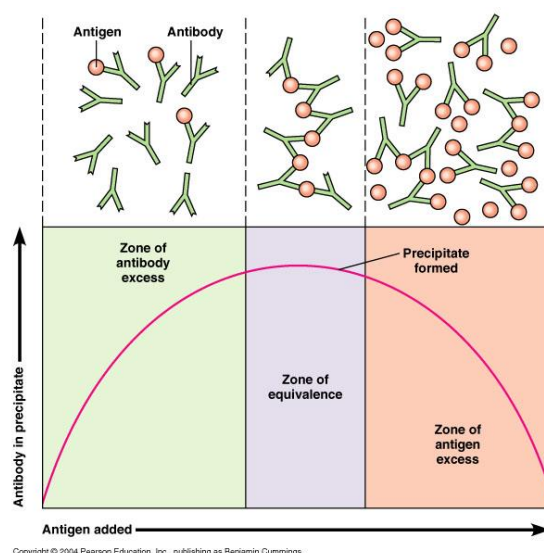


**Obr. 40** Precipitácia (vlastné spracovanie)

### 3.6.1 Zóna ekvivalencie

Reakcia môže prebiehať v tekutom alebo gélovom prostredí. Veľkosť precipitátu závisí od koncentrácie antigénu a protilátky. **Množstvo precipitátu** sa znižuje jednak pri nadbytku antigénu ako aj pri nadbytku protilátky v reakcii.

Najviac precipitátu sa vytvorí v **zóne ekvivalencie**, kde **dochádza k úplnému vyviazaniu antigénov a protilátok**. Grafické znázornenie tvorby precipitátu v závislosti od koncentrácie antigénu za použitia konštantného množstva protilátok znázorňuje krivka precipitácie (obrázok 41).

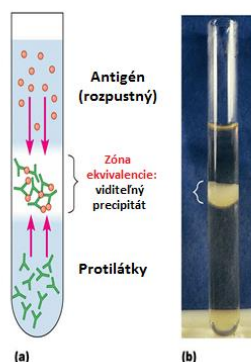


**Obr. 41** Krivka precipitácie so zónou ekvivalencie

([http://classes.midlandstech.com/carterp/Courses/bio225/chap18/18-02\\_Precipitation\\_1.jpg](http://classes.midlandstech.com/carterp/Courses/bio225/chap18/18-02_Precipitation_1.jpg))

### 3.6.2 Precipitácie v tekutom prostredí

Precipitácia môže prebiehať v tekutom prostredí, najjednoduchším typom takejto reakcie je **prstencová precipitácia (ring test)**, pri ktorej sa **na styčnej ploche vytvára precipitačný prstenec**. Využíva sa napríklad v Ascoliho termoprecipitácii na dôkaz antigénov *Bacillus anthracis*, kedy sa z vyšetrovaného materiálu (kúska tkaniva, hlavne sleziny) povarením vo fyziologickom roztoku pripraví extrakt. V extrakte sa dokazuje polysacharidový antigén *B. anthracis*. Extrakt sa podvrství sérom s protiantraxovými protilátkami – antraxovým antisérom. Na styčnej ploche sa vytvorí precipitačný prstenec (obrázok 42). Pri precipitácii v tekutom prostredí sa intenzita vytvoreného zákalu môže merať turbidimetricky (kedy sa meria množstvo prechádzajúceho svetla) alebo nefelometricky (kedy sa meria množstvo rozptýleného svetla pri prechode lúča), obidve metódy sú automatizované a získané údaje sú počítačovo spracovávané.



**Obr. 42** Precipitácia v tekutom prostredí (<http://web.campbell.edu/faculty/mlsuhan-thomas/biol335/lec-02-13-antibody-ch6.html>)

### 3.6.3 Precipitácie v gélovom prostredí – imunodifúzie

Precipitácie v gélovom prostredí sa označujú ako **imunodifúzne metódy**, pri nich sa v mieste stretnutia antigénu s protilátkou **vytvorí precipitačná línia**. Na imunodifúziu sa najčastejšie používa agar alebo agarózový gél. Imunodifúzne metódy sa delia na jednoduché a dvojité imunodifúzie.

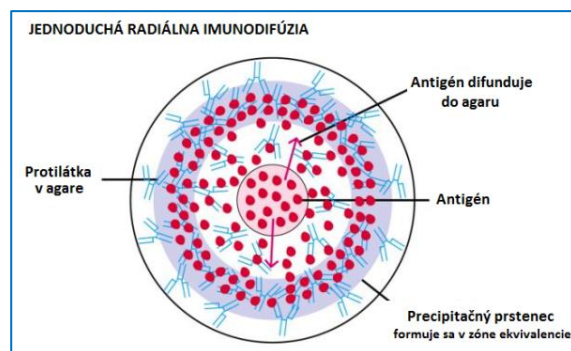
- **Pri jednoduchej imunodifúzii** do gélového prostredia difunduje iba jedna zložka, druhá zložka je rozptýlená v géli.
- **Pri dvojitej imunodifúzii** difundujú do gélu súčasne obidve zložky – antigén aj protilátka.

#### *Jednoduchá imunodifúzia*

K **jednoduchej imunodifúzii** patrí **jednoduchá radiálna imunodifúzia**. Je to základná metóda na **kvantitatívne stanovenie** antigénov vo vzorke.

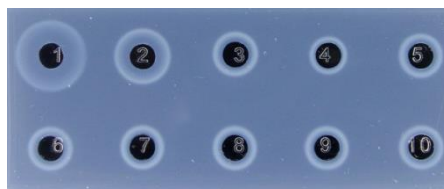
**Postup:** Na sklenených alebo plastových platniach je naliaty roztok agarózy alebo agaru zmiešaný so známou protilátkou proti hľadanému antigénu. Po stuhnutí agarózy sa podľa predlohy vyhlbia okrúhle otvory. Časť otvorov sa naplní štandardnými roztokmi so známou koncentráciou antigénu, zvyšná časť otvorov sa naplní vzorkami pacientov.

Následne sa takto pripravená platňa vloží vo vodorovnej polohe do vlhkej komôrky, aby mohla reakcia prebiehať a nedošlo k popraskaniu gélu a k znehodnoteniu vyšetrenia. Pri jednoduchjej radiálnej imunodifúzii **difunduje iba jedna zložka**, v tomto prípade antigén difunduje **z otvorov všetkými smermi do okolia** (= radiálna, dvojrozmerná imunodifúzia) pričom reaguje s protilátkami a **v zóne ekvivalencie sa vytvorí precipitačný prstenec** (obrázok 43).

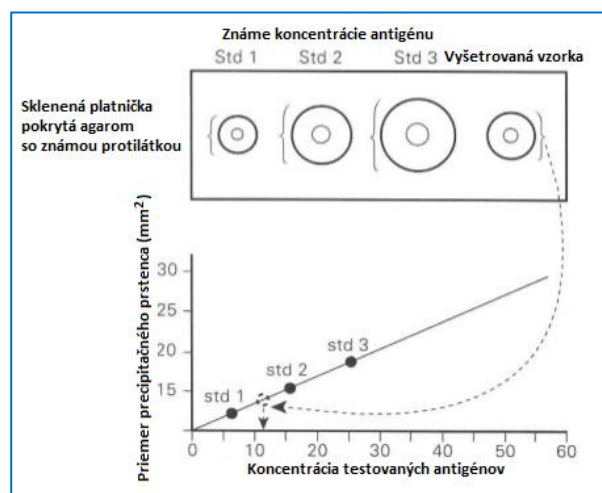


**Obr. 43** Princíp jednoduchjej radiálnej imunodifúzie (upravené podľa <http://www.sbs.utexas.edu/sanders/Bio347/Images/Lectur41.jpg>)

**Výsledok:** Priemer precipitačného prstenca je tým väčší, čím väčšia je koncentrácia antigénu. Na základe zmeraných priemerov precipitačných prstencov okolo otvorov so známymi koncentraciami antigénu sa vytvorí **analytická čiara** závislosti precipitačného prstenca (jeho štvorec v  $\text{mm}^2$ ) od koncentrácie vyšetřovaného antigénu. Pomocou nej sa po zmeraní priemeru precipitačného prstenca vzorky určí koncentrácia antigénu vo vyšetřovanej vzorke (obrázok 44, 45).



**Obr. 44** Jednoduchá radiálna imunodifúzia (<http://www.idbiotech.com/53-143-thickbox/bovine-lactoferrin-rid-plate.jpg>)



**Obr. 45** Jednoduchá radiálna imunodifúzia – analytická čiara (upravené podľa <http://image.slidesharecdn.com/immunodiffusion-130121011208-phpapp01/95/immunodiffusion-principles-and-application-9-638.jpg?cb=1359056050>)

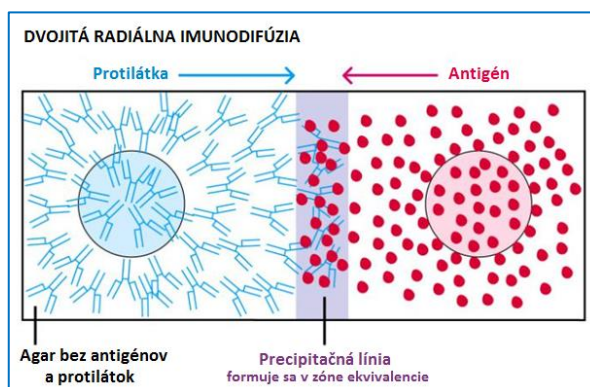
**Využitie:** technikou jednoduchkej radiálnej imunodifúzie je možné stanoviť rozsiahle množstvo sérových proteínov, hladiny imunoglobulínov (IgG, IgM, IgA, IgD), zložiek komplementu (C3, C4), proteínov akútnej fázy zápalu (CRP, Oroso atď.). Napriek tomu, že v súčasnosti sa v klinickej praxi viac využívajú turbidimetria a nefelometria, jednoduchá radiálna imunodifúzia je stále považovaná za dôležitú štandardnú metódu pre stanovovanie koncentrácií proteínov aj v medzinárodne uznávaných certifikovaných materiáloch.

### **Dvojitá imunodifúzia**

**K dvojitej imunodifúzii patrí dvojitá radiálna imunodifúzia** (protismerná). Je to metóda, ktorá slúži **na kvalitatívne stanovenie** antigénov, nie je to vhodná metóda na určenie koncentrácie antigénov.

**Postup:** Dvojitá radiálna imunodifúzia sa robí najmä v úprave podľa Ouchterlonyho, kedy sa použije gél, ktorý neobsahuje ani antigény ani protilátky a po stuhnutí sa do neho vyrežú otvory v dostatočných vzdialenostiach. Do časti otvorov sa napipetujú antigény a do ďalších protilátky. Počas inkubácie vo vlhkej komôrke pri laboratórnej teplote. **Z otvorov difundujú všetkými smermi do gélu aj antigén aj protilátka, difúzia je teda radiálna** (alebo dvojrozmerná).

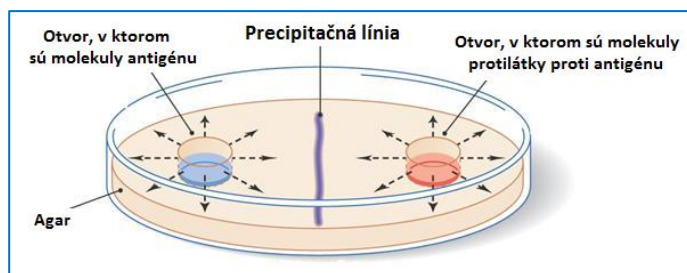
**Výsledok:** Ak sa antigén a protilátka nachádzajú v dvoch susedných otvoroch vyhlbených do gélu, ich molekuly sa stretnú **a v zóne ekvivalencie vytvoria typickú precipitačnú líniu**: môže ísť o rôzne zaoblený precipitačný oblúčik. Princíp dvojitej radiálnej imunodifúzie je zobrazený na obrázku 46.



**Obr. 46** Princíp dvojitej radiálnej imunodifúzie (upravené podľa

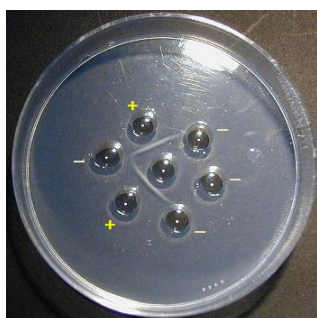
<http://www.sbs.utexas.edu/sanders/Bio347/Images/Lectur42.jpg>)

**Využitie:** táto metóda sa používa **na dôkaz antigénov** (ak sú dostupné špecifické antiséra s protilátkami) **alebo na dôkaz protilátok** (ak sú dostupné známe antigény) (obrázok 47, 48). Princíp dvojitej radiálnej imunodifúzie sa využíva aj v Elekovom teste na dôkaz toxigenicity kmeňa *Corynebacterium diphtheriae* (pôvodca záškrtu), pri ktorom sa využíva antitoxín (ekvivalent protilátky) a suspenzia testovaného kmeňa, kde dokazujeme prítomnosť toxínu (ekvivalent antigénu). Antitoxín sa aplikuje do strednej jamky, suspenzia testovaného kmeňa do okrajových jamiek. Pozitívny výsledok (produkcia toxínu) sa prejaví vytvorením precipitačnej línie.



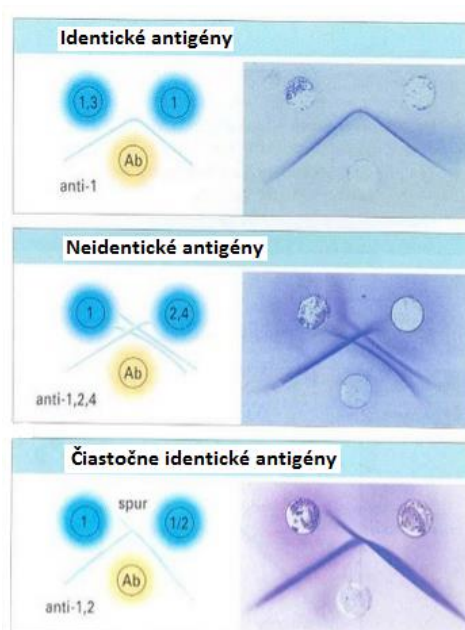
**Obr. 47** Dvojité radiálna imunodifúzia (upravené podľa

[http://intranet.tdmu.edu.ua/data/kafedra/internal/micbio/classes\\_stud/en/nurse/Associate%20Degree%20Nursing/ptn/Microbiology/1/08%20Usage%20of%20immunological%20tests...files/image102.jpg](http://intranet.tdmu.edu.ua/data/kafedra/internal/micbio/classes_stud/en/nurse/Associate%20Degree%20Nursing/ptn/Microbiology/1/08%20Usage%20of%20immunological%20tests...files/image102.jpg))



**Obr. 48** Pozitívny (+) a negatívny (–) výsledok pri dvojitej radiálnej imunodifúzii (upravené podľa <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/ATP/images/ouchb1.jpg>)

Pri dvojitej radiálnej imunodifúzii je možné sledovať **rôzne precipitačné fenomény**. Keď sa okolo otvoru s protilátkou vyreže niekoľko jamiek, do ktorých sa napipetujú rôzne antigény, môžu vzniknúť vzájomne prekrížené alebo spojené precipitačné línie (oblúčky). Podľa toho je možné určiť, či sú jednotlivé antigény identické, neidentické alebo usudzovať o príbuznosti ich antigénnych determinant (obrázok 49).

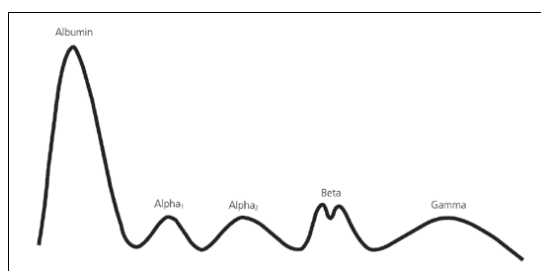


**Obr. 49** Rôzne precipitačné fenomény pri dvojitej radiálnej imunodifúzii (upravené podľa <http://www.slideshare.net/suniu/immunodiffusion-principles-and-application>)

## 3.7 ELEKTROFORÉZA A IMUNOELEKTROFORÉZA

### 3.7.1 Elektroforéza

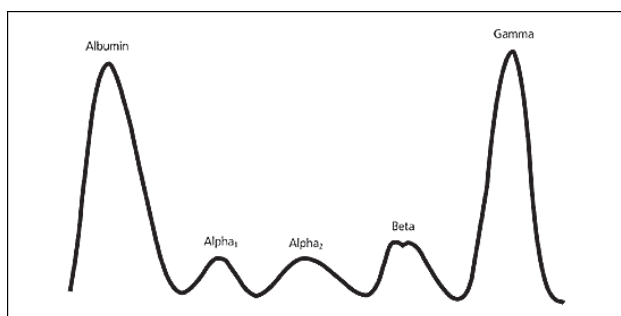
Elektroforéza je metóda, pri ktorej dochádza k rozdeleniu proteínov na základe ich rozdielnej pohyblivosti v gélovom prostredí umiestnenom v elektrickom poli, a to v závislosti na veľkosti molekúl a rozdielnych elektrických nábojoch. Pri elektroforéze je možné použiť rôzne jednoduché elektroforetické nosiče, napr. agar, agarózu, polyakrylamidový gél a iné. Kladne nabité proteíny sa pohybujú smerom ku katóde, záporne nabité proteíny sa pohybujú smerom ku anóde. Bežnou elektroforézou sa sérum rozdelí na **albumín, alfa 1, alfa2, beta 1, beta 2 a gamaglobulíny**. Pre imunológiu má význam hlavne gamafrakcia, pretože obsahuje imunoglobulíny (obrázok 50).



**Obr. 50** Fyziologický nález pri elektroforéze sérových bielkovín u zdravého človeka  
(<http://www.aafp.org/afp/2005/0101/afp20050101p105-f1.gif>)

Elektroforézou sa dajú zachytiť orientačné zmeny v zmysle:

- **hypergamaglobulinémie** (kedy je zvýšená koncentrácia všetkých imunoglobulínov),
- **hypogamaglobulinémie** (znížená koncentrácia alebo chýbanie imunoglobulínov)
- **a monoklonálne gamapatie** (deformácie gamafrakcie do úzkeho prúžku v prítomnosti monoklonálneho imunoglobulínu, tzv. peak, zobrazený na obrázok 51).



**Obr. 51** Typický „peak“ gamaglobulínovej frakcie pri mnohopočetnom myelóme  
(<http://www.aafp.org/afp/2005/0101/p105.html>)

### 3.7.2 Imunoelektroforéza

Imunoelektroforéza je kombináciou elektroforetických a imunodifúzných metód.

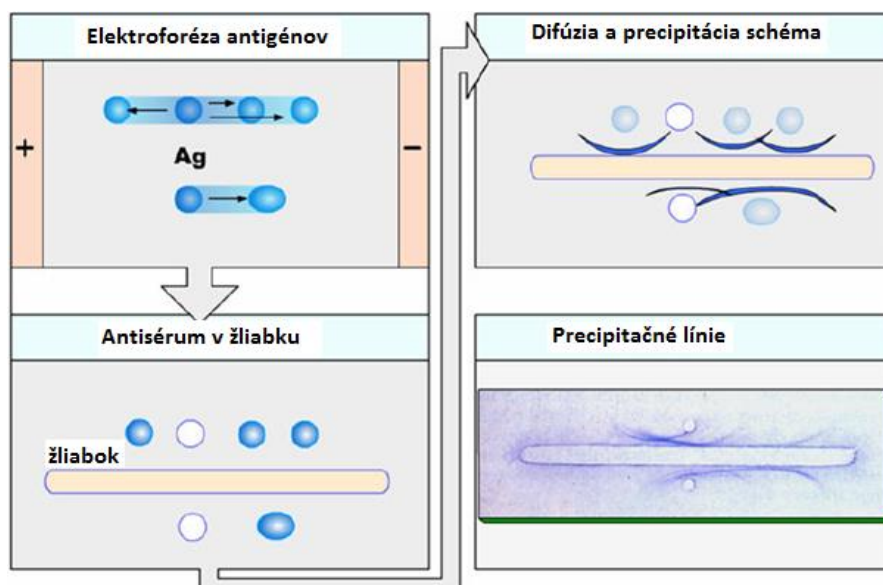
Patrí sem:

- **klasická imunoelektroforéza** (kombinácia klasickej elektroforézy a dvojitej radiálnej imunodifúzie),
- **raketová imunoelektroforéza** (pohyb molekúl antigénov je urýchlený jednosmerným elektrickým prúdom),
- **protismerná (stretná) imunoelektroforéza** (pohyb molekúl antigénov aj protilátok je urýchlený jednosmerným elektrickým prúdom),
- **imunofixácia** (po elektroforetickej separácii proteínov séra sa pridá špecifické antisérum proti niektorému ľahkému alebo ťažkému imunoglobulínovému reťazcu).

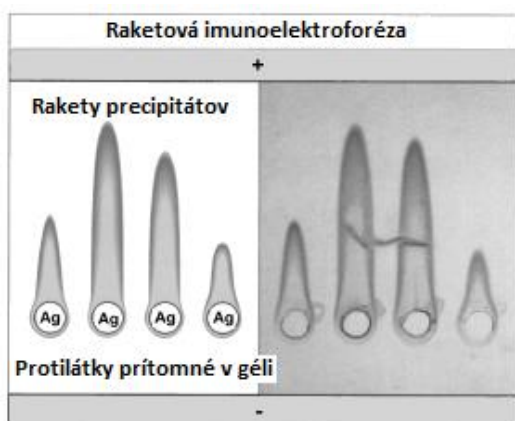
Imunoelektroforéza a jej modifikácie spájajú elektroforetickú separáciu proteínov s imunodifúziou, pri ktorej sa už uplatňuje reakcia medzi antigénom a protilátkou.

Imunofixácia bielkovín v sére je dôležitá na diagnostiku monoklonálnej gamapatie, teda na určenie izotypu monoklonálneho imunoglobulínu (paraproteínu). Býva spôsobená nadmerným zmnožením jediného klonu buniek produkujúcich protilátky. Toto zmnoženie je obvykle malígne (pri plazmocytóme IgG, IgA, pri Waldenströmovej makroglobulinémii IgM). Monoklonálna gamapatia môže byť tiež benígna (dnes označovaná ako MGUS – monoklonálna gamapatia nejasného významu – ale z onkologického hľadiska je považovaná za prekancerózný stav). Imunofixácia je vhodná na monitorovanie a diagnostiku monoklonálnych gamapatií.

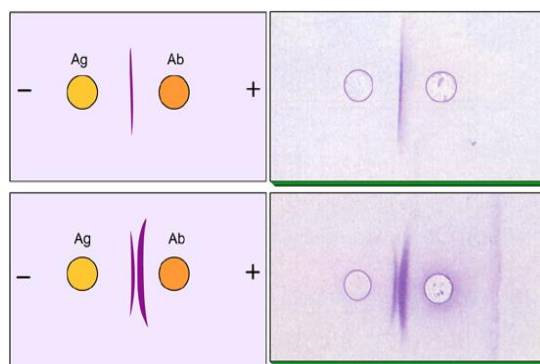
Jednotlivé skupiny imunoelektroforéz sú znázornené na obrázkoch 52, 53 a 54.



**Obr. 52** Klasická imunoelektroforéza s jednotlivými krokmi (upravené podľa <http://jpkc.yzu.edu.cn/course/shywshw/pictures/MYX-Ch10-02-09.jpg>)

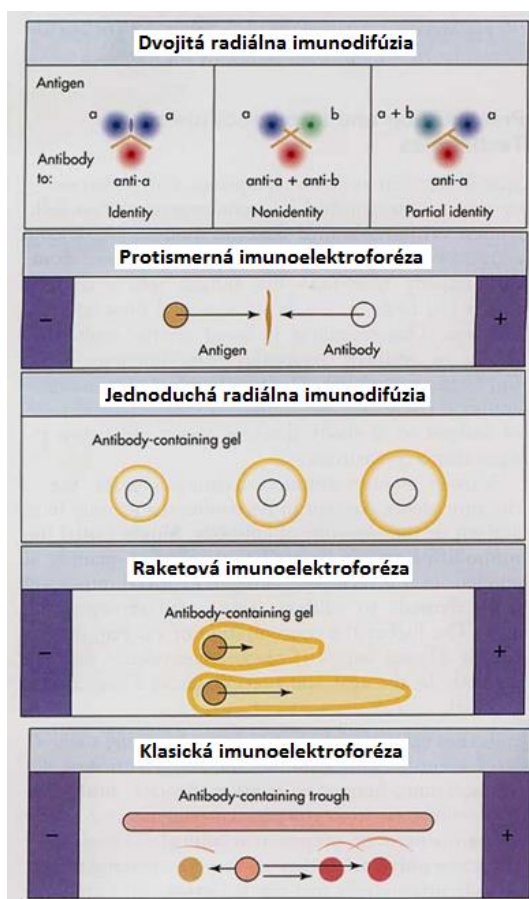


**Obr. 53** Raketová imunoelktroforéza  
(upravené podľa: <http://www.microbiologybook.org/mayer/Image51.gif>)



**Obr. 54** Protismerná (stretná)  
imunoelktroforéza  
([http://zssom.sysu.edu.cn/zhongda/loori/upload/my/24-03\\_1.jpg](http://zssom.sysu.edu.cn/zhongda/loori/upload/my/24-03_1.jpg))

Príklady niektorých modifikácií imunodifúzií a imunoelktroforéz znázorňuje schéma na obrázku 55.



**Obr. 55** Modifikácie imunodifúzných a imunoelktroforetických metód (upravené podľa <http://micro.digitalproteus.com/pics/immunoprecipitation.jpg>)

### 3.8 KOMPLEMENT FIXAČNÉ REAKCIE (KFR)

Komplement fixačná reakcia je sérologická metóda najčastejšie používaná na dôkaz prítomnosti protilátok. Jej **podstatou je väzba komplementu na komplex antigén – protilátka** (Ag-Ab). Pred reakciou je potrebné inaktivovať vyšetrované sérum zahriatím na 56 °C na 30 minút, aby sa odstránila aktivita pacientovho komplementu vo vzorke séra.

#### 3.8.1 Fázy komplement fixačnej reakcie

KFR prebieha v dvoch fázach: **prvá je špecifická a druhá je nešpecifická**.

V **prvej fáze** dochádza k väzbe antigénu (Ag) a protilátky (Ab) a fixácii vopred vytitrovaného komplementu (C). Ako zdroj komplementu sa používa morčacie sérum, ktoré sa pred reakciou vytitruje. Ak sa v sére nachádzajú protilátky, reagujú s antigénom a vytvoria imunokomplex, na ktorý sa naviaže komplement. Táto fáza sa však neprejaví viditeľnými zmenami.

Preto nasleduje **druhá fáza**, ktorá je určená na vizualizáciu prvej fázy KFR. Slúži na to hemolytický systém, ktorým sú senzibilizované baranie erytrocyty (senzibilizované sú amboceptorom, čo je králičia protilátka proti baraním erytrocytom).

#### 3.8.2 Hodnotenie výsledku komplement fixačnej reakcie

Výsledok reakcie sa hodnotí podľa hemolýzy erytrocytov v hemolytickom systéme.

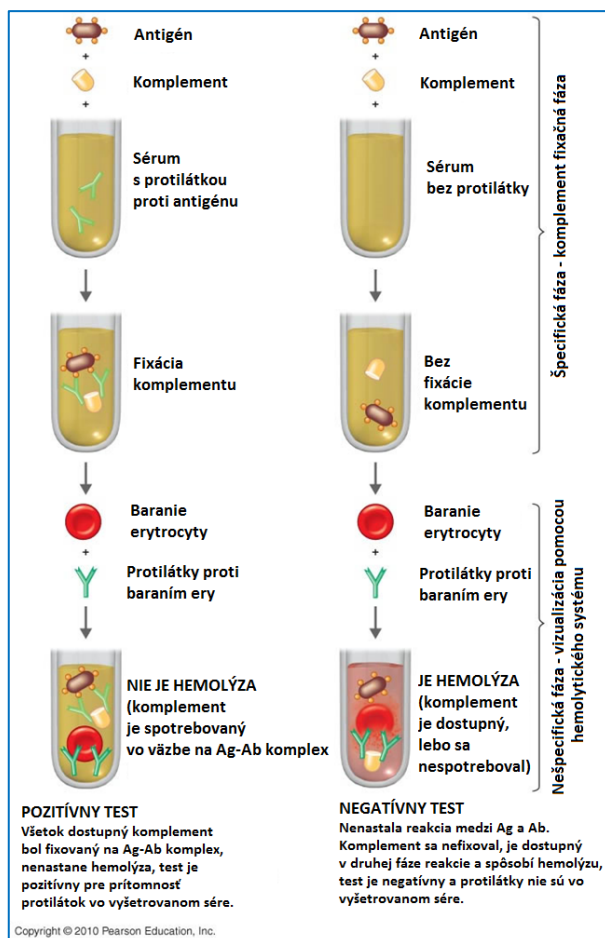
- **Ak je KFR pozitívna** (v sére sú hľadané protilátky), vytvorí sa imunokomplex antigénu s protilátkou, na ktorý sa fixuje (nadviaže) komplement C, a teda v druhej fáze nemôže komplement C reagovať s erytrocytmi a **nenastane hemolýza** (a erytrocyty len sedimentujú). Pozitívna KFR sa teda neprejaví hemolýzou a potvrdzuje prítomnosť protilátok vo vyšetrovanom sére.
- **Ak je KFR negatívna**, nevytvorí sa imunokomplex antigénu s protilátkou, komplement C sa nefixuje (nenadviaže), a teda v druhej fáze môže komplement C reagovať s erytrocytmi a **nastane hemolýza**. Negatívna KFR sa teda prejaví hemolýzou a znamená, že protilátky sa nenachádzali vo vyšetrovanom sére (obrázok 56).

Výsledok sa vyjadruje pomocou titra určeného podľa najvyššieho riedenia vyšetrovaného séra, kde boli zistené protilátky (t.j. kde nenastala hemolýza a prítomná bola len sedimentácia erytrocytov).

**Využitie:** KFR je vhodná na dôkaz protilátok pri rôznych infekčných ochoreniach bakteriálnej, parazitárnej, mykotickej a vírusovej etiológie, napr. syfilyse, toxoplazmóze, brucelóze, ornitóze, vírusových respiračných infekciách (vírusy influenzy, parainfluenzy, respiračný syncytiálny vírus, koronavírusy, adenovírusy a podobne).

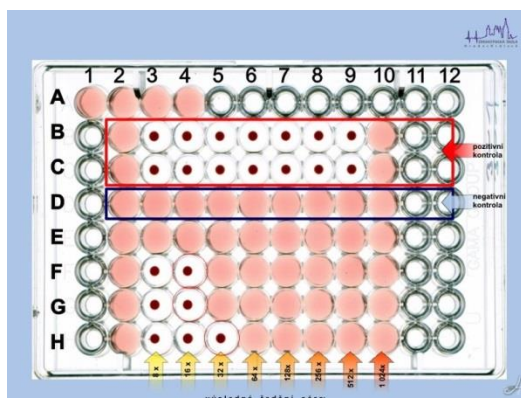
Nie je vhodná pre zistenie jednotlivých tried imunoglobulínov, pretože sa pri nej zisťujú celkové imunoglobulíny.

Opakované vyšetrenie umožňuje sledovať dynamiku tvorby protilátok. Odoberajú sa minimálne dve vzorky séra v odstupe zvyčajne 14 dní. O dôkaze akútneho ochorenia svedčí štvornásobný vzostup titra protilátok alebo sérokonverzia (obrázok 57).



**Obr. 56** Komplement fixačná reakcia (upravené podľa

[http://classes.midlandstech.edu/carterp/Courses/bio225/chap18/figure\\_18\\_10\\_labeled.jpg](http://classes.midlandstech.edu/carterp/Courses/bio225/chap18/figure_18_10_labeled.jpg))



**Obr. 57** Výsledok komplement fixačnej reakcie v mikrotitračnej doštičke pri dôkaze toxoplazmózy: riadky B, C = pozitívna kontrola s titrom 512, riadok D = negatívna kontrola, v riadku E negatívny pacient, v riadku F pacient s titrom 16, v riadku G pacient s titrom 16, v riadku H pacient s titrom 32

([http://labmet.zshk.cz/media.aspx?id=SLM017&TB\\_iframe=true&height=750&width=820](http://labmet.zshk.cz/media.aspx?id=SLM017&TB_iframe=true&height=750&width=820))

## Otázky k samohodnoteniu

1. Čo sú to sérologické reakcie? Čo je antigén, imunogén, haptén, superantigén, alergén? Ktoré antigény sú korpuskulárne a ktoré koloidné?
2. Čo sú protilátky? Aký je rozdiel medzi sérom a plazmou?
3. Ktoré fázy má sérologická reakcia? Ako sa delia sérologické reakcie podľa použitého antigénu, podľa techniky a v akom prostredí môžu prebiehať? Na akú diagnostiku sa využívajú sérologické reakcie? Ako sa hodnotia sérologické reakcie? Aký nález svedčí o dôkaze akútneho ochorenia?
4. Čo je aglutinácia? Čo je princípom priamej aglutinácie? Čo je Widalova reakcia? Čo sa určuje pri spätnej aglutinácii?
5. Čo je princípom nepriamej aglutinácie? Aké nosiče sa využívajú pri hemaglutinácii a pri latexovej aglutinácii? Aké sú možnosti využitia hemaglutinácie a latexovej aglutinácie?
6. Čo je precipitácia? Čo je charakteristické pre zónu ekvivalencie? V akom prostredí môže prebiehať precipitácia a uveďte príklady.
7. Ako sa volá precipitácia v gélovom prostredí? Načo sa využíva jednoduchá radiálna imunodifúzia a aký je jej princíp? Načo slúži dvojité radiálna imunodifúzia a vysvetlite jej princíp.
8. Čo je to elektroforéza a imuno elektroforéza?
9. Čo je podstatou komplement fixačnej reakcie? Aké sú fázy komplement fixačnej reakcie? Ako sa hodnotí výsledok KFR? Čo znamená, keď nastane hemolýza pri KFR? A ako sa hodnotí výsledok KFR, keď nenastane hemolýza? Kedy je KFR pozitívna a kedy negatívna? Načo sa KFR využíva?

## 4 NOVŠIE METÓDY V IMUNOLÓGII

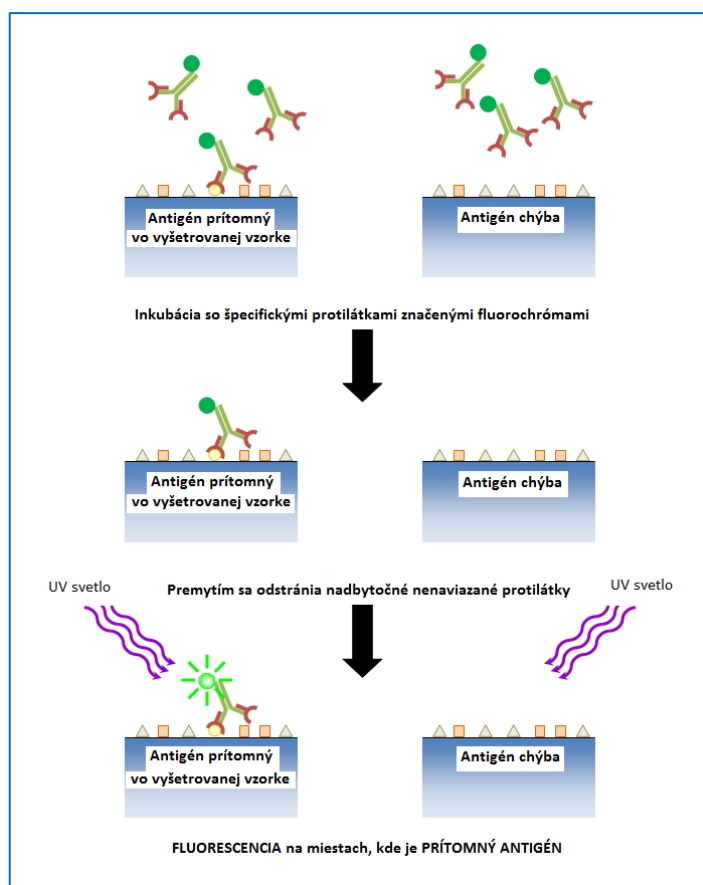
### 4.1 IMUNOFLUORESCENCIA

Imunofluorescenčné techniky sa využívajú na dôkaz antigénov alebo protilátok pričom vizualizácia vzniknutého imunokomplexu sa robí **pomocou protilátok značených fluorescenčnými farbivami (fluorochrómami)**. Medzi najznámejšie fluorochrómy patrí FITC – fluoresceín isotiokyanát. Imunofluorescencia je známa v dvoch modifikáciách: priama a nepriama imunofluorescencia.

#### 4.1.1 Priama imunofluorescencia

**Priama imunofluorescencia** sa používa hlavne na dôkaz antigénu. Fluorescenčným farbivom je označená špecifická protilátka. Dokazovaný antigén sa môže nachádzať v tkanive, telesnej tekutine, bunkovej kultúre a pod.

**Postup:** skúmaná vzorka musí byť v tenkej vrstve fixovaná na podložné sklíčko. Na povrch takto pripraveného preparátu sa potom aplikuje špecifická protilátka značená fluorochrómami. Ak je antigén vo vzorke prítomný, počas inkubácie sa naviaže na protilátku. Následným premytím sa odstránia nadbytočné nenaviazané protilátky. Po inkubácii a premytí sa potom hodnotí preparát vo fluorescenčnom mikroskope.

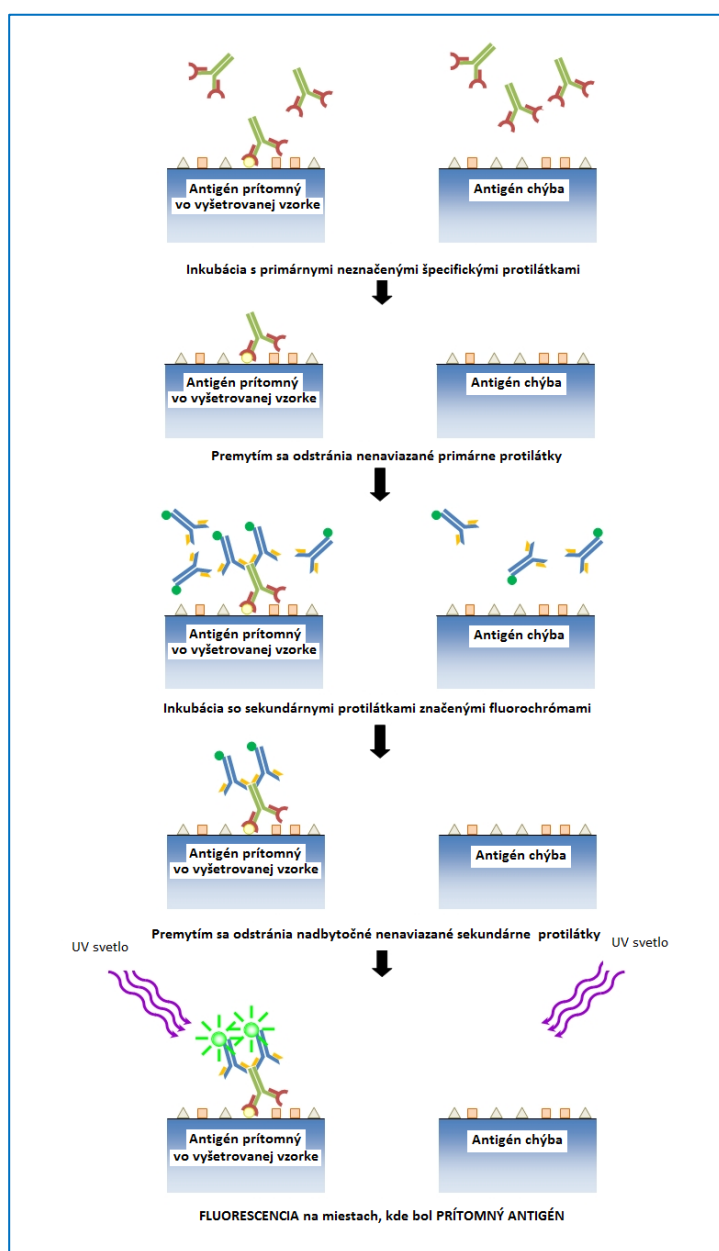


**Obr. 58** Priama imunofluorescencia (upravené podľa <http://www.di.uq.edu.au/sparq/images/directIF.jpg>)

**Výsledok:** pozitívny výsledok sa prejaví fluorescenciou na miestach, kde je prítomný antigén (obrázok 58, 60a). Ak sa použil fluorochróm FITC, fluorescencia bude žltozelená. Priama imunofluorescencia sa používa najmä na dôkaz antigénov v tkanivových rezoch, rôznom bioptickom materiáli, na rýchly dôkaz patogénov v spúte, steroch a pod.

#### 4.1.2 Nepriama imunofluorescencia

**Nepriama imunofluorescencia** má dve fázy, v prvej fáze reaguje „primárna“ neznačená špecifická protilátka, v druhej fáze sa pridáva „sekundárna“ protilátka, ktorá je už značená fluorochrómi. V oboch fázach dochádza k inkubácii a premytiu, potom k hodnoteniu vo fluorescenčnom mikroskope. Pozitívny výsledok sa prejaví fluorescenciou (obrázok 59).

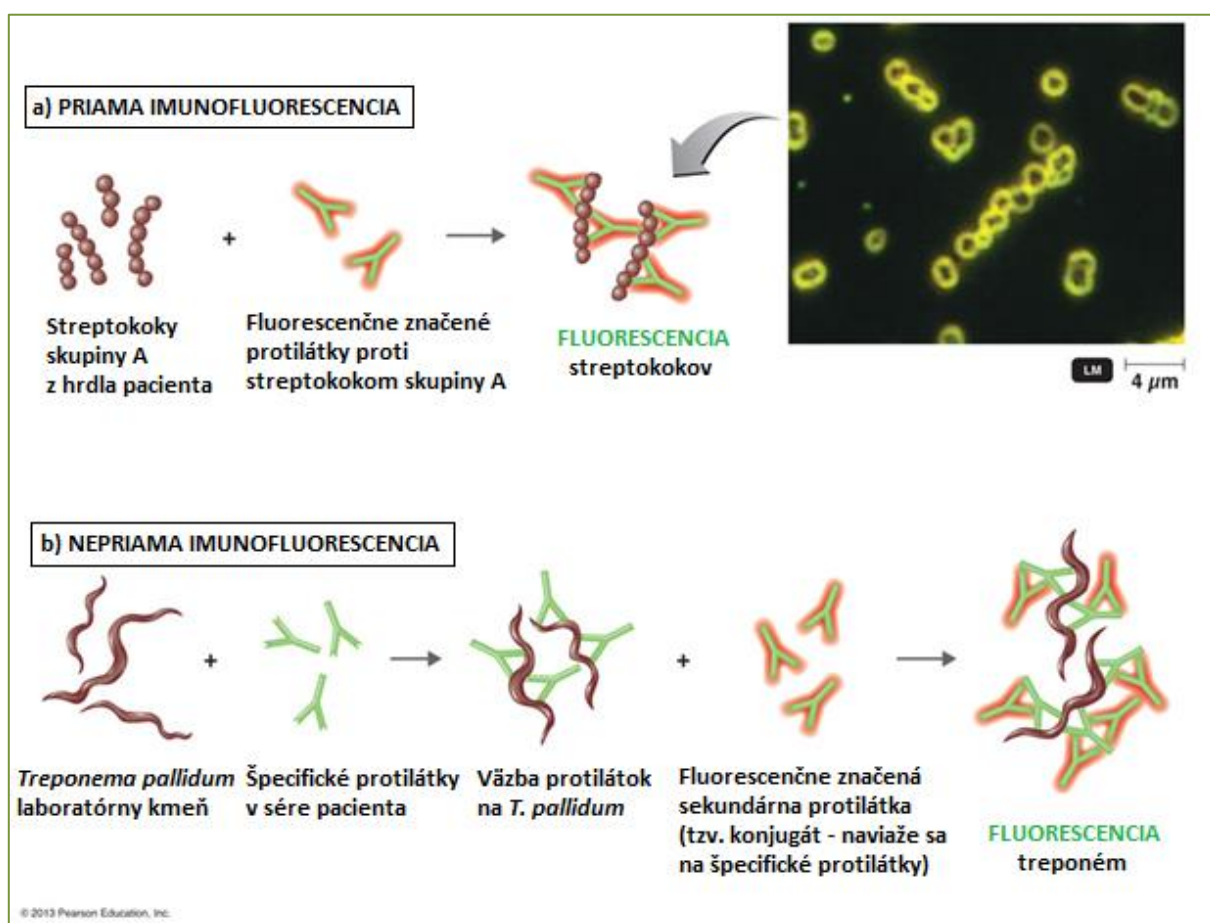


**Obr. 59** Nepriama imunofluorescencia na dôkaz antigénov (upravené podľa <http://www.di.uq.edu.au/sparq/images/indirectIF.jpg>)

Nepriama imunofluorescencia sa používa častejšie na dôkaz protilátok v sére.

**Postup:** vtedy je preparát pripravený zo zdravého tkaniva, bunkovej alebo bakteriálnej kultúry. Na tento preparát sa aplikuje vzorka pacienta vyšetovaná na prítomnosť protilátok. Po prvej inkubácii a premytí sa pridá sekundárna protilátka značená fluochrómom (tzv. konjugát). Po druhej inkubácii a premytí sa preparát prehliada pod fluorescenčným mikroskopom.

**Výsledok:** pozitívna reakcia sa prejaví fluorescenciou štruktúr obsahujúcich antigény, proti ktorým boli v sére pacienta prítomné protilátky. Táto metóda sa najčastejšie používa na stanovenie antiinfekčných protilátok (obrázok 60b) a autoprotlátok pri orgánovo špecifických aj systémových (orgánovo nešpecifických) autoimunitných ochoreniach (napr. prítomnosti antinukleárných protilátok vo vyšetrovanom sére sa prejaví fluorescenciou jadrových štruktúr v bunkách).



**Obr. 60** Priama imunofluorescencia na dôkaz antigénov vo vzorke (a)  
Nepriama imunofluorescencia na dôkaz protilátok v sére (b)  
(upravené podľa [http://classes.midlandstech.edu/carterp/Courses/bio225/chap18/figure\\_18\\_11\\_labeled.jpg](http://classes.midlandstech.edu/carterp/Courses/bio225/chap18/figure_18_11_labeled.jpg))

## 4.2 IMUNOANALYTICKÉ METÓDY

Imunoanalytické metódy sa využívajú v modernej bioanalytike, **umožňujú stanoviť aj nízke koncentrácie antigénov alebo protilátok**, ktoré sa zvyčajne nedajú stanoviť klasickými sérologickými metódami. Môžu sa využiť tiež na stanovenie malých množstiev **rôznych hormónov, cytokínov, nádorových markerov a pod.**

**Princíp:** pracujú na princípe rozpoznania a dokázania antigénu alebo protilátky v tekutej vzorke pomocou väzby medzi antigénom a protilátkou na princípe „kľúč-zámka“. Spoločným znakom imunoanalytických metód je, **že na vizualizáciu prebehnutej reakcie medzi antigénom a protilátkou sa musí použiť „sekundárna“ protilátka, ktorá je značená rôznymi značkami:**

- enzýmom (enzýmová imunoanalýza),
- rádioizotopom (rádioimunoanalýza),
- luminoform (luminiscenčná imunoanalýza) alebo
- fluorochrómom (fluorescenčná imunoanalýza).

Imunoanalýzy sa delia na homogénne a heterogénne. Pri heterogénnych je potrebné oddeliť naviazané reakčné látky od nenaviazaných zložiek reakcie. To sa zabezpečí pomocou premývania premývacím roztokom medzi jednotlivými krokmi reakcie.

### 4.2.1 Enzýmová imunoanalýza – EIA

Jednou z najčastejšie používaných metód v imunologických a klinických laboratóriách je enzýmová imunoanalýza, ktorou je možné stanoviť aj veľmi nízke koncentrácie antigénov alebo protilátok (všeobecne povedané analytov) v tekutej vzorke. Enzýmová imunoanalýza (EIA – Enzyme ImmunoAssay) je metóda, pri ktorej sa používa vo fáze vizualizácie enzýmová reakcia.

EIA metódy sa rozdeľujú na heterogénne a homogénne.

- **Homogénne metódy** nevyžadujú separáciu voľnej a viazanej frakcie analytu.
  - **Heterogénne metódy** vyžadujú separáciu voľnej a viazanej frakcie analytu.
- Heterogénne EIA môžu byť **kompetitívne** (so značenou protilátkou alebo so značeným antigénom) alebo **nekompetitívne** (so značenou protilátkou).

### *ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)*

**V praxi sa veľmi často používa ELISA.** Je špeciálnym druhom EIA. Môže byť heterogénna nekompetitívna – tzv. sendvič alebo môže byť heterogénna kompetitívna. Na úspešné prevedenie sendvičovej metódy je potrebný antigén, ktorý má na svojom povrchu odlišné epitopy, najmenej pre dve odlišné protilátky. V súčasnej dobe je väčšina metód postavená na heterogénnej kompetitívnej EIA so značenou protilátkou.

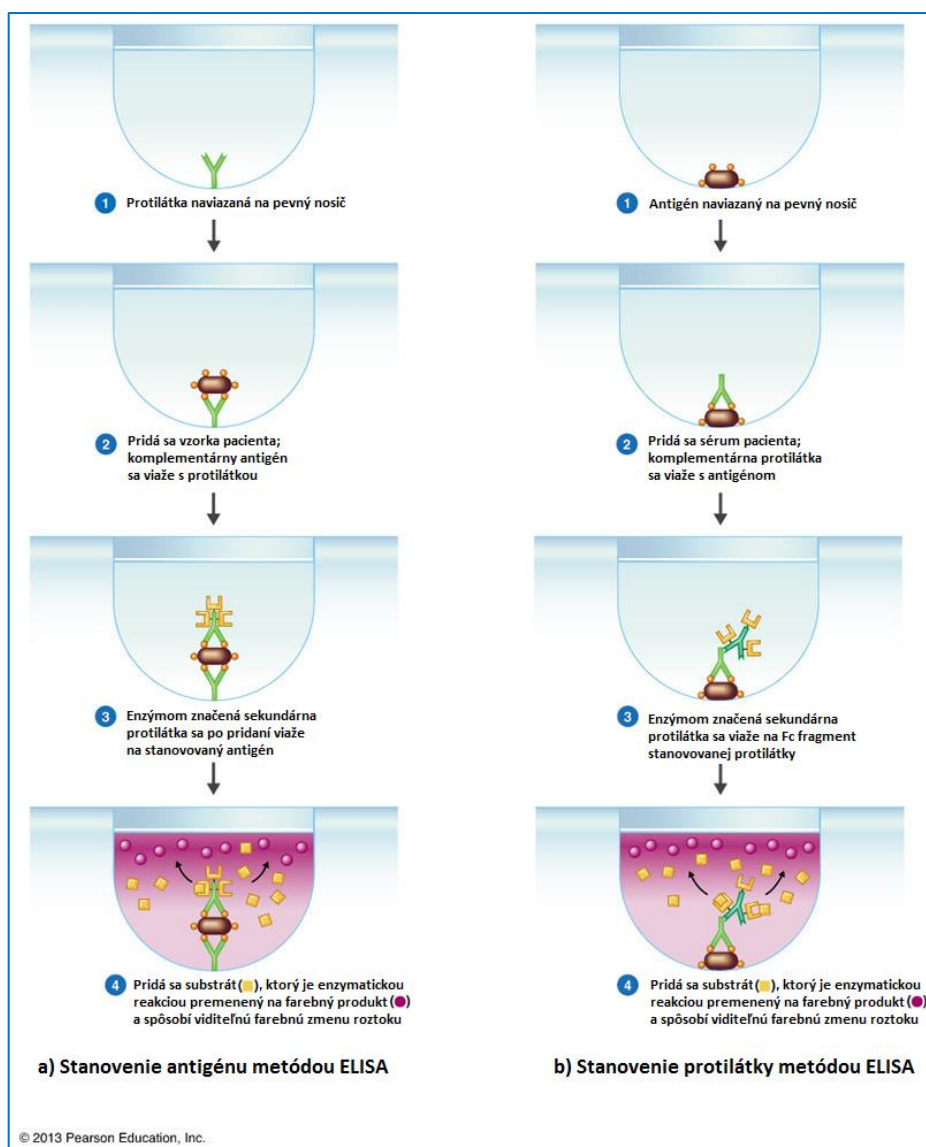
**ELISA je enzýmová imunoanalýza na pevnej fáze.** Znamená to, že jedna z reagujúcich látok (buď známy antigén, alebo známa protilátka) je naviazaná na pevnú fázu (nosič). Ako **nosič** sa najčastejšie používajú jamky mikrotitračnej doštičky. **Samotná reakcia prebieha v niekoľkých krokoch, medzi ktorými sa premývaním odstraňujú z reakčnej zmesi nenaviazané látky.**

## ELISA na dôkaz protilátok

**Pri dôkaze protilátok (obrázok 61b) je na stenu jamiek mikrotitračnej doštičky naviazaný známy antigén.**

**Postup:** do jamiek mikrotitračnej doštičky sa aplikujú vzorky, v ktorých sa stanovuje prítomnosť špecifických protilátok. Na antigén sa po pridaní vyšetrovanej vzorky naviažu stanovené špecifické protilátky (ak sa vo vzorke nachádzali). Premytím sa odstránia nadbytočné nenaviazané protilátky. V ďalšom kroku sa pridá enzýmom značená sekundárna protilátka proti ľudskému imunoglobulínu (konjugát), ktorá je namierená proti Fc fragmentu stanovovanej protilátky. Po ďalšom premytí sa pridá bezfarebný substrát, ktorý je v pozitívnom prípade štiepený enzýmom naviazaným na sekundárnu protilátku a vzniká farebný produkt.

**Výsledok:** Intenzita výsledného zafarbenia sa meria spektrofotometricky a je úmerná koncentrácii stanovovanej protilátky.



**Obr. 61** ELISA: stanovenie antigénu (a), stanovenie protilátky (b)  
(upravené podľa <http://classes.midlandstech.edu/carterp/Courses/bio225/chap18/lecture5.htm>)

## ELISA na dôkaz antigénov

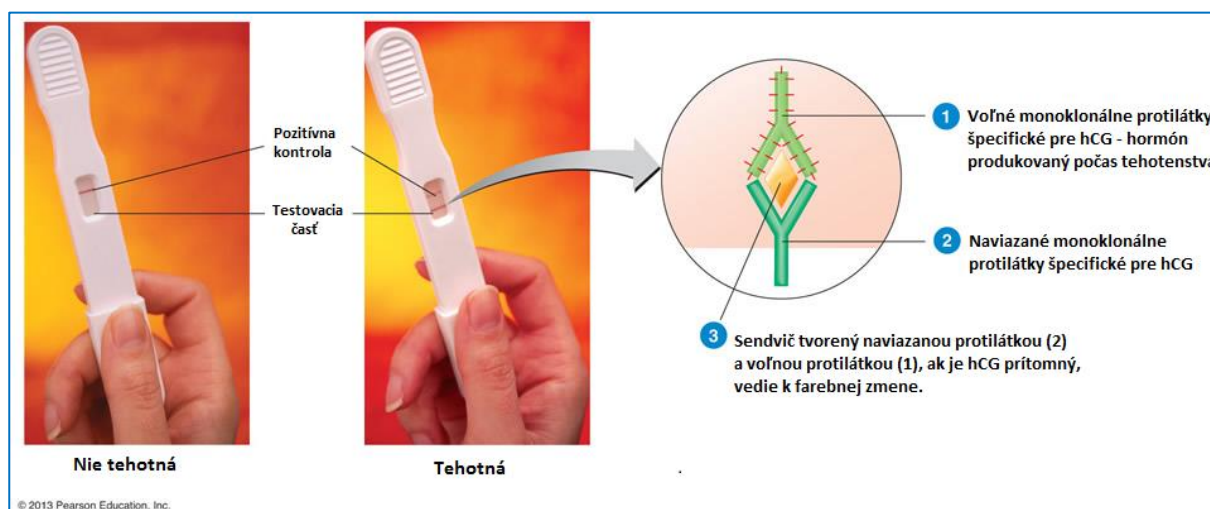
**Pri dôkaze antigénov (obrázok 61a) je na stenu jamiek mikrotitračnej doštičky naviazaná známa protilátka.**

**Postup:** do jamiek sa pridávajú vzorky, v ktorých sa stanovuje prítomnosť antigénu. Potrebné je však, aby antigén mal aspoň dva odlišné epitopy. Na protilátku fixovanú k stene jamky mikrotitračnej doštičky sa naviaže stanovovaný antigén, na ktorý sa v ďalšom kroku naviaže enzýmom značená protilátka proti vyšetrovanému antigénu. Pridá sa bezfarebný substrát, ktorý sa v pozitívnom prípade enzymaticky katalyzovanou reakciou zmení na farebný produkt.

**Výsledok:** Intenzita výsledného zafarbenia roztoku sa meria spektrofotometricky a je úmerná koncentrácii dokazovaného antigénu vo vzorke.

## Využitie ELISA

ELISA súpravy sú v súčasnosti dostupné nielen pre klinickú diagnostiku v laboratóriách, ale aj pre domáce použitie. S obľubou sú využívané napr. tehotenské testy, ktoré registrujú prítomnosť tehotenského hormónu hCG v moči tehotnej ženy (obrázok 62).



**Obr. 62** Princíp tehotenského testu (upravené podľa:

<http://classes.midlandstech.edu/carterp/Courses/bio225/chap18/lecture5.htm>)

## 4.2.2 Rádioimunoanalýza – RIA

RIA (Radio Immuno Assay) je **rádioizotopová metóda**, ktorá patrí k historicky najstarším imunoanalytickým metódam. Bola určená na kvantitatívne stanovenie antigénov alebo protilátok. Napríklad na stanovenie antigénu sa použije protilátka značená rádioaktívnym prvkom (najčastejšie  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ). RIA môže prebiehať na pevnej fáze – na stene skúmavky alebo v kvapalnej fáze. Ak prebieha na pevnej fáze, princíp sa podobá ELISA testom, pričom namiesto enzýmu je použitý rádioizotop. Po premytí sa meria intenzita rádioaktívneho žiarenia (gama alebo beta).

RIA sa vyznačuje vysokou citlivosťou a špecifickosťou, **umožňuje stanoviť aj látky v nano- a piktogramových koncentráciách**. Možno ňou určovať hormóny, vitamíny, ich metabolity, niektoré autoprotilátky a iné biologicky významné látky. Keďže si však vyžadujú prácu s rádioizotopmi, špeciálnu meraciu techniku, vyškolený personál a vzniká pri nich izotopový odpad, legislatíva je pri nich veľmi prísna a zvyčajne bývajú súčasťou oddelení nukleárnej medicíny. V súčasnosti je väčšina RIA testov už nahradená neizotopovými imunoanalýzami.

#### 4.2.3 Chemiluminiscenčná imunoanalýza

**Chemiluminiscenčná imunoanalýza** využíva ako značku luminofory – látky, ktoré pri oxidácii vyžarujú svetlo. Svetlo je emitované v priebehu chemickej reakcie a detegované je luminometrom.

#### 4.2.4 Fluorescenčná imunoanalýza

**Fluorescenčná imunoanalýza** využíva ako značku fluorochróm a detekcia signálu sa robí fluorimetricky. Princípy oboch metód sú zhodné s metódami pri enzýmoimunoanalýzách a sú popísané vyššie.

### 4.3 IMUNOBLOTOVACIE TECHNIKY – IMUNOBLOT

Blotovacie metódy **kombinujú elektroforézu a imunoanalýzu**. Uskutočňujú sa v rôznych modifikáciách.

Môžu sa využiť na:

- analýzu DNA (Southern blot),
- analýzu RNA (Northern blot),
- analýzu proteínov (Western blot),
- analýzu posttranslačných úprav (Eastern blot).

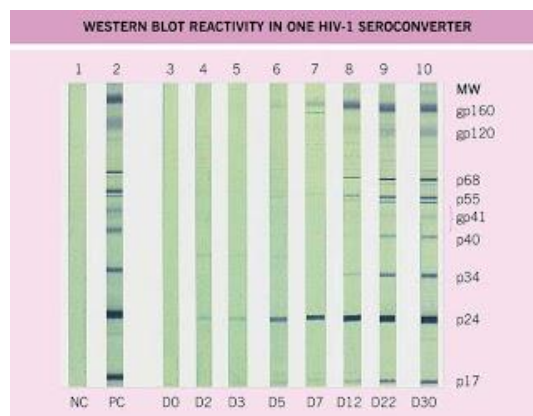
Najčastejšie sa používa imunoblot Western blot a imunodot.

#### 4.3.1 Western blot

**Princíp Western blotu** spočíva v tom, že skúmaná zmes proteínových antigénov je rozdelená elektroforézou v géli a následne prenesená na pevný nosič (napr. nitrocelulóзовú membránu). V ďalšej fáze dochádza k vlastnej imunoanalýze.

**Postup:** imunoblot sa ponorí do vzorky pacientovho séra, v ktorom sa majú dokázať protilátky. Po inkubácii a premytí sa miesta s naviazanými protilátkami vizualizujú pomocou značenej sekundárnej protilátky proti ľudskému imunoglobulínu (značená je napr. enzýmom).

**Výsledok:** v pozitívnom prípade sa na imunoblote objaví tmavý prúžok na mieste, ktoré zodpovedá určitému antigénu, proti ktorému vyšetrovaná vzorka obsahovala príslušnú protilátku (obrázok 63).

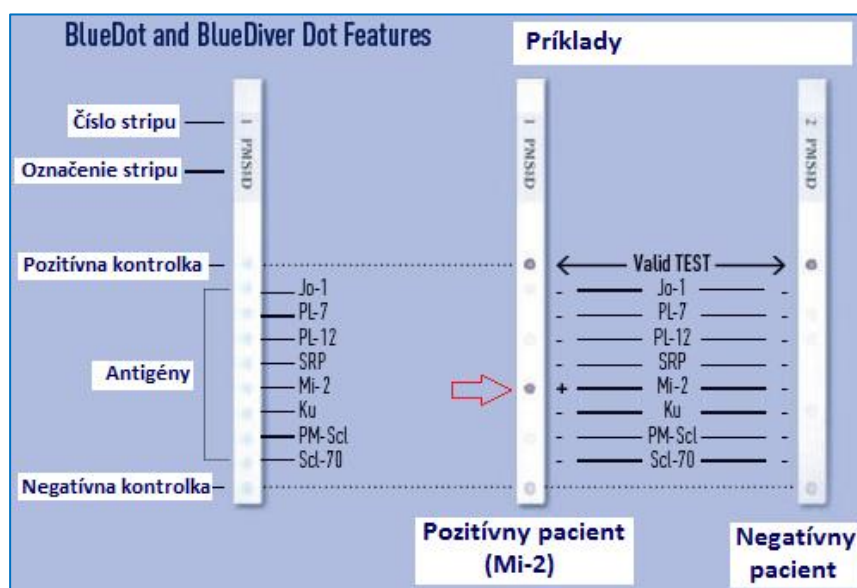


**Obr. 63** Western blot na dôkaz HIV-1

(<http://meromicrobiology.blogspot.sk/2011/07/western-blotting-for-hiv-test.html>)

#### 4.3.2 Imunodot

Pri imunodotoch sa používajú vyčistené natívne antigény alebo umelo pripravené rekombinantné antigény, ktoré sa fixujú na membránu. Odčítanie imunodotov je jednoduchšie, ale testy sú ekonomicky nákladnejšie (obrázok 64).



**Obr. 64** Imunodotová analýza autoprotílátok – pozitívita je v obrázku vyznačená šípkou  
(upravené podľa <http://www.clsdiagnostics.com/news/index.htm>)

#### 4.3.3 Využitie imunoblotovacích techník

Výhodou blotovacích techník je možnosť zistiť zo vzorky naraz aj niekoľko špecifických protílátok proti jednotlivým antigénom. Blotovacie metódy majú v súčasnosti široké využitie pre svoju vysokú citlivosť a špecifickosť. Umožňujú detegovať špecifickú protílátkovú odpoveď proti rôznym proteínom v antigénnych zmesiach. Používajú sa pri analýzach antigénov mikroorganizmov (napr. proti jednotlivým antigénom vírusov HIV, HCV, proti antigénom *Helicobacter pylori*, *Treponema pallidum*, boréliám

atď), pri analýzach alergénov, enzýmov, proteínov, hormónov, protilátok, autoprotílátok a mnohých ďalších.

Pre stanovenie špecifických protilátok proti infekčným pôvodcom sa tieto testy využívajú ako **konfirmačné (tzn. potvrdzujúce) testy**. Použitie majú ako ďalšia možnosť špecifického dôkazu v prípadoch, kedy ostatné metódy neposkytli jednoznačný výsledok.

#### 4.4 ELISPOT (Enzyme-Linked ImmunoSPOT assay)

Táto metóda **patrí medzi metódy používané na vyšetrovanie zložiek bunkovej imunity**. Pôvodne však bola vyvinutá na detekciu B-lymfocytov produkujúcich protilátky. Neskôr bola táto metóda modifikovaná na detekciu aktivovaných T lymfocytov reagujúcich na špecifický antigén a produkujúcich príslušné cytokíny. **Meria aj nízke množstvá aktivovaných lymfocytov a uvoľnených cytokínov. Umožňuje získať rýchlu informáciu o bunkovej imunite** na základe minimálneho invazívneho vyšetrenia periférnej krvi. Väčšinou sa používa na detekciu množstva uvoľneného interferónu  $\gamma$ , ale sú dostupné súpravy pre detekciu mnohých cytokínov (IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, atď.).

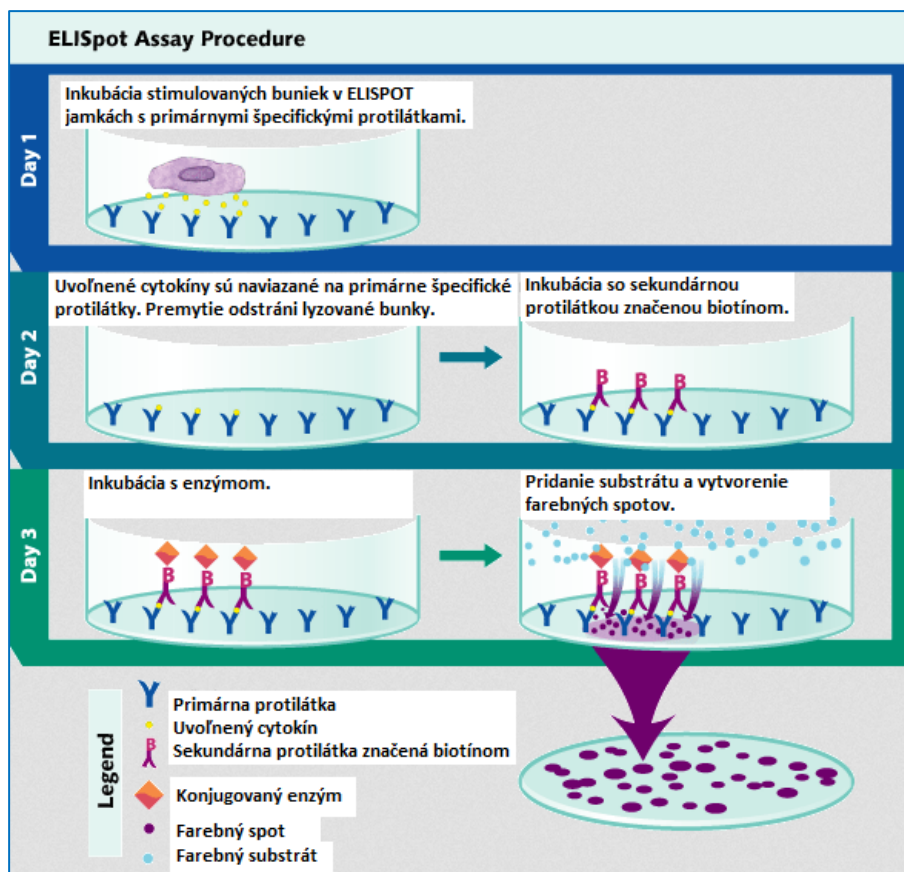
**Postup:** rutinne sa vykonáva v 96 jamkových mikrotitračných doštičkách. Tie sú upravené tak, že dno jamiek tvorí nitrocelulózová alebo PVDF membrána, na ktorú je naviazaná primárna špecifická protilátka proti cytokínu, ktorý sa bude zisťovať. Predpokladom na úspešný ELISPOT je najskôr špecifická stimulácia sledovaných buniek správnym podnetom. Napríklad pri detekcii počtu T lymfocytov špecifických pre určitý antigén sú mononukleárne bunky z periférnej krvi pacienta s týmto antigénom inkubované, aby došlo k spracovaniu a prezentácii antigénu T-lymfocytmi. Takto stimulované T-lymfocyty sú prenesené na mikrotitračné doštičky ELISPOTu. Cytokíny uvoľnené zo stimulovaných T-lymfocytov sa počas inkubácie naviažu na primárne anticytokínové protilátky fixované na membráne. Po inkubácii sa bunky lyzujú a premytím odstránia. V ďalšom kroku je pridaná biotínom značená sekundárna protilátka proti zisťovanému cytokínu. Jej väzba sa deteguje pomocou streptavidín konjugovaného enzýmu. V poslednom kroku sa pridá farebný substrát a peroxid vodíka.

**Výsledok:** na mieste, kde T-lymfocyt produkoval daný cytokín, sa vytvorí farebný bod (spot) na dne jamky (obrázok 65).

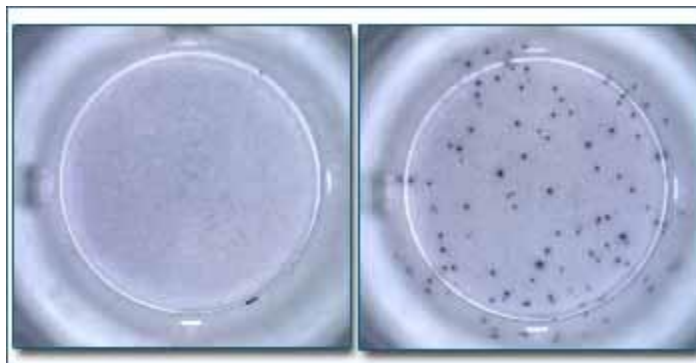
Analýza (obrázok 66): intenzita a veľkosť spotov závisí od množstva uvoľneného cytokínu

jeden spot = zodpovedá jednej bunke

počet spotov = počet buniek produkujúcich cytokín



**Obr. 65** Princíp ELISPOT (upravené podľa: <http://www.rndsystems.com/resources/images/5680.gif>)



**Obr. 66** ELISPOT vľavo negatívny, vpravo pozitívny výsledok  
([https://aid-diagnostics.com/deutsch/bild\\_allg/borders/eli-assays.jpg](https://aid-diagnostics.com/deutsch/bild_allg/borders/eli-assays.jpg))

ELISPOT umožňuje odčítať množstvo buniek produkujúcich stanovovaný cytokín. **Pre každú stimulovanú bunku produkujúcu cytokíny sa vytvorí farebný spot. Väčší spot indikuje bunku produkujúcu viac cytokínov ako bunka, ktorá má menší spot.** Vyhodnotenie počtu spotov (tzn. počtu stimulovaných – aktivovaných buniek produkujúcich cytokíny) je možné manuálne pomocou inverzného mikroskopu alebo automaticky. Metóda síce nie je nová, ale až v posledných rokoch boli vyvinuté postupy na analýzu aj väčšieho množstva doštičiek pomocou automatických prístrojov ELISPOT readerov. Tieto dokážu vyhodnotiť veľké množstvo doštičiek na základe digitálnej analýzy obrazu.

**Využitie:** Vstupné náklady pre prístrojové vybavenie ELISPOT sú však vysoké. Preto patrí medzi špecializované metódy dostupné hlavne vo veľkých laboratóriách, určené sú nielen na laboratórnu diagnostiku, ale aj na výskum. Má využitie na stanovenie sekrécie cytokínov *in vitro* najmä pri vývoji vakcín, liekov, pri sledovaní priebehu infekčných chorôb, pri monitorovaní účinkov protinádorovej imunoterapie, imunoterapie alergií, pri transplantáciách, autoimunitných ochoreniach, na určenie Th1-Th2 rovnováhy.

#### 4.5 PCR – Polymerase Chain Reaction

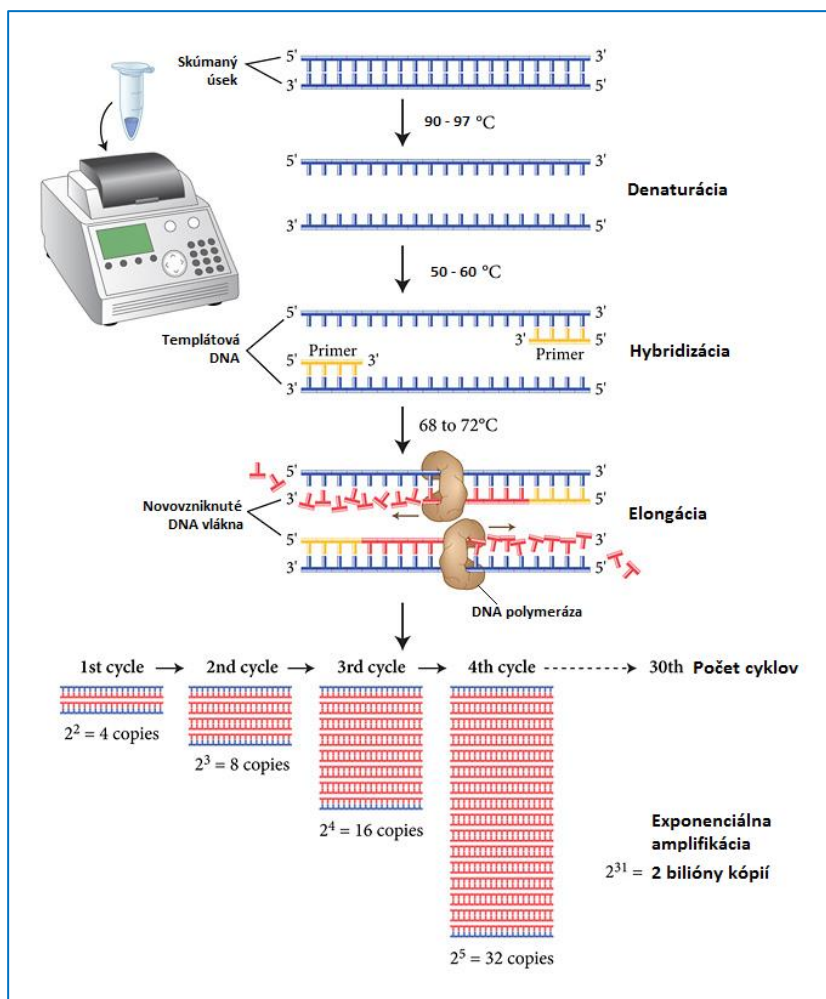
**Polymerázová reťazová reakcia** je metóda umožňujúca **mnohonásobné zmnoženie (amplifikáciu) špecifického úseku DNA *in vitro***, založená je na princípe replikácie, pričom veľkosť amplifikovaného úseku ohraničujú dva oligonukleotiky – primery. Touto technikou je možné amplifikovať špecifické fragmenty DNA aj v prípade, keď je množstvo vzorky DNA malé.

**Princíp reakcie** je založený na replikácii nukleových kyselín. Dvojvláknová DNA je schopná denaturovať pri vysokej teplote a vznikajú dve izolované vlákna. Následne pri znížení teploty dochádza k renaturácii so zachovaním komplementarity báz. Špecifická sekvencia, ktorá má byť amplifikovaná, musí byť označená pomocou oligonukleotidových sond (primerov). PCR je exponenciálna reakcia, kedy sa po každom cykle zdvojnásobí počet kópií označeného úseku DNA, teoreticky ak sa vychádza z jednej kópie fragmentu DNA, získa sa po 35 cykloch  $2^{35}$  kópií, t.j.  $7.10^{10}$ . Toto množstvo predstavuje cca 1 µg DNA, teda dostatočné množstvo na použitie pre ďalšie aplikácie (obrázok 67).

Jeden cyklus PCR prebieha v troch opakujúcich sa krokoch:

1. **Denaturácia dvojvláknovej molekuly DNA** (pri 90-97 °C), pri ktorej dochádza k oddeleniu jednotlivých vlákien DNA templátu (vzniknú dva jednoduché reťazce), čo umožní hybridizáciu primerov.
2. **Hybridizácia (annealling, naviazanie, „nasadnutie“) primerov** ku komplementárnej sekvencii denaturovaného templátu DNA (ku 3'koncu). Prebieha pri teplote 50-60 °C.
3. **Elongácia (extenzia) je syntéza nových vlákien**, počas ktorej DNA polymeráza prikladá k 3'OH koncu primera nukleotidy podľa komplementárnej sekvencie templátu (prebieha pri teplote 72 °C, čo je optimum pre **Taq polymerázu**. Je to DNA polymeráza izolovaná z baktérie *Thermus aquaticus*, ktorá žije v horúcich prameňoch). Tým dochádza k predlžovaniu vlákien DNA v smere od 5'konca k 3'koncu.

Po dokončení syntézy oboch vlákien sa skúmavka s PCR znovu zahreje na 95 °C, aby mohla prebehnúť opäť denaturácia novovzniknutých DNA vlákien (amplikónov), ktoré slúžia v ďalšom cykle ako matrica pre vznik nových kópií. Cykly sa opakujú 25 až 35-krát v programovateľnom prístroji – **termocykler**. Amplifikovaná DNA sa dokazuje napr. elektroforeticky, fluorescenčne...

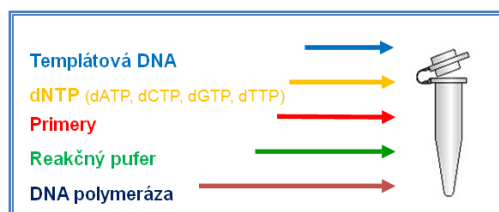


**Obr. 67** Schéma reakcie PCR (upravené podľa:

<https://www.neb.com/~media/NebUs/Page%20Images/Applications/DNA%20Amplification%20and%20PCR/pcr.jpg>)

**Základnými potrebami štandardnej PCR sú (obrázok 68):**

- templátová DNA – vzorka DNA, ktorá obsahuje skúmaný úsek
- dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) – zmes všetkých 4 deoxynukleotidtrifosfátov
- primery – syntetické oligonukleotidy potrebné pre hybridizáciu
- reakčný pufer
- DNA polymeráza – Taq polymeráza



**Obr. 68** Základné súčasti štandardnej PCR (vlastné spracovanie)

**Využitie:** PCR sa uplatňuje v diagnostike mnohých ochorení alebo predispozícií k nim, pri zisťovaní etiologických agensov infekčných chorôb, pri zisťovaní mutácií DNA

a v mnohých ďalších oblastiach. Používa sa aj v situáciách, kedy sa infekčný pôvodca kultivuje pomaly, identifikuje sa obtiažne alebo sa zatiaľ nedá kultivovať. PCR je možné využiť pri identifikovaní *M. tuberculosis*, *Chlamydia trachomatis*, *N.gonorrhoeae*, *B. burgdorferi*, *Legionella.spp.*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Bartonella henselae* a ďalších.

### Otázky k samohodnoteniu

1. Čo je imunofluorescencia? Na dôkaz čoho sa využíva priama imunofluorescencia? Nepriama imunofluorescencia sa využíva častejšie na dôkaz antigénov alebo protilátok? Ako sa prejaví pozitívna reakcia pri imunofluorescenčnom dôkaze?
2. Čo umožňujú imunoanalytické metódy a kde sa využívajú? Čo je spoločným znakom imunoanalytických metód a ako sa rozdeľujú?
3. Aká reakcia sa využíva pri enzýmovej imunoanalýze vo fáze vizualizácie? Čo je princípom ELISA testu? Prečo je dôležité premývanie medzi jednotlivými krokmi ELISA? Ktorá zložka reakcie musí byť naviazaná na stene mikrotitračnej doštičky pri ELISE ak sa ide použiť na dôkaz protilátok a ktorá pri dôkaze antigénov?
4. Čo sú imunoblotovacie techniky? Vysvetlite princíp Western blotu a imunodotu. Kedy a prečo sa využívajú blotovacie techniky? Vysvetlite čo znamená konfirmačné testy?
5. Čo je to ELISPOT? Na vyšetrenie ktorej zložky imunity sa využíva? Čo sa meria ELISPOTom? Uveďte príklady, kde možno túto metódu využiť.
6. Čo je polymerázová reťazová reakcia? Aký je princíp PCR? Z ktorých krokov sa skladá jeden cyklus PCR? V diagnostike ktorých ochorení sa PCR využíva?

# 5 METÓDY POUŽÍVANÉ NA VYŠETRENIE ZLOŽIEK BUNKOVEJ IMUNITY

## 5.1 DÔKAZ ŠPECIFICKEJ BUNKOVEJ IMUNITY, METÓDY POUŽÍVANÉ IN VIVO A IN VITRO PRI DIAGNOSTIKE TUBERKULÓZY

**Tuberkulóza je chronicky prebiehajúca infekčná choroba**, ktorá je vyvolaná predovšetkým (až v 95 % prípadov) acidorezistentnými baktériami *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). Cieľovým orgánom sú hlavne pľúca (pľúcna tuberkulóza), ale môžu spôsobiť chorobný proces aj v mimopľúcnej lokalizácii (mimopľúcna – extrapulmonálna tuberkulóza).

Latentná (subklinická) tuberkulózná infekcia znamená usídlenie tuberkulózných mykobaktérií v organizme, ktoré však nevyvolávajú klinicky manifestnú infekciu. Len okolo 10 -15 % latentne infikovaných osôb skutočne ochorie na aktívnu tuberkulózu. Vznik aktívnej formy tuberkulózy z latentnej formy môže trvať niekoľko desiatok rokov za podmienok, kedy dôjde z rôznych dôvodov k oslabeniu funkcie obranných mechanizmov.

**Latentná tuberkulózná infekcia** predstavuje v krajinách s nízkou incidenciou tuberkulózy rezervoár vzniku nových tuberkulózných infekcií. Postihuje približne 1/3 ľudstva a je ďalším zdrojom tuberkulóznej infekcie hlavne pri oslabení obranných funkcií organizmu – imunosupresii. Identifikáciou a preventívnou liečbou sa môže znížiť počet ochorení na tuberkulózu a tak zabrániť ďalšiemu šíreniu tuberkulózy v populácii.

**Na identifikáciu latentných foriem tuberkulózy** bol medzinárodne prijatý postup, kedy sa v krajinách s povinnou BCG vakcináciou populácie vykonáva okrem štandardných diagnostických postupov aj vyšetrenie imunologické.

Medzi **štandardné diagnostické postupy** sú zaradené:

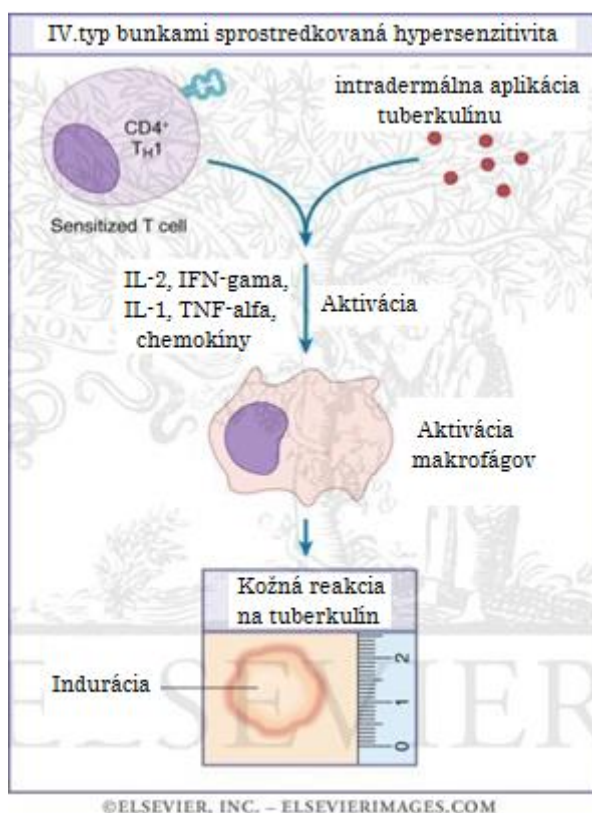
- klinické vyšetrenie
- rtg vyšetrenie
- bakteriologické vyšetrenie
- kožný tuberkulínový test

**Imunologické vyšetrenie – IGRA testy** (Interferón Gamma Release Assay) sa vykonávajú u kontaktov (hlavne zdravotníckych pracovníkov vystavených otvoreným formám tuberkulózy), u pacientov pred začatím biologickej liečby preparátmi antiTNF $\alpha$ , ďalej pri vyšetrení rizikových skupín (utečenci, vojaci pôsobiaci na misiách v krajinách s vysokou prevenciou tuberkulózy, väzni).

### 5.1.1 Kožný tuberkulínový test

Tuberkulínový test (Mantoux II) je celosvetovo akceptovaný spôsob diagnostikovania latentnej formy tuberkulózne infekcie.

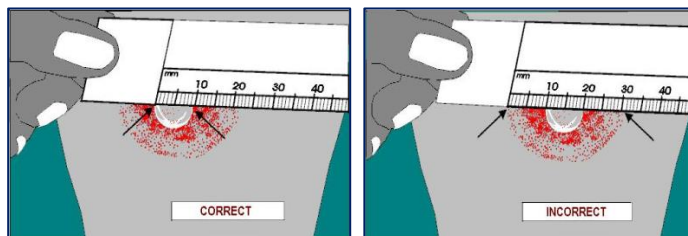
**Princíp:** Ide o precitlivenosť tuberkulínového typu, ktorá patrí k **IV. typu hypersenzitivity (oneskorená, sprostredkovaná bunkami)**. Robert Koch popísal túto formu precitlivenosti u chorých na tuberkulózu. Po subkutánnej injekcii tuberkulínu mali pacienti celkový pocit choroby so zvýšenou teplotou a na mieste injekcie vznikol edém a zatvrdnutie kože. Práve táto kožná reakcia sa dnes využíva v tuberkulínovom kožnom teste. T-lymfocyty po kontakte s antigénom mikroorganizmu (prezentovaným antigén prezentujúcimi bunkami) uvoľňujú do prostredia početné cytokíny typu Th1 (hlavne interferón gama –  $\text{IFN}\gamma$ , interleukín 2), ktoré vyvolávajú zmeny typické pre tieto reakcie. Priťahujú makrofágy do miesta aplikácie tuberkulínu, kde dochádza k nahromadeniu makrofágov a ich aktivácii. Zatvrdnutie, edém a erytém majú najväčšiu intenzitu za 48-72 hodín, preto „oneskorený“ typ hypersenzitivity (obrázok 69).



**Obr. 69** Princíp tuberkulínovej reakcie (upravené podľa: *elsevierimages.com*)

**Postup:** Pri kožnom tuberkulínovom teste sa aplikuje injekčne 0,1 ml (5 tuberkulínových jednotiek) purifikovaného proteínového derivátu – PPD do hornej vrstvy pokožky predlaktia bez abnormalít. Aplikuje sa prísne intradermálne. Správna aplikácia vedie k diskretnému bledému vyvýšeniu kože v mieste aplikácie 6-10 mm v priemere, ktorý sa rýchlo vstreáva.

**Odčítanie:** Kožný test sa odčíta za 48-72 hodín od aplikácie tuberkulínu. Reakcia na tuberkulín je prítomnosť hmatnej, vyvýšenej svrdnutej plochy v okolí miesta vpichu, tzv. indurácia. Hodnotí sa prítomnosť a priemer indurácie. Priemer sa meria priečne k dlhej osi predlaktia (obrázok 70, 71). Začervenanie, prípadne podliatina sa nemerajú. Miesto aplikácie môže svrbieť, môžu vzniknúť aj pľuzgieriky naplnené tekutinou alebo iné narušenie celistvosti kože v mieste vpichu. Po viac ako 72 hodinách je výsledok už skreslený.



**Obr. 70** Odčítanie kožného testu (vľavo správne, vpravo nesprávne meranie)  
(<http://www.jfmed.uniba.sk>)



**Obr. 71** Postup pri odčítaní kožného testu (meranie priemeru indurácie kolmo k dlhej osi predlaktia) ([http://images.slideplayer.cz/10/2641126/slides/slide\\_23.jpg](http://images.slideplayer.cz/10/2641126/slides/slide_23.jpg))

### Interpretácia tuberkulínového testu

Interpretácia tuberkulínového testu je komplikovaná postvákcinálnou imunitou (po BCG vakcíne). Špecifická a senzitivita vyšetrenia je vzhľadom k postvákcinálnej imunite nízka. Špecifita (pravdepodobnosť, že test bude negatívny u osôb bez choroby) je u BCG vakcinovanej populácie 46-73 %. Senzitivita (pravdepodobnosť, že test bude pozitívny u chorých) u BCG vakcinovanej populácie je 77 % (Pai a spol., 2010).

**Falošne pozitívne výsledky tuberkulínového testu** môžu vzniknúť nielen po BCG vakcinácii, ale aj pri infekciách atypickými baktériami, pri aplikácii tuberkulínu do miesta patologicky zmenenej kože, atď.

**Falošne negatívny výsledok tuberkulínového testu** môže vzniknúť po prekonanej vírusovej infekcii, očkovaní živou vírusovou vakcínou, po imunosupresívnej/kortikosteroidnej liečbe, u pacientov s HIV, atď.

**Priemer indurácie je interpretovaný ako pozitívny v závislosti od určitých okolností:**

- Zdravý imunitný systém – 15 a viac mm
- Oslabený imunitný systém – 5 a viac mm
- Zdravotnícki pracovníci, kontakty s aktívnou tuberkulózou, bezdomovci, väzni, utečenci, - 10 a viac mm

### 5.1.2 IGRA testy (Interferón Gamma Release Assay)

Sú imunologické testy *in vitro* medzinárodne schválené na detekciu latentnej tuberkulózne infekcie. Používa sa QuantiFERON – TB Gold test alebo T-SPOT.TB test. Tieto testy pomáhajú detegovať infekciu *M. tuberculosis*.

**Princíp:** Založené sú na kvantifikácii interferónu gama (INF- $\gamma$ ) uvoľneného zo senzibilizovaných T-lymfocytov v plazme ako reakcia na antigény *M. tuberculosis* pomocou ELISA testu (4.2.1) alebo ELISPOTu (kapitola 4.4). Majú menej falošne pozitívnych výsledkov ako kožný tuberkulínový test.

**Indikácie:** IGRA testy sú indikované podľa metodického odporúčania hlavného odborníka MZ SR pre odbor pneumológia a ftizeológia:

- U všetkých pacientov pred začatím biologickej liečby preparátmi antiTNF $\alpha$ : každý pacient pred začatím takejto liečby musí byť vyšetrený pneumológom a dispenzarizovaný za účelom vylúčenia latentnej alebo aktívnej tuberkulózne infekcie. Ide o preparáty používané pri liečbe reumatoidnej artritídy, juvenilnej chronickej artritídy, ankylozujúcej spondylitídy, psoriázy, psoriatickej artritídy, ulceróznej kolitídy a Crohnovej choroby. TNF $\alpha$  plní kľúčovú úlohu v obranyschopnosti proti mykobakteriálnym infekciám a pri oslabení jeho aktivity hrozí riziko reaktívácie tuberkulózy alebo infekčných ochorení vyvolávajúcich granulomatózne reakcie.
- U zdravotníckych pracovníkov, ktorí sú v kontakte s otvorenými formami tuberkulózy
- U vojakov prichádzajúcich z misií z krajín s vysokou prevalenciou tuberkulózy
- U rizikových skupín pri podozrení na výskyt tuberkulózy (žijúcich v oblastiach s vysokou prevalenciou tuberkulózy)
- V rámci diferenciálnej diagnostiky pri pľúcnej a mimopľúcnej tuberkulóze
- Opakovane raz za rok u pacientov liečených preparátmi antiTNF $\alpha$
- U kontaktov, osôb, ktoré boli v styku s pacientom s aktívnou formou tuberkulózy.

### QuantiFERON – TB Gold test

Je to imunologický diagnostický laboratórny test, ktorý napomáha detegovať infekciu *M. tuberculosis*.

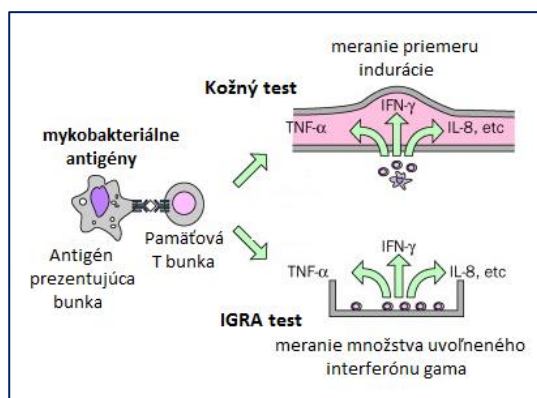
**Postup:** Test zahŕňa odber krvi venepunkciou do 3 špeciálnych skúmaviek s farebne označenými vrchnákmi (sivý – Nill Control, červený – TB antigén, modrofialový – Mitogen Control) v množstve 1 ml krvi do každej skúmavky – po čiernu rysku na skúmavke, následné dôkladné premiešanie. V laboratóriu nasleduje inkubácia heparinizovanej krvi 16-24 hodín s antigénmi, ktoré sa vyskytujú iba v *M. tuberculosis* (ESAT-6, CFP-10, TB7.7) a nie sú prítomné v žiadnom z kmeňov používaných pri BCG vakcinácii. Práve chýbanie týchto antigénov v BCG vakcíne sa využíva v diagnostike aktívnej aj latentnej tuberkulózne infekcie v populácii očkovanej BCG vakcínou. Špecifita testu je odhadovaná na 98 %, senzitivita testu na 89 %. Po inkubácii nasleduje stanovenie INF- $\gamma$  v plazme pomocou ELISA testu. Výhody QuantiFERON – TB Gold testu spočívajú v tom, že výsledok nie je ovplyvnený predchádzajúcou BCG vakcináciou,

nevzniká subjektívna chyba pri odčítaní výsledku a stačí jedna návšteva u lekára, netreba sa dostaviť na odčítanie testu v presnom termíne.

**Výsledok:** Pozitívny výsledok vyšetrenia IGRA testom podporuje diagnózu infekcie *M. tuberculosis*. Je nutné korelovať s klinickými nálezmi a anamnestickými údajmi a usilovať sa o bakteriologické potvrdenie štandardnými metódami (mikroskopia, klasické a metabolické kultivačné metódy a génové metódy).

Negatívny výsledok vyšetrenia znamená, že aktívna infekcia *M. tuberculosis* je nepravdepodobná, ale nemožno ju s určitosťou vylúčiť. Doporučuje sa klinické sledovanie s eventúalnym vykonaním štandardných bakteriologických vyšetrení a v časovom odstupe je možné IGRA test opakovať.

Obidva typy testov vykonávaných *in vivo* (kožný test) aj *in vitro* (IGRA testy) sú schematicky znázornené na obrázku 72.



**Obr. 72** Testy *in vivo* a *in vitro* na detekciu aktívnej alebo latentnej tuberkulózne infekcie (upravené podľa: <http://www.thelancet.com/cms/attachment/2002735434/2009762277/gr1.jpg>)

## Otázky k samohodnoteniu

1. Čo je schválené na identifikáciu latentných foriem tuberkulózne infekcie? Ktoré metódy slúžia na dôkaz špecifickej bunkovej imunity *in vivo* a ktoré *in vitro*?
2. Čo je princípom kožného tuberkulínového testu? Aký typ hypersenzitívnej reakcie je zodpovedný za precitlivosť tuberkulínového typu? Ktoré cytokíny sa uvoľňujú z T-lymfocytov po kontakte s tuberkulínom? Čo je tuberkulín?
3. V akom časovom intervale sa odčítava test a čo sa meria? Ako sa interpretuje výsledok odčítania tuberkulínového testu? Kedy sa využíva tento test? Kedy môže byť falošne pozitívny a falošne negatívny?
4. Čo sú to IGRA testy? Na akom princípe sú testy IGRA založené? Akou metódou sa meria množstvo uvoľneného interferónu INF- $\gamma$ ? U koho sa vykonávajú? Aké sú výhody IGRA testov u populácie zaočkovanej BCG vakcínou?

## 6 IMUNODEFICITNÉ STAVY

**Imunodeficiencia je imunitná nedostatočnosť, porucha imunitného systému prejavujúca sa zníženou odolnosťou.** Je to stav organizmu, pri ktorom je niektorá zložka (jedna alebo viaceré zložky) imunitného systému porušená, a to v zmysle chýbania, zníženia alebo alterácie. Podozrenie na imunodeficitný stav vzniká zvyčajne pri zvýšenej náchylnosti na infekcie, pomerne charakteristické sú recidivujúce infekcie.

Imunodeficiencie môžu byť dedičné (primárne, vrodené, genetické poruchy) alebo získané (sekundárne). Vrodené imunodeficitné stavy sú spôsobené poruchami génov, ktoré kódujú niektoré súčasti dôležité pre funkcie imunitného systému.

- ❖ **Primárne imunodeficiencie** – ich závažné formy sú zriedkavejšie ako sekundárne imunodeficiencie.
- ❖ **Sekundárne imunodeficiencie** sú získané počas života, vyskytujú sa častejšie, možno sa s nimi stretnúť v mnohých medicínskych odboroch. Príčiny ich vzniku sú rôznorodé (napr. imunoterapia, iatrogénne navodenie, po ochorení, v súvislosti s vekom, malignity atď.).

Imunodeficitné stavy **môžu byť navodené umelo alebo spontánne**, môžu sa týkať ktorejkoľvek funkcie alebo zložky imunitného systému – rozpoznávacej, regulačnej, obrannej funkcie, bunkovej alebo humorálnej imunity, špecifickej alebo nešpecifickej imunity.

**Môžu byť parciálne alebo celkové**, môžu zvyšovať alebo znižovať prejavy imunitných mechanizmov.

### 6.1 PRIMÁRNE IMUNODEFICITY

Sú to **vrodené poruchy spôsobené mutáciami génov pre jednotlivé zložky imunitného systému**, zvyčajne sú závažné, ale zriedkavejšie. Môžu sa prejavovať širokou škálou klinických príznakov od ľahších až po veľmi závažné prejavy ťažkých infekcií vedúcich k smrti postihnutého jedinca v útlom veku (ťažké kombinované imunodeficity). Obvykle sa zistí pozitívna rodinná anamnéza.

#### 6.1.1 Klinická manifestácia

**Klinická manifestácia** je rôznorodá: môže sa pozorovať neprospievanie, chronická hnačka, atypické kožné vyrážky, oportúnne infekcie. Môžu byť prítomné opakované kožné či orgánové abscesy, opakované infekcie určitou skupinou mikroorganizmov, opakované ťažké infekcie so zlou odpoveďou na použitú liečbu. Najčastejšie sa vyskytujú primárne imunodeficity protilátkové (okolo 70 %), nasledujú bunkové a kombinované (20 %), fagocytárne (9 %) a komplementové (1 %). V tabuľke 4 je zhrnuté základné rozdelenie primárnych imunodeficitov.

**Tab. 4** Primárne imunodeficity a ich charakteristika (vlastné spracovanie)

	protilátkové	bunkové a kombinované	fagocytárne	komplementové
<b>výskyt v rámci imunodeficitov</b>	70 %	20 %	9 %	1 %
<b>príznaky začínajú</b>	od 6. mesiaca až do dospelosti	po narodení až do cca 2. roku	po narodení, v detstve aj v dospelosti	v detstve aj v dospelosti
<b>príznaky</b>	infekcie dýchacích ciest, otitídy, artritídy	neprospievanie, infekcie dýchacích ciest, hnačky, dermatitídy	omfalitídy, pyodermie, adenitídy, otitídy	pyogénne infekcie, edémy
<b>pôvodcovia ochorení</b>	opuzdrené mikroorganizmy, echovírusy	vírusy, pneumocysty, plesne, mykobaktérie	stafylokoky, plesne, enterobaktérie	neisserie
<b>komplikácie</b>	echovírusové infekcie, nádory, autoimunitné choroby	nádory, autoimunitné choroby	infekcie, rôzne	rôzne
<b>prežívanie</b>	dospelosť	ranné detstvo	rôzne	rôzne
<b>príklady imunodeficitov</b>	- Selektívna IgA deficiencia(sIgAD) - X-viazaná agamaglobulinémia (XLA) - Bežná variabilná imunodeficiencia (CVID)	- Ťažký kombinovaný imunodeficit (SCID)	- Chronická granulomatózna choroba (CGD) - Deficit leukocytárných integrínov (LAD)	- Hereditárny angioedém (HAE)

Varovné príznaky, ktoré svedčia na možnú primárnu imunodeficienciu, sú uvedené v tabuľke 5 (Čížnár, 2006).

**Tab. 5** Varovné príznaky na vyhľadávanie rizikových pacientov s imunodeficitmi

1.	Dieťa s 8 a viac otitídami v priebehu roka, alebo dospelý s opakovanými ušnými komplikáciami
2.	5 a viac potvrdených infekcií prínosových dutín ročne
3.	2 pneumónie v priebehu roka alebo 1 pneumónia ročne v dvoch po sebe nasledujúcich rokoch
4.	2 a viac infekčných bronchitíd ročne
5.	2 a viac hlbokých tkanivových infekcií alebo kožných abscesov
6.	Potreba dlhodobejšej alebo intravenózneho liečba antibiotikami
7.	Sepsa alebo meningitída
8.	Atypické infekcie (napr. kvasinková infekcia v ústach alebo na koži po prvom roku života)
9.	Pretrvávajúca hnačka, malabsorpcia, v prípade detí nepriberanie na hmotnosti alebo zaostávanie v raste
10.	Prítomnosť chronických infekcií
11.	Primárna imunodeficiencia v rodine

### 6.1.2 Liečba pri primárnych imunodeficitoch

Liečba pri vrodenných imunodeficitoch **je rôzna a závisí od druhu a závažnosti imunodeficitu.**

- Pri protilátkových imunodeficitoch sa aplikuje **substitučná liečba gamaglobulínmi** a podporná liečba **antibiotikami**.
- Pri ťažkých a kombinovaných imunodeficitoch, závažných formách defektov fagocytózy sa vykonáva **transplantácia kmeňových hematopoetických buniek**. Úspešnosť závisí od vhodnosti darcu a od včasnosti stanovenia diagnózy.
- V prípade, že sa nemôže z nejakých dôvodov uskutočniť transplantácia, využíva sa **liečba symptomatická** – aplikácia imunoglobulínov intravenózne, antibiotiká širokospektrálne, antimykotiká, virostatiká.

## 6.2 SEKUNDÁRNE IMUNODEFICITY

**Sú to poruchy imunity sprevádzajúce základné ochorenie pacienta, liečbu, malnutríciu, infekcie, stres atď.** V porovnaní s primárnymi imunodeficitmi sa vyskytujú častejšie. So získanými imunodeficitmi je možné stretnúť sa v mnohých medicínskych odboroch.

### 6.2.1 Príčiny sekundárnych imunodeficitov

Sekundárne imunodeficity môžu byť vyvolané mnohými faktormi:

- poruchami metabolizmu (urémie, diabetes, hypotyreóza, dlhodobé redukčné diéty, malnutrie),
- iatrogénnymi vplyvmi (cytostatiká, imunosupresívna liečba, ožarovanie),
- nádorovými ochoreniami,
- vírusovými chorobami (AIDS, osýpky, cytomegalovírusová infekcia, infekčná mononukleóza),
- chronickými infekciami,
- pri pečňovom zlyhávaní, cirhóze pečene
- alkoholizme,
- po splenektómii,
- chronickým stresom,
- ťažkými úrazmi,
- rozsiahlymi popáleninami,
- operáciami,
- celkovou anestézou,
- v súvislosti s vekom (nedonosené deti, staré osoby).

Dočasné imunodeficity boli zaznamenané po prekonaní infekcie niektorými herpetickými vírusmi a tiež po infekcii vírusom osýpok (morbíl).

**Príčiny sa môžu vzájomne kombinovať** (pacient s malignitou, použitá liečba a sekundárna podvýživa). **V celosvetovom meradle však dominuje ako príčina sekundárnych imunodeficitných stavov infekcia HIV a malnutrície (podvýživa).** Podobne ako pri primárnych imunodeficitoch podľa prevažujúcej poškodenej zložky môžu byť sekundárne imunodeficity protilátkové, bunkové, fagocytárne a komplementové alebo ich kombinácie.

### 6.2.2 Liečba pri sekundárnych imunodeficitoch

**Liečba sekundárnych imunodeficitov** spočíva v identifikovaní a terapii základnej príčiny sekundárnych imunodeficitov (alebo jej zmiernení), v rámci podpornej liečby je vhodná terapia preparátmi, ktoré individuálne modulujú funkcie imunitného systému.

## 6.3 DIAGNOSTIKA IMUNODEFICIENCIÍ

### 6.3.1 Anamnéza

Základom diagnostiky imunodeficitných stavov je anamnéza. **V rámci rodinnej anamnézy** sa pátra po výskyte opakovaných infekcií alebo úmrtí v rodine, a to aj ďalej do minulosti (v predchádzajúcich generáciách). Pátra sa dôkladne hlavne u predkov z matkinej strany, pretože mnohé primárne imunodeficity sú viazané na X chromozóm. **V rámci osobnej anamnézy** sa pátra aký bol priebeh tehotenstva a pôrodu, psychomotorický a fyzický vývoj v prvom roku života, výskyt infekcií, ich závažnosť a opakovanie, aké boli reakcie po očkovaní. Pri podozrení na sekundárny imunodeficit najmä u dospelých sa hľadá základná príčina, ktorá mohla viesť k jeho vzniku. Cieľom je teda identifikovať jednak základné ochorenie, ale aj na to nasadajúci imunodeficit.

### 6.3.2 Klinický obraz

Ďalším krokom je klinický obraz, ktorý síce môže byť rôznorodý, ale **dominujú v ňom opakované infekcie**. Pri podozrení na primárne imunodeficity ide najčastejšie o infekcie dýchacích ciest.

- **Pri deficite protilátkového typu** sú to prevažne opakované respiračné infekcie, ktoré sa začnú náhle objavovať po šiestom mesiaci veku dieťaťa, pretože sa vytratí ochranný efekt materských protilátok prenesených transplacentárne. Najčastejšími pôvodcami bývajú extracelulárne baktérie (*Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* a pod.) a vírusy.
- **Pri deficite bunkového typu** sú to opakované respiračné infekcie, pri tých najťažších stavoch, kedy je kombinovaný imunodeficit bývajú infekcie veľmi závažné a vznikajú už v rannom detstve. Pôvodcami sú najčastejšie intracelulárne baktérie, rôzne atypické kmene mikroorganizmov, vírusové a mykotické infekcie.
- **Pri fagocytárnom deficite** sú to infekcie vyvolané pyogénnymi baktériami, najčastejšie stafylokokmi.
- **Pri deficite v oblasti komplementu** sú to infekcie vyvolané najmä neisseriami.

Podľa povahy imunodeficitu môže dôjsť aj k vzniku komplexného klinického obrazu typického pre danú poruchu imunitného systému (napr. Brutonova

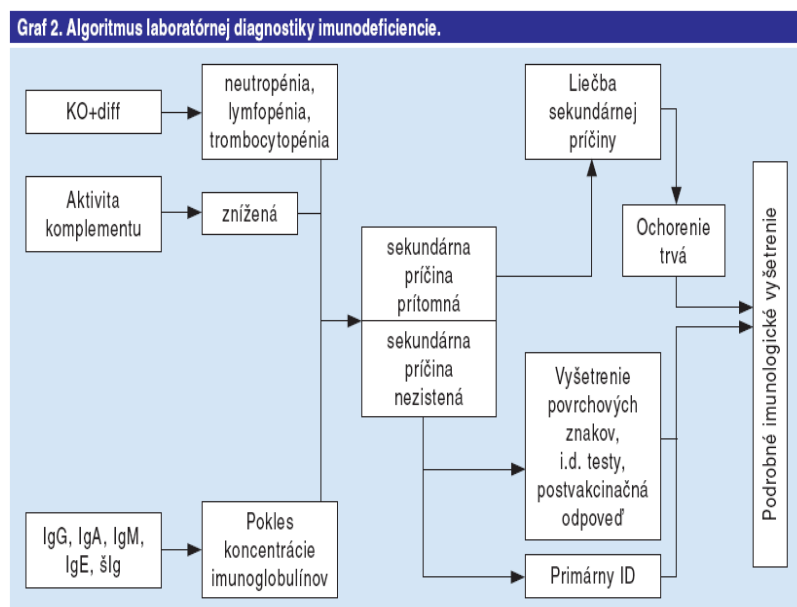
agamaglobulinémia, DiGeorgov syndróm, hereditárny angioedém atď). Pri sekundárnych imunodeficitoch je spektrum klinických príznakov veľmi rôznorodé a typický obraz (ako býva u primárnych imunodeficitov) sa tu nevyskytuje, hoci sa môžu deliť podľa prevažujúcej poškodenej zložky (obdobne ako primárne).

### 6.3.3 Spektrum imunologických vyšetrení v prípade diagnostiky imunodeficiencií.

Základom je vyšetriť imunoglobulíny a špecifické protilátky. Orientačne sa môže použiť elektroforéza séra, kde sa zachytí oblasť gamaglobulínov, v ktorej sa pohybujú imunoglobulíny (pozri obrázok 50).

**Na vyšetrenie sérových ukazovateľov** sa používa čerstvo odoberatá krv. Odoberá sa do čistej suchej skúmavky, bez protizrážanlivého prostriedku. Po viditeľnom oddelení krvného koláča sa skúmavka scentrifuguje a sérum odsaje. Sérum treba spracovať ihneď, aby nedošlo k zmene niektorých ukazovateľov ich degradáciou. Pokiaľ sérum nie je možné ihneď spracovať, je možné ho odložiť do mrazničky na dlhšiu dobu pri teplote  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Stanovujú sa hladiny imunoglobulínov a ich podtiedy a hladiny špecifických protilátok po očkovaní (na dôkaz schopnosti odpovedať tvorbou protilátok po podaní špecifických proteínových alebo polysacharidových antigénov).

**Na analýzu bunkovej imunity** je potrebná nezrazená krv, zrážaniu sa zabráni pridaním protizrážanlivého prostriedku. Takto pripravená krv sa používa na ďalšie spracovanie, môžu sa použiť rozličné separačné metódy. Izolovať sa môžu polymorfonukleárne leukocyty, lymfocyty, môžu sa stanoviť ich počty a určiť subpopulácie T a B-lymfocytov. Algoritmus laboratórnej diagnostiky imunodeficiencie je znázornený na obrázku 73.



**Obr. 73** Algoritmus laboratórnej diagnostiky imunodeficiencie (Čížnar, 2006)

### 6.3.4 Metódy používané v laboratórnej diagnostike imunodeficitných stavov

#### *Vyšetrenie humorálnej imunity*

- stanovenie hladín imunoglobulínov IgG, IgM, IgA – turbidimetria, radiálna imunodifúzia (RID)
- IgE – ELISA
- Stanovenie podtried imunoglobulínov – ELISA
- Hladiny špecifických protilátok po očkovaní – ELISA
- Stanovenie kryoglobulínov
- Dôkaz imunokomplexov – turbidimetria
- Dôkaz proteínov akútnej fázy zápalu a slizničných a sérových proteínov (CRP, alfa1antitrypsín, makroglobulín, transferín, ceruloplasmín, orosomukoid, lyzozým) – RID, turbidimetria
- Dôkaz autoprotílátok – imunofluorescencia
- Dôkaz funkcie a hladín komplementovej kaskády – turbidimetria, RID, CH50, stanovenie C3, C4 zložky komplementu

#### *Vyšetrenie bunkovej imunity*

- Krvný obraz a diferenciálny leukogram
- Počty T a B-lymfocytov – test aktívnych roziet, ELISPOT, hladiny lymfokínov (spontánne a po stimulácii antigénom)
- Kožné testy
- Stanovenie subpopulácií T-lymfocytov – prietoková cytometria, ELISA
- Stanovenie NK buniek
- Stanovenie počtu a funkcie neutrofilov – fagocytóza, fagocytárna aktivita, fagocytárny index, test nitrotetrazoliovou modrou
- Typizácia HLA antigénov – sérotypizácia, PCR

Okrem skríningových testov sa vykonáva v špecializovaných laboratórnych pracoviskách exaktná diagnostika imunodeficitných stavov. Podrobná diferenciálna diagnostika patrí do rúk klinického imunológa.

**Včasnú rozpoznávanie diagnózy je veľmi dôležité z hľadiska prognózy pacienta.** Oneskorenie diagnózy vedie k zlej kvalite života pacienta, najmä z dôvodu častej chorobnosti, vedie k ireverzibilnému tkanivovému poškodeniu a k zvýšeniu nákladov na dlhodobú liečbu.

#### **Otázky k samohodnoteniu**

1. Čo je imunodeficiencia? Čo je príčinou primárnych imunodeficitov? Čo je príčinou sekundárnych imunodeficitov? Čo dominuje ako najčastejšia príčina sekundárnych imunodeficitov?
2. Aké skupiny primárnych imunodeficitov sa môžu vyskytovať a ktoré z nich bývajú najčastejšie? Aké sú varovné príznaky na vyhľadávanie rizikových pacientov?
3. Aké postupy sa používajú na diagnostiku imunodeficitných stavov? Čo dominuje v klinickom obraze pri deficitoch jednotlivých typov imunodeficitov?

# 7 AUTOIMUNITNÉ OCHORENIA A ICH DIAGNOSTIKA

## 7.1 AUTOIMUNITA

Autoimunita môže byť definovaná ako **porušenie mechanizmov zodpovedných za toleranciu voči vlastným antigénom a navodenie imunitnej odpovede proti zložkám vlastného tela**. Táto imunitná odpoveď nemusí byť škodlivá vo všetkých prípadoch, ale v mnohých prípadoch autoimunitných ochorení je zjavné, že produkty imunitného systému poškadzujú vlastný organizmus. Ako výkonné nástroje pri vzniku autoimunitných ochorení môžu pôsobiť aj protilátky aj T-lymfocyty. Incidencia autoimunitných ochorení sa pohybuje na úrovni 5 – 7 % populácie.

## 7.2 AUTOPROFILÁTKY

Autoprotilátky sú **imunoglobulíny, ktoré sú namierené proti vlastným antigénom organizmu** (napr. proteínom, fosfolipidom, nukleovým kyselinám atď.) a nachádzajú sa v sére a ďalších telesných tekutinách.

Pre normálnu funkciu ľudského organizmu je **autoreaktivita** do určitej miery potrebná. Autoreaktívne procesy teda prebiehajú aj v organizme zdravého človeka. Tieto autoprotilátky sa označujú ako **prirodzené (fyziologické) autoprotilátky**, majú nízku afinitu a zvyčajne sú izotypu IgM. Keďže ich koncentrácia v sére býva veľmi nízka, bežne dostupnými laboratórnymi metódami sa ich prítomnosť často nezachytí. Ich výskyt stúpa s vekom, vo vyššom veku je ich nález autoprotilátok bežný, ale ich úloha v autoimunitnom ochorení je nepodstatná. Na druhej strane, u detí je potrebné venovať zvýšenú pozornosť nálezu autoprotilátok.

Ale tiež platí, že **autoimunitné ochorenie vzniká vtedy, ak množstvo autoimunitných procesov presahuje regulačné (adaptačné a homeostatické) schopnosti organizmu a vedie k poškodeniu**. Z tohto dôvodu len samotný nález autoprotilátok nie je dôkazom autoimunitného ochorenia (existujú zdravé osoby s nálezom autoprotilátok), potrebná je klinická manifestácia a autoprotilátky môžu byť prítomné v organizme aj dlho pred začatím ochorenia.

**Autoprotilátky pri autoimunitnom ochorení sú prítomné zvyčajne vo vysokých koncentráciách a prevažujú izotypy IgG a IgA s vysokou afinitou**. Ak sa však nenájde aj klinická symptomatológia, nemôže sa tento nález považovať za autoimunitné ochorenie. Jedincov s nálezom autoprotilátok je však potrebné sledovať a včas odhaliť varovné klinické príznaky, aby sa predišlo vzniku ireverzibilného poškodenia.

Predpokladá sa, že autoprotilátky nie sú bezprostrednou príčinou autoimunitného ochorenia, ale sú skôr markerom autoimunitného ochorenia. Ich nález môže predchádzať

klinickému prejavu autoimunitnej choroby, môže byť jeho súčasťou, autoprotílaky môžu pretrvávať po ochorení, ale môžu byť v organizme aj bez ochorenia.

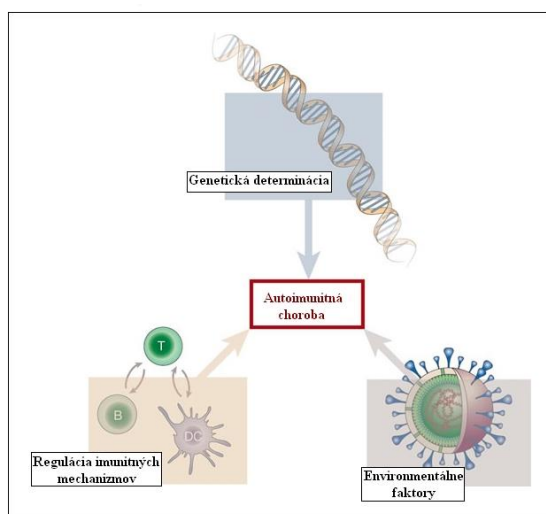
### 7.3 DELENIE AUTOIMUNITNÝCH OCHORENÍ

Autoimunitné choroby sa delia **podľa orgánov a tkanív, ktoré postihujú** na:

- **Orgánovo špecifické** – imunitná odpoveď je namierená proti antigénom, ktoré súvisia s určitým cieľovým orgánom, patologický proces postihuje určitý orgán
- **Orgánovo nešpecifické (systémové)** – imunitná odpoveď je namierená proti antigénom, ktoré nesúvisia s cieľovým orgánom, postihnuté bývajú viaceré orgány a tkanivá

**V etiológii autoimunitných ochorení sa uplatňuje viaceré faktory.** Environmentálne faktory prostredia môžu vyvolať autoimunitné ochorenie u geneticky predisponovaných jedincov za podmienok porušených regulačných mechanizmov imunity (obrázok 74).

**Klinická manifestácia** autoimunitných ochorení je ovplyvnená mnohými faktormi a je veľmi rozmanitá. Podľa postihnutia orgánov alebo tkanív autoimunitným procesom sa delia na systémové a orgánové autoimunitné ochorenia.



**Obr. 74** Podmienky pre vznik autoimunitnej choroby (upravené podľa Fathman, 2005)

### 7.4 SYSTÉMOVÉ AUTOIMUNITNÉ OCHORENIA

Medzi **systémové autoimunitné ochorenia** sa zaraďujú nasledovné:

- Systémový lupus erythematosus – multiorgánové ochorenie s bolestivým postihnutím kĺbov, kože, obličiek, CNS, slizníc ústnej dutiny, pleuritídou, perikarditídou, neurologickým postihnutím atď.
- Reumatoidná artritída – zápalové postihnutie kĺbov s bolestivosťou a rannou stuhnutosťou kĺbov

- Dermatopolymyozitída – ochorenie svalov a kĺbov so svalovou slabosťou, ekzémami nad kĺbami, na tvári, edémami viečok s nádychom do fialova
- Sjögrenova choroba – postihuje žľazy s vonkajšou sekréciou, aj vnútorné orgány, objavuje sa syndróm suchých úst, suchých očí
- Systémová sklerodermia – progredujúca fibróza kože a orgánov, zo začiatku blednutie prstov, ktoré sa opakuje
- Zmiešaná choroba spojiva – podobne ako systémová sklerodermia, ale miernejší priebeh
- Antifosfolipidový syndróm – trombózy ciev, predčasné pôrody alebo potraty, infarkty myokardu alebo náhle cievne mozgové príhody u mladých ľudí
- Primárna vaskulitída – nekrotizujúce zápaly ciev v rôznych orgánoch a tkanivách
- Sarkoidóza – granulomatózný zápal najmä v pľúcach

Systémové autoimunitné ochorenia si vyžadujú komplexnú starostlivosť o pacienta.

## 7.5 ORGÁNOVO ŠPECIFICKÉ AUTOIMUNITNÉ OCHORENIA

Medzi **orgánovo špecifické autoimunitné ochorenia** sa zaraďujú nasledovné:

- **Autoimunitné endokrinopatie:**
  - o Hashimotova tyreoiditída – deštrukcia štítnej žľazy a hypofunkcia
  - o Graves-Basedowova choroba – stimulácia štítnej žľazy a hyperfunkcia
  - o Diabetes mellitus I. typu (juvenilný) – poškodenie beta buniek pankreasu, ktoré produkujú inzulín, vznik v detstve a mladom dospelom veku
  - o Addisonova choroba – poškodenie kôry nadobličiek a porucha produkcie kortikosteroidov a mineralokortikoidov
  - o Autoimunitné poruchy reprodukcie a syndróm predčasného ovariálneho zlyhania – poruchy plodnosti
- **Autoimunitné ochorenia hematopoetického systému**
  - o Hemolytická anémia – rozpad erytrocytov
  - o Trombocytopénia – rozpad trombocytov
  - o Neutropénia – rozpad leukocytov
- **Autoimunitné ochorenia kože**
  - o Pemfigus – pľuzgierovité ochorenie kože, protilátky proti bazálnej vrstve pokožky
  - o Psoriáza (lupienka) – kožné ochorenie s typickým postihnutím kĺbov
- **Autoimunitné ochorenia nervového systému**
  - o Myashenia gravis – progresívna svalová slabosť, protilátky proti acetylcholínovému receptoru
  - o Sclerosis multiplex – porucha mozgového tkaniva s vážnymi dôsledkami na citlivosť a motoriku rôznych častí tela
  - o Periférna demyelizačná neuropatia – porucha periférnych nervov, protilátky proti obalom periférnych nervov
- **Autoimunitné ochorenia obličiek**
  - o Goodpastureov syndróm – glomerulonefritída, krvácanie z pľúc, protilátky proti bazálnej membráne glomerulov, alveolov, kolagénu IV. typu

- **Autoimunitné ochorenia tráviaceho traktu**

- Primárna biliárna cirhóza – zápal pečeneých žľčovodov, môže vyústiť do cirhózy, začína v strednom veku svrbením tela, únavou a zvýšené sú pečeneé enzyémy
- Autoimunitná hepatitída – zápal pečene, ktorý vyústi do cirhózy, začína nešpecificky (únavou), zvýšené pečeneé testy
- Celiakia – dôsledok precitlivelosti na obilný lepok (glutén), vznik najčastejšie v detstve
- Crohnova choroba – spolu s ulceróznou kolitídou patria k nešpecifickým črevným zápalom, ulceráciami v tenkom a hrubom čreve, vzniká v detsve alebo mladých dospelých
- Ulcerózna kolitída – nešpecifický črevný zápal hrubého čreva s ulceráciami
- Atrofická gastritída a perniciózna anémia – postihnutie parietálnych buniek žalúdka, poruchy vstreáavania vitamínu B12, vznik perniciózneé megaloblastovej anémie a nervových porúch

- **Autoimunitné ochorenia oka**

- Uveitída – zápal riasnatého telieska oka

Orgánovo špecifické autoimunitné ochorenia sa liečia špecialistami podľa orgánov a tkanív, kde sa autoimunitný proces klinicky manifestuje. Liečba autoimunitných ochorení je obvykle symptomatická a zahŕňa protizápalové a imunosupresívne prípravky.

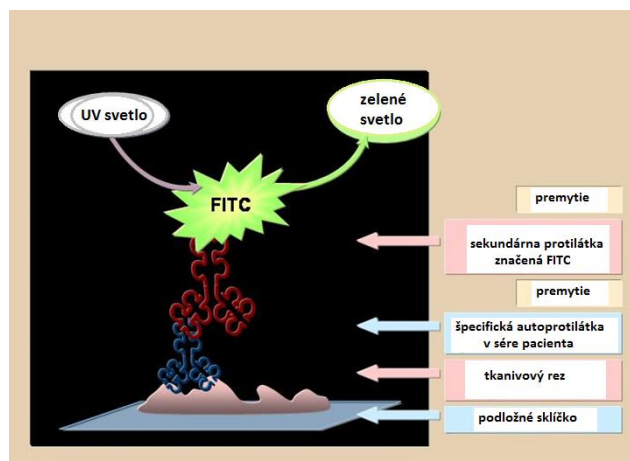
## 7.6 DIAGNOSTIKA AUTOIMUNITNÝCH OCHORENÍ

Je založená na klinickej symptomatológii a dôkaze autoprotílátok alebo T buniek reagujúcich s antigénmi poškodených tkanív. Autoprotílátky sa môžu dokázať imunosérologickými metódami. Na laboratórny dôkaz autoprotílátok sa využíva najčastejšie imunofluorescencia, ELISA, imunoblotty a imunodoty, aglutinácia, precipitácia a biočipy. Dokazuje sa prítomnosť protílátok (kvalitatívne) a ich množstvo (kvantitatívne).

### 7.6.1 Nepriama imunofluorescencia

Zlatým štandardom pri vyšetrení autoprotílátok je nepriama imunofluorescencia. **Slúži na detekciu autoprotílátok reagujúcich s antigénmi, ktoré sú lokalizované v tkanivách alebo sú umiestnené vnútri bunky.**

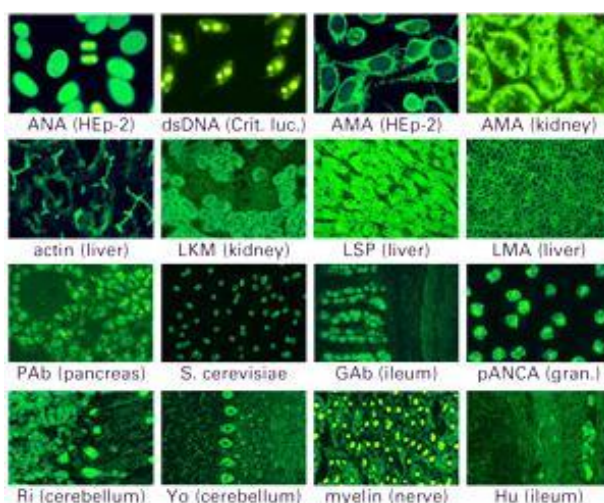
**Princíp:** Pre detekciu autoprotílátok je potrebné mať **substrát**, na ktorom sa robí vyšetrenie. Môže ísť o mikrotómový rez z príslušného tkaniva, bunkovú suspenziu alebo tkanivovú kultúru, na ktorú sa pridá vzorka séra od vyšetřovaného pacienta. Ak **sérum** obsahovalo špecifické autoprotílátky, naviažu sa na cieľovú štruktúru substrátu. V ďalšom kroku sa pridá sekundárna (zvyčajne zvieracia) fluorochrómom značená protílátka proti Fc fragmentu ľudskej autoprotílátky. Medzi jednotlivými krokmi sa preparát premýva, aby sa odstránili nenaviazané protílátky. Tento spôsob sa označuje ako nepriama imunofluorescencia (kapitola 4.1.2) (obrázok 75).



**Obr. 75** Nepriama imunofluorescencia (FITC – fluorochróm fluoresceinizothiokyanát)  
(upravené podľa <http://www.jfmed.uniba.sk>)

Nepriama imunofluorescencia je metóda náročná na technické vybavenie (základom je fluorescenčný mikroskop), profesné skúsenosti i finančné zabezpečenie. Vo väčšine prípadov sa používajú v laboratóriách na stanovenie autoprotílátok komerčne vyrábané rezy alebo preparáty. Ako substrát používaný na detekciu autoprotílátok sa v súčasnosti môže použiť Hep2 bunkové línie ľudského nazofaryngeálneho karcinómu, ľudské neutrofilné leukocyty, opičie a krysie obličky, krysia pečeň, krysí žalúdok, opičí pažerák, opičí kostrový sval a iné.

**Každá naviazaná autoprotílátka vykazuje typickú fluorescenciu v závislosti na lokalizácii antigénu** (obrázok 76). Jednotlivé typy autoprotílátok sú spojené s rôznymi autoimunitnými chorobami. Určitá skupina autoprotílátok sa zvyčajne vyskytuje s vysokou frekvenciou pri určitej diagnóze, ale zároveň môže byť detegovateľná aj pri ďalších autoimunitných ochoreniach (tu už zvyčajne s nižším percentom výskytu). Napr. nález antinukleárných (ANA) autoprotílátok proti ds-DNA sa najčastejšie spája s výskytom SLE (systémový lupus erythematoses), ale môže sa tiež spájať s výskytom autoimunitnej hepatitídy, tyreoiditídy, Sjögrenovho syndrómu a ďalších.



**Obr. 76** Rôzne typy nepriamej imunofluorescencie  
([http://www.immunfluoreszenz.de/uploads/pics/IFT\\_global\\_EN.jpg](http://www.immunfluoreszenz.de/uploads/pics/IFT_global_EN.jpg))

### 7.6.2 Ďalšie metódy v diagnostike autoimunitných ochorení

Nepriama imunofluorescencia na orgánových a tkanivových rezoch a cytologických preparátoch umožňuje určiť základné spektrum autoprotilátok a určiť tak ďalšie smerovanie v diagnostickom procese.

Na určenie špecificity autoprotilátok v prípade, že cieľový antigén je známy, sa používa **ELISA**, **imunobloty** (napr. western blot), **imunodoty**, prípadne **RIA** (sú však situácie, kedy cieľový antigén doteraz nie je známy, a preto špecificitu zistených autoprotilátok u pacienta nemožno dostupnými vyšetreniami stanoviť).

#### **ELISA, RIA**

Princíp týchto metód je popísaný vyššie (kapitola 4.2.1 a 4.2.2). Slúžia na presný dôkaz špecificity autoprotilátok, využívajú konjugát – sekundárnu protilátku značenú enzýmom alebo rádionuklidom a umožňujú vizualizovať miesto reakcie ľudskej protilátky s antigénom v *in vitro* podmienkach.

#### **Blotovacie techniky**

**Blotovacie techniky** (imunoblot, imunodot) sú v podstate kombináciou elektroforézy a imunodetekcie a založené sú na sendvičovom princípe (kapitola 4.3).

#### **Biočipy**

Trendom v detekcii autoprotilátok je miniaturizácia vo forme tzv. **biočipov**. Ide o mikročastice s nadviazaným antigénom. Na nosiči na malej ploche (mm<sup>2</sup>) je umiestnených niekoľko desiatok až stoviek antigénov. Biočip je inkubovaný so sérom a naviazané autoprotilátky sú vizualizované pomocou farebnej sondy. Výsledkom je matica farebných bodov, ktoré sú scanované optickým systémom a získané údaje sa analyzujú pomocou výpočtovej techniky (komerčným softwarom). Biočip tak umožňuje simultánne vyšetriť viacero autoprotilátok (obrázok 77).

Prepojením imunológie a genetiky vznikajú nové laboratórne techniky, napr. **stanovenie HLA antigénov na biočipoch**. Dá sa tak stanoviť genetická predispozícia pre niektoré autoimunitné ochorenia, napr. celiakiu, psoriázu, Bechterevovu chorobu.

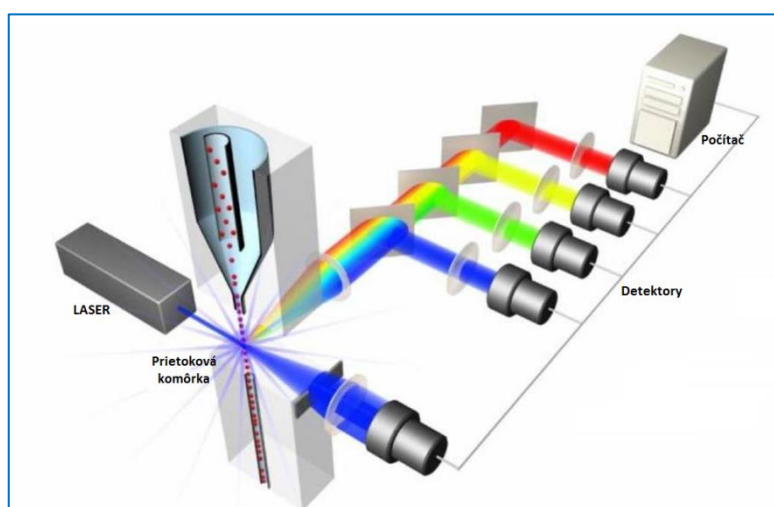


**Obr. 77** Biočip

(<http://www.phadia.com/Global/A%20Document%20Library/Product%20Catalogues/Product-Catalog-2015.pdf>)

### Prietoková cytometria

Autoprotilátky sa dajú stanoviť aj pomocou **prietokovej cytometrie**, kedy je známy autoantigén naviazaný na špeciálne nosiče – guľičky. Autoprotilátka z vyšetrovaného séra sa naň naviaže a vzniknutý komplex je vizualizovaný pomocou sekundárnej protilátky označenej fluorescenčnou látkou. Následne postupujú jedna za druhou cez prietokovú komôrku, v ktorej pretínajú svetelný lúč tvorený zväzkom laserových lúčov. Detektor zachytáva svetelné signály. Jednotlivé svetelné signály sa prevádzajú na elektrické signály, ktoré sú spracované počítačom a výsledky sú dostupné v grafickej a číselnej forme. Nosiče (guľičky) sú potiahnuté jedným typom antigénu, avšak v jednej reakčnej jamke je definovaná zmes viacerých guľčiek s rôznymi antigénmi. Z jednej vzorky séra sa takto môže stanoviť viacero autoprotilátok (obrázok 78).



**Obr. 78** Schéma prietokového cytometra (upravené podľa: <http://bcrf2.ucsd.edu/wp-content/uploads/2012/09/InterrogationPoint.jpeg>)

### Interpretácia

**Nález autoprotilátok je potrebné hodnotiť s ohľadom na klinický stav jedinca a výsledky ďalších laboratórnych vyšetrovacích metód.** Vyšetrenie a sledovanie dynamiky autoprotilátok je prínosom pre včasnú diagnostiku autoimunitného ochorenia, ale aj pre liečbu a komplexnú starostlivosť o pacienta.

### Otázky k samohodnoteniu

1. Ako je definovaná autoimunita? Čo sú autoprotilátky? Existujú aj fyziologicky autoprotilátky?
2. Ako sa delia autoimunitné choroby podľa orgánov a tkanív, ktoré postihujú? Ktoré faktory sa uplatňujú v etiológii autoimunitných ochorení?
3. Uveďte príklady niektorých systémových a orgánovo-spezifických autoimunitných chorôb.
4. Čo sa využíva ako štandardná metóda v diagnostike autoimunitných ochorení? Ktoré ďalšie metódy sa využívajú v ich diagnostike? Ako sa interpretuje nález autoprotilátok?

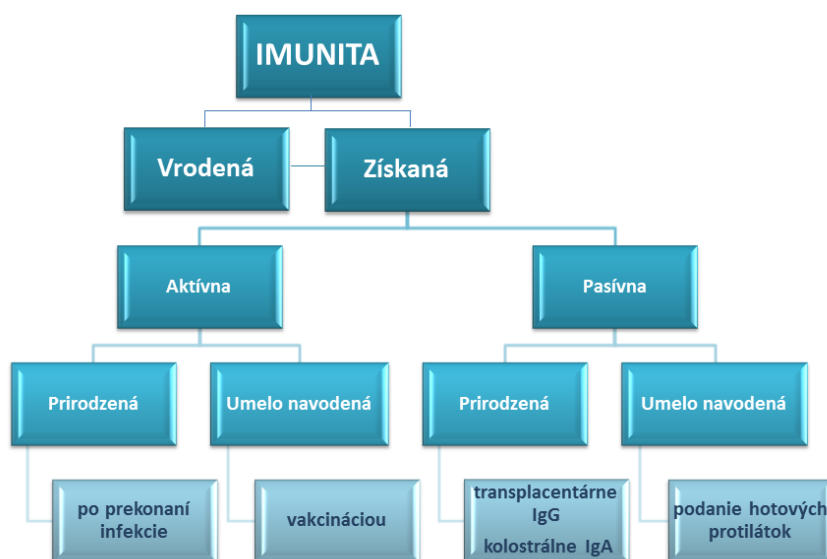
## 8 VAKCINAČNÁ IMUNOLÓGIA

Vakcíny sú považované za najúčinnnejšie intervencie modernej medicíny. Od chvíle, kedy **Edward Jenner prvýkrát použil vakcínu proti pravým kiahňam** v roku 1796, stalo sa použitie vakcín nevyhnutné pre eradikáciu, zníženie počtu úmrtí, či zníženie výskytu komplikácií mnohých chorôb. Do súčasnej doby získalo licenciú viac ako 70 vakcín na použitie proti približne 30 mikroorganizmom, čo viedlo k záchrane nespočetného množstva ľudských životov. Priaznivé účinky vakcinácie na zdravie verejnosti vyplývajú nielen z vytvorenia účinných vakcín, ale aj adekvátnej infraštruktúry pre výrobu vakcín, pre reguláciu a dohľad nad bezpečnosťou a zo stanovenia najefektívnejšieho spôsobu podania vakcíny. Vakcíny predstavujú najlacnejší a najúčinnnejší spôsob ochrany pred zničujúcimi epidémiami. Predstavujú najefektívnejší spôsob ako predísť stratám na ľudských životoch, ako udržať zdravie jednotlivca aj kolektívu a vysokú kvalitu života. Vždy je výhodnejšie ochoreniu predchádzať ako ho liečiť.

### 8.1 IMUNIZÁCIA

Imunizácia je spôsob navodenia špecifickej ochrany proti niektorým mikrobiálnym vyvolávateľom prenosných a nebezpečných ochorení.

Jej cieľom je navodiť odolnosť dostatočnú na prevenciu klinických prejavov **prirodzenej infekcie**. Živá alebo neživá antigénna substancia (proteín, polysacharid) navodí imunitnú odpoveď. Protilátky (imunoglobulíny) produkované B-lymfocyty pomáhajú eliminovať antigén. Špecifická ochrana môže byť navodená pasívne alebo aktívne, v oboch prípadoch prirodzene alebo umelo (obrázok 79).



**Obr. 79** Imunita a grafické znázornenie mechanizmov navodenia získanej imunity (vlastné spracovanie)

## 8.2 PASÍVNA IMUNITA

### 8.2.1 Výhody a nevýhody pasívnej imunity

**Pasívna imunita** (obrázok 80) je navodená prenesením hotových protilátok vyprodukovaných človekom (homológne protilátky) alebo zvierat'om (heterológne protilátky). Pasívna imunizácia chráni príjemcu pred infekčnými chorobami len dočasne, pretože hotové protilátky sa prirodzene odbúrajú.

Výhodou ich použitia je však okamžitý nástup ochrany.

Nevýhodou je krátkodobá ochrana, riziko vzniku alergických ochorení alebo krvou prenosných ochorení.

### 8.2.2 Spôsobu navodenia pasívnej imunity

Pasívna imunita môže byť navodená prirodzene alebo umelo.

- **Prirodzene je pasívna imunita** navodená **transplacentárnym prestupom materských protilátok IgG**, ktoré sa postupne odbúravajú a okolo 2. – 3. mesiaca sú už na úrovni okolo 50% hodnoty v porovnaní s obdobím po narodení. **Materským mliekom získava dieťa protilátky izotypu IgA.**
- **Umelu je pasívna imunita** navodená **vpravením hotových protilátok** intramuskulárne alebo intravenózne podľa toho, pre akú aplikáciu sú imunopreparáty určené. Cieľom umelej pasívnej imunizácie je profylaxia alebo liečba. V rámci profylaxie sa aplikujú preparáty pred tým, ako začne infekcia alebo v počiatočných fázach inkubačnej doby. V rámci liečby sa aplikujú pri imunodeficitných stavoch, pri infekčných chorobách alebo liečbe niektorých autoimunitných ochorení.

Používajú sa **homológne protilátky**, ktoré sa získavajú od zdravých darcov krvi alebo **heterológne protilátky**, ktoré sa získavajú po imunizácii zvierat (napr. koní). **V súčasnosti prevláda použitie homológnych sér**, ktoré obsahujú protilátky získavané od ľudí. Pripravujú sa z krvi zdravých darcov postupmi získania gamaglobulínovej frakcie s prevažnou časťou IgG protilátok (označujú sa ako normálny ľudský imunoglobulín, predtým gamaglobulín). Heterológne séra sa používajú výnimočne (napr. antidifterické, antirabické, antitulínové, antigangrérové a pod.).

## 8.3 AKTÍVNA IMUNITA

### 8.3.1 Výhody a nevýhody aktívnej imunity

**Aktívna imunita** (obrázok 80) je navodená **stimuláciou antigénom v organizme jedinca**. Tento typ imunity si vytvára jedinec sám.

Výhodou očkovania je vznik dlhodobej ochrany.

Nevýhodou je, že jej ochranný účinok nastupuje neskôr ako pri podaní hotových protilátok (teda ako pri umelo navodenej pasívnej imunite).

### 8.3.2 Spôsoby navodenia aktívnej imunity

Aktívna imunita môže byť navodená prirodzene alebo umelo.

- ✓ **Prirodzená aktívna imunita** vzniká **po prekonaní infekčného ochorenia**.
- ✓ **Umelá aktívna imunita** je navodená **po očkovaní** (vakcinácii). Umelou aktívnou imunizáciou sa navodí obranyschopnosť jedinca pred tým, ako dôjde k expozícii vyvolávateľovi infekcie. Navodí sa kontrolovaná oslabená infekcia, bez príznakov, môže ísť len o laboratórne preukázateľné potvrdenie infekcie alebo mierne prebiehajúce ochorenie bez vážnych komplikácií a následkov.



**Obr. 80** Spôsoby navodenia špecifickej imunity (upravené podľa: [http://images.slideplayer.com/27/9168554/slides/slide\\_45.jpg](http://images.slideplayer.com/27/9168554/slides/slide_45.jpg))

## 8.4 DRUHY VAKCÍN

**Základné očkovanie** je podanie vakcíny (resp. niekoľkých dávok vakcíny) tak, aby došlo ku vzniku dlho trvajúcej špecifickej imunity.

**Preočkovanie** znamená podanie jednej dávky vakcíny obdobného zloženia ako bolo použité v základnom očkovaní. Očkovací kalendár na aktuálny rok pre povinné pravidelné očkovanie detí a dospelých na Slovensku je dostupný na internetovej stránke: [www.uvzsr.sk](http://www.uvzsr.sk).

**Vakcína – očkovacia látka** sa používa na aktívnu imunizáciu, čo znamená podanie živých modifikovaných, atenuovaných alebo usmrtených infekčných mikroorganizmov, ich častí alebo ich upravených toxínov do organizmu. Vakcína je schopná navodiť imunitnú odpoveď očkovaného jedinca, ktorý sa tak stáva odolný voči danej nákaze. V súčasnosti existujú rôzne druhy vakcín.

### *Živé atenuované vakcíny*

Živé atenuované vakcíny **obsahujú živé oslabené baktérie alebo vírusy, ktorých virulencia bola oslabená alebo neutralizovaná, avšak pri zachovanej imunogenicitě**. Oslabenie (atenuácia) môže byť dosiahnutá viacerými spôsobmi, napr. opakovanými

kultiváciami na umelých živných pôdach (tzv. pasážovaním), opakovanými kultiváciami priamo v hostiteľovi (Sabinova polio vakcína u primátov), genetickou manipuláciou.

Príkladom živých atenuovaných vakcín proti vírusovým infekciám je vakcína proti osýpkam, mumpsu, rubeole, žltej zimnici, rotavírusom a ďalšie, živé atenuované vakcíny proti bakteriálnym infekciám sú napr. BCG vakcína proti tuberkulóze, orálna vakcína proti týfusu.

### **Usmrtené (inaktivované) vakcíny**

Usmrtené (inaktivované) vakcíny **obsahujú suspenziu usmrtených baktérií alebo vírusov**. Môžu byť celobunkové, subjednotkové alebo toxoidy.

**Celobunkové (celovirionové)** inaktivované vakcíny sú zložené z kompletných mikroorganizmov. Ak ide o baktérie, vakcíny sú nazývané celobunkové (napr. celobunková vakcína proti čiernemu kašľu). Ak ide o vírusy, vakcíny sú nazývané celovirionové (napr. celovirionová vakcína proti chrípke, injekčná Salkova vakcína proti poliomyelitíde, vakcína proti hepatitíde A, B, besnote, kliešťovej encefalitíde...).

**Subjednotkové vakcíny** obsahujú rozloženú štruktúru mikroorganizmu, ktorá je následne vysoko purifikovaná a vo finálnej verzii zostávajú iba purifikované antigény. Tie sú ďalej chemicky ošetrované a adsorbované na adjuvantnú látku (napr. subjednotková vakcína proti chrípke). Klasické **subjednotkové polysacharidové vakcíny** sú vakcíny proti pneumokokom, meningokokom, *Haemophilus influenzae* typ b... Imunogénnou štruktúrou vakcíny je puzdrový polysacharid, protilátky proti nemu sú protektívne (schopné zabrániť šíreniu mikroorganizmu). Polysacharidy sú však vo všeobecnosti slabo imunogénne, sú T-nezávislé antigény (nevyžadujú spoluúčasť antigén prezentujúcich buniek). Imunitná nezrelosť v detskom veku (do 2. roku života) predisponuje práve k týmto infekciám vo zvýšenej miere. Preto sa v tejto vekovej skupine používajú konjugované vakcíny, v ktorých je polysacharidový antigén mikroorganizmu naviazaný na proteínový nosič, čím sa posilní imunitná odpoveď na polysacharid. **Subjednotková konjugovaná vakcína** tak zabezpečí odpoveď detského organizmu na málo imunogénny polysacharid ako na vysoko imunogénny proteín. Prvou konjugovanou vakcínou na svete bola vakcína proti inváznym ochoreniam *Haemophilus influenzae* typ b.

**Toxoidy – toxoidové vakcíny** sú vyrobené z inaktivovaných toxínov z toxín-produkujúcich mikroorganizmov (napr. *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium tetani*). Sú to toxíny proteínovej povahy. Sú imunogénne, denaturovateľné a neutralizovateľné. Slúžia na prípravu očkovacej látky – toxoidu (anatoxínu). Denaturáciou toxínov dochádza k strate toxických vlastností, ale pritom sú zachované antigénne vlastnosti. Po aplikácii toxoidovej vakcíny do organizmu sa navodí tvorba protilátok (protilátka proti toxínu = antitoxín), ktoré chránia pred účinkami toxínov, neutralizujú pôsobenie toxínov (vakcína proti záškrtu, tetanu).

### *Acelulárne vakcíny*

V prípade, že vakcína **obsahuje len čiastočný bunkový materiál** (hemaglutinín, filamenty a pod.), jedná sa o acelulárnu vakcínu (napr. acelulárna vakcína proti *Bordetella pertussis*).

### *Splitové vakcíny*

Vakcína, v ktorej je **vírusová štruktúra rozštiepená a obsahuje povrchové aj vnútorné antigény mikroorganizmu**, sa označuje ako splitová vakcína. Táto technika sa využíva pri príprave niektorých vakcín proti chrípke.

### *Rekombinantné vakcíny*

Vakcíny sú navrhované aj metódami génového inžinierstva, a to génovou manipuláciou oslabených alebo usmrtených mikroorganizmov. Po podaní takejto vakcíny je stimulovaná humorálna alebo bunková imunita proti konkrétnemu mikroorganizmu, ale nie je schopná spôsobiť infekciu. Postupy génového inžinierstva sa využívajú pri príprave rekombinantných vakcín. **Gén kódujúci produkciu určitého antigénu sa vkladá do iného mikroorganizmu, ktorý následne pri svojom raste a rozmnožovaní začne okrem svojich vlastných antigénov produkovať aj antigén, ktorý kodoval zabudovaný gén. Tento antigén je následne izolovaný** (napr. HBsAg obsiahnutý vo vakcíne proti hepatitíde B je produkovaný na kvasinkách). Rekombinantné vakcíny navodzujú prevažne humorálnu imunitnú odpoveď.

### *Rekombinantné vektorové vakcíny*

Rekombinantné vektorové vakcíny indukujú humorálnu aj celulárnu imunitnú odpoveď. **Skúšajú sa baktériové aj vírusové vektory, do genómu ktorých sa zabuduje gén kódujúci vybraný antigén vyvolávateľa infekcie. Úlohou vektora je vytvoriť čo najrýchlejšie cieľový antigén alebo čo najrýchlejšie ho dopraviť k bunkám imunitného systému, čím by nebol potrebný adjuvans na zvýšenie imunogenicity.**

### *DNA-vakcíny*

DNA-vakcíny sú **najjednoduchšie vektorové vakcíny**. Na prenos génu do hostiteľskej bunky stačia fragmenty DNA kódujúce gény pre kľúčové mikrobiálne antigény a nosičom (vektorom) je plazmid baktérií. Po vpravení DNA-vakcíny do organizmu začína expresia príslušného antigénu a navodenie špecifickej imunitnej odpovede. V súčasnosti sa ešte DNA-vakcíny v praxi nepoužívajú, sú zatiaľ v štádiu skúšok.

### *Polyvalentná vakcína*

Ak je vakcína **pripravená z antigénov viac ako jedného kmeňa alebo druhu mikroorganizmu**, ide o polyvalentnú vakcínu.

## 8.5 INDIVIDUÁLNA A KOLEKTÍVNA IMUNITA

**Individuálna imunita** proti niektorému vírusu alebo baktérii **chráni konkrétneho jednotlivca** (získaná je prekonaním ochorenia alebo vakcináciou). Čím viac ľudí je v populácii zaočkovaných proti určitému infekčnému pôvodcovi, tým sa znižuje pravdepodobnosť šírenia infekcie, až po vytvorenie kolektívnej imunity. Šírenie infekčnej choroby sa tak obmedzí len na priamy kontakt medzi nakazeným človekom a neočkovaným človekom.

Pri **kolektívnej imunitě** je **odolnosť populácie** taká, že **bráni šíreniu infekcie a vzniku epidémií**. V ideálnom prípade vedie k vymiznutiu ochorenia v určitej oblasti. Príkladom sú pravé kiahne (variola), ktoré boli celosvetovo eradikované vďaka očkovaniam.

Percento zaočkovania populácie potrebné na to, aby určité ochorenia vymizli, závisí od viacerých faktorov (hustota obyvateľstva, vek, v ktorom sa infekcia vyskytuje najčastejšie, nákazlivosť ochorenia). Z toho dôvodu sa aj líšia hodnoty zaočkovania potrebné na vznik kolektívnej imunity niektorých nákazlivých chorôb. Potrebné je aj to, aby bolo zaočkovanie plošne rovnomerne rozložené na celom území. Pri veľkých regionálnych rozdieloch sa môže stať, že niekde klesne zaočkovanosť pod potrebnú hranicu kolektívnej imunity a vznikne tzv. vakcinačná diera, v ktorej sú nechránení jednotlivci a môžu byť nakazení (stačí, aby sa objavil jeden infikovaný jedinec, ktorý môže vyvolať miestnu epidémiu).

**Pri vakcinácii je potrebné dodržiavať základné princípy správnej vakcinácie.** Je to dodržiavanie pokynov od výrobcu, dodržiavanie absolútnych a relatívnych kontraindikácií, dodržiavanie správnej očkovacej techniky a individuálny prístup k očkovanému jedincovi.

**Kontraindikácie očkovania** sú situácie, kedy by nemala byť podaná vakcína za žiadnych okolností, pretože existuje zvýšené riziko závažnej nežiaducej reakcie na vakcínu (závažná alergická reakcia po predchádzajúcej dávke alebo na zložky vakcíny, závažné akútne ochorenie, špecifické kontraindikácie pre jednotlivé vakcíny).

V rámci **individuálneho prístupu k očkovanému jedincovi** je potrebné brať v úvahu údaje z anamnézy a fyzikálneho vyšetrenia. Predovšetkým ide o závažné ochorenia (autoimunitné ochorenia, imunodeficity, hemoblastózy a iné malignity), reakcie po predchádzajúcich očkovaniach, užívanie imunosupresívnych liekov, alergie na zložky vakcín, prebiehajúce akútne ochorenie, tehotenstvo. **Potrebné je poučiť o možných reakciách a ich liečbe.**

### Otázky k samohodnoteniu

1. Čo je imunizácia a čo je jej cieľom? Akými mechanizmami je možné navodiť získanú imunitu?
2. Aké sú spôsoby navodenia pasívnej imunity? Aké sú spôsoby navodenia aktívnej imunity?
3. Čo je to vakcína? Čo je typické pre živé atenuované vakcíny? Čo obsahujú usmrtené (inaktivované) vakcíny a uveďte príklady. Čo je toxoid? Čo je anatoxín? Čo je antitoxín? Aký je rozdiel medzi individuálnou a kolektívnou imunitou?

# LITERATÚRA

Andersen P, Munk ME, Pollock JM, Doherty TM. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet* 2000; 356(9235):1099-104.

Bakoš I. Zásady správneho očkovania. Škola očkovania. *Inštitút očkovania a cestovnej medicíny Bratislava* [online]. 2010. [cit. 2016.03.21]. Dostupné na internete: <[http://www.vpl.sk/files/file/skola\\_ockovania\\_2010/1\\_bakos\\_zasady\\_spravneho\\_ockovani\\_a\\_%202010.pdf](http://www.vpl.sk/files/file/skola_ockovania_2010/1_bakos_zasady_spravneho_ockovani_a_%202010.pdf)>

Barrett KE, Barman SM, Boitano S, Brooks HL. *Ganong's Review of Medical Physiology*. 24th ed. New York: The McGraw Hill Companies; 2012. ISBN 978-0071780032.

Bartůňková J, Paulik M a kol. *Vyšetrovací metody v imunologii*. Praha: Grada publishing 2011; s. 164. ISBN 978-80-247-3533-7.

Boyce JA. Mast cells and eicosanoid mediators: a system of reciprocal paracrine and autocrine regulation. *Immunol Rev* 2007; 217:168.

Buc M. *Základná a klinická imunológia*. Bratislava: VEDA vydavateľstvo SAV 2012; s. 831. ISBN 978-80-224-1235-3.

Buc M a kol. *Praktické cvičenia z imunológie*. Bratislava: Univerzita Komenského v Bratislave 1993; s.76. ISBN 80-88718-01-5.

Byrne AJ, Mathie SA, Gregory LG, Lloyd CM. Pulmonary macrophages: key players in the innate defence of the airways. *Thorax* 2015; 70: 1189-96.

Costabile M. Measuring the 50% haemolytic complement (CH50) activity of serum. *J Vis Exp* 2010; 29: 37.

Čižnár P. Primárne poruchy imunitného systému – ich diagnostika a liečba. *Via pract* 2006; 3 (3): 120-4.

Elektronická verzia prednášok z imunológie pre Jesseniovu lekársku fakultu v Martine Univerzity Komenského v Bratislave 2016, [online]. 2016. Dostupné na internete: <[www.jfmed.uniba.sk](http://www.jfmed.uniba.sk)>

Elektronická verzia praktických cvičení z imunológie pre Jesseniovu lekársku fakultu v Martine Univerzity Komenského v Bratislave 2016, [online]. 2016. Dostupné na internete: <[www.jfmed.uniba.sk](http://www.jfmed.uniba.sk)>

Fathman CG, Soares L, Chan SM, Utz PJ. An array of possibilities for the study of autoimmunity. *Nature* 2005; 435: 605-611.

Gurish M, Castells MC. Mast cell derived mediators. *Wolters Kluwer* 2016, [online]. 2016. [cit. 2016.06.21]. Dostupné na internete: <<http://www.uptodate.com/contents/mast-cell-derived-mediators>>

Horváthová M. Celulárna imunológia. *Laboratórne metódy*. Bratislava: SZU 2015, [online]. 2016. [cit. 2016.05.12]. Dostupné na internete:

<[http://www.szu.sk/userfiles/file/Katedry/kat\\_149/BUNKOV%C3%81%20IMUNOL%C3%93GIA%20-%20laborat%C3%B3rne%20met%C3%B3dy.pdf](http://www.szu.sk/userfiles/file/Katedry/kat_149/BUNKOV%C3%81%20IMUNOL%C3%93GIA%20-%20laborat%C3%B3rne%20met%C3%B3dy.pdf)>

Hořejší V, Bartuňková J, Brdička T, Špíšek R. *Základy imunologie* (5. vyd.). Praha: Triton 2013; s. 330. ISBN 978-80-7387-713-2.

Janeway ChA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. *Immunobiology – the immune system in health and disease*, 6th edition. New York and London: Garland Science Taylor & Francis Group 2005; pp. 823. ISBN 0-8153-4101-6.

Jeseňák M, Rennerová Z, Bánovčin P a kol. *Recidivujúce infekcie dýchacích ciest a imunomodulácia u detí*. Praha: Mladá fronta 2012; s. 631. ISBN 978-80-204-2618-5.

Klement C a spol. *Vybraná terminológia I*. Banská Bystrica: SZU Bratislava 2014; 220s. ISBN 978-80-89057-48-1.

Kompaniková J, Nováková E, Neuschlová M. *Mikrobiológia nielen pre medikov*. Žilina EDIS 2013; s. 209. ISBN 978-80-554-0827-9.

Kumar V, Abbas AK, Aster JC. *Robbins Basic Pathology*. 8th ed. Elsevier Saunders 2013; pp.603. ISBN 978-1-4377-1781-5.

Litzman J a kol. *Základy vyšetření v klinické imunologii*. Brno: Masarykova Univerzita Lékařská fakulta 2011; s. 53. ISBN 978-80-210-4227-8.

Marshall JS, Jawdat DM. Mast cells in innate immunity. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114:21.

Neuschlová M, Péčová R, Hajtman A, Hanzel P, Piecková Zacharová A, Nováková E. Faktory vzniku autoimunitných ochorení štítnej žľazy. *Klin Imunol Alergol* 2011; 2: 21-26.

Nováková E, Oleár V, Klement C. *Lekárska vakcinológia nielen pre medikov*. PRO Banská Bystrica 2007; 141 s. ISBN 978-80-89057-18-4.

Pai M, Zwerling A, Menzies D. Systemic Review: T-cell-based Assays for the Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection: An Update. *Ann Intern Med*. 2008;149:177-184.

Stratton CW. Serum bactericidal test. *Clin Microbiol Rev* 1988; 1 (1): 19-26.

Suto H, Nakae S, Kakurai M, et al. Mast cell-associated TNF promotes dendritic cell migration. *J Immunol* 2006; 176:4102.

Šterzl I a kol. *Základy imunologie pro zubní a všeobecní lékaře*. Praha: Univerzita Karlova v Praze 2007; s.207. ISBN 978-80-246-0972-0.

Votava M. *Lékařská mikrobiologie obecná*. Brno: Neptun 2005; s. 351. ISBN 80-86850-00-5.

Young B, Lowe SJ, Alan S, Heath JW. *Wheater's Functional Histology*. 5th ed. Elsevier Limited 2006; pp.448. ISBN 978-0-443-06850-8.

## Zoznam internetových odkazov:

<http://biology.missouristate.edu>

[http://bookcoverim.gs.com/radial-diffusion/www.microbiologybook.org\\*mayer\\*rx-13.jpg/www.acoart.com.br\\*novo\\*radialdiffusion/](http://bookcoverim.gs.com/radial-diffusion/www.microbiologybook.org*mayer*rx-13.jpg/www.acoart.com.br*novo*radialdiffusion/)

<http://classes.midlandstech.edu>

<http://www.elispot.com/>

<http://galleryhip.com>

[http://www.hcdm.org/index.php?option=com\\_molecule&view=molecules&limitstart=400](http://www.hcdm.org/index.php?option=com_molecule&view=molecules&limitstart=400)

<http://www.idbiotech.com/rid-srid-kit-test-radial-immunodiffusion/57-horse-igg-idr-rid.html>

<http://jeeves.mmg.uci.edu/immunology/Assays/RadImmunDiff.htm>

<http://www.jfmed.uniba.sk/pracoviska/vedecko-pedagogicke-pracoviska/predklinicke-ustavy/ustav-mikrobiologie-a-imunologie/studium-temy-prednasok-praktickych-cviceni-studijne-materialy-na-stiahnutie/vseobecne-lekarstvo/prednasky-ls-roc2-imunologia/>

<http://www.jfmed.uniba.sk/pracoviska/vedecko-pedagogicke-pracoviska/predklinicke-ustavy/ustav-mikrobiologie-a-imunologie/studium-temy-prednasok-praktickych-cviceni-studijne-materialy-na-stiahnutie/vseobecne-lekarstvo/prakticke-cvicenia-ls-roc2-imunologia/>

[http://klinickabiochemia.sk/download/infolist\\_36.pdf](http://klinickabiochemia.sk/download/infolist_36.pdf)

[http://www.klinickabiochemia.sk/download/OKM\\_prirucka.pdf](http://www.klinickabiochemia.sk/download/OKM_prirucka.pdf)

<http://labmet.zshk.cz/>

<http://lekarske.slovniky.cz/>

<http://www.medicalhealthtests.com/blood-tests/complement-ch50.html>

<http://www.medical-labs.net/neutrophil-macrophage-and-myeloid-derived-dendritic-cell-function-840/>

<http://www.medscape.com>

<http://quizlet.com/13101861/immuno-block-4-flash-cards/>

[http://www.rheumatology.sk/public/pdf/odborne\\_usmernenie\\_2011.pdf](http://www.rheumatology.sk/public/pdf/odborne_usmernenie_2011.pdf)

<http://www.ssi.dk>

<http://www.studentconsult.com>

[www.studyblue.com](http://www.studyblue.com)

<http://www.svt.ac-versailles.fr/IMG/jpg/monocyt.jpg>

[http://whqlibdoc.who.int/hq/2003/WHO\\_V&B\\_03.07.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2003/WHO_V&B_03.07.pdf)

[www.cellsalive.com/ouch.htm](http://www.cellsalive.com/ouch.htm)

[www.exbio.cz](http://www.exbio.cz)

[www.hpl.sk](http://www.hpl.sk)

[www.imuna.sk](http://www.imuna.sk)

[www.sprievodcaockovanim.sk](http://www.sprievodcaockovanim.sk)

# REGISTER

## A

adherencia, 42  
aglutinácia, 53, 54  
agranulocyty, 12  
aktívna imunita, 103, 104  
aktívne rozety, 24  
alergén, 51  
alergickej reakcii, 14  
alternatívna cesta aktivácie komplementu, 26  
antigén, 16, 19, 28, 50, 58  
antigén prezentujúce bunky, 13, 16, 17, 24, 37  
autoimunita, 95  
autoprotílátky, 95, 98, 101  
autoreaktivita, 95

## B

baktericídna aktivita séra, 33  
bazofily, 13, 14  
biočipy, 100  
blotovacie techniky, 100  
B-lymfocyty, 12, 16, 18, 21, 23

## C

C3, 22, 26, 27, 28, 30, 42, 63, 94, 109  
C4, 27, 28, 30, 63, 94  
CD znak, 12  
celkové rozety, 24  
CRP, 34, 35, 36, 49, 63, 94  
cytotoxické, 12, 19

## D

denaturácia, 81  
dendritové bunky, 16, 17, 18, 24  
dvojitá radiálna imunodifúzia, 63, 70  
dynamika tvorby protílátok, 53

## E

Edward Jenner, 102  
efektorové bunky, 19, 22  
EIA, 74  
Elektroforéza, 65  
ELISA, 28, 47, 74, 75, 76, 83, 87, 94, 98, 100  
ELISPOT, 79, 80, 81, 83, 94  
elongácia, 81  
enzýmová imunoanalýza, 74  
eozinofily, 13, 14, 39, 40  
epitop, 50  
E-rozety, 23

## F

fagocytárna aktivita, 44, 45  
fagocytárny index, 45  
fagocytóza, 37, 42  
fagolyzozóm, 43  
fagozóm, 43  
fenomén prozóny, 57  
fluorescenčná imunoanalýza, 77  
fyziologické, 95

## G

gradientovej centrifugácie, 22, 23  
granulocyty, 12  
granuly, 13, 14, 15, 39, 40

## H

haptény, 50  
hemaglutinácia, 57  
hematopoéza, 11  
hemolytická jednotka, 31, 49  
hemolýza, 30, 68, 70  
heterológne, 103  
histiocyty, 16, 41  
homológne, 103  
hybridizácia, 81

## CH

CH 50, 28, 30, 31  
chemiluminiscenčná imunoanalýza, 77  
chemotaxia, 27, 42  
chemotaxíny, 42  
chladová aglutinácia, 57

## I

IGRA, 84, 87, 88  
imunizácia, 102  
imunoanalytické metódy, 74  
imunodeficiencia, 89  
imunodeficit, 90, 92  
imunodifúzne, 61  
imunodot, 78  
imunoelektroforéza, 66  
imunofluorescencia, 71, 72, 73, 83, 94, 98, 99, 100  
imunogény, 50  
imunoglobulín ige, 14  
imunoglobulíny, 14, 15, 24, 51, 65, 68, 93, 95, 102  
imunokompetentné bunky, 11  
individuálna imunita, 107  
indurácia, 86

INF- $\gamma$ , 48, 87, 88  
ingescia, 43  
INT, 46, 47

## J

jednoduchá radiálna imunodifúzia, 28, 29, 62

## K

K bunky, 21  
klasická cesta aktivácie komplementu, 26  
kolektívna imunita, 107  
koloidné, 51, 70  
komplement, 25, 68  
komplement fixačná reakcia, 68, 69  
korpuskulárne, 51, 70  
Kupfferove bunky, 16, 41  
kvantitatívne stanovenie, 29, 35, 61, 76

## L

latexová aglutinácia, 58, 59  
lektínová cesta aktivácie komplementu, 26  
leukocyty, 13, 24, 37, 93, 99  
lína, 11, 61  
lymfoidná, 11  
lyzozým, 31, 32

## M

makrofágy, 12, 16, 20, 37, 38, 40, 41, 85  
MALT, 16, 41  
manózu viažuci lektín, 26, 42  
mastocyty, 15  
mikroglie, 16  
monocyty, 12, 15, 40, 41  
monovalentné, 56  
M-rozety, 23  
myeloidná, 11

## N

NBT, 46, 47  
nefelometria, 28, 36, 63  
nepriame aglutinácie, 57  
nešpecifická, 68  
neutrofily, 12, 13, 37, 38, 39  
NK bunky, 12, 20, 21  
NKT bunky, 21  
nTreg-lymfocyty, 19

## O

očkovacia látka, 104  
očkovanie, 104  
opsonizácia, 27  
opsonizácia, 42

orgánovo nešpecifické, 96  
orgánovo špecifické, 96, 97, 98  
orosomukoid, 34  
osteoklasty, 16, 41  
oxid dusnatý, 43  
oxidačné vzplanutie, 43

## P

pamäťové bunky, 19  
PAMP, 42  
pasívna imunita, 103  
PCR, 81, 82, 83, 94  
plazmatické bunky, 12, 22  
plazmocyty, 21  
polymerázová reťazová reakcia, 81  
polymorfonukleárne, 13  
polyvalentné, 56  
pomocné, 19  
precipitácia, 60, 61  
precipitačný prstenec, 28, 61, 62  
precipitát, 35, 36, 60  
preočkovanie, 104  
prietoková cytometria, 24, 101  
primárne imunodeficity, 89, 90  
prirodzene, 103  
prirodzené regulačné, 19  
profesionálne fagocyty, 13, 16, 37, 41, 49  
prokalcitonín, 34  
proteíny akútnej fázy zápalu, 34  
protilátky, 51, 52, 53, 102

## Q

QuantiFERON – TB Gold test, 87

## R

rádioimunoanalýza, 76  
receptory, 14, 15, 19, 22, 23, 24, 40, 41, 42  
RIA, 76, 77, 100  
ring test, 61

## S

sekundárne imunodeficity, 48, 91  
sérologické diagnostické okno, 53  
sérologické reakcie, 50, 52  
sérotypizácia, 52, 56, 94  
sérum, 25, 32, 33, 35, 49, 51, 52, 54, 56, 57, 65, 68, 93, 98  
spätná aglutinácia, 56  
spot, 79, 80  
superantigén, 51  
systémové, 96

Š  
špecifická, 42, 68, 71, 72, 79

T  
Tc-lymfocyty, 19  
termocykler, 81  
Th-lymfocyty, 19  
tkanivové makrofágy, 16, 41  
T-lymfocyty, 12, 17, 18, 19, 20, 23, 24, 79, 85, 95  
toxoidy, 105  
tuberkulínový, 84, 85, 87  
turbidimetria, 36, 63, 94

U  
umelo, 103

V  
vakcína, 106  
vakcíny, 102, 104, 105, 106, 107

W  
Western blot, 77, 78  
Widalova reakcia, 54, 55, 70

Z  
zóna ekvivalencie, 60

Ž  
žirne bunky, 15

Autorky: MUDr. Martina Neuschlová, PhD., doc. MUDr. Elena Nováková, PhD.,  
MUDr. Jana Kompaníková, PhD.

Názov: **Návody na praktické cvičenia z imunológie**

Vydavateľ: Univerzita Komenského v Bratislave Jesseniova lekárska fakulta v Martine

Vydanie: prvé

Počet strán: 114

**ISBN 978-80-8187-017-0**

EAN 978801870170

© M. Neuschlová, E. Nováková, J. Kompaníková, 2016